

マウスにおけるINH早期治療の再感染 防禦力に及ぼす影響

京都大学結核研究所小児特異性研究部

小 林 裕, 川 田 義 男, 寺 村 文 男

〔内 容 抄 録〕

われわれはマウスを用い、人型結核菌黒野株を尾静脈より接種し、その後再接種を実施し初回接種後のINH治療が再感染防禦力におよぼす影響について主に死亡率をめやすとして観察し以下の結果を得た。(1)初回接種菌量が大量(3.3×10^6 生菌単位)であれば、INHを菌接種直後から8週間投与してもその後の再感染に対して強い防禦力を認めた。(2)初回接種菌量が少量(3.3×10^2 生菌単位)であれば、INHを菌接種直後から8週間投与すると、ほとんど再感染に対する防禦力を認めることが出来なかつた。(3)初回接種菌量が少量であつても、INHを菌接種4週後から投与開始した場合には、再感染防禦力は増大し、初回少量菌接種INH非治療群の再感染防禦力に近い成績を得た。したがつて少量菌感染でも「ツ」反応陽転を確認した後INH投与を行えばその後の再感染防禦力にうれべき影響はあたえないと推定される。

I 結 言

INH剤による結核の化学予防は国内及び海外にて広く臨床的応用が実施されている¹⁾²⁾⁸⁾⁹⁾。しかしなお多くの問題が残されている。すなわち化学予防対象者の撰択、INH投与量及び期間、耐性菌発生の有無、免疫に対する影響などである。一方、動物実験の成績は、Dubos⁵⁾⁶⁾⁷⁾, Palmer⁸⁾⁹⁾, Schmidt¹⁰⁾, Lambert¹¹⁾¹²⁾等の報告がある。それ等はいずれもINH投与中はよく結核の発病を阻止することを認めているが、INH投与中止後に結核が再び進展を見ないか、あるいはINH投与により免疫の獲得に好ましくない影響を及ぼすのではないかという点についてはいまだ見解の一致を見ず、検討を加える余地があるように思われる。そのため、われわ

れはマウスを用いINH投与が再感染防禦力に及ぼす影響について主に死亡率をめやすとして観察した。

II 実験材料及び方法

体重20瓦前後のdd系雌性マウス130匹を用いた。使用菌株は塩野義研究所より分与された人型結核菌黒野株であつて、これを10%人血漿加キルヒナー培地に2週間培養、さらにグリセリンブイヨン培地にうつし、3週間培養後、管壁に上昇せる若い菌膜を採取し、濾紙で乾燥後秤量、乳鉢で磨砕、生理的食塩水を加えて1mg/ccになるように稀釈し、Tween 80を一滴添加し、菌浮游液の均等化をはかつた。菌接種はいずれもマウスの尾静脈より0.1ccの菌液を静脈内に注射した。

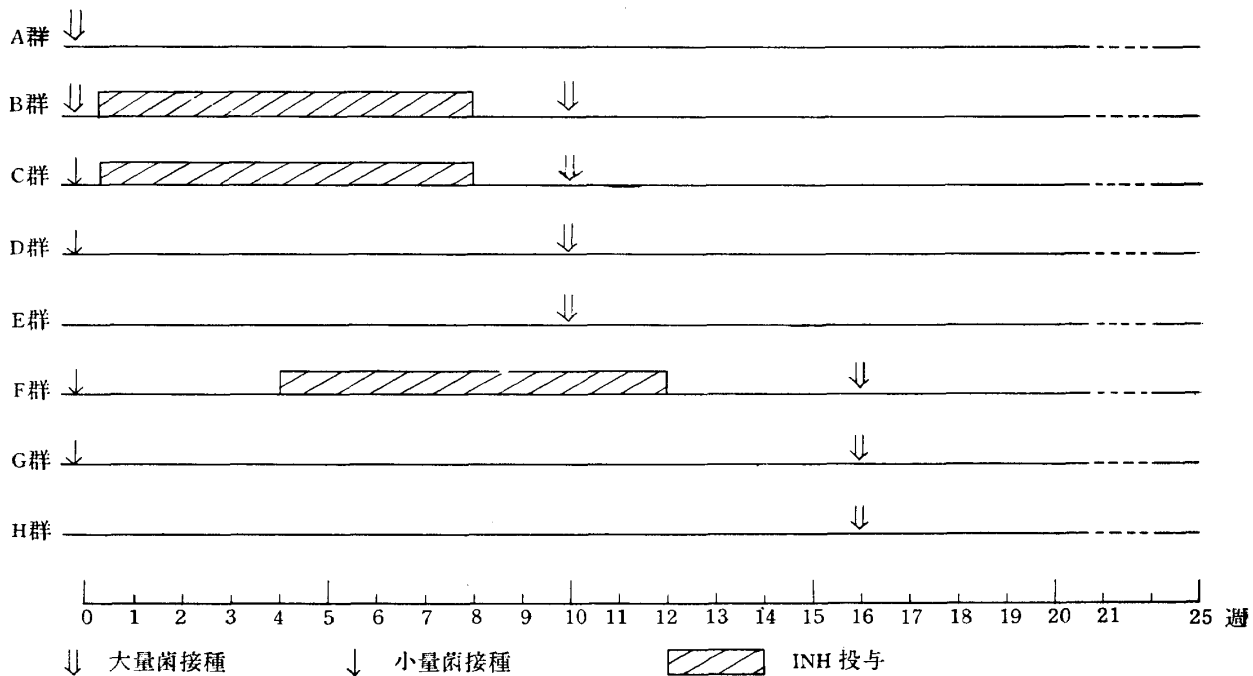
実験計画を第1図に示した。初回大量菌接種群の接種生菌単位は 3.3×10^6 初回少量菌接種群の接種生菌単位は 3.3×10^2 であつた。初回菌接種より10週目及び16週目に再接種を実施したが、10週目再接種時の生菌単位は 6.8×10^6 , 16週目再接種時の生菌単位は 5.4×10^6 であつた。INH投与は滅菌蒸溜水でINHの2mg/ccの溶液を作製し、その0.1ccをマウスの背部皮下に注射し(マウスあたりINH 0.2mg)8週間(1週6日間)実施した。マウスは以下の8群に分けた。

A群：初回大量の菌を接種してその後そのまま観察した。20匹。

B群：初回大量の菌を接種し、その翌日からINH治療を開始し8週間後INH治療を中止、中止後2週間すなわち初回菌接種より10週目に再接種を実施した。20匹。

C群：初回少量の菌を接種し、その翌日からINH治療を開始し、B群と同様に10週目に再接種を実施した。20匹。

D群：初回少量の菌を接種し、そのままINH治療



第 1 図 実 験 計 画

をせずに10週目に再接種を実施した。10匹。

E群：観察10週目に初めて大量の菌を接種し、そのまま観察した。15匹。

F群：初回少量の菌を接種し、4週後からINH治療を開始し8週間で治療を中止、中止後4週すなわち初回菌接種より16週目に再接種を実施した。20匹。

G群：初回少量の菌を接種し、そのままINH治療をせずに16週目に再接種を実施した。10匹。

H群：観察16週目に初めて大量の菌を接種し、そのまま観察した。15匹。

観察期間は25週間であつて、10週目に再接種を実施したB、C、D、E群は再接種後15週目まで、16週目に再接種を実施したF、G、H群は再接種後9週目までで観察を打切つた。観察途中で死亡したマウスは死亡時に、観察終了時になお生存していたマウスは屠殺後、いずれも剖検して肉眼観察を行い、結核病巣の有無をたしかめた。また初回少量の菌を接種したD群及びG群は3週及び4週目にそれぞれ2匹ずつ屠殺剖検して結核感染の有無をたしかめ、さらに脾の培養により結核菌を検出した。

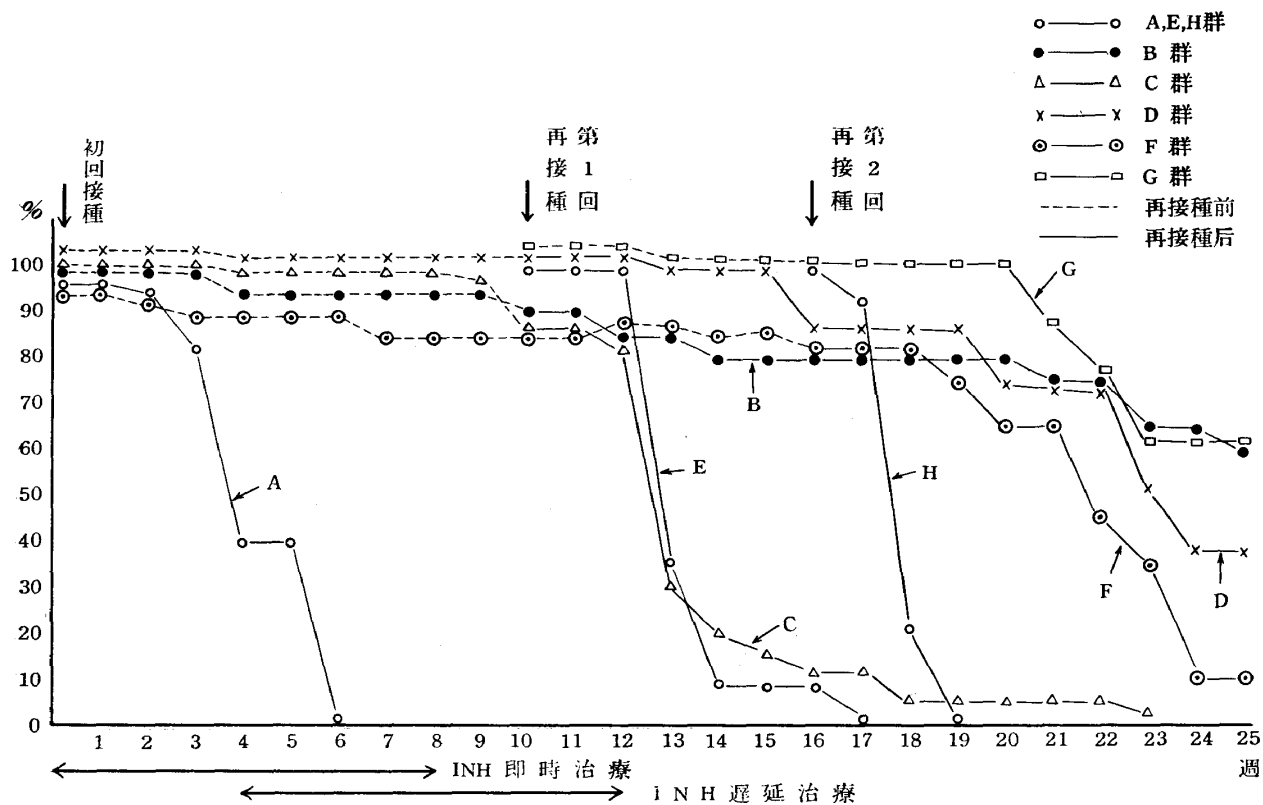
実験は昭和35年2月4日に開始し、7月29日に終了した。マウスは金属箱にほぼ10匹ずつ收容し、固型飼料を用い水は自由に与え、週1回体重を測定した。

III 実 験 成 績

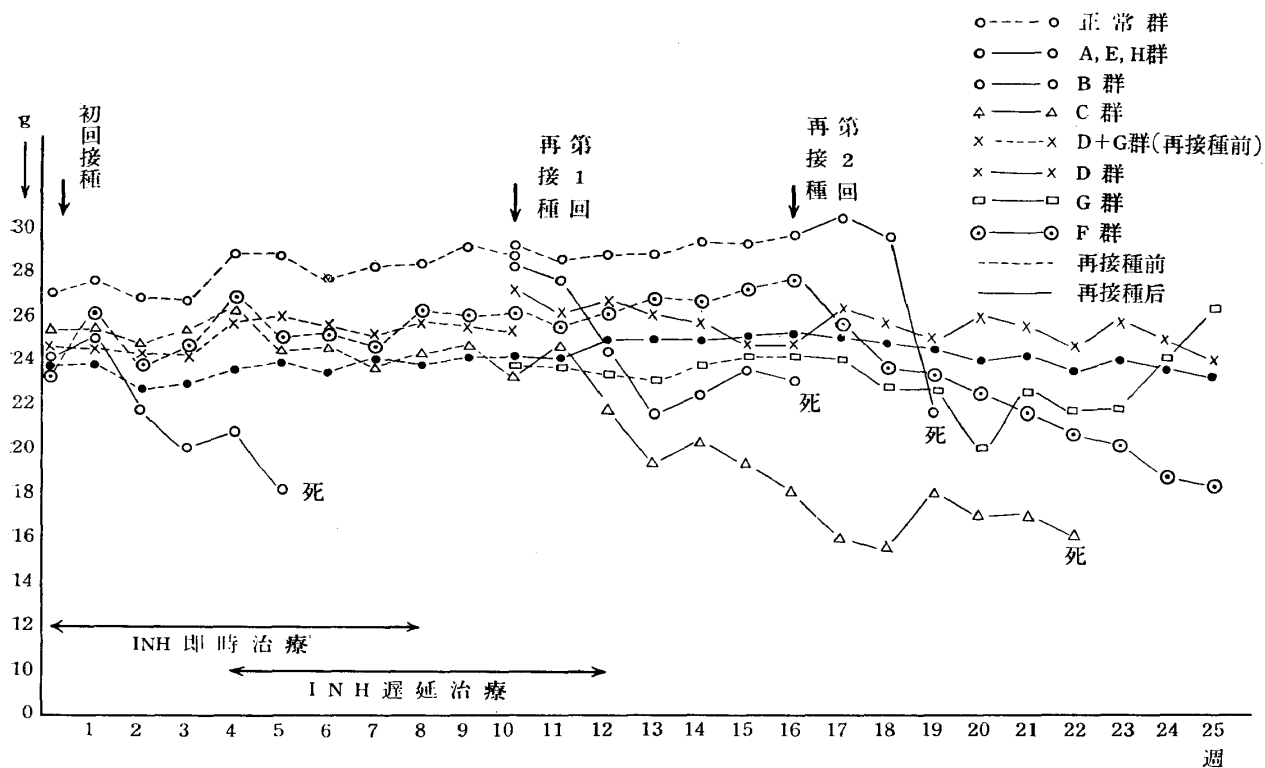
第2図にマウスの死亡率を曲線で示した。また第1表に再接種後の累積死亡匹数を表示し

た。まずA群は菌接種後6週間以内に全員死亡した。これに反し、少量の菌接種を受けて、INHを投与されなかつたD群及びG群は剖検した4匹以外は、10週あるいは16週の再接種時までに1匹の死亡も認めなかつた。

10週目にB、C、D、E群に再接種した。ただしE群は対照群で初回接種であり、他の3群は再接種である。E群は接種後7週以内に全員死亡した。C群はほとんどE群と同様に急激に死亡し、それぞれ3週でC群55%、E群66%、6週でC群83%、E群91%が死亡した。全員死亡はC群13週、E群7週であつた。初回に少量の菌を接種し、INHを翌日から投与した群（C群）はほとんど再感染に対する防禦力を示さず、対照群と変りがなかつた。これに反しB群は累積死亡率再接種後3週で5.5%、6週で11%、9週で11%であり、15週観察終了時になお66%が生存していた。D群は3週で0%、6週で12.5%、9週で12.5%死亡し、15週観察終了時になお37.5%が生存していた。D群は3週で0%、6週で12.5%、9週で12.5%死亡し、15週観察終了時になお37.5%が生存していた。明らかに再感染に対する防禦力はB群が最もすぐれ、次いでD群であり、C群が最も劣り、対照群すなわちE群と変りがなかつた。初回の菌



第2図 マウスの死亡曲線



第3図 マウス体重の推移

第 1 表 マウスの再接種後死亡累積数

群別	初回接種菌量	INH治療 0.2mg/ mouse 皮下注射	第1回接種菌量 再接種菌単位	第2回接種菌量 再接種菌単位	観察期間 (週)	再接種後死亡累積数												
						再接種後死亡累積数												
						3週	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	3.3×10^6	—	—	—	0匹	再接種後死亡累積数												
B	3.3×10^6	即時治療 8週間	6.8×10^6	—	18	1匹/5.6%	2/11.1	2/11.1	2/11.1	2/11.1	2/11.1	2/11.1	2/11.1	3/16.7	3/16.7	5/27.7	5/27.7	6/33.3
C	3.3×10^2	即時治療 8週間	6.8×10^6	—	18	10/55.6	12/66.7	15/83.3	15/83.3	16/88.9	16/88.9	17/94.4	17/94.4	17/94.4	17/94.4	18/100	—	—
D	3.3×10^2	—	6.8×10^6	—	8	0	0	0	1/12.5	1/12.5	1/12.5	1/12.5	2/25.0	2/25.0	2/25.0	3/37.5	5/62.5	5/62.5
E	—	—	6.8×10^6	—	12	8/66.7	11/91.6	11/91.6	11/91.6	12/100	—	—	—	—	—	—	—	—
F	3.3×10^2	遅延治療 8週間	—	5.4×10^6	16	1/6.2	2/12.5	3/18.6	4/25.0	8/50.0	10/62.5	14/87.5	—	—	—	—	—	—
G	3.3×10^2	—	—	5.4×10^6	8	0	0	1/12.5	1/12.5	3/37.5	3/37.5	3/37.5	3/37.5	3/37.5	3/37.5	3/37.5	3/37.5	3/37.5
H	—	—	—	5.4×10^6	14	3週	再接種後死亡累積数											

接種量が大量であれば INH 即時治療は再感染防禦力に対して影響を及ぼさないが、少量であればほとんどが再感染防禦力の獲得を認めることが出来なかつた。16週目に接種した F, G, H 群についてみると、この場合も H 群は対照群で初接種、他の 2 群は再接種であるが H 群は 3 週以内に全員死亡、F 群は再接種後 3 週で 6%, 6 週で 25% 死亡し、9 週観察終了時になお 12.5% が生存していた。G 群は 3 週で 0%, 6 週で 12.5% 死亡し、9 週観察終了時になお 62.5% が生存していた。初回に少量の菌を接種し、その翌日から INH 治療を開始した群すなわち C 群と、INH 治療を 4 週間ほど遅れて開始した群すなわち F 群とを比較すると明らかに F 群は再感染防禦力がすぐれており、全く INH 治療をしなかつた D 群及び G 群に近い成績を得た。

第 3 図に各群の平均体重の推移を示した。いずれも死亡数の増加とともに低下していたが、G 群は再接種後一度低下した体重が 5 週以後に上昇傾向を認めた。また B, C, G 群には著明な体重低下を認めなかつた。

剖検所見はいずれも肺及び脾に明瞭な結核性病変を認め、結核死と考えられることと確認した。耐性菌の検索および臓器の定量培養などは施行しなかつた。

IV 考 案

人間における INH 化学予防の効果は、約 2700 人を対象とした United States Public Health Service の成績²⁾をみると、INH 投与中は明らかに結核の発病を阻止することが認められている。しかしその対象者は感染時期が一定ではなく「ツ」反既陽性者も感染直後のものも含まれており、それ等に対する化学予防の効果を一概に論ずるわけにはゆかない。また、INH 投与中は発病を阻止し得ても INH 投与を中止した後の外因性再感染に対する防禦力、あるいは完全に死滅されなかつた病巣内菌による再発などについては、さらに長期の観察を必要とする。Schmidt の猿の実験成績¹⁰⁾、また Lelong の乳児についての観察¹³⁾の如く INH 投与中は発病を阻止したが、INH 投与中止後にあたかも初感

染の如く結核の発病を招来した例のあつたことも報告されている。これらの INH 投与中止後の問題に関して、人間を対象にしては明瞭な成績を得ることは困難であり、感染菌量、感染時期を一定にし、その後の再感染に対する防禦力を観察した動物実験の成績をみると、Dubos et al, Palmer et al 等の報告がある。Palmer⁸⁾⁹⁾は多数のモルモットを用い、その腹腔内に大量の強毒菌を接種し種々の量の INH を菌接種前あるいは接種直後から投与した結果、INH 治療群は再感染に対し抵抗力を有し、BCG 接種非治療群と同程度であつたと述べ、INH による化学予防を行うにあつて、発病阻止と同時に INH 投与による免疫の低下を心配する必要がないことを強調した。しかし Dubos¹⁰⁾¹¹⁾、マウスを用い初回の菌接種量が大量であれば INH を早期に投与し菌の増殖が阻止されても免疫の獲得が成立するが、菌接種量が少量であれば INH 投与は免疫の獲得を阻害するという実験成績を示して、Palmer の成績を批判し、人間の場合には極めて少量の菌感染であるから、INH 化学予防の臨床的応用に際しては慎重でなければならないと主張した。われわれの実験成績においても初回大量の菌接種と少量の菌接種(330生菌単位)とに分けて、INH を接種翌日から8週間投与して比較したところ、明らかに大量菌接種群(B群)は再感染に対する防禦力がすぐれておるのに対し、少量菌接種群(C群)は対照群であるE群と同様で再感染防禦力を認め難かつた。

人間における化学予防では通常「ツ」反の陽転を確認してから INH 投与が行われており感染後かなりの期間が経過している。Dubos, Palmer 等の動物実験成績は INH 投与開始時期が初回菌接種以前か直後、あるいは2週以内の短期間後であつた。そのためわれわれは INH 治療開始時期を接種後4週間にした際の再感染防禦力について観察する必要があると考えた。初回少量の菌を接種し4週後から INH を8週間投与したF群は明らかにC群にくらべて再感染防禦力の増大を認め、INH 非治療群(G群)に近い成績を得た。動物実験の成績をそのまま人間に

あてはめて考えるには、結核に対する感受性の差異、菌接種方法が人間と異なり若い培養菌をそのまま静脈内に注入していること、人間では「ツ」反陽転を確認してからであり従つて感染の時期が不定であることなどの大きな相違がある。しかしながら INH 治療接種後を4週目から開始することによつて再感染防禦力の増大をみたことは、人間で「ツ」反陽転確認後に INH を投与しても、この点に関してはさほど深い影響がないのではないかと想像される。最近、Lambert はこれまでの動物実験の成績を総括し、動物の免疫が初感染後間もなく最高に達するものかどうか、また動物が免疫を獲得したのちに INH 投与を開始すればこの免疫力が阻害されるかどうかという点が問題であることを指摘し¹²⁾、われわれとほぼ同時に実験を行つた。¹²⁾その成績によるとマウスを用いて初回接種菌量は13ないし130生菌単位の少量を接種し、初回接種後8週から INH 治療を開始し、その後再感染を行い、種々の期間後に屠殺して肺、脾の臓器定量培養を実施して生菌単位を測定したものであるが、免疫は8週で確立し、その後は増加しない、また菌接種後8週から INH 投与を開始したが免疫に対して好ましくない影響を認めなかつたと述べている。われわれの成績では菌接種後4週から INH を投与したが、Lambert の成績はこれにほぼ一致している。

V 結 論

われわれはマウスを用い、人型結核菌黒野株を尾静脈より接種し、再感染に対する防禦力におよぼす INH 治療の影響を主に死亡率をめやすとして観察し以下の結果を得た。

1) 初回接種菌量が大量(3.3×10^6 生菌単位)であれば、INH を菌接種直後から8週間投与してもその後の再感染に対して強い防禦力を認めた。

2) 初回接種菌量が少量(3.3×10^2 生菌単位)であれば、INH を菌接種直後から8週間投与すると、ほとんど再感染に対する防禦力を認めることができなかった。

3) 初回菌接種量が少量であつても, INHを菌接種4週後から投与開始した場合には, 再感染防禦力は増大し, 初回少量菌接種INH非治療群の再感染防禦力に近い成績を得た。したがつて少量菌感染でも「ツ」反応陽転を確認して後INH投与を行えばその後の再感染防禦力にうれうべき影響はあたえないと推定される。

文 献

- 1) Debré, R.: New Engl. J. Med., 255, 794. (1956).
- 2) Ferebee, S.H., Mount, F.W., Anastasiades, A. A.: Amer Rev. Tuberc., 76, 942 (1957).
- 3) 結核病学会シンポジウム: 結核, 33 増刊, 278 (昭33).
- 4) 佐川一郎: 呼吸器診療, 12, 385 (昭32).
- 5) Dubos, R. J., Pierce, C.H., Schaefer, W. B. : J. Exper. Med., 97, 207 (1953).
- 6) Dubos, R. J.: Amer, Rev, Tuberc., 74, 117 (1956).
- 7) Dubos, R. J., Schaefer, W. B.: Amer, Rev, Tuberc., 74, 541 (1956).
- 8) Ferebee, S. H., Palmer, C. E.: Amer, Rev, Tuberc., 73, 1 (1956).
- 9) Palmer, C.E., Ferebee, S.H., Hopwood, L.: Amer. Rev. Tuberc., 74. 917 (1956).
- 10) L. H. Schmidt, : Amer. Rev, Tuberc., 74, Supplement p. 138 (1956).
- 11) H. P. Lambert, : Amer. Rev. Resp. Dis., 80, 648 (1959).
- 12) H. P. Lambert, : Amer. Rev. Resp. Dis., 82, 619 (1960).
- 13) Lelong, M. et al : Arch. franc, pédiat., 11. 895 (1954).