

諸種抗結核剤に対する耐性菌の研究

第 3 報

結核海猿に於ける薬剤投与量並に投与期間と耐性菌発現との関係

金沢大学結核研究所診療部 (主任: 鈴木茂一教授)

高 野 徹 雄

(受付: 昭和29年11月1日)

Tetsuo TAKANO: STUDIES ON THE RESISTANCE OF TUBERCLE BACILLI AGAINST VARIOUS TUBERCULOSTATIC AGENTS
Part 3. Studies on the Correlation between the Doses of Tuberculostatic Agents and their Period of Administration and Emergence of Resistant Strains in Tuberculous Guinea Pigs

Department of Clinical Research, Research Institute of Tuberculosis, Kanazawa University.
(Director: Prof. Moichi SUZUKI)

(Received for publication: Nov. 1, 1954.)

結 言

第 1, 第 2 篇に於て臨床及び試験管内実験により結核菌の抗結核剤に対する耐性発現が薬剤の種類, 投与量, 投与或は接触期間に関係する

事を報告したが本篇では更に結核海猿に就て此等諸項目を吟味せんとするものである。

実 験 方 法

〔I〕 短期間投与実験

- 1) 人型結核菌“H₂”-株に就て実験前に各薬剤に対する感受性を検定し,
- 2) 「ツベルクリン」反応陰性なる健常海猿の左大腿内側皮下に“H₂”-株1mgを接種し, 2週後に於て「ツ」反応の陽転を確認したる後,
- 3) 次の6群に分ち, 夫々毎日1回宛35日間に亘り薬剤を投与した。
 - a 群) SM 20mg 毎日皮下注射。
 - b 群) OM 40mg 毎日皮下注射。
 - c 群) OM 80mg 毎日皮下注射。

d 群) OM 40mg 毎日経口投与。

e 群) OM 80mg 毎日経口投与。

f 群) 対象として生理的食塩水のみ皮下注射。

- 4) 薬剤投与後各群を屠殺剖検し, 病理学的検索並に, 各臓器に就て定量培養を実施すると共に脾より分離せる結核菌を Kirchner 培地に移植し, 此菌株に就て岡本・松田の方法⁽¹⁾に準じて2倍連続減稀法により夫々薬剤の発育阻止限界濃度を検定し対象群に於ける菌株と比較検討した。

〔II〕 長期間投与実験

オI実験では所望の耐性菌発現は証明されなかつ

*間接法の採用は次の理由による。

- 1 次記長期間投与実験の定量培養の結果之等海猿群よりの発育集落が少数であつた。
- 2 高度耐性菌が予期されず, 精密性を要求された。

た。依つて本実験では次の点を考慮して検索した。即ち

- (i) 実験の海狸結核に可及的慢性経過を取らしめる目的にて弱毒菌を使用し、且つ
- (ii) 薬剤の急速なる大量投与は生体内に於て耐性菌の出現以前に結核菌増殖の停滞が予想される為、前回より少い治療量を長期間連用した。而して
- (iii) 耐性菌発現の最も容易と考えられる SM の

みに就て実験を行つた。

- ① 実験動物に対する前処置は才 I 実験の場合と同様に、
- ② 次の 3 群に分ち 143 日間投与した**。
a 群) SM 5mg 毎日皮下注射。
b 群) SM 5mg 毎日肺内注射。
c 群) 対照として生理的食塩水注射
- ③ 剖検臓器定量培養並に分離菌の耐性検査等は才 I 実験と同様に行つた。

実験成績

[A] 短期間治療実験

a) SM 毎日20mg皮下接種群

海狸臓器よりの発育結核菌数は対照群に比し明に僅少であり、肉眼的病変抑制度も良好であつた。脾より分離せる結核菌の各薬剤に対する発育可能限界濃度は OM 0.7 γ /ml, SM 0.7 γ /ml で、対照群より分離せし菌との間に感受性の差は見られなかつた。

b) OM 毎日40mg皮下接種群

c) OM 毎日80mg皮下接種群

c 群は b 群より相当病変が軽度であり、皮下注射群が経口投与群より幾分病変抑制制度が強い成績となつていた。尚分離菌の抗結核剤に対する感受性は対照群より分離せし菌に比し著明な変化なく、OM 1.5~0.7 γ /ml, SM 1.5~0.7 γ /ml にて何れも発育阻止された。

d) OM 毎日40mg経口投与群

e) OM 毎日80mg経口投与群

皮下接種群に於ける如く投与量の多い程良好な治療成績を得た。

分離菌に対する発育阻止限界濃度は OM 1.5~0.7 γ /ml, SM 1.5~0.7 γ /ml となつていた。

以上第 I 実験に於ける治療成績は、従来報告された成績に略々一致したが、耐性菌を得る事が出来ず、而も其の傾向すら推定されな

つたのである。

[B] 長期間治療実験

a) 皮下注射群

第 I 実験の SM 治療群と略々同一総量になる迄 SM を連続投与したのであるが、体重増加が著明であり、接種局所に於ける瘻孔形成は対象群に比しては勿論、前回の SM 投与群よりも顕著に癒痕治療傾向が窺われた。接種局所淋巴腺の所見は両者間に格別の差異なく、乾酪化せるものもなかつた。更に剖見所見に於て、脾、肺並に肝等主要臓器の病変に就て述べると、先ず脾に於ては前実験に比し長期間連用群の結節形成は大小不同、而も陳旧と新鮮なものが混在して居り、各結節間には比較的健全な組織の存在を見たが、その重量には大差を認めなかつた。長期間連用群の体重が増加せるにも拘らず、反つてそれ等の肺重量は稍軽くなつていたが、病変抑制制度には大差がなかつた。一方肝でも結節形成、重量の何れも両者間に差異がなく、各臓器の結核菌定量培養成績にても長期間投与群が特別良好とは云い得なかつたのである。

脾よりの分離菌に対する発育阻止濃度の検定では、他薬剤に対しては何れも対照群よりの分離菌と同一態度を示したにも拘らず、SM に対しては 1 例に於て 6.2 γ /ml の

**143 日間投与せるは総量に於て才 I 実験と略等しくせんが為である。

濃度でも発育阻止されない集落を認めた。本例は其の経過並に剖見所見に於て他の2例と異なる所がなかつたが、定量培養に於て幾分集落数が多かつた。

b) 肺内注射群

SM 治療効果は剖検時の所見に於て皮下接種群のそれと大同小異であつたので、ここには共通事項を省略し、其の差異点に就てのみ述べる事にしたい。体重では本群中1例が6週後より漸次減少し、剖検時に於ては620g→570gとなつていた。次に菌接種局所の所見では明確に皮下注射群の方が良好であり、瘻孔形成を認め局所淋巴腺の乾酪化を来せるものが本群に2例あつた。一方臓器の所見として脾、肝では両群に同程

度の病変抑制状態を認めた。肺*では肺内注射群が若干良好であつたが、予期された如き良果が得られなかつた。定量培養成績も大体同様であつたが、肺内注射群の1例では4週目に集落を認めたものがあつたが、皮下接種群では概ね2週で既に集落発生を見た。分離菌に対する薬剤の発育阻止濃度試験で1例がSM 3.1 γ /ml含有培地に発育したのみで他は何れも正常感受菌に於けると同様の成績を示した。

以上の如く長期間連用せる本実験に於て、其の経過、及び剖検所見は略々前回実験成績と同様な結果となつているが脾よりの分離菌中に軽度のSM耐性を示すものを認めた事は興味ある事実である。

考 按

肺結核症に於て抗結核剤に対する耐性菌の発育は不可避であり、其の本態究明と共に之が防止は極めて重要であるが、従来試験管内では容易に耐性菌を証明する事の出来る薬剤に対して動物実験では至難とされ、之が為耐性菌の動物実験では、管内実験或は人体より得られた耐性菌を動物に接種すると云う迂遠な而も不自然な方法を探らざるを得なかつたのである。結核海狸に於けるSM耐性菌発現の有無に関して、Steenken⁽²⁾はSM 18,000units 125日間投与し、Doubos 培地を使用してのSM感受性試験では耐性株を発見する事が出来なかつたと述べている。一方Feldman, Karlson, Hinshaw⁽³⁾は5匹の海狸にSM6mgを毎日4回に分注し146日間の治療に於て其の3匹に2000 γ /ml, 3000 γ /ml, 2000 γ /mlの高度耐性菌を得たと報じ投与量、投与期間が略々同一なるにも拘らず、前者と全く相反する成績となつている。私は第I及び第II実験を通じ投与総量は略々同量

となし、治療条件を異にした場合如何なる結果を招来するやを知らんとしたのである。実験的海狸結核は周知の如く急性粟粒結核の様相を呈して居り、もとより人間の肺結核と比肩すべくもないが、比較的急性経過を辿る小児結核に於てWilking et al.⁽⁴⁾はSM耐性菌の発現を認めており、血行性急性結核症に耐性菌発現せずとは云い難く、従つて海狸結核に於ても耐性獲得現象の可能なることを推定し得たのである。竊に私は第I、第II篇に於て結核菌の耐性獲得には抗結核剤の連用乃至長期間の接触が重要な意義を有する事を特に強調したのであるが、今回の実験に於て海狸結核を可及的慢性経過を採らしめる為、第II実験は幾分発育不良の状態にあつた河上株を使用し、更に薬物の1日投与量を前実験より少くした処、皮下及び肺内注射せる海狸群の各一匹に軽度のSM耐性菌を得る事が出来た。即ち第I第II実験を通じ、SM投与総量が同量であるに拘らず、投与期間の長いも

*肺内接種群に於て注射肺が稍固く、且散在性の出血斑を認めたが、病変度では両側肺に著明な差異がなかつた。然し機械的刺戟影響を除く為、反対側肺に就て観察した。

のに耐性菌の発現する事を知り得たのである。

小 括

結核海狸に就て抗結核剤に対する耐性菌発現の有無並に其の要因を検索した本実験に於て、次の結果を得た。

1 SM 或は OM を大量短期間投与せる結

核海狸からは耐性菌の発現を見なかつた。

2 SM の同一治療総量でも其の1日投与量を少くし、投与期間を延長した場合に軽度の耐性菌を分離し得た。

文 献

1) 岡本隆, 他: 金大結研年報, 2, 93, 1944. 2) Steenken, W. Jr. et al. : Am. Rev. Tuberc., 56 (5), 382, 1947. 3) Feldman, W. F. et al. : Am.

Rev. Tuberc., 57 (2), 162, 1948. 4) Wilking, V. N. et al. : Am. Rev. Tuberc., 66 (1), 63, 1952.

Summary

Experimenting with the tuberculous guinea pig, I examined the relation between the amount and period of administration of tuberculostatic agents and the emergence of resistant strains of tubercle bacilli and obtained the following results:

- (1) No emergence of resistant strains was observed in tuberculous guinea pigs, which had been treated with a large dose of either streptomycin (SM) or o-aminophenol (OM) for a short period.
- (2) As far as SM was concerned slightly resistant strains appeared in the tuberculous guinea pigs which had been treated with the same total dose of SM as in the above experiment if the drug was given in smaller doses for longer periods.

Table 1.

Macroscopical autopsy findings of the experimental animals treated with larg daily dosis of SM or OM for short duration

1. Drug tested; (1) SM (Dihydrostreptomycin sulfate "Sankyo")
(2) OM (o-Aminophenol "Kindai Kekken")
2. Infection ; Guinea pig were infected subcutaneously in the left groin each with 1mg of human tubercle bacilli "Stain H₂"
3. Treatment ; Treatment was begun 15 days after infecion and continued for 35 days
4. Autopsy ; All animals were killed 50 days after infection

Group	Drug tested (Route of administrated)	Guinea pig No.	A daily dose (in mg)	General dosis administrated	Experimental period	Autopsy findings macroscopically							Weight (gm)			
						Visceral organ			Lymph nodes			Site of infection	Visceral organ			Body-weight gain or less
						Spleen	Lung	Liver	Mesenteric	Pulmonis	Inguinal		Spleen	Lung	Liver	
a	SM (subcutaneously)	1	20	700	50	±	±	+	+	±	+	±	1.2	5.9	2.78	+50
		2	20	700	50	++	+	+	+	++	###	+	1.6	4.3	1.76	+95
b	OM (subcutaneously)	1	40	1400	50	±	±	+	++	++	###	+	2.5	4.3	2.36	+35
		2	40	1400	50	+	+	+	++	+	+	+	2.9	5.0	2.18	+65
c	OM (sudcutaneously)	1	80	2800	50	++	+	++	++	+	++	±	6.7	4.6	3.51	+45
		2	80	2800	50	±	+	+	+	+	++	+	2.6	4.0	2.53	+65
d	OM (orally)	1	40	1400	50	###	±	++	+	±	++	++	2.7	4.8	2.60	+60
		2	40	1400	50	+	++	±	+	±	++	++	1.5	3.4	2.44	+70
e	OM (orally)	1	80	2800	50	++	±	++	+	±	++	++	2.0	4.2	2.55	+15
		2	80	2800	50	+	++	±	++	++	###	++	1.5	3.4	2.44	+70
f	Controls (.)	1	0	0	50	###	###	###	###	###	###	++	2.9	4.8	2.52	0
		2	0	0	50	++	+	+	+	±	++	###	1.3	4.1	1.75	+80

Table 2.

Quantitative measurement of tubercle bacilli in the visceral organs (0.1gm) of the experimental animals treated with larg daily dosis of SM or OM for short duration after five weeks culture

Group	Drug tested (Route of administrated)	Organ										
		Guinea pig No.	Test tube No.	Spleen			Lung			Liver		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3
a	SM 20mg (subcutaneously)	1		2	1	3	1	0	0	0	0	0
		2		2	3	6	0	2	0	0	2	0
b	OM 40mg (subcutaneously)	1		38	76	107	38	6	21	6	4	11
		2		6	10	12	0	0	0	2	10	8
c	OM 80mg (subcutaneously)	1		46	17	50	12	5	3	13	41	17
		2		13	3	1	0	0	0	1	0	3
d	OM 40mg (orally)	1		53	85	73	6	11	0	46	18	13
		2		38	46	15	12	7	0	67	35	53
e	OM 80mg (orally)	1		23	93	68	17	16	3	37	33	18
		2		112	25	21	0	0	0	0	0	1
f	Controls (.)	1		300>	300>	300>	163	132	132	107	104	285
		2		300>	300>	300>	50	106	106	38	20	132

Reading taken after 5 weeks incubation; 0=No colony, 1=1 colony
2=2 colonies, 3=3 colonies, 300>=More than 300 colonies.

Table 3.

To SM or OM sensibility of Tubercle bacilli isolated from the spleen of tuberculosis guinea pigs treated with larg daily dosis of SM or OM for short duration

Group	Drug tested (Route of administrated)	General dosis administrated (mg)	Inhibiting concentration		
			Guinea pig No.	OM (γ/ml)	SM (γ/ml)
a	SM 20mg (subcutaneously)	700	1	1.5	1.5
			2	1.5	0.7
b	OM 40mg (subcutaneously)	1,400	1	1.5	0.7
			2	1.5	0.7
c	OM 80mg (subcutaneously)	2,800	1	1.5	1.5
			2	1.5	1.5
d	OM 40mg (orally)	1,400	1	1.5	1.5
			2	1.5	0.7
e	OM 80mg (orally)	2,800	1	1.5	1.5
			2	1.5	1.5
f	Controls (.)		1	1.5	0.7
			2	0.7	0.3

Observation after 4 weeks culture in Kirchner's medium added rabbit serum in 10%.

Table 4.
Macroscopical autopsy findings of the experimental animals treated with small daily dosis of SM or OM for long duration

1. Drug tested: SM (Dihydrostreptomycin sulfate "Sankyo")
2. Infection : Guinea pigs were infected subcutaneously in the groin each with 1 mg of human tubercle bacilli "Strain Kawakami"
3. Treatment : Treatment was begun 34 days after infection and continued for 143 days
4. Autopsy : All animals were killed 176 days after infection

Group	Drug tested (Route of administrated)	Guinea pig No.	A daily dose (in mg)	General dosis administrated	Experimental period	Autopsy findings macroscopically							Weight (gm)			
						Visceral organ			Lymph nodes				Visceral organ			Body-weight gain or less
						Spleen	Lung	Liver	Mesenteric	Pulmonis	Inguinal	Site of infection	Spleen	Lung	Liver	
a'	SM (subcutaneously)	1	5	715	176	++	-	++	++	±	++	-	1.7	3.9	17.2	+210
		2	5	715	176	+++	++	++	+	++	+++	-	2.9	4.5	27.6	+185
		3	5	715	176	+++	++	+++	+++	++	+++	+	3.5	3.6	22.6	+ 50
	controls	1	.	.	.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	2.2	4.9	20.2	-150
b'	SM (intra-Pulmonary)	1	5	715	176	+++	++	+++	++	++	+++	+	1.9	4.3	17.9	- 50
		2	5	715	176	++	+	++	±	±	+	-	2.5	5.8	18.7	+290
		3	5	715	176	++	+	++	++	++	++	+	2.8	4.7	23.2	+150
	controls	1	.	.	.	+++	++	+++	++	++	+++	+	2.6	5.0	24.5	-140

Table 5.

Quantitative measurement of tubercle bacilli in the visceral organs (0.1gm) of the experimental animals treated with small daily dosis of SM or OM for long duration

Group	Drug tested (Route of administrated)	Organ Guinea pig No.	Test tube No.	Spleen			Lung			Liver		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3
a	S M (subcutaneously)	1		4	20	15	0	0	0	0	0	0
		2		110	87	240	12	1	0	4	2	6
		3		2	0	0	0	0	0	0	0	0
	Controls	1		300>	300>	300>	35	20	40	150	180	54
b	S M (intrapulmonary)	1		150	70	110	8	3	1	7	13	2
		2		23	20	80	0	0	0	0	0	0
		3		0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Controls	1		300>	300>	300>	30	90	160	180	30	25

Reading taken after 5 weeks incubation : 0=No colony 1=1 colony 2=2 colonies.....300> More than 300 colonies.

Table 6.

To SM or OM sensibility of tubercle bacilli isolated from the spleen of tuberculosis guinea pigs treated with small daily dosis of SM or OM for long duration

Group	Drug tested (Route of administrated)	General dosis administrated	Inhibiting concentration Guinea pig No.	OM	SM	PAS	Tb1	INAH
				(γ /ml)	(γ /ml)	(γ /ml)	(γ /ml)	(γ /ml)
a'	SM 5mg (subcutaneously)	715mg	1	1.5	3.1	0.7	12.5	0.2
			2	1.5	12.5	0.7	6.2	0.1
			3	0.7	1.5	0.7	6.2	0.2
	control	.	1	0.7	0.7	0.7	12.5	0.1
b'	SM 5mg (intrapulmonary)	715mg	1	1.5	6.2	0.7	12.5	0.1
			2	0.7	1.5	0.7	12.5	0.1
			3	1.5	0.7	1.5	12.5	0.1
	control	.	1	1.5	0.7	0.7	12.5	0.1

Observation after 4 weeks in the Kirchner's medium added rabbit' serum in 10%.

総 括

上記述した第1, 第2, 第3の諸篇より次の結論を得た。即ち
in vitro 及び in vivo に於て長期間諸種抗

結核剤と接触せる結核菌は夫々薬剤に対し早晩耐性となるが o-Aminophenol は此の点に就て最も安泰な抗結核剤である。

General Summary

The following conclusions have been obtained from the above mentioned parts 1, 2, and 3.

Tubercle bacilli exposed to various tuberculostatic agents either in vivo or in vitro for a long period were found to develop sooner or later into strains resistant to the respective agents. And o-Aminophenol was confirmed to be the most suitable tuberculostatic agent for long-term administration because it induces such development less than any other substance experimented with.