HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Cyclophosphamideの結核アレルギーに及ぼす影響に関する実験的研究
Author(s)	中本, 節朗
Description	
Citation	結核の研究, 32, 25-47
Issue Date	1972
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26818
Type	departmental bulletin paper
File Information	32_P25-47.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Cyclophosphamide の結核アレルギーに及ぼす影響に関する実験的研究

中　本　節　朗
（北海道大学結核研究所予防部　主任：高橋義夫教授）
（国立療養所旭川病院　院長：小野英夫博士）

（受付：11月30日，1971）

緒　　言

1906年，アレルギーに関する概念が，Von Pirquet によって確立されてから，アレルギーに関する研究は種々の進歩発展をとげて来た。一方これに関する抗原抗体反応の研究方法として脱感作操作がある。実際に脱感作を起させる合理的かつ可能性ある方法として，Thomsen[1]は〝脱感作とは第1に，感作抗体を破壊もしくは中和すること，第2に，体液性抗体に影響を与えずに細胞性抗体と抗原との反応を妨害すること，最後に，抗原抗体反応を妨害することなくその反応産物に対して示す組織細胞の感受性を低下させることである〟と指摘している。

他方脱感作操作とほぼ同様の目的で，化学薬剤を使用し，抗体そのものの産生を抑制させる方法がある。この化学物質を使用して種々のアレルギー反応を抑制させる研究は，1921年，Hektoen[2]が Mustard gas を使用して非結核性アレルギーの抑制に成功して以来，種々の化学物質，主として細胞代謝阻害物質が用いられた数々の研究が報告されている。

これらの研究は脱感作とほぼ同様の効果をあげるのに役立つばかりでなく，他の免疫アレルギーの分野での基礎的研究，及び実用的分野においての治療効果にも大きな成果を期待できるものとして注目されている。結核アレルギー抑制に関する同様の研究は，1962年 Hoyer[3]，1963年 Borel[4]及び Friedman[5]等が代謝阻害性物質を使用して報告している。Cyclophosphamide による非結核性過敏症抑制に関する基礎的及び実用的分野における研究については，1961年 Maguire and Maibach[6]，1963年 Berenbaum[7]，1964年，J.L. Turk[8]等が報告しているが，Cyclophosphamide を用いる結核アレルギー抑制については，1966年，前田[9]らがわが国で初めて結核菌死菌感作ウサギ及びモルモットを使用して，抗体産生及び遅延型アレルギーが感作後2週間抑制されたと報告している。

著者はこの報告に基づき，ウサギを使用し，Cyclophosphamide の結核アレルギー（遅延型皮内反応）及び抗体産生に対する抑制作用について同様の実験をさらに11週まで延長して長期間観察し，同化学物質の動物に及ぼす影響及びその量的関係をくわしくしらべた。さらに結核生菌に対する同剤の効果及び抗結核剤との併用によっていかなる治療効果があがるかについて，免疫反応検査及び病理組織学的検査を用いて検討し，結核アレルギー発現機序をうかがう一端とした。

実　　験　I

実験目的

代謝阻害物質 Cyclophosphamide（以下CPA）が結核アレルギーを抑制するという前田らの報告にもとづいて，その実験を追試する目的と，さらに本剤の抗体産生抑制効果を長期にわたって観察する目的で実験を行なった。

1966年，前田[9]らは結核死菌で感作されたウサギでは CPA 10mg～20mg/kg連日投与で，遅延型ツベルクリン皮内反応は完全に，血中抗体は不完全に抑制されたと報告した。但し薬剤投与期間は2週間であった。

著者はこの報告にもとづき結核死菌感作ウサギにCPA 15mg/kg を11週間連日投与し，その抑制効果を長期観察した。

実験方法及び材料

実験動物：体重3kg前後のツベルクリン反応（以下ツ反応）陰性の白ウサギ10羽を結核死菌で感作し，2群に分けた。

第1群A　5羽，CPA 15mg/kg筋注群
　　動物番号：1～5
第2群K　5羽，対照群
　　動物番号：6～10

感作方法：ソートン培地10週培養のH37 Rv 株アセトン乾燥死菌を，Adjuvant として Arlacel，Drackeol（1：9）に，10mg/mlになるようにブレンダーで混和し，動物の左右大腿部外側の筋肉内に 0.5 ml ずつ計1 mlを1回

注射した。

薬剤投与法：感作1日前より CPA (Endoxane, 塩野義製薬)1バイアル100mgを蒸留水5ccに溶解し，pro kilo 15mg宛を注射群5羽の大腿部筋肉内に連日注射で感作後11週目まで持続した。

ツ反応：北大結核研究所予防部で製造した旧ツベルクリン原液の100倍稀釈液0.1mlを皮内注射，24時間後測定した。テストは隔週おこなった。

体重測定：3週目より隔週測定した。

血中抗体価測定：感作赤血球凝集反応により行なった。

多糖体抗原は結核菌青山B株より抽出した菌体多糖体(Bs-6)で，これを用いて Middlebrook-Dubos 反応を行なった。

燐脂質抗原は BCG 株より抽出した菌体燐脂質画分(Pd.B)で，これで高橋反応を行なった。

蛋白抗原は結核菌 H37Rv 株より抽出した蛋白画分(BR-7)で，これで Boyden 反応を行なった。

これらはいづれも北大結核研究所予防部で抽出作製されたものである。

緩衝食塩水としては脱イオン水で生食水をつくり，これに1/15N，pH7.2の Sörensen 燐酸緩衝液を9：1の割に混合したものを使用した。

緬羊血球は北大結研より分与されたもので，脱線維血球にAlsver液を等量混和したものを冷蔵庫に保存，3週間以内に使用。

被検血清の異種凝集素の除去には型のごとく10%緬羊血球浮遊液を用いた。

以上3つの反応の血清学的特異性は高橋及び協同研究者によって確立されている。[21)]

実験成績

ツ反応：(図1) CPA 注射群は11週間の実験期間中，陽性反応を示さなかった。対照群は陽性反応を示し3週と9週に特に強い反応を示し5週目，7週目では反応はやや弱かったが確かな硬結を伴う発赤であった。但し壊死及潰瘍は全例に認められなかった。

体重：(図2) CPA 注射群はすべて11週目まで著明な減少を示した。これに反し対照群では，11週目まで僅かではあるが増加を示した。7週目でC剤注射群の体重減少は最も著るしく70%まで低下し2羽は8週に至らず死亡した。

血中抗体：多糖体抗体価（図3），CPA 注射群は，3週目に，対照群は9週目に抗体価それぞれ試験管5本及び6本とばらついたが，他の週では試験管3本以内の抗体価を示した。

対照群との差は試験管2ないし3本であった。

燐脂質抗体価（図4），CPA 注射群の抗体価は3週目及び9週目では対照群と比べすべての動物が低い価を示した。平均をみると図のようにその差は試験管1ないし3本であった。

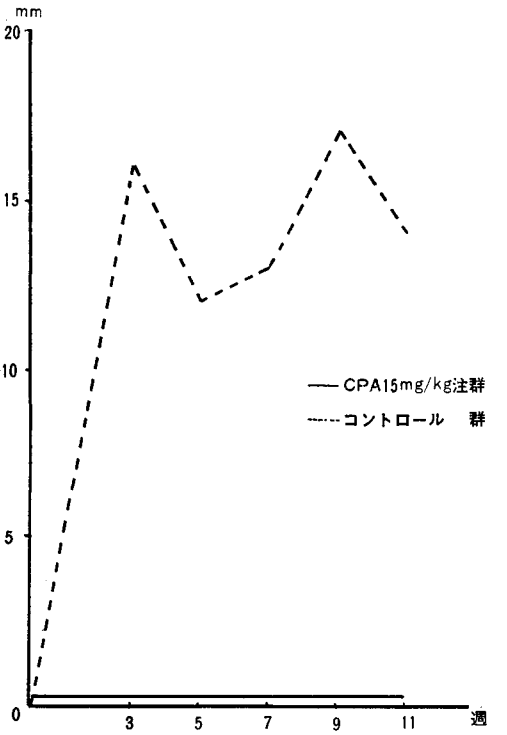


図1　ツベルクリン反応の推移（平均）

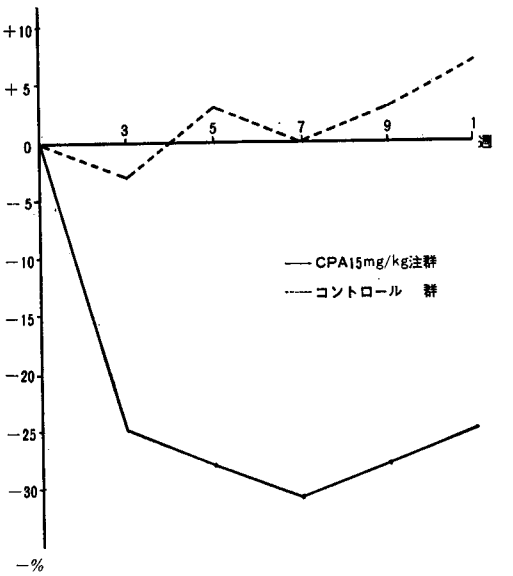


図2　体重平均増減率（%）

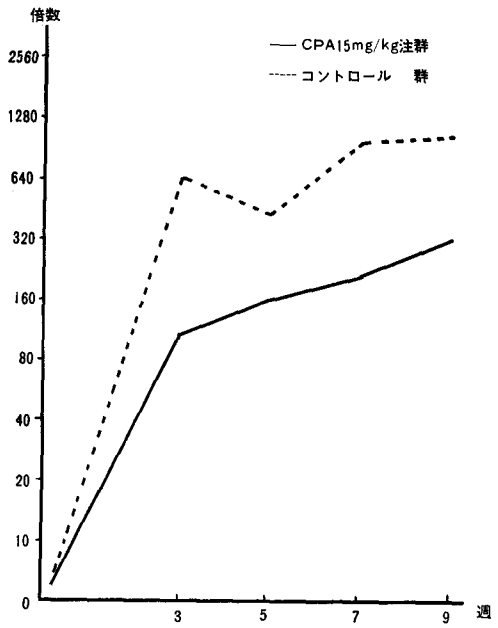


図3　多糖体抗体価平均推移

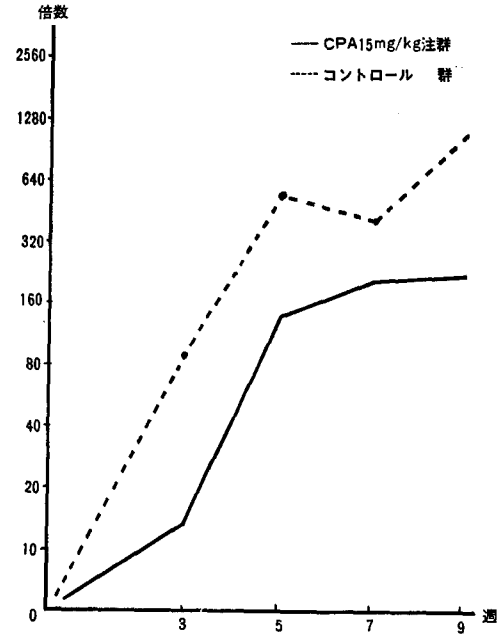


図4　燐脂質抗体価平均推移

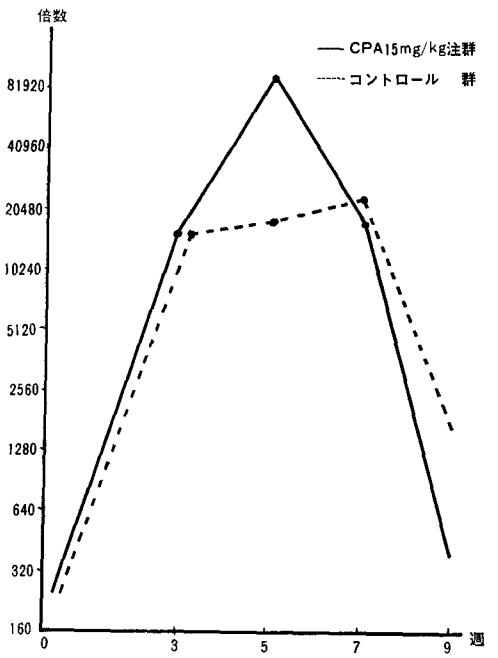


図5　蛋白抗体価平均推移

蛋白抗体価(図5)，前2者に比べると CPA 注射群と対照群の間に著差は認められなかった。9週を除くと蛋白質抗体価は多糖体及び燐脂質抗体価よりすべて高い値を示した。又5週目では逆に対照群に比べ CPA 注射群の方に高い抗体価がみられた。

考　　案　I

代謝阻害物質による抗体産生抑制実験は，1921年 Hektoen[2]がこの目的のために nitrogen mustard を用いたことに始まる。結核アレルギーに関しては葉酸拮抗剤としての Aminopterin，核酸代謝阻害剤としての 6-mercaptopurine に抑制効果があるとされている。[3)~5)] Cyclophosphamide 系薬剤（アルキル化剤）については，結核感作モルモットの皮内反応が本剤によって抑制されるという Orris[10]らの報告があるのみであるが，抗体産生抑制効果については多くの報告がある。又，一方本剤の非結核アレルギー抑制効果についても多くの報告がある。[11)] 1961年，Maguire and Maibach[6]らはモルモットにおける DNCB (1-Chloro-2, 4-dinitro benzene) 接触皮膚炎の遅延型皮内アレルギーが本剤によって抑制されると報告しているが，この抑制効果は，本剤が抗体産生を抑制するためであると結論している。[7)] 又1964年 J.L. Turk らは，受動的に過敏性を伝達（donor 動物の脾細胞及び小リンパ球を経静脈的に伝達する）されたモルモットの皮内反応（donor 動物の場合と同じ薬剤に対する過敏性）が抑制されたと報告している。[8)] 又1963年 M.C. Berenbaum はマウスの同種皮膚移植の場合のアレルギーを抑える目的で大量の CAP を使用し，移植後4日以内であれば本剤の注射によってアレルギーは抑制され皮膚移植が成立すると報告している。

CPA の作用機序については，本剤は in vitro では Transport 型でさして作用を発揮できないが生体内に注射されると活性化し，Active型として初めて効力を発揮するもので新しい，Mustard系に属する薬剤群の原型とみなすことが出来るとされている。その作用機序に関しては未だ不明の点も多いが，Rotti[12]及び Holzer and Kröger[13]らは本剤は細胞毒で組織の中の DPN 濃度を特異的に減少させるものと考えているということで，Brock[14]らにより追試証明が行なわれているが，本剤は直接 DNA 分子に作用し細胞分裂を阻止する作用を有し，そのため細胞分裂のおう盛な腫瘍細胞が障害をうけ，又細網内皮系細胞の抗体産生も阻害されるものと考えられている。したがってその作用には特異性があり且つ又安全域が高いので現在入手可能の他の毒性の高い細胞増殖抑制剤に比べ大量使用できる利点がある。このことは著者が一連の結核アレルギー抑制実験のために本剤を取り挙げた理由の1つである。

さて前田ら[9]は CPA pro kilo 10～20mgを結核死菌感作ウサギに2週間にわたって注射したところ，ツ反応は完全に抑制されたと報告している。著者の今回の実験でも pro kilo 15mg でツ反応は完全に抑制されたのでその点では完全な一致をみた。但し，著者は11週間連続投与してこの間ツ反応は完全に抑制されるのをみたが，結核アレルギーに関して本剤をこのように長期間使用した報告には未だ接していない。

このように長期投与の場合でも薬剤効果を続持させる為には，毎日連続投与が必要であって，途中で投与を中断すると効果は中断後短時日に失われて，ツ反応は出現し始め血中抗体価も上昇を始める。隔日投与及びその他の間けつ的投与も目的にそわない。著者は予備実験でこのことを確めたが，前田らも既に同様の報告をしている。

血中抗体抑制に関しては，著者の実験成績においても前田らのそれと同様，多糖体抗体及び燐脂質抗体は明らかに抑制されたが，前田らと異なる点は，蛋白質抗体には CPA 投与群と対照群の間に明確なる差が見られなかったことである。このことはウサギの個体差，飼料及び栄養状態，実験手段の差等に原因があると考えられるが薬剤を増量投与すれば蛋白質抗体も抑制されるのかも知れない。

また結核皮膚アレルギーは完全に抑制されるにも拘わらず，血中抗体は抑制されるにしても不完全であることは，前田らの成績と同様であるが，この事実は結核皮膚アレルギーは質的にも量的にも血中抗体とは関係がないことを示すものであろう。とまれ，血中抗体が CPA によって抑制される事実は，本剤によるツ反応の完全抑制が本剤の単なる非特異的消炎作用によるものでないことを示していると思われる。

動物の体重は実験中，70%にまで減量し，又途中2羽のウサギが死亡した。このことは CPA が高い安全性をもつといってもまだかなりの毒性があることを示すもので，動物実験といえども，その投与量及び投与期間には自ら限度があると考えられる。

小　　括　Ⅰ

結核死菌感作ウサギに，CPA 15mg/kgを11週間毎日連続筋注を行ない，次の結果がえられた。

① ツベルクリン皮内反応は完全に抑制され，血中抗体は，多糖体抗体，燐脂質抗体が低下し，蛋白質抗体には低下は殆んどみられなかった。

② 連続投与による影響として動物の体重減少が著明であった。

実　　験　Ⅱ

実験目的

実験Ⅰの成績から結核死菌感作ウサギの遅延型アレルギーの出現及び抗体産生は CPA の連日筋注により抑制されることがわかった。しかし同時に同種薬剤の中ではかなり高い安全性を買われている CPA にもかなりの毒性があり実験動物の体重は著るしく減少した。これと同時に CPA 注射により白血球数も減少することは既知のことである。

著者は今後結核生菌を接種されたウサギの実験的結核症に及ぼす CPA の影響を検討する予定であるが，そのためには CPA の毒性にかんがみ，免疫現象抑制のための同剤の最少有効量を決定しなければならない。本実験はその目的のために行なったものである。

方法は実験Ⅰの場合と同様であるが，CPA の投与量を4段階に分けた。又今回はC剤の生体に及ぼす影響として最も重要な白血球減少についての検討を併わせて行なった。

実験方法及び実験材料

実験動物：2.5～3 kgのツ反応陰性の白ウサギ25羽を次のように4群に分けた。

第1群　CPA 4 mg/kg注射群5羽，
　　動物番号：1～5

第2群　CPA 6 mg/kg注射群5羽，
　　動物番号：6～10

第3群　CPA 8 mg/kg注射群5羽，
　　動物番号：11～15

第4群　CPA 10mg/kg注射群5羽，
　　動物番号：16～20

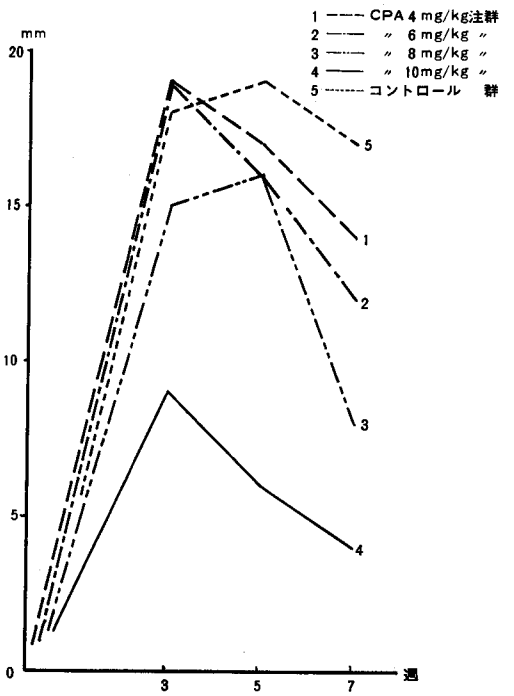


図6 ツ反応平均推移

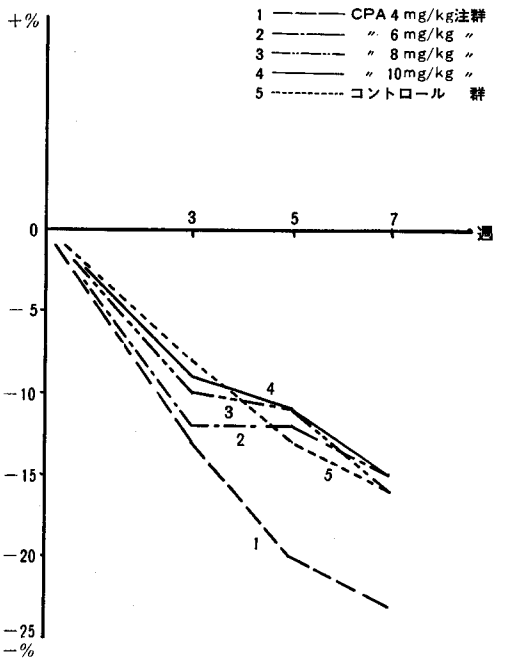


図7 体重平均増減率（%）

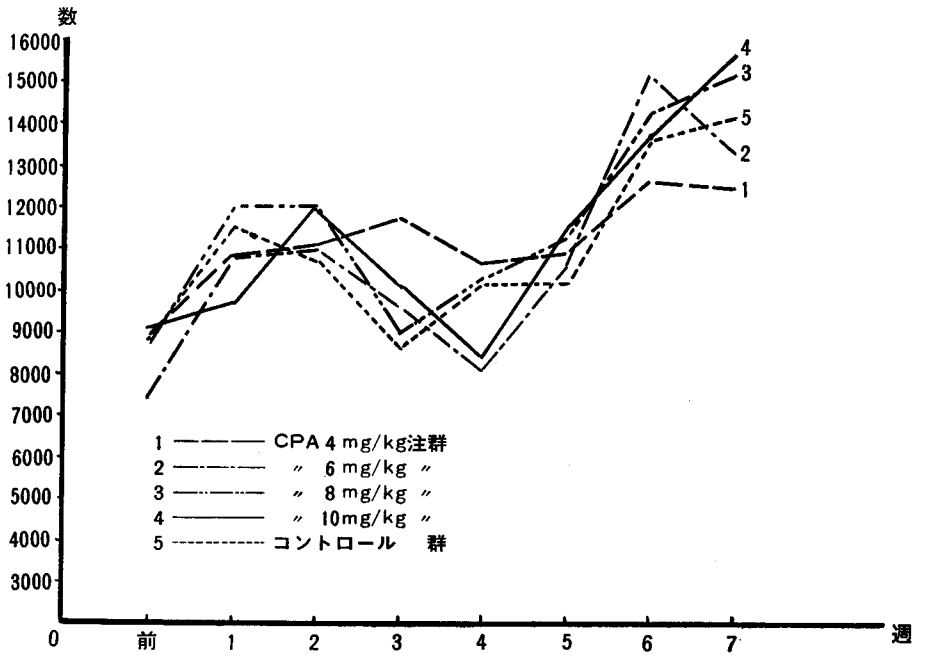


図8 白血球数平均推移

第5群　対照群5羽

動物番号：21～25

感作方法，注射方法，体重測定，血中抗体価測定等は実験Ⅰと同様である。

白血球算定：型の如く被検ウサギ耳静脈血をメランジュールに採血，Thoma の計算盤により算定した。

実験成績

ツ反応：(図6)反応は第4群，すなわち，CPA 10mg/kg注射群に於て全実験期間を通じ10×10㎜以下に抑制され，対照群との差は直径として10㎜以上であった。又第3群の8 mg/kg 注射群との間に直径として5㎜ないし10㎜の差を生じた。しかし同群においても対照群よりは抑制されており，薬剤注射量の増量につれて反応の抑制度も増大した。尚，10mg/kgおよび8 mg/kg群の7週目のツ反応の硬結はすべて他の群にくらべて弱かった。

体重：(図7)全群3週目より10%前後の体重減少を示し，実験終了時の7週まで減少を続け，最初の85%の体重まで減少した。又予期に反して4 mg/kg注射群においては他群に比べ著しい体重減少がみられ，75%程度に減量した。

白血球数：(図8)全群について群別の差は認められなかった。4 mg/kg注射群以外は，4週目に多少の減少がみられたが，実験終了時に向うにつれて再び増加の傾向を示し12,000から15,000程度であった。

血中抗体価：多糖体抗体価(図9)，各群共比較的ばらつきがなく，各ウサギ共一定の値を示し，群別には著

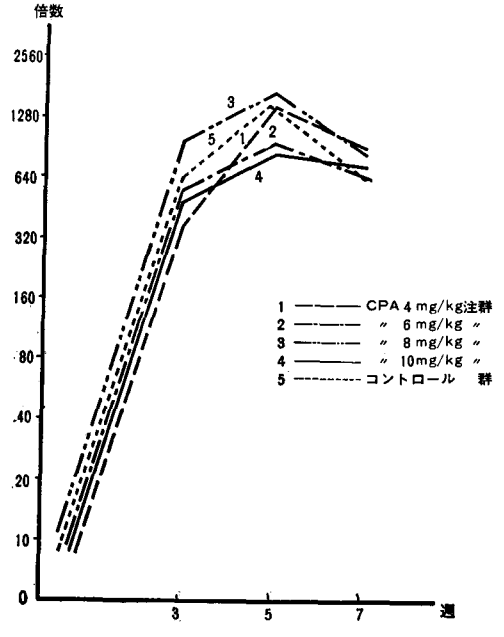


図9　多糖体抗体価平均推移

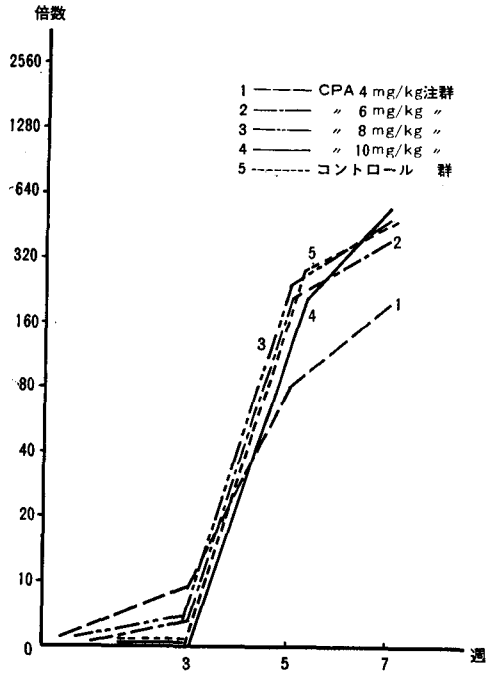


図10　燐脂質抗体価平均推移

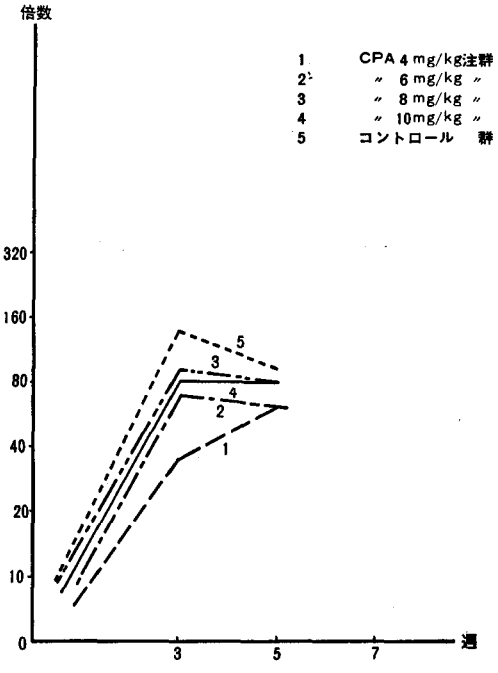


図11　蛋白抗体価平均推移

明な差はみられなかった。ただ10mg/kg注射群のみが，わずかに一定して他群より低い傾向を示したにすぎなかった。

燐脂質抗体価(図10)，全群3週まで低い抗体価を示したが，5，7週で抗体価は上昇した。群別の差は殆んどなく，わずかに4mg/kg注射群が，5，7週目で低い値を示したにすぎなかった。

蛋白質抗体価(図11)，全実験期間を通じて対照群に比べCPA注射群が低い値を示した。その差は試験管1ないし2本程度で4mg/kg注射群が最も低い値を示した。

考　　案　Ⅱ

実験Ⅰによって結核死菌感作ウサギのツ反応はCPA 15mg/kg連日筋注により完全に抑制されることがわかったので，今回の実験ではCPAの最少有効量を知る目的で，同じく結核感作ウサギについて，pro kilo 4，6，8，10mgの4段階投与を試みた。その結果，実験期間7週までの経過中，10mg/kg投与群では5羽中2羽において全期間を通じ反応の出現が完全に抑制されたが，他の動物には多少の反応が出現した。8mg/kg注射群では抑制は不完全であった。

以上の成績からツ皮内反応の完全抑制のためには10mg/kg以上の連日投与が必要であり，実験Ⅰの15mg/kg前後が最少必要量と考えられ，前田[9]らの実験結果にも一致している。

今回の実験では，体重減少は対照群を含めたすべての群に同程度にみられたので，CPA 10mg/kg連日投与の程度では体重減少をきたす程の毒性は発揮されないものと思われる。

白血球についても同様に考えられ，実験前期と後期では後期の白血球数がむしろ増加の傾向すら示した。先人の行なった実験では，前田らの報告を除き，いずれも白血球数の減少が認められているが，これはいづれも大量投与のためと考えられる。

CPAを長期に亘って使用する際に問題になる毒性は，結核死菌感作ウサギについて長期間CPAを投与して，主としてアレルギー抑制効果を見る場合，そのためのCPAの最少有効量と毒性の量的関係を考察するのが実験Ⅱの目的であった。CPAのラットに対するLD_{50}は，Nitrogen mustardの50mg/kgに対して160mg/kgとも210mg/kgともいわれているが，CPAは他のアルキル化剤と異なり全身性毒性が著るしく低いばかりでなく，臓器選択性もなく，従って臓器特異的毒性もまた低く，臨床的に重要な意味のある白血球減少作用も少ないとされている。

Brock[14]はこの点について，いろいろな細胞増殖抑制剤を動物に投与し，流血中の白血球数を調べたが，同程度の効果を示す投与量ではCPAはNitrogen mustardや，nitrogen mustard N-Oxideに比べ副作用はまれであったと報告している。又，Gerhantz[14]は骨髄の組織培養にいろいろな細胞抑制剤を作用させて核分裂係数を調べ同様な結果に到達している。

このようにCPAの安全域の広いことは先人の数々の実績で確かめられているが，一方CPAのようにアルキル化剤は白血球に及ぼす影響が長期連関に際して当然問題となるのみならず，他の臓器への毒性の蓄積も考慮に入れる必要がある。CPAの致死作用の蓄積は，回復が極めて速い白血球減少作用に比べ，はるかに強いといわれこの2つの作用はそれぞれ機序を異にするものではないかと考えられている。したがって，白血球数のみを調べただけでは毒性の危険なしに投与するわけにはいかない。しかし著者の実験で7週間のCPA投与により，ウサギの体重および栄養状態は，投与群，対照群とも差異が認められなかったところから，10mg/kg程度の7週連日投与は安全と考えられる。抗癌剤として用いられるCPAを含めた薬剤の癌に対する化学療法では，治療単位なるものが按出され，その薬剤のLD_{50}の1％が適当と考えられている。このことから，ウサギに対する最少有効量は15mg/kg前後であろうと考えられる。

血中抗体産生の抑制は全群に殆んど認められなかった。著者は主として結核アレルギー抑制を主目的としているのであって，実験Ⅰの成績からも推察できた。

小　　括　Ⅱ

結核死菌感作ウサギ20羽を4等分し，各群にCPAを各々，pro kilo 4，6，8，10mg連日7週間投与し，その効果を比較観察した。

次のような結果が得られた。

① ツ反応は，10mg/kg注射群で抑制効果が認められたが，完全ではなかった。8mg/kg以下の投与群では，抑制効果は軽度であった。薬剤投与の減量に従って抑制効果も減少した。

② 血中抗体は，10mg/kg以下の投与では，多糖体抗体，燐脂質抗体，蛋白質抗体とも，ほとんど抑制がみとめられなかった。

③ 体重，及び白血球は，10mg/kg以下の投与ではほとんど影響されなかった。

実　　験　Ⅲ

実験目的

先に行なったCPAの結核アレルギーに及ぼす影響についての実験Ⅰ，Ⅱにより一連の結果を得た。すなわち

結核死菌感作をうけたウサギではCPA 10mg/kgでは皮内反応の抑制は不十分であるが，15mg/kgで完全に抑制されること，血中抗体は15mg/kgで不完全に抑制されること，及び白血球，体重などは10mg/kgで影響されないことがわかった。

副腎皮質モルモンは，ツベルクリン反応や多くの臨床的及び実験的過敏症を抑制し，その化学療法剤との併用は速やかに結核病巣等の炎症に対する治療効果をあげることは既に知られているところであり臨床的にも応用されている。一方 Aminopterine, 6-Mercaptopurine 等抗体産生抑制剤を用いて抗結核剤と併用した実験も報告されている。著者は先に行なった実験結果に基づいて，ウサギの実験的結核症に対して CPA と SM による化学療法を併用して，SM 単独の治療効果と比較検討した。その際 CPA の使用量としては先の実験結果から，過敏症のみを抑え生体及び血中抗体にはそれ程影響を及ぼさないと思われる量，すなわち12mg/kgを選んだ。又SMについてはウサギの実験的結核症に対し最少有効量と考えられる10mg/kg及び有効量以下の 3 mg/kgを使用した。なお実験Ⅰ，Ⅱの場合と同様に，血中抗体，ツ反応，体重などを経時的に観察し，生菌感染の場合抗体産生及びツベルクリンアレルギーに対して CPA がどの程度の抑制効果を示すかを比較検討した。

実験材料及び実験方法

実験動物：3 kg前後のツ反応陰性のウサギ30羽を次のように 6 群に分けた。

第 1 群　CPA 12mg/kg筋注及びSM10mg/kg筋注群5羽，
　　動物番号：1～5
第 2 群　CPA 12mg/kg筋注及びSM 3 mg/kg筋注群5羽，
　　動物番号：6～10
第 3 群　CPA 12mg/kg筋注群 5 羽，
　　動物番号：11～15
第 4 群　SM 10mg/kg筋注群 5 羽，
　　動物番号：16～20
第 5 群　SM 3 mg/kg筋注群 5 羽，
　　動物番号：21～25
第 6 群　対照群 5 羽，
　　動物番号：26～30

感作方法：小川培地14日培養のウシ型三輪株菌を，1.6mg/mlになるよう蒸留水で浮遊液をつくり，その0.5 mlすなわち生菌 0.8 mgをすべての動物の耳静脈から注入感染した。

薬剤投与方法：CPA としては，感染 1 日前より，Endoxane（塩野義製薬）1 バイアル 100mgを滅菌蒸留水 5 mlに溶解し，12mg/kg あてを第 1 ～ 3 群の15羽の大腿部筋肉内に日曜日を除き 9 週間毎日注射した。SM 投与は，対照群の動物全部がツ反応陽性となる感染 3 週後より開始した。それには市販の SM 1 バィアル 1 g を滅菌蒸留水で 20mg/ml になるよう溶解し，第 1 群及び第 4 群には10mg/kg，第 2 群及び第 5 群は 3 mg/kgあてを大腿部筋肉内に日曜日を除き毎日注射し，感染後 9 週間目まですなわち 6 週間継続した。

ツ反応：北大結核研究所で製造した旧ツベルクリン原液の100倍稀釈液0.1mlを皮内注射，24時間後成績を判定した。感染 2 週間前，感染後 3 週間目，5 週間目，7 週間目，9 週間目の計 6 回にわたって測定した。なお測定にあたっては前回と同様硬結を指標とした。

血中抗体の測定：実験Ⅰ及びⅡで使用したものと同じ抗原を用いて，前回同様 Middlebrook-Dubos 反応，高橋反応，及び Boyden 反応を行ない，多糖体，燐脂質及び蛋白抗体の抗体価を，感染前，感染後 3 週目，5 週目，7 週目及び 9 週目の 5 回にわたり測定した。

体重測定：ツ反応実施時に，感染前，感染 2 週目，3 週目，5 週目，7 週目及び 9 週目の計 6 回にわたり測定した。

剖検：生菌感染後 9 週目すなわち化学療法開始後 6 週目に，耳静脈空気注入により致死せしめた直後に，肺・脾・肝についてその肉眼的所見を観察，脾重量を測定，肺・脾の定量培養を行なった。

実験成績

ツ反応：（図12）3 週目までは第 1 ～第 3 群の CPA 注射群と，CPA 非注射群との間に明らかに差が認められた。又 5 週目から 9 週目までは CPA 注射群では時折反

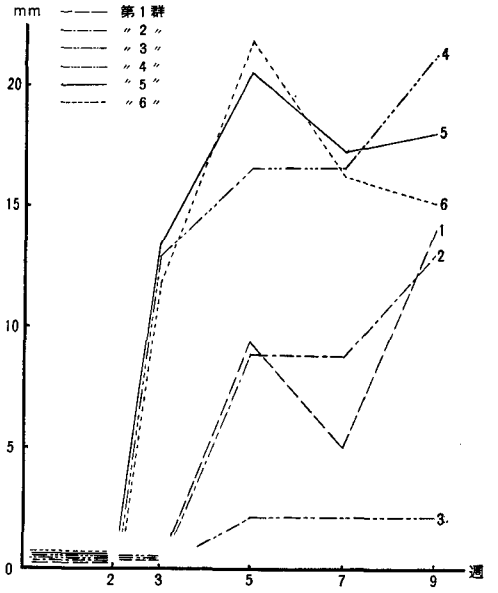


図12　各群ツ反平均推移

応陰性を示すものがあったが，非注射群では陰性反応は全く認められなかった。各群における測定値の平均をとって比較してみると CPA 投与群と非投与群の間にはすべての週において著差が認められた。また硬結の程度も CPA 注射群では非注射群に比して弱かった。なお CPA 単独注射の第 3 群では，CPA・SM 併用群に比べ反応はさらに弱かった。

体重：(図13)すべての群で 5 週目が体重減少の谷となり 9 週に近ずくに従って正常に戻った。その増減率をみ

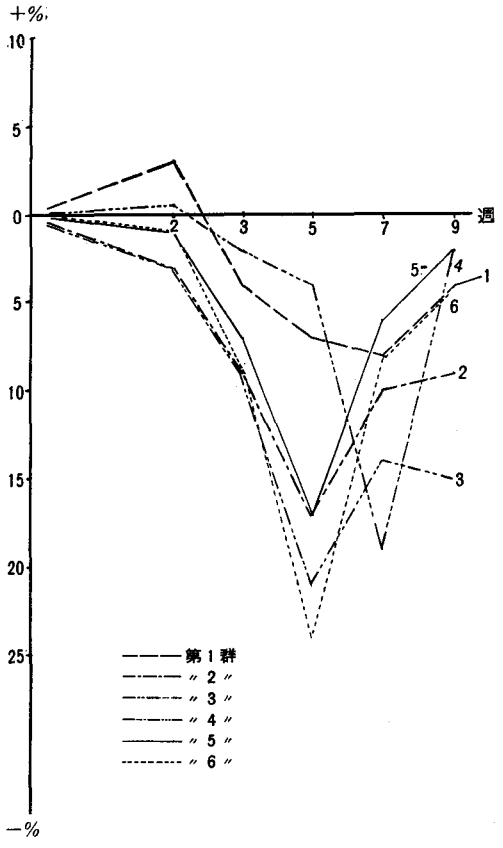


図13　体重平均増減率(%)

ると，体重の増減に比較的変動の少なかったのは CPA と SM 10mg併用群であった。これに反して体重減少の最も著しかったのは，CPA 単独使用群であったが，これも 9 週目には最初の体重の約 85% まで回復した。CPA 投与群は非投与群に比べて，第 1 群を除き，体重は全体として減少傾向にあった。

血中抗体価：多糖体抗体価(図14)，全実験期間を通じて同一群中に動物の個体差があったが，抗体価は 3，5，7 週で高く，9 週目ではいずれの群でも抗体価は下降した。いずれの群でも抗体価の推移は同様な曲線を示し，平均抗体価の推移をみるとわずかながら CPA 注射群の 3 群が CPA 非注射群 3 群より低い抗体価を示した。

燐脂質抗体価(図15)，各群とも動物の個体差が最も著しかった各群間には大差はなく，中には稀釈度 6 の群も

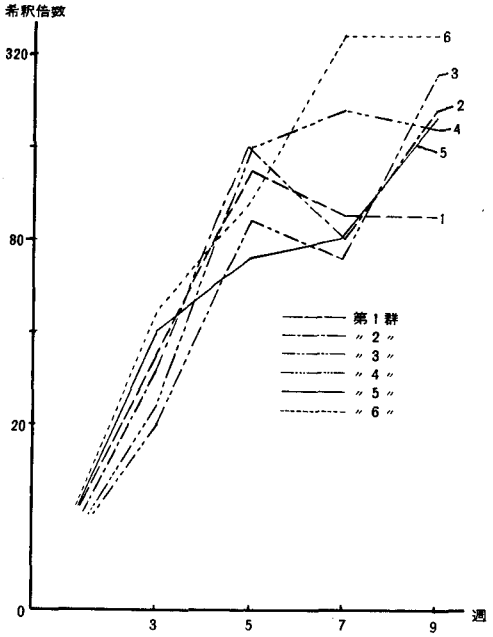


図14　多糖体抗体価平均推移

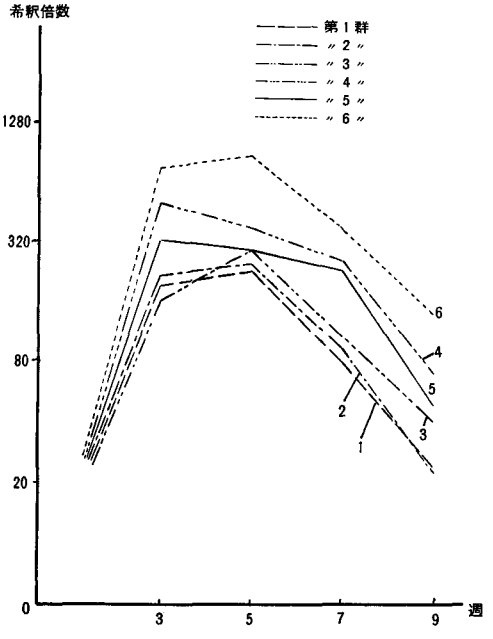


図15　燐脂質抗体価平均推移

あった。各群の平均抗体価の曲線も一様ではなく一定の型は認められなかった。多糖体及び蛋白抗体と比べて9週目に抗体価が頂点に達したのが特徴的であった。

蛋白抗体価(図16)各群で動物の個体差が比較的少なかった。抗体価は CPA 注射群では5週目に最高となり，7，9週目で下降するに反して，非注射群では5，7週目に最高となり下降傾向は注射群と比べてやや緩慢であった。CPA の抑制効果は著明ではないが7，9週目に見られた。

剖検所見：(表1)，肺の肉眼的病変は，第1群のCPA•SM10mg/kg併用群において最も軽く，肺表面に出現した結節は最小であった。次いでCPA•SM 3 mg/kg併用群において，SM 10mg/kg に比べてやや病変が少なかった。第3群の CPA 単独群において病変は最も強く，大きな結節が密集してみられた。第6群の対照群では第3群に次いで強い変化が見られ，第5群の SM 3 mg/kg 群に比べても多少の差が認められるに過ぎなかった。実験群を病変の軽い順序にならべてみると，第1，2，4，6，5，3群の順であった。

肝の病変所見は第1群と第4群がほぼ等しく最も軽く，次いで第5群，第2群，第6群の順で軽く，第3群において肺の場合と同様最も強く，結節も大きかった。

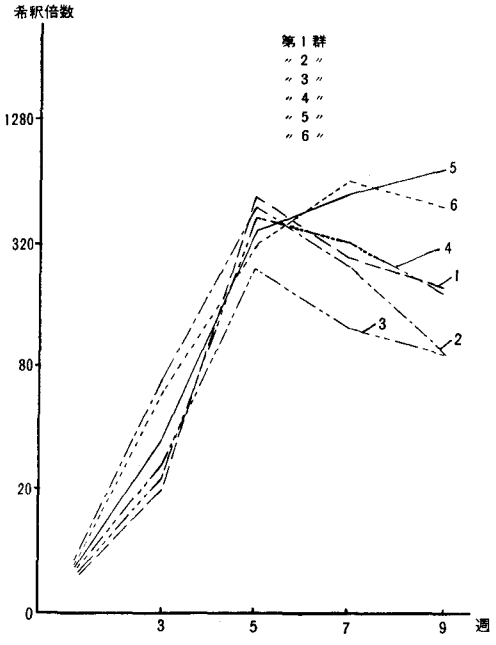


図16 蛋白抗体価平均推移

表1 剖 検 肉 眼 的 所 見

	動物番号	肺	肝	脾	脾重
第1群 CPA+SM 10mg/kg	1	+	+	+	2.0
	2	死	亡		
	3	+	+	+	1.5
	4	++	++	+	1.1
	5	—	+	+	2.7
第2群 CPA+SM 3mg/kg	6	+	++	+	2.0
	7	++	++	+	2.8
	8	++	+++	++	2.5
	9	+++	++	+	1.8
	10	+++	++	++	2.8
第3群 CPA	11	++++	++++	++	4.0
	12	++++	++	++	3.3
	13	+++	+++	+++	8.8
	14	+++	+++	++	1.3
	15	+++	+++	++	2.0

	動物番号	肺	肝	脾	脾重
第4群 SM 10mg/kg	16	+++	+	+	2.3
	17	++	+	+	2.9
	18	+++	+	+	2.2
	19	+++	++	+	3.8
	20	++	+	+	4.5
第5群 SM 3mg/kg	21	++++	+	++	5.0
	22	++	+	+++	6.0
	23	+++	+++	+	2.5
	24	+++	++	++	1.7
	25	+++	++	+++	3.3
第6群 対照	26	+++	+++	+++	2.4
	27	++++	++	++	6.0
	28	++++	+++	++	2.6
	29	++++	+++	++	3.0
	30	++++	+++	++	3.5

なおCPA・SM 3 mg/kg併用群とSM 3 mg/kg 単独投与群の間には著差は認められなかった。

脾の肉眼的病変は,第1群と第4群において最も軽く,その程度もほぼ等しかった。次いで第2群が軽い病変を示し,前2者に比べ2羽が十の病変を示したに過ぎなかった。次いで第5群の順であったが,対照群との差は著明ではなかった。第3群と第6群の間には肉眼的の差はほとんどみられなかった。

脾重量:(図17),第1群において最も少なく平均1.84 gであった。次いで第2,第4,第6,第5群の順に重く,第3群では最も重く3.88 gで第1群の2倍以上であった。脾重量と体重の比は,第1,第2,第4,第5,第6,第3,群の順に大きく,これは次に述べる肺内生菌数の消長とよく一致した。

定量培養:(表2),菌の定量培養は,10^2, 10^3, 10^4, 10^5の4段階希釈について行なった。

肺の生菌数は,第1群では全動物とも10^2以下,すなわち10^2希釈では菌が生えなかった。第2群は第1群についで菌数は少なく1羽のみが150×10^5の菌数を示したが他の4羽のうち3羽では第1群と同様菌が生えなかった。次いで第5,第4,第6群であり,これらの群と対

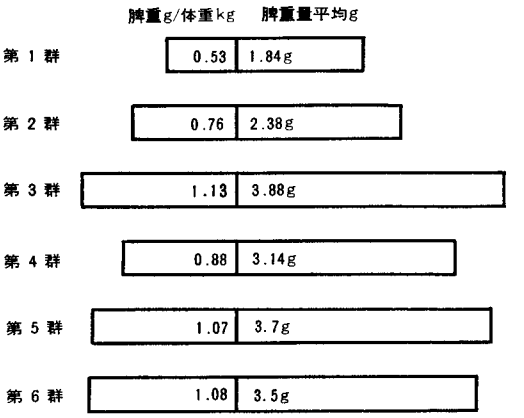


図17 各群脾重平均と体重との関係

表2 肺及び脾1g中の菌数(4週間培養)

	動物番号	肺	脾
第1群 CPA+SM 10mg/kg	1	10^2以下	7×10^2
	2	死	亡
	3	10^2以下	9×10^2
	4	10^2以下	2×10^2
	5	10^2以下	7×10^2
第2群 CPA+SM 3 mg/kg	6	10^2以下	4×10^2
	7	10^2以下	3×10^2
	8	140×10^2	19×10^2
	9	10^2以下	5×10^2
	10	150×10^5	52×10^2
第3群 CPA	11	10^6以上	6×10^2
	12	70×10^5	10×10^2
	13	5×10^5	3×10^2
	14	5×10^3	2×10^2
	15	5×10^4	14×10^2

	動物番号	肺	脾
第4群 SM 10mg/kg	16	5×10^3	10×10^2
	17	37×10^2	6×10^2
	18	5×10^3	1×10^2
	19	4×10^3	4×10^2
	20	50×10^3	1×10^2
第5群 SM 3 mg/kg	21	7×10^3	10^2以下
	22	3×10^2	16×10^3
	23	63×10^4	10^2以下
	24	17×10^4	5×10^2
	25	55×10^3	10^2以下
第6群 対照	26	10^2以下	10^2以下
	27	13×10^3	26×10^2
	28	6×10^3	14×10^2
	29	13×10^3	1×10^2
	30	24×10^3	8×10^2

照群の間にはほとんど差が認められなかった。第3群においては菌数は最も多く，1羽のみが 5×10^3 を示し他はいずれも10^4以上,多いものでは10^6以上であった。脾の定量培養では，すべての群が10^3以下の菌数を示し，各群の間に有意の差は認められなかった。

小　括 Ⅲ

結核生菌ウシ型三輪株を耳静脈より感染したウサギ30羽を，CPA 12mg/kgとSM 10mg/kg及び3 mg/kgとで併用治療した。CPAは生菌感染1日前より，SMはツ反が陽転する感染3週後より連日投与を開始し，感染後9週間観察して次のような結果を得た。

① CPA12mg/kg連日投与はツ反応を抑制したが不完全であった。

② CPA12mg/kg連日投与は血中抗体の産生に対してかなりの抑制効果をあらわした。

③ CPA12mg/kg連日投与はウサギの体重を一時的に減少させるに過ぎなかった。

④ CPA12mg/kgとSM 10mg/kg連日併用投与は，SM10 mg/kg 単独連日投与よりも肺の病変を軽減させ，肺の生菌数を減少させた。

⑤ CPA12mg/kgと有効量以下と思われるSM 3 mg/kgの併用連日投与は，少なくともSM10mg/kg単独連日投与に匹敵するか，あるいはよりよい治療効果を挙げた。

⑥ CPA12mg/kg単独連日投与は，結核病変を悪化させた。

実　験 Ⅳ

実験目的

実験Ⅲの結果から，CPA 12mg/kg投与はウサギの実験的結核のツ反応の出現を不完全ながら抑制し，それとSM10mg/kgの併用療法は，満足すべき治療効果を示すことがわかった。しかしCPA 12mg/kg連日投与のツ反抑制作用は生菌感染の場合，不完全であったので，実験Ⅱ及びⅢの成績にかんがみ，今回はCPA投与量を1日15mg/kgに増量して，実験Ⅲの場合とほぼ同様な方法で実験を行なった。これは生菌感染の場合のCPAのツ反応抑制作用を最大限に発揮させるのが目的であった。勿論，実験Ⅲの成績から考えると，CPA 15mg/kg連日投与が生菌感染の場合のツ反応出現を完全に抑制し得るとは考え難いが，生体への影響を考慮して長期間投与する場合，CPA投与は15mg/kgが限界ではなかろうかと考えた。

なお，今回の実験では，組織病変の病理学的所見を検べて，感染9週後の肉眼的剖検所見と比較検討した。又生菌感染には前回同様ウシ型三輪株を用いたが，感染量を1.0mg/kgに増量した。

実験材料及び実験方法

実験動物：体重3～4 kgのウサギ30羽を次のように6群に分けた。

第1群　CPA 15mg/kg及びSM10mg/kg併用群5羽，動物番号：1～5

第2群　CPA 15mg/kg及びSM 3 mg/km併用群5羽，動物番号：6～10

第3群　CPA 15mg/kg単独投与群　5羽，動物番号：11～15

第4群　SM10mg/kg単独投与群　5羽，動物番号：16～20

第5群　SM 3 mg/kg単独投与群　5羽，動物番号：21～25

第6群　対照群　5羽，動物番号：26～30

感作方法：小川培地14日間培養のウシ型三輪株生菌を，2 mg/kgになるよう蒸留水で浮遊液をつくり，その0.5mℓ，すなわち生菌1 mgを耳静脈より感染した。

薬剤投与：CPA (Endoxane，塩之義製薬) の1バィアル100mg/mℓを5 mℓの蒸留水に溶解し，15mg/kgを実験Ⅲと同様な方法で9週間，日曜日を除き毎日連続投与した。

SM 投与：生菌感染後3週間経てから，ツ反応が対照群に陽性になったことを確かめ，動物剖検まで6週間連日投与した。

ツ反応，血中抗体，体重，剖検肉眼的所見，及び臓器生菌定量培養の検討は実験Ⅲの場合と同様な方法によった。

実験成績

ツ反応：(図18)実験Ⅲの場合と同様CPA非投与群では3群とも,第3週ですでに著明な反応を呈したが,CPA投与の3群では3ないし5週目まで反応の出現はやや完全に近く抑制され，5週目ないし7週目になって初めて陽転した。硬結，出血，壊死の程度も実験Ⅲの場合と同様CPA非投与群で強かったが，CPA投与群では硬結の程度は極めて弱く，出血，壊死の所見はみられなかった。

体重：(図19) 体重はすべての実験群で減少した。CPA投与群において特に著るしく，投与5週目に最大の谷が認められた。体重減少率の最も著るしかったのは第1群で，5週目では最初の体重の70%以下に落ちた。又SM単独群においても7週目に最初の体重の70%をわったが，9週目には100%まで回復した。他の5群においても80%から90%まで回復した。なお，実験開始後2週目でNo. 3，13，20の動物が4週目でNo. 4，18，30が，5週目でNo. 1がそれぞれ死亡した。

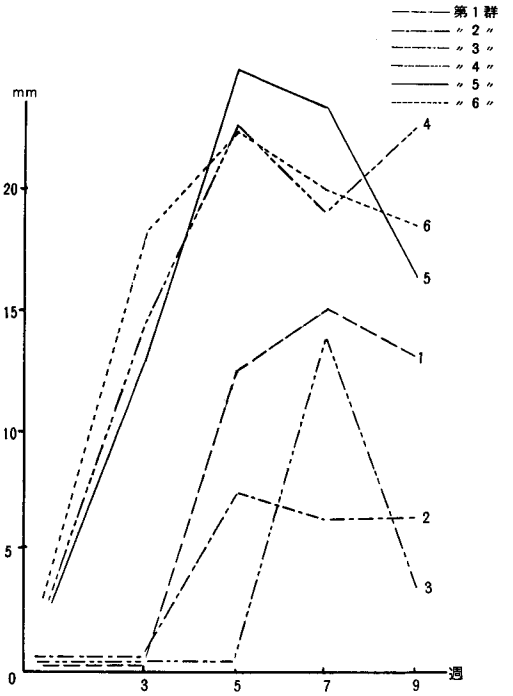


図18 各群ツ反平均推移

血中抗体価：多糖体価(図20)は5週目までほぼ全群で上昇し頂点に達し7，9週になるにつれて抗体価は低下した。平均抗体価線は全群ほぼ同じような経過をとり実験Ⅲの場合とほぼ同じであった。抗体産生抑制効果は全実験期間を通じてみとめられたが，特に第1群(CPA 15 mg/kg＋SM10mg/kg)において9週目で抗体価の減少が著るしかった。

燐脂質抗体価：(図21)5週目で抗体価は頂点に達したことは多糖体抗体の場合と同様であったが，全群，全実験期間を通じて抗体価は総じて高くならず，最高で平均160×程度であった。特にCPA 投与群の3群では5週目で第2，第3群が平均20～40×程度の抗体価を示したのみで，3，7，9週目では平均10×以下であった。中でも第1群（CPA 15mg/kg＋SM10mg/kg）では全実験期間中，ほとんど0に近い低い抗体価しか認められなかった。

蛋白抗体価：(図22) CPA 投与群の3群全部において抑制効果が著るしく，平均20×以下であった。CPA 非投与群3群では3，5週目で頂点に達し，平均160×を示したが9週目に近ずくにつれて低下の傾向を示した。

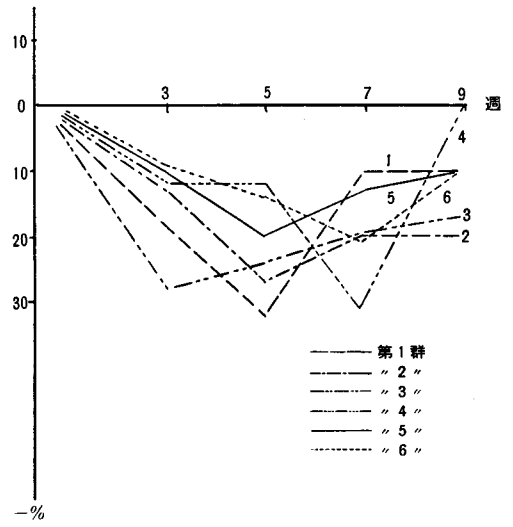


図19 体重平均増減率(%)

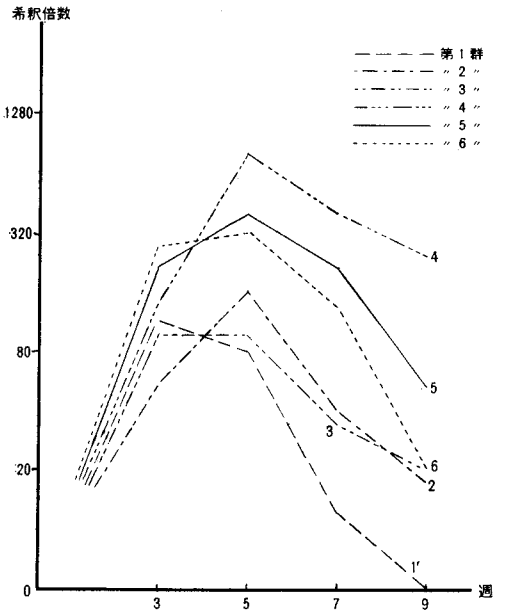


図20 多糖体抗体平均推移

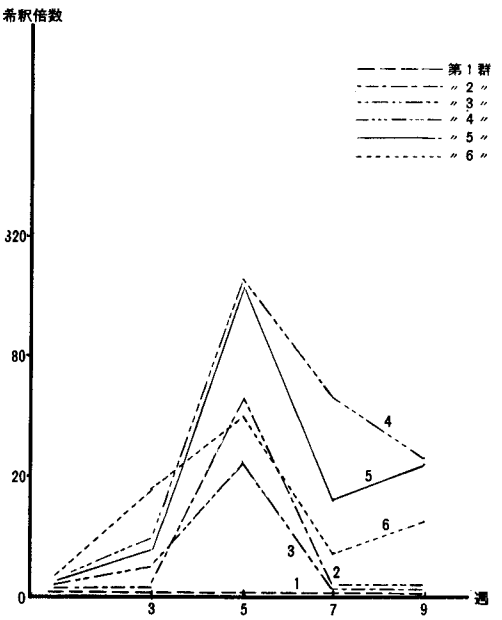


図21 燐脂質抗体価平均推移

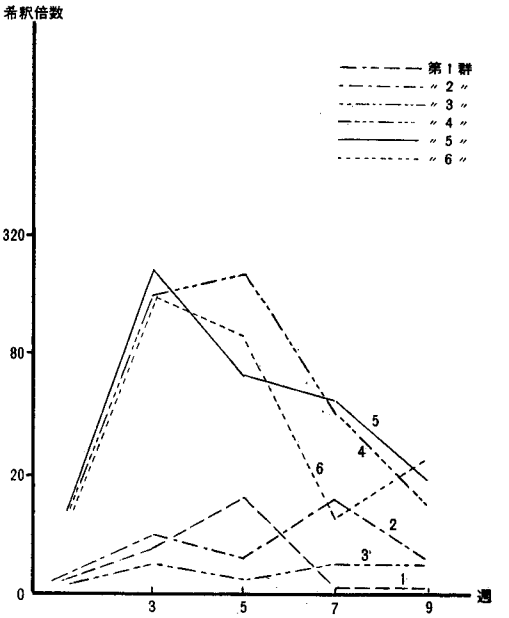


図22 蛋白抗体価平均推移

表3 剖検肉眼的所見

	No.	肺	肝	脾	脾重g
CPA 15mg/kg + SM 10mg/kg	1	死		亡	
	2	++	+	+	1.9
	3	死		亡	
	4	〃		〃	
	5	+	+	—	2.1
CPA 15mg/kg + SM 3 mg/kg	6	+	+	+	2.1
	7	++	+	+	1.4
	8	+	+	+	2.8
	9	++	+	+	4.3
	10	+++	+	+	2.1
CPA 15mg/kg	11	++++	+++	+++	7.7
	12	++++	+++	++	1.8
	13	死		亡	
	14	++++	+	++	1.9
	15	++++	++	+	2.3

	No.	肺	肝	脾	脾重g
SM 10mg/kg	16	+++	+	+	2.3
	17	+++	+	+	4.0
	18	死		亡	
	19	+++	+	++	2.3
	20	死		亡	
SM 3 mg/kg	21	+++	++	+	5.3
	22	+++	++	+++	9.4
	23	++	++	+++	4.1
	24	+++	++	++	3.1
	25	+++	++	+	6.7
対照	26	++++	++	++	4.2
	27	+++	++	++	6.0
	28	++++	+++	++	3.6
	29	+++	++	++	1.7
	30	死		亡	

剖検所見

肉眼的所見：(表3)肺の肉眼的所見は第1群において最も軽く結節も少なかった。次いでCPAとSM3㎎/kg併用群の第2群において結節も比較的少なくまた小さく2番目に軽い所見を示した。対照の第6群と第4，第5群のCPA非投与群の間には，著るしい差は認められなかった。CPA単独投与の第3群では実験Ⅲの場合と同様病変は最も強く，大きな結節が密集しているのが認められた。

肝の肉眼的病変は第1，第2及び第3群とも同程度で，明らかな差はみられなかった。第5群と第6群においては肺の場合と同様差はみられなかった。CPA単独投与の第3群では肺の場合と同様最も著るしい病変が認められた。

脾の病変は肝の病変とほとんど同程度で，各群間の関係も又肝の場合と同様であった。

脾重量：(図23)第1群(CPA 15㎎/kg＋SM10㎎/kg)において最も小さく，脾重と体重の比は平均0.8であった。最も大きかったのはSM3㎎/kg単独群の第5群で，体重との比は平均2.22であり，CPA単独群の第3群では1.46であった。この関係を軽い方から示すと，第1群，第2群，第4群，第3群，第6群，第5群の順となる。

肺及び脾の生菌定量培養：(表4)肺1g中の生菌数は第1群と第2群において最も少なく，次いで第4群，第

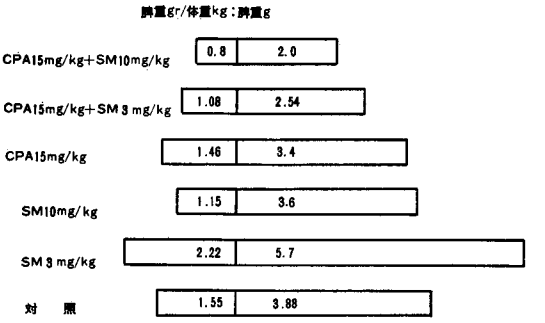


図23　各群脾重平均と体重との関係

表4　肺及び脾1g中の菌数(4週間培養)

	No.	肺	脾
END	1	死	亡
	2	11×10^2	9×10^2
15mg/kg＋SM 10mg/kg	3	死	亡
	4	〃	〃
	5	1×10^2	8×10^2
END	6	8×10^2	10×10^2
	7	3×10^2	26×10^2
15mg/kg＋SM 3 mg/kg	8	2×10^2	16×10^2
	9	2×10^2	40×10^2
	10	15×10^2	28×10^2
END	11	23×10^3	1×10^3
	12	10^5以上	18×10^3
15mg/kg	13	死	亡
	14	10^5以上	27×10^2
	15	11×10^4	10×10^2

	No.	肺	脾
SM 10mg/kg	16	6×10^3	3×10^2
	17	9×10^3	6×10^2
	18	死	亡
	19	12×10^3	12×10^2
	20	死	亡
SM 3 mg/kg	21	1×10^3	2×10^2
	22	1×10^3	10^3以下
	23	20×10^3	16×10^2
	24	3×10^3	9×10^2
	25	1×10^3	53×10^2
対照	26	6×10^3	9×10^2
	27	2×10^3	9×10^2
	28	40×10^3	22×10^2
	29	2×10^3	5×10^2
	30	死	亡

表5 病理組織所見

	No.	肺				脾				肝		
		結節程度	壊死	胞隔肥厚	滲出炎	結節程度	沪胞萎縮	芽中心形成	細網細胞増殖	結節程度	グ鞘細胞浸潤	変性
第1群	2	—	—	±	—	+	±	—	+	+	++	±
	5	+	—	++	—	++	+	—	++	+	++	—
第2群	6	++	—	++	—	+	++	+	++	++	++	+
	7	+	—	++	+	++	++	—	++	+	++	++
	8	±	—	++	—	++	++	—	++	+	—	+
	9	++	—	++	+	+	++	—	++	++	—	++
	10	±	—	++	—	++	++	—	++	++	++	+
第3群	11	++	—	++	—	±	++	—	++	++	++	++
	12	++	—	++	+	++	++	—	++	++	++	++
	14	++	++	++	—	++	++	—	++	+	++	+
	15	++	++	++	±	++	++	—	++	++	++	++
第4群	16	++	—	++	±	++	+	—	+	+	+	±
	17	++	—	++	—	+	+	+	++	±	++	+
	19	++	—	++	±	++	+	+	++	+	+	±
第5群	21	++	—	+	±	++	++	—	++	++	++	+
	22	++	—	++	—	±	+	+	+	±	++	+
	23	±	—	—	—	++	+	±	++	++	+	—
	24	+	—	±	—	+	++	+	++	+	+	—
	25	++	+	+	—	++	++	—	±	+	+	+
第6群	26	+	—	++	—					+	++	—
	27	++	+	++	—	—	++	—	++	+	++	+
	28	++	++	±	—	+	++	+	++	+	++	+
	29	+	—	—	—	+	++	—	±	+	++	+

5群，第6群がほとんど同程度で差がなく，第3群で最も多く，そのうち2羽には10^5以上の菌数が認められた。

組織病理所見：(表5)

肺の病変

① 対照群(第6群)(写真①のf：No.28)

胞隔肥厚は中等度で，結節形成のあまり強くないものもあったが，中には大きな結節を有するものもあり，そのような大結節の中には中心部が壊死におちいっているものもあった。又類上皮細胞が繁殖炎の形で肺胞内に広汎に増殖した形をとったものもあった。病巣の数はそれ程多くはなかったが，個々の病巣は大きかった。

② SM群（第4，5群)(写真①のd，e：No.19，22)

中心壊死のない大きな繁殖炎病巣で，肺胞内に僅かに大滲出細胞の出ているところも認められた。胞隔肥厚は一般に広く存在したが，対照群に比べて大差はない。類上皮細胞及び単核細胞からなる結節又は繁殖炎様増殖で中にリンパ球の浸潤があった。

③ SM•CPA併用群(第1，2群)(写真①のa，b：No. 5，9)

一般に胞隔肥厚が高度，広汎であり胞隔に単核細胞の増加があった。その一部が結節状をなして単核細胞の集積しているのがみられたが，定型的な結節は非常に少なく，対照に比べて小さかった。繁殖炎は少なく，また壊死もみられなかった。

④ CPA単独群(第3群)（写真①のc：No.15)

全体を通じて最も病変が強かった。結節形成は大きくまた数も多い。繁殖炎の形が主で，2例では中心に大きな壊死巣がみられた。その中には多形核白血球の不規則な浸潤もみられた，また大きな血管の周囲には強度のリンパ球浸潤がみられるものもあった。

脾の病変

① 対照群(第6群)（写真②のf：No.29)

明らかな結節形成はみられなかった。しかし濾胞は高度に萎縮し結節の名残りのようなものはみえた。赤色髄では細網細胞が増加していた。ここには多形核白血球の浸潤の強いものもあったが，一般にはリンパ球，形質細胞が増加していた。

② SM群(第4，5群)（写真②のd，e：No.17，23)

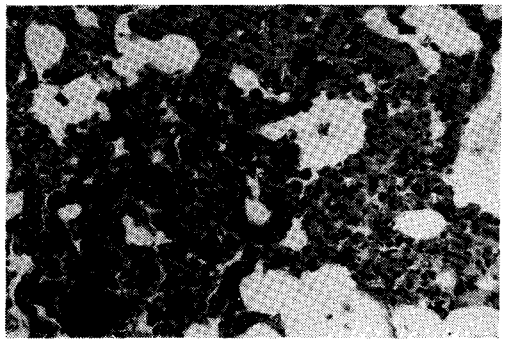
全般に明るい形の類上皮細胞結節の名残りのような小さな病巣が濾胞内や赤髄内に散在していた。その数の多いものが3例にみられた。濾胞萎縮は対照群よりやや軽度であったが中には強いものもあった。細網細胞増殖にも一定の傾向は認められず，一例を除けば対照群と同程度であった。赤髄内には多形核白血球の浸潤が目立った。

③ SM•CPA併用群(第1，2群)（写真②のa b：No. 6，8）

SM10mg/kg群(第1群)の方は結節は散在していたが数は少なかった。濾胞の萎縮もまた弱かった。しかしSM 3mg/kg群では明らかに結節が形成されていたが，小さく数も多くなかったが，赤色髄の細網細胞の増殖が強くて，結節との区別のむずかしいものが多かった。また全体に濾胞の萎縮が高度であった。1例では結節が大きく多数形成されていたが，細網細胞の増生は弱かった。

④ CPA単独群(第3群)（写真②のc：No.15)

小ないし中等大の結節が濾胞内及び赤色髄内に多数散在しており，細網細胞の増生も高度であった。濾胞の萎縮も強かった。全群を通じ最も結節形成が強かった。



真写１ａ　Ｃ剤＋ＳＭ10㎎/kg No.５（第Ⅰ群）
単核細胞増加による胞隔肥厚と局所的な結節状の集まり。

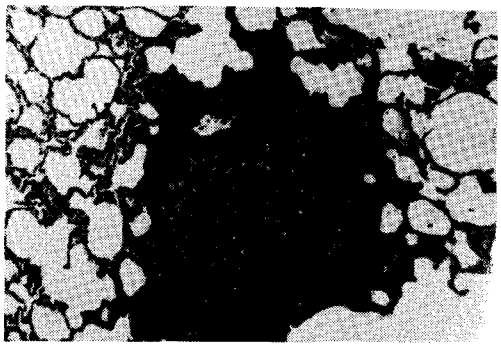


写真１ｄ　ＳＭ10㎎/kg単独 No.19（第Ⅳ群）
結節形成は繁殖炎の形でみられ，周囲の胞隔肥厚は少ない。

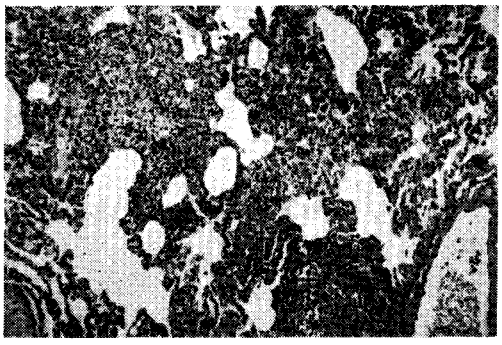


写真１ｂ　Ｃ剤＋ＳＭ３㎎/kg No.９（第Ⅱ群）
胞隔肥厚と局所的結節形成。

写真１ｅ　ＳＭ３㎎/kg単独 No.22（第Ⅴ群）
繁殖炎巣。リンパ球の浸潤を伴うものが多い。

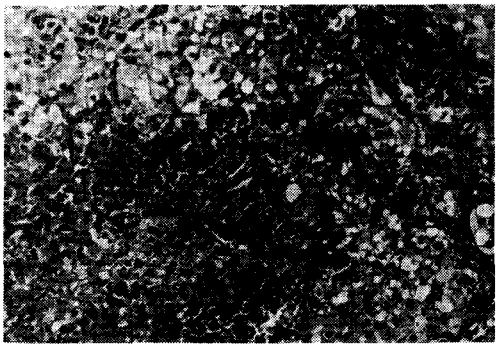


写真１ｃ　Ｃ剤単独群 No.15（第Ⅲ群）
繁殖炎巣内に不規則に多形核白血球の浸潤と壊死巣がみられる。

写真１ｆ　対照群 No.28（第Ⅵ群）
大きな壊死巣を伴った結節でＣ剤投与群と異なり定型的な結節の形をとっている。

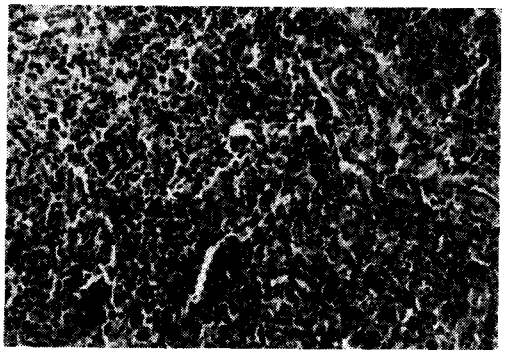


写真2 a　C剤＋SM10mg/kg No.6（第Ⅰ群）
赤色髄内に細網細胞増加と多形核白血球の浸潤あり。

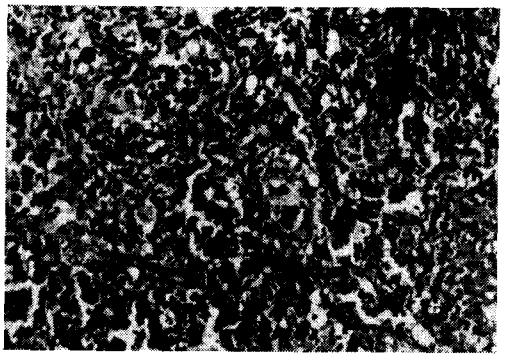


写真2 b　C剤＋SM3mg/kg No.8（第Ⅱ群）
赤髄内に類上皮細胞の結節の名残りがある。

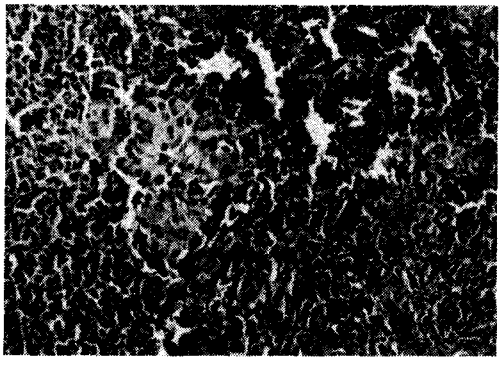


写真2 c　C剤単独 No.15（第Ⅲ群）
類上皮細胞による結節。

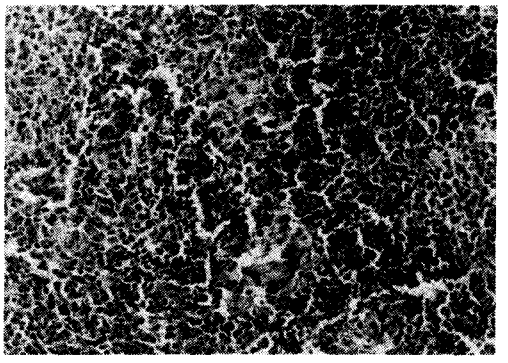


写真2 d　SM10mg/kg単独 No.17（第Ⅳ群）
赤色髄内類上皮細胞小結節形成。

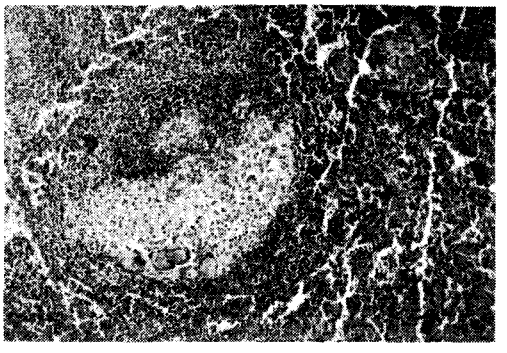


写真2 e　SM3mg/kg単独 No.23（第Ⅴ群）
沪胞内に割合大きな結節形成がある。

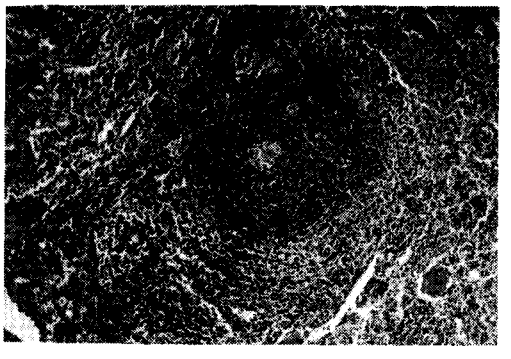


写真2 f　対照 No 29（第Ⅵ群）
沪胞内に小結節の名残りがある。

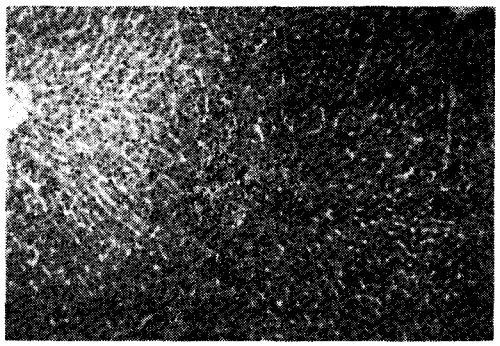


写真３ａ　C剤＋SM10mg/kg No. 2（第Ⅰ群）
グリソン鞘の連続で結節の治癒に向っているもの。

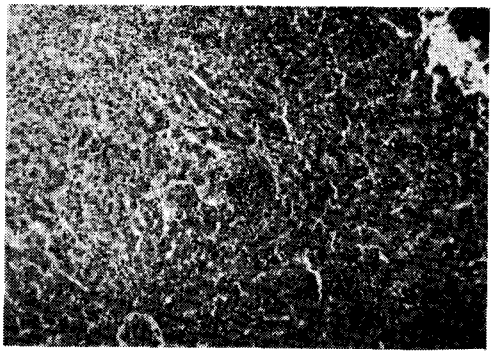


写真３ｃ　SM３mg/kg No.21（第Ⅴ群）
グ鞘の細胞浸潤と小結節形成。

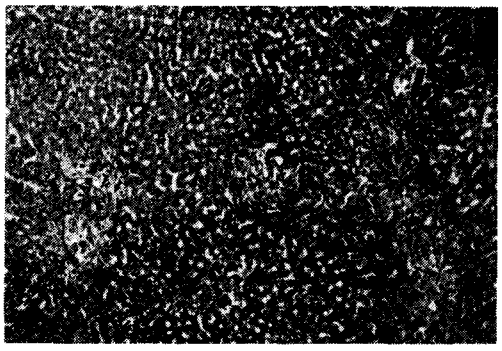


写真３ｂ　C剤単独 No.11（第Ⅲ群）
肝細胞の変性強く，グ鞘内の細胞浸潤も強い。小結節が多く散在する。

写真３ｄ　対照 No.28（第Ⅵ群）
グ鞘の細胞浸潤と小結節状単核細胞集積。

肝の病変（写真③のａ，ｂ，ｃ，ｄ：No. 2,11,21,28）
肝の病変には全群を通じ大差はなかった。グリソン鞘内にリンパ球の浸潤が中等度に認められ，グリソン鞘は増大して胆管増生が強くみられた。はっきりした結節はみられなかったが，なんとなく結節部の修復した結果のようにみられるところがあった。小葉内には単核球の小集団が散在しており，少し大きいものでは中心部に多形核白血球をもっているものが多かった。小さいものがほとんどであった。第２，３群にやや大きな結節がみられたものもあり，病変がやや強いようであった。肝細胞自体には，空胞変性がみられ，これは第２，３群に強いようであった。

小　　括　Ⅳ

本実験では結核生菌ウシ型三輪株１mgを耳静脈より感染したウサギ30羽に，CPA 15mg/kgを実験Ⅲと同じ方法により投与し，SM 併用療法を行ない次の結果を得た。

① CPA 15mg/kgの連日投与はツベルクリン反応の発現を３ないし５週間まで完全に抑制する。しかしそれ以上期間がのびると抑制効果は不完全となる。ただし対照に比べると抑制効果は依然著しい。

② CPA 15mg/kg連日投与は実験Ⅲの 12mg/kg 連日投与に比べて，血中抗体産生に対する抑制の度合が大きい。

③CPA 15mg/kg連日投与はウサギの体重を著るしく減少させる。

④ SM との併用効果は実験Ⅲの場合と同様著明に認められた。ただし CPA 単独投与は結核病変をかえって増悪し，臓器内生菌数は増加する。

⑤ 組織病理所見

1） 肺の病変はSM・CPA併用の場合対照と比べて著しく少なく結節も小さい。壊死はなく，リンパ球浸潤もみられない。ただし胞隔肥厚が著るしい。CPA 単独投与の場合は胞隔肥厚が強く結節も大きいが，繁殖炎増殖が主である。この場合，白血球浸潤がみられるが，リンパ球浸潤はみられない。CPA 非投与の場合はSM単独投与の場合と同様リンパ球浸潤がみられ，結節はSM併用

の場合と比べて大きく，かつ数も少ない。胞隔肥厚は中等度である。

2） 脾の病変としては，SM・CPA 併用の場合は，細網細胞の増殖が強く，結節は少ない。濾胞の萎縮は弱い。CPA 単独投与の場合は結節がみられ細網細胞の増生が高度である。濾胞の萎縮は強い。CPA 非投与の場合は，SM 単独投与及び無処置の場合と同様，濾胞萎縮は高度で Reticulose が強い。またリンパ球形質細胞が増加し，多形核白血球浸潤が認められる。

3） 肝の病変には，併用投与，単独投与及び無処置のすべての場合に，ほとんど差が認められない。

考案及び総括

結核アレルギーが結核症の発症及び治癒，ひいては獲得抵抗といかなる関係にあるかを考察する目的で，ウサギの実験的結核症に対する Streptomycin（SM）による化学療法と細胞代謝阻害剤としての Cyclophosphamide（CPA）の併用がいかなる効果をもたらすかをいろいろな角度から研究した。

そのためまず実験Ⅰ及びⅡで結核死菌感作ウサギについて，CPA のツベルクリンアレルギー抑制効果，及び生体に対する影響を確かめ，その結果を基として，生菌感染に対する本剤の治療効果を検討し，あわせて死菌感作の場合の効果と比較してみた。

結果としてまずわかったことは，実験Ⅰ及びⅡの死菌感作の場合は，CPA 投与によってツ反応の出現はほとんど完全に抑制されるが，実験Ⅲ及びⅣの生菌感染の場合は同量あるいはそれ以上の CPA をもってしても，ツ反応の出現は発現時期が遷延されるだけで，完全には抑制されないということである。このことは CPA には抗菌作用はなく，結核生菌感染ウサギの体内ではたとえ CPA の投与を受けていても，感染に用いられた生菌は依然として増殖を続け得る事実からみて当然であろう。事実，生菌感染ウサギでは，CPA 投与により3ないし5週間はツ反応の発現は抑制されるが，その後ツ反応は出現しており，また臓器内生菌数は CPA 単独投与群で著明に多かったのである。

次にツ反応の経過をみると，実験Ⅲの生菌感染の場合，治療効果のあった SM・CPA 併用群の第1，2群及び SM 10mg/kg 単独投与群においてツ反応は，群ごとに程度の差はあったが，対照に比べて9週目まで上昇過程をたどった。これに反して治療効果のなかった対照群と SM 3 mg/kg 投与群においては，ツ反応は5週目で頂点に達し以後下降，CPA 単独投与群では同じく5週目に最高に達し以後平行線をたどった。

以上の実験事実は，前の3群においては結核病変が治療過程をたどったために，動物は反応能力を回復し，結果として，最後までツ反応が増強し，これに反して後の2群においては，結核病変が増悪の過程をたどったために動物は反応能力を消失し，いわゆる陰性アレルギーの状態に移行したため，最後にはツ反応が減弱したものと一応解釈できそうである。しかしながら，ほとんどすべての実験動物の体重が，群によってかなりの差はあったが，実験中期に下降し，後期に再び上昇しているところを考えると，この現象をあながち陰性アレルギーだけに帰するわけには行かないようである。おそらく対照群と治療効果が認められなかった SM 3 mg/kg 投与群においては，結核病変の増悪に伴う結核菌の過剰増殖を招来し，いわゆる抗原過剰の状態になり，これがツ反応の抑制に一役買ったものと考えざるを得ない。

生菌感染の実験Ⅳの CPA 非投与群は同じ生菌感染の実験Ⅲのそれとほぼ同一の傾向を示したが，CPA 投与群のツ反応は3ないし5週まで抑制され，7週あたりで頂点に達し，以後9週目で再び減弱した。

CPA 投与群のツ反応は実験Ⅲ，Ⅳを通じて同じ大きさでも硬結は著しく弱く，かろうじて触診し得る程度のものであった。したがって大きさのみでは正確な比較はできないのであるが，一旦発現したツ反応は CPA によって再び強い抑制を受けることはないように思われた。これを完全に抑制するには，対応する抗原を用いる脱感作操作が必要であることはすでに確かめられているところである[15]。このことから考えると，実験Ⅳの第1で示されたツ反応曲線が CPA の抑制効果の限界を示したものとして理解できよう。第2，3群におけるツ反応の極度の低下は実験Ⅲの場合と同様動物側の反応能力，及び抗体産生能の低下によるものと思われる。このことはとりもなおさず CPA が選択的に抗体産生細胞にのみ作用するものでないことを示すものであろう。

実験Ⅲでは CPA 12mg/kg，実験Ⅳではさらに多く 15 mg/kg を使用したのにもかかわらず，ツ反応は一般に実験Ⅳの方にやや強く出現した。このことはおそらく感染生菌量の差によるもので，実験Ⅳでは 1.0mg，実験Ⅲでは 0.8mg を感染したためで，CPA 投与量の差はこの場合重大な影響を与えなかったものと考えられる。事実 CPA 非投与群でも実験Ⅳの方が一般に強いツ反応を示した。

CPA 投与による体重減少は実験Ⅲ，Ⅳ双方にみられた。実験Ⅳでは動物は生菌感染後早いもので2週目，遅いもので5週目に死亡し，さらに全群にわたって体重減少がみられたが，死亡が比較的早期にあらわれ，しかも CPA 単独群で死亡例が多かったわけでないので，これを直ちに CPA の副作用とみるわけには行かないであろう。事実実験Ⅱの CPA 10mg/kg 連日投与の場合には白血

球減少は認められなかったし，また前田らもCPA 20mg/kg連日投与の場合，著明な白血球減少を認めていない。しかしCPAの毒性は単に白血球に対してのみあらわれるものでなく，他の機転も考えられているので，[16]結核症そのものの進展とCPA毒性との相加作用も考えられるところで，CPAによるツ反応抑制の過程を観察していると，その感を深くする。同時にまた実験ⅣでSM•CPA併用投与群（第1及び4群）に多くの死亡例が出たことは，SMの副作用とCPAの毒性の相加作用をも示唆するものではなかろうか。したがってウサギにおけるこの種の実験ではCPA 15mg/kg連日投与が限度であろうと考えられる。

次に病理組織学的所見であるが，実験終了時すなわち9週の所見について，今迄の諸家の報告を参考にしながら考察してみよう。

まず最も顕著な所見は肺にみられたが，CPA投与群と非投与群の差をみると，全体としてCPA非投与群では類上皮細胞及び単核細胞からなる中等度及び大結節がみられた。無処置の対照群では加えて壊死巣がみられたが，SM群にはみられなかった。ただし，リンパ球浸潤は双方にみられた。

これに反してCPA単独投与群では，大きな繁殖炎が結節状となり胞隔肥厚の形で病巣が拡がり，多形核白血球の浸潤がみられた。

CPA・SM併用群では定型的な結節はほとんどみられず，胞隔肥厚が強く，その一部は単に単核細胞の集積により小さな結節状を呈していた。またCPA非投与群とは対照的に双方にリンパ球の浸潤はみられなかった。

正常の動物が血行性に結核菌の感染を受けると，いわゆる急性結核性敗血症（Sepsis tuberculosa acutissima）をひきおこし，まず白血球性に反応する。[17]肺では細胞の変性，充血，線維性滲出及び白血球の浸潤が次々ひきおこされる。このような滲出炎についで増殖炎となるが，この増殖炎，すなわち結節の生じる機転は，Rösslerによれば〝通常ツ反応が陽転する時期に肉芽腫，すなわち結核結節を発生する〟といわれる。[18]Pagelは，正常動物が結核菌の感染を受けると，感染後10～20日で初めて結核結節を生ずるが，これに反し，高度のツ・アレルギーを持っている動物では，感染後すでに3日目に結節を生ずる事実を指摘し，この事実から結核結節は明らかに抗原抗体反応の結果として生ずる組織反応であると説いたが，この説は今日一般に認められている。そこで一般に結核症の治療にあたっては，上述のアレルギー反応の所産である結節形成や膠様線維化を抑制すれば，抗結核剤がよくよく病巣に滲透して，それによって結核症の治癒が促進されるというのが今日の定説である。

実験Ⅲ及びⅣのSM・CPA併用群においては，SM単独群に比べて胞隔肥厚が著るしく，リンパ球の浸潤がなく，定型的結節がきわめて少ないことはCPAによって結節形成が抑制された証拠であろう。事実CPA投与群においてはツ反応の出現は3週まで完全に抑制されており，その時期にはCPA単独群の臓器内生菌数は増加していたと推定されるが，アレルギーの発生が抑制されていたため，この時期に投与開始したSMの効果が最大限発揮されて，結核結節の形成とアレルギーの発生が極度に抑えられたものと考える。

現在結核症に対するステロイドホルモンの単独投与は禁忌とされているが，これを抗結核剤と併用すると，用い方によっては，抗結核剤単独投与より，さらに良好な治療効果が得られるとされているが，この両薬剤の関係も上述のSM及びCPA投与の関係と軌を1つにするものであろう。

1960年，小杉[19]はウサギの実験的結核症においてステロイドホルモン剤単独投与は結節の形成を著明に障害し，さらに滲出現象及び類上皮細胞の出現を抑制したが，ス剤とINHの併用投与は，INH単独投与より病巣を著しく改善したと報告し，その改善機転をス剤のアレルギー抑制効果に帰した。

それならば本研究においてCPA単独投与の場合何故あのような著明な繁殖炎様増殖及び多数の大きな結節が認められたのであろうか。

実験ⅣではCPA単独投与の場合，ツ反応の出現は5週目まで確かに抑制されたが，7週目からは急に強いツ反がみられた。このことは急増する結核菌による抗体産生に対してCPAがもはや抗しきれなくなった証拠で，結核菌はこの時期にむしろ反動的に増殖したと推定出来る。すなわちCPAの抑制作用によって生体のアレルギー状態が弱かったために病巣の繁殖炎は胞隔肥厚の形で拡がったと考えられる。多形核白血球の滲出，リンパ球の欠如等は病巣の新鮮さを示すものであろう。すなわちCPA投与によってアレルギー状態の形成が遅延するものと解釈され，このことはいわば弱いプレドニン様効果とみて差支えないと思われる。

膠様線維形成については，動物の結核症では線維形成はほとんどみられないとされているので今回の実験ではCPAが線維芽細胞を抑制するか否かについては言及できない。

丸谷ら[20]は，同じく代謝阻害剤である6-mercaptopurineの作用を生菌感染のマウスについて6週にわたりしらべたところ，結核結節の形成が抑制され，臓器内生菌数は増加するというプレドニン様効果があると報告している。また併用抗結核剤としてはSMより組織滲透性の高

い INH を用いた為か，臓器生菌数の定量培養はできなかったという。この実験事実から見ると 6-MP も CPA も同様な作用を持っていると考えられ，これら代謝阻害剤と抗結核剤との併用効果は充分期待できるところである。

血中抗体については，それぞれ Middlebrook-Dubos 反応，Boyden 反応及び高橋反応を用いて，多糖体抗体，蛋白抗体及び燐脂質抗体をしらべた。実験Ⅲの CPA12mg/kg 投与群ではこれら血中抗体の抑制が比較的軽度で，これに反してツ反応はかなり抑制された。実験Ⅳの CPA 15mg/kg 投与群ではこれとは逆で血中抗体の方が比較的強く抑制された。これら血中抗体が直接結核の獲得免疫に関与しているという証拠はないが，CPA がツ・アレルギーの発現と同時に抗体産生をも抑制する事実から考えると，本薬剤は獲得抵抗としての〝免疫〟の発現をも抑制するのではないかという疑問が当然生じて来る。

この点に関し丸谷ら[20]は，結核死菌で感作したマウスに感作前より 6-MP を投与してツ・アレルギーを抑制しておき感作後 1～2 週目に結核生菌で感染させ，結節形成と臓器内生菌数をしらべたところ，むしろ僅かながら免疫効果の増強を認め，6-MP はマウスに対する結核死菌感作の免疫効果を抑制しないと報告している。

6-MP及びCPAはいずれも細胞代謝阻害剤で，類似の作用を有するものと考えられるから，CPA もある限度内の使用によってはツ・アレルギーの発来を抑制しても免疫は抑制しないという可能性は充分あり得ると考えられる。しかし CPA を用いてのこの点に関する詳細な研究は将来にまたねばならない。

結　　論

実験Ⅰ　結核死菌H37Rv10mgを Arlacel-Drackeol アジュバントに混じてウサギに筋注，同時に感作前日より Cyclophosphamide (CPA)15mg/kgを連日11週投与して，次の結果が得られた。

① ツベルクリン皮内反応は完全に抑制されたが血中抗体の抑制は軽度であった。

② CPA の副作用として体重減少が著明であった。

実験Ⅱ　実験Ⅰと同様にして得られた感作ウサギに対し CPA pro kilo 4 mg，6 mg，8 mg，10mg をそれぞれ7週間投与して，次の結果が得られた。

① ツ反応は CPA10mg/kg投与の場合，顕著に抑制されたが完全ではなかった。CPA 8mg以下の場合は抑制効果は軽度になり，投与量に比例して抑制効果も減弱した。

② 血中抗体はこの程度の CPA 投与量ではほとんど影響を受けなかった。

③ また体重，白血球に対する影響もほとんど認められなかった。

実験Ⅲ　ウシ型結核生菌三輪株0.8 mgを耳静脈より感染したウサギに，感染前日より CPA12mg/kgを連日投与し，あるものには3週後よりSM10mg及び3 mg/kgを6週にわたって併用投与して，CPA 及びSM単独及び両者併用の効果を調べ次の結果が得られた。

① ツ反応は3週までは完全に抑制されたが，以後は除々に出現した。

② 血中抗体への影響はわずかであった。

③ CPA 12mg/kg連日投与はさほどの体重減少を来さなかった。

④ SM10mg/kgとCPAとの併用は，SM10mg/kg単独投与よりよりよい治療効果を示し，肺の肉眼的病変を軽減させ，肺内生菌数を減少させた。またSM 3 mg/kgと CPA との併用の場合でも，SM 3 mg/kgが有効量以下であったにもかかわらず，SM10mg/kg単独投与の場合に匹敵するか，あるいはそれ以上の治療効果を示した。

⑤ CPA 単独投与は結核病変を却って悪化させた。

実験Ⅳ　ウシ型結核生菌三輪株1 mgを耳静脈より感染したウサギに CPA15mg/kgを感染前日より9週連日投与し，あるものには感染後3週よりSM10mgまたは3 mg/kgを6週間連日投与して，単独併用の効果を肉眼的病理組織学的に比較検討した。

① ツ反応は，3ないし5週まで完全に抑制されたが，以後は除々に出現した。しかし無処置対照群に比べると明らかに弱かった。

② 血中抗体は実験Ⅲの場合より強く抑制された。

③ CPA 15mg/kg連日投与は結核ウサギの体重を著明に減少させた。

④ 併用効果は実験Ⅲの場合と同様であった。

⑤ 病理組織学的には，SM 併用群の肺では結節が小さくまた極めて少なく，リンパ球の浸潤もなかった。このことは，CPA 投与3週ないし5週目までアレルギーの発生が抑制されたため結節形成が阻害され，逆に SM の組織滲透を容易ならしめて，その結果良好な治療効果があがったことを示すものである。すなわち CPA のプレドニン様効果と考えられる。

文　　献

1) Thomsen, O. : Zeitschrift f. Immunitätsfors., **26**, 213, 1917.
2) Hektoen, L. et al : J. Infect. Dis., **28**, 279, 1921.
3) Hoyer, J.R. et al : J. Exp. Med., **116**, 679, 1962.
4) Borel, Y. et al : J. Immunol., **92**, 754, 1964.
5) Friedman, R.M. et al, : J. Immunol., **91**, 846, 1963.

6) Maguire et al : J. Investig. Dermat., **37**, 427, 1961.
7) Turk, J.L. : Int. Arch. Allergy, **24**, 191, 1964.
8) Berenbaum, M.C. : Nature, 200, 94, 1963.
9) 前田和夫，他：医学と生物学，73，53，1966.
10) Orris, L. et al : Fed. proc. **10**, 231, 1951.
11) Grabar, P. et al : Ⅱnd International Symposium on Immunolopathology, Benno Schwabe, Basel, **385**, 1962.
12) Rotti, J.M. : Biochem. J., **63**, 300, 1956.
13) Holzer, H. und Kröger, H. : Biochem. Z., **330**, 579, 1958.
14) Brock, N. : Ⅱnd International Symposium of Chemotherapy, Naples, 1961.
15) 前田和夫：結核の研究，第23，24集，1966.
16) Druckrey, H. : Arzneimittelforsch., **7**, 449, 1957.
17) Lewandowsky : Münch. med. Wsch., **961**, 1910.
18) Pagel : Z. gesamt Exp. Med., **77**, 396, 1931.
19) 小杉秀之進：結核の研究，**12**，140，1959.
20) 丸谷竜司：第16回日本結核病学会北海道地方会，1968.
21) Takahashi, Y., Fujita, S. and Sasaki, A. : J. Exp. Med., **113**, 1141, 1961.