

ストレプトマイシン耐性結核菌による海狸の重感染実験

主として体内菌の消長から見た初感染より後感染迄の
期間と免疫との関係について

慶応義塾大学医学部細菌学教室 (主任 牛場大蔵教授)

阿部逸夫・小沢 敦・遠藤 武・草間久子

(昭和 28 年 4 月 14 日受付)

(本論文の要旨は昭和 27 年 11 月第 7 回日本細菌学会関東支部総会において報告した)

結核症において、既に結核に感染している個体が、結核菌の重感染に対して免疫となつているということは、Koch¹⁾以来よく知られた事実であるが、この場合後感染菌としてストレプトマイシン (SM と略) 耐性結核菌を使用すれば、この SM 耐性という特性によつて感染菌の体内における増殖及び散布の状態を容易に知ることが出来る。我々は昭和 25 年以来 SM 耐性結核菌を使用して海狸の重感染実験を行つて来ているが、ここでは初感染から後感染迄の期間と免疫との関係を主として臓器内結核菌の定量培養によつて検討した。

実験材料及び方法

使用動物： 体重 300—400g のツベルクリン皮内反応 (以下ツ・反応と略) 陰性の健康海狸を使用した。

使用菌株： 初感染には予研より分与された弱毒人型菌 H37 株、後感染には SM に対し 1000 γ /ml 以上の耐性を有する有毒結核菌中野株を使用した。これは患者の尿から分離され、分離後約 3 年を経過したものである。

菌液は瑪瑙乳鉢を使用し、法に従つて所要の濃度の生理的食塩水浮游液とした。

定量培養による生菌推定数は初感染菌 H37 株では、その時によつて多少の変動があつたが 1mg 中約 1000 万—4000 万であり、中野株は約 300 万個であつた。

実験は全体を 7 群に分ち、第 1—6 群は前処置群であつて、後感染前それぞれ 8、4、3、2、1 週及び直前に H37 株 0.1mg (0.5ml) を左大腿皮下に接種し (これらをそれぞれ 8 週、4 週、3 週、2 週、1 週、直前群と略)、第 7 群は無処置対照群とした。

後感染は全群同時に行い、中野株 0.01mg (0.5ml) を反対側の右側大腿皮下に接種した。

後感染に先立ち、各群 2 匹宛屠殺して H37 株の保菌状態を検査し、残り全部にツ・反応を行つた。ツ・反応は全部 100 倍旧ツベルクリン (北研) を使用し、その 0.1ml を皮内に注射し、判定は 24 時間後に行い、その硬結の大きさを mm で現わした。

後感染後は臨床的症状に注意し乍ら、定期的に体重測定とツ・反応とを行い、後感染後 2、4、9、17 週に各群 2 匹宛エーテルで屠殺剖検し、主要臓器組織の定量培養をほぼ小川²⁾の方法に従つて行つた。この場合 SM

を 100 γ /ml の割合に含む培地と、含まない培地を併用したが、SM (+) 培地に発育したものは SM 耐性の中野株と見なすことが出来、SM (+) 培地に発育しないで SM (-) 培地のみに発育したものは SM 感受性の H37 株と見なし得るわけである。然しこの方法では SM 感受性株を積極的に証明することは出来ない。

実験成績

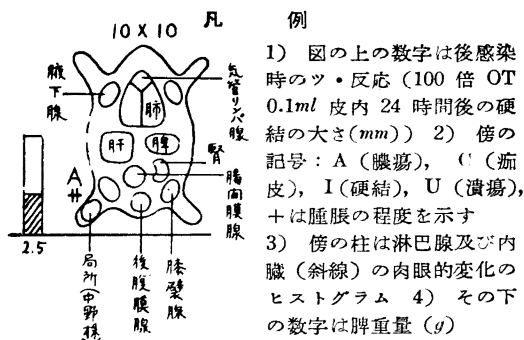
1) 中野株感染時における各群の屠殺海狸の H37 株保菌状態は、H37 株接種後直ちに屠殺したものでは局所にのみ菌を認めたが、1 週群では更に局所淋巴腺にも少数の菌を認めた。2 週群になると局所淋巴腺の菌は増加し、更に上位の淋巴腺や脾にも少数ながら菌を認めた。3 週以上経過した群もほぼ同様の菌分布を示したが、ただ期間が長くなるに従つて局所及び局所淋巴腺の菌数が減少していた。

2) 後感染時におけるツ・反応の結果は、第 1—4 図に示す通りで、処置期間 1 週以内では全部陰性、2—3 週では不定であり、4 週以上ではすべて陽転していた。

3) 後感染後 2 週で屠殺した群の成績は第 1 図 (図の説明は凡例に示した) に示す通りで、まず後感染菌中野株の分布を見ると、対照群においても限局されていて、未だ菌の侵入増殖が軽度であることを示している。前処置群では対照群の侵入増殖が軽度なために、余り著明な差を認めることが出来なかつたが、後感染菌の侵入増殖が幾らか遅延せしめられており、それも処置期間の長いもの程その程度が大であるように思われた。

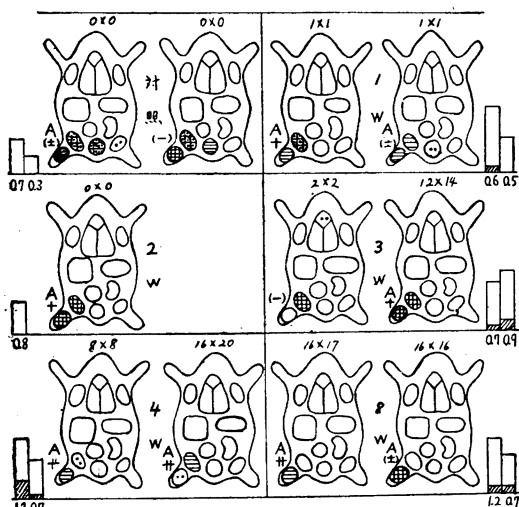
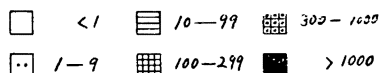
剖検時の肉眼的変化のヒストグラムや脾の重量を見ると、対照より前処置群の方が却つて病変が高度ということになるが、これは初感染菌 H37 株による変化が重なつている為であろう。

なお図には示さなかつたが、SM (+) 培地に発育しないで SM (-) 培地にのみ発育した菌即ち H37 株の分布を見ると、1 週群 (H37 株感染より 3 週経過) では初感染局所及びその局所淋巴腺に多数の菌を認め、その他の臓器組織にも多少の菌を認めた。2—8 週群にも同様の H37 株の分布を見たが、一般的にいつて菌数が減



第1図 後感染2週後の中野株体内分布

(各臓器 1mg 中の生菌単位)

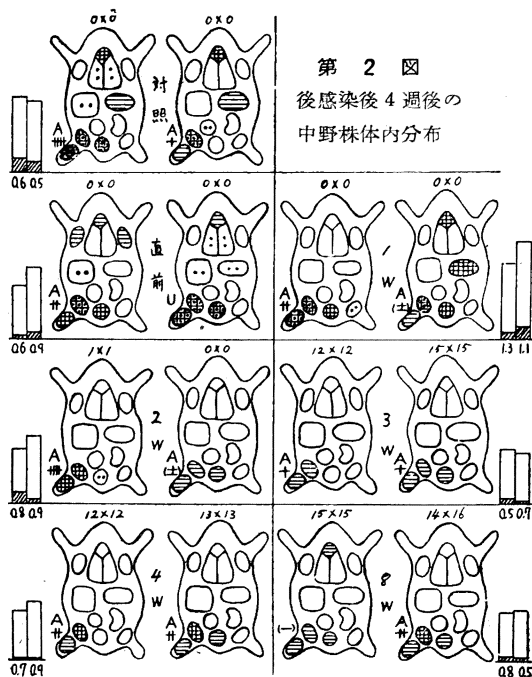


少していた。

4) 後感染後4週で屠殺した群の成績は、第2図に示す通りであつて、まず中野株の分布を見ると、対照ではこの時期になると淋巴腺の他、肺・肝・脾の内臓にも菌が認められている。直前群では対照との間に差は認めにくい。1週群中の1例及び2週群以下はすべて後腹膜淋巴腺造は菌を認めるが、それより上位の淋巴腺や内臓には菌が殆んど認められなかつた。なお4週群の1例は局所淋巴腺造で菌が止つていた。

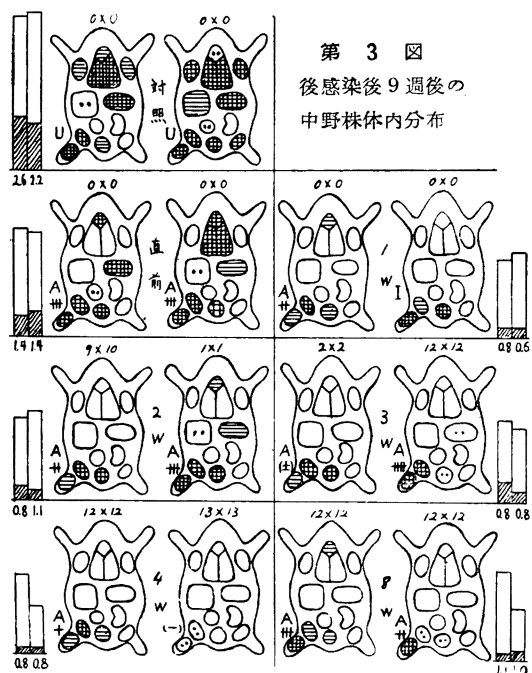
この時期の臓器組織の肉眼的変化は、前処置群の処置期間の長いものでは対照より僅か乍ら軽度であり、処置期間の短いものでは却つて高度となつているものがあつたが、それらの例では中野株の撒布増殖の阻止が認められなかつた。又局所の変化は膿瘍乃至潰瘍形成が見られたがその程度と体内菌分布とは必ずしも平行しなかつた。

H 37 株の分布を見ると、各群共初感染局所及びその局所リン腺にはなお多数の菌を認めたが、それも 8 週群となると菌数が非常に少なくなっていた。その他のリン腺・臓器における菌数はずっと少なくなっていて、時々



少数の菌があちこちに認められたり、認められなかつたりする程度であつた。又中野株の分布の広汎な例ではこれに覆われてH37株の分布を知ることは出来なかつた。

5) 後感染後9週で屠殺した群(第3区)では、対照



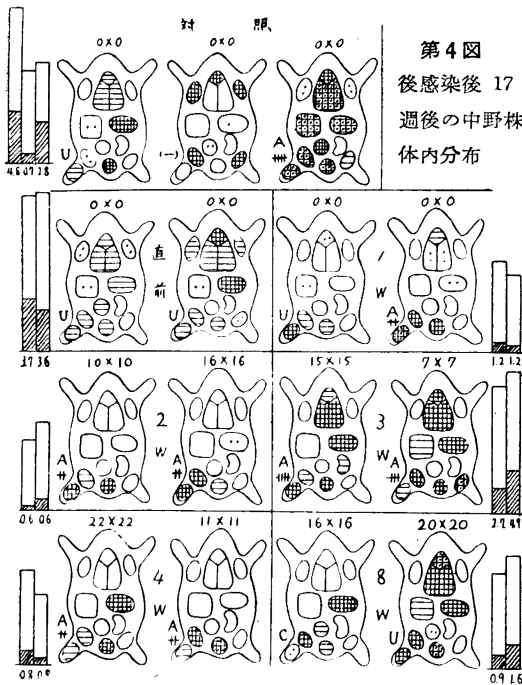
群における中野株の撒布増殖及び肉眼的所見が高度となっていることが目につく。中野株は殆んどあらゆる臓器組織に相当数に認められた。直前群の1例はやや分布の範囲が対照より狭くなっていたが、他の1例では対照と殆んど差がなかった。1週群以下は対照に比してかなり

菌の撒布増殖が阻止されていることが窺われた。即ち多くは後腹膜淋巴腺で止つていたが、中に2, 3その他の遠隔淋巴腺や内臓に散発的に少数乍ら菌を認めるものがあつた。

臓器の肉眼的所見もこの時期になると、前処置群の方が断然軽度であることが分る。脾も対照ではやや大きくなつていた。

この時期の H37 株の分布は一般に非常に少数の臓器組織に限られ、その数も少なく、8週群では初感染局所にも菌を認め得なかつた。中野株の分布の広いものでは4週屠殺群と同様 H37 株の分布は不明であつた。

6) 後感染後 17 週で屠殺した群(第4図)では、体内の中野株の分布を見ると、対照群は9週屠殺に比べるとやや菌数が減少している傾向にあるが、個体によつては広範囲に多数の菌を認めた。前処置群と対照との差はこれ迄はつきりしなくなつてきているが、一般的にいつて前処置群に菌の侵入増殖が阻止されている傾向は認められる。但し直前群は対照との差がなく、又或程度の処置期間を有するものでも、3週群や8週群の1例の如く対照と殆んど同様の菌分布を示し、個体によつては菌の侵入増殖阻止力が打破されていることを示していた。



第4図
後感染後 17
週後の中野株
体内分布

臓器組織の肉眼的変化もヒストグラムで見られるように、大体中野株の分布が広く増殖の著しいものに変化が強く、脾の重量も大きくなつていた。

H 37 株の分布は、この時期には中野株の分布が広い為、SM (−) 培地に発育して SM (+) 培地に発育しないものは殆んどなく、従つてこの時期に H37 株がどのような分布を示したかは不明であつた。ただ、SM

(+), (−) の両培地に発生した集落数の差が殆んどないことや、H 37 株のみを感染させ 17 週迄色々な時期に屠殺した例では、体内の H37 株は3週を頂点として漸次減少し、17週では殆んど認めることが出来なかつたことを考えると、たとえ H37 株が存在するとしても取るに足らぬ数であつたと想像される。

7) 後感染による局所及び局所淋巴腺の変化を経過を追つて観察した結果は、一般的にいつて、対照群・直前群・1週群・2週群では 10—14 日で局所に腫脹硬結を認めるようになり、対照群及び直前群の殆んど全部と1週群の約半数のものでは3—4週でそれが潰瘍となり、多くはその儘治癒することにはなかつたが、時に痂皮を形成しやがて治癒してしまうものがあつた(対照群の17週屠殺の1例がそれであつた)。3週、4週、8週群では局所の腫脹硬結は以上の群よりやや早く、やや高度に現われる傾向にあつて、5—7日で認められたが、潰瘍を形成するものは殆んどなく、8週群の 17 週屠殺の1例のみ 15 週になつて潰瘍を認めた。潰瘍の程度は前処置群の処置期間の長いものでも、後感染後時日の経過と共に増大していくものが多かつたが、中には腫脹が間もなく消失するものや、非常に軽度のものもあつた。

後感染局所淋巴腺の変化は後感染後3—4週になると殆んど全部のものに腫脹が認められ、概して局所の変化より一層各群の間に差を認め難かつたが、前処置の期間が2週以上の群では、腫脹の発現がやや後れる傾向にあり、又全経過を通じて腫脹の程度が軽度であつた。然しこれらの群も 17 週頃になると個体によつてかなり著明な腫脹を来とし、各群の間に差を認め難くなつていた。

総括及び考案

以上の成績を総括して見ると、まず対照群では感染後2週では未だすべての点で軽度の変化しか現れていなかったが、時日の経過と共に増強していつた。然し全観察期間中病変の為に死亡した例はなかつた。

これに対し前処置群の中、直前群はほぼ対照と同様の経過を辿つたものと見ていいと思うが、少なくとも前処置によつて中野株による病変が高度になつたと思われる所見は見当らなかつた。ここで一寸興味あると思つたことは、H 37 株のみの感染をうけたものに比して、H 37 株接種局所の変化が強く現われたことである。即ち H 37 株のみを感染させた群では局所に潰瘍を形成するものがあつたが、何れも6—7週で完全に治癒してしまい、局所淋巴腺も腫脹を認めたが、10 週を過ぎる頃には殆んど触れなくなつていた。これに反して H37株 感染後直ちに中野株を感染させた海狸においては、局所淋巴腺については特筆すべきことはなかつたが、H37 株接種局所の変化は、やや後れて現れその後次第に増大して、17週では豌豆大乃至大豆大の腫脹を認め、又1例では潰瘍を形成していた。又他の1例では局所は完全に治癒し

ていた代りに、局所淋巴腺が高度に腫脹し、剖検時乾酪化していることが認められた。これで見ると、H37株感染後直ちに中野株を感染させた例では、局所の変化に関する限りH37株による変化がより高度に現れるような印象を与えた。

次に1週群では後感染時未だツ・反応が陰性であつたが、対照に比して中野株の撒布増殖が制約されていることが認められ、特に4週屠殺の1例及び9週屠殺例において著明であつた。

両感染の間隔が2週以上の群ではそれが一層著明で多くは局所から後腹膜淋巴腺迄で後感染菌が止まつたが、個体によつては時々この増殖阻止力が破れて、上位の淋巴腺や内臓に迄菌を認めるものがあつた。しかしこれも対照に比すればごく軽微であつた。然し後感染後17週屠殺群では特に3週群と8週群において、対照と殆んど変らない程の菌の分布状態を示しており、前処置群と対照群との差がこれ迄程明らかとなつていない。これは個体差の爲と思われるが、一面前処置による免疫力も比較的のものであつて、個体差に打克つ程強力なものではないと考えられる。

臓器組織の肉眼的変化についても、後感染後比較的前期(2週)では初感染菌H37株による変化が重なつている為と、中野株による変化が未だ軽微である為に、対照の方が却つて変化が少ないように見えたが、時日の経過と共に対照群の変化は高度となり、前処置群との間に差が生じ、前処置によつて免疫が出来ていることが窺われた。又体内菌の分布も、SM(一)培地に発育した菌で見ると、後感染後初期には前処置群の方が分布が広く、それが初感染・後感染いずれに由来する菌か不明な為に、肉眼的変化と同様に後感染後初期における前処置群の免疫の状態を知ることが出来ない。ここにSM耐性菌を使用した意義があると思われる。

次にツ・反応と上記の後感染菌の体内侵入増殖との関係を見ると、処置期間2週以上のツ・反応陽性のものは、よく菌の撒布増殖を阻止していたが、処置期間2週以内のツ・反応陰性のものの中にもそれに劣らぬ阻止力を示したものがあつた。又17週屠殺群の中ではツ・反応陽性の3週、8週群のものより却つてツ・反応陰性の1週群の中で阻止力が著明に現れていたものがあつた。即ちツ・反応と免疫との間に直接の関係は見られなかつた。

又局所と局所淋巴腺の変化は、前処置を受けたものでツ・反応陽性のもの(多くは処置期間3週以上のもの)では、対照に比して幾らか早期にやや強く局所の反応が現れたが、局所淋巴腺はいずれも殆んど全例に腫脹を認め、所謂Koeh現象は余り定型的には見られなかつた。これは毒力・菌量が適当でなかつた為であろうか。

結核症の重感染に関する研究はKoeh¹⁾、Römer³⁾以來広く行われて来たが、これ迄の実験では多くは病変や

体内の菌消長によつて免疫を論じたので、初感染による病変と後感染による変化とが重なり合つて判定に困難を生じ、又体内の菌も初感染菌と後感染菌との和であつて、後感染菌の侵入増殖の様相を直接追跡することは出来なかつた。この場合後感染菌に何らかの標識があればよいわけであるが、結核菌においては人型・牛型の区別は簡単でなく、鳥型菌を人・牛型菌の免疫実験に使用することにも無理がある。この場合SM耐性結核菌を使用すれば、SM耐性という特性の外は任意の性状を有する結核菌を用いることが出来、しかもSM含有培地を使用することによつて容易に鑑別することが出来る。この場合問題となるのはSM耐性復帰の問題であるが、一般に高度の耐性を有するものは継代によつても動物通過によつても感受性となり難いと云われているが、菌株によつては耐性の不安定な場合もあるという⁴⁾。我々の使用した中野株は1000γ/ml以上の高度の耐性を有し、3年の継代によつてもなおその耐性を保持していたから、この株の耐性は安定なものと考えられる。

このSM耐性菌を利用する実験的結核症の免疫実験は大里^{5),6)}、伊東⁷⁾、堀本⁸⁾、Curei & Marzou⁹⁾らの報告があるが、我々もこの実験に対する予備実験としてSM感受性菌H37株を海狸の皮下に感染させ、約5週後SM耐性菌中野株を反対側皮下に感染させた時の中野株の分布を追究した¹⁰⁾、後感染菌中野株は局所及び局所淋巴腺で止められるが、時に更に上位の腸間膜淋巴腺に迄菌が認められたが、これはほぼ大里⁵⁾の報告と一致し、菌量によつては後感染菌が前処置による免疫抵抗性を打破つて遠隔の組織に迄侵入していくことを示したものである。ついで初感染をH37株で海狸の皮下、腹腔内、気管内に行い、約4週後SM耐性菌中野株で気管内に重感染を行つた¹¹⁾が、この場合やはり肺及び気管淋巴腺のみならずその他の臓器組織に相当数のSM耐性菌が認められたが、対照に比すればその程度はずつと軽度で相対的免疫を有していることが分つた。この場合伊東⁷⁾の報告と異り初感染経路が異つてもすべて肺には乾酪性変化を生じ、ただその程度が異なるという量的の差しか認められず、又免疫力も伊東とは逆に気管内前処置群が最も大であつた。以上の実験は何れも初感染後一定の時日を経過し、ツ・反応が陽性となつてからの実験であるが、この実験では初感染から後感染迄の期間を中心として実験を進めた。

生菌免疫における免疫処置期間に関しては、当教室において実験的チフス症の免疫についてこの問題が取上げられ、堀¹²⁾、中井¹³⁾、牛場¹⁴⁾らによつて家兎対豚コレラ菌においては初感染後3—5日で既に相当程度の免疫が得られたと報告され、更に牛場¹⁵⁾はマウス対ゲルトネル菌においては5日で或程度の免疫を認めたが、家兎におけるより程度が弱かつたと報告している。

結核症に関しては古く Debré & Bonnet¹⁶⁾が海狸において Koch 現象を時期的に追試して、定型的なものを見るのには約1カ月を要するが、10日で既に軽度の Koch 現象を認めている。BCG に関しては、細沼¹⁷⁾は海狸に BCG を接種後2, 15, 25, 30 週たつて人型有毒結核菌を感染させて、BCG 接種後2週の未だツ・反応の陽性に揃わない時期にも感染防禦力のあることを見ている。又有馬・山本は BCG 5mg では1週で既に明らかな免疫効果を見たといひ、更に BCG を感染菌と同時にさしても、BCG が一定量以上であれば、これを感染菌と混合¹⁸⁾してさしても、別々¹⁹⁾の場所にさしても免疫効果が見られたと報告している。この種々実験を SM 耐性菌を使用して行つた Curei & Marzo⁹⁾は有毒結核菌を初感染させた後12日の前アレルギー期に、SM 耐性結核菌を再接種し免疫効果を認めたといつている。これらの実験は何れも結核菌に感染すると10日前後で感染防禦能が現れて来ることを示しているが、我々の実験でも1週間にかかる効果を認めることが出来た。ただ有馬^{18), 19)}は同時接種によつても BCG の効果を認めているが、我々の実験では少なくとも後感染菌による経過を増悪させることはないといへても免疫効果ありとはいへぬ成績であつた。又前述したように同時接種によつて前処置菌による変化を増悪する可能性が見られたが、この点はおもに実験を重ねる必要があると思う。

先に発表したマウスにおける BCG の免疫実験²⁰⁾では、前処置後2週で初めて効果が現れ、4週迄は週を追つて免疫力が強くなつていくことを認めたが、海狸における本実験では、免疫処置期間1週でも既に効果を認め、免疫処置期間が長くなつても感染防禦能はそれ程著しく増強せず、2週以上は殆んど変らなかつた。即ちマウスでは海狸における程早期の免疫は著明でなく、牛場^{14), 15)}のサルモネラにおけるマウスと家兎との関係の思ひをさせた。

最後にツ・反応と免疫の問題に少しく触れて見たい。結核症におけるアレルギーと免疫との関係については、Koch 現象以来非常に多くの議論がなされているが、Römer²¹⁾, Hamburger²²⁾らのアレルギーと免疫を不離のものと考え一派と、Rich²³⁾を代表とするアレルギーと免疫とは切り離しうるものであるという一派とがある。ここに述べた実験成績から、結核のアレルギーと免疫との問題に解決を与えようとは勿論考えていないが、ここでは結核免疫と結核アレルギーの中、特にツ・反応のみとの関係について考えて見よう。細沼¹⁷⁾は BCG 接種後、感染防禦能がツ・反応の陽転と共に次第に現れ、ツ・反応の強くなるに従つて増大し、ツ・反応が減弱すると共に減弱するといつて、ツ・反応と感染防禦能がよく平行すると述べているが、Curei & Marzo⁹⁾は免疫はツ・アレルギーに先行し免疫とツ・アレルギーは同じで

ないといつている。我々の実験からは、少なくともツ・反応(但し100倍旧ツベルクリン使用)の未だ出現しない初感染後1週でも既に感染防禦能が存していたということだけはいえると思う。

結 論

1) 結核感染海狸は次に来る結核菌の重感染に対し免疫となり、感染菌の体内における散布増殖を阻止するものであるが、その阻止力は相対的のものであり、又観察期間が長くなるに従つてその阻止力が失われてくるものがある。

2) 未だツ・反応の陽転しない初感染後1週でも相当程度の感染菌散布増殖阻止を示し、2週後では更に強力な阻止力を示したが、それ以上経過してもその能力は余り増強しないようである。

本研究は文部省科学研究費によつた。ここに謝意を表する。終りに御指導・御校閲を賜つた恩師牛場教授に謹謝する。

文 献

- 1) Koch, R.: Dtsch. med. Wschr., 17: 101, 1891.
- 2) 小川辰次: 結核, 24 (2): 19, 昭 24.
- 3) Römer, P. H.: Beitr. Kl. Tuberk., 11: 79, 1908; 13: 1, 1909; 17: 281, 1910.
- 4) 小川辰次: 日本臨床結核, 9: 221, 昭 25.
- 5) 大里俊吾他: (抄録) 結核, 26: 528, 昭 26.
- 6) 大里俊吾他: (抄録) 結核, 27: 546, 昭 27.
- 7) 伊東健: (抄録) 結核, 27: 547, 昭 27.
- 8) 堀本清治郎: (追加) 結核, 26: 529, 昭 26; 27: 547, 昭 27.
- 9) Curei, G., & Marzo, R.: 結核文献の抄録速報, 3: 507, 1952.
- 10) 阿部逸夫: 慶応医学例会, 昭 26, 12.
- 11) 阿部逸夫・草間久子: 第6回日本細菌学会関東支部総会, 昭 27, 6.
- 12) 堀道紀: 細菌学雑誌, 483 号, 313, 昭 11.
- 13) 中井憲一: 細菌学雑誌, 538 号, 785, 昭 15.
- 14) 牛場大蔵: 細菌学雑誌, 524 号, 632, 昭 14.
- 15) 牛場大蔵: 細菌学雑誌, 537 号, 741, 昭 15.
- 16) Debré, R., & Bonnet, H.: C. R. Soc. de Biol., 87: 449, 1922.
- 17) 細沼栄一: 結核, 22 (7, 8): 1, 昭 22.
- 18) 有馬純・山本健一: (抄録) 結核, 26: 501, 昭 26.
- 19) 有馬純他: (抄録) 結核, 27: 535, 昭 27.
- 20) 阿部逸夫: 結核, 28: 423—427, 昭 28.
- 21) Römer, P. H.: Beitr. Kl. Tuberk., 11: 79, 1908.
- 22) Hamburger, F.: Beitr. Kl. Tuberk., 12: 259, 1909.
- 23) 武田勝男: アレルギーと結核, 昭 19, 東西医学社.