

# てんじくねずみにおける Streptomycin 依存性結核菌の 病原性と Streptomycin 投与の関連について

## 第 1 報

橋本達一郎・関根修  
小河秀正・江頭靖之

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳沢 謙)

国立予防衛生研究所病理部 (部長 江頭靖之)

受付 昭和 31 年 10 月 3 日

Streptomycin (SM) 依存性結核菌 18-b 株は、1951 年強毒人型結核菌 H<sub>2</sub> 株から分離されて以来<sup>1)2)</sup>、SM 含有 Kirchner 寒天培地に継代されているが、その間第 11、25、35 代の逆変異率はそれぞれ  $1:4.8 \times 10^6$ 、 $1:4.3 \times 10^6$ 、 $1:5.8 \times 10^6$  を示し<sup>3)</sup>、極めて安定な変異菌と思われる。この菌について、てんじくねずみには皮下、静脈内、脳内の各接種経路から、また、はつかねずみに対しては腹腔内、静脈内の各接種法により菌力試験が行われたが全く菌力のないことが証明されている<sup>4)5)</sup>。

この菌力喪失の主因は SM 依存性のためと考えられ、18-b 株感染後充分量の SM を投与した場合には菌の増殖と病変の発現があることが認められている<sup>4)5)</sup>。

ここに報告する実験では、てんじくねずみに大量の SM を長期間投与した場合または一定期間投与後中止した場合に、臓器内において感染 18-b 株の示す動態がもとの強毒菌に比し、いかなる変化を示すか、病原性の発現、消長はいかなる様相をおびるであろうかを見ようとした。実験は次にのべる二つの意図の下に行われた。一つは SM という生体には存在しない物質を要求する結核菌の生体内の動きを SM 投与の有無と関連させて把握し、これから菌をとりかこむ宿主側の機能や環境の変化を推定したり、一般の栄養要求変異結核菌を用いて病巣の生化学的環境を分析する場合の足場にしようとする意図である。第二は SM 投与によつて 18-b がつくつた種々の結核性病変が、SM 投与を中止した場合にいかなる運命をとるかを組織学的にしらべ、結核病巣の治癒過程についての知見を補遺しようとした。

### 実験方法

接種菌：強毒人型結核菌 H<sub>2</sub> 株の SM 依存性変異菌 18-b 株、これは SM 200 $\gamma$ /ml 含有 Kirchner 寒天培養の凍結乾燥菌 (分離第 27 代) である。

接種対象および接種方法：体重 400g 前後のてんじくねずみの足静脈内に 18-b 株の 0.01mg (0.4ml, 生菌数：

$29 \times 10^4$ ) を注射。

SM 投与方法：Dihydro-Streptomycin の 200mg/ml 溶液を 1 日 1 回 0.5ml ずつ腹部皮下に注射。動物は 3 群に分け、第 1 群は各動物に対し SM 100mg/日 で連日 4 週間注射し、以後 SM を投与せずに 16 週まで放置。第 2 群は第 1 群と同じ SM 投与方法で連日 16 週間継続。第 3 群は全く SM を投与せず。SM の投与は菌接種と同時に始め、その投与量は pure base 相当量で示してある。

剖検および培養：各群の動物は SM 投与および菌接種後、1 日、3、4、5、6、8、10、12、14、16 週の各時期に 2～3 匹ずつ屠殺剖検し、内臓の結核性病変を観察した後、肺、肝、脾を定量的に培養し各臓器 10mg 中の生菌数を決定した。培養には SM 200 $\gamma$ /ml 含有 Kirchner 寒天培地と、SM を含まぬ小川培地を併用したが全実験を通じて小川培地からは集落を検出できなかったため、生菌数はすべて SM 依存性菌のそれとみなされる。

組織学的検索：主要臓器およびリンパ腺、骨髄は直ちにホルマリンで固定し、ヘマトキシリン-エオジン染色、鍍銀染色、菌染色 (Ziehl-Neelsen 法) を行つて、鏡検した。

### 実験成績

#### I. 臓器中の生菌および肉眼的病変の消長

各実験群の動物の各臓器 10mg 中の SM 依存性結核菌の消長は表に示す通りである。SM を 4 週間連日投与して以後中止した群についてみると 3 週目には各臓器とも、菌数が増加しており、脾が最も多いが、増加率はむしろ肺の方がやや大きい。しかし SM の投与は 4 週まで続けられたにもかかわらず、4 週目には各臓器とも生菌数の減少が著しい。以後脾では 6 週目になるとほとんど生菌がなくなり、10 週以後は全く依存性菌が証明されない。肝もほぼ脾と同様な経過をとっている。ひとり肺ではその消長が異なり、他臓器にくらべて生菌がやや長く残存し、14、16 週目にも生菌を証明することができた。

てんじくねずみ各臓器10mg中のSM依存性結核菌の消長

臓器別	SM 100mg/日 4 週			SM 100mg/日 16 週			SM 投与せず		
	肺	肝	脾	肺	肝	脾	肺	肝	脾
1 日	14 36	140 180	160 400	14 36	140 180	160 400	14 36	140 180	160 400
3 週	1600 128 1200	530 85 112	3900 3900 3500	1600 128 1200	530 85 112	3900 3900 3500	2 1	4 12	36 119
4 "	220 30	10 30	90 30	220 30	10 30	90 30	1 1	4 5	6 6
5 "	110 420 410	20 30 30	20 70 220						
6 "	130 96 45	49 3 1	1 3 0	20 50	70 30	70 130			
8 "	25 240 78	4 1 1	1 1 0	35 2	1 46	1 0	0 0	0 0	1 0
10 "	1 50 2	0 6 2	0 0 0	16 75	1 9	1 1			
12 "	31 23 24	9 0 0	0 0 0	11 C	0 0	0 13			
14 "	0 23 1	1 0 0	0 0 0						
16 "	3 0 1	1 0 0	0 0 0	4 2	0 0	0 0			

C: 雑菌汚染

肉眼的に結核性病変の消長を追ってみると、菌数が最高の3週目は各臓器とも病変は微弱であり、ことに肝は変化が認められない。肺、脾においても結節は小さく数が少ない。ところが4週目では各臓器とも結節性病変が著しく、脾、肝の表面は微細なやや隆起した結節が全面をおおっているが、肺では結節が他臓器のそれより遥かに大きく、半米粒大およびそれ以下の大小の結節が散在し、黄白色の中心壊死巣がはつきり認められるものも多い。5週目の各臓器の病変は4週目とほとんどかわらず著明であるが、6～8週目になると肺には乾酪化結節が

認められるが、脾、肝の病変は著しく減退している。10週以後は肺にのみ16週まで乾酪化結節が認められ、その数は次第にすくなくなつてゆく。肝、脾には何らの病変も認められない。

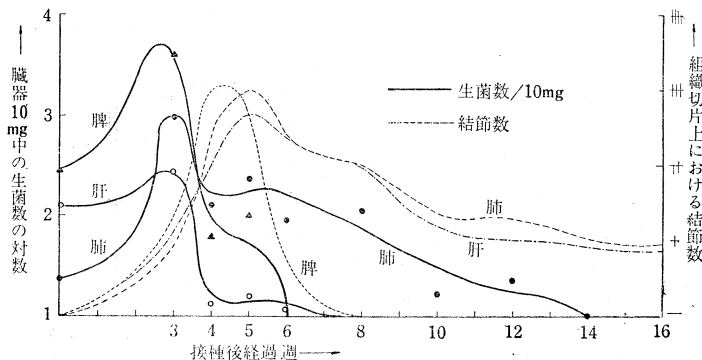
接種と同時にSMの注射を開始し16週間連日継続した群では、5週以後脾において生菌がやや長く残存すると思われる以外は、各臓器内生菌数の消長についてSM投与中止群とほとんど差がない。SMの投与は連日16週まで行われたのにもかかわらず、10週以後は肺の乾酪結節を除いては肝、脾に何ら結核性変化を肉眼的に認めることができなかつた。肺の結節もSM投与中止群のそれと同じで、新しい結節の発生、病変の進展の像はみられなかつた。

SMの投与を行わない群では従前の実験<sup>4)</sup>と全く同じく各臓器とも菌数は減少するのみで、8週目にはほとんど生菌を証明できず、肉眼的にも初めから何らの病変を認めなかつた。またSM投与群のように肺にのみやや長く生菌および病変が残るという傾向はみられず、むしろ脾よりも早く生菌が消失している。

図1はSM4週間投与群の各臓器10mg中の生菌数曲線と組織切片上にみられる結節数の消長を示したものである。結節数は1視野中にみえる数の大小を次のように十～Ⅲまでに区分してあらわした。十: 全切片に1～2個, 十十: 1視野に1～2個, 十十十: 1視野に数個, Ⅲ: 1視野に多数で融合。菌数の最大になるときに結節数の最高峰が2週間前後ずれているが、肉眼的病変の出現も上述の如くこれに相応している。

図2はSMを同条件でそれぞれ8週および16週投与した場合の脾10mg中の18-bの生菌数の消長を、SMを投与しない場合のものとのSM感受性H<sub>2</sub>株および18-b株の消長<sup>4)</sup>と比較したものである。18-b株はすべて第27代の凍結乾燥菌であり、接種量はどの菌株も0.01mg 静脈内注射である。SM投与下の18-b株の増殖はもとのH<sub>2</sub>株ほど高くなく、肉眼的病変もH<sub>2</sub>株では2週目にすでにはつきり出現しているのに対し、18-b株の場合は2週で

図1 18-b静脈内注射後、SM4週間連続投与てんじくねずみの各臓器における18-b生菌数と結核結節数の消長

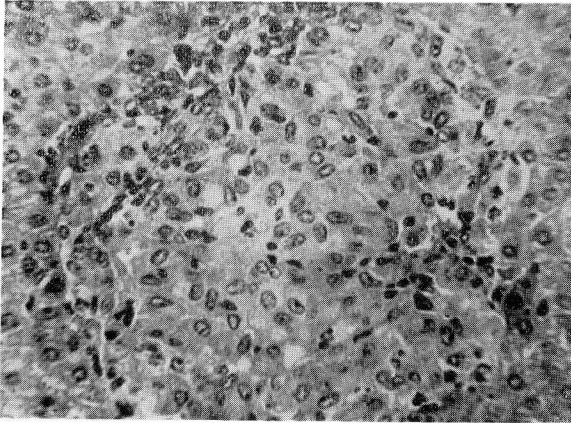


は何らの病変もなく、4週に至つてH<sub>2</sub>株の2週目に相当する病巣が認められた。またH<sub>2</sub>株と相違する点は、増殖した菌および形成された病変が持続することなく、10週以後は脾から全く消失するが、H<sub>2</sub>ではこのようなことはなく感染菌および病変の持続は長い<sup>6)</sup>。SMを投与しない場合の18-b株は増殖が全く認められないし、肉眼的病変もみられなかつた。

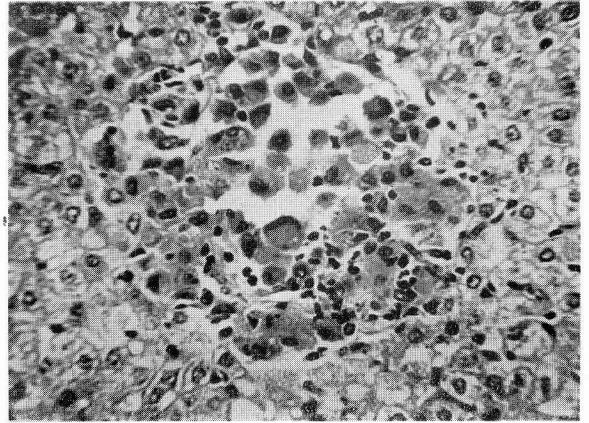
II. 組織学的所見

A. SM4週間投与群の病変

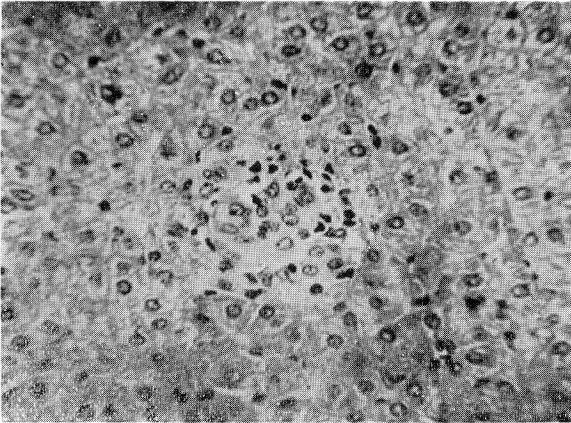
a) SM投与期間(4週間)中の病



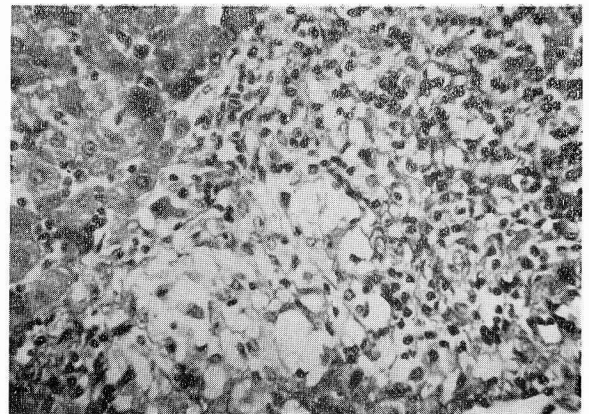
1. 肝の定型的充実型類上皮細胞結節, SM投与4週, 感染後4週



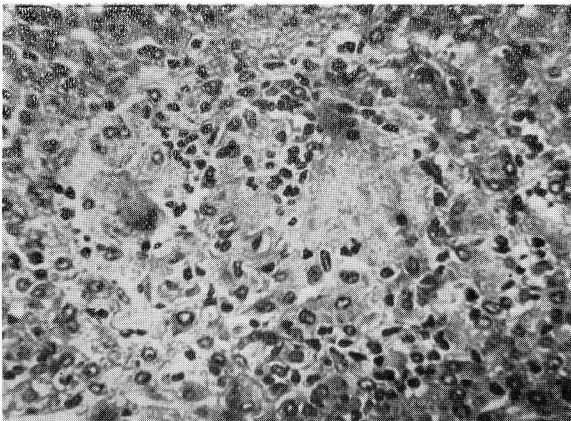
2. 肝の解離型類上皮細胞結節, SM投与4週, 感染後10週



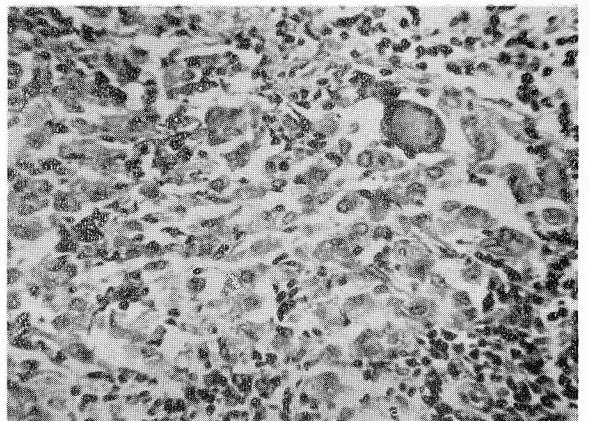
3. 肝の濃染型類上皮細胞結節, SM投与4週, 感染後10週



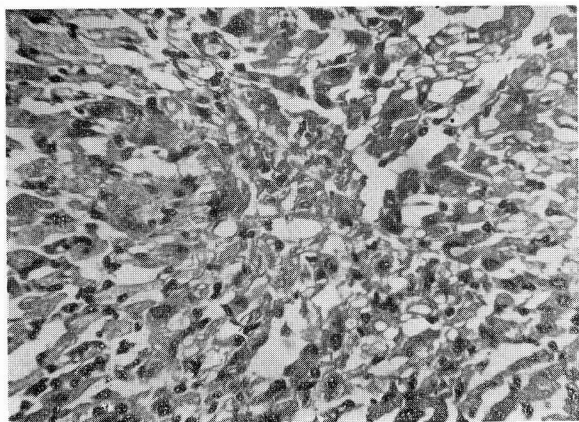
4. 肝の網状型類上皮細胞結節, SM投与4週, 感染後6週



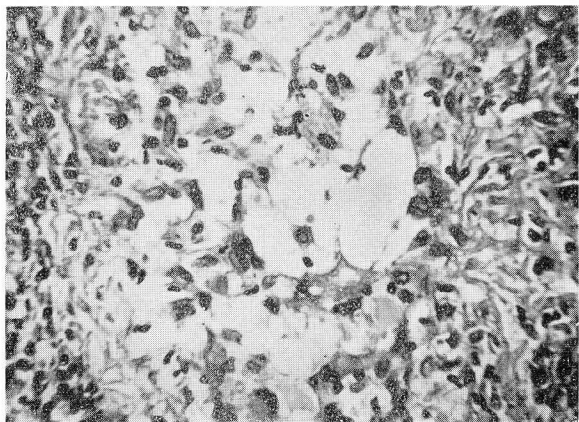
5. 肝の類上皮細胞の臙化一変性, 2~4の変形の他にしばしばみられた。SM投与4週, 感染後8週



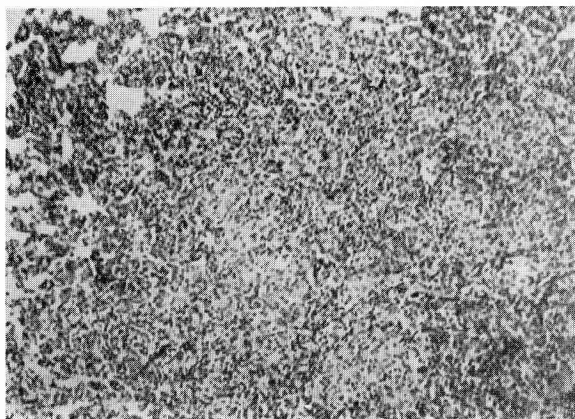
6. 脾の網状一解離混合型類上皮細胞結節, SM投与4週, 感染後6週



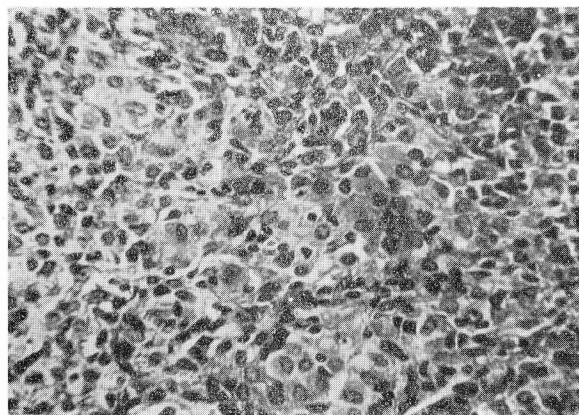
7. 心臓における結核病巣，疎化しつつある。SM投与4週，感染後6週



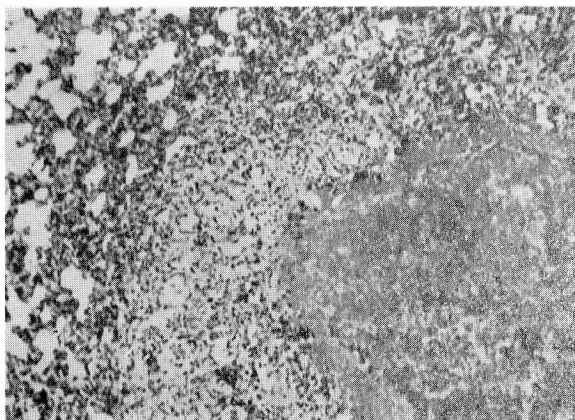
8. リンパ腺の網状型類上皮細胞結節，SM投与4週，感染後6週



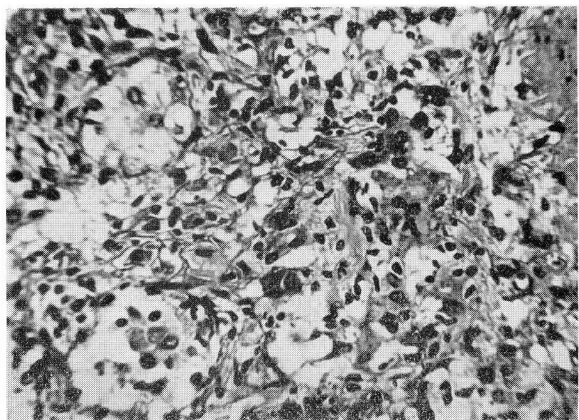
9. 肺の定型的結核巣，SM投与4週，感染後4週



10. 写真9の強拡大，病巣は大部分肺胞をみたした大単核滲出細胞からなる

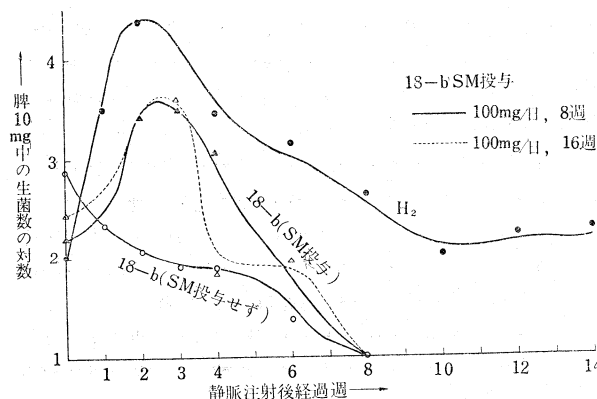


11. 肺の石灰化結節(脱灰)，類上皮細胞層はうすく，疎になっている。SM投与4週，感染後16週



12. 写真11の強拡大，右端に石灰化巣(脱灰)，結節細胞は肺胞相当部に膨化または萎縮しつつ残存

図2 H<sub>2</sub>株およびその Streptomycin 依存性変異株のてんぐくねずみ脾 10mg 中の消長



### 巣の進展

脾：限局性細胞反応は感染後3週目にすでに認められるが、いわゆる結核結節とみなしうる病巣は感染後4週目にみられた。病巣は大部分肺胞をみたした大単核滲出細胞で占められ、少数の多形核白血球、核崩壊物を混在している(写真9,10)。肺胞壁は比較的正常に保たれており、軽度の嗜銀線維の増生がみられる。結節周辺部では肺胞壁の細胞性肥厚がある。

肝：感染後3週目では極めて小さい小単核性細胞集簇や幼若類上皮細胞巣が少数みられるにすぎない。4週目で豊かな原形質をもち細胞境界の明らかでない定型的な成熟類上皮細胞結節(充実型)が多数形成される(写真1)。

脾：結核結節の形成は脾で最も速く、感染後3週目で充実型類上皮細胞結節が濾胞、髄質ともにみられる。4週目では更に病巣の数、大きさが増し、中心が乾酪化した結節もみられた。

その他の組織：リンパ節(ひざ、肺門部)、骨髄等に3週目に充実型類上皮細胞結節がみられ、4週目ではひざリンパ腺中の結節に乾酪化がみられた。

### b) SM投与中止後の病変の運命

脾：感染後5～6週目(SM投与中止後1～2週目)では、病巣は拡大され、結節中心部が乾酪化する。類上皮細胞層(肺胞をみだしている大単核滲出細胞は他の臓器や人にみられるいわゆる類上皮細胞にかなり似た形態学的性状を示すものである。これを類上皮細胞とするかどうかについては、この場合決定し難いが、ここでは一応病巣の主体をなす細胞として他臓器の類上皮細胞結節と同様の見方でその運命を追求した)は、中心乾酪巣に近い部分では細胞が空胞化し、その排列がかなり疎になつてきているが、外層では細胞はもとのままで密に排列している。感染後8週以後になると、乾酪巣には中心部より散発的に石灰沈着が始まり、類上皮細胞層は薄く、一層疎になり、層中に不規則に結合織の増生が著明になる。大単核滲出細胞は膨化崩壊し、または萎縮し、肺胞

に相当する部分に僅かに残存する(写真11,12)。

感染後16週までの観察では、石灰層が存続しており、石灰量は増してゆきが脱灰するとなお後に壊死巣が残っているのが認められる(写真11)。

気管枝周囲リンパ組織や血管周囲結合織の孤立性類上皮細胞結節には、細胞が星芒状に萎縮し、細い原形質突起で連なっている網状型結節が多い。

肝：感染後6週までは充実型類上皮細胞結節が持続しているが、以後これらの結節の性状に種々の変化が認められる。すなわち、(1)細胞が萎縮濃染性になり、結節に裂隙を生じたり、細胞相互の連絡がなくなり解離してくる(解離型)(写真2)。(2)細胞が萎縮濃染性になり解離することなく、結節が濃縮性になる(濃縮型)(写真3)。(3)結節細胞が星芒状に萎縮し、細い原形質突起で連なる(網状型)(写真4)。

解離、網状の変形はグリソン氏鞘や小葉内の嗜銀線維の増生を伴う比較的大きな結節であり、濃縮型は主として小葉内 Sinusoid に認められ、嗜銀線維のほとんど認められない小結節である。以上3つの結節の変形はH<sub>2</sub>株感染後、抗結核剤を投与した実験例にも観察されたが<sup>7)</sup>、本実験ではこれらの変形のほかに類上皮細胞で膨化し、変性崩壊してかなり疎になつた結節がしばしばみられた(写真5)。この種の細胞変性は染色上、いわゆる乾酪化とは区別されるものであり、また乾酪巣のように拡大、進行しない。感染10週以後では結節の数、大きさともに著しく減少する。

脾：感染後5週目では、SM投与中止直後にくらべて類上皮細胞結節の数、大きさがやや減ずる。性状は充実型が多いが、細胞間に裂隙がみられる結節や、細胞が萎縮、解離して疎になつた結節も認められる。6～8週の間で結節の数、大きさが著しく減少し、性状には解離型、網状型あるいは解離-網状混合型が濾胞、髄質に認められる(写真6)。また濾胞部では結節は疎になる一方、細網組織で次第に置換される。8週以後では結節はほとんど認められない。

骨髄：感染後5～6週目に網状型あるいは網状-解離混合型の類上皮細胞結節がみられた。6週以後では結節は見出されない。

リンパ節：感染6週以後、類上皮細胞結節は網状あるいは解離状になり、疎になる一方結合織の増生がみられる(写真8)。また10週目頃から乾酪巣の石灰化が始まる。16週までの観察では、極めて疎化した網状型または網状-解離混合型結節が少数存続している。

腎、心臓(写真7)では極めて稀に、疎になつた結節が少数見出されたにすぎない。

### B. SM連続16週間投与群における病巣の経過

感染4週以後さらにSM投与を続けた群の結核病巣の推移は、各観察時期において量的にも、形態学的性状に

についても、SM投与中止群の病巣と著しい差異が認められなかった。各臓器の結核結節は上記の諸変形に移行し、治癒あるいは消失している。

### C. SM非投与群における組織学的所見

結核性病巣は各臓器および骨髄、リンパ腺（ひざ、肺門部）に全く認められなかった。

### D. 組織内可染菌の消長と病巣の形態学的推移との関係

感染と同時にSM投与を始めた場合、上述の臓器培養成績と一致して、組織内の可染菌は感染後3週までの肝、脾の未成熟小結節を構成する幼若類上皮細胞中や、肺胞内の大単核滲出細胞、肺胞壁の単核細胞中に数個、ときには10数個の塊としてみられる。菌数は殊に肺の大単核滲出細胞内に多く、またこの種の細胞は他の反応細胞にくらべて容易に変性崩壊する。定型的結核結節が多数形成される4週目になると、可染菌は成熟類上皮細胞や肺の結核病巣の構成細胞中には極めてすくなくなる。その後SM投与の有無にかかわらず、6～8週以後の治癒過程にある肝、脾の変形結節中や肺の疎になった類上皮細胞層には菌はほとんど証明されない。しかし乾酪巣ではその周辺部に常に少数の可染菌が見出され、肺の石灰化した病巣には16週までの観察期間を通じて存続していた。

## 考 察

これまでの成績では18-b株感染でんじくねずみに充分量のSMを投与すると強毒菌による病変とほぼ同じ病変が出現することが認められており<sup>4)</sup>、この実験によって再びこれを確かめることができたが、SMの連続投与を更に続けるにもかかわらず病変および感染菌が治癒消失に向う点は、もとの強毒菌H<sub>2</sub>株と著しく異なる点である。結核菌の菌力の強弱を宿主体内の増殖力の大小によつて規定し、病変の形成によつて裏づけるならば、この場合感染後少なくとも5週までは、生菌の消長、病変の発現からみて強毒結核菌の働きとみなすことができよう。しかし16週までの経過をみると、強毒結核菌に特有の感染像がなく、生菌および病変が持続することなくして治癒、消失に向つている点は弱毒菌の範囲に入れるべきであり、完全な意味で菌力の回復がみられなかったといえよう。すなわち結核菌の菌力の規定には感染巣における菌の持続が考慮されねばならぬことを示すものである。

SM投与下の感染18-bが4週以後生菌数の減少消失に向う現象には二つの要因が重なっているものと推定される。一つは一般に結核菌感染巣において、菌の増殖に伴つておこる生化学的または免疫学的変化のために菌の生存が障害をうけることで、強毒菌H<sub>2</sub>株感染の場合にも図2に示すように感染菌の減少曲線として認められている。他の一つは菌のSM依存性という特殊条件に関連を

もち、寄生細胞内の18-b株のSM利用が妨げられる状態になることである。後者の機作としては次の二つの点が考えられる。(1) Suter<sup>8)</sup>、Mackness<sup>9)</sup>がガラス器内培養腹水単核性細胞について証明したように、宿主細胞内へのSM透過はかなり困難であること。(2) 結核病巣の生体染色所見から推測されるように<sup>10)</sup>、結核結節を構成する成熟類上皮細胞では周囲の環境から種々の物質を取り入れる能力が発生の前段階の単核細胞に比して低く、したがつて胞体内のSM量がさらに減少するという可能性。上述のようにSM投与下の18-bの減少時期と成熟類上皮細胞結節が出現する時期がほぼ一致しているという事実も上記の推定を下す上に注目される点であろう。もし上述の2要因の中、はじめの菌のSM依存性に関連のない要因のみが、菌の消失にあずかるとすれば18-b株はSM依存性以外の菌力に関連ある未知の因子にも変異をおこしていると考えねばなるまい。

肺に生ずる結節が他臓器のそれとくらべて最も大きく、また乾酪化結節に容易に進行するという点は、従来の脾または肝と肺における結核病変の発現に相違があるという知見<sup>11)</sup>と軌を一にするものであるが、この原因としては、肺における定着菌の分布の外に、肺の結核病巣の主体をなす大単核滲出細胞の結核菌に対する抵抗性が他臓器の反応細胞のそれに比べて小である事実をあげることができる。この所見はNyka<sup>12)</sup>もはつかねずみ結核症についての観察において記載している。

肺以外の臓器では形成された定型的類上皮細胞結節はSM投与の有無にかかわらず、菌の消失と平行して網状、解離、あるいは濃染型のいずれかに移行して治癒、消失におもむき、類上皮細胞結節の治癒過程を最も明らかに追跡することができた。このような治癒像は強毒菌感染でんじくねずみに抗結核剤を投与した場合<sup>7)</sup>の治癒像と同じ類型とみなすことができ、したがつて類上皮細胞結節の治癒形成はいずれの場合も本質的に異なるものでないと考えられる。なお、これら治癒過程の諸変形が出現する理由としては、病巣の存在部位の組織構造との関連が重視される。

## 総 括

SM依存性結核菌18-b株をてんじくねずみに静脈内注射後、大量のSMを連続投与すると病変の形成に先立ち各臓器において著しい増殖を示すが、3～4週で生菌数が急に減少し始め、4週以後はSM投与継続の有無にかかわらず、脾、肝内の菌は消失に傾き14～16週ではほとんど証明できなくなる。肺では病変の持続とともに少数の依存性菌が16週まで生存をつづけるのが認められた。

肉眼的および組織学的にみた場合、SMの連続投与によつて18-b感染後4週目に定型的な結核結節が肺、肝、脾、骨髄、リンパ腺に多く形成され、その大きさ、数ま

たは性状は強毒菌による病巣と差が認められないが、以後はSM投与継続の有無にかかわらず、乾酪結節の持続する肺以外の臓器では、充実型の類上皮細胞結節が消失してゆく治癒過程を明瞭に追跡することができる。すなわち結節構成細胞の配列が疎になり、網状、解離、濃染のいずれかの変型に移行し消失してゆく。これら治癒過程をたどる病巣には可染菌はほとんど証明されない。肺では乾酪巣に石灰沈着が始まり、次第に強くなるが、16週後にもその中に少数の可染菌がみられる石灰巣を認めることができた。

以上のSM投与下の18-b株の感染像をもとの強毒菌H<sub>2</sub>株のそれと比較すると、はじめの菌の増殖と形成される病変の性状は同様であるが、感染菌および病巣の持続がみられない点が著しく相違していると考えられる。

終りにのぞみ柳沢結核部長の御指導を感謝する。

## 文 献

- 1) 橋本達一郎: Streptomycin 依存性結核菌の一菌株の Virulence について, 医学と生物学, 23: 201~204, 1952.
- 2) 橋本達一郎: Streptomycin 依存性結核菌の分析に基いた結核症の感染と免疫に関する実験的研究, 第1報 Streptomycin 依存性菌の分離, 生物学的性状および Streptomycin 投与の病原性に及ぼす影響, 結核, 30: 4~8, 1955.
- 3) 同上, 第2報 Streptomycin 依存性菌逆変異株の菌力について, 結核, 30: 237~241, 1955.
- 4) 同上, 第3報 Streptomycin 依存性菌18-b株の菌力について, 結核, 30: 461~466, 1955.
- 5) 加藤允彦・三木勝治・松永清輝: ハツカネズミ全身 Homogenize 法による結核菌菌力の研究, III. ハツカネズミ体内における人型結核菌のストレプトマイシン依存性変異株の生存と増殖について, 医学と生物学, 35: 81~85, 1955.
- 6) 橋本達一郎・加藤允彦: てんじくねずみにおける抗結核免疫について, I. 結核生菌又は加熱死菌によつて免疫されたてんじくねずみにおける感染結核菌の運命, 日本細菌学雑誌, 10: 219~223, 1955.
- 7) 江頭靖之: 実験的結核症の化学療法に関する病理学的考察, 結核研究の進歩, No.14: 85~104, 医学書院, 東京, 1956.
- 8) Suter, E.: The multiplication of tubercle bacilli within normal phagocytes in tissue culture, J. Exp. Med., 96: 137~150, 1952.
- 9) Mackaness, G.B. & Smith, N.: The bactericidal action of isoniazid, streptomycin, and terramycin on extracellular tubercle bacilli, Am. Rev. Tuberc., 67: 322~340, 1953.
- 10) 小河秀正: 未発表.
- 11) 橋本達一郎・加藤允彦: てんじくねずみにおける抗結核免疫について, II. 菌量を異にする強毒結核菌の攻撃に対するBCG免疫の効果, 日本細菌学雑誌, 10: 311~315, 1955.
- 12) Nyca, W., Faherty, J.F., Malone, L.C. & Kiser, J.S.: A histological study of the pathogenesis of tuberculosis in mice experimentally infected with bacilli of human type, Exp. Med. & Surg., 12: 367~429, 1954.