

吸入感染による結核菌の重感染実験

下 出 久 雄

結核予防会結核研究所特別研究生(所長 隈部英雄)

受付 昭和35年7月19日

緒 言

肺結核症の発病に関して初感染発病と再感染発病の問題は古くから論じられてきた。再感染発病がきわめてわずかな頻度しか起こりえないとするものの根拠は初回の感染によつて獲得された抵抗性がきわめて強く、少なくとも外来性に吸入によつて再感染する菌量に対しては、その増殖を阻止しうるだけの力をもっていることである。この仮説を裏付ける実証的研究としては、夫婦結核の研究、ツベルクリン陽転後発病までの期間、石灰化初感染巣と初発病巣との位置的関係、陳旧性病巣の崩壊による病変進展の可能性に関する病理学的研究等があげられ、また動物実験による研究も行なわれてきた。これに対して既感染者からの発病、たとえばツベルクリン反応陽転後2年以後にはじめてX線写真上に認められる病変が発生するものの中には外来性再感染によるものがあるのではないかということが問題にされ、最近では抗結核剤に対する耐性菌の感染ということに着目し、外来性再感染、あるいは重感染がありうるということが論じられている。初感染発病を重視するものも外来性再感染の可能性を否定するものではなく、また外来性再感染を強調するものもその頻度は比較的には少ないであろうということは認めている。

結核菌に対する個体の反応性は、先天抵抗性、獲得抵抗性、過敏性、菌の毒力、感染菌量等が複雑に組み合わさつて決定されることであるから、人の結核症において外来性再感染がいかに阻止され、またいかなる場合には再感染が起こりうるかということはきわめて解明の困難な問題であろう。このような複雑な問題の解明のためには動物実験による分析的研究が必要であり、すでに多数の研究が行なわれているが、他の感染実験と同様に、吸入感染による実験はきわめてわずかである。しかし Ratcliffe¹⁾らはすでに1948年に経気道吸入感染による再感染実験を行なつている。また再感染実験の方法として初回感染と再感染とに異なつた菌株(たとえば耐性菌と感性菌²⁾、eugonic strain と dysgonic strain³⁾)を用いることも多くの研究者によつて行なわれている。私は先にBCG接種の吸入感染に及ぼす影響⁴⁾について報告したが、今回の小実験は吸入感染による再感染実験に人型結核菌 H37Rv 株の SM 100 γ 耐性菌と

同株 SM 感性菌とを用い、有毒菌による初感染の再感染に及ぼす影響を観察せんと試みた。

実験方法

(1) 実験動物および実験群：

体重 480~680 g のツベルクリン反応陰性成熟モルモット(雌) 13 匹を 3 群に分け第 1 群(重感染群 4 匹)は初回に人型結核菌 H37Rv SM 100 γ 耐性株(SMR)を吸入感染せしめ 5 週間後に同株 SM 感性菌(SMS)を吸入感染せしめ再感染後 5~6 週後に剖検した。第 2 群(SMR 群 3 匹)は第 1 群の初回感染時に同一条件で SMR を感染せしめ、再感染を行なうことなく第 1 群と同時に剖検し、第 3 群(SMS 群 6 匹)は第 1 群の再感染時に同一条件で SMS を感染せしめ第 1 群と同時に剖検した。

(2) 吸入感染装置および噴霧菌液(表 1)

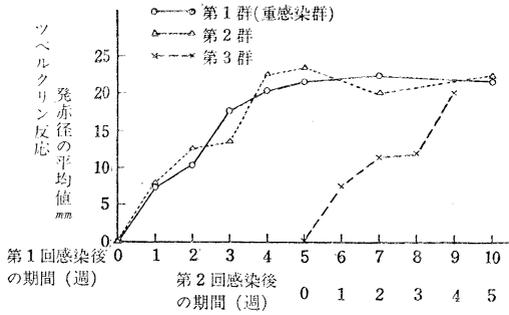
吸入感染装置の詳細はすでに報告した⁵⁾ので概略を述べると、長さ 40 cm、直径 10 cm のプラスチック製円筒(気密にされたもの)の一端より、スプレーガンによつて菌液を微細な水滴として噴霧し、他の端の吸入マスクに動物を固定して感染せしめた。噴霧菌液の調製は第 1 回感染では H37Rv SM 100 γ 耐性株の 1% 小川培地 20 日培養菌を Tween 80 を 0.06% に加えた生理的食塩水 1 cc 中に 1 mg 浮遊せしめ、これを 2,500 回転 5 分間遠沈し、上清 14 cc を 40 cc の生理的食塩水で稀釈し、濾紙 1 枚で濾過した濾液を噴霧に用いた。遠沈前の生菌数は $9 \times 10^5/cc$ 、遠沈後稀釈した菌液の生菌数は $1 \times 10^5/cc$ であつた。第 2 回感染では H37Rv SM 感性株の Sauton 培地 18 日培養菌を前記とほとんど同様な方法で菌液としたが、遠沈後の生食水による稀釈は行なわず、2,500 回転 10 分間遠沈した。遠沈前の生菌数は $33 \times 10^5/cc$ であつた。

(3) 吸入時間と噴霧菌液量(表 1)

吸入時間は噴霧時間と等しく第 1 回感染では 3~10 分で、噴霧菌液量は 2~3.3 cc であつた。第 1 群と第 2 群との感染条件の差を少なくするため、両群を交互に 1 匹ずつ感染せしめた。噴霧圧は 20~30 pound/sq. inch である。第 2 回感染では吸入時間は 5~10 分で噴霧菌液量は 6~6.5 cc であり、第 1 群と第 3 群とは交互に感染せしめた。噴霧圧はすべて 25 pound/sq. inch で

図1 ツベルクリン反応の推移

あつた。



実験成績

(1) ツベルクリン反応の推移 (表2, 図1)

旧ツベルクリン 100 倍稀釈液 0.1 cc を側腹部皮内に注射し, 24 時間後に発赤の径を測定した。第1 群は第1 回感染後1 週目に1 匹, 2 週目に2 匹, 3 週目に1 匹陽転し, 以後剖検時まで陽性を持続, 第2 回感染後ツベルクリン反応の大きさに変動はなかつた。第2 群では第1 回感染後1 週目に2 匹, 2 週目に1 匹陽

表1 実験条件

実験条件	動物番号	第1群 (重感染群)				第2群 (第1回感染のみ)			第3群 (第2回感染のみ)					
		12	13	15	24	25	26	29	36	37	38	39	40	41
体 重 (g)		560	500	610	680	600	650	610	570	520	580	520	530	480
第1回感染の菌株		H37Rv SM 100γ 耐性株				"			"					
噴霧菌液の生菌数 (1cc 中)		9×10 ⁵ (選前) 1×10 ⁵ (選後)				"			"					
噴霧時間 (分)		8	5	7	5	4	10	3						
噴霧菌液量 (cc)		2	3.1	2.1	2.5	3	2	3.3						
第1回感染よりツ反陽 転までの期間 (週)		1	2	2	3	2	1	1						
第1回感染より剖検ま での期間 (週)		10	10	10	11	11	10	10						
第1回感染より第2回 感染までの期間 (週)		5	5	5	5									
第2回感染の菌株		H37Rv SM 感性株				"			H37Rv SM 感性株					
噴霧菌液の生菌数 (1cc 中)		33×10 ⁵ (選前)				"			33×10 ⁵ (選前)					
噴霧時間 (分)		5	6	9	10				7	7	7	5	5	9
噴霧菌液量 (cc)		6.5	6	6.5	6				6	6	6.5	6	6.5	6.5
第2回感染よりツ反陽 転までの期間 (週)									2	3	2	2	2	1
第2回感染より剖検ま での期間 (週)		5	5	5	6				5	5	5	5	5	6

表2 ツベルクリン反応の推移 (発赤径の平均値 mm)

実験群	初回感染後の期間 (週)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
第1群	0	7.3	10.3	17.8	20.3	21.8		22.3			21.5
第2群	0	8.0	12.5	13.7	22.7	23.5		20.2			22.0
第3群	0	7.7	11.6	11.9	20.3						

転し、剖検まで陽性持続し、ツベルクリン反応の大きさは第1群と同様な推移を示した。第3群では感染後1週目に1匹、2週目に4匹、3週目に1匹陽転し、剖検まで陽性を持続し、ツベルクリン反応の大きさは第1群、第2群の4週までの推移と同様であった。体重の推移は各群ともに次第に増加し、各群間に異なつた傾向はみられなかつた。

(2) 肉眼的剖検所見 (表3)

第1群は第1回吸入感染後10~11週、第2回感染後5~6週で剖検した。肺表面より観察しえた結核結節数は5~26コ(平均12コ)であり、結節の大きさは1.5mm以上のものがほとんどすべてを占め、全例に3mm以上の結節が認められ、その中心には壊死が認められた。脾には1例に6コの結節が認められ、気管リンパ節はすべての例に著明な腫脹が認められ、壊死がみられた。3例には後胸骨リンパ節にも腫脹がみられた。その他のリンパ節および肝、腎には肉眼的病変はみられ

なかつた。

第2群は第1回感染後10~11週で剖検した。肺表面の結核結節数は11~41コ(平均23コ)で、結節の大きさは第1群と同様1.5mm以上が大部分で、全例に3mm以上のものが認められ、その中心には壊死が認められた。脾には1例に13コの結節が認められ、気管リンパ節はすべての例に著明な腫脹があり、壊死がみられた。2例に後胸骨リンパ節、1例に門脈節の腫脹がみられた。その他のリンパ節および肝、腎には肉眼的病変は認められなかつた。

第3群は感染後5~6週で剖検した。肺表面の結核結節数は5~37コ(平均21.7コ)で、結節の大きさは比較的小さいものが多く、3mm以上の結節は全例にみられず、1例を除き他は一部に壊死が認められた。脾では1例に1コだけ結節があり、気管リンパ節は全例に軽度~中等度の腫脹があり、1例を除きすべてに壊死を認めた。その他のリンパ節および肝、腎には肉眼的病

表3 肉眼的剖検所見

実験群			第1群				第2群			第3群					
			動物番号				25	26	29	36	37	38	39	40	41
臓器	リンパ節	膝	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		鼠	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		腋	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		腸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		腸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		門	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		後	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		胸	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
臓	脾	腎	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
		肝	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
		小腸	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
		肺	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
肺内結核結節数			5	26	11	6	17	11	41	34	16	5	10	37	28
同上3mm以上の結節数			2	9	1	1	3	5	13	0	0	0	0	0	0
同上1.5mm以上の結節数			5	16	10	6	17	10	29	25	10	1	1	24	23
脾重量(g)			1.3	0.8	1.3	1.15	1.1	1.35	1.15	1.2	1.45	1.05	1.3	0.95	0.95

肺内結核結節数 + 1~10コ
 + 11~50コ
 ○ 中心壊死
 リンパ節病変 + 米粒大
 + 大豆大
 + 豌豆大以上
 ○ 壊死

変を認めなかつた。脾重量は各群間にとくに差は認めなかつた。

(3) 臓器培養所見 (表4)

剖検時、全例の肺、肝、脾内の結核菌定量培養を行なつた。臓器10mg中の生菌数は次のごとくであつた。

肺では第1群でSM100γ耐性培地(培地はすべて3%小川培地を使用)上に検出されたコロニーの数、すなわちSM耐性菌の生菌数は $\frac{5}{2} \times 10 \sim \frac{198}{2} \times 10$ (平均 $\frac{119}{2} \times 10$) であり、普通培地に検出されたコロニ

一菌，すなわち SM 耐性菌プラス SM 感性菌の生菌数は $\frac{10}{2} \times 10 \sim \frac{291}{2} \times 10$ (平均 $\frac{164}{2} \times 10$) であった。耐性培地上のコロニー数と普通培地上のコロニー数の差は $\frac{5}{2} \times 10 \sim \frac{93}{2} \times 10$ (平均 $\frac{46}{2} \times 10$) であった。

第 2 群では SM 耐性培地のみで培養し，SM 耐性菌の生菌数は $\frac{41}{2} \times 10 \sim \frac{572}{2} \times 10$ (平均 $\frac{306}{2} \times 10$) であり，第 3 群は普通培地のみで培養し，SM 感性菌の生菌数は $\frac{15}{2} \times 10 \sim \frac{333}{2} \times 10^2$ (平均 $\frac{1,320}{2} \times 10$) であった。肝では第 1 群で 1 例に菌が証明され SM 耐性培地，普通培地ともにコロニー数は 10 であった。第 2 群では 3 例ともに菌陽性で SM 耐性菌の生菌数は $\frac{4}{2}$

$\times 10 \sim \frac{23}{2} \times 10$ (平均 $\frac{106}{2}$) で，第 3 群では 3 例菌陽性で SM 感性菌の生菌数は $\frac{1}{2} \times 10 \sim \frac{11}{2} \times 10$ (平均 15) であった。脾では第 1 群で 2 例が菌陽性で SM 耐性培地上のコロニー数は $\frac{4}{2} \times 10 \sim \frac{49}{2} \times 10$ ，普通培地上のコロニー数は $\frac{3}{2} \times 10 \sim \frac{49}{2} \times 10$ であり，各例とも両培地上のコロニー数には差がほとんど認められない。第 2 群では 3 例菌陽性で SM 耐性菌の生菌数は $\frac{1}{2} \times 10 \sim \frac{125}{2} \times 10$ であり，第 3 群では 5 例が菌陽性で SM 感性菌の生菌数は $\frac{6}{2} \times 10 \sim \frac{91}{2} \times 10$ であった。

表 4 臓器内結核菌定量培養成績 (各臓器 10 mg 中の生菌数)

臓器	実験群 動物番号 培地	第 1 群						第 2 群						第 3 群					
		12	13	15	24	25	26	29	36	37	38	39	40	41					
		肺	(1) SM 100 γ 耐性培地	$\frac{195}{2} \times 10$	$\frac{198}{2} \times 10$	$\frac{5}{2} \times 10$	$\frac{76}{2} \times 10$	$\frac{305}{2} \times 10$	$\frac{41}{2} \times 10$	$\frac{572}{2} \times 10$									
	(2) 普通培地	$\frac{265}{2} \times 10$	$\frac{291}{2} \times 10$	$\frac{10}{2} \times 10$	$\frac{91}{2} \times 10$	$\frac{275}{2} \times 10$			$\frac{333}{2} \times 10^2$	$\frac{130}{2} \times 10^2$	$\frac{15}{2} \times 10$	$\frac{142}{2} \times 10$	$\frac{253}{2} \times 10^2$	$\frac{611}{2} \times 10$					
	(2) - (1) の差	$\frac{70}{2} \times 10$	$\frac{93}{2} \times 10$	$\frac{5}{2} \times 10$	$\frac{15}{2} \times 10$	$\frac{30}{2} \times 10$													
肝	(1) SM 100 γ 耐性培地	0	$\frac{2}{2} \times 10$	0	0	$\frac{5}{2} \times 10$	$\frac{4}{2} \times 10$	$\frac{23}{2} \times 10$											
	(2) 普通培地	0	$\frac{2}{2} \times 10$	0	0	$\frac{7}{2} \times 10$			$\frac{11}{2} \times 10$	0	0	$\frac{6}{2} \times 10$	$\frac{1}{2} \times 10$	0					
	(2) - (1) の差	0	0	0	0	$\frac{2}{2} \times 10$													
脾	(1) SM 100 γ 耐性培地	$\frac{4}{2} \times 10$	$\frac{49}{2} \times 10$	0	0	0	$\frac{20}{2} \times 10$	$\frac{125}{2} \times 10$											
	(2) 普通培地	$\frac{3}{2} \times 10$	$\frac{49}{2} \times 10$	0	0	$\frac{1}{2} \times 10$			$\frac{9}{2} \times 10$	$\frac{12}{2} \times 10$	0	$\frac{91}{2} \times 10$	$\frac{6}{2} \times 10$	$\frac{11}{2} \times 10$					
	(2) - (1) の差	$-\frac{1}{2} \times 10$	0	0	0	$\frac{1}{2} \times 10$													

(1) : SM 耐性菌数 (2) - (1) : 感性菌数
 (2) : SM 耐性菌数 + 感性菌数

(4) 肺病変の組織学的所見

第 1 群 (重感染群) では約 1 mm の線維増殖を伴った著明な類上皮細胞の増殖がみられ，他にきわめて微小な，痕跡的な類上皮細胞の集りが認められた。大きな結節の中心の壊死はきわめて軽度であり，抗酸菌もきわめてわずかに認められた。第 2 群では第 1 群と同様な約 2 mm の著明な類上皮細胞増殖が認められ，その中心の壊死はわずかであり，菌もわずかであった。他に比較的小さい結節もみられたが，第 1 群の微小結節に比すればかなり大きい。第 3 群では小円形細胞の集簇の多い

小さな類上皮細胞結節が少数認められ，一部では小さな集合結節が認められた。壊死はほとんど認められず，菌は 1 例で少数認められ，他はきわめてわずかにみられるか，全く認めえなかつた。

総括ならびに考案

本実験において，第 1 群 (重感染群) は初回に SM 耐性菌を接種し，ツベルクリン反応が一定の強い反応を持続しはじめたところで第 2 回感染，すなわち SM 感性菌の感染を受けたものであり，第 2，第 3 群は第 1

群の2回の感染のうち一方の感染のみを受けたものであるから、感染菌量としては第1群は第2群と同一の感染菌量に初回感染後5週目に第3群と同一の感染菌量が加わったわけである。それにもかかわらず、肺内に認められた結核結節数は各群ともに個体差がかなり認められ、例数が少ないので厳密な比較はできないが、第1群(重感染群)は第2,第3群に比し少なくとも多いとはいえなかつた。

また、肺、肝、脾の結核菌定量培養成績において、第1群の生菌数は第2,第3群の生菌数より少ない傾向にあり、第1群のSM耐性培地上のコロニー数と普通培地上のコロニー数の差、すなわち第2回感染で感染せしめられたSM感性菌の数は $\frac{46}{2} \times 10$ で、同様な条件で第3群に感染せしめられたSM感性菌数($\frac{1,320}{2} \times 10$)に比し著しく少なく約1/30にすぎない。一方肺病変の組織学的所見中、重感染群に認められたきわめて小さい痕跡的な類上皮細胞の集合は重感染菌によるものではないかと考えられるが、この点はさらに検討を要する。

以上の成績から、重感染群において第2回感染で感染せしめられたSM感性菌は増殖が阻止され、肉眼的に認められる結節を作りえなかつたと考えられる。すなわち第1回のSM耐性菌の感染によつてSM感性菌の重感染に対する抵抗性が獲得されたといえよう。Ratcliffe¹⁾らは重感染の初感染巣に対する影響について述べているが、今回の実験ではその点を明らかに認めることはできなかつた。またRatcliffe¹⁾は初感染巣と重感染巣との相違を被包化の程度と病巣内の菌の多寡に認めているが、今回の実験では感染菌量、初感染から重感染までの期間、使用動物等実験条件が異なっており、そのような差異を認めることはできなかつた。今回の実験では初感染菌量、初感染より重感染までの期間、重感染菌量等と重感染に対する組織反応との関係については検討していない。

これらの問題が今後検討されねばならないが、そのさい、感染菌量の定量化は吸入感染ではきわめて困難であ

り、現在の段階では感染直後に一部の動物の臓器を培養する方法か、アイソトープの標識を利用することが考えられる。また肺内に沈着する菌量が正確に測定しうようになれば、同一菌量を皮下、静脈内等に接種した場合と吸入感染せしめた場合の抵抗性獲得能力の差異を明らかにすることができよう。本実験はこれらの定量的実験の予備実験にすぎないが、吸入感染法による再感染、重感染実験の可能性を明らかにしえたと同時に、これら再、重感染による病変の形成は初感染の場合に比較し著しく阻止されることが明らかにされたと思う。

結 語

人型結核菌 H37Rv SM 耐性株を微量に初回吸入感染せしめ、ついでツベルクリン反応陽転後(初感染後5週目)に H37Rv SM 感性株を吸入により重感染せしめた結果、肺内には重感染菌によつて肉眼的病変はほとんど形成されず、重感染菌は増殖を阻止され、わずかに検出される程度であつた。吸入感染法による定量的な重感染実験が可能であることが明らかにされた。

終りに、本研究の機会を与えられ、御指導、御校閲を賜つた結核予防会結核研究所長隈部英雄先生、同研究部長岩崎龍郎先生に深く感謝いたします。また実験に御協力下さつた同研究所部員豊原希一先生はじめ研究室の方々に感謝いたします。

文 献

- 1) Ratcliffe, H.L.: Jour. Exper. Med., 87: 585, 1948.
- 2) Osato S. et al.: Amer. Rev. Tuberc., 74: 258, 1956.
- 3) Dubos, R.J. et al.: Amer. Rev. Tuberc., 74: 541, 1956.
- 4) 下出久雄: 結核, 35: 570, 昭35.
- 5) 下出久雄: 呼吸器診療, 13: 848, 昭33.