

# 結核菌の吸入感染に関する実験的研究

## 第2報 モルモットの吸入感染に対する BCG の免疫効果

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 6 月 1 日

### 緒 言

第1報<sup>1)</sup>で報告した家兎の結核菌吸入感染装置を用い、今回はモルモットに対する経気道吸入感染を行なった。実験の主目的は吸入感染による病巣形成に対する BCG の免疫効果を観察することにおいた。

### 実験方法および実験材料

#### (1) 吸入感染装置

第1報で報告した家兎の吸入感染装置をそのまま使用し、吸入マスクの部分をモルモットに合うように調製した。

#### (2) 実験動物

体重 360~600 g のツベルクリン反応陰性の成熟モルモット (雌) 14 匹を 3 群に分ち、第1群 (5匹) は吸入感染の 5 週間前にあらかじめ BCG 乾燥ワクチン 5 mg を 2 cc の蒸留水に浮遊せしめて右側腹部皮下に接種した。第2群 (5匹) は BCG による感作

を行わずに吸入感染させ対照群とした。第3群 (4匹) は BCG 乾燥ワクチン 5 mg を右側腹部皮下に接種したのみで吸入感染を行なわなかつた。

#### (3) 噴霧菌液

第1報の場合と同様な方法で調製した。すなわち人型結核菌 H<sub>37</sub>Rv 株の Sauton 培地 16 日培養菌を Tween 80 を 0.06 % に加えた生理的食塩水 1 cc 中に 10 mg 浮遊せしめ、これを 1 分間 2,000 回転で 5 分間遠沈し、その上清を濾紙 2 枚で濾過した液を噴霧に用いた。遠沈前の菌液 (磨砕ホルメンで均等にしたもの) の生菌数は 18×10<sup>6</sup>/cc であつた。菌の分離状態は第1報の場合に比しやや不良で、粗大な菌塊 (10 コ以上の菌からなるもの) が散見された。

#### (4) 吸入時間と噴霧菌液量

吸入時間 (噴霧時間と同じ) は 8~15 分で、噴霧菌液量は 14.2~21.5 cc であり、第1群と第2群の感染条件の差を少なくするため、両群を 1 匹ずつ交互に感染せしめた。噴霧圧は 20~35 pound/sq. inch である。

表 1 実験条件

実験群 動物番号	BCG 感作群 (第1群)					非感作群 (第2群)					BCG接種のみ (第3群)			
	2	3	4	5	35	6	7	8	9	10	16	18	19	20
体 重 (g)	420	423	450	540	363	550	420	410	440	520	600	480	470	490
噴霧時間 (分)	15	11	10	8	11	11	11	13	10	11				
噴霧菌液量 (cc)	20.5	19.3	18.3	14.5	14.2	17.0	18.3	21.5	18.0	14.5				
噴霧気圧 pound/sq. inch	30	25	35	25	30	25	25	30	30	35				
噴霧菌液の 生菌数 (1cc中)	18×10 <sup>6</sup>	"	"	"	"	"	"	"	"	"				
BCG接種より 吸入感染までの 期間 (週)	5	"	"	"	"									
吸入感染後ツ反 応陽転までの期 間 (週)	BCG 接 種後 2 週 以後剖検 まで陽性 持続	"	"	"	"	3 週	3 週目に 死亡のため 陽転不 確認	3 週	"	2 週	BCG 接 種後 2 週 以後剖検 まで陽性 持続	"	"	"
吸入感染より剖 検までの期間 (週)	5	"	"	"	4	5	3	5	"	"	BCG 接 種後 10 週 目に剖検	"	"	"
肺内結節数	43	9	34	63	114	237	631	346	167	384	0	0	0	5

実験成績

(1) ツベルクリン反応の推移 (表 2, 図 1)

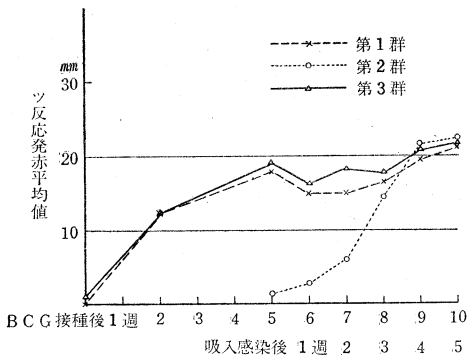
旧ツベルクリン 100 倍稀釈液 0.1 cc を側腹部皮内に注射し, 24 時間後に発赤, 硬結の径を測定した。第 1 群では BCG 接種後 2 週目に 5 匹ともに陽転し, 吸入感染時および剖検時まで陽性を持続した。第 2 群で

は吸入感染後 2 週目に 1 匹, 3 週目に 3 匹陽転し, 1 匹は感染後 3 週で死亡 (非結核死) したため陽転を確認しえなかつた。第 3 群は BCG 接種後 2 週目に 4 匹ともに陽転し, 剖検時まで陽性を持続した。各群の BCG 接種および吸入感染後のツ反応の大きさの平均値の推移は図 1, 表 2 のごとくであり, 吸入感染 4 週以後は各群とも等しい値を示している。

表 2 ツベルクリン反応の推移 (発赤平均値)

実験群	BCG接種後											
	0 週	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
第 1 群	0.6mm		12.6			18.0	15.0	15.3	16.8	19.5	21.7	
第 2 群						1.9mm	2.9	6.0	14.4	21.0	22.3	
第 3 群	1.9mm		12.5			19.4	17.0	18.8	17.9	20.9	22.0	

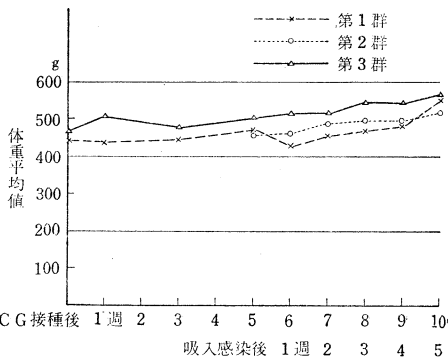
図 1 ツベルクリン反応の推移



(2) 体重の推移 (図 2)

各群ともにわずかな増加が認められ, 各群間に異なつた傾向は認められなかつた。

図 2 体重の推移 (各実験群の平均値)



(3) 剖検所見 (肉眼的) (表 3, 4)

第 1 群 (BCG 感作群) は吸入感染後 4 週目に 1 匹, 5 週目に 4 匹を撲殺して剖検した。肺の表面より肉眼的に観察された結核結節の数は表 4 に示すごとく, 吸入後 5 週目のモルモットでは 9~63 コ, 1 匹平均

37.3 コで, 4 週目のもの (体重のもつとも少なかつた例) では 114 コ認められた。結節の肺葉別分布は上葉と中葉の計が 92 コ (35%), 下葉 163 コ (62%), 心臓葉 8 コ (3%) であつた。結節の大きさは 0.5mm 以下のものが大部分で, 中には 1.5~2.0 mm のものが数コ認められたが, 中心に壊死を認めるものは全くなかつた。脾重量は 0.95~1.3 g, 平均 1.28 g であり, 肉眼的に結節を認めず, 肝には 2 匹にわずかな微小結節が認められた。門脈リンパ結節には肝に結節を認めた 2 例に著明な腫脹, 壊死を認めた。その他のリンパ結節には肉眼的病変を認めなかつたが, 肺の結節がもつとも多数認められた例 (No. 35) には気管リンパ節のきわめて軽度の腫脹が認められた。第 2 群 (非感作群) は吸入感染後 3 週目に 1 匹が非結核性疾患で死亡, 他の 4 匹は 5 週目に撲殺して剖検した。肺表面の結核結節数は吸入後 5 週目のものでは 167~384 コ, 1 匹平均 280 コで, 3 週目で死亡したものでは小結節が 631 コ認められた (多数の結節あるものの数は概算である)。結節の肺葉別分布は上葉と中葉の計が 600 コ (34%), 下葉が 1,015 コ (57.5%), 心臓葉が 149 コ (8.5%) で感作群との間に差は認められなかつた。結節の大きさは吸入後 5 週目のものではほとんどが 1 mm 以上で, 2 mm 以上の結節も多数認められ, 融合して 3~4 mm の結節を形成しているものもあつた。大きい結節はもちろん, 1 mm 前後の比較的小さい結節の中心にも壊死を認めるものが多く, 結節数の少ない例 (No. 9) でも 2 mm 以上の結節があり, ここには中心壊死が認められた。脾重量は 0.95~1.9 g, 平均 1.35 g であつた。気管リンパ節は 2 例に著明な腫脹, 1 例に中等度, 1 例に軽度の腫脹があり, すべての例に乾酪化が認められた。ただし 3 週目に死亡したものにはきわめてわずかな腫脹が認められたのみである。肺の結節がもつとも大きかつた例 (No. 6) では, 後胸骨, 鼠蹊,

表3 臓器病変の肉眼的所見

実験動物群 動物番号		BCG 感作群 (第1群)					非感作群 (第2群)					BCG 接種のみ(第3群)				
		2	3	4	5	35	6	7	8	9	10	16	18	19	20	
臓器	右膝 膜	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	±	-	
	左 " "	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	
	右鼠 蹊	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	左 " "	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	右腋 窩	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	左 " "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	腸間 膜	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	右腸 骨	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	左門 脈	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	後胸 骨管	-	-	⊕	⊕	-	-	-	-	-	-	-	⊕	⊕	⊕	
	気管	-	-	-	-	±	⊕	±	⊕	⊕	⊕	-	-	-	-	
	内臓	脾	-	-	-	-	-	-	-	卅	-	-	-	-	-	-
		肝	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	膿瘍	膿瘍
		肺	+	+	+	+	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-	+
脾重量 g		0.95	1.7	1.2	1.25	1.3	1.5	1.3	1.9	1.1	0.95	2.0	2.1	1.2	0.7	
肺内結核結節の概数		43	9	34	63	114	237	631	346	167	384	0	0	0	5	
肺内結核結節の大きさ		1.5 mm 1 コ 1mm.4 コ 他は 0.5 mm 以下	すべて 0.5 mm 以下	すべて 0.5 mm 以下	1~ 0.5 mm 以下	2mm3 コ 1mm 11 コ 他は 1mm 以下	大部分 2mm 以上 3~4mm (融合) あり	ほとんど 0.5mm 以下	すべて 1mm 以上 2mm 以上多数 あり	多くは 1mm 以上 2mm 以上ものあり	多くは 1mm, 2mm 以上もかなりあり					きわめて小
リンパ腺病変 (-) 全く腫脹なし      内臓病変 (-) 全く結節なし      ○乾酪化 (+) 米粒大腫脹      (+) 数10コ以下 (十) 大豆大 "      (卅) 約100コ以下 (卅) 豌豆大以上 "      (卅) 約100~200コ ○乾酪化      (卅) 約200コ以上																

表4 肺内結核結節の肺葉別分布

実験動物群 動物番号		BCG 感作群 (第1群)						非感作群 (第2群)					
		2	3	4	5	37	計	6	7	8	9	10	計
右肺	上葉	1	0	2	1	3	7	10	20	2	8	10	50
	中葉	8	1	5	8	8	30	58	61	94	13	41	267
	下葉	11	1	9	10	34	65	46	150	110	53	140	499
	心臓	0	1	2	3	2	8	18	50	40	10	31	149
	計	20	3	18	22	47	110	132	281	246	84	222	965
左肺	上葉	15	3	4	18	15	55	32	150	30	17	54	283
	下葉	8	3	12	23	52	98	73	200以上	70	65	108	516
	計	23	6	16	41	67	153	105	350以上	100	83	162	799
総計		43	9	34	63	114	263	237	631	346	167	384	1,764
両側計	上葉						92 (35%)						600 (34%)
	中葉						163 (62%)						1,015 (57.5%)
	下葉						8 (3%)						149 (8.5%)

腸骨等のリンパ節にもわずかながら腫脹が認められた。肝、脾、腎には1例の脾における結節を除き著変を認めなかった。第3群(BCG接種のみの群)では1例に小結節が5コ、肺に認められたが、後述のごとく臓器培養では結核菌を検出しえなかった。門脈リンパ節に3例、肝に2例、膿瘍が認められたが、門脈リンパ節からは第1群のNo.4と同様に少量の結核菌が検出された(第1群の門脈リンパ節の病変もBCGによるものではないかと思われる)。肝膿瘍は非結核性のものであった(後述)。脾重量は0.7~2.1g、平均1.5gであった。

(4) 組織学的所見(表5)

肺、肝、脾、気管リンパ節、門脈リンパ節についてヘマトキシリン-エオジン、鍍銀、菌染色(隈部法)を行ない組織学的検索を行なった。まず肺では、BCG感作群は結核結節の数が少なく、1例を除き1切片に2~3コ

ないし数コ認められるのみで、大きさはきわめて小さく(0.3~1.0mm)、あるものは小さい類上皮細胞結節であり、わずかに線維増殖が認められた。中には類上皮細胞が萎縮したものもみられ、ある結節では小円形細胞が主な成分で、その中に類上皮細胞が混ざるという型であった。壊死のある結節は1例もみられなかった。また結節中の結核菌は結節数のもつとも多くかつ大きかつた例(No.35)にのみ見出され、他にはすべて認められなかった。これに対し非感作群では、肺の結核結節数は感作群に比し、はるかに多く、大小様々(2~3mm)で、いずれも境界不鮮明で、周囲の肺胞壁に細胞浸潤が認められるものが多い。大きい結節には著明な中心壊死が認められた。結節中の結核菌は1例(No.7)を除きすべての例の壊死巣中に多数認められた。BCG接種のみの群では1例できわめてわずかな類上皮細胞の集りが2~3コに認められたのみであった。

表5 組織学的所見

実験動物群 動物番号		BCG 感作群 (第1群)					非感作群 (第2群)					BCG 接種のみ (第3群)			
		2	3	4	5	35	6	7	8	9	10	16	18	19	20
臓器	病変の性状														
	結節の大きさ mm	0.3	0.5以下	0.7	0.5~1.0	0.7	3~4	0.5~1.0	2.5~3.0	0.7~2.0	3.0				0.2以下
	結節の数 (1切片中)	1~2	3	数コ	数コ	多数	多数	多数	多数	多数	多数	-	-	-	1~2
	類上皮細胞増殖	極僅	僅	僅	僅	少	広汎	比較的少	多数	かなり多数	多数	-	-	-	極僅
	中心壊死	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+				-
	小円形細胞浸潤	僅	やや混合	やや多数混合	多数	やや多数	多数	多数	かなり多数	かなり多数	かなり多い所あり	-	-	-	やや混合
気管リンパ節	結節中の菌	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	
	腫脹	-	-	-	-	±	+	±	+	+	-	-	-	-	
	類上皮細胞結節	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
	壊死	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	
	腺周囲炎	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	
肝	結節中の菌	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	
	類上皮細胞結節	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+	
脾	類上皮細胞結節	+	-	-	-	+	+	+	+	+				-	

次に気管リンパ節においては、BCG感作群では腫脹はほとんどなく、腺周囲炎は認められず、小さい類上皮細胞結節がわずかに存在し、壊死は全くみられなかった。これに対し非感作群では感染後3週で死亡した1例を除き、著明な腫脹があり、腺周囲炎が認められ、大きな集合結核結節を形成し、その中に広汎な壊死が認められた。また壊死巣中には多数の結核菌が見出された。

肝では、感作群でも結核結節が認められるが、非感作群に比しはるかに小さかつた少なく、しばしば小円形細胞

を主とし、類上皮細胞の少ないものが認められた。非感作群では大きな類上皮細胞結節がかなり多数認められたが、壊死はほとんどなかった。

脾についてみると感作群では結核結節の認められない例が約半数で、他は小さい結節がわずかに認められるのみであった。非感作群ではすべての例に結核結節が認められたが、肝に比して数が少なかつた。

門脈リンパ節にみられた壊死巣中にはほとんど結核菌を認めず、壁の類上皮細胞層は比較的発達が弱いように

思われた。肝に認められた膿瘍は非結核性のものであった。

(5) 臓器内結核菌培養所見 (表6)

剖検時に肺、肝、脾および一部の門脈リンパ節の結核菌定量培養を行なった。各臓器 10 mg 中の生菌数は次のごとくであった。肺では、感作群で 7~243, 平均 87, 非感作群では 3,000~44,200, 平均 21,300 であり、肝

では、感作群で 1~27, 平均 7.8 であり、非感作群で 37~319, 平均 213 であつた。脾では感作群で 5/2~27, 平均 8.8 であり、非感作群で 16~359, 平均 144 であつた。すなわち各臓器ともに生菌数は感作群が非感作群に比しはるかに少なかつた。また BCG 接種のみの群では肺からは菌を証明しえず、肝、脾、門脈リンパ節より微量の菌が証明されたのみであつた (おそらく BCG

表 6 臓器内結核菌定量培養成績

実験動物群 動物番号 臓器	BCG 感作群 (第1群)					非感作群 (第2群)					BCG 接種のみ (第3群)			
	2	3	4	5	35	6	7	8	9	10	16	18	19	20
肺 10 mg 中 生菌数	35	7	64	86	243	44,200	/	32,400	3,000	5,600	0	0	0	0
肝 10 mg 〃	7	2	2	1	27	241	/	319	255	37	1/2	0	3	1 2
脾 10 mg 〃	5 2	13/2	7 2	9 2	27	106	/	359	95	16	0	3 2	3 2	1/2
腸間膜腺膿瘍	/					/					/			
	/					/					13 2			

と思われる)。

総括ならびに考案

結核菌の吸入感染実験は人結核症の大部分が経気道飛沫ないし塵埃感染であるゆえ、もつとも自然の感染条件に近い実験方法であるが、感染菌量の定量がきわめて困難なことに難点があることは第 1 報において述べたところである。

したがって免疫効果の判定、化学療法等の治療効果の判定等の実験に応用するためには、感染菌量の定量化が先決問題となる。Lurie らはこの点に関し、噴霧菌液中の生菌数、噴霧菌液量、気流中の菌数、動物の呼吸量等を測定して、これらから吸入された菌量を予測し、その値に対して、実際に肺内に生じた結節数を比較することによって、1 コの結節を作るのに必要な菌数を求め、この数を指標として BCG の免疫効果<sup>2)</sup>、重感染<sup>3)</sup>、副腎皮質ホルモン<sup>4)</sup>、甲状腺ホルモン<sup>5) 6)</sup>、動物の先天抵抗性<sup>7)</sup> 等の結核症に及ぼす影響について実験を行なっている。しかしながら、これらの定量実験においても、菌の肺内への沈着率は考慮されていないから、相対的な定量化といわねばならない。相対的な定量化ならば、実験条件を一定にし適当な条件で感染せしめることによって、簡単な装置により目的を達することが可能と思われる。条件を一定にするためには噴霧菌液中生菌数、噴霧菌液量、吸入時間、噴霧菌液の粒度分布<sup>8)</sup>、実験動物の呼吸の型<sup>9)</sup> と量<sup>10)</sup>、動物の先天抵抗性等が問題になるが、今回の実験では動物の先天抵抗性、呼吸量については十

分な考慮を払うことができなかつた。しかし、BCG を接種した群のツ反応陽転状況等からみると個体差はそれほど大きくないと思われる。Lurie<sup>2)</sup> によれば先天抵抗性の弱い種の家兎では BCG 接種による免疫効果が吸入感染実験によつては明らかでないが、抵抗性の強い種では免疫効果が著明に現われることを述べ、そのさい、BCG 接種によるツベルクリン反応陽性化の速さ、強さ、持続性、および BCG 接種局所の変化の強さ、治療速度等が先天抵抗性の強弱の指標になると述べている。BCG を接種しなかつた群 (全例の 1/3) にのみ他の群と異なつた抵抗性のものが偶然選ばれる可能性は少ないと考えられる。今回の実験において BCG 感作群は非感作群に比し、肺内結核結節数およびその性状、気管リンパ節の病変、肺、肝、脾中の生菌数等がすべて軽度あるいは少であつたことは BCG 接種の免疫効果を明らかにしているものといえよう。すなわち比較的簡単な吸入感染装置によつても、条件を一定にすることによつて相対的に定量的な感染を行なえば定量的な免疫実験が可能であり、治療実験等も可能であろうと思われる。使用動物、菌株の組合せを種々に変えた場合どのような条件が適しているか、また BCG 接種量、感作より吸入感染までの期間、吸入菌量、感染より剖検までの期間を種々に変えた場合、どのような差異がみられるかはなお検討を要する問題である。また吸入感染実験と他の感染方法による実験との差異について検討することも吸入感染の評価のために必要と思われる。いずれの場合においても感染菌量の絶対的定量化は将来検討されねばなら

ない重要な問題であろう。

## 結 論

第1報で報告した吸入感染装置によりモルモットに人型結核菌  $H_{37}Rv$  株を吸入感染せしめ、BCG接種の影響を観察し、次のごとき成績を得た。

1) BCG感作群は非感作群に比し、肺内結核結節の数がはるかに少なく(約1/10)かつ大きさが小さく、感作群では結節の中心に壊死を認めなかったが、非感作群では大部分の例に壊死を認め、壊死巣中に多数の菌を認めた。

2) 肺内結核結節の肺葉別分布は感作群と非感作群の間に差異を認めなかった。

3) 気管リンパ節の病変は感作群にはほとんど認められなかったが、非感作群では著明な腫脹と広汎な壊死が認められたものが多かった。

4) 肺、肝、脾の結核菌定量培養による各臓器内の生菌数においても、感作群は非感作群に比しはるかに少なかった(約1/20~1/250)。

以上の成績からBCGの免疫効果をモルモットの吸入感染実験によって判定することができた。

終りに本研究の機会を与えられ、御指導、御校閲を賜りました結核予防会結核研究所長隈部英雄先生、研究

部長岩崎龍郎先生に深く感謝いたします。また御助言を頂いた研究副部長大林容二先生に感謝いたします。実験に御援助頂いた小関勇一、豊原希一、青木正和、工藤賢治の諸先生、内山花子、塚越兼吉、他研究室の方々に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 下出：呼吸器診療，13：848，昭33.
- 2) Max B. Lurie et al. : J. Immunology, 68 : 369, 1952.
- 3) H.L. Ratcliffe & W.F. Wells : J. Exper. Med., 87 : 585, 1948.
- 4) M.B. Lurie et al. : Science, 113 : 234, 1951.
- 5) M.B. Lurie : Amer. Rev. Tuberc., 73 : 434, 1956.
- 6) M.B. Lurie et al. : Amer. Rev. Tuberc., 79 : 152, 180, 1959.
- 7) M.B. Lurie et al. : Amer. Rev. Tuberc., 72 : 297, 1955.
- 8) L. S. Sonkin : Amer. J. Hyg., 53 : 337, 1951.
- 9) H.D. Landahl : Arch. of Indust. Hyg. & Occup. Med., 3 : 359, 1951.
- 10) M. Kleiber : Science, 99 : 542, 1944.