

結核菌の吸入感染に関する実験的研究

とくにINH耐性菌による感染とBCG免疫との関係

下出久雄*・豊原希一**

*国立東京療養所 **結核予防会結核研究所

受付昭和36年6月13日

緒言

INH耐性, カタラーゼ反応陰性結核菌の毒力の低下についてはすでに多数の研究者によつて報告されているが, その多くはモルモットに対する皮下, 静脈内, 腹腔内, 脳内接種の成績であり^{1)~13)}, また気道内感染実験^{14) 15)}も気管内への菌液の注入による方法によつてゐる。しかしCohn¹⁶⁾らは airborne infection による実験も行なつてゐる。これらの実験において気管内感染は他の接種法に比し臓器内生菌がより長期間認められること, airborne infection では時に比較的強い病変が肺内に形成されること等が認められているが, INH 感性菌の感染に比較すればはるかに軽度であり治癒傾向が強いとされている。菌の毒力は宿主, 寄生体関係によつて

決定されるものであり, また寄生体が主として定着する宿主臓器の種類によつても左右され, また感染経路によつても左右されるものである¹⁷⁾。したがつてINH耐性菌の毒力を論ずる場合, なかんずく人体への感染, 発病の可能性を論ずるさい, 動物実験においても airborne infection による検討が必要である。われわれはかつて結核菌の相対的定量的吸入感染装置について報告し¹⁸⁾, その後本装置がBCGの免疫実験¹⁹⁾, 重感染実験²⁰⁾等にも使用しうることを報告したが, 今回は本装置によりINH耐性, カタラーゼ陰性菌の毒力について検討した。すなわちINH耐性菌とINH感性菌の毒力を比較し, 次にINH耐性菌の吸入感染に対するBCGの免疫効果を観察し興味ある知見を得たので報告する。

Table 1
Materials and Methods of Experiments

Experimental Group	First Experiment										Second Experiment									
	Group R1 infected with INH resistant strain					Group S infected with INH susceptible strain					Group R2 infected with INH resistant strain					Group BR infected with INH resistant strain after BCG vaccination				
No. of animals	1	7	8	9	10	26	27	28	29	30	21	2	4	5	6	16	17	18	19	20
Experimental condition																				
Body weight (g)	480	530	470	600	470	450	530	600	570	500	535	590	550	520	615	600	600	470	655	590
Strain	INH-resistant catalase negative H37Rv strain					INH-susceptible H37Rv strain					INH-resistant catalase negative H 37 Rv strain									
Viable units of atmized suspension (per ml)	35×10 ⁵					38×10 ⁵					40×10 ⁵									
Time of inhalation (minute)	10	7	10	13	11	5	10	10	11	10	10	9	8	5	6	11	6	9	5	5
Volume of atmized suspension (ml)	9	9	10.5	9	9	10	10	10	10	10	15	11	10.7	11.5	13	15	10.7	11.7	13.3	10.9
Atimizing pressure (pound/sq. inch)	25	25~30	"	"	25	25~30	"	"	"	"	30	20~30	"	30	"	"	"	"	"	"
Time for positive conversion of tuberculin reaction after airborne infection (week)	3	3	2	3	3	3	3	3	3	4~5	4	2	3	3	4					
The time of autopsy after airborne infection (week)	5	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"					
The time of airborne infection after BCG vaccination (week)																5	"	"	"	"
Number of tubercles in the lungs	200	110	72	158	157	126	601	581	379	460	33	236	97	52	164	4	2	5	9	2

II 実験方法

吸入感染装置についてはすでに報告したので原理のみを述べると、菌の aerosol は菌浮游液を compressor からの圧搾空気により spray gun から噴霧することによつてつくられ、これを気密にされた円筒内に気流として通過せしめ、円筒の他端に実験動物の頭部をゴムマスクに密着させて吸入せしめた。このさい気流中の菌塊は数コ以下、ほとんどが単個菌となるよう、また噴霧液粒子は 10μ 以下、大部分が 1μ くらいとなるようにした。実験条件は次のごとくである。(表 1)

第 1 実験：感染に使用した菌株は H37Rv およびこれより *in vitro* で INH $50\gamma/cc$ に完全耐性化されたカタラーゼ反応陰性の菌株で、ともに Sauton 培地 2 週間培養菌を蒸留水に $1cc$ 中 $10mg$ の濃度に浮遊せしめ、これを 2,500 回転、10 分間遠沈し、その上清を濾紙にて濾過した菌液を噴霧用菌液とした。菌液中の生菌数は H37Rv 株では $1cc$ 中 38×10^5 、同株 INH 耐性株では 35×10^5 であった。噴霧吸入時間は 5~13 分、噴霧菌液量は 9~10.5 cc で、噴霧圧は 25~30 *pound/sq. inch* であった。実験動物は体重 450~600 g の 100×旧ツベルクリンの皮内反応陰性雌モルモット 10 匹で、これを 2 群に分ち、第 1 群 (R 1 群とよぶ) 5 匹には前記 INH 耐性株を、第 2 群 (S 群とよぶ) 5 匹には INH 感性株を吸入感染せしめた。感染後 5 週目に剖検し、肺表面の結核結節数を算定し、その他各臓器の肉眼的、組織学的観察を行ない、肺、肝、脾の結核菌定量培養 1% 小川培地ならびに耐性菌感染群に対しては INH $50\gamma/cc$ 含有小川培地によつても行なつた。

第 2 実験：体重 470~655 g のツ反応陰性雌モルモット 15 匹を 3 群に分ち、第 1 群 (BR 群とよぶ) はあらかじめ BCG 乾燥ワクチン $5mg$ を皮下接種し、5 週間後に第 1 実験と同株の INH 耐性株から同一の方法でつくられた菌液を噴霧し、吸入感染せしめた。この菌液中の生菌数は 40×10^5 であった。第 2 群 (R 3 群とよぶ) は BCG 接種を行なうことなく BR 群と同一の菌液を交互に 1 匹ずつ吸入感染せしめた。第 3 群 (B 群とよぶ) は BCG 接種のみを行ない吸入感染を行わず対照とした。噴霧吸入時間は 5~11 分、噴霧菌液量は $10.7 \sim 15cc$ で両群はほぼ同様な条件で感染せしめた。感染後 5 週目に剖検し、第 1 実験と同様な観察を行なつた。両実験ともに感染後毎週、100 倍旧ツベルクリン液による皮内反応を行ない、体重を測定した。

III 実績成績

A) 第 1 実験

(1) ツ反応の推移 (図 1)：ツ反応は R 1 群は感染後 2 週目に 1 匹、3 週目に他の 4 匹がすべて陽転し、S 群は 3 週目に 4 匹、他の 1 匹は 5 週目に陽転した (4 週は未測定)。ツ反応硬結径の平均値の推移は図 1 のごとく両群間に差はなかつた。

(2) 体重の推移：体重の平均値の変動を図 2 に示したが両群間に有意の差はなかつた。

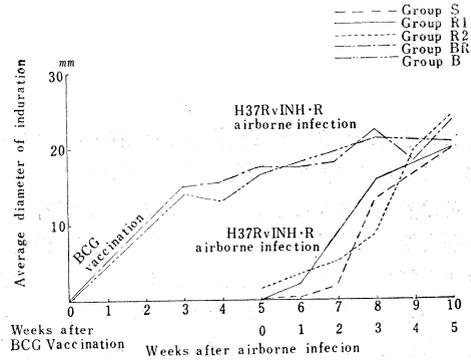


Fig. 1. Changes in tuberculin reaction.

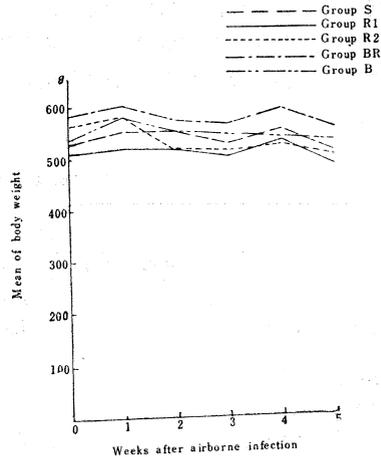


Fig. 2. Changes in body weight.

(3) 肉眼的剖検所見 (図 3)：肺表面の結核結節数は R 1 群では 72~200 コ (平均 139 コ) で大きさはケシの実大が多かつたが、中には約 $1mm$ の中心に壊死の認められる結節もみられた。S 群では肺表面の結節数は 126~601 コ (平均 429 コ) で大きさは 2~3 mm が大部分で融合しているもの多く、中心壊死が多数にみられた。気管リンパ節は R 1 群は平均 $6.6 \times 10.2 mm$ (長短径)、S 群は平均 $9 \times 13.2 mm$ の腫脹を示し、S 群のほうがやや腫脹が高度で、壊死が強かつたが肺病変ほどの差はみられなかつた。肝、脾には両群ともに肉眼的病変はほとんど認められず、脾重量は両群ともに平均 $0.8g$ で著変なく差はみられなかつた。

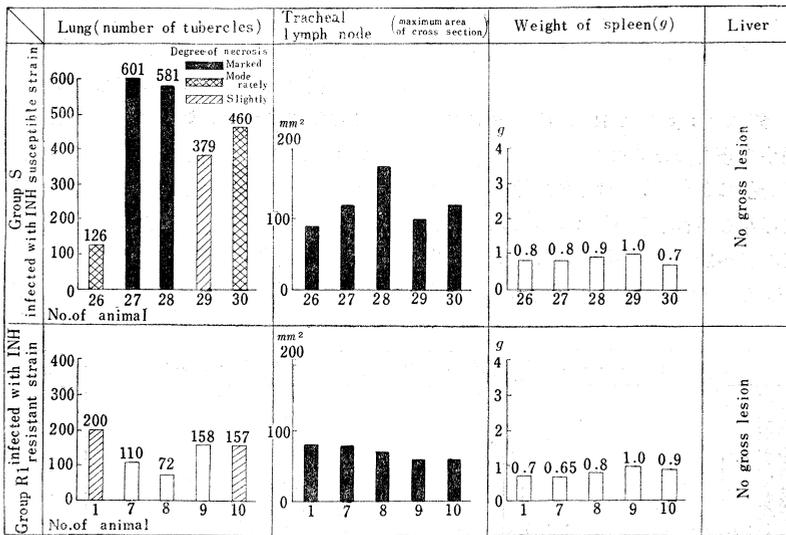


Fig. 3. Macroscopic findings of organs and tracheal lymph node. (First Experiment)

(4) 組織学的所見：R 1 群では 0.1~0.3 mm またはそれ以下の微小な類上皮細胞増殖が比較的多数散在し、他に少数ではあるが 0.5~1.0 mm の中心に壊死の認められる結節がみられ、その中心には少数の抗酸菌がみられた。これに対し S 群では 1~3 mm の融合した類上皮細胞結節が多数みられ、中心壊死も強く、比較的多数の抗酸菌が認められた。気管リンパ節病変は肺病変に比し両群間に著差なく、ともに広汎な類上皮細胞増殖とかなり強い壊死がみられたが、S 群は R 1 群に比しやや高度であった。肝では両群間にほとんど差なく、ともに微小な類上皮細胞結節がわずかに認められたにすぎず、脾でも同様であった。脾では S 群に R 1 群よりやや多数の結節を有するものが多かつたが、ともに肺に比しはるかに少数であった。

(5) 臓器内結核菌定量培養成績 (表 2) : S 群は肺の

10 mg 中生菌数は 220~1,610 (平均 998), 肝では 4~26 (平均 9.3), 脾では 6.5~49 (平均 21.9) であり, R 1 群では肺では 3.5~102.5 (平均 58.3), 肝では 6.5~171.5 (平均 62.6), 脾では 0~3.5 (平均 2.2) であつた。すなわち肺における R 1 群の生菌数は S 群の約 1/17 であり、また脾における生菌数も R 1 群は S 群の約 1/10 で組織学的所見と一致していた。しかし肝における生菌数は R 1 群では肺とはほぼ同数で S 群より多数であつた。R 1 群の臓器培養は INH 50 γ /cc 含有培地によつても行なつたが、INH 非含有培地とはほぼ同数の集落が認められた。

B) 第 2 実験

(1) ツ反応の推移 (図 1) : ツ反応は B R 群では B C G 接種後 3 週目にはすべて陽転しており、吸入感染後、硬結径平均値はわずかに増大したのみで、R 2 群

Table 2
Results of Quantitative Cultures of Tubercle Bacilli from Tissues
(viable units) per 10 mg of tissue (First Experiment)

Experimental group	Group R1					Group S				
	infected with INH-resistant strain					infected with INH-susceptible strain				
No. of animal	1	7	8	9	10	26	27	28	29	30
Lung	19 (27)	102.5 (107)	3.5 (2)	65 (63)	101.5 (87)	1,100	1,610	1,105	220	955
Liver	50 (31.5)	6.5 (5.5)	77.5 (41.5)	7.5 (12)	171.5 (161)	6	4	4.5	26	6
Spleen	1 (0.5)	0 (0)	3.5 (8)	1.5 (1.5)	0 (0)	11	6.5	22.5	49	20.5

(): Results of cultures on the medium containing 50 γ of INH per ml.

では吸入感染後 2 週目に 1 匹, 3 週目に 2 匹, 4 週目に 2 匹が陽転し, B 群は B R 群とほぼ等しい推移を示した。

(2) 体重の推移 (図 2): 体重は R 2 群に B R 群, B 群に比しやや減少の傾向がみられた。

(3) 肉眼的剖検所見 (図 4): 肺表面の結節数は B R 群ではきわめて微小な結節が 2~9 コみられたにすぎず, R 2 群では 33~236 コ (平均 116.4 コ) の結節がみられ, 多くは 1 mm 以下であつたが, 中には

1~3 mm の結節もあり, 中心に壊死を認めた。第 1 実験の R 1 群に比し結節数は等しかったが, 個々の病変の程度は R 2 群のほうが強かつた。ただし S 群よりは軽度であつた。気管リンパ節は B R 群ではわずかな腫脹を認めるものもあつたが B 群と著差なく, R 2 群ではかなり著明な腫脹を示し, 壊死を認めるものが多かつた。各群ともに肝, 脾には肉眼的病変を認めず, 脾重量も 3 群間に差はなかつた。

(4) 組織学的所見: B R 群では肺に明らかな結節を

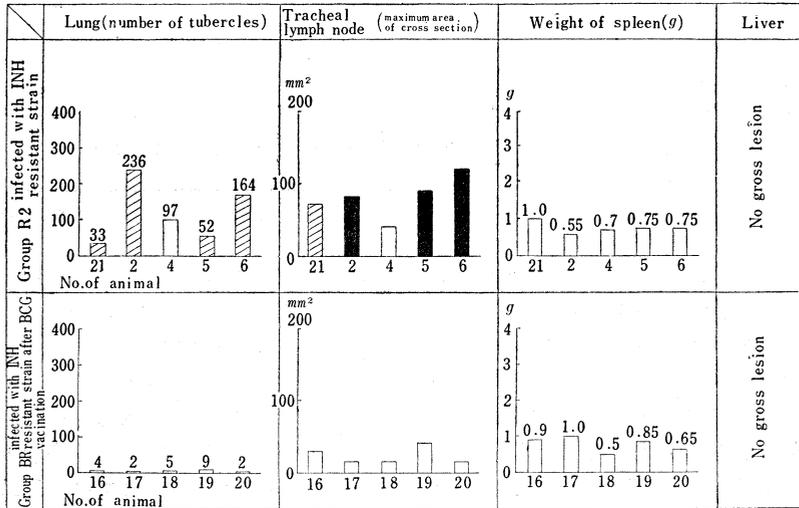


Fig. 4. Macroscopic findings of organs and tracheal lymph node. (Second Experiment)

認めえないものが多く, 一部にきわめて微小な類上皮細胞の集りや小円形細胞の集簇を認めたにすぎず, 抗酸菌は全く認めえなかつた。また気管リンパ節, 肝, 脾にはほとんど病変を認めず, まれにわずかな類上皮細胞の集りを認めたにすぎない。これに対して R 2 群では肺に

おいては R 1 群より結節が大きいものが多く, 中心壊死を認める類上皮細胞結節も多く, 多数の抗酸菌を認めたものがあつた。気管リンパ節, 肝, 脾の病変は R 1 群と同様であつた。

(5) 臓器内結核菌定量培養成績 (表 3): B R 群では

Table 3
Results of Quantitative Cultures of Tubercle Bacilli from Tissues (viable units per 10 mg of tissue) (Second Experiment)

Experimental group	Group R2					Group BR				
	infected with INH-resistant strain					infected with INH-resistant strain after BCG vaccination				
No. of animal	21	2	4	5	6	16	17	18	19	20
Lung	3,000 (2800)	1,540 (2210)	710 (650)	580 (690)	1,500 (1490)	0 (0)	0.5 (0)	103 (115)	1 (0)	0 (0)
Liver	4 (1.5)	0.5 (1.5)	13.5 (7.5)	28 (29)	62 (59)	0	0	0	0	0
Spleen	5.5 (15.5)	0.5 (0.5)	46 (35)	10.5 (10.5)	4 (4.5)	1.5				

(): Results of cultures on the medium containing 50 γ of INH per ml. Tubercle bacilli in the spleen of No. 16 was catalase positive. Tubercle bacilli in the lung of No. 18 was catalase negative.

肺、肝、脾ともにほとんど、あるいは全く菌を認めえないものが多く、1例のみ肺 10 mg 中 115 コのカタラーゼ陰性、INH 50 γ 耐性菌を認めた。これに対し R 2 群では肺 10 mg 中に 580~3,000 (平均 1,466) の菌を認め、R 1 群よりはるかに多く、S 群よりも多数であつた。肝では 0.5~62 (平均 21.6) で R 1 群の生菌数より少なく、肺に比し著しく少なかった。

脾では 0.5~46 (平均 13.3) であつた。これらの培養成績は INH 50 γ /cc 含有培地による培養成績と等しく、検出された菌はほとんど INH 50 γ 耐性菌であつたと考えられる。なお BR 群の BCG 接種局所の膿瘍および脾から検出された菌はカタラーゼ反応(+)であり BCG と思われる。

IV 総括ならびに考案

すでに緒言に述べたごとく、INH 耐性カタラーゼ陰性結核菌のモルモットに対する毒力の低下は多くの実験によつて証明されている。ただし菌株によつては INH 感性菌とあまり変わらない毒力をもつものもあることが報告されているが¹⁷⁾、この場合は同一株の感性株と耐性株を比較したものではない。また INH 耐性株の毒力の低下は皮下、静脈内、脳内、腹腔内、気管内注入および吸入感染等いずれの接種法においても認められているが、接種法により多少の差が認められている。このことは接種菌量の相違にもよると考えられるが、主として菌が最初にもつとも多く定着する臓器の種類ならびにその臓器内の部位の相違によると考えられる。そのような差異によつて菌の増殖力、生体側の菌増殖阻止力、免疫形成の速さ、強さが異なるために毒力の程度が異なつて現われるということが考えられる。しかし現在までの種々の実験ではこのような差は著しいものではなかつたようである。われわれの第 1 実験においては INH 耐性株はその原株に比し、病理形態学的にも、細菌学的にも毒力の低下を示す所見を得た。また第 2 実験において BCG の免疫効果は著明であり、かつて行なつた H 37 Rv INH 感性株の吸入感染に対する免疫効果¹⁹⁾に比し、より顕著であるように思われた。このことは染谷ら²¹⁾がマウスの実験で述べているように INH 耐性菌の弱毒化の一面を現わしているものと思われる。しかしながら一方、気管リンパ節の病変等には耐性菌感染と感性菌感染との間に著明な差は認められず、また耐性菌感染によつても中心に壊死の認められる病巣が形成され、とくに第 2 実験では BCG 非接種 INH 耐性菌感染群では肺の生菌数はかなり多量であり、従来の報告にみられる成績に比し、かなりの毒力を示しているように思われる。第 1 実験と第 2 実験とは時期を異にした実験であるが、ほぼ同様の条件で感染せしめたとと思われるのに INH 耐性菌感染動物の臓器内生

菌数にかなりの差が認められることは、吸入感染法では定量化が困難であるため感染菌量に差が生じやすいことも考えられるが、一面 INH 耐性菌の毒力の低下が airborne infection では他の接種法におけるほど著明ではないためではないかと思われる。時に比較的強い病変ができる場合のあることは Cohn ら¹⁶⁾の吸入感染実験でも認められている(ただし臓器内生菌数は示されていない)。この点に関しては稿をあらためて静脈内接種と吸入感染における INH 耐性菌と感性菌との毒力の差異を比較検討した結果を報告する予定である。また感染直後の各臓器内生菌数を測定し、5 週、8 週後の生菌数の推移を観察した成績も報告する予定である。さらに長期間、数カ月以上の経過については今後検討したいと考えている。

V 結 論

INH 耐性、カタラーゼ陰性化された人型結核菌 H 37 Rv 株のモルモットに対する毒力を吸入感染法によつて検討し、また INH 耐性菌の吸入感染に対する BCG の免疫効果を観察した結果、次の結論を得た。INH 耐性菌の毒力は吸入感染法によつても低下している。しかし他の接種法に比し、その程度はかなり少ないように思われ、壊死を伴つた病変も認められ、かなり長期間多数の生菌が臓器内に認められる。INH 耐性菌の吸入感染に対し BCG は著明な免疫効果を示し、病巣の形成、菌の増殖をほとんど完全に阻止する。

謝辞：

稿を終わるにあたり終始貴重な御教示にあずかり、また病理組織標本の御指導を頂いた結核研究所岩崎所長に深甚なる謝意を表します。また実験遂行上労苦を共にして頂いた塚越、高橋両技師に御礼申し上げます。

なお本論文の要旨は第 36 回日本結核病学会総会において発表した。

文 献

- 1) 平野憲正他：東京医事新誌，70：371，昭28.
- 2) 佐藤直行：医学と生物学，29：1，14，昭28.
- 3) 金井興美：医学と生物学，34：154，昭30.
- 4) 金井興美：医学と生物学，34：248，昭30.
- 5) 金井興美：医学と生物学，35：105，昭30.
- 6) 工藤祐是他：結核，32：551，昭32.
- 7) 柴田一郎他：結核研究の進歩，22：69，昭33.
- 8) 北本治他：結核研究の進歩，22：83，昭33.
- 9) Middlebrook, G. : Amer. Rev. Tuberc., 69 : 471, 1954.
- 10) Meissner, G. : Therapeutische Berichte Bayer, 4/5, 1957.

- 11) Meissner, G. : Diseases of the Chest, 26 : 15, 1954.
- 12) Morse, W.C. et al. : Amer. Rev. Tuberc., 69 : 464, 1954.
- 13) Mitchison, D.E. : Brit. Med. Jour., 4853 : 16, 1954.
- 14) 高橋正雄 : 日本細菌学会誌, 12 : 315, 昭32.
- 15) 佐藤直行他 : 胸部疾患, 4 : 943, 昭35.
- 16) Cohn, M. L. et al. : Amer. Rev. Tuberc., 70 : 641, 1954.
- 17) Bloch, H. : Ann. Rev. Microbiol., 7 : 19, 1953.
- 18) 下出久雄 : 呼吸器診療, 13 : 848, 昭33.
- 19) 下出久雄 : 結核, 35 : 570, 昭35.
- 20) 下出久雄 : 結核, 35 : 789, 昭35.
- 21) 染谷四郎他 : 感染のシンポジウム, 第1集 : 193, 昭34.

Experimental Study on the Airborne Infection of Tubercle Bacilli—On the pathogenicity of the isoniazid highly resistant strain and the effect of BCG vaccination on the infection of this strain. Hisao SHIMOIDE (Tokyo National Sanatorium) Mareichi TOYOHARA (Research Institute, Japan Anti-Tuberculosis Association)

It is generally said that the virulence of the isoniazid highly resistant and catalase negative tubercle bacilli is attenuated. And it is also well known that the expression of the virulence is different by the infection's route.

There are only a few reports on the airborne infection of the isoniazid highly resistant tubercle bacilli. The authors studied the virulence of the isoniazid resistant and catalase negative tubercle bacilli using H37Rv which acquired the resistance to isoniazid of 50 mcg per ml in vitro, and studied the effect of BCG vaccination on the airborne infection of H37Rv highly resistant to isoniazid (H37Rv INHR).

In the first experiment, the virulence of H37Rv INHR was studied by the airborne infection, being compared with the virulence of H37Rv by the same method.

When the guinea pigs inhaled the susceptible bacilli to isoniazid (H37Rv), a good many tubercles involving the caseous centres were generated in their lungs.

On the other hand, in the case of the airborne infection of the highly resistant bacilli to isonia-

zid the number of tubercles in their lungs was less than the former case, and the histological changes were also a little weaker compared with those of the infection by the susceptible bacilli to isoniazid. As to the changes of the tracheal lymph-nodes, there was little difference between these two strains, that is, swelling and diffuse caseation of the tracheal lymph-nodes were found. By the quantitative culture method it has been found that the number of viable bacilli in the lungs and spleens was much less in the animals infected with the isoniazid resistant strain than in the animals infected with the isoniazid susceptible strain.

In the second experiment the authors studied the effect of BCG vaccination for the airborne infection of isoniazid resistant tubercle bacilli. The number of tubercles generated in the lungs and the number of the viable bacilli in each organ were much less in BCG vaccinated animals than in non-vaccinated animals.

From these results the authors conclude as follows: It cannot be denied that the virulence of the isoniazid highly resistant and catalase negative strain is attenuated for the guinea pigs even by airborne infection, but it was not so much weakened as the authors had hitherto considered and BCG vaccination is very effective for the airborne infection of the isoniazid highly resistant tubercle bacilli.