

マウス実験的結核症の病変度判定方法について

青木正和・工藤賢治

続木正大

結核予防会結核研究所（所長 岩崎竜郎）

受付 昭和 36 年 4 月 21 日

マウスの結核感染実験は、すでに R. Koch¹⁾ によつて試みられているが、その後、結核菌を皮下に接種した場合、一定した進行性病巣を作らないこと、ツベルクリン・アレルギーを判定しにくいことなどの理由で用いられず、主としてモルモット、家兎などが用いられてきた。化学療法の実験的研究が広く行なわれるようになってから、マウスは扱いが簡単で、個体差が比較的少なく、費用が少なくすみ、しかも短時日の実験ですむなどの利点から比較的しばしば用いられるようになった。1948 年に Raleigh & Youmans²⁾ により文献総説および病理学的変化について精しい研究が発表され、わが国では翌 1949 年に岩崎³⁾ により化学療法のスクリーニング・テストにマウスを用いることの有用性について提唱がなされている。最近、他の動物に比し比較的容易に近交系動物を用いることができるようになったことから、結核症の研究にもマウスが広く用いられるようになってきた。

われわれはマウスを用いて結核症の経過に及ぼす非特異的因子の影響について研究を行なっているが、その実験にあつてマウス実験的結核症の基礎的問題のいくつかの点で疑問をもつた。マウスの結核症でみられる脾腫の意味、肺の肉眼的病変の評価法、わが国で容易に得られる dd 系マウスに一定の結核症をつくるための感染菌量の問題などである。このため、以下述べるごとく実験を試み、マウス結核症についての基礎的な検討を行なつた。

I 実験方法

体重 20 g 前後、生後約 7 週の dd 系雌性マウス 55 匹を用いた。接種菌には H₃₇Rv 凍結乾燥菌を用い、各菌量とも 0.1 cc の浮游液として尾静脈より静注感染せしめた。接種菌量および生菌単位は表 1 のごとくである。

マウスは毎週 1 回体重測定を行ない、3 週および 6 週に剖検を行なつて (0.5 mg 群および 1 mg 群では 3 週および 4 週に剖検)、肉眼的、顕微鏡的、細菌学的に検索した。臓器重量は torsion balance を用い、mg 単位まで正確に計測した。

なお、このほか、別の目的で行なつた実験の成績も参考としたが、実験方法は成績の項で述べるとおりである。

Tab. 1 Inf. dosis and its viable units

Exp. group	No. of animals	Inf. dosis	Viable units
I	5	1mg	12.5 × 10 ⁶
II	5	0.5	62.5 × 10 ⁵
III	5	0.1	14.7 × 10 ⁵
IV	10	1/100	14.7 × 10 ⁴
V	10	5/1,000	73.5 × 10 ³
VI	10	1/1,000	14.7 × 10 ³
VII	10	1/10,000	14.7 × 10 ²

II 成績

1. 感染菌量と生存日数、体重の推移

感染後第 4 週に 0.5 mg 群の 1 匹が死亡したほかは実験中死亡した動物はみられなかつた。0.5 mg および 1 mg 群では 3 週以後全身状態の悪化を認めたので第 4 週の終りに全部剖検した。他の群は 6 週までいずれも順調に体重の増加をみた。

2. 脾について

1) 健康マウスの脾重量：マウス実験的結核症でもつとも早期にみられる変化は脾の腫脹である。脾の腫脹の程度を明らかにするために、まず健康マウスの脾重量をみると表 2 のごとくである。脾重量は年令によつて異なり、6~7 週まで次第に増加し、以後わずかに減少傾向をたどる。しかし、同年令マウスでみても個体差はきわめて大きく、その大きさは体重の多少とは必ずしも平行しなかつた。

2) 結核菌感染後の脾重量の変化：H₃₇Rv 凍結乾燥菌 10⁻² mg (12.5 × 10⁴ 生菌単位) 静脈内感染後の脾重量の時間的推移をみると、感染後第 1 日で 283 mg、5 日で 234 mg、7 日 228 mg、15 日 337 mg、19 日 239 mg、42 日で 289 mg (それぞれ 3 匹平均) であつた。感染後の脾腫脹も個体差が著しいので動物数を

Tab. 2 Weight of spleen in normal healthy mice.

Weeks old	No. of animals	Average body weight	Average weight of spleen	Standard dev.	Max. of spleen weight	Min. of spleen weight
2	6	6.95 ^g	32.8 ^{mg}	12.4 ^{mg}	52 ^{mg}	16 ^{mg}
4	6	14.7	64.8	19.4	92	42
6	6	18.5	117.7	8.6	125	101
8	5	21.5	112.1	20.7	155	88
10	6	22.7	121.1	42.7	193	66

多くして比較しなければならぬ。しかし、この成績からも、感染直後からすでに著明な腫脹を認め、多少の増減はあるが 6 週の実験終了時までひき続き腫脹がみられたといふことができる。

さて、感染菌量群別に脾腫脹の程度をみると表 3 のごとくである。3 週でも 6 週でも、各群平均脾重量は、感染菌量が多いほど重くなっている。

Tab. 3 Average weight of spleen and no. of viable Myco. tbc. in 10mg tissue of spleen.

	Inf. dosis	Average weight of spleen	Average viable units
3 w. after infection	1 ^{mg}	488.5 ^{mg}	504 × 10
	0.5	486.5	449 × 10
	10 ⁻¹	424	142 × 10
	10 ⁻²	217	337 × 10
	5 × 10 ⁻³	219	203 × 10
	10 ⁻³	199	588
6 w. after inf.	10 ⁻¹	336	7 × 10 ²
	10 ⁻²	235	7.4 × 10 ²
	5 × 10 ⁻³	217	99.7 × 10
	10 ⁻³	175	500
	10 ⁻⁴	153	193.3

3) 脾重量と脾臓内結核菌数：脾重量は感染菌量の増加に伴って増大するが、脾臓内結核菌生菌数は必ずしも増加をみない。3 週では 5 × 10⁻³ mg 以上の菌量感染群はいずれも 10 mg 中に 10³ 代の菌数を認め、6 週では感染菌量の如何をとわずいずれも 10² 代の菌数が認められた (表 3)。したがって、脾重量と脾生菌数とは平行しない。

同量菌量感染群内での個体間で比較を行なっても同様である。図 1 に 5 × 10⁻³ mg 感染群および 10⁻² mg 感染群の 6 週剖検時の脾重量と脾臓 10 mg 中の生菌数との相関を図示した。脾の重いもので、かえって脾内生菌数が少ない傾向さえみられた。

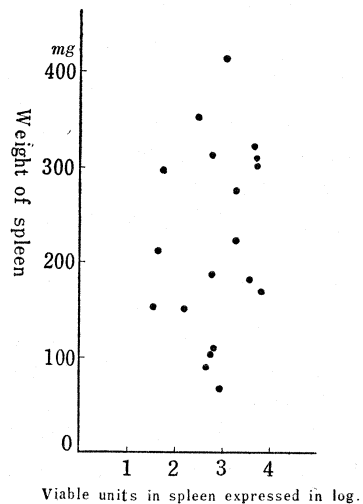
4) 脾臓の組織学的所見：3 週では 5 × 10⁻³ mg 以上

の感染群で結核結節が認められる。感染菌量が多いほど結節の数は多いが、大きさはほぼ同様であり、壊死はみられない。10⁻³ mg 感染群では類上皮細胞様の細胞数コが集合した集団がみられる程度で、結核菌はみられず、10⁻⁴ mg 群では細胞集団も見出だしたがたい。

6 週でも 3 週とほぼ同様の結節を認めるが、10⁻² mg 群および 10⁻¹ mg 群ではむしろ結核菌は少なくなっている。やや萎縮傾向のみられる結節もある。これに反し 10⁻⁴、10⁻³ mg 群では 3 週より結節数は多くみられるようになる。

脾重量の重い脾臓では脾髄の細胞増殖著しく、赤脾髄の巾は著しく大きくなつており、充血がみられることもある。同量菌感染群内でみると、脾重量が重いものではむしろ結節数は少なく、脾重量は脾髄の細胞増殖の程度とほぼ平行する。

Fig. 1 Correlation between weight of spleen and no. of viable Myco. tbc..



3. 肺の病変について

1) 肺の肉眼的所見の模式図

われわれは最近、他の目的で行なつた実験も含めて約 360 匹のマウスについて感染後 3 週または 6 週に剖検

を行なつてその変化を観察する機会をもつた。これらの実験を通じて、肉眼的に病変を認めることができた臓器は肺のみであつた。

肺病変の模式図を画くと 図 2 のごとくである。H₃₇Rv 菌を 10⁻³ mg 程度静脈内に接種し 3 週をこえると肺には微少な結節の出現がみられる。半透明、灰色の結節で、その大きさは点状である。数は菌量に応じて数コから無数の結節が認められるものまで種々な段階がみられる (I, II および IVa)。6 週では直径 3 mm くらいの結節を混ざるようになる。この結節は灰色ないし灰白黄色で、中心部に混濁が強く壊死を伴っているものもみられる。数は数コから 20 コ以上に及び、互いに癒合して不整形を呈するものもみられる (III および IV)。さらに大量菌感染の場合には、肺は全体として著しく大きくなり、結節も大きくなつて小豆大に及び、黄色調が強くなつて灰黄色を呈する。結節は肺の表面からもり上がつてみえる。密に散布したこれら結節間の肺組織にはうつ血が認められる (V)。

以上のごとき病変のほか、灰色びまん性の病巣の撒布を認めることもあつた (IV b)。しかし、この形はきわめて少なく、われわれの実験では 2 例のみであつた。

そこで、われわれは表 4 のごとき基準を作つて肺病変の評価を試みた。各動物についてこの基準で採点し、実験群ごとに平均点をだして比較を行なう方法である。

Fig. 2 Schema of typical macroscopic findings.

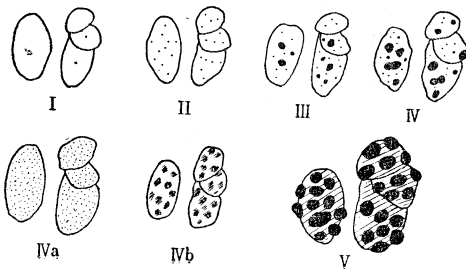


Fig. 3 Schema of macroscopic findings of lung. (3 weeks after infection)

Inf. dosis	1 mg	0.5 mg	0.1 mg	1/100 mg	5/1,000 mg	1/1,000 mg	1/10,000 mg
Macroscopic findings of lung							
Average degree of involvement	3.0	2.0	2.0	1.2	0.6	0.5	0.2
Average weight of lung	366 mg	338 mg	281 mg	173 mg	152 mg	162 mg	146 mg
Average viable units	8.8 × 10 ⁴	21 × 10 ³	61 × 10 ³	29.3 × 10 ³	30 × 10 ²	88	8

Fig. 4 Schema of macroscopic findings of lung. (6 weeks after infection)

Inf. dosis	1 mg	0.5 mg	0.1 mg	1/100 mg	5/1,000 mg	1/1,000 mg	1/10,000 mg
Macroscopic findings of lung							
Average degree of involvement			2.3	2.2	1.8	1.0	0.6
Average weight of lung			282 mg	245 mg	245 mg	149 mg	188 mg
Average viable units			9.5 × 10 ⁵	32.9 × 10 ⁴	10.8 × 10 ⁴	323 × 10 ²	283 × 10

(infection)

Tab. 4 Standard for degree of macroscopic pulmonary involvement.

No lesion	0
Minute tubercles : less than 20	1
" : more than 20	2
With some tubercles larger than 2mm	3
With many tubercles larger than 2mm	4
All surfaces are studded with many tubercles from one to several mm in diameter	5

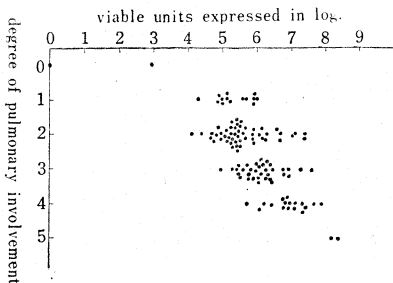
2) 感染菌量群別の肺の肉眼的変化: 1 mg より 10^{-4} mg までの 7 段階で感染したときの肺病変は図 3 および図 4 に示すごとくである。3 週剖検で 10^{-2} mg 以上の感染では大部分で肺に微細な結節が認められるが、 10^{-3} mg 以下の感染では肺に病変が認められないものが多い。6 週では 10^{-4} mg 感染群でも病変を認めるもの多く、 10^{-2} mg 以上の感染群では比較的大きい結節が認められるようになる。

前節で述べた基準に従って各群の平均病変度をみると図の下欄に記したとおりで、菌量に従って病変が少なくなっていくことが明らかにみられる。

3) 肺臓内結核菌生菌数: 各群平均肺内生菌数をみると、3 週でも 6 週でも感染菌量にほぼ平行した菌数がみられる。6 週では 3 週に比し、いずれの群でも菌数の著しい増加をみる。

凍結乾燥 H_37Rv 菌 10^{-4} mg ないし 10^{-2} mg 感染後 6 週で剖検を行なったマウス 120 匹について、肺病変度と全肺内生菌数との相関関係の検討を行なった(図 5)。肺の培養はすべて右上葉について行ない、肺重量の測定も行なって、両者から全肺内生菌数を計算した。各病変度ともかなりのバラツキがみられるが、それぞれほぼ一定の生菌数を示すということができる。

Fig. 5 Correlation between degree of pulmonary involvement and no. of viable Myco. tbc.. (6 weeks after infection)



4) 肺重量: マウスの肺重量は肺病変が重くなるほど重くなる。われわれは血液量の多寡による影響を少なくするため空気栓塞によつて死亡せしめて、torsion balance で肺重量の測定を行なった。

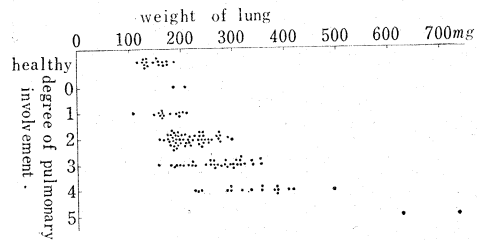
まず、健康マウスの肺重量をみると体重の大きいものほど重くなる傾向がみられるが、17 匹の平均で 147.5 mg (最低 118 mg, 最高 186 mg) であった。

肺に肉眼的に病変を認めるようになると肺重量は増加し、病変度 2 以上となれば肺重量 150 mg 以下のマウスはみられなくなる。感染菌量群別の平均肺重量は図 3 および図 4 の下欄に示した。病変の軽い群ではほぼ正常の肺重量を示し、病変の重さと必ずしも平行しないが、一定程度以上の病変をみる群では肺病変が重いほど平

均肺重量も重くなっている。0.5 mg 以上の感染では 3 週で健康肺の 2 倍以上の肺重量を示した。

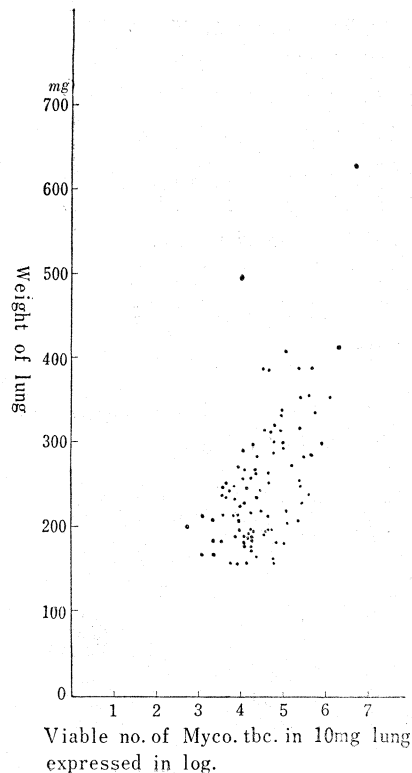
前述の感染後 6 週で剖検を行なったマウス 120 匹について、肺重量と肺病変度および肺内生菌数との相関関係をみると、図 6 および図 7 のごとくである。いずれもよく相関しているということができる。

Fig. 6 Correlation between degree of pulmonary involvement and weight of lung. (6 weeks after infection)



5) 組織学的所見: 肺病変は肉眼的には結節状にみえるが、組織学的には繁殖性間質性肺炎と肺胞内への細胞滲出が主体をなしている。大量菌感染では中心部に壊死がみられるが、濃染する核残渣が多く、乾酪変性とは異なっている。3, 6 週とも巨細胞、線維増殖はみられな

Fig. 7 Correlation between lung weight and no. of viable Myco. tbc..



い。結核菌は多く見出だされ、とくに6週では著しい。1コの foam cell 中に20~30コの菌がみられることもある。

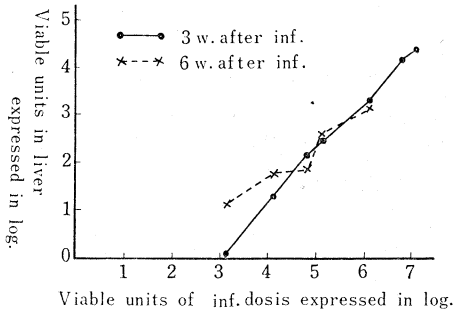
感染菌量または時間的な差はこれらの変化を量的に変化せしむるのみで、比較的単純な組織反応を呈している。

4. その他の臓器の変化について

1) 肝：肉眼的には病変は認められないが、顕微鏡的には繁殖性結核結節が認められる。3週では 5×10^{-3} mg 群以上で結節はみられ、その数は感染菌量に比例して多くなる。6週では3週よりやや萎縮性の結節を混ざるようになるが、極微量菌感染群では6週のほうがより明らかな結節が認められる。

肝臓内生菌数は図8に示すごとく、感染菌量にきわめてよく比例して増加する。感染菌量の多い群では3週に比し6週のほうが菌数は少ないが、少量菌感染群では6週のほうが多くなっている。

Fig. 8 Inf. dosis and no. of viable Myco. tbc. in liver.



2) 腎：肉眼的には病変は見出だされない。顕微鏡的にも変化は比較的少なく、3週で 10^{-2} mg 感染群以上で少数の繁殖性結節が血管周囲にみられるのみである。

6週では3週より変化はさらに軽微である。

3) リンパ腺：マウスではリンパ腺は比較的小さいが、感染菌量、時間に従ってやや腫脹がみられる。結節などの病変は肉眼的にはみられない。われわれは外界からの影響が少ないと考えられる門脈腺について組織学的に検討を行なったが、3週で 5×10^{-3} mg 感染群以上で結節がみられた。感染菌量に従って結節数は多い。

6週では3週よりやや結節数も多く、結核菌もやや増加する。リンパ腺の結節も他臓器と同様の繁殖性類上皮細胞結節で、壊死、巨細胞、線維形成はみられなかった。

III 考 案

マウス実験的結核症の病変度判定方法として現在多く用いられている方法は、平均生存日数をみる方法および臓器内結核菌の定量培養による方法である⁴⁾。このほか

肺重量測定法⁵⁾、肺比重測定法⁶⁾、Youmansの肺病変評価法⁷⁾などがある。

それぞれ特徴をもった方法であるが、平均生存日数をみる方法は、感受性の強い純系マウスを用いた場合、あるいはきわめて大量菌感染による急性重症結核症の観察であり、また、死亡原因に非特異的因子が混入した場合誤りを避けられない点などに欠点があると考えられる。臓器内生菌数算定法は、病理学的立場からはもの足りなく感じられる。

われわれは必要な場合、肉眼的所見、顕微鏡的所見、細菌学的所見をあわせて観察できる方法で、かつ、予備実験的には肉眼的所見のみで大体の傾向を知りうるような判定方法を求めたかった。このような観点から、他の目的の実験を行なっている途上で考案した判定方法が、肺の肉眼的病変度判定法である。

成績の項で述べたごとく、マウス実験的結核症で肉眼的に変化がみられるのは、脾の腫脹と肺の病変のみであった。そこでまず、成績判定に脾重量を加えるかどうかが問題となる。

たしかに平均脾重量でみると、3週でも6週でも感染菌量が多いほど、脾重量は重くなり、化学療法を行なった場合にはその効果に応じて軽くなってくる。したがって、ある程度これで病変度の判定を行なうと考える。しかし、脾内結核菌生菌数と脾の重さとは相関せず、また、組織学的所見とも平行しない。これらの点からマウスの場合脾の重量増加は、モルモットでみるごとき病変形成によるというよりはむしろ菌感染に対する反応によると考えられるのである。また、たとえばチフス・ワクチン注射によって脾は腫脹し、コーチゾン投与で萎縮するなどの非特異的な影響も受けるので、病変度の判定にさいしては参考にする程度がよいと考えられた。

肺病変の判定方法としては、すでにいくつかの方法が提唱されている。Youmans氏法は原則的にはわれわれの方法と同じで、病巣の占める面積によつて4段階に分けている。この方法は病変の程度が重いほうに傾いており、ここに述べた程度の病変ではほとんどがプラス1と判定されてしまい、かつ、面積%なので判定が難しい点に欠点がある。肺比重測定法⁵⁾は追試しなかつたが、操作が複雑である。肺重量測定法はすでに述べたごとく、肺重量と病変度、肺重量と肺内生菌数はよく相関し、かつ、客観的に数値化できる点優れた方法と考えられる。この方法は、肺内血液量による誤差がでること、軽微な病変のときには判定に誤りがでること、測定の手数が複雑なことなどの欠点を持ち、病変の性状を直接表現していない点にやや不満を感じるが、客観的に判定できるよい方法であると思う。

われわれの判定方法は、すでにみたごとく、肺内生菌数ともよく平行しており、そのうえ、容易に判断できる

ので使いやすいのではないかと考えている。

マウスではこのほか、肝、腎、リンパ腺、心筋、副腎などにも顕微鏡的には結節形成がみられる。これらの病変はリンパ腺を除いて、3週に比し6週で治癒傾向を認める点、肺病変と必ずしも平行しない。しかし、一定時点で比較するかぎり肺病変の重い動物ほどこれらの臓器の病変も重くなっており、また、比較的軽微な病変なので、マウスでの病変度は上述の肺病変度でほぼ代表しうると考える。

なお、マウス結核症での線維形成の有無、先天抵抗性の強さの検討など、2, 3の検討も行なっているため次の機会に報告したいと考えている。このため、今回は組織学的所見については簡単にふれるにとどめた。

IV 結 語

ddY系マウスに 10^{-4} mgより1 mgまでの7段階のH₃₇Rv結核菌を静脈感染せしめて種々な程度の結核症をつくり、マウス結核症の基礎的問題に検討を加え、次の結論を得た。

1) マウス実験的結核症で最初にみられる変化は脾の腫脹である。感染後第1日よりすでに著明な腫脹がみられ、6週以上まで持続する。感染菌量群別に脾重量をみると3週でも6週でも菌量の多いほど脾重量は重い。

2) しかし、脾重量と脾内結核菌生菌数とは必ずしも平行せず、重量の重いものほど病変が重いとはいえない。

したがって、病変度の判定にさいしては参考にするにとどめるがよいと考える。

3) マウスで肉眼的に病変を認めうるのは肺のみである。肺病変を5型に分類し、新しい判定基準を提示した。この基準の各病変度の肺内生菌数はほぼ一定の数字を示す。したがってこの基準によつて容易にマウスの病変度を判定しうると考える。

4) わが国で容易に手に入れることのできるdd系マウスに一定の病変をつくるのに必要な結核菌菌量を示した。

最後に御指導、御校閲を頂いた結核研究所長岩崎竜郎先生に感謝の意を表します。なお当論文の要旨は第36回日本結核病学会総会において発表した。

文 献

- 1) Koch, R.: Die Aetiologie d. Tbk., 1884.
- 2) Raleigh, G.W. & Youmans, G.P.: J. of Inf. Dis., 82: 197, 1948.
- 3) 岩崎竜郎 他: 結核, 24: 173, 昭24.
- 4) 染谷四郎: 第35回日本結核病学会総会, 昭35.
- 5) Gray, D.F. et al.: Am. Rev. Tbc., 78: 226, 1958.
- 6) Crowle, A.: Am. Rev. Tbc., 77: 681, 1958.
- 7) Youmans, G.P. (Chairman): Am. Rev. Tbc., 61: 274, 1950.