

マウスの実験的結核症における網内系貪食機能の推移

工藤賢治・青木正和

結核予防会結核研究所（所長 岩崎竜郎）

受付 昭和 36 年 10 月 26 日

結核症に対する非特異的抵抗性に関する研究は、本邦では heterogenous resistance についての額田¹⁾の広汎な研究がある。また近年になつて、Dubos^{2)~5)}らもマウスを用い、異種細菌感染がマウスの非特異的抵抗性を高めるといふ事実を明らかにした。一方、網内系機能測定法として信頼性の高い炭粉粒子貪食機能の測定法が確立され、網内系機能との関連において論じられるようになってきた⁶⁾。

これとは別個に、われわれはすでに網内系機能検査法に関し、より簡便な墨汁を用いての測定法を発表した⁷⁾⁸⁾。本法を用いてマウスの実験的結核症の進展と、網内系機能との関連を検討し、マウスの結核症に対する感受性の個体差と網内系機能との関連をも検討した。

網内系の機能判定法の主なものとしては、赤崎らの組織学的検索によるもの、および血中に異物を注入して血中よりの消失速度をみるものの 2 つがあげられる。前者は必ずしも定量的でないこと、および病理学的手技の熟達が要求され、一般的でないうらみがあるので後の方法を選んだ。後者に用いられる粒子に炭粉、糖鉄、P³²で標識した Chromium Phosphate 粒子、鳩の赤血球、I¹³¹で標識したアルブミン・グロブリン複合体およびコンゴ赤色素等¹⁰⁾である。これらのうち、わが国において旧くより慣用されているのはコンゴ赤指数であり、われわれも始めはこの方法を用いた。しかし実験中にコンゴ赤は注射後早期より胆汁内に排泄されることを認め、種々検討した結果、コンゴ赤指数は肝細胞の機能状態によつて影響を受けることを確かめた⁷⁾⁸⁾。そこで、これに代わるものとして、特異的に網内系細胞に摂取されることを組織学的に確認した墨汁粒子を注入し、その血中よりの消失速度を測定して網内系貪食機能を検査した。本法を用いてマウスの実験的結核症の種々な時期に測定し、結核症の進展および病変罹患度との関連を追求した。

網内系貪食機能測定法としての墨汁（貪食）指数

本検査方法の詳細は青木⁷⁾、工藤⁸⁾が報告しているもので、ここでは要点のみを記述する。すなわち 250 A° 前後の炭粉粒子を 80 mg/cc 含有する市販 Pelikan 印 India Ink を 16 mg/cc に稀釈し、0.1 cc/10 g をマウスの尾静脈より注射する。注射 20 分後に腋窩動脈を切断して採血し、3.8 % クエン酸ソーダで 2 倍に稀釈する。これを遠沈して上清を分離し、その 0.5 cc に蒸留水 2.5 cc を加え、光電比色計にて波長 520 mμ で濁度を測定する。あらかじめ作成した標準曲線から墨汁濃度を算出し、墨汁濃度の対数の絶体値を墨汁（貪食）指数とした。墨汁指数に影響する主なる因子は測定時の気温と動物の生後日数である。したがって室温はほぼ 15° C~25° C とし、生後日数の揃つた動物について実験する必要がある⁷⁾⁸⁾、なおその他の条件によつても変動するので、各実験ごとに対照をとることが必要である。

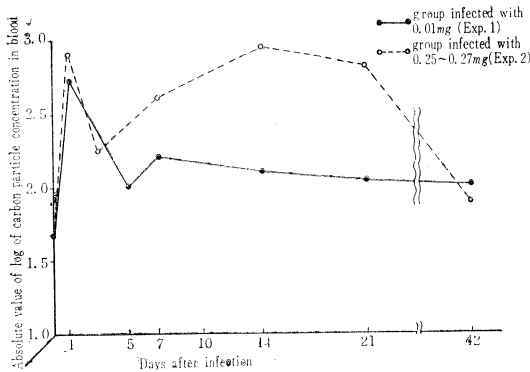
第 I 実験 少量結核菌感染時における墨汁指数の推移

実験方法：生後日数 8 週の ddY 系雌マウス 21 匹に H₃₇Rv 凍結乾燥菌 0.01 mg 湿菌重量を尾静脈より注射し、経時的に墨汁指数を測定した。菌感染 6 週後には剖検して肺病変の罹患度と墨汁指数との関係を検討した。

実験成績：図 1 のごとく、正常値の 1.7 より、第 1 日にはすでに 2.7 と著しい機能亢進を示し、5 日後には一時急激に下降するが、7 日後には再び上昇し、以後 6 週まで軽度の機能亢進状態を保ちつつ、漸次下降する 2 峰性の反応を示した。

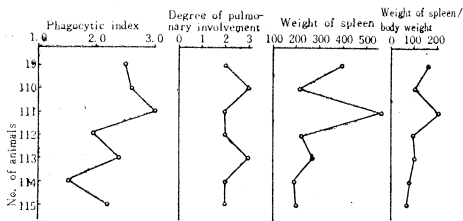
図 2 は、6 週剖検時の肺病変度⁹⁾、脾重量、比脾重と墨汁指数との関係を示したものである。結核罹患度の代表として肺の肉眼的病変度と墨汁指数との相関をみると、両者の間には一定の関係は認められない。脾重量と墨汁指数との関係は、墨汁指数のもつとも著しい亢進を示した動物番号 111 では脾重量がもつとも重く、逆にも

Fig. 1. Effects of Infection with M. tuberculosis upon Clearance Rate of Carbon Particle in Albino Mice



つとも機能低下を示した動物番号 114 では脾重量がもつとも少なかった。しかし、この関係は常に認められるとはかぎらない。また比脾重との関係も同様である。

Fig. 2. Correlation of Phagocytic Activity of Carbon Particle with degree of Pulmonary involvement, Weight of Spleen and Weight of Spleen/Body Weight, by Small Dosis Infection



Standard for degree of macroscopic pulmonary involvement

- Minute tubercles : less than 20 1
- : more than 20 2
- With some tubercles larger than 2 mm... 3
- With many tubercles larger than 2 mm... 4

第 II 実験 大量結核菌感染時における墨汁指数の推移

実験目的：第 I 実験では肺病変度が 2~3 で比較的軽症であり、そのため網内系に及ぼす影響も明らかに認められなかったと考へた。そこで、さらに大量の結核菌を接種したときの網内系機能に及ぼす影響を追求した。

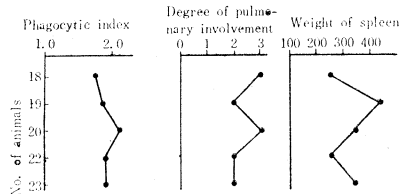
実験方法：生後日数 19 週の ddY 系雌マウス 21 匹に H₃₇Rv 凍結乾燥菌 0.1 mg/10 g (湿菌重量で 1 匹当り 0.25~0.27 mg) を尾静脈より注射し、第 I 実

験と同様の方法で検討した。

実験成績：図 1 のごとく、感染 1 日後には著しい機能亢進を示し、3 日後には一時下降することは第 I 実験と同様である。しかし、菌感染 7 日後より 3 週までは第 I 実験よりもより機能の亢進を示している。そして感染 6 週目にはほぼ正常値近くまで下降している。

菌感染 6 週後の剖検時の肺病変度およびその他の測定値と墨汁指数との相関関係をみたのが図 3 である。肺病変度との関係は肺病変度 3 を示す No. 18 がもつとも機能低下を示し、同じく肺病変度 3 を示す No. 20 では逆にもつとも機能亢進を示しているごとく、両者の相関関係は認められない。脾重量との関係は、第 I 実験と同様に墨汁指数の亢進を示すものでは脾重量の重い傾向を認めた。

Fig. 3. Correlation between Phagocytic Activity of Carbon particle and Degree of Pulmonary Involvement, Weight of Spleen, in Large Dose Infection



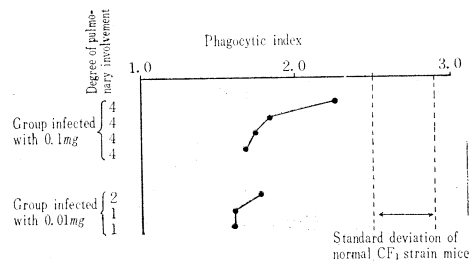
第 III 実験 重症結核症における墨汁指数

実験目的：前記の 2 つの実験よりもさらに重症の結核症を作るために、結核症に対し感受性の強い CF₁ 系マウスを使用し、墨汁指数との関係をみた。

実験方法：生後日数 8 週の CF₁ 系雄マウスに、H₃₇Rv 凍結乾燥菌の 0.1 mg および 0.01 mg (湿菌重量) を静注し、6 週後に墨汁指数の測定と剖検を行なった。

実験成績 (図 4)：肺病変度は、0.1 mg 感染群では平均肺病変度 4 の高度の病変、0.01 mg を感染群では

Fig. 4. Correlation between Phagocytic Index of Carbon Particle and Degree of Pulmonary Involvement, on Tuberculosis of CF₁ Strain Mice



平均肺病変度 1.3 の軽度の病変であつた。しかし墨汁指数は高度病変群で平均 1.9, 軽度病変群で平均 1.5 を示し、両群とも対照群に比し機能低下を示しているが、とくに軽度病変群のほうが高度病変群よりもより機能低下を認めた。

第 VI 実験 枯草菌芽胞および墨汁を静注後の墨汁指数

実験目的：第 I, 第 II 実験において、結核菌感染後の早期には著明に貪食機能が亢進することを認めた。そこで、この現象が結核菌特有の物質による作用なのか、また単なる異物としての作用の結果なのかについて検討を試みた。

実験方法：化学的、生物学的作用のもつとも少ないと考えられる炭粉粒子と、今一つ粒子の大きさが結核菌に近いもので、しかも病原性の少ないものという点で枯草菌芽胞を選び、マウスの尾静脈より注射し、その 1 日後の墨汁指数を測定した。

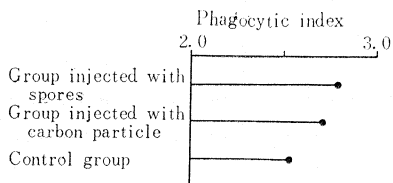
第 1 群—墨汁指数測定用の墨汁を 0.1 cc 静注し、その 1 日後に墨汁粒子が血中に全く存在しないことを確かめたのち、墨汁指数を測定。

第 2 群—枯草菌芽胞浮遊液の 0.1 cc を静注し（注入芽胞数は約 $2,300 \times 10^4$ ）、その 1 日後に墨汁指数を測定。

第 3 群—対照群。

実験成績（図 5）：第 1, 第 2 群ともに対照群に比して機能亢進を認める。

Fig. 5. Phagocytic Indices 24 Hours after Injection of Carbon Particle and Spores of *B. subtilis*



考 案

第 I, II 実験では、マウスに結核菌を静注して墨汁指数を経時的に測定した。成績は、菌感染 1 日後にいずれも著しい機能亢進を示し、3~5 日後には一時急激に下降するが、7 日後には再び上昇し、3 週ころまでは機能亢進状態を維持し、6 週後にはほぼ正常値まで下降する 2 峰性の反応を示すことを認めた。そして、感染菌量の多い場合には第 1 の山も第 2 の山も高く、より強い反応を示すことを認めた。この成績は、マウスに BCG を接種したときの Bouvier ら¹¹⁾の成績と一致する。また H₃₇Rv を接種した Biozzi ら¹²⁾の成績は、

菌感染初期の測定値が示されていないので第 1 の山は不明であるが、第 2 の山は同様の傾向を示している。

そこで、この反応の解析にさいし、菌接種による異物反応の関与を検討するため、第 IV 実験において墨汁および枯草菌芽胞を接種し、1 日後の墨汁指数を測定した。成績はいずれも機能亢進を示した。したがって菌感染後の最初の山は少なくとも一部は菌接種に伴う異物反応と考えられ、次の 1 週以後の山は結核菌に基づく変化による機能亢進と考えられる。

次に、病変の罹患度の判定に肺の内眼的所見をもつて代表し、墨汁指数と肺病変度との関係を検討した。第 I, II 実験において、菌感染 6 週後の剖検時の所見では、いずれも相関関係は認められなかつた。また、C F₁ 系マウスに大量菌を接種した第 III 実験においても、高度病変群のほうが軽度病変群よりもより高い墨汁指数値を示した。実験当初の予想として、病変がある限度以内に軽い場合には感染菌量が多いほどより機能亢進を示すが、重症の結核症においては当然網内系機能が低下し、したがって墨汁指数も低下するであろうと考えていた。しかし、前記の 3 つの実験より、病変罹患度と墨汁指数は平行しないと結論された。

自然抵抗性と網内系機能との関係についての Böhm¹³⁾の業績がある。彼は Salmonellosis に対する抵抗性の差異と炭粉粒子貪食能との関係をみており、感受性の高い系統のマウスでは初期の山が高く、抵抗性の強い系統のマウスでは初期の山がなく、感染 5 日以後に徐々に亢進を示すことを認めている。

その他、種々の細菌より得られた菌体内毒素の注射によつて貪食機能の亢進することが認められている¹⁴⁾。しかし、それらの意味づけは明確なものが得られていない。

次に、墨汁指数と脾重量、比脾重との関係を検討したが、明らかな関係は認められなかつた。しかし、傾向として脾重量の大きいものほど、墨汁指数の亢進を示すものが多いが、常にそうとはかぎらなかつた。

網内系の役割は異物貪食能とその処理能力、免疫抗体産生能、新陳代謝等その他多くの機能が考えられているが、今回は本系統のもつとも代表的な機能の 1 つである異物貪食能について結核症の進展との関連を検討した。実験成績より、菌感染後の貪食能の推移を確かめることはできたが、結核症の進展との相関関係は認められなかつた。

網内系細胞が炎症に対してきわめて重要な役割を演じていることは明らかであり、そのいくつかの機能のうち、どれかが優位に作用していることも考えうることである。われわれは、さらに次の機能測定法として、貪食した物質に対する網内系細胞の処理作用に注目し、次のごとき方法を行なつている。すなわち、マウスに枯草菌

芽胞を静注し、その後経時的に培養して組織学的に肝星細胞内の芽胞数を算定し、その消化速度をみる方法である。

結 論

マウスの実験的結核症における網内系貪食機能を測定し、次の結論を得た。

1) ddY 系マウスに H₃₇Rv 凍結乾燥菌 0.01 mg および 0.1 mg/10 g を静注し、経時的に墨汁指数を測定した。菌感染 1 日後には墨汁指数は著しく亢進し、3~5 日後には一時下降するが、7 日後には再び上昇し、3 週ころまでは機能亢進状態を維持し、6 週後にはほぼ正常値まで下降する 2 峰性の反応を示した。

2) 結核菌の代わりに枯草菌芽胞および墨汁を静注し、その 1 日後に墨汁指数を測定すると 1) と同様に機能亢進を示した。したがって菌感染時の最初の山は少なくとも一部は菌感染に伴う異物反応であり、第 2 の山は結核菌に基づく変化による機能亢進と考えられる。

3) 1) の実験において、各個体の肺病変度、脾重量、比脾重と墨汁指数との関係を検討したが相関関係は認められなかつた。

4) CF₁ 系マウスに H₃₇Rv 凍結乾燥菌 0.1 mg および 0.01 mg を静注し、6 週後に墨汁指数を測定し剖検した。両群とも機能の低下を認めたが、墨汁指数と肺病変との相関関係は認められなかつた。

5) 以上より、結核菌感染後の網内系貪食機能の推移を明らかにしたが、貪食能と結核症の進展との相関は認められなかつた。

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、大林容二先生に感謝の意を表します。なお当論文の要旨の一部は第 36 回日本結核病学会総会において発表した。

文 献

- 1) 額田晋他：肺結核の特殊転調療法，昭34。
- 2) Weiss, D.W. & Dubos, R.J. : J. Exp. Med., 101 : 313, 1955.
- 3) Dubos, R. J. & Weiss, D. W. : Amer. Rev. Tbc., 73 : 781, 1956.
- 4) Boehme, D. & Dubos, R.J. : J. Exp. Med., 107 : 523, 1958.
- 5) R.W. Schaedler & R.J. Dubos : J. Exp. Med., 106 : 719, 1957.
- 6) Biozzi, G. et al. : Brit. J. Exp. Med., 36 : 226, 1955.
- 7) 青木正和・工藤賢治：第 1 回網内系学会報告，最新医学投稿中。
- 8) 工藤賢治・青木正和：第 36 回結核病学会報告。
- 9) 青木正和・工藤賢治他：結核，36 : 355, 昭36。
- 10) Adler, H. & Reimann, F. : Z Exp. Med., 47 : 617, 1925.
- 11) C.A. Bouvier & D. Böhme : Amer. Rev. Resp. Dis., 83 : 85, 1961.
- 12) G. Biozzi et al. : Physiopathology of the Reticulo-endothelial System, 219, 1957.
- 13) D. Böhme et al. : J. Exp. Med., 110 : 95, 1959.
- 14) Biozzi, G. et al. : Brit. J. Exp. Path., 36 : 226, 1955.

Phagocytic Activity of Reticulo-endothelial Systems in Experimental Tuberculosis of Mice.

Concerning the non-specific resistance to tuberculosis, extensive studies were made by Nukada in Japan with his idea of "heterogenous resistance". Also recently Dubos and others reported that heterologous bacterial infection markedly enhanced this resistance in mice.

The establishment of the method of determining the function of reticulo-endothelial system (RES) by measuring the rate of clearance of carbon particles from the blood stream, has made it possible to study the relation between the function of RES and the resistance to infectious diseases. In this connection, the authors

formerly reported a simplified method of measuring the function of RES by use of India ink, which will be described as follows : Mice were injected intravenously with a dose of 16 mg of carbon particles per 100 gr of body weight.

After 20 minutes 0.4 ml of blood was taken by cutting the axillary vessel, diluted with the same amount of 3.8 % sodium citrate solution, and was subjected to the centrifugation. The supernatant fluid was further diluted with five-fold volume of distilled water. The amount of carbon contained in this sample was measured electrophotometrically. From this reading the log of the true concentration of carbon particles was calculated, of which the absolute value was

named "the phagocytic index of carbon particle" of RES.

In the present study the authors tried by using the above method, to examine the correlation between the development of tuberculosis and the activity of RES and to clarify the cause of the individual difference in susceptibility of mice to the tuberculous infection.

1) Mice of resistant ddY strain were injected intravenously with 0.1 mg or 0.01 mg (wet weight) of human type tubercle bacilli (H₃₇Rv), and after specified periods of time the phagocytic index of these animals was measured. The value rose markedly after a day, revealed a temporary drop after 3 to 5 days, rose again after 7 days keeping a high level for about 2 weeks, and returned to the normal level after 6 weeks. Thus two peaks were observed in these curves, and the height of these peaks was higher with large dose infection than with small dose infection, showing that the phagocytic activity increases with the increase of the dose of infection.

In order to analyze this reaction curve, the authors tried to examine the role of foreign body reaction resulting from the inoculation of the tubercle bacilli. For this purpose, carbon particles and spores of *B. subtilis* were employed, the former being chosen because of their minute chemical and biological activity, and the latter as an example of organisms with a size similar to tubercle bacillus and having little pathogenicity to mice. The phagocytic index was measured 24 hours after the injection of these agents. In both cases a definite increase of phagocytic activity was observed (Fig. 5). Accordingly it was considered that the first peak indicated, at least partially, a foreign body

reaction due to the injection of the bacilli, whereas the second peak represented an increase of phagocytic activity due to the biological activity of tubercle bacilli.

2) The same animals which had been used for the estimation of the phagocytic index 6 weeks after the infection, were killed and subjected to autopsy, the macroscopic findings of the lung being assessed and the weight of the spleen being measured. There was no definite correlation between the degree of tuberculous involvement and that of phagocytic activity (Figs. 2 and 3).

In the next experiment, mice of susceptible CF1 strain were used in order to produce more advanced tuberculosis than in the previous experiment. The animals were injected intravenously with 0.1 mg or 0.01 mg of tubercle bacilli, and after 42 days were measured of the phagocytic index and were subjected to autopsy. The value of phagocytic index of the infected mice was lower than the value of the normal mice of CF1 strain. Furthermore, the value was higher in the group infected with larger dose than in the group infected with smaller doses, just as seen in the former experiment. But when observed in each animal, no definite correlation was found between the value of phagocytic index and both the degree of tuberculous involvement of the lung and the weight of the spleen (Fig. 4).

In the present experiment, changes in the phagocytic activity during the course of tuberculous infection were studied to some extent, but further studies are required in order to clarify the role of this activity in the natural resistance to tuberculosis.