

結核菌の吸入感染法について

— ネブライザーによるBCGの吸入接種 —

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 12 月 20 日

I 結 言

本実験の1つの目的は簡単な治療用ネブライザーを利用して結核菌の吸入感染を試みることであり、他の目的はBCGの吸入接種による免疫形成を試みることである。したがってまず有毒人型結核菌がどのような条件で、どの程度に病変を形成するかを観察し、それに基づいてBCGを種々の条件で吸入接種し、免疫形成力を観察した。その結果簡単なネブライザーによる吸入感染実験の可能性、およびそれによるBCGの吸入免疫の可能性についての知見を得た。本実験は厳密に定量的な実験ではないが、定量的感染を行なうさいの適当な感染

条件を見出だすことができたと考える。また先にわれわれはINH耐性結核菌の吸入感染実験においてINH耐性カタラーゼ陰性菌のモルモットに対する毒力の低下が他の感染法に比し著しくないことを観察したが、一般に弱毒菌を吸入感染した場合、他の感染法とどのような差が認められるかについて検討するための予備実験となりえたと考える。

II 実験材料ならびに方法

(i) 実験群

実験動物はツベルクリン反応陰性のモルモット(体重360~365g)14匹で第1群(5匹)はH37Rv株をネ

Table 1a. Experimental Methods and Results

Experimental group No. of guinea pig	The first group				
	2	4	3	5	6
Method of airborne infection	simple glass nebulizer compressor		simple glass nebulizer rotary pump		
Strain	H 37 Rv		H 37 Rv		
Viable units of nebulized bacilli suspension	32.5×10 ⁵ per cc		32.5×10 ⁵ per cc		
Time of inhalation (minute)	15	6	30	15	30
Degree of the lesion on the lungs	⊕⊕	⊕	+	⊕	⊕⊕
Degree of the swelling of the tracheal lymph node	⊕⊕	⊕	⊕	⊕⊕	⊕
Tuberculin reaction 5 weeks after BCG inhalation	17×24 mm		20×28 mm	13×20	15×18

Hisao SHIMOIDE (Tokyo National Sanatorium, Kiyose-machi, Kitatama-gun, Tokyo, Japan),
 Mareichi TOYOHARA (Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association) : The
 Method of the Airborne Infection of Tubercle Bacilli to Guinea Pigs—Kekkaku, 37 (2) : 107~111, 1962.

Table 1b. Experimental Methods and Results

Experimental group No. of guinea pig		The second group					The third group			
		9	7	8	10	11	12	52	54	56
Vaccination	Method of airborne infection		Simple glass nebulizer Devilbiss compressor							
	Strain	BCG	BCG							
	Viable units of nebulized bacilli suspension	6.7×10^5 per cc	6.7×10^4	6.7×10^4	6.7×10^5	33.5×10^5	33.5×10^5			
	Volume of nebulized bacilli suspension (cc)	2	1	1	1	1	2			
	Time of inhalation (minute)	14	15	11	11	6	20			
Challenge infection	Method of airborne infection		spray gun compressor					spray gun compressor		
	Strain		H 37 Rv					H 37 Rv		
	Viable units of nebulized bacilli suspension		2×10^6 per cc	2×10^6	2×10^6	2×10^6	2×10^6	2×10^6	2×10^6	2×10^6
	Volume of nebulized bacilli suspension (cc)		10	10	10	10	10	10	10	10
	Time of inhalation (minute)		5	6	5	5	5	5	5	5
Degree of the lesion on the lungs	-	+ very small	+ very small	+ very small	+ very small	+ very small	+ very small	+ small	⊕ large caseous	⊗ large caseous
Degree of the swelling of the tracheal lymph node	-	-	-	-	-	+	-	+	⊕	⊗
Tuberculin reaction 5 weeks after BCG inhalation	15×22 mm	5×7	7×7	11×14	7×8	11×16				
Tuberculin reaction 4 weeks after challenge infection		12×12 mm	12×15	20×30	13×16	12×28	13×14	12×14	10×12 mm	

ブライザーにより表 1a のごとき種々の条件で吸入感染せしめ、6 週後に剖検した。この実験は従来からの吸入感染法²⁾とネブライザーによる感染法の病巣形成の差異を観察するために行なつた。第 2 群 (6 匹) はネブライザーにより表 1b のごとき種々の条件で BCG を吸入接種し、6 週後に H37Rv 株を従来の方で吸入感染せしめ、その後 14 週を経て剖検し、臓器内結核菌定量培養を行なつた。第 3 群 (3 匹) は第 2 群の対照とし、BCG の吸入を行なわず、第 2 群と同一条件で H37Rv 株を吸入感染せしめ、14 週後に剖検、臓器内菌培養を行なつた。

(ii) 噴霧菌液

第 1 群の感染に用いた菌液は人型結核菌 H37Rv 株の Sautou 培地 2 週間培養菌の蒸溜水 1 cc 中 1 mg の浮游液を 2,000 回転、15 分遠沈し、上清を噴霧菌液とし、1 cc 中生菌数は 32.5×10^5 であつた。第 2~3 群の再感染に用いた菌液は上記菌液とほぼ同様な方法で調製したが、最後に上清を濾紙で濾過した液を 5 倍に稀釈して噴霧菌液とし生菌数は 1 cc 中約 20×10^5 であつた。(なおこの場合は最初の菌液は 1 cc 中 5 mg の菌浮游液を使用した。) 第 2 群の BCG 吸入に用いた菌液は BCG の Sautou 培地 2 週培養菌の蒸溜水

1 cc 中 5 mg の浮游液を 2,500 回転, 15 分遠沈し, 上清をそのまま, および 5 倍, 50 倍に稀釈して作製し, 稀釈前の生菌数は 1 cc 中 33.5×10^5 であった。

(iii) 吸入条件

第 1 群は治療用ガラス製ネブライザーに, コンプレッサーまたはロータリーポンプより送気し, 上記菌液を噴霧し 6~30 分吸入せしめた。第 2~3 群の BCG 吸入には同様なネブライザーへ Devilbiss 小型コンプレッサーから送気し上記 3 種の BCG 浮游液を噴霧し 6~20 分吸入せしめた。噴霧菌液量は 1 匹当たり 1~2 cc であった。第 2~3 群の H37Rv 株の感染には従来のスプレーガンによる噴霧法を用い, 菌液 10 cc を 5~6 分間に噴霧し, 吸入せしめた。

吸入感染装置についてはすでに報告したので省略するが, 今回使用したネブライザーは, 従来の装置のスプレーガンの位置に取り付けられた。

(なおツベルクリン皮内反応を第 1 群では感染後 2, 5 週目に, 第 2~3 群は BCG 吸入後 2, 5 週および再感染後 2, 7, 14 週目に 100 倍 OT によつて行なつた。

III 実験成績

(i) 第 1 群

ツベルクリン反応は吸入感染後 2 週目に 3 匹, 5 週目に 4 匹が 10 mm 以上の発赤硬結を呈し, 次第に反応は強度となつた。2 週後ツ反応陰性の 1 匹は 4 週目に死亡したが, 剖検の結果, 他の動物と同様な結核病変が肺に認められた。

剖検の結果, 肺には 1~46 コの結節が認められた。結節数にはかなりのばらつきがみられ, ロータリーポンプを用いたものに病変のきわめて少ないものが認められたが, これはこの方法では噴霧気圧が弱く, かつ不安定なためと思われる。

(ii) 第 2 群

ツ反応は BCG 吸入接種 2 週後には 6 匹中 4 匹が 6~9 mm の反応を示し, 5 週後には 3 匹が 10 mm 以上となり, 他の 3 匹は 6~7.5 mm であった。ツ反応の弱かつた 3 匹中 2 匹は上述の 50 倍稀釈 BCG 浮游液を噴霧吸入せしめたものであり, 他の 1 匹は噴霧吸入時間の短つたものであった。H37Rv 株の再感染後 2 週目には再感染を受けた 5 匹がすべて 10 mm 以上の反応を呈し, 次第に強度を増した。

剖検所見ならびに臓器培養所見は次のごとくであつた。6 匹中 1 匹は BCG 吸入後 6 週目に有毒菌の感染を行なわず剖検したが, 各臓器に肉眼的病変を認めえず, 肺 10 mg 中 2 コの生菌が培養で検出されたのみであつた。他の 5 匹は再感染後 14 週目に剖検したが, 肺には 3~5 コのケシの実大の微小結節が認められた

が, 組織学的には類上皮細胞結節は認められなかつた。BCG 吸入量が少なかつた No. 7, 8 の動物では結節がわずかに大きいようであつた。肺以外の臓器, 各リンパ節にはほとんど病変を認めなかつた。臓器内生菌数は各臓器 10 mg 中肺では 0~3, 肝, 脾ではともに 0 であつた。検出された菌株には Niacin test 微弱陽性のももあつた。

(iii) 第 3 群

ツ反応は感染後 2 週目に 3 匹ともに 10 mm 以上となり, その後次第に強くなつた。感染後 14 週目に剖検したが, 肺には数コ~30 コ以上の結節が認められ, 中心壊死の認められる結節も認められ, 第 2 群より明らかに強い病変が認められ, 組織学的には中心の乾酪化した定型的な類上皮細胞結節が認められ, その中にかなり多数の抗酸菌が認められた。また気管リンパ節の腫脹が中等度に認められ, 1 例ではかなり強い壊死が認められ, 組織学的には一部に石灰沈着がみられた。しかし, 感染菌量が少なかつたためか, 臓器内生菌数は少なくともとも病変の多かつた No. 56 の動物でも肺 10 mg 中 9 コにすぎず, 他は肺 10 mg 中 0~0.5 であつた。肝, 脾には生菌を認めなかつた。

IV 総括ならびに考案

第 1 群の実験は種々の点で不安定な条件のもとに感染が行なわれたために, 形成された病変の程度にかなり個体間の差がみられた。しかしすべての動物に感染させることができ, 簡単なネブライザーやコンプレッサーによる吸入感染実験の可能性が明らかにされた。治療用のガラス製ネブライザーは噴霧口径が比較的大きいため, 強い気圧で噴霧するときには多量の送気が必要となる。そのために気密にされた感染路の途中にある滅菌装置の抵抗が大きいと内圧が高まり, より強い吸引装置による排気が必要となる。このような場合には菌の Aerosol の滅菌は火焰による焼却が適当と思われる。またガラス製ネブライザーでは破損の可能性もあり, 製品による口径の不同も大きいと思われるが, これらの点に考慮が払われれば定量的吸入感染を行なうことは可能と思われる。第 2 群の実験では BCG の吸入接種が試みられたが, 比較的少量の菌液の短時間の吸入によつてモルモットにツベルクリンアレルギーを形成し, 有毒菌の再感染に対する免疫を形成せしめることができた。すなわち BCG 吸入モルモットでは有毒菌による病巣形成が著明に阻止された。しかし, 臓器内生菌数は免疫, 非免疫群ともに少なく, 両者間の差は明らかにしえなかつた。この点は再感染菌量を多くして実験を行なえば明らかにされると思われる。

今回の実験装置では動物は 1 匹ずつ感染させられるので噴霧された菌の大部分は吸入されず無駄が大きい

が、多数の動物を同時に感染させるよう装置を改良すれば、1匹の動物を免疫するに要する菌液量はさらに少なくすることができるであろう。弱毒化したINH耐性菌が吸入感染ではモルモット体内でかなり増殖し、比較的長期間生存を続けることは緒言にも述べたが、BCGの吸入接種による免疫形成が他の接種法とどのように差があるかは今後の実験にまたねばならない。

V 結 語

簡単な治療用ガラス製ネブライザーによつて結核菌の吸入感染を試み、モルモットに確実に病変をつくることのできた。また同様な方法でBCGの吸入接種を行な

い、有毒菌の再感染による病巣形成を著明に阻止することができた。

終りに、御校閲を賜つた結核研究所副所長大林容二先生に厚く御礼申し上げます。また実験に御協力頂いた結研塚越、高橋両技師、東京療養所山本技師に感謝いたします。

文 献

- 1) 下出久雄・豊原希一：結核，36：776，昭36.
- 2) 下出久雄：呼吸器診療，13：848，昭33.

The Method of the Airborne Infection of Tubercle Bacilli to Guinea Pigs. BCG airborne vaccination by means of a simple nebulizer.

Introduction

In the present experiment an airborne infection with tubercle bacilli was attempted by means of a simple glass nebulizer used for medical treatment. Also a trial for BCG vaccination by the same method was carried out. Although the study could not be stated as strictly quantitative, preliminary informations for the quantitative infection were obtained from the results of this experiment.

Materials & Methods

Materials and methods used in this experiment are shown in table I.

Three groups of guinea pigs were challenged under various infectious conditions. Five guinea pigs in the first group were infected with the human type tubercle bacilli H37Rv strain by the airborne route and the guinea pigs were killed and examined pathologically six weeks after the infection.

Six guinea pigs in the second group were vaccinated with BCG by the airborne route, and were challenged with H37Rv by the same route six weeks after the BCG vaccination. The guinea pigs in this group were killed and examined both pathologically and bacteriologically 14 weeks after the infection.

Three guinea pigs in the third group were infected with H37Rv under the same infectious condition as in the second group and were killed

14 weeks after the infection.

The inhalation of tubercle bacilli was conducted as follows: The nose of guinea pigs, protruding through a tightly fitted rubber mask, was placed in a plastic cylinder, into the other end of which the bacilli suspension was sprayed by means of a simple glass nebulizer or a spray gun.

In this experiment, two-week-old cultures on Sauton's medium of H37Rv or BCG were used.

The number of viable units of the nebulized suspension of H37Rv used for the infection was 32.5×10^5 per ml. in the first group and 20×10^5 per ml. in the second and the third groups. Viable units of three kinds of BCG suspension used for the vaccination of the second group were 33.5×10^5 , 6.7×10^5 and 6.7×10^4 per ml. In the second group, one to two ml. of BCG suspension was nebulized and the guinea pigs were kept to inhale the suspension for six to 20 minutes. In the second and the third groups, ten ml. of H37Rv suspension was nebulized and inhaled by the guinea pigs for five to six minutes. Tuberculin reaction with 1 mg of old tuberculin was examined two and five weeks after the BCG vaccination, and two, seven and fourteen weeks after the infection with H37Rv.

Results

In the first group, tuberculin reaction was positive in four guinea pigs two weeks after the infection. In almost all cases, caseous lesions were observed macroscopically in the lungs, but under a certain infectious condition, only a few

lesions were observed.

In the second group, tuberculin reaction was positive in three cases and doubtfully positive in three cases five weeks after the BCG vaccination. Two guinea pigs which were vaccinated with a highly diluted BCG suspension showed doubtful reaction. Tuberculin reaction was positive in all cases two weeks after the infection with H37Rv. In this group, only a few very small lesions were observed macroscopically. In the tracheal lymph nodes, there were observed no tuberculous changes. By the quantitative culture methods, viable bacilli were scarcely isolated from the lungs.

In contrast, in the third group, gross caseous lesions were observed in the lungs in two cases, and a comparatively large number of acid fast bacilli were found microscopically in those lesions. However, even in this case only a few viable bacilli were recovered from the lungs by quantitative culture methods.

The difference in macroscopic and microscopic findings between the second and the third group was distinct.

Conclusion

In the first group, the guinea pigs were infected with virulent tubercle bacilli under various conditions and grossly visible lesions were found in all cases. From this result, the airborne infection with tubercle bacilli was considered as possible by means of a simple glass nebulizer.

In the second group, only a few, very small lesions were observed and no caseous lesion was found in the lungs of the BCG vaccinated and challenged guinea pigs.

In contrast, in the third group, gross caseous lesions were observed in the lungs of the nonvaccinated guinea pigs. From the results mentioned above, it is suggested that the resistance of guinea pigs to the reinfection with virulent tubercle bacilli is possible to be acquired by the airborne BCG vaccination.