

## INH 耐性結核菌の感染経路による毒力の差異について

下出久雄\*・豊原希一\*\*

\*国立療養所東京病院

\*\*結核予防会結核研究所

受付 昭和 38 年 2 月 10 日

## I 緒 言

INH 高度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感染経路によつてその程度に差異が認められる<sup>1)</sup>。すなわち静脈内感染に比し airborne infection (吸入感染) では肺に比較的高度の病変を形成する。静脈内感染ではほとんど肉眼的病変を形成しえないが、吸入感染では肺に定着した菌量が静脈内感染の場合より少なくともより高度な壊死を伴つた病巣が形成され、肺内生菌数も感染後 8 週までは次第に増加する<sup>2)</sup>。しかし吸入感染でも感染後 20 週にいたると病巣は著明に萎縮し、生菌数も著しく減少する<sup>3)</sup>。このような現象についてはすでに報告したところであるが、感染経路の差異により病変の程度や臓器内生菌数の推移が異なってくる原因として考えられることは、第 1 に吸入感染では菌の定着部位が酸素分圧の高い肺胞内であるため菌の増殖にとつて有利な条件があるということである。第 2 に静脈内感染では接種された菌の大部分は肝、脾に定着し、また感染菌量は吸入感染より多いため、吸入感染に比し獲得抵抗力がより速やかに形成され、臓器内の菌の増殖が速やかに阻止されることが考えられる。もし第 1 の因子すなわち菌が肺胞内に定着することが吸入感染のさいに比較的高度な病変を形成する主因であるとすれば、吸入感染と静脈内感染を同一モルモットに同時に行なつた場合、病変の程度は吸入感染単独の場合に近似するはずであり、またもし第 2 の因子すなわち免疫形成の速やかなことが静脈内感染で病変形成が阻止されることの主因であるとすれば、吸入と静脈内と二重の感染を行なつた場合、病変の程度は静脈内感染単独の場合に近くなり、病変はほとんど認められない程度になるはずである。以上の仮説に基づいて実験を行なつた結果興味ある成績が得られたので報告する。

## II 実験材料ならびに方法

## 1) 使用動物ならびに実験群

体重 320~430 g のツ反応陰性白色モルモット 33 匹を 3 群に分け、第 1 群 (吸入群 11 匹) は吸入感染のみを行ない、第 2 群 (混合群 11 匹) は吸入と静脈内の両経路から同時に感染し、第 3 群 (静脈群 11 匹) は静脈内感染のみを行なつた。

## 2) 使用菌株

吸入、静脈内感染ともに H37R<sub>v</sub> 株の試験管内で INH 50  $\gamma$ /cc に完全耐性化、カタラーゼ陰性化された菌株を使用した。

## 3) 感染方法

静脈内感染は上記菌株の Sauton 培地 2 週間培養菌の 2 mg/cc 蒸溜水浮游液を麻酔コルペンで作製し、その 0.1 cc を下肢静脈内に接種した。接種生菌数は  $7.3 \times 10^4$  であつた。吸入感染では上記菌浮游液を 2,500 回転/分、10 分間遠沈し、上清を濾紙で濾過した液を噴霧菌液とした。吸入感染装置は既報<sup>2)</sup>のものを用いた。噴霧菌液量は 1 匹宛 10 cc で吸入時間は 8~10 分とした。吸入中のモルモットの呼吸数は 1 分間 74~120 であつた。

## 4) 観察方法

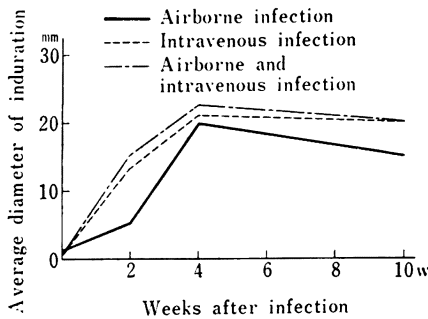
ツベルクリン反応、体重測定は感染後 4、10 週目に行なつた。各実験群ともに感染後 5 時間目に 3 匹、5 週目に 3 匹、10 週目に 5 匹を屠殺剖検し、各臓器の肉眼的観察を行ない、肺、脾の重量を測定し、右肺全体 (ホモジナイザーで均等化) および肝、脾の一部の臓器内結核菌定量培養を 1% 小川培地で行ない、左肺および肝、脾、気管リンパ節の組織学的検索を行なつた。

## III 実験成績

## 1) ツベルクリン反応の推移

ツ反応の硬結径の平均値は図 1 のごとくである。すなわち第 1 群 (吸入群) では感染 2 週後には微弱で硬結径が 10 mm 以上の例は 8 匹中 1 匹のみで、平均 5.4 mm であり、4 週後には 8 匹ともに 10 mm 以上で、平均 19.8 mm となり、10 週後には 4 匹の平均値は 14.9 mm であつた (1 匹は感染後 10 週目の 3 日前に非結核性疾

Fig. 1. Changes in Tuberculin Reaction



患で死亡。第2群(混合群)では感染2週後すでに8匹中7匹が10mm以上で、平均15.1mmであり、4週後には8匹ともに10mm以上で平均22.4mmとなり、10週後には平均20mmであった。

第3群(静脈群)でも感染2週後に8匹中6匹が10mm以上で平均13.2mmであり、4週後には7匹が10mm以上、1匹が9.5mmで平均21.1mmとなり、

10週後には5匹ともに10mm以上で平均20mmであった。

2) 体重の推移

各群間に差なく、ともに次第に増加した。

3) 剖検所見(表1)

i) 肉眼的所見: 肺には第1群では感染5週間後には3匹中2匹に中心壊死を伴った結節が20コ前後認められ、感染10週後には結節数は数コ以下であったが5匹中4匹に壊死を伴った結節が認められた。これに対し第2群では感染5週後には2匹にきわめて微小な結節が1~3コ認められたにすぎず、1匹には全く病変を認めえなかつた。感染10週後にも1例に微小結節を1コ認めただのみで、他には全く結核性病変を認めえなかつた。第3群でも感染5週後には1匹に微小結節1コを認めたのみで、他の2匹および感染10週後の全例には全く結核性病変を認めえなかつた。

肝、脾では感染5週後には第3群の1例に微小結節が比較的多数認められたが、他の例には全く病変を認めなかつた。感染10週後にも第3群の1例に微小な点状結

Table 1. Macroscopic Findings and Weight of the Lungs and Spleens

Time after infection		5 h.			5 w.			10 w.				
Animal No.		1	7	8	2	3	4	5	6	9	10	22
Airborne route	Lung				⊕	⊕	+1	⊕	⊕	⊕	⊕	+
	Liver				-	-	-	-	-	-	-	-
	Spleen				-	-	-	-	-	-	-	-
	Tracheal lymph node				-	‡	‡	-	+	-	‡	-
	Weight of lung	3.3	3.3	4.15	5.2	4.75	3.8	5.8	5.05	5.85	5.3	5.5
	Weight of spleen	0.5	0.5	0.5	0.7	0.75	1.05	1.25	0.9	1.15	0.9	1.0
Time after infection		5 h.			5 w.			10 w.				
Animal No.		12	13	17	11	14	15	16	18	19	20	21
Airborne and intravenous route	Lung				+1	+ <sub>s</sub> small	-	-	-	-	+ <sub>s</sub> small	-
	Liver				-	-	-	-	-	-	-	-
	Spleen				-	-	-	-	-	-	-	-
	Tracheal lymph node				-	+	‡	+	‡	-	+	-
	Weight of lung	4.0	3.8	3.3	3.85	4.8	5.05	6.8	6.0	6.35	8.7	4.8
	Weight of spleen	0.45	0.55	0.45	0.75	1.4	0.85	0.65	0.75	1.05	0.7	0.55
Time after infection		5 h.			5 w.			10 w.				
Animal No.		24	30	31	23	25	26	27	28	29	32	33
Intravenous route	Lung				+1	-	-	-	-	+	-	-
	Liver				-	-	+ small	-	-	+	-	-
	Spleen				-	-	+ small	-	-	-	-	-
	Tracheal lymph node				‡	-	+	+	-	+	+	+
	Weight of lung	5.15	3.9	3.3	5.5	4.6	5.05	4.2	4.6	5.25	6.2	4.75
	Weight of spleen	0.85	0.45	0.55	0.85	0.7	1.45	0.65	0.7	1.15	1.1	0.9

Number of tubercles in the organs: + 1~10, ‡ 11~20, †† 20<, ○ Necrosis.

Degree of swelling of the lymph nodes: + Rice grain size, ‡ Green-pea size, †† Horse-bean size.

Table 2. Viable Units of Bacilli per 10 mg of Each Organ

Time after inf.	Animal No.	Airborne route			Animal No.	Airborne and intravenous route			Animal No.	Intravenous route		
		P	H	S		P	H	S		P	H	S
5 h.	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	12	2.5 (0.5)	6 (8)	18 (23.5)	24	0.5 (0.5)	9.5 (4.5)	8.5 (7.5)
	7	0 (0)	0 (0)	0 (0)	13	0 (0)	0 (0)	0.5 (0)	30	4 (4)	47.5 (41)	52.5 (51)
	8	1 (0)	0 (0)	0 (0)	17	0 (0)	0 (0)	0 (0)	31	8.5 (5)	24 (34.5)	70 (76)
5 w.	2	13.5 (17.5)	0 (0)	0 (0)	11	0 (0)	0 (1)	0 (1)	23	0 (0)	50.5 (58.5)	20.5 (20.5)
	3	1.5 (0.5)	4.5 (0)	0.5 (0.5)	14	8 (8.5)	卅 (540)	330 (281)	25	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	4	50 (29)	0 (0)	0 (0.5)	15	0 (0.5)	卅 (卅)	7 (7)	26	1 (0.5)	306 (卅)	46 (41.5)
10 w.	5	0.5	0	0	16	0.5	0	0	27	0	0	0
	6	0	0	0	18	0	0	0	28	0	43.5	68.5
	9	5.5	0	0	19	0	0	0	29	0	4	0
	10	2.5	0	0	20	0	0	0.5	32	0.5	0	0
	22	4.5	0	0	21	0	0	0	33	0	1	0

P: Lung H: Liver S: Spleen

( ): The results of cultures in the medium containing 50 γ/ml of INH.

節が肝に認められたのみであった。気管リンパ節の腫脹の程度は吸入感染を行なった、第1、2群が第3群よりやや高度であった。

肺重量は第2群の感染10週後にやや大きいものが多かったが、これは非結核性病変によるものであり、脾重量とともに各群間に明らかな差は認められなかった。

ii) 組織学的所見: 肺では感染5週後第1群では中心壊死のみられる大きな類上皮細胞結節が認められ、その中に多数の抗酸菌が認められたものが1例、大きな類上皮細胞結節の認められたものが1例、残りの1例には微小な類上皮細胞結節が認められた。これに対し第2、第3群には類上皮細胞結節はほとんど認められず、第3群の1例に微小な疎鬆な類上皮細胞結節が1コ認められたのみであった。

感染10週後においても第1群では中心壊死を伴い、比較的多数の抗酸菌の認められる典型的な類上皮細胞結節を有するものが多かったが、第2、第3群では類上皮細胞結節は全く認められず、胞隔の肥厚、微小な小円型細胞、単核細胞の集簇が認められたのみであった。

肝では感染5週後には、静脈内感染を行なった第2、第3群の各2匹に比較的多数の類上皮細胞結節が認められ、わずかに抗酸菌の認められるものもあつたが、第1群では主として小円型細胞の集簇からなる微小結節がわずかに認められたにすぎなかった。感染10週後には第2群の1例に多数の小さな類上皮細胞結節が認められたが、他は第2、第3群に微小な類上皮細胞結節がわずかに認められたのみであった。脾では感染5週後肝に比し

やや少数の類上皮細胞結節がみられたが、10週後には第2群の1例に比較的多数の結節が認められたのみで、他には各群ともにほとんど病変を認めなかつた。気管リンパ節には各群ともに軽度の類上皮細胞の増殖しか認められなかつた。

#### 4) 臓器内結核菌定量培養成績 (表2)

第1群では感染5時間後の各臓器 10 mg 中の生菌数は肺0~1 (平均0.33)、肝脾は0で、感染5週後には肺1.5~50 (平均21.7)、肝0~4.5 (平均1.5)、脾0~0.5 (平均0.25) で、各臓器とも増加を示し、感染10週後になると肺0~5.5 (平均2.5)、肝脾0で各臓器ともに減少を示したが、肺にはなお少数の生菌が認められた。これに対し第2群では感染5時間後には肺0~2.5 (平均0.83)、肝0~6 (平均2)、脾0~18 (平均6.16) で各臓器ともに第1群よりやや多数であった。5週後には肺0~8 (平均2.75)、肝0.5~卅 (平均約500)、脾0.5~330 (平均112.5) で各臓器ともに感染直後より増加したが、肺の生菌数は第1群より少なかった。さらに感染10週後には肺0~0.5 (平均0.1)、肝0、脾0~0.5 (平均0.1) となり、各臓器ともに著明な減少を示し、ほとんど生菌を認めなくなつた。

第3群では感染5時間後には肺0.5~8.5 (平均4.33)、肝9.5~47.5 (平均27)、脾8.5~70 (平均43.66) で各臓器ともに第1、第2群より多かつたが、5週後には肺0~1 (平均0.33)、肝0~306 (平均118.8)、脾0~46 (平均22.2) で、肝では増加したが、肺脾では減少し、さらに感染10週後には肺0~0.5 (平均0.1)、肝0~

42.5 (平均 9.5), 脾 0~68.5 (平均 13.7) となり, 肝臓でも著しく減少し, 各臓器ともに感染 5 時間後よりかなり少なくなった。

#### IV 総括ならびに考案

以上の成績をみると第 1 群 (吸入群) は個体全体としての感染菌量も肺へ定着した菌量も第 2 群 (混合群), 第 3 群 (静脈群) に比してかなり少ない。またツベルクリン反応の強さは第 1 群が第 2, 第 3 群に比してやや弱く, 第 1 群では感染後 2 週目に 10 mm 以上の反応を示したものは 8 匹中 1 匹のみであつたが, 第 2, 第 3 群はほとんどが 10 mm 以上に達し, 第 1 群よりツベルクリン・アレルギーの形成が速やかであつた。このようなアレルギー形成速度の差異は前述した感染菌量の差異によるものと考えられる。一方肺の病変は感染菌量のもつとも少なかつた第 1 群がもつとも強く, 第 2 群は第 3 群と同様きわめて軽度であり, 肺内生菌数も第 1 群でもつとも増殖が著しく, かつ長期間生菌が認められた。すなわち吸入感染と静脈内感染を同時に行なつた群の病変は静脈内感染単独の場合に近似していた。緒言に述べた仮説からすれば, 吸入感染で比較的高度な病変が形成されるのは主として感染菌量が少ないため, 免疫形成がおそいからではないかと考えられる。しかし, このことは BCG や Turalemia の吸入免疫実験<sup>4)</sup>でも示されているように吸入感染では免疫形成が弱いということを意味しない。吸入感染では菌は肺胞内に定着するため増殖しやすく, 他の接種経路よりも少ない菌量によつて, より強い免疫を形成しうるのであるが, 感染菌量が少ないので免疫形成までの期間が長くかかるものと考えられる。INH 耐性菌が吸入感染で肺に比較的高度な病変を形成することには上記のごとき感染菌量免疫形成速度等の因子のほか, 肺胞内が菌増殖にとつて有利な環境であるということも関与していると思われる。

吸入感染菌量を大量とすれば宿主の免疫形成は速やかとなるはずであるが, その場合, 増殖に有利な環境に大量に存在する菌と宿主との関係はどのようになるかは今後の検討にまたねばならない。

毒力の強い菌株の場合には菌は宿主の獲得抵抗性に抗

して増殖を続けるために, 本報告に述べたような吸入感染と静脈内感染との差異は顕著にならないと考えられる<sup>2)</sup>。

INH 耐性菌に限らず比較的弱毒な菌株の場合には感染経路により病変の程度がかなり異なつてくる場合があるのではなからうか。一般に人体への自然の感染様式が Airborne である Organism の感染性, 病原性を検討する場合は, 吸入感染実験が必要と考えられる。

#### V 結 語

INH 高度耐性菌のモルモットに対する毒力は一般に低下しているが, 感染経路によつて差異があり, 吸入感染では静脈感染に比し肺に高度の病変を形成する。しかし吸入感染を行なつても, 同時に静脈内感染を行なうと肺病変の形成は阻害され, 静脈内感染と同様にほとんど肉眼的病変は形成されない。比較的弱毒な結核菌は増殖しやすい臓器肺内のみに着する場合には, 感染菌量が少なくても肺に比較的高度の病変を形成しうが, 増殖に不利な部位, 肝, 脾に大部分が定着する場合には感染菌量が多くても各臓器ともに高度な病変を形成しえないと思われる。

このことは獲得抵抗性形成の速さの差異にも起因するものと思われる。

終りに御校閲を賜りました国立療養所東京病院院長砂原茂一先生, ならびに実験を御指導下さいました結核予防会結研所長岩崎竜一郎先生に深く感謝致します。また実験に御協力下さつた結研塚越, 高橋両技師ならびに東京病院川端, 山本両技師に厚く感謝の意を表します。本論文の要旨は第 17 回国立病院療養所総合医学会で報告した。

#### 文 献

- 1) 高橋正雄: 日本細菌学会誌, 12: 315, 昭 32.
- 2) 下出久雄 他: 結核, 36: 776, 昭 36.
- 3) 下出久雄 他: 結核, 38: 23, 昭 38.
- 4) Middlebrook, G: Bacteriol. Rev., 25: 331, 1961.

### Changes of the Virulence of INH-resistant Tubercle Bacilli for Guinea Pigs according to Different Infection Routes.

#### Introduction

In our previous experiments, it was found that the virulence of INH-resistant catalase negative tubercle bacilli for guinea pigs varied with different

infection routes, and that the pathological changes of the lungs were severer in the airborne infection than in the intravenous infection. The purpose of the present study is to examine the cause of this difference in the virulence between the airborne and intravenous infections.

### Materials and Methods

Three groups of 11 guinea pigs each were challenged in this experiment: the 1st group by the airborne route; the 2nd group by the airborne and intravenous routes simultaneously; and the 3rd group by the intravenous route. Two week old cultures on Sauton's medium of the INH-resistant ( $>50\gamma$  of INH per ml) catalase negative strain of human type tubercle bacilli, H 37 R<sub>v</sub> were used in each infection experiment. From each group, 3 guinea pigs were sacrificed and examined pathologically and bacteriologically at 5 hours and 5 weeks, and the remaining animals were killed 5 and 10 weeks after the infection.

### Results

#### i) Tuberculin reaction

In the 1st group, tuberculin reaction was positive in one of 8 cases 2 weeks after the infection (5.4 mm in the average diameter of the indurations), and in all cases at 4 weeks (19.8 mm). While in the 2nd and the 3rd groups, it was positive in almost all cases at 2 weeks (15.1 mm and 13.2 mm respectively).

#### ii) Pathological findings (see Table 1)

In the 1st group, grossly visible caseous lesions were observed in the lungs in almost all cases 5 and 10 weeks after the infection. In contrast, in the 2nd and the 3rd groups, only a few small lesions were observed macroscopically in the lungs of a few cases. In the 3rd group, very small tubercles were observed macroscopically in the livers of 2 cases and in the spleen of one case. Histological examinations were also made, and only an atrophic epithelioid cell tubercle was found in the lung in both the 2nd and the 3rd groups.

#### iii) Bacteriological findings (see Table 2)

By quantitative culture, the number of viable

bacilli in the lungs of the 1st group was at 5 hours: less than, and at 5 and 10 weeks greater than, that of the 2nd and of the 3rd group. Viable bacilli were recovered from the lungs in almost all cases in the 1st group, but in only a few cases in the 2nd and the 3rd groups at 5 and 10 weeks after the infection.

### Conclusion

In the Guinea pigs infected with the INH-resistant strain by the intravenous route, lesions in every organ were very slight. On the other hand, in those infected with the same strain by the airborne route, gross caseous lesions were found in the lungs, and viable bacilli were recovered from the lungs for longer period of time than in the former group.

In those infected simultaneously by both infection routes pathological findings were similar to those in the intravenously infected group, and viable bacilli in the lungs decreased in number more rapidly than in the airborne infection group.

Even a small infection dose of low virulent tubercle bacilli is able to cause rather severe lesions in the lungs when deposited exclusively in such a susceptible organ as the lung. But when deposited mostly in such organs as the liver and spleen, even a large dose of the same strain seems to fail to cause serious lesions in any organ.

From the results mentioned above, it is suggested that the intravenous inoculation inhibits the formation of necrotic lesions by the airborne inoculation. Such an effect may be due to the fact that the infection doses are larger in the intravenous inoculation than in the airborne inoculation, and accordingly the resistance of guinea pigs to tubercle bacilli is sooner acquired in the intravenous inoculation than in the airborne inoculation.