

実験的マウス結核症における致死因子に関する考察

寺井武雄・永管徳子・山県英彦

国立療養所刀根山病院 (院長 山口寿)

受付 昭和 39 年 2 月 15 日

STUDIES ON LETHAL FACTORS IN EXPERIMENTAL MURINE TUBERCULOSIS

Takeo TERAJ, Tokuko NAGASUGA and Hidehiko YAMAGATA*

(Received for publication February 15, 1964)

Survival test has hitherto been used as the method for measuring the virulence of tubercle bacilli or the effect of chemotherapeutics against tuberculosis. In these experiments, the median survival time was most useful, and it was already shown that there existed a certain correlation between the size of infecting dose and the median survival times. This was the case with infecting the mice with a moderate dose. However, when mice were infected with either a large dose or a small dose of tubercle bacilli, no such correlation was found. Also the distribution of the death times in this case was different from that of the infection with a moderate dose. We have reported also that the survival curve was composed of three phases. It will be shown in the present paper that the cause of death of mice might not be similar in each death phase. The results were the following.

1) The viable bacillary level in the lungs of dead mice: After injecting intravenously with 0.05 mg wet weight of *Mycobacterium vobis*, Ravenel strain, death times of mice were recorded, and the number of tubercle bacilli in the lung was determined. These results are shown in figure 1. In most mice which died at 20 to 30 days after infection, 10^7 to 10^9 viable units of bacilli were found in each 10 mg of lung tissue. This time corresponds to acute death phase in the survival time. Mice, dying later than 30 days (chronic death phase), could be divided into two groups. The one is the group in which the number of viable bacilli is as large as that in acute death phase, and the other is the group in which the number is smaller. BCG vaccinated mice were often dead before 20 days (early death phase). In the lungs of these mice, the number of viable bacilli was not so large as that died in acute death phase.

2) The weight of the lungs of mice at the death time: The gross weight and the density of the lungs become large after tuberculous infection. These values may be used as the index of severity of the disease process. On the other hand, the body weight of mice decreases gradually after infection. Therefore, the ratio of the lung weight to the body weight (lung index) is different significantly between the infected and the normal mice, and the difference of the index between them is more remarkable than that of the lung density. Figure 2 shows the relationship between the lung index and the death time. Mice dying in acute death phase showed the high value of the index, but those in chronic death phase were divided into two groups. The one had the same degree of the lung index as that in acute death phase, and the other had the low level of the index. This result coincided with that obtained in the experiment of the bacillary population level.

* From National Sanatorium, Toneyama Hospital, 5-1, Toneyama, Toyonaka, Osaka, Japan.

3) The change of the bacillary population level and the lung index after infection: BCG vaccinated and non-vaccinated mice infected with 0.002 mg wet weight of tubercle bacilli were sacrificed at 1, 3 and 5 weeks after infection. The bacillary population level and the lung index increased gradually after infection within 5 weeks in non vaccinated mice. The number of viable bacilli in the lungs of vaccinated mice increased within 3 weeks, but ceased to increase after that time. The lung index of these mice increased rapidly within 1 week, and then was stationary until 5 weeks. These data were shown in figure 3.

4) Histological change in lungs of vaccinated and non vaccinated mice after infection: After injecting with 0.02 mg of tubercle bacilli, mice were sacrificed on the 8th, 20th and 28th day. The number and the size of tubercles increased after infection and edematous changes were remarkable in non vaccinated mice. In the early time tubercles were found also in the vaccinated mice, but these tubercles could not be found in vaccinated mice sacrificed in the later time. Remarkable hemorrhagic pictures found in vaccinated mice suggest that a systemic allergic reaction might occur.

5) Death by the secondary injection of bacterial cells and tuberculoprotein: Vaccinated and non vaccinated mice were injected intravenously with 0.2 mg of living BCG, heat-killed BCG and Protein A prepared from culture filtrate. Deaths occurred only in the vaccinated group and the phenomenon was most remarkable in the group of Protein A.

From the above results, the early deaths occur by the allergic reaction due to the protein fraction resulted from tubercle bacilli in the host tissues. The acute deaths appear to be a consequence of the toxic effects of some bacillary constituents and the result of physical insufficiency in respiration which occurred by the high population level of bacilli in the lungs. It will be supposed also that a terminal anergy or a systemic allergic reaction may occur suddenly in the chronic death phase.

実験的結核症において、宿主に防衛機構が成立する以前では、動物の生存日数と感染菌量との間に一定の関係が認められる¹⁾²⁾。すなわち実験動物群の感染後生存日数中央値は感染菌量の対数に逆比例する。しかし生存日数の分布をみると、大量感染と少量感染の場合とで異なり、また免疫群と非免疫群とでも異なる³⁾。生存率曲線を画くと、感染菌量が多いときには、その線は1相性であり、漸次感染菌量が少なくなるにつれて、生存日数中央値が延長するけれどもほぼ平行な線が得られる。しかし感染菌量がさらに少なくなると、生存日数の分散度が大きくなり、線としては勾配の緩やかな第2相があらわれる。この第2相はBCG免疫群ではとくに著明である。また免疫動物では感染菌が体内で致死的な数に達すると予測される時期以前に斃死することがみられる。いまこの時期を早期、第1相を急性期、第2相を慢性期と名付けると、これらの各時期によつて致死因子が異なるものと考えられる。この問題を解析するために、肺における菌数水準の推移、肺の物理的および組織的変化を指標として、時期によつていずれの因子が斃死を来す要因となるかについて実験を行なつたので報告する。

実験材料および方法

マウス：本院動物室において同腹繁殖させて得たCF 1系白色マウスを用い、感染時に体重が20g前後になるものを選んだ¹⁾。動物は実験動物関西研究所製ゼネラル固型飼料MR-1と水道水で飼育した。

使用菌株：免疫および感染には、それぞれ本院研究室に保存中のBCGおよび牛型結核菌Revenel株を使用した。

蛋白質A：人型結核菌H37R_v株のSauton培地培養液からSeibertの方法⁴⁾によつて本院研究室において分離精製した。

免疫および感染：菌液はいずれも滅菌濾紙上に集めた菌塊をガラス玉とフラスコを用いて生理食塩水に懸濁した。免疫はBCG 0.2 mg/0.2 mlを腹腔内に注入して行ない、感染はRevenel株 0.05 mg/0.2 mlを尾静脈から行なつた。

肺および体重の測定：斃死マウスあるいはエーテルで屠殺したマウスの体重を上皿天秤で10⁻¹gまで秤量したのち、胸壁および腹壁を十分開いて肺を剔出した。肺は滅菌生理食塩水で洗滌、滅菌濾紙で吸湿し、リンパ節

その他の付属物を除去したのち、トージョンバランスで $10^{-3} g$ まで秤量した。

肺における生菌数の定量：右肺をガラスホモゲナイザーで磨碎、苛性ソーダの終末濃度 1%，組織の濃度 100 mg/ml になるようにそれぞれ苛性ソーダ溶液および滅菌蒸留水を加えて均等化したのち、段階希釈してその 0.1 ml を小川培地上に接種し、4 週後の発育集落数から計算した。

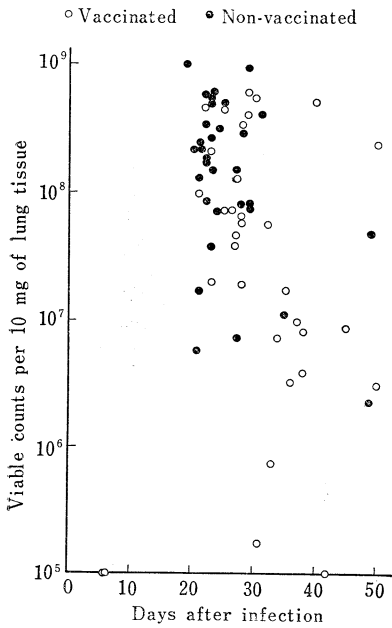
病理組織像：左肺を 10%ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋法により切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色した後検鏡した。

実験成績

1. 斃死時期と肺内生菌数との関係

結核菌の感染によつて斃死したマウスの肺における結核菌の生菌数と斃死時期との関係は図 1 のごとくである。大多数のマウスは感染後 20~30 日目に斃死し、そ

Fig. 1. The Relationship between the Viable Bacillary Level and the Death Time



Mice were vaccinated with 0.2 mg of BCG intraperitoneally, and challenged 28 days later with 0.05 mg of *Mycobacterium bovis*, Ravenel strain, intravenously.

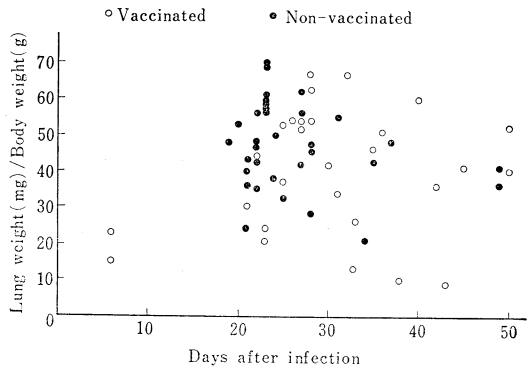
のときの肺内生菌数は組織 10 mg 当り $10^8 \sim 10^9$ 生菌単位である。生存日数の延長につれて、斃死時の生菌数の減少する傾向がみられる。さらに生存日数の長いものでは、生菌数が $10^8 \sim 10^9$ 単位のものと $10^6 \sim 10^7$ 単位のものの 2 つの群に分けることができる。また免疫マウスでは非免疫マウスよりも生菌数が少ない。生存率曲線上

の早期死のみられるのは免疫マウスで、このときの生菌数はとくに少ない。したがって、肺内の生菌数の上昇に伴つて斃死するものと、生菌数に依存することなく斃死するものがあり、後者は慢性期および早期に斃死したものに認められる。

2. 斃死時期と肺の重量との関係

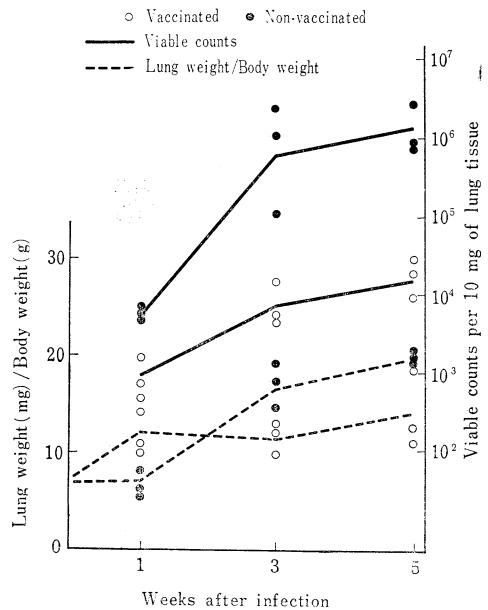
結核菌感染後日を経るにしたがつて、肺の密度ととも

Fig. 2. The Relationship between the Ratio of Lung Weight to Body Weight and the Death Time



Conditions were identical with those in figure 1.

Fig. 3. Changes of the Ratio of Lung Weight to Body Weight and the Viable Bacillary Level in Lungs After Challenge Infection



Experimental conditions were identical with those in figure 1, except that the challenge dose was 0.002 mg. After infection three mice each per group were sacrificed at 1, 3, and 5 weeks.

に総重量も増大する。一方マウスは衰弱して、体重は漸次減少してくる。そこで体重当りの肺重量、すなわち、肺重量(mg)/体重(g) (以下肺係数と略記) の値をとると、結核性変化と比例する。図2で横軸は感染後の日数を、縦軸は肺係数を示す。肺係数は正常マウスでは6~8であるが、急性期に斃死したものでは大多数が40~60である。慢性期では一般に急性期よりも小さく、しかも高値のものとは低値のものとの2群に分かれる。早期死マウスでは係数値は小であるが正常値よりは大きである。

3. 肺における生菌数水準と肺係数の推移

実験終了時までマウスが斃死しないように感染菌量を少なくして、0.002 mg (1.9×10⁴ 生菌単位) の感染を行ない、1, 3および5週目に免疫群および非免疫群とも

3匹あて屠殺して肺内生菌数および肺係数値を求めた(図3)。その結果、非免疫群では感染後3週目まで肺内生菌数は急速に増加し、それ以後は増加速度がおそくなり、肺係数もこれに比例した。これに反して免疫群では生菌数の増加は非免疫群よりもおそいが、感染後早期に肺係数の増加がみられ、しかも1週以後の増加が抑制されている。このことは免疫された動物の体内では非免疫のそれとは異なつた反応が起こることを示唆し、斃死の要因にも異なつたものがあると考えられる。とくに早期において菌数レベルが低いのに斃死のみられるのと、急速な肺重量の増加との間に関係があるものと考えられる。

4. 肺の組織像の推移

表1に示すように肺の重量に関係があると考えられる

Table 1. Changes of Histological Findings in Lungs of Vaccinated and Non-Vaccinated Mice After Challenge Infection

Vaccination	Days after challenge	Tubercle formation	Infiltration	Interstitial pneumonitis	Bleeding	Edema
Living BCG 0.2 mg, i. p.	8	-*	++	++	-	-
		++	-	++	-	-
		++	-	++	-	-
	20	##	-	-	++	-
		##	-	-	##	-
	28	-	-	+	+	-
	++	++	+	-	-	
	+	-	-	-	-	
None	8	++	-	++	-	-
		+	++	++	-	-
		+	++	++	-	-
	20	##	++	++	-	+
		##	++	-	++	+
		##	++	-	-	##
	28	##	##	##	+	##
		##	##	##	-	##
		##	##	##	-	##

Experimental conditions were identical with those in figure 1, except that the challenge dose was 0.02 mg. After infection three mice each per group were sacrificed on the 8th, 20th and 28th day.

* Degrees of lesions: ## Severe ++ Moderate + Slight - None

Table 2. Effects of the Intravenous Injection with Live BCG, Heat-Killed BCG, and Tuberculo-protein into Vaccinated and Nonvaccinated Mice

Number of exp.	BCG vaccination	Injection with*	Numbers of mice	Time-to death in days after injection
1	0.2 mg, i. v.	Live-BCG	13	11, 15, s**, s, s, s, s, s, s, s, s, s, s, s
		Heat-killed BCG	13	5, s, s, s, s, s, s, s, s, s, s, s, s
		Protein A	10	2, 2, 2, 2, 3, 3, 3, s, s, s
1	None	Live-BCG	13	s, s, s, s, s, s, s, s, s, s, s, s, s
		Protein A	10	s, s, s, s, s, s, s, s, s, s, s
2	0.2 mg, i. p.	Live-BCG	11	23, 23, 32, 34, s, s, s, s, s, s, s
		Heat-killed BCG	11	s, s, s, s, s, s, s, s, s, s, s
		Protein A	11	4, 4, 4, 6, s, s, s, s, s, s, s
	None	11	s, s, s, s, s, s, s, s, s, s, s	

* 0.2 mg of each material were suspended in 0.2 ml of saline for injection.

** survived.

5つの変化について観察した。非免疫群では結節、浸潤および胞隔炎とも日を追つて高度となり、とくに結節は28日目では肉眼的にもはなはだ著明で中心部には壊死を認めた。さらに浮腫があることは重量の増加を著明にする原因となつてと思われる。一方免疫群では、早期には結節形成および胞隔炎を認めたが、これらは治癒傾向にあり、しかも結節は一般に小さく、壊死も認めにくい。しかし出血性の変化がみられ、このことは免疫動物に感染を行なつた場合には、その体内にアレルギー反応が強くなることを示唆する。

5. 免疫マウスに及ぼす菌体およびツベルクリン蛋白の影響

そこで本報における実験条件下で、このようなアレルギー反応が死因となりうる可能性があるか否かをしらべる目的で以下の実験を行なつた。

BCG 生菌 0.2 mg (湿菌重量) を静脈内に注入することによつて免疫したマウスに、4 週後 BCG 生菌、BCG 加熱死菌および培養濾液蛋白質 A をそれぞれ 0.2 mg 宛静脈内に注入し、その後の生存日数を非免疫群と比較した。表2の実験1に示されるように、第2次の処置によつて非免疫群で斃死はみられないが、免疫群では斃死がみられた。とくに蛋白質A注入群では著明で、第2次処置後早期に斃死するものがある。これは免疫処置を腹腔内に行なつたときにも認められ(表2, 実験2), 感作の影響によるものと考えられる。

考 察

結核菌がこれに感受性のある動物体内に侵入した場合には、菌はそこで増殖を開始し、その増殖は菌の病原性を規定する指標とされ、また逆に一定量の菌の感染を受けた場合に菌数レベルの上昇が高い宿主は、その菌に感受性が高いと考えられている。しかし菌数レベルの上昇がいかなる点で動物の致死に結びつくかについては未だ明らかではない。あるいは中毒性物質の蓄積によるといひ、あるいは菌数レベルの上昇に比例して起こる組織的变化に基づく単なる物理的な機能不全によるといわれている。

結核菌体から、マウスに致死作用を有する成分が分離され構造式も決定されたが⁵⁾、病原性の弱い BCG や isoniazid 耐性人型菌においても同じ構造式を有する成分が存在するばかりではなく、量的にも差がない⁶⁾ ことから考えて、中毒物質のみによつて説明することは困難である。しかし実験的な結核症の場合には感染菌量も多く、大多数のマウスが斃死時一定の菌数レベルを有していること、あるいは感染後の生存率曲線による解析⁷⁾ からも中毒性の反応が致死を支配する一つの因子であると推定される。

しかし菌数レベルが比較的に低いのにマウスが斃死す

る例がある。とくに BCG 免疫マウスでは斃死時の菌数レベルが非免疫のものに比べて一般に低い。また肺係数も低値を示すことが多い。非免疫動物の場合には感染後日を追つて肺の重量⁸⁾ および密度⁹⁾ は高くなり、しかもこれらの変化は組織学的変化に平行するといわれている。しかし免疫群では肺の重量も組織的变化も推移を異にする。Youmans ら⁹⁾ は BCG 免疫マウスに感染を行なつた場合には、感染後の生存日数が2峰性となり、第1峰におけるマウスでは肺の組織像が非免疫のそれと等しいけれども、第2峰におけるマウスでは菌数レベルが低く、肺の増殖性細胞反応による呼吸不全を斃死の原因と考えている。表1で感染後の組織像の推移をみると、免疫群では結節形成は軽度であるけれども出血性の反応が著明であつた。また感染を行なつたのち、旧ツベルクリンを繰返し注射して脱感作すると肺の病変、重量増加が軽度に行まる¹⁰⁾。これらの成績は慢性期になつて斃死する原因としてアレルギー反応を関与することを示唆する。

一方、免疫群に静脈から感染を行なうとき動物が早期に斃死する現象をみることもある。Lurie ら¹¹⁾ は BCG で免疫した兎に、二次的に BCG を静脈から注入すると、7~9日後に50%近くが斃死することを認め、また Gray ら¹²⁾ も感作動物に大量の旧ツベルクリンを注射すると早期に斃死するマウスのあることを認めている。彼らはいずれも、注射から斃死までの日数および肺における著明な充血から、斃死の原因を遅延型アレルギー反応に帰している。本報でも蛋白質 A, BCG 菌体を用いて同様の結果を得た。これらの成績から、あらかじめ感作状態にある宿主が感染をうけたときには、結核菌に由来する蛋白質成分によるアレルギー反応も致死を促す要因の一つと考えられる。

結核菌の病原性あるいは抗結核剤の作用の評価にマウスの斃死試験が用いられることが多いけれども、アレルギー反応を除外できる条件を設定しなければその解析は複雑となるであろう。

結 論

結核菌感染マウス群の生存率曲線を3相に分けて考えることができる。本報ではそれらの各相における致死因子に差異のあることを推定せしめる根拠を得た。

早期死は主として免疫群にみられ、この時期では菌数増加および肺の物理的变化は軽度であり、組織像および二次的に蛋白質Aを注入することによつても起こりうることから、アレルギー反応が大きな因子であると考えられる。急性期相では菌数増加が著明で、しかも斃死時にほぼ一定のレベルであり、結核性変化も高度である。したがつてこの時期では中毒および肺の物理的機能不全が主因と考えられる。慢性期相では、急性期相と同じ変化を

示すものと、早期死の状態に近いものがある。前者の中にはアネルギー化し急性期の状態に移つたものも含まれ、後者の場合にはアレルギー反応が関与する可能性について考察を加えた。

終りに臨み、病理学的立場からの御助力をいただいた本院小川弥栄博士に衷心より謝意を表します。

本論文の要旨は、第28回日本結核病学会近畿地方会において発表した。

参 考 文 献

- 1) 寺井武雄・永管徳子：結核, 37 : 283, 1962.
- 2) Youmans, G. P. and Youmans, A. S. : Am. Rev. Tuberc., 64 : 534, 1951.
- 3) Youmans, G. P. and Youmans, A. S. : J. Immunol., 78 : 318, 1957.
- 4) Seibert, F. B. : Am. Rev. Tuberc., 59 : 86, 1949.
- 5) Noll, H. and Bloch, H. : Biochim. Biophys. Acta, 20 : 299, 1956.
- 6) Nagasuga, T., Terai, T. and Yamamura, Y. : Am. Rev. Resp. Dis., 83 : 248, 1961.
- 7) Costello, R. and Dubos, R. : J. Exp. Med., 116 : 847, 1962.
- 8) Ceriotti, G. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 104, 1954.
- 9) Crowle, A. J. : Am. Rev. Tuberc. & Pulm. Dis., 77 : 681, 1958.
- 10) Gray, D. F. : Am. Rev. Tuberc. & Pulm. Dis., 78 : 235, 1958.
- 11) Allison, M. J., Zappasodi, P. and Lurie, M. B. : Am. Rev. Resp. Dis., 85 : 364, 1962.
- 12) Gray, D. F. and Jennings, P. A. : Am. Rev. Tuberc., 72 : 171, 1955.