

結核症の成立, 進展における反復吸入感染と耐性結核菌
による重感染の意義についての実験的研究

豊 原 希 一

結核予防会結核研究所 (所長 岩崎竜郎)

下 出 久 雄

国立療養所東京病院 (院長 砂原茂一)

受付 昭和 41 年 3 月 1 日

EXPERIMENTAL STUDY ABOUT THE SIGNIFICANCE OF REPEATED
AIR-BORNE INFECTION AND SUPERINFECTION WITH DRUG
RESISTANT TUBERCLE BACILLI ON ONSET
AND EVOLUTION OF TUBERCULOSIS*

Mareichi TOYOHARA and Hisao SHIMOIDE

(Received for publication March 1, 1966)

Multiplication of tubercle bacilli in the lungs, dissemination of the bacilli to other organs, formation of immunity by repeated air-borne infection and effect of superinfection with resistant tubercle bacilli were studied by using an apparatus for air-borne infection.

As the drug sensitive tubercle bacilli $H_{37}R_V$ was used, and as the drug resistant tubercle bacilli KM_1 resistant to 100 γ /ml of streptomycin (KM_1 SMR) was employed. 0.5 mg/ml of the bacillary suspension was prepared from two week's culture of $H_{37}R_V$ on Sauton media, and was centrifuged at 2000 rotations per minute for fifteen minutes and the supernatant was filtrated with filter-paper and diluted to ten-fold amount. The diluted suspension was employed for air-borne infection. Time of inhalation was five minutes. As to KH_1 SMR 0.5 mg/ml of the bacillary suspension was prepared from dried bacilli, centrifuged and filtrated in the same way as $H_{37}R_V$. This filtrate was inhaled for ten minutes.

The apparatus for air-borne infection is shown in Fig. 1.

The experimental design is shown in Fig. 2.

The following experimental results were obtained.

(1) As seen in Fig. 3, tuberculin allergy of the first group became very strong by superinfection with KH_1 SMR. In the second and the third groups tuberculin allergy appeared strongly after the second infection with $H_{37}R_V$. When tuberculin allergy was already strong, the superinfection with KH_1 SMR exerted hardly any effect on the strength of tuberculin reaction.

(2) Macroscopic involvement

Macroscopic tuberculous involvement of the organs before the infection with KH_1 SMR is shown in Fig. 4. Lesions of the organs of the first group were slight, but caseous lesions were found in the lungs or spleens of the second and the third groups. Macroscopic tuberculous involvement after the superinfection with KH_1 SMR is shown in Fig. 5. Lesions of the first and the fourth groups were moderate in grade and those of the second and the third groups were of the far advanced grade.

(3) Results of cultivation

* From Research Institute, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose-Machi, Kitatama-Gun, Tokyo, Japan.

As seen in Table 1, no bacilli were found in each organ of the first group, but many bacilli were recovered from each organ of the second and the third groups.

Results of cultivation after infection with KH₁SMR are shown in Table 2. From each organ of all the groups a number of bacilli were found. The bacilli which were recovered from the first group were almost drug resistant bacilli, and those from the second and the third groups were almost drug sensitive ones.

The results are summarized as follows.

a) The degree of tuberculin allergy ran parallel both with the degree of multiplication of bacilli in vivo and with the degree of lesions, when the infections with a small dose of H₃₇R_v were repeated two or three times at the interval of five weeks.

b) When tuberculin allergy by the primary infection was weak, the tuberculous superinfection was effected with drug resistant tubercle bacilli.

c) When tuberculin allergy by the infection with sensitive bacilli was already strong, multiplication of resistant bacilli by superinfection was completely inhibited.

人の肺結核症の発病に外来性再感染が、いかなる意義をもつかという点については、すでに多くの実験的¹⁾²⁾臨床病理学的^{3)~5)}さらに疫学的^{6)~9)}研究がある。これらの知見からある人は初感染発病を重視し、ある人は外来性再感染の存在を主張しているが、結核化学療法剤したがつて耐性結核菌が出現するまでは、二次結核症が外来性再感染によるものか初感染巢の再燃あるいは管内性転移によるものかを立証することは困難であつたといつてよい。また微量の結核菌をくり返し吸入する環境下にある人は多いが、反復して感染することが、その個人にとつてプラスなのかマイナスなのかということに興味ある問題であるが、人についてこれを正確に分析することは至難である。

これらのことを解明する一端となればと考へ自然感染に最も近い吸入感染法を用いモルモットによる動物実験

を行ない、いささかの知見を得たので報告する。

実験方法

1. 感染方法

図 1 に示すごとき吸入感染装置を用いた。これにより一度に 16 匹のモルモットに一定時間ほぼ一定菌数の菌を吸入させることができる。なおこの装置の設計図等、詳細については別に発表予定である¹⁰⁾。

2. 実験計画

図 2 に示したように実験群を 4 群に分ち、第 1 群は H₃₇R_v 感染後 15 週目に SM 100 7/ml 完全耐性結核菌 KH₁ 株 (KH₁SMR と略) を重感染させる。第 2 群は 5 週おきに 2 回 H₃₇R_v を感染させ、さらに 10 週後に KH₁SMR を重感染させる。第 3 群は 5 週おきに 3 回 H₃₇R_v を感染させ、さらに 5 週後に KH₁SMR を重感染させる。第 4 群は KH₁SMR のみを感染させ対照とする。

3. 吸入菌液の調製

H₃₇R_v : Sauton 液体培地 2 週培養菌より磨砕コルベン

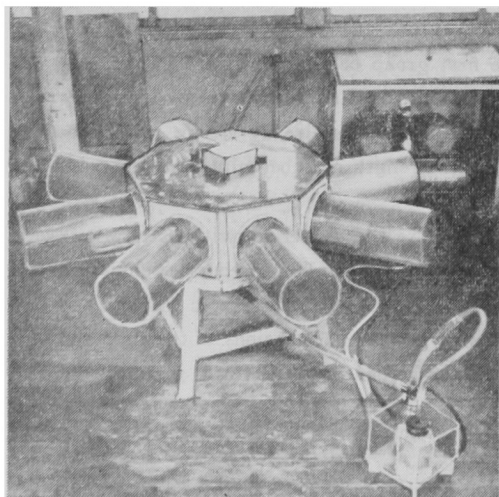
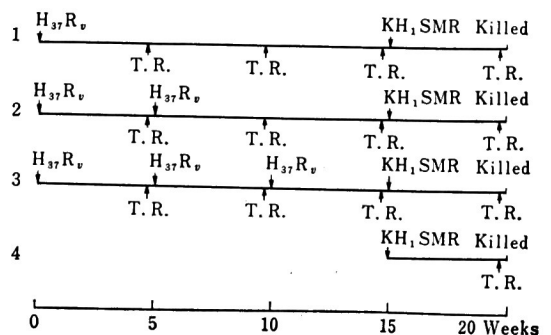


Fig. 1. Apparatus for Airborne Infection

Fig. 2. Experimental Plan



で 0.5 mg/ml の菌液をつくり、これを 2,000 回転/分 15 分遠沈し、上清を滅菌濾紙により濾過し、濾液を滅菌蒸留水で 10 倍にうすめる。濾液すなわち吸入菌液の 1 ml 中の生菌数は各回とも 5×10^8 、吸入時間は 5 分で肺内に定着した菌数は全肺の培養成績から 20 コと指定された。

KH₁SMR: 凍結乾燥菌より 0.5 mg/ml の菌液をつくり、これを H₃₇R_V と同じ方法で遠沈、濾過し濾液をそのまま吸入に用いた。吸入菌液 1 ml 中の生菌数は 10.5×10^8 、吸入時間は 10 分、肺内に定着した推定菌数は 40 コであつた。

KH₁SMR の吸入時間を H₃₇R_V のその 2 倍にしたのは KH₁SMR の毒力がやや弱い可能性があつたからである。

4. 使用動物

体重 400 g 前後の♂モルモットを各群 7~10 匹用いた。

実験成績

1. ツベルクリン・アレルギーの変動 (図3)

5週おきに 100×OT を用いてツベルクリン・アレルギーの変動をみた。硬結の横径、縦径の平均値でみると、第1群は感染前 4.3 mm, 5週後 8.5 mm, 10週後 6.8 mm, 15週後 10 mm, 20週後すなわち KH₁SMR 感染 5週後 21.2 mm となつた。第2群はそれぞれ 3.4 mm, 7.9 mm, 15.3 mm, 19.5 mm, 19 mm, 第3群はそれぞれ 3.4 mm, 6.5 mm, 15.5 mm, 20 mm, 21.4 mm, 第4群は KH₁SMR 感染前 4 mm, 感染5週後 16.3 mm であつた。

図3にみるごとく、第1群は KH₁SMR の重感染により、はじめて強いツベルクリン・アレルギーが発現する。これに対し第2群、第3群は2回目の H₃₇R_V の感染によりツベルクリン・アレルギーが強くなり、3回目の H₃₇R_V の感染を行なつた第3群のツベルクリン・ア

Fig. 3. Change of Tuberculin Allergy

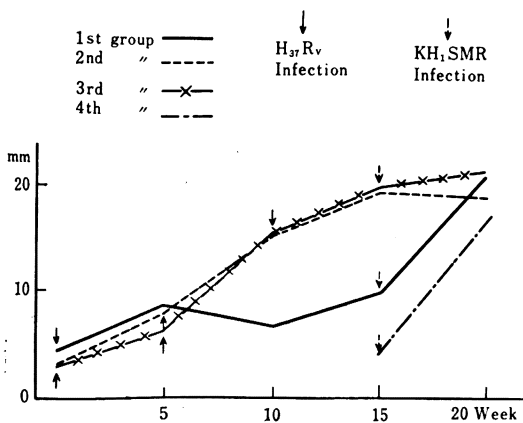


Fig. 4. Macroscopic Findings of Organs before Infection with SM-resistant Tubercle Bacilli

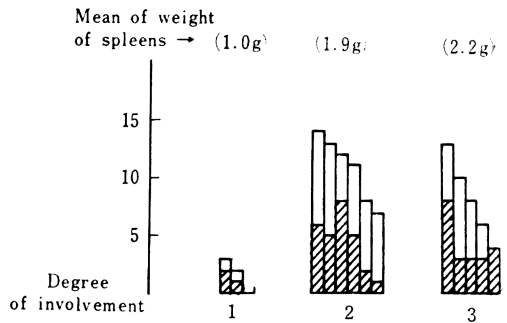


Table 1. Result of Cultivation of Organs before Infection with SM-resistant Tubercle Bacilli

Group	Lung	Liver	Spleen
1	0	0	0
2	352	38	212
3	533	66	506

Number indicates colonies in 10 mg of each organ.

レルギーは 15 週目で第2群のそれとほとんど差がないところからみて、3回目の感染はツベルクリン・アレルギーには大きな影響を及ぼさないとと思われる。また KH₁SMR の重感染もツベルクリン・アレルギーの面からは第2, 3群に影響を及ぼしていない。

2. KH₁SMR 感染前の所見

a) 肉眼的所見 (図4)

図4にみるごとく第1群の変化は軽微であるが、第2, 3群は中等度の変化を示し、脾重平均値も第1群 1.0 g, 第2群 1.9 g, 第3群 2.2 g であつた。第2群と第3群との差は著明でない。

b) 臓器培養成績 (表1)

肺、肝、脾の一部をとり乳鉢で磨碎し、1% NaOH で乳濁液とし、臓器 10 mg を 1% 小川培地に培養する。表1にみるように、第1群では肺、肝、脾いずれの臓器からも生菌は還元できなかったが、第2, 3群では感染局所である肺のみならず、肝、脾にも菌は転移し増殖し

Table 2. Result of Cultivation of Organs after Infection with SM-resistant Tubercle Bacilli

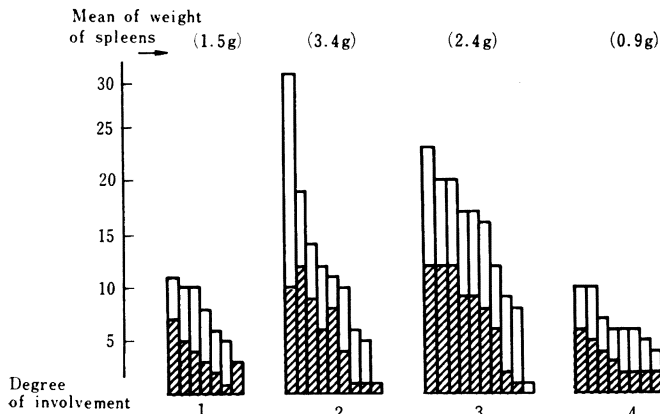
Group	Lung			Liver			Spleen		
	S	R	S-R	S	R	S-R	S	R	S-R
1	660	675	-15	30	30	0	180	159	21
2	422	0	422	50	0	50	266	0	266
3	820	2	818	49	0	49	363	0	363
4	639	632	7	86	87	-1	380	383	-3

Number indicates colonies in 10 mg of each organ.

S: Control media

R: Media that contains 100γ/ml of SM

Fig. 5. Macroscopic Findings after Infection with SM-resistant Tubercle Bacilli



ていた。また第2, 3群を比較すると第3群の菌数が多かった。

3. KH₁SMR 重感染後の所見

a) 肉眼的所見 (図5)

図5にみるごとく KH₁SMR のみを感染した第4群と H₃₇R_V 感染15週後に KH₁SMR を重感染した第1群との肉眼的所見には著差を認めない。これに対し第2, 3群は第1, 4群に比し、明らかに病変が強い。また第3群は第2群よりやや変化がつかつた。

b) 臓器培養成績 (表2)

表2にみるごとく第1群の肺, 肝から還元された菌は薬剤非含有および含有培地上の菌数の差すなわち S-R の平均値が0または0より小であり脾の場合は S-R の平均値が21であつたが統計学的に有意差はなかつたので第1群から分離された菌は耐性菌と考えてよいであろう。

これに対し第2群では各臓器とも耐性菌は認められず、すべて感性菌であつた。第3群では肝, 脾に耐性菌は全く認められなかつたが肺には10mg 中平均2コの耐性菌を認めた。第2, 3群の肝の菌数は差がないが脾では10mg 中約100コ, 肺で約2倍第3群のほうが第2群の菌数より多かつた。

考 察

実験結核症の研究のさい、感染手段として皮下、静脈内あるいは筋肉内、腹腔内感染等が一般に用いられているが、実験結果から人の結核症の諸問題を類推するためには最も自然の感染方法である気道内感染、すなわち吸入感染法によるのが最善であることは論をまたない¹¹⁾。INH 高度耐性菌のごとく、皮下感染ではモルモットに対しきわめて弱い毒力しか示さないにもかかわらず、吸入感染では相当期間菌の増殖もみられ、かなりの病変も

形成される¹²⁾¹³⁾など異なつた態度を示す事実などからみても、吸入感染法によつた今回の実験結果は人の結核症の発生、進展、耐性菌の重感染等を考えるときに示唆するところが多いものと考えられる。

再感染あるいは頻回感染が初感染による獲得抵抗性にいかん影響するかという問題はすでに古くから論争をくり返されてきた²⁾。この問題は菌の毒力、再感染の菌数、個体の自然抵抗性、感染相互の間隔等、複雑な要因が介在しているため、容易に結論を下し得なかつたと思われる。しかし最近耐性菌の出現によりある程度この問題を解決するための手がかりを得ることができるようになつた。

同一の毒力を有する有毒菌株を用いて行なつた本実験では、suballergic な状態で同程度の再感染が行なわれると結核症が進展するという結果が得られた。この場合、はたして初感染菌が増殖するのか再感染菌が増殖するのか不明であるが興味ある問題であり、一方に耐性菌を用いることにより今後さらにこれらの点を追及してゆきたいと思う。これにより反復感染時に結核が進展するという現象が単に感染の機会がふえたために生じたのか、あるいは2回の感染による相乗効果として起こつたのかを解明することができよう。

明らかなツベルクリン過敏性が発生した後に再感染があつた場合、その再感染は肉眼的変化、菌増殖からみても結核症の進展に大きな影響はもたない。このことは耐性菌による重感染の結果からいつそう明らかになる。すなわちツベルクリン・アレルギーがきわめて弱いときには、耐性菌の重感染に対する抵抗性がなんら認められず、耐性菌による結核症が成立進展するが、いつたん強いツベルクリン・アレルギーが発現した後に耐性菌の重感染があつても、その耐性菌の増殖は完全に阻止されている。耐性菌による重感染はツ反陽性者にはきわめて少ないという臨床的³⁾ 疫学的⁹⁾ 研究の成績を本実験は裏つけたものといえよう。

む す び

結核菌の反復吸入感染を行なつたさいの肺内における菌の増殖、他臓器への菌の散布増殖、ツベルクリン・アレルギーの発現、免疫形成、耐性菌による重感染に対する態度等につきモルモットを用い吸入感染装置によつて検討し次の結果を得た。

(1) ほぼ一定量の H₃₇R_V の微量菌を5週おきに反復感染させるとツベルクリン・アレルギー発現の確率は上昇し、ツベルクリン・アレルギーの強さと生体内菌増殖、病変形成とは関連があることを知つた。

(2) ツベルクリン・アレルギーが弱いときは耐性結核菌を重感染させると耐性菌による結核症が成立，進展した。

(3) 感性菌により強いツベルクリン・アレルギーが発現し，結核症がすでに成立進展している場合には無処置単独感染で十分，結核症が進展しうる程度の耐性菌を重感染させても耐性菌の体内増殖は完全に阻止された。

結核研究所岩崎所長，同島尾研究部長のご校閲を謝す。また本実験遂行にあたり，高橋テル，塚越兼吉両技師の労に負うところが大きかった。記して謝意を表する。

本論文の要旨は第40回結核病学会総会において発表した。

文 献

- 1) Lurie, M. B. : Resistance to Tuberculosis, 1964.
- 2) Rich, A. R. : The Pathogenesis of Tuberculosis, 1951.
- 3) 岩崎竜郎：日本胸部臨床，19：832，1960.
- 4) 北鍊平：結核，32（増刊号）：41，1957.
- 5) 家森武夫：結核，32（増刊号）：24，1957.
- 6) 千葉保之・所沢政夫：結核初感染の臨床的研究，1949.
- 7) 千葉保之：結核，32（増刊号）：17，1957.
- 8) 内藤益一：結核，32（増刊号）：24，1957.
- 9) 島尾忠男：結核，40：337，1965.
- 10) 下出久雄・豊原希一：結核，41：投稿中.
- 11) Middlebrook, G. : Bacteriological Reviews, 25: 331, 1961.
- 12) 下出久雄・豊原希一：結核，36：776，1961.
- 13) 下出久雄・豊原希一：結核，38：275，1963.