

吸入感染による結核菌感染初期像の細菌学的病理学的研究

第3編 INH 投与および BCG 免疫の影響

下 出 久 雄

国立療養所東京病院

豊 原 希 一

結核予防会結核研究所

受付 昭和 43 年 4 月 18 日

BACTERIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL STUDY OF THE CHANGES
IN THE EARLY STAGE OF AIRBORNE INFECTION
WITH TUBERCLE BACILLI*

Report III: Influence of isoniazid treatment and BCG vaccination

Hisao SHIMOIDE and Mareichi TOYOHARA

(Received for publication April 18, 1968)

Introduction

In the previous experiment, it was observed that tubercle bacilli inhaled and settled in pulmonary alveoli were phagocytosed by the alveolar macrophage, where multiplication of the bacilli took place. In the present study, the influence of INH treatment and BCG vaccination on the changes in the early stage of airborne tuberculosis of guinea pigs was observed.

Materials and Methods

I. Experimental groups

(1) The first group (BCG vaccinated group) was inoculated subcutaneously with 0.01 mg (the 1st exper.) or 0.0001 mg (the 2nd exper.) of dried BCG vaccines five weeks before airborne infection with virulent tubercle bacilli.

(2) The second group (INH treated group) was treated with 10 mg of INH daily (the 1st exper.) or with 5 mg of INH intermittently (the 2nd exper.), starting on the seventh or eighth day after the infection.

(3) The third group was used as control without any vaccination or treatment before airborne infection.

II. The dose of bacilli used for infection was larger in the first experiment than in the second experiment.

III. Methods of observation

In the first experiment, each 2 or 3 guinea pigs were sacrificed on the fourth, seventh, ninth, eleventh, fourteenth and sixteenth day after the infection.

A part of the lung, tracheal lymph node and spleen were homogenized and subjected to cultivation. Some other parts of the remaining organs were examined pathohistologically.

* From Tokyo National Chest Hospital, 3-1-1 Takeoka, Kiyose-machi, Kitatama-gun, Tokyo, Japan.

Results and Conclusion (See Fig. 1 to 6)

1. The first experiment

In the control group, the number of viable bacilli in each of the examined organs increased remarkably for sixteen days after infection. In the vaccinated group, multiplication of bacilli was completely inhibited in the lung, but the bacilli multiplied considerably in the tracheal lymph node and the spleen.

In the INH treated group, the number of viable bacilli in the lung decreased remarkably from two days after the beginning of the treatment, but the decrease was not obvious in the tracheal lymph node and in the spleen.

By the histobacteriological examination, tubercle bacilli in the alveolar macrophage of the non-vaccinated guinea pigs were found from the fourth day of infection and an obvious multiplication was observed from the seventh day to the sixteenth day of infection.

On the other hand, in the vaccinated and the treated groups no bacillus was found microscopically.

2. The second experiment

Multiplication of bacilli was found in each of the examined organs of the control group and the vaccinated group. But the number of viable bacilli in these organs was less in the vaccinated group than in the control group.

In the group treated with INH, the number of viable bacilli decreased remarkably from the first day of the treatment.

By the histobacteriological examination, tubercle bacilli were found in the alveolar macrophage of the non-vaccinated guinea pigs from the seventh day of infection and thereafter continued to increase. On the other hand in the guinea pigs treated only once with INH, only a few bacilli were found in the pulmonary lesions, showing a weak acidfastness and short in appearance.

緒 言

過去の実験^{1),2)}で吸入感染初期の結核菌の増殖状態と組織像を観察したが、その結果吸入され肺胞に定着した結核菌は肺胞大食細胞に貪食され、細胞内で増殖し、食細胞を破壊して散布され、再び食細胞に食われて増殖し、この過程をくり返して次第に増殖し、病巣を形成すると思われた。したがって食細胞の性状(菌に対する先天的または獲得抵抗性等)如何が感染初期の菌の増殖、病巣形成にとって重要な役割を果たすと考えられる。異なる抵抗性を有する個体の食細胞の菌に対する態度の差異については Hsu³⁾, Lurie⁴⁾らが組織培養や前眼房への食菌した細網細胞の接種等によって観察しているが、食細胞と菌との関係が肺における組織反応、病巣形成とどのように関連しているかを観察するためには、やはり肺内における感染初期像の観察が必要であろう。

Ratcliffe⁵⁾らは家兎の吸入感染によって初感染巣と再感染巣との組織細菌学的差異について観察しているが、感染後きわめて初期の食細胞と菌との関係については述

べていない。今回は吸入感染初期像に与える BCG 免疫および INH 投与の影響について観察した結果を報告する。

実験方法ならびに材料

[I] 第1実験

(i) 実験群: 体重 200~300 g のモルモット計 48 匹を 3 群に分け、第 1 群 (BCG 群 17 匹) はあらかじめ凍結乾燥 BCG 0.01 mg (0.5 ml) を側腹部皮下に接種し 5 週後に人型結核菌黒野株を吸入感染せしめた。ツベルクリン反応は吸入感染前にすべて 10 mm 以上 (平均 15 mm) の硬結を示していた。第 2 群 (INH 群 15 匹) は BCG 群と同時に黒野株を吸入感染せしめ感染後 7 日目から INH 10 mg (0.5 ml) を毎日皮下注射した。

第 3 群 (対照群 16 匹) は第 1~2 群と同時に黒野株を吸入感染せしめ以後無処置とした。

(ii) 吸入感染条件: 噴霧菌液は人型結核菌黒野株の Dubos 培地 14 日培養菌を希釈し比濁により菌量が 4 mg/ml となるように調製したものをを用いた (生菌数 $2.7 \times$

10⁷/ml)。吸入感染装置は既報¹⁾の装置を用い、吸入時間は120分、噴霧圧は4kg/sq.cmであつた。

(iii) 観察方法：各群とも吸入感染後0, 4, 7, 9, 11, 14, 16日目におのおの2~3匹ずつ(4日目は各1匹)屠殺剖検し、右肺下端、気管リンパ節および脾の結核菌定量培養を行ない、またこれら臓器の組織学的検索(臓器の連続切片標本をオーラミンで蛍光染色して菌を探し、後に隈部氏法で染色し直して菌と組織反応との関係を観察)を行なつた。

[II] 第2実験

(i) 実験群：体重495~680gのモルモット計40匹を第1実験と同様3群に分けた。ただしBCG接種量は10⁻⁴mg(第1実験の1/100)とし接種6週後に吸入感染を行なつた。ツベルクリン反応は吸入感染前にすべて10~13mm(平均10.5mm)の硬結を示していた。またINH群の屠殺剖検は感染後9, 11日目のみに行ない、INH投与は吸入感染後8, 10日目に5mg(0.5ml)を皮下注射した。

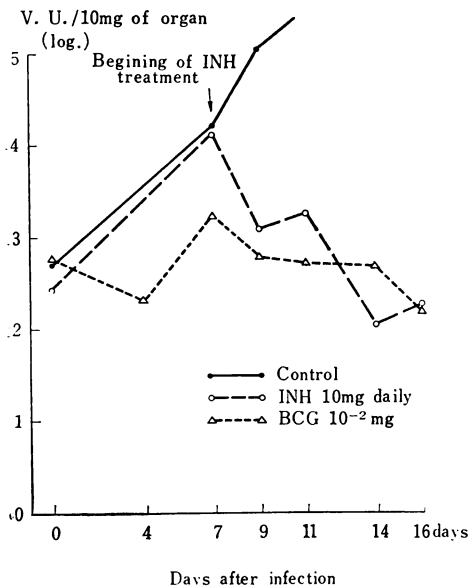
(ii) 吸入感染条件：感染菌株、吸入条件は第1実験と同様であるが、吸入時間を60分とした。噴霧菌液の生菌数は3.1×10⁶/mlであつた。

(iii) 観察方法：第1実験と同様であるが、屠殺剖検は吸入感染後1, 4, 7, 9, 11日目(INH群は9, 11日目のみ)に各3~4匹ずつ行なつた。また各群各観察日に1匹ずつ、Ringer氏液を気管より注入して肺を洗い、肺の食細胞を採取して菌の培養と染色標本による観察を行なつた。

実験成績

[I] 第1実験

Fig. 1. Changes in Viable Units of Bacilli per 10 mg of the Lungs (Exper. I)



(i) 各臓器内生菌数の推移 (Fig. 1, 2, 3)

(a) 肺：吸入感染後各時期の肺内生菌数(2~3匹の平均)はFig. 1のごとくで、対照群では、感染後1週目にもかなりの増加がみられ以後も次第に増加した。

BCG群では感染後ほとんど増加がみられず次第に減少の傾向を示した。

INH群では感染後7日目までは当然のことながら対照群と同様に増加し、INHを投与された7日以後は急速に減少を続けINH2日投与後は約1/10に、7日間投与後には、約1/100に減少した。

(b) 気管リンパ節：Fig. 2のごとく感染後4日目の10mg中生菌数は対照群445, BCG群53.5, INH群850でBCG群も増加を示し、感染後7日目には各群ともにさらにかなり増加した。

対照群、BCG群は感染後9~14日目は生菌数の算定ができなかつたが、感染後16日目には、対照群では10mg中生菌数約666×10²で4日目の約100倍に増加した。BCG群は7日目以後も増加したが対照群の約1/10で14日目ころで、増加がとまっている。INH群はINH投与2日後までに急激に減少したがその後はあまり減少していない。

(c) 脾：Fig. 3のごとく対照群では感染4日目に菌が検出され始め(10mg中生菌数0.5)以後次第に増加し16日目には4日目の約10⁴倍に達した。BCG群は7日目に対照群より多く(10mg中生菌数106)検出されているが、以後増加は認められたが対照群よりかなり少なかつた。INH群ではINH投与後増加は阻止されたが16日目までひき続き微量菌が検出された。

(ii) 組織学的所見

Fig. 2. Changes in Viable Units of Bacilli per 10 mg of Tracheal Lymph Node (Exper. I)

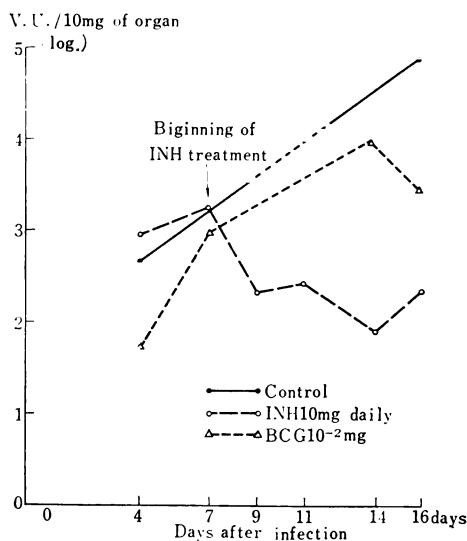
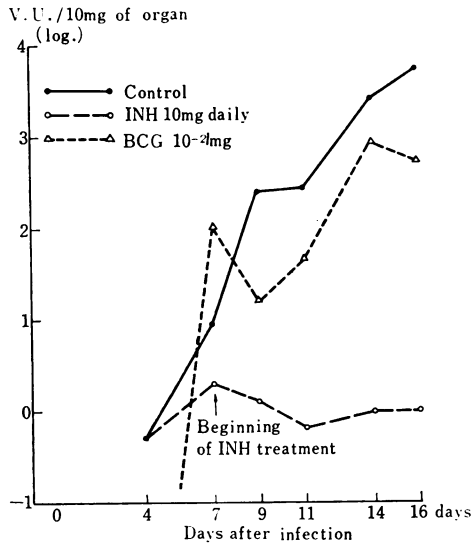


Fig. 3. Changes in Viable Units of Bacilli per 10 mg of the Spleen (Exper. I)



(a) 肺: 前回の実験²⁾では感染4日目以前に菌を認めえなかつたが、今回の第1実験の対照群では感染後4日目に肺胞壁内および肺胞腔内に遊離して1コずつ点在する肺胞大食細胞内に1~2コないし数コの菌が認められ、第2編の実験²⁾の感染後7~9日目の所見とほぼ一致していた。感染後7日目には、肺胞隔壁の肥厚がみられ、また1~数肺胞腔が食細胞により充たされ、その中に多数の菌を食した大食細胞がより多く認められるようになった。(第2編の実験の感染後11日目の所見とほぼ一致)。感染後9日目には数コないし十数肺胞腔が大食細胞によつて充たされ、感染後11~16日目にはさらに多数の肺胞腔が大食細胞と単核球によつて充たされ、菌も増加し、多核白血球も増加した。しかし1コの食細胞内に菌塊状に多数の菌が認められる所見は次第にみられなくなつた。(これらの所見は第2編²⁾の静脈内感染の所見に類似しているが、これは今回の実験では感染菌量が多いことおよび Dubos 培地の菌をそのまま希釈して噴霧菌液とし、濾過、遠沈をしなかつたため単個菌とともに微小な菌塊が吸入されたことによるのではないかと思われる。また組織学的に菌を検出する時期は第2編の実験では感染後7日目、今回の第1実験では4日目、第2実験では7日目であつたが、これは肺内生菌数が肺10mg中数百に達した時期に相当している。)

BCG 群の組織反応は対照群と同様に感染後7日目から微小な結節が認められ、次第に結節は大きくなつたが、対照群に比し結節の周囲の境界が鮮明で多数の小円形細胞によつてとりまかわれているものが多かつた。対照群との最も著明な差は結節内に菌を全く認めないことである。

INH 群では INH 2 日投与後 (感染後9日目) すでに

Fig. 4. Changes in Viable Units of Bacilli per 10 mg of the Lungs (Exper. II)

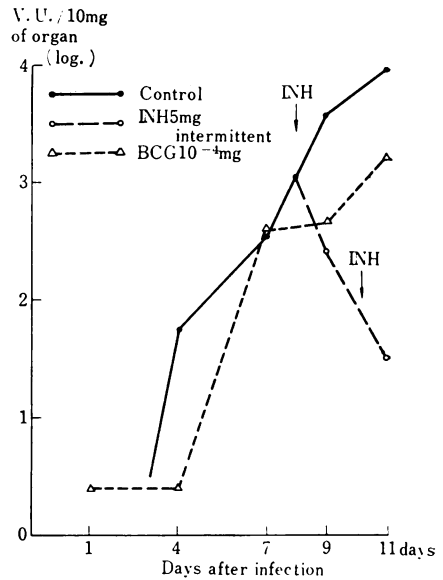
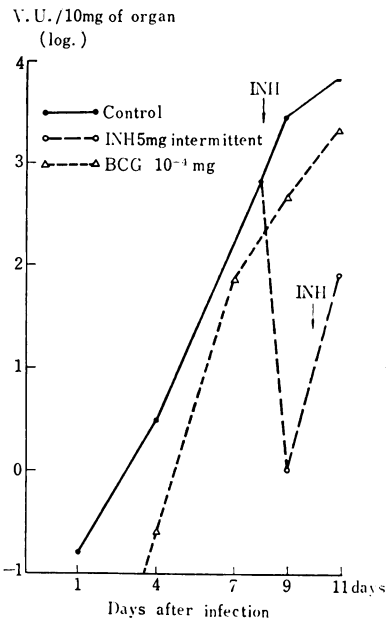


Fig. 5. Changes in Viable Units of Bacilli per 10 mg of Tracheal Lymph Node (Exper. II)



病巣内には全く菌が認められなくなつた。

【II】 第2実験

(i) 各臓器内生菌数の推移 (Fig. 4, 5, 6)

(a) 肺: 吸入感染後各時期の肺内生菌数 (2~3 匹の平均) は Fig. 4 のごとく対照群では感染7日後までもかなりの増加 (100 倍以上) を示し、その後も急速な増加が認められた。BCG 群では対照群よりやや少ないが、第1実験の BCG 群と異なりかなりの増加が認め

られた。

INH 投与後の肺内生菌数は INH 1 回投与後肺 10 mg 中 26×10^4 , 1 日において第 2 回投与後には 35 で 2 回の間欠的投与でも毎日投与の第 1 実験同様著明な減少 (数十分の 1) が認められた。

(b) 気管リンパ節: Fig. 5 のごとく生菌数は対照群では感染 1 日後にすでに菌が認められた。以後肺とはほぼ同様の速度で著明に増加した。

BCG 群では肺と同様対照群よりやや少ないがかなり著明な増加がみられた。INH 群では第 1 回投与後著明な減少を示したが, 第 2 回投与後は減少が認められなかった。

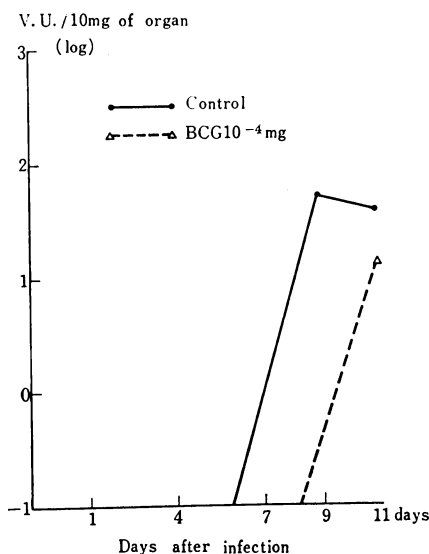
(c) 脾: Fig. 6 のごとく対照群では感染後 9 日目から菌が認められ, BCG 群ではややおくれ 11 日目に菌が認められ, INH 群では INH 投与後全く菌を認めえなかつた。

(ii) 各臓器の組織学的所見

(a) 肺: 対照群では第 2 編の実験²⁾と同様に感染後 7 日目にはじめて菌が認められた。すなわち肥厚した肺胞壁内の大食細胞内に 2~3 コの菌が貪食されている所見がわずかに見出された。感染後 9 日目には大食細胞が肺胞腔を充たし, 食菌している細胞数も個々の食細胞内の菌数もともに増加した。感染後 11 日目にはさらに多数の肺胞腔が食細胞によつて充たされ, 中心には多核白血球が現われ, この部位にとくに多数の菌が認められた。しかし第 1 実験同様一つの食細胞内に菌塊状に多数の菌が認められることは少なくなつた。

BCG 群, INH 群では組織像は各時期ともに対照群と著差はなかつたが病巣内にみられる菌が少ない (とくに INH 群で) のが特徴的所見であつた。肺の洗滌によつ

Fig. 6. Changes in Viable Units of Bacilli per 10 mg of the Spleen (Exper. II)



て得られた肺胞の中の菌所見でも対照群では細胞内で旺盛に増殖している菌が認められたが, BCG 群では増殖が抑制されており, INH 群では INH 1 回投与後すでに抗酸性を失つたものや短い菌がぎわめてわずかしか認められなかつた。

(b) 気管リンパ節: 対照群では感染後 7 日目までは類上皮細胞および菌はきわめてまれにわずかしか認められないが, 9 日目になると微小な類上皮細胞結節が散在, ときに融合してみられ, その中に少量の菌の点在, ときには菌の集簇が認められ, 11 日目には融合した多数の類上皮細胞結節の中に多数の菌が認められるようになった。BCG 群は肺と同様対照群と著差なく結節がやや小さく菌がやや少ない傾向がみられた。INH 群では対照群に比し類上皮細胞結節が小さく少なく, 菌は著明に少なくなつた。

(c) 脾: 対照群, BCG 群, INH 群ともに感染後 11 日目まで特異的病変を認めえなかつた。

総括と考案

[I] 吸入感染初期像について

前回の実験²⁾で肺に吸入された結核菌は肺胞食細胞に貪食されその中で増殖し食細胞を破壊して散布され, 再び食細胞に貪食され増殖するという過程をくり返し次第に増殖し, 病巣を形成していくことを観察したが, 肺の組織標本ではじめて菌が見出されたのは感染後 7 日目であつた。今回の第 1 実験では感染後 4 日目にすでに肺胞食細胞内に菌が認められ, 7 日目には食細胞内に多数の菌が認められ前回の実験の感染後 11 日目と類似した所見が認められた。この差異は感染菌量の差異によるとも考えられるが, 吸入感染菌量が多くても最初に個々の食細胞に貪食される菌数が同じであれば, 食菌した細胞の数は多くても個々の食細胞内の菌数は同じであつてよいと考えられる。今回の実験で感染後各時期の個々の食細胞内の菌量が多かつたのではないとも考えられる。すなわち噴霧菌液中の菌が単個菌の状態にあるか, 微小な菌塊の状態にあるかによつてこのような差異が認められるのかもしれない (前回の実験では菌液調製にさいして, 遠心濾過を行なつたが今回の実験では Dubos 培地をそのまま希釈して菌液とした。), また第 2 実験では菌が組織標本で最初に見出された時期は感染後 7 日目に肺内生菌数も前回実験の 7 日目とはほぼ等しかつたが感染後 7 日までの菌の増加率は前回実験に比しかなり大きい。この差異は使用した菌株, 培養条件にもよると考えられるので, 菌株, 培養条件, 菌液調製法 (菌量, 菌の分散状態, 毒力等) の差異が初期病変に及ぼす影響を今後検討せねばならない。

次に前回の実験と同様に今回の実験でも感染後一定時期 (前回実験では 9~11 日, 今回の第 1 実験では 7~9

日、第2実験9日)には菌塊状の多数の菌が1コの食細胞内に認められたが、その後菌塊状の菌集簇は認められなくなつた。Canetti⁶⁾はこのような所見を人の肺結核症の組織細菌学的研究から見出し(この時期を pre-exsudative stage と呼んでいる)、早期の病変にのみ食細胞内に塊状の菌集簇が認められることの説明として2つの可能性があると述べている。すなわち第1には菌が食菌される前に菌塊状になるか、第2には食菌された単個菌が細胞内で増殖するかである。われわれの経時的観察では第1の説明のような所見は得られず、第2の説明を裏付ける所見が認められた。Canetti はまた preexsudative stage に続く intralveolar exsudation の時期における clumped bacilli の減少は食細胞の破壊により菌が細胞外に遊離され菌塊が分離されることによるとしているが、われわれの観察でもそれを裏付ける所見が得られた。さらに Canetti は食細胞内で菌が増殖し菌塊状をなす現象を類に類似した所見として述べているが、結核菌感染初期において細胞内で塊状に菌が増殖する所見は、pre-allergic な時期における菌と生体との関係を示現しているとも考えることもできよう。Canetti はまた初期病変で macrophage の中に菌が位置することを重視し、皮下感染では菌はまず多核白血球内にみられ、ついで macrophage に攻撃されるが人の肺ではこのような順序はみられないと述べている。吸入感染による実験では人の肺における所見と同様菌はまず macrophage に食菌され、ついで多核白血球が認められた。

このような細胞反応の順序は Canetti によれば感染臓器の特異性や感染時期よりも感染菌量によつて規定されると考えられているが、吸入感染法は感染菌量の点でも人の自然感染に近い条件を満たしているといえよう。

[II] BCG 免疫による感染初期像の変化

第1実験 (BCG 10^{-2} mg 接種) の場合は強毒菌感染後、肺内生菌数はほとんど増加を認めず、組織学的検索で結節の形成は認められたが、その中に菌を認めえなかつた。気管リンパ節への転移の時期は対照群と差なくともに感染後4日目に菌が認められたが菌量は少なく転移も抑制されているように思われた。しかし4日目以後 BCG 接種群でもリンパ節内の生菌数の増加がかなり認められた。Lurie⁴⁾ は免疫された家兎では菌の感染局所から所属リンパ節への転移は抑制されず、また先天抵抗性の強い家兎のほうが肺に吸入された菌が早く局所リンパ節に転移し、転移したリンパ節での増殖が抑制され、一方モルモットでは、転移もリンパ節での増殖もともに抑制されると述べている。われわれの実験でも同様な所見が得られたが、リンパ節内の菌増殖の抑制は肺に比し著明でなかつた。

脾への菌移転も時期的に対照群と著差は認められず、脾内の菌増殖の抑制も肺に比し著明ではなかつた。これ

らの事実は Lurie⁴⁾ が述べているように免疫効果が菌の侵入門戸と局所リンパ節および遠隔の臓器とで異なつていることを示しているのではないだろうか。しかし今回の実験は感染後16日目までの経過であり、われわれの過去の実験^{7),8)} からみるとさらに日を経るに従つてリンパ節、脾での菌の増殖抑制はより著明となると考えられる。第2実験 (BCG 10^{-4} mg 接種) の場合攻撃菌量が第1実験より少ないにもかかわらず BCG 群でも肺内生菌数は著明に増加し、気管リンパ節、脾への転移時期および菌の増加率も対照群と著差を認めなかつた。しかしいずれの臓器でもわずかながら菌の増加は抑制されているように思われた。

[III] INH 投与による感染初期像の変化

INH 群 (第1実験では INH 10 mg 毎日投与、第2実験では INH 5 mg 隔日投与) では著明な生菌数の減少が各臓器で認められ、短期間の観察では INH 量、毎日、隔日投与の差異による効果の差を認めなかつた。肺の組織学的検索でもきわめてまれに単個菌を見出しうるのみで、INH 1回投与により、食細胞内の菌に縮小、離断、著しい抗酸性の消失が認められた。しかし第1実験の脾では少量の菌が持続して検出され、気管リンパ節でも最初著明に減少するが以後減少しなくなる傾向が認められた。これらの事実は菌の増殖がある程度阻止されたとき INH の効果が低下することを示すものであろうか。INH の間欠的投与の意義に関連して今後検討に値する問題と考える。

結 語

結核菌の吸入感染初期像に及ぼす BCG 免疫、INH 投与の影響をモルモットを用いて観察し次の結果を得た。

(1) 組織学的に肺内に菌が見出される時期は比較的少量感染後7日目であるが比較的大量感染では感染後4日目に比較的容易に見出される。この時期は肺内生菌数が 10 mg 中数百に達する時期に相当する。

(2) BCG 非接種モルモットでは吸入された菌は肺胞食細胞内で旺盛に増殖するが BCG 10^{-2} mg 接種動物では著明に増殖が阻止され減少し、組織学的にも菌を検出しえなかつた。BCG 10^{-4} mg 接種動物では増殖の抑制は認められるが感染菌量が BCG 10^{-2} mg 接種動物より少量であつても肺内生菌数はかなり増加した。BCG の免疫効果は気管リンパ節、脾では感染局所である肺に比し著明でなかつた。

(3) INH 投与直後より肺内生菌数は著明に減少し、INH 毎日投与でも隔日投与でも短期間の観察では、効果に差が認められない。細胞内の菌の一部には INH 1回のみ投与によつて著明な抗酸性の減弱、菌体の縮小が認められた。

終りにご指導ご校閲下さつた結核予防会結核研究所岩

崎竜郎所長ならびに国立療養所東京病院砂原茂一院長に深謝致します。また本研究にご協力願った結研高橋テル、東京病院村田能子両技師にお礼申し上げます。(本研究の要旨は第43回日本結核病学会総会で報告した。)

文 献

- 1) 下出久雄 他：結核, 41:329, 昭 41.
- 2) 下出久雄 他：結核, 41:333, 昭 41.
- 3) Hsu, H. S.: Amer. Rev. Resp. Dis., 91:488, 1965.
- 4) Lurie, M. B.: Resistance to Tuberculosis, p. 78, 50, 217, 52 Harvard, Cambridge, Mass., 1964.
- 5) Ratcliffe, H. L. & Wells, W. F.: J. Exper. Med., 87:585, 1948.
- 6) Canetti, G.. The Tubercle Bacillus in the Pulmonary Lesion of Man. p. 32, Springer Publishing Co., New York, N. Y. 1955.
- 7) 豊原希一 他：結核, 42:505, 昭 42.
- 8) 下出久雄：結核, 35:570, 昭 35.