

非定型抗酸菌の実験的研究

1. *M. kansasii* のモルモットにおける吸入感染初期像, および珪酸注入, BCG 接種の影響

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 45 年 10 月 5 日

EXPERIMENTAL STUDY ON ATYPICAL MYCOBACTERIA*

I. On the Changes in the Early Stage of Airborne Infection with *Mycobacterium kansasii* in Guinea Pigs. The Influence of BCG Vaccination and Intratracheal Infusion of Silica

Hisao SHIMOIDE and Mareichi TOYOHARA

(Received for publication October 5, 1970)

Patients with atypical mycobacteriosis have been detected more frequently among persons exposed to dust because of their occupation than among other persons.

The influence of dust inhalation on the infection with atypical mycobacteria was observed experimentally by many investigators.

In the present study, the influence of intratracheal dust infusion and BCG vaccination on the early stage of airborne infection with *mycobacterium kansasii* was observed in guinea pigs.

I. Experimental groups (see Fig. 1)

i) The first group (Silica gr.) was infected with Miura strain (*M. kansasii*) by airborne route 2 weeks after intratracheal infusion of amorphous silica suspension.

ii) The second group (BCG vaccinated gr.) was infected with Miura strain 3 weeks after subcutaneous inoculation with 0.1 mg of dried BCG vaccine.

iii) The third group (control gr.) was only infected with Miura strain without silica infusion.

iv) The fourth group (Si control gr.) was submitted to intratracheal infusion of silica without infection with Miura Strain.

II. Methods of observation

Two or six guinea pigs of each group were sacrificed 3 hours, 3, 7, 14 and 21 days after infection.

A part of the lung tissue and tracheal lymph node were homogenized and subjected to cultivation.

Neighbouring parts of the cultured tissues were examined pathohistologically.

III. Results

* From the National Tokyo Chest Hospital, Kiyose-ehi, Tokyo 180-04 Japan.

i) In the lungs, the number of viable bacilli increased considerably in all infected groups up to 7th day after infection. In the 1st and 2nd groups multiplication of bacilli continued till the 14th day after infection.

The number of viable bacilli decreased at 14th day after infection in the 3rd group and decreased at 21st day after infection in the remaining groups, but the decreases was not obvious in the 1st group. (Fig.2)

In the tracheal lymph node, the number of viable bacilli increased remarkably up to 14th day after infection and decreased at the 21st day after infection in all infected groups. (Fig.3)

ii) Pathohistological examination revealed only small epithelioid cell tubercles 14 days after infection in the lungs of the 2nd and 3rd groups.

In the 1st and 4th groups, a large number of alveolar macrophages and giant cells containing silica particles were found in the alveolar walls and spaces.

In the 1st group, a few bacilli were found in these macrophages and giant cells, but numerous bacilli observed as in the case of infection with virulent tubercle bacilli were not found. In the tracheal lymph node, necrotic lesions were found in the 1st group and also in the 3rd group.

緒 言

非定型抗酸菌（以下 AM と略）が人体に対しても比較的弱毒であると考えられるにもかかわらず、病変を形成することがあるのは、感染に対する宿主の局所的、全身的抵抗性の低下に1つの原因が求められている。とくに AM 感染に対する粉塵吸入の影響は、非定型抗酸菌症が粉塵職歴のあるものに明らかに多いこと¹⁾や動物実験²⁾³⁾によつても証明されている。

しかしながらどのような機構で粉塵吸入が影響を与えるかは必ずしも明らかにされているとはいえない。われわれは過去における INH 高度耐性の弱毒人型結核菌のモルモット感染実験⁴⁾で吸入感染法のみが微量な感染菌量で肺に壊死性病変を形成しうることを知つたが、弱毒抗酸菌の感染方法として吸入感染が適しているのでは

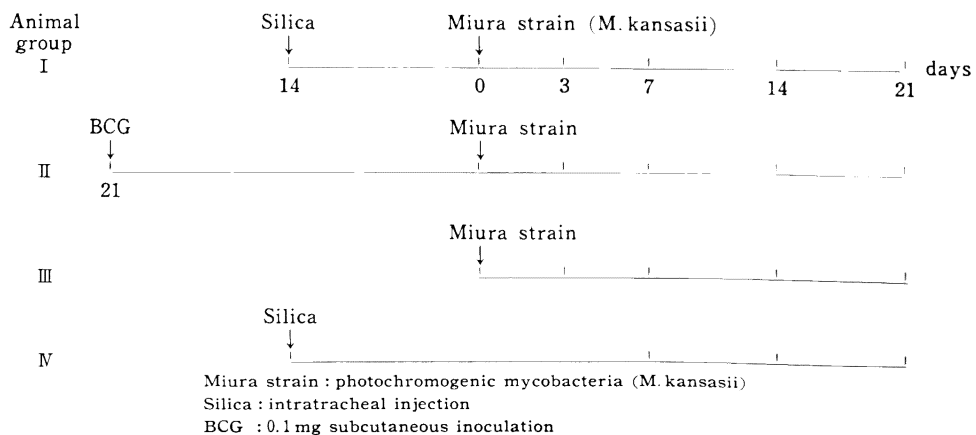
ないかと思う。また過去に人型菌の吸入感染初期像を観察してきたが⁵⁾毒力が弱い菌ほど Host-Parasite relationship を検討するためにはとくに感染早期の細菌学的組織学的検索が必要であると思われる。このような考えから今回は AM 感染に対する粉塵の影響を検討するために吸入感染による AM 感染初期像を観察した。また多くの抗結核剤に耐性を有する AM の感染対策としては化学療法の開発とともに免疫接種についても検討されねばならないし、結核菌の免疫と AM の免疫の相互関係についても検討されねばならないので BCG 接種の AM 感染への影響もあわせて観察した。

実験方法

I. 実験群

第1群 (silica 群モルモット 16 匹) は気管内より肺

Fig. 1. Experimental Design



内に silica を注入し2週間後に AM を感染させた。

第2群 (BCG 群 16 匹) は BCG を皮下接種し3週間後に AM を感染させた。

第3群 (対照群 11 匹) は AM の感染のみを第1, 2群の感染と同時にこなした。

第4群 (Si 対照群 7 匹) は silica の注入のみを行ない AM の感染を行なわなかつた。

II. 観察方法

AM の感染後3時間, 3, 7, 14, 21 日目 (silica 注入後では 14, 17, 21, 28, 35 日目) に各群 2~6 匹ずつ屠殺剖検した (感染3時間後は第1群のみ剖検)。各臓器の肉眼的病変の観察と, 肺, 脾重量の測定を行ない, 右肺下端と気管リンパ節内の AM 定量培養 (1% 小川培地使用) を行ない, 同部位の組織標本を作製し, AM のオーラミンおよび隈部氏法による菌染色, ヘマトキシリン, エオジン染色, 鍍銀染色, ワンギーソン染色等を行なつて観察した。

III. 使用菌株と感染方法

感染には AM 症の患者から分離された *M. kansasii* (三浦株) を使用し, 感染方法は吸入感染法により, 噴霧菌液は Dubos 培地5日培養菌を G5 ガラスフィルターで濾過した濾過液と原菌液を 500 回転/分, 5 分間遠沈した上清とを混じたもの (生菌数 $45 \times 10^6/ml$) を使用した。吸入装置は既報⁶⁾のものを使用し, 60 分間菌のエロゾルを吸入させた。

IV. 使用動物

体重 400~500 g のツベルクリン反応陰性のモルモット 50 匹を用いた。

V. BCG 接種

凍結乾燥 BCG 0.2 mg/ml の菌液 (生菌数 $18 \times 10^8/ml$) を 0.5 ml 右腹壁皮下に接種した。

VI. silica の肺内注入

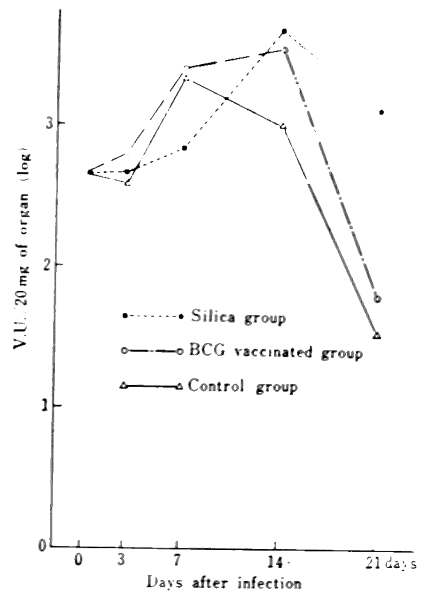
Ethyl silicate を焼いて作製した非晶性 silica (労働科学研究所小山内博氏より分与)⁷⁾ の 35 mg/ml 蒸留水懸濁液をつくり, その 0.5~1 ml をペニシリンを混じてラポナルで麻酔したモルモットの気管より注射器で注入した。

実験成績

I. 臓器内 AM 生菌数の推移

i) 肺内生菌数 (Fig. 2): 感染3時間後の肺 20 mg 中の生菌数は 441 であつた。感染後 3, 7, 14, 21 日目の肺 20 mg 中の平均生菌数は第1群 (silica 群) では 443, 686, 4930, 1317 であり, 第2群 BCG 群) では 625, 2530, 3530, 60 で, 第3群 (対照群) では, 398, 2223, 1010, 33 であつた。すなわち感染後7日目までは3群ともに増加がみられ, 14日目には silica 群, BCG 群はさらに増加し, 対照群は減少に転じ, 21日目

Fig. 2. Changes in Viable Units of Bacilli per 20 mg of the Lungs



には silica 群, BCG 群も減少に転じた。生菌数の減少は BCG 群, 対照群で著明であり, silica 群ではおそく最も多数の生菌数を示した。

ii) 気管リンパ節内の生菌数 Fig. 3): 感染後 3, 7, 14, 21 日目のリンパ節 20 mg 中の平均生菌数は, silica 群では, 23, 114, 3123, 1190, BCG 群では, 14, 470, 4033, 936, 対照群では, 35, 543, 3590, 923 であつた。すなわち感染後3日目に各群ともほぼ同数の菌が検出された。その後も3群ほぼ同様に14日目まで急速に増加し

Fig. 3. Changes in Viable Units of Bacilli per 20 mg of Tracheal Lymph Node

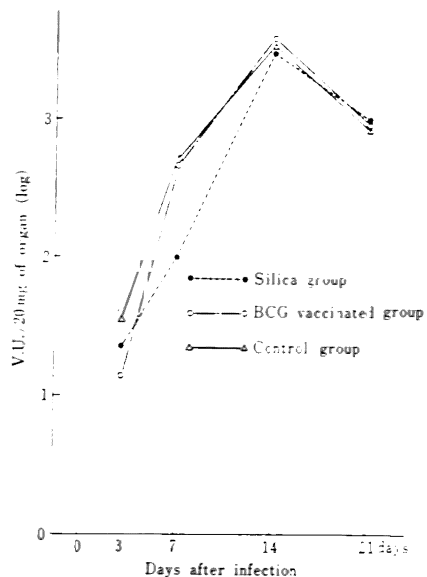
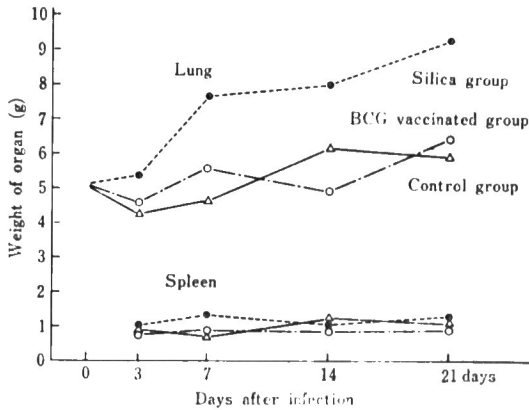


Fig. 4. Changes in Weight of the Lung and Spleen



21 日目には減少に転じた。

II. 病理学的所見

i) 各臓器の肉眼的所見

肺は silica 群で silica 注入後 28, 35 日目 (感染後 14, 21 日目) に灰白色の斑点が多数認められ, 肺重量 (Fig. 4) も明らかな増加を示したが, BCG 群, 対照群ではほとんど病変を認めず, 肺重量もほとんど増加しなかつた。肝, 脾にはすべての群で病変は認められず, 脾重量の増加もみられなかつた。

気管リンパ節は Fig. 5 のごとく, silica 群に最も著明な腫脹がみられたが, BCG 群, 対照群と著明な差はなく, AM 感染のみでも著明な腫脹がみられた。Si 対照群 (silica 注入のみ) ではほとんど変化は認められない。

ii) 組織学的所見

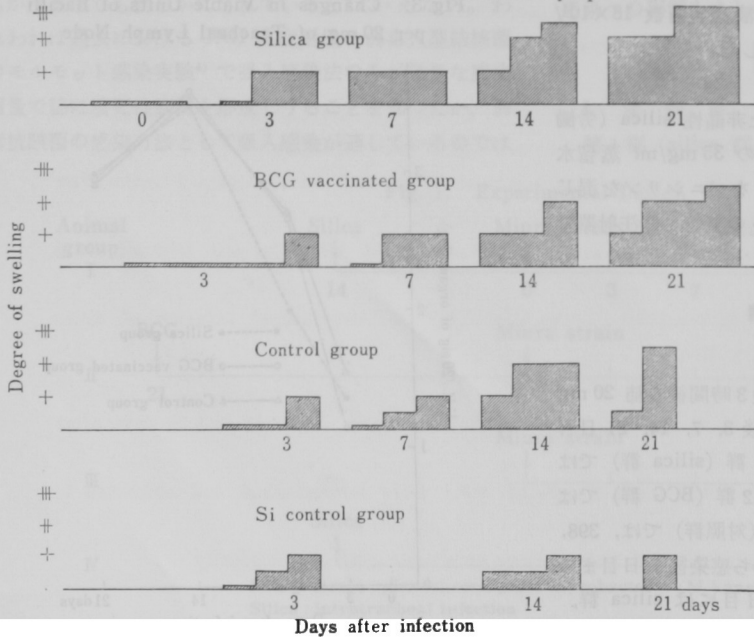
肺では AM 感染のみの対照群では著明な変化を認めず, 感染後 7 日ところから大食細胞からなる微小結節が認められ, 14 日目には小さな類上皮細胞結節と, その周辺に多核球・リンパ球の浸潤がみられるようになった。組織学的に菌を検出することはきわめて困難であつた。

silica 注入後 AM を感染させた群では感染後 3 日目 (silica 注入後 17 日目) から肺胞壁および腔内に silica を食した食細胞, 巨細胞が多数認められ, 7 日目には約 20 コの肺胞の範囲に上記の細胞が充満し, 14 日目にはさらに病変が拡がり多核球の浸潤もかなりみられ, silica を食した食細胞, とくに巨細胞の中に抗酸菌を 1~2 コ認めることができた。また肺内の小気管支リンパ節にも類上皮細胞の増殖がみられた。21 日目は 14 日目の病変とはほぼ同様であるが, 小気管支リンパ節の類上皮細胞結節は増大し, 壊死が認められた。

silica 注入のみの Si 対照群では silica 注入後 17 日目 (感染群では感染後 3 日目に相当する時期) には silica 注入後感染群 (第 1 群) と同様な所見を呈し, 28, 35 日目 (感染群では感染後 14, 21 日目) になると主として巨細胞を主とした病変となり, 感染群のような多核球の浸潤はみられなかつた。

BCG 群は対照群の所見と同様であつた。気管リンパ節は, silica 注入のみでは注入後 35 日には全く病変を示さず (ただし注入後 6 カ月目には著明な線維増殖を認めた), AM 感染群では silica 注入の有無, BCG 接種の有無に関係なく各群ともに著明な類上皮細胞の増殖と壊死が認められた。

Fig. 5. Macroscopic Findings of the Tracheal Lymph Node



考 案

佐竹²⁾ はマウスに石英粉を静注し, 翌日各種抗酸菌を静注した結果, マウスに病原性のある菌では石英粉の存在によつて著明に菌の増殖の促進がみられるが, 病原性のない菌では増殖がみられないか, あつてもわずかであつたと報告している。またモルモットに病原性のない Photochromogen (No. 8 株) を石英粉と一緒に気管内に注入しても皮下に接種しても進行性の病変を起こさなかつたと述べている。

Tacquet³⁾ はモルモットに不活性の炭粉粒子を吸入させ, 14 日後に, *M. kansasii* を静脈内感染させた結果, 感染のみに比

し病変が高度となり、とくに肺内生菌数が多くなった(ただし数カ月後には病変は退行してゆく)、と報告している。また感染後に粉塵を吸入させた場合は粉塵吸入の影響が少ないと述べている。

モルモットに AM によつて進行性の病変をつくる試みは多くの研究者によつて行なわれてきたが、いまだ成功していない。

われわれの今回の実験は粉塵注入を感染の 14 日前に行なつた点と、感染方法で佐竹の実験条件と異なり、感染方法として吸入感染を用いた点および粉塵の種類、注入方法では Tacquet の実験条件とも異なつていたが、モルモットの肺内生菌数が感染後 3 週目から減少に転じ、進行性病変をつくらなかつた点、および粉塵の存在によつて組織内生菌数が長期間相対的に多量に認められた点では、2 者の実験成績と同様な結果であつた。しかし従来の実験では感染初期の経時的観察は少なく、われわれの実験ではモルモットに本来病原性のない *M. kansasii* も感染初期(2 週間)には、silica が存在しなくても肺内で増殖しうることが明らかにされた。しかし強毒人型結核菌に比し増殖の程度は弱く、人型菌の感染初期のように食細胞に菌が充満している所見はみられず、食菌した細胞数も少なく、食細胞内の菌も 1~2 コにすぎなかつた。これら組織内の菌は主として食細胞、とくに巨細胞内に見出され、細胞内で silica と共存しており、silica の菌への影響は細胞単位で行なわれているように思われる。すなわち AM は食細胞に貪食されたあと、細胞内である程度増殖し、獲得抵抗性の形成によつて急速に処理されてゆくが silica の存在によつて比較的長期間細胞内で生存しうるとなると思われる。

感染初期の菌の増加は silica の存在有無で著差はみられないから、silica が直接菌の増殖を促進しているとは考えにくい。また silica 注入は食細胞の増殖を促すことはあつても低下させているとは考えられない。したがつて silica によつて長期間菌が存続する要因としては主として silica を貪食した食細胞の菌の処理能力の低下(食細胞の変性⁸⁾)ということが考えやすい。

しかしこのような要因のみでは進行性病変の形成を説明することはできない。今回の実験で注目された点の 1 つは肺病変に比しリンパ節の変化が強いことであり、この点について種々の実験条件(とくに silica がリンパ節に病変を形成する時期すなわち注入後数カ月後の AM 感染)による観察が必要であらう。

BCG 接種の AM 感染に対する影響は本実験では全く認められなかつたが、*M. kansasii* が病原性を有するマウスについて今後検討したいと考えている。

結 語

モルモットに *M. kansasii* を吸入感染させ、これに対する silica の肺内注入と BCG 接種の影響を観察した。

1) モルモットに *M. kansasii* を吸入感染させると肺内生菌数は 1~2 週間は増加し、3 週間後に減少し始め進行性病変はつくらない。

2) あらかじめ肺内に silica を注入した後に感染しても肺内生菌数の 3 週以後の減少がおくれ、比較的長期間菌が生存するが、進行性病変はつくらない。

3) *M. kansasii* の吸入感染は肺よりも気管リンパ節に強い壊死性病変をつくる。

4) BCG 接種はなんらの影響も与えなかつた。

終りにご校閲いただいた砂原茂一先生に厚くお礼申し上げます。本実験は結核予防会結核研究所において行なわれたものであり、同所望月テル技師のご協力に深く感謝いたします。また病理組織所見についてご教示いただいた初鹿野先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 非定型抗酸菌症研究協議会報告, 昭 45.
- 2) 佐竹央行 他: 抗研誌, 9: 219, 昭 38.
- 3) Tacquet, A. et al.: Z. Tbk., 127: 115, 1967.
- 4) 下出久雄 他: 結核, 36: 776, 昭 36.
- 5) 下出久雄 他: 結核, 41: 333, 昭 41.
- 6) 下出久雄 他: 結核, 41: 329, 昭 41.
- 7) 小山内博: 労働科学, 33(8): 611, 昭 32.
- 8) Hasuike, T.: Scie. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ. C, 9(3): 255, 1960.