百日咳菌のマウス吸入感染に関する研究

藤 田 浩 山 本 宣 男 金 子 順 一

武田薬工光工場細菌部

〔受付: 5月16日1955年〕

百日咳菌のマウス経気道感染は Burnet-Timmins²⁾の成績にもかかわらず一般には一定の成績がえられないので、百日咳菌免疫の研究上重要な感染法ではあるが広く応用されるに到らなかつた。関³⁾は特殊な気管内感染法を考案し、肺の菌数培養試験を免疫の研究に用いたが、この方法の繁雑さのために実施が制限せられる。下条⁴⁾は噴霧吸入感染を行つたがマウスを致死させるには到らなかつた。近來コーチソンの感染助長作用が多くの病原体の動物実験に用いられるようになったが、われわれは百日咳菌のマウスの吸入感染にこれを用いて興味ある成績をえたので報告する。

実験材料及び方法

マウスは主に dd, 一部は CF1 及び C57 BL/6 系のいずれも自家繁殖した生後 4 W のものを用いた。以下に特に記載せぬ限り dd である。醋酸コーチソン (Cortone Acetate "Merck") 5 mg 又は醋酸ヒドロコーチソン (Hydrocortone Acetate "Merck") 2.5 mg をマウスの後肢筋内に注射し、約 2 時間後に 2 ロデシケーター (18 L) に入れ、下口から菌液を噴霧し上口から空気を吸入して約 60 分かつて吸入させる。噴霧器は "Vaponefrin-Nebulizer" を用い、吹込空気を約 $\frac{1}{2}$ 気圧として、60 分間に 10~15 cc を霧化する。百日咳菌は I 相桜屋敷株をペプトン加 B-G 培地に 24 時間培養したものを 1% ペプトン水で約 100 bil/cc としたものを噴霧菌液とし、マウスは吸入感染後約 2 W 間観察した。死亡マウス及び生残マウスの肺を磨碎して百日咳菌を検索するに何れも純培養状に証明するので、後に検索を省略し、肉眼的に肺の病変の範囲を記載するにとどめた。

抗血清としては I 相 (桜屋敷株) 又は III 相 (島田株) 生菌ウサギ免疫血清、I 相クロム処理菌山羊免疫血清、或はこれらを I 相クロム処理菌で凝集素を吸収し抗毒性を残したのを用い、ワクチンには I 相又は III 相菌を型の通りにマーズニン殺菌したものを用いた。

実験成績

1) マウスの百日咳菌吸入感染に対するコーチソン、

ヒドロコーチソンの影響

ddT マウスを用いた実験は第 1 表の様であつた。噴霧菌量を 600~1600 bil, 吸入時間を 40~60 分とする範囲では死亡の状況に大差を認めない。又、コーチソン 5 mg とヒドロコーチソン 2.5 mg は同様な死亡促進作用を示す。(コーチソン 5 mg 以上では非感染マウスに死亡を 3~7 来し、2 mg では促進作用が著しくない。吸入時間を 20 分以下にすると菌液が濃くても死亡が少い。)

第 1 表の総括では、コーチソンを与えない時、マウスの約 40% が 4~12 日に涉つて死亡するにすぎないが、コーチソンを与えたものでは約 90% が死亡し、死亡日は 3~7 日が 60% を占める。生残を 15 日生存として計算した平均生存日数が非コーチソン群の約 12 日がコーチソンにより約 7 日に短縮される。

生残マウスも表に示す様に肺の変化が著しく時に全葉の $\frac{1}{3}$ に及ぶものがあるが、予備実験で 14 日以後に死亡するものが殆どないを見た。又、死亡マウスの肺変化は必発ではあるが、全葉の $\frac{1}{2}$ 又は $\frac{1}{4}$ 以下のものもあつて、死因は肺炎そのものによるものではないことが推定された。

感染 3 日後の肺、心血、脾の百日咳菌培養成績は第 2 表の様であつて、コーチソンは肺の菌増殖及び菌血症を促進しているのみならず、脾においても菌増殖を起させているようである。

マウスの系統による差は、dd, CF1 及び C57 の間では著しくはないが、C57 はそのままでは感受性が低いがコーチソンの増強作用をうけることが甚だしいようである。但しこの差はもう少し実験を繰返さないと確定的とはいえない。

FUJITA, Hiroshi, YAMAMOTO, Norio and KANEKO, Jun'ichi: Studies on the inhalatory infection of *H. pertussis* in the mouse. Bact. Dept., Hikari Plant, Takeda Pharm. Ind. Ltd., (Hikari City, Yamaguchi Pref.). — Jap. J. of Bact., 10(11), 913-917, 1955.

第1表 百日咳菌吸入感染におけるコーチソンの影響(ddT マウス)

Exp. No.	菌 * bil/min	コーチソン mg	マウス死亡日 ***								死: 試	平均生存日数
6A	600/60	0	4	10	HH	HH	+				2:5	11.8
		5	3	4	6	6	+				4:5	6.8
6B	800/60	0	HH	HH	+	+	+				0:5	15.0
		5	5	7	9	9	+	+			4:5	9.0
7	1050/40	0	10	12	HH	HH	HH	HH	HH		2:7	13.9
		5	3	3	5	5	5	8	HH		6:7	6.3
8	1400/50	0	4	4	7	HH	HH	HH	+	+	3:8	11.2
		5	3	3	3	4	4	4	5	5	8:8	3.9
9	1600/55	0	6	6	10	11	12	HH	HH	HH	5:8	11.2
		5	4	4	4	4	6	8	11	12	8:8	7.9
10	800/55	0	5	6	7	9	12	HH	HH	HH	5:8	10.5
		5	4	5	7	7	9	10	10	12	8:8	8.0
13	1500/60	5	4	8	10	10	12	13	HH	HH	6:8	10.9
		H 2.5**	4	6	7	10	10	12	12	13	8:8	9.3
綜 合		0									17:41	12.1
		+									52:57	7.1

死亡日分布	日		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	コーチソン	0	6	11	7	4	4	3	3	6	1	5	2
	ク	+	—	3	1	3	2	—	1	3	1	3	—

* 噴霧総菌量/吸入時間

** ヒドロコーチソン

*** 生残マウスは肺炎全葉の 1/2 以上をHHとし、以下HH, +, —に分ける。

第2表 百日咳菌吸入感染*後の培養成績

コーチソン	肺**			心 血	脾
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		
5 mg	464	81	20	HH	HH
0	191	15	1	+	—

* 800 bil/45' 噴霧 3 日後

** 5 四分の肺を併合 10% 乳剤としたものを稀釈, 0.1 cc ずつ 5 枚培養の平均

2) 抗血清の作用

種々の抗血清を腹腔内に注射後 24 時間に吸入感染させ、又は感染の翌日から 4 日間連続して血清を注射し、マウス死亡に及ぼす影響を見た。結果は第 4 表の通りである。

III 相血清 (ウ-B-III) では全く影響がないが I 相血清 (ウ-A-I) は明かに防禦作用を示す [Exp. No. 10]。I 相山羊血清 (羊-14-I) も I 相ウサギ血清 (ウ-118-I) と同じ程度の防禦作用を示すけれども、この山羊血清は抗毒作用を欠如するが極めて高い K 凝集価を示すものであつて、防禦作用は K 凝集価に比例するものではないことを知る [Exp. No. 7]。

I 相血清をクロム処理 I 相菌で吸収して K 及び O 凝集素をなくした吸収血清は、抗毒作用を残しているけれども防禦作用は見られなくなる。即ち、この防禦作用は前の実験で疑われた抗毒作用の関連したものではないこと

を知る。その反面、山羊血清を吸収して凝集素を失つた抗毒性のないもの (羊-14-吸) が防禦作用を残していることがわかつた [Exp. No. 8]。

しかるにウサギ又は山羊血清を感染後回復して注射すれば致死のみならず肺の病変をも著しく抑制するが、更に前の実験で殆ど効果のなかつた吸収血清がこの回復注射によつて明かな防禦作用を呈してくること、及びそれが抗毒素の有無に関しないことは、この防禦作用が凝集素、抗毒素以外の残存抗体によるものであるか、或はむしろ別の意味の非特異的作用によるものであるか、尙今後の検討を要する成績である。[Exp. No. 9]。

3) ワクチンの影響

ワクチン腹腔内接種 10 日後に吸入感染を行つた成績は第 5 表の様である。

I 相菌ワクチンでは明かな防禦作用を示すが、III 相菌ワクチンでは僅微な作用を認めたにすぎない。[Exp. No. 11 及び 12]。

I 相菌ワクチンを 100°C 30 分加熱して上清をすてることなく稀釈したものにおいても明かに作用を残している [Exp. No. 12]。

考 按

Burnet-Timmins²⁾ の実験では 0.2~1.0 bil/cc 菌液の 3 小滴の鼻孔滴下によつてマウスの多くは 2~3 日で死亡しているが、鼻孔滴下では液の大部分が胃に入つて肺

第3表 マウスの系統による差

Exp. No.	菌 bil/min	コーチ ソン mg	マウス 系統	マウス死亡日*																死: 試	平均生存 日数
3	256/30	0 0	ddT CF1	6 5	7 8	9 10	9 10	10 11	S 12	S S	S S	S S	S S	S S	S S	S S	S S	S S	S S	5:15 6:15	12.7 12.7
4	1080/50	0 5	ddT "	7 4	8 4	9 5	9 5	10 5	S 6	S 7	S 7	S 11	S 12	S S	S S					5:12 10:12	12.3 8.0
		0 5	CF1 "	10 3	10 4	12 4	S 5	S 5	S 6	S 6	S 8	S 10	S 11	S 11	S 2					3:12 12:12	13.9 7.3
6	800/30	0 5	C 57 "	10 3	S 3	S 5	S 5	S 5	S 7	S 9	S 9									1:8 8:8	14.4 5.8
10	800/55	0 5	ddT "	5 4	6 5	7 7	9 7	12 9	S 10	S 10	S 12									5:8 8:8	10.5 8.0
		0 5	C 57 "	S 3	S 3	S 4	S 5	S 5	S 8	S 8	S 10	10	12							0:8 10:10	15.0 6.8
総 合		0 5	ddT																	15:35 18:20	12.1 8.0
		0 5	CF 1																	9:27 11:12	13.3 7.3
		0 5	C 57																	1:16 18:18	14.7 6.3

* S 生 残

第4表 抗血清の影響

Exp. No.	血 清 *					菌 bil/min	マ ウ ス 死 亡 日												死 : 試	平均生 存日数
	No.	K	O	AT	注射量 cc															
10	ウーA—I	25600	320	256	前 0.25	800/55 ¹	9	10	11	11	+	+	+	+	2:8 7:8 8:8	13.6 8.3 8.0				
	ウーB—III	160	1280	—	—		3	5	7	7	8	9	12	+						
	—				—		4	5	7	7	9	10	10	12						
7	ウー118—I	6400	1280	320	前 0.25	1050/40 ¹	3	12	11	+	+	—	—	2:7* 3:7 5:7 3:7 3:7 4:7 6:7	12.9 11.6 9.3 12.1 12.1 9.3 6.3					
	羊—14—I	204800	5120	—	前 0.25		3	8	10	11	11	+	+							
							3	5	5	9	11	11	+							
							5	10	10	—	—	—	—							
							5	9	10	11	+	+	—							
—				前 0.25	3	3	3	11	11	11	11	4:7								
—				—	—	3	3	5	5	5	8	11	6:7							
8	ウー2—I	6400	800	64	前 0.25	1400/50 ¹	5	9	11	11	11	—	—	2:7 7:7 0:8 8:8 2:8 5:8 8:8	12.7 4.3 15.0 4.4 13.7 9.9 3.9					
	ウー3—I	6400	400	320	—		3	4	4	4	4	5	5			6				
	ウー3—I	—	—	64	—		3	4	4	4	4	5	5			6				
	羊—14—I	204800	5120	—	—		9	11	11	11	+	+	+			+				
	—				—		4	5	5	9	11	11	11			11				
—				—	—	3	3	3	4	4	4	5	5	8:8						
9	ウー1—I	12800	800	576	後 0.25×4	1600/55 ¹	+	+	—	—	—	—	—	0:8 1:8 0:8 2:8 8:8	15.0 14.5 15.0 13.7 6.6					
	ウー1—I	—	—	64	—		11	+	+	+	+	+	+			+				
	羊—14—I	204800	5120	—	—		+	—	—	—	—	—	—			—				
	—				—		7	12	+	+	—	—	—			—				

* K, O, AT はそれぞれ K-, O-凝集価, 及び 1 cc の中和する毒の m. r. d. 数を示す。

第5表 ワクチンの影響

Exp. No.	ワクチン	接種量 bil.	菌 bli/min	マウス死亡日												死：試	平均生存日数
11	I (桜屋敷)	1.5	850/55	7	9	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2:10	13.6
		0.3		7	7	10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3:10	12.9
	III (島田)	1.5		4	5	6	8	8	8	9	S	S	S	S	S	7:10	9.3
		0.3		4	4	4	4	5	5	7	9	10	S	S	S	9:10	6.7
	—	—		3	3	3	3	4	5	5	7	8	10	S	S	10:10	5.1
12	I (桜屋敷)	1.5	1500/60	10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1:10	14.5
		0.3		4	5	12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3:10	12.6
	I (桜屋敷)	1.5		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0:10	14.5
	100°C 30' 加熱	0.3		6	10	12	12	14	S	S	S	S	S	S	S	5:10	12.9
	III (島田)	1.5		8	12	12	14	14	S	S	S	S	S	S	S	5:10	13.5
		0.3		8	10	10	12	S	S	S	S	S	S	S	S	4:10	13.0
	—	—		4	8	10	11	11	12	12	13	S	S	S	S	8:10	11.0

に吸入される部分の差が著しいことは関⁹⁾の示摘する通りである。Bradford⁹⁾は 10 bil/cc 菌液 0.05 cc を特殊の針で気管内に注入し、1~10日で75%が死亡すると述べているが、関はこの方法を更に改良して確実に肺に吸入せられる様にした。しかし彼はそれによつて起るマウスの死亡の不確実さからか、肺の増殖菌数測定法を採用している。この方法は感染に特殊の手技を必要とし、又菌数測定に時間を要するので、多数のマウスを取扱う必要のある場合には適当といえない。どうしてもマウスの生死を以て判定するような方法が望ましいが、広く用いられる Kendrick の脳内接種法はたとえそれが百日咳症の肺の病理組織像と一脈の関連のある脳室上皮の変化に基くものにせよ、肺からの感染と等価値とは考えられない。

この報告によるコーチソンの併用による百日咳菌の吸入感染ではワクチン、抗血清の効果の実験に使用しうるような致死を招来し、それが肺からの感染であるという点で意義がある。しかし、この際のコーチソンの作用の意味づけ、従つてこれによつて起る致死が人間の感染防禦又は治療の実験の目標としてそのまゝ受入れうるかどうかについては尙お慎重であるべきである。

病原体のいわゆる感染力のコーチソンによる外見的な増強は種々のウィルス、細菌に認められるが(例えば^{10) 11) 12)}、その本態については Thomas⁹⁾は r.e.s. の閉塞作用を示摘しているけれども尙お不明というべきであろう。現象的には百日咳菌の肺感染において Bradford⁹⁾も認めている菌の血行移行が強化されている他、肺、脾における増殖も増強されていることを確認したが、又前述の通りマウスの死因を肺炎の故がりだけでは説明できないので、死因の一部を菌血症の増強に求むべきである

かもしれない。更に抗血清の実験において明かにした如く、非特異的な拮抗作用が生体対菌の間ではなく、生菌対コーチソンの間に存在することも考慮しておかねばならない。

この方法では実際に吸入される菌よりも遙かに大量の菌を使用しているが、これは吸入装置の改良によつて能率をよくすることが出来るであろう。

結 論

1. マウスにコーチソンを注射した後に百日咳菌を吸入感染させると高率の致死を来す。
2. この致死作用は I 相菌血清によつて防禦できるが、その効果は凝集素、抗毒素と直接の関連を求めえない。
3. この致死作用は I 相菌ワクチンによつて防禦できる。

文 献

- 1) Aronson, S. M. & Schwartzman, G.: Histopathogenesis of cortisonealtered experimental poliomyelitis. Observations on the Syrian-hamster inoculated intracerebrally with strain MEF 1, Amer. J. Pathol., 29, 381-399, 1953.
- 2) Burnet, F. M. & Timmins, C.: Experimental infection with H. pertussis in the mouse by intranasal inoculation, Brit. J. exper. Pathol., 18, 83-90, 1937.
- 3) Bradford, W. L.: Experimental infection in the mouse produced by intratracheal inoculation with H. pertussis, Amer. J. Pathol., 14, 377-383, 1938.
- 4) Kass, E. H., et al.: The effect of adrenal steroids, corticotropin (ACTH), and growth hormone on resistance to experimental in-

- fections. J. exper. Med., 99, 89-104, 1954.
- 5) Kilbourne, E. D.: Reactivation of non-infective virus in a cortisone-injected host, J. exper. Med., 101, 437-450, 1955.
- 6) 関悌四郎他: 百日咳菌のマウス気管内感染. 大阪大学医学雑誌. 5, 1-14, 昭 27 (1952).
- 7) Seligman, E.: Virulence enhancement of *Candida albicans* by antibiotics and cortisone, Proc. Soc. exper. Biol. Med., 83, 778-781, 1953.
- 8) 下条寛人: 私信. 1953.
- 9) Thomas, L.: Cortisone and infection, Ann. N. Y. Acad. Sci., 56, 799-814, 1954.