放射線障害に関する細菌学的研究

第3報 マウスの真菌感染に及ぼすX線照射の影響
—経鼻感染について—

木 林 由 勝

東京大学医学部細菌学教室 (指導 秋葉朝一郎教授)

〔受付: 8月12日・1957年〕

放射線の致死効果は、動物の種により感受性が異なるにしても多くの実験動物に適用するメディアン致死線量は300~800 r以内である。この点について、私は300~700 rに亘るX線量をマウスに照射して観察した結果を、すでに第1報で詳述した。

急性放射線障害に際して、出血、敗血症、小腸潰瘍、脾臓萎縮、骨髓機能低下は1週間以内に必発することが指摘されており、又放射線およびX線による動物の抵抗力減弱の機序として、白血球数の減少、骨髓およびリンパ組織の障害、抗体産生の減弱、喰菌作用の減弱、血液の殺菌力の低下、局所の抵抗減弱等が認められている。これらに直接的に関連する課題として、レントゲン照射を行つたマウスが種々なる真菌に対し感受性の亢進を来すことは第2報において述べてきた。

今回は、前報^{1,2)}に引続き、*Aspergillus fumigatus*の腹腔内感染に対して著明に影響を及ぼすX線照射が、肺アスペルギルス症のモデル実験として自然的と考えられる経鼻感染の場合に、いかに影響を及ぼすかを検討した。経鼻感染では、接種菌量が少ないばかりでなく動物の受ける侵襲も少く、而してX線照射によつて感受性が高まる結果が得られたならば、肺臓の病理組織学的検索と相俟つて極めて興味ある研究と考えられた。

実験方法

試験: 全て伝研 dd 系マウスを使用し、水および固形飼料 (実験動物中央研究所・飼育用) にて飼育した。第1実験には生後7週、雄を、第2実験には生後6~7週雌を使用した。体重は同一実験に供試した場合努めて一定とした。

照射方法: 東芝製深部治療用機械を使用した。管球電圧170KV、管球電流3mA、濾過板Al 1.0+Cu 0.3mm、距離40cm、1分間入射量9.3rで400 r照射した。マウスは直径23cm、高さ3cm、上および下面に直径0.3cmの多数の穴をあけた円形プラスチック製の箱に入れ

照射した。その他は前報^{1,2)}に準ずる。

接種方法: *Aspergillus fumigatus* 久保山株³⁾は、Sabouraud 斜面培地 (普通の中試験管使用) 2週間25°C培養したものに、0.5% Carboxymethyl cellulose 生理的食塩水溶液にて均等な孢子懸濁液をつくり、計算室法によつて菌数計算を行い濃度を修正した後、0.5ml ツベルクリン用注射器にて2滴 (0.03ml) を、Ether麻酔下のマウスに経鼻感染した。

培養方法: 無菌的に胸廓を開き、心臓血1~3白金耳量を Sabouraud 寒天培地に移殖培養する他、腹水、右肺および右腎臓については割面培養および乳鉢にて麻酔してその1~3白金耳量を培養すると同時に直接塗抹標本をつくつて鏡検した。

実験成績

Aspergillus fumigatus 久保山株経鼻感染後の死亡マウス10匹について、右肺の割面培養および乳鉢にて磨砕したものの培養の両者を比較したが、陽性比率はそれぞれ1:6であつて、肺臓をよく磨砕して培養すべきであることが示された。

第1実験

マウスは経鼻感染群、400 r 照射群、400 r 照射後2日目経鼻感染群の3群とし各群それぞれ13匹である。Asp. fum. 久保山株の孢子数は $1.1 \times 10^9/\text{ml}$ の2滴 (0.03ml) を経鼻感染した。

死亡率、病果および培養結果は第1図および第1表に示した。観察期間は経鼻感染後40日であるが、死亡するものは接種後9日までで、その他は全部40日を耐過した。死亡マウスは何れも漸次体重の減少を示し、死亡時は照射又は菌接種前より3~5gに亘る低下を認めた。

KIBAYASHI Yoshikatu: Bacteriological study on the radiation effect (III) Influence on the mycotic infection of mice. Department of Bacteriology, School of Medicine, University of Tokyo —Jap. J. of Bact., 12(11). 839-844, 1957.

400 r 照射および経鼻感染の両群は13匹中それぞれ1匹づつの死亡をみたにとどまったが、400 r 照射+経鼻感染群は $\frac{7}{13}$ (53.8%) の死亡率であった。死亡マウスから *Asp. fum.* を培養し得たものは $\frac{5}{7}$ (71.4%) である。培養陽性のもはこの群からのみ得られ、肺臓以外(心血、腹水、腎臓)からは検出されず、又耐過マウスからも検出されなかった。

第1図 400r 照射後 *Asp. fum.* 経鼻感染による死亡率 (第1実験)

胞子数 1.1×10^8 /ml

第1表 400 r 照射後経鼻感染による病変及び培養結果

—*Asp. fumigatus* 久保山株—

	マウス平均体重 g	* 死亡率 (%)	病 変**		培 養***	
			死亡	耐過	死亡	耐過
400r照射 + 経鼻感染	22.0	$\frac{7}{13}$ (53.8)	$\frac{2}{7}$	$\frac{0}{6}$	$\frac{5}{7}$	$\frac{0}{6}$
経鼻感染	21.9	$\frac{1}{13}$ (7.6)	$\frac{0}{1}$	$\frac{0}{12}$	$\frac{0}{1}$	$\frac{0}{12}$
400r照射	22.0	$\frac{1}{13}$ (7.6)				

* 分子は死亡匹数 分母は試験数

** 分子は病変陽性匹数 分母は検査マウス数

*** 分子は培養陽性匹数 分母は検査マウス数

第2実験

400r 照射後9日目経鼻感染群, 400r 照射後2日目経鼻感染群, 経鼻感染後2日目400r 照射群, 経鼻感染群および400r 照射群の5群とし, 各群共に12匹づつて

ある。*Asp. fum* 久保山株の胞子数 1.4×10^8 /ml の0.03 ml を経鼻感染した。

死亡率, 病果および培養結果は第2図および第2表に示した。観察期間は経鼻感染後42~44日であるが, 死亡するものは接種後主に11日までに漸次体重減少を来し, 死亡時の体重は照射又は接種前より3~8 gに亘る低下を示した。

第2図 400r 照射前及び後における *Asp. fum.* 経鼻感染の死亡率 (第II実験)

胞子数 1.4×10^8 /ml

* 400r 照射群は照射後日数を図示した

第2表 400 r 照射前及び後における経鼻感染の病変並びに培養結果

—*Asp. fumigatus* 久保山株—

	マウス平均体重 g	死亡率 (%)	病 変		培 養	
			死亡	耐過	死亡	耐過
400r照射後9日目経鼻感染	19.5	$\frac{3}{12}$ (25.0)	$\frac{2}{3}$	$\frac{0}{9}$	$\frac{2}{3}$	$\frac{0}{9}$
400r照射後2日目経鼻感染	19.5	$\frac{3}{12}$ (25.0)	$\frac{1}{3}$	$\frac{0}{9}$	$\frac{2}{3}$	$\frac{0}{9}$
経鼻感染後2日目400r照射	19.4	$\frac{4}{12}$ (33.3)	$\frac{2}{4}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{2}{4}$	$\frac{0}{8}$
経鼻感染	19.5	$\frac{0}{12}$ (0)		$\frac{0}{12}$		$\frac{0}{12}$
400r照射	19.5	$\frac{1}{12}$ (8.2)				

第2回目の実験では胞子数が第1回目より少なかったため, 第1回の実験ほど著明な結果は得られなかったが,

第3表 Asp. fum. 久保山株経鼻感染マウスの病理変化

	実験群	マウス 番 号	亡又は剖 見までの 日数, 経 鼻感染後 死	肺 臓				腎 臓			
				肉眼的 病 変	*1 培養結果	顕微鏡所見		肉眼的 病 変	*2 培養結果	顕微鏡所見	
						菌	病 変			菌	病 変
死 亡 マウス	400r照射後	1	7	+	+	+	+	-	-		
	9日目	2	10	-	+	+	+	-	-		
	経鼻感染	3	10	+	-	+	+	-	-		
	400r照射後	4	4	+	+	+	+	-	-		
	2日目	5	8	-	+	+	+	-	-		
	経鼻感染	6	11	-	-	-	+	-	-		
	経鼻感染後	7	7	+	+	+	+	-	-	-	-
	2日目	8	8	+	+	+	+	-	-	-	-
	400r 照射	9	29	-	-	-	+	-	-	+	+
耐 過 マウス	400r照射後	10	40	-	-	-	-	-	-	-	-
	2日目	11	40	-	-	-	+	-	-	-	-
	経鼻感染	12	40	-	-	-	-	-	-	-	-
		13	40	-	-	-	+	-	-	-	-
		14	40	-	-	-	-	-	-	-	-
		15	40	-	-	-	-	-	-	-	-
		16	40	-	-	-	-	-	-	-	-
		17	44	-	-	-	-	-	-	-	-
		18	44	-	-	-	-	-	-	-	-
		19	44	-	-	-	-	-	-	-	-
		20	44	-	-	-	-	-	-	-	-
		21	44	-	-	-	-	-	-	-	-
		22	44	-	-	-	-	-	-	-	-
		23	44	+	-	-	+	-	-	-	-

*1 乳鉢中でよく磨砕して培養した

*2 剖面培養

*3 PAS 陽性の円形菌体様物質を僅かに認める

*4 明らかな菌体はないが, PAS 陽性の円形菌体様物質数コを認む,
培養は肺及び腎の右側について, 病理組織検索は左側について行つた。

やはり照射+経鼻感染群に影響が認められる。培養陽性は死亡マウスの肺臓からのみで, 肺臓以外からは検出されず, 又耐過マウスから検出されたものはない。

認められた病変としては, 両群の死亡マウス中 7/18 (38.8%) に肺臓が haemorrhagish な事であつて他にはみられなかつた。又死亡マウスからの培養に際して, Gram 陰性桿菌, 一部 Gram 陽性桿菌の混在を認めた例があつた。

病理組織学的検査

病理組織学的検査は死亡マウスについては第2実験の9匹(経鼻感染後2日目 400r 照射群の32日目死亡の1

匹をのぞく), 耐過マウスについては第1実験の7匹および第2実験の7匹計23匹について行つた。検索臓器は肺臓, 腎臓, 一部は心臓, 脾臓, 膵臓, 副腎に亘つた。各臓器は Formalin 固定後 Haematoxylin-Eosin およびPAS染色を行つた。

経鼻感染マウスの肉眼的病変としては, 肺臓の出血性乃至充血状態, 帯黄白色の膿瘍および萎縮をみた程度で複雑な病変はみられなかつた。

病理組織学的所見として, 死亡マウスでは肺は全体に軽い充血があり出血性である。この出血傾向は軽度のものから強いものまで存在する。

第3図 肺臓 (PAS 染色 95×8)

400r 照射後 9 日目経鼻感染群, マウス番号 1
Aspergillus の頂囊及び梗子, 多数の胞子を認む

第4図 肺臓 (PAS 染色 10×8)

400r 照射後 2 日目経鼻感染群, マウス番号 5
気管支肺像: 菌糸性の発育の場を中心として,
壊死の強い結節様病巣があり, その周囲には肺
胞性出血がみられる。この壊死層の中で核粉末
が非常に目立っている。

第5図 肺臓 (Haematoxylin-Eosin 染色8×40)

400r 照射後 2 日目経鼻感染群, マウス番号 4
Aspergillus による血管穿通像

気管枝に類壊死が認められ, 又ヘマトキシリンに濃染する細状のものが存在する場合がある。かなり大きな気管枝の半分又は全体に亘り壊死巣があり, その部に Aspergillus の菌糸性穿通像が著明でその場所を中心として Aspergillus 菌糸性の出血性の病巣を認める。気管枝腔

第6図 肺臓 (PAS 染色 8×40)

400r照射後 2 日目経鼻感染群, マウス番号 4
Aspergillus による気管枝穿通像

第7図 腎臓 (Haematoxylin-Eosin 染色 8×10)

経鼻感染後 2 日目400r照射, マウス番号 9 腎盂
は拡大して, Aspergillus の見事なびのびし
た菌糸性発育を認める

には好中球の滲出が多数認められる。肺胞では好中球性の細胞の滲出著明で核破壊が目立ち, ヘマトキシリンで染まる壊死巣があり, 又一部には気管枝肺炎と共に肺胞性の出血がある。肺中隔に巾の増大, 核の増加が認められる。気管枝上皮細胞に分泌充進像を認め又多層性を示し, 主に単核球浸潤からなる気管支周囲炎を認める。又気管枝上皮細胞は剥離性で一部に肺胞性出血があり又甚だしい変性, 破壊状態のみられぬものもある。屢々限局性肺炎がありその中心では壊死が目立つ。菌糸性の発育の場を中心として壊死の強い結節様病巣がありその周囲には肺胞性出血が目立ち, この壊死巣の中で核粉末が著明に認められる。血管内に菌糸性発育が顕著で一部では白色血栓を形成する例があった。しかし乍ら菌糸性の発育が旺盛なるにもかかわらず細胞反応は極めて少く滲出細胞として好中球, 単核球を少数認めるのみの場合もあり, 又主に病変は気管枝炎の形で肺炎は軽度で菌も非常に少い例もみられた。

腎臓に病変がみられたものとしては, 限局性腎炎があり主に皮質に組織球性の細胞からなる肉芽腫に認める。又膿腎を来し, 腎盂は拡大して Aspergillus の見事な

びのびした菌糸性の発育があり、それと共に類壊死が認められた。

耐過マウスでは肺臓、腎臓等に *Aspergillus* による病変は殆ど存在しないのであるが、なかに病変を遺残するものがあつて次の所見を示すものは表 3 中の No. 11 のものである。即ち肺臓に小豆大の病巣があり、この中心は好酸性の完全な凝固壊死性乾酪巣でその周辺には好中球の浸潤が認められ、周囲の肺胞は圧迫され無気肺状を示す。この病巣の周囲に蜂窩状構造物を認める。PAS 染色でこの中に明瞭な菌体はないが、PAS 陽性の円形菌体様物質が数個認められた。

以上の結果を表 3 および図 3～7 に示した。

考 察

動物の感染実験において菌の接種方法を考える時特に真菌感染の場合には吸入乃至経鼻感染は自然的である点から重要と思われる。

前報²⁾ において私は種々なる真菌を腹腔内接種して放射線障害による影響を検討し、*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Asp. nidulans*, *Penicillium islandicum*, *Hormodendrum pedrosoi* および *Cryptococcus neoformans* 等の接種に際して、程度の大小はあつても X 線照射は感染の進行を助長することを認めた。そこで次に *Asp. fumigatus* 久保山株を用いて経鼻感染実験を行い X 線障害の影響について検討を加えた。

上記腹腔内接種では経過中にマウスの心血、脳、肺、腎等から接種菌が培養され菌の血中への移行が示された。*Asp. fumigatus* の皮下接種の場合に血行を介して全身症状を来すことのあるのは杉内⁴⁾ が述べている。杉内は吸入実験についての観察も行つたが、肺以外には病巣を認めなかつた。吸入実験については諸氏の報告があるが、X 線照射との組合せについては Shechmeister 等⁵⁾ が X 線照射はマウスの *Streptococcus zooepidemicus* 飛沫感染の感受性を高めることをみた。

経鼻感染後死亡マウスの培養に当つて肺の剖面培養と乳鉢にてよく磨砕したものの培養とでは、その陽性比率は 1:6 で肺はよく磨砕して培養すべきである事すでに述べたが、血行性に転移する例があるので独り肺のみに止まらず、他の臓器の検索に際しても肉眼的観察および剖面培養のみでは充分といえない。病理組織学的所見と臓器を乳鉢でよく磨砕して培養を行うことが必要である。組織内での菌の証明と磨砕培養とでは表 3 に示した如くほぼ平行する成績を得た。

Asp. fumigatus 経鼻感染において腎臓に病変あるも

のが病理組織学的に認められ又肺血管内に菌糸性発育が認められるので血行性に病変が拡大することのあるのは明白であるが、大部分の耐過マウスでは投与した胞子は異物として排泄されるものと解される。

X 線照射はそれのみで生体の防禦機構の減弱を来し又腸管内に存在する菌によつて敗血症を来して死亡する¹⁾ が、400 r 照射による死亡率は前報^{1,2)} の如く 5～10% であり、この報告の場合も死亡率は $\frac{1}{12}$ (8.2%) および $\frac{1}{13}$ (7.6%) であつた。それに対し 400r 照射 + 経鼻感染群では 25～53.8% のマウスが感染後ほぼ 2 週以内に死亡し且つそれらは病理組織学的に病変が認められ、経鼻感染によつても照射は感染の進行を促進する結果が得られた。

経鼻感染の手技としては噴霧器を用いて吸入する方法、特殊の針で気管内に注入する方法等が考えられている。このことは鼻孔滴下では口から胃に入り、肺に吸入される部分に差が存するであらうという懸念から確実に肺に吸入されるような方法の案出が努力される所以である。私の行つた経鼻感染（鼻孔滴下）の場合の経験からしても手技の熟練と実施にあたり細心の注意を必要とすることは勿論である。

岩田・大久保⁶⁾ は *Candida albicans* について *Kata-phyllaxis* によらない単独の各種接種法マウス感染実験をおこない、経鼻、腹腔内、静脈内、脳内接種はほぼ同様の死亡率をもたらす皮下接種の死亡率の低いことをみた。そしてその際いかなる接種法によるにせよ確実にマウスをたおすには大量の菌を必要とすることを指摘した。*C. alb.* 腹腔内注射によるマウス 100% 致死の困難なことについては諸氏の報告があるが池本⁷⁾ は軽量マウスに 1.5mg (概数 3×10^8) を接種して良好な実験結果を得た。私の場合第 1 実験、*Asp. fum.* 1.1×10^9 /ml の菌量（経鼻感染量は 0.03ml）では極めて明瞭なる照射による感染の影響を認めたが、それに比して第 2 実験の 1.4×10^9 /ml では前者程著明の影響は得られなかつた。しかしながら病理組織学的には菌糸量と病変の程度とは必ずしも平行関係はなく又しばしば菌型は多形態性を示した。組織中に頂囊のみられたものがあり、かゝる例について杉内⁴⁾ は Lichtheim (1884) が心疾患女子死体解剖時に肺胞内に *Asp. fum.* の頂囊および胞子を認めたことを述べており、又三上等⁸⁾ の報告にもみられる。

経鼻感染を 400r 照射前 2 日目および照射後 2 日目並びに 9 日目について、照射の日をずらし接種の日を同一にして検討したが、照射の影響はいずれもほぼ同様の結果で、接種と照射日の種々な組合せにより特にその影響

に差がみられるという傾向は私の実験範囲ではみられなかった。

前報で述べたように *Aspergillus* の感染実験では肺が出血性であることを指摘したが、病理組織学的にその病理変化を明確にすることができた。

骨髓、脾臓、リンパ腺などの造血臓器や生殖細胞は放射線感受性が高く障害を受け易いことはよく知られている。古くから放射線感受性の低い臓器として取扱われて来た肝臓について Ellinger 等は比較的感受性が高いものと評価し、永井等は総合的肝臓放射線感受性の過小評価に警告を与えている⁹⁾。肺についても radiosensitive の臓器であろうことが指摘され¹⁰⁾、又免の率丸を1回で 25,000 r 照射すると、放射線の全ての直接作用から完全に遮蔽した肺は露出後24時間以内に甚だしい退行性変化を示すこと¹¹⁾が知られている。この例は臓器の感受性の概念が確然としたものでなく、その決定が実験方法の相違によつて極めて困難であることを示すものと思考される。それらの疑義の解明は今後に残された課題であろう。

以上種々の点について考察したが、X線照射を受けたマウスに対する *Asp. fum.* 久保山株経鼻感染によつて照射は感染の進行を助長するという結果が得られ且つその病理組織像について述べた。

総 括

肺アスペルギルス症のモデル実験として自然的な接種方法と考えられる経鼻感染を実施した。即ち 400r 照射前および照射後の種々な時期に *Aspergillus fumigatus* 久保山株の胞子懸濁液の経鼻感染を行った。

胞子数 $1.1 \times 10^9/\text{ml}$ (接種量 0.03ml) の経鼻感染に対してX線照射は著明に影響し、死亡率は $7/13$ (53.8%)

で、対照の経鼻感染群および 400 r 照射群は何れも $1/13$ (7.6%) に過ぎなかった。胞子数 $1.4 \times 10^8/\text{ml}$ の場合は 400r 照射後 9 日目経鼻接種群、照射後 2 日目経鼻接種群、経鼻接種後 2 日目照射群について検討したが、それら相互間の死亡率はほぼ同様で $3-4/12$ (25.0~33.3%) 対照の経鼻感染群 $0/12$ および 400r 照射群 $1/12$ (8.2%) に比して軽度の影響がみられた。

病変および培養陽性を呈する臓器は概ね肺臓である。肺の出血性のものが死亡マウス中 38.8%, 培養陽性のもの 61.1% であった。大多数の耐過マウスに病変は認められないが、病理組織学的に *Aspergillus fumigatus* の経鼻感染によつても血行性に病変が広がるので、培養に際しては各臓器を乳鉢でよく磨砕して行うこと、および病理組織学的検索も必要である。

終りに終始御懇切な御指導と御校閲を賜つた秋葉教授に衷心からの謝意を表し、又病理組織学的検索に当つて三宅教授、奥平博士の御好意御援助を感謝する。

(本研究は文部省科学研究費の補助を受けた。秋葉)

文 献

- 1) 木林：日本細菌学雑誌，12 (2)，111，1957.
- 2) 木林：日本細菌学雑誌，12 (4)，337，1957.
- 3) 木林：J. Antibiotics，投稿中
- 4) 杉内：福岡医科大学雑誌，21 (6)，1158，昭3.
- 5) Shechmeister, I. L., Bond, V. P., and Swift, M. N. J. Immunology, 68, 87, 1952.
- 6) 岩田，大久保：最新医学，9 (10)，197，昭29.
- 7) 池本：J. Antibiotics, VIII, (8)，327，1955.
- 8) 三上，大久保，落合，山下，大橋，岩田，和田：呼吸器診療，12 (8)，664，昭32.
- 9) 永井，松田：最新医学，11 (7)，96，昭31.
- 10) 三宅：放射線障害総合研究班会合，昭31.
- 11) Spear, F. G. 玉木，吉井，辻井，渡辺訳：Radition and Living Cells, p. 110，昭30.