

結核菌の毒力に關する實驗的研究(第 I 報)

公衆衛生院衛生微生物學部

染谷 四郎 川村 達 重松 逸造
平山 雄 林 久子 張 仲鑣

1 まへがき

結核菌の毒力に關しては多數の學者によつて古くから研究論議せられゐる所であつて、Vagedes⁽¹⁾ Fraenkel 及び Baumann⁽²⁾ Lange⁽³⁾, Lange 及び Lydtin⁽⁴⁾, 等は家兎或は海獺を實驗動物として、その皮下又は靜脈内に結核菌の一定量を接種し、接種後の接種局所反應及び剖檢所見から結核菌の毒力を判定した。殊に Lange は接種される結核菌浮游液中の生菌の含有量を培養して生ずる集落數から想像して、感染極少量に就いて海獺を用ゐて検討した。又更に Soper 及び Duorski⁽⁵⁾, Feldman⁽⁶⁾⁽⁷⁾, Smithburn⁽⁸⁾⁽⁹⁾, 等は腦内接種法を採用し、動物の感染より斃死までの期間を以つて毒力を判定しようとした。又我が國では菅原⁽¹⁰⁾、芦名⁽¹¹⁾、高須⁽¹²⁾等は微量、或は比較的大量の結核菌を海獺の皮下、腹腔内、血管内に注射して、動物の斃死期間、感染動物臟器の病變を以つて毒力を判定する方法を提唱してゐるが、彼等はすべて實驗保存の結核菌を使用してをり、分離直後の菌に就いての實驗ではない。又、松久⁽¹³⁾ は結核患者より分離培養した結核菌を

Lange 及び戸田⁽¹⁴⁾ 等の四肢法を用ゐて毒力を判定し、結核菌の毒力と菌分離を行つた患者の病型との間に必ずしも相關關係のないことをのべてゐる。又、渡邊⁽¹⁵⁾ は Smithburn の方法を用ゐて海獺腦内に接種し結核菌の毒力を研究し、病型と毒力との間に一定の相關のあることを指摘してゐる。この様に實驗成績の異なるのは、一つは實驗方法それ自身に缺陷があるか、又は分離結核菌の培養條件が異なる爲とも考へられるのであつて、今村⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾ 等は分離培養した人型、牛型結核菌に就いて 5% glycerin 加牛膽汁馬鈴薯培地にて繼代培養を行ふことにより、毒力が著明に低下し、膽汁の加はらない培養基の通過は毒力の低下が著明でなかつたとのべている。著者等は結核菌の毒力に就いての研究を行ふ第一歩として、結核患者の喀痰より分離した直後の結核菌株、更に之を繼代培養した菌株及び研究室保存の青山 B 株に就いて海獺を用いて皮下接種法を實施し、毒力判定法の再検討を試みた。こゝにその成績の概略を報告する。

2. 實驗方法

本實驗に用ゐた結核菌株は、芝 3、青山 23、三田 17、芝 157、M 3、の 5 株と研究室保存の青山 B 株であつて、M 3、青山 B 株、以外はツベルクリン反應陽轉者中結核發病者の喀痰より分離したものであり、M 3 は結核研究所保生園に入院中の極めて輕症、經過良好であつた一患者の喀痰より分離したものである。青山 B 以外の菌株はすべて喀痰より、岡、片倉培地にて分離し、その第 1 代は、岡、片倉培地に植え、更に之を馬鈴薯グリセリン培地に植え繼ぎ、培養 3 週後(分離直後と呼ぶ)と其の後約 3 年間(4 週間隔で約 40 代前後)馬鈴薯グリセリン培地にて、繼代培養した菌株と更に研

究室にて馬鈴薯グリセリン培地にて繼代培養保存せられてゐる青山 B 株とに就いて實驗を行つた。分離直後の芝 157 の $\frac{1}{100}$ mg, $\frac{1}{1000}$ mg 及び $\frac{1}{10000}$ mg 等の異なる菌量を接種した各群に就いては接種後 5 週、8 週、及び 11 週目に於て剖檢し、菌量と病變との關係を觀察した。他の實驗に於いては何れも接種菌量を $\frac{1}{100}$ mg とし、實驗に使用した海獺は體重 350 瓦乃至 450 瓦のもの(豫備實驗に於いてこの位の體重のものでないと一定した成績が得られないことが分つた)を選び、その腹部皮下に結核菌浮游液 0.5cc を注射し、8 週後に於いて解剖、淋巴腺及び臟器の病變を觀察した。なほ

剖検所見は、佐藤(秀三)法に依つて記載した。結核菌浮遊液は充分に濾紙にて水分を取り、秤量した菌塊を瑪瑙乳鉢にて丁寧に磨碎し、所定の菌量を含む様に0.5% ゲラチン加生理的食鹽水に浮遊して調整せられたものである。剖検によつて得た各器官に就いて組織學的檢索をも行ふと共臓に脾は約その半分を乳鉢にて摺り碎き、之に2%の硫酸を10倍量加え、その0.1cc宛を、岡、片

倉培地に分注、孵卵器中に横たへ、1~2日乾燥後蠟封し、培養後4週で集落の發生狀況を觀察した。

又、接種局所、局所淋巴腺の觀察は接種後毎週行ひ、ツベルクリン反應檢査は第1週、第2週はソートンツベルクリン10×稀釋液を、第3週、第4週は100×稀釋液を、第5週以後は1000×稀釋液を0.1cc腹部皮内に注射し、24時間後に於いて判定した。

3. 實驗成績

(1) 接種を異にした場合の實驗成績

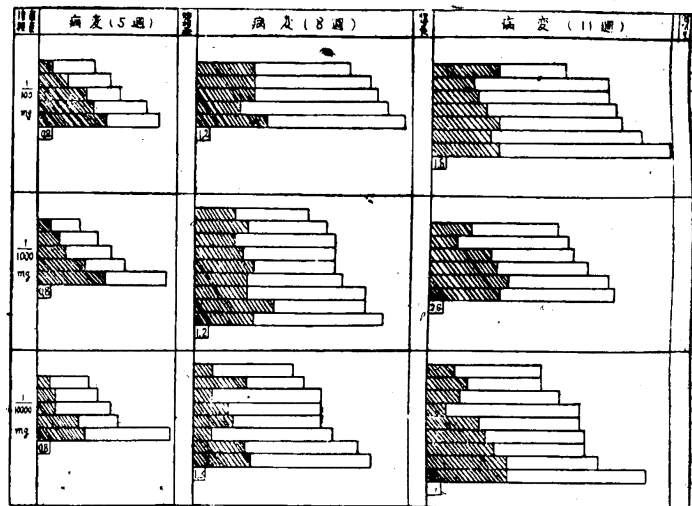
皮下接種法による毒力の實驗に際し如何程の接種が最も適當であるかを検討するために、芝157株の $\frac{1}{100}$ mg, $\frac{1}{1000}$ mg, 及び $\frac{1}{10000}$ mgの菌量を接種した3群に就いて接種後5週、8週及び11週迄の觀察を行つた。即ち剖検所見及び脾培養成績に就いては第1圖に示す様に、觀察時期が遅い程病變は著しく、脾培養成績では8週目に於いて最も多い菌集落發生が見られたが、何れの觀察時期に於いても接種量による差異は認められなかつた。

次に接種局所反應と所屬淋巴腺の變化及び接種後毎週實施したツベルクリン反應成績に就いては、第1表に示す様に各反應共接種菌量の多い程早く現はれ、程度も著しい傾向があるが、局所反應に於いては接種後5週以後、淋巴腺の變化では4週以後、ツベルクリン反應は2乃至3週以後に於いては各群間に差異が見られない。

(2) 分離直後及び數年間繼代培養後の菌株に就いての成績

分離直後の芝3、青山23、三田17、芝157、及びM3の5菌株、繼代培養を行つた芝3、青山23、

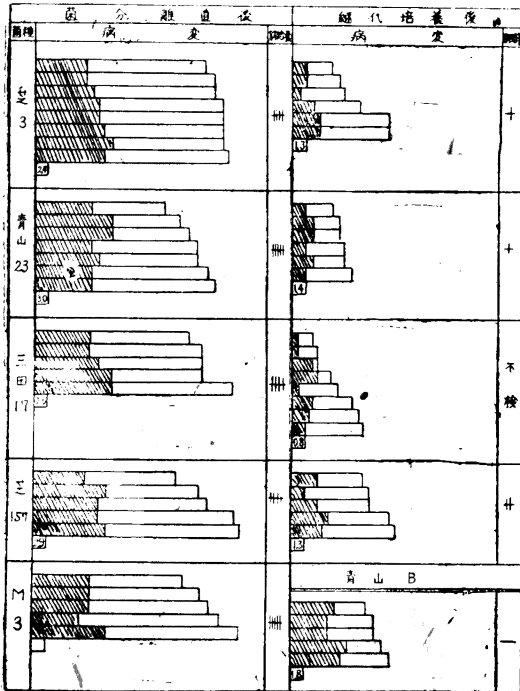
第一圖 接種量を異にせる群の接種後5週、8週及び11週目に於ける剖検所見及び菌培養成績



注 各柱の長さは病變(十數)の總和を示し、斜線部は内臓の病變、他は淋巴腺の病變を示す。
脾培養に就いては、菌集落を見ないもの、+ : 集落數の平均1-9ヶ、++ : 10-49ヶ、+++ : 50-199ヶ、++++ : 200ヶ以上、|||| : 集落數が殆ど一面に發生したものを示す。
各群ヒストグラムの下桁内の數字は其の群の動物の脾臓の重量の平均である。

三田17及び芝157の4株と研究室保存の青山B株に就いて各株の3週培養 $\frac{1}{100}$ mg菌量を接種し、接種後毎週の接種局所、所屬淋巴腺の觀察及びツベルクリン反應檢査を實施し、又8週目に於いて解剖し、臓器の結核性病變を觀察すると共に脾臓の培養を行つた。その成績は第2圖、第2表、第3表及び第4表に示す通りである。即ち分離直後の各菌株に就いては接種局所反應、所屬淋巴腺の

第二圖 分離直後及び數年間繼代培養後の菌種を接種せる各群の剖檢所見と脾培養成績



肥大も著しく、而も早く現はれ、ツベルクリン反應、臓器の結核性病變も極めて強く、又脾培養成績から見ても菌の分布が極めて多いことが見られ、研究室保存の青山B株に就いての實驗成績と比較しても、分離直後の菌は極めて強い毒力を有してゐることが認められる。之に反し繼代培養後3年を経た菌株に就いては、接種局所反應、所屬淋巴腺の状態、ツベルクリン反應成績、剖檢所見及び脾臓の培養成績の何から見ても分離直後の菌に較べると極めて弱反應を呈してゐることが認められ、著しい毒力の減弱を來してゐることが見られた。

4. むすび

以上のやうに結核患者より分離した數種類の結核菌株に就て接種菌量と病變との關係、更にその分離直後及び繼代培養後に於ける毒力の比較を海獺を用ゐて皮下法による動物實驗を實施した。例數が少いので斷言することは出来ないが、先づ第一に分離直後の結核菌に於いては極めて強い毒力を有してをり、皮下法によつては $\frac{1}{100}$ mg 乃至

第2表 分離直後及び數年間繼代培養後の菌種を接種した各群の接種局所と所屬淋巴腺の變化の比較

菌種	検査事項 週數	接種局所								所屬淋巴腺							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
芝 3	34	I	I	G	K	K	K	K		±	+	##	##	##	##	##	##
	12	I	I	G	K	K	K	K		±	+	##	##	##	##	##	##
	1	-	I	G	K	K	K	K		-	+	+	+	+	+	+	+
	29	±	I	K	K	K	K	K		±	+	##	##	##	##	##	##
	27	±	I	K	K	K	K	K		±	+	##	##	##	##	##	##
	21	±	I	G	G	G	G	G		-	-	+	+	+	+	+	+
	11	±	I	G	G	G	G	G		±	+	##	+	+	+	+	+
	25	±	I	G	K	K	K	K		+	+	##	##	##	##	##	##
	8	-	I	G	G	G	G	G		-	±	##	##	##	##	##	##
青	38	-	I	G	K	G	G	K	G	-	+	+	##	##	##	##	##
	50	-	I	I	K	G	G	K	K	-	+	+	+	##	##	##	##
	44	-	I	I	G	G	G	G	G	-	+	##	##	##	##	##	##

山 23	41	-	I	G	K	G	K	G	G	-	+	+	+	+	+	+	+	
	52	-	I	I	G	G	G	G	G	-	±	+	+	+	+	+	+	
	37	-	I	G	K	G	G	G	G	-	+	+	+	+	+	+	+	
	43	-	I	I	G	G	K	K	K	-	+	+	+	+	+	+	+	
三 田 17	81	-	I	G	I	G	K	K	K	-	+	+	+	+	+	+	+	
	96	-	I	I	G	G	G	K	K	-	+	+	+	+	+	+	+	
	100	±	I	G	G	K	K	K	K	-	+	+	+	+	+	+	+	
	94	-	I	G	G	G	G	K	G	-	+	+	+	+	+	+	+	
	78	-	I	G	G	K	K	G	G	-	+	+	+	+	+	+	+	
芝 157	167	-	I	I	K	G	G	G	K	-	+	+	+	+	+	+	+	
	168	-	I	G	K	K	K	K	K	-	+	+	+	+	+	+	+	
	212	-	I	G	K	G	K	G	K	-	+	+	+	+	+	+	+	
	165	-	I	G	K	G	K	K	K	-	+	+	+	+	+	+	+	
	166	-	I	G	K	K	K	K	K	-	+	+	+	+	+	+	+	
M 3	140	-	I	G	K	K	K	K	G	-	+	+	+	+	+	+	+	
	139	-	I	G	K	G	K	K	G	-	+	+	+	+	+	+	+	
	136	-	I	I	K	K	G	K	K	-	+	+	+	+	+	+	+	
	112	-	I	I	K	K	K	K	K	-	+	+	+	+	+	+	+	
	121	-	I	G	K	K	K	K	K	-	+	+	+	+	+	+	+	
繼 代 培 養 後	芝 3	12	-	I	I	I	P	P	P	P	-	±	+	+	+	+	+	
		11	-	-	-	±	±	-	-	-	-	±	-	±	±	-	±	
		12	-	±	I	±	±	-	±	±	-	-	+	+	+	+	+	+
		21	±	K	G	K	K	K	K	K	-	+	+	+	+	+	+	+
		14	-	±	I	K	K	K	K	K	-	±	+	+	+	+	+	+
		18	-	±	I	+	K	K	K	K	-	+	+	+	+	+	+	+
	香 山 23	31	-	I	I	K	K	K	K	K	-	+	+	+	+	+	+	+
		24	-	I	K	K	K	K	K	G	-	+	+	+	+	+	+	+
		28	-	-	I	I	I	I	P	K	-	+	+	+	+	+	+	+
		26	-	I	I	I	I	I		P	-	-	+	+	+	+	+	+
		25	-	±	±	±	±	±	-	-	-	-	+	±	±	+	+	+
		13	-	I	K	K	K	K	K	K	-	+	+	+	+	+	+	+

三田 17	40	-	-	-	I	I	I	I	I	-	-	+	+	+	+	+	+
	47	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+
	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	33	-	-	-	±	-	-	-	-	-	±	-	+	+	±	-	-
	45	-	-	I	I	I	I	I	I	-	-	-	+	±	+	+	+
	34	-	-	I	I	I	I	I	I	-	-	-	+	+	+	+	+
	53	-	-	-	I	I	I	I	I	-	-	-	-	+	+	+	+
	43	-	-	±	I	I	I	I	I	-	-	±	±	+	+	+	-
芝 157	8	-	I	I	I	I	I	I	-	-	-	+	+	+	+		
	2	-	I	I	I	I	K	G	-	-	+	+	+	+	+		
	3	-	±	I	I	I	I	G	-	-	+	+	+	+	+		
	4	-	I	I	I	I	K	K	-	-	+	+	+	+	+		
	7	-	I	I	I	I	K	K	-	-	+	+	+	+	+		

第3表 分離直後と数年間継代培養後の菌株を接種した各群に於けるツベクリン反応成績の比較

時期	菌株名	ツ反応發赤の大きいさの平均値 (mm)								ツ反応硬結を有するもの頭數								海頭數
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
菌分離直時	芝 3	14	20	21	23	20	22	14		6	9	9	9	9	9	9	9	9
	青山 23	6	21	22	19	23	20	20	19	2	7	7	7	6	7	7	7	7
	三田 17	6	21	23	18	20	21	21	20	4	5	5	5	5	5	5	5	5
	芝 157	3	25	24	23	20	23	15	21	2	5	5	5	5	5	5	5	5
	平均	7.3	21.8	22.5	20.8	20.8	21.5	17.5	20	/	/	/	/	/	/	/	/	/
M 3	5	0	12	26	26	18	28	23	2	4	4	5	5	5	5	5	5	
繼代培養後	芝 3	6	16	16	19	13	15	11	14	0	1	5	6	4	3	1	5	6
	青山 23	7	18	20	18	11	13	12	16	0	3	6	6	5	4	3	6	6
	三田 17	3	13	13	16	16	16	18	15	0	1	4	8	5	7	5	6	8
	芝 157	11	10	15	17	10	14	12		0	2	4	4	3	5	5		5
	平均	6.8	14.3	16.0	17.5	12.5	14.5	13.3	15.0	/	/	/	/	/	/	/	/	/
青山 B	14	16	18	21	16	12	18	/	3	5	2	5	5	5	3	/	5	

第4表 青山B株接種群に於ける接種局所反應と所屬淋巴腺檢査成績

檢査事項及週數	接 種 局 所							所 屬 淋 巴 腺						
	I	II	III	IV	V	VI	VII	I	II	III	IV	V	VI	VII
	-	±	+	±	±	±	-	-	-	+	+	+	+	-

青 山 B 株	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+	±
	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	±	+	±	±	-
	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	+	±	±	±
	-	-	+	+	+	+	K	-	-	+	+	-	+	+	+

1/10000 mg 程度の接種菌量の差異では剖検所見の上に著明な差異は見られず、皮下法では更に接種菌量の幅を持たせなければ毒力の差異が出て来ないのではないかと考へられる。接種菌量が少くなると完全なる菌浮遊液が得難いから誤差が多くなり、本方法によつて毒力の差異を見ることは不適當であらうと思はれる。又次に數年間繼代培養した菌株では著しく毒力が低下してをり、その度合は誠に著しい。この事は研究室保存の青山B株に就いても言ひ得ることである。併しながらすべての結核菌に於いてもこの様な毒力の低下が必ず起るのであるかどうか、或は又毒力の強い菌ではなかなか毒力が低下し難いのではないかと云ふ様な事

も考へられる。又この様に毒力の低下した菌に就いて動物通過を行ひ、毒力の恢復を計つてゐるのであるが毒力の低下したすべての菌が果して動物通過により毒力が恢復するか、又如何なる程度まで毒力が上昇して行くかと云ふ問題は興味のある所であらうと思う。更に又此等の菌に就いての諸種生物學的性狀の比較に就いては現在實驗中であるので、之等の成績については他日に報告したいと思ふ。

稿を終るに臨み、御指導を賜つた前公衆衛生院微生物學部長野邊地慶三博士及び豫防衛生研究所結核部長柳澤謙博士に對し、衷心感謝の意を表する。

文 献

- 1) Vagedes K., Experimentelle Prüfung der Virulenz von Tuberkelbazillen, Zschr. f. Hyg. Inf., 28 (1898), 276—320
- 2) Fraenkel C. & Baumann E., Untersuchungen über die Infektiosität verschiedener Kulturen des Tuberkelbazillus, Zschr. f. Hyg. Inf., 54 (1906), 247—261
- 3) Lange B., Die Feststellung der Zahl lebender Tuberkelbazillen in einer Bazillenaufschwemmung durch das Kulturverfahren und Vergleich dieser Ergebnisse mit dem Infektionserfolg, Zschr. f. Tbk., 46 (1926), 455—467
- 4) Lange B. & Lydtin K., Ein Verfahren der Virulenzbestimmung von Tuberkelbazillen für die Laboratoriumspraxis, Zbl. f. Bakt., 108 (1928), 22—25
- 5) Soper W. B. & Dworski M., Experimental tuberculous meningitis in rabbits, Am. Rev. Tuberc., 11 (1925), 200—216
- 6) Feldman W. H., Experimental tuberculosis meningitis by intracerebral inoculation, Am. Rev. Tuberc., 21 (1930), 400—422
- 7) Feldman W. H., Pathological changes induced in chickens by human and bovine tubercle bacilli, Am. Rev. Tuberc., 29 (1934), 415—423
- 8) Smithburn K. C., The standardisation of longivity against dose in experimental tuberculosis by intracerebral inoculation, Jour. Exp. Med., 64 (1936), 771—790
- 9) Smithburn K. C., Virulence of tubercle bacilli, Am. Rev. Tuberc., 39 (1939), 116—127
- 10) 菅原眞行, 結核菌の「モルモット」に對する毒性、結核、4(大正15年)、507—508
- 11) 芦名、泰、接種結核菌の量(大量及び少量)と結核病變との關係、大阪醫學會雜誌、28(昭和4年)、2319—2346
- 12) 高須 勇、結核菌毒力検査に就いて、大阪醫事雜誌、31(昭和7年)、4065—4086
- 13) 松久 昇、分離培養をなせし結核菌の毒力に就いて、中央醫學、12(昭和18年)、289—336
- 14) Toda T., Vergleichende Prüfung der Pathogenität von Tuberkelbazillenstämmen an Kaninchen durch intrakutanen Verimpfung dazu prüfenden Stämme an ein und demselben Tier, Zschr. f. Tbk., 55 (1930), 302—317
- 15) 渡邊喜海、結核菌の「ビルレンツ」に關する研究、結核、18(昭和15年)、101—146
- 16) 今村荒男、吉井馨、昭和9年以來5% glycerin加膽汁馬鈴薯に繼代培養しつゝある人型結核菌の毒力試験、大阪醫事新誌、14(昭和18年)、312—319
- 17) 今村荒男、吉井馨、小宮山四郎、繼代培養により毒力を減弱せる牛型結核菌株、大阪醫事新誌、14(昭和18年)、320—324