

結核菌の定量培養に就いて

(其の四) 實驗的結核症の天竺鼠臟器よりの培養……(1)

財團法人結核豫防會核結研究所(所長 隈部英雄)
(指導 柳 澤 謙)

小 川 辰 次 大 島 登 輝 夫
鳴 海 吾 郎

I 緒 論

先に小川⁽¹⁾等は、動物臟器中の結核菌の定量培養の方法を發表し、次いで余⁽²⁾等の方法の實施に就いての、2、3、の注意を述べた。そこで今回は人工的に感染した天竺鼠臟器から結核菌の定量培養を施行し、定量培養の成績から見た天竺鼠の結核症に就いて記し、更に動物實驗に於ける2、3の意見を述べ、大方の参考に供したい。

II 實驗方法

方法は以前、發表したようであるが、此處では、2%の硫酸水で處理して、岡片倉培地に植え、或いは、1%の苛性曹達水で處理して、原理に1%の割に第一磷酸加里の入つた、第一磷酸加里培地を使用した。尙、稀釋は、感染後の経過日數、或いは肉眼的病變の如何等によつて、10⁻¹倍稀釋のみを、或いは10⁻²倍稀釋、10⁻³倍稀釋と2段の部分、或いは、10⁻¹倍稀釋、10⁻²倍稀釋、10⁻³倍稀釋のように3段に稀釋して、各稀釋毎に培養した。培地は各稀釋毎に4本乃至5本宛使用した。結核菌數は、大部分は4週目に發育したものを數え、4~5本の培地のものを平均したが、その一部は、實驗途中の頻繁の停電により、孵卵器中の温度の上下が甚だしく、爲に發育が遅れ、7週目に發育した菌數を數えた。

感染に使用した菌株は何れも人型菌で、F株、陸F株、陸F T P株(陸F株の天竺鼠通過をやつたもの)、柴野株、柴田株、近藤株で、前三者は長期間に亘つて繼代培養をやり保存したものであり、後の三者は喀痰より分離して間もないものである。之等は何れも、グリュセリン馬鈴薯培地に、3週乃至4週間培養し、瑪璃の乳鉢でよく搗りつ

ぶして、滅菌蒸溜水で、菌浮游液を作り、0.1mg、0.01mgを0.5ccの滅菌蒸溜水に含むようにして、これを左下腹部の皮下に接種して感染した。動物は特別の記載のない限り、250g~480gのものを使用した。培養に供した臟器の量は、脾、0.3g~1.25g、肝、0.5g~1.9g、肺、0.3g~0.7gである。

III 培養成績

(1) 臟器中の結核菌の消長

第1表 脾ノ結核菌ノ消長(比較的弱毒菌接種ノ場合)

| 屠殺迄ノ週 | 菌 數 平均値(最少~最多) | 使用動物數 |
|---------|-------------------|-------|
| III 週 | 188.9(9.3~566) | 9 |
| VI 週 | 106.4(5.4~247.3) | 9 |
| VII 週 | 9.9(0~103) | 11 |
| XXIII 週 | 6.5(0~31.5) | 7 |

註: 1) 感染方法: F株 0.1mg 皮下接種
2) 培養方法: 2%硫酸水、岡片倉培地
3) 菌數ハ總器 1mg ノ中ノモノヲ示ス

F株、0.1mgを接種し、その脾を、菌接種後3週目、7週目、15週目、23週目の4回に亘つて培養した成績は、第1表のようである。培養は2%の硫酸水で處理した岡片倉培地に植えた。菌數は、臟器 1mg の中に含むものである。即ち、10⁻²倍稀釋の部分、0.1cc宛培養したものである。その成績を見ると、3週で最も多く、7週で次第に減少し、更に15週、23週と経過のながびくにつれて、菌數は著明に減少している。

第2表實驗(1)は陸F株を、0.01mg接種して7週目に屠殺したものであり實驗(2)は實驗(1)より3ヶ月後に、同一菌株を同量接種して18週目

第2表 脾、肝、肺ノ結核菌ノ消長(比較
的強毒ノ場合)

| 實驗 番號 | 接種 菌株 | 接種 菌量 | 經過週 | 菌 數 | | | 動物 數 | 培養 方法 |
|----------|----------|----------|------|------|------|------|---------|--------------------------------------|
| | | | | 脾 | 肝 | 肺 | | |
| (1) | 陸F | 0.01mg | VII | 19.2 | 0.78 | 0.25 | 5 | 2% H ₂ SO ₄ |
| (2) | | | VIII | 19.5 | 10.8 | 16.7 | 9 | |
| (3) | 柴野 | 0.1mg | VII | 351 | 87 | 88 | 5 | 1% NaOH |
| | 柴田 | | | 208 | 50 | 38 | 5 | |
| | 近藤 | | | 202 | 212 | 26 | 5 | |

註 1) 培養方法: 2% H₂SO₄ へ 2% 硫酸水 で處理シテ岡片倉培地へ培養 2% NaOH へ 2% 苛性曹達水で處理シテ第一磷酸加里培地ニ植エテ事ヲ示ス

2) 菌數ハ 1mg 臟器中ノ平均値ヲ示ス

3) 經過ハ週ヲ示ス

に屠殺したものである。この兩實驗の脾の菌數をみると、殆んど差がない。即ち菌接種後、18週も経過しているにもかかわらず、菌數は、すこしも減少していない。この成績は第1表の成績とかなり違ふところである。これは第1表に記載した菌株、F株が第2表に記載した菌株、陸F株よりも毒力が弱かつた爲であつて、F株接種の動物に於ては、感染も弱く、随つて病竈の治癒も早く行われた爲ではなからうか?

次に肝、肺に就いての消長をみると、第2表實驗(1)でみるように、7週目では、肝は0.78ヶ、肺は0.25ヶで、何れも脾に比して、菌數は著明に少い。又同一菌株を、同量接種して、18週後に屠殺培養したものは、實驗(2)でみるように、夫々、10.8ヶ、16.7ヶとなり、著明に増菌して、脾の菌數に近くなつてゐる。以上の結果から、毒力の弱い菌株を接種した場合は、脾では3週前後で最も増菌し、時期の経過と共に次第に減少してゆく。又、肝、肺に就いては實驗してないので、不明である。次に毒力の比較的強い菌を接種した場合は、脾は、3週前後で多くなり、そのまま18週頃まで變化がない。肝、肺は、3週目では、脾に比して著明に少いが、次第に増菌して、18週目頃には、脾の菌數に近づくと考えてよい。

次に分離培養して間もない、柴田株、柴野株、近藤株などを、0.1mg 接種したものを、7~8週目に屠殺培養した成績は、第2表實驗(3)のようである。即ち、脾の菌數は308ヶ、203ヶ、202ヶであつて、實驗(1)の場合の脾の菌數の約、10倍乃至は夫以上である。接種菌量は、實驗(1)の場合の10倍量である故、このような成績が出た事と思われるが、肝、肺の菌數は、實驗(1)に比して、約100倍前後となつてゐる。柴野株、柴田株、近藤株は前に述べたように分離培養してよりまもない菌株であつて、陸Fよりもかなり毒力が強い。即ち、この事實より、菌數が多く、しかも毒力も著明に強い菌株を接種した場合は、肝肺に於ける増菌の仕方は、著明になつてくるものであるという事が想像出来る。

尚、以上の實驗成績は、陸F株、0.01mg 接種に於ては、2%の硫酸水で處理して、岡片倉培地に植え、又、柴野株、柴田株、近藤株、0.1mg 接種に於ては1%の苛性曹達水で處理して、第一磷酸加里培地に植えてゐるで、この兩者を一本にして考える事は多少の無理があるが、しかし上述のような傾向のある事を想像しても、あながち無理ではないと思う。

(2) 同一動物の脾、肺、肝中の結核菌數の相互關係

第3表 脾、肝、肺ノ中ノ結核菌數ノ
相互關係(其ノ一)

| 動物番號 | 菌 數 | | |
|------|-------|-------|-------|
| | 脾 | 肝 | 肺 |
| 752 | 11.6 | 9.8 | 182.4 |
| 748 | 22.6 | 4.6 | 0.2 |
| 751 | 30.8 | 1.5 | 2.0 |
| 766 | 65.2 | 46.6 | 0 |
| 764 | 70.6 | ■ | 20.2 |
| 771 | 268.0 | 131.8 | ■ |
| 749 | ■ | 80.2 | ■ |
| 765 | ■ | 37.0 | 1.9 |
| 755 | ■ | 266.0 | ■ |

- 註 1) 感染方法: 陸F 0.01mg 皮下
 2) 感染後18週目 = 屠殺
 3) 培養方法: 2% 硫酸水、岡片倉培地
 4) 菌數 = 於テ卍卍、數エラレナイ程多數デア
 ル事ヲ示ス

第4表 脾、肝、肺、中ノ結核菌ノ相
 互關係(其ノ二)

| 接種菌株 | 動物 番號 | 菌 數 | | |
|------|----------|--------|------|-------|
| | | 脾 | 肝 | 肺 |
| 柴野株 | 18 | 8.6 | 2.0 | 0.1 |
| | 19 | 16.0 | 1.2 | 0.1 |
| | 16 | 36.0 | 0.5 | 2.5 |
| | 20 | 45.0 | 22.8 | 41.0 |
| | 17 | 70.0 | 17.0 | 0.5 |
| 柴田株 | 22 | 4.8 | 2.0 | 0.4 |
| | 24 | 10.0 | 0.6 | 0.2 |
| | 21 | 20.0 | 2.6 | 6.2 |
| | 23 | 29.0 | 5.4 | 4.4 |
| | 25 | 40.2 | 25.0 | 7.8 |
| 近藤株 | 26 | 5.1 | 93.0 | 9.6 |
| | 27 | 12.0 | 1.0 | 0.1 |
| | 28 | 38.0 | 0.6 | 2.8 |
| | 30 | 38.0 | 0.2 | 0.5 |
| | 29 | 50.0 | 卍 | 200.0 |

- 註 1) 接種菌量 0.1mg 皮下
 2) 0.1mg ノ總器中ノ菌數ヲ示ス
 3) 接種後 7~8 週目 = 屠殺
 4) 1% 苛性曹達水ヲ處理シテ培養
 5) 菌數ハ 7 週目ノモノヲ示ス

第3表は、F株、0.01mg を接種して、18 週後に屠殺し、 10^{-1} 倍稀釋を 0.1cc 培養、即ち、10 mg の臓器中の結核菌數を記したものであり、第4表は、柴野株、柴田株、近藤株を夫々、0.1mg 宛接種して、7~8 週目に屠殺して 10^{-3} 倍稀釋の部分培養、即ち、臓器 0.1mg 中の結核菌數を示したものである。培養方法は前者は 2% の硫酸水、後者は、1% 苛性曹達水で處理して、夫々、岡片倉培地、第一磷酸加里培地に培養した。この

二つの表でわかるように、大體に於て、脾の菌數は肝、肺に比して多い。又、脾の菌數の多いものは、これに相當して、肝、肺の菌數も多いし、脾の菌數の少ない場合は、肝、肺の菌數も少ない。即ち同一動物の脾、肝、肺の菌數は、大體に於て平行するとみてよい。この事實は、第4表、即ち、菌接種後比較的早く、しかも強毒の菌の接種したものに於て著明である。これに反して第3表、即ち前者よりも毒力の多少弱い菌株を前者よりも少量接種して、しかも 18 週という長期の経過のものに於ては、前者程ははつきりしていない。

以上の事實から、臓器中の結核菌の多少を比較するのに、脾、肝、肺の三つの臓器を同時に培養するのは理想であるが、この中の一つを培養しても、比較する事は可能であるといえる。それなら、どの臓器を使用するのが最も妥當であるか？ 先ず、肝、肺は、0.01mg の菌接種後 7 週目位では、第2表、實驗(1)でみるように、菌數が少くて、比較するのに困難であるし、又毒力の強いものを、0.1mg 接種したとしても、第4表でみるように、動物の間の菌數の開きが大きい。これに反し脾に於ては、常に菌數が最も多く、第4表でみるように、毒力の強いものを接種して、7~8 週後に屠殺培養した成績は、動物の間の菌數の開きが小さい。又第5表、3 週、7 週でみるように、毒力の比較的弱いと思われるものを接種した場合でも、前同様、菌數の開きが小さい。しかも、脾は、臓器其のものが小さいので、その半分、或いはそれ以上を培養に供する事が出来る。尙、第3表、第5表で見ると、経過の長いものは、脾に於ても、動物間の菌數の差が大きくなるが、これは、長期経過の動物の中には、種々の治療過程のものが存在するものと、培養方法が、餘り適當でなかつたが爲と思われる。それにしても、第3表で見ると、肝、肺に比すれば菌數の開きは小さい。

以上の事實から、臓器の中の一つをもつて、比較培養する場合は、脾をもつてする事が、最も合理的と思われる。

(3) 肉眼的病變と結核菌數

臓器の肉眼的病變は、佐藤、柳澤氏等の標準に

従つて

- 一…所見のないもの。
- 十…結節の漸く發見出来るもの。
- 廿…結節が直ちに發見出来るが、少數のもの。
- 卅…結節の可なり多いもの。
- 卍…結節の極めて多いもの。
- 卍…結節の著明に多いもの。

として、肉眼的病變と菌数を對比して見た。その成績は、第5表のようである。第5表の成績は、F株 0.1mg を皮下に接種して、3週、7週、15週、23週と4回に亘つて屠殺し、その脾を、2%硫酸水で處理して、 10^{-2} 倍稀釋の部分をつ片倉培地に植えたものである。随つて第5表の成績は脾の 1.0mg の中に含む菌数を示している。

第5表 肉眼的病變と結核菌數ノ關係

| 一覽表 | 肉眼的病變 經過週 | 菌 數 | | | | | |
|-----|--------------|-----|-----|-------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------|
| | | — | + | 廿 | 卅 | 卍 | 卍 |
| 一覽表 | III週 | | 9.3 | 83 115 163 310 | 107 158 187 566 | | |
| | VII週 | 5.4 | | 60.8 | 14 22.6 34.4 | 104.4 171.6 245.0 247.3 | 215.6 |
| | XV週 | | ○ | ○ | ○ | ○ 103.0 | ○ ○ ○ 3.4 |
| | XXIII週 | ○ | | 1.0 1.0 5.5 | ○ | 31.5 | 0.45 |
| 平均値 | III週 | | 9.3 | 169 | 252 | | |
| | VII週 | 5.4 | | 60.8 | 25.2 | 198.7 | 215.6 |
| | XV週 | | ○ | ○ | ○ | 51.2 | 1.7 |
| | XXIII週 | ○ | | 3.6 | 3.0 | 31.5 | ○ |

- 註: 1) 感染方法 F株 0.1mg 皮下接種
 2) 菌數ハ脾ノ 1.0mg ノ中ニ含ム數ヲ示ス
 3) 培養方法、2% 硫酸水、岡片倉培地使用
 4) 肉眼的病變ハ佐藤、柳澤氏等ノ標準ニ依ル

即ち、一覽表でみるように、接種後の何れの期間に於ても、肉眼的病變の強いもの程、菌數が多い。換言すれば、肉眼的病變と菌數は平行すると考えてよい。この事實は、菌接種後の期間の短い程はつきりしており、経過のながびくに随つて、次第に不鮮明となつてくる。又この表で、一見してわかるように、病變の程度が、同じであつても、経過の短いもの程、即ち、病竈の新しいもの程、菌數が多く、経過のながびくにつれて、即ち病竈の古くなるにつれて、菌數は少なくなつてくる。殊に、15週、23週のように経過のながいものでは、+、廿、卅、程度の軽い病變のものは勿論

の事、卍、卍のように、著明な肉眼的病變を示すものでも、屢陰性を示した。この成績は、定量培養に、手を染めた當初のものであり、處理方法もあまり適當でなかつたが爲と接種菌株の毒力が弱かつた爲に、病竈の新舊により、著明な差を示したものである。

最近の改良した方法、即ち1%苛性曹達水で處理して、第一磷酸加里培地に植える方法では、これ程著明な差はないとしても、新しい病竈に於ては菌數が多く、古い病竈では、菌數の少い事は、同じであらうと思われる。

之等の事實は、菌接種後の経過のながい古い病

竈に於ては、結核菌の生活力が減退し、或いは、菌が死滅するが爲であろうと思われる。

VI 總括並びに考察

我々は、實驗的結核菌の天竺鼠の臓器より定量培養をやり、前述のような種々の結果を得たが、之等の實驗は、初めから表題の意圖の下に、組織的に計畫されたものではなく、何等の計畫の關聯性がないのである。随つて、之等の實驗を一つにまとめて觀察する事は、かなり無理であると思われるが、然し、事實の傾向だけは、推定する事が出来ると思われる。

種々の實驗に於て、臓器中の結核菌の數を比較する場合に、多數の動物に就いて、脾、肝、肺、腎等の臓器の總てを、比較培養する事は、費用の點でも、勞力の點でも、負擔がかなり重い。それで我々は肝、肺、脾の菌數を檢査した結果、同一動物に於ては、臓器中の結核菌數は大體平行するものであり、随つて、之等の中の一つの臓器を培養してでも、比較する事が出来る事を知つた。それなら、どの臓器が比較するのに、最も好都合であるか？ 先ず肝、肺では7~8週以前では菌數が少い。又、経過のながいものでは、菌數は増加してくるが、動物個體に於ける菌數の間にかかなりの開きがある。且つ又、肝、肺は、臓器そのものが大きく、培養出来るのは、その極く一部分に過ぎない。

随つて、臓器の取り方によつては、誤差が大きくなる事は、當然考えられるところである。然るに脾に於ては、接種菌株の毒力の如何にかかわらず、又接種量の何如にかかわらず、接種後、3週~8週前後であれば、動物の間の菌數の差は少い。又接種後の期間のながい場合、例えば、15週23週に於ては、菌數が著明に減少し、比較するのに困難を感じたが、これは處理方法が不適當であつた事が、その原因の大部分であつて、この方法で陰性を示したのも、最近の方法によれば、澤山の菌を發育させる事が出来た。随つて長期経過のものでも脾を使用して、比較する事は可能と思われる。しかも脾は、三つの臓器の中では菌數が常に最も多く、又臓器としては小さいので、そ

の半分、或いはそれ以上を培養に供する事が出来るので、誤差を少なくする事が出来る。

随つて皮下接種によつて感染した實驗的結核症の天竺鼠に於ては、脾の中の菌數をもつて比較するのが最も合理的と思われる。尚、脾の中の菌數は3週前後で増加し時の経過と共に減少してくる傾向が認められる。益子⁽³⁾氏に依れば、5週前後が最も増菌するという。このように、菌接種後、比較的早期に於ては、肉眼的病變が軽度であつても發育する菌數は多い。しかも、動物間の菌數の差は少い。経過のながびくにつれて、その群の中には病變の種々の段階のものが含まれるので、動物間の菌數の差は多くなる。随つて菌數を比較するには、3週~5週のような菌増殖の著明な早期を選んだ方がよいと思われる。

V 結 論

1. 脾は何時の場合でも、大體に於て、肝、肺よりも菌數が多い。その消長を見ると、菌接種後、3週目前後で最も多く、毒力の弱い菌株では、次第に減少してゆくが、毒力の強い場合は、そのまま18週目位までは變りがない。肝、肺では3週目では脾よりも著明に少いが、次第に増菌して、18週では、肺は脾にせまり、肝はこれよりも増菌の仕方が軽度である。

2. 同一動物に於ては、脾、肝、肺の菌數は大體平行する。これは菌接種後の経過の早期のもの程著明である。

3. 菌接種後の期間が同一であれば肉眼的病變と、結核菌數は大體平行する。

これは菌接種後の比較的早期(3週~7週~9週)では、はつきりしており、経過のながびくと共に不明瞭となる。そして同じ程度の病變であれば、早期のもの程、菌數が多い。

文 獻

- 1) 小川, 未發表, 結核に發表の豫定
- 2) 小川, 未發表, 結核に發表の豫定
- 3) 益子, 結核, 23, 36, 昭23.