

結核菌並びに BCG の均等培養に関する研究

第6報 流動パラフィン加血清 Kirchner 液による

振盪培養均等発育菌の菌力について

広島医科大学細菌学教室 (主任 占部 薫 教授)

松 尾 吉 恭

(昭和 27 年 6 月 12 日受付)

(この研究は文部省科学研究費によつた。占部)

抗酸菌の毒力に関しては古くから多くの学者によつて研究論議されているところであり、*in vitro* の判定法としては抗酸菌の生物学的諸性状の差による方法^{1)~6)}、特殊培地上における顕微鏡的集落の形態学的所見差に基づく方法⁷⁾⁸⁾、特殊化学薬品に対する抗酸菌の反応差による方法⁹⁾等があげられているが、その成績は区々で、菌型鑑別上多少参考とはなり得ても、毒力判定法としてはいまだ信憑するに足るものはみられないようである。他方、*in vivo* の判定法としてはウサギ、モルモット、ネズミの皮下又は静脈内接種法^{10)~13)}、皮内接種法^{14)~16)}、脳内接種法^{17)~20)}及び皮下・腹腔内・血管内併用法^{21)~23)}等があげられているが、なかんずくモルモットの皮内又は脳内接種による判定法がより有利であるように思われる。

私は、既報²⁴⁾の流動パラフィン加血清 Kirchner 液 (以下流バ加 Kirchner 液) による振盪培養によつて均等に発育した有毒人型結核菌の菌力について、Bloch⁸⁾のいわゆる cord factor と毒力との関係の一端をも併せて窺知しようとの意図の下に、Lange¹⁴⁾¹⁵⁾及び戸田¹⁶⁾らのモルモットによる四肢皮内法を援用して検討を試み、この方面の研究に寄与すべき所見の若干を得たと考えるので以下報告する。

実 験 方 法

1. 供 試 菌 液

A菌液：既報の流バ加 Kirchner 液による有毒人型結核菌 Frankfurt 株の、4週間振盪培養均等発育菌 (含菌量約 1 mg/cc) を生塩水で5回洗つて遠沈した後、生塩水に再浮遊させたもの。

B菌液：血清加 Kirchner 液による同上株の、4週間静置培養液面発育菌膜より作られた、上と同濃度の手摺り菌液を生塩水で同じく5回洗つた後、生塩水に再浮遊させたもの。

C菌液：B菌液の生塩水で洗わないもの。

2. 動物群の編成

体重 400 g 内外の雄性健康モルモット 12 頭を同一条

件の下で約 1 カ月飼育した後、4 頭ずつの 3 群に群別し、I 群には A 菌液を、II 群には B 菌液を、また III 群には C 菌液を動物の四肢つけ根の部分の皮内にそれぞれ、右下肢には 0.0002 mg、右上肢には 0.002 mg、左上肢には 0.02 mg 及び左下肢には 0.2 mg の各菌量を接種した。

3. 観 察 事 項

菌液接種後、毎日注射局所の皮膚変化及び所属淋巴腺の腫脹の有無乃至程度を仔細に観察し、逐週体重及びツベルクリン・アレルギー (Roemer 反応) の発現状況を計測して5週間に及んだ後、全試獣を剖検して菌接種局所、各処淋巴腺並びに内臓の肉眼的病理所見、直接塗抹標本による結核菌の検索並びに内臓よりの結核菌定量培養成績よりの結核菌の体内播布度及び病理組織学的所見等について各々の菌力を比較検討した。

実 験 成 績

1. 体 重 の 推 移

菌液接種3週後迄は各群の試獣とも僅かずつながら体重増加の傾向を示したが、4週後より急激に下降し、5週後剖検前には各群の平均体重は、ともに接種時のそれに比してほぼ 50 g 減少しており、3群間に体重変動に関していべき差は見出されなかつた (図略)。

2. Roemer 反 応 の 推 移

ツベルクリン・アレルギーは菌液接種3週後に全試獣に発現し、その発現時期、陽性度及びその後の推移については、II群とIII群との間には差がなかつたが、I群においては他の2群に比して僅かながらより弱いように見受けられた (表略)。

3. 局所の皮膚変化及び所属淋巴腺の腫脹

菌液接種局所皮膚の初期症状すなわち発赤、腫脹は第1表に示すように、試獣のすべてにおいて菌量の最も多い左下肢 (0.2 mg 接種) に最も早く現れ、かつその病変の進行度も最も早くで、治癒傾向を示すものは全く認められなかつたが、一般に接種菌量が減ずるに従つて各局所変化は晩期に現れ、病変の進行度もおそくて、中には治癒傾向の認められるものもあつた。他方、各所属淋巴

第1表 菌液接種局所の皮膚変化及び所属淋巴腺の腫脹

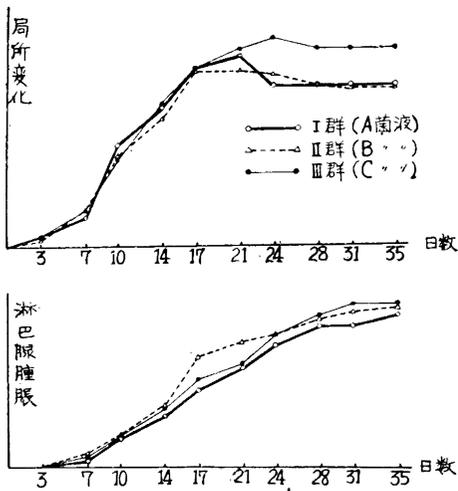
動物群	I				II				III			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
動物番号	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
接種菌量	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
3日		R				R				R		
7日		I				RRR				I		
10日		RIA				RRI				IR		
14日		JAA				RIIA				IRRIA		
17日		JAA				RIIA				IRRIA		
21日		JAA				RIIA				IRRIA		
24日		JAA				RIIA				IRRIA		
28日		JAA				RIIA				IRRIA		
31日		JAA				RIIA				IRRIA		
35日		JAA				RIIA				IRRIA		

註: 1. 接種菌量 a: 0.0002mg b: 0.002mg c: 0.02mg d: 0.2mg
 2. 局所変化 R: 発赤 I: 硬結 A: 膿瘍 G: 潰瘍 K: 痂皮形成
 3. 淋巴腺腫脹 半米粒大 米粒大 小豆大 大豆大 蚕豆大

腺の腫脹度もほぼそれぞれの局所変化度と平行してはいたが、仔細に吟味すると、各淋巴腺の解剖学的な大小不同という点も加味されて、それぞれの局所変化度と淋巴腺腫大度とが必ずしも平行しないものもあつた。

これを各群について逐日的に図示してみると第1図のように示される。

第1図



すなわち、菌液接種局所の変化度は逐日的に強くなり、第17日以後は3群間に著差を認め得なかつたが、第21日以後になると、菌液接種のIII群における病変が最も強く、I群とII群との間にはみべき所見差がなかつた。これを淋巴腺の腫大度についてみると、局所変化の場合とはやや趣を異にして、3群の腫大度はほぼ同等で互に平行していた。

4. 剖検時の肉眼的病理所見

肉眼的剖検所見を一括して比較すると第2表及び第2図のようになる。

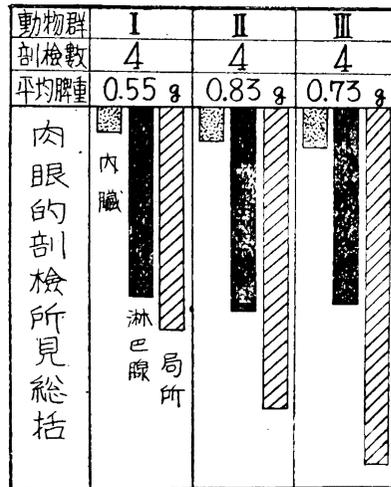
すなわち、全試験のほとんどすべての菌液接種部に一致して、多かれ少かれ結合織性の被膜で被われた膿瘍乃至潰瘍が形成され、その病変度はIII群>II群>I群の順となつており、3群間にかなり著しい差が観察されたが、淋巴腺及び内臓の病変度

第2表 剖検時の肉眼的病理所見

動物群	I				II				III			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
動物番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
局所												
下肢												
上肢												
膝												
鼠径												
腋窩												
肺門												
肝門												
腸系												
内臓												
肺												
肝												
脾												

註: 淋巴腺の大きさ 半米粒大 * 米粒大 小豆大 大豆大 蚕豆大 米粒大
 内臓の浸化 白斑少数 結核少数 結核中等度 結核多数
 結核多数 結核無数
 ○印: 軽微化

第2図 剖検時の肉眼的病理所見



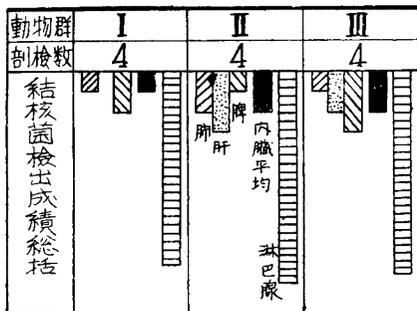
については、やはりIII群>II群>I群の如く、3群間の順位そのものには局所病変のそれと大差なかつたけれども、それらの間の所見差はきわめて微々たるものであつた。

5. 結核菌の体内播布度

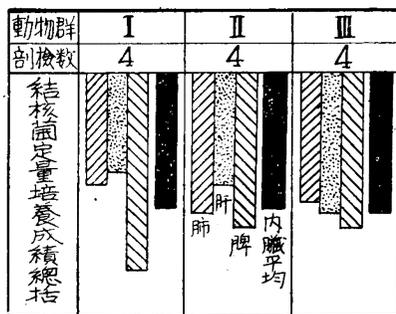
内臓及びリン腺よりの直接塗抹標本についての結核菌検索成績は第3図に、また内臓よりの結核菌定量培養成績は第4図に、一括してそれぞれ示した。

すなわち、直接塗抹標本についての結核菌検索成績よりみた体内菌播布度をみると、リン腺においては3群間にほとんど差がなかつたのに対して、内臓においてはI群の播布度が他の2群のそれに比してより少い結果となつた。しかしながら内臓よりの定量培養成績よりすると3群間における菌播布度に大差はなかつた。

第3図 直接塗抹標本よりの結核菌検出成績



第4図 内臓よりの結核菌定量培養成績



結果となつた。しかしながら内臓よりの定量培養成績よりすると3群間における菌播布度に大差はなかつた。

6. 病理組織学的所見

病理組織学的所見の記載に当つてはおおむね 弓削²⁵⁾の方法に倣い、その結果は第3表に示した。

いま第3表について3群を比較すると、肺においてはI群及びII群の1部には限局性の小結節の認められたものもあつたが、その変化はきわめて軽く、これに対してIII群においては結節の数もやや多くて壊死機転の認められるものも間々あつた。肝における病変は一般に肺におけるそれよりやや強くて、Glison 鞘にかなり円形細胞浸潤の認められるものもあり、僅かずつの差ながらIII群>II群>I群の順に病変差が認められたが、それともさほど著しくはなかつた。脾の所見についてみると、このさいにはむしろII群における変化が最も大で、I群とIII群とではその変化にえらぶところがなかつた。またリン腺については、接種局所の菌量に応じて一般にその変化が強かつたほかには、3群に特に差があるとは思われなかつた。従つて病理組織学的検索の結果からすると、3群間に少なくとも病理形態学上、質的にも量的に

第3表 病理組織学的検索成績

動物群	動物番号	I			II			III					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
肺	上皮様細胞結節	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	乾酪化巣	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	リン巴球浸潤	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ラ氏巨細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	結合織増殖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肝	石灰沉着	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	出血	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	上皮様細胞結節	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	乾酪化巣	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	リン巴球浸潤	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
脾	ラ氏巨細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	結合織増殖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	石灰沉着	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	出血	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	上皮様細胞結節	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
右リン腺(100%)	乾酪化巣	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	リン巴球浸潤	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ラ氏巨細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	結合織増殖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	石灰沉着	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
右リン腺(50%)	出血	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	上皮様細胞結節	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	乾酪化巣	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	リン巴球浸潤	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ラ氏巨細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
左リン腺(100%)	結合織増殖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	石灰沉着	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	出血	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	上皮様細胞結節	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	乾酪化巣	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
左リン腺(50%)	リン巴球浸潤	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ラ氏巨細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	結合織増殖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	石灰沉着	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	出血	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

註：
 + 出現せるもの
 結節-
 ■ 融合結節多数
 ■ 孤立結節多数
 ■ 結節稍多数
 + 結節少数
 乾酪化-
 ■ 結節の大多数が完全乾酪化
 ■ 過半数が完全乾酪化
 + 不完全に乾酪化
 石灰沉着-
 ■ 乾酪化の大部分が完全石灰化
 ■ 比較的大きい石灰沉着を認めるもの
 ■ 薄い層で完全に包圍
 ■ 不完全に包圍
 + / 部に認められるもの
 石灰沉着-
 ■ 比較的大い石灰沉着を認めるもの
 ■ 大小の石灰沉着を認めるもの
 + 小さい石灰化巣を認めるもの
 リン巴球浸潤-
 ■ 結節周囲に甚多
 ■ 結節周囲に多数
 + 少数

も有意の差を認め得たとはいふ難いように考えられる。

考 按

近来1部の学者の間には、抗酸菌の顕微鏡的集落の形態学よりして、その紐状发育形式 (cordform) を示すものと毒力との間にはかなりの関連性があると考えられる向きがあり^{7,8)}、殊に Bloech⁸⁾ は毒力結核菌はいわゆる cord

を形成しつつ發育するもので、その發育形式を司るものは菌体表面の新陳代謝産物である、石油エーテル及び流バ可溶のⅠ種のリポイドであるとしてこれを cord factor とよび、氏の方法によつて抽出した cord factor について、それと菌の毒力との關係を強調している。

これに対して教室の藤田は²⁶⁾、cord 形成相の有無乃至程度によつて各型抗酸菌 28 株をⅠ型よりⅣ型までの 4 群に群別し、それらと菌型、集落性状及び生物学的諸性状との關係について追究した結果、成程供試したすべての人型及び牛型結核菌は cord 形成度の強いⅠ型及びⅡ型に含まれたが、BCG 及び R 型の鳥型結核菌並びに非病原性抗酸菌の中にもまたこのⅠ型及びⅡ型のいづれかに属するものあることを知り、かかる点よりすれば毒力結核菌は少なくともこの実験に関する限り cord を形成することに異議はないにしても、cord を形成するもの必ずしも毒力菌であるとは限らず、むしろ cord 形成性は抗酸菌の集落の R 型性にこそより密接な關係があるのではないかということを示唆した。更に藤田²⁷⁾は Bloch の法に準じて各型抗酸菌よりいわゆる cord factor を抽出してみたところ、弱毒株である BCG からも人型結核菌に劣らぬ程度の収量があつたばかりでなく、cord 形成度の弱いか全く cord を形成しないⅢ型及びⅣ型の中にも、菌株によつてはいくらか cord factor の抽出されうることを認めている。

他方、Richmond & Cummings²⁸⁾は抗酸菌について、その cordform, parallel orientation, Dubos らの cytochemical test, 皮下及び静脈内接種法及びモルモットの皮内接種法の相互の關係について追究した結果、cytochemical reaction の強さと動物に対する菌の毒力程度とは直接關係がないこと、また毒力と cord 形成とは必ずしも關係がないことを認めている。

既報のように、私のいわゆる流バ加 Kirehner 液による振盪培養に際して得られる、結核菌並びに BCG の均等發育が、いわゆる cord factor の培養中の流バへの移行による、cord の緩解に基づくものかどうかについては確言を許されなかつたのであるが、Bloch のいうが如くに、流バ可溶の cord factor が果して抗酸菌の毒力と密接な關係にあるものならば、流バ加 Kirehner 液中に移行したと考えられる該 factor を培養とともに洗い去つた残りの菌体は、たとえ cord factor が菌の代謝産物である以上その後の發育において再び cord factor をもつに至ることは容易に首肯されるところであるにしても、少なくともその当初より暫くの間は通常の菌に比して、より少ない毒力を示すということがありはしないだろうか。

ここに示した実験の結果よりすると、流バ加 Kirehner 液による振盪培養均等發育菌を洗つて生塩水に再浮游した A 菌液接種のⅠ群においては、その接種局所の結核性

変化に関する限り、肉眼的剖検所見よりしてもまた観察期間中の変化度についてみても、ともに手摺り菌液を接種したⅡ群及びⅢ群におけるそれらに比してより軽度であり、また手摺り菌液の間においても、そのままの菌液を用いたⅢ群におけるよりも、洗つて遠沈することを繰返した菌液によるⅡ群の方が、その含菌量は同じであつたに拘らずより弱い反応を呈した。従つてこのことだけから考えると、洗つて遠沈すること自体が菌に対して或程度の障碍を及ぼしたかの如くみられるほかに、成程 Bloch のいうように、毒力と關係をもつ cord factor が培養中の流バへ移行し、ためにあたかも残余の菌体の病原性が弱められているかの如き観を与えるように見受けられるのであるが、ひるがえつて局所変化の逐日の所見を仔細に検討してみると、3 群間に変化度の差がみられるようになったのは菌液接種 3 週後からであることに留意すべきであろう。すなわち、代謝産物としての cord factor が果して抗酸菌の病原性と関連性をもつものならば、変化度の差はむしろ当然菌液接種当初に強く現れ、以後次第に僅少差を示す筈であるべきなのに、如上の成績ではむしろ逆の結果を示している事実よりすれば、Bloch のいわゆる cord factor と毒力との関連性に関する見解に対してはにわかに同意しえないところである。

しかもなお、内臓及び淋巴腺の肉眼的病変度、結核菌の体内播布度及び病理組織学的所見等よりしても、3 群の間に少くとも有意の差が認められなかつたことは先にも述べた通りであり、cord factor の移行していると考えられる流バを洗い去つた A 菌液の毒力減弱度がさほどでもないところから、cord factor と菌の毒力との関連性はかかる所見からするもやはり稀薄なもののように考えられる。

むすび

私のいわゆる流バ加 Kirehner 液中で振盪培養することによつて得られる、充分に均等發育した人型結核菌 Frankfurt 株の菌力について、在来の手摺り菌液のそれとモルモットの皮内接種法により比較検討してみた結果、流バ加振盪培養菌液より流バを洗い去つたもの、手摺り菌液を洗つたもの及び手摺り菌液の洗わないままのもの 3 種菌液接種モルモット群における、観察期間中の接種局所の変化と、所属淋巴腺の腫大度・体重と Roemer 反応との推移・肉眼的剖検所見・結核菌の体内播布度並びに病理組織学的所見よりすれば、これら 3 菌液間の毒力には多少の差異はあるにしても、特にいづれの著差はないようであつた。

以上のことから Bloch らのいう cord factor と菌の毒力との間の関連性には疑問がもたれる。

〔本論文の要旨は昭和 27 年 4 月、第 27 回日本結核病学会において報告した〕

摺筆に当り、御懇篤な御指導、御校閲を賜つた恩師占部教授に満腔の謝意を捧げ、また病理標本について種々御助言を戴いた病理学教室山田助教授に謝意を表する。

文 献

- 1) 占部 薫：日本微生物学病理学雑誌，27，956～968，昭8。
- 2) 戸田忠雄・占部 薫：東京医事新誌，2891，1893～1898，昭9。
- 3) 占部 薫：福岡医科大学雑誌，29，2854～2941，昭11。
- 4) 松枝勝夫：結核，18，976～980，昭15。
- 5) 高木 篤・山田倫子・藤田 浩：日本医学，3378，614～615，昭19。
- 6) 平野 覚：臨床と研究，24，347～352，昭22。
- 7) Middlebrook, G., Dubos, R. J. & Pierce, C.: J. Exp. Med., 86, 175～183, 1947.
- 8) Bloch, H.: J. Exp. Med., 91, 197～217, 1950; 92, 507～526, 1950; Am. Rev. Tbc., 61, 270～271, 1950.
- 9) Dubos, R. J. & Middlebrook, G.: Am. Rev. Tbc., 58, 698～699, 1948.
- 10) Vagedes, K.: Zschr. f. Hyg., 28, 276～320, 1898.
- 11) Fraenkel, C. & Baumann, E.: Zschr. f. Hyg., 54, 247～261, 1906.
- 12) 染谷四郎・川村 達・重松逸造・平山雄・林久子・張 仲儀：結核，24，11～17，昭24。
- 13) 上坂一郎：京大結核研究所年報，2，197～198，昭26。
- 14) Lange, B.: Zschr. f. Tbk., 46, 455～467, 1926.
- 15) Lange, B. & Lydtin, K.: Zbl. f. Bakt., 108, 22～25, 1928.
- 16) Toda, T.: Zschr. f. Tbk., 55, 302～317, 1930.
- 17) Soper, W. B. & Dworski, M.: Am. Rev. Tbc., 11, 200～216, 1925.
- 18) Feldman, W. H.: Am. Rev. Tbc., 21, 400～422, 1930; 29, 415～423, 1934.
- 19) Smithburn, K. C.; J. Exp. Med., 64, 771～790, 1936; Am. Rev. Tbc., 39, 116～127, 1939.
- 20) 渡辺喜海：結核，18，101～146，昭15。
- 21) 菅原真行：結核，4，507～508，大15。
- 22) 芦名 泰：大阪医学会雑誌，28，2319～2346，昭4。
- 23) 高須 勇：大阪医学会雑誌，31，4065～4086，昭7。
- 24) 松尾吉恭：結核，26，324～329，昭26.; 27，177～180，昭27; 27，225～228，昭27; 27，278～282，昭27; 27，339～343，昭27。
- 25) 弓削静彦：久留米医学会雑誌，13，347～360，昭25。
- 26) 藤田圭三：結核，27，409～413，昭27。
- 27) 藤田圭三：未発表
- 28) Richmond, L. & Cummings, M. M.: Am. Rev. Tbc., 62, 632～637, 1950.

東大教授 医学博士 詫摩武人著

A5判 360頁
上製函入
定価 400円
千 実 費

新刊 主な小児疾患とその臨牀 第2集

本書の第1集を昭和25年に上梓したところ絶賛を博し早速諸方面の方々が主要疾患の追加を出版するよう要望されたので第1集と同様第2集も一般医師・インターン・医学生諸君の参考になるよう斯界の権威が可及的新知見を紹介したものである。

本書内容

- | | | |
|----------------|--------------------|--------------|
| 第1章 赤痢 | 第2章 疫痢 | 第3章 猩紅熱 |
| 第4章 泉熱 | 第5章 原発性非定型肺炎 | 第6章 かぜ |
| 第7章 脳炎 | 第8章 早産児 | 第9章 脳性小児麻痺 |
| 第10章 粘液白痴・粘液水腫 | 第11章 精神薄弱症及び蒙古人様痴呆 | 第12章 先天性胆道異常 |

第1集内容

- | | | |
|-----------------|-----------|------------------|
| 第1章 乳幼児肺炎 | 第2章 乳児下痢症 | 第3章 乳児栄養失調症及び消耗症 |
| 第4章 メルラー・バルロー氏病 | 第5章 佝僂病 | 第6章 先天性心臓疾患 |
| 第7章 先天性肥厚性幽門狭窄症 | 第8章 自家中毒症 | 第9章 化膿性髄膜炎 |
| 第10章 麻疹 | 第11章 百日咳 | 第12章 デフテリア |
| 第13章 ハイネ・メゲン氏病 | 第14章 小児結核 | 第15章 小児梅毒 |

定価 450円 千 実 費

発行所 株式会社 東西医学社 東京都中央区(京橋局区内)銀座西7の1
電話銀座(57)2126～2129番 振替口座東京2818番