

強毒人型結核菌 H₂ 株及び H37Rv 株の 菌力の安定性について

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳 沢 謙)

橋本 達一郎・吉田 幸之助

(昭和 29 年 2 月 8 日受付)

結核菌が生体外にとり出されて人工培地に継代されると次第にその菌力 (Virulence) を失つてゆくことは多くの人々によつて観察されている。しかし稀に患者分離後の結核菌が極めて長年月の間、種々の人工培地に継代されても分離直後の強い菌力を維持し、菌力の減弱を示さない場合がある。アメリカの H37Rv 株、わが国の H₂ 株はその代表的なものであろう。

H37Rv 株は 1905 年、E. R. Baldwin が患者から分離して以来、長年月の間その菌力が減弱せず現在も強毒人型結核菌の標準株として、ひろく実験に用いられている。又 H₂ 株は柳沢が 1935 年頃患者の痰から分離し動物実験により人型結核菌であることを確認してから約 19 年を経過した菌株である。これはわれわれが日常用いる強毒人型菌の保存菌株の中では最も菌力が強いと考えられる。

われわれがこの実験において吟味しようとしたのは菌力の一方的な減弱ではなく、上述の H37Rv、H₂ のような強毒株の菌力の動揺である。1949 年 BCG ワクチンの国家検定開始以来 BCG ワクチンの感染防禦試験において攻撃に用いる強毒結核菌の菌力の動揺には最も苦しめられたが、これは同時に化学療法剤の効力測定を行う動物実験においても常に遭遇する難点であつた。これらの研究には成績を比較する上からも一定の感染経路をえらべば常に一定の罹患度を示す強毒結核菌が特に要求せられるからである。そこで強毒菌の菌力の動揺に関する因子についての考察を行うと共に、菌力の安定化をはかる具体的な方法について凍結乾燥法を主として検討を加えてみた。

実験 I H₂、H37Rv 培養の 菌力の動揺

H₂ 株：予研保存の H₂ 株のでんじくねずみ 1 代通過株を出発点として、14 日間隔で Glycerin-bouillon-potato 培地に継代した。実験に用いた H₂ 株はその各継代代数のもので、大部分は 14 日培養を用い、外に 13、21 日培養のものも用い

た。

H37Rv 株：1951 年アメリカの Mayo Foundation の A.G. Karlson 氏より分与されたものを小川培地に継代し、更にこれを Sauton-potato 培地に継代培養した。この実験には Sauton-potato 培地各継代の培養を用い 14 日培養を中心として 9、10、12、16、21 日培養のものを各々 1 培養ずつ用いた。以上の 2 菌株の potato 培地上に発育した菌苔をとり、水晶球入りコルベン手振法で蒸溜水浮遊菌液をつくり、てんじくねずみの右下腹部皮下に菌を 0.01mg ずつ接種した。接種後 6 週間放置した後屠殺剖検し、リンパ腺及び内臓の結核性変化を佐藤秀三法に従つて判定した。すなわち、リンパ腺は +：米粒大、++：大豆大、+++：えんどう大、++++：そら豆大、内臓病変は +：結節がようやく発見しうる程度、++：結節が 10 個内外、+++：結節がかなり多数、++++：結節が極めて多数で殆んど臓器

第 1 表 Potato 培地継代毎に変動する H₂ 及び H37Rv 培養の菌力

菌 株	Potato 上の培養日数	天竺ねずみ匹数	感染 6 週後のアレギー	結核症指標 (感染 6 週後)			
				リンパ腺	肺	肝	脾
H ₂	日		mm				
	13	10	17.9	3.3	0.3	0	0.9
	14	12	25.1	3.8	0.3	0.4	0.9
	14	5	23.0	5.8	0.6	0.6	2.4
	14	6	25.3	5.8	0.4	1.0	2.3
	14	5	22.2	3.4	0.2	0	0.8
	14	6	22.7	7.0	0.5	0.5	3.0
H37Rv	21	8	19.8	5.1	0.4	0.1	1.1
	9	10	21.4	7.3	0.5	1.0	2.5
	10	12	20.3	5.2	0.2	0	1.3
	12	9	20.7	5.6	0.4	0.4	2.0
	14	7	23.9	6.6	0.2	0.1	1.0
	14	9	20.9	6.9	1.0	1.3	2.6
	14	13	23.5	7.2	0.5	0.9	2.5
	14	13	23.2	4.3	0.1	0.1	0.9
	14	9	19.9	5.1	0.5	0.4	1.6
	16	11	23.2	4.8	0.2	0.4	1.3
21	11	19.5	3.7	0.3	0.1	1.0	

註 1) H₂ は Glycerin-bouillon-potato 培養、H37Rv は Sauton-potato 培養を用いた

2) 感染は皮下に 0.01 mg 注射した

表面をおおっている状態。この + の数をリンパ腺はすべてのリンパ腺について、臓器は各臓器別に合計して動物1匹あたりの平均値を出し、これを便宜上、結核症指標として用いた。ツベルクリン・アレルギーは感染後6週目に、すなわち屠殺直前に100倍稀釈ツベルクリンを用いて検査した。

成績は第1表に示す。結核病変の指標としてはてんじくねずみでは脾の指標が最も菌力の強さを鋭敏に反映すると思われるので、これを主にして各培養の菌力を比較すればその差が明らかである。第1表から H₂ 株も H37Rv 株も菌力の動揺が著しいことがわかる。培養日数を14日に一定しても菌力の差は著しい。H₂ の7培養の中、菌力の強いものは3つ、中等度のものは1つで他の3つは菌力が弱い。H37Rv は10培養の中、菌力の強いものは4つにすぎず、中等度1つ、他の5つは菌力が弱い。

実験Ⅱ Sauton-potato 発育 H37Rv の 培養日数と菌力の関係

Sauton-potato 15日培養の H37Rv を同一の培地からかきとり、12本の Sauton-potato に1白金耳ずつ同様に接種し直ちにふ卵器にに入れて培養した。以後7, 12, 14, 17, 21, 28日培養後にそれぞれ培地を1本ずつとり出し菌体を採取・秤量して蒸留水浮游菌液をつくつた。菌液の作製は毎回なるべく同一条件で行われるように考慮し、回転振盪機を用いて水晶球入りコルベン回転振盪法によつて作り、各実験毎の製造条件の誤差をできるだけ小さくするようにつとめた。このようにしてつくつ

第2表 Sauton-Potato 培地の培養日数の差異が H37Rv の 天竺ねずみに対する菌力に及ぼす影響

Potato 上の培養日数	菌取量 (湿菌量/培地) mg	0.1mg皮下接種量中の生菌数	動物数	感染6週後のアレルギー	結核症指標(感染6週後)				脾重量 g
					リンパ腺	肺	肝	脾	
7	70	2.6×10 ⁶	7	26.3	5.3	0.6	2.3	1.8	1.8
12	200	1.4×10 ⁶	7	25.1	4.6	0.6	2.1	1.6	1.6
14	340	7.6×10 ⁵	7	28.0	4.2	0.1	0.6	0.8	1.3
17	370	5.7×10 ⁵	7	27.2	4.2	0.3	1.0	1.2	1.4
21	500	2.2×10 ⁵	7	23.8	4.0	0.1	0.3	0.4	1.0
28	530	1.0×10 ⁶	7	24.2	3.8	0.1	0.3	0.3	1.2

第3表 ほぼ同じ生菌数を天竺ねずみの皮下に注射した場合に H₂ 株の各培養が示す菌力の変動

Potato 上の培養日数	0.05 mg 皮下接種量中の生菌数	動物数	感染6週後のアレルギー	結核症指標(感染6週後)				脾重量 g
				リンパ腺	肺	肝	脾	
7	1.6×10 ⁶	4	19.3	5.5	0.4	0.5	2.5	1.7
8	2.0×10 ⁶	12	22.8	5.5	0.3	0.8	1.6	1.5
12	1.8×10 ⁶	6	22.8	3.3	0.1	0	0.3	0.9
14	2.0×10 ⁶	9	23.1	5.9	0.5	0.5	2.1	1.2

た菌液を用いて、各々7匹のてんじくねずみの右下腹部皮下に菌 0.1mg ずつ接種し、同時に小川培地を用いた量培養によつて接種生菌数を決定した。接種後6週目にアレルギーを測定し実験Ⅰと同様に結核症指標をえた。

第2表にその成績を示すが、同一菌重量内の生菌数は培養日数がわかい程多い。菌力も大体生菌数に比例し7日、12日培養が高く、14日、17日培養がこれにつき、21日培養以後になると弱い。生菌数は7日培養を標準にするると14日培養ではその約1/3に、21日培養では1/10に減少している。従つて一定菌重量を感染に用いるのであれば同一継代代数の菌を用いる限り培養日数のわかい培養を用いた方が生菌数が多く菌力が強いということになるであろう。

実験Ⅲ ほぼ同じ生菌数をもつ H₂ 株各培養の菌力 継代代数を異にし培養日数を異にする H₂ 株 (Glycerin-bouillon-potato 培養) より菌液をつくり、0.05 mg の菌を皮下に接種した実験群より、接種生菌数がほぼ同じものを4群とり出し、菌力を比較した。菌液をてんじくねずみに接種後6週目にアレルギーを測定して屠殺剖検し前実験と全く同様に行つた。第3表にその成績を示す。

第3表よりわかるように各群の脾の結核症指標をみると、感染生菌数がほぼ同じであるにも拘わらず、その菌群の菌力は著しく異つていることが認められる。すなわち継代代数の異なる培養を用いれば生菌数、換言すれば接種に用いる菌群の大小はその菌力と直接の関係がないといえよう。

実験Ⅳ 凍結乾燥法による菌力の固定 H₂ 株及び H37Rv・R-SM 株 (SM耐性株) を用い、H₂ は Sauton 培地18日培養、H37Rv・R-SM は Sauton 培地12日培養のそれぞれの菌膜から菌液をつくり、5%-Lactose 浮游菌液としてアンブルに分注後、Cryochem process により凍結乾燥を行つた。乾燥後アンブルは真空のまま熔封し 5°C 以下の暗所に保存した。H₂ は乾燥直後、2, 2.5, 3, 4, 6, 10カ月保存後に、H37Rv・R-SM は乾燥直後、3.5, 4.5カ月保存後にそれぞれ乾燥菌を蒸留水で再浮游し、その0.1 mg をてんじくねずみの皮下に接種した。接種後、前実験と同様に6週目にアレルギーを測定し剖検を行つてその成績を第4表に綜括した。

第4表をみると、H₂ 株は乾燥直後の菌群が強い菌力を示しているが、この菌力は乾燥法によつて10カ月間ほぼ同じ程度に維持されていることが脾の指標から

第4表 凍結乾燥された H₂ 及び H37Rv・R-SM 株の天竺ねずみに対する菌力の安定性（皮下接種）

菌 株	乾燥菌の 保存月数 (0—5°C 保存)	天竺ねず み匹数	感染6週 後のアレ ルギー	結核症指標（感染6週後）			
				リンパ腺	肺	肝	脾
H ₂	0	7	16.6	7.1	1.1	2.6	3.0
	2	7	25.1	8.6	0.9	1.9	3.7
	2.5	7	24.8	4.9	0.5	0.9	2.4
	3	8	24.4	7.5	0.7	0.6	2.0
	4	12	24.2	8.2	1.6	2.5	3.4
	6	6	26.0	7.0	0.8	1.3	3.5
10	5	25.6	6.2	0.3	0.6	3.0	
H37Rv	0	7	19.7	6.9	1.7	2.4	2.6
R-SM	3.5	5	—	7.2	1.0	1.6	2.4
	4.5	7	22.0	4.3	0.8	1.0	2.9

註 1) — は測定せず

2) 感染は両株とも 0.1mg を皮下に注射した

3) 生菌数 H₂ : 24.6×10⁶/mg, H37Rv・R-SM : 27.6×10⁶/mg
うかがうことができる。

SM 耐性の H37Rv 株についても同様である。H₂ 株の接種生菌数は乾燥直後は 2.46×10⁶ で殆んど10ヵ月間を通じ同じ order を示していたが、これは実験Ⅲの H₂ 群の接種生菌量にほぼ相当している。従つて第3表の菌力の変動に比較すれば乾燥による菌力の固定が明瞭となると思う。

考 察

強毒菌として実験室に保存されている結核菌の菌力が動揺し、ある場合には殆んど病変をつくらぬ場合すらあるという現象は、菌力が関与する実験を行う場合に最も困惑する事実である。Steenken 等によれば H37 株は 1922 年頃より菌力の動揺がおこり始め、菌力の関与する実験を行う上に非常な障碍を与えたようである。彼はこの原因として強い菌力を示す菌群の中に無毒の菌が混在し、両者の比率の変動によつて菌群の菌力に動揺がおこると考えた。そしてこの比率は培地条件によつて強く支配され、H37 株の菌力に動揺がおこつたのも培地成分の変化により無毒菌の比率が大きくなつたためであろうとしている。われわれの得た成績から考えると、一つの培地から発育菌をとつて次の新しい培地に移植するとそこに発育してくる菌の示す菌力がどうであるかを接種量や菌の培養日数からは予言することができない。このことは Steenken の如く²⁾、結核菌の菌群は菌力に関して不均一な構成をもつていてと考えれば一番説明しやすいのであるが、強毒菌から変異する Ra 型の無毒菌の比率のみが菌力動揺の原因とは考え難い。何故ならば Ra 型の無毒菌から強毒菌への逆変異がいかなる方法によつても証明されない上に³⁾、Ra 型の無毒菌は強毒菌と人工培地上の発育速度がことなぬという報告もあるからで

ある⁴⁾。これでは菌力が一度低下すれば次に上昇する場合を考え難い。又 Ra 菌の分離が必ずしも容易でないことからみても強毒菌群中でその菌力の低下をおこす程に Ra の比率が極めて大きくなるとは思えない。従つてわれわれは菌群の中で大量に出現する不安定な弱毒菌は Ra や BCG のような性質のものでなく、強毒菌への変異がある程度おこり得る性質のもので両者の比率はある条件によりかなり不安定に動くと考えたい。

実験Ⅱにみるように培養日数が古くなる程発育菌群の菌力が低下することは、培地環境の変化で強毒菌の比率が小さくなる機会が多くなるのか、又は生菌数の減少のために強毒菌の絶対数が減少するためであろう。いずれとも断定できないが、培養が古くなるとともに菌力の強く

なる条件ができるとは考えられないようである。新しい培地に菌を接種するときその接種菌群中の強毒菌の数、比率がまず発育菌の菌力に関連して問題になるが、上述の意味から接種菌の培養日数も考慮の必要があらう。又ある培地に発育した菌のごく一部分を接種に用いるのであるから発育菌の菌力の分布が不均一であれば接種菌の菌力の構成が大きく変ることも考へうる。いずれにしても発育する菌群の強毒菌と弱毒菌の均衡を決定する条件については全く不明であるが、接種菌の特性と発育環境の影響に関連する複雑な因子の組み合わせによつてきめられるのであらう。

結核菌群の菌力の構成に及ぼす培地条件については現在具体的には何もわかつていない。Steenken によれば¹⁾ pH の変動の少ない Proskauer and Beck の合成液体培地が H37 の菌力の維持に最も適しているというが、われわれの経験では合成培地である Sauton 培地、鶏卵培地の小川培地、血清を含む Kirchner 培地、又 Potato 培地の Sauton-potato, Glycerin-bouillon-potato 培地等の間に差異を認め難い。すなわち現在われわれは培地の選択によつて H₂ や H37Rv の菌力を安定することに成功していないのである。

菌力は極めて複雑な因子の総合によつて発現されるものであり、Dubos のいう如く⁵⁾ しつかりと限定された菌側及び宿主側の条件の下で論議されねばならない。この点この実験がすべて、てんじくねずみの皮下に感染して行われたことは重要な条件である。元来皮下法は最も結核の感染に不安定な成績を与えるものと考えられているのであるが、この実験ではその不安定性の原因を主として接種に用いた菌側におき宿主側の条件については考慮していない。それは宿主側の条件については殆んど知

られていない上に、実験Ⅳから認められる如く菌が固定されていると10カ月にわたる皮下法による感染の動揺が余り著しくないからである。しかし無論個々の感染群において病変の発現に動物の個体差があり、宿主側の条件については今後の研究が必要である。

強毒結核菌の菌力の動揺は菌力の本質を研究する上からそれ自体興味ある研究対象であるが、実際問題としてもしこの動揺を防止できないと菌力の関与する実験は多くの時間、費用の浪費を余儀なくされるであろう。菌力の安定をはかるには次の二方法が考えられる。第一には強い菌力を示す菌群の中から菌力の強い菌を解離することである。Steenken 等が行つたS型菌の解離は⁶⁾その一例である。第二には強い菌力を示す菌群をそのまま凍結乾燥法によつて固定してしまうことである。第一の解離法は強毒菌の単一細胞をとり出すことを理想とするが、菌力に関する変異の安定性がまだ不明の上に方法論的にも難しい点が多い。

解離法にくらべると凍結乾燥法はBCGワクチンの製造により、多くの経験がたまっているので技術的には比較的簡単である。この方法により生菌数・菌力を一定に保つことができるので、予め生菌数・菌力のわかっている菌群を用いて実験を行うことが可能となり労力の浪費を防ぐことができるのみならず計画的に実験を行うことができるであろう。しかしこの方法にも次の如き難点がある。第一には実験Ⅰからわかるように菌力の強い菌群を選択的に乾燥することが容易でないということである。第二には強毒菌を乾燥するには危険な点が多く従つて操作が簡便でない。水蒸気の凝結器の融解水から多数の結核菌が培養されるのであるが、このことは乾燥機の経路がひろく菌に汚染されることを意味している。この点については研究者の安全性のために慎重な工夫を必要とすると考える。

結 論

強毒人型結核菌の標準菌株である H₂ 株及び H37Rv 株の菌力の動揺に関係する因子について実験を行い、接種菌の重量・生菌数・培養日数から、てんじくねずみに

対する菌力の強さ（皮下接種経路）を予測することができないことを認め、その動揺の本態について考察を行つた。

更に菌力の安定をはかる実際の問題としては強い菌力を示す菌群を凍結乾燥する方法をえらび、この乾燥菌を用いて保存10カ月間にわたつて、てんじくねずみ皮下接種法により菌力の測定を行いこの方法が菌力の安定化に用いること並びに菌力の関与する研究に与える利点を指摘した。

終りに柳沢部長・室橋博士の御校閲を感謝する。なお本研究の一部は文部省科学研究費によつたことを附記して謝意を表する。

文 献

- 1) Steenken, W., Jr. & Gardner, L. U. : History of H37 strain of tubercle bacillus. *Am. Rev. Tuberc.*, 54 : 62—66, 1946.
- 2) Steenken, W., Jr. : Lysis of tubercle bacilli in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 33 : 253—255, 1935.
- 3) Steenken, W., Jr. : Spontaneous lysis of tubercle bacilli on artificial media. *Am. Rev. Tuberc.*, 38 : 777—790, 1938.
- 4) Holmgren, N.B. & Youmans, G.P. : Studies on the metabolism of virulent and avirulent mycobacteria. *Am. Rev. Tuberc.*, 66 : 416—435, 1952.
- 5) Dubos, R.J. : *The bacterial cell*, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1949.
- 6) Steenken, W., Jr., Oatway, W.H., Jr. & Petroff, S.A. : Biological studies of the tubercle bacillus, III. Dissociation and pathogenicity of the R and S variants of the human tubercle bacillus (H37). *J. Exp. Med.*, 60 : 515—540, 1934.