

# ハツカネズミ全身 homogenize 法による 結核菌菌力に関する研究

## 第1報 ハツカネズミの全身組織と各臓器内における病原性 および非病原性人型結核菌の生存と増殖について

国立療養所刀根山病院（院長 渡辺 三郎）

加藤 允彦・三木 勝治・松永 清輝

（受付 昭和 30 年 6 月 11 日）

実験的結核症における感染の成立、すなわち進行性結核病変の設定や、罹患宿主の結核死は、感染菌の宿主体内における積極的な増殖を前提条件としていること、したがって病原性結核菌を非病原性の菌株から決定的に区別するものが、前者の宿主体内増殖力であることは、Rich<sup>1)</sup> によつて組織学的に追求され指摘されている。かれは十分な菌量が組織内に導入された場合には、timothy bacillus のような非病原性抗酸性菌、あるいは病原性菌株の死菌によつても、定型的な結核性病変が設定されるという実験的事実から、感受性宿主の組織内において、小菌数が導入された場合においても、病変を惹起させるに十分な菌数にまで増加する能力をもつということが、病原性を決定する因子であると考えた。

したがつて、菌力を病原性の尺度と規定するならば、結核菌の場合には、感受性宿主の体内において、生存し増殖していく能力そのものであると結論されたのであつた。

一方実験動物の結核症において、感染動物の臓器から直接に菌の培養をおこなうことにより、結核菌の宿主体内における生存、増殖および死滅の経過を追求するところみは、1928年にLurie<sup>2)</sup>が家兎を用いておこなつた実験にはじまり、その後Wesseis<sup>3)</sup>、Fenner<sup>5)</sup>、Fennerら<sup>4,6)</sup>、小川ら<sup>7,8)</sup>、水之江<sup>9)</sup>が、シロネズミ、ハツカネズミ、および家兎などのいろいろな動物を宿主として、それぞれの動物の臓器内における結核菌生菌数の消長を追求し、数多くの興味深い研究成績を発表している。

しかしながらその多くにおいては、主として病原性結核菌の、各臓器内分布や増殖の観察、および感染と免疫の各時期における生菌数の消長に興味が集まされて、結局それぞれの動物における実験的結核症の細菌学的な一面が明かにされたということとどまり、結核菌力との関連づけはなお不充分であつた。

ついで、1953年にはPierceら<sup>10)</sup>が、厳密に規定された実験条件のもとに、従来動物に対して種々の程度の病原性を示し、それぞれことなつた菌力水準に安定したと

考えられる結核菌菌株8株を、ハツカネズミの脳内および静脈内に接種して、肺、脾内生菌数の消長を比較検討した。この実験によつて、それぞれの菌株のハツカネズミに対する病原性と、肺や脾内における生存増殖力とがよく並行することがはじめて実験的に明かにされ、この方法が結核菌の菌力測定法として直接的かつ実態的であり、またある程度定量的な表現への可能性をもつ利点が強調された。

Macknessら<sup>11)</sup>もハツカネズミを用いて同様の実験をおこない、感染1週後の菌数増加係数を脾と肝について求めて、これが各菌株の病原性と併行することをみとめている。

このように結核菌の宿主体内生存増殖力を測定しようとする従来のところみは、すべて特定の臓器のいくつかを宿主環境としてえらんでいるために、臓器内 populationの動向をとらえることはできたが、実験的結核感染の場合に、感染菌の全 populationが、どのような生存と増殖の経過をたどるかということは、未知のままりのこされていたのであつた。

さらに、Lurieの報告<sup>2)</sup>以来今日まで発表された諸報告において、一致してみとめられている臓器の種類による分布定着菌数と以後の菌数推移の差異、あるいは感染の種々の時期における臓器相互間の菌移動の可能性などを考慮にいれると、結核菌の1 populationの菌力を表現するために生存増殖力を測定する場合には、宿主の全身組織という全体的な宿主環境における、感染菌株の全 populationの動きをとらえる方法がのぞましいと考えられる。

そこでわれわれは、山村、生田、奥山<sup>12)</sup>が動物組織における acetoin の代謝を追跡する目的で考案したハツカネズミ全身 homogenize 法を応用し、結核菌の菌力を種々の面から解析することを計画して実験を開始した。本報告においては、ハツカネズミに対して病原性を有する人型結核菌 H<sub>37</sub>Rv 株およびその非病原性変異株 H<sub>37</sub>Ra 株の、ハツカネズミ全身組織内における生存と増

菌の経過を、従来の臓器培養法によつてえた成績と比較検討しようとおもう。

## 実 験

### 材料および方法

#### 1. 菌株；実験には次の菌株を用いた。

人型結核菌  $H_{37}Rv$  株、——1954年に国立予防衛生研究所結核部から凍結乾燥菌として分与をうけ、以後4週ごとに小川培地に継代したもので、本実験には一度ハツカネズミを通過したのちに Sauton-potato 培地に培養し、その12日培養菌苔から菌液を調製した。

人型結核菌  $H_{37}Ra$  株、——同じく1954年に国立予防衛生研究所結核部保存の菌株の分与をうけたもので、小川培地に継代し、実験には同様に Sauton-potato 培地12培養菌を用いた。

2. 動物；大阪純系試験動物研究所において Swiss albino ハツカネズミから分離され、16代家族内交配をおこなつた NA-2 系ハツカネズミを用いた。感染時の年齢は生後6週で、平均体重15gの雄性動物を使用し、固型飼料 (Oriental Pellet Diet Mc5) とキャベツで飼育した。

3. 感染；両菌株の Sauton-potato 培地12日培養菌苔から beads flask 法によつて湿菌量  $0.4mg/ml$  の菌液をつくり、それぞれ  $0.25ml$  ずつハツカネズミの尾静脈内に接種した。感染菌量  $0.1mg$  中にふくまれる生菌単位数は、 $H_{37}Rv$ ； $7.2 \times 10^4$ 、 $H_{37}Ra$ ； $8.5 \times 10^4$  であつた。

4. 全身および各臓器内生菌単位数の測定；感染直後から週を追つてそれぞれ4匹ずつの動物をとりだし、エーテルで致死させたのち体重測定と剖検をおこない、ついで2匹は全身を、のこりの2匹は無菌的にとりだした各臓器を、以下の方法にしたがつて homogenize して培養した。

全身の homogenization はまず全身をバラバラに細切したのち、計算量の滅菌蒸留水を加え、mixer (Kenix Liquidiser Model A 900) によつて1分間ずつ3回 mix する。この操作によつてハツカネズミの全身組織は爪、歯および毛をのぞいて完全に均等化される。これを滅菌ガーゼで口過し、20%苛性ソーダ溶液を加えて苛性ソーダの終末濃度1%、組織の濃度  $100mg/ml$  の homogenate として5分間振とうしたのち、第1段階だけ1%苛性ソーダ溶液、以下滅菌蒸留水で段階希釈して、各段階をそれぞれ3本ずつの1%  $KH_2PO_4$ 、小川培地に  $0.1ml$  ずつ接種した。

臓器としては、肺、脾、肝および腎をえらび、いずれも全臓器をとりだして、glass homogenizer で磨砕し、1%苛性ソーダ溶液を加えおのおの  $100mg/ml$  の homogenate として、以下滅菌蒸留水で段階希釈し、全身の

場合と同様に各稀釈段階を小川培地に接種した。

集落計算は  $37^\circ C$  で4週間培養後、100コ以下の集落がかぞえられる段階からおこない、全身および臓器単重量中の生菌単位数を算定した。

## 成 績

### 体重の推移と剖検所見

両群いずれにおいても実験期間中体重の減少はみとめられず、実験開始時の平均体重15gに対し、実験終了時(8週後)の平均体重は、 $H_{37}Rv$  接種群；17.2g、 $H_{37}Ra$  接種群；21.5g であつた。

剖検による肉眼的病変の観察は、肺と脾についておこなつた。

$H_{37}Rv$  接種群では、感染2週後から肺表面に左白色の結核結節があらわれ、4週後には肺表全面に散布し、6~8週後も消退する傾向がみとめられない。脾腫は3~4週後に最も著しく、感染直後重量の5~10倍に達するが、4週以後は次第に消退する。

これにくらべて、 $H_{37}Ra$  接種群では、感染8週後までの各時期において、肺の結節および脾腫のいずれも全くみとめられなかつた。

全身 homogenate の小川培地上集落形成におよぼす影響

表1に培養組織量当りの集落数の実測値と、これから算出した感染直後における回復生菌単位数を示した。すなわちこれによると、両菌株とも全身 homogenate によつて著しい発育抑制をうけず、稀釈倍数と体重から計算した回復生菌単位数は、ほぼ接種生菌単位数にひとしい値を示した。

### 全身生菌単位数の推移

図1に示すように、 $H_{37}Rv$  接種群では感染2週後まで旺盛な生菌単位数の増加がみとめられ、2週後にピークをえがいて3週後から4週後にかけて減少する。しかし4週以後はほとんど減少することなく、接種時より高い生菌単位数水準が維持されて、そのまま8週までつづいている。これに反して  $H_{37}Ra$  接種群では、全身中の生菌単位数は全く増加の相を示さず、週を追つて持続的に減少する。

### 臓器内生菌単位数の推移

臓器培養の成績は、図2および図3に示した。これによると、 $H_{37}Rv$  接種群では、臓器  $10mg$  中の生菌単位数は、肺および腎では3週後を、また脾および肝では2週後をピークとする消長を示し、これらの時期に最大菌数に達したのちは、いずれの臓器においても8週後まで持続的に生菌単位数は減少する。

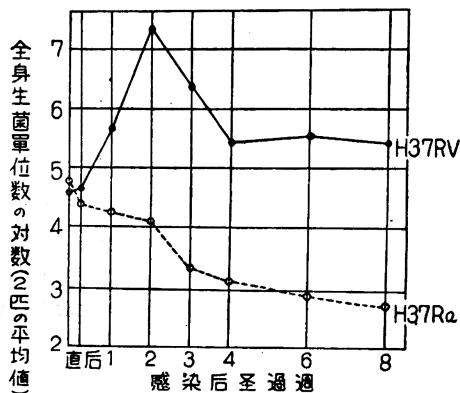
一方  $H_{37}Ra$  接種群においても、肺、脾および腎における生菌単位数消長は、 $H_{37}Rv$  接種群の場合とほとんど差異をみとめず、これらの臓器においては菌数消長曲線

第1表 全身 homogenize 法における接種生菌単位数の回復

| 感染菌株               | 接種生菌単位数               | ハツカネズミ番号 | 培養組織量(mg)当りの集落数 |    |                  | 回復生菌*単位数              |                       |
|--------------------|-----------------------|----------|-----------------|----|------------------|-----------------------|-----------------------|
|                    |                       |          | 10              | 1  | 10 <sup>-1</sup> |                       |                       |
| H <sub>37</sub> Rv | 7.2 × 10 <sup>4</sup> | 1        | 25              | 4  | 0                | 6.2 × 10 <sup>4</sup> |                       |
|                    |                       |          | 44              | 3  | 0                |                       |                       |
|                    |                       |          | 33              | 3  | 0                |                       |                       |
|                    |                       | 2        | 21              | 6  | 0                |                       | 7.9 × 10 <sup>4</sup> |
|                    |                       |          | 52              | 3  | 2                |                       |                       |
|                    |                       |          | 44              | 18 | 0                |                       |                       |
| H <sub>37</sub> Ra | 8.5 × 10 <sup>4</sup> | 1        | 15              | 3  | 0                | 4.8 × 10 <sup>4</sup> |                       |
|                    |                       |          | 11              | 2  | 0                |                       |                       |
|                    |                       |          | 16              | 2  | 0                |                       |                       |
|                    |                       | 2        | 20              | 3  | 0                |                       | 4.3 × 10 <sup>4</sup> |
|                    |                       |          | 12              | 4  | 0                |                       |                       |
|                    |                       |          | 16              | 2  | 0                |                       |                       |

\* 集落数平均値 × 体重 (mg) / 培養組織 mg 量

図1 H<sub>37</sub>Rv 株および H<sub>37</sub>Ra 株のハツカネズミ全身中における生菌単位数消長



の形によつて両菌株を区別することができない。ただ肝においては、全身の場合と同様週をおつて生菌単位数の減少が観察された。

考 察

Dubos<sup>13)</sup> は病原微生物の菌力を本質的に宿主寄生体関係として規定されるべきものと考え、菌力の問題を完全に分析するためには、宿主条件および実験条件を厳密に規定した上で、宿主と寄生体の間に存在し感染の成立を実現させるいくつかの相互関係を、これに関与する宿主側および寄生体側の諸因子を明かにしなければならぬとしている。そしてこのような菌力を構成する寄生体側の属性として、伝達性、侵襲力、宿主の正常あるいは免疫による防禦機能に対する抵抗力、毒素産生能などの因子をあげている。

菌力の本質をこのように考えるならば、菌力の分析を目的として、結核菌における病原性菌株と非病原性菌株

の生物学的性状を比較する場合には、まず宿主条件を一定にすることが必須の条件であり、また両菌株の培養条件や感染生菌数は同一でなければならない。そしてこのような条件のもとに、菌力の構成にあずかると考えられるいくつかの属性のひとつひとつを別々にとりあげて、それぞれについて両菌株の間の性状の差異を明かにし、その上にたつて結核菌の菌力を実験的に再構成していくことが必要であると考えられる。

Bloch<sup>14)</sup> も同様の立場から、結核菌の一菌株の菌力は、(a)培地条件、(b)培養日数、(c)感染菌量、(d)感染経路、(e)動物の種、系統、年令、体重、(f)動物の飼育条

図2 H<sub>37</sub>Rv 株の臓器内生菌単位数消長

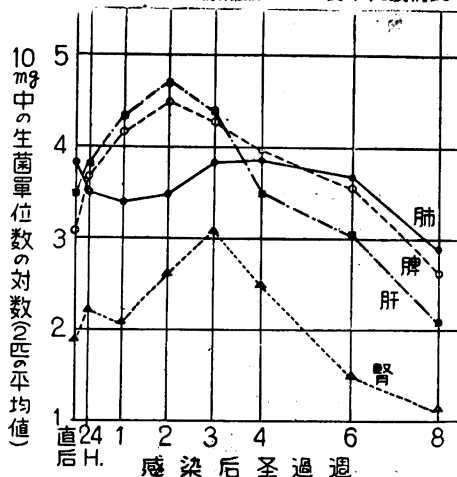
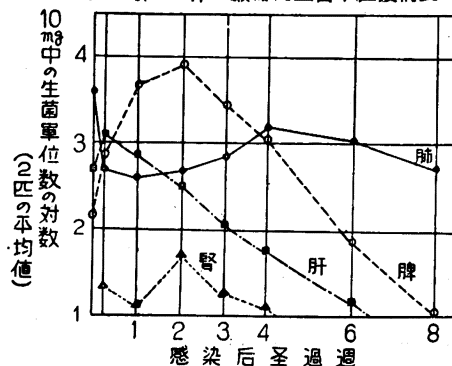


図3 H<sub>37</sub>Ra 株の臓器内生菌単位数消長



件、(g)混合感染あるいはその他の病的状態の有無などの各条件と共に、(h)罹患の重さをきめる規準を明確に規定したときにはじめて測定することができると述べている。

ところが結核菌の場合には、宿主体内における生存増殖力が、この菌の感染の成立と進展に重要な役割をはた

す菌力構成因子のひとつであると考えられるので、われわれの実験においては、 $H_{37}Rv$  および  $H_{37}Ra$  の両菌株の菌力を比較するのに、培養と感染条件および動物側の条件を同一にしたのち、まず両菌株のハツカネズミ体内における生存増殖力を比較の対照としてとりあげたのである。

われわれのえた  $H_{37}Rv$  株のハツカネズミ全身中における生菌単位数の消長曲線によると、感染2週後まで非常に旺盛な菌増殖があるとおもわれるが2週後から4週後にかけて菌の死滅がおこり、4週以後は著しい減少や増加を示すことなく、感染菌と宿主の間に一定のバランスが獲得され維持されていることをおもわせる。ところが各臓器内の生菌単位数の消長をみると、2~3週後に最大菌数に達するまでの経過は全身の消長と並行するけれども、4週以後も持続的な生菌単位数の減少を示し、この時期の全身における  $H_{37}Rv$  population の動向が正確に反映されているとはいいがたい。

極めて興味深いのは  $H_{37}Ra$  株の生菌単位数消長であつて、全身のそれは持続的なゆるやかな減少に終止し、積極的な宿主側の殺菌作用を受けるというより、菌株自体の宿主体内増殖力の欠除のために、次第に生菌数が減少していくことをおもわせる。ところが肺や脾では  $H_{37}Rv$  株の場合とほとんどことならない生菌単位数の消長がみとめられ、腎においても  $H_{37}Rv$  株の場合よりは軽度であるが、生菌単位数の増加が観察された。

$H_{37}Ra$  株の宿主体内増殖力に関しては、従来の報告にも混乱があり、Pierceら<sup>10)</sup>の成績では、ハツカネズミの脳内に接種されたこの菌株は脳および脾内で全く増加することなく、したがって宿主体内増殖力を完全に喪失したものと考えられているが、一方 Mackaness ら<sup>11)</sup>はハツカネズミの静脈内に接種された  $H_{37}Ra$  株の、8日後と1日後の脾、肝内生菌単位数の比をとつて、それぞれ 17, 1.8 という値をえ、ある程度の増殖があるものと考えている。

これらの成績をわれわれのえた成績と考え合わせると、 $H_{37}Ra$  株も肺、脾および腎ではある程度増殖することが考えられ、しかもその増殖による生菌数の増加は、全身組織における population 全体の生菌数の減少によつておおいにさされるのであろう。あるいはまたこれらの3臓器において観察された生菌単位数の増加は、実際の菌増殖によるよりも、臓器条件により密接に関連した菌の移動、集合の結果による可能性もあると考えられる。

このように、従来の臓器培養法に加えて全身 homogenize 法による感染菌全 population の動向の追求をすると、感染菌株の宿主体内増殖力をより全体的に把握することができると同時に、結核感染における宿主と寄生体間の相互関係の経過を、より明瞭に追跡することが

できると考えられる。

組織内部の結核菌を直接固型培地に培養して、形成される集落数からその菌数推移を追求するこの種の実験において、もつとも注意をはらうべき点は、(1)使用菌液として単個菌菌液に近いものを調製すること、(2)培地の検討、(3)組織による集落形成抑制の有無、(4)アルカリ処理の影響、(5)雑菌混入の防止などである。われわれは本実験を開始した初めから、これらの諸点について種々条件をかえて検討し、上記の実験法によれば大体接種した生菌単位数が感染直後に回復されることをみとめた。将来さらに菌液調製や培養法に改良を加えたいと考えている。

## 結 論

人型結核菌  $H_{37}Rv$  株と  $H_{37}Ra$  株の同一生菌単位数をハツカネズミの静脈内に接種したのち、両菌株の宿主体内増殖力を、全身 homogenize 法による全身生菌単位数消長の追求と、臓器培養法による肺、脾、肝および腎内生菌単位数の測定によつて比較した。

両菌株の宿主体内増殖力の差異は、全身生菌単位数の推移の比較において著明であつた。

臓器内生菌単位数の消長は両菌株の病原性の差異と並行せず、肺、脾および腎において  $H_{37}Ra$  株の生菌単位数の推移は  $H_{37}Rv$  株の場合とほとんど同様であつた。ただ肝においては、 $H_{37}Rv$  株が2週後に最大菌数に達したのち減少するのにくらべて、 $H_{37}Ra$  株では感染直後から持続的な生菌単位数の減少がみられた。

われわれのえた成績から、 $H_{37}Ra$  株が宿主体内増殖力を完全に喪失した菌株と結論することはできない。

本実験は、国立療養所刀根山病院、山村雄一博士の指導によつておこなわれた。また菌株の分与と実験上に多くの有益な助言を賜つた国立予防衛生研究所結核部柳沢謙博士、橋本達一郎氏に負うところは極めて大きい。記して厚く感謝の意を表わす。

## 文 献

- 1) Rich, A.R.: The pathogenesis of tuberculosis, Charles C. Thomas, Springfield, Ill. 1950.
- 2) Lurie, M.B.: J. Exp. Med., 48: 155, 1928.
- 3) Wessels, C.C.: Am. Rev. Tuberc., 43: 459, 1941.
- 4) Fenner, F., Martin, S.P. and Pierce, C.H.: Ann. New York Acad. Sci., 52: 751, 1949.
- 5) Fenner, F.: Am. Rev. Tuberc., 64: 353, 1951.
- 6) Fenner, F. and Leach, R.H.: Am. Rev. Tuberc., 68: 321, 342, 1953.
- 7) 小川辰次・工藤祐是・高倉廉・岩崎竜郎・橋本芳

- 郎・村瀬貞男：結核. 25 : 647, 1950.
- 8) 小川辰次：結核. 25 : 302, 1950.
- 9) 水之江公英：日本細菌学雑誌. 7 : 195, 1952.
- 10) Pierce, C.H., Dubos, R.J. and Schaefer, W. B. : J. Exp. Med., 97 : 189, 1953.
- 11) Mackaness, G.B., Smith, N. and Wells, A.Q. : Am. Rev. Tuberc., 69, 479, 1954.
- 12) 山村雄一・生田重雄・奥山典生：第2回日本生化学会近畿地方会報告, 1954.
- 13) Dubos, R.J. : The bacterial cell, Harvard University press. 1945.
- 14) Bloch, H. : Acid fast bacteria, Ann. Rev. Microbiol., 19, 1953.
-