

Vole Bacillus の天竺鼠に対する Virulence について

国立予防衛生研究所 結核部 (部長 柳沢 謙)

室橋 豊穂・関 又蔵・吉田 幸之助

(受付 昭和30年8月6日)

1 緒 言

Vole Bacillus としてわれわれは2菌株を保存している。その一つは D₁₅、他は OV₂₀₅ である。Vole Bacillus の培養性状や Virulence 等について従来しばしば行つて来た報告は専ら前者に関するものであり、また Wells 以外の研究者の報告も OV 株については行われていない。後者は 1953 年に A.Q. Wells から直接分与をうけた菌株で、現在イギリスではすでに人体接種に試用して無害有効なことが証明されているが¹⁾、われわれの経験にしたがえば、D₁₅ とは培養性状を明かに異なる菌株である。元来これは Lake Vyrnwy で捕獲した Field Vole の淋巴腺乳剤 (LV株) を、実験室飼育の Orkney Vole に接種、通過して得た株で、グリセリン含有培地には極めて発育が悪く、固型培地上の集落形態も D₁₅ とは明かに異なり、現在迄のところ、通常の液体培地表面には極めて僅かにしか発育を営みえないのである。これらの性質を異にする Vole Bacillus 菌株について Wells の行つた pathogenicity の検討は、Field Vole, Bank Vole, Orkney Vole, Continental Vole, Mouse, Wood Mouse, Hamster, Rat, 家兎、天竺鼠、豚等極めて多種の動物にわたり、各種の投与経路と投与菌量とによつて行われているが、それは主として多種類の動物の感受性を見るために、肉眼的病変所見と生存期間に重点をおいたものであつて、動物体内における菌の動態からは論じていない。しかし Virulence を論ずる以上は、ほぼ感受性の明かにされた特定の種類の動物について、体内における菌の増殖消滅の過程から詳細に観察する必要のあることはいうまでもない。この観点に立つてわれわれは、OV₂₀₅ および D₁₅ の両菌株の一定生菌単位数を天竺鼠静脈内に接種し、BCG および H₂ を対照として、菌の動態の面からそれらの Virulence を眺めようとして実験を行つた。

2 実験方法

菌株としては、Vole Bacillus-D₁₅、-OV₂₀₅ および

BCG, H₂ の4株を用いた。使用菌液の条件は各実験成績の項に述べる。

体重 350~400g の天竺鼠足静脈内に所定量の各株菌液を注射し、注射後 24 時間目に 1 群 2 匹屠殺、臓器 10 mg 中の菌を定量培養して定菌数を定めた後、時日を追つて、実験 I, II では 20 週迄、実験 III では 15 週迄、1 群 2~3 匹宛剖検し、肉眼的所見と共に臓器の定量培養による菌数の消長を追求した。

臓器からの還元培養に当り、H₂ および BCG の場合には、1% NaOH 処理後 10 倍段階希釈を行つて一臓器各希釈段階毎に 5 本の小川培地を用いて培養し、4 週後の集落数を以て判定したが、OV₂₀₅ はグリセリン含有培地には甚だ発育が悪く、また D₁₅ はグリセリン非含有培地に一層よく発育しうるので、この両株に対してはグリセリンを含まない小川培地を用いた。Vole Bacillus の場合は、還元培養によつて菌集落を発生するのは 4 週以後であるので、培養を 10 週迄行い、10 週目の集落数を以て判定した。生菌数の算定には、10~100 個の算定可能な集落を生じた希釈段階から計算して、臓器 10 mg 中の生菌単位数とした。

ツ反応は各群共毎週 100 倍希釈旧ツベルクリンを以て検査した。

3 実験成績

実験 I OV₂₀₅, D₁₅ および BCG の比較

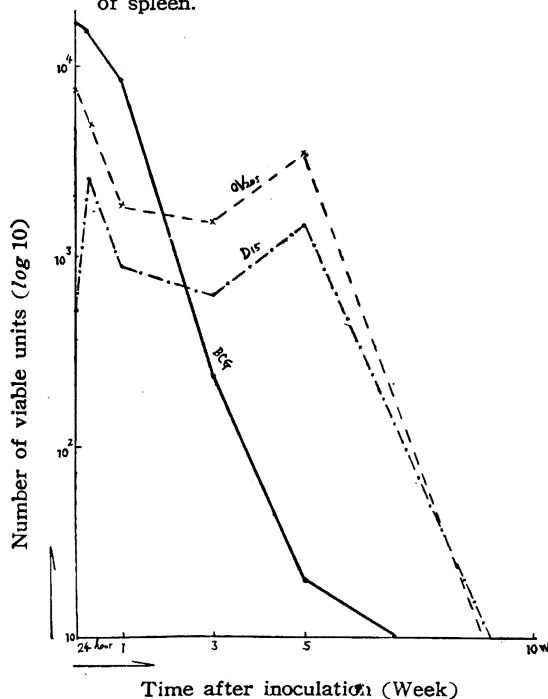
BCG は Sauton 2 代 10 日培養、D₁₅ は Sauton 2 代 21 日培養の各菌膜からそれぞれ菌液を作つたが、OV₂₀₅ は Sauton 培地表面に容易には発育しないので、グリセリンを含まぬ小川培地上の 21 日培養から集落を掻き取つて菌液とした。菌液の濃度を 5 mg/ml とし、その 0.2 ml 宛を天竺鼠足静脈内に注射した。接種生菌単位数はそれぞれ、OV₂₀₅ : 64.8×10^5 , D₁₅ : 38.0×10^5 , BCG : 78.8×10^5 で、BCG は Vole Bacillus のおよそ 10 倍であつた。

剖検は注射後 24 時間、3 日および 1, 3, 5, 10, 15, 20 の各週に 1 群 2 匹宛を行つた。

Table 1 Autopsy findings of guinea pigs inoculated with D_{15} , OV_{205} and BCG. (Exp. I)

Exp. Group	Time after injection (Week)	G.P. No.	Tuberculin R. (mm)	Lymphnodes		Viscera			
				Retro-periton	Port al	Lg.	Liv.	Sp.	Sp. Wg-ht(g)
Vole Bac. D_{15} 1 mg (vu: 38.0×10^6)	1	915 916	/	+					0.6 1.3
	3	917 918	16 17	+	##	##	+	###	6.3 3.5
	5	920 924	0 17	+	+	+	+	##	3.1 3.8
	10	921 923	21 0		+			+	2.0 8.8
	15	925 926	23 18		##				3.5 1.7
	1	895 896	/		+				1.5 1.0
Vole Bac. OV_{205} 1 mg (vu: 64.8×10^6)	3	897 898	13 15	+	##	##	+	##	3.6 3.9
	5	899 900	17 18	+	##	##	+	###	3.6 5.2
	10	901 902	20 23	+	##			+	2.9 1.7
	15	903 905	22 19		+				3.2 1.2
	1	935 936	/			##			1.4 2.4
	BCG 1 mg (vu: 78.8×10^6)	3	937 938	16 16	+	##			##
5		939 940	26 23	+	+				1.8 4.3
10		941 942	23 20						1.7 1.7
15		944 945	22 22						2.2 1.4

Fig. 1 Fate of vole bacillus and BCG in 10mg of spleen.



ツ反応は、 D_{15} 群の 2 匹を除き、全例 3 週以後 10mm 以上の硬結を呈した。剖検所見は表 1 の如くで、淋巴腺腫脹も臓器の結節形成やなかんずく脾腫も、BCG 群では接種生菌単位数が約 10 倍量であるにもかかわらず、Vole Bacillus 群よりも明かに軽微であつた。Vole Bacillus の両群間にはこれらの点ではほとんど差異がなく、接種後 3 ~ 5 週頃に門脈腺腫脹、著明な脾腫ならびに殊に脾の微細な無数の結節形成を認めたがこれらの変化は 10 週以後は著明に消褪し、15 週以後全く結節を認めえなかつた。

脾 10mg 中の菌の消長は図 1 の如くである。BCG では 24 時間後の定着菌数に比してほとんど増加傾向が見られず、3 週以後急速に菌数を減じている。これに対し、Vole Bacillus 群では両菌株共は、同型の消長曲線を描き、1 週後一旦菌数をやや減するが、3 ~ 5 週にかけてほぼ定着菌数と同等あるいはそれを凌駕する程度に達し、5 週以後は急速に減少して、10 週目には D_{15} 群の 1 匹の脾に 100 個内外の菌を

認めた以外は僅かに数個となり、15 週目以後はどの臓器からも菌を検出しえなかつた。肝では脾とほぼ同一傾向をとり、また肺では、3 ~ 5 週に著明な菌数増加の傾向を示したが、10 週目には数個以内に減じた。

実験 II 菌量を異にした場合の OV_{205} の消長

前実験によつて、Vole Bacillus と BCG との天竺鼠体内における増殖、消滅の過程が異なることがわかつたが、Vole Bacillus では 1 週目にやや菌数を減じてから、3 ~ 5 週に至る間かなり急峻な増殖を示すので、 OV_{205} を用いて、菌量の多い場合と少ない場合について、菌数の消長をしらべた。

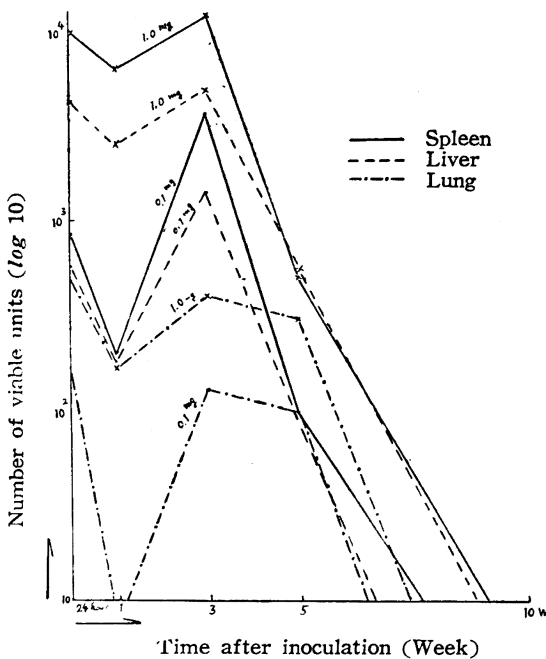
OV_{205} 菌液は実験 I と同様に、グリセリンを含まない小川培地 21 日培養の集落を掻き取つて作り、大菌量群は 1mg/0.4ml、少菌量群は 0.1mg/0.4ml 宛を静脈内に注射し、注射後 24 時間および 1, 3, 5, 10, 15 の各週に剖検して、肉眼所見の検索と臓器の定量培養とを行つた。接種生菌単位数は、大菌量群では 96.5×10^6 、少菌量群では 96.5×10^4 である。

ツ反応は大量群では少量群よりも早く現われ、3 ~ 5 週における淋巴腺腫脹も脾腫も少量群より著明で、かつ結節形成も脾において特に著しかつた。ただしこれらの変化も実験 I の場合と同様に、10 週以後にはほとんど認めえない程度に消褪した (表 2)。

Table 2 Autopsy findings of guinea pigs inoculated with *OV*₂₀₅. (Exp. II)

Exp. Group	Time after injection (Week)	G.P. No	Tubercul. R. (mm)	Lymphnodes		Viscera				
				Retro-periton	Portal	Lung	Liv-er	Sp.	Sp. Wght(g)	
Vole Eac. <i>OV</i> ₂₀₅ 1mg (vu : 56.5×10^5)	1	953 954	/						0.7 0.7	
	3	955	16		##	##		##	4.0	
		956	17		##	+		###	4.0	
	5	957	20		+	##	+	+	###	3.5
		960	17		+	##	+	+	##	4.4
	10	958	26		+	+				2.0
959		23		+	+			+	2.0	
15	961	17			+				1.4	
	962	21							2.5	
" 0.1mg (vu : 56.5×10^4)	1	967 968	/						0.6 0.6	
	3	969	8					###	2.0	
		970	13		+	+		+	1.2	
	5	971	23		##	+	+	##	4.3	
		972	21		##	##		##	3.6	
	10	973	25		+	##				2.0
974		25		+	+				1.4	
15	988	21							2.0	
	989	16							2.0	

Fig. 2 Fate of vole bacillus, *OV*₂₀₅, in 10 mg of viscera.



臓器内菌数の消長は図3に示す如くである。すなわち両群共いずれの臓器においても、1週目にはかなり菌数を減じ、ついで3週目にかけて急激な増加を示している。この傾向は実験Ⅰと同様である。菌数増加の程度が少量群の方に明かに著しいことは興味深い。その後、菌の消失は少量群に早く見られ、5週目には著しく菌数を減じ、10週目にはせいぜい数個を認めるにすぎぬ程度となった。大量群では、5週目に各臓器共なお数百個の菌

を含んでいたが、10週目にはいずれも数個以下となった。

実験Ⅲ *OV*₂₀₅, *D*₁₅および*H*₂の比較

前2実験からは生体内における接種菌の動態がわかつたので、予め定着菌数を予定し、実験を円滑に行う目的から、*H*₂ および *D*₁₅ はいずれも凍結乾燥して生菌単位数の明かなものを用いたが、*OV*₂₀₅ のみは当時これを行いえなかつたので、前2実験と全く同様にして菌液を作製した。接種生菌単位数は前実験の成績に鑑みてそのOrderを1つ下げることとし、0.1mg/0.4ml宛を天竺鼠静脈内に接種した。接種生菌単位数はそれぞれ、*OV*₂₀₅ : 38.5×10^4 , *D*₁₅ : 10.5×10^5 , *H*₂ : 31.3×10^4 で、*OV*₂₀₅ と *H*₂ とはほぼ同一菌数であった。剖検は、接種後24時間目および

2, 4, 8, 10の各週に行い、1週目は行わなかつた。

反応は*H*₂群では早くも2週目に現われ、臓器の肉眼所見も他の2群に比して極めて高度で、10週に至るもほとんどその程度を減じていない。これに対して *Vole Bacillus* 群では、4週目に相当強い淋巴腺腫脹、脾腫、結節形成が見られたが、それらの変化は8週以後には明かに軽減していた。殊に *OV*₂₀₅ 群では、全経過を通じて脾腫は余り著明でなかつた(表3)。

臓器内菌数の消長は図3に示す如くである。本実験では1週目の剖検および培養を行っていないので、前2実験の場合のような1週目における菌数減少があつたか否か不明であるが、第2週をPeakとする著明な菌数増加がみられた。増加の程度からみれば、*H*₂ が最も顕著で、*OV*₂₀₅ が最も緩やかであるが、やはり実験Ⅱにおける*OV*₂₀₅ の示したと同様な菌数増加傾向が見られている。このような菌数増加の点のみからみれば、*Vole Bacillus* も有毒菌と相似た経過を辿るということになる訳である。2週目をPeakとして、その後は *Vole Bacillus* 群も*H*₂群も共にかなり急速に菌数を減じているが、*H*₂ では10週に至つてもなお数百個の菌を脾から培養しえているのに対して、*D*₁₅ では8週目にすでに1~2個という極めて少い菌数となり、また *H*₂ と同一生菌単位数を接種した*OV*₂₀₅ では全く菌を証明しえなくなつている。このような速かな臓器からの菌の消失過程は、臓器の肉眼的所見の消褪速度と共に、*H*₂ とは明かに相違する点である。

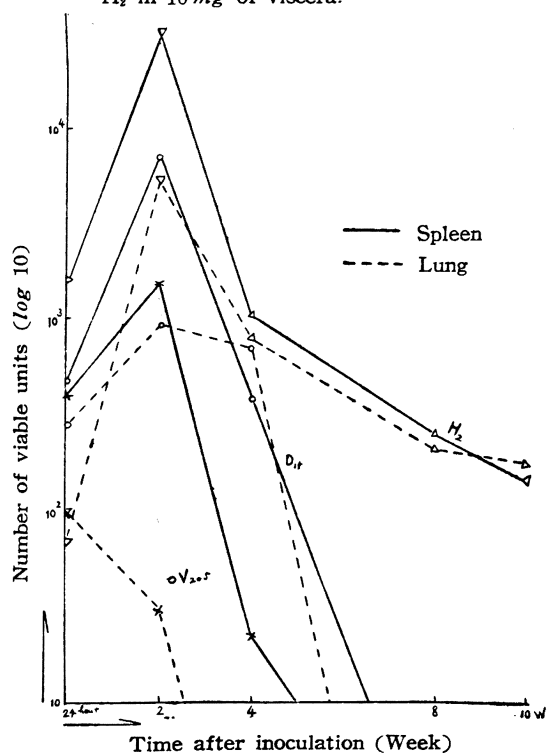
4 総括考案

天竺鼠の皮下および静脈内に *Vole Bacillus D*₁₅ を接種してそのVirulenceを検討した前報告(23)において、*D*₁₅ のVirulenceはBCGよりも強く、*H*₂ よりも明

Table 3 Autopsy findings of guinea pigs inoculated with D_{15} , OV_{205} and human type H_2 . (Exp. III)

Exp. Group	Time after injection (Week)	G.P. No	Tuberculin R. (mm)	Lymphnodes			Viscera			
				Retro-periton	Portal	Tracheal	Lg.	Liv.	Sp.	Sp.wght (g)
Vole Bac.	2	83	7		##					0.9
		84	6							0.7
D_{15} dried	4	85	17	+	##	##	##	+	##	2.7
		86	20	+	##	##	##	+	##	3.3
		87	20	+	##		+	##	##	3.2
0.1mg (vu: 10.5×10^5)	8	88	26	+	##				##	1.9
		89	27	+	##		+		+	1.7
	10	91	24	+	##				+	1.2
		92	24		##					1.1
	2	94	8							0.7
		97	7							0.7
OV_{205} 0.1mg (vu: 38.5×10^4)	4	98	18		+				##	1.2
		99	20	+	+		+		##	1.5
		100	18	+	##		+		##	1.2
	8	101	27	+	+				+	0.7
		102	24		+				+	1.4
	10	103	24		+				+	1.2
		104	24							1.0
human type H_2 dried (vu: 31.3×10^4)	2	107	17		##	##	##	+	##	2.0
		108	17		##	##	##		##	2.7
	4	109	25	+	##	##	##	##	##	4.2
		110	24	+	##	##	##	##	##	3.5
		111	20	##	##	##	##	##	##	3.5
	8	112	31	##	##		##	##	##	2.0
		113	29	+	##		##	##	##	5.7
		114	20	+	##	+	##	##	##	6.0
	10	115	23	+	##	+	##	##	3.0	

Fig. 3 Fate of vole bacillus and human type H_2 in 10 mg of viscera.



かに弱いことを述べた。本実験ではさらに OV_{205} を加えて、 D_{15} と OV_{205} 相互の比較のみならず、これら2株と ECG および H_2 との比較を行い、重ねて Virulence を検討した。菌の Virulence を検討する場合にわれわれは多くの接種経路を持つているが、ある期間体細胞の影響を恐らくはほとんど受けることなしに菌が増殖する過程を掴み得る方法として、直接目標とする臓器に到達せしめうる静脈内接種方法を選んだ。

前報告の成績³⁾から、 D_{15} は接種後3～5週をほぼ頂点とする増殖、消滅の消長曲線を描くことが推察されたが、本実験において接種生菌単位数を $10^4 \sim 10^5$ 程度にして追求してみると、前報告の場合とほとんど変わりなく、2～3

週に頂点を有するかなり急峻な消長曲線を描くことが確かめられた。この曲線の内、上昇曲線は BCG では全く認められず、むしろ H_2 のそれに酷似する程の急峻さを示すが、2～3週後の頂点を過ぎれば再び急激に減少して、 H_2 の減少曲線とは明らかに相違した傾向を示している。すなわち天竺鼠臓器内ではほとんど増殖曲線を認めえない程度にしか弱い増殖を営みえない BCG に対して、 D_{15} および OV_{205} は共に著明な増殖を営みうる点において、その Virulence は天竺鼠に対して BCG よりも明らかに強いといえるのである。しかし減少曲線の側から見れば、その傾向は H_2 よりも遙かに急峻であり、菌の消失が早く、したがって2～3週以後体内に成立した免疫によつて容易に消滅されることを示している。この点は、その Virulence が H_2 よりも弱いことを示すものと思う。

このような菌数の消長の差は、ツ反応の出現の遅速および臓器の肉眼的所見の異同とよく一致している。すなわち、BCG 群では淋巴腺腫脹や結節形成など甚だ軽微で脾腫も著明でなかつたが、 OV_{205} および D_{15} では接種生菌単位数がほぼ $1/10$ であるにもかかわらず、3～5週頃著明な脾腫や結節形成を示し、それらの所見からはかなり Virulence の高いものであるかの如き印象を与えている。しかしそれ以後、菌数の激減に伴い、これらの臓器所見は急速に消滅し、8～10週を経過すればほとんど異常を認めぬ程度に達するのであつて、この点は H_2

接種群の臓器所見とは著しく趣を異にしている。したがってその Virulence は、体内に産生された免疫力によって速かに菌消失を来す程度の、極めて限定された程度のものであろうと推察される。

菌数消長曲線を比較して興味ある点は、実験 I, II において、接種生菌単位数の多少にかかわらず、D₁₅ および OV₂₀₅ 共に 1 週目にかかなり著明に減少し、それが 3 週目に向つて再び急激に増加していることである。実験 III では 1 週目の剖検を行っていないのでこの点は不明であるが、恐らくは、定着した菌がその環境に適応しうる迄のある期間死滅する割合が相当多かつたことを示すものではあるまいか。in Vitro における培養の困難さから、そのような想像も出来そうである。また実験 II において、少菌量の場合に 3 週目に向つて大菌量群よりも急峻な増加傾向を示しているが、このことは、免疫発生に対してある一定の菌数水準に到達する必要があることを示すものかもしれない。しかしこの成績のみからはもちろん速断することは出来ない。

Vole Bacillus の 2 株、OV₂₀₅ と D₁₅ との間には、臓器の肉眼所見および菌数の消長から見て、僅か乍ら差異があるように見える。しかしそれぞれの接種生菌単位数にも多少宛の差があり、かつ少く共 BCG や H₂ など、それぞれの株との間に存する程に顕著な差異ではないので、本質的な差異と考える必要はなからうと思う。

なお、in Vitro で dysgonic な發育をしか営みえないにもかかわらず、特に OV₂₀₅ が in Vivo では上述の如く急速な分裂増殖を営みえた点は極めて興味が深く、培養条件の検討に示唆するところが甚だ多い。

5 結 論

Vole Bacillus OV₂₀₅ および D₁₅ の Virulence を BCG

ならびに H₂ と比較する為に、天竺鼠静脈内に接種し、時日を追うて剖検、肉眼所見ならびに臓器内菌数の消長を追求した。

BCG 群では肉眼的病変は極めて軽微であるが、Vole Bacillus 群では接種後 3～5 週に著明な脾腫、結節形成、淋巴腺腫脹等を来した。しかしこれらの所見は 8～10 週後にはほとんど消失し、同時期における H₂ 群とは明かに相違している。

臓器内菌数は、BCG 群ではほとんど増加を示さず急速に減少するが、Vole Bacillus 群では 2～3 週頃に頂点を有する著明な増殖を示し、以後急速に減少して 8～10 週にはほとんどかあるいは全く菌を証明しえなくなる。この点は H₂ と甚だ異なるところで、H₂ 群ではこの時期に至つてもなお相当数の菌を含んでいる。

以上の成績から、Vole Bacillus OV₂₀₅ および D₁₅ の天竺鼠に対する Virulence は、BCG よりも明かに強いが、H₂ よりも明かに弱く、ある限定された程度のものであるといふと思う。OV₂₀₅ と D₁₅ との間には著しい差異は認めえなかつた。

本実験の要旨は第 30 回日本結核病学会において報告した。

擧筆に臨み御校閲戴いた柳沢部長に深謝する。

文 献

- 1) Wells, A.Q.: The munitype of tubercle bacillus, Medical Research Council sp. Rep. Ser. No.259, 1946.
- 2) 室橋・関・高野: 結核 26(7). 329—336. 1951,
- 3) 室橋・関・高野・吉田: 結核 27(3). 144—148, 1952