

Streptomycin 依存性結核菌の分析に基いた結核症の 感染と免疫に関する実験的研究

第 2 報 Streptomycin 依存性菌逆変異株の菌力について

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳沢 謙)

橋 本 達 一 郎

(受付 昭和 29 年 11 月 10 日)

Streptomycin (SM) を増殖に要求する結核菌が、SM を必要としない菌に変異した場合、これに伴う菌力の変化を調べることは、SM 依存性菌の無毒性がいかなる因子によるかを明らかにするとともに、ひろく結核菌の菌力に関する変異の動態について洞察することを可能にするであろう。Doane および Bogen¹⁾ は SM 依存性結核菌から強毒の逆変異菌をえており、Bacon 等²⁾、Garber 等³⁾ および Formal 等⁴⁾ の実験によれば、*S. typhosa* や *K. pneumoniae* からのプリン要求性無毒株が、プリン要求性を喪失すると強毒に復帰する場合のあることを示している点からみて、無毒の依存性菌を生菌ワクチン等に利用しようとする場合には、逆変異菌の発生率とその菌力が充分考慮されねばならない。

著者は前に⁵⁾ SM 依存性結核菌 18b 株の継代第 4 代および第 5 代から分離した SM 感受性の逆変異菌 2 株が、てんじくねずみ皮下接種を行った結果無毒であつたことから、18b 株の無毒化は必ずしも SM 依存性変異のみによるものではなく、他の菌力の因子の変異によるのではなからうかと推測した。Bacon 等²⁾ はプリン要求性 *S. typhosa* において、プリン要求性を失つても菌力が復帰しない場合は、他の菌力に関係ある因子による変異のために無毒化が起つていると考えられる成績をえており、又一方、結核菌群においては、SM 要求性変異とは独立に弱毒又は無毒菌への自然解離が絶えず起つていると考えられるからである。

しかし用いた逆変異菌は、単一集落でなくて集落群であつた点と、結核菌の菌力を皮下接種法だけで検討することは不適當であるということが判明した⁶⁾ ので、ここに報告する実験では、以上の諸点に吟味を加えて、SM を増殖に必要としない逆変異菌の菌力を詳細に検討した。

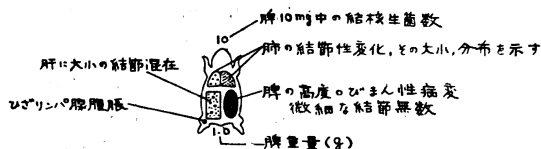
実験方法

分離 SM 依存性菌 (18b 株) を、SM 100 r/ml 又は 200 r/ml 含有の Kirchner 寒天培地に継代し、適当な代数の培養から、その発育に SM を必要としない逆変異菌株を分離した。その方法は蒸留水で充分洗つた SM 依存性菌を 10 mg/ml の蒸留水浮遊菌液にして、SM を含まない Kirchner 寒天平板に 3 mg ずつ接種して、37°C

で培養し、出現した多数の集落の中から at random に集落をとりだし、その SM 感受性を調べた。

逆変異菌各株を分離後 SM を含まない小川培地に同一条件で 5 代継代し、これを凍結乾燥して予め生菌数を測定しておき、既知生菌数を含む各菌株の同一菌液を用いて、同時に次の各経路により、てんじくねずみに接種し菌力の検討を行った。てんじくねずみはすべて体重 350 ~ 500 g, Römer 反応陰性のものを用いた。

(1) 皮下接種法： てんじくねずみの右下腹部皮下に 1 mg ずつ菌を接種し、8 週間放置して屠殺剖検した。剖検により各動物のリンパ腺および内臓の結核性病変を観察し、その程度を下図のように記録するとともに、脾の定量培養を行つてその 10 mg 中の生菌数を決定した。



(2) 静脈内接種法： 動物を 2 群にわけ、それぞれの群に 1 mg 又は 0.01 mg の菌を 0.4 ml に含ませて足静脈内に注射した。注射後 24 時間、2, 4, 8 週の各時期に各実験群の動物を 2 匹ずつ屠殺し、肉眼的に臓器の結核性病変を観察するとともに、脾および肺の定量培養を行つてその 10 mg 中の生菌数を決定した。なお 1 mg 接種群については 2 週目の脾を組織学的に検査した。

(3) 脳内接種法： 各動物の脳半球内に各菌株の 0.1 mg (0.1 ml) ずつを注射し、動物の生存日数を測ると同時に、後肢マヒ出現状態および体重の増減をしらべた。動物が死亡しない場合は 3 カ月間飼育して観察した。

各動物のツベルクリン・アレルギー測定は屠殺直前 100 倍ツベルクリン 0.1 ml 皮内注射 24 時間後の反応によつた。

動物臓器の定量培養は次のように行つた。まず 300 mg 前後の臓器片を無菌的に切り出し、これを乳鉢でよくすりつぶし、1% NaOH 溶液を加えて 100 mg/ml の臓器乳剤とする。これを蒸留水で 10 倍段階希釈して各段階を小川培地 2 本ずつに接種、37°C 4 週間培養し、平均 100 以下の集落を生じた段階から算定して臓器 10 mg 中の生菌数を決定した。

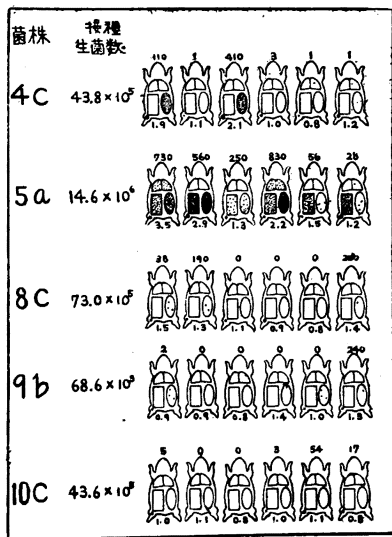
実験成績

SM 依存菌 18b 株の逆変異率: SM 高濃度含有 Kirchner 寒天培地 継代第 11 代および第 25 代の 18b からの逆変異率は、それぞれ $1:4.8 \times 10^6$ および $1:4.3 \times 10^6$ でほぼ等しい。逆変異菌の集落は R 型で、もとの H₂ 株又は 18b 株と形態学的にも発育速度についても殆んど変化はない。

逆変異菌の SM 感受性: 逆変異菌は常に SM 100 γ/ml 含有培地には全く発育しないが SM を含まない培地には小川培地でも Kirchner 寒天培地でも旺盛な発育を行う。しかし SM 感受性について、各逆変異菌の population が全くもとの SM 感受性 H₂ 株と同一であるとはいえない。それは SM 200 γ/ml 含有培地培養の継代第 25 代の 18b 株から逆変異菌集落 25 を任意にとり出し、各株の $10^{-4} mg$ を SM 含有量 1, 10, 100 γ/ml Kirchner 寒天に接種して培養すると、いずれの培地にも全く発育しないものが 10 集落、1 γ/ml SM 培地に発育をみるものが 14 集落、さらに 10 γ/ml SM 培地にも僅かな発育を行ったものが 1 集落であった。いずれの場合も SM を含まない培地での発育が最も旺盛であり、又 100 γ/ml SM 培地には発生集落を認めなかつた。

逆変異菌のてんじくねずみに対する菌力: 継代第 25 代の 18b 株からの逆変異菌 4c, 5a, 8c, 9b および 10c の 5 菌株について 3 接種経路から菌力をしらべた。これら 5 株の SM 感受性は次のようである。8c および 10c は SM 1 γ/ml の培地に発育せず、4c および 9b は SM 1 γ/ml では発育は認められるが 10 γ/ml では発育を阻止される。5a のみは 10 γ/ml SM 培地にも僅かな発育を示した。

表 1 SM 依存菌逆変異各菌株をてんじくねずみ皮下に 1 mg 接種後 8 週目の結核性病変



逆変異菌 5 株の皮下接種法による菌力の強弱は表 1 に示す。接種動物の一部に強い結核性病変をひきおこすことのできた 2 菌株の中、生菌接種量の多い 5a の方が 4c よりも強い結核性変化をおこしている。他の 3 株はこれにくらべて甚しく菌力が弱く、脾にわずかに結節をつくる程度である。中でも 10c は 4c と接種生菌数がほぼ同じであるにも拘らず、接種動物の内臓にいかなる結核性病変も生じなかつた。これら 3 株は接種動物の脾からの還元培養菌数からもその菌力の弱いことが認められ、脾に全く菌の侵入していない動物もあつた。ツベルクリン・アレルギーの惹起力は 5 株ともその菌力とは関係なく、いずれも著しく強い。菌力の差の甚しい 5a と 10c を比較しても、8 週目におけるアレルギーの強度には殆んど差が認められなかつた。

静脈内に注射された菌の臓器における増殖力並びに病変によつて 5 株の菌力をみると、表 2, 3, 4 のようになる。結核菌の増殖環境として好適な脾における初期の (2 週迄の) 増殖力を比較すると、散布菌数の少ない 0.01 mg 注射群の方が 1 mg 注射の場合よりも脾内増殖力の強弱を明瞭にあらわしている。すなわち、4c, 5a の 2 株は 100 倍以上に増殖し、他の 3 株はそれぞれに増殖率が低下している。殊に 5a の 1 mg 接種群は動物が次第に衰弱して 8 週迄生存することができなかつた。肉眼的結核性変化も、5a が最も強く 4c がこれについて強い。

8c, 9b, 10c の 3 菌株の中、0.01 mg 接種群の脾における増殖力では 8c が最も強く、9b は 2 週で約 50

表 2 SM-依存菌逆変異各菌株の 1 mg および 0.01 mg を、てんじくねずみの静脈内注射後、脾 10 mg における生菌数の消長

菌株 No. および 1mg 中の 生菌数	静脈内 注射菌量 (mg)	静脈内注射後、各時期における 脾 10 mg 中の生菌数*			
		24 時間	2 週	4 週	8 週
4 c 43.8 × 10 ⁵	1	5,200	16,000 26,000	1,170 —	2 23
	0.01	26	2,800 4,200	660 2,200	330 82
5 a 14.6 × 10 ⁶	1	13,000	13,500 21,500	7,850	死亡
	0.01	90	17,000 16,500	4,500 5,500	81 26
8 c 73.0 × 10 ⁵	1	9,850	12,500 9,000	80 980	13 42
	0.01	35	3,950 1,050	580 180	3 76
9 b 68.6 × 10 ⁵	1	4,550	5,300 5,200	470 80	270 55
	0.01	26	1,700 1,150	30 730	320 1
10 c 43.6 × 10 ⁵	1	3,450	5,950 9,400	260 110	0 0
	0.01	29	70 47	700 370	13 107

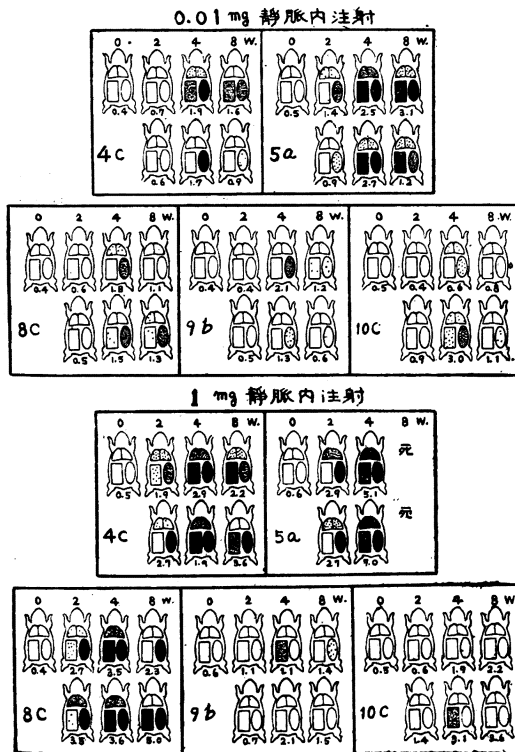
* 各菌株の各菌量につき、24 時間値は動物 1 匹の値
2 週以後の各数値は動物 2 匹のそれぞれの測定値
—: 測定せず

表 3 SM-依存菌逆変異各菌株の 1mg および 0.01 mg を、てんじくねずみの静脈内注射後、肺 10mg における生菌数の消長

菌株 No. および 1mg 中の 生菌数	静脈内 注射菌量 (mg)	静脈内注射後、各時期における 肺 10mg 中の生菌数*			
		24 時間	2 週	4 週	8 週
4c 43.8 × 10 ⁵	1	2,600	5,900 4,100	860 30	22 0
	0.01	8	—	50 10	0 0
5a 14.6 × 10 ⁵	1	14,000	40,000 45,500	110,000 375,000	死亡
	0.01	63	—	4,000 460	150 180
8c 73.0 × 10 ⁵	1	3,950	5,450 15,000	2,850 14,000	0 8
	0.01	9	—	260 0	4 1
9b 68.6 × 10 ⁵	1	1,450	880 460	440 150	0 2
	0.01	18	—	930 40	0 0
10c 43.6 × 10 ⁵	1	2,000	1,300 2,000	130 50	41 7
	0.01	8	—	140 0	0 0

* 各菌株の各菌量につき、24 時間値は動物 1 匹の値
2 週以後の各数値は動物 2 匹のそれぞれの測定値
—: 測定せず

表 4 SM 依存菌逆変異株をてんじくねずみに接種後、0, 2, 4, 8 週の各時期における結核性病変



倍の増殖でこれにつき、10c は約 2 倍の増殖で最も弱い。殊に 10c は 4c と注射生菌数がほぼ同一であり、従つて又脾 10mg 中の 24 時間値が殆んど等しいが、2

週後には 4c は 100 倍以上に増殖し、10c は約 2 倍の増殖しかない点からみれば、両菌株の脾における増殖力の差異は極めて顕著である。1mg 接種群の結核性病変では、8c は 4c、5a の 2 株とほぼ同じく強い病変を呈し、9b、10c の 2 株が著超する病変とは顕著な差がある。しかし増殖力の最も弱い 10c も或程度の病変を生じるが、それが時の経過とともに消失する傾向をみせている。9b にも同様な傾向がみられる。

肺では増殖力の比較は脾よりも不明瞭であるが、1mg 接種群では 2 週目に 4c、5a、8c の 3 株がいずれも増加しているのに対し、9b、10c の 2 株は減少し、しかも 8 週迄持続的に菌数が減少してゆき消失する傾向を示している。

脳内接種法による菌力の比較は表 5 に示す。生存日数についてみると 4c、5a はそれぞれ平均 26 日、22 日で動物を殺し強毒であるが、8c は全部死亡させず、又動物の生存日数も長く個体差が大きい。9b、10c の 2 株では接種後 3 カ月間死亡動物を認めなかつた。しかし 10c 接種動物が殆んど無症状で生存したのに対し、9b 接種動物はすべて後肢マヒを発現した。

生存日数、体重減少量から判定すれば脳内接種による 5 株の菌力の順位は 5a > 4c > 8c > 9b > 10c となる。この順位は同じく臓器内増殖力を反映する静脈内接種法による菌力の順位とほぼ一致する。しかし、さらに侵入力の因子が加わる皮下接種法では、上記 2 法による菌力の表示と平行しない点もある。

表 5 SM-依存菌逆変異各菌株の 0.1 mg てんじくねずみ脳内接種

菌株	接種生菌数	動物数	動物 1 匹の平均値		各動物の 生存日数
			生存中の 体重増減	側後肢マヒ までの日数	
4c	43.8 × 10 ⁴	3	-103(g)	20.5	20, 25, 32
5a	14.6 × 10 ⁵	4	-110	17.7	19, 19, 20, 30
8c	73.0 × 10 ⁴	3	-3	28.0	31, 77, S
9b	68.6 × 10 ⁴	4	+145	29.0	S, S, S, S
10c	43.6 × 10 ⁴	3	+180	発現せず*	S, S, S

S: 3 カ月間生存

* 3 匹中 1 匹は 42 日目に発現し、56 日目に消失

5 株を 1mg 静脈内接種した各動物の 2 週目の脾を組織学的に検索すると、9b と 10c の接種動物の脾では切片上に結核病巣がみつからない。

この脾は肉眼的にも所見がなかつた。しかし肉眼的に著しい病変を示していた他の 3 株を接種した脾では、いずれも同様にリンパ濾胞を中心に少数の大きい類上皮細胞結節、赤髄中には極めて小さいものが相当数にみられた。結節構成細胞は H₂ 株による普通の結核結節と変りはない。

又皮下接種後 8 週目の剖検時に 8c、9b、10c 接種動

物の脾から還元培養された動物通過菌の菌力を 1 mg 皮下接種法で全く同様にしらべてみると、いずれも 10^7 以上の生菌を接種したにも拘らず、てんじくねずみに引き起された病変は軽度であつた。殊に 10c では臓器に殆んど病変が認められず、この菌株は動物通過によつても菌力の上昇がないことを示した。

最後に上記 5 株に加えて、同じ第 25 代の 18b からの逆変異菌 20 株について脳内接種法のみで菌力をしらべ、それと SM 感受性との関連をみた成績を総合すると、菌力と SM 感受性度の間には何の関連も認められなかつた。

総括および考察

SM を高濃度に含む培地に長期間にわたつて継代された依存性結核菌から、その増殖に SM を必要としない菌を一定の率で分離することができたが、その大部分は低濃度の SM で既に増殖を抑制され、継代培地の SM 濃度 (100 r/ml) では全く発育しない故に、明らかに逆変異菌であり、変異発生後まもなく、殆んど増殖しない状態のまま SM を含まぬ培地によつて分離されたと考えられる。従つて菌液をつくる場合に機械的に菌塊を分離させる方法を用いても、同一の clone に属するものが分散する可能性は少ないと思われ、このことは結核菌群における菌力に関する変異の濃度を推定し、ある population の菌力構成を考察する上に有利な点であると思う。

SM 依存性結核菌の逆変異菌として、Yegian 等⁷⁾、Lenert 等⁹⁾および Vanderlinde 等⁹⁾は SM 耐性菌をえているが、この場合 Hurwitz 等¹⁰⁾の指摘するように、容易に SM 耐性菌と移行しあう「不安定な依存性菌」を対象として実験を行つた可能性が否定できない。しかし牛場等¹¹⁾は *S. enteritidis* の SM 依存性菌からの逆変異は SM 耐性であり、一定の率で SM の有無に関係なく生じていることを報告しており、Herzberg 等¹²⁾は SM 依存性 *Brucella melitensis* の逆変異菌 100 株の中、98 株が SM 感受性で 2 株のみが SM 耐性であつたとしていることから、依存性菌から SM 耐性菌の変異がおこることは確かであり、SM を必要としない変異菌がすべて SM 感受性菌ではなく、この点逆変異という言葉は妥当でないかもしれない。著者の成績では、10 r/ml の SM 含有培地に僅かな発育をする菌は 25 の逆変異菌株中 1 株にすぎなかつたが、高濃度の SM 培地に発育する完全耐性菌株は全くなかつた。このことは SM 依存性から感受性への変異は SM 耐性とは無関係におこりうるし、その逆も可能ではないかと考えしめるのである。

皮下・静脈内・脳内の 3 経路を経て行われた菌力テストの成績を総合すると、任意にとり出した逆変異菌 5 株の菌力は、H₂、H 87 Rv 株の水準にある強毒 2 株、中

等度 1 株、弱毒 2 株である。菌力測定法の中、脳内接種法は方法が比較的簡単な上に結果が明瞭に出る長所をもつているが、この方法で同じ第 25 代の 18b からの逆変異菌株 20 株の菌力をしらべた成績では、動物を殺さない弱毒株は 5 株のみで、他の 15 株は接種動物の全部又は一部を死亡せしめた。従つてこのように菌力の強い逆変異菌の比率が大きいことから、18b 株の無毒化は、もとの強毒の H₂ 株が SM 要求性変異をおこしたため、他の菌力因子には変化がなかつたと考える方が合理的であろう。これは一般細菌の無毒化した栄養要求変異菌において、栄養要求の逆変異に菌力の復帰が伴う場合には、菌力の弱体化は栄養要求変異のみに帰せられていること、無毒の結核菌群では強毒菌への変異が高率におこることではない等の諸点からも考えられる。しかし 18b 株では、一般細菌の栄養要求変異菌と異なり、要求する栄養素の投与によつても感染菌の菌力の強化がみられなかつたことは Herzberg 等の SM 依存性 *Brucella* 菌の場合と同じく¹²⁾、感染細胞内に SM が滲透しにくいために¹³⁾¹⁴⁾増殖を維持できなかつたのではなからうか。

又一方、この逆変異菌の菌力の分布が、長年月比較的菌力の安定している強毒結核菌の population の中でおこつている菌力に関する変異の様態を示すものであれば、著者等が行つた SM 耐性菌の選択における H₂ 菌群の菌力の分析⁶⁾や、BCG や H 87 Ra のような無毒菌、R 1 のような強毒菌が自然解離によつて強毒菌から常に生じていると考える Steenken 等¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾の立場を支持するものであろう。

結核菌の菌力の弱体化、感染発症力の喪失がすべて栄養要求変異のためであるとは考えられないが、これらの変異やその逆変異を利用して無毒結核菌を分離し、生菌ワクチンとしての可能性を検討することもできる。この実験でえられた 10c 株は逆変異を利用してえられた特殊な栄養要求をもたない結核菌で、その菌力は臓器内の増殖力、侵入力の点ではほぼ BCG の水準にあると考えられるが、なお菌力の安定性については十分な検討を要するであろう。

結 論

SM 依存性結核菌 18b 株から、増殖に SM を必要とせず、しかも低濃度の SM の存在で発育を阻止される逆変異菌を一定の率 (約 2:10⁷) で分離することができた。分離変異菌のてんじくねずみに対する菌力の強さには強毒から無毒のもの迄、種々の程度のものであり、その菌の SM 感受性との間には関連がなかつた。逆変異菌における強毒菌の比率が高いことから、SM 依存性 18b 株の無毒化は SM 依存性変異のみによるものであり、菌を貪食した細胞内に SM が滲透しにくいために、SM が極めて大量投与されぬ限り、菌力を発揮しえない

ものと考えられる。又逆変異菌の菌力の分布から、強い菌力を示す H₂ 株の菌群においても、常に弱毒及び無毒の菌力変異株が発生しており、強毒変異菌との均衡が結核菌群の表現する菌力の強さを決定するものと考えられる。

終に柳沢部長の御指導、室橋博士の御校閲に感謝する。組織学的検索については病理部江頭部長の御教示に、脳内接種には高橋宏氏の御援助に深謝する。

文 献

- 1) Doane, E. A. & Bogn, E.: Am. Rev. Tuberc., 64: 191-195, 1951.
- 2) Bacon, G. A., Burrows, T. W. & Yates, M.: Brit. J. Exptl. Pathol., 32: 85-96, 1951.
- 3) Garber, E. D., Hackett, A. J. & Franklin, R.: Proc. Natl. Acad. Sci., 38: 693-697, 1952.
- 4) Formal, S. B., Baron, L. S. & Spilman, W.: J. Bact., 68: 117-121, 1954.
- 5) 橋本達一郎: 医学と生物学, 23: 201-204, 1952.
- 6) 橋本達一郎・関根 修: 医学と生物学, 31: 115-119, 1954.
- 7) Yegian, D., Budd, V. & Vanderlinde, R. J.: J. Bact., 58: 257-259, 1949.
- 8) Lenert, T. F. & Hobby, G. L.: Am. Rev. Tuberc., 59: 219-220, 1949.
- 9) Vanderlinde, J. & Yegian, D.: Am. Rev. Tuberc., 63: 96-99, 1951.
- 10) Hurwitz, C. & Miller, J. B.: Am. Rev. Tuberc., 62: 91-98, 1950.
- 11) 牛場大蔵・高村長司・徐 毓 芝: 医学と生物学, 20: 265-268, 1951.
- 12) Herzberg, M. & Elberg, S.: J. Bact., 66: 585-599, 1953.
- 13) Suter, E.: J. Exp. Med., 96: 137-150, 1952.
- 14) Mackaness, G. B. & Smith, N.: Am. Rev. Tuberc., 67: 322-340, 1953.
- 15) Steenken, W. Jr.: Am. Rev. Tuberc., 38: 777-790, 1938.
- 16) Steenken, W. Jr. & Gardner, L. U.: Am. Rev. Tuberc., 54: 51-61, 1946.
- 17) Steenken, W. Jr.: Am. Rev. Tuberc., 62 (No. 1, Part 2): 22-33, 1950.