

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2報 結核菌のハツカネズミに対する病原性におよぼす
感染経路の影響について

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 12 月 26 日)

病原微生物の菌力を測定することを目的として実験動物に感染症を成立させる場合に、特定の経路を介して微生物を宿主体内に導入することが、その病原性の発揮に極めて重要な意味をもつことは古くからみとめられた事実であった。Dubos¹⁾はその著書“*The Bacterial Cell*”の中で、適当な感染経路をとる場合には宿主に対して高度の病原性を発揮する種々の病原菌が、他の経路から宿主体内に導入される場合にほとんど本来の病原菌としての態度を示さない多くの実例を引用している。これらの事実は、病原微生物の菌力を左右するひとつの factor として常に感染経路を考慮しなければならないことを示唆するのである。

この場合、ある侵入門戸によれば重篤な感染症を惹起しうる病原菌が、何故に他の経路によつては感染症を成立させえないかということが明かにされたならば、その病原菌のもつ病原性の特異性、いいかえれば一連の宿主寄生体関係の総和としての菌力のその病原菌に特異な一面を明かにすることもできるであろう。

ハツカネズミの実験的結核感染においては、静脈内²⁻¹¹⁾、脳内^{8,11)}経気道¹²⁾感染がこの動物を結核罹患に導く確実な経路として用いられている。そして最近、Pierce ら¹¹⁾は一定生菌単位数の結核菌をハツカネズミの体内に導入する場合に、脳内または静脈内菌接種は多数の菌の臓器への分布および旺盛な臓器内菌増殖とそれにつづく著明な臓器病変の設定、さらに宿主の結核死を惹起するけれども、腹腔内や、ことに皮下に菌を接種した場合には臓器から培養される菌数は少くしかも著しく不定であり、確実な結核罹患を成立させえないとのべている。

しかしながらこのように感染経路の相異によつて結核罹患の推移が異なるのはどのような機転によるのかという点は未だ充分に解明されているとはいいがたい。

たとえば皮下感染の場合には、結核菌の宿主への侵襲、すなわち宿主組織内における増殖が抑制され、感染菌数

の大部分が皮下リンパ系の組織によつて速かに殺滅あるいは排除される結果、生残する一部の菌が臓器に分布して小菌数感染と同様の結果を来すのか、それとも一旦宿主への侵襲は成立しても、それ以後に宿主側の抗菌機作が静脈内感染にくらべてより強く発現するために、感染症の進展が停止するのか明かにされていない。

著者らが先に発表したハツカネズミ全身 homogenize 法¹³⁾によると感染全菌数の動向を感染経路の如何にかかわらず追求することができるので、本実験においては異なつたいくつかの経路によつてハツカネズミ体内に注入した同一結核菌群の全菌数の消長を実験的に追求し、宿主体内における結核菌増殖と結核症の進展との関連について以下のような考察をこころみた。

実 験

材 料

1. 動物

実験動物は体重 15g 前後、生後 6 週の雄性ハツカネズミを用い、実験 1 には Na-8 系 (大阪純系試験動物研究所)、実験 2 には SM 系 (中央実験動物研究所) を用いた。実験期間中の飼育は固型飼料 (Oriental Pellet Diet MC5) とキャベツにより、飼育室温度は 15°C 前後に保つた。

2. 菌 株

H₃₇Rv 株: 1954 年に国立予防衛生研究所結核部から分与をうけた菌株を実験室において 4 週ごとに 1% KH₂PO₄ 小川培地に継代し、頻回ハツカネズミを通過させたもので、実験には Sauton 培地に 10 日前後培養した菌を使用した。

H₃₇Ra 株: 1954 年に国立予防衛生研究所結核部から分与をうけ、同様に 4 週ごとに 1% KH₂PO₄ 小川培地に継代したもので、実験には同じく Sauton 培地に 10 日前後培養した菌を用いた。

3. 感染菌液の調製

Sauton 培地培養菌膜を滅菌濾紙上に集菌し、十分に滅菌蒸留水で洗滌したのち、beads flask 法によつて湿菌量 20 mg/ml の菌液を作り、このものを 2500 r.p.m. で 20 分間遠心沈澱してその上清を 0.3 ml ずつ接種した。感染時に菌液の染色標本を作つて菌分散の状態を検鏡し、また 10^3 倍から 10^7 倍までの稀釈菌液を 1% KH_2PO_4 小川培地に播いて、適当な稀釈段階における集落計算から接種生菌単位数を求めた。

4. 培養材料の調製

ハツカネズミの全身組織および臓器をとりのぞいた残りの組織は第1報(13)に記載した全身 homogenize 法によつた。臓器は全臓器を glass homogenizer 中で磨砕し 1% NaOH を加えて全量 5 ml として、これから滅菌蒸留水による階段稀釈液を作つて 1% KH_2PO_4 小川培地に接種した。集落計算はすべて 37°C で 4 週間培養したのち、10個ないし 100 個の集落が数えられる稀釈段階についておこない、全身および各臓器中の生菌単位数を算定している。

実験 1

Na-8 系ハツカネズミを 60 匹ずつの H_{37}Rv 感染群および H_{37}Ra 感染群に分け、両群とも 20 匹は静脈内、20 匹は腹腔内、のこりの 20 匹は皮下に菌を接種した。接種菌液は H_{37}Rv 株の Sauton 9 日培養、および H_{37}Ra 株の Sauton 11 日培養から調製したもので、表 1 に示すようにいずれも 90% 前後単個菌からなつている。接種生菌単位数は H_{37}Rv : $1.2_2 \times 10^7$, H_{37}Ra : $2.1_0 \times 10^6$ であつた。感染直後、24 時間後、および 1, 2, 3, 4, 6 週後に 2 匹ずつとり出して臓器病変を剖検したのち、全身 homogenize 法により感染全菌数の消長を追求した。

表 1 接種菌液 (20 mg/ml 菌液の 2500 rpm 20 分遠心上清) の生菌単位と菌液の分散状態

実験	菌株	接種生菌単位	1 菌単位中の菌数				
			1	2	3	4	5 <
実験 1	H_{37}Rv	1.2×10^7	89*	6	3	1	1
	H_{37}Ra	2.1×10^6	96	3.6	0.2	0.2	0
実験 2	H_{37}Rv	1.4×10^6	89.6	6.6	2.4	0.9	0.5

*実験 1 では 500 単位、実験 2 では 1000 単位を数えて求めた % 値をあらわす

成績

1. 結核病変の推移

H_{37}Rv 静脈内接種ハツカネズミでは、感染 2~3 週後から高度の脾腫と多数の肺結節形成がみとめられ、感染 1 週後に 1 匹、3~5 週後に 4 匹が死亡、6 週後に残つた 3 匹の平均体重は 11 g (感染時平均より 4 g 減少) で

あつた。腹腔内接種ハツカネズミでは 3 週後から脾腫は静脈内接種ハツカネズミと同様に現われるが、肺の結節形成は 4~6 週後に軽度のみとめられるに過ぎない。また実験期間中死亡するものはなく 6 週後の平均体重は 17.2 g (感染時平均より 2.7 g 増加) であつた。ところが皮下接種ハツカネズミでは 6 週後まで脾腫、肺結節いづれも陰性であり、死亡動物もなく 6 週後の平均体重は 20.5 g であつた。

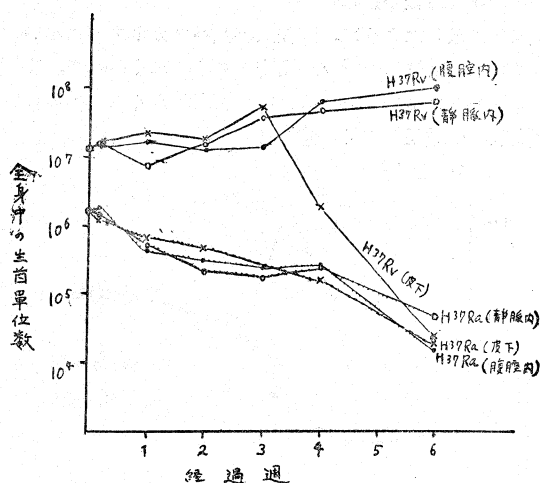
このように結核罹患は静脈内接種の場合には顕著であるが腹腔内、皮下の順に軽度となり、ことに皮下接種の場合には臓器病変の上から見ると全く流産的感染 (abortive infection) に終つている。

一方 H_{37}Ra 接種ハツカネズミではいずれの感染経路の場合も死亡するものなく、6 週後の平均体重は静脈内: 21.2 g, 腹腔内: 21.0 g, 皮下: 23.5 g であつて感染時の平均体重にくらべて 6~8 g の増加を示した。また感染 6 週後まで脾、肺に肉眼的に何らの病変もみとめなかつた。

2. 全身生菌単位数の消長

感染菌株および感染経路による全身生菌単位数推移の差異は図 1 に示した。

図 1 H_{37}Rv 株および H_{37}Ra 株の Na-8 系ハツカネズミ全身中における生菌単位数の消長



まず H_{37}Rv 接種ハツカネズミでは 3 感染経路を介してそれぞれ宿主体内に分布した感染菌群の動向の間に感染 3 週後までは大差がみとめられない。3 週以後も静脈内および腹腔内接種ハツカネズミでは同様に経過して 6 週後に到達する菌数水準はほぼひとしい。ところが皮下接種ハツカネズミでは 3 週後を境として急激な菌数減少がおこり、6 週後には接種生菌単位数の $1/100$ 以下に宿主体内菌数水準が低下するのである。

H_{37}Ra 接種ハツカネズミでは 3 感染経路による全身生

菌単位数推移の差異はみとめられないで、いずれの場合にもゆるやかな菌数減少を示し、6週後にはほぼ同一の菌数水準（接種時の $1/100$ ）に低下している。

実験 2

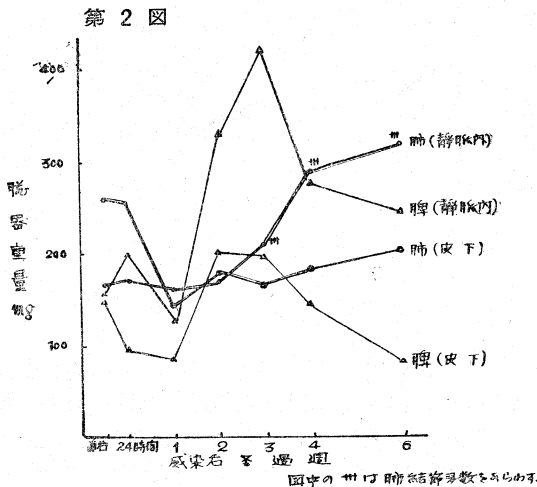
実験1においては、ハツカネズミに対する病原性菌株 $H_{37}Rv$ 株も、皮下経路を介して宿主体内に注入された場合には、非病原性菌株である $H_{37}Ra$ 株と同様にハツカネズミを結核に罹患させないことが示された。この現象をさらに宿主体内菌分布の面から解析するために次の実験をおこなった。

感染ハツカネズミの肺から小川培地に分離し、Sauton-potato 培地に 15 日間培養した $H_{37}Rv$ 株の遠沈上清菌液を、それぞれ 30 匹からなる 2 群の SM 系ハツカネズミに、1 群は静脈内に、他の 1 群は皮下を介して接種した。接種菌液は実験1と同様 90% が単個菌からなり（表1）、接種生菌単位数は 1.41×10^6 であった。感染直後から 6 週後にわたって両群からそれぞれ 4 匹ずつの動物をとり出して 2 匹は全身を homogenize して培養し、のこりの 2 匹は肺、脾、肝の 3 臓器およびこれらの臓器をとりぞいた残りの全組織をそれぞれ培養して、おのおのの部分における菌数推移を別々に測定した。

成績

1. 結核病変の推移

図2に示したように、静脈内接種ハツカネズミにおいては脾腫、肺結節の形成が顕著であるのにくらべて、皮下接種ハツカネズミではこれらの病変が全くみとめられず実験1の結果とよく一致している。



2. 感染時の菌分布

感染直後および 24 時間後における全身中と 3 臓器およびこれらの臓器を除いた残りの全組織内の生菌単位数を表2に示した。すなわち静脈内接種ハツカネズミでは感染菌の大部分は肝に定着し、皮下接種ハツカネズミで

表2 $H_{37}Rv$ 株の静脈内および皮下接種におけるハツカネズミ (SM系) 体内菌分布

	接種直後		接種 24 時間後	
	静脈内	皮下	静脈内	皮下
全身	7.0×10^5 3.9×10^5	6.2×10^5 —	6.9×10^5 3.0×10^5	2.2×10^6 3.3×10^6
肺	5.6×10^3 2.1×10^3	(—) (—)	4.0×10^3 1.4×10^4	(—) (—)
脾	4.3×10^3 1.7×10^4	(—) (—)	2.8×10^4 7.0×10^3	(—) (—)
肝	2.4×10^5 2.1×10^5	(—) (—)	6.4×10^5 4.8×10^5	(—) (—)
臓器外	1.6×10^4 1.5×10^4	5.5×10^5 4.1×10^5	5.8×10^3 3.8×10^3	5.8×10^5 1.3×10^6

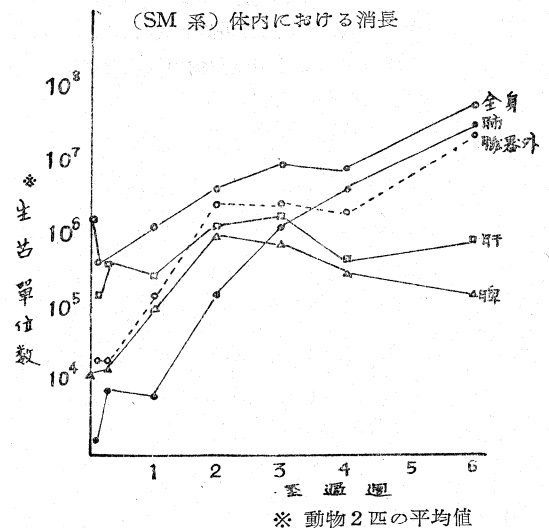
接種生菌単位： 1.4×10^6

は大部分が3つの臓器を除いた組織に分布して臓器に定着した菌数は臓器培養法によつては捕捉されない。

3. 生菌単位数の推移

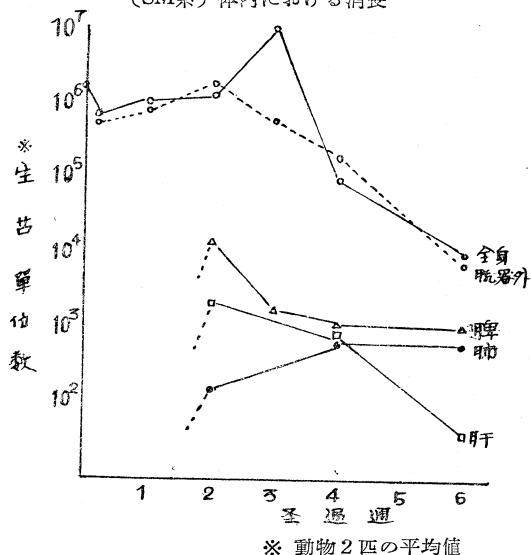
図3、図4に感染直後から 6 週後までのハツカネズミ体内における生菌数の推移を示した。実験1と同様感染 2~3 週後までの増加率には静脈内感染と皮下感染の間に差がみとめられない。この期間中には、いずれの感染経路を介して注入された場合でも、全身の各部分に分布定着した菌群はそれぞれ旺盛に菌数を増加している。小数のために分布の初期に捕捉されなかつたと考えられる皮下感染の場合の臓器内分布菌も、この期間中に臓器培養法で捕捉可能な菌数にまで増加する。

第3図 静脈内感染 $H_{37}Rv$ のハツカネズミ



両感染経路による菌増殖経過の差異は感染 2~3 週以後にはじめて顕著にあらわれてくる。すなわち静脈内感染菌群では 2~4 週の間軽度の増殖抑制がみられたのち再び宿主体内菌数水準は上昇しつづける。ことに肺内

第4図 皮下感染H₃₇Rv株のハツカネズミ (SM系) 体内における消長



菌群では全く増殖の抑制がみとめられない。ところが皮下感染菌群は2週以後に宿主体内のあらゆる部分で顕著に増殖を抑制され、その結果全身の菌群は静脈内感染の場合にくらべて著しく低い菌数水準において宿主とのbalanceを獲得しそれを維持する傾向を示すのである。

考 察

結核菌の病原性現象に中心的な役割を演ずる菌力因子(virulence factor)として, Choucroun¹⁴, Bloch¹⁵⁻¹⁹ら Asselineau²⁰⁻²³ら, Dubos 一派²⁴はそれぞれ特異な生物学的活性を有する菌体脂質画分を結核菌体から抽出精製することに成功している。また病原性結核菌に特異な細菌学的²⁵あるいは物理²⁶⁻²⁸・化学的²⁹⁻³⁰性状の記載も少くない。しかしながら一方において、特定の宿主に対する結核菌の菌力という概念を、感染条件や宿主側の種々の因子と無関係に、感染菌のもつ特異な菌体成分や生物学的活性のみによつて規定されるものと考えすることはできない。

たとえば Dubos¹が数多くの病原微生物における実験事実をもととして展開した菌力の本質論においては、病原菌の菌力は伝達性、侵襲性、毒素産生能、宿主のもつ自然または免疫による抗菌機作に対する抵抗性などの数多くの属性の総和と考えられている。したがつて菌力というものを一定の感染条件のもとに成立する特定の宿主と微生物の間の宿主寄生体関係とみる立場に立ち、感染現象の現実即して微生物の病原性を解析することがのぞましいと考えられるのである。

著者らが本実験において意図したのは、ハツカネズミの実験的結核感染における感染菌の病原性と感染条件との間の関連性を、結核菌の宿主体内生存増殖の現象を尺

度として追求することであつた。そして結核菌の菌力を厳密に規定された実験条件のもとに成立する宿主寄生体関係として解析して行く実験的基礎をえたいと考えたのである。

2つの実験を通じてみとめられた最も顕著な事実は、上述の実験条件においては H₃₇Rv 株が静脈内感染の場合にはハツカネズミに対して明かな病原性を発揮するのに、皮下経路を介して宿主体内に注入されると肉眼的病変の上で全く病原菌としての態度を示さないことであつた。実験1において6週後に全身から培養される生菌単位数についてみても、静脈内に接種された H₃₇Rv 菌群が高菌数水準に達しているのにくらべて、皮下に接種された菌群の宿主体内菌数水準は H₃₇Ra 株と同様著しく低下している。これらのことから皮下に入つた H₃₇Rv 株は H₃₇Ra 株と同様ハツカネズミに対して無害性(avirulent)であつたといふことができる。

ところが6週までの宿主体内生菌単位数の消長経過をみると、この2つの場合の無害性が全く異つた機転によるといふことができる。すなわち H₃₇Ra 株の場合は静脈内、腹腔内、皮下のいずれの経路を介して宿主体内に分布した菌群も、感染後全く同一の経過をたどつて持続的な菌数減少を示す。H₃₇Ra 株の実験動物に対する病原性の欠除については既に多くの報告^{11,31-33}があるけれども、著者らの成績からこの菌株の無害性の本質は Pierce¹¹らも指摘した侵襲性(宿主の組織内で生存増殖する能力)の欠除によるといつてよいであろう。一方皮下に注入された H₃₇Rv 株の生菌単位数消長の経過を眺めてみると、感染3週後までの菌増殖は全身についても各組織ごとにも静脈内に入つた菌群との間に大差がない。皮下から入つた場合には臓器への分布菌数は著しく少なく大部分は肺、脾、肝以外の組織に分布するが、感染2~3週後まではどの部分の分布菌群も旺盛に増殖している。したがつてこの時期まで全身の菌数水準は静脈内感染の場合と並行して上昇するのである。このことから H₃₇Rv 株はいずれの経路を介して宿主体内に入つても組織を侵襲する能力には変りないといえよう。ところが感染2~3週後から4週後にかけて皮下感染菌群では非常に著明な菌数減少がおこり、この時期に積極的な宿主側の菌増殖抑制機転がつよく発現して感染の進行が阻止されると考えられる。このような感染2~3週後の菌数増加抑制は宿主体内における結核菌の増殖を追求した諸実験^{11,34,35}においてひとしくみとめられている事実であつて、著者らはこれを感染菌自体による免疫の発現と考えたい。この場合の免疫という言葉は宿主側の菌増殖抑制機作を意味している。したがつて皮下に接種された H₃₇Rv 株の病原性の欠除は、H₃₇Ra 株の場合のように宿主への侵襲がはじめから阻止されるためではなく、感染2~3週後に発現する宿主側の免疫機転によつて侵

襲が中絶されるためなのである。一方静脈内感染 $H_{37}Rv$ 菌群の方は免疫発現後も持続的に増加し臓器病変も顕著になつて行く。

古くから実験動物における結核免疫は静脈内菌接種の場合に最もつよいといわれている^{36,37)}が、著者らの成績によるとむしろ皮下接種の場合によりつよく起るようになる。

以上の成績からハツカネズミの実験的結核症においては、感染菌の侵襲力と共に菌の侵襲後に感染菌自体によつて宿主側に発現してくる免疫機転の強弱と、菌側の既にある程度進行した侵襲分布との相互関係が、感染→罹患の進展を支配する重要な意義を持つと考えることができる。

結 論

感染条件が結核菌の病原性におよぼす影響をみることを目的として、 $H_{37}Rv$ 株および $H_{37}Ra$ 株の一定菌数を感染経路を変えてハツカネズミに接種し、結核罹患の推移と宿主体内生菌単位数の推移を比較追求した。

$H_{37}Ra$ 株では静脈内、腹腔内、皮下のいずれの経路を介して感染した菌も宿主への侵襲を阻止され結核罹患を導くことができない。

$H_{37}Rv$ 株では静脈内、腹腔内に接種された菌群は肺、脾の肉眼的病変を惹起させるが、皮下に接種された場合にはハツカネズミに対して全く病原性を発揮しない。この皮下感染菌の病原性の欠除は感染菌の侵襲が宿主側の免疫発現によつて中断されることによるという事実が全身 homogenize 法によつてたしかめられた。この成績は結核菌の菌力という概念が菌側および宿主側の種々の factor や実験のおこなわれる諸条件によつて規定されなければならないことを示唆すると思われる。

中村博士の御校閲を深謝する。

文 献

- 1) Dubos, R. J.: *The Bacterial Cell*, Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1945.
- 2) Pierce, C., Dubos, R. J. and Middlebrook, G.: *J. Exp. Med.*, 86: 159, 1947.
- 3) Raleigh, G. W. and Youmans, G. P.: *J. Infect. Dis.*, 82: 197, 205, 1948.
- 4) Youmans, G. P. and Raleigh, G. W.: *J. Infect. Dis.*, 82: 221, 1948.
- 5) Mckee, C. M., Rake, G., Donovan, R. and Jambor, W. P.: *Amer. Rev. Tuberc.*, 60: 90, 1949.
- 6) Donovan, R., Mckee, C. M., Jambor, W. P. and Rake, G.: *Amer. Rev. Tuberc.*, 60: 109, 1949.
- 7) Rake, G., Jambor, W. P., Mckee, C. M., Pansy, F., Wiselogle, F. and Donovan, R.: *Amer. Rev. Tuberc.*, 60: 121, 1949.
- 8) Stewart, G. T.: *Lancet*, 2: 562, 1951.
- 9) Stewart, G. T.: *Brit. J. Exp. Path.*, 31: 5, 1950.
- 10) Youmans, G. P. and Youmans, A. S.: *Amer. Rev. Tuberc.*, 64: 534, 1951.
- 11) Pierce, C. H., Dubos, R. J. and Schaefer, W. B.: *J. Exp. Med.*, 97: 189, 1953.
- 12) Middlebrook, G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 80: 105, 1952.
- 13) 加藤允彦・三木勝治・松永清輝: *結核*, 30: 638, 1955.
- 14) Choucroun, N.: *Amer. Rev. Tuberc.*, 56: 203, 1947.
- 15) Bloch, H.: *J. Exp. Med.*, 91: 197, 1950.
- 16) Bloch, H.: *J. Exp. Med.*, 92: 507, 1950.
- 17) Bloch, H., Sorkin, E. and Erlenmeyer, H.: *Amer. Rev. Tuberc.*, 67: 629, 1953.
- 18) Noll, H. and Bloch, H.: *Amer. Rev. Tuberc.*, 67: 828, 1953.
- 19) Asselineau, J., Bloch, H. and Lederer, E.: *Amer. Rev. Tuberc.*, 67: 853, 1953.
- 20) Asselineau, J.: *Thèse doctorat des Science Paris*, 1950.
- 21) Asselineau, J. et Lederer, E.: *Compt. rend. Acad. Sci.*, 230: 142, 1950.
- 22) Asselineau, J., Demartean, H. et Lederer, E.: *Compt. rend. Acad. Sci.*, 230: 877, 1950.
- 23) Asselineau, J. et Lederer, E.: *Experimentia*, 7: 281, 1951.
- 24) Spitznagel, J. K. and Dubos, R. J.: *J. Exp. Med.*, 101: 291, 1955.
- 25) Middlebrook, G., Dubos, R. J. and Pierce, C.: *J. Exp. Med.*, 87: 175, 1947.
- 26) Wilson, F. J., Kalish, C. and Fish, C. H.: *Amer. Rev. Tuberc.*, 65: 187, 1952.
- 27) Patnode, R. A., Wrinkle, C. K. and Beasley, C.: *Amer. Rev. Tuberc.*, 69: 599, 1954.
- 28) Randall, H. M., Smith, D. W. and Nungester, W. J.: *Amer. Rev. Tuberc.*, 65: 477, 1952.
- 29) Dubos, R. J. and Middlebrook, G.: *Amer. Rev. Tuberc.*, 58: 698, 1948.
- 30) Dubos, R. J.: *Amer. Rev. Tuberc.*, 60: 385, 1949.
- 31) Steenken, W., Jr.: *Amer. Rev. Tuberc.*, 38: 777, 1938.

- 32) Steenken, W., Jr.: Amer. Rev. Tuberc., 54: 62, 1946.
- 33) Steenken, W., Jr.: Amer. Rev. Tuberc. 62: 22, 1950.
- 34) Lurie, M. B.: J. Exp. Med., 48: 155, 1928.
- 35) Wessels, C. C.: Amer. Rev. Tuberc., 43: 459, 1941.
- 36) Clauson, B. J.: Arch. Path., 20: 343, 1935.
- 37) Freund, J. and Opie, E. L.: J. Exp. Med., 68: 273, 1938.

