

テンジクネズミの実験的結核性髄膜炎について

1 脳内接種法による菌力の測定

高 橋 宏

国立予防衛生研究所結核部一部長 柳 沢 謙

受 付 昭和 31 年 1 月 5 日

ヒトの結核性髄膜炎は結核菌の血行散布が重要な原因と考えられているが、この方法によつてテンジクネズミに結核性髄膜炎を惹起させることはむずかしい。静脈内に注射された結核菌が脳に定着増殖することは困難であり (Soltys¹⁾ 等) しかも極めて大量の菌を接種に用いると他の臓器の甚しい病変におおわれて結核性髄膜炎の発現を区別することができない。したがつて、結核性髄膜炎を実験的に惹起せしめるには、これまで頭蓋または脊椎腔内に直接結核菌を注入する方法がとられているが、技術的な容易さから、脳実質内に結核菌を注射する方法²⁻⁵⁾が最もしばしば用いられている。本実験の目的は、化学療法の著しい進歩にもかかわらず、なおおそるべき疾患にとどまつている結核性髄膜炎について、化学療法の効果を実験的に検討することにあるが、結核性髄膜炎の惹起に脳内接種法を用いたために、この方法の検討をまず行おうと思う。脳実質内注入によつておこる病変を結核性髄膜炎とよんでいいかということについては、異論がありうるが、次の2点から近似したものとして差支えないであろうと考えた。第1は結核性病変が脳膜に極めて著しいということであり、第2には、Stevens⁶⁾等の実験が示すように、脊椎腔内に結核菌を注入する方法によつても、動物における症状、経過は脳内接種の場合とほぼ同一であるということである。Levaditi⁷⁾等、Steenken^{8,9)}等、Wolinsky¹⁰⁾等はすでに脳内接種法により実験的結核性髄膜炎を出現させ、これに対して化学療法剤の効果を検討したことを報告している。著者はまずテンジクネズミの脳内接種による結核性髄膜炎について、若干の知見の補遺を行う意図の下に、第1報として各種の菌力 (Virulence) を示す結核菌の脳内接種成績および、この方法によつて弱毒人型結核菌¹¹⁾の菌力を検査した成績を報告しようと思う。

実験方法

体重330~430gでRömer反応陰性のテンジクネズミを用いた。脳内接種はSmithburnの方法にしたがつて次のように行つた。動物の頭を動かないように固定した後、頭部を脱毛して皮膚をアルコールで消毒する。次に左前頭部の鼻前頭縫合において、脳膜を損傷して出血を

おこさぬように注意しながら、正中線から3~5mmの点にきりで小さい孔をあける。この細孔を通じて、針先が脳底に達しない程度に注射針をいれ (約5mmの深さ)、所要濃度の菌液の0.1mlを徐々に注入する。注射後は局所皮膚をアルコールで消毒するだけで充分である。脳内接種後、動物は一時的に元気を失い食欲を低下するが、数日後には平常にもどる。接種後観察は毎日行い、死亡しない場合は、3ヵ月間飼育した後、屠殺して検索を行つた。この間、体重およびツベルクリン反応の測定、四肢ことに後肢麻痺の出現状況を観察し、死亡日数を測定した。ツベルクリン反応は100倍稀釈液を0.1ml皮内注射後24時間目に判定した。死亡または屠殺した動物は、その都度、剖検し各臓器およびリンパ腺の結核性病変を観察すると共に、脳、脾、肺のおおのの一部について定量培養を行つた。すなわち、各臓器の約300mgをとり、1% NaOHを以つて100mg/mlの乳剤とし、蒸溜水で10倍段階稀釈を行つて小川培地に接種培養し、各臓器10mg中の生菌数を算定した。使用菌株は実験Iでは菌力を異にする次の9菌株を用いた。Ravenel, H₃₇Rv, H₂, H₂-Streptomycin (SM)耐性、青山B, Frankfurt, BCG, H₃₇Ra, 18-b¹²⁾ (H₂-SM依存性株)。これらのうち、H₃₇RvはSauton-potato 10日培養菌を、18-bはSM 200γ/ml含有Kirchner寒天培地培養後凍結乾燥したものを用い、その他はすべて小川培地10~14日培養菌を凍結乾燥してあらかじめ生菌数を決定しておいたものである。各菌液共1mg/mlの濃度とし、その0.1mlを接種した。皮下または静脈内接種法によると、Frankfurtと青山Bの2株は中等度以下の菌力を示す菌とされ、BCGは弱毒菌、H₃₇Ra, 18-bは無毒菌、Ravenel, H₃₇Rv, H₂の3株は強毒菌と考えられ、いずれもかなり菌力の安定している保存菌株とみなされているものである。実験IIでは、弱毒人型結核菌今村株を用いた。胆汁培地継代による弱毒人型菌今村株の8株を1954年大阪大学より分与をうけ、当研究室で保存してきたものについて、脳内接種法、皮下接種法によつて菌力を調べた。8菌株はすべて胆汁培地よりSauton-potato培地へ移し、継代第3代目の12日培養の凍結乾燥菌を用いた。いずれも脳内接種には0.1mg、皮下接種には10mgを用いた。

表 1 菌力を異にする各結核菌株のテンジクネズミ脳内接種成績

菌 力	菌 株	接種生菌 単 位 数 (0.1 mg)	動 物 数	動 物 1 匹 の 平 均 値			死亡時各臓器 10mg 中 の結核菌生菌単位数		
				観察中の体重 の増減 (g)	後肢片側麻痺出 現までの日数	生存日数	脳(×10 ¹)	脾(×10 ²)	肺(×10)
毒 力 菌 株	Ravenel	17.0×10 ⁵	5	-148	9.4	14.0	75.0	50.0	30.0
	H ₃₇ Rv	33.4×10 ⁴	4	-100	20.0	34.5	3.4	9.6	1.1
	H ₂	10.0×10 ⁵	3	- 50	13.0	22.7	23.0	35.0	61.0
	H ₂ -SM耐性	16.4×10 ⁵	4	-107	14.0	22.2	25.0	26.0	14.0
	Frankfurt	14.8×10 ⁵	4	- 70	12.5	40.7	19.0	7.0	0.8
	青山B	25.8×10 ⁵	2	-180	14.0	24.0	39.5	17.5	23.0
弱無 毒菌 および株	B C G	62.4×10 ⁵	3※	+221	出現せず	生存	0	0	0
	H ₃₇ Ra	67.6×10 ⁴	2※	+295	"	"	0	0	0
	18—b	15.0×10 ⁵	4※	+238	"	"	0	0	0

※全例、接種後3カ月で屠殺。体重測定、臓器培養は屠殺時に行う

実 験 成 績

各菌株の脳内接種成績は表1の如くである。それらの接種生菌単位数は表の如く不揃であつたが、H₃₇Rv および H₃₇Ra の2株をのぞけば、同じ order にある。毒力菌接種動物では接種1週目から食欲がおとろえ、大体2週前後にはすべて後肢片側に麻痺を起し、数日後には後肢両側とも麻痺して後軀をひきずるようになる。また、まれには Stevens¹³⁾ 等の報告の如く前肢にも僅かに麻痺を惹起するのを観察した。麻痺の出現は動物の死因を確実にすると共に、死亡のおこる時日の目安にもなる。各株の中で Ravenel 株がもつとも早く麻痺を出現させ、死亡ももつとも早くおこっているが、H₃₇Rv のように接種生菌数が少くないと、麻痺の出現がおくれている。しかし、Frankfurt 株のような中等度菌力株で、動物の生存日数ものびているものでも麻痺がかなり早く現われている点は注意せねばならない。B C G、H₃₇Ra、18—b 接種動物はすべて全く後肢の麻痺を惹起することなく3カ月経過した。これらの各菌株を接種した動物の体重を測定したところ、図1の如き曲線を示し、感染後の動物体重の変動は接種菌株の菌力を良く反映している。すなわち、毒力菌株群では大体1週目から体重の減少が著しく、接種生菌単位数のやや多い青山B株および菌力の極めて強い Ravenel 株では殊に体重の減少が著しいのに対して、菌力の弱いB C G、H₃₇Ra を接種した動物では、感染後次第に体重を増し、3カ月でそれぞれ平均 221 g および 295 g を増加した。弱毒菌接種の各動物のツベルクリンアレルギーの発現は、同量を皮下接種した動物に比し、ややおくれて3週目頃からみられるようになるが、反応の程度は弱い。強毒菌接種の場合には、ツベルクリンアレルギー出現までに大部分の動物が死亡するが、あるいは生存していても衰弱が甚しいため

に、ツベルクリン反応を惹起しえない。脳内接種後死亡した動物の剖検所見は次のようである。肉眼的に脳膜の充血、肥厚がみられ、まれに側脳室附近に出血の認められることがあつた。その他の所見としては、頸部リンパ腺の腫脹が全般的にみられた程度である。内臓には肉眼的にはつきりした結核結節を認めることができなかった。しかし、脳、脾、肺の各臓器の定量培養を行つたところ、表1に示すように、脳にもつとも菌が多く認められた。また肉眼的変化のない脾、肺からもかなりの菌を分離することができ、他の臓器へも脳から相当数の菌が撒布されていることがわかつた。各臓器中の菌数は、各株ごとにやや相違するが、これは接種菌の菌力、生菌単位数および動物の生存日数によつてきまるもののように思われる。臓器培養のうち、脳の培養は左大脳半球の接種部位のあたりを大脳凸部から脳底に横断して、その附近300mg程度を培養したのであるが、脳中の菌の分布は次の観察によつてかなり不均一であることがわかつた。すなわち H₂株の0.05 mg を脳内接種して24日目に死亡したテンジクネズミについて、表2に示す如く大脳の各部

表2 強毒結核菌H₂株をテンジクネズミの左大脳半球内に接種した後における大脳各部位の結核菌生菌単位数

培 養 部 位	脳10mg中の生菌単位数
左大脳半球 前頭葉 灰白質部	17×10 ³
" 後頭葉 灰白質部	48×10 ²
" 側脳室尾状核周辺部	86×10 ²
左、右大脳半球 脳底 灰白質部	30×10 ²
右大脳半球前、後頭葉灰白質部	58×10
" 側脳室尾状核周辺部	57×10

位 300mg ずつを定量的に培養したところ、部位によつてかなり菌数に異同があることがわかつた。したがつて、実

驗Ⅱの今村株の実験からは脳の培養は接種した大脳半球全部を培養することにした。接種後3ヵ月以上生存したBCG, H₃₇Ra, 18-bなどの弱毒ないし無毒菌株接種動物では、ツベルクリンアレルギーの発現は認められるにもかかわらず、脳、脾、肺の各臓器10mg中からは菌が分離されなかつた。脳内接種後のもつとも主な観察目標は、動物の死亡であるが、Ravenel株ではもつとも早く、動物は5匹共14日目にそろつて死亡した。これに対し、ほぼ同じ接種生菌単位数のH₂, Frankfurt株ではそれぞれ死亡日数は平均22.7日および40.7日で個体差も大きくなっている。またH₂株のSM依存性変異菌18-b株は、同一生菌単位数を接種したにもかかわらず動物は1匹も死亡せず、SM感受性株および耐性変異株との相違は極めて顕著である。以上の各菌株の脳内接種後の生存日数の長短は、皮下あるいは静脈内接種法による菌力測定成績と全く一致している。強毒菌H₃₇Rv株群ではRavenel, H₂株群にくらべると、生存日数がのびている

が、これは接種生菌単位数が1order低いためであろう。また中等度毒力菌と評価されている青山B株群では、接種生菌単位数がやや高いにしても生存日数がFrankfurt株群より短かいのは、その菌力自体がかなり高いためであろうと考えられる。BCG, H₃₇Ra, 18-bの3株はもちろん動物を全く死亡させず、脳培養の成績よりすれば、3ヵ月以上たつてもおそらく死亡がおこることはないであろう。次にH₂株について、接種生菌単位数が減少していくにつれて生存日数がどう変化していくかをみた。Sauton培地12日培養のH₂より菌液をつくり、その0.1ml中にそれぞれ0.1, 0.01, 0.001, 0.0001mgを含ませて脳内接種を行つた。その成績は表3に示す。各群の平均生存日数は、それぞれ17.2, 27.0, 54.0および67.4日で、接種生菌単位数が少くなるに応じて、後肢麻痺出現までの日数および生存日数がのびており、動物個体差も接種生菌単位数が少くなるほど、大きくなっている。弱毒人型結核菌今村株の脳内接種成績は表4に示す通りである。

表 3 強毒結核菌 H₂株の接種生菌単位数を異にした場合のテンジクネズミ脳内接種成績

接種生菌単位数湿菌重量 (mg)		48.2×10 ⁵ 0.1	48.2×10 ⁴ 0.01	48.2×10 ³ 0.001	48.2×10 ² 0.0001
動 物 番 号		1. 2. 3. 4. 5.	1. 2. 3. 4. 5.	1. 2. 3. 4.	1. 2. 3. 4. 5.
死 亡 時 の 平 均 体 重 (g)		290	290	310	320
生 存 中 の 平 均 体 重 減 少 量 (g)		110	120	120	90
接 種 日 数 症 状 発 現 後	後 肢 片 側 麻 痺	13. 13. 14. 13. 13.	19. 21. 19. 19. 19.	30. 25. 25. 25.	32. 42. 42. 40. 47.
	” 平 均	13.2	19.4	26.2	40.6
	後 肢 両 側 麻 痺	15. 17. 18. 16. 13.	21. 25. 21. 19. 21.	42. 26. 30. 30.	34. 55. 49. 42. 55.
生 存 日 数		16. 19. 22. 16. 13.	26. 34. 25. 19. 31.	75. 33. 46. 62.	41. 79. 67. 83. 67.
” 平 均		17.2	27.0	54.0	67.4

表 4 弱毒人型結核菌今村株各菌株のテンジクネズミ脳内接種成績

今村株の 各 菌 株	接種生菌 単 位 数 (0.1 mg)	動 物 数	体 重 の 変 動 (g)		後肢麻痺 発 現 動 物 数	115 日間 中の死亡 動 物 数	ツベルクリン アレルギー		臓器 10mg 中 の生菌単位数	
			屠 殺 時	115 日間生存 中の平均増加			接 種 後 5 週	13 週	脳	脾
喜文字株	16.0×10 ⁴	5	588	232	0	0	11.2	17.4	3.2	0.5
園田株	46.0×10 ⁴	5	655	300	0	0	21.0	20.5	0.4	0.6
野岡株	74.0×10 ⁴	5	682	314	0	0	19.5	22.5	0.4	0
青木株	16.0×10 ⁴	5	634	244	0	0	17.0	16.0	0.3	0
山口株	12.8×10 ⁴	5	700	318	0	0	22.0	16.5	0.2	0
戸田株	11.8×10 ⁴	5	632	268	0	0	17.8	18.0	1.5	1.3
辰見株	14.8×10 ⁴	5	646	260	0	0	4.8	2.4	69.5	13.9
金沢株	19.8×10 ⁴	5	720	342	0	0	20.8	20.0	1.3	0

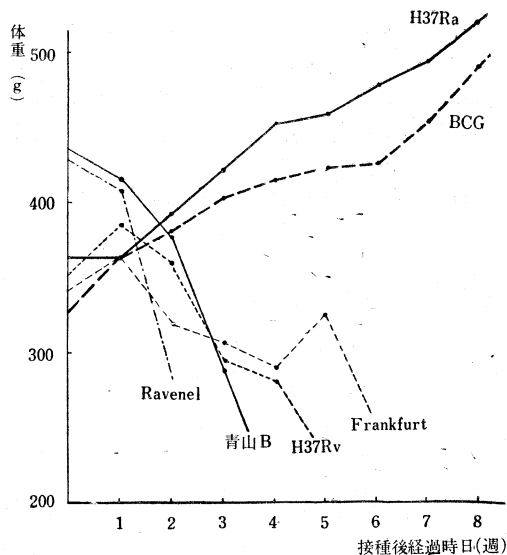
注：生存動物は接種後115日目にすべて屠殺し、体重の測定、脳、脾の培養を行つた

各菌株の接種生菌単位数は表3のH₂株の0.01~0.001mgの範囲に入るが、H₂株では平均27.0~54.0日で動物が死

亡しているのに対し、今村株各株群では上記弱毒株接種群と同じく115日では動物に麻痺、体重の減少、死亡を

全く認めることができなかった。ツベルクリンアレルギーは1株(辰見株)をのぞいてはすべてに発現をみた。しかし、臓器培養成績ではBCG等と異なり、僅かではあるが菌を分離できており、ことに1株(辰見株)ではかなりその数の多いものもあつた。各群7匹ずつ8群の皮下接種群を、接種後約8週目にすべて屠殺剖検したが、肉眼的には全く結核性病変を認めることができなかった。しかしツベルクリンアレルギーは全群に出現を認め、僅かではあるが、菌を脾から分離することができた。

図1 各強、弱毒菌株脳内接種後の
テンジクネズミの平均体重曲線



考 察

結核菌を脳内に接種後、テンジクネズミが発現する症状や死亡は、主として結核性髄膜炎のためにおこると考えられる。Levaditi等は脳内接種後の動物の死亡は全身に菌が散布されるためにおこると述べているが、他の臓器への散布菌数の高さや肉眼的病変がほとんどみられないことから考えると、死亡は脳および脳膜の病変によつておこると考えた方が妥当であろう。多くの研究者の報告によると、脳膜の結核性病変が甚だ高度であるといわれており、Stevens等の実験のように脳実質内に注射せず椎腔に菌液を注入しても、同様な死亡がおこることは脳膜病変の意義が大きいことを示すものであろう。以上の理由から、脳内接種後の結核性病変としては髄膜炎が最も大きい比重を占めると考えた。感染後の経過を追求する目標としては、接種動物の症状(一般状態、体重の推移、後肢麻痺の出現等)と死亡の有無および日数である。そして、これらの目標は主として接種菌の菌力、生菌数の2因子によつて変動し、これらの2因子が共にか

なり大きくないと、髄膜炎の軽重を比較的短かい期間に定量的に測定することができなくなるとみてよいであろう。したがつて、脳内接種法が接種菌の菌力の定量的測定に用いungという(Smithburn³⁾, 渡辺⁴⁾, Stewart¹⁴⁾等)のも、ある程度菌力の強い菌に限ることであり、渡辺は患者分離菌の菌力の強弱の測定にこの方法を利用しているのである。BCGを含む弱毒菌相互においては、当然この方法では菌力の区別をつけえず、その程度を測定することもできない。しかし、後肢麻痺および死亡というような明瞭な目標により、毒力菌と弱毒または無毒菌とを分けることは容易にできる。毒力菌は微量でも脳内接種法ではかなり鋭敏にその存在を検出することができるからである。本実験の成績でも、生菌単位数が 10^3 程度の毒力菌を接種すると、後肢麻痺の出現は平均40日、死亡日数は平均67日で、その存在を確認されているが、Smithburn, 渡辺によるとさらに微量でも動物の死亡によつてその存在が検出されうるとし、渡辺は強毒菌では $10^{-6}mg$ という微量の脳内接種でも平均生存日数が36日であることを示している。しかし、渡辺は生菌単位数になんら注意を払っていないから比較できない。この微量菌接種のことは、今後の実験的髄膜炎の細菌学的治療状態を評価するのによい尺度となるであろう。今村株は今村等により279代牛胆汁培地に継代されて、弱毒化された人型結核菌であるが、この菌株の菌力低下の程度を脳内接種法で測定した結果は、明らかに弱毒株の菌力のグループに入るようである。ただし今村株数株のうち、あるものは臓器に散布された菌が長期間生存していたのは、その意味においてはBCGに比し多少菌力が高いと考えてよいと思う。これらの菌株の対照として、今村¹⁶⁾により同時に牛胆汁のない培地に同様に継代された菌株は、かなり強毒であるということであることから、培地における牛胆汁の存在が菌力の低下をもたらすことは確実であるといいうることであろう。

結 論

菌力の異なる種々の結核菌をテンジクネズミの脳内に接種することにより、髄膜炎を主とした脳、脳膜病変により発現する動物の症状、死亡は、接種菌の菌力と生菌単位数によつて決定されるが、その両者のいずれもある程度以上に大きくないと、定量的にまた短時日に測定することができない。また、生体内生菌数の動態をみながつたこの実験では、弱毒菌、無毒菌の菌力の区別は不可能であつた。しかし、弱毒菌と毒力菌との区別はかなり明瞭であり、ことに動物の体重の増減においても、良く反映される。弱毒人型結核菌今村株の各型の菌力は、BCGとほぼ同等か、あるいはやや強いように思われる。本実験により、脳内接種の場合の脳における菌分布の不均一性と、他の臓器、脾、肺における菌分布の定量

的測定とを補遺することができた。

終りにのぞみ、柳沢部長の御指導、室橋博士、橋本技官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) Soltys, M. A. & Jennings, A. R. : Am. Rev. Tuberc., 61 : 399—406, 1950.
- 2) Feldman, W.H. : Am. Rev. Tuberc., 21 : 400—422, 1930.
- 3) Smithburn, K.C. : J. Exp. Med., 64 : 771—790, 1936.
- 4) 渡辺喜海 : 結核, 18 : 101—147, 1940.
- 5) 和田明二 : 日本細菌学雑誌, 8 : 225—229, 1953.
- 6) Stevens, R. R., Karlson, A.G. & Feldman, W. H. : Am. Rev. Tuberc., 66 : 722—731, 1952.
- 7) Levaditi, C., Vaisman, A. & Chaigneau-erhard, H. : Ann. Inst. Pasteur, 84 : 630—633, 1953.
- 8) Steenken, W. Jr. & Wolinsky, E. : Science, 106 : 638—639, 1947.
- 9) Steenken, W. Jr., Wolinsky, E. & Pratt, P. C. : Am. Rev. Tuberc., 64 : 87—101, 1951.
- 10) Wolinsky, E., Pratt, P. & Steenken, W. Jr. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 714—727, 1954.
- 11) 今村荒男・吉井 馨 : 大阪大学医学雑誌, 3 : 81—97, 1951.
- 12) 橋本達一郎 : 結核, 30 : 461—466, 1955.
- 13) Stevens, R.P., Karlson, A.G. & Feldman, W. H. : Proc. Staff Meet. Mayo Clin., 28 : 599—607, 1953.
- 14) Stewart, G. & Tamargo-Sanchez, M. : J. Hyg., 50 : 37—52, 1952.
- 15) Stewart, G. : Lancet, 261 : 562—566, 1951.
- 16) 今村荒男・伊藤 実・桜井 宏 : 大阪大学医学雑誌, 3 : 269—292, 1951.