

結核菌の Virulence に関する研究

第1報 結核菌菌液の検討

水之江 英・金 容 鉉・手 塚 孝
 岩 下 一 郎・居 合 亮・栗 本 勝 之 進

北 里 研 究 所

受 付 昭 和 31 年 2 月 8 日

序 論

1947年 Dubos¹⁾~²⁾らはマウスが結核菌にも感受性を有し、モルモットの場合に類似していることを報告している。また近來諸種抗結核剤の発見とともに結核症の実験動物としてマウスが広く用いられるようになり、1948年には Raleigh and Youmans³⁾および McKee⁴⁾と彼の協同研究者達は尾静内感染法により、マウスを使用して抗結核剤の力価判定の規準を決めるための広範な実験を行つた。1952年 Stewart⁵⁾らは脳内接種が尾静脈内感染に比し菌量の差に対して、より定量的な差を示すと報告また Gray⁶⁾らは経鼻感染法が微量菌の検出に有効なことを報告している。しかしマウス結核症の研究には一般に尾静内感染法を用いているのが現況であろう。

一方、菌の Virulence の強弱、マウスの感受性等の判定に多くの人達はマウスの平均死亡日数を挙げている。しかし実際には、できるだけ同一条件の下で感染した場合でもマウスの平均死亡日数にはかなりの変動が見られる。この理由を、菌の Virulence の変動と動物側の条件に帰しているようであるが、感染菌液の物理的な状態にもまた大きな考慮が払われるべきではなからうか。

われわれはマウスを使用して尾静内感染法により結核菌の毒力を見る際、菌液の物理的な状態がマウスの死亡日数を決定する重要な因子の1つであるとの知見を得たのでここに報告し、大方の御批判をえたいと思う。

実験材料および実験方法

1. 実験材料

使用菌株：強毒人型黒野株およびBCG株

使用培地：小川培地

使用酵母：Saccharomyces cerevisiae 18時間培養

使用動物：14g前後のDDN系マウス雄

2. 実験方法

i. 菌液一型の如くメノウ乳鉢で所要濃度の菌液を作る。以下これを普通菌液と呼ぶ。普通菌液を1,200廻転5分間宛3回遠心管を換えて遠心して粗大な菌塊を除去したのを遠心菌液と呼ぶ。この菌液には10個以上の菌塊は

ほとんどなく大部分が1個または2個の菌であつた。菌液の濃度は Colman の光電比色計の550m μ における光透過百分率で現わした。次に、遠心沈渣を再浮游してえた粗大な菌塊の多い菌液を以下沈渣再浮游菌液と呼ぶ。特別の目的以外には上記菌液はすべて生理的食塩水を用いて作成した。

ii. 菌液中の全菌数、菌塊数(単個菌も1個の菌塊と見做す)および推定される集落数の算出—Dryer法における赤血球を用いるとZ-N染色で赤血球が破壊されるので、比較的形がそろつていて大きさも適当である Saccharomyces cerevisiae の18時間培養の浮游液を加熱殺菌後遠心して菌塊を除去した後、Petroff-HauserのCell-Counterで1ml中の酵母数をかぞえ、この酵母浮游液と結核菌液との一定量混合液の塗抹標本をZ-N法で染色して鏡検し両者から算出した。塗抹に際してはなるべく細く、直径の小さい白金耳を用い、少量の液がなるべく平面的に載物ガラス上に附着するように注意した。

iii. 臓器内の生菌数—各臓器の全量をそれぞれ秤量し、これらの10倍乳剤を作つて定量培養を行い全臓器中の生菌単位をもつて現わした。斃死および生残マウスは剖見し、肺のほとんど全部が結核性病巣となつていものだけを結核死とした。

実験成績

1. 表1は Dryer の変法によつてかぞえた菌液中の全菌数、菌塊数および酵母数から推定した生菌単位と実際に培養してえた生菌単位との関係また全菌数と菌塊数との比および全菌数と培養生菌単位との比から遠心菌液と普通菌液との菌の分散状態およびその安定度を比較したものである。

普通菌液では推定生菌単位は実際培養してえた生菌単位の1.2, 1.7および2.4倍で変動が大きいのであるが、遠心菌液では1.6および1.7倍であつた。また全菌数と菌塊数の比を見ると、普通菌液においては2.3, 3.2および5.1となつて不安定であるが、遠心菌液においては1.4, 1.7で各菌液間のひらきが少ない。

以上の両者から算出される全菌数対培養生菌単位の比

表1 菌液の分散状態

菌液	菌株	培養日数	菌塊数 対 酵母数	推定 菌 単 位	培養 菌 単 位	推定生菌 単位 対 培養 生 菌 単 位 の 比	全菌数 対 菌塊数 の比	全菌数 対 培養生菌 単位の比
普通菌液 1mg/ml	黒	8日	374 ⁺ 132	5.8×10 ⁷ [※]	4.9×10 ⁷ [※]	1.2	1206 ⁺ 374 = 3.2	3.84
	野	14日	208 76	3.1×10 ⁷	1.3×10 ⁷	2.4	1071 208 = 5.1	12.24
	BCG	14日	232 85	3.2×10 ⁷	1.9×10 ⁷	1.7	524 252 = 2.3	3.91
遠心菌液 1,200RPM/5分 3回	黒野	14日	239 64	4.3×10 ⁷	2.5×10 ⁷	1.7	341 259 = 1.4	2.38
	BCG	14日	232 70	3.8×10 ⁷	2.4×10 ⁷	1.6	392 252 = 1.7	2.72
	黒野	17日	676 46	21.8×10 ⁷			1202 676 = 1.7	

※ ; 1ml 当りの菌単位を示す。 + ; 鏡検により数えた数字。

は、普通菌液においては3.84, 3.91および12.24となっており、生菌単位から菌液中の全菌数を推定することの困難さを示している。一方、遠心菌液においては、2.38および2.72ではほぼ安定しているように思われる。

以上から遠心菌液の方が普通菌液に比し、比較的安定した分散状態であるといえよう。表中の遠心菌液は遠心条件のみを一定にした任意濃度の菌液である。

2. 表2は培養条件をなるべく一定にした黒野株10日培養の1mg/ml濃度の普通菌液とはほぼこれと同濃度の遠心菌液尾静内感染マウスの48時間目屠殺時の肺臓および

表2 分散状態の異なる菌液感染マウスの48時間目における肺・脾における菌の分布状況

(黒野株10日培養 普通菌液: 1mg/ml
0.2ml尾静内感染 遠心菌液: 1,200 RPM/5分-2回)

普通菌液				遠心菌液			
菌液濃度 と 生菌単位	マウス	肺 ×10 ⁴	脾 ×10 ⁴	菌液濃度 と 生菌単位	マウス	肺 ×10 ³	脾 ×10 ⁴
76 %	1	64 [※]	40	76 %	1	15	21
	2	45	52		2	8	14
	3	41	39		3	10	22
	4	46	45		4	11	20
	5	38	40		5	21	13
平均	46.8	45.2	平均	13	18		
21.5× 10 ⁶ /cc	1	24	30	37.6× 10 ⁶ /cc	1	4	8
	2	22	20		2	4	8
	3	25	21		3	5	5
	4	28	24		4	16	12
	5	36	18		5	13	7
平均	27	22.6	平均	8.4	8		
79 %	1	44	27	76 %	1	10	10
	2	40	30		2	10	7
	3	130	14		3	11	8
	4	27	20		4	11	13
	5	50	30		5	13	11
平均	58.2	24.2	平均	11	9.8		

※ ; 数字は全臓器の生菌単位を現わす。

臓器における菌分布状況の比較成績である。

遠心菌液 1ml 中の生菌単位は 32×10⁶ないし 37.6×10⁶個の間で普通菌液のそれよりも多かつ各菌液間の変動も少ない。次に普通菌液感染群 5 疋の肺臓における菌数の平均は 46.8×10⁴, 27×10⁴ および 58.2×10⁴ であり、遠心菌液のそれは 13×10³, 8.4×10³ および 11×10³ で生菌単位の多い遠心菌液感染群の方がかなり少ない。また遠心菌液感染群の方が各実験における差

が少ない成績を示している。これは粗大な菌塊の多い普通菌液の方が遠心菌液に比較してより多数の菌が肺臓に附着することを示している。脾臓における菌数には両者の間に著明な差がなく肺臓を通過しえた菌が適宜に他の諸臓器に至り定着するものと思われる。

3. 普通菌液、沈渣再浮游菌液および遠心菌液尾静内感染マウスの斃死状況を見たのが表3である。沈渣再浮游菌液の濃度は Colman の比色計の 550mμ で 74%濃度の2倍稀釈菌液で、これは普通菌液 1mg/ml の2倍稀釈の濃度に等しく、定量培養による生菌単位もほぼ半数でありまたマウスの平均体重が 2g も大であつたにもかかわらず、死亡日数中央値は2日遅れているにすぎなかつた。遠心菌液の濃度は66%で、これは普通菌液のほぼ 1.5 mg/ml に相当する濃度で、感染生菌単位も普通菌液感染群の 4.6×10⁶の約4倍量でありかつマウスの平均体重が前者に比して小さいにもかかわらず、30日に至るも1疋も斃死することなくマウスは体重が増加する一方であつた。

図1は表3の普通菌液および遠心菌液尾静内感染群の各2疋宛を感染後3日、10日および18日目にそれぞれ屠殺して定量培養した成績である。

3日目における両群の肝臓と脾臓の菌数はそれぞれ大差なくかつ肝臓に感染菌の大部分が行つていることが同える。感染3または4日目頃は肺における菌数が定量培養によりほぼ最低値を示す時期で以後漸次増殖線をたどるのであるが、このときにおける普通菌液感染群の肺臓の菌数は遠心菌液感染群のその約72倍にも達している。次に腎臓においても両群の間にかんがりの開きが見られた。10日および18日目における各臓器における菌増殖曲線では、脾臓においては3日目における菌数の少ない方がより急速に増殖して18日目には下向するような傾向を示しているが、肺臓においては3日目における菌数の多い方すなわち普通菌液感染群の方が18日目迄により急速な増殖線をとつている。すなわち普通菌液感染群の肺

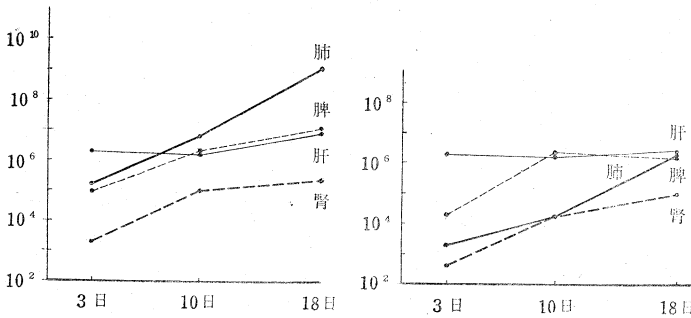
表3 分散状態の異なる各種濃度の菌液感染マウスの死亡状況

(黒野株10日培養尾静内感染, 各群5疋宛)

感染菌液	菌液の濃度	注射液量	感染生菌単位	マウスの平均体重	死亡状況				死亡日数中央値
					18日	19日	20日	21日	
普通菌液	1mg/cc	0.2cc	4.6×10^6	15g	●●	●●		●	19日
遠心沈渣再浮游菌液	74%の2倍希釈	"	2.4×10^6	15g			●	●●●	21日
遠心菌液	66%	"	13.4×10^6	12.6g					>50日

図1 普通菌液および遠心菌液感染マウスの各臓器における菌の消長

普通菌液 1mg/ml → 0.2cc 尾静内 遠心菌液, 66% → 0.2ml 尾静内
 { 感染生菌単位, 4.8×10^6 } { 感染生菌単位, 13.4×10^6 }
 { 死亡日数中央値, 19日 } { 死亡日数中央値, >30日 }



臓における菌数は同一日における遠心菌液感染群のそれに比して3日目には72倍であるが, 10日および18日目にはそれぞれ335倍および375倍となっている。そして19日前後で5疋が全部斃死しているのに, 遠心菌液感染群は30日に至るも1疋も死亡せず体重が増加する一方で, 屠殺剖見して見るとなおかなり多くの健康肺組織が残っていた。

4. 同一分散状態の菌液の同じ菌量を感染液量を異にして尾静内に感染した場合のマウスの死亡状況を表4に示した。実験誤差を少なくするためにすべて同一の1ml ツベルクリン用の注射器を用いて菌液の採取および希釈等を行いつつ注射筒の管壁に附着する菌を最少限ならしめるように注意した。

表に見られるように0.2mlに浮游して感染したマウス群の死亡日数中央値は24日で, 同一菌液の同一菌量を

表4 菌液の感染液量の多少によるマウスの死亡状況

(黒野株10日培養尾静内感染, 遠心菌液感染群は5疋)

菌液	濃度	感染液量	感染生菌単位	死亡状況									死亡日数中央値		
				21	22	23	24	25	26	27	28	29			
普通菌液	0.5mg/ml	0.2ml	4.8×10^6	●		●●	●●●		●						24日
普通菌液	0.1mg/ml	1ml	4.8×10^6				●		●●	●●				●	26.5日
遠心菌液	74%の10倍希釈	1ml	14×10^6						●	●●	●●			●●●	>60日

1mlすなわち前者の5倍量の浮游液にして感染した群の26.5日よりも2.5日早くなっている。なおこれと同一濃度の遠心菌液を1mlに浮游して感染した群においては, 感染生菌単位が前者の約3倍であるにもかかわらず, 60日迄に5疋中2疋が30日以後に斃死したのみであった。

5. 希釈液の物理的性状の差によつてマウスの死亡日数に差が生じるかどうかを見るために, 表5におけるような種々の希釈液を用いて尾静内感染実験を行つてマウスの斃死状況を見たのであるが, 希釈液による差異は本実験からは見られなかつた。

6. 同一菌株の培養日数の長短によつて毒力に差が生ずると言われているが, 感染後肺臓に定着する菌数からこの問題を採りあげて見た成績が表6である。

感染菌液の生菌単位は10日, 20日培養の方が30日, 45日培養よりも多い傾向を示している。古い培養は定量培養での集落の発現がおくれかつ集落の大きさも若い培養に比較して一般的に小さかつた。

表5 各種希釈液にて作成した菌液感染マウスの死亡状況

(黒野株10日培養尾静内感染, 普通菌液0.1mg宛)

稀釈液	マウス数	死亡状況				死亡日数中央値
		18日	19日	20日	21日	
0.85%食塩水	7	●●	●●●	●	●	19日
0.5%ゲラチン生理的食塩水	9	●●	●●●	●●	●	19日
0.1%bov. alb.	9	●●	●●	●●●	●●●	20日
0.5%bov. alb.	8	●●	●●	●●●	●●	19日
10%馬血清生理的食塩水	11	●●	●●	●●●	●	20日
25%Egg yolk生理的食塩水	14	●●	●	●●●	●●●	20日

感染6時間目における10日培養感染マウスの肺における菌数は 163×10^4 で20日培養の約2倍, 30日および45日培養はそれぞれこの約および1%と非常に少ない。肺と脾の菌数の合計は10日培養が最も多く, 20日培養がこれに次ぎ, 30日, 45日培養は10日培養のそれぞれ約1/2および1/3

表6 培養日数を異にする黒野株感染マウスの
6時間目における肺・脾の菌数
(各菌液共0.5mg/mlを0.2ml尾静脈内感染)

感染菌の培養日数	菌液1ml中の生菌単位	マウスNo.	肺の菌数		脾の菌数	
10日	7.9×10 ⁶	1	150×10 ⁴		25×10 ⁴	
		2	160×10 ⁴	165×10 ⁴	27×10 ⁴	22×10 ⁴
		3	180×10 ⁴		17×10 ⁴	
20日	9.9×10 ⁶	1	95×10 ⁴		40×10 ⁴	
		2	100×10 ⁴	97×10 ⁴	38×10 ⁴	39×10 ⁴
30日	3.8×10 ⁶	1	54×10 ⁴		9.5×10 ⁴	
		2	35×10 ⁴	52×10 ⁴	6.3×10 ⁴	7.6×10 ⁴
		3	67×10 ⁴		7×10 ⁴	
45日	3.9×10 ⁶	1	26×10 ⁴		4.3×10 ⁴	
		2	21×10 ⁴	30×10 ⁴	1.5×10 ⁴	3.4×10 ⁴
		3	35×10 ⁴		4.5×10 ⁴	

となつている。感染後1週および2週目の肺臓における病変は10日および20日培養感染群が他の2群よりはるかに進んでいた。なおこの時の定量培養は培地不良のため算出することができなかつた。マウスの斃死状況は10日および20日培養では感染後20日位より全マウスが斃死したが、30日および45日培養では感染後30日間に斃死するマウスを見なかつた。

考 案

マウス結核症においては、肺臓において結核菌が最も強く増殖する。そしてマウスを斃す原因はその肺における菌の増殖によつて起る病理組織学的変化、すなわち滲出性の変化が現われ、乾酪性肺炎を起し、その結果窒息死^{7,8)}するものであろうと水之江は述べた。このような意味から、感染時の肺に定着する菌数が問題になり、それには感染菌液の菌の分散状態が問題になつてくる。Saccharomyces Cerevisiae を使用した Dryer の変法⁹⁾で普通菌液と遠心菌液の分散状態を見ると、推定生菌単位と実際に培養してえた生菌単位の比は前者がかなりの変動が見られるに反し、後者ではかなり一定した値を示した。また全菌数と菌塊数の比を見ると、前者が2.3から5.1で不安定であるが、後者は1.4から1.7でかなり接近した値を示し、全菌数と培養生菌単位の比においても前者は3.84から12.24と大きく開き、後者は2.38から2.72とこれまた接近した値を示した。このような点から、菌液としては遠心菌液が安定した菌液と言うことができよう。両菌液を用いてマウスの尾静脈内に感染させ肺および脾臓に定着する菌数を見ると、肺臓では感染生菌単位の多い遠心菌液感染群の方が、普通菌液感染群よりかなり少なくかつ3回の実験においても各実験の間に差

が少ない。すなわち粗大な菌塊の多い普通菌液の方が肺臓に定着する菌数が多い。その後の増殖は普通菌液群の肺の菌数は遠心菌液群の3日目では72倍であつたが、10日、18日にはそれぞれ335倍および375倍となつている。脾臓においては著明な差が見られなかつた。さらに両菌液の外に沈渣再浮游菌液をも感染させた場合のマウスの斃死状況は、沈渣再浮游菌液はColmanの比色計より見ると0.5mg/mlの濃度であり、生菌単位も1mg/mlの約半分、遠心菌液の1/5.5であるにもかかわらず、1mg/ml普通菌液より約2日遅れ全マウスが斃死している。これに反して遠心菌液では30日に至るも1疋も斃死しなかつた。すなわち菌塊の多いほど肺に多くの菌塊が定着してマウスを早く斃すことを示している。

次に同一菌量でも浮游液量の少ない方がマウスを早く斃死させているが、これは1mlの菌液はマウスにとつてはかなりの液量であり、従つて血圧を相当高め、そのために肺における透過性をますます高めることになりその結果、液量が少ない場合に比べて肺に定着する菌数が少なくなつたためであると思われる。

Dubos¹⁾らが1947年に25%卵黄生理的食塩水菌液の腹腔内接種は食塩水菌液よりも早くマウスを斃せしめた成績から卵黄は結核菌の対マウス毒力を増強すると述べ、卵黄のみを菌接種前後に注射したのではかかることが見られなかつたので、これは卵黄の中に結核菌の毒力を増強する因子が存在するのに起因しているのではないかと推論している。また彼は結核菌に対する生体側からの有害作用を除去する目的で好んでbovine albumin液¹⁰⁾を菌液の稀釈液として用いている。われわれも同一の実験を試みたのであるが、接種菌量が少なかつたせいか腹腔内接種5疋中各群とも1疋のみが30日までに死亡、生存マウスの剖見では食塩水菌液と卵黄菌液との間に差が見られず、また尾静脈内感染では各種の稀釈液による差異はほとんど認められなかつた。

1953年 Bloch¹¹⁾はCord Factor 研究の初期の論文において、Dubosの液体培地に培養した菌の培養日数の長短およびTween-80の含有量の多少による結核菌の毒力の差を見るのにマウスの死亡日数をもつてし、培養日数が短いほど毒力が強くまたTween-80の濃度が高いほど毒力が減弱すると述べている。もちろんこれは若い培養が古いものよりも増殖力が旺盛でかつ死菌の割合も少なくかつBlochのCord Factorを多く持つていることに原因しているのであろうが、その報告においても言及しているように若い菌は古い菌に比較して菌体が一般的に大きくまた同一濃度の菌液においても全菌数は少ないが菌塊は多いと述べている。またTween-80の含有量が増加するとCordの形成が悪くなり菌の分散が良くなると述べている。われわれの実験では、10日および20日培養が30日および45日培養より菌液の生菌単位が多い傾向を

示した集落の発現が早くかつ集落の大きさも大きかった。感染後6時間目の肺における菌数は10日培養の方が20日培養の約2倍、30日培養の約3倍、45日培養の約5.5倍と圧倒的に多く、2週および3週における病変も高度であり、10日および20日培養感染群ではマウスが感染後20日位から斃死したが、30日および45日培養群では30日に至るもマウスの斃死するのを見なかつた。すなわち若い培養の方が肺に定着する菌数が多く、早くマウスを斃すことが窺える。これは Bloch の言うように若い培養は菌体が大きくかつ菌塊を作り易いという性質とその他の菌の生物学的性質と協同してマウスに作用するのであろう。

結 論

1. 結核菌を尾静内に感染させた場合のマウスに対する Virulence は、菌塊の多い菌液ほど肺に定着する菌数が多く、従つてその増殖も激しく早期にマウスを斃す。
2. したがつてマウスの尾静内感染で結核菌の Virulence を見る場合菌液としては、安定した分散状態の遠心菌液が普通菌液より適当であらう。
3. 菌液作製の場合各稀釈液間ではほとんど Virulence に差は見られなかつたが、培養日数には充分考慮を払うべきであらう。

文 献

- 1) Pierce, C.H., Dubos, R.J. & Schaefer, W.B.: J. Exper. Med., 86, 159~174, 1947.
- 2) Pierce, C.H., Dubos, R.J. & Middlebrook, G.: *ibid.*, 86, 175~184, 1947.
- 3) Rareigh, G.W. & Youmans, G.P.: J. Infect. Diseases., 82(3), 197~204, 1948.
- 4) McKee, C.M., Rake, G., Donovan, R. & Jambor, W.P.: Amer. Rev. Tuberc., 66(1), 90, 1949.
- 5) Stewart, G.T. & Tamargo-Sanchez, M.: J. Hyg., 50(1), 37~52, 1952.
- 6) Gray, D.F., Waksman, B.H., & Bocking, D.: Amer. Rev. Tuberc., 69(6), 991~1001, 1954.
- 7) 水之江公英: 日本細菌学雑誌, 7(3), 125, 1952.
- 8) Ratcliffe, H.L. & Palladino, V.S.: J. Exper. Med., 97(1), 61~68, 1953.
- 9) Butschowitz, E.: Zschr. für Tuberk., 55, 321~323, 1930.
- 10) Pierce, C.H., Dubos, R.J. & Schaefer, W.B.: J. Exper. Med., 97(2), 189~206, 1953.
- 11) Bloch, H. & Noll, H.: J. Exper. Med., 97(1), 1~16, 1953.