

## ハツカネズミ全身 Homogenize 法による結核菌菌力に関する研究

Ⅳ 人型結核菌 H<sub>37</sub>Ra 株およびストレプトマイシン  
依存性人型菌 18-b 株の菌力について

加藤 允彦・三木 勝治・松 永 清輝

国立療養所刀根山病院

受付 昭和 32 年 4 月 24 日

第 1 報<sup>1)</sup>において著者らは臓器内生菌単位数の測定によつて結核菌の宿主体内における分裂増殖能力を評価する場合には、臓器相互間の菌の移動による特定の臓器の菌数増加を真の菌増殖と誤る恐れのあることを指摘した。そして人型結核菌の無毒株 H<sub>37</sub>Ra がハツカネズミに感染後、全身中での population の大きさは徐々に減少するにもかかわらず、臓器中では肝においてのみ持続的に減少し肺・脾などの臓器ではある程度の菌数増加を示すことをみとめた。そしてこのような一部の臓器にみられる生菌単位数の増加が、はたしてこの菌株が肺や脾という臓器環境では増殖し肝では増殖しないということを示すのか、それともこのような菌数増加は感染のち時と共に菌が肺や脾に集積してくるということを示すのかという点に疑問を残しておいた。

また第 3 報<sup>2)</sup>においては、ハツカネズミに対して異なつた病原性を発揮する 6 つの mycobacteria の菌株の宿主体内における増殖力を比較し、結核菌の病原性の強弱を決定する因子としての宿主体内増殖力の意義について考察した。

著者らの用いた全身 homogenize 法によると、H<sub>37</sub>Ra 株はハツカネズミに接種されたのち接種部位<sup>3)</sup>、接種菌数<sup>4)</sup>の如何にかかわらず宿主体内全 population の大きさは常に減少していく。そしてその経過はストレプトマイシン依存性結核菌 18-b 株のそれとよく一致し<sup>2)</sup>、非病原性抗酸性菌 Mycobact. phlei のものとは本質的に相異している。すなわち H<sub>37</sub>Ra 株や 18-b 株では菌数の減少は極めて徐々に感染 6 週後にも生菌が残存しているのにくらべて、Mycobact. phlei では急速に減少して 2 週後には全身に生菌をみとめなくなる<sup>2)</sup>。

18-b 株は分裂増殖にストレプトマイシンを要求する特異な性質<sup>5,6)</sup>から、その宿主体内生存曲線を増殖という因子を除外して評価することができると考えられる。そこで本報においてはこの菌株と H<sub>37</sub>Ra 株とのハツカネズミ全身中および各臓器内生菌単位数の推移を詳細に比較し、いわゆる人型無毒株 H<sub>37</sub>Ra の宿主体内増殖力について明確な知見をえたいと考えた。そしてこのような無毒

菌株の菌力という概念を設定して結核菌の菌力を考察した。

## 材料および方法

1) 動物：大阪純系試験動物研究所から購入した Na-2 系ハツカネズミを用いた。購入後約 2 週間の間 10 匹ずつに群別して固型飼料 (Oriental Pellet Diet MC 5) と水で飼育し、体重の旺盛に増加しつつある生後 6 週前後の雄性動物、平均体重 15g 前後のものを用いた。

2) 菌株：H<sub>37</sub>Ra 株、18-b 株の両菌株は 1954 年に国立予防衛生研究所結核部から分与されたもので 1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 小川培地に月 1 回継代保存されている。18-b 株の保存にはストレプトマイシン 200 $\mu$ g/ml を添加した同培地を用いた。これらの保存株から Sauton 合成液体培地に移した菌膜の H<sub>37</sub>Ra 株；13 日発育、18-b 株；40 日発育から beads flask 法によつて 20mg/ml の菌液を調製した。この菌液を 3,000r.p.m. で 20 分間遠沈して粗大な菌塊を除いた上清菌液は表 1 に示すように大部分が単個菌からなっている。このものを 0.3ml ずつハツカネズミの尾静脈

表 1 使用菌液の分散状態

	1 bacterial unit 中の菌数			
	1	2	3	4<
H <sub>37</sub> Ra	967*	24	6	3
18-b	961	29	6	4

\* 1,000 units をかぞえた値を示す

表 2 ハツカネズミ全身中の生菌単位数

	全身中の生菌単位数 ( $\times 10^{-6}$ )						
	3時間	1	2	3	4	6	8週
H <sub>37</sub> Ra ( $1.6 \times 10^{6*}$ )	<sup>4.8</sup> 4.0	5.5 3.6	1.6 2.2	2.6 4.3	2.3 0.3	0.03 —	— —
18-b ( $4.6 \times 10^{6*}$ )	3.7 2.5	3.8 1.4	3.5 0.4	0.9 0.7	0.8 0.5	0.1 0.2	0.02 0.02

\* 接種生菌単位数 \*\* 動物 2 匹の値を表わす

に接種した。

3) 培養：接種菌液の $10^{-3} \sim 10^{-7}$ ×階段希釈をH<sub>37</sub>Ra株は1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>小川培地, 18-b株はストレプトマイシン200 $\mu$ g/ml加同培地に播いて生菌単位数を測定した。その値は表2に示す。さらに接種直後から週を追って両群から2匹ずつの動物を at random にとりだし、全身中の生菌単位数を全身 homogenize法<sup>1)</sup>により測定した。これと併行してさらに2匹ずつの動物から肺・脾・肝の全臓器を無菌的にとりだして1%NaOHを加えて homogenize し、全量を5 ml としてその階段希釈培養から全臓器中の生菌単位数を算定した。

成 績

1) 全身中の生菌単位数の推移

接種直後から8週までの間週を追って全身から回復される生菌単位数を表2に示し、これらの値と接種した生

図1 H<sub>37</sub>Ra株と18-b株の全身中における生存経過の比較

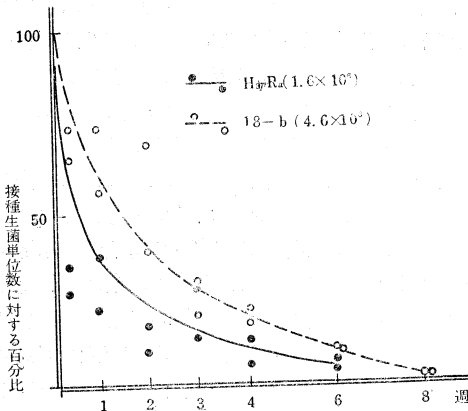
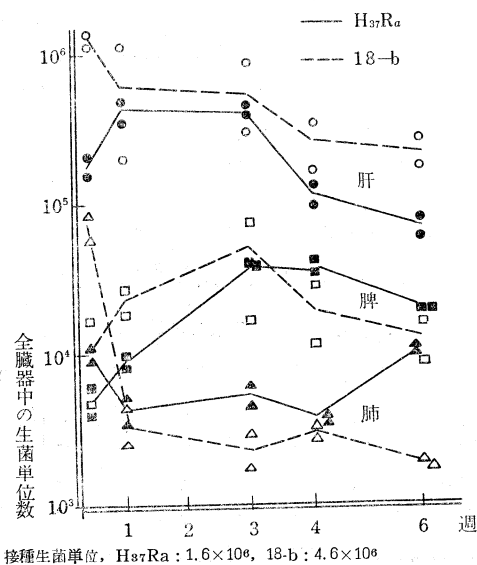


図2 H<sub>37</sub>Ra株と18-b株の臓器内生菌単位数の消長



菌単位数の比を図1にプロットして、両菌株の宿主体内における生存の経過を比較した。

18-b株の持続的な菌数減少は宿主体内で増殖を全くおこなわないで減少していく場合の経過を示すと考えられるが、H<sub>37</sub>Ra株の生存曲線はこれとよく一致している。

2) 臓器中の生菌単位数の推移

肺・脾・肝における各生菌単位数の対数を週を追って図2にプロットして両菌株の臓器中における生存の経過を比較した。この場合にも18-b株とH<sub>37</sub>Ra株の生菌単位数推移はよく一致している。

すなわち肺では直後に培養される菌数が1週後には減少しているが、その後は不規則な増減を示しながら6~8週までつづいている。

脾では両菌株とも3週後まで菌数の増加を示し、3週後にピークをえがいて以後は次第に減少する。

肝では両菌株とも持続的な菌数減少を示した。

考 察

結核感染組織を直接培養することによって感染菌の宿主体内増殖力を推定する実験においては、培養材料として全身あるいは臓器のいずれを用いるにせよ、それは感染菌の population を構成するある一部の菌の増殖、他の一部の生存、そしてさらに他の一部の菌の死滅の総和としての菌数の増加や減少を観察しているのである。すなわち生菌単位数の増加や減少という単純な現象の背後には、宿主と寄生体の間の刻々とうつり変わる interaction によって種々に変化しうるいくつかの異なつた複雑な現象があると考えなければならない。しかもこのような諸現象は、感染条件による初期の菌分布と各臓器の機能的あるいは機能的条件によってそれぞれの臓器ごとに異なつた様相をとるであろう。したがって宿主体内において菌が増殖したということを決定的に結論するためには、全身中の population の大きさの増加を測定するのが最も妥当であると考えられる。また種々の菌株の宿主体内増殖力を比較する場合にも、全身中の総生菌数の増減を測定することによつてはじめて再現性にとんだ成績をえることができるであろう。従来弱毒株BCGと無毒株H<sub>37</sub>Raの臓器内や単球中の生菌数推移の観察において、両者の増殖力が逆であるというような矛盾がみとめられてきた<sup>7)</sup>のも、結局臓器内あるいは単球内という宿主環境の極めて一小部分における現象の観察から宿主体内菌増殖の全貌を推論しようとする方法自体に無理があつたためであろう。本実験において全身中の菌数推移を比較の尺度のひとつとしたのはこのような考察にもとづいてであつた。

つぎに感染の経過中における菌の移動や再分布について考えてみよう。

Pierce ら<sup>8)</sup>は H<sub>37</sub>Rv, Ravenel, Amerzanga の3有

毒菌株をハツカネズミの脳内に接種したのち24時間後から188時間後にわたつて血液中の生菌の有無を検索し、菌接種後数分の間は培養によつて血液中の生菌をとらえることができるけれども、24時間後よりのちは宿主の“clearing mechanism”によつて結核菌は完全に血液から姿を消すとのべている。しかしながらこの事実によつて直ちに結核菌が臓器に固着し増殖をはじめたのちに臓器相互間を移動することはないと考えるのは尙早である。

Rich<sup>9)</sup>, Lurie<sup>10)</sup>の病理組織学的検索によつて明らかにされたように、侵入結核菌がまず宿主の貪食細胞にとらえられて“intracellular stage”とよばれる生活形式をとる場合、リンパ路を介して遊走性貪食細胞と共に菌が移動することは決して考え難いことではない。ことに結核結節、すなわち周囲組織から一応隔絶された環境とみなされる局在性病変が確立されるまでの期間には、増殖に好都合な組織環境への菌の集積や、逆に宿主の防禦機構によつて菌を殺滅排除するのに好適な臓器への菌の移動という因子をも考えて臓器内生菌数の増減を評価することが必要であろう。

ハツカネズミを宿主とした場合にH<sub>37</sub>Ra株の脾および時に肺の生菌数がある程度の増加を示すことは第1報に記載したが本実験においても再び確かめられた。ところがこのような臓器内生菌数の推移にもかかわらず、全身中の生菌数は週を追つて減少し増加の傾向をみせない。このことから著者らは感染→罹患の経過中に臓器相互に菌の移動、特定の時期に特定の臓器への菌の集積があるのではないかと考えた。

この点を明らかにするためにストレプトマイシン依存性人型菌18-b株をえらんだのは、この菌株がつぎのような好都合な性質をそなえているためである。

i) 18-b株は分裂増殖に適量量のストレプトマイシンを必須とする<sup>5)</sup>ためにハツカネズミに接種した場合の生菌数推移から増殖という因子を除外できること。

ii) 橋本による一連の実験<sup>5,6)11)12)</sup>によつて明らかにされたように、この菌株は母株の有毒人型菌H<sub>2</sub>株からストレプトマイシンに増殖を依存するという性質だけが変異したものと考えられ、したがつて菌力を構成する諸性質のうちから宿主体内増殖力だけが欠けた菌株と考えられること。

このような好都合な性質をそなえているために、もしもこの菌株がストレプトマイシンを授与しない宿主のある臓器で菌数増加を示すならば、それは感染の経過中にその臓器に菌が集積することを意味すると結論してよいであろう。さらに任意の弱毒株や無毒株の生菌数推移をこの菌株のそれと比較することによつて、前者の増殖の有無や強弱を推定することもできると思われる。

そこでまず18-b株の全身中における生菌単位数推移を

みると予期したとおり持続的に減少して全く増加の傾向をみせない。しかしながら第3報にもこのべたようにその減少経過は極めて緩徐であつて、侵入後急速に殺滅排除される非病原性抗酸性菌 *Mycobact. phlei* の生菌数推移とは本質的に相異している。つぎに脾の生菌単位数の増減をみると感染3週後まで明らかに脾内菌数は増加するのである。

この事実によつて、感染菌の脾内生菌単位数の増加には固着した菌の真の増殖のほか、時と共に菌が集積してくるという因子も関与していることが明らかにされた。またこのような菌の集積は感染3週後までに終了して、それ以後は集積した菌が脾に固着して増殖するかあるいは次第に死滅排除されるのであろうということも推定できる。さらに有毒結核菌の宿主体内増殖力を失つた変異菌は長期間にわたつて組織内に残存するということが明らかにされた。

そこで以下この18-b株とH<sub>37</sub>Ra株の両菌株を種々の立場から比較考察することによつて、この2つの無毒性結核菌の菌力という概念を設定し解析してみよう。

まず18-b株は人型有毒結核菌H<sub>2</sub>株から橋本によつて分離され5年間にわたつて極めて安定したストレプトマイシン依存性を保持している。しかも最近橋本<sup>9)</sup>はこの菌株がストレプトマイシンの授与によつてほとんど完全に母株H<sub>2</sub>株のてんじくねずみに対する菌力を回復するという興味深い事実を確認した。この成績から明らかのように18-b株は菌力に関与する他の諸因子は無変化のままストレプトマイシン依存性という特異な性質だけが母株とことなつた変異株と考えることができる。この菌株がてんじくねずみにツベルクリン感受性や抗結核免疫を附与する能力をもち、また静脈内感染によつて臓器に顕微鏡的結節をつくる能力をもつ<sup>1)</sup>ことはこの推論を裏付けすると思われる。

一方H<sub>37</sub>Rv株の菌力に関してはSteenkenの分離実験<sup>13)</sup>以後の報告に多くの不一致がみられる。Steenken自身はこの菌株が通常の感染条件では全く宿主に病変を設定する能力を失つたものとし、頻回の動物通過にもかかわらず母株H<sub>37</sub>Rvへの菌力復帰はみとめられないとのべている<sup>15)14)</sup>。

その後この菌株の宿主体内増殖力に関してPierceら<sup>8)</sup>の詳細な実験がおこなわれ、その無毒性の機作は『宿主体内増殖力の喪失』であると結論された。Suter<sup>15)</sup>の単球組織培養実験の成績もこの結論を支持すると考えられる。

ところがPierceらにひきつづいておこなわれたMacknessら<sup>7)</sup>の追試実験では、H<sub>37</sub>Ra感染後ハツカネズミの臓器から培養される生菌単位数がはじめの2~3週の間、とくに脾において増加することがみとめられた。このことは国立予研結核部保存のH<sub>37</sub>Ra株について、金

井<sup>16)</sup>, 佐藤<sup>17)</sup>, 著者ら<sup>1)</sup>によつてもみとめられている。菌株保存条件の相異による菌力復帰の可能性は Steenken<sup>ら</sup><sup>14)</sup>の否定にもかかわらず一応考慮されなければならないし, この点については Dubos<sup>18)</sup>, Mackaness<sup>7)</sup>も指摘している。しかしながら著者らの用いているH<sub>37</sub>Ra株が, ① 通常条件の感染でハツカネズミに病変を形成する働きや宿主を致死させる能力を全く欠き, ② Steenken<sup>13)</sup>の記載した典型的なRa型集落を卵培地上に作り, ③ 全身 homogenize 法によつて測定されるハツカネズミ体内での生菌数推移は終止減少を示し再現性とむ点からみて菌力の復帰がおこつたとは考え難い。

そこでH<sub>37</sub>Ra株の宿主体内増殖力を確定するために全身中および臓器内の生菌単位数の動きを 18-b 株のそれらの動きと比較したのであるが, 両者が完全に一致することからH<sub>37</sub>Ra株の宿主体内増殖力の欠除を結論してよいであろう。ただ18-b株ではこの増殖力の欠除がストレプトマイシン依存性によることおよびストレプトマイシンの授与によつて菌力を復帰することが確かめられているが, H<sub>37</sub>Ra株の場合にはどのような機作によつて宿主体内増殖力が欠除しているのか, またこの増殖力の欠除がこの菌株の全体としての菌力を規制する上にどのように関与しているのか, 直ちに結論するだけの実験事実に乏しい。

この点で極めて示唆にとんでいるのは, H<sub>37</sub>Ra株の大菌量を静脈内に接種するとハツカネズミを致死させるという事実<sup>18)</sup>や, 有毒菌株と同一の毒性物質がこの菌株からも抽出されるということ<sup>19)</sup>, さらにその死菌で宿主を前処理することによつて有毒株H<sub>37</sub>Rvに対する感染防禦力を附与することができる<sup>20,21)</sup>という, Dubos 一派によつて明らかにされた一連の事実である。

以上のような考察にもとづけば, H<sub>37</sub>Ra株は18-b株と同様に数多くの菌力因子のうちから宿主体内増殖力が脱落した無毒株と考えられるのであるが, この増殖力の欠除だけが欠除因子か否かは今後の研究をまつて結論されなければならないであろう。

菌力現象の解析には動物に対して強い病原性を示す強毒菌株を用い, 毒性物質の抽出, 精製や, 生・死菌あるいは精製された菌体成分のあるものによつて宿主組織にひき起される諸変化の病理学的, 生化学的探求という方法が第1にとられる。そして結核菌に関してもいくつかの注目すべき業績が集積されている。しかし方法論的には第2の方向としてこのような強毒菌株から変異した無毒あるいは弱毒菌株を研究の対象とし, 強毒→無毒の変異の機作や無毒菌感染における菌力の reconstruction の条件を追求することによつて病原微生物の菌力を解析することも必要であろう。本報においてはこのような研究方向への出発点としてH<sub>37</sub>Ra株の菌力, とくにその宿主体内増殖力について実験と考察を加えたのである。

## 結 論

ストレプトマイシン依存性人型結核菌18-b株と人型無毒株H<sub>37</sub>Raのハツカネズミ全身中および肺・脾・肝各臓器内における生存, 死滅の経過を比較検討し, 後者が宿主体内において分裂増殖する能力を欠除していることをたしかめた。

本実験は国立療養所刀根山病院山村雄一博士の直接指導のもとにおこなわれた。また国立予防衛生研究所結核部の柳沢謙博士, 室橋豊穂博士, 橋本達一郎, 佐藤直行, 金井興美の3氏からは実験上の貴重な助言や示唆, 菌株の分与など数々の御好意を戴いた。併せて記して厚く感謝の意をあらわす。

## 引用文献

- 1) 加藤允彦・三木勝治・松永清輝: 結核, 30: 638, 1955.
- 2) 加藤允彦・三木勝治・松永清輝: 結核, 掲載予定, 1957.
- 3) 加藤允彦・三木勝治・松永清輝: 結核, 31: 158, 1956.
- 4) 山村雄一・加藤允彦・三木勝治・松永清輝・山村好弘・谷 淳吉・寺井武雄: 第30回日本結核病学会報告, 1955.
- 5) 橋本達一郎: 結核, 30: 4, 1955.
- 6) 橋本達一郎: 結核, 30: 461, 1955.
- 7) Mackaness, G.B., Smith, N. and Wells, A.Q.: Amer. Rev. Tuberc., 69: 479, 1954.
- 8) Pierce, C.H., Dubos, R.J. and Schaefer, W.B.: J. Exp. Med., 97: 189, 1953.
- 9) Rich, A.R.: The pathogenesis of tuberculosis, C.C. Thomas, Springfield, I 11, 1950.
- 10) Lurie, M.B.: Immunology of tuberculosis, in Cyclopedia of medicine, 7: 1, 1950.
- 11) 橋本達一郎: 結核, 30: 237, 1955.
- 12) 橋本達一郎: 結核, 30: 707, 1955.
- 13) Steenken, W. Jr.: Amer. Rev. Tuberc., 38: 777, 1938.
- 14) Steenken, W. Jr. and Gardner, L.U.: Amer. Rev. Tuberc., 54: 62, 1946.
- 15) Suter, E.: J. Exp. Med., 96: 137, 1952.
- 16) Kanai, K., Katsuyama, S. and Yanagisawa, K.: Jap. J. Med. Sci. Biol., 8: 207, 1955.
- 17) 佐藤直行: 医学と生物学, 34: 90, 1955. 結核, 30: 455, 1955.
- 18) Dubos, R.J.: Biochemical determinant of microbial diseases, Harvard University Press,

Camb., Mass., 1954.

J. Exp. Med., 97: 207, 1953.

19) Spitznagel, J.K. and Dubos, R.J.: J. Exp. Med., 101: 291, 1955.

21) Dubos, R.J., Schaefer, W.B. and Pierce, C.H.:

J. Exp. Med., 97: 221, 1953.

20) Dubos, R.J., Pierce, C.H. and Schaefer, W.B.: