

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

## Ⅲ 抗酸性菌の病原性と宿主体内増殖力との関連について

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 2 月 28 日

結核感染ハツカネズミの全身を homogenize し感染全 population の消長を追求することによつて、人型結核菌の有毒株と無毒株の間の宿主体内増殖力の差異が明らかに把握されることは第 1 報<sup>1)</sup>にのべた。

結核菌の菌力において、感染菌の宿主体内における分裂増殖が病原性の発揮に重要な役割を演ずるということは多くの人々によつて強調されている<sup>2)3)</sup>。しかしながら、宿主の感染にはじまつて罹患→死に至る現象には菌増殖そのものの直接的機械的な障害の他に、おそらく特異的な菌体内毒性物質の組織内蓄積とそれによる宿主側の代謝機能や臓器機能の障害、アレルギー性の宿主組織反応および免疫機転の発現などの複雑な宿主・菌間の諸反応が関与すると考えなければならない。

このような結核感染現象の解析はさておき本実験では、

1) 静脈内感染によつて惹起されるハツカネズミ実験的結核を対象とした。

2) ハツカネズミに対する病原性の異なる数株の mycobacteria が宿主体内において示す population 全体としての初期菌数増加と維持される菌数水準を測定した。

それは感染初期における菌増殖が後続する菌・宿主間の諸関係(すなわちその菌の菌力)を左右するところの出発点と考えられるからである。このような立場に立つて宿主体内菌増殖が病原性の発揮にどのような役割を演ずるかということを明らかにするのが本実験の目的であつて、以下その成績をそれぞれの菌株の病原性と関連づけて 2, 3 の考察をこころみた。

## 材料および方法

1. 菌株。実験には次の 6 菌株を用いた。

牛型結核菌 Ravenel 株<sup>\*</sup>;

人型結核菌 H<sub>37</sub>Rv 株;

人型結核菌 H<sub>37</sub>Ra 株;

vole bacillus の D15 株<sup>\*\* 4)</sup>;

非病原性抗酸性菌 Mycobact phlei ;

ストレプトマイシン依存性人型菌 18-b 株<sup>5,6)</sup>。

それぞれの菌株の培養条件および感染生菌単位数は表 1 に示す。菌液の調製は第 2 報<sup>7)</sup>にのべた方法により、80~90%が単個菌からなる均等な遠沈上清菌液を作つてその 0.2ml あるいは 0.3ml をハツカネズミの尾静脈に接種した。

2. 動物。生後 6 週前後の雄性 Sm 系ハツカネズミ(中央実験動物研究所)を用いたが 18-b 感染群だけは Na-2 系ハツカネズミ(大阪純系試験動物研究所)の同一条件のものを使用した。飼育条件は第 1 報<sup>1)</sup>に記載したとおりである。全身中の生菌単位数の測定方法は第 1 報<sup>1)</sup>に詳細に記載したが、18-b 感染ハツカネズミにおいてはストレプトマイシン 200 $\mu$ g/ml 加小川増地を用いて感染生菌単位数および各時期の全身生菌単位数を測定した。

なお全身を homogenize するのに先立つて動物を剖検し、肺表面の肉眼的結核結節および脾の腫大を尺度として結核罹患の強さを評価した。

## 成績

表 1 にはそれぞれの感染群における感染条件とハツカネズミの死亡数および脾・肺の肉眼的変化を示した。

表 1 ハツカネズミに対する各抗酸性菌株の病原性

菌 株	培 養 条 件	接種生菌 単 位 数	動 物 数	死 亡 数	肺 結 節	脾 腫
Ravenel	ソー-ton ポテト 23日	2.20 × 10 <sup>6</sup>	12	6	冊	冊
H <sub>37</sub> Rv	ソー-ton 19日	2.26 × 10 <sup>5</sup>	12	2	冊	冊
H <sub>37</sub> Rv	グリセリン・ブイオン 25日	2.43 × 10 <sup>3</sup>	12	3	冊	冊
Vole bac- illus D15	ソー-ton・ポテト 16日	2.56 × 10 <sup>3</sup>	15	0	-	冊
H <sub>37</sub> Ra	ソー-ton 13日	1.60 × 10 <sup>3</sup>	15	0	-	-
M. phlei	ソー-ton 5日	6.00 × 10 <sup>3</sup>	15	0	-	-
18-b	200 $\mu$ g ストレプトマ イシン加ソー-ton 21日	1.57 × 10 <sup>7</sup>	14	0	-	-

まず各菌株の接種生菌単位数にはやや相異があるけれども牛型 Ravenel 株がもつとも強い病原性を示している。すなわちこの菌株の 2.20 × 10<sup>6</sup> 生菌単位数の静脈内接種をうけた 12 匹のハツカネズミのうち半数の 6 匹は 3 週後までに死亡し、最後に死亡したハツカネズミの剖検においては著しく充血腫脹して微細な結節におおわれた肺と著明な脾腫がみとめられている。

\* 1955年に国立予研結核部佐藤直行氏より分与をうけた。

\*\* 1954年に国立予研結核部室橋豊穂氏から分与されたもの。

H<sub>37</sub>Rv 感染群では培養条件と生菌数の異なつた2つのpopulationを接種したが、ハツカネズミの死亡数と臓器病変の上で10<sup>5</sup>order と10<sup>6</sup>order の両 population の病原性には差がみとめられない。すなわちいずれの場合も結核罹患による死亡は感染4週後以後におこり病変は肉眼的に見て Ravenel 株によるものよりやや軽い。

D15株接種群では感染6週まで罹患死および肺結節はみとめられないけれども脾の腫大が中等度におこる。

H<sub>37</sub>Ra 株, Mycobact. phlei および 18-b 株の接種を受けたハツカネズミ群には死亡・臓器の肉眼的病変のい

ずれもみとめられない。

結局、罹患宿主の死亡数および臓器病変を尺度としてこれら6菌株の病原性を評価してみると、Ravenel, H<sub>37</sub>Rv, D15についてH<sub>37</sub>Ra, Mycobact. phlei および18-bの3菌株の順に病原性がつよいとすることができる。

次に各菌株の宿主体内における全生菌単位数の推移を表2に示し、また宿主体内生菌数と接種生菌単位数の対数比を週を追つて図1にプロットして各菌株の宿主体内増殖率を比較した。

表および図から明らかなように、ハツカネズミの死亡

表2 ハツカネズミ全身中における各抗酸性菌株の生菌単位数消長

菌 株	10 <sup>-5</sup> × 全身中の生菌単位数						
	Ravenel	H <sub>37</sub> Rv	H <sub>37</sub> Rv	D15	H <sub>37</sub> Ra	M.phlei	18-b
接種生菌単位数	22×10 <sup>5</sup>	2.26×10 <sup>5</sup>	24.3×10 <sup>5</sup>	2.56×10 <sup>5</sup>	16×10 <sup>5</sup>	60×10 <sup>5</sup>	157×10 <sup>5</sup>
24 時 間	75.4 84.4	1.17 2.21	22.3 25.0	3.78 1.25	4.80 6.24	48 60	181 97
1 週	109 280	3.84 2.01	4.55 11.6	0.21 0.38	5.45 3.57	0.31 0.15	44 52
2 週	1140 6020	26.6 32.6	85.6 96.9	0.54 0.81	1.62 2.20	0 0	— —
3 週	All mice dead from infection	318 325	720 325	1.05 1.14	2.65 4.31	0 0	34.6 13.6
4 週		193 75	448	0.49 1.41	0.31 2.32	0 0	8 6
6 週		All mice dead from infection		0.20 0.61	0.03 0	0 0	4.5 5.3

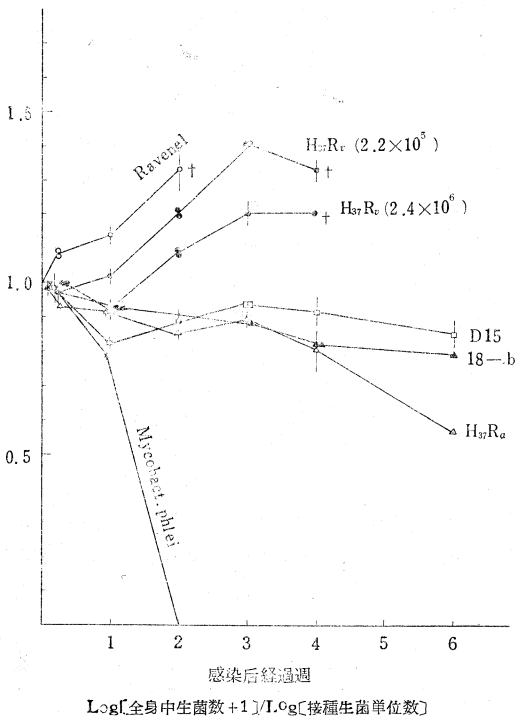


図1 抗酸性菌各菌株のハツカネズミ全身中における生菌数増加率の比較 接種生菌単位数は表1, 2を参照 +: この日のハツカネズミ全部結核罹患により死亡

と臓器病変の上からもつとも病原性がつよいと評価された Ravenel 株においては、全身の生菌単位数が接種後直ちに増加上昇をつづけ2週後には10<sup>6</sup>orderの菌数から出発して10<sup>8</sup>orderに達している。

H<sub>37</sub>Rv 株の宿主体内生菌数増加は Ravenel 株より1週遅れておこり3週後に最高に達して以後減少の傾向を見せる。

D15株では全体として減少傾向を示すけれどもその経過はゆるやかであり、1週後から3週後にかけての軽度の菌数増加はこの期間にある程度の菌増殖があることをおもわせる。

H<sub>37</sub>Ra 株と18-b 株の全身中生菌単位数の推移は全く同様の経過をたどつて終止減少する。

最後に Mycobact. phleiの場合には感染2週後までに宿主体内生菌数は0となる。

考 察

研究室における結核感染実験の材料として、私たちは実験動物に対して強い病原性を示し諸臓器に顕著な肉眼的病変を作つて動物を致死させる菌株、これらの菌株から変異し病原性を減弱あるいは喪失した菌株、およびいくつかの非病原性抗酸性菌の菌株をもっている。

これらの菌株を同一の感染条件のもとに一定の宿主に接種した場合にみとめられる病変の有無や強弱、さらに

感染→罹患の進行にともなう宿主の死亡という現象からそれぞれの菌株の菌力という概念が生れ評価されてきた。菌力という言葉が病原性の強弱という概念で理解され用いられる限りにおいては、それは一定条件下における感染によつて始まり種々の形をとつて宿主にあらわれる病変結果によつて表現することができる。しかしながら一方細菌学的な立場に立つて病原性細菌の側から菌力を解析するということは、どのような宿主と寄生体との相互関係においてある菌株は高度の病原性を発揮し、ある菌株は病原性が弱く、また他の菌株は全く病原性を欠くのかということを示すことである。そのためには感染後宿主に種々の病変結果があらわれるまでの間に宿主体内において菌の生存し増殖しまた死滅してゆく過程をまずとらえなければならぬと考えられる。

このような立場に立つて本実験では強毒菌株として Ravenel, H<sub>37</sub>Rv, 弱毒菌株として D15, 無毒菌株として H<sub>37</sub>Ra と 18-b, および非病原性抗酸菌菌株として Mycobact. phlei をえらんだ。

有毒結核菌が宿主に致死性的罹患を惹起する場合の臓器内菌増殖の様相に関してはすでに多くの報告があり<sup>3, 8) ~ 12)</sup>、骨髄、脾、肝などの臓器では感染後 2~4 週で最大値に達して以後減少する傾向をみせ、肺や腎では宿主の死に至るまで増加するとされている。このような菌増殖を先駆として各臓器の病変形成、宿主個体の衰弱と死がひきつづいておこなるのであるが、感染症の場合に宿主体内において到達される菌数水準が感染の終結果である宿主の死とどのような関連をもつかを検討することは興味深い。

Smith<sup>ら</sup><sup>13)</sup>は Bacillus anthracis について、Dubos<sup>14)</sup>は Micrococcus pyogenes var. aureus, Berry<sup>ら</sup><sup>15)</sup>は Salmonella typhimurium において、感染後の菌の宿主体内で到達する population の大きさと宿主の死との間に一義的な関係のみとめている。これらの bacteriemia あるいは腹腔内における急激な菌増殖を基盤とする急性の実験的感染症において、菌増殖が病原現象に演じる役割をそのまま結核症の場合に類推することはできないであろう。何故なら実験的結核感染の場合には菌の侵入と組織内増殖および宿主の罹患死の間の期間が長く、複雑な宿主と寄生体相互の interaction を予想させるからである。しかしながら菌増殖が感染の初期において少なくとも罹患の確立を左右する上に決定的な役割を演じるということは、結核という特異な感染症においても他の急性感染症の場合と同様と考えられる。このような観点からすれば菌の感染初期における宿主体増殖力そのものを菌力とする立場は正しいけれども、さらに将来種々の実験方法を組合わせて菌力現象は解析されなければならないであろう。

さて Ravenel 株と H<sub>37</sub>Rv 株の 2 菌株によるハツカネ

ズミの感染は 10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup> order の生菌によつていずれも致死性的罹患をきたすけれども、前者の場合には宿主の罹患死は感染後 1~2 週におこり、後者による死亡は 4~6 週の間におこる。致死ハツカネズミの臓器病変の上では両菌株間の差はそれほど著明ではない。

そこで図 1 によつて両菌株の増殖の様相を比較すると Ravenel 株の場合は接種された直後から直ちに増殖がはじまり 2 週後まで全く減少の傾向をみせない。H<sub>37</sub>Rv 株の場合には増殖開始は 1 週おくれおこるが、1 週以後の増殖率は図 1 から明らかなように Ravenel 株と変わらない。いずれの場合も 2 週間をわたる急激な菌数の増加を示しこれにひきつづいて臓器病変が著明にあらわれ宿主の死がはじまる点は共通している。

到達する菌数水準は Ravenel 株では 10<sup>8</sup> order, H<sub>37</sub>Rv 株では 10<sup>7</sup> order であつて、宿主体内における菌の population の大きさが宿主の死に直接的な関係をもつということも考えられるが、結核菌の病原現象には Ravenel 株で感染直後から 2 週後まで、また H<sub>37</sub>Rv 株では 1 週後から 3 週後までにみられた宿主体内菌数の急激な増加が病変の設定や宿主の死に密接な関係をもつと考えられる。

Youmans<sup>ら</sup><sup>16)</sup>は大量の生菌を静脈内に接種して体内の結核菌生菌量がある limit (H<sub>37</sub>Rv 株の乾燥菌量 10mg) をこえた場合にハツカネズミに急性致死がおこることをみとめ、宿主体内において感染菌が到達する population の大きさによつて結核感染における死亡の機作を説明しようとした。さらに Dubos<sup>17)</sup>はこのような現象が無毒菌株 H<sub>37</sub>Ra 株の菌体や phenol で脱脂した菌体によつてもみとめられるとのべている。同様の現象は Smith<sup>ら</sup><sup>13)</sup>によつて Bacillus anthracis でみとめられた。すなわちこの著者たちによると Bacillus anthracis の腹腔内感染をうけ臓器内生菌数が一定水準に達した動物(テンジクネズミ)では、ストレプトマイシンを与え以後の菌数増加を阻止してもはやその罹患死を防ぐことはできないという。罹患という現象が宿主と寄生体の闘争である限り、寄生体側の圧倒的な量的増大が宿主に対して致死的な影響をおよぼすことは、その機作が直接的であれ間接的であれ当然であろう。Ravenel 感染ハツカネズミにおける死はまさにこのカテゴリーに入るものと考えられる。宿主体内に入ったのち直ちに旺盛な増殖過程を示し、早期に宿主の死を招来する Ravenel 株のような菌株をもつてもつとも菌力の強いものと評価すべきであろう。

H<sub>37</sub>Rv 感染の場合の宿主の死亡は上の Ravenel 感染の場合と質的にことなると考えられる。すなわちこの場合には侵入後増殖の開始までに 1 週間の lagphase があり、また感染 3 週後をピークとして全身中の菌数は減少の傾向をみせ、さらに到達する宿主体内全 population

の大きさも Ravenel 株の場合より小さいにもかかわらず4週以後に宿主の死亡が観察されるのである。この事実もまた結核感染における宿主の死が単純に宿主体内における菌の population の大きさによつてのみ決定されるものではないことを示している。この場合は感染→罹患の経過中に Ratcliffe ら<sup>18)</sup>によつて“heterogenous stage”と表現された複雑な宿主と菌との相互関係が成立して宿主は死亡、生残のいずれかの方向に分れると思われ。H<sub>37</sub>Rv株感染の場合のハツカネズミの死亡はかなり不規則であるが、宿主体内菌数推移における Ravenel 株の場合との相異はある程度の説明を与えるものと言えよう。このような罹患をみちびくH<sub>37</sub>Rv株は先の Ravenel 株よりも菌力が弱いとすることができるであろう。McKee ら<sup>19)</sup>によつても Ravenel 株感染時の極めて規則的なハツカネズミの死が観察され、H<sub>37</sub>Rv株感染時において一部の生残ハツカネズミをのこす不規則な致死力との差異が強調されている。

D15株の菌数経過をみると、感染1週後までの lagphase はH<sub>37</sub>Rv株の場合よりさらに著しく、1週後～3週後の増殖はもしあるとしても極めて弱い。そして3週以後菌数は次第に減少しはじめ結局病変も中等度の脾腫にとどまり宿主の死もみられない。

次に H<sub>37</sub>Ra株と 18-b 株では感染後の宿主体内菌数はほとんど同様に経過してゆるやかに減少していく。18-b 株はストレプトマイシン依存性という特異な性質のために宿主体内増殖力を欠いた菌株であり<sup>20)21)</sup>、ストレプトマイシンを投与することによつて増殖力が回復し病原性を復帰することがみとめられている<sup>22)</sup>。すなわち母株の強毒人型菌株H<sub>2</sub>株からストレプトマイシンに分裂増殖を依存するという性質だけが変異したために、菌力を構成する諸因子のうち宿主体内増殖力だけを欠いた菌株と考えてよいのであるが、この菌株とH<sub>37</sub>Ra株の生菌単位数の経過がこのようによく一致することは、H<sub>37</sub>Ra 株の無毒性の機作を考える上に示唆するところが多い。この点に関しては第4報<sup>23)</sup>に両菌株の宿主体内における態度を詳細に比較して考察したいとおもう。

Mycobact. phlei の場合には接種後の生菌単位数の減少は極めて急激であつて2週後までに全身から生菌を証明することができなくなる。Mycobact. phlei とH<sub>37</sub>Ra 株、18-b株の2菌株は同じくハツカネズミに対して病原性を欠くのであるが、前者はハツカネズミ組織のもつ防禦機転によつて速やかに殺滅排除されると考えられるのにくらべ、後2者の場合は増殖力の欠陥によつて漸減し病変設定の能力を欠くと考えられる。すなわち本実験において Mycobact. phleiによつて代表されたいわゆる非病原性抗酸性菌の無毒性与、有毒の母株から変異した無毒菌株の無毒性与とは本質的にことなつたものといふことができよう。

## 結 論

ハツカネズミに対してそれぞれことなつた病原性を示す6つの mycobacteria の菌株を用い、感染後宿主の全身中の population の動向を追求することによつて、結核菌の菌力現象における宿主体内増殖力の役割について論じた。

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。また実験をすすめていく上の助言、鞭撻を国立予防衛生研究所結核部の柳沢謙博士、室橋豊徳博士、橋本達一郎氏、佐藤直行氏ほかの部員諸氏に負うところは極めて大きい。記して厚く感謝の意を表わす。

## 引用文献

- 1) 加藤允彦・三木勝治・松永清輝：結核，30：638，1955.
- 2) Rich, A.R. : The pathogenesis of tuberculosis, C.C. Thomas, Springfield, Ill., 1950.
- 3) Pierce, C.H., Dubos, R.J. and Schaefer, W.B. : J. Exp. Med., 97 : 189, 1953.
- 4) Wells, A.Q. : Le type murin du bacilles tuberculeux, dans Bacilles tuberculeux et paratuberculeux, par P. Hauduroy, E. Chain, H. Florey, K.A. Jensen, G. Panso, J. Trerouel et A.Q. Wells, Masson C., Paris, 1950.
- 5) 橋本達一郎：医学と生物学，23：201，1952.
- 6) 加藤允彦・三木勝治・松永清輝：医学と生物学，35：81，1955.
- 7) 加藤允彦・三木勝治・松永清輝：結核，31：158，1956.
- 8) Lurie, M.B. : J. Exp. Med., 48 : 155, 1928.
- 9) Wessels, C.C. : Am. Rev. Tuberc., 43 : 459, 1941.
- 10) Fenner, F., Martin, S.P. and Pierce, C.H. : Ann. New York Acad. Sci., 52 : 751, 1949.
- 11) Fenner, F. : Am. Rev. Tuberc., 64 : 353, 1951.
- 12) Mackaness, G.B., Smith, N. and Wells, A.Q. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 479, 1954.
- 13) Smith, H. and Keppie, J. : Studies on the chemical basis of the pathogenicity of Bacillus anthracis using organisms grown in vivo, in Mechanisms of microbial pathogenicity, University Press, Cambridge, 1955.
- 14) Smith, J.M. and Dubos, R.J. : J. Exp. Med., 103 : 87, 1956.
- 15) Berry, L.J., DeRopp, M.K., Fair, M.H. and

- Schur, E.M. : J. Infect. Dis., 98 : 198, 1956.
- 16) Youmans, G.P. and Youmans, A.S. : Am. Rev. Tuberc., 64 : 534, 1951.
- 17) Dubos, R.J. : Biochemical determinants of microbial diseases, Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass., 1954.
- 18) Ratcliffe, H.L. and Wells, W.F. : J. Exp. Med., 87 : 575, 1951.
- 19) McKee, C.M., Rake, G., Donovan, R. and Jambor, W.P. : Am. Rev. Tuberc., 60 : 90, 1949.
- 20) 橋本達一郎 : 結核, 30 : 4, 1955.
- 21) 橋本達一郎 : 結核, 30 : 21, 1955.
- 22) 橋本達一郎 : 結核, 30 : 39, 1955.
- 23) 加藤允彦・三木勝治・松永清輝 : 結核, 投稿予定, 1957.