

流動パラフィンに包埋し、感染せしめた場合の結核菌の病原性、毒力の特殊な修飾について

1. 人型結核菌

土 井 和 雄

京都大学結核研究所細菌血清学部（指導 植田三郎教授）

国立京都療養所（所長 蒲田小吉博士）

受付 昭和 35 年 6 月 22 日

緒 論

Hagen & Lévine¹⁾をはじめとして多数の研究者^{2)~17)}は結核加熱死菌に流動パラフィン（以下流パラと略す）その他各種 Adjuvant を付加し、また生沼¹⁾、山田¹⁴⁾、山口¹⁶⁾は少量の BCG 生菌に流パラを付加して動物に接種し、その感染防御力に与える影響を観察している。しかしながら結核生菌に流パラおよびその他の油脂を付加して動物に接種し、菌の病原性、毒力がどのように変化するかについて吟味した報告はいまだみないようである。

最近岡田¹⁷⁾は流パラ加結核加熱死菌ワクチンによる感作、免疫機序の検討において、流パラ死菌ワクチンは食塩水死菌ワクチンに比すべくもなく顕著に大量の菌体が流パラに吸着、運搬されて、臓器組織内に速やかに散布され、ほとんどすべての菌体が細胞に貪食されことなく、流パラ滴に密接して存在し、臓器組織内には大量の単核球の游出をうかがいえたことと記載した。著者は岡田¹⁷⁾の研究に示唆を得て、感染の自然の過程に沿って観察するという在来の方法によらないで、むしろ自然の過程を破壊して、すなわち流パラに包埋した結核生菌を動物に接種し、菌が容易に細胞に貪食されることを妨げるようにしたとき、はたしてその菌の病原性、毒力がどのように修飾して表現されるかを観察した。本編においてはまず人型結核菌を供試し、そのマウスに対する病原性、毒力が上記のような感染方法によつてどのように修飾されるか、またその修飾ははたしてどのような機転によつて招来されるものかを多少とも検討した。

実験その 1 H37Rv 株

毒力の強い H37Rv 株を供試し、流パラ菌液および対照として食塩水菌液をマウスの腹腔内に接種し、生残日数および臓器病変を肉眼的に、また臓器剖面から圧印標本作製し、菌の増減、消長を鏡検的に比較検討した。

〔方法〕

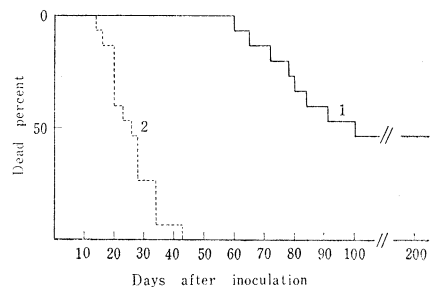
グリセリンブイヨン 3 週培養の菌を 20 mg/ml になるように流パラあるいは食塩水を加えて菌液を作製した。均一系マウス H 系の生後 1 カ月の体重約 15 g のもの 60 匹を 30 匹宛 2 群に分ち、1 群には流パラ菌液を、他群には食塩水菌液の 0.5 ml (10 mg) 宛を腹腔内に接種し、各群とも 15 匹は生残日数の観察に供し、残りの 15 匹は接種後 24 時間、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 14, 18 週に麻酔致死せしめて、各臓器の病変を肉眼的に観察し、同時に肺、肝、脾および腎の剖面の圧印標本作製し、Ziehl-Neelsen 染色を施して鏡検し菌の消長を追跡した。臓器からの定量培養ももちろん試みたのであるが、菌が流パラ滴に密着しているために定量培養によつて得られた生菌数の数値には方法の性質上はたしてどれだけの信頼がおけるか疑わしいと考えられるので、その成績の記載は省略する。

〔成績〕

(1) 生残日数の推移

Fig. 1 に示すように対照の食塩水菌液では接種後 14 日から死亡しはじめ、43 日で使用マウス 15 匹がすべて死亡し、T₅₀ は 26 日であつた。しかるに流パラ菌液では供試マウス 15 匹のうち 8 匹が 60 日後から

Fig. 1 The dead percent of the mice inoculated intraperitoneally with 10 mg of virulent H37Rv strain.



Line 1: animals inoculated with H37Rv strain embedded in liquid paraffin.

Line 2: mice inoculated with saline suspension of H37Rv strain.

100日後の間に死亡し、残り7匹は200日後なお生残した。上記のように流パラ菌液は食塩水菌液に比して接種マウスの生残日数をかなり顕著に延長し、とくにある日数以上生残したマウスの死亡は顕著に延長し、正規分布をとらなくなつた。すなわち強毒菌 H37Rv 株を流パラに包埋し、マウスに感染させることによつてその病原性、毒力の表現は食塩水菌液に比してやや顕著に減弱せられることを知つた。

(2) 臓器の肉眼的変化の推移

食塩水菌液では1,2週後に腸間膜淋巴腺の腫脹、膿瘍化が出現し、引き続き肺に粟粒大結節を生じ、ついで乾酪化し病巣は増大した。2,3週後から肝、脾および腎にもまた結核性病変を認め、これら臓器と大網および腸間膜淋巴腺との癒着が漸次増強した。しかるに流パラ菌液においては1週後から腸間膜淋巴腺が粟粒大に腫脹し、肝、脾、胃、腎および大網の癒着を認めた。これらの癒着は脾を中心としてみられ、3,4,5週と経過するに従つて増強され、かつこれら臓器の表面は結合組織の被膜で被覆された。しかし肺、肝、脾等の臓器には10週後までには結核性病変はみられなかつた。14週後には両肺に粟粒大の結節を認め、肝および脾にも数々の粟粒大結節を認めた。18週後には上記病変が増強した。すなわち流パラ菌液では食塩水菌液に比して一般にマウスにおける結核性病変の出現が顕著に遅延され、流パラ菌液接種のマウスの生残日数が食塩水菌液に比し、やや顕著に延長された事実とよく平行した。

(3) 臓器組織内の菌の消長

食塩水菌液では24時間後いずれの臓器中にも少数の菌を認め、2週以後では各臓器とも菌数は増加し、明らかに増殖を思わせる配列を示しており、しかもこれらの菌集団はほとんど細胞内に存在していた。一方流パラ菌液では趣を異にし、24時間後すでに臓器中に弱拡大($\times 80$)で多数の流パラ滴を認め、強拡大($\times 1,000$)で鏡検すると、その流パラ滴は20~50 μ 内外のものが多くまれには100 μ 内外、10 μ 内外のものもあつた。流パラ滴に密接して周辺部に多数の菌体を認めたが、流パラ滴を離れてはほとんど菌体を認めることはなかつた。1週後には流パラ滴は一般にやや小形となり、菌は一部においては引き続き増殖像を示したが、多数の流パラ滴においてはがいて菌数の増加はみられず流パラ滴の周辺部に多少とも集合する傾向を示した。週を経るにつれ流パラ滴は減少し、20 μ 内外と小さくなつており、一方流パラ滴に密接した菌は増殖像を示さずかえつて変性、崩壊し、抗酸性も弱くなり顆粒状となつた。なお10週後結核性病変をきたしたマウスは各臓器組織内において細胞の内外に多数の菌がみられた。

以上のように H37Rv 株を流パラ菌液としてマウスに接種すると、食塩水菌液の場合に比して菌はより速やか

にかつ大量に臓器組織内に流パラ滴に密着した状態で運ばれ、細胞に貪食されることがほとんどなかつた。またその後の経過では菌の増加は著しく抑制された。臓器組織内の菌の消長に関するこのような成績は上記の生残日数および臓器病変の観察の結果とよく平行した。すなわち H37Rv 株を流パラに包埋し、感染せしめるとマウスに対する病原性、毒力の表現は食塩水菌液に比し顕著に低弱化せられた。

実験その2 Frankfurt 株

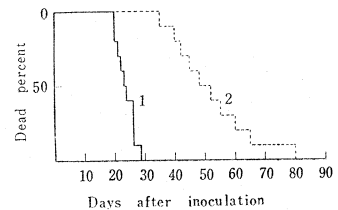
H37Rv 株に比し毒力がやや弱い Frankfurt 株(以下 F 株と略す)を供試し、上記実験その1と同様にして流パラ菌液および対照として食塩水菌液を作製してそれぞれマウス腹腔内に接種し、生残日数、臓器の病変および臓器組織内の菌の消長を比較検討した。

〔成績〕

(1) 生残日数の推移

Fig. 2 に明らかなように食塩水菌液では接種後35日から死にはじめ、80日で供試マウス10匹はすべて死亡

Fig. 2 The dead percent of the mice inoculated intraperitoneally with 10 mg of F strain.



Line 1: animals inoculated with F strain embedded in liquid paraffin.
Line 2: mice inoculated with saline suspension of F strain.

し、 T_{50} は52日であつた。これに反し流パラ菌液では上記よりも速やかにすなわち20日から死にはじめ、29日以内に使用マウス10匹はすべて死亡し、 T_{50} は23日であつた。以上のように流パラ菌液では生残日数が食塩水菌液に比してやや顕著に短縮され、一見 F 株のマウスに対する病原性、毒力の表現は増強された。

(2) 臓器の肉眼的変化の推移

食塩水菌液においては上記 H37Rv 株と同様に1,2週後に腸間膜淋巴腺の腫脹ないしは膿瘍化および大網、脾、胃等の腹部臓器の癒着、大網の限局性の膿瘍化が出現し漸次増大した。3週ごろから肺に粟粒大の結核結節を生じ、週を経るにつれて乾酪化し病巣は拡大した。4,5週後から肝および脾にもまた結節を認め次第に増大した。しかるに流パラ菌液では一般に腹部臓器の変化は急激であつて、1週後には腸間膜淋巴腺、大網、肝、脾、胃等の腹部臓器が脾を中心として相互に強く癒着し、週を経過するに従つて癒着は非常に強くなり、肝、脾およ

び腎の表面は結合織性の被膜で被われた。3, 4 週後には肺, 肝および脾に充血を認め出血性の傾向があつた。なお 2 週以後では腹腔内に血性のやや黄色を帯び濁した腹水の貯溜がみられた。

(3) 臓器組織内の菌の消長

食塩水菌液では 24 時間後にいずれの臓器中にも赤染菌体を認めることはできなかった。1 週後には少数の菌が見出され, 3, 4 週以後になると漸次菌数は増加し, 5, 6 週以後には各臓器とも非常に多数の菌を保持した。しかるに流バラ菌液においては, 24 時間後すでに臓器中には多数の微細な流バラ滴がやや多数の菌を密着した状態で撒布せられ, 上記 H37Rv 株の場合とほとんど同様の所見であつた。1 週後になつても流バラ滴は減少せず, 流バラ滴の周辺部に密着して存在したほとんどの菌体は大部分が増殖を思わせる配列を示し, 2 週以後には増加した菌は網目状に配列し, 流バラ滴全面を被うにいたつた。なお流バラ滴を離れて赤染した菌をほとんど認めえなかつた。このように流バラ菌液においてはマウス臓器内に流バラ滴に密着して多数の菌が撒布せられ, 週を追つて菌数の増加が著しく上記の食塩水菌液の場合とは顕著に相違した。この結果を上記(1)において流バラ菌液がマウスの生残日数を顕著に短縮した事実と照合するとき興味深いものがある。

実験その 3 H37Ra 株

次に無毒化した人型菌とみなされている H37Ra 株を供試し, 流バラならびに食塩水菌液として 10 mg 宛をマウス腹腔内に接種し, 上記同様の検討を行なつた。

〔成績〕

(1) 生残日数の推移

食塩水菌液, 流バラ菌液のいずれを接種したマウスも 6 カ月間の観察中には死亡しなかつた。

(2) 臓器の肉眼的変化の推移

食塩水菌液では 1 週後数々の腸間膜淋巴腺が腫脹し, 膿瘍化した, 週を経るにつれ軽快し遂に消失した。流バラ菌液では 1 週後脾を中心とした腹部臓器のかなり強い癒着がみられ, 漸次増強し, 肝, 脾および腎の表面は結合織性の被膜で被われたが, この癒着は H37Rv 株および F 株の流バラ菌液でみたような鞏固なものではなかつた。

(3) 臓器組織内の菌の消長

食塩水菌液では 24 時間後は脾を除く他の臓器のいずれにも菌を認めることはできなかった。脾では非常に少数の菌をみた。1 週後には各臓器中にきわめて少数ながら菌が見出されるにいたり, 脾では菌数はやや増加した。2 週後には脾の菌数は減少したがその他の臓器中にはすでに菌は姿を消した。3 週以後になると各臓器ともすでに菌を保持しなかつた。これに反し流バラ菌液では

24 時間後すでに各臓器に多数の微細な流バラ滴が散在し, その周辺部にはやや多数の菌を認め, 上記の H37Rv 株および F 株の流バラ菌液の場合にみられたと全く同様であつた。2 週後になると流バラ滴周辺の菌は増殖を思わせる配列を示し, 4, 5 週と経過するにつれ網目状の配列をし流バラ滴の表面を被うにいたつたが, それは上記 F 株の流バラ菌液の場合にみられたほどに顕著なものではなかつた。7, 8 週後になると流バラ滴上の菌数は次第に減少し, 増殖を思わせる上記のような配列はみられなくなり, 大多数の菌体は淡く赤染し, 変性, 崩壊しつつあるように思われた。20 週には流バラ滴は目立つて小形となり, またその数も顕著に減少し, その周辺部にごく少数の変性, 崩壊した顆粒状の菌体のみみられたにすぎなかつた。

総括ならびに考案

結核菌の病原性, 毒力に関しては古くから多数の報告がある。この場合細胞と菌, 体液と菌との関係が重要な手掛りを与えるのではないかと考えられる。この点についてもすでに多数の人々によつて検討されてきたが^(18)~22), その研究方法は感染の自然の過程に沿つて観察するように考案せられた。著者はむしろ感染の自然の過程を破壊して, 言い換えると接種された菌が細胞に貪喰されることをできるだけ妨げるように工夫して感染させたときに当該菌の病原性, 毒力の表現がはたしてどのように修飾されるかを観察した。

強毒菌 H37Rv 株の流バラ菌液はマウスの生残日数を食塩水菌液の場合に比し顕著に延長し, また一部腹腔内臓器の癒着を除いては, 臓器の肉眼的変化は感染初期にはほとんどなく, 結核結節は食塩水菌液に比し遅れて出現した。また大多数の菌は散在する流バラ滴に密接して存在し, 細胞内に存在することはほとんどなく, 食塩水菌液の場合と異なつて週を経るも菌数の増加はみられなかつた。このように H37Rv 株の病原性, 毒力の表現は流バラ菌液とすることによつて食塩水菌液よりも明らかに低弱化されることが確認された。次に弱毒菌 F 株の流バラ菌液はマウスの生残日数を食塩水菌液に比して短縮し, 上記 H37Rv 株の場合とは逆であつた。臓器とくに肺, 肝および脾には出血性傾向を認めた。また菌は流バラ滴の表面で顕著に増加したが, 食塩水菌液では細胞内に摂取されてその増加は緩徐であつた。すなわち弱毒の F 株においては, 細胞内よりもむしろ流バラ滴に密着してすなわち体液中に露出しているゆえに菌の増殖が促進されるかのようであつた。次に無毒の H37Ra 株の流バラ菌液を接種したマウスは食塩水菌液の場合と同様に 1 匹も死亡しなかつたが, 流バラに吸着され臓器組織内に撒布された菌は, 以後の経過中に一時的に菌数の増加を示した。因みに食塩水菌液では 2 週以後臓器内に菌

はみられなかった。以上の所見からみると、H37Ra株は細胞内に摂取されるとその増殖がほとんど不可能となるが、流パラ滴に密着して体液中に露出して存在する場合に増殖が多少とも可能なことを推測せしめた。

上記3株の観察の結果からまず最初に気付く点は、接種した菌の臓器組織内における特殊な撒布の状態である。強毒菌、弱毒菌および無毒菌のいずれもが流パラ菌液として動物に接種せられると、菌は流パラに吸着された状態で臓器組織内に食塩水菌液の場合よりもより大量に撒布された。次にはこのようにして流パラに吸着、撒布された菌はほとんど細胞内に摂取されることなく、流パラ滴に密着し、体液中に露出した状態で存在した。因みに組織内に撒布された流パラ滴はその大きさは数 μ 〜数10 μ であった。もとよりこのような大きな流パラ滴が腹腔内からそのままの大ききで運ばれてきたとは到底考えられない。おそらくはそれぞれごく少数の菌を吸着したごく微細な粒子として組織に運ばれ、しかるのち組織内で融合して大形になったものと推測せられる。ミコバクテリウムの油水系における態度については Mudd²³⁾ 以来多数の報告がある^{24) 25)}。とくに最近大岩²⁶⁾ が各種の細菌、菌類の油水系における吸着率を検討した結果によれば、上記観察においても実際には菌体は流パラ中に包埋せられて存在するとみるよりは、流パラ滴の表面にすなわち体液との界面に菌体が吸着されて存在するものとみるほうがむしろ穏当のようである。因みに表題に包埋と記載したのはただ単に慣例に従つたにすぎない。このようにみれば、次のような考察も許されるであろう。無毒の H37Ra 株は細胞内では増殖が許されないが、体液中では多少ともそれが許される。また弱毒の F 株では細胞内の増殖は初期にはかなり緩やかであるが、体液中ではやや顕著に促進される。しかるに強毒の H37Rv 株では細胞内での増殖はかなり顕著であるが、体液中の増殖は目立つて抑制される。このことが流パラの介在によつてこれら3株の毒力を異にする人型菌の病原性、毒力のそれぞれ特徴のある修飾となつて表現せられるのであろう。この結果は言葉を換えていえば強毒の菌は細胞内増殖の能力をもつが、体液中での増殖能力が乏しい。反対に弱毒の菌は細胞内増殖の能力は弱い、体液中での増殖の能力が強いということではないかと考えられる。もしこのような考察が正しいとするならば、細胞内での増殖の能力は弱い、体液中での増殖の能力が多少とも強い菌においては、流パラの添加はそのような菌の体液中での増殖を容易にする機会を与えるものと考えられよう。また逆に強毒の菌すなわち細胞内増殖力は顕著であるが、体液中での増殖の弱い菌においては、流パラの添加によつてそのような菌を、しいて体液中に留まらしめるならば、その増殖を不利にするということが当然考えられよう。このように考察するにあつては、もちろん細

胞内あるいは体液中の抗菌物質との関係を顧慮すべきは当然であるが、上記の結果はむしろこれら毒力を異にする3株の人型菌の細胞内および体液中における栄養物質の利用能力すなわち代謝能力の差異というようなことと関連して考察するほうが理解しやすいように思われる。上記の所見は結核菌の病原性、毒力に関係した1つの非常に興味深い現象のように思われる。なお上記の観察においては流パラ菌液を接種したマウスの早期死亡をその病原性、毒力の表現の1つとして取り上げたわけであるが、比較的大量の菌を接種し、しかも臓器内での増殖が顕著なのであるから全身的な中毒、すなわち菌の毒性ということも加味されていることは当然顧慮すべきであろう。この点については後編において吟味したい。

結 論

1) 流パラ菌液とした場合は、人型強毒菌 H37Rv 株、同弱毒菌 F 株および同無毒菌 H37Ra 株の3株とも、菌は流パラ滴とともに臓器組織内に食塩水菌液よりはより速やかに、より大量に撒布された。これは流パラが菌を吸着したごく微細な粒子として運ばれてのち、臓器組織内で融合したものと考えられる。しかもこのように流パラに吸着、撒布された菌はほとんど細胞に貪食されることなく、流パラ滴に密着し、体液中に露出した状態で存在した。

2) 強毒菌 H37Rv 株の流パラ菌液の感染はマウスの生残日数を食塩水菌液に比してやや顕著に延長させ、臓器病変をもまた遅れて出現せしめた。また臓器内に流パラとともに撒布された菌のその後の経過における増加は抑制された。しかるに弱毒菌 F 株の流パラ菌液は食塩水菌液に比しマウスをより短時日内に死亡せしめ、かつより顕著な病変を生ぜしめた。また臓器組織内に流パラ滴とともに撒布された菌はその後の経過中に顕著な増加を示した。次に無毒菌 H37Ra 株の流パラ菌液は食塩水菌液と同様にマウスを死亡せしめなかつたが、臓器内に流パラとともに撒布された菌はやや増加を示した。

3) このような結果は、それぞれ毒力を異にするこれら3株の人型結核菌の細胞内あるいは体液中での増殖能力、言い換えるとそれらの環境における物質利用能力すなわち代謝能力と関連することのようには推察せられる。

終りに御指導ならびに御校閲を賜つた植田教授、蒲田所長に深甚の謝意を表し、また終始御助言を賜つた上坂助教授、大岩博士の御好意をあわせて感謝する。

本稿の要旨は昭和35年4月第35回結核病学会総会および昭和34年10月同近畿地方会において発表した。

- 1) Hagen & Lévine : Amer. Vet. Med. Assoc., 81 : 723, 1932.
- 2) Coulaud, E. : Rev. de la Tuberc., 2 : 851, 1934 ; Compt. rend. Soc. de Biol., 119 : 368, 1935.
- 3) Saenz, A. : Compt. rend. Soc. de Biol., 120 : 870, 1935 ; 124 : 338, 887, 1937 ; 125 : 714, 1937.
- 4) Hensel, G. : Beitr. z. Klin. Tuberk., 90 : 26, 1937 ; 91 : 442, 1938.
- 5) Freund, J. & Cassals, J. : J. Immunol., 38 : 67, 1940 ; Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 37 : 509, 1937.
- 6) Haefliger, E. : Zschr. f. Tuberk., 82 : 91, 1939.
- 7) Birkhaug, K. : Acta tuberc. scand., Suppl., 5 : 1, 1940.
- 8) Rist, N. : Ann. Inst. Pasteur, 61 : 121, 1938.
- 9) 植田三郎・遠藤勇三 : 東京医事新誌, 3111 : 3051, 昭13.
- 10) 生沼金夫 : 海軍軍医会誌, 33 : 937, 昭19.
- 11) 大林容二・岩崎龍郎 : 実験医学誌, 27 : 307, 昭18.
- 12) 金光正次 : 東京医学会誌, 58 : 451, 昭19.
- 13) 村田春造 : 海軍軍医会誌, 33 : 793, 昭19.
- 14) 山田俊一郎 : 抗酸菌病研究誌, 10 : 59, 昭29.
- 15) 金井興美 他 : 結核, 26 : 289, 319, 昭26 ; 日本細菌学誌, 10 : 321, 427, 499, 昭30.
- 16) 山口登 : 日本細菌学誌, 11 : 63, 111, 185, 375, 昭31.
- 17) 岡田博 : 京都大学結核研究所紀要, 7 : 57, 68, 昭33.
- 18) Tsuji, S. et al. : Am. Rev. Tuberc., 72 : 393, 1955 ; 76 : 90, 1957.
- 19) 伊藤薫 : 京都大学結核研究所紀要, 7 : 35, 昭33.
- 20) E. Suter : J. Exp. Med., 96 : 137, 1952 ; 97 : 235, 1953.
- 21) Woodruff, C.E. & Kelly, R.G. : Am. Rev. Tuberc., 42 : 782, 1940.
- 22) 安平公夫 他 : 結核, 27 : 532, 昭27 ; 29 : 580, 昭29.
- 23) Mudd, S. & Mudd, E. : J. Exp. Med., 40 : 647, 1924.
- 24) Lange, L. & Nitsche, P. : Deutsche Med. Wchschr., 35 : 435, 1909.
- 25) 尾高憲作 : 日本微生物誌, 28 : 785, 昭9.
- 26) 大岩弘治 : 日本細菌学誌, 6 : 455, 昭26.