

# 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

## 2. 牛型結核菌

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

前編<sup>1)</sup>においては、人型結核菌を流動パラフィン(以下流バラと略す)に包埋してマウスに接種した結果、強毒の H37Rv 株ではその病原性、毒力が低弱化され、これに反し弱毒の F 株および無毒の H37Ra 株ではそれが逆に増強されるという興味ある事実を観察した。それでは牛型結核菌においてははたしてどうなるであろうかと考え、本編においては強毒の牛型結核菌 Ravenel 株、やや毒力の弱い RM 株およびきわめて弱毒の BCG 株を流バラに包埋し、マウスに感染せしめて、これらの菌株の病原性、毒力がどのように修飾せられて表現されるかを観察し、進んではこのような修飾ははたしてどのような機転によるものかを多少とも考察した。

### 実験その 1 Ravenel 株

強毒の Ravenel 株の流バラ菌液および対照の食塩水菌液をマウスの腹腔内に接種し、生残日数、臓器の肉眼的病変および臓器組織内の菌の消長について比較検討した。

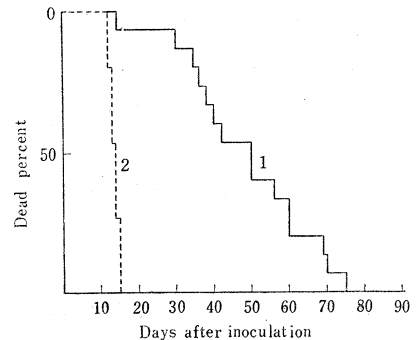
〔方法〕使用 Ravenel 株はグリセリンブイヨン 3 週培養のもので、20 mg/ml になるように流バラあるいは食塩水を加えて菌液を作製した。均一系マウス H 系の生後 1 カ月の体重約 15 g のもの 60 匹を 30 匹宛 2 群に分ち、1 群には流バラ菌液を、他群には食塩水菌液を、0.5 ml (10 mg) 宛を腹腔内に接種し、各群とも 15 匹は生残日数の観察に供し、残りの 15 匹は接種後 24 時間、1, 2, 3……10 週に麻酔致死せしめて、肺、肝、脾、腸間膜淋巴腺およびその他の病変を肉眼的に観察し、同時に肺、肝、脾および腎の剖面の圧印標本作製し、Ziehl-Neelsen 染色を施して鏡検した。その他は前編<sup>1)</sup>と同様に実施した。

#### 〔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 12 日から死にはじめ、15 日で使用マウス 15 匹がすべ

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



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

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

て死亡し、 $T_{50}$  は 14 日であつた。しかるに流バラ菌液は接種後 14 日に死亡した 1 匹を除き、14 匹は 30 日後から 75 日後の間に死亡し、 $T_{50}$  は 50 日であつた。すなわち強毒菌 Ravenel 株の流バラ菌液は食塩水菌液に比して接種マウスの生残日数を顕著に延長した。

##### (2) 臓器の肉眼的変化の推移

食塩水菌液では、24 時間後大網に粟粒大の黄色の塊りが数コみられ、1 週後には腸間膜淋巴腺の腫脹、膿瘍化が多数出現し、肺、肝および脾に粟粒大の結節を生じ、2 週後ではこれらの病巣は増大し、腹腔内に血性の腹水の貯溜がみられた。しかるに流バラ菌液においては、1 週後から腸間膜淋巴腺が粟粒大に腫脹し、脾を中心とする腹部臓器の癒着がみられた。2 週後になると、肺に粟粒大の結節が少数みられ、3, 4 週と経過するにつれ漸次乾酪化し、病巣は拡大した。6, 7 週後では肝および脾にも結核結節がみられるようになり、また腸間膜淋巴腺の膿瘍化が著しくなつた。すなわち流バ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やや遅延した。

##### (3) 臓器組織内の菌の消長

食塩水菌液では 24 時間後肺を除く他の臓器のいずれにも 1 視野に数々の菌を認めた。1 週以後では各臓器とも多数の菌を認め、明らかに菌は増殖を思わせる配列を示していた。これに反し流パラ菌液では趣を異にし、24 時間後すでにいずれの臓器中にも多数の流パラ菌液を認め、その表面に多数の菌体が密接して存在し、これを離れてはほとんど菌を認めることはなかつた。1 週後も流パラ菌液に密接した菌は増殖像を示さず、抗酸性は弱くなり、一部においては顆粒状となつた。しかし流パラ菌液を離れてごく少数の菌が細胞の内外に存在しているのがみられた。週を経るに従つて流パラ菌液に密接した菌は漸次変性、崩壊し、顆粒状となつて菌数は減少したが、一方流パラ菌液を離れて細胞の内外に存在した菌は漸次その数を増加し、細胞内で明らかに増殖を思わせる配列を示した集団が多く観察されるようになった。以上のように Ravenel 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、より大量に臓器組織内に流パラ菌液に密着した状態で運ばれ、初期においては細胞に貪食されることはほとんどなかつた。またその後の経過中における菌の増加はやや顕著に遅延した。

### 実験その 2 RM 株

Ravenel 株に比し毒力がやや弱い RM 株を供試し、上記実験その 1 と同様にして生残日数、臓器病変および臓器組織内の菌の消長について検討した。

〔成績〕

#### (1) 生残日数の推移

Fig. 2 に示すように食塩水菌液では接種後 30 日から死亡しはじめ、100 日で供試マウス 10 匹はすべて死亡し、 $T_{50}$  は 50 日であつた。しかるに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、30 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。このように流パラ菌液では食塩水菌液

に比して、生残日数はやや顕著に短縮され、RM 株のマウスに対する病原性、毒力は増強して表現された。

#### (2) 臓器の肉眼的変化の推移

食塩水菌液では、接種後 1~2 週に腸間膜淋腺の腫脹、膿瘍化が出現し、ついで肺に粟粒大結節がみられ、週を経過するにつれて肝および脾にも結核結節を生じ、病巣は乾酪化し拡大した。しかしながら Ravenel 株の場合に比して病巣の出現は遅延し、RM 株の毒力は明らかに Ravenel 株よりは弱かつた。しかるに流パラ菌液では、1 週後に脾を中心とする腹部臓器の癒着が著しかつたが、結節性病変を思わせるような変化はみられなかつた。2 週後には腹腔内に血性の濁潤した腹水の貯溜を認め、肺、肝および脾には出血性の傾向がみられた。3, 4 週と経過するも 2 週後の変化と同程度であつて、とくに新しい病変の出現はなかつた。すなわち流パラ菌液では、食塩水菌液の場合とは全く趣を異にし、急激な腹部臓器の変化を主とし、ついで肺、肝および脾に充血があつたが、結節性病変はみられなかつた。

#### (3) 臓器組織内の菌の消長

食塩水菌液では、24 時間後にいずれの臓器にも少数の菌を認めた。1, 2, 3 週と経過するも各臓器中の菌数の増加は緩徐であつた。6, 7 週以後になると、いずれの臓器においても多数の菌を認めるようになり、明らかに増殖を思わせるような配列を示す菌集団が多くみられた。これに反し流パラ菌液では、大いに趣を異にし、24 時間後すでに各臓器中には多数の流パラ菌液がやや多数の菌を吸着した状態で撒布され、上記 Ravenel 株の場合とほとんど同様であつた。1 週後では流パラ菌液に密接して存在する菌は大部分が増殖を思わせる配列を示し、2 週以後週を経るにつれ増加した菌は網目状に配列し、遂には流パラ菌液全面を被うにいたつた。なお全経過を通じ、流パラ菌液を離れては菌をほとんど認めえなかつた。このように流パラ菌液においては、マウス臓器内に流パラ菌液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、食塩水菌液の場合とは著しく相違した。

### 実験その 3 BCG 株

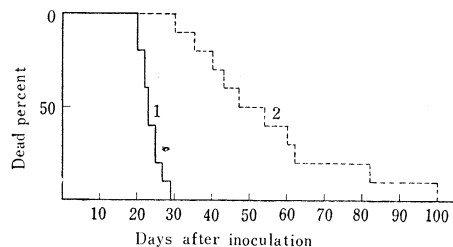
きわめて弱毒化した牛型菌の 1 株であるとみなされる BCG 株を供試し、上記実験と同様にして生残日数、臓器病変および臓器組織内の菌の消長を検討した。

〔成績〕

#### (1) 生残日数の推移

食塩水菌液では、接種後 4 カ月の観察期間中には使用マウス 15 匹はすべて死亡しなかつた。これに反し流パラ菌液では、Fig. 3 に明らかなように 14 日から死亡しはじめ、25 日以内に使用動物はすべて死亡し、 $T_{50}$  は 18 日であつた。以上のように流パラ菌液はマウスを短時日内に死亡させた。すなわちきわめて弱毒の BCG

Fig. 2 The dead percent of the mice inoculated intraperitoneally with 10 mg of RM strain of reduced virulence.

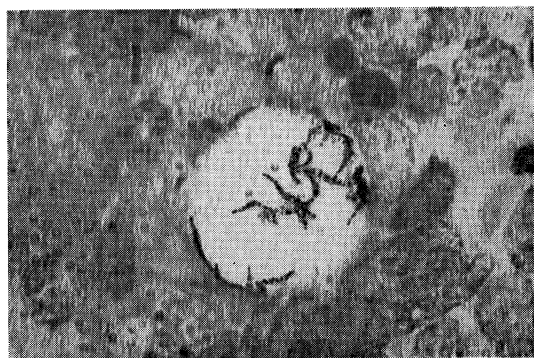


Line 1: animals inoculated with RM strain embedded in liquid paraffin.  
Line 2: mice inoculated with saline suspension of RM strain.

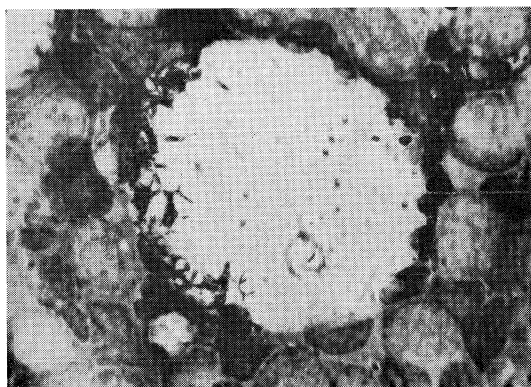
Fig. 4



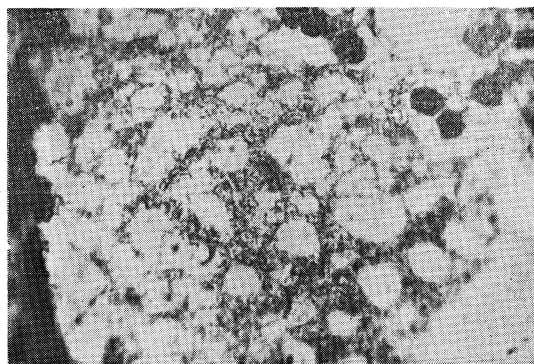
1. Ravenel strain embedded in liquid paraffin, after 24 hours of inoculation. The bacilli are seen only at the site of the liquid paraffin particle.  
(mouse, spleen) ( $\times 1,000$ )



2. Ravenel strain embedded in liquid paraffin, after 2 weeks of inoculation. The bacilli at the site of the liquid paraffin particle do not multiply.  
(mouse, spleen) ( $\times 1,000$ )

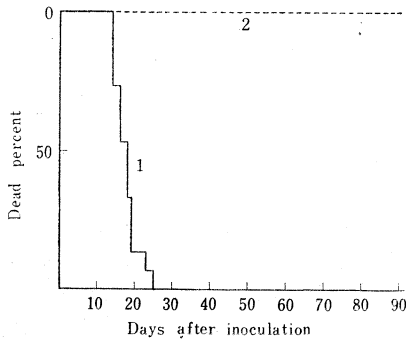


3. BCG strain embedded in liquid paraffin, after 24 hours of inoculation. The bacilli are seen at the margin of the liquid paraffin particle and not outside the particle.  
(mouse, spleen) ( $\times 1,000$ )



4. BCG strain embedded in liquid paraffin, after 2 weeks of inoculation. Considerable number of bacilli making networks at the site of liquid paraffin particle.  
(mouse, spleen) ( $\times 1,000$ )

**Fig. 3** The dead percent of the mice inoculated intraperitoneally with 10 mg of BCG strain.



Line 1: mice inoculated with BCG strain embedded in liquid paraffin.

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

株を流バラに包埋し、マウスに感染させた場合、生残日数からみて、その病原性、毒力は著しく増強されて表現された。

### (2) 臓器の肉眼的変化の推移

食塩水菌液では、1 週後に腸間膜淋巴腺に粟粒大～米粒大の腫脹、膿瘍化を数コ認めた。しかし週を経るにつれてこの所見は漸次軽減し、遂に消失した。しかるに流バラ菌液では、全く異なり、一般に腹部臓器の変化は急激であつて、1 週後には脾を中心として腹部各臓器は堅く癒着し、2 週後には癒着はさらに強くなり、肺、肝および脾に充血を認め、出血性の傾向があつた。また2 週以後には血性の濁濁した腹水の貯溜がみられた。以上のように流バラ菌液による病変は食塩水菌液のそれとは全く趣を異にした。

### (3) 臓器組織内の菌の消長

食塩水菌液では、24 時間後肺、肝および腎においては 50～100 視野に数コの菌を認め、脾では 20 視野に数コの菌を認めた。1 週以後 18 週まで観察したが、いずれの臓器中にも赤染菌体を認めえなかつた。しかるに流バラ菌液においては、24 時間後すでにいずれの臓器においても多数の流バラ滴の表面に密着して多数の菌が撒布されていた。この所見は上記実験その 1 Ravenel 株およびその 2 RM 株の場合と類似していた。1, 2, 3 週と経過するに従つて、上記 RM 株の場合と全く同様に、流バラ滴に密着した菌の増加は顕著であつて、網目状の配列を示し、遂には流バラ滴全面を被うにいたつた。なお全経過を通じ、流バラ滴を離れては菌はほとんど存在しなかつた。以上きわめて弱毒の BCG 株を流バラに包埋して、マウスに感染させることによつて、マウス体内で顕著な菌の増加をきたした。

### 総括ならびに考案

前編<sup>1)</sup>に報告したように、流バラを添加してマウスに感染せしめると、人型菌の強毒 H37Rv 株ではその病原性、毒力を減弱し、同弱毒の F 株においては逆に顕著に増強し、同無毒の H37Ra 株においてもまた多少とも増強した。

そこで本編においては、牛型菌を流バラに包埋し、マウスに感染せしめた場合に、上記人型菌でみられたような関係がはたしてこの場合にどのように表現せられるかを観察しようと試みた。その結果は、強毒 Ravenel 株においては、流バラの添加は食塩水菌液に比しマウスの生残日数をやや延長させ、また臓器病変の出現を遅延せしめた。さらに臓器内の菌は、初期には大多数の菌は流バラ滴に密着して存在し、ついで漸次減少し、菌数の増加はみられなかつた。一部流バラ滴を離れて細胞の内外に存在した菌は経過中に漸次増加したが、食塩水菌液の場合よりもやや目立つて遅れた。このように Ravenel 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マウスに対し食塩水菌液よりも明らかに低弱化された。

次に弱毒の RM 株の流バラ菌液では、マウスの生残日数を食塩水菌液の場合に比して著しく短縮し、臓器とくに肺、肝および脾に充血を認めた。また臓器組織内に撒布された菌は、流バラ滴に密着して存在し、経過とともに著しくその数を増したが、これに反し食塩水菌液では菌数の増加は緩徐であつた。すなわち流バラの添加によつて食塩水菌液の場合よりも弱毒の RM 株の病原性、毒力の表現はマウスに対してやや顕著に増強された。

次にきわめて弱毒の BCG 株の流バラ菌液は食塩水菌液と全く異なり、マウスを短時日内に死亡させ、肺、肝および脾に出血性傾向を生じ、また流バラ滴とともに撒布された菌はその後の経過中に著しい増加を示した。このような所見は食塩水菌液では全くみられなかつた。すなわち流バラ菌液とすることによつて BCG 株のマウスにおける病原性、毒力の表現は顕著に増強された。

上記の成績中まず最初に注意を惹く点は、上記3株の牛型菌は流バラ菌液としてマウスに接種するときは、食塩水菌液に比すべくもない大量の菌体が流バラ滴に吸着、運搬され臓器組織内に速やかに撒布されるという事実である。次に興味を惹く点は、上記のようにして撒布された菌はほとんどすべて流バラ滴に密着して見出され、細胞に貪食されたものをみなかつたことである。しかしながらこのように菌と組織細胞が隔離されるということは、組織反応を起していないということではなく、上記観察において流バラ滴の周辺には常に多核球および単核球の游出が多少とも顕著なことをうかがうことはできた。注意を惹く第3の点は、流バラ滴とともに撒布された強毒の Ravenel 株においては菌数の増加が

みられなかつたが、他の弱毒の RM 株および BCG 株においては、菌数の増加が著しく、流パラ滴全面を被うにいたつたことである。牛型結核菌におけるこれらの興味ある所見は、前編<sup>1)</sup>において観察した人型結核菌のそれと軌を一にするものであることが分かる。すなわち強毒菌は細胞内増殖の能力を有するが、組織液中でのそれが乏しい。これに反し弱毒菌は細胞内増殖能力は弱い、組織液中でのそれが強いということを示唆するようである。

最後に上記の所見およびその考察にあたり、顧慮すべき 2, 3 の事柄が残されていることは明らかである。その 1つ、就中重要な点は、上記のように流パラ菌液の接種によつて早期に死亡したマウスと、食塩水菌液の接種によつて遅れて死亡したマウスとの間に剖検所見にかなり顕著な差異がみられるということである。就中流パラ菌液では脾を中心とした腹腔内臓器の癒着、腹水の貯溜および肺、肝、脾等の出血性病変が顕著に出現したことである。最近大岩<sup>2)</sup>は INH 感性および耐性の H37Rv, H37Ra および BCG の加熱死菌 20 mg を流パラに包埋し、マウス腹腔内に接種してその毒性を検討した。それによると死亡したマウスの剖検所見は接種菌株の種類に関せず一様であつて、腹腔内臓器の癒着、出血を伴つた炎症、肺における小出血であつた。すなわちこれは著者の上記マウスにおける剖検所見と多少とも類似する。なお結核菌の死菌体を海狸に注射した場合に体重の減少をきたし、また菌量が多いときには死を招くことが知られている。Rist<sup>3)</sup>, Saenz<sup>4)</sup>は結核死菌を流パラに包埋することによつてさらに顕著な毒性を認めている。近年 Youmans<sup>5)</sup>, Dubos<sup>6)</sup>はマウスにおいて生菌、死菌を問わず急激な毒性効果を観察している。また Choucroune<sup>7)</sup>は結核死菌体から流パラに毒性物質を抽出し、さらに Dubos<sup>8)</sup>は菌体の毒性物質について詳しく検討し Primary toxicity として取り上げている。このように結核死菌の毒性に関する研究は多く、上記において著者が得た所見のある部分はおそらくはこのような菌体の毒性と関連をもつやにも考えられるが、しかし上記の観察においては、マウスの死亡の前提として毎常菌数の顕著な増加という事実があらかじめ存在し、かつ強毒菌の毒力の表現が流パラの添加によつて減弱され、弱毒菌のそれが反対に増強されるというような奇妙な事実があるのであるから、たとえばマウスの早期の死亡をすべてただ単に菌体の毒性という見地からだけ判断することは明らかに困難である。この菌体の毒性が上記のような場合にはたしてどの程度の、またどのような役割を演じておるかという点については別に系統的に検討中である。

牛型強毒菌 Ravenel 株、同弱毒菌 RM 株およびきわめて弱毒の同 BCG 株を流パラに包埋し、マウスに接種して、それぞれの病原性、毒力がどのように修飾されるかを検討した。

1) 使用した 3 株とも流パラ菌液とした場合は、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、しかもこれらの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 Ravenel 株を流パラに包埋してマウスに感染させると、食塩水菌液の場合に比べ、流パラ滴とともに撒布された菌は増加を抑制され、臓器病変の出現が遅延し、またマウスの生残日数がやや顕著に延長した。これに反し弱毒の RM 株においては、流パラの添加は、臓器内に流パラ滴とともに撒布された菌の増加および臓器病変は顕著であつて、マウスを短時日内に死亡させた。きわめて弱毒の BCG 株においてもまた同様に流パラとともに与えた場合は食塩水菌液の場合に比し、臓器内の菌数の増加および病変は顕著であつて、マウスの生残日数は顕著に短縮された。

3) このような結果はこれら 3 株のそれぞれ毒力を異にする牛型結核菌の細胞内あるいは組織液中での増殖能力の差異に関連することのよう推察せられる。

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。

## 文 献

- 1) 土井和雄：結核，35：738，昭35。
- 2) 大岩弘治：日本細菌学雑誌，12：291，昭32。
- 3) Rist, N. : C.R. Soc. Biol., 126 : 185, 1937.
- 4) Saenz, A. : C.R. Soc. Biol., 129 : 922, 1938 ; Press Méd., 42 : 849, 1939 ; Ann. Inst. Past., 65 : 13, 1940.
- 5) Youmans, G.P. & Youmans, A.S. : Am. Rev. Tuberc., 64 : 541, 1951.
- 6) Dubos, R.J., Shaefer, W.B. & Pierce, C.H. : J. Exp. Med., 97 : 221, 1953.
- 7) Choucroune, N. : Am. Rev. Tuberc., 56 : 203, 1947.
- 8) Spitznagel, J.K. & Dubos, R.J. : J. Exp. Med., 101 : 291, 1955.