

特別講演

1. 実験結核における近交系動物の意義と応用

国立公衆衛生院衛生微生物学部 染谷四郎

I まえがき

結核の感染、発症、経過および予後は人により各種各様であつて、外因的および内因的の幾多の要因によつて著しく影響を受けるものである。このような複雑な経過を辿る結核症の研究を人において行なう場合、もつとも困難に感ずる点は多数の対象を同一条件のもとに観察することができないということであろう。たとえば人の側の遺伝的素質を同一にするために双生児において結核の研究を行なつた Diehl および Verschuer¹⁾, Uehlinger および Künsch²⁾, Kallmann および Reisner³⁾, Puffer⁴⁾らの研究業績は広く熟知されているところであるが、このような双生児における研究は遺伝的素質を同一にすることはできても、多数の対象を集め、その他の条件を同じくすることはなかなか困難であるし、また思うような実験条件にして観察することもできない。このように人においては到底実施することのできない実験については、これを動物に移して研究しなければならないことになる。

動物の結核は人の結核とその様子が著しく異なるという事実から、動物実験の成績をもつてただちに人にあてはめることはできず、人にもつとも近縁の関係にある猿を用いての実験でないとならば人の結核を研究するうえにはあまり役に立たないと主張するものもある。しかし多数の猿を実験に用いることはわが国の現状ではなかなか困難であるし、また必ずしもすべての結核実験に猿を用いなければならないということもない。もつと手軽に入手できるマウスなどの小動物を用いて結核の実験的研究を行なうことが必要となるのであつて、またかなりの程度までその目的を達することができる段階まできているものと考えられる。

現在わが国で近交系動物(均一系動物) Inbred strain として繁殖、市販されているものは主としてマウスである。結核の感染に対する感受性が明らかにされ、しかも均一な態度を示す各種の近交系マウスを結核研究に用いられるようになったことは人体における研究と異なり、

思うがままに実験条件をたてることができ、しかも同一条件の動物を多数集めることができ、複雑な結核の感染、発症、免疫の機序その他多くの結核の研究を行なううえに役立つところがきわめて大きいと思われる。

私は結核の動物実験を行なうにあつて、動物の結核と人の結核とがいろいろな点で違うということについては特別に問題としていないし、また人の結核とよく似ている経過を示すような動物の種類や系統を見出だそうとしているわけでもないのである。人の結核にみられる複雑な機構のうちいずれかの面を動物実験において強調して観察できるような動物の種類、系統を見出だし、これらの動物について感染過程、免疫機序の分析を行ない、逆に人における複雑な結核症の進展の機作を解明しようとするのが、現在私の考えている研究の方向である。

しかし、このような考え方のほかに、実験動物は実験的研究を行なううえの1つの道具であるので、精密な測定器、純粋な試薬と同じように十分検討されねばならないものである。実験動物の供給者が異なると実験成績が変わつてきたり、成績のばらつきが大きかつたりすることや、動物に自然感染があつて実験中に動物が死亡することなどが注意されるようになり、実験中の環境、飼育管理もまた重要視されるようになってきた。最近わが国においても伝染病のない動物として SPF 動物(特殊の病原体のない動物、Specific pathogen free animals)の生産も要望されている。このように各種の近交系動物が医学研究用としてきわめて有用であることが認識されるようになり、一般の関心を集めるようになってきたことはまことに喜ばしい。

私はここ数年來各種系統のマウスについて結核の動物実験を実施しており、とくに結核菌のビルレンス、感染免疫の機序、化学療法剤の効果などの研究について興味をもつて実験を行なつていたのであるが、ここにその研究の概要を述べる。

II 実験成績に影響を及ぼす各種の因子

実験動物の結核に対する感受性に差異を与える因子としては動物の遺伝的要素すなわち系統による差異、性、年齢および飼育方法など各種の要素による影響が考えられる。

現在わが国にある系統の明らかなマウスは gpc, C 57 Br/cd, dd, C 57 BL/6, CFW, dba, CF# 1, C3H などである。なおこのほか SM 系マウスも用いられている。

以下現在入手可能な C57BL/6, CF# 1, CFW および dd 系などの近交系マウスについて系統、性、生後日数などと結核の感受性との関係について述べることにする。

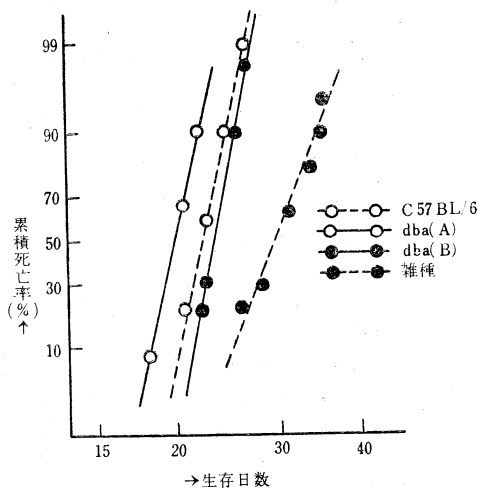
結核菌感染後の生存日数よりみた観察

(1) 系統による感受性の差異

マウスの系統によつて結核菌の感染に対する感受性が異なることは古くから知られている。

図 1 牛型結核菌牛 263 0.1 mg を静脈内接種した各系統マウス (♂) の生存日数の比較

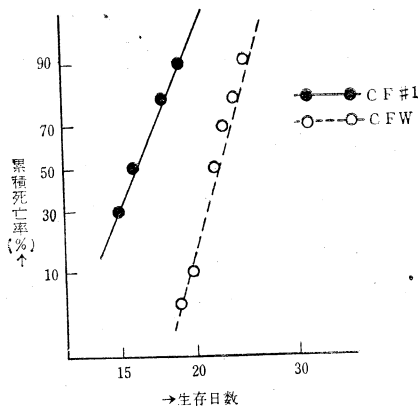
〔生後日数 C57 BL/6 : 58~68日, dba(A) : 35日〕
dba(B) : 75~78日



さて図 1 は C57 BL/6, dba および雑種マウスに牛型結核菌 263 を静脈内に感染した場合の死亡状況を示したものである。累積死亡率を半対数確率紙に画くと、その間に直線関係のあることが認められ、各系統間の生存日数の差を比較するのに便利であるので、以下この方式によることにする。図 2 は CF# 1 および CFW 系マウスに牛型結核菌 TC 50 を静脈内に感染した場合の死亡状況を示したものである。図によつて明らかなように dba の生後 35 日の A 群の生存日数がもつとも短く、C57 BL/6 と生後 75~78 日の dba の B 群がほぼ同様の生存日数を示している。雑種マウスは生存期間が著しく延長しており、しかも各マウスの死亡日数のばらつきが著しい。また CF#1 と CFW 系マウスについて比較して

図 2 牛型結核菌 TC 50 を静脈内接種した CF#1 および CFW 系マウスの生存日数の比較

〔マウス: CF# 1, ♂, 生後 37~47日, CFW ♂, 生後 33日~36日〕
TC50 デュボ-培地培養菌
接種生菌単位: 4.0×10^6



みると、CF# 1 系マウスのほうが早く死亡することが認められ、CF# 1 系マウスは CFW 系マウスに比べて結核感染に対する感受性が高いといえることができると思う。

(2) 性による感受性の差異

図 3 牛型結核菌 TC 50 を静脈内接種した各系統マウス性別による生存日数の比較

(TC50 デュボ-培地培養菌 接種生菌単位: 9×10^7)

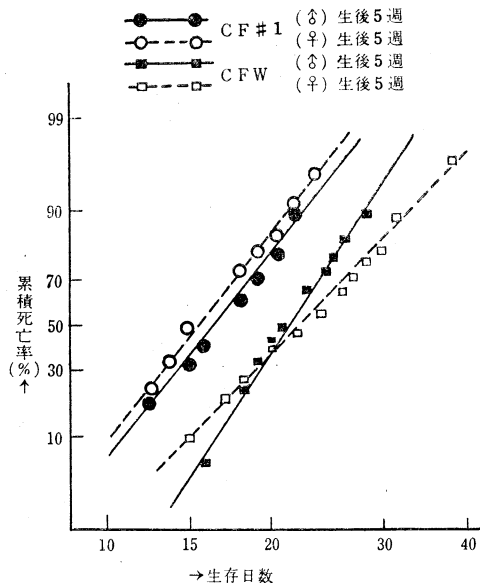


図 3 および 4 は牛型結核菌 TC 50 を静脈内感染した場合の CF# 1, CFW および ddN 系マウスの死亡状況の性別比較を示したものであり、図 5 は牛型結核菌牛 263 を感染した場合の C57 BL/6 系マウスの死亡状況を性別に比較した成績を示したものである。以上の成

図 4 牛型結核菌 TC 50 を静脈内接種した ddN 系および CF# 1 系マウスの生存日数の性別比較

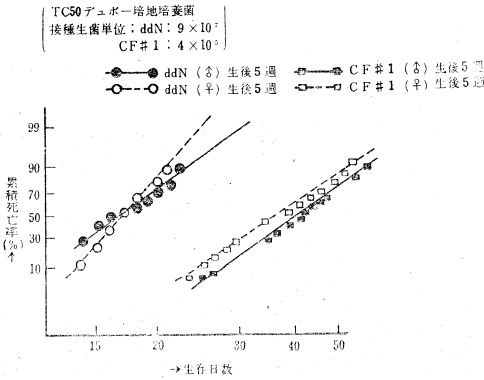
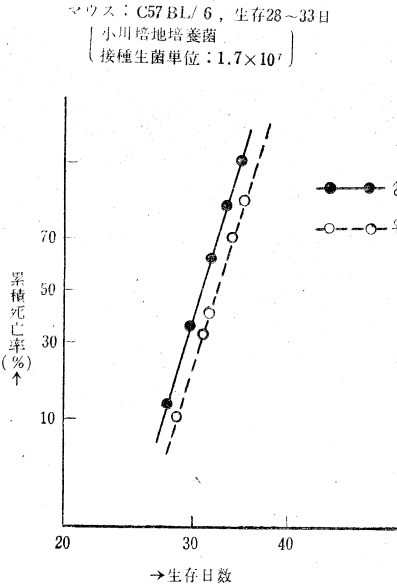


図 5 牛型結核菌牛 263 を静脈内接種した C57BL/6 系マウスの生存日数の比較



績から分かるように、各系統とも雌雄間に生存日数の差異はほとんど認められないが、CF# 1 および CFW 系マウスにおいては雌のほうがやや早く死亡する傾向がみられる。

次に図 6 は C57BL/ 6 系マウスに牛型結核菌牛 263 および TC 50 を接種した場合の平均生存日数を性別に比較した成績を示したものであり、図 7 は牛型結核菌 TC 50 を生後 8、6 および 4 週の C57 BL/ 6 系マウスに静脈内感染した場合の性別平均生存日数を示したものである。図によつて明らかなように、雄マウスは雌マウスよりも生存日数が長びいており、この傾向はビルレンスの比較的弱い牛 263 の感染群および幼若の生後 4 週の C57 BL/ 6 系マウスにおいて著しい。すなわち性別による感受性は雌マウスが雄マウスよりもやや高いようである。

図 6 牛型結核菌牛 263 および TC 50 を静脈内接種した場合の性別による生存日数の比較

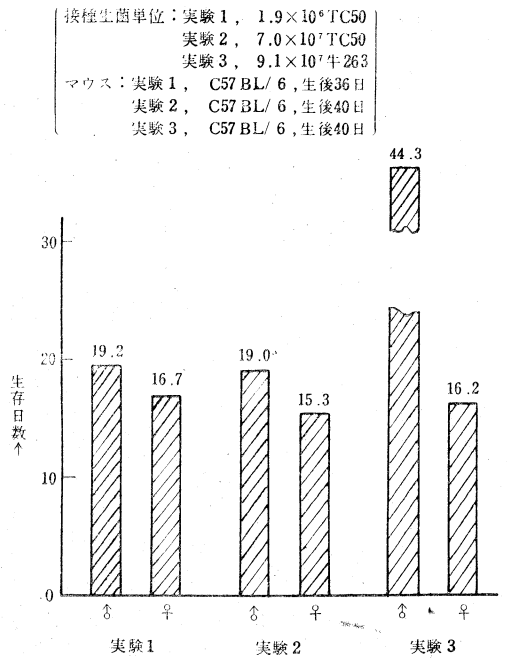
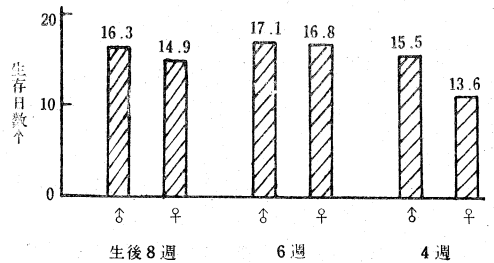


図 7 牛型結核菌 TC 50 静脈内接種 C57 BL/6 系マウスの生存日数に及ぼす生後日数の影響 (接種生菌単位: デュボ-培地培養菌, 1.2×10^7)



(3) 生後日数による感受性の差異

前述の図 7 によつて明らかなように、生後 4 週マウスは 6 週および 8 週のものよりもやや早く死亡する傾向があるが、その差はそれほど著しいものではない。しかし生後日数の少ない、4 週前後のマウスについてはどうであるかきわめて興味のある問題であるが、生後 4 週辺りを境としてマウスの生理的機能が著しく変化することが知られているので、結核実験においては生後 4~5 週以後のマウスを用いるのが適当であると思われる。

臓器内の結核菌増殖からみた観察

(1) 人型結核菌 H₃₇Rv 静脈内感染各系統マウスの臓器内生菌数の推移

図 8、9 および 10 は H₃₇Rv の致死量以下の生菌数 4.4×10^5 を CF# 1 および CFW 系マウス (♂) に静

図 8 人型結核菌 $H_{37}Rv$ 静脈内接種各系統
マウスの臓器内生菌数の推移 (肺)

(接種生菌単位：小川培地培養菌, 4.4×10^5)

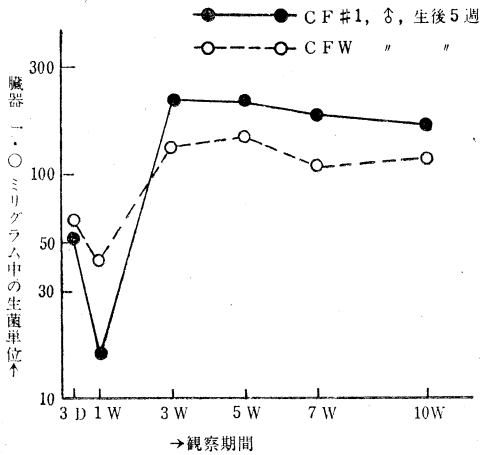
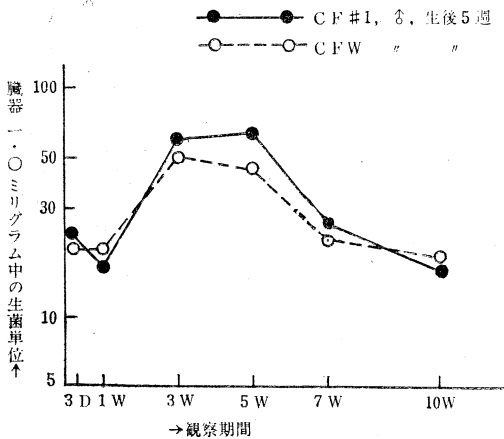


図 9 人型結核菌 $H_{37}Rv$ 静脈内接種各系統
マウスの臓器内生菌数の推移 (肝)

(接種生菌単位：小川培地培養菌, 4.4×10^5)



脈内に感染し、その後の臓器内の生菌数を示したものである。図によつて明らかなように、肝、脾内の生菌数にはCF#1とCFWとの両系統の間に著しい差異がみられないが、肺についてみると、CF#1系マウスの生菌数増加の度合が著しいのである。すなわち結核菌感染後早く死亡するCF#1マウスでは臓器内の感染菌の増殖も著しいことが認められ、マウスの結核に対する感受性を規定している重要な factor として、感染結核菌のマウス体内における増殖力ということがあげられると思う。

(2) CF#1 および CFW 系マウス臓器内におけるBCGの増殖状況の比較

図 11, 12 および 13 は日本株およびデンマーク株BCGの0.1 mgを静脈内に接種した場合のCF#1およびCFWマウス(♂)の臓器内BCG生菌数の推移

図 10 人型結核菌 $H_{37}Rv$ 静脈内接種各系統
マウスの臓器内生菌数の推移 (脾)

(接種生菌単位：小川培地培養菌, 4.4×10^5)

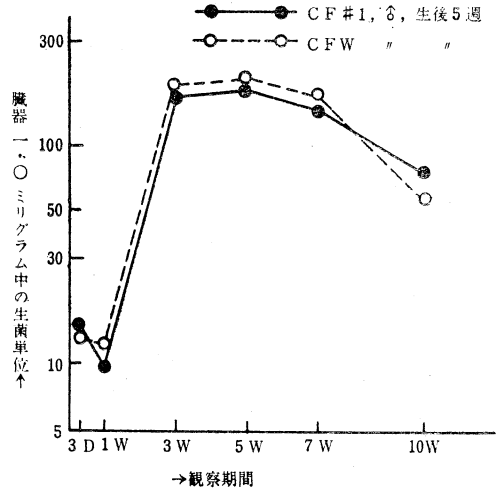
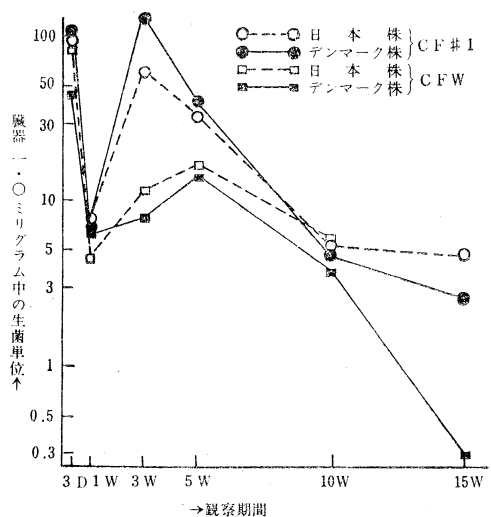


図 11 日本およびデンマーク株 BCG 0.1 mg
を静脈内接種したCF#1 および CFW 系
マウス (♂) の臓器内生菌数の推移
(その 1. 肺における成績)

(接種生菌単位：日本株： 8.6×10^5
デンマーク株： 3.5×10^5)



を示したものである。図に示すように臓器内生菌数の推移にはBCG菌株による差異を認めることができなかつたが、いずれの株においても接種3週後のBCG生菌の増加はとくにCF#1系マウスの肺において著しい。CFW系マウスでは臓器内におけるBCGの増殖がCF#1系マウスよりもやや遅れる傾向が認められ、接種5週後において生菌数の山がみられる。BCGのようなビルレンスの弱い抗酸菌においてもマウス体内の増殖力に系統

図 12 日本およびデンマーク株 BCG 0.1 mg を静脈内接種した CF#1 および CFW 系マウス (♂) の臓器内生菌数の推移 (その 2. 肝における成績)

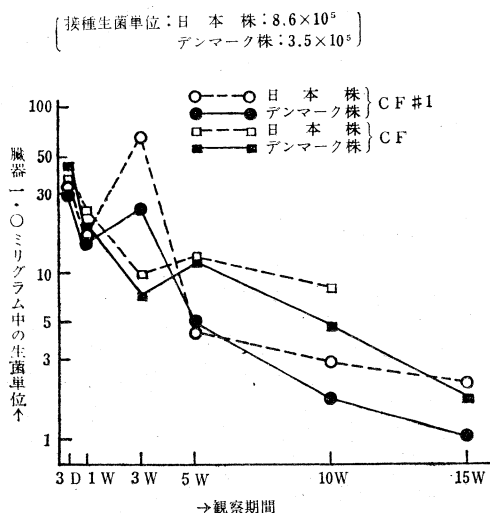
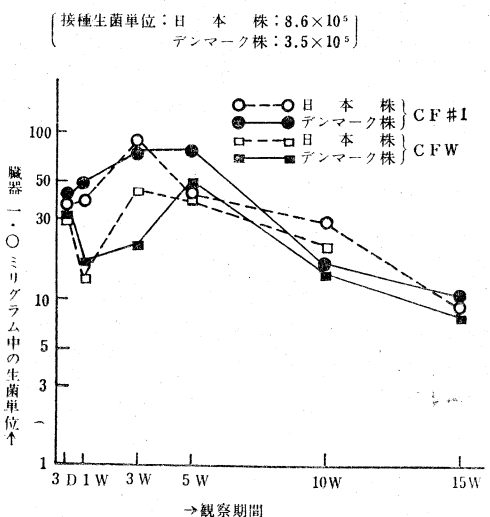


図 13 日本およびデンマーク株 BCG 0.1 mg を静脈内接種した CF#1 および CFW 系マウス (♂) の臓器内生菌数の推移 (その 3. 脾における成績)



による差異のあることが知られた。

Cord Factor の致死作用からみた観察

(1) Cord Factor に対する感受性に及ぼすマウスの系統の影響

図 14 は Drakeol No. 6 に溶解した Cord Factor の 5 γ および 10 γ を CF#1, CFW, C57BL/6 系マウスの腹腔内に隔日に注射した場合の生存日数を比較したものである。図に明らかなように死亡状況には系統による差異をほとんど認めることができない。

図 14 Cord Factor 5 γ および 10 γ を隔日腹腔内注射した CF#1, CFW および C57BL/6 系マウスの生存日数の比較

〔Cord factor は Drakeol No. 6 に 50 γ /ml および 100 γ /ml に溶解したものを 0.1ml 注射, Cord factor は 10 回まで注射し, その後はそのまま 26 日まで観察, 生存したものは屠殺した。〕

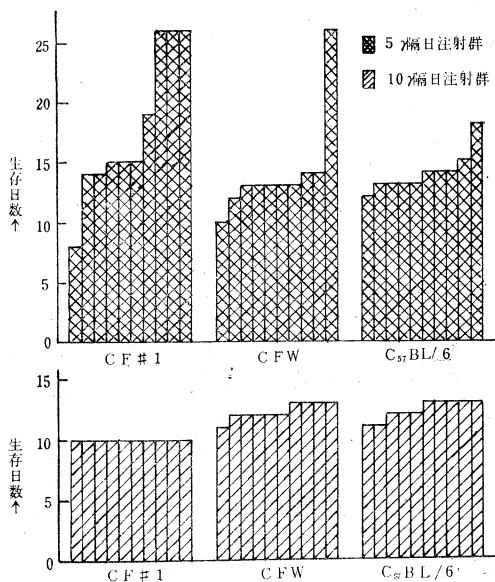
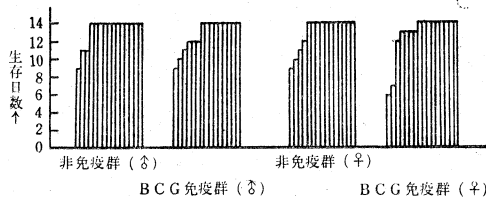


図 15 性別にみた BCG 免疫および非免疫 CF#1 系マウスの Cord Factor による死亡状況の比較

〔CF#1 系マウス (♂, ♀ 生後 30~35 日) に BCG1 mg (接種生菌単位： 1.4×10^7) を静脈内に接種し, 免疫後 4 週において Cord factor 10 γ (Drakol No. 6 浮遊液) を隔日に腹腔内に注射し, 5 回注射後は 14 日までそのまま観察した。〕



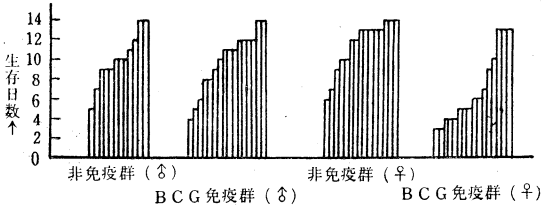
次に生後 8~9 週の CF#1 および CFW 系マウスに対し Cord Factor 10 γ の腹腔内注射を隔日に 5 回行なった場合の成績を図 15 および 16 に示した。図で明らかなように, CF#1 系マウスでは死亡するマウスが少なかったのに反し, CFW 系マウスではかなり多数の死亡マウスがみられる。この成績からみると, 結核菌の感染に対しては抵抗性である CFW 系マウスが Cord Factor に対してはかえって CF#1 系マウスよりも感受性が高いことが知られる。

(2) Cord Factor の感受性に及ぼす性の影響

生後 8~9 週の CF#1 および CFW 系マウスに Cord

図 16 性別にみた BCG 免疫および非免疫 CFW 系マウスの Cord Factor による死亡状況の比較

CFW系マウス(♂, ♀ 生後30~35日にBCG 1mg (接種生菌単位: 1.4×10⁷)を静脈内に接種し, 免疫後4週においてCord factor 10γ (Drakol No. 6 浮遊液)を隔日に腹腔内に注射し, 5回注射後は14日までそのまま観察した。



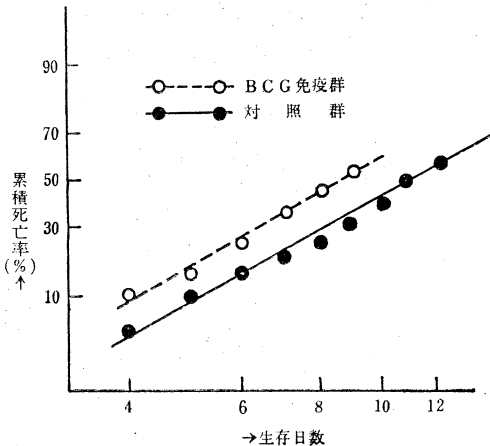
Factor の注射を隔日に 5 回行なつた場合の死亡状況を性別に比較したのが図15, 16である。図によつて明らかにように性による死亡状況の差異は全然認められない。

(3) Cord Factor の致死作用に対する BCG 免疫の影響

生後 31~35 日の CF# 1 および CFW 系マウスに BCG 1 mg を静脈内に接種し, 免疫後 4 週において Cord Factor 10 γ を隔日に腹腔内注射を 5 回行なつた場合の死亡状況を性別に比較した成績が図15および16である。図 15 で明らかなように CF# 1 系マウスにおいては雌雄のいずれにおいても BCG 免疫群と非免疫群との死亡状況に差異を認めることができない。しかし図16の CFW 系マウスの成績をみると, 雄では BCG 免疫群と非免疫群との間に生存日数の差がみられないが, 雌マウスでは BCG 免疫群のほうがかえつて早く死亡する

図 17 Cord Factor を腹腔内注射した CFW 系マウスの生存日数

マウス: CFW, ♂, 生後 5 週 BCG 1 mg (生菌単位: 27.2×10⁶) を腹腔内注射し, 免疫後 4 週において Cord factor 10 γ (流バラ浮遊液) を毎日 12 日間腹腔内注射した。



傾向が認められる。そこで CFW 系マウスの雄を用い, BCG 1 mg を腹腔内に接種し, 免疫後 4 週において流バラに溶解した Cord Factor 10 γ を毎日 12 日間腹腔内注射した場合の死亡状況を見ると, 図 17 に示すとおり BCG 免疫マウスのほうが対照マウスよりも早く死亡していることが認められた。すなわち CFW 系マウスにおいては BCG 免疫を行なつても Cord Factor の致死作用を抑制することができず, かえつて死亡を早めることが知られた。

III マウスによる結核菌のビルレンスの研究

結核菌感染後の生存日数によりビルレンスを比較検討するさいには, なるべく感受性の高い系統のマウスを選ぶほうがよいわけで, 一般には CF# 1, C57BL/6 系マウスが用いられている。また臓器内の生菌数の推移からビルレンスを比較する場合には, 使用マウスの感受性が高いことは必ずしも必要ではない。均一な感受性を示す系統のマウスであればよいわけである。それゆえ前述の系統のほかに dd および CFW 系マウスなども使用することができる。しかしこの場合はマウスが観察期間内に早く死亡してしまわないように接種菌量をあまり大量にしないことが大切である。

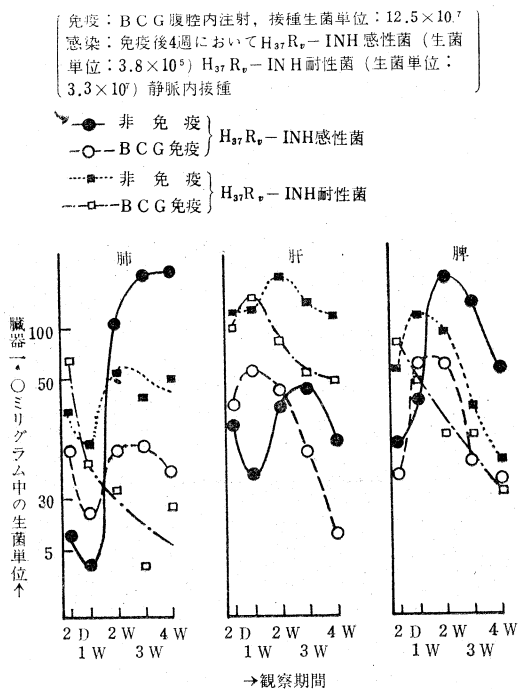
さてマウスに対しては一般に人型菌よりも牛型菌のほうがビルレンスが強い。しかし接種菌液中の生菌数, その分散性, 結核菌の培養条件など(5)~(8)により実験成績はかなり変動するものである。生菌数を一定にするために凍結乾燥菌を用いることも一方法であるが, デュボー培地培養菌を用いることは常に同一条件の菌液が調製できるので, 便利である。また同時にデュボー培地培養菌は小川培地培養菌と比較してビルレンスが強いことはわれわれの実験成績および小河・遠藤(9)の報告によつて明らかである。前述の各系統マウスの感染実験において用いた接種菌液の大部分はデュボー培地培養菌であつて, 10⁷ 前後の生菌単位の強毒結核菌の菌液を静脈内に感染した場合にはおおよそ 2~5 週くらいの期間内にマウスは死亡している。このように結核菌感染後のマウスの生存日数を比較することによつて, 各種抗酸菌のビルレンスの比較が可能である。

次に臓器内の生菌数の推移からみたビルレンスに関する研究成績について述べる。

(1) INH 耐性結核菌のビルレンスの研究

H₃₇Rv 株の INH 感性原株と試験管内において得られた INH 耐性株とのデュボー培地培養菌を BCG で免疫した ddN マウスと非免疫マウスとに静脈内感染を行ない, 感染後の臓器内生菌数の推移を比較した。その成績は, 図18に示すように上記 2 株の肺, 肝, 脾における生菌数増加の程度には明らかに有意の差がみられた。すなわち INH 耐性菌では臓器内での増殖が感性原株に比べて

図 18 $H_{37}Rv$ -INH 感性菌および $H_{37}Rv$ -INH 耐性菌を接種した BCG 免疫および非免疫マウスの臓器内生菌数の推移



著しく劣ることが知られた。

次に BCG 免疫の臓器内結核菌に対する増殖阻止をみると，INH 耐性菌のほうが感性菌よりも BCG 免疫を行なったマウス体内での増殖が劣ることが認められ，INH 耐性菌は感性菌よりも BCG 免疫の作用をより強く受けるものと考えられる。

さらに INH 耐性菌と感性菌とについて各臓器ごとの生菌数の推移を比較してみると，図18の肺における成績で明らかなようにビルレンスの強い感性菌では生菌数は著しく多く，しかも減少の傾向は認められない。前述の $H_{37}Rv$ を静脈内に感染した CF#1 および CFW 系マウスの肺内の生菌数をみた図 8 の成績にも認められるように強毒菌では相当長期間にわたり高い生菌数を示すのに反し，弱毒菌では感染後 3 週以後になると肺においても生菌数は減少する一方である。しかし肺以外の肝，脾では弱毒菌と強毒菌との間に生菌数の推移の傾向には著しい差異はみられない。この肺における菌増殖の様相が強毒菌と弱毒菌の間における著しい相違点であるように思われる。

IV マウスによる結核の免疫に関する研究

結核の免疫の研究においては従来から主としてモルモットやウサギが用いられている。私はマウスにおいて結核の免疫の研究が可能であるかどうかを検討するため BCG による免疫実験を行なった。

生存日数よりみた実験成績

図 19 は BCG 1 mg および 0.5 mg 腹腔内接種を行なった ddN 系マウスに牛型菌 TC 50 を静脈内感染した場合の死亡状況を示したものである。1 mg 免疫では明らかな免疫効果を認めることができるが，0.5 mg

図 19 牛型菌 TC 50 株を静脈内接種した BCG 免疫 ddN 系マウス (♂) の生存日数

免疫：BCG 1 mg (生菌単位： 8.3×10^8) および 0.5 mg 腹腔内接種
 感染：免疫後 4 週において牛型 TC 50 株デュボール培地培養菌 (生菌単位： 32×10^7) 尾静脈注射

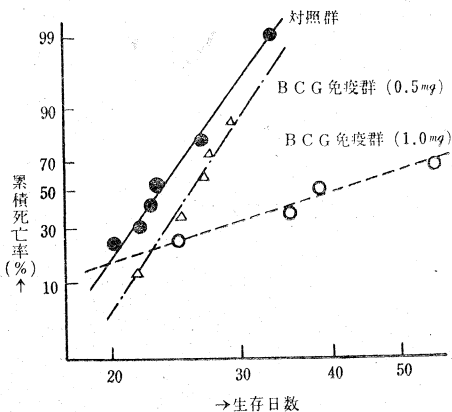
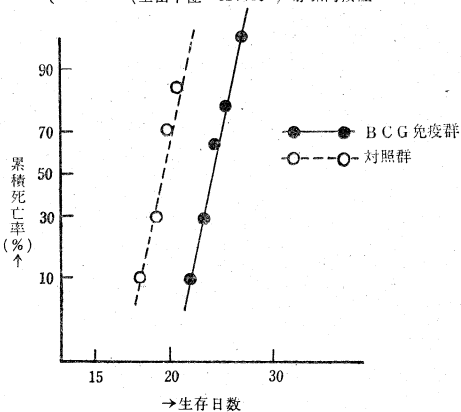


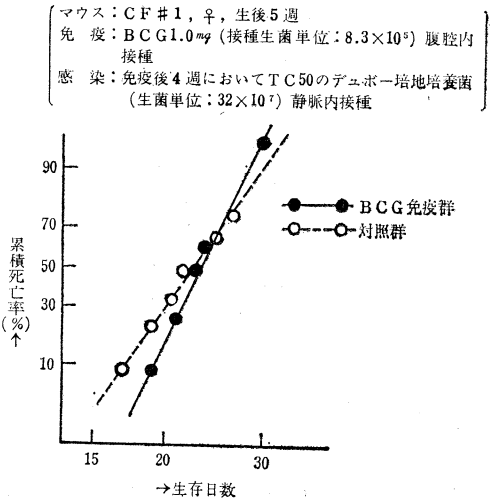
図 20 BCG 免疫および非免疫 CF#1 系マウスに牛型結核菌 TC 50 を静脈内感染した場合の生存日数の比較

マウス：CF#1，♂，生後 5 週
 免疫：BCG 1.0 mg (接種生菌単位： 8.3×10^8) 腹腔内接種
 感染：免疫後 4 週において TC 50 のデュボール培地培養菌 (生菌単位： 32×10^7) 静脈内接種



免疫では全然効果がなかつた。次に図 20 および 21 は BCG 1 mg 腹腔内免疫を行なった CF#1 マウスに牛型菌 TC 50 の静脈内免疫を行ない，その後の死亡状況を性別に比較したものである。図に明らかなように雄マウスでは明らかな免疫効果が認められるのに反し，雌マウスでは全然効果を認めることができなかつた。このような現象は他の系統のマウスにおいても認められるもの

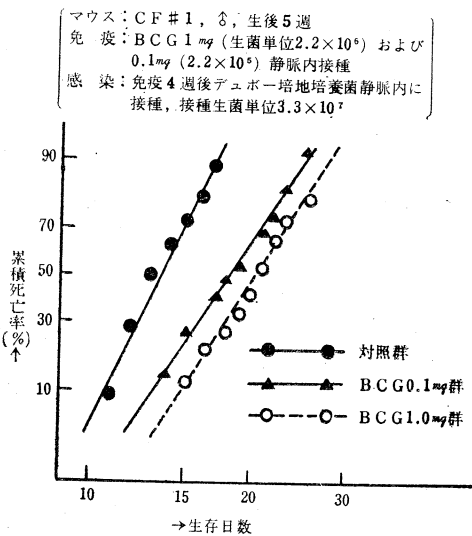
図 21 BCG 免疫および非免疫 CF# 1 系マウス (♀) に牛型結核菌 TC 50 を静脈内感染した場合の生存日数の比較



であるのか、またマウスの生後日数との関係はどうかなどの問題については今後さらに検討を加える必要があると思われる。

さて前述の実験は BCG を腹腔内に接種してマウスを免疫した場合であるが、さらに BCG の生菌および死菌を静脈内に接種してマウスを免疫した場合の免疫効果について検討してみた。その成績は図 22 および 23 に示すと

図 22 牛型結核菌 TC 50 を静脈内感染した BCG 免疫 CF# 1 系マウスの生存日数



おり、BCG 生菌では 0.1mg 免疫においても明らかな免疫効果を認めることができるが、死菌免疫の場合は 0.1mg では効果がなく、1mg 免疫によつてはじめて免疫効果のあることが知られる。

次に BCG 加熱死菌 1mg および 5mg を静脈内に

図 23 牛型結核菌 TC 50 を静脈内感染した BCG 免疫 CF# 1 系マウスの生存日数

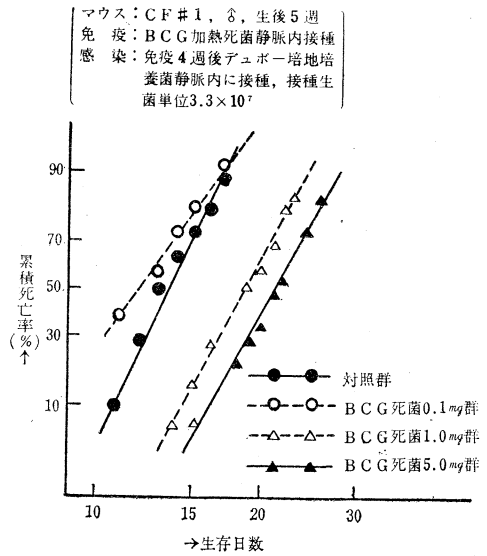
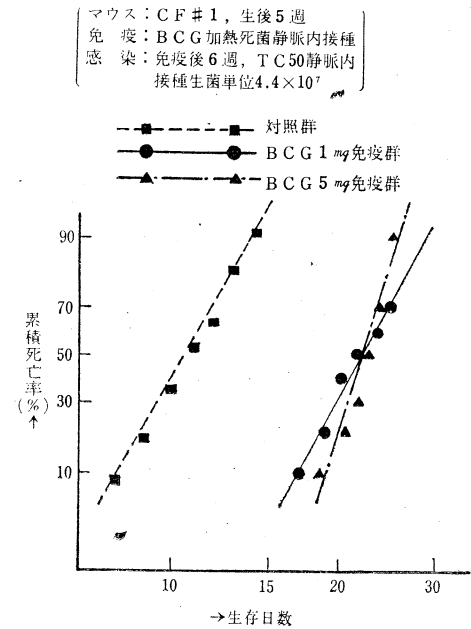


図 24 牛型結核菌 TC 50 を静脈内感染した BCG 免疫 CF# 1 系マウスの生存日数 (1)



接種してマウスを免疫した場合と、BCG 加熱死菌にアデューバントとして Aracel-A, Drakeol No. 6 を用いて混合液を作り、BCG 死菌 1mg および 5mg を筋肉内に接種して免疫を行なった場合との免疫効果を検討してみた。その成績は図 24 および 25 に示すとおり、いずれの場合も 1mg の BCG 死菌によつても明らかな免疫効果を認めることができた。

臓器内生菌数の推移からみた実験成績

図 25 牛型結核菌 T C 50 を静脈内感染した B C G 免疫 CF# 1 系マウスの生存日数 (2)

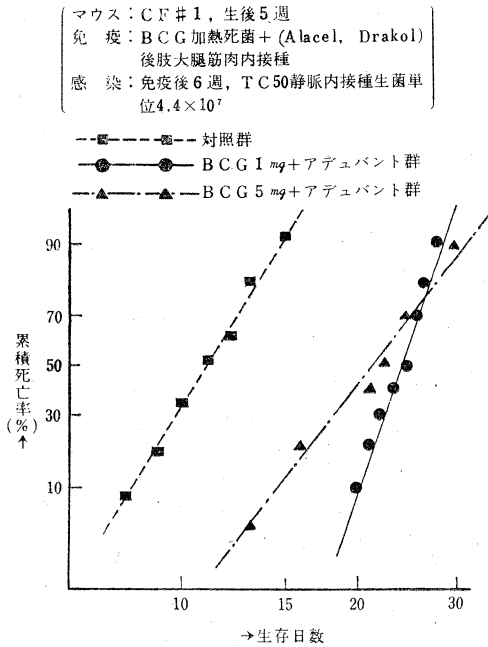
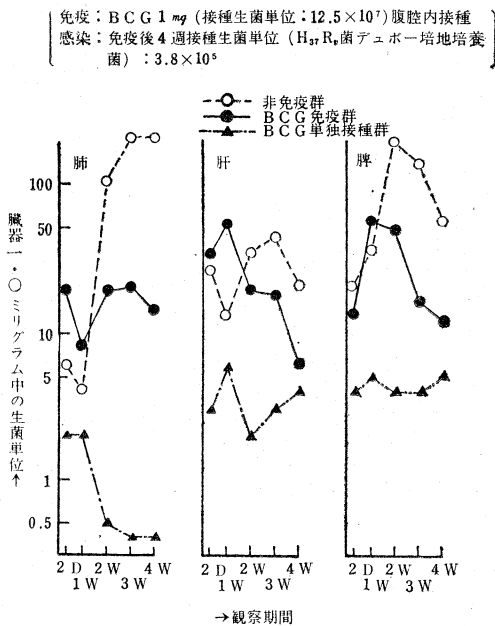


図 26 $H_{37}R_v$ 菌を静脈内接種した B C G 免疫および非免疫 ddN 系マウス (♂) の臓器内生菌数の推移

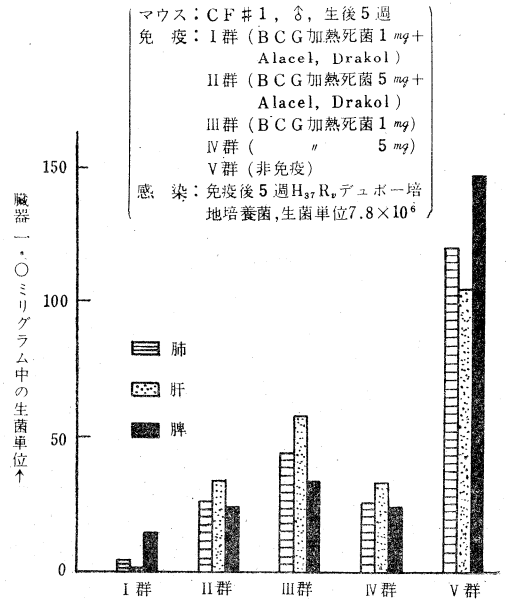


BCG 1 mg を腹腔内に接種して, ddN マウスを免疫し, 免疫後 4 週において $H_{37}R_v$ を静脈内に接種し, その後の臓器内生菌数の推移をみたのが図 26 である。図に明らかなように, いずれの時期においても B C G 免

疫群の生菌数は対照群に比較して少ないことが認められる。

次に B C G 加熱死菌 1 mg および 5 mg の静脈内接種による免疫の場合と, Aracel-A, Drakeol No. 6 の混合液として B C G 加熱死菌 1 mg および 5 mg の筋肉内免疫の場合とにおける免疫効果を比較してみた。す

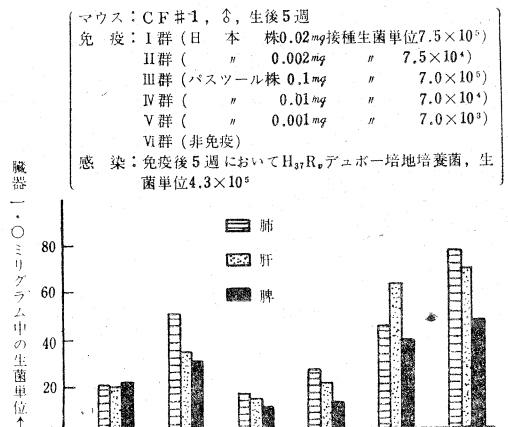
図 27 人型結核菌 $H_{37}R_v$ 静脈内接種後 4 週の B C G 死菌免疫 CF#1 系マウスの臓器内生菌数



なわち図 27 に示すとおり, アデュバントを加えた B C G 死菌免疫マウスおよびその他の免疫群においても, 臓器内生菌数は対照群に比較して明らかに少なく, 著明な免疫効果が認められる。

次に日本株 B C G とパスツール株 B C G との間に免疫

図 28 人型結核菌 $H_{37}R_v$ を静脈内接種した日本株およびパスツール株 B C G 静脈内免疫 CF#1 系マウスの感染後 4 週の臓器内生菌数



力の差異があるかどうかについて検討した成績についてみると、図28のように日本株BCG 0.02 mg, パスツール株 0.1 mg および 0.01 mg 免疫群の生菌数は対照群に比べて明らかに少ないが、日本株BCG 0.002 mg 免疫群の肝においてのみ対照群に比較してやや生菌数が少なく、辛じて有意の差を示した程度であつて、パスツール株BCGのほうが日本株BCGよりもやや免疫力が優れているように思われる成績が得られた。しかし接種菌液中の生菌数は日本株BCG 0.02 mg とパスツール株BCG菌液中には多量の死菌が含まれているので、この点に対する考慮が必要であらう。両菌株間の免疫力を比較するためには、マウス体内での増殖力に差異があるかどうか、抗原的にみて菌自身の免疫原性に相違があるかなどの問題を明らかにしなければならないと考えられる。

V 抗結核剤の効果に関する研究

新しい抗結核剤の探求にさいしてはその治効作用を簡単に判定する方法が要求される。一般にはまず *in vitro* における結核菌に対する抗菌作用が調べられるが、次には動物実験による効果判定が行なわれる。従来はモルモットによる動物実験が行なわれていたが、最近は実験動物としてマウスも用いられるようになった。

抗結核剤のスクリーニングテスト

スクリーニングテストの性質上マウスが用いられるのは当然である。マウスを用いるスクリーニングテストは実験方法、判定方法、実験操作も簡単で、実験期間も短くて効果判定ができるという点で優れている。

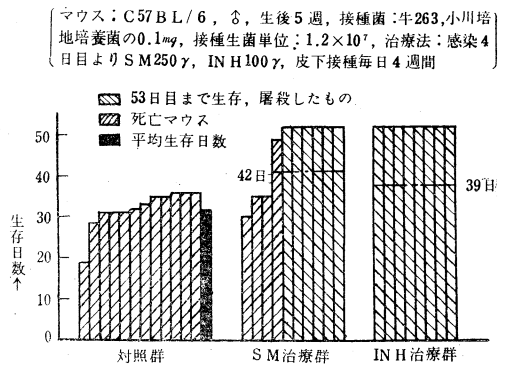
(1) 実験方法について

使用マウスとしては結核に対する感受性の均一である系統のものであればいかなる系統のものでもよい。私はC57BL/6, CF# 1, dd 系のマウスを用いるようにしている。感染菌としては強毒の人型および牛型結核菌が用いられる。治療群と対照群との間における生存日数を比較して効果判定を行なうのであるから、対照群は一定期間内に死亡するようなビルレンスを有する結核菌株であることが必要である。このような意味からデューボープ培地培養菌を静脈内に感染するのがよい。薬剤の投与方法としては注射法と経口法とが用いられる。注射法は一般に皮下注射法が用いられるが、経口法としては固型飼料中に所定量を混合して投与方法と、水に溶解して給水する方法とがある。薬剤投与は結核菌の感染と同時に進行すべきであり、投与量は毒性の許すかぎり大量に用うべきである。

(2) ストレプトマイシンおよびヒドラゼットの治療実験成績

図 29 は SM 250 γ 毎日注射および INH 100 γ 毎日注射による治療群の生存日数を示したものである

図 29 牛型結核菌牛 263 静脈内接種マウスの SM I NH 治療群および対照群の生存日数の比較



が、対照群はすべて36日までに死亡したのに反し、SM治療群では8匹中6匹は52日まで生存した。INH治療群では8匹全部52日まで生存し、SMおよびINHの著明な治療効果のあることが認められる。このようなSM治療群の一部が生き残り、対照群全部が死亡した場合にはいつまで観察すれば治療群の効果があると判定することができるかは実際問題としてきわめて重要である。これを統計学的に¹⁰⁾ ¹¹⁾に検討すると感染後42日において治療群の生き残りマウスを屠殺しても治療群と対照群との間の生存日数に差異があると断定することができるのである。さらにINH治療群のように全部のマウスが生き残つた場合でも同様の方法によつて統計学的に検討した結果、INH治療群は39日目に生き残つたマウスを全部屠殺して観察を打ち切つても治療群の薬剤の治療効果を断定することができるのである。

臓器内生菌数の推移からみた抗結核剤の治療効果について

(1) ヒドラゼットとカナマイシンまたはストレプトマイシンの併用療法の効果

抗結核剤の長期療法の効果の研究または併用療法の効果の研究などの精細な治療効果を問題にするような研究においては臓器内の生菌数の比較が行なわれる。図30, 31, および32はCF#1系マウスを用いて行なつたINH, INH+KM および INH+SM に対する治療効果を臓器内生菌数から比較した成績を示したものである。図に明らかのように併用療法は単独療法より優れているのは当然であるが、KM 毎日1,000 γ , SM 毎日500 γ とINHとの併用療法の間には差異を認めることはできない。また肺、肝ではときにより菌を培養することができなかつた場合があつたが、治療を中止すると再び生菌数が急激に増加することが認められた。それゆえ臓器内の結核菌は死滅しておらず、治療を中止するとともに再び増殖したものと考えられる。

図 30 INH, INH+KM および INH+SM によつて治療した CF# 1 系マウス (生後 37~47 日, ♂) の肺における結核生菌の推移

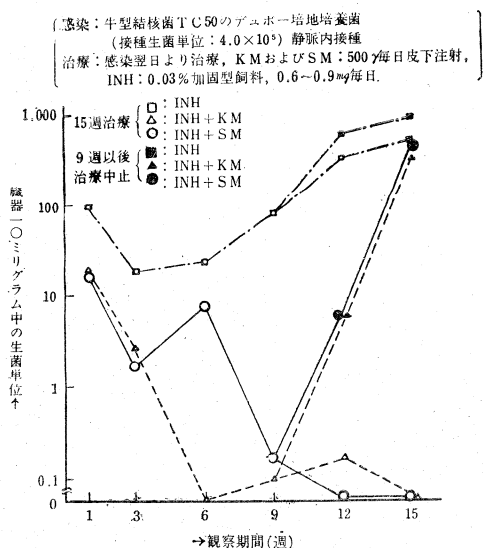
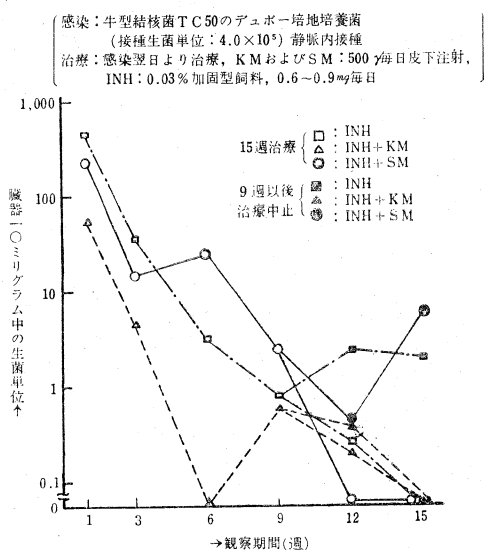


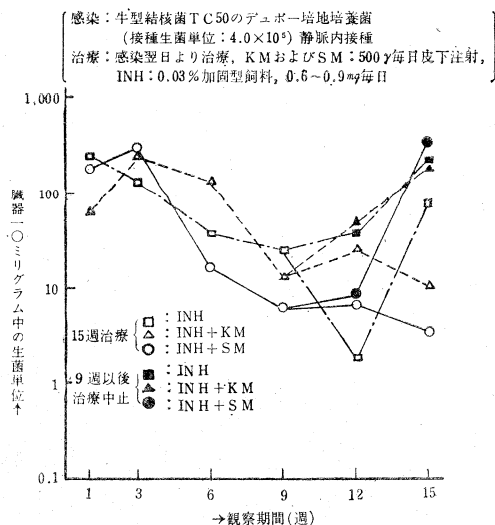
図 31 INH, INH+KM および INH+SM によつて治療した CF# 1 系マウス (生後 37~47 日, ♂) の肝における結核生菌の推移



(2) マウス体内における INH 耐性菌の発現

図 30 の INH 単独治療群の肺内生菌数の推移をみると、治療群および中止群ともに 6 週以後において生菌数が著明に増加しているのが認められる。そこで 15 週の肺からの分離菌について INH 耐性を調べたところ、INH 単独治療群では治療継続群中止群とも 10% 完全耐性であり、併用群では 1% 感性であることが知ら

図 32 INH, INH+KM および INH+SM によつて治療した CF# 1 系マウス (生後 37~47 日, ♂) の脾における結核生菌の推移



れた。すなわち CF# 1 系マウスにおいて感染菌として牛型結核菌 TC 50 を用い、INH を固型飼料に加えて 9~15 週治療を行なうことによつて、マウス体内において INH 耐性菌を作ること成功したのである。本方法はその後の実験においても再現性のあることを確かめており、今後各方面の研究に応用できるものと考えられる。

VI 総括およびむすび

(1) 感受性に及ぼすマウスの系統、性、生後日数の影響
 着色毛マウスは白色毛のものに比べて結核に対する感受性が高いことは Long および Vogt¹²⁾ によつて報告されている。Pierce ら¹³⁾ はスイス白色マウスよりも dba, C57BL のような着色毛のほうが感受性が高いことを発表している。またマウスの系統、性、生後日数、飼料による影響についても多くの報告^{14)~17)}がある。私が各系統マウスについて結核菌感染後のマウスの生存日数および臓器内の菌増殖から検討した結果結核に対する感受性の高い系統として CF# 1, C57BL/6, dba があげられる。CFW 系マウスは感受性もつとも低く、dd 系マウスはその中間の感受性を示した。次に各系統マウスの感受性の均一性についてみると、dd 系マウスはやや不均一であるが、他はすべて均一であり、ばらつきの少ない成績を示したが、dd 系マウスでも飼育管理に注意を払い、動物数を増せば一般の結核実験に用いられる。先ごろ一部で用いられていた SM 系マウスは結核ばかりでなく、他の細菌感染においても不均一な成績を示すので、現在はほとんど用いられていない。

性による感受性については、いずれの系統においても

著しい差異は認められないが、一般的にみて雌マウスのほうが雄マウスよりも感受性が高いようである。さらに BCG 免疫の現れ方について雌雄差を CF#1 系マウスにおいて実験した結果、雌マウスは雄マウスに比べて著しく劣ることが知られた。Hoyt¹⁸⁾は Olitsky "enteritidis resistant" white mice について全く同様の現象の存在することを報告しており、このように現象が CF#1 系マウス以外の他の系統のマウスにおいても認められるものかどうかさらに検討する必要がある。

(2) Cord Factor の致死作用に及ぼすマウスの系統、性、生後日数および BCG 免疫の影響

Bloch¹⁹⁾ 20) がマウスの系統別の Cord Factor に対する感受性についての報告によると dba, C57BL, C57Br 系マウスは感受性高く、CF#1 系マウスは感受性が低いということである。私の実験成績によると、生後 4~5 週の CF#1, CFW, C57BL/6 系マウスの間には Cord Factor に対する感受性に差異を認めなかつたが、生後 8~9 週になると CFW 系マウスのほうが CF#1 系マウスよりも感受性が高いことが知られたのである。この Cord Factor の致死作用には性による影響は全くみられなかつたし、また BCG 免疫を行なつても防禦することができなかつた。しかし CFW 系マウスでは BCG 免疫を行なつたほうが非免疫マウスよりもかえつて Cord Factor に対する感受性が高まる傾向のあることが知られた。新明ら²¹⁾は BCG 免疫によつて Cord Factor の致死を予防することができたと報告しているが、彼らは雑種マウスを用いているので、その機序の分析を行なうことができないのは残念である。また緒方ら²²⁾によると血清アナフィラキシー実験において CFW 系マウスの感受性が非常に高く、ショック死ないし重症のものを加えると、ほとんど 100% がアナフィラキシー症状を示すということである。CFW 系マウスは毒素に対する反応もきわめて過敏であるという。前述の BCG で免疫した CFW 系マウスが Cord Factor に対して高い感受性を示すという現象には結核アレルギーが重要な役割を果たしているのではないかと予想されるが、Bloch はツベルクリン反応陽性のモルモットにおいて Cord Factor に対するアレルギー反応は認められなかつたと報告しているので、実験に使用する Cord Factor 自身の検討とともに、前述の現象がはたしてアレルギーによるものかどうかの分析を行なう必要があると考える。

(3) マウスによる結核菌のビルレンスの研究

結核菌のビルレンスの研究には感染マウスの生存日数および臓器内生菌数の推移によつて比較ができることを述べた。強毒結核菌は弱毒結核菌に比べ、臓器内の菌増殖が著しく、とくに肺における増殖の様相に著明な差異があり、強毒結核菌感染マウスの肺の生菌数は長期間にわたり、高い値を持続し、また減少の傾向が少ない。この

現象は小河・遠藤⁹⁾の報告にあるような、同一菌株を感染したマウスの肺からの分離結核菌は肝からの分離菌に比べてビルレンスが著しく強いという事実と密接な関係があるように思われる。

山村ら²³⁾の報告したマウスの全身ホモジナイズ法による結核菌のビルレンスの研究方法は優れた方法であると思われるが、結核菌のマウス臓器によつて増殖状況が異なることなどを考慮すると、臓器親和性の問題などもあつて臓器ごとに生菌数を観察する方法もきわめて重要であると考えられる。

(4) マウスによる結核免疫実験

マウスを用いて結核の免疫実験が可能であることが知られた。本報告においては BCG の生菌および死菌、さらに死菌に Adjuvant を加えた場合の免疫効果について述べたが、同様の実験方法によつて広く結核の免疫実験が可能であることが知られたわけである。

(5) 抗結核剤の効果に関する研究

マウスを用いて抗結核剤の効果のスクリーニングテストを行なう方法について述べた。すなわち使用マウスとしては CF#1, C57BL/6 系マウスがよく、感染結核菌としては強毒人型または牛型菌のデューボア培地培養菌を用い、成績の判定には生存日数の比較を行なうことによつて、各種抗結核剤の効果を判定することができる。

次に抗結核剤の長期治療の効果、さらに併用療法の効果の研究をマウスにより行なうことができることについて述べた。このさいには治療効果の判定は治療マウスと対照マウスとの臓器内生菌数の推移を長期間にわたり観察することが必要である。

(6) マウス体内において INH 耐性菌発現の実験

マウスにより INH 耐性菌を作ることができることを知つた。岩崎²⁴⁾も雑種マウスを用いて結核菌感染後副腎皮質ホルモンを併用して INH 耐性菌を発現させることができたことと報告しているが、私のマウスを用いて INH 耐性菌を作り出した実験方法はきわめて簡単であり、再現性のある方法であるので、耐性菌発現阻止の研究など抗結核剤の効果に関する動物実験に広く応用することができるものと考えられる。要するに感染菌株、感染菌量、薬剤投与法、投与量などを適当な条件にするならば、比較的容易にマウス体内に INH 耐性結核菌を発現させることが分かつた。

以上は現在まで実施してきた実験成績の概要である。しかし研究はようやくその緒についた程度であつて、結核菌感染により早く死亡するマウスのうちでも、その感染機序は同一ではなく、また系統、性などによつて著しく異なることが知られた。また免疫の出来方、アレルギーの現れ方にも複雑な因子によつて影響を受けることも分かつたが、これらの点を明らかにするためには、細菌学、免疫学、病理学の専門家だけでなく、生化学、生理

学、薬理学、遺伝学など各方面の学者の共同研究を行なうことが必要である。さらに飼育管理、自然感染の問題、SPF動物、無菌動物など多くの重要な未解決の研究課題も残されている。今後はマウスだけでなく、他の近交系動物による動物実験がますます盛んに行なわれるようになり、結核の実験的研究が一層推進されることを念願するものである。

稿を終わるにあたり、第35回日本結核病学会総会において特別講演の機会をお与え下さった会長具田勝美教授に深甚の感謝の意を表す。

また本研究の実施にあたり、文部省総合研究、マウスの生理的特徴に関する研究班(班長安東洪次教授)、結核研究班(班長今村荒男教授)および抗酸菌の変異と分類班(班長戸田忠雄教授)、厚生省結核療法研究協議会(委員長熊谷岱蔵教授、同細菌科会長柳沢謙博士)、さらにBCG製法研究会(会長大林容二博士)より研究費の補助を得た。ここに深謝する。さらにCord Factorの分与など多大の御援助を頂いた山村雄一教授、乾燥BCGを分与して下さいた室橋豊徳博士、沢田哲治博士に感謝する。

本研究は伝研疫部田嶋嘉雄教授、鈴木潔博士、予研疫部今泉清博士、故遠藤元清学士、今井章浩氏、予研病理部江頭靖之博士、小河秀正博士、武田薬品工業光工場細菌部金子順一博士、労働省労働衛生研究所興重治博士および国立公衆衛生院衛生微生物学部林治博士ほか部員および専攻生諸君など多数のかたがたの共同研究によつて実施されたものであることを付記し、ここに厚く感謝の意を表す。

文 献

- 1) Diehl, K., & Verschuer, O. : Jens. Gustav. Fischer, 1936.
- 2) Uehlinger, E., & Künsch, M. : Beitr. z. Klin. Tuberk., 92 : 275, 1938.
- 3) Kallmann, F.J., & Reisner, D. : Am. Rev. Tuberc., 47 : 549, 1943.
- 4) Puffer, R.R. : Harvard University Press, 1944.
- 5) Youmans, G. P., & Youmans, A. S. : Am. Rev. Tuberc., 64 : 534, 1951.
- 6) Mayer, E., Jackson, E.R., Whiteside, E.S., & Alverson, C. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 419, 1954.
- 7) 水之江英・金谷敏・手塚孝・岩下一郎・居合亮・粟木勝之助 : 結核, 31 : 344, 昭31.
- 8) Bloch, H., & Mizuno, D. : Am. Rev. Tuberc., 75 : 488, 1957.

- 9) 小河秀正・遠藤元清 : 実験動物, 8 : 149, 昭34.
- 10) 染谷四郎・林治・興重治 : 日本臨床結核, 15 : 28, 昭31.
- 11) 興重治 : 動物実験法, P. 325, 朝倉書店, 昭31.
- 12) Long, E. R., & Vogt, A. B. : Ann. New York Acad. Sci., 52 : 627, 1948.
- 13) Pierce, C., Dubos, R.J., & Middlebrook, G. : J. Exp. Med., 86 : 159, 1947.
- 14) Donovan, R., Mckee, C. M., Jambor, W.P., & Rake, G. : Am. Rev. Tuberc., 60 : 109, 1949.
- 15) Milzer, A., & Levine, E. R. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 69 : 16, 1948.
- 16) Gray, D. F., & Mattinson, M.W. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 92, 1954.
- 17) Dubos, R. J., & Pierce, C. : Am. Rev. Tuberc., 57 : 287, 1948.
- 18) Hoyt, A., Moore, F. J., Knowles, R. G., & Smith, C. R. : Am. Rev. Tuberc., 75 : 618, 1957.
- 19) Bloch, H. : J. Exp. Med., 91 : 197, 1950.
- 20) Bloch, H., Sorkin, E., & Erlenmyer, H. : Am. Rev. Tuberc., 67 : 629, 1953.
- 21) 新明美仁・関川勲 : 日本細菌学雑誌, 14 : 290, 昭31.
- 22) 緒方富雄・鈴田達男・奥木実・今泉清・太田佑 : 医学と生物学, 49 : 248, 昭33.
- 23) 加藤允彦・三木勝治・松永清輝 : 結核, 30 : 638, 昭30 ; 31 : 158, 昭31 ; 32 : 472, 557, 昭32.
- 24) 岩崎龍郎・松崎芳郎・古久保文造・木野智慧光 : 結核, 34 (増刊号) : 217, 昭34.

本報告には下記の研究からも成績が引用された。

- 1) 染谷四郎・林治・田嶋嘉雄・遠藤元清・今井章浩 : 実験動物彙報, 4 : 57, 昭30.
- 2) 染谷四郎 : 化学療法, No. 10 : 7, 昭31.
- 3) 染谷四郎・林治・高橋正男・大久保重次郎・田嶋嘉雄・鈴木潔 : 胸部疾患, 1 : 155, 昭32.
- 4) 同上 : 胸部疾患, 1 : 259, 昭32.
- 5) 染谷四郎・林治・田嶋嘉雄・遠藤元清 : 結核, 26 : 74, 昭26.
- 6) 染谷四郎・林治 : 日本細菌学雑誌, 11 : 979, 昭31.
- 7) 高橋正雄 : 日本細菌学雑誌, 13 : 228, 昭33.
- 8) 染谷四郎・林治 : 結核, 34 : 78, 昭34.
- 9) 染谷四郎・林治・高橋正男 : 感染シンポジウム, 第1集, P. 193, 南江堂, 昭34.

2. 珪肺結核の外科的療法

九州大学結核研究所 井上 権 治

九大医学部結核研究所、国立療養所銀水園およびその他関連施設において集めえた北部九州地区における炭鉱労務者を主体とした珪肺結核患者手術症例 202 例を基礎として、本症の手術成績ならびに関連問題について考察を加える。

I 手術症例

手術症例は、肺切 111 例、胸成 86 例、空洞切開 6 例、計 203 例である。

手術患者を職歴別にみると、石炭鉱山 167 例、金属鉱山 22 例、窯業 13 例、石工 1 例となつている。

II 切除術

(1) 症例：全例 111 例であるが、そのうち部切 7、区切 55、葉切または複合手術 43、片肺全切 3 となつており、珪肺病型が第 2 型となると葉切の率が 50% 以上で他の病型におけるよりも多くなつている。

なお、珪肺病型別では、その基本型について述べると初期群では Ro 32, Rx 44 で、第 1 型 (R₁) 22, 第 2 型 (R₂) 13 例で第 3 型 (R₃) には切除術は行なっていない。

(2) 手術所見：従来から本症に対する肺切除術が肺結核のみの場合に比べて困難である点として、肋膜の癒着と肺門部変化の高度なことがあげられていたが、肋膜癒着については、初期群はもちろん、第 1 型、第 2 型にいたるも肋膜癒着の高度なもの、軽度なもの割合は変わらず、また単純結核の場合の癒着の度合とも変りはなかつた。さらに肺門部変化についても、手術的に血管、気管支などの剝離が容易であつたか、困難であつたかについて病型別に比較してみたところ、初期群より第 1 型までは剝離が容易であつたものと困難であつたものとの割合において、著差はなかつた。しかし、第 2 型になると困難なものが相当に多くなつている。また単純結核の場合と比較してみると、珪肺結核のほうに困難なものの出現率がやや多いようである。

術中出血量；大部分は 300~1,000 cc の出血量で珪肺病型との平行関係は認められず、多くは結核病変による肋膜癒着の如何によるものと思われる。

(3) 術後経過：術後順調に経過したものと血腫、膨脹不全、小病巣遺残などのため、補正成形術を加えたものを

併わせて 83 例 (74.8%) は良好な経過を示した。術後の排菌、結核悪化、気管支瘻、膿胸などの結核性合併症は 12 例 (10.8%) にみているが、そのうち 10 例は、追加胸成や化学療法にて治療し復職している。純粹の膨脹不全による追加胸成例は 9 例 (9.3%) にみられたが、その原因は結核性の肋膜癒着によるものが主で、珪肺病型と直接関係は認められなかつた。手術死亡は 2 例 (1.8%) で、1 例は術中輸血事故によるもの、他の 1 例は術後の脳栓塞様症状で失つた。

(4) 術後の遠隔成績：昭和 34 年 12 月末現在、術後 1 年以上、6 年目までの症例 85 例について検討した。このうち就労したものは 70 例 (82.4%) で、退院して未就労の軽快者は 8 例 (9.4%)、自宅療養 3 例 (3.5%)、術後引き続き入院中のもの 3 例、不明 1 例となつている。さらに術後一たん就労した 70 例について現在の状態を調査してみると、原職復帰は 39 例 (55.7%) で、そのうち 27 例 (38.6%) は坑内労働に従事している。

また、労働量軽減例は 25 例 (30.6%) で、以上の症例に自家営業に転じた 1 例を加えた 65 例 (87.7%) は就労中である。再療養の 3 例は術後結核悪化 2 例、結核悪化および珪肺進展で就労不能となつたもの 1 例である。

全般的にみて、珪肺第 2 型になると坑内復帰者はなく、一たん就労後再療養の必要が生じたものが多い。

術後の珪肺進展につき、肺切、胸成、空切症例を併わせ 201 例について調査を行なつたが、切除 8 (全切除例の 7.2%)、胸成 3 (3.4%)、空切 1 (33.3%) に珪肺病型の進展をみている。これらの症例について、術前の職歴、珪肺病型、年齢、結核病型、術後経過年数などを調査したが、術前の珪肺病型が第 1 型、第 2 型となるにつれて発生率が高くなつていることがもつとも関係あるように思われた。また、これらの症例のうち現在珪肺第 2 型または第 3 型となり、また自覚症として息切れを訴え、あるいはまた結核悪化を伴っているものは自宅療養や再入院を余儀なくされていて予後が悪い。なお、切除時、肋膜癒着と肺門部変化が高度のために所期の切除術を中止して、主病巣部分切除、胸成術、空切術などに変更したものが 5 例あるが、必ずしも珪肺病型の進んだものばかりではない。

III 胸成術

珪肺結核に対して胸成術を行なった 86 例について調査を行なった。手術は主として昭和 24 年より昭和 30 年の間に行なわれており、その中には肋膜外合成樹脂球充填術 3 例、および肋膜外合成樹脂球充填術併用例 22 例を含んでいるが、虚脱療法例として一括して考察した。

病型別にみると R_x 36 例、R₁ 34 例、R₂ 16 例である。術後経過として全く順調であったものは 40 例 (55.6%) で術後排菌例の 31 例 (43.1%) の大部分は術後 1 ないし 2, 3 回の排菌者で、これは虚脱療法としては通常みられることであり、全手術者の 70% くらいはよい経過を示している。術後の合併症でもつとも注目すべきは、呼吸困難で、例数は 4 例にすぎないが、そのうち 3 例をこの症状のために失っている。遠隔成績として術後 1 年以上 10 年にわたる 84 例について調査したところ、就労 60 例 (71.4%)、療養中 15 例 (17.9%)、死亡 6 例 (7.1%、術直後死 3 例を含む)、不明 3 例となつている。

IV 重症例の検討

珪肺病型が第 2 型以上、結核病型が NTA 分類 M. A. 以上の合併者を一応重症例として各種手術の成績を検討した。手術としては切除 7 例、胸成 15 例、空洞切開 6 例を行なっている。同じ重症例の範囲でも珪肺病型においては切除、胸成では R₂ ばかりであるが、空切例には R₃ が 2 例ある。また結核病型については、切除では M. A. のみ、胸成では約半数が F. A. また空切例は 6 例中 5 例が F. A. である。

手術成績をみると治癒または軽快が切除例で 4 例 (57.1%)、胸成例では 6 例 (40%) 認められるが空切例では、術後 1 年未満のもの 2 例を除いても、残りの 4 例に治癒、軽快はない。すなわち珪肺病型第 2 型以上、結核病型 M. A. 以上の合併した症例では各種手術の予後は一段と悪くなつていくが、とくに空切術の適応しかないような重症例ではほとんど治癒の望みはないようである。

V 珪肺結核の手術と肺機能

(1) 珪肺および珪肺結核の肺機能

珪肺および珪肺結核 113 例について検討した。職業別には炭鉱 53 例、金属鉱山 31 例、窯業 21 である。

まず珪肺例で換気機能について各職業別に比較してみたが、いずれの検査事項においても職業別に差はなく、また珪肺病型別にみると、R₂ より R₃ に進むに従つて機能が低下してゆく傾向がみられる。また珪肺結核例においても同様で、すなわち結核病変が NTA 分類の

Min. A. および M. A. 範囲内のものであればこれによるとくに著明な影響は認められないようである。珪肺および珪肺結核全症例において、換気機能の示標として A. V. I. に着目し、y 軸に M. B. C. %, x 軸に V. C. % をとつたグラフに各症例を展開してみると、調査した範囲では極端に拘束性障害または閉塞性障害のいずれかに偏するものは認めなかつた。さらに肺機能低下例につきその悪化の原因としては、年齢、職歴年数、さらに化膿症、喘息、気管炎、重症結核などの合併症が関係あることが認められた。

また外科的肺疾患として、珪肺結核、重症肺結核、肺化膿症、肺癌などの各症例において各種肺機能を比較してみると、珪肺結核では、軽症より中等症、重症と進むにつれて、換気、血流機能も一応平行して障害されているが、中等症以上になると、肺胞作用の障害が換気作用のそれより一歩先んじている傾向がみられた。しかし肺癌例のような著明な換気と血流のアンバランスは認めなかつた。

(2) 術後経過

術後の換気機能につき経過を追つて調査してみると、切除例、切除+補正成形例、胸成例いずれも術後 3~6 カ月で安定した値をとるようになるが、V. C., M. B. C. は切除例では術前の 90% 以上、切除+補正例では 70% 前後、成形例では 60~70% 付近まで回復して安定する。残気率は切除および切除+補正例では術前値または 10% 上昇、胸成例では 20% の上昇を認めた。

切除例で術前後 V. C., M. B. C. とともに術前値の 80% 以下に低下した症例を調べてみると、いずれも術後の気管支癒、膨脹不全などで補正成形を行なつたばかりである。

(3) 術後の遠隔調査

術後 1~8 年を経過した各手術群について、V. C., M. B. C., E. R. I. を調べたが、その成績は切除、切除+補正、胸成と順次低下を示すが、いずれも就労可能な良好な状態にあつた。

なお術後の心電図調査において右心負荷の有無を検討したが、これによつて現われてくる各所見は、珪肺病型、手術術式、術後経過などと特別の関係を示さず、また単純肺結核の場合と変りはなかつた。

結 論

珪肺結核に手術治療を行なう場合、その基本珪肺病型が第 1 型までの進展では、単純肺結核の場合と同様の適応をもつて手術を行なつてもその手術成績は良好である。しかし珪肺病型が第 2 型以上に進んでくると、肺機能上、手術の困難性などにおいて、手術の適応に制約を受けることが多くなり、また術後経過、遠隔成績などにおいて臨床的・肺機能学的にも予後が悪くなつてくる傾向がみられる。

特 別 講 演

3. 日本における珪肺および珪肺結核の実態

労働省労働基準局労働衛生課長 加 藤 光 徳

I 珪肺法の施行

昭和 30 年珪肺等特別保護法が施行され、粉塵作業労働者に対する国による珪肺健康診断を昭和 30 年以降 3 年間にわたり、対象事業所 12,981, 対象労働者 339,450 人について実施した。その集計結果については、すでに第 15 回日本医学会総会において発表したところであるが、今回はとくに珪肺に合併した肺結核についての集計結果を報告し、あわせて第 1 回珪肺健康診断実施後 3 年目の珪肺の推移について報告する。

II 珪肺健康診断の結果

粉塵労働者 339,450 人について、昭和 30 年 9 月から 32 年度末日まで 3 年間にわたって珪肺健康診断を実施し、その年次別実数は、昭和 30 年度約 71,000 人、

昭和 31 年度 210,000 人、昭和 32 年度 58,000 人である。健診の方法としては、X 線直接撮影、心肺機能検査、結核精密検査、粉塵職歴調査である。判定については、地方珪肺診査医（はじめ 20 人、後 76 人）によって診査することを原則としたが、初年度においては中央珪肺診査医が診断基準の統一のために一応目を通すことにした。

判定基準として、X 線写真の読影は法に規定した基準によることとし、これにさらに結核精密検査、心肺機能の結果を勘案した症度区分によつたものである。

III 産業別症度別有所見者数および率

健診の結果によれば表 1 に示すごとく全有所見者数 38,738 人、うち第 3 症度 1,937 人、第 4 症度 1,364 人であつて、有所見者率は表 2 のごとく全有所見者率

表 1 産 業 別 ・ 症 度 別 有 所 見 者 数

産 業 別	症 度 別 健 診 実 施 総 数	正 常	有 所 見 者 数					診 査 不 能
			計	第 1 症度	第 2 症度	第 3 症度	第 4 症度	
計	339,450	330,147	38,738	31,747	3,690	1,937	1,364	565
金 属 製 錬 業	11,962	10,742	1,215	1,048	81	59	27	5
鑄 物 業	45,937	40,836	5,058	4,293	447	194	124	43
船 舶 製 造 業	4,260	3,275	977	880	44	37	16	8
金 属 工 業 お よ び 機 械 器 具 製 造 業	28,782	25,533	3,241	2,842	226	120	53	8
化 学 工 業	3,118	2,874	244	194	26	18	6	
セメント製造業	997	923	74	73	1			
ガラス製造業	2,010	1,749	261	210	18	16	17	
陶磁器製造業	10,497	8,454	2,022	1,561	216	141	104	21
耐化煉瓦製造業	6,206	5,263	937	822	52	39	24	6
その他の窯業	5,885	4,999	883	733	63	51	36	3
土石工業	6,802	5,206	1,581	951	164	196	270	15
石炭鉱業	144,247	132,217	11,747	9,731	1,194	576	246	283
金属鉱業	34,637	27,967	6,620	5,430	694	278	218	50
亜炭鉱業	4,103	3,689	411	310	67	16	18	3
その他の鉱業	2,812	2,499	310	240	36	23	11	3
砂 鉱 業	161	153	8	7		1		
石 切 業	4,350	3,512	831	623	121	39	48	7
土石採取業	7,717	6,792	915	699	99	55	62	10
水力発電建設事業	4,312	3,869	431	325	51	27	28	12
隧道建設事業	9,083	8,203	803	638	78	37	50	77
その他の土木建築事業	701	602	94	69	9	11	5	5
その他の事業	871	790	75	68	3	3	1	6

表2 産業別・症度別有所見者率

産業別	症度別 健診実施総数	正 常	有 所 見 者 率					診査不能
			計	第1症度	第2症度	第3症度	第4症度	
計	339,450	88.42%	11.41%	9.35%	1.09%	0.57%	0.40%	0.17%
金 属 製 錬 業	11,952	89.80	10.16	8.76	0.68	0.49	0.23	0.04
鑄 物 業	45,937	88.90	11.01	9.35	0.97	0.42	0.27	0.09
船 舶 製 造 業	4,260	76.88	22.94	20.66	1.03	0.87	0.38	0.18
金 属 工 業 お よ び 機 械 器 具 製 造 業	28,782	88.71	11.26	9.87	0.79	0.42	0.18	0.03
化 学 工 業	3,118	92.18	7.82	6.22	0.83	0.58	0.19	
セメント製造業	997	92.58	7.42	7.32	0.10			
ガラス製造業	2,010	87.02	12.98	10.45	0.89	0.80	0.84	
陶磁器製造業	10,497	80.54	19.26	14.87	2.06	1.34	0.99	0.20
耐火煉瓦製造業	6,206	84.80	15.10	13.24	0.84	0.63	0.39	0.10
その他の窯業	5,885	84.94	15.01	12.46	1.07	0.87	0.61	0.05
土石工業	6,802	76.54	23.24	13.98	2.41	2.88	3.97	0.22
石炭鉱業	144,247	91.66	8.15	6.75	0.83	0.40	0.17	0.19
金属鉱業	34,637	80.74	19.11	15.68	2.00	0.80	0.63	0.15
重炭鉱業	4,103	89.91	10.02	7.56	1.63	0.39	0.44	0.07
その他の鉱業	2,812	88.87	11.02	8.53	1.28	0.82	0.39	0.11
砂 鉱 業	161	95.03	4.97	4.35		0.62		
石 切 業	4,350	80.74	19.10	14.32	2.78	0.90	1.10	0.16
土石採取業	7,717	88.02	11.85	9.06	1.28	0.71	0.80	0.13
水力発電建設事業	4,312	89.72	10.00	7.54	1.18	0.63	0.65	0.28
隧道建設事業	9,083	90.31	8.84	7.02	0.86	0.41	0.55	0.85
その他の土木建築事業	701	85.88	13.41	9.85	1.28	1.57	0.71	0.71
その他の事業	871	90.70	8.61	7.81	0.34	0.34	0.12	0.69

11.43%，第3症度有所見者率0.57%，第4症度有所見者率0.40%であった。

産業別にみると有所見者数は石炭鉱業11,747人、金属鉱業6,620人、鑄物業5,058人で有所見者実数としては多い産業であるが、有所見者率からみると土石工業23.30%、船舶製造業22.98%、陶磁器製造業19.30%、金属鉱業19.14%、石切業19.13%となっている。また、第4症度が多く発見された産業は土石工業270人、石炭鉱業246人、金属鉱業218人、鑄物業124人、陶磁器製造業104人であるが、発見率からみると土石工業3.98%、石切業1.10%、陶磁器製造業0.99%の順となっている。

IV 結核精密検査および活動性肺結核の判定基準

結核精密検査は、X線写真において、融合像または塊状陰影が認められた第IV型のものに対して行なうこととし、その検査項目は、

- ①ツベルクリン皮内反応
- ②赤血球沈降速度検査
- ③結核菌の検出(塗抹、培養検査)

である。

活動性肺結核の判定基準は、珪肺診査医の会合におい

て次のように申し合わされたので、これによることとした。

1. 定義

症状の有無にかかわらず明らかに不安定と認められるもの

2. 診断

①確実に排菌を認めるもの

②X線所見

A a. 初期結核症の一部

たとえば新鮮なもの

b. 播種状肺結核症の一部

たとえば部分的に病巣密度の著しく高いもの

c. 肺炎型肺結核症

d. 浸潤型肺結核症の一部

e. 限局巣状(結節性)肺結核症の一部

たとえば軟らかいものでおおむね拇指頭大以上のもの

f. 硬化性肺結核症の一部

g. 混合型肺結核症の一部

B. 病型の如何にかかわらず明らかに空洞の認められるもの

③臨床所見、著明な症状があるもの

表3 産業別結核合併者数および率

エックス線型別 産業別	健診実 施総数	非活動性肺結核					活動性肺結核				
		第I型	第II型	第III型	計	%	第I型	第II型	第III型	計	%
計	339,450	1,392	415	91	1,898	0.56	858	353	128	1,339	0.39
金属製錬業	11,962	50	9		59	0.49	16	9	2	27	0.23
鋳物業	45,937	168	22	3	193	0.42	110	11	2	123	0.27
船舶製造業	4,260	35	2		37	0.87	15		1	16	0.38
金属工業および機械器具製造業	28,782	110	9	1	120	0.42	45	8		53	0.18
化学工業	3,118	12	4	2	18	0.58	4	1	1	6	0.19
セメント製造業	997										
ガラス製造業	2,010	13	3		16	0.80	10	5	2	17	0.85
陶磁器製造業	10,497	96	39	2	137	1.31	60	39	4	103	0.98
耐火煉瓦製造業	6,206	35	3	1	39	0.63	17	7		24	0.39
その他の窯業	5,885	42	4	1	47	0.80	14	13	8	35	0.59
土石工業	6,802	153	34	7	194	2.85	198	47	21	266	3.91
石炭鉱業	144,247	375	162	27	564	0.39	141	74	27	242	0.17
金属鉱業	34,637	153	76	35	264	0.76	109	69	34	212	0.61
重炭鉱業	4,103	12	3	2	17	0.41	11	4	2	17	0.41
その他の鉱業	2,812	12	9	2	23	0.82	4	4	1	9	0.32
砂鉱業	161			1	1	0.62					
石切業	4,350	32	4	1	37	0.85	18	25	4	47	1.08
土石採取業	7,717	35	18	3	56	0.73	33	16	10	59	0.76
水力発電建設事業	4,312	23	2	1	26	0.60	19	7	2	28	0.65
隧道建設事業	9,083	26	9	2	37	0.41	30	12	7	49	0.54
その他の土木建築事業	701	8	2		10	1.43	3	2		5	0.71
その他の事業	871	2	1		3	0.34	1			1	0.11

V 珪肺結核について

珪肺第3症度と決定された1,937人のうちまたは第4症度と決定された1,364人のもののうち、結核によるものは第3症度1,898人、第4症度1,339人で総数の98.06%を占め、心肺機能障害によるものはわずかに2%弱であり、結核の合併によるものが多いかを示している。

1. 産業別結核合併者数および率(表3)

産業別にみると、活動性結核合併のものは土石工業3.91%、石切業1.08%、陶磁器製造業0.98%、ガラス製造業0.85%となっており、非活動性のものは土石工業

表4 珪肺のエックス線型別活動性肺結核合併者数および率

エックス線型	有所見者数	活動性のもの	%
計	38,738	1,339	3.45
第I型	33,997	858	2.52
第II型	4,216	353	8.37
第III型	525	128	24.38

2.85%、その他の土木建築事業1.43%、陶磁器製造業1.31%、船舶製造業0.87%となっている。

2. 珪肺の型と肺結核の合併率(表4)

珪肺の型の進むにつれて結核の合併は増加する。すなわち、活動性肺結核合併者1,339人中第I型2.52%、第II型8.37%、第III型24.38%と上昇し、この傾向は非活動性の場合より強い。

3. 粉塵作業別活動性肺結核合併者数および率(表5)

粉塵作業別にみると、活動性肺結核合併者数は、坑内の土石または鉱物の掘さく、破さい作業504人、岩石のみ仕上げ、研ま作業240人、砂型こわし、砂落し、はつり鋳物研ま作業152人、坑外の岩石の掘さく、破さい、さい断作業114人の順である。これを合併率からみると、岩石のみ仕上げ、研ま作業4.45%、坑外の岩石の掘さく、破さい、さい断0.74%、乾燥、かま詰め、かま出し作業0.62%である。

4. 粉塵作業経験年数別、型別、活動性肺結核合併者数および率(表6)

粉塵作業経験年数別にみると、全体としては合併率は、経験年数の増加に比例して上昇している。しかし型別にみると第I型においてのみ上述の傾向が保たれているほか、第II型、第III型のものでは経験年数の増

特 別 講 演

表 5 粉塵作業別・エックス線型別・活動性肺結核合併者数および率

粉塵作業別	エックス線型別	労働者数	活動性肺結核				%
			第 I 型	第 II 型	第 III 型	計	
計		339,450	858	353	128	1,339	0.39
坑内土石または鉱物の掘さく、破碎		176,107	267	164	73	504	0.29
坑内土石または鉱物の選別、運搬		22,743	24	9	2	35	0.15
坑外の岩石の掘さく、破碎、さい断		15,480	59	35	20	114	0.74
岩石のみ仕上げ、研ま		5,390	184	46	10	240	4.45
粉状の土石を含む鉱物岩石のふるいわけ、混合選別、投入		31,372	59	32	7	96	0.31
乾燥、かま詰め、かま出し		14,421	51	35	3	89	0.62
袋詰め、積み込み、積みおろし		1,725	1			1	0.06
砂型こわし、砂落し、はつり作業、鋳物、研ま		61,681	139	10	3	152	0.25
炉の修理、取りかえ		5,154	11	4		15	0.29
鉱さいのかき落とし		3,769	2		2	4	0.11
その他		1,608	63	18	8	89	5.53

表 6 経年数別・エックス線型別・活動性肺結核合併者数および率

エックス線型別	被総 検査 者数	計			第 I 型			第 II 型			第 III 型		
		総 数	活結 動性核	%	総 数	活結 動性核	%	総 数	活結 動性核	%	総 数	活結 動性核	%
3 年 未 満	76,039	1,533	30	1.96	1,437	19	1.32	85	5	5.88	11	6	54.55
3~5年未満	47,184	2,027	43	2.12	1,915	27	1.41	100	14	14.00	12	2	16.67
5~10年 "	103,841	9,560	176	1.84	8,869	119	1.34	625	40	6.40	66	17	25.76
10~15年 "	51,797	6,979	192	2.75	6,306	121	1.92	604	50	8.28	69	21	30.43
15~20年 "	29,565	7,036	209	2.97	6,032	132	2.19	895	57	6.37	109	20	18.35
20~25年 "	13,899	4,443	182	4.12	3,699	110	2.97	639	54	8.45	105	18	17.14
25~30年 "	7,207	2,753	127	4.61	2,237	74	3.31	463	35	7.56	53	18	33.96
30~40年 "	7,314	3,483	234	6.72	2,745	155	5.65	658	64	9.73	80	15	18.75
40 年 以 上	1,983	1,112	144	12.95	818	101	12.35	254	33	12.99	40	10	25.00
不 明	621	59	2	3.39	53			4	1	25.00	2	1	50.00
計	339,450	38,981	1,339	3.44	34,111	858	2.52	4,327	353	8.16	547	128	23.40

表 7 エックス線型別結核菌の検出率

エックス線 写 真 像	活動性肺結核合併				
	総 数	未検のもの	検 査 結 果		
			総 数	菌証明者	%
第 I 型	840	330	510	118	14.0
IV II 型	360	163	197	33	9.2
型 III 型	126	48	78	6	4.8

表 8 任意申請 (法 6・7 条) による産業別・症度別有所見者数 (昭和30年~34年3月末まで)

症 度 別 産 業 別	申請総数	正 常	有 所 見 者 数				保 留	診 査 能	
			計	第1症度	第2症度	第3症度			第4症度
計	2,689	308	2,326	543	214	306	1,263	15	4
金 属 製 錬 業 鑄 物 業 船 舶 製 造 業 金属工業および機械器 具製造業	87 35 18 34	12	74 35 18 31	15 7 7 4	14 3 2 1	21 3 5 2	24 22 4 24	1	
化 学 工 業	34	2	32	18	3	4	7		
セ ガ 陶 耐 火 の 他	2 19 68 41 73		2 18 65 34 66		1 1 6 3 8	1 2 3 4 4	1 14 47 27 42	1 1 1	1
土 石 金 垂 車 の 他	92 1,087 884 6 21	4 135 122 1	88 950 725 5 19	1 274 184 1 4	5 88 75 2	3 127 94 1 2	79 461 372 1 13	2 35	1 1
砂 石 土 水 隧 道 の 他	15 50 17 53	1 1 2 5	14 45 14 48		1 4 1 5	1 5 4 2	12 33 9 40		1
そ の 他 の 土 木 建 築 事 業 明	13 6 34	1 5	10 5 28		2 1 3	2 1 1	6 3 22	3	

表 9 任意申請 (法 6・7 条) による産業別・症度別有所見者率 (昭和30年~34年3月末まで)

症 度 別 産 業 別	申 請 総 数	保 留 お よ び 診 査 不 能	症 状 等 決 定 者 総 数	正 常 %	有 所 見 者 率 %				
					計	第1症度	第2症度	第3症度	第4症度
計	2,689	55	2,634	11.69	88.31	20.62	8.12	11.62	47.95
金 属 製 錬 業 鑄 物 業 船 舶 製 造 業 金属工業および機械器 具製造業	87 35 18 34	1	86 35 18 34	13.95 0 0 8.82	86.05 100.00 100.00 91.18	17.44 20.00 38.89 11.77	16.28 8.57 11.11 2.94	24.42 8.57 27.78 5.88	27.91 62.85 22.22 70.59
化 学 工 業	34		34	5.88	94.12	52.94	8.82	11.77	20.59
セ ガ 陶 耐 火 の 他	2 19 68 41 73		2 18 66 41 72	0 0 1.51 17.07 8.33	100.00 100.00 98.49 82.93 91.67		50.00 5.56 9.09 7.32 11.11	50.00 11.11 13.64 9.77 16.67	50.00 77.77 71.21 65.84 58.33
土 石 金 垂 車 の 他	92 1,087 884 6 21	2 37	92 1,085 847 6 19	4.35 12.44 14.40 16.67 0	95.65 87.56 85.60 83.33 100.00	1.09 25.25 21.72 16.67 21.05	5.43 8.11 8.86 33.32 10.53	3.26 17.71 11.10 16.67 10.53	85.87 42.49 43.92 16.67 68.42
砂 石 土 水 隧 道 の 他	15 50 17 53		15 46 16 53	6.67 2.17 12.50 9.43	93.33 97.83 87.50 90.57		6.67 8.70 6.25 1.89	6.67 10.87 25.00 3.77	79.99 71.74 56.25 75.48
そ の 他 の 土 木 建 築 事 業 明	13 6 34	3 6 1	10 6 33	16.67 15.15	100.00 83.33 84.85		20.00 16.67 9.09	20.00 16.67 3.03	60.00 49.99 66.67

加と合併率の上昇は平行せず、乱れている。

5. 結核菌の検出

活動性肺結核合併と診断されたもののうち結核菌の検査を行なった 785 人中結核菌陽性者は 257 人 20.0 % である。型別には、第 I 型 14.0 %、第 II 型 9.2 %、第 III 型 4.8 % である。この検出率は低いようであるが、珪肺健康診断の成績であつて、その後培養によつて菌の証明されたものは含まれていないためと思われる。

VI 任意申請による産業別、症度別有所見者数および率 (表8~10)

珪肺健康診断は定期に実施されるもので、この定期健診以外に、自他覚症状等が認められるものについては、法は任意申請によつて、症度の決定を行なうこととしている。

この任意申請による処理件数は 34 年 3 月末現在までに 2,689 人であり、そのうち第 4 症度と決定されたものは 1,263 人である。

産業別には、石炭鉱業、金属鉱業が多い。この第 4 症度のうち結核菌の検査を行なったもの 652 人について菌の検出率をみると 43.25 % である。型別には第 I 型 46.17 %、第 II 型 39.35 %、第 III 型 37.50 % である。この成績を公費負担による一般結核患者 713 人に対する菌検出率 38.71 % と比較すると、ほぼ一般結核と大差ない検出率であるといえる。

VII 珪肺の症状の進展 (表11)

珪肺の進展について、30 年度珪肺健診実施者 12,054

表 11 3 年間における珪肺の엑クス線写真像の推移

30 年度健診 엑クス線型		33 年度健診 実数	正 常	第 I 型	第 II 型	第 III 型	第 IV 型		
							I 型	II 型	III 型
正 常		9,584	(93.60) 8,971	(5.90) 565	(0.25) 24		(0.14) 13	(0.10) 10	(0.01) 1
第 I 型		2,191		(91.42) 2,003	(5.48) 120	(0.55) 12	(1.09) 24	(1.28) 28	(0.18) 4
第 II 型		183			(79.78) 146	(9.84) 18		(7.65) 14	(2.73) 5
第 III 型		24				(79.17) 19			(20.83) 5
第 I 型		56					(83.93) 47	(12.50) 7	(3.57) 2
IV II 型		16		(6.25) 1	(12.50) 2			(75.00) 12	(6.25) 1
型 III 型									
計		12,054	8,971	2,569	292	49	84	71	18

注：() 内数字はパーセントを示す。

表 10 任意申請による엑クス線型別結核菌の検出率

엑クス線 写真像	活 動 性 結 核 合 併		
	菌検査総数	菌証明者	%
第 I 型	392	181	46.17
IV II 型	188	74	39.36
型 III 型	72	27	37.50
計	652	282	43.25
公費負担による一般結核患者	713	276	38.71

人の症状と 3 年後の 33 年健診における症状の推移をみると、30 年度において正常であつた 9,584 人中 613 人 6.40 % が第 I 型以上に進展している。第 I 型 8.58 %、第 II 型 20.22 %、第 III 型 20.83 % がそれぞれ進展している。すなわち正常と第 I 型の進展率は大差ないが、第 II 型以上になると、その進展率は急増している。また結核の合併率をみると、正常のものが第 IV 型になるものは 0.25 % であるが、第 I 型は 2.55 %、第 II 型 10.38 %、第 III 型 20.83 % とそれぞれ第 IV 型になる率が增加している。

このことは今後の珪肺対策上興味ある事実といえる。

VIII 珪肺療養患者の推移 (表12)

珪肺療養患者は珪肺等特別保護法以前においては労災補償法によつて 3 年間の治療を受けることができるのであるが、それが特別保護法の施行当時 (昭和 30 年 9 月

表 12 珪肺療養患者の推移 (昭和30年9月～昭和34年8月まで)

給付区分 患者 時限	労 災 分		特 別 保 護 法 分		臨 時 措 置 法 分	
	療養患者数+新規+再発 -打切り-治癒-死亡=計	死亡者 (%)	療養患者数+新規 -終了-死亡=計	死亡者 (%)	療養患者数+新規 -終了-死亡=計	死亡者 (%)
昭和30年 9～12月	904+186+0-131 -3-13=943	13 ※3.57 (1.19%)	24+120-0-2=142	2 ※4.17 (1.39%)		
昭和31年 1～12月	943+481+7-418 -22-64=927	64 (4.47%)	142+436-0-23=555	23 (3.98%)		
昭和32年 1～12月	927+846+13-446 -28-76=1,230	76 (4.26%)	555+460-127 -47=841	47 (4.63%)		
昭和33年 1～12月	1,230+1,044+6-445 -52-100=1,683	100 (4.39%)	841+435-379 -39=858	39 (3.06%)	0+259-0 -1=258	※1.17 (0.39%)
昭和34年 1～8月	1,683+545+0-295 -36-37=1,860	37 ※2.49 (1.66%)	858+284-203 -32=907	32 ※4.20 (2.80%)	258+345-6 -15=582	15 ※3.74 (2.49%)

注：死亡率の算出は右の算式で行なった。死亡率 = $\frac{\text{年内死亡者}}{\text{年内療養患者数+新規+再発}}$

※印は1年間に換算した死亡率。

1日)に労災補償法で補償されていたものは904人であり、特別保護法に移行したものは24人であった。その後臨時措置法が施行され、さらに約2年間の療養延長がなされたのであるが、これに移行したものは259人である。これに加えて新規発生、再発、打切り、治癒、死亡等による移動がみられるのであつて、昭和30年9月以降昭和34年8月末日現在では労災保険法分が

1,860人、特別保護法分907人、臨時措置法分582人である。その年間死亡率は労災保険法分2.49～4.47%、特別保護法分3.06～4.20%、臨時措置法分1.17～3.74%で特別保護法分がやや高率である。年次別の傾向としては労災保険法分では死亡率は次第に減少しており、治癒者は年ごとに増加している。このことは珪肺結核に対する結核療養法の進歩を物語っているものといえよう。

外人特別講演

1. UNSOLVED PROBLEMS IN PHTHISIOLOGY AND THE
FUTURE OF HUMAN TUBERCULOSIS

Arnold R. Rich

The Department of Pathology, The Johns Hopkins University
School of Medicine, Baltimore, U. S. A.

I value very highly the honor of the warm invitation of this Society, extended to me by your President, Professor Kaida, and by your Secretary-General, Dr. Kumabe, to come to Japan to address this meeting, and to have the opportunity of personal contact with the members of the Society.

In accepting the invitation to speak about unsolved problems in tuberculosis, I knew that I would have difficulty in selecting the subjects for discussion,—certainly not because of any scarcity of problems relating to the pathogenesis of tuberculosis, but rather because of the overabundance of problems, each of which holds so high an importance for a proper understanding of this remarkable disease.

There is, of course, no pathological state, however trivial, that does not contain deeply interesting and important problems if one devotes sufficient attention to it to attempt to understand it thoroughly. Tuberculosis, however, stands preeminent among all disease in richness of recognized interesting and important problems relating to the establishment of the disease, to the character of the lesions, and to their progression or arrest.

I say this with due consideration. As far as we know at present, no other disease is influenced by so many recognized bodily and environmental circumstances, each of which introduces its own particular problems into the understanding of the pathogenesis of the disease.

The great abundance of recognized problems in tuberculosis is, to a large extent, the result of the enormous amount of study and investigation that has been devoted to this disease during the 78 years since the discovery of the tubercle bacillus. This long period of intensive study and investigation

in many different countries throughout the world has brought to light many important facts about the tubercle bacillus and the disease that it causes; but, as I have had occasion to remark in another connection, it is one of the paradoxes of science that each new discovery that extends the realm of the known, instead of decreasing the area of the unknown, increases it; for the answer to each important question holds in itself the germs of a swarm of new questions. It is not surprising, therefore, that we are still faced with a great many important problems relating to this complex disease, tuberculosis. Some of these problems are common to all bacterial infections; some of them are applicable to a few infections other than tuberculosis; but all of them are problems of tuberculosis. In addition to their theoretical interest, the solution of any one of them could have important practical implications.

Beginning with the infecting agent itself, there are the fundamental problems relating to the manner in which various organic constituents of the bacillus (the nucleoproteins, enzymes and other proteins; the lipides; and the polysaccharides) act to enable the bacillus to produce the pathological, immunological and clinical characteristics of the disease; the problem of the manner in which each antibacterial drug acts upon the bacillus to kill it or to inhibit its activity; the very important genetic problem of the factors that cause the bacterial mutations that are responsible for the development of drug resistance; the problem of the actual basis of virulence,—what it is that enables a highly virulent tubercle bacillus to multiply in the tissues more readily than a bacillus of low virulence; the problem of the mechanism of native species and racial resistance of the

host (i. e., what it is that prevents a bacillus of a given virulence from multiplying as readily in the tissues of a natively resistant species as in a natively susceptible one), and the even more immediate problem of the mechanisms that determine the highly important differences in the native resistance of different individuals of the same species and race,—differences which play so large a role in determining the outcome of an infection; the problem of the influence of sex, and of the reasons for the differences in the clinical and pathological manifestations of tuberculosis in infancy, in childhood, at adolescence, in adulthood and in old age; the problems relating to the factors responsible for the development of the strikingly different types of tuberculous lesions; the problem of the differences in the susceptibility of different organs, and of the tendency, in the human being, for progressive tuberculosis to develop in one bilateral organ if the opposite one is infected, even in the case of organs such as the adrenals or the eyes, in which no direct pathway of infection from one to the opposite organ exists; the problem of the mechanism through which hypersensitivity increases tissue damage and symptoms, and the problem of discovering a safe and effective method of desensitization to prevent those unfavorable effects in appropriate cases; the still unsolved problem of the mechanism of acquired resistance, about which our information is far more deficient than in the case of most bacterial infections; the highly important practical problems of the manner of action of the different factors which are believed to influence resistance to tuberculosis unfavorably, such as malnutrition, physical overexertion, mental overstrain, insufficient sleep, intercurrent infections, silicosis, endocrine disturbances such as diabetes, and the adjustments that occur at puberty; the problem of the nature of that very real but still completely obscure condition that can affect tuberculosis adversely and which, for want of more precise knowledge, has long been designated as “the run-down state”; the debated problem of the beneficial effect upon tuberculosis of the out-door life, of sunlight, and of meteorological conditions; the problem of the relative importance of

exogenous and of endogenous reinfection in the initiation of progressive tuberculosis, and the related problem of the degree of hazard in marital exposure and in the exposure of physicians, medical students and hospital nurses to the disease; and finally, the problem as to whether an arrested primary infection is likely to be more dangerous in itself than protective against further infection.

This recital of some of the unsolved problems of tuberculosis is far from complete. Many more important problems could be mentioned. But this incomplete list can serve to recall the complexity of this remarkable disease, and to make clearer why it has been difficult for me to decide which of these many interesting and important problems I should select for discussion in this lecture. The solution of any one of the unsolved problems of tuberculosis would not only greatly increase our understanding of fundamental pathogenetic processes, but could also have decidedly practical implications.

On looking over the many problems in the pathogenesis of tuberculosis that I had occasion to discuss in the first edition of my book on the subject, while it is gratifying that light has since been thrown upon some of the problems, it is rather unfortunate that so few of them have been solved in the intervening years. There is little doubt that one of the chief reasons for this has been the development of the very helpful drugs active against the disease. It is perhaps natural that while the discovery of a drug that is highly effective in the treatment of an infection may stimulate investigation into the manner in which the drug acts upon the bacterium, investigation into the fundamental problems of the pathogenesis of the infection itself often decreases greatly, for those important problems then appear to be less urgent. This, however, is unfortunate; for even though the morbidity and mortality of an infection are greatly reduced by drug treatment, as long as infection by the causative agent continues to exist some of those who are infected will be incapacitated by it, and some will die from it. It is small comfort to those unfortunates to know that, statistically, fewer persons are incapacitated

or killed by tuberculosis than formerly, though they, themselves, might have been saved had there been a better understanding of the pathogenesis of the disease.

Furthermore, as long as the causative agent exists, there is the threat that conditions favorable to the bacterium may arise, and may cause a revival of its spread in the population. There is also the threat that the development of drug resistance by the bacteria may outstrip the ability to discover new effective drugs. It is therefore of long-range importance to learn as much as possible about the mechanisms that increase or decrease individual resistance to the infection, independently of drugs; for that knowledge could be of great value in the very important matter of preventing the development of the disease and, indeed, in assisting recovery under drug treatment in those in whom the disease has become established.

In selecting certain problems for this discussion, I do not wish to imply that, they are necessarily the most important problems. I should like to stress this, because when dealing with fundamental problems of pathogenesis, it is, as you well know, often quite impossible to forecast which problem will have the most far-reaching effects if it is solved. The history of science is filled with instances in which the solution of what appeared at the time to be a minor problem of no broad application, has unexpectedly provided the information which made possible tremendous advances in knowledge and in the welfare of mankind. However, we may fairly begin with the question: What problems, if they can be solved, appear at present to offer the greatest promise of assisting in the control of tuberculosis by preventing progressive infection, or by arresting it when it occurs? I have chosen to comment upon problems relating to chemotherapy and to host resistance to infection.

I think that you will agree that among the highly important practical problems are those relating to effective drug therapy, for that is not only life-saving for those who are now suffering from tuberculosis, but by healing their lesions sources of infection for other are reduced.

About twenty-five years ago, the authors

of the most authoritative book on the chemistry of the tubercle bacillus and of the tuberculous patient, discussing the possibility of discovering a bactericidal drug that could cure tuberculosis, stated: "In the animal body the bacilli are protected by living cells from attack by agents introduced into the body of the infected animal, and generally these cells are much less resistant to strange chemicals than are the hardy, wax-armored tubercle bacilli. The plasma has also a disconcerting power to bind and inactivate bactericidal agents. Therefore the possibility of actively killing tubercle bacilli in tuberculous lesions by means of any conceivable sort of antiseptic agent seems remote or hopeless" (1).

While the antituberculosis drugs that are available today are effective far beyond the expectations of most thoughtful tuberculosis experts of past generations, there are, as you well know, continuing active efforts to discover better ones. The chief improvements that are desirable in an antituberculosis drug are, first, that it should possess a more potent bactericidal power; second, that its manner of action should provide no favorable opportunity to the tubercle bacillus to develop resistance against it; and third, that it should cause fewer or no injurious sideeffects. The first two of these desired qualities depend upon chemical interactions between the drug and the bacillus; the third, upon chemical interactions between the drug and the human body. If we are not to be left dependent upon blind trial-and-error in the search for antituberculosis drugs having the desirable, and as yet unattained, qualities that I have mentioned, it is essential to gain a better understanding of the chemistry of the metabolism of the tubercle bacillus, and of the manner of action of the various antibacterial drugs that we now have; and we must acquire knowledge concerning the chemical qualities that enable a drug to act as a sensitizing agent.

In an intelligent search for a drug of superior bactericidal power, one should certainly strive to learn more about the possible ways in which drugs can disrupt the life processes of the bacterium. A limited amount of important information in this regard has

been obtained; but it is very limited, and had its beginnings in studies concerned with bacteria other than the tubercle bacillus. You know, for example, that the sulfonamides have a chemical structure resembling that of para-aminobenzoic acid, a metabolite essential for the life processes of the bacteria that the sulfonamides affect. This structural resemblance deludes the bacteria into accepting the sulfonamides, instead of para-aminobenzoic acid, into metabolic reactions that require para-aminobenzoic acid; but since the sulfonamides, though structurally similar; cannot perform the chemical function of para-aminobenzoic acid, the essential bacterial metabolic reaction is disrupted.

This provides valuable information about one way in which a drug can exert an antibacterial effect, and offers one rational method of attack in the search for new and better antibacterial drugs. This particular method of approach, of course, can be used only in the case of a metabolite that is essential for the life processes of the bacterium but not for cells of the host, else they too would be injured or destroyed by the drug. It is obvious that an increase in information concerning the nature of the metabolic systems necessary for the life of the tubercle bacillus, could greatly aid the application of this bactericidal principle to the tubercle bacillus, - that is, the principle of excluding an essential metabolite from a vital enzyme system by causing the bacillus to accept in its place a drug that is structurally similar, but which cannot fulfill the function of the metabolite.

Information regarding other ways in which antibacterial drugs exert their effects is accumulating slowly, but there is still very little really precise information available. Obviously, the more knowledge that is obtained regarding the metabolic processes of the tubercle bacillus, the greater will be the possibility of searching intelligently for drugs which can interfere successfully with essential life processes of the tubercle bacillus. But in addition, there is every reason to believe that a better understanding of the metabolic processes of the bacillus would increase our understanding of the manner in which it damages tissue and produces

disease; would greatly assist our attempts to understand the mechanisms of virulence, of native resistance, and of acquired resistance; and would point the way to the solution of numerous other unsolved problems in the pathogenesis of tuberculosis. The study of the metabolism of the tubercle bacillus, therefore, has much wider implications than those concerned with the development of better antibacterial drugs. It occupies a crucial place in the effort to find answers to many of the most important unsolved problems in the pathogenesis of tuberculosis.

To return to the subject of improving the efficacy of antituberculosis drugs, a second major problem relating to antibacterial drug treatment, particularly in a chronic infection such as tuberculosis in which the drug has to administered for long periods of time, is, of course, the prevention of the development of drug resistance. When a bacterium develops resistance to a drug during the treatment of an infection, the antibacterial effect of the drug is, of course, weakened or completely abolished, and the drug loses much or all of its usefulness as a therapeutic agent. In addition, the drug-resistant bacteria can then be spread in the population, giving rise to an increasing number of infections which will not respond to treatment with the drug. This is precisely what has been happening in the case of the well-known, serious increase in drug-resistant staphylococci in populations in which the use of antibiotics is widespread. Even if drugs are discovered that are far more effective against the tubercle bacillus than those now available, the problem of the development of drug resistance by the bacillus will, in all probability, still be with us, unless more is learned about the ways in which antibacterial effects can be produced by drugs, and about the processes which enable bacteria to become resistant to the injurious effects of drugs. Our information about these matters is still very slight. A more adequate understanding might well make it possible to design a drug that would exert a bactericidal effect by acting at an essential metabolic point in a manner that the bacterium could not evade by developing a compensatory mechanism of drug-resistance.

I shall not discuss the fragmentary information concerning the possible mechanisms responsible for drug resistance. One thing about the development of the process, however, seems clear: it involves an inheritable change in the bacterium, which enables it to escape the injurious action of the drug. It is widely believed today that the inheritable change is not caused by the action of the drug, and that it would have occurred even if the bacteria had never been in contact with the drug, -in other words, that the change represents a spontaneous mutation which gives rise to drug-resistant bacteria among the progeny of the multiplying, drug-susceptible bacteria. When a spontaneous mutation of this sort occurs in the infecting bacteria of a patient under treatment with an antibacterial drug, the resistant mutants will survive contact with the drug, while all or most of the bacteria that remain susceptible to the drug will be destroyed by it, leaving the body at the mercy of the multiplying drug-resistant mutants.

There is, indeed, good evidence that in a culture of bacteria that are susceptible to a given drug, mutants can appear which are resistant to the drug, even though there has been no contact of the bacteria with the drug. However, in the present inadequate state of our information, I think that it would be unwise to exclude the possibility, if not the probability, that drug-resistant mutants may also result from the action of drugs upon susceptible bacteria. There are, in fact, reasons for believing that this may occur. Certainly, it would seem much wiser to leave the question open at present, rather than to conclude, as some would do, that drugs cannot influence bacteria to produce drug-resistant mutants. If the question is left open, it can encourage further study, and that is important; for if it is established that drug-resistant mutants can result from the action of a drug upon susceptible bacteria, study of the conditions responsible for the production of the mutation might well bring to light information that would make it possible to design bactericidal drugs that would have no tendency to cause the drug-resistant mutations, which are so serious a problem in antibacterial chemotherapy at present.

The third important quality to be sought for in the attempt to obtain a more effective antituberculosis drug, is that it should be as free as possible from undesirable effects upon the body, which either make the drug difficult to tolerate with reasonable comfort, or render it seriously dangerous to the body's tissues. The avoidance of effects which are caused by a direct toxic action of a drug upon body tissues (such, for example, as the effect of streptomycin upon the 8th nerve) is, of course, of decided importance. I shall not, however, discuss here the forms of direct toxic injury produced by individual drugs. I shall confine the present discussion to the problem of the injurious and even fatal effects that result from the development of hypersensitivity to a drug; for while each of a series of drugs may produce its own specific toxic effect, the group of injurious effects produced by hypersensitivity are the same, regardless of the drug to which the body becomes sensitized. The development of hypersensitivity, therefore, presents a special type of danger that accompanies the administration of sensitizing drugs of widely differing chemical constitution, ranging from simple chemical elements such as iodine, to organic compounds such as penicillin and streptomycin; and it is a danger that can accompany the use of drugs that possess no direct toxicity, but which, because of their sensitizing power, are rendered capable of producing markedly injurious effects.

The number of useful drugs that are now known to produce hypersensitivity is very large indeed; and it is a continuing experience that among the additional newly devised drugs that are being produced in rapid succession and used in the treatment of infections and other conditions, many turn out to be injurious sensitizing agents as well as useful drugs. It is therefore urgent to attempt to obtain information that will serve to reduce or abolish this rapidly increasing danger of seriously injuring patients by drugs that are administered to help them. The importance of this problem has, indeed, led to the formation of an international symposium which, during three days, was occupied exclusively with the problems of serious hypersensitivity reactions to drugs (2).

Present evidence indicates that a sensitizing drug becomes antigenic by attaching itself to body protein, thus creating a protein configuration that is foreign to the body, and therefore capable of inducing the formation of an antibody that reacts specifically with the drug. The clinical, pathological and experimental information that we now possess leaves little reasonable doubt that the injurious effects of drug hypersensitivity reactions are the results of the interaction of the drug with its specific antibody. The hypersensitivity is of the anaphylactic, not the tuberculin type.

Apart from its familiar, life-threatening hematological effects, drug hypersensitivity may produce injurious local effects, accompanied by marked inflammatory infiltrations, often containing eosinophils, in various tissues. Shortly after the sulfonamides began to be widely used in therapy, clinical effects that were quite like those familiar in anaphylactic serum-sickness, and which were clearly the result of hypersensitivity to the drug, began to be recognized by various observers (3), and we reported a sharp rise in the incidence of periarteritis nodosa on our autopsy service. It was found that these cases of periarteritis nodosa had occurred in patients who had been treated with sulfonamides and foreign serum, or with sulfonamides alone, and had exhibited clinical evidences of a hypersensitivity reaction before death (4). Dr. Gregory and I (5), in experiments that have been confirmed by many investigators, then showed that this destructive vascular lesion, in all respects like that of human periarteritis nodosa, could be produced experimentally by subjecting animals to be protracted hypersensitive reaction of the anaphylactic serum-sickness type. I think that there can be little doubt that the vascular lesions that Masugi and Sato (6) and Miura (7) observed in animals that were given repeated intravenous injections of foreign serum, were of the same type.

We then reported the occurrence of periarteritis nodosa in a patient who died from a severe hypersensitive reaction to iodine (8), and in another who had exhibited hypersensitivity to aspirin (9). Other visceral lesions which are caused by hypersensitivity to drugs

are myocarditis that can be severe enough to cause heart failure; pneumonitis; necroses in the spleen and lymph nodes; degeneration of connective tissue collagen; marked pancreatitis; and glomerulo- and interstitial nephritis, both of which can be severe enough to cause death from uremia (10). We have become familiar with all of these results of drug hypersensitivity. The literature now contains reports of the occurrence of these lesions in hypersensitive reactions to a wide variety of sensitizing drugs, including sulfonamides, Dilantin, neoarsphenamine, thiourea, phenobarbital, amidopyrine, penicillin, streptomycin, and other antibiotics.

There can be no doubt that in the instances in which the death of a patient is directly due to lesions resulting from hypersensitivity to a drug, either the development of hypersensitivity was not recognized clinically, or else the dangers of hypersensitivity were not understood by the physician. Certainly, cases in which the development of drug hypersensitivity was not recognized clinically are found to be not very rare in any hospital in which careful autopsies are performed by pathologists who are familiar with the lesions of drug hypersensitivity. The failure to recognize the development of hypersensitivity to a drug can be unfortunate, for the continued administration of a drug after hypersensitivity has appeared can lead to a fatal result, whereas if the development of hypersensitivity is recognized early enough, and a different drug can be substituted, the body will be spared from further damage by hypersensitivity. It is however, not always easy to detect the development of hypersensitivity clinically, particularly in patients who are febrile from infection. Indeed, it can be virtually impossible; and this serves to emphasize the need of a reliable test for the presence of hypersensitivity to drugs. At present, there is no reliable test.

There is another potential adverse effect of drug hypersensitivity which, as far as I am aware, has received no attention, but which deserves serious study. I refer to the effect of the antibody of hypersensitivity in reducing the therapeutic activity of a drug. Hypersensitivity to diphtheria antitoxin provides an example of the action of hypersensi-

tivity in reducing the effectiveness of a therapeutic agent. It is well established that in the treatment of diphtheria with horse serum antitoxin, if the patient is hypersensitive to horse serum the antitoxin will be much less effective than it would be in the non-hypersensitive body. The reason for this is that hypersensitivity to horse serum is the result of the production of antibodies against the various proteins of the horse serum. When the serum is injected into the hypersensitive body the antidodies unite with the horse serum proteins, forming complexes of horse protein and antibody. If the horse serum is injected into the tissues, the formation of the aggregates of horse serum protein with antibody interferes with the free absorption of the proteins from the site. If the horse serum is injected intravenously, the complexes of horse protein and antibody are very rapidly cleared out of the blood stream. Since the diphtheria antitoxin is itself a protein of horse serum, in the hypersensitive body it, too, will unite with its appropriate antibody and form complexes which will tend to be held at the site wherever the antitoxin is injected into the tissues, or will be cleared from the circulation with great rapidity if the injection is made into the blood stream. Either of these results will reduce the therapeutic effectiveness of the antitoxin by reducing the amount that will reach the sites where it is needed to neutralize the toxin.

It seems altogether reasonable to believe that a somewhat similar interference with therapeutic effectiveness may occur when the body becomes hypersensitive to antibacterial drugs. Though the union of a non-protein drug with its specific antibody does not result in the formation of large precipitating complexes, it is reasonable to believe that the therapeutic effectiveness of the drug could be destroyed if a part of its configuration were obliterated by the attached antibody, and also that the attachment of the drug to its globulin antibody would reduce its ability to diffuse freely through the tissues and into lesions to reach the bacteria, and would also interfere with the penetration of the drug into the bacteria. The development of hypersensitivity during the administration of an

antibacterial drug, therefore, not only carries the danger of serious injury to the body but, in addition, may decrease the antibacterial effectiveness of the drug. Since there is no doubt that during the administration of a sensitizing drug hypersensitivity can develop without clinical recognition the potentiality of hypersensitivity in reducing the effectiveness of the drug in this manner is a problem deserving pointed study; for in the union of the drug with its specific antibody markedly reduces the antibacterial effectiveness of the drug, the infection could progress unimpeded in spite of the administration of the standard dosage of the drug. This further emphasizes the importance of searching for a reliable clinical test that will reveal the development of hypersensitivity during the administration of a sensitizing drug.

The problem of freeing the patient from the dangers of drug hypersensitivity could be approached in several ways. First, the deliberate attempt can be made to create drugs that are effective, but which have no capacity to sensitize the body, or possess that capacity to only a slight degree. To accomplish this, it is obviously essential to become better informed about the chemical structures and properties that confer upon drugs the power of acting as an antigen, in order to learn whether those qualities can be avoided in the creation of new drugs, or removed from existing sensitizing drugs without destroying their effectiveness. There has been only a beginning of studies directed toward this end, and up to the present virtually no serviceable information has been obtained. The present lack of a test animal suitable for studies on drug hypersensitivity, renders study of the problem more difficult, but it is by no means insoluble.

While the procedure of eliminating the sensitizing power of a drug, if that can be achieved, would obviously be the perfect way in which to avoid the dangers of drug hypersensitivity, a second method of protecting the patient would be to discover how to prevent the interaction of a sensitizing drug with its antibody, for it is this interaction that causes tissue damage. Here we enter the field of desensitization against the ana-

phylactic type of hypersensitivity. I cannot discuss this problem here, other than to say that while this type of desensitization has been achieved in some patients in the case of certain drugs (11), there is at present no safe and effective, generally applicable method of preventing the interaction of a sensitizing drug with its antibody. This problem remains to be solved.

The harmful effects of drug hypersensitivity could be avoided if we were able to prevent the tissue injury that is caused by the interaction of a sensitizing drug with its specific antibody, when that interaction occurs. The rational approach to this problem lies in the attempt to gain an understanding of the mechanism by which the interaction of an antigen with its specific antibody injures tissues. In spite of the great importance of this fundamental problem, not only in regard to hypersensitivity to drugs but also for all types of allergic diseases, we have virtually no information whatever about it.

It has been widely believed that the tissue injury produced by the anaphylactic type of hypersensitivity is caused by the liberation of histamine at the site of the antigen-antibody interaction. Histamine liberation may possibly account for some of the minor effects of hypersensitivity, such as urticaria, but I think that it is clear that it is not the cause of the more serious lesions of hypersensitivity such as periarteritis nodosa, the mononuclear and eosinophil inflammatory infiltrations that can be extensive enough to produce heart failure or renal failure, degeneration of collagen, and the hemorrhagic, inflammatory-necrotic damage to tissue characteristic of the Arthus phenomenon. None of these effects of hypersensitivity can be produced by the injection of histamine into the tissues, nor can they be prevented either experimentally or clinically by the so-called antihistaminic drugs.

It seems highly likely that the lesions of anaphylactic hypersensitivity are produced by an injurious agent of some sort that is liberated, in some way, as a result of the antigen-antibody interaction; but the injurious agent has not yet been identified. This, I think, is the most important unsolved problem relating to this type of hypersensitivity. If

we knew what the agent that produces the damage is, it might well be found possible to neutralize its injurious effects. Knowledge that would provide a safe, effective and specific means of neutralizing the agent responsible for the injurious effects of anaphylactic hypersensitivity would, obviously, be of inestimable value, not only in the prevention of the damaging effects of hypersensitivity, but also in abolishing the distressing and dangerous effects of the antigen-antibody interaction in the great field of allergic diseases.

Finally, only some of the many persons to whom sensitizing drugs are administered develop clinical or pathological manifestations of hypersensitivity to the drugs. Similarly, as is well known, only some of those who are repeatedly exposed to other types of sensitizing agents in their environment develop manifestations of hypersensitivity, while many others who are equally exposed to the same agents do not, even though specific antibody can be demonstrated in their serum. The explanation of these individual differences in reactivity to sensitizing antigens is one of the great problems in the field of hypersensitivity. If we understood the reasons for these differences it might well be possible to apply that knowledge in a highly beneficial way.

Before leaving this discussion of hypersensitivity to drugs, I would like to mention an unexpected observation, of interest in relation to tubercle formation, that arose during our studies on drug hypersensitivity. The nature of the force that causes the mononuclear phagocytes to cluster together and adhere to each other to form a tubercle is one of the fundamental problems in the pathology of tuberculosis, and it is an unsolved problem. The attempt has often been made to attribute tubercle formation in tuberculosis to the fact that the bacillus has a very high lipide content. We pointed out some years ago (12) that while the lipides extracted from the bacilli will indeed cause the formation of giant cells and epithelioid cells, it requires the injection of relatively enormous amounts of the lipides to produce this effect,—amounts vastly greater than that present in the few bacilli that suffice to cause tubercle formation. It is perfectly clear that no lipide has ever

been obtained from the tubercle bacillus that can account for the marked tendency for tubercles to be formed in the body infected with the tubercle bacillus. Furthermore, it is well known that tubercle formation occurs not only in tuberculosis, but in certain other infections caused by bacteria, spirochetes, and fungi that are not characterized by having a high lipide content. Among these infections may be mentioned brucellosis (bacterial), syphilis (spirochetal), and blastomycosis (fungal).

During our studies of hypersensitivity to drugs we encountered a fatal case of hypersensitivity to iodine, in which tubercles, and also tuberculoid tissue (that is, irregular accumulations of coherent epithelioid cells and giant cells), were present in the spleen in the absence of tubercle bacilli or tuberculosis (8). The subsequent finding of tubercles and tuberculoid tissue in other non-tuberculous patients who had hypersensitivity reactions to a wide variety of different drugs, led us to believe that lesions of this type might be caused by the anaphylactic antigen-antibody reaction that is responsible for drug hypersensitivity. This received ample confirmation when we found that tuberculoid lesions could be produced experimentally by subjecting animals to a protracted, systemic antigen antibody reaction of the anaphylactic, drug hypersensitivity type, though produced by bland foreign proteins instead of by drugs (13). These experiments have been confirmed by others, and it is now clear that under proper conditions, the antigen antibody interaction in anaphylactic hypersensitivity can cause the development of tubercles and tuberculoid lesions. Germuth (14), in our laboratory, in beautiful experiments, has recently shown that lesions of this type can be produced with surprising rapidity by introducing a protein antigen and its specific antibody into the blood stream of a normal animal under proper conditions. The mechanism by which the antigen-antibody interaction stimulates the formation of tubercles and tuberculoid tissue is not yet understood. Whether an anaphylactic antigen-antibody interaction plays any role in the development of tubercles in tuberculosis and in the other infections in which tubercles occur, is certainly not

clear, but in view of our ignorance regarding the cause of tubercle formation in tuberculosis, that problem is worthy of study. There is at present no acceptable evidence that the tuberculin type of hypersensitivity is responsible for tubercle formation.

If I have spoken at some length about problems relating to antituberculosis drugs, I have done so because, in the first place, the main problems that I have discussed are of decided importance in the control tuberculosis. For the longrange control of tuberculosis, it would be most unwise to depend exclusively upon the method of trial-and-error in the search for new effective antituberculosis drugs that can replace the few that we now possess. There is very good reason to believe that unless there can be discovered new, effective antituberculosis drugs to which the tubercle bacillus will have little or no tendency to become resistant, the problem of the drug-resistant bacilli could, in time, become a vitally important one; for the gradual elimination of the susceptible bacilli, leaving the drugresistant strains to spread uncontrolled through the population, could lead to a loss of the great gains that the present drugs have contributed to the control of tuberculosis.

In the second place, a rational approach to the search for drugs that will destroy the tubercle bacillus more effectively, and a rational approach to the creation of drugs to which the tubercle bacillus cannot become resistant, require a better understanding of the metabolic processes of the bacillus than we now possess; and, as I have said, a significant increase in our information regarding the metabolism of the tubercle bacillus would be of great assistance to the solution of some of the most important of the unsolved problems relating to the interaction between the bacillus and the human body in the pathogenesis of tuberculosis.

In the third place, information regarding the mechanism responsible for the injurious effects of the anaphylactic type of hypersensitivity to drugs might well provide a clue for the attack upon the important unsolved problem of the mechanism through which the familiar injurious effects of the tuberculin type of hypersensitivity are produced.

Finally, pathogenesis includes all influences, internal and environmental, that affect the development of a disease, and antituberculosis drugs exert a highly important influence on the infecting agent and on the tissue reactions of the host. Problems relating to the effects of drugs upon the tubercle bacillus and upon the infected human body are, therefore, problems that are decidedly important to the pathogenesis of tuberculosis and to the future of human tuberculosis.

The pathogenesis of a bacterial infection includes factors that influence, primarily, the activity of the bacteria, and other factors that influence, primarily, the host's reaction to the bacteria. The development of the infection can be profoundly influenced either by changes in the activity of the bacteria, or by changes in the host's reactivity. I have discussed some of the problems relating to a factor of great importance that affects primarily the activity of the tubercle bacillus, namely, the antituberculosis drugs. I should now like to mention several of the major unsolved problems relating to the reactivity of the host.

Certainly, the most helpful alteration of the body's reactivity would be an increase in its resistance to the tubercle bacillus; that is, an increase in its ability to inhibit the multiplication of the bacilli and to destroy them. There are, as you well know, two different mechanisms by which the body resists the attack of the tubercle bacillus: one, an inborn, native resistance; the other, a resistance acquired as a result of contact with the bacillus.

There is ample evidence that the basic mechanism of native resistance to the tubercle bacillus is conferred by inheritance. This is quite clear in the case of the marked differences in the native resistance of different animal species; and even in a given species the influence of heredity in determining the degree of native resistance of different individuals has been demonstrated with perfect clarity by the inbreeding experiments of Lurie (15) and others. There is evidence that the inherited level of native resistance may be modified by a variety of circumstances. But what is the mechanism of the basic inheritable native resistance? This is one of

major unsolved problems in the pathogenesis of tuberculosis, for there can be little doubt that the level of native resistance that is possessed by each individual plays a very large, and probably often the dominant role in determining whether a primary infection in a healthy individual will be arrested or will give rise to progressive disease.

The marked differences in the degree of native resistance in different animal species, and in inbred families of the same species, have been clearly established experimentally for many years. It seems rather remarkable, therefore, that there has been so little study of the mechanisms through which native resistance restrains the activity of the tubercle bacillus. In proportion to the fundamental importance of this problem, very little study has been applied to it, and it is proper to say that we have, at present, no well-established information that enables us to understand just how the natively resistant body inhibits the multiplication and promotes the destruction of the tubercle bacillus.

It has long been clear, and it is easy to demonstrate experimentally, that tubercle bacilli can neither increase in numbers nor survive as well within the mononuclear phagocytes in the natively resistant body as they can within those cells in the natively susceptible body; but the mechanism by which the phagocytes of the natively resistant body suppress the activity of the bacilli is completely obscure. How does the interior of the mononuclear phagocyte in the natively resistant body differ from the interior of the phagocytes in the natively susceptible body? And is that difference an inherited metabolic quality of the mononuclear phagocytes, or is it a difference that is conferred upon the phagocytes by inherited differences in the surrounding extracellular fluids? These are unsolved, but soluble problems, and they deserve intensive study, not only because of their great biological interest, but because if we had the answers to these questions—if we knew how the natively resistant body suppresses the activity of the tubercle bacillus—it might be possible to apply that knowledge to the important problem of increasing the resistance of the infected human body.

During natural infection, and following vaccination by a virulent or even killed tubercle bacilli, the body develops acquired resistance, which manifests itself as an increased ability to restrain virulent tubercle bacilli from increasing in numbers as rapidly and progressively in the tissues as they do in the body without acquired resistance, and to destroy them. As in the case of native resistance, there are highly important unsolved problems relating to the mechanism by which this protective effect of acquired resistance is accomplished. It is true that following infection or vaccination, agglutinating, opsonizing, and complement-fixing antibodies appear in the serum; but whereas in the case of acute infections, such antibody-containing sera from animals with acquired resistance can ordinarily be easily shown to confer resistance upon normal animals when it is injected into them, the serum of animals with acquired resistance to tuberculosis has not yet been satisfactorily shown to increase the resistance of normal animals. It is fair to say that none of the experiments of this type that have been attempted up to the present have been carried out under proper conditions. In a chronic infection such as tuberculosis, there are complications that make this passive transfer experiment more difficult than in an acute infection, but the difficulties are by no means insuperable, and there are reasons for believing that the serum of animals with acquired resistance to tuberculosis, or the antibody fraction of the serum, concentrated by methods that are now available, may be found to increase the resistance of normal animals when injected under proper conditions.

This matter has more than a theoretical interest. If a protective antibody can be demonstrated in the serum of the body with acquired resistance, it would not only throw greatly needed light upon the still unsolved mechanism of acquired resistance in tuberculosis, but would also open the way for the development of a test for the presence, and perhaps for the degree, of acquired resistance in man; and a test for acquired resistance in tuberculosis has long been fervently desired. Such a test, if it properly reflected ac-

quired resistance, would provide a means of judging the relative ability of a patient to resist his infection; it would enable one to study the fluctuations in a patient's resistance, and to gain more precise information about the conditions that tend to increase or to decrease acquired resistance; it would provide a means of determining the relative efficacy of different preparations of vaccines such as BCG; and it would be of great service as a test in the effort to isolate an effective immunizing antigen from the tubercle bacillus.

As in the case of native resistance, it has long been obvious that the mononuclear phagocytes within the body with acquired resistance have developed a markedly increased ability to inhibit the multiplication of tubercle bacilli and to kill them. I have pointed out elsewhere that this is not simply an increase in the degree of native resistance, as had been assumed by some students of tuberculosis, but that there is evidence that the mechanism of acquired resistance is different from that of native resistance (16).

There has been some disagreement as to whether the mononuclear phagocytes, whose ability to inhibit the tubercle bacillus is so clearly increased within the body with acquired resistance, can preserve that ability when they are removed from the body and kept alive in tissue cultures. I may say that recent experiments, begun in our laboratory by Dr. Berthrong, seem to be demonstrating consistently that the mononuclear phagocytes of animals with acquired resistance to exhibit a marked inhibitory effect upon the tubercle bacillus outside the body in tissue cultures. But the mechanism by which their restraining effect is accomplished, whether within the body or in tissue cultures, is still completely obscure.

When this inhibiting power of the mononuclear phagocytes has been well developed, the bacilli can remain alive in lesions for very long periods of time, often for years, but their free multiplication is restrained and the lesions therefore do not progress. This bacteriostatic power of acquired resistance plays an extremely important role in the pathogenesis of tuberculosis. It is responsible for the fact that when a patient arrests

his infection he may remain symptom-free for years, with no increase in the size of his lesion even when the lesion contains living bacilli, since the bacteriostatic action of acquired resistance prevents the bacilli from increasing appreciably in numbers. But unless all of the bacilli in the lesion are killed (which often does not occur) the patient remains continually in danger of a relapse, for if he loses the bacteriostatic power of his acquired resistance the bacilli that have remained alive, but inactive, in the lesion can resume their multiplication, the destruction of tissue will begin again, and the patient's life will again be threatened.

Although the mechanism responsible for this bacteriostatic effect of acquired resistance is obviously one of the great unsolved problems in the pathogenesis of tuberculosis, very little study has been applied to its solution. As I have said, we know nothing of the process by which the mononuclear phagocytes inhibit the activity of the tubercle bacillus in the body with acquired resistance, and nothing of the process by which that inhibitory power becomes lost, causing a relapse. As for possible humoral inhibitory factors, a few investigators have reported an inhibition of the multiplication of tubercle bacilli by the body fluids of animals with acquired resistance, but others have not been able to detect such an effect, and there are certain sources of error in the experiments in which an inhibition of multiplication was observed. The interesting *in vivo* experiments of Tsuji and his co-workers in Kyoto (17) provided suggestive evidence of a bacteriostatic effect of the body fluids of animals with acquired resistance, and these investigators themselves, with an admirable judicial critique, pointed out possible sources of error in their own experiments. While it certainly cannot be said that a bacteriostatic effect of the fluids of the body with acquired resistance does not exist, it is fair to say that it has not yet been clearly proven to exist.

I shall mention only one more unsolved problem, namely, the very important problem of increasing the resistance of the uninfected body. Today, this problem is of especial importance for the control of tuberculosis in populations in which the morbidity and mor-

tality from the disease are still high, and also for the protection of uninfected persons everywhere, who have to live in intimate contact with sources of infection. But let us not forget that immunization will become a problem of universal importance if drug-resistant strains of tubercle bacilli continue to develop faster than new drugs are produced to destroy them.

We have in BCG a vaccine which definitely increases the resistance of a wide variety of experimental animals to tuberculous infection, and there is every reason to believe that under proper conditions, when properly prepared, it confers some degree of increased resistance upon the human being as well. However, after 40 years of world-wide vaccination of hundreds of thousands of individuals, there is still grave uncertainty as to the degree of its effectiveness. I cannot discuss here the reasons for this uncertainty, but undoubtedly one major reason is the great difference in the immunizing potency of different preparations of the vaccine that have been used by different investigators. Even at the present time, there is no standard method of preparing and evaluating the vaccine that will ensure a product of a relatively uniform degree of potency.

However, there is no other immunizing agent that is demonstrably more effective than BCG; and in spite of the deplorable uncertainties that still surround this vaccine, it would seem advisable to take advantage of whatever it may have to offer in increasing the resistance of the uninfected portion of the population in countries in which active tuberculosis is still widespread. In countries in which the tuberculosis infection rates, morbidity and mortality have fallen to very low levels, it seems wiser, for a number of reasons, to restrict BCG vaccination to uninfected persons who have to be exposed intimately to sources of infection.

Clearly, a better immunizing agent than BCG is needed both for mass prophylaxis and for individual protection; and one of the important unsolved problems of tuberculosis today is the creation of a better immunizing agent. Actually, since BCG is an avirulent bacillus, one would expect that its immunizing power would be less than that of a vi-

virulent bacillus, for that is true in the case of other bacteria. Vaccines prepared from virulent typhoid bacilli, pneumococci and other bacteria are well known to be more effective immunizing agents than vaccines prepared from the avirulent forms of those bacteria. As a matter of fact, it has long been known that, for whatever reason, living virulent tubercle bacilli are more effective as an immunizing agent in experimental animals than are living avirulent tubercle bacilli such as BCG; but living virulent tubercle bacilli cannot, of course, be used as a vaccine in the human being. Since even killed tubercle bacilli can produce acquired resistance, it is clear that an immunizing substance must be present in the bodies of the bacilli, and it should be possible to extract it and concentrate it for use as an immunizing antigen. As is well known, potent immunizing antigens have been isolated from the bodies of virulent pneumococci and other bacteria, and it is highly important to attempt to isolate from virulent tubercle bacilli the antigenic substance that is responsible for the ability of the bacillus to stimulate the development of acquired resistance. I think that there can be little doubt that the immunizing antigen of the tubercle bacillus can be isolated. Even if it can be obtained in a form only as effective as the most active BCG vaccine it would be a decided advantage, for it could be readily standardized; but it may very well be that the concentrated immunizing antigen isolated from virulent tubercle bacilli will turn out to be a more effective immunizing agent than the vaccine prepared from the avirulent BCG bacillus. Certainly, in the case of the pneumococcus, for example, the polysaccharide immunizing antigen obtained from virulent pneumococci is a far more potent immunizing agent than is a vaccine made from living avirulent pneumococci.

In addition to its value as a protective agent in the human being, the isolation of the immunizing antigen of the tubercle bacillus would provide an instrument of great value in the experimental study of the nature of acquired resistance. It might also throw light upon the mechanism of virulence. It will be remembered, for example, that it was found that the polysaccharide of the pneumo-

coccal capsule is not only a potent immunizing antigen against pneumococcal infection, but that it is also the chemical substance that is responsible for the virulence of the pneumococcus. Finally, the isolation of the immunizing antigen of the tubercle bacillus could be of assistance in the development of a test for the presence and degree of acquired resistance in the human being, — a test which, as I have said, would be of very great usefulness in the evaluation of the resistance of tuberculous patients during treatment, and also in the attempt to identify the internal and environmental factors that cause a lowering of resistance to tuberculosis.

I have been asked to comment on the future of human tuberculosis. Prophecy, in most human affairs, is only individual opinion formed after considering the influences that are recognized at the time; and forecasts of future events are often proved wrong by the occurrence of circumstances that were unforeseen or unforeseeable when the forecast was made. I would therefore certainly not pretend that I can give you a clear prediction as to what is going to happen to human tuberculosis in the future, but I may outline briefly what seems to me to be the most probable outlook for the future, in the light of past experience and of the influencing conditions that are apparent at present.

There is, of course, no doubt whatever that the introduction of streptomycin in 1947, of para-aminosalicylic acid in 1949, and of isoniazid in 1952 has played an extremely important role in accelerating the downward trend of tuberculosis mortality during the past decade. The justifiable enthusiasm over the lifesaving activity of these drugs has tended to cause many persons to forget the spectacular progressive fall in the mortality from tuberculosis that occurred in many countries during the fifty years before the drugs were discovered. In the United States, for example, the mortality from tuberculosis fell from 202 per 100,000 population in 1900, to 36 per 100,000 in 1946, — a decrease of 82 per cent; and a similar fall in tuberculosis mortality occurred in various other countries during the same period. It is very important to keep this clearly in mind, for there was obviously a reason for such a marked and

continuous fall in tuberculosis mortality during a period in which there were no drugs effective against the tubercle bacillus, and in which there had been no appreciable use of BCG in the United States and various other countries in which remarkable declines in the mortality occurred.

In any consideration of the future of human tuberculosis, I repeat that it is highly important to keep that remarkable period of mortality decline in mind, and to strive to understand clearly the cause or causes of the phenomenon. A time may come in the future when we shall have need of as much information as possible about it, if the tubercle bacillus is to be prevented from rising into ascendancy again; for we are not yet in a position in which we can, with confidence, depend upon being saved indefinitely by curative drugs, and we shall not be in such a position unless we can devise effective drugs to which the tubercle bacillus cannot become resistant.

What was the reason for that decline in tuberculosis mortality, which was of a degree sufficient to cause numerous expert students of the disease to believe that the tubercle bacillus was actually well on its way to extinction? I have discussed elsewhere (16a) the various factors that may have contributed to that extraordinary decline in tuberculosis during the fifty years before the introduction of drugs effective against the tubercle bacillus, and I shall not review them here. I shall only emphasize that there is persuasive evidence that by far the most important of those factors was the improvement in living conditions in the countries in which the tuberculosis mortality decline occurred. There are now sufficient studies to leave no doubt that before the introduction of the antituberculosis drugs, the tuberculosis mortality rate reflected sensitively the living conditions of all population groups that were studied. The countries in which the most marked fall in the tuberculosis death rate occurred were countries that had experienced the most marked improvement in living conditions. Also, it has been world-wide experience that the tuberculosis death rates in different parts of the same country, or even in different parts of the same city, are highest

among the groups with lowest income and *vice versa*. Furthermore, when for any reason the living conditions in a country are depressed, there is a prompt rise in the tuberculosis death rate, which promptly falls again when better conditions are restored. This was brilliantly evident in numerous countries as a result of each of the two world wars. It is now thoroughly clear that the living conditions of a population can exert a potent influence upon the level of mortality from tuberculosis.

What do we mean by "poor living conditions" and "good living conditions"? A variety of factors are involved in those terms. In poor living conditions, the most obvious factors that could affect tuberculosis adversely are inadequate nutrition, inadequate housing, inadequate hygienic conditions, and unfavorable working conditions. Adequacy in these factors is the obvious characteristic of good living conditions. There is evidence that even when housing, hygienic conditions and working conditions remain constant in a population, if nutrition becomes inadequate a prompt rise in the tuberculosis mortality will occur, and if adequate nutrition is then restored, there will be a prompt fall in the mortality (16b). This, together with the long-recognized beneficial effect of good nutrition in the therapy of tuberculosis, places particular emphasis upon nutrition as an important factor in resistance to tuberculosis, and therefore as a factor deserving especial consideration in long-range efforts to control tuberculosis.

There are three things which, if they were readily within reach, and were applied under intelligent guidance such as national tuberculosis associations could provide, would undoubtedly reduce tuberculosis in any country to a position of slight importance among the problems of public health, and would keep it in that position, or perhaps abolish it entirely. One of these would be the improvement of living conditions in population groups in which the conditions that lower resistance to tuberculosis, and increase exposure to infection, are prevalent; a second would be a safe and effective drug to which the tubercle bacillus could not become resistant; and the third would be a standardized immunizing

agent that would increase resistance to infection and would be suitable for widespread and even repeated use.

At the present time none of these are within the reach of all countries. Indeed, an effective drug to which the tubercle bacillus cannot become resistant, or would have only a slight tendency to do so, has not yet been produced; nor do we possess an immunizing agent with the qualities that I have mentioned. For immediate purposes, however, we do possess effective drugs, though in time the cumulative increase in resistant strains of bacilli as a result of the use of these drugs, will probably greatly reduce their general effectiveness; and for immediate purposes, we do have BCG which, when it happens to be in an effective form, can be useful in appropriate situations, though it lacks the advantages that a standardized immunizing antigen isolated from the tubercle bacillus would possess. As for the improvement of living conditions, although we know what to do in general to accomplish that, there are numerous countries in which it would be economically impossible at present to put that knowledge into practice, and there are other countries in which, though it would be possible to divert funds to that purpose, the resulting dislocation of other important phases of the national life would make it unwise to do so at present. The problem of reducing the incidence of tuberculosis is surrounded by different circumstances in different countries, and those circumstances will, in each case, influence the rate and the degree of the reduction in tuberculosis in the future. When we consider the future of tuberculosis, therefore, we can do so properly only in regard to each country separately; and we can do so intelligently only if we understand adequately the economic, political, scientific and cultural conditions in the country that we are considering.

There is, however, every reason to expect that unless nations become subjected to disrupting catastrophes caused either by Nature or by the unwise actions of men, conditions will eventually permit all nations to put into practice the procedures that are necessary to produce a marked and steady decline in the morbidity and mortality from tubercu-

losis. While the task is still a formidable one, there is now a high probability that, with intensive effort, tuberculosis can eventually be reduced to the level of a minor public health problem throughout the world. That time could be greatly hastened, and its ultimate attainment assured, if studies such as some of those that I have mentioned this morning, succeed in placing in our hands the knowledge and the weapons that the solution of those various problems would provide.

REFERENCES

- 1) Wells, H. G. & Long, E. R.: *The Chemistry of Tuberculosis*. 2nd Edition. Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 391, 1932.
- 2) *Sensitivity to Drugs*. Edited by M. L. Rosenheim & R. Moulton. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1958.
- 3) Hageman, P. O. & Blake, F. G.: Jour. Am. Med. Assoc., 109: 642, 1937.
- 4) Rich, A. R.: Bull. Johns Hopkins Hosp., 71: 123, 375, 1942.
- 5) Rich, A. R. & Gregory, J. E.: Bull. Johns Hopkins Hosp., 72: 65, 1943.
- 6) Masugi, M. & Sato, Y.: Virch. Arch., 293: 615, 1934.
- 7) Miura, T.: Trans. Soc. Path. Jap. 30: 378, 1940.
- 8) Rich, A. R.: Bull. Johns Hopkins Hosp., 77: 43, 1945.
- 9) Rich, A. R.: Harvey Lectures, 42: 106, 1946.
- 10) Rich, A. R.: *Sensitivity to Drugs*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 196, 1958.
- 11) Garrod, L. P.: *Ibid.*, p. 109.
- 12) Rich, A. R.: *The Pathogenesis of Tuberculosis*. 2nd Edition. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, p. 17, 1951.
- 13) Rich, A. R.: Bull. Johns Hopkins Hosp., 91: 109, 1952.
- 14) Germuth, F. G., Jr.: Bull. Johns Hopkins Hosp., 102: 245, 1958.
- 15) Lurie, M. B.: Am. Rev. Tuberc., 44(Suppl. No. 3): p. 1, 1941.
- 16) Rich, A. R.: *The Pathogenesis of Tuberculosis*. 2nd Edition. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, p. 504, 1951.
- 16a) Rich, A. R.: *Ibid.*, p. 899.
- 16b) Rich, A. R.: *Ibid.*, p. 618.
- 17) Tsun, S., Ito, K. & Oshima, S.: Am. Rev. Tuberc., and Pul. Dis., 76: 90, 1957.

外人特別講演

2. THE GREAT HISTORICAL CHALLENGES IN MEDICINE

Félix Marti-Ibáñez, M.D.

Professor and Chairman of the Department of the History of Medicine,
New York Medical College, Flower and Fifth Avenue Hospitals;
Editor-in Chief of MD. the Medical Newsmagazine.
New York, N. Y.

INTRODUCTION

My friends, it is a great honor to have been invited to Fukuoka to address this distinguished Congress, and it is a great privilege to speak to you as a colleague and brother-in-arms in the field of Medicine. I am here to learn from you. My modest person is only a symbol of the many physicians who, across the thousands of miles of the Pacific Ocean, live and work in America and who, despite the difference in nationality, share, as colleagues and as men of good will, your hopes and your dreams. Our being together here symbolizes the universal brotherhood of Medicine, which recognizes no frontiers in time or space. Such brotherhood has often made possible creative collaboration in Medicine between Japanese and Western investigators, for instance, between Shibasaburo Kitasato and Alexandre Yersin, and between Sahachiro Hata and Paul Ehrlich.

Ever since starting my acquaintance with Japan, first through my readings, then through friendships with Japanese colleagues, and now by visiting your beautiful country, I have felt that yours is a nation I know very well in my heart. The reason for this is that besides the Japan of the lovely cherry blossoms where we are right now there is also a Japan of the dreams, which I met and fell in love with when I first studied your literature and your art, when I gazed upon the exquisite Yamato-e and Kori paintings, and the delicate paintbrush work of Kobayashi and Hanyami, and when I read the inspired pages of Lafcadio Hearn, who later became Koizumi Yakumo, and who is buried here in

Japan, the land he loved so much.

Japan has a destiny of greatness, because it has suffered a great deal. History shows that both men and peoples, before they can enter the vast and luminous Hall of Greatness, must first cross the dark and narrow door of suffering and hardship.

There is another reason for your destiny of greatness. Countries like Japan do not forge their greatness only with magnificent collective achievements, but also, and above all, with many individual wills to greatness, even though some of these may not have been fulfilled; for those wills are never totally lost when enough work has been put into them.

One of the reasons that I greatly admire your country is that you combine an age-old tradition of wisdom with a modern urge for action.

In the last century you have been "in a hurry" to do great things in Medicine and in Science. And I, personally, love haste, but a deliberate, prudent haste, the *festina lenta* of the ancient Romans, the haste to fulfill a duty promptly but well. I love the haste of those who, like you in Japan, work fast because there is a great deal to be done and little time to do it, for the road of science has no end. One should hurry to do things only to keep on doing more. That is why haste is creative. He who makes haste is he who longs to do something great in the brief span of his life.

I regret that I do not speak your beautiful language; I am fortunate that you understand mine. All men of science, however, speak one language superior to that of words:

the universal language of science. This language recognizes no frontiers and unites all physicians the world over in a universal crusade for humanity and truth, dedicated to the progress of science.

When a physician, whatever his nationality, speaks to a foreign colleague about medicine, the semantic difficulties that may exist between them are overcome by the intimate brotherhood of their goals, their ideals, and their dreams.

That is why I believe that every time physicians from different countries gather together, as we are now in Fukuoka, they are weaving the splendid tapestry of the Medicine of tomorrow. At meetings like this, language is not only the flowery tunic of thought, but also the chisel with which we build new cornerstones for the ideal shrine for the medicine of the future. For just as ancient vases enclosing the heart of great heroes stood as symbols of gallantry and noble deeds, so does this scientific gathering symbolize the scientific hopes of the physicians gathered here in search of truth. Scientific congresses like this one are the beats of the heart of Medicine; and only by listening to these beats—the scientific congresses—can one diagnose the condition of the health of Medicine.

MAN AND HIS PROBLEMS

The philosophical purpose of this meeting is easy to define. As in that other famous symposium, recorded by Plato, held in Athens more than two thousand years ago in the quiet, silver-green shades of the olive groves, and presided over by the physician Eryximachus, you are gathered here to discuss *problems* of mutual interest. That you have *problems* indicates that, more than scientists, you are human beings. For only man has *problems*. This fact of his *problems*, from which spring all his misery and all his greatness, is what makes man human.

The dictionary defines the word "problem" as a "question proposed for solution." Any difficulty one may encounter is therefore a *problem*. Your *problem* is to develop new weapons with which to combat disease in general, and especially tuberculosis. This is a

scientific problem. You must also turn these new-found weapons into tools that will help you understand the natural history of that disease. This is a *historical* problem.

For most of us, scientific research involves at least one of these two problems. Whatever our interest may be—clinical, experimental, biochemical—research to all of us represents something vital. This is verified by the fact that you all have traveled to Fukuoka only to tell one another what you have done and what you contemplate doing further in the field of tuberculosis.

If we were to ask a historian fifty years from now what was done every year at your meetings, I am sure he would answer, "talk." But, to talk is to use words to communicate. Let me, then, dedicate a few minutes to speak about words.

Words, spoken or written, are the most powerful means of communication between human beings. Until the printing press was invented in the fifteenth century, the spoken word was the paramount vehicle for medical instruction, and ours was indeed the most *oral* of all professions. Then, when human knowledge began to be transmitted in print, medical communication adopted a more *visual* method.

Words, then and today, are the most important facet of the scientist's personality, for science is based on the transmission and assimilation of knowledge.

Philosophers have not, even yet, agreed on a definition of "man." We do know, however, that all men possess one characteristic in common that distinguishes them from all other creatures. Man makes things, but so do certain animals; man makes tools and instruments out of various objects, but so do a few animals. However, only man can *make tools with which to make other tools*. The most characteristic and constructive—and sometimes the most destructive—of all the tools fashioned by man are *words*.

Animals use notions and sounds as *signals*; only man learned to use them as *symbols*.

This was the simplest form of technological advance. Man became efficient as a toolmaker and tool-user, because he was a *maker* and *user* of words. Only after making considerable progress in constructing lang-

uage, that is, in the technology of creating symbols, did man acquire the ability to improve his tools. Ever since then, for half a million years now, man has been making words and tools. With words I shall now try to paint the historical picture of the great historical challenges in Medicine.

What counts in the life of men and of nations is not so much their achievements as the challenges they face. In this sense, the history of your annual meetings is the history of the great challenges encountered in your fight against tuberculosis and of the way you have faced them.

History tells us that medicine obeys the law of action and reaction. Each medical discovery starts a chain reaction of challenges, which the physician must resolve if he wants to ensure continuity in the history of medicine. In science, each conquest engenders new menaces to itself, and the scientist must stand ready to overcome these menaces.

Science, like human life, moves forward. Like life, science must also face its repertory of problems. In life, as in science, one cannot evade problems. They must be confronted with a valiant soul, for problems flee before the fearless fighter, just as ghosts in a haunted house vanish before the dawn which sheds light upon everything.

THE SEVEN GREAT CHALLENGES IN THE HISTORY OF MEDICINE

It is as important for physicians to look back at History, that is, *to remember*, as it is to anticipate the future, that is, *to dream*; for man's most engrossing occupations are to remember and to dream.

The emergence of challenges on the road of contemporary medicine is nothing new. At every period in history the physician has faced tremendous problems, which he has resolved by his ingenuity. We could reduce to seven these great challenges to medicine.

The first great challenge arose six thousand years ago, in the world that emerged from the neolithic world of the flint. "River civilizations" sprang up on sun-blazed steppes, and peoples, originally from Asia, condemned to annihilation by a scorching sun and whirling sands, struggled desperately to survive in the

desert. Such were the archaic Egyptian and Mesopotamian civilizations, when man answered the challenge posed by the shapeless world around him, peopled by invisible presences and demons, with protective pyramids and ziggurats. That was also the time when medicine-men tried to master the invisible forces of disease by means of the first pseudoscience, magic medicine. The archaic medicine-man resorted to the stars and to auguries to safeguard the life of his people against the demons that caused what they called spiritual possessions and fevers and we today call psychoses and infections.

The second great challenge occurred in the golden peninsula of Greece and its sun drenched lemon- and olive-groved islands, where the first great philosophies and religions of the western world were born. There, more than 2,500 years ago, man, for the first time in history, dared to face the intellectual challenge posed by the nature of the universe, of man, and of disease. The Greek philosophers, many of them physicians, were the first to use the magnificent instrument of thought to awaken man's conscience and dignity, and to formulate the concept of disease as a natural process that could be healed by empirical and rational means.

It was in this same period, around 500 B. C. (which the psychiatrist-philosopher Karl Jaspers called "time-axis" because of its portentous historical meaning), when, simultaneously in three countries independent of each other, China, India and Greece, inspired by the words of Confucius, Buddha and the Greek philosophes, a gigantic spiritual movement developed, human dignity and conscience were born, man aspired to self-liberation and asked himself profound spiritual questions, and the great religions of the world began. This memorable period was probably caused by the sudden appearance of men on horseback from Central Asia, who, together with the strange animals they mounted, brought their age-old wisdom to the sedentary matriarchal cultures.

The third great challenge happened under the dark skies of the Middle Ages, when the Black Death and other great pandemics threatened to destroy the human race. The men who met this challenge were physician-priests,

shut away in monasteries, which, stationed along the great travel routes, were a dynamic combination of news agencies and centers of bookish research. There was strictly a "book medicine"; nevertheless, in their fight against epidemics they created hospitals, universities, and public health measures, which, together with the Gothic cathedrals and Dante's *Divine Comedy*, were the great medieval contributions to Western civilization.

The fourth challenge arose in the European Renaissance, a period inspired by the parallel urges to explore the human body and the horizon stretching beyond the seas, both of which until then were *terra incognita*. The urge of the navigators to discover the lands asleep beneath the virgin stars of the western sky was matched by the urge of the Renaissance surgeons and anatomists to uncover with their scalpels the mysteries hidden beneath the human skin. The challenge posed by the mysterious structure of the organic fabric was answered by the hands of the Renaissance surgeons and anatomists, urged on by their rational thought.

The fifth challenge was to decipher the secret of the physiology of the human body and its mysterious functions. This problem was solved in Europe in the seventeenth century, when the motion and emotion characteristic of Baroque art were reflected in the concepts applied to scientific investigation, as in the discovery of the circulation of the blood, which represented anatomy moving in space, just as in the same period embryology represented anatomy moving in time. When dynamic physiology replaced the static anatomy of the past, the way was opened for a series of discoveries in circulatory, digestive, and nervous physiology, on which modern medical science is founded.

The sixth challenge was presented by disease-therapy, which at the end of last century was still almost as empirical as it was two thousand years ago. Clinical and laboratory investigators answered this challenge with immunobiologic, endocrine, and, more recently, antibiotic therapies, which represented a naturalistic criterion in the treatment of disease.

The challenge of our own time is to decipher the nature and biochemical substrate of

disease and its natural history, the biological cycles of germs, the enigma of genetics, and the secrets of ecology. We might then be able to anticipate the biological destiny of man, and to turn therapeutics into the key with which to unlock the last door opening to the threshold of life.

THE CONCEPT OF BIOCHEMICAL RESPONSIBILITY

We have therefore progressed from the primitive *anatomical* notion of disease, which placed all responsibility on one organ only, to the *physiological* notion, which accepted a multiple-organ functional responsibility, and from there to the *biochemical* notion, which accepts a biochemical responsibility.

This means accepting the *totality* of the pathological disorder, which, though initially arising from the alteration of one organ, is not limited to the boundaries of that organ, but follows the concept that the seat of every disease is the *whole* body, and the disorder is therefore a *general* disturbance of all the organic humors.

We have thus returned to the original *humoral* notion propounded more than two thousand years ago by Hippocrates, but with the difference that we now agree that diseases are localized in organs, but affect the totality of the organism, due to the correlation mechanisms of the body, particularly the endocrine system and the mysterious tissular jungle known as the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. This jungle is now the site of experimental explorations that are destined to make discoveries in the *inner space* of man more extraordinary than those that rocket ships may make in outer space.

Today we give great importance to physiology, because there is nothing more physiological than the pathological. That which is pathological is no longer considered something strange that is added to the personality; it is now considered the reverse of the coin of physiological personality. Pathological accidents are accelerated phases of life's most physiological process: the inexorable progress toward death.

We also accept a new revolutionary concept. Today we agree that man is not only nature

but also *history*. Man is what he does, the succession of moments in his life, his passage as a spatial form through time. Man is a form, always subject to the forces of his genetic equation, his environment, his internal stresses, and his free will, all of which create his biography, of which disease is a part. We accept the concept of the patient as a *whole*. The human being is regarded as a somatopsychic unit in motion, "making itself in the course of time." Disease is disharmonious living, an abnormal, painful, way of life, a series of interactions between an etiological cause and the patient.

Moreover, we accept that in therapeutics it is sometimes more important to lessen the organism's total response to the morbid attack than to treat the attack itself. The drugs of tomorrow may be used to lessen *excessive* organic response to microbial attack, just as those of today are used to destroy the attacking stimulus.

MEDICINE'S SEVEN ANSWERS TO THE CHALLENGE OF OUR TIME

The challenge, therefore, that Medicine faces today is to protect health and prevent disease by increasing its knowledge of health and disease.

In facing this challenge, modern medicine has established the basic problems it must first solve:

First, to know the biochemical substrate of health and its alterations, including the chemistry of the mental processes of joy and sorrow.

Second, to know the processes of growth, convalescence, aging, and death, so as to rehabilitate the sick, prolong life, and ensure that the sunset of man's life may be as bright as possible, while delaying the final fall of the mist-shrouded night.

And third, to know the biochemical processes underlying the etiology of the three great groups of diseases: neurosis, biosis, and sclerosis, that is, functional, organic (including the infectious), and degenerative diseases, for this is the only way we will be able to prevent or cure them.

To solve these problems, contemporary medicine has already started on different tra-

cks:

It is using biochemical resources to strengthen organic defenses as the best means of converting the body into a fortress, walled against the invasion of disease, and capable of expelling any invader that may succeed in penetrating its citadel.

It is applying ecology by providing man with the most suitable environment to protect his health. Pursuing this end, "portable" environments, with adequate food and the best artificial climate, have already been created to enable man to travel to the polar zones, the tropics, or in cosmic space.

It is combating the causes of disease—germs, toxins, traumas, stresses, radiation, noxious foods—by trying to prevent them and to eradicate them. Our aerocosmic age has brought about the vertiginous development of a new discipline: space medicine, whose greatest value lies in its findings not so much about man's life in cosmic space as about man's normal physiology.

Since the diseases of childhood and youth are mainly of an infectious nature, they will probably be eliminated through the proper prophylaxis. The enemy of man's early years is external; it is a threat *from without*, and we know how to deal with it. The enemy of the mature years comes *from within*—stress, psychoses, cancer, heart disease—and we have not yet discovered its prophylaxis. By overcoming infections, like tuberculosis, which until recently could cut off life at an early age, new drugs are forcing medicine to concentrate on the treatment not only of degenerative diseases but also of "new" diseases (such as anxiety neuroses and antibiotic-resistant infections), which are man's penalty for the progress of civilization. Medicine is also using new drugs to treat "old" diseases, replacing the old "bow-and arrow" type of medication with weapons of "long range" scope, such as antibiotics, ataraxics, and the new vaccines.

Medicine is also studying those processes of the body still unknown, in order to force the organs to reveal their secrets in their mysterious language, which is translated into microstructural images and laboratory reactions. These new techniques are also revolutionizing the teaching of medicine, by placing

at its service a dazzling armory of electronic resources.

To diagnose diseases still unknown, medicine is investigating new substances, such as experimental antimicrobial agents, the new cholesterol solvents, and the hallucinogenic drugs that are now being used in mental diseases and that one day may disclose some of the secrets of schizophrenia and perhaps even the roots of artistic genius.

A LOOK AT THE FUTURE

If we now, in the light of these advances, look toward the future, we can advance some scientific predictions:

Today we are writing the medical literature that will be considered "classic" in the year 2000. The medical student of the end of this century will have to cope with a pathology devoted specially to neuroses, radioactive and industrial diseases, cancer, hardening of the arteries, degenerative diseases, and illnesses caused by stress and *nonspecific* agents, as contrasted with the highly *specific* infectious pathology of our time.

Some germs that populate the air about us, in waves of everdecreasing virulence, may finally become saprophytes or may disappear altogether; others may develop new ways of resisting the natural organic defenses.

Medicine, in the year 2000, will be more prophylactic than therapeutic. Before investigating new antibiotics to treat tuberculosis, for example, attempts will be made to prevent it by means of good food and housing for everyone.

In the future, health, like peace, will have to be created through a peaceful and benevolent coexistence with germs (coexistence with ideological antagonists, in the case of peace), independent of chemotherapies (or long-range missiles). Disease prevention, through conditions (pure air; wholesome food) that will improve physical and mental health, will lead to healthier minds and clearer thinking, which in turn may contribute to a world peace based on the absence of fear and on the love for life. Healthier, happier men in the future may create a more peaceful, happier world.

THE DANGER OF CREATING A MYTHOLOGY OF SCIENCE

These, then, are the historical challenges that medicine faces today, which must be met not by philosophers, as in the past, but by scientific investigators, by men who have been driven into *research* by their *search* for truth and for their own personal destiny.

If that brave infantryman of Medicine, the general practitioner, must daily provide prompt answers to the immediate problems of his patients, the medical investigator must provide more permanent answers to general medical problems, answers in which he must even anticipate the future.

Never before have investigators had at their disposal so many and such good tools and equipment and so much economic aid with which to face medical problems. Even popular support, which in every period in history has invested great heroes with a golden halo, is now granted to investigators.

Unfortunately, the present formidable advance of science is creating a great danger: the superimposition of a mythology of science over contemporary scientific thought, a danger that, like a storm cloud, is darkening the sunlit scientific panorama of our time.

What do I mean by mythology of science?

We know that ancient mythology was characterized by an exaggerated overestimation of the hero's powers. The mythological hero was credited with supernatural powers and energy, which enabled him to master all things and to face impossible enterprises with the confidence that he could accomplish them.

The hero's weapons, also overevaluated, had an importance equal to that of the hero himself. Siegfried's sword and Apollo's arrows were considered invincible.

Finally, each individual triumph of the hero was so overestimated that his final goal was forgotten. Each successive victorious step was confused with the accomplishment of the hero's mission. The labors of Hercules became more important than their original motivations; Ulysses' voyage, in the *Odyssey*, because of its epic magnitude, obscured the original purpose of the hero: to return to the loving arms of his wife Penelope.

However, mythology was not made only by the poetic bards in the days of Homer and classical Greece. Mythology has continued to be made all through history, even in medicine, and the result has always been that myths, which are only projections of man's hopes and fears, eventually supplant reality.

Man, to this day, continues to create mythology, because he simply must have heroes to protect himself against the tedium of life, and because he still needs to project his hopes and fears onto extraordinary beings.

In medicine, a dangerous mythology of science is now being created, which has the same characteristics as the old Greek mythology: overevaluation of the supernatural power of the hero (in our case, the scientific investigator); overevaluation of his tools (in our case, technology); and confusing his partial triumphs (in our case, the conquests of applied science) with his final goal: to protect health, and to prolong life.

An example of the first characteristic is the publicity nowadays given all around the world to the scientific investigator, which leads to the belief that he who has developed a new substance has already conquered the disease for which it is intended, or that each new drug—steroid toxoid, antibiotic—is the definitive therapy for a disease. An example of the second characteristic is the almost religious worship of technological advances, such as electronic instrumentation and laboratory techniques, while the object for which they are destined takes second place. An example of the third characteristic is the recent overestimation of certain drugs, for instance, tranquilizers, which are only a key to unlock a few doors in the unexplored castle of psychoses.

We must be on guard lest this mythology of science grow roots and take the place of reality; lest excessive faith in the investigator's invincibility and in the power of his technological weapons, and excessive glorification of technical victories result in diverting science from its true path. Technological progress might make the investigator forget to keep his eyes on the broad sunny horizons that are the true objective of science. Each of the investigator's triumphs is a step forward in the march of progress, but techno-

logy—applied science—can never replace *basic* science, from which flows, like water from a fountain, the clear philosophical stream that guides man on his way through history.

Above all, it is necessary to banish the growing tendency to experiment for the sake of experimenting, without a philosophical purpose. Though Claude Bernard recommended hanging up imagination with one's hat upon entering the laboratory and taking both of them back only upon leaving, he himself never failed to exercise his *scientific* imagination, a luminous, poetic vision of what he wished to attain with his experiments.

Experimentation is the foundation of science, but it is not the sole reason for the existence of science, as devotees of the mythology of science claim. Experimentation must be guided by ideas, by an intuitive vision of the ideal goal that it wishes to reach. Should it not be so guided, the now developing hypertrophy of "pure" experimentation may lead to atrophy of the investigator's imagination.

We must differentiate between the two royal roads of Medicine: that which follows the technical path in search of *knowledge* and that which follows the philosophical path in search of *wisdom*.

The best protection against the danger of mythology is for all scientists to remind themselves that both the investigator and technology have their limitations. Although the answers we have found to concrete problems up to the present have been dazzling, the greatest problems still remain unsolved after six thousand years of written medical history.

The mythology of science, that is, excessive belief in what science can do for humanity, may continue to grow among the general public; but I feel sure that you will try to maintain a human, non-mythological attitude, because you know that without it there can be no real progress in science.

I believe this because, quite apart from the shining mythological armor in which the public clothes the investigator, the scientist does possess certain virtues, invisible to the public, in which reside his true greatness and that of his work.

THE SEVEN VIRTUES OF THE MODERN
SCIENTIFIC INVESTIGATOR

Everyone knows the technical resources today available to the medical investigator in accomplishing the formidable task entrusted to him. I shall not quote statistics, for though I sometimes use them I dislike them strongly, just as I hate umbrellas yet use one when it rains. Instead, I shall mention the spiritual resources of the investigator, his seven capital virtues, virtues that hold the key to his greatness and that justify our optimism in Medicine's ability to respond to the great challenges of our time.

It is important for us to remember the great men in medical history. While artistic work is intimately bound up with its creator, thus leading us to speak of Beethoven's *Ninth Symphony*, Cervantes' *Don Quixote*, or Leonardo Da Vinci's *Mona Lisa*, scientific work is synonymous with anonymity. Though every time we use a drug we are offering mute tribute to its discoverer, still we administer antiplague serum, anti-smallpox vaccine or anti-syphilitic medication without giving a thought to Shibasaburo Kitasato, William Jenner, or S. Hata. It is essential therefore that, on occasions like this one, we recall the great men of medicine, that we rescue not only their work but also their names from the dust of oblivion.

History, including the history of medicine, is made by men, and on the number of spiritual carats such men possess depends the possibility and magnitude of their triumphs. But even in the clean, fresh climate of science one needs a purpose, a method, a spirit. I have already spoken of the purpose and the method of contemporary medical science. Its spirit is that of the men who are today making that science. Benjamin Franklin, said, "All mankind is divided into three classes: those that are immovable, those that are movable, and those that move." Medical investigators are those who *move*, who do things, who express their greatness in actions of vast consequence to humanity. On their virtues depends the progress of science. The best scientific instrument, the most perfect laboratory, the latest electronic advance, all these would be worth nothing without the

man who, in the laboratory, clinic, or library, contributes his life so that the chariot of medicine may move forward. Without these men no history of medicine could be made, just as no good building could be erected without pillars to support its foundations.

Let us not forget the four great historical duties of the physician: He is the man who *heals*, using the *what* (the drug) and the *how* (his knowledge); he is the man who *knows*, and uses his wisdom to contribute to the progress of civilization; he is the man who *can foresee* future events, predicting the course of an epidemic, being a prophet of the biologic history of men; and finally, he is the man who *organizes human life*, improving dwellings, clothes, foods, and habits. The physician must also be a philosopher, to be able to fulfill all these missions and to set the cornerstone of the historical destiny of man.

Let us remember that what really cures a sick person is not drugs or instruments, for instruments cannot make a diagnosis by themselves, and drugs alone cannot effect a cure. The cure is achieved by *the man* who knows how to use these drugs and instruments correctly and effectively. An antibiotic no more cures an infection than a scalpel cures peritonitis. It is the brain and hands of the physician or surgeon that perform the miracle of healing.

The relationship between a patient and a physician is not a generic relationship between an infection and a drug; it is a specific relationship between two human beings, one sick and suffering and the other possessing the knowledge necessary to treat him. The final cure is accomplished by a combination of factors involving the nature of the patient, the characteristics of his disease, the knowledge of the physician, and the therapeutic resources at his disposal. It is only under the guidance of the physician that drugs perform their curative miracle.

Thus, the physician must believe, must reason, and must experiment. Faith, Philosophy, and Science must always inspire the physician. For, in their own fashion, both the physician and the scientist are striving for the good of mankind, either by the flickering light of a candle at the bedside of a sick fisherman, or by the pallid light, like a

twinkling star, of the gas burners in a laboratory.

Foremost among the seven virtues of the investigator I place *goodness*. A house is as strong as its foundations. Every great man, every great investigator, begins by being a good man. The humaneness of daily life must overflow into the humanism of the investigative genius. In no profession as in medicine is it so important to be a good man. Science without conscience is nothing but baseness of soul. The true investigator, renouncing success and profit, chooses the troubled seas of investigation instead of the calm harbors. Modesty is usually the inseparable companion of such goodness.

The second quality is *greatness*. Greatness is simplicity. This has been so from Hippocrates to Takamine. A greatness that is an aristocracy of the spirit is the only sovereignty people can accept without relinquishing their own sovereignty. Greatness in the true investigator is to go through life doing with a simple spirit things that may benefit his fellow-beings, building a mighty scientific pyramid without losing his childlike innocence of soul. It is to remain indifferent in the face of indifference, to have faith in his convictions, even during the interminable night of failure, certain that the dawn will come. It is to accept life as splendor and radiance, lighting the shadows of his laboratory with the inner light of his own soul.

Simplicity of thought, simplicity of felling, and simplicity in speech give meaning to medical greatness. The form adopted by a scientific truth often becomes an integral part of the truth itself. Truth means clarity. To express things clearly is of supreme importance in science. Scientific truth demands transparency, order, simplicity, precision, and harmony. Laennec, Tarawa, Pasteur, and Fleming fulfilled this demand.

Sometimes, *genius* is added to these qualities, as in the case of Hideyo Noguchi. While in art knowledge is non-accumulative, in science it is accumulative and keeps on replacing itself. A Sharaku, an Ogata Korin, a Beethoven, a Shakespeare, each in himself is a complete cycle that needs no predecessors and leaves no school. This is why a work of art—symphony, statue, painting—is immortal, while

the life of a scientific work—report, lecture—is ephemeral and is always superseded by a more recent work.

In art, a genius is he who creates his own universe in its entirety; in science, a genius is he who expands the universe by applying his intuition to already existing knowledge. Genius is intuition, but it is also logic in the service of a vocation. Besides quality, genius is also *quantity*, as exemplified by the prolific work of Paracelsus, Harvey, and Kitasato. The true genius rarely makes a single discovery. The great investigator, generally, makes many.

Add to that as the fourth quality the *spirit of inquiry*, such as was possessed by Bichat, Koch, Nagayo, Kiyoshi Shiga, and Hideyo Noguchi, whose work benefited all mankind. Experimenting is the indispensable complement to theorizing thought. Patience in waiting and quickness in thinking, distinguish the investigator. Often, intuition in the genius flashes suddenly, but the true investigator will spend years in verifying his spark of truth, reconciling noble haste in his endeavor with patience in its confirmation.

In all investigation, the search for elementary data always precedes the search for the dynamic interrelationships among objects, that is to say, *research* properly so-called. The flame always precedes the light. Similarly, the thirst for knowledge is born with human life. Are not children always asking the "how," "what," and "why" of things? The eyes of the researcher light up with the same curiosity as a child's eyes, which look at everything in astonishment and wonder.

Lucidity is the fifth quality indispensable in the investigator, because style is the man, and man in his human quality is his style. In Paris, in 1879, the historian, Ernest Renan, paid a tribute to the scientific style of Claude Bernard, which could be applied today to any Japanese investigator: "Human intelligence is a whole, so well united that a great mind is always a good writer. The true methods of investigation embrace the solid qualities of style.... The standard of good scientific style is lucidity, perfect adaptation to the theme, complete forgetfulness of self, absolute abnegation. That is also the standard for writing well, whatever the subject. The

best writer is the one who develops a great subject and forgets himself in order to allow his subject to speak for itself.... He uses words like a modest man uses his clothing, to cover himself.... He thinks, he feels, the words flow....”

The style of the good investigator sparkles with the diamantine limpidity of thought, typical of the man who knows certain things well and wishes to explain them so that everyone will understand. Reading great scientific writers, like Fleming or Takamine, one realizes that style is like the acrobat's tights, which cover all of him, yet sharply mold every line of his body. The style of these men is a transparent window, without a single mote of dust, through which one can see the wide prairies of their thought. The creed of the true investigator is fidelity to the truth, and that means not only to seek it and serve it, but also to express it in language intelligible to everyone. Cajal, Roux, Sahachiro Hata —these men allowed no exaggeration of concepts to creep into their prose and cripple its scientific probity. Lucidity in style presupposes lucidity in thought, and this implies clarity of spirit. A clear style, like a clean window pane, indicates that the owner does not fear inquisitive eyes. The investigator's prose must be fresh and crystalline, like the water from a mountain brook.

He must also keep a *total perspective*, seeing things, as the philosopher Spinoza said, “in view of eternity” and “in view of totality.” To live perceptively in this manner, as an investigator with a sense of history, who knows that his work is the heritage from his predecessors and, itself, the heritage of the future; to live as a philosopher at heart, who loves wisdom; to live thus is to be a complete man. He who does this will always speak with the clear, friendly tongue of the naturalist.

How the lack of lucidity in reporting can hinder scientific progress is proved by the fact that of about 2000 human diseases recorded in textbooks, the etiology of not more than 800 is known. Of several of the others, for instance asthma, gastric ulcer, hypertension, we know their *pathogenic* peculiarities, but we know little about their true etiology.

These diseases, whose pathogenesis is known but whose etiology is not too well known, are diseases *specific to mankind*; they are not observed in identical fashion in animals. On the other hand, the diseases against which we have efficient etiological therapies are the same diseases man has in common with the higher mammals. Present-day pathology only makes temporary, “prosthetic” replacements; it is etiological only in so far as it relates to the pathology of the higher mammals. Progress has been greater in those fields in which reporting has been clear and precise, instead of theoretic or interpretative. Tuberculosis is an excellent example of how accuracy, clarity, and excellence of description, from Hippocrates to our own days, including such men as Laënnec, Pasteur, Villemin, Koch, Trudeau and Waksman, can smooth the path of research. On the other hand—in schizophrenia, atherosclerosis, and cancer—multiple interpretations and semantic confusion have greatly hampered diagnosis and therapy. The better we learn how to describe the etiology and course of a disease, the easier it will be to find the proper treatment. Clear and prompt reporting is a vital part of the solution to medical problems.

The sixth quality of the investigator is *patriotism*, for he is a living part of the historical conscience of his epoch. He can look at the problems of his country and of his time with eyes both critical and loving; for the true lover loves his beloved though his eyes are wide open to her defects.

The investigator's homeland grows bigger with each of his discoveries, until it becomes a universal homeland not to be found in any geography book. That is what happened with your genius and medical martyr, Hideyo Noguchi, who became a glory not only to Japan, but to the whole medical world. The investigator is the *homo universalis* of our time, who helps to promote the health of all people on our planet. He can sometimes, without leaving his home or country, reach so deep in his work that he reaches universal roots, preferring vertical profundity to horizontal spread, which guarantees his universality in space and his immortality in time.

Finally, the investigator has *universality*.

Hideyo Noguchi and S. Hata had universality. In the address already quoted, Renan said, "glory has something homogenous and identical. Everything that vibrates produces it. There are not various types of fame, any more than there are various kinds of light." All glory derives its rays from the same source. The investigator's glory is universal, and it clothes with honor all those who admire an ideal and dedicate themselves selflessly to it.

Universality is imperative in Medicine. Even the new drugs today give us a lesson in universality. Antibiotics, for example, have done more than any other drug in history to universalize medicine. The search for an antibiotic substance starts with samples of earth from the four corners of the planet. Today, a lump of earth picked up in a field in Asia by an Australian pilot, and developed by American microbiologists, may be applied in the form of a new antibiotic by a Japanese physician, and save the life of a Latin-American patient. Can one ask for greater therapeutic internationalism?

Work in antibiotics is more international than in any other area of science, because today its principal source is the earth (tomorrow, it may be the sea), and what nature gave to all mankind cannot be made the exclusive property of one scientist or one country.

CLOSING REMARKS

In these times of atomic and cosmic terrors, it must be remembered that when the mechanical marvels of this age have been replaced by other marvels, the example of the selfless investigator will endure as an inspiration and as a memorial pillar for all time.

On such virtues is founded my optimistic belief that the mind of the investigator, like a many-colored glass dome projecting its radiance on all fields of human knowledge, guarantees the unceasing progress of human effort.

At the beginning, I spoke about words as a tool of science. Words, however, have another mission besides imparting knowledge, a mission of great importance, particularly at

a meeting like this one in Fukuoka, where old friends meet and new friends are made. That mission is for us to approach each other and, by talking among ourselves, to turn our individual loneliness into professional companionship. It is, perhaps, the noblest work that words can do: to act as carriers of sincere friendship among men. For, the simple act of two physicians meeting and stirring the air with the sound of words of greeting, the simple words, "How are you, my friend?" establishes the human basis of history with all its glory and grandeur.

Other colleagues here, more learned than I am, will describe the numerous technical instruments and institutions now at the service of medicine and of the investigator of tuberculosis. I, like a botanist emerging from the woods with a basket filled with cherry blossoms, would only like to pin in your lapel a sprig of seven cherry blossoms: goodness, greatness, genius, spirit of inquiry, lucidity, patriotism, and universality. On those seven ineffably sweet-smelling flowers is founded my belief that you in Japan, with your colleagues in the rest of the world, will solve the greatest scientific challenges that humanity has ever faced, by writing those glittering pages of goodness and humaneness that can be written only by the spirit of man.

A classical Greek legend tells that the town of Delphi, site of the famous oracle, was the center of the world, because if two eagles, they said soared into the sky from the two ends of the earth, they would inevitably meet in Delphi.

Today we know that these two eagles: the eagle of science and the eagle of the art of medicine, are flying not through Space but through Time. We can imagine the art and science of Medicine soaring across the sky, their golden wings flying toward their true temple, which lies in the Future and in the hearts of all of you, my brother-physicians, who have answered Destiny's call to greatness by devoting your lives to serve mankind.

1. 抗酸菌の変異と分類に関する問題

(1) 単個菌培養法を用いた結核菌変異の研究

国立予防衛生研究所結核部長 室 橋 豊 穂

I 緒 言

結核菌においても、他の細菌におけると同様に、菌群を構成する1つ1つの細菌細胞には、常にいろいろの意味での変異が起こっている。そのうち、薬剤感受性における変異や、virulenceに関する変異などは、日常もつとも広く取り扱われているが、われわれによつて観察されているこれらの現象は、あらゆる場合に、一定の大きさをもつ菌群において表現されるものであつて、これを構成する個々の細菌細胞の変異の総和と考えることができる。

したがつて、菌群の構成単位である個々の細菌細胞から出発して、その分裂、増殖によつて作られる1つの菌群を対象として検討を加えることは、結核菌における変異の機序をうかがう手段としてはきわめて重要であると思う。

ところで、このような方法を用いる場合においても常に考慮を必要とする点は、結核菌が分裂する場合に、単純に2分法で分裂すると一応仮定しているわけであるが、その場合でも核物質が1コであるという証明はなく、またたとえ1コであるとしても、均等に2分するという証拠もないということである。それゆゑ、単個菌培養によつて得られる菌群ないし集落を、ある性質に関して全く純粋であると仮定することはできないわけである。しかし少なくとも、1つの細菌細胞の単位から出発したcloneを取り扱いうるという意味においては、通常行なわれているような、未知の細菌細胞集団を扱うよりも、はるかに分析的な方法を提供しようと思われる。

このような考えに基づいて数年来重ねてきた、単個菌培養法を用いる結核菌変異に関する分析的な研究の概要を述べようと思う。ここでは、変異現象を、主として薬剤感受性に関するものと、virulenceに関するものにとり限りたい。

II 結核菌単個培養方法の概要

原則的には他の細菌におけると同様である。とくに考慮を要する点は、集落形成に要する培養期間がはるかに長いこと、および培地組成に特殊な考慮を払う必要があることの2点である。この2点の解決は結核菌の単個培

養を可能ならしめた。われわれの確立した方法は次のごとくである。

de Fonbruneのmicro-manipulatorを用いて、1コの菌をフィルム培地上に鈎菌し、ただちにフィルム培地ごとKirchner寒天培地斜面に重層、培養するのである。

フィルム培地としては、結核菌発育阻害脂肪酸を除去したメタノール精製寒天を3%に含むKirchner寒天を用いた。また、鈎菌用菌液としては、常に十分vitalityの高いものを得る必要から、Tween-albumin培地培養を用いた。すなわち、この培地に1週ごとに継代し、3代目の7日培養を常に用いるようにした。

実験条件のこのような規正は、再現性ある成績を得るためにはきわめて大切な点である。

ただし、鈎菌された個々の菌のすべてが生菌であるとはもちろん限らないから、それらの菌からの集落形成率については統計学的吟味を必要とはするが、上述の方法によつて培養された場合の、われわれの成績は表1に示すごとくで、ほぼ60~80%の一定した集落形成率を与えている。

Table 1 Results of single cell culture of tubercle bacilli

Strain	No. of isolated single cells	No. of colony formation	Percentage of positive colony formation
H ₃₇ Rv	9	5	55.6(%)
H ₂	21	15	71.4
H ₃₇ Rv	19	9	47.4
H ₂	18	7	38.9
Aoyama B	24	14	58.3
H ₂	47	27	57.4
H ₂	46	21	45.7
Aoyama B	70	51	73.0
H ₂	31	19	64.5
H ₂	64	38	59.4
H ₂	57	46	80.7
H ₂	53	28	52.8
			(Average 61.0%)

Note: All trials were made after the given strains were passaged three times through Tween-albumin medium.

III 薬剤感受性における変異の検討

薬剤感受性として通常われわれの扱うものは、1つの菌群についてのそれである。この場合、たとえば耐性菌とよばれるものがはたして様な感受性をもつ細菌細胞から構成されているものといえるのであろうか。この疑問を解くために、われわれは単個菌培養法を応用してみた。実験は直接薬剤含有フィルム培地上に単個菌を培養する直接法と、単個菌培養によつて得た集落をかきとつて薬剤感受性を調べる間接法とから成つている。

まず、 $H_{37}Rv$ の SM 感受性菌、SM 耐性菌、INH 耐性菌および 18b (H_2 株の SM 依存菌) の各株を用い、前述の方法で単個菌培養を行なつた。ただし、この実験では、フィルム培地には所定量の薬剤を含ませた。成績は表 2 のごとくで、白丸は集落を形成しなかつたもの、黒丸は集落を形成したものを示す。

この場合、釣菌された単個菌のすべてが汚菌であつたとの証明がないから、集落を形成しなかつたものすべてを薬剤感受性であるとみなすわけにはゆかないが、

Table 2 Drug sensitivity test of various strains of tubercle bacilli by single cell cultivation

Strain tested	Drug concentration (μg per cc)					
	0	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
Streptomycin						
$H_{37}Rv$	●○ ●○ ●○ ●○ ○	●○ ○	●○ ○	○	○	○
Streptomycin						
$H_{37}RvR-SM$	●● ●○ ●○ ●○ ●○ ●	●● ●● ●● ●○ ●	●● ●● ●● ●○ ●○	●● ●● ●● ●○ ●○	●● ●● ●● ●○ ●○	●● ●● ●● ●○ ●○
Streptomycin						
A SM-dependent strain named 18b	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○	●○ ○	●○ ○	●○ ○	●○ ○
Isoniazid						
$H_{37}RvR-INH$	● ● ● ●	●● ●○ ●○ ●○ ●	●○ ●○ ○	●○ ●○ ○	○	○

Note : ● Successful colony formation } from a single cell.
○ Failed colony formation

この成績は、それらの単個菌が由来した親株菌群を構成する個々の細菌細胞の薬剤感受性のある程度示しているといえるであろう。

次に、単個菌培養を薬剤を含まないフィルム培地に行なつて得た 15 集落をかきとり、それぞれ菌液を作つて薬剤感受性を調べた。使用菌株は $H_{37}Rv$ SM 感受性菌である。

表 3 に示したように、単個菌由来の集落の示す SM 感受性は一様でなく、しかも一般的に親株に比して感受性が高いようにみえる。とくに、5, 9, 11, 12 のように接種菌量の多いものにおいて親株よりも明らかに高い感受性の示されていることは興味がある。

以上 2 つの実験から、ここに用いた $H_{37}Rv$ 株が薬剤感受性に関して一様ならざる細菌細胞の集合から成ること、また、単個菌に由来する菌群 (集落) が、薬剤感受性に関して完全に純粋な細菌細胞分布を示すとはもちろんいえないが、親株よりは一層純粋になつてゐることが推察される。

この実験は、ある population size をもつた結核菌群の薬剤感受性の解析に対して、1 つの clone を確保するという意味において、単個菌培養法がきわめて有用な一方法を提供しうることを示している。

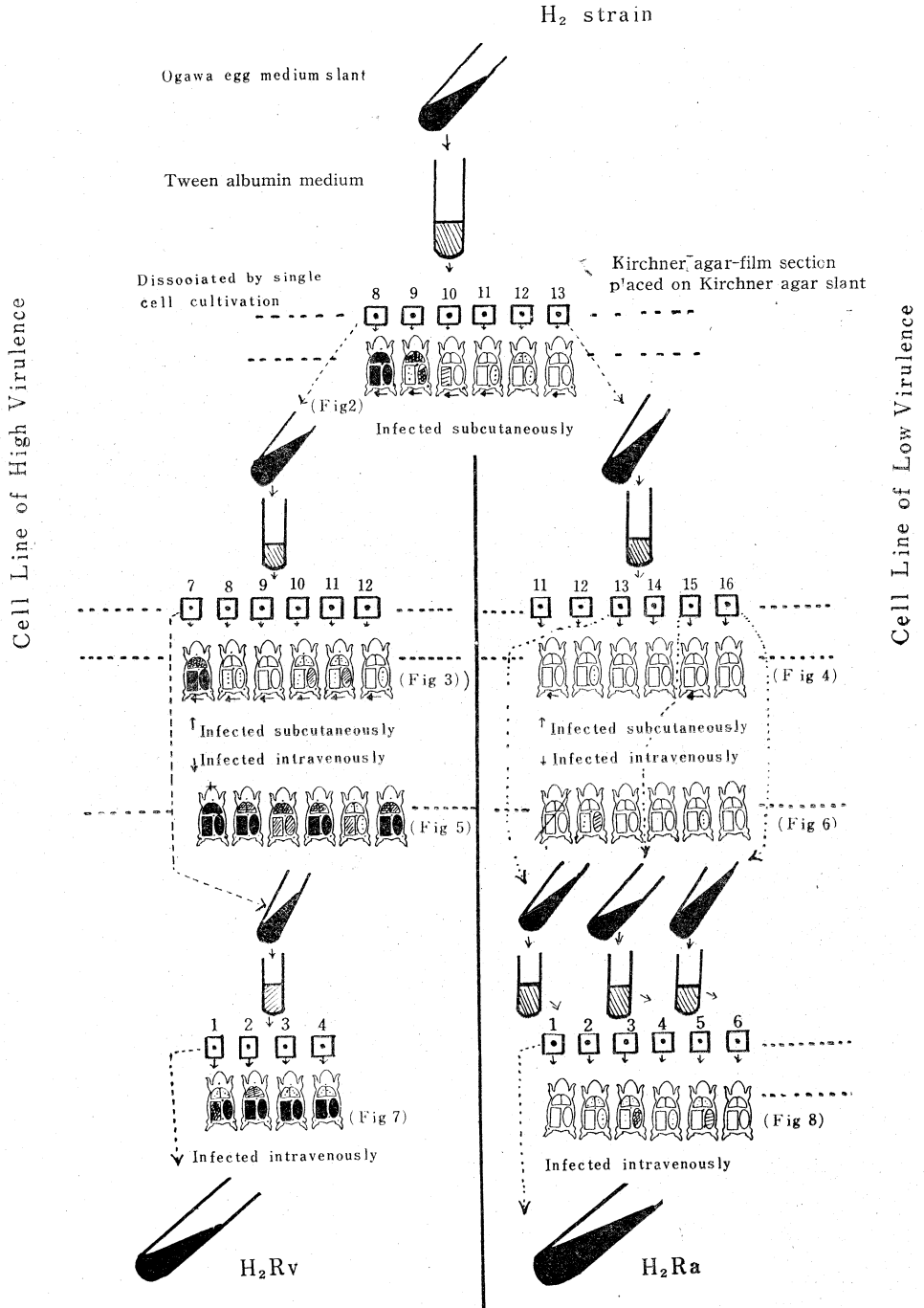
IV virulence における変異の分析に対する単個菌培養法の応用

結核菌の virulence における変異としては、有毒株から無毒ないし弱毒株の解離がその著しい例としてあげられる。BCG, 今村株, $H_{37}Ra$, R_1Rv , 18b などは、その代表的な例である。それぞれの由来する経緯は異なるが、培養途上における特殊な環境条件によつて選択純化されたとみなしうるものである。

他方、われわれは、菌株保存にあつて、長期間人工培地に継代する場合に、分離当初の virulence を維持することがきわめて困難なことや、virulence の減弱した場合に、動物通過によつて virulence の回復をはかりうることをしばしば経験する。

これらの事実、人工培地上では virulence の弱い菌が、また動物体内では逆に virulence の強い菌が、それぞれ選択されるという特殊な環境条件の存在を示唆する。それと同時に、結核菌群が virulence を異にする細菌細胞の集合から成り立つこと、したがつて、その菌群の virulence を規定するものは、そのうちに含まれる virulent な細胞群 (Rv 型) と avirulent な細胞群 (Ra 型) との混合比であることを推測せしめる。それゆえもし菌群を適切に選べば、これを構成する個々の細菌細胞を解離することによつて、virulence を異にする菌群の解離が可能となるのであろうし、したがつてまた、virulence に関する変異の機序を考察するうえにき

Fig. 1 Experimental process



Symbols in animal are explained in Figs. 2 and 5.

わめて好都合であると思われる。

実験の対象としては H₂ 株を選んだ。この株は柳沢謙博士によつて 1935 年ころ患者喀痰から分離されたもので、以来卵培地に継代されてきた。われわれの研究室ではきわめて多くの実験に用いられているが、モルモットに対する virulence は、現在のところきわめて強毒と

いうほどではない。しかし virulence の変動が比較的少ないので、実験には有利な菌株である。

以下、人型有毒菌 H₂ 株からの virulence に関する解離実験を述べるが、その実験の全貌を示せば図 1 のごとくである。すなわち、この実験では、単個菌分離培養を 3 回繰り返して、virulence に関して安定な株を得

Table 3 Streptomycin sensitivity of 15 daughter strains obtained by single cell cultivation from H₃₇Rv strain

Strain tested	Size of inoculum to each tube (viable cells)	Streptomycin concentration ($\mu\text{g}/\text{cc}$)					
		0	1	5	10	50	
The original H ₃₇ Rv strain	565 × 10 ³	‡	‡	10*	4*	0	
Daughter strains	No. 1	100 × 10 ³	‡	‡	0	0	0
	2	70 × 10 ³	‡	+	0	0	0
	3	320 × 10 ³	‡	+	0	0	0
	4	10 ³	‡	+	0	0	0
	5	1,640 × 10 ³	‡	+	0	0	0
	6	20 × 10 ³	‡	±	0	0	0
	7	7 × 10 ³	‡	0	0	0	0
	8	8 × 10 ³	‡	0	0	0	0
	9	850 × 10 ³	‡	±	0	0	0
	10	160 × 10 ³	‡	±	0	0	0
	11	560 × 10 ³	‡	+	0	0	0
	12	1,850 × 10 ³	‡	0	0	0	0
	13	8 × 10 ³	‡	0	0	0	0
	14	3 × 10 ³	‡	3*	0	0	0
	15	80 × 10 ³	‡	±	0	0	0

Note: One tube (slant) was employed for each drug concentration.

* Number of solitary colonies. (0) indicates no growth and other symbols, (‡, †, + and ±) indicate roughly the grade of confluent growth.

Fig. 2 Schematic representation of the degree of pathogenicity in guinea pigs of 15 colonies dissociated from a strain of tubercle bacilli (human type H₂) by single cell cultivation (The first step experiment)

(Subcutaneous inoculation test)

Colony No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Size of inoculum ($\times 10^4$) Viable bacterial units	50	2.5	680	3,500	33	1,000	33	1,700	45	250	2.5	4,800	5,300	2,500	?
Degree of involvement															
Spleen weight (g)	0.8 1.0	0.8 0.8	1.0 2.7	0.8 1.8	0.9 1.0	3.9 4.1	2.9 1.2	9.9 11.3	1.3 1.1	1.1 0.6	1.0 2.0	1.0 1.0	1.0 1.2	1.3 5.2	1.0 2.1
Number of viable bacterial units recovered from the spleen (per 10 mg)	3 37	0 0	7 530	1 1	0 1	2,500 2,300	1,800 3	770 1,600	660 680	74 7	0.3 3,000	4 0	0 0	260 100	1,600 51

Note:



- ← Abscess at inoculation site
- Numerous miliary tubercles
- ⊙ Many caseous or noncaseous tubercles
- ⊕ Scattered miliary tubercles
- ⊖ A few miliary or granulomatous tubercles
- No lesion
- Involvement of lymphnodes

fig. 3 Schematic representation of the degree of pathogenicity in guinea pigs of 27 colonies dissociated from a daughter strain of H₂ (No. 8 colony in Fig. 1) by single cell cultivation (The second step experiment) (Subcutaneous inoculation test)

Colony No.																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27			
Size of inoculum ($\times 10^6$)	4,000	1,250	27	4	5	<1	12,000	10	290	<1	2	4	5	250	70	230	65	50	<1	14	3,100	2	340	1,800	120	1,100	<1	5	5	
Degree of involvement																														
Spleen weight (g)	6.0	2.0	2.2	2.1	1.5	1.4	3.0	1.8	3.1	1.5	1.0	1.0	1.2	0.6	2.1	3.6	1.7	2.0	1.1	0.9	2.8	0.8	2.4	1.1	3.3	3.0	1.3	1.2	2.7	
Number of viable bacterial units recovered from the spleen (per 10 ^{mg})	370	2,000	2,000	2,200	18	89	730	4,700	700	150	7	4	5	230	55	200	2,600	390	870	100	50	1,700	260	1,100	100	2,200	1,000	520	1,400	570
	1,100	2,500	630	69	129	87	11,000	110	2,000	14	2	7	3	870	1,400	1,300	7,200	1,000	380	70	1,700	1,100	700	500	8,000	1,100	3	700	370	

Note: Symbols are the same as in Fig. 1.

ることができた。

(I) 分離経過

小川培地継代の H₂ を Tween-albumin培地に移植。
1 週ごとに 3 代継代後、前述の方法を用いて 21 コの単個菌を釣菌して、Kirchner 寒天培地に重層培養した。
9 週後、生じた 15 集落からそれぞれ菌液を作り、モルモットの皮下に接種し、7 週後に剖検した。剖検所見は図 2のごとくである。肉眼所見および脾からの分離菌数からみると、接種に用いたこれらの 15 集落は、virulence に関してかなり大きな幅を示していることが分かる。すなわち、たとえ接種生菌数の差を考慮するとしても、virulence の強いものから弱いものまで種々であった。これらの daughter strain のうちからもつとも強い病変を呈したもの(図 1—No. 8)と、接種生菌数の多いにかかわらず病変のきわめて軽微なもの(図 1—No. 13)とを選んで、それぞれ強毒系および弱毒系の親株として小川培地に培養、保存した。

この 2 つの daughter strain をそれぞれ Tween-albumin 培地に移植し、前述の方法で第 2 回目の単個菌分離培養を行なった。

強毒系から 27 コ、弱毒系から 16 コの集落を得たので、それぞれから菌液を作り、モルモットの皮下および静脈内に接種した。接種後 8~12 週に剖検。皮下接種の成績は図 3, 4 に、また静脈内接種の成績は図 5, 6 に示した。

図から明らかなように、強毒系では一般に病変が強かったが、弱毒系では静脈内接種の場合(図 6)に、罹患度が必ずしも均一でなく、かなり強い病変を呈したも

のがあった。そこで、強毒系のうち、もつとも強いと思われる No. 7 を強毒系の grand daughter strain とした。また弱毒系では、No. 13, 15, 16 の 3 株を選んで弱毒系の grand daughter strain とした。

これらの grand daughter strain を小川培地から Tween-albumin 培地に移植、継代し、第 3 回目の単個菌分離培養を行なった。

強毒系 No. 7 から 4 コ、弱毒系 No. 13, 15 および 16 からそれぞれ 10 コ宛の集落をとり、これらをモルモットに静脈内接種して virulence を調べた。その結果は図 7 および図 8 に示すごとくである。

強毒系の 4 株ではいずれも著明な病変を呈し、virulence において祖先株 H₂ に劣らぬことを示した。また弱毒系からの 30 株はいずれも virulence が弱く、第 1 回目の単個菌分離によつて選ばれた弱毒株の親株(No. 13)に比して、virulence に関して細胞分布がより純化されていることを示した。

ここに解離された強毒系株を H₂-Rv, 弱毒系株を H₂-Ra と名付け、小川培地に保存した。

以上の過程は、有毒株の菌群構成が、virulence の程度を異にする細菌細胞の集合より成ることを端的に示すとともに、このような単個菌分離培養という解離法を用いることによつて、不純なものの分離、したがって結果として純化の程度の増大が期待されることを示している。この解離過程は、他の既知の弱毒株ないし無毒株と異なり、特殊な培養条件を背景にもたぬがゆえに、とくに virulence に関する遺伝学的考察を加えるうえに、きわめて大きな意義を有するものといえよう。

Fig. 4 Schematic representation of the degree of pathogenicity in guinea pigs of 16 colonies dissociated from a daughter strain of H₂ (No. 13 colony in Fig. 1) by single cell cultivation (The second step experiment)

(Subcutaneous inoculation test)

Colony No.	No. 13 Parent	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Size of inoculum (×10 ³)	190	20	13,000	13,000	650	700	3,500	300	390	220	190	170	320	450	5	150	9
Degree of involvement																	
Spleen weight (g)	1.0 1.2	0.8 0.6	0.6 1.0	1.0 0.8	1.2 0.6	0.6 0.6	1.0 1.0	1.1 0.6	0.9 0.7	0.9 0.7	0.6 1.4	1.0 1.0	1.4 0.7	1.0 0.8	0.7 0.8	0.9 0.7	0.65 1.2
Number of viable bacterial units recovered from the spleen (per 10mg)	<1 20	1 0	<1 60	26 5	150 <1	<1 2	11 140	<1 22	0 <1	1 <1	<1 0	2 15	3 <1	3 1	0 4	0 2	0 7

Note: Symbols are the same as in Fig. 1.

Fig 5 Schematic representation of the degree of pathogenicity in guinea pigs of 27 colonies dissociated from a daughter strain of H₂ (No. 8 colony in Fig. 1) by single cell cultivation (The second step experiment) (Intravenous inoculation test)

Colony No.	Orig No. 8		Parent																											
	H ₂	Parent	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
Size of inoculum ($\times 10^3$)	4,000	1,250	27	4	5	<1	12,000	10	290	<1	2	4	5	250	70	230	65	50	<1	14	3,100	2	340	1,800	120	1,100	<1	5	5	
Degree of involvement																														
Spleen weight (g)	? 18.0	11.0 10.2	4.1 6.5	4.5 7.2	1.5 2.0	3.2 6.3	16.0 10.7	2.0 2.5	11.0 21.5	0.7 5.5	2.0 3.0	15.0 17.0	1.5 1.5	4.0 3.0	6.0 10.5	20.0 22.0	28.5 2.5	2.5 ?	2.0 2.0	8.5 9.0	6.3 14.5	1.8 3.0	3.0 1.5	9.0 6.0	3.0 7.5	8.0 ?	3.5 ?	2.0 ?	10.5 8.5	
Number of viable bacterial units recovered from the spleen (per 10 mg)	? ?	? ?	? 600	400 2,600	400 500	3,000 900	? ?	100 110	? ?	6,200 13,000	1,500 ?	70 4,100	300 ?	50 600	700 ?	1,600 600	600 ?	3,800 ?	620 ?	1,200 ?	?	690 ?	? ?	? ?	? ?	270 700	? ?	? ?	1,700 ?	350 1,900

Note : Symbols are the same as in Fig. 1.
 + Died of generalized tuberculosis before autopsy
 / Accident death before autopsy.

Fig. 6 Schematic representation of the degree of pathogenicity in guinea pigs of 16 colonies dissociated from a daughter strain of H₂ (No. 13 colony in Fig. 1) by single cell cultivation (The second step experiment)

(Intravenous inoculation test)

Colony No.	No. 13 Parent	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Size of inoculum (×10 ⁸)	190	20	13,000	13,000	650	700	35,000	300	390	220	190	170	320	450	5	150	9
Degree of involvement																	
Spleen weight (g)	2.0 7.5	1.5 2.5	1.1 1.5	1.6 9.5	2.0 2.3	1.0 2.0	2.0 3.7	2.0 2.0	0.9 2.0	4.0 1.5	1.0 1.5	? 1.0	1.8 1.5	2.0 1.5	1.5 1.5	2.0 2.0	1.2 1.2
Number of viable bacterial units recovered from the spleen (per 10 mg)	150 700	150 ?	? 77	42 5,200	310 620	0 3,600	2 1,200	250 320	48 55	6,800 1	1 38	? 0	23 141	23 14	0 1	7 1	0 0

Note: Symbols are the same as in Fig. 1.

+ Died of generalized tuberculosis before autopsy.

/ Accident death before autopsy.

Fig. 7 Schematic representation of the degree of pathogenicity in guinea pigs of 4 colonies dissociated from a grand-daughter strain of H₂ (No. 7 colony in Fig. 2) by single cell cultivation (The third step experiment)

(Intravenous inoculation test)

Colony No.	Original H ₂	1*	2	3	4
Size of inoculum (×10 ⁸)	180	25	64	26	39
Degree of involvement					
Spleen weight (g)	6.0 6.2	5.4 11.6	5.2 9.6	3.9 4.6	6.6 6.7
Number of viable bacterial units recovered from the spleen (per 10 mg)	1,200 51,000	74,000 6,000	1,800 7,000	31,000 2,100	4,200 2,400

Note: Symbols are the same as in Fig. 1.

* This dissociated colony was named H₂Rv.

(II) 解離された 2 株の属性

H₂Rv および H₂Ra の 2 株について, virulence, immunogenicity, 薬剤感受性等の属性を調べた。モルモットに対する 静脈内接種 (図 9, 10), 脳内接

種 (図 11, 表 4) および皮下接種 (図 12) の成績は, この 2 株の virulence が著しく相違すること, H₂Rv は祖先株 H₂ と同様に強毒であるが, H₂Ra は virulence がきわめて弱く, ほぼ H₃₇Ra に匹敵することを示している。また, 図 12 には, virulence の安定性をみるためにモルモット 1 回通過後の H₂Ra をさらにモルモットに接種した成績をも示したが, 通過前後において virulence に差があるとは思われない。もちろんこれはただ 1 回の動物通過にすぎないから, これのみをもつて virulence

Table 4 Comparative observation of survival days in two groups of guinea pigs infected intracerebrally with H₂Rv and H₂Ra

	Survival days									
H ₂ Rv	21	24	24	25	28	28	31	31	32	40
H ₂ Ra	40	63	S	S	S	S	S	S	S	S

S: Survived for 74 days.

Comparative observation of days to the onset of paralysis of the hinder leg of one side in two groups of guinea pigs infected intracerebrally with H₂Rv and H₂Ra

	Days to the onset of paralysis									
H ₂ Rv	18	18	18	21	21	21	21	21	25	None
H ₂ Ra	25	35	35	40	49	None	None	None	None	None

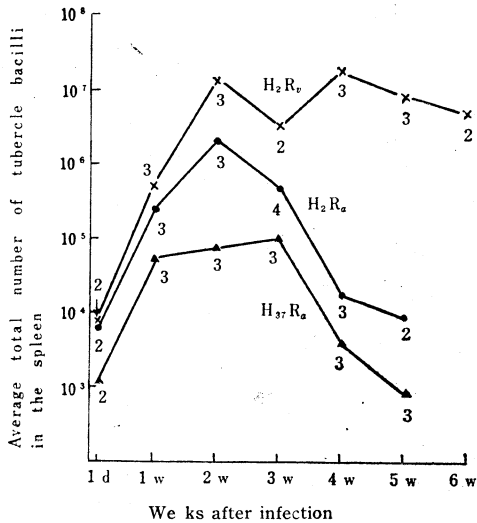
Fig. 8 Schematic representation of the degree of pathogenicity in guinea pigs of 30 colonies dissociated from a grand-daughter strain of H₂ (No. 13, 15 and 16 colony in Fig. 3) by single cell cultivation (The third step experiment) (Intravenous inoculation test)

Colony No.	From No. 13 in Fig. 3										From No. 15 in Fig. 3										From No. 16 in Fig. 3										
	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
Size of inoculum ($\times 10^4$)	10	22	16	6	4	7	2	56	28	42	4	37	16	59	9	11	16	23	36	26	1	9	22	15	40	4	2	6	9	16	
Degree of involvement																															
Spleen weight (g)	0.6	0.9	1.5	1.3	1.6	0.7	0.9	0.8	0.6	1.0	1.2	0.9	1.3	1.4	1.5	?	0.8	1.0	1.1	1.4	1.5	1.8	1.2	1.3	1.2	1.1	1.2	1.1	1.8	2.1	1.9
	0.9	2.1	1.4	1.6	0.7	0.9	0.5	1.6	1.1	1.8	1.0	1.1	0.8	1.6	1.2	1.6	1.5	1.7	1.1	1.0	1.0	1.0	1.7	1.8	0.6	1.4	1.6	1.4	1.6	1.9	1.3
Number of viable bacterial units recovered from the spleen (per 10 ^{mg})	23	100	140	360	310	30	51	30	370	150	18	140	310	110	?	40	180	190	240	310	290	30	190	90	130	59	70	650	150	230	
	18	350	120	130	120	36	25	550	210	210	80	180	230	600	230	230	510	370	130	100	10	180	320	110	230	24	110	270	660	30	

Note: Symbols are the same as in Fig. 1.

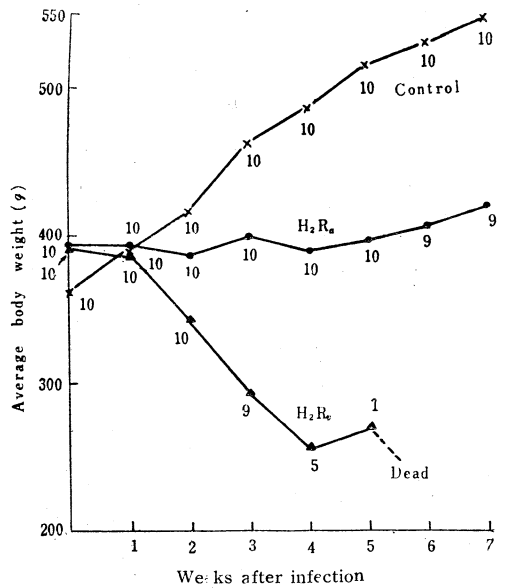
* This dissociated colony was named H₂Ra.

Fig. 9 Multiplication and survival of three strains of tubercle bacilli ($H_{37}Ra$, H_2Ra and H_2Rv) in guinea pigs after intravenous infection



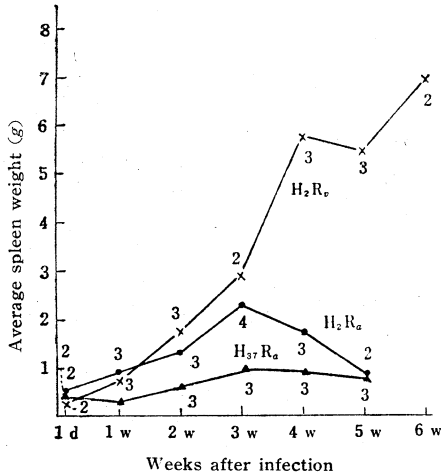
The number at each point in the figure indicates that of examined animals.

Fig. 11 Average body weight change of three groups of guinea pigs uninfected and infected intracerebrally with H_2Rv or H_2Ra



The number at each point indicates surviving animals.

Fig. 10 Change of average spleen weight of guinea pigs infected intravenously with $H_{37}Ra$, H_2Ra or H_2Rv



の安定性や復帰を云々するには不十分であることはいうまでもなく、そのためにはさらに時間と通過回数とを重ねる必要がある。

モルモットに対する免疫元性は表 5 および図 13 に示した。その成績によれば、 H_2Ra は、BCG および $H_{37}Ra$ と、全く免疫元性において差のないことを示している。

また、薬剤感受性は表 6 に示すごとくで、 H_2Rv , H_2Ra とともに、ほぼ同様な感受性 pattern を示し祖先株 H_2 のそれとほとんど変わっていない。このことは、

virulence における変異と薬剤感受性における変異とが、全く独立に起こりうることを示している。

(III) 長期間保存後の安定性

これら解離株の安定性を検討するために、小川培地に継代 1 年 6 カ月経過後、再びその属性について検討を加えた。すなわち、小川培地継代 41 代目の 10 日培養から菌液を作り、モルモット皮下に接種した。剖検所見は図 14 に示すごとくで、 H_2Rv は肉眼的病変ならびに分離菌数ともに H_2 祖先株とほとんど変りなく、依然強毒であり、これに対して H_2Ra はほとんど肉眼的病変を欠き、きわめて弱毒であった。

さらにこれらの菌株から、前述の方法を用いて、単個菌分離培養を行ない、Rv 系 20 コ、Ra 系 10 コの集落を用いて、それぞれ小川培地 1 代継代増菌後、モルモ

Table 5 Comparative observation of tuberculin reactions produced in three groups of guinea pigs infected subcutaneously with BCG, $H_{37}Ra$ or H_2Ra

Group	Size of reaction (diameter in mm)
BCG	18, 18, 20, 19, 21, 16, 17, 18, 18, 18
$H_{37}Ra$	19, 19, 18, 17, 15, 18, 15, 16, 20, 19
H_2Ra	21, 19, 21, 21, 21, 22, 21, 20, 19, 22

The test was conducted three weeks after infection. A 1:100 dilution of OT was injected intracutaneously in an amount of 0.1 cc and reading was done 24 hours after.

Fig. 12 Comparative observation of virulence of two strains of tubercle bacilli (H_2R_v and H_2R_a) by massive subcutaneous infection to guinea pigs

H_2R_v						
Spleen weight (g)		3.7	5.4	2.9	4.3	4.7
Culture		1,100	3,500	1,600	3,500	3,000
H_2R_a						
After animal passage						
Spleen weight (g)		1.7	1.4	1.0	1.3	1.1
Culture		1	11	23	8	5.7
No animal passage						
Spleen weight (g)		1.7	1.0	0.8	1.0	0.8
Culture		150	8	1	8	10

Culture indicates the number of recovered tubercle bacilli (v.u) from 10mg of the spleen.

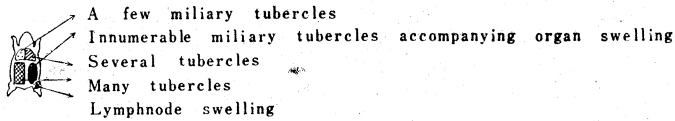


Fig. 13 Comparative observation of the immunogenicity of three strains of tubercle bacilli (BCG $H_{37}Ra$ and H_2Ra) against subsequent intravenous infection with virulent tubercle bacilli

	Immunized with																	
	BCG					$H_{37}Ra$					H_2Ra					Control		
Gross lesions																		
Spleen weight (g)	1.0	0.7	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.4	1.0	1.0	1.2	1.4	1.1	1.5	1.1	2.1	2.1	2.1
Viable bacterial units in 10 mg of the spleen	1	9	2	0	19	30	66	7	27	27	11	37	17	2	17	770	1,200	1,400
Viable bacterial units in 10 mg of the lung	16	0	0	4	0	0	23	1	0	0	0	1	0	1	0	37	120	210

Challenge infection was conducted three weeks after immunization. Symbols are the same as those in Fig. 3.

ット皮下に接種し、virulence の程度を調べた。成績は 図 15 に示すごとくである。すなわち、 H_2R_v 系の 20 株はいずれも相当高度の病変を呈し、脾からの分離菌数も多いが、 H_2Ra 系の10株ではいずれも病変はきわめて軽微で、かつ分離菌数もきわめて少なく、この両株の virulence にはきわめて著しい差のあることを示している。

この 2 つの実験からみると、 H_2R_v 、 H_2Ra は 1 年 6 カ月の継代保存にもかかわらず、それぞれの virule-

nce はきわめて安定に保持されていることが分かる。

さらにこれらの解離株について VM および KM 感受性を調べたところ表 7 のごとき成績を得た。すなわち、それぞれの親株ならびに H_2 祖先株とはほぼ相似た pattern を示すが、各 substrain を詳細に眺めると、それらの親株が薬剤感受性において種々程度を異にするものから構成されていることを示し、冒頭に述べた薬剤感受性に関する考察を再び確認することができた。

Table 6 Drug sensitivity test of three strains of tubercle bacilli (H₂, H₂Rv and H₂Ra)

Strain	Size of inoculum per slant	Drug concentration ($\mu\text{g per cc}$)									
		0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	
H ₂	19 × 10 ⁵ v.u.	S M	##	##	##	++	+	+	24	0	0
		I NH	##	5	4	4	1	0	0	0	0
		P A S	##	+	0	0	0	0	0	0	0
		K M	##	##	##	##	++	+	+	0	0
H ₂ Rv	27 × 10 ⁵ v.u.	S M	##	##	##	##	##	+	2	0	0
		I NH	##	7	7	4	2	4	2	1	0
		P A S	##	+	2	0	0	0	0	0	0
		K M	##	##	##	##	++	7	3	0	0
H ₂ Ra	13 × 10 ⁵ v.u.	S M	##	##	++	++	+	35	0	0	
		I NH	##	2	3	2	0	0	1	0	0
		P A S	##	0	0	0	0	0	0	0	0
		K M	##	##	++	+	20	0	0	0	0

Reading was made after 5 weeks' incubation at 37°C.

Confluent growth covering the entire surface of a slant

‡ Innumerable distinct colonies

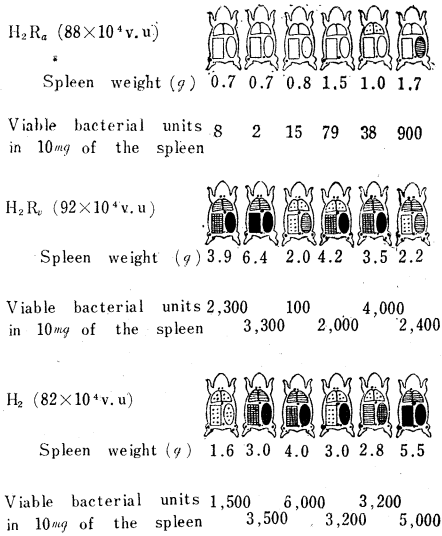
+ Over 100 colonies

Less colonies were indicated by num. er.

Table 7 Viomycin and Kanamycin sensitivity of strains obtained by single cell cultivation from H₂Ra and H₂Rv strains

Strain tested	Size of inoculum ($\times 10^3$)	VM concentration ($\mu\text{g per cc}$)					KM concentration ($\mu\text{g per cc}$)			
		0	2	5	10	20	0.5	1	2	4
H ₂	43	##	++	+	-	-	##	++	++	+
H ₂ Ra	34	##	++	-	-	-	##	+	+	-
a- 1	32	##	++	1	-	-	##	++	-	-
2	28	##	##	±	-	-	##	++	±	-
3	33	##	##	+	-	-	##	++	±	-
4	20	##	++	±	-	-	##	+	1.5	-
5	40	##	##	-	-	-	##	++	+	-
6	15	##	C	-	-	-	##	++	+	±
7	42	##	++	±	±	-	##	++	++	1.5
8	12	##	##	-	-	-	##	+	±	-
9	37	##	++	-	-	-	##	++	+	-
10	15	##	++	-	-	-	##	+	±	-
H ₂ Rv	33	##	++	-	-	-	##	++	+	-
v- 1	50	##	++	+	-	-	##	##	++	+
3	18	##	##	+	-	-	##	##	++	+
4	39	##	##	+	-	-	##	##	##	+
5	30	##	++	±	±	-	##	##	##	+
6	46	##	##	+	±	-	##	##	++	+
7	59	##	##	+	-	-	##	##	++	±
8	36	##	##	+	±	±	##	##	++	±
9	38	##	##	-	-	-	##	##	+	±
10	24	##	++	+	-	-	##	##	+	-
11	4.5	##	++	+	-	-	##	++	++	-
12	25	##	++	++	-	-	##	##	++	+
13	15	##	++	±	-	-	##	++	±	-
14	12	##	++	-	-	-	##	++	++	-
15	21	##	++	+	-	-	##	##	++	10
16	3.7	##	+	25	-	-	++	+	8	-
17	12	##	+	±	-	-	##	##	++	-
18	33	##	##	++	1	-	##	##	++	+
19	32	##	##	+	-	-	##	##	+	-
20	32	##	##	+	-	-	##	+	+	±

Fig. 14 Comparative observation of virulence of three strains of tubercle bacilli (H_2 , H_2R_v and H_2R_a) after one and half year subculture on Ogawa's medium



V 総 括

結核菌に常にみられる変異現象の機序の研究に対する単個菌分離培養法の有用性について述べた。

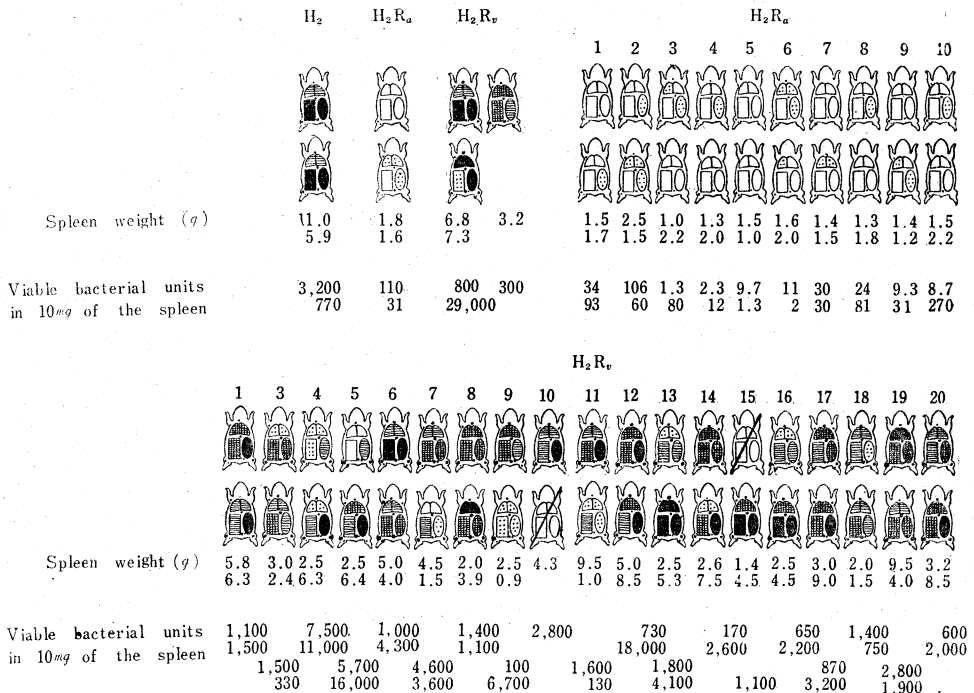
ここで取り上げたものは薬剤感受性と virulence とに関する属性に限つたが、われわれに既知の保存株が、そのいづれの属性に関してもけつして純粋な細菌細胞のみの集りから成り立つていないこと、ならびに、この方法によつて、純化の程度をさらに高めうることを示している。このことは、結核菌を含めて、細菌における変異現象を考察するうえにきわめて重要な知見である。

とくに virulence に関する変異追求のために行なわれた実験は、比較的安定な菌株と目されている人型菌 H_2 株でさえも、 R_v 型と R_a 型の細菌細胞から成り立つことを明瞭に示した。そして、これらの分離経過ならびに変異株の安定性は、結核菌株の virulence として示されるものが、それを構成する R_v 型と R_a 型の細菌細胞の混合比に帰着せしめられることを推測せしめる。

以上述べたごとく、結核菌の種々なる属性に関する変異現象の機序解明に対して、単個菌分離培養法は、菌になんらの障害を与えず、きわめて直接的なしかも有力な解答を示しうる研究方法といひうるであろう。

本研究は、国立予防衛生研究所結核部において、勝山茂、金井興美、高橋宏、小関勇一、佐藤直行諸博士によつて行なわれたことを記し、これら諸氏の長期にわたる尽力に対して感謝の意を表する。

Fig. 15 Schematic representation of the degree of pathogenicity in guinea pigs of 10 and 19 colonies dissociated from a daughter strain of each H_2R_a and H_2R_v by single cell cultivation



[追加] 牛場大蔵 (慶大細菌) 室橋氏の毒力の分析の御研究を興味深く聞いたが、分

離変異菌の安定性が population として復に戻ることの経過を今後も研究下さることを希望する。

1. 抗酸菌の変異と分類に関する問題

(2) ファージとツベルクリンを中心とした非定型抗酸菌の研究

九州大学医学部細菌学教室 武谷 健二
九州大学医学部結核研究所

近時、定型的結核菌以外の抗酸菌によつて人体に結核様病変を起こした例が多数報告されるにいたり、これらは一括して非定型抗酸菌と総称され、その性状は内外の研究者によつて検討されつつある。

非定型抗酸菌の示す諸性状のうち、ファージ感受性およびツベルクリン反応特異性は主要な性質であるにもかかわらず、従来詳細な報告が少ないので、これらの性状を中心として現在まで得られた成績を報告する。

I 使用菌株

使用菌株はいずれも総合研究「抗酸菌の変異と分類」班において、蒐集、保存されているものである。米国由来の菌株としては、scotochromogen 1 株 (No. 6), photochromogen 5 株 (Bostrum D-35, Forbes 85, Myc. Kansaii, No. 8, No. 22), nonchromogen 3 株 (100616, 121326, No. 7) 計 9 株を用いた。このうち Bostrum と Myc. Kansaii は同一スタムから出たものともいわれる。国内分離株は松本、石井、大久保、渡辺、三池、富田、蒲生、新倉、甲府、上田、二宮、永田、竹下、泉および山本の 15 株であつて、培養性状からみて松本から三池までの 5 株は scotochromogen に、蒲生から上田までの 4 株は nonchromogen に、山本はむしろ rapid grower に相当すると考えられる。富田は他の scotochromogen とはやや異なるがここではかりに scotochromogen に入れておく。上田および甲府については photochromogen ではないかという考え (今野・私信) もあるが少なくともわれわれの保存している株について調べた結果では nonchromogen に入れるほうが妥当であろうと考えられ、この考えはあとに述べるツベルクリン特異性およびファージ感受性についての成績とも一致しているのでここでは nonchromogen に入れておく。このように photochromogen に属する菌が国内分離株中に見当たらないことは興味深い。二宮から泉までの 4 株は培養性状からは非定型抗酸菌のいずれの群にも分類しがたく、薬剤感受性、その他の性状からヒト型菌を疑われている菌株である。

このほか、野犬から分離された抗酸菌 13 株 (直方 23, 直方 70, 直方 79, 粕屋 13, 粕屋 23, 三瀧 21-1, 福

岡 8, 福岡 14, 粕屋 24, 三瀧 21-2, 浮羽 1, 屋形原 3, 自衛隊 97) をも実験に用いた。諸種性状から直方 23 から福岡 14 までの 8 株はヒト型を疑われ、粕屋 24 から自衛隊 97 までの 5 株は非定型抗酸菌に類似するものではないかと考えられているものである。

対照としては、ヒト型菌 H₃₇Rv 株、トリ型菌 A 71 株、3717 株、Myc. fortuitum およびスメグマ菌などを使用した。

II ファージ感受性

われわれは先に結核菌を含む、抗酸菌を溶菌する A, B および C 群 12 株のファージを分離し、それぞれのファージについての溶菌スペクトルを詳細に検討し、その成績はすでに報告した。その結果トリ型菌および非病原性抗酸菌の一部を除いて、他の多くの抗酸菌はわれわれのファージのいずれかによつて溶菌されることを知り、腸内細菌やブドウ球菌の場合のように抗酸菌においてもファージ感受性による分類の可能性のあることを示唆した。最近、抗酸菌ファージの分離は国内の多数の研究室で行なわれるにいたり、道家および多賀、室橋および徳永は非定型抗酸菌を溶菌するファージについて報告している。今回は分離ファージ 12 株中特異の溶菌スペクトルをもつもの数株 (A-4, A-5, A-6, B-1, C-3) を用い、上記非定型抗酸菌について検討した結果を述べる。

ファージに対する感受性の有無は、小川培地およびグリセリン寒天培地を用い、半流動グリセリン寒天に混じて接種した菌に対して、ファージ液をスポットするいわゆる「スポット法」によつて調べた。

非定型抗酸菌は小川培地を用いた場合にはファージ感受性を示さないものが多かつたが、グリセリン寒天を用いた場合には大部分がいずれかのファージによつて溶菌されることを知つた。ここではグリセリン寒天培地上での感受性試験の成績を主として述べる。このように、培地によつてファージ感受性に相違をきたす原因としては、培地中のファージ吸着促進物質あるいは阻止物質の存在を考慮しなければならないが、この場合はおそらく、培地による菌体表面の性状の変化が主因ではないかと考えている。

ヒト型を疑われていた菌株はいずれも小川培地上で B-1 によつて溶菌され、まれに C-3 に弱い感受性を示すほかは他のフェージに溶けずヒト型菌特有のフェージ感受性パターンを示した。photochromogen は B-1 にすべて感受性をもち、大部分は C-3 にも溶菌される。A-4 および A-5 には感受性を示さぬが、A-6 に対しては弱い感受性を示すものがあつた。nonchromogen に属する菌株は A-4, A-5, B-1 に感受性がなく、ほとんどすべて C-3 に感受性を示し、A-6 に対する感受性はまぢまぢであつた。scotochromogen に属する菌株は A-4, A-5 に感受性がなく、ほとんどすべて C-3 に感受性を示し、B-1 および A-6 に対する感受性はまぢまぢであつた。

以上のフェージ感受性についての成績を総括すると表 1 のようになる。非定型抗酸菌はほとんどすべて C-3 に感受性を示す点でヒト、ウシ、トリ型結核菌とは区別が可能であろう。また nonchromogen は B-1 に感受性を示さぬ点に特徴があり、photochromogen はすべて B-1 に感受性を示す点に特徴がある。photochromogen はあとに述べるようにツベルクリン反応特異性においてヒト型にかなり類似する点があるが、ヒト型と同様 B-1 に感受性をもちつことは興味深い。

以上のように、フェージ感受性試験は非定型抗酸菌の鑑別ないし分類にある程度有用であると考えられる。しかし、なお用いた菌株の数も少なく、得られた結果もそれほど明確とはいへない点もある。また、実用化するためには他の菌の場合と同様 RTD を決めることも必要であろう。今後さらに被検菌株の数を増し、またフェージの種類もふやして、研究をすすめることによつて、フェージによる鑑別および分類の実用化が期待される。

表 1 フェージ感受性のまとめ

	A-4	A-5	A-6	B-1	C-3
ヒト型	-	-	-	##	-
ウシ型	-	-	-	##	-
トリ型	-	-	-	-	-~±
Photo.	-	-	-~+	##	+
Non.	-	-	-~##	-	##
Scoto.	-	-	-~##	-~##	##
Saprophytes	-~##	-~##	-~##	-~##	-~##

III ツベルクリン反応特異性

免疫学的性状の 1 つとしてのツベルクリン反応特異性は古くから菌型の鑑別その他に用いられている。菌の示す諸性状のうち、培養性状、薬剤感受性、毒力、その他物質代謝に関する性質などは種々の要因で変化を受けやすいが、ツベルクリン反応特異性はきわめて変化しにくいと考えられる。たとえば、BCG と毒力ウシ型菌、H₃₇Rv

と H₃₇Ra、あるいは薬剤耐性菌と感受性菌とはツベルクリン反応によつて区別できにくいことは周知の事実である。また、先にわれわれが報告したように、トリ型菌の S 型株と R 型変異株とでもツベルクリン反応の特異性に差異はない。このように、抗酸菌の同定、分類にはツベルクリン反応特異性をもつとも安定した物指しの 1 つであると考えられる。

しかし、ツベルクリン反応は生体の示すアレルギー性反応であつて、in vitro の免疫反応ほどの厳密さを欠くうらみがある。比較的正確な結果を得るためには、まず抗原として用いるツベルクリン液をできるだけ均一の力価にすることが望まれる。あとに述べるように、菌株によつて培養濾液中に産生されるツ活性蛋白の量の変動は著しく、単に菌の培養濾液を反応液として用いることは意味が少くない。また、それぞれ、特異性の異なつた菌株のツベルクリンの力価を皮内反応によつてあわせることは原理的にも不可能に近い。このため、培養濾液中のツベルクリン活性蛋白を精製し、その一定量をツベルクリン反応抗原として用いることが試みられている。PPD はその 1 例であるがツベルクリン活性蛋白には A, B および C の 3 種があり、その培養濾液中に含まれる量的比は菌株により異なり、しかもそれぞれの蛋白の単位重量当りの活性は異なることが知られている。したがつて、PPD の一定量をもつても、なお均一の力価の抗原を用いたことにはならない。一方、われわれのツベルクリン精製蛋白 π は C 蛋白質のみを成分とするものであつて、単位蛋白量当りの力価はほぼ一定と考えられる。この意味で非定型抗酸菌の各菌株および対照菌株からそれぞれ π を精製し、これを用いて各菌株感作モルモットについて、交叉皮内反応を行ないツベルクリン反応特異性を調べた。

米国由来株についての成績はすでに一部報告したが、photochromogen 群および nonchromogen 群のそれぞれの群内の各菌株はその群に共通の抗原性をもつており、明らかに 2 つの群に分けられる。nonchromogen 群の示す特異性はトリ型菌のそれにきわめて類似している。また非定型抗酸菌はいずれの群の菌株もヒト型菌とある程度共通の抗原性をもつており、なかでも photochromogen 群がもつとも近縁と考えられる。scotochromogen 群の特異性は nonchromogen 群にかなり似たものが多い。米国株、国内株を通じて、π の収量は photochromogen 群はヒト型菌と同程度で培養濾液 1 l 当り数百 mg の多量であるが、nonchromogen 群はいずれも 100 mg 以下の少量であり、scotochromogen 群は菌株により多少さまざまであつた。

国内ヒト分離株および野犬分離株中、ヒト型菌を疑われていた菌株は π の収量が多く、明らかにヒト型菌としてのツベルクリン反応特異性を示し、他の性状と考えあわせてヒト型菌ないしはその変異株と断定して誤りな

いと考えられる。国内分離株のうち nonchromogen に属すると考えられる菌株は米国由来の標準菌株と同様のツベルクリン反応特異性を示した。また、国内分離株中 scotochromogen に属すると考えられる菌株のうち石井、大久保、渡辺、松本は米国由来株 No. 6 と同様のツベルクリン反応特異性を示した。しかし、富田はむしろ nonchromogen 類似の特異性を示し、三池は独自のツベルクリン反応特異性を示して、他の scotochromogen 株と区別された。なお、Myc. fortuitum は Bostrum その他の photochromogen 群にきわめて類似のツベルクリン反応特異性を示すことが明らかになったことは興味深い。山本株はツベルクリン反応において、いずれの群とも全く関係のない特異性を示し、発育の早いことから rapid grower に入るものではないかと考えられる。

野犬分離株中 nonchromogen に属するのではないかと考えられた菌株はいずれもツベルクリン反応において米国由来標準株と同様の特異性を示し、nonchromogen 群に属するものとして誤りないものと考えられる。

π によるツベルクリン反応特異性の成績をまとめたのが表2である。すなわち、非定型抗酸菌は3群ともすべてある程度ヒト型と共通のツベルクリン反応特異性をもつが、とくに photochromogen 群がヒト型に似ており、nonchromogen 群はトリ型とほとんど区別できない特異性を示し、一方、scotochromogen 群は nonchromogen 群とかなり似ている。また、Myc. fortuitum と photochromogen 群とはツベルクリン反応ではほとんど区別できない。ツベルクリン反応特異性試験からそれぞれの群に属すると考えられる国内分離株および野犬分離株の各菌株を表の下段にそれぞれ示した。

IV ま と め

以上、われわれの分離したフェージに対する感受性お

表 2 π によるツベルクリン反応特異性のまとめ

Classified Mycobacteria	Human type		Bovine type		Avian type	
	↓		↓		↓	
Unclassified Mycobacteria	↓		↓		↓	
	↓		↓		↓	
Strains isolated in Japan	from human	永田 二宮 竹下 泉	ナシ	蒲生 甲府 新倉 上田	有久保 松本 渡辺 三池	松本 三池
	from dog	梶13 # 23 福8 直23 # 14 :21-1	ナシ	梶24 :21-2 浮1 屋3		

— ほとんど区別できない — かなり似ている
 ※ 独自の特異性をもつ

よび精製ツベルクリン蛋白 π を用いた ツベルクリン反応特異性の両面から、内外の非定型抗酸菌および野犬分離抗酸菌の研究を行なった結果について報告した。フェージ感受性については非定型抗酸菌の鑑別および分類に寄与すると考えられる 2, 3 の知見が得られ、かなり希望がもてるが、その実用化にはなお今後の研究が必要と思われる。一方、ツベルクリン反応特異性によつては、かなり明確な成績が得られたが、なかでも野犬分離抗酸菌中他の各種性状から nonchromogen を疑われていた菌株が明らかに nonchromogen 群に属するものと結論しうる成績が得られたことは、この群の菌の起源ないし ecology を考えるうえに興味深いものと思われる。また scotochromogen 群と一括されている菌株中にもツベルクリン反応特異性の面からは異なつた菌株が含まれていることが明らかになったことも、この菌群についての今後の研究に1つの手がかりを与えるものであろう。

本研究は教室の森良一、渡辺京子、福岡県衛生研究所武原雄平の諸氏との協同研究の一部である。

1. 抗酸菌の変異と分類に関する問題

(3) 自然界抗酸菌と非定型抗酸菌

広島大学医学部細菌学教室 占 部 薫

いわゆる非定型抗酸菌（以下 AM と略す）の本態ないし分類学的位置に関しては、いまだほとんど分かっていないといつてよいであろう。

そこで、私は仮に、人体材料たとえば喀痰、流血、髄液、臓器などより分離される抗酸菌のうち起病的ないし病原的に働いたと思われるようなものを、とくに“狭義”の AM とよび、その起病性のはつきりしないかまたは起病的に働いたとは思われないようなものを“広義”の AM とよんで、これらと自然界の材料たとえば土や、下水などから分離されたいわゆる自然界ないし雑菌性抗酸菌（以下 SM と略す）ならびに各型結核菌との異同または関連性について種々の面から追究してみたので、今回は主としてその結果得られた成績について以下述べる。

I 供試抗酸菌株

1. 人型結核菌株：6 株—Frankfurt 株, H₃₇Rv 株, H₂ 株, 青山 B 株, 安 α 株。
2. 牛型結核菌：6 株—三輪株, 大宮牛株, 三宮株,

263 株, 418—2 株, BCG 株。

3. 鳥型菌（非変異株）：6 株—4121 株, 3717 株, 62 株, 4110 株, Flamingo 株, 獣疫株。

4. 非定型抗酸菌（AM）：計 98 株。

a) 狭義 AM（起病性+）：23 株—喀痰（切除肺）系 19 株, 髄液系 2 株, 結核腫系 1 株, リンパ腺系 1 株。一文部省科研費「抗酸菌の変異と分類」総合研究班の標準株 18 株に Runyon より直接分与を受けた菌株ならびに教室で分離保存のものを加えた。

b) 広義 AM（起病性?）：75 株—喀痰系 54 株, 切除肺系 4 株, 流血系 14 株, 内臓系 3 株。

5. 自然界（雑菌性）抗酸菌：83 株—スズメ α 菌 3 株, チモテー菌 2 株, 植物系 1 株, 蛙系 1 株, 上水系 4 株, 下水系 10 株, 土系 62 株。

ただし、以下の各実験に毎常これらの菌株のすべてを供試したわけではない。

II 実験ないし観察成績

1. 集落の色素産生性（光発色性）（表 1）

表 1 集落の色素産生（光発色）性

供試抗酸菌		株数	Photochrom. I (Runyon)	Scotochrom. II (%)	Nonphotochr. III (%)
非定型菌	狭義菌(起病性+)	22	4 (18%)	8 (36%)	10 (46%)
	広義菌(% ?)	22	0	13 (59%)	9 (41%)
	計	44	4 (9%)	21 (48%)	19 (43%)
自然界菌		31	0	9 (29%)	23 (71%)

表 1 のように、Photochromogens は狭義 AM に 18% あっただけで広義 AM および SM には皆無であった。そして狭義 AM では Nonphoto. が、広義 AM では Scotochr. が、また SM では Nonphoto. がそれぞれもつとも多かつた。

なお、狭義 AM と広義 AM とを合わせた AM 群では Scotochr. がもつとも多かつたのに対して SM 群では Nonphoto. が圧倒的に多く、この点 AM 群と SM 群との間に一応差がみられたといつてよからう。ただし、AM 群にあつても、SM 群に多い Nonphoto. が必ずしも少なくはなかつたということも他方では留意されるべき所見と考えられる。

2. 累代培養時の集落初発所要日数（表 2）

表 2 のように SM では全株 3 日以内であつたが、AM では全体としても、またことに狭義 AM ではそれよりも遅れるものが相当数あつた。ただし AM 群にも SM なみに 3 日以内の菌株が 59% にみられた。このような所見は結核菌とは著しく相違するところといえよう。

3. 普通寒天培地上発育可能株の頻度（表 3）

Agar-agar 上に SM は全株発育可能であつたのに対して AM では狭義菌は 20% しか発育しえなかつたが広義菌を含めての全体としては 65% が発育した。

4. Eosin-methylene blue 培地上発育可能株の頻度

表2 累代培養時の集落初発所要日数 (10^{-1} mg, 岡・片倉培地上移植)

供試抗酸菌		株数	< 3日	< 7日	> 7日
非定型菌	狭義(起病性+)	19	3 (16%)	14 (74%)	2 (11%)
	広義(??)	22	21 (96%)	1 (5%)	0
	計	41	24 (59%)	15 (37%)	2 (5%)
自然界菌		30	30(100%)	0	0

表3 普通寒天培地上発育可能株の頻度の比較

供試抗酸菌		株数	発育可能株
非定型菌	狭義(起病性+)	10	2 (20%)
	広義(??)	21	18 (86%)
	計	31	20 (65%)
自然界菌		31	31 (100%)

表4 Eosin-methylene blue 培地上
発育可能株の頻度の比較

供試抗酸菌		株数	発育可能株
非定型菌	狭義(起病性+)	22	1 (5%)
	広義(??)	22	20 (91%)
	計	44	21 (48%)
自然界菌		30	30 (100%)

(表4)

SMでは100%であつたが狭義AMではわずかに5%にすぎず、AM全体としても半数たらずの48%にすぎなかつた。

5. Sorbit-NH₄Cl 培液 (Lebek) における発育可能株の頻度 (表5)

Lebek (Zbl.Bakt., IAbt., Orig., 174, 265, 1959) 培液に37°C, 3週後に発育したものは各型結核菌では皆無であり、AM群ではわずかに14%にすぎなかつたのに反してSM群では23株中22株(96%)に

表5 Sorbit-NH₄Cl 培液 (Lebek) に
発育可能株の頻度の比較
(37°C, 3週培養)

供試抗酸菌		株数	発育可能株
結核菌	人型	6	0
	牛型	6	0
	鳥型	6	0
非定型菌	狭義(起病性+)	22	3 (14%)
	広義(??)	21	3 (14%)
	計	43	6 (14%)
自然界菌		23	22 (96%)

まで達した。

この所見はSM群と結核菌群ならびにAM群との間に画然とした差異のあることを示すものといえよう。

6. 発育pH域 (表6)

pH5に発育しうるものは人型菌にはなかつたが、AM群とSM群とはそれぞれ61%および58%あり、この点ではAM, SM両群間に大差なかつた。ところがpH9に発育するものはSM群では100%であつたのに反してAM群では48%にすぎず、とくに狭義AMではわずかに20%しかなくこの点でもSM群とかなりの開きのあることが分かつた。

表6 発育pH域の比較

供試抗酸菌		株数	発育可能	
			pH5	pH9
人型結核菌		3	0	0
非定型菌	狭義(起病性+)	10	6 (60%)	2 (20%)
	広義(??)	21	13 (62%)	13 (62%)
	計	31	19 (61%)	15 (48%)
自然界菌		31	18 (58%)	31 (100%)

7. 発育温度域 (表7)

20°Cで発育しうる菌株の頻度は鳥型菌、AM群およびSM群のいずれも甚しく高率であつてこの点これら3菌群間に大差はみられなかつたが、40°Cでなお豊富に発育しうるものの頻度はSM群では94%の高率であつたのに反してAM群では39%にすぎず、この点でもこれら両菌群間にかなりの差のあることが分かつた。

表7 発育温度域の比較

供試抗酸菌		株数	20°C	40°C
			発育可能	発育豊富
結核菌	人型	2	0	0
	牛型	2	0	0
	鳥型	2	2	1
非定型菌	狭義(起病性+)	22	20 (91%)	7 (32%)
	広義(??)	22	21 (96%)	10 (46%)
	計	44	41 (93%)	17 (39%)
自然界菌		31	31 (100%)	29 (94%)

8. 5%食塩に対する抵抗性(表8)

5%食塩添加卵培地に発育可能な菌株は人・牛型菌にはなく鳥型菌では2株中1株であり、またAM群では60%であつたのに対してSM群では31菌株全株であつた。

表8 5%食塩に対する抵抗性の比較

供試抗酸菌			株数	5%食塩添加培地に発育可能株
結核菌	人型		2	0
	牛型		2	0
	鳥型		2	1
非定型菌	狭義(起病性+)		19	10(53%)
	広義(???)		21	14(67%)
	計		40	24(60%)
	自然界菌		31	31(100%)

9. 20%グリセリンに対する抵抗性(表9)

20%グリセリン添加卵培地にかなりよく発育しうる菌株はSM群では58%の高率を示したが、AM群では19%にすぎず、この点でもまた両菌群間にかなりの差がみられた。

表9 20%グリセリンに対する抵抗性の比較

供試抗酸菌		株数	20%グリセリン添加培地に発育良好菌株
結核菌(人型)		2	0
非定型菌	狭義(起病性+)	10	3(30%)
	広義(???)	21	3(14%)
	計	31	6(19%)
自然界菌		31	18(58%)

10. 1% Desoxycholic acid に対する抵抗性(表10)

1%の割合にDesoxycholic acidを加えた卵培地によくたえて発育しうる菌株はSM群では30株全部であつたのに対してAM群全体としては57%にすぎ

ず、とくに狭義AMではわずかに23%しかなく、SM群とは格段の差がみられた。なお、結核菌では鳥型菌のみが2株ともたえたが人・牛両型菌はすべて発育しえなかつた。

表10 1% Desoxycholic acid に対する抵抗性の比較

供試抗酸菌			株数	1%デゾキシコール酸添加培地に発育可能菌株
結核菌	人型		2	0
	牛型		2	0
	鳥型		2	2
非定型菌	狭義(起病性+)		22	5(23%)
	広義(???)		22	20(91%)
	計		44	25(57%)
	自然界菌		30	30(100%)

11. グラチン液化能、テルリット還元能および硫化水素産生能(表11)

グラチンの液化能は各型結核菌では全株陰性であつたが、SM群でも19%しか陽性でなく、これはAM群の11%陽性との間に大差はなかつた。

0.1%テルル酸カリ加グリセリン寒天上におけるテルリット還元作用は、結核菌では各型ともすべて陰性であり狭義AMでは41%が陽性であつたのに対して広義AMでは96%に、またSM群では100%に陽性であつた。

0.1%鉛糖加グリセリン寒天上における硫化水素産生能は、人・牛両型菌では陰性であつたが鳥型菌は2株とも陽性であり、SM群でも93%の高率において陽性を示したのに対してAM群全体としては71%が、また狭義AMでは59%がそれぞれ陽性であつた。

12. パルオキシダーゼ陽性株の頻度(表12)

パルオキシダーゼは結核菌では各型とも全株が、また狭義AMでは70%もがそれぞれ陽性であつたのに対して広義AMではわずかに10%が、またSM群では

表11 グラチン液化能、テルリット還元能および硫化水素産生能の比較

供試抗酸菌			株数	グラチン液化性株	テルル酸カリ還元性株	硫化水素産生性株
結核菌	人型		2	0	0	0
	牛型		2	0	0	0
	鳥型		2	0	1	2
非定型菌	狭義(起病性+)		22	2(9%)	9(41%)	13(59%)
	広義(???)		22	3(14%)	21(96%)	18(82%)
	計		44	5(11%)	30(68%)	31(71%)
	自然界菌		31	6(19%)	31(100%)	28(93%)

表 12 ペルオキシダーゼ陽性菌株の頻度の比較

供 試 抗 酸 菌			株数	ペルオキシダーゼ 陽 性 菌 株
結 核 菌	人	型	3	3
	牛	型	2	2
	鳥	型	2	2
非 定 型 菌	狭義 (起病性+)		10	7 (70%)
	広義 (?)		21	2 (10%)
	計		31	9 (29%)
自 然 界 菌			31	9 (29%)

29%がそれぞれ陽性にすぎなかつた。

13. Niacin test 陽性株の頻度 (表 13)

これは人型菌では 100%であつたが、その他にも牛型菌および狭義 AM が各 20%, 広義 AM が 13% ならびに SM でも 3% であつたこと、とくに人型菌の 43%にみられた卍程度の反応度を示すものが牛型菌に 10%, 狭義 AM に 20%および広義 AM に 0.4%に存在したことは、この反応が必ずしも人型菌に独特なものとはいえないことを示唆するものと考えられ注目し値するところといえよう。

14. 有機酸の利用能 (表 14)

表 13 Niacin test 陽 性 株 の 頻 度 の 比 較

供 試 抗 酸 菌				株 数	Niacin test 所 見				
					+	陽			性
						+	++	卍	
結 核 菌	人	型	7		3	1	3 (43%)	7 (100%)	
	牛	型	10			1	1 (10%)	2 (20%)	
	鳥	型	11	5				0	
非 定 型 菌	狭 義 (起 病 性 +)		10				2 (20%)	2 (20%)	
	広 義 (?)		24	1	2		1 (0.4%)	3 (13%)	
	計		34	1	2		3 (0.9%)	5 (15%)	
自 然 界 菌			31	1	1			1 (3%)	

Sod. succinate の利用：結核菌では鳥型菌の 2 株中 1 株が陽性のみで他はすべて陰性であり、狭義 AM ではわずかに 9% が陽性にすぎなかつたが、広義 AM では 86% 陽性のため結局 AM 群全体としては 48% 陽性ということになつたのに対して SM 群では 100% 陽

性であつた。したがつて狭義 AM と SM との間にはこの点でもまた著しい差異のあることが分かつた。

Sod. citrate の利用：結核菌および狭義 AM はすべて陰性であつたが、AM 群全体としては 30% が陽性であつたのに対して SM 群では 80% が陽性であつた。こ

表 14 有 機 酸 に 対 す る 利 用 能 の 比 較

供 試 抗 酸 菌				株 数	利 用 陽 性	
					Sod. succinate	Sod. citrate
結 核 菌	人	型	2	0	0	
	牛	型	2	0	0	
	鳥	型	2	1	0	
非 定 型 菌	狭 義 (起 病 性 +)		22	2 (9%)	0	
	広 義 (?)		22	19 (86%)	13 (59%)	
	計		44	21 (48%)	13 (30%)	
自 然 界 菌			30	30 (100%)	24 (80%)	

備考：Sod. acetate, Sod. pyruvate, Sod. lactate, Sod. tartate, Sod. oxalate, Sod. benzoate および Sod. propionate の利用相には各菌間に系統的差を求めがたい。

表 16 解糖能による群別

供試抗酸菌		菌 株 数	解 糖	-		
				A 群	B 群	C 群
				グルコースのみ +	グルコースほか +	
結核菌	人型	5	3 (60 %)	2 (40 %)	0	
	牛型	6	4 (60 %)	2 (33 %)	0	
	鳥型	7	7 (100 %)	0	0	
非定型菌	狭義 (起病性 +)	23	8 (35 %)	11 (48 %)	4 (17 %)	
	広義 (?)	75	6 (8 %)	16 (21 %)	53 (71 %)	
	計	98	14 (14 %)	27 (28 %)	57 (72 %)	
自 然 界 菌		83	0	3 (4 %)	80 (96 %)	

表 17 400 mg/cc の菌液で溶血陽性の菌株の比較

供 試 抗 酸 菌		株数	溶血陽性株
結核菌	人型	6	6 (100 %)
	牛型	6	6 (100 %)
	鳥型	6	4 (67 %)
非定型菌	狭義 (起病性 +)	5	4 (80 %)
	広義 (?)	13	3 (30 %)
	計	15	7 (47 %)
自 然 界 菌		12	3 (25 %)

18 のように両菌株は光発色性のみならず発育能、発育温度域、ならびに食塩、グリセリンおよび胆汁酸に対する抵抗力その他生化学的諸活性の点でほとんど一致していることが分かった。ただ pH 5 での発育の能否の点でのみ少しく違うようであった。

その 2 : 皮膚の慢性潰瘍の病原菌とされた M. balnei (狭義 AM) と前出その 1 に供試した広義 AM の大倉株とを比較してみると、表 19 のように 40°C での発育の能否、1%胆汁酸に対する抵抗力、ガラチン液化およびナイアシン試験成績以外の多くの所見においてこれら両菌株間にも近似ないし一致がみられた。

表 18 非定型抗酸菌の狭義菌と広義菌との近似例 (その 1)

非 定 型 菌	菌 株 名	分 離 材 料	光 発 色 性	発 育 能		発 育 域		抵 抗 性		※ 解糖による群別	ゲラチン液化	テルリット還元	硫化水素産生	ベルオキシダーゼ	ナイアシン試験	有 機 酸		
				卵培地	普通寒天	pH	温 度 (°C)	>5 % 食塩	20 % グリセリン							1 % 胆汁酸	コハク酸	クエン酸
狭 義	No. 1	喀痰	Scoto.	- -	三日以内	- -	III ±	- - ±	V	-	-	+	+	-	-	-	-	
広 義	大 倉	喀痰	Scoto.	- -	三日以内	+ -	III +	- - +	V	-	-	+	+	-	-	-	-	

注 ; × 印は不一致性状, ※ 印は表 15 参照。

19. 非定型抗酸菌 (狭義) と鳥型菌との近似例 (表 20)

偽性結核性髄膜炎患者の髄液よりその病原菌として分離された佐世保 I 株 (狭義 AM) は鳥型菌 3717 (Kirchberg) 株と、表 20 でみられるように、卵培地における発育所要日数、>5%食塩に対する抵抗力およびベルオキシダーゼ活性以外の多くの性状においてきわめて近似していた。

20. 非定型抗酸菌 (狭義) と自然界抗酸菌との近似例

(表 21)

潰瘍の原因菌と目されている M. fortuitum (狭義 AM) と土より分離された I B 株 (SM) とは、表 21 で分かるように、ただ解糖能の点を除いてほとんど完全に一致する諸性状を示すきわめて近似の菌株であることが検知できた。注目に値する所見といつてよからう。

21. 非定型抗酸菌 (広義) と自然界抗酸菌との近似例

(表 22)

表 19 非定型抗酸菌の狭義菌と広義菌との近似例 (その 2)

非 定 型 菌	菌 株 名	分 離 材 料	光 発 色 性	発 育 能 卵 レ ベ ッ ク 培 地 普 通 寒 天	発 育 可 能 域		抵 抗 性			※ 解 糖 に よ る 群 別	ゲ ラ チ ン 液 化	テ ル リ ッ ト 還 元	硫 化 水 素 産 生	ペ ル オ キ シ ダ ー ゼ	ナ イ ア シ ン 試 験	有 機 酸 用	
					pH	温 度 (°C)	>5 % 食 塩	20 % グリ セリ ン	1 % 胆 汁 酸							コ ハ ク 酸	ク エ ン 酸
狭 義	M. balnei	膿	Photo- chr.	- - 三 日 以 内	+ -	卅 - ×	- - - ×	- - - ×	V	+ ×	-	卅	卅	+ ×	- -	- -	
広 義	大 倉	喀 痰	Scoto- chr.	- - 三 日 以 内	+ -	卅 + ×	- - + ×	- - + ×	V	- ×	-	+	+	- ×	- -	- -	

注：× 印は不一致性状，※ 印は表15参照。

表 20 非定型抗酸菌 (狭義) と鳥型菌との近似例

抗 酸 菌	菌 株 名	分 離 材 料	光 発 色 性	発 育 能 卵 レ ベ ッ ク 培 地 ※ E M B 培 地	発 育 可 能 域		抵 抗 性			ゲ ラ チ ン 液 化	テ ル リ ッ ト 還 元	硫 化 水 素 産 生	ペ ル オ キ シ ダ ー ゼ	ナ イ ア シ ン 試 験	有 機 酸 用	
					温 度 域 (°C)	20 40	> 5 % 食 塩	1 % 胆 汁 酸	コ ハ ク 酸						ク エ ン 酸	
																20 40
非 定 型 菌 (狭 義)	佐世保 I	髄 液	Non- photo.	- - 三 日 以 内 ×	卅 +	+ 卅 ×	+ 卅	+ 卅	卅	卅	- ×	-	-	-	-	
鳥 型 菌	3717 (Kir- chberg)		Non- photo.	- - 七 日 以 上 ×	卅 卅	- 卅 ×	- 卅	- 卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-

注：× 印は不一致性状，※印は Eosin-methylene blue 培地。

表 21 非定型抗酸菌 (狭義) と自然界抗酸菌との近似例

抗 酸 菌	菌 株 名	分 離 材 料	光 発 色 性	発 育 能 卵 レ ベ ッ ク 培 地 ※ E M B 培 地	発 育 可 能 域		抵 抗 性			△ 解 糖 に よ る 群 別	ゲ ラ チ ン 液 化	テ ル リ ッ ト 還 元	硫 化 水 素 産 生	ペ ル オ キ シ ダ ー ゼ	ナ イ ア シ ン 試 験	有 機 酸 用	
					pH	温 度 (°C)	>5 % 食 塩	20 % グリ セリ ン	1 % 胆 汁 酸							コ ハ ク 酸	ク エ ン 酸
非 定 型 菌 (狭 義)	Myc. fortui- tum	膿 瘍	Non- photo.	+ - 三 日 以 内	+ +	卅 卅	+ + +	+ + +	IV ×	- ×	卅	卅	-	-	卅 卅		
自 然 界 菌	I B	土	Non- photo.	+ + 三 日 以 内	+ +	卅 卅	+ + +	+ + +	I ×	+	卅	+	-	-	卅 卅		

注：× 印は不一致性状，※ 印は Eosin-methylene blue 培地，△ 印は表 15 参照。

表 22 非定型抗酸菌（広義）と自然界抗酸菌との近似例

抗 酸 菌	菌 株 名	分 離 材 料	光 発 色 性	発 育 能		発 育 可 能 域		抵 抗 性		△ 解糖による群別	ゲ ラ チ ン 液 化	テ ル リ ット 還 元	硫 化 水 素 産 生	ヘ ル オ キ シ ン ダ ー ゼ	ナ イ ア シ ン 試 験	有 機 酸 利 用			
				※ E M B 培 地	レ ベ ック 培 地	卵 培 地	pH	温 度 (°C)	>5 % 食 塩							20 % グリ セリン	1 % 胆 汁 酸	コ ハ ク 酸	ク エ ン 酸
非 定 型 菌 (広 義)	120	流 血	Non- photo.	+	+	×	三 日 以 内	+	+	+	+	IV	-	+	-	-	+	+	
自 然 界 菌	B 1	土	Non- photo.	+	+	×	三 日 以 内	+	+	+	+	IV	-	+	-	-	+	-	

注：×印は不一致性状，※印は Eosin-methylene blue 培地，△印は表 15 参照。

結核患者の流血より分離された 120 号株（広義 AM）は表 22 のように土より分離の B1 株（SM）と、Lebek 培液での発育能およびクエン酸利用能の点以外の諸性状においてほとんど一致する所見を呈した。

22. 19~21 の小括

以上 19~21 において述べたところから、狭義 AM と広義 AM との間に近似の性状のみられる場合のあることが分かったほかに、狭義および広義各 AM と SM とが、また狭義 AM と鳥型菌とが、それぞれ菌株によってはきわめて近似の性状をもつものをそれぞれ含んでいることも明らかにされたが、このことは AM の本態

ないし由来について多かれ少なかれ示唆するところがあるものと考えてよいように思われる。

23. 非定型抗酸菌の菌株による馳背例

その 1：同じく喀痰系の Photochromogens について（表 23）

No. 8 株と No. 22 株とはともに米国において喀痰より分離された狭義 AM であり、同じく Photochromogen でもあるが、これら両者間にはある程度一致する性状もあるにはあつたが、他面著しい差が解糖およびテルリット還元能においてみられ、その他の 2, 3 の性状にも不一致があつた。

表 23 非定型抗酸菌の菌株による馳背例（その 1）同じく喀痰系の Photochromogens について

狭 義 非 定 型 抗 酸 菌	相 違 性 状					一 致 性 状						
	※ E M B 培 地 発 育	20°C 発 育	△ 解糖による群別	テ ル リ ット 還 元	乳 酸 利 用	レ ベ ック 培 液 発 育	卵 培 地 発 育	40°C 発 育	ゲ ラ チ ン 液 化	硫 化 水 素 産 生	コ ハ ク 酸 利 用	ク エ ン 酸 利 用
No. 8	-	+	V	-	-	-	<5日	+	-	-	-	-
No. 22	+	+	I	+	+	-	<5日	+	-	-	-	-

注：※印は Eosin-methylene blue 培地，△印は表 15 参照。

その 2：同じく喀痰系の Non-photochromogens について（表 24）

No. 7 株および 100616 株もまたともに米国において喀痰より分離された狭義 AM であり、同じく Non-photochromogens であるが、これら両者間にも表 24 のように Lebek 培液および 20°C における発育、解糖能、硫化水素産生ならびにコハク酸利用の点でかなり著明な不一致がみられた。

その 3：同じく喀痰系の Scotochromogens について（表 25）

ともに喀痰から分離された狭義 AM であつて、そつて Scotochromogen であるところの No. 5 株と石井株との間にも表 25 のように卵培地上および 20°C での発育、5%食塩に対する抵抗性、解糖能、テルリット還元、硫化水素産生ならびに乳酸利用能の点において多少にかかわらず相違のあることが分かつた。

表 24 非定型抗酸菌の菌株による馳背例 (その 2) 同じく喀痰系の Non-photochromogens について

狭義非定型抗酸菌	相 違 性 状					一 致 性 状								
	レ培 ベ液 ッ発 ク育	20°C 発 育	解 糖	硫 化 水 素 産 生	コ ハ ク 酸 利 用	※ E M B 培 地 発 育	卵 培 地 発 育	40°C 発 育	抵 抗 性		ゲ ラ チ ン 液 化	テ ル リ ッ ト 還 元	ク エ ン 酸 利 用	乳 酸 利 用
									5 % 食 塩	1 % 胆 汁 酸				
No. 7	-	+	-	-	-	-	< 7 日	+	-	+	-	-	-	+
100616	+	卅	グル コ ー ゼ の み +	卅	卅	-	< 7 日	+	-	+	-	-	-	+

注：※印は Eosin-methylene blue 培地。

表 25 非定型抗酸菌の菌株による馳背例 (その 3) 同じく喀痰系の Scotochromogens について

狭義非定型抗酸菌	相 違 性 状						一 致 性 状							
	卵 培 地 発 育	20°C 発 育	5 % 食 塩 抵 抗	解 糖	テ ル リ ッ ト 還 元	硫 化 水 素 産 生	乳 酸 利 用	※ E M B 培 地 発 育	レ ベ ッ ク 培 液 発 育	40°C 発 育	1 % 胆 汁 酸 抵 抗	ゲ ラ チ ン 液 化	コ ハ ク 酸 利 用	ク エ ン 酸 利 用
No. 5	9 日	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
石 井	5 日	卅	+	グル コ ー ゼ の み +	卅	-	-	-	-	+	+	-	-	-

注：※印は Eosin-methylene blue 培地。

その 4：同じく喀痰系ではあるが光発色性を異にする菌株について (a) (表 26)

No. 8 株と No. 7 株とは同じく喀痰より分離され、ともにヒトに起病性のあつた、しがつて狭義の AM であるにかかわらず表 26 のように両者は光発色性においてすでに著しく異なっているばかりでなく普通寒天培地における発育の能否、卵培地における発育速度、発育温度域、解糖能および乳酸利用の能否の点でかなりの相違のあることが分かつた。

その 5：同じく喀痰系ではあるが光発色性を異にする

菌株について (b) (表 27)

光発色性は違つているが同じく喀痰から分離されヒトに起病性のあつた、しがつて狭義 AM であるところの 100616 株と石井株との間にも Lebek 培液における発育、5%食塩に対する抵抗性、テルリット還元能、硫化水素産生ならびにコハク酸および乳酸の利用能の点ではかなりの相違が認められた。

その 6：同じく喀痰系ではあるが光発色性を異にする菌株について (c) (表 28)

同じく喀痰から分離された狭義 AM ではあるが表 28

表 26 非定型抗酸菌の菌株による馳背例 (その 4) 同じく喀痰系ではあるが光発色性を異にする菌株について (a)

狭義非定型抗酸菌	相 違 性 状						一 致 性 状							
	光 発 色 性	普 通 寒 天 上 発 育	卵 培 地 上 発 育	発 育 温 度 域 (°C)		解 糖	乳 酸 利 用	レ培 ベ液 ッ発 ク育	抵 抗 性		ゲ ラ チ ン 液 化	テ ル リ ッ ト 還 元	コ ハ ク 酸 利 用	ク エ ン 酸 利 用
				20	40				5 % 食 塩	1 % 胆 汁 酸				
No. 8	Photochr.	+	< 5 日	++	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-
No. 7	Non-chr.	-	7 日	+	+	グル コ ー ゼ の み +	+	-	-	+	-	-	-	-

表 27 非定型抗酸菌の菌株による馳背例 (その 5) 同じく喀痰系ではあるが光発色性を異にする菌株について (b)

狭義非定型抗酸菌	相 違 性 状							一 致 性 状						
	光 発 色 性	レベック培養発育	5%食塩に抵抗	テルリット還元	硫化水素産生	コハク酸利用	乳 酸 利 用	※ EMB 培地上育	卵培地上発育	発 育 温 度 域 (°C)	1%胆汁酸に抵抗	解 糖	ゲラチン液化	クエン酸利用
100616 石 井	Non-chr.	+	-	-	+++	+++	+	-	<7日	++ +	+	グルコースのみ	-	-
	Scotochr.	-	+	++	-	-	-	-	<7日	++ +	+	グルコースのみ	-	-

注：※印は Eosin-methylene blue 培地。

表 28 非定型抗酸菌の菌株による馳背例 (その 6) 同じく喀痰系ではあるが光発色性を異にする菌株について (c)

狭義非定型抗酸菌	相 違 性 状							一 致 性 状								
	光 発 色 性	普通寒天上発育	卵培地上発育	pH 5 における発育	発 育 温 度 域 (°C)	解 糖	硫 化 水 素 産 生	ペルオキシダーゼ	乳 糖 利 用	レベック培養発育	pH 9 における発育	抵 抗 性	ゲラチン液化	テルリット還元	コハク酸利用	クエン酸利用
No. 8	Photochr.	+	<5日	-	++ ++	グルコースのみ	-	+	-	-	-	5%食塩	-	-	-	-
No. 5	Scotochr.	-	9日	+	++ ++	グルコースのみ	+	++	+	-	-	1%胆汁酸	-	-	-	-

に示したように光発色性を異にするところの No. 8 株と No. 5 株との間にも普通寒天上の発育の能否、卵培地上の発育の遅速、pH 5 における発育の能否、発育温度域、硫化水素産生の有無、ペルオキシダーゼ活性の強弱ならびに乳糖利用度の点において相当の開きがみられた。

以上のように、同じく AM ことに狭義 AM の範疇に入れられるものであっても、菌株によつてはかなり性状を異にするものがまれならず存在することが分かったが、このことは AM の定義を決めるにあたって十分考慮に入れられなければならないところであるといつても過言ではあるまい。

24. マウス (dd-K 系) に対する病原性における AM と SM との近似例 (表 29)

1) 佐世保 I 株 (髄液よりの狭義 AM) 一尾静脈内 1 mg 接種一

a) 内臓の肉眼的変化 (No. 13) : 脾一少しく肥大、腎一肥大ならびに多数の結節形成著明。

b) 病理組織学的変化 (No. 13 の腎) : 主として類上皮細胞様細胞よりなる結節が散見されその中心は壊死に

陥り周囲には結合織増生著明。

c) 内臓よりの還元培養 (No. 13) : 肺よりは中等数の、また肝、脾、腎よりは多数の、それぞれ接種菌に一致する集落発生。

2) 120 号株 (流血よりの広義 AM) 一尾静脈内 1 mg 接種一

a) 内臓の肉眼的変化 (No. 1) : 上述の佐世保 I 株接種例の腎にみられたと近似の多数の結節が腎にあつた。

b) 病理組織学的変化 (No. 1) : 腎には佐世保 I 株接種例の腎におけると同様の所見があつたほかほとんどすべての細尿管に抗酸菌が充満していた。なお、大円形細胞よりなり周囲の組織とは明瞭に境され、うちに多数の抗酸菌を容れた結節が小脳に散見された。—これが Spinning disease の症状を起した原因と思われた。

c) 内臓よりの還元培養 (No. 1) : 肺よりは少数の、肝および脾よりは中等数の、また腎よりは多数のそれぞれ接種菌に一致する集落の発生をみた。

3) S 50 B 株 (下水よりの SM) 一尾静脈内 1 mg 接種一

a) 内臓の肉眼的変化 (No. 3') : 腎に上記の佐世

保 I 株接種例にみられたのと近似の結節が中等度に存在した。

b) 病理組織学的変化 (No. 3' の腎) : 佐世保 I 株接種例の所見と似た変化が散見された。

c) 内臓よりの還元培養 (No. 3') : 肺および肝よりは少数の, また脾および腎よりは多数の, 接種菌に一致する集落がそれぞれ発生した。

4) 土 30 号株 (土よりの SM) 一尾静脈内 1 mg 接種一

a) 内臓の肉眼的変化 (No. 7) : 腎に多数の結節形成と肥大とがみられた。

b) 病理組織学的変化 (No. 7) : 腎には多数の大単核細胞 (類上皮細胞様) に少数のリンパ球と多形核白血球とを伴うところの結節状病巣がみられたが, これは実質の破壊を伴うことが多くて結核結節とは趣を異にし, むしろ膿瘍に近い観を呈した。なお, 大脳には境界が明確で中心部は大部分壊死に陥り抗酸菌を多数含むところの類

上皮細胞様細胞よりなる結節が散在した。これがこのマウスに Spinning disease の症状を招来したものと判断された。

c) 内臓よりの還元培養 (No. 7) : 肺よりは少数の, 肝よりは中等数のまた脾および腎よりは多数のそれぞれ接種菌に一致する集落の発生があつた。

5) 小括

以上により, 髄液より分離された狭義 AM の佐世保 I 株はマウスに対してかなり強い病原性を示すことが分かつたが, 同時に広義 AM の 120 号株 (流血より分離) にあつても, さらには SM であるところの下水よりの S 50 B 株および土よりの 30 号株にあつてもまたこの佐世保 I 株に近似の病変ないし病原性をマウスに呈することもあわせて分かつた。したがつてこのような見地からしても AM 群と SM 群とは相互に近似した菌株の存在することが推知できるわけである。

25. モルモット前眼房内接種について

表 29 マウス (dd-K) に対する病原性における AM と SM との近似例 (1 mg 尾 静 脈 内 接 種)

大 別	供 試 抗 酸 菌		マウス No.	生存日数 転 帰	体重 (g)		Spinning disease	肉 眼 的 変 化 (定 量 培 養)			
	菌 株	分離系			始	終		肺	肝	脾	腎
非 定 型 菌	狭 (起 病 性 土) 義	佐 世 保 I 液	13	42 殺	26	28	-	- (+)	- (卅)	± (卅)	卅 (卅)
			14	〃 〃	23	25	-	- (-)	- (-)	- (-)	± (-)
			15	〃 〃	24	19	-	+ (-)	- (-)	- (-)	卅 (-)
	広 (起 病 性 土) 義	120 結 核 流 血	1	21 死	28	17	+	- (+)	- (++)	± (++)	卅 (卅)
			2	18 〃	25	17	-	- (-)	- (-)	- (-)	± (-)
			3	19 〃	28	18	+	+ (-)	- (-)	- (-)	± (-)
自 然 界 菌	S 下	50 水	1'	12 死	19	14	+	- (-)	- (-)	- (-)	± (-)
			2'	42 殺	19	20	-	- (-)	- (-)	- (-)	± (-)
			3'	18 死	15	10	-	- (+)	- (+)	- (卅)	± (卅)
	土 土	30	7	12 死	25	15	-	- (+)	- (++)	- (卅)	卅 (卅)
			8	22 〃	24	14	+	- (-)	- (-)	- (-)	± (-)
			9	42 殺	19	16	+	- (-)	- (-)	- (-)	± (-)

モルモットのの前眼房内に 0.2 mg 宛の下記の供試菌を接種して眼球に対する各供試菌の病原性の程度を 1~28 日間にわたつて追究した結果, その程度には人型 H₃₇Rv 株 ≡ 山本 S₁ 株 (喀痰より分離の狭義 AM) ≡ 120 号株 (流血より分離の広義 AM) ≡ 鳥型菌 71 号株 > 土 30 号株 (土より分離の SM) ≡ 佐世保 I 株 (髄液より分離の狭義 AM) ≡ 内田 D 株 (ネズミらい腫より分離

の広義 AM) ≡ B 101 株 (土より分離の SM) > チモチー株 ≡ S 50 B 株 (土より分離の SM) ≡ ML 16 号株 (ヒトの内臓より分離の広義 AM) > スメグマ株の順がみられた。

以上によりモルモットの眼球に対する病原性は, 狭義 AM でも人型菌なみのものもある (山本 S₁ 株) 反面 SM (土 30 号株) なみのものもある (佐世保 I 株) と

と、また広義 AM でも狭義 AM (山本 S₁ 株) と同程度のももあり (120 号株), 他方 SM (チモテー株) なみのももある (ML 16 号株) ことなどが分かった。

26. 孵化鶏卵内接種について

狭義 AM の二宮 L₁ 株 (切除肺より分離), 同山本 S₁ 株 (喀痰より分離) および広義 AM の 77 a 株 (流血より分離) の各 1 mg を 7~10 日孵化鶏卵の漿尿膜上に接種して招来される病変度を比較したところその程度には二宮 L₁ 株 ≒ 77 a 株 > 山本 S₁ 株の順がみられた。

これにより、広義 AM であっても狭義 AM の菌株の如何によつてはそれと同程度の変化を起こしたり、さらにはより強い変化をひき起こしたりしうる場合のあることが分かった。すなわち、このことは広義 AM が狭義 AM に比して常に必ずしも病原性が弱いとはかぎらないことを示唆するものといつてよからう。

III 総括的結辞

まず以上の諸成績のうちの生物学的ないし生化学的諸活性についてみるに、一般的にいってそれは SM 群においてもつとも大きく、ついで広義 AM 群, 狭義 AM 群, 鳥型菌の順であり哺乳動物結核菌においてもつとも微弱であることが認められた。

さらに前述の諸検討結果の成績に基づいて仔細に比較考案してみると、AM 群はほぼ結核菌群と SM 群との中間に位し、しかもどちらかといえば結核菌群よりもむしろ SM 群のほうにより近いものように思われた。

ところで、さらに個々の菌株をとりあげて考案してみると、同じく AM とよばれている菌株であっても、それらのうちには一ヒトに対する起病性の有無にはかかわり

なく一相互にかなり著しい性状差を示すものも一括含まれておるばかりでなく、さらには諸性状のみならずマウスその他に対する病原性においてさえも、同じ AM 群に属する他の菌株とよりもむしろ SM 群に所属する菌株のあるものとよりよく似ているといったような菌株さえも必ずしもまれならず含まれていることも分かった。

したがつて如上の知見からすれば一方では現在の AM という名称はあくまで便宜的なものにすぎないものであつて、これら一群の抗酸菌に対する分類上の Genus や Species の名称のごときは今後さらにできるだけ多数の生体材料よりの抗酸菌を供試し、同時に結核菌ならびにとくに SM をしかもこれまた十分に多数対照として供試して、それらについての系統的追究による比較検討が行なわれたのちにはじめて決定されるべきであろうということ、ならびに他方では上述の諸所見は AM の本態ないし由来についての考察上ある程度の示唆を提供するものであろうということがいえるかと考えられる。

〔追加〕 平野憲正 (東京女子医大)

大正 4 年ごろ有馬頼吉博士はウサギの Hoden に結核菌を接種すると弱毒のものでも Hoden に病変を起こし、さらに諸臓器に病変を起こすと述べている。私は H₈₇Rv および非定型抗酸菌を Hoden に接種したところ Hoden は 2~7 週で著しく腫脹し、約 2 カ月後に剖検したところ H₈₇Rv を接種したウサギにおいては Hoden における病変のみならず肺に著明な結節が認められ、非定型抗酸菌を接種したウサギにおいても Hoden における病変のほか、肺に結節が認められたが非常に小さく H₈₇Rv のそれとは明らかに異なつていた。(スライド説明)

1. 抗酸菌の変異と分類に関する問題

(4) 生化学的立場から

九州大学医学部医化学教室 山村 雄一

I いとぐち

各種抗酸性菌を生化学的に分類することはきわめて困難なことであるが、生化学的方法を用いて今日までに行なわれた分類方法としては (1)菌体成分の組成の差によるもの、たとえばロウD面分中に含まれるアミノ酸の定性 (Asselineau ら) や脂質画分について赤外スペクトルを比較する方法 (Randall ら) など報告されている。また(2)物質代謝の差によるもの、たとえば a) ナリアシメントスト (今野), b) 色素に対する還元力の差, c) 芳香族化合物代謝による方法 (山村ら), 炭化水素に対する代謝の相違による方法 (大島) などがある。

この報告においては菌体成分として純粋にとり出されるもののみを対照として選び、それらが各菌株によつてどのように差がでてくるかを調べた。そのような菌体成分として昨年われわれが分離したツベルクリン活性ペプチド (TAP と略記) および Cord Factor (Trehalose-6, 6'-dimycolate C.F. と略記) の2つをとりあげた。TAP については化学的性状と免疫学的性質, C.F. については化学的性質と毒性について比較した。

II ツベルクリン活性ペプチドについて

まず研究方法としては、免疫学的には、人型結核菌 H₃₇Rv 株, 牛型結核菌三輪株, 非定型抗酸菌としては # 22, Kansasii, 石井株, No. 8, その他 M. phlei, M. smegmatis, M. butyricum, Nocardia asteroides のおのおのから、われわれの方法に従つてツベルクリン活性を有するペプチドを純粋に分離した。

これら各ペプチドの皮内反応における抗原特異性はモルモットを用いて検査した。動物の感作には人型結核菌 H₃₇Rv 株, 牛型結核菌三輪株, 非定型抗酸菌として # 22, Kansasii その他 M. phlei, M. smegmatis, M. butyricum, Nocardia asteroides の死菌を使い, Freund's adjuvant を加えて行なつた。皮内反応には 5 μg または 10 μg のペプチドを用いた。

化学的にはこれらペプチドの C 末端をカルボキシペプチダーゼ法で調べた。

実験結果: ペプチドの収量はいずれの菌株を用いても菌体 10 g 当り約 10 mg である。

皮内反応の特異性をまとめると表 1 のようになる。

表 1 ペプチドの皮内反応における特異性

		感 作 用 菌 株								
		結 核 菌		非 定 型 抗 酸 菌		そ の 他 の 抗 酸 菌			Nocardia asteroides	
		人 型 H ₃₇ Rv	牛 型 三 輪	# 22	Kansasii	Phlei	Smegma	Butyr.		
ペ プ チ ド	結核菌									
	TAP(人型)	⊕	++	+	-	-	-	-	-	
	牛型三輪	++	⊕	-	+	-	-	±	-	
	非定型抗酸菌	# 22	±	±	⊕	±	+	-	-	-
		Kansasii	-	±	±	⊕	-	-	±	-
		石 井	-	-	-	-	-	-	±	-
		No. 8	-	-	-	-	-	-	-	-
	そ の 他 の 菌	Phlei	-	-	-	-	⊕	-	-	-
		Smegma	-	-	+	-	-	⊕	±	-
		Butyr.	-	-	-	-	-	-	⊕	-
Nocardia asteroides		-	-	-	-	-	-	-	⊕	
O T		++	++	+	++	++	++	++	-	

すなわち、

- 1) 人型結核菌 ($H_{37}Rv$) と牛型結核菌 (三輪株) のペプチドは相互に交叉する。
- 2) 非定型抗酸菌のうち #22, *Kansasii* は相互に若干交叉し、結核菌との間にも交叉反応が起こる。
- 3) *Kansasii* 株のペプチドはとくに 2) の傾向が強い。
- 4) 非定型抗酸菌のうち No. 8, 石井株のペプチドは交叉反応が少ない。
- 5) *M. phlei*, *smegmatis*, *butyricum* のペプチドはかなり特異性が高い。
- 6) 一般的に各ペプチドは同株の菌で感作された動物でもつとも強く皮内反応が起こる。
- 7) 旧ツベルクリンは *Nocardia* を除くすべての抗酸菌と強く交叉する。
- 8) *Nocardia asteroides* は他の抗酸菌とは全く反応しない。

カルボキシペプチダーゼ法によつて各ペプチドのC末端を調べると表 2 のような結果を得た。これは定性的な成績であるが、ほとんど全例に最初に出現するメーバークロマトグラフィー上のスポットとして、アラニン、

ついでロイシンを証明できた。

したがつて以上を要約すると、このペプチドは免疫化学的にはかなりの特異性をもっているが、化学的にはまだ各ペプチドを区別するまでにはいたっていないということになる。

III Cord Factor について

対照とした菌株としては人型結核菌 $H_{37}Rv$ 株, INAH 耐性人型結核菌 M 株 (弱毒), 非定型抗酸性菌 米国由来株 #22, No. 8, No. 7, Bostrum, 同国内由来株石井株および *M. fortuitum*, 鳥型菌 A71, *M. phlei* などである。

C.F.分離の出発材料としては各乾燥菌体から Anderson の方法によつて得られる精製ロウ (PW) を用いた。

この精製ロウを石油エーテル・エーテル (1:4) に溶かしシリカゲル・セライト (2:1) に吸着させ、表 3 に示す各溶媒 600~700 ml で溶出した。これをクロマトグラフィー I とよぶ。人型結核菌の場合毒性はメタノール・クロロホルム (1:4) の溶出画分に認められたので、この画分をさらに表 4 に示す要領に従つてシリカゲル・セライトを用いクロマトグラフィーを行なつた。これをクロマトグラフィー II とよぶ。毒性はクロロ

表 2 カルボキシペプチダーゼ A による C 末端分析

(基質:酵素 (モル比)=100:1)

菌 株	主なスポット	その他のスポット
青 山 B $H_{37}Rv$	Ala \div Leu Ala > Leu	Val > Gly, Glu, Asp, Ser, Tyr, Thr Val > Gly, Glu, Asp, Ser, Thr > Tyr
<i>Kansasii</i>	Ala \div Leu	Val > Gly, Glu, Asp, Ser, Tyr, Thr
<i>Butyricum</i>	Ala > Leu	Tyr, Val > Gly, Glu, Asp
<i>Phlei</i>	Ala > Leu	Val > Gly, Glu, Asp > Tyr, Ser, Thr
#22	Ala \div Leu	Tyr, Val > Gly, Glu, Asp, Ser, Thr
<i>Smegma</i>	Ala > Leu	Tyr, Val > Gly, Glu, Asp, Ser, Thr
<i>Nocardia</i>	Ala > Leu	Val > Gly, Glu, Tyr > Asp, Ser
人型結核菌	Ala > Leu	Val, Gly, Glu, Asp, Ser, Tyr, Thr
T-Casein*	Tyr \div Leu	Phe, Ala > Gly, Glu, Asp, Ser, Thr
Insulin**	Ala	なし

* Casein の Trypsin 分解物: 同様抽出処理したもの

** クジラ結晶 Insulin

表 3 精製ロウのクロマトグラフィー I (Silica-gel-Celite (2:1) 21 g)

画分 No.	溶 媒	収 量	融 点	毒性 (10 μ g によるマウス死亡率)
材 料	精 製 ロ ウ	563.4 mg	49°	
A	石油エーテル:エーテル (1:4)	432.5	51°	0/10(1mg, 14日でも死亡しない)
Ⓐ	メタノール:クロロホルム (1:4)	125.2	55°	10/10
C	メ タ ノ ー ル	7.6		1/10
収 量		565.3mg	=103%	

表 4 B画分のクロマトグラフィー II (Silica-gel-Celite (2:1) 21 g)

画分 No.	溶 媒	収 量	融 点	毒 性 (10 µg)
材 料	B 画 分	236.4 mg		
1	クロロホルム	200 ml	3.4	0/6
2	クロロホルム：メタノール (99:1)	200 ml	6.7	43~46°
3	" "	200 ml	3.0	41~43°
④	" "	500 ml	139.0	43°
5	" "	200 ml	33.7	145°
6	" "	200 ml	39.8	190~200°
収 量		225.6mg=95.4%		

表 5 No. 4 画分の Rechromatography III (Silica-gel-Celite (2:1) 15 g)

画分 No.	溶 媒	収 量	融 点	毒 性
材 料	No. 22 精製ロウB画分	55 mg	55 ~ 63°	
a	クロロホルム	23	56 ~ 61°	なし
b	クロロホルム：メタノール (99:1)	1		
③	" "	12(22%)	46 ~ 53°	10 µg で 5/5
d	" "	0		
e	" "			
収 量		36 mg=65%		

ホルム・メタノール (95:5) および (90:10) に認められたが、融点、赤外線スペクトル (IR) の成績からクロロホルム・メタノール (95:5) の画分が、C.F.であることが分かった。

しかるに非定型抗酸性菌その他においては、この段階のクロマトグラフィーで、(95:5) の画分は毒性も弱く一般に融点が高く、また、IR も C.F. と異なるので、さらに表 5 に示すような要領に従ってクロマトグラフィーを行なった。これをクロマトグラフィー III とよぶ。

これは # 22 の例でこのクロマトグラフィーを行なう前は融点 55~63°C で IR も 1,560 cm に著明な吸収を認めるが、このクロマトグラフィーで (98:2) の画分は融点も 46~53° となり、上の吸収も消失して C.F. の IR と同じものが得られた。したがってこれらの菌については適宜、クロマトグラフィー III の精製まで行なった。このようにして得た C.F. 画分の化学的性状、毒性、収量を人型結核菌の場合と比較し次のような結果を得た。

1) 収量：表 6 に示すごとく、精製ロウの収量は各菌株の間にほとんど差異はないが、C.F. 画分の収量は人型結核菌のほうが多く、乾燥菌体に対して大体 0.3~0.5% であるが、その他の抗酸性菌は 0.1% 前後である。とくにクロマトグラフィー III を行なった場合の収量はきわめて悪く 0.05% 以下になっている。

2) 融点：表 7 に示すごとくクロマトグラフィー II の段階では人型結核菌と M. phlei を除いて他の菌株の

C.F. 画分の融点は高く、一般にクロマトグラフィー III を行なうと低くなる傾向があるようである。

3) 組成：C.F. 画分の加水分解を行なってみるとエーテル可溶性部分はすべてミコール酸とよばれるものの中に入る。水溶性部分については、人型結核菌は Noll らの報告と同じく、グルコースであるが、非定型抗酸性菌ではグルコース以外のものが一般に検出された。すなわち # 22, A 71 では五炭糖とグルコース、石井株ではイノシット・グリセリン、少量のグルコース、No. 7, phlei グルコース、Kansasii と fortuitum ではごく少量

表 6 No. 4 画分 (Cord factor 画分) の収量

		精製ロウ No. 4 (C.F.) 画分		
		乾燥菌体に対して %	乾燥菌体に対して %	精製ロウに対して %
人型結核菌	H ₃₇ Rv	3.5	0.35	10.0
	I NH 耐性株	3.5	0.49	14.2
非定型抗酸性菌	# 22	1.7	0.17(0.037)	3.4(0.30)
	Kansasii	2.0	0.1(0.022)	4.7(0.92)
	石 井	3.5	0.16	4.5
	No. 7	2.5	0.22	9.0
	No. 8	7.7	0.17	2.2
その他抗酸性菌	Fortuitum	8.0	0.3(0.045)	4.0(0.6)
	A. 71	5.4	0.5(0.2)	9.3(0.7)
	Phlei	2.0	0.09	4.3

() 内はクロマトグラフィー III のときの %。

表 7 Cord Factor 画分の化学的性状と毒性

菌 株	クロマト*	融 点	加 水 分 解		毒 性** (d d N 5匹の 最小致死量)	
			エーテル溶性部分	水 溶 性 部 分		
人 型 結核菌	H ₃₇ Rv	II	43 ~ 44°	ミコール酸	グルコース	+(5 μg)
	INAH 耐性M株	II	43 ~ 44	ミコール酸	グルコース	+(5 μg)
非 定 型 抗 酸 菌	No. 22	II	55 ~ 63	ミコール酸	5炭糖+グルコース	+(10) ^{μg}
		III	46 ~ 53			
	Kansasii	II	54 ~ 61	ミコール酸	イノシット } (-) グリセリン }	±(100)
		III	46 ~ 49			- (10)
	石 井	II	56	ミコール酸	イノシット・グリセリン・少量グルコース	+(10)
	No. 7	II	54	ミコール酸***	グルコース	±(10)
No. 8	II	155			-(10)	
そ の 他 の 抗 酸 菌	Fortuitum	II	60 ~ 63	ミコール酸	イノシット } (-) グリセリン }	+(10)
		III	43 ~ 46			
	A 71	II	55 ~ 62	ミコール酸	5炭糖+グルコース	±(10)
		III	54 ~ 63			
Phlei	II	45	ミコール酸	グルコース	±(10)	

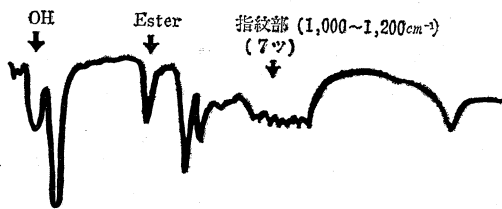
* II は Silica-gel-Celite によるクロマトグラフィー II を, III はクロマトグラフィー III を示す。

** + は全供試マウスの死を, ± は 2/5~3/5 の死を示す。

*** このもののエーテル溶液はメタノールで沈澱ににくい。

表 8

赤外吸収スペクトル



菌 株	クロマト	OH	Ester	指紋部 (7ツ)	そ の 他	
人型菌	H ₃₇ Rv	II	+	+	+	
	INH耐性M株	II	+	+	+	
非 定 型 抗 酸 菌	# 22	II	+	+	5, 不明瞭	1,560cm ⁻¹
		III	+	+	+	
	Kansasii	III	+	+	-	1,520, 970, 920, 885, 835cm ⁻¹
		石 井	II	+	+	+
	No. 7	II	+	+	-	
	No. 8	II	+	+	5, 不明瞭	1,620, 1,540cm ⁻¹
そ の 他 の 抗 酸 菌	Fortuitum	III	+	+	-	800, 1,660cm ⁻¹
	A 71	II	+	+	+	1,580cm ⁻¹
		III	+	+	+	
	Phlei	II	+	+	+	

のグルコースとイノシットやグリセリンではない未知のスポットをペーパークロマトグラフィーで認めた。

4) 毒性: 人型結核菌 H₃₇Rv 株および INAH 耐性M株 (弱毒) はいずれも 5 μg でマウスを致死させる。しかるに非定型的抗酸菌のうち # 22, 石井株は 10 μg で毒性を示し, Kansasii, No. 7 は 5 匹中 2~3 匹のマウスを致死させた。No. 8 には毒性は認められなかつた。そのほかでは fortuitum に毒性が認められたが, A71, phlei は弱毒であることを示した。

5) 赤外スペクトル: 表 8 に示すように人型結核菌から得られる典型的な C. F. は-OH, エステルおよびいわゆる指紋部の中で 1,000~1,200⁻¹ の間に 7 つの特異な吸収を示す。非定型的抗酸菌その他ではクロマトグラフィー II の段階までの精製ではこれと一致しないものも多く, さらにクロマトグラフィー III を行なうと人型菌のそれと一致するもの (# 22, A71) とクロマトグラフィーを繰り返しても一致しないもの (Kansasii, fortuitum) がある。M. phlei はクロマトグラフィー II の段階ですでに人型菌とほとんど同様の赤外スペクトル像を示す C. F. 画分が得られた。以上をまとめると人型結核菌の C. F. と全く同様の性状を示すものは, 人型菌から C. F. を分離するのと同じ方法および精製段階では, 他の抗酸菌からは分離されなかつた。また非定型的抗酸菌から分離された C. F. 画分の糖部分, 赤外スペクトルと毒性との間に一定の関係はみられなかつた。しかし一般に C. F. またはこれに類似した毒性物質の量は, 人型結核菌が他の菌に比して多いと思われる。

1. 抗酸菌の変異と分類に関する問題

(5) 臨床的立場からみた薬剤耐性菌といわゆる非定型抗酸菌

九州大学医学部胸部疾患研究所 杉山浩太郎

緒言

抗酸菌の変異と分類について臨床的立場から重視するところがあるとすれば、まず薬剤耐性結核菌感染例の頻度、および耐性菌の「ひと」に対する菌力の問題であり、次にいわゆる非定型抗酸菌の臨床的意義、すなわちその出現頻度、病原たりうる可能性、および病原たりうるならばその臨床像などであろう。

両者を詳細にわたって述べる余裕はないので、前者については、主としてINH耐性菌の「ひと」に対する菌力についての知見を述べ、後者についてはいわゆる非定型抗酸菌検出の状況、菌力、疑わしき例の臨床的所見等について述べ、最後にDebye-ScherrerのX線廻折写真上の特徴について述べたい。

薬剤耐性菌感染の問題、およびINH耐性菌の「ひと」に対する菌力について

—未治療患者における耐性菌から—

未治療患者においても耐性結核菌を発見する頻度が近年増加したようにみえる。福岡、北九州地区の症例を主とし、九州地方各地の国立療養所から供与を受けた例とともに総数359例の未治療患者中78例(21.8%)の耐性菌保有者を認めた。耐性検査法は直接法、間接法相半ばする。ただし、SM 1 γ 、PAS 1 γ 、INH 0.1 γ /cc以上の濃度で、対照の約10%程度以上の集落数発生をみた最高濃度をもって耐性の値とした。表1のごとく1剤耐性が大多数(63例)であつて、そのうち52例はSM耐性であり、INH耐性例は著明に僅少であつた。

表1 未治療結核排菌患者の耐性検査

検査例	非耐性	耐	性		
			1剤耐性	2剤耐性	3剤耐性
359	281 78.2%	78 21.8%	SM	63	52
			INH		6
			PAS		5
			SM-INH	11	6
			SM-PAS		5
			INH-PAS		0
			4		

一方一般に感染の機会をもつ結核菌中の耐性菌の割合をみるために可及的広い地域にわたる病院の患者について耐性検査を行なつた。しかし在宅患者、無自覚患者等を捕捉することの困難さのために検査例は偏つたsampleであることを否認しない。したがつて感受性菌对各种耐性菌の分布の割合、およびそれが耐性菌感染とどのような関係にあるかについての一般的推論は困難であり、以下の考察はもつぱら耐性菌相互の割合について行なつたが、これにおいてもまたある程度の手がかりが得られるにとどまる。

この耐性検査はすべて直接法で定量的に行ない、対照培地に50以上500以下程度の集落を作らせるようにして、各薬剤濃度の耐性菌集落数の対照培地のそれに対する百分率を求め、次に計算によつて、たとえばSM 1 γ /cc未滿の感受性菌が排菌の何%を占め、1 γ 以上10 γ 未滿の耐性菌が何%を占めるか等を算出し、かくし

表2 結核患者の耐性菌分布および未治療患者の耐性例数分布

	感受性	耐				計
		<1 γ /cc	1 γ ~<10 γ	10 γ ~<100 γ	100 γ <	
S	%	%	%	%	%	
重症結核患者の耐性菌分布(福岡県下10施設222例)	30.6	29.5	17.0	22.9	69.4	
M	%	%	%	%	%	
九大胸部研入院および外来患者耐性菌分布(昭和34年度90例)	63.9	19.1	6.2	10.8	36.1	
	%	%	%	%	%	
未治療患者の耐性例数分布(36施設359例)	81.3	11.7	5.3	1.7	18.7	

	感受性	耐				計
		<0.1 γ /cc	0.1 γ ~<1 γ	1 γ ~<10 γ	10 γ <	
I	%	%	%	%	%	
重症結核患者の耐性菌分布(福岡県下10施設222例)	24.8	32.2	25.1	17.9	75.2	
N	%	%	%	%	%	
九大胸部研入院および外来患者耐性菌分布(昭和34年度90例)	48.7	26.3	8.7	15.3	50.3	
H	%	%	%	%	%	
未治療患者の耐性例数分布(36施設359例)	95.9	1.9	1.1	1.1	4.1	

て各患者の保有する菌の耐性分布を多数の例について集めて平均を求めた。なおわれわれの耐性検査のための定量培養成績の誤差の範囲は、ある薬剤濃度の集落数の対照のそれに対する割合を $a\%$ とすると、おおよそ $\pm a \times 30/100\%$ と考えられた。

表2はSMとINHに分けて、上、中段はそれぞれ重症患者喀痰中の耐性菌の分布、および九大胸部研における中等症以上の患者のそれ、下段は未治療患者の耐性例数分布である。上、中段のごとき耐性分布を示す菌の集合を想定し、それが感染可能な菌を代表すると仮定しうると、そのうちのある菌が感染の機会をもつたとき、未治療患者の個々を感染菌の代表と考えると、上、中段においてはINH耐性菌がSM耐性菌より多く、下段においてはSM耐性例がINH耐性例より著明に多いことは、INH耐性菌が「ひと」に対してSM耐性菌よりも菌力において劣ることによるのではないかと推測される。

さらにまた一方中等症以上の治療中の患者から得られたINH耐性菌のCatalase活性は表3上段のごとく、ことに10 γ/cc 耐性菌の約77%はCatalase陰性であつたが、下段のごとく未治療患者から得られた10 γ/cc 耐性菌はすべてCatalase陽性であつた。

以上からINH耐性菌は一般的にいつて、SM耐性菌よりも「ひと」に対しても菌力が低く、わずかにCatalase陽性であるごときINH耐性菌のみが感染を起こしうるか、あるいは感染は同様に起こしてもCatalase陽性であるごとき菌のみが残つて未治療患者から回収されたのではないかと推測される。

表3 INH耐性菌のCatalase反応

	カタラゼ活性	集落発生培地のINH濃度				
		0.1 γ	0.3 γ	1 γ	3 γ	10 γ
治療者中の耐結核菌	+	34	65	73	23	30
	-	2 (5.6%)	5 (7.1%)	7 (8.8%)	5 (17.9%)	101 (77.1%)
	計	36	70	80	28	131
未治療者耐結核菌	+	4	1	2	0	4
	-	0	0	0	0	0

重症耐性例の臨床的経過からみたINH耐性菌の菌力の問題

INH耐性菌の菌力は「ひと」に対しても減弱がみられるとすれば、その減弱が長く排菌を続けるごとき重症例においても臨床的経過に何ほどの意義をもちうるのではないかという推測が行なわれることがある。

われわれは福岡県下各国立療養所、公私立病院の協力を得て、約3ヵ月ごとに定量的耐性検査を行ないつつ、

図1 薬剤耐性の程度の分け方

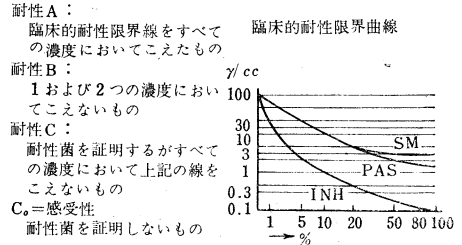
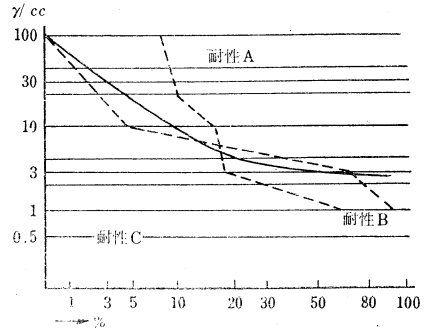


図2 臨床的耐性限界線 (SM)



耐性例の経過を観察し、同時にCatalase, Peroxydase活性を検査した。

観察対象 495, そのうち記載条件上使用不適のものを除き 380 例を得た。

薬剤耐性の程度は数年来われわれの提案する臨床的耐性限界線を基準にして、各薬剤ごとに図1, 2のごとく耐性A, B, Cおよび感受性C₀に分けた。

症例中INH耐性AすなわちINHが臨床的に耐性限界をこえており、しかもなおINHを使用したごとき群と、SM耐性AすなわちSMが耐性でなおSMを使用した群とに分ける。症例数はそれぞれ214,

表4 INH耐性AにINHを、SM耐性AにSMを使用した2つの集団の間の比較 (病型別, PAS耐性別, 経過別比較)

INH 耐性 A				経過	病型	SM 耐性 A				
PAS 耐性						経過	PAS 耐性			
A	B	C	C ₀				A	B	C	C ₀
		1	6	2	B	2	1		1	
1	2	1	3	3		3				
3	3	4	6	4		4	1	2		
2		2	2	2	C	2			1	
19	6	7	11	3		3	2	1	1	
11	7	6	3	4		4	2	5	1	
4		2	2	2	F	2	1	2	0	
38	17	12	7	3		3	5	7	2	
17	5	5	4	4		4	4	3	3	

表 5 INH 耐性例, SM 耐性例にそれぞれ INH, SM を使用した場合の経過について (病型別, PAS 耐性別, 経過別比較)

INH耐性A INH使用例				病型別 分類	SM耐性A SM使用例			
B	C	F	計		B	C	F	計
27	74	113	214例		5	14	32	51例
12.7	34.5	52.8	100%		9.8	27.4	62.8	100%
A	B	C	C ₀	P別 A分 S類 耐性	A	B	C	C ₀
95	40	40	39例		16	18	10	7例
44.5	18.7	18.7	18.1%		31.4	35.3	19.6	13.7%
経過別 分類				経過別 分類	経過別 分類			
4	3	2			4	3	2	
74	121	19例			24	19	8例	
34.6	56.6	8.8%		47.1	37.2	15.7%		

51 である。(表 4)

両群の病型の比較 (表 5 上) では学研分類 F, C, B の割合は両群相似である。なおここでは B は B 型の要素をやや多く加味した C 型を意味するものとする。また両群は PAS 耐性の程度においても相似であった (表 5 中)。他の Factor すなわち薬剤の使用期間, 併用薬剤の種類も 6 カ月の観察期間の範囲内ではそれぞれ大差を認めなかった。

さて両群がどのような経過をとつたかを学研基準の 2, 3, 4 すなわちそれぞれ改善, 不変, 悪化に分けてみると, INH 耐性群には不変例の多い傾向はあるが, 両群の間には全体として有意の差はみられない。(表 5 下) ($n=2, \chi^2=4.82$)。

すなわち SM 耐性例に SM を使用した場合も, INH 耐性例に INH を使用した場合もその経過において差を証明しえなかった。すなわち, SM 耐性菌と INH 耐性菌の菌力の差は, このような重症耐性例の場合には必ずしも本質的な役割をもたない程度のものではないかと考えられる。

なお耐性検査のたびごとに得られる菌の Catalase, Peroxydase の活性の変動と INH 耐性の変動とを比較すると, 大体において INH 耐性が低下すれば Catalase, Peroxydase も陽性化, または陽性度が強くなる傾向がみられた。また Catalase, Peroxydase の変動と臨床経過との関係は, これらの活性が増強あるいは不変のものうちののみ改善例がみられ, 活性減弱例の中にはみられなかった。

いわゆる非定型抗酸菌の臨床的意義について

いわゆる非定型抗酸菌 (AM と略) についての報告がわが国においてもときどきみられる。しかし

わが国において, はたしてこのものが日常の臨床に重大な意義を有するほどしばしばみられるものか, またその病原となりうる能力, および病原たりうるとすればその臨床像, またはなりにくいとしてもどのようにして人体材料中に出現するかということは, 一応調査を要することであろう。

主として福岡県を中心に, 九州各地の国立療養所, 公私立病院について調査した結果では, 培養検査における AM の発現頻度は培養件数 47,562 中 212 件, 0.45% であった。その大部分 (Ca. 0.4%) は AM 単独で出現したが, 結核菌と共存する場合が 0.05% にみられた。

これを検査材料別にみると, 喀痰から検出される割合は 0.43%, 胃液からは 0.87%, その他の病的材料から 0.3%, 直接法耐性検査から 0.24% であった。すなわち胃液からの検出率は比較的高く, 薬剤耐性結核菌が多くみられる耐性培養においては検出率が低い。

蒐集した AM 株を Runyon の分類に従って分けると, Nonchromogen 30 (16.7%), Scotochromogen 149 (83.3%) で Photochromogen は全然みられなかった。このことは約 2 年前全国の国立療養所で蒐集された AM 株 (福岡療養所および清瀬病院より分与) 53 株においても, Nonchromogen 8 (15.1%), Scotochromogen 45 (84.9%) で同様であったし, また従来わが国で一応病原に擬せられているいわゆる標準株においても同様であった。したがってわが国には, 米国と

表 6 非定型抗酸菌排出患者の臨床経過 (1)

浦 〇 鉄 〇 75 才 ♂ S. 34 年 2 月 発見 (国立療養所福寿園)
S. 34 年 10 月 入院

		34.2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	35.1	2
化学療法	INH/G	(0.6 毎日)												
	CS	(0.5 毎日) (0.5 毎日)												
結核菌	塗抹										—	—	—	—
	培養	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
非定型抗酸菌		13 col., 20 col.	+	+	6 col., 6 col., 6 col.					+	+			
臨床症状 (1st)	体温	平	平	平	平	平	平	平	平	平	平	平	平	平
	体重										45	46	46	47
	血沈										6	11	6	2
	咳嗽	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	咯痰	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	食欲	良	良	良	良	良	良	良	良	良	良	良	良	
X線所見														
学研分類		C ₁			C ₁			C ₁			C ₁			
改善度		↖			3			3			3 ↘			

表7 蒲生株

集落(分離培養性状) 継代	S型  日とともにクリーム色からクリーム色	薬剤感受性 K	S M	PAS	INH		
光発色性	-(暗室内 40 W 52 cm 1 h)	+	1 10 20	1 10 100	0.1 1 10		
発育温度域	32°C 37°C 42°C ++ + - : 1% 小川培地	1%小川培地	V M	T B ₁	S I		
Generation time	5.9 h (H ₃₇ Rv 16.9 h) : Kirchner Sy.-Ser. 培地	+	2 20 200	5 50 100	10 100		
集落初発日数	8 days (1% 小川培地)	++	100 10	30 20 30	30 10		
培養成績	37°C Agar Lebek Wong-Weinzirl 2週判定 + - +	キルヒナー-寒天培地	T C	K M	C M		
菌の形態	小桿菌	+	10 100	5 50	10 100		
コード形成	- 0% Tween 80, Vandiviere	++	++ +	- -	- -		
抗煮沸性 Kf.	15 min	動物実験 (マウス)	臓器定量培養	1 W	1 W	4 W	6 W
ナイアシン試験	定性 - 定量 0.89γ/mg	肺	517	1,250	1,137	2,500	
中性紅反応	- Wayne の Scale 1 pH 10.5 1 h で脱色	肝	1,100	1,250	638	2,500	
カタラーゼ反応	10 sec	脾	1,075	1,000	600	2,500	
ペルオキシダーゼ反応	+	体重	2 W	3 W	4 W	6 W	
N T C	K 3 10 30 100 300 γ/cc ++ ++ ++ ++ ++	体重g	17.4	16.6	17.1	16.9	
K. Tellulite	K 10 100 300 1,000 γ/cc ++ ++ ++ ++ ±	匹数	8	6	6	4	
		皮内接種 (菌量 0.3 mg) 潰瘍最大径 5×7.5mm (12 days)					

表8 πによる皮内反応 (各0.15γ)

	青山 π	蒲生 π	100616 π
	24時間 48時間	24 48 時間 時間	24時間 48時間
蒲生	2×2	3×2	22×24×511×1111×16
対照	阿部 8×10	11×12	8×9×4×5
	坂上 5×7	6×4	45×76×7
	吉田 6×8	5×4	45×78×9
	伊賀上 13×13	16×17	10×11 15×17
	出光 4×5	10×9	10×11 10×12
	松木 11×13	9×14	7×11 9×8






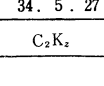
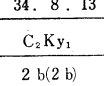
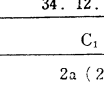
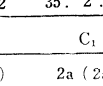
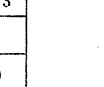
異なり、Photochromogen は存在しないかあるいは非常にまれにのみ存在するのではないかと考えられる。

われわれの検査しえた AM 排出症例 147 例の臨床的特徴を求めてみた。われわれの例は結核療養所入所患者が主であるから、性・年齢別分布は一般結核患者のそれと大差がない。また受けた化学療法の期間は 1 年以上が多く、また結核菌排菌との関係は結核菌を入院当初より喀痰中に証明しない例のほうが多い。以前喀痰中に結核菌陽性であった例では陰転後 4 カ月以内の例が多かった。

上記 147 例の「V」線病型の分類を行なうと学研分類 B 24, C 99, その他 24 で、C 型が多く、C 型中には切除あるいは胸成術を行なった 27 例が含まれていた。また全例中約半数 69 例にかなり著明な気管支拡張

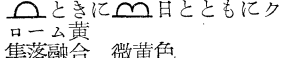
表9 非定型抗酸菌排出患者の臨床経過 (3)

外 ○ と ○ 64才 ♀ S. 34年5月入院 (国立赤江療養所)

		34.5	6	7	8	9	10	11	12	35.1	2	
		(週2日)										
化学療法	SM	(0.3毎日)										
	INH	(INH-G)										
	SI	(3.0毎日)										
結核菌	塗抹	G 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	培養		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
非定型抗酸菌			+	+								
臨床症状	体温	平	平	平	平	平	平	平	平	平	平	
	体重	35	35	37	39	40	41	41	42.5	42	44	
	血沈 (1st)	128	127	58	42	28	21	22	19	16	11	
	咳嗽	+	-	-	-	+	±	+	-	-	-	
	喀痰	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
食慾	良	良	良	良	やや不良	やや不良	良	やや不良	良	良		
X線所見												
		34. 5. 27	34. 8. 13	34. 12. 2	35. 2. 3							
学研分類		C ₂ K ₂	C ₂ K ₁	C ₁	C ₁							
改善度			2 b(2b)	2a (2a)	2a (2a)							

がみられた。これら 147 症例中の約 15% は AM を 2 回またはそれ以上、観察期間 1~6 カ月間に排出した例であるが、それらのほとんどすべては排出した AM が該当患者の肺病変の原因とは考えがたいものであった。

表 10 No. 297 (外山) 株

集落性状	分離培養	S型	 ときに日とともにクローム黄					
	継代	S型	集落融合 微黄色					
光発色性	- (暗室内 40 W 52 cm 1 h)							
発育温度域	32°C	37°C	42°C	++ : 1%小川培地				
Generation time	6.3 h (H ₃₇ Rv 16.9 h) : Kirchner Sy.-Ser. 培地							
集落初発日数	8 days (1%小川培地)							
培養成績	37°C	Agar	Lebek	Wong-Weinzirl	2週判定			
菌形態	細小桿菌							
コード形成	- 0% Tween 80, /Vandiviere							
抗煮沸性 Kf.	15 min							
ナイアシン試験	定性	- 定量 0.37γ/mg 湿菌量						
中性紅反応	- Wayne の Scale 2, pH 10.5 で 1 h							
カタラーゼ反応	+ 15 sec							
ペルオキシダーゼ反応	+							
N	T	C	K	3	10	30	100	300 γ/cc
##	##	##	##	##	##	##	##	##
K. Tellulite	K	10	100	300	1,000 γ/cc	##	##	##

1%小川培地	薬剤感受性	K	S	M	PAS	INH		
			1	10	100	0.1	1	10
		++	+	500	300	++	++	+
キルヒナー寒天培地		K	T	C	K	M	C	M
			10	100	5	50	10	100
		++	+	+	+	-	+	+

動物実験 (マウス)						
臓器定量培養		1 W	2	3	4	
	肺	114	6	63	167	
	肝	1,150	19	13	20	
	脾	525	19	53	20	
体重		前	1 W	2	4	6
	体重 g	13.5	16.4	19.1	21.3	27.4
	匹数	10	10	8	5	2

皮内接種 (菌量 0.3 mg)
潰瘍最大径 1.5 × 1.5 mm (14 days)

わずかに Nonchromogen 2 株が該当症例の肺病変に関係を疑わしめたにすぎない。2 症例の臨床経過、菌株の性状を表示する (表 6, 7, 8, 9, 10)。いずれも高齢者で該当菌より作成した「ツπ」と結核菌「ツπ」とに対する反応の特異性は第 1 例では明瞭でなく、第 2 例ではやや特異性を示した (表 8, 11)。

一方 Scotochromogen は切除肺から得られたものも、切除前に同一の菌の排出がみられなかつたり、あるいは切除後の培養において結核菌と共存したりで、肺病変の原因と推定しうるものは 1 例も存在しなかつた。

すなわち 臨床的検索を行ないえた 147 例中 Nonch-

表 11 297 (外山) π と H₃₇Rv π との比較

		24 時間値	48 時間値
該当患者 (外山)	297 H ₃₇ Rv	30 × 22 12 × 13	47 × 40 25 × 22
結核患者	297 H ₃₇ Rv	25 × 15 23 × 18	12 × 9 19 × 14
	297 H ₃₇ Rv	25 × 20 22 × 20	30 × 25 35 × 30
	297 H ₃₇ Rv	15 × 13 16 × 14	21 × 15 30 × 25
健康者	297 H ₃₇ Rv	3 × 2 17 × 14	5 × 4 20 × 18
	297 H ₃₇ Rv	0 15 × 15	2 × 2 25 × 15
	297 H ₃₇ Rv	0 10 × 10	0 14 × 13

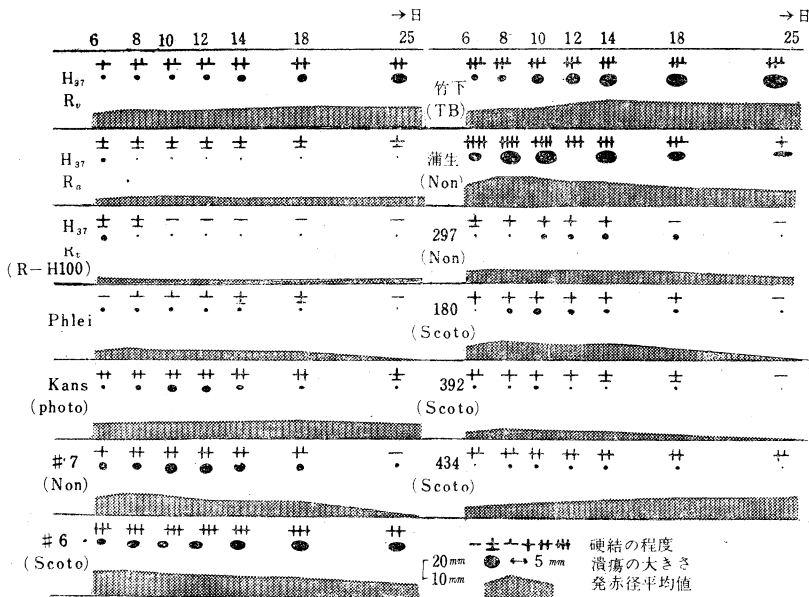
romogen 排出例は 22 例であつたが、うち 2 例に肺病変との関連を疑いえたのに対し、Scotochromogen 排出例 125 例中には 1 例もそのような症例に遭遇しえなかつた。

このような日常目にふれる AM の菌力の程度をみるため次の 2 つの動物実験を行なつた。

人型結核菌 H₃₇Rv、竹下、牛型 Ravenel、鳥型 Kirchnberg を対照として、Photochromogen では M. Kansasii、Nonchromogen として標準株 # 7、および蒐集した蒲生、外山、その他 6 株、Scotochromogen 標準株 # 6、および蒐集した 8 株の 2 週間培養の菌 0.1 mg を dd 系マウス尾静脈より接種し、1, 2, 4, 6 週後に各株ごとに 2 匹を屠殺して病変を検査するとともに肺、肝、脾の生菌数を検査したところ、各種結核菌接種マウスの体重は 2~3 週以後減少したのに対し、Scotochromogen 接種マウスはすべて終始増加を示した。Photochromogen および Nonchromogen はその中間を示し、2~3 週以後は大きな増加も、また減少も示さなかつた。また臓器中に各型結核菌および Photochromogen、Nonchromogen においては 6 週にいたるまで生菌がみられたが、Scotochromogen においては # 6 株を除いてはほとんどすべて 2 週以後には生菌を認めなかつた。

また H₃₇Rv、H₃₇Ra、H₃₇Rv-INH 100 γ 耐性株、竹下株 (以上 4 株人型結核菌)、M. Kansasii (Photochromogen)、# 7、蒲生、外山 (以上 3 株 Nonchromogen)、# 6, 180, 392, 434 (以上 4 株 Scotochro-

図 3 抗酸菌皮内接種局所反応 (10.3 mg)



mogen), *M. phlei* の 2 週培養菌 0.3 mg を 0.1 cc に含ませて、モルモット背側皮内 2 か所に接種し、発赤、硬結、潰瘍発生の状態および大きさ等を観察したところ図 3 のごとく、*H₃₇Rv*、竹下、蒲生、# 6、# 7、*Kansasii* 等において、発赤、硬結、潰瘍が著明であった。有毒結核菌 *H₃₇Rv*、竹下においては潰瘍は 3 週以後も増大する傾向があるに反し、蒲生、# 6、# 7 等では 2~3 週を頂点として漸次縮小治癒の傾向を示した。*H₃₇Ra* および *H₃₇Rv*-INH 100 γ 耐性菌による変化は *M. phlei* のそれと大差なくもつとも軽微であり、外山株 (297)、180、434 等は *H₃₇Ra* 等よりも強い変化を示したが消退もやや速やかであった。

以上により日常われわれが遭遇する AM は少数の Nonchromogen と比較的多数の Scotochromogen であるが、臨床的検索からもまた実験的観察における菌力の程度からも、病因となりうることはなほはだまれで、かつ病因となりうるのはいずれかといえば Nonchromogen

中の特殊な菌株であろうと推察しえた。

しからばこれら大多数の菌株はどのようにして喀痰等の人体材料の培養中に出現するのであろうか。その 1、2 について解析を試みた。

まず培養検査の過程において混入してくるものか否かを検討するため、AM がしばしば検出される病院とほとんど検出されない病院とで喀痰等の処理方法になんらかの偏りがみられないかを調査したが、使用する器具の滅菌、アルカリ液の濃度、アルカリ液作製用の水、作製後の滅菌等においてなんらの差も見出しえなかつた。また患者の喀痰の喀出の仕方、すなわち覚醒直後喀出か、洗面含嗽あるいは食事ののちに喀出するかを AM 検出患者と非検出患者に分けて調査したが両者に差を見出しえなかつた。

前述の材料別 AM 検出率において、胃液培養よりの AM 検出率は喀痰培養のそれをこえていることがみられた。しかしこれからただちに食物、上水等に混在する

AM が胃中に入るためと速断することはできない。さきに AM 検出は結核菌を検出しない例か、あるいは最近結核菌が陰転したごとき例に多発することをみたが、ちょうどそのような例が胃液培養の対象となるからであると考えられる。この推察は入院患者のほとんど全部に胃液培養を喀痰培養より優先して行なうごとき施設 (例 九電病院: 同一期間内の喀痰培養 565 件、胃液培養 2,573 件、AM 検出件数それぞれ 8 件、10 件) では胃液培養の AM 検出率は低いことから推察される。

一方 AM がある時期に頻回に検出された病

図 4 結核菌培養時非定型抗酸菌検出表 (病棟別, 時期別)

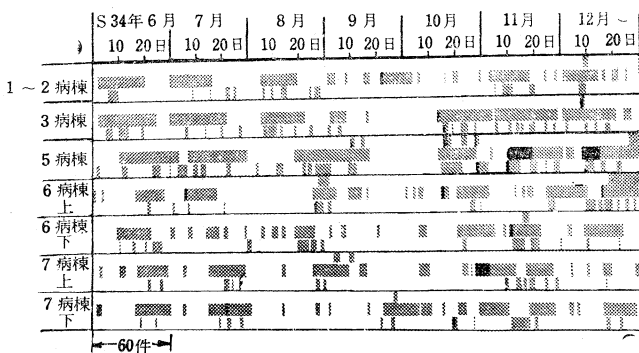


表 12 同一時期に見出された AM 株間の類似性

培養月日	患者名	株番号	病棟病室	AM 種別	抗凝性 KI.	中性紅	N T C	R Telling	カメラゼ	ペダーオキシ	Generation time	集落初発日	寒天発育	Wong-Wong	Leber 管	コード	集落(型) 菌(色)	薬剤耐性 (対照と同じ γ/cc)					
																		SM	PA	SI	IN	HS	VM
6. 1	■	108	2S-4	Non chrom	15'	5' (pH 9.5)	γ/cc 300	γ/cc 10	秒 20.1	+	h 9.5	H 16	-	+	-	(-) Tween 0%	副 S	100	100	10	100	100	200
6. 2	■	97	2N-2	"	15'	10' (pH 9.5)	300	10	13.8	+	5.9	17	-	+	-	"	副 S	/	/	/	/	/	/
6. 9	■	101	2N-5	"	15'	5' (pH 9.5)	300	10	10.5	+	9.2	9	-	+	-	"	副 S	100	100	10	100	100	200
6.10	■	96	3S-3	"	15'	30' (pH 9.5)	300	10	18.4	+	8.7	C	-	+	-	"	副 S	/	/	/	/	/	/
6.11	■	98	1S-2	"	15'	5' (pH 9.5)	100	10	10.0	+	9.0	9	-	+	-	"	副 S	<1	<1	1	<10	100	<2
6.15	■	105	2N-3	"	15'	1' (pH 9.5)	300	10	19.0	+	5.6	8	-	+	-	"	副 S	10	100	10	100	100	200
対 照	100616			Non chrom	10'	1' (pH 10.5)	10	<10	8.0	-	/	7	-	##	-	(-) Tween 0%	副 S	1	10	10	<10	100	20
	121326			"	15' <	5' (pH 9.5)	30	10	8.0	+	(10.9) ^p	6	-	##	-	"	副 S	10	10	0.1	10	<5	20
	# 7			"	3'	20' (pH 9.5)	3	<10	6.2	-	/	7	-	+	-	"	副 S	1	<1	0.1	<10	<5	2
	蒲生			"	15'	10' (pH 9.5)	3	10	10.6	+	5.9	8	+	+	-	"	副 S	<1	10	0.1	<10	<5	2
	外山			"	15'	60' (pH 10.5)	100	10	8.7	±	±	8	-	+	-	"	副 S	1	100	1	<10	100	20

図5 結核菌培養時非定型抗酸菌検出表
(病室別, 時期別)

		10月				11月				12月						
		5	10	15	20	25	5	10	15	20	25	5	10	15	20	25
5病棟上	個室															
	7															
	8															
5病棟下	個室															
	7															
	8															
6病棟上	個室															
	9															
	10															
	11															
6病棟下	個室															
	9															
	10															
	11															
7病棟上	個室															
	9															
	10															
	11															
7病棟下	個室															
	9															
	10															
	11															

院において、その検出の状態を詳細にみると、図4の屋形原病院における *Scotochromogen* 検出の場合にみるごとく、5, 6, 7病棟に多発している。なお図中灰色の矩形または線の面積は検査例数を、矩形の向かつて左端の縦の辺の目付においてその検査を行なったことを示す。したがって各病棟欄中央を占める比較的大きい矩形は定例的培養、その上下の縦線が定例以外の培養を示す。また黒色の部分は AM 検出例数を示す。図5は図4の10月、11月、12月における第5, 6, 7病棟の部分のみを拡大し、病室をも示したものである。図によれば、一定検査日に多発したというよりも、一定病棟ことに個室以外の室において多発したというのではないかと考える。

また表12上段は昭和34年6月1日~6月15日の間に国立福岡療養所の喀痰培養において得られた *Nonchromogen* の全部であつて、いずれも1~数コの集落をみたのみであるが、これらの6株は相互にはなほ類似点が多い(下欄対照株参照)。ことにNo.98株を除いてはほとんど全く同一性状であるが、これらの患者の病室が比較的近接していることも上記の屋形原病院の例と一致する。

最後に AM が抗酸菌の分類学上にいかなる位置を占めるか、また AM 相互間において集落の色彩等以外になんらかの本質的相違を見出すことは可能であろうか、と考へて次の試みを行なった。すなわち、われわれは数年前各種細菌の Debye-Scherrer の X 線廻折像を撮つて、*Mycobacterium* は他の細菌と異なり、特有の Halo を示すこと、その Spacing は $4.26 \sim 4.27 \text{ \AA}$ に相当し、結核菌ではそれが強く、また鮮鋭であるが *M. phlei*、*M. smegmatis*、*M. ranche* 等ではやや幅広く、鮮鋭で

ないことを示した。同様の条件において、人型結核菌および *Photochromogen* はその培養期間の長短に関係なく従来と同様に 4.27 \AA の付近に1つの Halo を示したに反し、*Nonchromogen* および *Scotochromogen* は培養8週以後の菌では従来の Halo の外側に1~数本の明瞭な Halo を示した。このことはおそらく菌体の一部ことに菌体外表に特異な物質を形成し、これが結晶状格子構造をとるものと考えられる。この物質が何であるかまだ明瞭でないが、このことから *Nonchromogen*、*Scotochromogen* は、人型結核菌等の他の *Mycobacteria* とはや異なる由来と性質をもつものではないかと考えられる。

総 括

薬剤耐性菌感染の頻度を調査して未治療患者の約20%に耐性菌を見出した。そのうち、INH耐性菌の検出はSM耐性菌に比して著明に僅少であつた。一方排菌源たる臨床例の耐性検査成績等より推論して、健康人への感染、その後の増殖等の条件においてINH耐性菌は一般に「ひと」に対しても菌力低下がみられると考えられ、Catalase陽性の一部のINH耐性菌のみが感染あるいは発病能力を有すると推察された。

しかるに重症耐性例においては、INH耐性菌の菌力低下が臨床的に好結果をもたらすとき証拠はSM耐性例との比較においては得られなかつた。すなわち一般的な菌力低下という概念を個々の症例の場合に適用することは必ずしも妥当ではなく、HostとParasiteの相対的關係において考慮すべきであると考へる。

いわゆる非定型抗酸菌AMの培養検査における発現率は約0.5%であり、*Photochromogen* は見出しえない。*Nonchromogen* の出現率は *Scotochromogen* のそれに比較して僅少であるが、菌力は一般にやや強い。しかしそれが病因をなすと疑わしめる例ははなはだ僅少であつた。

Nonchromogen、*Scotochromogen* の検出状態上より考へて、これらは多くは *Saprophytic* であつて一時的に上気道等に寄生を行ない、また周囲に一時的な保菌者を作りうるにすぎないが、耐性結核菌においてもみることごとく、AM株中でもやや菌力の強いものはHostの状態如何によつては感染あるいは発病を生じうると考へられる。

AM症例の臨床像についてはわが国では現在のところただ疑わしき症例の菌株と臨床像のDataをもつばら集積すべき段階であつて、それ以上に出るべきではないと考へる。

なお *Nonchromogen* と *Scotochromogen* は Debye-Scherrer の X 線廻折像から結核菌等の抗酸菌とはやや異なる像を示した。このことはなお検討の余地を残すが、おそらく結核菌等とはまた異なる由来のものであると推察された。

1. 抗酸菌の変異と分類に関する問題

発 言 (1)

抗酸菌の分類とナイアシンテストおよびニコチンアミダーゼテスト

東北大学抗酸菌病研究所 今 野 淳

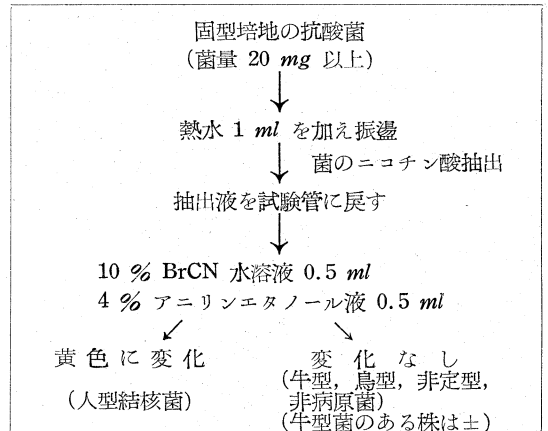
いわゆる非定型抗酸菌“*Atypical Acid-fast Bacilli*”とは何かということには諸説がありまだ明確な定義はない。ある人は人間に病原性がありしかも結核菌と異なる抗酸菌というように病原性のあるものだけに限定して考え、またある人は人間あるいは動物から得た抗酸菌で非定型集落を作る抗酸菌をすべて非定型菌と称している(占部薫：昭和35年日本結核病学会演説)。私は人間から得た抗酸菌で人型結核菌のみを“定型菌”(Typical)と称しそれ以外の、人間から得た抗酸菌をすべて“非定型菌”(Atypical)とよびたい。なぜなら人間から得た抗酸菌で病原性のあるいわゆる非定型菌は非常に範囲が広く集落の外観、菌の性質も非常に異なりその中のある株は人間に病原性のない菌と区別のつかないものもある。すなわち病原性の非定型菌とそうでない非定型菌の間に生物学的には相当な overlap があり非定型菌は1つのTypeでないとも考えられる。このように動物実験やその他の試験で現在のところ病原菌と非病原菌とはつきり区別できないものははじめから分類しないで一応非定型菌と名づけたほうが臨床的には便利であろうと思う。また日本では牛型菌や鳥型菌の人間に対する感染はほとんど皆無であるので臨床的にはあまり問題とはならないが、培養上人型菌と異なつた態度を示すので非定型菌の中に入れてたいと思う。非定型菌を人間に対する病原菌と非病原菌(雑菌性非定型菌)とに分ける。

人間より得た抗酸菌の分類(臨床的分類)

- A) 定型菌 (Typical)
人型結核菌
- B) 非定型菌 (Atypical)
- 1) 病原非定型菌
Paratubercle Bacilli
Anonymous Mycobacteria
Anomalous Mycobacteria
Pathogenic Atypical Acid-fast Bacilli
 - 2) 非病原非定型菌(雑菌性)
Nonpathogenic Atypical Acid-fast Bacilli
Saprophytic Atypical Acid-fast Bacilli
 - 3) 牛型結核菌
鳥型結核菌

まず定型菌すなわち人型菌と非定型菌との鑑別であるが、これにはもつとも簡単な Niacin-test をすすめた。この方法によれば抗酸菌のうち人型菌だけが陽性に出るが人型菌以外の抗酸菌はすべて陰性に出る (Konno, K. : Science, 124 : 985, 1956 ; 今野淳他 : 日本臨床結核, 17 : 504, 昭33 ; Runyon, E.H. et al. : Am. Rev. Tuberc., 79 : 663, 1959)。このうち Runyon の Modification がよく出るようである。この Niacin-test は世界各国で追試されているが大休人型菌は 96~100 % 陽性に出るし、人型菌以外の抗酸菌は 97~100 % 陰性に出ている信頼できる方法であると思う(表1)。

表1 Niacin-test (直接法)



定型菌のごとき集落を呈していてもそれが非定型菌であることはしばしばあるので注意を要する。われわれは (Konno, K. et al. : Am. Rev. Tuberc., 77 : 669, 675' 1958) 米国において Technician が結核菌と診断した抗酸菌の中に 1 % もいわゆる非病原性非定型菌が混在していることを Niacin-test および動物実験で確かめた。すなわち米国で培養上からのみ診断をしている Technician の診断には 1 % の間違いがあるということである。これは結核の診断上非常に重要であるから間違いのないようにしなければならない。また逆に現在日本で人間に病気を起こす病原性非定型菌として論文に発表され、戸田先生を班長とする抗酸菌の変異と分類研究班で研究している日本の非定型菌株の中にも数株 Niacin-

test 陽性のものがあり、それらは動物実験その他の試験たとえば Bacteriophage, 化学療法剤に対する感受性などから人型菌と同じ態度を示し人型菌ではないかと疑われている株もある(武谷健二: 昭和 35 年日本結核病学会演説)。すなわち定型菌と思われる菌の中にも非定型菌があり、非定型菌と思われる菌の中にも定型菌があるのでその鑑別には慎重でなければならない。Niacin-test のほかには動物に対する病原性, Cord 形成, 中性紅反応, ネオテトラゾリウム試験および抗結核剤に対する感受性などがある。人型菌と非定型菌は上記の生物学的試験で割に画然と区別されるが、非定型菌の中の病原菌と非病原菌との間には生物学的試験上画然たる差はない。

人間で牛型菌の感染が疑われる場合, BCG の感染が疑われる場合, ことに BCG は現在のところ動物実験その他の Test では BCG であるとする決め手がない。このときはわれわれのニコチンアミダーゼテストをすすめたい。このニコチンアミダーゼは抗酸菌のうち牛型菌だけが陰性に出る他の抗酸菌はすべて陽性に出る(Konno, K. et al. : Nature, 184 : 1743, 1959)。われわれはナイアシンテストとニコチンアミダーゼテストを用いて BCG 接種後できた Lupus Vulgaris から培養した菌をたしかに BCG と同定した(表 2, 3)。

Runyon によれば(Runyon, E. H. : M. Clin. North

表 2 ニコチンアミダーゼテスト

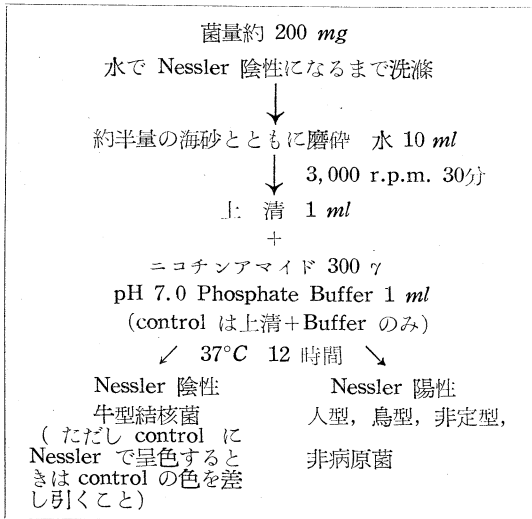


表 3 抗酸菌の生化学的分類

型	ナイアシンテスト	ニコチンアミダーゼテスト
人型結核菌	+	+
牛型結核菌	-	-
鳥型結核菌	-	+
Anonymous Myco.	-	+
非病原抗酸菌	-	+

America, 43 : 273, 1959) 彼は非定型抗酸菌を 4 群に分けている。すなわち光発色菌 (Photochromogen), 光不発色菌 (Nonphotochromogen), 暗発色 (Scotochromogen) および迅速発育菌 (Rapid growers) である。このうち彼は Scotochromogen の大部分および Rapid growers のほとんど全部は人間に非病原性の菌であるとしており、彼の分類でも病原菌, 非病原菌をとくに区別していない。すなわち米国でも最近是非定型菌を広く考え、必ずしも人間に病原性のあるものばかりではなく人間から得た抗酸菌で、非定型集落を示すものをすべて Atypical Acid-fast Bacilli とよぶ傾向にある。この考え方は実際的でわれわれの見解と一致する。

Tarshis (Tarshis, M.S. et al. : Am. Rev. Tuberc., 65 : 278, 289, 302, 1952) は肺膿瘍および肺結核患者から分離した Chromogenic Acid-fast Bacilli がある程度動物に病原性があることを報告し、また戸田先生は(戸田忠雄他: 昭和 35 年日本結核病学会講演) 犬から分離した抗酸菌が病原性の Nonphotochromogen に類似していることを発表している。すなわち非定型菌のうち病原性の菌は人型結核菌が化学療法剤のために変異したと考えるよりも、むしろ自然界にある抗酸菌のうちある程度病原性のあるものが人間に付着して、その host の抵抗性の減弱が何かの理由でその host に疾患を起こしたと考えたほうが合理的であると思う。自然界抗酸菌と正常の人間から得た抗酸菌とを比べると後者のほうが人間に病原性のある非定型菌に近い性状を呈しているのは 1 つの淘汰ともみなされる。非定型抗酸菌症の多い米国で患者家族に 1 例も同じ菌の感染例が発見されないことから、人間から人間に感染する結核菌などとは異なるものが考えられる。

またこの非定型菌感染症には地方病的な傾向もみられる。すなわち Edwards によると(Edwards, L. B. et al. : Am. J. Pub. Health, 48 : 754, 1958) Nonphotochromogen による肺疾患患者および米国南部の住民は人型菌のツベルクリンには反応せず Nonphotochromogen のツベルクリンに反応するものが多く、北部の住民は人型菌ツベルクリンに反応するものが多かつた。実際 Crow によると(Crow, H. E. et al. : Am. Rev. Tuberc., 75 : 199, 1957) 米国南部の Georgia 州では Nonphotochromogen による患者がすべての非定型菌患者 69 例中 64 例もあり、南部には Nonphotochromogen による感染が多いことを示している。これに反し米国北部ことに Chicago 付近では Photochromogen 感染が多く(Keltz, H. et al. : 16th Veterans Administration Conference, p. 290, 1957) 非定型菌の 22% もあったが Nonphotochromogen はわずかに 2% であつた。すなわち南部と北部では感染の様相を異にしている。日本では現在まで発見された非定型菌感染症には 1 例も

Photochromogen はなくすべて Nonphotochromogen か Scotochromogen であつた (武谷健二 他: 昭和 35 年 日本結核病学会シンポジウム)。

またわれわれの調査でも (Sato, K.: Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ. Ser. C, 9, No. 2, 1960) 肺結核患者より培養陽性の抗酸菌のうち結核菌が 632 株に対して非定型菌が 43 株 (0.5%) であつたが、そのうち Photochromogen は 1 株もなく Nonphotochromogen

が 20 株, Scotochromogen が 23 株あつた。同じ非定型菌を続けて略出し非定型菌感染症と思わせるものはなかつた。また米国では非定型菌感染症が多く入院肺結核患者の 1~2% もあるというが、わが国でははなはだ希有で現在までわずかに全国で 10 数例を数えるにすぎない。以上のことからわが国の非定型菌感染症は外国ことに米国とは大分その趣を異にしているものと思う。

発 言 (2)

東京大学医学部細菌学教室 秋 葉 朝 一 郎

患者から分離された抗酸菌と患者の間に、免疫学的な関連性が証明されるということが、Atypical mycobacteria, Atypical mycobacteria 症の診断にはかなり重要なことであると考えられるので、Atypical mycobacteria と感染動物ないしは人間の間に、特異的な免疫学的反応をなんらかの方法でみるのができないかと考え、培養濾液を用いた皮内反応を試みた。

家兎、モルモットを、それぞれ $H_{37}Rv$ の死菌で免疫し、または上田株に感染させ、それらの動物にソートンツベルクリン、上田株培養濾液を用いて皮内反応を行ない硬結をもつて判定した。

上田株感染動物はツベルクリン反応が陰性で、上田株培養濾液による皮内反応が陽性であり、 $H_{37}Rv$ で免疫した動物はその逆である。すなわちかなり特異的な反応を起こさせる。

健康者および肺結核患者について、同様の皮内反応を行なうとツベルクリンと上田株培養濾液に対し、ともに

陽性な例は非常に少なく、その場合は例外なくツベルクリン反応が(++)の場合であり、しかも上田株培養濾液に対する反応がツベルクリン反応よりもはるかに弱い。

上田株を排菌している患者ではその逆で、ツベルクリンに対して弱陽性、上田株培養濾液に対して強陽性であつた。

この皮内反応の結果から、Atypical mycobacteria らしい菌を排出している患者があつた場合、その菌と患者の免疫学的な関連の検査として、1,000 倍培養濾液による皮内反応を行なうことが役立つだろうと考えられる。

さらに、われわれは他の一般細菌の場合に準じて凝集反応を行なつて、Atypical mycobacteria を他の抗酸菌から区別することができないかと考え実験を行なっているが、少なくとも上田株を *M. phlei*, *Ravenel*, 竹尾からは区別できたが、このことについては次の機会に述べたい。

発 言 (3)

人型結核菌 ($H_{37}Rv$) および非定型抗酸菌培養濾液抗原の 寒天拡散沈降法による比較解析

大阪大学微生物病研究所 堀 三 津 夫
竹尾結核研究部

非定型抗酸菌の *Mycobacterium* 属における分類学的位置は現在なお明らかでない。われわれはすでに人型結核菌 ($H_{37}Rv$) の非加熱培養濾液より、硫酸分画および澱粉を支持体とするゾーンエレクトロフォーシスによつて、沈降元性をもつ 4 つの易熱性蛋白画分 (I, II, III, IV) を得ているが、今回はこの蛋白抗原の非定型抗酸菌培養濾液中におけるその存否、さらにその微細な抗原性の異同について、寒天ゲル内沈降反応による解析の結果を述べる。

使用菌株は、非定型抗酸菌として No. 1, No. 7, No. 8, No. 22, その他 $H_{37}Rv$, $H_{37}Ra$, BCG, *M. phlei*, *M. avium* で、これらの粗抗原は表 1 のごとく調製された。抗血清は、各粗抗原を Freund の incomplete adjuvant とともに家兎に 2 回筋肉注射することによつて得られた。抗原量は初回注射 30 mg タンパク、ブースター量は 5 mg タンパクである。このようにして得た粗抗原および対応する抗血清と先述した $H_{37}Rv$, I, II, III, IV の各画分の沈降反応は、Ouchterlony の寒

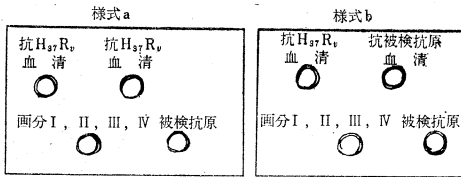
表 1 粗抗原の調整法

全 培 養
↓ 濾紙濾過 Seitz filter で濾過
非加熱培養濾液
↓ 硫酸 80% で沈澱
沈 澱 画 分
↓ borate-phosphate buffer pH 8.3 μ=0.1 に透析
粗 抗 原
使用菌株：非定型抗酸菌 No. 1, No. 7, No. 8, No. 22, H ₃₇ Rv, H ₃₇ Ra, BCG, M. phlei, M. avium (竹尾)

表 2 寒天拡散法による成績

菌 株	H ₃₇ Rv 画分			
	I	II	III	IV
No. 1	+ (Spur)	-	+ (Spur)	-
No. 7	+ (Spur)	-	+ (Spur)	-
No. 8	+ (Spur)	-	+ (Spur)	-
No. 22	+ (Spur)	-	+ (Spur)	-
BCG	+	+	+	+
H ₃₇ Ra	+	+	+	+
M. phlei	- ?	-	- ?	-
M. avium (竹尾)	- ?	-	- ?	-

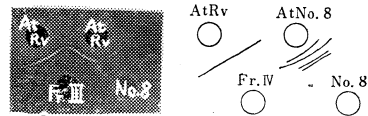
寒天拡散法を用い、次のごとき2つの様式によつて行なわれた。



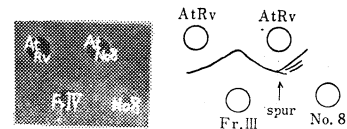
寒天ゲル内沈降法による解析の結果は表 2 に示してある。この表から明らかなように、非定型抗酸菌粗抗原中には、1) II, IV の画分に相当する抗原は認められず (写真A), 2) I, III 画分と cross react する抗原が存在している (写真B)。

以上の所見は、使用した非定型抗酸菌培養濾液抗原がその構成において H₃₇Rv, H₃₇Ra, M. phlei, M. avium のそれと異なることを示している。

現在、他の非定型抗酸菌についてもその培養濾液抗原



写真A H₃₇Rv 画分 IV と No. 8 粗抗原との関係 (様式・b)



写真B H₃₇Rv 画分 III と No. 8 粗抗原との関係 (様式・a)

の分析が行なわれているが、表 2 の結果はさらにこのような培養濾液抗原の解析が Mycobacterium 属の分類または変異に一般的な指標の 1 つとして役立つ可能性のあることを示唆している。

発 言 (4)

北海道大学結核研究所 高 橋 義 夫

任意に選んだ数種のいわゆる非定型抗酸菌および結核菌から同一方法でツベルクリン蛋白, 多糖体, 菌体蛋白多糖体および磷脂質を分離し, これら抗原物質を感作原として各菌株の抗血清(ウサギ)との間に交叉赤血球凝集反応を行なつたところ(綿羊血球), 表に示すような成績

を得た。すなわちいわゆる非定型抗酸菌の抗原構造は定型結核菌とは著しく異なっているが, 主要な共通抗原は菌体蛋白にあるらしい。しかし菌体蛋白もあまり共通していないものもある (# 4 および 100616)。磷脂質は非定型抗酸菌のグループとしての共通抗原になつている

非定型抗酸菌の血清学的性状 (赤血球凝集反応による交叉反応)

抗血清		# 8	100616	Forbes	# 4	# 1	# 6	人 型 菌
ツ 多 ベ ル ク リ ン 糖 体	# 8	—	—	—	—	—	—	—
	100616	—	—	—	—	—	—	—
	Forbes	—	—	—	—	—	—	—
	# 4	80	10	20	10	—	40	20
	# 1	160	40	80	—	—	80	160
	# 6	—	—	—	—	—	—	—

菌体多糖体	# 8	—	—	—	—	—	—	—
	100616	80	160	80	40	40	160	320
	Forbes	—	—	—	—	—	—	—
	# 4	—	—	—	—	—	—	—
	# 1	—	—	—	—	—	—	—
	# 6	—	—	—	—	—	—	—
	H ₃₇ Rv	320	320	320	320	320	320	320
磷脂質	# 8	—	—	—	—	—	—	—
	100616	—	1,280	—	—	—	—	—
	# 4	320	40	320	320	320	320	—
	# 1	160	20	320	320	320	320	—
	# 6	40	40	320	320	320	320	—
	H ₃₇ Rv	320	320	320	320	80	160	320
ツベルクリン蛋白	# 8	—	—	—	—	—	—	—
	100616	—	—	—	—	—	—	—
	Forbes	—	—	—	—	10	10	10
	# 4	20	20	160	80	80	160	40
	# 1	160	160	—	10	—	40	320
	# 6	—	—	10	80	160	80	20
	B C G	—	—	—	160	320	160	640
菌体蛋白	100616	—	320	—	20	20	10	20
	Forbes	1,280	1,280	1,280	1,280	1,280	1,280	1,280
	# 4	—	—	20	320	320	80	—
	# 1	160	20	1,280	160	640	1,280	1,280
	# 6	1,280	1,280	1,280	1,280	1,280	1,280	1,280

が、人型結核菌とは共通していない。とくに type specific ともいうべき磷脂質抗原があることは興味深い(100616)。

以上は赤血球感作能を有する抗原からみた成績である

が、一般に抗原の赤血球感作能と in vitro の抗原性とは無関係であるから、沈降反応、補結反応のような直接抗原抗体反応をみる血清反応を用いれば別の成績が出る可能性はもちろん考えられる。

発 言 (5)

国立予防衛生研究所 柳 沢 謙

1954年 Timpe および Runyon が人の結核症と似た疾病の病原菌として考慮すべきものとして Atypical acidfast bacilli, Atypical Mycobacteria, Anonymous Mycobacteria などの名のもとに、ある抗酸菌を発表して以来、各方面の注目を浴びるにいたつたことは、このシンポジウムをここで取り上げられた1つの理由になつたことと思う。

しかし、昨今、各国において分離研究されている非定型抗酸菌は喀痰から分離された抗酸菌ではあるけれども、必ずしも、それが Timpe および Runyon がさきにいつた病原菌として考慮されないものも研究の対象とされているようである。

昨年9月行なわれた第15回国際結核病学会の非定型抗酸菌の問題についてのシンポジウムにおいて、ア

リカの Jenkin によれば培養陽性者1,360名中非定型抗酸菌だけが陽性のものが実に385名(28.3%)の多きにのぼり、結核菌と混在しているものが190名(14.0%)ということであつた。これに対し、イギリスの Mitchison は0.6%、イタリアの Besta は0.5%、ポーランドの Paryski は2%、スウェーデンの Hedvall は1%、カナダの Burke は4%でアメリカの報告とはその分離率において著明に差異がある。わが国においても、アメリカのごとく高率に非定型抗酸菌が分離されるようには思われぬ。このような差異は抗酸菌の各国の分布差にただちに結びつける前に、喀痰からの結核菌の分離培養法を比較検討する必要がないかと思う。アメリカではわが国と異なりアルカリ前処理後、酸で中和してから分離培地に移植するに對し、わが國の小川法ではア

ルカリで処理したのち中和することなしに小川培地に移植するので、アメリカの場合よりアルカリに作用する時間が相当長いと考えねばならない。それで私は高橋(宏)とともに表1に示すような方法で、人型結核菌 H₂ 株(予研保存株)、非定型抗酸菌 Forbes 株、Bostrum 株および松本株(九大より分与)および非病原性抗酸菌 Mycobacterium 607 に対する NaOH, H₂SO₄ および Zephiram (逆性石鹼)の殺菌作用を比較した。成績は表2に示すように、NaOHの殺菌作用は明らかに人型菌より非定型抗酸菌および非病原性抗酸菌では強いことが分かる。Zephiram および H₂SO₄ の殺菌作用は人型菌と非定型菌との間に著差はないが非病原性菌に対してはきわめて強いといえる。

以上のことから、わが国でもアメリカ方式の分離培養法を行なえば、あるいはアメリカと同程度の非定型抗酸

表1 抗酸性菌の前処理剤による影響について

使用菌株 人型 H₂
非定型 Forbes, Bostrum, 松本
非病原性 M. 607
Kirchner 液体培地発育菌で物理的刺激を受けない菌浮游液を用いた。
前処理法

実験群	前処理剤	菌液 (2mg/ml) との混合比	培養
A	対照(蒸溜水)	1 : 1	中和せずに培養 NaOHで中和後培養
B	4% NaOH	1 : 1	
C	0.1% Zephiram	1 : 1	
D	4% H ₂ SO ₄	1 : 3	

前処理剤接触 30 分, 60 分後に 1% KH₂PO₄ 培地に定量培養して生菌数を調べた。

菌が分離されるかもしれないと推測される。

次に、非定型抗酸菌の分類については、Runyon の提案になる、第 I 群 photochromogens, 第 II 群 Scotochromogens, 第 III 群 Nonphotochromogens, 第 IV 群 Rapid grower が一応の分類として国際学会では認められたが、これは培養速度、集落の色および光線による集落の変色によつて分類したものできわめて Primitive な分類法といわねばならない。

非定型抗酸菌と結核菌の鑑別法として種々のものがあるが、そのうちで、Niacin test (今野) が世界各国のこの方面の研究者に賞用されていることは今野博士に対して改めて敬意を表する次第である。

表2 前処理剤による生残率

菌型	菌株	接触時間 (分)	前処理方法			
			4% NaOH	0.1% Zephiram	4% H ₂ SO ₄	%
人型	H ₂	30	28.3※	83.3	77.7	
		60	21.6	77.7	50.0	
非定型	Forbes 84 (Photo)	30	0.68	68.1	84.0	
		60	0.19	36.2	34.0	
非病原性	Bostrum D-35 (Photo)	30	1.1	81.1	74.0	
		60	0.28	80.0	40.0	
非病原性	松本 (Scoto)	30	10.0	100.0	44.0	
		60	1.7	44.0	22.0	
非病原性	M. 607	30	0.0002	0.017	0.0077	
		60	0.0002	0.0073	0.0046	

注: ※は対照(蒸溜水処理)群の生菌数に対する各処理群の生菌数を百分率で示した。
M. 607 は培養1週後その他は4週後に判定した成績を示した。

座長報告

九州大学医学部 戸田 忠雄

このシンポジウムは現在問題になっている非定型抗酸菌を中心にして各演者および追加者を選んだ。その中でも室橋氏には、変異そのことが非定型菌に関係があるというような考えかたをしているものが欧州の学者のなかにはあるので、耐性者と変異との関係のありかたを基礎的に論ずるために方法論的に演説をしてもらった。占部氏には非定型菌の伝染経路などを知るために自然界の抗酸菌と人体に由来するいわゆる非定型菌の生物学的性状の差異を比較検討した結果の報告をしてもらった。武谷氏はツベルクリンを主とした抗原性の特異性を検討し、さらにその成績とバクテリオファージに対する感受性について検討し、ある程度分類に対する基準のできる可能性について述べた。山村氏は Cord Factor の特殊性を認

めると述べて今後の研究に期待したいと報告した。杉山氏は非定型抗酸菌の九州地方における分布を臨床的立場から述べたが、その中で興味深い点は日本では photochromogen が見出だされないということであった。

シンポジウムの最初に戸田は非定型抗酸菌の定義について次のように述べて大体の賛同を得た。

ある患者からある菌株が一定期間頻回に分離され、それが結核類似の症状を起こしたと考えられる抗酸菌、およびこの菌と関連があると思える菌株を非定型抗酸菌として取り扱う。

なお分類については Runyon などを用いている 4 群に従うべきであるといつて菌株の供覧を行なつた。

第1群 Photochromogens (光発色菌)

暗所で培養した菌株に 30 ワットのランプを 45 cm のところから 1 時間照らして、暗いフラン器に納めて 6~12 時間後に黄色（レモン色）に変わる菌株（Yellow Bacilli）。

第2群 Scotochromogens

とくに光を当てなくても、オレンジ色を呈する菌株（Orange Bacilli）。

第3群 Nonphotochromogens

培養したままの白色の集落を保つもので遅れて多少淡黄を帯びるものも含める（Battey type）。動物に対す

る病原性を除けば鳥型菌に似た性質がある。

第4群 Rapid growers

発育の早い菌株で既知のものとしては *M. fortuitum* などがこれに含まれる。

今野氏は追加発言としてナイアシントテストが人型結核菌と非定型抗酸菌の鑑別に役立つことを述べ、ニコチンアミダーゼテストが牛型結核菌に陰性だと発表した。そのほか秋場、牛場、柳沢、高橋、平野の諸氏からも有益な追加があつて、有意義にシンポジウムを終わつた。