

マウスの実験的結核症における感染菌量と 生存率曲線との関係について

寺井武雄・永管徳子

国立療養所刀根山病院

受付 昭和 37 年 4 月 6 日

実験動物を用いて、菌の病原性あるいは免疫の解析を行なう場合には、宿主としての動物の系統および寄生体として宿主の体内で生活を営む感染菌株の選定は、実験成績の判定を容易にするとともに、その再現性および統計的処理を可能ならしめるうえで重要である。すなわち、結核の免疫実験に用いるマウスには、遺伝的に均一であることはもとより、結核菌に対する感受性が高く、そのうえに免疫獲得性の強いことが要求される。一方宿主の免疫獲得の程度を survival test を指標として評価する場合には、感染に用いる菌株の菌力が安定であり、さらに比較的少量感染で宿主を結核死させることが、自然感染に近く、また異物としての物理的影響を少なくするうえに必要な条件と考えられる。

われわれはマウスを用いて結核の免疫に関する実験を行なうのに先立つて、実験条件としてのマウスの系統および感染菌株の選定に関して基礎的な実験を行なうとともに、感染条件によって宿主群の survival curve に興味のある結果を得たので、これらの成績について報告する。

実験材料および方法

1. 動物

CF1系マウス：昭和35年7月、東京都中央実験動物研究所より分与された成熟マウスから本院動物室において繁殖させて得たものの中で、免疫時には生後約6週体重16g前後、感染時に体重20g前後の雄性マウスを使用した。動物はオリエン特母工業株式会社製の固型飼料と水道水で飼育し、固型飼料は繁殖用にはNMFを、実験中にはMFを用いた。

ddK系マウス：実験にさいして、大阪市共栄動物大阪営業所より入手し、約1週間本院動物室で飼育観察したのち、CF1系マウスと同じ条件で実験に供した。

2. 使用菌株

人型結核菌 H37Rv 株：1954年国立予研結核部より分与された。

牛型結核菌 Ravenel 株：1955年国立予研結核部より分与された。

牛型結核菌三輪株：

BCG：

上記3株はときどき動物を通過させながら、小川培地に継代保存し、BCGはときどき小川培地を通過させながら、Sauton培地に継代保存したもので、実験にのぞんでRavenel株はSauton-potato培地上に3週間前後培養し、その馬鈴薯上の菌苔を集め、その他の菌株は、Sauton培地上で3週間培養し液体表面上の菌苔を用いた。濾紙上に集めた菌塊をよく滅菌生理食塩水で洗滌、滅菌濾紙で吸湿したのち、beadsflask法によつてそれぞれ所定の濃度の菌液を調整した。

3. 免疫および感染

感染は生理食塩水0.2cc当りに所定量の菌を懸濁してマウスの尾静脈から注入した。免疫実験ではBCG0.5mg/0.2ccの菌液を腹腔内に注入し、4週後に感染を行なつた。

実験成績

1. 結核菌のマウスに対する病原性

体重20g前後のCF1系マウスを1群15匹とし、それぞれの群にH37Rv株、三輪株およびRavenel株0.5mg/0.2ccの菌液を尾静脈から注入し、感染後の死亡日数を記録するとともに、30日後に生存マウスを屠殺剖見した。

Ravenel株感染マウスでは30日以前に全例肺に多数の結節を形成して死亡したのに反して、他の2株感染マウスは全例生存し、しかも肺の肉眼的病変は軽度であつた。

したがつてRavenel株のマウスに対する病原性は他

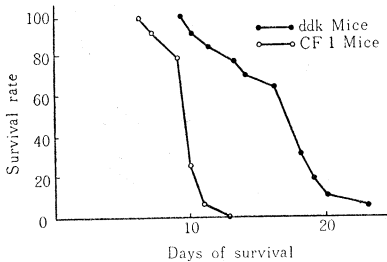
の2株に比べてきわめて強いと考えられるので、以後の実験には Ravenel 株を感染に用いることにした。

2. マウスの結核菌に対する感受性

体重約 18 g の CF 1 および ddK 系マウスをそれぞれ 15 匹ずつの群とし、これらの尾静脈から Ravenel 株 0.5 mg/0.2 cc (生菌単位 1.5×10^7) を注入し、感染後の各群マウスの死亡日数を記録するとともに、死亡マウスを剖検して肺の結節および脾の腫大を確認した。

各群のマウスの survival curve は 図 1 のごとくで、この成績から CF 1 系マウスは ddK 系マウスよりも感受性が高いとともに、それらの死亡日数の分散度から遺伝的にも均一に近いと考えられる。

Fig. 1. Survival Curve of Two Strains of Mice Injected Intravenously with 0.5 mg Wet Weight of Tubercle Bacilli, Ravenel Strain

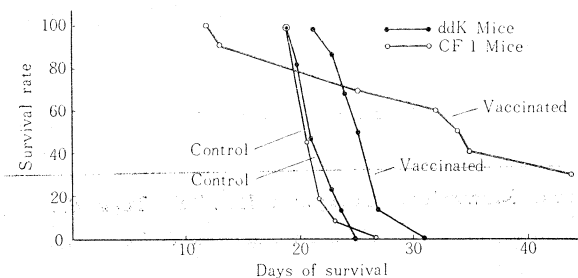


3. マウスの抗結核抵抗力獲得性

体重 16 g 前後の CF 1 および ddK 系マウスをそれぞれ 15 匹ずつの 2 群とし、そのおのおのの 1 群の腹腔内に湿菌量 0.5 mg の BCG を 0.2 cc の生理食塩水に懸濁して注入、他のおのおのの 1 群は対照として生理的食塩水のみを注入した。その後 3 週目に Ravenel 株 0.05 g/0.2 cc (生菌単位 8×10^5) を全群のマウスの尾静脈から注入し、それぞれの群のマウスの死亡日数を記録した。

その結果を CF 1 および ddK 系について、対照群

Fig. 2. Effect of BCG Vaccination in Two Strain of Mice



に対する免疫群の生存日数中央値の延長日数で比較すると、ddK 系群の 4 日に対して CF 1 系群は 14 日であり、またその survival curve は 図 2 に示すごとくである。

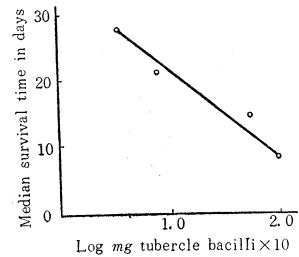
この成績から、BCG による抗結核抵抗力の獲得性においても CF 1 系マウスが ddK 系マウスよりも優れている。

4. 感染菌量とマウスの生存日数との関係

体重 18 g 前後の CF 1 系マウスを 15 匹ずつの 4 群に分ち、各群のマウスの尾静脈からそれぞれ湿菌量で、0.5, 0.3, 0.05 および 0.02 g の Ravenel 株を 0.2 cc の生理食塩水に懸濁して注入し、各群のマウスの生存日数を記録した。

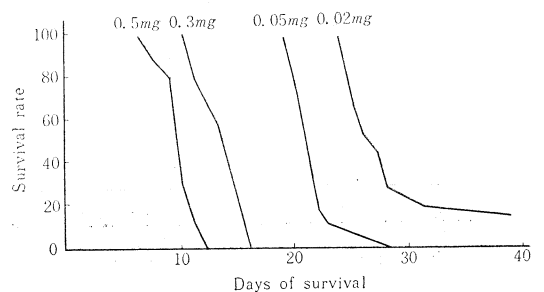
各群のマウスの生存日数の分布はほぼ正規分布を示し、また各群のマウスの生存日数中央値は 図 3 に示すように感染菌の湿菌量に逆比例する。

Fig. 3. Correlation between Injecting Doses of Tubercle Bacilli and Median Survival Times of Mice



ところが感染菌量が少なくなるに従って正規分布から離れ、生存日数が延長したマウスの匹数が増してくる。これを survival curve によつて考察すると 図 4 にみられるように、感染菌量の多い場合にはその曲線がほぼ一相性であるのに対して、感染菌量の少ない場合には二

Fig. 4. Survival Curve of Mice Injected Intravenously with Doses of Tubercle Bacilli



相性になる。しかも感染菌量が少なくなるにつれて第二相が著明になってくる。

この第二相は感染後3週以後に現われ、またBCG免疫マウス群の survival curve にもみられるので免疫獲得を示唆するものと考ええる。

考 察

結核の実験にマウスを用いる場合にはマウスと結核菌との相互関係が実験条件としてきわめて重要な因子となる。一般にマウスは結核菌に対する抵抗力が強いといわれているが、多数の動物を集団として用いることができ、また遺伝的に均一な系統が得やすいという利点があるので、これを結核症の諸問題の解析に用いることははなはだ有利であり、また実験を容易にする。しかし結核菌に対する感受性の点においてマウスの系統間の差異は大きく、さらにその系統の遺伝的均一性は実験成績を評価するうえにきわめて重要な因子である。

本報では入手しえたCF1およびddKの2系統のマウスについて結核菌に対する感受性およびBCG免疫による感染防禦力獲得性について調べた結果、いずれの点においてもCF1系マウスのほうが優れており、感染後の死亡日数の分散度から推して、遺伝的にもCF1系のほうが均一に近いと考えられる。一方感染に用いる菌株についてみると、従来の動物実験では主としてH37Rvをはじめ人型結核菌が用いられているが、Ravenel株のほうがはるかに菌力が強く、0.005 mgの感染によつても感染後3週間後でマウスの肺に致命的な多数の結節を形成する。以上の成績から考えて結核菌の毒力あるいは免疫に関する実験を survival test を指標として行なう場合には、CF1系マウスとRavenel株の相互関係を実験条件として選ぶことは適当であると考ええる。

感染菌量と感染マウスの生存日数との関係についてはすでに Youmans ら¹⁾は Strong A マウスと H37Rv の系について報告しているが、本報で選んだ host-parasite 系でも、感染菌量が 0.5 mg と 0.02 mg の間では感染マウスの生存日数中央値が感染菌量の対数に反比例するという結果を得た。この成績は実験的結核症のマウスの死亡が in vivo における生菌数の水準に関係のあることを示唆する。

ところが、それぞれの感染菌量によるマウス群の survival curve をみると、感染菌量の多いときには curve がそれぞれの生存日数中央値の点を通る一相性の平行線を示すが、菌量が少ないときにはこの curve の勾配が途中から緩やかになる二相性となる。BCG免疫マウスに感染を行なうと、主として第二相に平行な曲線を得る。第二相が微量感染後3週以後に現われること、また微量毒力菌感染のさいには、菌が宿主体内で静的平

衡を保つてこれに免疫を与えるという成績²⁾、およびマウスのBCGによる免疫獲得時期³⁾から考えて第二相の出現は免疫機転の成立に関係があるものとする。さらに、感染菌量によつて第二相出現時期が異なることは免疫獲得の時期が感染菌量に支配されることを示す。

免疫マウス群の感染後死亡日数の分布は非免疫群と異なり bi-modal になると Youmans らも報告しているが⁴⁾、彼らの場合にはその第一峰は非免疫群の死亡日数分布に一致し、この時期に死亡する免疫マウスは感染に対する防禦力の上昇はなく、その死因は肺における菌数の増加を伴う壞疽性渗出性変化によるものであるとしている。一方免疫マウスの体内においては感染菌の増殖が抑制されるという報告^{4)~6)}も多い。もちろんマウス体内における菌の増殖の程度は、免疫の程度と感染菌量との平衡によると考えられ、本報において免疫マウスの第一相が非免疫群よりも遅れて現われるのは、宿主側の感染菌増殖抑制機転が強く作用しているものと考えられる。さらに免疫群で第二相が著明に現われてくるのは、免疫の機転が宿主体内における菌の増殖抑制だけでなく、組織の細胞性反応の変化を誘起する作用^{4)7)~9)}も含まれていることを示唆する。後者の機転があるとしてもそれが質的なものか量的なものかにも問題がある。

BCG免疫マウスの survival curve で、さらに興味のあることは、非免疫群の死亡に先行して少数マウスの死亡がみられることである。その時期は感染後1週間前後であり、感染菌数がマウスを致死せしめる水準に達しない時期である。Youmans ら⁴⁾はアレルギー反応に由来するものであろうと推論しているが、この問題に関してはさらに解析する必要がある。

結 論

1) 結核菌の病原性あるいは抗結核免疫の実験を survival test を指標として行なう場合に、host-parasite system として、CF1マウス—牛型Ravenel株の系を用いるとよい。

2) この系において、感染菌量が 0.5 mg と 0.02 mg の間では、感染マウスの生存日数中央値は感染菌量の対数に逆比例する。

3) 感染マウスの survival curve は大量感染の場合には一相性曲線を示し、少量感染の場合には二相性となる。BCG免疫マウスに感染を行なうと、少量感染のときと同様に第二相を主とする曲線となる。したがって第二相の出現は免疫機転の成立に由来するものと考ええる。

本論文の要旨の一部は、第37回結核病学会総会(昭和37年4月)において発表した。

References

- 1) Youmans, G. P., & Youmans, A. S.: *Am. Rev. Tuberc.*, 64: 534, 1951.
- 2) Rees, R. J. W., & Hart, P. D'Arcy: *Brit. J. Exp. Pathol.*, 42: 83, 1961.
- 3) Bloch, H., & Segal, W.: *Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.*, 71: 228, 1955.
- 4) Youmans, G. P., & Youmans, A. S.: *J. Immunol.*, 78: 318, 1957.
- 5) Conge, G., Collin, E., Levy, F. M., & Dubos, R. J.: *Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.*, 79: 484, 1959.
- 6) Sever, J. L., & Youmans, G. P.: *Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.*, 76: 616, 1957.
- 7) Fong, J., Chin, D., & Elberg, S. S.: *J. Exp. Med.*, 115: 475, 1962.
- 8) Suter, E.: *J. Exp. Med.*, 97: 235, 1953.
- 9) Oshima, S., Myrvik, Q. N., & Leake, E.: *Brit. J. Exp. Pathol.*, 62: 138, 1961.

The Correlation between the Infecting Doses of Tubercle Bacilli and the Survival Curve of Mice in Experimental Tuberculosis

Host-parasite system is an important factor for the studies on the virulence or immunity in the experimental tuberculosis. Data will be presented in this paper at first bearing about the selection of strain of mice and mycobacteria for experimental condition, when the response of mice will be measured by survival test.

Strains of mice used as host were CF1 and ddK line, and tubercle bacilli used as parasite were H37Rv of human type, Miwa and Ravenel strains of bovine type.

1) Pathogenicity of tubercle bacilli for CF1 mice.

0.5 mg wet weight of H37Rv, Miwa and Ravenel strains were suspended in 0.2 ml of 0.9 per cent saline, and injected intravenously into the tail vein of mice. Then, the survival times of each group of mice were recorded.

All mice challenged with Ravenel strain have died within 30 days after challenge infection, and many remarkable tubercles in lungs and enlarged spleens were seen in all mice. On the other hand, mice challenged with H37Rv or Miwa strain were all survived over 30 days, and scarcely remarkable tubercle formation were seen in lungs.

From these results it has been conceivable that Ravenel strain is the most virulent against CF1 mice.

2) Susceptibility of mice for tubercle bacilli, Ravenel strain.

Fifteen mice of each group, CF1 and ddK strain, were challenged intravenously with 0.5 mg wet weight of Ravenel strain, and their survival days were recorded. As shown in figure 1, CF1 mice were more susceptible for tubercle bacilli than ddK mice. Moreover, CF1 mice are believed to be more pure line in

hereditary from the comparison of the survival curve of each experimental group of mice.

3) The response of mice to BCG vaccination.

Figure 2 shows the difference between the response of two strains of mice to vaccination. The effect of vaccination on the resistance produced in mice to challenge infection can be measured by comparing the median survival times of vaccinated and nonvaccinated animals. In the group of CF1 mice, the median survival time of vaccinated mice has been prolonged 14.3 days over than that of control, on the other hand, this prolongation has been only 4.0 days in the group of ddK mice.

4) The correlation between the size of infecting doses and the survival time of mice.

0.5, 0.3, 0.05 and 0.02 mg wet weight of Ravenel strain were injected in each 15 mice and recorded the survival time. As shown in figure 3, the median survival time of mice was in inverse ratio to the logarithm of infecting dose. This result is agree with the data from Youmans et al. and suggest that the death of mice is presumably dependent upon the viable bacillary level in the host.

However, the distribution of deaths did not show always the normal frequency pattern, namely, the lesser was the size of infecting dose, the more was the number of mice died later. If the consideration was given to the result from the survival curve shown in figure 4, the curve of mice infected a large dose was one phase line, and yet the curve of mice infected a small dose was two phases line. The curve of BCG vaccinated mice in figure 2 was in parallel with the second phase in figure 4.

Therefore, it may be seen that the appearance of the second phase in the survival curve is based on the acquirement of immunity in the host.