

非定型抗酸菌の感染防禦能に関する研究

1. 各種非定型抗酸菌免疫マウスの牛型菌 TC 50 および Ravenel 静脈内感染後の死亡状況

小山 憲次郎

国立公衆衛生院衛生微生物学部 (部長 染谷四郎博士)

受付 昭和 38 年 11 月 8 日

緒 言

いわゆる非定型抗酸菌については、各方面でそれぞれの立場から研究が行なわれ、とくに生物学的^{1)~3)}、および生化学的性状^{4)~6)}、phage 感受性⁷⁾⁸⁾、ツベルクリン反応 (以下ツ反応と略) の特異性^{9)~13)}ならびに実験動物に対する感受性^{14)~17)}など検討がなされ、多くの報告が行なわれている。武谷¹⁸⁾は結核菌および非定型抗酸菌のツ反応特異性について検討し、これらの菌の間にある程度のツ反応共通抗原の存在することを報告しているが感染防禦能¹⁹⁾についての特異性に関する報告はあまり見当たらない。佐竹ら²⁰⁾のこれら非定型抗酸菌の感染防禦能をモルモットについて比較実験した成績では、photochromogens No. 8 は明らかに BCG と同程度の感染防禦能を有し、scotochromogens No. 6, nonphotochromogens 100616 はやや弱く、nonphotochromogens 100616 株は自然界抗酸菌 *M. phlei* より感染防禦能が劣つていることを報告している。染谷²¹⁾²²⁾によれば非定型抗酸菌石井株免疫モルモットは人型菌 $H_{37}R_V$ の比較的少量菌による皮下感染に対し弱いながら、ある程度の免疫力を示したが、腹腔内感染の場合は全く感染防禦力を示さなかつたという。

今回、著者は非定型抗酸菌による感染防禦能を、マウスを用いて検討したのでその概要を報告する。

実験方法

1. 供試菌株

A. 第1実験

Nonphotochromogens P-7

Photochromogens P-8

BCG (対照株)

B. 第2実験

Scotochromogens P-6

Nonphotochromogens P-7

Photochromogens P-8

BCG (対照株)

2. 免疫菌の調製

1%小川培地 2 週培養菌を一定量秤取し、加熱死菌体とし、この死菌体と Adjuvant (Drackeol No. 6 8 容, Arlancel A 2 容との混合物に等量の生理食塩液を加え、乳化 (Water in oil emulsion) した。

3. 免疫方法

各乳剤には、各菌株それぞれ 2 mg/0.4 ml の濃度に含有されるように調製されており、その 0.2 ml ずつ合計 0.4 ml (2 mg) をマウス両大腿外側筋肉内に接種した。

なお、対照 (非免疫) 群は菌体を除く Adjuvant のみ接種した。

4. 使用動物

第1実験は CF #1 系マウス (♂), 第2実験は ddS 系マウス (♂) それぞれ生後 4 週, 12~15 g のものを選び使用した。

5. 攻撃菌株およびその調製と攻撃方法

第1実験感染菌株: 牛型菌 TC 50

第2実験感染菌株: 牛型菌 Ravenel

以上菌株の Dubo's 液体培地 7 日間培養菌を濁度計で測定、稀釈調製し、感染生菌単位 Viable Unit は第1実験では TC 50 8.1×10^6 , 第2実験では Ravenel 8.4×10^5 であつて、感染は免疫後 6 週において尾静脈内注射によつて行なつた。

6. 統計学的検討

第1実験, 第2実験成績のそれぞれの死亡状況を各実験群について生存日数別の累積死亡率を計算し、この値から半対数確率紙に累積死亡直線を描き統計学的処理²³⁾

を行なつて比較検討した。

実験成績

CF #1 系免疫マウス (♂) の TC50 感染後の生存日数をみた第1実験の成績は Table 1 に示すとおりであり、その各群の累積死亡直線を比較したのが Fig. 1 である。

さらに第2実験の Table 2 を Fig. 2 に示した。

まず第1実験において対照群 (非免疫) は TC50 静脈内感染後18日目より体重の減少とともに死亡が観察され、37日目にはこの対照群全部が死亡した。これに対し nonphotochromogens P-7 は23日目より死亡は緩慢で49日目に全部のマウスが死亡し、photochromogens P-8 は29日目より死亡し、42日目には全部死亡した。

しかしこれら P₇, P₈ の免疫群に対し BCG 免疫群は36日目より死亡し、50日目まで観察したがなお7匹のマウスが生残した。

つぎに ddS 系免疫マウス (♂) の Ravenel 感染後の生存日数をみた第2実験の成績によると、対照群は感染後15日目より死亡が観察され、40日目までに体重の減少とともに全部のマウスが死亡した。これに対し、scotochromogens P-6, nonphotochromogens P-7, photochromogens P-8 および BCG 群の死亡は非常に緩慢で、引続き49日まで観察したが scotochromogens P-6, BCG 群がそれぞれ11匹, nonphotochromogens P-7 および photochromogens P-8 群がそれぞれ5匹生残した。

Table 1. Percent of Daily Mortality of CF #1 (♂) Strain Mice Immunized with Unclassified Acid-Fast Bacilli, at the Different Days After Intravenous Infection with 8.1×10^6 Viable Units of Tubercle Bovine Type TC50

Survival days	Non-photochromogens P ₇		Photochromogens P ₈		BCG		Control (non-immuni.)	
	Number of dead mice	Death rate	Number of dead mice	Death rate	Number of dead mice	Death rate	Number of dead mice	Death rate
18 19 20							3	15
21 22 23 24 25	1	5					2 1 3	25 30 45
26 27 28 29 30	1	10	4 1	20 25			1 1 1	50 55 60
31 32 33 34 35	1 4	25 45	1 3 2 2	30 45 55 65			1 2 3	65 75 80
36 37 38 39 40	2	55	2	75	2 2 2	10 20 30	2	100
41 42 43 44 45	2	65	1 4	80 100	3	45		
46 47 48 49 50	1 4	80 100			2	65		
**	0		0		7		0	

** : Number of survived mice at the 50th day after infection.

Fig. 1. Curves of Cumulative Death Percentages of Immunized and Control Mice Infected Intravenously with 8.1×10^6 Viable Units of Tubercle Bovine Type TC 50

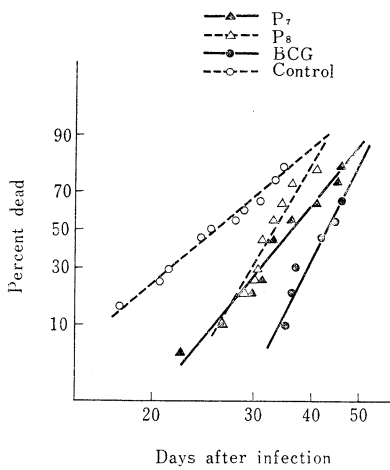


Fig. 2. Curves of Cumulative Death Percentages of Immunized and Control Mice Infected Intravenously with 8.4×10^5 Viable Units of Tubercle Bovine Type Ravenel

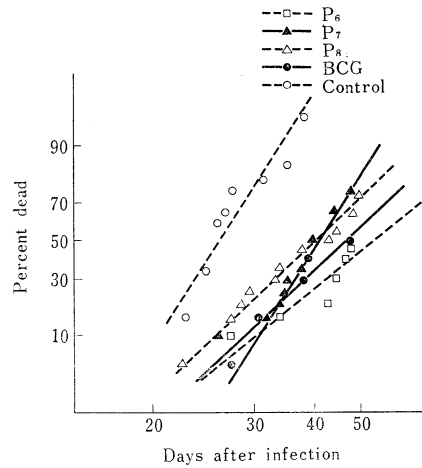


Table 2. Percent of Daily Mortality of ddS (♂) Strain Mice Immunized with Unclassified Acid-Fast Bacilli, at the Different Days After Intravenous Infection with 8.4×10^5 Viable Units of Tubercle Bovine Type Ravenel

Strains	Scoto chromogens P ₆		Non-photo chromogens P ₇		Photo chromogens P ₈		BCG		Control (non-immuni.)	
	Number of dead mice	Death rate	Number of dead mice	Death rate	Number of dead mice	Death rate	Number of dead mice	Death rate	Number of dead mice	Death rate
15	1	5	1	5					2	10
16										
17										
18										
19										
20										
21										
22										
23					1	5			1	15
24									4	35
25										
26			1	10					5	60
27									1	65
28	1	10			2	15	1	5	2	75
29					1	20				
30					1	25				
31										
32							2	15	1	80
33			1	15						
34					1	30				
35	1	15	1	20	1	35				
36			1	25						
37			1	30					1	85
38										
39			1	35	2	45	3	30	2	95
40							2	40	1	100

Strains	Scoto chromogens P ₆		Non-photo chromogens P ₇		Photo chromogens P ₈		BCG		Control (non-immuni.)		
	Survival days	Number of dead mice	Death rate	Number of dead mice	Death rate	Number of dead mice	Death rate	Number of dead mice	Death rate	Number of dead mice	Death rate
41			3	50							
42			2	60							
43	1	20									
44	2	30			1	50					
45											
46	2	40	1	65	1	55					
47											
48	1	45	2	75	2	65	1	45			
49					2	75					
**	11		5		5		11		0		

** : Number of survived mice at the 49th day after infection.

考 察

第1実験は感染後50日および第2実験は感染後49日までの観察による死亡状況より統計学的に処理²³⁾を加え各免疫群と対照群(非免疫)との死亡に対する有意性について検討を行なった。なお、第1実験ではTC50感染後50日までの観察でBCG群のみ20匹中7匹の生残数を示したが、一応これは51日目に7匹全部死亡したと仮定し、また第2実験についてもRavenel感染後49日までの観察でscotochromogens P-6, BCGが20匹中11匹, nonphotochromogens P-7, photochromogens P-8がそれぞれ20匹中5匹のマウスが生残したが、これも第1実験の場合と同様、50日目に生残数が全部死亡したと仮定して検定を行なった。

したがって、対照群とそれぞれの免疫群との死亡に対する有意性の検定であつて、51日(第1実験)および50日(第2実験)目に死亡を仮定した場合における感染防禦能最小値を示すことになり、各免疫群相互における有意性の比較は不適当である。

以上の実験成績から統計学的解析を行なった結果、第1実験の成績からはnonphoto. P-7, photo. P-8およびBCGの各免疫群の生存日数はそれぞれ非免疫群に比較して長く、その差は1%以下の危険率で有意であることが認められた。

また第2実験においてはscoto. P-6, nonphoto. P-7, photo. P-8およびBCGの各免疫群はそれぞれ非免疫群に比較して長くその差は第1実験同様1%以下の危険率で有意であることが観察された。

む す び

各種非定型抗酸菌(scotochromogens P-6, nonphotochromogens P-7, photochromogens P-8)のマウスによる感染防禦能を比較検討した結果、強弱の差はあるが、それぞれ結核菌の感染に対し、かなりの感染防禦力のあることが知られた。さらに主要臓器内感染菌の生菌数の

消長および病変の推移等について目下検討を続けている。

稿を終わるにあたり染谷四郎部長より御指導御校閲を、さらに林治博士より御指導を得た。ここに謝意を表する。

文 献

- 1) 占部薫 : 日本細菌学雑誌, 16 : 664, 昭36.
- 2) Breed, R.S., et al. : Bergey's Manual of determinative bacteriology, williams and wilkins Co., : p. 696, 1957.
- 3) Runyon, E.H., et al. : Anevaluation of some new diagnostic procedures Trans, 21 St Res. conf. in Puln, Dis., Vet Admin, -Armed forces : p. 153, 1962.
- 4) 山村雄一 : 結核, 35 : 77, 昭35.
- 5) 今野淳 : 結核, 37 : 315, 昭37.
- 6) 堀三津夫 : 日本細菌学雑誌, 16 : 667, 昭36.
- 7) 武谷健二 : 結核, 35 : 62, 昭35.
- 8) 室橋豊穂 : 日本細菌学雑誌, 16 : 668, 昭36.
- 9) 浅見望 他 : 日本細菌学雑誌, 14 : 193, 昭34.
- 10) 浅見望 他 : 日本細菌学雑誌, 14 : 262, 昭34.
- 11) TAKEYA, K. et al. : Am. Rev. Resp. Dis., 81 : 674, 1960.
- 12) Magnussan, M. et al. : Am. Rev. Resp. Dis., 83 : 57 ; 69, 1961.
- 13) 岡田博 他 : 日本医事新報, No. 2007 : 昭37.
- 14) Durr, F.E., et al. : Am. Rev. Dis., 87 : 876, 1959.
- 15) 占部薫 : 医学のあゆみ, 34 : 413, 昭35.
- 16) 牛場大蔵 他 : 結核, 36 : 689, 昭36.
- 17) 染谷四郎 他 : 日本細菌学雑誌, 16 : 669, 昭36.
- 18) 武谷健二 : 結核, 35 : 62, 昭35.
- 19) 浅見望 他 : 日本細菌学雑誌, 14 : 316, 昭34.
- 20) 佐竹央行 他 : 結核, 37 : 556, 昭37.
- 21) 染谷四郎 : 第15回日本医学会総会学術集會記録,

111: 445, 昭34.

23) 染谷四郎 他: 日本臨床結核, 15: 28, 昭31.

22) 染谷四郎 他: 日本細菌学雜誌, 17: 376, 昭37.

Experimental Studies on Immunizing Effect of Unclassified Acid-Fast Bacilli against Tuberculous Infection. 1. Observations on survival days of mice immunized with various strains of unclassified acid-fast bacilli and infected with bovine type tubercle bacilli.

Albino, male mice of CF #1 and ddS strains weighing 12~15 gm. were used in all experiments. Heat killed bacilli of scotochromogens P-6, nonphotochromogens P-7, photochromogens P-8 and BCG were suspended in sterile physiological saline and emulsified with an equal volume of adjuvant containing 8

volumes of paraffin oil (Drackeol No. 6) and 2 volumes of mannide monooleate (Arlacel-A).

The immunization and infection were carried out as follows:

Mice were immunized intramuscularly with 0.4 ml of emulsion of each antigen and infected intravenously with 0.2 ml of suspensions of tubercle bacilli (TC 50 or Ravenel). Then the survival days of each group were observed and the death rates at different times of observation period were calculated.

These death rates were plotted graphically on semi-logarithmic normal probability paper. From the results of experiment 1 and 2, shown in Table 1, 2 and Fig. 1, 2, the mice immunized with BCG, nonphotochromogens P-7 and photochromogens P-8 survived remarkably longer period than those of the not immunized control mice and the mice immunized with BCG showed a little longer survival days than those immunized with P-7 and P-8. From the results of experiment 2, shown in Table 2 and Fig. 2, there was found no difference of survival times between the mice immunized with BCG and those with scotochromogens P-6.

Judging from the results mentioned above, it will be concluded that unclassified acid-fast bacilli, P-6, P-7 and P-8, had the almost the same or a little lower grade of immunizing effect against tuberculous infection as compared with BCG.

Experiment	Mice strain	Antigen of immunization	Dose of immunization	Challenge strain and dose of infection
1	CF #1 (male)	Nonphotochromogens P-7	2 mg.	TC 50 8.1×10 ⁶
		Photochromogens P-8	"	
		BCG	"	
		Control mice	0	
2	ddS (male)	Scotochromogens P-6	2 mg.	Ravenel 8.4×10 ⁵
		Nonphotochromogens P-7	"	
		Photochromogens P-8	"	
		BCG	"	
		Control mice	0	

* Numbers of mice of each group were 20.