

38年および39年結核実態調査で分離された 人型結核菌の毒力に関する研究

第II編 モルモットに対する毒力

岩崎竜郎・続木正大・青木正和・工藤賢治

結核予防会結核研究所

室橋豊穂・佐藤直行

国立予防衛生研究所

染谷四郎

国立公衆衛生院

受付 昭和40年6月25日

THE VIRULENCE OF TUBERCLE BACILLI NEWLY ISOLATED FROM JAPANESE PATIENTS*

Report II. Virulence to Guinea Pigs

Tatsuro IWASAKI, Masahiro TSUZUKI, Masakazu AOKI, Kenji KUDO,
Toyoho MUROHASHI, Naoyuki SATO and Shiro SOMEYA

(Received for publication June 25, 1965)

In the previous report, the virulence of 43 strains of tubercle bacilli to mice was presented. The authors concluded that the virulence of tubercle bacilli newly isolated from the Japanese patients was not of the same degree with each other, but was varied from high to relatively low degree. Employing the same strains as used in the previously reported mice experiments excluding six out of eight Indian strains, the virulence to guinea pigs was examined. The suspensions of bacilli used in the experiments of guinea pigs were the same as used in the experiments of mice.

Three or six adult male guinea pigs were infected subcutaneously with 0.1 mg of each strain. All the animals were sacrificed eight weeks after infection. The tuberculous changes of visceral organs and lymph glands were observed macroscopically.

The standard of the macroscopic tuberculous indices of guinea pigs used in this report was as follows: For the changes of lungs and spleens, no lesions...0, 1 to 9 tubercles...1, 10 to 19 tubercles...2, 20 to 29 tubercles...3, more than 30 tubercles...4, innumerable tubercles...5. If large confluent tubercles existed, or many necrosis were found, 0.5 or 1 was added to the previous indices. For the liver, no lesion...0, few tubercles...1, some tubercles...2, many tubercles...3, innumerable tubercles...4, innumerable tubercles with necrosis...5. For the lymph glands, tuberculous swelling of the gland 2 to 5 mm in diameter...1, 5 to 10 mm in diameter...2, 10 to 20 mm in diameter...3, more than 20 mm in diameter...4.

Another three guinea pigs were infected intraperitoneally with 0.1 mg of bacilli, and the death rate up to eight weeks after infection was observed. (Thirteen out of 43 strains were omitted from the experiment of intraperitoneal infection.)

The results were summarized as follows:

(1) The average macroscopic tuberculous indices of guinea pigs infected subcutaneously with 0.1 mg of bacilli were varied from 26.8 to 5.2. The average indices of visceral organs

*From Research Institute, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose Machi, Kitatama Gun, Tokyo, Japan.

excluding lymph glands varied from 10.9 in the strain of the maximum virulence to 0.9 in the strain of the minimum virulence (Table and Fig. 1).

(2) The average weight of the spleens also showed the differences of virulence according to the strain from one strain to another. The maximum average weight was 8.9 g and the minimum was 0.8 g (Table 1).

(3) The root indices of virulence after Mitchison were calculated. In our experiments, infection was performed subcutaneously, infectious dosis being 0.1 mg, and all the guinea pigs were sacrificed eight weeks after infection. Therefore, the methods of experiments were not identical with that of Mitchison, et al.

Thirty four strains out of 43 Japanese strains were more than 0.8 in indices. The indices of 4 strains were 0.8 to 0.6. The indices of five strains were less than 0.6., of which two were resistant to INH (Tables 1 and 2).

(4) Death rate of guinea pigs infected intraperitoneally with 0.1 mg of bacilli varied from 100 % to 0 % (Table 1). But, the death rate did not correlate with the macroscopic tuberculous indices.

(5) INH-resistant strains were less virulent to guinea pigs.

緒 言

未治療結核患者から新しく分離された人型結核菌のマウスに対する毒力はけつして一様に強いものではなく、強弱かなりの幅がみられることを前編¹⁾で述べた。本編では、これらの菌のモルモットに対する毒力を検討した成績を述べる。また英国あるいはインドの患者から分離した菌の毒力についての Mitchison らの報告は、すべてモルモットで行なわれているので、これらの報告と日本の菌との比較についても考察を加えたい。

実験方法

供試菌株、菌液作成法などは前報で述べたのと同様なので簡単に述べる。

1) 供試菌：結核実態調査分離菌 43 株および Dr. Mitchison から分与を受けた英国株、インド株、ならびに結核研究所保存の人型黒野株を供試菌とした点は前報と同様である。ただしインドの菌株については J. K. の 2 株のみについてモルモットでは実験を行ない、他の 6 株の実験は行なわれなかつた。したがって、検討した菌株は計 48 株である。

2) 菌の継代：前報とまったく同様で、実態調査分離菌については 2 代継代菌を実験に用いた。

3) 菌液作成法：前報とまったく同様である。すなわち Dubos 原法培地に培養した菌液の濁度を測定して菌量を推定し、0.1 mg/1 ml の菌液を作成した。

4) 実験動物：体重 370~390 g の成熟雄モルモット（船橋農場または静岡県実験動物組合産）を実験に用いた。各菌株について皮下感染 6 匹（一部の菌株では 3 匹）

腹腔感染 3 匹ずつの動物を用いたが、13 菌株については腹腔感染実験を省略した。計 330 匹のモルモットが使用された。

5) 感染方法および接種菌量：皮下感染では前述の 0.1 mg/1 ml の菌液を 1 ml ずつ右大腿皮下に接種して感染を行なつた。また腹腔感染は同一菌液を腹腔内に接種して行なつた。したがって接種菌量はいずれも 0.1 mg である。

各菌の接種生菌数は第 I 編で述べたとまったく同様である。なお本編の表 1 にも接種生菌数は再掲した。

6) 観察方法：皮下感染群では感染後 8 週まで体重測定、ツ反応などを行ない、8 週に全動物の剖検を行なつた。佐藤氏法に準じて肉眼的病変の判定を行なつたが、肺・肝・脾の病変については最高を +5 として病変の程度を 5 段階に分け、病変の数のみでなく性状も加味して判定を行なうなど多少の改変を加えた。（判定法については別に工藤が報告を行なう予定である）

また Mitchison ら²⁾の方法に従つて root index of virulence の算出も行なつた。Mitchison の原法では筋肉内感染であり、感染後 6 週および 12 週で各 1 ないし 2 匹の剖検を行なうこととしてある。当実験では皮下感染であり、8 週で 6 匹の剖検を行なつているので原法とは異なつている。しかし、これら剖検動物で Mitchison らの方法にならつて root index の算定を行ない比較を行なつた。

このほか脾重量の測定も行なつた。

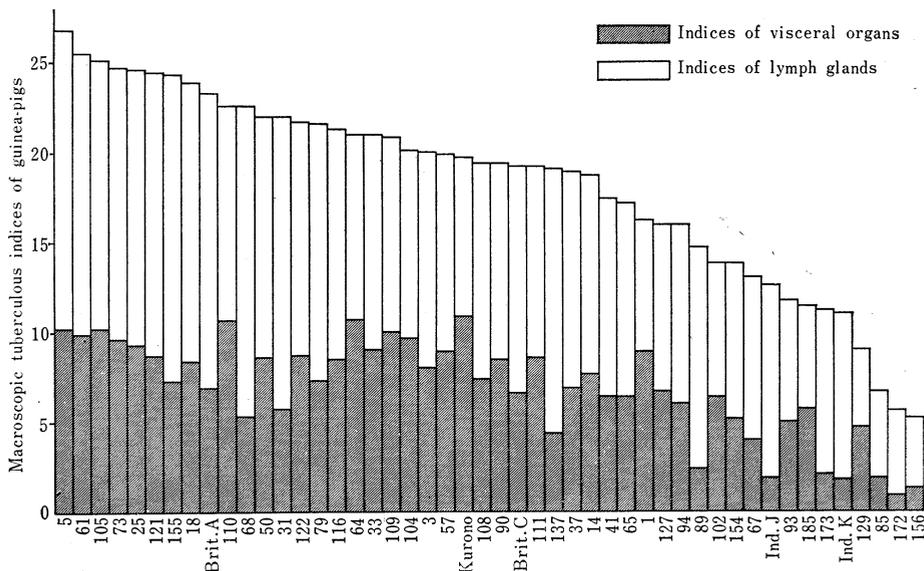
腹腔感染群では 8 週までの死亡率を観察した。死亡動物は全例解剖して結核死か否かを判定した。8 週まで生存したモルモットは全例 8 週で剖検し、皮下感染と同

Table 1. Macroscopic Findings of Subcutaneously Infected Guinea-pigs and Death Rate of Intraperitoneally Infected Guinea-pigs

Strain number	Infectious viable units ($\times 10^5$)	Animal number	Autopsy findings of subcutaneously infected guinea-pigs							Weight of spleen	Root indices	Death rate of intraperitoneally infected	
			Macroscopic tuberculosis indices					A+B+C	Lymph glands (D)				A+B+C+D
			Lung (A)	Liver (B)	Spleen (C)	A+B+C	Lymph glands (D)						
5	43	6	2.7	3.3	4.2	10.2	16.6	26.8	6.6 g	1.168	100%		
61	41	6	2.1	4.1	3.7	9.9	15.6	25.5	2.5	1.145	66		
105	48	6	2.5	3.9	3.8	10.2	14.9	25.1	3.7	1.139	100		
73	33	6	2.1	3.5	4.0	9.6	15.1	24.7	5.3	1.128	100		
25	52	3	3.0	3.3	3.0	9.3	15.3	24.6	3.7	1.066	66		
121	57	3	1.7	3.7	3.3	8.7	15.7	24.4	7.3	1.051	100		
155	40	3	1.7	3.3	2.3	7.3	17.0	24.3	8.7	0.961	66		
18	35	6	1.4	3.8	3.2	8.4	15.5	23.9	3.5	1.064	100		
Brit. A	54	6	1.7	2.5	2.9	6.9	16.4	23.3	2.3	0.987	0		
110	18	6	3.8	3.0	3.8	10.6	12.0	22.6	2.9	1.114	—		
68	26	3	1.0	1.3	3.0	5.3	17.3	22.6	2.5	0.923	66		
50	43	6	2.3	2.9	3.4	8.6	13.4	22.0	3.0	0.956	100		
31	47	3	1.7	1.3	2.7	5.7	16.3	22.0	2.9	0.878	33		
122	66	3	2.7	3.7	2.3	8.7	13.0	21.7	2.6	1.012	66		
79	32	3	1.0	3.3	3.0	7.3	14.3	21.6	2.9	1.007	100		
116	53	6	1.1	3.6	3.8	8.5	12.8	21.3	3.3	1.078	100		
64	56	3	2.3	4.7	3.7	10.7	10.3	21.0	3.9	1.152	66		
33	40	3	3.0	3.5	2.5	9.0	12.0	21.0	2.7	1.024	66		
109	16	6	2.2	3.9	3.9	10.0	10.8	20.8	2.0	1.109	—		
104	24	6	2.5	3.8	3.3	9.6	10.5	20.1	2.5	1.065	—		
3	37	3	1.7	4.0	2.3	8.0	12.0	20.0	2.4	0.990	33		
57	58	3	2.3	3.3	3.3	8.9	11.0	19.9	3.0	1.048	0		
Kurono	16	6	4.1	3.6	3.2	10.9	8.8	19.7	2.6	1.110	—		
108	43	3	1.7	3.7	2.0	7.4	12.0	19.4	2.3	0.951	66		
90	17	6	2.5	2.7	3.3	8.5	10.9	19.4	2.0	0.980	—		
Brit. C	36	6	1.0	2.2	3.4	6.6	12.6	19.2	2.4	0.928	33		
111	20	6	1.9	3.9	2.8	8.6	10.6	19.2	3.4	1.027	—		
137	42	3	1.7	1.7	1.0	4.4	14.7	19.1	2.2	0.708	100		
37	42	6	0.7	3.2	3.0	6.9	12.3	18.9	2.3	0.969	33		
14	58	3	1.3	4.7	1.7	7.7	11.0	18.7	2.5	0.956	66		
41	48	3	1.0	3.7	1.7	6.4	11.0	17.4	2.1	0.892	33		
65	48	6	0.6	2.6	3.2	6.4	10.8	17.2	1.5	0.948	66		
1*	16	6	2.8	3.0	3.1	8.9	7.3	16.2	1.6	1.009	—		
127	36	6	0.4	2.7	3.6	6.7	9.3	16.0	1.6	0.961	0		
94	42	3	1.7	3.0	1.3	6.0	10.0	16.0	1.6	0.841	33		
89	34	3	0.7	0.7	1.0	2.4	12.3	14.7	1.4	0.600	33		
102*	32	6	1.3	3.0	2.1	6.4	7.4	13.8	1.6	0.875	—		
154*	27	6	0.7	1.7	2.8	5.2	8.6	13.8	1.8	0.841	—		
67	36	3	1.0	1.7	1.3	4.0	9.0	13.0	1.5	0.719	66		
Ind. J	11	6	0.2	0.3	1.4	1.9	10.7	12.6	1.3	0.598	0		
93	40	3	1.0	2.3	1.7	5.0	6.7	11.7	1.7	0.774	66		
185	20	6	0.8	1.8	3.1	5.7	5.5	11.2	0.9	0.849	—		
173	36	3	0.7	0.7	0.7	2.1	9.3	11.4	1.8	0.517	66		
Ind. K	53	6	0.2	0.2	1.4	1.8	9.2	11.0	1.1	0.521	0		
129	59	3	0.7	2.3	1.7	4.7	4.3	9.0	2.1	0.564	100		
85	35	6	0.7	0.5	0.7	1.9	4.8	6.7	1.0	0.462	—		
172*	25	6	0.1	0.3	0.5	0.9	4.7	5.6	0.9	0.349	—		
156*	24	6	0.2	0.3	0.8	1.3	3.9	5.2	0.8	0.391	—		

* Resistant to INH.

Fig. 1. Macroscopic Tuberculous Indices of Guinea-pigs



様の観察を行なつた。

7) 実験分担：分担および実験実施施設は第I編と同様である。

実験成績

1) 皮下感染8週剖検時の肉眼的所見：8週剖検時の所見は表1および図1に示すごとくである。内臓およびリンパ腺の病変指数を合計した値の大きい順に並べた。

モルモットにおいても病変の程度には菌株による大きな相違がみられ、肉眼的病変指数は最高26.8、最低5.2であつた。ただし最低の病変指数を示した156番菌と172番菌は、第I編で述べたようにINH耐性菌なので、これらを除くと病変指数の最低は6.7となる。言葉を換えれば、強い毒力を示した菌では8週剖検時に肺、肝、脾および体表、深部リンパ腺のいずれにも広汎な進行性の病変を形成しており、もつとも弱い病変を示した菌株では、内臓は6匹中2~3匹に病変を認める程度の変化をみたのみであつた。リンパ腺でも局所の所属リンパ腺などに軽度の変化をみるのみであつた。そして、その他の菌は、これらの間の強弱種々な程度の病変を示したわけである。

内臓病変のみについてみても同様で、実態調査菌では最高10.7、最低0.9 (INH耐性菌を除けば1.9) と広い範囲に分布していた。肺、肝、脾など各臓器の所見についても表1にみるごとくである。

2) 皮下感染群の脾重量：各菌株皮下接種後8週剖検時の平均脾重量は表1に示したごとくである。脾重量でも最高8.7gから最低0.8g (INH耐性菌を除けば0.9g) と広い範囲に分布している。

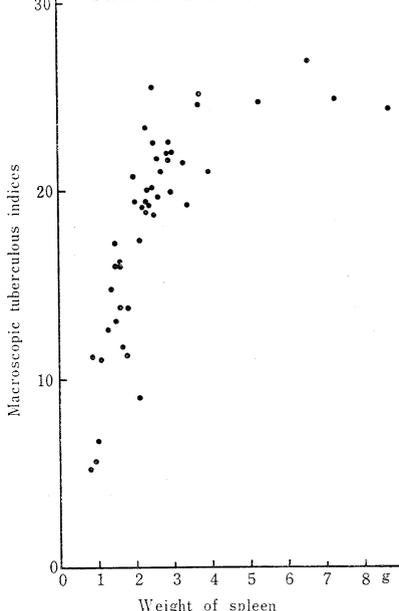
モルモットではマウスと異なり、病変の程度と平均脾

重量はだいたい平行している。脾重量がかなり広い範囲に分布していること、および一部を除いて肉眼的病変指数とほぼ相関関係を示すことは図2にみるごとくである。これら48株で両者の相関係数を計算すると $r = +0.72$ と比較的高い値が得られた。

3) Root index of virulence: Mitchson らの方法に従つて各菌株の root index を算出すると表1のごとくである。値の大きい順に並べて表2に再掲した。

Mitchson らは 0.8 以上を強毒、0.6 未満を毒力の弱

Fig. 2. Correlation between the Macroscopic Tuberculous Index and the Weight of Spleen in Guinea-pigs Infected with Various Strains of Tubercle Bacilli



い菌としている。実験方法に差異があるため、そのままこの値を当てはめることはできないが、一応この値でみると次のごとくである。すなわち、root index 0.8 以上の強毒菌が 43 株の実態調査株のうち 34 株 (79.1%) を占めている。index が 0.6 未満で毒力の弱い範囲に入る菌は 5 株 (11.6%) みられたが、うち 2 株は INH 耐性菌であつた。インドの毒力の弱い菌株 J および K の root index はそれぞれ 0.598 および 0.521 でいずれも毒力は低いと判定されており、英国株 A および C はいずれも 0.9 以上の値で強毒と判定された。

4) 腹腔感染群の 8 週までの死亡率：実験方法の項で述べたごとく、一部の菌株では腹腔感染実験は省略した。検討を行なつた菌株での死亡率は表 1 に示したごとくである。死亡率 100 のものが 10 株、66% が 13 株、33% が 7 株、0% が 5 株であつた。

5) 薬剤耐性との関連：第 I 編にも述べたごとく、これらの菌はいずれも未治療患者から分離された菌であるが、一部は薬剤に対し耐性を示していた。耐性のみられた菌の菌株番号と耐性の種類、程度は第 I 編でみたごとくである。また、本編の表 2 にも耐性の種類のみは記してある。

INH に対する耐性を示す菌はいずれもモルモットに対する毒力はかなり弱かつた。

考案ならびに総括

毒力の検討を行なう場合、菌の保存、菌液の作成その他に慎重な配慮が必要であることは第 I 編で述べた。本編で報告したモルモットに対する毒力の検討実験は、第 I 編のマウスで行なつた実験と同時に作成した菌液で感染を行なつて検討したものである。接種前の菌の扱い方、菌液作成法、接種生菌数などは、菌株間の毒力の比較実験に十分耐えうると考えられることはすでに述べたごとくである。

未治療肺結核患者から新たに分離された人型結核菌の毒力はモルモットに対してもけつして一様に強いものではなく、強弱かなりの幅がみられた。肉眼的病変指数、脾重量、あるいは Mitchson らの root index of virulence のいずれかでみてもその範囲はかなり大きいものであつた。

実態調査分離菌はいずれも未治療者から分離されたものであるが、一部は SM, INH などに対して耐性を示していた。INH 耐性菌のモルモットに対する毒力が低下していることはすでに認められていることであるが、当実験でも INH 耐性菌はいずれも毒力が低かつた。しかし、これらとほぼ同様の弱い毒力を示す菌が、薬剤感性の人型結核菌の中にも数株見出だされたことは注目に値しよう。

Mitchson ら²⁾ は英国の患者から分離される人型結核

Table 2. Root Indices of Virulence. 3~6 guinea-pigs were infected subcutaneously with 0.1 mg of tubercle bacilli, and were autopsied 8 ws after infection

No. of strains	Root indices of virulence	Susceptibility to drugs*	No. of strains	Root indices of virulence	Susceptibility to drugs*
5	1.168		127	0.961	
64	1.152		50	0.956	
61	1.145		14	0.956	
105	1.139		108	0.951	
73	1.128		65	0.948	
110	1.114	Res. to S. P.	Brit. C	0.928	
Kurono	1.110		68	0.923	
109	1.109	Res. to S. P.	41	0.892	
116	1.078		31	0.878	
25	1.066		102	0.875	Res. to I
104	1.065	Res. to S	185	0.849	
18	1.064		154	0.841	Res. to S. P. I.
121	1.051		94	0.841	
57	1.048		93	0.774	
111	1.027	Res. to S. P.	67	0.719	
33	1.024		137	0.708	
122	1.012		89	0.600	
1	1.009	Res. to S. P. I.	Ind. J	0.598	
79	1.007		129	0.564	
3	0.990		Ind. K	0.521	
Brit. A	0.987		173	0.517	
90	0.980	Res. to S.	85	0.462	Res. to S.
37	0.969		156	0.391	Res. to S. P. I.
155	0.961		172	0.349	"

*"Res. to S." means "Resistant to Streptomycin".

P.=PAS I=INH. The other strains were susceptible to these three drugs.

菌は一様に強毒であるが、インドの患者から分離される菌の約 30% はモルモットに対する毒力が著しく低いという。Mitchson から送付を受けた毒力の低いインド株 J および K は、われわれの再実験でも同様の成績であつた。実態調査菌の中に見出だされた毒力の低い菌はこれらとほぼ同程度の菌である。耐性のない 36 株中 root index が 0.6 未満のものは 2 株 (129 番菌および 173 番菌) 見出だされ 5.5% にあつた。

Mitchson らの報告以来、いくつかの国で毒力の検討が行なわれている。実験方法は Mitchson らの root index で比較する方法が多く用いられている。この方法はモルモットの筋肉内に湿菌量 1 mg の菌液を接種し、6 週および 12 週に 1 ないし 2 匹剖検して肉眼的所見を観察する方法である。病変の評価にあつては脾の病変をもつとも重視して最高 40 点までの点を与え、ついで肝では 30 点まで、肺は 20 点まで、所属リンパ腺 10 点までの点を与えている。これらを合計した値を感染から

剖検までの日数で割り、その商を平方に開いたものが Mitchson らのいう root index of virulence である。

当実験の方法と比較するとまず接種菌量が異なっている。Mitchson らの 1 mg に対しわれわれは 0.1 mg の接種なので 10 倍の菌接種を行なっている。(一部の実験では Mitchson とも感染菌量を 0.1 mg として実験を行なっている。)次に接種法も異なり、筋肉内接種に対しわれわれは皮下接種を行なっている。脾の病変を重視する root index による評価では皮下感染のほうがやや軽い方向に傾くだろう。また剖検も Mitchson らの 6 週および 12 週に対し、当実験では 8 週で全例剖検している。この相違も index が低くなるように影響しているようである。

以上のごとき実験方法の差のため比較は困難となつてくる。当実験のほうが index が低くなるからである。しかし上記の点を考慮しながら毒力の弱い菌のみられる頻度を国別にみると次のごとくなる。

英国の菌³⁾は検討した 65 株のうち root index が 0.6 未満のものは見出だされていない。接種菌量を 0.1 mg とした 9 株の実験でも同様であつた。東アフリカの菌 30 株でも同様に 0.6 未満の菌はみられなかつたという。香港の患者では 40 株中 1 株 (2.5%)。タイ⁴⁾では 81 株中 10 株 (12.1%) でみられている。これに対し、インドの患者では検討した 254 株中 79 株 (31.1%)、あるいは 55 株中 21 株 (38.2%) で root index は 0.6 未満であつたという。実態調査菌では 36 株中 5.5% だつたから、香港での値に近い成績といいえようか。

モルモットの病変の判定方法を変えて Feldman index でみた成績でも英国または米国の患者から分離された菌には毒力の弱いものはみられず、インドの菌株の中には弱いものがみられたという⁵⁾⁶⁾。また腹腔感染 1 カ月後の脾臓の重さを体重で割つた値で病変の程度をみる spleen index 法でみた成績でも、チェコスロバキアの患者から分離された 134 株の平均指数は 6.94 だつたのに対し、インド菌 104 株では平均 4.80、ビルマ菌 8 株の平均では 4.60 だつたという⁷⁾。

いずれにしても新鮮分離人型結核菌のモルモットに対する毒力はけつして一様に強いものではなく、強弱の差があることは確かであろう。また毒力の弱い菌の頻度が国によつて異なつたものであることも事実であろう。さらに検討を要すると思えられる。

結 語

38 年および 39 年結核実態調査のさい、未治療患者か

ら分離された人型結核菌 43 株のモルモットに対する毒力を検討し、英国およびインドの患者から分離された菌の毒力と比較した。使用した菌の継代、菌液作成法、接種生菌数などは第 I 編と同様である。次の成績が得られた。

(1) 未治療患者から分離された人型結核菌のモルモットに対する毒力はけつして一様ではない。

(2) 毒力の差は肉眼的病変指数でみれば最高 26.8 から、最低 5.2 までの広い範囲に分布した。ただし最低の病変指数を示した菌は INH 耐性菌なので、これらを除くと最低 6.7 である。

(3) モルモットでは各群の平均脾重量は病変指数とよく相関を示した。脾重量でみても最高では平均 8.7 g 最低 0.8 g と 広い分布を示した。

(4) Mitchson らの root index of virulence でみても強い菌と弱い菌との間には大きな差がみられる。root index が 0.6 未満の菌は耐性のない 36 株中 2 株 (5.5%) でみられた。

(5) 実験方法の差のため諸外国の菌の毒力との正確な比較は困難であるが、Mitchson らのいうインドの毒力の弱い菌とほぼ同程度の毒力を示す菌は、日本の菌でも少数はみられると考えられた。

(5) INH 耐性菌のモルモットに対する毒力は感性菌に比して弱かつた。

本論文の要旨は第 40 回日本結核病学会総会で発表した。本編の集計、解析は青木が担当した。なお、本研究は厚生科学研究補助金の援助を受けた。

文 献

- 1) 岩崎竜郎・続木正大・青木正和 他：結核，40：359，1965.
- 2) Mitchson, D. A., Bahtia, A. L., Radhakrishna, S. et al.: Bull. Wld. Hlth. Org., 25: 285, 1961.
- 3) Mitchson, D. A.: Bull. Intern. U. ag. Tuberc., 35: 287, 1964.
- 4) Bahtia, A. L., Jacob, C. V., Hitze, K. L. et al.: Bull. Wld. Hlth. Org., 29: 483, 1963.
- 5) Singh, B.: Am. Rev. Resp. Dis., 89: 1, 1964.
- 6) Singh, B.: Tubercle, 45, 235, 1964.
- 7) Sula, L. & Langerova, M.: Bull. Intern. U. ag. Tuberc., 35: 325, 1964.