

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Ⅲ編 マウスに対する毒力とモルモットに対する毒力との比較

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7月20日

THE VIRULENCE OF TUBERCLE BACILLI NEWLY ISOLATED FROM JAPANESE PATIENTS*

Report III. Comparison between the Virulence to Mice and the Virulence to Guinea-Pigs

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

(Received for publication July 20, 1965)

The virulence of tubercle bacilli isolated from Japanese tuberculous patients to mice was reported in the 1st report, and the virulence to guinea-pigs in the 2nd report. Comparison between the results obtained in mice experiments and in guinea-pigs experiments was carried out in this paper.

Materials and methods of animal experiments were reported previously. Briefly, 0.1 mg (wet weight) of tubercle bacilli of each strain was injected intravenously to mice, and subcutaneously to guinea-pigs. In about half strains of tubercle bacilli, intraperitoneal infections to guinea-pigs were carried out, too. The results were summarized as follows:

1. As a whole, the strains which had high virulence to mice showed high virulence to guinea-pigs, too. And, low virulence to mice, also low to guinea-pigs. (Fig. 6)

Ten strains out of 43 strains isolated from Japanese tuberculous patients, showed very high virulence to mice as well as to guinea-pigs. Eight out of 43 strains showed low virulence to both animals, 4 strains of which were resistant to INH.

2. In detail, the results obtained from mice experiments did not always coincide with the results obtained from guinea-pigs experiments. For example, some strains which showed very low virulence to guinea-pigs showed moderate virulence to mice.

3. The results obtained by various methods evaluating the tuberculous changes in mice and in guinea-pigs were compared with each other.

(1) The death rate up to 8 weeks of mice infected with 0.1 mg of bacilli intravenously did not show any correlation with the death rate up to 8 weeks of guinea-pigs infected with 0.1 mg of bacilli intraperitoneally (Fig. 1).

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

(2) The death rate of mice showed some mutual connection with the indices of macroscopic tuberculous changes in guinea-pigs (Fig. 2).

(3) The indices of macroscopic tuberculous changes in guinea-pigs had a little correlation with the degrees of pulmonary tuberculous involvements in mice. ($r=+0.56$) (Fig. 3).

(4) The degrees of pulmonary tuberculous involvements in mice were not relative to the root indices of virulence in guinea-pigs. ($r=+0.39$) (Fig. 4).

(5) The weights of spleens of mice were not relative to the weights of spleens of guinea-pigs. ($r=+0.06$) (Fig. 5).

(6) In mice, the degrees of pulmonary involvements were correlated with the weight of lungs ($r=+0.89$), or with the ratio of pulmonary weights divided by body weights ($r=+0.94$).

(7) In guinea-pigs, the indices of macroscopic tuberculous changes were correlated with the root indices of virulence ($r=+0.91$), or with the weights of spleens ($r=+0.72$).

From these data, the methods evaluating the virulence of tubercle bacilli were discussed.

緒 言

第I編¹⁾では未治療肺結核患者から分離された人型結核菌のマウスに対する毒力の検討成績を述べ、第II編²⁾ではモルモットに対する毒力の検討成績を報告した。人型結核菌の毒力はいずれの動物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ることはすでにみたごとくである。

第II編で述べたように、マウスに接種した菌液とモルモットに接種した菌液は同時に作成されている。また接種菌量はいずれも0.1mgで接種生菌数も同じである。両動物での成績を比較検討することにより、動物の種の相違による毒力判定成績の異同について検討することが可能であろう。そこで本編では、これら両動物で得られた成績の比較検討を行ない、さらに毒力の判定方法について考察を試みた。

研究 方法

実験方法は第I編および第II編で述べたので省略する。本編ではこれらの実験で得られた成績について、以下述べるような比較検討を行なつた。

研 究 成 績

1) マウスの死亡率とモルモット腹腔感染の死亡率との比較

マウスでは各菌株とも10匹ずつ静注感染し、モルモットでは3匹ずつ腹腔感染を行なつた。いずれも感染後8週までの死亡率である。接種菌量はいずれも0.1mgで生菌数も同じになっている。

第1図にみるごとく、両動物で実験を行なつた35株での成績は、まったく相関を示さなかつた。

2) マウスの死亡率とモルモット皮下感染8週剖検時

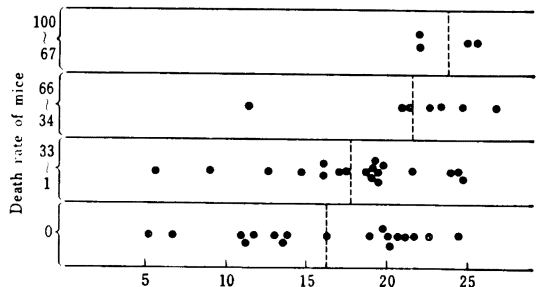
の肉眼的病変指数との比較

両者の比較を行なうと図2のごとくであつた。マウスの死亡率が67~100%または34~66%の菌株ではモ

Fig. 1. Correlation between the Death Rate of Guinea-pigs and the Death Rate of Mice. Guinea-pigs were Infected Intraperitoneally with 0.1 mg of Bacilli, and Mice were Infected Intravenously with the Same Dosis

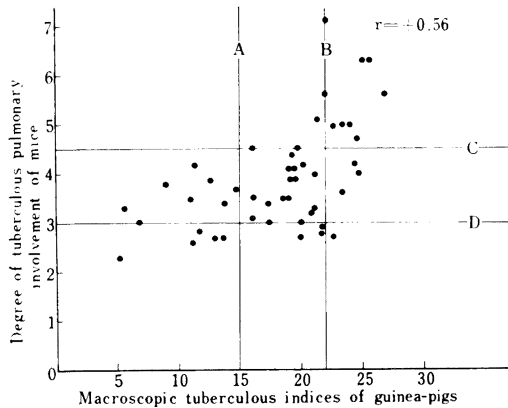
| Death rate of guinea-pigs (8 ws) | Death rate of mice (8 ws) | | | |
|----------------------------------|---------------------------|-------|--------|---------|
| | 0% | 1~33% | 34~66% | 67~100% |
| 100% | ● | ●●●● | ●● | ●● |
| 66% | ●●●● | ●●●● | ●●●● | ● |
| 33% | ●● | ●●●● | | ● |
| 0% | ●● | ●● | ● | |

Fig. 2. Correlation between the Death Rate of Mice and the Macroscopic Tuberculous Indices of Guinea-pigs. Mice were Infected Intravenously, and Guinea-pigs were Infected Subcutaneously with the Same Dosis



Macroscopic tuberculous indices of guinea-pigs (Dotted line means the average of the macroscopic tuberculous indices in the group).

Fig. 3. Correlation between the Degree of Tuberculous Pulmonary Involvement of Mice and the Macroscopic Tuberculous Indices of Guinea-pigs



ルモットの病変指数の値は高かった。しかし死亡率0または1~33%を示した菌株群の間では、モルモットの病変指数の分布にほとんど差がみられなかつた。

3) マウス肺病変度とモルモット肉眼的病変指数との比較

両動物で検討を行なつた48株の菌についての相関をみると図3に示すごとくである。全体としてみれば両者は比較的良く相関を示し、相関係数は+0.56であつた。

モルモットの結核感染実験では動物の個体差は比較的大きくである。そこで1菌株につき3匹ずつの皮下感染を行なつたものは除いて、1菌株につき6匹ずつの実験を行なつた27菌株で、マウス肺病変度との相関を検討した(第I実験および第III実験のみについての検討となる)。これらの菌株では $r = +0.74$ となり、マウスの病変度とモルモットの病変度はかなり良く相関を示していた。

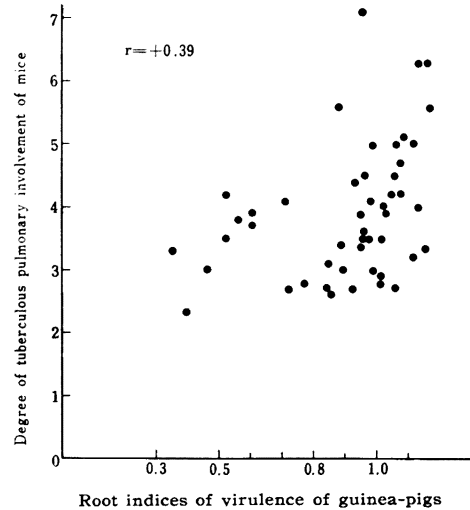
しかし一部の菌ではマウスでの判定とモルモットでの判定にはかなりの差異がみられている。図にみるように、モルモットで軽度の病変を作つた菌(図のA線より左側にプロットしてある菌)は13株あるが、これらのうちマウスでも軽度の病変を作つたと判定された菌(図のD線より下の菌)は6株のみであり、他の7株はマウスでは中等度の病変を作つたと判定されている。

またモルモットで高度の病変をつくつた菌(図のB線より右にプロットした菌)は13株みられたが、うち1株はマウスでは軽度の病変(図のD線以下)、3株は中等度の病変(図のC線とD線の間)と判定されている。

マウスの肺病変とモルモットの肉眼的病変との比較でも、一部の菌株では両動物の判定成績は一致しなかつた。48菌株での相関係数は+0.42であつた。

またマウス肺病変度とモルモットの肺病変度との比較でも、48菌株での相関係数は+0.42で、ほぼ同様の成績であつた。

Fig. 4. Correlation between the Degree of Tuberculous Pulmonary Involvement of Mice and the Root Indices of Virulence of Guinea-pigs



4) マウス肺病変度とモルモットの root index of virulence との比較

マウスの肺病変度とモルモットの root index of virulence との相関をみると図4のごとくである。 $r = +0.39$ で、両者の間に相関があるとはいえない。各菌株について6匹ずつのモルモットに皮下感染を行なつた27菌株について(第I実験と第III実験)両者の相関をみると $r = +0.57$ で、ある程度の相関があると考えられた。

Mitchson らが毒力の弱い菌としている root index が0.6未満の菌は6株みられたが、うち5株ではマウスの肺病変度は3.0以上で中等度の病変を形成していると判定された。マウスでも軽度と判定されたのは6株中1株のみだつた。

5) マウス脾重量とモルモット脾重量との比較

モルモットでは脾重量は比較的よく病変の程度を表現する。モルモットの肉眼的病変指数と脾重量との相関をみると $r = +0.72$ であつた。

マウスの脾重量とモルモットの脾重量との比較を行なうと図5にみるごとくであつた。両者はまったく相関を示さず、相関係数は+0.06であつた。

マウスの肺病変度とモルモットの脾重量と比較しても $r = +0.31$ で相関はみられなかつた。

6) マウスに対する毒力とモルモットに対する毒力の総合判定

以上の検討によりマウスあるいはモルモットのある一つの判定方法によつて、いくつかの判定方法での成績をも代表しうるようなものは見出だされなかつた。そこで次に次のような基準を設けて、マウスに対する毒力の総合判定、モルモットに対する毒力の総合判定を試み

た。

マウスでは8週までの死亡率が50%以上のものを毒

Fig. 5. Correlation between Weight of Spleen of Mice and Weight of Spleen of Guinea-pigs

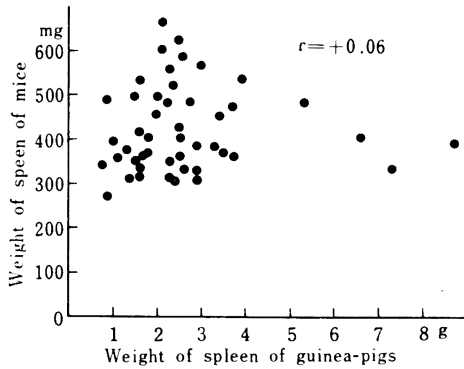


Fig. 6. Virulence to Mice and Guinea-pigs

| No. of strains | Mice | | | | | Guinea-pigs | | | Virulence of bacilli |
|----------------|----------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|------------------|--------------------------|----------------------|
| | Death rate in 8 wks. | Pulmonary tbc. involvement | Lung weight/body weight | Virulence to mice | Macroscopic tbc. index | Root index of virulence | Weight of spleen | Virulence to guinea-pigs | |
| 5 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 50 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 110 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 105 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 31 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 61 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 25 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 33 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 18 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| Brit. A | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| Kurono | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 73 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 116 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 121 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 108 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| 122 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 155 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 64 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 137 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 104 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 111 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 14 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 90 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 89 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 127 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 3 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 173 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 129 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Brit. C | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 109 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 79 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 41 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 37 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 1 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 57 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 94 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 65 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Ind. J | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 102 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 68 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 67 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Ind. K | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 172 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 93 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 154 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 85 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 185 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 156 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

in mice,

- death rate more than 50%.....● 0%.....○
- pulmonary tbc. involvement more than 4.5.....● less than 3.5.....○
- lung weight/body weight more than 220.....● less than 180.....○
- virulence to mice, two or three.....●.....● two or three ○.....○

In guinea-pigs,

- macroscopic tbc. index more than 22.....● less than 15.....○
- root index more than 1.1.....● less than 0.6.....○
- weight of spleen more than 3.0g.....● less than 2.0g.....○
- virulence to guinea-pigs, two or three.....●.....● two or three ○.....○

力が強いとし、0%のものを弱いとする。肺病変度は4.5以上を強いとし、3.5未満を弱いとする。比肺重は220以上を強いとし、180未満を弱いとする。図6にみるように、強毒とされた菌株には黒丸をつけ、毒力が比較的弱いとされた菌株には白丸を付した。黒丸が2つ以上ある菌株はマウスに対する毒力が強いと判定し、白丸が2つ以上あるものは弱いとした。

モルモットでは次のごとき基準を設けた。皮下感染8週後の肉眼的病変指数22以上を強、15未満を弱、root index 1.1以上を強、0.6未満を弱、脾重量3.0g以上を強、2.0g未満を弱とし、マウスと同様に黒丸または白丸を付した。2つ以上の丸を得た菌株を強毒菌または毒力の比較的弱い菌とした。

このようにして判定すると、検討した48菌株のうち11菌株はマウスに対して強毒、16株は毒力が比較的弱く、その他の21株は中等度と判定された。モルモット

では11株が強毒、13株が毒力比較的弱く、24株は中等度と判定されている。

図6にみるように、全体としてみるとマウスに対する毒力とモルモットに対する毒力はほぼ一致している。

マウスでもモルモットでも強毒とされた菌は8株である。一方の動物のみで強毒とされた菌は6株みられたが、うち5株は他方の動物でも黒丸が1コ付せられており、強毒菌に準ずるものと考えられた。一方の動物で強毒とされ、他の動物で毒力が弱いとされたのは64番菌1株のみであった。

またマウスでもモルモットでも毒力が比較的弱いとされた菌は8株みられた。両動物で判定が異なっている菌は11株みられたが、うち3株では白丸が1コ付せられており、毒力の弱い菌に準ずるものと考えられた。

不一致のみられた8株のうち、マウスで毒力が比較的弱く、モルモットで強くとされたのは前述の64番菌1株である。モルモットで毒力が比較的弱く、マウスで強毒とされた菌はみられなかつたが、モルモットで弱、マウスで中等度とされた菌はインドのJ、K菌および89、173、129番菌の5菌株認められた。

考案ならびに総括

結核菌の毒力の判定実験を行なうとき、動物に何を選び、判定方法にどの方法をとれば良いだろうか。容易に実験が

でき、しかも客観的に判定できる方法が望ましい。当実験では、動物にモルモットおよびマウスを用い、判定方法もいくつかの方法を用いて行なつたので、それぞれの成績の比較検討を試みたわけである。

マウスについてみると第I編でみたように、死亡率、肺病変度、肺重量、比肺重、さらに当実験では行なわなかつたが、臓器定量培養などの方法がある。これらの方法で判定した成績はだいたい相関するので（肺病変度と肺重量では $r=+0.89$ 、肺病変度と比肺重では $r=+0.94$ ）、実験の容易さと客観性を考慮して方法を選ばよいだらう。接種菌量が多ければ死亡率、少なければ肺病変度と比肺重での判定が容易であらう。接種菌量を本実験と同じく 0.1 mg とし、3週で剖検を行なつて比肺重などでみる方法も簡単でしかも客観性に富む点優れていると思われる。

モルモットでは肉眼的病変の判定方法にずいぶん多くの方法が発表されている⁹⁾。肺、肝、脾、リンパ腺のそれぞれに対する病変の評価を、Feldman index では $35:25:30:10$ とし、Steenken らは $25:25:25:25$ 、Bloch らは $33:33:33:0$ としている。また Mitchson らは $40:30:20:10$ とし、その合計を剖検日数で割り、さらに平方に開いて root index を算出している。当実験では肺、肝、脾を平等に取扱つて $5:5:5$ とし、体表、深部の10カ所のリンパ腺の病変もそれぞれ5点までの評価を与えて肉眼的指数とした。この他にも Sula ら⁴⁾ の spleen index または omental index による方法、脾重量の測定による方法、臓器定量培養法などその方法はきわめて多い。

しかし今回の実験成績の検討では、リンパ腺病変の点数も加えた肉眼的病変指数と内臓病変のみの指数とは $r=+0.84$ 、肺病変のみとの相関をみても $r=+0.68$ となつている。判定方法の異なつている root index との相関も $r=+0.91$ であつた。また脾重量とも $r=0.72$ で比較的良好に相関していた。（モルモット腹腔感染の死亡率はこれらの成績と異なつた成績が得られる。なお検討を要すると思われる）

したがつて実験動物にマウス、あるいはモルモットなど一定の動物を使用すれば、判定方法に差があつても、まずだいたい同様の成績が得られると考えられよう。

マウスでの成績とモルモットの成績は、図6でみたように、全体としてみればよく一致するといえよう。同菌株で両動物に対する毒力を検討した Lange ら⁵⁾、染谷ら⁶⁾も同様の見解を述べている。

しかし、いくつかの相関図でみたように、モルモットに対して毒力の弱い菌では、モルモットでみるほどマウスに対する毒力は弱くない、という印象であつた。免疫の発生の強いモルモットでは、弱毒菌は病変の進展がよく抑えられるのに、マウスではあまり影響を受けないの

であらうか。インドの患者由来の毒力の低い菌も、マウスではモルモットほど明らかな差がみられないことを Wallace ら⁷⁾は報じている。当実験でのインド菌 J, K 株などの成績も同様であつた。今後検討を要する問題だらう。

いずれにしても、両動物で一致して強い、あるいは弱い毒力をもつと判定された菌が、それぞれ10菌株程度みられている。ヒトに対する結核菌の毒力は、マウスに対する毒力、あるいはモルモットに対する毒力のいずれに類似しているのかいまのところ分かつていない。しかし両動物に対し、同じように強い菌、あるいは弱い菌はヒトに対しても強い、あるいは弱いと考えることは無理でない推論と思われる。

新鮮分離人型結核菌の毒力がけつして一様でないことは、これらの成績から確実といえよう。さらに多くの菌株についての検討が必要であらうし、基礎的な問題についても今後の研究が望まれる。

結 語

第I編で述べたマウスの成績と第II編で述べたモルモットの成績の比較検討を行なつた。いずれも 0.1 mg の菌接種を行ない、接種菌数も同様である。次の結論が得られた。

① 全体としてみれば、人型結核菌のマウスに対する毒力の強弱はモルモットに対する強弱とほぼ平行していた。

② 実態調査分離菌43株のうち、10株はマウスでもモルモットでも著しく強毒の菌であると判定された。また8株はいずれに対しても毒力は比較的弱かつた。（ただしこれらのうち4株はINH耐性菌である）

③ マウスおよびモルモットの種々な判定成績を比較して、次の相関係数を得た。

マウス肺病変度とマウス肺重量 $r=+0.89$ 。

マウス肺病変度とマウス比肺重 $r=+0.94$ 。

モルモット肉眼的病変指数とモルモット内臓病変指数 $r=+0.84$ 。

モルモット肉眼的病変指数とモルモット脾重量 $r=+0.72$ 。

モルモット肉眼的病変指数とモルモット root index $r=+0.91$ 。

マウス肺病変度とモルモット肉眼的病変指数 $r=+0.56$ または $r=+0.74$ 。

マウス肺病変度とモルモット root index $r=+0.39$ または $r=+0.57$ 。

マウス肺病変度とモルモット脾重量 $r=+0.31$ 。

マウス脾重量とモルモット脾重量 $r=+0.06$ 。

以上の成績に基づいて判定方法について考察を行なつた。

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) 岩崎竜郎・続木正大・青木正和他：結核, 40 : 427, 1965.
- 3) Mitchson, D. A., Bahtia, A. L., Radhakrishna, S. et al.: Bull. Wld. Hlth. Org., 25 : 285, 1961.
- 4) Sula, L. & Langerová, M.: Bull. Intn. U. ag Tuberc., 34 : 325, 1964.
- 5) Lange, B.: Zeitschr. f. Tbk., 57 : 129, 209, 1930.
- 6) 染谷四郎・林治・田島嘉雄：結核, 26 : 74, 1951.
- 7) Wallace, J. G. & Mitchson, D. A.: Tubercle, 42 : 212, 1961.