

毒力を異にする人型結核菌の微量菌感染実験

青木正和・続木正大

結核予防会結核研究所（所長 岩崎竜郎）

受付 昭和 40 年 8 月 10 日

EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS OF GUINEA-PIGS INFECTED WITH MINIMAL DOSIS OF TUBERCLE BACILLI WITH DIFFERENT DEGREES OF VIRULENCE*

Masakazu AOKI and Masahiro TSUZUKI

(Received for publication August 10, 1965)

Virulence to mice and guinea-pigs of newly isolated 43 strains of tubercle bacilli from Japanese tuberculous patients was reported previously. Many strains of tubercle bacilli showed high or moderate virulence to mice and guinea-pigs, but some strains showed low virulence to both animals. Two strains out of them were used for this study. One strain, No. 105 had high virulence and the other, No. 37 had moderate virulence to both animals.

Sixty adult male guinea-pigs were divided into six groups. Each group was infected subcutaneously with 10^{-5} mg, 10^{-6} mg or 10^{-7} mg of tubercle bacilli of the strain No. 105 or No. 37. Viable units were 190 colonies for 10^{-5} mg of the strain No. 105, and 520 colonies for 10^{-5} mg of the strain No. 37. All animals were sacrificed ten weeks after infection. The results were summarized as follows:

1. In the groups infected with the same dosis, the swelling of the regional lymph glands of the animals infected with the strain No. 105 appeared more early and was bigger than that of the animals infected with the strain No. 37 (Table 1).

2. Macroscopic findings of all animals ten weeks after infection were demonstrated in Table 2, Table 3 and Table 4. Extensive and progressive tuberculosis was found in the guinea-pigs infected subcutaneously with 10^{-7} mg (viable units 1.9 colonies) of the strain No. 105.

3. The macroscopic tuberculous changes of the animals infected with 10^{-5} mg (viable units 520 colonies) of the strain No. 37, moderate virulent strain, were slighter than the changes of the animals infected with 10^{-6} mg (viable units 19 colonies) of the strain No. 105, high virulent strain. The changes induced by 10^{-5} mg of the strain No. 37 were almost the same as the changes induced by 10^{-7} mg of the strain No. 105 (Table 5).

4. These results were ascertained bacteriologically by the viable units of tubercle bacilli recovered from 10 mg tissue of each organ (Tables 2 and 3). The results were verified by the histologic findings too (Table 6).

5. From the above-mentioned results, the authors concluded that the degree of the virulence of bacilli had more important significance for the progression of tuberculosis than the dosis of tubercle bacilli infected.

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

緒言

未治療肺結核患者から分離された人型結核菌の Maus および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い。強毒の菌では 0.1 mg の静脈内接種で Maus を 8 週までに 100% 死亡せしめるし、弱い菌では 1 匹も死亡せしめない。モルモットでも強毒菌では 0.1 mg の皮下感染で全臓器に広範な病変を形成するのに対し、毒力の弱い菌では病変は局所および所属リンパ腺に止まりきわめて軽度であつた^{1)~3)}。

菌の毒力の強弱と、その菌を排菌した患者の病型、病勢などとは、断面での比較でみるかぎり関連はみられなかつた⁴⁾。しかしヒトの場合、感染は比較的少量の菌で起こつていると推定される⁵⁾ので、感染から発病へ導く因子の一つとして、菌の毒力が関与していることも考えられよう。

そこで毒力を異にする人型結核菌の 2 菌株を用いてモルモットに微量菌感染を行ない、病変の進展に及ぼす毒力の意義について検討を試みた。

実験方法

1. 使用菌株 昭和 38 年結核実態調査分離菌のうち、モルモットに対する毒力が強いと考えられた 105 番菌および毒力が比較的弱いと判定された 37 番菌の 2 菌株を供試菌とした。これらの菌の毒力を実態調査で分離された他の 41 菌株と比較した成績は、すでに報告したごとくである^{1)~3)}。

2. 使用菌液 小川培地で分離培養を行なつた菌の一代継代菌を Dubos 液体培地に植え、さらに Dubos 培地に植えついで菌液を作成した。菌液の濁度を測定して菌量を推定し、倍数希釈を行なつて 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} mg/1.0 ml の菌液を作成した。

3. 使用動物 体重 230 g ないし 300 g のツ反陰性の雄性モルモット (船橋農場産) 60 匹を、各群 10 匹ずつに分けて実験に供した。

4. 感染菌量 105 番菌、37 番菌とも 10^{-5} 、 10^{-6} および 10^{-7} mg の 3 段階の感染を行なつた。105 番菌では 10^{-5} mg で生菌単位 190 コであつた。したがつて生菌単位では 190 コ、19.0 コおよび 1.90 コの 3 段階の感染を行なつたこととなる。37 番菌は 10^{-5} mg で 520 生菌単位であつた。したがつて生菌単位では 520 コ、52 コおよび 5.2 コの 3 段階で感染を行なつたこととなる。

5. 感染方法 上記の菌量がそれぞれ 1.0 ml 中に含まれる菌液を作成し、これを 1.0 ml ずつモルモット右大腿皮下に接種して感染を行なつた。

6. 観察方法 感染後毎週体重を測定し、局所および所属リンパ腺の観察を行なつて経過を観察した。4 週および 8 週にはツ反応を行なつた。

感染後 10 週で全動物の剖検を行ない、佐藤秀三氏法にならつて肉眼的所見の観察を行なつた。また肺、肝の臓器内結核菌の定量培養を行なつた。

実験成績

1) 体重の推移

いずれの動物も体重は順調に増加し、また途中で死亡した動物はみられなかつた。

2) 菌接種局所および所属リンパ腺の変化

菌接種局所は一部の動物で潰瘍を形成したが、大部分では皮下膿瘍を作り、その大きさは 105 番菌感染群でやや大きかつた。

所属リンパ腺は 105 番菌 10^{-5} mg 感染群では大部分で 2 週よりふれ、37 番菌 10^{-7} mg 感染群では 4 週ではじめてふれた。他群はだいたい 3 週で腫脹を認めた。

リンパ腺の大きさを大豆大まで 1、えんどう大 2、そらまめ大 3、それ以上 4 とし、各群の平均の大きさをみると表 1 のごとくであつた。

3) ツ反応

いずれの群も 4 週で明らかな陽転を示した。その発赤の大きさ、硬結の大きさは 37 番菌 10^{-7} mg 感染群でわずかに小さかつたが、他群ではほとんど差をみなかつた。

4) 10 週剖検時の肉眼的所見

10 週剖検時の所見は表 2、表 3 および表 4 に示すごとくである。

105 番菌 10^{-5} mg 感染群では体表、深部リンパ腺とも著しく大きく腫大し、肺、脾にも全動物で結節が認められ、広範に進展した病変のみられる動物もあつた。 10^{-6} mg 感染群もほぼ同様である。 10^{-7} mg 感染群ではリンパ腺病変、内臓病変ともやや軽度であつたが、肺、脾には全動物で結節が認められた。

これに対し 37 番菌感染群の病変は軽く、 10^{-5} mg 感染群でも 10 匹中 5 匹では肺に肉眼的病変を認めず、

Table 1. Average Size of Regional Lymph Gland after Infection

Strain	Dosis of infection (mg)	Viable units of infection	Period after infections			
			1 w	2 ws	3 ws	4 ws
105	10^{-5}	190	0	0.7*	1.9*	2.4*
"	10^{-6}	19	0	0.2	1.5	2.2
"	10^{-7}	1.9	0	0	1.0	1.9
37	10^{-5}	520	0	0.4	1.1	1.9
"	10^{-6}	52	0	0.1	0.8	1.4
"	10^{-7}	5.2	0	0	0	0.7

* Mark was given to each animal as following standard: 0...no swelling, 1...swelling as big as soybean, 2...swelling as big as green-pea, 3...swelling as big as lime-bean, 4...more than lime-bean. Number shows the average of ten animals in each group.

Table 2. Macroscopic Findings and Viable Units in 10 mg Tissue of Each Organ, 10 wks after Infection. (1) Animals infected with high virulent Strain, No. 105

Strain	Dosis of infection	Animal number	Index of macroscopical changes		Weight of spleen (g)	Viable units in 10 mg tissue	
			Viscera	Lymph glands		Lung	Liver
No. 105	10 ⁻⁵ mg	1	7	25	2.2	300	49
		2	2	16	1.0	0	0
		3	4	9	1.7	13	80
		4	3	14	1.0	7	0
		5	3	14	1.7	119	6
		6	4	16	1.7	36	0
		7	4	16	1.9	81	12
		8	4	22	3.5	84	4
		9	5	25	4.0	34	58
		10	5	23	2.1	12	4
Average			4.1	18.0	2.1	68.5	21.1
No. 105	10 ⁻⁶ mg	11	4	24	1.8	133	9
		12	4	13	2.0	57	0
		13	6	21	1.3	230	127
		14	2	14	1.1	300	2
		15	2	14	0.9	1	4
		16	2	18	1.1	6	1
		17	6	20	1.8	230	9
		18	2	17	1.0	0	0
		19	3	14	1.0	7	2
		20	2	24	1.3	68	0
Average			3.3	17.9	1.1	103.0	15.1
No. 105	10 ⁻⁷ mg	21	2	14	0.9	0	0
		22	3	20	0.8	65	1
		23	3	17	1.5	0	4
		24	2	16	1.1	4	2
		25	3	19	0.9	2	1
		26	2	14	0.8	0	0
		27	2	18	0.9	0	0
		28	2	17	1.0	0	0
		29	2	19	1.3	2	7
		30	3	12	1.1	0	0
Average			2.4	16.6	1.0	7.3	1.3

Each visceral organs were evaluated as following standard: —no lesion...0, 1~10 tubercles...1, 11~20 tubercles...2, more than 20 tubercles...3.

Each lymph glands were evaluated as following standard: —no swelling...0, 2~5 mm in diameter...1, 5~10 mm...2, 10~20 mm...3, more than 20 mm...4, many lymph glands more than 20 mm in diameter...5.

10⁻⁶ mg 感染群では肺に病変の認められた動物は 10 匹中 2 匹のみ, 10⁻⁷ mg 感染群では全例で肺に病変が認められなかった。脾も同様で, 10⁻⁸ mg および 10⁻⁷ mg 感染群では肉眼的に病変の認められない例が多かった。リ

Table 3. Macroscopic Findings and Viable Units in 10 mg Tissue of Each Organ, 10 wks. after Infection. (2) Animals infected with moderate virulent strain, No. 37

Strain	Dosis of infection	Animal number	Index of macroscopical changes		Weight of spleen (g)	Viable units in 10 mg tissue	
			Viscera	Lymph glands		Lung	Liver
No. 37	10 ⁻⁵ mg	41	1	18	1.0	0	3.5
		42	0	7	0.8	0	0
		43	1	6	0.6	0	1.5
		44	3	18	1.7	53.5	9
		45	3	23	1.0	7.5	4
		46	3	12	0.9	0	1.5
		47	2	13	0.8	0.5	2
		48	1	15	0.9	0	10
		49	0	6	0.8	0	0
		50	3	12	1.2	0.5	1.5
Average			1.7	13.0	1.0	6.2	3.3
No. 37	10 ⁻⁶ mg	51	1	7	1.0	0	0
		52	0	4	0.8	0	0
		53	0	11	0.9	0	0
		54	0	5	0.8	0	0
		55	2	17	0.9	6	0
		56	2	7	0.7	0	0
		57	0	7	0.2	0	0
		58	0	9	0.9	0	0
		59	0	5	0.6	0	0
		60	1	6	0.8	0	0
Average			0.6	7.8	0.8	0.6	0
No. 37	10 ⁻⁷ mg	61	0	5	0.7	0	0
		63	1	7	0.8	0	0
		64	0	3	0.6	0	0
		65	0	2	0.6	0	15.5
		66	0	5	0.5	1	0
		67	1	7	0.7	0	0
		68	1	6	0.8	0	0
		69	1	4	0.9	0	0.5
		70	0	4	0.7	0.5	0
		Average			0.4	4.8	0.8

ンパ腺病変も 105 番菌に比し各段階の感染群とも軽微な病変を示していた。

内臓病変指数とリンパ腺病変指数とを加えた平均値について, 各群間の有意性の検定を行なった成績が表 5 である。105 番菌 10⁻⁷ mg 感染群および 37 番菌 10⁻⁷ mg 感染群では, 他群と比較して母分散が小さく, 母分散が等しいといえないので, Cochran & Cox の方法に従って *t* 値の計算を行なった。母分散が等しいといえる群の間での *t* 値の計算はもちろん, 通常の方法に従った。

Table 4. Average Indices of Macroscopical Tuberculous Changes in Each Experimental Group

Strain	Dosis of infection (mg)	No. of animals	Average indices of macroscopical changes	U ²
105	10 ⁻⁵	10	22.1	370.9
"	10 ⁻⁶	10	21.2	221.6
"	10 ⁻⁷	10	19.0	66.0
37	10 ⁻⁵	10	14.7	382.1
"	10 ⁻⁶	10	8.4	166.4
"	10 ⁻⁷	9	5.2	34.8

表5にみるごとく、105 番菌 10⁻⁵ mg および 10⁻⁶ mg 感染群と比較すると、37 番菌の各段階の感染群はいずれも有意の差をもつて病変は軽度であると判定された。105 番菌 10⁻⁷ mg 感染群と比較すると 37 番菌 10⁻⁶ mg および 10⁻⁷ mg 感染群は有意の差をもつて病変が軽度であった。

5) 組織学的所見

105 番菌 10⁻⁵, 10⁻⁶ mg 感染群では全動物で肺, 脾, 気管腺, 門脈腺に結核結節を認め, 肝でも 10⁻⁶ mg 感染群の 1 例を除いていずれも結節が認められた。10⁻⁷ mg 感染群でも, 気管腺, 門脈腺では全例で結節が認められた。脾では 10 例中 1 例, 肺では 3 例, 肝では 5 例で結節をみながつたが, 他の動物ではいずれも定型的結核結節が認められた。

これに対し 37 番菌感染群では 10⁻⁵ mg 感染群でも 10 例中 3 例は肺に結節を認めず, 5 例は肝に病変なく, 脾では 4 例で結節が認められなかつた。気管腺でも 3 例では結節が認められず, 門脈腺では標本を作成することのできた 8 例では全例で結節を認めたが, 2 例ではリンパ腺がきわめて小さいため標本作成時に失われ, 鏡検することができなかつた。37 番菌 10⁻⁶ mg 感染群, 10⁻⁷ mg 感染群では, 表6にみるように, 結節の認められない動物はさらに多かつた。

Table 5. Comparison of Average Indices of Macroscopical Tuberculous Changes of Various Groups

Groups compared	t	df	P value
No. 105, 10 ⁻⁵ mg vs. No. 37, 10 ⁻⁵ mg	2.75	18	**
" vs. " 10 ⁻⁶ mg	5.58	18	***
" vs. " 10 ⁻⁷ mg	7.89*	17	***
No. 105, 10 ⁻⁶ mg vs. No. 37, 10 ⁻⁵ mg	2.56	18	**
" vs. " 10 ⁻⁶ mg	6.15	18	***
" vs. " 10 ⁻⁷ mg	9.35*	17	***
No. 105, 10 ⁻⁷ mg vs. No. 37, 10 ⁻⁵ mg	1.94*	18	
" vs. " 10 ⁻⁶ mg	6.62*	18	***
" vs. " 10 ⁻⁷ mg	12.44	17	***

* t value were calculated by the method after Cochran & Cox

** Significant

*** Highly significant

Table 6. Histologic Findings: Number of Animals without Tubercle in Each Organ

Strain	Dosis of infection (mg)	Lung	Liver	Spleen	Bronchial lymph gl.	Portal lymph gl.
105	10 ⁻⁵	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
105	10 ⁻⁶	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10
105	10 ⁻⁷	3/10	5/10	1/10	0/10	0/10
37	10 ⁻⁵	3/10	5/10	4/10	3/10	0/8
37	10 ⁻⁶	5/10	7/10	5/10	7/10	4/9
37	10 ⁻⁷	4/9	6/9	4/9	5/8	3/6

Denominator.....No. of specimen observed

Numerator.....No. of specimen without tubercle

結節の有無のみでなく, 結節の数, 大きさ, 壊死の有無などを考慮すれば, 105 番菌と 37 番菌との組織学的差異はさらに大きくなる。

6) 臓器内結核菌定量培養成績

表2, 表3に示したごとくである。

各臓器とも約 150 mg の臓器を採取して定量培養を行なつたが, 培養した組織の量が比較的少なかつたためか, 培養陰性となつた例がやや多かつた。しかし表から明らかのように, 105 番菌感染群では 37 番菌感染群に比し, 肺および肝の臓器内結核菌生菌数が多く, 肉眼的所見, あるいは組織学的所見で得られたと同様の成績が得られた。

考案ならびに総括

昭和 38 年および 39 年結核実態調査分離菌の Maus およびモルモットに対する毒力の検討成績をさきに報告した¹⁾⁻³⁾。当実験に用いた菌株は, これらの中から選んだ 2 菌株である。すでに述べたように, 新たに分離された人型結核菌の毒力は一様なものではなく強弱かなりの幅がみられたが, そのさいに用いた菌液とは別に作成した菌液を用いて行なつた当実験でも, さきに強毒と判定された 105 番菌は毒力が著しく強く, 毒力が比較的弱いとされた 37 番菌では毒力がかなり弱かつた。このことは,

さきに報告した実験成績の再現性を認めるものといえよう。Maus でも 4 菌株を用いて再現性の検討を行ない, 同様の成績が得られているので⁶⁾, 新たに分離された人型結核菌の毒力に差があるという成績に再現性があることは確認できたといえることができる。

強毒の 105 番菌の 0.1 mg の皮下感染, または腹腔感染では広範な進行性の病変形成が認められた²⁾が, 今回の 10⁻⁷ mg (生菌単位 1.9 コ) という微量菌の皮下感染でも, 体表リンパ腺や深部リンパ腺はもちろん, 肺, 脾, 肝にも病変が認められたことは注目されよう。接種菌液の生菌単位が,

そのまま接種菌数であるとは考えられないとしても、10匹のモルモットにこの量の菌液を接種して、全例で進行性病変がみられたことは、強毒の人型結核菌ではきわめて微量でもモルモットに進行性病変をつくることを示している。

これに対し 37 番菌では、 10^{-5} mg 感染群でも肉眼的病変は 105 番菌の 10^{-7} mg 感染群より軽く、 10^{-6} mg 感染群と比較すれば有意差ありと判定された。生菌数で見れば 105 番菌の 1.9 コまたは 19 コに対し、37 番菌の 10^{-5} mg は 520 生菌単位である。感染菌量の 25 倍、あるいは 250 倍の差よりは、菌の毒力の差異のほうが病変の進展に大きな影響を及ぼすことを示している。

さきに検討した 43 菌株のうち、105 番菌はもつとも強毒の菌株の 1 つであるが、37 番菌はけつして毒力のもつとも弱い菌ではない。毒力の総合判定成績³⁾では D 群(マウスに対してもモルモットに対しても中等度の毒力の菌)と判定されている。Mitchson ら⁷⁾は root index of virulence でみて 0.6 以下を弱毒の人型結核菌としているが、この基準によつても 37 番菌は 0.969 で強毒菌に分類されよう。105 番菌の root index は 1.139 で 37 番菌よりはるかに強毒である。この程度の毒力の相違でも微量菌感染では成績の項でみたとき差がみられることは、結核症の発病、進展に及ぼす毒力の意義の重要性を物語つていると考えられる。

ヒトの結核症の感染のさい、何個の菌が侵入しうるかいまのところ明らかではない。Rich⁸⁾は終末気管支の太さは直径 0.5 mm 程度であり、0.3 mm 程度の粒子には 400 コの結核菌を含みうると述べている。しかし 5 μ 以上の粒子はほとんど上気道に沈着して肺胞に到達しないといわれている⁹⁾。肺胞にもつとも沈着しやすい粒子の大きさは 1 μ 前後のものであることも塵肺症の研究者により広く認められている¹⁰⁾。われわれが肺胞内に沈着した炭粉粒子の大きさを測定した成績⁹⁾でも、その大部分は 1 μ 前後の粒子であつた。結核菌の大きさは長さ 2~4 μ 、太さ 0.2~0.4 μ 程度なので、肺胞にまで侵入し、沈着しうる結核菌の数は 1 コないし数コ、どんなに多く考えても数十コを出ないものと推論されよう。

結核菌に感染した者のうち発病してくる者の割合は最近では著しく低くなつている¹¹⁾。菌数、菌の毒力、菌の侵入部位、BCG などの特異的抵抗性、その他の非特異的な宿主側の条件など、多くの因子が関係して一部の人間たちでは発病にまで導かれるのであろう。現在、いずれの因子がどの程度の役割を果たしているか明らかでないが、微量菌を用いて行なつた当実験の成績は、発病の因子として菌の毒力も重要な意義をもつことをよく示しているといえるであらう。

結 語

昭和 38 年結核実態調査のさい、新しく未治療患者から分離された人型結核菌のうち、きわめて強毒な 105 番菌および中等度の毒力をもつ 37 番菌の 2 菌株を選び、モルモットに微量菌感染を行なつた。感染菌量は両菌株とも 10^{-5} mg、 10^{-6} mg および 10^{-7} mg の 3 段階である。皮下感染後 10 週で剖検を行ない、次の成績を得た。

(1) 強毒の 105 番菌の皮下接種では、 10^{-7} mg (生菌単位 1.9 コ) という微量菌感染でも、モルモットに進行性病変をつくる。

(2) 中等度の毒力をもつ 37 番菌の 10^{-5} mg (生菌単位 520 コ) によつて形成される病変は、105 番菌 10^{-6} mg (生菌単位 19 コ) によつて作られる病変より有意の差をもつて軽微であつた。

(3) 37 番菌 10^{-5} mg (生菌単位 520 コ) による病変と、105 番菌 10^{-7} mg (生菌単位 1.9 コ) による病変は統計的に差がないと判定された。接種生菌単位を 250 倍にしてほぼ同程度の病変が形成されることを示している。

(4) 以上の成績は、さきの人型結核菌の毒力の検討実験の再現性を認めるものである。また結核症の発病、進展に、菌の毒力が重要な意義をもつことを示していると考えられた。

結核研究所岩崎竜郎所長および島尾忠男研究部長のご指導、ご校閲を深謝いたします。また統計学的なご助言をいただいた国立予防衛生研究所佐藤直行先生に感謝いたします。本論文の要旨は第 40 回日本結核病学会総会で発表した。なお当研究は厚生科学研究費の援助を受けた。

文 献

- 1) 岩崎竜郎・統木正大・青木正和他：結核，40：359，1965.
- 2) 同上：結核，40：427，1965.
- 3) 同上：結核，41：1，1966.
- 4) 同上：結核，41：47，1966.
- 5) 北鎌平：結核，32(増刊号)：41，1957.
- 6) 青木正和：結核，投稿中
- 7) Mitchson, D. A.: Bull. Intern. U. ag. Tbc., 35：287，1964.
- 8) Rich, A. D., 隈部英雄訳：結核の病理発生論，岩波書店 1954 年刊.
- 9) Brown, J. H., Cook, K. M., Ney, F. G. et al.: Am. J. Publ. Hlth, 40：450，1950.
- 10) 興重治・坂部弘之：労働科学，30：552，1954.
- 11) 島尾忠男：第 40 回結核病学会特別講演，1965.