

毒力の異なる結核菌の生菌または死菌接種 による結核菌の毒力の検討

青 木 正 和

結核予防会結核研究所 (所長 岩崎竜郎)

受付 昭和 40 年 9 月 28 日

EXPERIMENTAL MURINE TUBERCULOSIS INFECTED WITH LIVE OR HEAT-KILLED TUBERCLE BACILLI WITH DIFFERENT DEGREES OF VIRULENCE TO MICE*

Masakazu AOKI

(Received for publication September 28, 1965)

Virulence to mice and guinea-pigs of tubercle bacilli newly isolated from 43 Japanese tuberculous patients was reported previously^{1)~4)}. Virulence of these strains was not identical each other: many strains showed high or moderate virulence to mice and guinea-pigs, but some strains showed low virulence. To confirm the results of the previous experiments, and to observe the difference of tuberculous changes induced by heat-killed tubercle bacilli with different degrees of virulence, the following experiments were performed. In addition, the method evaluating the murine tuberculous changes with specific lung weight was discussed in this paper.

1. As the tuberculous changes in mice were relatively simple, the degrees of tuberculous changes could be roughly expressed by the weight of lung. But, as the weight of lung correlated with the body weight ($r=+0.85$), specific lung weight might be more favorable for evaluation of the tuberculous changes. In normal healthy mice, the specific lung weight was 70.0 ± 2.9 . (Tab. 1)

2. Four strains of tubercle bacilli out of previous 43 strains were used for this experiment. Nine or ten mice were infected with 0.1 mg of each strain intravenously. Twenty days after infection, all animals were sacrificed.

The average degrees of pulmonary tuberculous involvement were 4.84 for the mice infected with No. 50 strain of bacilli, 4.10 for No. 105, 2.15 for No. 65 and 1.60 for No. 37. (Tab. 2) These results could be more markedly demonstrated by the specific lung weight. (Tab. 3) From these results, 1) the previous results^{1)~3)} that the virulence of newly isolated tubercle bacilli was not identical with each other were confirmed, 2) the method evaluating the tuberculous changes in mice by the specific lung weight was considered as one of the useful, objective and simple methods for the evaluation of murine tuberculosis.

3. The weight of spleen did not correlate with the weight of lung, or the degrees of tuberculous changes in mice. ($r=-0.45$) (Fig. 1)

4. Even the highest virulent strain, the heat-killed tubercle bacilli could not form macroscopic tuberculous change. There was no difference between the mice infected with heat-killed bacilli of high virulent strain and the mice infected with heat-killed bacilli of moderately virulent strain. (Tab. 4)

* From Research Institute, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose-machi, Kitatama-gun, Tokyo, Japan.

5. The microscopic findings of the mice infected with heat-killed bacilli of different degrees of virulence were identical with each other, too. These findings were markedly different from the findings of the mice infected with live bacilli (Table 5).

さきに未治療肺結核患者から新たに分離した人型結核菌の毒力について報告し^{1)~4)}、さらにその一部の菌株を用いてモルモットに微量菌感染実験を行なった成績について報告した⁵⁾。これらの中で、新鮮分離人型結核菌の毒力は一様でなく、毒力の強い菌と弱い菌との間にはかなりの幅がみられることを報告した。また毒力と断面でみた臨床所見との関連はみられなかつたが、モルモットに微量菌を感染した場合、接種菌量の差より毒力の差のほうが病変の進展に大きく影響を及ぼすので、結核症の発病に菌の毒力の強弱も重要な意義をもつと考えられることなどを述べた。

このような毒力の検討実験に再現性が認められるか否かをみることを一つの目的とし、また毒力を異にする結核菌の死菌接種の場合にも毒力の強弱によつて差がみられるか否かを検討することをも目的として、当実験を行なった。さらにこの実験のさい、肺の重量測定または比肺重測定によるマウス実験的結核症の病変度の判定方法についても検討を行なったので、これらをあわせて報告したい。

実験材料

- (1) 動物。dd 系マウス（船橋農場産）を用いた。動物の性・年齢などは成績の項に述べるごとくである。
- (2) 使用菌株。昭和 38 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のうちの 4 菌株を使用した。すなわちマウスおよびモルモットに対して毒力がきわめて強いと判定された 50 番菌および 105 番菌、ならびに両動物に対して中等度の毒力をもつと判定された 65 番菌および 37 番菌の 4 菌株である。これらの菌株のマウスおよびモルモットに対する毒力の検討成績はすでに述べたごとくである^{1)~3)}。
- (3) 菌液の作成。喀痰または喉頭粘液から小川培地で分離培養を行ない、さらに小川培地に継代した菌を Dubos 液体培地に継代、これを Dubos 液体培地に植えつけた菌液を使用した。菌液は比濁計で濁度を測定して菌量を推定し 0.5 ml/ml の菌液とした。
- (4) 死菌液の作成。上記の菌液を 100°C、1 時間加熱して死菌液を作成した。
- (5) 感染方法。生菌、死菌ともに上述の菌液を 0.2 ml ずつマウス尾静脈より接種して感染を行なった。接種菌量は 0.1 mg となる。
- (6) 実験群および観察方法。成績の項で述べるごとくである。

くである。

実験成績

〔第 I 実験〕 正常健康マウスの肺重量、比肺重の測定マウスの実験的結核症は比較的単純なので、病変の程度を肺の肉眼的所見または肺重量によつて代表させることができる⁶⁾。とくに肺重量測定は客観的に判定できる点、優れている。このためその基礎資料をうる目的で、次の検討を行なった。

(1) 実験方法。dd 系雌性健康マウス生後 6 週ないし 12 週のもの、計 32 匹を剖検して体重、肺重量を測定し、さらに比肺重を計算してその分布を観察した。肺重量は剖検時の肺の血液量に大きく影響されるので、次のごとく剖検した。すなわちマウスをエーテルで麻酔し、四肢を解剖台に固定、腋窩動脈を切断して致死せしめた。以下、型のごとく剖検し肺をとり出した後、心、リンパ腺を分離、吸取紙で付着した血液を軽くつつた後、肺重量を torsion balance で正確に mg 単位まで測定した。なお肺重量 (mg) を体重 (g) で割り、これを 10 倍した値を比肺重と呼んだ。

(2) 実験成績。体重、肺重量などの測定成績は表 1

Table 1. Lung Weight, Body Weight and Specific Lung Weight of 32 Normal Healthy Mice (dd Strain, ♂, 6~12 ws old)

	Average	Range	Standard dev.	Coefficient of variability
Lung weight	145.2* ±10.5mg	102~226mg	29.2	20.1
Body weight	21.6 ±1.4 g	13.5 ~ 27.2g	3.97	18.4
Specific lung** weight	70.0 ±2.9	50~ 79	7.95	11.4

* 95% confidence limit

** Specific lung weight=lung weight(mg)/body weight ×10

のごとくである。肺重量は平均 145 mg であつたが、最低 102 mg から、最高 226 mg までの広い範囲に分布している。肺重量は体重の重い動物ほど重く、相関係数を計算すると $r=+0.85$ で両者はかなり密な相関関係を示した。

そこで比肺重を計算し、その平均をみると平均 70、分布は 50 ないし 79 であつた。変動係数でも肺重量の係数 20 に対し、比肺重の変動係数は 11 であり、比肺

Table 2. Degree of Pulmonary Tuberculous Involvement, Body Weight and Weight of Organs of Mice 20 Days after Infection (Average rates with 95% confidence limit)

Strain	No. of animals	Infections dosis in viable units ($\times 10^6$)	Body weight (g)	Degree of pulmonary tuberculous involvement	Lung weight (mg)	Specific lung * weight	Spleen weight (mg)
50	9	21	11.1 \pm 1.8	4.84 \pm 0.27	479 \pm 74	435 \pm 75	158 \pm 36
105	10	19	13.5 \pm 4.5	4.10 \pm 0.72	367 \pm 53	281 \pm 57	236 \pm 56
65	10	15	16.4 \pm 4.0	2.15 \pm 0.37	297 \pm 34	179 \pm 15	311 \pm 65
37	9	52	16.9 \pm 5.6	1.60 \pm 0.53	232 \pm 33	146 \pm 12	283 \pm 63

* Specific lung weight = lung weight(mg)/body weight $\times 10$

重でみた方が分布幅が狭くなることが認められた。

(3) 小括。雌マウスでみても生後6週以上の動物では比肺重は70近くの値を示し、雄マウスと有意差を示さない。一方体重が平均3g以上異なっている群で比較すると、肺重量では有意差を示すこともある。したがって体重の異なる群の比較の場合には、肺重量を用いるより比肺重を用いるほうが良いと考えられた。

〔第Ⅱ実験〕 毒力の異なる結核菌生菌の感染実験

前述の結核実態調査分離菌のうちの4菌株を用い、その生菌感染を行なつて各菌株の毒力の比較を行なつた。

(1) 実験方法。dd系雌、生後6週のマウス38匹を9ないし10匹の4群に分ち、各群にそれぞれ50番菌、105番菌、65番菌または37番菌の0.1mgの静注感染を行なつた。感染後20日で全動物を剖検し、病変の観察を行なうとともに、上述のごとく肺重量などを正確に測定した。なお各菌株の接種生菌数は表2にみるごとくである。

(2) 実験成績。感染後20日までは全動物で死亡はみられなかったが、50番菌および105番菌では体重減少著しく、50番菌では全身状態も次第に悪化した。感染後20日の各群の剖検所見は表2に示すごとくである。

平均肺病変度⁹⁾でみると、50番菌の4.84に対し、105番菌では4.10、65番菌では2.15、37番菌では1.60であつた。50番菌ではいずれの動物でも肺全面は大きな結節でおおわれ、著しく進展した病変を示したのに対し、105番菌、65番菌と順次軽くなり、37番菌では小さい点状の結節を認めるのみであつた。

肺重量でみても50番菌では平均479mg、105番菌367mg、65番菌297mg、37番菌では232mgであつた。比肺重でも435から146の間に分布し、同様の傾向であつた。

これに対し脾重量は50番菌でもつとも軽く、65番菌でもつとも重かつた。肺の病変、または肺重量の重い群ほど平均脾重量が軽い傾向である。これら4群の全動物38匹について肺重量と脾重量の相関をみてもほぼ同様の傾向であつた。相関係数を計算すると $r = -0.45$ となる。(図1)

組織学的所見は第Ⅲ実験の項で述べる。

(3) 小括。各群間の有意性の検定を行なうと表3の

Table 3. Comparison of Results

Groups compared	d. f.	Degree of pulmonary tbc. involvement		Lung weight		Specific lung weight	
		t	p	t	p	t	p
50 vs. 105	17	2.05		2.80	*	3.69	**
50 vs. 65	17	12.80	**	5.12	**	18.77	**
50 vs. 37	16	11.30	**	6.72	**	21.91	**
105 vs. 65	18	4.47	**	2.69	*	3.86	**
105 vs. 37	17	5.66	**	4.72	**	4.89	**
65 vs. 37	17	1.79		3.06	**	12.04	**

* Significant ($P < 0.002$)** Highly significant ($P < 0.001$)

ごとくである。もつとも強毒とみられた50番菌ともつとも毒力の弱かつた37番菌の間はもちろん、50番菌と105番菌、あるいは65番菌の間にも有意の差がみられている。判定方法としては、肺重量で比較するより肺病変度でみたほうが差がでやすく、比肺重で判定すればさらに各群間の差は明瞭にでる、と考えられた。

〔第Ⅲ実験〕 毒力の異なる結核菌加熱死菌の接種実験
生菌感染の場合、各菌株間に著しい差異が認められたので、これらの菌を加熱死菌として接種したときの変化にも菌株間の差異がみられるか否か、また生菌接種の場合とどの程度の差異がみられるかを知るため、次の実験を行なつた。

(1) 実験方法。第Ⅱ実験で用いた菌液を100°C、1時間の加熱で死菌菌液とし、これを0.2mlずつ静注接種した。接種菌量は生菌感染の場合と同じこととなる。

死菌接種後、10日、20日で各群2匹ないし3匹の剖検を行ない、第Ⅱ実験と同様の方法で判定を行なつた。なお使用した動物はdd系雌、生後6週マウスで第Ⅱ実験と同様である。

(2) 実験成績。死菌接種後20日まで死亡した動物はなく、体重も順調に増加した。また10日または20日後の剖検時にも、全動物で肺には肉眼的病変はまったく見出されなかつた。剖検時の肺重量、比肺重などは表4に示すごとくである。動物数が少ないため各菌株ごとに多少の変動がみられたが、肺重量も比肺重も健康マウスのそれと比較して有意の差はみられなかつた。

組織学的所見は表5に示すごとくである。死菌接種ではいずれの群でも肺、腎には結節は認められない。脾に

Table 4. Body Weight and Weight of Organs of Mice Infected with Heat-killed Tubercle Bacilli of Strain No. 50, 105, 65 and 37*

Strain	No. of animals	Interval between infection and autopsy (days)	Body weight (g)	Lung weight (mg)	Specific lung weight	Spleen weight (mg)
50	2	10	15.8	135	86	75
50	3	20	18.9	170	91	127
105	2	10	14.8	108	73	66
105	3	20	19.5	151	78	146
65	2	10	16.8	139	82	71
65	3	20	19.2	147	77	180
37	2	10	15.9	124	78	74
37	3	20	19.7	133	73	133

* Dosis of infection were the same as the previous (lived bacilli infection) experiment.

Table 5. Microscopic Findings of Mice Infected with Heat-killed or Live Tubercle Bacilli with Different Degree of Virulence

Live or killed bacilli infection	Strain	Interval between infection and autopsy (days)	Liver		Spleen	Lung	Kidney
			No. of tubercles*	No. of tbc. bacilli**			
Heat-killed	50	10	2.0	0.3	±	—	—
		20	1.6	0.3	±	—	—
	105	10	1.0	0	±	—	—
		20	6.8	0.3	±	—	—
	65	10	1.1	0.1	±	—	—
		20	4.4	0.1	±	—	—
	37	10	3.5	0.2	±	—	—
		20	3.7	0.8	±	—	—
Live	50	10	30~70	15.3	++	++	+
		20	30~70	31.6	+++	+++	+
	105	10	30~70	20.0	++	++	+
		20	30~70	24.3	+++	+++	+
	65	10	30~70	5.0	+	+	—
		20	30~70	13.6	+	++	+
	37	10	30~70	7.6	+	+	+
		20	30~70	6.1	+	++	+

* Average number of tubercles in one microscopic field (One field is 1.7 mm in diameter). In the mice infected with live bacilli, number of tubercles could not be counted because of too abundant tubercles.

** Average number of acid-fast bacilli in one tubercle.

は萎縮性の結節が少数認められた。結節の性状を比較しやすい肝でみると、表に示したごとくであつた。すなわちいずれの群でも10×10の1視野(直径1.7mmの円)に1コないし数コの結節が認められたが、萎縮性または非定型的なものも多い。抗酸性菌は認められない結節が多いが、数コの結節に1コ程度の割合では結節中に菌がみられ、結節1コ当り平均でみると0.1~0.8であつた。しかし結節の数、結節中の菌の数など、いずれでも菌株間の差はみられず、強毒の50番菌でも毒力の弱い37番菌でも同様の所見であつた。

なお生菌感染のときの組織所見も表5に掲げた。肺、肝、脾、腎の各臓器に抗酸性菌が多数染色される結節が多くみられている。とくに50番菌および105番菌生菌感染群の肺にはきわめて多数の結核菌が染め出され、65番菌または37番菌感染群より菌数は明らかに多かつた。肝の結節中の結核菌数でみても、生菌感染の場合には菌株間の差異がはつきり認められた。

(3) 小括。きわめて強毒の菌接種の場合でも、加熱死菌ではマウスに肉眼的病変は作らず、顕微鏡的にも貧弱な結節を肝などに小数形成するにすぎない。また生菌接種では菌株間の毒力の相違が明らかに認められたが、加熱死菌にすると菌株間の毒力の差は認められなかつた。

総括および考案

マウスの結核性病変は肺、肝、脾、腎、リンパ腺、心膜などにみられるが、肉眼的に認められる病変は普通の実験では肺に限られている。しかも肺病変の組織学的所見は他動物と比べると単純なので、病変の程度を肺重量によつてだいたい推定することができる⁶⁾。しかし肺重量は体重の大きいマウスほど重い傾向があるから、体重の大小による補正を行ない、比肺重と比較することを試みた。

肺重量(mg)を体重(g)で割り、これを10倍した値はdd系正常健康マウスでは常に70近辺で、100を越えることはなく、変動係数でみても肺重量のそれより小さい。これに

対し、非常に進展した病変を示す動物の比肺重は450~500を示し、以下軽くなるに従つて低い値を示す。その値は肉眼的病変の程度とよく平行する。肉眼的に肺病変度をつけるより客観的に判定できる点、優れているといえよう。

実験群中に死亡マウスがあると、肺はうつ血で著しく重く、剖検マウスの比肺重と比較しにくい。また感染後3週以内に剖検すれば免疫あるいはアレルギーの影響は少なく、菌の一次的な毒力を判定しうる利点をもつ。このため当実験では全動物の剖検を感染後20日で行なつ

た。このような実験方法は、短時日で実験を行なうことができ、簡単で、しかも客観的に判定できるので、多くの菌株の毒力の比較実験の場合などには良い方法の一つであると考えられた。

Bloch⁷⁾は菌株間の毒力の比較実験の場合、次の8条件を一定に行なうことが必要であると述べている。すなわち、① 菌の培養条件、② 菌の培養日数、③ 感染菌量、④ 感染方法、⑤ 動物の種類、系統、年齢など、⑥ 動物の飼育条件、⑦ 潜在性感染の除去、⑧ 病変度判定方法の8条件である。われわれの実験の場合、潜在性感染の除去は市販マウスを使用したためできなかったが、他の条件についてはかなり一定の条件下で実験を行なうことができた。

各菌株間の毒力には明らかに有意差がみられ、強弱の順はさきの実験成績^{1)~3)}と一致した成績であった。モルモットでの微量菌感染実験⁵⁾とあわせ、毒力検討実験の再現性を認める成績であると考えられた。

未治療患者から新しく分離された人型結核菌の毒力がけつして一様に強いものではなく、強弱かなりの幅があることを再確認できたわけであるが、菌を死菌とした場合でも菌株間に病変を作る能力に差があるか否かを第Ⅲ実験で検討した。

成績の項でみたごとく、まず注意されるのは、最強毒の菌でも加熱死菌とすれば肝、脾に少数の結節を形成するのみで、生菌接種の場合と比較したときの著しい相違であった。このことは結核菌の毒力は組織の中での増殖能力によつて規定されるという Rich⁸⁾らの考え方と一致する成績である。

組織学的にみてもつとも比較しやすい肝の結節でその性状を比較しても、生菌感染では毒力の異なる50番菌、

105番菌、65番菌、37番菌の間で、結節の数、大きさ、結節内の抗酸性菌の数のいずれでも差がみられなかった。当実験では菌液を100°C、1時間の加熱によつて死菌としているので、菌体への影響はかなり大きいと考えられよう。この意味で毒力の異なる人型結核菌を死菌とした場合の病変形成能の差異の有無についても、厳密には再検討の要が残されている。Cord factor、中性紅反応、酸化還元試験などを始め、紫外線に対する抗酸染色性の態度の差異⁹⁾、H₂O₂に対する感受性の差異¹⁰⁾など多くの因子が毒力の差異に関与する基本的な因子として報告されているが、今後、この方面についての検討も必要であると考えられる。

結 語

dd系マウスを実験動物として人型結核菌の毒力について検討し、次の結論を得た。

1) マウス実験結核症の病変度判定方法として比肺重で比較する方法は、簡単で、しかも客観性に富んだ方法であると考えられた。

2) 未治療患者から新たに分離された人型結核菌の毒力を4菌株で検討したが、肺病変度、肺重量、比肺重のいずれでもみて有意の差が見出され、新鮮分離人型結核菌の毒力に差異があることが再び認められた。

3) これらの菌の毒力の強さは、さきの実験成績と一致しており、さきの報告の再現性を認める成績であると考えられた。

4) しかし、これらの菌を加熱死菌として接種すると、肝、脾にわずかの結節が形成されるのみで生菌接種の場合とは著しい差がみられる。また菌株間の毒力の差異も加熱死菌接種では明らかでなかった。

擱筆にあたり結核研究所岩崎竜郎所長のご指導、ご校閲を感謝いたします。

文 献

- 1) 岩崎竜郎・続木正大・青木正和 他：結核，40：359，1965。
- 2) 同上：結核，40：427，1965。
- 3) 同上：結核，41：47，1966。
- 4) 同上：結核，41：47，1966。
- 5) 青木正和・続木正大：結核，41：13，1966。
- 6) 青木正和・工藤賢治・続木正大：結核，36：355，1961。
- 7) Bloch, H.: Annual Rev. of Microb., 7:19, 1953.
- 8) Rich, A. D.・隈部英雄訳：結核の病理発生論，岩波書店，1954。
- 9) 室橋豊穂・吉田幸之助：日本細菌学雑誌，20：76，1965。
- 10) Mitchson, D. A., Selkon, J. B., Lloyd, J.: J. Path. and Bact., 86:377, 1963.

Fig. 1. Correlation between Lung Weight and Weight of Spleen of Mice Infected with 0.1 mg of Tubercle Bacilli of Strain No. 50, 105, 65 or 37

