

毒力の異なる2種の人型結核菌のモルモット に対する毒力の安定性

工藤賢治・続木正大

結核予防会結核研究所(所長 岩崎竜郎)
名古屋大学医学部第一内科(教授 日比野進)

受付 昭和41年6月3日

STUDIES ON STABILITY OF VIRULENCE OF TWO STRAINS OF TUBERCLE BACILLI WITH DIFFERENT VIRULENCE TO GUINEA PIGS*

Kenji KUDOH and Masahiro TSUZUKI

(Received for publication June 3, 1966)

Experimental studies on the virulence of 43 strains of tubercle bacilli, isolated from the tuberculous patients who were newly discovered by the Tuberculosis Prevalence Survey in Japan in 1963 and 1964 and received no therapy, revealed that these 43 strains showed various degrees of virulence, from high to relatively low, in mice and guinea pigs. (KEKKAKU, 41, 359 and 427, 1966).

In the above-mentioned experiments, the bacilli were planted successively on Dubos' liquid media twice, after isolation from the patients on egg media. It is the purpose of this paper to study the reliability of the results of the previous experiment using the same methods as in the previous reports and to study the influence of successive plantation on the virulence of bacilli.

Schedule of this experiment is illustrated in Fig. 1. Two parent strains were selected: No. 110, representing high virulent strains, and No. 185, representing low virulent strains. From the lungs of the animals of No. 38 and No. 41, both of which had been infected with strain No. 110 (parent), two daughter strains were isolated on egg media. The animal No. 38 was affected severely while the animal No. 41 was affected moderately. From the animals No. 69 and No. 67, both of them having been infected with strain No. 185 (parent), other two daughter strains were isolated. The animal No. 69 showed moderate changes while the animal No. 67 showed slight lesions.

These four daughter strains were planted on Dubos' media twice, and adult male guinea pigs were infected with 0.1mg (wet weight) of each daughter strain subcutaneously. One group consisted of 6 animals. All the animals were sacrificed 8 and a half weeks after infection. The tuberculous changes of viscera and lymph nodes were observed macro- and microscopically.

The macroscopic index of tuberculous lesion in animals was the same as the one described in the previous reports, and maximum number of the index of viscera was +5. The microscopic index was determined considering the extensiveness of lesion, size of each lesion, degree of necrosis and number of bacilli on the stained section. The maximum number was +5, too.

The average with 95 per cent confidence intervals of the standard error of macro- and microscopical indices of No. 110 strain is shown in Table 1, and No. 185 strain in Table 2. The statistical study on the results of this experiment was performed by application of t-test.

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

The "t" value of No. 110 strain is shown in Fig. 2, and No. 185 strain in Fig. 3. The value of t-table of 5 per cent level of significance at 10 degree of freedom is 2.23. If the "t" value of both examined strains is more than 2.23, these strains is considered to significantly differ in virulence.

The results were as follows: There was no difference between the virulence of No. 110 strain (parent) and that of daughter strains, from macroscopical and microscopical observation. The virulence of No. 185 strain (parent) was thought to be the same as that of daughter strain from microscopical observation, while macroscopical indices of the liver and the spleen showed statistical difference. This discrepancy, as seen in slightly affected animals, may be explained by exclusion of unspecific changes by microscopical observation.

From these data, it can be said that the virulence of tubercle bacilli, which were planted on Dubos media twice after isolation on egg media from the animal infected with the parent strain, was stable and not influenced by the above-mentioned conditions.

The virulence of two daughter strains isolated from the same parent strain was same with each other, so the difference of the severity of tuberculous changes in each animal infected with the same parent strain might be due to the difference of susceptibility of each animal to *Mycobacterium tuberculosis*.

未治療の結核患者より分離された結核菌の毒力には差異のあることが、最近 Mitchson ら¹⁾によつて報告されている。われわれも昭和38年および39年の結核実態調査で分離された人型結核菌43株のモルモットおよびマウスに対する病原性について検討し、強弱にかなりの幅がみられることを報告した。(文献2, 3, 4)

結核菌の毒力の検定成績は、非常に多くの因子によつて左右されるので、厳密な実験条件のもとで行なう必要があることは、従来強調されてきた。文献2, 3, 4に報告した成績はこのような点を十分吟味して行なわれた実験より得られたものである。しかし供試菌は全国各地の実態調査該当の保健所で小川培地を用いて分離培養を行ない、陽性のものは各県衛生研究所に集めて小川培地に1回継代し、さらにDubos培地に2代継代した菌である。このようにいくつかの過程を経た菌について、しかも被検菌株が多いためにモルモットでは動物数が制限され、各菌株6匹で8週後剖検という条件で行なわれた。このような条件のもとでなされた毒力の検定試験には、どの程度の再現性があるのか、またモルモットの結核性病変は元来個体差が大きいのであるが、同一菌株でも変化の強い動物と、弱い動物とで、それぞれの動物より分離した結核菌に毒力の差異がみられるものなのか等の問題について検討を試みた。

実験方法

実験の概要を図1に示した。

(1) 供試菌 昭和38年および39年結核実態調査で分離された人型結核菌43株のうちで、モルモットおよ

びマウスに対する病原性が強いと判定された110番菌と、弱いと判定された185番菌を対象とした。文献2, 3, 4での実験において110番菌を接種したモルモット6匹のうち重い病変を認めた動物番号38, 比較的軽い病変を認めた動物番号41の動物、および185番菌を接種したモルモット6匹のうち、比較的重い病変を認めた動物番号69, 軽い病変を認めた動物番号67の合計4匹の肺より、1%小川培地に分離培養して得られた4株の娘株を使用した。

(2) 菌液作成法 1%小川培地に分離培養して得られた娘株をDubos原法培地に2代継代し、菌液の濁度を光度計で測定して菌量を推定し、0.2 mg/mlになるように調整した。これらの操作は1回目の親株の感染実験と同様の方法である。

(3) 実験動物 成熟雄モルモット24匹を使用した。

(4) 感染方法および接種菌量 0.2 mg/mlの菌液を0.5 mlずつ右側腹部皮下に接種した。

(5) 観察方法 菌接種8.5週後に全動物を剖検して肺、脾、肝およびリンパ腺の肉眼所見、組織所見および脾重量を測定した。

肉眼所見の判定は佐藤氏法にはほぼ準じて行なつた。すなわち、肺については肺の背面よりみて結核結節数を数え、1~9コを+1, 10~19コを+2, 20~29コを+3, 30コ以上の多数のものを+4, ほとんど肺全体に病変のみられるものを+5とした。そのほか病変の性状を加味するために癒合結節が数コ以上みられるもの、数コ以上の結節に中心壊死がみられるもの、またきわめて小さい結節状病変が多数みられるものとか、瀰漫性の肺炎型の

Table 1. Macroscopic and Microscopic Indices of the Lesions of Guinea Pigs Infected with High Virulent Strain No. 110

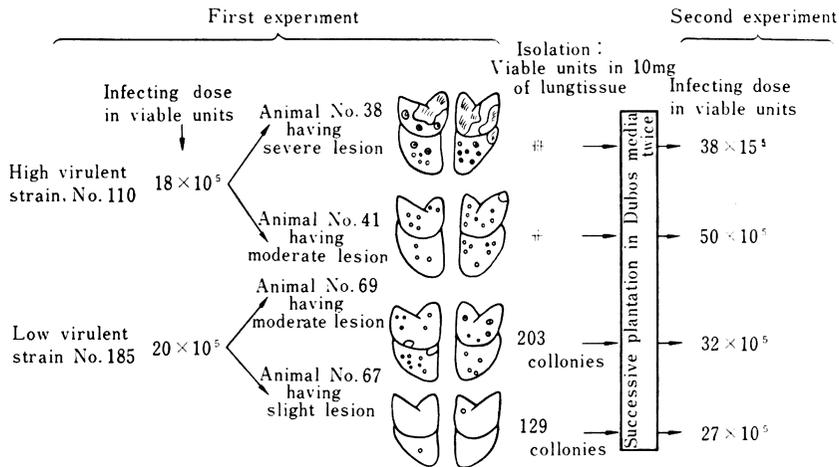
		(A) Lung	(B) Spleen	(C) Liver	A+B+C	(D) Lymph-glands	A+B+C+D	Root indices	Weight of spleen	
Macroscopic indices	First exper.	3.8±0.4*	3.8±0.3	3.0±0.4	10.8±0.6	12.0±2.3	22.6±2.6	1.114±0.039	2.9±1.0	
	Second exp.	Animal ** No. 38	3.1±0.9	3.3±0.3	3.8±0.4	10.2±1.2	8.8±2.2	19.0±1.7	1.045±0.052	7.3±2.8
		No. 41	2.6±1.0	3.4±0.3	3.5±0.8	9.5±1.6	10.0±1.6	19.5±1.0	1.035±0.071	5.5±1.6
Microscopic indices	First exper.	3.8±0.6	2.2±0.9	2.1±0.7	8.2±1.2		20.2±2.9	0.958±0.083		
	Second exp.	No. 69	3.5±1.1	3.3±0.8	3.3±0.7	10.1±2.2		18.9±1.8	1.032±0.097	
		No. 67	2.6±1.1	3.0±0.9	3.0±0.4	8.6±0.7		18.6±1.1	0.965±0.042	

* 95 per cent confidence interval of standard error
 ** Strain isolated from animal No. 38

Table 2. Macroscopic and Microscopic Indices of the Lesions of Guinea Pigs Infected with Low Virulent Strain No. 185

		(A) Lung	(B) Spleen	(C) Liver	A+B+C	(D) Lymph-glands	A+B+C+D	Root indices	Weight of spleen	
Macroscopic indices	First exper.	0.8±0.8	3.1±0.6	1.8±1.1	5.8±2.1	5.5±1.7	11.2±3.6	0.849±0.133	0.9±0.5	
	second exp.	Animal No. 69	0.4±0.3	0.4±0.4	0.2±0.3	1.0±0.8	2.3±0.5	3.3±1.1	0.275±0.127	1.0±0.1
		No. 67	0.5±0.2	0.5±0.6	0.3±0.4	1.3±0.9	3.3±1.2	4.6±1.4	0.366±0.132	0.9±0.1
Microscopic indices	First exper.	0.4±0.3	1.2±0.7	0.8±0.2	2.4±0.9		7.9±2.4	0.558±0.118		
	Second exp.	No. 69	0.4±0.1	0.7±1.0	0.4±0.3	1.5±0.9		3.8±1.2	0.392±0.128	
		No. 67	0.5±0.1	0.6±0.2	0.5±0.3	1.5±0.3		4.8±1.1	0.428±0.032	

Fig. 1. Outline of the Experiment



病変等には +0.5~+1.0 を加えて評価し、最も重い病変を +5 とし、これを肺病変度とした。脾肝についても肺の判定方法に準じて行ない、最も重い病変を +5 とし、病変の程度を 5 段階に分けた。リンパ腺病変は大きさによつて分け、直径 2~5 mm のものを +1, 5~10 mm を +2, 10~20 mm を +3, 20 mm 以上のものを +4 とした。
 root index of virulence は Mitchson らの方法に準

じて行なつたが、原法とは多少異なつている。すなわち肺、脾、肝の肉眼所見を上記の方法で判定し、脾の病変は 8 倍、肝は 6 倍、肺は 4 倍し、それぞれの最高病変が 40, 30, 20 になるように算出し、リンパ腺病変の最も重い例では +20 であつたので 1/2 倍して最高病変を 10 とし、各臓器、リンパ腺病変の総和が 100 になるように換算した。この値を剖検時までの日数で除した値の平方

Fig. 2. "t" Test of No. 110 Strain

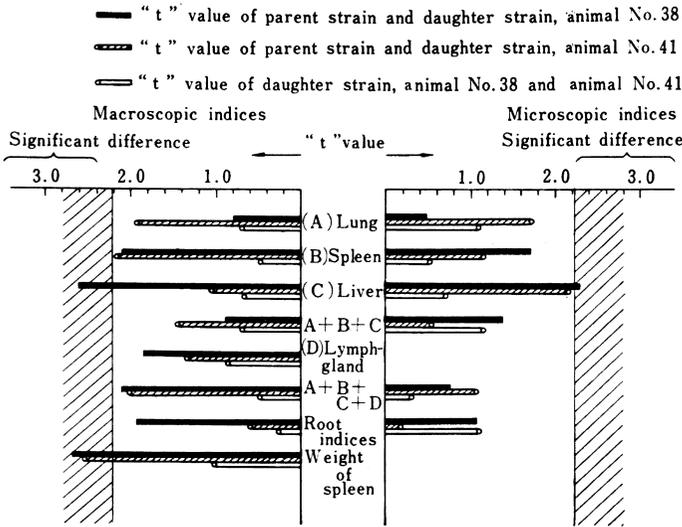
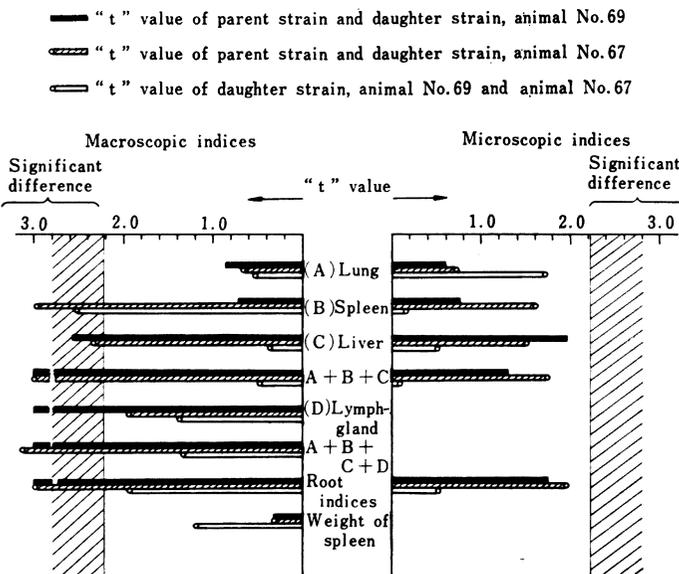


Fig. 3. "t" Test of No. 185 Strain



根を root index of virulence とした。

組織所見は病変の拡がり、個々の病巣の大きさ、壊死の程度および結核菌染色標本での菌所見について検討し、最も重い病変を +5 とし、病変の程度に応じて 5 段階に分け、肉眼所見と対比しやすいように基準を決めた（組織所見の基準の詳細については後報の予定）。また組織所見についても肉眼所見の場合と同様の換算を行なつて root index を算出した。この場合、リンパ腺病変のみ肉眼所見を代用した。

実験成績

110 番菌の肉眼所見および組織所見の成績は表 1 に、

185 番菌の成績は表 2 に示した。表には実験群別、病変の判定項目別の各 6 匹の平均値と、標準誤差の 95% 信頼区間が示されている。

実験群間の比較は、判定項目別に t 分布による検定を行ない、t の値を図 2, 3 に示した。t 分布で P=0.05, 自由度 10 の値は 2.23 であり、実験群間の t の値がこれより大きい場合には両群間に有意の差ありと判定される。これより小さい場合には両群の病変には有意の差がなく、したがつてほぼ同じであつたと推定できるわけである。

(1) 110 番菌 肉眼所見は、肺では 1 回目の実験の病変度の平均値が 3.8, 2 回目の娘株のうち動物番号 38 の株では 3.1 と 1 回目の値に近似し、No. 41 株では 2.6 とやや軽くなつてゐる。しかし t の値は 1 回目と No. 38 が 0.8, 1 回目と No. 41 が 2.0, No. 38 と No. 41 が 0.7 といずれも 2.23 以下で有意の差がみられない。脾についても肺と同様に、t の値が 2.23 以下で有意の差を認めない。肝では 1 回目の病変度が 3.0, 2 回目の No. 38 の病変度が 3.8 であり、t の値が 2.6 となり有意の差を認めた。しかし内臓病変の和 (A+B+C), リンパ腺病変 (D), A+B+C+D および root index のいずれの項目においても有意の差は認められなかつた。

脾重量では 3 群にかなりの差がみられ、1 回目と 2 回目の両株とも有意の差がみられた。

組織所見では肉眼所見の場合と比較して t の値がより小さく、3 群の間に

差のないことを示している。しかし肝では 1 回目と No. 38 の t 値は 2.24, 1 回目と No. 41 の t 値は 2.16 と大きい値であつた。

1 回目の成績が No. 38 と No. 41 のいずれにより近い値を示しているかをみると、判定項目別に区々であり、いずれにより近似しているともいえない。しかし No. 38 と No. 41 との比較では t 値がいずれの判定項目でも常に小さく、両娘株間の差は、親株に対する差よりも小さいことを示している。

(2) 185 番菌 肉眼所見は、肺では 3 群とも著しく軽微であり、t 値はいずれも小さい値であつた。しかし肺および脾重量を除くその他の判定項目では 1 回目比

して2回目の No. 69, 67 の変化が軽くなつており、したがつて t 値は著しく大きく、有意差ありと判定された。2回目の No. 69 と 67 との比較では、脾を除く判定項目で差なしとなつている。ところが組織所見についてみると、肺、脾、肝、A+B+C および root index とともに、3群とも類似した成績であり、 t 値はいずれも小さく有意差を認めなかつた。

そこで肉眼所見と組織所見とが著しく異なつていた例の脾および肝について検討した。脾の病変では肉眼的に確認できる結節は濾胞大をこすものであり、濾胞大のものでは肉眼的に明らかに変化としては認められず、濾胞大に達しない病変では全く肉眼的には認められなかつた。また肉眼的に濾胞が大きくなつたと認めた例を組織学的にみて病変を認めた例は50%であり、残りの50%には病変を認めなかつた。1回目の実験において、肉眼的に濾胞が大きくなつた所見をすべて病変ありと判断し、+3~+4 と評価したために組織所見とのずれを生じたものであつた。また肝については、肉眼所見で結節と判断したものは、組織学的には多くはグリソン氏鞘の間質細胞の増殖であつて、結核結節はほとんど認められず、これが両者にずれを生じた原因の主たるものであつた。

185 番菌については、組織所見のほうが肉眼所見よりも信頼性が高いと判断されたので、3群の比較を組織所見についてみると、有意の差は認められず、モルモットに対する毒力是不変であつたといえる。

なお脾重量は3群とも軽く、 t 値が小さかつた。

考 案

結核菌の毒力の検定成績は、菌側の条件、宿主側の条件および判定方法によつて著しく異なつた成績の得られることから、実験成績の再現性についての検討も、その点に十分の配慮をする必要がある。第1に菌側の条件としては培地上での長期保存による影響、培養日数の影響、菌塊の多少、また培地に含まれる成分、たとえば Tween 80 の含有濃度によつては生菌数の減少は来たさないが、毒力が低下する問題⁶⁾、紫外線に対する感受性の差異等、多くの問題が含まれるが、本実験はこれらの点をできるだけ一定に行なわれた。また室橋⁶⁾、Steenken⁷⁾ らは、一菌群の毒力は多くの個々の菌の毒力の総和されたものであると考え、動物通過では毒力の強いほうへの菌の選択が行なわれると述べている。本実験では動物一代のみの通過であり、もちろん室橋らのいう動物通過の代数とは異なるわけである。しかしもし一代の動物通過で毒力が変異するようなことがあれば、文献2~4 にみられた成績は意味をもたないことになるので、この点の検討も本実験の一つの狙いであつた。

第2に宿主側の因子について、モルモットでは純系動

物が得られず、性、年齢、飼育条件を揃えても著しい個体差がみられる。接種菌の毒力と個体差の関係は、一般に毒力の強い菌では一様に重い病変を形成し、ある程度以下に弱い菌では病変が一様に軽く、したがつて個体差が少ないが、中間の毒力の菌では個体差が大きくなる傾向がある。個体差を生ずる要因は動物の側にあると考えられてきたのであるが、菌の側からも検討する意味で同一菌株のうちでも重い病変を認めた動物および軽い病変を認めた動物の肺より分離培養して得た娘株の毒力の比較を行なつた。

第3に毒力判定のための動物実験の方法にも問題がある。同一菌でも菌の接種方法、接種生菌量および剖検までの日数によつて著しく異なつた病変が形成されるので、毒力の判定にどの実験条件が最も適した方法であるのか、論議される必要がある。しかし今回の実験は文献2~4の再現性の検討ということが主眼であつたので、接種菌量 0.1 mg、皮下感染、8週後に剖検という方法を選んだ。また橋本⁸⁾ は同一菌について、培養条件を同じにしたいくつかの菌液を、接種菌量を揃えてモルモットの皮下に接種し、6週後に剖検したところ、毒力が強いと判定された菌液と、弱いと判定された菌液が約半々であつたと述べている。しかしこの場合、惹起された病変の判定方法が問題になるであろう。この点については、文献4において臓器、リンパ腺の肉眼所見および脾重量の関係を検討し、どの判定方法を用いても密な相関関係のあることが述べられた。また肉眼所見と組織所見との相関を、文献3の被検株のうち結核子防会結核研究所において実験した27株についてみると、肺、脾、肝とも $r=0.9$ と、これも密な相関が認められた。さらに著者らは肺、脾、肝の肉眼所見を観察方法の項で述べた方法を用いて判定すると、臓器内生菌数ともよく相関することを認めている⁹⁾。しかし臓器別にみると、肺の病変は肉眼的に判断しやすく、組織所見ともよく相関するのであるが、脾肝では肉眼的判定の困難な場合があり、組織所見と異なる成績の得られることもある。これについては成績の項で既述した。結局一般的には肉眼所見にかなりの信頼性をおいてよいと考えられるが、個々の少数例について厳密な比較を行なう場合には、肉眼所見にあわせて組織所見の検討も必要であろう。

最後にどの程度の病変の差異をもつて毒力に差ありと判定してよいかという問題が残されている。本研究では親株の病変と娘株の病変ないしは娘株間の病変が同一であるかどうかをみたいわけであるが、統計処理では両者の有意差の検定はできるが、両者が積極的に同一のものであるという検定方法が見当たらない。ここでは t 分布の自由度=10、 $P=0.05$ の値について検討し、 t の値が 2.23 以上のものでは両者の毒力に差ありと考えた。本来モルモットの病変の個体差は大きく、各平均値の分

散の幅が種々であるため、F分布によつて分散の幅の異なるものを選び、これらについては Cochran & Cox 法による検定も行なつた。しかし Cochran & Cox 法では t 検定よりも有意差の限界が厳しく、両者が同一であることを確かめる本研究の目的からすれば、逆に有意差の幅が大きい t 検定のほうが目的に適していると考えられる。

実験成績より 110 番菌および 185 番とも、親株と娘株、および同一菌の娘株間の毒力の差は認められなかつたといえる。では毒力が安定していたと考えた場合、一致率の高い判定方法はどれか、という見方を図 2, 3 の t の値についてみると、110 番菌のごとく強い菌では一様に重い病変が形成されるため、どの判定項目でも 3 群の一致率が高いが、肝のみは肉眼所見、組織所見とも親株と差のある娘株がみられた。185 番菌のごとく弱い菌では、肺のみが肉眼所見でも組織所見でも一致率が高いが、脾、肝の肉眼所見で著しく異なつた成績が得られている。

リンパ腺病変は毒力の強い菌では一様に変化が強く、病変の数値も大きく、3 群に有意の差を認めないが、毒力の弱い 185 番菌では測定値が 5.5, 2.3, 3.3 と小さい値であり常識的には差がないと考えたいが、統計処理では有意差ありとなつている。

root index ではリンパ腺病変が軽く評価されるので臓器病変の和 (A+B+C) に近似した値を示すが、脾、肝の比重の大きい点には疑問が残される。

脾重量は毒力の強い菌では種々の程度に腫脹し、3 群の平均値がかなり異なつているため有意差を認め、弱い菌では一様に軽いため差なしとなつている。したがつて脾重量は少なくとも皮下感染の場合には重視しないほうが、誤りが少ないものと考えられた。

以上の成績より病変の判定が容易であり、判定誤差の少ない判定方法としては、肺の肉眼的病変度が最もすぐれた方法と考えられた。

結 論

肺結核症の患者より分離された毒力の異なる 2 種の人型結核菌をモルモットに接種し、同一菌株で重い病変を認めた動物と、軽い病変を認めた動物の肺より分離した娘株の 4 株を 3 代継代後、さらにモルモットに接種し、菌のモルモットに対する毒力の安定性について検討した。

1. 強毒株および弱毒株ともにモルモットを一代通過し、3 代培地に継代しても毒力の変動はみられなかつた。したがつて未治療の結核患者より分離された結核菌の毒力は、この程度の操作で変異するほど不安定なものではないと考えられた。

2. 親株の菌を接種し、重い病変を形成した動物より分離した娘株の毒力と、軽い病変を形成した動物より分離した娘株の毒力とは同程度であり、病変の個体差は動物の側にその要因があると考えられた。

終りにご指導、ご校閲をいただいた岩崎所長、岩井、青木の諸先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) Mitchson, D. A., Wallace, J. G., Bahtia, A. L. et al.: Tubercle, 41: 1, 1960.
- 2) 岩崎竜郎・続木正大・青木正和 他: 結核, 40: 359, 1965.
- 3) 岩崎竜郎・続木正大・青木正和 他: 結核, 40: 427, 1965.
- 4) 岩崎竜郎・続木正大・青木正和 他: 結核, 41: 1, 1966.
- 5) Bloch, H., Noll, H.: J. Exp. Med., 97: 1, 1953.
- 6) 室橋豊穂: 結核, 35: 特別号, 35, 1960.
- 7) Steenken, W., Jr.: Am. Rev. Tbc., 62: 22, 1950.
- 8) 橋本達一郎・吉田幸之助: 結核, 29: 221, 1954.
- 9) 工藤賢治・続木正大・羽鳥弘 他: 第 41 回結核病学会総会発表