



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	馬流産菌の死菌免疫に関する研究 : I. 馬流産菌のマウスに対する病原性に就て
Author(s)	平戸, 勝七; HIRATO, KATSUSHICHI; 佐藤, 儀平 他
Citation	獣醫學研究, 1(1), 11-28
Issue Date	1953-01
DOI	https://doi.org/10.14943/jjvr.1.1.11
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11342
Type	departmental bulletin paper
File Information	KJ00000104913.pdf



馬流産菌の死菌免疫に関する研究

I. 馬流産菌のマウスに対する病原性に就て

平戸勝七・佐藤儀平

(北海道大學獸醫學部家畜衛生學教室：主任平戸教授)

STUDIES ON EQUINE PARATYPHOID VACCINE.

I. COMPARATIVE STUDIES ON THE PATHOGENICITY OF DIFFERENT STRAINS OF SALMONELLA ABORTUS-EQUI FOR THE MOUSE.

KATSUSHICHI HIRATO and GIHEI SATO

From the Laboratory of Veterinary Hygiene and Microbiology,
Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University,
Sapporo, Chief: Prof. K. HIRATO

I. 緒 言

著者等は馬流産菌死菌による馬体免疫試験に先立ち、小動物主としてマウスにより死菌免疫の基礎知見を獲得すべく実験を進めた。しかしながら免疫試験の前提として本菌の對マウス病原性を充分理解しておく必要があることは論ずるまでもない。既に越智¹⁾及び添川²⁾は同様の目的からマウスに對する本菌の病原性に就て検討した。即ち越智は主としてチフス性疾患を中心観點として腹腔及び經口の兩部位に就てマウスの感染經過を観察し、又添川は腹腔、皮下、靜脈及び經口感染マウスの流血中に於ける菌の消長並に菌の滯留状態に關して詳細に記載している。鳥羽³⁾等も本菌の菌体成分に關する研究中、對マウス病原性について上記各研究者と同一の結果を得たとのべている。我々は上記各報告に缺けている感染部位によるマウスの感染經過を追及すると共に添川の言う分離日時の新らしい菌株は保存株に比べ毒力が強いが否か、又之等菌株の毒力の差を證明するには如何なる觀察方法を以てすればよいかに就て検討するため分離當初の新鮮株と累代培養保存株に就

てマウスに對する感染状態、致死量等の面から各菌株の毒力を比較し、更に豚胃ムチンの毒力増強作用についても研究した(本論文の要旨は昭和25年4月第28回日本獸醫學會に於て報告した)。

II. 實驗方法

1. 使用菌株

實驗供試菌株の明細は第1表に示した。新鮮株は北海道各地から入手した流産胎兒胃液及び他の病的材料を數日～相當期間室温又は冷蔵庫に保存した後分離培養し接種までの普通寒天培地の通過は1～3代である。累代培養保存株(以下保存株)は當教室で分離保存したもので約60日毎に普通寒天斜面に繼代し來つたものである。夫等の保存期間は1～26年に及んでいる。各菌株は普通寒天平板上に於ける集落性状、ブイヨンの發育状態、食鹽水及びトリパフラビン溶液中の安定性によつてS型なることを確めた。なお保存期間10年以上に及ぶ5株に就てはミロン反應及びモルモット新鮮血清に對する抵抗性、S型及びR型菌免疫血清による沈降反應等の檢定項目を追加し、變異の程度を檢索した(第8表参照)。R型株は保存菌株

Table 1. Strains of *Salmonella abortus-equi* used for Experiments

Name of Strain	Source of Strain	Date of Isolation	§ Time of Pre- servation of Materials or Cultures	Colony Appear- ance	Growth in Broth	Aggluti- nability in Normal Saline	Aggluti- nability in Trypa- flavin	Type of* Sugar Fermen- tation (Kasai)	
Freshly Isolated Strains	Daini-Manryū	Gastric content of aborted fetus	5/IV '52	23 days	Smooth	Uniform turbidity	—	—	III
	Shūrei	Pus in fistulous withers	"	"	"	"	"	"	"
	Daihachi- Ōgument	Gastric content of aborted fetus	21/II '52	Ca 3 days	"	"	"	"	"
	Daigo-Hōgetsu	"	20/XII '51	Ca 1 month	"	"	"	"	"
	Daishi-Daian	"	2/III '51	5 days	"	"	"	"	"
	Shūka	"	26/XII '50	19 days	"	"	"	"	"
	Katsumoto	"	15/XII '50	30 days	"	"	"	"	"
	Endō	"	17/IV '50	10 days	"	"	"	"	"
	Suzuki	"	20/III '50	Ca 2 months	"	"	"	"	"
	Gotō	"	14/III '50	3 days	"	"	"	"	"
	Murase	"	2/III '50	15 days	"	"	"	"	"
	Itō	"	"	Ca 3 months	"	"	"	"	"
	Segawa	"	4/II '50	7 days	"	"	"	"	"
	Asahi	"	19/XII '49	12 days	"	"	"	"	"
	Rōrin	"	1/XII '49	7 days	"	"	"	"	"
	Sugimoto	"	22/XI '49	10 days	"	"	"	"	"
Eiraku	"	16/VI '49	2 months	"	"	"	"	"	
Hanshun	"	22/II '49	8 months	"	"	"	"	"	
Stock Strains	Tsunehana	Liver of aborted fetus	12/XII '48	Ca 1 years	"	"	"	"	"
	Eikan	Gastric content of aborted fetus	7/XII '48	Ca 1.5 years	"	"	"	"	"
	Hokuryū	"	29/X '48	Ca 1.5 years	"	"	"	"	"
	Satsuki	Synovial fluid of foal	25/VI '48	Ca 0.5-2 yrs	"	"	"	"	"
	Asatoyo	Gastric content of aborted fetus	12/XII '47	Ca 2-3 yrs	"	"	"	"	"
	Hōkin	"	11/XI '47	Ca 2-4 yrs	"	"	"	"	"
	Konishiki	"	14/II '47	Ca 3-4 yrs	"	"	"	"	"
	19-Ayame	"	12/XI '46	Ca 3 years	"	"	"	"	"
	Seika	Heart blood of fetus	4/I '42	Ca 10 years	Smooth (Unstable)	"	"	+ ~ ±	"
	Hanaoka	Unknown	? '40	Ca 12 years	"	A little sediment	"	—	"
	Hatsuhime	Lochia	19/IX '33	Ca 19 years	"	Uniform turbidity	"	±	"
	Shitakara	Unknown	30/IV '26	26 years	"	"	"	—	I
	Kushiro	"	? '26	Ca 26 years	"	"	"	±	"
	R-Strain	Broth culture	/	/	"	Rough	Sedi- ment	+	+

* Kasai and his associates classified *S. abortus-equi* into 4 types by the fermentation form of dulcitol, trehalose and rhamnose. Type I does not split all 3 carbohydrates within 2 days, type II ferments these three carbohydrates. Type III ferments dulcitol and trehalose and type IV splits dulcitol and rhamnose within 2 days.

§ These experiments were carried out during the period from 1949 to 1952.

のブイオン陳舊培養から得られ、諸性状は定型的 R 型を示す (第 1, 第 8 表 参照)。なお葛西⁴⁾ 等による糖分解型別は釧路, 舌辛 2 株の I 型を除きすべて III 型に属する。

2. 感 染 法

普通寒天 18~20 時間培養菌を生理的食鹽水又は pH 7.0 の燐酸鹽緩衝食鹽水で稀釋し, 腹腔, 靜脈, 皮下接種は 0.25 c.c. 又は 0.5 c.c., 脳内接種は 0.03 c.c., 經鼻, 經口兩感染は凡そ 1 滴中に所要菌量を含ませた。菌量計測は秤量によりその都度培養によつて菌数を検定した。1 mg の濕潤菌は數億~10 億個内外であつた。

3. 供 試 マ ウ ス

札幌附近で同一業者の飼育する純系スイスマウスを使用した。大部分 15 g 以下で体重差は 2 g 内外である。兩性を混用したが性別は殆ど相半ばしている。

4. 観 察 法

斃死マウスの心血中に菌を検出したものを收血症死と見なした。体内菌分布を検するには各臓器その他を細挫し 1 定量を直接平板培養して發育コロニー数を數え殘部を普通ブイオン中に投じ増菌法を講じた。2, 3 の實驗例については推計學的に検討した。危険率はその都度示す。

III. 感染マウスの生死観察と新鮮株, 保存株の毒力比較

1. マウス体重並に性別と斃死率の關係

免疫期間中マウスの成長に伴う体重増加が本菌の感染に對し抵抗性を増すことは安東等⁵⁾ がこれを指摘し, 添川は靜脈内感染に於て 12 g のものは 15 g のものより 50% も斃死率が高いと述べている。マウス体重 10, 12, 15, 18, 20 g のものに就き新鮮株 0.1 mg を腹腔内接種し斃死率及び斃死マウスの平均生存日數を示したのが 第 2 表 である。

これによると体重の増加と共に斃死率は減少し, 平均生存日數は増大して, 抵抗力の強まる傾向がみられる。次に各体重の斃死率を併せて 10~15 g と 18~20 g で比較すると, 前者の斃死率は 18~20 g の成長マウスより明かに高い (危険率 1%

Table 2. Effect of Mice Weights on Mortality and Survival Time

Body Weight (g)	10	12	15	18	20
Mortality	10/10	9/9	9/10	8/10	5/10
Mean Survival Time (Days)	5.2	5.8	6.7	5.5	8.8

Numerator indicates number of deaths within 3 weeks after intraperitoneal injection.

Denominator indicates number of mice used.

以下), 以上の結果は体重差が特に著しくなければ斃死率に餘り變化のないことを示すものであるが感染菌量が微量になれば体重差の影響も大になることも考えられるので, 實驗マウスの体重差は出来るだけ小にした。

性別により本菌に對する抵抗性に差があるか否かに就ての報告はない。他の *Salmonella* 屬菌に就ては近年 BATSON⁶⁾ がチフス菌微量にムチンを添加して感染せしめた場合早が舌よりやや強い感受性のあることを述べている。本菌に於ては 第 3 表 に示す如く, 10^{-2} mg, 5×10^{-4} mg の感染菌量に對する斃死率は, 後者に於て早が舌よりやや高いが, いずれも性別により有意の差は認められない。

Table 3. Mortality in both Sexes of Mice inoculated with *S. abortus-equi*

Sex	Dose (mg)	
	10^{-2}	5×10^{-4}
Male	3/5 (60%)	0/5 (0%)
Female	3/5 (60%)	2/5 (40%)

Observation period was 30 days after injection.

2. 腹腔内接種による各菌株毒力の測定

越智は本菌のマウスに對する毒力に關して腹腔内又は經口接種のいずれによるも大量菌を除きその斃死率は接種量に無關係に大体 70% 内外であるとし, 添川は靜脈内接種により接種菌量と共に斃死率は遞減するが, 所謂最少致死量の決定の困難なことを指摘している。

私共はマウスに對する接種経路として腹腔内を選んだがその理由は皮下接種では 1 mg の如き

Table 4. Lethal Dose against Mice (Intraperitoneal Inoculation)

Name of Strain		Source	Time of Preservation of Materials or Cultures	100% Lethal Dose (mg)	50% Lethal Dose (mg)
*Freshly Isolated Strains	Rōrin	Gastric content	7 days	10^{-1}	$10^{-3.37}$
	Segawa	"	"	10^{-1}	$10^{-2.32}$
	Sugimoto	"	10 days	10^{-1}	$10^{-2.60}$
	Asahi	"	12 days	10^{-2}	$10^{-2.87}$
	Daini-Manryū	"	23 days	10^{-3}	$10^{-4.32}$
	Shūrei	Pus	"	10^{-4}	$<10^{-5.17}$
	Suzuki	Gastric content	Ca 2 months	10^{-2}	$10^{-2.07}$
	Eiraku	"	2 months	$>10^{-1}$	$10^{-2.04}$
	Satsuki**	Synovial fluid of foal	7 months	10^{-4}	$<10^{-4.30}$
	Hanshun	Gastric content	Ca 8 months	10^{-1}	$10^{-2.57}$
Stock Strains	Tsunehana	Liver of fetus	Ca 9 months	$>10^{-1}$	$10^{-2.28}$
	Asatoyo	Gastric content	2 years	10^{-1}	$10^{-2.75}$
	Hōkin	"	"	10^{-1}	$10^{-3.33}$
	Konishiki	"	Ca 3 years	10^{-2}	$10^{-3.33}$
	19-Ayame	"	3 years	$>10^{-1}$	$10^{-1.06}$
	Seika	Heart blood of fetus	Ca 10 5 years	10^{-2}	$<10^{-3.78}$
	Hanaoka	Unknown	12 years	10^{-1}	$10^{-1.83}$
	Hatsuhime	Lochia	Ca 18.5 years	10^{-2}	$10^{-3.50}$
	Shitakara	Unknown	Ca 26 years	$>10^{-1}$	$10^{-1.38}$
	Kushiro	"	"	10^{-1}	$10^{-2.0}$

LD₅₀ was calculated by Reed and Muench's method. Death of mice was observed during 3 weeks after inoculation.

* These strains were freshly isolated from gastric contents of fetus or from the other materials which were stored in ice-box.

** Weights of mice used for virulence test of this strain were not uniform.

多量菌でも屢々生残して個体差が大きく現われ、従つて斃死率が極めて不整であり、又静脈内接種は手技上煩瑣を免れず、これに對し腹腔内接種では接種量と併行して斃死率がほぼ整然とした關係を示すことによる。従つて毒力を表現する致死量の算定には50%致死量 (LD₅₀) を用いた。即ち經驗的に 10^{-1} ~ 10^{-5} mg の菌量を各段階數匹宛に接種し約3週間觀察して REED and MUENCH⁷⁾ の方法で LD₅₀ を算定することが出来た。

各菌株の致死量：新鮮株、短期及び長期保存株の20株に就て100%並びに50%致死量を求めた。3週間觀察によると第4表に示す如く、100%致死量は大体 10^{-2} mg 以上の接種菌量の多い

所に集中している。即ち 10^{-1} mg 以上4株、 10^{-1} mg 8株、 10^{-2} mg 5株、 10^{-3} mg 1株、 10^{-4} mg 2株であつた。他方50%致死量は100%致死量より10~100倍ずれて分散する。即ち 10^{-1} ~ 10^{-2} mg 4株、 10^{-2} ~ 10^{-3} mg 8株、 10^{-3} ~ 10^{-4} mg 5株、 10^{-4} ~ 10^{-5} mg 2株、 10^{-5} ~ 10^{-6} mg 1株である。即ち LD₁₀₀ と LD₅₀ の差が2以上のものは2株にすぎない。

斯く兩致死量が比較的大きく、しかも兩者が接近していることは、多量の菌では100%斃死するが、それより少くなると斃死率が激減することを示すものであつて、本菌毒力の強烈ならざることを表わしている。

觀察日數と LD₅₀ の推移：第4表で用いた

接種マウスについて、各週ごとの LD₅₀ を算出すると 第5表の如くなる。本成績によると 2週間で LD₅₀ の最高値に達したものが 3株あるが、一般に 3週間でほぼ最高値に達し 3, 4週に於ける LD₅₀ の差は認められないか或は軽度である。即ち斃死すべきマウスは 3週までに殆ど斃死して以後の生残数は安定することを意味する。従つて LD₅₀ は接種後 3週目に算定してほぼ誤りないものとする。

接種菌量と斃死マウスの生存日数：接種マウスの生存日数が菌量の減少と平行して延長することは各菌株共通であつて、このことは比較的少量の菌量である 10⁻¹~10⁻³mg でも同様で、たとえばローリン株に於ては接種菌量各段階に於けるマウスの平均生存日数には明かに差が認められる(危険率5%以下)(第6表参照)。

又接種マウスの流血中に於ける菌の消長を観察してみると、接

Table 5. LD₅₀ of various Strains at every Week after Injection

Name of Strain	-Log(LD ₅₀) at Different Weeks				Time When LD ₅₀ Reaches Maximum (Week)	
	1	2	3	4		
Freshly Isolated Strains	Rōrin	2.31	3.16	3.37	3.37	3
	Segawa	1.83	2.32	2.32	2.32	2
	Sugimoto	2.48	2.48	2.60	2.75	4
	Asahi	2.50	2.87	2.87	3.29	4
	Daini-Manryū	3.83	3.83	4.32	4.50	4
	Shūrei	3.50	>5.17	>5.17	>5.17	2
	Suzuki	2.52	2.67	2.67	3.00	4
	Eiraku	1.40	1.89	2.40	2.40	3
	Hanshun	2.43	2.43	2.57	2.57	3
Stock Strains	Tsunehana	2.08	2.21	2.28	2.28	3
	Asatoyo	1.88	2.34	2.75	2.83	4
	Hōkin	2.78	3.00	3.33	3.33	3
	Konishiki	2.00	3.33	3.33	3.33	2
	19-Ayame	1.42	1.42	1.60	1.60	3
	Seika	3.00	3.50	>3.78	>3.78	3
	Hanaoka	1.50	1.68	1.83	1.83	3
	Hatsuhime	3.17	3.38	3.50	3.50	3
	Shitakara	1.38	1.38	1.38	1.38	1
	Kushiro	1.63	1.63	2.00	2.00	3

Table 6. Survival Time of Mice after Intraperitoneal Injection with various Doses of Strain Rōrin

Dose (mg)	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
Survival Time (Days)	1	4	1
	1	5	14
	1	6	14
	2	8	15
	8		
Mean Survival Time (Days)	2.6	5.8	11.0

種菌量 10⁻¹mg の如き大量菌ではいずれも短時日に斃死し一次敗血症を現わすが、少ない菌量(10⁻⁴mg)の段階では殆ど二次敗血症の経過をとり斃死又は生残する(第7表参照)このことは本菌による二次敗血症は必ずしも致死的でなく、先人の指摘する様に非常に個体差が著しく、結局する

所本菌の弱毒性の表現に外ならない。

3. 累代保存株と非累代株の毒力

長期保存株の毒力：10年以上の長期保存株中より、集落型、ブイオン中の發育態度等を考慮して選擇をくりかえし、S型又は殆どこれに近いと思われる5菌株を得た。これ等の菌株については第8表に示す如く、諸反應を試み抗原構造の變異の有無を検討した。即ちミロン反應は、WHITE⁸⁾の法により加熱後の着色、沈澱の程度を観察したが、陰性のもでも着色程度は新鮮S型株にくらべると、必ずしも定型的とはいひ難い。KAUFFMANN⁹⁾の法に準じて、新鮮モルモット血清に對する各菌株の抵抗性を感作前後の菌数の比でみると、釧路、舌辛兩株以外は著しく弱く、特に花岡株は殆どR型に等しい。これ等5菌株の凝集原性はS型株にくらべると2~3管ひくい傾向にあるが、岡本¹⁰⁾等の方法による耐熱性抗原の沈

Table 7. Showing the Number of Bacteria in Tail Blood at various Times after Intraperitoneal Injection of Strain Segawa

Dose (mg)	No. of Mice	Time after Inoculation (Days)															
		1/8	1	2	3	4	5	6	9	11	12	13	16	19	21	23	27
10 ⁻¹	1	++	+	++	++	D											
	2	+++	++	+++	D												
	3	++	+	+++	+++	++	D										
	4	++	++	++	++	D											
	5	+++	++	++	D												
10 ⁻⁴	1		+	-	-	-	-	-	++	++	D						
	2		-	-	-	-	-	-	-	-		++	++	+	D		
	3		+	-	-	-	-	-	++	+		++	-	+++	-	-	D
	4		-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	+	-	-	S
	5		-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	∞	++	+	S

-, (+), +, ++ indicates number of colonies by cultivation of 1 drop of tail blood; -, none; (+), positive in enriching culture; +, 1-30; ++, 31-100; +++, over 100; ∞, numerous. D = Death, S = Survived

Table 8. Some Characters of 5 long-period Stock Strains

Name of Strain	Stock Period	Millon's Reaction	Resistance to Fresh Guinea Pig Serum	Precipitation	
				S-Serum	R-Serum
Kushiro	26 yrs.	-	* 44/45=0.978	1:20	1:10 weak
Shitakara	"	+~±	38/45=0.844	1:40	1:5 weak
Hatsuhime	Ca 19 yrs.	-	10/42=0.238	1:20	1:10 weak
Hanaoka	12 yrs.	-	1/40=0.023	1:20	1:5 weak
Seika	Ca 11 yrs.	±	5/30=0.166	1:20	1:5 weak
Control	R-Strain	+	0/47=0	-	1:10
	Daini-Manryū (fresh strain)	-	128/57=2.245	1:40	1:5 weak

1. Method of sensitization by an active serum: A fresh guinea-pig serum 0.3 cc, normal saline 0.7 cc, 5 drops of broth and 0.1 cc of diluted broth culture are mixed. This mixture is sensitized at 37°C for 3 hours. Before and after sensitization, 0.1 cc, of this mixture is seeded on the plates.

* Denominator and numerator indicate number of colonies developed before and after sensitization respectively.

2. 1:5, 1:10 indicates dilution of antigen showing positive precipitation after incubation at 37°C for 1 hour.

降反應でO抗原の變異程度をみると、對照R型抗原は第二萬隆株S型免疫血清に對し全く反應せず、5菌株はS型抗原と同程度又はやや弱い反應を示す。R型血清に對してはS型及び保存抗原はR型抗原とほぼ同等の抗原價を示すが、沈降の程度はいずれも弱い。

この様なS型抗原のR型血清に對する沈降性

は齋藤⁽¹⁾が豚コレラ菌に於てS型抗原のR血清に對する反應程度は、該當R抗原と餘り差異のないことをのべている報告と一致する。以上の沈降反應の成績では之等保存株に於ける著しい抗原性の變化はないものと考えられる。之等長期保存株の毒力を見るに、初姫、成歌兩株はやや強く他の3菌株は明かに毒力の低下を示しているが(第4

表), この様な毒力の差異と上述の諸反應に對する差異とは必ずしも平行せず, 従つてこれ等菌株の毒力の變化は以上の様な集落型の判定法によつて現われる差異とは別の原因に由來するものの如く思われる。從來行われている幾多の S 型, R 型鑑別法は眞正な S 型, R 型株には鋭敏であるが, ごく長期の保存株は非定型的な集落型を呈するものが多く, 従つて之等鑑別法に對しても不安定な成績を生ずるものであろう。一面之等諸反應は必ずしも絶體的の價値はなく, たとえば大前¹²⁾は血清抵抗に於て, 馬流産菌 S 型菌株間に相當の強弱のあることを指摘している。次に長期保存株中マウス致死量の低い菌株間にも, 菌の体内滯留度に差のあることは第 9 表に示す如くであつて, 釧路株は他の 2 株よりも体内菌分布が著しい。

Table 9. Bacterial Localization in Mice
4 Weeks after Intraperitoneal Injection
of low virulent Strains with a
Dose of 10^{-4} mg

Sites	Strain		
	Kushiro	Shitakara	Hanaoka
Heart blood	1/5	0/5	0/5
Spleen	4/5	0/5	1/5
Liver	3/5	2/5	1/5
Mesenterial lymph node	4/5	0/5	1/5

Numerator indicates number of mice which gave positive localization at each site. Denominator indicates number of mice examined.

新鮮株と保存株の毒力比較: 第 4 表 中ローリン株から範春株に至る 10 菌株は各種病的材料から分離培養 1~3 代の新鮮分離株である。材料の保存期間は 7 日より 8 箇月に及ぶ。

之等の新鮮株と常花株以下保存期間が 9 ヶ月~26 年に亘る 10 株との致死量に就て比較を行つた。新鮮株の内 3 株 (第二萬隆, 秀麗, 五月) のやや高い毒力のものを除けば, 各菌株共多少の差はあるにしても, ほぼ平均した致死量を示している。又保存株に於ては, 19 ヤアメ (3 年保存), 花岡 (12 年保存), 舌辛及び釧路 (各 26 年保存) の 4 株を除けば新鮮株との間に差異を認め難い。殊に 10

年以上保存した 2 株 (成歌, 初姫) が一般に比べかなり高い毒力を示したことは, 長期保存に依つて劇然とした毒力の低下は起らないことを意味するものであろう。以上の成績から考えると, 添川の指摘したように, 分離後日數を経ぬものはマウスに對して, 一般に毒力が高いとは言い難い。菌の出所と毒力との關係をみると, 新鮮株の内秀麗株は鬚甲腫膿汁から又五月株は仔馬關節液から分離されたものであるが, 共に高毒力を示し, 他の 8 株はいずれも胃液からの分離株であつて第二萬隆株を除き一般に平均した毒力を示した。このことから菌の出所と毒力との間に多少の關連性がある如く思われるが斷定の限りではない。この點に關し FELIX & PITT¹³⁾, FINDLAY¹⁴⁾ がチフス菌のマウス毒力は菌株の得られた患者の疾患の程度と對應すると述べた觀察は馬流産菌に就ても検討の必要があることを示唆している。

本章小括

1. 10~15 g と 18~20 g の成長マウスの間には体重による斃死率の差がみられる。各体重間には平均生存日數には明かな差はない様である。又 12g 内外のマウスでは性別による斃死率の差はない。

2. 菌株の毒力測定には 10^{-1} mg から 10 倍稀釋數段階の菌量を各數匹宛の 10~12g のマウス腹腔内に接種し, 3 週目で 50% 致死菌量を求める方法が好適である。

3. 各菌株の 100% 致死量と 50% 致死量が比較的大きく, しかも兩者の差の餘り著しくないこと, 10^{-1} mg 以下の菌量では菌量の遞減と共に生存日數が長くなること, 微量菌でも二次敗血症は起るが必ずしも致死的でないことなどから, 本菌の對マウス毒力は強いものでなく, 凡そ鼠チフス菌とチフス菌の中間にありと考える先人の見解に一致する。

4. 新鮮菌株と, 1~26 年間累代保存株の毒力を致死量で比較すると, 長期保存により毒力の低いものもあるが, 1~3 年の保存では新鮮株と殆ど差がない。又長期保存株 (10 年以上) でも毒力の強いものもある。各菌株の 50% 致死量は大部分 10^{-2} ~ 10^{-4} mg に存する。炎症, 化膿部位より分離

された新鮮株は流産胎児由来の菌より毒力が強い様である。

5. 長期保存株は定型的S型菌に比べ各種鑑別反應に對し不安定であるが、之等の性狀の變化と毒力との間に關係を見出すことは困難である。

IV. 感染経路別の菌侵襲様式と新舊株の比較

上述の如く我々は新舊株多數に就て致死量を比較した結果、新舊兩株間に劃然とした毒力の差を證明し得なかつたので、更に兩者の間に侵襲力(Invassiveness)の差ありや否やを検討した。即ち菌接種後マウス体内への菌の侵入速度、擴がり、滯

留状態等の角度から兩者の比較を試みた。我々は種々な接種部位からする菌の侵襲態度を各菌株について比較し、接種後の時日を逐つて菌の侵襲經過を考察した。感染部位による接種菌の侵襲經過については、越智は經口、腹腔内感染、添川は靜脈内、皮下感染について考究したが、我々は主として經口、經鼻、腹腔、皮下及び腦内感染マウスについて觀察した。

1. 經口感染

新鮮株及び保存株各2株に就て、菌を約1mg經口投與後、1週間逐日各菌株毎に2匹宛屠殺してマウス体内侵襲狀況を見るに(第10表)、頸部淋巴節には早期から菌が侵入しており、又腸間膜淋

Table 10. Spread of the Organism in Mice after Peroral Inoculation of the Organism with a Dose about 1 mg

Tissues and Organs Examined	Days after Inoculation																				
	1			2			3			4			5			6			7		
	A	B	C D	A	B	C D	A	B	C D	A	B	C D	A	B	C D	A	B	C D	A	B	C D
Heart-blood							1/2				1/2	1/2 1/2	1/2			1/2					
Lung							1/2				1/2	1/2 1/2	1/2	1/2 1/2 1/2	2/2 2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Ascites												1/2				1/2					
Gl. Mesent.							1/2 1/2					1/2 2/2	1/2 1/2			1/2 2/2	1/2 2/2	1/2 2/2	1/2 2/2	1/2 2/2	1/2 2/2
Spleen							1/2			2/2 2/2	2/2 2/2	1/2 1/2 2/2 2/2	1/2 2/2 2/2 2/2	1/2 2/2 2/2 2/2	1/2 2/2 2/2 2/2	2/2 2/2 2/2 2/2	2/2 2/2 2/2 2/2	2/2 2/2 2/2 2/2	2/2 2/2 2/2 2/2	2/2 2/2 2/2 2/2	
Liver							1/2				1/2	1/2 1/2 2/2 2/2	1/2 2/2 2/2 2/2	1/2 2/2 2/2 2/2	1/2 2/2 2/2 2/2	2/2 2/2 2/2 2/2	2/2 2/2 2/2 2/2	2/2 2/2 2/2 2/2	2/2 2/2 2/2 2/2	2/2 2/2 2/2 2/2	
Kidney												1/2		1/2	1/2 1/2	1/2 2/2	1/2 2/2	1/2 2/2	1/2 2/2	1/2 2/2	1/2 2/2
Gonad							1/2					1/2							2/2 1/2		
Gl. Submax.		1/2 1/2		1/2 1/2 1/2 1/2			1/2 1/2 2/2 2/2	2/2 1/2				1/2 1/2	1/2 2/2 2/2 2/2	1/2 2/2 2/2 2/2	1/2 2/2 2/2 2/2	2/2 2/2 2/2 2/2	2/2 2/2 2/2 2/2	2/2 2/2 2/2 2/2	2/2 2/2 2/2 2/2	2/2 2/2 2/2 2/2	2/2 2/2 2/2 2/2
Gl. Axil.												1/2							2/2 1/2		1/2
Gl. Inguin.												1/2	1/2	2/2					1/2 2/2		1/2
Intestinal content	2/2 1/2		1/2																		

1. A, B denotes freshly isolated strain Endō and Suzuki, and C, D stock strain Konishiki and Asatoyo.

2. Numerator indicates number of mice showing positive cultivation in corresponding tissue and denominator number of mice killed.

に認められぬものでも他の部に菌が證明される。腸管には初日にのみ菌が認められる。數日で大体全身感染の状態となり、肝、脾の如き主要臓器には5、6日經過で大多數のものに菌の侵入増殖が認められる。新舊株間に於ける差異は認められない。

更に少量菌 10^{-3} mg を投與して14日目の菌分布を新舊各3株について見るに(第11表)新舊兩

株間に差異がなく菌分布は廣汎であつて、菌血症の認められたものは1/3を占め、肝、脾、腎、肺等の實質臓器には過半数に菌が檢出された。従つて經口感染は本菌のマウスに對する良好な感染経路の一つであると言ひ得る。

2. 經鼻感染

馬流産菌を用いてマウスの經鼻感染を行つた

Table 11. Spread of the Organism 2 Weeks after Peroral Inoculation with a Dose of 10^{-3} mg

Tissues and Organs Examined	Freshly Isolated Strains			Stock Strains		
	Itō	Gotō	Murase	Hokuryū	Eikan	Tsunehana
Heart-blood	3/6	2/6	1/6	1/6	2/6	2/6
Lung	4/6	2/6	1/6	4/6	3/6	2/6
Ascites			1/6	1/6		1/6
Gl. Mesent.	3/6	2/6	1/6	4/6	3/6	2/6
Spleen	4/6	2/6	1/6	4/6	3/6	2/6
Liver	4/6	2/6	1/6	4/6	3/6	2/6
Kidney	4/6	2/6	1/6	4/6	4/6	1/6
Gonad	2/6	2/6	1/6	2/6	1/6	1/6
Gl. Submax.	2/6	2/6	1/6	4/6	3/6	2/6
Gl. Axil.	3/6	2/6	1/6	3/6	2/6	1/6
Gl. Inguin.	3/6	2/6	1/6	3/6	2/6	1/6

報告はない。他のサルモネラ属菌では瀧田¹⁵⁾, 福留¹⁶⁾の報告が詳細である。瀧田は豚コレラ菌, 鼠チフス菌では菌株により致死量が異なることを述べ, 福留は毒力のある菌は速に体内に擴散増殖することを観察している。第12表は約0.5mg接種した場合の新舊株の菌分布を示す。これによると頸部リンパ節及び脾には初期から菌が出現し, 4日目に至ると頸部リンパ節, 肝, 脾には殆ど菌が検出される。6日に至れば二次敗血症を起すものが現われ, 菌の擴がりは全身的となる。15日では菌の体内増殖及び擴がりは最高度となる。3週目をすぎるとマウスの生死はほぼ安定し菌の分布も狭められる。鼻粘膜には永く菌が滞留し42日目にも検出し得た例があつた。経鼻感染後の流血中に於ける菌の出現状況は第13表に示す如くで, 新鮮株に於ける出現頻度は保存株より多い傾向を示し

Table 12. Spread of the Organism in Mice intranasally inoculated with 0.5 mg

Tissues and Organs Examined	Days after Inoculation																	
	2		4		6		8		* 15		21		29		42			
	Daishi-Daian	Hōkin	Daishi-Daian	Hōkin	Daishi-Daian	Hōkin	Daishi-Daian	Hōkin	Daishi-Daian	Hōkin	Daishi-Daian	Hōkin	Daishi-Daian	Hōkin	Daishi-Daian	Hōkin		
Heart blood					2/3	1/3	1/3	1/3	3/3	3/3	1/3	1/3	1/2					
Lung		1/3	1/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	1/2					
Ascites						1/3			1/3	3/3	3/3	1/3	1/2					
Gl. Mesent.	1/3		2/3		2/3	2/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/2	1/2	1/2	1/2		
Spleen		3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/2	2/2	1/2			
Liver			3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/2	2/2	1/2	1/2		
Kidney			1/3	1/3	2/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	1/3	2/3			1/2			
Gonad					2/3	2/3		1/3	3/3	3/3		1/3						
Gl. Submax.	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/2	2/2	2/2	1/2		
Gl. Axil.					2/3		1/3	1/3	3/3	3/3	3/3	2/3	2/2	1/2	1/2	1/2		
Gl. Inguin.					2/3	2/3	2/3	2/3	3/3	3/3	2/3	2/3	1/2	1/2	1/2	1/2		
Nasal cavity	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/2	2/2		1/2		

Daishi-Daian is a freshly isolated strain.

Hōkin is the stock strain.

* The results on 15th day include a certain number of mice died.

Table 13. Showing the Number of Bacteria in Tail Blood of Mice inoculated intranasally with a Dose of 0.5 mg

Strain	No. of Mice	Days after Inoculation																		
		1	2	3	5	6	7	8	9	10	12	13	15	16	17	18	19	20	21	
Daini-Manryū	1	--	--	--	(+)	∞	##	D												
	2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	(+)	--	--	--	--	--	--		
	3	--	--	--	--	--	--	--	--	+	--	--	(+)	--	--	--	--	--		
	4	--	--	--	--	--	--	--	(+)	(+)	--	--	--	--	--	--	--	--		
	5	--	--	--	--	--	--	--	##	(+)	+	+	+	+	(+)	+	--	--		
Hōkin	6	--	--	--	--	--	--	--	(+)	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
	7	--	--	--	--	(+)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
	8	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
	9	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
	10	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--		

Table 14. Spread of the Organism becomes narrow corresponding to the Diminution of inoculated Dose. (Mice were killed 3 weeks after pernasal inoculation with Strain Suzuki)

Tissues and Organs Examined	Dose (mg)							
	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Heart blood								
Lung		1/4						
Gl. Mesent.	1/4			1/4				
Spleen		1/4	2/4		1/4			
Liver	1/4	1/4	1/4					
Gl. Submax.	4/4	2/4	4/4	2/4	3/4	1/4	1/4	

た。又同一菌株に就て菌量を遞減的に経鼻接種し3週後の体内分布を検索してみると、菌量の減少と平行して体内分布は壓縮される傾向を示した(第14表)。

3. 皮下感染

新舊各2株を選び、10⁻⁶mgを皮下接種し、隔日に3匹宛の菌分布を追求した處、第15表に示す様に感染初期から重い感染を起す個体もあるが一般に他の接種経路と同様数日後から全身的な菌分布がみられる。各菌株の菌分布状態は、菌株によつてかなり動搖があるが、脾、肝等主要臓器に於ける菌の増殖は大多数のものに認められる。菌接種後6日目に於ける菌分布を新舊株に就いて比

較すると新鮮株の方が明かに廣汎な分布を示し、新鮮株は体内に侵襲擴散する速度が保存株に比べ速かなように見受けられるが、12~14日になると兩者の差なく菌分布は廣汎となる。従つて接種後一定日數を以て兩者の菌分布を比較することは危険である。結局皮下接種経路を以てしても新舊兩株間に侵襲力の明確な差異を求めることは困難と解される。

4. 腹腔内感染

第III章第2項に述べた如く腹腔内接種ではマウスの斃死率は接種菌量とほぼ平行して10⁻¹~10⁻²mg程度の大菌量では各菌株共殆ど100%に一次敗血死を遂げその経過は速い。10⁻⁶~10⁻⁷mg程

Table 15. Spread of the Organism in Mice after subcutaneous Injection with a Dose of 10^{-6} mg

Tissues and Organs Examined	Days After Inoculation																												
	2				4				6				8				10				12				14				
	Shūka	Katsumoto	Hōkin	Konishiki	Shūka	Katsumoto	Hōkin	Konishiki	Shūka	Katsumoto	Hōkin	Konishiki	Shūka	Katsumoto	Hōkin	Konishiki	Shūka	Katsumoto	Hōkin	Konishiki	Shūka	Katsumoto	Hōkin	Konishiki	Shūka	Katsumoto	Hōkin	Konishiki	
Heart blood	1/3		1/3					2/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	2/3	4/2/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	3/3	2/3	2/3	2/3	1/3	2/3	2/3	2/3
Lung	1/3		1/3					3/3	2/3	1/3	1/3	1/3	1/3	2/3	3/4	2/3	3/3	3/2	3/2	3/2	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Ascites	1/3	2/2	1/3					2/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	2/4	2/3	1/3			1/3	2/3	2/3	1/3	1/3	1/3	1/3	2/3	1/3	1/3
Gl. Mesent.	1/3	1/2	1/3					2/3	2/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	2/4	2/3	1/3	1/3		1/3	2/3	3/3	3/2	3/2	2/3	2/3	3/3	3/1	1/3
Spleen	1/3	1/2	1/3					3/3	2/3	1/3	1/3	1/3	1/3	3/3	4/4	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	3/3	3/3	3/3
Liver	1/3	1/2	1/3					2/3	3/3	3/1	3/2	3/3	3/3	3/3	3/4	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	3/3	3/3	3/3
Kidney	1/3	1/2	1/3					2/3	2/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	2/4	2/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3
Gonad	1/3	1/2	1/3					2/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	2/3	2/4	2/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	2/3	2/3	2/3	2/3	1/3	1/3	1/3	1/3
Gl. Submax.	2/3		1/3					2/3	2/3	1/3	1/3	1/3	1/3	2/3	1/4	2/3	3/3	1/3		3/3	2/3	3/3	3/3	2/3	2/3	3/3	3/2	2/3	2/3
Gl. Axil.		1/2			1/2	1/3	3/1	3/3	3/3	3/2	3/3	3/3	3/3	3/3	4/4	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	3/3	3/3	3/3
Gl. Inguin.	2/3	2/2	2/2		2/3	1/3	1/3	3/3	3/3	3/1	3/1	3/1	3/1	2/3	2/4	2/3	1/3	1/3	3/3	3/3	3/2	3/3	3/3	3/3	1/3	2/3	2/3	2/3	2/3

Shūka and Katsumoto = freshly isolated strains.

Hōkin and Konishiki = stock cultures.

Table 16. Spread of the Organism in Mice 2 Weeks after intraperitoneal Injection with various Strains

Tissues and Organs Examined	Dose (mg)							
	10^{-6}				10^{-7}			
	Yamaguchi	Asahi	Konishiki	Satsuki	Yamaguchi	Asahi	Konishiki	Satsuki
Heart blood	2/6	2/6	5/6	5/6	4/6	3/6	3/6	1/6
Lung	6/6	5/6	5/6	2/6	6/6	3/6	5/6	2/6
Ascites	5/6	6/6	5/6	3/6	6/6	3/6	2/6	1/6
Gl. Mesent.	6/6	6/6	5/6	4/6	6/6	4/6	4/6	4/6
Spleen	6/6	5/6	6/6	2/6	6/6	3/6	6/6	5/5
Liver	6/6	5/6	5/6	3/6	6/6	3/6	6/6	4/6
Kidney	6/6	5/6	5/6	2/6	6/6	3/6	4/6	3/6
Gonad	6/6	4/6	5/6	3/6	6/6	3/6	3/6	1/6
Gl. Submax.	6/6	6/6	5/6	3/6	5/6	3/6	3/6	3/6
Gl. Axil.	6/6	4/6	5/6	2/6	5/6	3/6	3/6	1/6
Gl. Inguin.	5/6	3/6	6/6	4/6	3/6	3/6	4/6	3/6

Yamaguchi and Asahi = Fresh strain.
Konishiki and Satsuki = Stock strain.

度の菌量では一次敗血症を起すことは殆どない。新鮮及び保存各2株に就いて同上菌量を腹腔接種し2週後に屠殺してマウスの体内侵襲状況を比較するに(第16表),殆ど半数のマウスの血液に菌が検出され,臓器,リンパ節にも廣汎に分布し重度の感染を被むつている。新舊兩株間に差異は認められない。なお種々の菌量を腹腔接種し生残したマウスを接種後30日及び70日目に殺して菌の体内分布を検すると,30日ではなお廣汎に菌が分布するが70日では肝,脾を除き菌の消失が目立つてくる。即ち菌座は著しく壓縮されている(第17表)。

5. 脳内接種

BATSON et al¹⁷⁾ はチフス菌株の毒力を比較するため,これをマウス脳内に接種したが,この方法によつては菌株の毒力の差異をもとめ得なかつたとしている。馬流産菌に関しては本経路の接種は未だ行われていない。新鮮株(第二萬隆株)と長期保存株(釧路)を脳内接種し生死観察を行つた。その成績は腹腔内接種に於けると同様長期保存釧路株の致死毒力は著しく低下している。0.1mg程

Table 17. Spread of the Organism in Mice killed after about 30 and 70 days (intra-peritoneal Injection with freshly isolated Strain Rōrin)

Tissues and Organs Examined	Days after Injection	
	Ca 30 days	70 days
Heart blood	1/11	0/6
Lung	3/11	1/6
Ascites	4/11	1/6
Gl. Mesent.	9/11	3/6
Spleen	6/11	2/6
Liver	5/11	4/6
Kidney	1/11	1/6
Gonad	6/11	1/6
Gl. Submax.	6/11	0/6
Gl. Axil.	4/11	0/6
Gl. Inguin.	4/11	0/6

Two groups of mice killed after about 30 and 70 days were injected with doses of $10^{-2} \sim 10^{-5}$ and $10^{-1} \sim 10^{-2}$ mg respectively.

度の大量菌接種では腹腔内接種と同様一次敗血症を呈し、菌の侵襲状態も腹腔内接種と大同小異である。脳症状は新舊株の差なく接種菌量の多いものに多く現われる。

Table 18. Death of Mice during 30 Days after intracerebral Inoculation.

Strain	Dose (mg)				
	10^{-1}	10^{-3}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-8}
Daini-Manryū	1 6 6	5 8 12	3 9 S	9 S S	SSS
Kushiro	2 7 15	SS	SS	SSS	

Note: Figures in each column indicate survival time (day) of mice died. S indicates Survivor. Daini-Manryū = a freshly isolated strain. Kushiro = a long preserved stock culture.

本章小括

1. 経口感染に於ては少量菌でもよく体内に侵入増殖し二次敗血症を起すものが多い。頸部リン巴節には早期に菌が出現し、腸管には初日にのみ菌が認められる。

2. 0.5 mg 経鼻感染せしめると先ず頸部リン巴節に次いで肝、脾に増殖し更に二次敗血症を起す。流血中の菌の出現頻度は新鮮株が保存株よりも多

かつた。

3. 皮下感染では微量菌を以てしても数日中には全身的な感染を示す。菌株によつて菌分布には動搖があり、又同一菌株でも時期によつて不定である。

4. 腹腔内に $10^{-1} \sim 10^{-2}$ mg を感染せしめると多くは一次敗血症を起すが、微量菌では二次敗血症を起すものが多い。感染後生残したマウスは時日の経過と共に菌座が壓縮される。

5. 脳内接種では、菌の侵襲又はマウスの生死の状況は腹腔内感染と異なる。接種菌量の多いものには脳症状が著明である。相当期間脳内に菌を保有していても脳症状を缺くものがある。

6. 以上の各接種経路について、体内への侵襲経過を追及した成績では新鮮株と保存株との間に著明な差異を見出し得なかつた。

V. ムチンによる馬流産菌の マウス毒力の増強

豚胃ムチンはチフス菌の毒力増強に廣く用いられている。他のサルモネラ属菌に就ては、BUTTLE et al.¹⁸⁾により、パラチフス B 菌、鼠チフス菌に試みられた。その他の細菌についてもムチンの毒力増強が理論、實際の面から數多く検討されている(OLITZKI)¹⁹⁾ 然しながら馬流産菌に就てムチンの毒力増強作用を検討した報告はない。著者等がムチン試験を行つた動機は、毒力が鼠チフス菌とチフス菌の間にある本菌に對してムチンの毒力増強作用が如何に作用するかに関心を持つと同時に、馬流産菌の免疫試験に於て、生死の検定にはチフス菌と同様後感染に多量の菌を要し、抗感染性の検定上支障があるので、ムチン添加による毒力増強に期待したからである。

實驗方法

ムチン菌液の調製法は BATSON et al.¹⁷⁾ がチフス菌で行つた方法に準じた。使用ムチンは、Granular hog gastric mucin (Wilson. Type 1701-W) である。5%ムチン液に接種直前 $1/10$ 量の菌液を加え稀釋混和し、10~12 g のスイスマウス腹腔内に 0.5 c.c. 宛接種した。ムチンは使用の都度無菌試験、安全試験を行つた。使用各菌株は前記各章の實驗

に使用したものと同一である。対照菌液は生理的食鹽水又は燐酸鹽緩衝食鹽水 (pH=7) に浮遊せしめた。

1. 致死量の減少

第19表によれば、第五寶月、第8オーグメ

ント、第二萬隆の3新鮮株のムチン菌液は対照菌液にくらべ致死量は著減して 10^{-7} mg では100%斃死し、菌數にして10箇以下 (10^{-8} mg) 殆ど1箇 (10^{-9} mg) でもよく斃死せしめる。対照も他の實驗例にくらべやや高い毒力を示したが、斃死に至る

Table 19. The Effect on Mouse Virulence of suspending *S. abortus-equi* in gastric Mucin (Intraperitoneal Injection)

Strain	Suspension	Dose (mg)								
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Daigo-Hōgetsu	5% mucin		3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3
	Control		3/3	3/3	1/3	2/3	2/3	3/3	1/2	0/3
Daihachi-Ōgument	5% mucin	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
	Control	2/2	1/2	2/2	0/2	1/2	2/2	1/2	0/2	0/2
Daini-Manryū	5% mucin	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2
	Control	5/5	5/5	5/5	3/5	1/5				
Shitakara	5% mucin	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	1/2	0/2	0/2
	Control	4/5	0/5	0/5	0/5	0/5				
R-Strain	5% mucin	2/2		0/2		0/2		0/2		
	Control	0/2	0/2							

1. Numerator indicates number of deaths within 3 weeks after injection. Denominator indicates number of mice injected.
2. Controls were suspended in normal saline or phosphate buffer solution.

迄の日數はムチン菌液にくらべ著しく遅延した。即ちムチン菌液は殆ど1~數日にマウスを斃死せしめ第8オーグメントでは大体 $\frac{1}{2}$ ~2日であつた。対照菌液は高稀釋での斃死はすべて二次敗血症であり、経過は長期に及んだ。然し第8オーグメント株以外の2新鮮株ではムチン菌液でも菌數が少なくなると生存日數が延長される傾向がみられた。又第二萬隆株 10^{-8} , 10^{-9} mg の生殘マウスは30日目屠殺培養した結果体内諸臓器に菌を保有していた。即ち微量菌ではマウスを保菌状態にはするが必ずしも斃死せしめるものでなく、従つて馬流産菌の病原性そのものがムチン添加によつて根本的に改變されたのではないものと解される。なお長期保存の舌幸株もムチン添加により著しく致死量は減少したが新鮮株とは格段の差がある。

2. ムチン菌液接種マウスの感染経過と腹水中の菌の消長

第20表に示す如く、第五寶月株 10^{-6} mg ムチン菌液接種マウスの流血中の菌の出現は対照食鹽水菌液に比べ著しく早く、マウスは2日で斃死した。又対照 10^{-1} mg 感染マウスが初期から強い菌血症を呈するに拘わらず、死期はムチン添加による微量菌よりも延びる。ムチン菌液接種後短時間では血中に菌は認められない。

第21表に於ても1時間目には血中に菌が認め得ないが、腹水中の菌の増殖は頗る速かで時間の経過と共に増加し、2時間では無數となりそのまま増殖を持續する。之に反し食鹽水浮游菌液接種マウスの腹腔では時間の経過と共に激減する。従つてムチン菌液では 10^{-7} mg の如き微量を接種しても大量菌を一時に接種したと同様の結果を招

Table 20. Invasion into Blood Stream following intraperitoneal Injection with Mucin Suspension of Strain Daigo-Hōgetsu

Dose	Colonies in 1 Drop of Tail Blood														
	1/2 hrs.	2 "	4 "	15 "	1 day	2 "	4 "	5 "	6 "	7 "	8 "	9 "	11 "	13 "	19 "
10 ⁻⁶ mg, mucin suspension	-	-	-	+	+	D									
	-	+	-	+	++	D									
10 ⁻⁶ mg, saline suspension	-	-	-	-	-	+	++	++	##	D					
	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	##	+	D
10 ⁻¹ mg, saline suspension	##	++	++	++	##	##	##	D							
	##	++	++	++	++	##	D								

Table 21. Comparison of the Effect of Mucin and Saline Suspensions on the Spread and Multiplication of the Organism following intraperitoneal Injection

Time after Inoculation	Mucin *					Saline *				
	Heart blood	Spleen	Liver	Gl. Mesent.	Peritoneal washings**	Heart blood	Spleen	Liver	Gl. Mesent.	Peritoneal washings**
1 hour	0	0	(+)	0	84 in 3 cc	0	0	0	0	131 in 3 cc
2 hours	++	+	++	##	∞ in 0.5 cc	0	0	0	0	39 in 0.5 cc
4 "	+	++	+	+	∞ in 1 drop	0	?	?	?	9 in 3 cc
15 "	?#	?	?	?	"	0	(+)	0	0	21 in 3 cc
1 day	∞	++	+	+	"	0	(+)	(+)	0	1 in 1 drop
2 days	(+)	(+)	+	+	3 in 10 ⁻³ cc	(+)	(+)	0	0	0 in 10 ⁻³ cc
4 "	##	∞	∞	+	∞ in 1 drop	0	+	+	(+)	(+) in 1 drop

* Strain Daihachi-Ōgument, Dose 10⁻⁷ mg.

** Peritoneal washing of each mouse was made up to a volume of 3 cc with sterilized saline.

?, Number of colonies could not be counted on account of the contamination.

0 = no colony; (+) = positive in enriching culture; + = 1~30 colonies; ++ = 31~100 colonies;

= over 100; ∞ = numerous.

來するものと解釋したい。

表参照。

3. 試験管内に於けるムチン菌液の増殖

各菌株株に就て、5%ムチン液中に 10⁻⁷mg を浮遊せしめ菌数の増減を検討した。生理的食鹽水又は燐酸鹽緩衝食鹽水に比べムチンは發育を促進する有効な培養基であることを示している (第22

4. 長期保存弱毒菌株及び R 型菌に對するムチンの作用

長期保存舌辛株はムチン添加により著しい毒力の増強が見られるが、新鮮株に比べれば甚だしい懸隔がある。R 型菌では極く僅かの増強がみら

Table 22. Enhancement of Growth of the Organism in vitro by the aid of Mucin

Strain	Suspension	Number of Colonies after Incubation (37°C) for Each Time (Hours)					
		0	1	2	4	18	24
Daibachi-Ōgument	Mucin	82	93	130		∞	
	Saline	95	103	113	89	45	
Daini-Manryū	Mucin	54	64	68	455		∞
	Buffer solution	84	81	12	0		0
Shitakara	Mucin	69	64	75	357		∞
	Buffer solution	62	74	35	7		2
R-Strain	Mucin		36	41	85		∞
	Buffer solution		78	20	1		0

Figures indicate mean number of colonies of 3 plates seeded with 1 loop of cultures.

Table 23. Invasion of the Organism into Blood Stream following intraperitoneal injection of suspending R-strain in mucin

Dose	Colonies in Drop of Tail Blood									
	1/4 hr.	1/2 "	1 "	2 "	4 "	1 day	2 days	3 "	4 "	5 "
10 ⁻¹ mg, mucin	+	++	+	+	+	++	D			
	+	++	+	+	+	+	D			
10 ⁻¹ mg, buffer solution	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁵ mg, mucin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁵ mg, buffer solution	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

D = Death

れるにすぎない(第19表参照)。

之に反して試験内でのムチン液中に於ける菌の増殖態度は弱毒菌もR型菌も新鮮株と同様に時間の経過と共に増加する(第22表)。然るにマウスに對しムチン菌液を用いてもこれ等弱毒菌又はR型菌の致死量が依然として新鮮株に劣るのは、接種菌量が少ないと、致死量迄増殖するに長時間を要し、一方ムチンは有効作用時間が盡きるためこれ等の變異菌は充分に増殖し得ず、従つて斃死に至らぬものの如く解される。

第23表にR型菌接種によるマウス流血中の菌の消長を示したが、ムチンを添加すれば10⁻¹mgでは短時間に血中に菌が現われ菌血症を持続してそのまま斃死するが、接種量が10⁻⁵mgに低下するとたとえムチンを添加しても流血中に溢れ出る力がなく換言すると起始菌数が少なければ、腹腔に於ける増殖が或る程度で抑制されてしまうことを意味する。この様にR型菌の致死量減少作用が限定されることは、BOIVIN² et MESROBEAU²⁰ が赤痢菌のS型及びR型菌の比較に於ても観察してい

る。

上述の如くムチンの毒力増強作用は菌株の固有毒力に支配されるものであつて、ムチン添加によつて菌株本来の毒力の差をなくしてしまうものではない。

5. ムチンの毒力増強作用についての考察

馬流産菌はマウスに對してはよく侵入増殖するので、腹腔内に接種された場合 10^{-7} mg 程度までは大体二次敗血症を起し、廣汎に体内に擴散するが、腹水中の菌は比較的短時間に消失するか、或は著しく減少する(第 21 表参照)。これに反しムチン菌液接種マウスでは急速に腹水中の菌は増殖し、重篤な感染を起し、しかも 10^{-8} mg 程度までは殆ど一次敗血症死を招來する。このことは腹腔中に多量の菌を接種したと同様であるが、その経過は更に著しく速い。斃死しないものでも恰も多量接種されて一次敗血症死を免れて生存しているものと同様所見である。生体内で微量の菌が試験管内と同様何の障害もなく増殖するには完全に生体の抵抗から保護されていなければならぬ。第 24 表に 0.3% の割に石炭酸を混和したムチンと對照液の試験管内 37°C に於ける菌の増減を示すと、5 分及び 1 時間目の菌数はムチン菌液では混和前にくらべ 48.8%, 61.8% であるに反し、對照菌液では 35.4%, 19.7% である。(緩衝食鹽水は元來菌に

Table 24. Effect of Mucin on Sterilization by Phenol Solution in vitro

* Suspension	Before Mixing Phenol	After Mixing Phenol			
		1/12 hr.	1 "	2 "	4 "
Mucin	655	320	405	395	357
Buffer solution	940	333	186	1	0

* Suspension contained 10^{-6} mg of Daini-Manryū Strain.

Phenol was mixed in each bacterial suspension at the rate of 0.3%. Each suspension was incubated at 37°C after mixing. Figures indicate the number of bacteria by plate count.

對する感作がやや強いが、1 時間目迄はその影響は認められない) この様にムチンは石炭酸の殺菌作用から相當よく菌を保護する。然しこれは物理

的作用によるものか又は化學的作用によるものかは明かでない。OLITZKI¹⁹⁾ はムチンの毒力増強作用の根本は、ムチンの菌體に對する被覆作用にあるとしているが、馬流産菌に於てもムチンは菌體を生体の攻撃から保護し、その結果菌は増殖して速かにマウスを斃すものと思う。又ムチン添加微量菌の接種によつて保菌状態となるに拘わらず、死を免れる個体のあることやムチン添加による致死量の減少が、菌株本来の毒力程度とほぼ平行していることは、ムチンが馬流産菌自体のマウス病原性を變えることなく、又菌株そのものの毒力を改變するものでないことを示すものである。即ち本菌に對するムチンの作用はチフス菌によつて既に研究された作用機構と同一であると解される。

本章小括

1. 5% ムチン添加により、馬流産菌の致死菌数は數箇にまで低められ、菌株によつては 1 箇でも斃死が起り得る。斃死マウスの生存日數も著しく短縮される。しかしムチン添加微量菌では必ずしも斃死せず保菌状態で生存する。

2. ムチン菌液を腹腔接種すると、腹腔内の菌の増殖は速かで、従つて血中にも速かに出現し重篤な感染を示す。

3. 長期保存弱毒株、R 型菌に對するムチンの致死量減少作用には限度があり、各菌株本来の毒力の程度に應ずる。即ちムチンは菌株本来の毒力を變えない。

4. 試験管内ではムチンは良好な培養基である。又ムチンは菌を保護して石炭酸の殺菌作用を低下させる。これ等は生体内のムチンの毒力増強作用を説明するに好都合であらう。

VI. 總 括

我々は馬流産菌の新鮮分離株と約 1~26 年保存累代株の毒力をマウスに就て比較し、同時に各接種経路に於ける感染経過を追及した。更にムチンの本菌に對する毒力増強作用に關して検討し次の成績を得た。

1. 腹腔内感染に於て、マウスの体重により斃死率は影響をうけ、体重の大きいものは抵抗力も強い。但し性別による差異はない。

2. 毒力の測定は $10^{-1} \sim 10^{-4}$ mg にける 數段階の菌量を腹腔内接種し 3 週後に於ける LD_{50} を求める方法が最適の如くである。

3. 新鮮株及び保存株各 10 株宛に就て腹腔内接種による 50% 致死量を比較したが、特定の菌株を除いては新舊株間に明かな差異を認め得ない (第 4 表)。

4. 新鮮株中化膿巢、炎症部位から得られた菌株は流産胎児胃液から分離されたものにくらべ毒力が強い様に見受られる (第 4 表)。

5. 保存期間 10 年以上の長期保存 5 株に就て種々な集落型の S, R 型鑑別法を試み特に新鮮モルモット血清に対する抵抗性は新鮮株に比べ何れも著しい減弱を示したが、50% 致死量は新鮮株並のもの 2 株、弱毒化したもの 3 株であり、長期保存により必ずしも毒力の低下を示さなかつた (第 4, 8 表)。

6. 経口、経鼻、脳内、皮下及び腹腔内接種経路による菌の侵襲態度を検討した。脳内及び腹腔内接種によると大量菌ではほぼ 100% に一次敗血症を起し、皮下接種はやや斃死率が低下する。以上の接種経路により微量菌を注射した場合や経口及び経鼻接種で 0.5~1 mg の大量菌を用いても一次敗血症は起さず二次敗血症の型をとるものが多い。

7. かかる場合二次敗血症を起し体内に廣く菌が侵入増殖してもマウスは必ずしも斃死しない程度の本菌の毒力は先人の言う如く鼠チフス菌とチフス菌の中間に位するものと考えられる。

8. 以上の接種経路につき新鮮株及び保存株の侵襲態度を比較したが、兩者の間に明確な差を認め難い。但し微量菌を皮下接種した後 6 日頃に体内菌分布を比べると新鮮株の方が廣汎な分布を示したが、2 週後では兩者の差がない。

9. ムチン添加により本菌の毒力は著しく増

強され、致死量は數個まで低められ、又生存日數も短縮する。

10. ムチン菌液は腹腔接種後腹腔内で速かに増殖し流血中に侵入する。

11. 弱毒株及び R 型菌もムチン添加によつて毒力は増強するが、その程度は限定され各菌株本來の毒力と平行する。

本研究は文部省科學研究費によつて行われた。記して謝意を表する。

文 献

- 1) 越智：細菌學雜誌，第 455 號，35 (昭和 9 年)。
- 2) 添川：日本獸醫學雜誌，6，19 (昭和 19 年)。
- 3) 鳥羽等：農林省家畜衛生試驗場研究報告，21 號，169 (1949)。
- 4) 葛西等：日本獸醫學雜誌，8，129 (昭和 21 年)。
- 5) 安東 (清) 等：細菌學雜誌，第 464 號，757 (昭和 9 年)。
- 6) BATSON, H. C.: *J. Exp. Med.*, 90, 233 (1949)。
- 7) REED, L. J. and H. MUENCH: *Amer. J. Hyg.*, 27, 493 (1938)。
- 8) WHITE, P. B.: *J. Path. and Bact.*, 32, 85 (1929)。
- 9) KAUFFMANN, F.: *The Diagnosis of Salmonella Types* (1950)。
- 10) 岡本等：實驗醫學雜誌，28，185 (1944)。
- 11) 齋藤：日本細菌學雜誌，6，15 (昭和 26 年)。
- 12) 大前：細菌學雜誌，第 464 號，707 (昭和 9 年)。
- 13) FELIX, A. and R. M. PITT: *J. Hyg. Camb.*, 49, 92 (1951)。
- 14) FINLAY, H. T.: *J. Hyg. Camb.*, 49, 111 (1951)。
- 15) 瀧田：細菌學雜誌，第 467 號，1 (昭和 10 年)。
- 16) 福留：同上誌，第 480 號，95 (昭和 11 年)。
- 17) BATSON, H. C. et al: *J. Exp. Med.*, 91, 219 (1951)。
- 18) BUTTLE, G. A. H. et al: *Lancet*, 232, 681 (1937)。
- 19) OLITZKI, L.: *Bact. Rev.*, 12, 149 (1948)。
- 20) BOIVIN, A. et L. MESROBEAU: *Compt. rend. soc. biol.*, 128, 446 (1938)。

Résumé

In the present paper some experiments are described on the comparative studies on mouse virulence of the freshly isolated strains of this bacillus and of stock cultures stored for a period of 1~26 years. The authors also investigated the spread of the organism by the various routes of administration of the bacilli. Besides, the effect of mucin on mouse virulence was tested. The results are summarized as follows:

1. The death-rate following intraperitoneal inoculation is affected by the weights of the mice. The heavier mice show a tendency to have stronger resistance. No difference between the two sexes is detectable (Tables 2, 3).

2. The mouse virulence of the bacilli is to be estimated preferably by reading off the LD_{50} from the observed mortalities in each of the mice groups inoculated intraperitoneally with a series of six dilutions $10^{-1} \sim 10^{-6}$ mg within 21 days.

3. The LD_{50} of each 10 freshly isolated strains and stock cultures were compared. Except in certain strains, there is no marked difference between the fresh and stock strains (Table 4).

4. The fresh strains isolated from pyogenic or inflammatory lesions appeared to be more virulent than the ordinary fresh strains from aborted fetus (Table 4).

5. Some biological and serological characters of 5 stock cultures preserved for more than ten years were observed, and the resistance to fresh guinea pig serum of these strains is markedly less than that of fresh strains. However, LD_{50} of two stock cultures are almost the same as fresh strains and three of them showed lower virulence (Tables 4, 8).

6. The behavior of invasion and multiplication of the bacilli in mice administered by various routes of inoculation was tested. Large doses of bacilli administered intracerebrally or intraperitoneally cause deaths by the first septicaemia in almost all mice; subcutaneous injections also cause a lesser percentage of deaths. A minute dose of bacilli given by above 3 routes or a large dose such as 0.5~1 mg administered perorally or pernasally does not cause first septicaemia but secondary septicaemic infection (Tables 10~18).

7. However, mice which suffered from secondary septicaemia do not necessarily die. Thus the mouse virulence of abortion bacilli, as many authors already stated, seems to be intermediate between *Salm. typhi-murium* and *Salm. typhi*.

8. No differences between the behavior of the invasion into mice of the fresh and stock cultures have been detected clearly with various routes of infection.

It must be noted, however, that a minute dose of a fresh strain given by subcutaneous routes showed comparatively a wider spread of bacilli than that of a stock strain after 6 days but not after 2 weeks.

9. Even a small number of bacilli injection with mucin inevitably cause death of mice within a short period (Table 19).

10. The bacilli injected intraperitoneally with mucin multiply readily in the peritoneal cavity and invade the blood stream very soon (Tables 20, 21).

11. The presence of mucin also enhances the virulence of a low-virulent strain and rough variant in a restricted degree. The enhancement of virulence goes parallel with its original virulence.