



Title	結核菌のGeneration timeに就いて：第3報 マウス体内におけるGeneration timeの測定
Author(s)	新明, 美仁; SHIMMYO, Yoshihito
Description	
Citation	結核の研究, 3, 63-69
Issue Date	1956-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26581
Type	departmental bulletin paper
File Information	3_P63-69.pdf



結核菌の Generation time に就いて

第3報 マウス体内における Generation time の測定

新 明 美 仁

(北海道大学結核研究所細菌部 主任：大原 達教授)

(受付 昭和30年11月30日)

1. 緒 言

結核菌の Generation time を測定するには色々な方法が考えられるが、すでにわれわれは第1報¹⁾及び第2報²⁾において夫々 micro-Kjeldahl による菌体窒素の定量 Small inoculum technique (Youmans), 培養菌液の Turbidity 測定等の方法によつてこれを求め、相互の成績について比較検討を行つた。これ等は何れも in vitro における Generation time を測定したものであるが、これとやらんで in vivo における測定もまた、実際上色々な場合に必要となつて来る。後者に関してはこれまで良法を見なかつたが、最近に到り Youmans and Youmans³⁾ は接種菌量と Survival time との間に一定の関係があることを見出し、これより Generation time を算出し得ることを示した。もとより生体内における菌の Generation time 測定という困難な問題は、如何なる方法を以てしてもある程度の誤差は避けられないものである。この点 Youmans 等の方法とても例外ではあり得ないが、彼等による Generation time の求め方は、単に動物生存日数の観察のみから世代時間を算出するという実験操作の極めて単純な点に特色がある。原理的に見るならば本法は丁度曩に述べた Small inoculum technique に比較し得べきもので、数群のマウスに夫々菌量を異にする結核菌を接種し各群の平均生存日数から被検菌の Growth rate constant ならびに Generation time を求めるものである。Small inoculum technique においてわれわれは種々なる量の結核菌を液体培地に植え、菌の発育が肉眼的に初めて認められるまでの日数を観察したが、この日数は本法におけるマウスの平均生存日数に相当する。即ちマウスの静脈内に結核菌を感染せしめた場合、もし菌のマウス体内における増殖速度が接種菌量の多少に拘らず同一ならば、マウスの平均生存日数即ち結核菌がマウス体内において一定の population を示すに至るまでの日数と接種菌量との間に一定の関係が成立する筈である。実際において縦軸に平均生

日数、横軸に接種菌量の対数を取つて実験成績を plot するならば、1つの直線が得られる。この直線の傾きは結核菌のマウス体内における Growth rate を示すもので、これより前報と同様に Generation time を求め得る。この方法は、結核菌が生体内において一定数に達した時に丁度宿主動物の斃死が起ることを前提としているので、実験には出来得る限り純系動物を用いることが望ましく、而も個体差を考慮に入れて可なり多数の動物を用うる必要がある。この意味から実験動物としてはマウスを用いるのが適当と考えられ、Youmans 等もこれを用いて実験して居る。この場合、マウスの Strain によつて結核菌に対する感受性は著しく違ふから、得たる Generation time の値も用いられたマウスの Strain 毎に異なるものであることはいう迄もない。逆にいえば異つた系統のマウスについて同一菌株の Generation time を測定した場合、求められた Generation time の値の大小は直ちに動物の感受性の差を示すものであり、本法はこのような感受性の比較にも用い得る。

以下マウス体内における結核菌世代時間測定法の実際につき詳細に報告し度いと思うが、ここに述べる方法は定量培養等の如き労多くして実験誤差の多い方法を用いない為実験操作自体の単純さ(マウスの死亡日数を記録するだけである)にも拘らず、比較的正確な Generation time を与えるものといつて良からう。従つて動物の免疫度、Chemotherapeutica の効果等を調べるような実験においては広く応用し得べき方法と考える。

2. 実験材料及び実験方法

1) 使用動物： 体重 18g 乃至 22g の dd 株純系マウス 60 頭を用意し、これを 10 頭宛第 1 群から第 6 群までの 6 つの群に分けた。

2) 使用菌株： 人型菌仲野株を用いた。研究室保存の同菌株は毒力が若干落ちてゐるものと思われたので、実験を開始するに先立ち予めスイス系マウスを 3 代 passage

して毒力を恢復せしめ、最後のマウスより分離した菌を小川培地に培養、その4週目のものを実験に供した。

3) 菌の接種: 小川培地に生じた菌集落を直接白金耳にて掻き取り、適当量秤量後、型の如く水晶玉入りコルベーンに移して手振り法によつて磨砕し、これに生理的食塩水を加えてそれぞれ per cc 7.5mg, 12.5mg 20mg, 30mg, 40mg, 50mg となるような菌液を作る。かかる6種の菌稀釈液を上記の如く各群それぞれ10頭宛第1群より第6群までのマウスに注射した。接種部位は尾静脈、接種量は1頭につき0.2ccである。これによつて第1群のマウスは1頭につき結核菌1.5mg, 第2群は2.5mg, 第3群は4.0mg, 第4群は6.0mg, 第5群は8.0mg, 第6群は10.0mg づつの接種をそれぞれ受けたことになる。

4) 平均生存日数 (Median Survival time) の計算法: 上記の如く菌接種を受けたマウスを群毎にそれぞれ異なる箱に入れて飼育し、各々の群について所属する各個のマウスの生存日数を観察すれば、これより所定の方法で平均生存日数が計算し得られる。この実験においてわれわれはかかる平均生存日数計算のため、Youmans 等³⁾ の例にならつて Litchfield⁴⁾ の方法を採用した (一般に time percent effect curve から median effective time を求めるに当つては Bliss の graphic solution あるいは Fischer その他の LD₅₀ を求める方法なども応用されるが、これ等は何れも正確ではあるにしても対数、Probit 等を用い、かつ計算が複雑で甚だしい時間と労力とを必要とする。これに反しここに述べる Litchfield の方法は logarithmic probability paper と3つの Nomograph のみから計算を行うもので、data は終始その original な form のままで使用が許され対数や Probit を用いる必要がない。従つて計算が簡単迅速であり、而も Litchfield によれば如応何なる log-normal curve の cumulative form にも用出来るという)。

Litchfield による median survival time の求め方は以下の如きものであるが、この項においてはその概略を述べるに止め、詳細は実験成績の項において実際の data によつて記述したいと思う。

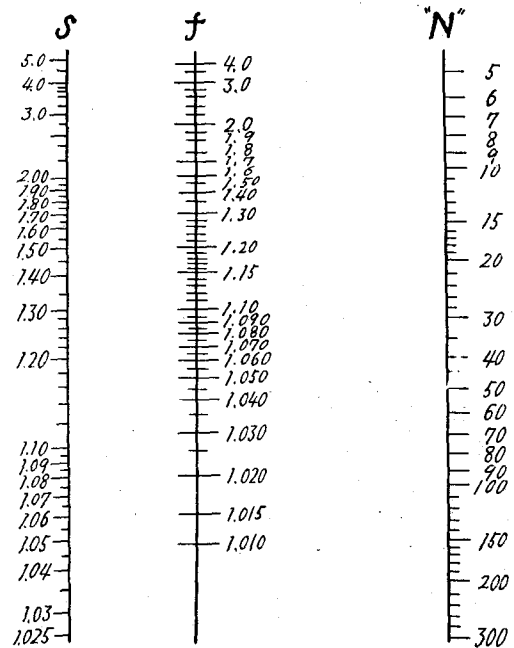
(i) 本計算に使用する用紙として上述の如く Logarithmic probability paper (対数正規確率紙) 及び図に示す如き3つの Nomograph を用意する。

(ii) 観察された動物の死亡日数に対応して、その時までの累積死亡百分率を直接 logarithmic probability paper 上に作図する。

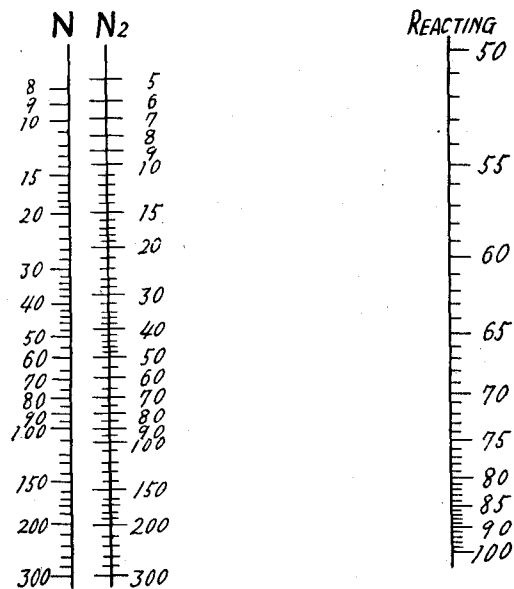
(iii) 次に累積死亡百分率10%と90%の間において、かくして得られた点を結ぶ直線を引く。

(iv) この直線上に縦軸における 16, 50 及び 84 pe-

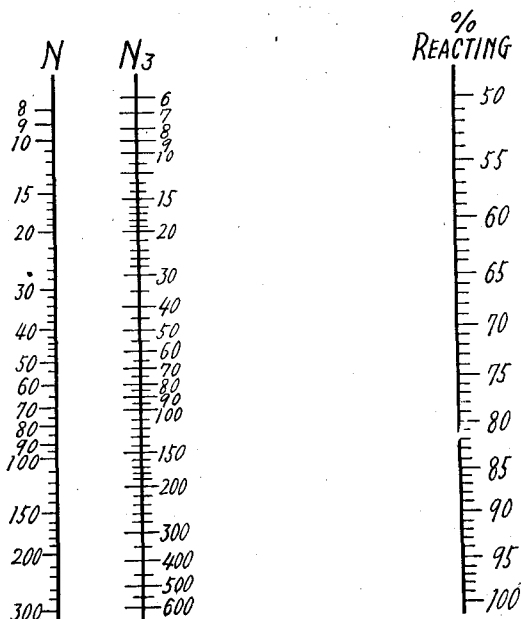
cent の点を投影し、これに対応する横軸の読みを取る。この場合の横軸の読みをそれぞれ ET₁₆, ET₅₀, ET₈₄ とすれば、求むる median effective time は ET₅₀ である。



NO. 1 NOMOGRAPH FOR OBTAINING FACTORS FOR ERROR LIMITS



NO. 2 NOMOGRAPH FOR OBTAINING N₂



NO. 3 NOMOGRAPH FOR OBTAINING N_3

(v) Slope function (standard deviation) S は次の如くして計算する。

$$S = \frac{ET_{84}/ET_{50} + ET_{50}/ET_{16}}{2}$$

(vi) 実験に用いた動物の全部 (100%) が反応に当たった場合 (観察期間内に全部が斃死した場合) は、 S 及び test した全個体数: N を用いて Nomograph No. 1 から fET_{50} (factor for the ET_{50}) が導かれる。また S 及び N_1 を用いて Nomograph No. 1 から fs が導かれる。但し $N_1 = 2N - 1$

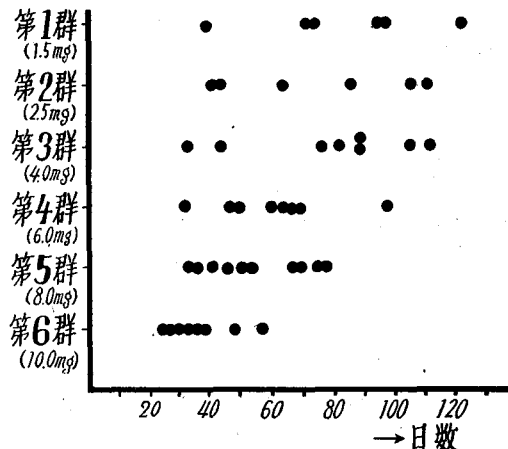
(vii) 若し全部の動物が反応に与らなかつた場合 (斃死数が 100% よりも少いとき) N 及び反応に当たった動物の percentage を用いて Nomograph No. 2 より N_2 が導かれ同じく Nomograph No. 3 より N_3 が導かれる。而して N : と S を用いて Nomograph No. 1 より fET_{50} が、また N_3 と S を用いて fs がそれぞれ導かれる。

(viii) 19/20 probability に対する parameter の信頼限界は次の如くして計算される。

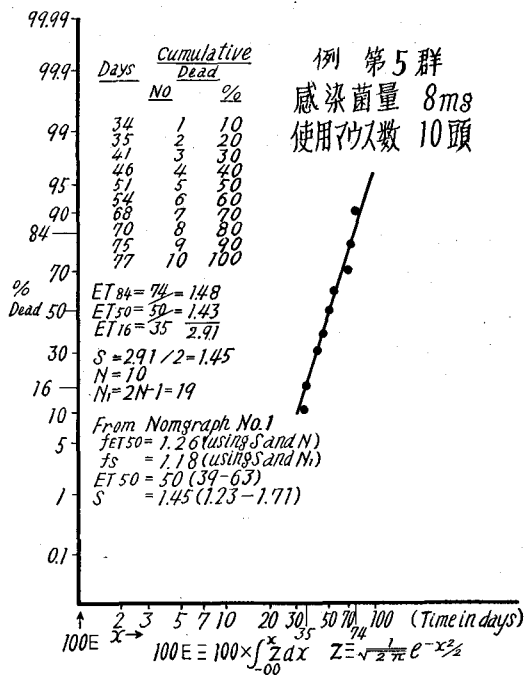
Parameter $\times f$ = upper limit.

Parameter / f = lower limit.

以上は方法の概略であるが、抽象的で理解困難な点もあると思われるので、前述した如く実験成績の項においてわれわれの実験例につき、補足的な説明を加えて行きたいと思う。



第 1 図 各群別マウス死亡分布図



第 2 図 Litchfield の graphic Solution による median survival time の求め方

3. 実験成績

上記の如く群毎にそれぞれ異なる菌量の毒力菌仲野株を接種した 6 群のマウスについて、各群別に所属マウスの死亡日を記録して行くと、第 1 図に示すような死亡分布図が得られる。図において縦軸は動物の群別、横軸は日数を表わし、1 つの黒点はマウス 1 頭の死亡を意味する。尚実験

の都合上、観察は130日を以て打切つた。

Median survival time を求めるには、動物が菌接種を受けてから斃死するに至るまでの期間を観察し、各群毎に各々の死亡日に累積死亡百分率を対応せしめた点を結んで直線を引き、これをグラフ的に解けば良い。

今1例として菌量 8 mg を接種した第5群につき median survival time を求めて見ると第2図に示す如き直線が得られる。即ち第5群に属する10頭のマウスは第1図に見る如く、結核菌接種後夫々34, 35, 41, 45, 51, 54, 68, 70, 75, 77日目に斃死しているの、これ等の観察日数におけるマウスの累積死亡百分率を求め、この両者を対応せしめて第2図の如き logarithmic probability paper 上に直接作図する。即ち何日目にその群の全体の頭数に対して何パーセントのマウスが死亡したかを直接この paper 上に plot し、次でその10%と90%の間のそれぞれの点を結んで直線を引く。この図より median effective time 及びその信頼限界の上限と下限ならびに standard deviation を求めるには次の如くする。即ち先ず図の直線がそれぞれ縦軸の16, 50及び84%の線と交差する点の日数を直接この図より求める (ET₁₆, ET₅₀, 及び ET₈₄)。第2図においてその値はそれぞれ35日, 50日, 及び74日である。

従つてこの場合、第5群のマウスにおける求むる median survival time は丁度50日ということになる。かくの如く、この方法によれば data を原形のままで対数や Probit 等を用いることなく直接 logarithmic probability paper 上に作図し、図によつて median effective time を簡単に求めることが出来る。

Standard deviation (S) は前記の如く

$$S = \frac{ET_{84}/ET_{50} + ET_{50}/ET_{16}}{2}$$

であるから、この式に ET₈₄=74, ET₅₀=50, ET₁₆=35 を代入すれば S=1.45 となる。

尚この第5群の例では観察日数内に10頭全部が死亡して居る。換言すれば100%が反応に当たつたのであるから Nomograph No. 1 を用いて fET₅₀=1.25, fs=1.18 となり、更に実験方法の項で述べた如くして 19/20 probability に対する parameter の confidence limit を求めると、この場合には ET₅₀=50 (39-63), S=1.45 (1.23-1.71) という値が夫々得られる。尚使用マウスの全部が反応に当らなかつた場合、Nomograph No. 2 及び No. 3 を用いて計算することは前に述べた通りである。

第1表は以上の如くして各群毎に計算した第1群から第6群までの median survival time を纏めたものである。表に見る如く、接種菌量 1.5mg の第1群のマウスは median survival time が110日、2.5 mg を接種した第

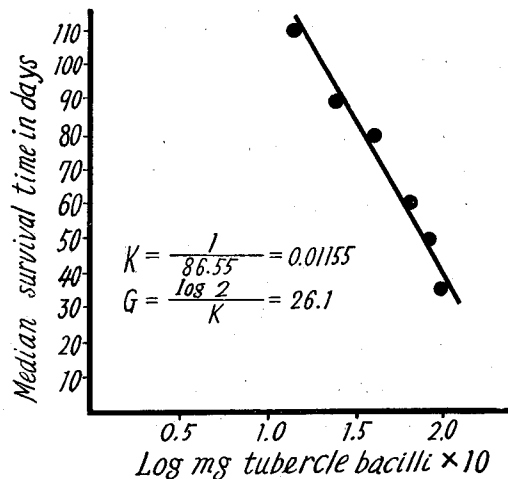
第1表 感染マウスの各群別平均生存期間

群 別	接種菌量 (mg)	使用マウス数	平均生存期間
第1群	1.5	10	110 (65-185) *
第2群	2.5	10	90 (58-139)
第3群	4.0	10	80 (54-118)
第4群	6.0	10	60 (48-74)
第5群	8.0	10	50 (39-63)
第6群	10.0	9	36 (29-44)

* 括弧内は95%信頼限界を示す

2群は90日、以下第3群80日、第4群60日、第5群50日、第6群36日となつて居り (括弧内は95%信頼限界を示す) 接種菌量の大小と median survival time の大小とは逆の関係にあることが分る (median survival time の計算に当つて第6群のみは、うち1頭が早期に事故死した為これを除外し、使用頭数を9頭として計算を行つた)

このような接種菌量と平均生存日数の関係は、第1表の data を図示して見るとなお一層明らかになる。即ち縦軸に日数を取り横軸に接種した結核菌量の対数を取つて第1表の成績をグラフに移して見ると、各群の平均生存日数は大体一直線上にならぶ。換言すれば、接種菌量の対数と median survival time の間には直線関係が成立つ。第3図はこれを示したものである。図においてすでに第1報及び第2報において述べたと同様に最小自乗法によつて Growth rate constant (K) を求め、更に $G = \frac{\log 2}{K}$



第3図 結核菌感染量と平均生存期間の関係

により Generation time (G) を求めれば

$$K = 1/86.55 = 0.01155, \quad G = 26.1$$

仍つて求むる 仲野株の dd 系マウス体内における **Generation time** は 26.1 日である。

4. 総括ならびに考按

以上述べた如き方法によつて著者はマウス体内における人型菌仲野株の **Generation time** を測定した。これによつて得た値は上述の如く 26.1 日で、すでにわれわれが報告した **in vitro** における測定値に較べるとその値は著しく大きい。勿論 **Generation time** は測定方法如何によつて多少とも異なる値を取るべきものであり、同じ BCG の試験管内世代時間でも、われわれの行つた実験においては **Small inoculum technique** における 15.6 乃至 21.7 時間から **micro-Kjeldahl** 法による 2.84 乃至 4.04 日に至るまで、大小色々値が得られて居る。本報における測定値がこれらに較べ格段の差を示したのは、**strain** の相違(仲野株と BCG)によるというよりは、根本的にいつて **in vitro** と **in vivo** という全く違つた場における測定の結果と見るのが妥当であろう。但し原理的に見れば緒言の項にも述べた如く、本報の求め方は **Small inoculum technique** におけるそれと何等異つた所はない。両法とも結核菌を動物あるいは適当な培地に接種し、これが増殖して一定の数に達するまでの時間からこの菌の **Generation time** を算出したものである。然し動物体内における菌の増殖過程を考えて見るに、一方において菌が増殖して行く反面、少くとも一部の菌は絶えず死滅して行くものと想像される。従つて菌が全体として 2 倍に達する迄には人工培地上における場合よりもより長い時間を要するであろうことは想像に難くない。勿論人工培地の場合といえども菌の総てが分裂し得るものでない事は否定出来ないが、動物の有する **natural resistance** を考えれば培地における菌の死滅は動物体内におけるそれに比し無視し得べきものといつて差支えなからう。而して動物体内において、侵入菌の幾何が死滅し幾何が増殖して行くかを、個々の場合について適確に知る方法は無いようである。かく考えれば、**in vitro** における菌の世代時間を測定することは可能であつても、動物体内における真の **Generation time** を求めることは不可能といわねばならない。即ち **in vitro** における測定は大体において 1 個の菌が 2 個になるまでの時間を示すものと見做し得るが **in vivo** における測定値には動物の **natural resistance** が可なり影響を与えているものと見るべきである。従つて 1 個の菌が 2 個になるという真の意味の世代時間は、**in vivo** の場合、測定値よりも遙かに少いものと考えなければならない。

一般に動物体内における菌の増殖状態乃至は **Generation time** を知らんとする場合、常識的に一応頭に浮ぶの

は **viable count** の方法であらう。即ち一定の生菌数(予め何等かの方法で測つて置く)を動物体内に注射し、適当の日数を経た後これを殺して定量培養により動物体内の全菌数を測る方法である。その観察値から最初の接種菌が何日後に何倍になつたかを知ることが出来、これより最初の菌が倍の量になる迄の時間を推定することが出来る。然しながらこの方法には 2 つの大きな弱点がある。その 1 つは上に述べた如く、生体内で死滅した菌の割合を知り得ないことである。**Generation time** の測定において個々の菌が分裂する時間を直接観察し得ない以上、**total mass** が 2 倍になる時間を測る以外に方法はないが、これには体内にある総ての菌が分裂能力を持つていることを前提とする。同時にまた、分裂した菌を生死に拘らず測定し得るものであることを必要とする。この点 **viable count** では生菌数しか測定し得ないから甚だ不完全といわなければならない。第 2 に **viable count** においては、1 個の **colony** が 1 個の菌より作られるものであることを前提として居る。然し結核菌の如き **homogeneous** になり難い菌を取り扱う場合において、厳密に言えばこの前提が成り立つという保証はない。ある **colony** は 2 個の菌から生じたものであり、ある時には 10 個の菌が塊つて 1 個の **colony** しか作らないという場合もあり得よう。従つて **viable count** においては生体内の全生菌数を数えたといつても、実際にはその何分の一かを数えているに過ぎない。このことが **Generation time** の測定に当り如何なる誤差を与えるかは多言を要しないであらう。

續つて本報における方法を検討して見るに、この種の実験に避けられない上述の 2 つの難点を、完全とはいへぬまでもとに角避け得ている点、**viable count** 法より優れているということが出来る。本法においては実際の菌数を数える代りに一定量の菌によつて動物が斃死するまでの期間を求めて居る。このような観察においては一部の菌の生死は前法成績に影響を及ぼさない。仮りにこれが影響を及ぼすものとしても **viable count** の如く直接的なものではなく間接的な影響である。結核菌はその生死に拘らず動物に対し毒性を有するものであり、死菌といえども動物の死亡に対しては一樣に一定の影響を持つ。この際の個体差はある程度以上の動物数を用いることによつて平均化され而も純系動物を用いることによつてこれを最小限になし得る。更に定量培養を必要としないことは上述の如き誤差の介入を許さないばかりか、労力上から見ても甚だ経済的な方法といひ得よう。但しこの方法の欠点は可なり多くの動物数を必要とすることである。

最近の結核研究においては、実体動物としてマウスの用いられる頻度が次第に増加しつつある。殊に本論文の如

き種類の研究においては、経済的な理由からもマウスの使用が最も望ましい。結核菌感染ルートとして静脈を用いる限り、マウスは海狸と同様に用いて差支えないが、唯結核に対する感受性はマウスの strain によつてかなりの差がある事を銘記して置く必要がある。試みに Youmans and Youmans⁹⁾ の実験成績を記述して見ると第2表の如くである。この表から Youmans 等が計算した Generation time は 4.6 日、Growth rate constant $K=0.057$ でわれわれの得た値より遙かに小さい。彼等の測定した菌株は H37 Rv で本報の仲野株とは strain も異り、また菌自体の生物学的状態も当然違つていてと考えられるにしても、彼等の測定値の開きは菌株の相違と考えるには余りにも大き過ぎる。寧ろ彼等の用いたマウスの strain が “strong A” なる高感受性のものであつたことに原因を求めのがこの場合妥当であろう。

第2表 Youmans におけるマウスの平均
死亡日数

INFECTING DOSE OF TUBERCLE BACILLI IN MG.	NUMBER OF MICE	MEDIAN SURVIVAL TIME (95 PER CENT CONFIDENCE LIMITS)
0.5	40	17.0 (16.4—22.6)
1.0	467	14.0 (13.8—14.2)
2.0	60	9.8 (9.3—10.2)
3.0	40	5.2 (4.6—5.7)
4.0	80	3.5 (3.1—3.8)
6.0	40	1.7 (1.4—2.0)
8.0	20	0.26 (0.14—0.49)
10.0	20	0.0
12.0	20	0.0

われわれが使用した仲野株は前述の如くスイス系のマウスを3代 passage して毒力を高めたものであるが、その毒力は大体 3~4 mg の静脈内接種により同系のマウスを20日前後で確実に斃すものであつた。スイス系に対するかかる毒力はわれわれの得た同系が純粋なものでなかつた為 systematic に測定したものでないことを遺憾とするが、本実験における dd 系の成績と比較して (dd 系は 4 mg に対する平均生存日数 80 日) その感受性はむしろ後者を凌駕するものと考えて差支えあるまい。一方文献を尋ねて見ると Bloch¹⁰⁾ においては dba 系の “very high..”, C₅₇ black 系の “high” に対し swiss albino 及び CF₁ 系は “low” と記載されて居り、染谷等¹¹⁾ によれば dba 系に較べ dd 系は死し難い傾向があるといわれて居る。Youmans 等の strong A がどの程度のものであるか直接

の比較がないので不明であるが、少くとも以上から dd 系マウスが結核に対し余り感受性を示さないことは明らかであろう。然し dd 系において結核菌の Generation time が長いのは、(i) 同系のマウスの体内において1個1個の菌の成長が実際に遅いのか (ii) あるいは菌が増殖して行く半面死滅するものが多く、全体として菌が2倍に達するのに長期間を要するのか (iii) それとも更に何等か他の factor によるものであるのか、この実験からは未だ審らかでない。

尚第2表の Youmans 等による data を見てわれわれが少しく不審に思ふのは、第7, 8, 9 群における動物の死亡時間が余りにも早いことである。勿論この点に関しては Youmans 等もその論文で言及し、これと同量の死菌を静脈内に接種してもマウスの斃死が見られなかつたことからこれを vascular phenomena によるものではないとしているが、真の死因が何であるかについては更に追求して見る必要があるように思われる。

なおまた、核結菌がマウス体内において増殖を開始するに先立ち lag period の存在する可能性も考えなければならぬ。但し lag phase の存在は第3図に示した直線の傾斜 (即ち Growth rate) に影響を与えるのではなく単にこの直線が横軸を切る点を延長せしむるだけである。この intercept は理論的のいう immediate death を惹起せしむべき菌量を示すものであるが、Youmans の data においてこの理論値が丁度実験値に一致していることは甚だ興味深い。

5. 結 論

dd 系マウスを10頭宛6群に分ち、群毎にそれぞれ異つた菌量の結核菌を接種して各群マウスの平均生存日数を求め、これより菌のマウス体内における Generation time を計算した。かくして得た人型菌仲野株の dd 系マウス体内における Generation time は 26.1 日である。この成績から見ると、同系のマウスは結核に対し余り高い感受性を持たないように思われる。尚群別の平均生存日数を算出するに当つて Litchfield の方法を用いたが、この方法は簡便にして正確であり、time percent effect curve の迅速なグラフ的解法として広く応用し得べきものと考えられる。

稿を終るに当り、終始御指導、御校閲を頂いた大原教授に深い感謝を捧げる。

引 用 文 献

- 1) 新明美仁・横井敏夫、信太隆夫：本誌，50頁，昭30
- 2) 新明美仁・信太隆夫，横井敏夫：本誌，57頁，昭30

- 3) Youmans, G. P. & Youmans, A. S. : Am. Rev. Tuberc. 64(5), 534, 1951.
- 4) Litchfield, J.T. : J. Pharmacol. & Exp. Therap. 97(4), 399, 1949.
- 5) Bloch, H. : J. Exp. Med. 91, 197, 1950.
- 6) 染谷四郎・林治 : 日本細菌学雑誌, 8卷 特別号, 昭28,