



Title	マウスの実験的結核症に関する研究(Ⅰ) : 生存日数より観察した牛型結核菌Ravenel株の菌力について
Author(s)	信太, 隆夫; SHIDA, Takao; 平野, 五郎 他
Description	
Citation	結核の研究, 7, 32-39
Issue Date	1958-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26628
Type	departmental bulletin paper
File Information	7_P32-39.pdf



マウスの実験的結核症に関する研究 (I)

生存日数より観察した牛型結核菌 Ravenel 株の菌力について

信 太 隆 夫

平 野 五 郎

石 山 司 浪

(北海道大学結核研究所細菌部 主任: 大原 達教授)

緒 言

実験的結核症にマウスを用いたのは Koch¹⁾ が最初であるが、その後長い間この動物は結核の研究に不適当と考えられて来た。即ち結核菌に対して感受性を持つてはいるが、甚だ抵抗の強いこと、血清を採取しにくいこと、及びツベルクリンアレルギーを惹起しないこと、などが実験にあまり用いられなかつた主な理由であろう。然るに近時活潑に行われるようになった抗結核剤の研究において薬剤の治療効果判定にこの動物が利用されるようになってから、結核研究動物としてマウスが遽に脚光を浴びるに至つたことは衆知の如くである。現今では screening test^{4)5)8)~18)} のみならず、結核菌の毒力検定^{19)~25)}、結核菌感染に対する感受性^{7)18)26)~31)} や免疫の研究^{32)~41)} 更には微量菌の探求等^{42), 43)} に関する実験に至るまでマウスは広く利用されるに至つている。

一方 Feldman and Hinshaw⁴⁴⁾ はモルモットによる過去5年間に亘る研究から、無効物質有効物質の判定がこの動物においては短期間に観察出来ないと結論し、Rake 等⁸⁾ はモルモットの使用が結核症の研究に最も妥当であると信ずる理由は何もないと述べている。かく見れば単にモルモットが結核菌に対してより感受性が高いと云う理由のみから有用性においてマウスに勝ると考える事は早計であろう。むしろ次の如き種々なる理由からマウスの方が結核研究にはより適しているとも云えないことはない²⁾⁶⁾。即ち均一な実験結果を得るためには宿主側の条件も当然同一でなければならないが、この点マウスの方が比較的均一なものを揃え易いこと、安価であり且維持費が少なくて済むため統計的に意義のある頭数が得易いこと、結核の自然感染が恐らく皆無であること、調製の困難な薬剤が少量で足りることなどの利点を挙げ得る。しかしこれにも増して重要なことは今迄考えられて来た以上にマウスは人型及び牛型

結核菌に対して感受性が強い事⁵⁾⁴⁵⁾⁴⁶⁾、静脈内に感染せしめるならば殆んど一定の死亡日数を得ること、比較的大量の結核菌を接種することによつて短期間に致死結核症を惹起せしめ、迅速に実験成績を判定し得ることなど種々なる利点をマウスは具えている。

マウスの実験的結核症を基礎付けるためには、当然宿主側及び接種菌側の条件を充分分析吟味しなければならないが、この点に関する諸家の研究^{6)7)10)17)19)~21)26)27)31)} は極めて広汎に亘るものであり、宿主側の条件に関してはマウスの年令、体重、性、遺伝関係、更にはその飼料環境等について調べられて居り、接種菌側については培地による影響、各菌株による差、感染経路による差異等に関し詳細な検討がなされている。Youmans & Mc Carter⁵⁾ は screening test に初めてマウスを用いたが、その後 Raleigh & Youmans²⁾ はマウス結核症を論じた綜説において人型結核菌 H 37 Rv 感染による裏付けから種々の判定基準について言及し³⁾⁴⁾、Donovick 等⁶⁾⁷⁾⁸⁾ も同様に牛型菌 Ravenel 株を用いた広汎な基礎実験から彼等の標準法を発表している。この何れにおいても使用菌株には菌力の安定した代表的な保存菌株が用いられており、佐藤⁴⁷⁾ の云う様に接種菌側に立つてみると、新鮮分離菌を用いることは宿主に高い死亡率を与えると云う実験目的を満すことができるにしても、菌力の予期せぬ弱化和云う突発的な支障が起らないとは断言出来ない故に、感染実験にあつては安定した菌株を用いることは constant な再現性を期待する上に必要なことと思われる。

われわれはマウスの実験的結核症の基礎的研究を始めるに当つて、予防衛生研究所結核部より1956年9月分を得た牛型菌 Ravenel 株のマウスに対する毒力やその安定性を確めると共に如何なる感染菌量を用いれば雑系マウスにも均一な死亡分布をもたらすかについて検討する目的から感染マウスの生存期間を主目標にして本実験を試み

た。本邦にあつては感受性の高い純系マウスが未だ入手困難であり、且その上安定した強毒菌が得られない現状にあつたために、これまでは主として各臓器の定量培養が成績判定の基準¹³⁾¹⁶⁾¹⁷⁾²⁴⁾として用いられ生存期間の観察が行われるようになったのは比較的最近の事に属する^{14)18)39)~41)47)}。Ravenel 株では既に dd 系マウスを用いた佐藤⁴⁷⁾の実験があるが本実験において著者は、Ravenel 株を用いる限り敢えて入手困難な純系マウスを用いずとも、市販の雑系白色マウスによつて十分に均一な成績が得られる事を知つた。但しそれには感染菌量が適当量であることを要する。著者はマウスの生存日数を目標として感染菌量の適否を検討したので、ここにその成績を報告し度い。

実験材料及び実験方法

使用動物：市販の雑系白色マウス（一般に Swiss 系と称されている strain）で、すべて同一場所より購入したものである。全実験を通じ雄のみを用いた。体重は 13g より 25g までのものをえらび、第 1 表に示す如く体重差によつて 15g 前後、18g 前後、及び 20g 以上の 3 つに群別した。

使用培地及菌株：本実験を通じ培地は 1% KH₂PO₄ 鶏卵培地、菌株は予研結核部より分与された牛型菌 Ravenel 株を用いた。上記培地上に移植した Ravenel 株を便宜上原株と名付け（マウスを通過しない strain の意）これを 2 回マウスに継代してその肺よりそれぞれ通過 1 代菌株、通過 2 代菌株を分離した。

菌の感染：菌液調製は型の如く手振り法に従つたが、第 1 表に示す如き所定量を生理的食塩水 0.2 cc に浮游せ

第 1 表 実験の概要

接種菌	群別	接種菌量とその生菌単位	使用動物頭数	接種時動物体重の幅とその平均
原株	1群	3.0 : 19.2 × 10 ⁷	14	14.0 ~ 17.8 : 15.4
	2群	1.0 : 6.4 × 10 ⁷	13	14.4 ~ 17.5 : 15.4
	3群	0.5 : 1.3 × 10 ⁷	13	13.5 ~ 18.1 : 15.4
	4群	0.1 : 6.4 × 10 ⁶	14	13.1 ~ 16.8 : 14.3
一代通過菌株	11群	1.0 : 7.2 × 10 ⁷	13	13.1 ~ 16.8 : 15.7
	12群	1.0 : "	17	16.7 ~ 19.4 : 18.6
	13群	1.0 : "	8	20.7 ~ 23.5 : 21.3
	14群	0.5 : 3.6 × 10 ⁷	14	16.2 ~ 19.7 : 18.6
	15群	1.0 : ——*	12	14.3 ~ 17.7 : 15.7
	16群	1.0 : ——*	10	13.0 ~ 16.3 : 14.2
二菌代通過株	21群	1.0 : 4.8 × 10 ⁷	13	13.0 ~ 17.5 : 16.0
	22群	0.1 : 4.8 × 10 ⁶	12	13.3 ~ 16.9 : 14.9

* : 生菌単位の測定は行わない

しめる様に作製し、之をマウスの尾静脈より感染せしめた。

マウスの群別、各群の接種菌量、体重等は第 1 表に一括して示した。

生存日数の観察：正規確率紙及び対数正規確率紙上に得られた time per cent mortality curve を比較することによつて行つたが、更にこれらより得られた median survival time (夫々 T₅₀, ET₅₀) と平均生存日数及生存日数中央値 (最短生存日数と最長生存日数との間の中央にある日数) との関係と比較検討した。

各マウスは菌接種後隔週に体重を測定し、各群別平均体重を算出した。

実験成績

第 1 表の実験計画に従つてそれぞれの菌量を接種した各群のマウスにつき確率紙から ET₅₀、及び T₅₀ を求めたが、その成績は第 1 図から第 5 図までに示した。これらの図から読んだ ET₅₀ (正規対数確率紙)、T₅₀ (正規確率紙) の値と、平均生存日数、生存日数中央値、及び生存日数の幅を群別にまとめたものが第 2 表である。

第 2 表 各群マウスの生存日数

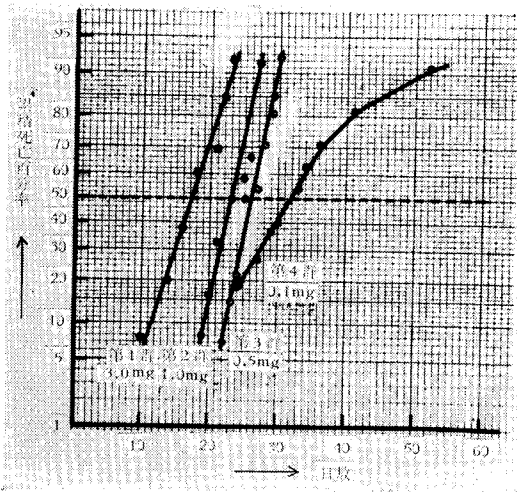
実験群 (接種菌量(mg)/ 平均体重(g))	ET ₅₀	T ₅₀	平均生存日数	生存日数中央値	生存日数の幅
1群(3.0/15.4)*	17	17.3	18.6	18.5	10~25
2群(1.0/15.4)	23	23	24.1	23	19~32
3群(0.5/15.4)	26	26	27.8	27	22~42
4群(0.1/14.3)	32	31.5	36.0	33.5	24~54
11群(1.0/15.7)	19.5	—**	24.3	23	13~29
12群(1.0/18.6)	27	—	27.5	26.5	19~35
13群(1.0/21.3)	28	—	28.4	29	22~33
14群(0.5/18.6)	26	—	29.4	28	20~41
15群(1.0/15.7)	18.3	—	19.6	20	14~25
16群(1.0/14.2)	23	—	23.7	23	18~29
21群(1.0/16.0)	22	21.7	22.5	22.5	18~27
22群(0.1/14.9)	26	27	28.2	28	16~53

* : 1 群中 1 頭は感染後 6 日目に死亡したが特徴的な病変を認めなかつたので除外した。

** : T₅₀ 値は算出せず

1) 原株接種：マウスにおける生存日数の観察。1 体重 15g 前後のマウスを第 1 表の如く 4 群に分ち (第 1 ~ 4 群) それぞれ 3 mg, 1 mg, 0.5 mg, 0.1 mg, の Ravenel 株を静脈内に感染せしめた。第 1 図に示す如く第 1 群から第 3 群までは正規確率紙上に plot したマウスの累積

第1図 正規確率紙上における原株接種マウスの累積死亡分布



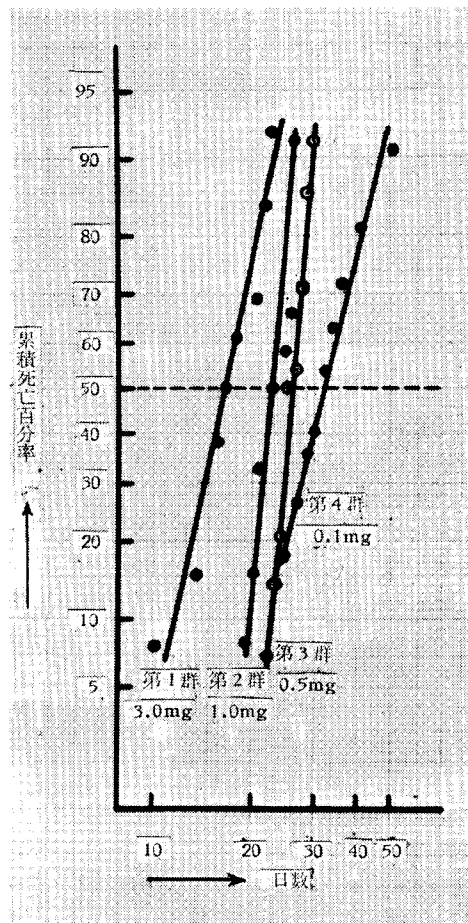
死亡分布が直線をなしたが、0.1 mg を接種した第4群のみは 70% mortality を越えると明かに deviation を来たし正規分布より脱れる事が分つた。同じ data を正規対数確率紙 (横軸が logarithmic scale) に plot したものが第2図で、同じく第3群までは直線関係が得られている。第4群になると依然 plot せる各点は曲線上に並んだが、この間に直線を引くことは正規確率紙に比較すると容易であつた。求められた median survival time は対数確率紙を用いた場合 (ET₅₀) も正規確率紙を用いた場合 (T₅₀) もその値に殆んど変りはなかつたが (第2表) 前者を用いれば、図から簡単に 95% 信頼限界及び standard deviation を求め得ると云う利点がある。

尚感染菌量が 3 mg 及び 1 mg である場合は、マウスの全数が 5 週以内に死亡したが 0.5 mg 接種群では生存日数の幅が稍大となり 0.1 mg 接種群は最後の 1 頭が 54 日に至るまで死亡しなかつた。

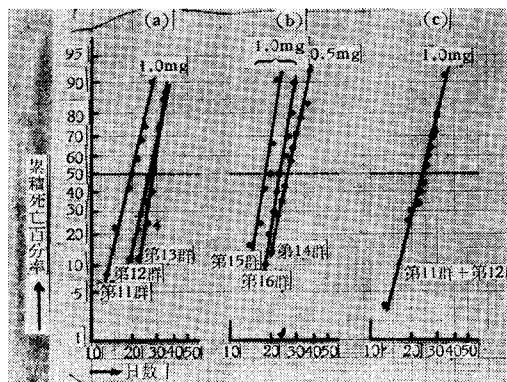
この結果から観察期間を 30 日前後とするためには 1 mg 前後の菌量を接種する必要があると考えられたので、以下の実験は一先ずこの量为目标として行つた。

2) 通過1代菌株による観察: 体重を異にする3つの群即ち第11群 (体重 15g 前後), 第12群 (18g 前後), 及び第13群 (20g 以上) に対し、同じ量の菌 1 mg を接種した場合の累積死亡分布を第3図 (a) に示した。何れの群もマウスの死亡は直線をもつて表わすことが出来る。接種時の体重が大きい群程 median survival time は延長していたが、3群共に5週以内に全動物が死亡していた。第3図 (b) の第15及び第16の2群は再び 15g 前

第2図 対数正規確率紙上に於ける原株接種マウスの累積死亡分布



第3図 対数正規確率紙上に於ける通過代菌株接種マウスの累積死亡分布

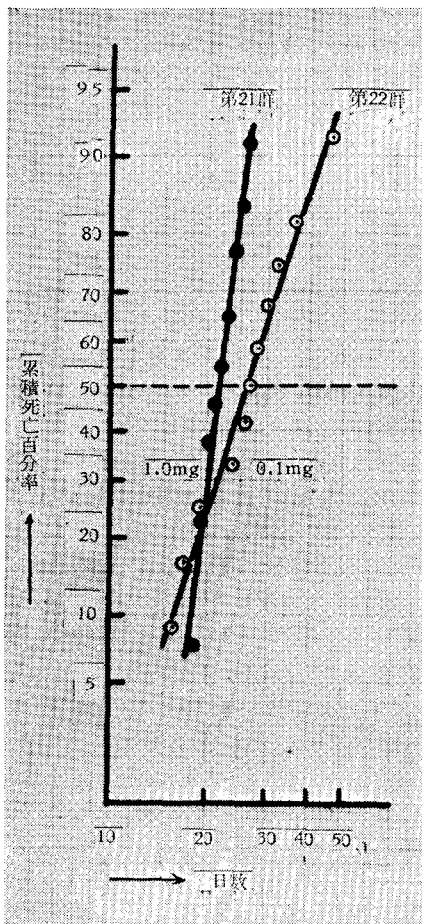


後のマウスを用い接種量 1 mg に対する累積死亡率の均一性を確かめたものであるが、感染菌は互に異つたマウスより得たものを用い、又菌液調製も別個に行つた（生菌単位の測定は行つていない）得たる結果は上述と同じくマウスの死亡分布は他の 1 mg 接種群と全く変るところはなかつた。第 14 群は 18g 前後のマウスに対し 0.5 mg を接種したものでこの場合にも均一な結果を得たが、最長生存日数は尚 40 日を越してゐた。

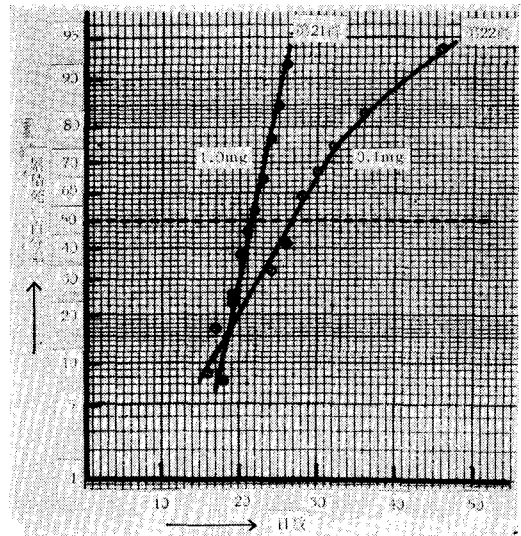
以上述べた均一性を更に確かめるべく、体重を異にする第 11 群と第 12 群の成績を併せてその死亡分布を plot して見た。第 3 図 (C) がその結果である。この場合体重の幅は 13g から 20g までの範囲に広がつたが、やはり死亡分布は直線を以て表わすことが出来、この範囲においても成績が均一であることを示していた。

3) 通過 2 代菌株による観察：第 4 図及び第 5 図に示した如く、1 mg 接種群の均一性は更に良く再現されてい

第 4 図 対数正規確率紙上に於ける通過 2 代菌株接種マウスの累積死亡分布



第 5 図 正規確率紙上における通過 2 代菌株接種マウスの累積死亡分布



た。

体重 15g 前後の第 22 群には再び 0.1 mg の菌量に感染せしめて見たが得たる成績は原株の場合と全く同じでマウス通過による菌力の上昇は認められなかつた。しかし正規確率紙上（第 5 図）において deviation が起り始めるのは 80% mortality を越えてからの事で、而も原株に較べれば各プロットは幾分直線に近い線を描いていた。

4) マウスの体重の推移：各群の平均体重の増減は第 3 表に記した。一般に菌感染後平均体重は漸次減少して行つたが、初めの 1 週間においては、さほど著明ではなく中

第 3 表 各群の平均体重の推移

実験群	接種菌量 (mg) / 平均体重 (g)	1 週	2 週	3 週	4 週	5 週
1 群	3.0/15.4	(±) -0.3	(±) -1.6	(±) -2.6	(±)	(±)
2 "	1.0/15.4	-0.3	-0.2	-0.7	-2.1	
3 "	0.5/15.4	+0.1	-0.5	-1.1	-1.4	-2.2
4 "	0.1/14.8	-0.2	-0.4	-1.7	-2.0	-2.6
11 "	1.0/15.7	-1.0	-1.6	-2.7		
12 "	1.0/18.6	-0.5	-2.0	-5.2	-5.1	
13 "	1.0/21.3	-2.3	-3.4	-5.4	-6.3	
14 "	0.5/18.6	-0.2	-1.1	-2.1	-3.1	
15 "	1.0/15.7	-0.7	-2.0	-3.2		
16 "	1.0/14.2	-0.2	-0.5	-0.8		
21 "	1.0/16.0	+0.8	-0.7	-3.5		
22 "	0.1/14.9	-1.1	-1.3	-1.7	-2.1	-2.4

には増加したのもあつた。しかし2週間を越えると何れのマウスにも例外なく急激な体重減少が見られた。又感染時体重が大きいもの程この減少は甚だしく、1週間目でかなりの減少を見たのが多かつた。

個々のマウスの死亡時体重は略々 11 g 前後であつたが、10 g 以下になつて初めて死亡するものもあり 14 g 前後の体重で死亡するものもあつた。又死亡時体重は接種時体重と必ずしも並行していなかつた。

5) 臓器病変の観察：以上のマウスは第1群の1頭のみが接種6日後何等特徴的な病変を認める事なしに斃死したのを除けばすべて肉眼的に結核性の病変が認められた。肺ではその殆んど全表面に結核結節が観察された。この結節は深紅色の肺実質中に鮮やかな黄白色を呈して肺全体を埋め尽し、或は孤立し、或は癒合して乾酪化を聯想させるものもあつた。この様な結節の大部分は周囲の組織より隆起していなかつたが、之とは別な形で明らかに隆起した結節を認めるマウスもあつた。このようなものでは灰白色の透明な感じを与える結節が大小入り混つて散在し、殆んど互に癒合していない様であつた。肺実質の外観は貧血性の浅い紅色を示すものから出血と思われる程の暗赤色を呈しているものまで色々なものが見られた。又すべての死亡マウスにおいて、肺病変と共に胸膜、気管、更には心膜に至る迄多数の結節を認めた。

肝には数個の小結節が散在する程度で、これを全く認めないものもあり、脾は明らかに増大を示してはいたが結節は必ずしも認められなかつた。腎は肉眼的に全く病変を認めなかつた。

総括並びに考按

最近になつて結核の治療や免疫に関する実験にマウスの用いられる頻度が増して来たのは、緒言で述べた如き種々の利点があるからであるが、およそ実験動物として最も必要な条件は一定の観察期間内に感染した動物の殆んど全数が死亡すること、その死亡の分布が均一であること、及び得たる成績が再現性に富むことの3つであろう。

我々の得た成績から牛型菌 Ravenel 株 1 mg を接種されたマウスは略々上記の条件を満足している様に思えた。以下これについて検討してみたい。

菌量 0.1 mg 接種群は2群(4群及び22群)共正規確率紙上においてマウスの死亡率と生存日数との間に直線関係が認められず、何れの群も直線より外れた deviation を示し、且生存日数の幅が非常に広くなつている。生存日数の延長が見られたマウスは全マウスの僅か1割に満たなかつたが、第2表に示した如く最後の1頭は両群共50日を越して生存していた。これは恐らくマウス個々の感受性

の差とか後述する如く接種時の体重差が少量の菌感染によつてかなり明瞭に表現されたのかも知れないし、或いは Martin⁴⁸⁾ の云う様に小量菌接種によつてマウスの抵抗力が急速に増大したためかも知れない。しかし何れにせよ感染に対するマウスの反応が均一でない意味に於て 0.1 mg を攻撃感染量として選ぶことは不適當と云うべきである。この実験に用いた Ravenel 株は分離以来 40 年を閲しているの、その菌力がかかる長期間の継代中に殆んど固定してしまつたものと見て良いが、それでもなお今後の保存によつて菌の毒力が多少なりとも衰退しないとは云えないし、又一部にS型の解離が起らぬとも限らない。Saeng and Costil⁴⁹⁾ の報告を俟つまでもなく rough 型はマウスに対して smooth 型より病原性の強いことが知られており、実際に Mc Kee⁶⁾ 等はマウス感染菌として rough 型のみを用いている。従つて我々の得た Ravenel 株をこれから 1% KH₂ PO₄ 鶏卵培地に継代して行く上にどれだけ菌力の安定が保証されるかは断定出来ない。それでこの様な意味からも、0.5 mg 接種群のマウスは感染後30日迄にその 92% が死亡しその死亡分布は何れも正規型を示していたがなお残り約8%はこれから外れており、マウス死亡の均一性という目標に対して多少の難点が無いとは云えない。これに反し接種菌量 1 mg の場合には 15 g 前後、18 g 前後及び 20 g 以上と接種時の体重が異なる群において、この順に僅かづつ ET₅₀ は延長していたが、何れも5週間以内にその 100% が死亡し且死亡率と生存日数との関係は美事な直線で示されていた。しかし 20 g 以上のマウスは頭数も少なく又体重も高々 24 g 迄のものしか用いていなかつたので一応除外するとしても、体重を異にする第11群第12群の data を合せた 13 g から 20 g 迄に至る広い範囲についてその死亡率をプロットした第3図(C)が完全に直線を示していることは如何にこの場合の死亡分布が均一であるかを示すものであろう。一般にモルモットでは年齢による感受性の差はそれ程著明ではない様であるが⁵⁰⁾ マウスではかなりの差があるらしい³¹⁾。しかし感染経路を静脈内を選ぶと、或る限られた年齢範囲では略々一定した死亡日数が得られている⁶⁾⁻⁸⁾¹⁴⁾¹⁸⁾⁴⁷⁾⁵¹⁾。著者の用いた市販の所謂雑系白色マウスでは年齢が明示されていないが、発育の途上にあつて体重の増加はなお認められたものばかりであり、又一般に或る一定の体重に至る迄は年齢と体重とは略々並行しているから体重について死亡率を検討する事も年齢について検討することもこの場合同様に考えて良からう。15 g 前後のマウスを用いた場合は生存日数の幅が10日前後であり、更に接種時体重の差を縮小させれば信頼度がそれだけ高まるものと推察される。Donovick 等⁷⁾ は4乃至6週(14 g 乃至 18 g)までのマウスについてのそ

の死亡が殆んど均一であつたのを見ているが、著者の実験においては更にこれより広範囲の 13g から 20g までのマウスが 1mg の Ravenel 株に対し均一な死亡分布を示した。この事は免疫実験の如く、途中で group 間に体重の差が出て来る場合にも、ある程度までの体重の開きは死亡分布の均一性において無視し得べき事を示すもので、実際上の意義は甚だ大きい。

20g 以下のマウスに対し 1mg の Ravenel 株を静脈内感染せしめた場合、median survival time が 20 日前後の値をとることは佐藤⁴⁸⁾ も dd 系マウスについて発表しているが彼我の data には殆んど差がなく所謂雑系白色マウスの感受性は dd 系マウスのそれとさして変りはないのでないかとさえ思えた。彼我の比較は兎も角として、これまで見て来た実験成績から見れば、少くも Ravenel 株を攻撃菌として用いる限り、結核の研究に高価な純系マウスを使用する必要はない。雑系マウスによつても十分に一にして且再現性に富む成績を期待し得るからである。

静脈内感染量と死亡日数に関して文献を尋ねてみると Donovanick⁶⁸⁾ 等は Ravenel 株の 10^5 の order の菌量で CF1 マウスに対して 20 日前後の T_{50} を得、Dudos 等⁵³⁾ も Rockefeller Institute Swiss albins 株に対し牛型菌株 MV を用いて (菌量は per cc 10^7 order のもの 0.2 cc で前者より多いが) 同じく 20 日前後の値を得ており、又人型菌 H₃₇ Rv 株について Youmans 等⁵¹⁾ の行つた実験では Strong A 株に 0.5 mg を感染した場合の ET_{50} は 17 日であつた。一方染谷¹⁸⁾ は 063 又は TC50 (共に牛型菌) を 0.1 mg 乃至 0.5 mg 感染せしめた C57 black/6 株マウスにおいて 5 週以内に全動物の死亡を見、又水之江¹⁴⁾ は市販の白色マウスに対して人型菌黒野株 0.1 mg を感染せしめ TD_{50} の値 19 日を得ている。これ等の間の接種菌量は極めて区々であり、加えて感染菌株の差違も当然加わるであろうから上の値が果してマウスの感受性を示すものか或いは菌力の差を示すものかは明瞭ではないが、何れにせよ使用動物の大半を 30 日位で斃死させるには大体湿潤量にして 0.1 mg から 1 mg 迄の菌量が用いられている様である。われわれの行つた 1 mg (10^7 の order) はかなりの大量ではあつたが、マウスの感受性及びその死亡の均一性と云う意味からは当然の必要量と思われる。但し 0.5 mg を用いた場合にも、接種時体重 20g 迄のマウスでは感染後 30 日迄にその 92% が死亡し、最長生存日数は高々 6 週に過ぎず、而も均一な死亡分布を得てはいるがこの量ではまだ多少の難点がある事は既に吟味したところである。

マウスを再度通過しその肺より復元した Ravenel 株の菌力は 1 mg を接種した実験において殆んど原株と変つ

ていないように思われた。即ち生存日数の幅に関しては原株よりは 1 代、1 代よりは 2 代とマウス通過を重ねるにつれそれぞれ 16 日、12 日、10 日と短縮するのが見られ、従つてかなり均一性が増して信頼度が大にはなつたが、その ET_{50} の間には差を認め得なかつた。接種菌量 0.1 mg の場合については原株と 2 代通過菌株の菌力を比較すると、 ET_{50} は夫々 32 日及び 26 日で而も正規確率紙上において 2 代通過菌株による死亡分布は正規型に近き deviation が少くなつた点、稍々毒力が増強した様に思えた。このことから少量菌感染の場合にはマウス体内に於ける増殖能力の差がより良く表現されるのでないかと云う事も一応考える必要がある。死亡分布の均一性を犠牲にすれば少量菌感染によつてマウスの strain による感受性の差²⁹⁾ や免疫の程度^{33)~35)} 等がある程度詳細に分析し得る可能性があるから、適量菌感染による観察と相俟つて実験成績を広く検討することが最も良いと思われる。我々は僅かに 2 回の通過しか行つていないので未だ充分ではなかつたが、我々の用いた Ravenel 株は殆んど一定した毒力を保持している為か、通過による毒力の増強は僅かに窺い知る程度であつた。しかし Pierce 等²⁶⁾ Mc Kee 等⁶⁾ Browning 等⁵²⁾ 及び水之江などがマウス通過によつて結核菌の毒力が或る程度増強したことを報告している様に、接種菌の毒力を増強しこれを維持して行く意味に於てマウスを通過して行くことは決して意義がないとは云えない。

各群の平均体重の推移を見ると、感染後体重は減少する一方であるが、接種菌量との間に殆んど関係は認められずむしろ接種時体重が大である程減少は著明であつた。個々のマウスの死亡時体重と死亡期間とは略々並行関係が認められたが、同一群中のマウスにおいて必ずしも体重減少の著しいものが早期に斃死するとは限らず、かなりの体重を保つているものが先に死ぬ場合も少くなかつた。結核感染実験に於てマウスの平均体重を比較する方法は屢々用いられているが⁴⁷⁾、これのみを判定の根拠とすることは不適當で単に附加的な意義を置き得るに過ぎないであろう。

さて Bliss⁵³⁾ は種々の生物学的 data に於て、算定された time-mortality curve と、mortality をプロットにとり log time に対してプロットすることによつて図表上に得た curve とが非常に一致していることを報告した。Litchfield⁵⁴⁾ は更にこれを簡単化し、この様な曲線は実験で得た死亡率をその儘 probability scale 上にとり、logarithmic scale 上の time に対してプロットすることによつて容易に得らるること、しかもその median survival time の信頼限界は Nomograph によつて、極めて簡単に得られることを発表した。この点については Youmans and Youmans,⁵¹⁾ 及びわれわれの教室における

新明⁵⁶⁾などの検討があるので稿を避けるが、Donovick等⁷⁾はBlissのgraphic solutionを検討し、死亡率をlogarithmic scale上にとる事については、これによつて(probitを用いることに相当する)timeをarithmetic scaleにとつた場合よりも得られた直線の性状を格別良くはしなかつたし、又両者で得られたmedian survival timeにも大差を認めなかつたとして正規確率紙のみを用いて実験を観察している。実際われわれも原株と2代通過菌株との場合に死亡率をarithmetic scale上のtimeに対してプロットしてみたが、1mg接種群は何れも直線を示しlogarithmic scale上にtimeをとつた場合と大差はなくその50% mortalityも両者に殆んど差違がなかつた。しかし一方、正規確率紙上で明らかにdeviationを認め従つて正規型から外れた死亡分布を示していると考えられる0.1mg接種群では死亡日数をlogarithmic scale上にとることによつて略々直線関係が得られるようになった。

生存日数の比較には50%生存日数を求める以外にその平均値や中央値等が用いられているが、之等の値の間には大きな開きはない様であつた(第2表)。しかし感染菌量が少くなる程50%生存日数と平均生存日数や中央値との差は開いている。このことはRake⁸⁾等⁹⁾も云つている様に、生存日数の幅が広くなり最後の少数が並外れて長く生存している様な場合には、平均値や中央値を用いることは特に誤差を伴う危険があるし、事実短期間の観察は不可能になつて来る。median survival timeを求める場合には観察期間は短くても可能であり、60%乃至70%の死亡率を得れば充分これを推定出来る利点がある。

治療実験や免疫実験などの様に対照動物と処置動物とが異つた場で比較される場合にはtime-mortality curveを求めることは特に精度が高くなるであろうし、実際に動物の死亡とその時期との関係を観察する様な実験では死亡の分布が対数正規型をとることが多いから、対数正規確率紙を用いることによつて比較検討することが妥当であると思われる。かく見ればこのgraph上に50%死亡日数(ET₅₀)を求める方法は、その信頼限界が簡単に算出出来る利点もあつて⁵⁴⁾極めて利用価値に富んだ方法と云う事が出来る。

さて最後に、マウスの実験的結核症に於いて比較の基準となるのは感染マウスの生存期間、諸臓器内菌の定量培養及びその病理所見の3つを調べることが主であるが、Raleigh & Youmans⁴⁾は化学療法剤の効果判定に當つて生存日数、体重の変化、病理組織学的所見を基準にして検討し、特に病理組織学的変化に関しては薬剤の毒性等によつてマウスの死亡が早められることもあるのでこれを除

外することは出来ないとしている。本報ではこの様な判定基準について論及すべきdataは持合せていないので、近く発表するマウスの免疫実験⁵⁶⁾において検討したいと思う。しかし染谷¹⁶⁾はスクリーニングテストにマウスを用いる場合、病理所見は客観性を欠き又定量培養は煩雑さを免れないから、簡単で而も主観の入る余地のない生存期間の観察が最も推奨されると述べている。同様にRake⁸⁾、Malone¹⁰⁾、Martin⁴⁸⁾なども生存期間の検討のみを以て薬剤効果の判定を行つている。生存日数以外に定量培養、病理所見等を組合せている研究者^{4)5)11)14)15)32)~34)38)~40)}は多い。しかし我々が得た結果から見てマウスは結核菌に対し極めて均一な反応を示しているし、動物体内の菌の増殖状態が結局動物の死亡と關聯性を有しているなら⁵¹⁾⁵⁵⁾、死亡期間を目標にして感染実験を行うことはむしろ定量培養に勝つてゐるのではないかと考えられる。

結 論

牛型結核菌Ravenel株の静脈内感染による雑系白色マウスの生存日数を観察することによつて次の如き結論を得た。

1) 体重13g乃至20g迄のマウスは接種菌量1mgに対して最も均一な反応を示し、感染後5週以内に全動物が死亡した。従つてChallenge testに用いられる菌量としては1mgが最も適当と考えられる。その際のET₅₀(50%死亡日数)は20日前後であつた。

2) 少くもRavenel株の適当量を用いる限り、結核の実験において特に入手困難な純系マウスを使用する必要はなく、雑系マウスによつても十分均一にして且再現性に富む成績を期待し得る。

3) マウス通過による菌力の増強は2代目迄の通過では僅かに認められる程度であつた。しかしマウス通過によつて死亡の均一性は増すようになり、従つて信頼性は高まる。

4) マウスの感染後の体重減少は必ずしも死亡の時期とは関係がない様であつた。

5) 治療実験や免疫実験などにおいて50%死亡日数の算定には正規確率紙よりも正規対数確率紙を用いた方が良いと考えられる。

引 用 文 献

- 1) Koch, R.: Die Aetiologie & Tuberkulose Mitteil Kaiserl. Gesundh 2. 1884
- 2) Raleigh, G. W. and Youmans, G. P.: J. Inf. Dis. 52, 197, 1948
- 3) Raleigh, G. W. and Youmans, G. P.: ibid. 82, 295,

- 1948
- 4) Raleigh, G.W. and Youmans, G.P. : *ibid.* 82, 221, 1948
- 5) Youmans, G.P. and Mc Carter, J.C. : *Am. Rev. Tuberc.* 52, 432, 1945
- 6) Mc Kee, M. et al : *Am. Rev. Tuberc.* 60, 90, 1949
- 7) Donovick, R. et al : *Am. Rev. Tuberc.* 60, 109, 1949
- 8) Rake, G. et al : *Am. Rev. Tuberc.* 60, 121, 1949
- 9) Baker, M. J. et al : *Ann. New York Acad. Sci.* 52, 678, 1949
- 10) Malone, L. et al : *Am. Rev. Tuberc.* 65, 511, 1952
- 11) Ilavsky, J. : *Am. Rev. Tuberc.* 69, 280, 1954
- 12) Youmans, G. P. and Youmans, A. S. : *Am. Rev. Tuberc.* 64, 541, 1951
- 13) 岩崎竜郎, 小川辰次 : *結核* 24, 173, 1952
- 14) 水之江公英 : *日本細菌学雑誌* 7, 293, 1952
- 15) Solotorovsky, M. et al : *Am. Rev. Tuberc.* 70, 806, 1954
- 15) 柳沢謙 : *結核の臨床* 2, 601, 1954
- 17) 加藤允彦 : *医学と生物学* 32, 314, 1954
- 18) 染谷四郎他 : *日本臨床結核* 15, 28, 1956
- 19) Pierce, C.H. et al : *J. Exp. Med.* 97, 189, 1953
- 20) 水之江公英 : *日本細菌学雑誌* 7, 195, 1952
- 21) 水之江公英 : *日本細菌学雑誌* 7, 199, 1952
- 22) 加藤允彦他 : *医学と生物学* 34, 161, 1955
- 23) 加藤允彦他 : *医学と生物学* 34, 212, 1955
- 24) 加藤允彦他 : *医学と生物学* 35, 81, 1955
- 25) 染谷四郎他 : *日本細菌学雑誌* 5, 177, 1950
- 26) Pierce, C. et al : *J. Exp. Med.* 86, 159, 1947
- 27) Dubos, R.J. : *J. Exp. Med.* 101, 59, 1955
- 28) Youmans, G. P. and Youmans, A.S. : *Am. Rev. Tuberc.* 69, 790, 1954
- 29) Tabeyi, K. (田部井 和) et al : *Kobe J. Med. Sci.* 1, 257, 1954
- 30) 染谷四郎他 : *実験動物集報* 4, 65, 1955
- 31) Uesaka, I. (上坂一郎) et al : *Jap. J. Tuberc.* 4, 64, 1956
- 32) Dubos, R.J. et al : *J. Exp. Med.* 97, 207, 1953
- 33) Dubos, R.J. et al : *J. Exp. Med.* 97, 221, 1953
- 34) Weiss, W. and Dubas, R. J. : *J. Exp. Med.* 101, 313, 1956
- 35) Weiss, W. and Dubos, R. J. : *J. Exp. Med.* 103, 73, 1956
- 36) Youmans, G. P. et al : *J. Bact.* 70, 557, 1955
- 37) Levaditi, C. et Vaisman, A. : *Compt. Rend. Soc. Biol.* 143, 312, 1949
- 38) Siebeumann, C.O. : *J. Immunol.* 67, 137, 1951
- 39) 阿部逸夫 : *結核* 28, 374, 1953
- 40) 阿部逸夫 : *結核* 28, 423, 1953
- 41) 石原定次 : *結核* 31, 22, 1956
- 42) Francis, J. : *Nature* 175, 344, 1955
- 43) Gray, D. F. et al : *Am. Rev. Tuberc.* 69, 92, 1954
- 44) Feldman, W.H. and Hinshaw, H. C. : *Am. Rev. Tuberc.* 51, 582, 1945
- 45) Long, E.R. and Vogt, A.B. : *Am. Rev. Tuberc.* 44, 196, 1941
- 46) Gunn, F.D. et al : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 31, 527, 1934
- 47) 佐藤直行 : *医学と生物学* 37, 43, 1955
- 48) Martin, A.R. : *J. Path. & Bact.* 58, 580, 1946
- 49) Saeng, A. and Costil, L. : *Compt. Rend. Soc. Biol.* 116, 836, 1934
- 50) Duca, C.J. : *Am. Rev. Tuberc.* 57, 389, 1948
- 51) Youmans, G.P. and Youmans, A.S. : *Am. Rev. Tuberc.* 64, 534, 1951
- 52) Browning, C.H. et al : *J. Hyg.* 25, 323, 1926
- 53) Bliss, C.I. : *Am. Applied. Biol.* 24, 815, 1937
- 54) Litchfield, J.T. : *J. Pharmacol. & Exp. Therap.* 97, 399, 1949
- 55) 新明美仁 : *結核の研究* 3, 63, 1955
- 56) 信太隆夫他 : *結核の研究*