



Title	結核感染臓器の組織培養による結核菌の毒力測定
Author(s)	小野, 英夫; ONO, Hideo; 小野寺, 忠純 他
Description	
Citation	結核の研究, 12, 1-14
Issue Date	1960-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26685
Type	departmental bulletin paper
File Information	12_P1-14.pdf



.....
原 著

結核感染臓器の組織培養による結核菌の毒力測定*

小野 英夫・小野寺忠純・桑 島 核・深 江 肇

(国立療養所旭川病院)

望 月 孝 二

(国立北海道第二療養所)

有 島 純・山 本 健 一

(北海道大学結核研究所予防部 主任 高橋義夫教授)

(昭和 34 年 11 月 30 日受付)

緒 言

結核菌の毒力が菌株によつて異なることはよく知られているが、毒力の測定には従来結核感受性動物における菌の侵襲性、増殖性あるいは滞留性の差をしらべる方法がとられている。動物としては、モルモット、ウサギ、マウス、ハムスター等が多く用いられているが、この中モルモットは結核に比較的感受性が高いところから最も数多く使用されており、試験方法としては種々の経路から菌接種後、各臓器内の菌の消長をしらべるか、または一定期間後に剖検して肉眼的ならびに病理組織学的検査をおこなうのが普通である¹⁾。なおまたモルモットの脳内接種法²⁻⁴⁾、あるいは皮内接種法⁵⁾も試みられており、前者では、未だこの動物の純系がえ難い吾国の現状でも、接種後の生存日数からかなり正確に毒力を測定しうる点で、また後者では、接種局所の病変の強弱で毒力を比較するという操作の簡便さの点で有利な方法と考えられる。モルモットについてマウスは近年結核の実験に広く用いられて来ているが、とくに結核に比較的鋭敏な純系のもので生産され始めた結果、菌感染後の生存日数の判定⁶⁾により、また体内での菌の増殖性⁷⁻¹⁰⁾乃至病変の検索によつて毒力測定が容易になされるようになった。

しかしいづれにせよ、これら動物接種による方法には相当数の動物と成績の判定までに十数日から数ヶ月を要するという不便が伴う。そこでこのような難点を改良する意味で今迄多くの *in vitro* の測定法が考案され、結核

菌の種々の酵素の活性度を比較して測定しようとする方法¹¹⁻¹⁵⁾、中性紅^{16,17)}あるいはナイル青^{18,19)}のような色素を用いる細胞化学的方法、あるいはまた菌集落上の菌体の配列状態を観察する形態学的方法²⁰⁻²⁵⁾が報告されている。しかしこれらの方法は操作が簡単、かつ成績判定が短時間でなされうる利点があるにせよ、極めて大まかな毒力鑑別しかなしえないことが多くの研究者により認められている。なおわれわれが以下述べようとする組織培養法に関しては、既に孵化鶏卵接種法²⁶⁾があげられるが、われわれの追試した限りでは、その鋭敏さを欠く点で適当な方法とは考え難い。

今回われわれは結核菌感染モルモットの脾を組織培養し、組織細胞との共存下で菌の増殖状態が毒力に極めて密接に関係している事を認めたので、この方法が結核菌の毒力測定法として利用しうるかどうかについて詳細に検討してみた。

実 験 例

実験 1 組織培養における結核菌の増殖性と菌毒力との関係

結核菌浮遊液をモルモットの静脈内に接種し、1週間前後に脾の細胞浮遊液を作り、組織培養をおこない、組織細胞と共に菌が如何なる状態で増殖するかをしらべた。

実験材料ならびに実験方法

使用した菌株は、ヒト型毒力菌として H₃₇Rv 株、H₃₇Rv INH 耐性株 (以下 INH 感性株と耐性株はそれぞれ INH-S 株、INH-R 株と略す)、仲野株、向井

* 本論文要旨は第 34 回日本結核病学会 (1959 年) 及び第 39 回北海道医学会 (1959 年) に分けて発表した。

INH-S 株, 同じく INH-R 株, 水木 INH-S 株, 同じく INH-R 株, ヒト型弱毒菌として H₃₇Ra 株, ウシ型毒力菌三輪株, および BCG の 10 株である。この中, 仲野株, 向井株および水木株は患者から分離された強毒株で, 向井 INH-R 株²⁷⁾と水木 INH-R 株²⁷⁾は INH 未使用の患者から one step で分離され, 現在 INH 100 γ に完全耐性を持ち, いずれもカタラーゼ陰性が立証されているが, モルモットに対する毒力試験では, 向井 INH-R 株は極めて弱毒であり, 一方水木 INH-R 株は親株にほぼ等しい毒力をもつことが確かめられている。

これらの各菌株を Dubos の Tween-albumin 培地に接種し, 37°C に約 10 日培養した均等菌液を 0.5 ml ずつ体重約 500 g のモルモットに後肢静脈より注射した。注射直後, 2, 5, 7, 10 および 14 日後に 3 匹ずつ動物をエーテルで殺し, 脾を無菌的に取出し, その約 0.5 g を組織培養に供し, 同時に残りの脾, 肝, 肺および門脈リンパ節をとって各臓器内の生菌数を 1% 酸性小川培地をもちいて定量的に測定した。なお組織培養は実験の都合上, 接種直後, 5 日および 10 日後の脾について実施した。

組織培養にもちいた培養液は, ニワトリ胎児 (培養 9 日目のもの) の抽出液 (0.6 ml), 健康馬血清 (0.6 ml) およびタイロッド液 (0.8 ml) からなり, これらを径 18 mm, 長さ 85 mm の試験管に分注した。

組織培養は, 脾約 0.5 g を容量 50 ml の遠沈管にとり, ただちに子宮剪刀で細切し, これに per ml 200 単位トリプシンをくわえたタイロッド液 (但し Ca と Mg を含まないもの) 6 ml, これを水晶球入り三角コルベン (100 ml 入り) にとつて 37°C のフラン器内に 30 分間放置, その間 5 分毎に振盪した。ついでこの組織懸濁液を 2000 r. p. m., 10 分間遠沈し, ほぼ中間層の部分約 1 ml をとり, これをタイロッド液で 2 回遠沈洗滌した後, 10 ml のタイロッド液に再浮遊し, ついで 80 および 150 メッシュを通して粗大な組織片を除いて所要の細胞浮遊液とした。

別に上記の培養液 2 ml の入った試験管にあらかじめ被いガラスを入れて置き, これに前述の脾細胞浮遊液を 1 ml ずつくわえ, ゴムキャップをした後, 約 10° の傾斜を保つて 37°C のフラン器に置いた。

培養 1 日および 3 日後に被いガラスをとり, メタノールで固定, チール・ネールセン法で染色し, 検鏡して 100 視野に見出される菌数の平均値を算出した。なお菌数の算定に際して接種時の小菌塊, 培養後のコード形成のものをも 1 菌単位と見做した。別に対照として, 37°C に培養せず室温 1 日放置の試料についても同様に菌数を求めた。

実験成績

菌静注後脾の組織培養における菌の消長を表 1 および図 1 に示した。すなわち接種直後と 5 日および 10 日後の脾についての組織培養 24 および 72 時間の成績である。これによつて明かなことは, 毒力の強いヒト型仲野株, H₃₇Rv 株, 向井 INH-S 株, 水木 INH-S 株, およびウシ型三輪株では菌接種直後の試料でも, また 5 日後, 10 日後のものでもすべて菌増殖が極めて旺盛で, 菌数の増加率が大きいこと, これに比して弱毒菌たる BCG, H₃₇Ra 株, H₃₇Rv INH-R 株および向井 INH-R 株では極めて微々たる増殖しかみられず, 強毒菌との間に確然たる差異が認められた点である (図 2, 3)。また表 1 の中, 室温保存の対照試料の菌数をみると, 毒力菌では静注直後のものに比して 5 日目, 7 日目のものに著明な菌数増加の傾向がみられ, 一方弱毒菌ではこのような傾向は明かではない。これは感染後, 脾でこの期間中に毒力菌は増殖するが弱毒菌は増殖しないか, あるいは増殖するとしても極めて弱いことを示すものとも思われる。また注目すべきことは, INH 高度耐性・カタラーゼ陰性でありながら親株にほぼ等しい毒力をもつと言わ

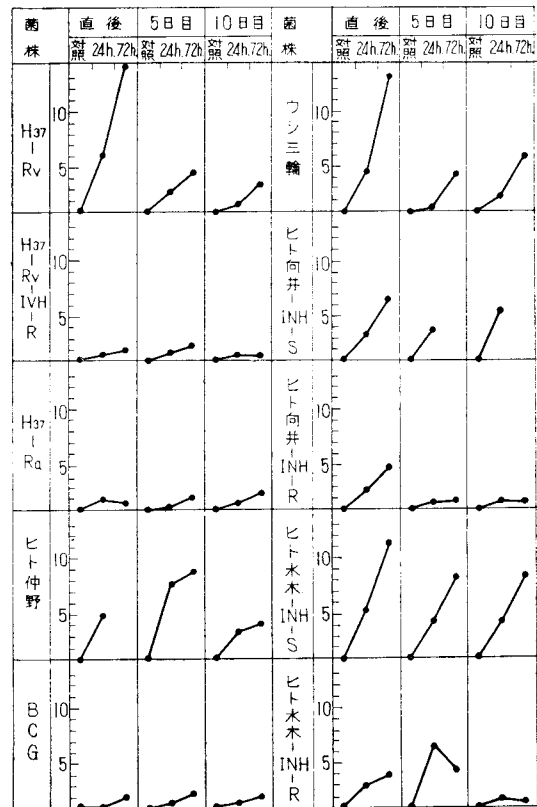
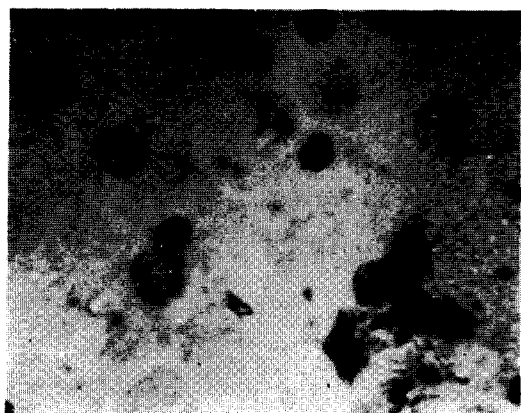
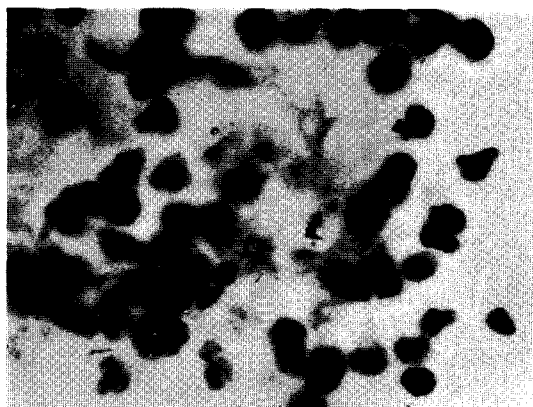
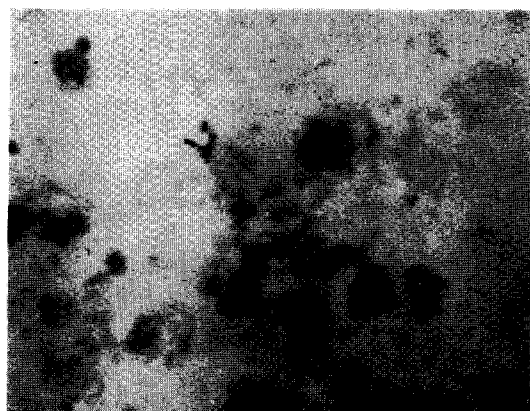
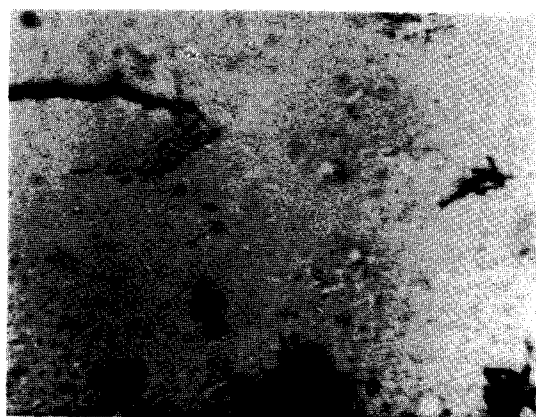


図 1 組織培養における各菌株の菌数の消長

表 1 組織培養における各菌株の菌数の消長

菌株	経過時間 培養室 時間 24時 (対照)	菌接種直後			5日目			10日目		
		24時	72時	対照	24時	72時	対照	24時	72時	
H ₃₇ Rv	4	24	56	31	88	138	43	64	148	
H ₃₇ RvINH-R	9	16	18	19	32	47	11	17	15	
H ₃₇ Ra	3	6	5	7	9	15	10	14	25	
ヒト 仲野	2	10		10	79	88	30	102	120	
BCG	4	4	8	3	4	8	2	3	4	
ウシ 三輪	6	29	80	21	28	89	7	17	41	
ヒト向井 INH-S	6	20	39	38	138		68	378		
ヒト向井 INH-R	3	8	14	8	12	14	8	14	14	
ヒト水木 INH-S	6	38	67	30	132	247	23	137	190	
ヒト水木 INH-R	11	34	44	30	200	133	91	154	122	

図 2-a H₃₇Ra 対照図 3-a H₃₇Rv 対照図 2-b H₃₇Ra 培養3日目図 3-b H₃₇Rv 培養3日目

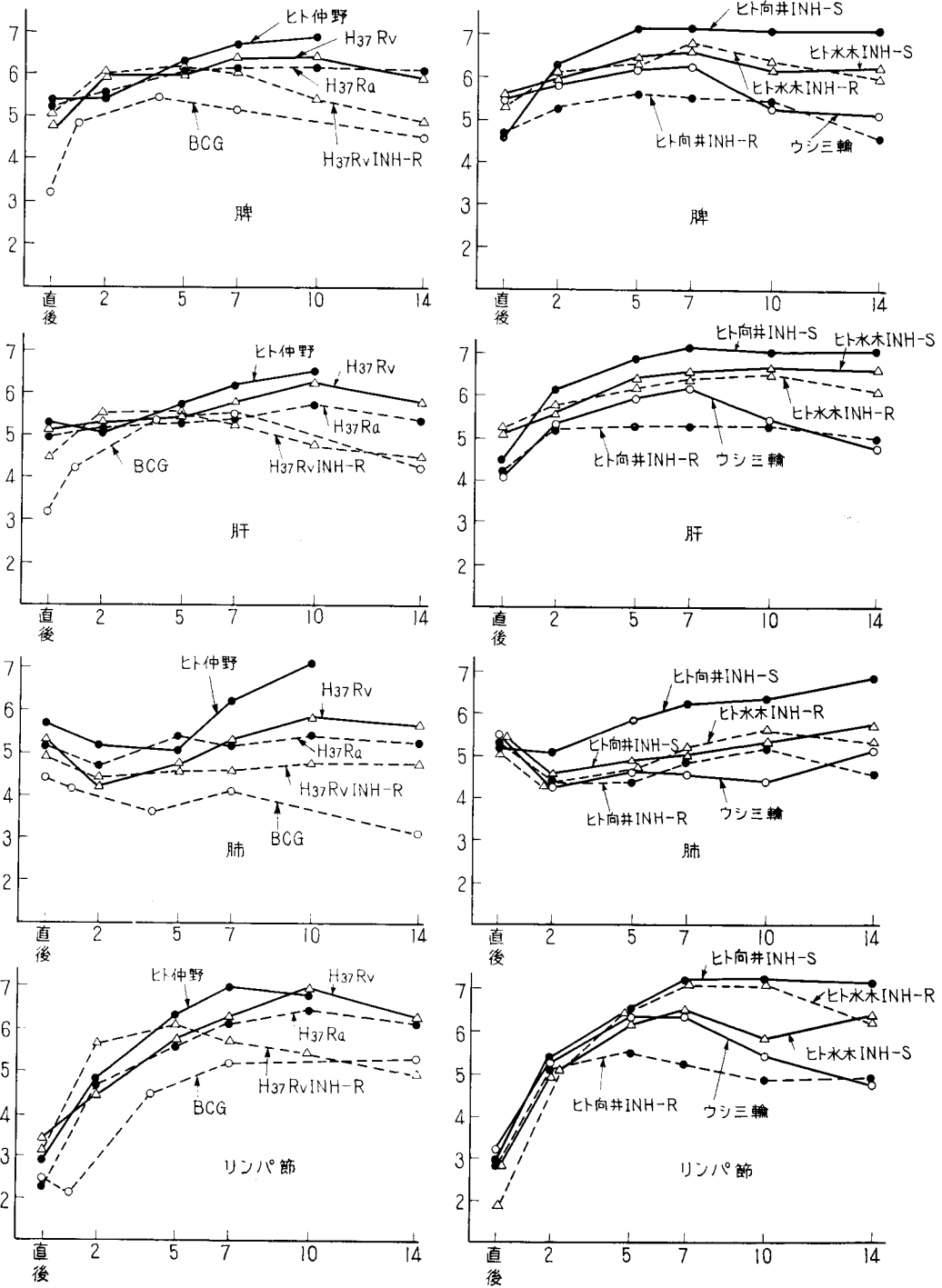


図 4 モルモット各臓器内の菌数の消長 (定量培養成績)

れる水木 INH-R 株が、本実験でも INH-S 株ほどではないにしても、かなりの菌増加率を示したことである。

つぎに各種臓器内生菌数の培養成績を図 4 によつてみると、接種後各臓器内の菌増殖は強毒株（向井 INH-S 株、水木 INH-S 株、仲野株、H₃₇Rv 株）では著明であるが、弱毒株（BCG、H₃₇Rv INH-R 株、向井 INH-R 株）では弱い傾向がみられ、およそ組織培養の成績と一致した。但し成績の喰違いとして、組織培養では典型的弱毒菌の態度を示した H₃₇Ra 株が、定量培養成績では H₃₇Rv 株とほぼ等しい菌数の消長を示し、反対に組織培養で菌増殖率の大きいウシ型三輪株が、定量培養で弱毒菌に近いパターンを示したことをあげなければならない。

考 察

組織培養によつて結核菌の毒力を論じた報告としては Suter²⁶⁾、Mackness²⁹⁾、浅田³⁰⁾らの論文があるが、Suter、Mackness はモルモット或はウサギの腹腔内渗出細胞をガラス器内で結核菌浮遊液と混じてから組織培養し、細胞内の菌増殖を観察しており、浅田はあらかじめ腹腔内感染後大網細胞を組織培養し、細胞に喰された菌の推移を観察している。Suter は細胞内の菌増殖は毒力菌（H₃₇Rv 菌）株と弱毒（R₁Rv 株、BCG）の間に差異を認めず、ただ無毒菌 H₃₇Ra 株だけは全く増殖がみられないと云い、Mackness は H₃₇Rv 株と R₁Rv 株との間に、さらに R₁Rv 株と H₃₇Ra 株、BCG との間にも明らかに増殖上の差異を認めたと報じている。このような成績の不一致は、腹腔内細胞による喰菌現象が、細胞と菌との量的関係により極めてデリケートに左右されることを示すもので、事実 Berthrong³¹⁾によれば、細胞に対する感染菌量が多ければ BCG でも毒力菌同様、細胞内の増殖は強く、また感染後の細胞障害もいちじるしいという。次に浅田の実験は組織培養前にあらかじめ菌感染を行なっている点われわれの実験に似ているが、大細胞内の菌増殖が強毒菌（H₃₇Rv）と弱毒菌（BCG）で違わないと報じており、この点 Suter の成績に一致し、われわれや Mackness の成績とは異なっている。

われわれは感染脾の組織細胞浮遊液をガラス器内で培養し、菌の増殖状態をしらべたわけであるが、この方法では菌増殖は細胞内よりはむしろ細胞外により強くみられ、しかも強毒菌ほど著明で、弱毒菌、INH 耐性菌では弱いことが認められた。細胞の存在が細胞外の菌増殖に如何なる意味をもつかについては目下研究中で決断を下すことは出来ないが、従来の結核菌の培養実験（組織

培養法以外の方法による実験）では、菌は毒力の強弱に関係なく増殖し、その間に何ら違いを認め難いことを考えると、本実験で細胞の共存下でとくに弱毒菌の増殖が弱かつたことは、やはり組織細胞が弱毒菌の発育に対し阻止効果を持つものと解すべきではなからうか。

なお感染組織の *in vitro* の培養に関しては、最近 Brieger³²⁾らの報告があるが、彼は結核菌静注後のウサギの臓器を組織培養し、生体内では同じ時期に組織中に菌を認め難いのに反して、ガラス器内では菌が短時間で旺盛に増殖すること、しかしこの場合菌の増殖には組織細胞の存在が必要なることを主張し、さらに細胞内増殖には Virus size の型をとる時期があると考えている。さて本実験では、Brieger らが組織培養に感染組織片をもちいたのに対し感染組織の細胞浮遊液をもちいており、この場合彼のいうように感染後数日間組織内に抗酸性桿菌を検出しえないという事実はみられず、少なくとも本実験にもちいた菌量の範囲（[5~50]×10⁶ヶ）では乳鉢で磨砕してえた組織のホモジェネートの中にも、また組織培養に供した細胞浮遊液中にも抗酸性桿菌を、接種直後より持続的に観察しえたのであつて、本実験ではこのような菌がそのまま細胞外で増殖したものと考えてよいと思う。したがつて本実験でも菌の細胞内増殖を認めているにもせよ、Brieger のいうように細胞内増殖の phase が生体内あるいは組織培養上の結核菌の増殖に不可欠とは考え難いのである。

ただ Brieger が主張するように、静脈内感染後数日間は顕微鏡的に組織内に菌を容易に見出しえないのに対し、このような時期の材料でも組織培養をおこなうと菌の爆発的増殖がみられることは本実験でも確認されており、この場合培養開始時の生菌数（単一菌体、菌小塊、コードもすべて 1 菌単位として算定）が毒力菌では僅か 24 時間の培養で 3~6 倍に達することは、やはり Brieger の指摘するように光学顕微鏡では不可視の状態の菌が存在するのかも知れない。

つぎに組織培養と平行しておこなつた各臓器の定量培養の成績について考察をくわえてみよう。今回の実験では菌の消長を、菌接種後 2 日~2 週の如き短期間でしらべたのであつて、この点従来の多くのこの種の実験と異なつており、しかもこのような方法でも菌株による毒力の違いが菌増殖上の差となつて示されたことは興味あることに思われる。すなわち、ヒト型毒力菌仲野株、向井 INH-S 株、水木 INH-S 株、H₃₇Rv 株、また親株とほぼ毒力が等しいといわれる水木 INH-R 株では接種後 5~7 日で臓器内の菌数は最高値（脾、肝、門脈リンパ節では臓器 10 mg あて 10⁶~10⁷、肺では 10⁶~10⁶）を示

し、その後も暫らく菌数は増加するか同じレベルを保っており、一方 BCG, 向井 INH-R 株, H₃₇Rv INH-R 株のような既知の弱毒株では菌数の最高値は 10⁵ 程度で低く、また接種後 1 週より漸減する傾向が明らかにみられた。しかしてこのような菌株の毒力の違いに基づく菌増殖性の差異が定量培養でも組織培養でも凡そ一致してみられたことは、今回実施した組織培養法が結核菌の毒力測定法として信頼するに足ることを裏づけるものであらう。

総 括

静脈内結核菌感染モルモットの脾を細胞浮遊液として *in vitro* で培養し、菌の増殖状と菌の毒力との関係をしらべ、つぎの結果をえた。

1) ヒト型ならびにウシ型毒力菌は細胞共存下で旺盛に増殖するが、BCG, H₃₇Ra 株, INH 耐性菌のような弱毒菌では極めて弱い増殖しかしなかつた。

2) 組織培養でみられる菌株間の毒力の差異は、臓器内生菌の培養成績とほぼ一致した。

実 験 例

実験 2 組織培養法による結核菌の毒力測定法と従来 の測定法の比較

前の実験で、組織培養法により結核菌の毒力がかかなり正確に、また短時間で測定されることが判つて来たので、さらにこの方法を従来から広くおこなわれているモルモットとマウスをもちいる動物実験法、中性紅試験およびコード試験と比較してみた。

実験材料ならびに実験方法

使用菌株：保存株として H₃₇Rv 株, H₃₇Ra 株, BCG, ウシ型毒力菌三輪株, ヒト型毒力菌仲野株, 同じく向井 INH-S 株, -R 株, 水木 INH-S 株, -R 株の 9 株；患者からの分離株として SM, PAS, INH の 1 剤以上に耐性をもつもの 20 株と感性株 9 株の計 29 株, 保存株と合計して 38 株をもちいた。

各菌株について Dubos 培地に約 10 日培養した菌液を実験によつてはそのまま、あるいは稀釈してもちいたが、中性紅試験のみは一度小川培地に移植した菌をもちいた。

組織培養法：前述の方法に準じた。但し被検菌株数が多いため、モルモットの数を各菌株 2 匹とし、菌静注後 5 日目の脾についてのみ培養をおこない、菌数の判定は培養 3 日に対照に対する菌増殖率を算定しておこなつた。

モルモット接種法：各菌株につきモルモット 4 匹の右下腹皮下に生菌単位 10⁵~10⁶ を含む菌液を注膨し、8 週後剖検して臓器の肉眼的変化、脾内生菌数および脾重量をしらべた。

マウス接種法：生後 4~6 週の CF₁ 系マウス（各菌株につき 10 匹内外使用）の尾静脈内に菌液 0.5 ml（生菌単位 10⁵~10⁶）を注射し、生存日数をしらべた。

中性紅試験法：ほぼ Dubos らの原法に準じて実施した。すなわち小川培地に 3~4 週間培養の菌約 5 mg を白金耳で磨砕しながら 50% メタノールに浮遊させ、37°C に 1 時間放置後、遠沈して上清をすて、再びメタノールで洗滌、ついで蒸留水で数回洗つてえられた菌を 5% NaCl 加 1% Na-babitate 緩衝液 2 ml に浮遊させ、これに 0.01% 中性紅水溶液 2 滴をくわえ、室温 30 分放置後に成績を観察した。

コード試験法：Dubos 培地培養の菌液を蒸留水で数回遠沈洗滌してえられた均等菌浮遊液を 10% 牛血清加キルヒナー寒天・コロジオン膜面培地³³⁾に接種し、37°C に 3~7 日間培養して生じたマイクロ・コロニーを電子顕微鏡で撮影し観察した。

実 験 成 績

まず組織培養の成績を表 2 によつてみると、保存株の菌増殖率は、実験 1 の成績同様、H₃₇Rv 株, 仲野株, ウシ三輪株, 向井 INH-S 株, 水木 INH-S 株ではいずれも高い値を示し、一方 H₃₇Ra 株, BCG, 向井 INH-R 株では ratio は 2 以下の低値であり、水木 INH-R 株は強毒株と弱毒株の中間の値 (2.7) を示した。分離菌では ratio 2.5 以下を示したのは主として耐性菌で、19 株中 2 株 (63%)、これに対して感性菌では 8 株中 2 株 (25%) であつた。このようにいずれか 1 剤以上の薬剤に耐性をもつ菌株では感性菌よりも一般に ratio が低い傾向がみられた。

つぎにモルモット皮下接種 8 週後の剖検成績を図 5 に示したが、保存株 9 株ではヒト仲野株, 向井 INH-S 株, 水木 INH-S 株の病変は最も強く、またこれに比例して脾内生菌数も極めて多く、H₃₇Rv 株ではこれらの株より病変は弱かつた。さらに H₃₇Ra 株と BCG では病変が弱かつたのは当然と思われるが、ウシ三輪株と水木 INH-R 株でも病変が比較的少なく弱毒株の所見がえられた。この中、三輪株の所見は実験 1 のモルモット臓器内の菌所見と一致するが、水木 INH-R 株の成績は実験 1 とも、また従来の久世²⁷⁾や高橋³⁴⁾の成績とも一致せず、この菌株の毒力が分離当時からみてかなり減弱していることが考えられる。分離菌の成績からいえることは、感

表 2 組織培養の成績

菌 株	菌 数			増殖率	菌 株	菌 数		
	対 照	3 日後	増殖率			対 照	3 日後	増殖率
H ₃₇ Rv	49	246	5.0	No. 11	40	染色不良	—	
H ₃₇ Ra	27	49	1.7	No. 12	6	28	4.7	
ヒ ト 仲 野	50	181	3.6	No. 13	39	115	3.0	
BCG	4	8	2.0	No. 14	52	220	4.2	
ウ シ 三 輪	25	100	4.0	No. 15	2	7	3.5	
ヒト 向井 INH-S	402	<1200	<3.0	No. 16	105	450	4.3	
ヒト 向井 INH-R	54	98	1.8	No. 17	31	65	2.0	
ヒト 水木 INH-S	113	584	5.2	No. 18	44	108	2.5	
ヒト 水木 INH-R	60	160	2.7	No. 20 P:1, H:0.1	29	30	1.0	
* No. 1 S:100, P:10, H:0.1	10	21	2.1	No. 21 S:100	62	177	2.9	
No. 2 S:10, P:10, H:10	10	9	0.9	No. 22 P:(10), H:(0.1)	61	153	2.5	
No. 3 S:100, P:(10), H:(10)	10	30	3.0	No. 23 P:(10), H:1	65	67	1.0	
No. 4 P:1, H:10	30	116	3.9	No. 24 H:(0.1)	10	60	6.0	
No. 5 S:100, P:1, H:(10)	68	74	1.1	No. 25 S:10, P:1, H:10	24	116	4.8	
No. 6 S:(10), P:(10), H:(1)	20	汚染	—	No. 26 H:10	25	100	4.0	
No. 7 S:100, P:(1), H:(0.1)	14	25	1.8	No. 27 P:(100), H:(0.1)	29	62	2.1	
No. 8 P:(10), H:(10)	19	25	1.3	No. 28 P:(10), H:(0.1)	67	93	1.4	
No. 9 S:(100), P:(10), H:(10)	26	47	1.8	No. 29 P:(100), H:(0.1)	45	132	2.9	
No. 10	60	230	3.8	No. 30 H:(10)	59	130	2.2	

* S: ストレプトマイシン, P: パラアミノサリチル酸, H: イソニコチン酸ヒドラザド, 数字はその薬剤に対する耐性度 (γ) を, () は不完全耐性を示す。

性株 (No 10~18) が耐性株 (No 1~9, No 20~30) よりも強い病変を起し, かつ脾内菌数も多いことで, この点組織培養所見と凡そ一致すると思われた。

マウス生存試験の成績を表 3 に示したが, 保存菌の中, マウスの死亡の最も早くみられたのは仲野株, 向井 INH-S 株, 水木 INH-S 株で, その TDM (斃死日数中央値) は 11~15 日であつた。一方 H₃₇Ra 株, BCG, 向井 INH-R 株では 100 日後も死亡はみられず, H₃₇Rv 株, ウシ三輪株, 水木 INH-R 株では TDM はそれぞれ 48, 32, 29 日で, マウスの成績でも水木 INH-R 株は親株より弱毒なことが明らかにされた。分離菌では 100 日以上生存を示した菌株は No 28 のみで大部分は 60 日以内に死亡した。ただ組織培養やモルモットの成績と異なる点は, 耐性獲得とマウスの生存日数との間に明か

な関係性を認め難いことで, 表 3 にみられるように No 1 から 9 迄の耐性株の TDM は感性株 No 10~18 のそれよりも多少値が大きいが, No 20 以下の耐性株では No 28 を除き, 他はすべて極めて低い値を示し, 感性株よりもむしろ早くマウスが死亡する傾向がみられている。

中性紅試験とコード試験の成績は, 前述の 3 つの測定成績と一括して表 5 に示した。なおコード形成の電子顕微鏡写真の中で代表的なものを図 6~17 に示した。

表 5 に表わした各測定法による毒力の規準は, あらかじめ表 4 のようにして定めた。

表 5 に示した成績の中, 組織培養とモルモットおよびマウスの成績のみについて比較してみると,

a) 3 測定法の成績が比較的よく一致した例: H₃₇Ra, ヒト仲野, BCG, ウシ三輪, ヒト向井 INH-R, ヒト水

表 3 マウス静脈内接種後の生死状態

菌株	接種菌数	感染後の死亡状態 (日)										生マ残マ	TDM
		10	20	30	40	50	60	70	80	90			
H ₃₇ Rv	17X10 ⁶			••••		••••						0/8	48
H ₃₇ Ra	47X10 ⁵											7/7	>100
ヒト仲野	55X10 ⁵		••••									0/8	15
B C G	C											9/9	>100
ウシ三輪	C			••••••	•							0/9	32
向井INH-S	16X10 ⁵		••									0/6	13
向井INH-R	C											8/8	>100
水木INH-S	28X10 ⁵		••									0/5	11
水木INH-R	8X10 ⁵			••••••	••							0/8	29
NO. 1	25X10 ⁵					••		••	••••			0/9	64
NO. 2	5X10 ⁵					••	••	••				0/8	56
NO. 3*	20X10 ⁵												
NO. 4	40X10 ⁵			••••	••							0/9	32
NO. 5	35X10 ⁵			•	••	••	••	••	•			0/9	59
NO. 6	13X10 ⁵		••••									0/9	14
NO. 7	24X10 ⁵				••••	••	••	••	•			0/9	40
NO. 8	70X10 ⁵				••••••	••	••	••				0/9	38
NO. 9	55X10 ⁵			••••	••							0/9	25
NO.10	60X10 ⁵			••••	••							0/9	31
NO.11	60X10 ⁵			••	••••	••						0/9	38
NO.12	55X10 ⁵			••••	••	••						0/9	25
NO.13	29X10 ⁵		••••									0/8	21
NO.14	6X10 ⁵		••••	••								0/8	20
NO.15	3X10 ⁵			••	••	••	••					0/8	37
NO.16	29X10 ⁵			••••	••							0/10	24
NO.17	26X10 ⁵		••••	•								0/10	16
NO.18	31X10 ⁵		••••									0/9	17
NO.20	21X10 ⁵		••••	••								0/10	17
NO.21	12X10 ⁵		••••	••								0/10	20
NO.22	18X10 ⁵		••••	••								0/10	19
NO.23	11X10 ⁵		••••	••								0/10	20
NO.24	33X10 ⁵		••••	••								0/10	19
NO.25	14X10 ⁵		••••	•								0/10	21
NO.26	7X10 ⁵				••	••	••	••				0/16	36
NO.27	20X10 ⁵		••••									0/8	20
NO.28	50X10 ⁵				•							9/10	>100
NO.29	36X10 ⁵		••••									0/10	16
NO.30	12X10 ⁵		••••									0/7	15

* 菌接種後数日で大多数のマウスが死亡。

表 4

組織培養		モルモット*		マウス
	菌増殖率	脾重	脾内生菌数	TDM
+	<2.0	<1.0g	$0 \times 10^2 \sim 10 \times 10^2$	60<
++	2.1~3.0	<1.0//	$10 \times 10^2 \sim 10 \times 10^3$	35~60
+++	3.1~4.0	1~2//	$10 \times 10^3 \sim 10 \times 10^4$	21~35
++++	4.1<	2<	$10 \times 10^4 \sim 10 \times 10^5$	<20

中 性 紅 試 験		コ ー ド 試 験	
—	僅かに黄色を呈するもの	全く菌体の配列に方向性のないもの	
+	うす桃色を呈するもの	やや菌の集束のみられるもの	
++	やや濃い桃色を呈するもの	かなり集束の明かなもの	
+++	濃い紅色を呈するもの	集束の極めていちおるしいもの	

* モルモットによる菌毒力の判定には、脾重、脾内生菌数の他に肉眼的病変所見をも考慮した。

表 5 各毒力測定法の成績の比較

菌株	組織培養	モルモット	マウス	コード	中性紅	菌株	組織培養	モルモット	マウス	コード	中性紅
H ₃₇ Rv	+++	+++	++	+++	+++	No. 11		+++	++		—
H ₃₇ Ra	+	+	+	+	+	No. 12	+++	+++	+++	++	+
ヒト 仲野	+++	+++	+++	+++	+++	No. 13	++	+++	+++	++	
BCG	+	+	+	+++	+	No. 14	+++	+++	+++	+++	+
ウシ 三輪	+++	++	+++	+	++	No. 15	+++	+++	++		—
ヒト 向井 INH-S	++	+++	+++	++	+++	No. 16	+++	+++	+++	+++	+++
ヒト 向井 INH-R	+	++	+	++	+	No. 17	++	++	+++	++	+
ヒト 水木 INH-S	+++	+++	+++	++	+	No. 18	++	++	+++	+++	
ヒト 水木 INH-R	++	++	+++	++	+	No. 20 P:1, H:0.1	+	+	+++	++	+
* No. 1 S:100, P:10, H:0.1	++	+	++	++	+	No. 21 S:100	++	++	+++	+++	+
No. 2 S:10, P:10, H:10	+	++	++	±	+	No. 22 P:(10), H:(0.1)	++	+++	+++	+++	+
No. 3 S:100, P:(10), H:(10)	+++	+++		++	+++	No. 23 P:(10), H:1	+	++	+++	+	+
No. 4 P:1, H:10	+++	+++	+++	+++	++	No. 24 H:(0.1)	+++	++	+++	++	+
No. 5 S:100, P:1, H:(10)	+	++	++	++	+++	No. 25 S:10, P:1, H:10	+++	+++	+++	++	+++
No. 6 S:(10), P:(10), H:(1)		+++	+++	++	+	No. 26 H:10	+++	+	++	++	++
No. 7 S:100, P:(1), H:(0.1)	+	++	++	++	++	No. 27 P:(100), H:(0.1)	++	+++	+++	++	++
No. 8 P:(10), H:(10)	+	+++	++	+	++	No. 28 P:(10), H:(0.1)	+	+	+	++	++
No. 9 S:(100), P:(10), H:(10)	+	++	+++		++	No. 29 P:(100), H:(0.1)	++	++	+++	++	+
No. 10	+++	++	+++	++		No. 30 H:(10)	++	++	+++		+

* S: ストレプトマイシン, P: パラアミノサリチル酸, H: イソニコチン酸ヒドラゼド, 数字はその薬剤に対する耐性度 (γ) を, () は不完全耐性を示す。

木 INH-S, 水木 INH-R, No 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 25, 28 の計 19 株 (54%)。

b) 組織培養とモルモットの成績が一致し、マウスの成績が不一致の例: No 17, 18, 20, 21, 23, 29, 30 の計 7 株 (20%)。

c) 組織培養とマウスの成績が一致し、モルモットの成績が不一致の例: No 24 の 1 株 (3%)。

d) モルモットとマウスの成績が一致し、組織培養の成績が不一致の例: H₃Rv, ヒト向井 INH-S, No 7, 22, 25 の計 5 株 (14%)。

e) 3 つの測定法による成績が区々で不一致の例: No 8, 9, 26 の 3 株 (85%)。

以上の成績からさらにマウスの成績とは関係なく、組織培養法とモルモット法の成績が一致したもののみを集計すると a 項と b 項の和 26 例となり、全体の 74%, 同様に組織培養法とマウス法の成績が一致したものは 20 株 (57%), またモルモット法とマウス法の成績一致をみたもの 24 例 (68.5%) となつた。

つぎに、コードの試験では表 5 と図 6~17 に示すように、薬剤耐性菌、既知の弱毒菌をも含めて大部分の菌株に中等度乃至強度のコード形成がみられ、動物培養試験あるいは組織培養試験の成績との間に関聯性を認め難く思われた。また中性紅試験でも、動物試験で強毒を示しながら弱い反応を呈するもの 11 株、逆に弱毒でありながら強い反応を呈するもの 3 例、計 14 例 (39%) が動物試験と不一致の成績を示した。

考 察

組織培養法による結核菌の毒力測定の信頼性を検討するために、従来からおこなわれている 2 つの動物接種法と 2 つの *in vitro* の判定法を実施したが、この中モルモットによる方法は、この動物が結核に対して感受性高く、またツベルクリン皮膚アレルギーの発現も著明な点などから考えて、菌の毒力測定法としては最も信頼しうるものであろう。そこでひとまずその他の方法をモルモット接種法と比較してみると、これに最も近い成績を示したのは組織培養法で 35 例中 26 例 (74%) に一致の成績がみられ、モルモット法とマウス法の一致例 24 例 (68.5%) をやや上廻る傾向がみられた。つぎに組織培養法とマウス法の成績一致は 20 例 (57%) にすぎず、これらの成績から組織培養法はマウス法よりもむしろモルモット法に近い成績を示すことが窺われるが、今回の実験で組織培養にもちいた材料がモルモットの脾であつたことも当然このことの原因になつているものと思われる。

中性紅試験は、われわれが今回もちいた手技に関する限り、あまり正確に呈色上の差異を示さなかつたし、またその成績も約半数が動物接種の成績と一致せず、信頼される方法とは考えられないが、この点創案者 Dubos³⁵⁾ 自身も認めているようである。

つぎにコードの試験では、毒力の如何を問わず、ほとんどすべての菌株に所謂菌体の *parallel orientation* 乃至 *serpentine strand* がみられ、コード形成と毒力との間に関聯性を見出しえなかつた。

さて、もう一度毒力測定法としての組織培養法について吟味をくわえてみると、この方法で成績の正確さを左右する原因の主なるものは、恐らく培養直前に細胞浮遊液中に含まれる菌数の不安定性であつて、実際本実験でも経験したところであるが、はじめの菌数があまり少ない場合、またあまり多すぎる場合には菌増殖率は不正確になるのを免れない。したがつて本法の実施に際しては、培養直前の細胞浮遊液中の菌数を適当 (100 視野中凡そ 10~50 ケ) に一定する必要があるわけで、今後さらに工夫を要するところであらう。つぎに本法を結核菌の毒力測定の *routine* にもちいることに関しては、本法では動物接種法よりも動物が少なくすむ点、また成績判定に要する期間が菌接種後 1 週程度ですむ点、極めて有利と思われるが、実施上他の方法に比して幾らか熟練を要するところに問題があらう。

最後に、実験成績の上で興味深く思われたのは、患者からの分離菌で INH 耐性を示した 10 数株中、10 γ 完全耐性の 2 株 (No 4 と No 25) が、試みられたすべての測定法で比較的強い毒力を示したことで、INH 耐性菌の毒力が、耐性が高い程、またそれが *population* 中に占める比率が高い程減弱するという従来の研究者の考え方を今一度振り返つて検討する必要があるのではあるまいか。

総 括

研究室保存株 9 株、患者からの分離株 29 株、計 38 株の結核菌について、組織培養法による毒力測定成績と、従来おこなわれているモルモット皮下接種法、マウス生存日数測定法、中性紅試験法およびコード試験法の成績とを比較し、つぎの結果をえた。

1) 組織培養法はモルモット接種法に比較的近い成績を示し、その成績一致率は組織培養法とマウス法との一致率、またモルモット法とマウス法との一致率より高い傾向が認められた。

2) 中性紅試験法とコード試験法はいずれも動物試験の成績と不一致のことが多く、これらの方法は菌の毒力

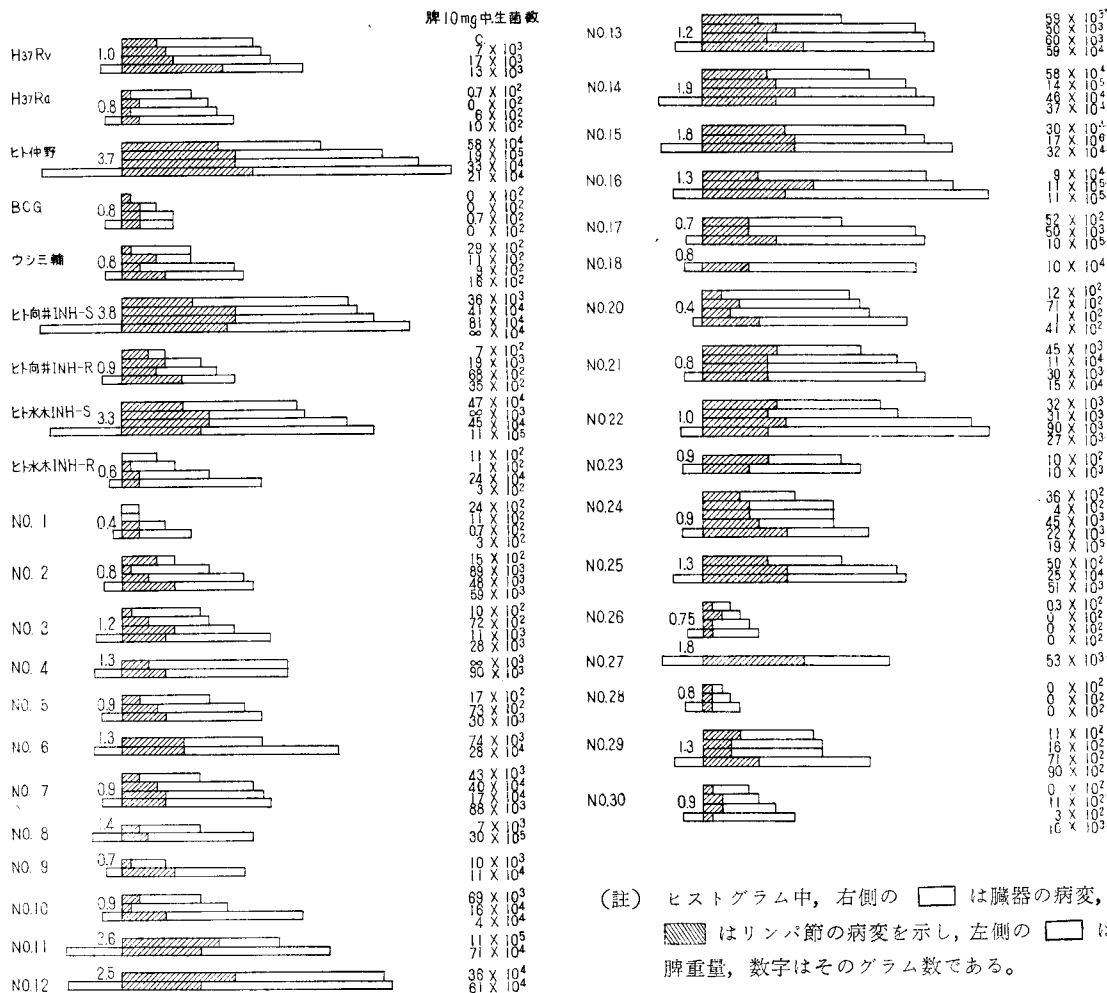


図5 モルモット皮下接種8週の剖検成績

測定法として不適当と思われた。
稿を終るに当り、御校閲を賜った高橋教授に深謝する。

文 献

- 1) 染谷四郎, 他: 結核, 24, 24, 1951.
- 2) Smithburn, K.C.: J. Exp. Med., 64, 771, 1936.
- 3) 渡辺喜海: 結核, 18, 101, 1940.
- 4) Brown, C.D. et al.: Am. Rev. Tuberc., 76, 426, 1957.
- 5) Lester, V.: Acta Tuberc. Scandinav., 13, 251, 1939.
- 6) 大岩弘治: 日本細菌学雑誌, 13, 241, 1957.
- 7) Pierce, C.H. et al.: J. Exp. Med., 97, 189, 1953.
- 8) 佐藤直行: 医学と生物学, 34, 90, 1955.
- 9) 加藤允彦, 他: 結核, 30, 638, 1955.

(註) ヒストグラム中、右側の □ は臓器の病変、
▨ はリンパ節の病変を示し、左側の □ は脾重量、数字はそのグラム数である。

- 10) 金容鉉: 日本細菌学雑誌, 13, 15, 1958.
- 11) Bloch, H.: Am. Rev. Tuberc., 61, 270, 1950.
- 12) Wilson, F.J.: Am. Rev. Tuberc., 65, 187, 1952.
- 13) Singer, J. et al.: Am. Rev. Tuberc., 65, 779, 1952.
- 14) Whitehead, J.E. et al.: J. Path. & Bact., 65, 451, 1953.
- 15) Patnode, R.A. et al.: Am. Rev. Tuberc., 69, 599, 1954.
- 16) Dubos, R.J. et al.: Am. Rev. Tuberc., 58, 698, 1948.
- 17) Viallier, J. et al.: C.R. de Soc. Biol., 144, 1513, 1950.
- 18) Desbordes, J.: Ann. Inst. Pasteur, 83, 809, 1952.
- 19) 松尾 仁: 結核, 31, 651, 1956.
- 20) Middlebrook, G. et al.: J. Exp. Med., 86, 175, 1947.

- 21) Hart, P. D'A, et al. : J. Gen. Microbiol., 10, 150, 1954.
- 22) Yegian, D. et al. : Am. Rev. Tuberc., 65, 181, 1952.
- 23) Krasnow, I. et al. : Am. Rev. Tuberc., 71, 361, 1955.
- 24) Goldman, E.C. et al. : Am. Rev. Tuberc., 73, 674, 1956.
- 25) Richmond, L. et al. : Am. Rev. Tuberc., 62, 632, 1950.
- 26) Emmart, E.W. et al. : Am. Rev. Tuberc., 47, 426, 1943.
- 27) 久世彰彦：結核の研究(北海道大学結核研究所編) 3, 39, 1955.
- 28) Suter, E. : J. Exp. Med., 96, 137, 1952.
- 29) Mackaness, G.B. et al. : Am. Rev. Tuberc., 69, 479, 1954.
- 30) 浅田高明：最新医学, 14, 268, 1959.
- 31) Berthrong, M. et al. : Am. Rev. Tuberc., 77, 436, 1958.
- 32) Brieger, E. M. : Experimental Tuberculosis, A. Ciba Foundation Symposium. J. & A. Churchill Ltd., London, W. I. 1955, p.p. 225-236.
- 33) 有馬 純, 他：電子顕微鏡, 3, 92, 1953.
- 34) 高橋正雄：胸疾, 1, 301, 1957.
- 35) Dubos, R. J. : Biochemical Determinants of Microbial Diseases. Harvard Univ. Press, Cambridge 38, Massachusetts. 1954, p. 98.



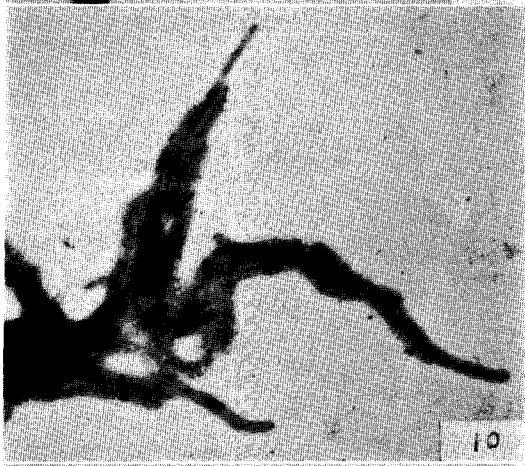
6



9



7



10



8



11

写真説明

- 図 6 H₃₇Rv 株
- 図 7 H₃₇Ra 株
- 図 8 ヒト仲野株

- 図 9 ウシ三輪株
- 図 10 BCG
- 図 11 ヒト向井 INH-S 株

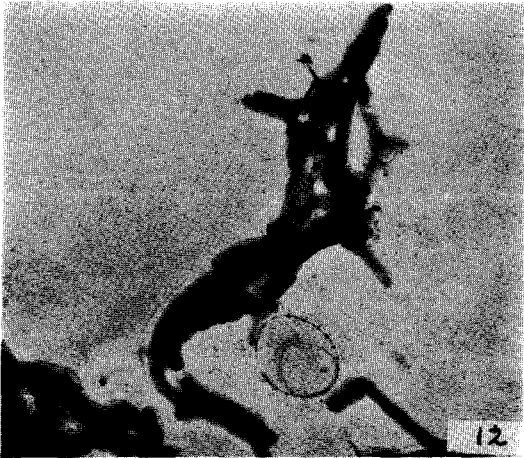


図 12 ヒト向井 INH-R 株
 図 13 ヒト水木 INH-S 株
 図 14 ヒト水木 INH-R 株

図 15 分離菌 No 2 株
 図 16 No 23 株
 図 17 No 26 株