結核菌の毒力に関する研究

第2編 結核菌濃厚菌液の溶血作用について

大 岩 弘 治

京都大学結核研究所細菌血清学部 (指導 植田三郎教授)

[受付: 6月27日1956年]

緒 言

結核菌の示す物理化学的, 生物学的性状とその毒力との関連性を見出し, これによつて毒力を *in vitro* で表示し, 兼ねて毒力の本態を解明しようとする努力が最近迄に数多くなされて来た。その中で, 主なものを挙げると, 人型結核菌 H37 Rv 及び Ra の分離以来, 先ず Schain¹⁾, Steenken²⁾ がこの両者をジフテリア・アナトキシンによつて区別しようとした。次で Dubos³⁾ 等は形態学的に毒力菌の鑑別が可能であると発表した。更に Dubos⁴⁾, Yegian⁵⁾ 等が追加実験を行つている。又毒力と白血球との関係については, 貪食作用に関しては Suter^{6,7)}, Bloch⁸⁾, 遊走阻止作用に関しては Bloch^{9,10)}, Dubos¹¹⁾ 等が, 著者¹²⁾ も亦第1編において報告した。他方菌体成分と毒力との関係についても亦古くから研究されて来たが, 最近注目されたのは何んと云つても Bloch^{13,14,15)} 等の cord factor に関係するものであるが, Philpot 等¹⁶⁾ は併し乍ら之に反対している。

Bloch 等の cord factor と多少関連して, 著者は下記の如く, 全く新しい現象として, 結核菌に依る赤血球溶血作用を見出し, しかも本現象が結核菌の毒力と密接な関係にあることを知つた。

実験方法

1) 供試菌: 供試した菌株は人型7株, 牛型3株, BCG, Vole 菌, 鳥型3株, 非病原性ミコバクテリウム7株の合計22株である。

人型: Frankfurt, 青山B, H37 Rv, 朝倉株 (以上保存菌株) に, 結核患者喀痰より新たに分離した T₁, T₂, T₃ 株 (何れも海狸に対して強毒) を加えた。

牛型: 牛1号, RM, B15 (保存菌株) BCG (保存菌株)

Vole 菌: (保存菌株)

鳥型: 鳥京, 鳥獣, 鳥71株 (保存菌株) 非病原性ミコバクテリウム: スメグマ株 (保存菌株)

F5, A1, F4, E5, 藤井, 小杉株. 以上6株は土壌より分離した。

培養基は Sauton を使用し, 人型, 牛型, Vole は4乃至6週, 鳥型は2乃至4週, 非病原性ミコバクテリウムは3日乃至2週間培養のものを供試した。その際の培養温度は総て37°Cとした。

2) 赤血球 血液は主として海狸血液を用いたが, 亦別に人, 山羊, 兎, 鶏も使用した。

3) 実験方法

Sauton 培養の菌膜を蒸留水によつて充分洗滌し, 培養基成分を除いた後, 蒸留水を以つて所定の濃度の菌液を作る。減菌スライド上にピペットで菌液の1滴を滴下し, 径約5mmの円形に拡げて無菌的に乾燥させる。乾燥後スライドの両端に厚さ約0.05mm, 長さはスライドの短径, 巾約5mmの減菌した小紙片をのせておく。他方, 供試動物より血液を採取し, 手早く注射器から, さきの乾燥菌液の上に血液を2~3滴々下し, 更にその上に減菌スライドを注意して重ねる。血液の凝固を待つてスライドの周縁を溶解したパラフィンにて密封し, スライドを水平にして, 37°Cの孵卵器に入れ, 1昼夜後とり出し判定する。判定は菌液の部分が完全に透明であるものを+, 菌液の辺縁のみ透明で中央に尚不透明の部分を残すものを±, 全然不透明のものを-とした。尚本溶血現象は菌液の存在する部分にのみ見られ, それを越えて血液のみの部分には観察出来ないのが通常である。それ故に万

OIWA Koji: Studies on the virulence of the Tubercle Bacillus. II. Hemolysis caused by the Dense Bacterial Suspension. Bacteriological Laboratory of Tuberculosis Research Institute, Kyoto University, —Jap. J. of Bact., 11 (10), 901-906,

一菌液の部分を越えて広く溶血が起つた場合は雑菌混入によるものと判断して大過はない。尚菌液の拡がりには必ずしも一定ではないから、スライド中央の菌液の部分における一定面積に含まれる菌濃度は一定とは云い難く亦血液の厚さについても同様であるから、他が総て同一条件であつても多少とも結果に動揺が起ることが考えられるので、同一条件で3例以上の標本を作つて実験を進めた。以下に示す表中+++とあるのは3例ともに完全溶血、+-とあるのは1例のみ部分的溶血が見られ、2例は陰性であつた事を示す。

実験成績

先ず最初に結核菌による溶血現象成立の条件及び機転について吟味し、次で溶血作用と菌の毒力乃至病原性との関係を確め、最後に溶血作用に關係する物質の本態についていささか検討した。

I. 溶血現象成立の条件及び機転

a) 菌量との關係について

第1表に示す如く、モルモット血液を用いて、人型F株、H37 Rv株について実験した所では、低濃度の菌液では溶血作用は起らず、或程度以上濃い菌液において初めて見られた。完全溶血を毎常起すには、50 mg/ml以上の濃度を必要とした。この点より見れば本作用はさして強いものではなく、従来見逃がされたのは恐らく此の為ではないかと思う。

b) 作用温度並びに作用時間について

モルモット血液に対する人型F株50 mg/ml菌液の溶血作用を作用温度及び作用時間の面より検討したのが第2表である。

作用温度は37°Cが適当であり、10°C内外の室温では溶血作用の発現が遅れ且程度も弱い。氷室では溶血現象は起らなかったが、氷室72時間後に37°Cに移せば、溶血が見られた。尚37°C以上の温度では結核菌による溶血以外に温熱による溶血が加わるから適当ではない。作用時間は37°C16時間乃至24時間が適当であり、12時間では溶血は充分ではなかつた。又24時間以上では雑菌により血液

第2表 溶血作用に及ぼす温度及び時間の影響

時 間	12	24	48	72
氷 室 (5°C)	- - -	- - -	- - -	- - -
室 温	- - -	- - -	- - -	- ± ±
37°C	- - -	+ + +	+ + +	+ + +

Frankfurt 株 50 mg/ml.

溶解の起る頻度が多く成り易い。

c) モルモットの個体差について

人型F株、H37 Rv株を用いて、モルモット血液に個体差が見られるかどうかを検討した。菌液濃度は何れも50 mg/mlで行つた。第3表に明らかな如く、6匹のモルモットにおいては殆んど個体差は見られなかつた。むしろ同一個体について作つた3枚の標本の間の差の方が多い様に思われた。以下個体差は無いものとして実験を進めた。

d) 培養日数との關係について

モルモット血液とF株及びH37 Rv株50 mg/ml菌液を用いて培養日数と溶血作用との關係を観察した(第4表)。培養日数としては1, 4, 及び10週の3種類とした。その結果は3者の間に顕著な差異は見られなかつたが、強いて云えば培養日数の長い程溶血作用は強い様であつた。

e) 生菌、死菌、培養濾液等による差異

結核菌の一定菌量中に含まれる生菌の数は培養日数によつて可成り顕著な差異を示すにも拘らず第4表に見る如く、それらの菌による溶血作用の程度にはさして差異が見られなかつた。この点よりしても此溶血作用は菌の生死には直接關係の無いものの様に思われるが、念の爲めに100°C30分加熱死菌について、調べた所、第5表に示す如く、その溶血作用は同一濃度の生菌によるものと変らなかつた。亦乾燥菌を乳鉢で充分磨砕した後、蒸留水を加え、37°C48時間孵卵器に入れた後、Seitz濾過器で濾過した磨砕濾液についても、溶血作用は見られなかつた。亦 Sauton 及びグリセリン・ブイヨンF株4週培

第1表 菌濃度と溶血作用との關係

菌 濃 度	1 mg/ml	5 "	10 "	20 "	50 "	100 "
H 37 Rv	- - -	- - -	- - -	- - ±	+ + +	+ + +
Frankfurt	- - -	- - -	- - -	- ± ±	+ + +	+ + +

+ 完全溶血……菌の存在する部分が完全に透明となるもの。

± 部分的溶血……一部が透明となるもの。

- 陰 性……全然溶血が見られず完全に不透明なもの。

第3表 モルモットの個体差と溶血との関係

モルモット番号	1	2	3	4	5	6
H 37 Rv	+	+	+	+	+	+
Frankfurt	+	+	+	+	+	+

菌濃度 50 mg/ml.

第4表 培養日数と溶血との関係

培養日数(週)	1	4	10
H 37 Rv	±	+	+
Frankfurt	±	+	+

第5表 生菌、死菌及び培養濾液と溶血との関係

	生菌 50mg/ml	加熱死菌 50mg/ml	菌体磨砕 濾液	培養濾液	ツベルクリン
溶血	+	+	+	+	+

Frankfurt 株を使用

養の Seitz 濾過液についても溶血作用は見られず、舊ツベルクリンの10倍稀釈液についても亦本現象は陰性であった。

以上本溶血現象成立の条件及び機転について、些か検討して得た成績より見れば、結核菌による此様な溶血作用は、菌の生死に関せず起る現象、即ち菌の生活現象に伴う作用乃至現象では無い事が特色である。この事は、加熱死菌でも生菌と変らず溶血を起す事、又生菌数の含有率の少ない陳腐培養菌が、増殖旺盛な培養初期の菌に比して却ってその作用が強い事からも充分納得出来る。又第2の特徴としては、この溶血作用を起す物質が容易に水に溶け難いと考えられる事である。それは培養濾液、ツベルクリン或は菌体磨砕濾液に本作用が見られないこと及び本現象がオブジェクト上菌液を乾燥せしめた部分にのみ見られ、その外側の血球には殆んど作用を及ぼさない事実からも判断出来る。

II, 毒力乃至病原性との関係

a) 菌型及び毒力について

モルモット血液を用い、人型7株、牛型4株、Vole菌、鳥型3株及び非病原性ミコバクテリウム7株、計22菌株について菌型、毒力と溶血作用の強さとの関係を検討した(第6表)。

人型結核菌7株は総て Sauton 培養基培養6週間の菌を使用した。研究室保存の4菌株中ではF株に最も強く表われ、毒力の比較的弱い青山B株に弱く表われた。H37 Rv 株及び朝倉株はその中間に位いた。患者喀痰より

第6表 Mycobacterium 各種菌型菌株の溶血作用

菌型	菌株	20mg/ml	50mg/ml	100mg/ml
人型	Frankfurt	± ± ±	+	+
	青山 B	— — —	+	+
	H 37 Rv	± ± ±	+	+
	朝倉	± ± ±	+	+
	T ₂	± ± ±	+	+
	T ₅	— — ±	+	+
牛型	牛 1 号	+	+	+
	RM	— — ±	+	+
	B 15	— — ±	±	+
	BCG	— — —	— — ±	±
Vole	Vole	— — —	— ± ±	+
鳥型	鳥 京	— — —	— ± ±	+
	鳥 獣	— — ±	+	+
	鳥 71	— — —	± ± ±	+
非病原性 Mycobacterium	スメグマ	— — —	— — —	— — —
	F 5	— — —	— — —	+
	A 1	— — —	— ± ±	+
	F 4	— — —	— — —	— — —
	E 5	— — —	— — —	— — —
	藤井	— — —	— ± ±	+
	小杉	— — —	— — —	± ± ±

分離した3株は共に強毒株であるが、殆んどH37株と同程度の強さの溶血を起した。以上7株の人型結核菌の溶血作用は多少強弱の差はあったが、20 mg/ml では部分的溶血を、50 mg/ml では全ての菌株が完全溶血を起した事は他の菌型に比べて注目すべき事と思われた。

牛型4菌株の中、モルモットに対して最も毒性の強いのはRM株であるが、溶血作用の点では牛1号株が最も強い。B₁₅株は毒力の点でもRM、牛1号株に劣るが、溶血作用もそれに対応して弱かった。BCGは人型、牛型の有毒株よりは溶血作用は遙かに劣り、50 mg/ml でも殆んど溶血を示さなかつた。この点有毒株と判然とした区別が見られた。

Vole 菌についても 20 mg/ml では陰性、50 mg/ml で部分的に溶血、100 mg/ml で完全溶血と云うように殆んど BCG と同様な成績を得た。

鳥型 3 株は 4 週間培養の菌を使用した。この中毒力の最も強い鳥獣株において溶血も亦強く、鳥京、鳥 71 株は之に次いだ。

スメグマ及び土壌より分離した 6 株の非病原性ミコバクテリウムについて溶血作用を観察した所、その作用は殆んど総ての菌株において弱く、100 mg/ml の高濃度の菌液においてさえも溶血の起らない菌株が多く、仮令作用を呈する場合も、上述の結核菌に比べるならば、遙かに弱いものであった。

以上の成績からして、本溶血作用は病原性の結核菌について著明に見られ、非病原性のミコバクテリウムでは非常に弱い事が知られた。又同じ菌型中では本作用は大体毒力と平行関係にあると言えよう。BCG, Vole 菌にその作用が弱いのも亦興味深い。

b) 各種動物血液間の差異

第 6 表の成績から結核菌の溶血作用と病原性、毒力とが一見平行関係にあるように思われたので、人型 F 株及び鳥型鳥獣株に対する人、山羊、兎、モルモット及び鶏の血液の溶血を比較した (第 7 表)。

第 7 表 各種動物血液に対する溶血作用

菌 型	動 物	20 mg/ml	50 "	100 "
人 型 (Frankfurt)	人	— — —	— — —	± + +
	山 羊	— — —	— — —	+ + +
	兎	— — —	+ + +	+ + +
	モルモット	± ± ±	+ + +	+ + +
	鶏	— — —	— — —	± + +
鳥 型 (鳥 獣)	人	— — —	— — —	± + +
	山 羊	— — —	— — —	± + +
	兎	— — —	+ + +	+ + +
	モルモット	— — —	— — —	+ + +
	鶏	— — —	— — —	+ + +

人型菌に対しては、モルモット血液が最も溶血し易く、それに次ぐものは兎血液であり、人、山羊、鶏血液は比較的抵抗性が強い。鳥型菌においては、鶏血液が特に溶血され易いと言うような事はなく、上述の人型菌同様、兎、モルモット血液に強く溶血が表われ、人、山羊、鶏血液では著明でなかった。第 6 表では病原性との密接な関係を思わせたが、第 7 表の結果から見れば、菌型との関係よりはむしろ各種動物血球の本来の抵抗性と何等か関係あるやに思われた。

併し乍ら衆知の各種動物赤血球の食塩抵抗性とは全然別個に考えねばならないことは第 8 表から明らかである。この場合は山羊血球が最も抵抗弱く、兎、人、モルモットの順であるが、結核菌による溶血はモルモットにおいて最も顕著に見られた。この点よりして此の二つの場合の溶血の機転は全然別種のものとして考えねばならない。

第 8 表 各種動物赤血球の食塩溶血抵抗性

NaCl %	8.5	8.0	7.5	7.0	6.5	6.0	5.5	5.0	4.5	4.0	0
人	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
モルモット	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
山 羊	—	—	±	+	+	+	+	+	+	+	+
兎	—	—	—	—	—	±	±	+	+	+	+

c) 結核モルモット血液

此の溶血現象が溶血素の如き免疫学的な機構によつて発現するものならば、結核感染モルモット血液と健康なもののそれとの間には何等かの差異が表われなければならないと考え、実験を行ったが、そこには何等の差異も見られなかった (第 9 表)。即ち本現象は免疫、アレルギーとは関係なしに発現するものであると言える。

第 9 表 結核モルモット血液における溶血作用

	10 mg/ml	20 "	50 "	100 "
健康モルモット	— — —	— ± ±	+ + +	+ + +
結核モルモット No. 1	— — —	— — ±	+ + +	+ + +
No. 2	— — —	± ± ±	+ + +	+ + +
No. 3	— — —	— ± ±	+ + +	+ + +

以上の成績を小括すれば、本溶血現象によつて有毒結核菌と非病原性ミコバクテリウムとの間には割然と一線を引くことが出来る。而して同菌型においては毒力の強い菌株程溶血作用が強く表われる傾向が窺える。殊に BCG, Vole 菌は強毒菌に比べて溶血作用は遙かに弱い。然るに尚該菌株に対する動物の感受性と本溶血作用との間には特殊な関係は無い。即ち人型菌は人、モルモット血球を強く溶血せしめるが、鶏に弱く、鳥型菌は鶏の血球を強く溶血させるが哺乳動物には弱いと云う様な種特異的な関係は認められなかった。

Ⅲ. 作用物質の本態、所在について

以上の成績から、本溶血作用の作用物質は、菌体成分の一部、而も水に難溶性を示す或種の脂質成分であろうと推測する事が出来る。そこで Anderson¹⁷⁾ の物質分析の

方法にならい作用物質の本態, 所在を検討した。その方法は第10表に示す如くである。

第10表 溶血作用物質の分離

9週間 Sauton 培養基に培養した人型朝倉株を使用した。抽出方法は先づ菌を充分水洗し、湿菌のまゝアルコール・エーテル等量混合液に投じて室温で充分攪拌振盪した後、この抽出液を氷室2昼夜冷却放置し、生じた白色蠟様の沈澱物を濾過によつて除き、濾液を濃縮しそれにアセトンを注加し、アセトン不溶性の粘着性物質とアセトン可溶性分劃とに分けた。前者に対してはエーテル溶解、アセトン注加を繰返し精製した。アセトン可溶性分劃は濃縮して褐色油状の物質を得た。一方菌体残渣はクロロフォルムを加えて、クロロフォルム可溶性の黄色蠟質と脱脂菌体とに分けた。

以上の操作により得た5物質につきモルモット血液に対する溶血作用を試みた所、最も強力に溶血を起すものは、褐色油状のアセトン可溶性分劃であつた。その溶血作用は非常に強く、短時間即ち2時間以内に表われ、而もスライド上の菌液の部分を超えて血液のみの部分に迄広範に発現する。この様な事は濃厚菌液においてさえも起らないことである。粘着性のアセトン不溶の沈澱物にも溶血作用は認められたが、これは前者に比べて非常に弱かつた。其他の分劃である白色蠟様物質、黄色蠟質及び脱脂菌体には溶血作用は全然認められなかつた。

それ故、結核菌による上述の如き溶血作用の本態は菌体成分に由来するものであつて、而も主としてアセトン可溶性の脂質に立脚する事を確認することが出来た。

考 按

結核菌の生物学的特性の一つとして、溶血作用のあることを示し、その発現のための条件、毒力との関係及び作用物質について吟味を行つたが、その作用の本態が菌体成分中のアセトン可溶性脂質であることが、重要であると思われる。

作用物質が水に難溶性である為、大量の菌を使用しなければ本溶血作用は見られない。この故にこそ結核菌体組成にこのような特異な作用のあることが今日迄看過せられたのであろう。

さて本溶血作用の本態であるが、当然免疫学的な溶血素とか滲透圧による溶血作用は否定する事が出来る。作用物質としてアセトン可溶性脂質であることを確認し得たのであるが、この分劃中には *Phthioic acid* と *Tuberculostearic acid* とが含まれていることが知られている¹⁸⁾。これ等は結核菌の他の脂質即ち蠟質、磷脂質等に比して融点が遙かに低く37°C以下であり、実験条件下でプラスマに僅かにしる溶解する可能性は充分考えられる。この種の物質が表面活性的に働き血球の表面張力を下げることににより、溶血を起すと考えるのが最も妥当な解釈ではなからうか。本作用物質に得する各種動物赤血球の溶血感受性と、滲透圧によるそれらの食塩抵抗性の序列とが、全然異なるのも表面張力の低下が本溶血作用の本態であるならば、説明し易い。又低温において本溶血作用が起らないのも、脂肪酸の融点と溶解度を考慮すれば理解し易い。尚 *Phthioic acid* 及び *Tuberculostearic acid* を動物に注射することにより、類上皮細胞及び巨細胞の出現を伴う定形的結核性炎症を起し得る事が知られている¹⁹⁾。この作用と本溶血作用とを毒力に結びつけて併せ考えるならば誠に興味深いものがある。

さて毒力乃至病原性と本溶血作用との関係であるが、この問題は第1編にも述べた如く¹²⁾、本来強毒の菌と、それから変異して出来た弱毒の菌とを比較するのでなければ、因より毒力と本溶血作用との真の関連性は云々出来ない。が敢えて比較するならば、毒力結核菌と非病原性ミコバクテリウムの溶血作用との間には明白な量的差違が見られるし、又BCGも他の牛型菌に比して溶血作用が弱い。但し人型菌と鳥型菌の溶血作用の強さの差異を直ちに毒力の差異と見なす事は、先にも述べた如く充分な考慮を要する問題である。

又本作用物質と Bloch^{13,14,15)} 等の *cord factor* との関係であるが、これ等は明らかに別種のものである。

cord factor は結核菌脂質のクロロフォルム分割にあるが、本作用物質はアセトン分割に存在する。

結 論

1) 結核菌体は特定の方法で検査すれば溶血作用を呈する。

2) このような作用に関係する物質は菌体脂質中のアセトン可溶性脂肪中に含まれる。

3) 溶血作用は病原性ミコバクテリウムにおいて強く BCG, Vole 菌等において弱く、非病原性ミコバクテリウムにおいては最も弱い。

4) 本作用に関係する物質は結核菌の病原性、毒力の一因子であること、及び本作用を利用して毒力の体外における表示が可能である事が考えられる。

終りに臨み御指導、御校閲を賜った恩師植田教授に深謝します。

参 考 文 献

- 1) Schain, P.: Am. Rev. Tuberc., 49, 551, 1944.
- 2) Wagley, P. E. & Steenken, W. Jr.: Am. Rev. Tuberc., 53, 496, 1946.

- 3) Middlebrook, G., Dubos, R. J. & Pierce, C.: J. Exp. Med., 86, 175, 1947.
- 4) Stuel, E. & Dubos, R. J.: J. Exp. Med., 93, 559, 1951.
- 5) Tegian, D. & Kurung, J.: Am. Rev. Tuberc., 63, 181, 1951.
- 6) Suter, E.: J. Exp. Med., 96, 137, 1952.
- 7) Suter, E.: J. Exp. Med., 97, 235, 1953.
- 8) Bloch, H.: Am. Rev. Tuberc., 58, 662, 1948.
- 9) Allgöwer, M. & Bloch, H.: Am. Rev. Tuberc., 59, 562, 1949.
- 10) Bloch, H.: Am. Rev. Tuberc., 91, 197, 1950.
- 11) Martin, S. P., Piece, C. H., Middlebrook, C. & Dubos, R. J.: J. Exp. Med., 91, 4, 1950.
- 12) 大岩弘治: 日本細菌学雑誌, 11巻, 9号 787, 1956.
- 13) Bloch, H.: Am. Rev. Tuberc., 61, 270, 1950.
- 14) Bloch, H., Sorkin, E. & Erlenmeyer, H.: Am. Rev. Tuberc., 67, 629, 1953.
- 15) Noll, H. & Bloch, H.: Am. Rev. Tuberc., 67, 828, 1953.
- 16) Philpot, F. J. & Wells, A. Q.: Am. Rev. Tuberc., 66, 28, 1952.
- 17) Anderson, R. J.: Physiol. Reviews, 12, 166, 1932.
- 18) Sabin, S.: Am. Rev. Tuberc., 25, 153, 1932.