実験的チフス症の研究 (特にマウス対ゲルトネル 腸炎菌との組合せにおいて)

IV 感染臓器内における菌の状態

三 橋 進 川 上 正 也 五 島 嵯 智 子

群馬大学医学部微生物学教室 (主任 三橋進教授)

小 此 木 丘 深 井 孝 治 石 塚 博 一

群馬大学医学部病理学教室 (主任 川合貞郎教授)

[受付: 3 月 11 日・1958 年]

マウスが弱毒の腸炎菌 S E R 株に感染すると、その後の強毒菌感染に耐えうるようになる。この抵抗力は生菌免疫後 3 週以後において成立する¹⁾。従来多くの研究者は、実験的チフス症において、マウスに投与された弱毒菌は接種局処より血液中に拡がり、各臓器に分布した後、血中より消失、臓器内に長期間残存することを報告している²⁻⁵⁾。この場合免疫に使われる菌は長期間臓器に生存するものほど有効である^{6,7)}ともいわれ、また早く消失する場合は強い免疫の形成されているときである⁸⁾ともいわれている。生菌免疫の様相を検討するにあたって、この免疫菌の生体内での存在状態を詳しく知る必要がある。

そこでマウスに弱毒腸炎菌を感染させ、体内での菌の分布、増殖状況、薬剤に対する菌の態度、大きさ等についてしらべた。

実験方法

実験動物: ddF 系マウスを用いた。飼育その他の条件は前報の通りである。

使用菌株: S. enteridis SER 18 M 株⁹⁾ を普通寒天斜面 18 時間培養し、前報の如く、 10^{-5} mg を一匹のマウスに腹腔より感染させた。

臓器内の菌の検出: 感染したマウスを断頭により殺し各臓器の可能な限り全体を無菌的にとり出し、缺で破碎して数 ml のブイヨンに入れ、20 時間増菌させた後その培養液 1 白金耳を B T B 乳糖寒天平板に塗つて、37°C、24 時間培養したとき、乳糖非分解の定型的な集落を作り、抗 O と抗 O H 血清に凝集するものを陽性とした。他の菌

の汚染があるときは更に適当な方法で分離同定を試み、まぎらわしい時は因子血清による凝集と糖分解能により判定した。

生菌数計算: 臓器内の生菌数は感染臓器を磨碎し、稀釈液について平板混積培養を行つて測定した。すなわち断頭しや血したマウスの臓器を秤量し、その重量の 3 倍量の生理食塩水に浮べ、一定廻転数のホモジナイザーで 2 分間破碎し、ブイヨン・食塩水 (1:4) を加えて 10 倍階段稀釈を行い、各稀釈液の 1 ml を平板混積培養し、24 時間後、発生した集落数を数え、もとの浮ゆう液の菌数を算定した。上記の条件で臓器とともに既知濃度の菌液をホモジナイザーにかける場合、生菌の減少率はほぼ 18% であつたから、これを考慮に入れて臓器 1 g 当りの菌数を補正した。

菌の大きさ: 分割遠心によつて比較した。マウスの肝をとり出し秤量し、1 g につき滅菌した 0.88 M しょ糖液を加えて 5 ml になるようにする。これを上述のホモジナイザーに 2 分間かけたのち、10,000 単位の varidase (Lederle Laboratories, New York) を加え、37°C に 2

MITSUHASHI Susumu, KAWAKAMI Masaya, GOTO Sachiko, OKONOGI Takashi*, FUKAI Koji* and ISHIZUKA Hirokazu*: Studies on the experimental typhoid. IV The status of the presence of bacteria in the organs of infected mice with S. enteritidis. Department of Microbiology, Department of Pathology*, School of Medicine, Gunma University — Jap. J. of Bact, 13(8), 704-709, 1958.

時間において肝組織細片の自家融解をおこさせる。これを冷却後、容積 8 ml, 内径 12 mm の遠心沈澱管に 5 ml ずつ移して分割遠心を行い、第 1 図に示すような装置に

第 1 図 肝ホモジネートの上清を一定の深さから採取する装置

より液面から正確に 1.5 cm の深さにピペットをさし入れ、2 ml の上清をとり、これについて上述の方法で菌数計算を行った。遠心は Spincro L 型または佐久間製作所冷凍高速遠心機を使用した。遠心効果は沈澱管の底端について計算した。操作はすべて 5°C で無菌的に行った。

実験成績

各臓器における菌の分布

マウスの腹腔に 10^{-5} mg の菌を注射し、時間を追って 3 匹ずつのマウスを殺し、各臓器と心血中の菌の有無をしらべた。

第 2 図に示すように菌は注射後 6 時間以内に流血中に証明されはじめるが、24 時間以後は心血からの菌の検出は稀になり、主として肝、脾、腸間膜リンパ結節に定着するようになる。この他に各リンパ結節、肺、腎にも検出される。この菌は感染後長期に亘って残存し、感染後 126 日においても尚陽性であった。肝、脾の検出率は最

第 2 図 腸炎菌弱毒株 10^{-5} mg 感染後のマウス、臓器における菌の検出

検査臓器	1/4	1/2	1	2	4	8	16	21	32	64	126	菌検出率 %
肝	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
脾	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	97
腸間膜リンパ結節	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	68
肺	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	52
大腸系リンパ結節	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	48
腎下リンパ結節	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	43
腎	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	33
心血	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15

■ 陽性 □ 陰性

も大きいので、この 2 つの臓器について感染後の生菌数を定量的に日を追って測定した。定量は 3 匹のマウスについて行い、平均値を算出した。結果は第 3 図に示した。肝の菌数は感染後次第に増加し、24 時間後に最高になるが、その後減少しはじめ、37 日には最高値の $1/10$ 程

第 3 図 マウスに感染した弱毒腸炎菌の臓器内菌数の変化

度にも減少する。脾についてもほぼ同様の結果がみられる。これによつてマウス腹腔に感染した弱毒腸炎菌はかなり初期に流血中に放出され、各臓器に分布定着し、長期にわたって生残していることがわかる。

抗生物質に対する感受性：弱毒変異菌 (SER) の生菌感染 3 週以後、強い生菌免疫が成立し、その後、強毒菌の攻撃に耐えるようになる。この生菌免疫が 3 週以前にどのような状態を示すかを知る目的で、生菌免疫を施したマウスに抗生物質 (ストレプトマイシン、クロラムフェニコール) を投与し、マウス全身から生菌を消失させることを試みた。予期に反し、SM, CM の種々の組みあわせて、1 週に亘って治療を試みても全身から菌を消失せしめることが出来なかつた。この事実を詳細に検討する目的で次のような実験を試みた。即ち感染したマウスに硫酸ジヒドロストレプトマイシン (SM) 0.3-0.5 mg を与えて治療を行い、その 24 時間後に臓器をとり出して培養し、生菌の有無をしらべた。同時に対照として SM を投与しない群をおき、同様にして菌の有無をしらべた。第 4 図に示すように、感染後 18 時間以内に SM を与えたものでは各臓器の菌は完全に消失しているが、24 時間以後に治療した群ではこの量の SM 投与によつて菌をなくすることはできなかった。

つぎに感染後 6 日以上経過したマウスを SM またはクロラムフェニコール (CM) を或は両者の併用によつて治療を試みた。感染後 6 日目に 1 日量 0.7 mg から 1.5 mg の SM を 2 回ないし 3 回に分けて与え、またはこの投与法による治療を 2 日続けて行つた。1 日の注射の間隔は 2 回のときは 8 時間、3 回のときは 4 時間とした。また感染後 9 日目に治療をはじめた群には CM 0.9 mg から 1.0 mg を 2 回から 3 回にわけて併用し、5 日間連

第4図 弱毒腸炎菌 10^{-5} mg 感染させた後、SM
で治療したマウスの臓器における菌の検出

続投与した。しかし第5図に示すように、いずれの投与方法によつても全動物の各臓器から菌を全く消失させることはできなかった。

このように感染後比較的早期に治療を行えば臓器内の菌を消失させることができるが、感染後24時間を過ぎるとこれらの抗生物質の種々の組合せによる、長期に互る投与によつても全身から菌を消失せしめることができなかった。

試験管内でのSM感染性のテスト

このようなことから感染後動物体内の諸臓器に定着した菌は生体内でSM耐性または非感受性のものに変化した可能性も考えられる。このことを確かめるために感染後6日目または7日目に治療したマウスの肝から菌を分離培養して食塩水に浮かべ、種々濃度のSM液を加えたブイヨンに培養して、翌日菌の発育をしらべ、SMにたいする感受性をしらべたが、原菌株との間に差がみられず、耐性になつていないことがわかった。この場合菌を

第5図 弱毒腸炎菌 10^{-5} mg を感染させた後、
SM または CM で治療したマウスの臓
器における菌の検出

平板に移して培養すると、大きさ、抗原構造、集落の形態、糖分解能は原菌株と全く同じであるので、肝からとり出した菌を平板培養することによつてSMに対する感受性も原菌株と同じに復帰することもあると考えられる。

そこで肝をそのままホモジナイザーで破碎、菌を細胞からとり出したままの状態感受性試験を行った。感染

肝ホモジネート遠心上清の菌と、平板培養の菌を健康マウスの肝ホモジネート遠心上清に浮ゆうさせたものを、同様にSMを加えて培養したが、両者の間に感受性の差はみられなかった(第1表)。

第1表 感染菌と培養菌の in vitro における
SM 感受性

菌	培 養	浮 ゆ う 液	菌数/ml	SM 最低発 育阻止濃度 γ/ml
原 株	普通寒天平板 8 時 間	食 塩 水	1.0×10^3	32
感染菌	普通寒天平板 18 時 間	食 塩 水	2.9×10^3	32
原 株	普通寒天平板 18 時 間	肝ホモジネ ート遠心上清	8.2×10^3	64
感染菌	培養せず	肝ホモジネ ート遠心上清	3.4×10^3	64

生体内生存菌の大きさ：

感染後24時間以上経過した菌は細菌学的方法でマウスの臓器内に証明されるが、病理組織学的検査ではこれを確認することはできない。その理由として、菌が細胞内に入つて通常の染色では染り難くなっているか、あるいは形態が非常に小さくなっているのではないかと考えられる。

感染した結核菌は生体内で小さくなり染色可能の顆粒として証明され、Much の顆粒として知られている^{10a, b)}。そこで肝内に棲息している 菌の大きさを in vitro で培養した菌の大きさと比較してみた。感染後6日目にマウ

第6図 感染菌と in vitro で培養した菌の大き
さの比較

G: 遠心果効 * $\frac{\text{沈澱した菌数}}{\text{全菌数}} \times 100$
t: 作用時間(分)
.....○..... 平板18時間培養菌
————●—— 肝臓内感染菌

スの肝を無菌的にとり出し、前述の方法でホモジネートを作り、廻転数と遠心時間を変えて分割遠心を行い、上清に残る菌数を生菌数計算により算出した。

対照としてとり出した感染菌を平板上18時間培養した集落をかきとり0.88 M しょ糖液に浮かべ、健康マウスの肝を加えて同様にホモジネートを作り、遠心して菌数を計った。加える菌はあらかじめ感染菌と同数になるよう加減した。第6図で明らかなように、同一の条件では培養菌の方が感染菌より沈澱しやすい傾向を示す。

一般に液体の中を粒子が沈降するときの摩擦力 F はその速度 dx/dt に比例し、その比例定数すなわち摩擦係数を f とすれば

$$F = f \frac{dx}{dt} \dots\dots\dots (1)$$

粒子が球体であれば Stokes の法則により

$$F = 6 \pi \eta r \frac{dx}{dt} \dots\dots\dots (2)$$

ただし η は液体の粘度、 r は球の半径である。また沈降定数 s は単位力場での沈降速度と定義されるので

$$s = (dx/dt) / \omega^2 x \dots\dots\dots (3)$$

ここに ω は遠心の角速度、 x は廻転軸よりの距離である。また密度 δ の球が密度 ρ の液体中を落下すればやがて抵抗 F と釣り合つて等速になる。すなわち、

$$F = \frac{4}{3} \pi r^3 (\delta - \rho) \omega^2 x \dots\dots\dots (4)$$

(2)(3)(4) より

$$S = \frac{2 r^2}{9 \eta} (\delta - \rho) \dots\dots\dots (5)$$

δ, ρ, η が一定ならば

$$r^2 = KS \quad \text{また} \quad r^2 = \frac{K'}{\omega^2 x t}$$

すなわち菌体を近似的に球とすれば、遠心効果と時間を変えたときに沈澱する菌の大きさが比較できる。200 G, 5 分間の遠心で沈澱する菌の径を 1 とすれば、これより大きな遠心力で落ちる菌の径は第7図のように比較される。菌体が廻転楕円体である場合、長径が短径の2倍、3倍になったとき、(1) 式の f は球の場合に較べてそれぞれ1.05倍、1.12倍と考えてよい¹¹⁾。

これによりマウスに感染させて、6 日目の肝内生存菌は18時間平板培養菌に比べて小さいものが多いことが明かである。

次に前と同様に弱毒腸炎菌を感染させ、時間を追つてその肝臓を取り出し、ホモジネートを作つて1000 G, 10 分間の遠心をした上清の生菌数を測つて、感染の各時間における小型感染菌の割合を比較した。第8図に示すよ

第7図 感染菌と in vitro で培養した菌の大きさ

* 200×G, 5 分間遠心で丁度沈澱する菌を 1.0 とする

第8図 肝臓内感染菌の大きさの変化

うに、感染3日以後は感染菌全体に対する小型菌の割合は大きくなった。

考 察

マウスに弱毒腸炎菌を感染させるとある程度菌の増殖を許すがマウスをたおすまでには至らないで、長期間各種の臓器内に生存している。このような状態のマウスは強毒菌の再感染に対し極めて強い抵抗を示す。

また病理組織学的にみると、かような動物の肝、脾、リンパ節等には、特有なチフス結節を形成し、死菌ワクチンによつてつくられる結節と細胞学的に完全に異なる。両者を夫々生菌結節、ワクチン(死菌)結節と名付ける²³⁾。

この場合感染後18時間までは S.M. 0.3 mg の投与でこの菌を臓器内から完全に消失させることができるが、それ以後菌を生体内から消失せしめることは非常に困難であつた。最近 Hóbson²⁾ もマウスの *S. typhimurium* 感染に対する治療実験で、早期(一日以内)の治療によつ

て臓器の菌をなくすことができるがそれ以後は菌を消失させることができなかったと報じている。感染24時間以後の治療の困難なことの原因としては、1) 菌が耐性になっている。2) 細胞膜透過性の関係、3) 菌の代謝が変化してSMに対して感受性がなくなっている、という3つの可能性が考えられる。しかしこの実験では臓器から分離した菌についてしらべたところ耐性になっていないことは明らかである。

細胞内に入った菌は種々の殺菌性物質に対する感受性が低下または消失する事実は多くの学者によつて報告されている¹²⁻¹⁴⁾。Shafferら¹⁵⁾はモルモットの白血球に感染されたプルセラが *in vitro* で抗生物質および免疫血清にたいする感受性が低下していることをみており、これはこれらの物質が細胞膜を透過しにくいためとも考えられる。著者の腸炎菌感染の場合も当然菌は細胞内に侵入増殖しており、しかも適当な方法で細胞から遊離させた菌は、SMに対して感受性があることが確認された(第1表)。このことからみれば細胞膜の薬剤透過性の低さが感染菌治療の困難性の原因になっているようにみえる。しかし一方感染後すでに6時間で流血中に菌がなく、各臓器の大部分にそれが証明されること(第1図)、また肝、脾内の菌数はこの時間に相当増加していること(第2図)などをみれば、これらの菌は感染後18時間までに大部分細胞の中に入つていると考えられる。もし細胞膜の透過性の低さを原因と考えるならば、この時期においてすでにSMによる治療は成功しなくなるはずである。事実はこれに反し0.3 mgのSMの一回投与で比較的容易に菌を消失させることができる。故にこの治療の条件では細胞膜の透過性はあまり問題にならない。

感染した肝細胞を破碎して遠心すると上清に残る感染菌が多くなる。すなわち遠心により沈澱しにくくなる(第5図)ことから臓器内感染菌は18時間平板培養菌より形態の小さいものが多いことは明らかである。

Diens¹⁶⁾は多くのサルモネラ属からI型菌を分離し、*S. enteritidis*についてもその記載がある。臓器に残存する小型菌はI型であるとも考えられる。しかし肝、脾の感染菌をペニシリン含有ウマ血清培地、同ウサギ血液寒天、ヒツジ血液寒天に培養したが、原菌と異なる小型集落を作ることできなかった。Dubos¹⁷⁾は壊死組織、乾酪変性果の菌に薬剤が効きにくいことの理由として、これらの組織の崩壊物の拮抗作用を挙げているが、これもこの感染の場合にはあてはまらない。一般に菌は増殖の誘導期の終りから対数増殖期にかけて、石炭酸、抗生物質、温度刺等の影響を受けやすく、増殖の終期には比較

的その影響を受けにくくなる^{14,18-20)}。Cl. tetani, Cl. welchiiらの孢子は発症することなく何年も組織内に生存していて、この菌の増殖に適当な条件ができると増殖、発症する²¹⁾ということはよく知られている事実である。結核菌は酸素の乏しい乾酪果で長い間生体の抵抗にうちかつて生存しているが、ひとたびその病巣が気管枝に開放すると増殖しはじめるという²²⁾。

マウスに感染した弱毒腸炎菌は、侵入局所の抵抗を突破して比較的容易に血流に入る。このことは感染後6時間目の心血中に100%菌を証明しうることからも分る。ついで菌は終末寄生部位である肝、脾、淋巴腺等に定着する。しかし感染後18時間迄はSMの一回投与によつて容易に菌を消失せしめることができる。しかるにこれ以後は菌と生体細胞相互の作用(interaction)によつて、相互に平衡を保ちながら菌は細胞内で生存しつづけ得ようになる。この時期の菌と細胞との関係は未だ解明されない多くの問題を残しておく。

この生菌でマウスを免疫するとき接種後4日から21日にかけて抗菌作用が現れ、強毒菌の後感染を防禦すること、また2次的に感染した強毒菌も直ちに消滅しないで組織内に長期に亘つて生存しながら、増殖しえず、生体との間に平衡状態が保たれるという事実と上述の事がらを考え合わせるとき、この種の免疫の一端をうかがい得て興味がある。またこの現象は抗生物質治療に抵抗する慢性感染症の一模型として考えるとき、一般に感染の初期に治療効果が有り、時日を経過すると効きにくくなるという現象は菌の薬剤に対する耐性獲得、または細胞の透過性の変化と共に、菌の生活状態の変化による場合があると考えるべき一根拠となり得るものである。

結 論

マウスに感染した弱毒腸炎菌の体内分布、増殖状態、大きさ、抗性物質にたいする感受性の変化をしらべた。

1) 腹腔に投与された菌は数時間内に流血中に入り、その後肝、脾をはじめ各臓器に定着される。菌数は感染後24時間から48時間で最高に達し、それ以後漸減する。

3) 臓器内の菌は感染後18時間以内ならば0.3 mgのSM投与により完全に消失するが、24時間を過ぎると強力な治療によつても菌を消失させることは難しくなる。しかしこの菌はSM耐性になっていない。

4) 遠心分劃法により、生体内に定着した菌の大きさをしらべると培養菌より小さくなつていくことがわかる。

5) 臓器内の菌を分離して普通寒天に培養するときは

大きさ, 抗原構造, 集落の形態, 糖分解能, 抗生物質に対する感受性等すべて原菌株と同じである。またこの菌はL型の集落を作らなかった。

6) 以上より, 菌が細胞内にとり入れられた場合 *in vitro* の培養菌と異った特殊な生態に変化することが予想される。

文 献

- 1) 三橋進他: 実験的チフス症の研究(特にマウス対ゲルトネル菌との関係において)生菌免疫と死菌免疫の効果の比較, 日本細菌学雑誌, 13, 323, 1958.
- 2) 大野順之助: 鼠チウス菌のムタビール型変異菌について(其二)病原性並に生菌免疫による感染防禦力賦与性について, 細菌学雑誌, 443, 54-87, 昭8 (1933)
- 3) 窪田幸記: 鼠チフス菌のバクテリオファージュ抵抗菌の生菌を以てする予防接種試験の効力に就て, 第3報, 細菌学雑誌, 445, 388-368, 昭8 (1933)
- 4) 臣永義夫: マウスに於けるゲルトネル菌死菌静脈内免疫について, 日本細菌学雑誌, 3, 18-20, 昭23 (1948)
- 5) Hobson, D.: Chronic bacterial carriage in survivors of experimental mouse typhoid, J. Path. Bact., 123, 399-410, 1957.
- 6) 春日亀助: 腸炎菌の菌株別に因る免疫, 廿日鼠に於ける腸炎菌の死菌並に生菌(原型菌)に因る免疫実験上の差異, 日本細菌学雑誌, 3, 17-18, 昭23 (1948)
- 7) 吉岡守正: 腸炎菌 R 型菌のマウス菌力とその原型菌感染防禦能について, 日本細菌学雑誌, 5, 31-34, 昭25 (1950)
- 8) 茅野秀孝: 腸炎菌弱毒株のマウス感染とその免疫効果に関する研究, 日本細菌学雑誌, 10, 945-950, 昭30 (1955)
- 9) 三橋進他: 実験的チフス症の研究(特にゲルトネル菌対マウスの関係において)実験に使用した菌株の比較, 日本細菌学雑誌, 印刷中.
- 10a) Much, H.: Beitr. Klin. Tuberk., 8, 85, 1907.
- 10b) Mudd, S., Winterscheid, L. C., De Lamater, E. D. and Henderson, H. J.: Evidence suggesting that the granules of mycobacteria are mitochondria, J. Bact., 62, 459-475, 1951.
- 11) Svedberg, T. and Pedersen, K. O.: The Ultracentrifuge, Glarendon, Oxford, 1946.
- 12) Mackaness, G. B.: The action of drugs on intracellular tubercle bacilli, J. Path. Bact., 54, 429, 1952.
- 13) Wackaness, G. B. and Smith, N.: The bacteriocidal action of isoniazid, streptomycin and teramycin on extracellular and intracellular tubercle bacilli Am. Rev. Tuberc., 67, 322-340, 1953.
- 14) Suter, E.: Multiplication of tubercle bacilli within phagocytes cultivated in vitro and effect of streptomycin and iso-nicotinic acid hydrazide, Am. Rev. Tuberc., 65, 775-776, 1952.
- 15) Shaffer, J. M., Kucera, C. J. and Spink, W. W.: The protection of intracellular brucella against therapeutic agents and the bacteriocidal action of serum, J. Exp. Med., 97, 77-89, 1953.
- 16) Diens, L.: Isolation of L type colonies from typhoid bacilli with the aid of penicillin. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 68, 589-590, 1948. : The isolation of L type cultures from Bacteroides with the aid of penicillin and their reversion into the usual bacilli. J. Bact., 56, 445-456, 1948.
- 17) Dubos, R. J.: Biochemical Determinants of Microbial Diseases, Harvard Univ. Press, p. 112, 1954.
- 18) Winslow, C. E. A. and Walker, H. H.: The earlier phases of the bacterial culture cycle, Bact. Revs., 3, 147-186, 1939.
- 19) Sherman, J. M. and Naylor B. H.: Ageing without reproduction and the viability of young bacterial cells at low temperature, J. Bact., 43, 749-756, 1942.
- 20) Schaefer, W. B.: The effect of isoniazid on growing and resting tubercle bacilli, Am. Rev. Tuberc., 69, 125-127, 1954.
- 21) Fildes, P.: Tetanus, Brit. J. Exp. Path. 10, 151-175, 1929.
- 22) Canetti, G.: La bacille de Koch dans la lésion tuberculeuse de poumon, Editions Medicales Flammarion, France, 1946.
- 23) 小此木丘, 他: 実験的チフス症の研究(特にゲルトネル菌対マウスの関係において)生菌感染, 死菌注射動物の病理組織学的差違, 日本細菌学雑誌, 印刷中.