マウスのチフス菌感染に関する実験的研究 第1報

榎 元 一 雄

東京大学伝染病研究所第一臨床研究部 (部長 北本 治教授)

〔受付: 2月3日・1959年〕

1. ま え が き

従来行われて来たチフス性疾患の動物実験には、単チフス菌、腸炎菌、豚コレラ菌が専ら使用されて来たが、先年伝研の北本¹⁾等が、パラチフスB菌を使用してマウスにチフス性疾患を起させ得る事を確め、これが人の腸チフスにある程度近似のものである事が明かになった。チフス菌をマウスに使用してチフス性疾患を起させる実験は今迄殆んど行われていない様であるので、今回私はチフス菌を各種系統マウスに投与し、C57Bl系のマウスに或る程度チフス性疾患を起させ得るという所見を得た。以下それについて報告する。

2. 実験方法

(1) 使用動物: ddD系, C57Bl系, A系, CFw系, CF1系, C3H系, gpc系, の7種類のマウスで、何れも生後4週健康なおすを使用し、約1週間恒温状態で飼育し、毛並よく、元気活潑である事を観察してから使用した。

(2) 使用菌: *Salmonella typhi*, watson株(V相)及びH901(W相)並に *Salmonella paratyphi* A(1015株)で、寒天平板上に塗抹してS型菌であることを確めた。又腹腔内接種によるLD₅₀価は、V相0.3mg, W相1.33mgである。

これを24時間、寒天斜面に培養した後、標準白金耳でかきとり、稀釈ブイヨン(生理食塩水:ブイヨンを4:1に含む)中へ浮遊させ、その0.5cc中に湿菌0.1mg, 1.0mg, 50mgを含むようにした。

(3) 投与方法: 注射器の先にビニール管をつけたものを直接マウスの胃内に挿入し、0.5cc宛注入した。

(4) 保菌状態検索: 菌投与後経過を追って第3週乃至第5週迄観察した。即ち1週毎に1群のマウスを断頭放血して屠殺し、心血はそのまま、1白金耳宛、肝、脾、腎、腸間膜リンパ腺等実質臓器は細砕した後、小

腸、盲腸、大腸はその内容をそのまま用いるか、或はその内腔を白金耳にて擦過して、各々1白金耳宛5区分又は8区分したS.S培地及びMacConkey培地に塗抹した。同時に肝、脾、腸間膜リンパ腺、盲腸内容については、ブイヨンに投入して、24時間増菌を行い、その後、S.S培地及びMacConkey培地に塗抹培養した。

24時間ふらん器中に置いた後、平板培地より乳糖非分解の透明な集落を釣菌してKligler確認培地に移し、免疫血清にてのセガラス凝集反応を行って確めた。

3. 実験成績

(1) 臨床症状及び病理組織学的所見

臨床症状については、菌投与後のマウスの状態を観察したところ、死亡する一部のマウス以外は殆んど何等臨床症状を呈しなかった。C57Bl系の保菌を認めた一部のマウスの肝、脾について、病理組織学的検査を行い、軽度の単核細胞、クッペル星状細胞による肉芽腫のチフス結節を認めた。しかし程度は、パラチフスB菌をマウスに胃内投与した場合程強くなかったが、所謂、自然のcontaminationによるものとは思われなかった。

(2) 保菌状態検索

各系マウスに、*Salmonella typhi*, watson株0.1mg投与の毎週の成績を図1, 2, 3, 4に示す。縦の柱1本はマウス1匹を示し、横線は増菌法で始めて菌を証明出来たものを表し、縦横格子縞は塗抹法でS.S或はMacConkey培地の平板8分の1区割或は5分の1割の何れかに発育した菌集落数が100以下のもの、黒く塗つてある個所は同法で菌集落数が100以上無数までのものを表す。ddD系では菌投与後第1週、11匹中1匹腸間膜リンパ腺に陽性で、他のすべては陰性であった。菌投与後

ENOMOTO Kazuo: Experimental Studies on the Infection of mice by *Salm. Typhi* Report I. Institute for infectious diseases, Tokyo University. —Jap. J. of Bact., 14(3), 698-706, 1959.

図1 ddD系 4w Watson 0.1mg 胃内注入

$$2W \text{ (11日)}^{0/12}$$

図2 ddD系 4w Watson 0.1mg 胃内注入

※ 3 W (18日)⁰/₁₃

* 4 W (26日)^{2/13}

図3 C57Bl系 4w Watson 0.1mg 胃内注入

* 1 W (3日) $\frac{3}{11}$

* 2 W (9日) $\frac{1}{11}$

図4 C57Bl系 4w Watson 0.1mg 胃内注入

为 3 W (16 日) 0/9

* 4 W (23日) $\frac{2}{8}$

第2週になると12匹中全部陰性で、第3週も同じく全部陰性で、第4週になると13匹中1匹心血陽性、小腸1匹陽性であつた。

C57Bl系では菌投与後第1週、11匹中1匹脾陽性、1匹盲腸陽性、1匹大腸陽性、計3匹陽性であつた。投与後第2週になると、11匹中1匹心血陽性で、第3週は全部陰性であり、第4週は8匹中1匹心血陽性、腸内容1匹陽性であつた。以上0.1mg投与では、ddD系とC57Bl系では大した差は認められなかつた。

ここで菌量を10倍の1.0mgに増量して行つた成績は

図5 ddD系 4w Watson 1.0mg 胃内注入

図6 C57Bl系 4w Watson 1.0mg 胃内注入

図5, 6, 7, 8, 9で、ddD系では菌投与後第1週7匹中1匹大腸陽性、第2週及び第3週は何れも陰性であつた。ddD系に較べ、C57Bl系では第1週6匹中1匹肝、脾、腸間膜リンパ腺に陽性で、第2週は6匹中1匹

図7 A系 4w Watson 1.0mg 胃内注入

図8 CFW系 4w Watson 1.0mg 胃内注入

肝, 脾, 他の3匹は脾に陽性で, 第3週は6匹中1匹に心血1匹肝, 1匹脾と3匹に陽性で, 第3週でも保菌状態を認めた。

A系では第1週9匹中1匹大腸に陽性, 第2週は8匹中1匹大腸に陽性で, 第3週は8匹中全部陰性で, C57Bl系に較べて保菌は弱い様であった。

CFW系では第1週7匹中全部陰性, 第2週も同じく5匹中全部陰性で, 第3週4匹中1匹心血に陽性で, C57Bl系と較べて保菌は弱いようであった。

CFI系では第1週, 第2週, 第3週の何れも4匹中全部陰性で保菌は認められなかった。

以上 1.0mg について5種類のマウスに胃内投与した成績では, C57Bl系に他の系統マウスより保菌状態が強く認められた。

図9 CFI系 4w Watson 1.0mg 胃内注入

図10 ddD系 4w Watson 50mg 胃内注入

図11 C57Bl系 4w Watson 50mg 胃内注入

1.0 mg 投与において C57Bl 系以外の系統マウスでは, 著しい保菌も認められず, 又直接敗血症死の死亡マウスも各系1匹或は2匹程度であつたので, 大量投与を考え, 50倍の50mg 投与を次の実験として行つた。

その成績は図10, 11, 12, 13, 14, 15, に示す通りで ddD系では第1週7匹中1匹盲腸に陽性, 第2週は7匹中1匹は脾, 腸間膜リンパ腺に, 1匹は脾に陽性, 第3

週, 第4週, 第5週は何れも5匹中全部陰性であつた。

C57Bl系では第1週5匹中3匹に心血, 肝, 脾, 腸間膜リンパ腺, 腸内容何れかに陽性で1匹は盲腸のみ陽性であつた。第2週は4匹中3匹陽性で, 何れも肝, 脾に菌を認めた。

第3週は4匹中2匹に肝, 脾陽性であつた。

第4週は4匹中全部陰性であつた。

1.0 mg の時と同様に第3週でも肝、脾に陽性であったのは、他の系統に比較してやはり、C57Bl 系はチフス菌に対する感受性が高いようであった。

C F W 系では第1週6匹中1匹に脾陽性、1匹小腸陽性、第2週は7匹中1匹肝陽性、第3週は10匹中1匹脾陽性であった。

C F I 系では第1週7匹中1匹に脾陽性、1匹腸間膜リンパ腺陽性、第2週は7匹中全部陰性、第3週は7匹中1匹盲腸陽性、第4週は7匹中2匹盲腸陽性であった。

C 3 H 系では第1週6匹中1匹腸間膜リンパ腺陽性、第2週は第5匹中全部陰性、第3週は2匹中全部陰性で

あった。

gpc 系では第1週6匹中4匹に肝、脾、腸間膜リンパ腺の何れかに陽性、1匹は盲腸のみに陽性で、かなり菌の侵襲を認めたが、第2週になると6匹中全部陰性、3週も4匹中全部陰性であった。

(3) チフス菌W相株の保菌状態検索

Salmonella typhi H 901 株 (W相) を前実験と同じく ddD 系マウスの胃内に 0.1mg 投与したが、図16に示す如く、2日目5匹中3匹脾、腸内容陽性、4日目5匹中1匹腸間膜リンパ腺陽性、第2週12匹中全部陰性、第3週18匹中1匹大腸に陽性であった。

(4) Salmonella Paratyphi A の保菌状態検索

図12 CFW 系 4w Watson 50mg 胃内注入

図13 CFI 系 4w Watson 50mg 胃内注入

図14 C3H 系 4w Watson 50mg 胃内注入

図15 GPC 系 4w Watson 50mg 胃内注入

図 16 ddD 系 4w H901 株 0.1mg 胃内注入

図 17 ddD 系 4w PA 菌(1015 株)1.0mg 胃内注入

前実験と同じく ddD 系マウスの胃内にパラチフス A 菌 (1015 株) を, 1.0mg 宛投与した。その成績は図 17 で, 1 日目 5 匹中 1 匹盲腸に陽性, 3 日目 5 匹中全部陰性, 第 2 週 5 匹中 1 匹に肝, 小腸に陽性, 第 3 週は 5 匹中全部陰性であつた。即ち ddD 系では, 著しい保菌状態は認められなかつた。

(5) 分離菌の検索

胃内感染に用いた *S. typhi* の中, watson 株を投与されたマウスの各臓器及腸内容より W 相, 或は V W 相を示す菌が検出されることがあつた。マウスより分離された *S. typhi* の中, 精査したものは計 165 株で, 中 124 株 (75%) は V 相, 36 株 (21%) は W 相, 5 株 (3%) は V W 相菌であつた。W 相又は V W 相が分離された臓器には特別の傾向はなく, 広く各臓器から見出されるようであつた。又 W 相を胃内投与した時には検出される菌はすべて W 相であつた。

(6) 凝集素価の測定

菌検索のため屠殺する 1 群のマウスについて, 血清をプールしておき, 診断用チフス Vi 菌液及び O 菌液を用

いて凝集素価を測定した。Watson 株 0.1mg 投与した時には, ddD 系及び C57Bl 系マウスに第 1 週より第 4 週迄, 凝集素価の上昇は認められなかつた。又 1.0mg 投与では何れの系統マウスの場合も凝集素の上昇は認められず, 50mg 大量投与の際に C57Bl 系及び CFI 系マウスに第 2 週より第 4 週に亘り, Vi40 倍, T O40 倍と上昇を認めた。他の系統マウスでは, 50mg 大量投与でも, 凝集素価の上昇は認められなかつた。

(7) 脾重量の測定

生後 4 週の ddD 系感染マウスを断頸放血後, 脾重量を測定した。菌投与後第 1 週 (2 日目) の脾重を 100% とすると図 18 の如く相菌投与群では, 第 1 週後半 (4 日目) では 65%, 第 2 週 51%, 第 3 週 50%, 第 4 週 76% となり, W 相菌投与群では, 第 1 週後半 (4 日目) では 104%, 第 2 週 67%, 第 3 週 97%, 第 4 週 157%, となつた。

図 18 ddD 系 4w Watson 株 H901 株 0.1mg 胃内投与

同様にして計算した無処置の ddD 系マウスの脾重量の経過は, 深谷⁴⁾によれば, 第 2 週 78%, 第 3 週 85%, 第 4 週 68% である。

3 考 察

北本等^{1)~4)}がマウスにパラチフス B 菌を経口投与し, 初めて系統的観察を行い, マウスにチフス性疾患を起させ得ることを確めた。今迄は, 単チフス菌, 腸炎菌, 豚コレラ菌を使用した報告が多く見られのみであつた。チフス菌を使用して, マウスに感染実験を行つた報告は殆んどないようである。又家兎, 家兎, 白兎を使用してチフス菌を感染させた実験は散見されるが, 何れも投与方

法が、チフス菌の静脈内注入であるので、経口投与とは趣を異にしている。マウスを使用してチフス菌経口投与の実験は、おそらく今回の実験が初めてではないかと思う。

実験的チフス症の成立を確める条件として、1) 病理組織学的検査によつて、チフス結節を認めること、2) 流血中及び逐日屠殺による菌の各臓器における増加、3) 動物の症状の発現の三点が満されることが必要とされている⁹⁾。

私の今回の実験は、北本等が行つたのと同じ方法でチフス菌 (Watson 株) を使用して、系統的観察を行い、1) 2), の条件を満足し得る結果を得たので、チフス菌は、マウスに対して、系統を選べばチフス性疾患を起し得ると云えよう。

安東等⁹⁾によると、チフス菌、パラチフスA菌では、実験的チフス症を起し得る動物はないとされており、Blachstein u. Welch⁷⁾、秦⁸⁾も、チフス菌を家兎の血管内に注入して実験したが、各臓器及び流血中の何処にも菌を証明しなかつたと報告している。

又有馬⁹⁾も同じく家兎の血管内にチフス菌を注入して、逐時屠殺して、5分以内は未だ流血中に菌を証明し得たが、5分以後は何処にも菌を証明しなかつたと云っている。これに対して市川等¹⁰⁾は同じく家兎の血管内にチフス菌を注入して実験したところ、肝、脾、腎等に数日間菌を証明したと云っている。しかし数日間の菌陽性では、菌の侵入はあつたとしても、感染が成立し、保菌されたとは考え難い。しかし大前¹¹⁾はチフス菌の生菌0.01mgを家兎及び白鼠の尾静脈に注入して実験したところ、糞便中よりも血液中に菌を証明することが多いとし、何れも1週間以内に陰性となり、まれに1ヵ月後も肝、脾に菌を証明したのもあつたと云っている。

以上何れの実験も、直接に血液中に菌を注入する方法であつて、ごく自然な感染実験とは云えないであらう。

島田¹²⁾は、白鼠、家鼠(80~150 gm)に実験的にチフス菌を、パン或は西瓜の皮に浸して投与し逐日屠殺して便、尿、心血、肝、脾、腎について菌検索を実施し、25日以後にも心血、脾、腎等に菌を証明し得たと云っている。この実験は使用動物がマウスではないが、極めて自然な感染実験と云えるであらう。

韓¹³⁾は初めてマウスを使用し、経口的に数株のチフス菌を投与して、幼若マウス及び成熟マウスについて実験を行つたが、菌投与後1時間より4日迄の消化管及び各臓器の菌検索の結果は、消化管内に僅かに菌を証明し得たのみで、各臓器は全部陰性であつたと述べている。こ

の結果はチフス菌の量及びマウス系統の撰択のためではないかと思われる。

以上の文献に見られる如く、マウスの実験的チフス症は従来全く報告をみない。

私の実験では、チフス菌の1.0mg或は50mg宛を胃内に注入されたC57Bl系において、第3週にも尚各臓器に菌を証明し、又陽性マウスの肝、脾の病理組織学的検査の結果、チフス結節を認めたことにより、一応感染及び保菌が成立したと見做して差支えないのではないかと思う。

北本等¹¹⁾のパラチフスB菌の実験では、胃内注入量が0.1mgと1.0mgとの間に差がなかつたといつており、韓¹³⁾はマウスにチフス菌(桜田株)0.1mgの経口投与を行い、上記の成績を得たが、私の実験でも0.1mgでは保菌は認められなかつた。この点パラチフスB菌の場合は少量で感染及び保菌が成立するが、チフス菌の場合では、少くとも1.0mg、約10倍の菌量が必要のようである。

マウス系統により、各種細菌に対する感受性に差異のあることは、今迄云われてきたことであり、M. Landy¹⁴⁾はチフス菌を各系統マウスの脳内に接種して、その死亡率により感受性の高低について実験を行つてゐる。彼は高度、中等度、低度の3段階に分け、高度は死亡率90%以上、中等度は死亡率50%から90%迄、低度は50%以下としたが、この実験によると、私の実験で感受性の高かつたC57Bl系が中等度感受性であり、感受性の低かつたC3H系が高度感受性となつてゐる。CFW系は私の実験と同じく感受性が極めて低度になつてゐる。しかしこの実験は投与法が脳内接種であり、又その感染式が全然別のもと考えられるので、この実験の成績と私の実験成績が一致しなかつたのは、致し方ないであらう。

有色系マウスは大体感受性が大きいとも云われているが、安東等によれば、チフス性疾患の抵抗性は直接毛色に関係がない。しかし腸炎菌の実験では、明らかにC57Bl系のマウスは感受性が他の系統のマウスに比較して大きいことを指摘している。

この点、同じサルモネラ属の一員であるチフス菌の実験でも同じことが云えると思われる。又 Webster¹⁵⁾によると感受性系統と抵抗性系統のマウスは、死亡に至らないときにおいて、流血中の菌の出現及び長期排菌等に差があると述べているが、私の実験でもC57Bl系のマウスは長期に排菌する点において、他の系統マウスに比較して顕著であつたと思われる。

韓¹³⁾はパラチフスA菌の4株を使用し、幼若マウスに

経口投与し、菌投与後1時間から4日迄、逐時屠殺して菌の体内分布を検索した結果、少数例に消化管に菌を認めたが、各臓器は全部陰性であつたと述べている。

姜声郁^{16,17)}は、モルモットを使用してパラチフスA菌を経口投与し、菌投与後時間的にこれを剖検したところ腸壁を通過して体内臓器への侵入は全例認められなかつたとし、口腔気管を経て肺への侵入、口腔粘膜より頸腺への侵入は投与後8時間迄は陽性であつたが、それ以後菌は消失したと云っている。

又マウスを使用しての実験では、経口投与後30分より逐時屠殺して40時間迄の成績では、肺、消化管に多く菌を証明し得たが、他臓器には少数例しか菌を証明しなかつたと云っている。又7日から23日迄の逐日屠殺の検索では、消化管、及び各臓器何れも菌が認められず、幼若マウスでも感染発病は認められなかつたと云っている。

Rolly¹⁸⁾はパラチフスA菌を経口的にマウスに投与した時、出血性腸炎を来とし、同時に全身感染を起し斃死せしめたと報告した。

しかし Biewald¹⁹⁾はこれを追試し、更にマウスに菌を注射しても疾病を起さなかつたと報告している。しかし大前は家兎の尾静脈より菌を注入して実験した結果、

100日以後にも肝、脾に菌を見たものがあつたと述べている。私の実験でも、胃内投与ではパラチフスA菌はマウスに感染、保菌を起し得なかつた。又 Rolly の述べた如き、出血性腸炎のため、死亡したと思われた例も認められなかつた。

チフス菌、パラチフスA菌、パラチフスB菌のマウスに対する感染保菌状態を比較してみると、チフス菌のマウス保菌状態の成績は、パラチフスB菌投与の成績とパラチフスA菌投与の成績との中間にあるようである。

腸チフス²⁰⁾、百日咳²¹⁾、コレラ²²⁾、赤痢²³⁾、においてはその疾病の経過に応じ、又その流行の時期の異なるにつれ、解離によつて必ずしも単一菌相のみを証明するとは限らないことは、すでに指摘されている。しかし菌相の解離が病期により又流行の時期に如何に推移するか不明である。チフス菌V相株とW相株との間では、マウスに対する菌力において差があり、LD₅₀価は前述の如くV相0.3mg, W相1.33mgである。しかしこの値は両株を腹腔内注射により投与した場合に見られる差異である。

私の実験では、両株とも胃内投与であるが、この場合においてマウス体内への侵入度、保菌率に両株に差はなく、V相株のもつ Vi 抗原も、経口感染時には感染の成立にどれ程の役割を果しているか疑問である。

深谷⁴⁾はパラチフスB菌の実験で、脾の重量を測定

し、明らかに感染の様相の推移を示すが、人体の腸チフスに見られる脾腫よりも稍々遅い感じがあつたと云っている。

私は脾の重量を経過を追つて観察することが、マウスのチフス性疾病成立の簡単な標示の一つの方法になることを期待して脾の重量を逐週測定したが、V相菌投与群では、無処置群に比し脾重量の減少は菌投与後第1週後半より、第2週、第3週にかけて著明であり、第4週において菌処置群マウスに匹敵する重量迄恢復した。但しW相菌投与群では、第3週迄、菌処置群との間に著しい差はないにも拘らず、第4週において著しい脾の増大を示した、奥木²⁴⁾によれば、同一週齢の菌処置マウスにおいても、脾重量の個体差は著しく大きいものであり、且つ飼育条件等によつても甚しい動揺を示すものであるから、その判定には慎重を要する。私の観察期間中には少くともV相投与群において著しい脾の増大は認められず、人の腸チフスに見られる感染脾と思われる所見は認められなかつた。

深谷¹¹⁻¹⁴⁾の報告によれば、パラチフスB菌はマウスに対してチフス性疾患を起し、人間のチフス症に類似するものであり、人間のチフス症の治療、免疫、病態生理の研究はこの線に沿つて行いうると述べている。

私の今回のチフス菌を用いた実験でも、マウスの系統を選べば、かなり類似した成績が得られたので、同様に人間のチフス症の種々の研究に活用することが出来ると云えよう。

4 結 論

1) ddD, C57Bl, A, CFW, CFl C3H, gpc の各々の系統のマウスにチフス菌(Watson株)を胃内投与して観察したところ、C57Bl系のマウスにおいて、他の系統マウスにおけるよりも著しい保菌状態の成立を認めた。

1) チフス菌1.0mg及び50mgの2種の投与菌量の間では、保菌状態に大差はなかつたが、0.1mg投与に比べると、顕著な保菌状態の成立を認めた。

3) チフス菌経口投与時の保菌状態は、パラチフスB菌投与時とパラチフスA菌投与時の保菌状態との中間にあるようであつた。

終りに御指導をいただいた北本 治教授、滝上 正、笠井直倫両博士及び深谷一太学士、佐研病理学研究部河合博士、獣疫研究部、奥木氏に敬意を表します。

本論文の要旨は第13回日本細菌学会関東支部総会において発表した。

文 献

- 1) 北本等：日本細菌学会雑誌，12 (8)，651-655，1957.
- 2) 深谷：日本細菌学会雑誌，12 (9)，697-701，1957
- 3) 深谷：日本細菌学会雑誌，12 (10)，747-752，1957.
- 4) 深谷：日本細菌学会雑誌，12 (10)，747-752，1957.
- 5) 牛場：日本医学：3，3421，97-103，昭和23年.
- 6) 安東等：動物実験法，朝倉書店，東京，初版，415-444，昭和31年8月.
- 7) Blachstein：J. Hopk. Bull. 1899，(12)より引用
- 8) 秦：細菌学会雑誌，101，195-200，明治37年.
- 9) 有馬：大阪医学会雑誌，9，962-970，明治43年.
- 10) 市川等：細菌学会雑誌，272，311-329.大正7年
- 11) 大前：細菌学会雑誌，458，279-291，昭和9年.
- 12) 鳥田：東京医事新誌，2954，2812-2816，昭和10年
- 13) 韓：細菌学会雑誌，499，587-615，昭和12年.
- 14) M. Landy：Brit. J. Exp. Path. 38 (1)，15-24 1957.
- 15) L. J. Webster：J. Exp. Med. 57 (5)，793-817. 1933.
- 16) 姜：細菌学会雑誌，456，83-90，昭和9年.
- 17) 姜：細菌学会雑誌，451，989-1001，昭和8年.
- 18) Rolly：Deusches, Archiv. Klin. Med. 87，595 1906.
- 19) Biewald：Deutsch. Archiv. Klin. Med. 111. 1139，1906.
- 20) 安東：綜合医学，10，8-13，1953.
- 21) 春日等：日本細菌学会雑誌，9 (5)，345-347，1954
- 22) 安田等：日本微生物学病理学雑誌，37，898-907 昭和18年.
- 23) 滝上：日伝誌，30，772-778，昭和31年.
- 24) 奥木：私信による