抗酸性菌の孵化鶏卵内培養

和田 明 二

京都大学医学部微生物学教室 (主任: 木村教授)

[受付: 6 月 1 日, 1951 年]

I 緒 言

孵化鶏卵は Goodpasture, Woodruff¹⁾, 木村, 西²⁾の研究以来 Virus, 細菌, 原虫, 腫瘍等の研究³⁻⁹⁾に盛に用いられるようになった。結核菌を接種した実験には江藤, 古屋¹⁰⁾, 松田¹¹⁾, 窪田, 高橋¹²⁾等の報告がある。

三輪¹³⁾(昭 17)は孵化鶏卵の脈絡尿膜 (以下單に尿膜と称す)上接種に依り, 結核菌は尿膜に結核結節を作るが, 非病原性抗酸性菌はこれを作らずといひ, 東, 竹広¹⁴⁾(昭 19)は尿膜に生ずる結節の差異を利用して菌型鑑別が可能であると報告した。Dubos 等¹⁵⁾(1946)は, 使用した鳥型結核菌 4 株中 1 株のみが尿膜上接種に依つて結節を形成したにすぎず, 又大量の人型菌を卵黄嚢内に接種すれば胎児は死亡するが, 少量を接種すれば血行感染に依つて結節を生ずると発表した。Eggerth 等¹⁶⁾は卵黄嚢内接種の場合尿膜の場合尿膜に生ずる結節は接種孔からの漏洩によるものであるとし, かつ卵黄嚢内接種の場合には卵を力強く振盪して菌を撒布することが必要であるといふ。

植田¹⁷⁾は結核菌の抗酸性型は既に生活力を失つた形態であり, 非抗酸性型こそ生活力を持つた定型菌であると発表している。

私は各種の抗酸性菌を孵化鶏卵の尿膜上並びに卵黄嚢内に接種して, 尿膜における変化, 胎児の生死並びに發育に及ぼす影響及び非抗酸性型の出現状況等を観察したのでここに報告する。

II 実験方法

1. 接種材料

人型結核菌高垣株及び戸田株, 牛型結核菌三輪株及び京大保存株, 鳥型結核菌鳥京株及び竹尾株, 非病原性抗酸性菌関口株及びチモテ株をグリセリンブイオン上に培養し (人型, 牛型は 2 週間, 鳥型は 1 週間, 非病原性菌は 3~4 日毎に継代培養) その可及的幼な部分を取り, 滅菌濾紙で充分水分を除去し, 消毒した瑪瑙乳鉢内で滅菌生理食塩水浮游液を作り, 之を接種材料とした。

2. 孵化鶏卵

白色レグホン種の孵化卵を各群 5~15 箇, 平均 8 箇宛用いた。

3. 接種方法

(1) 尿膜上接種

東, 竹広法¹⁴⁾に依り, 6 日目卵を用い, かつ接種液量は常に 0.1 cc とした。

(2) 卵黄嚢内接種

Cox⁸⁾の法に依り, 4 日目乃至 10 日目卵を用い, かつ接種液量は常に 0.2 cc とし, 卵は振盪せずに直ちに孵卵器内に納めた。

4. 観察方法

孵化第 20 日目に孵卵して次の諸点を観察した。

(1) 尿膜における肉眼的変化即ち結節の数, 大きさ, 撒布状態及び尿膜の肥厚, 濁濁等の有無

(2) 尿膜気室部細片の塗抹標本における菌の有無及び非抗酸性型の出現状況 (Ziehl-Neelsen 法及び Ziehl-Heidenhein 法¹⁷⁾染色に依る) (以下單に ZN 法及び ZH 法と記す)

(3) 尿膜気室部を 10% Formalin 固定 Paraffin 包埋後, 切片標本とし Hematoxylin-Eosin 染色, Ziehl-Hematoxylin 染色及び ZH 染色, その病理組織学的変化, 菌の有無及びその染色状態

(4) 胎児の生死並びに發育の状況

III 実験成績

1. 予備実験

(1) 卵黄嚢内接種に依る胎児の感受性

4 日目乃至 10 日目卵に対し, 牛型結核菌京大保存株 0.5 mg 宛を接種すると, 6~7 日目卵が最も感受性が大であつて, 9~10 日目卵は感受性が小であり, 4~5 日目卵は死亡率が高い。故に本実験においては 6 日目卵を用いることに一定した。

WADA, Akiji: On the cultivation of acid-fast bacilli in embryonated chicken eggs.

Jap. J. Bact., Microbiological Institute of Medical Faculty, Kyoto University. (Director: Prof. Ren Kimura, M. D.)

第1表 尿膜上接種に依る変化

接種 菌量	菌 型 所 見 別	牛 型	人 型	鳥 型	非病原性
mg 10 ⁻¹	肉眼所見 塗抹所見 病理所見	全面結節, 癒合, 尿膜肥厚 +-/+ 滲出性結節	左 同 +-/+ 滲出性結節	稀に白斑 +-/+ 僅に細胞浸潤	なし +±/++ なし
10 ⁻²	肉眼所見 塗抹所見 病理所見	殆んど全面結節, 一部癒合尿 膜肥厚なし +-/+ 滲出性結節	接種部中心に半面結節 +-/+ 滲出性結節	なし --/-- なし	なし +-/+ なし
10 ⁻³	肉眼所見 塗抹所見 病理所見	接種部中心に半面結節 +-/+ 滲出性結節	接種部中心に結節10數ヶ +-/+ 増殖性結節	なし --/-- なし	なし +-/+ なし
10 ⁻⁴	肉眼所見 塗抹所見 病理所見	接種部中心に結節10數ヶ +-/+ 増殖性結節	稀に渾濁 +-/+ 僅に細胞浸潤	なし --/-- なし	なし +-/+ なし
10 ⁻⁵	肉眼所見 塗抹所見	稀に接種部に結節2, 3ヶ +-/+	なし --/--	/	/

備考 1. 塗抹所見の上段 ZN 法, 下段 ZH 法染色; 左方記號 抗酸性型, 右方記號 非抗酸性型
 2. チモータ株は 10⁻⁴ の場合 塗抹所見(一, 一)

第2表 卵黄嚢内接種に依る変化

接種 菌量	菌 型 所 見 別	牛 型	人 型	鳥 型	非病原性
mg 1.0	肉眼所見 塗抹所見 病理所見	全面結節 +-/+ 滲出性結節	全面結節 +-/+ 滲出性結節	/	/
0.5	肉眼所見 塗抹所見 病理所見	全面粟粒結節 +-/+ 滲出性結節	結節10~50ヶ散在 +-/+ 増殖性結節	/	/
10 ⁻¹	肉眼所見 塗抹所見 病理所見	全面に10數ヶの結節 +-/+ 増殖性結節	結節數ヶあることあり ±-/-- 増殖性結節	なし +-/+ なし	/
10 ⁻²	肉眼所見 塗抹所見	結節數ヶあることあり +-/+	なし --/--	なし +-/+	なし ++/++
10 ⁻³	肉眼所見 塗抹所見	なし --/--	なし --/--	なし --/--	なし +-/+
10 ⁻⁴	肉眼所見 塗抹所見	なし --/--	なし --/--	なし --/--	なし +-/+

備考 1. 塗抹所見の欄記載法は第1表に同じ
 2. チモータ株は 10⁻³mg 及び 10⁻⁴mg 接種で塗抹所見(一, 一)

(2) 培地上抗酸性菌の染色状態

各型抗酸性菌の最も発育旺盛な時期の辺縁部を Spatel で静にとり、予め滅菌蒸留水 1 滴をのせた載物ガラス上に浮べ、自然乾燥後型の如く ZN 法及び ZH 法に依り染色する。又菌膜を消毒した瑪瑙乳鉢内で滅菌生理食塩水に依り平等の菌液とし、この菌液及びその毎分 3000 回轉 5 分間遠心沈澱後の上澄液について同様染色を行った。

菌膜においてはその辺縁部に非抗酸性型を認め、鳥型菌及び非病原性菌では特に著明である。

菌液においては特にその遠心上澄液に多く、鳥型菌及び非病原性菌ではその半数以上が非抗酸性型である。

一般に ZN 法に依るよりも ZH 法に依る方より明瞭に非抗酸性を示し、かつ ZN 法に依つては弱抗酸性を示すもの迄も ZH 法に依ると黒く染つて見える。

2. 本実験

(1) 尿膜上接種 (第 1 表)

(i) 人型及び牛型結核菌

(イ) 人型菌に依つては 10^{-3} mg 接種迄、牛型菌に依つては 10^{-5} mg 接種迄尿膜に結節の形成を認め、結節の数、大きさ、撒布の程度及び尿膜の肥厚状態等は接種菌量に比例し、三輪及び東、竹広の報告とはほぼ一致した成績を得た。接種菌量の多い時には尿膜全面に結節を生じ特に気室部尿膜の結節は融合するものもあるが、接種菌量の少い時は気室部にのみ、更に少い時は接種部を中心として小さい結節を生ずる。

(ロ) 結節が形成された場合には塗抹標本において ZN 法及び ZH 法で赤色に染つた菌が認められ、培養に依つて結核菌であることを確め得たが、非抗酸性型はこれを認めることが出来なかつた。

(ハ) 病理標本に依ると、外胚葉は肥厚、角質化し、Pearl の形成がある。中胚葉は一樣に肥厚し特有の結核結節を形成する。 10^{-1} mg 接種時に見られる結節は所謂滲出性乾酪結節で、その中心部は壊死に陥り、周囲に円形細胞浸潤が著明で、類上皮細胞及び少数の巨大細胞が出現するが典型的な巨大細胞は見られない。Ziehl-Hematoxylin 法及び ZH 法に依つて赤色に染色された菌は集束となりあるいは散在して結節中に存在する。内胚葉には変化が少い。

ZH 法に依る染色標本は組織と非抗酸性型とが共に黒染する爲その判別が困難であつて、非抗酸性型を検出することは出来なかつた。

(ニ) 胎児の発育は何れの場合にも同様に良好であつた。

第 3 表 接種菌量と胎児死亡率との関係

接種方法	菌型	接種菌量 mg					
		1.0	0.5	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
尿膜上接種	人型 (高垣株)	2		2	1	0	0
		26		15	15	8	8
	牛型 (京大保存株)	2		3	1	0	0
		26		15	8	8	8
	鳥型 (竹尾株)			9	8	4	1
				12	12	12	5
	非病原性 (關口株)			6	2	1	0
				11	5	5	5
	" (チモータ株)			5	2	1	1
				10	8	9	9
	對照 (生理的食鹽水)	0 5					
卵黄囊内接種	人型 (高垣株)	5	3	2	1	1	0
		15	13	10	6	6	5
	牛型 (京大保存株)	8	3	1	1	1	0
		15	15	8	7	5	5
	鳥型 (竹尾株)	10	9	6	3	1	1
		10	10	10	10	5	5
	非病原性 (關口株)	5	9	5	4	1	0
		5	10	5	5	5	5
	" (チモータ株)			4	1	0	1
				4	4	9	9
	對照 (生理的食鹽水)	0 5					

備考 分母は接種卵数、分子は死亡卵数

(ii) 鳥型結核菌及び非病原性抗酸性菌

(イ) これ等に依つては尿膜に結節を生ぜず、鳥型菌は 0.2 mg を接種するも尚結節の形成を認めなかつた。尿膜は肥厚浮腫状を呈するものが多い。

(ロ) 塗抹標本に依る抗酸性型の出現は、鳥型菌は 10^{-1} mg 接種の場合迄、チモータ株は 10^{-3} mg 迄、關口株は 10^{-4} mg 迄であつて、非抗酸性型は鳥型菌では認められず、非病原性菌では 10^{-1} mg 接種の場合にのみ認められた。

(ハ) 病理標本では、鳥型菌接種の場合には中胚葉が浮腫状を呈し、その 10^{-1} mg 接種の場合にのみ中胚葉に僅の細胞浸潤が認められたが、菌は認められぬ。非病原性菌接種に依つては著明の変化なく、菌も認められぬ。

(ニ) 第 3 表に示す如く接種菌量の多寡に應じた胎児の死亡が見られ、生存したものはその発育が幾分不良であつて、解卵時尙大きな卵黄囊が胎児に附着している。

(2) 卵黄囊内接種 (第 2 表)

(i) 人型及び牛型結核菌

(イ) 人型菌では 10^{-1} mg、牛型菌では 10^{-2} mg 接種

の場合迄尿膜に結節の形成を認め、尿膜上接種の場合と同様両型間に僅に差異あるを認めた。結節は尿膜気室部に最も多いが其他の部分にも不規則に散在する。但しその成績は接種卵に依る個性差を無視し得ず、尿膜上接種の成績の劃一的であるには及ばない。

(ロ) 塗抹及び病理標本における所見は尿膜上接種の場合と同様であつた。

(ハ) 大量の菌、即ち 1 mg を接種した場合には、人型菌では約 $\frac{1}{3}$ 、牛型菌では約 $\frac{1}{2}$ の胎児が死亡する。生存胎児の發育は良好であつた(第3表)。

(ii) 鳥型結核菌及び非病原性抗酸性菌

(イ) これ等に依つては結節を生じなかつた。

(ロ) 尿膜塗抹標本において、鳥型菌及びチモータ株接種の場合には 10^{-2} mg 接種の場合迄抗酸性菌を証明するが、非抗酸性型は認められない。これに反し開口株接種の場合には常に抗酸性菌を、又 10^{-2} mg 接種の場合迄非抗酸性型を検出する。

(ハ) 病理標本においては著明の変化なく、菌も認められぬ。

(ニ) 大量の菌を接種した場合には胎児の死亡率は高く、鳥型菌では 10^{-1} mg、非病原性菌では 10^{-2} mg 接種に依つて大部分の胎児が死亡する(第3表)。又生存胎児の發育は尿膜上接種の場合と同様幾分不良である。

(ホ) 死亡胎児の尿膜気室部には解卵時その表面に恰も糊を塗布しような厚い淡黄色の斑点ないし苔を蒙り、これを塗抹して ZN 法及び ZH 法に依つて染色すると抗酸性菌の純培養であつて、しかもその中には非抗酸性型を多数に認めた。

(ヘ) 卵黄内において菌は著明に増殖するが、塗抹標本を ZH 法染色すると卵黄物質が黒染する爲非抗酸性型の判別は出来ない。

以上尿膜上並びに卵黄囊内接種において、使用菌株に依る差異は、非病原性抗酸性菌間における些少の差の外にはこれを認めることは出来なかつた。

IV 考 按

1. 卵黄囊内接種に依つて尿膜に形成される結核結節に關し、Dubos 等は血行感染といい、Eggerth 等は接種孔よりの漏洩と爲し、又 Taylor 等⁽⁸⁾は同位元素を卵黄囊内に注入した後各器官中におけるその分布状態を検査して漏洩は問題とするに足らずと報告した。

私は本実験に依つて次の諸点から Dubos の血行感染説に賛成する。

(1) 抗酸性菌を卵黄囊内に接種した場合、生存卵においては尿膜気室部に最も多く結節を生じ、又死亡して單

なる培地と化した尿膜においても気室部にのみ純培養を生ずることは、接種菌が好気性である以上怪しむに足らず、気室部に結節が多く形成されるから直ちにこれを漏洩に依るものとは断定出来ぬ。

(2) 尿膜上接種に依つて生ずる尿膜の結節は接種部を中心として次第に周辺部に及び比較的規則的であるのに反し、卵黄囊内接種に依つて生ずる結節は必ずしも尿膜通過孔を中心として形成されるとは限らずかつ撒布状態が不規則であつて気室部を離れた部にも独立して生ずることが多い。

2. 卵黄囊内接種は、その方法は簡單ではあるが、結節形成の劃一性接種菌量の多寡、胎児死亡率等から考へて尿膜上接種に勝るとはいえぬ。又尿膜上接種に於いては、田中法、Burnet 法⁽¹⁰⁾及び東、竹広法の内、東、竹広法が最も劃一的な成績を示すので、化学療法剤の効果判定に利用する場合には本法が最も良いと思う。

3. 尿膜上並びに卵黄囊内接種に依つて人型菌、牛型菌、及び鳥型菌と非病原性菌とを鑑別することは困難であるが、前二者と後二者との鑑別は尿膜上接種に依る外に卵黄囊内接種に依つても可能である。鳥型菌と非病原性菌との鑑別は尿膜塗抹標本における菌の検出状態に依つて可能の場合もあるが、この点は更に研究を要する。

4. Dubos は大量の菌の卵黄囊内接種は胎児を殺すといひ、植田⁽²⁰⁾は培養組織に過量の結核菌を接種すればその發育を遅延せしめると報告したが、本実験においても發育の早い鳥型菌及び非病原性菌は胎児の發育を阻害し、その大量接種に依つて胎児は死亡した。

5. 非抗酸性菌を以て結核菌の定型菌であるとする植田の説に對し、木村、水野⁽²¹⁾⁽²²⁾は特殊なデッキグラス法培養の成績に依つて之を否定する。

菌液特に鳥型菌及び非病原性菌の浮游液及びこれを卵黄囊内に接種して死亡した胎児の尿膜上には非抗酸性型を多数認めるのに反し、生命力を持つた胎の尿膜には殆んどこれを認めない事から、私は非抗酸性型は定型菌ではなくて却つて生活力の弱い型あるいは何等かの変化を蒙つた非定型菌であると爲す方が妥当だと考える。

6. ZH 法は結核菌の非抗酸性型に対する極めて強力な染色法であるが、結核菌の抗酸性非抗酸性という語が ZN 法を基として定められた事から考えると、ZN 法に依つては弱抗酸性を示し乍ら ZH 法に依つては黒染する菌をも、ZH 法に依つて非抗酸性と爲すことには一考を要すると思う。

又病理組織標本の染色に際し組織が共に黒染する爲、組織と非抗酸性型との判別が困難である。

V 結 論

1. 孵化鶏卵の尿膜上接種に依り, 人型結核菌は 10^{-3} mg 接種迄, 牛型結核菌は 10^{-5} mg 接種迄, 尿膜に結核結節を形成したが, 鳥型結核菌及び非病原性抗酸性菌は 10^{-1} mg を接種しても結節を形成しなかつた。

2. 卵黄囊内接種に依る血行感染に依つて, 人型結核菌は 10^{-1} mg, 牛型結核菌は 10^{-2} mg 接種の場合迄尿膜に結核結節を形成したが, 鳥型結核菌及び非病原性菌に依つては結節の形成は認められぬ。

3. 發育の早い鳥型結核菌及び非病原性抗酸性菌は, これを尿膜上並びに卵黄囊内に接種すれば胎兒の發育を遅延せしめ, その大量を卵黄囊内に接種すれば胎兒の大部分を死亡させる。

4. 孵化鶏卵を利用した人型, 牛型結核菌間の鑑別は困難である。鳥型結核菌と非病原性抗酸性菌とは尿膜塗抹標本における菌の検出如何に依つて鑑別可能な場合もあるが, この点更に研究を要する。

5. 人型及び牛型結核菌と, 鳥型結核菌及び非病原性抗酸性菌との鑑別は尿膜上接種に依る外に卵黄囊内接種に依つても可能である。

6. 接種菌液並びにこれを卵黄囊内に接種して死亡した胎兒の尿膜に非抗酸性型を多数認めるのに反し, 生命力を有する生存胎兒の尿膜にはこれを認めることが極めて少いことから推して, 非抗酸性型は結核菌の定型菌であるとは思われぬ。

7. Ziehl-Heidenhein 法は結核菌の非抗酸性型に対する強力な染色法であるが, 病理組織標本中の菌の検出に対しては別途の染色法の研究が望まれる。

擧筆するに当り御懇切な御指導並びに御校閲を賜つた恩師木村教授に心から感謝の誠を捧げる。

引用文献

- 1) Woodruff, A M., Goodpasture, E.W.: Amer. J. Path. 7, 209, 1931.
- 2) 木村, 西: 東京医事新誌, 2880 号, 1294, 昭 9.
- 3) 清野, 川上: 京都医学雑誌, 13, 384, 大 5.
- 4) 水口: 日微生物誌, 28, 1329, 昭 9.
- 5) 田中: 実験医学雑誌, 25, 797, 昭 16.
- 6) 福住: 細菌学雑誌, 544 号, 347, 昭 16.
- 7) Bradford, W. L., Titsler, R.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 34, 241, 1936.
- 8) Cox, H. R.: Pub. Health Rep. 53, 2241, 1938.
- 9) Kirber, H. P., Kirber, M. W., Heule, W.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 73, 481, 1950.
- 10) 江藤, 古屋: 衛生学傳染病学雑誌, 12, 313, 大 5.
- 11) 松田: 細菌学雑誌, 271 号, 31, 大 7.
- 12) 窪田, 高橋: 皮膚科泌尿器科雑誌, 31, 1531, 昭 6.
- 13) 三輪: 細菌学雑誌, 561 号, 558, 昭 17.
- 14) 東, 竹広: 日微生物誌, 38, 178, 昭 19.
- 15) Dubos, R. J., Davis, B. D., Middlebrook, G., Pierce, C.: Amer. Rev. Tbc. 54, 204, 1946.
- 16) Eggerth, A. H., Drescher, E., McOsler, V.C.: ibid. 57, 632, 1948.
- 17) 植田: 東京医事新誌, 66, 7, 昭 24; 67, 9, 昭 25.
- 18) Taylor, R. M., Saenz, A. C.: J. immunol. 63, 319, 1949.
- 19) Goodpasture, E. W., Buddingh, G. J.: Viral and Rickettsial Infection of Man, edited by Rivers, T. M. 1948.
- 20) 植田: 日微生物誌, 25, 1207, 昭 6.
- 21) Kimura, R., Mizuno, D.: Acta scholae medicinalis universitatis in Kioto, vol. 27, Fasc. 1, 31, 1949.
- 22) 水野: 日本細菌学雑誌, 4, 89, 昭 24.
- 23) Emart, E. M., Smith, M. I.: Amer. Rev. Tbc. 47, 426, 1943.