試験管内で性状を移変せしめた際のコレラ菌の毒力と侵襲力

— コレラ菌性状の動態研究補遺¹⁾ 3 —

山 口 伊 典

長崎大学風土病研究所病理部 (指導 青木義勇教授)

佐賀縣衛生研究所

コレラ菌の性状の中, カタラーゼ作用とコレラ赤反應は特定の薬剤を加えた培養液通過によつて, 特に明瞭な相関を保ちつゝ移変する事を, 余は既報¹⁾業績の内て立証した。勿論この他に相伴つて変動する性状があり, 菌形態や集落の外観も條件の選択によつては, これと関聯を保たしめ得るのであつて, 結局, 高山²⁾が動物接種→分離→培地継代→保存→再び動物接種という循環過程で立証した生活力の変轉を, 單なる試験管内の方法で容易に, 且つ短時間で実現する可能性を認め得た事になる。

ところが, 唯一つ, 最も重要な問題が残されている。それは, 余の場合の性状移変に, 事実毒力或は侵襲力の変化が伴うかであり, 本章ではこの点に就いての実験を述べ, 次章に全編の所見を総括する。これは当然前報の実験と同時に進行可きであつたが, 広範囲多量の且つ定量的意欲で行つた生物学的諸性状の検査は, これ以上複雑な動物実験の実施を許さず, 止むを得ず実験の一部を再試し, この度は動物実験に主意を注いだ。猶お, この動物試験には海猿或はマウスの致死量測定という常套的安易の方法でなく, たとえば家兎の静脈内接種, 臓器培養という少数の試験に就いて精検する方針をとつた。これは, 実験当時³⁾の試験入手事情に対処する苦肉の策であつたが, 結果として在来の毒力の定義を分析観察し得た事になり, 偶然の事ながら, その成功を喜んでいる。

即ち, 余は従來の広義の毒力なるものを, Zinssér¹²⁾の定義に従い, 病原性の程度或は菌毒素による狭義の毒力 Virulence と, 宿主の組織や体液内に侵入し, 着床し其処に於て増殖を來す細菌生活力の程度の綜合表現である侵襲力 Invasiveness とに分ち, 考察を加えて行つた。中村豊教授¹³⁾の毒性 Toxität と攻撃力 Aggressivität なる毒力の分析も亦, 之と異字同義のものであると判定している。

供試材料と実験材料

前報の実験に用いた第 24, 65, 132 号株の 4 株を発育忍容限界濃度のネオアルバジール含有ペプトン水に移植し, 新たに通過継代を行い, 原菌は勿論各世代菌に

就いて前章と同じく定量的方法でカタラーゼ作用とコレラ赤反應を検し, 数世代目で恰も両性状が原菌の場合の關係と逆に発現するに到つたときのものを探つて, 原菌と共に比較動物接種実験を行つた。

供用動物中, 家兎は体重殆んど 1 kg の 1 群, 且つ, 同一実験には同一腹の同一條件下に飼育されたものを使用し得た。海猿は同一腹のものではないが体重 300 ± 20 gr のものを使用し得た。

実験は家兎の耳靜脈内に注射したコレラ菌の流血中の菌消長, 致死量, 臨床的並びに解剖的所見, 菌の臓器着床と体外排泄並びに免疫体產生に就て観察し, 海猿では腹腔内注射による臨床的变化及び致死量を観察した。

1) 流血中の菌消長: 第 24, 65, 132 号株の原菌, ネオアルバジール培地通過菌の 6 株, その 18 時間培養菌 2.5 mg を 2 cc のペプトン水に浮遊せしめ上記幼若家兎耳靜脈内に注入, 注射後, 10, 30 分, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 時間目に, 耳靜脈又は直接心臓から 1~2 cc 宛採血し, 43°C に保つた 溶融寒天と夫々 0.5 或は 1.0 cc 宛混釈, 2 枚宛作製し, 培養後, 菌集落数を検し, 両菌数の平均値を, 血液 1 cc 当りに換算, 成績とした。

2) 靜脈内注射による家兎致死量: 上記家兎と別に, 1.0 mg の菌を耳靜脈内に注射し, 全く採血操作等を加えず飼育し, 10 日間観察, その成績を記録した。

3) 臨床的並びに解剖的観察: 体重, 体温, 起毛, 呼吸, 食欲, 不安, 尿 pH, 下痢等の観察, 尿及び尿の強アルカリ性ペプトン水法による菌検索 (尿は肛門よりの直接採便, 尿は自然排尿を排泄直後無菌的に処置)等を, 時間を追い実施, 斃死又は観察終了後各菌株につき各一羽を撲殺, 解剖, その肉眼宏変化を記録した。尙お, 通

YAMAGUCHI, Isuke: Virulence and Invasiveness of Cholera vibrio at properties movement in-vitro. — Supplement to movemental studies on vitality of Cholera vibrio, part III. Institute of Health of Saga Prefecture., Institute of Endemie. Nagasaki University. — Jap. J. of Bact., 7(4): 287—291, 1952.

過菌接種家兎の斃死時には、原菌接種家兎も24時間以内に撲殺し、之を解剖した。

4) コレラ菌の臓器着床：解剖時の各臓器、殊に胆嚢、腸管、尿路等に就て剖面擦過物又は内容を無菌的にとり、直接塗抹、及び強アルカリ性ペプトン水増菌法により菌検索した。

5) 免疫体産生：観察終了時（第65号株通過菌接種家兎は8日目斃死直前）に採血し、血清につき凝集素産生を検した。

6) 海猿致死量：第65, 24, 48, 132号株の原菌、通過菌の8株につき、18時間培養菌を0.1 mgより50 mgに到る段階的菌量をペプトン水2 ccに浮遊せしめ、海猿腹腔内接種し、4日間、臨牀的所見と共に観察した。

実験成績

供用原菌株は大体に於てカタラーゼ作用<コレラ赤反應の性質を持つているが、ネオアルバジール培地通過によりカタラーゼ作用強化、コレラ赤反應弱化の移変を示し、高山の実験結果の逆行関係は充分認められる。但しその程度は、前報での結果と少しく異り、前回は第48 > 132 > 24 > 65号株の順にこの関係が顯著であつたのに対し、今回の実験では第65 > 24 > 132号株の順で、ネオアルバジール培地通過により同一菌株必ずしも同じ移変態度をその程度まで同様には示さない事が窺われた

此等の菌を幼若家兎耳靜脈に注射すると、原菌は何れの株でも pro kilo 3.5 mg で斃死せしめ得ないが、通過菌は第65及び24号株が1.0 mg で斃死した。但し第132及び48号株は2.5 mg で斃死していない。

海猿腹腔内注射では第65号株原菌1.0 mg、通過菌0.5 mg、第24号株原菌25 mg、通過菌15 mg、第48, 132号株は共に原菌40 mg、通過菌25 mgで300±20 gの海猿を24時間内に斃し得た。

以上の成績を表示すると第3表の様になつた。

即ち家兎海猿共に原菌より通過菌の方が少量で動物を斃し、且つ第3表にも比較出来る如く、通過によりカタラーゼ作用増強、コレラ赤反應弱化の傾向が著明であればある程、致死量からみた毒力の増強も亦著しい。然し、この兩反應の成績を原菌、通過菌の區別を考えずにたゞ兩性狀の對蹠程度の著明な順に列べると下記(A)の如くなる。之は家兎注射の際の致死毒力の強弱の順(B)と概ね一致する。然るに海猿の場合の順(C)は之と全く一致しない。

(A) 65原<24原<132原・48原<132通・48通・65通<24通

(B) 65原・24原・132原<24通<65通

(C) 48原・132原<24原<48原・132通<24通<65原<65通

Table 3. Virulence, Viewed from Angle of Mortality.

a) Young Rabbits, intravenous injection.					b) Guinea pig, intraperitoneous injection.										
	Strain No.	C. A.	Injected Dose (mg)	Results	No. of Strain		65		24		48		132		
					Passage		B	A	B	A	B	A	B	A	
					Catalase Red React.		+	++	+	++	+	++	+	++	+
Before Passage	65	+	++	2.5	(-)	Injected Dose (mg)	0.1	(-)	(-)						
	24	+	++	"	(-)		0.3	(-)	(-)						
	48	++	++	"	(-)		0.5	(-)	(+)						
	132	++	++	"	(-)		1.0	(-)	(+)						
					3.0		(-)	(+)							
5.0	(-)														
After Passage	65	++	+	2.5	(+)		10.	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	"	++	+	1.0	(+)		15.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	24	++	-	2.5	(+)		20.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	"	++	-	2.5	(+)*		25.	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
	"	++	-	1.0	(+)**		30.	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	48	++	+	2.5	(-)		40.		(+)	(+)	(+)		(+)		
	132	++	+	2.5	(-)		50.			(+)	(+)				

Remarks: B=before P., A=after P., (+)=died, (-)=left alive,

*=died after 8 days, **=died after 15 days.

Table 4. Pathologic Manifestations Found at Autopsie; Distribution and Excretion of Cholera Vibrio in Young Rabbits by Intravenous Injection.

a) Pathological Found							b) Dist. & Excret.					
Passage	before			after			before			after		
Number of Strain	24	65	132	24	65	132	24	65	132	24	65	132
Time in hours (h) or days (d) after injection.	18 h.	32 h.	10 d.	6 h.	18 h.	10 d.	18 h.	32 h.	10 d.	6 h.	18 h.	10 d.
Heart	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
Lung	—	—	—	—	—	—	*	*	*	*	*	*
Stomach	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Liver	—	—	—	+	++	+	—	—	—	+	+	—
Gall Bladder	—	—	—	+	+	—	*	*	*	*	*	*
Gall Hose	—	—	—	++	+	—	*	*	*	*	*	*
Gall	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+++	+++	—
Duodenum	+	+	+	+++	+++	++	—	—	—	+++	+++	—
Small Intestine	—	+	+	+++	+++	+++	—	—	—	+	++	—
Ileum	—	—	—	+++	+	+	—	—	—	+	++	—
Caecum	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	+	—
Large Intestine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—
Rectum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—
Mesentery	—	—	—	++	+++	—	*	*	*	*	*	*
Lymph Gland	—	—	+	—	+	—	*	*	*	*	*	*
Kidney	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	++	—
Urine Hose	—	—	—	+	+	—	*	*	*	*	*	*
Bladder	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	—
Spleen	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
Ascites	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Subct. Tissue	—	—	—	+	—	—	*	*	*	*	*	*
Faeces after 1 h.	G	G	G	G	G	G	—	—	—	—	—	—
" 8 h.	"	"	"	"	"	"	—	—	—	+	—	—
" 12 h.	"	"	"	"	"	"	—	—	—	*	+	—
" 18 h.	"	"	"	"	"	"	—	—	—	*	—	—
Urine after 1 h.	A	A	A	A	A	A	—	—	—	—	—	—
" 8 h.	A	N	A	N	N	N	—	—	—	—	+	—
" 12 h.	A	N	A	*	N	N	—	+	—	*	+	—
" 18 h.	*	*	*	*	N	A	—	+	—	*	—	—

Remarks: Pathological Found; (++, +) = found, (—) = not found, G = no Diarrhoea, A = Acid, N = Neutral.

Dist. & Excret.; (++, +) = found, (—) = not found, * = no examination.

この不一致が家兎、海獺と云う種族差によるものか、注射方式の差によるものかは判明し難い。然し、何れにせよ、その致死量の比較からみると、両獸間に余りに大きな差が存し、靜脈内注射と腹腔内注射と云う感染方式

の差に原因があり、其処に余の立証せんとする増弱する毒力なるものゝ意義解析の鍵が存する様であり、之は後で実験を総括して考察する事とする。

上記実験時の臨床所見として、家兎は 2.5 mg 注射の

際、間もなく例外なく起毛、不安、食慾不振を起し、原菌では6乃至8時間目に早くも食慾を恢復したが、通過菌の場合には、かゝる恢復はみられなかつた。体重は一定の所見を得なかつたが、通過菌は減少、原菌は変化なしと概述出来る。体温は原菌の場合1時間目平温又は寧ろ低下し、直ちに恢復する。通過菌では1時間目やゝ低下、4乃至12時間目に上昇、著しい場合は40°Cにまで及び、其後少しく降る。6乃至8時間目以後に急激に体温上昇した場合、家兎はその直後より著しく疲弊して遂に斃れた。ともかく耳靜脈注射の場合、家兎の予後は觀察期間の最後まで全く判断を許さず、8日目、15日目に漸次瘦弱の末、斃死したものもあつた。これに反し、海狸は注射後、注射量家兎に比し甚だ大なるにかゝわらず斃死しない場合には6時間目迄に諸症狀漸次恢復又は輕減し、18時間後には全く健康同様となつた。特に食慾の恢復と不安態度の消褪は迅速で、6乃至8時間目頃の食慾は寧ろ旺盛ですらあり、爲に体重増加を示したものもあつた。家兎と著しく異なる所見としては、通過菌5.0 mg、原菌20.0 mg以上という致死量に近い菌を注射した場合、海狸はその予後の如何にかゝわらず1乃至4時間目から後肢に先ず麻痺と不随様運動を起し、次で半身不随狀となつて、一方側に倒れんとするのを懸命に防ぐ姿勢を示し、耐え得ずして横臥するものもあつた。然し之も12乃至18時間目迄に斃死せざる場合、恢復し24時間後に於て斃死或は麻痺症を残すが如きはなかつた。猶お、家兎では、尿は総ての通過菌及び第65号株菌の場合、第1日6時間目より中性又は酸性となり、且つ白濁した。下痢は何れの場合にも認められなかつた。

以上の様に、家兎は比較的少量の菌で永續した症狀を現し、且つ、二次的病變と考えられるものを示す事多きに対し、海狸は一次的病變は家兎より強く現われるが、速に恢復し、二次的病變が現われない。即ち、家兎体内に於ては菌血症以外に何等かの病變の起つている事が推察された。

又何れの動物の場合も、通過菌接種が原菌の場合より臨床症狀は重篤である事も認められる。尿pHと体温の変化は、接種菌のカタラーゼ作用とコレラ赤反應の対照発現の程度と似通つた順位に著明である。特にカタラーゼ作用の程度に平行する様にも見受けられた。

こゝに於て家兎解剖所見を検討してみると、第4表の如くなる。

即ち、明らかに認めらるゝ如く、原菌は腸管粘膜の一部に輕度の充血、時に少数の少潰瘍をみる以外、殆んど病變と稱するもの無く、これに反し通過菌の場合は幾多

著明な変化を示す。即ち、肝の著明な溢血、肥大、胆嚢は腫脹し、胆汁は原菌の場合深緑色であつたのが淡黄色となり分泌旺盛なるを思はしめ、輸胆管は灰白色に太く軟化し、6時間目解剖例に於て早くも十二指腸部より廻腸部にかけて、漿膜充血、水腫性軟化を來し、粘膜は淡紅色に著しく軟くなつてゐる。これは18時間目解剖例にも認められ、10日目解剖例では十二指腸より廻腸、殊に十二指腸部の粘膜下漿膜に達する潰瘍又は癰瘍様腫脹形成が集團的に多数認められた。腸間膜は6時間、12時間目共に血管怒張を來し、腎実質及び輸尿管は軟化していた。

次に各部位及び排泄尿尿よりの菌檢索の結果をみると、原菌の場合第65号株菌が尿路に陽性の外、総て陰性、これに反し通過菌では6及び18時間目に各臓器、腸管、尿から菌が証明された。然し尿路及び尿からは第65号株通過菌のみ陽性であつた。10日目の剖檢例では菌は全く証明されていない。

Table 5. Viability of Cholera
Vibrio in Blood of Rabbits.

Time in hours after inoculation

Remarks: + died, * no examination,

No. 132 (after Passage) ————,

No. 65 (after Passage) ————,

No. 132 (before ") ······,

No. 65 (before ") - · - · - ·.

特に定量的に行つた流血中の菌消長は血液1 cc中菌数を檢し、第5図に之を図示した。

之に拠ると注射された菌は1時間目に急激に減少し、それ以後24時間前後まで可成の数として現われる。そして通過菌の場合は特に4時間目に著明な増加の山が現われる。家兎はこの頃著しく疲弊するが斃れない。この菌数は6時間目には2時間目より少くなり、8乃至12時間目に再び増加し始めるが、之の山は4時間目の山程著しくない。然し、此の8乃至12時間目の増加時に、通過菌接種家兎の半数が倒れている。原菌の場合は、通過菌の時より流血中に菌数が多く檢出されても、家兎は倒れ

ていない。

以上の成績からコレラ菌耳靜脈内注射の場合の家兎体内の感染機轉を考えると、家兎の体内防衛装置は3時間目迄は大體菌を圧するが、コレラ菌の内、抵抗力乃至生命力の大なるものゝみが4時間目頃から増殖し、これが臓器に着床するが爲か、一時減少し、臓器着床大體終了と推定される時期、即ち6乃至8時間目頃より再び數を増して来る。この第1次菌増加(3乃至4時間目の山)は原菌でも幾分かは認められるが、通過菌で特に著しく、その後の減少の著明な事と共に本菌の特徴を強調している。第2次菌増加(8乃至12時間目の山)は上記の様に菌の臓器着床後の遊出の結果と解するが、余の場合は、中俣の葡萄狀球菌¹⁴⁾、福田の赤痢菌¹⁵⁾、安村の豚コレラ菌¹⁶⁾の場合の如く著明でない。

最後に耳靜脈内一回接種家兎10日目の血清について凝集素產生狀況を検した所、H、O因子に抗原を分ち実験を行い、原菌に比して通過菌は生菌(即ちH+O、事實上反應はH因子)に対する凝集素を強く產生している、然し加熱遠心沈澱した死菌体(O因子)を用いると、原菌接種家兎血清は原菌と通過菌の死菌体に同様に反應するが、通過菌抗血清は通過菌死菌体により強く作用した。即ち、以上より、通過菌は原菌に比し凝集素產生能が大である事が解つた(図表略)。

又、溶血素產生も檢したが、微弱で比較検討し得なかつた(図表略)。

以上本章に関する実験成績の説明を終るが、本研究の主題目標が、この結果と前章までの成績との連関性如何

に関わるものであるが爲に、本実験成績の詳細な検討は、之を次報に譲り度いと思える。

要 約

承前

(14) 試験管内操作によつて、即ちネオアルバジール添加培地の継代培養通過操作によつて、カタラーゼ作用を強化せしめたコレラ菌は、致死量よりみたその毒力が原菌に比し一般に高まつた。

(15) その通過菌家兎靜脈内注射の感染経過に発病罹患の特異な点を認めると共に、原菌感染にみられぬ臓器侵襲を証し得る。

(15) コレラ菌海狗腹腔注射と家兎耳靜脈内注射の場合の最少致死量は後者の場合甚だ感受性が高い。

文献及び註

承前

- 11) 山口伊典: コレラ菌主要性狀の相関性に関する靜態觀察, 本論文第1報; コレラ菌主要性狀の相関性に関する動態觀察, 本論文第2報; 日本細菌學雜誌 7, 3, 1952.
- 12) Zinsser, H., Enders, J. F. and Fothergill, L. D.: Immunity, Principles and Application, Medicine & Public Health, 5th Ed., p. 5, 1939.
- 13) 中村豊: 細菌學免疫學講本, 増訂6版, 第28頁, 昭18. (1944)
- 14) 中俣國夫: 長崎医学会雜誌, 第20卷, 第1848頁, 昭17. (1943)
- 15) 福田正雄: 長崎医学会雜誌, 第20卷, 第2019頁, 昭17. (1943)
- 16) 安村外茂鉄: 長崎医学会雜誌, 第21卷, 第528頁, 昭18. (1944)