

破傷風菌について*

Ueber den Tetanusbacillus

Kitasato S. Zeitschrift für Hygiene. 7:225-34,1889

Carle, Rattone[1-2] が、ヒト破傷風感染巣の膿をウサギの接種し、数世代にわたって破傷風の継代に成功し、破傷風が伝染性感染症であることを証明して以来、多くの研究者がこの問題に取り組んで来た。Nicolaier[1-3] は、この桿菌が地表に広く存在し、マウス、モルモット、ウサギの皮下に接種すると典型的な致死破傷風の像を呈することを発見した。その後まもなく Rosenbach[1-4] は、Nicolaier の破傷風菌がヒト破傷風にも存在することを示し、その後多くの研究者が様々な破傷風の症例においてこのような桿菌を認めている (Hochsinger, Bonome, Beumer, Ohlmüller and Goldschmidt, Morisani, Amon, v. Eiselsberg, Bonnardi, Beumer and Peiper, Brown, Ferrari, Giordano, Shakespeare, Rietsch, Bossano, Belfanti and. Pescarolo, Raum 他)。

しかし最近、破傷風患者あるいは動物の膿中に Nicolaier 桿菌の頭部芽胞が認められない例がいくつか報告されている。例えば、Widenmann[2-1] が報告しており、Flügge[2-2] もこれを確認している。したがって、この桿菌が絶対確実に破傷風病原体であるとは言えない。

Nicolaier 桿菌を動物の体外で確実に純粋培養したり、人工培地で培養して実験的に破傷風を起こすことに誰も成功していないことを考えると、この点については慎重に臨む必要がある。

この不確かかつ一部に矛盾がある結果を明白にするべく、筆者は師 R. Koch 博士の指導のもと、当地の衛生学研究所で実験を行なった。結果は以下の通りである。

当地の陸軍病院で、破傷風の兵士が死亡した。その膿汁の顕微鏡検査では、さまざまな微生物とともに Nicolaier 桿菌が認められ、膿汁の動物接種により陽性結果を得た。

E. Pfuhl 博士の厚意により、この検体をいくつか入手した。これを数匹のマウスに皮下接種したところ、わずか 24 時間後に典型的な破傷風を発症し、2-3 日後に死亡した。組織切片では、接種部位に限局して膿病巣があり、鏡検にて頭部芽胞を有する桿菌がさまざまな他の微生物とともに認められた。筆者はこの膿を人工培地に移植することを試みた。かつて Nicolaier が示した通り、この桿菌は常に他の細菌と混在しており、他

の細菌と混在する場合のみ、固化血清上で良く増殖し、寒天、ゼラチン上でも増殖する。しかし、常に他の細菌と共存している。

この桿菌を他から分離するには通常の方法を行ない、Nicolaier 桿菌の他、嫌気性菌 3 種、通性嫌気性菌 5 種、好気性菌 7 種をこの膿から得た。詳細については続報する。これらのすべての細菌について (後述する頭部芽胞を有する桿菌以外は)、純粋培養、混合培養による動物への移植実験を試みたが、破傷風の症状を起こすことはできなかった。一方、以下の方法で陽性結果を得た。破傷風の膿汁を傾斜固化血清培地あるいは寒天培地の表面に広げ、36-38℃の培養器内に保存すると、24 時間で膿中の細菌がすべて増殖を開始する。この段階で、培養器を鏡検すると、さまざまな細菌の中に頭部芽胞をもつ桿菌がみられる。48 時間後、頭部芽胞を持つ桿菌はさらに数が増える。

次いでこの培養器を、事前に 80℃加熱した水浴にいれ、3/4 ないし 1 時間放置した。このように処理した培地は、生存芽胞のみを含むと考えられることから、数匹のマウスに接種したところ全て破傷風で死亡した。これによって、培地に破傷風菌が含まれていることを確信し、その一白金耳とゼラチンを混合し、これを一部は通常の方法で平板培地に注ぎ、一部は水素を流した扁平なガラス容器 [3-1] (図 1) に入れた。培地はすべて 18-20℃に保存した。水素を流した容器では、1 週間後にコロニー形成が開始した。通常の方法で作成した平板培地は完全に無菌状態であった。10 日後、容器を開いていくつかのコロニーからカバーガラス標本を作成して鏡検した。これらは悪性水腫桿菌よりも小さい桿菌で、しばしば独立して、長い線維状に成長していた。問題の桿菌はあきらかに嫌気性であることから、この分離コロニーをさらに一部は高層寒天培地で、一部はブイヨンと水素を入れた Liborius 容器で培養した。恒温槽内でいずれの培地も 30-48 時間で良く増殖し、ブイヨン培地は明らかに混濁していた。鏡検にて、一端に明るい菌体と芽胞を有する桿菌が認められた。

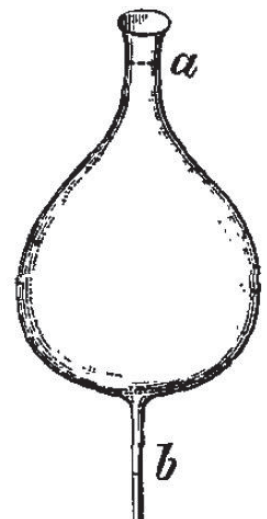


図 1. 扁平なガラス容器 (註 3-1 参照)

* 同題について、1889年4月27日第18回ドイツ外科学会(ベルリン)で報告、供覧した。

この明らかに純粋培養である寒天ブイヨン培地からマウスに接種したところ、わずか 20 時間で典型的な破傷風を発症し、2-3 日後に死亡した。この培養法を数回繰返し、破傷風膿汁の混合培養を 3/4 ないし 1 時間、80℃に加熱し、さらに閉鎖容器の水素下で平板培養法を行えば、破傷風菌を確実に分離できることを見いだした。破傷風膿汁内には、芽胞を形成する他の嫌気性菌も存在するが、幸いこれらの栄養型は熱耐性が低く、80℃、わずか 30 分で消滅する。

さらに異なる場所の土壌をマウスに接種し、破傷風で死亡後に同じ培養法を行ない、常に頭芽胞を有する、実験動物に破傷風を発症させる同じ桿菌を得た。

培養法

純粋培養で観察される破傷風菌の特徴は以下の通り。破傷風菌は偏性嫌気性菌で、空気が存在しないところでのみ増殖する。水素下では良く増殖するが、炭酸ガス下では増殖しない。通常のペプトン含有、弱アルカリ性寒天あるいはゼラチン培地で増殖し、ゼラチンを緩徐に液化し、少量のガスを産生する。寒天および血清は液化しない。寒天あるいはゼラチンにブドウ糖 1.5-2% を加えると、増殖はより急速、活発となる。同様に 100cc の培地に 0.1% インジゴ硫酸ナトリウムまたは 5cc の青リトマス色素を加えると増殖が旺盛になる。水素下、弱アルカリ性ペプトンブイヨンでも良好である。この場合、培養物は特徴的な刺激臭を放つ。破傷風菌は、他の細菌と同様、その毒性を失うことなく継代培養可能である。

コロニーの外観

密閉容器内の水素下でゼラチン培地に増殖した個々のコロニー細胞は、既知の枯草菌のコロニー細胞に一見類似する。枯草菌と同じく、中心部は密で、その周囲に取り囲む細い均一な放射状構造が四方に認められる(写真 1)。唯一の違いは、破傷風菌ではゼラチンの液化がずっと緩徐であることで、このため発育が進むにつれて前述の類似性が失われてゆく。陳旧性のコロニーでは、全体が一本一本の光芒状で、糸状菌コロニーに類似する。

高層ゼラチン内の穿刺培養で、破傷風菌はゼラチンの表面から 1-2 横指の位置から穿刺溝に沿って下方に増殖し、次第に放射状に四方に拡大する(写真 2)。ゼラチンは緩徐に液化し、ガスを産生し、陳旧化した穿刺培養では表面まで上昇する。

温度との関係

破傷風菌は、36-38℃で最も良く増殖する。一方、ゼラチン培地では 20-25℃で 3-4 日後から増殖し始める。水素下 18-20℃の密閉容器内では、増殖が明らかになるのは 1 週間後である。14℃以下では全く増殖しない。

培養温度では、約 30 時間後に既に芽胞が形成されるが、20-25℃のゼラチン培地では 1 週間後、下層が既に液化した状態で、芽胞形成がみられる。

破傷風菌の顕微鏡像

既に述べたように、破傷風菌はゼラチン培地では、先端がまるい桿状、あるいはこれが連なった長い糸状である(写真 3)。培養器中では速やかに芽胞を形成する。芽胞はまるく菌体より厚く、桿菌の一端にあって、芽胞状態では紡錘状になる(写真 4)。

運動性

破傷風菌は、明らかな運動性を有するが、その自発運動は活発なものではない。加熱可能な鏡検台の上では、運動性はやや増強する。芽胞状態では運動性を示さない。

染色性

破傷風菌は通常のアニン染料で良く染色される。グラム染色でも染色される。Ziehl 二重染色も使用できる。

芽胞の寿命

植木鉢の土と混ぜた芽胞を、木綿で軽く包んで 10 時間蒸気滅菌し、絹糸上で乾燥させたものを、デシケータの硫酸上に数日間置き、その後通常の空気に曝露してもなお数ヶ月間毒性を保持していた。

破傷風菌芽胞の熱、化学物質に対する抵抗性

破傷風菌芽胞は、熱に極めて耐熱性が高い。多湿状態、80℃、1 時間の加熱にも耐えるが、蒸気釜、100℃、5 分で死滅する。

破傷風菌は、化学物質にも非常に耐性が強い。芽胞を付着させた絹糸を 5% 石炭酸に 10 時間浸しても高毒性を示すが、15 時間では死滅する。5% 石炭酸と 0.5% 塩酸、2 時間で無力化する。1% 昇汞水 3 時間、0.5% 塩酸 30 分でも死滅する。

36℃、3 日間培養し、芽胞が既に形成されているブイヨン培地 100cc を、クロロフォルム 10cc と混ぜて、気密状態で繰返し振盪し、2 日間置く。クロロフォルムは、2 日後には蒸発させた。この培養液を、マウス 3 匹に各 1cc、モルモット 2 匹に各 5cc、ウサギ 2 匹に各 10cc を注射した。

マウスとモルモットは、15 時間後に典型的な破傷風症状で死亡した。ウサギも 10 時間後に発症し、20 時間で死亡した。新たに接種した培地でも良く増殖した。従って、クロロフォルムはこの時間では芽胞を死滅できないといえる。

純粋培養による動物実験

前述の純粋培養に白金線を浸し、マウスの皮下に接

種すると、24時間で典型的な破傷風を発症し、2-3日で死亡する。ラット、モルモット、ウサギも、動物の大きさに応じて量を多目に接種すると感染する。例えば、ウサギの場合はブイヨン培地 0.3-0.5cc で感染する。ラット、モルモットは、24-30時間で発症するが、ウサギではやや長い(2-3日)。ハトは、破傷風にほとんど感受性がないようにみえる。

従って、混合培養の場合に必要な綿花、木片などの異物は不要である。

注目すべきは、破傷風の症状が常に接種部位近傍から始まることである。すなわち、初期は局所的で、その後徐々に拡大する。躯幹後部に接種すると、まず後肢に痙攣が現れ、頸部に接種すると頸部の筋肉に最初に発症する。

動物の剖検では、充血のみで化膿は見られず、内臓にも明らかな変化はない。接種部位を丹念に鏡検したが、桿菌や芽胞は全く認めなかった。同様に、脊髄、神経、筋、血液、脾、肝、肺、腎などにも菌はなかった。臓器(脊髄、神経、血液、脾など)により、動物に破傷風を発症させることはできず、また破傷風菌を培地上に人工的に培養することもできなかった。

さらにウサギ2匹に、硬膜を切除してブイヨン培地を接種し、他の2匹には耳の静脈に静注したところ、30時間後に発症し、48-60時間後に死亡した。新鮮標本、切片標本ともに、脳、脊髄、血液、その他の臓器に破傷風菌は認めなかった。これらの臓器の培養も陰性であった。

破傷風患者の血液から純粋培養を得たとする、Hochsinger[4-1]、Lampiasi[4-2]の報告は、前述の理由で疑わしいと考える。

破傷風菌が、動物の体内でその特異的毒素を産生する速度を調べるため、マウスの尾の付け根に破傷風培養を接種し、0.5, 1, 2, 3, 4... 時間後に接種部位を切断し、断端を焼きごてで焼灼した。この処置を接種1時間後に行なったマウスは、20時間後に典型的な破傷風を発症した。処置1時間以内のマウスは生存した。接種部位には、8-10時間後にも鏡検にて破傷風菌が認められたが、10時間以降は完全に消失した。内臓には当初から全く認められなかった。

破傷風菌は、純粋培養接種後、動物の体内から非常に速やかに消失する。にも関わらず、典型的な破傷風を惹起する。破傷風菌は、消失する前に何らかの化学的作用を持つ毒物を産生していると推測されるが、この点についてはTh. Weyl博士と共同で研究中で、補遺として発表予定である。

しかし、現在は破傷風を発見できないが、実際には存在し、技術改良により発見される可能性を否定できず、この点については更に研究したい。

以上の結果から、以下の結論が得られる。

1. 破傷風は、特異的な桿菌によっておこる感染症である。

2. ヒト破傷風と接種破傷風の病原体は同一であり、Nicolaierが初めて記載し、後にRosenbachらが確認した嫌気性菌である。

3. この桿菌は、破傷風患者や実験動物の膿巢に存在する。滲出液中ではしばしば芽胞を形成するが、早期に観察すると無芽胞桿菌として認められる。

4. 破傷風菌は、破傷風患者あるいは動物の滲出液から人工的に培養可能で、この純粋培養から、動物を再感染できる。

5. 破傷風の病因、菌の外観については、これまで異なる記載があるが、これは鏡検時期が異なることにより説明できる。患者や動物が早期に死亡すると、滲出液中の芽胞型は少ない。しかし、菌自体が消失することはなく、芽胞を持たない膿汁から芽胞型破傷風菌をいつでも人工的に培養可能である。

本研究については師 R. Koch 教授の助言と励ましを得たことに深甚の謝意を表する。また軍医大尉 E. Pfuhl 博士には試料提供の厚意に、C. Fränkel 博士には写真作成の協力に感謝する。

【註】

1-2. Carle, Rattone. Studo sperimentale sull' etiologia del tetano. Giorn dell R. acad. d. Med. di Torino, 1884

1-3. Nicolaier. Beiträge zue Aetiologie des Wundstarrkrampfes. Inaug Dissert Göttingen, 1885

1-4. Rosenbach. Zur Aetiologie des Wundstarrkrampfes beim Menschen. Archiv zeitschr f. Hygiene VII.

2-1. Widenmann, Beitrag zur Aetiologie des Wundstarrkrampfes. 本誌. Bd. V. S.522

2-2. Flügge. 上記への注釈. Ebenda. Bd. V. S.525.

3-1. この容器(図1)は、R. Münckeと筆者が製作したもので、嫌気性菌の平板培養に非常に優れている。使用法は良く知られる Liborius 管とほぼ同じである。非常に扁平で、厚さわずか2cmである。2つの開口部はまず綿栓で閉鎖しておき、全体を乾燥機で滅菌する、細い首の部分を中心部(b)で細く延ばす。その後、長い漏斗を使用して、培養物質とできるだけ均一に混合したゼラチンあるいは寒天を広口から15-20cc注ぐ。広口の首を(a)でさらに引き延ばす。首の入口部の溶融など後処置については、Liborius管と同じである。

4-1. C. Hochsinger, Zur Aetiologie des menschlichen Wundstarrkrampfes. Centralblatt für Bacteriologie und 40-Parasitenkunde. 1887. Bd. II. Nr. 6-7.

4-2. Lampiasi, Ricerche sull' etiologia del tetano. Giornale Intern. delle scienze Mediche. Anno X.

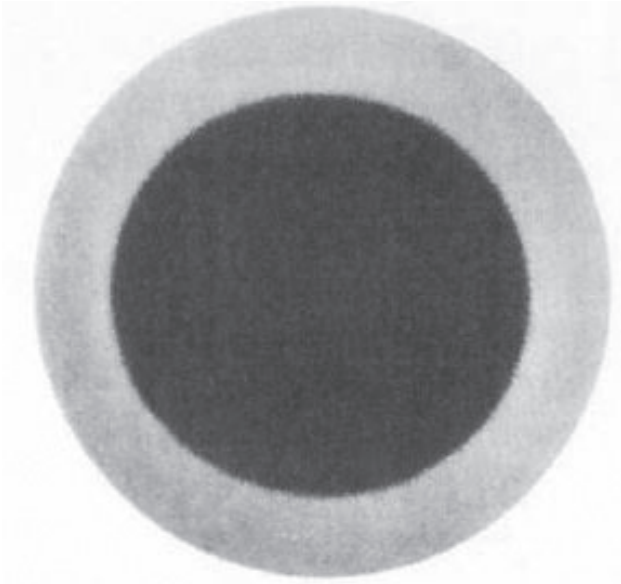


図 1. 純水素下ゼラチン培地上の破傷風菌コロニー (225 頁参照). 100 倍, Zeiss Apochromat レンズ, 16mm, 0.30, 接眼レンズ 2, 灯光照明, コンデンサー開放.

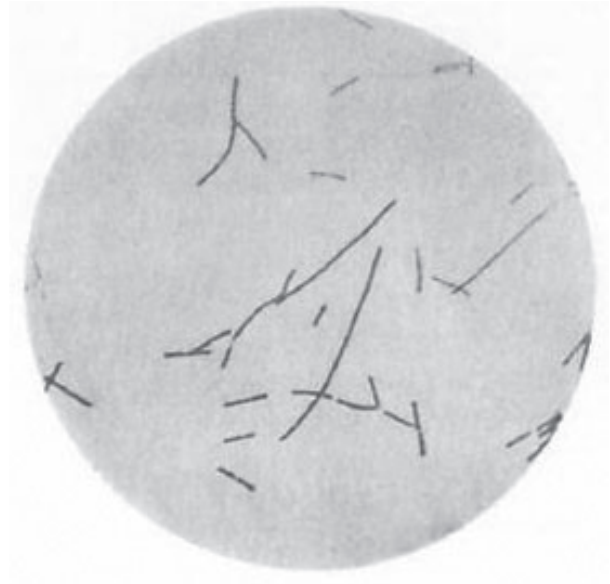


図 3. 破傷風菌のゼラチン培養. 無芽胞桿菌. フクシン染色塗抹標本. 1000 倍. Zeiss Apochromat レンズ, 2mm, 1.40. 接眼レンズ 2, 陽光, コンデンサー開放.

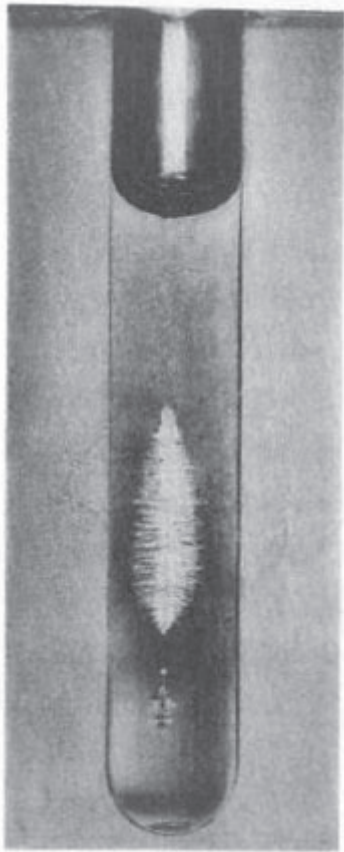


図 2. 破傷風菌のゼラチン培地穿刺培養. 等倍, 拡散昼光.

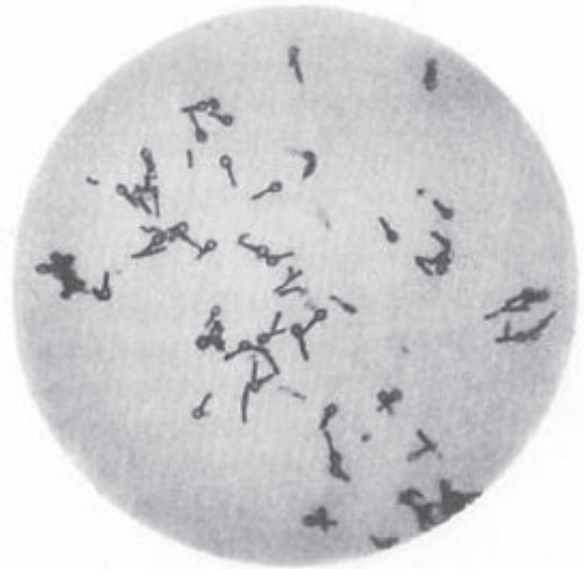


図 4. 破傷風菌の寒天培養. 芽胞形成桿菌. フクシン染色塗抹標本. 図 3 に同じく 1000 倍.