

## 野犬から分離された nonphotochromogens のマウス およびイヌに対する病原性について

武谷 健二・天見 和暢・松村 寿夫

九州大学医学部細菌学教室 (主任 戸田忠雄教授)

受付 昭和37年1月5日

われわれは先に野犬のリンパ腺から分離された抗酸菌 15 株について、集落の性状、抗煮沸性、生化学的性状、薬剤に対する感受性、フェージ感受性、ツベルクリン反応特異性、およびニワトリ、モルモットに対する毒力などについて検討し、A、B、C の 3 群に群別することができることを報告した<sup>1)~8)</sup>。

すなわち、A 群の 7 株は R 型の集落を示し、抗煮沸性、薬剤に対する感受性ともに強く、モルモットに対し強い毒力を示し、B-1 フェージに対して感受性が強く、ナイアシントステ陽性で、ヒト型結核菌と考えられ、ツベルクリン反応の特異性からもこの考えは裏付けられた。一方、B 群の 6 株は S 型の集落を示し、抗煮沸性、薬剤に対する感受性ともに弱く、ニワトリ、モルモットに対して毒力がほとんど認められず、ウレアーゼテスト陰性で、非定型抗酸菌の nonphotochromogens に類似の性状を示した。また、ツベルクリン反応においても nonphotochromogens と同じ特異性を示す成績が得られ、nonphotochromogen と同定された。

C 群の 2 株は数日以内に旺盛な発育を示し、抗煮沸性、薬剤に対する感受性ともにきわめて弱く、モルモットに対して病原性を示さず、“rapid growers”に属するものと考えられた。

以上の野犬分離抗酸菌のうち、nonphotochromogen に属する B 群の菌株につき、今回はマウスおよびイヌに対する病原性について検討を加えたので報告する。

### I マウスに対する接種実験

#### 実験材料および実験方法

使用菌株：野犬分離抗酸菌の B 群の 5 株、すなわち、粕屋 24、三瀧 21-2、浮羽 1-1、浮羽 1-2、屋形原 3 株を使用した。対照として、ヒト型結核菌 H<sub>37</sub>Rv 株、photochromogen P-16 株、nonphotochromogen

100616 株 および国内分離 nonphotochromogen 菌生株を用いた。

使用マウス：生後約 8 週の ddn 系、雄、白色マウスを使用し、各菌株につき 8 匹ずつ接種した。

接種および判定方法：1% 小川培地に 2 週間培養した菌の 5 mg/cc の均等な生理的食塩水浮遊液をつくり、その 0.1 cc、すなわち 0.5 mg をマウスの尾静脈内に接種した。接種後、2 週、4 週、8 週の 3 回にわたり各群 2 匹ずつ屠殺剖検し、肝、脾、腎、肺の肉眼的変化を観察するとともに、各臓器からの定量培養を行なった。

#### 実験成績

接種菌量、2 週、4 週、8 週後におけるそれぞれ 2 匹のマウスの各臓器の生菌数を平均したものは Table 1 に示すとおりで、これを図示すれば Fig. 1 のようになる。すなわち、粕屋 24、三瀧 21-2、浮羽 1-1、浮羽 1-2 の 4 株は肉眼的に肝、脾のみ肥大を認め、生菌数も肝、脾に比較的多かつたが、週を追って生菌数は漸次減少した。これは対照の 100616 および菌生株とほぼ同様の成績であつた。しかし、屋形原 3 株は各臓器にかなりの生菌数を認め、4 週、8 週後も生菌数の減少はなく、これは対照の P 16、H<sub>37</sub>Rv 株とほぼ同様の成績であつた。これらの成績から、マウスに対しては、粕屋 24、三瀧 21-2、浮羽 1-1、屋形原 3 の 4 株は毒力が弱い、屋形原 3 株はかなり強い毒力を示すことが明らかになつた。

### II イヌに対する接種実験

#### 実験材料および実験方法

使用菌株：野犬分離抗酸菌の B 群のうち 4 株、すなわち、粕屋 24、三瀧 21-2、屋形原 3、浮羽 1-2 株を使用した。対照としてヒト型結核菌 H<sub>37</sub>Rv 株、トリ

Table 1. Intravenous Inoculation into Mice with 5 Strains of Nonphotochromogens Isolated from dogs and Control Strains

|   | Name of strain               | Inoculum<br>(viable<br>units) | Organ                             | Number of colonies recovered<br>from each organ                                  |  |  |
|---|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|--|--|--|
|   |                              |                               |                                   | 2 weeks  | 4 weeks  | 8 weeks  |
|   |                              |                               |                                   | After inoculation  |  |  |
| Nonphotochromogenic strains isolated<br>from dogs | Kasuya 24                    | $9 \times 10^5$               | liver<br>spleen<br>kidney<br>lung | $2 \times 10^5$<br>$4.6 \times 10^3$<br>$2.7 \times 10^2$<br>$1.2 \times 10^4$   | $2.8 \times 10^3$<br>$1.6 \times 10^2$<br>0<br>0                                 | $3.3 \times 10^1$<br>$1.6 \times 10^1$<br>0<br>0                                 |
|   | Mizuma 21-2                  | $4 \times 10^7$               | liver<br>spleen<br>kidney<br>lung | $1.6 \times 10^7$<br>$3.4 \times 10^5$<br>$4.2 \times 10^5$<br>$1.8 \times 10^5$ | $3.5 \times 10^6$<br>$2.6 \times 10^4$<br>$3.5 \times 10^2$<br>$2.3 \times 10^2$ | $3.7 \times 10^3$<br>$5 \times 10^1$<br>0<br>0                                   |
|   | Ukiha 1-1                    | $3 \times 10^7$               | liver<br>spleen<br>kidney<br>lung | $2.5 \times 10^7$<br>$1.7 \times 10^6$<br>$1.7 \times 10^5$<br>$2.6 \times 10^3$ | $2.2 \times 10^7$<br>$7 \times 10^4$<br>$2.6 \times 10^3$<br>$3.3 \times 10^1$   | $2 \times 10^5$<br>$1.4 \times 10^3$<br>$1.6 \times 10^1$<br>0                   |
|   | Ukiha 1-2                    | $5.3 \times 10^7$             | liver<br>spleen<br>kidney<br>lung | $1.8 \times 10^7$<br>$3.6 \times 10^5$<br>$1.6 \times 10^3$<br>$2.8 \times 10^3$ | $7 \times 10^3$<br>$2.7 \times 10^3$<br>0<br>0                                   | $9 \times 10^3$<br>$2.3 \times 10^3$<br>$1 \times 10^2$<br>0                     |
|   | Yakatabanu 3                 | $3.2 \times 10^7$             | liver<br>spleen<br>kidney<br>lung | $7.5 \times 10^7$<br>$1.1 \times 10^7$<br>$1 \times 10^4$<br>$3 \times 10^4$     | $1.6 \times 10^7$<br>$1.8 \times 10^6$<br>$5.3 \times 10^3$<br>$5.2 \times 10^5$ | $4.5 \times 10^7$<br>$8.5 \times 10^6$<br>$1.6 \times 10^4$<br>$2.8 \times 10^6$ |
|   | Control strains              | 100616<br>(Nonphotochromogen) | $5.8 \times 10^7$                 | liver<br>spleen<br>kidney<br>lung  | $8.5 \times 10^4$<br>$3.6 \times 10^3$<br>0<br>0                                 | $2.1 \times 10^4$<br>$2.6 \times 10^2$<br>0<br>0                                 |
|   | Gamou<br>(Nonphotochromogen) | $6.7 \times 10^5$             | liver<br>spleen<br>kidney<br>lung | $6.1 \times 10^5$<br>$5.6 \times 10^4$<br>$6.5 \times 10^1$<br>$3.5 \times 10^1$ | $2.5 \times 10^4$<br>$1.1 \times 10^2$<br>0<br>0                                 | $5 \times 10^5$<br>0<br>0<br>0   |
|   | P 16<br>(Photochromogen)     | $1.9 \times 10^7$             | liver<br>spleen<br>kidney<br>lung | $1.8 \times 10^6$<br>$8.3 \times 10^5$<br>$4.5 \times 10^4$<br>$8.3 \times 10^5$ | $7.5 \times 10^6$<br>$1.7 \times 10^7$<br>$9 \times 10^4$<br>$7.5 \times 10^6$   | $2 \times 10^6$<br>$2 \times 10^6$<br>$6.7 \times 10^4$<br>$4.1 \times 10^6$     |
|   | H37Rv<br>(Human type)        | $3.7 \times 10^6$             | liver<br>spleen<br>kidney<br>lung | $1.3 \times 10^6$<br>$3.6 \times 10^5$<br>$4.3 \times 10^4$<br>$6.7 \times 10^5$ | $3.8 \times 10^6$<br>$1.8 \times 10^6$<br>$1 \times 10^5$<br>$7.6 \times 10^6$   | $1.2 \times 10^5$<br>$4.5 \times 10^4$<br>$1.5 \times 10^4$<br>$2.7 \times 10^6$ |

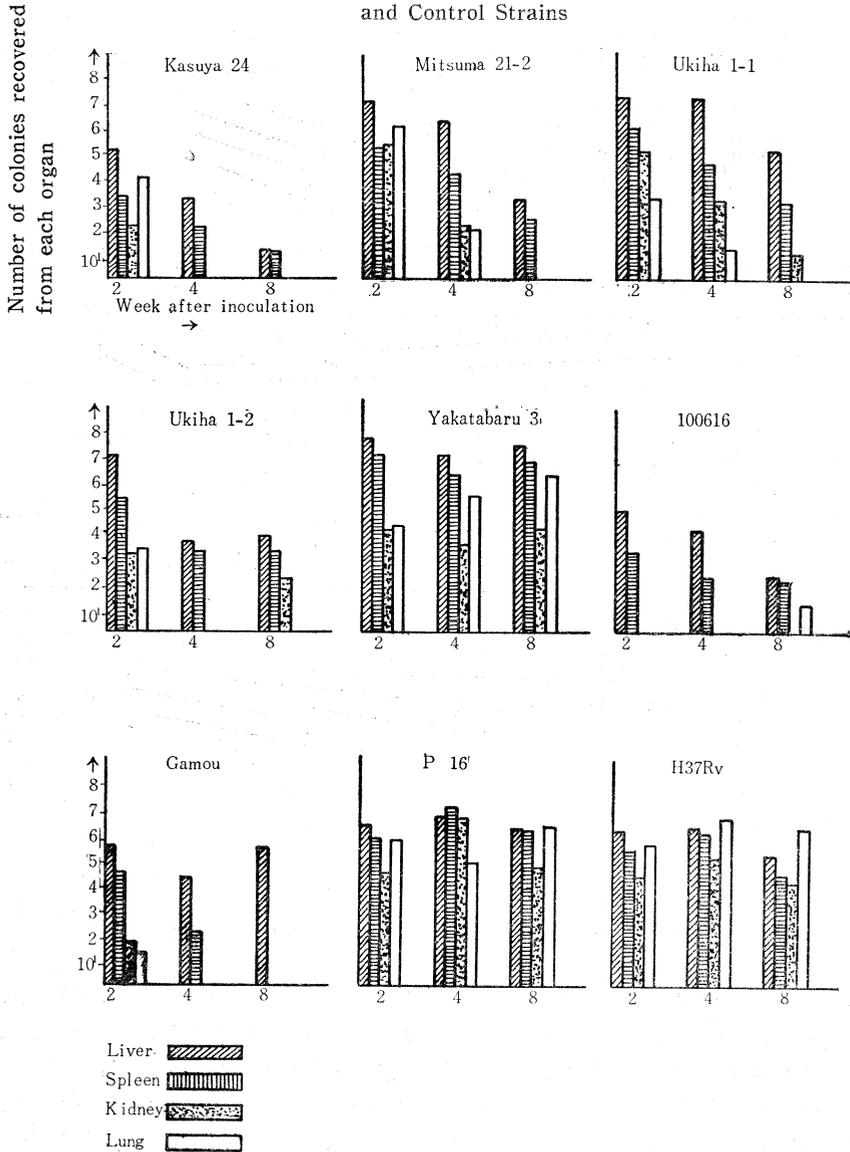
型結核菌 3717 株, nonphotochromogen 100616 株を用いた。

使用イヌ: 保健所で捕獲された野犬のうち生後 6 カ月 ~ 1 年半程度と推定される比較的若いものを使用し、

各菌株につき 2 匹ずつ接種した。

接種および判定方法: 1% 小川培地に 2 週間培養した菌の 20 mg/cc の均等な生理的食塩水浮遊液をつくり、その 0.5 cc を腹腔内に接種した。接種 8 週後に

Fig. 1. Intravenous Inoculation into Mice with 5 Strains of Unclassified Mycobacteria Isolated from Dogs and Control Strains



屠殺剖検し、肝、脾、腎、肺および腸間膜リンパ腺の肉眼的变化を観察するとともに、各臓器の塗抹標本をつくり、同時に定量培養を行なった。

接種後 4 週目および 8 週目に、ヒト型結核菌 H<sub>37</sub>Rv 株、三瀧 21-2 株、粕屋 24 株からそれぞれ精製したツベルクリン蛋白質 π を用いて皮内反応を行なった。接種量はそれぞれ 30 γ/0.1 cc で、48 時間後に硬結を測定した。三瀧 21-2 株と粕屋 24 株との π はともに nonphotochromogen として同じ程度の特異性をもつものである4)。

実験成績

接種菌量、体重の変化、ツ反応成績を Table 2 に示

した。ツ反応の現れ方は一般に発赤を伴わない硬結が多く、正確な測定にやや困難を感じた。その成績は 8 週後ではある程度特異的にでたが、全般に弱く、モルモットにおける動物実験の場合4)ほど明確なものではなかつた。

剖検時、肉眼的には粗い結節様の変化を認めた臓器が 2, 3 認められたが、各臓器の塗抹染色成績はすべて陰性であつた。臓器からの定量培養の結果、ヒト型 H<sub>37</sub>Rv 株接種イヌの 1 匹の脾およびリンパ腺、トリ型 3717 株接種イヌの 1 匹の肺、他の 1 匹では肝および脾、屋形原 3 株接種イヌの 1 匹のリンパ腺から少数の菌の還元培養がみられた。一方、マウスに対する毒力の弱かつ

Table 2. Intraperitoneal Inoculation into Dogs with 5 Strains of Nonphotochromogens Isolated from Dogs and Control Strains

|   | Name of strain  | Inoculum<br>(viable<br>units)<br>$\times 10^7$ | Dogs                  |                   |      | Tuberculin sensitivity   |              |           |                              |              |           | Recovery on culture<br>of lung, spleen,<br>liver and abdominal<br>lymph nodes, 8 weeks<br>after inoculation<br>(viable units) |      |
|---|-----------------|--|-----------------------|-------------------|------|--|--------------|-----------|------------------------------|--------------|-----------|---|------|
|   |                 |  | Body weight<br>(kg)   |                   |      | 4 weeks after<br>inoculation   |              |           | 8 weeks after<br>inoculation |              |           |   |      |
|   |                 |  | Before<br>inoculation | Before<br>autopsy |      | Diameters of indurations in mm.<br>48 hours after injection of the<br>purified tuberculin $\pi$ of |              |           |                              |              |           |   |      |
|   |                 |  |                       |                   |      | Mizuma<br>21-2   | Kasuya<br>24 | H37<br>Rv | Mizuma<br>21-2               | Kasuya<br>24 | H37<br>Rv |   |      |
| Nonphotochromogenic<br>strains isolated from dogs | Kasuya 24       | 85   | 1                     | 5.1               | 8.5  | 10   | 16           | 6         | 13                           | 6            | 4         | none  |      |
|   |                 |  | 10                    | 6.2               | 9.5  | 0  | 0            | 0         | death (45th day)             |              |           | none  |      |
|   | Mizuma 21-2     | 415  | 8                     | 9.4               | 12.2 | 0  | 0            | 0         | 13                           | 15           | 4         | none  |      |
|   |                 |  | 9                     | 5.8               | 6.0  | 0  | 0            | 0         | 14                           | 8            | 0         | none  |      |
|   | Ukiha 1-2       | 691  | 6                     | 5.2               | 5.2  | 0  | 0            | 0         | 0                            | 0            | 0         | none  |      |
|   |                 |  | 7                     | 4.6               | 5.6  | 0  | 0            | 0         | 13                           | 7            | 3         | none  |      |
|   | Yakatabaru 3    | 234  | 2                     | 3.0               | 5.0  | 0  | 0            | 0         | 7                            | 4            | 2         | none  |      |
|   |                 |  | 4                     | 5.8               | 7.0  | 0  | 0            | 0         | 18                           | 14           | 7         | $4 \times 10^2$ /lymph node   |      |
|   | Control strains | 100616<br>(Nonphoto-<br>chromogen)             | 141                   | 11                | 6.6  | 7.8  | 14           | 15        | 11                           | 0            | 0         | 0   | none |
|   |                 |  |                       | 12                | 6.2  | 8.2  | 8            | 8         | 5                            | 4            | 4         | 0   | none |
| 3717<br>(Avian type)                              |                 | 316  | 13                    | 7.2               | 7.6  | 20   | 19           | 13        | 8                            | 4            | 2         | $1 \times 10^2$ /1gm.<br>of lung tissue   |      |
|   |                 |  | 14                    | 7.3               | 8.4  | 14   | 10           | 7         | death (49th day)             |              |           | $5 \times 10^2$ /1gm.<br>of spleen tissue<br>$6 \times 10^2$ /1gm.<br>of liver tissue   |      |
| H37Rv<br>(Human type)                             |                 | 295  | 3                     | 10.0              | 11.5 | 0  | 0            | 0         | 0                            | 0            | 20        | none  |      |
|   |                 |  | 5                     | 8.2               | 7.8  | 0  | 0            | 0         | 3                            | 0            | 12        | $120 \times 10^2$ /lymph node<br>$4 \times 10^2$ /1gm.<br>of spleen tissue  |      |

た粕屋 21-2, 浮羽 1-2 および 100616 株接種イヌでは還元培養はいずれも陰性であった。すなわち, マウスに比較的毒力の強かつた菌株接種イヌの一部の臓器から少量の菌の還元培養がみられる程度にすぎなかつた。これは接種方法, 剖検までの期間などに不適当な点があつたためかもしれないが, いずれにしても, イヌ分離菌株を含めて, nonphotochromogen のイヌに対する病原性は弱いものと考えられる。

### 考 案

非定型抗酸菌のマウスに対する毒力については, Runyon<sup>9)</sup>, Durr<sup>ら</sup><sup>10)</sup>, 染谷<sup>ら</sup><sup>11)</sup>, および牛場<sup>ら</sup><sup>12)</sup>などによる多くの報告があり, 一般に photochromogen に属する菌株は毒力が強く, 多くの場合進行性の病変を起こすが, nonphotochromogen および scotochromogen の菌株は一般に毒力が弱いことが知られている。この傾向は今回の実験で対照として用いた photochromogen 株, および nonphotochromogen 株についても明らか

に認められ, しかもその成績は同一菌株が用いられた染谷<sup>ら</sup><sup>11)</sup> および牛場<sup>ら</sup><sup>12)</sup>の成績とよく一致している。野犬分離 nonphotochromogen 5 株のうち 4 株はヒト分離の nonphotochromogen と同様に毒力は弱かつたが, 屋形原 3 株のみはマウスに対して photochromogen およびヒト型結核菌と同等の強い毒力を示した。諸性状から nonphotochromogen と考えられる B 群の中に, 屋形原 3 株のようにマウスに対して強い毒力をもつ菌株が含まれていることは興味深い。

非定型抗酸菌のマウス臓器親和性について, とくに腎に病変をつくりやすいとの報告が, 2, 3 みられるが<sup>11)13)</sup> 14), 今回の実験ではとくにそのような事実は認められず, むしろ肝の生菌数が比較的多い傾向があつた。

一方, 野犬からこのようにかんりの頻度で nonphotochromogens が分離されるので, これらの菌株がはたしてイヌに強い病原性があるかどうか, もし強い病原性ありとすれば, nonphotochromogens は元来イヌの抗酸菌病を起こすいわば「イヌ型結核菌」であつて, それ

がヒトに感染した場合非定型抗酸菌症を起こすものではないかという可能性が考えられる。この点を明らかにするためにイヌに対する毒力を検討したが、ほとんど病変を認めることができず、この可能性は一応否定されるべきものであることが明らかになった。

### ま と め

野犬から分離された抗酸菌のうち、nonphotochromogen に属する B 群の菌株のマウスに対する毒力は、一般にヒト分離の nonphotochromogens と同様に弱かつたが、屋形原 3 株のみは強い毒力を示した。これらの菌株のイヌに対する病原性はきわめて弱かつた。

本研究は文部省科学研究費総合研究班「抗酸菌の変異と分類」(班長戸田忠雄教授)の援助によつてなされたものである。戸田教授の御指導、御校閲を感謝します。

### 文 献

- 1) Takeya, K., Zinnaka, Y., Yamaura, K., & Toda, T. : Am. Rev. Resp. Dis., 81 : 674, 1960.
- 2) Toda, T., Takeya, K., Matsumura, H., Hisatsune, K., & Takehara, Y. : Am. Rev.

- Resp. Dis., 82 : 414, 1960.
- 3) 武谷健二 : 結核, 35 (増) : 62, 昭35.
- 4) Takeya, K., Nakashima, K., Takehara, Y., & Toda, T. : Jap. J. Microbiol., 5 : 51, 1961.
- 5) 松村寿夫 : 医学研究 : 31 : 229, 昭36.
- 6) 戸田忠雄・萩原義郷・武谷健二 : 医学と生物学, 55 : 184, 昭35.
- 7) Toda, T., Hagihara, Y., & Takeya, T. : Am. Rev. Resp. Dis., 83 : 757, 1961.
- 8) 武谷健二 : 日本細菌学雑誌, 16 : 666, 昭36.
- 9) Runyon, E.H. : Med. Clin. North. Am., 43 : 273, 1959.
- 10) Durr, F.E., Smith, D.W., & Alban, D.P. : Am. Rev. Resp. Dis., 80 : 876, 1959.
- 11) 染谷四郎・林治・江頭靖之・小河秀正 : 文部省総合研究班「抗酸菌の変異と分類」報告, 昭35.
- 12) 牛場大蔵・小沢敦・中山昇二・氏家淳雄 : 結核, 36 : 689, 昭36.
- 13) Schmidt, L.H., Hoffman, K., & Steenken, W. Jr. : Am. Rev. Tuberc., 75 : 169, 1957.
- 14) Wolinsky, E., Smith, M.M., Mitchell, R.S., & Steenken, W. Jr. : Am. Rev. Tuberc., 75 : 108, 1957.

### Pathogenicity of the Nonphotochromogenic Strains of Unclassified Mycobacteria Isolated from Dogs for Mice and Dogs.

Fifteen strains of mycobacteria have been isolated by the present authors from the lymph nodes of dogs without owners. Studies on the cultural and staining characteristics, biochemical properties (Niacin and urease test), drug-sensitivity, phage-susceptibility, specificity in tuberculin reaction and pathogenicity for guinea pigs and chickens have disclosed that these mycobacteria were classified into three groups. Seven strains of the mycobacteria (group A) were identified as human type tubercle bacilli, six strains (group B) as the nonphotochromogens and the remaining two strains as "rapid growers".

The purpose of the present paper is to report the pathogenicity of the nonphotochromogenic strains of group B for mice and dogs.

#### Materials and methods

Nonphotochromogenic strains of group B used

were Kasuya 24, Mizuma 21-2, Ukiha 1-1, Ukiha 1-2, Yakatabaru 3. Besides these the following strains were used as controls: *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv strain), *M. avium* (3717 strain), a photochromogen (P16 strain), two non-photochromogens (100616 and Gamou strains).

Animals used were male white mice (ddn strain) and young dogs without owners. Inoculums were prepared from the two week-culture of each strain on Ogawa's egg medium. One tenth ml. of 5 mg. per ml of bacterial suspension was inoculated intravenously into mice and a half ml. of 20 mg. per ml. of the suspension intraperitoneally into dogs. The actual infecting doses were checked by viable count. Viable counts of infecting organisms in various organs of infected animals were carried out at various periods after inoculation.

Tuberculin tests were performed on infected dogs 4 and 8 weeks after infection. Each 30  $\mu$ g. of purified tuberculin protein  $\pi$  prepared from culture filtrates of the H37Rv, Mizuma

21-2 and Kasuya 24 strains were injected intracutaneously and the diameters of indurations were measured after 48 hours.

#### Results and discussion

Results obtained from mice experiments are summarized in Fig. 1 and Table 1. In accord with the observations of other investigators, a photochromogenic strain (P16) caused progressive disease in mice, but nonphotochromogenic strains (100616 and Gamou) used as controls were much less virulent for mice. Among the non-photochromogens isolated from dogs the Kasuya 24, Mizuma 21-2, Ukiha 1-1, Ukiha 1-2 strains were also weakly virulent for mice. However, it is noteworthy that the Yakatabaru 3 strain was as highly virulent as the photochromogenic strain (P16). No particular strains with special affinity to kidney could be observed.

Results obtained from dog experiments are summarized in Table 2. In most cases only

indurations without erythematous reaction were observed by injection of homologous tuberculin protein  $\pi$ . The specificity of tuberculin reaction was not so clear as shown in previous experiments using guinea pigs. With a few exceptions, recovery of infecting organisms on culture of various organs of dogs 8 weeks after infection was negative. All the nonphotochromogenic strains tested were considered to be incapable of producing progressive disease in dogs inoculated intraperitoneally, even when the inoculum was as large as in this experiment.

Since several nonphotochromogenic strains had been isolated from dogs, we had a working hypothesis that these strains would be highly virulent for dogs and be designated as "*Mycobacterium caninum*". This hypothesis, however, was refuted by the results obtained from the present dog experiment.