

非定型抗酸菌に関する研究

第5報 既往の結核菌歴のはつきりしている非定型抗酸菌症（森株）の一例
—森株のマウス，モルモット接種実験—

小 川 辰 次

北 里 研 究 所

片 桐 鎮 夫・足 立 達・西 村 セ ッ 子

北里研究所付属病院

受付 昭和 41 年 9 月 5 日

STUDIES ON UNCLASSIFIED MYCOBACTERIA*

V. A Case of Pulmonary Disease Due to Unclassified Mycobacteria, with
Definite Previous History Positive for *M. tuberculosis*: Virulence
of Strain "Mori" for Mice and Guinea Pigs

Tatsuji OGAWA, Shizuo KATAGIRI, Itaru ADACHI
and Setsuko NISHIMURA

(Received for publication September 5, 1966)

In a previous paper was reported a case of pulmonary disease which had been positive for the human tubercle bacilli repeatedly and, after a negative period of three and half years, has become positive for only nonphotochromogens of unclassified mycobacteria. This report describes the virulence tests in mice and guinea pigs of a culture of the latter organisms.

The test culture used, strain Mori, was isolated from a sputum of Dec. 7, 1964 and maintained on Ogawa egg medium. Inoculation was made with 0.1 mg moist weight of a 3-week-old culture grown on Ogawa egg medium, injecting into each of 9 ddN mice intravenously and of 9 guinea pigs subcutaneously. The inoculum consisted of 13.5×10^7 V.U. of the organisms. Three animals of each group were killed 3, 6, and 9 weeks after inoculation, respectively. The evaluation of virulence was based on gross inspection, histopathologic examination, and quantitative culture of their organs. In case of guinea pigs tuberculin test was performed the preceding day before sacrifice, using a 1:100 dilution of OT. The results obtained were as follows:

1) Virulence for mice. Macroscopically no change in their organs was observed at post-mortem examinations except in spleen and kidneys. Histopathologic study, however, revealed that the typical epithelioid cell tubercles were rather constantly found in most of the organs (Table 2). Table 1 shows also the results of quantitative culture of the various organs. At 3 weeks, an amount of 10^{-2} mg of both spleen and liver was found to contain the organisms of the order of 10^2 V.U., whereas lung and kidneys harbored the organisms of the order of only 10^1 V.U. in the amount of 10^0 mg tissue. The number of the organisms recoverable from spleen and liver showed a decreasing tendency in the course of infection, but that from the lung showed an increasing one; no apparent change was observed in the kidneys through the period. It is obvious that the virulence for mice of this strain was definite but not marked.

* From the Kitasato Institute and the Kitasato Institute Hospital, Shiba Shirokane Sanko-cho, Minato-ku, Tokyo, Japan.

2) Virulence for guinea pigs. At autopsy there was observed no macroscopic changes except at the site of inoculation and in the lymph nodes (Table 4). Histopathologic examinations revealed the typical tubercles and mononuclear cell infiltrations in the tissue sections of the lung, liver, and kidneys. The number of these lesions, however, was always scanty as compared with that found in the case of mice. Table 4 shows also the number of colonies recovered from 10^1 mg tissue of the various organs. Only the spleen was positive throughout the whole period but the organisms recoverable from it showed a gradual decrease. The liver was positive at 3 weeks but negative later. All the lung and the kidneys, except one of the latter, were entirely negative through the period. All the animals were proved to have a positive tuberculin reaction with a definite induration (Table 3). It seems reasonable to conclude that the strain Mori when inoculated subcutaneously is much less virulent for guinea pigs.

1. 緒 論

第4報¹⁾に森〇四〇氏の臨床経過と、氏の喀痰より分離した抗酸菌の性状について報告したが、今回は、その起因菌である森株のマウス、モルモットに対する毒力について実験したので報告する。

2. マウス接種実験

i 方法の概略

a. マウスの種類：ddN系の25g前後の♂マウス、9匹を準備した。

b. 接種菌液、および接種方法：再入院3カ月目の昭和39年12月7日に、4% NaOH内容の喀痰液を0.1 mlずつ、3%小川培地に接種して分離した森株を1%小川培地に継代し、37°C 3週培養の発育のよい菌苔をとつて、型のように1 mg/mlの菌浮遊液を作り、この菌液を0.1 mlずつ、すなわち0.1 mgずつを尾静脈より接種した。なおこの菌液の1 mg中の生菌単位は 13.5×10^7 コである。

c. 観察の方法：体重は毎週測定した。3週、6週お

よび9週後に、それぞれ3匹ずつを屠殺剖検し、肉眼的に病変を見、脾、腎の重さを測り、また脾、肝、肺、腎は組織学的に検査するとともに、一部は無菌的に採取して、1% NaOHで前処理して、脾、肝は 10^3 , 10^4 , 10^5 倍に、肺、腎は 10^1 , 10^2 , 10^3 倍に希釈して、そのおのおのの3段階を0.1 mlずつ1%小川培地、2本に接種し、37°Cに約1カ月培養し、脾、肝は 10^4 倍希釈、すなわち臓器1 mg中の集落数に換算して、その成績を示した。

ii 成績

成績は表1, 2のようである。

a. 体重、肉眼的所見：表1でみるように、体重は次第に増加している。また脾は6週が最も重く、つぎに3週であり、9週は最も軽い。

腎は3週に比して6週、9週は多少増加している。つぎに臓器においては、どの臓器でも、また経過の如何にかかわらず、肉眼的の結節は認めない。

b. 組織学的所見：

表2でみるようで、脾、肝では週の如何を問わず、マウスのほとんど全部に、肺では3週の1匹、6週の1匹

Table 1. Effects of Intravenous Inoculation of Strain Mori (0.1 mg) on Mice
(a) Body weight, weight of organs, and number of colonies recovered from organs

Sacrificed at	No. of animal	Body weight (g)	Weight of organ (mg)		Colonies of nonphotochromogens recovered from			
			Spleen	Kidney	Spleen*	Liver*	Lung**	Kidney**
3 wks	(1)	28.0	400	150	107.5	230.0	65.0	47.5
	(2)	27.0	400	150	118.0	158.5	90.5	60.0
	(3)	28.7	240	250	165.0	425.0	19.0	30.5
6	(4)	25.8	440	200	33.0	87.0	45.0	17.5
	(5)	28.5	440	300	51.5	119.5	155.0	27.0
	(6)	29.0	560	210	26.0	141.5	15.5	12.5
9	(7)	30.0	160	300	44.0	39.5	74.0	9.0
	(8)	30.5	200	300	99.5	38.0	1,815.0	138.0
	(9)	29.0	400	250	55.0	87.0	500.0	45.5

Note: * 10^{-2} mg amount of the tissue; ** 10^0 mg amount of the tissue.

Table 2. Effects of Intravenous Inoculation of Strain Mori (0.1 mg) on Mice (b) Histopathologic findings in the various organs

Sacrificed at	No. of animal	Type, number, and size of lesions in			
		Spleen	Liver	Lung	Kidney
3 wks	(1)	?	20/1 ●	1/T ●	1/1 .
	(2)	20/1 ●	20/1 ●	—	—
	(3)	1/T ●	20/1 .	—	1/3 .
6	(4)	20~30/1 ●	30/1 ●	— #	—
	(5)	30/1 ●	—	— #	1/T ●
	(6)	30~40/1 ●	25/1 ●	1/1 ●	1/2 ●
9	(7)	10/1 .	15/1 .	1/T . #	2~3/T .
	(8)	15/1 .	15/1 ●	1/T . #	— *
	(9)	5/1 .	20/1 ●	5/T . #	— *

Notes :

- 1) 20/1 means twenty epithelioid cell tubercles per field of the tissue section under the magnification of 100×; 1/T, one typical tubercle in the total fields; —, no typical tubercle found.
- 2) The size of solid circles represents diagrammatic sizes of the epithelioid cell tubercles found; large, middle, small, or very small.
- 3) #, non-specific reaction with infiltration of small mononuclear cells in the alveolar walls and alveoli; *, small mononuclear cell lesions.

および9週の3匹に、また腎では3週の2匹、6週の2匹、9週の1匹に、それぞれ類上皮細胞結節を認めた。なお、類上皮細胞結節の認めなかつた肺の6週の2匹では虚脱があつて、肺胞壁と肺胞内に小円形細胞の浸潤のある病巣を認めた。同様の所見は類上皮細胞結節を認めた9週の3匹の肺にもみられた。

また類上皮細胞結節の数をみると、概して脾、肝では多く、肺、腎では少ない。脾では時日の経過とともに数

Table 3. Effects of Subcutaneous Inoculation of Strain Mori (0.1 mg) on Guinea Pigs (a) Body weight and tuberculin reactions

Sacrificed at	No. of animal	Body weight (g)		Tuberculin test* at		
		Before	After	3 weeks	6 weeks	9 weeks
3 wks	(1)	380	485	+ 15×15	—	—
	(2)	400	500	+ 8×11	—	—
	(3)	450	545	± 6×7	—	—
6	(4)	420	610	+ 15×17	+ 15×16	—
	(5)	420	580	+ 15×18	+ 18×23	—
	(6)	410	600	+ 11×11	+ 15×17	—
9	(7)	310	500	+ 2×3	+ 20×20	+ 18×20
	(8)	370	650	+ 13×13	+ 20×23	+ 19×20
	(9)	450	855	+ 11×11	+ 15×15	+ 18×18

Notes: * Tuberculin reaction with 1:100 dilution of OT was read after 24 hours;

Induration (+, definite; ±, doubtful)
Diameters of erythema (in mm)

は少なくなり、かつ小さくなる傾向を認めるが、肝では数も大きさも全週を通してほとんど同じである。肺、腎では数が少なかつたので、はつきりした傾向は分からない。

これを要するに、脾、肝、肺、腎の4つの臓器においては、9週までの経過の間に、その全部、あるいはその一部のマウスに結節を認めることができた。

Table 4. Effects of Subcutaneous Inoculation of Strain Mori (0.1 mg) on Guinea Pigs (b) Gross involvement, spleen weight, and number of colonies recovered from various organs

Sacrificed at	No. of animal	Gross Involvement			Spleen weight (mg)	Number of cols. recovered from the organs**			
		Site of injec.	Lymph node*	Viscera		Spleen	Liver	Lung	Kidney
3 wks	(1)	—	8	—	500	69.5	2.5	—	—
	(2)	Abscess	9						
	(3)	Abscess	11						
6	(4)	Abscess	9	—	1100	0.5	—	—	—
	(5)	—	5						
	(6)	Abscess	6						
9	(7)	—	5	—	960	8.0	—	—	—
	(8)	Abscess	5						
	(9)	—	5						

Notes: 1) * Figures are the sum of the indices of the lymph nodes (knee-, inguinal, axillar, cervical, retro-peritoneal, portal, retro-sternal, and para-tracheal). The index is based on the size of the lymph node: 0, no swelling; 1, grain-sized; 2, azuki bean-sized; 3, soybean-sized; 4, bean-sized or more.

** 10⁻³ mg each of the tissue.

c. 臓器内の集落数：臓器内の集落数は表1でみるように、いずれの臓器においても9週まで多数の集落を認める。個々の臓器における消長をみると、脾では3週が最も多く、6週、9週では減少しているが、6週と9週の間には著明な差はない。その数も3週の約半分であつて、減り方は徐々である。肝も3週が最も多く、6週、9週と次第に減少しているが、脾同様減少の傾向はあつても非常に徐々である。つぎに肺は動物間に差があるが、全体としてみると、経過とともに増加の傾向を認めるし、腎は6週で多少減少するが、9週では、1匹は減少しているが、他の2匹は3週と大差がないか、むしろ増加している。

このように臓器の中の森株の集落数は、組織学的の所見を裏書きするかのようになり、いずれの臓器においても9週の経過までかなり多数認める。また脾、肝では減少の傾向はあるとしても徐々であるし、腎でも減少する傾向は少ない、また肺では増加の傾向を示している。

3. モルモット接種実験

i 方法の概略

a. モルモットの種類：400g前後の♂の白色のモルモット9匹を準備した。そしてこれらは10倍希釈の旧ツベルクリンでは皮内反応を行ない、陰性であることを確かめた。

b. 接種菌液および接種方法：前述のマウス接種に用いた菌浮遊液を蒸留水で0.2mg/mlに希釈して、その0.5mlすなわち0.1mgの菌を、右下腹部皮下に接種した。

c. 観察の方法：毎週1回回診して、体重をはかり、菌の接種局所、膝腺、腋窩腺、頸腺の腫脹の程度を観察し、マウス同様、3週、6週、9週に各3匹ずつ屠殺剖検し、鼠蹊腺、膝腺、腋窩腺、頸腺、後腹膜腺、腸間膜腺、門脈腺、胸骨腺、肺門腺の腫脹の程度を

- | | |
|----|-----|
| +1 | 米粒大 |
| +2 | 小豆大 |
| +3 | 大豆大 |
| +4 | 豌豆大 |

と区別して、これを合計して、リンパ腺の病変の程度を表わした。

また臓器は、認められる結節の数によつてつぎの4つに区別した。

- | | |
|----|-------------|
| +1 | ようやく発見しうる程度 |
| +2 | 10コ以内 |
| +3 | かなり多数 |
| +4 | 無数 |

つぎに脾の重量をはかり、脾、肝、肺、腎については、肉眼的、組織学的に検査するとともに、一部を無菌的に採取し、1% NaOHで臓器を 10^1 、 10^2 、 10^3 倍に希

釈して、その0.1mlずつを2本の1%小川培地に接種し、37°Cに約1月培養して、発育した集落数を 10^1 倍希釈、すなわち臓器10mg中の集落数に換算して示した。

なお、屠殺前には、100倍希釈の旧ツベルクリンにより、ツベルクリン反応を行なつた。

ii 成績

a. 体重、ツ反応：成績は表3のように剖検時の体重は、感染時に比していずれも増加しているが、それは経過の週に比例している。つぎにツ反応は3週では9匹中の(3)、(7)のモルモットが陰性を示したほかはみな陽性を示している。また6週の6匹、9週の3匹はともにその全部が陽性を示したが、反応は3週に比して強い。しかし6週と9週とではほとんど差がない。なおいずれの場合においても硬結がみられた。

これを総括すると、森株は3週ではその大部分が、6週以後では、その全部がツ反応は陽性に転化したことを示している。

b. 肉眼的所見、脾の重さ：肉眼的の病変をみると表4のようである。すなわちリンパ腺は3週、6週、9週と区別してみると、3週で最も病変が多く、6週、9週となるに従つて軽くなつている。つぎに臓器には、臓器の種類を問わず、全経過を通して、結節の認めたモルモットは1匹もない。しかし脾の重量は経過とともに増加している。

c. 組織学的所見：前述のように4つの臓器には肉眼的所見を認めなかつたが、組織学的には所見の認めたものもあつた。すなわち類上皮細胞結節の認めたのは、肺の9週の1匹、肝の3週の3匹、9週の2匹であるが、これらの結節は1視野に1コ、全視野に1コといつたように、マウスの場合に比して非常に少ない。このほかに肺では3週の3匹、6週の1匹、9週の1匹に虚脱があり、肺胞壁と肺胞内に小円形細胞の浸潤を、また肝の9週の1匹、腎の9週の1匹に小円形細胞の浸潤のある病巣を認めた。なお脾では経過週の如何にかかわらず、ほとんど異常を認めなかつた。

これらの成績を総括すると、軽度ではあるが病変を認めることができた。しかしこの成績はマウスの静脈接種に比して著しく軽度である。

d. 臓器内の森株の集落数

成績は表4に示した。みると脾の3週が最も多く、 10^4 の桁を示しているが、6週、9週と経過するに従つて減少する。肝では3週においてのみ、1桁の集落を認めたが6週、9週では陰性を示している。つぎに肺、腎では週の如何を問わずほとんど集落を認めていない。これを前述のマウスの臓器中の集落数と比較すると、いずれの臓器においても著明に少ない。

4. 総括および考察

われわれの分離した森株は、マウスの静脈感染においては、臓器には肉眼的には病変を認めなかつたが、組織学的には、9週の経過中には、いずれの臓器においても類上皮細胞結節を認めることができたし、臓器よりの定量的の還元培養においては、かなりの集落を認めたとし、減少の傾向はあつたとしても軽度であり肺ではむしろ増加する傾向を示した。これらの成績は、森株はマウスの静脈感染では、毒力を示したといえるだろう。つぎにモルモットの皮下接種では、肉眼的には臓器には異常を認めず、臓器よりの還元培養においても、集落数はマウスの場合に比して少ない。しかしリンパ腺は肉眼でも病変を認めたとし、臓器には組織学的に類上皮細胞結節を認めたとしたものもある。またツ反応も3週の2匹を除けば、9週までの間にすべて陽性を示し、しかもいずれも硬結を認めた。これらの事実は森株はモルモットの皮下接種では、軽度ではあるが毒力を示したといつてよからう。

つぎに森株を以前に述べた寺井株²⁹⁾と比較してみよう。まずマウスについてみると、接種菌量は寺井株と同じであつたが、生菌単位は寺井株は森株に比して一桁多い。しかし臓器の脾、肝、肺の定量培養における希釈倍数は森株の場合は一桁少ない。それで脾、肝、肺の集落数については比較できるが、屠殺までの期間が異なるし、寺井株では無数の集落のマウスもあつたので正確な比較はできない。それでまず集落の経過につれての減り方をみると、森株は寺井株に比して概して徐々であり、また肺では寺井株の減少の傾向に比して、森株は増加の傾向があるし、9週の森株の集落数は、脾、肝、肺ともに寺井株の8週に比して多い。腎は比較できない。つぎに組織学的の所見は、接種菌液の生菌単位が寺井株の1/10にかかわらず脾、肝、肺については、寺井株とほとんど同じであるけれども、腎では寺井株の結節の認めないのに森株では認めている。

なお細かいことではあるが、脾、腎の腫脹の程度も寺井株とほとんど同じである。このような所見を総合してみると、森株のマウス静脈接種における毒力は、寺井株に比してまさるとも劣らないものであることが推定できる。

つぎにモルモットの皮下接種の成績であるが、寺井株では森株に比して接種菌量が10倍多いし、それに前述のように生菌単位も10倍多いから、寺井株では森株に比して100倍量の生菌単位を接種したことになる。したがつて比較にはこの点を念頭におく必要がある。まず脾の重量は、森株の実験に使用したモルモットの屠殺時の体重が多いのにかかわらず寺井株に比して少ない。つぎに森株では臓器の肉眼的の所見は認めなかつたが、寺井株では脾、肝に病変を認めたとし、組織学的の所見も、森

株では肝、肺のみで、それも動物の全部に認めたのではない。また脾では1例も所見のあつたものはない。しかし寺井株では脾、肝、肺のいずれの臓器にも結節を認めた。このように森株が肉眼的、組織学的に病変の軽かつたのは、接種した菌の生菌単位が少なかつたためであろう。つぎに森株の臓器よりの還元培養の成績は、接種した菌の生菌単位が寺井株の1/10であることを念頭において比較すると、寺井株とほぼ同じ程度の集落数であることが推定できる。

しかもツベルクリン反応は1/100の生菌単位にかかわらず、森株ではそのいずれの動物においても硬結を認めたのに、寺井株では硬結は認めていない。このような成績を総合してみると森株のモルモット皮下接種による毒力は、寺井株とほぼ同等ではないかと推定される。

これを要するに森株は寺井株同様に、マウスに対しては毒力を示し、モルモットに対しても、ある程度の毒力を示したことは興味がある。

5. 結 論

患者の喀痰より分離した光非発色菌に属する非定型抗酸菌の森株を ddN 系のマウス、白色モルモットの各9匹ずつに、前者は尾静脈より、後者は右下腹部皮下に0.1 mg ずつ接種、3週、6週、9週の3回にわたつて3匹ずつ屠殺剖検し、肉眼的、組織学的にみるとともに、臓器より森株の定量的の還元培養を行ない毒力を判定した。なおモルモットでは屠殺前にツベルクリン反応を行なつた。使用した菌液の生菌単位は、1 mg 中 13.5×10^7 コである。成績はつぎのようである。

1. マウス

臓器には肉眼的病変を認めなかつた。しかし組織学的には、時期の如何を問わず、いずれの臓器においても類上皮細胞結節を認めた。つぎに還元培養により脾、肝では臓器 10^{-2} mg 中の、肺、腎では1 mg 中の集落数をだした。

その結果、3週では脾、肝は100の桁を肺、腎では10の桁を示した。脾、肝では経過とともに多少減少する傾向を示したが、肺では増加の傾向を、腎では9週まで大差なかつた。なお脾、腎の腫脹も認めた。以上の成績から森株は、マウスの静脈接種においては、毒力を示したとみることができる。

2. モルモット

肉眼的には接種局所およびリンパ腺に軽度の病変を認めたのみで、臓器には病変を認めなかつた。しかし組織学的には肝、肺、腎に類上皮細胞の結節を認めたがマウスに比して軽度であつた。つぎに臓器10 mg 中の集落数をみると、全期間を通して陽性であつたのは脾のみで、3週で10の桁であるが漸次減少した。肝では3週で1の桁を示したがその後は陰性を示し、肺、腎は全期

間を通して陰性であつた。なおツ反応はいずれの時期においてもほとんど全部が陽性を示したし、常に硬結を伴つていた。

以上の成績から森株は、モルモットの皮下接種では、弱い毒力を示したとみることができる。

文 献

- 1) 小川辰次・片桐鎮夫・足立達・西村セツ子：結核，41：531，1966.
- 2) 小川辰次・足立達・村江久忠・大谷典子・宮城小枝子：結核，40：85，1965.
- 3) 小川辰次・足立達・村江久忠・大谷典子・宮城小枝子：結核，40：133，1965.