

非定型抗酸菌のウサギ辜丸内接種試験

中野 寿 夫

東京女子医科大学細菌学教室 (指導 平野憲正)

受付 昭和44年12月3日

INOCULATION OF ATYPICAL MYCOBACTERIA INTO
TESTICLES OF RABBITS*

Hisao NAKANO

(Received for publication December 3, 1969)

Hirano and Sushida found that atypical mycobacteria isolated in Japan and in the United States caused tuberculous changes not only at the site of inoculation, but also produced evidence of visceral tuberculosis in some cases when they were inoculated into the testicles of rabbits. The present study was designed to elucidate the pathogenicity of three groups of atypical mycobacteria, i. e. non-photochromogens, photochromogens, and scotochromogens, and the following results were obtained:

Rabbits inoculated intratesticularly with a suspension of atypical mycobacteria showed tuberculous lesions at the site of the injection and in some cases tuberculous nodules were also observed in the lungs, spleen, liver, and kidneys. These lesions produced by I, II and III groups were almost similar and indistinguishable. Atypical mycobacteria heated at 100°C for 30 minutes did not cause pathological changes after intratesticular inoculation, but the H₃₇Rv strain killed by heat caused necrosis at the site of inoculation.

以前からモルモット、ウサギ、ワトリ等に無害で人に結核性病変を起こす今日のいわゆる非定型抗酸菌の存在することが知られていた。Timpe and Runyon¹⁾は多数の肺疾患患者から数百株の抗酸菌を分離し詳細に検討した結果、これらを、Group I. photochromogens, Group II. scotochromogens, Group III. nonphotochromogens と Group IV. rapid growers の4群に分けた。これらのうちI, IIおよびIII群による肺における病変は人型結核菌によるそれと区別することは困難であり、またI, IIおよびIII群による病変の間にも区別することは困難であった。

平野と須子田²⁾は人型結核菌、あるいは非定型抗酸菌をウサギの辜丸内に接種すると、接種部に結核性病変が起こるばかりでなく、時には内臓にも病変が起こることを認めた。平野らが実験に用いた非定型抗酸菌は日本お

よびアメリカにおいて分離されたものであつたが、これらが何群に属するかは明確でなかつた。たまたまRunyonの好意により Group I~III 群の菌株の分与を受けたので著者は人型結核菌 H₃₇Rv 株、非定型抗酸菌 Group I, Group II, および Group III を別々にウサギの辜丸内に接種して各菌株による病変を検討した。また人型結核菌および非定型抗酸菌の加熱死菌を接種した場合の病変をも研究した。

実験材料および実験方法

実験材料：実験に用いた菌株は Runyon より分与された菌株、すなわち

Group I (photochromogens) : P-18, P-21, P-22, P-24, P-26, 2299 株。

Group II (scotochromogens) : P-5, P-6, P-15, 2512,

* From the Department of Bacteriology, Tokyo Women's Medical College, 10 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162 Japan.

2513 株。

Group III (nonphotochromogens) : P-39, P-41, 2388, 2390, 2391 株で合計 16 株である。これらを 1% 小川培地に培養したものを使用した。対照として H₃₇Rv 株を用いた。

実験方法：平野と須子田²⁾の方法に従った。すなわち上記の各菌を 1% 小川培地に 2 週間培養したものを定量白金耳で微量の滅菌生理食塩水を加えたガラス玉入りコルベンにとり手振り法により 5 分間、振盪し均等菌浮遊液とし、これに 10 mg/ml の割合になるように滅菌生理食塩水を加えて接種に用いた。体重 2,500 g 前後の雄性ウサギを 1 菌株につきウサギ 1 羽卵を用いて両側の辜丸の実質部におおの菌量 2.0 mg ずつを接種した。接種生菌数の計算法は菌液の 10⁻⁸~10⁻⁹ の希釈菌液を 1% 小川培地に 0.1 ml ずつ流し、37°C, 5 週間培養して発生した集落数をもって接種生菌単位とした。辜丸に接種したウサギは 2 カ月 (60~70 日) 観察した後に、放血により殺し、肝臓、脾臓、腎臓、辜丸を無菌的に摘出し、次いで肺臓を摘出し、肉眼的観察を行ない、組織の一部はハサミで細切し、それぞれの臓器について 3 本の 1% 小川培地に 1 白金耳ずつ塗抹し、37°C, 5 週間培養を行なった。ただし肺臓は培養を行なわなかつた。また各臓器は 6 倍希釈ホルマリン液で固定した後病理組織標本を作成鏡検した。その他 P-18, P-21, P-22, P-5, P-6, P-15, P-39, P-41 および人型結核菌 H₃₇Rv の接

種菌液を 100°C, 30 分加熱したものを辜丸内に接種した。

実験成績

辜丸および副辜丸における肉眼的所見

Group I, Group II および Group III 中本実験に用いたいずれの菌株を接種した場合にも接種部の辜丸あるいは副辜丸に粟粒大から直径約 10 mm 大の結節が発生し、多くは乾酪性変性を呈していた (Fig. 1~4)。また表 1 は各菌株を接種したウサギの内臓の肉眼的所見をまとめたものである。すなわち Group I (photochromogens) のうち辜丸のみに病変を起こしたものは P-18, P-21, P-24 と P-26 であつて P-22 および 2299 株を接種したものにおいては辜丸と副辜丸がおかされ、また P-21, P-22 を接種したものにおいては辜丸鞘膜にも結節が認められ、2299 株を接種したものにおいては腎臓にも結節が認められた。Group II (scotochromogens) の P-5, 2512 および 2513 株 (6 日後死亡) を接種したものにおいては辜丸のみがおかされ結節は乾酪性であつた。P-5 株を接種したものにおいては辜丸鞘膜にも結節が認められ、P-26 株を接種したものにおいては副辜丸にのみ病変が認められた。Group III (nonphotochromogens) を接種したもののうち辜丸のみをおかしたものは 2388 と 2391 株の 2 株であつて、P-39 と P-41 株の 2 株は辜丸と副辜丸をおかした。結節は乾酪性であつた。2390 株

Table 1. Gross Appearance of Organs of Rabbits Inoculated with Atypical Mycobacteria into Testis

Group	Strain	Inoculated V. U.	Survival days after inoculation	Gross appearance of organs					
				Testis	Epi-dymis	Lung	Liver	Spleen	Kidneys
Group I (photochromogens)	P-18	25 × 10 ⁷	69 days	+	-	-	-	-	-
	P-21	27 × 10 ⁷	63 "	+	-	-	-	-	-
	P-22	1.2 × 10 ⁷	62 "	++	++	-	-	-	-
	P-24	1.0 × 10 ⁷	62 "	###	-	-	-	-	-
	P-26	6.2 × 10 ⁷	60 "	###	-	+	-	-	-
	2299	60 × 10 ⁷	60 "	###	+	-	-	-	++
Group II (scotochromogens)	P-5	14 × 10 ⁷	69 "	+	-	-	-	-	-
	P-6	49 × 10 ⁷	69 "	-	###	-	-	-	-
	P-15	6.4 × 10 ⁷	62 "	###	+	-	-	-	-
	2512	46 × 10 ⁷	59 "	###	-	-	-	-	-
	2513	40 × 10 ⁷	68 "	+	-	-	-	-	- (Died)
Group III (nonphotochromogens)	P-39	2 × 10 ⁷	63 "	++	+	-	-	-	-
	P-41	61 × 10 ⁷	63 "	++	+	-	-	-	-
	2388	4.4 × 10 ⁷	68 "	###	-	-	-	-	- (Died)
	2390	16 × 10 ⁷	62 "	-	+	-	-	-	-
	2391	11 × 10 ⁷	10 "	###	-	-	-	-	- (Died)
	2391	48 × 10 ⁷	65 "	++	-	-	-	-	-

Lesions were evaluated as follows: - No lesion + Slight lesion ++ Moderate lesion ### Heavy lesion

Table 2. Results of Reisolation of Mycobacteria from Tissues of Rabbits Inoculated with Atypical Mycobacteria into Testicle

Group	Strain	Results of reisolation				Notes
		Testis	Liver	Spleen	Kidneys	
Group I (photochromogens)	P-18	++	-	-	-	
	P-21	++	-	-	-	
	P-22	++	-	-	-	
	P-24	+++	-	-	-	
	P-26	+++	1	-	-	
	2299	+++	-	1	+	
Group II (scotochromogens)	P-5	+++	-	1	-	
	P-6	++	-	-	-	
	P-15	-	-	-	-	
	2512	+++	-	-	-	
	2513	/	/	/	/	Died 68 days after inoculation
Group III (nonphotochromogens)	P-39	17	0.3	0.3	/	
	P-41	++	-	-	-	
	2388	/	/	/	/	Died 68 days after inoculation
	2390	50	-	-	-	
	2391	/	/	/	/	Died 10 days after inoculation
	2391	++	-	-	-	

The colonies were counted 5 weeks after cultivation.

- No growth + Moderate growth ++ Heavy growth +++ Very heavy growth

を接種したものにおいては副睾丸のみ乾酪性病変が認められた。ただし 2388 株は接種後 68 日目に 2391 株を接種したウサギのうち 1 羽は 10 日目に死亡した。

$H_{37}R_v$ 株を睾丸内に接種した成績

$H_{37}R_v$ 株の生菌を接種した場合には睾丸は大きく腫大し無数の結節が認められたが (Fig. 5), 副睾丸, 肺臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓には変化は認められなかった。

非定型抗酸菌および人型結核菌 ($H_{37}R_v$) の 100°C, 30 分加熱死菌を睾丸内に接種した場合の病変 (接種後 60 日目の観察)

非定型抗酸菌 P-18, P-21, P-22, P-5, P-6, P-15, P-39 および P-41 の死菌をウサギの睾丸内に接種した場合には初めは接種部の腫脹が認められることもあるが, 接種後 60 日目においては腫脹は完全に消失し, 剖検の結果他の臓器にも病変は認められなかった (Fig. 6)。 $H_{37}R_v$ 株の死菌を接種した場合には接種部に壊死が認められた所があつた。

病理組織学的所見

病理組織学的には非定型抗酸菌をウサギ睾丸に接種した場合も, 人型結核菌 ($H_{37}R_v$) を接種した場合もほとんど同様であつた。また Group I, II および III の間における病変の差異を認めることは困難であつた。著者の実験においてはいずれの株を接種した場合においても接種部の睾丸および副睾丸に壊死巣や類壊死巣があり, P-15,

P-5, および P-18 株を接種したものにおいては壊死巣の一部に石灰化がみられた。病巣における細胞は類上皮細胞, 組織球, リンパ球と少数の巨細胞等であつて一般の結核病巣におけるものと同様であつた。また非定型抗酸菌の死菌を接種した場合には全然変化を認めなかつたが, 人型結核菌の死菌を接種した場合, 死菌という異物の接種によつて接種部に壊死が起こり, それを吸収しようとして壊死部に集まつたリンパ球, プラズマ細胞がみられた (Fig. 7~14)。

病変部より抗酸菌の再分離

非定型抗酸菌を接種し, 結核性病変の起こつた睾丸からは表 2 のように II 群の P-15 株を除き抗酸菌が分離された。P-15 株を接種した睾丸における病変は著明であり顕微鏡的にも抗酸菌が認められたので培養上菌が証明されなかつたのは技術上の誤りだつたのだと思う。抗酸菌は睾丸のみならず肝臓, 脾臓等からも証明されたものがあつた。

考 察

以上の結果から Runyon より分与された非定型抗酸菌 16 株はウサギの睾丸内に接種した場合接種された菌はいずれも接種部に結節を認め, 再分離培養により抗酸菌集落を認めた。また肺臓, 脾臓, 肝臓, 腎臓において一部のものにおいて病変が認められた。内臓からはわずか

に菌の証明されたものがあつた。接種部における結節は中心壊死性で弱毒人型結核菌を接種した場合のものとなるところがなかつた。I, II, III 群の間においても大きな差異が認められなかつた。

1961年、平野ら²⁾は H₃₇Rv 株、当病院において分離された非定型抗酸菌、およびアメリカ株、合計 10 株をウサギ辜丸内に接種した場合、辜丸あるいは肺臓、肝臓に病変が認められたと報告しているが著者は photochromogens, scotochromogens および nonphotochromogens について実験を行ない上記の成績を得た。atypical mycobacteria は I, II, III 群のいずれにおいてもウサギ辜丸内接種では主として接種部に結核性の病変が認められ、その変化は人型結核菌接種の場合とほとんど同様であることを認めた。一方染谷ら³⁾、Pollack ら⁴⁾も非定型抗酸菌をウサギに接種してその病原性について研究しているが、いずれの場合も静脈内接種法を用いて病変は認めなかつたと報告している。同一菌でも被検動物の接種部を異にすることによって病原性の異なることは、他の菌において経験することであるが、ウサギに病原性がないといわれる人型結核菌を辜丸内に接種して結核性病変を認め、また人に結核性病変を起しうる非定型抗酸菌も同様にウサギ辜丸内接種によつて主として接種部に結核性病変を認めたことは興味あることと思う。また非定型抗酸菌の死菌をウサギの辜丸に接種した場合にはなんらの変化を起さなかつたが、同じく死菌でも人型結核菌 H₃₇Rv を接種した場合には接種部に壊死が認められたところからみると非定型抗酸菌は弱毒結核菌に似ているようである。

結 論

非定型抗酸菌 I 群 (6 株)、II 群 (5 株)、III 群 (5 株)、計 16 株をウサギ辜丸内に接種したところ、辜丸時にはまた副辜丸に結核様の病変の起こることを認めた。その変化は人型結核菌 H₃₇Rv 株を接種した場合と区別することは困難であり、また病変部から抗酸菌が分離された。

I, II および III 群は毒力において多少の差があるようであつたが明らかでない。実験に用いた菌株数が少ないので明確にいいがたい。

上記の菌株の加熱死菌を辜丸に接種した場合には接種

後接種部に腫脹を認めたこともあつたが接種後完全に治癒し、剖検のさいには人型結核菌の死菌を接種した場合のほか病変は全然認められなかつた。非定型抗酸菌接種によつて辜丸に発生した病変は接種菌株による特有の病変と思う。またその病変は弱毒の人型結核菌を接種した場合と区別することが困難であることは注目すべき所見であると考えらる。

拙筆するにあたり、ご指導、ご校閲いただいた細菌学教室平野憲正先生に深謝し、とくにご助言いただいた須子田キヨ助教授および日本医科大学病理学教室福士勝成教授のご助言を深謝します。

なお本実験の成績の大半は昭和 40 年第 40 回日本結核病学会において報告したものであることを付記いたします。

文 献

- 1) Alice Timpe, M. A., and Ernest, H. Runyon, Ph. D.: J. Lab. and Clin. Med., 44 : 202, 1954.
- 2) Norimasa Hirano, and Kiyo Sushida : J. J. of Microbiol., 5 : 35, 昭 36.
- 3) Norimasa Hirano, and Kiyo Sushida : J. J. of Microbiol., 5 : 174, 昭 36.
- 4) 染谷四郎・林治 : 日本細菌学雑誌, 7 : 605, 昭 27.
- 5) Ann Pollack and Victor B. Buhler : Am. Rev. Tuberc., 71 : 74, 1954.

写 真 説 明

Changes Produced by Atypical Mycobacteria or *M. tuberculosis* (H₃₇Rv) Inoculated into Testicles of Rabbits

Fig. 1~4. Gross appearance of testicles of rabbits inoculated with atypical mycobacteria.

Fig. 5. Gross appearance of testicles of rabbit inoculated with *M. tuberculosis* (H₃₇Rv).

Fig. 6. Testicles of rabbit inoculated with heat-killed atypical mycobacteria.

Fig. 7~12. Microscopic findings produced by atypical mycobacteria inoculated into testicles of rabbits. ×100 and ×400. H-E staining.

Fig. 13~14. Microscopic findings of testicles of rabbits inoculated with *M. tuberculosis* (H₃₇Rv). ×100 and ×400. H-E staining.



Fig. 1. P-22. $\frac{3}{2}$ mg 63 days



Fig. 2. P-24. $\frac{3}{2}$ mg 63 days



Fig. 3. P-15. $\frac{3}{2}$ mg 63 days



Fig. 4. P-39. $\frac{3}{4}$ mg 60 days



Fig. 5. H₀Rv $\frac{3}{2}$ mg (Living bacilli)



Fig. 6. P-39. $\frac{3}{2}$ mg 64 days (Dead bacilli)

