

原 著

新たに記載された遅発育抗酸菌種のマウスに対する毒力

¹斎藤 肇 ¹村上 和保 ²矢島 幹久 ³石井 則久
⁴権 赫 僊

¹広島県環境保健協会, ²国立療養所多磨全生園, ³横浜市立大学皮膚科,
⁴ソウル保健大学臨床病理

THE VIRULENCE FOR MICE OF NEWLY DESCRIBED
MYCOBACTERIAL SPECIES

¹*Hajime SAITO, ¹Kazuyasu MURAKAMI, ²Mikihisa YAJIMA, ³Norihisa ISHII,
 and ⁴Hyuk Han KWON

¹*Hiroshima Environment and Health Association, ²National Sanatorium, Tama-Zenshoen
³Yokohama City University, ⁴Seoul Health College

The virulence for mice of some newly described slowly growing mycobacterial species, *M. intermedium* DSM 44049 (Group I), *M. lentiflavum* ATCC 51985 and *M. interjectum* ATCC 51457 (Group II), *M. genavense* ATCC 51233, *M. celatum* ATCC 51131, *M. branderi* ATCC 51788 and *M. conspicuum* DSM 6333 (Group III) was compared with the virulence of *M. intracellulare* N-260 (virulent strain). 10⁶ CFU cultured in Middlebrook 7H9 medium were given i.v. to the BALB/c mice. Infected animals were sacrificed after one day and 56 days, and observed for the incidence and/or degree of gross lesions of visceral organs. The bacterial load (CFU) in tissue homogenates of the lungs and spleen was counted using 7H11 agar plates. Macroscopically, marked enlargement of the spleen and numerous small whitish nodules in the lungs of mice infected with *M. intracellulare* were noted, whereas with other test strains no gross disease in the lungs and slight enlargement of the spleen of mice infected with *M. genavense* and *M. branderi* were noted. The average log CFU in the lungs and spleen 56 days after the infection was in the order as follows: *M. intracellulare* (5.90 and 7.57, respectively), *M. genavense* (4.35, 7.15), *M. celatum* (5.01, 6.00), *M. branderi* (4.09, 6.33), *M. conspicuum* (3.11, 5.10), *M. intermedium* (2.26, 4.19), *M. lentiflavum* (1.70, 3.91), and *M. interjectum* (1.43, 2.93). Microscopically, granulomatous lesions mainly consisted of macrophages with acid-fast bacilli were found in the alveolar walls and splenic red pulp of mice infected with *M. intracellulare*. No histopathological changes were produced in the lungs of any of mice infected with other test strains, and some milder features were revealed in the spleen of mice infected with *M. genavense*, *M. branderi* and *M. celatum*.

*〒730-8631 広島県広島市中区広瀬北町9-1

*9-1, Hirosekita-machi, Naka-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima 730-8631 Japan.

(Received 5 Aug. 1999/ Accepted 20 Oct. 1999)

Thus, we concluded that all of the test strains of the newly described nontuberculous slowly growing mycobacteria were less virulent for mice than were *M. intracellulare*.

Key words : New mycobacterial species, Nontuberculous mycobacteria, Slowly growing mycobacteria, Virulence

キーワードズ : 新抗酸菌種, 非結核性抗酸菌, 遅発育抗酸菌, 毒力

緒言

近年, AIDSあるいは非 AIDS 患者における全身播種性感染や肺疾患の原因菌として *Mycobacterium intermedium*¹⁾, *M. celatum*²⁾, *M. genavense*³⁾, *M. interjectum*⁴⁾, *M. branderi*⁵⁾, *M. conspicuum*⁶⁾, *M. lentiflavum*⁷⁾, などの新種の遅発育抗酸菌が報告されている。これらの菌種は培養・生化学的性状のみならず, 分子遺伝学的性状をも加味した分類法により独立種として報告されたものであるが, いずれにおいても実験動物に対する毒力についての記載は見られない。そこで今回われわれは上記の新規7抗酸菌種のマウスに対する毒力を *M. intracellulare* のそれと比較検討したので以下に報告する。

材料と方法

供試動物 : 日本クレア (大阪) から購入後2週間飼育した6週齢のBALB/c雌マウスを用いた。

供試菌 : 供試菌株並びにそれらのRunyon分類, 報告者, 報告年度および由来はTable 1に示した。なお, 対照菌株として *M. intracellulare* N-260を用いた。

動物接種 : 各菌株のMiddlebrook 7H9培地中37℃, 7日培養菌をNOVASPEC (LKB, Sweden) のOD₅₄₀

で0.2に調整し, その0.1 ml ($2.0 \times 10^6 \sim 9.0 \times 10^6$ CFU) を各8匹ずつのマウスの尾静脈内に接種後, 1日目に3匹および56日目に5匹を屠殺, 剖検し, 内臓の肉眼的病変の有無ないし程度を観察した。次いで, 肺および脾を無菌的に摘出し, ガラスホモジナイザーを用いて蒸留水 (5 ml) による組織ホモジネートを作り, その蒸留水による10倍通減希釈液の0.1 ml を7H11寒天平板へ移植し, CO₂ ふらん器内で37℃, 3週間培養して, 還元CFUを求めた。他方, 肺および脾のヘマトキシリン・エオジン染色あるいは抗酸菌染色 (Fite法) した組織切片についての病理組織学的検討をも併せて行った。

結果

肉眼的病変 : 菌接種後56日間にわたる実験経過中, 供試いずれの菌株の接種マウスにおいても死亡例はなく, 観察期間終了後屠殺, 剖検した。剖検時, 内臓の肉眼的所見としては, *M. intracellulare* 接種マウスでは肺に多数の結核様結節と脾の著しい腫大が見られたが, 新抗酸菌接種マウスには, 肺に肉眼的病変の見られたものはなく, 脾では *M. genavense* および *M. branderi* において軽度の腫大が見られたにすぎなかった。なお, いずれの実験動物においても肝および腎に肉眼的病変の見られたものはなかった。

Table 1 Newly described slowly growing mycobacteria tested

Strain	Group (Runyon)	Taxonomic description	Source
<i>M. intermedium</i> DSM 44049	I	Meier et al., 1993	Biotest, Germany
<i>M. celatum</i> ATCC 51131	III	Butler et al., 1993	ATCC, U.S.A.
<i>M. genavense</i> ATCC 51233	III	Böttger et al., 1993	ATCC, U.S.A.
<i>M. interjectum</i> ATCC 51457	II	Springer et al., 1993	ATCC, U.S.A.
<i>M. branderi</i> ATCC 51788	III	Koukila-Kähkölä et al., 1995	Kuopio University Hospital, Finland
<i>M. conspicuum</i> DSM 6333	III	Springer et al., 1995	Biotest, Germany
<i>M. lentiflavum</i> ATCC 51985	II	Springer et al., 1996	ATCC, U.S.A.

M. intracellulare N-260 (virulent, stock strain) was used as a control strain.

Table 2 Bacterial loads in the lungs and spleen in mice infected with newly described slowly growing mycobacterial species

Organism	Challenge dose ($\times 10^6$ CFU)	Log CFU/organ (mean) ^a				Δ Log CFU/organ (mean) ^b	
		Lungs		Spleen		Lungs	Spleen
		day 1	day 56	day 1	day 56		
<i>M. genavense</i>	2.9	3.85	4.35	5.64	7.15	0.50	1.51
<i>M. celatum</i>	4.2	4.51	5.01	5.07	6.00	0.50	0.93
<i>M. branderi</i>	4.3	4.34	4.09	5.45	6.33	-0.25	0.88
<i>M. conspicuum</i>	8.0	3.12	3.11	4.96	5.10	-0.01	0.14
<i>M. intermedium</i>	2.8	4.12	2.26	3.94	4.19	-1.86	0.25
<i>M. lentiflavum</i>	9.9	2.82	1.70	3.94	3.91	-1.12	-0.03
<i>M. interjectum</i>	2.0	4.22	1.43	4.11	2.93	-2.79	-1.18
<i>M. intracellulare</i>	8.9	3.73	5.90	5.22	7.57	2.17	2.35

^aS.E.M. ranged from 0.03 to 0.45, with average value of 0.12.

^bLog CFU at day 56 - Log CFU at day 1.

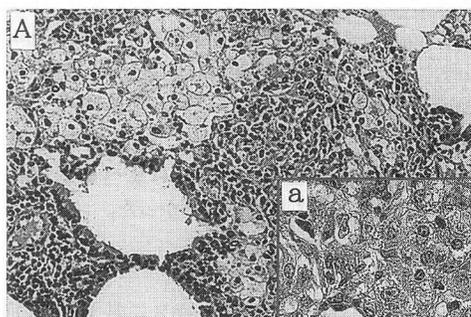


Fig. 1 Photomicrographs of hematoxylin- and eosin-stained section (A) and Fite-stained section (a) of the lungs infected with *M. intracellulare* N-260. magnification: (A), $\times 200$; (a), $\times 1000$.

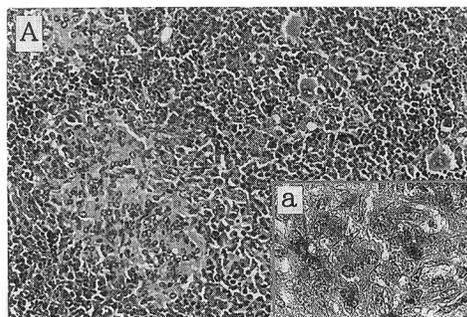


Fig. 2 Photomicrographs of hematoxylin- and eosin-stained section (A) and Fite-stained section (a) of the spleen infected with *M. intracellulare* N-260. magnification: (A), $\times 200$; (a), $\times 1000$.

還元培養：一括して Table 2 に示した。これから分かるように、感染56日目における肺および脾よりの平均 log CFU は *M. intracellulare*, *M. genavense*, *M. celatum*, *M. branderi*, *M. conspicuum*, *M. intermedium*, *M. lentiflavum* および *M. interjectum* の順に多く、また肺および脾の感染後56日間での菌増殖のパラメーターとしての Δ log CFU でも、*M. intracellulare*, *M. genavense*, *M. celatum*, *M. branderi*, *M. conspicuum*, *M. intermedium*, *M. lentiflavum* および *M. interjectum* の順であった。

病理組織：肺について見ると、*M. intracellulare* 接種マウスでは肺胞壁に主としてマクロファージの集積よ

り成る肉芽腫が見られ (Fig. 1A), マクロファージ胞体内には貪食された桿状の抗酸菌が見られた (Fig. 1a) が、いずれの新抗酸菌接種マウスでは特記すべき所見は見いだし得なかった。次に脾について見ると、*M. intracellulare* (Fig. 2A), *M. genavense* (Fig. 3A), *M. branderi* および *M. celatum* (Fig. 4A) では赤脾髄の洞と髄索に小結節状の主としてマクロファージより成る肉芽腫が見られ、ラングハンス巨細胞も散見されたが、その病変の強さ並びにマクロファージ内被貪食菌 (Fig. 2a, 3a, 4a) の多寡は *M. intracellulare*, *M. genavense* 並びに *M. branderi*, 次いで *M. celatum* の順であった。上記の脾の組織病変度並びにマクロファ

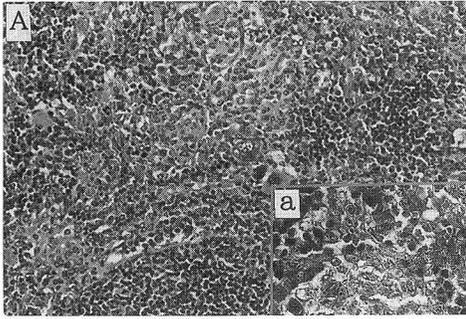


Fig. 3 Photomicrographs of hematoxylin- and eosin-stained section (A) and Fite-stained section (a) of the spleen infected with *M. genavense* ATCC 51233. magnification: (A), $\times 200$; (a), $\times 1000$.

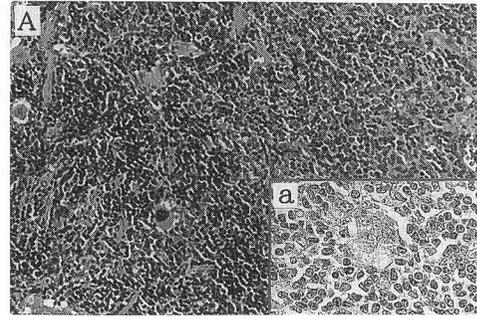


Fig. 4 Photomicrographs of hematoxylin- and eosin-stained section (A) and Fite-stained section (a) of the spleen infected with *M. celatum* ATCC 51131. magnification: (A), $\times 200$; (a), $\times 1000$.

ジ内被貪食菌の多寡は菌の還元 CFU と比較的良好に相関した。

考 察

1950年代に入り、非結核性（“非定型”）抗酸菌と呼ばれる一群の抗酸菌が注目されるようになり、抗酸菌の分類学的研究が活発に行われ、1970年代にはその分類体系はほぼ確立された感がある⁸⁾⁹⁾。その後、1990年代に入り、AIDSあるいは非 AIDS 患者における非結核性抗酸菌症の原因菌として、新種が相次いで報告されている¹⁰⁾¹¹⁾が、これは抗酸菌培養法の進歩もさることながら、従来の培養・生化学的性状に基づいた数値分類法に加えるに、脂質分析、さらには分子遺伝学の分類学への導入に負うところが大きいものと思われる。

ところで、非結核性抗酸菌は通常モルモット並びにウサギおよびニワトリ（血清型 1, 2, 3 *M. avium* を除く）には病原性がなく、本菌群に対して比較的感受性の高いマウスが実験動物として用いられている。マウスを用いた系では *M. kansasii* は肺および腎に、*M. fortuitum* および *M. abscessus* は腎および内耳に、また *M. marinum* および *M. ulcerans* は体表部に一定の病変を引き起こす¹²⁾。先に著者ら¹³⁾は DNA プローブで分類された *M. avium* complex のうち、*M. intracellulare* が *M. avium* よりも強毒であることについて報告した。

今回、われわれは近年新種として承認された遅発育抗酸菌 7 菌種 (Table 1) のマウスに対する毒力を、剖検時内臓の肉眼的病変、肺および脾の CFU 並びに病理組織学的病変についての観点からこれら菌種相互間の、また、*M. avium* complex 中強毒株に属した *M. intracellulare*

llulare N-260¹³⁾ との比較検討を行った。その結果、Ⅲ群菌 (*M. genavense* > *M. branderi* > *M. celatum* > *M. conspicuum*) の毒力は I 群菌 (*M. intermedium*) 並びに II 群菌 (*M. lentiflavum* > *M. interjectum*) よりも強かったが、これらの菌種中、毒力の最も強かった *M. genavense* でも対照毒力菌 *M. intracellulare* N-260 (Ⅲ群菌) に比べると上記のいずれの観点から見ても明らかに弱かった。

結 語

新規遅発育抗酸菌 7 菌種のマウスに対する毒力を、BALB/c 系雌マウスの尾静脈内に $2.0 \times 10^6 \sim 9.0 \times 10^6$ CFU を接種し、56 日後に屠殺剖検し、内臓の肉眼的病変の有無ないし程度、肺および脾よりの還元 CFU 並びに病理組織病変に基づいて評価した。その結果、供試菌の毒力はⅢ群菌 (*M. genavense* > *M. branderi* > *M. celatum* > *M. conspicuum*) > I 群菌 (*M. intermedium*) > II 群菌 (*M. lentiflavum* > *M. interjectum*) の順であったが、これらのいずれにおいても対照毒力菌 *M. intracellulare* N-260 よりも弱かった。

文 献

- 1) Meier A, Kirschner P, Schröder K-H, et al.: *M. intermedium* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1993; 43: 204-209.
- 2) Butler WR, O'Corner SP, Yakrus MA, et al.: *M. celatum* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1993; 43: 539-548.
- 3) Böttger EC, Hirschel B, Coyle MB: *M. genavense* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1993; 43:

- 841-843.
- 4) Springer B, Kirschner P, Rost-Meyer G, et al.: *M. interjectum* sp. nov. J Clin Microbiol. 1993; 31: 3083-3089.
 - 5) Koukila-Kähkölä, Springer B, Böttger EC, et al.: *M. branderi* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1995; 45: 549-553.
 - 6) Springer B, Tortoli E, Richter I, et al.: *M. conspicuum* sp. nov., a new species isolated from patients with disseminated infections. J Clin Microbiol. 1995; 33: 2805-2811.
 - 7) Springer B, Wu W-K, Bodmer T, et al.: Isolation and characterization of a unique group of slowly growing mycobacteria: description of *M. lentiflavum* sp. nov. J Clin Microbiol. 1996; 34: 1100-1107.
 - 8) 斎藤 肇: 抗酸菌の分類. 結核. 1975; 50: 401-405.
 - 9) 斎藤 肇: 非定型抗酸菌の分類. 臨床と細菌. 1982; 9: 35-43.
 - 10) 斎藤 肇: 抗酸菌の分類学—その歴史と進歩. 日臨微誌. 1997; 7: 39-46.
 - 11) 非定型抗酸菌症対策委員会: 非定型抗酸菌症の治療に関する見解—1998年. 結核. 1998; 73: 599-605.
 - 12) 斎藤 肇: いわゆる非定型抗酸菌をめぐる諸問題について. 広島医学. 1967; 20: 335-350.
 - 13) Tomioka H, Saito H, Sato K, et al.: Comparison of the virulence for mice of *M. avium* and *M. intracellulare* identified by DNA probe test. Microbiol Immunol. 1993; 37: 259-264.