実験的非定型抗酸菌症マウスにおける

Nocardia asteroides の検出

小 川 辰 次 本 村 恵 子

北里研究所

緒 言

我々は患者の喀痰や喉頭粘液より分離した非定型抗酸菌の毒力を見る為にマウスに接種感染して種々の時期に屠殺剖検し、臓器より非定型抗酸菌の還元培養を行つてゐるが、その際、肺だけに時々 *Nocardia asteroides* の検出が見られた。この実験的非定型抗酸菌症マウスにおける *Nocardia asteroides* の検出が今後の研究の何等かの参考になるだろうと思われたので、ここに発表し御批判を仰ぐ次第である。

実験方法

i マウス：体重12—13 g前後の♂の ddN 系のマウスを使用した。

ii 菌株および感染の方法：昭和43年2月より昭和44年3月までの間に実験した13株の非定型抗酸菌であつて、Runyon の分類では12株は非定発色性菌であつて、残りの1株は暗着色性菌である。これらの菌株の1%小川培地、37°C、3週培養のもので1 mg/ml の菌浮遊液を作り、これをマウスの尾静脈より0.1 ml すなわち10⁻¹ mg宛接種感染した。1株の菌株で10匹のマウスを使用した。尚1%小川培地により接種菌の生菌単位を測定した。

iii *Nocardia asteroides* の検出方法：マウスは1週に1回宛、体重を測定した。1カ月、3カ月および7カ月（時により4カ月、5カ月）に3～4匹屠殺剖検の予定であつたが途中で死亡したものもあつたので最終の月の剖検は1～3匹となつた場合や、全然剖検できなかつた場合もある。剖検したらまづ肉眼的に病変をみるとともに、脾、肺、腎ではその全部を、肝ではその一部を無菌的にとつて乳鉢ですりつぶし、1% NaOH 液で処理して、非定型抗酸菌の数えることのできる集落数を得

る為に、脾、肝、は10²、10³、10⁴倍、あるいは10³、10⁴、10⁵倍に稀釈し、肺、腎は10¹、10²倍に稀釈して、各稀釈段階の0.1 ml 宛を2本の1%小川培地に接種し、37°Cの孵卵器に約1カ月培養した上で発育した非定型抗酸菌の集落数を数え、10¹倍稀釈、0.1 ml 接種、即ち臓器10 mg中の集落数に換算した。その際に *Nocardia asteroides* の発育の有無に注意し、発育した場合は集落数を数え、前同様、臓器10 mg中のものに換算した。尚同様の方法により、健康マウスの肺よりの検出も試みた。

成 績

i 実験的非定型抗酸菌症マウスよりの

Nocardia asteroides の検出

実験した13株の中の6株の感染マウスにおいて、その何れかの時期の剖検に *Nocardia asteroides* が検出された。検出されたのは、何れも肺だけであつて、脾、肝、腎では検出されていない。

a. *Nocardia asteroides* の検出された菌接種群と、検出されなかつた菌接種群、各6群のマウス例。

Nocardia asteroides の検出された6群の非定型抗酸菌症マウス群の中の5株は、非発色性菌であつて、残り1株の岡本株だけが暗着色性菌である。肺の中に検出された10 mgの臓器の中の *Nocardia asteroides* の集落数と非定型抗酸菌の集落数および肺の非定型抗酸菌による結節様の病変の数を、十……漸く発見し得る程度、十……10以内、十……かなり多数、十……無数にわけて、更に剖検の時期別にして記したものが表1、表2であつて、表1は *Nocardia asteroides* の検出された群、表2は検出されなかつた群である。

まづ表1からみてゆくと、どの菌株の接種マウスにおいても肺に肉眼的病変を認めない。

次に石田株と田中株の接種マウスでは、経過とともに非定型抗酸菌の減少の傾向を認めるが、*Nocardia asteroides* の検出を認めたのは各、7カ月経過の3匹と4匹であつた。また嶺井株、松田株、木村株、岡本株の接種マ

Tatsuji OGAWA and Keiko MOTOMURA: Detection of the *Nocardia asteroides* from the Experimental Atypical Mycobacteriosis of Mouse. From The Kitasato Institute, Tokyo, Japan.

表1 *Nocardia asteroides* の検出された実験的非定型抗酸菌症マウス群の例

感染より 期間 剖検 ま	動物 番 号	石田株			田中株			嶺井株			松田株			木村株*			岡本株*		
		非光発色性菌			非光発色性菌			非光発色性菌			非光発色性菌			非光発色性菌			暗着色性菌		
		34.5×10 ⁶			15.5×10 ⁶			13×10 ⁶			1.0×10 ⁵			10.5×10 ⁶			4.0×10 ⁶		
		ノカル	非定	肉眼所見	ノカル	非定	肉眼所見	ノカル	非定	肉眼所見	ノカル	非定	肉眼所見	ノカル	非定	肉眼所見	ノカル	非定	肉眼所見
1カ月	(1)	0	1135	—	0	41	—	0	2	—	0	0	—	0	2	—	0	20	—
	(2)	0	191	—	0	27	—	0	2	—	0	0	—	0	1	—	①	2	—
	(3)	0	45	—	0	21	—	0	1	—	0	0	—	①	1	—	0	1	—
3カ月	(4)	0	125	—	0	151	—	②	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—
	(5)	0	10	—	0	26	—	①	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—
	(6)	0	5	—	0	9	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—	0	0	—
7カ月 (4カ月)	(7)	①	3	—	①	46	—				0	2	—	0	0	—	0	0	—
	(8)	③	0	—	①	2	—				②	0	—	0	0	—	0	0	—
	(9)	④	0	—	①	0	—				①	0	—	0	0	—	0	0	—
	(10)				①	0	—				①	0	—	0	0	—	0	0	—

- 注：1) *は最後の剖検が、感染後4カ月経過のマウスであることを示す。
 2) 株の下に記した数は接種した菌の生菌単位を示す。
 3) ノカルは *Nocardia asteroides*、非定は非定型抗酸菌を示す。
 4) 表中の *Nocardia asteroides* と非定型抗酸菌の集落数は臓器10mg中のものを示す。尚○を印したのは特に *Nocardia asteroides* の集落数である事を示している。

表2 *Nocardia asteroides* の検出されなかつた実験的非定型抗酸菌症マウス群の例

感染より 期間 剖検 ま	動物 番 号	山下株			木戸山株			落合株			山田株			平等株			山添株*		
		非光発色性菌			非光発色性菌			非光発色性菌			非光発色性菌			非光発色性菌			非光発色性菌		
		19×10 ⁶			48.5×10 ⁶			26.5×10 ⁶			16.0×10 ⁶			26.0×10 ⁶			29.5×10 ⁶		
		ノカル	非定	肉眼所見	ノカル	非定	肉眼所見	ノカル	非定	肉眼所見	ノカル	非定	肉眼所見	ノカル	非定	肉眼所見	ノカル	非定	肉眼所見
1カ月	(1)	0	19	—	0	118	—	0	125	—	0	45	—	0	325	—	0	108	—
	(2)	0	1280	—	0	148	—	0	173	—	0	126	—	0	540	—	0	120	—
	(3)				0	Ⅲ	—	0	185	—	0	175	—	0	1090	—	0	1525	—
3カ月	(4)	0	5	—	0	65	—	0	128	+	0	130	+	0	46	—	0	250	+
	(5)	0	35	—	0	1300	—	0	380	—	0	975	+	0	99	—	0	2600	+
	(6)	0	70	—	0	4400	—	0	1005	—	0	6500	Ⅲ	0	5150	—	0	5500	+
7カ月 (5カ月)	(7)	0	11	—	0	0	—	0	1130	Ⅲ	0	590	Ⅲ	0	5	—	0	120	+
	(8)	0	93	—	0	3000	—				0	640	+	0	350	—	0	215	+
	(9)										0	17000	Ⅲ	0	2000	+	0	350	—
	(10)										0	43000	+	0	208000	Ⅲ	0	635	Ⅲ

- 注：1) *は最後の剖検が感染後5カ月経過のものであることを示す。
 2) その他は、表1に準ず。

ウスでは、非定型抗酸菌の集落数は、いずれの時期においても少いか、あるいは陰性を示すものが多かったが、嶺井株では3カ月経過の3匹中の2匹に、松田株では7カ月経過の4匹中の3匹に、そして木村株と岡本株で

は、1カ月経過のそれぞれ3匹中の1匹に *Nocardia asteroides* を検出している。検出された *Nocardia asteroides* の集落数はいずれも少く、4コが1匹、3コが1匹、2コが2匹、残りの10匹はいずれも1コだけであつた。ま

表3 剖検までの期間別および分離した非定型抗酸菌の集落数別にみた *Nocardia asteroides* の検出率

感染より剖検 までの期間	0—9コ		10—99コ		100コ以上		合 計	
	検 査 マウス数	陽性マウス数 (陽性率)	検 査 マウス数	陽性マウス数 (陽性率)	検 査 マウス数	陽性マウス数 (陽性率)	検 査 マウス数	陽性マウス数 (陽性率)
1ヵ月	11	2 (18.2%)	7	0	20	0	38	2 (5.3%)
3ヵ月	16	2 (12.5%)	8	0	15	0	39	2 (5.1%)
4—7ヵ月	19	9 (47.4%)	3	1 (33.3%)	13	0	35	10 (28.6%)
合 計	46	13 (28.3%)	18	1 (5.6%)	48	0	112	14 (12.5%)

た非定型抗酸菌と1諸に発育したものは5匹であつた。*Nocardia asteroides* の集落の認めるまでの期間は、1～2週であつて、1週が最も多かつた。次に *Nocardia asteroides* の検出されなかつた菌接種群マウスの表2をみると、接種した生菌単位は表1と大差ないのにかかわらず、表1に比して概して非定型抗酸菌の集落数が多いし、経過とともに集落数の増加を示すものが多い。また3ヵ月、7ヵ月と経過するにしたがつて、稀に結節様のものを認めるものがあつた。

b. 感染より剖検までの期間別および肺の非定型抗酸菌の集落数別に見た *Nocardia asteroides* の検出率

表3に見る様に、剖検までの期間別にみると4—7ヵ月が最も検出率が高かつた。また非定型抗酸菌の検出された集落数別にみると、0—9コの部分が最も検出率が高く、10—99コはこれにつき、100コ以上の部分では *Nocardia asteroides* の検出されたものは1匹もなかつた。

以上の成績は、*Nocardia asteroides* の検出率は、剖検までの期間の長いものほど、また非定型抗酸菌の集落数の少ないもの程、高いことを示している。

ii 健康なマウスの肺よりの *Nocardia asteroides* の検出

ddN 系の8のマウスを、そのまま、非定型抗酸菌を接種したマウスと同室に飼育し、iに準じて剖検し、肺のみを無菌的にとり出し、培養を行い、*Nocardia asteroides* が検出できるかどうかを実験した。

表4に示す様に、3回の実験で、28匹のマウスについて行つていますが、*Nocardia asteroides* はこの中の3匹より分離された。集落数は臓器10mgに対して1～2コであり、検出までの期間は1週間であつた。

考 察

Nocardia asteroides の検出されたのは実験的非定型抗

表4 健康マウスの肺よりのノカルヂアの検出率

	飼育期間	検 査 マウス数	陽性マウス数 (陽性率)
第 1 回	4ヵ月	13	3 (23.1%)
第 2 回	6ヵ月	10	0
第 3 回	6ヵ月	5	0
合 計		28	3 (10.7%)

酸菌症マウスでは肺のみであつて、脾、肝、腎では検出されていない。脾、肝で検出できなかったのは 10^2 倍以上の様な高度稀釈の段階のみを培養しているの、少数の *Nocardia asteroides* は検出できなかったかもしれないが、肺、腎では 10^1 倍稀釈の段階も培養しているので、少数の *Nocardia asteroides* でも検出できる筈であるが、肺のみに検出されて、腎には検出されていないこと、剖検までの期間の長いものに検出率が高かつたこと、また *Nocardia asteroides*¹⁾ は1% NaOH 液によつて約 $1/2$ に減少することを考慮に入れても、検出された集落数が少なかつたこと、更には、健康なマウスの肺にも検出されたことなどを総合して考えて見ると、土壌の中に存在している *Nocardia asteroides* が、なんらかの機会に動物舎に運ばれ、それがたまたま空気と一諸にマウスの肺に吸入され、迷入の形で肺に落ちつき、それが雑菌として検出されたものであつて、*Nocardia* 症が存在していたのではなさそうに思われる。次に非定型抗酸の中でも、毒力の弱いと推定される菌株を接種した場合、すなわち肺における非定型抗酸菌の少いか、あるいは消失したマウスに *Nocardia asteroides* がしばしば検出された。そして毒力の強いと推定される菌株を接種した場合、即ち肺の中の非定型抗酸菌が多く、且、経過とともに増菌

の傾向を示すマウスでは *Nocardia asteroides* は検出されなかつた。この様にマウスの非定型抗酸菌症の軽いものに *Nocardia asteroides* の検出されたことは、肺結核症を経過した人や^{2) 3) 4)}、あるいは化学療法実施中の⁴⁾肺結核症患者で喀痰中に結核菌の証明できない人達の喉頭粘液や喀痰に *Nocardia asteroides* が一過性に検出されるのと似ているが、このことは、人の肺結核症において長く化学療法をやつて、喀痰中に結核菌が消失し、しかも肺に不活動性の病巣が残っている様な人達にしばしば、非定型抗酸菌⁵⁾症をみる様に、*Nocardia* 症の発病は軽く経過した肺の非定型抗酸菌症に起りうる可能性を暗示するものではないだろうか。

すなわち菌交代的の現象は、単に化学療法においてのみ起りうるものではなくて、自然的にも起りうることを示唆するものであろう。次に *Nocardia asteroides* が健康なマウスの肺に検出されたことは、健康な人の喀痰等に *Nocardia asteroides* が検出されるのと似ている。

以上の実験の成績からは、肺の *Nocardia* 症は、原発性にも、続発性にも起りうる可能性が推定される。

綜 括

ddN 系の8のマウスに、非光発色性菌に属する12株と、暗着色性菌に属する1株を静脈内に接種感染し、感染後1～7カ月の種々の時期に2～3匹宛屠殺剖検し、肉眼的に病変を見るとともに、脾、肝、肺、腎をとつて、非定型抗酸菌の定量的な還元培養を行つた。その時に肺だけに112匹中の14匹(12.5%)に *Nocardia asteroides* の検出をみた。

検出されたマウスは、いずれも毒力の弱い菌株を感染

したものであつて、感染より剖検までの期間の長いものに検出率が高かつた。また健康なマウスの肺からは28匹中3匹(10.7%)に *Nocardia asteroides* を検出した。検出した *Nocardia asteroides* の集落数は、臓器10mgについて1～4コロニーであつた。検出までの期間は1～2週であつて、1週間までのものが大部分であつた。

この論文の要旨は昭和44年10月に開催された第13回日本医真菌学会総会で発表した。

文 献

- 1) 小川辰次ら：肺結核症空洞の穿孔によつて起つた膿胸に *Nocardia asteroides* の混合感染を起した1例と、この菌株の分離についての2, 3の実験, 日本胸部臨床, **25**, 605—613, 昭41.
- 2) Tatsuji Ogawa et al.: Improvements on Methods of Selective Culture of Acid-Fast Bacilli, Report III. An Experiment on Treatment of Laryngeal Swab with Low Concentration NaOH Solution, Kitasato Arch. of Exp. Med., **38**, 17—27, 1965.
- 3) Tatsuji Ogawa and Noriko Otani: Improvements on Methods of Selective Culture of Acid-Fast Bacilli, Report II. An Experiment on Treatment of Sputa with Low Concentration NaOH Solution, Kitasato Arch. of Exp. Med., **37**, 15—25, 1964.
- 4) 小川辰次：肺結核症に関連した *Nocardia asteroides* について, 北里メヂカルニュース, **147**, 23—38, 昭41.
- 5) 小川辰次ら：非定型抗酸菌に関する研究, 第4報, 既往の結核菌歴のはつきりしている非定型抗酸菌症の1例, 結核, **41**, 531—535, 昭41.
(昭和45年1月6日受付)