実験的脳アスペルギルス症に対するリン酸 ベタメサゾンナトリウムの影響

宮 治 誠* 藤原喜久夫* 西村 和子**

*千葉大学腐敗研究所腐敗研究部

**国立習志野病院皮膚科

I. 緒 言

1969年西村¹⁾はマウスの脳を特異的に侵す *Aspergillus fumigatus* (以下 *Asp. fum.* と略す) の1分離株について報告した。つづいて藤原²⁾は25株の *Asp. fum.* を使用し、これら菌株のマウス中枢神経系への侵襲性を比較検討し、25株中2株がマウス中枢神経系を強く侵すことを報告した。一方 Oehlert ら³⁾はラットの腹腔中に *Asp. fum.* を接種し、同時にヒアルロニダーゼを注射した場合に脳での菌糸の発育を認め、また杉本⁴⁾および鈴木⁵⁾は *Asp. fum.* の胞子をマウスの尾静脈に接種後、連日副腎皮質ホルモンを投与した場合脳に菌糸が発育しているのを認めたと報告している。このように *Asp. fum.* の脳への侵襲性に対して菌株に重きをおく考え方と、宿主の状態に、より重きをおく考え方が存在している。この実験で著者らは *Asp. fum.* のマウスの脳への侵襲性の強弱は菌株個々の性質によるものか、それとも宿主の状態により、左右されるものであるのかを検討した。

II. 実験材料と方法

1) 使用菌株：千葉大学腐敗研究所で保存されている *Asp. fum.* のうちマウスの脳を強く侵すことのない N I G E 株、A-F-7 株、A-F-8 株および K-11 株の4株を使用した。これら4株のマウスに対する virulence、マウスの脳における菌糸発育の程度および各臓器での病原性に関しては以前に発表した²⁾。

2) 実験動物：体重22±1 gの dd 系の雄性のマウスを使用した。マウスは1群2匹とし、8群に分けられ、各株につき2群が割り当てられた。この2群のうち1群

は対照として無処置のまま胞子を尾静脈に接種されたが、他の1群は副腎皮質ホルモン様作用物質の連続投与を受けつつ胞子を接種された。

3) 副腎皮質ホルモン様作用物質並びにその投与方法：リン酸ベタメサゾンナトリウム（商品名リンデロン、塩野義製薬製、以下「リ」と略す）を使用した。1群2匹としたマウスの8群のうち4群の各マウスに毎日腹腔内に2mgずつ連続して注射した。7日間連続投与を受けたマウスは8日目に胞子を尾静脈に接種された。なお胞子接種後もマウスは毎日連続して「リ」を注射された。

4) 菌液の調製および接種法：各菌株を2%ブドウ糖添加じやがいもエキスを寒天培地に室温で10日間培養し、培養された斜面寒天に Tween 80を0.01%添加した^{1/15}M リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) を適量注ぎ込み、ピペットで軽く攪拌し、その浮遊液を他の滅菌試験管に移し、よく振盪して均一な胞子の浮遊液を作り、Thoma の血球計算盤で胞子数を数え、0.2ml 中 5×10^6 個の胞子を含むよう菌液を調製した。この調製された各株の菌液は（菌液の調製を開始してから1時間後に）1株につき2群あてに（このうち1群は「リ」が連続投与されている）マウスの尾静脈に0.2ml あて接種された。

5) 肉眼的並びに組織学的観察法：胞子を接種されたマウスは72時間後に屠殺され、肉眼的並びに組織学的検査に供された。なお組織の固定にはホルマリンを使用し、染色は H & E 染色、Luxol fast blue と P A S の重染色および Cresylechtviolet 染色を用いた。

6) 脳における菌糸発育並びに細胞浸潤の範囲の測定法：前に報告²⁾したようにマウスの頭蓋骨を開き、破損せぬよう注意しながら脳を取り出し、ホルマリン固定後嗅脳より外耳孔上縁を結ぶ線で水平に切断し（標本A）、更に切り離された上部の組織より大脳と小脳の部位の2

Makoto MIYAZI*, Kikuo FUJIWARA* and Kazuko NISHIMURA**: The Influence of Betamethasone disodium phosphate on Experimental Aspergillosis of the Brain in Mice. from the *Department of Sanitary Bacteriology, Institute of Food Microbiology, Chiba University. and **Department of Dermatology, Narashino National Hospital.

Table 1 Gross anatomical findings

organs strains	brain		kidneys		spleen		other organs	
	M.D.P.	control	M.D.P.	control	M.D.P.	control	M.D.P.	control
NIGE	hemorrhage (±)	hemorrhage (±)	microabscess (+++)	microabscess (+)	atrophy (+++)	atrophy (-)	normal	normal
A-F-7	"	"	microabscess (+++)	microabscess (++)	"	"	"	"
A-F-8	"	"	microabscess (+++)	microabscess (++)	"	"	"	"
K-11	"	"	microabscess (+)	microabscess (+)	"	"	"	"

(72 hours after injection)

cf: i) (一) → (+++)
none conspicuous

ii) M.D.P.: betamethasone disodium phosphate

枚の縦断面の組織標本を作製した(標本B, C).次に標本A, B, Cの面積を計測して3者の和を標本の総面積として算出し,同時に標本A, B, C中での菌糸が発育している面積および細胞が浸潤している面積をマイクロメーターを用いて計測し,この総和を標本総面積で割り100倍して%で表わした.なお1群2匹の割で実験を行なっている故,数値は平均して表わしてある.

III. 結 果

1) 剖検所見:剖検所見は表1に示した.「リ」投与群,対照群共に脳に異常を認めなかつた.しかし腎における膿瘍の形成は「リ」投与群においてより著しい傾向がうかがわれた.また「リ」投与群において脾の強い萎縮が認められた.

2) 脳の組織学的所見:全例において多少の差はあるが以下に述べる変化が認められた.即ち大脳においても灰白質白質を問わず多形核白血球を主とした小規模の細胞浸潤巣が散在性に認められ(写真1),その中心に菌糸が認められる場合と少なくとも切片上では細胞浸潤のみで菌糸は全く認められない場合が存在した.これら病巣の部位並びに程度によつて出血,壊死,神経細胞の変性(写真2)および脱髄現象(写真3)が附随して起こっているのが散見されたが,「リ」投与群と対照群との間に特に差は認められなかつた.

3) 脳における菌糸発育および細胞浸潤の範囲の比率:標本中における細胞浸潤および菌糸の発育している面積が標本全体の面積の何%にあたるかを計算した結果を表2に示した.即ち「リ」を投与された群が対照群と比較して脳における菌糸の発育が増大しているとは認められなかつた.この結果はマウスの脳で発育しにくい株

Table 2 The growth of hyphae and cell infiltration

groups	strains			
	NIGE	A-F-7	A-F-8	K-11
betamethasone disodium phosphate	1.92%	1.69%	0.76%	0.13%
control	2.91%	0.86%	0.25%	0.38%

は,たとえ「リ」を投与し宿主の抵抗力を減弱させたとしても脳での発育はほとんど影響を受けないことを示すと思われる.

4) その他の臓器の組織学的所見:腎では「リ」投与群において大小の菌糸発育巣を中心とした単核球,好中球,核片よりなる細胞浸潤巣が多数認められ,それらの病巣周辺および末梢の細尿管上皮には変性が認められた(写真4).NIGE株,A-F-7株の胞子を接種されたマウスの2匹中各1匹に,K-11株は2匹中2匹に真菌性腎盂炎が認められ,菌糸の発育が見られた.対照群でも「リ」投与群に比べて菌糸を中心とした膿瘍形成の数は少ないがかなり認められた.また細尿管上皮の変性も「リ」投与群に比べて軽度であつた.なお小規模の真菌性腎盂炎が対照群においてもK-11株の2匹中1匹だけに認められた.

心では「リ」投与群は対照群に比べて小さい細胞浸潤巣(中心に菌糸発育のある場合もない場合もあつた)は多少増加しているが顕著な差は認められなかつた.また心筋線維の変性は「リ」投与群においてやや著しかつた(写真5).

肝では両群共に小さい細胞浸潤巣が散在し顕著な差は

写真1. Luxol fast blue, PAS重染色×200
A-F-8 株, 「リ」投与群, 側頭葉
菌糸を中心に好中球の浸潤があり, その下方に軟化壊死と神経細胞の変性が見られる。

写真2. Luxol fast blue, PAS 重染色×200
A-F-8 株, 対照群, ヒポカンブス
好中球と核片よりなる小さい細胞浸潤巣が散在, 右下方には出血, 左方にはヒポカンブスの神経細胞に変性が見られる。

写真3. Luxol fast blue, PAS 重染色×200
A-F-7 株, 対照群, 線状体
樹枝状の菌糸発育。一部にグリヤと好中球よりなるごく軽度の細胞浸潤がある。斜走している(上方では横断されている)神経線維に脱髓が見られる。

写真4. P A S 染色×400
K-11 株, 「リ」投与群, 腎
菌糸を中心に好中球, 細胞の破片, 核片がみられる。辺縁の細尿管上皮の変性, 消失が著しい。

写真5. P A S 染色×400
A-F-7 株, 「リ」投与群, 心
心筋線維の間にみられた菌糸。まわりに大型の単核球が少数ある。

写真6. P A S 染色×400
K-11 株, 「リ」投与群, 肝
中心静脈壁を貫ぬいて菌糸が発育している。

写真7. PAS染色×400

A-F-7 株, 「リ」投与群, 肺
太い菌糸が樹枝状に发育している。(辺縁の肺胞上皮の増殖が著しい)

認められなかった。しかし、A-F-7 株、K-11 株において「リ」投与群の各1匹に中心静脈、肝静脈を中心とした菌糸发育巣が散見された(写真6)。

脾では「リ」投与群は著しいリンパ濾胞の萎縮を示し、発芽管を伸ばしている胞子が多数脾細胞に喰食されているのが認められたが、両群共菌糸发育巣はきわめて少なく、かつ小規模で両群の間に差を認めることは出来なかった。

肺では両群共部分的にうつ血あるいは軽度ないし中等度の間質性肺炎の像を示した。A-F-7 株の「リ」投与群の2匹に菌糸发育(写真7)を中心とした小膿瘍が散見されたが他の3株では両群とも菌糸は認められなかった。

以上総括してみると、「リ」投与群は対照群に比べて腎においては感染の促進が明らかに認められた。しかしながら、他の臓器では菌株によつては菌糸发育の出現あるいは増加、実質細胞の変性の増加が認められたが4株に共通して感染の促進が起こっているわけではなく、両群の間にはつきりした差を認めることは出来なかった。

IV. 考 按

動物を使用した *Asp. fum.* の感染実験は現在までかなり報告されている。しかし脳への侵襲性に焦点をあてた研究は僅かに散見されるにすぎない。1880年 Grawitz⁷⁾ は *Aspergillus* をウサギと犬の頸動脈中に接種し脳に病巣を作ったことを報告している。1954年 Eger⁸⁾ は人の脳アスペルギルス症より分離した *Asp. fum.* をラットの腹腔内に接種し、脳実質に菌糸が豊富に发育しているのを観察した。1969年西村¹⁾ はマウスの脳を特異的に侵

す *Asp. fum.* の1分離株につき報告し、同年藤原ら²⁾ は患者、空中および土壤中より分離された25株の *Asp. fum.* を使用し、これら菌株のマウス中枢神経系への侵襲度を定量的に計測し、25株中2株がマウスの中枢神経系を強く侵すことを報告した。1971年西村および宮治⁶⁾ は *Asp. fum.* のマウスの脳における发育を経時的、定量的に追求し、また Laovoravit⁹⁾ はウサギを使用して *Asp. fum.* の脳に対する感染を病理学的に詳しく記載した。ここでどの様な株がマウスの脳を強く侵す株であるかという著者らの基準を述べてみたい。著者らは組織学的所見よりも、肉眼的所見に重きをおいている。即ち、 5×10^6 個の胞子をマウスの尾静脈に注入した場合少なくとも4日以内にマウスの脳は著しく腫脹し、その為矢状縫合は1~2mmの巾に離解し、大脳縦裂および小脳横裂は密着しており、同時に大脳半球表面近くに大小の出血巣が透見される場合である。このような場合は菌糸が脳内で縦横に发育しているのが観察され、組織がどの方向に切られて作製されても豊富に发育した菌糸を認めることが出来るのである。逆にいえば顕微鏡的に観察してやつと見出されるような菌糸の发育や微小な膿瘍(中心に菌糸が認められる場合と認められない場合がある)や、またたとえ比較的大きい膿瘍を作りその中でやや太めの菌糸が見出されるような場合でも、上記の肉眼的所見がないかぎり脳を強く侵す株とは認めていない。この実験で著者らが使用した4株は脳を強く侵す株ではない。しかしこのような株でもなんらかの方法で宿主の抵抗力を減退させた場合脳への侵襲性が増大するか否かを検討する為、この実験を行なった。人間においては消耗性疾患、抗生物質、副腎皮質ホルモン剤等の投与を受けている患者に真菌感染が増加しているのは日常よく見うけられ、また副腎皮質ホルモン、ACTH剤、抗腫瘍剤を投与された動物、レントゲン照射された動物は *Asp. fum.* の感染が促進されたという報告もある^{4) 5) 10~20)}。特に脳に対しては Oehlert ら³⁾ はラットの腹腔内に *Asp. fum.* を接種し同時にヒアルロニダーゼを投与すると脳に菌糸の发育が起こってきたことを報告し、また杉本⁴⁾ および鈴木⁵⁾ は *Asp. fum.* の胞子をマウスの尾静脈に接種後連日コチゾン投与した場合に脳に菌糸の发育を認めたと述べている。しかし彼らの実験ではなるほど脳の組織内に菌糸を認めたかもしれないが肉眼的に見て上記のような強い変化は観察されていない。このように *Asp. fum.* の脳への侵襲性に対して菌株に重きをおく著者らの考え方と、宿主の状態により重きをおく考え方が存在す

る。しかし、著者らの実験でみるかぎりでは「リ」を投与された群と対照群との間に脳への侵襲性に差を認めることは出来なかつた。しかし、興味あることは、腎においては「リ」投与群の方が感染は著しく促進されていたことである。したがって、菌株が本来感染を起こし易い臓器では宿主の抵抗力が減退した場合その臓器での感染は促進されるが、その株にとってあまり感染を起こしにくい臓器では宿主の抵抗力が弱められた場合でも感染を飛躍的に促進することは難しいように思われた。

V. 結 論

Asp. fum. の4株を使用しマウスの脳への侵襲性に対する副腎皮質ホルモン様作用物質（リン酸ベタメサゾンナトリウム）の影響を調べた結果、本物質投与群は対照群と比較して脳での感染の促進を認めることは出来なかつた。

文 献

- 1) 西村和子：真菌と真菌症, 10, 170, 1969.
- 2) 藤原喜久夫, 宮治 誠, 西村和子, 倉田浩：千葉大学腐敗研究所報告, 22, 33, 1969.
- 3) Oehlert, V.W. und Düffel, F.: Zbl. allg. Path., 98, 41, 1958.
- 4) 杉本 裕：日新医学, 46, 675, 1959.
- 5) 鈴木文直：真菌と真菌症, 9, 280, 1968.
- 6) 西村和子, 宮治誠：真菌と真菌症, 12, 24, 1971.
- 7) Grawitz, P.: Arch. Path. Anat. Physiol.

- Klin. Med., 81, 355, 1880.
- 8) Eger, W. und Kührt, P.: Dtsch. Ztschr. Nervenhe., 171, 370, 1954.
- 9) Laovoravit, M.: Japan. J. Med. Mycol., 11, 15, 1970.
- 10) Mankowski, Z.T. and Littleton, B.J.: Antib. & Chemo., 4, 253, 1954.
- 11) Zimmerman, L.E.: Amer. J. Clin. Path., 25, 46, 1955.
- 12) Keye, J.D. and Magee, W.E.: Amer. J. Clin. Path., 26, 1235, 1956.
- 13) Sidransky, H. and Friedman, L.: Amer. J. Path., 35, 169, 1959.
- 14) Louria, D.B. and Browne, H.G.: Ann. N.Y. Acad. Sci., 89, 39, 1960.
- 15) 千葉直彦：真菌と真菌症, 7, 82, 1966.
- 16) Epstein, S.M., Verney, E., Miale, T.D. and Sidransky, H.: Amer. J. Path., 51, 769, 1967.
- 17) Merkow, L., Pardo, M., Epstein, S.M., Verney, E. and Sidransky, H.: Science, 160, 79, 1968.
- 18) Sandhu, D.K., Sandhu, R.S., Damodaran, V.N. and Randhawa, H.S.: Indian J. Chest Dis., 11, 115, 1969.
- 19) 後藤靖彦：直菌と真菌症, 11, 7, 1970.
- 20) Sandhu, D.K., Sandhu, R.S., Damodaran, V.N. and Randhawa, H.S.: Sabouraudia, 8, 32, 1970.

(昭和47年3月11日受付)

Abstract

The influence of betamethasone disodium phosphate was studied on cerebral infections of mice with 4 strains of *Aspergillus fumigatus*. Experimentally, the strains invade severely the kidneys of mouse but less the tissues of the brain. Male mice of dd line weighing 22 ± 1 g were used for the animal experiment. They were divided into 8 groups of 2 mice each. Two groups per one strain were employed and one group of them was received continuous 10 days' administration of betamethasone disodium phosphate, 2 mg/day, intraperitoneally.

On the other hand, spore suspensions were prepared in 1/15 M phosphate buffer (pH 7.4, supplemented with 0.01% tween 80) from 10 days cultures of the test strains on potato dextrose agar at room temperature. The number of spores was determined by the direct count with Thoma's hemocytometer chamber.

After 7 days' administration of the drug, each mouse was injected intravenously 5×10^6 spores of the strain suspended in 0.2 ml phosphate buffer solution. After 72 hours of injection, mice were sacrificed and examined grossly and microscopically.

The extent of the growth of hyphae and cell infiltration of the brain was determined by the following method; after fixation with 10% formalin solution, the brain was cut from three directions (section A, B

and C).

Section A was made by cutting horizontally along with the straight line that connects the olfactory brain and the upper part of the external ear hole. The section B was made from the cerebrum by cutting vertically and the section C was made from the cerebellum. Each section was stained with hematoxylin-eosin, periodic acid Schiff stain of Hotchkiss-McManus, luxol fast blue and cresylechtviolet.

By using micrometer, the areas of section A, B and C were measured (this was termed total area). The sum of areas showing the growth of hyphae and cell infiltration on the three sections was also measured. The ratio of that to the total area was calculated with the average data from 2 mice.

Grossly, no brain was swollen although a few hemorrhagic areas were found on the surface of the tissue. Microscopically, in all tissues of the brain small sporadic lesions that were composed of aggregates of leucocyte with a few hyphae were observed. Besides, necrotic foci, hemorrhagic areas, degeneration of nervous cells and demyelination were observed. The extent of the growth of hyphae and cell infiltration in the brain was as follows; in the groups injected betamethasone disodium phosphate, the areas affected by the strain NIGE was 1.92%, the strain A-F-7 1.69%, the strain A-F-8 0.76% and the strain K-11 0.13%, while, in the groups without administration, the strain NIGE 2.91%, the strain A-F-7 0.86%, the strain A-F-8 0.25% and the strain K-11 0.38%.

From the result, it seems to be considered that there is no definite influence of betamethasone disodium phosphate on the cerebral infection. However, mycotic lesions were established severer in the kidneys of mice injected betamethasone disodium phosphate than that not administered.

真菌と真菌症, 13(1); 47~52, 1972.

題名 実験的脳アスペルギルス症に対するリン酸ベタメサゾンナトリウムの影響

著者 宮治 誠, 藤原喜久夫, 西村和子

所属 千葉大学腐敗研究所腐敗研究部, 国立習志野病院皮膚科

抄録 *Aspergillus fumigatus* のマウスの脳への侵襲性の強弱は菌株固有の性質か, それとも宿主の状態により左右されるものであるかを検討した. 使用菌株はマウスの脳に対して侵襲性があまり強くない4株を, 実験動物として22±1gのdd系のオスのマウスを, また宿主の抵抗力を弱める目的でリン酸ベタメサゾンナトリウム(以下「リ」と略す)を使用した. マウスは1群2匹とし, 8群に分けられ, 各株につき2群が割り当てられた. この2群のうち1群は対照として無処置のまま 5×10^6 個の胞子を尾静脈に接種されたが, 他の1群は「リ」の連続投与(2mg/day)をうけつつ同数の胞子を接種された. 胞子接種後72時間後にマウスを犠牲死させ肉眼的, 顕微鏡的観察および侵されている範囲の測定を行なった. 結論として「リ」を投与された群は対照群と比較して脳での感染の促進を認める事は出来なかつた.