Cryptococcus neoformans の莢膜と 病原性に関する研究

鎌 田 勝 甫

横浜市立大学医学部第1内科教室（指導：福島孝吉教授）

緒 言

近年、一般細菌性感染症に対する大量の各種抗生物質の使用、各種疾患に対する副腎皮質ホルモンの長期間に亘る使用、及び真菌症に関する認識の高揚に従い、深在性真菌症が世界的に増加する傾向にある。我が国においてもアスペルギルス症、クリプトコックス症、カンジダ症及びムコール症等は症例数も多く、増多の一途をたどっている。しかし、その多くは血液疾患を始め、多くの重篤疾患の末期に感染し、急性の経過をとり、生前の診断が未だ困難であるが、クリプトコックス症は、約半数例が亜急性乃至慢性の経過をとり、他の多くの慢性疾患との鑑別が必要とされ、又治療が可能である為に、最も重要な真菌症の一つである¹⁾。

我が国に於いては、1915年の渡辺²⁾の報告以来1966年迄 143例ある。

不完全菌類に属す酵母菌たる *Cryptococcus neoformans* によつて惹起されるクリプトコックス症が³⁾、Busse, O.³⁾ Buschke, A.⁴⁾ によつて初めて報告されて以来、本症の一般的事項については、Littman, Zimmerman⁵⁾、美甘⁷⁾、福島⁸⁾の詳細な報告がある。

Cryptococcus neoformans の感染は、経口的にも起り得るとの Takos⁹⁾ の記載はあるが、主として呼吸道を介して肺に初感染巣を作り、心、動脈等の循環器系¹⁰⁾、皮膚、粘膜、及び肝、脾、腎、腸等の腹部諸臓器¹¹⁾ に病変をみ、しばしば中枢神経系を犯すので、臨床的に慢性脳膜炎、結核性髄膜炎、及び脳腫瘍等との鑑別が必要となる。

Cryptococcus neoformans は、Lodder¹¹⁾、及び Conant¹²⁾ によれば、その菌体に厚い莢膜を保有する為、临床上その同定に際し、他の酵母菌と比較的に鑑別出来る

のが特徴とされているが、本邦において患者よりの分離株、及び鳩の糞、ねずみの糞、土壌、野菜、果実等の自然界よりの分離株全てが、必ずしも莢膜を保有しているとは限らない。

本研究は、Lodder¹¹⁾、Benham¹³⁾、Conant¹²⁾ 等による同定方法により、*Cryptococcus neoformans* と同定された種々の厚さの莢膜を有する自然界分離株、及び人体分離株を用いて、自然界分離株と人体分離株との間に、又莢膜保有株と無莢膜株との間に、如何なる相違があるかを知るべく、これ等菌株の莢膜の変動、抗原性の差異、

表1 自然界分離株の莢膜の変動No. 1

菌株	原 株	継代培養株	放 置 株	
	40. 1. 19	40. 5. 26	1	2
2	+	+	+	—
3	+	+	±	+
8	+	+	—	+
15	+	+	+	—
16	+	±	+	—
17	±	±	±	—
22	+	+	—	—
27	+	+	±	—
29	+	+	+	—
32	+	±	—	—
34	+	+	—	+
35	+	+	±	—
36	+	+	±	—
40	+	+	—	—
41	—	+	±	—
48	+	±	±	—
50	±	+	+	—
58	+	+	—	+
60	+	+	+	—
62	+	—	—	—
67	+	±	—	—
68	+	±	±	—

Shoho KAMATA: Study on the capsule of *Cryptococcus neoformans* and its pathogenic significance.
From The first Department of Medicine, Yokohama City University Medical School.

表2 自然界分離株の莢膜の変動No. 2

菌株	原 株	継代培養株	放 置 株	
	40. 1. 19	40. 5. 26	1	2
76	+	+	—	—
77	+	+	±	—
88	+	+	+	+
92	+	+	±	+
93	+	+	±	—
94	+	+	+	—
95	+	±	—	—
98	+	+	±	—
101	—	—	—	—
105	+	±	—	—
112	+	+	+	—
113	+	±	+	—
114	+	+	±	—
115	+	+	±	—
117	+	+	—	—
118	+	—	—	—
119	+	+	±	—
124	+	+	±	+
146	+	±	—	—
155	+	+	—	—
159	+	±	+	—

病原性、及び人の好中球による食作用等について検討し、以つて本症発病の機序の一部を明らかにしようとした。

自然界及び人体分離株の莢膜の変動 実験方法

教室の戸塚¹⁶⁾が、昭和37年12月より39年8月迄の21カ月に亘つて、鳩の糞、ねずみの糞、野菜、土壤等 184株より分離した44種の自然界分離株の中、著者が表1、2に示す如く、39年12月に継代培養を行い、40年1月19日に墨汁標本にて莢膜の有無を観察した43株を原株とし、40年2月6日にサブロー寒天培地上に1代の継代培養を行つた菌株群を継代培養株、39年12月の継代培養後6カ月間放置した菌株群を放置株1、16カ月間放置した菌株群を放置株2とした。人体分離株に於いては表3に示す如く、教室に既存せる10種の菌株の莢膜を39年8月23日に観察して、これ等を原株とし、40年2月6日にサブロー寒天培地上に1代の継代培養を行つた菌株群を継代培養株、継代培養を行わず、39年8月の莢膜の観察以後9カ月間放置した菌株群を放置株1、20カ月間放置

表3 人体分離株の莢膜の変動

菌株	原 株	継代培養株	放 置 株	
	39. 8. 23	40. 5. 26	1	2
美 甘	—	+	—	—
K	—	+	±	+
Duke	+	+	+	+
田 坂	—	±	—	—
東 邦	+	+	+	+
大 阪	—	±	—	—
順天堂	—	+	+	—
松 井	—	±	+	—
東大皮	—	—	—	—
国 豊	—	+	+	—

した菌株群を放置株2とした。

自然界及び人体分離株共に、継代培養株は40年5月26日に、放置株1は40年5月25日に、放置株2は41年4月11日に夫々墨汁標本にて莢膜の有無を観察し、1代の継代培養を行つた場合と、継代培養をせず放置した場合に、莢膜の変動に如何なる差が生ずるかを比較検討した。

実験成績

1. 自然界分離株について

表4に示す如く、原株43株の中、41株が莢膜を保有していたが、1代の継代培養によつて莢膜に変動のないも

表4 莢膜保有株の莢膜の変動

莢 膜		継代培養株		放置株1		放置株2	
		自然界	人体	自然界	人体	自然界	人体
不 変	株数	27	1	11	1	7	1
	%	65.9	50.0	26.8	50.0	17.1	50.0
厚 くなつたもの	株数	1	1	1	1	0	1
	%	2.4	50.0	2.4	50.0	0	50.0
薄 くなつたもの	株数	13	0	29	0	34	0
	%	31.7	0	70.8	0	82.9	0

のは27株で65.9%、莢膜の厚みが増えたものは1株で2.4%、莢膜が消失乃至薄くなつたものは13株で31.7%であつた。6カ月間放置した放置株1では、莢膜不変のものは11株で26.8%、莢膜が厚くなつたもの1株で2.4%、莢膜が消失乃至薄くなつたものは29株で70.8%であつた。16カ月間放置した放置株2では、莢膜不変は7株17.1%、莢膜が厚くなつたもの0、莢膜が消失したものは34株で82.9%であつた。

莢 膜		継代培養株		放置株 1		放置株 2	
		自然界	人 体	自然界	人 体	自然界	人 体
		2	8	2	8	2	8
不 変	株数	1	1	1	4	2	7
	%	50.0	12.5	50.0	50.0	100.0	87.5
厚 く な つ た も の	株数	1	7	1	4	0	1
	%	50.0	87.5	50.0	50.0	0	12.5

自然界及び人体分離株による家兎抗血清の凝集反応 実験方法

表6 自然界分離株, 人体分離株による家兎抗血清の抗体価

血 清		Cap.	25	50	100	200	400	800	1600	3200	6400
自 然 界	101	⊕	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	88	⊖	+	—	—	—	—	—	—	—	—
人 体	Duke	⊕	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	T ₁	⊖	+	+	+	+	+	+	+	+	—

全採血によつて得られた8種の抗血清を用いて、自然界分離株20株と人体分離株10株を抗原として、凝集反応を行つた。

表7 各種抗血清の自然界分離株に対する抗体価

菌 株	莢 膜	抗 血 清							
		人 体 分 離 株				自 然 界 分 離 株			
		T ₁	T ₂	D ₁	D ₂	101 ₁	101 ₂	88 ₁	88 ₂
8	+	400	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
16	+	400	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
76	+	400	<25	<25	<25	<25	<25	25	<25
101	+	400	<25	<25	25	<25	<25	<25	<25
105	+	400	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
58	—	200	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
93	—	200	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
95	—	200	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
15	—	400	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
34	—	400	<25	<25	<25	<25	<25	25	<25
40	—	400	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
77	—	400	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
92	—	400	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
112	—	400	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
117	—	400	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
119	—	400	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
124	—	400	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
3	—	800	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
48	—	800	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
88	—	800	<25	<25	<25	<25	<25	25	25

表8 各種抗血清の人体分離株に対する抗体価

菌 株	莢 膜	抗 血 清							
		人 体 分 離 株				自 然 界 分 離 株			
		T ₁	T ₂	D ₁	D ₂	101 ₁	101 ₂	88 ₁	88 ₂
Duke	+	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
東 邦	+	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
大 阪	+	400	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
K	+	400	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
松 井	+	400	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
豊 橋	+	400	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
美 甘	—	400	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
東 大 皮	—	400	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
順 天	—	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
田 坂	+	3200	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25

表7, 8に示す如く, 自株に対する凝集素価が3200倍の田坂株家兎 No. 1 抗血清の他の菌株の抗原に対する凝集素価は, 自然界分離莢膜⊕の5株全々と400倍で, 莢膜⊖の3株と200倍, 9株と400倍, 残り3株と800倍, 人体分離莢膜⊕の2株と25倍以下, 莢膜⊕の4株と400倍, 莢膜⊖の2株と400倍, 1株と25倍以下であ

つた。

その他の抗血清で凝集反応がみられたものは, Duke. 株家兎 No. 2 抗血清が自然界分離莢膜⊕の1株に対して25倍, 第88株家兎 No. 1 抗血清が自然界分離莢膜⊕の1株, 莢膜⊖の1株に及び自株に対して25倍, 第88株家兎 No. 2 抗血清が自株に対して25倍であり, その他の

抗血清は全株に対して25倍以下で、凝集反応はみられなかった。

自然界及び人体分離株のラッテ肺内経皮的注入による感染実験

実験方法

サブロー寒天培地上培養4日後の人体分離莢膜⊕のDuke株と、自然界分離莢膜⊕の第35株を生理的食塩水で2回洗滌し、Duke株は 20×10^4 コ/mm³、第35株は 30×10^4 コ/mm³の生理的食塩水浮遊液として、各0.1ccを1群3匹とするラッテの右肺内に、皮内接種針を用いて経皮的に注入した。

本実験に先立ち、60%ウログラフィンをラッテの右肺内に外側より皮内接種針を用いて経皮的に注入し、確実に肺実質内に注入し得るかをレントゲン撮影により確かめた上で、本実験を行った。

実験成績

注入後全身状態の肉眼的な観察と、胸部レントゲンによる観察を行った。

菌液注入後、第1、2、3週目の胸部レントゲン写真では、いずれのラッテにも病的所見はみられなかったが、第5週目の撮影に際し、第35株注入のラッテNo. 1の両肺に柔い異常陰影を認めた。注入右37日目に、Duke株注入ラッテNo. 1と、第35株注入ラッテNo. 2を、エーテルにて斃死せしめて解剖した。しかし肉眼的には、両ラッテに病的変化はみられなかった。サブロー寒天培地に脳、肺、肝、脾、腎等の各組織を培養した。注入後44日目に第35株注入ラッテNo. 1が死亡した。直ちに解剖し、各組織を培養した。肉眼的には肝に寄生虫を認め、両肺に膿瘍を形成していた。注入後46日目に、残り3匹のラッテを屠殺し、肉眼的観察と各臓器の培養を行った。

培養所見は、表9に示す如く、第35株注入ラッテNo.

表9 自然界及び人体分離、莢膜⊕株のラッテ肺内経皮的注入実験

		胸部レントゲン所見	死亡	肉眼的所見	培養	
Duke 人体分離	1	—	—	—	—	
	2	—	—	—	—	
	3	—	—	—	—	
35	1	⊕ 5週目	⊕	肺：膿瘍 肝：寄生虫	—	44日目に死亡
	2	—	—	—	—	
	3	—	—	—	—	胃にCandida

3の胃を培養したものよりCandidaの発育を認めた以外、Duke株注入ラッテNo. 1, 2, 3, 第35株注入ラッテNo. 1, 2の各臓器からのCryptococcus neoformansの発育はなかった。

自然界及び人体分離株のマウス肺内経皮的注入による感染実験

実験方法

サブロー寒天培地に培養4～5日後、生理的食塩水で2回洗滌した自然界分離莢膜⊕の第76株を 17×10^4 コ/mm³、第36株を 17×10^4 コ/mm³、第35株を 5×10^4 コ/mm³、第58株を 10×10^4 コ/mm³、及び人体分離莢膜⊕のDuke株を 10×10^4 コ/mm³、東邦株を 12×10^4 コ/mm³、無莢膜の松井株を 14×10^4 コ/mm³、田坂株を 20×10^4 コ/mm³の生理的食塩水浮遊液として、各液0.1ccを1群を10匹とするマウスの右肺内に経皮的に注入した。別に生理的食塩水のみを0.1cc、10匹のマウスの右肺内に注入し、菌液注入群との対照とした。

実験成績

菌液注入後4日目より、各群のマウスは逐次死亡し始めた。死亡後直ちに、脳、肺、肝、脾、腎等の臓器をサブロー寒天培地に培養した。注入後16日目に、未だ生存

表10 Cryptococcus neoformans のマウス経皮的肺内注入感染実験

由来	菌種	実験動物数	発病数	培養陽性臓器数				
				脳	肺	肝	脾	腎
自 分 然 界 株	76	10	6	5	6	4	4	5
	36	10	6	3	6	5	3	4
	35	10	4	2	4	3	3	4
	58	10	2	0	2	1	1	2
計		40	18	10	18	13	11	15
人 体 分 離 株	田坂	10	2	1	2	1	2	3
	Duke	10	2	0	2	1	0	0
	松井	10	1	1	1	0	0	0
	東邦	10	0	0	0	0	0	0
計		40	5	2	5	2	2	3
生理的食塩水注入群		10	0	0	0	0	0	0
総計		90	23	12	23	15	13	18

せる全てのマウスを、エーテルで屠殺し、諸臓器を培養した。

各群のマウスの発病数と、各臓器の培養陽性数を表10に示す。

菌の分離別に、発病数と臓器培養陽性数を検討する

と、自然界分離株では、発病数は18匹、臓器別培養陽性数は、脳10、肺18、肝13、脾11、腎15で、人体分離株では、発病数は5匹、臓器別培養陽性数は、脳2、肺5、肝2、脾2、腎3であつた。即ちいずれの臓器でも、自然界分離株注入群は、人体分離株注入群の3.6～6.5倍の培養陽性臓器数を示している。臓器別にみた場合、培養陽性数は、直接菌の侵襲を受けた肺が23と最も高く、次いで腎18、肝15、脾13、脳12の順であつた。

生理的食塩水注入群の各臓器の培養結果は、全て陰性であつた。

自然界及び人体分離株の健康人及び各種疾患々者の好中球による貪喰率について。

実験方法

1. 使用菌株。表11に示す如く、本実験にはサブロー寒天培地に培養3～4日後の自然界分離莢膜2.4 μ の第

表11 菌株と莢膜の厚さ

	菌 株	莢膜の厚さ	
人 体 分 離 株	Duke	6.3 μ	⊕
	秀	3.3	⊕
	K	1.8	⊕
	大阪—1	0	⊖
	大阪—2	1.8	⊕
	国豊—1	0	⊖
	国豊—2	2.1	⊕
自 然 界 分 離 株	8	2.4	⊕
	88	2.7	⊕
	92	0.9	⊕
	124—1	2.7	⊕
	124—2	2.9	⊕
	50	0	⊖
	77	0	⊖
	95	0	⊖
	105	0	⊖

8株、2.7 μ の第88株、0.9 μ の第92株、2.7 μ と2.9 μ の第124株、無莢膜の第50株、第77株、第95株、第105株、及び人体分離莢膜6.3 μ のDuke株、3.3 μ の秀株、1.8 μ のK株、無莢膜と莢膜1.8 μ の大阪株、無莢膜と莢膜2.1 μ の国豊株の16種類の *Cryptococcus neoformans* を使用した。

2. 菌の操作。16種類の菌株を夫々生理的食塩水で3回洗滌し、10倍の生理的食塩水浮游液とし、K.M.を0.2g添加する。これ等の10倍浮游液の菌数を、血球計算盤で計算した上で、滅菌した有栓試験管に保存する。

写真1 Duke株、莢膜保有株

写真2 第77株、無莢膜株

写真3

写真 4

3. 貪食作用, 酢酸及びメタノールで洗滌した後, 乾熱滅菌したウイントローベのヘマトクリット管に, 極く少量のヘパリンを加えて採取した血液を1 cc注入し, 37°Cに保ちながら1500回転で2分間遠沈し, 上澄の血清をすて, 直ちに白血球数の約4倍以上の菌数が入るよう10倍浮游液を重積して, 白血球層と菌液を充分に攪拌し, 37°Cの培養器中に30分間静置する. 次に氷水中に5分間置き貪食作用を停止せしめ, 再び1500回転で3分間遠沈し上澄をすて, 菌層と白血球層を攪拌して, その一部を塗沫標本とし, ギムザ染色にて検鏡する. 写真3は, 健康人の好中球によつて第77株が同時に2コ貪食された状態で, 写真4は, 2コの好中球が夫々大きな異なる第124株を貪食している状態である.

実験成績

1. 健康人の好中球による貪食率. 1株につき5名の健康人の好中球によつて貪食作用を試み, その平均値を貪食率とした.

表12, 13に示す如く, 人体分離莢膜⊕の Duke 株の被貪食率は2.7%, 莢膜⊕の秀株は7.0%, 莢膜⊕のK株は13.3%, 自然界分離莢膜⊕の第8株は14.7%, 第88株は13.0%, 第92株は24.7%, 第124-1株は8.0%であった. 人体分離無莢膜の大阪-1株は25.3%, 国豊-1株は15.3%, 自然界分離無莢膜の第50株は15.7%, 第77株は27.0%, 第95株は13.0%, 第105株は14.3%であった.

表14, 15に示す如く, マウス脳内に2回継代して, 1.8μの莢膜を形成した大阪-2株の被貪食率は12.3%, 2.1μの莢膜を形成した国豊-2株は9.7%, 莢膜を2.9μ

表12 莢膜を保有する株の健康人好中球による貪食率

		I	II	III	IV	V	
Duke	⊕	3	3	2	2	3	2.7
秀	⊕	6	7	8	8	3	7.0
K	⊕	42	7	22	10	8	13.3
8	⊕	53	14	23	6	7	14.7
88	⊕	1	4	17	18	35	13.0
92	⊕	20	10	54	19	35	24.7
124-1	⊕	3	4	11	9	15	8.0
							12.7

単位%

表13 莢膜⊖株の健康人好中球による貪食率

		I	II	III	IV	V	
大阪-1	⊖	25	11	31	20	37	25.3
国豊-1	⊖	21	5	33	15	10	15.3
50	⊖	3	13	41	23	11	15.7
77	⊖	35	8	34	12	41	27.0
95	⊖	18	8	8	4	49	13.0
105	⊖	12	10	18	13	21	14.3
							18.4

単位%

表14 動物通過後の貪食率

		I	II	III	IV	V	
大阪-2	⊕	12	16	9	21	7	12.3
国豊-2	⊕	19	11	8	10	5	9.7
124-2	⊕	6	8	2	12	4	6.0
							9.3

単位%

表15 動物通過前の貪食率

		I	II	III	IV	V	
大阪-1	⊖	25	11	31	20	37	25.3
国豊-1	⊖	21	5	33	15	10	15.3
124-1	⊕	3	4	11	9	15	8.0
							16.2

単位%

表16 莢膜⊕及び⊖株の病人好中球による貪食率

	Duke ⊕	77 ⊖
貧血	0	0
骨髓性白血病	0.3	0.7
肝硬変	1.3	4.3
尿毒症	0	2.3
肺癌	0.3	0.7
胃癌	1.3	4.7
癌性腹膜炎	0.3	1.3
肝腫瘍	0	2.0
骨腫瘍	0.7	1.0
平均	0.5	2.0
クリプトコッカス髄膜炎	2.3	13.7

単位%

と僅かに厚くした第124—2株は6.0%であつた。

2. 内科的各種疾患患者好中球の貪食率

表16に示す如く、健康人好中球による被貪食率の最も低い莢膜⊕のDuke株と最も高い莢膜⊖の第77株を用いて、各種疾患患者各1例の好中球による貪食作用を行った。

赤血球数 244万、Hb 30%の低色素性貧血患者好中球の貪食率はDuke株0、第77株0であつた。白血球数1400、骨髓芽球18%の骨髓性白血病例はDuke株0.3%、第77株0.7%であつた。A/G比0.9、黄疸指数18、B.S.P 20単位、G.O.T 19単位の肝硬変症例はDuke株1.3%、第77株4.3%であつた。尿素窒素120mg/dlの尿毒症例はDuke株0、第77株2.3%であつた。左下肺野の円柱上皮癌例はDuke株0.3%、第77株0.7%であつた。幽門部に発生し、手術不能の胃癌例はDuke株1.3%、第77株4.7%であつた。癌性腹膜炎例はDuke株0.3%、第77株1.3%、肝腫瘍5横指、A/G比0.6、G.O.T. 180単位、アルカリホスファターゼ14.7の肝腫瘍例はDuke株0、第77株2.0%、第6胸椎の椎体腫瘍例はDuke株0.7%、第77株1.0%であつた。中等度発熱、腰椎穿刺にて、初圧280 mmH₂O、髄液中に*Cryptococcus neoformans*を認め、髄液のサブロー寒天培地への培養にて菌の発育をみたクリプトコッカス髄膜炎例は、Duke株2.3%、第77株13.7%であつた。

3. 健康人好中球による被貪食率と、使用した菌株の莢膜の厚さとの関係。

図1に示す如く、縦軸に貪食率の値、横軸に莢膜の厚さの値をとり、表12, 13, 14に示した如く、1菌株につ

図1 莢膜の厚さと貪食率

き健康人5例の好中球による被貪食率の平均値の16菌株の値が、夫々の菌株の莢膜の厚さに相当する箇所を点で示し、貪食率と莢膜の厚さとの関係を見た。

これによると、菌株の莢膜の厚さが増すに従い、その被貪食率は低下する傾向がある。

総括並びに考按

Cryptococcus neoformans は Emmons¹⁴⁾ によると、鳩の糞から57%分離されているが、本邦に於いては、福島¹⁵⁾、戸塚¹⁶⁾は、鳩の糞、その他の鳥の糞、野菜等からは勿論、新知見として鼠糞からも高率に検出し、自然界から23.9%に分離している。

これ等の分離菌の実験動物に対する病原性は、絶対的なものではなく、クリプトコックス症の発症に関しては、これ等の菌が何等かの誘因で病原性をもつものと考えられるが、本菌は自然界に多く存在するが人体内では検出が殆んどないこと、及びクリプトコックス髄膜炎患者の多くのものに、本症発現以前に呼吸器症状があり、約半数例に肺又は胸膜に病変があることなどから、主に気道を経て肺に初感染病巣をつくり、全身に播種すると考えられる。

本実験に使用した自然界分離株は、分離当時から既に莢膜を保有するものと無莢膜のものがあったが、本菌の形態学的な特徴の一つである莢膜が、サブロー寒天培地上で、如何に変動するかについては、既に戸塚¹⁶⁾は、マウス脳内通過によつて莢膜を形成した自然界及び人体分離株を用いて、約2週間に亘つてサブロー寒天培地上に3代の継代培養を行った場合と、サブロー寒天培地上に37℃で13日間放置した場合の莢膜の変動を観察

し、いずれの場合でも、自然界及び人体分離株とも、夫々約80%及び50%の株が、急速にその莢膜を消失すると報告しているが、著者は、同一菌株の保存株について、サブロー寒天培地に継代培養を一回行つたものと、全然継代培養を行なわず放置したものとの2群について、16カ月のより長期間の経過を追つて観察した。

自然界分離株では、莢膜保有株は41株あり、莢膜が消失乃至薄くなつたものは、一回の継代培養により31.7%、6カ月間の放置により70.8%、16カ月間の放置により82.9%であり、放置株は継代培養株の約2倍の莢膜消失率を示している。

継代培養或いは放置することにより、莢膜を形成することは殆んどできなかつた。人体分離株では、莢膜保有株は2株で、継代培養或いは放置することによつての株はみられず、無莢膜の8株は、継代培養によつて87.5%が、放置することにより50.0%が莢膜を形成した。従つて人体分離株は、自然界分離株に比して、サブロー寒天培地上にて、莢膜を消失し難く、むしろ継代培養によつて莢膜を形成する傾向がうかがえる。

自然界分離株に於いては、一回の継代培養では、継代培養株と放置株とを完全に比較することは無理であるが、いずれによつても、分離後年代を経ると共に莢膜は消失乃至は薄くなる傾向があるが、ただ一度の継代培養でも、継代培養した方が莢膜はよりよく維持される。

人体分離 *Cryptococcus neoformans* の抗原性に関しては、Neill¹⁷⁾ Benham¹⁸⁾、秋葉¹⁹⁾、大塚²⁰⁾の報告があるが、自然界分離株との比較は未だなされていない。これ等の報告では、1) *Cryptococcus neoformans* は抗体産生が得られ難い。2) 無莢膜株は、莢膜保有株より抗原性が高い、とされている。

本実験では、莢膜⊕と⊕株によつて得た抗血清による凝集素価は、自株と他の全菌株に対して25倍以下であり、自然界分離莢膜⊖株によつて得た抗血清では、自株と莢膜⊕株1株、及び莢膜⊖株1株に対してのみ25倍で、人体分離莢膜⊖株によつて得た抗血清では、自株に対して3200倍であり、莢膜⊕株2株に対して25倍以下、莢膜⊕株全てに400倍で、莢膜⊖株に対しては1株のみ25倍以下であつたが、他の菌株に対しては200倍から800倍、平均400倍であつた。即ち無莢膜株は抗原性が高く、厚い莢膜を有する菌株は抗原性が低い。菌の自然界及び人体分離別による抗原性及び凝集素価に差はみられない。無莢膜株による抗血清に対しては、厚い莢膜

を有する株は凝集し難い。等の結果を得た。

一般に、*Cryptococcus neoformans* の抗体産生能は低いと言われているが、菌株により又動物によつては3200倍の抗体価が得られたことは興味ある事実である。

Cryptococcus neoformans は、人、猿、マウス、ラツテ、牛等に病原性を有するが、実験動物としてはマウスが最適と言われている。¹¹⁾ 現在まで、各種動物を用いての実験的クリプトコックス症を惹起せしめる実験は数多くなされてきた。その方法として、菌浮游液の腹腔内接種、静脈内接種、脳内接種、及び気道内注入等があるが、本実験では、ラツテとマウスを使用して、菌液を経皮的に直接肺内に注入して発病せしめる方法をとつた。

ラツテを用いた場合、人体分離、及び自然界分離莢膜⊕株の注入によつては斃死はみられず、注入後37日及び46日目に屠殺して、各臓器の肉眼的観察と培養を行つたが、そのいずれにも *Cryptococcus neoformans* の感染はみられなかつた。

マウスを用いた実験では、特に自然界と人体よりの分離別にその病原性をみたが、自然界分離株注入群40匹中、発病数は18匹、45.0%で、人体分離株注入群40匹中、5匹、12.5%が発病した。臓器別にみた場合、その感染率は、直接注入した肺が57.5%と最も高く、次いで腎、肝、脾、脳の順で、分離別による感染率の差はなかつた。

自然界分離株群による発病率は、人体分離株群の3倍以上の値を示しているが、人体分離株より自然界分離株の病原性が強いのは、クリプトコックス症が、主として自然界に存在する菌の感染によつて発病すると考えられている事と考え合わせて、興味深いことである。

本実験によつては、マウスには比較的高い発病率を見たが、ラツテには発病はみられなかつた。しかし、ラツテに対する体重当りの菌数は $15 \times 10^4/g$ で、マウスには $65 \times 10^4/g$ であり、ラツテには接種菌数の不足と実験動物数の不足が考えられる為、一概にラツテが *Cryptococcus neoformans* に対して耐性の強い動物であるとは言い切れない。

一般細菌の貪食作用に関する研究は従来よりなされてきたが、真菌の貪食作用に関する報告は少ない。特に *Cryptococcus neoformans* に関する貪食作用の研究については、Gadebusch²¹⁾ の、正常白血球より貪食作用が強いと言われる貧血マウスの白血球を用いての研究と、中野²²⁾ の、試験管内の家兎白血球による貪食作用と、マ

ウス腹腔内滲出細胞による生体内貪食作用に関する研究等、数例の報告があるに過ぎない。

本実験では、健康人と各種疾患患者の好中球による試験管内貪食作用を検討した。

自然界及び人体分離株で、莢膜が0乃至6.3 μ の厚さの13菌株の健康人好中球による貪食率は、莢膜 $\oplus$ の5株は平均12.7%で、莢膜 $\ominus$ の6株は平均18.4%であり、さほど大きな差はないが、莢膜 $\oplus$ 株の2.7%、莢膜 $\oplus$ 株の7.0%と無莢膜株群の平均18.4%とを比較した場合、無莢膜株群の被貪食率は、明らかに高い。

菌の分離別に貪食率をみた場合、人体分離株5株は平均12.4%で、自然界分離株8株は平均16.3%であり、その差は小さく、貪食率が菌の分離別に大きく影響されるとは思われない。

動物通過によって、莢膜を形成した3株の貪食率は平均9.3%で、通過前の平均16.2%と比較すると、莢膜保有菌株群は明らかに貪食率が低下している。しかし、無莢膜株が常に、莢膜保有株より貪食率が高いとは限らない。

健康人好中球による貪食作用で、最も被貪食率の低い莢膜 $\oplus$ 株と最も高い莢膜 $\ominus$ 株を用いての内科的各種疾患患者の好中球による貪食率は、従来他の細菌の場合でも貪食率が低いと言われている疾患、即ち、白血病、肝炎、腎疾患、及び腫瘍等にては、*Cryptococcus neoformans*に於いても同様に貪食率は低かった。しかし、Berry, Spies²³⁾は、貪食時の好中球の貪食能は亢進すると言っているが、本実験では0であつて、著しい低下を示した。

莢膜の厚さ別にみると、莢膜 $\oplus$ 株の被貪食率は平均0.5%で、莢膜 $\ominus$ 株は平均2.0%であり、この場合も明らかに莢膜 $\ominus$ 株の被貪食率は高かった。

クリプトコックス髄膜炎患者の好中球の貪食率は、莢膜 $\oplus$ 株は2.3%で、莢膜 $\ominus$ 株は13.7%であり、健康人と同程度の値を示した。

健康人好中球による貪食率と菌株の莢膜の厚さとの関係では、莢膜の厚さが増すに従い、その被貪食率は低下する傾向がみられ、これは人体分離株が、自然界分離株より莢膜の厚いものが多く、又莢膜を消失し難いことと考えると、本症の発病に莢膜が重要な関係があることを推定せしめる。

中野²²⁾の報告した例では、試験管内での本菌の貪食作用はみられず、*Cryptococcus neoformans*は難被貪食菌であると言われているが、本実験に用いた方法によると、

Aspergillus 或いは *Mucor* 胞子の貪食率は、健康人で夫々35.2%、28.1%²⁴⁾であるのに比して、本菌では13.2%と低いが、比較的活発な貪食作用を、試験管内でみる事ができた。

結 語

自然界及び人体分離の *Cryptococcus neoformans* の菌株で、莢膜の厚さを $\ominus$ ～ $\oplus$ と区別した53種の菌株を用いて、菌株の分離別、及び莢膜の厚狭によつて病原性に如何なる差があるか比較検討し、次の結果を得た。

1. 莢膜を保有する自然界分離株を一回継代培養し、接種後4カ月目の観察で、莢膜不変のもの65.9%、厚くなつたもの2.4%、薄くなつたもの31.7%であつた。

人体分離株では、莢膜不変のもの50.0%、厚くなつたもの50.0%、薄くなつたもの0であつた。

保存菌株の莢膜を保有する自然界分離株をサブロー寒天培地に接種後放置し、6カ月後の観察で、莢膜不変のもの26.8%、厚くなつたもの2.4%、薄くなつたもの70.8%であつた。

人体分離株では、莢膜不変のもの50.0%、厚くなつたもの50.0%、薄くなつたもの0であつた。

無莢膜の自然界分離株を一回継代培養し、接種後4カ月目の観察で、莢膜不変のもの50.0%、厚くなつたもの50.0%であつた。

人体分離株では、莢膜不変のもの12.5%、厚くなつたもの87.5%であつた。

保存菌株の無莢膜の自然界分離株をサブロー寒天培地に6ヶ月間放置することにより、莢膜不変のもの50.0%厚くなつたもの50.0%であつた。人体分離株では、莢膜不変のもの50.0%、厚くなつたもの50.0%であつた。

即ち、分離後莢膜は薄くなる菌株が多いが、一回の継代培養でも、莢膜はより保存される傾向にある。

人体分離株は、自然界分離株よりサブロー寒天培地上にて莢膜を消失し難い。

2. 人体分離莢膜 $\oplus$ 株石炭酸死菌浮游液42ccの家兎耳静脈注射によつて、5週目に3200倍の凝集素価をもつ抗血清を得た。自然界分離莢膜 $\ominus$ 株では、25倍の凝集素価を得た。莢膜 $\oplus$ 株、及び $\oplus$ 株では抗体の産生はみられなかつた。

自株に対する凝集素価が3200倍の抗血清による他菌株との凝集素価は、莢膜 $\oplus$ 株と25倍以下、莢膜 $\oplus$ 株と400倍、莢膜 $\ominus$ 株と25～800倍、平均400倍であつた。

即ち、1) 無莢膜株は抗原性が高く、厚莢膜株は、抗

原性が低い。2) 分離別による抗原性、及び凝集素価に差違はない。3) 無莢膜株による抗血清に対しては、厚莢膜株は凝集し難い。

3. *Cryptococcus neoformans* の健康人好中球による貪食率は、最低 1.0%, 最高54.0%であつた。

莢膜⊕株の被貪食率は平均 2.7%, 莢膜⊕株は平均 7.0%, 莢膜⊕株は平均12.7%, 莢膜⊖株は平均18.4%であつた。

健康人好中球による貪食率と使用した菌株の厚さの関係をみると、莢膜の厚さが増すに従い、貪食率は低下する傾向を示した。

4. 貧血、白血病、肺癌、癌性腹膜炎、骨腫瘍等の、患者好中球による貪食率は低かつたが、クリプトコックス髄膜炎例は健康人と同程度の値を示した。

5. 自然界及び人体分離莢膜⊕株の平均 15×10^4 個/g の菌の経皮的肺内注入によつて、ラツテに感染を惹起することができなかつた。

6. 自然界分離 4 株の平均 61×10^4 個/g, 及び人体分離 4 株の平均 70×10^4 個/g の菌の マウス経皮的肺内注入による発病率は、自然界分離株は45.0%, 人体分離株は12.5%であつた。

なお、本論文の要旨は、第9回、及び第10回日本医真菌学会総会に於いて発表した。

終りに、御指導、御校閲を賜つた恩師福島孝吉教授に深く感謝致します。

文 献

1) 福島孝吉：真菌症，1963，金原書店。

- 2) 渡辺信吉：福岡医科大学雑誌，8：470，1915.
- 3) Busse, O.: Virchow's Arch. Path. Anat., 144: 360, 1956.
- 4) Buschke, A.: Deutsche med. Wochensch., 21: 14, 1895.
- 5), 6) Littman, M. L. & Zimmerman, L. E.: *Cryptococcus*, New & London., 3: 1956.
- 7) 美甘義夫，福島孝吉：第5回日本化学療法学会特別講演。
- 8) 福島孝吉：最新医学，11：1184，1956.
- 9) Takos, M.J.: New Eng. J. Med., 254: 598, 1956.
- 10) Duvall, C.P. & Carbone, P.P.: Ann. Intern. Med., 64: 850, 1966.
- 11) Loddor, J. & Kregar-Van N.J.B.: The Yeasts., 1952.
- 12) Conant, N.F.: Man. Clin. Mycology., W.S. Saunders Co., 1954.
- 13) Benham, R.W.: Tr. New York Acad., Sc., 17: 532, 1933.
- 14) Emmons, C.W.: Am. J. Hyg., 62: 227, 1955.
- 15) 福島孝吉：真菌と真菌症，6：77，1965.
- 16) 戸塚侑：真菌と真菌症，発表予定。
- 17) Neil, J.M.: J. Bact., 59: 263, 1950.
- 18) Benham, R.W.: J. Infect. Dis., 57: 255, 1953.
- 19) 秋葉朝一郎：真菌と真菌症，1：3，1960.
- 20) 大塚恭生：真菌と真菌症，2：186，1961.
- 21) Gadebusch, H.H.: J. Bact., 78: 259, 1959.
- 22) 中野安二：真菌と真菌症，1：34，1960.
- 23) Berry, L.J. & Spies, T.D.: Blood, Special Issue., 1: 98, 1947.
- 24) 近松徹也：真菌と真菌症，発表予定。
(昭和41年12月20日受付)