Streptobacillus moniliformis 脳炎の研究

第3報 Streptobacillus moniliformis 純培養菌接種による脳炎

大久保 つる

北里研究所ウイルス・リケッチャ部 (部長 笠原四郎)

〔受付: 7月14日1956年〕

第1報において、私はマウスを用いての各種のウイルス及びリケッチャ分離試験実施中に、脳炎或は腹膜炎症状を呈したマウスから、*Streptobacillus moniliformis* (以下 *St. m.* と略す) を分離して、この菌がマウス由来であることを述べ、更に一見健康に見えるマウスからも、本菌を検出してこのことを裏書した。*St. m.* が分離されたマウスの解剖所見と病理組織学的変化については、第2報に記載した。

本編では、私の分離した *St. m.* をマウスに接種して、果して先に報告したと同じ症状と病理解剖・病理組織学的変化を再現出来るかを述べ、併せてマウスにおける *St. m.* 感染確認法を報告する。

実験方法

使用菌株：小関株を主として使用し、一部の実験では笠原株を用いた。両菌株とも30%馬血清寒天を以つて5～10代継代保有したものである。

菌液：37°C, 70時間前後の培養菌を生理的食塩水に1 mg/cc の割合に浮遊した。

マウスと接種部位：DD系マウスを使用し、脳内には菌液0.02ccを、腹腔内には0.25ccを注射し、鼻腔内にはエーテル麻酔のもとに0.8ccを滴下した。

観察期間：接種後最長80日間観察することとし、必要に応じてクロロホルムで麻酔致死せしめて検索した。観察中には神経症状、下痢、血尿、血便の有無、四肢・尾部の腫脹・脱落の有無に注意した。

剖見：マウスは発症死後又は屠殺後、開腹して腹水及び浸出物の有無を調べ、肝・脾・腎の大きさ、色調を観察した。胸腔を開いて肺・心臓を調べた。最後に頭蓋を開いて脳の充血・浮腫を検した。必要に応じて諸臓器を秤量して、体重との比を算出した。

細菌培養：*St. m.* の再分離には、心血・肝・脾及び脳(脳底部を選んだ)の一部を30%馬血清寒天にうえ

た後、37°C, 3～4日間培養を試みた。

臓器スタンプ標本：脳(脳底部)・肝・脾・リンパ腺よりその小片をとり、吸取り紙にのせて湧出する血液をとり去り、スライドに軽く押しつけた。乾燥するのを待ってメタノール固定し、ギムザ染色を施した。後日は火焰固定後 Pfeiffer 液で瞬時染めて鏡検した。

病理組織標本：諸臓器をホルマリン固定後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作った。

実験成績

A. 脳内接種

(1) 小関株

血清寒天5継代の *St. m.* 菌液0.02cc宛をマウス11匹(体重7.5～8.0 g 7匹及び4.5～5.5 g, 4匹)の脳内に接種した。

接種後5日に4匹は立毛・丸背を示し、1匹は6日に、5匹は7日に、残りの1匹は8日同様の症状を示した(第1図)。個々のマウスについて症状を記載することはわずらわしいから、概括的に述べよう。

発病初期は丸背、立毛の程度であるが、数時後には“よちよち歩き”を示し、尾端を拇指と示指で持つて3～4秒つるしあげて後、2～3回転く尾をひねつてマウスの体を右廻り、左廻りと廻転させた後、実験台の上におくと、頸部を背部に少しく引きつけながら、頭を左右に交互に数回振り動かす。発症後2～3日を経て昂奮状態を示し、尾を立てたり、はねまわつたりする。このような昂奮状態は1～4日間続いた後、後肢ごとに足に不全麻痺が現れ、半日から1日を経て前肢に麻痺が現れ、ついで全身性の運動麻痺が来り全く腹這ひになって死亡し

ÖKUBO Tsuru: Studies on *Streptobacillus moniliformis* Encephalitis. III. Encephalitis caused by purely isolated *Streptobacillus moniliformis* in mice. The Kitasato Institute for Infectious Disease. — Jap. J. of Bact., 11(11), 961-964, 1956.

第1図 Streptobacillus moniliformis

小関株 1 mg/cc, 0.02 cc

マウス脳内接種

たものがあつた。これらの接種マウスの中、5匹は致死するまで観察したが、他の6匹は接種後5～9日、発症後4日に殺した。接種後5日に発症したもの (No. 2) を殺して脳をとり、脳乳剤を以て次代マウス3匹の脳内に継代した。

3匹中2匹は接種後2日に丸背、立毛を示し、その中1匹はその症状は著明となつたが、翌々日に至り症状は軽くなつたので、接種後4日に殺して脳を血清寒天に培養して St. m. を分離した。接種後2日に発症した他のマウスは翌日に丸背、立毛が著しくなつたが、翌々日から症状は軽くなつた。ところが、接種後17日になつて足部が腫脹し来り、かつ後肢に不全麻痺が現れた。この麻痺は進行せず接種22日迄生きていたので、殺して脳・肝から St. m. を分離し得た。3匹中1匹は、接種後25日まで外観上異常を認めなかつた。

St. m. 菌液の脳内接種をうけた1匹 (No. 8) は、接種後5日に丸背、立毛と頭部振せんを示した。翌日殺して剖見するに、脳は浮腫性に著しく腫脹し、肝また腫脹し、腎は濁濁腫脹していた。脳から St. m. を再分離した。諸臓器の病理組織学的変化については、脳は定型の St. m. 脳炎の所見を示し、海馬角附近に壊死果を検出し、腎には腎主部に上皮細胞の濁濁腫脹を示し、肝・脾・淋巴腺の細網系細胞は活性化していた。このマウスの脳の半分を以て次代マウス4匹に継代した。

その中3匹は、接種後5日に発症し、中2匹は翌日完

全麻痺で這ひ廻つていた。殺して剖見するに、脳は浮腫顯著で腎・肝の濁濁腫脹も著しかつた。他の1匹は全く異常を認めなかつたが、脳・肝から St. m. を分離出来た。

濾過試験: No. 8 マウスの脳半分から、卵黄緩衝液を以て20%乳剤を作り、3500 r. p. m. で10分間遠心沈澱した上清を Chamberland L₂ を以て濾過した濾液を4匹のマウス脳内に0.02cc宛を注射し、対照として上清液を用いた。濾過液を注射したマウス4匹は、注射後10日まで異常を認めなかつたが、殺して脳からスタンプ標本を作つて鏡検して、小球状の St. m. を検出し、脳から St. m. を再分離出来た。

2匹の脳混合乳剤を次代マウス2匹の脳内に注射したが、中1匹は注射後7日に定型的に発症し、脳・心・肝・脾から St. m. を再分離し、脳のスタンプ標本で定型的な St. m. を検出した。

濾液を注射した1代マウスの1匹は、注射後15日まで異常を認めなかつたが、15日に殺して脳標本で St. m. を鏡検出来た。対照である感染マウス脳乳剤の遠心上清脳内接種マウス4匹中、3匹は、7, 8, 12日発症し、他の1匹は発症を示さなかつた。発症した1匹から次代2匹に移殖したが、接種後4日で2匹とも定型的に発症した。

(2) 笠原株

血清寒天8代の笠原株の菌液をマウス3匹の脳内に接種した。3匹中2匹は接種後異常を認めなかつたが、1匹は接種後2日に発症した。その翌日殺して脳スタンプ標本で St. m. を検出した。その脳を以て次代マウスに移殖した5匹中、1匹は8日に、2匹11日、他の1匹は9日に発症を認めたが、残りの1匹は28日間異常を認めなかつた。接種9日に発症したマウスを殺し、脳を以て次代マウス3匹に継代を試みた。

3匹中1匹は接種後翌日に既に発症し、脳は浮腫性に腫脹して居た。他の2匹は接種後8日に発症したので直ちに殺した。剖見するに脳・腎の腫脹著しく、脳・肝・腎から St. m. を再分離した。

(3) 他の実験例

小関株を以てのマウス脳内接種試験は、更に2例あるが、実験結果は大同小異であるから記載は省略する。

B 脳内以外の接種部位によつて脳炎は起きるか。St. m. はマウス腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内接種によつて十分に感染発症するが、脳炎症状を招来することは稀である。皮下接種では脳炎症状は起きなかつた。

脳炎症状を感染標識とするならば、脳内接種によらな

ければならない。

腹腔内累代接種するときには、時に腹腔内に稍々粘稠性をおびる腹腔内浸出液或は腹水を認めることがある。その浸出液はいくらか濁っていたり稍々黄赤調をおびることがある。

この点ウイルスやリケッチア性腹膜炎の所見と区別出来る。この場合腹膜から塗抹標本を作つて、メタノール固定、ギームザ染色を施して鏡検すると、糸状の *St. m.* 或は淋巴球核のように見える *St. m.* の糸毬状菌塊が検出される。

C *St. m.* 接種脳炎の症状の総括

脳内接種後、3～9日に立毛、丸背などを示して発症して来るが、早い時には接種後80時間後、遅い時には3～4週後に発症を示すこともあり、全く症状を示さず月余の間生き残るものも時にはある。また一見発症しても、その症状が進展せず1週間も同じ程度に止まり、やがて恢復してしまうこともある。

これらのことはウイルス性腹膜炎とは明に異なる。

症状は、丸背、立毛、“よちよち歩き”のほか、振せん、立尾、強直性痙攣、四肢の不全麻痺、完全麻痺などを示す。即ち、脳炎・髄膜炎症状である。下痢、血便、血尿をもらすこともあり、結膜炎を起して眼瞼の膠着することもある。

D *St. m.* 接種脳炎の解剖及び病理組織学的変化

剖検するに、脳の浮腫性腫脹は顕著であつて、時々頭蓋を開くと漿液性又は稍々出血性の液が流出することがある。脳については、腎の濁濁腫脹が著しい。肝・脾・淋巴腺の腫脹は著しくはない。少くとも特徴的であるとは言えない。

病理組織学的には、脳における海馬角附近における壊死果が特異的である。附近の神経細胞は変性、消失し一見明晶化せる部位が見える。この部には好中球の浸潤は殆んどなく、一見淋巴球に見えるものがかなり多数に散在している。これは細胞ではなく糸毬状にまつわりついた *St. m.* である。この壊死附近に血管周囲細胞浸潤や、Virchow-Rovin 腔の拡張が見られ、軟脳膜に単核細胞の増生が見られる。

腎臓においても主部上皮細胞の濁濁腫脹があり、肝・脾・淋巴腺の細胞系細胞の活性化がある。心臓には間質性心筋炎の像を認めることがある。

3 マウスにおける *Streptobacillus moniliformis* 感染の簡易なる証明法。

これには *St. m.* を分離培養すれば確実である。それには脳の小片（脳底部）を血清寒天、血液寒天、Löffler

培地、卵黄寒天に移殖し、37℃に3日以上培養すれば、*St. m.* の小集落を認める。血清ブイヨンに脳小片を投じて2日間以上培養すれば、培地は濁濁することなく管壁又は管底に、恰も窓ガラスに吹きつけられた雪のようにこの菌塊が現れて来る。これらの培養所見は、*St. m.* に特異的と言える。菌集落から塗抹標本を作つてメタノール固定、ギームザ染色を施すか、熱固定後 Pfeiffer 液で染色すれば、定型的な *St. m.* を検出出来る。しかし、培養のために、2, 3, 4日が必要であるから、急速の診断には手ぬるい。それには、海馬角附近の脳小片をとり、スタンプ標本を作り、メタノール固定、ギームザ染色或は加熱固定後 Pfeiffer 液で染色して鏡検すればよい。一見淋巴球と見える塩基性色素に濃染する小体が数多く見られると共に、恰も神経繊維に見える糸又は網状のものが全視野を越えて検出される。前者は *St. m.* が糸毬状に互にまつわりついたものである。淋巴球とは細胞質のないことと、核と見える濃染部にかすかながら間隙が見えることによつて区別出来る。後者と神経繊維との区別は、標本のバックとの間に必ず狭い間隙のあるのが *St. m.* であり、又結節状の膨隆部のあるのは *St. m.* である。

考察及び全編の総括

マウス脳内接種法は、各種ウイルスの分離・継代保存に賞用されている。それは、

- 1) マウス脳が各種ウイルスの生体培地として役立つこと。
- 2) マウスが脳炎・髄膜炎症状を呈する故に、感染標識が明確であること。
- 3) 脳内接種は手技が容易であること。
- 4) マウスは実験動物として安価であること。

であると考えられる。かくして、本邦においては、マウス脳内接種により、多くの病原ウイルスが分離されて報告されているが、その中のいくつかはマウスからの迷入ウイルスが所期のウイルスと誤認されているであろうことの論議もある。

私は泉熱或は恙虫病リケッチア分離試験中に、一見ウイルスと思われる8株の病原因子を分離したが、これが *Streptobacillus moniliformis* であることを明にした。更に非接種マウスでありながら多少の症状を呈したマウス、或は外観は全く異常のなかつたマウスに誘発処置を行つて *St. m.* 5株を分離した。

かくして、私の分離した *St. m.* はマウス由来であることを推定し、更に純培養 *St. m.* をマウスに接種して脳炎を再現した。

St. m. 脳内接種マウスがウイルス感染と誤認される理由は、先ず

1) 症状は脳炎・髄膜炎症状であつて、ウイルス性脳炎・髄膜炎と区別し難い。

2) この菌は濾過性である。

3) 分離培養が困難であり、3日以上培養しなければ集落として認めがたい。

4) 菌の形態が非常に多型性であり、この菌を知らなければ鏡下に見えて居ても見逃してしまう。

5) 病理組織学的には一見非膿性髄膜炎或は脱髄性脳炎であつて、この St. m. 脳炎像を知らなければ、ウイルス性脳炎と見誤れる危険があるからである。

笠原博士は既に昭和17年(1942)に本邦のマウスの間に St. m. の感染あることを経験し、ついで私と共にマウス脳内累代接種法によつて病毒を分離するとき、St. m. が迷入し、これを所期の病毒と誤認してはならないと警告したが、マウス脳内接種で分離された病毒については、一応 St. m. でないことを確認する必要があると思われる。

結 語

1) 本邦のマウスには *Streptobacillus moniliformis* の自然感染がある。

2) マウス脳内累代接種によつてウイルスを分離又は保有する場合には *Streptobacillus moniliformis* の迷入を警戒しなければならない。

3) マウス St. m. 脳炎の症状、病理解剖所見、組織変化について述べた。

4) マウス St. m. 感染の簡易な証明法を述べた。

稿を終るに臨み、御指導並びに御校閲を賜つた恩師笠原部長に深甚なる謝意を表す。

文 献

- 1) Parker, F., Jr. and Hudson, N. P.: Am. J. Path., 2, 257-379, 1926.
- 2) Strangways, W. I.: J. Path. and Bact., 37, 45-51, 1933.
- 3) Klieneberger, E.: J. Path. and Bact., 40, 93-105, 1935.
- 4) Sabin, A. B.: J. Bact., 40, 823-856, 1940.
- 5) Sabin, A. B.: Bact. Rev., 5, 1-56, 1941.
- 6) Bergey's manual of Determinat. Bact., 6th Ed., 588, 1948.
- 7) Larson, C. L.: Pub. Health Rep., 56, 1961-1969, 1941.
- 8) Jellison, W. L.: Pub. Health Rep., 64, 1661-1665, 1949.
- 9) 本間遜: 医学のあゆみ, 14, 95, 1952.
- 10) 笠原四郎, 石田国男, 吉岡勇雄, 牧野慧, 有馬速水, 大久保つる: 日本細菌学雑誌, 7, 408, 1952 (10月特別号).
- 11) 笠原四郎, 大久保つる, 日本細菌学雑誌, 10, 973, 1955.
- 12) Burrows, W.: Textb. of Microbiol., 16th Ed., 578-579, 1954.