実験小動物より分離せる *Corynebacterium* *Pseudopyogenes* について

佐藤 卯三郎 藤 江 昇 小 池 和 明

成 田 亮 一 阿 部 尙 人

農林省畜産局薬事課分室 (指導 杉村克治博士)

緒 言

Corynebacterium pyogenes は主として偶蹄獣における種々な臓器に化膿性の炎症を惹起する病原菌として、多数の報告がある¹⁻¹⁶⁾。小動物の本菌による疾患についての報告は少いが、Souckin¹⁷⁾ は家兎の傳染性子宮炎より分離している。越智等¹⁸⁾ は牛及びモルモットの健康口腔粘膜について精細な試験を行つた結果、*C. pyogenes* は牛及びモルモット或はその他の動物に常在性のものであろう事を指摘すると共に、本菌に極めて近縁な *C. pseudopyogenes*¹⁹⁾ の存在について報告している。然しながら *C. pseudopyogenes* は病原性なく、従つて病原的意義はないものとされており、病竈より分離された報告はない。

私たちは動物用生物学的製剤の検定用として健康観察期間中のもの、安全及び力價試験実施中における実験小動物(主としてマウス)の他病死の原因菌として、豚より分離した *C. pseudopyogenes* (未発表) と極めて近似の *Corynebacterium* を分離し、本疾患は越智の分類²⁰⁾ による *C. pseudopyogenes* による疾患であることを知つたのでその大要を報告する。

II 発生及び分離状況

1951年6月より1952年3月に至る約1カ年間の調査成績では、年間を通じ本疾患の散発的発生を見たが、特に春秋の季節に多発して恰も流行性の如く観察せられた。購入系路別の調査では購入系路中特に一系路のものが多発を示した。

実験方法は健康観察中のマウス群より、元氣喪失、被毛逆立、瘦削、萎縮、流涙、下痢等の徴候を現わした非健康マウスを選別剖検し、原則としてその心血及び各臓器を普通寒天に塗抹培養し、24時間及び48時間後発育集落について検索を行つた。その結果これらのマウスより約20%に本菌が分離せられ、特に肺臓より高率に分離された。

安全及び力價試験実施中(主として狂犬病及び流行性

脳炎予防液の検定)に斃死したものについては、その斃死原因を確かめるため詳細な剖検所見を観察すると共に、原則として心血及び各臓器を普通寒天、血液或は血清加寒天に培養し、又必要に應じSS寒天或は嫌気性培養を行い前者同様検索を行つた。その結果本菌の分離には季節的差異が認められたが、マウスにおいては他病死中の30%に本菌が分離せられ、そのほとんどが敗血症死であつた。尚モルモット及び家兎より分離したものは、斃死動物の主として肺炎部より分離したものである。

III 培養形態及び生物学的性状

1. 培養: 本菌は普通寒天培地に比較的良好に発育し、24時間培養で直径0.2~0.5mmの露滴状透明或は半透明で円形隆起し、一種の光輝を有する稍々乾燥性の集落で、一見連鎖菌様の集落を呈し、軽度の螢光性を有するが粘稠性はない。然しながら中には発育不良で痕跡的の発育を呈するものがあつた。血清加、血液寒天及びLoeffler培地の発育は良好で、ブイヨン培養では一般に中等度の平等濁濁を呈し、中には微細雲絮状或は顆粒状の平等発育をなすものがあるが菌膜の形成はない。

2. 形態及び一般性状 一般性状はマウス系24株、モルモット系5株、家兎系1株計30株について試験を行つた。本菌はグラム陽性で運動性なく、その形態は一般に短小桿菌(所謂球桿菌)を呈するものが多いが、球菌状、糸状、棍棒状、分岐状等極めて多形性を示す。ブイヨン培養では普通寒天で球菌状を呈するものは、2~3個の短連鎖を呈するものがある。Loeffler培地の発育は良好で孤立或は松葉状に並列するが、Neisser染色法によ

SATO, Usaburo, FUJIE, Noboru, KOIKE, Kazuaki, NARITA, Ryoichi & ABE, Naoto: Studies on the *Corynebacterium pseudopyogenes* isolated from Smolt-test Animals. Pharmaceutical Section, Live stock Bureau, Ministry of Agriculture and Forestry. — Jap. J. of Bact., 8(2): 221-224, 1951.

る Metachromatic granules を認めるものは比較的少い(陽性8株)。普通寒天分離初代の抵抗性は弱く、10日以内で死滅するものが多く、血清加寒天の室温(20°~22°C)放置では約1ヵ月生存する。又耐熱性については60°C 5分の加熱で総て死滅した。馬、牛、豚、綿羊血液に対する溶血性なく、Gelatin, Loeffler 培地及び馬凝固血清における蛋白質分解作用は陰性で培養1ヵ月に至つても液化しない。北里・Salkowski 法による Indol 反應(照内ペプトン7日培養)は陰性。ブイヨン培養(鉛糖紙法)で H₂S を微に產生する(陽性18株)。油酸ソーダ寒天(Bücker u. Manfred 法)に発育せず。テル、酸加里の還元性は Clauberg 培地では発育微弱で陰性、越智法では、陽性を示し。葡萄糖及び半固形高層穿刺培養の発育状態は通性嫌気性の状態を示し上層より下層迄一様に発育し、Litmus 牛乳は2~4日で赤変し管底部より次第に脱色するものがあり、凝固するものは少い。Litmus 乳清は1~3日で赤変しその後変化なく、カタラーゼ反應(スライドガラス法)は陰性。MR 反應はほとんど陰性(陽性6株)。V.P.K 反應は陰性、メチレン青の還元性弱く、澱粉の加水分解能陰性、エスクリン分解能は陰性(14株)及び陽性(16株)を認めた。

3. 炭水化物分解: 基礎培地として Hiss 培地(馬血清1分に水3分、標示薬 B. T. B.) に各種炭水化物を1%に加減菌したものに分離菌を培養し21日間観察した。試験に供した炭水化物は18種でその内 Glucose,

Lactose, Sacharose, Levulose, Mannose, Xylose, Arabinose, Maltose, Trehalose, Raffinose, Mannitol, Dextrine, Sorbitol, Salicin, Adonitol の15種類を分解するが瓦斯を產生せず、Inositol は分解(21株)或は非分解(9株)で、Inulin は非分解(19株)或は分解(11株)し、Dulcitol は非分解である。

IV. 病原性

本菌の非汚染地区より購入した体重12~13gのマウスの腹腔内にブイヨン18時間培養を0.2及び0.1ccの接種によつて概ね2~5日の間に敗血症死を来すものが多く、本菌の毒力は一様に弱い中には病原性のほとんどないもの或は 10⁻⁴ 程度の毒力を有するものがあつた。生残したものは外観上健康に見えるが3週間後に殺したものの剖検、培養によつて肺の病変及び接種菌が一部の臓器より証明せられた。同居感染は自然感染及び経鼻感染群中に同居せしめ感染の有無を1ヵ月間観察したが陰性で、餌食試験(1mg 餌剤)は感染不確定で下痢等を認めず、一部感染斃死したものも剖検上より呼吸器系感染によつたものと考えられた。次に経鼻感染は比較的容易で臨床及び剖検上自然感染と同様の所見が認められた。即ちブイヨン18時間培養を体重12~13gの半麻酔マウスに1/2注射針の1滴宛(約0.02cc)経鼻感染せしめたところ4~10日の間に定型的な症状を以て感染斃死するものが多かつた。又生残したのも被毛逆立、流涎、瘦削、萎縮し3週間後の剖検によつて肺臓の大葉性の硬

第1表 分離菌の一般性状

菌形	グラム染色	運動性	Loeffler 培地配列	顆粒	溶血性	蛋白質分解性 ゼラチン・凝固血清	インドール	H ₂ S	油酸ソーダ	テ加里還元	牛乳凝固	乳清マス	M・R	V・P・K
多形性	+	-	孤樹立状松葉	-	-	-	-	(+)	-	+	(+)	赤	(+)	-

第2表 分離菌の含水炭素分解

グルコース	ラクトローゼ	サツカロース	レブローゼ	マンノース	キシロース	アラビノース	マルトース	トレハロース	ラフィノース	マンニツト	デキストリン	ソルビツト	サリシン	アドニツト	イノジツト	イヌリ	ヅルチツト
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	-

変, 心囊炎及び胸腔液の滲留等が見られ又稀に肝臓及び腎臓等に帽針頭大の灰白色の結節を形成し, 培養によつて各臓器或は一部の臓器より菌が証明せられ保菌の状態を呈することを認めた。

V. 剖検及び組織学的所見

本病罹患マウスの病変は一般に肺臓が最も著明で、次いで腎臓, 心臓, 肝臓, 脾臓の順に変化が認められた。即ち健康観察群中より選別した罹患マウスでは肺臓の大葉性の充血水腫或は硬変。脾臓及び腎臓の充血腫大。心筋の濁濁等が認められた。安全及び力價試験実施中本疾患により斃死したマウスは, 全般的に病変が著明で特に肺臓は大葉性の暗赤色或は帶黄褐色の硬変を呈するもの, 肺肋膜が肥厚しその面は粗糙で胸壁に癒着する症例を屢々観察した。又心囊は肥厚充血し肺と癒着し, 胸腔内には黄褐色濁濁胸水の滲留等が見られた。腎臓は充血腫大し少数例に稀薄な紅暈及び灰白壊死点を認め, 肝臓は褪色し濁濁が著しく稀に表面に灰白色斑紋狀の仮性結核様結節の形成が認められた。

次にマウス自然感染材料7例について組織学的に検査した成績を経過的に述べれば, 肺臓では肺胞間及び中, 小動脈が拡張し充, 鬱血が顯著で散発性に肺胞内の酸性滲出物を認める所謂肺水腫, 或は肺胞間の充盈が著しく中, 小気管枝上皮細胞の剝脱及び気管枝周囲固有層が肥厚し, 周囲の肺胞内に弱酸性の滲出物が見られ, 肺胞上皮細胞の核の破片及び淋巴球單核球等の浸潤する所謂カタル性肺炎の症例が最も多く観察された。次で気管枝梢内は中性好性顆粒球で全く充塞され, 気管枝周囲固有層, 動脈及び気管枝周囲の肺胞内等に核の破片及び中性好性顆粒球が強度に浸潤する所謂化膿性気管枝肺炎も比較的多く認められ, 又肺肋膜に線維素の滲出を来して肥厚し, 限局性に線維素の纏絡による菌集落を認め, 集落の周囲は多数の中性好性顆粒球が圍繞し所謂線維素性化膿性肋膜炎の病例も屢々認められた。腎臓では曲細尿管間質部の充盈が著明で一部限局性に小出血竈が見られ, 尿管は濁濁退行性病変を呈し所謂ネフローゼを来し, 集合管部は走行性に充血が強度で集合小管及び腎盂部に限局性に菌の集落が散在し, 周囲に中性好性顆粒球の集簇する小膿瘍を散見した。心臓では外膜下及び尖部に出血を認め一般に筋間隙は疎開し限局性に筋線維間に菌の集落があり, 周囲は筋線維の退行性変化及び中性好性顆粒球の浸潤する小膿瘍が見られた。脾臓は白髓の増殖腫脹を来し, 充盈が著しく, 肝臓では中心静脈, 間質静脈等の鬱血が強く肝細胞の濁濁腫脹が全例に認められ, 稀にグリソン氏鞘の動脈周囲に單核球, 淋巴球の浸

潤を来し, 又小化膿竈を認めたものもあつた。

VI. 血清学的性状

本菌の血清学的異同を知るために家兔免疫血清について常法により凝集反應を行つたがマウス, モルモット, 家兔より分離したものととの間に血清学的の特異性なく, いずれも菌株特異性が強く血清学的に極めて多型であつた。

VII 考 察

動物用生物学的製剤の検定実施中屢々実験小動物の他病死に遭遇し, その原因を確かめたところ *C. pseudopyogenes* による疾患が存在することを知つた。本菌は普通寒天の発育, Litmus 乳清の変化, 炭水化物分解能に多少の差異を認めるが越智の分類による *C. pseudopyogenes* I 型に属するものと考ええる。*C. pseudopyogenes* は各種動物の口腔粘膜に常在性で従来病原的意義はないものとされていた。今回の発生病況は散発的であつたが或時期に多発して恰も流行性の如く観察せられ, 分離した本菌の病原性も又弱いが経鼻感染は容易で自然感染と同様な症状及び経過を以て感染することが出来た。そしてその剖検上本疾患に特徴的な肺臓の肝変様硬変等の所見が認められた。本菌に近似するものとして Klein²⁾ は *Corynebacterium* に属する *Bacterium muris* を報告しており, 当時 *Corynebacterium* の命名は分離動物の種類及び病型によつていたのでその名称は交錯重複しているが *Bacterium muris* はマウスの肝変様肺炎の病原菌として報告している点, 本菌との関係上興味深い。

前記生物学的製剤の安全及び力價試験には肉眼的観察上全く健康と認めたもののみを使用したのであるが, その中に既に保菌状態のものがあつて, 予防液等の接種によつて動物個体の全身的な抵抗力の減退等によつて本菌が病原性を發揮し, 肺炎等を惹起してついに特発性の敗血症を發したものと考えられる。

以上の如く本疾患は所謂 *Gelegenheitserkrankung* 或は越智の所謂自発性傳染病に属するものと考えられ, 健康観察中において既に相当罹病保菌していること及び購入系路により發生率に差があることより, 本疾患發生の原因は試験実施中の飼育管理失敗によるものでなく, 寧ろ納入前の飼育業者の管理にその根源があるものと考ええる。尙お本試験実施中 *Pasteurella* D 型菌 (所謂 *Shigella* 菌) 等を分離しているがこれらについては別に報告したい。

VIII 結 言

1. 私たちは動物用生物学的製剤の検定実施中におけ

る実験小動物の他病死の原因菌として *Corynebacterium pseudopyogenes* を分離した。

2. 本菌の病原性は一般に弱いが、経鼻感染は比較的容易に感染し、自然感染と同様な症状及び剖検変状が認められた。

3. 本疾患は剖検上肺臓の硬変が特徴的で組織学的には肺臓のカタル性化膿性の肺炎或は肋膜肺炎、腎臓においてはネフローゼ及び小化膿竈が認められた。

稿を終るに臨み畜産局薬事課長星修三博士に敬意を表し、御校閲を賜った東京大学農学部越智勇一教授に謝意を表します。

文 献

- 1) Grips: Zeitschr. f. Fleisch. Milchhyg., 8, 166, 1898.
- 2) Glage, F.: Zeitschr. f. Fleisch. Milchhyg., 13, 166, 1903.
- 3) Kunneman, D.: Arch. f. Prakt. Tier., 2110, 128, 1903.
- 4) Grips, Glage & Nieberle.: F. d. vhyg., 2, 5, 1904.
- 5) Ward, A. R.: J. Bact., 2, 619, 1917.
- 6) Brown & Orcutt.: J. Exp. Med., 32, 219,

1920.

- 7) Magnusson, H.: Arch. f. Wiss. prakt. Tier., 50, 22, 1923.
- 8) 江本, 新美: 日本獣医学雑誌, 3, 321, 1924.
- 9) Jewett & Walter.: J. Comp. Path. Ther., 38, 180, 1925.
- 10) Rolle, M.: D. T. W., 36, 585, 1928.
- 11) Murray, Biester, H. E. et al.: J. A. V. M. A., 72, 1003, 1928.
- 12) Merchant, I. A.: J. Bact., 30, 95, 1935.
- 13) 田島: 日本獣医学雑誌(第5回学会講演要旨) 2, 366, 1940.
- 14) Boyd, W. L. & Kelly, M. D.: J. A. V. M. A., 103, 24, 1943.
- 15) Maxwell, H.: Corn. Vet., 33, 315, 1943.
- 16) Phillips, C. E.: Canad. J. Comp. Med., 10, 33, 1946.
- 17) Souckin: Vet. Bull., 5, 542, 1935.
- 18) 越智, 財前: 日本獣医学雑誌, 15, 30, 1936.
- 19) 越智, 財前: 日本獣医学雑誌, 16, 17, 1936.
- 20) 越智, 財前: 日本獣医学雑誌, 2, 155, 1940.
- 21) Klein, E.: Cent. f. Bakt., 1. Abt, Orig, 33, 488, 1902.
- 22) Holzhausen, G. G.: Cent. f. Bakt. 105, 94, 1927.

Fig. 1 普通寒天集落

Fig. 2 血清加寒天培養菌（球形菌）

Fig. 3 Loeffler 培地培養菌．（柵状，松葉状，分岐状等存在）

Fig. 4 化膿性肺炎（マウス自然感染材料，弱拡大）

肺肋膜面に多数の中性好性顆粒球の浸潤が認められ中心部に菌塊を認める。

Fig. 5 化膿性気管枝炎（マウス自然感染材料，弱拡大）

気管枝内腔は壁上皮の剥離細胞及び中性好性顆粒球等により充塞され気管枝周囲は多数の中性好性顆粒球等による化膿性気管枝周囲炎が認められる。

Fig. 6 腎臓集合小管部の化膿性（マウス自然感染材料，弱拡大）

集合小管の一部に菌の充塞が見られその周囲に中性好性顆粒球が浸潤する所謂化膿部が認められる。