

Cryptococcus 症の研究

第 I 編

Cryptococcus neoformans の岡山地方における分布状況

岡山大学医学部第 1 内科教室 (指導: 小坂淳夫教授)

岡山済生会総合病院内科 (院長: 大和人士博士)

湯 原 淳 良

〔昭和 41 年 3 月 30 日受稿〕

緒 言

Cryptococcus neoformans の発見は、1894 年に Sanfelice, F.¹⁾ が醸酵果実中より分芽菌を分離し、*Saccharomyces neoformans* と命名したのにはじまっている。これとほぼ時を同じくして 1894 年には Busse, O.²⁾ が、1895 年には Buschke, A.³⁾ がそれぞれ人体感染例について報告している。そして Busse はこの分芽菌に対して *Saccharomyces* と命名し本症を *Saccharomycosis hominis* と呼んでいる。本邦における本菌の分離は、1912 年に渡辺⁴⁾ が本菌による髄膜炎例を記載したのがはじまりである。その後諸外国でも次々と本症の報告が行われ、Littman, M. L.⁵⁾ の monograph によると 1955 年迄に 300 例以上が報告されている。本邦に於ても 1925 年に五斗⁶⁾ が報告して以来久しくとだえていたが、1943 年頃からの文献を探してみると、酵母菌症と云う呼び方で中枢神経系のみならず各種部位の感染例が散見される。1943 年に松田⁷⁾ は *Cryptococcus* と云う呼び名を用いて報告している。1956 年に北本⁸⁾、1956 年に福島⁹⁾、1957 年に金子¹⁰⁾、1958 年に山川¹¹⁾ など、この頃から急激に本症の報告例が増して来た。現在迄に発見された本症の数¹²⁾ は、本邦においても 100 を越えるのではないかと推定される。これらの事実は、真菌症自体の増加と云うより、近年真菌症全体にむけられている関心のたかまりを裏書きしているのではないかと考えられる。

われわれの居住している岡山地方に於ても上へのべた傾向は例外ではなく、1959 年に小川¹³⁾、1960 年に大和¹⁴⁾ の報告にみられる他、毎年 2~3 例が発見されている。現在迄に判明している症例のみですですに 15 例に達し、この中 6 例は自験例である。

6 例の自験例のうち、生前診断をうけたものは 4 例であり、このうち 2 例はすでに死亡しており、生

存中の 2 人のうち 1 人は、目下治療を継続中である。本症の治療には Amphotericin B が最も推奨されているが、本症の予後は極めて悪く、本剤をもつても完全に治癒せしむることは不可能に近い。

ところで本症の疫学については明らかでないことが多く、個々の症例についてもその発症要因をみつけることは全くと云つてよいくらいなされていない。そこで先ず本菌の分布を明らかにすることにより、その予防上の第一要因を明らかにしようとして企てた。

実験 1 鳥類排泄物からの菌の分離

実験材料及び実験方法

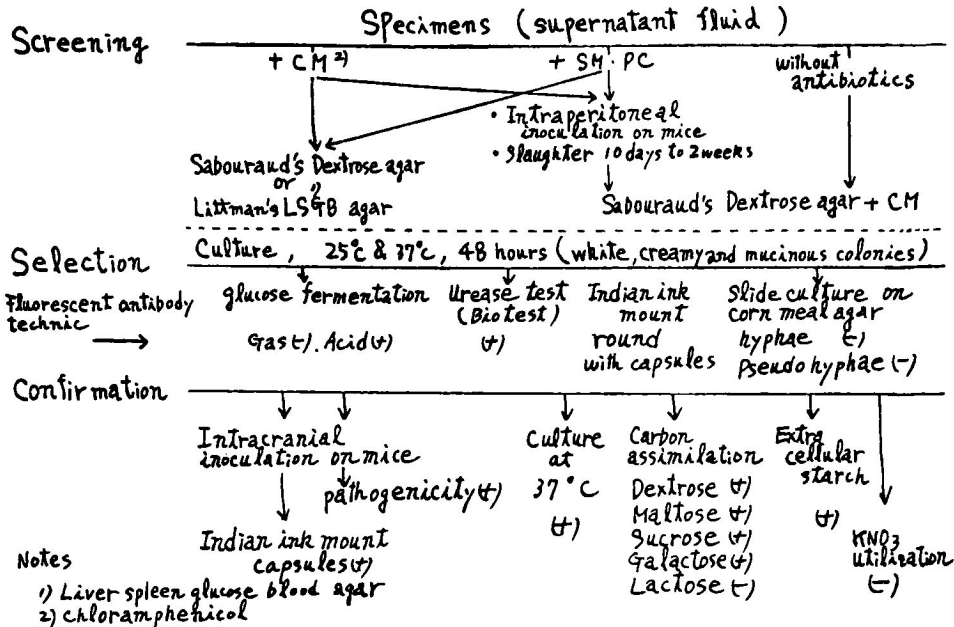
岡山地方の分散した地区より、無作為的に 66ヶ所を選び、91 サンプルを集めた。時期は 1960 年から 1964 年迄の 5 年間で、5 月から 10 月迄に採取・培養を行った。サンプルは鳥類の排泄物を用い、鳥類の種類は、飼鳩 61、鶏 25、メジロ 3、つばめ 2 の割合であつた。いずれの場合も巣の中にちらばつている乾燥した排泄物を用いた。

採取法：無菌処理をした大きさ 15×10cm² のビニール袋を用意して採取地におもむき、排泄物を入れたあと、ゴムバンドで袋の口を密封し、研究室へもちかえり、無菌操作によつて滅菌試験管に入れて実験に供した。

懸濁液の作製：排泄物の 1 つまみを直径 2.5cm×長さ 15cm の試験管に入れ、滅菌生理的食塩水を約 4 倍量になるように加えた。あらかじめ滅菌したゴムキャップをしめて、約 10 分間放置後、排泄物が充分湿軟した頃に約 5 分位強く振盪し、更に 10 分間静置後白濁した上清をピペットでとり以後の検査のため別の滅菌試験管へ移した。

雑菌の防止：鳥類排泄物中の雑菌の発育を防止する目的で抗生物質を使用した。方法は

Fig. 1 Method of Isolation of *Cryptococcus neoformans*



A : 上清 1cc について Penicillin 1 万単位 Streptomycin 2 mg を加えておく。

B : 上清 1cc について Chloramphenicol 0.7mg を加えておく。

C : Sabouraud 氏 Dextrose Agar 1 平板について, Chloramphenicol 1mg を加えておく。

のいずれかにした。

分離培養法 (Screening) : 以下の方法のいずれかでを行った。

a : A 処理又は B 処理の上清をマウスの腹腔内に 0.5~1cc 宛接種して 10 日から 2 週後に肺, 肝, 腎, 脾をとりホモジェナイズして C 処理培地に培養した。

b : A 処理又は B 処理の上清を Sabouraud 氏 Dextrose Agar 平板に直接塗抹した。

c : A 処理又は B 処理した上清を, Littman 氏 Liver Spleen Glucose Blood Agar に塗抹した。

d : 上清をすぐ C 培地に塗抹した。

次に, 24 時間~48 時間培養後, 糸状菌と混じて生じた集落より白色クリーム様のもを選択し培養を行った。

選別 (Selection) : 疑しい集落はすべて釣菌され, 糖醱酵試験, slide 培養, urease 試験, 墨汁染色に供された。

確認 (Confirmation) : 図 1 の如く行った, 即ち,

1) : マウスの脳内接種で病原性を観察 (脳水腫を起して死亡する), カプセルを証明すること。

2) : 糖同化培地で Dextrose, Maltose, Sucrose, Galactose は利用するが, Lactose を利用しない。

3) : KNO₃ を利用しない。

4) : 細胞外でんぷん形成能がある。

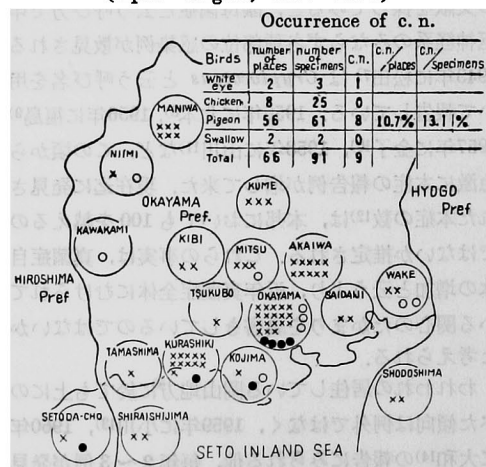
5) : 37°C で培養可能。

以上 5 つの条件をすべて満足した場合, *Cryptococcus neoformans* と確認した。

成績

図 2 の如くメジロの糞より 1 株, 飼鳩の糞より 8 株の *Cryptococcus neoformans* を検出した。又飼

Fig. 2. Distribution of *Cryptococcus neoformans* (April~August, 1960~1964)



Notes c. n. : *Cryptococcus neoformans*

x : Places where specimens were collected.

● : Places where c. n. was found.

○ : Places where cryptococcal patients appeared.

鳩の糞より *Cryptococcus diffluens* を1株検出した。各鳥類間の検出率は、対象数が異なるので比較はできないが、鶏よりは1株も検出できなかった。飼鳩を対象に行つた採取地に対する検出率では10.7%であつた。サンプルに対しては13.1%であつた。

地域的にみると、瀬戸田町、倉敷、児島、岡山と南部の地域に比較的多く検出されており、北部の地域では検出されなかつた。

患者との関係は、1患者のメジロの糞より *Cryptococcus neoformans* を発見しているのみで、その他各患者の各種鳥類の糞について検出を試みた結果はすべて陰性であつた。

実験2 鳩株と人体株との比較について

実験材料及び実験方法

使用菌株：実験1で得られた鳩株 A₁, C₂, C₉ の3株及び1960年大和⁽⁴⁾の報告になる人体株：倉田株 *Cryptococcus neoformans* につき実験を行つた。

使用動物：市販の健康な雑系マウス（体重 15g）を使用した。

接種方法：脳内（IC）、経鼻（IN）、静脈内（IV）、腹腔内（IP）の各方法で各群5匹あてマウスを使用した。菌は Sabouraud 氏 Dextrose Agar 上 37°C、

48時間培養のものを生理的食塩水に浮遊し、IC、INでは 0.04cc（1mg の菌量）、IV、IP では 0.12cc（1mg の菌量）を接種した。

病原性判定の方法：接種後10日目及び14日目に剖検を行い、脳、肺、肝、腎、脾、等の肉眼的所見、並びに検鏡所見を判定し、病原性の基準とした。病理組織は Carnoi 固定後、Hematoxylin-Eosin 染色並びに PAS 染色を行つて、各臓器ごと2枚の標本を作製した。

成 績

1. 病原性の比較：表1の如く各臓器内に病巣が分布しているのがみられる。組織学的に分布病巣の数と大きさ、嚢胞性病変の出現、肉芽性炎症反応、菌体の量等を併わせ考え病変の程度を次の如く判定し（±）～（≡）の記号で表示した。

- 異常所見のないもの……………（-）
- 炎症性反応病変はないが菌体を認めるもの……………（±）
- 少数の炎症性反応病巣のあるもの……………（+）
- （+）と（≡）の中間的病巣の拡がりを示すもの……………（≡）
- 高度且きわめて多数の炎症性反応病巣のあるもの……………（≡）

Table 1 Pathogenicity to Mice of Pigeon Strains (A₁, C₂ and C₉) and a Human Strain (Kurata)
— Histopathologic Changes —

Strains	Method of inoculation	Brain	Lung	Liver	Kidney	Spleen
A ₁	IC	+	+	±	-	+
	IP	-	±	+	±	+
	IV	+	+	±	-	-
	IN	-	≡	≡	-	-
C ₂	IC	+	±	±	-	-
	IP	-	≡	-	-	-
	IV	-	≡	-	-	-
	IN	-	≡	-	-	-
C ₉	IC	+	-	-	-	+
	IP	-	+	-	-	-
	IV	-	+	+	-	-
	IN	-	+	-	-	-
Kurata	IC	≡	≡	≡	+	+
	IP	+	+	≡	+	+
	IV	≡	≡	≡	≡	+
	IN	-	+	-	-	-

その結果表 1 の如く、倉田株では著しく病巣の拡がりはずよく、鳩株は病原性が低いことを示している。鳩株の間では、C₉にやや軽い病巣があるという程度で本質的な差はみられなかつた。

鏡検所見を更に詳しく観察してみると、組織像では 4 株の間に差がみられず、融解性囊胞状病変と肉芽性病変がいずれの場合にもみられた。組織内での菌の形態は、肺では直径 20 μ 迄の菌体を有するものが多く、それらは厚い莢膜を有するものであつた。しかし肉芽性炎症の組織では菌体も小さく、莢膜も薄く又はみえないものが多かつた。

鳩株について各臓器の病巣をみると、IC では IV と異なり、髄膜炎の型をとるものが多かつた。その殆んどは肉芽性病変が多いが囊胞状病変も時にはみられた。しかし脳実質内では囊胞状病変のみであつた。肺では IV, IN, IC, IP いずれの接種方法によつても病変がみられ組織学的には肉芽性炎症のつよいカタル性肺炎の像をみとめた。弱い病巣ではカタル性肺炎の形をとり、細胞浸潤は強くないが、多数の菌体を肺胞中隔内や肺胞内にみとめ、一部では肺胞の中に菌体が充満しているのもあつた。肝では肉芽炎性の小結節性病巣が主体をなし散在性のみとめられる。脾は脾腫をとめない、囊胞状の病巣をもつものは少く、殆んどがリンパ濾胞の腫大、細網細胞の増殖を呈するものであつた。腎では軽い実質の変性はみとめたが *Cryptococcus neoformans* による明瞭な病巣はみとめなかつた。

2. 諸臓器への蔓延: IC 接種群では A₁ 株や C₂ 株の腎をのぞいてすべての臓器に菌の転移をおこしている、IN 感染では A₁ 株の肝に病変をみとめるが、他は肺に強い病巣を形成しているのみで、肺からその他の臓器への菌転移はみとめられなかつた。IP 接種群では倉田株では脳への転移がみとめられるが、鳩株ではみとめられなかつた。IV 接種群では肺、肝には病変がみとめられるが、脳に菌の転移をおこしたのは A₁ 株のみであつた。

3. 分離菌の性状: やや茶色に染つた白色クリーム状の集落として生じ、これを Lactophenol cotton blue で生染し検鏡してみると、大きさ 6~7 μ の円形の酵母様細胞で莢膜はみとめなかつた。マウスの脳内接種により細胞の直径とほぼ等しい巨大な莢膜の形成をみとめた。この莢膜も、Sabouraud 氏 Dextrose Agar へ移植すると消失しはじめ、2 代、3 代と継代するにつれてますます薄くなり、ついには単なる円形の酵母様細胞のみとなつていのがみとめ

られた。一度 37°C で培養可能であつた菌でも、一旦 25°C で継代培養を続けていると、再び 37°C で培養しても、良好な発育状態に戻る迄に 2~3 代の経過を必要とした。倉田株は、Brain heart infusion glucose blood Agar で厚い莢膜を形成したが、鳩株では同培地での莢膜形成はみられなかつた。かような菌の性質は、検出株のいずれに於ても同様であつた。

総括及び考案

Cryptococcus neoformans の自然界における分布については、1950年に Emmons, C. W.¹⁶⁾ が土よりの分離に成功して以来引続き 1951年に Emmons, C. W.¹⁶⁾ がヴァージニア州の土から、1954年に Emmons, C. W.¹⁷⁾ がメリーランド州の鳩の排泄物から、1955年に Emmons, C. W.¹⁸⁾ がヴァージニア州の鳩の排泄物から、更に 1955年に Menna, M. E.¹⁹⁾ が土から、1957年に Kao, C. J.²⁰⁾ が鳩の排泄物から、1958年に Ajello, L.²¹⁾ が土から 1959年に Littman, M. L.²²⁾ が鳩の排泄物から、1960年に Emmons, C. W.²³⁾ が鳩の排泄物から、夫々主としてアメリカで分離を試み 0.6%~72% の検出率であつたと報告している。特に鳩の排泄物からの検出率は著しく高く、36~72% の高率に見出されている。日本では、山本²⁴⁾によると、1957年に東京での検出率は 80% であつたと云う。外国ことにアメリカでは、野鳩の棲息が多く本邦では稀である。一方伝書鳩はかなり家庭で飼つておりその管理には子供があたつていのが常である。この岡山地方での鳩も大部分は家庭にいる伝書鳩である。著者は人体への感染源としてこの地方では飼鳩に意義があるものと考え殆んどサンプルを飼鳩にもとめた。その検出率は以外に低く、前にあげた諸氏の成績とはかなり食いちがいがみられた。しかし 13.1% の検出率であつたことは、重要な感染源の意味をもつていると考える。飼鳩からの検出率と、土鳩からの検出率との食いちがいは排泄物の古さに関係があろう。鳩の高い体温のために鳩自身の感染症はなく、その腸内からの本菌の培養も不成功に終つていることは、Littman, C. W.⁵⁾ もその著書の中でのべているが、又 Emmons, C. W.²⁵⁾ の云うごとく、鳩の糞の菌は堆積した排泄物に増殖したいわゆる腐生的なものであろうと云うことも、著者の検索成績から推察できる。

他方本邦に於ても養鶏業の企業化が進み、各地に大養鶏場が経営されつつある現況に注目して若干の鶏についても本菌の検出を試みたが、いずれも

菌を検出することができなかつた。この問題は今後の研究に俟たねばならないが、にわりの糞に本菌が検出されることになれば養鶏家の職業病として注目される必要があろう。

著者の検出した A₁, C₂, C₉ の鳩株はいずれも、1) 菌糸を作らず、2) 糖の醗酵を行わず、3) マウスに対する病原性を有し、4) 莢膜を有し、5) 乳糖の利用を行い得ず、6) KNO₃ を利用せず、7) 37°C で発育可能であり、8) 細胞外でんぷん形成能を保有していたから Lodder and Kreger Van Rij, Benham よる *Cryptococcus neoformans* の証徴を完全に満足するものであつた。Littman, M. L.²⁶⁾ は *Cryptococcus neoformans* の分離同定に際して、screening, selection, confirmation の3段階にわけて、selection の段階で urease 試験と slide 培養の併用を推奨しているが、著者は糖の醗酵を併用した。つまりこの段階で gas を発生するものをすべて除外して次の confirmation へ進んだ。日常の同定では、この selection がむつかしいのであるが、特に glucose で gas をみとめるものは除外してもよいのではないかと考えている。

以上の様に同定された3株の菌は、同じく *Cryptococcus neoformans* であつても、倉田株と比べるとマウスに対する病原性かなり差のあることがわかつた。鳩株と人体株について詳細な成績を提供しているものは少なく、わずかに螺良²⁷⁾ が ET₅₀ (Effective Fatality Time 50%, 平均致死日数) によつて計算しているが、それによるとアメリカ由来の人体株と鳥類からの分離株との間にはあまり差がないとしている。

更に接種後の菌の転移の問題について検討すると、人体例では圧倒的に髄膜炎型が多くみとめられている。又 Littman, M. L.²⁶⁾, Emmon, C. W.²⁸⁾ は肺に初感染病巣を作り、それが各種の条件のもとで発病に至ると云う推定を行つているが、著者の実験では鳩株も人体株もいずれをとつてみても、IN 感染例では脳への菌転移がみられなかつた。又 IV 接種ではかなり強い嚢胞状病巣を脳に作つてはいても、髄膜炎型の病巣はごく稀であつた。つまり人体で多いとされている髄膜炎の感染経路については、必ずしも肺から髄膜へと云う方向だけではないかも知れない。この点は今後の問題として充分検討を要すると考える。

次に一般の見解として、培養時 37°C で発育するものを *Cryptococcus neoformans* とし、分離培養時に 37°C に発育しないものは除外される傾向にあるが、著者の検討では、この方法では *Cryptococcus neoformans* を見逃すおそれがある。即ち長く 25°C の状態で継代培養を続けている株を急に 37°C で培養すると、集落を作り難いことをしばしば経験した。長時間培養し、代を重ねてゆくと次第に 37°C の培地上でよく発育するようになってくる事実を知つた。従つて、人体、自然界を問わず本菌は 37°C 以下でも生存が可能であるから、本菌の分離を試みる時は、必ず 25°C と 37°C とで培養を行うべきと考える。

結 論

1. 岡山地方の鳥類とくに飼鳩の排泄物について *Cryptococcus neoformans* の分離を試みた。その結果、飼鳩の排泄物56ヶ所より61サンプルを得、8株の *Cryptococcus neoformans* を検出した。
2. 検出株のうち、A₁株、C₂株、C₉株の3株についてマウスに対する病原性を検討したところ、人体由来の倉田株のそれに比して、かなり弱いことが確かめられた。
3. マウス体内での *Cryptococcus neoformans* は2種の病巣を作つた。即ち融解性嚢胞状病変と肉芽性病変である。
4. 経鼻感染実験によると脳への菌転移が困難であつた。静脈内に接種した場合、脳に生じた病変は脳実質内の嚢胞状病変のみで、髄膜炎型の病変はみられなかつた。
5. *Cryptococcus neoformans* は 37°C で培養可能であつたが、25°C で継代しているものを 37°C で継代しようとしても、1代目では集落を作り難いことをみた。
6. 莢膜は、動物体内では大きく、培地上へ移すと1代で殆んど失われるか、極めて薄くなることがわかつた。

(本論文の要旨は、日本結核病学会中国四国第11回地方会にて発表した。)

(終りに臨み、御指導、御校閲を戴いた岡大小川病理学教室の小川教授並びに堤助教授に深く感謝致します。)

文 献

- 1) Sanfelice, F.: Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti chesi sviluppano nei succhi di alcuni frutti. Ann. d'ig. 4: 463~495, 1894.
- 2) Busse, O.: Ueber parasitäre zelleinschlüsse und ihre Züchtung. Zentralbl. f. Bakt. 16: 175~180, 1894.
- 3) Buschke, A.: Ueber eine durch coccidien hervorgerufene Krankheit des Menschen. Deutsche med. Wechschr. 21: 14, 1895.
- 4) 渡辺信吉: Hebe に起因せる髄膜炎. 福岡医大誌 8: 470, 1915.
- 5) Littman, M. L. and Zimmerman, L. E.: Cryptococcosis. Grune & Stratton, 1956.
- 6) 五斗欽吾: Über Blastomyceten Meningitis. 東京帝国大学医科記要 5: 75, 1916.
- 7) 松田龍一他: 二種の酵母菌を病原菌とし上気道全域を侵襲した酵母菌病症例. 日本耳鼻咽喉科学会会報, 51, 2: 65, 1947.
- 8) 北本治他: クリプトコックス症の1例. 内科 3: 570~575, 1959.
- 9) 美甘義夫, 福島孝吉: 日本に於ける内科的真菌症について. Chemotherapy 6: 127~140, 1958.
- 10) 金子仁郎他: *Cryptococcus neoformans* による Meningoencephalitis の一例. 最新医学 12: 1779~1788, 1956.
- 11) 山川邦夫他: *Cryptococcus* 症の2剖検例. 内科4: 343~351, 1959.
- 12) 美甘義夫, 福島孝吉: クリプトコックス症の症状とその二, 三の問題. 真菌誌 3: 43~49, 1962.
- 13) Ogawa, K. et al: Cryptococcosis—pathological observations of five autopsy cases and one biopsy case. Acta Med. OKAYAMA 13: 319~346, 1959.
- 14) 大和人士他: 肺 *Cryptococcus* 症一分離菌の性状. 真菌誌 1: 61~66, 1960.
- 15) Emmons, C. W.: The natural occurrence in animals and soil of fungi which cause disease in man. Proc. Seventh International Bot. Cong. Stockholm, Sweden, p. 416~420, 1950.
- 16) Emmons, C. W.: Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. J. Bact. 62: 685~690, 1951.
- 17) Emmons, C. W.: The significance of saprophytism in the epidemiology of the mycosis. Trans. New York Acad. Science., Ser. II, 17: 157~166, 1954.
- 18) Emmons, C. W.: Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon. Amer. J. Hyg. 62: 227~232, 1955.
- 19) Menna, M. E.: A search for pathogenic species of yeasts in New Zealand soils. J. gen. Microbiology 12: 54~62, 1955.
- 20) Kao, C. J. and Schwarz, J.: The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon nests, Am. J. clin. path. 27: 652~663, 1957.
- 21) Ajello, L.: Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soil, Amer. J. Hyg. 67: 72~77, 1958.
- 22) Littman, M. L. and Schneierson, S. S.: *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta in New York City. Amer. J. Hyg. 69: 49~59, 1959.
- 23) Emmons, C. W.: Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. Publ. Health Rep., Wash. 75: 362~365, 1960.
- 24) Yamamoto, S. et al: Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pulmonary granuloma of a cat and from pigeon droppings. Jap. Vet. Science 19: 179~191, 1957.
- 25) Emmons, C. W.: 第5回日本医真菌学会総会シンポジウム及び特別講演, 1961.
- 26) Littman, M. L.: An improved method for detection of urea hydrolysis by fungi. J. Inf. Dis. 101: 51~61, 1957.
- 27) 螺良英郎: クリプトコックス症の基礎的研究. 真菌誌 3: 50~55, 1962.

Studies on Cryptococcosis

Part I. Distribution of *Cryptococcus neoformans*
in the Okayama District.

By

Atsuyoshi Yuhara

The 1st Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Kiyowo Kosaka)Department of Internal Medicine, Okayama Saiseikai General Hospital
(Director: Dr. Hitoshi Yamato)

Abstract

Isolation of *Cryptococcus neoformans* from the pigeon excreta in the Okayama district was attempted. As the result, 8 strains of *Cryptococcus neoformans* were isolated from 61 specimens collected at 56 different places in the district.

1. Studies on the pathogenicity to mice of 3 isolated strains, A₁, C₂ and C₃, revealed that pigeon strains were less pathogenic than the Kurata strain isolated from human cryptococcosis.

2. In the mice, *Cryptococcus neoformans* provoked 2 kinds of lesions, either cystic or granulomatous lesions.

3. By way of intranasal inoculation the fungal metastasis to the brain was difficult, whereas intravenous inoculation induced cystic lesions within the parenchyma of the brain instead of meningitis in the most instances.

4. Though the *Cryptococcus neoformans* was able to be cultured at 37°C, the strains which had been cultured at 25°C was difficult to produce large colonies in the first generation at 37°C.

5. The capsule of *Cryptococcus neoformans* was large in vivo but it was found to disappear or become thinner on transplantation to a culture medium.
