

Histoplasma capsulatum に 関 す る 研 究

第 2 編

Histoplasma capsulatum Okayama-56 (Yamato) と 米国系 Histoplasma capsulatum G-1456 との比較検討

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂教授)

岡山済生会総合病院 (院長: 大和人士)

三 村 宏 二

〔昭和 37 年 9 月 24 日受稿〕

I. 結 言

分離真菌 *Histoplasma capsulatum* Okayama-56 (Yamato) (以下 0 株と略す) はその分離元の臨床並びに病理¹⁾において、結核との混合感染であり、病理組織学的に所謂 large form (以下 l.f. と略す) を示し、著者の第 1 編に見られた如く、酵母型培養においても、実験動物組織内においても l.f. を示すものがやや多数に認められる点、典型的な *Histoplasma capsulatum* よりむしろ *Histoplasma duboisii*²⁾ により近いのではないかと推察される。

そこで著者は C. W. Emmons 氏より分与された *Histoplasma capsulatum*-G-1456 株 (以下 G 株と略す) を用い、それを対照として、0 株の酵母型発育各期における性状と感作血球凝集反応を検討し、特に l.f. の出現について若干の考察を加え、0 株が異種とさるべきや否やにつき検討した。

II. 培養日数の推移による両株の比較

Histoplasma capsulatum の酵母型培養における対数期及び定常期は D. A. Rowley 他³⁾によると 2~4 日及び 4~8 日で、一般細菌に比してその発育は相当ゆるやかである。Rowley 他はその実験において 2 日培養菌を用いているが、既に 20~40% は集落を形成し得ない。同一菌量を接種しても培養条件によつてその毒力に差の生じるのは当然で、J. B. Middleton 他⁴⁾ も菌の活性の有無に対する注意の必要性を強調している。又 Rowley 他は菌数の測定、培地成分の洗滌等の操作による活性の低下についても考慮の必要性を強調している。

著者らの予備実験⁵⁾においてはこれらの点についての考慮が不充分で、培養日数も 5~7 日のものが

多く用いられたが、本実験においては両株の 3 日、1, 2, 3 週培養の酵母型菌につき、その形態、菌数、生菌率及び毒力を比較し、更に病理組織内の菌分布及び菌形態について比較検討することとした。

1. 実験材料及び実験方法

菌株: 0 株は第 1 編に述べた Chocolate 培地に、G 株は Brain-heart infusion glucose blood agar にそれぞれ 37°C で培養した酵母型発育菌を用いた。

マウス: CF-1 系の近交系及び均一系、4~5 週発育、体重 20~25 g のものを各♀の区別なく用いた。

方法: 両株のそれぞれ 3 日、1, 2, 3 週培養の酵母型菌集落を掻き取り、湿菌として秤量し、10 mg/cc の生理食塩水浮游液とし、可及的迅速に各群 5 匹のマウスに 0.1 cc づつ静注接種した。一方、各菌浮游液について直接塗抹標本を作り、グラム染色による菌形態の観察に当て、血球計算用メランデュール及び計算盤により単位重量中の菌数を測定し、更にその 100 aggregate づつを各至適平板培地に培養し、生菌百分率を求めた。

菌液接種マウスは死亡の部度、4 週以上生存例は 29 日目に屠殺剖検し、肝、脾、肺及び腎の各臓器の病変及び菌の分布とその形態につき比較検討した。組織固定は 10% ホルマリン液により、染色は主として H. E. により又菌染色として Gridley 法⁶⁾ 及び Gomori's Methenamine silver⁷⁾ 法を併用した。

2. 実験結果

a. 菌形態 (写真 1~4)

菌液を塗抹標本とし、グラム染色を施して両株の形態を比較すると、培養 3 日では両株共に 2~4 μm の円形又は卵円形の small form (以下 s.f. と略す) が

大部分で、O株の染色性がやや勝り、やや卵円形の感が強く、又多少大きい程度であつて著しい差は見られない。

培養1週に至るとG株は殆んど著しい差を示さないのに対し、O株は染色性に乏しい中空性の5~10 μ 前後の菌体が半数近くを占めるに至る。この菌体は第1編の病理組織中に見られたものよりやや小型であるが、所謂 l.f. というべきものと考えられる。培養2週に至るとO株は大部分が l.f. で占められるのに対し、G株はやはり s.f. が殆んどを占め、少数の染色性に富む10 μ 前後の l.f. の混在と、少数の連鎖形式を認めるのみである。培養3週菌は培養2週菌と特記すべき差が認められない。即ちO株における早期の著しい特異な l.f. の出現が注目される。

b. 菌数及び生菌率 (表1)

表1 両株の菌数及び生菌百分率

	O—56株		G—1456株	
	1 mg 中の菌数	生菌%	1 mg 中の菌数	生菌%
3日培養菌	600~500万	76	1,000~900万	65
1週培養菌	500~400万	34	800~700万	52
2週培養菌	300~250万	13	600~500万	35
3週培養菌	300~250万	9	600~500万	12

全体にO株の菌数がG株の菌数より少数である。これはO株の s.f. がG株のそれよりやや大きめのこと、l.f. が早期且多数に出現することによるもので、aggregateを作る割合の差はあまり認められない。

至適培地上に3週以内に集落を形成する菌数を見て生菌百分率を見ると、3日培養菌でO株76%、G株65%であるが、培養日数の経過と共にO株の生菌率の低下が著しい。

致死日数 (表2)

表2 1.0mg 静注マウスの致死日数

	O—56株						G—1456株					
	1	2	3	4	5	致死率	1	2	3	4	5	致死率
3日培養	9	9	9	10	11	5/5	5	6	6	6	7	5/5
1週培養	14	0	0	0	0	1/5	9	9	10	12	13	5/5
2週培養	0	0	0	0	0	0/5	0	0	0	0	0	0/5
3週培養	0	0	0	0	0	0/5	0	0	0	0	0	0/5

数字は致死数 0印は28日以上生存 29日目屠殺剖検

3日培養菌ではG株の致死日数がO株のそれよりも短かいが、共に100%の致死率を示す。1週培養菌ではG株がなお100%の致死率を保つのにに対し、O株の毒力は急激に低下して5匹中1匹を致死させたに止まる。2週及び3週培養菌では致死率は共に0となる。

即ちO株の毒力低下がより急激である。

d. 病変と菌分布並びに菌の形態

病変の性状はO、G両株共に第1編の如く、肝、脾を主とする網内系の増殖性、肉芽性炎である。

① 3日培養菌 (表3の1~4)

両株による病変の強度には著しい差は認められない。菌分布では同一程度の病変を示す組織内で、O株よりもG株の菌数がやや多い傾向が見られ、特に網内系の細胞内の s.f. にこの傾向が強い。菌形態について見ると、両株共に大部分は喰細胞内の s.f. であるが、O株の3、4、5番に l.f. を認めるのみでなく、G株においても、やや染色性に乏しい大型の l.f. と考えるべき形態の菌を5番のマウスに認める。

② 1週培養菌 (表4の1~4)

両株共に病変及び菌分布が軽度となり、特にO株において、その差が著しい。菌形態ではO株の l.f. をとるものが増加するが、培養菌における程著しいものではない。一方G株にも少数の l.f. と思われる菌体が認められる。

③ 2週培養菌 (表5の1~4)

両株共に病変は軽微となり、菌分布も減少し、検索に困難を来すようになる。O株では l.f. の割合が s.f. に勝るに至るが、G株では l.f. は殆んど認められない。

④ 3週培養菌

所見は極く軽微で菌体は殆んど認められない。

3. 小括並びに考察

培養日数の推移と培地上の酵母型形態に関してのO

表3の1 3日培養菌による肝病変

菌株 マウス番号 致死日数			O株					G株				
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
			19	9	9	10	11	5	6	6	6	7
小葉	星細胞	腫大・増殖 結節形成	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	肝細胞	萎縮 変性壊死	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+
	円形細胞	浸潤	±	±	±	—	—	+	—	—	—	—
グ 精	増殖		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	円形細胞 線維化		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
菌 量	星細胞	small form	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
		large form	—	—	+	±	—	—	—	—	—	±
	肝細胞	small form	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+
		large form	—	—	—	±	±	—	—	—	—	±
量	グ精	small form	+	+	+	±	+	卅	卅	+	+	+
		large form	—	—	—	±	—	—	—	—	—	±

表3の2 3日培養菌による脾病変

菌株 マウス番号 致死日数			O株					G株				
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
			9	9	9	10	11	5	6	6	6	7
赤 髓	細胞腫大・増殖 壊死		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
			卅	卅	卅	+	+	卅	卅	卅	卅	+
濾 胞	萎縮 細胞増殖		卅	卅	卅	+	+	卅	卅	卅	卅	卅
			+	+	+	±	+	+	+	+	+	+
菌 量	赤髓	small form	卅	卅	卅	+	+	卅	卅	卅	卅	卅
		large form	—	—	+	±	±	—	—	—	—	+
量	濾胞	small form	±	±	±	±	±	卅	+	+	+	+
		large form	—	—	+	±	±	—	—	—	—	—

G両株の著しい相違は、O株における早期の特異な l.f. の形成にある。この l.f. の問題は病理組織内の l.f. と関連して考察を加えたいのでしばらくおき、湿菌 1.0 mg 中の菌数及び生菌率について見ると、O、G両株共に培養日数の経過につれて低下し、特にO株の生菌率低下が著しい。菌数の測定において aggregate を形成するものも1個として算定したため、aggregate の増加が菌数減少の一因を成しているかも知れないが、両株間のその割合に著

しい差はなく、O株の菌数がG株のそれより少ないのは l.f. の占める割合の問題が大きいと思われる。

生菌率においては計算その他に要する時間内の菌の活力低下も無視出来ず、前記 Rowley³⁾ の実験によると生理食塩水浮游液として2時間放置すると、直後のものに比し、2日培養菌で80%が71%に、4日培養菌で60%が13%に、又8日培養菌で43%が9%にと生菌率が低下するという。この点培養日数の

表3の3 3日培養菌による肺病変

マウス番号 致死日数 病 変			菌 株					O 株					G 株				
			株					株					株				
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
			9	9	9	10	11	5	6	6	6	7					
胞	胞隔細胞	腫大増殖 結節形成	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+
			++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
隔	血管内皮	増殖 結節形成	++	+	+	+	+	++	++	++	+	+	++	++	++	+	+
			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
肺胞	上皮の腫大脱落 滲		++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			+	±	±	±	-	+	±	±	±	±	+	±	±	±	±
菌	胞隔細胞	small form	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+
		large form	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
量	血管内皮	small form	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+	++	++	++	+	+
		large form	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
量	肺胞上皮	small form	+	+	+	+	+	±	±	±	+	+	±	±	±	+	+
		large form	-	-	+	+	±	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+

表3の4 3日培養菌による腎病変

マウス番号 致死日数 病 変			菌 株					O 株					G 株				
			株					株					株				
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
			9	9	9	10	12	5	6	6	6	7					
糸球体係蹄の細胞増殖			+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	++	+	+	+	+
細尿管の変性、壊死			+	+	+	+	+	++	+	+	+	±	++	+	+	±	±
間質血管内皮細胞増殖			+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
菌	糸球体	small form	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		large form	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
量	細尿管	small form	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-	±	±	-	-	-
		large form	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
量	間 質	small form	±	+	++	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		large form	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

古いもの程生菌率は低く現われやすいと考えられ、O株の場合、2週培養菌の塗抹標本上で l.f. が大部分を占めながら、なおその生菌率が13%であることは、l.f. の活力の存在を示すものと考えられる。このことは実験動物組織内で l.f. の budding 像を認め得ることからも裏付けられる。一方G株の場合、s.f. を維持しつつも生菌率が次第に低下しており、形態のみから菌の活力を判断出来ぬことを示している。勿論この場合、両株の培地の相異による影響も否定出来ないものと思われる。

両株の毒力を比較すると、両株共に培養日数の経過と共に毒力の低下を来すが、O株では培養1週で既に著明な毒力低下を示すのに比し、G株では培養2週に至つて急激な毒力低下を示すに至る。前記の Rowley³⁾ の実験で 8×10^8 個の酵母型菌の静注による致死率は2日培養菌で100%、4日培養菌で85%、8日培養菌で70%で、50%致死日数はそれぞれ13日、15日、18日である。この菌数は大約1.0mgと考えられるので、G株の毒力は大体これと一致するようであるが、O株では培養1週目での毒力低下が

表4の1 1週培養菌による肺病変

マウス番号 致死日数		O 株					G 株				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
		14	0	0	0	0	9	9	10	12	13
小葉	星細胞腫大, 増殖, 結節形成	++	++	+	+	+	++	++	++	++	++
	肝細胞萎縮, 変性, 壊死	++	+	+	+	±	++	++	+	++	++
	円形細胞浸潤	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
グ精線	増殖, 円形細胞浸潤	+	±	±	±	-	+	+	+	±	±
	線維化	+	±	-	-	-	±	±	±	±	±
	線維化	-	±	±	±	±	±	-	±	-	-
菌量	星細胞 small form	+	+	+	+	+	++	++	++	++	+
	large form	+	±	±	±	±	±	±	-	-	-
	肝細胞 small form	+	±	±	±	±	±	±	+	+	+
量	large form	±	±	±	±	±	±	±	-	-	-
	グ精線 small form	+	±	±	±	±	+	+	+	+	+
	large form	±	±	±	±	±	-	-	-	-	-

致死日数中0印は4週以上生存29日目屠殺剖検(以下同じ)

表4の2 1週培養菌による脾病変

マウス番号 致死日数		O 株					G 株				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
		14	0	0	0	0	9	9	10	12	13
赤髄	細網細胞腫大, 増殖, 壊死	+++	++	+	+	+	+++	+++	++	++	++
	壊死	++	+	±	±	±	++	++	+	+	+
	壊死	++	+	±	±	±	++	++	+	+	+
濾胞	萎縮, 細網細胞増殖	++	+	±	±	±	++	++	+	+	++
	増殖	+	+	±	±	±	++	++	+	+	+
	増殖	+	+	±	±	±	++	++	+	+	+
菌量	脾髄 small form	+	±	±	±	±	++	++	++	++	+
	large form	±	±	±	±	±	±	±	-	-	-
	濾胞 small form	+	±	±	±	±	+	+	+	+	+
量	large form	+	±	±	±	±	-	-	-	-	-
	濾胞 small form	+	±	±	±	±	+	+	+	+	+
	large form	+	±	±	±	±	-	-	-	-	-

著しい。これは生菌率の低下によるのみでなく、l.f. の形成との関連も考えられる。

病変及び菌の組織内分布を比較すると、全般にO株では病変の割に菌数がやや少なく、特に網内系細胞内のs.f.がG株に比し少ない傾向が見られる。これはG株のs.f.の細胞内での増殖性がすぐれていることによると考えられるが、一方、O株のl.f.の破壊産物や所謂Endotoxin⁸⁾の影響も考えられ、

又菌染色の関係上、後述の如くl.f.が見落されやすい点も考慮されるべきであろう。

最後に菌形態について見ると、第1編においても、又本実験の培養菌塗抹標本においても認められたl.f.がO株において比較的多数に認められるのに対し、G株では少数に認め得るに過ぎなかつた。しかし、両株共に殆んどs.f.のみであつた3日培養菌を接種した場合にも、マウス組織内でl.f.

表4の3 1週培養菌による肺病変

菌 株 マウス番号 致死日数			O 株					G 株				
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
			14	0	0	0	0	9	9	10	12	13
病 変	胞隔細胞	腫大, 増殖 結節形成	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	血管内皮	増殖 結節形成	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+
肺 胞	上皮の腫大・脱落		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	滲		+	±	±	±	—	+	+	+	—	—
菌	胞隔細胞	small form	+	+	+	±	±	+	+	+	+	+
		large form	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	血管内皮	small form	±	±	±	—	—	+	+	+	+	+
		large form	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
量	肺胞上皮	small form	+	±	±	±	±	+	+	+	±	±
		large form	±	±	±	±	±	±	±	—	—	—

表4の4 1週培養菌による腎病変

菌 株 マウス番号 致死日数			O 株					G 株				
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
			14	0	0	0	0	9	9	10	12	13
糸球体係蹄の細胞増殖			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
細尿管の変性壊死			+	+	+	+	+	+	+	+	±	+
間質血管内皮細胞増殖			±	±	±	—	—	+	+	+	+	+
菌	糸球体	small form	±	±	±	—	—	+	+	±	±	±
		large form	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	細尿管	small form	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		large form	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
量	間 質	small form	—	—	—	—	—	±	±	±	±	±
		large form	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

が認められた点、又逆に殆んど l. f. のみとなつた O 株の 2 週培養菌接種例にも s. f. が認められた点、組織内での両型の移行が起り得ることを示すものとして注目される、但し、一般に、l. f. は s. f. の如く細胞内で無数に増殖する像を示すことは稀で、s. f. が主として網内系細胞内に認められるのに対し、l. f. は脱落上皮とか壊死巣などの陳旧性病巣に認められることが多く、従つてその分布の疎な場合は Gridley 染色によらないと認め難いことが多かつた。

所謂 l. f. についての記載は 1931 年に R. M.

Crumrine 他⁹⁾が全身性 *Histoplasma* 症（以下 H 症と略す）の脾臓組織内に見られた l. f. について報告しているのが最初である。この例は培養に成功していないため、*Cryptococcus* との鑑別がやや不明確であるが、1934 年、De Monbreun¹⁰⁾ は血清培地上 6～8 日培養の集落に s. f. の 4～5 倍大の l. f. を認め報告している。しかし、一般には *Histoplasma capsulatum*（以下 H. cap. と略す）の酵母型は s. f. をとるものと考え、l. f. は何か人工的産物乃至は他種真菌の混在によるものと考えが支配的であつた。

表5の1 2週培養菌による肝病変

マウス番号 致死日数		菌 株					株				
		O					G				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
病 変		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
小 葉	星細胞	腫大増殖	+	+	+	+	+	+	+	+	±
	結節形成		+	+	+	±	+	±	±	±	±
	肝細胞	萎縮変性壊死	+	+	+	±	+	±	±	±	—
グ 精	円形細胞浸潤		+	+	+	+	+	+	+	±	±
	増殖		—	—	—	—	—	—	—	—	—
	線維化		—	—	—	—	—	—	—	—	—
菌 量	星細胞	small form	±	±	—	—	+	+	±	±	—
		large form	±	±	±	±	—	—	—	—	—
	肝細胞	small form	—	—	—	—	±	±	±	±	—
グ 精		large form	±	±	±	±	+	—	—	—	—
	small form		—	—	—	—	—	—	—	—	—
	large form		±	±	—	—	—	—	—	—	—

表5の2 2週培養菌による脾病変

マウス番号 致死日数		菌 株					株				
		O					G				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
病 変		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
赤 髓	細網細胞腫大増殖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
	壊死	+	+	±	±	±	±	±	±	±	—
濾 胞	萎縮	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
	細網細胞増殖	±	±	±	±	±	±	±	±	±	—
菌 量	脾 髓	small form	±	±	±	±	+	+	±	±	—
		large form	±	±	±	±	—	—	—	—	—
濾 胞	small form	±	±	—	—	—	±	±	±	±	—
	large form	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—

1953年, Vanbreuseghem³⁰⁾ はアフリカに見られるH症では, l.f. の形成が比較的多く, s.f. も卵円形のものが多く, 硬膜胞子形成が少ないこと, 弱毒性であること, その他侵襲部位に肺型でなく皮膚型が多いなどの点を挙げて, H. duboisii を別種として提唱した。

一方同年 J. Schwarzl¹¹⁾ はH症患者のリンパ腺組織切片よりの培養中, 偶然多数の l.f. の形成を認め, 実験的にも l.f. の形成に成功し, その形成の条

件として, 発育を促進するある種の酵素の存在に, ある程度の好気的条件が加わつたものとし, l.f. をある菌種の特長とする考え方に疑問を投げかけた。

翌年には C. H. Binford¹²⁾ は22例の全身性H症の剖検例の病理組織の検討において, 多くの細胞外の l.f. の出現と更に hyphe 様の菌体を認め報告している。そして, それらが心弁膜や腎乳頭の病巣に多かつたことから, 液体培地に似た環境が l.f. 形成の原因であろうと述べている。又更に F. N.

表5の3 2週培養菌による肺病変

マウス番号 致死日数			O 株					G 株				
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
病 変	胞 隔	腫 大 増 殖 結 節 形 成	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			±	±	—	—	—	±	±	±	±	±
肺 胞	血管内皮	増 殖 結 節 形 成	±	±	±	—	—	+	+	+	+	—
			—	—	—	—	—	±	±	±	±	—
菌	胞隔細胞	上 皮 の 腫 大, 脱 落	+	+	±	±	±	+	+	±	±	±
			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
量	肺胞上皮	small form	±	±	—	—	—	+	+	—	—	—
		large form	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—

表5の4 2週培養菌による腎病変

マウス番号 致死日数			O 株					G 株				
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
病 変	糸 球 体	糸 球 体 係 蹄 の 細 胞 増 殖	±	±	—	—	—	+	+	±	±	±
		細 尿 管 の 変 性 壊 死	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
菌	間 質	間 質 血 管 内 皮 細 胞 増 殖	—	—	—	—	—	±	±	—	—	—
			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
量	間 質	small form	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		large form	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Silverman 他¹³⁾の報告での第4例は副腎病巣に2~3μのs.f.と6~8μのl.f.が場所を変えて認められ、局所の環境がl.f.形成に大きな役割を果たすことを示している。

E. Drouhet¹⁴⁾は13のアメリカ株、4のアフリカ株及びH. fascinosumの計18株につき、その菌絲型及び酵母型培養の比較と、マウス及びハムスターに対する毒力及び組織内の菌形態の比較を行ない、現段階ではHistoplasmaの種を分類するに足る方法は見出し得ないとしている。即ち、アメリカ株中全

くl.f.を形成しないのは13株中2株に過ぎず、別の2株はアフリカ株以上にl.f.を形成しており、又毒力の点からも両者に決定的な差は認められていない。

以上の如く現在ではl.f.は宿主と菌との相互関係及び菌周囲の環境により出現するもので、ある一定菌種の特性とはいえず、唯O株の如くl.f.を形成し易い株と、G株の如く形成し難い株が区別されるに過ぎないとする見解が多い。

即ちO株はG株に比し、やや弱毒性で、s.f.に

卵円形のものが多く、培地上及び組織内で、1. f. の形成が著しい等、*H. duboisii* 又はアフリカ株にやや近い性質を持つが、これらはすべて *H. cap* の範疇に入れられるべきもので、異種とするに足るものではないと考える。

Ⅲ. 菌分屑感作血球凝集反応による両株の比較

前実験に見られた O, G 両株の形態学的な差異が疫学的にも考慮すべきものか否かにつき検討するため、著者ら¹⁵⁾ は先に両株の菌絲型液体培地培養濾液 (Histoplasmin) を用いて、酵母型菌の腹腔内接種により免疫したマウスの皮内反応及び血清による沈降反応を試みたが、成績が不均等で満足すべき結果が得られなかった。

一般に H 症の疫学的、血清学的検索方法としては、Histoplasmin 液による皮内反応が用いられるが、患者の鑑別診断、予後判定その他の目的には補体結合反応もよく利用される。

その抗原としてはやはり Histoplasmin¹⁶⁾ ¹⁷⁾ ¹⁸⁾ ¹⁹⁾ 液が最も多く用いられるが、その他酵母型菌のホルマリン処理死菌²⁰⁾、加熱死菌²¹⁾ 及び磨砕処理分割²²⁾ 等が用いられている。又沈降反応²³⁾ も行なわれ、抗原としては酵母型菌のエタノール抽出分割が用いられる。一方 S. Saslaw 他は感作血球凝集反応²⁴⁾ ²⁵⁾ ²⁶⁾ を Histoplasmin 液を用いて行ない良好な成績を得ている。矢追²⁷⁾ はこの感作血球凝集反応を用いて結核に関する免疫学的研究を試み、患者の診断に利用出来ることを報告している。

著者は本実験において主として矢追の方法に従って血球凝集反応を行なつたが、感作液として Histoplasmin 液を用いた場合、凝集価の昇が不充分であつた¹⁵⁾ ので、今回は下記の方法で得た菌分屑を以て血球感作を行ない良好な成績を得た。

1. 実験材料及び方法

a. 感作血球浮游液の作製

前編に述べた各々の培地上 37°C, 3 日培養の酵母型菌浮游液を 120°C 60 分加熱し、その上清を 10% の三塩化醋酸 (pH 3.0) で処理した上清及び沈渣から表 6 の過程で多糖体分屑 (以下 c. f. と略す) と蛋白分屑 (以下 p. f. と略す) を得、各分屑を生理食塩水により 1 mg/cc の濃度の感作液とし、これに生理食塩水で 3 回洗滌した山羊血球を感作液の 1/200 容加え、時々軽く振盪しつつ 37°C 2 時間の感作を行なつた。感作終了後生理食塩水で洗滌、遠沈し再び 0.5% の感作血球浮游液とした。

表 6 菌分屑の作製

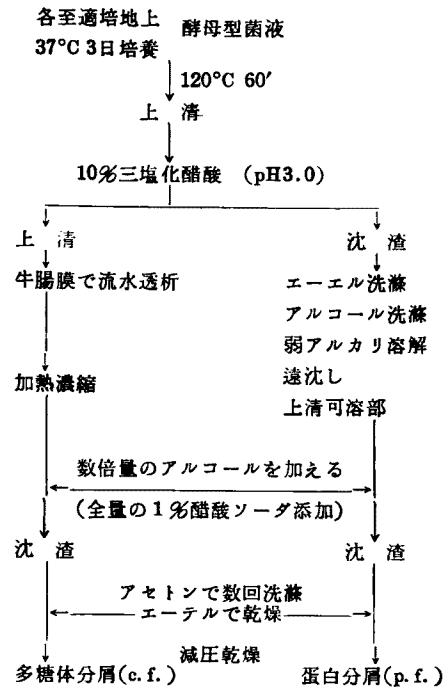


表 7 家兎の免疫接種

実験日	接種菌量	接種部位	採血
1	死菌 5 mg	皮下接種	
3	" 10 mg	静注接種	
10	" 20 mg	"	
17	" 30 mg	"	
31			心採血
32	半数 死菌 30 mg 半数 生菌 15 mg	"	
46			全採血

b. 家兎免疫血清の作製

体重 2~2.5 kg の健康家兎に各々の酵母型菌の 100°C 20 分加熱死菌 5 mg を皮下接種し、ショックのないことを確かめ、以後表 7 の如く順次各量を静注接種し、一括心臓採血を行なつた。次いで半数に死菌を、残り半数に生菌を追加静注した。即ち I, II 及び VI VII の家兎は各々 O 及び G 株の生菌を追加免疫、III IV 及び VIII IX の家兎は各々の株の死菌のみで免疫した。追加免疫後 2 週間全例を剖検、全採血した。心臓採血及び全採血した血清は先ず 56°C 30 分の非働化の後、0.5% の正常山羊血球浮游液を等量加えて 37°C 2 時間置き、正常異種血球凝集素を吸

着除去して反応に供した。

c. 感作血球凝集反応の実施及び判定

免疫家兔血清を倍数希釈して1024倍に至り、各々に等量の0.5%感作血球浮游液を注加し、よく混和した後、時々振盪しつつ 37°C 2時間作用させ、その後は室温に静置して翌朝判定した。凝集の判定は肉眼的凝塊の振盪に対する抵抗性により、中等度振盪によつて肉眼的凝塊の消失したものを(+)とし、振盪の強度により(++)、(+++)とし、軽度の振盪によつて凝塊の消えるものを(±)とした。

免疫血清と感作血球の組合せは同株同志の他、全採血々清については交叉反応を行なつた。又対照として、生理食塩水+0.5%感作血球浮游液及び免疫血清+0.5%未感作血球浮游液の2種を置き、後者の血清を倍数希釈した。

2. 実験成績

a. O株免疫血清とO株感作血球の凝集反応

表8の如く心採血血清での凝集価はp.f. c.f. 共に32倍(+)~64倍(±)程度の上昇で、全採血血清では生菌追加のI, IIでp.f., c.f. 共に256倍(+)まで凝集価が上昇するのに対し、死菌追加のIII, IVでは殆んど上昇を示さない。生菌追加免疫血清ではc.f. よりp.f. の方がやや高い凝集価を示す。

す。

b. G株免疫血清とG株感作血球の凝集反応

表9の如く心採血血清での凝集価はO株の場合と殆んど同様で、VIIの.p.f. がやや低く、IXのc.f. がやや高い。全採血血清では生菌追加のVI, VIIではp.f. は希釈倍数で2管、c.f. は3管程度の上昇を示すのに対し、死菌追加のVIII, IXでは1管の上昇を示すのみである。O株とは逆に全体としてp.f. よりc.f. の方にやや高い凝集価を認める。

c. 交叉凝集反応

全採血血清についてのみ、他株感作血球との凝集反応を行なつた。

O株免疫血清とG株感作血球の交叉反応では表10の如く、死菌免疫のIII, IVではp.f., c.f. 共に8倍(+)程度の凝集価に止まるのに対し、生菌免疫のI, IIではp.f. は64倍(+), c.f. は16倍(+)~32倍(±)とやや上昇するがp.f. の凝集価は明らかにc.f. のそれより高い。

G株免疫血清とO株感作血球の交叉反応では表11の如く前例よりも全体に凝集価が高く、死菌免疫のVIIIでもp.f. 32倍(+), c.f. 16倍(+), IXはp.f. 64倍(+), c.f. 16倍(+)であり、生菌免疫のVIはp.f. 64倍(+)~256倍(±), c.f. 16倍

第8 O株免疫血清×O株感作血球

家番 免号	感 分 作 屑	追 加	免 疫 菌	採 血	血 清 稀 釈 倍 数									
					4	8	16	32	64	128	256	512	1024	
I	pf	死 生	菌 菌	心 全	卅 卅	卅 卅	卅 卅	卅 卅	+	±	—	—	—	
	cf	死 生	菌 菌	心 全	卅 卅	卅 卅	+	+	±	—	—	—	—	
II	pf	死 生	菌 菌	心 全	卅 卅	卅 卅	卅 卅	卅 卅	+	—	—	—	—	
	cf	死 生	菌 菌	心 全	卅 卅	卅 卅	+	+	±	—	—	—	—	
III	pf	死 死	菌 菌	心 全	卅 卅	卅 卅	+	+	±	—	—	—	—	
	cf	死 死	菌 菌	心 全	卅 卅	+	+	+	±	—	—	—	—	
IV	pf	死 死	菌 菌	心 全	卅 卅	+	+	+	±	—	—	—	—	
	cf	死 死	菌 菌	心 全	卅 卅	卅 卅	+	+	±	—	—	—	—	

表9 G株免疫血清×G株感作血球

家番 免号	感分 作屑	追 加	免 疫 菌	採 血	血 清 稀 釈 倍 数								
					4	8	16	32	64	128	256	512	1024
VI	pf	死 生	菌 菌	心 全	卅 卅	卅 卅	卅 卅	+	± +	- +	- ±	- -	- -
	cf	死 生	菌 菌	心 全	卅 卅	卅 卅	卅 卅	卅 卅	+	- +	- +	- +	- -
VII	pf	死 生	菌 菌	心 全	卅 卅	卅 卅	+	± +	- +	- -	- -	- -	- -
	cf	死 生	菌 菌	心 全	卅 卅	卅 卅	卅 卅	卅 卅	+	- +	- +	- -	- -
VIII	pf	死 死	菌 菌	心 全	卅 卅	卅 卅	卅 卅	+	± +	- ±	- -	- -	- -
	cf	死 死	菌 菌	心 全	卅 卅	卅 卅	卅 卅	卅 卅	+	± +	- ±	- -	- -
IX	pf	死 死	菌 菌	心 全	卅 卅	卅 卅	卅 卅	+	± +	- ±	- -	- -	- -
	cf	死 死	菌 菌	心 全	卅 卅	卅 卅	卅 卅	卅 卅	+	± +	- ±	- -	- -

表10 O株免疫血清×G株感作血球

家番 免号	感分 作屑	追 加	免 疫 菌	血 清 稀 釈 倍 数								
				4	8	16	32	64	128	256	512	1024
I	pf	生	菌	卅	卅	+	+	+	±	-	-	-
	cf	生	菌	卅	卅	+	±	-	-	-	-	-
II	pf	生	菌	+	卅	卅	+	+	-	-	-	-
	cf	生	菌	+	卅	+	±	-	-	-	-	-
III	pf	死	菌	卅	+	±	-	-	-	-	-	-
	cf	死	菌	+	±	-	-	-	-	-	-	-
IV	pf	死	菌	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	cf	死	菌	+	+	±	-	-	-	-	-	-

(+), VIIは p.f 64倍(+), c.f. 32倍(+)である。この場合も明らかに p.f. の凝集価は c.f. のそれよりも高い。

即ち交叉反応において p.f. は可成り高い凝集価の上昇を認めるのに対し, c.f. は極く低い凝集価しか示さない。

3. 小括並びに考察

前記 S. Saslaw らは Histoplasmin 液で感作した血球凝集反応を行ない, 血清稀釈20~80倍までの

凝集価を得ている。しかし Histoplasmin 液の作製は長期を要する上に力価が不安定となりやすく, 著者らの予備実験¹⁵⁾でも最高16倍(+)程度の凝集価で対照と劇然たる差が見られなかつた。本実験における菌分屑の作製はやや複雑であるが, 各々モーリッシュ反応及びビュレット反応で分屑の混和していないことを確認し, 死菌免疫血清で平均32倍(+)~64倍(±)の凝集価の上昇を得ている。対照とした生理食塩水+0.5%感作血球浮游液及び免

表11 G株免疫血清×O株感作血球

家番 免号	感分 作屑	追 加	免 疫 菌	血 清 稀 釈 倍 数								
				4	8	16	32	64	128	256	512	1024
VI	pf cf	生 生	菌 菌	++	++	++	+	+	±	±	—	—
				++	+	+	±	—	—	—	—	—
VII	pf cf	生 生	菌 菌	++	++	++	+	+	±	—	—	—
				+	+	+	+	—	—	—	—	—
VIII	pf cf	死 死	菌 菌	++	++	+	+	±	—	—	—	—
				++	++	+	±	—	—	—	—	—
IX	pf cf	死 死	菌 菌	—	+	+	+	±	—	—	—	—
				+++	+++	++	++	+	±	—	—	—

疫血清+0.5%未感作血球浮游液は8倍(±)以上を示さず、16倍(+)以上を陽性と判定してよいと考えられる。即ち生菌免疫血清は元より、死菌免疫血清においても、同株の分屑で感作した血球については、p.f., c.f. 共に陽性の凝集価を示す。異株の分屑で感作した血球については生菌免疫血清は辛じて陽性を示すが、死菌免疫血清では凝集価が低く特にO株免疫の場合は8倍(+)~(±)で疑陽性の成績を示す。又交叉反応ではc.f. はp.f. よりも常に低い凝集価を示し、p.f. は同株反応のときと著しい差を認めないが、c.f. では凝集価の低下が著明である。即ちp.f. は両株に共通性が高く、ために交叉反応も起りやすく、c.f. は特異性が大きいために交叉反応凝集価が充分上昇しないものと考えられる。前記 Saelaw の血球凝集反応では *H. cap.* で20~80倍(+)なのに対し、*Blastomyces braziliensis* は4倍(±)であることからすると、前記両株の特異性はそれ程著しいとはいえず、O株を異種とするに足るものではない。

IV 総 括

1906年、S. T. Darling²⁹⁾ の第1例報告以来、H症は長く致死性の全身感染症と考えられたが、A. Christie²⁹⁾³⁰⁾、C. E. Palmer³¹⁾³²⁾ らを初めとする疫学的研究は次第にH症の全貌を明らかにし、更に最近は治療面での進歩も³³⁾³⁴⁾ も期待されている。一方菌学的には N. F. Conat³⁵⁾ の研究以来、長く本菌の酵母型は1~3μの円形又は卵円形のs.f. をとると考えられ、所謂l.f. を示すものは異型又は異種とされて来た。そしてアフリカのH症にl.f. が多いことから Vanbreuseghem³⁾ は *H. duboisii* を

提唱するに至っていた。しかし最近の種々の研究は所謂l.f. が生体と菌との相互関係によつて、菌の周囲の環境によつて生じ得るものであることを示している。

著者は本編においてG株を対照として、O株の性状を種々検討したが、l.f. の形成がO株において著しい点以外に特記すべき差は見出されず、G株においても少数ながらl.f. の形成を認めている。一方、至適培地、毒力、菌数、生菌率、更に感作血球凝集反応におけるc.f. の特異性等に差異を認め得たが、これらは又同じ米国系株相互間にも認められる程度の差異であり、特にO株を異種とするに足るものではない。

日比野³⁶⁾ は名古屋地方における1952~1953年と1958~1959年の2回にわたる Histoplasmin 反応成績と肺石灰巣の推移の検討から、本邦における Histoplasmin 反応陽性は *H. cap.* によるものではなく、土壤中に存在する *Histoplasma* と交叉反応を営む不明因子によるものであらうと推論し、P. Q. Edwards³⁷⁾ 他のアジア、アフリカ10カ国での Histoplasmin 反応実施結果の推論と一致すると述べている。しかし両者共に交叉反応を営む不明因子については全く追求しておらず、又H症の肺石灰化発生についても考えられていた程高率でないといわれる現在、両者の推論は未だ十分な妥当性を得たものとはいえない。

更にO株の分離症例が存在し、全国各地に Histoplasmin 反応陽性者が存在し、日比野のいう交叉反応因子が解明されず、上述の如く分離真菌O株が *H. cap.* の範疇に入ると考えられる以上、本邦におけるH症の検索は更に急務と考えられる。

V. 結 論

O株と C. W. Emmons 氏より分与されたH. cap. (G株)との酵母型発育各期における性状並びに感作血球凝集反応を比較検討し、次の結果を得た。

1) O株では培養早期に染色性に乏しい所謂 large form が大部分を占めるのに対し、G株は長く small form に止まる。

2) 1.0 mg 中の菌数は3日培養菌で、O株 600~500万個、G株1000~900万個であるが、培養日数の経過と共に次第に減少する。

3) 生菌率は3日培養菌で、O株76%、G株65%であるが、培養日数の経過と共に急速に低下し、その低下度はO株に著しい。

4) 両株の各 1.0 mg を CF-1 系マウスに静注すると、3日培養菌では共に100%の致死率を示すが、1週培養菌ではG株がなお100%の致死率を保つのにに対し、O株は20%に低下する。2、3週培養菌では両株共にマウスを致死させ得ない。

5) 両株の病変の性状は共に網内系を犯す増殖性、肉芽性炎で差は見られないが、網内系細胞内の

small form の分布がG株においてやや著しい。

6) 菌形態は両株共に主として網内系細胞内の small form であるが比較的長く生存したマウスの壊死巣内には large form も認められ、その分布はO株において著しいが、G株においても認められる。

7) 両株の蛋白及び多糖体分層による感作血球凝集反応において、両株は蛋白分層に共通性が強く、多糖体分層に特異性が認められる。

以上の両株の差異は米国系株相互間にも認め得る程度のものであり、特にO株を異種とするに足るものではない。

稿を終るに当り、終始、実験の御指導を頂いた岡山済生会総合病院大和人士院長、本学病理学教室小川博士教授並びに提啓助教授に深謝致します。

又菌株を分与下さいました C. W. Emmons 氏に深謝致します。

本論文の要旨は次の学会において発表した。

第58回日本内科学会、第3回、第4回日本医歯学会。

文

献

- 1) 前川：岡山医誌，71，7425 (1959)。
- 2) Vanbreuseghem: R.: Mycologia 45, 803 (1959)。
- 3) Rowley, D. A. et al.: J. Inf. Dis. 96, 174 (1955)。
- 4) Middleton, J. B. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 75, 164 (1950)。
- 5) 大 和 他：日内会誌，47，479 (1958)。
- 6) Gridley, M. F.: Am. J. Clin. Path. 23, 303 (1953)。
- 7) Gomori, G.: Am. J. Clin. Path. 10, 177 (1946)。
- 8) Salvin, S. B.: J. Immunol. 69, 89 (1952)。
- 9) Crumrine, R. M. et al.: Am. J. Trop. Med. 11, 435 (1934)。
- 10) De. Monbreun. W. A.: Am. J. Trop. Med. 14, 93 (1934)。
- 11) Schwarz, J.: Am. J. Clin. Path. 23, 898 (1953)。
- 12) Binford, C. H.: Am. J. Clin. Path. 25, 25 (1955)。
- 13) Silverman, F. N. et al.: Am. J. Med. 19, 410 (1955)。
- 14) Drouhet, E. et al.: J. Lab. Clin. Med. 47, 128 (1956)。
- 15) 大 和 他：日内会誌 48, 660 (1958)。
- 16) Salvin, S. B. et al.: J. Immunol. 60, 57 (1948)。
- 17) Tennenberg, D. J. et al.: Pub. Health. Rep. 63, 163 (1948)。
- 18) Schubert, J. et al.: J. Lab. Clin. Med. 41, 91 (1953)。
- 19) Furcolow, M. L. et al.: Pub. Health. Rep. 63, 169 (1948)。
- 20) Salvin, S. B.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 66, 342 (1947)。
- 21) Saslaw, S. et al.: J. Lab. Clin. Med. 33, 811 (1948)。
- 22) Saslaw, S. et al.: J. Lab. Clin. Med. 33, 1207 (1948)。
- 23) Campbell, C. C.: Am. J. Pub. Health 43, 712 (1953)。
- 24) Saslaw, S. et al.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 68, 559 (1948)。

- 25) Saslaw, S. et al.: Pub. Health. Rep 63, 290 (1949).
26) Saslaw, S. et al.: Pub. Health. Rep. 64, 424 (1949).
27) 矢追: 医事新報 1441, 3395 (1951).
28) Darling, S. T.: J. A. M. A. 46, 1283 (1906).
29) Christie, A. et al.: Am. J. Pub. Health. 35, 1131 (1945).
30) Christie, A.: J. Pediat. 29, 417 (1946).
31) Palmer, C. E.: Pub. Health. Rep. 60, 513 (1945).
32) Palmer, C. E.: Pub. Health. Rep. 61, 475 (1946).
33) Satiff, W. D.: Amer. Rev. Tuberc. 75, 912 (1957).
34) Yates, J. L. et al.: Dis. Chest. 37, 144 (1960).
35) Conant, N. F.: J. Bact 47, 563 (1941).
36) 日比野: 真菌と真菌症 1, 10 (1960).
37) Edwards, P. Q. et al.: Am. J. Trop. Med. 5, 2 (1956).
-

Studies on *Histoplasma capsulatum*

Part 2. Comparative Studies of *Histoplasma capsulatum* Okayama—56 (Yamato) and American G—1456 Strains

By

Kozi MIMURA

The First Department of Internal Medicine Okayama University Medical School

(Chief: Prof. K. Kosaka)

The Okayama Saiseikai General Hospital

(Director: Dr. H. Yamato)

Conclusion

An attempt to compare the nature of yeast phase cultures of the two strains and hemagglutination test was made and the findings gained were as follows:

1. In the Japanese strain, the large form fungi were predominant even on young cultures, and on the contrary, the culture of the American strain was composed of the small form organisms irrespective of the stage of growth.

2. The count of fungi on 3-day cultures attained to $(5-6) \times 10^6/\text{mg}$, $(9-10) \times 10^6/\text{mg}$ in the Japanese and American strains respectively, and decreased gradually with the passage of time.

3. The ratio of viable cells on 3-day cultures was 76 per cent in the former strain and 65 per cent in the latter, and it decreased significantly with the passage of time, especially in the former strain.

4. The lethality of CF-1 mice intravenously inoculated with 1.0 mg of 3-day cultures was found to be 100 per cent in both strains, and when 7-day cultures are applied, no alteration was revealed in the American strain but it was as low as 20 per cent in the Japanese strain. No lethal case was induced by fortnight cultures of either one of the two strains.

5. The pathologic features produced were represented by productive and granulomatous inflammations in the reticulo-endothelial system, and distribution of the small form organism in the reticulo-endothelial cells was more distinguishable in the American strain than in the Japanese one.

6. The characteristic appearance of the experimental infection in mice was dissemination of the small form organisms in the reticulo-endothelial system in both strains, but the large form ones were also seen in necrotic lesions of survived mice, and this incidence was more frequent in the Japanese strain.

7. The data obtained from hemagglutination tests suggested that the protein fraction might be common in both strains, and the polysaccharide fraction had somewhat strain-specificity.

The above varieties proved were not always sufficient to differentiate the one from the other as it had been observed in isolated strains in the North America.

三 村 論 文 附 図

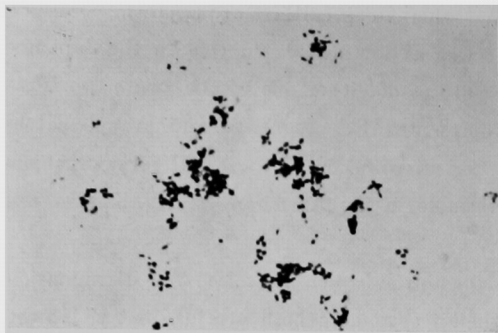


写真1 O株, 3日 培養酵母型

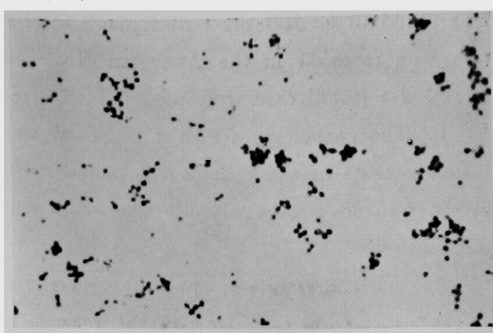


写真2 G株, 3日 培養酵母型

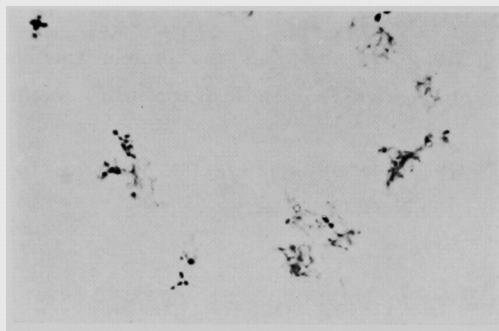


写真3 O株, 2週培養酵母型

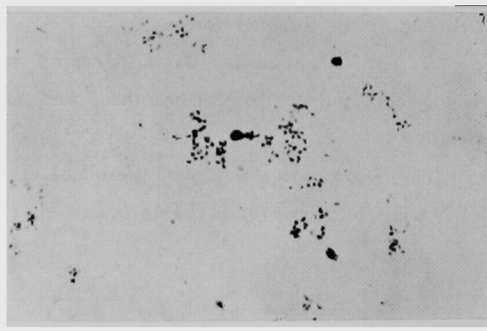
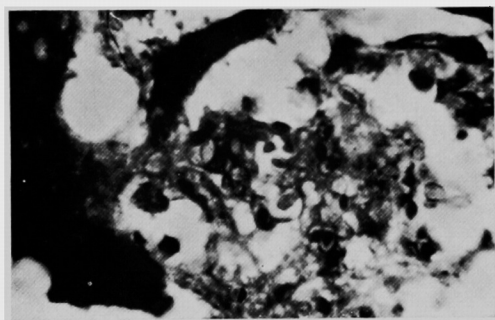
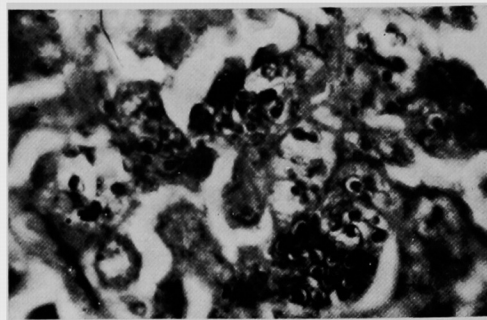
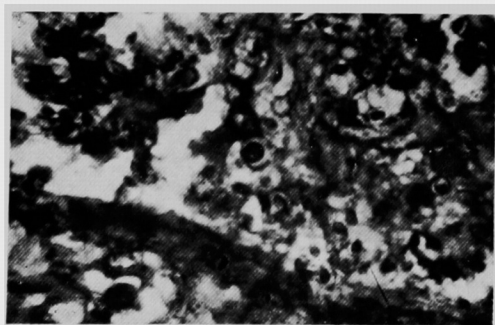
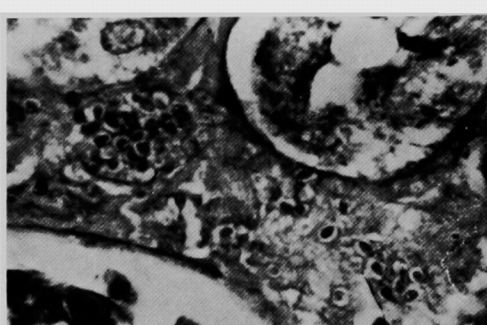


写真4 G株, 2週培養酵母型

写真5 肝 強拡 Gridley 染色
G株の l.f. と思はれる形態を含む写真6 脾, 強拡 Gridley 染色
やや大型の形態を示すG株写真7 肺 強拡 Gridley 染色
G株の l.f. と思はれる形態の菌を含む写真8 腎, 強拡 Gridley 染色
やや大型の形態を示すG株