



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ラットおよびマウスのCAR bacillus感染症に関する研究：特に形態学的変化を中心にして
Author(s)	松下, 悟
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第4200号
Issue Date	1992-12-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3065038
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49856
Type	doctoral thesis
File Information	000000257076.pdf



ラットおよびマウスのCAR bacillus 感染症に関する研究

—特に形態学的変化を中心にして—

松 下 悟

①

ラットおよびマウスのCAR bacillus感染症に関する研究

—特に形態学的変化を中心にして—

1) 動物	1.1
2) 実験菌の作成と感染実験	1.2
3) 病理学的観察	1.3
4) 免疫学的観察	1.3
5) 結核菌の分離	1.5

松下 悟

目 次

緒 言	-----	1
第 I 章	CAR bacillus実験感染ラットの 病理組織学的研究 -----	6
1. 要 旨	-----	7
2. 序 文	-----	9
3. 材料と方法	-----	11
1) 動物	-----	11
2) 供試菌液の作製と感染実験	-----	12
3) 病理学的検索	-----	13
4) 微生物学的検索	-----	13
4. 成 績	-----	15
1) 臨床所見	-----	15
2) 肉眼所見	-----	15
3) 病理組織学的所見	-----	18
4) 微生物学的所見	-----	32
5. 考 察	-----	36
第 II 章	CAR bacillus実験感染ラット、マウスと発育鶏卵 の呼吸器系組織の超微形態学的研究 -----	39
1. 要 旨	-----	40

2.	序 文	4 2
3.	材料と方法	4 4
	1) 動物および発育鶏卵	4 4
	2) 菌接種および材料採取	4 4
	3) 走査電顕標本	4 5
	4) 透過電顕標本	4 7
4.	成 績	4 9
	1) ラット気管粘膜上皮の 走査電顕所見	4 9
	2) 発育鶏卵尿膜の走査電顕所見	5 5
	3) ラット肺内気管支粘膜上皮の 透過電顕所見	5 5
	4) CAR bacillusの超微形態および 宿主細胞への付着形態	6 0
5.	考 察	7 1

第Ⅲ章 間接蛍光抗体法によるCAR bacillus感染症の 血清学的診断に関する研究

1.	要 旨	7 5
2.	序 文	7 7
3.	材料と方法	7 9
	1) 抗原	7 9
	2) 被検血清	8 0
	3) 反応方法	8 2

4.	成 績	-----	84
5.	考 察	-----	90
第IV章	マウスを用いてのCAR bacillusの		
	伝播様式に関する実験的研究	-----	92
1.	要 旨	-----	93
2.	序 文	-----	94
3.	材料と方法	-----	95
	1) 動物	-----	95
	2) 接種材料	-----	95
	3) 感染実験	-----	96
	A. 経鼻接種	-----	96
	B. ケージ内同居感染	-----	96
	C. 室内同居感染	-----	96
	4) CAR bacillus抗体価測定	-----	97
	5) 病理組織学的検索	-----	97
4.	成 績	-----	98
	1) 経鼻接種	-----	98
	2) ケージ内同居感染	-----	105
	3) 室内同居感染	-----	110
5.	考 察	-----	111
総 括	-----		114
参考文献	-----		119

謝 辞

126

英文抄録

127

緒 言

獣医学・医学・生物学の研究を行う上で実験動物の果たす役割は極めて大きい。実験動物のなかでも、マウスとラットは極めて良くコントロールされた動物で、清浄な施設で、微生物学的に行き届いた管理がなされている。それにもかかわらず、いまだにいくつかの感染症が発生し[5、13、27、37]、大きな問題となっている。

なかでも齧歯類呼吸器マイコプラズマ症 (murine respiratory mycoplasmosis, MRM) はしばしば発生する感染症の一つである[5、13、27]。MRM の特徴病変は、気道粘膜におけるリンパ様細胞の浸潤、増生を主体とした化膿性滲出を伴う鼻炎、中耳炎、喉頭気管炎、気管支炎、および気管支周囲にリンパ様細胞の過形成を伴う気管支肺炎、さらに末期の気管支拡張と肺膿瘍である[7、9、12、19-22、28]。MRMは、当初は齧歯類の慢性呼吸器病(chronic respiratory disease, CRD)と呼ばれ[7、12、20、22]、その病因として *Mycoplasma* (*M.*) *pulmonis* とウイルスが疑われた。しかし、ウイルスの証明はなされず[20]、*M. pulmonis* のみが注目され[12、19、20、22]、CRDをMRMと呼ぶようになった[20、21]。

1980年、van Zwietenら[41]はオランダでラットにCRDの発生を認め、罹患ラットが血清学的に *M. pulmonis* と Sendai virus 陽性であったのみならず、その中耳、鼻腔、喉頭および肺の気道粘膜上皮の線毛部にフィラメント状の桿菌を光顕的および電顕的に初めて観察した。翌年 MacKenzieら[24]は、米国の野生ラット、マウス、ウサギおよび *Mystromys albicaudatus* の気道上皮に形態学的に上記の菌に類似した菌を確認した。

また彼ら[24]は、約35年前のラットの肺組織標本、さらには北米やスウェーデンのラットにも類似の菌を確認し、本菌が古くから広い地域で存在していたことを指摘している。彼ら[24、41]によって認められたフィラメント状桿菌は、通常の無細胞培地で増殖させることができなかったため、その菌の病原学的意義は明確にし得なかった。

しかし1985年、Ganawayら[6]は、発育鶏卵尿膜腔液中でこの菌を増殖させることに成功するとともに、これによって得られた分離菌をマウスとラットに経鼻接種してCRDを再現させ、接種動物から菌を回収することにも成功した。彼ら[6]は位相差顕微鏡によりこの細菌が滑走運動をすることを観察し、この細菌が滑走細菌(*gliding bacteria*)[32]と呼ばれる一群に属する可能性を示唆した。しかし本菌は、正式に分類されるまでには至らず、呼吸器の粘膜上皮の線毛部に付着することから、*cilia-associated respiratory (CAR) bacillus*と呼ぶことが提唱された[6]。かくしてCAR bacillusが齧歯類CRDの病原体の一つとなり得る可能性が示された。

以後、CAR bacillus自然感染の発生報告は、わが国[10、16、25]と米国[8、42]で、ラット[10、25]、マウス[8]およびウサギ[16、42]においてなされている。これら自然発症例には、*M. pulmonis*[24、41]、Sendai virus[8、41]、pneumonia virus of mice (PVM)[8]、*Pasteurella (P.) pneumotropica*[10]、および*Bordetella (B.) bronchiseptica*[16]などの混合感染が認められた。

CAR bacillusの実験感染は当初は不可能であったが[24、41]、近年、発育鶏卵の尿膜腔液[6、33、34、42]および無細胞の特殊な培養液[35]で増殖させた菌、あるいは感染動物の肺洗浄液[6、10]を用いて、ラッ

ト[6、10、33、34]、マウス [6、33-35]およびウサギ[42]に対してなされている。いずれも実験感染は成功し、気道の粘膜上皮の線毛部に本菌の付着が認められている。

CAR bacillusはグラム染色では陰性で[6、8、25]、Warthin-Starry (ワーチン・スターリイ) 染色[18]やGrocott (グロコット) 染色などの銀染色によつては黒色に染色される[6、8、16、24、25、41]長桿菌である。本菌はリンパ様細胞の浸潤を伴う鼻炎 [6、41]、中耳炎[41]、喉頭炎[41]、気管炎[10、25、34、41] および気管支肺炎 [6、8]を惹起するが、最も特徴的な病変は、リンパ様細胞の浸潤、集簇による気管支および細気管支周囲炎である[6、8、10、24、25、34、35、41]。侵された肺は、無気肺、肺気腫および気管支拡張を伴う[6、8、10、24、25、34、41]。以上の呼吸器系に見られる病変は、先に述べたMRMの呼吸器病変[7、9、12、19、20、22、28]と極めて類似している。CAR bacillus感染での粘膜上皮の変化については、著変は見られなかったという報告[24]と、軽度の肥大、増生[41]、消失[6]、潰瘍化[10、41]および扁平様化 (squamoid change)[6、10、34、41]などが見られたという報告に分かれ、一定していない。

電顕的に、CAR bacillusは気道の粘膜上皮で線毛に平行して線毛間に付着する[6、8、10、16、24、25、41]。菌体の大きさは幅 $0.12\mu\text{m}$ [24]～ $0.21\mu\text{m}$ [41]、長さ $4\mu\text{m}$ [6、16、41]～ $12\mu\text{m}$ [41]の範囲で記載され、測定値にはかなりの幅がある。菌体の粘膜への付着端は他の菌体部より細くなっており[41]、さらに先端が膨れている像も観察されている[16、24、25、41]。菌体の表層は3層[8、16、25、41]または層状構造[10]をなし、運動器官は認められていない [6、16、41]。

実験動物コロニーよりCAR bacillusに感染した動物を摘発、排除し、コロニーを清浄化したり、清浄化されたコロニーが本菌に汚染されるのを防ぐためには、生前診断として検出率の良い血清学的診断法の確立が不可欠である。抗CAR bacillus抗体の検出は、ELISAによって初めてなされた[6]。すなわち、感染母ラットから生まれた3週齢の幼若ラットに移行抗体が検出された。さらに、菌を経鼻接種したラットにおいて、接種後4週目で抗体が陽転したことが認められている[6]。その後一部の研究者が、ELISA[8、33]と感染ラットの気管スメアーを抗原とした間接蛍光抗体(IFA)法[10]により、自然発症ラット[10、33]とマウス[8、33]ならびに実験感染ラット[33]とマウス[33]のCAR bacillus抗体を測定した。その結果、自然発症例では、組織学的なCAR bacillusの感染率と抗体の検出率が一致している。一方、実験感染例では、菌接種後4週目に抗体の発現を認めている[33]。気管スメアーには多種類の蛋白が含まれ、抗原としての安定性に疑問が残る。ELISAは、感染初期の検出率がIFA法より劣ることがM. pulmonis感染の診断の際に指摘されている[15]。したがって、検出感度の良い血清学的診断法の開発が本菌感染について強く望まれる。

実験動物コロニーにおいて、CAR bacillusがどのような感染経路で伝播するか、また動物コロニーが汚染した後病理学的診断や血清学的診断がいつ有効になるかを明確にすることは、本菌感染の本態の究明、ならびに微生物学的コントロールおよび予防法の確立のために、極めて重要な課題である。CAR bacillusに感染した母ラットの仔の気道粘膜に菌が認められた[6]という所見は、本菌が接触感染を行うことを示唆している。本菌の伝播様式に関する研究は、Itohら[10]のラットを用いた小規

模な感染実験の成績があるのみである。彼ら[10]は、感染ラットと正常ラットを同一ケージで飼育し、ケージ内接触感染を調べた。また、感染ラットを入れたケージと正常ラットを入れたケージを交互に配置し、ケージ間感染を調べた。その結果、ケージ内接触感染とケージ間感染は、それぞれ実験開始後2カ月目と7カ月目に認められ、接触感染が本菌の主要な感染経路であることが示唆された[10]。しかし、それらの組織学的病変や血清抗体産生の経時的推移については調べられていない。

前述のように、CAR bacillusは通常の培地には増殖できず、しかも本菌感染の病理組織像がMRMと極めて類似するため、今日まで本菌感染症をMRMとして見過ごしてきた可能性が強い。本菌とその感染症に関する研究は最近ようやく端緒を開いたところである。本研究では、CAR bacillusを実験的に感染させたラットとマウスを用い、感染組織の病理形態学的変化の特徴を明らかにするとともに、IFA法による本菌感染症の血清学的診断法を確立し、さらには本菌の伝播様式を明らかにする。

第 I 章 CAR bacillus 実験感染ラットの病理組織学的研究

1. 要 旨

5週齢 Wistar/Msラットに 8.5×10^6 のCAR bacillusを経鼻接種し、接種後4、7、14、21、28と56日目に3例ずつ解剖した後、病理組織学的に検索した。

臨床的には、接種後21日目より数例に、乾性および湿性の異常呼吸音が聴取され、全例に体重増加の抑制、活動の低下および粗毛が観察された。これらの症状は接種後56日目（観察終了時）まで持続したが、死亡例は認められなかった。

肉眼的には、接種後14日目より肺の肥大と重量増加、無気肺巣、気管支拡張、気管支周囲のリング状の乳白色充実域、肺気腫、ならびに気管と気管支腔内の粘液増量などが認められた。以上の肉眼病変は経時的に増悪した。

組織学的には、接種後7日目で、鼻腔の呼吸器粘膜固有層にリンパ球主体の小円形細胞の軽度の浸潤が見られた。接種後14日目からは、鼻腔、気管、気管支および細気管支の粘膜上皮の表面に好銀性のCAR bacillus（長さ4～8 μ m）が付着し始め、接種後56日目まで定着していた。気管、気管支および細気管支の粘膜上皮は上皮細胞の増生によって肥厚し、杯細胞が増数していた。侵された粘膜上皮の粘膜固有層には小円形細胞浸潤が認められ、この一部は上皮細胞層に達し、上皮細胞は菲薄化していた。肺内気管支周囲には、小円形細胞の浸潤、集簇が見られ、同時にリンパ濾胞形成を伴った気管支および細気管支周囲炎の像が認められた。以上の病変は経時的に気管支樹の近位から遠位へ拡大し、さらに病変の

程度も進行して接種後21日目以降56日目までに化膿性気管支肺炎も認められた。以上の他、接種後21～56日目には、鼻腔粘膜の扁平様化と腺腫様過形成 (adenomatous hyperplasia) ならびに中耳の鼓室炎などが認められた。

以上の成績から、CAR bacillusがラットの気道の粘膜上皮に感染する呼吸器系病原体であることが示された。CAR bacillus感染の病理組織像はラットの MRMのそれに極めて類似していたが、気道の粘膜上皮における本菌の存在によって MRMとは明確に識別された。なお、経鼻接種した後、気道粘膜に明瞭な病理組織学的変化が出現するまでには、14日間を要した。

2. 序 文

CAR bacillusは通常は無細胞の細菌用培地には増殖しないが[24、41]、発育鶏卵の尿膜腔液中 [6]および特殊な培養液中[35]では増殖する。よって、発育鶏卵尿膜腔液と特殊培養液で増殖させた菌[6、33-35、42]あるいは罹患ラットの肺洗浄液[6、10]を用いて、ラット[6、10、33、34]とマウス[6、33-35]への接種実験が行われた結果、いずれの動物も感染することが立証された。

CAR bacillus感染ラット[6、10、24、25、34、41]とマウス[6、8、34、35]の呼吸器系において、自然感染例の組織像 [6、8、10、24、25、41]と実験感染例のそれ [6、10、34、35]は類似していた。本菌は気道の粘膜上皮の線毛部に付着し、粘膜固有層にリンパ様細胞の浸潤と軽度の化膿性滲出を伴う鼻炎[6、41]、中耳炎[41]、喉頭炎[41]、気管炎[10、25、34、41]、 および気管支肺炎[6、8]を惹起するが、最も特徴的な病変はリンパ様細胞の浸潤、集簇による気管支周囲炎[6、8、10、24、25、34、35、41] である。侵された肺は、無気肺、肺気腫および気管支拡張を伴っている[6、8、10、24、25、34、41]。以上の病変は MRMの呼吸器病変[7、9、12、19、20、22、28]に酷似する。

CAR bacillus感染では侵された気道の粘膜上皮には著変は認められなかったという報告[24]と、粘膜上皮は肥大、増生を示し[41]、さらに滲出の重度な部位では粘膜上皮の消失[6]、潰瘍化[10、41]および扁平様化[6、10、34、41] が見られたという報告に分かれ、一定していない。MRMでは、侵された粘膜上皮には扁平様化[7、22]と扁平上皮化生[28]が

見られ、前者は感染後数週間目で、また後者は感染後数カ月目で初めて見られる病変である[20]と言われている。CAR bacillus感染がMRMと明らかに異なる所見は、菌の付着により粘膜上皮の線毛部がHE染色によっては好塩基性に染色され[8、10、25、41]、しかも菌体はグラム染色陰性[6、8、25]で、ワーチン・スターライ染色[18]やグロコット染色などの銀染色によって黒色に染色される[6、8、24、25、41]ことである。このように、CAR bacillus感染とMRMの病像は、菌体の存在を除けば極めて類似している。

本研究では、ラット由来CAR bacillusをマウスの肺で継代し、その肺乳剤を接種材料としてラットに感染を成立させ、その病理形態像を明らかにするとともに、病理発生について考察する。

3. 材料と方法

1) 動物

供試菌であるCAR bacillusが分離された SPFコロニーに由来する3カ月齢雄Wistar/Msラット[25]、菌の継代に使用した2カ月齢のSPF雄BALB/cマウス、および菌接種実験に使用した5週齢の雄 Wistar/Msラットは、いずれも放射線医学総合研究所（放医研）で生産、飼育されていた。これらの生産コロニーは、以下の方法で月1回定期的に微生物学的検査が実施された。すなわち腸内容はDHL寒天培地、NAC寒天培地（栄研化学、東京）およびTryptic soy寒天培地(Difco Laboratories, Detroit)で培養し、*Escherichia coli* 0115a, c:K(B)、*Pseudomonas* (P.) *aeruginosa*、*Corynebacterium* (C.) *kutscheri*、および *Salmonella* spp.を検査した。鼻腔スワブはPPL0寒天培地とDHL寒天培地(Difco Laboratories, Detroit)で培養し、*M. pulmonis*と*B. bronchiseptica*を検査した。気管スワブはPPL0寒天培地と10%馬血液寒天培地で培養し、*M. pulmonis*と*P. pneumotropica*を検査した。血清中の抗体価測定は、補体結合反応[37]により、*M. pulmonis*、Sendai virus、*Bacillus piliformis*および mouse hepatitis virus について実施し、凝集反応[27]によつては、*B. bronchiseptica*と*C. kutscheri*について実施した。内・外部寄生虫は肉眼と光顕[30]で検査した。しかし、これらのコロニーではいずれの時期でも病原体による汚染は全く認められなかった。

供試菌CAR bacillusが分離されたラット[25]は、4週齢で SPF施設からコンベンショナル (CV) 動物実験施設に移された。ここでさらに2カ

月間飼育したところ、それらのラットが湿性異常呼吸音を示したため、菌分離のため解剖された。この施設は温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ と12時間明・暗サイクルに管理されていた。これらのラットはオートクレーブで滅菌したケージに入れられ、市販固形飼料（MB-1：船橋農場、千葉）および高塩素（10～15ppm）・高塩酸（pH 2.5～3.0）飲水を自由に与えて飼育されていた。

感染実験に使用したマウスとラットは、感染動物飼育装置内で、温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ と12時間明・暗サイクルの環境で飼育した。マウスは1群5匹、またラットは1群3匹ずつオートクレーブで滅菌したケージに入れ、オートクレーブ滅菌された市販固形飼料（MB-1：船橋農場、千葉）および高塩素（10～15ppm）飲水を自由に与えて飼育した。

2) 供試菌液の作製と感染実験

CAR bacillus自然感染を示したラットは、クロロフォルムで深麻酔させて全採血した後、肺を無菌的に摘出した。この肺病変部の一部を滅菌リン酸緩衝生理食塩水で無菌的に乳剤とし、これをBALB/cマウスにエーテル軽麻酔下で経鼻接種した。接種マウスは2カ月間飼育した後放血殺し、ラットで行ったと同様の方法で肺乳剤を作製して再びマウスに経鼻接種した。以上の操作を繰り返して菌を継代し、標準株（SMR株）としてラットの感染実験に使用した。接種菌液であるマウス肺乳剤の塗抹標本を作製し、Fontana（フォンタナ）染色により菌数を測定した結果、乳剤中の菌量は $8.5\times 10^7/\text{ml}$ であった。

5週齢の正常ラットには、上記の接種菌液を0.1mlずつエーテル軽麻

酔下で経鼻接種した (8.5×10^6 / ラット)。非感染対照ラットには、正常マウス肺乳剤を上記と同様の方法で接種した。

菌を接種されたラットでは、接種後4、7、14、21、28と56日目に3例ずつクロロフォルム深麻酔した後全採血し、解剖に供した。正常対照ラットでは接種後56日目に解剖した。

3) 病理学的検索

菌接種ラットと対照ラットからは、剖検後、肺、気管、気管気管支リンパ節、前縦隔リンパ節、胸腺、脾臓および頭部を取り出し、10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。頭部は10%ギ酸ホルマリン液で脱灰後、鼻腔と中耳の観察のため切り出した。組織標本は通常の方法で作製後、HE染色を行って鏡検した。さらに、標本の一部には、グロコット染色および過ヨウ素酸シッフ(PAS)染色を行った。

4) 微生物学的検索

CAR bacillus感染により発症したラットと菌の継代のために接種されたマウスでは、解剖時に鼻腔と気管のスワップならびに肺のスタンプ材料を採取し、これらを10%馬血液寒天培地およびPPL0寒天培地で培養した。菌接種ラットは各解剖日に1例について、上記の検索を実施した。接種材料である肺乳剤も、上記の培地で培養した。解剖直前に採血して得られた各動物の血清について、前述の定期的微生物検査で対象としているすべての病原体に対して抗体測定を行った。測定は定期検査の場合

と同様の方法で行ったが、M. pulmonisについては検出感度の良いELISA [26]によっても実施した。

1) 呼吸所見

接種後21日目より、数例が乾性および湿性の呼吸音を聴し、また全例で呼吸の低下と聴えられた。併発は、同じ日齢の正常マウスと比較した場合、接種後21日目より著しく増加がみられた(図1)。接種後21日目と28日目では顕著な腫脹が1例ずつ認められた。これらの呼吸所見は実験期間中持続して観察されたが、死亡例はなかった。

2) 肉眼所見

接種後14日目より、肺の肥大と重量増加が認められ、これらの変化は実験終了時の接種後28日目まで持続した(図1)。

接種後14日目では、1例の気管内に透明な白線状粘液が増量していたが、肺には肉眼的変化は認められなかった。

接種後21日目では、1例の肺の左葉の一部に米粒大の黄色無気腫瘍が認められた。他の1例では、肺の2葉に小豆大の不規則な灰白色の無気腫瘍が認められ、これとは別に葉の大から葉根入までの大きさの黄色無気腫瘍が全葉に散見された(写真1)。これも2例には肺気腫、気管支壁の破壊や気管支周囲のリング状の灰白色無気腫瘍が観察され、さらに気管や肺内気管支には灰白色粘液が増量していた。

接種後28日目では、2例の肺の左葉に葉根大から葉根入までの大きさの黄色または灰白色の不規則な無気腫瘍が散見され、そのほかに、近接的

4. 成績

1) 臨床所見

菌接種後21日目より、数例が乾性および湿性の異常呼吸音を発し、また全例で活動の低下と粗毛が見られた。体重は、同じ日齢の正常ラットと比較した場合、接種後21日目より既に増加抑制がみられ（図1）、接種後21日目と28日目では顕著な消瘦が1例ずつ認められた。これらの臨床症状は実験期間中持続して観察されたが、死亡例はなかった。

2) 肉眼所見

接種後14日目より、肺の肥大と重量増加が認められ、これらの変化は実験終了時の接種後56日目まで持続した（図1）。

接種後14日目では、1例の気管内に透明な泡沫様粘液が増量していたが、肺には肉眼的著変は認められなかった。

接種後21日目では、1例の肺の左葉の一部に米粒大の褐色無気肺巣が認められた。他の1例では、肺の2葉に小豆大の不整形で灰白桃色の無気肺巣が認められ、これとは別に粟粒大から米粒大までの大きさの褐色無気肺巣が全葉に散見された（写真1）。これら2例には肺気腫、気管支腔の拡張や気管支周囲のリング状の乳白色充実域が観察され、さらに、気管や肺内気管支には灰白色粘液が増量していた。

接種後28日目では、2例の肺の全葉に粟粒大から米粒大までの大きさの褐色または黄褐色の不整形無気肺巣が散見され、それは特に、近位の

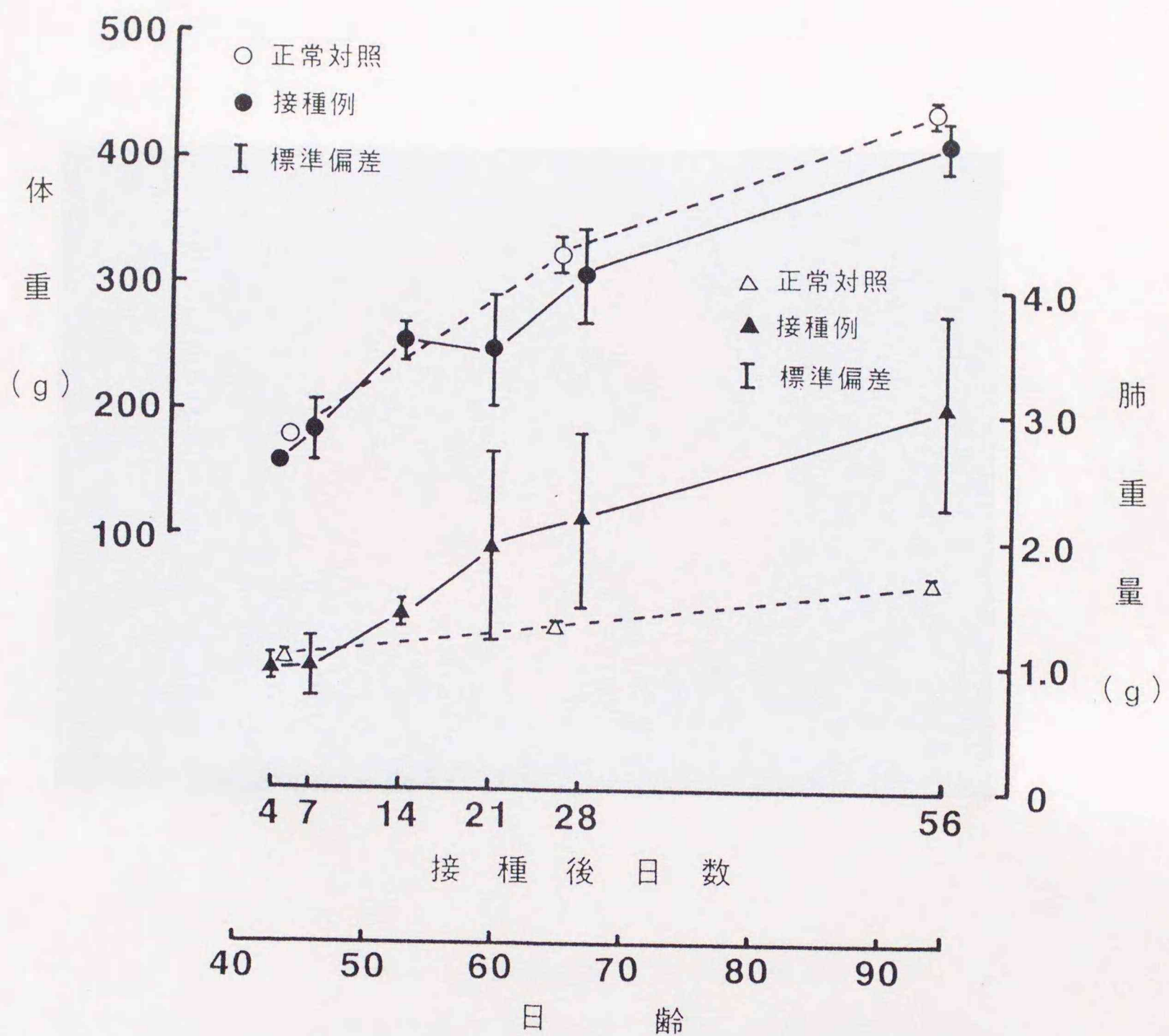


図 1. CAR bacillus経鼻接種ラットの体重 (●) と肺重量 (▲).
白ヌキは同じ日齢の正常対照ラットの値を示す。各点は平均
値と標準偏差を示す。

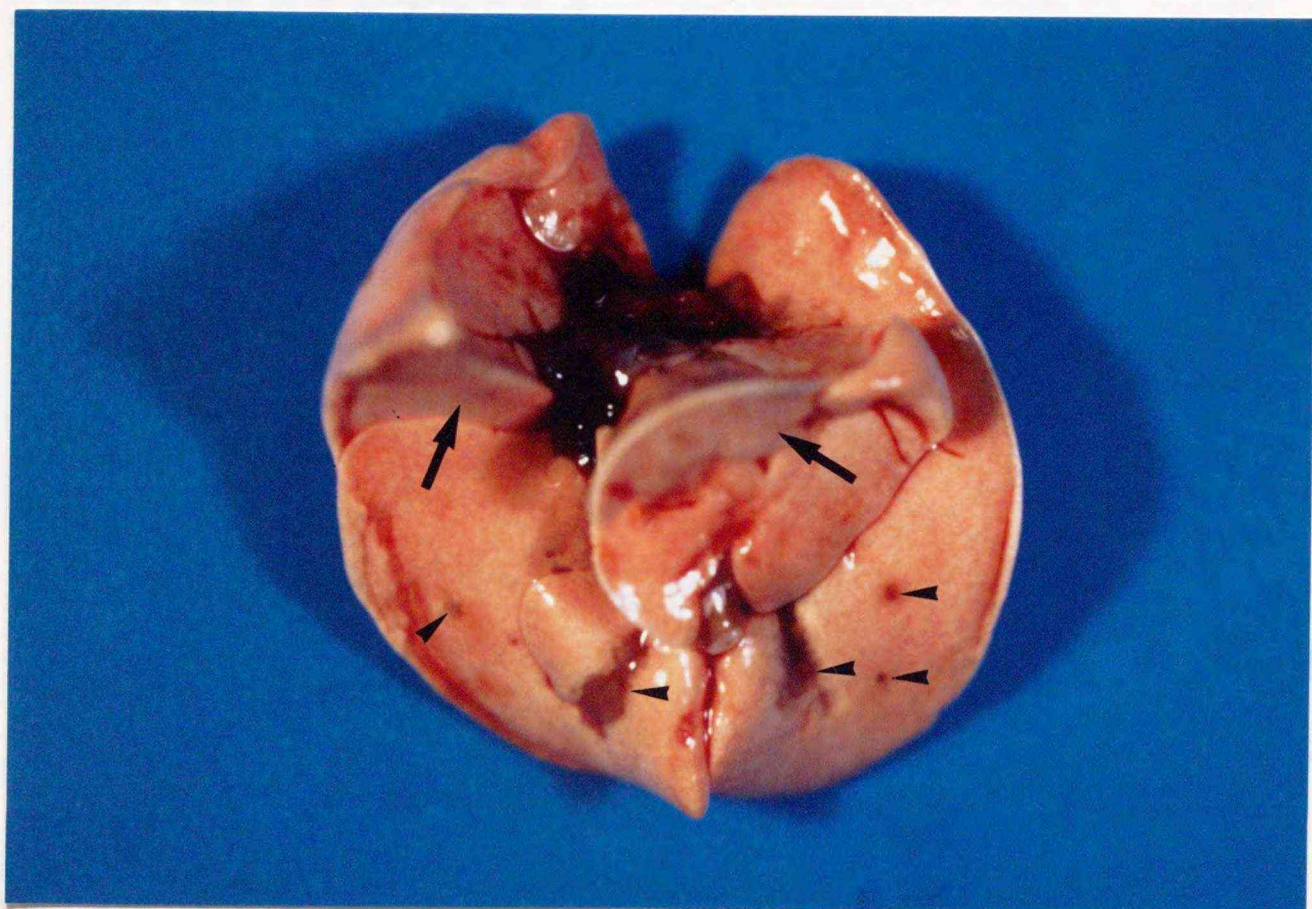


写真 1. 接種後21日目の肺。左中葉と中間葉に小豆大の不整形灰桃色無気肺巣が認められる（矢）。全葉に粟粒大から米粒大までの大きさの褐色無気肺巣が散見される（矢頭）。肺は全体に気腫性である。

気管支周囲で目立っていた。これら2例には肺気腫と気管支拡張が伴われ、さらに気管支周囲にはリング状の乳白色充実域が認められた。なお、気管と肺内気管支には灰白色粘液が増量していた。残る1例では、気管に粘液の増量のみが認められた。

接種後56日目では、全例の肺に肺気腫および気管支拡張が見られ、気管支周囲はリング状に乳白色充実化していた。気管と肺内気管支には灰白色粘液が増量していた。1例の肺の全葉に粟粒大から米粒大までの大きさの褐色ないし黄褐色の無気肺巣が認められ、また1葉の先端に帽針頭大の不整形をした癥瘰様の病巣が認められた。本例の気管支拡張は他の例より明らかに進行していた。

以上の他、接種後21日目より気管気管支リンパ節および前縦隔リンパ節の腫大が認められた。これらにおいてリンパ節の腫大は経時的に増大し、接種後56日目でも観察された。しかし、その他の臓器には著変は認められなかった。

3) 病理組織学的所見

鼻腔、気管、肺および中耳の主要な組織学的変化を表1に示した。接種後4日目では、検索されたいずれの気道粘膜にも変化は認められなかった。接種後7日目では、2例の鼻腔の呼吸粘膜の粘膜固有層に軽度の小円形細胞浸潤が見られたのみであった。接種後14日目以降56日目までの間に、鼻腔、気管および肺内気管支の粘膜上皮に、粘膜上皮の線毛部のCAR bacillusの存在、さらにそれに伴う粘膜固有層の大形リンパ様細胞、形質細胞とリンパ球からなる小円形細胞の浸潤、集簇による気管支

表 1. CAR bacillus経鼻接種ラットにおける主な呼吸器病変

病 変	接種後日数と病変例数 (程度)					
	4	7	14	21	28	56
鼻腔						
Cb ^a の付着	0 ^b	0	3(+) ^c	3(++)	3(++)	3(+~++)
小円形細胞浸潤	0	2(+)	3(++)	3(++)	3(++)	3(++)
化膿性滲出	0	0	3(+~++)	3(+~++)	3(++)	3(++)
扁平様化 ^d	0	0	0	1(+)	2(+)	3(++)
腺腫様過形成 ^e	0	0	0	0	0	3(++)
気管						
Cbの付着	0	0	2(++~+++)	3(+++)	3(++~+++)	3(++~+++)
小円形細胞浸潤	0	0	2(+~+++)	3(+~+++)	3(++~+++)	3(+~+++)
好中球浸潤	0	0	2(+)	3(+)	2(+)	1(+)
杯細胞増数	0	0	1(+)	3(+~++)	3(+~++)	3(+~++)
肺						
気管支・細気管支						
Cbの付着	0	0	2(+~++)	2(+~+++)	3(++~+++)	3(+++)
気管支周囲炎	0	0	2(+~++)	3(+~+++)	3(++~+++)	3(+++)
気管支拡張	0	0	2(+~++)	2(+~+++)	3(++~+++)	3(+++)
化膿性滲出	0	0	2(+)	2(+)	3(+~++)	3(+~++)
杯細胞増数	0	0	1(+)	2(+~++)	3(++~+++)	3(++~+++)
肺胞						
化膿性滲出	0	0	0	2(+~+++)	1(++)	3(+~+++)
肺気腫	0	0	2(+~++)	2(+~+++)	3(++~+++)	3(+++)
中耳						
Cbの付着	0	0	0	0	0	1(+)
鼓室炎	0	0	0	0	1(+)	3(+)

^aCAR bacillus、^b病変保有例数、^c病変の程度 (+: 軽度、++: 中等度、+++ : 重度)、

^d鼻甲介、^e鼻中隔

と細気管支周囲炎などの、この感染症に特徴的な病変が認められた。

鼻腔の呼吸粘膜では、CAR bacillusの付着は接種後14日目以降56日目までの間に全例において観察された。菌の付着は、接種後14日目では一部の粘膜上皮においてであったが、接種後21日目と28日目では粘膜上皮の広い範囲に広がり、接種後56日目では若干ながら狭まった。それらの粘膜上皮では、上皮細胞の高さがわずかに増加し、粘膜固有層には中等度の小円形細胞浸潤が認められた。さらに鼻腔内には、接種後の日数の経過に伴い、少量の化膿性滲出物が認められ、接種後56日目では滲出物中に球菌様の細菌塊が散見された。以上の変化に加え、接種後21日目では1例の鼻甲介粘膜上皮の一部に扁平様化が見られ、また接種後56日目ではこれが次第に進行して3例すべてに認められるとともに、鼻中隔の呼吸粘膜の腺腫様過形成（写真2）も観察された。

気管の粘膜上皮では、接種後14日目に2例、接種後21日目から56日目では3例に、多数のCAR bacillusの付着が認められた。これらの粘膜上皮は細胞増生によって肥厚し、接種後の日数の経過に伴い、杯細胞がわずかに増数していた。粘膜固有層には、菌の付着量とほぼ比例して、多数の小円形細胞が浸潤し、少数の好中球浸潤も伴われていた。一部の粘膜では、粘膜固有層の小円形細胞浸潤が強く、上皮細胞層にまで達し、その部位の粘膜上皮は菲薄化していた。この領域の上皮には菌はほとんど認められなかった。

肺内気管支の粘膜上皮では、接種後14日目と21日目に2例、接種後28日目と56日目に3例でCAR bacillusの付着が認められた。いずれの付着例にも種々の程度の気管支周囲炎が認められ、リンパ濾胞の形成も伴われていた。気管支および細気管支周囲炎の程度によって、肺病変を3段

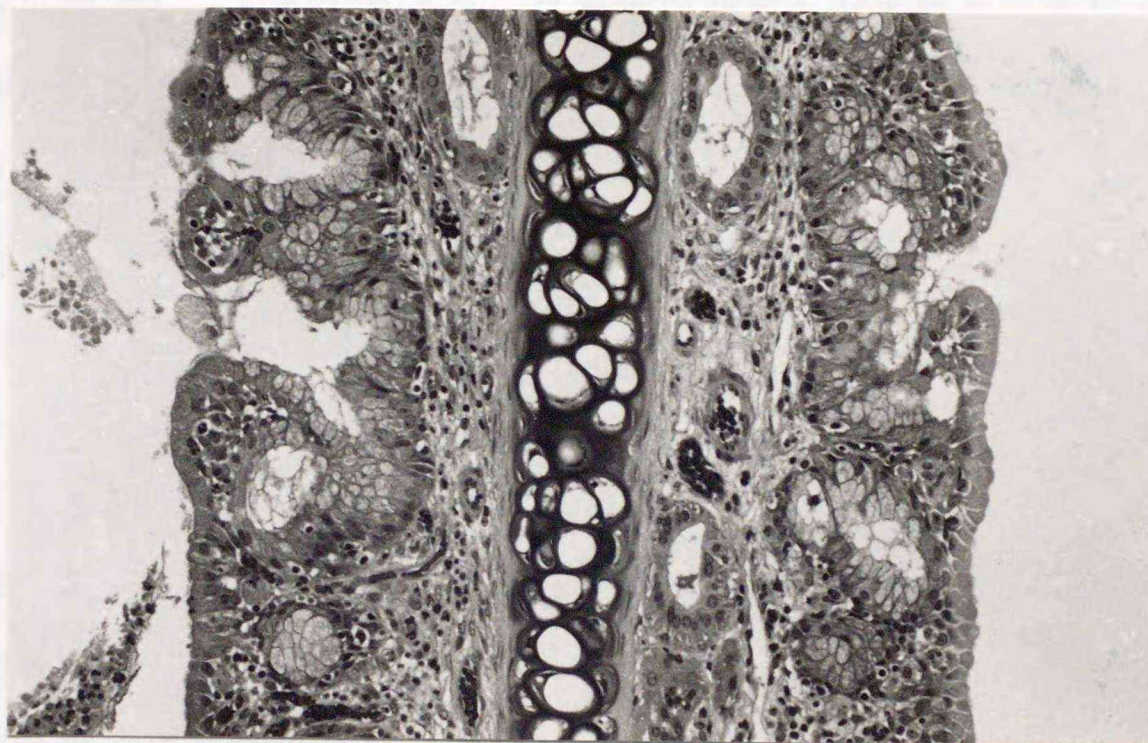


写真 2. 接種後56日目の鼻中隔。呼吸上皮の腺腫様過形成を示す。
HE. $\times 170$.

階に分類した。その結果、接種後14日目では軽度（写真3）と中等度の肺病変が各1例、接種後21日目では軽度と重度の肺病変が各々1例と2例、接種後28日目では中等度と重度の肺病変が各々1例と2例、接種後56日目では重度の肺病変（写真4）が3例すべてに認められた。以上のように、肺病変は接種後14日目に初めて出現し、接種後日数の経過に従って次第に顕著となった。さらに、気管支周囲炎とともに気管支拡張と代償性肺気腫も認められ、各病変の程度は相関性があった。病変部の肺内気管支腔内には、好中球、マクロファージおよび小円形細胞を伴った化膿性滲出物が認められた。肉眼的に無気肺巣が認められた部位には、化膿性気管支肺炎も認められ、細気管支と肺胞には多数の好中球とマクロファージおよび少数のリンパ球が滲出し、肺胞上皮は腫大、増数していた。

接種後14日目と21日目に見られた軽度の肺病変例では、気管支周囲炎が1～2肺葉の近位の気管支に小範囲で認められたのみであったが、その一部の気管支では既にリンパ濾胞が形成されていた（写真5）。病変部の気管支の粘膜上皮の一部にはCAR bacillusが付着し、粘膜上皮は上皮細胞増生によってわずかに肥厚し、少数の杯細胞が認められた。粘膜固有層には小円形細胞浸潤が認められ、その一部では浸潤が上皮細胞層にまで達し、その上皮細胞は菲薄化していた（写真6）。この部位の線毛と菌体は剝離性であった。正常な上皮細胞と増生した上皮細胞が、同一断面上に認められる気管支も存在していた（写真5）。これらの病変を示した気管支付近の気管支と細気管支の粘膜上皮では、上皮細胞がごく軽度に増生していたが、CAR bacillusの付着や気管支周囲炎は認められなかった。病変部の気管支周囲の間質では、血管周囲の水腫と少数

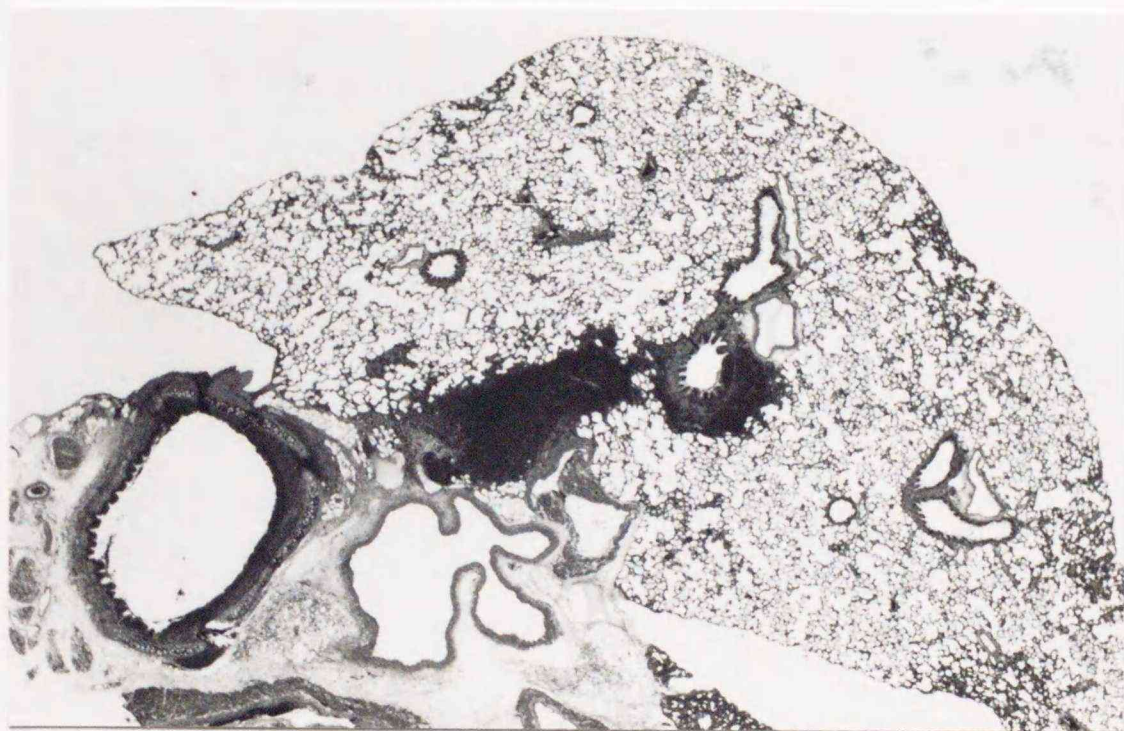


写真 3. 接種後14日目の肺。軽度の気管支周囲炎が認められ、病変部の気管支は拡張している。気管支周囲炎は小円形細胞の集簇からなる。HE. $\times 16$.

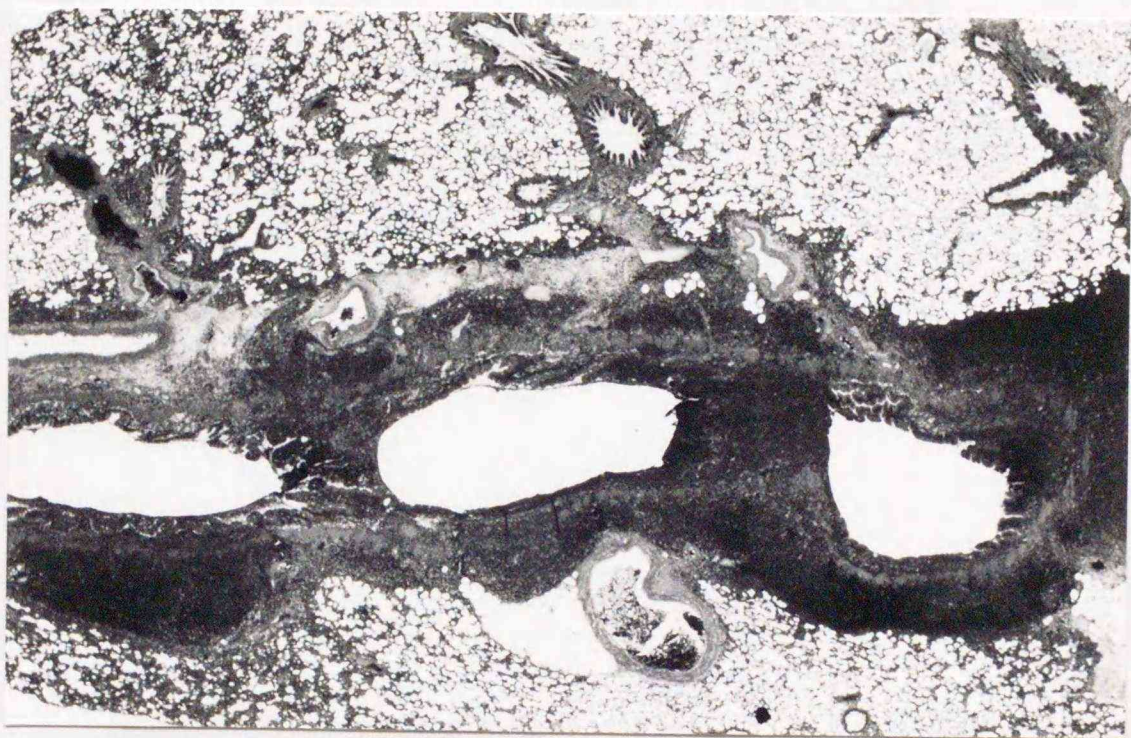


写真 4. 接種後56日目の肺。重度の気管支周囲炎を示す。すなわち、気管支から細気管支の周囲に多数の小円形細胞が集簇し、リンパ濾胞も形成されている。侵された気管支は著しく拡張している。HE. $\times 16$.

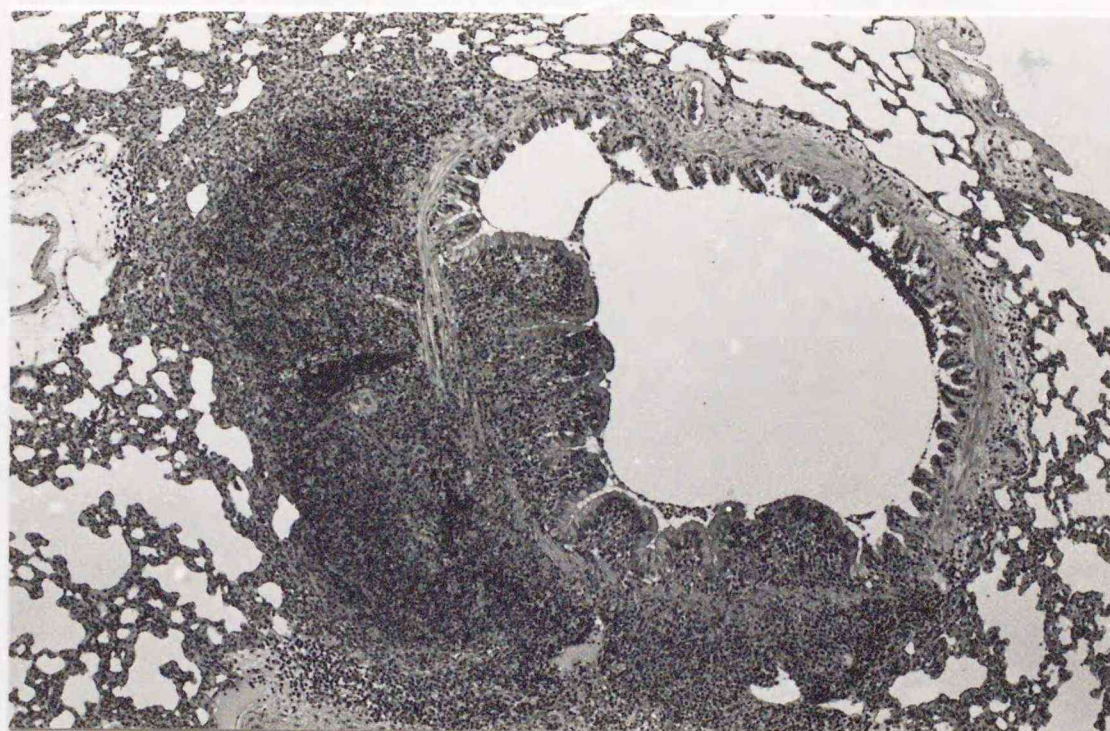


写真 5. 接種後14日目の気管支。粘膜固有層とその周囲にリンパ濾胞形成を伴った小円形細胞浸潤がある。なお、気管支は拡張性である。右半の粘膜上皮はほぼ正常である。HE. $\times 65$.

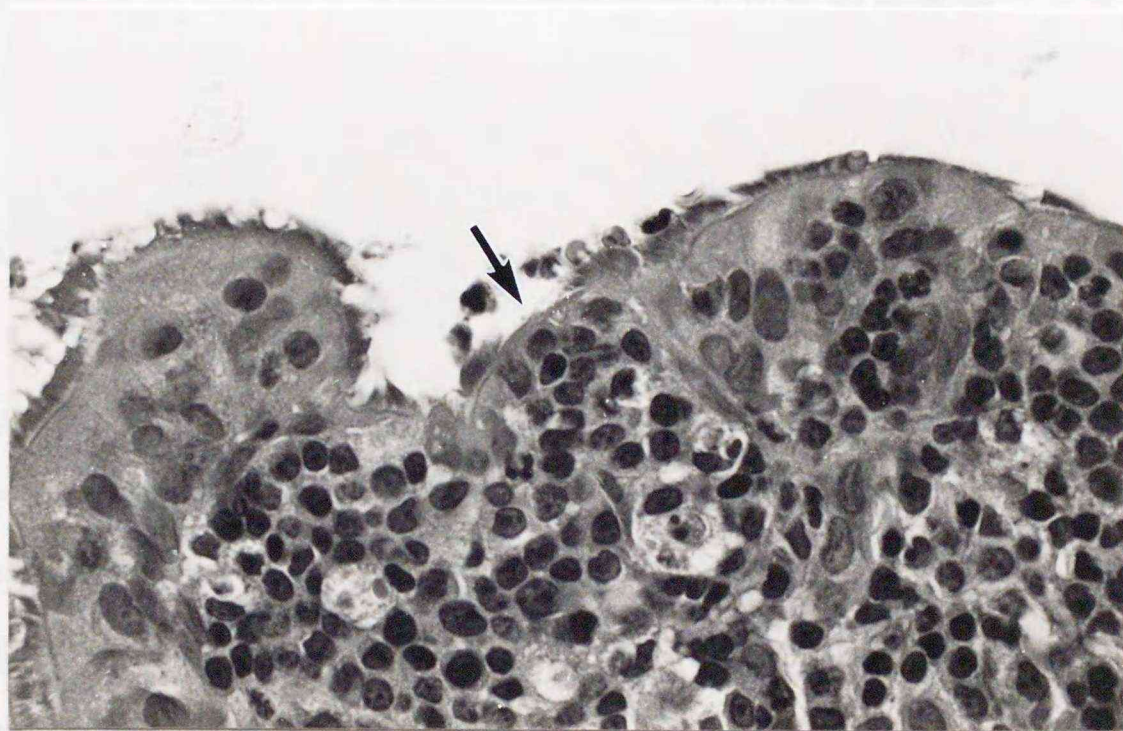


写真 6. 接種後14日目の気管支。粘膜固有層から上皮細胞層にかけて小円形細胞が浸潤し、一部の上皮細胞は菲薄化している（矢）。線毛部に多数のCAR bacillusが付着している。

HE. ×650.

の小円形細胞浸潤が認められた。

接種後14日目と28日目に見られた中等度の肺病変では、数葉の気管支から細気管支に至るまでの間に気管支周囲炎が認められた。気管支周囲炎の程度は遠位の気管支では軽度であったが、近位の気管支では重度で、そこではリンパ濾胞が高度に形成されていた。特に、近位の気管支の粘膜上皮では粘膜固有層から上皮細胞層にかけ小円形細胞浸潤が重度で、ほとんどの上皮は菲薄化を示した。CAR bacillusは粘膜表面の一部に付着していたのみで、線毛は消失していた。一方、遠位の気管支と細気管支の粘膜上皮は上皮細胞の増生によって著しく肥厚し、杯細胞が少数ながら認められ、その粘膜表面には多数の菌が付着していた。病変部の気管支周囲の間質には水腫が認められ、血管周囲に少数の小円形細胞が浸潤していた。

接種後21日目と28日目に見られた重度の肺病変では、ほぼ全葉の気管支から細気管支に至るまでの広範囲に気管支周囲炎が認められた。気管支周囲炎は末梢の細気管支では軽度であったが、それより近位の肺内気管支では極めて重度で、リンパ濾胞の形成も顕著であった（写真7）。病変部の多くの気管支の粘膜上皮では、粘膜固有層から上皮細胞層まで小円形細胞浸潤が著明で上皮は菲薄化し、線毛は消失していた（写真8）。そこにはCAR bacillusの付着はほとんど認められなかった。病変部のその他の気管支と細気管支の粘膜上皮は、上皮細胞の重度の増生によって肥厚していた。そこには杯細胞が多数認められ、線毛部に多数の菌が付着していた（写真9）。さらに、細気管支内と周囲の肺胞には、好中球とマクロファージが滲出し、化膿性肺炎の像を示していた（写真10）。病変部の間質では、しばしば血管周囲に水腫が認められ、少数の

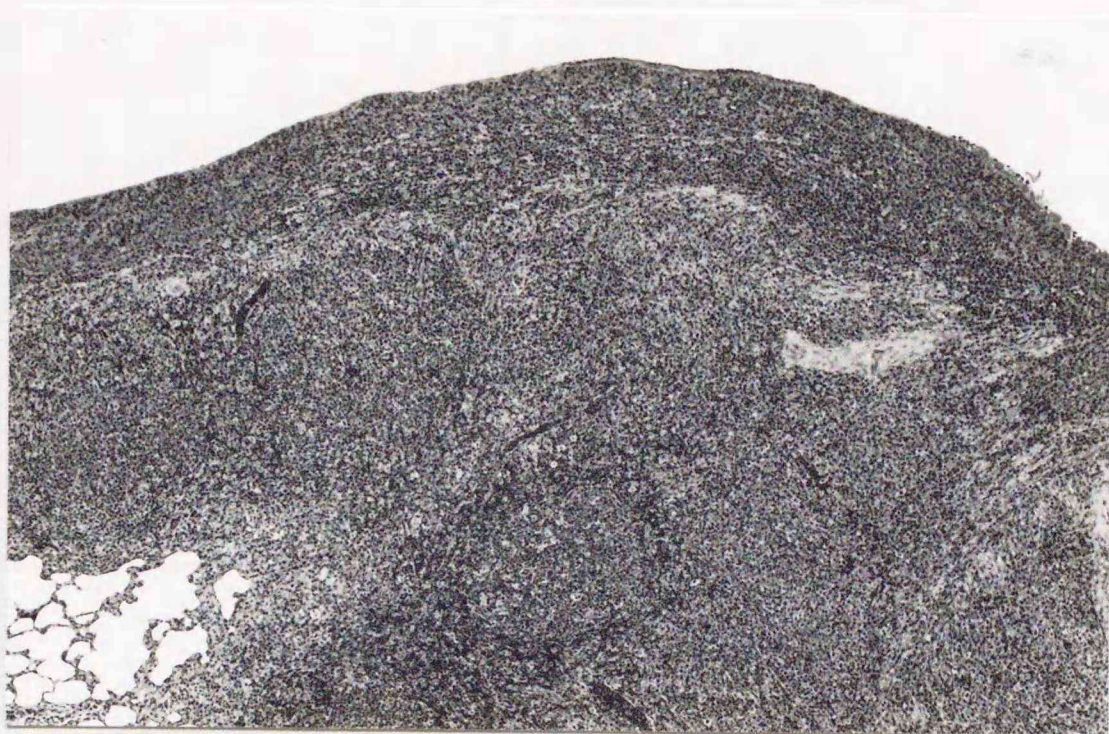


写真 7. 接種後21日目の気管支。小円形細胞の重度の浸潤と多数のリンパ濾胞形成からなる気管支周囲炎。HE. ×65.

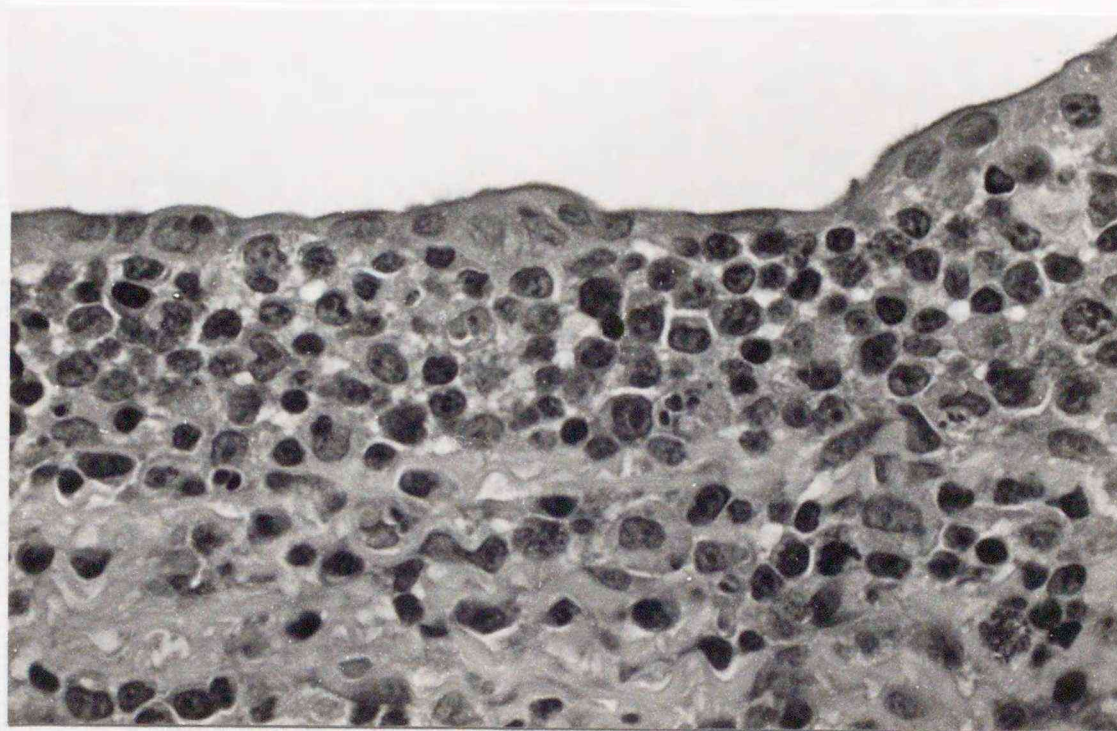


写真 8. 接種後28日目の気管支。粘膜固有層から上皮細胞層にかけて小円形細胞が浸潤し、上皮細胞は菲薄化を示す。粘膜表面に線毛およびCAR bacillusは認められない。HE. ×650.

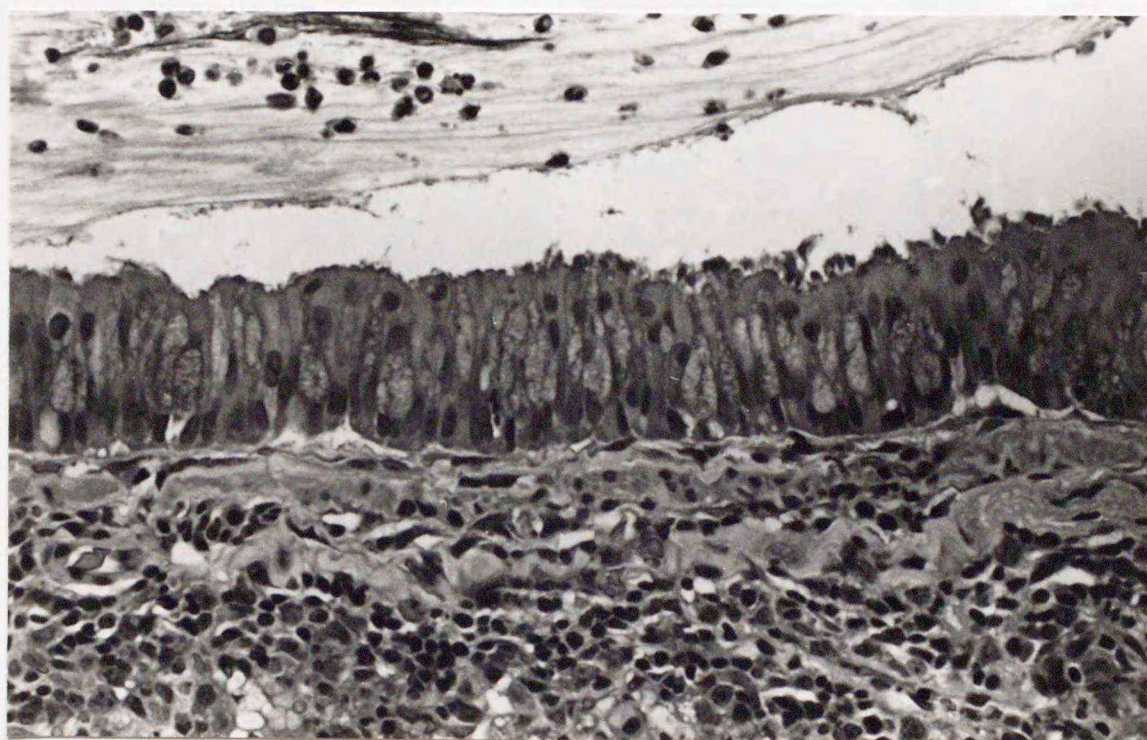


写真 9. 接種後21日目の気管支。上皮細胞層は細胞増生の結果正常ラットの約3倍に肥厚し、杯細胞の増数も見られる。この上皮の線毛部にはCAR bacillusが付着している。気管支腔内には粘液と好中球が滲出している。HE. $\times 340$.

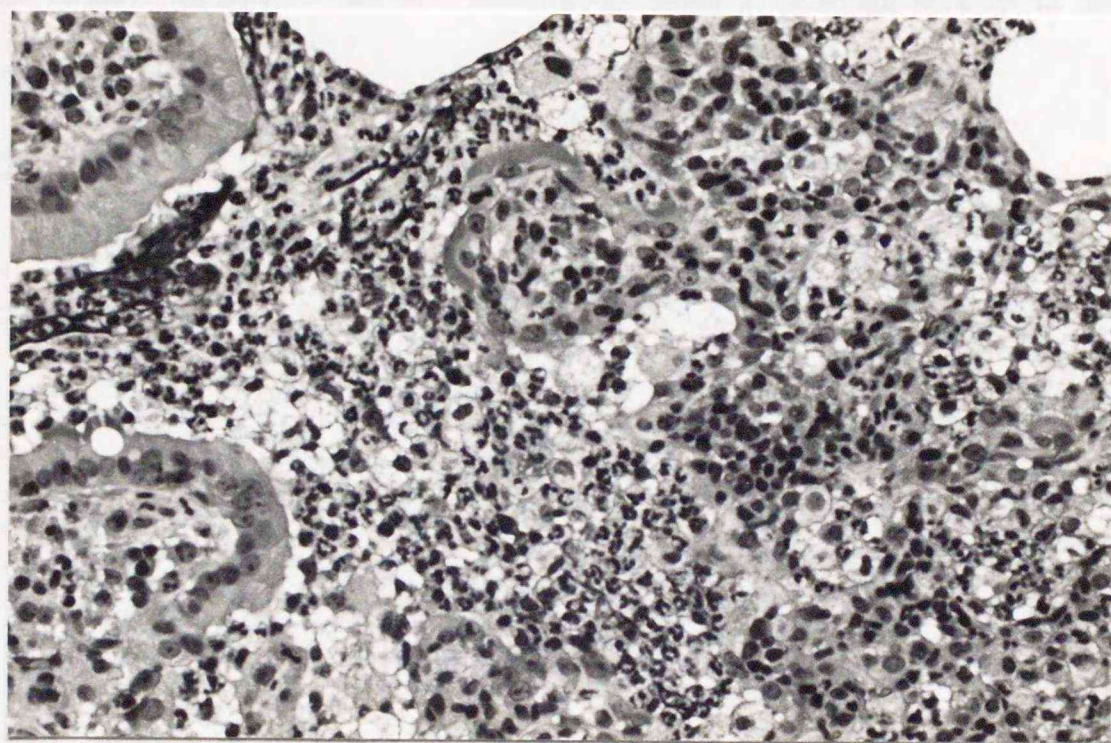


写真 10. 接種後21日目の細気管支。細気管支腔内から肺胞にかけて多数の好中球、マクロファージおよび小円形細胞が滲出し、化膿性肺炎像を呈している。HE. $\times 650$.

小円形細胞が集簇していた。

接種後56日目に見られた重度の肺病変（3例すべて）は、上記の重度の肺病変と基本的に同一で、間質における水腫も顕著であった。1例では、気管支から呼吸細気管支に至るまで重度の気管支拡張が認められた。呼吸細気管支は嚢胞状に拡張し、腔内には好中球が滲出していた（写真11）。この周囲の肺胞は、腫大、増殖した肺胞上皮細胞やマクロファージの増殖などによって無気肺となっていた。

中耳では、接種後28日目で1例、接種後56日目では3例に軽度の鼓室炎が認められた。一部の粘膜上皮にはリンパ球と好中球が浸潤し、その表面に好中球、小円形細胞、マクロファージおよび少数の異物巨細胞からなる少量の滲出物が付着していた。CAR bacillusは粘膜上皮の線毛部にごくまれながら付着していた。

鼻腔、気管、気管支および細気管支のグロコット染色標本では、長さ4～8 μm の好銀性フィラメント状桿菌が、粘膜上皮の線毛に平行して（粘膜表面に対して直角方向に）多数認められた（写真12）。また菌は、PAS染色によつては弱陽性に染色された。さらに、気道腔内の滲出液中にも同様の菌が少数浮遊して存在していた。

気管気管支リンパ節と前縦隔リンパ節の腫大は、濾胞の肥大と髄索における形質細胞の増数によるものであった。胸腺と脾臓には著変は見られなかった。

4) 微生物学的所見

供試菌が分離された自然感染ラット、CAR bacillusの継代に使用され

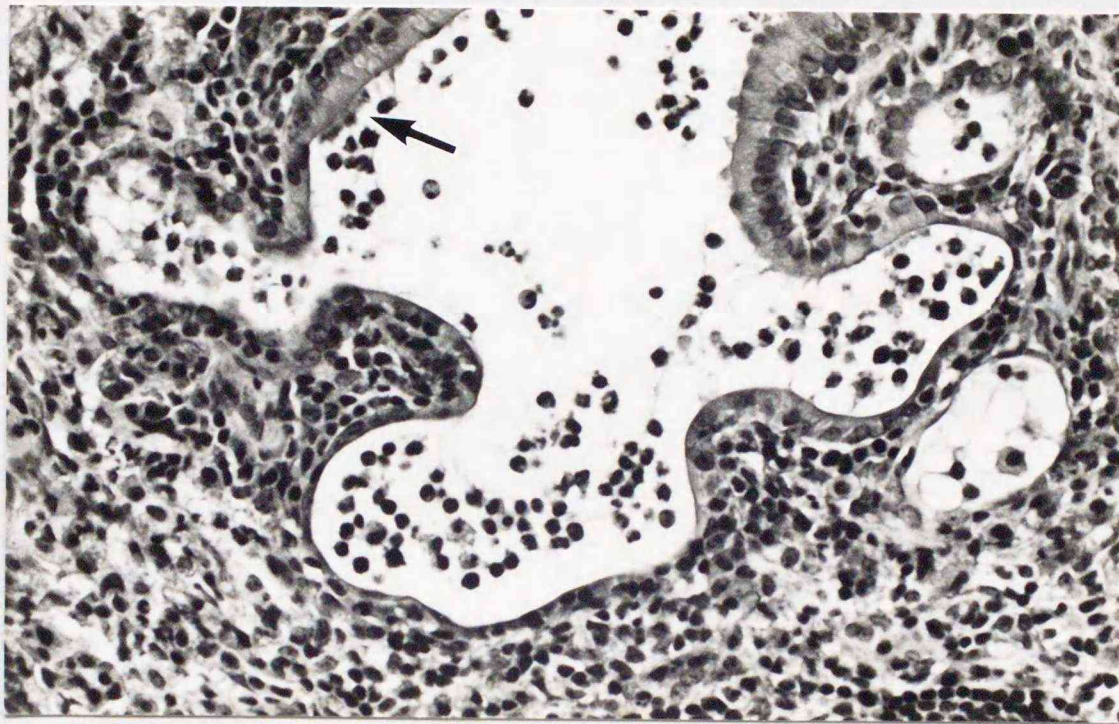


写真 11. 接種後56日目の細気管支および呼吸細気管支。気管支拡張が顕著で、腔内には、好中球と小円形細胞が滲出し、周囲組織には小円形細胞浸潤があり、細気管支の粘膜上皮の線毛部の一部にCAR bacillusが付着している（矢）。
HE. ×650.

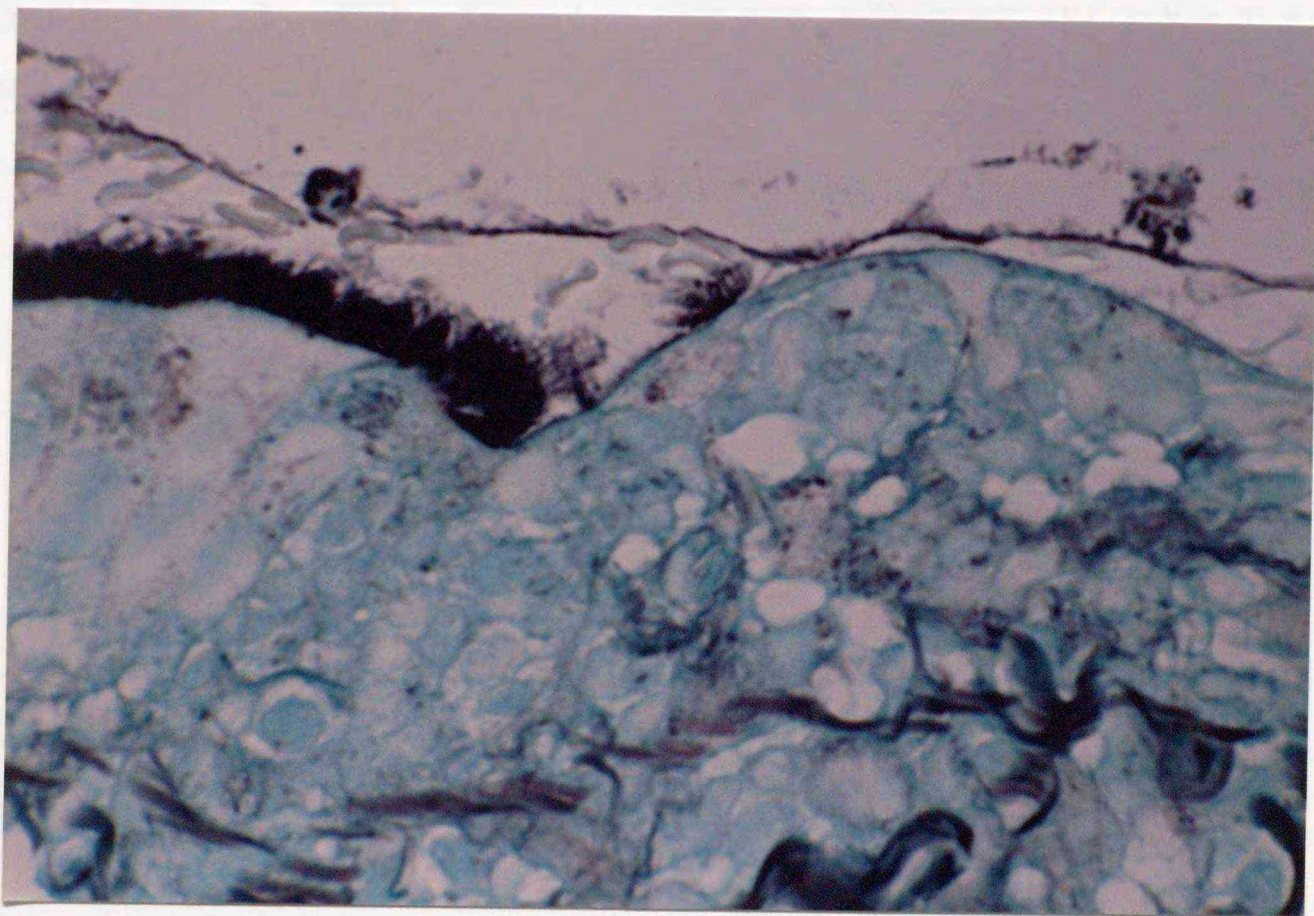


写真 12. 接種後21日目の気管支。粘膜上皮の線毛部に黒色に染色されるフィラメント状のCAR bacillusが多数付着している。粘膜上皮の右方では線毛が失われ、菌の付着も見られない。グロコット染色。×1,200。

たマウス、および菌を経鼻接種したラットから得られた材料および接種材料である肺乳剤などからは、好気性菌および *Mycoplasma* spp. は全く分離されなかった。また、すべての被検血清で、既知の病原体の抗体は検出されなかった。特に、*M. pulmonis* に対する抗体はELISAによっても陰性であった。

5. 考 察

本研究において、ラットにCAR bacillusを経鼻接種して作出された小円形細胞の浸潤を主体とする鼻炎と気管炎、気管支拡張を伴う肺内気管支周囲炎、化膿性気管支肺炎ならびに中耳炎などの呼吸器病変は、自然感染例の報告[6、8、10、24、25、41]および実験感染例[6、10、34、35]のそれに一致していた。なお、本菌は接種後14日目に初めて気道粘膜に出現し、同時に病変も発現した。Ganawayら[6]の観察では、感染母ラットから生まれた仔では、生後1～2週間で、また、発育鶏卵で増殖させた菌や感染ラットの気管支洗浄液を経鼻接種されたラットやマウスでは、接種後2週間で菌が上部気道に現れている。一方、Shojiら[34]は、ラットとマウス由来のCAR bacillusを発育鶏卵尿膜腔液で11代継代し、これをラットとマウスにそれぞれ $10^6 \sim 10^5$ 個の菌量で接種した場合、呼吸器病変は接種後4週目から出現したとしている。ラットのCAR bacillus感染症において、気道粘膜に本菌を伴った病変は、その発現が接種菌株や菌数および動物の日齢に左右されるとしても、少なくとも経鼻感染後約2～4週間を必要とするようである。なお、呼吸器系の中では、特に気管が本菌の好付着部位のようであった。

本症において、病変部の気道粘膜における長期間の小円形細胞集簇は、CAR bacillusの感染による抗原刺激によって、長期間にわたって局所免疫が持続していることを示唆する[6]。また、本菌に感染した気道粘膜上皮には、上皮細胞の増生[41]と杯細胞の増数が認められたが、この変化は、異物を排除するための粘液線毛クリアランス能の活性化像[2]と

みなされる。CAR bacillus感染において、化膿性肺炎は接種後3週目以降に出現し、次第に肺病変が重度となった例も観察された。ラットにおける本菌の自然感染例では、種々の程度の化膿性肺炎が *M. pulmonis*、Sendai virusおよびPVMなどとの混合感染例 [6、41]、ならびにCAR bacillusの単独感染例[6]などで報告され、さらにそれらから他の細菌（非溶血性グラム陽性球菌や腸内細菌など）も分離されている[6、41]。本実験では、CAR bacillusによる肺炎は細気管支より炎症反応が肺胞に及んだ結果と考えられた。

以上の呼吸器病変はCAR bacillusの存在を除けば、ラットのMRM [7、9、12、19、20、22、28]に良く類似している。CAR bacillus接種後早期より重度の小円形細胞浸潤の見られた粘膜上皮では、上皮細胞が菲薄化していた。本菌に自然感染していたラットの気管や気管支の粘膜上皮では、粘膜上皮の消失 [6]と潰瘍化[10、41]が報告されている。それらの部位にはリンパ様細胞の浸潤が顕著である[10]。粘膜上皮の崩壊はラットのMRMでも観察されているが[7、22、28]、これは浸潤したリンパ様細胞によるものとみなされている[28]。本実験で見られた上皮細胞の菲薄化は、浸潤した小円形細胞の圧排による二次的な変化と解された。

本実験では、鼓室炎が接種後28日目以降に観察され、その一部の粘膜上皮にはCAR bacillusの付着も認められた。ラットのCAR bacillus感染症において中耳[24、41]と耳管[24]の粘膜上皮の線毛部に、本菌が観察されている。したがって、本菌は感染後期に鼻腔の粘膜より耳管を經由して中耳に波及するものと考えられる。

本実験で菌の接種に用いた肺乳剤より *M. pulmonis*は分離されなかった。また、菌を接種されたラットは培養検査と ELISAによる血清学的検

査によって、 M. pulmonisを含め既知の呼吸器感染症の病原体の関与は否定されている。CAR bacillusは、MRMと極めて類似の疾患を惹起し、ラットとマウスの間で相互に感染する [6、10、34]呼吸器系病原体の中で最も重要なものである。しかし、本菌は通常の培地には増殖できないので、組織学的検査のワーチン・スターライ染色[18]やグロコット染色などの銀染色によって、気道粘膜で菌を証明することが、本菌感染症の診断に最も有効と考えられる。

第II章 CAR bacillus実験感染ラット、マウスと発育鶏卵
の呼吸器系組織の超微形態学的研究

1. 要 旨

Wistar/MsラットおよびBALB/cマウスにCAR bacillus-SMR株を経鼻接種し、菌の形態および菌と宿主細胞の相互関係を明らかにするため、それぞれ接種後56日目と接種後96日目まで定期的に動物を解剖し、以下の観察を行った。ラットでは、気管と肺内気管支の粘膜上皮を走査電顕および透過電顕で観察した。マウスでは、気管と肺をルテニウム赤染色固定後、それぞれの粘膜上皮を透過電顕で観察した。さらに、発育鶏卵の尿膜腔にCAR bacillus-SMR株を接種し、接種後7日目の尿膜を走査電顕で観察するとともに、ルテニウム赤染色固定後、透過電顕で観察した。

走査電顕で観察した菌接種ラットの気管粘膜には、接種後7日目で少数のフィラメント状のCAR bacillusが線毛間および一部の無線毛細胞の表面に出芽するように付着していた。接種後14日目の粘膜上皮の表面には、多数の菌体が局所的に群生し（苔状巣）、この苔状巣領域は接種後28日目まで次第に拡大した。苔状巣が認められなかった粘膜は無線毛細胞領域で、その表面には少数の菌が付着していた。接種後56日目では苔状巣領域はやや縮小し、苔状巣の認められなかった粘膜に細長い無線毛細胞が認められた。

走査電顕で観察した発育鶏卵の感染尿膜表面にも、CAR bacillusからなる種々の大きさの苔状巣が認められた。

透過電顕で観察した菌接種ラットの肺内気管支の粘膜上皮では、接種後14日目以降56日目まで線毛細胞と無線毛細胞の表面にCAR bacillusの付着が認められた。軽度に侵された肺内気管支粘膜では、クララ細胞は

減数し、杯細胞（粘液細胞）が増数していた。重度に侵された肺内気管支粘膜では、線毛細胞と杯細胞の増生が著しく、クララ細胞は観察できなかった。線毛細胞では大部分の線毛の消失、微絨毛の発達および基底小体の不規則な配列が認められた。

CAR bacillusは、検索したいずれの宿主細胞においても、その表面に対し直角方向に付着していた。菌の宿主細胞付着側では、先端から長さ約 $0.5\mu\text{m}$ は他の菌体部より細く（幅 $0.15\sim 0.18\mu\text{m}$ ）なり（狭部）、一部の菌では先端が膨大していた。菌体狭部と宿主細胞の細胞膜との間には 70nm 以下の間隙が存在し、そこには細繊維状構造物が両者を連結するように存在していた。この構造物はルテニウム赤染色標本で、より明瞭に観察され、接着に関与する粘液物質と考えられた。狭部以外の菌体の幅は $0.35\mu\text{m}$ 以下で、多くは $0.24\sim 0.28\mu\text{m}$ であった。菌の全長は $3.5\sim 9.0\mu\text{m}$ 以上で、一定ではなかった。菌の表層構造は、細胞壁、中間層および細胞膜の3層からなり、各々の幅は約 10 、 20 および 7nm であった。また、細胞壁と細胞膜は単位膜構造を示していた。ルテニウム赤染色標本により、菌体表面に厚さ約 $10\sim 20\text{nm}$ の電子密度の高い微細顆粒状の粘液層が観察できた。この粘液層は別の菌体の粘液層ならびに宿主細胞の細胞膜、微絨毛、および線毛と直接接着して観察され、粘液層は宿主細胞への付着に重要な役割を演じているものと思われた。発育鶏卵の尿膜表面に付着したCAR bacillusには、細胞質の二分された細胞分裂像が認められ、本菌の長さの不均一性はこれに由来しているものと考えられた。

2. 序 文

CAR bacillus感染に関する形態学的研究では、組織病変の記載[6、8、10、16、24、25、34、35、41、42] がほとんどで、電顕所見[6、8、10、16、24、25、41] は単に菌の存在を証明するための補助的な記述にとどまっている。本菌の形態に関しては、菌の大きさ、形および表層構造が報告されている。すなわち、CAR bacillusの幅は $0.12\sim 0.2\mu\text{m}$ [24]、 $0.155\sim 0.21\mu\text{m}$ [41]および $0.2\mu\text{m}$ [6、10、16、25]、ならびに長さは $4\sim 6\mu\text{m}$ [6、16]、 $5\sim 8\mu\text{m}$ [25]、 $6\sim 8\mu\text{m}$ [24]、 $7\mu\text{m}$ [10]および $8\mu\text{m}$ ($4\sim 12\mu\text{m}$ の範囲) [41]と報告され、一定していない。一方、CAR bacillusの形の特徴として、菌の一端が膨れ[16、24、25、41]、殊にその先端は 170nm の幅 [41]となっている。また、CAR bacillusは3層の外細胞壁を有し [8、16、25]、それぞれの厚さは15、8および9 nmであったと記述されている[41]。

第I章で述べたように、銀染色標本の組織学的観察[6、10、16、24、25、41] では、本菌は気道の粘膜上皮の表面にあたかも線毛のごとくに付着する。電顕的観察によれば、CAR bacillusは線毛の間に線毛と平行して付着し[6、8、10、16、24、25、41]、線毛が本菌の付着に対しなんらかの役割りを演じているように思われる。しかしGanawayら[6]は、発育鶏卵の尿膜腔中に本菌の存在を認め、無線毛細胞にも本菌が付着することを示唆した。

CAR bacillusは宿主細胞の表面に付着するので、走査電顕による観察が有用である。しかし、この観察は乏しく、わずかにMacKenzieら [24]

が気管支の線毛に本菌を観察しているのみである。なお彼ら[24]は、CAR bacillusは線毛に類似しているので、線毛よりやや太く、ノブ状の先端が観察された時のみ本菌と同定できたと記載している。

以上のように、CAR bacillusの基本的な形態は、一部は観察されているが、詳細は明らかでない。また、本菌の宿主細胞への付着形態については不明である。本研究では、CAR bacillusを接種したラットおよびマウスの気道粘膜、ならびに発育鶏卵の尿膜について超微形態学的に観察し、本菌の形態および本菌と宿主細胞の相互関係を明らかにする。

3. 材料と方法

1) 動物および発育鶏卵

動物は、第 I 章で用いた 5 週齢 SPF Wistar/Ms 雄ラット 21 例と、新たに 8 週齢 SPF BALB/c 雌マウス 12 例を使用した。これらの動物は、放医研で生産、飼育され、その生産コロニーは月 1 回定期的に実施した微生物学的検査で、以下の病原体が陰性であった。Salmonella spp., E. coli 0115a, c:K(B), P. pneumotropica, B. bronchiseptica, C. kutscheri および M. pulmonis (菌培養)、Sendai virus、mouse hepatitis virus、B. piliformis および M. pulmonis (CF 反応)、B. bronchiseptica および C. kutscheri (凝集反応) ならびに内・外部寄生虫 (肉眼、鏡検)。

実験期間中、動物は温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ と 12 時間明・暗サイクルに保たれた感染動物飼育装置内で飼育された。動物は、オートクレーブ滅菌したケージに入れ、市販固形飼料 (MB-1: 船橋農場、千葉) および高塩素 (10-15ppm) 飲水を自由に与えて飼育した。

発育鶏卵は市販の受精卵 (船橋農場、千葉) を購入し、 37°C で 7 日間孵卵した後実験に使用した。

2) 菌接種および材料採取

第 I 章で述べたラット由来の CAR bacillus-SMR 株感染マウスの肺乳剤から調整された、 8.5×10^7 / ml 個の菌を含む菌液を接種材料とした。

ラットおよびマウスには、菌液をそれぞれ 1 匹当たり 0.1ml および $25\mu\text{l}$ 、

エーテル軽麻酔下で経鼻接種した。非感染対照動物にはマウス正常肺乳剤を同様の方法で経鼻接種した。菌接種ラットは接種後4、7、14、21、28および56日目に、正常対照ラットは接種後56日目に解剖した。菌接種マウスは接種後28、56および98日目に、正常対照マウスは接種後56日目に解剖した。動物は各解剖日に3例ずつ、クロロフォルムで深麻酔後、全採血して採材した。

発育鶏卵（7日卵）には、尿膜腔内接種法によって上記の菌液 0.2ml を接種した。接種後37℃で7日間孵卵後、尿膜腔液を採取した。さらに、この尿膜腔液 0.2mlを発育鶏卵に同様の方法で接種し、CAR bacillusを継代した。菌継代12代目の発育鶏卵より、接種後7日目の尿膜を採取し、検索した。正常対照尿膜は菌未接種の発育鶏卵から得た。採取した尿膜からは組織標本を作製し、これにグロコット染色を行った。その結果、菌継代12代目の尿膜表面に多数のCAR bacillusが付着していた（写真13）。

各解剖日の1例について、前述の病原体に対する微生物学的検査を実施した。その結果、それらは既知の呼吸器系病原体の感染はみられなかった。さらに、*M. pulmonis*に対する抗体は、ELISAによっても検出できなかった。菌接種液である肺乳剤と発育鶏卵の尿膜腔液について、PPL0寒天培地と10%馬血液寒天培地で培養を試みたが、*Mycoplasma* spp. と好気性菌は分離できなかった。

3) 走査電顕標本

菌接種ラットの気管および菌継代12代目の発育鶏卵の尿膜を材料とし

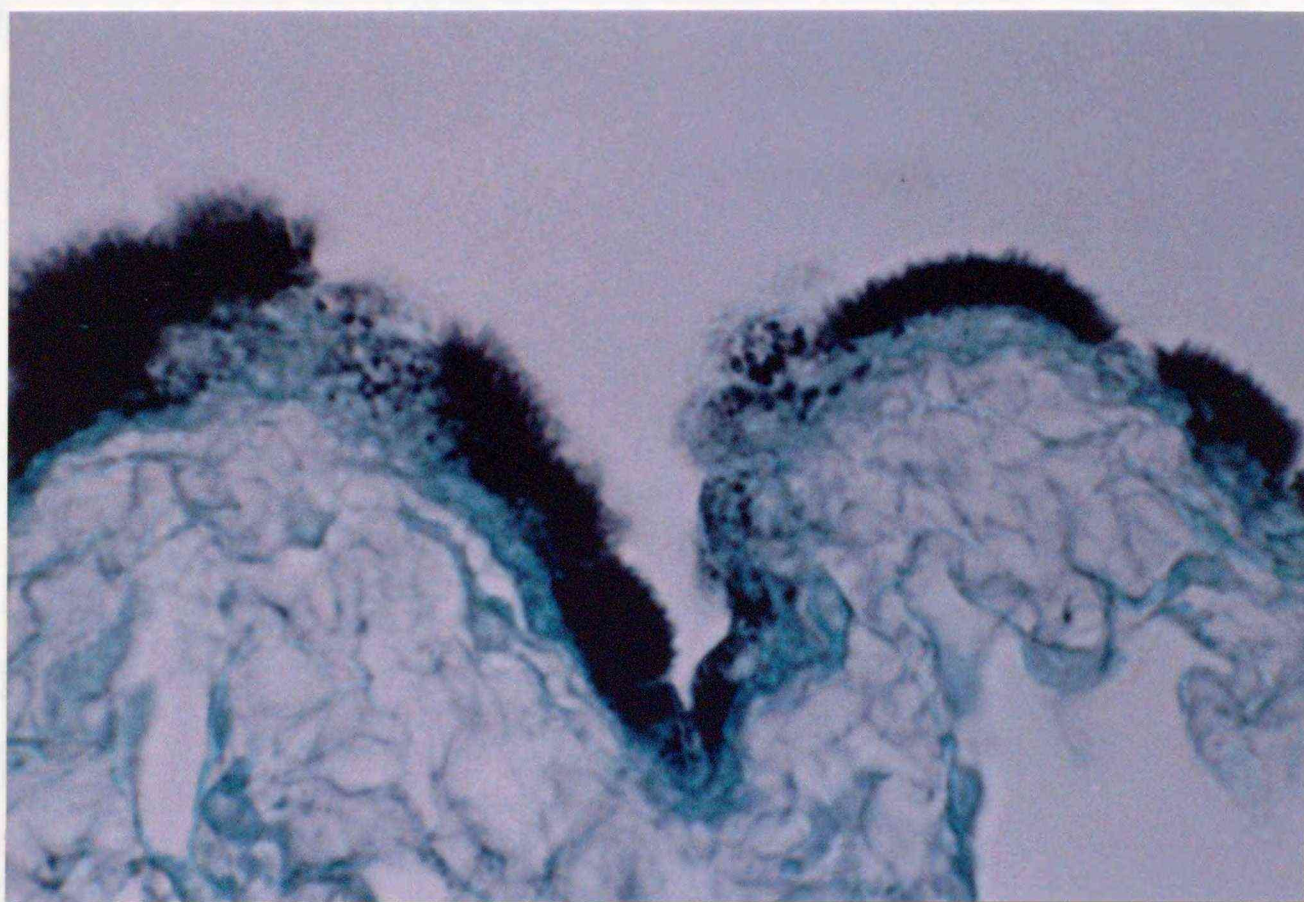


写真 13. CAR bacillus-SMR株を7日発育鶏卵の尿膜腔内に接種後7日目の尿膜。尿膜表面に黒色に染色される多数のCAR bacillusが付着している。グロコット染色。×1,200。

た。気管は摘出後、前半を縦断した。尿膜は摘出後4 mm角に細断した。両組織片は3.5%グルタルアルデヒド-0.1Mカコジル酸ナトリウム (pH 7.4) で4℃、2時間固定し、1%四酸化オスミウム溶液で4℃、1時間の後固定を行った。試料は脱水後、液体炭酸ガスにより臨界点乾燥を行い、イオン・スパッタリング法で金を厚さ150Åに蒸着し、JSM-840A (日本電子) で観察した。

4) 透過電顕標本

菌接種ラットの肺、菌接種マウスの気管と肺、ならびに菌継代12代目の発育鶏卵の尿膜を材料とした。剖検後ラットの肺は1~4 mm³ の大きさに細断し、走査電顕標本と同様に後固定までを行った。その後、組織片は脱水後エポン樹脂により包埋した。超薄切片は、酢酸ウラニル・クエン酸鉛で二重染色を行いJEM-100S (日本電子) で観察した。

菌接種マウスの気管と肺ならびに発育鶏卵尿膜は、Springer and Rothの方法[36]によってルテニウム赤染色固定を行った。固定は3.6%グルタルアルデヒド溶液、0.2Mカコジル酸ナトリウム (pH 6.5) 溶液および0.15%ルテニウム赤水溶液をそれぞれ等量に混合した溶液で行った。ルテニウム赤非染色固定は、0.15%ルテニウム赤水溶液の代わりに等量の0.2Mカコジル酸ナトリウム液を加えた溶液で行った。後固定は、4%四酸化オスミウム溶液、0.2Mカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) および0.15%ルテニウム赤水溶液の等量混合液で行った。1mm³ の大きさに細断した組織片は、それぞれの前固定液で4℃、1時間固定し、カコジル酸ナトリウム緩衝液で3回洗浄後、後固定を室温で3時間行った。そ

の後の処理は、上記ラットの肺の透過電顕試料作製と同様に行った。

4. 成績

1) ラット気管粘膜上皮の走査電顕所見

菌接種後7日目に解剖した3例中1例の気管粘膜に、フィラメント状のCAR bacillusが少数線毛上皮細胞の線毛間に観察された。菌体の形態は線毛に類似していたが、長さは線毛よりやや長かった。菌は一端を粘膜上皮に付着させ、これより管腔側に突出して観察された。無線毛上皮細胞の表面にも、長さ不定のCAR bacillusが少数集合し、粘膜上皮より芽生えるように観察された。

接種後14日目に解剖された3例中2例と、接種後21日目から56日目に解剖された9例すべての気管の粘膜上皮の表面に、ほぼ同様の所見が観察された。すなわち、気管粘膜全表面の3/5~4/5は、数個の上皮細胞を覆う広さ(写真15)から、粘膜の広範な部分を覆う広さ(写真17)でCAR bacillusの群生した苔状巣によって占められていた。正常な粘膜で観察された線毛の波状配列像(写真14)は不明瞭となるため、菌体と線毛の識別は困難であった。苔状巣以外の粘膜表面では、正常の波状配列を示す線毛はほとんど観察されなかったため、線毛細胞の存在は指摘できなかった。無線毛細胞は腫大し、一部の表面は平滑となっていた(写真18)。無線毛細胞の表面には時折、CAR bacillusが単独または集簇して、粘膜上皮より芽生えるように観察された(写真15、16、18)。接種後56日目では、観察部位によって粘膜表面が細長い無線毛細胞によって構成される領域が存在し(写真17)、表面の一部に長さが不定のCAR bacillusが付着していた。

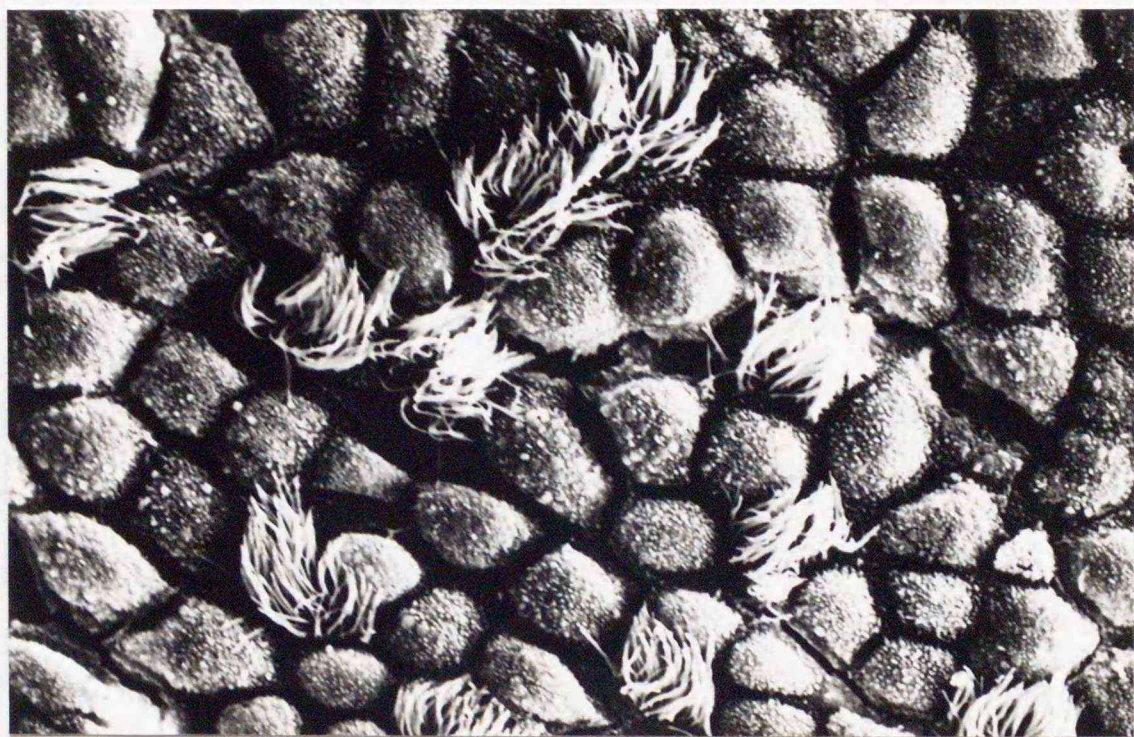


写真 14. 正常対照ラットの気管粘膜上皮表面。線毛細胞と無線毛細胞が認められる。線毛は波状を示す。×1,400.

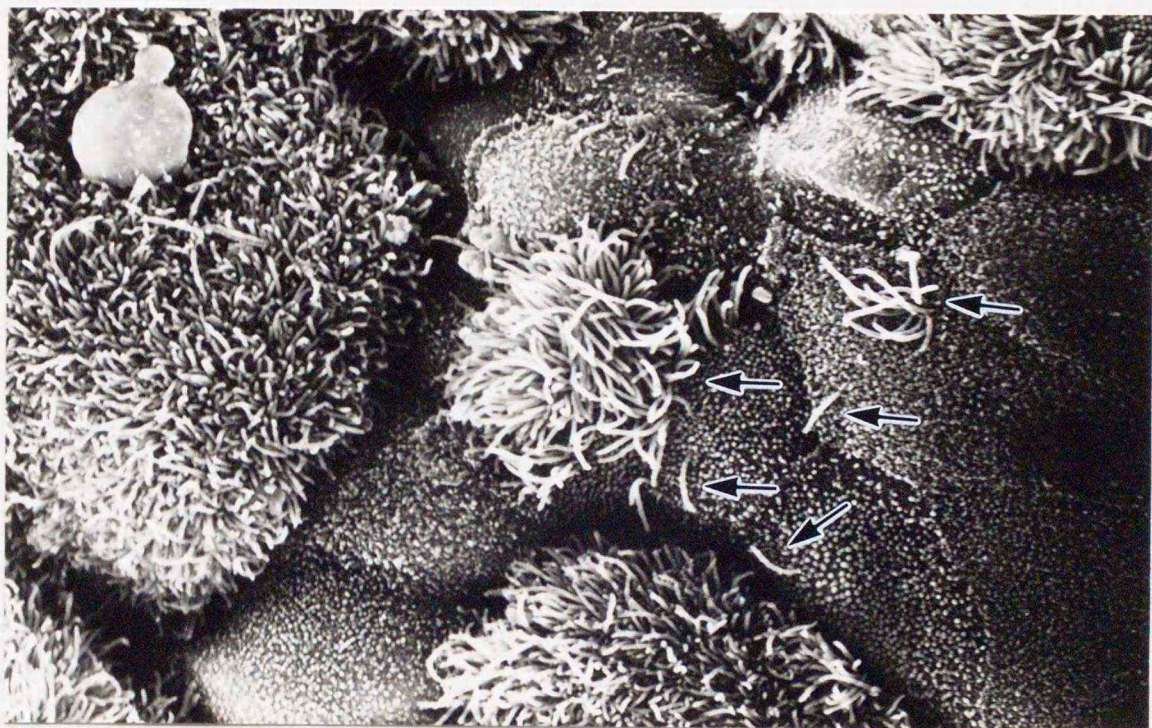


写真 15. 接種後14日目のラットの気管粘膜上皮表面。写真の左方に CAR bacillusが付着した苔状巣が認められる（CAR bacillus と線毛との識別は困難である）。無線毛細胞は腫大し、表面にフィラメント状のCAR bacillusが単独で、または集簇して認められる（矢）（右半）。×2,100。

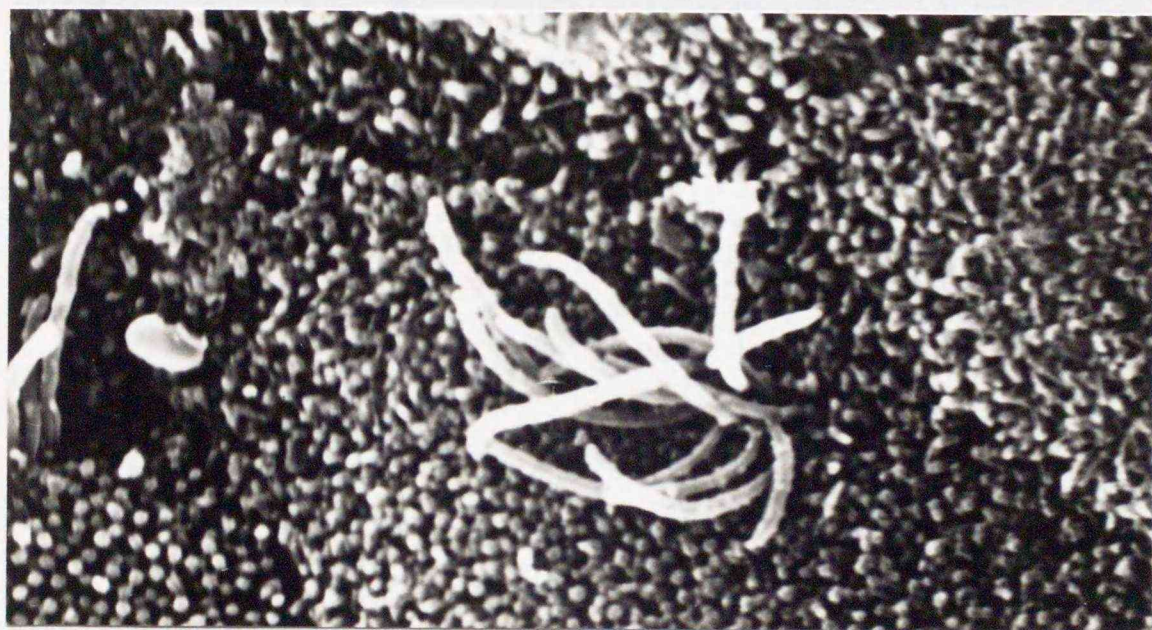


写真 16. 写真15の拡大。少数のフィラメント状のCAR bacillusが気管粘膜上皮の無線毛細胞から芽生えているように見える。
×7,800.



写真 17. 接種後56日目のラットの気管粘膜上皮表面。写真の右方の線毛上皮にCAR bacillusが群生した苔状巣があり、左方の粘膜は横長の無線毛細胞よりなる。×680。



写真 18. 接種後56日目のラットの気管粘膜上皮表面。無線毛細胞は腫大し、横長に見え、表面にCAR bacillusが集簇している（矢）。一部の細胞表面は平滑となっている。×1,900.

2) 発育鶏卵尿膜の走査電顕所見

菌を接種した発育鶏卵の尿膜表面には、ラットの気管粘膜におけると同様、多数のフィラメント状のCAR bacillusの付着が認められた。本菌の多くは一端を尿膜表面に接触させ、線毛様に尿膜腔側に突出していた。観察部位によって、菌体は数個単位で付着しているものから、菌体が多数群生して付着し、種々の大きさの苔状巣として観察されるものまで様々であった(写真19)。一部の菌体の尿膜表面への付着端は、マッチの頭のように膨れていた(写真20)。

3) ラット肺内気管支粘膜上皮の透過電顕所見

接種後14日目以降56日目までの間で、気管支および細気管支の粘膜上皮の上皮細胞の表面にCAR bacillusの付着が観察された。それらの粘膜上皮細胞の変化は、その部位の気管支周囲炎および細気管支周囲炎の程度によって一定の傾向が観察された。

接種後14日目と21日目に見られた気管支周囲炎の軽度なラットにおける気管支の粘膜では、線毛細胞の表面にCAR bacillusが観察された。菌体は線毛と平行して線毛間に付着していたが、菌が多数付着した線毛細胞では、線毛はほとんど消失し、自由面近くの細胞質に基底小体が不規則に配列していた(写真21)。菌体が付着した線毛細胞では、微絨毛と微小ヒダが伸長、発達し、一部は網の目状(写真22)を呈していた。病変部の気管支粘膜では上皮細胞層が肥厚し、そこには細胞内小器官を豊富に有する線毛細胞、ならびに発達した粗面小胞体と分泌顆粒を有する杯細胞の増生が認められた。なお、この粘膜上皮ではクララ細胞は減数

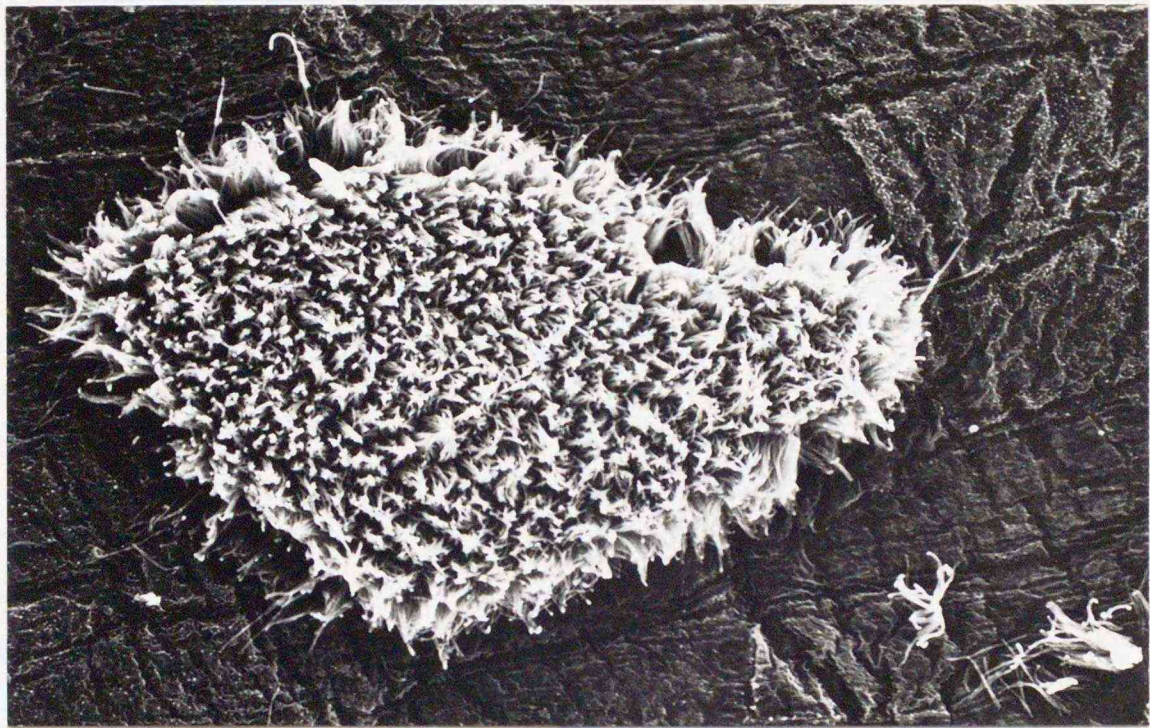


写真 19. 発育鶏卵尿膜表面におけるCAR bacillusの群生した苔状巣。
×1,500.

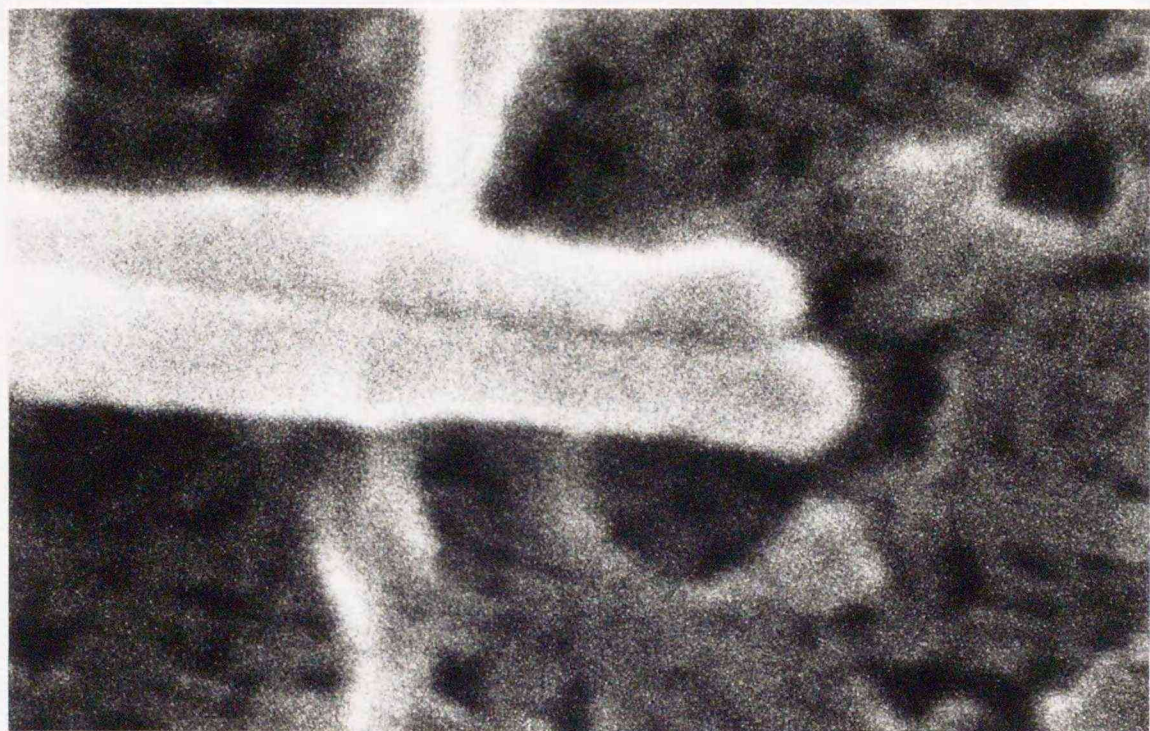


写真 20. 発育鶏卵尿膜表面のCAR bacillus. 菌の尿膜表面接着端は軽度に膨大している。×80,000.

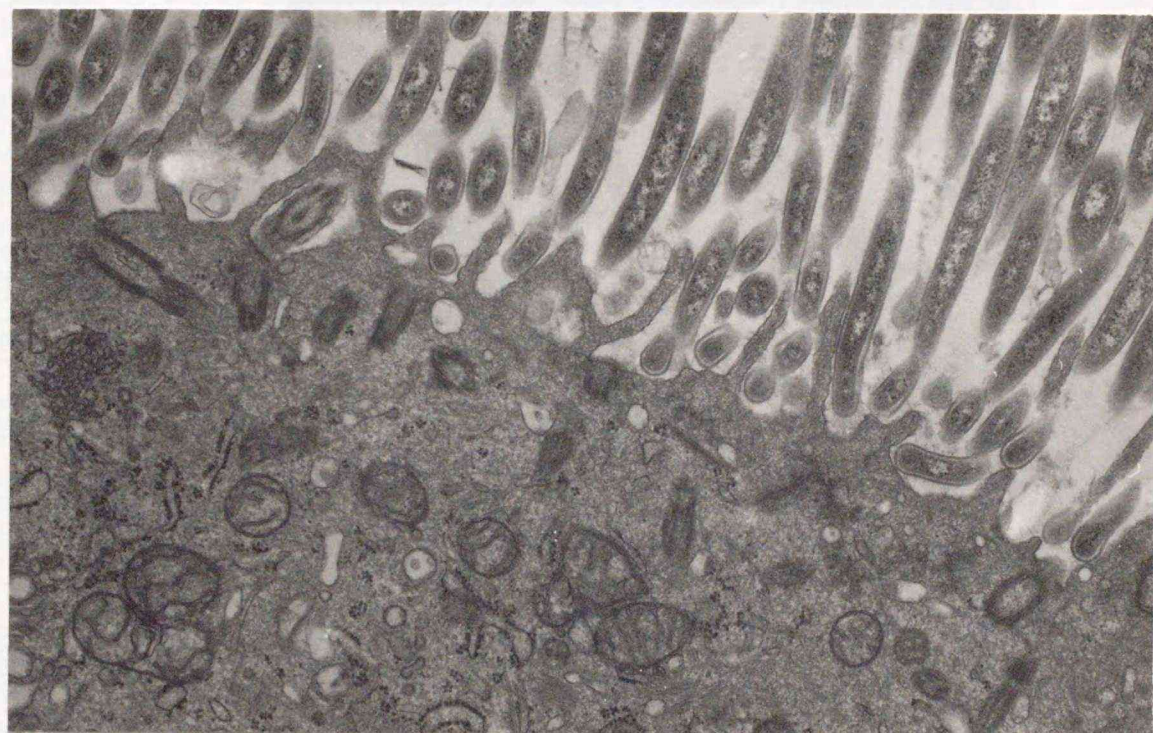


写真 21. 接種後21日目のラットの気管支粘膜上皮。多数のCAR bacillusが線毛細胞に付着している。線毛はほとんど消失し、微絨毛が軽度に発達している。基底小体は細胞質の自由面近くに不規則に配列している。なお、本菌の宿主細胞付着端は他の菌体部より細くなっている（狭部）。×16,300。



写真 22. 接種後14日目のラット気管支粘膜上皮。線毛細胞表面に多数のCAR bacillusが付着している。線毛はほとんど消失し、伸長した微小ヒダが網目状をなしている（矢）。基底小体が細胞の自由面近くに不規則に配列している。×24,400.

していた。

接種後14日目以降56日目までに見られた、気管支周囲炎が顕著な近位の気管支の粘膜上皮では、円形細胞浸潤が粘膜上皮層に達し、上皮細胞の多くは菲薄化していた。また、CAR bacillusは一部の菲薄化した上皮細胞の表面にも多数見られた。遠位の気管支から細気管支までの間の粘膜上皮では、上皮細胞の増生により上皮細胞層が著しく肥厚していた。これらの気管支および細気管支では、豊富な細胞内小器官を有する線毛細胞と発達した粗面小胞体を有する杯細胞の増生が著明で、クララ細胞を観察できなかった。さらに本菌は、これら線毛細胞の表面のみならず杯細胞の表面にも多数付着していた（写真23）。

接種後56日目に観察された気管支拡張の著しい症例では、呼吸細気管支の上皮細胞表面にも多数のCAR bacillusが付着していた（写真24）。この上皮細胞は腫大し、細胞質に豊富な細胞内小器官を有していたが、扁平な形態は保たれていた。

本菌の付着が認められた肺内気管支の腔内には、菌が少数ながら遊離して認められ、滲出した好中球やマクロファージのライソゾーム中には、まれながら消化された菌体の一部が認められた（写真25）。

4) CAR bacillusの超微形態および宿主細胞への付着形態

本菌がラットやマウスの気道の粘膜上皮および発育鶏卵の尿膜に付着する場合、その多くは、菌体の一端を宿主細胞に向け、宿主細胞の表面に対し直角方向に付着していた。菌の宿主細胞付着側では、菌の先端より中心方向約 $0.5\mu\text{m}$ は、その他の菌体部より細くなっていた（狭部）

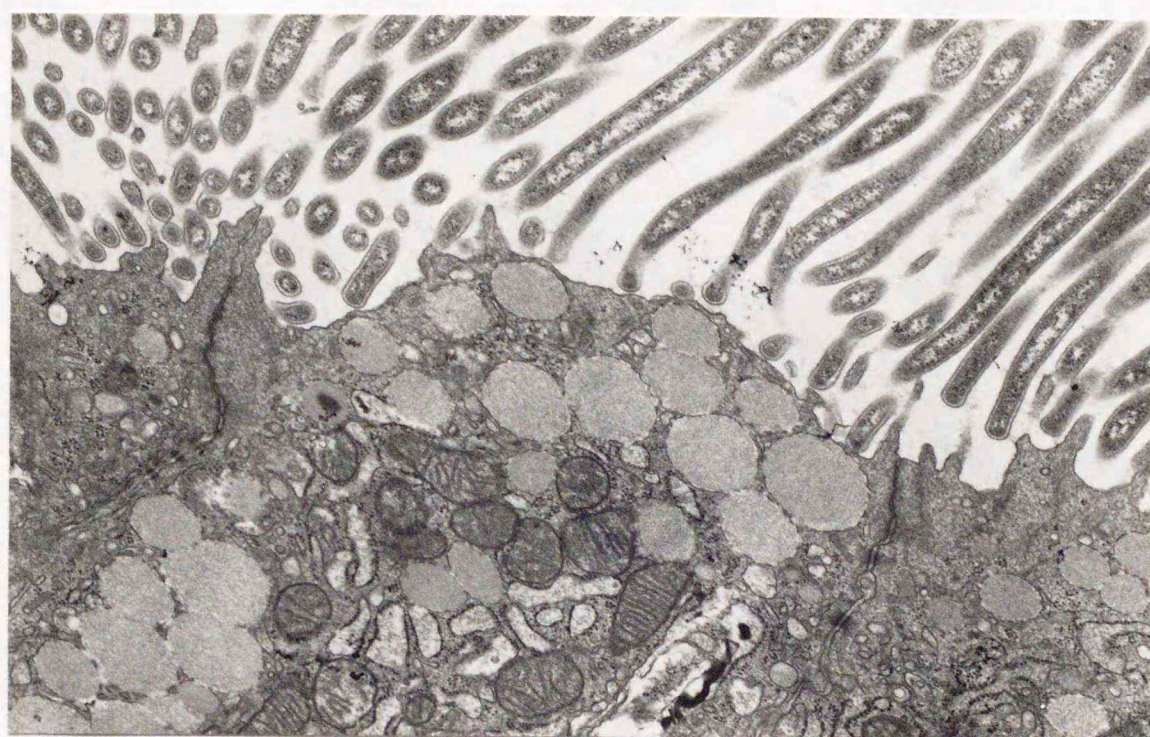


写真 23. 接種後21日目のラットの細気管支粘膜上皮。杯細胞に多数のCAR bacillusが付着している。菌の宿主細胞付着端は他の菌体部より細くなっている（狭部）。×13,000.

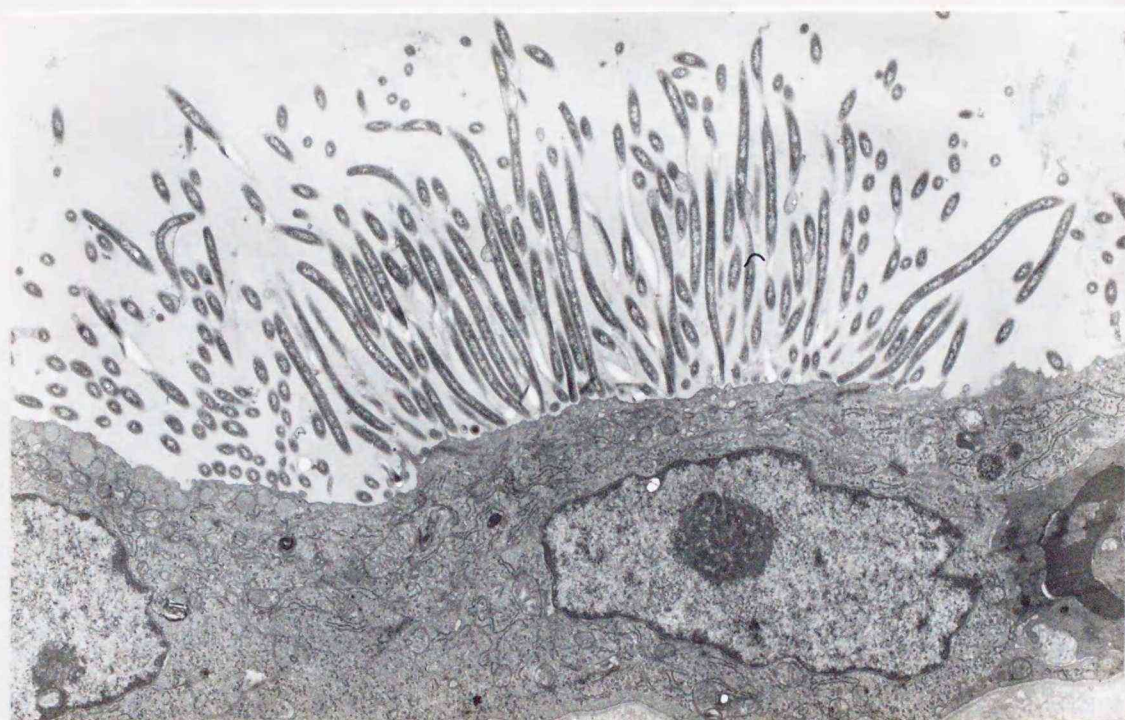


写真 24. 接種後56日目のラットの呼吸細気管支。粘膜上皮表面に多数のCAR bacillusが付着している。×4,900.

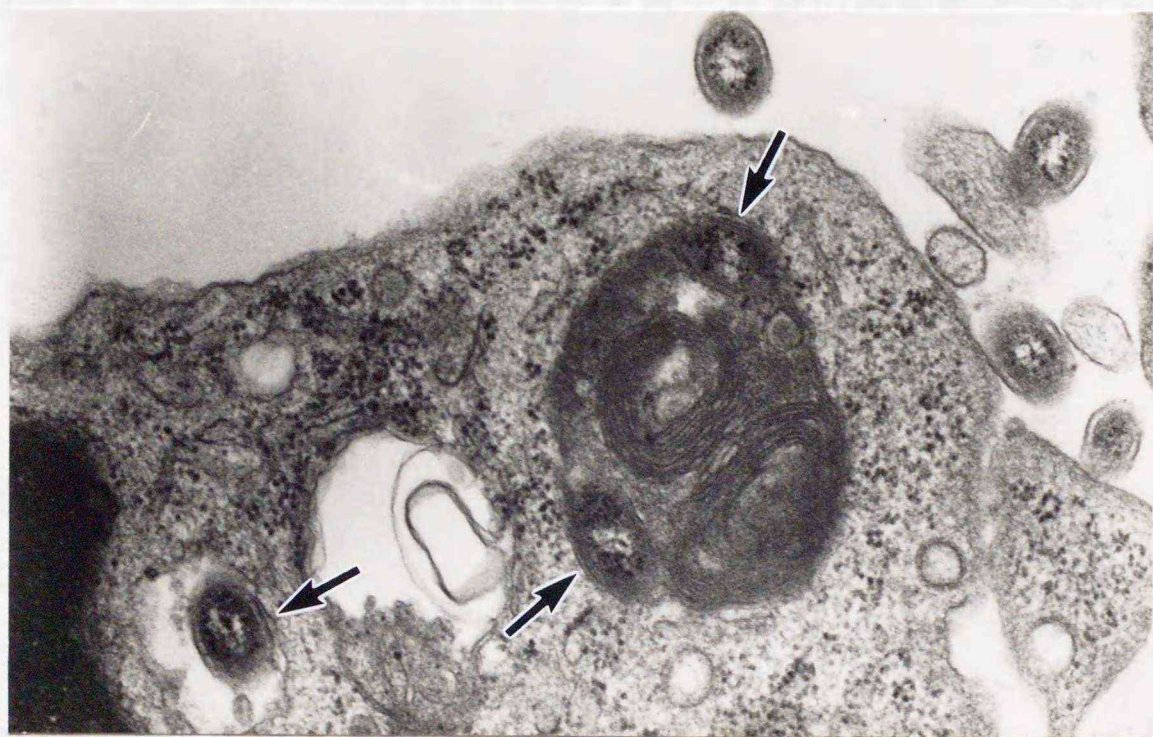


写真 25. 接種後56日目のラット細気管支腔内のマクロファージ。ライソゾームに消化された菌の一部（矢）が認められる。
×32,500.

(写真21、23、27)。すなわち、狭部の幅は $0.15\sim 0.18\mu\text{m}$ 、その他の体部の幅は $0.35\mu\text{m}$ 以下（多くは $0.24\sim 0.28\mu\text{m}$ ）であった。まれに狭部先端付近の幅が狭くなり、先端が膨大している菌も見られた（写真20）。CAR bacillusの細胞壁と宿主細胞の細胞膜や微絨毛とは直接接触している場合もあったが、多くは両者の間に 70nm 以下の間隙が存在し、そこには微細な線維状構造物が菌体の細胞壁と宿主細胞の細胞膜とを結ぶようにして存在していた（写真26）。ルテニウム赤染色固定標本では、前述の菌体狭部周囲の細線維状構造物が一層明瞭に観察された（写真27）。

菌体の長さは様々で、 $3.5\mu\text{m}$ から長いものでは $9\mu\text{m}$ 以上あり、同一切片上では全長を観察できない場合が多かった。菌の細胞質は電子密度の高いマトリクスで構成され、これは特に菌体の周辺部で明らかで、菌体の中央部付近にはリボゾームを含む細線維からなる核様物質が存在していた（写真28）。菌体は3層の表層構造で被覆されていた（写真29）。すなわち、最外層は厚さ約 10nm の細胞壁、次は厚さ約 20nm の電子密度の低い中間層、最内層は厚さ約 7nm の細胞膜で、さらに細胞壁と細胞膜は単位膜構造を示していた。ルテニウム赤染色固定標本では、菌体表面に粘液層が見られ、これは厚さ約 $10\sim 20\text{nm}$ の、電子密度の高い微細顆粒状の集合層として観察された（写真27、30）。菌は粘液層を、別の菌体の粘液層ならびに宿主細胞の細胞膜、微絨毛および線毛と接着させて集簇していた（写真30）。

発育鶏卵の尿膜におけるCAR bacillusでは、細胞質が細胞膜によって二分されている像も見られた（写真31）。

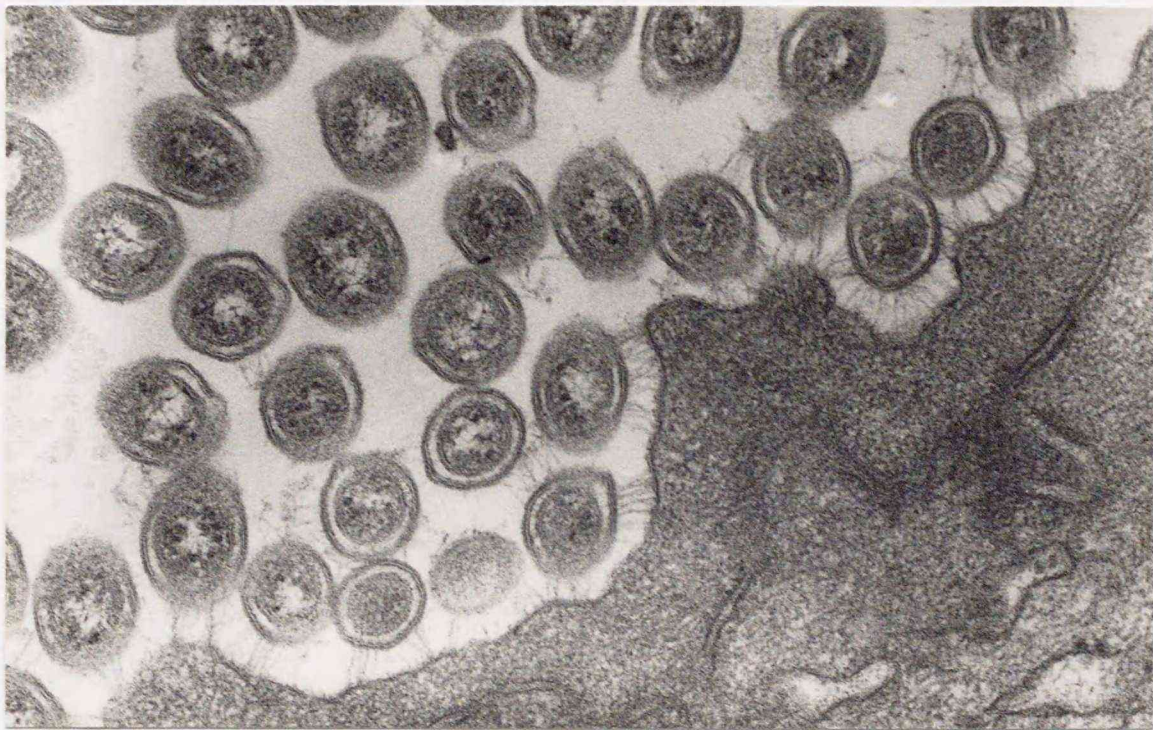


写真 26. 接種後21日目のラット気管支粘膜上皮。CAR bacillusと宿主細胞の細胞膜との間に細線維状構造物が存在する。
×48,800.



写真 27. 接種後98日目のマウス気管粘膜上皮。ルテニウム赤染色固定標本では、菌体狭部周囲に細線維状構造物が明瞭に認められる。菌体表面は厚さ約10nmの電子密度の高い層（粘液層）として観察される。ルテニウム赤染色固定。
×81,300.



写真 28. 接種後14日目のラット気管支腔内のCAR bacillus. 菌体の太さは種々である（細い矢、太い矢、矢頭）。細胞質には電子密度の高いマトリクス、菌体中央部にはリボゾームを含む細線維状の核様物質がある。×40,600.

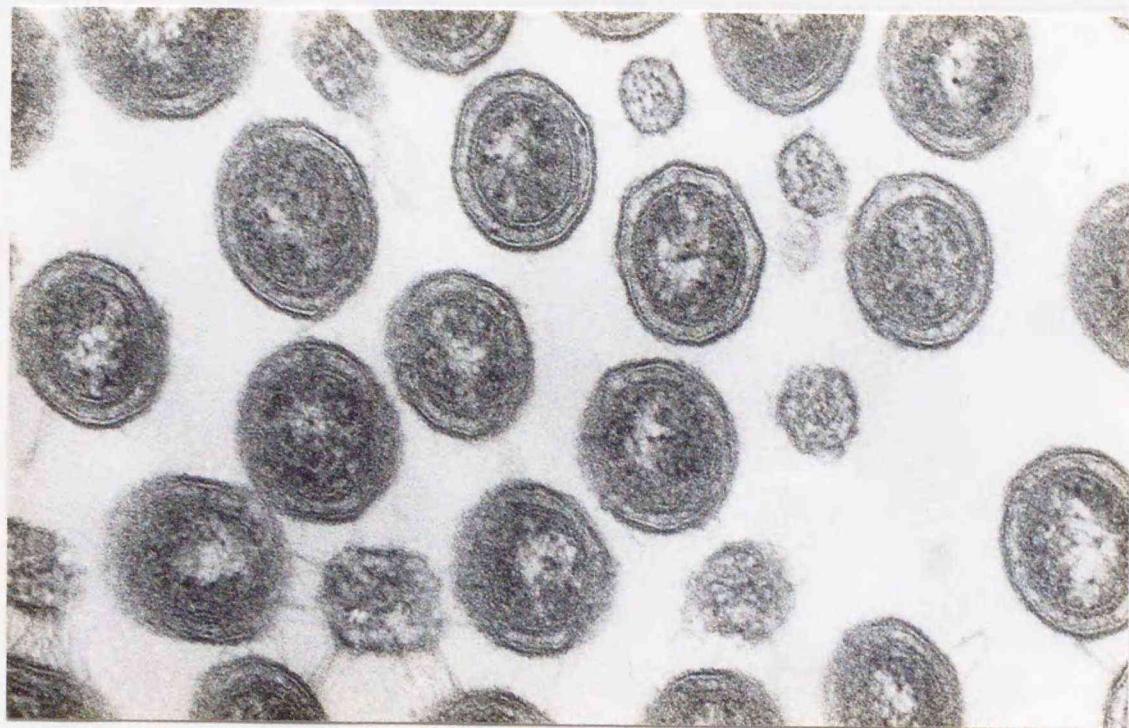


写真 29. 接種後14日目のラット気管支粘膜上皮のCAR bacillus横断面。菌の表層構造は最外層より細胞壁、電子密度の低い中間層および細胞膜の3層構造からなり、細胞壁と細胞膜は単位膜構造を示す。×81,300。

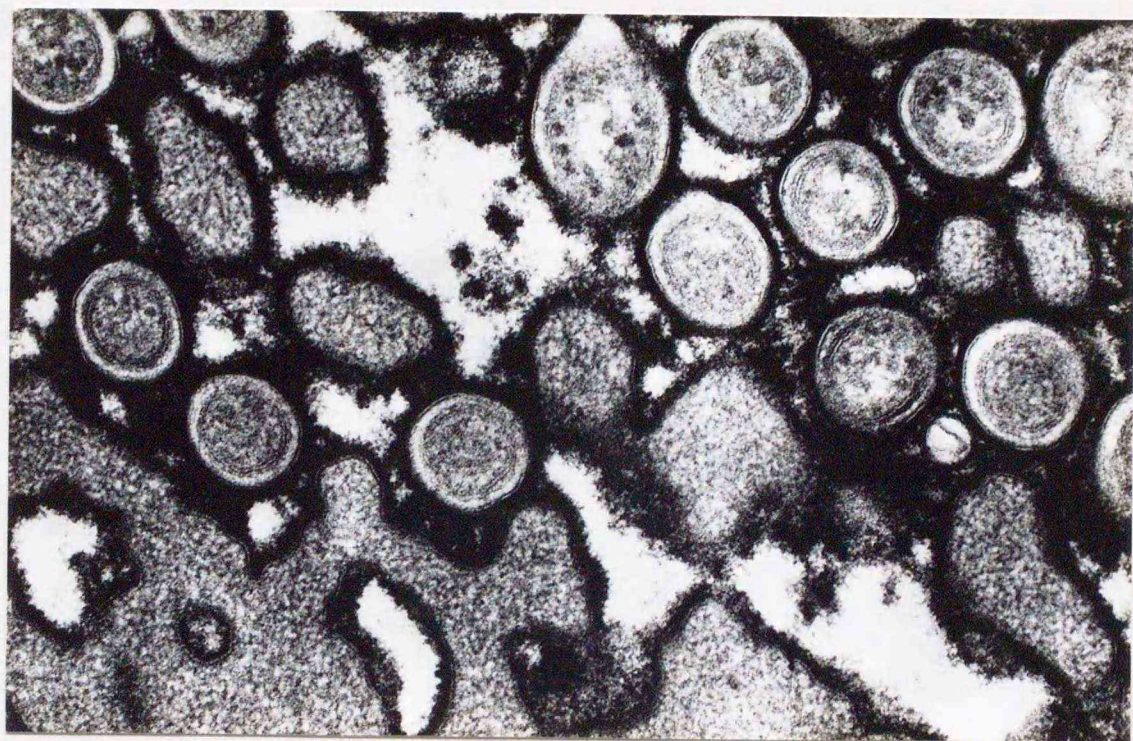


写真 30. 接種後98日目のマウス気管粘膜。CAR bacillusは粘液層（厚さ約20nm）を別の菌体の粘液層ならびに気管粘膜上皮細胞の細胞膜や微絨毛と接着させて集簇している。ルテニウム赤染色固定。×65,000。

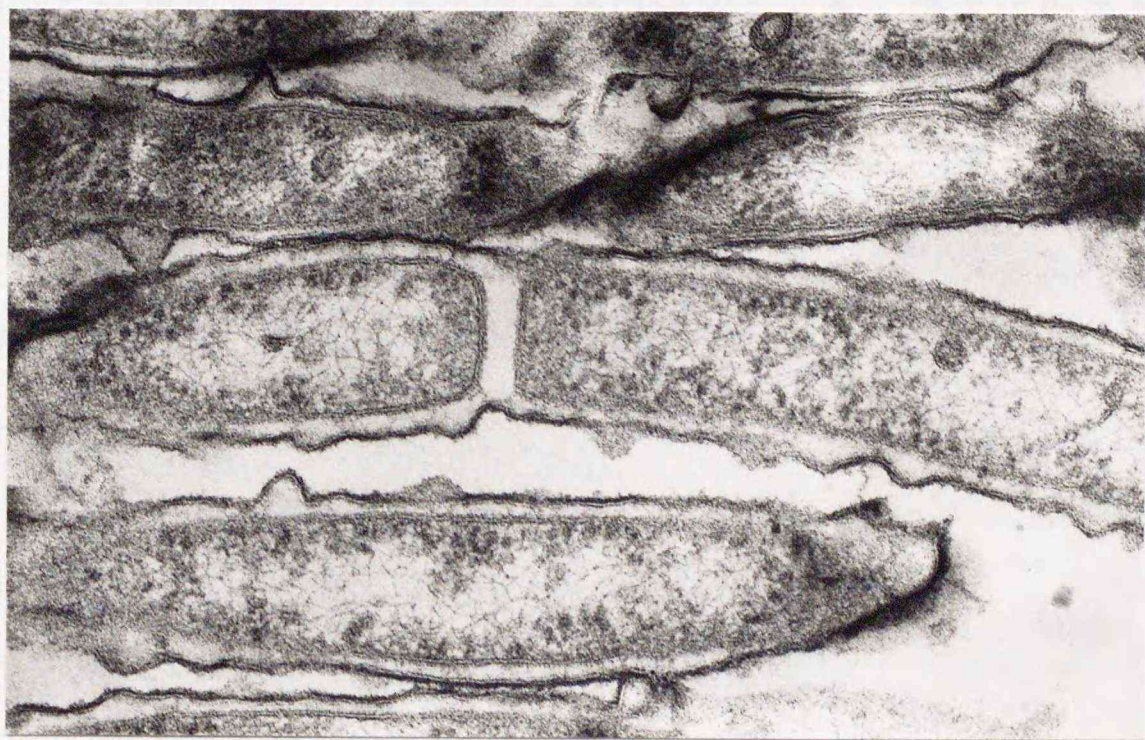


写真 31. 発育鶏卵尿膜のCAR bacillus. 細胞質は二分され、それぞれは細胞膜で囲まれている。ルテニウム赤染色固定。
×81,300.

5. 考 察

CAR bacillusは、宿主細胞の表面に対し直角方向に付着するフィラメント状の表面寄生体である。菌体の宿主細胞への付着端側約 $0.5\mu\text{m}$ は細い狭部として認められ、その先端は鈍円状であった。過去に報告された電顕写真を見ると、CAR bacillusの粘膜への付着端は他の菌体部より明らかに細く [6, 16, 24, 41]、その幅は155~170nmで[41]、今回の計測値150~180nmとほぼ等しかった。また、本研究で観察されたCAR bacillusの宿主細胞付着端の膨大部も、過去の報告例の写真にしばしば所見される[6, 16, 24, 25, 41]。

CAR bacillus付着端と宿主細胞の表面との間には細繊維状構造物が両者を結ぶように存在していた。類似の構造物は自然感染ウサギの気道粘膜上皮においても観察されている[16]。この細繊維状構造物はその形態からみて、菌の宿主細胞への接着に重要な役割を果していることが推察される。この構造物はルテニウム赤によって明瞭に染色され、それがマイコプラズマ [38-40]におけると同様に、酸性ムコ多糖類を含む粘液物質[23]からなる菌の粘液層であることを示唆する。粘液層の量が毒力の強さの主要因子であることが *Bacteroides fragilis*で明らかにされている[14, 29]。また、粘液層が菌の宿主表面への接着に機能することがグラム陰性菌[4]やマイコプラズマ[38-40]で明らかにされ、さらに、その接着が毒力の発現に直接関与することがマイコプラズマ [38-40]で知られている。Ganawayら[6]は位相差顕微鏡で、CAR bacillusが一端をスライドグラスに密着させ、自由端を屈折させて滑走運動を行う像を観察し

た。著者の観察においても、細線維状構造物が菌の狭部端にのみ認められたことは、これが菌特有の接着構造である可能性を強く示唆する。さらに、菌体の粘液層による菌体同士の接着像、ならびに宿主細胞の線毛や微絨毛との接着像は、粘液層が菌の群生に何らかの役割を果たしているものと推察される。

今回の観察において、CAR bacillusは気道の線毛細胞および無線毛細胞双方に付着していた。そして付着菌数が増加するにつれて線毛は減少、消失していた。これに伴い、微絨毛はむしろ発達していた。これらの相互関係は明らかにし得なかったが、線毛の消失した細胞には基底小体が観察され、線毛の再生の可能性 [1, 17] を示唆していた。

著者は第 I 章において、感染した気道の粘膜上皮の上皮細胞の増生は、障害物を排出するための粘液・線毛クリアランス能の活性化による変化 [2] であることを示唆した。本章の電顕的観察において、細胞内小器官を豊富に有する線毛細胞や杯細胞の増生が認められ、それらの細胞の機能亢進が示唆された。正常なラットやマウスでは肺内気管支のほぼ全域にクララ細胞が存在していたが [11, 31]、本研究では、菌に侵された肺内気管支の粘膜上皮では、クララ細胞は減数と消失を示し、一方杯細胞は増数を示した。クララ細胞は粘液細胞化生を示すことが知られており [31]、今回観察された無線毛細胞（杯細胞、クララ細胞）の増減は、粘液・線毛クリアランス能の活性化と同一の範疇に属する変化とみなされる。

CAR bacillusは電顕的に細胞壁、電子密度の低い中間層および細胞膜の表層構造で被覆されていた。一般にグラム陰性桿菌は、細胞壁、ペリプラズマ間隙および細胞膜の 3 層構造を示すことが知られている [3, 4]。

発育鶏卵尿膜に付着したCAR bacillusにおいて、細胞質が細胞膜で覆われ、完全に二分割されている像がしばしば観察されたが、細胞隔壁は認められなかった。したがって本菌は、細胞質が先に長軸方向に二分裂して増殖するものと推察された。また、本菌は長さが4～12 μ m[6、10、16、24、25、41]と一定でないが、これは菌の分裂方式に起因しているのかもしれない。

1. 要 旨

CAR bacillus感染症の血清学的診断を行うため、IFA法による抗CAR bacillus抗体の測定法を確立し、各種の血清について抗体検出を試みた。抗原は、CAR bacillus-SMR株を経鼻接種したマウス気管、および菌を増殖させた発育鶏卵尿膜腔液より作製した。マウス気管は冷アルコールで固定した後、パラフィンに包埋してから切片とし、これを4℃で保存した。CAR bacillus-SMR株継代第11代目の発育鶏卵尿膜腔液をホール・スライドグラスに5 μ lずつ滴下し、風乾後アセトンで固定し、-20℃で保存した。

CAR bacillus自然感染ラットコロニーより得られた13例のラットの検索では、9例に抗体が検出され、またその抗体価は1:10~1:80であった。病理組織学的検索によって、CAR bacillusは抗体陽性の9例のラットでのみに認められ、血清学的診断と組織学的診断とは一致した。しかし、Sendai virusとM. pulmonis 陽性ラット血清ならびに正常対照ラット血清に対する陽性反応は認められなかった。また、気管抗原プレパレートを用いて抗体測定を行っても尿膜腔液抗原プレパレートを用いて抗体測定を行っても、同じ血清試料から得られた抗体価に差はみられなかった。CAR bacillus自然感染ウサギコロニーより得られた15例のウサギの検索では、4例に抗体が認められたが、それらの抗体価はいずれも1:10~1:40であった。またこれらの病理組織学的検索では、抗体陽性の3例と抗体陰性の3例にCAR bacillusが認められ、血清学的診断と組織学的診断とは完全には一致しなかった。これは、ウサギのCAR bacillus感染で

は病変が軽度なために組織学的には菌体を見出しにくいこと、および菌が感染してから抗体価が上昇するまでに十分な期間を要することなどの理由によると考えられた。

CAR bacillusを経鼻接種したラットの血清中の抗体測定では、接種後14日目より抗体陽性例がみられ（抗体価1:10）、接種後21日目には全例が陽転した（抗体価1:40～1:80）。これらの抗体価は接種後28日目に最高に達し（抗体価 1:80と1:160）、観察終了時の接種後56日目まで持続して認められた。

以上のように、IFA法がCAR bacillus感染の血清学的診断に極めて有用であることが明らかとなった。また、ラットが感染した後全動物が陽転するまでには2～3週間必要とすることが示された。さらに、ラット由来のCAR bacillus-SMR株をもとにした抗原を使用する本法は、ラット以外の動物種における本感染症の診断にも応用できることが判明した。

2. 序 文

CAR bacillusは通常は無細胞細菌用培地では培養できない。そのため、本菌感染の診断には、主に感染動物の気道粘膜を形態学的に観察し、菌を証明する方法がとられてきた[24、41]。しかし、この方法は限られた動物にしか適用できず、生前診断にも役立たない。実験動物コロニーより本菌に感染した動物を摘発、排除してコロニーを清浄化し、そのコロニーにおいて微生物学的モニタリングを行うには、血清学的診断法の確立が不可欠である。

抗CAR bacillus抗体の検出は、Ganawayら[6]によって初めてなされた。彼らは、発育鶏卵尿膜腔液で継代されたラット由来の菌を抗原とし、ELISAによる抗体測定を実施した。まず、CAR bacillusに感染した母ラットからの産仔の抗体を測定し、3週齢の産仔に移行抗体を検出した。また彼らは、菌を経鼻接種したラットにおいて、接種4週間後に初めて抗体を検出した（接種2週間後では陰性）。Shojiら[33]は、ラットとマウス由来のCAR bacillusを発育鶏卵尿膜腔液で培養し、両株それぞれを抗原としたELISAで抗体測定を試みた。その結果、自然感染したラットとマウスではともに、菌検出例と抗体陽性例とが一致した。また菌接種ラットとマウスの抗体は、接種後4週目で初めて検出された（接種後2週目では陰性）。Griffithら[8]は、本菌に汚染されたマウスコロニーの抗体検索をELISAで行い、病理組織学的手法による菌の検出率と抗体陽性率がほぼ等しかったと報じている。

以上のように、ELISAによるCAR bacillus抗体の検出は、既に試みら

れてはいるが、ELISAでは感染初期の抗体検出率がIFA法より劣ることも指摘されている[15]。CAR bacillus菌体と感染動物の血清を反応させた後、さらに蛍光色素標識抗体と反応させると、菌体は特異蛍光を発する。この事実は本菌感染のIFA法による血清学的診断の可能性を示唆する。IFA法によるCAR bacillus抗体の検出は、Itohら[10]によつてのみ報告されている。これでは、CAR bacillus自然感染ラットの気管スメアーを抗原として抗体を検索し、本菌の感染が認められたラットの全例で抗体を証明した。しかし、気管スメアーには本菌以外の多種類の蛋白が存在するので、どの程度特異性が保たれるか検討を要する。

本研究では、実験動物からのCAR bacillus感染の排除と防御を目的に、菌体を抗原とするIFA法を確立し、これによる本感染症の血清学的診断法開発の可能性と問題点を検討した。なお、本菌を経鼻接種したラットの抗体価の推移に関しては、第I章で供試した動物を用いて検索し、その病理学的成績を参考にして考察を加えた。

3. 材料と方法

1) 抗原

抗原としては、ラット由来のCAR bacillus-SMR株を実験感染させたマウスの気管の粘膜上皮に付着している菌体、および同一菌株を増殖させた発育鶏卵の尿膜腔液の塗抹標本中の菌体の2種類を用いた。

8週齢SPF BALB/c雄マウスに軽エーテル麻酔下で、CAR bacillus-SMR株を含むマウスの肺乳剤を、1匹当たり 2×10^6 個経鼻接種した。このマウスは接種後2カ月目にクロロフォルム深麻酔下で全採血され、解剖に供された。剖検後、気管を取り出し、冷80%アルコール固定後、パラフィンに包埋した。連続切片作製後プレパラートは4℃で保存して、HE染色およびグロコット染色を行い、粘膜上皮にCAR bacillusが付着していることを確認後、気管抗原プレパラートとして使用した。正常対照気管プレパラートは、正常マウスの肺乳剤を8週齢SPF BALB/c雄マウスに経鼻接種し、前記と同様の方法で気管より作製した。使用動物と肺乳剤は、微生物学的検索（第I章参照）により、既知の呼吸器系病原体の感染のないことを確認した。

CAR bacillus-SMR株は発育鶏卵で尿膜腔内接種法により継代した（第II章参照）。その第11代目尿膜腔液をホール・スライドグラスに5 μ lずつ滴下し、風乾後アセトンで10分間固定した後、抗原プレパラートとして-20℃で保存した。正常対照尿膜腔液プレパラートは、正常な発育鶏卵の尿膜腔液より同様の方法で作製した。使用した肺乳剤と尿膜腔液については、微生物学的検索（第II章参照）を実施し、*Mycoplasma* spp.

と好気性菌が陰性であることを確認した。

2) 被検血清

Wistar/MsラットにおけるCAR bacillusの自然流行が、1984年から1985年の間に、放医研CV動物実験施設で3回(A、B、C)発生し、これらの流行時に飼育されていたラットから13例の血清が得られた(表2)。それらのうち9例の気道粘膜にCAR bacillusが組織学的に認められた。流行Bの3例は、菌培養とELISAによる抗体検査では、M. pulmonis が陽性であったが、他の10例では既知の呼吸器系病原体の感染は認められなかった。作製した抗原の非特異反応を評価するため、保存中のWistar/Msラット血清のうち、Sendai virus自然感染例、M. pulmonis自然感染例と非感染対照例の血清について抗CAR bacillus抗体を測定した。

CAR bacillus自然感染ウサギ血清は、1987年から1988年の間に購入した日本白色種 (Oryctolagus cuniculus)15例から得られた(表2) [16]。これらの動物は、2カ月齢で購入後5カ月齢まで放医研外の研究機関のCV動物施設で飼育された。これらのうち6例の気道粘膜にCAR bacillusが組織学的に認められた。また、11例の気管より B. bronchiseptica が分離され、13例の血清にB. bronchiseptica 凝集抗体が検出された(抗体価1:5~1:80)。非感染対照ウサギ血清は、市販の3カ月齢雄 Fub:JW (日本白色種)ウサギ(船橋農場)4例から得られた。これらのウサギより B. bronchiseptica凝集抗体が検出され(抗体価1:20~1:80)、B. bronchisepticaが分離された。

表2. CAR bacillus自然感染ラットとウサギ血清のCAR bacillus抗体価および血清学的・組織学的診断によるCAR bacillus感染率

被 検 動 物			CAR bacillus抗体価				CAR bacillus感染率			
由 来	例数	月 齢	性	<10	10	20	40	80	血清学的	組織学的
ラット										
CAR bacillus感染										
発生 A	5	3	♂	4 ^d				1	1/5 ^a	1/5
発生 B ^a	3	10	♀		1	2			3/3	3/3
発生 C	5	4	♂			4	1		5/5	5/5
Sendai virus感染	15	2-6	♂	15					0/15	0/15
M. pulmonis感染	15	3-6	♂	15					0/15	0/15
非感染対照	15	3-6	♂	15					0/15	0/15
ウサギ										
CAR bacillus感染 ^b	15	5	♂	11	3		1		4/15	6/15
非感染対照 ^c	4	3	♂	4					0/4	NT ^f

^a 3例共M. pulmonisとの混合感染、^b 13例はB. bronchisepticaとの混合感染、^c B. bronchiseptica陽性例、^d 例数、^e 陽性動物数/検索動物数、^f 未検索

CAR bacillusを経鼻接種したラット血清は、第 I 章において使用した動物から菌接種後 4、7、14、21、28 および 56 日目に得たもので、これらの動物には既知の呼吸器系病原体の感染は認められなかった（第 I 章参照）。

いずれの血清も PBS で 5 倍に希釈した後、ラット血清では 60℃、20 分、またウサギ血清では 56℃、30 分の非働化を行い、PBS で倍数希釈を行って抗原プレパレートと反応させた。

3) 反応方法

気管抗原プレパレートは冷キシロールで脱パラフィンを行い、冷 PBS で 3 分ずつ 2 回洗浄した。PBS で希釈した被検血清を抗原プレパレートの切片上に滴下し、37℃、30 分加湿箱中で反応させた。反応後、プレパレートを PBS で 3 分ずつ 3 回洗浄し、ラット血清には 40 倍希釈蛍光色素 (fluorescein isothiocyanate) 標識抗ラット IgG ヤギ血清 (Jackson ImmunoResearch Laboratory, USA) を、またウサギ血清には 40 倍希釈蛍光色素標識抗ウサギ IgG ヤギ血清 (Jackson ImmunoResearch Laboratory, USA) を気管切片抗原に滴下して 4℃ で 1 晩加湿箱中で反応させた。反応後、PBS で 3 分ずつ 3 回洗浄し、90% グリセリン・PBS で封入した後、蛍光顕微鏡で観察した。

尿膜腔液抗原プレパレートでは、希釈した被検血清を抗原上に滴下し、37℃ で 1 時間加湿箱中で反応させた。反応後、プレパレートを PBS で 1 分ずつ 3 回洗浄し、ラット血清には 40 倍希釈蛍光色素標識抗ラット IgG ヤギ血清を、またウサギ血清には 40 倍希釈蛍光色素標識抗ウサギ IgG ヤ

ギ血清を抗原上に滴下した後、37℃、30分加湿箱中で反応させた。プレパレートは反応後 PBSで1分ずつ2回、さらに蒸留水で1分洗浄し、風乾後鏡検に供した。

① GAS-114に感染したラット血清と気管腔液プレパレートを反応させた結果、抗原上皮の核の部に相着している細胞に一致して、抗 IgG 染色の陽性はほとんど特異性が認められた（写真32）。また、同一血清を組織液で反応したプレパレートでなされた結果、GAS-114血清に一致して陽性で特異性が認められた（写真33）。GAS-114血清とラット血清、抗 IgG 染色ラット血清および非感染ラット血清を反応させ、プレパレートに反応させた場合には、特異性は認められなかった。また、非感染ラットプレパレートとした胃液マウス気管腔液や正常な鼠血清の陽性結果として GAS-114 感染ラット血清を反応させた後、さらに血清を非感染血清と交換させても、それらの組織上皮の陽性や陽性細胞に一致して陽性は認められなかった。

上記の GAS-114 感染血清およびマウスの血清（正常鼠血清を含む）を、1:10より倍數希釈を行って抗 IgG プレパレートと反応させた。その結果、いずれの血清も 1:5 希釈では、倍數以外の組織にも非特異性陽性が見られ、1:10以上の希釈血清ではそれらに非特異性陽性は認められなかった。したがって、1:10以上希釈した血清を抗原と反応させ、組織に特異性陽性が見られる場合陽性と判定した。

GAS-bacillus, Zardai-virus または、pulvis 16 に自然感染したラット血清、鼠肺や脾臓、肺臓等に感染していない正常ラット血清、さらに GAS-bacillus に自然感染したウサギ血清における抗 GAS-bacillus 抗体の陽性結果を認るに際す。なお、気管腔液プレパレートを用いて抗

4. 成 績

CAR bacillusに感染したラット血清と気管抗原プレパラートを反応させた結果、粘膜上皮の線毛部に付着している菌体に一致して、抗 IgG抗体の結合にもとづく特異蛍光が観察された（写真32）。また、同一血清を尿膜腔液抗原プレパラートに反応させた結果、CAR bacillus菌体に一致して同様の特異蛍光が観察された（写真33）。Sendai virus感染ラット血清、*M. pulmonis* 感染ラット血清および非感染正常ラット血清を両抗原プレパラートに反応させた場合には、特異蛍光は観察されなかった。また、正常対照プレパラートとした正常マウスの気管切片や正常な発育鶏卵の尿膜腔液とCAR bacillus感染ラット血清を反応させた後、さらに蛍光色素標識血清と反応させても、それらの粘膜上皮の線毛や尿膜腔液に特異蛍光は観察されなかった。

上記のCAR bacillus感染血清およびその他の血清（正常対照血清を含む）を 1:5より倍数希釈を行って抗原プレパラートと反応させた。その結果、いずれの血清も1:5 希釈では、菌体以外の組織にも非特異蛍光が見られ、1:10以上の希釈血清ではそれらに非特異蛍光は観察されなかった。したがって、1:10以上希釈した血清を抗原と反応させ、菌体に特異蛍光が見られた場合陽性と判定した。

CAR bacillus、Sendai virusまたは *M. pulmonis*に自然感染したラット血清、既知の呼吸器系病原体に感染していない正常ラット血清、ならびにCAR bacillusに自然感染したウサギ血清における抗CAR bacillus抗体価の測定結果を表2に示す。なお、気管抗原プレパラートを用いて抗

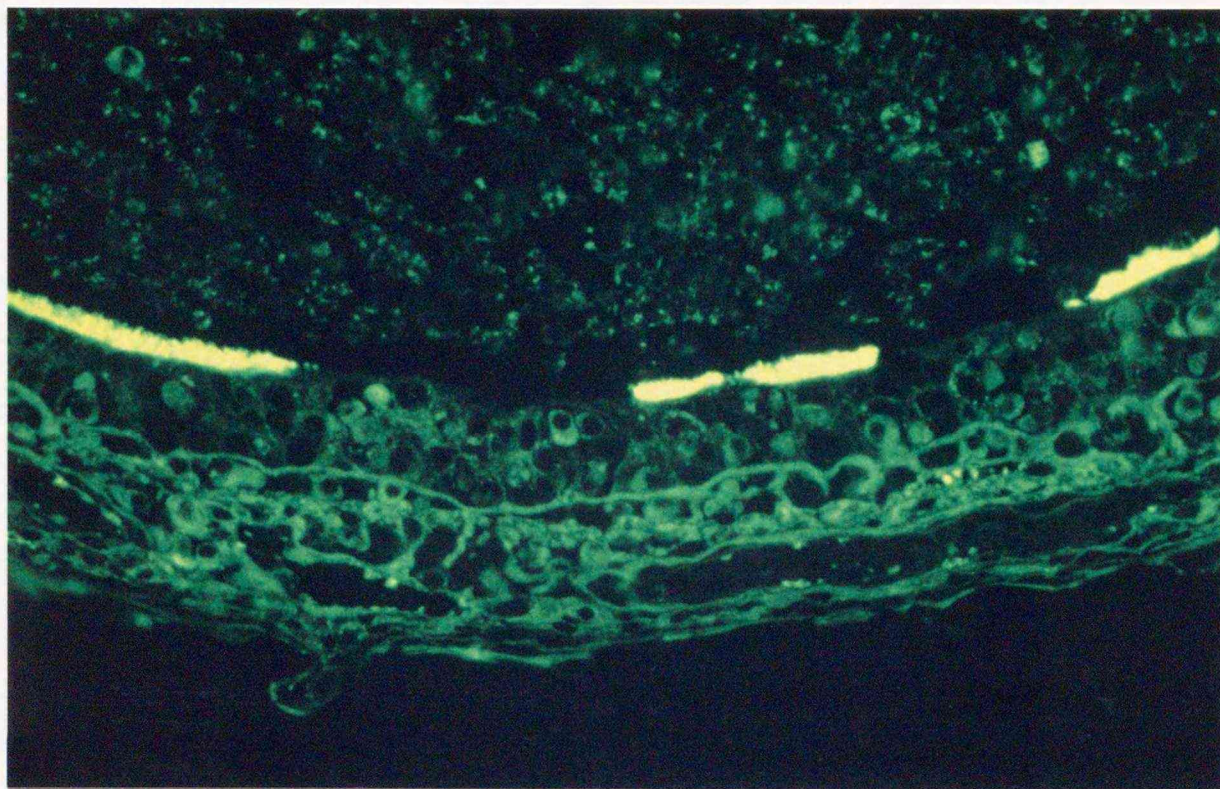


写真 32. CAR bacillus-SMR株を経鼻接種したマウスの気管抗原プレパレート。CAR bacillusと抗体陽性ラット血清との反応による特異蛍光が粘膜上皮の線毛部に見られる。×400。

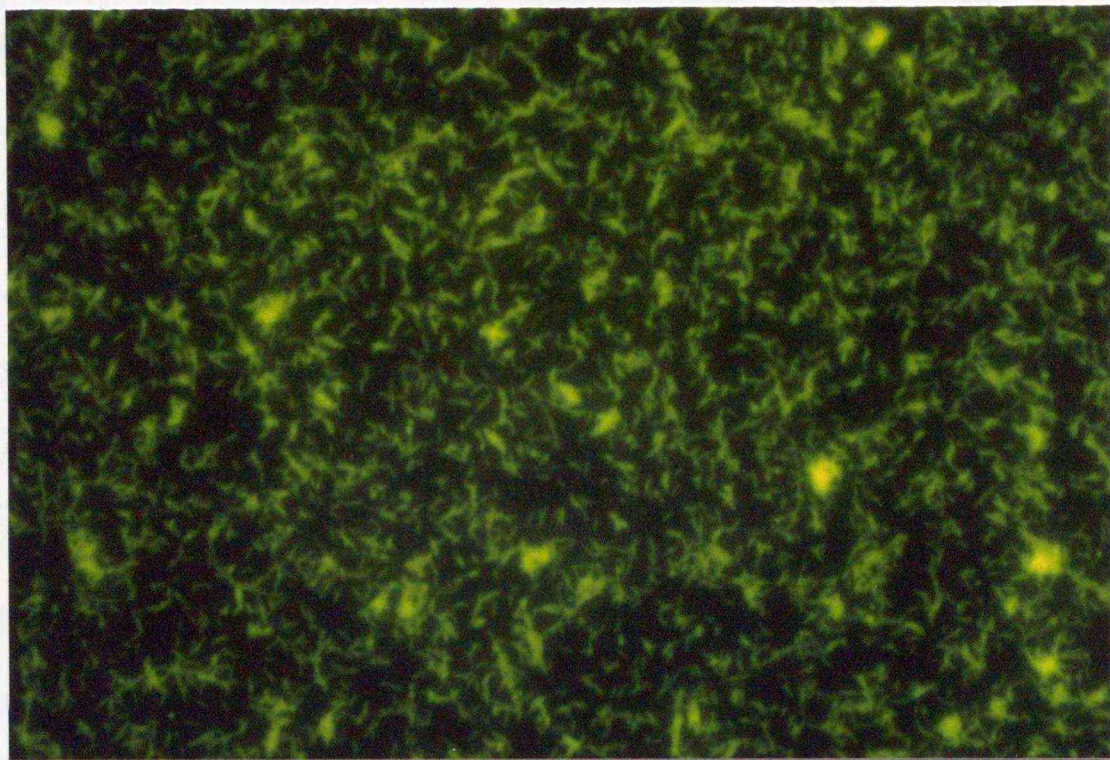


写真 33. CAR bacillus-SMR株の發育鶏卵継代第11代目の尿膜腔液抗原プレパレート。抗体陽性ラット血清との反応による特異蛍光が菌体に見られる。×800。

体測定を行っても、尿膜腔液抗原プレパレートを用いて抗体測定を行っても、同じ血清試料からは同一の抗体価が得られた。

CAR bacillusの自然感染が集団発生した時にその汚染コロニーのラット13例中9例が、1:10から1:80の抗体価を示した。これらの抗体陽性ラットでは、全例の気道粘膜上皮にCAR bacillusが観察され、血清学的診断と組織学的診断とは一致した。

CAR bacillusの自然感染が発生した時に、その汚染コロニーのウサギより採取された血清15例中4例で抗体が検出され、それらの抗体価は1:10のものが2例と1:40が2例であった。しかしウサギ血清でも1:5希釈では本菌以外の組織に非特異蛍光が観察されたので、1:10希釈を陽性限界とした。抗体陽性のウサギ4例中3例と、抗体陰性のウサギ11例中3例の気道粘膜上皮にCAR bacillusが観察され、血清学的診断と組織学的診断とは必ずしも一致しなかった。

CAR bacillusを経鼻接種したラットにおける抗体価の経時的推移を図2に示す。抗体は接種後14日目で3例中1例に見られ（抗体価 1:10）、接種後21日目以降56日目までは3例すべてが陽性を示した。接種後21日目の抗体価は1:40～1:80で、その後抗体価は上昇し、接種後28日目に最高となり（抗体価 1:80～1:160）、56日目までこの抗体価が維持された。組織学的に、接種後14日目の抗体陽性例ではCAR bacillusは鼻腔、気管および肺内気管支の粘膜上皮に認められ、また気管の粘膜固有層の小円形細胞浸潤と気管支周囲炎は抗体陰性例の場合より重度であった。すなわち、抗体陰性の1例では本菌は抗体陽性例と同様に鼻腔、気管および肺内気管支の粘膜上皮に認められたが、気管粘膜の小円形細胞浸潤と気管支周囲炎は抗体陽性例より軽度であった。他の抗体陰性の1例では鼻

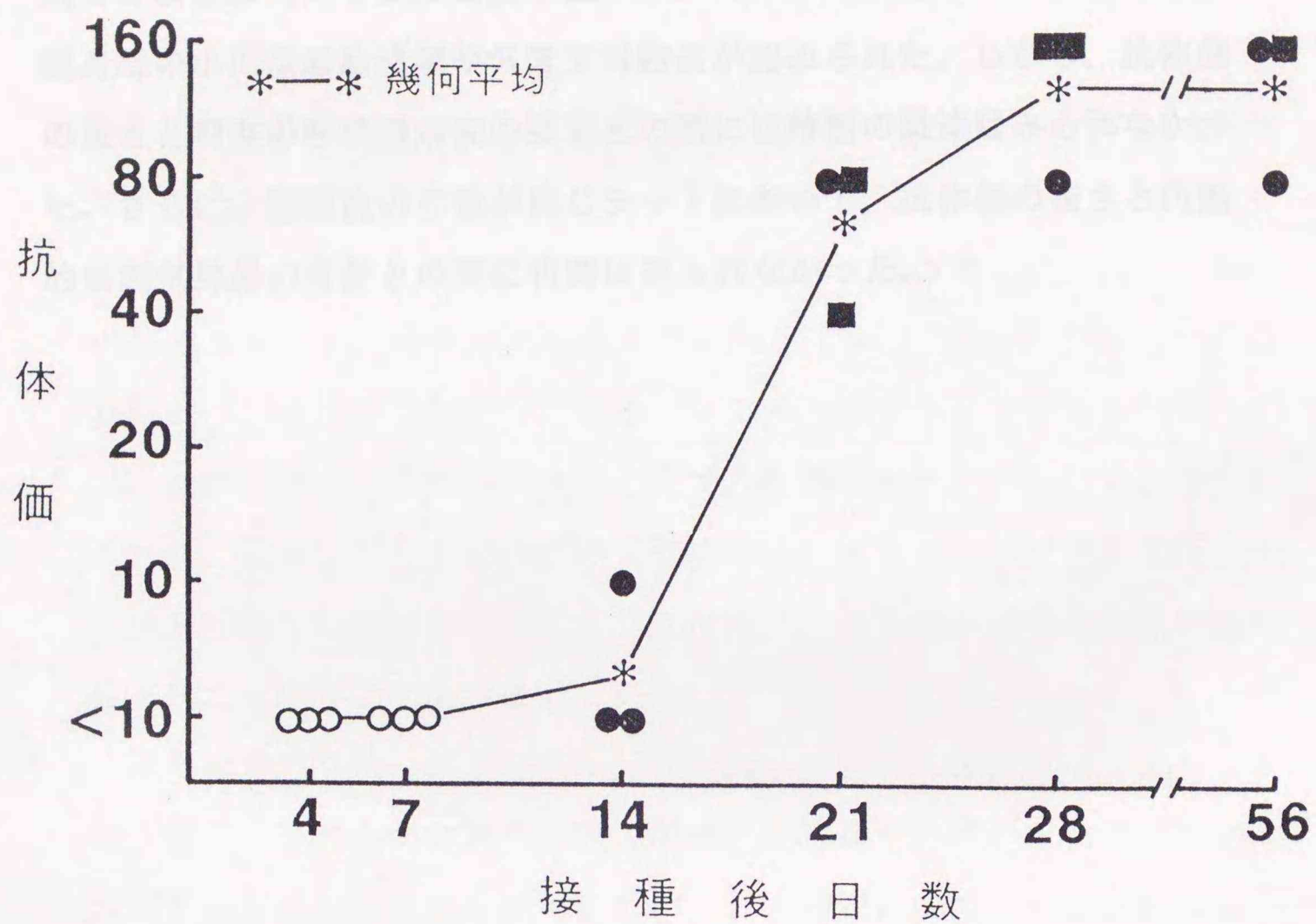


図 2. CAR bacillus経鼻接種ラット血清中の抗CAR bacillus IFA抗体価。

○: CAR bacillus陰性 (組織学的) ラット、●: CAR bacillus 陽性 (組織学的) ラット、■: CAR bacillus陽性 (組織学的)、無気肺巣陽性 (肉眼的) ラット。

腔の粘膜上皮にCAR bacillusが見られたのみで、その他の呼吸器系に著変は観察されなかった。接種後21日目以降56日目までは、全例の鼻腔、気管および肺内気管支の粘膜上皮にCAR bacillusが見られ、気管の粘膜固有層の小円形細胞浸潤や気管支周囲炎が認められた。しかし、抗体価の高さと特定の呼吸器病変の強さとの間には特別の関連はみられなかった。さらに、接種後の日数が同じラットにおいて、抗体価の高さと肉眼的な無気肺巣の有無との間に相関はみられなかった。

5. 考 察

今回の実験成績は作製したCAR bacillus抗原の特異反応性を示している。その陽性限界は1:10と判断された。今回用いたCAR bacillus-SMR株はラット由来であるが、それから作製した診断用抗原はCAR bacillusに自然感染したラット血清のみならず、本菌に自然感染したウサギの血清にも一部反応し、特異蛍光を発した。Shojiら[33]はELISAによってCAR bacillus抗体を検索した結果、マウス由来とラット由来のCAR bacillus抗原は、いずれもマウスとラットの陽性血清と反応したと報告している。彼ら[33]および今回の実験結果は、ラット、マウスおよびウサギ由来のCAR bacillusをもとにした抗原は、いずれの動物の血清中の抗体も検出できることを示唆している。

第I章で明らかにしたように、CAR bacillusを経鼻接種したラットでは、接種後7日目では鼻腔粘膜上皮の粘膜固有層に軽度の小円形細胞浸潤が見られたが、本菌は認められず、この時期には抗体は検出されなかった。接種後14日目で初めて検索した3例すべての気道の粘膜上皮に菌が出現したが、抗体が検出できたのは1例のみであった。この抗体陽性例と陰性例を比較すると、気管粘膜の小円形細胞浸潤と気管支周囲炎の強さに程度差が認められた。しかし接種後21日目以降では、抗体価の高さと病変の分布や程度との間に特別の関連はみられなかった。以上の所見は、ラットが本菌に感染した後免疫細胞が刺激を受け、血中に抗体が出現して間もない感染初期は病変の強さと抗体の量が関連するが、感染後一定期間を過ぎると抗体は既に十分に産生されているので、病変の分

布や強さと抗体価は関連しなくなるものと思われる。

Ganawayら[6]は、発育鶏卵尿膜腔液で培養した菌をラットに経鼻接種後ELISAで抗体を測定した。その結果、接種後2週目では抗体は検出されなかったが、接種後4週目で抗体陽性となった。これらのラットでは接種後2週目より気道粘膜にCAR bacillusが出現していた。一方、Shojiら[33]は、発育鶏卵で培養した菌をラットとマウスに経鼻接種後ELISAで抗体を測定した。その結果、ラット、マウスともに接種後2週目では抗体は検出されなかったが、接種後4週目から8週目の間に全例が抗体陽性となった。Ganawayら[6]およびShojiら[33]のELISAによる実験結果は、IFA法による今回の実験結果より抗体陽転の時期が約2週間遅延している。Kraftら[15]は実験感染させたラットの*M. pulmonis*抗体(IgG)の検出をELISAとIFA法で比較した。その結果、抗体はいずれも感染後8日目から検出できたが、感染後8日目から16日目までの抗体検出率がIFA法では100%であったのに対し、ELISAでは60~80%で、後者による抗体検出率が劣っていた。著者のCAR bacillus感染においても、IFA法が感染初期の抗体の検出に良いことを示している。

以上のように、本研究によりIFA法によるCAR bacillus感染の血清学的診断は、極めて有用であることが示された。さらに、IFA法では抗原の製作過程や抗原と被検血清との反応手技がELISAのそれ[6、33]に比較し極めて簡便である。IFA法の実用化に際しては、抗原作製過程がより簡便で、被検血清や蛍光色素標識血清との反応時間がより短い、発育鶏卵尿膜腔液中の菌体で作製した抗原プレパラートを用いる方法が推奨される。

1. 要 約

24H bacillusの伝播様式を明らかにするため、3315⁺の24H bacillus
500個を正常マウス (BALB/c) に経鼻投与し、感染マウスを作出した。
感染マウスは、伝播実験に適用できるまでのIFN産生量が120以上になった
ため、その一群を以下の実験に利用し、感染マウス伝播マウスと
して伝播実験を行った。

第IV章 マウスを用いてのCAR bacillusの 伝播様式に関する実験的研究

まず、12週間齢の感染マウスをケージに入れ、
12週間齢の正常マウスをケージの隣に、非感
染マウスを入れたケージを設置し、12週間飼育した。いずれも実験開始
後4、8および12週目、さらに感染マウスは接種後16週目に死亡し、
両群の右側中脳神経節摘出およびIFN抗体を検出する血清学的検査で判
断した。

結果概要では、接種後4週目以降16週目まで全例に感染が成立した。
ケージ内伝播実験では、接種後4週目から感染し始め、(接種後の感染：
1/15例、血清学的感染：0/15例)、実験終了時(接種後12週目)では全
てのものが感染した(接種後の感染：5/5例、血清学的感染：3/5
例)、ケージ外伝播実験では、実験終了時(接種後12週目)まで感染は成立
しなかった。以上の実験から、24H bacillusの主要伝播様式は、感染マ
ウス同世代接触を介しての接触感染であるとみなされた。

1. 要 旨

CAR bacillusの伝播様式を明らかにするため、 2×10^6 のCAR bacillus-SMR株を正常マウス (BALB/c) に経鼻接種し、感染マウスを作出した。感染マウスは、菌接種後4週間で血清中のIFA抗体価が1:160以上に達したので、その一部を以下の実験に使用し、残りは経鼻接種感染マウスとして16週間飼育した。

まず、非感染マウスと感染マウスを 3:1の割合で同一ケージに入れ、12週間同居飼育した。次に、感染マウスを入れたケージの周囲に、非感染マウスを入れたケージを配置し、12週間飼育した。いずれも実験開始後4、8および12週目、さらに経鼻接種マウスは接種後16週目に解剖し、感染の有無を組織学的検査およびIFA 抗体を検出する血清学的検査で判定した。

経鼻接種では、接種後4週目以降16週目まで全例に感染が成立した。ケージ内同居感染では、同居後4週目から感染し始め（組織学的診断：1/15例、血清学的診断：0/15例）、実験終了時（同居後12週目）ではほとんどのものが感染した（組織学的診断：5/6例、血清学的診断：3/6例）。室内同居感染では、実験終了時（同居後12週目）まで感染は成立しなかった。以上の成績から、CAR bacillusの主要伝播様式は、感染動物や汚染媒介物を介しての接触感染であるとみなされた。

2. 序 文

著者は第Ⅲ章において、IFA法による血清学的診断がCAR bacillus感染の生前診断に極めて有用で、それが実験動物の微生物学的コントロールにとって重要な手段となることを明らかにした。実験動物コロニーの中で、本菌がどのような伝播様式をとるか、感染後どれほど経過した時に血清学的診断や病理学的診断が有効となるかを明確にすることは、本菌感染の本態を明らかにするのみならず、実験動物の微生物学的コントロールの面からも重要である。

CAR bacillusの感染実験の多くは経鼻接種によってなされ[6、10、33-35、42]、この場合感染は容易に成立している。Ganawayら[6]は、CAR bacillusに感染した母ラットから生まれた1～2週齢の哺乳中のラットの気道粘膜に本菌を認めた。Itohら[10]は、ラットを用いた小規模な感染実験を行い、CAR bacillusの感染経路を調べている。それによると、感染ラットと同一のケージで飼育された非感染ラットの気管と肺に、同居後2カ月目で組織学的に菌を認めている。一方、感染ラットを入れたケージと非感染ラットを入れたケージを交互に配置して調べた室内同居感染では、同居後7カ月目で非感染動物の気道粘膜に菌を認めている。これらの成績は、自然界におけるCAR bacillusの伝播は、接触感染が主役であることを示している。本菌感染の潜伏期間に関しては、1～2週間[6]あるいは2カ月[10]との記載がある。

本研究では、マウスを用いてCAR bacillusの伝播様式を検討するとともに、感染後の抗体価や組織病変の推移を検索する。

3. 材料と方法

1) 動物

マウスは、放医研で生産、飼育された8週齢SPF BALB/c雌マウスを合計147例使用した。マウスはオートクレーブで滅菌した木材敷料、給餌器および給水瓶を備えた金網蓋のアルミニウムケージで、オートクレーブで滅菌した固形飼料(MB-1:船橋農場、千葉)と高塩素(8~13ppm)・高酸性(pH 2.5~3.0)水を自由に与えて飼育した。

動物は特殊動物飼育装置で、1週間順化飼育を行った後、実験飼育を開始した。この飼育装置は温度 24 ± 2 °C、湿度 55 ± 10 %、12時間明暗サイクル、および70%新鮮空気30%循環空気の換気回数10~15回/時間に維持された。装置内の棚はステンレス棒の棧で作られ(棚と棚の間隔は30~40cm)、空気の流れは上部右端より水平に出て下方に流れ、下部右端より吸い込まれた。動物は実験終了時に、クロロフォルムで深麻酔後全採血を行い解剖した。

実験終了時の微生物学的検査(第I章参照)では、使用した動物は既知の呼吸器系病原体に関してすべて陰性であった。

2) 接種材料

-80°Cに保存したラット由来CAR bacillus-SMR株 8.5×10^7 /mlを含むマウス肺乳剤を使用した。正常対照マウス肺乳剤は、SPF BALB/cマウスより同様にして作製した。いずれの組織乳剤からも *Mycoplasma* spp.と

好気性菌は分離されなかった（第I章参照）。

3) 感染実験

A. 経鼻接種

マウス40例に 2×10^6 CAR bacillus-SMR株をエーテル軽麻酔下で鼻腔内接種した。接種後4週目に眼下静脈叢から採血し、抗CAR bacillus IFA抗体価が1:160以上であることを確認した後、一部は感染マウスとしてケージ内同居感染実験と室内同居感染実験に用いた。正常対照マウスの5例には、正常マウスの肺乳剤を前記と同様にして接種した。動物は、接種後4、8、12および16週目に10例ずつクロロフォルム深麻酔下で全採血し、解剖後病理組織学的検索を行った。これらのマウスの菌接種前の血清、および正常肺乳剤接種後16週目の正常対照マウス血清の抗CAR bacillus IFA抗体価は、1:10未満であった。

B. ケージ内同居感染

6例の非感染マウスと2例の感染マウスを同一ケージ内で飼育し、この実験を5ケージで行った。同居飼育後4、8および12週目にそれぞれ15、9および6例（3例/ケージ）の非感染マウスをクロロフォルム深麻酔下で全採血し、解剖後病理組織学的検索を行った。感染マウスは実験終了時（同居飼育後12週目）に、非感染マウスと同様に解剖と検索を行った。

C. 室内同居感染

5例の感染マウスを入れたケージを、飼育装置の中央棚の中央に配置した。非感染マウス3または6例を入れたケージを、上段棚と下段棚に

3 ケージずつ配置し、さらに、感染ケージの左右に1 ケージずつ配置した。なお、ケージとケージの間隔は約3 cmの距離を置いた。飼育作業時の相互感染を防ぐため、定期的なケージと給水瓶の交換は非感染マウスを入れたケージを先に行い、感染マウスのケージは最後に行った。実験配置後4、8 および12週目に非感染マウスを24例ずつ（3例/ケージ）クロロフォルム深麻酔下で全採血し、解剖後病理組織学的検索を行った。感染マウスは実験終了時（実験配置後8 と12週目）に、非感染マウスと同様に解剖と検索を実施した。

4) CAR bacillus抗体価測定

第Ⅲ章で述べた IFA法を用いて血清中の抗体価を測定した。抗原はCAR bacillus-SMR株を経鼻接種したマウスの気管切片の抗原プレパラートを用いた。2次抗体は各動物のIgGに対する蛍光色素（fluorescein isothiocyanate）標識IgG ヤギ血清（Jackson Immunoresearch Laboratory, USA）を用いた。

5) 病理組織学的検索

剖検後、肺、気管および頭部を取り出し、10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。頭部は10%ギ酸ホルマリン液で脱灰し、中耳と鼻腔の検索のため切り出した。組織標本は通常の方法でパラフィン切片を作製後、HE染色を行って鏡検した。標本の一部にはグロコット染色を行った。

4. 成績

3種類の感染経路によるCAR bacillusの感染率は表3に示す。

1) 経鼻接種

接種後4週目までに全例が感染し、接種後4、8、12および16週目の血清中の抗CAR bacillus IFA抗体価は1:160以上に上昇した。菌接種マウスは、接種後2週目より全例が体重増加の抑制、活動の低下および粗毛を示し、またこれらの症状は接種後16週目まで持続した。さらに、接種後2週目より菌接種動物の約1/10に湿性異常呼吸音が聴取された。異常呼吸音を示す動物数は接種後次第に増加し、接種後8週目では約半数、接種後16週目では約2/3に達した。さらに接種後11週目には、1例が重度の消瘦と呼吸困難を示して死亡した。

解剖時の肉眼所見では、菌接種されたマウスの全例で、肺の数葉の全域は淡褐色または黄褐色の無気肺となっていた（写真34）。これら以外の肺葉では、気管支周囲に限局性に無気肺巣が認められ、無気肺巣以外の肺組織は気腫性であった。断面では、気管支は拡張し、その周囲にリング状の乳白色充実域が観察された。気管と気管支腔内には灰白色の粘液が認められた。接種後4週目以降16週目までの間に、全例の前縦隔リンパ節と気管気管支リンパ節が米粒大と粟粒大に腫大していた。

組織学的に、接種後4週目以降16週目まで全例の気道の粘膜上皮にCAR bacillusが付着していた。その粘膜固有層にはリンパ球および形質

表3. マウスにおける感染経路別のCAR bacillus感染率

感 染 経 路	診 断	感 染 後 の 週 数 と 感 染 率			
		4	8	12	16
経鼻接種	血清学的 ^a	40/40 ^b	10/10	10/10	10/10
	肉眼的 ^c	10/10	10/10	10/10	10/10
	組織学的 ^d	10/10	10/10	10/10	10/10
ケージ内同居感染	血清学的	0/15	4/9	3/6	
	肉眼的	0/15	1/9	1/6	
	組織学的	1/15	4/9	5/6	
室内同居感染	血清学的	0/24	0/24	0/24	
	肉眼的	0/24	0/24	0/24	
	組織学的	0/24	0/24	0/24	

^a IFA抗体、^b陽性動物数/検索動物数、^c肺の無気肺病巣、

^d CAR bacillusの存在

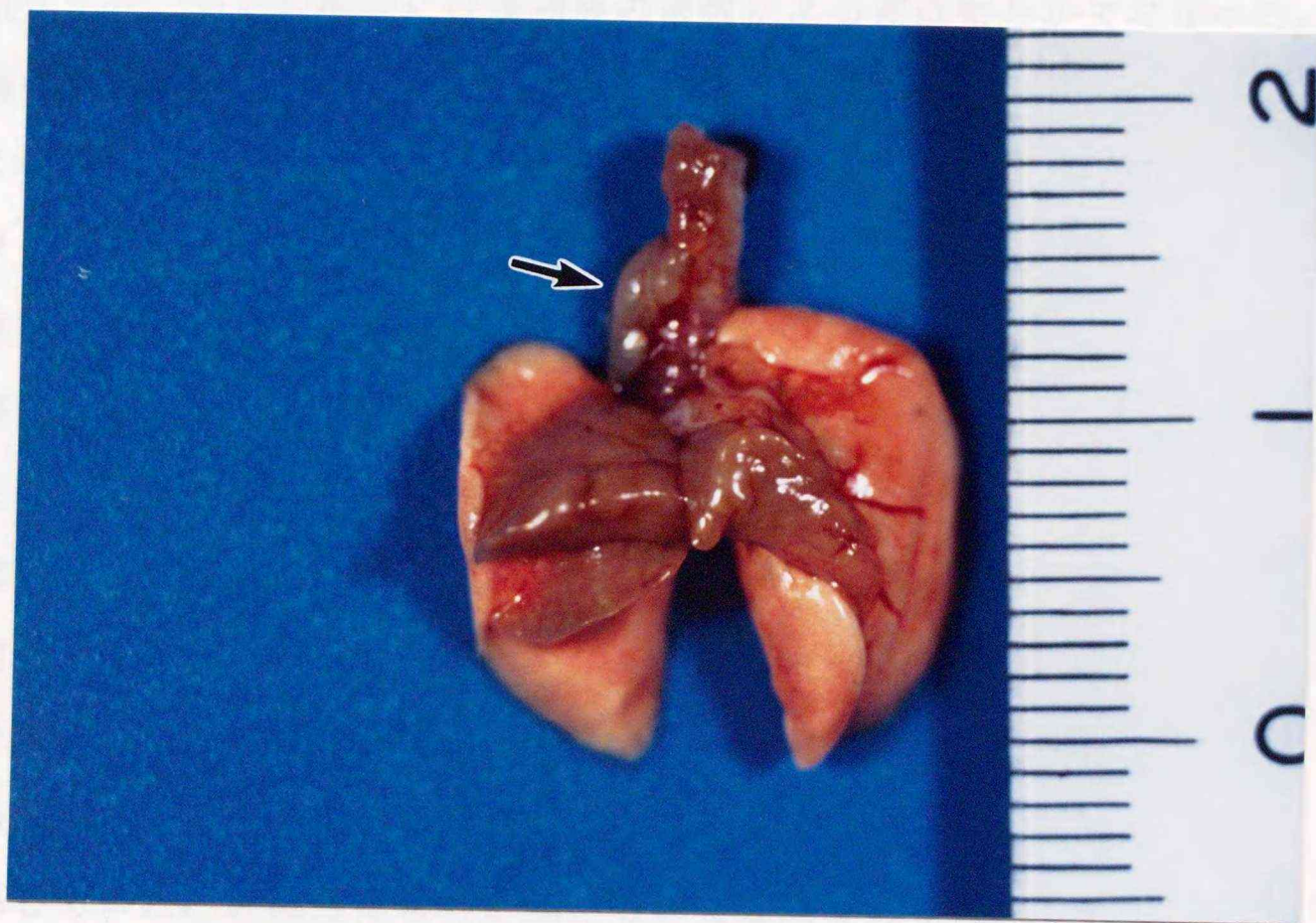


写真 34. CAR bacillus経鼻接種後12週目のマウスの肺。左前葉、左中葉および中間葉の全域は淡褐色の無気肺となっている。他の肺葉は気腫を示す。気管気管支リンパ節は腫大している（矢）。

細胞からなる小円形細胞が浸潤し、肺では小円形細胞の重度な浸潤、増殖およびリンパ濾胞の過形成による気管支と細気管支周囲炎（写真35）、化膿性気管支炎と細気管支炎（写真36）、ならびに化膿性気管支肺炎が観察された。以上の病変には接種後の週数による差は明らかでなかった。本菌の付着が認められた気道の粘膜上皮の線毛部は、ヘマトキシリンに濃く染色され、グロコット染色で、幅約 $0.2\mu\text{m}$ 、長さ約 $4\sim 11\mu\text{m}$ の好銀性フィラメント状桿菌が観察された。

鼻腔では、呼吸器粘膜上皮の一部に CAR bacillus の付着が観察され（写真37）、粘膜固有層には少数の小円形細胞浸潤が認められた。侵された粘膜上皮の表面には少量の粘液化膿性滲出物が付着していた。接種後16週目では、一部の粘膜上皮に扁平様化が認められ、その表面にも菌が付着していた。

気管では、粘膜上皮の表面のほぼ全域に多数の CAR bacillus の付着が観察された。それらの上皮細胞はわずかに増殖し、上皮細胞層は軽度肥厚していた。杯細胞はまれに認められる程度であった。これらの粘膜固有層には症例によっては多数の小円形細胞が浸潤し、接種後12週目と16週目では形質細胞の浸潤が優勢であった。接種後16週目では、粘膜の一部に小円形細胞の重度な浸潤による上皮細胞の菲薄化が観察された。

肺では、多くの肺内気管支に小円形細胞による重度の気管支および細気管支周囲炎が観察された（写真35）。これら肺内気管支の粘膜上皮では、上皮細胞の増殖によって上皮細胞層は肥厚し、その表面には部位によって多数の CAR bacillus が付着していた。杯細胞はまれに認められる程度であった。粘膜固有層には多数の小円形細胞が浸潤していた。さらに、近位の気管支の粘膜上皮の一部では、小円形細胞の重度の浸潤によ

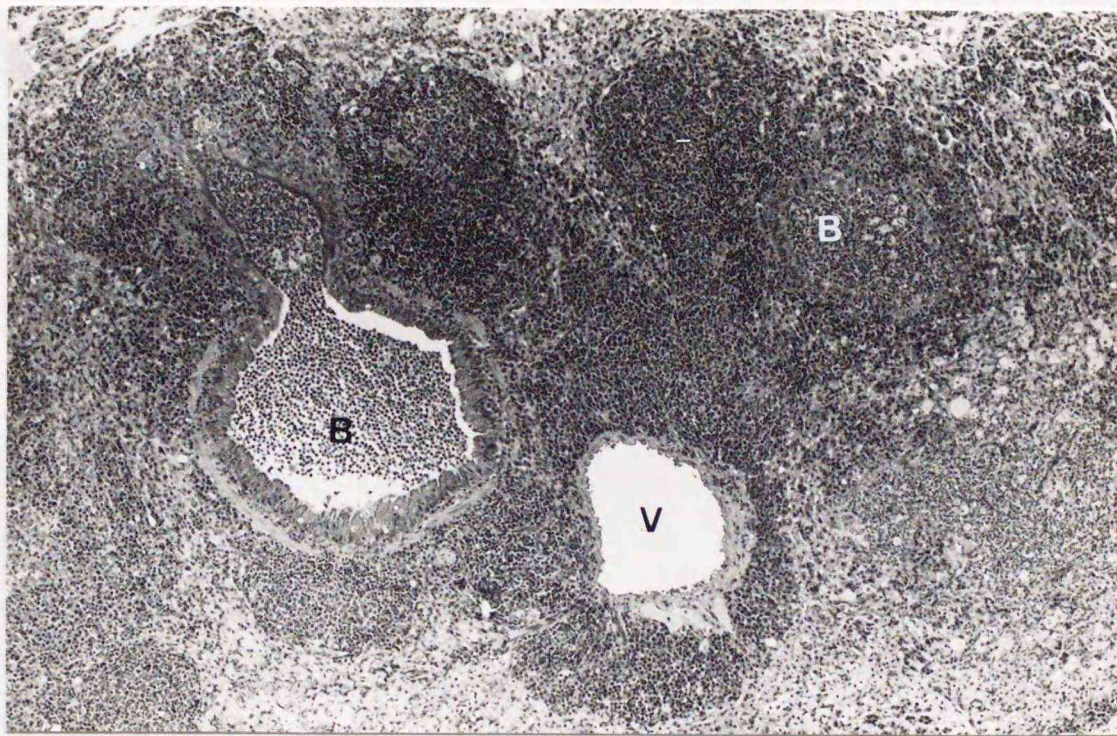


写真 35. CAR bacillus経鼻接種後8週目の肺における重度の気管支
周囲炎。リンパ濾胞形成が著明で、拡張した細気管支腔内
(B) には多数の好中球と少数のマクロファージが滲出し
ている。血管(V)周囲にも小円形細胞が集簇している。
HE. ×65.

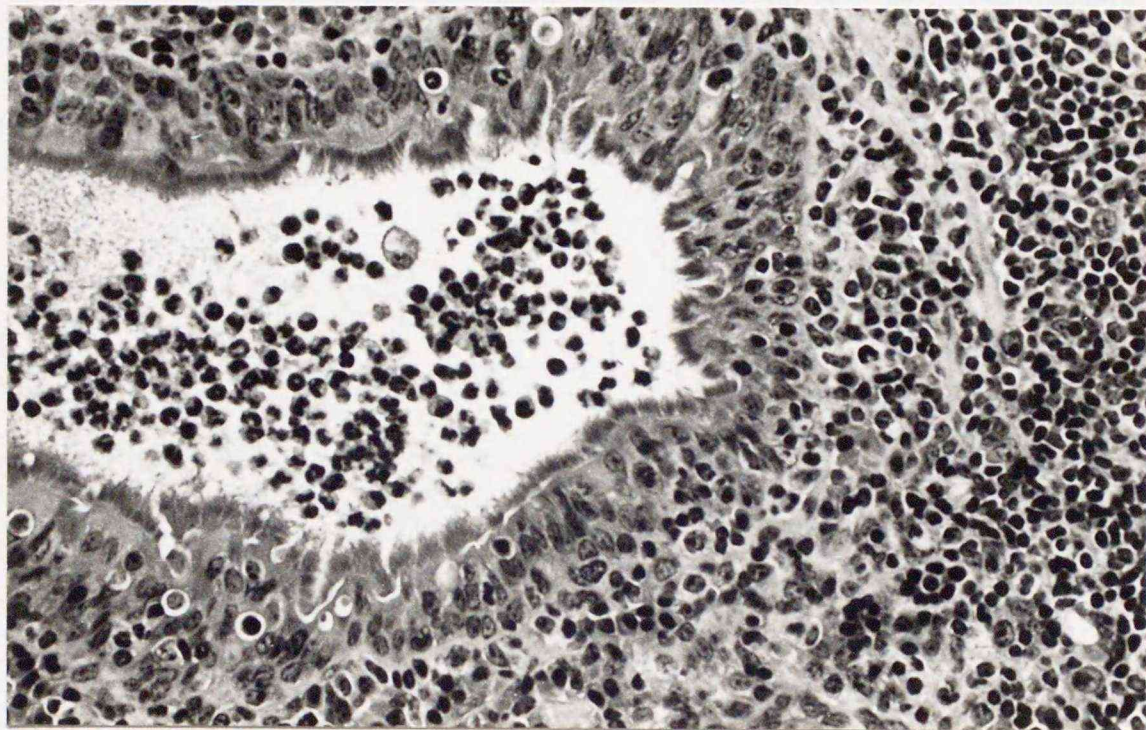


写真 36. CAR bacillus経鼻接種後16週目の肺における亜急性化膿性
気管支炎。重度の小円形細胞浸潤が粘膜固有層から周囲組
織にあり、気管支腔内に好中球が滲出している。粘膜上皮
線毛部は濃密で、CAR bacillusが付着している。
HE. ×340.

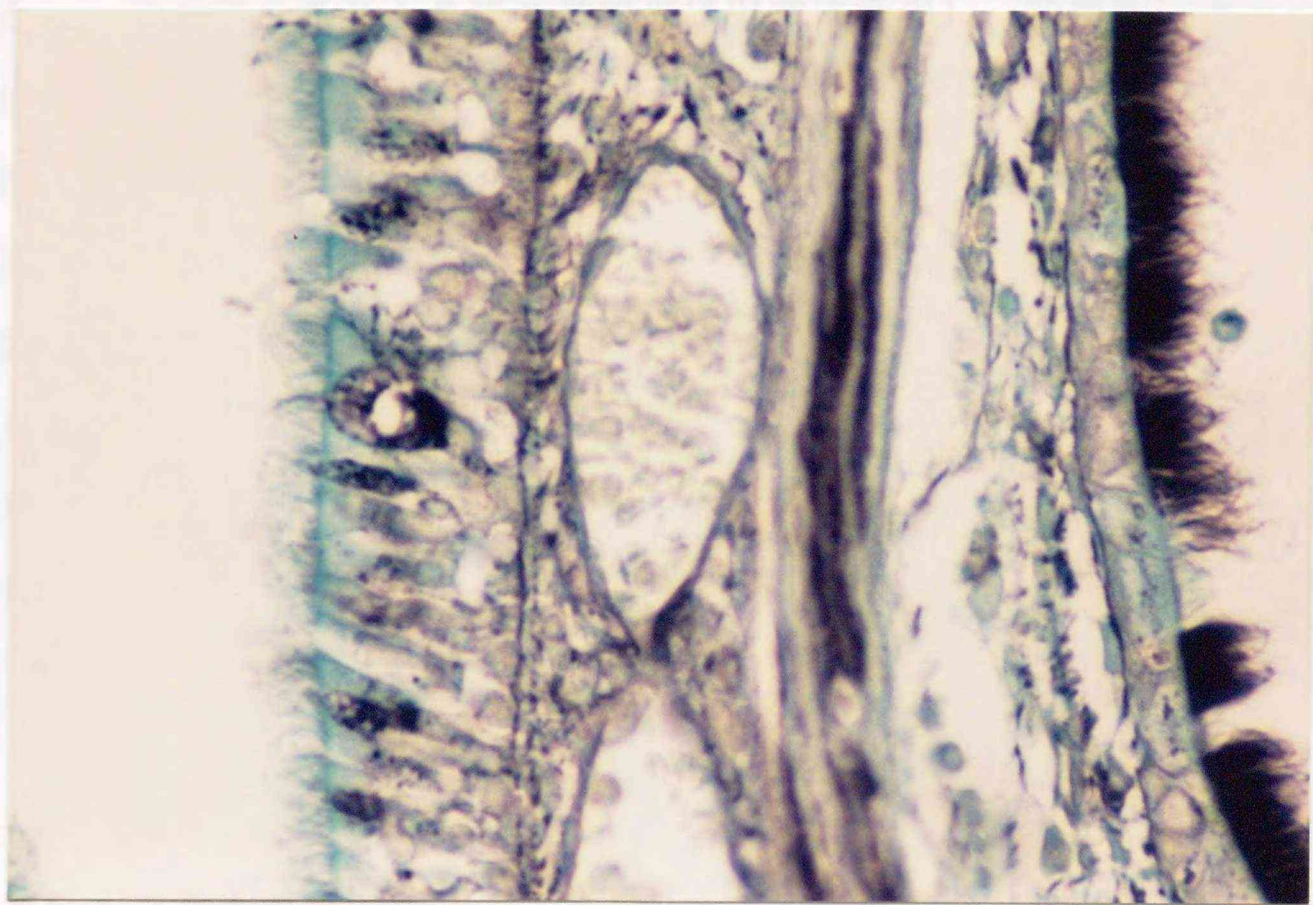


写真 37. CAR bacillus経鼻接種後8週目の鼻甲介。右方の粘膜上皮の線毛部に多数のCAR bacillusが付着している。左方の粘膜上皮は腫大しているが、線毛は正常である。
グロコット染色。×800。

る上皮細胞の菲薄化がまれながら認められた。病変部の肺内気管支は重度に拡張し、腔内には多数の好中球とマクロファージが充満していた。これらの細胞滲出は細気管支周囲の肺胞にも認められた（化膿性肺炎）。しかし、接種後8週目より肺炎巣内の好中球は減少し、接種後12週目と16週目では腫大、増数した肺胞上皮細胞、マクロファージおよび小円形細胞の浸潤による肺炎像を呈していた。肺炎像の認められなかった部位の肺胞は気腫性であった。間質では血管周囲に小円形細胞が浸潤し、接種後8～12週目ではリンパ濾胞が伴われていた。しかし、接種後16週目ではリンパ濾胞はやや小型となり、形質細胞集簇が優勢となっていた。

中耳では、粘膜の上皮細胞の一部にCAR bacillusが付着し、粘膜固有層には少数の小円形細胞と好中球が浸潤していた。鼓室には多数の好中球とマクロファージが充満していた。

2) ケージ内同居感染

同居後8週目に IFA抗体価の上昇（1:20以上）が9例中4例に観察された（表3、図3）。実験終了時の同居後12週目では6例中3例に1:80以上の抗体価が観察された。臨床的に、同居後8週目より2例に体重増加の抑制と粗毛が観察され、これらの症状は解剖時まで持続した。肉眼的に、同居後8週目で9例中1例に、肺の左葉の一部に淡褐色の無気肺巣が認められた。同居後12週目では、6例中1例に2肺葉の全域に淡褐色の無気肺巣が見られ、他の肺葉には淡褐色および黄褐色の無気肺巣がモザイク状に観察された。これら無気肺巣の認められた2例では、前縦隔リンパ節と気管気管支リンパ節が米粒大と粟粒大に腫大していた。こ

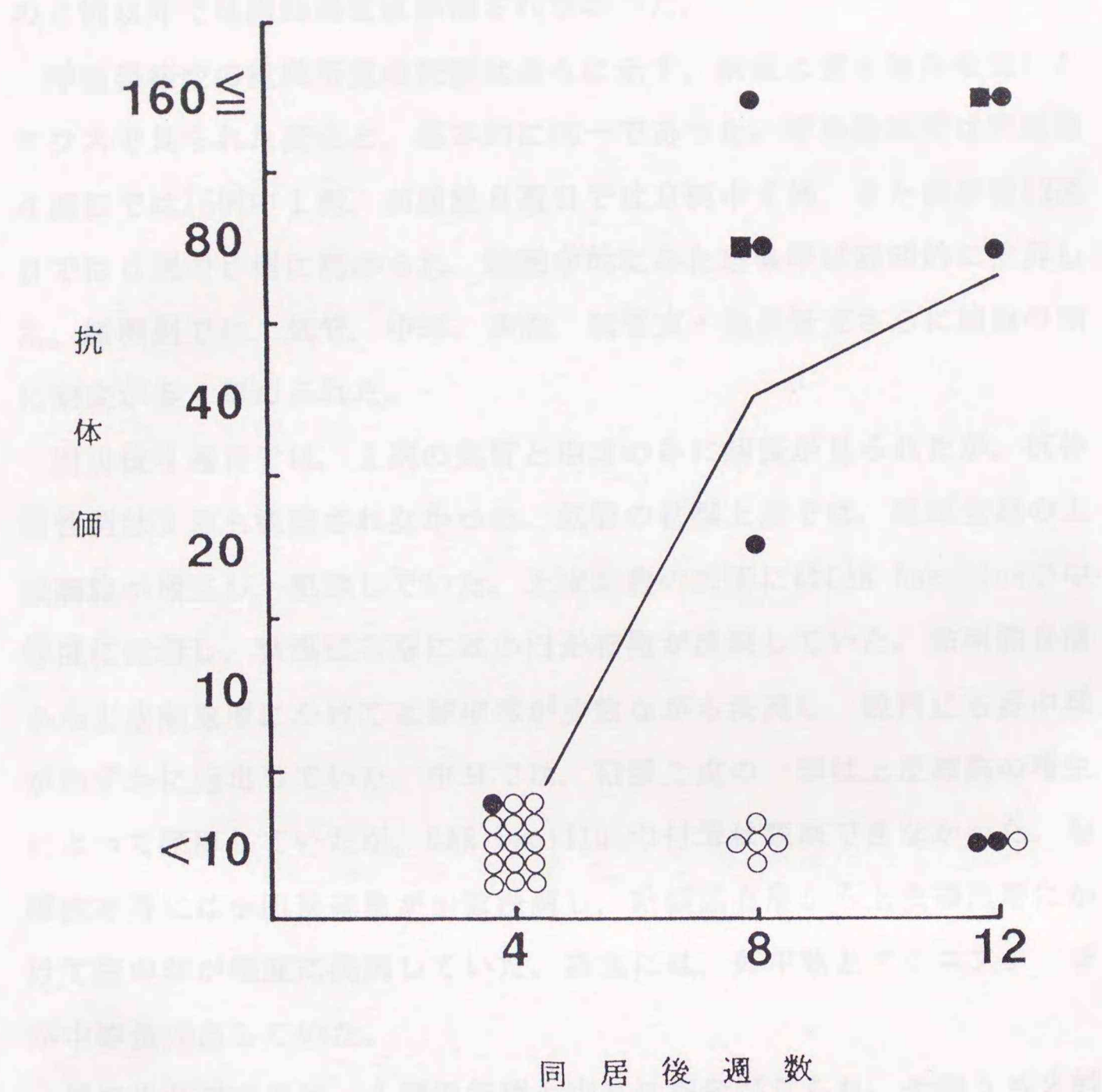


図 3. ケージ内同居感染マウス血清中の抗CAR bacillus IFA抗体価.
 ○: CAR bacillus陰性 (組織学的) マウス、●: CAR bacillus陽性 (組織学的) マウス、■: CAR bacillus陽性 (組織学的)、無気肺巣陽性 (肉眼的) マウス、——: 幾何平均.

の2例以外では肉眼病変は観察されなかった。

呼吸器病変の組織所見の概要は表4に示す。病変は菌を経鼻接種したマウスで見られた変化と、基本的に同一であった。呼吸器病変は同居後4週目では15例中1例、同居後8週目では9例中4例、また同居後12週目では6例中5例に認められ、組織学的にみた感染率は経時的に上昇した。組織別では、気管、中耳、鼻腔、気管支・細気管支さらに肺胞の順に病変が多く認められた。

同居後4週目では、1例の気管と中耳のみに病変が見られたが、抗体陽性例は1例も観察されなかった。気管の粘膜上皮では、ほぼ全域の上皮細胞が増生し、肥厚していた。上皮細胞の表面にはCAR bacillusが中等度に付着し、粘膜固有層には小円形細胞が浸潤していた。粘膜固有層から上皮細胞層にかけては好中球が少数ながら浸潤し、腔内にも好中球がわずかに滲出していた。中耳では、粘膜上皮の一部は上皮細胞の増生によって肥厚していたが、CAR bacillusの付着は観察できなかった。粘膜固有層には小円形細胞が少数浸潤し、粘膜固有層から上皮細胞層にかけて好中球が軽度に浸潤していた。鼓室には、好中球とマクロファージが中等量滲出していた。

同居後8週目では、4例の気管と中耳に病変が見られ、そのうち2例には肺病変、他の2例には鼻腔の病変が伴われていた。これら4例は1:20以上の抗体価を示した。気管の病変の強さは同居後4週目の発症例とほぼ同様であったが、1例では病変が進行し、肉眼的に無気肺巣が見られた。中耳では3例の粘膜上皮の表面にCAR bacillusが付着し、それらの粘膜の変化は同居後4週目のそれより進行していた。特に、粘膜固

表4. CAR bacillusケージ内同居感染マウスにおける主な呼吸器病変

病 変	同居後週数と病変の出現例数 (程度)		
	4 (n=15) ^a	8 (n=9)	12 (n=6)
鼻腔			
Cb ^b の付着	0 ^c	2(+~++) ^d	3(+)
小円形細胞浸潤	0	3(+~++)	2(+)
粘液化膿性滲出	0	3(+)	2(+~++)
気管			
Cbの付着	1(++)	4(++~+++)	5(+~+++)
小円形細胞浸潤	1(++)	4(++~+++)	5(+~+++)
化膿性滲出	1(++)	4(+~++)	4(+~++)
肺			
気管支・細気管支			
Cbの付着	0	1(++)	1(+++)
気管支周囲炎	0	2(++~+++)	2(+++)
化膿性滲出	0	2(+~+++)	2(+~+++)
肺胞			
化膿性滲出	0	2(++~+++)	1(+++)
肺気腫	0	1(++)	1(++)
中耳			
Cbの付着	0	3(+~++)	0
鼓室炎	1(+)	4(+~+++)	4(+~+++)

^a 検索動物数、^b CAR bacillus、^c 病変保有マウス数、

^d 病変の強さ：+；軽度，++；中等度，+++；重度

有層には多数の小円形細胞や少数の好中球が浸潤し、一部の上皮細胞は菲薄化していた。他の1例では同居後4週目の発症例と同様の軽度の鼓室炎が観察された。

肺病変に関して軽度病変を示した1例では、1肺葉の気管支の粘膜上皮の一部が、上皮細胞の増生によって肥厚し、これらの周囲組織に少数の小円形細胞が集簇していた。それらの上皮細胞の表面には少数の好中球と粘液が付着していたが、CAR bacillusは認められなかった。他の1例は、肉眼的に無気肺巢の認められた例で、肺病変は重度であった。すなわち、数個の肺葉において気管支から細気管支に至る粘膜上皮は上皮細胞の増生によって肥厚し、それらの上皮細胞の一部の表面には多数のCAR bacillusが付着していた。さらに、これらの気管支および細気管支には周囲炎が伴われ、リンパ濾胞が形成されていた。病変部の気管支と細気管支は拡張し、一部の腔内には好中球が充満していた。また、一部の細気管支には多数の好中球と少数のマクロファージが滲出し、周囲の肺胞やさらに広い範囲にマクロファージの滲出と肺胞上皮細胞の腫大、増生を伴った化膿性肺炎が観察された。肺炎巣付近の血管周囲に軽度の小円形細胞集簇が観察された。肺炎像の認められなかった部位の肺胞は気腫性であった。

鼻腔では、一部の呼吸器粘膜上皮が上皮細胞の増生によって肥厚し、杯細胞の軽度の増数が見られた。それら上皮細胞の表面にはCAR bacillusが付着し、粘膜固有層には小円形細胞が浸潤していた。さらに、粘膜固有層と上皮細胞層に少数の好中球が浸潤し、鼻腔内に少量の好中球が滲出していた。

同居後12週目では、1例の気管にのみ、他の1例では気管と中耳にの

み病変が見られたが、これら2例で抗体は検出できなかった。その気管の粘膜上皮では一部に上皮細胞の軽度の増生が見られ、その表面に少数のCAR bacillusが付着していた。中耳には同居後4週目の場合と同様に軽度の鼓室炎が観察された。他の3例では気管、中耳および鼻腔に病変が見られ、そのうちの2例に肺病変も見られた。これら3例は1:80以上の抗体価を示していた。いずれの病変も同居後8週目で見られたのと同程度の病変を示し、特に進行した組織像は観察されなかった。

3) 室内同居感染

同居後12週目に至っても非感染マウスにはCAR bacillusの感染を示す、1:10以上のIFA抗体価の上昇、臨床症状および呼吸器系の組織学的変化は観察されなかった。

5. 考 察

ラットおよびマウスへのCAR bacillusの経鼻接種実験において、いずれにも接種後1カ月以内に感染を成立せしめたことが血清学的 [6, 33] および組織学的 [6, 10, 34] に証明されている。本章における菌の経鼻接種によるマウスの呼吸器系の組織病変は、本質的には第I章や過去の報告例 [6, 8, 10, 24, 25, 34, 35, 41] のそれと同一であった。しかし、第I章で述べた経鼻接種ラットのそれに比較すると、化膿性気管支炎、化膿性細気管支炎および化膿性気管支肺炎が重度で、接種後11週目では1例ながら死亡例も観察された。Griffithら [8] は、CAR bacillusに自然感染したマウスに重度の化膿性細気管支炎と化膿性気管支肺炎を認め、若干の死亡例を観察している。これらの例にはSendai virusやPVMの混合感染が認められたが、彼ら [8] はマウスにおけるCAR bacillus感染は致死적であろうと述べている。Itohら [10] は、CAR bacillusに自然感染したラットでは死亡例は観察されなかったが、菌を経鼻接種したラットでは接種後10カ月を経て呼吸困難により死亡した例を少数ながら認めている。CAR bacillus感染においては、重度な気管支肺炎の場合に死亡を起こすようであるが、一般に死亡率はかなり低いとみなされる。

本章のケージ内同居感染実験では、同居後12週目までの間にほとんどのマウスに感染が成立した。診断方法別に感染率をみると、組織学的診断法によるものが最も高く、血清学的診断法がこれに次ぎ、肉眼的診断法はかなり低かった。IFA法はCAR bacillus感染の診断に有用な方法ではあるが、第III章で述べたごとく、マウスでは感染してから血中にIgG

抗体が出現するまでの期間は長く、しかも抗体価も低いために、感染初期では組織学的診断との併用による診断が必要である。

Itohら[10]は、CAR bacillus経鼻接種ラットにおいて、接種後1カ月目から気管に菌を認めたが、肺では確認できなかった。Kurisuら[16]は、CAR bacillusに自然感染したウサギにおいて、菌の付着を伴う病変が喉頭と気管に好発し、肺内気管支では少ないことを観察している。著者も第I章で、CAR bacillus-SMR株を経鼻接種したラットでは、病変が上部気道で早期に、しかも重度に出現することを所見した。本実験でも、ケージ内同居感染後CAR bacillusの感染とそれに伴う病変は気管で最も多く出現した。特に、抗体が検出されなかった例では、主に気管に本菌が付着していた事実は、本菌の好付着部位が気管を含む上部気道であることを強く示唆する。抗体陽性例では、組織病変の広がりや強さと抗体価の高さとは特に関連しなかった。

本実験では、ケージ内同居感染後中耳にCAR bacillusの付着と鼓室炎が感染初期より観察された。これに対し、菌を経鼻接種したラットでは、同様の病変は感染後期に見られた(第I章)。中耳における本菌の付着は、自然感染したラット[41]では報告されているが、マウスでは自然感染および実験感染ともに観察されていない。ラットとマウスにおける中耳の病変の出現時期の相違が感染経路によるのか、動物種差によるのかについては今後の課題である。

Ganawayら[6]は、CAR bacillus感染母ラットが哺乳している1~2週齢の仔ラットの上部気道に菌を認めた。Itohら[10]は感染ラットと2カ月間同一ケージで飼育した非感染ラット6例すべてに菌を認めている。これに対して、本実験ではケージ内同居感染後4週目および8週目のマ

ウスを対象にして組織学的検索が行われ、これによる感染率はそれぞれ7%(1/15)と44%(4/9)であって、Itohらの成績より明らかに低かった。Shojiら[34]は、ラット由来とマウス由来のCAR bacillusをそれぞれラットとマウスに経鼻接種した結果、菌が由来したと同種の動物を用いた方が感染率が高く、病変も強かったと報告している。

本章における室内同居感染実験では、感染の証拠は同居後12週間の観察期間の間で全く認められなかった。ラットを用いた室内同居感染実験において、同居後2カ月目で感染は成立しなかったが、7カ月目では4例すべてが感染している[10]。長期にわたるこの種の実験では、敷料のような汚染媒介物を介しての接触感染が起こる可能性も高い。

今回の成績から、CAR bacillusの伝播は、感染動物や菌に汚染された物質などに接触することにより、鼻腔または口腔-喉頭を経由して起こるものと考えられる。一方、本菌の空気感染は持続感染や伝播に、さして重要な役割は果たしているとは思われなかった。したがって、動物コロニーが本菌に汚染された場合、できるかぎり早期に罹患動物を発見し、感染動物や感染の疑われる動物を隔離、淘汰して、健康な動物との接触を絶つことによって、コロニー内での本菌の伝播をかなりの程度は防ぐことができるものと考えられる。

総 括

齧歯類の気道の粘膜上皮の線毛部にのみ付着するフィラメント状の桿菌に起因し、呼吸器マイコプラズマ症 (MRM)と同様の病変を示す疾患が、1980年にオランダで初めて認められた。この病原菌は1985年cilia-associated respiratory (CAR) bacillusと呼ぶことが提唱された。CAR bacillus感染症は、ラット、マウスやウサギに認められるが、本菌の培養が困難なこともあってその本態の究明が遅れている。本研究では、ラットとマウスに本菌を実験的に感染させ、これを用いて、本症の病態を究明するとともに血清学的診断法を確立し、さらに本菌の伝播様式を解明した。

先ず、ラットの自然感染例より分離されたCAR bacillus-SMR株をラットに経鼻接種し、接種後56日目まで定期的に3例ずつ解剖して、病理組織学的に検索した。臨床的には、接種後21日目より一部のラットが異常呼吸音を発し、また全例が体重増加の抑制、活動の低下と粗毛を示した。肉眼的には、同じく接種後21日目より肺の肥大と重量増加、無気肺巣、気管支周囲のリング状の乳白色充実域と気管支拡張、ならびに肺気腫などが認められた。組織学的には、接種後14日目より、鼻腔、気管、気管支、細気管支および中耳の粘膜上皮の線毛部に好銀性のフィラメント状CAR bacillus (長さ4~8 μ m) の付着が見られ、またそれらの粘膜固有層には小円形細胞浸潤が認められた。病変部の肺内気管支は拡張し、その周囲に重度の小円形細胞浸潤およびリンパ濾胞の形成からなる気管支

周囲炎が認められた。これらの病変は経時的に、気管支樹の近位から遠位へ拡大するとともに病像も重度となり、また接種後21日目以降では化膿性気管支肺炎も認められた。

上記の菌接種ラットの気管と肺内気管支の粘膜上皮を走査電顕と透過電顕で観察した。走査電顕ではCAR bacillusは接種後7日目からラットの気管粘膜上皮の線毛間および一部の無線毛細胞の表面に出芽するような形状で付着していた。接種後14日目以降では、気管粘膜の大部分はCAR bacillusが群生した苔状巣で覆われていた。またこれ以外の粘膜は腫大した無線毛細胞によって構成され、その表面にも本菌が出芽するような形状で付着していた。透過電顕では、接種後14日目より肺内気管支の粘膜上皮の線毛間に線毛と平行して菌が付着していた。菌が多数付着した線毛細胞では、線毛がほとんど消失する一方で微絨毛が発達していた。CAR bacillusは杯細胞（粘液細胞）の表面にも粘膜と直角方向に付着し、また侵された粘膜上皮では、線毛細胞と杯細胞の増生ならびにクララ細胞の減数・消失が観察された。

以上の所見から、CAR bacillusはラットの気道粘膜に感染する呼吸器系病原体であることが示された。菌接種ラットの気道の粘膜上皮における本菌の付着像は、電顕的には接種後7日目から観察されたが、組織病変が出現するまでには14日間を要した。感染は上部気道より肺内気管支へ下行性に拡大し、細気管支周囲には化膿性肺炎を惹起する場合もあった。病変部の粘膜の小円形細胞反応は菌の感染にもとづく局所の免疫反応とみなされた。

菌の感染を受けたラットとマウスの気管と肺内気管支を透過電顕で検

索した結果、CAR bacillusはいずれの粘膜上皮の宿主細胞に対しても表面に直角方向に付着していた。菌の宿主細胞付着端は細くなり（狭部）、先端が膨れているものもあった。付着した菌の先端部と宿主細胞の細胞膜との間には狭い空間が存在し、そこには細線維状構造物が両者を結ぶように存在していた。この構造物はルテニウム赤染色標本で一層明瞭に観察され、接着に参与する粘液物質と考えられた。菌の幅は、最狭部は $0.15\sim 0.18\mu\text{m}$ 、その他は $0.35\mu\text{m}$ 以下（多くは $0.24\sim 0.28\mu\text{m}$ ）で、長さは $3.5\sim 9.0\mu\text{m}$ 以上あり一定ではなかった。菌の表層は、約 10nm の細胞壁、約 20nm の中間層および約 7nm の細胞膜の3層からなり、細胞壁と細胞膜は単位膜構造を示していた。またルテニウム赤染色標本により、菌体表面に厚さ約 $10\sim 20\text{nm}$ の電子密度の高い微細顆粒状の粘液層が観察できた。本菌表面の粘液層は、別の菌体の粘液層あるいは宿主細胞の細胞膜、微絨毛さらに線毛とも直接接着しており、宿主細胞への付着に重要な役割を演じているとみなされた。

CAR bacillus感染症について、IFA法による血清学的診断法の精度を検討した。抗原はCAR bacillus-SMR株を実験感染させたマウスの気管切片の粘膜上皮細胞に付着している菌体と、菌を増殖させた発育鶏卵尿膜腔液の塗抹標本中に存在する菌体をもとにして2種類作製した。本菌自然感染ラットコロニーより得られた13例のラット血清を検索した結果、9例に抗体が検出された（抗体価は $1:10\sim 1:80$ ）。感染ラットの病理組織学的検索で菌は抗体陽性例にのみ認められ、血清学的診断と組織学的診断とが一致した。なお、気管粘膜に付着している菌体抗原と発育鶏卵尿膜腔液中に存在している菌体抗原のいずれを用いて抗体測定を行って

も、同じ血清試料から得られた抗体価に差はみられなかった。またそれら2種類の菌体抗原は、既知の呼吸器系病原体に対する抗体陽性のラット血清および正常対照のラット血清に対しては反応を示さなかった。次に、CAR bacillus自然感染ウサギコロニーより得られた15例のウサギ血清を検索した結果、4例に抗体が検出された（抗体価は1:10と1:40）。また、これら15例のウサギにおける病理組織学的検索では、抗体陽性3例と抗体陰性3例で菌が認められ、血清学的診断と組織学的診断の成績は必ずしも一致しなかった。これは、ウサギが本菌に感染した場合、病変が軽度なため組織学的には菌体を見出し難いことと、菌が感染してから抗体が上昇するまでの期間が長いことなどの理由によるものと思われる。さらに、経鼻接種ラットにおけるIgG抗体の測定結果では、抗体は接種後14日目から検出され、抗体価が28日目で最高に達した後（抗体価1:80と1:160）、実験終了の56日目でも維持されていた。

以上の成績から、IFA法はCAR bacillus感染症の血清学的診断に極めて有用であることが示された。また、ラットが感染してから抗体が陽転するまでに少なくとも2～3週間が必要であった。

最後に、本菌の伝播様式を明らかにするためにマウスを用いてCAR bacillusの同居感染実験を行った。感染の診断は、病理組織学的方法とIFA法による血清学的方法によった。感染マウスはCAR bacillus-SMR株を経鼻接種して作出し、これを非感染マウスと同一ケージに入れ、12週間同居飼育を行った。その結果、同居後4週目から感染が成立し始め、同居後12週目では大部分のマウスが感染した（血清学的診断 3/6例、組織学的診断 5/6例）。他方、室内同居感染の成立の有無を検討するため、

本菌を経鼻接種して感染させたマウスを入れたケージの周囲に、約3 cmの距離を置いて非感染マウスを入れたケージを配置し、12週間飼育した。しかし、感染例は1例も認められなかった。

以上の成績から、CAR bacillusの主要伝播様式は感染動物や汚染媒介物を介しての接触感染であるとみなされた。

参 考 文 献

1. Becci, P. J., McDowell, E. M., and Trump, B. F. 1978. The respiratory epithelium. 2. Hamster trachea, bronchus, and bronchioles. J. Natl. Cancer Inst. 61: 551-561.
2. Center, D., and McFadden, R. 1985. Pulmonary defence mechanisms. pp. 460-418. In: Pathologic Physiology, 7th ed. (Sodeman, W. A. Jr. and Sodeman, T. M. eds.), W. B. Saunders, Philadelphia.
3. Cheville, N. F. 1983. Pathogenic intracellular microorganisms. pp. 451-502. In: Cell Pathology (Cheville, N. F. ed.), Iowa State University Press, Ames.
4. Costerton, J. W., Ingram, J. M., and Cheng, A. J. 1974. Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. Bacteriol. Rev. 38: 87-110.
5. 藤原公策 1984. 実験動物感染症への対応－経緯と現状－. 獣医学 1: 81-106.
6. Ganaway, J. R., Spencer, T. H., Moore, T. D., and Allen, A. M. 1985. Isolation, propagation, and characterization of a newly recognized pathogen, cilia-associated respiratory bacillus of rats, an etiological agent of chronic respiratory disease. Infect. Immun. 47: 472-479.

7. Giddens, W. E., Whitehair, C. K., and Carter, G. R. 1971.
Morphologic and microbiologic features of trachea and lungs
in germfree, defined-flora, conventional, and chronic
respiratory disease-affected rats. Am. J. Vet. Res. 32:
115-129.
8. Griffith, J. W., White, W. J., Danneman P. J., and Lang C.
M. 1988. Cilia-associated respiratory (CAR) bacillus
infection of obese mice. Vet. Pathol. 25: 72-76.
9. Innes, J. R. M., McAdams, A. J., and Yevich, P. 1956.
Pulmonary disease in rats: A survey with comments on
"Chronic murine pneumonia". Am. J. Pathol. 32: 141-159.
10. Itoh, T., Kohyama, K., Takakura, A., Takenouchi, T., and
Kagiyama, N. 1987. Naturally occurring CAR bacillus
infection in a laboratory rat colony and epizootiological
observations. Exp. Anim. 36: 387-393.
11. Jeffery, P. K. and Reid, L. 1975. New observations of rat
airway epithelium: A quantitative and electron microscopic
study. J. Anat. 120: 295-320.
12. Jersey, G., Whitehair, C. K., and Carter, G. R. 1973.
Mycoplasma pulmonis as the primary cause of chronic
respiratory disease in rats. J. Am. Vet. Med. Assoc. 163:
599-604.

13. Kagiya, N., Takakura, A., and Itoh, T. 1986.
A serological survey on 15 murine pathogens in mice and rats. Exp. Anim. 35: 531-536.
14. Kasper, D. L., Hayes, M. E., Reinap, B. G., Craft, F. O., Onderdonk, A. B., and Polk, B. F. 1977. Isolation and identification of encapsulated strains of Bacteroides fragilis. J. Infect. Dis. 135: 75-81.
15. Kraft, V., Meyer, B., Thunert, A., Deerberg, F., and Rehm, S. 1982. Diagnosis of Mycoplasma pulmonis infection of rats by an indirect immunofluorescence test compared with 4 other diagnostic methods. Lab. Anim. 16: 369-373.
16. Kurisu, K., Kyo, S., Shiimoto, Y., and Matsushita, S. 1990. Cilia-associated respiratory bacillus infection in rabbits. Lab. Anim. 40: 413-415.
17. Lane, B. P. and Gordon, R. 1974. Regeneration of rat tracheal epithelium after mechanical injury. I. The relationship between mitotic activity and cellular differentiation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145: 1139-1144.
18. Lillie, R. D. 1954. The Warthin technic. pp. 401-402. In: Histopathologic Technic and Practical Histochemistry (Lillie, R. D. ed.), The Blakiston Co. Inc., New York.

19. Lindsey, J. R. and Cassell, G. H. 1973. Experimental Mycoplasma pulmonis infection in pathogen-free mice. Models for studying mycoplasmosis of the respiratory tract. Am. J. Pathol. 72: 63-90.
20. Lindsey, J. R., Cassell, G. H., and Baker, H. J. 1978. Diseases due to mycoplasmas and rickettsias. pp. 1481-1550. In: Pathology of Laboratory Animals (Benirschke, K., Garner, F. M., and Jones, T. C. eds.), Springer-Verlag, New York.
21. Lindsey, J. R., Davidson, M. K., Schoeb, T. R., and Cassell, G. H. 1985. Mycoplasma pulmonis-host relationships in a breeding colony of Sprague-Dawley rats with enzootic murine respiratory mycoplasmosis. Lab. Anim. Sci. 35: 597-608.
22. Lindsey, J. R., Baker, H. J., Overcash, R. G., Cassell, G. H., and Hunt, C. E. 1971. Murine chronic respiratory disease. Significance as a research complication and experimental production with Mycoplasma pulmonis. Am. J. Pathol. 64: 675-716.
23. Luft, J. H. 1971. Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. Anat. Rec. 171: 347-368.

24. MacKenzie, W. F., Magill, L. S., and Hulse, M. 1981.
A filamentous bacterium associated with respiratory disease
in wild rats. Vet. Pathol. 18: 836-839.
25. Matsushita, S. 1986. Spontaneous respiratory disease
associated with cilia-associated respiratory (CAR) bacillus
in a rat. Jpn. J. Vet. Sci. 48: 437-440.
26. 中川雅郎 1984. マウスおよびラットにおける Mycoplasma
pulmonis 感染の診断と疫学に関する最近の知見. 実験動物
33: 141-149.
27. Nakagawa, M. Saito, M., Suzuki, E., Nakayama, K.,
Matsubara, J., and Muto, T. 1984. Ten years-long survey on
pathogen status of mouse and rat breeding colonies.
Exp. Anim. 33: 115-120.
28. Newberne, P. M., Salmon, W. D., and Hare, W. V. 1961.
Chronic murine pneumonia in an experimental laboratory.
Arch. Pathol. 72: 224-233.
29. Onderdonk, A. B., Kasper, D. L., Cisneros, R. L., and
Bartlett, J. G. 1977. The capsular polysaccharide of
Bacteroides fragilis as a virulence factor: Comparison of
the pathogenic potential of encapsulated and unencapsulated
strains. J. Infect. Dis. 136: 82-89.
30. 小山力 1977. 原虫検査法. pp. 298-307. 実験小動物の感染症
(藤原公策, 中川雅郎, 石井俊雄, 高垣善男編), ソフトサイエン
ス, 東京.

31. Pack, R. J., Al-Ugaily, L. H., and Morris, G. 1981.
The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse:
A quantitative light and electron microscope study.
J. Anat. 132: 71-84.
32. Reichenbach, H. and Dworkin, M. 1981. Introduction to the
gliding bacteria. pp. 315-324. In: The Prokaryotes. A
Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of
Bacteria (Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G., Balows,
A., and Schlegel, H. G. eds.), Springer-Verlag, Berlin.
33. Shoji, Y., Itoh, T., and Kagiya, N. 1988. Enzyme-linked
immunosorbent assay for detection of serum antibody to CAR
bacillus. Exp. Anim. 37: 67-72.
34. Shoji, Y., Itoh, T., and Kagiya, N. 1988.
Pathogenicities of two CAR bacillus strains in mice and
rats. Exp. Anim. 37: 447-453.
35. Shoji, Y., Itoh, T., and Kagiya, N. 1992. Propagation of
CAR bacillus in artificial media. Exp. Anim. 41: 231-234.
36. Springer, E. L. and Roth, I. L. 1973. The ultrastructure
of the capsules of Diplococcus pneumoniae and Klebsiella
pneumoniae stained with ruthenium red. J. Gen. Microbiol.
74: 21-31.

37. Suzuki, E., Matsubara, J., Saito, M., Muto, T., Nakagawa, M., and Imaizumi, K. 1982. Serological survey of laboratory rodents for infection with Sendai virus, mouse hepatitis virus, reovirus type 3 and mouse adenovirus. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 35: 249-254.
38. Tajima, M. and Yagihashi, T. 1982. Interaction of Mycoplasma hyopneumoniae with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. Infect. Immun. 37: 1162-1169.
39. Tajima, M., Yagihashi, T., and Miki, Y. 1982. Capsular material of Mycoplasma gallisepticum and its possible relevance to the pathogenic process. Infect. Immun. 36: 830-833.
40. 田島正典 1984. マイコプラズマの発病病理を規定する二, 三の問題. 獣医学 1: 61-79.
41. Van Zwieten, M. J., Solleveld, H. A., Lindsey, J. R., de Groot, F. G., Zurcher, C., and Hollander, C. F. 1980. Respiratory disease in rats associated with a filamentous bacterium: A preliminary report. Lab. Anim. Sci. 30: 215-221.
42. Waggle, K. S., Spencer, T. H., and Allen, A. M. 1987. Cilia associated respiratory (CAR) bacillus infection in New Zealand white rabbits. Lab. Anim. Sci. 37: 533.

謝 辞

終わりにのぞみ、本論文作成にあたり、終始ご高篤なご指導とご校閲を賜りました、北海道大学獣医学部比較病理学講座板倉智敏教授に対し衷心より厚く御礼申し上げます。また本論文のご校閲を賜りかつ有意義なご助言をいただきました北海道大学獣医学部実験動物学講座波岡茂郎教授、同家畜解剖学講座杉村誠教授、同獣医公衆衛生学講座橋本信夫教授に対し深謝申し上げます。

さらに、本研究の実施にあたりご協力とご助言をいただきました放射線医学総合研究所障害基礎研究部故鹿島正俊博士、同技術部松本恒弥博士および同生理病理研究部大津裕司博士、ならびに国立予防衛生研究所獣疫部故中川雅郎博士および鈴木映子博士に対し感謝いたします。

Pathological Studies on Cilia-Associated Respiratory (CAR) Bacillus Infection in Rats and Mice

Satoru MATSUSHITA

National Institute of Radiological Sciences

4-9-1 Anagawa, Inage-ku, Chiba-shi, Chiba 263, Japan

Filamentous bacilli colonizing the ciliary borders of the airway epithelium were found for the first time, in rats suffering from a disease similar to murine respiratory mycoplasmosis (MRM), in the Netherlands in 1980. This organism was designated cilia-associated respiratory (CAR) bacillus in 1985. Although CAR bacillus infection has occurred in rats, mice and rabbits, little information is known on the disease entity because of difficulty in culturing the bacilli in cell-free media. This paper was carried out to investigate the pathogenesis, transmission and serodiagnosis of CAR bacillus infection by using experimentally infected rats and mice.

Rats were intranasally inoculated with the CAR bacillus-SMR strain obtained from a spontaneously infected rat, necropsied chronologically up to day 56 postinoculation (p.i.) and examined histopathologically. Clinically, some rats showed respiratory signs and all rats revealed body weight loss, decreased activity and ruffled fur from day 21 p.i. Grossly, the lungs showed enlargement with an increase in weight,

atelectasis, bronchiectasis with milky white ring appearance in the peribronchial areas, and emphysema from day 21 p.i.

Histologically, argentaffin filamentous CAR bacilli (4 to 8 μ m in length) were colonized on the ciliated epithelium of the nasal cavity, trachea, bronchus, bronchiole and middle ear associated with lymphoid infiltration in the lamina propria from day 14 p.i. In the affected intrapulmonary airways, there were bronchiectasis and peribronchitis consisting of peribronchial lymphoid cuffings and lymphoid follicle formation. These lymphoid cell aggregations were regarded as a local immuno-reactive change. The lesions progressed and expanded from the upper to lower airways with time. Focal purulent bronchopneumonia was also observed around the bronchioles of some cases from day 21 p.i.

On scanning electron microscopy (SEM), the CAR bacilli were colonized either among cilia of some ciliated cells or on the nonciliated cells in the tracheal epithelium of the rats from day 7 p.i. From day 14 p.i. most of the tracheal lining epithelium was covered with "moss-grown" foci consisting of clusters of the CAR bacilli. Transmission electron microscopy (TEM) revealed that the CAR bacilli were colonized among and parallel to cilia of the intrapulmonary airway epithelial cells from day 14 p.i. Most ciliated cells having numerous bacilli lost almost all their cilia, while they had many elongated microvilli. The CAR bacilli were also colonized on

goblet cells (mucous cells), being perpendicular to their surface. In the affected airway epithelium, there was hyperplasia of the ciliated cells and goblet cells, while there was a decrease or loss in number of Clara cells.

The findings obtained here indicate that CAR bacillus is a primary respiratory pathogen in rats.

On TEM the ends of the CAR bacillus that colonized perpendicularly to the host cell surface were thinner than the other part of the bacterial body. Fibrillar structures were observed in narrow spaces between the end of the bacilli and the free surface of host cells. These structures seemed to be mucous substance relating to their attachment, because they were positively stained with ruthenium red (RR). The widths of the thin end and the other parts of the CAR bacilli were 0.15 to 0.18 μm and less than 0.35 μm (mostly 0.24 to 0.28 μm), respectively. The length of the bacilli varied from 3.5 to more than 9 μm . The bacilli were enclosed by a three-layers; cell wall, electron-lucent inter-space and cell membrane, approximately 10, 20 and 7 nm thick, respectively. The cell wall and cell membrane appeared as a triple-layered unit membrane. An electron-dense fine granular slime layer, approximately 10 to 20 nm thick was demonstrated on the bacterial surface when the tissues were stained with RR. The slime layer was attached to the same layer of another CAR bacilli, as well as cell membranes, microvilli and cilia of the host cells. These findings suggest that the slime layer plays an important role in the

bacterial attachment to the host cells.

Serodiagnosis of CAR bacillus infection by the indirect immunofluorescence assay (IFA) technique was performed. CAR bacilli adsorbed on the tracheal epithelium of mice experimentally infected with CAR bacillus-SMR strain and the bacilli existed in the smear of allantoic fluid from embryonated chicken eggs inoculated with the same strain were used as the antigen. Nine of 13 serum samples collected from a naturally infected rat colony were positive for IFA antibody (titers 1:10 to 1:80). All antibody-positive cases had histological lesions characteristic of CAR bacillus infection. The titers of positive-sera tested with the antigen derived from the bacilli adsorbed on the tracheal epithelium were in agreement with those tested with the antigen derived from the bacilli in the smear of allantoic fluid. These two types of antigen had no positive reaction to the sera collected from rats infected with known respiratory pathogens or from normal control rats. Four of 15 rabbit sera collected from a rabbit colony naturally exposed with CAR bacilli were positive for IFA antibody (titers 1:10 and 1:40). Three of four antibody-positive and three of 11 antibody-negative cases possessed histological lesions due to CAR bacillus infection. This inconsistency seemed to result from the following; it was difficult to detect CAR bacilli in rabbits because their lesions were usually slight in

degree, and a long period was needed for the antibody to be demonstrated in the sera after infection. When the sera collected from experimentally infected rats mentioned above were tested, seroconversion occurred between days 14 and 21 p.i. Antibody titers reached a maximum on day 28 p.i. (titers 1:80 and 1:160), which continued until the end of the experiment (day 56 p.i.).

From the results presented here, it was suggested that the IFA technique is available for the diagnosis of CAR bacillus infection in all tested animal species.

Finally, the mode of transmission for the CAR bacillus in mice was examined experimentally. Diagnosis of the infection was made with serological (IFA technique) and histopathological methods. Some uninfected mice kept with intranasally infected mice as the transmitter in the same cage showed positive infection at 4 weeks after contact. And most of them were infected at 12 weeks after contact (serologically, 3/6 cases; histologically, 5/6 cases). On the other hand, during the observation period (12 weeks), there was no evidence of infection in the mice kept in another cage at 3 cm apart within the same room, though separated from the cage containing the transmitter mice.

These results suggest that the main mode of CAR bacillus transmission is due to direct contact with the infected animals or fomites contaminated by infected animals.

