

結核喀痰系および切除肺系非定型抗酸菌の研究

第1報 非定型抗酸菌の分離およびその集落性状について

河 合 恭 幸

広島大学医学部細菌学教室 (主任 占部薫教授)

受付 昭和32年10月28日

緒 言

非病原性といわれる抗酸菌が自然界に広汎かつ濃厚に分布存在することについてはすでに古くより数多くの文献に指摘されているところであるが¹⁻⁷、一般にこれらは病原性のないいわば雑菌の存在として看過されてきた観があつた。1936年占部¹⁻⁴)も、これらの菌群に関する広汎な研究をおこなっているが、その結果それらの中には動物体に対してある程度の病原性を示すものがあつたことを認め、さらにその後も占部⁸)はかかる菌群中にはヒトに対してもある程度病原性を発揮しうようになるもののあることを示唆している。ところが漸く最近に至り、米国においていわゆる chromogenic acid-fast bacilli によると思われる人体疾患が相ついで発見されるに及んで⁹⁻¹⁹、これらの抗酸菌群に関する一般の関心もようやく高まり、この方面に関する研究はにわかに活発化してきた²⁰。しかるにわが国においては、いまだこの方面に関しては必ずしも一般の関心をひくいたつてはいないものようであつて、現在までのところようやく2、3の報告²¹⁻²⁴)がみられるにすぎない。

そこで私は、結核患者の喀痰および切除肺材料より結核菌以外の抗酸菌の検出分離をこころみ、その結果えられた分離菌株について諸種生物学的性状とか、実験動物に対する態度などとかについて追究し、さらにそれによつて得られた知見と、このような菌株の分離されたヒトの病症との間の関連性などについても検討の歩をすすめた。

今回はその第1報として主としてこのような抗酸菌の分離とその集落性状について報告する。

なお、私は以下生体材料例えば喀痰や切除肺などから検出されるところの結核菌に似て非なる抗酸菌に対して占部²⁵、McMillen²⁶)その他に従い、とくに「非定型抗酸菌」という名称を用いることを、ここに予め断つておきたい。

第1章 非定型抗酸菌の分離

第1節 結核患者喀痰よりの分離培養

1. 実験方法

入院中の肺結核患者の早朝の喀痰を採り、それを一方では4% H₂SO₄をもつて住吉法に準じて前処理したのち、これを岡・片倉培地に接種し、他方では小川の方法により4ないし7% NaOHで前処理したのち3%小川培地に接種する2方法によつた。

2. 実験成績

表1に示すように3,281例の喀痰を硫酸法によつて培養した結果では、17例(0.5%)の非定型抗酸菌と173例(5.2%)の結核菌とをそれぞれ分離しえた。他方、3,763例の喀痰を小川法によつて培養した結果では23例(0.6%)の非定型抗酸菌と191例(5.2%)の結核菌とがそれぞれ分離できた。なお、同一培地上に結核菌と非定型抗酸菌との混生したものは、いずれの場合にも1例もみられなかつた。したがつて、計7,044例の喀痰培養により40例(0.6%)の非定型抗酸菌と364例(5.2%)の結核菌とが分離しえられたことになつた。

表1 結核患者喀痰よりの非定型抗酸菌分離培養成績

被検材料	前処理法	培養例数	非定型抗酸菌	結核菌	結核菌と非定型抗酸菌との混生
喀痰	住吉法	3,281	17 (0.5%)	173 (5.2%)	0
	小川法	3,763	23 (0.6%)	191 (5.2%)	0
計		7,044	40 (0.6%)	364 (5.2%)	0

第2節 結核切除肺よりの分離培養

1. 実験方法

切除肺材料について切除後直ちに培養を行わず、Hobby²⁷)の方法を援用して、被検材料を無菌的に-2°Cの氷室中に24時間冷凍保存した後、これを無菌的に切開して病巣をとり出し、滅菌磁石乳鉢中で磨碎し、1% NaOHで前処理後3%小川培地に接種した。他方、教室の山下の考案した方法²⁸)²⁹)にしたがつて残余の病巣をKirchner Sy-Ser 培養液中に移し、これを5°Cの冷蔵庫中に30ないし110日間保存した後、上記同様に前処理後3%小川培地に接種した。

2. 実験成績

表2に示したように冷凍保存1日後培養では123例中3例(2.4%)の非定型抗酸菌と79例(64.2%)の結核菌

表2 切除肺よりの非定型抗酸菌分離培養成績

被検材料	培養前条件	保存日数	培養方法		培養例数	非定型抗酸菌	結核菌	結核菌と非定型抗酸菌との混生
			前処理	培養基				
切除肺	Kirchner Sy-Ser 中冷蔵	30—110日	1% NaOH	3% 小川培地	172	10 (5.8%)	55 (32%)	3 (1.7%)
	冷凍保存	1日	1% NaOH	3% 小川培地	123	3 (2.4%)	79 (64.2%)	1 (0.8%)
計					295	13 (4.4%)	134 (48.1%)	4 (1.4%)

とが得られた他に非定型抗酸菌と結核菌との混生例が1例(0.8%)得られた。また、Kirchner Sy-Ser 中に冷蔵30—110日後の培養では、172例中10例(5.8%)の非定型抗酸菌と55例(32%)の結核菌とが得られた他に非定型抗酸菌と結核菌との混生例が3例(1.7%)得られた。

以上の成績よりみると、非定型抗酸菌の分離頻度は、Kirchner Sy-Ser 培液に冷蔵したさいの方が冷凍保存した場合に較べてより高いようであつた。

3. 非定型抗酸菌を分離しえた切除肺材料

a) 切除した肺区域：供試の切除肺区域と非定型抗酸菌の分離陽性との関係についてみるに右上葉S1(肺尖区域)またはS2(後肺尖区域)では109例中4例(3.7%)に、左上葉S₁₊₂(肺尖および後肺尖区域)では99例中7例(7.1%)に、右中葉では14例中1例(7.1%)におよび右下葉S6(上・下葉区域)では16例中1例(6.3%)において非定型抗酸菌が分離できた。すなわち左上葉、右中葉における病巣を供試材料としたさいに最も分離頻度が高かつた。

b) 切除病巣の種類：供試材料として用いた切除肺材料は主として被包乾酪巣中心部の乾酪物質および空洞内壁上に附着した内容物であつたが、前者では148例中7例(4.7%)にまた後者では127例中4例(3.1%)においてそれぞれ非定型抗酸菌が分離された。その他にも結節性撒布巣を用いたさいにも20例中2例(10%)に非定型抗酸菌が分離できた。

c) 抗酸菌鏡検所見：計13株の非定型抗酸菌が分離しえられた上記の各病巣を Ziehl-Neelsen 法による染色後鏡検した結果、すべて抗酸菌陽性で、その程度はGaffky IないしIX号であり、そのうち一般にGaffky II~III号程度のものが最も多かつた。

第2章 分離抗酸菌の分類

以上によつて分離しえた非定型抗酸菌の喀痰系(喀痰より分離しえた菌株)40株、切除肺系(切除肺より分離しえた菌株)13株ならびに他所より分与をうけた喀痰系5株計58株を戸田・占部³⁰⁾にしたがつて、主としてそれらの集落の色調にもとずき分類すると表3のようである

表3 集落の色調よりみた分離抗酸菌の分類

抗酸菌	集落の色調	白色系	黄色系	橙色系	紅色系	計
喀痰系		21 (36.2%)	13 (22.4%)	6 (10.3%)	5 (8.6%)	45 (77.6%)
切除肺系		2 (3.4%)	3 (5.2%)	7 (12.1%)	1 (1.7%)	13 (22.4%)
計		23 (39.6%)	16 (27.6%)	13 (22.4%)	6 (10.3%)	58

すなわち、喀痰系では白色系株が最も多く45株中21株であり、切除肺系では橙色系株が最も多く13株中7株を占めた。なお、両系菌を合計した58株についてみるに白色系株が23株(39.6%)で最も多く、次で黄色系株が16株(27.6%)、橙色系株13株(22.5%)であり、紅色系株は6株(10.3%)で最も少なかつた。

次に、これらの58株の菌株を米国 Veterans Administration Hospital における Mycobacteria 協同研究会の方法³¹⁾によつて分類すると表4のように photochromogenic strain (光にあてると色素を産生するもの)は計4株(6.9%)にすぎなくて、non-photochromogenic strain (色素を産生しないもの)は22株(37.9%)でありその他の32株(55.1%)はいずれも scotochromoge-

nic strain (光にあてなくとも暗中で色素を産生するもの)で最も多かつた。

表4 色素産生と光線との関係よりみた分類

抗酸菌	菌株	photochromogenic strain	scotochromogenic strain	non-photochromogenic strain	計
喀痰系		3 (5.2%)	22 (37.9%)	20 (34.4%)	45
切除肺系		1 (1.7%)	10 (17.2%)	2 (3.5%)	13
計		4 (6.9%)	32 (55.1%)	22 (37.9%)	58

第3章 分離抗酸菌の集落性状

第1節 肉眼的ないし外観的性状

結核患者喀痰ならびに切除肺より分離された計58株の抗酸菌の岡・片倉培地における初代ないし2代目の集落発生後1週間前後における肉眼的な外観性状について、その外形、大きさ、構造、表面、辺縁、色調、光沢性、透明度、硬度、乾湿性および粘濁性の11項目について観察したところ概略次のような所見をえた。

1. 外形と大きさ：表5のように、供試58株のうち大きさ3mm前後の径を有する円形集落が最も多くて28株(48.3%)を占め、径1mm以下の小円形集落を結ぶものが16株(27.6%)であつて計44株(75.9%)において円形集落の発育をみた。残余の14株(24.1%)はすべて類円形の中ないし小型集落を示し、不正形および径5mm以上の大型の集落をむすぶ菌株はみられなかつた。

表5 分離抗酸菌集落の外形ならびに大きさ

外形 大きさ	円形	類円形	不正形	計
大	0	0	0	0
中	28 (48.3%)	13 (22.4%)	0	41 (70.7%)
小	16 (27.6%)	1 (1.7%)	0	17 (29.3%)
計	44 (75.9%)	14 (24.1%)	0	58

注：大…径5mm以上，中…径3mm前後，小…径1mm以下

2. 構造：58株すべて均質な集落構造を示した。

3. 表面、辺縁および光沢性：同一患者よりつづけて分離しえた菌株でそれらの集落性状の等しかつた13株を加えて計14株(24.2%)においては表面凹凸、辺縁は平滑と波状との混合性であつたが、他の44株はいずれも表面、辺縁ともに平滑な集落を形成した。また集落が光沢性であるものは37株(63.8%)であり、その他の21株はいずれも非光沢性であつた。

4. 透明度および硬度：58株すべての集落が不透明であつたが、その硬度ではやや硬いものが7株(12.1%)で、その他の51株はいずれも柔軟であつた。

5. 色調：色調についてはすでに第2章において述べかつその概要は表3にかかげた。

そして供試58菌株のうち白色系株が最多数を占めていたことも既述の通りであるが、これはその中に含まれるところの同一患者よりつづけて分離された13株の山本系菌株ならびに同4株の二宮系菌株がいずれもすべて白色系集落形成菌であつたことにもとづくものである。

6. 乾湿性：表6のように湿潤性(S型)のものは58株中51株(87.9%)で大多数を占め、乾燥性(R型)のものはわずかに7株(12.1%)にすぎなかつた。なお、この乾燥性のもの7株の集落の色調は白色系と紅色系とがいずれも3株ずつであり、橙色系は1株のみであつて黄色系は1株もなかつた。また、湿潤性のもの51株のうちには、継代培養中に特発的に乾燥性株に変異したもの

が白色系株に7株、橙色系ならびに紅色系株に各1株宛計9株認められた。

表6 分離抗酸菌集落の色調と乾湿性

菌株	乾湿性		計	%
	湿潤性	乾燥性		
白色系	20	3	23	39.7
黄色系	16	0	16	27.6
橙色系	12	1	13	22.4
紅色系	3	3	6	10.3
計	51 (87.9%)	7 (12.1%)	58	100

7. 粘濁性：供試58菌株のむすぶ集落の粘濁性の程度を牽縷性のものより、軽度の粘濁性を有するものおよび粘濁性の認められないものに至るまで段階を設けて分類したものが表7である。すなわち、牽縷性が多少にかかわらず認められる集落をむすぶ菌株は58株中わずかに4株(7%)にすぎなくて、反対に粘濁性の認められないものが35株(60.2%)の多きに達し、その他にそれのほとんど認められないものが9株(15.5%)あり、これを併せると計44株(75.7%)となり、大多数を占めていた。

表7 分離抗酸菌集落の粘濁性

粘濁性の程度		菌株数	%
牽縷性		2	3.5
やや牽縷性		2	3.5
粘 濁 性	強	3	5.2
	弱	7	12.1
	殆ど無	9	15.5
無		35	60.2
計		58	100

第2節 集落初発所要日数

58株の非定型抗酸菌の分離培養当初における集落初発所要日数は表8に一括して示した。

すなわち、7日以内に集落の初発を認めたものは計29株(50%)で半数を占め、14日以内に発育したものを加えると計54株(93.1%)となり、培養後14日目までに初発集落を形成するものが大半であつて、集落の初発に30日以上を要したものは1例も認められなかつた。すなわち、分離58菌株ともにすべて人型結核菌に比してその発育がきわめて迅速であるといつてよからう。なお、このような集落初発所要日数と分離に供用した材料の種類との間には特別の関係は認められなかつた。

表8 分離抗酸菌の集落初発所要日数

菌株	初発所要日数	<3日	3~7日	8~10日	11~14日	15~30日	>30日	計
喀痰系		1	21	12	10	1	0	45
切除肺系		1	6	2	1	5	0	15
計		2 (3.4%)	27 (46.6%)	14 (24.1%)	11 (19.0%)	4 (6.9%)	0	58

第3節 継代培養中における集落ないし菌株の変化について

分離非定型抗酸菌を岡・片倉培地に継代培養しているうちに、前述(第3章, 第1節の5)したように湿潤性集落をむすぶ51菌株のうち9株が特発的に乾燥性集落を形成するように変異した。

その他注目に値することには、喀痰系菌株45株のうち4株がそれぞれ3ないし8代目までかろうじて継代できたのみでその後はKirchner Sy-Ser 培液にも移植してみる等の手段をも講じたにもかかわらず遂に消滅した。また、切除肺系菌株13株中の2株も3ないし5代目以後において上記同様に消滅するに至った。

総括ならびに考案

1) 結核患者喀痰よりの非定型抗酸菌の分離にあつては、住吉法と小川法とでは、いずれも大略同様の成績がえられ、両法間にとくにいうほどの有意の差は認められないようであつた。また結核菌の分離陽性率にあつてもまた両法はほぼ同様であつた(表1)。

2) 切除肺よりの非定型抗酸菌分離培養陽性度は、材料を予めKirchner Sy-Ser 培液中に30—110日間の長期にわたり冷蔵した方が冷凍1日保存したさいに較べて、より良結果が期待できるようであつた。ただし、結核菌の分離成績では反対に冷凍1日保存の方がより良好であつた(表2)。なおこれは山下²⁸⁾の成績とも一致するところである。

3) 同一培地上に結核菌と非定型抗酸菌とが混生したものは、切除肺よりの分離培養において4例みられたのみで、その他の大多数の場合にあつては非定型抗酸菌のみが単独に発育した(表2)。

4) 被検材料として用いた切除肺病巣は被包乾酪巣、空洞内容物および結節性撒布巣であつたが、非定型抗酸菌がこれらのいずれからより多く分離されるかについては、例数が少なかつたため今回は、いまだ何とも論断しがたい。

5) 58株の分離非定型抗酸菌を戸田・占部³⁰⁾に従つて分類すると、白色系(39.6%)、黄色系(27.6%)、橙色系(22.4%)および紅色系(10.3%)で、白色系が最も多かつたがこれはこの白色系株のうちに同一患者よりつづけて分離された13株の山本系菌株および同4株の二

宮系菌株(いずれも白色系株)がふくまれていたことによるものと考えられる。

6) 次にVeterans Administration HospitalにおけるMycobacteria 協同研究会による方法³¹⁾によつて分類してみるとscotochromogenのものが32株(55.1%)で最も多くnon-photochromogenのものが22株(37.9%)でこれに並び、photochromogenのものはわずかに4株(6.9%)にすぎなかつた。

7) 58株の非定型抗酸菌のうちでは中ないし小型円形、湿潤性で白色ないし黄色の集落性状を呈する菌株が最も多かつた。

8) 供試非定型抗酸菌の集落初発所要日数は14日以内のものが58株中54株(93.1%)で大半を占め、30日以上を要したものは全く認められず、人型結核菌に比してはるかにその発育速度が迅速であつた。

9) これらの分離非定型抗酸菌58株のうちには、継代培養中に種々の方法を講じたのにもかかわらず、遂に消滅したものが6株もあつたことは注目にあたいる。

私は結核患者の喀痰および切除肺より非定型抗酸菌の分離培養をこころみた結果、概略上記のような知見をえた。これによつて、結核患者の喀痰のみならず肺病巣内にも相当の頻度において非定型抗酸菌が混生していることが知られるのであるが、これらの非定型抗酸菌がその宿主生体たるヒトの疾患に如何なる役割を演じまたは演じうる能力を内蔵しているかという問題については未だ不明という他はなく、今後追究せらるべき重要課題というべきであろう。

結 語

1) 7,044例の結核患者喀痰より40例(0.6%)の非定型抗酸菌と364例(5.2%)の結核菌とを分離した。

2) 295例の結核患者切除肺よりKirchner Sy-Ser 培液中長期冷蔵法および冷凍1日保存法により計13例(4.4%)の非定型抗酸菌と134例(48.1%)の結核菌とを分離した。

3) これらの分離抗酸菌は、白色系株が最も多く(39.6%)、次で黄色系株(27.6%)、橙色系株(22.4%)であつて、紅色系株は最も少なかつた(10.3%)。

4) いわゆるphotochromogenicの菌株は58株中わずかに4株(6.9%)にすぎず、大多数がscotochromoge-

nic (55.1%) かまたは non-photochromogenic (37.9%) に属した。

5) 分離非定型抗酸菌は中ないし小型円形, 湿潤性の集落性状を示すものが多く, かつその集落初発所要日数も14日以内のものがほとんどであり, 人型結核菌とはこのような所見のみよりしても明らかに差異が認められた。

6) 分離非定型抗酸菌のうちには, その継代培養中に自然に漸次消滅していくような発育能力の弱いものも少数 (6.9%) ながら存在したことは注目にあたいる。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました恩師占部教授に深甚なる感謝の意を捧げます。

(本研究の1部は第9回日本細菌学会中四国支部総会において発表した)

主要文献

- 1) 占部: 福岡医誌, 29 (12): 102, 1936.
- 2) 占部: 福岡医誌, 29 (12): 127, 1936.
- 3) 占部: 福岡医誌, 29 (12): 150, 1936.
- 4) 占部: 福岡医誌, 29 (12): 285, 1936.
- 5) 占部・山内: 日本医学, (3376): 17, 1944.
- 6) Pinner, M.: Am. Rev. Tuberc., 32 (4): 424, 1935.
- 7) 大平: 京大結研年報, (3): 198, 1952.
- 8) 占部: 日新医学, 33 (2): 68, 1944.
- 9) M.S. Tarshis: Am. Rev. Tuberc., 65 (3): 278, 1952.
- 10) A. Pollak & V.B. Buhler: Am. Rev. Tuberc., 71 (1): 74, 1955.
- 11) G. Middlebrook et al.: Am. Rev. Tuberc., 72 (5): 693, 1955.
- 12) A. Timpe: J. Lab. & Clin. Med., 44 (2): 202, 1954.
- 13) Lagercrantz, R.: Acta Med. et Microbiol., 1157 (1): 50, 1953.
- 14) L.E. Wood, V.B. Buhler & A. Pollak: Am. Rev. Tuberc., 73 (6): 917, 1956.
- 15) V.B. Buhler & A. Pollak: Am. J. Clin. Path., 23 (4): 363, 1953.
- 16) G.C. Wilson & D.E. Morton: Am. Rev. Tuberc., 73 (3): 351, 1956.
- 17) E. Wolinsky et al.: Am. Rev. Tuberc., 75 (2): 180, 1957.
- 18) H.E. Crow et al.: Am. Rev. Tuberc., 75 (2): 199, 1957.
- 19) H. Florence: Dis. of Chest, 30 (3): 250, 1956.
- 20) 今野: 日本医事新報, (1734): 39, 1957.
- 21) 染谷・林: 日本細菌学誌, 7 (6): 605, 1952.
- 22) 野沢: 新潟医学会誌, 67 (3): 236, 1953.
- 23) 占部・河合: 医学と生物学, 42 (1): 33, 1957.
- 24) 占部・河合: 医学と生物学, 44 (5): 196, 1957.
- 25) 占部: 日本細菌学誌, 11 (2): 178, 1956.
- 26) S. McMillen et al.: Am. Rev. Tuberc., 76 (1): 103, 1957.
- 27) G.L. Hobby: Am. Rev. Tuberc., 70 (2): 191, 1954.
- 28) 山下・岡野: 日本細菌学誌, 12 (4): 362, 1957.
- 29) 河合・山下: 胸部疾患, 1 (9): 361, 1957.
- 30) 戸田・占部: 東京医事新誌, (2984): 1539, 1936.
- 31) E.H. Runyon et al.: Am. Rev. Tuberc., 72 (6), 866, 1955.