

肺疾患患者喀痰より分離された非定型抗酸菌 (3 株) の 細菌学的性状ならびに動物に対する病原性

(第 2 篇: 佐々木株, 黒沢株)

下 出 久 雄・小 川 政 敏

国立療養所東京病院

受 付 昭 和 37 年 4 月 21 日

緒 言

第 1 篇では集落の形態から人型結核菌と区別しがたいが、特異な培養性状から非定型抗酸菌と疑われた菌株 (川村株) について報告したが、本稿では集落の形態から一見して非定型抗酸菌と想像された 2 菌株 (佐々木株, 黒沢株) について報告する。この 2 菌株はともに黄色, S 型の集落を形成し, 諸種の性状に類似点があるが, 異なる点もあり, 川村株とともに非定型抗酸菌の種々相を示すものとして興味をもたれた。(実験は川村株と同時に同一方法で行なわれたので第 1 篇を参照されたい。動物接種はマウスでは尾静脈内 0.1, 1 mg, 家兎は 10 mg 皮下, モルモットは 1, 5 mg 皮下接種し, 家兎, モルモットは感染後 8 週で剖検。)

第 2 例: 佐々木株

(i) 臨床経過

患者は 1907 年生れの男子で元教員で現職はない。昭和 13 年ツ反応陽性, 13~20 年の間肺結核症で安静療養, 22~27 年にも安静療養, とときどき血痰あり, 31 年より化学療法を始め, 32 年 2 月まで SM・PAS・INH 併用, INH・PAS 併用, ついで 32 年 5 月より INH・PZA・Sulfisoxazole 併用を 20 カ月, 33 年 10 月より SM・INH・PAS 5 カ月, 34 年 4 月より SM・INH・Sulfadiazine 8 カ月, 35 年 1 月より INH・Sulfisomidine を併用して現在にいたっている。当所に入所したのは 32 年 2 月で, そのときにはじめて本菌株が患者喀痰より分離され, その後 34 年 1 月までに喀痰検査 29 回中 20 回に本菌株が検出され, 36 年 3 月に再び同一菌株が微量に検出された。この間定型的結核菌は全く検出されていない。入所前の結核菌の検出の有無は不明である。X 線写真所見では 24 年

には空洞なく軽度進展であつたが, 31 年 8 月には学研分類 C₃Kx₃ 型となり著明な悪化を示し, 32 年 2 月まで不変, 以後 INH・PZA・Sulfisoxazole 併用により空洞はかなり縮小 C₃Kx₂ 型となり, その後も次第に空洞は縮小した。排菌は上記化学療法開始後次第に減少し 32 年 10 以後は陰性化した。入所時の薬剤耐性は SM 10 γ 完全, PAS 10 γ 完全 (100 γ 不完全), INH 0.1 γ 完全 (1 γ 不完全) であり, 33 年 2 月には SM, PAS は同様で, INH は 1 γ 完全 (10 γ 不完全) に上昇した。人型菌ツによるツ反応は当所では 34 年, 36 年に施行しともに陽性であつた。

(ii) 細菌学的所見 (表 1)

(a) 培地性状: 1% 小川培地にて 37°C で培養し, 5~6 日目に肉眼的にみうる集落を形成し, 1% 小川培地に継代し 20°C 前後で培養し 1 カ月後に淡黄色集落を形成, 集落の性状は円形 (球状) 淡黄~橙黄色で軟らかく粘稠, S 型である。寒天培地に継代し, 25°C 前後の室温に 2 カ月放置し白色扁平な集落が形成された。

小川培地上の集落では菌の形態は短桿状で食塩水に容易に懸濁された。

(b) 光発色性: 完全に遮光して培養しても, 光に当てて培養しても同様に黄色集落を生じ, Runyon の Sco-tochromogen に分類される。

(c) 生化学的性状: Niacin test (-), Neutral red 反応 (-), Catalase 反応 (+), Peroxidase 反応 (+), Cord 形成 (-), Preis 煮沸試験で Kf 2~3 であつた。

(d) 薬剤感受性: 臨床経過に述べたごとくである。

(iii) 動物実験成績

実験方法は第 1 例川村株と同様である。

(a) マウスに対する毒力 (表 2, 3): マウスに対する毒力はきわめて弱い。すなわち接種後 6 週まできわめて微小な結節が肺にわずかに肉眼的に認められるものが

Table 1. Bacteriological Properties of Various Strains

Strain	Colonial morphology		Kf (min)	Cord	NR-T	NC-T	C	P	Drug resistance (mcg/cc)			Growth on Ogawa's medium	
									SM	INH	PAS	at 37°C	at 20°C
Kawamura	Rough greyish white	Nonphoto-chromogen	5	+	++	-	+	+~	5	2	1>	No or slight in 21d.	No
Sasaki	Smooth Yellow orange	Scoto-chromogen	2	-	-	-	++	+	10	1	10	Good in 5d.	Slight in 30d.
Kurosawa	Smooth Yellow orange	Scoto-chromogen	3	±	-	-	++	+	10	1	10	Slight in 7d.	Slight in 30d.

Kf: Preis test (Resistance to boiling) NR-T: Neutral red test NC-T: Niacin test
C: Catalase test P: Peroxidase test

あり、組織学的には単核細胞、小円形細胞からなる小結節と、胞隔の肥厚が認められたのみであつた。結節内の抗酸菌はきわめてわずかしき認められなかつた。肝脾には肉眼的病変は全く認められなかつたが、組織学的には肺より多数の結節と抗酸菌が認められた。きわめてまれに腎に微小結節と抗酸菌が認められた。これらの病変は対照の H37Ra 株接種マウスの病変に比すれば明らかに強いものであつた。(第 1 篇 表 3, 4 参照)

(b) 家兎およびモルモットに対する毒力 (表 5, 6): 家兎, モルモットに対してはともにきわめて弱毒であつた。すなわち家兎では接種局所の膿瘍と腸間膜リンパ節の腫脹を認めたのみで、1 例の脾病変を除き、肺肝脾等各臓器、リンパ節に肉眼的病変を認めなかつた。臓器内生菌も脾および接種局所に少数認められた以外は検出されなかつた。

モルモットでは肉眼的病変は全くなくほとんど毒力はないと思われた。臓器内生菌も肝脾に少数認められたのみであつた。またツ反応は接種 8 週後に平均約 10 mm であつた。(表 4) (第 1 篇 表 6~8 参照) (ツ反応は人型菌ツによる)

第 3 例: 黒 沢 株

(i) 臨 床 経 過

患者は 1891 年生れの男子で商業地区の在住者である。昭 35 年 8 月の集団検診ではじめて肺疾患を発見され、同年 10 月末加療のまま当所に入所した。本菌株は入所時、未化療時に喀痰より分離され、その後現在 (36 年 6 月) まで毎月同様な菌株が分離されている。X 線写真所見では右肺上葉に Ka 型空洞があり学研 CB, K₂₂₋₃ 型であつたが、SM・INH・PAS 併用により空洞はかなり縮小、排菌も一時減少したが、排菌は再び増加し、現在 INH・PZA を使用中であるが菌陰性化の傾向はまだみられない。化療前の薬剤耐性は SM 10 γ 完全, PAS 10 γ 完全, INH 1 γ 完全, Sulfisoxazole 50 γ 完全で、36 年 3 月には、SM 10 γ ほぼ完全, 5 γ 完全, 50 γ 不完, PAS 5 γ 完全, 50 γ ほぼ完全, INH 1 γ 完全, 10 γ 不完, Sulfisoxazole

50 γ ほぼ完全, KM 1 γ ほぼ完全, 100 γ まで不完全耐性であつた。

Table 2. Macroscopic Findings of Organs of Mice Infected with Various Strains

Organ		Lung				Liver and spleen
Strain	Time of sacrifice (weeks)	2	4	6	10	2 to 10
	Inf. dosis (mg)					
Kawamura	0.1	+	+++	+++	+++	no
	1	+	+++	+++	+++	
Sasaki	0.1	-	-	-	-	no
	1	-	+	+	+	
Kurosawa	0.1	-	-	+	-	no
	1	-	+	+	+	
Brownell	0.1	-	+++	+++	+++	no
	1	+	+++	+++	+++	
H37Ra	0.1	-	-	-	-	no
	1	-	-	-	+	
KH ₁	0.1	+	+	++	+	no
	1	+	++	+++	+++	

Brownell: Unclassified photochromogen
KH₁: Human type virulent strain
H37Ra: Human type avirulent strain

本症例においても定型的結核菌は1回も検出されていない。なお患者の次男は昭和31~33年に当所に肺結核として入所していたことあり、最近5年間同居していた。また既往に肋膜炎ありという。ツ反応は36年7月10×9
21×19 mmであつた。(ツ反応は人型菌ツベルクリンによる。

(ii) 細菌学的性状 (表 1)

(a) 培養性状：小川培地での発育は比較的遅く、約1週間で微小な集落が認められるがその後5週目まであまり大きくなならない。集落の性状はS型、淡い橙黄色であり、食塩水にかなり懸濁しがたい(この点は佐々木株や非病原性抗酸菌より人型菌、川村株にやや近似して

Table 3. Microscopic Findings of Acid-fast Bacilli in the Tissues of Mice Infected with Various Strains

Strain	Time of sacrifice (weeks)	Inf. Organ dosis (mg)	2				4				6				10			
			P	L	S	K	P	L	S	K	P	L	S	K	P	L	S	K
Kawamura	0.1		++	+	++	+	++	++	++	+	++	+	++	+	+	+	++	+
	1		++	+	++	-	+++	+	++	+	++	+	++	+				
Sasaki	0.1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	+	+	-
	1		-	-	-	-	-	+	+	±	-	+	+	-				
Kurosawa	1		-	++	++	-	+	+++	++	+	±	++	++	+				
			+	++	++	-	+	++	++	+	++	++	++	+				

P: Lung L: Liver S: Spleen K: Kidney
Number of bacilli in the focus which contains maximum number of bacilli
-: 0 ±: Few +: Less than 20 ++: 20~50 +++: 50~100
⊕: Approximately 100 ⊕⊕: Approximately 200 ⊕⊕⊕: Countless

Table 4. Changes in Tuberculin Reaction and Body Weight of Guinea Pigs Infected with Various Strains

Weeks after infection	Tuberculin reaction (mm)				Body weight (g)			
	0	4	6	8	0	4	6	8
Strain								
Kawamura	2.5	23	29.8	25	380	471	550	578
Sasaki	1.5	6	6.5	10.8	370	481	530	560
Kurosawa	1.2	7.6	8.5	10	350	498	566	535

いる)。菌の形態は佐々木株と同様短桿状である。
(b) 光発色性：光を遮閉して培養するとほとんど着色のないこともあり、淡黄色を呈することもある。長時間たとえば毎週1回観察のため室内自然光に当たると、数週間の間に次第に色調が強くなり淡橙黄色となる。1時間の露光では発色しない。Photochromogenではない。

(c) 生化学的性状：Niacin test (-), Neutral red 反応 (-) (濃橙色), Catalase 反応 (++) , Peroxidase

Table 5. Macroscopic Findings of Organs of Rabbits Infected with Various Strains

Organ	Strain	Kawamura		Sasaki		Kurosawa	
		No. of rabbit					
Lymph nodes	Inoculation site	1	2	3	4	5	6
	r. Knee fold	⊕	+	⊕	⊕	⊕	⊕
	r. Inguinal	+	+	+	+	+	+
	l. Knee fold	+	+	+	+	+	+
	l. Inguinal	+	+	+	+	+	+
	Mesenterial	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	Portal	+	+	+	+	+	+
Viscera	Tracheal	+	+	+	+	+	+
	Spleen	-	-	+	-	-	-
	Liver	-	-	-	-	-	-
	Kidney	-	-	-	-	-	-
Weight of spleen (g)		1.5	2.2	2.4	1.0	1.2	2.2
Weight of lung (g)		10.6	9.9	10.0	10.0	10.5	10.2

Table 6. Macroscopic Findings of Organs of Guinea Pigs Infected with Various Strains

Strain No. of guinea pig		Kawamura			Sasaki			Kurosawa		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Inf. dosis (mg)		1	1	5	1	1	5	1	1	5
Organ										
Inoculation site		⊕	⊕	⊕	—	—	—	—	—	⊕
Lymph nodes	r. Knee fold	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	r. Inguinal	⊕	⊕	⊕	—	—	—	—	—	—
	l. Knee fold	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	l. Inguinal	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	r. Axillary	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	l. Axillary	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	r. Cervical	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	l. Cervical	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Mesenterial	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	r. Iliacal	⊕	—	—	—	—	—	—	—	+
	l. Iliacal	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Portal	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Retrosternal	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Tracheal	—	—	+	—	—	—	—	—	—
Viscera	Spleen	No gross lesion			No gross lesion			No gross lesion		
	Liver									
	Kidney									
	Lung									
Weight of spleen (g)		1.3	0.9	0.9	0.6	1.1	0.7	1.1	0.8	0.9
Weight of lung (g)		5.5	4.9	4.0	3.8	5.2	3.9	4.4	5.5	5.0

総括ならびに考案

第 1 篇に述べた川村株 および 以上の 2 菌株はすべて Niacin test (－) で、人型結核菌と異なるものと思われたが、このうち佐々木株と黒沢株とは略痰よりの分離培養によつて得られた集落が橙黄色、S 型でただちに結核菌以外の抗酸菌と考えられた。しかし川村株は集落の性状からは結核菌と区別しえず、たまたま小川培地に発育しがたいことから特殊な性状の結核菌と考えられ、牛型菌の疑いももたれた。しかし実験動物に対する毒力では、マウスに強毒で、家兎、モルモットにはきわめて弱毒であり、Runyon のⅢ群 (Nonphotochromogen) に分類された非定型抗酸菌に近似した菌株とも考えられる^{11, 51~71}。これらの性状は INH 等の化学療法により結核菌の変異によつて生じたものではないかとも考えられるが、INH 耐性は必ずしも高度ではなく、Catalase, Peroxidase 反応も陰性ではないので、耐性獲得に伴う弱毒化とはいきれない。Neutral red 反応, Cord 形成等では人型結核菌 KH₁ 株ときわめて近似の性質を示した。

川村株の種々の培地での培養性状はきわめて特殊であり、その性状の分析はまだ不十分であり、またその性状が化学療法以前よりあつたものか不明であるので、菌型を断定することは差しひかえない。しかし、定型的結核菌とは異なり、分類が確定しがたいという意味では非定型、未分類抗酸菌とよんでよいと考える。結核菌と非定型菌との鑑別法として Tarshis らが推奨している Thioglycolate test^{21~41} 等はまだ行なつていないが、今後さらに種々の検討を加えたいと思う。第 2 例の佐々木株は小川培地上集落が橙黄色、S 型で食塩水に容易に懸濁され、Scotochromogen で、Niacin test (－), Neutral red 反応 (－), Cord 形成 (－) 等の性状より Runyon のⅡ群に属する非定型抗酸菌と思われる。しかし Peroxidase 反応は (+) であつた (非定型菌の多くは Peroxidase 反応 (－) でⅢ群に (+) のものがあるという⁴¹)。室温 (20℃ 前後) 培養での集落発生に約 1 カ月を要し、雑菌性抗酸菌よりは発育が遅いようであるが、雑菌性抗酸菌と佐々木株のごとき菌株の鑑別は今後の生化学的研究に期待されるところが大である。

反応 (+), Cord 形成 (±), Preis 煮沸試験 3 分。

(d) 薬剤感受性：臨床経過に述べたので省略。

(iii) 動物実験成績 (表 2~6)

実験方法は第 1 例と同様である。マウス、家兎、モルモットに対しても弱毒であつた。しかしマウスでは肉眼的には肺にわずかな微小結節を認めたのみであつたが、組織学的には肝脾にかなり多数の類上皮細胞結節を認め、その中に多数の抗酸菌が認められた。腎には少数の細胞浸潤と抗酸菌が認められた (観察は接種 6 週後まで行なつたが、肝脾腎の病変は KH₁ 株の場合と著差がなかつた)。脾重量は他菌株に比しかなり増加していた。家兎では接種局所の膿瘍以外にはほとんど肉眼的病変を認めず、臓器内生菌は接種局所では無数であつたが、肺肝脾では全く認められなかつた。モルモットでは 5 mg 接種の 1 匹の局所に膿瘍を認めたのみで、他にほとんど肉眼的病変なく、人型菌ツによるツ反応はきわめて弱く、接種 8 週後に 10 mm に達した程度であつた。臓器内生菌は肺肝脾にわずかずつ認められたが、脾がもつとも多かつた。

(たとえば Formamidase test⁸⁾)

第3例黒沢株は佐々木株と同様に集落が淡橙黄色、S型であるが、佐々木株と異なり、食塩水に容易に懸濁されない。また完全に遮光して培養するとほとんど灰白色の集落の発生をみることもあり、淡黄色集落のこともあり、1時間の露光(30 W 電球より45 cmの距離、または室内自然光)では発色は認められず、頻回に露光することによって次第に淡橙黄色となる。Photochromogen ではないが Scotochromogen と Nonphotochromogen との鑑別がやや困難であつた。Catalase, Peroxidase 反応は佐々木株と同様であつたが、Neutral red 反応は(一)であるがやや橙色を帯び Cord 形成(±)でマウスに対する毒力は佐々木株よりやや強く、Runyon のⅡ群とⅢ群の性状が混在している。本菌株は未治療患者より分離されたものであり、非定型菌と化学療法との関係を考えるうえに重要な症例と思われる。また前の2菌株ではINH・PZA等の併用により排菌の減少ないし陰性化がみられたが、本菌株ではその傾向がみられていない。

結 語

肺疾患患者喀痰より頻回に分離された非定型の抗酸菌3株について臨床的、細菌学的、病理学的検索を行なつた。

いずれの菌株も Niacin test (一)であり、これら菌株が、人型結核菌、さらには結核菌と異なる菌株であることを知るうえに同 Test は有力な Screening test であつた。

またいずれの菌株もモルモット、家兎に對し、きわめて弱毒であり、マウスには強毒(川村株)ないし弱毒(佐々木株、黒沢株)であり、非定型抗酸菌の鑑別に動物実験はなお重要な方法と考えられる。とくに Nonphotochromogen の1菌株(川村株)は培養性状がきわめて

特異であり、小川培地にきわめて発育しにくく、Niacin test (一)であつたが、他の性状は人型結核菌ときわめて近似しており、鑑別が困難であつた。

他の2菌株はともに集落が橙黄色、S型で Scotochromogen であつたが、諸種の性状は互いに異なり、非定型抗酸菌および一般に抗酸菌の分類において種々の移行型が考えられねばならない。

終りに砂原茂一院長の御校閲を感謝します。

またマウス接種実験にあつて種々御指導、御協力下さつた結核予防会結核研究所所長岩崎竜郎先生、同所豊原希一先生に深く感謝いたします。また症例を提供して頂いた東京療養所沼田至先生、ならびに動物実験にあつて協力頂いた研究室の皆さんに厚く御礼申し上げます。

なお本報告の一部は第36回日本結核病学会総会シンポジウム「耐性の臨床」で小川が報告した。

文 献

- 1) Timpe, A. & Runyon, E.H.: J. Lav. & Clin. Med., 44: 202, 1954.
- 2) Tarshis, M. S.: J. Lav. & Clin. Med., 54: 630, 1959.
- 3) Tarshis, M. S.: Dis. Chest, 38: 413, 1960.
- 4) Tarshis, M. S.: J. Lav. & Clin. Med., 57: 480, 1961.
- 5) Tarshis, M. S. & Frisch, A. W.: Amer. Rev. Tuberc., 65: 289, 1952.
- 6) Runyon, E.H.: Amer. Rev. Tuberc., 72: 868, 1955.
- 7) Cohn, M. L.: Amer. Rev. Tuberc., 72: 693, 1955.
- 8) 岡捨己他: 結核, 36: 543, 昭36.

The Bacteriological Properties and Animal Pathogenicity of Three Strains of Unclassified Acid-Fast Bacilli Isolated from the Sputum of Patients with Pulmonary Disease (Report II: On Sasaki Strain and Kurosawa Strain)

Introduction

In the first report, studies were made on a strain of unclassified acid-fast bacilli (Kawamura strain), which was nonphotochromogenic and similar to human tubercle bacilli. In this second report, other two strains (Sasaki strain and Kurosawa strain), which were chromogenic, were

examined.

Materials and methods

Strains tested in this study: 1) Sasaki strain—isolated from sputum of a patient with pulmonary disease who had previously been treated for pulmonary tuberculosis 2) Kurosawa strain—isolated repeatedly from sputum of another patient with pulmonary disease who had received no treatment for pulmonary tuberculosis. Typical tubercle bacilli were not recovered from these patients' sputum.

Biological and biochemical tests and animal

experiments for the type differentiation of these strains were performed as described in the first report on the equal condition (refer to the experimental condition described in the first report).

Results

Colonies of Sasaki strain and Kurosawa strain were smooth and moist. The color of colonies was yellow when growth was first visible. Both strains grew slowly on Ogawa's medium at approximately 20°C. and more rapidly at 37°C.

Both strains gave negative results with neutral red test and niacin test, and gave strongly positive results with catalase test and weakly positive results with peroxidase test (see Table 1). Both strains were resistant to streptomycin of 10 mcg per cc, isoniazid of 1 mcg per cc, and PAS of 10 mcg per cc on Ogawa's medium.

The pathogenicities of both strains for mice,

guinea pigs and rabbits were very weak. On the guinea pigs tuberculin reaction was weakly positive 8 weeks after the infection (see Table 2~6). In respect of these results, both strains had much in common. But Kurosawa strain was somewhat different from Sasaki strain in respect of the results with cord formation and microscopic findings of bacilli in the tissues of mice (see Table 3). Sasaki strain dispersed easily in saline solution, but Kurosawa strain did not easily disperse.

Conclusion

From these results, it can be supposed that Sasaki strain and Kurosawa strain are scotochromogenic unclassified acid-fast bacilli. Both strains are similar to saprophytic mycobacteria, but are somewhat different from them in respect of the growth rate on Ogawa's medium, the pathogenicity for animals and of other several properties.