

浦和市立結核療養所における非定型抗酸菌の分離について

氏家 淳雄*・木下 喜親・根元 儀一**

* 慶応義塾大学医学部微生物学教室

浦和市立結核療養所

**浦和市立結核療養所

受付 昭和 38 年 6 月 13 日

結核菌と異なる抗酸菌がしばしば人体から分離されることは昔から知られていたが¹⁾²⁾、これらの菌のある株は結核に似た肺感染の病因菌となりうることが知られ³⁾⁴⁾、急にその病原性および *Mycobacteria* における分類学的位置についての関心が高まり、研究が盛んに行なわれるようになった。

これらの抗酸菌は分類学的位置が、まだ確立されていないので、atypical acid-fast bacilli¹⁾, atypical *Mycobacteria*, anonymous mycobacteria⁵⁾, unclassified mycobacteria などと多くの名称がある。わが国では通常、非定型抗酸菌⁶⁾とよばれている。

肺感染の原因菌であることが確かめられた菌のみに限つて非定型抗酸菌と解釈するものと、人体および動物から分離されたもので、まだ分類されていない抗酸菌をすべて非定型抗酸菌と広義に解釈するものとに分かれているが、われわれは広義に解釈した非定型抗酸菌の分離を約 3 年前より主として結核と診断されている患者について試みてきたので、その分離状況、分離菌の性状および結核菌を排泄しないで非定型抗酸菌を長期に排泄している患者の臨床経過について報告する。

方 法

1) 分離方法

小川培地を用いる普通の結核菌培養検査を利用して結核菌以外の抗酸菌を主として喀痰から分離した。

すなわち、材料をアルカリ処置 (4% NaOH 液を等量混和) してから中和せずに 3% 小川培地に接種培養した。8 週目まで 1 週間ごとに観察し、この間に疑わしい集落があれば、抗酸性染色によつて抗酸性を確かめ、その染色所見を観察するとともに、1% 小川培地に純培養して、以後の性状検査に供した。

2) 性状検査

純培養した小川培地から Dubos albumin 培地に接種培養し、その発育性状および抗酸性染色所見を観察するとともに、一定濁度以上に発育したとき、適当に稀釈して 0.1 ml ずつ (約 0.01 mg) 種々の培地に接種培養して性状をみた。

すなわち数本の 1% 小川培地および 4% グリセリン寒天斜面培地で、37°C および室温における発育の有無や発育の状態 (色素産生、集落性状、発育速度等) および 37°C 遮光培養による色素産生の変化をみた。

薬剤感受性はイソニコチン酸ヒドラジット (INH) (10 mcg/ml, 1 mcg/ml, 0.1 mcg/ml), ストレプトマイシン (SM) (100 mcg/ml, 10 mcg/ml, 1 mcg/ml) およびパラミノサルチル酸 (PAS) (100 mcg/ml, 10 mcg/ml, 1 mcg/ml) をそれぞれ単独に含む 1% 小川培地を用いて検査した。

その他、Wayne⁷⁾の方法による中性紅染色すなわち小川培地に millipore filter membrane の小片を入れ、これに菌液を滴下して 37°C に培養し小集落がわずかにみえるようになってから取り出して染色性および cording の有無をみた。その他カタラーゼの有無⁸⁾をみるとともに niacin test⁹⁾を行なつた。

3) 症例観察

長期に、かつ頻回にかかる非定型抗酸菌を排泄している症例については、検痰を必要に応じて行なうとともに、胸部レ線像を中心として臨床的に観察した。

成 績

1) 分離成績

昭和 34 年 5 月から昭和 36 年 6 月までの約 2 年間に分離された非定型抗酸菌は 80 株で表 1 のごとくである。ただし同一人から同様の菌を 2 回以上分離しているときは初回分離株のみを集計に入れ、他は除外している。

Runyon の分類⁵⁾に準じたのであるが、Wayne ら⁷⁾の分類を参考にして彼らが用いた中性紅染色が陰性の菌株を“others”にし、それ以外の陽性株を Runyon の分類に従って分類した。なおすべてナイアシン陰性である。

これらの分離株の性状は表1のごとくであるが、ここで Non-photochromogen はほとんどがいわゆる Battey 型¹⁰⁾と思われる菌株である。

“others”は小川培地で培養すると1週間以内で full growth をするものが28株中20株もあるが、これは Runyon のいう rapid growers に属するものが含まれていると思われる。

Table 1. Characteristics of Atypical Mycobacteria Isolated at Urawa Municipal Sanitarium

Atypical Mycobacterium	Number of strains	Catalase reaction # + or ±	Growth on Ogawa's egg-medium			*Growth on Glycerin agar			
			Full growth in a week	*Growth at room temperature # + or ± -		#	+	-	
Non-photochromogen	38	6 32	0	1	9	28	3	29	6
Scotochromogen	14	13 1	1	2	10	2	0	2	12
“Others”	28	20 8	20	18	7	3	20	3	5

*Growth after four weeks of incubation.

Table 3. In Vitro Drug Susceptibilities of Atypical Mycobacteria Isolated at Urawa Municipal Sanitarium

Classification	Number of strains	Streptomycin			PAS			Isoniazid		
		>17	17≤	107≤	>17	17≤	107≤	>17	17≤	107≤
Non-photochromogen	38	0	11 (29)	27 (71)	1 (3)	9 (24)	28 (74)	26 (68)	3 (8)	9 (24)
Scotochromogen	14	0	3 (21)	11 (78)	2 (14)	8 (58)	4 (29)	6 (43)	7 (50)	1 (7)
“Others”	28	3 (11)	10 (36)	15 (54)	0	7 (25)	21 (75)	10 (36)	8 (29)	10 (36)

() : per cent.

Table 2. Patterns of Characteristics of “Others”

Growth on Ogawa's medium		*Growth on glycerin agar	Number of strains	Isolated from	
In a week	*At room temperature			In-patients	Out-patients
+	+	+	12	8	4
+	+	-	2	1	1
+	-	+	2	1	1
+	-	-	4	1	3
-	+	+	1	0	1
-	+	-	1	0	1
-	-	+	2	2	0
-	-	-	4	0	4

+: Indicate the full-growth.
-: No growth.

Non-photochromogen のカタラーゼ反応は人型結核菌と同程度に弱いものが多く、小川培地で1週間以内に full growth をする株はみられず、室温では発育しない菌株が多い。

これに反し“others”は一般にカタラーゼ反応を強く示し、また発育の速い株が多く、小川培地で1週間以内に full growth を示すものが20株(71.4%)もみられた。室温でも発育が良く4%グリセリン寒天斜面培地にも良く発育するものが多くみられる。これらの“others”は rapid grower (*M. fortuitum*), その他 saprophytes および nocardia 等が含まれると思うが、これらの性状により、いくつかの patterns に分けると、表2のごとくである。

Non-photochromogen や Scotochromogen と中性紅染色の所見以外に生物学的性状の著差を認めえない株もあるが、かくのごとく中性紅染色で大きく分けることの是非については全く疑問がないとは思われない。

次にストレプトマイシン、イソニコチン酸ヒドラジドおよびパスに対する耐性を検討し、その完全耐性を表3に示した。Non-photochromogen および Scotochromogen はすべて SM 耐性を示しているが、PAS に対しては感受性のものが数種みられる。INH に対しては感受性を示すものが多く、とくに Non-photochromogen では 68% が感受性菌である。

“others”では SM 感受性を示すものが数株みられるも PAS に対してはすべて耐性を示している。また INH に対しては前2者に比しやや耐性株が多い。これらの菌株の分離状態を表4および表5に示したが、表4によると2年間の分離率は入院および外来患者を合わせると17,338件中98回陽性で0.57%である。そのうち入院患者では0.14%にすぎないが、外来患者では2.83%と20倍も多く分離されている。しかも入院患者には“others”が多く分離されているのに反し、外来患者では Non-photochromogen (Battey type) が多い。

Table 4. The Rate of Isolation of Atypical Mycobacteria from Sputa

	Number of tests	Number of isolates	Classification			Rate of isolation
			Non-photochromogen	Scotochromogen	"Others"	
In-patients	14,562	20	3	4	13	0.14%
Out-patients	2,776	78	57	10	14	2.83%
Total	17,338	98				0.57%

(from July 1959 to June 1961)

Table 5. The Status of Isolation of Atypical Mycobacteria

	Number of patients from which positive cultures were obtained at the frequency of			Number of positive case showing colony numbers of*		Isolation of M. tbc. in the past		
	1	2	3≤	5≥	5<	Yes	No	Not clear
In-patients	21	0	0	17	4	10	11	0
Out-patients	38	6	4	61	20	19	25	4

* None of the cases showed the concomitant isolation of M. tbc.

Fig. 1. The Follow-up of 4 Patients Concerning the Isolation of Non-photochromogens

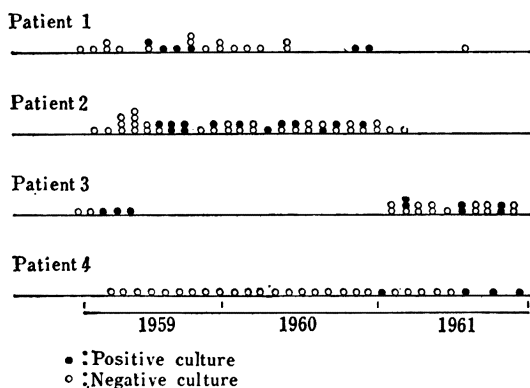


Table 6. Isolation of Atypical Mucobacteria Through the Medical Examination for Citizens and for Old Ages at a Work House of Urawa City

The medical examination	Number of tests	Positive cultures of M. tbc.	Positive cultures of atypical mycobacteria
For citizens	107	4	4 (3.7%)
For old ages at a work house			
1st examination	137	2	0
2nd examination	149	2	0 (0.2%)
3rd examination	153	1	1

回数がすべて 1 回のみで、分離の小川培地における集落数も少ないのに反し、外来患者では分離回数の 3 回以上の症例が 4 例みつけれられている。分離の小川培地における集落数も割合に多い。次に浦和市民の集団検診でとくに精密検査を要する人についてのみ検痰を行なったのであるが、その抗酸菌分離成績と、浦和市の老人ホームにおいて 1 カ月間隔で 3 回行なった検痰成績を表 6 にまとめた。

環境的に入院に相当す

る老人ホームでは 0.2% に非定型抗酸菌が分離されたのみであつたが、外来患者に相当する集団検診ではその 20 倍に近い 3.7% に分離された。

3) 症例観察

肺結核として治療を行なっている患者で、結核菌が分離されず、非定型抗酸菌のみが長期にかつ頻回に分離されたものが当療養所で 4 例みつけれられ、すでに学会等¹¹⁾¹²⁾で発表されているが、その臨床経過について観察した。

分離状況は図 1 に示したが、分離された菌は 4 例とも Non-photochromogen で Battey type に属するものである。動物実験¹³⁾ではマウスに軽度の病原性が認められた。

これらの患者はいずれも胸部レ線写真で空洞または気管支拡張等の変化がみられる。

しかし非定型抗酸菌が排泄されているにもかかわらず、また薬剤投与と菌の耐性とより推定して妥当な治療を行なつているとは思えないときでも、全身状態良く、病状の悪化する傾向はみられなかつた。

以下各症例について略述する。

症例 1 (■) 29 才 女

27 年 1 月より左肺結核と診断され、約 1 年 6 カ月間左の人工気胸を行なつたが、癒着のため中止した。

28 年 12 月から 3 カ月間 SM, PAS 併用療法を行ない、その後 PAS のみ 3 カ月間用いた。

29 年 7 月来所し、同年 8 月から入所とともに

SM, PAS 併用を6カ月間行なつて退所し、その後はPAS, INH 併用を6カ月間行なつた。全身状態は常に良好で、胸部レ線写真は左肺上野に直径約2cmの壁の薄い空洞様陰影を認めるが、32年11月より著変を認めない。

非定型抗酸菌の分離に注目したところ、すなわち34年8月から11月まで6回分離されているが、結核菌は発病以来まだ分離されたことがない。

症例2 (●) 27才女

25年2月両側肺結核と診断され、初めに左側次に右側とそれぞれ別個に人工気胸を約3年間行なつた。27年5月より1年あまりSM, PAS または PAS, INH の併用を行なつたが、31年9月より33年5月まで当所に入所し、SM, PAS, INH の3者併用を1年行つた。以後PAS, INH 併用にしたが、34年10月からピラジナマイド(PZA), INH併用6カ月行ない、以後INHのみ単独に用いている。

発病以来自覚症状ほとんどなく、赤沈正常で胸部レ線写真は発病時両側上野にかなり広範囲な境界不鮮明の雲絮状陰影を認めたが、29年6月ころには右上野の陰影は境界がかなり鮮明となり、斑点状および索状陰影が散在するようになった。左上野も良くなり、軽度の索状陰影を残すのみとなった。以後ほとんど著変を認めていない。

非定型抗酸菌の分離は図1のごとくであるが、結核菌については25年、27年11月、27年12月に塗抹陽性(ガフキー3号~2号)27年2月培養陽性というも、当療養所に来所以後は塗抹培養ともに陰性である。

症例3 (●) 67才男

33年9月当所にて右肺結核と診断され、PAS, INH 併用をはじめた。34年8月転医したが35年6月まで化学療法を行なつた。36年2月より検査のため来所を求め、経過を追求した。はじめは喀痰多く、咳嗽も軽度であり、赤沈は1時間33であったが、現在は全身状態可良である。

胸部レ線写真では右肺尖部に直径1cmくらいの小空洞を認める。

34年5月より3回非定型抗酸菌を分離しているが、以後転医のためこの間は不明である。

36年2月より再び検査を行ない同様な菌を分離している。

結核菌は経過を通じて分離されたことがない。

症例4 (●) 43才女

33年4月咯血し某医院にて左鎖骨下浸潤と診断され、SM, PAS 併用を行なつた。

33年7月当療養所に入所し、SM, PAS, INH の3者併用を行ない、軽快したので35年4月退所した。以後はPAS, INH 併用を外来で行なっている。

自覚症状はときどき血痰を排泄することである。

胸部レ線写真では左鎖骨下に軽度の陰影あり、断層写真に直径1cmくらいの小空洞を認める。気管支鏡検査では33年1月に気管支分岐部に点々と粘膜下溢血がみられたが、34年8月にはとくに所見を認めなかつた。

36年1月より非定型抗酸菌を分離しうることになった。

結核菌は33年8月に培養陽性で以後陰性である。34年12月に6日間連続検査した。結果は塗抹3回(ガフキー5号)陽性を示したが、培養は陰性であった。

考 察

非定型抗酸菌の分類は多くRunyon⁹⁾の分類に従っているが、これは主に産生色素の性状によつてPhotochromogen, Non-photochromogen, Scotochromogen とそれに発育速度によつてrapid growers と分類されている。しかし病原性を考慮せずに単に人体から分離された結核菌以外の抗酸菌を広義に解釈して非定型抗酸菌として分類すると、Photochromogen を除いては、たとえばNon-photochromogen といつても、性状の著明に異なるものも含まれ nocardia や saprophyte に似ている株が相当数みられ、かかる分類に対して疑問がないわけではない。

Wayneら⁷⁾は彼らの方法による中性紅染色陰性のものを atypical から除いているが、われわれもかかる陰性菌を“others”として、残りをRunyon に従つて分類した。

かく分類することによつてわれわれの分離したNon-photochromogen はすべてがBattey type に属するものであるということ、および外来患者よりも入院患者にこのような“others”が多く分離されたということは注目すべきことと思われる。rapid growers は1週以内にfull growth を示した菌株中に含まれるが、中性紅染色陽性菌では52株中わずかに1株のみであるのに反し、中性紅染色陰性の“others”では28株中20株が1週以内にfull growth を示している。Runyon のrapid growers はほとんどが、“others”に含まれるものと思えるのでrapid growers を分類から除いた。

結核患者または一般の人からの広義の非定型抗酸菌の分離頻度および種類は研究者および国¹⁶⁾によつて、方法の異なることにもよるが割合に著明な差がみられている¹⁵⁾¹⁷⁾。病原性のはつきりと認められ、生物学的性状も一定であるPhotochromogen は日本ではほとんど分離されていないが、われわれも分離することはできなかつた。

分離頻度は入院患者と外来患者とを比較すると外来患者に入院患者よりも20倍も多く分離され、しかも病原性に関係する頻度の割合に多いBattey type が外来患者により多く分離された。なおこのような菌を長期に排

泄している患者も外来患者にのみ数例みられた。

これに反し、入院患者からは“others”に属する株が多く分離され、分離回数も全例が1回のみで、長期にかかる菌を排泄しているものはみられなかつた。

このことは外来患者に相当する市民検診と入院患者に相当する老人ホームの分離頻度でも同様のことがみられた。

これらのことから外界に接触することの多いものに分離頻度が高いということが想像できる。

気管支拡張の患者より非定型抗酸菌が多く分離されている成績があることより¹⁴⁾、気管支炎や気管支拡張の多い老人には高頻度に分離されることを予想して、老人ホームで検痰を行なつたのであるが、そのような傾向は認められなかつた。

外来患者のうちで、いずれも Non-photochromogen を長期に排泄している4例を観察しえたのであるが、かかる菌が排泄されているにもかかわらず、病変および病状が悪化しないことより、これらの菌が一次的に病変を起こしたとは考えにくい。日本では Photochromogen による症例が少ないためか一般にかくのごとき症例が多く、菌排泄とともに悪化していく症例は少ない。化学療法を行なつても菌の排泄に影響を及ぼさぬ例が多くみられるも¹⁵⁾¹⁷⁾、このような場合菌自体が感受性が低いということよりも菌の存在するところが薬剤効果の及ぶがたい空洞または気管支腔に常在しているためであるとも考えられる。

結核または何かの原因で空洞または気管支拡張の病変が起こり、かかる菌の常在に都合のよい素地が作られ、二次的に侵入し常在菌として排泄されている例が多いものと考えられる。

総 括

1) 約2年間に分離された非定型抗酸菌は80株であるが、Wayne 法による中性紅染色を行ないその陰性菌は“others”とし、陽性菌は Runyon に従つて分類した。

かく分類することにより Non-photochromogen はすべて Battey type と思われるもので38株(47.5%)分離され、Scotochromogen は14株(17.5%)、”others”は28株(35%)分離された。

Photochromogen は分離されなかつた。

2) Non-photochromogen はカタラーゼ反応が人型結核菌と同程度に弱いものが多く、発育速度もおそく、室温では発育しにくい。Scotochromogen はカタラーゼ反応の強いものが多く、室温でも割合に発育するものが多くみられる。“others”は多くカタラーゼ反応が強く、1週以内で full growth に達し、室温でも良く発育する株が多い。薬剤耐性はいずれも SM, PAS に耐性を

示すものが多いが、INH に対しては感受性を示すものが割合多くみられた。

3) 結核と診断された患者からの非定型抗酸菌の分離率は2年間観察で0.57% (17,338件中98回)であるが、入院患者と外来患者を比較すると、入院患者では0.14% (14,562件中20回)のみであるのに反し、外来患者では2.8% (2,776件中78回)と20倍も多く分離されている。それに入院患者では“others”が多く分離されているのに反し、外来患者では Non-photochromogen が多く分離され、外来患者のみより長期に、また頻回にかかる菌を排泄している患者が4名みつけられている。

入院患者に近い環境にあると思われる老人ホームにおける非定型抗酸菌の分離率は0.2% (439件中1回)のみであるが、外来患者に相当する浦和市民の集団検診では3.7% (107件中4回)に分離されている。

これらのことから、非定型抗酸菌は外界と接触の機会が多いものより、多く分離されることが推察される。

4) 結核菌を排泄しないで、かかる抗酸菌を長期にかつ頻回に排泄している例をみつけたが、ともに Battey type の抗酸菌で、いずれも胸部レ線写真で空洞または気管支拡張等の変化がみられる。しかしかかる菌が排泄されているにもかかわらず、また不合理な薬剤投与を行なつているときでも、症状の悪化がみられなかつた。

このことよりかかる例においては病原菌であると考えられるよりも単に常在菌としてすなわち非病原菌として存在していると思われる。

稿を終るにのぞみ御校閲を賜つた牛場大蔵教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Pinner, M. : Am. Rev. Tuberc., 32 : 424, 1935.
- 2) 占部薫 : 日新医学, 33 : 68, 昭 19.
- 3) Buhler, V. B., & Pollak, A. : Am. J. Path., 23 : 363, 1953.
- 4) Timpe, A., & Runyon, E. H. : J. Lab. & Clin. Med., 44 : 202, 1954.
- 5) Runyon, E. H. : Med. Clinics of North America, 43 : 273, 1959.
- 6) 占部薫 : 日本細菌誌, 11 : 178, 昭 31.
- 7) Wayne, L. G., Krasnow, I., & Huppert, M. : Am. Rev. Tuberc., 76 : 451, 1957.
- 8) Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 69 : 471, 1954.
- 9) Huppert, M., Wayne, L. G., & Juarez, W. J. : Am. Rev. Tuberc., 76 : 468, 1957.
- 10) Crow, H. E., Coleman, T. K., Smith, C. E.,

- Corpe, R. F., & Stergus, I. : Am. Rev. Tuberc., 75 : 199, 1957.
- 11) 36回日本結核病学会 (名古屋), 昭和 36.
- 12) 37回日本結核病学会 (京都), 昭和 37.
- 13) 牛場大蔵 他 : 結核, 36 : 689, 昭 36.
- 14) Lewis, A. G. et al. : Am. Rev. Tuberc., 80 : 188, 1959.
- 15) 山本正彦 他 : 日本胸部臨床, 21 : 589, 昭 37.
- 16) Symposium on "so-called Atypical Mycobacterium" : Bull. Intr. Union against Tbc. 29 : 367, 1959.
- 17) 日比野進・須藤憲三 : 日本医師会雑誌, 48 : 271, 昭 37.

A Study on the So-called Atypical Mycobacteria Isolated at Urawa Municipal Sanitarium

The survey of the atypical mycobacteria that were meant as the acid-fast bacilli of human sources but differing from human tubercle bacilli, has been made for about two years mainly with the sputa of patients diagnosed as lung-tuberculosis.

- 1) The frequencies of isolations of these bacilli were as follows;

all patients diagnosed as lung-tuberculosis;

0.57% (17,338 materials)

in-patients; 0.14% (14,562 materials)

out-patients; 2.8% (2,776 materials)

old ages at a work house in Urawa city; 0.2% (439 materials)

Urawa Citizens examined by the medical service; 3.7% (107 materials)

From the out-patients and the citizens these bacilli were isolated more frequently than from the in-patients and old ages at a work house.

These results seemed to suggest that the atypical mycobacteria were more frequently isolated from men who used to live mainly outdoors than from men who used to spend a day almost indoors.

- 2) In this study, the acid-fast bacilli isolated by our method included many kinds of mycobacteria, such as saprophytes. At first, these strains were

divided as negatives and positives by the neutral red staining test modified by wayne et al. The negatives were designated as "others" in this study, and the positives were classified according to pigment production. Photochromogen was not isolated in our survey.

All strains classified as non-photochromogen were Battey type and were more frequently isolated from the out-patients than from the in-patients, but "others" were less frequently isolated from the out-patients than from the in-patients.

The biological characteristics of these strains are tabled in table 1 and a good many of the "others" seems to be consisted of rapid growers.

- 3) Four patients who excreted non-photochromogen frequently or constantly for a long time without isolations of tubercle bacilli were detected in the out-patients diagnosed as lung-tuberculosis.

In them, chest-roentgenographic abnormalities were seen, showing cavities or bronchiectasis. These patients had not grown worse, in spite of excreting these bacilli constantly or a wrong drug-treatment.

From these facts, it is not clear whether these bacilli were pathogens or members of normally existing acid-fast saprophytes.