

## 人より分離したナイアシン陰性抗酸菌の一例

中村昌弘・木下恒雄

久留米大学医学部微生物学教室細菌学講座(指導 中村昌弘教授)

国立療養所二豊荘(院長 薮勇博士)

受付 昭和42年6月17日

ISOLATION OF A NIACIN-TEST NEGATIVE MYCOBACTERIUM FROM  
A PATIENT WHO WAS DIAGNOSED AS TUBERCULOSIS\*

Masahiro NAKAMURA and Tsuneo KINOSHITA

(Received for publication June 17, 1967)

This paper is to report biochemical properties of a strain of mycobacterium isolated from a patient who has been treated as human tuberculosis. The patient has been administered with streptomycin and PAS since 1951. The mycobacteria were isolated 13 times of 18 times cultivations since 1965, and the number of colonies obtained in each positive cultivation was approximately more than 100. No other different types of mycobacteria were obtained.

The most important property of this strain was negative in Niacin test. Other properties of the strain were as follows:

- 1) The strain requires approximately 2 weeks for colony formation on the Ogawa-medium and needs glycerin for growth. Optimal temperature for growth is 37°C, and no growth is observed at 30°C as well as 40°C.
- 2) The colony is R-type with light yellow-white color, and no changes in the color are seen in dark and in light. The cord formation in liquid medium is demonstrated.
- 3) Urease and nicotinamidase reaction are positive, but benzamidase and formamidase are negative.
- 4) The strain is sensitive to INH but resistant to streptomycin, Kanamycin and PAS.
- 5) When the bacilli were inoculated intramuscularly into a guinea-pig, no pathogenic changes were observed in the spleen, but tubercle-like-findings were noted in the pancreas.
- 6) Tuberculin reactions of the patient were observed by injection of human tubercle bacillus-tuberculin but not by nonphotochromogen and other mycobacterial tuberculin.

From the results described above, the possibility of this strain being human tubercle bacillus can be excluded, but there still remain some problems in order to determine whether this strain is any kind of atypical mycobacteria or not.

緒言

報告する。

下記病歴を有する患者より一抗酸菌を分離して、その性状を検討したところ、ナイアシンテスト陰性であり、その他 2, 3 の興味ある性状を有しているので、ここに

病歴および現症

氏 〇 (大正4年5月10日生)  
主 訴: 咳嗽および喀痰

\* From the Kurume University, School of Medicine, Asahi-machi, Kurume-shi, Fukuoka-ken, Japan.

既往症：特記すべきものはない。

家族歴：両親は幼少時死亡（死因不明），妹が肺結核により 20 才で死亡。

現病歴および治療歴：昭和 19 年 12 月，神戸製鋼にて溶接作業（アセチレン使用）中，ガス中毒症状を来し，同会社付属病院にて診療を受けた。このとき肺結核を指摘されたが，自覚症状はなく治療も受けずに普通生活を行なっていた。昭和 20 年 2 月呉鎮守府官下部隊に入隊し，同年 7 月まで軍隊生活を送つたが，教練が少しきついと感じた以外に著明な自覚症状はなかつた。昭和 20 年 8 月から，大分県佐伯市にて漁業の手伝いを行なうようになったが，昭和 26 年夏にいたり，咳嗽，喀痰等の自覚症状をみるようになり，同年 9 月突然咯血（約 600 g）があり，同市某医院にて治療を開始した。往診または通院にて化学療法（昭和 30 年までに SM 75 g，PAS 500 g）および気腹療法（昭和 27 年 1 月より 30 年 5 月まで毎週 1 回程度行なつた）を受けた。この当時は 1 年 1 回程度の咯血をみていた。昭和 31 年 4 月，同医転居のため，某医院に転医し，32 年 3 月まで化学療法（INH 47 g，PAS 3,300 g）を受けた。この間 1 回咯血している。その後はほとんど治療を受けずに過していた。昭和 33 年 4 月佐伯保健所より入院加療を奨められた。この当時は割合自覚症状は少なかつた。昭和 33 年 8 月，国立療養所二豊荘入所，昭和 35 年 5 月，経済的事情により止むを得ず退所す（この間 SM 47 g，INH 102 g，PAS 2,990 g，IHMS 176.8 g の化学療法を受けた）。その後南海病院にて 3 カ月間化学療法〔INH および SF（Sulfisoxazol とと思われる）〕を受けたが，昭和 37 年 4 月，佐伯保健所にて健康診断を受け，強ちに再入院を奨められ，同年 6 月 16 日再び二豊荘へ入所し現在にいたつている。再入所後 40 年 5 月までに SM 27 g，INH 123 g，PAS 1,056 g，KM 208 g，Sulfisoxazol 927 g，Sulfaphenazol 288.5 g，TH 49.9 g の化学療法を受けている。

〔現症〕 体重 47 kg，肺活量 1,200 ml，排菌，培養ともに陽性，病型は学会分類 bII 2-3，学研 F(ky+kz) PivPp，胸部 X 線写真は図 1 のごときものである。

ツベルクリン反応：人型「ツ」で陽性（ $\frac{6 \times 6 \text{ mm}}{16 \times 17 \text{ mm}}$ ）であるが，鳥型「ツ」で陰性，蒲生「ツ」でも陰性。

血沈：1 時間 5 mm，2 時間 20 mm。

検尿：異常なし。検便：虫卵，潜血ともに（-）。

一般検血：赤血球数  $458 \times 10^4$ ，血色素 95%，白血球数 9,600，分画，好酸球 18%，リンパ球 32%，単球 3%，多核好中球 45%，桿状核好中球 2%。

肝機能諸検査：血清総蛋白 6.4，黄疸指数 4，チモール混濁反応 4，硫酸亜鉛反応 13，ハイムテスト（+），BSP 30 分 5%，45 分 2%，トランスアミナーゼ GOT 11，GPT 5。現在，TH，INH 二者併用療法を行なつて

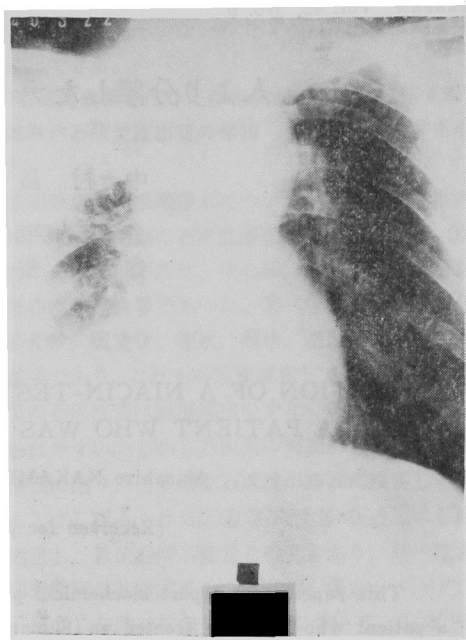


Fig. 1

いる。

#### 分離菌株の性状

##### 1. 集落および菌形態

一応分離した菌株を [ ] 株と名づける。喀痰の直接塗抹標本中の菌数，培養成績，得られた菌の耐性試験，化学療法の経過は表 1 に示した。小川培地で発育に約 2 週間以上を要し，集落の色調は淡黄白色，乾燥した R 型集落で，光発色試験は陰性である。菌形態，染色性では人型結核菌と区別するところがない。

##### 2. ナイアシンテスト

今野<sup>1)</sup>の方法に従つて，アニリン，ブロムシアンおよびベンチジン，ブロムシアンの 2 法を用いてナイアシンテストを試みた。成績は表 2 のごとくであつて，[ ] 株は両反応とも全く陰性であつた。

なお今後の実験においてこの [ ] 株の対照株として人型結核菌としては H<sub>97</sub>Rv，牛型結核菌としては BCG，鳥型結核菌としては A 3717，非定型抗酸菌の中では photochromogen p-16，nonphotochromogen 100616，Scotochromogen p-6，雑菌性抗酸菌としては Myc. smegmatis，Myc. phlei，および Jucho 株を用いた。

##### 3. 発育温度域

小川培地とグリセリンを除いた小川培地とを用いて [ ] 株およびその他の株の発育温度域を検討した。検討した培養温度は 30°C，37°C，および 40°C である。その成績は表 3 のごとくである。

これによると亀井株は 30°C および 40°C では集落を作らぬ。この所見は H<sub>97</sub>Rv に一致して，その他の型の

Table 1. Isolation of Mycobacteria from the Patient and the Course of Chemotherapy since 1965

Year		1965				1966												1967		
Month		9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
Smear*		2		3	2	—	3	—	3	2	—	—	—	3	2	2	2	3	2	—
Culture		+		+	+	—	+	+		+	—	—	—	+	+	—	+	+	+	7
Drug-Resistance	SM	+		+	+		—	+		+				—	—	+	+	+	+	+
	PAS	—		—	—		—	—		—				+	+	—	—	—	—	—
	INH	—		—	—		—	—		—				—	—	—	—	—	—	—
	KM	+		+	+			+		+				+	+	+	+	+	+	+
	CS															—	—	—	—	—
	TH													+	+	—	+	+	+	+
Chemotherapy	TH	5.8	7	11.6	12	12	10.8	8.4	11.6	4										
	SP**	5																		
	KM	13																		
	INH	5.7	6	8.7	9	9	8.1	6.3	8.7	9	3									
	INHG										9	30	30	29	30	29	30	30	27	30

\* Number of bacilli according to Gaffky Formula  
 \*\* Sulfaphenazole

Table 2. Niacin Test of the [redacted]-strain and Other Mycobacteria

Strains tested	Niacin test methods	
	Anilin-bromcyan method	Benzidin-bromcyan method
[redacted]	—	—
H <sub>37</sub> Rv	+	+
A3717	—	—
100616	—	—

Table 3. Growth of Mycobacteria at Different Temperatures of Incubation and on Glycerin Minus Medium

Incubation temperature		30°C		37°C		40°C
Medium tested		Ogawa med.	Ogawa med.	Ogawa med. minus glycerin	Ogawa med.	Ogawa med.
Medium tested	[redacted]	—	+	+	—	—
	H <sub>37</sub> Rv	—	+	+	—	—
	BCG	+	+	+	—	—
	A3717	+	+	+	+	+
	P-6	+	+	+	+	+
	100616	+	+	+	+	+
	P-1	+	+	+	+	+

抗酸菌とその趣きを異にした。また [redacted] 株はグリセリン要求性があり、この所見も人型菌と一致した。

4. コード形成能

Kirchner 培地に [redacted] 株を接種して、コード形成能の有無を検した。その所見は人型結核菌 H<sub>37</sub>Rv 株と全く区別のつかぬコード形成能を認めた。

5. ウレアーゼ反応

戸田・萩原・武谷<sup>2)</sup>の方法に従ってウレアーゼ定性反

応を試みた。すなわち3% 尿素緩衝液 (M/10 Sørensen buffer) 3 ml 宛ずつ分注されたものに 10~20 mg/ml の菌液を 0.3 ml 宛に加え、さらに 0.1% phenol red 液を 1 滴加えたのち、37°C で incubate し日を追って変色度を観察した。その結果は表4のごとくで、 [redacted] 株は陽性、その他では鳥型菌 A3717 および nonphotochromogen 100616 株のみ陰性で、他は陽性を示した。

Table 4. Urease Test of the [redacted] Strain and Other Mycobacteria

Strains tested	Urease reaction* (for 48 hrs.)
[redacted]	+
H <sub>37</sub> Rv	+
A3717	—
100616	—
Jucho	+
M. phlei	+

\* Toda, Hagihara and Takeya's method

6. アミダーゼ反応

Russell<sup>3)</sup> の Indophenol 法に従ってアミダーゼ反応を試みた。基質としてはニコチンアミド<sup>4)</sup>、フォルムアミドおよびベンツアミドを用いた。酵素液としては 10~20 白金耳にガラスウール、または海砂を約同量加えてドライアイスを加えながら 20 分間乳鉢で磨碎、5 ml の Aq. を加え、のち 3,000 rpm 30 分遠心した上清を反応酵素液とした。この酵素液 0.5 ml にアミド基質 0.02 M/buffer (pH 7.0) 0.5 ml と 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 1.0 ml を加え、37°C で 18 時間反応させ、その 0.5 ml に 0.03 M MnSO<sub>4</sub> 溶液 0.1 ml, アルカリ性フェノール溶液 1.0 ml 次亜塩素酸ナトリウム

溶液 0.5 ml をこの順に加え、静かに混合して、沸騰湯浴中で5分加熱する。冷水で冷却し、水 10 ml を加えて、定温に 20 分間放置、緑色または青色を呈したものを反応陽性とした。

成績は表5のごとくであつて、■■■■株はニコチンアミダーゼ(++)、フォルムアミダーゼ(-)、ペンツアミダーゼ(-)であつた。

Table 5. Amidase Reactions of the ■■■■ Strain and Other Mycobacteria

Strains tested	Substrates		
	Nicotinamide	Formamide	Benzamide
<span style="background-color: black; color: black;">■■■■</span>	++	-	-
H <sub>97</sub> Rv	++	NT	NT
BCG	±	NT	NT
A3717	+	-	-
100616	+	NT	NT
M. smegmatis	NT	NT	###
M. phlei	NT	###	NT

NT=Not tested

#### 7. 薬剤耐性試験

小川培地に SM および KM それぞれ 10 mcg/ml, 100 mcg/ml 含有したもの、PAS 1 mcg/ml および 10 mcg/ml, INH 1 mcg/ml および 5 mcg/ml 含有したものをを用いて耐性試験を行なつた。その結果、■■■■株は INH に全く耐性なく、PAS に軽度の耐性、SM と KM に高度の耐性があることが分かつた。

Table 6. Anti-tubercle Drug Sensitivity Test of the ■■■■ Strain

Antibiotics added	Concentration per ml	Growth rates
Streptomycin	10 mcg	∞
	100 mcg	∞
INH	1 mcg	-
	5 mcg	-
PAS	1 mcg	+
	10 mcg	+
Kanamycin	10 mcg	∞
	100 mcg	∞

#### 8. 動物感染実験

体重 250 g のモルモット、下腿筋肉内に 2 mg の菌量を含む菌液 1 ml を接種して、毒力試験を試みた。接種した 2 匹のモルモットは 21 日後同時に死亡した。

その剖見所見では、脾臓に強度の結節を認めたが、脾臓には肉眼的病変は認めることができなかった。このさい病理組織検査ならびに還元培養は行なわなかつた。

#### 考 察

はじめ肺結核の診断のもとに治療されていた本患者より菌の分離が試みられ、容易に一抗酸菌株が得られた。

この集落の初発要日数、色調、形態は人型結核菌と全く区別できない R 型集落であつたが、これについてナイアシンテストを行なつたところが、ナイアシン陰性であり、この反応は数カ月にわたる分離ごとに再三試みられたが、常に陰性であつた。そこでこの菌株の特殊性に興味をもたれ、種々の性状が検討されたところ、ナイアシン(-)のほかに、概略次のごとき性状を有していた。

至適発育温度は 37°C であり、30°C でも 40°C でも発育は認められず、発育にグリセリンを要求する。光発色試験は陰性であり、コード形成は強い。ウレアーゼ(+), ニコチンアミダーゼ(+), ペンツアミダーゼ(-), フォルムアミダーゼ(-)であり、INH のみに感受性があり、SM, KM, PAS に耐性を有している。以上の性状からすれば、ナイアシン反応陰性という事項を除けば、人型結核菌のそれに酷似しているが、人型結核菌の決定的条件であるナイアシン反応が陰性である点と、これに加えてモルモットへの感染実験を行なうと、脾臓に病変を作らなくて、脾臓に結節を生じた点とより、人型結核菌は一応除外されるものと思われる。ただこの患者のツベルクリン反応は、人型ツベルクリンに強く反応して非定型菌ツベルクリンに反応性がない点が人型結核菌感染を除外できないうらみがある。したがつてこの菌株の決定には、さらに他の 2, 3 の化学反応や動物実験の再検討が要求されるものと思われる。

#### 結 論

結核症の診断のもとに長期間治療されている一患者より一抗酸菌を分離して、その菌株の性状を検討したところ次の性状を有していた。菌分離回数は昭和 40 年来 18 回培養が試みられたうち、13 回培養陽性でその大部分が 100 コ以上の集落を得ている。

1. R 型の淡黄白色の集落で、集落初発日数は約 2 週間、発育至適温度は 37°C、光発色試験は陰性。
2. コード形成能は強い、グリセリンを発育に要求する。
3. ナイアシンテスト(-)
4. ウレアーゼ(+), ニコチンアミダーゼ(+), ペンツアミダーゼ(-), フォルムアミダーゼ(-)。
5. INH 感受性があるが、SM, KM, PAS には耐性である。
6. モルモットに対する病原性は人型結核菌による感染の場合と著しく異なる所見をとる。
7. 患者のツベルクリン反応は人型結核菌ツベルクリンのみ強く反応する。

以上の成績より、人型結核菌ではないが他のいかなる種類の抗酸菌かは今のところ今後の検討にまつべき事項が残されている。

この研究においてツベルクリンの分与をいただいた九大細菌学武谷教授，ならびに種々ご教示いただいた九大戸田名誉教授，武谷教授，広島大学占部教授，斉藤肇講師，予研究室橋部長，北里研究所小川辰二博士に深甚なる謝意を表す。

#### 文 献

- 1) 今野淳：日本臨床結核，17：432，503，昭 33.
- 2) 戸田忠雄・萩原義郷・武谷健二：医学と生物学，55：184，昭 35.
- 3) Russell, J.A. : J. Biol. Chem., 156 : 457, 1944.
- 4) 今野淳・長山英夫：結核，35：287，昭 35；日本臨床，20：1736，昭 37.