

皮下膿瘍より分離された暗発色性
非定型抗酸菌の1菌株について

高 木 篤・江 角 郁 子

鳥取大学医学部細菌学教室

茂 理 春 光

鳥取大学医学部附属病院中央検査部

上 平 用

鳥取大学医学部整形外科学教室

受付 昭和 44 年 7 月 14 日

ON A STRAIN OF SCOTOCHROMOGENIC ATYPICAL
MYCOBACTERIA ISOLATED FROM PREAURICULAR
SUBCUTANEOUS ABSCESS*

Atsushi TAKAGI, Ikuko ESUMI, Harumitsu MORI
and Mochiru KAMIHIRA

(Received for publication July 14, 1969)

From a 4 years old male patient with subcutaneous abscess in the preauricular region, a strain belonging to the scotochromogenic group of atypical mycobacteria was isolated which was thought to have pathogenic relation with the disease. This paper reports the results of various examinations on the biological, biochemical and animal experimental characteristics of this strain.

Since May, 1967, the patient noted a tumor formation in the preauricular region. From the pus obtained by the puncture of the tumor, the acid-fast bacilli were isolated, and the colonies were yellowish orange in color and smooth and moist in nature. As the strain was proved to be sensitive to streptomycin, the patient had been treated by streptomycin combined with surgical treatment. Since February, 1968, the tumor has been cured, and the acid-fast bacilli have become negative.

The strain took 3 weeks to grow on 1% Ogawa's egg media. The optimal temperature for the growth was 37°C, and it was not photochromogenic. As to the other properties, a niacin test was negative, a neutral red test was negative if the extraction was done with 50% methanol, while it was strongly positive if the extraction was done with absolute methanol. Moreover, an urease test was negative, the resistance to decolorizing effect of boiling water (Kf) was 1.5 minutes, a catalase activity was distinct and a cord formation property was not found.

For the purpose of investigating pathogenicity, mice were inoculated intravenously through the tail vein with 1 mg of the strain, but no mice showed pathologic change on autopsy. A half of mice which were inoculated with 8 mg of the strain died in about a week after infection. The surviving mice were sacrificed on the 58th day. Among died mice, macro-

* From the Department of Bacteriology, Tottori University School of Medicine, Yonago, Tottori Pref. 683 Japan.

scopically, the lung was congested, the spleen was swollen and the liver showed spotty necrosis. Microscopically, non-specific pneumonia was recognized in the lung. Among sacrificed mice, no macroscopical change was noticed, however, in microscopic observation of the lung, scattered proliferative tuberculous lesions consisting mainly of epithelioid cells were observed. The demonstration of the acid-fast bacilli by staining revealed that a great number of organisms were found in the inflammatory lesions of the lung of the deceased mice, but in the sacrificed mice, no bacilli was found even in the tuberculous lesions of the lungs.

In order to examine the degree of multiplication of the strain in the lung of mice, 11 mice were inoculated intravenously with 1 mg of the organisms, and were sacrificed at 2, 4, 6 and 8 weeks after the infection. The lung obtained from the sacrificed mice was subjected to the cultural examination for the enumeration of acid-fast bacilli contained. From 2 mice viable organisms could be recovered.

From the above-mentioned facts it is concluded that the pathogenicity of the present strain against mice is not so distinct. Furthermore, the result of the pathogenicity experiment of the strain on rabbits was negative.

近年、非定型抗酸菌による感染症例報告がだんだんと増加しているが、非定型抗酸菌の病原性に関して、十分な理解を得るためには多数の症例報告が必要と思われる。ここでは耳前部膿瘍より分離され、この疾患に病原的な関係があると思われた暗発色性非定型抗酸菌の1菌株について報告する。

本菌株が分離された患者の臨床経過

患者はわれわれの大学の整形外科外来患者で、4歳の男児である。既往歴、家族歴には特記すべきものはない。また現在症である右耳前部膿瘍以外に記すべき疾患は見あたらなかつた。現病歴は1967年5月より右耳前部に腫瘍形成があり、コバルト照射1回、抗生物質(薬剤不明)の投与を受けると、腫瘍はやや縮小してきた感があった。翌月大学を訪れ、腫瘍部を穿刺して約3mlの濃厚な黄色の穿刺液が得られ、一般細菌検査が行なわれたが菌を証明できず、クロラムフェニコールを内服していた。その後同じく穿刺液に一般細菌検査が行なわれ、さらに抗酸菌検査が併用されると、一般細菌検査では前回同様菌を証明することができなかつたが、抗酸菌検査では塗抹陰性、培養陽性を示した。生じた初発集落は黄橙色を呈していたため非定型抗酸菌が疑われた。この培養期間中、腫瘍は外科的療法が試みられ、切開して膿汁を搾り出して培養検査を行なうと、やはり前回同様の抗酸菌を認めた。耐性検査では本菌株はストレプトマイシンに感受性を示したので、その後ストレプトマイシン0.5gの週2回筋注が続けられた。同年9月末になると培養検査で、一般細菌、抗酸菌とも陰性になつた。さらにクロラムフェニコール、カナマイシン、ストレプトマイシン、INHの投与が続けられ、1968年2月には排

膿もなくなり治癒して今日にいたっている。分離された抗酸菌株を患者名をとって杉本株と命名した。

杉本株の細菌学的所見

被検菌は多くの場合1%小川培地に3週間培養して検査に供した。培養温度は特記しないかぎり37°Cとした。なお対照として人型結核菌 H₃₇Rv 株を使用した。

I. 培養性状

杉本株は1%小川培地上で発育におよそ3週を要する。この培地上での発育はやや不良であり、普通寒天培地、グリセリンを含まない小川培地には全く発育しない。集落形態は円形、湿潤、平滑で軟らかく、光沢があり、黄橙色を呈し、菌液は均等に懸濁されやすい。45°Cでは全く発育せず、27°Cでは少数の集落を認めるのみである。発育至適温度は37°Cであつた。

II. 光発色性

光をさえぎるために、杉本株を接種した培地全体をアルミホイルで包み、対照はアルミホイルで包まないでそのままの状態に培養した。3週目に結果を判定すると、両者の間に色調の差はみられず、その後光線に当ててもさらに着色するという事はみられず、光発色性はなかつた。

III. ナイアシン試験²⁾

プロムシアン・アニリン法とプロムシアン・ベンチジン法とによつて試験した。結果は表1に示すように杉本株は陰性、対照の H₃₇Rv 株は陽性であつた。

IV. 中性紅反応

菌塊を1白金耳量かきとり、スピッツグラスに入れて、これに50%メタノールを3ml加え、65°C、1時間加温し、遠心沈殿後毛細管ピペットでメタノールを除

Table 1. Biological and Biochemical Properties of Sugimoto Strain

| Strain | Colony | Photochromogenic nature | Growth on Ogawa's egg media* at | | | Neutral red test (Extraction with) | | Urease | | Kf (min.) | Cord formation | |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|------|------|------------------------------------|-------------------|--------|----------|-----------|----------------|---|
| | | | 27°C | 37°C | 45°C | 50% methanol | Absolute methanol | Niacin | Catalase | | | |
| Sugimoto | Smooth Yellowish orange | — | Few colonies | Good | None | — | + | — | — | + | 1.5 | — |
| H ₉₇ Rv | Rough Grayish white | — | | | | + | — | + | + | ± | >20 | + |

* Degree of growth at the third week after inoculation.

く。これにアルカリ緩衝液 (NaCl 5g, NaHCO₃ 1g, Aq. dest. 100 ml, pH 8.9) を 2 ml 加え、さらに 0.05% の中性紅溶液の 0.1 ml を加えて、37°C に 30~60 分間おき、菌の着色状態を観察した。また合田らの報告⁹⁾ に従って、50% メタノールによる処置を無水メタノールで置きかえて行なつてみた。その結果は表 1 に示す通り、50% メタノール処置では H₉₇Rv 株陽性、杉本株は陰性を示し、無水メタノール処置によると、H₉₇Rv 株は陰性、杉本株は強陽性であつた。

V. ウレアーゼ試験

戸田、武谷の方法⁴⁾ に従って行なつた。対照として教室保存の H₉₇Rv 株のほか、牛型結核菌 R-14 株、トリ型結核菌 Kirchberg 株、非定型抗酸菌 Nonphotochromogen Okayama 株をあわせて試験に供した。結果は杉本株、トリ型結核菌、Nonphotochromogen が陰性に、他の菌株は陽性を示した。

VI. 抗煮沸性¹⁾

杉本株、H₉₇Rv 株、教室保存の非定型抗酸菌 Scotochromogen P6 株の抗煮沸性の比較を行なつた。スライドガラスに被検菌を塗抹し、Ziehl の石炭酸フクシン液に 60°C、20 分間浸し、その後煮沸生理食塩水中における脱色までの時間を比較した。この脱色されるに要する時間を分で表わし、Kf 値と称するが、得られた Kf 値は、H₉₇Rv 株が 20 以上、Scotochromogen が 1、杉本株は 1.5 であつた。

VII. カタラーゼ活性¹⁾

スライドガラス法で試験を行なつた。杉本株は 3% 過酸化水素水を混ぜあわせると直ちに激しく発泡した。一方 H₉₇Rv 株はわずかに発泡するのが認められる程度であつた。

VIII. コード形成能¹⁾

10% 牛血清加 Kirchner 培地に 3 週間培養すると、混濁発育を認めた。その 1 滴をスライドガラス上に落とし、乾燥、固定した後、Ziehl の石炭酸フクシン液で加温染色を行なつて鏡検した。杉本株にはコード形成はみられなかつた。

IX. 薬剤耐性試験¹⁾

小川培地上の菌集落をとり、手振り法により 1 mg/ml

相当の滅菌蒸留水浮遊液をつくつた。すなわちガラス玉入り滅菌コルベンに 3 週培養菌を無菌的にはかつて入れそれを振りながら徐々に滅菌蒸留水を入れ、均等な菌の浮遊液をつくつた。これを滅菌蒸留水で 100 倍に希釈し、その 0.1 ml ずつを薬剤含有小川培地と対照培地に接種して 37°C で培養し、毎週観察を行なつた。小川培地に含有される薬剤と濃度はストレプトマイシン (10, 100 μg), PAS (1, 10 μg), INH (0.1, 1, 5 μg) である。3 週目の結果判定では、杉本株はストレプトマイシンに感受性があり、PAS, INH にはほぼ完全耐性を示した。(表 2)

動物実験成績

I. マウス

杉本株の 10 mg/ml 菌液をつくり、その 0.1 ml を 5 匹のマウスの尾静脈内に接種し、30 日間観察したが、剖検上肉眼的変化は認められなかつた。さらに 8 mg を接種すると、6 匹のうち 3 匹が接種後 1 週間目前後に死

Table 2. Sensitivity of Sugimoto Strain to Antituberculous Drugs (Growth on Ogawa's egg media containing drugs after inoculation of 10⁻⁸ mg of the organisms)

| Drugs | Concentration (mcg/ml) | Growth | | |
|---------|------------------------|--------|---------|---------|
| | | 1 week | 2 weeks | 3 weeks |
| SM | 10 | — | — | — |
| | 100 | — | — | — |
| PAS | 1 | + | ## | ## |
| | 10 | + | ## | ## |
| INH | 0.1 | + | ## | ## |
| | 1 | + | ## | ## |
| | 5 | — | + | ## |
| Control | — | + | ## | ## |
| | — | + | ## | ## |

All-over growth on the surface of the media.

Most of colonies are confluent.

+ Most of colonies are isolated, but a few colonies are confluent.

+ A few of colonies on the surface.

— No growth.

亡した。残り3匹は接種後58日目にエーナル麻酔のもとに屠殺し剖検した。とり出した組織は10%ホルマリンで固定して、パラフィン切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して観察した。

8mg接種、1週間前後死亡例を剖検すると、肺の充血、脾の腫脹があり、また1例に肝の斑点状壊死が認められた。肺の組織学的所見では非特異性異物性肺炎像がみられ(Fig. 1)、肺胞内には赤血球、好中球、大単核細胞(単球、組織球)、リンパ球の滲出が認められた(Fig. 2)。また動脈性血管周囲に炎症性浮腫が著明にみられた(Fig. 3)。静脈性血管内には好中球、大単核細胞、リンパ球からなる細胞性塞栓が認められ、一部にはこれら細胞の血管外遊出像がみられた(Fig. 4)。

8mg接種58日目屠殺例を剖検すると、肉眼的には著変は認められなかつたが、肺の組織学的所見では、すでに滲出性炎症像は消退して、増殖性の結核病変が散在性に多数認められた(Fig. 5)。また類上皮細胞を中心に、その周囲がリンパ球ならびに類リンパ球よりなる類上皮細胞結節も認められた(Fig. 6)。乾酪変性、壊死は全く認められなかつた。

8mg接種1週間目前後死亡の3例のマウスの肺のパラフィン切片に抗酸菌染色を施して鏡検すると、すべてのマウスにおいて細胞の滲出部分に抗酸菌を多数認めた。しかし本菌8mg接種58日目屠殺の3例では、肺の正常部にも結節部にも抗酸菌は証明できなかつた。

次に、本菌株の肺における増殖力をみるため、1mgをマウス尾静脈内に接種したのち、2週目毎に2~3匹ずつ屠殺して、肺重量を測定したのち、4% NaOH水10mlを加え、テフロンホモジェナイザーで均等化して、その後4% NaOH水で10倍希釈を行ない、その0.1mlを1%小川培地に接種し、37°Cで培養を行なつた。毎週観察を行ない最終的に8週目に生じた集落数を数えて結果を判定した。集落が生じたのは接種した11匹のうち、4週目および6週目屠殺の2匹からで、生じた集落数は10コロおよび8.5コロであつた。また肺重量を測定して肺指数 $=\frac{\text{肺重量(mg)}}{\sqrt{\text{体重(g)}}}$ を求めたが、杉本株接種マウスと対照マウスとの間の肺指数は有意の差を認めなかつた。

II. ウサギ

上記と同様にして作つた菌液を接種量10mg相当量になるよう4羽のウサギの耳静脈内に接種した。2カ月間の観察中2羽が死亡したので、死亡後剖検したが記すべき病変はみあたらなかつた。おそらく寒さによる死と思われる。2カ月目に生存したウサギを屠殺剖検したが、同様に病変は認められなかつた。

考 察

杉本株は患者の皮下膿瘍の穿刺液より、純培養的に得

られた抗酸菌である。集落形態が平滑で黄橙色に着色していたので、非定型抗酸菌が疑われた。そこでこの菌種についての種々の検索同定を試みた結果RunyonのGroup II Scotochromogenに分類されることが分かつた。

杉本株は37°Cで最もよく発育し、27°Cではわずかに発育する程度である。小川培地上での集落数が最多となるのは37°Cで約3週間が必要で普通寒天培地には発育しない。

さらに本菌株の諸性状を結核菌と比較しながら検討してみると、まず人型結核菌に特異的に陽性に出て他の抗酸菌では陰性を呈するナイアシン試験では、杉本株は陰性を示し、抗煮沸性も杉本株は低く雑菌性抗酸菌のKf値に近いものであつた。中性紅反応においては、50%メタノールと無水メタノール両処置による反応の差を合田ら⁹⁾が見出しているが、今回の検査にそれを適用すると、結果は合田らの報告によるScotochromogenの結果と一致した。すなわち50%メタノールを作用させると、Scotochromogen陰性、人型結核菌陽性となり、無水メタノールを作用させると結果が逆になることである。しかしあわせて検査に供した教室保存トリ型結核菌との間に差が生じなかつた点について、合田らのトリ型菌は50%メタノール、無水メタノールのどちらを作用させても同程度の反応が現われるという報告に相違した。そこで集落の色調は多少トリ型菌とは異なるが、ウレアーゼ陰性であつたことからトリ型菌との鑑別が必要と思われ、ウサギに対する病原性を検討したところ、ウサギ静脈内接種で病原性は全く認められなかつた。このことは本菌株がトリ型菌と相違することを裏づける一つの証明になつたと思われる。病原性を示す抗酸菌にみられるコード形成性は杉本株には見出されなかつた。杉本株のマウスに対する病原性は少量接種では病変を起こさず、大量(8mg)を接種することによつて弱度の病原性を示した。

非定型抗酸菌症には今までの抗結核剤は効果が少ないという報告が多いが、本菌株はストレプトマイシンに感受性を示した。しかしPAS、INHには抵抗性を示した。

分離検出状況より本菌株は、今回の疾患である皮下膿瘍と病原的な関係があると思われるが、本菌株の由来に関しては既往歴、家族歴等にとくに注目すべき点はみあたらず、本菌株がどこから由来し、どのようにして病原性をもつようになったかは不明である。

わが国においても日比野ら¹⁰⁾の全国的な非定型抗酸菌症の精査結果によると、Scotochromogenによる疾患はNonphotochromogenに次いで多い。またScotochromogenによる疾患の内訳は、肺疾患が最も多く70%近く占め、次いで髄膜炎、リンパ節疾患となつている。膿瘍の症例報告も2例あり本菌株もそれに該当する

1例であつた。

総 括

4歳の男子の右耳前部膿瘍より分離され、本疾患の病原と思われる暗発色性非定型抗酸菌の1菌株の諸性状について報告した。特筆すべき性質としては、本菌株がストレプトマイシン感受性であつたことである。

稿を終わるに臨み、病理組織標本所見について、懇切なるご指導をいただいた本学病理学教室坂本巖助手に深

く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 厚生省監修：結核菌検査指針，日本公衆衛生協会，東京，昭39.
- 2) 今野淳：結核研究の進歩，26：73，昭34.
- 3) 合田忠・阪本竜夫：結核，42：279，昭42.
- 4) Toda, T. Hagihara, Y. and Takeya, K.: Am. Rev. Res. Dis., 83：753, 1961.
- 5) 日比野進：結核，37：307，昭37.

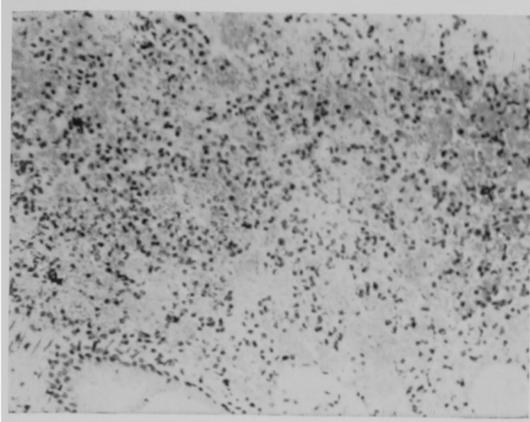


Fig. 1. The lung of mice died on 8 days after infection, showing nonspecific pneumonia. Hematoxylin-Eosin (H.E.) $\times 100$.

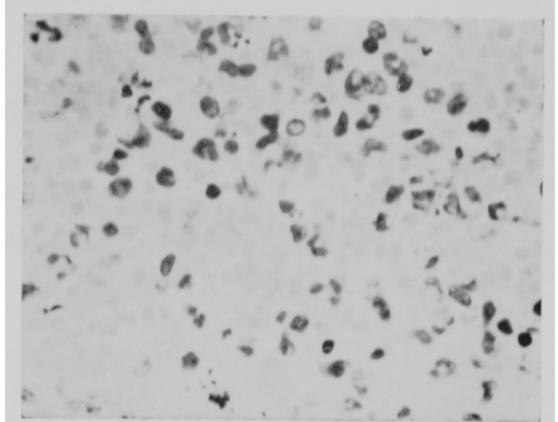


Fig. 2. Enlargement of Fig. 1. H.E. $\times 400$.

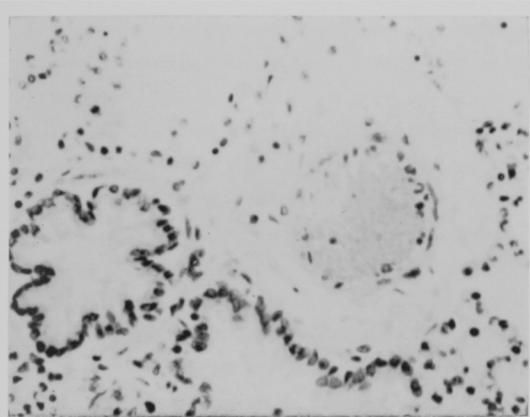


Fig. 3. The same lung as in Fig. 1, showing inflammatory edema seen around the pulmonary artery. H.E. $\times 200$.

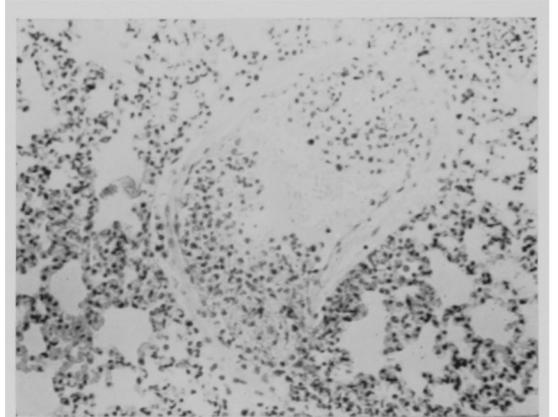


Fig. 4. The same lung as in Fig. 1, showing cellular embolism in the pulmonary vein. H.E. $\times 100$.

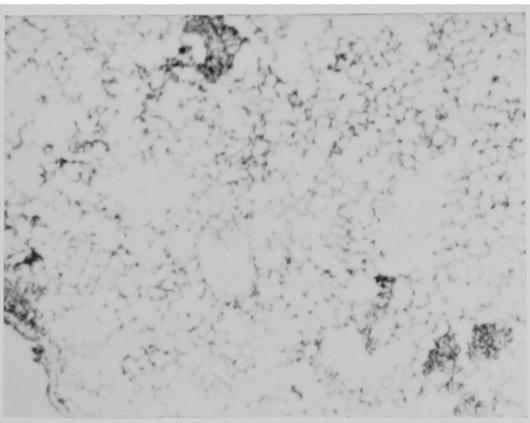


Fig. 5. The lung of mice sacrificed on the 58th day after infection, showing epithelioid cell tubercles. H.E. $\times 40$.

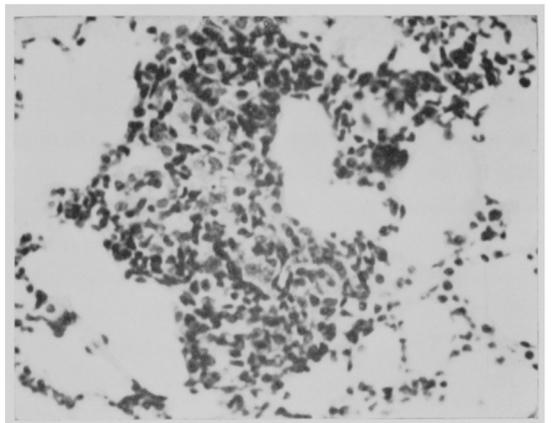


Fig. 6. Enlargement of Fig. 5. H.E. $\times 200$.