

原 著

非定型抗酸菌に関する研究

第2報 生物学的性状の考察

正 井 秀 雄

関東中央病院臨床検査科

受付 昭和48年11月6日

STUDIES ON ATYPICAL MYCOBACTERIA*

Report II. Biological Properties

Hideo MASAI

(Received for publication November 6, 1973)

During the six-year period from 1966 to 1971, the author conducted 11,431 sputum culture and obtained 382 specimens of atypical mycobacteria from 74 cases. These 74 cases were subjected to the following biological property tests:

1) The pigmentation of the colonies on the Ogawa egg medium proved to be orange, orange yellow, light orange, light yellow white, greyish white and white. The most frequent was greyish white followed by orange, while the least frequent were orange yellow and white. The difference in the color tone was surveyed with an automatic spectrophotometer (HITACHI ESP 3T), but no conspicuous results were obtained since all the colors showed a similar curve with 450 m μ at its peak. When petro-ether and acetone were employed to abstract the pigments, those of photochromogens could easily be abstracted while it took considerably longer time in the other groups.

2) Most of the colonies on the Ogawa egg medium were round in shape and only a few presented other forms. However, because of the great number of bacteria on the egg medium, there were many cases whose form could not be identified.

3) As for the smoothness of the colonies, most of the atypical mycobacteria showed smooth colonies, whereas a part of the photochromogens and nonphotochromogens showed a rough form.

4) When the bacteria were observed under a microscope by Ziehl-Neelsen staining, the photochromogens proved to be long bacilli, while the nonphotochromogens and all the others were short bacilli.

5) Some of the photochromogens presented inconspicuous cord formation while the others did not.

6) As for the temperature of culture, all atypical mycobacteria showed growth at 37°C, and only one case of nonphotochromogens did not grow at 25°C. Comparing the grade of colour production after exposure to light at different. Culture temperature, the grade was more marked at 37°C.

* From the Kanto Chuo Hospital, Kamiyoga, Setagayaku, Tokyo 158 Japan.

The above findings show that it is possible to group atypical mycobacteria by their biological properties.

緒 言

非定型抗酸菌を結核菌と鑑別し、更に非定型抗酸菌の分類、同定を行うには、抗酸菌の生物学的検査、生化学的検査、抗結核薬剤耐性およびファージなどによる総合検査を必要とする。しかし分離された抗酸菌が非定型抗酸菌であろうと考えるとき、まずその集落の性状によるのが常である。私は第1報¹⁾において報告した症例の非定型抗酸菌分離株について集落にあらわれた所見を、更に分析し、その分類に利用する際の精度の限界を検討しようとした。

研究対象および方法

昭和41年1月から昭和46年12月までの6年間に得られた非定型抗酸菌株74例について、次の6項目の生物学的性状の検査を行った。

1) 菌苔の色調：小川培地上に発育した菌苔の色調を肉眼的に分類した。また菌苔を光にさらし光発色検査も行い、更に光発色試験によつて得られた橙黄色の菌と光発色性によらない有色菌の色素をそれぞれ抽出して比較検討した。

この色素抽出の方法は小川培地1斜面分の菌苔を培地が混らないようにかきとり、アセトンあるいは石油エーテルを2ml加えて振盪遠沈し、得た上清について自記分光光度計で吸収曲線画させた。

2) 集落の形：小川培地上の菌を円形とそれ以外の形に分けて観察した。

3) 菌のS型とR型：滅菌生理的食塩水に菌塊を入れてつぶし、容易に混濁液が得られるか否かで判定した。

4) 菌体の長さ：Ziehl-Neelsen染色を行い、顕微鏡で菌体の長さを観察した。

5) コード形成：Kirchner液体培地に継代培養した菌についてZiehl-Neelsen染色を行い、コード形成の有無を検討した。

6) 発育温度：37℃と25℃における培養発育状態を観察し、ことにPhotochromogensについては37℃、25℃の培養による光発色性を観察した。

成 績

1. 色 調

小川培地上の非定型抗酸菌の集落の色調を、人型結核菌4週培養後の集落の色調淡黄白色と比べて、Orange色のみがみられた集落を橙色、橙色のうすい色調の集落を淡橙色、人型結核菌よりややOrange色の集落を橙黄色とした。また黄色は認められないが白色に至らない色調の集落を灰白色、それより白い集落を白色と判定した。

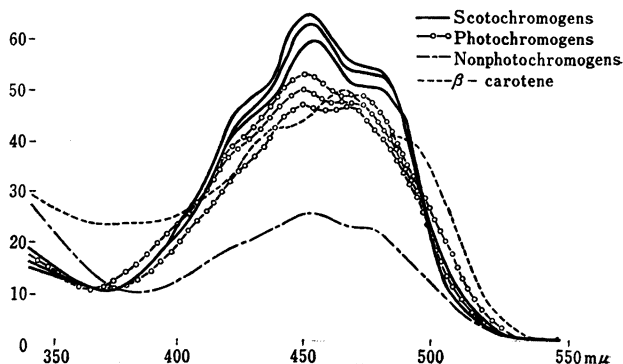
非定型抗酸菌の集落の色調として橙色、淡橙色、橙黄色、淡黄白色、灰白色、および白色の6色が認められ、表1にみるごとく、非定型抗酸菌74例のうち、灰白色を示したものが48例、64.8%で最も多く、ついで橙色の13例、17.6%、淡橙色5例、6.8%、淡黄白色4例、5.4%であり、最も少ないのは橙黄色と白色のおのおの2例、2.7%であつた。非定型抗酸菌74例をRunyon²⁾のグループ別に分けてその色調をみると、最も多い灰白色は全例がNonphotochromogensであり、橙色の13例中12例はScotochromogensにみられ、1例はRapid

Table 1. The Color Tone of Atypical Mycobacteria

Tone	Cases	%	Runyon classification			
			I	II	III	IV
Orange	13	17.6		12		1
Light orange	5	6.8			5	
Orange yellow	2	2.7			2	
*Light yellow	4	5.4	3		1	
Greyish white	48	64.8			48	
White	2	2.7				2
Total	74	100.0	3	12	56	3

*M. tuberculosis shows this tone.

Fig. Absorption Curve (Automatic spectrophotometer) of the Pigments of Atypical Mycobacteria Abstracted by Petro-Ether and Acetone



growersであつた。淡橙色の5例は全例 Nonphotochromogens であり、淡黄白色の4例中3例は Photochromogens, 1例は Nonphotochromogens にみられた。また白色の2例は全例 Rapid growers にみられた。橙黄色2例は Nonphotochromogens であつた。ただし Photochromogens の淡黄白色3例は光にさらすことにより橙黄色に変化した。

これらの色調の差を調べるために、Photochromogens

Table 2. The Form of Colonies of Atypical Mycobacteria

Form	Cases	%	Runyon classification			
			I	II	III	IV
Round	45	60.8		12	32	1
Others	7	9.5	3		2	2
Unidentified	22	29.7			22	
Total	74	100.0	3	12	56	3

Table 3. Smoothness of Colonies of Atypical Mycobacteria

R or S	Cases	%	Runyon classification			
			I	II	III	IV
Rough	6	8.2	3		3	
Smooth	68	91.8		12	53	3
Total	74	100.0	3	12	56	3

Table 4. Microscopic Forms of Atypical Mycobacteria

Form	Cases	%	Runyon classification			
			I	II	III	IV
Short bacilli	68	91.8		12	53	3
Ordinary bacilli	3	4.1			3	
Long bacilli	3	4.1	3			
Total	74	100.0	3	12	56	3

Table 5. Cord Formation of Atypical Mycobacteria

Cord	Cases	%	Runyon classification			
			I	II	III	IV
+	—	—				
±	3	4.1	3			
—	71	95.9		12	56	3
Total	74	100.0	3	12	56	3

Table 6. Culture Temperature and Speed of Growth

Temp. and speed	Cases	%	Runyon classification			
			I	II	III	IV
37°C	74	100.0	3	12	56	3
Speed			1~2w	2~3w	1~2w	3~4d
25°C +	73	98.6	3	12	55	3
—	1	1.4			1	
Total	74	100.0	3	12	56	3

w = week d = day

の光発色後の橙黄色3例、Scotochromogens の橙黄色3例と Nonphotochromogens の橙黄色の1例計7例について色素を抽出し、 β -カロチンの色素を対照として自記分光光度計（日立・ESP・3T）で吸収曲線を測定比較した。成績は図にみられるごとく、Photochromogens, Scotochromogens, Nonphotochromogens の全例は同じパターンを示し、450 m μ 近くに最高値を認めた。

2. 集落の形

小川培地上の集落の形としては円形、あるいは集落の周辺が不規則な形のもの、ドーナツ状等多様な形状がみられた。集落の形を円形とそれ以外の形のものとに分けてみると、表2のように、74例中円形状は45例、60.8%、円形以外の形のものは7例、9.5%を認めた。これを非定型抗酸菌のグループ別でみると、Nonphotochromogens の32例、Scotochromogens の12例、全例および Rapid growers の1例が円形状であり、円形以外の形の7例は Photochromogens の3例全例と Nonphotochromogens と Rapid growers の2例ずつに認められた。Nonphotochromogens 22例、29.7%は培地上の集落が無数のため、単一集落として観察できず、円形か否かは判読しえなかつた。

3. 菌のS型、R型

非定型抗酸菌を滅菌生理的食塩水の中へ菌塊を入れてつぶし、容易に混濁液が得られたものをS型とし、そうでないものをR型とした。成績は表3のようにS型の性状を示したものは68例、91.8%であり、R型のものは6例、8.2%であつた。このR型の6例は Photochromogens の3例全例と Nonphotochromogens の3例であつた。

4. 菌体の長さ

培養菌について Ziehl-Neelsen 染色を行い、顕微鏡下で菌の形を観察し、人型結核菌と比べて同じくらいの長さを示した菌体を桿菌とし、それより明らかに長い菌体を長桿菌、短い菌体を短桿菌と区別した。その成績は表4に示すごとく、短桿菌が多数を占め74例中68例、91.8%であり、長桿菌と桿菌はおのおの3例ずつ4.1%であつた。非定型抗酸菌のグループ別では長桿菌は Photochromogens の3例のみに、桿菌は Nonphotochromogens の3例に認められた。

5. コード形成

Middlebrook⁹⁾ らは結核菌が液体培地において、ひも状の発育を示すが雑菌抗酸菌はそのよ

Table 7. The Grade of Colour Production after Exposure to Light at Different Culture

Strain	Temp.	24 hrs	48 hrs	72 hrs
■	37°C	卅	卅	卅
	25°C	±	+	卅
■	37°C	卅	卅	卅
	25°C	±	+	+
■	37°C	卅	卅	卅
	25°C	±	+	卅

うな発育を示さないことを報告し、多くの追試⁴⁾⁻⁶⁾によつてこの事実が確認されている。私は Kirchner 液体培地培養菌について Ziehl-Neelsen 染色を行い、表5にみるごとく 74 例中 71 例、95.9% はコード形成を示さず、残りの 3 例、4.1% は菌体が並列状の弱いコード形成を示した。この 3 例は全例が Photochromogens であった。

6. 発育温度

小川培地の非定型抗酸菌を 37°C と 25°C での発育を観察した。表6のごとく 37°C では 74 例全例が 卅 の発育を示した。25°C でも 73 例は 卅 の発育を示したが、Nonphotochromogens の 1 例のみは全く発育がみられなかつた。37°C における発育速度を非定型抗酸菌のグループ別でみると、Rapid growers は全例 3 日後に培地上菌の発育が認められ、Photochromogens と Nonphotochromogens は Rapid growers より遅く、10 日前後の日数を要し、また Scotochromogens は 2 週間前後の日数で菌の発育が認められた。

非定型抗酸菌の Photochromogens 3 例について光発色と温度との関連をみるために、37°C で培養した菌を光にさらした後、37°C と 25°C で培養し菌の光発色の程度を観察した。表7にみられるように光発色の強さは 24 時間後には 37°C 培養菌は 卅、25°C は ± であった。25°C 培養菌を更に 48 時間培養すると発色は + に、72 時間では 卅 に増強するのが認められた。

以上の諸性状で 1 例は色調、R 型、菌体の長さ、発育温度等で非定型抗酸菌と異なる性状を示したが、ファージ型別により Nonphotochromogens に同定された。

考 案

生物学的性状によつて非定型抗酸菌を分類する方法として、Runyon²⁾ は非定型抗酸菌の色調ならびに光による発色性を重要視し、それに菌の発育速度を考慮し、非定型抗酸菌を Photochromogens, Scotochromogens, Nonphotochromogens, Rapid growers の 4 群に分類した。現在 Runyon の分類法として広く用いられている。私の成績をみても非定型抗酸菌 74 例中結核菌の淡

黄白色と同じ色調を示したものは Photochromogens の 3 例と Nonphotochromogens の 1 例のわずか 4 例のみであり、残り 68 例は結核菌とは異なる色調を示した。ことに結核菌にみられない橙～黄色は 20 例にみられ、Scotochromogens は 12 例の全例が橙色であり、Nonphotochromogens は 56 例中 7 例が橙黄色から淡橙色であり、Rapid growers は 3 例中 1 例が橙色であつた。

したがつて集落が橙～黄色系に着色している場合はまず非定型抗酸菌が考えられる。しかも橙色を示す場合は Scotochromogens の可能性が大きく、ついでわずかであるが Nonphotochromogens, Rapid growers も疑えるが、Rapid growers はその特異な発育速度と併せ考えれば鑑別は比較的容易である。灰白色のものは私の成績からでは全例が Nonphotochromogens である。白色はわずかであつたが Rapid growers のみにみられた。

このように集落の色調は非定型抗酸菌の検出には重要な手がかりになるばかりでなく、非定型抗酸菌のグループの鑑別にも参考となる。したがつて集落の色調の注意深い観察はきわめて大切な方法である。Photochromogens の全例は結核菌と同じ淡黄白色を示したが、光発色性検査で鮮やかな橙黄色に変色した。この光発色性による橙黄色ならびに Scotochromogens の橙色、Nonphotochromogens の橙黄色の色素をアセトン、石油エーテルを用いて抽出し、各色素によつてグループの鑑別を試みた。

Tárnok⁷⁾ は Photochromogens の光合成による色素の 90% は β-カロテンであるとの報告があるので、β-カロテンを対照として抽出色素をそれぞれ自記分光光度計（日立・ESP-3T）で吸収曲線の測定を行つたが、橙～黄色系の全例が 450 mμ 近くに最高値を示し、吸収曲線のパターンによつて非定型抗酸菌のグループ別を鑑別することはできなかつた。しかしアセトン、石油エーテルを用いて菌苔から色素を抽出する際、Photochromogens の橙黄色のみは容易に抽出しえたのに対し、Scotochromogens の橙色、Nonphotochromogens の橙黄色の色素は抽出するのがきわめて難しく、アセトンで 2 度抽出してもなお菌塊に微量の色素が残っているのが認められた。このことは Photochromogens の光によつて産生された色素は菌体のきわめて表面に存在するが、Scotochromogens, Nonphotochromogens の色素は菌体内に存在すると推論できる。

また Photochromogens の光発色性の検査を行う際の培養温度についてみると、37°C と 25°C とでは 37°C 培養のほうにより鮮やかな橙黄色の色調が認められた。

集落の形態に関し、私の成績では非定型抗酸菌に円形のもの 74 例中 45 例認められ、他方結核菌には不規則な形状のものが多く、菌の形によつて非定型抗酸菌と結核菌は鑑別できそうであるが、培養陽性の観察時点では

培地上で単一の集落として観察できず、菌の形のみによつて非定型抗酸菌と結核菌の鑑別は困難であつた。

非定型抗酸菌のS型、R型で下出⁵⁾は15例中14例が滑であつたことを報告しており、私の成績でも74例中68例にS型の性状を認めたが、R型は6例ありこの6例が結核菌との鑑別が困難であつた。しかし光発色性の検査を試みることで Photochromogens の3例が除外され、非定型抗酸菌と鑑別できなかったのは74例中 Nonphotochromogens の3例のみであつた。

菌体の長さでは短桿菌が非定型抗酸菌74例中68例も占めており、長桿菌の3例は Photochromogens のみに認められ、結核菌と同じ桿菌を示したのは Nonphotochromogens の3例であつた。

コード形成で河合⁴⁾らは51例の非定型抗酸菌のうち1例のみに陽性を認め、下出⁵⁾は15例全例コード形成を認めなかつた。私の成績では非定型抗酸菌74例中結核菌のような強いコード形成を示した例は1例もなく、ただ Photochromogens の3例のみが弱いコード形成を示したにすぎなかつた。

発育温度において非定型抗酸菌は1例を除いて37°Cでも25°Cにもよい発育を示した。しかし結核菌は25°Cでは発育しないので、抗酸菌の培養を25°Cと37°Cとに平行して行くと非定型抗酸菌を容易に検出しようと思う。また発育速度では Rapid growers の3例は3日後に菌の発育を認め、非定型抗酸菌の他のグループや結核菌からの鑑別に役立つ。

以上の6項目の生物学的性状検査を組合せることで、非定型抗酸菌の分類がかなりできうるものと考え。特に Runyon の分類のうち Nonphotochromogens に属するものの中には多くの異型が認められた。

結 論

非定型抗酸菌74例を用い生物学的検査を行い次の結論を得た。

1. 非定型抗酸菌74例中70例、94.6%は結核菌の淡黄白色以外の色調を示した。4例の淡黄白色のうち3例は光発色性検査により橙黄色を示した。灰白色は Nonphotochromogens のみに、橙色の大部分は Photochromogens、白色は Rapid growers のみに認められ

た。

各グループより抽出した橙～黄色系の色素を自記分光光度計により測定したが、吸収曲線によつて鑑別することはできなかつた。

2. 非定型抗酸菌の集落は74例中45例、60.8%が円形を示し、Scotochromogens の全例と Nonphotochromogens の過半数に認めたが、単一の集落として観察できない例もあつた。

3. 非定型抗酸菌74例中68例、91.8%はS型の性状を示し、結核菌と同じR型の性状を示した菌は Photochromogens 3例と Nonphotochromogens の3例であつた。

4. 菌体の長さでは非定型抗酸菌74例中68例、91.8%は短桿菌を示し、Photochromogens は長桿菌であり、結核菌と同じ桿菌を示したのは Nonphotochromogens 56例中3例であつた。

5. 非定型抗酸菌で弱いコード形成を示した例は Photochromogens 3例のみで、他の非定型抗酸菌にはコード形成を認めなかつた。

6. 非定型抗酸菌は1例を除いて25°Cに発育した。

7. 以上の諸検査を実施することにより、結核菌から非定型抗酸菌を鑑別すると共に、非定型抗酸菌の分類が74例中73例が可能であつた。

終に本研究に対し、ご指導とご校閲いただいた江波戸 欽弥先生、ご助言とご援助いただいた結核研究所高橋昭三先生、国立予防衛生研究所佐藤直行先生、東京通信病院藤田真之助先生、真鍋幸男先生、関東中央病院野坂謙二先生に深謝する。

文 献

- 1) 正井秀雄：結核，47：361，1972.
- 2) Runyon, E. H.: Med. Clin. N. Amer., 43: 273, 1959.
- 3) Middlebrook: J. Exp. Med., 86: 175, 1947.
- 4) 河合恭幸・坂本竜夫：胸部疾患，5：370，1961.
- 5) 下出久雄：日本胸部臨床，26：855，1967.
- 6) 岡野義一郎・高山保郎・三谷良夫・藤原増男・安達信義：胸部疾患，4：1331，1960.
- 7) Tárnok, I.: Tubercle, 51: 305, 1970.