

原 著

抗酸菌の形態と菌種の関係

村 田 浩・水 野 松 司・東 村 道 雄

国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班

受付 昭和 52 年 10 月 3 日

RELATIONSHIP BETWEEN MYCOBACTERIAL SPECIES
AND THEIR MORPHOLOGY

Hiroshi MURATA*, Shoji MIZUNO and Michio TSUKAMURA

(Received for publication October 3, 1977)

Microscopic observations of the morphology of mycobacteria after the Ziehl-Neelsen stain serve for differentiation among mycobacterial species. Rapidly growing mycobacteria were cultivated on Ogawa egg medium slants at 37°C for 5 days, and slowly growing ones for 14 days. The organisms grown were observed after staining by the Ziehl-Neelsen method. Useful morphological characteristics were the occurrences of long rods (longer than 7 μ), coccoids, and cross-barring (intracellular granules).

Within Group I, the majority of strains of *M. kansasii* show long rods with cross-barring, whereas *M. marinum* strains show these features relatively rarely.

Within Group II, the occurrence of long rods with cross-barring is rare in *M. scrofulaceum* strains, whereas the majority of strains of *M. szulgai* and *M. gordonae* show cross-banded long rods.

Within Group III, *M. avium-intracellulare* complex appears usually as short rods or intermediate rods without cross-barring, whereas long rods and cross-barring are not rare in *M. nonchromogenicum* complex and *M. gastri*.

M. simiae and *M. asiaticum* are differentiated from each other by their morphological characteristics (Tables 2 and 4).

Among rapidly growing mycobacteria, only the strains of *M. duvalii* and *M. tokaiense* show cross-barring, and only *M. chitae* and *M. chubuense* appear as only coccoids.

緒 言

Ziehl-Neelsen 染色法による抗酸菌の形態観察はすでに古典的検査法に属し、臨床検査室における日常業務となつている。近時、抗酸菌の分類学は飛躍的發展を遂げたが、抗酸菌の形態を分類、同定の手技として使用することには、あまり関心が払われなかつた。しかし、個々

の菌種の報告例をみれば、必ず若干の形態的観察の結果が記載されているし、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974)¹⁾にも形態についての記載がある。個々の著者の記載をみると、「結核菌に比して…」という記載がかなりあるが、形態の記載には、かなりの主観が入らざるをえないと思われる。

形態の観察が分類の手段として、あまり用いられな

* From the Mycobacteriosis Research Group of the Japanese National Chest Hospitals, Obu, Aichi 474 Japan.

つた理由は、(1) 定量的記載が困難で、主観が入りやすい。したがって、研究者が敬遠する傾向がある、(2) 形態を規定する要素が単純で、得られる情報も限定されるなどによると思われる。

最近、有馬ら²³⁾は、抗酸菌の電子顕微鏡的観察によつて菌体内の縞模様を認め、これが Ziehl-Neelsen 染色によつて菌体内に認められる縞模様 (cross-barring) (場合により顆粒のごとくにみえる) に相当することを報告した。この cross-barring は *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. gordonae* および *M. asiaticum* に見出された。この報告に刺激されて、筆者は抗酸菌の菌種と形態の関係について観察を続けたところ、両者の間に関連性があり、菌種の分類・同定にも役立つと考えるに至つ

たので報告する。

研究材料および方法

菌株は本研究室に保存のもので、すでに同定を終えたものを使用した。検査の方法は、routine work に使用できるように簡便な方法を用いた。

Slowly growing mycobacteria は、1% 小川培地斜面に塗抹後、37°C、14日培養し、rapidly growing mycobacteria は5日間培養して検査に用いた。

発育した菌をスライドに塗抹し、火炎固定した後、Ziehl の石炭酸フクシン液をスライド上に盛り、2分間加温染色した。フクシン液を捨てた後、3% HCl エタノール液を注いで1分間処理した後、水洗し、Löffler のメチレンブラウ液で1分間後染色をした後、水洗、乾燥し鏡検した。

菌の長さの定義および cross-barring の定義は表1のごとくにきめた。

Cross-barring は、桿状型の菌体内に数個の抗酸性顆粒があるものを指す。この形態の菌が各視野に見られるものを陽性とする。

菌の長さは、接眼鏡に micrometer をつけて測定した。視野にみられる全部の菌について測定することは、勿論、不可能なので、視野にみられる菌の中、数個について測定し、他は目測によつた。視野の菌が、Lb, b, sb の混合物であれば、記録はそのまま Lb, b, sb となる。菌種ごとのまとめは次のごとく行なつた。ある菌種の a 株の成績が Lb, b, sb で、b 株の成績が Lb, b で、c 株の成

Table 1. Criteria of Bacterial Shape of Mycobacteria Observed by the Ziehl-Neelsen Stain

Criteria	Abbreviation	Definition
Long rods	Lb	7 μ ~
Intermediate rods	b	3~6 μ
Short rods	sb	~2 μ
Coccioids	c	
Cross-barring* (Intracellular granules)	G	

(+): More than a few per microscopic field (magnification: 900 \times);

(-): Less than one per several microscopic fields.

* Presence of several acid-fast granules in a rod-form cell.

Table 2. Morphological Characteristics of Slowly Growing Mycobacteria

Species	No. of strains	Number of strains showing:				Number of strains showing cross-barring
		Lb	b	sb	c	
<i>M. kansasii</i>	30	27	24	0	0	27 (90%)
<i>M. marinum</i>	12	1	12	12	0	3 (25%)
<i>M. scrofulaceum</i>	22	3	14	22	3	3 (13%)
<i>M. szulgai</i>	12	10	12	3	0	9 (75%)
<i>M. gordonae</i>	20	17	17	3	0	18 (90%)
<i>M. avium-intracellulare</i> complex	50	0	48	50	0	0 (0%)
<i>M. gastri</i>	8	6	8	3	0	6 (75%)
<i>M. nonchromogenicum</i>	20	12	20	15	0	8 (40%)
<i>M. novum</i>	25	17	25	16	0	12 (48%)
<i>M. terrae</i>	20	5	17	18	0	6 (30%)
<i>M. triviale</i>	17	3	17	15	0	5 (29%)
<i>M. shimoides</i>	6	3	6	6	0	2 (33%)
<i>M. asiaticum</i>	4	3	4	1	0	4 (100%)
<i>M. simiae</i>	5	0	2	5	3	0 (0%)
<i>M. tuberculosis</i>	10	0	8	10	1	1 (10%)
<i>M. bovis</i>	5	0	2	5	0	0 (0%)

Note: If a strain consisted of a mixture of long rods (Lb) and intermediate rods (b), the results were recorded in both the columns Lb and b.

Table 3. Morphological Characteristics of Rapidly Growing Mycobacteria

Species	No. of strains	Number of strains showing:				Number of strains showing cross-barring
		La	b	sb	c	
<i>M. rhodesiae</i>	5	0	1	5	2	0(0%)
<i>M. neoaurum</i>	5	2	4	5	0	0(0%)
<i>M. aurum</i>	5	0	2	5	0	0(0%)
<i>M. parafortuitum</i>	10	0	1	10	1	0(0%)
<i>M. vaccae</i>	5	0	2	5	0	0(0%)
<i>M. duvalii</i>	4	0	4	4	4	4(100%)
<i>M. obuense</i>	5	1	5	3	0	0(0%)
<i>M. tokaiense</i>	3	2	3	2	0	3(100%)
<i>M. chubuense</i>	5	0	0	0	5	0(0%)
<i>M. chitae</i>	5	0	0	0	5	0(0%)
<i>M. aichiense</i>	5	0	0	5	5	0(0%)
<i>M. phlei</i>	5	0	5	5	1	0(0%)
<i>M. fortuitum</i>	10	0	0	10	0	0(0%)
<i>M. flavescens</i>	31	0	5	31	20	0(0%)
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	6	1	6	4	0	0(0%)
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>	5	0	2	5	0	0(0%)

Note. Appearance as only coccoids is characteristic for *M. chubuense* and *M. chitae*. Appearance of cross-barring in rapidly growing mycobacteria is characteristic for *M. duvalii* and *M. tokaiense*.

Table 4. Differentiation within Group

Group	Species	Long rods	Cross-barring (Granules)
I	<i>M. kansasii</i>	27/30(90%)	27/30(90%)
	<i>M. marinum</i>	1/12(8%)	3/12(25%)
II	<i>M. scrofulaceum</i>	3/22(13%)	3/22(13%)
	<i>M. gordonae</i>	17/20(85%)	18/20(90%)
III	<i>M. avium-intracellulare</i> complex	0/50(0%)	0/50(0%)
	<i>M. gastri</i>	6/8(75%)	6/8(75%)
	<i>M. nonchromogenicum</i> complex	3/17~17/25 (18%~68%)	5/17~12/25 (29%~48%)
IV	<i>M. simiae</i>	0/5(0%)	0/5(0%)
	<i>M. asiaticum</i>	3/4(75%)	4/4(100%)

績がLb, sbであれば、成績のLb, b, sbの項株の数は、Lb3, b2, sb2となる。

培養日数は、本来は、種々の日数について観察することが望ましいが、実際に、このようなことを行なうのは困難なので、上記の日数を便宜的に使用した(考察の項参照)。

研究成績

成績を表2および表3に掲げた。

Group⁴⁾内での主な抗酸菌の比較を表4に示す。

Group I内での*M. kansasii*と*M. marinum*, Group II内での*M. scrofulaceum*と*M. gordonae*, Group

III内での*M. avium-intacellulare* complexと*M. nonchromogenicum*, *M. novum*および*M. gastri*の間には、Lb(long rods)およびG(cross-barring)の出現率に著明な差がある。

*M. simiae*と*M. asiaticum*は、ともに光発色性がある菌としてWeiszfeilerら⁵⁾⁶⁾によつて報告された菌であるが、その分類学的位置はGroup Iとはかなり違っている⁷⁾。この2つは、形態により区別ができる。*M. simiae*にはLbもGも出てこないが、*M. asiaticum*にはLbとGが出てくる(表4)。

Group IVでは次の菌が特徴を示す。抗酸菌は通常rods(桿状型)を示すが、*M. chitae*と*M. chubuense*

は rods がなく, coccoids(球菌状型)のみからなっている。また, 菌体に G を示すものは, ほとんど *M. duvalii* と *M. tokaiense* だけである。

考 察

抗酸菌がいわゆる多形態性を示すことは, 古くから知られている⁸⁾⁻¹⁶⁾。筆者の1人, 東村¹⁷⁾⁻²⁴⁾も以前に *M. smegmatis* 菌株 (当時は *M. avium* とされていた) を材料として, 抗酸菌の発育環と形態の関係について研究した。一般に, 抗酸菌は発育相の誘導期には長大な桿状型で, 対数期になると短くなり, 停止期に入ると顆粒化する。したがって, 分類, 同定のために形態を観察するには, 捕えやすい対数期の終りが適している。陳旧な培養では, どの菌でも顆粒化の傾向が現れる。したがって, 本研究では, 小川培地に豊富な発育が起こった時期 (対数期の終りに当たると想像される) を取ることにした。

抗酸菌の形態を観察するに当たつての難しい問題は, 成績の定量化が困難なことである。表1に示すような目安をおいたが, 実際にはスライドに塗抹した菌量も違われ, スライドの部分によつて菌量も違ってくる。しかし, 実際にもてみると, 菌種別の差がかなり大きいためか, Lb や G の有無は比較的是つきりと特徴づけられる。各視野に沢山の Lb 型のものがみられれば Lb (+) と判定されるし, いくら探してもみつからないときは (-) と判定される。したがって, 比較的簡単にみつかる場合のみを (+) とすればよい。

形態の観察は, 成績の項, 特に表4に示すように, 実際にはかなり役に立つと思われる。上述のような判定の困難があるにもかかわらず, なおかつ, かなりはつきりした差が出ることが多い。

抗酸菌の形態に関する記載を文献でしらべてみると, 著者により形態への関心の差がかなりある。最も早く形態が目ざされたのは, *M. kansasii* の場合である。Tarshis & Frisch (1952)²⁵⁾は, 「結核菌に比較して, 大部分の菌は長く厚く, ある株には顆粒がみられる」と述べている。同様な記述は, 抗酸菌委員会報告 (1962)²⁶⁾, Silcox & David (1971)²⁷⁾, Bergey's Manual (1974)¹⁾にもみられる。Bergey's Manual には, 長桿菌で著明な cross-barring があると書いてある。*M. marinum* についての Aronson (1926)²⁸⁾の最初の記載には特徴が明らかでないが, Bergey's Manual¹⁾には短桿菌であるが, 時に長桿菌および “barred bacilli” があるとされており, 本報の結果と一致する。このように観察結果が一致することは, 形態観察が満更役に立たぬものではないことを示している。

M. scrofulaceum の記載時の形態は, 単に「病巣内では短桿菌」と記されている²⁹⁾。一方, *M. gordonae* も, これを記載した Bojalil *et al.* (1962)³⁰⁾は形態的特徴を

とらえていない。これに対して, Arima *et al.* (1972)²⁾は *M. gordonae* における cross-barring 構造を報告している。この所見は, 長桿菌の存在とともに *M. gordonae* の一つの特徴であると思われる。*M. szulgai* の記載者 Marks *et al.* (1972)³¹⁾は “barred staining” の存在を指摘して, 本報の結果と一致する。

Group III では, Crow *et al.* (1957)³²⁾は, *M. intracellulare* が結核菌よりも短く球菌状形態がみられると述べている。しかし, 私どもの所見では短桿菌型までで球菌型のみはみられないと言つてよい。非病原性の *M. nonchromogenicum*³³⁾, *M. terrae*³⁴⁾, *M. gastri*³⁴⁾, *M. triviale*³⁵⁾の著者らは, 形態に関する関心が少なかつたためと思われるが, 単に抗酸性桿菌とのみ記している。この点, 本報の所見は知見を補うに足ると思われる。

M. simiae については, Weiszfeiler³⁶⁾は, 短く, しばしば球菌状を呈する桿菌, そして, *M. asiaticum* は球菌状としているが⁶⁾, 本報の所見の方が確かであると信じる。

Group IV に関しては, Tsukamura³⁷⁾が *M. chitae* で “acid-fast coccoids” であるとしているが, それ以外の報告は特徴の記載に乏しい。事実, われわれの観察結果も表3に示すように, 形態と菌種を結びつける特徴が乏しい。その中で注目されるのが, *M. chitae* と *M. chubuense* が coccoids であることと, *M. duvalii* と *M. tokaiense* が cross-barring を示すことである。

結 論

卵培地に培養した抗酸菌の形態を Ziehl-Neelsen 染色で観察することは, 分類, 同定の一つの手段として役に立つ。注目すべき形態は, 7 μ 以上の長大桿 (Lb) の存在, 菌体の cross-barring (菌体内の縞模様または顆粒の存在) (G), および球菌状形態 (c) である。例えば, Group I では, *M. kansasii* には Lb と G が大抵の場合みられるが, *M. marinum* には比較的まれである。Group II では, *M. scrofulaceum* には Lb と G はまれであるが, *M. gordonae* と *M. szulgai* には大抵の場合これがみられる。Group III では, *M. avium-intracellulare* には, 通常 Lb も G もみられない。一方, 非病原性の *M. gastri* や *M. nonchromogenicum* では, かなりの頻度でこれがみられる。*M. simiae* は Lb も G も示さないが, *M. asiaticum* は Lb および G を示す。

Group IV の中では, *M. duvalii* と *M. tokaiense* が G を示す点で特徴的であり, *M. chitae* と *M. chubuense* は coccoids からなり, rods が見当たらないのが特徴である。

文 献

- 1) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, p.1~1246 (p.681~701) (Ed., R.E. Buchanan, N.E. Gibbons, S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, C.F. Niven, A.W. Ravin & R.Y. Stanier).
- 2) Arima, J., Takahashi, S. and Igarashi, H.: Comptes rendus der séances de la Société de Biologie, 166 : 480, 1972.
- 3) 有馬純・高橋昭一郎・五十嵐仁: 結核の研究, 33 : 26, 1973.
- 4) Runyon, E. H.: Med. Clin. North Amer., 43 : 273, 1959.
- 5) Weiszfeiler, J. G.: Die Biologie und Variabilität des Tuberkelbakteriums und die atypischen Mycobakterien, p.227~256, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1969.
- 6) Weiszfeiler, G., Karaszeva, V. and Karczag, E.: Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 18 : 247, 1971.
- 7) Tsukamura, M.: Int. J. Syst. Bact., 26 : 409, 1976.
- 8) Hauduroy, P. and Vaudremer, A.: Compt. rend. Soc. Biol., 89 : 1276, 1923.
- 9) Bezançon, F., Philibert, A. and Hauduroy, P.: Comt. rend. Soc. Biol., 90 : 475, 1924.
- 10) Kahn, M. C.: Amer. Rev. Tuberc., 20 : 150, 1929.
- 11) Oerskov, J.: Zbl. Bakt. I Orig., 123 : 271, 1932.
- 12) Mellon, R. R.: J. Bact., 25 : 45, 1933.
- 13) Gróh, E.: Zbl. Bakt. I Orig., 128 : 353, 1933.
- 14) Wyckoff, R. W. G.: Amer. Rev. Tuberc., 29 : 389, 1934.
- 15) 植田三郎: 結核菌の研究. 形態及び発育様式, 南江堂, 1951.
- 16) 占部薫: 福岡医科大学雑誌, 29 : 2983, 1936.
- 17) 東村道雄: 結核, 26 : 315, 1951.
- 18) 東村道雄: 結核, 26 : 373, 1951.
- 19) 東村道雄: 医学と生物学, 23 : 73, 1952.
- 20) 東村道雄: 医学と生物学, 23 : 117, 1952.
- 21) 東村道雄: 医学と生物学, 23 : 198, 1952.
- 22) 東村道雄: 医学と生物学, 24 : 75, 1952.
- 23) 東村道雄: 医学と生物学, 24 : 183, 1952.
- 24) 東村道雄: 医学と生物学, 26 : 7, 1953.
- 25) Tarshis, M. S. and Frisch, A. W.: Amer. Rev. Tuberc., 65 : 278, 1952.
- 26) Subcommittee on Mycobacteria, American Society for Microbiology: J. Bact., 83 : 931, 1962.
- 27) Silcox, V. A. and David, H. L.: Appl. Microbiol., 21 : 327, 1971.
- 28) Aronson, J. D.: J. Infect. Dis., 39 : 315, 1926.
- 29) Prissick, F. H. and Masson, A. M.: Canad. Med. Ass. J., 75 : 798, 1956.
- 30) Bojalil, L. F., Cerbón, J. and Trujillo, A.: J. Gen. Microbiol., 28 : 333, 1962.
- 31) Marks, J., Jenkins, P. A. and Tsukamura, M.: Tubercle, 53 : 210, 1972.
- 32) Crow, H. E., King, C. T., Smith, C. E., Corpe, R. F. and Stergus, I.: Amer. Rev. Tuberc. Pulm. Dis., 75 : 199, 1957.
- 33) 東村道雄: 医学と生物学, 71 : 110, 1965.
- 34) Wayne, L. G.: Amer. Rev. Resp. Dis., 93 : 919, 1966.
- 35) Kubica, G. P., Silcox, V. A., Kilburn, J. O., Smithwick, R. W., Beam, R. E., Jones, W. D., Jr. and Stottmeier, K. D.: Int. J. Syst. Bact., 20 : 161, 1970.
- 36) Tsukamura, M.: Jap. J. Microbiol., 11 : 43, 1967.