

原 著

## 臨床分離非定型抗酸菌の同定および血清型別

永 富 鳳 一

国立療養所東埼玉病院

新井俊彦・小松貞男

慶応義塾大学医学部微生物学教室

柚 木 弘 之

農林水産省家畜衛生試験場

受付 昭和 55 年 7 月 29 日

IDENTIFICATION AND SERO-TYPING OF THE CLINICALLY  
ISOLATED ATYPICAL MYCOBACTERIUM STRAINS

Hoichi NAGATOMI\*, Toshihiko ARAI, Sadao KOMATSU and Hiroyuki YUGI

(Received for publication July 29, 1980)

We identified all the niacin-non-producing mycobacterium strains isolated from sputa of patients in our hospital from April to September, 1979. Atypical mycobacterium strains were isolated from 1.75% of the sputum specimens. Finally, 24 independent atypical mycobacterium strains were identified as *Mycobacterium intracellulare* (75.0%), *M. kansasii* (8.3%), *M. gordonae* (8.3%), *M. nonchromogenicum* (4.2%) and *M. fortuitum* (4.2%). All these species were also reported by the co-operative study group of the Japanese National Chest Hospitals, but in our hospital, rather a variety of species were widely isolated than any single hospital of the members of co-operative group.

These *M. intracellulare* strains were typed serologically using the anti-sera against 17 type standard strains to distinguish human popular strains (types 6, 14 and 16) from the strains to cause intestinal tuberculosis for domestic animals (types 4, 8, 9, 10, 11 and 12) and other strains. Our strains were classified into types 6, 16, 15, 8, 12 and others. No type 14 strain, one of the most popular human types, was isolated in our materials, but these results suggested that not only human types but also the types to cause intestinal tuberculosis for domestic animals were common in human patients.

## 緒 言

肺結核症あるいは肺結核症を疑われる患者の喀痰から検出される非定型抗酸菌は増えることはあつても減少することはない<sup>1)</sup>。すでに、これらの検出率については、その地理的分布も含めて、国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班によつて詳細な報告がなされている<sup>2)3)</sup>。また、それぞれの菌種の起病性<sup>4)</sup>、抗結核剤耐性<sup>5)</sup>についても

すでに多くの報告がある。そして、それによると、非定型抗酸菌の起病性、薬剤耐性、あるいはこれらによる感染症の予後を考えるには、これらの菌種の同定が必要となる<sup>6)</sup>。また非定型抗酸菌には、ヒト以外の特定の動物の定型的感染症起因菌として知られるものも多く、特に、現在ヒトから検出されることが多い *Mycobacterium intracellulare* では、それらの宿主動物と血清型の関係が明らかにされている<sup>7)8)</sup>。したがつて *M. intracellulare* では、

\* From the National East Saitama Hospital, Hasuda, Saitama 349-01 Japan.

菌株の由来, 病原性の理解に, 菌種の同定のみならず, 血清型別も必要とされる。

そこで, 我々は国立療養所東埼玉病院で, 1979年4月から9月までに患者喀痰から分離された, ナイアシン試験陰性の抗酸菌全株を同定し, 更に *M. intracellulare* と同定されたものについては血清型別を行なった。

### 材料および方法

菌株: 国立療養所東埼玉病院で, 1979年4月から9月までの6カ月間に, 外来および入院患者の喀痰から通常の抗酸菌培養検査で分離された菌株のうち, ナイアシン試験陰性の全株を用いた。ただし, 同一患者から検出された菌株は, 菌種, 血清型が異なる限り, 集計のときは1株として数えた。

同定法: 厚生省監修の微生物検査必携, 細菌・真菌検査第2版に示された非定型抗酸菌同定法に従った<sup>9)</sup>。まず発育速度, 集落の色, 生化学的性状による同定のブロックダイアグラムに従って分類を行ない, 次いで発育温度域を参考にして種名を同定した。

血清型別: Schaefer<sup>10)</sup>の方法に従った。すなわち, Table 1 に示した型別標準株として Schaefer から分与を受けた菌株を用いて, 農林水産省家畜衛生試験場ツベルクリン室で作った抗血清を型別用抗血清として用いた。抗血清は, それぞれの標準株をオレイン酸アルブミン寒天培地で培養し, 出現した集落を0.5%に石炭酸を含む pH 7.0 のリン酸緩衝生理的食塩水に浮遊し, この菌液 2 ml を2羽の家兎に週2回静注し, 5回注射後予備採血して, 抗体価が×320以上になったものを随時全採血して作った。この血清は oxyquinoline sulfate を0.001%に加えて小分けし, 冷凍保存して使用した。

本試験の被験菌株はグリセリンを含まない小川培地に培養し, 発育した菌をかき取って上記の石炭酸リン酸緩衝食水におよそ 1 mg 湿菌/ml に浮遊した。これと標準菌株浮遊液を用いて型別用抗血清による定量凝集試験を行なった。

血清は×10希釈液から2倍の段階希釈を行ない, 対照を加えて10段階の希釈液 0.5 ml に上記の菌液 0.5 ml を加えて37°C 4時間後, および1夜後に凝集の有無をしらべた。一つの抗血清でのみ凝集し, 凝集価が標準株とほとんど同じものはその血清型とした。凝集価が標準株と非常に異なるもの, およびいくつかの抗血清で凝集したものは, それぞれの血清を被験菌で吸収(×10血清 0.5 ml に遠沈濃縮被験菌液 0.5 ml を加え 4°C 1夜静置後の遠心上清)し, 被験菌株に対する凝集価がなくなつたとき標準菌株に対して凝集価が残るかどうかによつて標準株との抗原性の相違を検討した。なお, 標準菌株は旧表示時に分与を受けたものであるが, Table 1 に示した対照表によつて, Wolinsky と Schaefer によつて新

Table 1. Serotypes of Several Mycobacterial Species

Species	Old serotype designations	New serotype designations
<i>M. avium</i>	1, 2, 3	1, 2, 3
<i>M. intracellulare</i>	IV	4
	V	5
	VI	6
	VII	7
	Davis	8
	Watson	9
	IIIa	10
	IIIb	11
	Howell	12
	Chance	13
	Boone	14
	Dent	15
	Yandle	16
	Wilson	17
	Altman	18
Darden	19	
Arnold	20	
<i>M. scrofulaceum</i>	Scrofulaceum	41

しく提唱された番号表示<sup>11)</sup>によつて示した。

### 成 績

当院において1979年4月から9月までの6カ月間に喀痰の抗酸菌培養を行なった延べ件数は4,106件で, そのうち510検体12.4%に抗酸菌が検出された。また, そのうち72株, 抗酸菌中14.1%, 全体の検体中1.75%がナイアシン試験陰性であった。

同一人から継続して毎月検出された非定型抗酸菌株はすべて同一菌種であった。また, 中数カ月間の非検出期間において同一人から検出された非定型抗酸菌も, 同一菌種であるのみならず同一血清型であつて, 同じ菌株が排出されているものであることがわかつた。そこで, これらをそれぞれ1株として数えると, 6カ月間に検出された非定型抗酸菌株は24株であつた。Table 2 にこれらの菌株の発育温度域, 発育速度, 集落の性状および生化学的性状と, それによつて決めた菌種名および, *M. intracellulare* についてはその血清型をまとめた。すなわち, これら24株は, *M. intracellulare* 18株(75.0%), *M. kansasii* 2株(8.3%), *M. gordonae* 2株(8.3%), *M. nonchromogenicum* 1株(4.2%) および *M. fortuitum* 1株(4.2%) と同定された。また, *M. intracellulare* と同定された18株について血清型別を行なった結果, 6型3株, 16型3株, 8型2株, 12型4株および15型2株が型別された。残りの4株中, 1株はいずれの型別血清にも凝集せず, 他の3株は, 発育が悪かつたり, 菌が rough で血

清型別が不能であつた。

## 考 察

当院は国立療養所非定型抗酸菌共同研究班には参加していないが、当院における喀痰検体中の全抗酸菌検出率および非定型抗酸菌検出率はいずれも最近の同研究班報告<sup>3)</sup>の平均値と非常に近い。すなわち、全喀痰検体中における非定型抗酸菌検出率について比較すると、当院では1.75%で、研究班の総合成績1.53%にかなり近い。また、これを近隣の療養所の成績と比較すると、国立栃木病院の0.33%よりかなり高く、国立療養所東京病院の3.06%よりはるかに少なく、国立療養所神奈川病院の1.86%よりやや少ない。

同じく、検出非定型抗酸菌中の各菌種の占める割合でも、ほとんど最近の共同研究班報告<sup>3)</sup>と同じ傾向であり、報告書中にある6菌種中5菌種が、検出率も含めて同様に検出された。ただ、被験菌株数が少ないためか、最多検出菌種である *M. intracellulare* が相対的に低くなり、1~2株検出された他菌種の検出率が高くなった。しかし、それぞれの菌種の検出地をみると、共同研究班の多くの病院ではほとんど *M. intracellulare* のみが検出され、多菌種が検出されているのは東京病院と東福岡病院のみであるが、当院ではこれらの菌種がすべて広く検出されていることが目立つた。

*M. intracellulare* は、ヒトからも多数検出されるが、また牛、豚などの腸結核症の起因菌であることから血清型別が行なわれている。Schaefer<sup>9)</sup>によると、ヒトからは多くの血清型が検出されるが、特に多いのは14型で約15%、続いて8型で11%、以下16型、9型、4型、6型および19型が9.8%から8.2%を占めているのに対して、牛では10/11型20%、8型18%、4、7型いずれも16%、9型10%で、豚では8型32%、9型16%、10/11型13.5%、4型10.8%、5、12型いずれも8.1%であつた。これは我が国でも同様であつて、立川と十勝の屠場で腸結核豚のリンパ節から分離された *M. intracellulare* 株でも、48%が8型で、次いで4型が20%と多かつた<sup>12)</sup>。またヒト由来では14、16型が多かつたという報告がある<sup>13)14)</sup>。

これを我々の成績と比較すると、やはりヒトに特有な6、16型が血清型別が行なえた15株中6株と多く検出されているが、また家畜の腸結核起因性と考えられる8、12型も6株と同様に多い。これは、我が国でも欧米と同様に家畜と共通の抗酸菌がヒトにも感染している可能性を示唆している。なお14型が全く検出されなかつたこと、比較的報告の少ない12型が多かつたことが既報と若干異なつていた。

## 結 論

肺結核症を疑われた患者の喀痰から分離されたナイアシン試験陰性の非定型抗酸菌について菌種の同定を行なつた。これらは、*M. intracellulare* (75.0%)、*M. kansasii* (8.3%)、*M. gordonae* (8.3%)、*M. nonchromogenicum* (4.2%) および *M. fortuitum* (4.2%) と同定された。これは我が国の一般的傾向とよく一致しているが、一療養所としては多彩な菌種が検出されていることが特徴的であつた。*M. intracellulare* については、家畜(豚、牛)の腸結核起因菌との関係のみをみるために血清型別を行なつた。その結果、ヒトに特有な型の菌株が多かつたが、同時に家畜の腸結核起因型の菌株も同様に多数検出されることがわかつた。

## 謝 辞

菌株の収集に協力下さつた国立療養所東埼玉病院技師長小堀与四郎氏、および菌株の血清型別に協力下さつた農林水産省家畜衛生試験場ツベルクリン室の皆様へ感謝します。

## 文 献

- 1) 下出久雄: 非定型抗酸菌症の諸問題, 結核, 54: 535, 1979.
- 2) 東村道雄他: 非定型抗酸菌および非定型抗酸菌症に関する研究, 結核, 53: 65, 1978.
- 3) 東村道雄他: 肺非定型抗酸菌症に関する研究, 結核, 54: 393, 1979.
- 4) 東村道雄: 非定型抗酸菌による肺疾患の診断基準案, 結核, 53: 367, 1978.
- 5) 正井秀雄: 抗結核剤耐性による抗酸菌の鑑別, 結核, 54: 297, 1979.
- 6) 斎藤 肇: 非定型抗酸菌分類の現況, 結核, 51: 233, 1976.
- 7) Schaefer, W. B.: Serologic identification of the atypical mycobacteria and its value in epidemiologic studies, Am. Rev. Resp. Dis., 96: 115, 1967.
- 8) Schaefer, W. B.: Incidence of the serotypes of *Mycobacterium avium* and atypical mycobacteria in human and animal diseases, Am. Rev. Resp. Dis., 97: 18, 1968.
- 9) 微生物検査必携編集委員会: 微生物検査必携, 細菌・真菌検査第2版, 日本公衆衛生協会, 東京, 1978.
- 10) Schaefer, W. B.: Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination, Am Rev Respir Dis, 92:85, 1965.
- 11) Wolinsky, E. and Schaefer, W. B.: Proposed numbering scheme for mycobacterial serotypes by agglutination, International J. Systemic Bacteriol., 23: 182, 1973.
- 12) Yugi, H. et al.: Serotypes of *Mycobacterium intracellulare* of porcine origin, Natl. Inst. Hlth Quart., 12: 168, 1972.

Table 2. The Clinically Isolated Atypical Mycobacterium Strains

Specimen No.	Growth speed					Colony Rough/Smooth	Colour	
	<3 days	1	2	3	4		Dark	After lightening
1	-	-	-	+	++++	S	-	+ - Y
2	-	-	-	-	+++	S	-	-
3	-	-	-	+	++	S	-	-
4	-	-	-	+	++	R	-	-
5	-	-	-	-	++	S	-	-
6	-	-	-	-	+ -	S	-	-
7	-	-	-	+++	++++	S	-	-
8	-	-	-	+++	++++	S	-	+ - Y
9	-	-	+++	++++	++++	S	- O	- O
10	-	-	-	+	+	S	-	-
11	-	-	-	+	++	S	-	-
12	-	-	+++	++++	++++	R	-	+
13	-	-	++	++++	++++	R	-	+
14	-	-	-	-	+	S	-	-
15	-	-	-	+++	++++	S	-	-
16	-	-	-	+++	++++	S	-	-
17	-	-	-	+++	++++	S	-	-
18	-	-	-	-	++	S	-	-
19	-	-	-	-	++	R	-	-
20	-	-	-	+++	++++	R	-	-
21	-	-	+++	++++	++++	R	- O	+ - O
22	-	-	-	+++	++++	S	-	-
23	-	-	-	-	+	S	-	-
24	+	+++	++++	++++	++++	R	-	-

Specimen No.	Growth temperature range (weeks)									
	28°C					37°C				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	-	-	+ -	+ -	++	-	-	+	++++	++++
2	-	-	-	-	+ -	-	-	+ -	++	++
3	-	+	+	+	+	-	-	+	++	++
4	-	-	-	-	+ -	-	-	+	++	+++
5	-	-	-	-	-	-	-	+ -	++	++
6	-	-	-	-	-	-	-	-	+ -	+
7	-	-	+ -	++	++++	-	+ -	+++	++++	++++
8	-	-	+ -	++	++++	-	-	+++	++++	++++
9	-	++	++++	++++	++++	-	+++	++++	++++	++++
10	-	-	+ -	+ -	+	-	-	+	+	++
11	-	-	+ -	+	+	-	-	+	++	+++
12	-	-	+++	++++	++++	-	-	+++	++++	++++
13	-	-	+++	++++	++++	-	++	++++	++++	++++
14	-	-	-	-	-	-	-	+ -	+	+
15	-	-	+ -	+ -	++	-	+ -	+++	++++	++++
16	-	-	+ -	++	++++	-	+ -	+++	++++	++++
17	-	-	-	+ -	++++	-	-	+++	++++	++++
18	-	-	-	-	-	-	-	+ -	++	++
19	-	-	-	-	-	-	-	+ -	++	++
20	-	-	-	+	+++	-	-	+++	++++	++++
21	-	++	++++	++++	++++	-	+++	++++	++++	++++
22	-	-	-	+ -	++	-	-	+++	++++	++++
23	-	-	-	-	-	-	-	+ -	+	++
24	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++

Y: Yellow, O: Orange, #: After 5 days, NT: Not tested, UT: Untested, \* Identified after absorption

and Their Properties and Serotypes

Biochemical characters						
Niacin reaction	Nitrate reduction	Heat resistant catalase	Hydrolysis of tween 80	Aryl-sulfatase	Catalase	Urease
-	-	-	-	-	++	-
-	-	+	-	-	+	-
-	-	-	-	-	++	-
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	+	-
-	-	-	-	-	++	-
-	-	+-	-	-	++	-
-	-	+-	+- 5#	-	++	-
-	-	+	-	-	+	NT
-	-	+	-	-	+++	-
-	-	-	-	-	++	-
-	+++	++	+	-	+++	NT
-	+++	++	+	-	+++	NT
-	-	+	-	-	+	-
-	-	++	-	-	++	-
-	-	+-	-	-	++	-
-	-	+-	-	-	++	-
-	-	-	-	-	++	-
-	-	+-	+- 5#	-	+++	-
-	-	+-	+	-	++	NT
-	-	-+	-	-	++	-
-	-	-	-	-	++	-
-	-	-	-	-	++	-
-	-	+-	+- 5#	-	+++	-
-	-	+	+	-	++	NT
-	-	-	-	-	++	-
-	-	-	-	-	++	-
-	+++	+-	+	+	++++	+

			Group	Species identified	Serotype <sup>1</sup>
3	45°C 4	5			
-	-	-	III	<i>M. intracellulare</i>	16
-	-	-	III	<i>M. intracellulare</i>	12
-	-	-	III	<i>M. intracellulare</i>	16
-	-	-	III	<i>M. intracellulare</i>	15
-	-	-	III	<i>M. intracellulare</i>	6*
-	-	-	III	<i>M. intracellulare</i>	UT
-	-	-	III	<i>M. intracellulare</i>	6*
-	-	-	III	<i>M. intracellulare</i>	12*
-	-	-	II	<i>M. gordonae</i>	NT
-	-	-	III	<i>M. intracellulare</i>	12
-	-	-	III	<i>M. intracellulare</i>	new ?
-	-	-	I	<i>M. kansasii</i>	NT
-	-	-	I	<i>M. kansasii</i>	NT
-	-	-	III	<i>M. intracellulare</i>	12
-	-	-	III	<i>M. intracellulare</i>	8
-	-	-	III	<i>M. intracellulare</i>	6
-	-	-	III	<i>M. intracellulare</i>	8
-	-	-	III	<i>M. intracellulare</i>	15(+2)
-	-	-	III	<i>M. intracellulare</i>	UT
-	-	-	III	<i>M. nonchromogenicum</i>	NT
-	-	-	II	<i>M. gordonae</i>	NT
-	-	-	III	<i>M. intracellulare</i>	16*
-	-	-	III	<i>M. intracellulare</i>	UT
-	-	-	IV	<i>M. fortuitum</i>	NT

- 13) 齋藤 肇・山岡弘二: 豚系 *Mycobacterium intracellulare* の分類と性状について, 日細誌, 29: 91, 1974.
- 14) Nemoto, H. et al.: Serotype of *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* Complex that caused lung disease in Japan, Japan. J. Microbiol., 19:69, 1975.