

原 著

肺病巣から分離したナイアシンテスト陽性の *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex について

佐 藤 明 正

神戸市環境保健研究所

宮本 覚・庄村東洋・中井 準・吉栖正之

神戸市立中央市民病院

東 村 道 雄

国立療養所中部病院

受付 昭和 56 年 5 月 25 日

NIACIN—POSITIVE *MYCOBACTERIUM AVIUM*-*M. INTRACELLULARE*
COMPLEX ISOLATED FROM LUNG LESIONS OF A PATIENT

Akimasa SATO*, Satoru MIYAMOTO, Toyo SHOMURA, Hitoshi NAKAI,

Masayuki YOSHIKUMI and Michio TSUKAMURA

(Received for publication May 25, 1981)

Mycobacterium avium-*M. intracellulare* complex opportunely causes human pulmonary disease. This species generally gives a negative reaction to the niacin test.

The present paper describes the isolation of a strain of niacin-positive *M. avium*-*M. intracellulare* complex from lung lesions of a patient. The characteristics of the isolate are shown in Table 1.

The niacin test was performed by the qualitative and the quantitative methods which were slightly modified from the original description by Konno³⁾.

In the qualitative method, the positive reaction to the niacin test, i.e., pink coloring, was observed in the isolated strain.

In the quantitative method, the organism was incubated on the synthetic liquid Sauton medium for three weeks. After incubation, the liquid medium was kept at 100°C for one hour, and then filtered through the Toyo filter paper. The bacilli were dried and weighed. The volume of the filtrate was measured, and a 2 ml sample of the filtrate was mixed with 1 ml of 10 per cent cyanogen bromide solution and 1 ml of ammonium-buffer solution.³⁾ The reaction color was measured spectrophotometrically at 405 m μ . These tests were performed simultaneously to the isolated strain, *M. tuberculosis* H₃₇Rv and *M. intracellulare* ATCC 15984. The results are shown in Figure 1. Whereas the niacin production of *M. intracellulare* ATCC 15984 was less than 1.0 μ g per 1 mg of the dried bacilli, the isolated strain produced about 3 μ g and H₃₇Rv produced about 8 μ g. This quantitative method showed that the isolated strain produced apparently more niacin than *M. intracellulare*.

* From the Public Health Research Institute of Kobe City, 4-6, Minatojimanakamachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650 Japan.

緒 言

Mycobacterium avium-M. intracellulare complex はわが国における非定型抗酸菌種の代表的な起因菌である。この菌種のナイアシン試験は通常陰性であるが、非常にまれな例としてナイアシン陽性の菌株の分離例が報告されている。すなわち、Zvetina と Wichelhausen¹⁾は米国の患者喀痰からナイアシン陽性の *M. avium* を分離した症例を報告している。著者らはヒト肺病巣からナイアシン陽性の *M. avium-M. intracellulare* complex の1菌株を分離したので、本菌による症例の臨床所見と分離株の性状について報告する。

症 例

症例は1976年8月、当時28歳の女性。某病院で流産後、微熱が続き、子宮不全による発熱と診断されていた。その後転医し、某病院で胸部レントゲン写真に異常陰影を認めながらも、咳や痰の喀出が全くなく、肺真菌症の疑いありと診断されていた。

1976年10月、当病院に来院受診した。その結果、胸部レントゲン写真では右上肺野に空洞像が認められ(写真1)、かつツベルクリン反応が陽性であったので肺結核と診断された。入院のうえ、SM, PAS, INH による結核化学療法を開始した。入院時の喀痰検査では結核菌は塗抹・培養ともに陰性であった。しかし血沈値5mm/13mmは1ヵ月後17mm/40mmと上昇し、抗結核剤による治

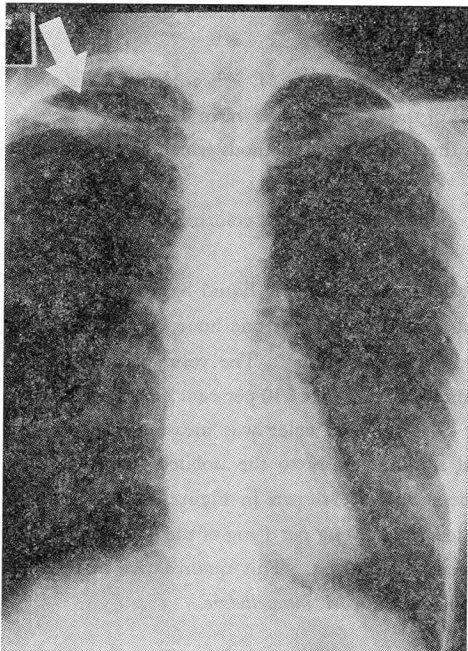


Photo. 1. Chest X-ray.

The arrow shows tuberculous lesions with cavities.

療効果もなく、レントゲン所見にも回復の兆がなかつた。患者は出産計画のある女性であり、早期社会復帰を希望したので、3ヵ月後、肺病巣の切除を行なった。開胸の結果、右上肺野S₂に乾酪性病巣を含む直径1cm大の病巣が散在しており、S₁にも米粒大の病巣1個を認め、切除した。

患者は手術1ヵ月後、熱も下がり、3ヵ月後の血沈値は7mm/18mmに回復し、8ヵ月後退院した。

開胸時の切除肺を培養し分離菌を得た。

研究材料と方法

1) 切除肺からの抗酸菌の分離

切除肺はガラスホモジナイザーで均質化し、4%水酸化ナトリウム液を検体の半量添加し、その0.1mlを1%小川培地に接種、37°C、6週間培養し、335個の抗酸菌集落を分離した。

2) 分離菌の同定方法

単個菌分離培養法で得た単個集落を、分離菌株(77-1-165W)とし、以下の研究に供した。分離菌株の同定は東村²⁾の方法に基づき実施した。

3) ナイアシンテスト法

ナイアシン産生能を定性法と定量法の両法で検討した。定性法は臭化シアン・ベンチジン法を用いた。すなわち1%小川培地で分離菌を6週間培養し、培地表面に増殖した菌苔上に熱水1mlを加え、5分間沸騰水中に浸し、よく振盪した後、培地表面を水平に30分間静置し、ナイアシンの熱水抽出を行なった。抽出液0.3mlに3%ベンチジン・エタノール液0.1mlと10%臭化シアン水溶液0.1mlを加えて発色試験を行なった。対照としては、抽出液0.3mlに3%ベンチジン・エタノール液0.1mlと蒸留水0.1mlを加えた。この定性法を分離株および結核菌H₃₇Rv株、同H₃₇Ra株および*M. intracellulare* ATCC 15984株について、それぞれ同様なテストを実施し、菌株間の比較を行なった。

定量法は今野³⁾の臭化シアン・アンモニア緩衝液法の変法を用いた。すなわちSauton液体培地5mlに菌を接種、37°C、3週間静置培養した。培養菌液を100°C、60分間加熱滅菌し、濾紙で濾過し、菌体と濾液を分離した。菌体は105°Cで乾燥、秤量した。濾液2mlに10%臭化シアン水溶液1mlとアンモニア緩衝液³⁾1mlを加えてナイアシン反応を行なった。反応液の405m μ の波長における吸光度を測定しナイアシンの定量を実施した。この反応は試薬を添加してからの時間により、呈色の度合が異なるので、試薬を添加してから約15分間連続的に吸光度を測定し、その最大値をもつてナイアシン産生量とした。対照としては濾液2mlに蒸留水1mlとアンモニア緩衝液1mlを加え、同様にして吸光度を測定した。そしてナイアシンの標準曲線より、ナイアシン産生量を

Table 1. The Characteristics of the Isolate

Niacin	+
Pigment (in dark)	-
Pigment (after exposure to light)	-
Growth after 3 days	-
Growth on <i>p</i> -Nitrobenzoic acid agar	+
Growth on Sauton agar	+
Growth on 0.2% Picric acid-Sauton agar	-
Growth on 0.1% Nitrite-Sauton agar	-
Tween 80 hydrolysis (14 days)	-
Nitrate reduction	-
Arylsulfatase (14 days)	-
Catalase (semiquantitative)	-
Catalase (68°C, 20 minutes)	+
Growth (at 28°C)	+
Growth (at 45°C)	+
Growth on RFP medium (25 µg/ml)	+
Growth on PAS medium (2 mg/ml)	+
Growth on EB medium (5 µg/ml)	+
Growth on Hydroxylamine medium (500 µg/ml)	+
Glucose as C source (ammonium sulfate-N)	-
Glucose as C source (glutamate-N)	-
Succinate as C source (glutamate-N)	-
Nicotinamidase	-

求め、乾燥菌体 1mg 当りの産生量を算出した。この定量法は分離株、結核菌 H₃₇Rv 株および *M. intracellulare* ATCC 15984 株について行ない、菌株間のナイアシン産生量を比較した。

成 績

1) 分離菌の性状

分離菌株 (77-1-165W) は小川培地で淡黄白色・光沢ある S 型コロニーの集落性状を有し、光発色性陰性、遅発育性の抗酸菌である。本菌の性状は表 1 に示した。(1) *p*-Nitrobenzoic acid 培地に発育し、(2) Picric acid-Sauton agar には発育しない。(3) Tween® 80 分解能陰性、(4) 硝酸塩還元能陰性、(5) アリルスルファターゼ陰性 (14日)、(6) カタラーゼ半定量法陰性、(7) 耐熱性カタラーゼ陽性、(8) RFP (25 µg/ml)、PAS (2 mg/ml)、EB (5 µg/ml) のそれぞれに耐性、(9) Hydroxylamine (500 µg/ml) に耐性の諸性状を有し、ナイアシンテスト陽性という性状以外には *M. avium-M. intracellulare* complex のそれと一致するものであった。

2) 分離株の同定

分離株はナイアシンテスト陽性菌種である *M. tuberculosis* とは PNB 培地上の発育、28°C での発育、硝酸塩還元能陰性の点で明らかに異なる。*M. simiae* も同様にナイアシンテスト陽性菌種であるが、*M. simiae* は Picric

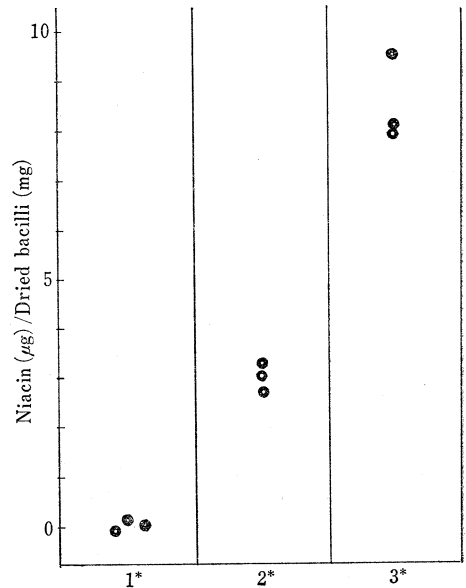


Fig. 1. Niacin production of Mycobacteria.

*1 : *M. intracellulare* ATCC 15984

2 : The isolate 77-1-165W

3 : *M. tuberculosis* H₃₇Rv

acid-Sauton agar に発育し、さらにコハク酸塩を炭素源として利用できる点で分離菌と鑑別ができる。以上の諸性状から、分離菌は *M. avium-M. intracellulare* complex のナイアシンテスト陽性変異株であると同定された。

3) ナイアシンテスト

定性法におけるナイアシンテストは、H₃₇Rv 株および H₃₇Ra 株はともに強陽性を示し、*M. intracellulare* ATCC 15984 株は陰性、著者らが分離した菌株は結核菌ほどの強い陽性は示さなかつたが、明らかにナイアシンテスト陽性であった。

定量法では分離菌および供試対照菌株を Sauton 液体培地に 3 週間培養し、その濾液中のナイアシン産生量を定量した。3 回の実験結果を図 1 に示した。*M. intracellulare* ATCC 15984 株では 1 µg 以下、H₃₇Rv 株では 8~9.5 µg であったのに対して、分離株ではほぼ中間値の 3 µg であった。したがって、分離株のナイアシン産生量は結核菌ほど多量ではないが、ナイアシンテスト陰性の *M. intracellulare* に比べると、約 3 倍量の産生値であったことになる。

考 察

ナイアシンテスト陽性の抗酸菌には *M. tuberculosis* や *M. simiae* のほかに、まれに *M. bovis*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* などにおいても、陽性を示す菌株の存在が知られている。分離株 (77-1-165W) は *M. tuberculosis* や *M. simiae* と異なることは前述

したが、他の菌種とは次の諸性状で異なる。

M. bovis は28°Cおよび45°Cでは増殖せず、耐熱性カタラーゼも陰性である点において分離株とは異なる。*M. marinum* は37°Cより28°Cの方がより至適であり、かつ光発色性を有することを特徴とするが、分離株では28°Cより37°Cの方が至適で、かつ光発色性も陰性である点において明らかに異なる。*M. ulcerans* の増殖温度域は非常に狭く、30°C~33°Cであるが、分離菌は28°Cでも45°Cでも増殖可能である。*M. chelonae* と *M. fortuitum* は速育性であり、分離菌は遅発育性で全く異なる菌種である。

したがって、表1に示した諸性状から、分離株は *M. avium-M. intracellulare complex* のナイアシン陽性変異株であると同定された。

分離株のナイアシン産生量は、定性法および定量法で共に H₃₇Rv 株ほど高くはなかつたが、ナイアシンテスト陰性の *M. intracellulare* ATCC 15984 株よりは、明らかに多量のナイアシンを産生した。

分離株は肺疾患患者の切除肺から分離されたものであるが、その際、一般細菌は分離されなかつたこと、分離菌株のみが多数検出されたこと、および病巣は乾酪性肉芽腫巣であつたこと、さらには病巣切除後患者は順調に経過したこと等から、患者は本分離株による肺非定型抗酸菌症であつたと考えられる。

このようなナイアシンテスト陽性の *M. avium-M. intracellulare complex* は Zvetina と Wichelhausen¹⁾ の患者喀痰からの分離例があるのみで、わが国においては本例がはじめてである。

結 論

- 1) ヒトの肺病巣からナイアシンテスト陽性の *M. avium-M. intracellulare complex* の1菌株を分離した。
- 2) 分離株のナイアシン産生量は、乾燥菌体 1mg 当り、約 3 μg であつた。

本論文の要旨は、第45回日本結核病学会第15回日本胸部疾患学会合同近畿大会（1980年11月）において発表した。

文 献

- 1) Zvetina, J. R. and Wichelhausen, R. H.: Pulmonary infection caused by niacin-positive *Mycobacterium avium*, Amer Resp Dis, 113 : 885, 1976.
- 2) Tsukamura, M.: Identification of Mycobacteria, A publication of the National Sanatorium Chubu Chest Hospital, Obu, Aichi, p. 1-75, 1975.
- 3) 今野 淳: 人型結核菌の生化学的鑑別法 (ナイアシンテスト), 臨床病理, 8 : 52, 1960.