

原 著

## 日本家屋の塵埃中の抗酸菌

東村道雄・水野松司・外山春雄

国立療養所中部病院

受付 昭和59年8月4日

## MYCOBACTERIA FROM DUSTS OF JAPANESE HOUSES

Michio TSUKAMURA\*, Shoji MIZUNO and Haruo TOYAMA

(Received for publication August 4, 1984)

As a survey to investigate the source of lung infection by atypical mycobacteria to humans, mycobacterial isolation from dust of Japanese houses was conducted. Mycobacteria belonging to the *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare* complex were isolated at a rate of 2.8% among relatively slowly growing mycobacteria isolated from the dusts. The dusts contained a large number of strains of *Mycobacterium thermoresistibile* and *Mycobacterium pulveris*. The dusts of the Japanese houses seem to be a treasure source of new species of mycobacteria, as suggested from the fact that unidentifiable mycobacteria reached ca. 30% of the isolates.

**Keywords:** Mycobacteria, *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium thermoresistibile*, *Mycobacterium pulveris*, House dusts of Japanese houses

**キーワード:** 抗酸菌, 日本家屋の塵埃, *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium thermoresistibile*, *Mycobacterium pulveris*

## 緒 言

非定型抗酸菌症の感染源は、現在、環境——土、水、塵——であると考えられている<sup>1)</sup>。非定型抗酸菌症の圧倒的多数を占めるのが肺感染症である以上、感染原として最も注目されるのは、容易に気道に侵入する機会がある塵埃であろう。しかし、塵埃中の抗酸菌に関する研究は意外に少ない。最初に塵埃から病原性抗酸菌を分離したのは、Dawson(1971)<sup>2)</sup>、Reznikov, Leggo and Dawson (1971)<sup>3)</sup>で、彼らは家屋の塵から *Mycobacterium intracellulare* および *Mycobacterium scrofulaceum* を分離して報告した。また、Kleeberg and Nel(1973)<sup>4)</sup>も塵埃からの *M. intracellulare* の分離を報告している。日本では、Tsukamura et al.(1974)<sup>5)</sup>が、病院の塵埃の抗酸菌について研究し、これと結核患者

の喀痰から分離される抗酸菌との比較研究を行なった。その際、塵埃から分離同定された菌は、*Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium nonchromogenicum*, *Mycobacterium gordonae* が大部分で、病原菌としては *M. intracellulare* が1株、*M. scrofulaceum* が1株分離されたにすぎなかった。しかし、一方、結核患者の痰から偶発的排菌として分離される菌は、*M. intracellulare* が圧倒的に多かった。そこで、この現象の解釈として次のように考えた。気道に侵入する菌は、環境の生態に比例して、非病原菌が多いが、これらは気道内で比較的速やかに殺滅されてしまう。一方、病原菌は、侵入する数は少ないが、気道内で生存するので、結局、痰から分離されるのは、病原菌の方が多くなると考えた。このように、塵埃を感染源と考えるためには、日本人の住居する家屋の塵埃から病原菌、特に *M.*

\* From the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

*intracellulare* を分離する必要がある。この研究は、このような目的で実施したもので、畳敷きの日本家屋の塵の抗酸菌の生態を研究してみた。

### 研究方法

研究に用いた塵埃は、国療中部病院研究検査科の検査技師および助手7名の日本家屋（畳敷き；所在地、愛知県知多郡東浦町）から採取した。電気掃除器で集めた塵埃10gに0.9% NaCl水溶液（生食水）200mlを加えて、振盪機（振幅8 cm, 毎分56 strokes）で20分間振盪した後、15分間静置して得た上清を東洋濾紙（No. 2）で濾過し、得た濾液100mlを取って854×gで20分間遠心した。得た沈渣に1% KOH水溶液2.0mlを加えて混和し、5分後に、0.067M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>液8.0mlを加えて中和した。この液を再び20分間遠心して上清を捨て、沈渣を生食水3.0mlに浮遊させた。この浮遊液を渦巻白金耳で1%小川培地斜面100本に接種した。1白金耳で0.02mlずつ接種したので、100本の培地に浮遊液2.0mlを接種したことになる。結局、塵埃10gの $\left(\frac{1}{2} \times \frac{2}{3}\right) = \frac{1}{3}$ 、即ち、3.3g中の抗酸菌を培地100本に接種

したことになる。

塵埃は、1982年10月、11月、1983年1月と3回ずつ採取した。

接種後の試験管には、底に3 mmの切れ目のあるゴム栓をかぶせ、37℃に8週まで培養した。前に報告したように、塵埃の抗酸菌には *M. fortuitum* が多く、また今回の予備研究でも多数の迅速発育性暗発色抗酸菌が分離された。しかし、今回の研究では、比較的発育の遅い抗酸菌の生態を知りたいと考えたので、次のような手段をとった。37℃で培養して7日後に観察し、この時に発育していた集落には、試験管の壁にマジックインキで印しをつけた。その後、1週ごとに観察し、新たに発育した小集落から白金耳で釣菌し、新しい培地（1%小川培地）に分離培養した。

分離培養した菌は single colony isolation-techniqueにより純化した。即ち、培養集落から菌液を作り、これを希釈して1%小川培地に接種し、出現した単個集落を継代培養して菌株とした。

分離菌株については、先ず Ziehl-Neelsen 染色を行なって、強く抗酸性を示すことを確かめ、次いで既報の

Table 1. Number of Strains of Relatively Slowly Growing Mycobacteria<sup>a</sup> Isolated from Samples of Dust of Japanese Houses

Sample no. <sup>b</sup>	Number of mycobacteria isolated from dust sample, 3.3 g
1	165
2	63
3	73
4	33
5	5
6	44
7	31

a Mycobacteria of slow or intermediate growth rate.

b Samples no. 1-4 were collected in October 1982, no. 5 in November 1982, and no. 6-7 in January 1983.

Ten grams of dust of a Japanese house were suspended in 200ml of a 0.9% NaCl solution and shaken mechanically at room temperature for 20 minutes. After allowing to stand the dust suspension for 15 minutes, the supernatant was filtered through a filter paper (Toyo no. 2) and a 100ml-sample of the filtrate was centrifuged at 854xg for 20 minutes. The residue was added with 2ml of a 1% NaOH solution, mixed well, and allowed to stand for 5 minutes. The suspension was added with 8ml of a 0.067M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solution and centrifuged for 20 minutes. The supernatant was discarded, and the residue was suspended in 3ml of a 0.9% NaCl solution, and 2 ml of this suspension was inoculated onto 100 slants of the Ogawa egg medium using a spiral loop which delivers a 0.02ml sample by one inoculation. The media inoculated were incubated at 37℃ for 8 weeks. The colonies which were visible on the 7th day of incubation were marked on tube wall by a magic pen. Colonies that grew after 2 weeks or more of incubation were picked up by a loop, subcultured, and tested for their characters. The colony isolated was purified by single colony-isolation-technique before the study of the characters. The characters were tested by the methods described in 1975 (Tsukamura, M.: Identification of mycobacteria, p. 1-75, The National Chubu Hospital, Obu, Aichi, Japan).

方法<sup>6)</sup>により、性状を検査した。

*M. avium*-*M. intracellulare* 同定の条件は、次のとおりとした。

1. (1)37°Cで小川培地に3日後に発育しない。(2)0.2% picric acid-Sauton 寒天培地に発育しない(37°C14日培養後、以下、特記しない限り同じ)。(3)0.1% NaNO<sub>2</sub>含有 Sauton 寒天培地に発育しない。以上の3条件は遅発育性抗酸菌の条件である。

2. 非光発色性

3. 硝酸還元反応(24時間)陰性。Tween80水解(14日)陰性。Ethambutol耐性(5 μg/ml)。p-Nitrobenzoic acid, 0.5mg/mlを含む小川培地に発育。NH<sub>2</sub>OH·HCl, 500μg/mlを含む小川培地に発育。α-およびβ-Esterase 強陽性。β-Galactosidase 陰性。

### 研究結果および考察

研究結果を表1および2に示す。

表1の結果から、塵埃1g中の「比較的発育の遅い抗酸菌」の数を計算すると18個となる。前に我々が病院の病室の塵埃から分離した抗酸菌の平均値は24/gであった。しかし、この数は、発育の速い抗酸菌も含んでいるので、発育の比較的遅い抗酸菌(*M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. nonchromogenicum*, *M. flavescens*, *M. tuberculosis*)のみを取ると、 $24 \times 0.432 = 10.4$ となる<sup>5)</sup>。従って、日本家屋の塵埃から分離された抗酸菌の数の方が多い。

次に、分離された「比較的発育の遅い抗酸菌」の菌種を表2に示す。一方、病室の塵埃から分離された「比較的発育の遅い抗酸菌」の菌株数とその百分率は次のとおりであった<sup>5)</sup>。*M. scrofulaceum*, 1株(1.2%); *M. gordonae*, 32株(38.6%); *M. intracellulare*, 1株

(1.2%); *M. nonchromogenicum* complex, 45株(54.2%); *M. flavescens*, 1株(1.2%); *M. tuberculosis*, 3株(3.6%)。合計83株。

こうして比較してみると、*M. gordonae*と*M. nonchromogenicum* complexが病室(洋式家屋)では多く、日本家屋では少ない。また、肺結核患者の病室の塵埃からは*M. tuberculosis*が分離されたが、健康人の住む日本家屋から、これが分離されなかったのは当然の結果である。

健康人の住む日本家屋の塵埃中の抗酸菌を研究して注目されることが4つある。

第1は、*M. avium*-*M. intracellulare* complexが3株分離できたことである。即ち、この菌が日本家屋にも常在して、常に我々の呼吸器に侵入しつつあることが証明されたことになる。この菌の感染原が、環境中の塵埃であるという考え<sup>1)</sup>を裏付ける一つの証拠となる。

第2に注目されることは、日本家屋塵埃中に多数の*M. thermoresistibile*が発見されたことである。この菌は、1966年にTsukamura<sup>7)</sup>が新菌種として報告したもので、*M. phlei*と並んで52°Cの高温で発育できるただ2つの抗酸菌の1つである。この菌は、最近まで、非病原菌と考えられていたが、最近、米国で、人間の肺感染症を起こしたという報告が2つ現れた(1例は immunocompromised hostで)<sup>8)9)</sup>。この菌の有力な reservoirとして家屋の塵埃があげられるであろう。

第3に注目されることは、分離された「比較的発育の遅い抗酸菌」の30%が同定不能であったことである。これは、これらの抗酸菌が、既知のいずれの抗酸菌にも属しないと考えられたためである。日本家屋の塵埃は未知の抗酸菌を多数含む、生態学的に極めて興味ある研究対象と思われる。

Table 2. Species of Mycobacteria Isolated from Dust Samples of Japanese Houses

Species	Number of strains (%)	
<i>M. avium</i> - <i>M. intracellulare</i>	3	( 2.8)
<i>M. nonchromogenicum</i>	2	( 1.9)
<i>M. terrae</i>	1	( 0.9)
<i>M. gordonae</i>	2	( 1.9)
<i>M. flavescens</i>	4	( 3.7)
<i>M. thermoresistibile</i>	44	(41.1)
<i>M. pulveris</i>	20	(18.7)
Group II unidentifiable	2	( 1.9)
Nonphotochromogenic intermediate	28	(26.2)
Group III unidentifiable	1	( 0.9)
Total	107	(100.0)

Table 3. Comparison of Characters between *Mycobacterium thermoresistibile* and *Mycobacterium pulveris*

Character	% of strains showing positive reaction	
	<i>M. thermoresistibile</i> (44 strains)	<i>M. pulveris</i> (20 strains)
1. Gram-positiveness	100	100
2. Strong acid-fastness	100	100
3. Weak acid-fastness	100	100
4. Permanent mycelium	0	0
5. Temporary myclium	0	0
6. Long rods, >7 $\mu$ in length	2	0
7. Intermediate rods, 3-6 $\mu$ in length	48	0
8. Short rods, <2 $\mu$ in length	100	9
9. Cross-baerring	0	0
10. Cord (compact grouping of bacilli)	0	0
11. Rough colonies	95	0
12. Colony pigmentation in dark	0	0
13. Photochromogenicity	0	0
14. Growth after 3 days	95 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
15. Growth at 28°C	100	100
16. Growth at 37°C	100	100
17. Growth at 42°C	100	100
18. Growth at 45°C	100	0
19. Growth at 52°C	70	0
20. Resistance to p-aminosalicylate <sup>b</sup> (2 mg/ml)	91	55
21. Degradation of p-aminosalicylate	0	0
22. Resistance to NH <sub>2</sub> OH. HCl (125 $\mu$ g/ml) <sup>b</sup>	89	30
23. Resistance to NH <sub>2</sub> OH. HCl (250 $\mu$ g/ml) <sup>b</sup>	0	10
24. Resistance to NH <sub>2</sub> OH. HCl (500 $\mu$ g/ml) <sup>b</sup>	0	0
25. Growth on Sauton agar medium	100	100
26. Tolerance to 0.1% salicylate <sup>c</sup>	66	0
27. Degradation of salicylate	0	0
28. Tolerance to 0.1% picric acid <sup>c</sup>	73	90
29. Tolerance to 0.2% picric acid <sup>c</sup>	73	80
30. Arylsulfatase (3 days)	0	0
31. Arylsulfatase (14 days)	7	100
32. Resistance to thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (1 $\mu$ g/ml) <sup>b</sup>	100	100
33. Resistance to salicylate (0.5 mg/ml) <sup>b</sup>	100	100
34. Resistance to ethambutol (5 $\mu$ g/ml) <sup>b</sup>	0	0
35. Tolerance to 0.1% NaNO <sub>2</sub> <sup>c</sup>	100	100
36. Tolerance to 0.2% NaNO <sub>2</sub> <sup>c</sup>	100	100
37. Growth on 1% Tween-Sauton agar	100	90
38. Resistance to p-nitrobenzoic acid (0.5 mg/ml) <sup>b</sup>	98	100
39. Resistance to rifampicin (25 $\mu$ g/ml) <sup>b</sup>	98	100
40. Niacin production	0	0
41. Tween 80 hydrolysis (7 days)	48	20
42. Tween 80 hydrolysis (14 days)	57	75

Table 3. (continued)

43. Catalase (foam height >45 mm)	66	75
44. $\alpha$ -Esterase	95	95
45. $\beta$ -Esterase	100	95
46. Acid phosphatase	7	100
47. $\beta$ -Galactosidase	7	95
48. Nitrate reduction (6 hours)	25	100
49. Nitrate reduction (24 hours)	25	100
50. Acetamidase	0	0
51. Benzamidase	0	0
52. Urease	61	90
53. Isonicotinamidase	0	0
54. Nicotinamidase	100	100
55. Pyrazinamidase	100	100
56. Salicylamidase	0	0
57. Allantoinase	0	0
58. Succinamidase	0	0
59. Glutamate as N and C sources	98	100
60. Serine as N and C sources	0	0
61. Glucosamine hydrochloride as N and C sources	0	0
62. Acetamide as N and C sources	0	0
63. Benzamide as N and C sources	0	0
64. Monoethanolamine as N and C sources	0	0
65. Trimethylene diamine as N and C sources	0	0
66. Glucose as C source (glutamate-N)	100	100
67. Acetate as C source (glutamate-N)	100	100
68. Succinate as C source (glutamate-N)	98	85
69. Pyruvate as C source (glutamate-N)	98	100
70. Acetate as C source	100	100
71. Citrate as C source	0	0
72. Succinate as C source	2	0
73. Malate as C source	2	0
74. Pyruvate as C source	98	80
75. Benzoate as C source	0	0
76. Malonate as C source	0	0
77. Fumarate as C source	9	0
78. Glucose as C source	95	90
79. Fructose as C source	57	25
80. Sucrose as C source	0	0
81. Ethanol as C source	34	0
82. n-Propanol as C source	98	50
83. Propylene glycol as C source	0	0
84. 1,3-Butylene glycol as C source	48	0
85. 1,4-Butylene glycol as C source	0	0
86. 2,3-Butylene glycol as C source	0	0
87. n-Butanol as C source	70	0
88. iso-Butanol as C source	91	0
89. Acid from glucose	18	0

Table 3. (continued)

90. Acid from mannose	2	0
91. Mannose as C source	23	5
92. Galactose as C source	0	0
93. Arabinose as C source	0	0
94. Xylsoe as C source	0	0
95. Rhamnose as C source	0	0
96. Trehalose as C source	0	0
97. Inositol as C source	0	0
98. Mannitol as C source	0	0
99. Sorbitol as C source	0	0
100. Serine as N source	64	100
101. Acetamide as N source	68	95
102. Benzamide as N source	0	5
103. Urea as N source	34	95
104. Pyrazinamide as N source	36	90
105. Nicotinamide as N source	39	100
106. Succinamide as N source	48	100
107. Nitrate as N source	9	100
108. Nitrite as N source	0	65
109. Resistance to 5% NaCl <sup>b</sup>	100	100
110. Resistance to isoniazid (10 $\mu$ g/ml) <sup>b</sup>	100	100

a Growth occurs after 3 days when incubated at 42°C and 45°C. a' Scant growth.

b Tested in the Ogawa egg medium.

c Tested in a modified Sauton agar medium, in which sodium glutamate was substituted for asparagine.

Unless specially noted, the utilization of carbohydrates was tested in the presence of ammoniacal nitrogen, and the utilization of nitrogen compounds was tested in the presence of glycerol-carbon source.

第4に、日本家屋の塵埃の中には、*M. thermoresistibile*と並んで、最近、我々が報告した中間的発育速度を持つ非光発色性の抗酸菌、*M. pulveris*<sup>10)</sup>が相当数発見されることである。*M. thermoresistibile*と*M. pulveris*の性状を表3に示す。各々の菌種の“Hypothetical median organism”<sup>11)</sup>を作って、各菌株のこれに対するmatching coefficientsを測定すると、(平均値)±(標準偏差)は、*M. thermoresistibile*91.64±2.46%、*M. pulveris*96.55±2.01%であった。*M. pulveris*の方が性状がより均一であった。

### 総 括

日本家屋の塵埃から、比較的発育の遅い抗酸菌107株を分離し、その菌種分布を調べた。107株中3株(約3%)は、*Mycobacterium avium*-*M. intracellulare*であり、日本家屋の塵埃が感染原となりうることがわかった。また、分離株の約60%は、*Mycobacterium thermoresistibile*と*Mycobacterium pulveris*であった。更に、約30%

は、同定不能で新菌種に属すると思われた。

### 文 献

- 1) 東村道雄：非定型抗酸菌の感染原と感染経路，結核，52：261—267，1977.
- 2) Dawson, D. J. : Potential pathogens among strains of mycobacteria isolated from house dusts, Med J Australia, 1 : 679—681, 1971.
- 3) Reznikov, M., Leggo, J. H. and Dawson, D. J. : Investigation by seroagglutination of strains of the *Mycobacterium intracellulare* - *M. scrofulaceum* group from house dusts and sputum in southeastern Queensland, Am Rev Respir Dis, 104 : 951—953, 1971.
- 4) Kleeberg, H. H. and Nel, E. E. : Occurrence of environmental atypical mycobacteria in South Africa, Ann Soc Belge Méd Trop, 53 : 405—418, 1973.

- 5) Tsukamura, M. et al. : A comparative study of mycobacteria from patients' room dusts and from sputa of tuberculous patients, Source of pathogenic mycobacteria occurring in the sputa of tuberculous patients as casual isolates, Japan J Microbiol, 18 : 271—277, 1974.
- 6) Tsukamura, M. : Identification of mycobacteria, p.1-75, The National Chubu Hospital, Obu, Aichi, Japan.
- 7) Tsukamura, M. : Adansonian classification of mycobacteria, J Gen Microbiol, 45 : 253—273, 1966.
- 8) Weitzman, I. et al. : *Mycobacterium thermoresistibile* : a new pathogen for humans, J Clin Microbiol, 14 : 593—595, 1981.
- 9) Liu, F., Andrews, D. and Wright, D.N. : *Mycobacterium thermoresistibile* infection in an immunocompromised host, J Clin Microbiol, 19 : 546—547, 1984.
- 10) Tsukamura, M., Mizuno, S. and Toyama, H. : *Mycobacterium pulveris* sp. nov., a nonphotochromogenic *Mycobacterium* with an intermediate growth rate, Int J Syst Bacteriol, 33 : 811—815, 1983.
- 11) Liston, J., Wiebe, W. and Colwell, R. R. : Quantitative approach to the study of bacterial species, J Bacteriol, 85 : 1061—1070, 1963.