

原 著

臨床材料より分離された非結核性抗酸菌の同定成績とその考察

佐藤 勝昌・斎藤 肇

島根医科大学微生物・免疫学教室

副島 林造・安達 倫文

川崎医科大学呼吸器内科学教室

山村 好弘・平田 義徳

国立療養所刀根山病院

藤沢 和明

九州労災病院

林 勝文・石川 兵衛

奈良県立医科大学第1内科学教室

久世 彰彦

国立療養所札幌南病院

受付 平成元年1月12日

IDENTIFICATION OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA ISOLATED FROM
CLINICAL MATERIALS AND SOME COMMENTS ON IT

Katsumasa SATO*, Hajime SAITO, Rinzo SOEJIMA, Michifumi ADACHI,
Yoshihiro YAMAMURA, Yoshinori HIRATA, Kazuaki FUJISAWA,
Masafumi HAYASHI, Hyoe ISHIKAWA and Akihiko KUZE

(Received for publication January 12, 1989)

Six mycobacterial strains which were isolated and identified with some suspicions in five hospitals in Japan were retested for their biological and biochemical characteristics for correct identification at the Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University. One strain originally classified as Group IV Mycobacterium, and two unidentified strains were presently identified as *Mycobacterium nonchromogenicum*

* From the Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, Izumo, 693 Japan.

complex. Two strains originally identified as *M. xenopi* were identified by us as *M. szulgai* and *M. avium* complex, respectively. Finally, one strain originally identified as *M. phlei* was identified by us as *M. fortuitum*. In these cases, inexactly controlled examinations for growth rate, growth at 45°C, Tween 80 hydrolysis, and pigment production or lack of tests for certain key characters of a given organism seemed to be main causes of initial incorrect identification.

Key words : Nontuberculous mycobacteria, Identification

キーワードズ : 非結核性抗酸菌, 同定

はじめに

非結核性抗酸菌は一般に抗結核剤やその他の抗菌剤に対して耐性である¹⁾が、菌種あるいは菌株によっては感受性を示し、それによる感染症患者に用いて有効な場合もある^{2)~4)}。したがって、分離菌を正しく同定し、治療方針を決定することは極めて重要なことであり、今日では抗酸菌研究専門機関のみならず、一般検査室でも抗酸菌の同定検査が行われるようになってきた。しかし、抗酸菌の同定にはかなりの経験を必要とすることから、あまり抗酸菌の同定になじみの少ない機関でなされた検査成績には、まま誤りがみられるところである。最近、島根医科大学微生物・免疫学教室（以下教室）へ、わが国の5カ所の病院で分離され、一定の検査機関で同定不能と回答された菌株、あるいは同定菌種に疑問のもたれた菌株計6株が、同定検査のため送付されたので、その得られた成績について報告するとともに若干の考察を加えてみたい。

材料と方法

(1) 供試菌

非結核性抗酸菌症患者の起炎菌（ただし、A株の場合は一過性の排菌であり、臨床症状等より菌株送付後本症は否定された）と考えられた初代または1代継代小川培地培養菌を1%小川培地並びに7H9液体培地（Difco）へ移植・培養後、4°Cに保存し、用に臨み実験に供試した。供試菌は小川培地では、迅速発育菌は3~7日、遅発育菌は2~3週、また7H9液体培地では、前者では3日、後者では5~7日培養したものを用いた。ただし、ナイアシン試験は小川培地上3~4週間培養菌を、また α 抗原⁵⁾の分析（広島大学田坂博信助教授のご好意による）には小川培地上4~8週間培養菌を用いた。

(2) 同定法

同定検査は30項目について行われた^{6)~12)}。ただし、すべての菌株について、これらの検査のすべてが行われたわけではない。

結果

Table 1は教室で行われた供試6菌株（A-F）の検査性状を、またTable 2は他機関での同定成績とわれわれのそれとを対比して示したものである。

A株はRunyon IV群に分類され、その同定を依頼されたものであるが、本菌は当教室の検査では遅発育菌（発育所要日数：2週）で、その他の検査性状も*M. nonchromogenicum* complexと符合し、本菌群と同定しえた。

B株はRunyon II群菌で、ピクリン酸培地、PAS培地およびHA (hydroxylamine hydrochloride) (500 μ g/ml)培地上での発育陰性、PNB (*p*-nitrobenzoic acid)培地並びにEB培地上での発育陽性、ナイアシン試験陰性、硝酸塩還元陽性、Tween 80水解陰性の性状を示したとのことで*M. xenopi*と同定され、その確認のために送付された菌株である。しかし、これらの性状についての教室での検討成績によれば、本菌はPNB培地並びにHA (500 μ g/ml)培地上で発育し、Tween 80水解（2週間法）陽性であったが、他は上記の性状が追認され、また集落はR型、28°Cでの光発色性陽性、ウレアーゼ陽性で、これらの生物学的・生化学的性状に加えるに α 抗原の分析からも*M. szulgai*と同定された。

C株並びにD株はともにRunyon III群菌で45°Cでの発育陰性、INH (1 μ g/ml)培地上で発育したが、EB培地上では発育せず、ナイアシン陰性、耐熱性カタラーゼ、アリルスルファターゼおよび硝酸塩還元陽性、ウレアーゼおよびTween 80水解陰性で同定不能ということで教室に同定を依頼された菌株である。教室での検討によればINH培地での発育は検討されていないが、Tween 80水解は1および2週間法とも陽性（この点同定依頼病院の報告と異なる）で、その他の性状を加味すると本菌は明らかに*M. nonchromogenicum* complexと同定しうるものであった。

E株はRunyon II群菌で、42°Cで発育可能、ピク

Table 1. Biological, Biochemical and Antigenic Characteristics of the Tested Strains of Nontuberculous Mycobacteria

Character	Strain					
	A	B	C	D	E	F
Growth at 28 °C	+	+	+	+	+	+
Growth at 37 °C	+	+	+	+	+	+
Growth at 45 °C	-	-	-	-	-	-
Growth rate	2 w	2 w	2 w	2 w	3 w	4 d
Colony morphology	R	R	RS	RS	S	SR
Colony pigmentation in dark	-	+	-	-	-	-
Photochromogenicity at 37 °C	-	-	-	-	-	-
Photochromogenicity at 28 °C	NT ^{a)}	+	NT	NT	NT	NT
Growth on picric acid medium	-	-	-	-	-	+
Growth on sodium azide medium	NT	NT	NT	NT	NT	+
Utilization of sodium citrate	NT	NT	NT	NT	NT	+
PAS degradation	-	-	-	-	NT	-
Salicylate degradation	NT	NT	NT	NT	NT	-
Resistance to ethambutol (5 µg/ml)	-	+	-	-	+	+
Resistance to hydroxylamine (125 µg/ml)	+	+	+	+	+	+
Resistance to hydroxylamine (250 µg/ml)	+	+	+	+	+	+
Resistance to hydroxylamine (500 µg/ml)	+	+	+	+	+	+
Resistance to <i>p</i> -nitrobenzoic acid (0.5 mg/ml)	+	+	+	+	+	+
Niacin	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	-	+
Catalase (foam height, >45mm)	+	+	+	+	-	NT
Heat-stable catalase	+	+	+	+	+	NT
Heat-stable acid phosphatase	-	-	+	+	-	+
Urease	NT	+	NT	NT	NT	NT
Tween 80 hydrolysis (7 days)	+	-	+	+	-	-
Tween 80 hydrolysis (14 days)	+	+	+	+	-	-
Arylsulfatase (3 days)	-	-	-	-	-	+
Arylsulfatase (14 days)	+	-	-	-	+	+
Tellurite reduction	-	-	-	-	-	+
α-Antigen	-	M.s. ^{b)}	-	-	M.a. ^{c)}	NT

a) NT : Not tested. b) *M. szulgai*. c) *M. avium* complex.

Table 2. Comparison between Our Results of Identification of the Tested Mycobacterial Strains and Those in the Other Laboratories

Strain	Identification	
	Other laboratory	Shimane Medical University
A	Runyon IV group	<i>M. nonchromogenicum</i> complex
B	<i>M. xenopi</i>	<i>M. szulgai</i>
C	?	<i>M. nonchromogenicum</i> complex
D	?	<i>M. nonchromogenicum</i> complex
E	<i>M. xenopi</i>	<i>M. avium</i> complex
F	<i>M. phlei</i>	<i>M. fortuitum</i>

リン酸培地およびPAS培地上で発育不能、ナイアシン、硝酸塩還元、ウレアーゼおよびTween 80 水解陰性、アリルスルファターゼ（2週間法）陽性で *M. xenopi* と同定されたが、その確認を依頼された菌株である。教室での検討によれば本菌株はテルル酸塩還元は陰性であったが、その他の生物学的・生化学的諸性状は *M. avium* complex に一致し、また本菌群の α 抗原を有することから *M. avium* complex と同定された。

最後に、F 株は scotochromogenic な迅速発育菌で、45°C で発育し、ナイアシンおよびアリルスルファターゼ陰性、耐熱性カタラーゼおよび硝酸塩還元陽性で、*M. phlei* と同定された菌株で、そのヒトに対する病原性に疑問をもった医師より同定検査を依頼された菌株である。教室での検討によれば本菌は nonphotochromogenic な迅速発育菌で、45°C の発育陰性、ピクリン酸培地上で発育陽性、硝酸塩還元、耐熱性酸性フォスターゼおよびアリルスルファターゼ（3日法）陽性で、*M. fortuitum* と同定したが、PAS およびサリチル酸分解陰性の菌株¹³⁾であった。

考 察

わが国における5施設より同定不能あるいは確認のために送付された計6株の抗酸菌を、島根医科大学微生物・免疫学教室で同定したので、その成績について若干の考察を加えてみたい。

A 株は迅速発育菌として詳細な検討を依頼されたものであるが、教室での発育速度並びにピクリン酸培地上での発育の両性状検査により遅発育菌に群別され、さらに諸性状を検討した結果、*M. nonchromogenicum* complex と同定された菌株である。遅発育菌でも大量の菌を1%小川培地上に移植すると、迅速発育菌とあやまる原因となるので微量菌を接種するよう意を払うべきである¹⁰⁾。

B 株は *M. xenopi* と同定され、その確認の依頼を受けた菌株であるが、調べられた性状のうち硝酸塩還元陽性である点は *M. xenopi* とは考え難く、また本菌種ならば28°Cでの発育陰性、45°Cでの発育陽性であるので、その検討を行っていけば、このような誤診はさげられたものと思われる。

C 株およびD 株はともに同定不能菌株として送付されたものであるが、教室での検討の結果、両菌株とも *M. nonchromogenicum* complex と同定された。これは両菌株とも Tween 80 水解試験が陽性であることを陰性と判定したことに起因したのかもしれない。

E 株は集落が淡黄色をおびていたことより Runyon II 群に分類され、42°C で良好な発育を示したこと、その他の諸性状を勘案して、*M. xenopi* と誤って同定されたものと思われる。しかし、教室へ送付された本菌の

集落は“buff”で、遅発育菌の Runyon III 群に分類されて然るべき菌株であり、28°Cでの発育陽性、45°Cでの発育陰性（*M. xenopi* では28°C発育陰性、45°C発育陽性）で、テルル酸塩還元能を除いた諸種の生物学的・生化学的諸性状は *M. avium* complex とよく符合するものであり、また *M. avium* complex の α 抗原を有したことから本菌群所属菌株と同定された。

F 株は *M. phlei* として送付され、教室での検討では *M. fortuitum* と同定された菌株である。本例は健康若年者に一次感染型として発症し、胸部X線像で両肺野に空洞病変が認められ、その喀痰より分離、同定されたものである。本菌は淡黄色、45°C発育陽性で、アリルスルファターゼ陰性の迅速発育菌であったということから *M. phlei* と同定されたものと思われる。しかし、教室での検討によれば、本菌は nonphotochromogenic、45°C発育陰性、アリルスルファターゼ試験（3日法）陽性という成績がえられた。本菌はPAS並びにサリチル酸分解こそ陰性であったが、HA（500 μ g/ml）培地並びにピクリン酸培地に発育し、硝酸塩還元および耐熱性酸性ホスファターゼ陽性で、クエン酸塩を利用したことから *M. fortuitum* と同定された。

以上の6菌株の同定検査を通じて言えることは、いわばその方向づけを大きく左右する集落の色調（E株、F株）や発育速度（A株）の検査が正しく行われていれば、またB株のように28°Cおよび45°Cでの発育能が検査されていれば、あるいは正しい同定が可能であったかもしれない。さらにC株およびD株のようにTween 80 水解が正しく行われていなかったことが同定不能の原因であったと考えられる菌株もあり、ある疑われた菌種と若干の性状の違いがある場合には、その検査を繰返して検討することが望まれる。

ま と め

同定不能または確認のため島根医科大学微生物・免疫学教室に同定を依頼された非結核性抗酸菌6株を検討したところ、同定不能の2株はいずれも *M. nonchromogenicum* complex に、また同定が誤っていたと思われる菌株は、迅速発育菌とされていたものは遅発育菌の *M. nonchromogenicum* complex に、*M. xenopi* は *M. szulgai* に、*M. xenopi* は *M. avium* complex に、また *M. phlei* は *M. fortuitum* に同定されたが、その誤りのよって来るところについて若干の考察を加えた。

謝 辞

α 抗原の検討を頂いた広島大学田坂博信助教授に深謝します。

文 献

- 1) Wolinsky, E. : Nontuberculous mycobacteria and associated diseases, *Am Rev Respir Dis*, 119 : 107-159, 1979.
- 2) 下出久雄 : 非定型抗酸菌症の臨床的研究 (第3報) — *M. kansasii* の肺感染症について —, *日胸*, 30 : 128-134, 1971.
- 3) Bailey, W. B., Raleigh, J. W. and Turner, J. A. P. : Treatment of mycobacterial disease, *Am Rev Respir Dis*, 115 : 185-187, 1977.
- 4) 東村道雄, 喜多舒彦, 下出久雄他 : *Mycobacterium fortuitum* および *Mycobacterium chelonae* による肺感染症, *結核*, 60 : 429-434, 1985.
- 5) Tasaka, H., Kiyotani, K. and Matsuo, Y. : Purification and antigenic specificity of alpha protein (Yoneda and Fukui) from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium intracellulare*, *Hiroshima J Med Sci*, 32 : 1-8, 1988.
- 6) 日本結核病学会抗酸菌分類委員会 : 臨床材料に見出される抗酸菌とその鑑別, 同定法—抗酸菌分類委員会試案一, *結核*, 51 : 247-256, 1976.
- 7) Tsukamura, M. : Identification of Mycobacteria, 1984, Mycobacteriosis Research Laboratory of the National Chubu Hospital.
- 8) 斎藤 肇 : 非定型抗酸菌とその類似菌の鑑別, 同定法, *臨床検査*, 29 : 394-404, 1985.
- 9) 斎藤 肇 : 抗酸菌の分類と同定, *臨床と微生物*, 13 : 656-669, 1986.
- 10) 工藤祐是, 斎藤 肇, 高橋 宏 : 抗酸菌の同定試験, 微生物検査必携, 細菌・真菌検査, 第3版, 1987, F-102~F-118, 日本公衆衛生協会.
- 11) Kilburn, J. O., Silcox, V. A. and Kubica, G. P. : Differential identification of mycobacteria. V. The tellurite reduction test, *Am Rev Respir Dis*, 99 : 94-100, 1969.
- 12) 斎藤 肇, 浅野健治, 高倉鉄也他 : 抗酸菌同定用キットの用途 (第2報) 臨床分離株を用いてのキットの有用性の評価, *臨床検査*, 27 : 118-192, 1983.
- 13) Saito, H., Gordon, R. E., Juhlin, I. et al. : Cooperative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria. The second report, *Int J Syst Bacteriol*, 27 : 75-85, 1977.