

非定型抗酸菌の性状(Ⅲ)

——平板培地上における集落観察の試み(ii)——

京都大学結核胸部疾患研究所 内科学第一

久世文幸, 武田貞夫, 前川暢夫

(51年12月25日受付)

序 論

Mycobacterium tuberculosis および *Mycobacterium bovis* 以外の抗酸菌によって惹起される非定型抗酸菌症 (AM 症) は, ことに最近10数年来注目され, 多くの基礎的ならびに臨床的研究の成果が得られている。いわゆる Runyon¹⁾ の Group 分けに端を発した非定型抗酸菌 (AM) の分類も飛躍的に進み, 多数の菌種²⁾ が確立されている。結核症と非定型抗酸菌症との鑑別は, 現在の所窮極には抗酸菌種の同定と鑑別に帰するので, 病的材料より分離された抗酸菌の臨床細菌学はますます必要の度を加えている。AM の分類, 同定には現在主として生化学的反応が応用されており, 極めて多種類の同定検査が提唱されている。通常, 臨床細菌学にはそれらの検査項目のうち主要なもの数種類の組合せで菌種を確定ないし推定している訳であり, この目的に応じた検査術式^{3,4,5)} も多く提案されているが, 実際的にみてこれらの検査を逐一実施するにはかなりの時間を要し, 実施上, より簡易な, 誤りの出来るだけ少ない同定術式が臨床の場においては望まれる訳である。前回の私共の報告^{6,7)} も簡易検査術式を目指した1つの検討であった。前回の報告では主に Slow grower を対象として, 平板培地上の比較的発育初期の集落形態の観察が AM の Group もしくは菌種の推定にかなり有用であることを報告したが, 今回は Rapid grower を中心として追加検討したので報告する。

材料および方法

1) 培 地

一般細菌検査用のプラスチック製無菌ペトリ皿 (90×15 mm) に後述の寒天培地を 20 ml ずつ注入し使用に供した。今回の観察ではキルヒナー (Kirchner) 寒天培地* (KA), Modified Corn Meal Glycerol 寒天培地† (CMA) の2種類を使用した。

2) 使用菌株

1%小川培地で継代保存している迅速発育抗酸菌25株を使用に供した。内訳は次の如くである。

M. fortuitum:

TMC 1529, TMC 1545, TMC 1547, 18109 (ATCC 6842), 18112 (ATCC 6841), 18001 (ATCC 19709)

M. chelonae:

TMC 1524, TMC 1537, TMC 1542, TMC 1543, TMC 1544, 12011 (ATCC 14772), 22012 (ATCC 19977)

M. phlei:

TMC 1523, No. 12

* キルヒナー寒天培地 (KA): キルヒナー液体基礎培地 900 ml, 細菌用寒天末 15 g を加熱溶解後高圧滅菌を行ない, 50°C まで冷まし牛血清を10%になる様に加える。

† Modified Corn Meal Glycerol 寒天培地 (CMA): Corn Meal Agar (Difco) 17 g, Glycerol 30 ml に 1,000 ml の蒸溜水を加え高圧滅菌を行なう。

M. smegmatis:

TMC 1546, TMC 1533, TMC 1515, 17002 (SN2), 17027 (ATCC 14468), No. 16

M. flavescens:

TMC 1541, 33003 (No. 3363), 33002 (No. 3362), 33001 (ATCC 14474)

以上の菌株のうち TMC 株はアメリカ合衆国 NIH (National Institutes of Health) を介して Trudeau Institute より直接分与を受けた Trudeau Mycobacterial Culture Collection の中に含まれる諸菌株で、18109, 18112, 18001, 12011 22012, 17002, 17027, 33003, 33002, 33001 の10株は国立療養所中部病院、東村道雄博士より分与されたものである。なお No. 12 および No. 16 は本研究室保存株である。

3). 観察方法

上記菌株の1%小川培地に発育したものを用い、ガラス玉コルベンで均等な菌液(約 1.0 mg/ml) を作成、その1滴を滅菌生食水 20 ml で稀釈したものを 0.5 ml ずつ平板培地全面に接種した。原則として 37°C で3日間培養し、24時間後、48時間後、72時間後(一部の菌株では1週間後)に観察のためとり出し、ペトリ皿を反転し、直下からの透過光を用い弱拡大(10×10倍)で鏡検、集落の形態を観察すると共に写真撮影を行なった。(Nikon L型, EFM でフィルムは Fuji 35 mm Neopan SS ASA 100 を使用)

観察結果

1) 全般的にみた集落の形成状況

Slow grower⁷⁾ でみられたと同様、Rapid grower でも発育初期の段階(通常24時間以内)では、各菌種もしくは菌株間に形態学的に著明な差違はなく、この時期にみられる集落形態は前回の報告⁷⁾でも述べたごとく、桿状の菌体が束状に集合した紐状ないし糸屑様の形態と、きわめて初期の不整形の小集落か、もしくは中心から菌体が周囲に向かって放射状に配列した小集落の構造をもっている(写真1-A, 写真1-B)。集落は緊密でなく内部の菌体が観察し得る。

3日後(72時間後)の観察では、ほとんどすべての菌株が成長した固有の集落形態を示しはじめ、各菌株相互の集落形態の差異がかなり明瞭になる。今回の観察では Slow grower にみられたるとき、典型的な毛髪の束状の形態(コード形成)とか明確な円形のドーム様の集落形成を示す菌株はほとんど観察出来ず、菌種ごとにより多様な形態をとり易いのがみられた。

2) 菌種別の集落形態

以下の観察は原則として培養3日後のものである。

(i) *M. fortuitum*

この菌種の集落形態の特徴は、集落周縁より外部に向う支枝状もしくは棘様の突起が多数観察出来ることであると思われる。これらの突起は KA にみられる集落の不整な周縁からの比較的少数の棘状の突起(写真2-A)から、緊密な円形集落の周縁より無数のフィラメント様ないし菌糸様突起を示すもの(写真2-B)、さらに集落はより緊密さを欠き周辺への樹枝状突起がかなり大きく集落の大部分を占める形態(写真2-C)にいたるまで種々の程度のものが認められた。写真2-Bに示した集落形態はキルヒナー寒天培地における *M. smegmatis* (写真5-A) とか、*Nocardia* にみられる集落形態⁷⁾と類似している。喀痰より分離した *M. fortuitum* の観察では極端な樹枝状形態をとる集落は余り頻度が高くなく、CMA では写真2-Bに示した形態が一般的であった。

(ii) *M. chelonae*

M. fortuitum とことなり集落周縁に突起は観察されない。特徴的と思われるのは、集落が緊密でなく平板状で周縁は不整であること、中心部はかなり緊密であるものもあるが、集落周縁は薄く広がった形態(写真3-A)をとっていることである。しかし *M. intracellulare* にみられる透明な薄い集落⁷⁾に比較するとより緊密な構造を示し、また一方不透明なドーム様集落⁷⁾とも区別出来る様に思われる。菌株によっては集落中心部から周辺に向い一見コード形成を思わす紐状の構造物が蛇行している形態がみられ

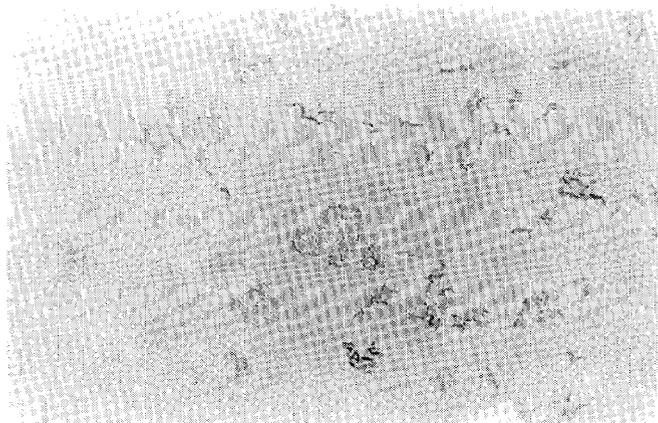


写真1-A *M. chelonei* (TMC 1524), CMA, 1日目



写真1-B *M. smegmatis* (TMC 1515), CMA, 1日目

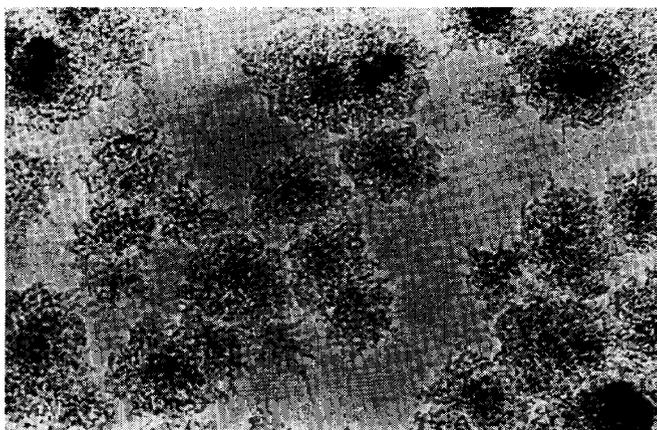


写真2-A *M. fortuitum* (18109), KA, 3日目

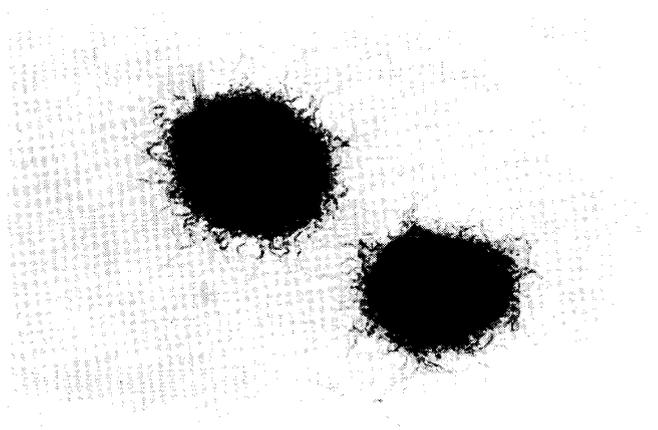


写真2-B *M. fortuitum* (18109), CMA, 3日目

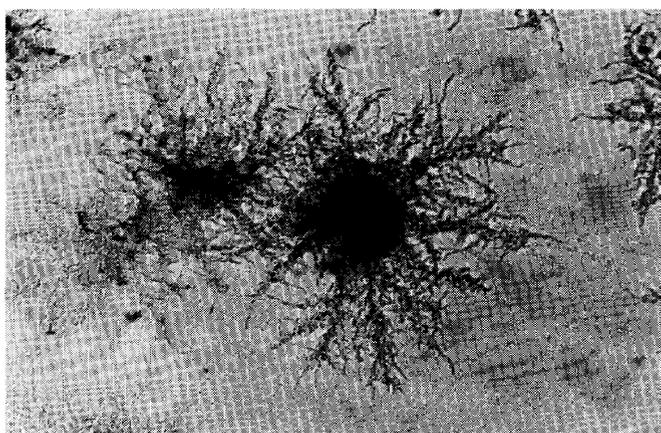


写真2-C *M. fortuitum* (TMC 1529), CMA, 7日目

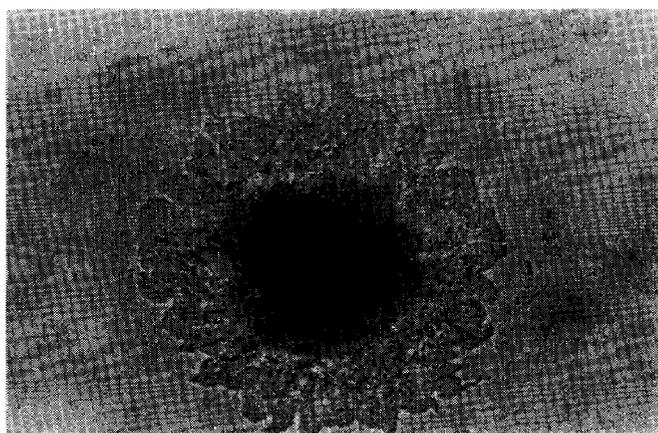


写真3-A *M. chelonei* (TMC 1543), CMA, 3日目

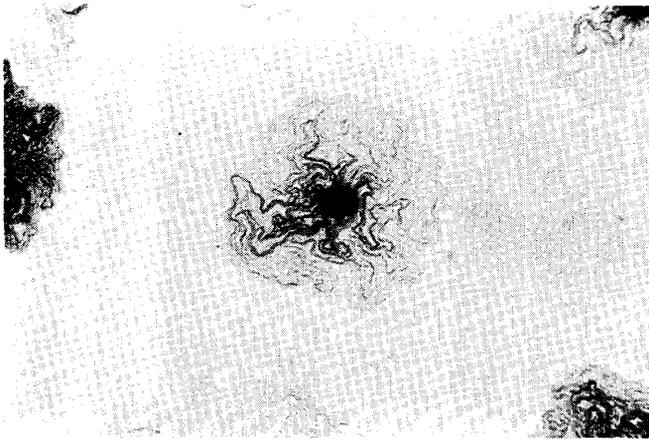


写真3 B *M. chelonei* (22012), CMA, 3日 (×40)

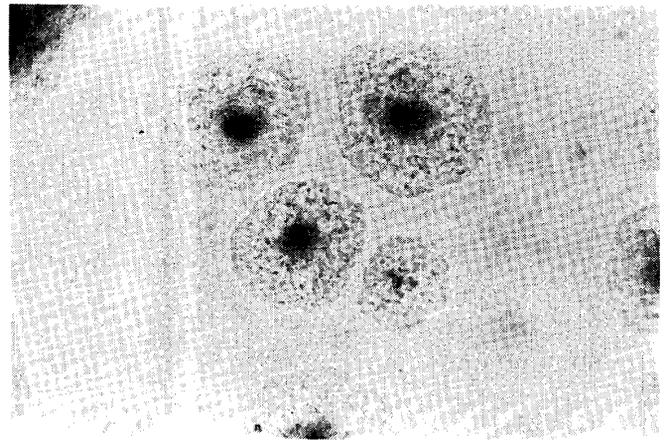


写真4 A *M. phlei* (TMC 1523), CMA, 3日 (×40)

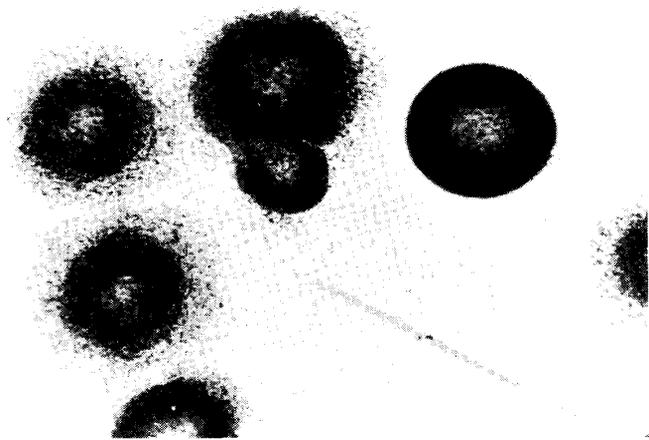


写真5 A *M. smegmatis* (No. 16), KA, 3日

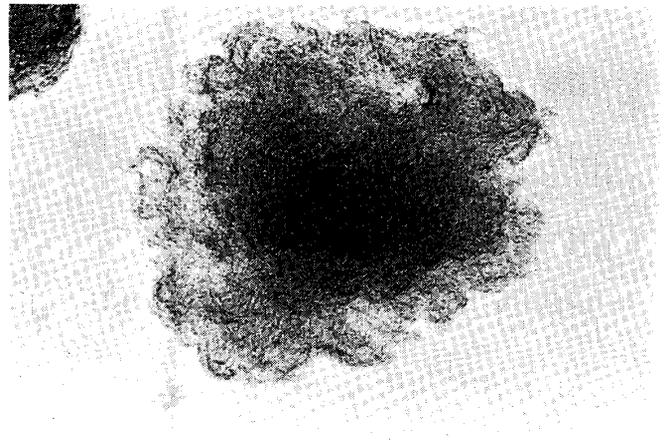


写真5 B *M. smegmatis* (TMC 1546), CMA, 3日

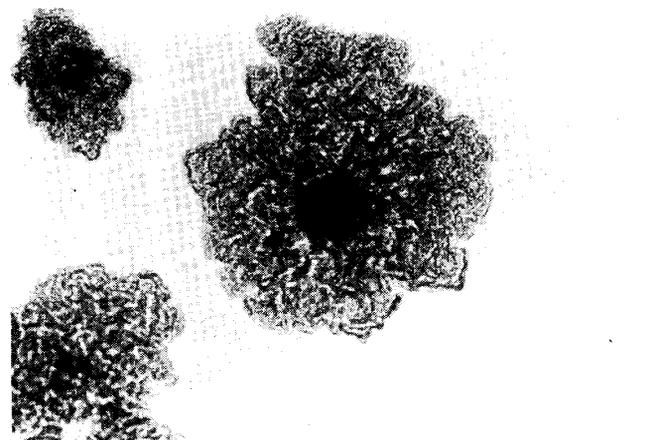


写真6 A *M. flavescens* (33003), CMA, 7日

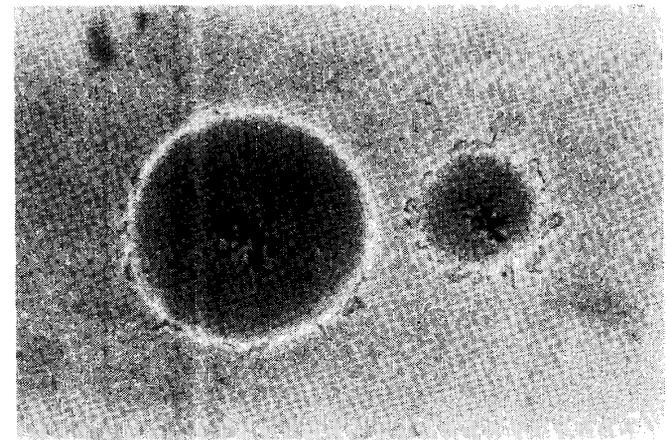


写真6 B *M. flavescens* (33002), CMA, 7日

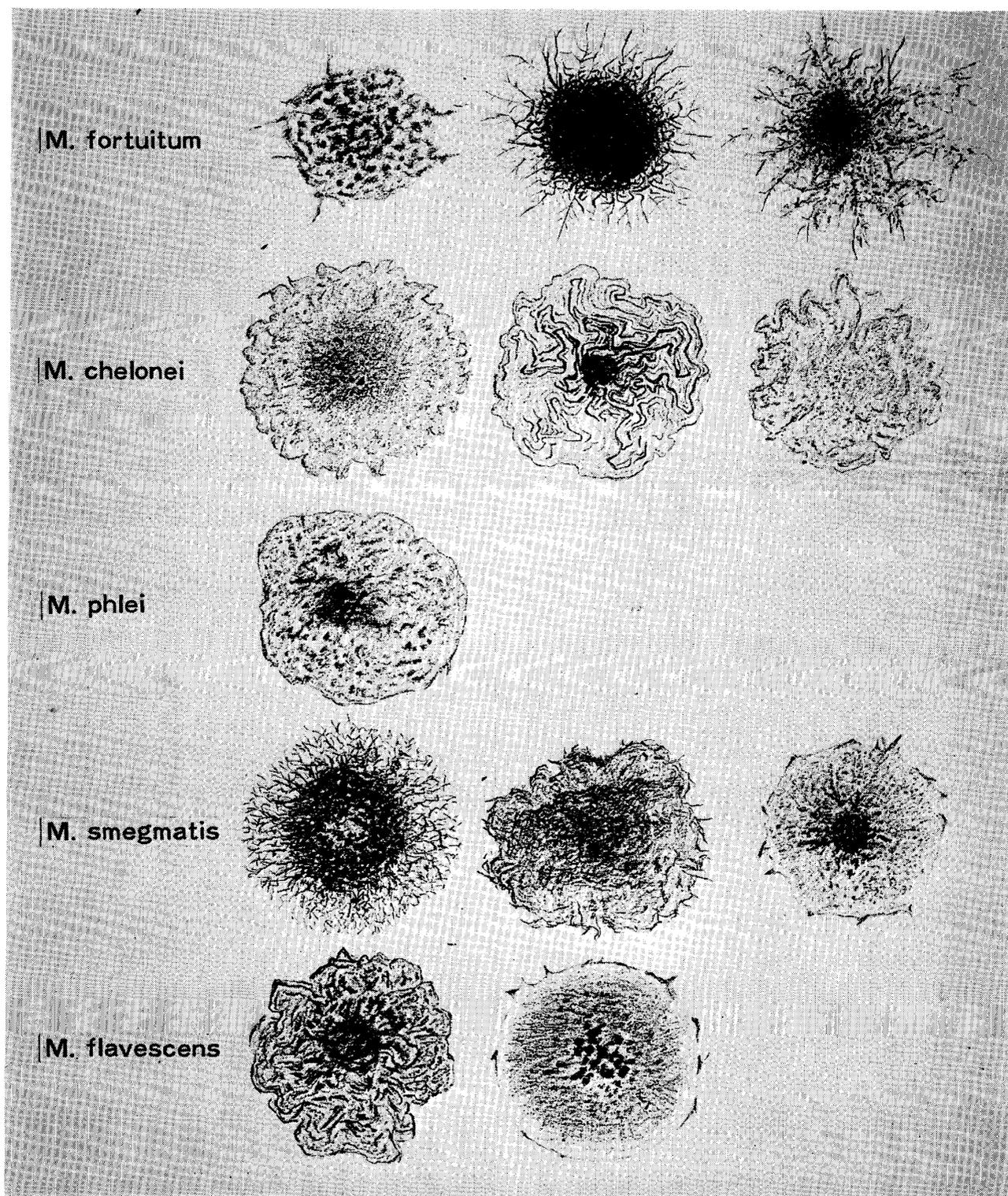


Fig. 1 速発育菌の集落形態

るが(写真3-B), 写真3-Aの形態よりはこの形態の方が一般によくみられる様である。またこの形態は, *M. intracellulare* のII型⁷⁾にかなり類似を示した。

(iii) *M. phlei*

M. phlei に関しては今回は2株のみしか観察していないが, 写真4-AのごとくCMA上で*M. chelonae*の写真3-Aに類似した集落形態が観察された。

(iv) *M. smegmatis*

写真1-Bに示したごとく, ごく初期の集落は菌体が放射状に配列する傾向が強い様である。KAにおける集落形態は, 写真5-Aに示したごとく*M. fortuitum*の集落形態と類似しているが, 集落周縁のフィラメント様突起は余りいちぢるしくない。KAでの集落は円形であるが, CMA上にみられる集落では類円形のものもあるが概して周縁は不整のものが多くわずかに渦巻様の構造を示し全体の構造は緊密で少数の突起を有している(写真5-B)。*M. tuberculosis*にみられる緊密な紐状の発育(I型)⁷⁾とかなり近い集落形態である。また円形ドーム様の集落形態に近いものもみられた。

(v) *M. flavescens*

*M. intracellulare*にみられるII型⁷⁾に類似したいわゆるroughな形態と(写真6-A), 同じく*M. intracellulare*のIII型⁷⁾に類似したドーム様集落(写真6-B)の2種類の集落形態がみとめられた。なおFig. 1に今回観察出来た迅速発育菌の主要な集落形態をまとめて示した。

考 按

迅速発育菌(Rapid grower)の中で, 人体に対して病原性があると一応考えられているものは現在のところ*M. fortuitum*と*M. chelonae*であろうが, Rapid growerにはこれ以外に*M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. flavescens*をはじめとして多数の抗酸菌種が含まれる。しかしながら人体材料から分離されるRapid growerは比較的その頻度が低く, また菌種についても*M. fortuitum*と*M. chelonae*以外のものが分離されることは意外にまれな様に思われる。したが

って私共の今回の観察もこの両菌種に主眼を置いたものである。

*Mycobacterium*の集落形態を観察したものにはFregnanとSmith⁸⁾, VestalとKubica⁹⁾, JonesとKubica¹⁰⁾, Runyon^{11,12)}の報告がある。

JonesとKubica¹⁰⁾は*M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. smegmatis*に関してDubos oleic acid-albumin agar(OAA)とModified Corn Meal Agar(CMA)を用いて詳細な観察を行ない, この3菌種がいずれもrough variantとsmooth variantの2種類の集落形態をとることをみている。*M. fortuitum*に関して彼等はOAAならびにCMA上で, コード形成の著明な周縁にフィラメント形成の認められない集落をRough Fと記載し, OAA上にみられる*M. tuberculosis*の集落と類似していることを強調している。一方同じくOAA上で辺縁の平滑なドーム様の集落ならびにCMA上で短いフィラメント様構造を周縁にもった集落を観察し, Smooth Fと記載している。この報告での典型的なSmooth FとRough Fの集落形態は私共の観察ではみられなかった。KA上にみられた集落形態がややRough Fに類似する様にも思われるが, CMA上の形態は全て彼等のいうSmooth F f(f: filamentous)に相当すると考えられる。Runyon¹¹⁾も後者の集落形態, すなわちCMA上でみられる分枝状のフィラメント, もしくは菌糸状の集落周縁の広がりをも*M. fortuitum*の極めて特徴的な所見として記載しており, 私共の観察結果からみても臨床細菌学的に有用な特徴であると思われる。

*M. chelonae*に関して, Runyon¹¹⁾は集落周縁にフィラメント様構造のないのをその特徴として記載している。私共の観察では, 中心がかなり緊密かつドーム様で周縁は薄く分葉した形態と, 全体として透明な薄い集落であるが中心部から紐状の構造物が粗に蛇行している形態の2種類を認めた。前者は*M. intracellulare*にみられるIVa⁷⁾に, 後者は同じく*M. intracellulare*のII型⁷⁾に類似している。要するに*M. fortuitum*と比較すると特徴の少ない集落形態

である。

M. phlei に関しては Jones と Kubica¹⁰⁾ が Smooth P と記載した集落に相当する形態を認めた。

M. smegmatis では KA 上で Jones と Kubica¹⁰⁾ の smooth variant に相当する集落形態をみとめ, CMA 上では, 少数のフィラメント様構造を持つドーム様集落と, KA 上の *M. tuberculosis* すなわち I 型⁷⁾ に比較的近い集落形態を認めた。

M. flavescens についてもこの菌種固有の特徴は少ない。

以上, 今回検討した範囲でも全般的にみて, CMA 上においても2種類以上の集落形態をとる菌種がほとんどで, かつ *M. intracellulare* にみられた集落形態と類似のものもかなり認められた。唯一の例外と思われるものに *M. fortuitum* があり, 写真2-Bおよび2-Cに示した集落形態は極めて特徴的なものである。Nocardia が CMA 上で類似した集落形態を示すことに留意すれば臨床細菌学的な鑑別にも有用であろう。ことに *M. chelonae* との鑑別上有用であろうと思われる。

結 論

一般細菌検査用の平板でキルヒナー寒天培地, Modified Corn Meal Glycerol 寒天培地を使用し, 迅速発育菌25株を用いて, それらの集落形態を顕微鏡下で観察した。*M. chelonae*, *M. smegmatis*, *M. flavescens* ではいずれも菌種固有の特徴的な集落形態が明らかでなく, 臨床細菌学上, 同定, 鑑別の見地からみて, これらの観察は余り有用ではないと考えられた。*M. fortuitum* に関しては樹枝状もしくはフィラメント様構造が特徴的で *M. chelonae* との鑑別に利用し得ると思われた。

終りに臨み, 貴重な菌株を分与していただいた国立療養所中部病院東村道雄博士ならびに米国 NIH Lambert 博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Runyon, E. H.: Anonymous mycobacteria in pulmonary disease, Med. Clin. N. Amer., 43: 273, 1959.
- 2) Buchanan, R. E., Gibbons, N. E.: Bergey's manual of determinative bacteriology, The Williams and Wilkins Company, 8th ed. p. 681, 1974.
- 3) 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, 1976.
- 4) Tsukamura, M.: A simple identification system for atypical mycobacteria, J. Tubercul. Chest. Dis., 17: 8, 1971.
- 5) Kubica, G. P.: Differential identification of mycobacteria, Amer. Rev. Resp. Dis., 107: 9, 1973.
- 6) 久世文幸, 前川暢夫: 非定型抗酸菌の性状 (I) —臨床細菌学の立場から—, 京大胸部研紀要, 8(2): 88, 1975.
- 7) 久世文幸他: 非定型抗酸菌の性状 (II) —平板培地上における集落観察の試み(i)—, 京大胸部研紀要, 8(2): 99, 1975.
- 8) Fregnan, G. P., Smith, D. W.: Description of various colony forms of mycobacteria, J. Bact., 83: 819, 1962.
- 9) Vestal, A. L., Kubica, G. P.: Differential colonial characteristics of mycobacteria on Middlebrook and Cohn 7H10 agar-base medium, Amer. Rev. Resp. Dis., 94: 247, 1966.
- 10) Jones, W. D. Jr., Kubica, G. P.: Differential colonial characteristics of mycobacteria on oleic acid-albumin and modified corn meal agars. II. Investigation of rapidly growing mycobacteria, Zbl. Bakt., 196: 68, 1965.
- 11) Runyon, E. H., Brisbay, J. E.: Identification of acidfast pathogens, utilizing colony characteristics, Veterans Administration, 2nd ed., 1969.
- 12) Runyon, E. H. et al.: Mycobacterium, in Manual of Clinical Microbiology, eds. Blair, J. E. et al., The Williams and Wilkins Company, p. 112, 1970.

CHARACTERISTICS OF ATYPICAL MYCOBACTERIA (111)

—A trial of the identification of various species of mycobacteria utilizing colony characteristics by plate culture technique (2)—

Fumiyuhi KUZE, Sadao TAKEDA and Nobuo MAEKAWA

The First Department of Medicine, Chest Disease Research Institute, Kyoto University

A total of 25 strains of rapidly growing mycobacteria which represent 5 species were inoculated on two kinds different media, namely Kirchner agar medium and modified Corn Meal Glycerol agar medium, and their colonial characteristics were observed by a low power microscope to make sure if it is useful enough to differentiate various rapidly growing mycobacterial species.

Among the species tested, *M. fortuitum* showed most characteristic colonial morphology than others with its conspicuous branching filamentous extensions on modified Corn Meal Glycerol agar medium, though this feature was less evident on Kirchner agar medium. This characteristic seems to have some resemblance to colonial morphology of *Nocardia* species.

The colonies of *M. chelonae* lack their branching filaments and in this they seem to be rather sharply distinct from *M. fortuitum* and some other species of rapid growers.

The species tested other than *M. fortuitum* and *M. chelonae* were all without distinctive characteristics in their colonial morphology. In view of rather frequent isolation from clinical specimen of *M. fortuitum* and *M. chelonae*, the above mentioned characteristic colonial morphology of *M. fortuitum* is useful tool in the identification procedures.