

抗酸性菌の分類に関する研究

第1編 抗酸性菌の諸種抗結核剤に対する感受性

札幌医科大学衛生学教室(主任 金光正次教授)

荒 木 雅

(受付 昭和 29 年 8 月 12 日)

緒 言

従来、抗酸性菌の分類に関しては、主として形態学的乃至血清学的な見地から研究が行われた。その主なるものを挙げると、まず C.A. Frey & W.A. Hagan¹⁾、戸田²⁾、占部³⁾、佐藤・井田⁴⁾等が、コロニーの色調、形態乃至発育状態によつてこれを群別し、H. Schlossberger u. W. Pfannenstiel⁵⁾、B.Lange⁶⁾、占部⁷⁾等は、発育温度域による分類を試みている。又、内藤⁸⁾、草場⁹⁾は、沈降反応、凝集反応について詳細な研究を行い、特に内藤は、非病原性抗酸性菌において、沈降反応により菌株の所在に特異性を認め、これを利用して分類が可能であると報告した。又 R.E.Gordon¹⁰⁾¹¹⁾ 一派は、抗酸性菌の糖分解能を測定し、これと発育温度域、耐熱性との関係から分類を試み、G.Penso¹²⁾は、Bacteriophageの特異性による分類を報告している。さらに最近平本¹³⁾、川村¹⁴⁾は、諸種の Antibiotics に対する感受性により本菌群の分類を試みている。しかし本菌群が生物学的及び免疫学的に複雑なために、その系統的分類が容易でないことは、諸家の等しく認めるところである。よつて私は、これらを総合したより広い角度からその分類を企図し、諸種の抗結核剤に対する感受性、並びに耐性獲得の状態、耐熱性、テルル酸加里感受性、及び諸種の酵素作用を測定し、これと他の細菌学的諸性状とを対比してこれらの各因子の相互関係の中に抗酸性菌の分類の基準を求めようと試みた。本編においては、供試菌の細菌学的性状と、諸種の抗結核剤に対する各菌株の感受性について報告する。

研究材料及び研究方法

a) 供試菌株

札幌市内及び近郊の土壤、下水、動物糞便等の各種自然界材料から Söhngen 氏法¹³⁾によつて分離した 69 株、結核患者喀痰から分離した 1 株、並びに公衆衛生院微生物学部から分与された鳥型株、チモテイ株の計 73 株の抗酸性菌を用いた。新たに分離した菌株の病原性については、動物実験を行っていないので確言できないが、諸種培地における発育速度、抗煮沸性試験等により、非病原性と推察される。尚実験に用いた菌株は、岡・片倉培

地上における色調、形態、乾湿性、Kirchner 培地における増殖状態及び抗煮沸性等の性状を総合して、できるだけ相互に異なる菌株を用いるようにした。

b) 発育状態の観察方法

固型培地としては岡・片倉培地、液体培地としては 10%馬血清加 Kirchner 培地(以下 Kirchner 培地と記す)を使用し、その他 4%グリセリン寒天、4%グリセリンブイオンを併用して発育状態を観察した。岡・片倉培地においては、分離後 2 代乃至 3 代の菌株を、37°C に 10 日乃至 2 週間培養したコロニーについて、その色調、形態、乾湿性、光沢等を観察し、Kirchner 培地においては、グリセリン寒天から本培地に移植した 37°C 10 日培養の菌株について、その発育状態により、菌膜形成(以下膜と記す)、平等濁濁(以下濁と記す)、管底発育(以下底と記す)の 3 群に分類した。菌株により移行型があつたが、いずれの群に属させるかの判定は容易で、各発育程度の強弱に応じ、最も適当と思われる群に属せしめた。

c) 使用薬剤

Dihydro Streptomycin Sulfate (SM) (武田製)

Sodium Para Amino Salicylate (PAS) (田辺製)

Isonicotinic Acid Hydrazide (INAH) (山之内製)

d) 薬剤感受性測定方法

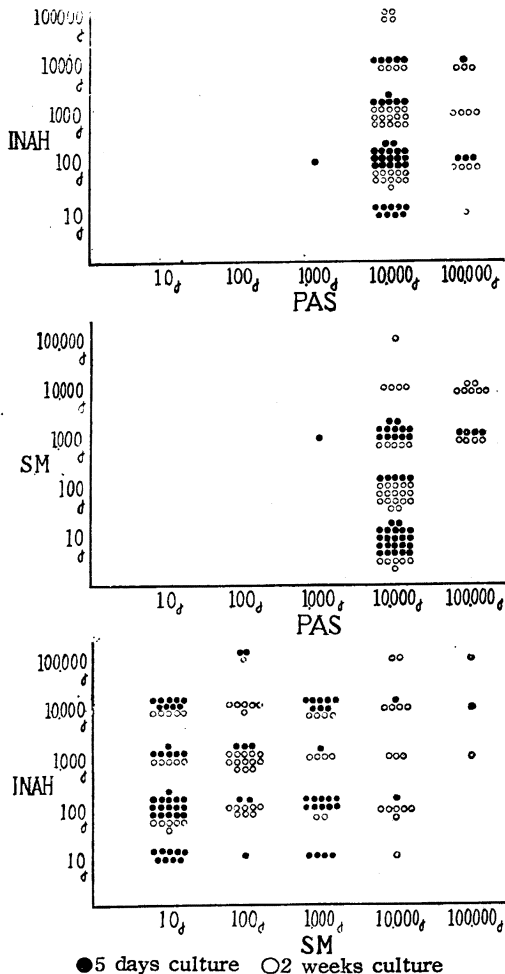
薬剤感受性の測定には、10倍稀釈法によつて調製した薬剤加 Kirchner 培地を用いた。すなわち各薬剤を滅菌生理食塩水に溶解して 100 倍原液を調製し、以下 10 倍稀釈法により、1 億倍迄の系列を作り、その 0.5cc 宛を Kirchner 培地に分注して各薬剤が 1ml 当り 10 万 Y, 1 万 Y, 1000Y, 100Y, 10Y, 1Y, 0.1Y, の濃度に行まれるようにした。接種菌液は Kirchner 培地 1 週間乃至 10 日培養の菌を Kirchner 液を以つて 1cc 中約 1 mg の菌を含む平等浮游液となし、その 1 滴量を各試験管に加えて 37°C に培養し、5 日後、10 日後、2 週間後に肉眼的観察により、菌の発育状態を観察した。

実験成績

a) 供試菌の細菌学的性状

まず岡・片倉培地上における発育状態をみると、白色系が最も多く 22 株 (30.2%) を占め、着色系では、紅

色系が最も多く 21 株(28.9%)、橙色系、紅色系はそれぞれ 15 株(20.5%)である。一般に白色系では集落の表面状態が乾燥し、粗雑なものが多く、これに対し着色系では著しく湿潤粘濁なものが多い。自然界抗酸性菌が培養中に色調の変異を生ずることは R. E. Gordon¹⁰⁾ 占部³⁾等によつても報告されているが、われわれも数株においてこれを認めた。しかしながら色調の判定には、前記の如く可及の色調の変化を来さないと思われる時期、すなわち分離後 1 カ月以内及び培養 10 日目を基準とし全菌株共同一条件の下に観察した。次に Kirchner 培地上における発育状態を培養 10 日目に観察すると、過半数の 54 株(74%)が管底発育を示すが、この場合管底の菌は、雲架状、粘土状、毛屑状等種々の状態を呈し、振盪すると培地を濁濁せしめるものも認められた。しか



● 5 days culture ○ 2 weeks culture
Fig. 1. Relations among sensitivities of 73 strains of acid-fast bacteria against INAH, SM and PAS.

し静置状態において培地を平等に濁濁せしめる菌株は比較的少なく、図に示す如く 7 株(9.6%)に過ぎない。これ等のものは培養日数を経るに従い、漸次沈渣を生じ、又岡・片倉培地上ではいずれも著しく湿潤性の集落

を形成した。さらに 12 株(16.4%)においては、菌膜を形成して発育し、いずれも培地は透明であつた。次に菌の形態を Zihl-neelsen 染色を施して観察し、短桿菌長桿菌、及びこれらの混合したものを不同型として分類すると、短桿状は 42 株(57.5%)で最も多く、長桿状 10 株(13.7%)、不同型 21 株(28.8%)である。長桿状菌中には典型的形態をとるものが多かつたが、中には糸状を呈するものや、放線状に排列するものも認められ、短桿菌中には、球菌状のものが相当数認められた。抗煮沸性試験は諸家の成績¹⁴⁾¹⁵⁾と殆んど大差なく、いずれも 10 秒～2 分以内で脱色した。すなわち 30 秒以内に脱色するもの 26 株(35.6%)、30～60 秒のもの 35 株(47.9%)、1 分以上 2 分以内のもの 12 株(16.5%)であつた。

b) 諸種薬剤に対する感受性

前記方法により、供試菌 73 株の INAH, SM, PAS に対する感受性を測定した結果、第 1 図に示す如き成績を得た。すなわち 5 日目で判定した場合、まず PAS についてみると、44 株中 39 株(約 90%)が 1 万 γ/ml で、他の 5 株は 10 万 γ/ml で発育を阻止され、1000 γ/ml で阻止されたものは僅か 1 株である。すなわち自然界抗酸性菌の本剤に対する感受性は、後述の他薬剤に比較すると極めて鈍く、且つ菌株による差が少ない。以上の成績から PAS に対する測定は 44 株に止めた。これに対し INAH においては 100 γ/ml で発育を阻止されるものは最も多く 29 株、次で 10 γ/ml で 14 株、1000 γ/ml で 10 株、1 万 γ/ml で 18 株、10 γ/ml で 2 株が発育を阻止され、PAS に比較すると一般に感受性が高く、且つ発育阻止濃度は菌株によりかなりの幅が認められる。更に SM では 10 γ/ml で 40 株、1000 γ/ml で 23 株、100 γ/ml で 8 株、1 万 γ/ml で 2 株が夫々発育を阻止され、感受性は最も高く、発育阻止帯の幅は SM, PAS の中間に位している。次に培養 2 週間目で判定した際には、いずれの薬剤に対しても感受性がかなり低下し、且つ菌株による差は SM において最も大きい。このことは小川¹⁶⁾のいう如く試験管内の SM の作用が、時間の経過により低下したためと思われる。

c) 各薬剤相互間における発育阻止濃度の関係

全菌株の INAH, SM, PAS に対する態度から、これ等 3 種薬剤における発育阻止濃度の間に如何なる関係があるかを調べると、第 1 図に明らかなように INAH と PAS, SM と PAS との間においては、本菌群の殆んどが PAS に対し 1 万 γ/ml という限定された濃度で発育が阻止されている関係上、両者の間には特異な関連を認め難く、このことは INAH と SM との間においても同様である。すなわち 3 種薬剤に対する抗酸性菌の感受性の間には、特別の関係を認めることができない。

d) 薬剤感受性と Kirchner 培地上における発育状態との関係

Kirchner 培地上における発育状態を、「膜」、「濁」、「底」の3群に区別し、これと各種薬剤に対する感受性との関係を見ると第2図の如くである。まず PAS の場合についてみると、本剤に対し $1 \text{万}\gamma/\text{ml}$ で発育が阻止された39株は、「濁」群に3株、「膜」群に10株、「底」群に26株が属し、 $10 \text{万}\gamma/\text{ml}$ で発育が阻止された4株及

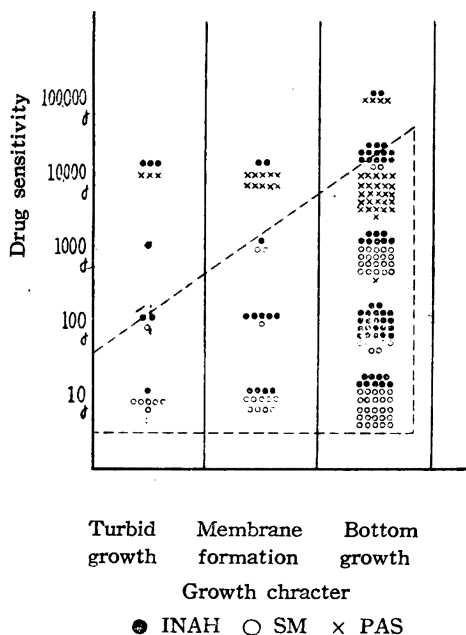


Fig.2. Relations between sensitivities of acid-fast bacteria against various antituberculosis agents and growth characteristics in Kirchner's media.

び $1000\gamma/\text{ml}$ で阻止された1株はいずれも「底」群に属している。

以上の如く底群に属する菌株の感受性の幅は、他群に比較しやや広い傾向が認められるが、これは底群に属する菌株が比較的多いためと思われる、本剤に対する感受性と Kirchner 培地上における発育状態との間に特別な関係は認められない。INAH の場合についても同様関連はない。しかし SM の場合には「濁」群に属する7株中6株が $10\gamma/\text{ml}$ で発育を阻止され、「膜」群に於ても同様12株中9株が $10\gamma/\text{ml}$ で発育を阻止され、両群は本剤に対し極めて感受性が高い。これに対し「底」群では、 $10\gamma/\text{ml}$ で発育の阻止される菌株は、54株中25株で半数以下であり、更に $1000\gamma/\text{ml}$ で発育が阻止されるもの20株、 $1 \text{万}\gamma/\text{ml}$ で阻止されるもの2株が認められ、「底」群に属する菌株は、本剤に対する感受性の幅が、他群に比較すると広がる傾向がある。すなわち Kirchner 培地上における発育状態と SM 感受性との間には、第2図の点線で示す様に「濁」、「膜」、「底」発育の順に感受性の

鈍い菌株が増加する傾向がある。

e) 薬剤感受性と岡・片倉培地上における色調との関係

第3図は各薬剤に対する感受性を岡・片倉培地上における色調と比較したものである。すなわち PAS の $1 \text{万}\gamma/\text{ml}$ で発育を阻止される群には、各色調の菌株が殆んど同数ずつ含まれており、両者の間に特別な関係は見られない。INAH の場合も同様、本剤に対する感受性と色調の間に見るべき関連はないが、SM に対しては紅色系群に属する21株中19株が $10\gamma/\text{ml}$ で発育が阻止され、本剤に対して極めて鋭敏であるのに対し、灰白色系群では22株中19株が $1000\gamma/\text{ml}$ で発育を阻止され、紅色系にくらべて感受性が著しく鈍いものが多い。更に図に見る如く橙色系、黄色系では、本剤に対する感受性が紅色系と白色系の中間に位している。すなわち紅、橙、黄、白の順に SM に対する感受性が鈍くなり、こ

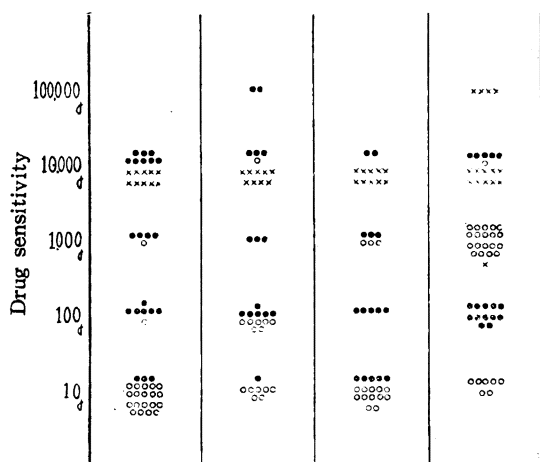


Fig.3. Relations between sensitivities of acid-fast bacteria against INAH, SM, PAS and colourings of colonies on Oka-Katakura media.

の際においても Kirchner 培地上で見られたとはほぼ同様な関連が認められた。かくの如く抗酸性菌の培地上における諸性状が、諸薬剤中 SM に対してのみその感受性との間に特異な関連があるということは、極めて興味ある現象といえよう。

総括及び考按

現今、結核菌と自然界乃至非病原性抗酸性菌との鑑別法として、コロニーの色調、或いは発育状態の相違、又は抗煮沸性、酵素作用、テルール酸加里感受性差等を用いてする方法が報告されており、これ等は両者を区別す

るという点では意義があるものと思われる。しかしながら緒言に述べたように抗酸性菌全体をより系統的に分類するためには、これらの性状のみでは不可能であつて、他の新たな性状とともに多角的に総合考察する必要があるが、この方面の研究は未だ少ない。私は一般細菌学的性状が互に相異ると認められる抗酸性菌 73 株をかかるとの考案の下に分類しようと試み、その第一段階として INAH, SM, PAS に対する感受性を測定しこれと一般細菌学的性状との関係を観察した。その結果まず岡・片倉培地、或いは Kirchner 培地上における発育状態、抗煮沸性、顕微鏡的形態等の間においては何等関連が認められず、占部¹⁵⁾、草場¹⁷⁾も報告した如く私の成績においても、分類の基準となるような性状は見出されなかつた。次に薬剤感受性と細菌学的諸性状との関係をみると、まず PAS では発育阻止力が極めて弱く、しかも殆どの菌株が $1\text{万}\gamma/\text{ml}$ の濃度で発育が阻止されたのでこれと他の性状とを比較することは不可能であつた。

又 INAH に対しては菌株による感受性の差がかなり著しいにも拘らず、他の性状との関係は PAS の場合と同様認めることができなかつた。この培養性状と薬剤感受性との問題に関して平本¹⁸⁾は SM 感受性と岡・片倉培地上における色調との間には関連は見出し難いと報告しているが、私の実験では、紅色系は本剤に対する感受性が高く、白色系は鈍く、更に橙、黄色系は凡そ両者の中間に位するという成績を得た。又川村等¹⁹⁾は INAH, SM, PAS, TM 中 SM においてのみ培養性状と一定の関連が認められたといい、私の成績とほぼ一致している。

次に佐藤等²⁰⁾、占部²¹⁾は、諸種液体培地中の発育状態により、抗酸性菌を分類乃至鑑別することは不可能であるといつているが、私の成績では Kirchner 培地における発育状態と SM 感受性との間には、岡・片倉培地上で見られたと同様に一定の関連があることを見出した。すなわち本培地での発育が「濁」、「膜」、「底」の順に漸次 SM に対する感受性の鈍い菌株が増加する傾向が見られた。次に供試菌に対する薬剤の感受性についてであるが、太田²²⁾は SM に対する非病原性抗酸性菌の原株感受性が最高 32 万倍、最低 4000~8000 倍であつたと報告しているが、これを私の場合と比較すると、5 日目判定の場合、最小発育阻止濃度は、 $10\gamma/\text{ml}$ (10 万倍) で、 $1\gamma/\text{ml}$ (100 万倍) で発育が阻止される菌株は認められず、又最高発育阻止濃度は $1000\gamma/\text{ml}$ (1000 倍) で $1\text{万}\gamma/\text{ml}$ (100 倍) で発育し得る菌株もなかつた。すなわち私の場合では 10 倍希釈法によつたので細かい濃度は現れていないが、以上の成績は太田のそれとほぼ一致するといえよう。堂野前²³⁾は、INAH の鳥型菌、チモテイ菌、スメグマ菌に対する感受性を測定した結果、最小発育阻止濃度を、それぞれ $15.6\gamma/\text{ml}$, $3.9\gamma/\text{ml}$, $62.5\gamma/\text{ml}$ とし

ているが、私の用いた鳥型株チモテイ株は、共に $10\gamma/\text{ml}$ で発育が阻止され、その他、此の濃度で感受性を有したものは 44 株中 9 株であり、 $1\gamma/\text{ml}$ で発育を阻止される菌株は SM の場合と同様認められず、又最高発育阻止濃度は $10\text{万}\gamma/\text{ml}$ であつた。最後に PAS についてであるが、Sievers²⁴⁾は、本剤の非病原性抗酸性菌に対する発育抑制力は殆んど認められないと報告している。私の実験においても 1 菌株のみが $1000\gamma/\text{ml}$ で発育を阻止されているが、残る 43 株は悉く $1\text{万}\gamma/\text{ml}$ 以上の濃度を要し、PAS の発育阻止力は本菌群に対し、極めて弱いという成績を得た。以上の如く、3 種薬剤の本菌群に対する発育阻止力は、比較的初期では、SM が最も有効であり、次で INAH が強いが、時日を経過してからの判定においてはかえつて INAH の抗菌力が強いという成績を得た。又これ等 3 種薬剤間における発育阻止濃度の間には全く関連がないことから、本菌群に対する INAH, SM, PAS の作用機序がそれぞれ独自なものであろうと想像される。

結 論

自然界及び結核患者から分離した 73 株の抗酸性菌について INAH, SM, PAS に対する感受性を測定し、これと他の細菌学的な性状とを対比して抗酸性菌の分類を試み、次の成績を得た。

- 1) 自然界抗酸性菌に対する PAS の発育阻止濃度は殆ど一定しているが、INAH, SM のそれは菌株により著しい差異がある。
- 2) 3 種薬剤の発育阻止濃度の間には、特異な関連がない。
- 3) SM に対する感受性と岡・片倉培地上における色調及び Kirchner 培地における発育状態の間には、一定の関連が認められる。
- 4) 諸培地上の発育状態、抗煮沸性、菌の形態の間には関連がない。

稿を終るに臨み、恩師金光教授の御懇篤なる御指導に深甚なる感謝の意を表す。又鳥型株、チモテイ株を御分与下さつた公衆衛生院微生物学部 染谷四郎部長に衷心より感謝する。

本論文の要旨の一部は、第 3 回結核病学会北海道地方会及び第 28 回結核病学会総会において発表した。

文 献

- 1) C.A.Frey & W.A.Hagan: J. Inf. Dis., 49:497, 1931.
- 2) 戸田他: 東京医事新誌, 2934: 1539, 昭11.
- 3) 占部: 福岡医科大学雑誌, 29: 3008, 昭11.
- 4) 佐藤他: 実験医学雑誌, 23: 215, 昭14.

- 5) H.Schlossberger u. W. Phannensteil: D.Med. Wschr. , 46 :1213,1920.
- 6) B.Lange: D.Med.Wschr. , 46 :1280,1920.
- 7) 占部:福岡医科大学雑誌, 29 :2942, 昭11.
- 8) 内藤:実験医学雑誌, 21 : 1065, 昭12.
- 9) 草場:レプラ, 9 : 779, 昭13.
- 10) R.E.Gordon: J.Bact. , 34 : 617,1937.
- 11) R.E.Gordon & W.A.Hagan: J.Bact. , 36 : 39, 1958.
- 12) G.Penso: Bacilles Tuberculeux et paratuberculeux. 1952.
- 13) Söhngen: Zbl.Bakt. , 37 : 191,1913.
- 14) 戸田:満洲医学雑誌, 7 : 67, 昭2.
- 15) 占部:福岡医科大学雑誌, 29 : 2902, 昭11.
- 16) 小川:結核菌検索の基礎と応用, 1951年.
- 17) 草場:レプラ, 9 : 625, 昭13.
- 18) 平本: J.Antibiotics, 12 : 658,1952.
- 19) 川村他: 昭和29年第29回結核病学会総会演説
- 20) 佐藤池: 実験医学雑誌, 23 : 489, 昭14.
- 21) 占部:福岡医科大学雑誌, 29 : 2854, 昭11.
- 22) 太田:結核, 24 : 224, 昭24.
- 23) 堂野前他: 臨牀, 5 : 460, 昭27.
- 24) Sievers: 臨牀, 4 : 368, 昭26より引用

