

抗酸性菌の分類に関する研究

第2編 抗酸性菌の耐熱性及びテルル酸

加里に対する感受性

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 9 月 21 日)

緒 言

前編¹⁾において私は、自然界抗酸性菌の諸種抗結核剤に対する感受性と細菌学的諸性状との関係について観察した成績を報告したが、本編では、更に抗酸性菌の耐熱性及びテルル酸加里に対する感受性を測定し、これと前編で得た薬剤感受性ならびに諸種培地上における発育状態との関係について報告する。

実験材料及び方法

1) 耐熱性の測定方法

菌株の耐熱性の測定に当り、均等の菌浮遊液を得るため Dubos²⁾培地を使用した。すなわち本培地に1週間乃至10日間培養せる菌を充分混和し、室温に一定時間放置して、比較的大きい菌塊が沈殿した後、Kirchner液をもつて、別に用意した濁度標準液(*per cc 1mg*の濃度)に濃度を合せ、この0.5cc 宛を沈降反応用の小試験管に移し、サーモスタットによつて耐熱性を測定した。実験に際しては、特に菌液が均等に加温されるように留意し、55°C、60°C、65°C、70°C、及び75°Cにおいて、それぞれ10分間加熱した後、その一金耳を4%グリセリンブイヨンに移植し、37°Cに5日乃至10日間培養して、菌の発育の有無により殺菌される温度を決定した。なおDubos培地に2週間培養しても菌の発育が所定の濃度に達しないものが数株あつたが、これ等はKirchner培地に培養し同様の方法により実験を行った。

2) テルル酸加里に対する感受性の測定方法

テルル酸加里(Potassium Tellurate)は、関東化学の製品を用いた。これを滅菌生理食塩水で種々の濃度に溶解させた後、その1ccにKirchner液1ccを加え、5%、4%、3%、2%、1%、及び0.5%の割合にテルル酸加里を含む2倍稀釈Kirchner培地の系列を調製した。これに*per cc*約1mgの濃度に菌を含むKirchner培地浮遊液の1一金耳宛を移植し、37°Cに10日培養した後、肉眼的観察により発育の有無を判定した。この際、テルル酸加里の濃度が高まるに従い、白色の沈澱を生ずるが、菌が発育すると、コロニーが本剤により黒変するので測定は可能である。

実験成績

1) 耐熱性と諸種培地上における発育状態との関係

前記の方法により、耐熱性を測定した結果、使用した73株中最高の耐熱性を示したものは、70°10分(以下いずれも10分間加熱を表わす)の1株(1.4%)であり、最底は55°の6株(8.2%)で、他はいずれもその中間に位している。その中60°が最も多く31株(42.7%)、65°が29株(39.7%)、70°が6株(8.2%)である。

次に耐熱性と諸種培地上における発育状態との関係を見ると、図Iに示す如く、岡・片倉培地、Kirchner培地、いずれの場合においても両者の間に特別な関係は認められなかつた。

2) テルル酸加里に対する感受性と諸種培地上における発育状態との関係

テルル酸加里に対する感受性を測定した成績は図4に示す如く、2%において発育を阻止されるものが最も多く39株(50.6%)で、3%が13株(18.6%)、4%が11株(15.7%)、1%が7株(15.1%)である。

次に菌のテルル酸加里感受性と、諸種培地における発育状態との関係を見ると図2の如くである。まず岡・片倉培地上におけるコロニーの色調との関係は、紅色系の菌株では、21株全部がテルル塩の2%の濃度で発育が阻止されるのに対し、橙色系の12株では、2%で7株、1%で3株、3%で2株が夫々発育を阻止され、紅色系に比較すると菌株により発育阻止濃度の幅がかなり広い。

次に黄色系では、2%で7株、3%で4株、4%、1%ではそれぞれ2株ずつ発育が阻止され、発育阻止濃度の幅は、紅、橙色系に比較すると更に増大し、感受性はやや低下している。更に白色系では、22株中9株が4%で初めて発育を阻止され、3%で7株、2%で4株、1%で2株がそれぞれ発育を阻止されている。また発育阻止濃度の幅は、黄色系とほぼ同程度で、テルル塩に対する感受性は着色系に比べて低い傾向がある。すなわち紅色系と白色系は、テルル酸加里に対し相反的性状を示し、黄・橙色系はその中間に位すると云える。この関係は、前編で観察したSM感受性と岡・片倉培地上における色

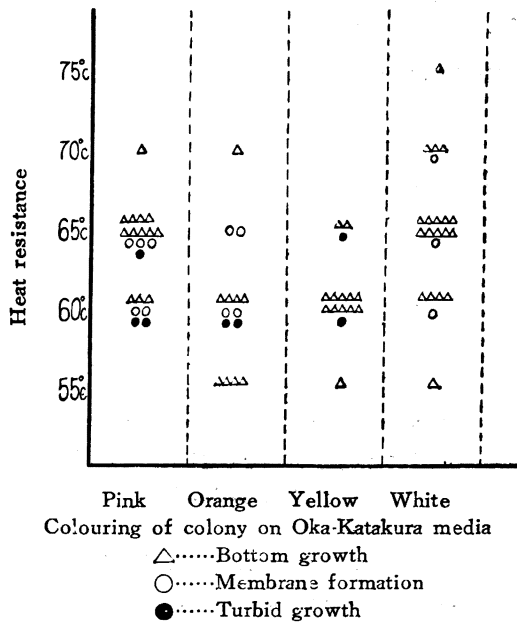


Fig. 1. Relations between heat resistance of acid-fast bacteria and their growth characteristics on solid and in liquid media.

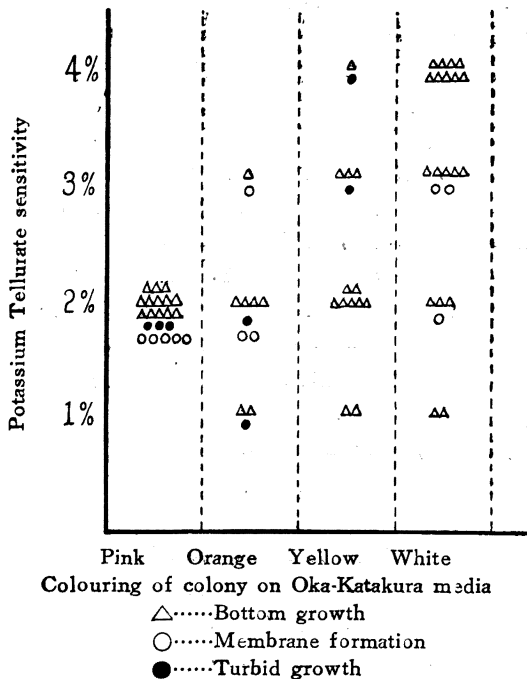


Fig. 2. Relations between Potassium Tellurate sensitivities of acid-fast bacteria and their growth characteristics on solid and in liquid media.

調との間の関係と類似しているので興味ある現象と思われる。次に Kirchner 培地における発育状態との関係であるが、一般に本培地で菌膜を形成する菌株は、テルル

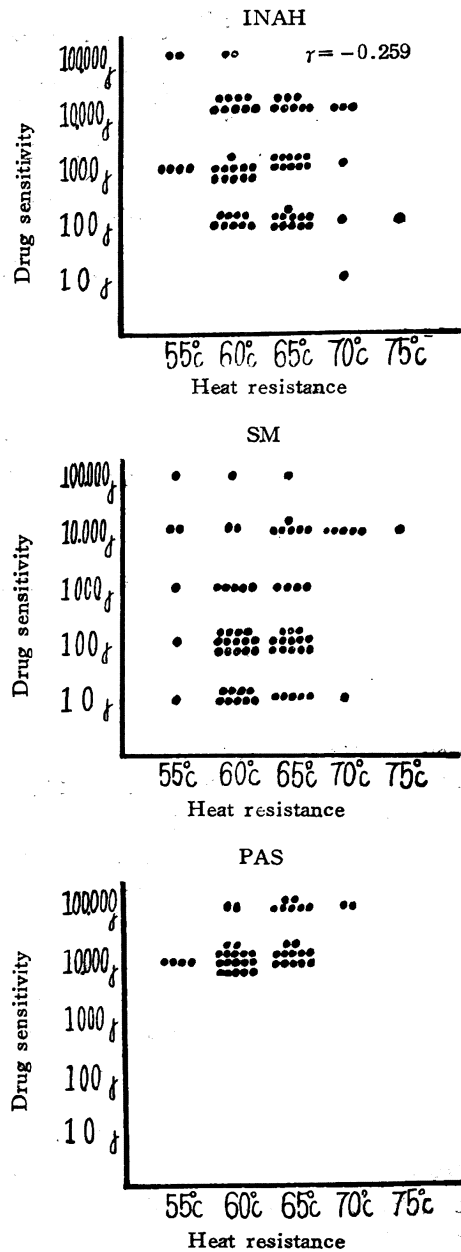


Fig. 3. Relations between sensitivities against antituberculosis agents and heat resistance of acid-fast bacteria.

酸加里に対し 2~3% の濃度で発育を阻止されるが、管底発育を呈するもの、及び平等濁濁するものではいずれも 1~4% の濃度で発育が阻止され、Kirchner 培地における発育状況とテルル酸加里に対する感受性との間にもある程度の間隔が認められる。

3) テルル酸加里感受性と耐熱性との関係

テルル酸加里感受性と耐熱性との間には、図 4 に示す如く、極めて顕著な関係が認められた。すなわちテルル酸加里に対し 1% の濃度で発育が阻止された 7 株におい

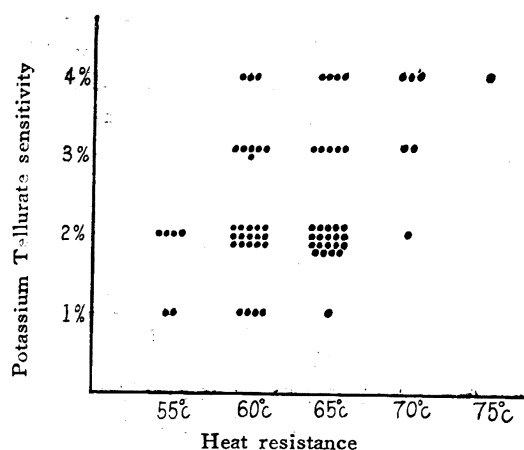


Fig. 4. Relations between Potassium Tellurate sensitivities and heat resistance of acid-fast bacteria.

ては、耐熱性は概して低い、テルル酸加里の発育阻止濃度が上昇するに従い、菌の熱に対する耐性度も上昇する傾向が見られ、両者の間に有意の順相関が認められる。

4) 耐熱性と抗結核剤に対する感受性と関係

以上の実験により自然界抗酸性菌の熱に対する耐性は菌株によつて異ると共に、テルル塩による発育阻止濃度との間に密接な関係のあることが明かにされたが、次にこの耐熱性と各菌株の諸種抗結核剤に対する感受性と関係を観察した。すなわち上述の実験で得た各菌株の10分間の加熱によつて殺菌される温度と、前編で測定したPAS, SM, 及び INAH によるそれぞれの菌株の発育阻止濃度との関係を相関図に表すと図3の如くである。まずPAS感受性と耐熱性との関係であるが、前編においても述べた如く抗酸菌は本剤に対し極めてよく且つ限定された濃度で発育が阻止されている関係上、両者の間には特別な関係は認められない。又SMの発育阻止濃度には菌株によりかなりの特異性が認められたにも拘らず、耐熱性との間には同様に特別な関係はない。これに対して INAH との関係を見ると、INAH による発育阻止濃度が低下するに従い耐熱性が上昇する傾向があり、軽度ではあもが両者の間に有意の負の相関が認められる。前編においてSM, INAH 及びPASが本菌群に対してそれぞれ作用機序を異にする如き成績を得たが、この事は、上述の耐熱性と薬剤感受性との関係からも明らかに認められ興味深い所見と思う。

5) テルル酸加里感受性と薬剤感受性との関係

前述の如く、テルル酸加里に対する感受性と岡・片倉培地上におけるコロニーの色調及びSM感受性と岡・片倉培地上におけるコロニーの色調の間には、それぞれ特定の傾向が認められたことから、テルル酸加里感受性と諸種薬剤感受性との間にも何等かの関係があるもの

と想像して観察したが、耐熱性の場合とは異りいずれの薬剤に対する感受性との間にも特定の関係は認められなかつた。

総括ならびに考按

従来、抗酸菌の耐熱性に関しては、Yersin⁴⁾, de Man⁵⁾, North & Park⁶⁾, 柳沢・井田⁷⁾, 太田原・市原⁸⁾, 太田・今野⁹⁾等多数の報告があるが、これらはいずれも結核菌乃至は鼠頸菌について行われたもので、自然界抗酸菌に関するものは比較的少い。私は73株の自然界抗酸菌について耐熱性を測定し、これと前編で報告した諸種培地上における発育状態ならびに薬剤感受性との関係を観察した。Gordon¹⁰⁾¹¹⁾は、331株の自然界抗酸菌を、耐熱性によつて2群に分類し、これと糖分解能、発育温度域及び発育状態との関係を考察しているが、全菌株中60°C 1時間の加熱で死滅するもの301株、これに耐えるもの30株を見出したと報告し、井上¹²⁾も各種の培地に培養した自然界抗酸菌7株について殺菌温度域を観察している。私の実験においては、上述の諸家と加熱温度及び時間が異なるのでその成績を直接に比較することは困難であるが、供試菌株の大部分は、10分加熱60~65°Cで殺菌され、最高は75°の1株で最低は55°の6株であつた。このように菌株により耐熱性に差異を生ずる原因として Edwards & Rettger¹³⁾は、菌のある種の酵素作用との関係を考察し、Kantorowicz¹⁴⁾は、菌が加熱されることにより、その細胞膜が破壊し、その結果代謝機構に異常を来して菌が死滅するといっている。又 Friedman & Henry¹⁵⁾は *B. mycooides* 等3株について、細菌胞子と繁殖細胞について結合水の量を測定し、結合水の量が多い程、その菌の胞子の耐熱性が高いといっているが、耐熱性の本質的な機構については未だ明らかにされていない。次に耐熱性と諸種培地上における発育状態との関係について、佐藤・井田¹⁶⁾は、抗酸菌の加熱及び冷却に対する抵抗力と Löwenstein 培地上におけるコロニーの発育形状との間には特に関係がないといっているが、私の実験において、岡・片倉培地及び Kirchner 培地を用いた場合でも同様に菌の発育状態と耐熱性との間には特定の関係を見出すことができなかつた。然しここで極めて興味を感じる事は、耐熱性と薬剤感受性との関係である。すなわちPasの本菌群に対する発育阻止作用は著しく弱く且つ菌株間の差が小さいので問題とならないが、本菌群のSMとINAHに対する感受性は共に菌株により著しく異なるに拘らず、SM感受性と耐熱性との間には何等関係を認めない。これに対し、INAHにおいては本剤に対する感受性が高い菌株程耐熱性も高く、両者の間に有意の関係が存在する事は、INAHとSMの作用機序の研究の上に意義のある所見と思われる。

次は本菌群のテルル塩に対する態度であるがCoper¹⁷⁾

は、テルル酸加里の結核菌に対する発育阻止作用からその化学療法剤としての価値を研究すると共に、結核菌が本剤を還元することを報告した。その後諸家^{19)~21)}により、本剤の殺菌作用と還元作用とが種々の細菌学的研究に应用されているが、最近、林²²⁾²³⁾、内藤²⁴⁾は各型結核菌及び非病原性抗酸菌が本剤に対し感受性を異にする事を応用して、菌株の鑑別を試みている。しかし以上の報告は、いずれも結核菌、あるいは結核菌と非病原性抗酸菌との鑑別が研究の主対象となっており、非病原性抗酸菌のテルル酸加里に対する感受性と他の細菌学的諸性状との関係を広く検討した報告は見ないようである。まずテルル酸加里の本菌群に対する発育阻止濃度は、私の成績では1~5%の間にあり、なかんづく2%の濃度で発育を阻止される菌株が最も多く見出された。林は、非病原性抗酸菌の集落発生率は、テルル酸加里の濃度が0.1%では58.1%、0.05%では89.2%に認めたといひ、内藤は、本剤が0.1%以下の濃度では本菌群の発育は阻止されないと報告し、いずれも0.1%以下では発育を認めている。私の場合は、テルル酸加里の濃度が0.5%以下で発育を阻止される菌株は見当らないのみならず、3%の濃度でも発育が阻止されない菌株が見出された。従来の研究では結核菌を対象とするものが多い為、多くの実験には低濃度のテルル塩が用いられているが、この成績によりテルル塩による自然界抗酸菌の発育阻止濃度は、結核菌に比べて著しく高い菌株のある事が証明された。次にテルル酸加里感受性と諸種培地上における発育状態との関係についてであるが、両者の間には密接な関係のあることがわかつた。すなわち岡・片倉培地上において紅色のコロニーを生ずる菌株は本剤に対して感受性が鈍く、且つすべての菌株が2%の濃度で発育が阻止されるのに対し、白色系では本剤に対する感受性が著しく強い菌株が多く、感受性の幅は広く、更に橙色系においては丁度両者の中間に位するという成績を得た。なお前編において、紅色系はSMに対する感受性が弱く、白色系は強く、黄・橙色系は両者の中間に位置している事を報告したが、テルル酸加里に対する感受性に関しても同様の菌株の配列が見られる事は興味深い。又一般にKirchner培地で菌膜を形成するものは、溷濁発育及び管底発育を示すものに比較すると、テルル酸加里に対する感受性において菌株特異性が強い傾向を認めた。しかしこの関係はテルル酸加里感受性と岡・片倉培地上における発育状態との間に認められた関係に比べると余り明瞭でない。最後にテルル酸加里感受性と耐熱性との関係であるが、テルル酸加里による発育阻止濃度の高い菌株程、耐熱性も高い傾向が見られ、両者の間にかなり密接な相関関係のある事を見出した。以上述べた如く、自然界抗酸菌においては、テルル酸加里感受性、耐熱性、諸種培地上における発育状況ならびに各種抗結核剤に対する

感受性との間にそれぞれの関係があるが、その中で特に本菌群の各種抗結核剤及びテルル塩に対する態度、更にこれと温度に対する抵抗性との間に見出された関係は本菌群を分類する上に新たな意義を有するものと考えられる。

結 論

73株の自然界抗酸性菌について、耐熱性及びテルル酸加里に対する感受性を測定し、これと前編の諸種培地上における発育状態、ならびにINAH, SM, PASに対する感受性とを対比して次の成績を得た。

1) テルル酸加里に対する感受性と岡・片倉培地及びKirchner培地上における発育状態との間には一定の関係が認められる。

2) INAHに対する感受性の高い菌株程耐熱性が高い傾向がある。然しこの関係は、SM及びPASでは認められない。

3) テルル酸加里感受性の高い菌株程耐熱性が低い傾向がある。

3) テルル酸加里感受性とPAS, SM, 及びINAH感受性との間には特定の関聯がない。

本論文の要旨は第28回日本結核病学会総会及び第4回日本結核病学会北海道地方会においてそれぞれ発表した。

稿を終るにのぞみ、恩師金光教授の御懇篤なる御指導に深甚なる謝意を表する。

文 献

- 1) 荒木：結核，30，19，昭30。
- 2) R. J. Dubos & G. Middlebrook：Am. Rev. Tbc., 56, 334, 1947.
- 3) G. Middlebrook：Bacterial and Mycotic Infections of Man, 1948.
- 4) A. Yersin：Ann. Inst. Past., 2, 63, 1888.
- 5) G. de Man：Archiv. f. Hyg., 18, 133, 1893.
- 6) C. E. North & W. H. Park：Am. J. Hyg., 7, 147, 1927.
- 7) 柳沢他：実験医学雑誌，19，137，昭10。
- 8) 太田原他：レブラ，7，167，昭11。
- 9) 太田他：レブラ，3，149，昭7。
- 10) R. E. Gordon：J. Bact., 34, 617, 1937.
- 11) R. E. Gordon & W. A. Hagan：J. Bact., 36, 39, 1938.
- 12) 井上：熊本医学会雑誌，10，1175，昭9。
- 13) O. F. Edwards & L. F. Rettger：J. Bact., 34, 489, 1937.
- 14) Kantrowicz：Bacterial Physiology, 1951より引用。

- 15) C. A. Friedman & B. S. Heny: J. Fact., 36, 99, 1938.
- 16) 佐藤他: 実験医学雑誌, 23, 489, 昭 14.
- 17) H. Cooper: J. Inf. Dis., 16, 47, 1915
- 18) 吉田: 十全会雑誌, 39, 1658, 昭 9.
- 19) 熊谷: 結核, 21, 第 20 回日本結核病学会講演要旨, 昭 17.
- 20) 志賀: 細菌会雑誌, 555, 249, 昭 17.
- 21) 志賀: 細菌学雑誌, 558, 373, 昭 17.
- 22) 林: 細菌学雑誌, 5, 441, 昭 25.
- 23) 林: 細菌学雑誌, 5, 445, 昭 25.
- 24) 内藤: 広島医学, 5, 379, 昭 27.