

抗酸性菌の分類に関する研究

第5編 抗菌性菌のコード形成

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 30 年 3 月 11 日)

(本論文の要旨は、第 30 回日本結核病学会総会および第 5 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。)

緒 言

前編^{1)~4)}において私は、自然界抗酸性菌の諸種薬剤に対する感受性、耐性上昇度、耐熱性、テルル酸加里感受性、諸種酵素作用、および他の一般細菌学的性状についてこれら各性状間の関係を観察した成績を報告したが、本編では、さらに Dubos 培地内における発育状態、およびコード形成の状況を調べ、これと前述の諸性状とを対比した成績を報告する。

実 験 方 法

Dubos 培地は、原法⁵⁾⁶⁾にしたがい調製した。本培地に、岡・片倉培地上に発育した菌の一片金耳を移植し、37°C で約一カ月にわたり、発育状況を観察した。各菌株の発育速度は培液の濁濁度を、別に調製した濁濁度標準液 (Per cc 5 *m.l* の濃度) と比較して、両者が同一濃度に達した時期をもつて決定した。コード形成の状態を観察するにあつては、斯様にして得られた Dubos 培養液から、毛细管ピペットにて 1~3 滴の菌をデツキグラス上に採り、そのままの状態 (普通行う塗抹操作は、菌のコード状排列を破壊する) 37°C ふらん器中で数時間乾燥後、Zihl-Neelsen 染色を施して鏡検した。

実 験 成 績

1) 自然界抗酸性菌の Dubos 培地における発育状態

Dubos 培地に自然界抗酸性菌を培養すると、早いものでは 3 日ですでに発育を完了するが、大部分の菌株は、5 日ないし 2 週間を要し、菌株による発育速度の差は、他の液体培地に比して著しい。又少数の菌株は静置したままでも、培地を平等に濁濁せしめるが、他の多くの菌株においては、管壁にそつた液面に輪状のコロニーを形成するもの、さらに薄膜状を呈するもの、管底発育を営むもののおよそ 3 通りの発育形態が見られる。しかし、これらは、いずれも軽く試験管を振盪することによつて均等に濁濁し、いわゆる Homogeneous culture を容易に得ることが出来た。この際、菌株により色素の形成は認められるが、その程度は、Kirchner 培地における場合と比較すると著しく弱い。

2) コード形成の状態

上述の如き方法により、被検菌のコード形成の状況を観察したところ、第 1 図に示すように全くコードを作らず、不規則な排列を示すものが 10 株 (14.3%) で、他の菌株は、いずれも強弱種々のコードを形成したこれらのものは、その程度によつて、およそ 4 つの段階に分けられ、全菌株を計 5 型に分類することが出来た。第 2 図は、2 週間の培養によつて得られ、最も弱いコードを作つた 1 例である。すなわち平行に排列した菌の集団は、さらに伸びて一つの大きな曲線を形成しており、本型 (A 型) に属するものは、14 株 (19.7%) である。

第 3 図は、同じく 2 週間培養の菌株であるが、前者と比較すると、菌体は一段と緻密に排列し、かつコードの幅は著しく細くなつており、Dubos 等のいう Serpentine cords の感じが強い。しかし総体的に見て菌の排列状況は、連続性に乏しく、本図でもおよそ 3~4 個の菌集団が見られる。本型 (B 型) に属するものは最も多く 21 株 (29.6%) である。第 4 図は、すでに培養 4 日にして得られたもので、菌体は、相互に密接な関連を保ちながら糸線状となり、その弯曲の状態は、あたかもなわをなつた感じを良く表しており、前型に比しコードの形成はさらに強い。この型 (C 型) に属するものは、16 株 (27.5%) である。さらに第 5 図は、3 週間の培養によつて得られたものであるが、全型中最も強いコードを形成した 1 例である。図にも明らかなように、緻密に排列して糸状を呈した菌が、鮮かな曲線をえがいて捻廻し、典型的なコード状態を現わしている。本型 (D 型) に属するものは比較的少なく 4 株 (5.6%) である。次に対照として人型結核菌について観察したが、第 6 図に見られるように、上記 4 型中、コード形成度の最も強い D 型と同様の排列状況を示した。

3) Dubos 培地における発育速度と岡・片倉培地におけるコロニーの色調との関係

前述の如く、自然界抗酸性菌の Dubos 培地における発育速度は、菌株によりかなりの差が認められるが、これを岡・片倉培地上におけるコロニーの色調と対比したところ、第 7 図 A) に示す如き成績を得た。まず紅色系の菌株を見ると 21 株中 17 株が 3~10 日で発育を完了し、Dubos 培地における発育速度は、有色系の中では最も早い。これに対し橙色系においては 4~20 日、黄色系で

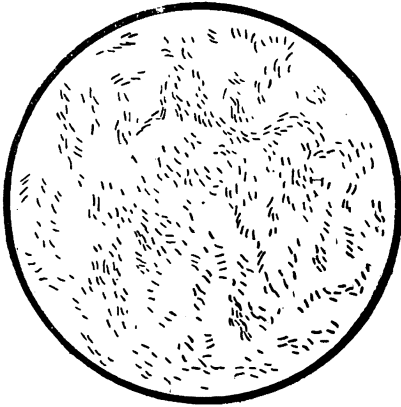


Fig. 1 Ziehl-Neelsen stained preparation of 3 week old culture of AT strain grown in Tween-albumin liquid medium. The bacilli showed no serpentine cords.



Fig. 4 Ziehl-Neelsen stained preparation of 4 day old culture of DY strain grown in Tween-albumin liquid medium. The bacilli are arranged parallel and form serpentine cords.

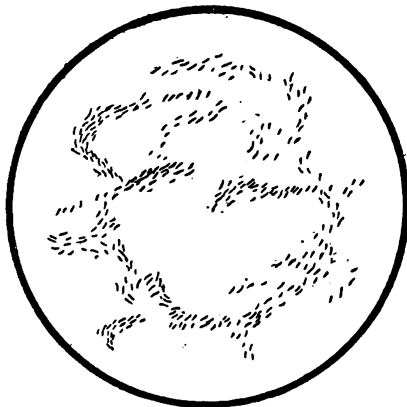


Fig. 2 Ziehl-Neelsen stained preparation of 2 week old culture of BE 2 strain grown in Tween-albumin liquid medium. The bacilli formed weak cords.

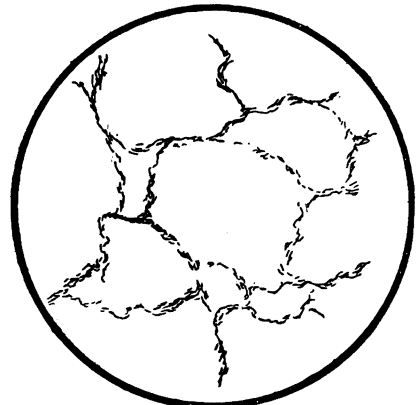


Fig. 5 Ziehl-Neelsen stained preparation of 3 week old culture of FG 2 strain grown in Tween-albumin liquid medium. The bacilli arranged in very dense and shows typical cord formation.



Fig. 3 Ziehl-Neelsen stained preparation of 2 week old culture of A 30 strain grown in Tween-albumin liquid medium. The cords are more dense than in Fig. 2.

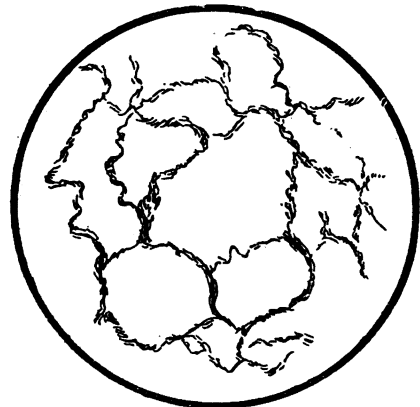


Fig. 6 Ziehl-Neelsen stained preparation of 3 week old culture of *M. tuberculosis* var. *hominis* grown in Tween-albumin medium. The bacilli showed typical cord formation.

は9~24日で、菌株による発育速度の幅は、紅色系と類似している。換言すると、着色系においては、紅、橙、黄の順序で発育速度が早い、白色系に属する菌株は、前3者のおよそ中間に位している。さらに本培地上で発育不能と見られる菌株は、ことごとく着色系に属している。

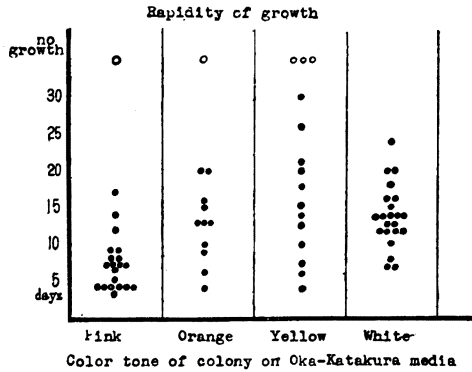


Fig. 7 A) Relations between rapidity of growth of acid-fast bacteria in Dubos media and their color tone of colonies grown on Oka-Katakura media.

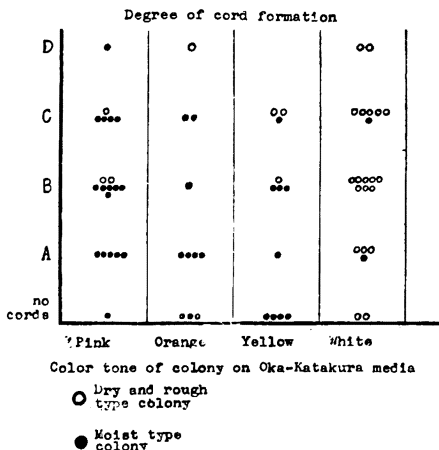


Fig. 7 B) Relations between degree of cord formation of acidfast bacteria and their growth characteristics on Oka-Katakura media.

4) Dubos 培地における発育速度とその他の性状との関係

前編¹⁾の諸種薬剤に対する感受性、耐性上昇度、耐熱性、テルル酸加里感受性、および諸種酵素作用と Dubos 培地における発育速度との関係を観察したが、いずれの場合にも特異な関連は認められない。

5) コード形成と岡・片倉培地における発育状態との関係

まずコロニーの色調とコード形成との関係であるが、第7図 B) に示す如く、黄色系菌株は、12株中4株

(30%) がコード形成性を全く欠いており、かつ、D型に属する菌株も認められないので、他の色調系に比べるとややコード形成性が弱い。これに対し、白色系では、22株中、B型、C型、D型に属する菌株が、それぞれ8、6、2株、計16株(72.7%)で、コードを作らないものおよびA型に属するものを合せて僅か6株(27.3%)に過ぎず、一般にコード形成の強い菌株が多く認められる。しかし以上の成績は、限局的にみられる所見であり、コード形成性とコロニーの色調の間には、特別な関係はないと思われる。

又、岡・片倉培地上で乾燥性のコロニーを生ずる菌株は、同図に見る如く、紅色系が3株、橙色系が1株、黄色系が1株、白色系が20株である。これら各菌株のコード形成状況を見ると、紅、橙、黄の各着色系では、いずれもB型より強い型に属し、白色系においても同様、大多数の菌株は、B型、C型、およびD型に属している。これは本培地上で乾燥性のコロニーを生ずる菌株は、一般に強いコードを作ることを明らかに示している。一方湿潤性のコロニーを生ずる菌株の場合について見ると、D型に属するものは僅か紅色系の1株であり、かつ着色系において、コード形成性を全く欠く菌株が比較的多く見られる。しかし強いコードを形成する菌株もかなり認められるので、この際には、湿潤性のコロニーを生ずる菌株が、弱いコードを作るとは、必ずしも言えない。

6) コード形成とカタラーゼ作用との関係

コード形成の状態と、前報で得たカタラーゼ作用との間には密接な関係のあることを知った。その成績は、第8図 A) に示す通りであるが、まず全くコードを作らない菌株のカタラーゼ作用は、すべて16~128倍の間において陽性となつており、活性度は全菌株中最も強い。又、A型では、2~256倍の間でほとんど同数宛の菌株が見られ、前者に比較するとカタラーゼ作用はやや減弱し、

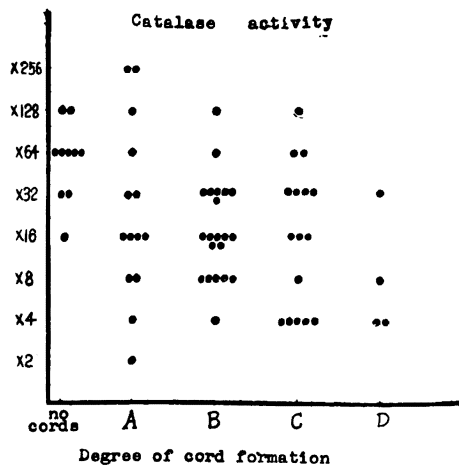


Fig. 8 A) Relations between degree of cord formation of acid-fast bacteria and their catalase activities.

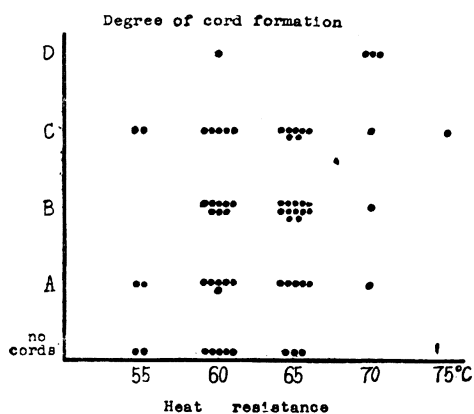


Fig. 8 B) Relations between degree of cord formation of acid-fast bacteria and their heat resistance.

かつ、菌株による活性度の差異が著しい。さらにB型に属するほとんどの菌株は、8~32倍陽性で、本作用は一層低下し、以下C、D型となるに従い、カタラーゼ活性度は増々減弱し、殊にD型では、64倍以上で陽性の菌株は全く見られない。以上のように本菌群においては、コード形成性が強大となるに伴ってカタラーゼ作用は、かえって低下する傾向が見られ、両者の間には負の相関が認められる。

7) コード形成と耐熱性との関係

第7図B)には、コード形成と耐熱性との関係を表わした。全くコード形成性を欠く菌株の殺菌温度を見ると、55~65°Cの間にあり、耐熱性は一般に低い。又A型でも55~65°Cで殺菌される菌株の数は、前者とほぼ同様であるが、70°Cの1株が見られ、B型では、温度はすべて60°C以上となり、耐熱性は、前2者に比較すると著しく高い。次にC型では55~75°Cの間に広く分布しており、耐熱性は菌株によつてかなり異なるようであるが、D型では、大多数が70°Cで殺菌され、大体においてコード形成性の強い菌株程耐熱性も高い傾向が認められる。以上の成績から、本菌群においては、コード形成性と岡・片倉培地上における集落の乾湿性、カタラーゼ作用、および耐熱性との間に、それぞれ密接な関係のあることが明らかとなつた。

8) コード形成とその他の性状との関係

前編と同様にコード形成性と抗煮沸性、テルル酸加里感受性、薬剤感受性、耐性上昇度、乳酸および琥珀酸脱水素酵素作用、およびKirchner培地における発育状況との関係を観察したが、いずれの場合においても特別な関係は見られなかつた。

総括および考案

Dubos, Pierce, Middlebrook⁷⁾⁸⁾は、結核菌およびB.C.G.が、Tween-albumin含有培地内で特異なコー

D状排列 (Serpentine cords) を呈して発育することを報告したが、その後、Bloch およびそのI派^{9)~12)}は、コード形成因子について詳細な研究を行い、Dubos等⁷⁾¹³⁾ Yegian, Budd¹⁴⁾は、この排列形態と菌の病原性との関係を論じている。さらにRichmond¹⁵⁾は、Radishより分離の非病原性抗酸菌および *M. phlei* にコード形成性を認め、藤田¹⁶⁾¹⁷⁾は、自然界抗酸菌を含めた各型抗酸菌のコード形成の状況をS.C.法によつて観察している。しかしながら、多数の非病原性抗酸菌のコード形成の状態をTween-albumin培地によつて観察した研究は未だないようである。私は、約70株の自然界抗酸菌をDubos培地に培養し、かかる特異な排列形態の状況を観察し、これと前編で得た薬剤感受性、耐性上昇度、テルル酸加里感受性、耐熱性、諸種酵素作用、抗煮沸性、および諸種培地上における発育状況とを対比してコード形成性が、抗酸菌を分類する上に有効な因子となるか否かを検討した。前述のように、自然界抗酸菌は、Dubos培地内において、およそ3型の異なつた発育形態を示すが、いずれも容易に均等な培養を得ることが出来た。これは本培地中に含まれるTween 80が影響するためであると考えられるが、このことに関し、Dubos等¹⁸⁾は、Tween 80がlipophilおよびhydrophilの両性を有し、これが菌を親水的とし、さらに菌の発育を促進させるためであると述べている。しかし本菌群中には、1カ月の培養によつても培地の潤湿度が一定に達しない数種の菌が認められた。これらのものは、おそらく本培地内で発育が不可能であると考えられるが、かような現象を呈した菌株が悉く着色系に属することは、本菌群の色素形成性とTween 80および血清albuminとの間に何等かの関係のあることが想像される。藤田¹⁶⁾¹⁷⁾は、各種抗酸菌のコード形成性をその程度によつて、強いものより順に、1, 2, 3, 4型と、4群に分類しているが、自然界抗酸菌10株は、2型に2株、3型に5株、4型に3株宛属し、第1型に属する菌株は認められない旨を報告している。私の成績では、同時に観察した対照結核菌と同程度の強いコードを形成した菌株が、全体の5.6%の割に見出された。さらに藤田は、鳥型株が2型と4型にそれぞれ認められると云い、Richmond¹⁵⁾は、*M. phlei*にコードの出現を観察しているが、私の場合では、鳥型株は、最も強いコードを作つたD型に、*M. phlei*はC型に属した。以上の成績から、抗酸菌におけるコード形成は、必ずしも結核菌およびB.C.G.に特有なものでなく、非病原性と想像される自然界抗酸菌中にも、結核菌と同程度の強いコードを形成する菌株の存在することが明らかとなつた。次にコード形成の状態を他の種々なる性状と対比したところ、コード形成性と岡・片倉培地上におけるコロニーの乾湿性、カタラーゼ作用、および耐熱性との間にそれぞれ興味ある関係が認められた。占部¹⁹⁾

は、非病原性抗酸菌および結核菌の発育形式について詳細な研究を行い、単個菌の発育相がコロニーの湿潤性と一定の関係があることを報告し、藤田¹⁵⁾も又、抗酸菌のコード形成は、集落形態がR型のものに主として出現すると述べているが、両氏は抗酸菌の発育形式をそれぞれ異つた観点から観察し、いずれも発育形式と集落の形態との間に一定の関係があることを明らかにしている。私の成績では、岡・片倉培地上で乾燥性のコロニーを生ずる菌株は、いずれも比較的強いコードを形成し、白色系においても大多数の菌株に、より強いコードの出現が見られ、藤田と類似の成績を得た。戸田²⁰⁾広木²¹⁾等は、人型結核菌のカタラーゼ作用は、自然界抗酸菌のそれに比して微弱であると述べ、Dubos 等⁷⁾ Yegian¹⁴⁾は、病原性の強い菌株程、コード形成が著明であることを報告している。私の実験で、カタラーゼ作用の強い菌株は、コード形成性が弱いことを知つたが、これは上記諸家の成績と合せ考えると、極めて興味ある所見と思われる。又諸種酵素作用中、カタラーゼ作用だけがコード形成性と特定の関係を有することは、コード形成の因子を研究する上に注目すべき事実といえよう。次に、コード形成と耐熱性との関係については、菌株により可成の差異があるが、大体において温熱に対して抵抗性の強い菌株は、コード形成性が弱い傾向を示した。前編⁴⁾でカタラーゼ作用と耐熱性との間には特定の関係があることを報告したが、さらに以上の成績により、自然界抗酸菌のコード形成性とカタラーゼ作用および耐熱性の3者の間には菌の発育と代謝の上に特異な関係のあることが想像される。又、前編²⁾において耐熱性の高い菌株程、テルル酸加里感受性が高いという成績を得たので、テルル酸加里感受性とコード形成の強弱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、両者の間に特定の関係が見られなかつた。さらにコード形成性と Kirchner 培地における発育状況、抗煮沸性、薬剤感受性、耐性上昇度との間においても特異な関係を認めることは出来なかつた。私の実験では抗酸菌の病原性を検していないので、コード形成能と病原性との関係は明らかでない。しかし上述の如く、コード形成能およびその程度と他の細菌学的諸性状との間にそれぞれ特異な関係が存在している点より、抗酸菌の分類上コード形成は有力な標識となるものと思う。

結 論

自然界抗酸菌を Dubos 培地に培養し、発育速度およびコード形成の状態を観察し、前報で得た諸性状と対比して次の成績を得た。

1) Dubos 培地における発育速度と岡・片倉培地上におけるコロニーの色調との間には、一定の関係が認めら

れる。

2) 全菌群をコード形成の状況によつて分類し、本菌群中には人型結核菌と同程度の強いコード形成を営むものが存在する事を認めた。

3) 一般に岡・片倉培地上で乾燥性のコロニーを生ずる菌株にコード形成が著明である。又コード形成性とカタラーゼ作用、および耐熱性との間には、それぞれ特異な関係が認められる。

4) コード形成性と薬剤感受性、耐性上昇度、抗煮沸性、テルル酸加里感受性、脱水素酵素作用、および Kirchner 培地における発育状態との間においては、特定の関係がない。

稿を終るにあたり、恩師金光教授の終始御懇篤なる御指導に対し、深甚なる謝意を表する。

文 献

- 1) 荒 木: 結核, 30, 19, 昭 30.
- 2) 荒 木: 結核, 30, 81, 昭 30.
- 3) 荒 木: 結核, 30, 220, 昭 30.
- 4) 荒 木: 結核, 30, 303, 昭 30.
- 5) G. Middlebrook: *Bacterial and Mycotic Infections of Man*, 1948.
- 6) R. J. Dubos & G. Middlebrook: *Ame. Rev. Tbc.*, 56, 334, 1947.
- 7) G. Middlebrook, R. J. Dubos & C. J. Pierce: *J. Exp. Med.*, 86, 175, 1947.
- 8) R. J. Dubos & G. Middlebrook: *J. Exp. Med.*, 88, 81, 1948.
- 9) H. Bloch: *J. Exp. Med.*, 88, 355, 1948.
- 10) H. Bloch: *J. Exp. Med.*, 91, 197, 1950.
- 11) H. Bloch, E. Sorkin & H. Erlenmeyer: *Ame. Rev. Tbc.*, 67, 629, 1953.
- 12) H. Bloch & H. Noll: *J. Exp. Med.*, 97, 1, 1953.
- 13) R. J. Dubos: *Bact. Rev.*, 12, 173, 1948.
- 14) D. Yegian & V. Budd., *Ame. Rev. Tbc.*, 68, 557, 1953.
- 15) L. Richmond & M. M. Cummings: *Ame. Rev. Tbc.*, 62, 632, 1950.
- 16) 藤 田: 結核, 27, 409, 昭 27.
- 17) 藤 田: 結核, 28, 173, 昭 28.
- 18) R. J. Dubos, B. D. Davis, G. Middlebrook & C. J. Pierce: *Ame. Rev. Tbc.*, 54, 204, 1946.
- 19) 占 部: 福岡医科大学雑誌, 29, 2983, 昭 11.
- 20) 戸 田: 満洲医学雑誌, 7, 67, 昭 2.
- 21) 広 木: 満洲医学雑誌, 23, 769, 昭 10.