

抗酸性菌の試験管内病原性試験に関する研究

第2報 諸種実験条件の影響の検討

松 尾 仁

鳥取大学医学部細菌学教室 (主任 高木篤教授)

受付 昭和31年7月11日

緒 言

実験成績

第1報¹⁾において著者は Dubos-Middlebrook²⁾, Desbordes³⁾, Wilson⁴⁾ の3反応を諸種の抗酸性菌および非抗酸性菌について観察した結果の比較検討と、それらの反応と動物実験成績の対比を報告したが、第2報として各種培地に発育した菌によるこれらの反応の差、殺菌処置を加えた菌と然らざる菌との反応の差、陳旧培養菌と新鮮培養菌との反応の差等を検討した結果を報告する。日本においてもこれらの反応の追試を行つた結果の発表⁵⁾がなされているが、その結果は必ずしも著者の成績と一致していない点もある。

実験材料および実験方法

A) 使用菌株

1) 各種培地発育の菌の Dubos, Desbordes, Wilson 3反応における差異を調べるには、教室保存の抗酸性菌のうち、第1報に述べたモルモット脳内接種毒力試験に使用した牛型菌9株、同鳥型菌6株を Petragrani, 小川, 岡・片倉の各固型培地, Kirchner, Sauton 各液体培地に3~4週培養した菌を用いた。

2) 紫外線照射死菌, 加熱死菌, 陳旧培養菌と新鮮培養菌の比較の観察にはいずれも Petragrani 培地3~4週培養の, 人型菌5株, 牛型菌はBCGを含めて12株, 鳥型菌10株, 非病原性抗酸性菌16株を使用した。

B) 実験方法

Dubos, Desbordes, Wilson 3反応の実施方法は第1報¹⁾に詳しく述べたので省略する。

紫外線照射死菌は白色磁製の絵皿の径20mm, 深さ5mmの凹みの中において, 新鮮被検菌ほぼ5mgをpH7.2 Phosphate buffer 1滴をもつてできるだけ細かくツマ楊子を用いて碎き拡げて, 15Wのマツダ殺菌燈で15cmの距離より2時間照射して実験に供した。

加熱死菌は, 新鮮被検菌を試験管に移し, 100°C, 1時間 Koch 釜にて加熱して殺菌したものを使用した。

新鮮菌は培地上に3~4週培養のものを使用し, 陳旧培養菌は培地上に5~6ヵ月以上発育したものを実験に供した。

A) 培地による菌の反応の強さの差

1) Dubosの反応においては, 表1に見るように, 固

表1 Dubosの反応

菌株	培地	Petra-	小川	岡・片倉	Kir-	Sauton
		gnani			c-hner	
牛 型 菌	伝 研	卅	卅	卅	卅	卅
	1	卅	卅	卅	卅	卅
	2	卅	卅	卅	卅	卅
	3	-	-	-	-	-
	10	卅	卅	卅	卅	卅
	261	卅	卅	卅	卅	卅
鳥 型 菌	M D	-	-	-	-	-
	三輪	卅	卅	卅	卅	卅
	仙台	卅	卅	卅	卅	卅
	獸鳥	+	+	卅	+	+
鳥 型 菌	A 62	卅	卅	卅	+	+
	A 71	-	-	-	-	-
	A3171	-	-	-	-	-
	A4121	-	-	-	-	-
	竹尾	-	-	-	-	-

型培地間には, 牛261株が Petragrani, 小川両培地において(卅)であるのに対し, 岡・片倉培地において(+), 仙台株が Petragrani(卅), 小川, 岡・片倉両培地(H), また獸鳥株が Petragrani, 小川(+)で, 岡・片倉(+)となつている他に著しい差を認めない。一方液体培地においては固型培地に比し全般的にかなり反応の弱い傾向が見られる。すなわち牛型菌において固型培地において(卅)で液体培地(卅)の数が見られ, ことに Sauton 培地の方が弱い。鳥型菌も固型培地(卅)であるものも液体培地(+)である。しかしながら両型を通じて, 陽性, 陰性の入れ替つているような現象は固型培地間, あるいは液体培地間, また固型液体両培地間にも認められない。

2) Desbordesの反応も Dubosの反応とほとんど同様の結果が見られる(表2)。すなわち固型培地間に多少の差を認めるのみであり, 液体培地, ことに Sauton 培

表 2 Desbordes の反応

菌株	培地	Petra-	小川	岡・片倉	Kir-	Sauton
		gnani			chner	
牛型菌	伝 研	≡	≡	≡	≡	≡
	1	≡	≡	≡	≡	≡
	2	≡	≡	≡	≡	≡
	3	-	-	-	-	-
	10	≡	≡	≡	≡	≡
	261	≡	≡	≡	≡	≡
	M D	-	-	-	-	-
鳥型菌	三輪	≡	≡	≡	≡	≡
	仙台	≡	≡	≡	≡	≡
	獣鳥	+	≡	≡	+	+
鳥型菌	A 62	≡	≡	+	+	+
	A 71	-	-	-	-	-
	A3171	-	-	-	-	-
	A4121	-	-	-	-	-
	竹尾	-	-	-	-	-

地において反応が弱く、陽性、陰性の転換は認められない。

3) Wilson の反応は Sodium benzenoneindophenol Sodium benzenoneindo-3'-chlorophnol, Sodium 2,6-dibromobenzenoneindophenol の3酸化還元色素について実施したが、3色素の実験結果に著変がないので Sodium benzenoneindophenol についての結果のみを表示した(表3)。牛型菌においては固型培地間にそれほど差

表 3 Wilson の反応 (Sodium benzenoneindophenol)

菌株	培地	Petra-	小川	岡・片倉	Kir-	Sauton
		gnani			chner	
牛型菌	伝 研	≡	≡	≡	+	≡
	1	≡	≡	≡	≡	≡
	2	≡	≡	≡	≡	≡
	3	≡	≡	≡	+	+
	10	≡	≡	≡	+	≡
	261	≡	≡	≡	+	≡
	M D	≡	≡	≡	+	+
鳥型菌	三輪	≡	≡	+	+	≡
	仙台	≡	≡	≡	+	+
	獣鳥	≡	≡	≡	≡	≡
鳥型菌	A 62	≡	≡	≡	+	≡
	A 71	-	≡	≡	≡	≡
	A3171	-	+	+	+	+
	A4121	-	≡	≡	≡	≡
	竹尾	-	+	≡	≡	≡

異はなく、しかも Dubos, Desbordes 両反応陰性の牛型 3, MD 両株は固型培地は、いずれの固型培地についても他の株よりも脱色が強い。液体培地においては明らか

に脱色が固型培地に比し高度で、Kirchner 培地の方がより強く脱色している。鳥型菌においては Petragrani 培地を除き全般的に液体培地の方が僅かながら固型培地よりも脱色が明らかに強く、株による差もよく現われている。

B) 殺菌処理菌と生菌の反応の差

1) 紫外線照射死菌と生菌の比較

表4の1に見られるように、人型菌、牛型菌において

表 4 の 1 紫外線照射死菌と生菌の比較(1)

菌株	反応	Dubos		Desbordes		Wilson	
		生菌	死菌	生菌	死菌	生菌	死菌
人型菌	人 F	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	松本	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	船岡	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	青山B	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	H ₃₇ Rv	≡	≡	≡	≡	≡	≡
牛型菌	BCG	+	+	+	+	≡	≡
	伝 研	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	1	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	2	≡	≡	≡	+	≡	≡
	3	-	-	-	-	≡	≡
	10	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	261	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	R-14	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	R M	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	M D	-	-	-	-	≡	≡
鳥型菌	三輪	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	仙台	≡	≡	≡	≡	≡	≡

は、Dubos, Desbordes 両反応は死菌の方が多少反応が弱まっている株が約半数ある。反対に死菌の方が反応が強まっているようなものが牛型菌に2株見られる。しかし生菌陽性で死菌陰性というような株は見られない。一方 Wilson の反応は全くといっていいほど生菌死菌に差

表 4 の 2 紫外線照射死菌と生菌の比較(2)

菌株	反応	Dubos		Desbordes		Wilson	
		生菌	死菌	生菌	死菌	生菌	死菌
鳥型菌	獣鳥	+	≡	+	≡	≡	≡
	A 62	≡	+	≡	+	≡	≡
	A 71	-	-	-	+	-	≡
	A3171	-	-	-	-	-	≡
	A4121	-	+	-	+	+	≡
	T B13	-	-	-	-	-	≡
	竹尾	-	-	-	-	-	≡
	鳥京	-	-	-	-	+	≡
	獣疫	-	+	-	+	-	≡
	獣調	-	-	-	-	+	≡

表 5 の 2 加熱死菌と生菌の比較(2)

菌株	反応	Dubos		Desbordes		Wilson	
		生菌	死菌	生菌	死菌	生菌	死菌
鳥型菌	獸鳥	+	+	+	+	+	+
	A 62	+	+	+	+	+	+
	A 71	-	+	-	+	-	+
	A3171	-	-	-	-	-	-
	A4121	-	+	-	+	+	+
	T B 13	-	-	-	-	-	+
	竹尾	-	-	-	-	-	-
	鳥京	-	-	-	-	+	+
	獸疫	-	+	-	+	-	+
	獸調	-	-	-	-	+	+
非病原性抗酸性菌	木戸黄	-	-	-	-	+	+
	木村II	-	-	-	-	+	+
	920 (1)	+	+	+	+	-	+
	920 (2)	+	+	+	+	+	+
	B102A	-	-	-	-	-	-
	S 50 B	-	-	-	-	-	-
	Duval	-	-	-	-	-	-
	長崎ケド ロフスキ	-	-	-	-	+	+
	549 肋膜滲 出液(黄)	-	+	-	+	+	+
	肋膜滲 出液(赤)	-	+	-	+	-	+
H 麦	-	+	-	+	-	+	
チモテー	-	-	-	-	+	+	
S 578	-	-	-	-	+	+	
人非	-	+	-	+	+	+	
学非	-	-	-	-	-	-	

が見られない。

しかるに鳥型菌および非病原性抗酸性菌においては表 4 の 2 に見られるように Dubos, Desbordes 両反応が生菌死菌に多少差があるもの他に生菌陰性, 死菌陽性に転じている数株が目される。Wilson の反応は表に見るように死菌においては生菌に有していた脱色力の消失しないしは低下をきたしているものがほとんどである。

2) 加熱死菌と生菌の比較

人型菌, 牛型菌, 鳥型菌, 非病原性抗酸性菌とも, 3 反応においてほぼ紫外線照射死菌の場合と同様な結果をえている (表 5 の 1 および 2)。BCG は Dubos, Des-

表 5 の 1 加熱死菌と生菌の比較(1)

菌株	反応	Dubos		Desbordes		Wilson	
		生菌	死菌	生菌	死菌	生菌	死菌
人型菌	人 F	+	+	+	+	+	+
	松本	+	+	+	+	+	+
	船岡	+	+	+	+	+	+
	青山B	+	+	+	+	+	+
	H ₃₇ Rv	+	+	+	+	+	+
牛菌	BCG	+	+	+	+	+	+
	伝研	+	+	+	+	+	+
	1	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+
	3	-	-	-	-	+	+
	10	+	+	+	+	+	+
	261	+	+	+	+	+	+
	R-14	+	+	+	+	+	+
	R M	+	+	+	+	+	+
	M D	-	-	-	-	+	+
三輪	+	+	+	+	+	+	
仙台	+	+	+	+	+	+	

bordes 両反応において死菌の方がやや強く反応が出ており, 紫外線照射死菌の場合と異なっている。

3) 陳旧株と新鮮株の比較

表 6 の 1 に見るように, 人型菌, 牛型菌ともに新鮮培養菌と陳旧培養菌との間に Dubos, Desbordes 両反応において数株多少成績不一致が認められるが, 新鮮菌が一般に強いとか, 陳旧菌が一般に強いといった関係は見られず, また陽性, 陰性の転換も見られない。Wilson の反応においても脱色力の差は認められない。鳥型菌,

表 6 の 1 陳旧株と新鮮株の比較(1)

菌株	反応	Dubos		Desbordes		Wilson	
		新鮮	陳旧	新鮮	陳旧	新鮮	陳旧
人型菌	人 F	+	+	+	+	+	+
	松本	+	+	+	+	+	+
	船岡	+	+	+	+	+	+
	青山B	+	+	+	+	+	+
	H ₃₇ Rv	+	+	+	+	+	+

牛 型 菌	BCG	+	+	+	+	##	##
	伝研	##	##	##	##	##	##
	1	##	##	##	##	##	##
	2	##	+	##	+	##	##
	3	-	-	-	-	##	##
	10	##	+	##	+	##	##
	261	+	##	+	##	##	##
	R-14	##	+	##	+	##	##
	R M	##	##	##	##	##	##
	M D	-	-	-	-	+	+
三輪台	##	+	##	##	##	##	
仙	+	##	+	##	##	##	

表 6 の 2 陳旧株と新鮮株の比較(2)

菌株	反応	Dubos		Desbordes		Wilson	
		新鮮	陳旧	新鮮	陳旧	新鮮	陳旧
鳥 型 菌	獸鳥	+	+	+	+	+	##
	A 62	+	+	+	+	##	##
	A 71	-	-	-	-	-	+
	A3171	-	-	-	-	-	+
	A4121	-	-	-	-	+	+
	T B13	-	-	-	-	-	+
	竹尾	-	-	-	-	-	##
	鳥京	-	-	-	-	+	+
	獸疫	-	-	-	-	-	##
	獸調	-	-	-	-	+	+
非 病 原 性 抗 酸 性 菌	木戸黄	-	-	-	-	+	+
	木村II	-	-	-	-	+	+
	920 (1)	+	+	+	+	-	##
	920 (2)	+	+	+	+	+	##
	B102A	-	-	-	-	-	##
	S 50 B	-	-	-	-	-	##
	Duval	-	-	-	-	-	##
	長崎ケ ロフスキ	-	-	-	-	+	##
	549	-	-	-	-	-	##
	肋嚙滲 出液(黄)	-	-	-	-	+	##
	肋嚙滲 出液(赤)	-	-	-	-	-	##
	H 麦	-	-	-	-	-	+
	チモテー	-	-	-	-	+	##
	S578	-	-	-	-	+	##
	人非	-	-	-	-	##	##
学非	-	-	-	-	-	+	

非病原性抗酸性菌は新鮮培養菌も陳旧培養菌も Dubos, Desbordes 両反応にほとんど差はないが, Wilson の反応は陳旧培養において, ほとんど全株脱色力の低下ないしは消失を現わしている。

考 案

1) 培地によるこれらの反応の差について考察すると, 牛型菌, 鳥型菌ともに Dubos, Desbordes 両反応は固型培地間に著しい差がないことより, 固型培地成分の差はこれらの反応にあずかる菌体物質にそれほど影響を与えるものでないことが示唆される。液体培地において反応が弱いことは従つて固型培地との成分の差が影響するものと考えねばならないが, 果して如何なる物質が如何ように働いているかは興味ある問題であろう。ことに無蛋白培地である Sauton 培地が最も弱いことは注目される。しかし Dubos, Desbordes 両反応の実施は, 菌株による差が強くなるという見地において, 固型培地ことに Petragrani 培地上に発育した菌によるのがよいと考えられる。

Wilson の反応は固型培地よりも液体培地の方が強毒の牛型菌においても脱色がかなり強く, かつ株によつてその差が明瞭に出難いから, 固型培地によるのが無難である。鳥型菌においても Petragrani を除いて液体培地の方が脱色の強い傾向を示している。Petragrani 培地は他の固型培地, 液体培地よりも鳥型菌の脱色が明瞭に現われている。したがつて Wilson の反応も Petragrani 培地によるのが牛型菌, 鳥型菌の差も, 菌株による差もよく現わし, 最もよいと思われる。

2) 紫外線照射死菌は人型菌, 牛型菌において Dubos, Desbordes 両反応が死菌に多少弱く反応がでる株があるが著しい差は認められぬのでこの両反応は紫外線によつて破壊されない物質が関与するものと考えられるが, やはり明瞭に反応を判定する上からは生菌によるのがよいと思われる。人型菌, 牛型菌についての, Wilson の反応は生菌死菌間に差がないが, これは生菌も脱色力が非常に弱いか, ほとんどないのであるから紫外線によつて酵素系の破壊を受けたとしても差が現われないのは当然である。しかるに牛 3, 牛 MD 両株は生菌, 死菌ともに (++) で変化がみられないことは鳥型菌, 非病原性抗酸性菌が照射死菌の場合に明らかに脱色力が低下することと一致せず, 矛盾した結果といえる。しかしながら鳥型菌の中にも 1~2 株は照射によつても脱色力の低下を見ないものもあつた。これらの菌株では酸化還元酵素系の紫外線抵抗性が特に強い条件にあつたのかも知れない。

鳥型菌, 非病原性抗酸性菌においては Dubos, Desbordes 両反応とも, 生菌において陽性のもののうち死菌の方がやや強い反応を示すものも認められ, また生菌において陰性の株で死菌の方に弱いながらも陽性にできるものが数株が見られる。これはあるいは生菌において反応陰性に出るように働いていた物質が破壊されたことによるものではないかと想像される。Wilson の反応は生菌において有していた脱色力が死菌に消失ないし低下しているが, やはり酵素系の破壊によるものであろう。

3) 加熱死菌においては 3 反応各個についてもまた菌

株毎の考察でもほぼ紫外線照射死菌と同じような結果をえているので、意義についても同様に考えられる。

したがって殺菌処置を加えた菌体による実験について総合すると、人型菌および牛型菌対、鳥型菌および非病原性抗酸性菌の差が明瞭でかつ菌株の差がはつきり現われるので実際面の検査実施には生菌による方がよいと考えられる。

4) 5ヵ月以上の陳旧培養菌については、人型菌、牛型菌はDubos, Desbordes, Wilson 3 反応とも新鮮培養菌との差がそれほど認められないので、この両型については少々古い菌体でも検査に差支えないといえる。Wilson の反応は人型菌、牛型菌とも、生菌においても色素の脱色力がないので陳旧培養で死菌が増えたものに脱色が見られなくても比較の意義は少ない。しかし、Dubos, Desbordes 両反応において死菌が増えた管の陳旧培養が新鮮培養と差がないので、これら2反応にあずかる菌体物質は菌の死ぬことによつて速かに破壊されないしは消失するものでないことを示すものと考えられる。

一方鳥型菌および非病原性抗酸性菌においては、Dubos, Desbordes 両反応は人型菌、牛型菌と同様に陳旧培養と新鮮培養に差が見られないのはやはり反応にあずかる物質の消失がないことを示し、該2反応は古い培養でも差支えないといえる。Wilson の反応で陳旧培養が明らかに脱色力の低下をきたすのは、古い培養では死菌が増し同時に酵素系が働かなくなつたためと考えられる。よつて3反応を比較実施するには新しい培養によるのがよいといえる。

また紫外線照射死菌、加熱死菌において、Dubos, Desbordes 2 反応に、生菌のとき陰性であつたものが陽性

に出るものがあるのに、一方死菌の増している管の陳旧培養にかかる現象が現われないことは、同じ死菌でも、紫外線照射、加熱等によつて死菌体とした場合と、自然に長時間のうちに死菌となつたもの間には菌体物質の破壊消失に差があるためと考えられる。

総括

試験管内抗酸性菌病原性試験としての Dubos, Desbordes, Wilson 3 反応を種々条件を変えて実施し、日常検査には固型培地ことに Petraghani 培地發育の菌による方がよく、また紫外照射、加熱等による死菌、あるいは陳旧培養菌よりも Petraghani 培地3~4週培養の新鮮菌によつて実施する方がよいという結果を得た。かつ死菌による反応の減弱等の機構について若干の考察を加えた。

高木教授の御指導と御校閲を感謝する。

主要文献

- 1) 松尾「結核」投稿中.
- 2) Dubos, R.J. & Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 58, 698, 1948.
- 3) Desbordes, J. : Ann. Inst. Pasteur, 83, 809, 1952.
- 4) Wilson, F.J., Kalish, C. & Fish, C.H. : Am. Rev. Tuberc., 65, 187, 1952.
- 5) Toyohara, M. : Ann. Rep. Jap. Assoc. Tuberc., 1, 41, 1956.