

結核菌の呈色反応

豊原希一

結核予防会結核研究所(所長 隈部英雄)

受付 昭和31年7月27日

緒言

1948年 R. Dubos によりノイtralロートによる結核菌培養菌塊の細胞化学反応が報告されてから^{1,2)}, その追試^{3,4)}や他の色素による新法の紹介^{5,6)}が次々と発表された。その多くはこの反応が菌の毒力と平行するものであるから毒力を判定する有力な手段であるとし更に Cord 形成の程度を併せみれば一層正確を期しようという報告もある⁷⁾。しかしこの反応に関する基礎実験の報告は少なく僅かに Paraf, Desbordes 等による成績があるにすぎない⁸⁾。

この反応が化学的反應であるだけに不安定であることはいなめないところであり従つて十分な基礎実験を行わずして毒力との平行性を云々するのは早計と思われる。このため私はノイtralロートおよびその他の色素による呈色反応の基礎実験をこころみ、これら反応が条件により相当に変動し毒力と平行すると考えるのは危険であるという結果をえた⁹⁾。

今回は更に培地上のコロニーの所見からは結核菌が抗酸性雑菌か判然としないものを臨床材料よりえらび呈色反応と動物実験を平行して行い両者の相互関係を検討した。

(I) 実験方法

表1 菌の性状

菌株	H ₃₇ Ra	H ₃₇ Rv	QT ₁	QT ₂	種村	山原	吉野	内野	遠藤	坂井	水越	No.607	
染色性	赤染菌	3	3	1	2	3	赤染菌のみ	2	2	2	赤染菌のみ	赤染菌のみ	赤染菌のみ
	青染菌	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
		1	1	1	1	1	1	1	1	1			
菌体の性状		稍短い	稍短い	短い	細長い	稍短い	短い	稍短い	細長い	稍短い	稍細長い	短い	稍細長い
Colony type		R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R

注: colony type の記号.

R: R型

S: S型

H₃₇Rv, H₃₇Ra を用いた。

患者喀痰よりの分離株は染色所見では抗酸性菌であるがコロニー所見は結核菌か否か即断できないものをえらんだ。

* 緩衝液

NaCl 5g NaHCO₃ 1g, 水 100cc.

動物: ツ反(-), 体重500~700gのモルモットを各株につき2匹ずつ用いた。

培地: 3%小川培地で分離, その後1%培地に継代した。

(1) 各菌株につき Ziehl-Neelsen 染色を行う。

(2) 菌塊一白金耳をとりノイtralロート反応, および亜硫酸ソーダ, フクシン反応を行う。

(3) 菌量0.02mgをモルモットに接種, 接種後8週目に殺し臓器の病変を観察し肝肺の定量培養を行う。

(4) 培養陽性例の菌塊について更にそのノイtralロート反応および亜硫酸ソーダ, フクシン反応を行う。

(II) 実験成績

(1) 菌塊の Ziehl-Neelsen 氏法による染色所見

赤染菌のみからなる菌株もあるが青染菌を相当にふくむ菌株もある。各菌株の性状は表1に示すが如くである。結核菌か否か不明株を特にえらんだためコロニーの性状はS型のものが多い。

(2) 呈色反応

(i) ノイtralロート反応

菌塊一白金耳をとりメタノール中で2度よく洗い pH 8.9 の緩衝液*を2cc加え更に0.05%ノイtralロート0.1ccを加えよく振盪し30分後に菌塊の呈色度をみる。

菌株: 患者の喀痰より分離培養したもの10株および

呈色度は番号であらわし大きな数ほど反応がつよい。

(反応陽性の場合には菌塊が桃色ないし赤色に呈色する。)

各菌株の呈色度は表2に示す通りである。比較的呈色度の高い菌株は坂井, 種村, 水越 No. 607 の4株で強毒株H₃₇Rvは弱陽性である。またH₃₇Ra, 遠藤, Q T,

表 2 接種前ノイソラロート反応

菌 株	H ₃₇ Ra	H ₃₇ Rv	QT ₁	QT ₂	種 村	山 原	吉 野	内 野	遠 藤	坂 井	No.607	水 越
呈 色 度	2	3	2	1	5	1	1	1	2	8	5	7

の3株はH₃₇Rvより更に呈色度が低い。QT₂山原、吉野、内野株はほとんど呈色しない。基礎実験によると有毒結核菌の呈色度は5以上である。

(ii) 亜硫酸ソーダ、フクシン反応

菌塊一白金耳を培地をかきとらないように注意してと

りこれを亜硫酸ソーダ、フクシン試薬* 中にいれ呈色度をみる。結果は表3に示す通りである。基礎実験によると結核菌の呈色度は3~4で抗酸性雑菌は5以上あるいは逆に2以下である。番号が大きくなるほど桃色がつよくなる。

表 3 接種前亜硫酸ソーダ、フクシン反応

菌 株	H ₃₇ Ra	H ₃₇ Rv	QT ₁	QT ₂	種 村	山 原	吉 野	内 野	遠 藤
呈 色 度	5	4	7	3	4	4	1	1	4

(3) 動物接種

図1にみる如く明らかに病原性を示したのはH₃₇Rv種村、遠藤、水越の4株、ごく軽度の肉眼的変化を示したのはH₃₇Ra、No.607、QT₁、QT₂、吉野、内野、坂井株、全く変化をみなかったのは山原株である。H₃₇Rv種村、遠藤3株を接種したモルモットの平均脾重は2g

であるが、その他の株を接種したモルモットのそれは0.7gであつた。

(4) 臓器定量培養

モルモットの肝および肺の一定量を取り、これを10倍および100倍に稀釈しその0.1ccを1%小川培地に培養する。培養8週目のコロニーを観察すると表4の如くな

表 4 臓 器 定 量 培 養

菌 株	H ₃₇ Ra	H ₃₇ Rv	QT ₁	QT ₂	種 村	山 原	吉 野	内 野	遠 藤	坂 井	No.607	水 越
肺 臓	0 0	115 54	0 0	0 0	64 430	0 0	0 0	57 0	300 200	0 0	0 0	180 170
肝 臓	0 0	37 1	0 0	0 0	1 205	0 0	0 0	0 1	230 126	0 0	0 0	105 85

註 10:1に稀釈しその0.1cc 培養

る。定量培養によつて陽性となつたH₃₇Rv、種村、遠藤三株は臓器の肉眼的所見もいちじるしくおおむね臓器変化と培養所見は一致している。なお、内野株によるコロニーの性状は非病原性と思われた。

(5) 定量培養によつて得られたコロニーの呈色反応

定量培養で陽性となつたH₃₇Rv、種村、遠藤、内野水越の5株のコロニーにつきノイソラロートおよび亜硫酸ソーダフクシン反応を同時に行つて接種前のコロニーの呈色反応と差異があるか否かをみた。結果は表5に

表 5 動物通過後の呈色反応

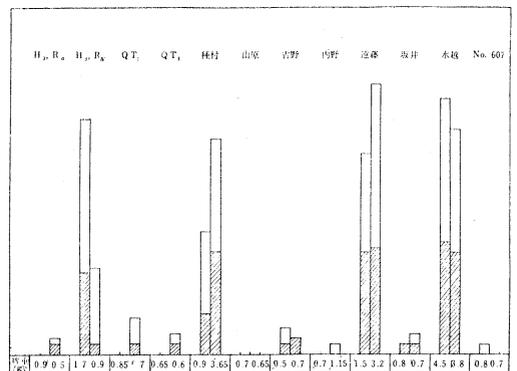
菌 株	H ₃₇ Rv	種 村	遠 藤	内 野	水 越
呈 色 度 N-R	6	7	5	1	7
S-F	4	4	4	6	4

* 亜硫酸ソーダ、フクシン試薬:

1g フクシンを200ccの沸騰水中に加え50°Cまでひやし濾過する。濾液に1NHCl 20ccを加え25°Cまで冷却する。これに無水亜硫酸ソーダ1gを加え冷暗所に静置し液が黄色味をおびるまで待つ。用いたのぞみ上記液80ccに10%無水亜硫酸ソーダ100ccを加える。

示す如くである。強い病原性を示した4株の菌塊は二反応とも哺乳動物結核菌と考えられる反応を示すが内野株は抗酸性雑菌の反応を示す。表2の接種前の菌塊の反応と比較するとノイソラロート反応では動物通過後にえられた菌塊の反応が、より強く、ことに遠藤株にこの差は著明である。亜硫酸ソーダ、フクシン反応では表3にみる如く両者間の差はみとめられない。

図 1 臓器の変化と脾重



(III) 考 案

R. Dubos をはじめ多くの追試者はノイtralロート反応によつて菌の毒力を判定することができるとしているが著者は前著において⁹⁾ノイtralロート反応およびその他の呈色反応は哺乳動物結核菌、鳥型菌、非病原性抗酸菌の区別はできる、すなわち有毒菌と無毒菌の区別はできるが毒力の強弱を判定することは困難であるとのべた。

本実験においても $H_{37}Rv$ は有毒人型菌であるがノイtralロート反応の呈色度は弱い。にもかかわらず動物通過後の菌について同反応を行うと呈色度は相当強くなつていて、培地の上に継代すると反応が弱まるということも考えられる。また遠藤株では動物通過前の Ziehl-Neelsen 氏法による染色所見は赤染菌のみでなく青染菌も相当にみとめられ抗酸性が強いはいいがたいわけで、このことも動物通過前の反応が弱い一要素となつていられる。逆に坂井株の如く抗酸性もつよくノイtralロート反応も強いにもかかわらず動物接種陰性というのものもある。No. 607 株の場合も坂井株ほど反応は強くはないが相当程度陽性であるにもかかわらず動物接種成績は陰性である。これは基礎実験⁹⁾においてBCGが無毒であるのにノイtralロート反応は強陽性であつたことと相似している。

次に亜硫酸ソーダ、フクシン反応についてみると基礎実験によると⁹⁾抗酸性雑菌は強く紅変するものと全く変化のないものの二種類があり哺乳動物結核菌はある程度紅変するが微弱であるという結果をえている。今回の実験で無毒菌と思われたものは QT_1 , $H_{37}Ra$, 吉野, 内野株であり逆に有毒菌と思われたものは $H_{37}Rv$, QT_3 , 種村, 山原, 遠藤株であつた。モルモットに対し明らかに病原性を示したのは $H_{37}Rv$, 種村, 遠藤の三株のみで亜硫酸ソーダ、フクシン反応のみで毒性の判定をすることも危険であることを思わせる。しかし臓器培養によつてえられたコロニーの反応をみたところ動物通過前と同じ反応を示した。この点、ノイtralロート反応とやや趣を異にする。

ノイtralロート反応の追試者の多くは、この反応が動物実験とよく一致していることを強調するが種々の条件で結核菌か否か判然としない発育を示す場合は呈色反応のみで毒力の程度はもちろん、毒力の有無を判定することも危険であると思われる。

(IV) 結 論

固形培地上で有毒結核菌か抗酸性雑菌か判然としない集落を示す菌株12株につきノイtralロート反応、亜硫酸ソーダ、フクシン反応の呈色反応を行い同時にモルモットに菌液を接種し呈色反応により毒力が推定できるか否かを検討した。

モルモットに毒力を示したのは3株であつたがノイtralロート反応では種村株のみが相当につよく呈色していたにすぎず逆に強く反応している坂井株でも毒力を示さなかつた。

また亜硫酸ソーダ、フクシン反応はノイtralロート反応と逆に動物接種陰性の菌にもかかわらず有毒菌の如く反応するものもあつた。

反応を行う前に、抗酸性染色を行い、染色所見上、抗酸性菌の存在をまずたしかめ、ついで両法を併用すれば培地上一見紛らわしい場合でも結核菌と抗酸性雑菌の鑑別が相当程度可能となるが一つの呈色反応のみで断定的な判断を下すことは危険である。

稿を終るに当り御懇切な御指導を賜つた当所、工藤博士に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) Dubos, R.: Am. Rev. Tbc., 58: 6, 698~699, 1948.
- 2) Dubos, R.: Am. Rev. Tbc., 60: 3, 384, 1949.
- 3) Hein, H.: Z. Tbk., 103: 6, 339~343, 1953.
- 4) Ingrano, F.: Ann. Ist. C. Forlanini, 13: 4, 333~345, 1952.
- 5) Paraf et Desbordes: Rev. de la tbc., 17: 8, 849~857, 1953.
- 6) Wilson, F.I.: Am. Rev. Tbc., 65: 2, 187~193, 1952.
- 7) Clark, M.E.: Am. Rev. Tbc., 68: 5, 786~787, 1953.
- 8) Desbordes: Annales de l'institut Pasteur, 88: 2, 240~243, 1955.
- 9) Toyohara, M.: Ann. Rep. Jap. Assoc. Tuberc., No. 1, 41~55, 1956.