

抗酸性菌の試験管内病原性試験に関する研究

第4報 有機溶媒による抗酸性菌抽出物の示す neutral red 反応について

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32年7月15日

緒 言

1948年 Dubos-Middlebrook¹⁾により試験管内抗酸性菌病原性試験として neutral red 反応が発表されて以来、追試、検討も多数行われているが、これらは主として菌体についての実験であり、菌体に処置を行った実験^{2,3)}においてもやはり菌体における反応の強さの減弱といった変化を見ているものが主で、有機溶媒による抽出の抽出液側における反応陽性物質の追求は少ない。Asselineau, Lederer⁴⁾は、neutral red 陽性物質は、Wax Dがこの反応陽性であることから糖脂質に多く含まれる遊離のミコール酸がその本態であろうといっている。一方 Kölbl⁵⁾はミコール酸そのものには毒性はないが、neutral red 反応に遊離の脂肪酸が関与することを脂肪酸によるモデル実験から証明し、さらにそのカルボキシル基によつて neutral red のイオンの変化がおこるため neutral red 反応が陽性になると述べている。Kölbl は毒力株からクロロホルムで Neutralrot-Virulenzfaktor と称するものを抽出しえたと言い、またかれのいう“relative Säure-Index”が毒力に関係あるらしく、neutral red 反応の結果とも平行するようだといつている。

さて有機溶媒によつて処置を加えられた菌体が、Dubos の反応の強さの低下を示すものとするれば、抽出溶媒の作用で呈色反応に関与する物質が単に変化を受けるだけであるかも知れないが、抽出溶媒の方に抽出され移行することも当然想像されるので、抽出液から溶媒を蒸発させた残渣に neutral red 反応陽性物質を証明し、その化学的性状を知りうる可能性を想定して実験を行つた結果、期待していたような整然とした成績は得られなかつたが、興味ある所見を見出すことができた。また neutral red 反応陽性物質の菌体における所在、その性状に関連して若干の実験を行つたので報告する。

実験材料および実験方法

1) 実験材料

使用菌株：Dubos の反応陽性株として教室保存の人型菌松本、H37Rv 両株、牛型菌牛 1 株、鳥型菌 A62 株、非病原性抗酸性菌の 920(1) 株の 5 株を使用した。いずれも著者が既報の実験^{6,7)}において使用し反応の性格既知のも

のである。しかして菌量をやや多量にうる必要があるためと、固型培地発育菌では培地成分が入り易く、また培地に附加してある色素の影響を受ける可能性を考慮して、固型培地発育菌よりも Dubos の反応が弱くである場合もあるけれども、これらの菌株を Sauton 培地に 8 週間前後培養し菌膜形成させたものを生菌として用いた。一方死菌としては Sauton 培地発育菌を、ツベルクリン作製の時と同じ要領で培養液と共に 100°C、1 時間加熱し、培養液を濾過した残りの菌体を用いた。

抽出有機溶媒：エーテル、アセトン、クロロホルムの脂肪溶剤のほか、脂肪酸溶解能のあるものとしてエタノール、メタノール、対照という意味を含めて蒸留水を用いた。

2) 実験方法

Dubos の反応、Desbordes⁸⁾ の反応とも原法に則り、判定もすべて第 1、第 2 報に報告した通りに行つた。

i) 抽出操作：定量を目的としなかつたので加熱乾燥死菌はほぼ 1g ずつを、生菌は濾紙上で培養液を濾過したものをほぼ 3g ずつを太目の試験管にとり、おのおのに溶媒 20cc ずつを加え、密栓した後、10 日間、4°C の氷室にて抽出を行つた。しかしてその間 1 日 2 回ずつガラス棒を用いて菌塊をばらばらに磨砕すると同時に振盪を加え抽出の促進を計つた。かくして得られたものを菌体と抽出液とに濾紙で濾し分け、濾液は 42°C の乾燥器中に溶媒の蒸発するまで放置し、管底ないしは管底に近い管壁に黄色ないしは黄褐色に附着する蒸発残渣を採取した。抽出菌体は軽く 1 回水で洗つた後孵卵器中で乾燥させた。この抽出物と菌体について、菌体部は菌塊を砕いて直接 Dubos の buffer に浮遊し、抽出物についても何ら処置することなく Dubos の buffer に投入した後、色素反応を行つた。

ii) 加熱死菌に対する洗滌の影響を見るためには 50% メタノールおよび水に菌を浮遊させ 37°C、30 分放置後濾紙で濾別し菌体を集めるこの操作を 2 回繰返えし、後は生菌に対すると同様の方法を用いた。

iii) 菌を水に浮遊し加熱によつて neutral red 反応陽性物質の破壊あるいは抽出の有無を見るためには H37Rv 株の Sauton および Petragnani 培地培養菌を 10cc の水に適量浮遊させ、100°C、2 時間加熱し、後は有機溶

媒による抽出の際と同様に実験を行つた。

iv) Sauton 培養液における neutral red 反応陽性物質の有無を調べるためには、加熱を行わず菌体を濾過しただけの培養液およびその 100°C, 2時間加熱したものについて各 10cc を試験管にとり、42°C の乾燥器中で水分を蒸発せしめ管底に残つた餾状の濃縮物について同様 neutral red 反応を試みた。

実験成績

表1に見るように、Sauton 培地培養生菌と同培地培養の死菌について Dubos の反応を試みたものにおいて

表1 生菌と加熱死菌の比較(Dubosの反応)

	■	H37Rv	牛 1	A 62	920 (1)
生 菌	+	+	+	+	+
死 菌	-	-	-	-	-

は、生菌はもちろん前報の場合と同じく陽性を示すのに反し、死菌の方は全株とも陰性になつている。

表2、表3は抽出を行つた場合の死菌、生菌についての菌体および抽出濾液蒸発残渣についての Dubos の反

表2 加熱死菌有機溶媒抽出後の菌体および抽出濾液蒸発残渣の Dubos の反応

	■	H37Rv	牛 1	A 62	920(1)
	菌 濾液	菌 濾液	菌 濾液	菌 濾液	菌 濾液
エーテル	- +	- +	- +	- +	- +
アセトン	- +	- +	- +	- +	- +
クロロホルム	- +	- +	- -	- +	- +
エタノール	- +	- +	- -	- +	- +
メタノール	+ +	- -	- -	+ +	- +
水	- -	- -	- -	+ -	- -

表3 生菌有機溶媒抽出後の菌体および抽出濾液蒸発残渣の Dubos の反応

	■	H37Rv	牛 1	A 62	920(1)
	菌 濾液	菌 濾液	菌 濾液	菌 濾液	菌 濾液
エーテル	+ +	- +	- -	- -	- -
アセトン	+ -	+ -	+ -	- -	+ -
クロロホルム	+ +	- +	- -	- -	- -
エタノール	+ -	+ -	- -	- -	- -
メタノール	+ -	+ +	+ -	- -	+ -
水	- -	- -	- -	- -	- -

応の結果である。表1によつて分るように、死菌は直接 Dubos の反応を行えば陰性であり、生菌は陽性であるからむしろ生菌から Dubos の反応陽性物質が抽出され、死菌からは抽出されないであろうと予測したのであるが

事実は反対に死菌から多量に抽出され、生菌からは抽出が弱かつた。この結果については後に検討を加えたい。

表2において ■ A62の両株のメタノール抽出と A62の水による抽出において菌体に弱いながら陽性が認められるのは後に述べるように、死菌をメタノール、水で洗滌することによつて陽性になることと関係があるが、他の H37Rv, 牛 1, 920(1)の株についてはこのようなことが起らない。(表4参照)

表4 加熱死菌メタノール、水による洗滌の影響 (Dubos の反応)

	■	H37Rv	牛 1	A 62	920(1)
非 処 理	-	-	-	-	-
メタノール 2回洗滌	+	+	+	+	-
水 2回洗滌	+*	-	+*	+*	-

* 陽性なれど極めて弱し

また抽出後の菌体にも、抽出濾液蒸発残渣にも陽性物質の認められない個々の例が生菌においてかなりあるが、これはやはり後に検討を加えたい。

他方溶媒の側から見ると、死菌においてはアセトンが最も強く neutral red 陽性物質の抽出を示しており、エーテル、クロロホルム、エタノール、メタノールに大差がない。しかるに生菌においてはアセトンおよびエタノールによつていずれの株からも抽出された様子がなく、死菌の場合と明らかに異なつている。また生菌においては他の有機溶媒間に大差はないようである。

表4は前にも少しふれたが、直接 Dubos の反応を行つたのでは陰性であるところの死菌が、メタノールで処置することによつて陽性になり、水によつても極くわずかに陽性になることを示すものであるが、洗滌による陽性物質の菌体表面への曝露の点よりこの現象を説明することができるかもしれない。

表5は H37Rv の Sauton 培地および Petraghani 培地培養生菌を 100°C の水で 2時間抽出した際の結果であ

表5 H37Rv生菌加水 100°C, 2時間加熱の影響 (Dubos の反応)

Sauton 培地発育菌		Petraghani 培地発育菌	
菌 体	濾 液	菌 体	濾 液
-	-	+	-

るが、neutral red 陽性物質が破壊されることが想像できる。しかし Petraghani 培地発育菌体にわずかに残存するのが見られ、Sauton 培地発育菌よりも破壊されにくいものようである。

表6の示すところは、非加熱のまま生菌を濾別した Sauton 培養濾液を 42°C の乾燥器中で蒸発させた残渣

表 6 H37Rv Sauton 培地培養濾液低温蒸発残渣の Dubos の反応

菌体濾別前非加熱	+※
菌体濾別前加熱 (100°C, 30分)	-

※ 陽性なれど極めて弱し

と、100°C, 30分加熱滅菌後菌体を濾別した Sauton 培養濾液を同じく 42°C の乾燥器中で蒸発させた残渣について neutral red 反応を行つた成績であるが、非加熱の場合明らかに neutral red 陽性物質の存在が示され、それが熱によつて破壊されるらしいことも窺える。

表 7 は加熱死菌を洗滌その他の処置を加えることなく直接 Dubos の反応および Desbordes の反応を行うと、

表 7 Sauton 培地発育加熱死菌の Dubos, Desbordes 両反応の比較

	松本	H37Rv	牛 1	A62	920(1)
Dubos の反応	-	-	-	-	-
Desbordes の反応	+	+	+	+	+

生菌において両反応を同じ条件で実施すれば、第 1, 第 2 報に述べたように全く一致して陽性の成績が得られているにかかわらず、この場合は Dubos の反応は全株陰性で、Desbordes の反応は全株同じように陽性を示している。すなわち Dubos の反応と Desbordes の反応の機構とが必ずしも同一でないことが想像される。

考 案

抗酸性菌の病原性に関係した物質の本態はまだ確定されていない。毒力株と無毒株の菌体成分に化学的の差のあることから毒力株に多い物質が病原性に関係あるものであらうと考えられ、各種の lipoid, polysaccharide, ことに cord factor (Wax C), PMKO (lipopolysaccharide), Wax D の他糖脂質に含まれるミコール酸等があげられている。また Dubos の反応が提案されて以来この反応によりある程度毒力株と無毒株の区別が可能であるので、該反応陽性物質の本態が追求され、毒力との関係が求められてきている。今のところ Mycobacterium 以外の菌はすべて陰性であり、Mycobacterium のうち毒力株と思われるものに陽性のもの多く、無毒株に陰性のものが多いことより、また化学的菌体成分の分析から Asselinau, Lederer の糖脂質ないしは遊離のミコール酸であるという説や、Kolbel の relative Säure-Index なるものが Dubos の反応と平行するらしいという説がある。

しかし抗酸性菌の病原性は恐らく単一の物質の働きによるものではなくいろいろな factor の複雑な組合せによつてもたらされるものであらうことは、絶対的な病原

性関係物質の確定がなされておらず、かつ各種の物質が病原性との関連において考えられていることから想像できる。

さて著者の実験は、この neutral red 反応陽性物質は、有機溶媒で処置を加えることによつて菌体側の反応が弱くなるとすれば、これら溶媒が陽性物質に対し抽出的に働いていることが考えられるので、溶媒の方に移行したかどうかを調べ、如何なる物質であるかの推測の根拠を求めたのである。

まず加熱乾燥死菌を処置を加えることなく直接 Dubos の反応を実施すれば生菌陽性、死菌全株陰性であるので一まず加熱によつて陽性物質の破壊されることが考えられる。しかるにこの死菌を 50%メタノールに浮遊、37°C, 30分保持を 2 回繰返すと陽性になるので加熱によつて破壊されているとはいひ難い。恰も菌体表面を覆っていた物質がメタノールによつて除去され、その内側にある陽性物質が反応にあずかることができたものと解釈される状態である。メタノールの代りに水によつても弱いながらこの現象が見られるのでますます表面の物質の除去ということが考えられる。生菌の場合 50%メタノールで洗う方がしからざる場合よりも強く反応が現われるという結果も同様の現象と考えられるが、生菌ではメタノール処置がなくても元来陽性にでているので、死菌において全く陰性のものが陽性に変ずるのとは同意義ではない。

さてこの加熱死菌は完全に neutral red 陽性物質が破壊されていないとすれば、生菌と同様に有機溶媒で抽出可能であり、また生菌の方がより強く抽出されるものと予想したが、結果は反対に死菌からの抽出の方がより強かつた。この事実を如何に説明すべきであらうか。加熱によつて死菌の方が抽出され易い状態にあることも考えられるが決定的なことは判明しない。しかして生菌を有機溶媒により抽出操作を行うと菌の種類によつては蒸溜水抽出の場合と同様に抽出液菌体も抽出濾液蒸発残渣も共に反応が陰性になつている例が見られる。これは抽出過程あるいは抽出濾液蒸発過程における陽性物質の変化による陰性化が起つたというよりほか致し方ないが同じような例は死菌抽出例にも若干認められている。

死菌は乾燥される際表面に培養濾液物質が濃縮乾固されて表面に附着することが考えられ、しかもこの濾液物質は neutral red 反応陰性であるので(表 6)、この物質の表面被覆により死菌の反応が陰性になる可能性も考えられる。表 3 においては蒸溜水処理によつて生菌の neutral red 反応が陰性になつたのが見られるが、これは蒸溜水処理が加熱とは無関係に菌体内反応陽性物質の分解に関与するかも知れないことを示唆し、また加熱はこのような変化を促進することも考えられる(表 5)。なお加熱は陰性化させないまでも反応陽性物質の質的变化を

おこすことは表2, 表3の各種溶媒により抽出され方が死菌と生菌とでは異なることから知られ(例えばアセトンは死菌体からは良く抽出したが, 生菌体から抽出していない), このように考えると各表の一見矛盾したような結果もある程度説明できるように思われる。

Sauton 培養液と共に菌体を加熱した場合陽性物質が破壊されてしまわないことは, 培養濾液は蒸溜水とは異なり溶存する塩類, 結核菌代謝物のため分解がある程度阻止されていると考えられようか。

さて本実験では neutral red 反応陽性物質がアセトンによつて死菌からは強く抽出され, その他の溶媒によつて生, 死菌双方からある程度抽出されたということから neutral red 反応陽性物質が何であるかを推定すると, これらの脂肪溶剤に抽出される脂質, 脂肪酸が考えられまたアルコールに溶けることから脂肪酸であることも想定されるという位しかいえない。また加熱乾燥死菌に何ら処置を加えないで, Dubos, Desbordes 両反応を実施すれば Desbordes の反応のみ陽性に現われることから両反応陽性物質の本態は同じものではないように想像される。

結 び

1) Dubos の反応陽性の抗酸性菌5株(人型結核菌2株, 牛型結核菌1株, 鳥型結核菌1株, 非病原性抗酸性菌1株)について, Sauton 培地培養後に得られた加熱乾燥死菌と, 同培養の生菌とで, エーテル, アセトン, クロロホルム, エタノール, メタノールの5種の有機溶媒で抽出を行い, 抽出済菌体と抽出濾液蒸発残渣について Dubos の反応を試み neutral red 反応陽性物質が抽出濾液蒸発残渣に証明された。しかし該陽性物質は生菌からよりも, 抽出処置を加えないでそのまま Dubos の反応を実施すれば陰性であるところの死菌からより著明に抽出され, かつアセトンによつていずれの株からも最も強く抽出された。しかるにアセトンによつて生菌からは抽出されなかつた。溶媒の種類によつては抽出後の菌体にも抽出濾液蒸発残渣にも陽性物質が証明されない場合もあつた。

neutral red 反応陽性物質は, 本実験からは確定的なことはいえないが脂肪酸系統のものであるらしい。

2) 生菌を蒸溜水で抽出処理を行うと, 今まで陽性であつた菌体の反応が陰性になる。

3) Sauton 培養より得た加熱乾燥死菌はそのまま Dubos の反応を行えば陰性であるが50%メタノール, あるいは水に浮遊し 37°C に30分保持することによつて陽性になる。

4) H37Rv株 Sauton 培地培養後加熱を行わず生菌を濾別した濾液を 42°C で水分を蒸発させた残渣に Dubos の反応を試みると弱陽性を示す。

5) 蒸溜水に浮遊した Sauton 培地発育H37Rv株生菌を 100°C, 2時間加熱すると, 菌体も, 濾液蒸発残渣も neutral red 反応陰性である。

6) Sauton 培養加熱乾燥死菌は, そのまま Dubos, Desbordes 両反応を実施すれば, Desbordes の反応陽性, Dubos の反応陰性の結果が得られ, 両反応本態物質は同一でないようである。

7) 以上の実験結果の解釈に関して可能な限り考察を試みた。

高木教授の御指導と御校閲を感謝する。

文 献

- 1) Dubos, R.J. & Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 58: 698, 1948.
- 2) Toyohara, M. : Ann. Rep. Jap. Assoc. Tuberc., 1: 41, 1956.
- 3) 五味 一: 日大医誌, 15: 12, 1956.
- 4) Asselineau, J. & Lederer, E. : C.R. Acad. Sci., 230: 142, 1950.
- 5) Kölbl, H. : Zschr. Hyg., 143: 387, 1957.
- 6) 松尾 仁: 結核, 31: 651, 1956.
- 7) 松尾 仁: 結核, 31: 728, 1956.
- 8) Desbordes, J. : Ann. Inst. Pasteur, 83: 809, 1952.