

黄色菌（いわゆる非定型抗酸性菌）の代謝的特性と、 他の抗酸性菌との代謝による分類

大 島 一 馬

国立療養所刀根山病院（指導 九州大学医学部医化学 山村雄一教授）

受付 昭和 35 年 12 月 21 日

I 序

いわゆる非定型抗酸性菌に関する報告は、1930 年前後より認められ^{1) 2)}、当初は人体から分離された病原性を有する色素産出性のミコバクテリアとされ、その後も多くの研究者が同様な菌株を報告している^{3)~9)}。本邦においても、戸田教授一派の広範な研究がある²⁾。しかしそれらは、その細菌学的性状、動物に対する病原性、抗結核剤感受性等の諸性状が、各菌株によってまちまちであり、さらには非色素産出性の菌株が分離されたり²⁾¹⁰⁾、また人体以外の自然界から分離される従来非病原性といわれた抗酸性菌の中にも、一定の病原性を有するものがある等^{2) 11)}、非定型抗酸性菌なる概念が複雑、混乱してきて、その分類学的位置が不明瞭になっている。したがって細菌学的、病理学的方法では、現在のところこれらの鑑別および分類は十分に行いえないのではないかと考えられる。

非定型抗酸性菌の物質代謝に関しては、まだ報告されていないので、本報告においては、物質代謝の方面から、その特性を追及して、他の抗酸性菌との鑑別を試みた。

II 使用菌株の一般的性質

国立療養所刀根山病院に肺結核として入院中の患者の喀痰より、小川培地にて分離した黄～橙黄色のコロニーを有する菌株 52 株中より、1) Ziehl-Neelsen 染色にて抗酸性桿菌、2) 表 1 に示すごとく Karl-Preis 氏抗煮沸性試験にて 3~10 分で脱色するもの、3) 固形培地（小川）、液体培地（Kirchner）にて、3~5 週間で S 型の最大発育を示すもの。以上の性状のもの 15 株を用いた。したがってここにいう非定型抗酸性菌は、占部氏らのいう広義の意味の非定型抗酸性菌のうち喀痰型と考えられる¹²⁾。なお対照として、鳥型菌竹尾株、チモテー菌、M. 607 株、BCG、人型結核菌 H₃₇Ra 株を使用した。

なおこれらの非定型抗酸性菌につき、従来から行われている抗結核剤に対する感受性試験および動物に対する毒力試験（マウスに対する）を行った。

表 1 非定型抗酸性菌の抗煮沸性試験（Karl-Preis 氏法）

〔完全脱色までに要する時間（k.f.）〕

k. f.	1' 以内	3' 以内	10' 以内	計
例 数	0	5	10	15

対照：チモテー 3' 以内，H₃₇Rv 10'~20' 以上

1. 抗結核剤感受性試験

臨床的に行われている結核菌の抗結核剤耐性検査間接法のごとく、1% 小川培地で 3~5 週間培養した非定型抗酸性菌の 1 mg/ml 蒸溜水浮遊菌液の 100 倍稀釈液を 0.1 ml ずつ、表 2 に示す系列の濃度の SM, P A S, INAH を含有する 1% 小川培地に接種して、4~6 週目に完全に発育を阻止する濃度を検した。

その結果は表 2のごとく、SM, INAH に抵抗性のある菌株が多い。しかし、これらの菌株の宿主たる入院患者は、多くは長期間化学療法を行ったものであり、この結果はあまり意義を認められないと考える。

2. マウスに対する毒力試験

非定型抗酸性菌（吉川および久田株）、H₃₇Rv、チモテー菌の Kirchner 液体培養にて、それぞれの最大発育を示す時期のもの湿菌量 2 mg/0.2 ml を Na₂ 系マウス（体重 17~18.5 g）の尾静脈内へ注射して、4 週間観察、4 週の終りに生き残つたものを剖検し、一部組織検索を行った。その結果は表 3 に示すごとく、1) 体重変化、死亡数には有意の差を認めず、2) 剖検上 H₃₇Rv、非定型抗酸性菌では脾、肝重量の増大、腸間リンパ腺腫大著明にして、肺出血例を認め、肺出血をきたせるものの中には、組織学的に空洞を有するものあり、チモテー菌とは明らかな差が認められた、3) 脾重増大、肺出血例中の組織上の空洞形成率からみれば、非定型抗酸性菌は H₃₇Rv に比し、その毒力が弱いように思われる。

III 非定型抗酸性菌の物質代謝

1. 代謝測定の方法

非定型抗酸性菌は Kirchner 液体培地で S 型の最大発育を示す 3~5 週のもの、対照菌すなわち、鳥型竹尾株、チモテー菌、M. 607 株、BCG、および人型結核

表2 非定型抗酸性菌の抗結核剤感受性
〔各濃度において完全に発育を阻止せられた例数〕

(全例 15例)

薬名	S M						P A S						INAH					
	1γ	3	10	30	100	100以上	1γ	10	30	100	300	500以上	0.1γ	1	3	10	30	300以上
例数	0	2	10	2	0	1	9	2	2	1	0	1	0	5	4	1	0	5

表3 非定型抗酸性菌, H₃₇Rv および M. phlei のマウスに対する毒力試験比較
(2mg/0.2cc 尾静脈注射, 4週間観察, 4週終剖検)

菌株	例数	死亡数	肺出血例	脾重(平均)	肝重(平均)	腸間膜腫脹	組織上* 空洞形成
H ₃₇ Rv	8	3/8	4	400 mg	1,481 mg	5	1/2
非定型株 吉川	8	3/8	3	275 "	1,638 "	4	1/3
非定型株 久田	7	2/7	2	233 "	1,516 "	0	0/2
チモテー菌	7	1/7	0	217 "	1,145 "	0	0/2
対照 (蒸溜 0.2cc)	3	0/3	0	133 "	1,233 "	0	0/2

* 1) 分母は肺出血をきたせる例のうち、組織検査を行つた例数
2) 分子はそのうち組織上空洞形成を認めた例数
3) チモテー菌および対照群は任意のものを用いた

表4 対照菌群の糖質および芳香族化合物代謝
(各基質 M/200 添加による O₂-吸収量増加 μl/mg/hr.)

基質	グリセリン	安息香酸	カテコール	サリチル酸	メタオキシ安息香酸	パラオキシ安息香酸	醋酸	ブドウ糖	乳酸
鳥型竹尾	3.9	13.3	7.4	2.2	0.02	0.8	3.3	2.5	1.9
M. 607	4.7	7.0	1.4	-1.3*	1.9	1.4	3.5	2.7	2.4
チモテー菌	3.7	2.3	0.8	1.4	3.2	5.0	3.7	3.1	2.8

* (-) は酸素吸収量減少を示す

菌 H₃₇Ra 株は同培地でそれぞれ最大発育を示す時期のものを用いた。その生菌の乳鉢磨砕蒸溜水浮遊液 1 ml (乾燥菌量 10~20 mg/ml) に、以下記す種々の基質の M/10 のもの 0.1 ml を添加、緩衝液としては、磷酸緩衝液 pH 7.2 のもの 0.7 ml, 中心室には 20% KOH 0.2 ml を入れ、すなわち基質の終末濃度を M/200 として、Warburg 検圧計を使用して、その酸素吸収量を 3~4 時間にわたって測定した。測定値は O₂-吸収量増加 μl/mg/hr. (すなわち、菌量 1 mg あたりの基質添加による 1 時間の酸素吸収量の増加) で表わした。添加した基質としては、(1)糖質 (グリセリン, ブドウ糖, 醋酸, 乳酸, 蔞酸), (2)芳香族化合物 (安息香酸, カテコール, サリチル酸, メタおよびパラオキシ安息香酸), (3) TCA サイクルの基質 (コハク酸, リンゴ酸, フマル酸, クエン酸, 焦性ブドウ酸), (4)炭化水素 (n-C₆H₁₄, n-C₁₂H₂₆, n-C₁₆H₃₄, n-C₁₈H₃₈, いずれも大阪市立工業試験所より分与されたもので、添加量は

0.05 ml, 終末濃度およそ M/100) である。

2. 実験結果

1) 糖質および芳香族化合物の代謝

表4の対照群に比し、非定型抗酸性菌の代謝活性は図1のごとく、一般的に弱い。しかしその中ではグリセリンによる酵素吸収増大が目立っている。対照群では山村^{13) 14)}の報告のごとく、安息香酸添加による酸素吸収増大が著明であるが、非定型抗酸性菌では芳香族化合物の基質によつてはほとんど影響を受けない。

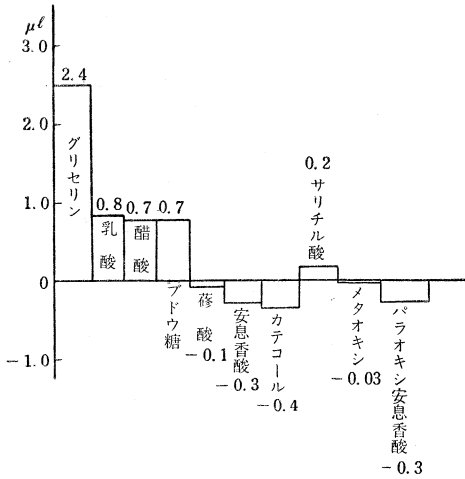
2) 非定型抗酸性菌による TCA サイクルの基質の代謝

図2にみられるごとく、TCA サイクルの基質の代謝活性は全般的に弱く、対照としたグリセリンにはすべて及ばない。

以上非定型抗酸性菌群および対照菌群とも一様にグリセリンによる酸素吸収増大が著明であるので、以下常に対照としてグリセリンを基質として加えた。

図1 非定型抗酸性菌の糖質および芳香族化合物代謝

[各基質M/200添加によるO₂-吸収量増加 $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{hr.}$]
(それぞれ7例の平均値)



*(-)は吸収量減少

図2 非定型抗酸性菌のTCAサイクルの基質の代謝

[各基質M/200添加によるO₂-吸収量増加 $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{hr.}$]
(7例の平均値)

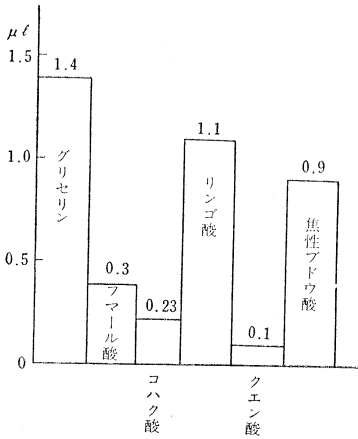


表5 対照菌群の炭化水素系基質の代謝

[各基質M/100添加によるO₂-吸収量増加 $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{hr.}$]

菌株	グリセリン	n-C ₆ H ₁₄	n-C ₁₂ H ₂₆	n-C ₁₆ H ₃₄	n-C ₁₈ H ₃₈
鳥型竹尾	4.4	-5.2	-2.1	2.4	1.6
チモテー菌	5.0	7.8	10.2	5.7	4.2
M.607	3.7	-1.4	-2.0	0.2	-0.3

*(-)は吸収量減少を示す

3) 炭化水素系基質の代謝

対照菌群では表5で分るごとく、チモテー菌を除き、他の菌株では、炭化水素系を基質としたときには、酸素

表6 非定型抗酸性菌群の炭化水素系基質の代謝
[各基質M/100添加によるO₂-吸収量増加 $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{hr.}$]

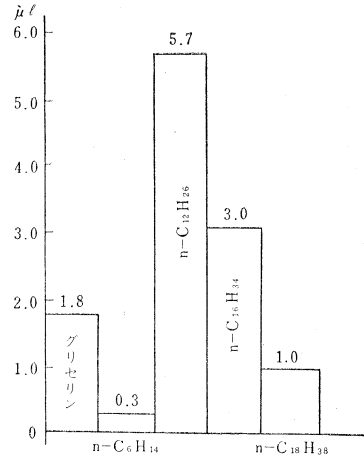
菌株	吉川	寺尾	義本	伊関	小幡	西川	平岩	平均
グリセリン	2.0	1.1	1.8	1.2	1.5	1.4	2.3	1.8
n-C ₆ H ₁₄	0.9	-0.5	-0.2	0.03	3.9	-2.3	0.3	0.3
n-C ₁₂ H ₂₆	5.2	2.9	3.1	3.3	14.3	3.0	7.8	5.7
n-C ₁₆ H ₃₄	2.5	1.5	0.8	1.4	4.0	1.4	9.4	3.0
n-C ₁₈ H ₃₈	2.9	0.8	-0.7	0.6	2.1	0.1	7.0	1.9

*(-)は吸収量減少を示す

吸収の増大は認めない。しかるに非定型抗酸性菌群では、表6および図3に認められるように、n-C₆H₁₄以外の高級な炭化水素系基質では、すべて酸素吸収増大を示し、とくにn-C₁₂H₂₆添加では、いずれの菌株においても、グリセリンをも凌駕する著明な酸素吸収増大を認める。

図3 非定型抗酸性菌の炭化水素系基質の代謝

[各基質M/100添加によるO₂-吸収量増加 $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{hr.}$]
(表6平均値の図表)



4) 諸種の抗酸性菌の代謝による分類

上記の成績を総合して、グリセリン、安息香酸、サリチル酸、パラオキシン安息香酸、n-C₁₂H₂₆の5つの基質をとり出し、これを添加して、いろいろの抗酸性菌について同様の酸素吸収を測定して、同じ傾向のものを1つのグループにまとめてみた。

a) 鳥型竹尾株, M.607 株の代謝

このグループのものは、図4のごとく、芳香族化合物のうち、安息香酸、サリチル酸を基質として添加した場合酸素吸収増大が著明であるが、対照としたグリセリン添加の場合に及ばない。一方炭化水素 n-C₁₂H₂₆ 添加のさいには酸素吸収増大を認めない。

図4 鳥型竹尾株, M.607株の代謝

[各基質添加によるO₂-吸収量増加 $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{hr.}$]

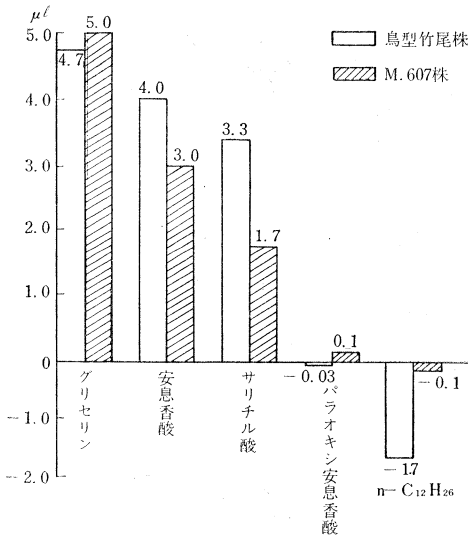


図6 BCG, H₃₇Ra の代謝

[各基質添加によるO₂-吸収量増加 $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{hr.}$]

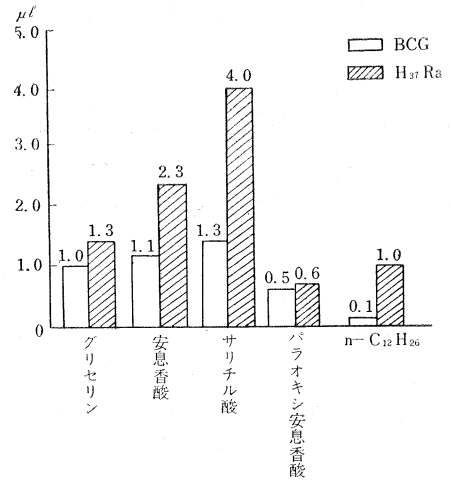


図5 チモテー菌の代謝

[各基質添加によるO₂-吸収量増加 $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{hr.}$]

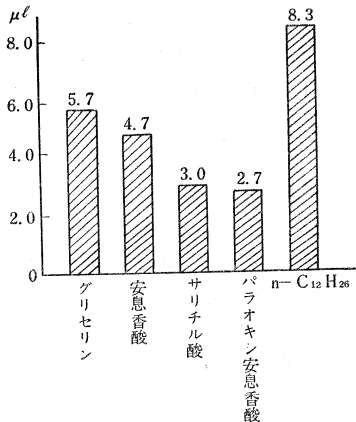
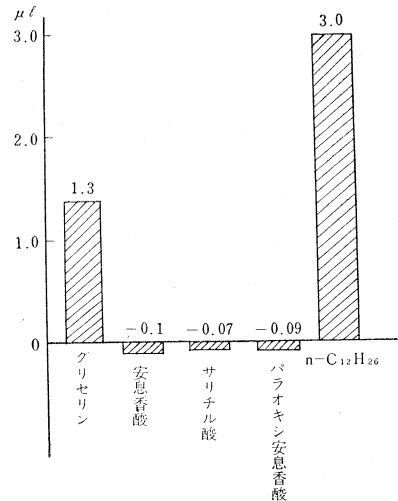


図7 非定型抗酸性菌の代謝

[各基質添加によるO₂-吸収量増加 $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{hr.}$]



b) チモテー菌の代謝

図5のごとく、すべての基質添加のさいにも酸素吸収増大を示している。炭化水素の基質添加のさい、それがもつとも大である。

c) BCG, H₃₇Ra の代謝

このグループは、図6に認められるごとく、芳香族化合物のうち、安息香酸、サリチル酸を基質として添加せるときの酸素吸収増大は、グリセリン添加のときのそれよりも大であつて、n-C₁₂H₂₆添加ではわずかに吸収増大を示しているにすぎない。

d) 非定型抗酸性菌の代謝

この菌群は図7が示すごとく、芳香族化合物の基質添加のさいは全く無影響であり、炭化水素 n-C₁₂H₂₆

表7 抗酸性菌の代謝による分類

菌株	添加基質				
	グリセリン	安息香酸	サリチル酸	パラオキシ安息香酸	n-C ₁₂ H ₂₆
鳥型竹尾株 M.607	+	+	+	-	-
チモテー菌	+	+	+	+	+
BCG H ₃₇ Ra	+	(+)	(+)	-	-
非定型抗酸性菌	+	-	-	-	+

* +はO₂-吸収量増加
 (+)は内部呼吸増大(山村氏による)
 -はO₂-吸収量減少または無影響

の基質添加のさいの酸素吸収増大が特異的であり、グリセリン添加のさいのそれをはるかに凌いでいる。

以上の4群を一括して表示すれば、表7に示すようになる。

IV 総括および考案

従来の非定型抗酸性菌に関する研究は、個々の菌株についての形態学的、細菌病理学的性状についてであり、非定型抗酸性菌群に共通する性状についての報告はみるべきもなく、そのため非定型抗酸性菌の分類学的位置が明白でない。したがってこれらの従来の方法とともに、生物化学的、酵素学的方法により、その物質代謝を明らかにすることによつて、その分類学的位置を明白にする手がかりになると考えられる。

1940年ころから Bernheim¹⁵⁾、山村らによつて、結核菌の物質代謝とくにその安息香酸の酸化に関する研究が行われているが、山村^{15) 14)}は1949年芳香族化合物代謝の特異性によつて、人型結核菌、鳥型結核菌および非病原性抗酸性菌の分類を行つている。一方 Saz¹⁶⁾は1949年高級な炭化水素が Sigerson 株(鳥型結核菌)、H₃₇Ra, BCG および H₃₇Rv の呼吸を促進すると報告している。本報においては、かかる意味から、糖質、芳香族化合物、TCA サイクルの基質および炭化水素を基質として、非定型抗酸性菌の酵素化学的酸化に及ぼす影響を、他の抗酸性菌と比較しながら検討してみた。

上記の成績から分ることく、非定型抗酸性菌は一般的に酵素学的活性が弱い。このことは病原性抗酸性菌と酷似している。しかし活性が弱いながらも、糖質の中ではグリセリンによる酸素吸収増大がもつとも著明なことは、他の抗酸性菌と同じく、炭素源としてグリセリンがもつともよく利用され、菌の発育上、グリセリンが良好な基質となることを示している。このことは、非定型抗酸性菌の培養性状からもうなずかれる。

芳香族化合物の基質によつては、非定型抗酸性菌はほとんど影響を受けない。しかるに他の抗酸性菌は一様にこの基質添加によつて酸素吸収増大を認める。

炭化水素基質添加のさい、非定型抗酸性菌の酸素吸収増大はもつとも特異的であつて、とくに n-C₁₂H₂₆ 添加のときには、いずれもグリセリンを凌駕する値を示している。しかるに他の抗酸性菌においては、チモテー菌を除き、ほとんど無影響である。

以上のごとく、非定型抗酸性菌および他の抗酸性菌の酵素化学的代謝活性を測定することにより、それらの菌株の分類、鑑別の1つの助けになると考えられる。

V 結 論

国立療養所刀根山病院入院患者の喀痰から分離した

わゆる非定型抗酸性菌15株を用い、Warburg 検圧計にて、諸種の基質を添加して、その酸素吸収に及ぼす影響を測り、代謝上の特性を調べ、さらに他の数種の抗酸性菌(鳥型竹尾株、チモテー菌、M.607 株、BCG および人型結核菌 H₃₇Ra)との代謝による分類、鑑別を試み、次の結果を得た。

1) 非定型抗酸性菌は、一般的に、他の非病原性抗酸性菌に比し代謝活性が弱い。糖質、芳香族化合物、TCA サイクルの基質の中ではグリセリンを基質として添加したときがその酸素吸収増大がもつとも大である。芳香族化合物の基質添加によつては、ほとんど無影響である。

2) 非定型抗酸性菌は n-高級炭化水素を基質に用いた場合、その酸素吸収増大が特異的に大であつて、とくに n-C₁₂H₂₆ のときには、グリセリンを凌駕する酸素吸収増大を認めた。

3) 糖質としてグリセリン、芳香族化合物として、安息香酸、サリチル酸およびパラオキシ安息香酸、炭化水素として n-C₁₂H₂₆ を基質として使用することにより、その代謝による特異性から、非定型抗酸性菌と他の抗酸性菌との鑑別が可能と考える。

直接御指導、御校閲を賜つた山村雄一教授に満腔の謝意を表するとともに、いろいろ御援助を賜つた国立療養所刀根山病院医局員御一同に厚く感謝する。

本報の要旨は第33回日本結核病学会総会において報告した。

主 要 文 献

- 1) Pinner, M. : Am. Rev. Tuberc., 32 : 424, 1935.
- 2) 戸田忠雄 : 結核菌とBCG, 327, 昭18.
- 3) S. Tarshis & W. Frisch : Am. Rev. Tuberc., 65 : 278, 289, 1952.
- 4) Pollak & B. Buhler : Am. Rev. Tuberc., 71 : 74, 1955.
- 5) E. Wood, B. Buhler & Ann. Pollak : Am. Rev. Tuberc., 73 : 917, 1956.
- 6) Schmidt, Hoffmann & W. Steenken : Am. Rev. Tuberc., 75 : 169, 1957.
- 7) Wolinsky, M. Smith & S. Mitchell : Am. Rev. Tuberc., 75 : 180, 1957.
- 8) E. Crow, T. King, C.E. Smith, F. Corpe & I. Stergus : 75 : 199, 1957.
- 9) H. Feldmann & G. Karlson : Am. Rev. Tuberc., 75 : 266, 1957.
- 10) Huppert, G. Wayne & J. Juarez : Am. Rev. Tuberc., 76 : 468, 1957.
- 11) 山村雄一他 : 結核, 33 : 135, 昭33.
- 12) 占部薫他 : 結核, 33 : 379, 昭33.

- 13) 山村雄一：結核菌の生化学，昭30.
- 14) 山村雄一：酵素化学の進歩，第2集，269，昭25.
- 15) Bernheim：J. Bact., 41：387，1941.
- 16) A.K. Saz：Arch. Bioch., 22：195，1949.
- 17) 小川辰次：日本臨牀結核，16：512，昭32.
- 18) 今野淳 他：Am. Rev. Tuberc., 77：669，675，1958.