

黄色菌（いわゆる非定型抗酸菌）の毒力についての考察

——ハツカネズミ全身 homogenize 法による宿主体内生菌数推移——

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教室山村雄一教授）

受付 昭和 34 年 10 月 19 日

I 序

先に本院入院結核患者の喀痰より分離した黄色菌（いわゆる非定型抗酸菌、以下 A.A.B. と略）について、その物質代謝上の特性を検討し、A.A.B. と他の抗酸菌との鑑別の一助になしうと報告したが¹⁾、今回は A.A.B. の毒力を理解するため、ハツカネズミ全身 homogenize 法を用いて、その宿主体内生菌数推移が他の抗酸菌といかに相違するかを比較検討してみた。なお A.A.B. はわれわれの分離した菌株およびアメリカ由来のものをあわせ用いた。

II 実験材料および方法

1. 使用菌株

(a) 非定型抗酸菌

i) 肺結核として国立療養所刀根山病院入院中の患者の喀痰より分離した 8 株（仮りに Y₁~Y₈ とす）

ii) アメリカ由来のもの

Bostrum D-35 } Photochromogens
Forbes 84 } Pollak & Buhler

Batley No. 100616—non-Photochromogen crow et al.

(b) 非病原性抗酸菌

i) *Mycobacterium (M.) phlei*

ii) *M. butyricum*

これらの菌株をそれぞれ約 4 週ごとに 1% KH₂PO₄ 小川培地に継代したものを、Kirchner 液体培地に表面培養する。A.A.B. は 15~20 日間、非病原性菌は 4~5 日間培養したものをを用いた。

2. 使用動物

d 系ハツカネズミの雄で、体重 15~20 g、生後約 6 週のものを使用し、固形飼料（Oriental Pellet MF Lot 87）で飼育した。

3. 使用菌液の調整および動物感染

Kirchner 培地培養菌液を、*M. phlei* では濾紙上に、*M. butyricum* および A.A.B. では遠心沈澱して集菌し（smooth なときには pasty な菌膜を形成するので、濾紙では粘着するため）、十分に滅菌蒸留水で洗滌したのち、beads flask 法によつて、湿菌量 5 mg/ml また

は 10 mg/ml の菌液を作り、0.2 ml ずつハツカネズミの尾静脈内へ接種した。

4. 全身生菌単位数および接種生菌単位数の測定

感染直後およびその後週を追つて、1~2 週ごとに 2 匹ずつの動物を任意抽出し、エーテルで致死させ、体重測定後、全身 homogenize 法により、全身を細切、Waring blender にて全身組織をほぼ均等化する。これを滅菌ガーゼで濾過し、この homogenate に 10% または 20% NaOH 液を加えて 10 分間処理、NaOH の終末濃度を 0.5% または 1%、組織の濃度を 100 mg/ml となるようにし、滅菌蒸留水で階段希釈して、各段階をそれぞれ 3 本ずつの 1% KH₂PO₄ 小川培地に 0.1 ml ずつ接種した。

なお接種菌液自身の生菌単位数は、10³ 希釈の段階において、0.5% または 1% NaOH 液で 10 分間処理したのち、段階的に希釈して 1% KH₂PO₄ 小川培地に 3 本ずつ、0.1 ml ずつ接種した。

集落計算は 37°C で培養したものを、非病原性菌では 4~5 日目、A.A.B. は 20 日目に検し、100 以下の集落が数えられる段階から行ない、菌液自身および全身の生菌単位数を算定した。

III 成 績

1. 予備実験の成績

a) 菌液自身の NaOH 処理の相違による生菌単位数の変動

M. phlei, *M. butyricum* およびわれわれの分離せる A.A.B. の一株（Y₁ 株）について、その 10 mg/ml の菌液を 10³ 希釈の段階において、それぞれ 0.5% および 1% NaOH 液で 10 分間処理、順次階段希釈した場合の生菌単位数の変動は表 1 のごとくである。

すなわち、*M. phlei*, *M. butyricum* においては 1% NaOH 10 分間処理で生菌単位数が 10⁻²~10⁻⁵ も著減しているが、0.5% 10 分間処理では、NaOH 無処理のさいの生菌単位数とほぼ合致している。一方 A.A.B. Y₁ 株では、1% 10 分、0.5% 10 分および無処理の 3 者とも、生菌単位数の変動を認めない。

b) 全身 homogenate の NaOH 処理の相違による生菌単位数の変動

表 1 アルカリ処理の相違による非病原性抗酸菌および非定型抗酸菌菌液の生菌単位数の変動
(10 mg/ml 0.1ml 当り 1% K₂HPO₄ 小川培養地植付け)

NaOH濃度 処理時間	Control (NaOH 処理せず)	0.5 % 10 分 間	1 % 10 分 間
M. phlei	6.0 × 10 ⁶	4.7 × 10 ⁶	0.017 × 10 ⁶
M. butyricum	310 × 10 ⁶	160 × 10 ⁶	0.0057 × 10 ⁶
A.A.B. Y ₁ 株	9.3 × 10 ⁶	7.5 × 10 ⁶	11.0 × 10 ⁶

表 2 アルカリ処理の相違による非病原性抗酸菌 (M. phlei) および非定型抗酸菌感染ハツカネズミ全身 homogenate の生菌単位数の変動
(10mg/ml 0.2ml ハツカネズミ尾静注直後、2匹のハツカネズミの平均)

NaOH濃度 処理時間	接種菌液 の生菌数	0.5 % 10 分 間	1 % 10 分 間
M. phlei	6.0 × 10 ⁶	3.0 × 10 ⁶	0.045 × 10 ⁶
A.A.B. Y ₁ 株	9.8 × 10 ⁶	15.0 × 10 ⁶	17.0 × 10 ⁶

M. phlei および A.A.B. Y₁ 株について、その湿菌量 10 mg/ml の菌液を 0.2 ml ずつそれぞれ d d 系ハツカネズミの尾静脈内接種直後、2 匹ずつのハツカネズミの全身 homogenate を作り、NaOH 終末濃度が 0.5 % および 1 % となるように 10 分間 NaOH 処理を行ない、その全身 homogenate の生菌単位数を、接種菌液自身の生菌単位数と比較した結果は表 2 に示すとおりである。

すなわち M. phlei では 0.5 % NaOH 10 分間処理の場合、その生菌単位数は接種菌液のそれと同じ order であるが、1 % 10 分間処理では明らかに回復菌数がおちている。Y₁ 株では 0.5 % および 1 % 処理の場合とも、接種菌液の生菌単位数とほぼ同じである。

以上 a), b) 予備実験の結果から、非病原性菌 M. phlei および M. butyricum 使用の場合は 0.5 % NaOH 10 分間、A.A.B. においては 1 % 10 分間 処理を行なうこととした。

2. 本実験

a) 非病原性抗酸菌 (M. phlei および M. butyricum) の宿主体内生菌数推移

表 3 および図 1 に示すとく、この 2 株とも感染後著明な菌数減少の途をたどり、M. phlei ではすでに 2 週目に、M. butyricum では 4 週目には生菌を認めなくなっている。

b) われわれの分離せる A.A.B. 株 (Y₁ ~ Y₈) の宿主体内生菌数推移

表 3 非病原性抗酸菌のハツカネズミ全身 homogenize 法による生菌数推移 (×10⁵)
(NaOH 0.5% 10分間処理、それぞれ2匹ずつの平均)

菌株	接種菌数	感染後経過週			
		1 W	2 W	3 W	4 W
M. phlei	60 × 10 ⁵	54	0.23	0	
M. butyricum	100 × 10 ⁵	770	7.9	0.33	0

図 1 非病原性抗酸菌およびわれわれの分離せる非定型抗酸菌 (3株) の宿主体内生菌数推移 (接種生菌数 10⁷ 前後の場合)

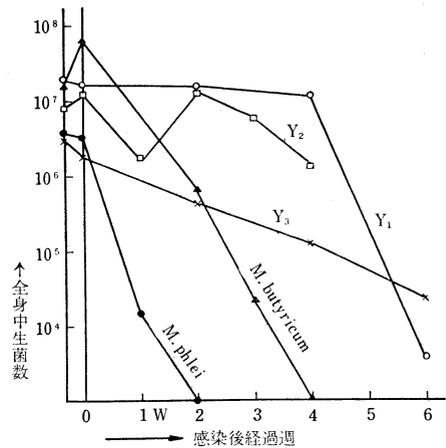


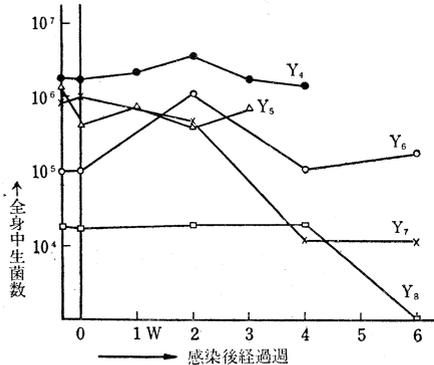
表 4 はその感染後の経過を追った生菌単位数の変動である。これを図示したものが図 1, 2 であつて、図 1 に示される Y₁, Y₂ および Y₃ 株は、その接種菌数が非病原性菌とほぼ同じ 10⁷ 前後であるが、いずれも 4~6 週にいたるも十分に生菌を認め、明らかに非病原性菌との差異が現われている。

図 2 は 10⁴~10⁶ 前後の接種菌数の場合で、図 1 の非病原性菌の場合よりその接種菌数が少ないにもかかわらず、

表 4 われわれの分離せる非定型抗酸菌のハツカネズミ全身 homogenize 法による生菌数推移 (×10⁵)
(NaOH 1% 10分間処理、それぞれ2匹ずつの平均)

菌株	接種菌数	感染後経過週					
		1 W	2 W	3 W	4 W	5 W	6 W
Y ₁	190	140	140	110		0.043	
Y ₂	98	110	22	170	79	19	
Y ₃	50	28	6.7	1.3		0.35	
Y ₄	28	25	35	54	23	18	
Y ₅	15	5.6	8.6	5.5	8.2		
Y ₆	1.0	1.1	11	1.2		3.4	
Y ₇	9.2	10	6.1	0.16		0.14	
Y ₈	0.32	0.23	0.38	0.38		0	

図2 われわれの分離せる非定型抗酸菌の宿主体内生菌数推移 (接種生菌数 $10^4 \sim 10^6$ 前後の場合)



$Y_4 \sim Y_8$ 株いずれも4週目においても十分に宿主体内に生菌を証明している。

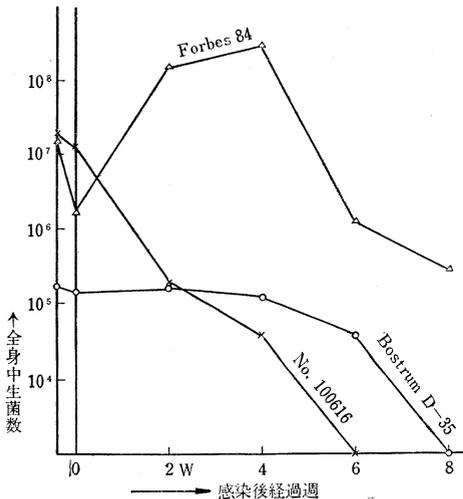
c) アメリカ由来のA.A.B. 3株の宿主体内全身生菌単位数の変動

表5および図3に示されるごとく、これらの3株の生菌単位数推移には明らかな差異があり、Photochromogen Forbes 84 株においては2~4週に著明な菌数

表5 アメリカ由来の非定型抗酸菌のハツカネズミ全身 homogenize 法による生菌数推移 (NaOH 1% 10分間処理, 2匹づきの平均)

菌株	接種菌数	感染直後	2W	4W	6W	8W
Bostrum D-35	21×10^4	18	21	15	6	0
Forbes 84	20×10^6	2.9	120	480	1.6	0.5
No. 100616	30×10^6	13.5	0.3	0.059	0	0

図3 アメリカ由来の非定型抗酸菌の宿主体内生菌数推移



単位の上昇を認めるが、他の2株ではかかる現象をみない。Photochromogen Bostrum D-35 株は6週ごろまで、接種時の菌数単位を保持し、battey No. 100616 株は接種後、漸次菌数減少を示している。

これらの3株と、われわれの分離したA.A.B.株の生菌数推移を比較すると、ともに非病原性抗酸菌 *M. phlei*, *M. butyricum* とは明らかに異なる生菌数推移を示し、非病原性菌では4週には全く生菌を検出しえないのに、これらはともに4週後も十分に宿主体内に検出さる。

また Y_6 株は Forbes 84 株と同じく、菌数上昇の傾向を示し、 Y_3 および Y_7 株は No. 100616 株に類似し、 Y_1, Y_2, Y_4, Y_5 および Y_8 株は Bostrum D-35 株と同一傾向の生菌数推移を示している。

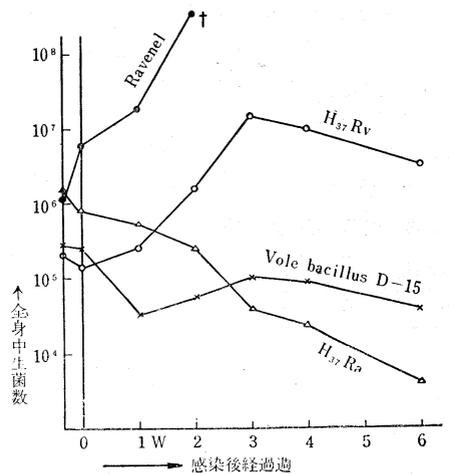
図4はわれわれの研究室において、同様ハツカネズミ全身 homogenize 法によつて行なわれた数種の抗酸菌の生菌数推移である。これとわれわれの分離したA.A.B. 菌株およびアメリカ由来のA.A.B. 菌株の生菌数推移を比較検討してみると、

1) A.A.B. Forbes 84 および Y_6 株は有毒 $H_{37}Rv$ 株と同様、感染後より全身生菌数の増加を示し、2~4週にはその生菌数が最大に達してのち、漸次菌数減少の傾向をとる。

2) A.A.B. No. 100616 および Y_3, Y_7 株は、無毒 $H_{37}Ra$ 株の菌数推移と同様の類型に属して、感染後漸次菌数減少を示している。

3) A.A.B. Bostrum D-35 および Y_1, Y_2, Y_4, Y_5, Y_8 株は、弱毒 Vole bacillus D-15 と同様な菌数推移を示して、感染後4週目ごろまで感染時とはほぼ同じ生菌単位数を維持している。

図4 数種の抗酸菌のハツカネズミ全身 homogenize 法による宿主体内生菌数推移 (加藤・三木による) (NaOH 1% 10分間処理, それぞれ2匹の平均)



すなわち A.A.B. のハツカネズミ全身生菌単位数の推移は、有毒 H₃₇Rv 型から無毒 H₃₇Ra 型にいたるまでその菌株によつて多様性を示すことが認められる。

IV 総括および考案

A.A.B. の動物に対する毒力については、Pollak ら²⁾ はハムスターに致死的な病変を呈するところから、実験的にもハムスターを使用することが好都合であったが、モルモットの場合と同じく A.A.B. の菌株によつてその病変の設定に普遍性がなく、最近ではむしろハツカネズミが A.A.B. の病原性を論ずる場合に重要な役割を有することが認められるようになってきた^{3)~11)}。

宿主体内へ入れられた A.A.B. が感染後の経過とともにその体内においていかなる population の推移を示すかを知ることが、A.A.B. と他の抗酸菌との毒力の相違を比較するうえに必要であるし、またその population の相違から A.A.B. の Mycobacteria における分類上の位置を明らかにする一つの方法となるのではないかと考える。

このような意味で、ハツカネズミ全身 homogenize 法を用いて A.A.B. と非病原性抗酸菌およびその他の抗酸菌との宿主体内全身生菌数推移がいかに相違するかを比較検討してみた。われわれの研究室の三木、加藤らはハツカネズミ全身 homogenize 法を用いて諸種の抗酸菌について、その全身生菌数推移と毒力との関連性を検討して、Ravenel 株、H₃₇Rv 株のごとく、強い毒力を示す一つの条件として、宿主体内に入つた菌が感染初期において増殖力を示すことが必要であると述べている^{12)~14)}。

A.A.B. においても、Forbes 84 株およびわれわれの分離せる Y₁ 株は、ハツカネズミ体内においてこの初期増殖力を呈して、あたかも H₃₇Rv 株の菌数推移を思わせる。

Bostrum D-35 および Y₁, Y₂, Y₄, Y₅, Y₈ 株は初期増殖を示さないが、感染時の生菌単位数を一定期間維持していることは弱毒 Vole bacillus D-15 と同様であつて、弱いながらもハツカネズミ組織に病変を形成せしめる能力を有しているものと考えられる。

No. 100616 株および Y₃, Y₇ 株の宿主体内生菌数推移は、無毒 H₃₇Ra 株のそれと同じ類型に属するものであつて、感染後漸次菌数減少を呈しているのは、これらの菌株がハツカネズミ体内で増殖する能力を欠き、組織の抵抗力とたたかつて一定の菌数を保持する力を有せず、ハツカネズミ組織に病変を設定することができないものと考えられる。

以上のように、A.A.B. 菌株のハツカネズミ体内生菌数推移が、有毒 H₃₇Rv の類型に属するものから無毒

H₃₇Ra の類型に属するものにとりて多様性を示すことは、今まで報告されたように種々の A.A.B. 菌株のハツカネズミに対する病原性が菌株によつて一定せず、致死的な病変から非常に弱い病変まで多種多様であることを立証しているものと思われる。一方非病原性抗酸菌 M. phlei および M. butyricum は感染後急激な生菌単位数の減少を示し、2~4 週目にはすでに体内に生菌を検出しえなくなる。すなわち宿主の組織がもつ防御機転によつて速やかに殺滅、排除されるものであろう。

なおアルカリ処理に対しては、これらの非病原性菌が 1% NaOH 10 分間処理により 0.5% 10 分間処理のさいよりその生菌数が 10⁻²~10⁻⁵ まで低下するのに比し、A.A.B. の諸株は有毒結核菌の場合と同じく 1% 10 分間処理でもその生菌数に影響をうけない。このようなアルカリに対する態度においても、A.A.B. と非病原性菌の間に明らかな差異があり、一面 A.A.B. と有毒結核菌との近似性を示している。

V 結 語

ハツカネズミ全身 homogenize 法を用いて、われわれが本院入院結核患者の喀痰より分離した非定型抗酸菌 8 株と、アメリカ由来の非定型抗酸菌 3 株の宿主体内生菌単位数の推移を比較するとともに、非病原性抗酸菌 (M. phlei, M. butyricum) およびその他の抗酸菌の生菌数推移と、その相違を検討して次の結果を得た。

1) 非病原性菌は、感染後急激な生菌数の減少を示し、2~4 週目にはすでに宿主体内に生菌を検出しえなくなる。

2) われわれの分離した非定型菌株も、アメリカ由来の菌株も同様な傾向の生菌数推移を示した。

3) 非定型抗酸菌のハツカネズミ全身生菌数推移は多様性を示して、次の 3 型に分類できる。

i) 有毒 H₃₇Rv 型に属するもので、初期増殖力を示すもの。

ii) 弱毒 Vole bacillus 型のごとく、一定期間 (感染後 4~6 週ころまで) 接種時の生菌数単位を保持するもの。

iii) 無毒 H₃₇Ra 型の類型に属するもので、感染後漸次菌数減少を呈するもの。

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、たえず御援助を頂いた刀根山病院研究室の三木勝治および加藤彦彦両博士に厚く感謝する。

参 考 文 献

- 1) 大島一馬：結核，34：400，昭34。
- 2) L.E. Wood, V.B. Buhler & A. Pollak：Am.

1960年3月

- Rev. Tuberc., 73 : 917, 1956.
- 3) A. Pollak & V.B. Buhler : Am. Rev. Tuberc., 71 : 74, 1955.
 - 4) L.H. Schmidt, R. Hoffmann & W. Steenken : Am. Rev. Tuberc., 75 : 169, 1957.
 - 5) H.E. Crow, C.T. King, C.E. Smith, R.F. Corpe & I. Stergus : Am. Rev. Tuberc., 75 : 199, 1957.
 - 6) W.H. Feldmann & A.G. Karlson : Am. Rev. Tuberc., 75 : 266, 1957.
 - 7) 田坂定孝 他：日本臨牀結核, 17 : 512, 昭32.
 - 8) 小川辰次：日本臨牀結核, 16 : 512, 昭32.
 - 9) 占部薫 他：結核, 33 : 379, 昭33.
 - 10) 占部薫 他：医学と生物学, 42 : 33, 昭32.
 - 11) 占部薫 他：医学と生物学, 45 : 196, 昭32.
 - 12) 加藤允彦 他：結核, 30 : 638, 昭30.
 - 13) 加藤允彦 他：結核, 31 : 158, 昭31.
 - 14) 加藤允彦 他：結核, 32 : 472, 昭32.