

肺結核症ならびに実験的結核モルモットより分離した 結核菌以外の抗酸性菌について

第2報 抗煮沸性, コード形成性, 中性赤反応, ナイアシン反応
および抗結核剤に対する感受性の実験

遠 山 和 明

北里研究所付属病院 (指導 小川辰次部長)

受付 昭和35年1月12日

I 緒 論

第1報において、私が分離した結核菌以外の抗酸性菌に関する臨床的な観察と、その肉眼的の性状について記したが、これらの成績を通して私の抗酸性菌は従来のわれわれの考えておつた非病原性抗酸性菌と推定されるものようであるが、アメリカの学者のいつている非定型的抗酸性菌にも一部一致するようである。第2報としてここで報告するのは試験管内実験であつて、はたして私の分離した菌は非病原性抗酸性菌に一致するかどうか、化学療法に広く行なわれている現在においてもこれらの試験管内の実験によつて結核菌との鑑別ができるかどうか、さらにはアメリカの人たちの非定型的抗酸性菌とどのような差があるかをみるためである。このことによつて、結核菌検索の態度のうえに検討を加えるとともに非定型的抗酸性菌の研究の足場を作らうと思つたからである。

II 実験方法

まず分離できた菌株の中で、はつきり橙色等に着色しているもの、結核菌のような色をしているが集落が湿潤であるもの、発育の早いもの等を選択して、これらの菌株について Ziehl-Neelsen 法で抗酸性であることを確かめ、さらに 1% 小川培地に継代培養することにより集落が R 型を示し結核菌と確定されたものは、これを新鮮分離結核菌として同時に検索を進めた。このようにして結核菌以外の抗酸性菌として分離されたものは 61 株であつて、これを被検群とよぶことにする。また対照として検索を進めた新鮮分離株は 16 株、このほかに保存結核菌の H₃₇Rv 株、H₃₇Rv-PAS 耐性株、H₃₇Rv-INAH 耐性株、H₃₇Rv-SM 耐性株、黒野株、H₂ 株の 6 株を同時に検査した。これらを全部合せて対照群とよぶことにする。試験管内の実験手技は従来わが国で広く使用されている方法として Karl-Preis¹⁾ の抗煮沸性検査、新しい方法としては Dubos & Middlebrook

2) の中性赤反応、Dubos³⁾ の Cord 形成性、今野⁴⁾ のナイアシン反応、抗結核剤に対する感受性の検査等を実施した。これらの方法についての予備実験および私の実施した手技は次のようである。

1) 抗煮沸性 (Karl-Preis)

Preis の原法は次のようである。塗抹標本を空気中で乾かし、37°C の Ziehl 氏液中に 15 分浸漬、水洗後 98°C の煮沸水中につけて一定時間後とり出し、1% メチレン青で後染色して鏡検する。その後、戸田⁵⁾、大道⁶⁾、占部⁷⁾、広木⁸⁾ が変法を発表している。私は Ziehl-Neelsen 染色だけでなく蛍光染色によつても検査した。方法は次のようである。

標本の作製：菌はすべて継代 1~2 週間の発育旺盛な時期のものを用いて、水晶玉を入れた磨砕コルベンで 3 分間磨砕、蒸溜水を加え約 1 mg/cc の均等浮遊菌液を作る。次に 7 倍ないし 10 倍に薄め、ガーゼ 2 枚で濾した卵白液 1 滴を載物ガラスに滴下、これに前記菌液 1 滴を加え混和、直径約 1.5 cm の円型に塗抹、1 被検菌につき 15 枚の標本を同時に作る。空中で自然乾燥を行ない、ついで火焰上 10 cm の所を 3 回通過固定する。このようにして作つた標本を次のような 2 種類の染色法によつて、抗煮沸性を検査した。

a) Ziehl-Neelsen 染色

標本に Ziehl 液を注ぎ火焰上で軽く水蒸気が出る程度に 2 分間加温染色 (8 枚のうち 1 枚の標本は対照用として普通の脱色、水染、後染色を行なつておく)。次に生理的食塩水による沸騰水中に前記標本 7 枚を同時に投入し、それぞれ 1 分、3 分、4 分、5 分、6 分、7 分、20 分後にとり出し、自然冷却後 1% メチレン青で後染色を 30 秒間行ない水染、自然乾燥後前の対照標本と比較しつつ脱色の有無を 500~750 倍の顕微鏡により観察した。

b) 蛍光染色

標本に 1% ローダミン液を注ぎ 30 秒間染色。ローダミン液を棄て 1% オーラミン液で 10~15 分間染色

し、生理的食塩水による沸騰水中に上記標本を同時に入れ、それぞれ 30 秒、1 分、1.5 分、2 分、2.5 分、3 分後にとり出し、自然冷却後 1% メチレン青で後染色を 30 秒間行ない、水染し、自然乾燥後、蛍光顕微鏡協会の装置で 200 倍拡大で鏡検した。菌液を水晶玉入りの磨砕ホルベンで作つたのは単個菌にして正確な成績を得るためであり、7~10 倍の卵白液を塗抹に使用したのは 20 分の沸騰水中の煮沸によつても剝離しないようにするためであつて、とくに蛍光法では 5 倍以下の濃度では判定に支障を示すのでこの稀釈濃度を用いた。また火焰固定は抗煮沸性の検査にはあまり行なわれていないようであるが、私がこれを実施したのは、塗抹した材料を十分に乾かして、実験の途中で剝離しないようにするためである。これらの卵白使用および軽い固定は抗煮沸性にはなんらの影響を示さないばかりでなく 20 分間、沸騰水中につけておいても剝離しないので、正確な成績を得ることができた。生理的食塩水を用いたのは、染谷ら⁹⁾に従つたのであるが、このことにより沸騰水の pH はほぼ一定し、従つて一定した成績を得ることができた。

2) コード形成性 (Dubos)

Dubos の方法は次のようである。Tween Albumin 液体培地に菌浮遊液を接種し 37°C の孵卵器に培養、7 日後にとり出し遠沈し、その沈渣を載物ガラスに塗抹し、染色して 50~200 倍の弱拡大で顕微鏡的集落をみる。

コード形成性の試験には、その後いろいろな方法が考案されているが私は次の 2 つの方法を行なつた。

a) 4 区画の Felsen Plate を用いる方法

齊藤¹⁰⁾にならぬ直径 10 cm の 4 区画に分画されたシャーレの各分画にキルヒナー寒天培地を 2.5 cc ずつ分注した透明固型培地上に 0.1 mg/cc の被検浮遊菌液を 0.1 cc ずつ接種し、37°C の孵卵器で培養。4 日目と 7 日目に 75 倍の弱拡大でシャーレの裏側から鏡検し顕微鏡的集落を観察した。

b) Kirchner 液体培地を用いる方法

Kirchner 液体培地 5 cc 中に 1 mg/cc の菌液 0.1 cc を接種し、37°C で培養し、4 日目と 7 日目に遠沈。沈渣をとり、これを載物ガラス上に塗抹、Ziehl-Neelsen 染色を施し 75 倍の弱拡大で鏡検した。

a) の方法は、視野は寒天培地であるため十分な明るさが得られ、また培地内に不純物または培地成分の結晶等は全く認められず集落は十分なコントラストをもつて視認することができた。またその集落は、遠沈、染色による機械的障害を受けないため自然の姿でみることができるのできわめて好都合である。b) の方法は従来まで行なわれている方法であるが正確さを期するため前者に併用した。判定は、蛇のような強いうねりを示して絡み

ついているものを陽性とし、ゆるい結びつきのコードを作つたものを疑陽性とし、コードを認めないものを陰性とした。

3) 中性赤反応 (Dubos & Middlebrook)

Dubos & Middlebrook の行なつている方法になつた。方法は次のようである。

1 白金耳の菌塊をとつて遠心沈澱管に入れ、50% メタノールで 2 回洗う。すなわち 2~3 cc のメタノールを加えてガラス棒で攪拌して菌塊を碎き、37°C の孵卵器に 1 時間放置し、これを遠沈して上清のメタノールを棄て、得た沈渣に再びメタノールを加えて同様の操作をくり返す。このようにして準備した菌塊に食塩 5 g、バルピタル曹達 1 g、蒸溜水 100 cc のようにして作つたアルカリ緩衝液 2 cc とさらに 0.05% 中性赤溶液 0.1 cc を加える。これをよく振盪して混ぜ、室温に 30 分ないし 60 分放置して菌塊の呈色をみた。菌塊が紫~赤となつたとき陽性、黄色を示したときは陰性、その中間である桃色は疑陽性と判定した。なお、菌株は継代 1~2 週培養のものを使用した。集落の着色している抗酸性菌株では、赤の色が多少はつきりしないがこのような場合でも判定に支障をきたすことはなかつた。

4) ナイアシン反応

今野の方法に従つた。方法は次のようである。継代固型培地に生えた菌の集落から 2~3 白金耳の菌をとり、95% アルコールに 4% に溶かしたアニリン液 1 cc の中に入れる。これに 10% の臭化シアン溶液 1 cc を加えて振盪する。対照としては、菌にアニリン溶液と蒸溜水を加える。直後にみて黄色を呈したら陽性、無色のときは陰性とする。

また黄色、橙色の着色系の抗酸性菌はアニリン液の中に入れてのみでそのアルコール中に、黄、橙の色素の色を溶かしてくる。この場合は陰性とする。

5) 抗結核剤に対する感受性の検査

化学療法剤の投与を受けていない患者から分離した菌株について間接法によつて実施した。使用培地、薬剤の混入濃度は次のようである。

| 抗 結 核 剤 | 培 地 | 混入濃度 (γ /cc) |
|--|-----------------------------|--|
| ストレプトマイシン パラアミノサリチル酸 イソニコチン酸 ヒドラゼッド | 1% 小川培地 | 0, 1 γ , 10 γ , 100 γ |
| サイクロセリン | 1% 小川培地 | 0, 10 γ , 100 γ , 1,000 γ |
| ピラジナマイド | pH 5.5 に 修正した 1% 小川培地 | 0, 10 γ , 100 γ , 1,000 γ , 5,000 γ |
| カナマイシン バイオマイシン | キルヒナー 寒天培地 | 0, 1 γ , 10 γ , 100 γ |

ストレプトマイシン（以下 SM と略す）、パラアミノサリチール酸（以下 PAS と略す）、イソニコチン酸ヒドラゼッド（以下 INAH と略す）、サイクロセリン（以下 C と略す）、ピラジナマイド（以下 PZA と略す）はすべて平沢らに従い所定濃度の 50 倍量の薬液を作つて、5 cc ずつ分注凝固した 1% 小川培地に 0.1 cc ずつ流し込み、1 晩 37°C の孵卵器に斜面を水平にしておかし、翌日使用した。カナマイシン（以下 KM と略す）、バイオマイシン（以下 VM と略す）は寒天培地を分注して固める前に所定濃度を混入した。接種菌量は $10^{-5}mg$ 、 $10^{-6}mg$ とした。菌種は集落が湿潤のものが多く、正確な秤量のできないものがあつたが、このような量でも数えられないこともある。判定は 3 週とした。

なお、発育の悪いものは 4 週で判定したものもある。そして SM, PAS, VM, KM は 10% 以上、PZA, C は 100% 以上、INAH は 1% 以上をもつて耐性とし、薬剤混入培地に発育した集落が対照とほぼ同数のときは完全耐性、対照よりも少ないときは不完全耐性とした。

以上 5 種の実験を同一菌株について行なつた。しかし一部、種々な都合で行なえなかつたものもある。なお、これらの実験は、同一菌株について同時に行なつたものは少なく、継代培養を行ないながら、かなり長い期間にわたつて実施されたものである。

III 成 績

1) 抗煮沸性

まず Ziehl 染色をみてゆくと表 1 の㉑のように被検群では 61 株の中の大部分すなわち 57 株 (93.4%) の Kf 値は 3 までであつた (Kf 値とは脱色に要する時間を分で表わしたものである)。4 までが 3 株、5 までが 1 株あつたが、対照群はその全部が 4 以上であつ

て、被検群と対照群の間には著明な開きがある。なお、Kf 値 4~5 の間に対照群が 5 株、被検群が 1 株存在する。次に蛍光染色においては表 1 の㉒のように、被検群は大部分の 56 株 (91.8%) は 0.5 であるが一部 2.5, 3 のものが 1 株ずつある。また対照群では 0.5 より 3 までの間に Kf 値が分散している。また Ziehl 染色と蛍光染色の相関関係を見ると表 2 の ㉓ のようであつて、被検群はその 61 株中の 41 株 (67.2%) が一致しているがその他のものはいずれも Ziehl 染色の Kf 値が高い。対照群は、Ziehl 染色が蛍光染色に比していずれも高い Kf 値を示している。さらに Ziehl 染色による抗煮沸性は対照群の保存菌株と新鮮分離株との間において差がないかどうかをみたが、保存株が 2 株のみであつたので差ははつきりしない。次に対照群の集落の性状によつて差があるかどうかをみた。S 型は 3 株だけであるが Kf 値 5 が 1 株、7 が 2 株であつて、7 以上のものはなかつた。したがつて対照群の中では比較的低いものと考えられようが、しかし被検群に比しては高い値を示している。次に被検群について有色と無色で差があるかどうかをみた。成績は表 3 のように無色のものが Kf 値の高いものが多い。また S 型と R 型とで差があるかをみた。成績は表 4 のようであつて、S 型に Kf 値の高いものがみられた。

2) コード形成性

被検群では、Kirchner 寒天平板法では 61 株中の 60 株 (98.4%) が陰性であつて 1 株のみが陽性を示したが、液体培地法では 59 株 (96.7%) が陰性を示し 2 株が疑陽性を示した。また、対照群では、Kirchner 寒天平板法では 19 株 (86.4%) が、液体培地法では 16 株 (72.7%) が陽性であつた。このように両方法において多少くい違いのあることはコード形成性の敏感さを示すのであろうが、これを要約すると被検群ではその大部分が陰性を、対照群では大部分が陽性を示したことに

表 1 抗 煮 沸 性

㉑ Ziehl 染色

| 抗煮沸値 | 抗煮沸値 | | | | | | 合 計 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-----|
| | 0 ~ 1 | 1 ~ 3 | 3 ~ 4 | 4 ~ 5 | 5 ~ 7 | 7 ~ 20 | |
| 被 検 群 | 40 | 17 | 3 | 1 | 0 | 0 | 61 |
| 対 照 群 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 12 | 22 |

注：表中の数字は菌株数を示す。

㉒ 蛍光染色

| 抗煮沸値 | 抗煮沸値 | | | | | | 合 計 |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----|
| | 0 ~ 0.5 | 0.5 ~ 1 | 1 ~ 1.5 | 1.5 ~ 2 | 2 ~ 2.5 | 2.5 ~ 3 | |
| 被 検 群 | 56 | 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 61 |
| 対 照 群 | 3 | 4 | 5 | 3 | 3 | 4 | 22 |

注：表中の数字は菌株数を示す。

表2 抗煮沸値の Ziehl 染色と蛍光染色との相関関係

① 被検群

| | | Ziehl 染色法 | | | | | | 合計 |
|-----------------------|-----|-----------|----|---|---|---|-----|----|
| | | 1 | 3 | 4 | 5 | 7 | 7 < | |
| 蛍 光 染 色 法 | 1 | 40 | 16 | 2 | 1 | | | 59 |
| | 3 | | 1 | 1 | | | | 2 |
| | 4 | | | | | | | |
| | 5 | | | | | | | |
| | 7 | | | | | | | |
| | 7 < | | | | | | | |
| | 合 計 | 40 | 17 | 3 | 1 | | | 61 |

注：表1に同じ。

② 対照群

| | | Ziehl 染色法 | | | | | | 合計 |
|-----------------------|-----|-----------|---|---|---|----|-----|----|
| | | 1 | 3 | 4 | 5 | 7 | 7 < | |
| 蛍 光 染 色 法 | 1 | | | | 3 | 2 | 2 | 7 |
| | 3 | | | | 2 | 3 | 10 | 15 |
| | 4 | | | | | | | |
| | 5 | | | | | | | |
| | 7 | | | | | | | |
| | 7 < | | | | | | | |
| 合 計 | | | | 5 | 5 | 12 | 22 | |

注：表1に同じ。

表3 被検群の Ziehl 染色による抗煮沸値と着色の関係

| 抗煮沸値 | 有 色 | 無 色 |
|--------|-----|-----|
| 0 ~ 1 | 29 | 11 |
| 1 ~ 3 | 4 | 13 |
| 3 ~ 4 | 0 | 3 |
| 4 ~ 5 | 0 | 1 |
| 5 ~ 7 | 0 | 0 |
| 7 ~ 20 | 0 | 0 |
| 合 計 | 33 | 28 |

注：表1に同じ。

なる。したがってコード形成性は被検群と対照群の間に差をはつきり示すと考えてよいであろう。次に平板法で陰性を示した3株の対照群の集落の性状は2株がS型であり1株がR型であったが、Kf値はいずれも7以

表4 被検群の Ziehl 染色による抗煮沸値と菌の性状の関係

| 抗煮沸値 | S 型 | R型および中間型 |
|--------|-----|----------|
| 0 ~ 1 | 30 | 10 |
| 1 ~ 3 | 12 | 5 |
| 3 ~ 4 | 3 | 0 |
| 4 ~ 5 | 1 | 0 |
| 5 ~ 7 | 0 | 0 |
| 7 ~ 20 | 0 | 0 |
| 合 計 | 46 | 15 |

注：表1に同じ。

上であった。また中性赤反応は2株が陽性、他の1株は疑陽性であった。そして、SM, P A S, INAH, C, P Z A, K M, V M に対する感受性検査ではいずれも感性であった。すなわちこれらの成績から、このコード陰性の3株は結核菌であったと推定される。

3) 中性赤反応

表5でみるように、被検群では61株中の36株(59%)が陰性であり、21株(34.4%)が疑陽性を示し4株(6.6%)が陽性であった。対照群では3株(13.6%)が陰性を示し、4株(18.2%)が疑陽性を示している。このように、大まかにいえば被検群には陰性が多く、対照群では陽性が多いといえるが、被検群、対照群ともに疑陽性が多いし、また被検群で陽性、対照群で陰性のような例が比較的多い。次に被検群のうち、中性赤反応陽性を示した4株の性状をみると集落の色は白色が2株、橙および黄色が各1株であり、その集落はいずれもS型であるし、Kf値も1が3株、3が1株でとくに高い値を示したものはない。コードもすべて陰性を示している。また耐性値が種々であった。これらの成績から、この4株は非病原性菌と推定されるものである。対照群中で中性赤反応陰性を示した3株についてみると、いずれもR型で、Kf値もそれぞれ5, 7, 7以上のように高い。コードはいずれも陽性である。すなわちこの3株は結核菌に一致するものである。なお耐性値をみると1株はいずれの抗結核剤に対しても感性を示しているが1株はSMに、1株はSM, P A S, INAHに耐性を示していた。

4) ナイアシン反応

表5のように被検群61株全部が陰性を示した。対照群は22株中21株(95.5%)が陽性を示し、1株のみが疑陽性を示した。この1株は、集落がS型であつてKf値が5で結核菌としては低いほうであるが中性赤反応もコードも陽性を示している。すなわち結核菌と推定されるものである。なお、SM, P A S, INAH等に対しては耐性を認めない。

5) 感受性検査

表5 コード形成性と中性赤反応およびナイアシン反応の成績

| 判 定 | | 菌 株 | | 陽 性 | 疑 陽 性 | 陰 性 | 合 計 |
|-------------------|--------------|-----------------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| | | | | | | | |
| 形成性 | コード | キルヒナー 寒 天 平 板 法 | 被 検 群 | 1 (1.6%) | 0 | 60 (98.4%) | 61 |
| | | | 対 照 群 | 19 (86.4%) | 0 | 3 (13.6%) | 22 |
| | 液 体 培 地 法 | 被 検 群 | 0 | 2 (3.3%) | 59 (96.7%) | 61 | |
| | | 対 照 群 | 16 (72.7%) | 4 (18.2%) | 2 (9.1%) | 22 | |
| 中 性 | 被 検 群 | 4 (6.6%) | 21 (34.4%) | 36 (59 %) | 61 | | |
| 赤反応 | 対 照 群 | 15 (68.2%) | 4 (18.2%) | 3 (13.6%) | 22 | | |
| ナイア シ ン 反 応 | 被 検 群 | 0 | 0 | 61 (100 %) | 61 | | |
| | 対 照 群 | 21 (95.5%) | 1 (4.5%) | 0 | 22 | | |

注：表1に同じ。

表6 抗結核剤に対する感受性検査の成績

| 抗結核剤 の 種 類 | 被 検 株 数 | 成 績 | | |
|---------------|------------|-----------|--------------|-----------|
| | | 完全耐性 | 不 完 全 耐 性 | 感 性 |
| SM | 1 | 1(100 %) | 0 | 0 |
| P A S | 0 | 0 | 0 | 0 |
| INAH | 2 | 0 | 1(50 %) | 1(50 %) |
| C | 38 | 2(5.3%) | 0 | 36(94.7%) |
| P Z A | 33 | 29(87.8%) | 2(6.1%) | 2(6.1%) |
| KM | 29 | 1(3.4%) | 14(48.3%) | 14(48.3%) |
| VM | 28 | 16(57.2%) | 6(21.4%) | 6(21.4%) |

注：表中の数字は菌株数を示す。

61 株の全部について検査したが、化学療法の実施されたことのあったものは除いたので表6のように菌株数は少なくなった。

SM, P A S, INAH は数が少ないので比較できない。その他の抗結核剤に対する感受性検査の成績をみると、P Z A にもつとも耐性のものが多くて、完全耐性、不完全耐性を入れると 93.1 % である。次に多いのは VM であつて 78.6 % であり、次に KM が 51.7 % であつて、C はもつとも少なくて 5.3 % である。

IV 総括および考察

私は先に報告した人および動物より分離した結核菌以外の抗酸性菌について、抗煮沸性、コード形成性、中性赤反応、ナイアシン反応および抗結核剤に対する感受性検査を行なつた。

まず個々の反応の成績について考察してみよう。抗煮沸性についていえば Ziehl 染色による方法では被検群では大部分は Kf 値が 1 から 3 までであり、対照群ではその全部が Kf 値 4~5 以上であつた。この成績は化学療法以前および以後の時代における占部¹²⁾、植田¹³⁾、染谷⁹⁾、工藤¹⁴⁾ の非病原性抗酸性菌についての成績、

占部、松枝¹⁵⁾、戸田¹⁶⁾ らの人および牛結核菌についての成績にほぼ一致する。なお被検群の抗煮沸性は無色のものは有色のものに比して、S 型は R 型や中間型のものに比して Kf 値の高いものが存在した。また結核菌の抗煮沸性については集落の性状、耐性の有無には関係のないことをみているが、村田¹⁷⁾ は SM, P A S の耐性結核菌は低いといつている。

次に蛍光染色による抗煮沸性は被検群ではその大部分が 0.5 以下であつたが 2~3 を示したものが 2 株あつたし、対照群では種々の程度の抗煮沸性を示した。

次にコード形成性であるが、Kirchner 平板法による場合は被検群では 1 例が陽性を示したのみで大部分のものが陰性を示したし、対照群では 3 株を除けば皆陽性を示した。諸先進の成績をみると非病原性抗酸性菌の大部分は陰性を示しているが私のように陽性を示したのものもある。たとえば幸田¹⁸⁾ は 47 株中の 1 株が、荒木¹⁹⁾ は 1 例が、植田²⁰⁾ は 19 例中の 13 例がそれである。次にアメリカの非定型的抗酸性菌では Albert G. Lewis²¹⁾ は皆陰性を示したが、Wendel H. Hell²²⁾、J.B. Selkon²³⁾、Horace E. Crow²⁴⁾ はいずれも陽性の菌株を認めている。集落の光による着色性によつて分類して観察したものうち、Lawrence G. Wayne²⁷⁾、Milton Huppert²⁸⁾ はいずれも Photochromogen の中にコードを示したものをみているし、Mervin Rogul²⁹⁾ は Photochromogen のものだけでなく Scotochromogen の 1 例においてもコードを認めたとつた。次に対照群中の 3 株がコード陰性を示した。これらの例は SM, P A S, INAH 等に対する耐性を証明していない。この成績は幸田のものとは一致するが J. B. Selkon²³⁾ は SM, P A S, INAH に耐性を示した結核菌の 1 株が陰性を示したといふ。次に中性赤反応であるが、私の成績は疑陽性が被検群で 1/3 あるし、対照群で 1/5 ある。またはつきり陽性を示したものが被検群で 4 株

あつたし対照群で陰性を示したものが3株あつた。私の被検群における成績は植田や松尾²⁵⁾の一部陽性を示した成績とはほぼ一致するが工藤ら²⁶⁾が非病原性抗酸性菌の全部陰性であつた成績とかなり異なる。またアメリカの非定型的抗酸性菌と比較すると J.B. Selkon ら, Wendel H. Hell ら, Harold Keltz ら²⁶⁾の大部分は陰性で一部陽性であつた成績とはほぼ一致するが、しかし、Lawrence G. Wayne ら²⁷⁾は 53 株中の 37 株, Milton Huppert ら²⁸⁾は 26 株中の 23 株が, Marvin Rogul ら²⁹⁾の 20 株中の 7 株, Irving Krasnow ら³⁰⁾の 11 株中の 10 株が陽性であつたというような、陽性率の高い成績とはかなり異なる。次に対照群の検査では、陰性、疑陽性を示したものが前述のように 1/3 もあつたがこれらの疑陽性、陰性の例はいろいろの性状で結核菌に一致するのであるが、耐性を示すものが多かつた。しかし、幸田は耐性とは関係ないという。

次にナイアシン反応は、被検群は 61 株全部が皆陰性で、対照群では 1 株のみ疑陽性であつた。これを諸先進の成績と比較すると、非病原性抗酸性菌における今野, K.A. Jensen の成績と一致するし、また J.B. Selkon ら, Wendel H. Hell, H.C. Engbaek ら³²⁾の非定型的抗酸性菌の成績ともほぼ一致する。なお、私の結核菌の 1 株は疑陽性を示しているが、この菌は S 型であつて Kf 値、中性赤反応、コードの点は皆結核菌に一致するし、種々の抗結核剤に対してもいずれも感性であつた。K.A. Jensen はカタラーゼ陰性の INAH 耐性結核菌の 4 株が陰性であつたというが、私の INAH 耐性結核菌はいずれも陽性を示している。

次に感受性についてであるが、私の被検群における SM, P A S, INAH の成績は菌株が少ないのではつきりしないが、多くのわが国^{14) 20)}や外国の学者^{21)~24)} 28) 29) 33) の研究によれば非病原性抗酸性菌や、非定型的抗酸性菌はこれらの 3 剤に対して耐性を示すものが多いことは一致した所見である。

次に C, P Z A, KM, VM の 4 者の耐性の率を比較すると C は 5.3 % でもつとも少なく、次に KM の 51.7 %, VM の 78.6 % であつて、P Z A は 93.9 % でもつとも多い。これを諸先進の成績と比較すると Emanuel Wolinsky ら³⁵⁾の P Z A, VM, C, 占部の KM, Marvin Rogul の VM の成績とはほぼ一致するが、Albert G. Lewis の C, VM, 工藤ら³⁴⁾の KM の成績とは一致しない。

個々の反応の成績は以上のようなのであるがこれを総括してみると大まかな点では私の成績と多くの先進たちの成績とは一致しているが、しかし細かい点ではくい違いがある。すなわち結核菌においてさえも多少くい違いがあるし非病原性抗酸性菌や非定型的抗酸性菌についてはそのくい違いは著明である。このような事実は技術的な誤

差もその 1 つの原因かもしれないが分離された菌がいろいろな種類のものがあるということも 1 つの原因であろう。私の分離した菌は前述のように、わが国の学者の非病原性抗酸性菌の性状とほとんど同じであるから、おそらくはその大部分は非病原性抗酸性菌であろう。この中にはたしてアメリカの学者のいう非定型的抗酸性菌が存在するかどうかは決定できなかったが、私の成績とアメリカの非定型的抗酸性菌についての諸学者の成績を比較するとかなり似ているもののように思われる。それで私は動物実験によつて、さらに研究を進めるつもりである。

次に結核菌と非病原性抗酸性菌との鑑別について考察してみよう。鑑別の最善の方法は疑陽性がなく、はつきり陽性と陰性とに分けられ、しかも結核菌が 100 % 陽性で非病原性抗酸性菌が 100 % 陰性、あるいはその反対の場合であろう。このような見地から抗煮沸性 (Ziehl 染色)、コード形成性、中性赤反応、ナイアシン反応の 4 者の優劣を比較した。まず疑陽性の率をみると中性赤反応がもつとも多く、次にコード形成性、抗煮沸性であり、ナイアシン反応はもつとも少ない。被検群の陰性を示した率と対照群の陽性を示した率を求めてみると次の表ようになる。

| | 抗煮沸性 | コード形成性 | 中性赤反応 | ナイアシン反応 |
|---------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|
| 被検群で陰性を示したものの数(陰性率) | 60(98.4%) Kf値4以下 | 60(98.4%) | 36(59%) | 61(100%) |
| 対照群で陽性を示したものの数(陽性率) | 22(100%) Kf値4以上 | 19(86.4%) | 15(68.2%) | 21(95.5%) |

すなわち被検群の陰性率、対照群の陽性率がナイアシン反応がもつともよく、次にコード形成性、抗煮沸性であり、中性赤反応はもつとも悪い。以上の成績から鑑別の点ではナイアシン反応がもつとも優れており、次にコード形成性、抗煮沸性、中性赤反応という順になるがコード形成性は判定するまでかなりの期間を要するからナイアシン反応、抗煮沸性のようなものがもつとも適当ではないかと推定されるが正確を期するためには Irving Krasnow もいつているように、1 つの反応だけでなく 2 つ以上の反応を同時に行なうべきであろう。表 7 の成績はこの事実を暗示している。

なお、蛍光法による抗煮沸性の検査は対照群における抗煮沸値が種々であり、被検群でも多少高いものがあるから鑑別にはむかない。藪茂ら³⁵⁾は鑑別できるといつているが私は賛成できない。横田の不可能とする説に賛成する。

V 結 論

非病原性抗酸性菌と推定される 61 株 (これを被検群

表 7 1つの反応に予想に反した成績を示した菌株におけるその他の反応成績

| 菌株名 | 検査成績 | | 抗煮 沸値 | 中 性 コー ド | | 薬 剤 感 受 性 | | | | | | | ナイア シン 反 応 | |
|------------------------------|----------|----|----------|----------|-----|-----------|---------------|---------------|-----|-------|-----|-----|------------------|----|
| | 着色 | 性状 | | 赤反応 | 形成性 | SM | P A S | INAH | C | P Z A | KM | VM | | |
| 被 検 群 | ■ | 白 | S | ⑥ | + | - | 耐 | 耐 | 不完耐 | 感 | 耐 | 耐 | 耐 | - |
| | ■ | 白 | S | 1 | ⊕ | - | 耐 | 不完耐 | 不完耐 | 感 | 耐 | 不完耐 | 耐 | -- |
| | ■ | 橙 | S | 1 | ⊕ | - | 不完耐 | 不完耐 | 感 | 感 | 耐 | 感 | 感 | - |
| | ■ | 白 | S | 3 | ⊕ | - | (100γ) 不完耐 | (100γ) 不完耐 | 不完耐 | 感 | 耐 | 不完耐 | 耐 | - |
| | ■ | 黄 | S | 1 | ⊕ | - | | | | | | | | - |
| | ■ | 灰色 | R | 3 | ± | ⊕ | 耐 | 感 | 感 | 感 | 不完耐 | 不完耐 | 耐 | - |
| 対 照 群 (結 核 菌) | ■ | 灰白 | R | 7 | ⊖ | + | 耐 | 感 | 感 | 感 | 感 | 感 | 感 | + |
| | ■ | 灰白 | R | > 7 | ⊖ | + | 耐 | 耐 | 耐 | 感 | 耐 | | | + |
| | 727モルモット | 灰白 | R | 5 | ⊖ | + | 感 | 感 | 感 | 感 | 感 | 感 | 感 | + |
| | ■ | 灰白 | S | 7 | ± | ⊖ | 不完耐 | 感 | 感 | 感 | 感 | 感 | 感 | + |
| | ■ | 灰白 | R | 10 | + | ⊖ | 感 | 感 | 感 | 感 | 感 | | | + |
| | ■ | 灰白 | S | 7 | + | ⊖ | 感 | 感 | 感 | 感 | 感 | 感 | 感 | + |

注：1) ○の中は予想に反した成績を示す。
 2) 記号は本文に準ずる。
 3) 感とは感受性，耐とは完全耐性，不完耐とは不完全耐性を示す。

とよぶことにする)，人型結核菌および人型結核菌と推定される（これを対照群とよぶことにする）22株の抗煮沸性，コード形成性，中性赤反応，ナイアシン反応および抗結核剤に対する感受性を実験した結果次のような成績を得た。

1) 抗煮沸性：Ziehl 染色法では被検群では Kf 値1までは 65.6% で，高いのでは 4~5 のものが1株あった。しかし対照群ではその全部が 4~5 以上であった。蛍光法では被検群の 96.7% が 1 以内であるが対照群では 0.5~3 までの間に分散していた。また Ziehl 染色法による抗煮沸値は蛍光染色法に比して高いものが多い。

2) コード形成性：Kirchner 寒天平板法では被検群の 98.4% が陰性であり，対照群の 86.4% が陽性であった。液体培地法では被検群の陰性率は 96.7% ，対照群の陽性率は 72.7% であった。

3) 中性赤反応：被検群の陰性率は 59% ，対照群の陽性率は 68.2% であった。

4) ナイアシン反応：被検群の陰性率は 100% ，対照群の陽性率は 95.5% であった。

5) 感受性：C，PZA，KM，VM についてみると耐性のもつとも多いのは PZA の 93.1% であつて次に VM の 78.6% ，KM の 51.7% であつて，C はもつとも少なく 5.3% であった。

6) これらの反応を通してみると私の分離した抗酸性菌は非病原性抗酸性菌に一致するが一部アメリカの学者たちのいつている非定型の抗酸性菌にも一致する。

7) これらの反応を結核菌と非病原性抗酸性菌の鑑別に応用するにはナイアシン反応がもつともよくて次に抗煮沸性，コード形成性，中性赤反応の順であるが正確を期するにはこれらの 2 ないし 3 つの反応を同時に実施するのが好ましい。

終始御指導と御鞭撻を頂きました慶応義塾大学石田二郎教授，ならびに北里研究所小川辰次部長，また種々この研究に協力して頂いた宮城小枝子さん，大谷典子さんに感謝の意を表します。

文 献

- 1) Karl Preis : Wiener Klin. Wschr., 43 : 841, 1922.
- 2) Dubos & Middlebrook : J. Exp. Med., 86 : 175, 1947.
- 3) Dubos : Am. Rev. Tbc., 58 : 698, 1948.
- 4) 今野：日結，17 : 504, 昭33；結核，33 (増刊号) : 362, 昭33.
- 5) 戸田：日本微生物病理学雑誌，20 : 2663, 昭1.
- 6) 大道：岡山医学雑誌，40 : 1747, 昭3.
- 7) 占部：福岡医学雑誌，29 : 2902, 昭11.

- 8) 広木：満州医学雑誌，23：726，昭10.
- 9) 染谷 他：結進，4：95，昭28.
- 10) 齊藤：結核，34：574，昭34.
- 11) 平沢：結核，30：199，昭30.
- 12) 占部：福岡医科大学雑誌，29（下）：102，昭11.
- 13) 植田：結核菌検査の実際，20頁，昭28.
- 14) 工藤 他：結進，26：181，昭34.
- 15) 松枝 他：結核，18：981，昭15.
- 16) 戸田：日新医学，32：591，昭13.
- 17) 村田：結核，32：584，昭32.
- 18) 幸田：結核，32：6，昭32.
- 19) 荒木：結核，30（増刊号）：76，昭30.
- 20) 植田：日結，18：6，昭34.
- 21) Albert G. Lewis et al. : Am. Rev. Resp. Dis., 80 : 188, 1959.
- 22) Wendel H. Hell et al. : Transactions of the 16th Conference on the Chemotherapy of Tuberculosis by the Veterans Administration-armed forces, 286, 1957.
- 23) J.B. Selkon et al. : Tubercle, 40 : 141, 1959.
- 24) Horace E. Crow et al. : Am. Rev. Tbc., 75 : 199, 1957.
- 25) 松尾：結核，31：651，昭31.
- 26) Harold Keltz et al. : Transactions of the 16th Conference on the Chemotherapy of Tuberculosis by the Veterans Administration-armed forces, 290, 1957.
- 27) Lawrence G. Wayne et al. : Am. Rev. Tbc., 76 : 451, 1957.
- 28) Milton Huppert et al. : Am. Rev. Tbc., 76 : 468, 1957.
- 29) Marvin Rogul et al. : Am. Rev. Tbc., 76 : 697, 1957.
- 30) Irving Krasnow et al. : Am. Rev. Tbc., 71 : 361, 1955.
- 31) K.A. Jensen : 結核文献の抄録速報，9：750，昭33より引用.
- 32) H.C. Engbaek et al. : Acta tbc. scandinavica, 34 : 145, 1957.
- 33) Emanuel Wolinsky et al. : Am. Rev. Tbc., 76 : 497, 1957.
- 34) 工藤 他：結進，26：181，昭34.
- 35) 藁茂 他：Modern Media, 2 : 11, 1956.
- 36) 横田：慈恵会医科大学雑誌，67：43，昭27.