

非定型抗酸性菌(黄色菌)の生化学的性質

東 村 道 雄

国立療養所大府荘

受付昭和35年6月2日

緒 言

非定型抗酸性菌(黄色菌=atypical chromogenic mycobacteria)の細菌学的性状については多くの報告があるが、生化学的性質に関するものは少ない。大島¹⁾は非定型抗酸性菌の物質代謝を研究し、他の非病原性抗酸性菌に比し代謝活性が弱く、糖質、芳香族化合物、TCA cycleの基質の中では glycerol を基質としたときに比較的酸素吸収が増大することを報告し、また山村²⁾は cord factor, 赤外線吸収 spectrum, tuberculin 活性 peptide について報告している。しかし非定型抗酸性菌を他の既知抗酸性菌から生化学的に区別する特徴は見だされていない。著者は非定型抗酸性菌の核酸含有量およびピクリン酸還元を検討したところ、非定型抗酸性菌のグループ分けが可能であるように思われた。以下、非定型抗酸性菌を atypical chromogenic mycobacteria の頭文字をとつて ACM と記す。

実験材料および方法

(1) 菌株：被検 ACM は肺結核患者喀痰から分離された8株で国立療養所黄色菌研究班の保存株の一部である(石井株を除く)。これらはいずれも scotochromogen であるが、小川培地での発育速度は一定ではない。したがって本実験では、予備実験の結果から、おおよそ停止期のはじめにあたると思われる培養日数の菌を使用した。したがって表1の培養日数は被検菌のおおよその発育速度を示している。対照としては種々の既知抗酸性菌8株を使用した(表1参照)。

(2) 培地：中試験管に8ml分注し斜面に固めた1%小川培地を使用した。

(3) 湿菌量および乾燥菌量の測定：1%小川培地に十分発育した菌を白金耳でとり、蒸留水で3回洗滌したのち集菌し、濾紙上に約3分放置したのち、秤量した。乾燥菌量の測定には湿菌の一部をとつて秤量したのち、60°C 24時間乾燥して菌量を測定した。湿菌量と乾燥菌量との関係は菌株による差がほとんどなく、乾燥菌量は湿菌量の $20 \pm 1\%$ であつた。したがって、以下すべて湿菌量で成績を示す。

(4) RNA および DNA の定量法：Schneider³⁾法の核酸分画について、それぞれ orcinol-HCl 反応⁴⁾

および diphenylamine 反応⁵⁾で測定した。

(5) ピクリン酸還元能の測定：ピクリン酸還元能は著者の方法^{6)~10)}によつた。菌の最終濃度約 4~10 mg/ml の反応系(後述)で基質なしで好氣的条件のまま 37°C 20~24 時間静置培養した。赤変した反応系に等量(5 ml)の acetone を加えて濾過し、透明な濾液の吸光度(550 m μ)を測定し、標準曲線によつてピクリン酸還元量を定量した。この程度の濃度では、還元は24時間までおおよそ直線的に起こるので、ピクリン酸還元量は湿菌量 1 mg が1時間に還元するピクリン酸量として表示した。

(6) ピクリン酸を水素受容体とした代謝活性の測定：等モルに加えた基質の存在で起こるピクリン酸還元量の比(還元 spectrum)は菌株によりおおよそ一定で培地によつて著明な影響を受けない¹¹⁾。還元 spectrum の測定には次の反応系を用い、前記と同様にして測定した吸光度の比で表わした。反応系：菌液、2.0 ml；0.067 M 磷酸緩衝液 pH 7.8, 1.0 ml；0.4% ピクリン酸, 1.0 ml；0.1 M 基質(Na 塩) 1.0 ml, 計 5.0 ml。

実 験 成 績

(1) DNA 含有量(表1)

表1のごとく、DNA 含有量によつて ACM を他の既知抗酸性菌と区別することはできない。しかし ACM をおおよそ2群に分かちうるごとく思われた。すなわち、DNA 含有量が少ない群(石井, No. 11, No. 27, No. 28, No. 34の5株)とその2倍以上ある群(No. 16, MB 6, 刀Iの3株)とが区別された。MB 6株の含有量はとくに高かつた。

注目すべきことは、表1にもみられるごとく、抗酸性菌の DNA 含有量が、最少量を示す M. avium 獣調株のそれのほぼ倍数関係を示していることである。これについては別に詳報するが¹²⁾、進化学的見地から注目すべき所見と思われる。

(2) RNA : DNA 比(表1)

抗酸性菌の RNA : DNA 比および RNA 絶対量は一般細菌に比してかなり高い¹³⁾。ACM の中には抗酸性菌中でもとくに高い RNA : DNA 比を示すものがあることが注目された(たとえば, No. 11, No. 27, No. 28, No. 34の4株)。

表1 非定型抗酸性菌 (atypical chromogenic mycobacteria = 黄色菌) および
既知抗酸性菌の RNA : DNA 比および DNA 含有量

| 菌 | 株 * | 培養日数 | RNA : DNA ** | DNA 含有量 *** (mcg/mg 湿菌量) | DNA 含有 量比 **** |
|---------------------------------------|-----------|---------|-----------------|-----------------------------|-------------------|
| atyp. chrom. myc. | 石井 | 13 | 6.22 ± 0.51 (2) | 4.00 ± 0.44 (2) | 1.2 |
| " | No. 11 | 6 | 17.5 (1) | 3.00 (1) | 0.9 |
| " | No. 16 | 10 | 7.68 (1) | 6.78 (1) | 2.1 |
| " | No. 27 | 9 | 17.4 (1) | 2.23 (1) | 0.7 |
| " | No. 28 | 9 | 17.1 (1) | 3.50 (1) | 1.1 |
| " | No. 34 | 6 | 19.0 (1) | 3.46 (1) | 1.1 |
| " | MB 6 | 8 | 4.41 ± 2.39 (2) | 15.8 ± 0.22 (2) | 4.8 |
| " | 刀 I | 8 | 6.82 ± 1.05 (2) | 6.03 ± 0.99 (2) | 1.8 |
| M. tuberc. v. hom. H ₃₇ Rv | | 28 ~ 30 | 6.10 ± 2.89 (5) | 9.06 ± 2.76 (5) | 2.8 |
| " | Aoyama-B | 28 ~ 30 | 5.88 ± 2.00 (5) | 7.72 ± 1.06 (5) | 2.3 |
| " | Frankfurt | 28 | 7.33 (1) | 5.88 (1) | 1.8 |
| M. tuberc. v. bov. BCG | | 28 | 7.22 (1) | 5.96 (1) | 1.8 |
| M. avium | 獣調 | 7 ~ 9 | 5.48 ± 1.47 (4) | 3.28 ± 1.51 (4) | 1.0 |
| M. avium | 竹尾 | 7 ~ 9 | 6.48 ± 2.04 (4) | 6.38 ± 2.38 (4) | 2.0 |
| M. smegmatis | 伝研 | 7 ~ 10 | 4.03 ± 1.31 (4) | 7.30 ± 1.15 (4) | 2.2 |
| M. phlei | 伝研 | 7 ~ 10 | 8.17 ± 3.90 (4) | 5.23 ± 1.63 (4) | 1.6 |

* 1% 小川培地培養

** (平均値) ± (標準偏差) () 内は実験回数

*** (平均値) ± (標準偏差) () 内は実験回数, 乾燥菌量は湿菌量の 20 ± 1% であったので, 乾燥菌量 1mg 当りの DNA 含有量は
この5倍となる。

**** M. avium 獣調株を1.0としたときの比

表2 非定型抗酸性菌および既知抗酸性菌の
ピクリン酸還元能
(基質なしのときに, 湿菌量 1 mg が)
(1 時間に還元するピクリン酸量)

| 菌 | 株 * | 還元ピクリン酸量 |
|---------------------------------------|----------|----------------|
| atyp. chrom. mycobac. | 石井 | 2.65 mcg/hr/mg |
| " | No. 11 | 0.52 |
| " | No. 16 | 1.42 |
| " | No. 27 | 0.61 |
| " | No. 28 | 0.94 |
| " | No. 34 | 0.67 |
| " | MB 6 | 3.00 |
| " | 刀 I | 4.70 |
| M. tuberc. v. hom. H ₃₇ Rv | | 0.82 |
| " | Aoyama-B | 0.91 |
| M. avium | 獣調 | 3.28 |
| M. smegmatis | 伝研 | 4.68 |
| M. phlei | 伝研 | 2.32 |

* 表1参照。

ACM は RNA : DNA 比によつておおよそ 2 群に分かちえた。すなわち, 第 1 は比のはなはだ高い前記の 4 株で, 他は既知抗酸性菌とほぼ同水準の値を示す 4 株 (石井, No. 16, MB 6, 刀 I) である。

(3) ピクリン酸還元能 (表 2)

ピクリン酸還元能についても, ACM をとくに既知抗酸性菌から区別することはできなかつたが, ACM をおおよそ 2 群に分かつことができた。すなわち, 1 つはピクリン酸還元能が 1 mcg/hr/mg 以下の群 (No. 11, No. 27, No. 28, No. 34 の 4 株) で, 他は 1 mcg/hr/mg 以上の群 (石井, No. 16, MB 6, 刀 I の 4 株) である。既知抗酸性菌では M. tuberculosis は前者に, M. phlei, M. smegmatis, M. avium は後者に属する (表 1)。

(4) ピクリン酸還元 spectrum (ピクリン酸を水素受容体としてみた代謝活性) (表 3)

(a) malate : malate の存在でピクリン酸還元が著明に亢進することは抗酸性菌全部にみられた。この現象は抗酸性菌のほか B. subtilis にもみられているが, 他の菌ではみられない¹⁴⁾。

(b) glycerol : 既知抗酸性菌の中には glycerol の存在で著明なピクリン酸還元を示すものはなかつたが (表 3 および文献 11), 被検 ACM 8 株中 6 株 (石井, No. 11, No. 16, No. 27, No. 28, 刀 I) が glycerol の存在で著明なピクリン酸の還元を起こした。glycerol に関する代謝活性のたかまはり ACM にのみみられるごとく思われ, この点酸素吸収でみた大島¹⁾の観察結果と一致する。

表 3 非定型抗酸性菌および既知抗酸性菌の、等モル基質（終末濃度 0.02 M, Na 塩）添加時のピクリン酸還元量の比 (picric acid reduction spectrum)

| 菌 株 * | ACM 石 井 | ACM No. 11 | ACM No. 16 | ACM No. 27 | ACM No. 28 | ACM No. 34 |
|-------------|------------|--------------------------------|------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| 基 質 | | | | | | |
| no substr. | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| glucose | 1.90 # | 1.23 | 1.07 | 0.84 | 1.24 | 1.00 |
| glycerol | 1.55 # | 1.64 # | 1.60 # | 1.41 # | 1.73 # | 1.00 |
| lactate | 1.26 | 1.45 # | 1.44 | 1.08 | 1.61 # | 1.22 # |
| pyruvate | 1.80 # | 1.86 # | 1.60 # | 1.16 # | 1.61 # | 2.00 # |
| malate | 1.26 | 1.45 # | 1.44 | 1.41 # | 1.49 | 1.22 # |
| acetate | 1.34 | 1.23 | 1.44 | 1.08 | 1.49 | 1.20 |
| succinate | 1.36 | 0.82 | 1.52 # | 1.16 # | 1.12 | 1.00 |
| ACM MB 6 | ACM 刀 I | M.t.v.h. H ₃₇ Rv | M.t.v.h. 青山 B | M. avium 獣 調 | M. smegmatis 伝 研 | M. phlei 伝 研 |
| 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| 0.85 | 1.31 # | 1.24 | 1.10 | 1.28 # | 1.43 # | 1.53 |
| 1.08 | 1.54 # | 1.12 | 1.10 | 1.03 | 1.14 | 1.20 |
| 0.85 | 1.11 | 1.37 # | 1.24 # | 1.05 | 1.18 | 1.64 |
| 1.64 # | 0.98 | 1.49 # | 1.49 # | 1.14 # | 1.28 # | 1.80 # |
| 1.64 # | 1.13 # | 1.61 # | 1.24 # | 1.52 # | 1.74 # | 1.69 # |
| 1.49 | 0.86 | 1.24 | 1.00 | 1.10 | 1.20 | 1.83 # |
| 1.54 # | 0.91 | 1.12 | 1.00 | 1.14 # | 1.20 | 1.36 |

* ACM atypical chromogenic mycobacteria
 M. t. v. h. = Mycobacterium tuberculosis var. hominis
 いずれも 1% 小川培地発育。培養日数は表 1 参照。
 # ピクリン酸還元度の強い値 3 つを示す。

(c) lactate: 既知抗酸性菌中では人型結核菌が lactate の存在で比較的著明なピクリン酸還元量の増加を起したが、このような反応を示すものは被検 ACM 8 株中の 3 株 (No. 11, No. 28, No. 34) にみられた。

(d) glucose: 既知抗酸性菌中では M. avium と M. smegmatis が glucose の存在で著明なピクリン酸還元を示した (表 3 および文献 14)。このような反応は ACM の 2 株 (石井, 刀 I) にみられた。

考察および総括

(1) atypical chromogenic mycobacteria (ACM) の分類学的地位

一体 ACM は人型結核菌に似た性質をもつか、非病原性抗酸性菌に似た性質をもつかが細菌学的に問題となっているが、ここに検した生化学的性質からは、被検 8 株とも一部では人型結核菌に似ていても他では異なっており、また非病原性抗酸性菌のいずれとも一致するものはない。このような結果は、元来 ACM なる定義が漠然としたものである以上やむをえないものかもしれない。

人体由来の ACM の起原については、(a) 人型結核菌の変異による、(b) 単なる抗酸性菌雑菌にすぎないとの 2 つの考えがある。しかし人型結核菌由来説はまだ科学的な根拠をもたないと思われる。ACM の若干

の性質が人型菌に似ていることは抗酸性菌である以上ある程度の共通性があるのは当然であるし、また抗結核剤に対する耐性が高いことは非病原性抗酸性菌に一般にみられる性質である。ただ代謝活性が比較的弱い一群の ACM があることは (文献 1 および本報)、既知の非病原性抗酸性菌と若干趣を異にする。しかし本報に示したとおり、ピクリン酸を水素受容体としてみると、代謝活性の弱いものもあるが、また一方既知非病原性抗酸性菌と同じくらいに代謝活性の高いものもある。要するに ACM を括一的に考えることは無理であるが、生化学的性質からみても、既知の非病原性抗酸性菌よりは人型結核菌に近い性質を示す一群もあり、また RNA : DNA 比や glycerol 代謝活性の面で既知の抗酸性菌のいずれとも異なる性質をもつ群もあるように思われる。おそらく ACM は自然界にあつて種々雑多の変異をしている抗酸性菌が一過性に人体に寄生したものと考えるのが常識的であろう。もちろんその一部には人体または動物にある程度の病原性をもつものもあるであろう。

(2) 抗酸性菌の変異の要因

抗酸性菌の永続的な変異の要因としては他の一般細菌と同じく遺伝子突然変異と染色体異常が考えうるであろう。しかし、これらでは DNA 量そのもの変化は起こらないはずである。ところが実験成績で述べたように

表4 DNA含有量, RNA:DNA比, ピクリン酸還元能, ピクリン酸還元 spectrum からみた非定型抗酸性菌ならびに既知抗酸性菌の比較(総括)

| 菌 株 * | DNA 含有量比 ** | RNA : DNA | ピクリン酸還元能 (mcg/hr/mg) | reduction spectrum *** |
|-----------------------------|-------------|-----------|----------------------|------------------------|
| ACM No. 11 | 1 | 15 < | 1 > | M P L G |
| 〃 No. 27 | 1 | 15 < | 1 > | M P G |
| 〃 No. 28 | 1 | 15 < | 1 > | (M) P L G |
| 〃 No. 34 | 1 | 15 < | 1 > | M P L |
| ACM 石井 | 1 | 10 > | 1 < | (M) P D G |
| 〃 No. 16 | 2 | 10 > | 1 < | (M) P G |
| 〃 MB 6 | 5 | 10 > | 1 < | M P |
| 〃 刀 I | 2 | 10 > | 1 < | M D G |
| M.t.v.h. H ₃₇ Rv | 3 | 10 > | 1 > | M P L |
| M.t.v.h. 青山 B | 2 | 10 > | 1 > | M P L |
| M. phlei | 2 | 10 > | 1 < | M P A |
| M. smegmatis | 2 | 10 > | 1 < | M P D |
| M. avium 獣調 | 1 | 10 > | 1 < | M P D |

* ACM=atypical chromogenic mycobacteria
M.t.v.h.=mycobacterium tuberculosis var. hominis
1%小川培地発育。培養日数は表1参照。

** M. avium 獣調株の DNA 含有量を1としたときの比, 4捨5入

*** ピクリン酸還元能の強い基質を示す。

M: malate P: pyruvate L: lactate D: dextrose G: glycerol A: acetate

抗酸性菌の DNA 含有量には倍数性が存在するようである。この所見は抗酸性菌の変異および進化に ploidy の関与を暗示することと思われる。

(3) atypical chromogenic mycobacteria (ACM) の分類の試み

DNA 含有量, RNA:DNA 比, ピクリン酸還元能, 還元 spectrum について被検 ACM を整理してみると表4のごとくなる。すなわち, これらの検査項目のおのおのによつて被検 ACM を2群に分かちうるが, さらにこれらを総合しても ACM をおおよそ2群に分類しうるごとく思われる。

第1群は No. 11, No. 27, No. 28, No. 34 の4株で, DNA 含有量比1, RNA:DNA 比15以上, ピクリン酸還元能 1 mcg/hr/mg 以下, 還元 spectrum では malate, pyruvate, lactate (No. 27 を除く), glycerol (No. 34 を除く) の優位を示す。

第2群は石井, No. 16, MB 6, 刀 I の4株で, DNA 含有量比2以上(石井株を除く), RNA:DNA 比10以下, ピクリン酸還元能 1 mcg/hr/mg 以上, 還元 spectrum では malate, pyruvate (刀 I 株を除く), glucose (石井, 刀 I の2株のみ), glycerol (MB 6 を除く) の優位を示す。

もちろんこの分類はまだ試みにすぎない。将来多数の株についての検討を経なければならないが, 一つの試みとして提出する次第である。

結 論

atypical chromogenic mycobacteria (ACM) の生化学的性質を DNA 含有量, RNA:DNA 比, ピクリン酸還元能, 還元 spectrum (ピクリン酸を水素受容体とした) の4項目について検討した。

1) 被検 ACM 8 株中の4株は RNA:DNA 比15以上の値を示した。このような高い値は他の既知抗酸性菌にはみられなかった。

2) 被検 ACM 8 株中の6株は glycerol の存在で強いピクリン酸還元を示した。このような性質は他の既知抗酸性菌にはみられなかった。

3) 被検 ACM は DNA 含有量, RNA:DNA 比, ピクリン酸還元能, 還元 spectrum によつて2群に分かつことができた。またこれら4つを総合してもおおよそ2群に分かちうるごとく思われた。

御校閲を賜わつた勝沼六郎荘長, 日比野進教授に感謝の意を表す。また実験に協力された本研究室の水野, 外山, 岡田, 村瀬の諸氏に感謝の意を表す。

文 献

- 1) 大島一馬: 結核, 34: 400, 昭34.
- 2) 山村雄一: 日本結核病学会総会報告, 昭35.
- 3) Schneider, W.C.: J. Biol. Chem., 161: 293, 1945.
- 4) Kerr, S.E. & Seraidarian, K.: J. Biol. Chem., 159: 211, 1945.

- 5) Dische, Z. : Mikrochemie, 8 : 4, 1930.
- 6) 東村道雄 : 医学と生物学, 33 : 59, 昭29.
- 7) 東村道雄 : 同上, 33 : 270, 昭29.
- 8) 東村道雄 : 同上, 34 : 111, 昭30.
- 9) 東村道雄 : 同上, 37 : 79, 昭30.
- 10) 東村道雄 : J. Biochem., 掲載予定.
- 11) 東村道雄 : Amer. Rev. Resp. Dis., 掲載予定.
- 12) 東村道雄 : J. Biochem., 掲載予定.
- 13) 東村道雄 : 日本細菌学雑誌, 掲載予定.
- 14) 東村道雄 : Japan. J. Microb., 掲載予定.