

抗酸菌の呈する硝酸塩還元反応

佐藤 直行

国立予防衛生研究所結核部 (部長 室橋豊徳)

受付 昭和36年7月31日

生物化学的反應によつて抗酸菌を分類同定しようとする試みは、未分類抗酸菌の出現以来再び魅力ある研究課題となつている。その研究結果の一つとして、ナイアシントテストのような過去の研究成果を基礎として発展した優れた方法が得られている。しかし、未分類抗酸菌の分類に利用できるような化学反応はまだ確認されていない。

現在、Runyon ら¹⁾によつて便宜的に一時的に定義区分されている未分類抗酸菌については、これに属すとみなしうる分離菌株を生理学的、生化学的に検討し、その結果を総合して未分類抗酸菌とはという概念を再形成しようとする考え方がある。他方、未分類という概念にとらわれず、これらの菌と既知抗酸菌との異同はなにかという分析的な考え方もある。

Runyon らのいう未分類抗酸菌の4群に属する菌株が、群ごとに均一同等の生理学的性状をもつていれば前者の考え方も肯定しうるが、もしある検査により一群中に異なつた性状を有するものを含むとすれば、この菌株群に対する考え方も変えざるをえなくなるであろう。

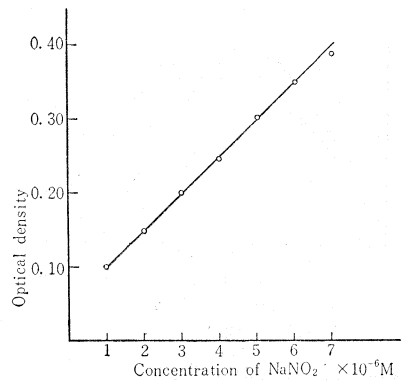
さて、抗酸菌の呈する硝酸塩還元反応は近年になつて検討されたものではない。すでに Gordon ら^{2) 3)}は非病原性抗酸菌について本反応を検討し、これら菌株の生物化学的性状の1項目にとりあげている。また、BCG について本反応を検討した報告もある⁴⁾。最近、Virtanen⁵⁾は多数の抗酸菌株について硝酸塩還元反応を詳細に検討した結果、本反応陰性を示す菌株は牛型菌であると結論している。しかし、その論文において、ある菌型に属する菌株の中に強陽性のものと陰性のものが混在している点は理解しがたく、また未分類抗酸菌についても同じことが指摘できる。そこで抗酸菌株の本還元反応の陰、陽を検索し、この区分と既知抗酸菌型との関係を調べようと考えた。まず、定性反応を試みたが、その結果

を裏づけるためには定量的測定が必要となり、それを検討した。その実験成績を次に述べる。

実験方法

使用した菌株は、日本およびアメリカ由来の未分類抗酸菌を含めてすべて予研結核部保存のものである。それらの各菌株については成績を述べるときふれることにする。

亜硝酸塩の定量法： 10^{-6} M～ 10^{-5} M の NaNO_2 水溶液をつくり、その4 ml ずつを内径ほぼ一定の洗浄した中試験管にとつた。各試験管に Shinn 法に従つて2倍稀釈濃塩酸 0.1 ml、0.2% Sulfanilamide 液 0.4 ml、0.1% N-(1-Naphthyl)-ethylenediamine-dihydrochloride 液 0.1 ml をこの順序に加えた。数分間室温において発色した紫赤色を、日立光電比色計 S 53 フィルター (緑色) を用いて比色した。図1にその定量標準曲線を示した。すなわち、 10^{-6} M より 6×10^{-6} M までの NaNO_2 溶液では、その吸光度が一直線にあつて定量可能であることを認めた。

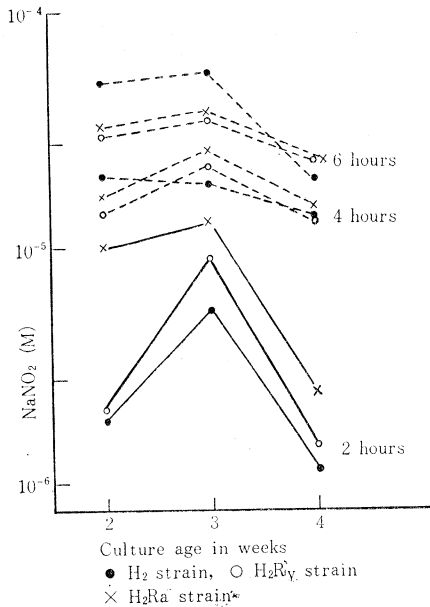
Fig. 1. Standard Curve of NaNO_2 Solution

硝酸塩還元能の定量的測定法：抗酸菌菌株は、すべて 1% 小川培地上に移植しその培養菌体を使つた。硝酸塩は pH 7.0 の磷酸塩緩衝液をもつてつくつた 10^{-2} M の NaNO_3 液とし、高圧滅菌し保存した。培養菌体 60 mg を無菌的に秤り、これを滅菌大試験管にとつた 10^{-2} M の NaNO_3 液 30 ml の中に入れ、管底に沈下せしめた。ただし、鳥型菌、未分類抗酸菌など S 型集落を示す菌株の場合には、液中における菌の分散を防ぐために滅菌濾紙小片上に菌体を秤り、濾紙小片とも液中に静かに沈下させた。その後、 37°C のフラン器中におさめ、2, 4, 6 時間後に、一部では 24 時間後に各回とも 5 ml ずつの試料をとり出し、試料 4 ml そのまま、または適当に稀釈してその中に産生されている亜硝酸塩を定量した。

菌塊を用いて半定量的ともいうべき方法をとつた理由は、定性反応に対する裏づけを目的とし、さらに実験上の難点や菌液とした場合に起こる還元能の弱化などを避けるためである。

使用菌株の培養日数：人型菌 H_2 , H_2Rv , H_2Ra の 3 株による実験成績では、図 2 に示すように小川培地上

Fig. 2. Effect of the Culture Age on Nitrate Reduction Activity



4 週間培養菌では、還元能がやや弱体化しており、培養 2 ~ 3 週間の菌体が適当であることを知つた。したがつて、塗抹培養後十分な発育をみるまでに 2 ~ 3 週間を要する菌株では、原則的に 17 ~ 21 日とし、1 週間以内に十分発育する菌株では、2 ~ 5 日培養菌を用いることにした。

実験成績

Table 1. Nitrate Reduction Activity of Mycobacterium Tuberculosis

Strains	Amount of NaNO_2 ($\times 10^{-6}$ M)		
	2 hrs	4 hrs	6 hrs
H_2	7.6	35	76
H_2Rv	9.6	40	57
H_2Ra	20	46	61
$\text{H}_2\text{R-SM}$	66	370	720
$\text{H}_2\text{R-KM}$	37	210	400
H37RvR-SM	68	280	580
H37RvR-NM	68	240	500
H37RvR-VM	94	320	650
H37RvR-KM	28	80	540
H37RvR-PAS	54	200	400
H37RvR-INH	26	160	400

人型菌およびその各種薬剤耐性菌について得た成績を表 1 に示した。 H_2 , H_2Rv , H_2Ra 株と H_2 株の SM および KM 耐性株である $\text{H}_2\text{R-SM}$ 株, $\text{H}_2\text{R-KM}$ 株, さらに H37Rv 株の 6 薬剤にそれぞれ耐性である, H37RvR-SM , -R-NM (Neomycin), -R-VM , -R-KM , -R-PAS , -R-INH の各株を用いた。これら薬剤耐性株はすべて試験管内で分離したものである。これら 11 菌株の間では、薬剤耐性株の場合に NaNO_3 還元能がより強いようにみられたが、実験群を異にしてい

Table 2. Nitrate Reduction Activity of Mycobacterium bovis and BCG

Strains	Amount of NaNO_2 ($\times 10^{-6}$ M)			
	2 hrs	4 hrs	6 hrs	24 hrs
Ravenel	0	0	0	1
4118	0	0	0	1.6
4228	0	0	0	6.4
BCG (1)				
Sweden	2.4	20	42	300
Japan	0	4	10	48
Denmark	1.2	3.6	10	88
Norway	0	2.2	5.4	43
Portland	1	2.2	5	36
Soviet	0	0	4.4	49
India	0	0	3.6	34
France	0	0	2	20
BCG (2)				
Sweden	5.8	28	65	
Japan	4.2	15	36	
France	0	4.7	10	

るため比較することはできない。いずれにしろ、人型菌は薬剤耐性の有無にかかわらず強い還元能をもっていることを認めた。

牛型菌と各国由来の BCG について得た成績を表 2 に示した。アメリカ由来の Ravenel, 4118, 4228 の各株は、6 時間以内では還元能を全く示さず、24 時間後においてもそれぞれ $10^{-6}M$, $1.6 \times 10^{-6}M$, $6.4 \times 10^{-6}M$ の $NaNO_2$ を産生するにすぎなかつた。また BCG 菌株の中では、還元能はスウェーデン株がもつとも強く、ついでデンマーク、日本、ポーランド 株の順となり、ノルウエー、ソビエト、インド、フランスの各株では 6 時間後にはじめて定量可能な $NaNO_2$ を産生していた。さらに、スウェーデン、日本、フランスの 3 株について、2 回目の試験を行なつたところ、スウェーデン株はほぼ人型菌に匹敵する還元能を示したが、日本、フランスの両株もまた相当強い還元能を示した。

Table 3. Nitrate Reduction Activity of Mycobacterium Avium

Strains	Amount of $NaNO_2$ ($X \times 10^{-6} M$)			
	2 hrs	4 hrs	6 hrs	24 hrs
Kirchberg	}	}	}	}
4110				
4121				
E 38686				
Maren Cecilie				
A 71				
Nagoya 59	}	}	}	}
Flamingo				
Den-Cho	26	70	110	640

鳥型菌で得た成績を表 3 に示した。アメリカ由来の Kirchberg, 4110, 4121 の 3 株、デンマーク由来の E 38686, Maren Cecilie の両株、国内分離株の A 71, 名古屋 59 の両株はいずれも全く還元能を示さず、Flamingo 株のみが微弱な還元能を示したにすぎなかつた。古くから鳥型菌と呼称されている伝鳥株では、その集落性状および発育速度の速い特色とともに、本還元能も強度であり、本来の鳥型菌の性質を全く失っている。すなわち、この菌株は現在非病原性抗酸菌といわざるをえない。

非病原性抗酸菌について得た成績を表 4 に示した。M. smegmatis, M. phlei では 2 時間後に $5 \times 10^{-5}M$ 前後、6 時間後には $10^{-4}M$ の $NaNO_2$ を産生していた。M. fortuitum では以上の 2 株に比較すると、還元能はより弱く 6 時間後に $3 \times 10^{-5}M$ の $NaNO_2$ を産生

Table 4. Nitrate Reduction Activity of Saprophytic Acid-fast Bacilli

Strains	Amount of $NaNO_2$ ($X \times 10^{-6} M$)			
	2 hrs	4 hrs	6 hrs	24 hrs
M. phlei	44	69	140	500
M. smegmatis	70	140	210	650
M. fortuitum	4	14	30	
M. ranae	1	1.6	2.8	6
M. balnei	1.6	4.2	6.7	13

するにすぎなかつた。また M. ranae の還元能も弱く、M. balnei も軽度の活性を示したにすぎない。

いわゆる未分類抗酸菌について観た成績を表 5 に示した。

Table 5. Nitrate Reduction Activity of Unclassified Mycobacteria

Strains	Amount of $NaNO_2$ ($X \times 10^{-6} M$)			
	2 hrs	4 hrs	6 hrs	24 hrs
Photochromogen				
P 1	3.8	21	43	150
P 1	170			530
P 4	150			690
P 8	130			380
P 16	150			730
P 22	190			810
Scotochromogen				
P 6	0	0	0	0
Miike	3.6	5	12	
Ookubo	4.2	5	11	12
Watanabe	1.1	2.4	3.4	29
Ishii	0	1.6	4.6	18
Matsumoto	1	1.8	1.8	
Non-photochromogen				
P 7	0	1	3.5	10
100616	0	0	1	4.2
121326	0	1	1.4	3.1
Ueda	0	0	1.3	5.8
Koofu	3.4	3.0	3.8	
Niikura	1.9	1.4	1.4	

Photochromogen 所属の P 1 株、Scotochromogen 所属の P 6 株、Non-photochromogen 所属の P 7 株について、同一実験条件で調べたところ、P 1 株は強い還元能を示したが、P 6 株では陰性、P 7 株はきわめて弱

い活性しか示さなかつた。

そこで改めてアメリカ由来の Photochromogen 所属菌株である P1, P4, P8, P16, P22 の 5 株について、還元能をみたところ 2 時間後にすべて 10^{-4} M 以上の NaNO_2 を産生していた。この活性はこの実験観察を通じて最高のものであつた。

また Scotochromogen 所属とされる国内分離株、三池、大久保、渡辺、石井、松本の諸株のうち、前 2 株はやや活性強いが、いずれも軽度の活性を示すのみであつた。さらに、アメリカ由来の Non-photochromogen 所属の 100616, 121326 の両株、および国内分離株の甲府、上田、新倉の 3 株は、すべてごく軽度の活性を示したにすぎない。

ところで、Rapid grower に属すとみられる確実な菌株を保持していないので、この菌株の還元能はまだ検査していない。

以上の実験成績を総括して、定性的な表現によつて還元活性の程度を示すと表 6 のようになる。すなわち、

Table 6. Grade of Nitrate Reduction Activity of Various Mycobacteria

Species or group	Grade of reducing activity
<i>M. tuberculosis</i>	卅
<i>M. bovis</i>	—
BCG	卅, +
<i>M. avium</i>	—
Saprophytens	卅, 卅, +
Unclassified :	
Photochromogen	卅
Scotochromogen	+, —
Non-photochromogen	+, —

硝酸塩還元能の強い菌株は、Photochromogen 所属菌株、*M. phlei* および *M. smegmatis* であり、これに次ぐのは人型結核菌と BCG 中の特定株である。明らかに弱い活性を有するものは、*M. fortuitum*, *M. ranae* など、Scotochromogen および Non-photochromogen 所属菌株であつた。牛型菌、鳥型菌はほとんど活性を有しないとみなされた。

考 察

実験室保存の抗酸菌株の呈する硝酸塩還元能を検討した結果、既知抗酸菌株および未分類抗酸菌株中には、強陽性、弱陽性、陰性を示す菌型あるいは菌株群のあることを認めた。したがつて、Virtanen の結論とする所見の一部を是認する一方、鳥型菌や未分類抗酸菌群におい

てそれぞれ特徴ある所見を知りえた。

もちろん、本反応の陰陽のみで菌型、菌株群を鑑別しようとはいいえないが、ナイアシンテスト陽性の人型菌を除いた、その他の未同定抗酸菌株には応用してよい反応と考えられる。また小川培地上で dysgonic な発育をするため、ナイアシンテストも陰性となり、人型菌らしいとみられながらも確実に試験管内で同定しえなかつた菌株で、本反応強陽性を示したものが 2 株あつた。このような例の場合も同定上相当の参考資料となりうると思う。

最近、アメリカ由来の未分類抗酸菌株 48 株を小川培地に移植したさい、同時にこの定性還元反応を行なつた。本反応強陽性を示した菌株が 10 株あり、表 6 の総括表よりこれらを一応 Photochromogen 所属と推定しておいた。さらに光発色性を調べたところ、10 株中 9 株は発色陽性であつたが、1 株のみ陰性であつた。予想の中しなかつた 1 株は、もちろん Non-photochromogenic ではあるが、発育が相当速い。したがつて、Rapid grower か非病原性抗酸菌に属せしめるべきものと考えている。この場合も培養 1 週間前後で発育状態を観察しておけば、還元反応を検査しなくても同菌株の性状の特徴は知りえたであろう。しかし試験検査の実施が相前後しても、ある菌株の培養性状と対応した化学的反応試験の結果を知ることは、当該抗酸菌の所属を決定するうえにおおいに意義のあることである。

さて硝酸塩還元能は、抗酸菌の物質代謝において本質的な意味を有するものでなく、むしろ付随的な異化作用として働くものと解してよいであろう。たとえば、 10^{-2} M の NaNO_3 液 1 ml について 2 mg の割合に菌体をとつたとき、人型菌でも菌体そのままの場合と、菌液にした条件とにおいては、両者間に著明な還元能の差を認めるのである。同様の事実は Virtanen も認めているが、その機序については明らかでない。また、生菌でない還元能を示さぬことも事実であるが、この反応の本質、機序に関してはなお不明の点が多い。

次に、Virtanen の菌型鑑別に関する総括中、一部正しく一部誤りの結論が導き出された理由は、その観察成績は正しいとしても、使用した菌型、菌株群に分類上の考慮があらかじめ十分に払われていなかったという、根本問題から出発していると断言してよいと思う。前述した牛型菌と BCG との間に見る還元能の差、さらに BCG 各菌株間に認められる差、鳥型菌とそれに非ざるいわゆる鳥型菌間に認められる差はこの点を物語るものである。すなわち、Virtanen の成績中還元反応強陽性の鳥型菌は、本実験における伝鳥株と似た性状のものではないかと推定される。また BCG についても、彼は菌株間に多少の還元能の差を認めつつも、なお牛型菌と同等の弱い活性ないし活性なしと判定して牛型菌の中

に一括しているが、あまりにも既知の菌型という概念にとらわれすぎているといえよう。

われわれの成績によれば、BCG スエーデン株は、Sauton 培地内においてもナイアシン産生量が一きわ高く、BCG 中特殊な性状をもつものと考えているが、同時に硝酸塩還元能においても、とくに強い活性を示したことは興味深いことである。このことはまた、取り扱う菌株については、常に生物学的諸性状に対する周到な検討と精密な観察を続ける必要性のあることを明らかに指示している。

前述のように未分類抗酸菌の出現以来、その分類学上の位置づけのために、各方面より多くの実験観察がなされているがまだ満足すべき方法はない。他方、本実験の硝酸塩還元能の面よりみても、未分類抗酸菌群間に活性差を認めはしたが、既知の他菌型との鑑別上の決定打となりうるほどのものではない。

とくに鳥型菌と Non-photochromogen 所属菌株との間の鑑別は、実際上もつとも困難な点であるが、この還元能においても他の諸試験法による成績とはほぼ一致する傾向があつた⁶⁾⁷⁾。すなわち、実験成績に示したように、両菌株に本還元能においても定量的に僅少の差を認めなければ、この差を定性法によつては認めることは困難であつた。このことは、両菌株間に還元能において著明な差のないことを示すものと解すべきであろう。一般に、定性法による場合、用いる菌量には多少の増減があり、したがつて陰陽の境界にある弱い活性をもつ菌株では、判定に困難を感じ、ときに多少のズレを生ずることがある。この点は本法を実施するさい、とくに注意しておく必要がある。

現状では、一つの生物化学的反応によつて抗酸菌の分類、鑑別、同定が可能であるとはいえない。あくまでこれらの菌の生物学的諸性状とともに、種々の生物化学的反応の結果を組み合わせて総合的に判定すべきである。それとともに、いかなる方法ないし反応をいかに実施するかという検査方式を確立することが望まれるわけである。その意味で、硝酸塩還元反応は、抗酸菌の示す一生物化学的反応として、検査項目の中に入れておいてよい試験法と考えている。

結 論

Nitrate Reduction Activity of Mycobacteria.

Nitrate reduction activity was tested on the stock cultures of various Mycobacteria. For the quantitative measurement of nitrite, three reagents were used following Shinn's method: one

実験室保存の各種抗酸菌の呈する硝酸塩還元反応を検討した。その結果、菌型、菌株群間に強弱の著しい活性差のあることを認めた。既知抗酸菌では、人型結核菌とその薬剤耐性菌および非病原性抗酸菌中 *M. phlei*, *M. smegmatis* が強い活性を有し、*M. fortuitum* も軽度の活性を有していた。これに反し、牛型菌と鳥型菌は全く活性を示さず本反応陰性と認めしたが、BCG 菌株中には陽性を示すものもあつた。

また未分類抗酸菌では、Photochromogen 所属菌株はもつとも強い還元能を示し、Scotochromogen および Non-photochromogen 所属菌株は、それぞれごく軽度の活性を示すことを認めた。

以上の成績から、本反応検査を定性的に実施する場合の菌株、菌株群別の反応の強弱と陰陽の関係を示すことができた。

室橋部長の御校閲を深謝する。また高橋宏、加藤睦子、川久保喜四郎の諸氏の実験上の援助に感謝する。

本報告の要旨は、第36回日本結核病学会総会において発表した。

文 献

- 1) Chapman, J. S. 編: The Anonymous Mycobacteria in Human Disease, Charles C. Thomas 出版, Springfield, Illinois, 1960.
- 2) Gordon, R. E. & Smith, M. M.: J. Bact., 66: 41, 1953; 69: 502, 1955.
- 3) Breed, R. E., Murray, E. G. D. & Hitchens, A. P. 編: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7 版, pp 694, Baltimore, Williams & Wilkins 社, 1957.
- 4) 熊谷博: 抗研誌, 4: 42, 昭23. Kumagai, H.: Rep. Res. Inst. Tuberc. & Leprosy, 2: 10, 1950.
- 5) Virtanen, S.: Acta Tuberc. Scand., Suppl. 48: 5, 1960.
- 6) 戸田忠雄・萩原義郷・武谷健二: 医学と生物学, 55: 184, 昭35.
- 7) Juhlin, I.: Acta Path. Microbiol. Scand., 50: 177, 1960.

to two dilution of HCl, 0.2% sulfanilamide solution and 0.1% N-(1-Naphthyl)- ethylenediamine dihydrochloride solution. As NaNO_2 solution shows a linearity between the concentrations from 10^{-6}M to $6 \times 10^{-6}\text{M}$, the reaction was read quan-

titatively by the use of photometer.

All strains tested were subcultured on 1 % Ogawa's medium and the growth was used for the test. One to hundred mole solution of NaNO_3 in 1/40 M phosphate buffer (pH 7.0) was autoclaved at 120° C for 20 minutes and stored at room temperature. Thirty ml of NaNO_3 solution thus prepared was put into a test tube and 60 mg of bacillary mass of each strains was added aseptically into it. After every 2, 4, 6 and 24 hours of incubation at 37° C, the amount of NaNO_2 produced was measured quantitatively.

Stock cultures tested were as follows : 11 strains of *Mycobacterium tuberculosis* including 8 drug resistant strains, 3 strains of *M. bovis*, 8 substrains of BCG, 8 strains of *M. avium*, 6 saprophytic and 17 unclassified acid-fast bacilli. Among these unclassified *Mycobacteria*, 5 were Photochromogens, 6 Scotochromogens, 6 Non-photochromogens according to Runyon's Classification.

In accordance with their type and group, these *Mycobacteria* have shown various degrees of activity in reducing nitrate.

Both drug sensitive and drug resistant strains of *M. tuberculosis* have shown strong activity.

Contrary to this, *M. bovis* could not show the activity in reducing nitrate after 6 hours of in-

cubation. Among 8 BCG strains, however, some have shown strong and others weak activities in reducing nitrate.

Among 8 strains of *M. avium*, 7 strains could not reduce nitrate at all even after 24 hours of incubation, while only one (Flamingo) has shown weak positive reaction.

Den-Cho strain, which was originally isolated from chicken and maintained for a long period of time as an avian strain, has to be identified as a saprophytic strain not only with its strong activity in reducing nitrate but also with other biological properties.

The strong positive reaction was observed in the strains of *M. phlei* and *M. smegmatis*. *M. fortuitum* was also able to reduce nitrate relatively strong, but *M. ranae* was able to do so only weakly.

Among the unclassified *Mycobacteria*, Photochromogenic strains alone have shown strong activity, whereas both Scotochromogenic and Non-photochromogenic strains very weak activity.

From these results, it is concluded that nitrate reduction test seems to be available in the daily laboratory testing as one of the methods in differentiating qualitatively the type or the group of *Mycobacteria* to be examined.