

# 鳥型菌と Non-photochromogen 所属菌株の Sauton 培地上の発育性状による鑑別

高 橋 宏

国立予防衛生研究所結核部 (部長 室橋豊穂)

受付 昭和 37 年 2 月 1 日

一般に細菌が液体培地表面に膜状発育を示す現象は、細胞表面の疎水性<sup>1)</sup>によるとされている。抗酸菌のうち、人型菌、牛型菌および R 型集落抗酸雑菌は、培地表面に菌膜を形成し、培地の表面張力を低めないかぎり均等発育を示さない。それに対して鳥型菌、非定型菌および S 型集落抗酸雑菌に属するものは一般に、R 型集落菌と同程度には菌膜を形成しがたく、培地内に濁濁発育する傾向が強い。この両者の間には既報<sup>2)</sup>のように、水あるいは石油ベンジン懸濁性に難易があり、菌体細胞表面の性状に差異のあることを示している。

一方、いわゆる非定型菌のうちの nonphotochromogen (以下 np と略す) の菌株と鳥型菌とは、種々の in vitro test において生物学的性状に差異<sup>3)4)</sup>を見出だしたがたく、ニワトリに対する病原性の有無が両者の鑑別には不可欠とされている。

そこで、細胞表面性状の差を考え、Sauton 培地上の両菌株の発育性状を比較した。その結果、実験室保存の真性鳥型菌 8 株のすべてが培養約 3 週で菌膜を形成するのに対して、np 所属菌株の中には菌膜を形成するものと、菌膜を形成せずに濁濁発育を示すものが含まれていることが分かった。液体培地における菌膜形成の難易は、菌体細胞表面の水に対する親和性の程度に関連して、菌型鑑別に意味ある所見と考えられるのでその検討成績を報告する。

## 実験材料および方法

使用菌株：真性鳥型菌 8 株および np 所属菌 27 株 (米国由来 23 株, 国内分離 4 株)。対照として人型菌 H<sub>2</sub>, 非定型菌 2 株 (photochromogen P16, scotochromogen 所属 P6), 抗酸雑菌 M. phlei の 4 株を用いた。

## 実験方法

1) urease 試験：戸田<sup>5)</sup>の方法に従い urease test を行なった。

0.003 % phenol red 添加 M/100 磷酸緩衝液 (pH 6.8) に、濾過滅菌した尿素を 2 % に加えた尿素溶液を 3 ml ずつ試験管に分注し、この試験溶液に小川培地 1~3 週間培養の各菌体 1 白金耳を入れて 37°C フランキ内に 5 日間放置した。反応の強弱の程度を淡褐色~董赤色の発色変化に従って、-, +, ++, +++ の区分で判定した。

2) Sauton 培地における発育の観察：

(A) 小川培地 10 日培養菌から 1 mg/ml 菌浮遊液を作り、Sauton 培地を 6 ml ずつ分注した試験管に菌液 0.5 ml ずつを接種して、37°C フランキ内に 4 週間静置培養し、Sauton 培地における発育状態とくに菌膜形成の有無を観察した。

(B) (A) と同一条件でフランキ内で培養したものを、培養直後、5 日後、10 日後によく振盪して発育程度を比濁計で測定するとともに、管底に発育した菌体の振盪による分散性の難易を調べた。

3) ニワトリに対する病原性の検討：np 所属 27 株のうち、Sauton 培地表面に後述のごとく IA 型の菌膜を形成する 3 株 (P50, P52, P53) と、IB 型の発育をする 2 株 (P23, P47) を 1 mg ずつ腹腔内に接種し、ニワトリに対する病原性を調べた。

## 実験成績

1) urease 試験：対照の 3 株 (H<sub>2</sub>, M. phlei, P16) は ++, P6 は + の陽性を示したのに対し、鳥型菌 8 株および np 所属 27 株のすべては 5 日後の観察においても陰性であることを確認した。

2) (A) Sauton 培地に静置培養した場合発育性状は菌株によつて相違する。そこでその相違点に基づき次の IV 型に区分し、各菌株の所属を表 1 に示した。

I 型：培地表面に菌膜を形成するもので、発育の遅速により次の亜型に分ける。

IA 型：3 週間培養で菌膜を形成するもの。

IB 型：4 週間以上培養してはじめて薄い菌膜を形成するもの。

II 型：菌の発育によつて培地が多少濁濁し、菌膜形成は遅く、しかも菌膜から下方に菌糸状の発育が認められるもの。

III 型：濁濁均等発育を主とし、4 週間培養しても菌膜が形成されがたいもの。

IV 型：Sauton 培地では発育が不良で、菌膜は形成されず濁濁もみられず、わずかに管底に発育するもの。

固型培地上の集落形態からみると、鳥型菌と np 所属菌株とは一見区別しがたいが、Sauton 培地における発育性状には、表 1 に示すような著しい差が認められ、しかも、np 所属菌株には異なつた発育性状を示すものが混在していることが明らかとなつた。

さて、IA 型には鳥型菌 8 株の全例と、np 所属の 3 株 (P50, P52, P53) が含まれる。鳥型菌のうち名古屋 59 は、予研で近年分離した菌株で、分離当初は発育が悪く、そのために Sauton 培地での発育も IV 型を示した。しかし小川培地継代培養を繰り返したのちは、Sauton 培地にもよく発育するようになり、IA 型に属する表面発育を示すようになった。IB 型に属する P23, P47 の 2 株は IA 型に比べて、発育は遅いが一応菌膜を形成する。この差異を確認するために、IA 型と IB 型所属のこれらの菌株について、実験観察を繰り返し毎常同じ結果を得ている。また、II 型には 14 株、III 型には 5 株が所属するが、27 株の np 所属菌株の大半が II 型あるいは III 型であることは、このような発育性状が np 所属菌株の一特性であることを示している。IV 型所属の 3 株は、Sauton 培地内での発育が不良であり、しかも、この 3 株はいずれも水に比較的懸濁されがたい。とくに P2, P45 の 2 株は、固型培地上では RS 型集落を形成し、石油ベンジンに懸濁される特異な菌株である。

ところで、対照に用いた P6 は II 型、H<sub>2</sub>, M. phlei, P16 の 3 株は一応 IA 型に属する発育を示した。このうち P16 のみは、菌膜の薄い時期に振盪すると培地の濁濁をきたさないが、II 型にみるような菌糸状の発育を伴つた菌膜を形成する中間的な性状であつた。

Table 1. Growth Type of *M. Avium* and Nonphotochromogens in Sauton Liquid Medium

Growth type	Strains examined
I	A Kirchberg*, 4110*, 4121*, Flamingo*, E38686*, M.C*, A71*, Nagoya-59*, P50*, P52*, P53*
	B P23, P47
II	P17, P20, P25, P40, P41, P42, P44, P48, P51, P54, 100616, Ko-ofu, Ni-ikura, Gamou
III	P39, P49, P55, 121326, Ueda
IV	P2, P7, P45

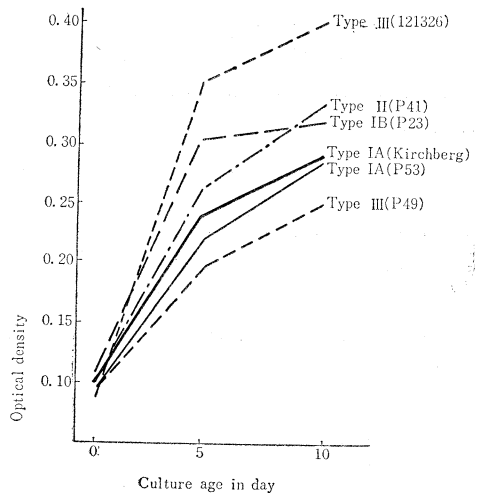
※ Stock culture of *M. avium*.

\* Identified as *M. avium*.

による分散性に 2 つの型があり、前述の発育性状による区分との間に一定の関連がある。すなわち、濁濁発育を示す III 型菌株は当然として、IA 型、IB 型菌株も振盪によつて比較的均等になりやすい。これに対して II 型菌株は、管底に繩状に附着して均等になりにくい傾向がみられる。

また、Sauton 培地における発育増殖の程度を比濁計で測定した結果は、図 1 に示すごとくである。静置培養で IB 型、II 型および III 型の発育性状を示す菌株は、濁度の面からみると必ずしも発育が IA 型の菌株に劣るものではなく、あるものでは、Sauton 培地ではるかに良好に発育しながら、菌膜形成がみられないことが明らかにされた。

Fig. 1. Growth Curves in Density of *M. Avium* and nonphotochromogens in Sauton Liquid Medium



『3) ニワトリに対する病原性

IA 型の 3 株 (P50, P52, P53) と、IB 型の 2

株 (P23, P47) の計 5 株をニワトリに接種した結果は次のようである。P53 は Kirchberg と同じ程度の結核結節を各臓器に形成し、接種後 32 日にニワトリを弊死せしめた。これに対して P50, P52 の両株は、肝、脾、腸間膜に結核結節を形成したが、6 週間の観察時には弊死せしめなかつた。これら 3 株はニワトリ未通過株であるが、以上の所見から鳥型菌と判定された。ところが IB 型の P23, P47 の 2 株は、接種 6 週後の屠殺剖検において肉眼的に結核性変化を示さず、観察期間中体重増加も大幅でありニワトリに対して病原性が認められなかつた。

### 考 察

本実験に用いた鳥型菌および np 所属菌株はすべて urease 試験陰性で、鳥型菌、np 所属菌株、および抗酸雑菌の一部のみが、urease 陰性であるとする戸田らの成績と一致した。

最近 Meissner<sup>7)</sup>は、鳥型菌が 43°C の培養温度に発育可能かつ INH 低感受性という 2 性状において np 所属菌株と異なることを述べている。また Kubica<sup>8)</sup>は、np 所属菌株が arylsulfatase activity test に弱陽性以上の呈色反応を示すのに対して、鳥型菌は全く陰性であることから両者を区分しえたと述べている。本実験の観察を反復確認しているときに Kubica らの成績を知った。検討の対象とした性状は彼とは異なるが、期せずして P50, P52, P53 の 3 株が鳥型菌と同定されたわけである。そして本実験で観察された培養性状の違いと arylsulfatase および urease 試験、ニワトリに対する病原性との間にきわめて高い相関が認められたことは、菌型鑑別上培養性状の観察が有意義であることを示すものである。しかし Bergey の必携<sup>9)</sup>によれば鳥型菌鑑別上の特性として、グリセリンブイヨン、ブイヨンあるいはグリセリン牛血清のような液体培地には菌膜を形成しないと記載されているがこの点は考察を要する。前述のごとく、名古屋 59 は分離当初 Sauton 培地に菌膜の形成をみず (IV 型)、やがて菌膜を形成しうる (IA) 型ようになった菌株である。したがって分離直後に鳥型菌と判定せねばならぬ場合においては、本実験方法の適用はある程度制限を受けることになろう。しかし、菌型の鑑別同定にはただ一つの性状のみでなく、他の諸性状を参考にすべきであることはいうまでもない。また、継代培養による良好な発育菌について調べることを怠るべきではない。本実験の結果からみて、鳥型菌は Sauton 培地に管底発育した菌体が振盪によつて分散しやすく、かつ培地表面に菌膜を形成するものであることをとくに強調したい。このような菌膜形成は、細胞表面

の性状の相違に起因するものであり、IB, II, III 各型所属株よりも発育が良好なことに必ずしもよらないことが明らかにされた。そして培養性状の観察というきわめて簡単な方法によつて、きわめて困難視されていた鳥型菌と np 所属菌株との鑑別を相当高い信頼性をもつて行ないうることが、抗酸菌の分類同定上資するところはなほ大きいと思う。

### 総 括

S 型集落を呈する抗酸菌株は、一般に Sauton 培地上に菌膜を形成することが困難である。とくに現在分類上問題視されている nonphotochromogen 所属の菌株は、表面発育がきわめて困難で、なかには溷濁発育のみを示すものである。この点において菌膜を形成しうる鳥型菌とは著しく性状を異にし、これら両者の細胞表面の疎水性の程度に相違があることを示している。また、Sauton 培地における発育性状を urease 試験、ニワトリに対する病原性の面と比較検討し、高い相関が認められた。nonphotochromogen 所属菌株を鳥型菌から鑑別同定するうに、Sauton 培地培養性状の観察はきわめて簡易かつ有用な方法と考えられる。

稿を終るにあたり御校閲を賜つた室橋部長、佐藤主任に感謝します。

### References

- 1) Werkman, C. H. & Wilson, P. W.: *Bacterial Physiology.*, New York Academic Press., 1951.
- 2) 高橋宏・室橋豊穂: *医学と生物学*, 62: 67, 昭37.
- 3) Bojalil, L. F. & Cerbon, J.: *Am. Rev. Resp. Dis.*, 81: 382, 1960.
- 4) Merk, J. & Trollape, D. R.: *Tubercle.* 41: 133, 1960.
- 5) 戸田忠雄・萩原義郷・武谷健二: *医学と生物学*, 55: 184: 昭35.
- 6) 今泉清・遠藤元清・浅川豊・高橋宏・小河秀正・千葉胤孝: 第47回日本獣医学会報告, 昭34.
- 7) Meissner, G.: *Zbl. f. Bakt. I. Orig.*, 180: 510, 1961.
- 8) Kubica, G. P. & Vestal, A. L.: *Am. Rev. Resp. Dis.*, 84: 728, 1961.
- 9) Breed, R. S. Murray, E. G. D. & Hitchens, A. P.: *Bergey's manual of determinative bacteriology.*, Baltimore Williams & Wilkins 7th 1957.

### Differentiation of Avian and Non-photochromogenic Strains of Mycobacteria by Their Growth Types in Sauton Medium.

According to the general conceptions, membranous growth of bacteria on the surface of a liquid medium depends on the hydrophobic properties of their cell surface. S-type mycobacteria, such as avian, anonymous and most of the saprophytic strains tend to grow in the depth of a liquid medium somewhat more dispersed than those of R-type and hardly form a pellicle on it, suggesting the differences in their cell surface properties.

In the present paper, investigation results on the growth types of mycobacteria, especially on the differences in the pellicle formation on Sauton medium between avian and non-photochromogenic strains were related.

Mycobacteria examined were 8 avian and 27 non-photochromogenic strains and all of them were proved to be negative to urease test. They were grouped into the following 4 different types by their growth attitude on Sauton medium:

I type: strains of this type are able to form pellicle on the surface of Sauton medium and are divided into two sub-groups according to their growth speed.

I-A: strains in this sub-group form a pellicle within 3 weeks cultivation (8 avian and 3 non-photochromogenic strains).

I-B: strains in this sub-group form a thin pellicle later than 4 weeks cultivation (2 non-photo. strains).

II-type: strains of this type tend to grow more or less dispersed in the depth of Sauton medium and later, form a pellicle attached with filamentous growth (macroscopic cords). (14 non-photo. strains).

III-type: strains of this type show mainly dispersed growth in the medium and scarcely form a pellicle even after 4 weeks cultivation (5 non-photo. strains).

IV type: strains of this type grow only poorly at the bottom of the culture tube (3 non-photo. strains).

Three non-photochromogenic strains of I-A type, which formed a pellicle on Sauton medium

rather early, were identified as the true avian strains by their pathogenicity to chicken. On the contrary, 2 strains of I-B type, which formed pellicle rather late, were found to be non-pathogenic to chicken and defined as the non-avian strains.

The fact that most of the non-photochromogenic strains, i. e. 19 out of 27, showed either II or III type growth is most likely to suggest that the growth of these types is one of the important biological properties of non-photochromogenic strains to differentiate them from the avian.

Turbidometrical examination of the growth in Sauton medium revealed that among the strains of I-B, II and III types, there are some which are able to grow more vigorously dispersed in the depth of the medium than I-A type strains, in spite of their inferior ability in pellicle formation.

According to Bergey's remarks, one of the distinctive characters of avian strains is regarded as the disability to form pellicle on liquid media, such as broth, glycerol broth and glycerol beef serum. However, the present studies clearly demonstrated that the true avian strains are able to form pellicle on the surface of Sauton medium, even though the degree of the growth is inferior to the R-type strains including mammalian. This fact seems to be really a new finding and is thought to be very useful in the identification of the true avian strains.

Among 8 avian strains examined, Nagoya 59 could hardly grow in Sauton medium (IV type) immediately after the primary isolation. However, with the successive cultivation, its growth became better and better, and now, it shows I-A type. In the case of freshly isolated avian strains, generally, identification simply by the degree of pellicle formation on Sauton medium may not always prove successful, and in such a case, examination after several successive cultivations is indispensable.

The results obtained show that a simple method to investigate growth types on Sauton medium is believed to be very useful enabling us to differentiate true avian from non-photochromogenic strains.