

發育のおそい抗酸菌のファージタイピング

室 橋 豊 穂・徳 永 徹
水 口 康 雄・丸 山 米 夫

国立予防衛生研究所結核部

受付 昭和 38 年 1 月 7 日

著者らはさきに抗酸菌のファージタイピングの方法論を報告し^{1)~3)}, かつ比較的發育の早い抗酸菌 (Saprophytic mycobacteria) のファージによる分類試案を提案した⁴⁾。本報告においては, 發育のおそい抗酸菌, すなわち人型結核菌, 牛型菌, 鳥型菌, 未分類抗酸菌, および Saprophyte ではあるが前報告に述べなかつた *Myc. fortuitum* に関するファージタイピングの成績を述べ, その意義を論じたいと思う。

実験方法

使用ファージ: 血清型と溶菌型とにより選定されたタイピング用ファージ 15 株⁵⁾と, Redmond より送られたファージ 2 株を使用した。その名称と由来を表 1 に示した。

Table 1. Typing Phage and Its RTD Used

| Phage | Isolated by | RTD/ml |
|--------|-------------------|-----------------|
| Y 7 | Murohashi, et al. | 5×10^7 |
| Y 10 | " | 5×10^7 |
| Y 13 | " | 1×10^7 |
| A 6 | Takeya, et al. | 5×10^8 |
| B 1 | " | 1×10^7 |
| C 3 | " | 1×10^7 |
| PP | Penso, et al. | 5×10^6 |
| PR | " | 5×10^7 |
| PL | " | 5×10^7 |
| D 4 | Froman, et al. | 1×10^6 |
| D 29 | " | 1×10^6 |
| D 30 | " | 1×10^8 |
| D 39 | " | 1×10^8 |
| HC | Hauduroy, et al. | 1×10^8 |
| L 1 | Doke, et al. | 1×10^7 |
| GS 4 E | Redmond, et al. | 5×10^6 |
| DS 6 A | " | unknown |

使用菌株: 人型結核菌 163 株, 牛型結核菌 18 株, ネズミ型菌 1 株, 鳥型菌 6 株, 非定型抗酸菌 101 株, *Myc. fortuitum* 5 株, 計 294 株の抗酸菌を用いた。その名称

と由来は次のごとくである。

人型結核菌 163 株: H₃₇R_v, H₃₇R_a, H₂R_v, H₂R_a, 青山 B, DT, PN, C, F (予研保存株), アマミ 1 号ほか 79 株 (奄美大島にて患者喀痰より分離), 中野 980 号ほか 75 株 (中野療養所より分与)。

牛型結核菌 18 株: Ravenel, 4228, 4118 (Mayo Clinic より), BCG (予研保存株), TC 50 (公衆衛生院より), 263 ほか 11 株 (家畜衛生試験場より)。

鳥型菌 6 株: Kirchberg (Mayo Foundation Exp. Path. より), Flamingo (伝研より), A 62 (広木より抗酸菌病研を経て), Maren Cecilie, E 38686 (Denmark, State Serum Inst. より), 名古屋 59 (予研分離)。

非定型抗酸菌 97 株: P 1~8, P 15~42, P 44~45, P 47~55, 121326, 100616, 新倉ほか 8 株 (文部省科学研究費総合研究「抗酸菌の変異と分類」班 (班長: 戸田忠雄) より), 永井ほか 38 株 (名古屋大, 日比野より)。

ファージ感受性試験: 前報告の方法¹⁾²⁾によつた。すなわちあらかじめおのおのの宿主菌に対して完全溶菌を示すファージ液の最高希釈濃度 (RTD) を決め, その 1 滴 (1/5 注射針による) を被検菌播種後 1 日目の小川平板培地上にスポットした。成績の判定は溶菌がもつとも進んだ時点で行ない, その程度を 0 から 5 までの数字と, 括弧記号を組合わせて表現した²⁾。

成績

(1) RTD 法の改良

抗酸菌に対する RTD 法は著者らによつて確立され¹⁾²⁾, Redmond ら⁵⁾によつてその優秀性が確認されたが, 実際に RTD を決定するさいには判定上多少の動揺をまぬがれない。試みに著者らの研究室において数人の術者が別個に数回くり返して RTD の決定を行なつたところ, 若干のファージにおいて 1~2 段階の希釈の判定差が生じることが知られた。そこでむしろタイピング用ファージのおおのについて, その 1 RTD 中のファージ粒子数を決めておいたほうが, 実用的であろうとの考えから, 表 1 のごとく各 RTD 中のファージ粒子数を定めた。実

際的にはこの数値に近似した範囲であればさしたる誤差は生じない。たとえば 5×10^7 という場合には $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^7$ の間、また 1×10^7 という場合には $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^6$ の範囲の濃度であれば判定のさいに過誤をおかす可能性が少ないことが知られているので、この程度の粒子数を 1/5 針でスポットすることにする。ただし DS 6 A ファージのごとく発育のおそい抗酸菌が宿主菌である場合は、目下のところ RTD を容易に決められない状態なので、このようなファージの取扱い方に関しては、今後の検討を必要とする。本報告の場合には増強して得た原液をスポットに使用した。

(2) RTD 法と高濃度スポット法の比較

高濃度ファージ原液をスポットする場合に真の溶菌と区別できない溶菌様の外観を呈するにもかかわらず、RTD を用いるとそれが消失する事実に関してはすでに人型結核菌²⁾ と非定型抗酸菌⁶⁾ について実例をあげて述べた。その後さらに多数のファージと抗酸菌株とを用いて実験を行ない、このような例が無数に見出だされ、従来他の研究者の多くが行なっているように、スポットに高濃度ファージ液を用いることが抗酸菌のファージタイピングを混乱せしめる原因となることが確認された。

(3) 哺乳動物結核菌のファージパターン

Y 系ファージに関してはすでに速報を行なつたが⁷⁾、ファージ、抗酸菌ともにその株数をふやして検討した。そのうち代表的な菌株の成績を表 2 に示した。表示例以外の菌株についてもほぼ同様の成績であつた。

Table 2. Example of the Phage Patterns of Mammalian Tubercle Bacilli

| Mammalian Tubercle bacilli | Phage | | | | | | | |
|--------------------------------|---|-----|-----|----|----|------|------|--|
| | Y7, Y13, A6, PP, PR, PL, D4, D30, D39, HC, LI | D29 | Y10 | C3 | B1 | GS4E | DS6A | |
| H ₃₇ R _v | 0 | 4 | 4 | 4 | 5 | 4 | 5 | |
| H ₃₇ R _a | 0 | 5 | 5 | 3 | 5 | 5 | 5 | |
| H ₂ R _v | 0 | 5 | 4 | 4 | 5 | 2 | 5 | |
| H ₂ R _a | 0 | 5 | 5 | 4 | 5 | 2 | 5 | |
| Aoyama-B | 0 | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 | 5 | |
| Ravenel | 0 | 5 | 5 | 5 | 1 | 0 | 5 | |
| BCG | 0 | 5 | 4 | 5 | 0 | 0 | 5 | |
| Ushi 2345 | 0 | 5 | 4 | 5 | 0 | 0 | 5 | |
| Ichikawa 5 | 0 | 5 | 4 | 4 | 1 | 0 | 3 | |
| Ushi 1495 | 0 | 5 | 3 | 5 | 1 | 0 | 4 | |
| Vole D15 | 0 | 5 | 4 | 4 | 2 | 0 | 5 | |

すなわち人型、牛型、ネズミ型の哺乳動物結核菌はすべて近似のパターンを示した。しかし RTD を用いて慎重に検討すると、B1 ファージは明らかに人型菌に対して強く、牛型に対して弱い溶菌性を示し、C3 はどちらかというとその逆であつた。また GS4E に対しては高濃度スポット法では photo. の大部分、Scoto. と Nonphoto. の一部が感受性を示すが、RTD を用いると人型

のみ感受性があり、牛型は感受性を示さなかつた。ただしこの点は被検株数が少ないので、なお菌株をふやして検討を行ないたい。ネズミ型は牛型と同じパターンを示した。

また同一菌型間でも菌株により感受性に多少の差がみられた。とくにこれは高濃度のファージ液をスポットした場合に著しかつた。たとえば人型結核菌中にはかなりの率で D4, A6, HC, L1, Y13 のファージのうち、1 つあるいはそれ以上に対して弱い溶菌様外観を示す株が見受けられた。しかしこのような現象は Y7, D30, PP, PR, PL, D39 に対してはみられなかつた²⁾。

Y13 のこのような溶菌様部位からファージをとり、人型菌を高度に溶菌しうるファージの増強に成功した(未発表データ)。これらの溶菌様外観を呈する現象の中には、真の溶菌でないものもかなり含まれているものと考えられ⁸⁾、その点については今後の検討を必要とする。

高濃度スポット法によるこのような溶菌様外観は、必ずしも特定のファージと特定の菌株の間に常に生じるものではない。したがつてこれをタイピングにただちに應用することはできない。しかし将来上述の検討がさらに進むならば、この現象をも利用してファージのタイピングに役立てることもできるかも知れない。

(4) 鳥型菌のファージパターン

鳥型菌はすべてのファージに対して感受性がみられなかつた。しかし高濃度ファージ液をスポットすると、鳥型菌といえども著明な発育抑制斑がしばしば認められた。しかしそのような一種の溶菌様外観を形成しうるファージは限られており、D29, B1, C3, L1, D4, HC, A6, Y13 などに著しい。また鳥型菌中でも名古屋 59 などはこのような現象を示さなかつた。この現象も必ずしも常時一定のパターンとしてあらわれるものではなく、したがつてただちにこれをタイピングに利用するのは困難と思われた。

(5) 非定型抗酸菌のファージパターン

非定型抗酸菌に関しては、Myc. kansasii Hauduroy (photochromogen) が特異的なパターンを示した。すなわち L1 ファージによつて明らかに溶菌を受けた。この点はすでに指摘したが⁹⁾、さらに菌株をふやした本実験においても同じ成績が得られた。Nonphotochromogen と Scotochromogen とは、すべてファージ感受性を示さなかつた。ただし鳥型菌の項で述べた溶菌様外観は、これらの菌においてもまれにあらわれ、同じく B1, C3, D29, Y10, Y13, L1, D4, HC などのファージのうち、1 またはそれ以上に対して発育抑制を思わせる所見を示す株があつた。これには必ずしも高い再現性はなく一度ならずそのような外観を呈した菌株は、Nonphoto. のうちの P2, P51, P53, 121326, 100616, 上田の諸

株, Scoto. のうちの P 32, P 34, P 35, P 36, 富田, 高橋, 大野の諸株であつた。これらの中には HC に対する富田株, D 29 に対する高橋株などのように RTD を用いた場合でも真正の溶菌となら区別しえないものも含まれている。このような現象が眞の溶菌であるか否か, 溶菌でないとするればいかなる機作に基づくものか, などの点が明らかになれば, さらにこまかな型別が可能となるかも知れない。

(6) *Myc. fortuitum* のファージパターン

Myc. fortuitum は Saprophyte の 1 種ではあるが, 前報告⁴⁾中に洩れたので, 本報告中に加えることとした。

5 株のうちわずかに 335-R 株のみが B 1 ファージに 3 程度の感受性を示したにすぎず, その他のファージに対しては一般に感受性がなかつた。また高濃度ファージ液をスポットするとその溶菌様外観のパターンは種々雑多に現われ, その集落の性状からしても到底これを 1 群と考えるわけにはいかない。

Table 3. Number of Mycobacterial Strains Lysed by DS 6 A and GS 4 E

| Mycobacteria type | Nos. of strain tested | Nos. of strain lysed by | |
|--------------------|-----------------------|-------------------------|--------|
| | | DS 6 A | GS 4 E |
| Human | 10 | 10 | 10 |
| Bovine | 13 | 13 | 0 |
| Murine | 1 | 1 | 0 |
| Avian | 5 | 0 | 0 |
| Photochromogen | 5 | 0 | 0 |
| Non-photochromogen | 5 | 0 | 0-1 |
| Scotochromogen | 5 | 0 | 0 |
| Saprophyte | 7 | 0 | 3 |

Table 4. A Scheme of the Phage Typing of Slow-Growing Mycobacteria

| Mycobacteria type | Number of strains tested | Phage pattern | | | | | | |
|-------------------|--------------------------|------------------|----|----|------------------------------|-----------------------|-----------|-----------|
| | | D29 Y10 C3 | B1 | L1 | Y7, PP, D30 PR D39, PL | Y13 A6 D4 HC | GS- 4E | DS- 6A |
| Mammalian | | | | | | | | |
| Human | 163 | ## | ## | —* | — | —* | ## | ## |
| Bovine | 18 | ## | + | —* | — | —* | — | ## |
| Murine | 1 | ## | + | —* | — | —* | — | ## |
| Avian | 6 | —* | —* | —* | — | —* | — | — |
| Unclassified | | | | | | | | |
| Photochr. | 10 | ## | ## | ## | — | —* | — | — |
| Non-photochr. | 41 | —* | —* | —* | — | —* | —* | — |
| Scotochr. | 46 | —* | —* | —* | — | —* | — | — |

Note: ##: Lysis in the degree of 5~4.
 #: " " " " 4~3.
 +: " " " " 3~1.
 —*: No real lysis, but sometimes with lysis like appearance
 —: No lysis.

なお前報告⁴⁾の Saprophytic mycobacteria 中 b-3, b-4 の 2 型は, その後 D 4 に対する感受性が低いことが明らかとなつた。したがつてこれらはむしろ e-1, e-2 型に近く e 型に所属せしめるべきであると思われた。b 型には 1 型, 2 型の広い溶菌パターンを示す株だけを所属せしめるほうが合理的だと思われるので, ここでそのように訂正したい。

(7) DS 6 A, GS 4 E の溶菌パターン

成績を表 3 に示した。菌株数がまだ十分多いとはいえないが, DS 6 A は哺乳動物結核菌に対してだけ活性を有することはまず間違いなさそうである。一方 GS 4 E は高濃度スポットでは非定型抗酸菌の一部に溶菌様外観を示すことがあるが, RTD を用いると人型にのみ活性を示した。しかして同じ人型でも菌株により多少の感受性の差があるようである。

以上の成績をまとめて表 4 に示した。

考 察

抗酸菌のファージタイピングは, Penso ら⁹⁾, Froman ら¹⁰⁾¹¹⁾, Hnatoko¹²⁾, 武谷ら¹³⁾¹⁴⁾, Redmond ら¹⁵⁾によつて進められてきてきたが, その方法論に関してはとくにみるべき報告がない。本報告の成績には上記の先人たちが著しく異なる結果が多く得られているわけではないが, しかし十分に検討された方法論^{1)~3)}に立つて行なわれたという点で意義あるものといえよう。

従来, 結核菌を溶菌しうるファージは, すべて Saprophyte をその宿主菌としており, 結核菌だけを溶菌しうるファージは知られていない。しかし Redmond ら¹⁵⁾は DS 6 A ファージがそれであることを報告し, 本実験によつてそれが確認された。ただし Redmond らは, Vole 菌が DS 6 A に感受性がないと述べているが, 著者らは逆の結果を得た。これは実験方法の違いによるものか, あるいは菌株(著者らのは D 15¹⁶⁾)の違いによるものであろう。

次に Redmond は, GS 4 E について, 人型結核菌を溶菌するが, 牛型菌を溶菌しないと述べた¹⁷⁾。この点に関する著者らの追試はほぼその事実を確認しえた。ただし人型菌の中でも H₂ 株は H₃₇ 株に比しやや感受性が鈍い。

B 1 ファージに対して BCG の感受性が弱いことは, かつて武谷ら¹³⁾が認めた所見であるが, 当時方法論が未確立であつたために再現性という点で若干問題を残していた。著者らは RTD 法を用いて, B 1 に対しては BCG を含む全牛型菌が感受性が弱く(2~0), 一方人型菌はこれに対して著しく感受性の強い(5~3)ことを確認した。また C 3 に対してはそれほど著明ではないが, その逆であると思われた。この事実も人型と牛型のファージによる鑑別に有力な手段を提供しうらと思われる。

Photochromogen に対する L1 ファージの特異的活性は、すでに著者らによって報告された。この菌型は、D 29, Y 10, B 1, C 3 などに対して哺乳動物結核菌よりも感受性が低いので、その点でも若干の区別はできるが、なお決め手とはなりえない。その点 L1 はその特異的な溶菌 (4~3 程度) によって、抗酸菌のファージタイピング上、重要な地位を占めるものというと思う。

各型菌を通じてファージ高濃度液スポットにより生じる一種の溶菌様外観に関してはすでに成績の項でも論じたが、さらに検討を行なうことによりこれが真の溶菌でない場合でも、タイピングに役立てうる可能性が残されている。また Y 13 ファージでなされたように (未発表)、高濃度ファージ液中に含まれるファージ mutant をとり出すことにより、特異的なパターンをもつファージ株、あるいは高い適応性をもつファージ株を得る可能性も考えられよう。

表 4 の試案はなおきわめて不十分なものである。疫学的あるいは臨床の見地からすれば、人型結核菌の中をさらにいくつかに分けることこそ、抗酸菌のファージタイピングに期待されることであろう。近年抗酸菌ファージに関する研究の目ざましい発展を考えると、単に Saprophyte のみでなく発育のおそい抗酸菌に対してもファージタイピングの将来に大きな希望がもたれるのである。

結 論

著者らがすでに検討発表した抗酸菌ファージの感受性試験方法と、17種のタイピング用ファージとを用いて、人型結核菌 163 株、牛型結核菌 18 株、ネズミ型菌 1 株、非定型抗酸菌 101 株、それに発育がやや早い *Myc. fortuitum* 5 株、計 294 株に対するファージパターンをしらべた。

その結果、暫定的ながら本文表 4 に示すような発育の比較のおそい抗酸菌のファージタイピング試案を得た。

Phage Typing of Slow Growing Mycobacteria.

In the present paper phage typing of slow growing mycobacteria such as human type tubercle bacilli, bovine type, avian type and unclassified mycobacteria, and additionally one of the saprophytes, *Myc. fortuitum*, is discussed.

Phage strains used were 15 typing phages selected by the serological and lytic types and 2 new phages, DS 6 A and GS 4 E, sent by the courtesy of Dr. W. B. Redmond, U. S. A. Mycobacteria strains tested were in total 294 and were consisted of 163 human, 18 bovine, 1 murine and 6 avian types, 101

稿を終るにのぞみ多数の抗酸菌株を分与された九大戸田教授、名古屋大日比野教授、ファージの分与を受けた Dr. Redmond に深く感謝する。

本研究は日本ワックスマン財団研究助成金の援助によつてなされた。

文 献

- 1) 徳永徹 他：日本細菌学雑誌，16：898，昭 36.
- 2) 徳永徹 他：同誌，16：960，昭 36.
- 3) 徳永徹 他：結核，37：672，昭 37.
- 4) 徳永徹 他：日本細菌学雑誌，16：1031，昭 36.
- 5) Redmond W. B. et al.: Am. Rev. Resp. Dis., 85：883，1962.
- 6) 室橋豊穂 他：医学と生物学，60：7，昭 36.
- 7) 室橋豊穂 他：同誌，56：210，昭 35.
- 8) 水口康雄 他：日本細菌学雑誌，17：770，1962.
- 9) Penso, G.: Hauduroy's "Le bacille tuberculeux et paratuberculeux" 99, Masson et Cie, 1951.
- 10) Froman, S. et al.: Am. J. Publ. Hlth., 44：1326，1954.
- 11) Froman, S.: The 18th Conference on Chemotherapy of tuberculosis. 1959.
- 12) Hnatoko, S. I.: Canad. J. Med. Sci., 31：462，1953.
- 13) Takeya, K. et al.: Am. Rev. Resp. Dis., 80：543，1959.
- 14) 武谷健二 他：九州大学結研紀要，5：423，昭 34.
- 15) Redmond, W. B. et al.: Am. Rev. Resp. Dis., 82：781，1960.
- 16) 室橋豊穂 他：結核，27：36，昭 27.
- 17) Redmond, W. B. et al.: Canad. J. Microbiol., 7：697，1961.

unclassified mycobacteria and 5 *Myc. fortuitum*. Phage sensitivity test was carried out employing RTD which was determined preliminarily on each phage as described before, comparing with the modified RTD method and the spot method employing a concentrated phage suspension.

It was revealed that spotting with a concentrated phage suspension gave rise very often confusions of the results of phage typing of mycobacteria.

Mammalian type tubercle bacilli showed quite similar lytic pattern. However, precise examinations employing RTD demonstrated a slight difference in

the degree of sensitivity to the typing phages among them. For instance, human tubercle bacilli were lysed by B1 more strongly than bovine ones, and by C3 the reverse was the case. To GS4E human type bacilli alone were very sensitive, while bovine and murine types were not. Even among the same type bacilli a slight difference was noticed in the degree of phage sensitivity. For example, not a small part of human type strains have shown a growth inhibitory area with lysis like appearance to one or more of the phages, such as D4, A6, HC, L1 and Y13, but not to Y7 D30, PP, PR, PL and D39. And from the lysis like area produced by Y13 a phage strain which was able to lyse human type bacilli strongly was isolated and propagated. Accordingly, it is likely that some of the areas with lysis like appearance indicate a true lysis and others do not.

Avian type bacilli were not sensitive to all of the phage strains tested by RTD method. However, by spotting a concentrated suspension of D29, B1, C3, L1, D4, HC, A6 and Y13 a lysis like growth inhibition was often observed, although not in a definitive

pattern.

Among the unclassified mycobacteria, *Myc. Kansasii*, Hauduroy (photochromogens) had a specific sensitivity to L1. On the contrary, non-photochromogens and scotochromogens had no sensitivity to all of the phages tested by the use of RTD just like the avian type. Some of them, however, sometimes indicated an area with lysis like appearance by one or more of the phages, such as B₁, C3, D29, Y10, Y13, L1, D4 and HC, by spotting a concentrated phage suspension.

Among the 5 strains of *Myc. fortuitum*, 335-R alone was sensitive to B1 in the degree of 3.

Phages DS6A and GS4E showed such characteristic lytic patterns as that the former was active only to mammalian tubercle bacilli and the latter only to human type bacilli. It is very interesting that among human type tubercle bacilli a slight difference in the sensitivity to these phages was noticed.

A scheme of the classification of mycobacteria by the phage typing was tentatively proposed.