

## ヒト型結核菌抗酸菌ファージ K1, S1 に対する感受性

宍戸昌夫・杉田暉道・津田忠美

横浜市立大学医学部公衆衛生学教室

榊原高尋

秦野保健所

受付 昭和 42 年 3 月 2 日

STUDIES ON SUSCEPTIBILITY OF K1 AND S1 PHAGE  
AGAINST MYCOBACTERIA\*Masao SHISHIDO, Kido SUGITA, Tadayoshi TSUDA  
and Takahiro SAKAKIBARA

(Received for publication March 2, 1967)

Forty strains of stock cultures and 37 strains of fresh cultures were examined of their phage patterns using K1 and S1 phage which showed range of specific lysis against human tubercle bacilli respectively.

The results obtained were as follows: Stock cultures were classified into four types and fresh cultures were classified into three types by their phage patterns.

The difference was observed in the sensitivity of K1 and S1 phage, catalase activity and boiling fastness between stock cultures and fresh cultures.

The correlation of sensitivity of 2 strains of phage and catalase activity or boiling fastness was not observed.

## 緒 言

ヒト型結核菌をファージ感受性によつて細分類しようとする試みは、最近ようやく盛んになつてきたが、古くは Froman ら<sup>1)</sup>、武谷<sup>2)3)</sup>の業績がある。1963 年ローマで行なわれた抗酸菌ファージに関するシンポジウムにおいて、徳永<sup>4)</sup>はヒト型結核菌のファージ型別の可能性を強調した。その後 Baess<sup>5)</sup>、牛久<sup>6)</sup>、高橋<sup>7)</sup>らはヒト型結核菌に対して、特異的な溶菌域をもつファージ BK 1, K 1, S1 をそれぞれ分離し、これを用いてヒト型結核菌の細分類を試みた。徳永<sup>8)</sup>は BK 1, K 1, B1, および DS 6 A を用いてヒト型結核菌のファージパターンの検討を行なつた。

著者らは K1, S1 ファージを用いて、ヒト型結核菌

のファージパターンについて検討をなし、あわせてこれらの菌株の生物学的ならびに生化学的諸性状との比較検討を行なつた。

## 実 験 方 法

## 1) 使用菌株

肺結核患者の喀痰より分離し、当教室に保存してある 40 株と、2, 3 の療養所より分与を受けた新鮮分離菌株 37 株のヒト型結核菌計 77 株を用いた。

非病原性抗酸菌は当教室に保存してある 52 株を用いた。その内訳は、学生の喀痰または含嗽水より分離したもの 30 株、モルモットの臓器または糞便より分離したもの 7 株、池水および下水より分離したもの 7 株、野菜屑や土壌より分離したもの 3 株、残りの 5 株は予研また

\* From Department of Public Health, Yokohama University School of Medicine, 2-33 Urafunecho, Minamiku, Yokohama, Japan.

Table 1. Lysis range by Spotting Method

Phage Titer Strain	K1				S1			
	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>
H <sub>37</sub> Rv	0	0	0	0	5	4	3	2
H <sub>37</sub> Ra	5	5	5	3	5	5	5	4
H <sub>2</sub> Rv	5	5	4	2	5	5	0	0
H <sub>2</sub> Ra	5	5	5	1	5-4	4	1	1
H <sub>2</sub>	5	5	4	1	5	5	5	4
AoyamaB	0	0	0	0	0	0	0	0
Shiba A 496 (Host strain)	5	5	5	5	5	5	5	5

\* shows RTD

は他の研究所より分与されたものである。

2) 使用ファージ

牛久<sup>6)</sup>の分離した K1 ファージ (titer : 2×10<sup>10</sup> particles/ml) および高橋<sup>7)</sup>の分離した S1 ファージ (titer : 1×10<sup>10</sup> particles/ml) を用いた。これらのファージの宿主菌はいずれも芝 A 496 株である。さて2株のファージは表1に示すごとく、RTD において K1 は H<sub>37</sub>Rv, H<sub>2</sub>Rv, H<sub>2</sub>Ra, H<sub>2</sub>, 青山Bなどの菌株に対して感受性がきわめて弱いかまたは全然なく、S1 は H<sub>37</sub>Rv, H<sub>2</sub>Rv, H<sub>2</sub>Ra, 青山Bなどの菌株に対して感受性がほとんどないという特性をもつ。

3) 感受性試験

徳永ら<sup>9)10)</sup>の方法によつた。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、ヒト型結核菌ではその1滴 (1/4 注射針による) を被検菌液播種後1日目の小川平板培地上にスポットした。非病原性抗酸菌では、被検液を4%グリセリン寒天平板上に播種して、表面が乾燥してからスポットした。成績の判定は溶菌がもつとも進んだ時点で行ない、その程度を次のように数字で表わした。

5: 完全溶菌しているもの。

4: 完全溶菌に近いもの、耐性菌の2次集落がわずかにあるものを含む。

3: 溶菌斑が相互にくっつき合つて、いわゆる semi-confluent lysis となつているもの。

2: 十数コあるいはそれ以上の独立した溶菌斑を認めるもの。

1: 数コ以上の独立した溶菌斑を認めるもの。

0: 全く溶菌を示さないもの。

各菌株のファージパターンを決定するさいの溶菌の有無は、上記の溶菌程度が3以上の場合は溶菌あり、2以下の場合は溶菌なしと判定した。

4) ナイアシン試験

結核菌検査指針 (1964)<sup>11)</sup>の方法に従い、その判定法

Table 2. Phage Patterns of Stock Cultures

Phage patterns	K1, S1	K1 alone	S1 alone	No lysis	Total
No. of strains	28	4	6	2	40
(%)	(70.0)	(10.0)	(15.0)	(5.0)	(100.0)

Table 3. Correlation between Phage Sensitivity and Some Properties of Stock Cultures

No. of strains	Phage		Niacin	Catalase		Value of Kf	Drug resistance		
	K1	S1		Room temperature	68°C		SM	PAS	INH
1	5	3	+	+	-	8	C	C	B
2	3	5-4	+	+	-	3	C	C	C
5	4	4	+	+	-	1	C	C	B
8	5	4	+	±	-	1	B	B*2	A*1
10	5	3	+	+	-	5	C*3	C	C
11	2	3	+	+	-	9	B	C	B
13	0	0	+	+	-	4	C	C	C
14	4-3	3	+	+	-	3	A	B	B
18	5	5	+	+	-	3	C	B	C
22	5	5	+	+	-	5	C	C	B
25	5	5	+	±	-	2	C	C	C
30	5	5	±	+	-	3	A	B	A
33	4	4	±	+	-	10	B	B	B
35	4	4	±	±	-	10	C	C	A
36	0	0	+	±	-	3	B	C	A
37	5	5	+	-	-	10	A	C	B
38	5	5	+	+	-	10	B	C	B
39	5	5	+	±	-	10	B	C	A

\*1 The strain showed complete drug resistance.

\*2 The strain showed incomplete drug resistance.

\*3 No strain showed drug resistance.

は次のごとく行なつた。

一: 対照と同様の白色沈殿

±: わずかに桃色がかった沈殿

+: 明らかに薄桃色に着色した沈殿

++: こい桃色に着色した沈殿

5) カタラーゼ活性試験

佐藤ら<sup>12)</sup>の方法に従つて室温と68°Cについて行ない、その判定法は次のごとく行なつた。

一: 泡が全く発生しないか、表面に数コの泡が発生。

±: 表面に1層程度の泡が発生

+: 表面に層をなして泡が発生し、その層の幅が3mm以内のもの

++: 表面に層をなして泡が発生し、その層の幅が3mm以上のもの

6) 抗煮沸試験

5mg/mlの菌浮遊液を作り、載物ガラスにその1滴を塗抹して室温で乾燥させ、チール氏石炭酸フクシンで37°C 15分間染色、これを生理的食塩水で一定時間処理し、1%メチレン青で10秒間後染色を行なつて鏡検判

定した。

7) 抗結核剤耐性試験

結核菌検査指針(1964)<sup>19)</sup>の間接法によつて行なつた。抗結核剤には Combined Streptomycin (T製薬 Co., 以後 SM と略称), *p*-Aminosalicylic Acid Sodium Salt (TK工業 Co., 以後 PAS と略称), Sodium Isonicotinyl Hydrozid Methanesulforrate (D製薬 Co., 以後 INH と略称) の3剤を使用し, 判定は耐性菌の発育なし, 不完全耐性, 完全耐性の3段階とした。

実験成績

ヒト型結核菌の保存菌 40 株のファージパターンを表 2 に示した。K1, S1 の両ファージに溶菌するもの 28 株 (70.0%) で K1 のみに溶菌するもの 4 株 (10.0%), S1 のみに溶菌するもの 6 株 (15.0%) であつた。

次にこれらの菌のナイアシンテスト, カタラーゼ活性, 抗煮沸性および抗結核剤に対する態度などの生物学的ならびに生化学的性状のファージパターンとの関連について検討を行なつた。表 3 はその成績の一部である 18 株のヒト型結核菌についての結果を示したものである。本表をみてまず気がつくことは, Kf 値の小さいものが相当にあるということである。ついで抗結核剤の耐性とファージパターンとの関連は全然みられないということが分かる。室温におけるカタラーゼ活性程度とファージパターンとの関連をさらに詳細に検討すると, 表 4 に示す成績となつた。しかして相互の関係を見出すことはできなかった。

新鮮分離菌 37 株についてファージパターンをみると表 5 に示すごとく, K1, S1 の両ファージに溶菌するものはわずかに 1 株 (2.7%) で, K1 のみに溶菌するものはなく, S1 のみに溶菌するものは 5 株 (13.5%) であつた。このファージパターンと, 分離菌株のナイアシン, カタラーゼ活性, 抗煮沸性および抗結核剤に対する

Table 4. Correlation between Catalase Activity and Phage Patterns of Stock Cultures

Phage patterns	Degree of activity				Total
	+	+	±	-	
K1, S1	18	1	5	4	28
K1 alone	3	0	1	0	4
S1 alone	5	1	0	0	6
No lysis	1	1	0	0	2
Total	27	3	6	4	40

Table 5. Phage Patterns of Fresh Cultures

Phage patterns	K1, S1	K1 alone	S1 alone	No lysis	Total
No. of strains	1	0	5	31	37
(%)	(2.7)	(0)	(13.5)	(83.8)	(100.0)

態度等の生物学的ならびに生化学的性状との関連を検討すると, 表 6 に示す成績となる。すなわちナイアシンでは±のものが 12 株 (30.3%) あつてかなり多く, 室温におけるカタラーゼ活性は±のものが 3 株 (8.1%) のみであつた。抗煮沸性の Kf 値は 3 以内のものは 1 株し

Table 6. Correlation between Phage Sensitivity and Some Properties of Fresh Cultures

Name of strains	Phage		Niacin	Catalase		Value of Kf	Drug resistance		
	K1	S1		Room temperature	68°C		SM	PAS	INH
Miyamoto	0	0	±	±	±	3	A	B	B
Tada	0	0	+	±	-	10	C	C	C
Makita	0	0	+	-	-	10	B	C	B
Fujisawa	0	0	+	-	-	9	C	C	A
Anzawa	0	0	±	+	±	7	B	B	A
Chimen	0	0	+	-	-	10	C	C	A
Takayanagi	0	1	+	-	-	10	A	C	A
Uchida	0	0	±	±	±	8	A	B	B
Sasaki	1	1	+	±	-	10	C	C	C
Suzuki	0	0	+	-	-	8	C	C	A
Ōyabu	0	0	+	-	-	5	C	C	A
Hisataka	0	0	+	±	-	6	C	C	C
Nakano	0	0	+	-	-	10	C	C	A
Yonezawa	0	0	+	-	-	8	C	C	C
Ishikawa	0	0	+	-	-	7	B	C	C
Ōta	0	0	+	+	-	10	C	C	C
Mogi	1	3	+	±	-	8	C	C	B
Tsunoda	0	0	+	-	-	8	C	C	C
Ninomiyama	0	0	+	-	-	10	C	C	B
Inomata	0	0	+	-	-	10	C	C	C
Takahashi	0	1	±	-	-	7	C	B	C
Kawaguchi	0	3	±	-	-	8	A	C	A
Akiyama	0	3-2	±	-	-	8	C	B	C
Matsuyama	0	3	+	-	-	10	C	B	C
Tanahashi	4-3	4	+	+	-	5	C	B	C
Morokore	0	0	+	-	-	6	C	C	A
Iida	0	0	±	±	-	6	C	C	C
Ueno	0	4	+	-	-	5	C	C	C
Moronawa	0	0	+	-	-	7	A	C	B
Kumakiri	0	0	±	±	-	10	C	C	C
Furukawa	0	0	±	+	-	10	C	C	C
Nara	0	0	±	-	-	10	C	C	C
Seto	0	0	±	±	-	8	C	C	C
Toda	0	0	±	+	-	10	C	C	C
Muramatsu	0	0	±	±	-	10	C	C	C
Wadata	0	0	+	-	-	7	B	B	B
Togawa	0	0	+	-	-	7	C	C	C
H <sub>37</sub> Rv	0	0	+	±	-	7	C	C	C

かなかつた。そしてこれらの性状とファージパターンとの関係はいずれも見出しえなかつた。

ファージパターンとヒト型結核菌の生物学的ならびに生化学的性状との関係は上記のごとく、保存菌株においてもまた新鮮分離菌株においても見出すことはできないが、これを保存菌株と新鮮分離菌株とについて比較すると注目すべき事実が見出された。すなわち室温におけるカタラーゼ活性程度は、 $\pm$ を示すものが保存菌株では40株中26株(65.0%)であるのに対し、新鮮分離菌株では37株中3株(8.1%)のみであつた。抗煮沸性ではKf値が3以下のものは40株中9株(22.5%)あるのに対し、新鮮分離菌株では37株中1株(2.7%)しかなかつた。ファージパターンについては、K1, S1の両ファージに溶菌するものは、保存菌株では28株(70.0%)であるのに対し、新鮮分離菌株ではわずか1株(2.7%)であつた。

Table 7. Phage Patterns of Saprophytic Mycobacteria

Classification by Tokunaga	Phage patterns				Total
	K1, S1	K1 alone	S1 alone	No lysis	
1 group				1	1
2			1	1	2
3	2			7	9
4	1			7	8
5	10	1	1	1	13
6	5	2	2	10	19
Total	18	3	4	27	52

非病原性抗酸菌52株のファージパターンの成績は表7に示されている。K1, S1の両ファージに溶菌するもの52株中18株(35.0%)、K1ファージのみに溶菌するもの3株(5.8%)、S1ファージのみに溶菌するもの4株(7.6%)であつた。これを徳永らの分類<sup>14)</sup>と比較すると、第1群に属する31株はいずれのファージにも溶菌せず、第2群に属する2株は、1株のみがS1ファージに溶菌した。第3群に属する9株では7株がいずれのファージにも溶菌せず、第4群に属する8株についても、7株が同様にいずれのファージにも溶菌しなかつた。第5群に属する13株のうち、10株がK1, S1の両ファージに溶菌し、K1ファージのみにまたS1ファージのみに溶菌するものがそれぞれ1株ずつあつた。第6群に属する19株では、K1, S1の両ファージに溶菌しないものが10株あつた。

#### 考 察

ヒト型結核菌のファージタイピングの研究がいままであまり行なわれなかつたのは、実験を行なつてから判定

までの日数が相当に長いということと、ヒト型結核菌に対するファージ感受性が2者択一の態度をとると考えられていた<sup>10)</sup>ことが大きな要因であると思われる。

しかし抗酸菌のファージ感受性試験法が、徳永ら<sup>9)10)</sup>によつて確立され、ヒト型結核菌に対し溶菌程度の異なるB1<sup>2)3)</sup>, BK1<sup>5)</sup>, K1<sup>6)</sup>, S1<sup>7)</sup>などのファージの存在することが分かつてから、にわかにはヒト型結核菌の細分類が注目をあびるにいたつた。

著者らは徳永ら<sup>9)10)</sup>が確立したRTD法を用いて、保存菌40株、新鮮分離菌37株の計77株について、K1, S1の溶菌程度を検討し、生物学的および生化学的性状をも調べてその関連性を考察した。

抗酸菌のファージタイピングと菌の生物学的ならびに生化学的性状との関連については、非病原性抗酸菌においては、菌の最高発育温度による分類および糖分解利用による分類とファージタイピングとは密接な関連のあることを徳永ら<sup>14)</sup>は述べているが、ヒト型結核菌においてはほとんどなされておらず、武谷<sup>2)3)</sup>の毒力ならびに薬剤耐性とファージ感受性との関係および徳永<sup>9)</sup>の薬剤耐性とファージ感受性の関係の報告があるのみである。両者ともに毒力ならびに薬剤耐性とファージ感受性の関係は認められないと述べている。

著者らがナイアシン、カタラーゼ活性、抗煮沸性および抗結核剤耐性などの諸性状の検討を行なつたのは、ナイアシンについてはヒト型結核菌であることを確認する意味で行ない、カタラーゼ活性と抗煮沸性は、ヒト型結核菌に対するこれらの性状を、gradeをつけて判定を行なうことができ、しかも試験方法が簡易であるという点から選んだ。そしてこれらの反応の強弱の程度とファージパターンとの関係を見出すことができないかと考えたわけである。抗結核剤の耐性検査は、先人の報告を追試する意味で行なつた。

その成績は上記のごとく、保存菌株のほうが新鮮分離菌株よりも、室温におけるカタラーゼ活性の強いものが多く、抗煮沸性の弱いものが多かつた。ファージ感受性では、K1, S1の両ファージに溶菌するものが前者では70%、後者ではわずかに2.7%であつた。ここで注意を要するのは、カタラーゼ活性の強いものまたは抗煮沸性の弱い菌株は、ファージ感受性に強い傾向にあるということではできないということである。保存菌株でも新鮮分離菌株においても、生物学的および生化学的性状とファージ感受性との関連のないことは、成績に示すとおりである。しかしながら保存菌株と新鮮分離菌株とを比較すると上記のごとく、差異がみられたということは興味がある。この差異は第1に保存菌株のほうが新鮮分離菌株より培地になれているために生ずる、発育程度の差異、第2には保存菌株は分離後長年月(少なくとも7年)継代しているために、生物学的ならびに生化学的性状が分

離当初に比較して変化しているのではないかということが考えられるが、この点については今後の検討を要する。

非病原性抗酸菌のファージパターンについてみると、徳永らの分類<sup>14)</sup>の第5群に属する15株中、10株がK1、S1の両ファージに溶菌し、K1ファージのみおよびS1ファージのみに溶菌したものを合わせると12株になったということは、第5群を明確なものにするうえにおいて、K1、S1ファージはかなり役立つのではないかと思われる。

なおK1、S1ファージの抗血清を作り、K1、S1、Y7、L1の各ファージの中和率を求めた成績では、K1ファージとS1ファージの差異を見出すことはできなかった。

#### 結 語

著者らはヒト型結核菌に特異的な溶菌域をもつK1、S1の両ファージを用いて、喀痰から分離し長期保存している菌株40株、新鮮分離菌株37株のヒト型結核菌のファージパターンを調べた結果、保存菌株では4型に、新鮮分離菌株では3型に分かつことができた。

ついでカタラーゼ活性、抗煮沸性およびファージ感受性の差異が保存菌株と新鮮分離菌株の間にみられた。

カタラーゼ活性、抗煮沸性などの生物学的性状とファ

ージ感受性との関連はみられなかった。

本論文の要旨は、第39回日本細菌学会総会において講演した。

#### 参 考 文 献

- 1) Froman, S., Will, D. W., and Bogen, E. : Am. J. Pub. Hlth., 44 : 1326, 1954.
- 2) 武谷健二 : 日本臨床結核, 18 : 147, 昭 34.
- 3) 武谷健二 : 日本臨床結核, 19, 246, 昭 39.
- 4) 徳永徹 : 胸部疾患, 8 : 126, 昭 39.
- 5) Baess, I. : Am. Rev. Resp. Dis., 93 : 622, 1966.
- 6) 牛久禮三 : 横浜医学, 17 : 269, 昭 41.
- 7) 高橋友夫 : 横浜医学, 17 : 258, 昭 41.
- 8) 徳永徹 : 日本細菌学雑誌, 21 : 396, 昭 41.
- 9) 徳永徹・関又蔵・室橋豊穂 : 日本細菌学雑誌, 16 : 88, 昭 36.
- 10) 徳永徹・関又蔵・室橋豊穂 : 日本細菌学雑誌, 16 : 960, 昭 41.
- 11) 衛生検査指針, 結核検査指針 (1964), p. 22, 日本公衆衛生協会, 昭 39.
- 12) 佐藤光三・佐竹央行 : 結核, 36 : 785, 昭 36.
- 13) 文献 11), p. 20.
- 14) 徳永徹・丸山米夫・室橋豊穂 : 日本細菌学雑誌, 20 : 554, 昭 40.