

抗酸菌の中性紅反応に関する一考察

合 田 忠・阪 本 竜 夫

広島大学医学部細菌学教室(主任 占部 薫教授)

国立賀茂療養所(所長 久保西健司博士)

受付 昭和 42 年 5 月 25 日

SOME OBSERVATIONS ON THE NEUTRAL RED TEST WITH MYCOBACTERIA*

Kiyoshi GODA and Tatsuo SAKAMOTO

(Received for publication May 25, 1967)

Modifications for the neutral red test described by Dubos and Middlebrook have been tried by many investigators, and it is recognized that the intensity of the reaction depends on the methods employed. The authors have observed that the Aratani strain of atypical group organisms gave a negative reaction for this test when the bacterial mass was pretreated with 50% methanol, while positive with absolute methanol.

One hundred and thirteen acid-fast bacilli, including 8 human strains, 6 bovine strains, 9 avian strains, 4 photochromogens, 21 scotochromogens, 21 nonphotochromogens, 27 rapid-growers from human sources, 17 rapid-growers from natural sources, were examined of the neutral red reaction, using 50% and 100% methanol, respectively, as a pretreatment agent.

Human strains of tubercle bacilli showed much stronger reaction by the treatment with 50% methanol, whereas the majority of *M. kansasii* and scotochromogens showed much stronger reaction by the treatment with 100% methanol.

Irrespective of the concentrations of methanol, the majority of bovine, avian and nonphotochromogenic strains showed much the same intensity of the reaction, and the rapid-growers both from human and natural sources showed a negative reaction.

中性紅反応は Middlebrook ならびに Dubos¹⁾ が病原性抗酸菌は陽性を、また非病原性抗酸菌は陰性をそれぞれ示し、これにより病原性抗酸菌と非病原性抗酸菌との鑑別ができると発表して以来、抗酸菌の毒力試験法の一つとして動物実験に代りうるものと高く評価されていた²⁾³⁾。その後非病原性抗酸菌の中にも陽性反応を示すものがあることが分かり^{4)~6)}、その声価は低下したが、現在でもなお抗酸菌の生物学的性状テストの重要な一つであることに変わりはないようである。この中性紅反応には Dubos の原法のほかに、種々の変法が考案され^{7)~9)}、その方法によつて反応に強弱の差のあることは占部、幸田¹⁰⁾あるいは松尾¹¹⁾¹²⁾によつて、くわしく報告されて

いる。

ところでわれわれは、国立賀茂療養所で分離された scotochromogen であるところの荒谷株の中性紅反応を検査中、たまたま菌塊の前処理にあつて、50% メタノールを使用すると陰性ないし疑陽性を示すにかかわらず、無水メタノールを使用すると強陽性を呈することを発見した。そこで他の抗酸菌株の中にもこのような反応を示すものがあるかどうか、もしあるとすれば抗酸菌の分類上役立つかどうかを検討するため、各種抗酸菌を供試し、それらの菌塊を一方では 50% メタノールで前処理し、他方では無水メタノールで前処理を行ない、それぞれについて中性紅反応を行なつてみた。

* From Department of Bacteriology (Director: Prof. Kaoru Urabe), Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima, Japan.

供試菌株

表 1 から表 4 までに示したような、人型結核菌 8 株、牛型結核菌 6 株、鳥型結核菌 9 株、photochromogens 4 株、scotochromogens 21 株、non-photochromogens 21 株、人体より分離のいわゆる rapid-growers 27 株 (着色株 19 株および非着色株 8 株) ならびに自然界系抗酸菌 17 株 (着色株 4 株および非着色株 13 株) の総計 113 株を供試した。なおそのさい結核菌、photochromogens, scotochromogens および non-photochromogens は 1% 小川培地に 4 週間培養したものを、また rapid-growers および自然界系菌は 1% 小川培地に 2 週間培養したものをそれぞれ用いた。

実験方法

2 ないし 3 白金耳量の菌塊を 50% メタノールおよび無水メタノールの 5 ml ずつ入った遠沈管に各別にとり菌塊をよく碎き 37°C のふらん器に 1 時間入れ、遠心沈殿しアルコールを捨てる。同様の方法を再度くり返し菌塊の入った遠沈管にアルカリ緩衝液 5 ml と 0.05% の中性紅溶液 0.2 ml とを加え、よく振とうし 37°C のふらん器に入れ 15 分後に成績を判定した。

成績判定

全く着色しないものを (-), 淡橙色になったものを (±), 紅色のものを (+), 深紅色のものを (卍) とし、さらに (+) と (卍) との中間の色調を呈するものを (⊕) とした。

実験成績

表 1 に示したように H₃₇Rv, 保利, 河上, 青山 B, Frankfurt の 5 株は 50% メタノール処理では強陽性ないし中等度陽性を示したにかかわらず、無水メタノール処理では陰性ないし疑陽性を示した。また H2, 吹田の 2 株は 50% メタノール処理では強陽性を示したのに、無水メタノール処理では弱陽性を示した。

H₃₇Ra 株は 50% メタノール処理では弱陽性を、また無水メタノール処理では疑陽性を示した。いずれにせよ人型結核菌では菌塊を 50% メタノールで処理したもののほうが無水メタノールで処理したものよりも中性紅反応は強く現われた。

牛型菌では芝, RM および三輪の 3 株はどちらの方法でも陰性を示し、牛 263 および BCG の 2 株はどちらの方法でも同程度の弱陽性を示したが Ravenel 株のみは 50% メタノールで処理すると強陽性を示したにかかわらず、無水メタノール処理では弱陽性を示し、人型結核菌と同じ傾向がみられた。

鳥型菌では Kirchberg, A 4121 の 2 株はどちらの方法でも強陽性を示し、Flamingo および A 71 の 2 株はどちらの方法でも同程度の中等度陽性を示した。他の 5 株はどちらの方法でも陰性であった。要するに鳥型菌では 2 つの方法による反応の強弱の差はみられなかった。

Table 1. Results of the Neutral Red Test with *M. tuberculosis*, *M. bovis*, and *M. avium*

Strains	Agents		
	Absolute methanol	50% methanol	
<i>M. tuberculosis</i>	H ₃₇ Rv	—	卍
	Kawakami	—	⊕
	Aoyama	—	⊕
	Frankfurt	—	卍
	Hori	±	⊕
	H ₃₇ Ra	±	+
	H 2	+	卍
	Fukita	+	卍
<i>M. bovis</i>	Ushi 263	+	+
	BCG	+	+
	Ravenel	+	卍
	Shiba	—	—
	RM	—	—
	Miwa	—	—
<i>M. avium</i>	Flamingo	⊕	⊕
	A 71	⊕	⊕
	Kirchberg	卍	卍
	A 4121	卍	卍
	A 62	—	—
	Takeo	—	—
	Torikyo	—	—
	Torijuchyo	—	—
	TB 13	—	—

次に非定型抗酸菌にあつては表 2 のように photochromogens では P 1, P 16 および P 22 の 3 株は無水メタノール処理では弱陽性を示したにかかわらず、50% メタノール処理では陰性を示したが P 8 株のみは両方法とも疑陽性であつた。すなわち photochromogens では 4 株中 3 株にあつて無水メタノール処理のほうが 50% メタノール処理よりも強い反応を示した。

scotochromogens では荒谷, P 6, P 31, Frost, Bridge, 大久保, 渡辺, 松井, 中榎, 藤井, 倉田, 蓮見, 森田の 13 株は 50% メタノール処理では陰性ないし疑陽性を示したにかかわらず、無水メタノール処理では強陽性ないし中等度陽性を示し、二宮 S5, Brooks, 竹の 3 株は 50% メタノール処理では陰性ないし疑陽性であつたが、無水メタノール処理では弱陽性を示した。

倉本株は 50% メタノール処理では弱陽性を、また無水メタノール処理では強陽性をそれぞれ示した。大野および中島の 2 株のみはこれとは反対に 50% メタノール処理では中等度陽性を、無水メタノール処理では疑陽性ないし陰性をそれぞれ示した。なお P 5, 山崎の 2 株はどちらの方法でも陰性であつた。すなわち scotochromogens の 21 株のうち 16 株は 50% メタノール処理

Table 2. Results of the Neutral Red Test with Atypical Mycobacteria

	Strains	Agents		Strains	Agents		Strains	Agents	
		Absolute methanol	50% methanol		Absolute methanol	50% methanol		Absolute methanol	50% methanol
Photochromogens	P 1	+	-	Aratani	##	-	Hashimoto	##	##
	P 8	±	±	P 6	++	-	Ueda	++	++
	P 16	+	-	P 31	##	-	P 20	++	++
	P 22	+	-	Frost	##	-	Shimamoto	+	+
				Brooks	+	-	121326	##	##
				Bridge	++	±	Okayama	##	-
				Watanabe	##	±	5808	##	+
				Ninomiya S 5	+	±	Sasebo	+	##
				Matsui	##	-	Takakuwa	-	±
				Nakamasu	##	-	P 25	-	-
				Fujii	++	-	Kōfu	-	-
				Kurata	##	±	Yamamoto S 1	-	-
				Hasumi	##	±	Yamamoto S 2	-	-
				Morita	++	±	Kinshi	-	-
				Take	+	±	T 3133	-	-
				Kuramoto	##	+	Douglas	-	-
			Ōno	±	++	355	-	-	
			Nakajima	-	++	Singer No. 3	-	-	
			P 5	-	-	Singer No. 4	-	-	
			Yamasaki	-	-	Singer No. 6	-	-	
						Singer No. 16	-	-	

では陰性ないし疑陽性であつたのかかわらず、無水メタノール処理では陽性を示し、他の2株では50%メタノール処理で陽性、無水メタノール処理で陰性ないし疑陽性であつた。残余の1株はどちらの方法でも陽性であつたが無水メタノールで処理したほうが反応はより強く現われた。つまり scotochromogens では大部分の菌株において上述の人型結核菌とは反対の態度を示した。

non-photochromogens では橋本、上田、P 20、嶋本、121326の5株は50%メタノール、無水メタノールのいずれによつて処理してもともに同程度の陽性反応を示した。ところが岡山および5808の2株は無水メタノールで処理すると強陽性を示したにもかかわらず、50%メタノール処理では陰性および弱陽性をそれぞれ示した。また佐世保株のみは50%メタノール処理で強陽性を示し、無水メタノール処理では逆に弱陽性を示した。なおその他の13株はいずれの処理方法でも陰性であつた。すなわち non-photochromogens では21株中5株が鳥型菌と同傾向の態度を示し、2株が scotochromogen 型、1株が人型結核菌型ともいふべき態度を示したのである。

次に人体材料から分離されたいわゆる rapid-growers では表3に示すように、また自然界系抗酸菌では表4に示すように、いずれも全株が無水メタノールで処理しても、50%メタノールで処理してもともに陰性成績に終

始した。

総括ならびに考案

すでに占部、幸田¹⁰⁾によつて抗酸菌の中性紅反応は、Dubos 原法の50%メタノール液の代りに、エタノール、エーテル等量混合液を用いると、一般にその呈色度が増強されることが報告されているが、われわれも50%メタノール使用では呈色反応が陰性であるにかかわらず、無水メタノールを使用すると強陽性を示す菌株のあること(表2)を知つたので、総計113株の抗酸菌を供試して50%メタノールを使用した場合と無水メタノールを使用した場合との呈色反応の異同を追究してみた。その結果によると人型結核菌8株ではそのうち7株までが50%メタノール処理では中等度ないし強陽性を示したにかかわらず、無水メタノール処理では陰性4株、弱陽性2株、疑陽性1株であつた。すなわち人型結核菌では8株とも50%メタノール処理のほうが無水メタノール処理の場合よりも強い中性紅反応を示すことがみられた。

牛型菌6株のうち3株はいずれの方法でも陰性であつたが、残余の3株のうち2株ではいずれの方法でも同程度の弱陽性を示し、また1株のみは人型結核菌と同様に50%メタノール処理のほうがより強い反応を示した。

次に鳥型菌についてみるに9株のうち陽性を示した4

Table 3. Results of the Neutral Red Test with Rapid-growers from Human Sources

Strains	Agents		
	Absolute methanol	50% methanol	
Pigmented strains	Imaoka	—	—
	Idenoue	—	—
	Dōmen	—	—
	Ōta	—	—
	Kurokawa	—	—
	Morishita	—	—
	Takehara	—	—
	Konaka	—	—
	Yokogawa	—	—
	Kushida	—	—
	150	—	—
	Banmoto	—	—
	Kataoka	—	—
	Murakami	—	—
	Kodama	—	—
	Deki	—	—
	Miyashita	—	—
	Sugimoto	—	—
Dai	—	—	
Nonpigmented strains	Ninomiya S11	—	—
	Okugawa	—	—
	Kiji	—	—
	Shimosaki	—	—
	Kashihara	—	—
	Togikawa	—	—
	Makio	—	—
	Uefuji	—	—

株はともにいずれの方法によつても同程度の着色を示し、両法による強弱の差はみられなかつた。

photochromogens では4株のうち3株は無水メタノール処理では陽性を示したのに、50%メタノール処理では陰性を示し、上述の人型結核菌とは逆の着色態度を示した。

ところが、ここに興味あることには scotochromogens では21株のうち17株までもが無水メタノールで処理したほうが50%メタノールで処理した場合よりもはるかに強い着色反応を示した。そして他の2株のみが人型結核菌と同じように50%メタノール処理のさい、より強い着色反応を示すことがみられた。

non-photochromogens では21株のうち8株が陽性反応を示したが、その8株のうち5株までもがいずれの方法でも同程度に着色し、これは鳥型菌と同じ傾向の反応型と判断された。ところが他の2株では無水メタノール処理のほうがより強く着色し、この点 scotochromogens と同じような反応型を示した。なお佐世保株のみ

Table 4. Result of the Neutral Red Test with Acid-fast Bacilli from Natural Sources

Strains	Agents		
	Absolute methanol	50% methanol	
Pigmented strains	K Tsuchi 31	—	—
	K Tsuchi 111	—	—
	B 14	—	—
	B 3	—	—
Nonpigmented strains	S 50 B	—	—
	S 12	—	—
	B 1	—	—
	B 2	—	—
	B 5	—	—
	B 6	—	—
	B 7	—	—
	B 10	—	—
	B 15	—	—
	B 16	—	—
	Tsuchi 5 A	—	—
	Tsuchi 30	—	—
	238	—	—

は人型結核菌と同じように50%メタノールで処理したほうがより強く着色した。

人体より分離のいわゆる rapid-growers および自然界系抗酸菌では着色系と非着色系とを問わず計45株ともいずれの方法によつても陰性を示した。以上の所見よりして中性紅反応の、多少にかかわらず陽性を示す抗酸菌においてはその菌種の如何によつて、菌塊の前処理を50%メタノールで行なう場合と無水メタノールで行なうさいとで反応度に著しい差異のみられるものとそうでないものとの別のあることが分かつた。すなわち全株中性紅反応陽性であるところの人型結核菌では50%メタノール処理の場合のほうが、無水メタノール処理のさいに比べて常により強い着色度を示すが、鳥型菌、牛型菌ならびに non-photochromogens の中性紅反応陽性の菌株においては両処理間に着色度の差は生ぜず、また photochromogens ならびに scotochromogens では多少の例外はあるにしてもその中性紅反応が無水メタノール処理法によると陽性を示すのに、50%メタノール処理法では全く陰性かまたは疑陽性程度の反応しか示さないことがみられた。

したがつて如上の知見は抗酸菌の群別ないし同定に多少とも参考になることもあるのではないかと思われる。なお一般にいつて上記の中性紅反応の程度差は培養期間のあまり短い場合には著明には現われないことを付記しておく。

結 論

- 1) 抗酸菌の中性紅反応は菌塊の前処理を無水メタノ

ールによつた場合と、50%メタノールによつたさいとでは菌種、菌株によりその着色度に多少にかかわらず強弱の差の出現することがある。

2) 人型結核菌では50%メタノールで処理したほうが着色反応がより強く現われるが、photochromogensならびに scotochromogens ではそれらの大部分の菌株が逆に無水メタノールで処理したほうが強い着色度を示す。

3) ところが牛型菌、鳥型菌ならびに non-photochromogens の中性紅反応陽性株では大部分の菌株において両処理間に着色度の差はみられなかつた。

4) 人体系 rapid-growers ならびに自然界系抗酸菌においては全菌株ともいずれの前処理法によつても中性紅反応は陰性を示す。

稿を終わるに臨み、終始ご懇篤なご指導を賜わりご校閲をいただいた恩師占部薫教授に深謝しますとともに、ご援助をいただいた齊藤肇講師ならびに久保西健司所長

に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Dubos, R. J. and Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 58 : 698, 699, 1948.
- 2) Morse, W., Dail, M. C. and Olizky, I. : Am. J. Pub. Health., 43 : 36, 1953.
- 3) 西条頼広・善養寺浩・辺野喜正夫他 : 日本公衆衛生雑誌, 10 : 409, 昭 38.
- 4) Richmond, L. and Cummings, M. M. : Am. Rev. Tuberc., 62 : 632, 637, 1950.
- 5) 幸田忠彦 : 原著広島医学, 6 : 1695, 昭 33.
- 6) 豊原希一 : 結核, 32 : 23, 昭 32.
- 7) Hughes, D. I. and Mass, D. E. : Am. J. Clin. Path. Tech., 24 : 621, 1954.
- 8) Krasnow, L., Wayne, L. G. and Salkin, B. : Am. Rev. Tuberc., 71 : 361, 370, 1955.
- 9) 幸田忠彦 : 結核, 32 : 6, 昭 32.
- 10) 幸田忠彦 : 原著広島医学, 6 : 1487, 昭 33.
- 11) 松尾仁 : 結核, 31 : 728, 昭 31.
- 12) 松尾仁 : 結核, 33 : 24, 昭 33.