

原 著

## 抗酸菌バクテリオシンに関する研究

1) マイコバクテリオシン検出に及ぼす  
クロロホルムその他の有機溶媒の影響

萩 原 義 郷

久留米大学医学部微生物学教室細菌学講座

受付 昭和 49 年 7 月 27 日

## STUDIES ON THE MYCOBACTERIOCIN

Report 1. Effects of Treatment with Chloroform and Other Organic  
Solvents on the Detection of Mycobacteriocin

Yoshisato HAGIHARA\*

(Received for publication July 27, 1974)

Mycobacteriocin produced by *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841 was detected only when the bacilli on the assay plate were treated with chloroform, whereas no bacteriocin activity was observed in the non-treated plate. Carbon tetrachloride, ethyl ether, benzen, 1,2-dichloroethane, petroleum ether and acetone had similar effects to that of chloroform. The treatment with chloroform resulted in the complete killing of the bacilli, but other organic solvents tested had no killing effect. Therefore, the mycobacteriocin which was detected by chloroform treatment might not be due to the extraction of the active principle from bacterial cells after death.

On the other hand, in the control experiments with colicin, such effects of the organic solvents were not demonstrated, and colicin was detected either when the plate was treated with or without chloroform.

Mycobacteriocin, which shows its activity just after the treatment of chloroform, is quite distinct from colicin and other bacteriocin previously been reported in the literatures.

バクテリオシンとは同種または近縁の細菌に対して増殖阻止作用を示す蛋白性物質で、その産生能は遺伝的なものであることが知られている (Lwoff<sup>1)</sup>)。バクテリオシンの中では大腸菌の産生するコロシン<sup>2)</sup>、緑膿菌の産生するピオシン<sup>3)</sup>について詳細な研究がなされている。抗酸菌のバクテリオシンは武谷ら<sup>4)5)</sup>によつて発見され、それを利用した抗酸菌分類についての研究が始められたばかりでまだ詳細は明らかでない。著者は共同研究者として武谷らとの抗酸菌バクテリオシンによる抗酸菌分類の研究で、ある菌株の産生するマイコバクテリオシンが

クロロホルムその他の有機溶媒によつて初めてその発育阻止作用を発現することを見出したので報告する。

## 実 験 方 法

供試菌および供試培地: 抗酸菌としては武谷教授 (九大・医・細菌) から分与を受けた抗酸菌 *M. fortuitum* ATCC 6841 (6841 株), *M. smegmatis* ATCC 14468 株 (14468 株) および *M. diernhoferi* ATCC 19340S (19340S 株) を使用した。これらの菌株はいずれも rapid grower として分類されている抗酸菌で、6841 株の産生

\* From the Department of Microbiology, Kurume University School of Medicine (Director: Prof. M. Nakamura), Kurume 830 Japan.

Table 1. Effects of Organic Solvents on the Detection of Mycobacteriocin Produced by *M. fortuitum* ATCC 6841 and on the Growth of *M. fortuitum* ATCC 6841 Treated with Organic Solvents

Organic solvent	Indicator strain		Growth of 6841 strain
	19340S	14468	
Chloroform	+*	-	-**
Carbon tetrachloride	+	-	+
1,2-Dichloroethane	+	-	+
Ethyl ether	+	-	+
Petroleum ether	+	-	+
Benzen	+	-	+
Aceton	+	-	+
Methanol	?	?	+
Ethanol	?	?	+
Isopropanol	?	?	+
n-Buthanol	?	?	+
Non-treated	-	-	+

\* +: Growth inhibited -: Growth not inhibited  
?: Growth inhibition doubtful

\*\* +: Could grow -: Failed to grow

するマイコバクテリオシンによつて 19340S 株の発育は阻止されるが、14468 株は発育阻止を受けないことが知られている。実験にはグリセリンを加えたハートインフュージョン寒天培地 (GHA) に 37°C 48 時間培養した菌を生塩水で適当な浮遊液として使用した。対照実験であるコリスンの実験においては、常盤博士 (福岡県衛生公害センター細菌部) から分与を受けた *E. coli* 6 株、*Paracoli* 1 株および *S. typhimurium* 2 株計 9 株を使用した (表 1)。この 9 株のうち *E. coli* Row (col-) と *S. typhimurium* cys 36-col- の 2 株がコリン非産生菌であり、他はすべてコリン産生株である。コリン検出の indicator 菌としては *E. coli* Row (col-) 株を使用した。コリスンの実験においては培地は普通寒天培地および半流動寒天培地を用いた。

供試有機溶媒: クロロホルム, 四塩化炭素, 1,2-ジクロールエタン, エチルエーテル, 石油エーテル, ベンゼン, アセトン, メタノール, エタノール, イソプロパノールおよび *n*-ブタノール計 11 種類の有機溶媒 (和光純薬, 特級) を使用した。

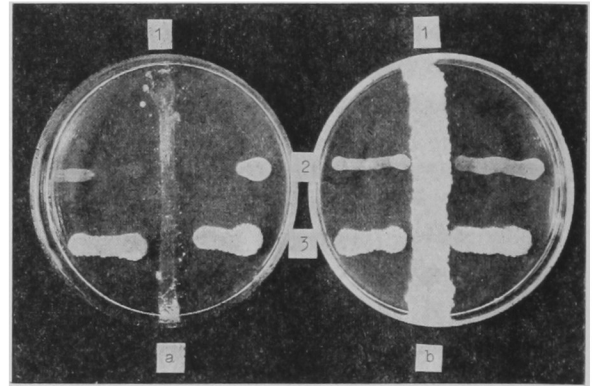
実験方法: 実験方法は武谷らの方法<sup>4)5)</sup> に従つたが、詳細については成績の項に述べる。

### 成 績

実験 1: マイコバクテリオシン検出に及ぼすクロロホルムの影響

6841 株を 3 日間グリセリン寒天平板上に画線培養したシャーレを 2 組用意し、1 組は武谷ら<sup>4)</sup> の方法に従つて

Fig. 1. Effect of Chloroform on the Detection of Mycobacteriocin Produced by *M. fortuitum* ATCC 6841



(a) Chloroform treated (b) Non-treated  
(1) *M. fortuitum* ATCC 6841 (2) *M. diernhoferi* ATCC 19340S (3) *M. smegmatis* ATCC 14468

クロロホルム処理を行い、他の 1 組は無処理のままとした。次にこれらのシャーレに indicator 菌として 19340S 株および 14468 株の生塩水浮遊液 (約  $10^6$ /ml) を 6841 株の画線と直角に、しかも接触しないように画線接種し、37°C 72 時間培養後 indicator 菌の発育状況を観察した。

図 1 に実験結果を示す。定法に従つてクロロホルム処理を行った場合、図 1 (a) に示すように 6841 株の産生するマイコバクテリオシンによつて 19340S 株の発育は阻止されたが、14468 株の発育は阻止されなかつた。

この結果は武谷らの成績と一致するものであつた。一方、クロロホルム処理を行わなかつた場合においては図 1 (b) に示すように、クロロホルム処理を行った場合と異なり、14468 株のみならず、19340S 株の発育阻止も全く認められなかつた。この結果から 6841 株の産生するマイコバクテリオシンはクロロホルム処理を行わなければ検出しえないことが判明した。

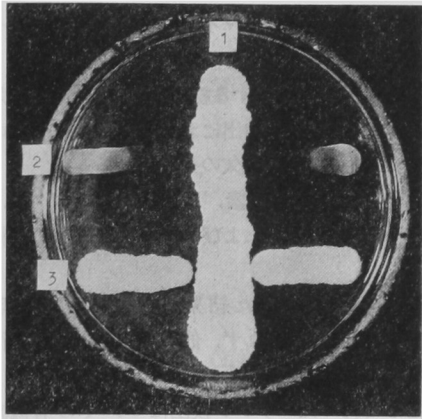
実験 2: クロロホルム以外の有機溶媒のマイコバクテリオシン検出に及ぼす影響

次に実験 1 でみられたように 6841 株のマイコバクテリオシン検出にはクロロホルム処理が重要な役割を果たしていると思われるが、クロロホルム以外の他の有機溶媒にはこのような作用はないかということを調べる目的で実験を行った。

実験方法は実験 1 に準じ、クロロホルムの代りに、方法の項であげた有機溶媒で処理を行い、indicator 菌の発育阻止を調べた。これらの有機溶媒のうちメタノール、エタノール、イソプロパノールおよび *n*-ブタノールで処理した場合には約 5 時間放置後も培地に揮発臭の残存が認められた。

結果は表 1 に示すように 6841 株のバクテリオシンに非感受性の 14468 株は、アルコール類による処理の場合を除いては有機溶媒の処理の有無にかかわらず、発育阻

Fig. 2. Growth Inhibition of Indicator Strain on the Benzen-treated Plate



(1) *M. fortuitum* ATCC 6841 (2) *M. diernhoferi* ATCC 19340S (3) *M. smegmatis* ATCC 14468

止を受けなかつた。一方、感受性の 19340S 株は、無処置では発育阻止はみられなかつたが、四塩化炭素、1,2-ジクロロールエタン、エーテルおよびベンゼンで処理した場合にはクロロホルム処理の場合と同様な発育阻止が認められた。図2にベンゼン処理の場合の結果を示す。なおアルコール類で処理した場合には表には示していないがマイコバクテリオシン産生菌接種の有無にかかわらず indicator 菌そのものの発育が認められないかあるいは微弱であつたので、バクテリオシン検出に及ぼす影響についての判定は不能であつた。これらの結果は四塩化炭素、1,2-ジクロロールエタン、エーテル、ベンゼン、石油エーテルおよびアセトンもバクテリオシン検出においてクロロホルムと同様な効果を有することを示すものである。

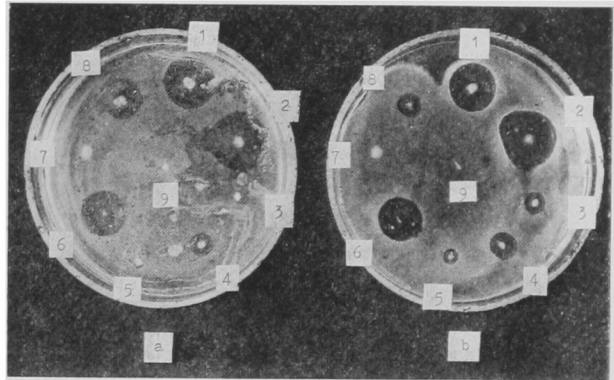
実験 3: マイコバクテリオシン検出における有機溶媒処理と菌の生死について

実験 1, 2 において 6841 株の産生するマイコバクテリオシン検出にはクロロホルムなどの有機溶媒処理が必要不可欠であることを明らかにしたが、これらの処理は殺菌的に作用しているのであろうか、すなわちバクテリオシン産生には菌の生死が関係しているか否かを調べる目的で有機溶媒処理後の菌について、培養実験を行った。菌は白金耳で GHA 斜面に接種して発育を調べた。結果は表 1 に示すようにクロロホルム以外の有機溶媒処理の場合にはすべて菌は生残していた。一方、クロロホルム処理の場合には全く菌の発育は認められなかつた。

実験 4: クロロホルム、ベンゼンおよびエーテル処理のコリシン検出に及ぼす影響

抗酸菌 6841 株のマイコバクテリオシン検出には有機溶媒処理が必要であるが、これが抗酸菌株に特異的な必須条件であるか否かを知る必要から対照実験として、コ

Fig. 3. Effect of Chloroform on the Detection of Colicin



*E. coli* Row (col<sup>-</sup>) was used as an indicator strain.

- 1: *E. coli* CA 18-B
- 2: *Paracoli* CA 62-J+I
- 3: *E. coli* CA 53-I
- 4: *E. coli* CA 38-E<sub>3</sub>+I
- 5: *E. coli* K12-30-E<sub>1</sub>
- 6: *E. coli* K 12-317-E<sub>2</sub>
- 7: *E. coli* Row (col<sup>-</sup>)
- 8: *S. typhimurium* cys 36-I
- 9: *S. typhimurium* cys 36-col<sup>-</sup>

Table 2. Effects of Chloroform, Benzen and Ethyl Ether on the Detection of Colicin

Strain	Treatment			
	Non	Chloroform	Benzen	Ethyl ether
<i>E. coli</i> CA 18-B	18*	13	19	19
<i>E. coli</i> CA 53-I	7	6	8	6
<i>E. coli</i> CA 38-E <sub>3</sub> +I	7	9	9	8
<i>E. coli</i> K 12-30-E <sub>1</sub>	7	6	8	7
<i>E. coli</i> K 12-317-E <sub>2</sub>	15	15	18	20
<i>E. coli</i> Row (col <sup>-</sup> )	0	0	0	0
<i>Paracoli</i> CA 62-J+I	19	19	21	20
<i>S. typhimurium</i> cys 36-I	11	7	11	8
<i>S. typhimurium</i> cys 36-col <sup>-</sup>	0	0	0	0

*E. coli* Row (col<sup>-</sup>) was used as an indicator strain.

\*: Figures indicate the diameter of inhibited area in mm.

リシン検出におけるクロロホルム、ベンゼンおよびエーテルの処理の影響について検討した。

寒天平板に穿刺培養によりコリシン産生株および非産生株 9 株を 1 夜培養したシャーレを 4 組用意した。そのうちの 1 組は無処置とし、他の 3 組は定法に従つてそれぞれクロロホルム、ベンゼンおよびエーテル蒸気によつて処理した後、indicator 菌を 10<sup>8</sup>/ml に混ぜた半流動寒天培地を重層し、37°C 1 夜培養した。

コリシン検出は indicator 菌の発育阻止の有無によつた。成績は表 2 および図 3 に示す。

無処置の場合にもまたクロロホルム、ベンゼンおよびエーテル処理を行った場合もほとんど変わらない阻止がみられた。すなわちコリシン産生菌の場合にはこれらの有機溶媒による処理は、コリシン検出とは無関係といえ

る。

### 考 察

一般にコリシン検出の実験においては、コリシン産生菌を殺菌するためにクロロホルムが使用されており、これは routine 化されている。抗酸菌においても同様な目的でクロロホルムが使用されているようである。しかし、今回の実験結果から抗酸菌 6841 株の産生するマイコバクテリオシンはクロロホルム処理を行つてはじめて検出されることが明らかである。このことはコリシン発見以来 routine 化されているコリシン産生菌殺菌のためのクロロホルム処理が単に殺菌の目的のみならずその他の意義を検討する必要がある重要な課題を提示するものと考えられる。また実験2に示したようにクロロホルム以外の有機溶媒によつてもクロロホルム処理の場合と同様な結果が得られたが、コリシン検出の場合と全く異なる結果(実験4)と考え合わせると6841株のマイコバクテリオシン検出においては有機溶媒が重要な役割を果たしていることが考えられる。このような抗酸菌6841株のマイコバクテリオシン検出における有機溶媒処理が抗酸菌特有の現象か株特異的現象かについても今後検討を要するであろう。更に実験3の結果が示すようにクロロホルム以外では生残菌がみられたことは定量的測定でないのではつきりしたことはいえないにしても菌の生死とバクテリオシン産生との関係がないようにもみえる。このことについては更に検討する必要がある。最後に、抗酸菌6841株において見出されたクロロホルム処理によつて初めて検出されるマイコバクテリオシンが、従来知られているようなバクテリオシンと同一カテゴリーに属するか否かについては現在不明である。

### 結 論

抗酸菌 6841 株の産生するマイコバクテリオシンについて検討した結果、次の結論を得た。

1. 抗酸菌 6841 株の産生する抗酸菌 19340 S 株に対するマイコバクテリオシン検出においては、6841 株のクロロホルム処理が必要不可欠の条件である。
2. 同様な効果は四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン、エチルエーテル、ベンゼンおよびアセトンによつても得られた。
3. 直接塗抹培養法で調べた結果、クロロホルム処理の場合のみ菌の発育がみられず、他の有機溶媒処理を行った場合菌は発育した。
4. 対照として行つたコリシン検出についての有機溶媒の影響は全くみられなかつた。

以上の結果から抗酸菌 6841 株の産するマイコバクテリオシンは従来コリシンなどについて知られているものと異なる性質を有するものと思われる。

稿を終るにあたりご校閲を頂いた中村昌弘教授に心から感謝すると共に、抗酸菌株の分与を頂いた武谷健二教授(九大・医・細菌)コリシン産生株を分与された常盤博士(福岡県衛生公害センター細菌部)に感謝します。

### 文 献

- 1) Lwoff, A.: *Bacteriol. Rev.*, 17 : 269, 1953.
- 2) Fredericq, P.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 11 : 7, 1957.
- 3) Takeya, K., Minamishima, Y., Amako, K. and Ohnishi, Y.: *J. gen. Virology*, 145 : 145, 1969.
- 4) Takeya, K. and Tokiwa, H.: *Int. J. syst. Bacteriol.*, 22 : 178, 1972.
- 5) Takeya, K. and Tokiwa, H.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 109 : 304, 1974.