

原 著

結核菌のマイコバクテリオシン型別

常 盤 寛

福岡県衛生公害センター保健科学部

武 谷 健 二

九州大学医学部微生物学教室

受付 昭和 51 年 10 月 4 日

MYCOBACTERIOCIN TYPING OF HUMAN
TYPE TUBERCLE BACILLI

Hiroshi TOKIWA* and Kenji TAKEYA

(Received for publication October 4, 1976)

Mycobacteriocin produced by human type tubercle bacilli could be demonstrated easily on egg medium containing 0.05% tween 80 by means of stab culture or streak plate methods, and eleven mycobacteriocin-types have been recognized on the basis of the inhibition pattern by using 9 indicator strains of rapidly growing mycobacteria.

At present, types 1 (4.9%), 2 (13%), 4 (38.5%), 9 (2%) and 11 (14.8%) showed a stable mycobacteriocin pattern, but types 3 (7.8%) and 7 (6.7%) were apt to show type replacement to types 2 and 4, respectively, and strains belonging to types 5, 6 and 8 were few, less than 1.5% to the total. In order to perform a reproducible mycobacteriocin typing, our previous typing scheme was revised to be consisted of five groups (A-E). Among 438 strains, mycobacteriocin group C containing types 4 and 7 was 46.1% of strains tested, group B containing types 2, 3 and 6 was 22.6%, group E containing type 11 was 15.1%, group A containing types 1 and 8 was 5.5%, group D containing types 9 and 10 was 4.1%, and untypable strains were no more than 6.6% among all tested strains.

Human type tubercle bacilli classified as type 4, which consisted of more than 45% of strains tested, could be divided into three sub-types from sensitivity to *M. gordonae* 1324 and *M. terrae* 1450.

Mycobacteriocin producing strains belonging to type D: 9 showed an extremely wide antibacterial activity to strains of more than 90% of rapidly growing mycobacteria (42 strains), to about 40% of slow growing mycobacteria (29 strains), and even to 10 strains of *Staphylococcus aureus*.

細菌の産生するバクテリオシンは遺伝的に安定な形質であるといわれ、現在最も解析されたコリシンはプラスミットと呼ばれる蛋白性の遺伝的単位から成っている。したがって、これらを利用して菌種分類または型別を

行なう試みがあり、従来、主としてグラム陰性菌について試みられてきた^{1)~4)}。したがってバクテリオシン型別法にはバクテリオシン原性に基づいて型別する“Bacteriocinogeno typing”と、1組の感受性菌に対する抗菌パタ

* From the Fukuoka Environmental Research Center, Fukuoka 818-01 Japan.

ーンから型別する“Bacteriocino typing”の2種の方法があり、いずれの方法も疫学的研究に応用される。

結核菌の型別法には古くからフェージ型別法が試みられてきたが⁵⁾⁶⁾、いまだ方法論的確立に至っていない。一方著者らは抗酸菌の産生するマイコバクテリオシンを明らかにし、迅速発育菌群のマイコバクテリオシン分類⁷⁾をはじめとして、主として“Bacteriocino typing”による結核菌の型別方法について研究してきた。本型別法では9株の迅速発育菌を指示菌としてその抗菌パターンから結核菌は11のマイコバクテリオシン型に型別可能であることを示唆した^{8)~10)}。現在マイコバクテリオシンの遺伝生化学的性状について積極的に証明する成績が得られていないが、最近島元ら¹¹⁾によつて *M. lactae* の産生する活性物質は蛋白性の低分子物質であることが明らかとなり、従来 Bradley¹²⁾ の定義した低分子のバクテリオシンと類似の性状を示すことが明らかになつてきた。本報では結核菌および *M. africanum* のマイコバクテリオシン型別法確立を目的として型別の現状を報告する。

実験材料と方法

菌株：使用菌株としては非定型抗酸菌IV群菌については ATCC 系 108 株⁹⁾ を用い、結核菌については Dr. Kleeberg から分与された 41 株と、福岡、長崎の結核患者分離菌株を使用した。 *M. africanum* 15 株¹⁰⁾ は Dr. Kleeberg 由来の菌株である。型別に使用した指示菌は *M. diernhoferi* ATCC 19340, 19341, *M. thermoresistibile* ATCC 25815, 25814, *M. chitae* ATCC 19627, 25805, *M. aurum* ATCC 25797, 25800 の 9 株でいずれも小川培地で継代保存した。

マイコバクテリオシン型別法：前報¹⁰⁾に報告した方法によつた。すなわち被検結核菌を Tween 80 加卵培地に線状に接種し、37°C 2 週間培養後、クロロホルムで 1 時間殺菌した。次いで型別培地上に約 4 ml の 4% グリセリン加ハートインフュージョン寒天培地を重層し、3 日間冷室に保存した。一方継代によつて 48 時間培養後の各指示菌 10⁶/ml の菌浮遊液を作成し、各指示菌を型別培地上に画線、48 時間後に判定した。判定は指示菌の阻止帯 5 mm 以上のものは陽性とした。ただし被検結核菌の線状培養上に指示菌が部分的に発育しても明らかに阻止帯 (5 mm 以上) が認められたものについては陽性と判定した。この現象は指示菌 *M. aurum* にしばしば認められた。なお被検結核菌は小川培地ほぼ 2 週間培養後発育良好な菌株について型別を実施し、発育の遅い菌株については継代をくり返し、培養 2 週間で発育良好な状態で型別に使用した。

成 績

1. 結核菌のマイコバクテリオシン産生と型別

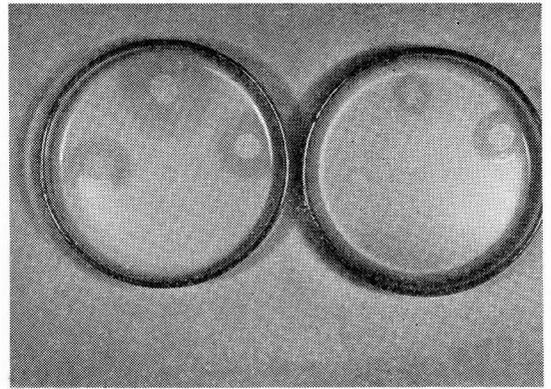


Photo 1. Detection of mycobacteriocin.

結核菌のマイコバクテリオシン産生性は固形培地中で容易に検出することができる(写真 1)。しかし本菌をデュボス液体培地で培養してもマイコバクテリオシン活性物質は菌体から遊離しがたい。すなわち培養遠心上清液にはマイコバクテリオシン活性は認めがたい。したがつて発育良好な結核菌を小川培地上にせん刺またはストロークし、培養 2 週後にクロロホルムで殺菌した後、感受性指示菌を軟寒天とともに重層または画線すると感受性菌の発育が部分的に阻止され、マイコバクテリオシンの検出が可能となる。本菌群の産生するマイコバクテリオシンは *M. diernhoferi*, *M. aurum*, *M. chitae*, *M. thermoresistibile*, *M. rubrum*, *M. phlei* などの迅速発育菌と *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. gordonae*, *M. terrae* などの遅延発育菌の一部に対してのみ特異的に発育を阻止する比較的狭い抗菌スペクトルを示す。したがつて比較的短日時に結果を判定しようという点から迅速発育菌 9 株を指示菌として使用し、その抗菌パターンから 11 種のマイコバクテリオシン型に一応型別し¹⁰⁾、その後の成績に基づいて改定したものを表 1 に示した。この型別法によると、1 型 (4.9%)、2 型 (13.0%)、4 型 (38.5%)、9 型 (2.0%) および 11 型 (14.8%) の各型は安定した抗菌パターンを示す。一方 5 型 (1.1%)、6 型 (1.3%)、8 型 (0.5%) は型別頻度が少なく、まれなマイコバクテリオシン型であるため、これらの型の存在は現在のところ保留することが望ましいと考えられる。7 型および 10 型はそれぞれ 4 型および 9 型に類似の抗菌パターンを示す。また 3 型は *M. aurum* 15009 または 25797 株に対する感受性が不安定で 2 型と類似のパターンを示すことがあり、現状では 2 型と 3 型を区別しがたいことがある。したがつて型別安定性の面から再検討した結果、11 型型別法を整理統合して A : 1 および 8 型, B : 2, 3 および 6 型, C : 4 および 7 型, D : 9 および 10 型, E : 11 型の 5 群のマイコバクテリオシン型に群別し、次いで各 11 型のマイコバクテリオシン型に型別する方法がより実用的であろうと考えている。

Table 1. Mycobacteriocin Patterns of *Mycobacterium tuberculosis* by using 9 Indicator Strains

Mycobacteriocin types	Indicator strains*									No. of cases (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1	+	+	+	V	-	V	-	V	-	22 (4.9)
2	+	-	-	-	V	+	V	+	V	58 (13.0)
3	+	-	-	-	+	+	-	+	-	35 (7.8)
4	V	-	-	-	-	-	-	+	-	172 (38.5)
5	-	+	+	+	-	-	-	-	+	5 (1.1)
6	+	V	-	-	+	+	V	+	-	6 (1.3)
7	V	V	-	-	-	-	-	+	-	30 (6.7)
8	+	V	+	+	-	V	-	V	-	2 (0.5)
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9 (2.0)
10	+	+	+	+	V	+	V	V	+	9 (2.0)
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66 (14.8)

* 1) *M. diernhoferi* 19340, 2) *M. thermoresistibile* 25815, 3) *M. thermoresistibile* 25814, 4) *M. chitae* 25805, 5) *M. aurum* 15009 or 25797, 6) *M. aurum* 15011 or 25800, 7) *M. aurum* 15002, 8) *M. diernhoferi* 19341, 9) *M. chitae* 19627, V: Variable.

Table 2. Mycobacteriocin Typing Results Summarized in Five Groups

Mycobacteriocin types	No. of cases (%)
A: 1 & 8	24 (5.5)
B: 2, 3 & 6	99 (22.6)
C: 4 & 7	202 (46.1)
D: 9 & 10	18 (4.1)
E: 11	66 (15.1)
Untypable	29 (6.6)

Table 3. Sensitivity to *M. gordonae* and *M. terrae* of Type C: 4

Bacteriocin sub-type	<i>M. gordonae</i> TMC 1324	<i>M. terrae</i> TMC 1450	No. of cases (%)
C: 4 a	+	+	19 (25.0)
C: 4 b	-	+	21 (27.6)
C: 4 c	-	-	36 (47.4)

この方法を 438 株の分離結核菌に応用すると、表 2 に示したとおり、C 群 46.1%、B 群 22.6%、E 群 15.1%、A 群 5.5% および D 群 4.1% の順で型別され、型別不能は供試菌株の 6.6% にすぎない。しかし C: 4 型のマイコバクテリオシン型が型別菌株の約 40% を占めたため、この型を亜型に分類する必要が生じた。供試 C: 4 型結核菌 76 株について *M. gordonae* TMC 1324 株、*M. terrae* TMC 1450 株の 2 株に対する感受性を調べた結果、表 3 に示したように 3 種の亜型が設定されることが

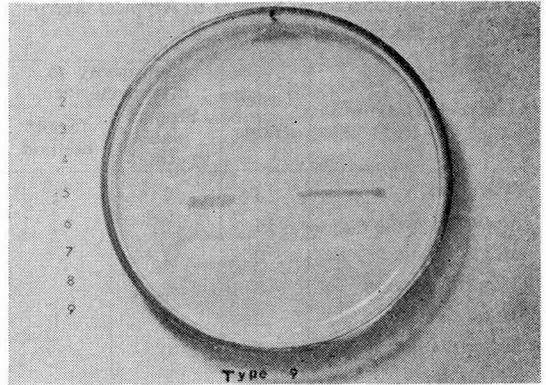


Photo 2. Mycobacteriocin patterns of type D: 9. Indicator strains: 1) *M. diernhoferi* 19340, 2) *M. thermoresistibile* 25815, 3) *M. thermoresistibile* 25814, 4) *M. chitae* 25805, 5) *M. aurum* 15009, 6) *M. aurum* 15011, 7) *M. aurum* 15002, 8) *M. chitae* 19627, 9) *M. diernhoferi* 19340.

わかった。この 2 株の感受性菌は遅延発育型であるため、判定は指示菌画線培養後 6~7 日後に行なつた。マイコバクテリオシンによる指示菌の阻止反応は迅速発育菌と同様に明瞭で、5 mm 以上の阻止帯を陽性と判定した。

2. マイコバクテリオシン D: 9 型の性状

9 株の指示菌に対して抗菌性を示すマイコバクテリオシン D: 9 型の型別頻度は低いが(表 1)、9 株の指示菌すべてに抗菌性を示す特異なマイコバクテリオシン型として注目される(写真 2)。したがってこの型に属する結核菌(5 株)を用いて、画線法によつて多数の他の抗酸菌種に対する感受性を調べた結果は表 4 に示したとおりである。すなわち迅速発育菌群については供試 42 株中 38 株(90.4%)が、また *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. terrae*, *M. marinum*, *M. xenopi* の 29 株中 11 株(38%)が、更に *M. avium* 3 株中 1 株が感受性を示し、この型のマイコバクテリオシンは広域抗菌スペクトルを有することが明らかにされた。

一方 D: 9 型の S.H 株(20 年の病歴を有する患者で、6 回の排菌株のマイコバクテリオシン型別成績はいずれも D: 9 型)はデュボス液体培地 4 週培養後の菌体抽出液がマイコバクテリオシン活性を有することがわかった。すなわち、本菌のデュボス 1 l 培養液の菌体を集菌によつて集め、5 ml の Tris-HCl 緩衝液(pH 7.8)に浮遊し、超音波処理(久保田 200 M, 200 W 20 分)後 10,000 rpm 20 分遠心した上清は *M. diernhoferi* 19340 株に対してスポット法で 2 倍のマイコバクテリオシン活性を示した。このマイコバクテリオシン粗標品について各抗酸菌に対する抗菌域を検討した。その結果供試 74 株のうち 24 株に抗菌活性が認められ(表 4)、画線法陽性株の約 50% に対して菌体抽出液によつてもマイコバクテリオシン活

Table 4. Antibacterial Spectra to Atypical Mycobacteria of Type D: 9

Mycobacterium	Tested strains	Sensitivity to mycobacteriocin	
		Streak plate method	Spot* method
<i>M. avium</i>	3	1	1
<i>M. intracellulare</i>	14	6	4
<i>M. gordonae</i>	2	1	
<i>M. scrofulaceum</i>	8	2	
<i>M. terrae</i>	2	1	1
<i>M. marinum</i>	1	0	
<i>M. xenopi</i>	2	1	
<i>M. abscessus</i>	5	1	
<i>M. fortuitum</i>	2	2	2
<i>M. parafortuitum</i>	3	3	1
<i>M. vaccae</i>	5	5	1
<i>M. smegmatis</i>	1	1	1
<i>M. "runyonii"</i>	1	1	1
<i>M. "giae"</i>	1	1	1
<i>M. "minetti"</i>	1	1	
<i>M. thermoresistibile</i>	5	5	2
<i>M. phlei</i>	1	1	1
<i>M. chitae</i>	5	5	3
<i>M. rubrum</i>	1	1	
<i>M. "lacticola"</i>	1		1
<i>M. "peregrinum"</i>	1		1
<i>M. flavescens</i>	2	2	
<i>M. diernhoferi</i>	3	3	3
<i>M. aurum</i>	6	6	

* The sample for spot method was prepared by the sonic extraction of cells of type D: 9 strain S.H.

性を証明することができた。このマイコバクテリオシン活性標品は大量に抽出することが困難であるため、現在この活性物質の物理化学的性状を明らかにすることはできないが、熱(90°C, 30分)で失活)に対しては比較的安定な活性物質であろうと推定される。一方、このマイコバクテリオシンのグラム陰性、陽性菌に対する抗菌域についても検討した。使用した菌種は *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Providencia* および *Staphylococcus* の10菌属である。D: 9型結核菌をマラカイトグリーンを除いた卵培地にストリークし、2週培養後、クロロホルムで殺菌した後、各グラム陰性、陽性菌のブイオン1夜培養液を画線し、24時間後阻止の有無を観察した。*S. aureus*を除く他の菌種には抗菌性は認められなかつたが、*S. aureus* 209P株をはじめ供試黄色ブドウ球菌10株に対して抗菌性が認められた。しかし菌体抽出法による抗菌活性は認められなかつた。

3. *M. africanum* のマイコバクテリオシン産生能

Table 5. Mycobacteriocin Pattern of *M. africanum*

<i>M. africanum</i>	Indicator strains*						
	1	2	3	4	5	6	7
R 5947	-	+	-	-	+	+	+
R 6390	-	-	-	-	+	+	+
R 6437	-	-	-	-	+	+	+
R 6393	-	+	+	+	+	+	+
R 6087	-	-	-	-	+	+	+
R 5273	-	-	-	-	+	+	+
R 6391	+	+	+	+	+	+	+
R 6290	+	+	+	+	+	+	+
R 6378	-	-	-	-	+	+	+
R 6087	-	-	-	-	+	+	+
R 5946	-	+	-	-	+	+	+
204	-	-	-	-	+	+	+
195	+	+	+	+	+	+	+
K21	-	+	-	-	+	+	+
58	-	-	+	-	+	+	+

* 1) *M. gordonae* 1324, 2) *M. terrae* 1450, 3) *M. intracellulare* P54, 4) *M. intracellulare* 97, 5) *M. diernhoferi* 19340, 6) *M. aurum* 25797, 7) *M. aurum* 25800.

Dr. Kleeberg 分与の11株と結研由来の4株の *M. africanum* についてマイコバクテリオシン産生と感受性を調べた。15株の本菌は小川培地で10代以上継代し、2~3週で十分発育可能な菌とした。多数の抗酸菌について感受性を検討した結果、表5に示したとおり *M. gordonae* TMC 1324, *M. terrae* TMC 1450, *M. intracellulare* P 54, 97株および迅速発育菌群菌の *M. diernhoferi* 19340, *M. aurum* 25797, 25800株の7株に対してのみマイコバクテリオシン活性が認められた。したがって結核菌型別法によると本菌はすべてB: 3型に型別された。

考 察

一般に結核菌の産生するマイコバクテリオシンは非定型抗酸菌迅速発育菌については *M. diernhoferi*, *M. chitae*, *M. thermoresistibile*, *M. aurum*, *M. giae*, *M. rubrum*, *M. peregrinum*, *M. phlei* などの菌種に対し、一方遅延発育菌については *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. terrae*, *M. avium* などのそれぞれ一部の菌種に対してのみ抗菌性を示す。しかし例外的にマイコバクテリオシンD: 9型の結核菌のように供試迅速発育菌の約90%に対してマイコバクテリオシン活性を有する広域抗菌スペクトルを有する産生株のあることも事実である。更にこのD: 9型産生株がブドウ球菌に対しても抗菌活性を示したことは本菌の産生するマイコバクテリオシンが種属を越えて抗菌性をもつ可能性を示している。しかし一方、この抗菌性はマイコバクテリオシンとは異なる

抗菌物質の産生による可能性も完全には否定できない。Hammonら¹³⁾はグラム陽性菌の産生するバクテリオシンはその活性スペクトルからグラム陰性菌に及ぶことはないとしながらも、種属を越えて抗菌性を示すことがあり、またバクテリオシン活性はしばしば自己の産生菌に対しても活性を示すと定義づけている。また Gaglianoら¹⁴⁾はブドウ状球菌のある菌株の産生するバクテリオシンが同一菌種属内だけでなく、一部のグラム陽性菌に対しても活性を示すことを報告している。したがってD:9型の産生する活性物質がブドウ状球菌に抗菌活性を示すことは、この現象がマイコバクテリオシンによるものとして説明できるが、他の抗菌物質の産生による可能性も完全に否定するためには今後更に検討が必要であろう。

前報においては9株の指示菌に対する抗菌パターンから11型のマイコバクテリオシン型別法を報告した。その後の型別追試によれば5型、6型、8型および10型はまれなマイコバクテリオシン型であり、また3型が2型に、7型が4型にしばしば型置換現象を示した。すなわち同一患者排菌株が型置換を起こすことは前報¹⁰⁾において示唆したが、その後の患者分離株についても4~6回の再排菌株9例中2例に同じ現象を見出している。一方これらの再排菌型置換株の薬剤耐性には顕著な変化は認められない。型置換の要因としては、1) マイコバクテリオシン産生因子の脱落、消去、2) マイコバクテリオシン耐性菌の出現による指示菌の変異現象など遺伝学的背景に起因することが推定される。したがって、これらの問題の解明は本菌群の遺伝学的解析に待つ以外にないが、現状では類似の抗菌パターンを示すマイコバクテリオシン型は同一の群として本報で示したようにA~Eの5群に整理して表現し、今後特異性の高い指示菌の開発によつてそれぞれのマイコバクテリオシン型を確立すべきであろう。

M. africanum は前報¹⁰⁾において11型すなわちマイコバクテリオシン非産生であると報告した。しかしその後小川培地で10代以上継代した後型別した結果、マイコバクテリオシン産生性であることがわかった。*M. africanum* は元来発育不良のため前報の実験に際しては、マイコバクテリオシンが十分産生されていない状態で判定したため非産生と誤つたものと考えられる。結核菌型別法によると*M. africanum* 15株はすべてB:3型に型別され、更に非定型抗酸菌*M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. terrae*の一部の菌種に対して抗菌性を示し、結核菌と類似の抗菌パターンを示すと考えられる。したがって今後とも培養2週で十分発育可能な菌株のみを本型別に使用する必要がある。

今後結核菌を中心として各種抗酸菌の同一菌種内におけるマイコバクテリオシン型別とその疫学的应用法の確立と同時に、各菌種間の鑑別にマイコバクテリオシン産生性を利用しうる可能性もあり、今後更にこれらについて検討を進めたい。

結 論

著者らは先に結核菌のマイコバクテリオシン型を11型に型別することを提案したが、その後の実験成績から一部不安定なマイコバクテリオシン型が認められたため、本報においては本型別法を5群に整理した。この方法によれば438株の分離結核菌はC:4, 7型46.1%, B:2, 3, 6型22.6%, E:11型15.1%, A:1, 8型5.5%およびD:9, 10型4.1%の順に型別され、更にC:4型は*M. gordonae* 1324, *M. terrae* 1450株に対する抗菌パターンから3重型に細分類可能であることを示した。

D:9型のマイコバクテリオシン産生株は迅速発育菌群に対しては90%以上、その他の非定型抗酸菌に対しては約40%の菌株に対して、更に菌種の異なる*Staphylococcus aureus* に対しても抗菌活性を示す広域抗菌スペクトルを有することが明らかになった。

終りに臨み、多数の菌株分与を受けた国立福岡東病院長・瀬川二郎博士に対し厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Abbott, J. D. and Shannon, R.: J. Clin. Path., 11: 71, 1958.
- 2) Darrell, J. H. and Wahba, A. H.: J. Clin. Path., 17: 236, 1964.
- 3) Chakrabarty, A. N., Adhya, S., Basu, J. and Dastidar, S. G.: Infec. Immun., 1: 293, 1970.
- 4) Hettiaratchy, I. G. T., Cooke, E. M. and Shooter, R. A.: J. Med. Microbiol., 6: 1, 1973.
- 5) 武谷健二: 日本臨床結核, 18, 147, 1959.
- 6) 古川和宏: 医学研究, 29: 2903, 1959.
- 7) Takeya, K. and Tokiwa, H.: Int. J. Syst. Bacteriol., 22: 178, 1972.
- 8) Takeya, K. and Tokiwa, H.: Amer. Rev. Resp. Dis., 109: 304, 1974.
- 9) 常盤寛: 福岡医誌, 65: 473, 1974.
- 10) 常盤寛: 福岡医誌, 65: 481, 1974.
- 11) 島元宗暉・武谷健二: 結核, 51: 227, 1976.
- 12) Bradley, D. E.: Bacteriol. Rev., 31: 230, 1967.
- 13) Hammon, Y. and Peron, Y.: Acad. Sci. C. R., 257: 1191, 1963.
- 14) Gagliano, V. J. and Hinsdill, R. D.: J. Bacteriol., 104: 117, 1970.