

街路上喀痰より分離した抗酸性菌について

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

曾	我	恒	夫
荒	井	正	宏
西	村	博	顕
政	岡	滋	実

（受付：昭和33年6月28日）

緒 言

化学療法剤耐性結核菌による汚染の現況を推測するため1956年10月金沢市の街路上に喀出せられていた膿性喀痰 108個を採取し滅菌食塩水で洗浄した後、型のごとく8% NaOH 液で処置し3%小川培地に培養して結核菌の検索を試みた。

しかして自然界には多くの非病原性抗酸性菌が存在しており、路上喀痰より分離した抗酸性

菌を結核菌と同定するには、種々の検討を必要とするところであり、かつまた近時結核類似病変を呈する色素産生抗酸性菌の存在が諸家によりあいついで報告されているので今回私たちが分離した21株の抗酸性菌（第1表参照）について各種性状の比較検討を行つたところ興味ある知見を得たのでここに報告する次第である。

実験方法ならびに実験成績

（1）分離抗酸性菌の初代培養時の集落性状について

第2表に示したように着色著明なもの、湿潤傾向のもの、光沢性の強いものなど明らかに結核菌と異なると思われるものは約半数をしめていた。

（2）分離抗酸性菌の集落発見までの期間

集落発見までの期間を初代培養について観察した結果第3表に示すごとく培養15日目後に可視集落を認める場合が多かつた。継代により21株中11株は培養3日目にて可視集落が発見出来るに至つた。

（3）分離抗酸性菌の Ziehl-Neelsen 染色所見

1%小川培地3週間培養の継代株について Ziehl-Neelsen 染色を施してその所見を検討したところ第4表に示したように染色性では抗酸性を示すものと淡青染した非抗酸性のものとの混じたもの、濃染した顆粒を

有するもの、形態的には、著しく長いか、あるいは短い桿状のものが認められた。

（4）分離抗酸性菌の抗煮沸性について

前項と同じ菌株集落より作つた標本を用いて Preis 染色戸田変法により抗煮沸性を調べたところ第5表に示したように、kf 値3以上のものが半数を占めていた。

（5）分離抗酸性菌の食塩水懸濁性

1%小川培地に発育した集落より一白金耳の菌塊を生理的食塩水の入つた小試験管にとり強く振盪してその懸濁性の難易を調べたところ第6表に示したように約半数は難懸濁性であつた。

（6）分離抗酸性菌のカタラーゼ反応

定性試験の結果第7表に示したように H_2O_2 液を加えると瞬時に発泡した強陽性のものが約半数を占めて

いた。

(7) 分離抗酸性菌の呈色反応

豊原¹⁾の行った方法に従つて中性紅反応、ならびに亜硫酸ソーダフクシン反応を行い、呈色度により区分したところ第8, 9表に示したように $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{8}$ は反応不明瞭であつた。

(8) 分離抗酸性菌のコード形成

Kirchner 培地に各菌株を培養し、1週間後に遠心し、その沈査より塗抹標本を作り Cord 形成の有無を調べたところ第10表に示したように21株中9株にコード形成を認め、そのうち7株が各種の検査成績を総合して、結核菌と同定できた。しかし結核菌と同定されたうちの1株にはコード形成を認めなかつた。

(9) 分離抗酸性菌の普通寒天培地上での発育

普通寒天培地斜面に各菌を移植し培養を試みたところ、4週間後に発育を認めたものが11株あり、認めなかつたものが10株でうち8株は各種の検査成績を総合して結核菌と同定されたものであつた。

(10) 培養温度による分類

1%小川培地上37°C培養では全株とも発育し、21°C培養では21株中9株は発育を認めずこのうち各種検査を総合して結核菌と同定されたものが8株含まれていた。

(11) 光と色素産生との関連

光の存在下ならびに遮光状態での培養による色素産生の状況を検討したところ着色株10株はすべてScotochromogenであつた。他の白色株10株ならびに継代中黄色株より白色株に変異し以後着色を見なかつた1株は両条件下での培養で着色の差異を示さなかつた。

(12) 分離抗酸性菌のソートン培地における発育

分離抗酸性菌をソートン培地に培養し4週間後観察したところ第11表に示したような状態で底面ならびに液面に鐘乳洞様発育を認めたものには各種の検査成績から結核菌と同定されたものはなかつた。またかかる菌株はすべて粘調性のものであつた。

(13) 分離抗酸性菌の培養ろ液による皮膚反応

ソートン培地4週間培養液より旧ツベルクリンの製法に準じて作つた各株の培養濃縮ろ液を用いて流パラ死菌免疫ウサギに対し皮膚反応を試みたところ、第12表に示したように結核菌と同定されたものの培養ろ液はすべて反応原性を有していた。

(14) 分離抗酸性菌の培養ろ液の血球感作原性

前項において述べた培養濃縮ろ液の10倍稀釈液に洗浄ウサギ赤血球を混じたところ血球凝集を起したものが8株あり。これを除いた13株の培養濃縮ろ液感作ウサギ血球と西東²⁾の方法に準じて作製した旧ツベルクリン("H₈₇Rv"より作製)感作血球免疫血清との間で凝集反応を行つた。その結果結核菌と同定された8株の培養ろ液感作血球においては旧ツベルクリンによる場合とおおむね大差ない凝集反応が認められたが他のものの培養ろ液感作血球凝集反応は陰性かあるいは高濃度血清との間においてわずかにみられたにすぎなかつた。

(15) 分離抗酸性菌の薬剤感受性

型のごとく1%小川培地を用いて各菌株の抗結核剤に対する感受性を調べた結果は第13表に示したとおりで、分離抗酸性菌のうち各種の検査成績を総合して結核菌と同定されるものの半数はSM10r完全耐性を示し8株中3株はPAS10r完全耐性で、かつ100r不完全耐性を示しそれ等は総て、SMとの二重耐性株であつた。しかしながらINAH, OM, の10r培地に発育したものはなかつた。一方各種の検査成績を総合して結核菌と同定されたもの以外の抗酸性菌ではSMおよびPAS, 10r培地に発育したものが13株中各9株あり、PAS100rで発育したのも6株あつた。またINAHにおいては10r培地に発育したものは13株中8株あつた。またOMではすべての株が10r以上の培地で発育したことは各種の検査成績を総合して結核菌と同定されるものがOM10rに発育しなかつたこととともに注目に値する結果であつた。VMにおいては10r培地に発育しなかつたものは3株にすぎなかつた。

考按ならびに総括

自然界抗酸性菌が抗酸性という結核菌との共通な基盤のために従来より幾多の学者により追究されてきていることは衆知の事柄である。結核菌との鑑別には集落の発生期間、その性状、

菌の抗煮沸性あるいは動物に対する病原性等に考慮が払われてきたが近年に至りDubosによる中性紅反応、DesberdsによるNile-Blue反応、Wilsonによる2-6-Dichlorphenol

Indophenol の還元反応および豊原によるフクシン反応などの呈色反応による鑑別, Cord形成の有無による鑑別あるいはテルール酸カリ, 各種抗結核剤などに対する感受性を応用した鑑別方法が行われてきている³⁾。しかしながらわれわれも経験したごとく結核菌以外の抗酸性菌にも発育遅きもの, 集落性状がR型を示すもの無着色のものなどあり, kf 値の大きなものや, 食塩水に懸濁し難い菌もあり, またカタラーゼ反応, 呈色反応においても結核菌と酷似した反応態度を示すもの, あるいはコードを形成するものも認められ, 単独な方法にて結核菌と鑑別することの困難な場合のあることを確認した。一方ここ数年の間に諸家の注目を浴びてきている非定型結核菌の存在は, 従来の結核菌に対する見解をもつてしては鑑別が困難であり今野⁴⁾が報じているように更にBacteriophageの応用, 菌のニコチン酸産生量の定量あるいは菌体リピッドのクロマトグラフィおよび赤外線吸収スペクトルの利用などによる鑑別ないしは分類が試みられつつあるが, なお病原性の有無を中心にした抗酸性菌分類の必要性が痛感されるに至っている。しかしながら現在のところは暫定的に色素産生能および集落の性状を主にした分類法⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾が多く用いられている。これに従えばわれわれの分離した色素産生菌はすべてScotochromogen で非病原性菌に属するものと思われたが, 色素を産生しなかつた他の菌株は必ずしも結核菌とはいいい難い結果であつた。次にCosters⁸⁾はLöwenstein 培地37°Cおよび21°C培養, ならびにINAH 10r/ml 加培地 37°C培養の併用により結核菌とSaprophytic myco.との鑑別の可能性を報告しているが, われわれもOM 10r/ml 加小川培地における発育いかんにより

結 語

街路上の喀痰 108 個より分離した抗酸性菌21株について各種性状を検討して次の結果を得た。

1) 分離抗酸性菌にはヒト型結核菌に酷似した

ヒト型結核菌と結核菌以外の抗酸性菌との鑑別が可能であることを知りえた。すなわちわれわれの検討した範囲内ではOM 10r/ml 含有小川培地には非病原性抗酸性菌のすべてが発育したにもかかわらず, 分離結核菌ならびに保存株ヒト型結核菌の発育は認められなかつた, Costersらの方法においてはINAH耐性結核菌ならびにINAH 感受性非病原性抗酸性菌の存在のため鑑別困難な場合がありうるが, OM 耐性結核菌の出現は認められておらず⁹⁾この点われわれの方法は勝れているものと考え。また街路上の喀痰中の結核菌の発見率は昭和15年当金沢市においては梶川他¹⁰⁾が2.9%という成績を発表しており今回(昭和31年)のわれわれの成績では, 7.4%でその2.6倍であつた。他の都市においては昭和14年東京市内で6.9%¹¹⁾昭和24年鹿児島市で13.3%¹²⁾昭和28年函館市内で8.7%¹³⁾の陽性率であつたと報告されている。しかし薬剤に対する感受性については三枝¹²⁾は分離結核菌の半数がSM耐性菌であつたと報じておりわれわれもまた分離結核菌8株中4株がSM 10r完全耐性菌であり, またPASに対しては8株中3株が10r完全耐性菌であつたが, それらはすべて, SM との二重耐性株であつた。INAH, OM および VM に対してはいづれも耐性をみとめえなかつた。われわれの喀痰採取には医療機関に近い路上より採取したものが多かつたのであり, また路上喀痰中の結核菌よりの感染いかんには, なお問題のあるところではあるが, 近年化学療法 of 普及に伴ない, 隔離を忌避し在宅治療に走る患者の多い傾向を示している現況においては, かかる高率にかつ比較的耐性度の高い結核菌による汚染があることは, 疫学上重要な問題を含むものと考え次第である。

性状を示す非病原性抗酸性菌が存在し, 単独な検査では結核菌を同定することが困難な場合のあることを確認した。しかしながらここに簡単な方法として, OM 10r/ml 含有小川培地上の

発育如何を検討することにより両者を鑑別することが可能であると思われた。

2) 分離抗酸性菌21株中ヒト型結核菌と同定したものが8株(36.1%)あり、残りの13株は非病原性抗酸性菌と思われた。しかして分離結核

菌8株中 SM10r/ml 完全耐性菌が4株 PAS, 10r/ml 完全耐性菌が3株で、しかも SM との二重耐性株であつたが INAH, OM および VM に対してはいずれも耐性を有しなかつた。

文 献

- 1) 豊原希一：結核, **32**, 23, 1957.
- 2) Saito, T. et al. : Jap. J. Tuberc., **3**, 77, 1955.
- 3) 小川辰次：日本臨牀結核, **16**, 512, 1957.
- 4) 今野 淳：日本医事新報, **1734**, 39, 1957.
- 5) Timpe, A. & Runyou, E. H. : J. Lab. and Clin. Med., **44**, 202, 1954.
- 6) Runyou, E. H. : Am. Rev. Tuberc., **72**, 866, 1955.
- 7) Wayue, L. G. et al. : Am. Rev. Tuberc., **76**, 454, 1957.
- 8) Coster, J. F. et al. : Am. Rev. Tuberc., **74**, 958, 1956.
- 9) 東野音信：金大結研年報, **9**(上), 108, 1950.
- 10) 梶川敏一郎, 他：十全医学会雑誌, **46**(6), 66, 1941.
- 11) 中山政晴：東京医学専門学校雑誌, **2**(2), 105, 1939.
- 12) 千早正寿：鹿児島医学雑誌, **23** (1), 25, 1950.
- 13) 三枝慶一郎：金大結研年報, **14**(下), 321, 1956.

第 1 表 分離菌の抗酸性ならびに集落色調による分類

抗 酸 性 菌	2 1 株
白 色 系	1 0 株
黄 色 系	8 株
橙 色 系	3 株
非 抗 酸 性 菌	3 株
黄 色 系	2 株
紅 色 系	1 株

- 喀痰数 108 個
- 抗酸性菌白色系株10株中より 8 株の結核菌を同定した。
- 抗酸性菌中白色系の 1 株と橙色系の 1 株が同一喀痰より分離された。

第 2 表 分離抗酸性菌の初代培養時の集落性状

性 状	株 数	結核菌と同定された株数	
色 調	白 色	4	3
	白 帯 黄 白 色	6	5
	黄 色	8	0
	橙 色	3	0
乾 湿 性	湿 潤 傾 向	11	0
	乾 燥 傾 向	10	8
光 沢 性	強 い	11	0
	弱 い	10	8
粘 稠 性	強 い	5	0
	中 等	7	0
	弱 い	6	5
	無 い	3	3
外 形	正 円 形	12	2
	類 円 形	9	6
大 き さ	大 き い	6	0
	中 等 大	10	5
	小 さ い	5	3

第 3 表 分離抗酸性菌の初代集落発生に要した期間

初代集落発生までの期間	株 数	結核菌と同定された株数
1 週 間 以 内	4	0
1 ~ 2 週 間	6	0
2 ~ 3 週 間	7	4
3 週 間 以 上	4	4

第 4 表 分離抗酸性菌の Ziehl-Neelsen 染色所見

所 見	株 数	結核菌と同定された株数
染 色 性	抗 酸 性 型 の み	12
	非 抗 酸 性 型 を 混 ず	9
形 態	長 桿 状	4
	中 等 大 桿 状	13
	短 桿 状	4
濃 染 顆 粒	あ り	14
	な し	7

第 5 表 分離抗酸性菌の抗煮沸試験成績

Kf 値	株 数	結核菌と同定された株数	標 準 株 (対 照)
1 0 ≤	6	5	ヒト型結核菌 (H ₃₇ Rv, H ₂ 株)
3 ~ 9.3	5	3	
1 ~ 2.3	3	0	トリ型結核菌 (竹 尾 株)
≤ 0.3	7	0	

第 6 表 分離抗酸性菌の食塩水懸濁性について

懸濁性	株数	結核菌と同定された株数
瀰慢性混濁	11	0
絮状混濁	10	8

第 7 表 分離抗酸性菌のカタラーゼ反応

反応の程度	株数	結核菌と同定された株数
強陽性	11	0
弱陽性	10	8
陰性	0	0

第 8 表 フクシン反応

紅変度	株数	結核菌と同定された株数	対照
強度	2	0	
弱度	10	8	ヒト型結核菌 (H ₃₇ Rv株) H ₂ 株
不明	9	0	
なし	0	0	

第 9 表 中性紅反応

紅変度	株数	結核菌と同定された株数	対照
強度	2	1	
弱度	7	5	ヒト型結核菌 (H ₃₇ Rv株) H ₂ 株
不明	7	2	
なし	5	0	

第 10 表 コー ド 形 成

コード形成の有無	株 数	結核菌と同定された株数	対 照
あ り	9	7	ヒト型結核菌 (H ₃₇ Rv 株)
な し	12	1	

第 11 表 ソートン培地における発育所見

所 見	株 数	結核菌と同定された株数
液面にのみ発育	10	8
液面に鐘乳洞様発育	2	0
底面にのみ発育	4	0
液面, 底面に発育	3	0
液面に鐘乳洞様発育, 底面にも発育	2	0

第 12 表 分離抗酸性菌の培養濃縮ろ液による皮膚反応

反応結果(48時間判定)	株 数	結核菌と同定された株数	対 照
陽 性	6	6	OT "H ₃₇ Rv"
疑 陽 性	4	2	
陰 性	11	0	フライ菌培養ろ液

流パラ死菌免疫ウサギを使用

第 13 表 分離抗酸性菌の抗結核剤感受性試験成績

整理 株No.	薬剤 γ /ml	O	S M			P A S			I N A H			O M			V M		
			1	10	100	1	10	100	1	10	100	1	10	100	10	100	500
結核菌以外の 抗酸性菌株	1	卅	卅	卅	-	卅	+	-	卅	-	-	卅	卅	-	卅	-	-
	2	卅	卅	卅	-	卅	+	-	卅	-	-	卅	卅	-	卅	+	-
	3	卅	卅	+	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	卅	+	-
	4	卅	-	-	-	卅	-	-	+	+	-	卅	卅	-	-	-	-
	5	卅	卅	卅	-	+	-	-	+	-	-	卅	卅	-	卅	-	-
	6	卅	卅	卅	-	卅	卅	卅	+	-	-	卅	卅	卅	卅	-	-
	7	卅	卅	+	-	卅	+	+	卅	卅	-	卅	卅	+	+	+	-
	8	卅	-	-	-	卅	-	-	+	+	-	卅	卅	-	-	-	-
	9	卅	-	-	-	卅	-	-	卅	+	-	卅	+	-	-	-	-
	10 [▲]	卅	卅	+	-	卅	卅	卅	卅	+	-	卅	卅	+	卅	-	-
	11	卅	卅	卅	-	卅	+	-	卅	-	-	卅	卅	-	卅	-	-
	12	卅	卅	+	-	卅	卅	+	卅	+	-	卅	卅	+	卅	+	-
	13	卅	卅	-	-	卅	卅	+	+	+	-	卅	卅	-	卅	-	-
結核菌と 同定された株	17 [▲]	卅	卅	卅	+	卅	卅	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	18	卅	+	-	-	卅	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	19	卅	卅	卅	+	卅	卅	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	卅	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	21	卅	卅	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	22	卅	卅	-	-	卅	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
	23	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	卅	卅	卅	-	卅	卅	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
対 照 菌 株	Myc. tuberculo- sis H ₃₇ Rv	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	卅	-	-	+	-	-
	Myc. avium 竹尾株	卅	卅	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	-	-
	Myc. phlei	卅	+	-	-	卅	卅	卅	卅	+	-	卅	卅	-	卅	-	-
	B.O.K.	卅	-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-

▲ 印の No.10 株と No.17 株は同一喀痰より分離された。