

# 鳥型結核菌に関する研究

## 第2報 不活性化した鳥型結核菌の Viability とその抵抗性について

金沢大学医学部微生物学教室(主任：谷友次教授)

河 上 清

(昭和32年8月30日受付)

(本論文の要旨は第9回日本細菌学会北陸地方支部集会においてこれを報告した)

### Studies of Mycobacterium Tuberculosis Avium Report 2. Viability and Resistance Against a Few Chemical Factors of Mycobacterium Tuberculosis Avium in Metabolically in Active Phase

KIYOSHI KAWAKAMI

Department of Microbiology, School of Medicine, Kanazawa University  
(Director : Prof. Dr. Tomoji Tani)

#### 結 言

著者は前報において鳥型結核菌が増殖の早期に代謝不活性化状態へ移り易いことを報告した。この機能的代謝不活性化は生物における生存の重要な因子であるから鳥型結核菌について前報で述べた代謝不活性化相への移行はその生存性に関し重要な役割を果していることが予想された。結核菌の生存性に関しては sauton 培地上

の結核菌が極めて早く死滅し易いことについて少なからぬ記載<sup>1), 2)</sup>がある一方 Corper 等<sup>3), 4)</sup>は12年の長きにわたって結核菌が glycerinbouillon 培地上で生存したことを報告している。著者は本報で本菌の早期代謝不活性化と生存能力との関係について検討を試みた。

#### 実験材料並びに実験方法

使用菌株：前報同様鳥型結核菌 A<sub>22</sub> で2～3代 sauton 培地で継種した発育の良いものを用いた。

使用培地：菌収獲には sauton 培地を用い生菌単位量測定には1%第一磷酸加里加小川培地(斜面と平板)並びに5%血液加グリセリン寒天培地平板を用いた。

Viable units (或いは生菌単位量) 測定方法：結核菌は均等な菌液を作り難いので西田<sup>5)</sup>に従って tween 80を使用した。即ち培地 25ml を入れた 200ml 容量のフラスコに 37°C で培養し収獲時期に従って適当量(フラスコ1～3本)収獲された菌を無菌箱中で無菌的に濾別、水洗後充分水分の切れるのを待つて乳鉢に移し滅菌 tween 80 を 0.05～0.1ml 加え磨砕10分後、滅菌生理食塩水で希釈、滅菌中試験管に入れて30分静置、上液を菌液とした。次いで各培養日数のものを光

電値的 (Hitachi-type-120s 使用) に一定にした。なお tween 80 を磨砕に際して微量に使用することは極めて有用ではあつたが、希釈に従う菌の解離は依然として充分ではなく希釈倍数より逆算することによつて実数値を得ることは適当ではないと考えられたので同一濃度の同一希釈液中の生菌単位量の比を求めた。生菌単位量の判定は1%小川培地に接種した場合は5日後、5%血液加グリセリン寒天培地の場合は3日後とした。

新旧両菌についての物理的・化学的物質に対する抵抗性測定方法：

1) 酸、アルカリ、熱に対する抵抗性について

酸としては5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、アルカリとしては5% NaOH、を作用させ、熱抵抗については 75°C、80°C、85°C の3種について実験した。即ち新旧各菌の湿潤重量 2g

(濾紙にて濾過水洗後新たな濾紙を用いて圧迫水分を吸収する)をとり tween 80 を 0.05ml 加えて乳鉢にて10分磨砕後生理食塩水で稀釈し中試験管に入れて30分静置, 上液をとり光電光度計 (Hitachi-type-120s) を用いて 1mgN/ml の菌液を作った。その 1ml 宛を 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10% NaOH 各 1ml 宛入れた小試験管に加え H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> については 6 時間, 8 間時, 12 時間, NaOH については 1 時間, 3 時間作用させ, 熱については上記 3 種の温度に10分間作用させた。各作用時間毎に 1 白金耳とりだし 1% 小川培地斜面に接種した。培地はすべて 3 本宛用いその平均集落数を値とした。

### 2) Formalin, 37°C の水, 乾燥, 紫外線に対する抵抗性について

Formalin は 1% のものを作用させた。即ち前述の如く tween 80 を用いて 2mgN/ml の菌液を作りこれと等量の 2% formalin 液に混じり 7 分作用させた後その 0.5ml に 4.5ml の滅菌蒸留水を加えてこれを標準菌液 (0.1mgN/ml) とし以後10倍階段稀釈を行い新旧両菌について生菌単位量を測定した。37°C の水に対する抵抗は滅菌蒸留水にて 0.1mgN/ml の菌液を作り (tween 80 使用) 37°C の孵卵器に12時間放置後生菌単位量を比較した。乾燥については無菌的に調製した 0.1mgN/ml 菌液を吸引ポンプで吸引水分を除きそのままデシケータ中に 2 週間放置後滅菌生理食塩水を加えて再び光電値的に 0.1mgN/ml の菌液を

作り新旧両菌について乾燥前, 乾燥後の生菌単位量を比較測定した。紫外線については殺菌ランプ (マツダ GL 15) を用いた。菌液は型の如くにして 2mgN/ml のものを作製しその 0.1ml を 1% 小川培地平板 (ペトリシャーレ使用) に塗抹し 1m の距離にて10分, 20分, 30分の3段階に分けて照射した。

### 3) 抗生物質に対する抵抗性について

SM (明治ジヒドロストレプトマイシン), PAS (武田ニッパスカルシューム), INAH (三共ツペロン) の 3 種を用いて実験した。抗生物質と菌との接触方法は金井<sup>6)</sup>に従つて増殖中の培地内に一定濃度の抗性物質を入れて一定時間作用させた。即ち 200ml 容量のフラスコに 25ml の sauton 培地を入れて鳥型結核菌を 2 日間或いは 6 日間培養した後 SM については 10γ, PAS, INAH については 100γ になるように培地内に入れ再び孵卵器に入れて45時間作用させ生菌単位量を新旧両菌について測定した。なお抗生物質を培地内に注加する時は静かに操作して菌膜が沈まないように注意し振盪混合することはされた。

### 4) 酵素の安定性について

型の如く作製された 2.5mgN/ml の 2 日培養菌液 (tween 80 使用せず) を 4°C の氷室に 2, 4 日間放置し, 又 37°C の孵卵器に12時間放置した後前報の如く Warburg's manometer, Thunberg 管を用いて酸化, 脱水素両酵素の安定性を調べた。

## 実験成績

### I 培養各時期における単位菌量中の生菌単位量について

緒言で述べた如く前報の代謝不活性状態へ移り易いという事実に対する生存性の問題について検討したのが第 1 表, 第 2 表である。即ち培養早期の 2 日培養のもの, 古い培養の 1 週から 6 週迄のもの生菌単位量を測定した結果第 1 表の如く各培養日数のものに著明な差はなく, 浅見等<sup>7)</sup>のいう培養日数の経過に従つて Viability を喪失するという報告を否定する成績

第 1 表

Sauton 培地に發育した鳥型結核菌の生菌単位量 (判定培地: 1% 小川培地)

培養日数	2 日	1 週	2 週	3 週	4 週	5 週	6 週
10 <sup>-7</sup> mgN	36	38	41	40	49	47	24

第 2 表

Sauton 培地に發育した鳥型結核菌の生菌単位量 (判定培地: 5% 血液加グリセリン寒天平板)

培養日数	2 日	4 日	6 日	8 日
10 <sup>-7</sup> mgN	129	126	118	117

を得た。又念のためマラヒットグリーンのような發育抑制物質を入れない 5% 血液加グリセリン寒天の平板で測定したのが第 2 表であるが, この実験においても各単位菌量中の生菌単位の増加は認められるが新旧菌における差は認められなかつた。

### II 乳鉢による手摺り法と tween 80 を使用する法との生菌単位量の比較

第 3 表は 4 週培養菌を用いて普通の手摺り法と

第 3 表  
Tween 80 を使用する方法と乳鉢による普通手摺の方法との  
生菌単位の比較 (判定培地: 1%小川培地)

比較方法		菌 量		$2.5\text{mg} \times 10^{-6}$		$2.5\text{mg} \times 10^{-7}$		$2.5\text{mg} \times 10^{-8}$	
		No.	数	平均	平均	平均	平均		
Tween 80 使用による 手摺	No. 1	無	数	111 73 80	平均 88	11 12 16	平均 13		
	No. 2	同	上	93 86 101	平均 93	14 10 15	平均 13		
	No. 3	同	上	79 115 97	平均 97	12 18 17	平均 16		
	総平均	同	上		93		14		
普通の手摺	No. 1	無	数	80 73 90	平均 81	9 8 13	平均 10		
	No. 2	同	上	83 76 81	平均 80	12 6 9	平均 9		
	No. 3	同	上	76 81 67	平均 75	8 12 7	平均 9		
	総平均	同	上		79		9		

tween 80 を用いての手摺り法との比較を示しているが tween 80 を用いる法が僅かながら生菌単位数多く菌の解離が良いように思われる。

### III 酸, アルカリ, 熱に対する抵抗性について

第 4 表  
5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  に対する抵抗性  
(測定数値: 生菌単位数)

培養日数	2	4	6
菌量	0.5mgN/ml	0.5mgN/ml	0.5mgN/ml
作用時間	菌液 1 白金耳	菌液 1 白金耳	菌液 1 白金耳
6	36	64	130
8	0	13	19
12	0	3	10

第 5 表  
5%  $\text{NaOH}$  に対する抵抗性  
(測定数値: 生菌単位数)

培養日数	2	4	6
菌量	0.5mgN/ml	0.5mgN/ml	0.5mgN/ml
作用時間	菌液 1 白金耳	菌液 1 白金耳	菌液 1 白金耳
1	1	4	11
3	0	2	2

第 4 表は酸 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) に対し第 5 表はアルカリ ( $\text{NaOH}$ ) に対する抵抗性を示しているが 2 日, 4 日, 6 日培養のものには差を示し古い培養菌が強いことが認められる。第 6 表は熱に対する抵抗性であるが新旧培養菌に著明な差を認めることは出来なかつた。

第 6 表  
熱に対する抵抗性  
(測定数値: 生菌単位数)

培養日数	2	6
菌量	0.5mgN/ml	0.5mgN/ml
作用条件	菌液 1 白金耳	菌液 1 白金耳
75°C 10分	##	##
80°C 10分	##	##
85°C 10分	44	29

### IV Formalin, 37°C の水, 乾燥, 紫外線に対する抵抗性について

第 7 表は formalin についての抵抗性であるが 6 日培養菌が僅かに強い値を示している。第 8 表, 第 9 表, 第 10 表はそれぞれ 37°C の水, 乾燥, 紫外線に対する新旧菌の抵抗性を示しているが, いずれも著明な差をみる事が出来なかつた。

第 7 表  
1% Formalin\* (作用時間7分) に対する  
抵抗力 (測定数値 : 生菌単位量)

培養日数	菌量			
	10 <sup>-3</sup> mgN	10 <sup>-4</sup> mgN	10 <sup>-5</sup> mgN	10 <sup>-6</sup> mgN
2	29	1	0	0
6	40	11	1	0

第 8 表  
37°C の水 (作用時間12時間) に対する  
抵抗力 (測定数値 : 生菌単位量)

培養日数	菌量			
	10 <sup>-4</sup> mgN	10 <sup>-5</sup> mgN	10 <sup>-6</sup> mgN	10 <sup>-7</sup> mgN
2	##	##	254	20
6	##	##	51	4

第 9 表  
乾燥14日に対する抵抗力  
(測定数値 : 生菌単位量)

培養日数	菌量	10 <sup>-7</sup> mgN	10 <sup>-7</sup> mgN
		(直 後)	(14日後)
2		75	25
6		73	16

第 10 表  
紫外線に対する抵抗力  
(測定数値 : 生菌単位量)  
(使用菌量 : 0.2mgN)

培養日数	作用時間 (分)		
	10	20	30
2	##	##	269
6	##	##	260

V 抗生物質 (SM, PAS, INAH) に対する抵抗力  
について

第11表は標記抗生物質45時間接触後の新旧菌につい

第 11 表  
抗生物質に対する抵抗力  
(測定数値 : 生菌単位量)

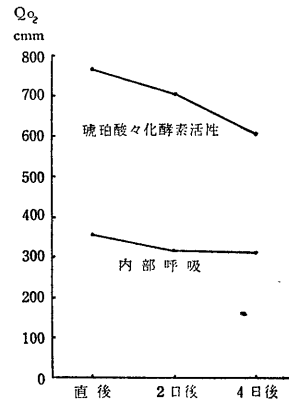
培養日数	抗生物質濃度	菌量		
		10 <sup>-4</sup> mgN	10 <sup>-5</sup> mgN	10 <sup>-6</sup> mgN
2	SM 10γ	##	30	8
	PAS 100γ	##	##	##
	INAH 100γ	##	##	##

6	SM 10γ	47	4	1
	PAS 100γ	##	##	##
	INAH 100γ	##	##	##

ての生菌単位量の比較を示している。SM については新しい2日培養菌が僅かに抵抗が強いように思われるが PAS, INAH についてはその抗菌作用が認め難い成績を示している。

VI 菌液を 4°C, 37°C の環境においた場合の菌体  
酵素の安定性について

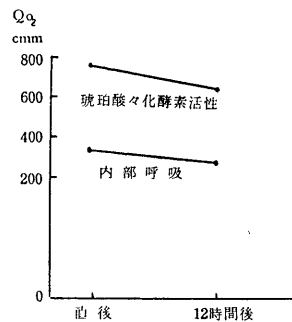
第 1 図  
4°C における酸化酵素の安定性  
(Sauton 培地48時間培養菌)



第 1 2 表  
4°C における脱水素酵素の安定性  
Sauton 培地48時間培養菌

基 質	経過日数		
	直 後	2 日後	4 日後
乳 酸	1分10秒	1分30秒	1分30秒

第 2 図  
37°C における酸化酵素の安定性  
(Sauton 培地48時間培養菌)



菌液は不活性化し易い 2 日培養菌液を用いて実験した。第 1 図はその菌液を 4°C の氷室に放置した場合の酸化酵素活性を示し、第 12 表はその脱水素酵素活性を示しているがいずれも古い培養菌の如くに著明な活

性降下を示さず比較的安定であつた。第 2 図は 2 日培養菌液を 37°C の孵卵器に放置した場合であるが 4°C の場合と同様比較的安定であつた。

## 考 按

先に西田、石田等<sup>7)</sup>は *C. diphtheriae* を用いて冷蔵庫 (4°C)、室温、孵卵器 (25°C) のうち最も生存能力の強い温度が 25°C であることを記載した。又結核菌について Corper 等<sup>8), 9)</sup>は 37°C において 12 年間の長きにわたつて生存したことを報告している。このような温度環境では通常の菌は代謝の基質を消費した結果自己融解を起すのが常であるが *Corynebacterium*, *Mycobacterium* がこの温度でかえつて生存力の強いことは注目すべきことである。*Bacteria* の種族保存の最も代表的なものとして孢子があるが、孢子形成菌の最も主な職能は自己融解を防ぐべく酵素の休止形を形成することである。かくて孢子では cytoplasm が濃縮され孢子膜が形成されるので形態学上明らかに増殖型と区別し得るが *Mycobacterium* や *Corynebacterium* では孢子は証明されない。しかし細胞が granule を形成し易いことはよく知られており<sup>10)</sup>この granule をめぐつて Mitochondria 説<sup>11), 12), 13)</sup>, Nucleus 説<sup>14)</sup>等があるが著者は Bisset 等<sup>15), 16)</sup>の Cytoplasm の濃縮説を支持したい。そこで何故 cytoplasm が濃縮し易いかが問題となるが顆粒化と共に生化学的には休止形の形成が予想され、又この不活性化した菌が Viability を喪失していないのではないかということが予想された。不活性化の問題についてはその移行性について前報で述べたが本報で Viabi-

lity を調べた結果果して Viability を喪失していないという結果を得たのである。又この不活性化した菌が孢子の如く物理的・化学的物質に対する抵抗性が強いのではないかという問題が当然予想された。金井<sup>17)</sup>も古い菌が SM に対して新鮮な菌より抵抗が強いことを報告しているが sauton 培地発育の鳥型結核菌を用いての著者の実験では確認出来なかつた、しかし代謝不活性状態の菌に薬品が効果を及ぼさないことは充分予想されるのでなお検討を要するだろう。又西田等はジフテリア菌が乾燥状態で極めて安定であり水中では非常に早く菌体の崩壊をうけることを報告しているが鳥型結核菌では水に対して安定であるのは菌膜質の主成分たる mycolic acid の特性を示すものと考えられる。しかしながら孢子膜の膜質の主成分たる  $\beta$ -hydroxybutyric acid の縮合体のように熱耐性、酸、アルカリ耐性を強固に示さないので普通細菌との中間的位置を保っているものと考えられる。ジフテリア菌も膜質に mycolic acid を含んでいるが侵入する水に対して極めて弱いのは孢子の  $\beta$ -hydroxybutyric acid の縮合体並びに結核菌の mycolic acid (mycolic acid も butyric acid の縮合体といわれる) とちがつて恐水性の欠如した物質によつて cytoplasm が覆われているためだろう。

## 結 論

I 新旧各培養日数 (2 日~6 週間迄) の鳥型結核菌の単位菌量中生菌単位量は著明な差異を認めることが出来なかつた。

II 諸種物理的・化学的物質 ( $H_2SO_4$ , NaOH, 熱, formalin, 37°C の水, 乾燥, 紫外線, SM, PAS, INAH) に対する抵抗性は  $H_2SO_4$ , NaOH, formalin, では僅かに古い菌が強いように考えられたがその他の物質に対しては抵抗性の差異を認めることが出来なかつた。

III 型の如く調製された 2 日培養菌液を 4°C, 37°C

の環境においても酵素活性(酸化酵素, 脱水素酵素共)は比較的安定であることが判つた。

IV 前報の代謝不活性への移行性、本報の各培養時期の単位菌量中生菌単位量、物理的・化学的物質に対する抵抗性、酵素の安定性を総合して考える時鳥型結核は孢子形成菌と普通細菌との中間に位置するものと考えられる。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた谷友次教授、西田尚紀助教授に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) 浅見望・細井正春・土屋皖司・上野一恵・土田耕三・三浦馨 : 結核, 28 : 117, (1953).  
 2) 浅見望・細井正春・土屋皖司・上野一恵・土田耕三・三浦馨 : 結核, 28 : 164, (1953).  
 3) **Corper & Cohn** : Am. Rev. Tubercul., 28 : 856, (1933).      4) **Corper & Cohn** : J. Bact., 35 : 223, (1938).      5) **S. Nishida** : Jap. J. Med. Sci. & Biol., 7 : 495, (1954).      6) **金井興美** : 日本細菌学雑誌, 9 : 181, (昭29).      7) **S. Nishida, M. Ishida, M. Murakami** : Jap. J. Med. Sci. & Biol. : (発表予定).      8) **Mudd** : Annual Rev. Microbiol., 8 : 10, (1954).      9) **Winterscheid, L. C. and Mudd S.** : Am. Rev. Tuberc., 67 : 59, (1953).      10) **Mudd, S., Winterscheid, L. C., De Lama-ter, E. D. and Henderson, H. J.** : J. Bact., 62 : 459, (1951).      11) **Davis, J. C., Mudd, S.** : J. Bact., 69 : 372, (1955).      12) **Knaysi** : J. Bact., 60 : 423, (1950).      13) **Bisset, K. A.** : J. Gen. Microbiol., 8 : 50, (1953).      14) **Bisset, K. A.** : J. Gen. Microbiol., 3 : 93, (1949).