

非定型抗酸菌に関する研究

第 1 報

PAS 添加培地黒化現象及びそれによる 非定型抗酸菌の分類への試み

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

福 山 裕 三

（受付：昭和39年7月1日）

緒 言

著者は北陸地方における非定型抗酸菌を検索中、たまたま腎結核を疑われた患者の尿より分離した抗酸菌三株¹⁾の抗結核剤耐性検査を行なったところ、この株は PAS 1000r/ml を含む培地にもよく成育し、しかもその培地が黒褐色に着色されることを認めた。

そこで当教室保存の各種抗酸菌43株についてこの黒化現象の有無を検したところ、きわめて明らかに陽性群と陰性群に区分せられるのみならず、この現象を示す菌は多くの共通点を有することが観察された。

この黒化現象は1961年東村²⁾が土壌より分

離した非定型抗酸菌10株において観察しているが、ヒト由来の菌がこの現象を示すことは未だ報告されていない。

この研究ではこの現象を示す菌の一つ山本³⁾株について PAS 添加培地黒化現象をいろいろな角度より検討し、次いで PAS 黒化現象陽性菌の生物学的性状ならびに生化学的性状を追求し、更に PAS 類似物質にこの現象が見られないかを検討し、この現象は抗酸菌の一分類法として利用され得ることを知った。

以下はその成績の概要である。

I. PAS 添加培地黒化現象の検討

PAS 添加培地黒化現象をいろいろな角度から検討するために次に示す3実験を行なった。

- 1) PAS 濃度と黒化度との関係について
- 2) 生菌数と黒化度との関係について
- 3) 静止菌による黒化現象について

実験1. PAS濃度と黒化度との関係について
材料及び方法

第1図に示すような各種濃度の PAS を含む Dubos 培地に、Dubos 培地2週間培養の非定型抗酸菌山本³⁾株の均等な菌液1滴（生菌数約 10^8 /ml）宛接種し、37°C ふ卵器中で培養し、

接種後4日、7日、14日、30日後に各管の黒化度を光電比色計を用い、波長470m μ で測定しその optical density (O. D.) を求めた。

結果及び考察

各種濃度の PAS を含む培地の4日、7日、14日、30日後の黒化度の推移は第1図に示す。

PAS の濃度が増加するにつれて培地の黒化度は増し、1,000~2,000r/mlの培地で最高の黒化度を示すが、それ以上ではかえつて減少する傾向が見られる。4,000r/ml では他の管に比べて菌の発育がきわめて悪く、おそらくこのよう

な高濃度の PAS は菌の発育を抑制するものと思われる。

実験2. 生菌数と黒化度との関係について 材料及び方法

各種濃度の PAS を含む Dubos 培地 (PAS 濃度は第2図に示す) に実験1のごとく調整された菌液を1滴宛接種し, 37°C ふ卵器中にて培養し, 菌液接種後7日目に光電比色計で O. D. を求める一方, 各管より得られた試料より小川培地で生菌数の測定を行なった。

結果及び考察

実験1で示された曲線から想像されるように PAS 黒化現象を示す菌でも高濃度の PAS によって発育が幾分抑制されるであろうという考えでこの実験を行なった。生菌数と黒化度との関係は第2図のごとく, 黒化度の余り強くない 250r/ml PAS 培地までは生菌数は余り変化を見ないが, 黒化度が強い 500r/ml PAS 培地より急激な生菌数の減少が見られ, 生菌数が 10^2 以下となる 4,000r/ml PAS 培地では黒化度も急減し 8,000r/ml PAS 培地ではほとんど生菌数が0に近くなっている。

すなわち, 高濃度の PAS はこのような高度の

PAS 耐性菌の発育をも抑制あるいは阻止し, PAS 黒化現象が最も強く認められる濃度でも, 菌の発育は相当強く抑制されていることがわかる。

実験3. 静止菌による黒化現象について 材料及び方法

PAS 1,000r/ml を含む生理的食塩水を比色管にとり, Sauton 培地に充分発育した菌を生理的食塩水で3回洗浄し, その菌体を上記比色管中にそれぞれ 0.1, 1, 10, 100mg/ml (湿菌量) になるように浮遊せしめ, 37°C ふ卵器中に静置し, 3日, 6日, 12日後に各管を実験1のごとく比色して O. D. を求めた。

結果及び考察

各管は反応時間にはほぼ比例して黒化し, 菌量が多いほど黒化する率が大きであつた。この実験に用いた medium は 0.85% 食理的食塩水と PAS のみを含み, この場合においても黒化現象を認めたことは細菌の発育とは無関係であると思われる。

同様の実験を加熱死菌で検討したところ黒化現象は見られず, この現象は菌の代謝機構と関係あることは確かである。

II. PAS 添加培地黒化現象を呈する菌について

先ず, 当教室保存の抗酸菌43株についてこの黒化現象が現われるかどうかを調べ, 次いでこの黒化現象を呈する菌株と他の各菌群の代表株について生物学的性状および生化学的性状を検討し, この現象が抗酸菌の一分類法となり得るかどうかを検討した。

実験4. PAS 添加培地黒化現象を呈する菌の検索

材料及び方法

この実験では当教室保存の抗酸菌43株を用いた。それらの菌株名は第1表に示す。各菌株は Dubos 培地に4週間発育したものをガラス玉にて磨砕し適当な濃度の菌液 (生菌数約 10^6) を作り, それぞれ PAS 0, 100, 1,000r/ml を含む小

川培地およびキルヒナー寒天培地に上記菌液を1滴ずつ接種し, 37°C のふ卵器中で培養, 1週毎にその発育状態および培地の着色を観察し4週後に判定した。

結果及び考察

各培地における抗酸菌の発育状態および黒化現象の有無は第1表に示す。PAS 1,000r/ml を含む培地では nonphotochromogen および雑菌性抗酸菌および rapid grower のすべては PAS により発育は阻止されなかつた。また scotochromogen の半数は発育が阻止され, photochromogen では 1,000r/ml で発育するものは見られなかつたが, 100r/ml では多くは貧弱な発育を示した。この傾向は東村³⁾の発表と一致し

ている。

PAS 1,000 γ /mlの培地で発育したものは43株の被検株中29株で、そのうち8株の抗酸菌にPAS黒化現象が見られた。これらの8株は文献によれば rapid grower 2, scotochromogen 2, nonphotochromogen 2, avian 1, その他1となつてゐるが、次の実験により rapid grower に属するものと推察される。

実験5. PAS黒化現象を呈する菌の生物学的性状ならびに生化学的性状について

材料及び方法

前実験で明らかにされたPAS黒化現象を呈する菌の生物学的性状および生化学的性状を検討するために、この黒化現象を呈した菌8株、発育速度が類似せる雑菌性抗酸菌6株、各菌群の代表株4株(photochromogen; P-1株, non-photochromogen; 121326株, ヒト型菌; H₃₇Rv, PAS耐性ヒト型菌; 藤井株), 計18株について次に示す諸試験または諸反応を試みた。

- 1) 小川培地における発育日数
- 2) 馬鈴薯グリセリン培地における集落の色調
- 3) ナイアシンテスト⁴⁾
- 4) 中性紅反応⁵⁾
- 5) コード形成試験⁶⁾
- 6) ニコチンアミダーゼテスト⁷⁾
- 7) ウレアーゼテスト⁸⁾
- 8) アリルサルファターゼ3日テスト⁹⁾

結果及び考察

これらの菌の生物学的性状および生化学的性

状は第3表に示す。PAS黒化現象を呈する菌はいずれも3日で発育し、集落の色調は馬鈴薯グリセリン培地では灰白ないし淡黄白色であり、アリルサルファターゼ3日テストはいずれも陽性である。これらの結果はRunyon¹⁰⁾のIV群いわゆる rapid grower の示す性状と一致する。第2表に記した分類は菌由来の文献によるものであるが、この記載は従来分類が発育速度とか集落の色調、光発色性とかいう非常にあいまいな因子をもとに分類してあるので、これが絶対的な分類であると思ふことはできない。そこで従来分類法に従わず、PAS黒化現象を呈する菌群を一つの独立した菌群と見なしてもよいように思われる。まだ例数が少ないので今後より多くの菌株について検討すればこのPAS黒化現象の有無により抗酸菌の一群を他の菌群からはつきり鑑別できるようになると考えられる。

東村²⁾は土壌より分離した非定型抗酸菌でこの現象を見出し、ヒト由来の抗酸菌にもこの現象を呈する菌があるだろうと示唆している。

著者は東村のこれらの菌をも含めてこの黒化現象を呈する菌の一群がそれらの菌の由来を問わず、抗酸菌の一菌群として分類される可能性があると思ふ。薬剤耐性度によつて菌を分類することは菌の薬剤耐性化という問題で甚だ危険なことであるが、このPAS黒化現象はそれらの菌の有する本来の特性であると考えられるのでそのような危険性は先ず考えられない。

III. PAS類似物質による黒化現象

この黒化現象はPAS以外の物質で起こらなうであろうかという疑問を解くために次の実験をなつた。

実験6. PAS類似物質による黒化現象の検討

材料及び方法

の実験に用いた薬剤はPAS, Salicylic acid, tyl salicylic acid, PABA, Benzoic acid,

Phthalic acid, Resorcinol, Catechol, o-Aminophenol, p-Amino phenol の10種でいずれもキルヒナー寒天培地に1,000 γ /mlの濃度になるように加えpH7.0に調整して使用した。

使用菌株はPAS黒化現象を呈した8株のほかM. fortuitum, P-1, 石井, 121326, H₃₇Raの5株の抗酸菌を使用した。

いずれも接種後 37°C ふ卵器中に培養し3週後に培地の着色で判定した。

結果及び考察

結果は第3表に示す。PASと同様に黒化現象を示した物質は Salicylic acid. と Acetyl salicylic acid であつた。

PA BA および *m*-Aminophenol はおよそPASの黒化現象に似てはいるが、黒化の度合がまちまちであり、また幾分うすく呈色した。

Resorinol では山本⁵, 佐藤の2株にのみ呈色が見られ、Benzoic acid では全く不変であつた。

Phtholic acid では全株が発育しなかつた。

結

高濃度の PAS を含む培地に或る種の非定型抗酸菌を培養すると、その培地が黒褐色を呈することが認められた。

この現象は PAS 1,000 γ /ml の濃度で最も著しく、またその黒化度は培養時間にほぼ比例して増加する。またこの現象は静止菌でも認められるが、死菌では認められない。

この現象は当教室保存の抗酸菌43株中8株に認められ、これらの菌は生物学的性状および生

Catechol および *o*-Aminophenol では非接種対照の培地も時とともに黒褐色に呈色して判定不能であつた。

以上のごとく PAS と同様な黒化現象を示した物質は Salicylic acid と Acetyl salicylic acid であり、この現象はおそらく PAS は Salicylic acid を経て分解されるであろうという示唆を与えている。

なお、Salicylic acid あるいは Acetyl salicylic acid による黒化現象は PAS に感受性があり、しかも PAS 黒化現象を呈する可能性ある菌の黒化現象を検する際に利用できる。

論

化学的性状より多くの共通点が見られ、これらの菌は菌分類学上近縁な株の集まりであろうと推察される。

従つてこの現象は抗酸菌の一分類法として利用され得るものと考える。

なお、このような現象は Salicylic acid および Acetyl-Salicylic acid を含む培地でも認められた。

文

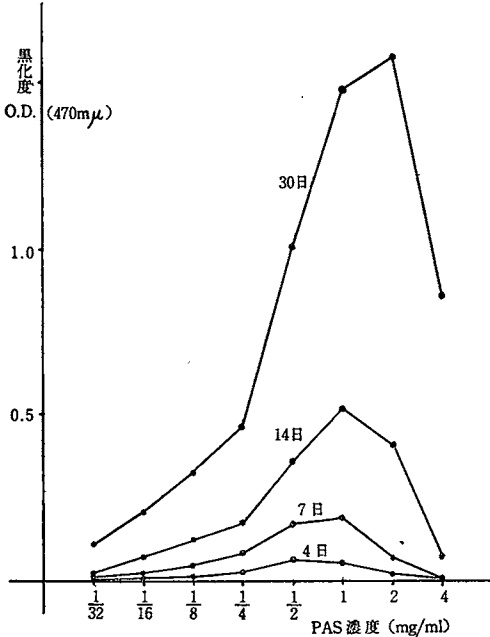
- 1) 福山裕三・田川修次：結核, 39, 187, 1964.
- 2) 東村道雄：医学と生物学, 60, 5, 1961.
- 3) 東村道雄：医学と生物学, 60, 92, 1961.
- 4) Konno, K., Kurzmann, R., Bird, K. T. & Sbarra, A. : Am. Rev. Tuberc., 77, 669; 675, 1958.
- 5) Dubos, R. J., & Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 58, 698, 1948.
- 6) Middlebrook, G., Dubos, R. J. & Pierce, C. : J. Exper. Med., 86,

献

- 175, 1947.
- 7) Konno, K., Nagayama, H. & Oka, S. : Am. Rev. Resp. Dis., 81, 550, 1960.
- 8) Toda, T., Hagihara, Y. & Takeya, K. : Am. Rev. Resp. Dis., 83, 757, 1961.
- 9) Wayne, L. G. : Am. J. Clin. Path., 36, 185, 1961.
- 10) Runyon, E. H. : Bull. Inter. Union against Tuberc., 29, 69, 1959.

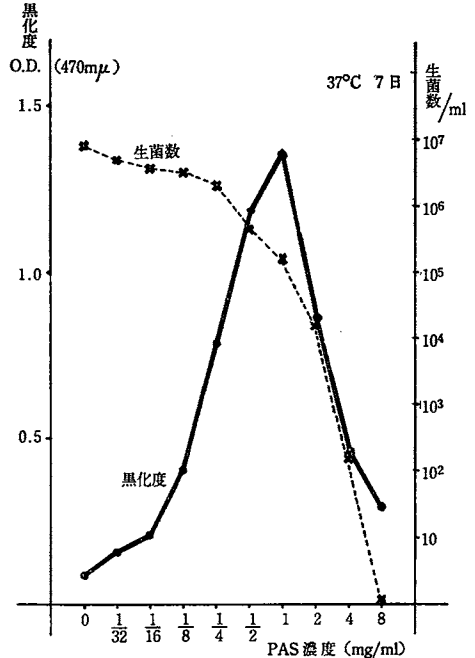
第1図 PAS 濃度と黒化度との関係

使用菌株 ; 山本s
 使用培地 ; PAS (各種濃度の) を含む Dubos 液体培地



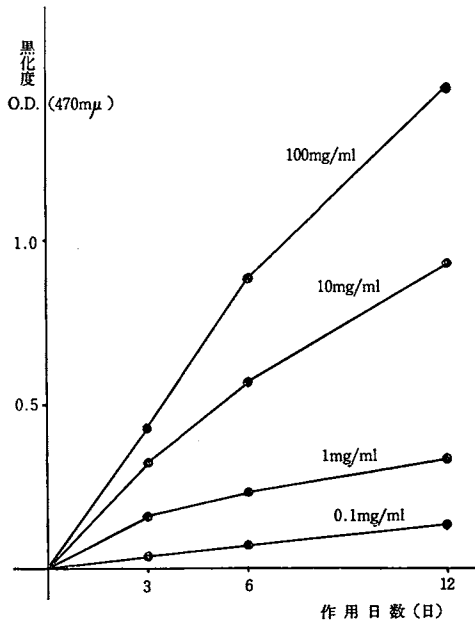
第2図 生菌数と黒化度との関係

使用菌株 ; 山本s
 使用培地 ; 各種濃度の PAS を含む Dubos 液体培地



第3図 接種菌量 (wet weight) と黒化度の関係

使用菌株 ; 山本s
 使用培地 ; PAS 1,000γ/ml を含む生理的食塩水



第1表 各種抗酸菌のPAS感受性および黒化現象

株	分 類*	PAS感受性 (γ /ml)		黒化 現象	株	分 類*	PAS感受性 (γ /ml)		黒化 現象
		対 照	100 1,000				対 照	100 1,000	
H ₂	ヒト	++	- -	-	上 田	III	++	++	-
H ₃₇ Rv	ヒト	++	- -	-	甲 府	III	++	++	-
藤 井	ヒト	++	+ -	-	島 本	III	++	++	-
牛10	ウシ	++	- -	-	100616	III	++	++	-
BCG	ウシ	++	- -	-	121326	III	++	++	-
P 1	I	++	+ -	-	P17	III	++	++	-
P 4	I	++	+ -	-	P44	III	++	++	-
P 6	I	++	+ -	-	P48	III	++	++	-
P 8	I	++	- -	-	P55	III	++	++	-
M. Kansassi	I	++	+ -	-	P39	III	++	++	+
石 井	II	++	+ +	-	P53	III	++	++	+
大 久 保	II	++	++	-	佐 藤	IV	++	++	+
松 本	II	++	- -	-	山 本 S	IV	++	++	+
渡 辺	II	++	+ -	-	三 林	IV	++	++	+
P22	II	++	+ -	-	M. 607	S**	++	++	-
P29	II	++	- -	-	BOK	S	++	++	-
713	II	++	++	-	K16	S	++	++	-
P 5	II	++	++	+	M. smegmatis	S	++	++	-
P27	II	++	++	+	M. fortuitum	S	++	++	-
A62	トリ	++	++	+	M. phlei	S	++	++	-
					竹 尾	S	++	++	-
					細 谷	S	++	++	-
					獣 調	S	++	++	-

* Runyon の分類による。¹⁰⁾

** Sは雑菌性抗酸菌を示す。

第2表 各種抗酸菌の諸性状

株	分類*	発育(日)	集落の色	ナイアシンテスト	中性紅反応	コード形成試験	ゼテスト	ニコチンアミダー	ウレアーゼテスト	アリルサルファタ	1-ゼニテスタ	パス耐性 (γ/ml)	パス黒化現象
山本 ^s	IV	3	灰白	-	-	-	±	+	+	+	1,000	+	
佐藤	IV	3	灰白	-	-	-	±	+	+	+	1,000	+	
P 5	II	3	灰白	-	-	-	+	+	+	+	1,000	+	
P27	II	3	灰白	-	-	-	+	+	+	+	1,000	+	
P39	III	3	灰白	-	-	-	+	+	+	+	1,000	+	
P53	III	3	灰白	-	-	-	+	+	+	+	1,000	+	
A62	トリ	3	灰白	-	-	-	+	+	+	+	1,000	+	
三林	IV	3	灰白	-	-	-	±	+	+	+	1,000	+	
M. fortuitum	S	3	淡黄	-	-	-	±	+	+	+	1,000	-	
M. smegmatis	S	3	灰白	-	-	-	+	+	-	-	1,000	-	
M. phlei	S	3	黄	-	-	-	+	+	-	-	1,000	-	
M. 607	S	3	橙黄	-	-	-	+	+	-	-	1,000	-	
K16	S	3	赤	-	-	-	+	+	-	-	1,000	-	
竹尾	S	3	淡黄	-	-	-	+	+	-	-	1,000	-	
P 1	I	5	黄	-	-	-	+	+	-	-	100	-	
121326	III	10	灰白	-	-	-	+	-	-	-	1,000	-	
石井	III	7	橙黄	-	-	-	+	-	-	-	1,000	-	
H ₃₇ Rv	ヒト	25	淡黄	+	+	+	+	+	-	-	0	-	
藤井	ヒト	30	淡黄	+	+	+	+	+	-	-	100	-	

*第1表の記載に準ずる。

第3表 PAS 類似物質による黒化現象

葉 劑 株	パ ス	サ リ チ ル 酸	ア ル セ チ ル サ リ チ 酸	パ ラ ア ミ ノ 安 息 香 酸	安 息 香 酸	フ タ ー ル 酸	レ ゾ ル シ ン	カ テ コ ー ル	エ ノ ー ル ア ミ ノ フ ォ ール	メ タ ア ミ ノ フ ェ ール
山本s	+	+	+	+	-	n	+	+	+	+
佐藤	+	+	+	+	-	n	+	+	+	+
P 5	+	+	+	+	-	n	n	+	+	+
P 27	+	+	+	+	-	n	-	+	+	+
P 39	+	+	+	±	-	n	n	+	+	+
P 53	+	+	+	±	-	n	-	+	+	+
A 62	+	+	+	±	-	n	-	+	+	+
三林	+	+	+	±	-	n	n	+	+	-
M. fortuitum	-	-	-	-	-	n	-	+	+	-
P 1	n	-	-	-	n	n	n	+	+	-
石井	-	-	-	-*	-	n	-	+	+	-
12136	-	-	-	-*	-	n	n	+	+	-
H ₃₇ Ra	n	n	n	-	n	n	n	+	+	-
非接種対照	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

+ 黒褐色に着色

± 淡褐色に着色

* 黄色に着色

n 発育せず