牛乳から分離した抗酸性菌に関する研究

第2報 モルモットに対する態度

佐々木 諭

広島県衛生研究所食品衛生部 (部長 上田貞善博士)

東京女子医科大学細菌学教室 (教授 平野憲正博士)

[受付: 9月4日・1958年]

さきに著者は可及的無菌的に採取した新鮮な生牛乳より、分離した抗酸性菌 105株の集落性状および生物学的性状について報告したが、ひきつゞきそれら分離抗酸性菌をもつて、モルモットへの接種実験を行つたのでその成績について報告する。

実 験

I. 供試菌株: 表1に示す如く、分離抗酸性菌 105株中より、白色系 23株 (No. 11, 12, 13, 19, 20, 24, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47) を選び供試した。

II. 実験方法: Lack 等²⁾の記載に従い、供試菌の 5 mg/cc 生理食塩水均等浮游液を作製し、その 1 cc を、あらかじめツベルクリン反応 (以下「ツ」反応と略称する) 陰性³⁾なることを確認した 250 g~350 g^{4,5)}のモルモットの左側内股部皮下に接種した。

接種菌浮游液は滅菌生理食塩水にて更に一万倍希釈液となし、その 0.1 cc を 3% KH_2PO_4 小川培地に塗抹後、四週間培養し発生集落数より接種菌数の算定を行つた。また接種モルモットについては接種局所および局所淋巴腺の変化を観察すると共に、接種後 3 週目、4 週目の 2 回にわたつて Roemer⁶⁾の皮内反応を行い、「ツ」反応陽性化の有無を検した。

なおこれら被接種モルモットを 6 週間後に殺処分に附し、内臓とくに肺、肝、脾、腎並びに単徑、膝蓋、腸間膜の各淋巴腺について、肉眼的病変の有無を観察し、病変部が認められたものにおいてはその部位を、肉眼的病変を認めないものにおいては当該臓器並びに淋巴腺の乳剤を作製し、常法⁷⁾通り 3% KH_2PO_4 小川培地に還元培養を行い、6 週間にわたつて接種抗酸性菌発育の有無を観察した。

III. 実験成績

(1) 接種生菌数: 供試各菌株間に多少の差は認められたが、接種菌液中 (5 mg/cc) の生菌数は表 2 に示す如く、その大部分が 4000 万~6000 万であった。

(2) 接種局所および局所淋巴腺の変化: 表 3 に示す如く、大多数 (70%) のものが菌接種後 1 週目に、接種局所に大豆大乃至蚕豆大の硬結を生じたが、潰瘍を形成したものはわずかに 1 株 (No. 28) のみで、しかもこの 1 株以外はすべて 3 週目には硬結が消失した。

なお局所淋巴腺には全例に軽度の腫脹が認められたが、4 週目には正常に復帰し、対側淋巴腺には全く変化が見られなかった。

(3) Romer の皮内反応⁸⁾: 菌接種後 3 週目および 4 週目に実施した供試モルモットにおける、Romer の皮内反応成績は表 3 に示す如く、陽性化せしめた菌株は 13 株で、若干の例外を除き 3 週目、4 週目何れも陽性を示したものが多し。なお前項で述べた接種局所の変化との関係を見るに、硬結を認めたもの程本反応陽性化を示す頻度が高いという結果を得た。

(4) 内部臓器の肉眼的所見並びに接種菌の還元培養成績 (表 4 参照)

⑧ 淋巴腺: 観察を行つた各種淋巴腺のうち、単徑および膝蓋の淋巴腺に腫脹を認めたものはなく、No. 11, 13, 19, 28, 33, 43, 44, 46 の 8 菌株 (39%) にはわずかに腸間膜淋巴腺の腫脹若しくは充血腫脹がみられた。しかしこれら腫脹淋巴腺も内部に乾酪性変化を伴つたものは皆無であり、且つ還元培養の結果も総て陰性に終

SASAKI Satoshi: Studies on acid-fast bacilli isolated from raw milk. II. On the pathogenic behaviour of the isolated acid-fast bacilli for guinea pigs. Laboratory of Public Health, Hiroshima Prefecture, Hiroshima. — Jap. J. of Bact., 14(2), 138-143, 1959.

表 1 分離抗酸性菌と供試抗酸性菌

分離菌	分離菌株数	供試菌株数
白色系	47	23
紅色系	27	—
黄色系	18	—
無色系	13	—
計	105	23

表 2 接種生菌数 (単位万)

菌株	菌数	菌株	菌数	菌株	菌数	菌株	菌数
11	4000	28	2000	35	7000	43	5000
12	3000	29	500	36	4000	44	7000
13	3000	31	1000	38	5000	45	4000
19	4000	32	4000	40	3000	46	7000
20	6000	33	7000	41	1000	47	2000
24	8000	34	5000	42	2000		

つた。

① 肺: 肉眼的に変化を認めたものは、供試23菌株中の No. 33, 43を接種したもののみで、灰白色の結節が認められ (写真1) とくに No. 43株を接種したものにおいては内部の乾酪化が見られた。又還元培養の成績は No. 43株接種モルモットよりは接種菌と同一集落性状を示す抗酸性菌集落の発生を見たが、他の菌株を接種したものからは何れも陰性であった。

② 肝: No. 11, 13, 28, 29, 33, 35を接種したものにおいて、主として表在性の灰白色の小結節が数個乃至十数個散見された (写真2) 還元培養の結果、これら小結節様病巣を作った菌株中の No. 11, 28 および肉眼的病巣を認め得なかつた No. 38, 43 の計4株の被接種モルモットからは、何れも当該抗酸性菌集落の発育を見た

写真 1 肺に形成された結節 (No. 43)

表 3 局所の硬結及び「ツ」反応

所見 接種後 菌株 No.	硬 結			「ツ」反応	
	1 週目	2 週目	3 週目	3 週目	4 週目
11	++	++	—	—	+
12	++	—	—	—	—
13	—	—	—	—	—
19	++	—	—	—	—
20	+	—	—	+	—
24	—	—	—	—	—
28	++	++ (潰瘍)	+	+	+
29	+	++	—	+	+
31	—	—	—	+	+
32	—	—	—	—	—
33	++	—	—	+	+
34	—	—	—	—	—
35	++	—	—	+	+
36	++	+	D	D	—
38	++	+	—	—	+
40	—	—	—	—	—
41	++	++	—	+	+
42	++	—	—	+	—
43	—	—	—	—	—
44	++	++	—	+	+
45	++	+	—	—	—
46	++	++	—	+	+
47	++	—	—	—	+

++, ++, +, は夫々硬結の程度を示す。

D: 斃死

写真 2 肝に形成された小結節 (No. 11)

肝全葉にわたって見られる小白色部が結節

表 4 A. モルモット接種菌の生物学的性状並びにモルモットに対する態度

菌 株 No.		11	12	13	19	20	24	28	29	31	32	33	34
供試菌の 主要生物学的 性状	集 落 性 状	乳白色乾	同左	同左	灰白色湿	同左	灰白色乾	同左	同左	同左	同左	同左	同左
	集落発生迄の日数	14	21	21	21	21	7	14	14	21	21	21	21
	抗 酸 性 (分)	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15
	抗 煮 沸 性 (分)	5~10	5~10	10~15	5~10	5~10	10~15	3~5	1~3	10~15	5~10	5~10	3~5
	菌 の 大 き さ (μ)	1.3	1.5	1.6	1.6	2.3	0.9	2.2	1.7	1.2	1.1	1.1	1.2
	耐 熱 性 60°C 4h	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	食 塩 抵 抗 性	{ 5 %		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		{ 7 %		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	酵 素 作 用	{カタラーゼ		1	2	1	2	2	1	2	1	4	<1
		{ウレアーゼ		—	+	—	—	+	+	+	—	—	+
	中 性 紅 反 応	+	+	—	+	+	—	+	—	+	+	+	+
	メチレン青還元能 (分)	20	18	5	25	13	9	37	4	50	15	27	13
	Thioglycollate 培 地	—	+	+	—	—	+	+	+	—	+	+	+
	テルル酸カリ培地 (0.05%)	13	30	100	90	100	100	70	100	0	0	5	18
	Cord 形 成 能	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
	抗 菌 剤	{ SM (15 γ)		—	—	+	+	—	—	+	—	+	—
		{ PAS (1,000 γ)		—	+	+	+	+	—	+	—	—	+
		{ INAH (10 γ)		—	—	—	—	+	—	—	+	—	—
モルモット に対する態度	菌接種後の「ツ」反応	+	—	—	—	+	—	+	+	+	—	+	—
	肉 眼 的 病変及び 還元培養 成績	淋 巴 節 腸 間 膜 鼠 径 腹 壁 肺 肝 脾 腎	—/+	—/—	—/+	—/+	—/—	—/—	—/+	—/—	—/—	—/+	—/—
			—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
			—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
			—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
			—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	そ の 他	肺	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
		肝	+/++	—/—	—/++	—/—	—/—	—/—	+/++	—/++	—/—	—/—	—/++
		脾	+/+	—/—	+/+	—/—	—/—	—/—	—/+	—/—	—/—	—/—	—/—
		腎	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—

〔註〕 カタラーゼは定量試験の成績、即ち数字は陽性限界稀釈倍数を示す。

テルル酸カリ培地欄は発育集落%を示す。

肉眼的病変及び還元培養成績欄中分母は病変 分子は還元培養の成績を示す。

が他は何れも陰性であった。

④ 脾：肉眼的に濾胞の腫大隆起を認めたものは No. 11, 13, 28, 44, 46の5菌株で、肺、肝における如き結節様病巣は全くみられなかった。又還元培養の結果病巣を認めた No. 11, 13および肉眼的に病巣を認め得なかった No. 43の各菌株接種モルモットよりは、夫々当該抗酸性菌を認めたが、他菌株接種モルモットからの還元培養成績は何れも陰性であった。

⑤ 腎：供試全菌株共、肉眼的病巣を認めず、又還元培養成績もすべて陰性であった。

以上モルモットに接種した実験成績と供試菌株の主要性状¹⁾とを表4 AおよびBに一括した。

考 察

人における非定型抗酸性菌の実験動物に対する態度については、既に多くの研究者によつて追及されている。即ち Timpe⁹⁾, Runyon 等⁷⁾, Wolinsky⁸⁾, Buhler 等⁹⁾, Middlebrook¹¹⁾, 占部等^{12,13)} 河合¹⁴⁾によれば非定型抗酸性菌は一般にモルモットに進行性病変を形成せず、マウスおよびハムスターに対しては病原性を示すものがあるとしているが、一方藤井等¹⁵⁾、染谷等¹⁶⁾はモルモットに対しても病原性を有する菌株が存在する事実を報告している。又 Tarshis 等¹⁶⁾はモルモットの腹腔内接種試験（接種菌量 25 mg）により、非定型抗酸性菌を

表 4 B. モルモット接種菌の生物学的性状並びにモルモットに対する態度

菌 株 No.		35	36	38	40	41	42	43	44	45	46	47
供試菌の主要生物学的性状	集 落 性 状	灰白色乾	同左	同左	同左	同左	同左	同左	同左	同左	同左	同左
	集 落 発 生 迄 の 日 数	21	21	28	42	42	49	49	49	49	56	56
	抗 酸 性 (分)	>15	>15	>15	>15	>15	>15	1~3	>15	>15	>15	>15
	抗 煮 沸 性 (分)	3~5	5~10	10~15	5~10	3~5	5~10	10~15	5~10	3~5	3~5	5~10
	菌 の 大 き さ (μ)	1.3	2.0	1.0	1.0	1.2	1.8	1.3	1.4	2.1	2.3	1.2
	耐 熱 性 60C° 4h	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	食 塩 抵 抗 性	5 %	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
		7 %	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	酵 素 作 用	カタラーゼ	2	2	1	1	2	8	8	<1	2	4
		ウレアーゼ	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	中 性 紅 反 応	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	メチレン青還元能 (分)	45	20	15	15	65	50	12	55	45	37	15
	Thioglycollate 培 地	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—
	テルル酸カリ培地 (0.05 %)	31	90	90	27	100	27	100	32	28	51	5
	Cord 形 成 能	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
モルモットに対する態度	抗 菌 剤	SM (10 γ)	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—
		PAS (1,000 γ)	—	—	—	+	+	+	+	—	+	—
	耐 性	INHA (10 γ)	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+
	菌 接 種 後 の 「ツ」 反 応	+		+	—	+	+	—	+	—	+	+
		—/—	/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/+	—/+	—/—	—/+	—/—
		—/—	/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
		—/—	/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
		—/—	/—	—/—	—/—	—/—	—/—	+/++	—/—	—/—	—/—	—/—
		—/++	/—	+/—	—/—	—/—	—/—	+/—	—/—	—/—	—/—	—/—
		—/—	/—	—/—	—/—	—/—	—/—	+/—	—/+	—/—	—/+	—/—
		—/—	/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	そ の 他		16日目 斃死	35日目 斃死								

〔註〕 表 3 A に同じ

No. 36 接種モルモットは還元培養を行わず

3群にわけている。即ち菌接種後14~31日で斃死し、病変++, 菌+のものを第Ⅰ群, 菌接種後11週目に剖検し、病変+, 菌+のものを第Ⅱ群, 菌接種後11週目に剖検した場合、病変—, 菌—のものを第Ⅲ群と称している。

しかるに自然界抗酸性菌の病原性に関する報告は極めて少く、戸田¹⁷⁾は「病原性および培養の能否による抗酸性菌の群型」において、自然界抗酸性菌を第Ⅲ群に属さしめ、ラットに対して時に多少の病変を形成するものがあるが、永續性を欠くという理由で病原性を否定し、占部等¹⁸⁾はマウスの尾静脈内接種 (1~5 mg) によって、内臓に病変を形成したものも認められたが、モルモットに対しては病原性を発揮する菌株の存在を認めなかつたと述べている。

著者は今回生牛乳より分離した自然界抗酸性菌のうち、白色系 23株についてモルモットに対する態度を小川¹⁹⁾, Tarshis 等¹⁰⁾に従い、動物体内における接種菌の増殖性 (侵襲性) に重点をおき検討を加えた結果、接種菌株中に接種モルモットの臓器に肉眼的な病変を呈するもののあることを認めた。これらの菌株中 No. 11, 13, 28, 38, 43は還元培養においても接種菌と同一性状を示す抗酸性菌を検出し得た。これ等 5菌株の中 No. 38株を接種したモルモットは35日目に斃死した。従つて本菌株は動物体内に侵入し且つ増殖したものと解釈されるし、他の4菌株においても臓器に若干の病変を形成した事実から、これら5菌株はモルモットに対し病原性を有するものというと思う。これ等の菌株は普通寒天培

表 5 病原性株の性状

検査項目	供試菌株 No.	11	13	28	38	43
集 落 性 状		乳白色, 乾燥	同左	灰白色, 乾燥	同左	同左
集 落 発 生 迄 の 日 数		14	21	14	28	49
抗 酸 性 (分)		>15	>15	>15	>15	1~3
抗 煮 沸 性 (分)		5~10	10~15	3~5	10~15	10~15
耐 熱 性 60°C 4h		—	—	—	—	—
酵 素 作 用	カタラーゼ	1	1	1	1	8
	ウレアーゼ	—	—	+	—	+
中 性 紅 反 応		+	—	+	+	+
メチレン青還元能 (分)		20	5	37	15	12
Thioglycollate 培 地		—	+	+	—	+
テルル酸カリ培地 (0.05%)		13	100	70	90	100
Cord 形 成 能		—	—	—	—	—
抗菌剤耐性	SM (10γ)	—	+	—	—	+
	PAS (1,000γ)	—	+	—	—	+
	INAH (10γ)	—	—	+	—	—
硝 酸 塩 還 元 能		+	+	+	—	+
糖 分 解 能	Rhamnose	—	—	—	—	—
	Arabinose	—	—	—	—	—
	Maltose	—	—	—	—	—
	Mannite	—	+	—	—	+
	Saccharose	—	—	—	—	—
澱 粉 加 水 分 解		—	+	—	—	+
カゼイン加水分解		—	—	—	—	—
ゼラチン液化能		—	—	—	—	—
発 育 温 度	37°C	+	+	+	+	+
	20°C	+	+	+	+	—
寒 天 培 地 (37°C)		—	+	—	—	+

〔註〕 表 4 に同じ

地並びにグリセリン又は卵成分を含まない培地にも、或る程度発育可能であるという点で Meym²⁰⁾ が述べている牛乳系菌株とも明らかに異なる菌株である。

またこれら 5 菌株は表 5 に示す如く、何れも乾燥集落を形成し、集落性状では結核菌と全く判別困難であり抗酸性並びに抗煮沸性が強く、戸田¹⁸⁾ の記述した自然界抗酸性菌では抗煮沸性がすべて 2 分以内であり、非定型抗酸性菌の殆んどが 4 分以内であるとする占部等¹²⁾、小川¹⁹⁾、芝本²¹⁾ の報告に比し、何れもそれらを凌駕する抵抗性を示したことは、極めて興味を惹く事実であつて特記すべき性状と見做された。

次に菌の毒力と密接な関係を有するといわれる中性紅反応^{22, 25)} 及び Cord 形成^{24, 27)} については前記 5 株中 4 株は中性紅反応陽性を示したが Cord 形成株は認めら

れなかつた。

Koch 等²⁸⁾ は Thioglycollate 培地に結核菌は発育しないが、非定型抗酸性菌は発育すると報告しているが、モルモットに病原性を示した 5 株中 3 株は本培地に発育し、2 株は発育しなかつた。

結核菌と非定型抗酸性菌の鑑別に低温 (24°C) 培養を行うことを Cabelli 等²⁹⁾ および Coster 等³⁰⁾ は提唱しているが 5 菌株中 No. 43 を除いた 4 株は何れも 20°C において良好な発育を示した。

次に被接種モルモットの臓器に或る程度の肉眼的病変を認めたが、還元培養陰性の結果におわつたものは No. 19, 29, 33, 35, 44 および 46 の 6 菌株で、肝、脾等に見られた変状は前述の例に略一致している。従つてこれら 6 菌株はモルモットに病原性を有するとは断定出来難い

が、諸検索性状の成績(表4 AおよびB)からも病原性を完全に否定し得ないものと考えられる。

なお「ツ」反応成績についてみると、供試23株中13株が陽性化した事は、さきに著者等¹¹⁾が牛乳から検出した抗酸性菌中にも同性状を有するものが存在した事実と鑑み、極めて興味深い事である。

結 論

(1) 生牛乳より分離した自然界抗酸性菌23菌株のうち、モルモットの内股部皮下接種(5 mg)により、内臓に結節様病変を作り更に還元培養においても陽性を示した菌が5株あった。これらの菌株はその生物学的性状においても従来報告された自然界抗酸性菌中には見られないものと思考される。

(2) モルモットに肉眼的病変を呈したが、還元培養陰性を示した菌が6株存在した。

(3) 菌接種によつて「ツ」反応の陽性化したものが23株中13株存在した。

終りに臨み、本研究の機会を与えられた所長沖波実博士及び終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた、東京女子医科大学教授平野憲正博士に心から御礼申し上げます。尙有益な御助言と御鞭撻をいただいた食品衛生部長上田貞善博士、終始御協力いただいた甲充、品川昭士の両氏に深く感謝致します。

文 献

- 1) 佐々木: 日本細菌学雑誌, 13, 1091-1097, 1958
- 2) Lack, C. H. Newman, B. J., Tanner, F. A. & Towers, A. G.: J. Clin. Path., 10, 204-207, 1957.
- 3) Roemer, P. H.: Beitr. Klin. Tuberk., 13, 1, 1909. (Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, 4th Ed., 1520, 1957).
- 4) 厚生省編: 衛生検査指針 I, 協同医書出版社, 125, 1950.
- 5) 染谷, 林: 日本細菌学雑誌, 7, 6, 605-612, 1952.
- 6) Timpe, A.: J. Lab. Clin. Med., 44, 2, 202-

- 209, 1954.
- 7) Runyon, E. H.: Am. Rev. Tuberc., 72, 866, 1955.
- 8) Wolinsky, E.: Am. Rev. Tuberc., 75, 180, 1957.
- 9) Buhler, V. B. & Pollak, A.: Am. J. Clin. Path., 363, 1953.
- 10) Buhler, V. B. & Pollak, A.: Am. Rev. Tuberc., 71, 74, 1955.
- 11) Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 72, 693, 1955.
- 12) 占部, 河合: 医学と生物学, 42, 33, 1957.
- 13) 占部, 河合: 医学と生物学, 44, 196, 1957.
- 14) 河合: 原著広島医学, 6, 5, 265-300, 1958.
- 15) 藤井, 高橋, 秋葉: 第31回日本細菌学会総合演題要旨, 114, 1958.
- 16) Tarshis, M. S. & Frisch, A. W.: Am. Rev. Tuberc., 65, 3, 278-288, 1952.
- 17) 戸田: 結核菌とBCG 南山堂, 1947.
- 18) 占部, 大徳, 三登, 齊藤: 第31回日本細菌学会総合演題要旨, 113, 1958.
- 19) 小川: 日本臨床結核, 16, 7, 512-522, 1957.
- 20) Meym, A.: Zbl. Bakter., 158, 298, 1952.
- 21) 芝本: 結核の臨床, 2, 5, 438-441, 1954.
- 22) Dubos, R. J. & Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 58, 698-699, 1948.
- 23) Ingrano, F.: Ann. Ist. C. Forlanini, 13, 4, 333-345, 1953.
- 24) Goldman, C. E. & Goldman, S. D.: Am. Rev. Tuberc., 73, 5, 674-680, 1956.
- 25) 占部, 幸田: 医学と生物学, 40, 6, 210-214, 1956.
- 26) Middlebrook, G., Dubos, R. J. & Pierce, C.: J. Exp. Med., 86, 2, 175, 1947.
- 27) Darzins, E.: Dis. Chest., 30, 6, 642-648, 1956.
- 28) Koch, M. L. Griffin, V. L. & Agostini, E. E.: Am. Rev. Tuberc., 77, 356-358, 1958.
- 29) Cabelli, V. J., Elliot, W. E. & McElroy, R. J.: Am. Rev., Tuberc., 69, 4, 604, 1954.
- 30) Coster, J. F. & Manten, A.: Am. Rev. Tuberc., 65, 3, 958, 1956.
- 31) 坂井, 佐々木, 今井, 遠藤, 田島: 日本獣医学雑誌, 17, 75 (学会号), 1955.