



| | |
|------------------|---|
| Title | Mycobacteria分類のためのArylsulfatase testの簡易化：特に接種菌量と培養期間について |
| Author(s) | 山本, 健一; YAMAMOTO, Ken-ichi; 高橋, 義夫 他 |
| Description | |
| Citation | 結核の研究, 32, 17-23 |
| Issue Date | 1972 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/26817 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 32_P17-23.pdf |



Mycobacteria 分類のための Arylsulfatase test の簡易化

特に接種菌量と培養期間について

山本健一・高橋義夫

(北海道大学結核研究所予防部)

(受付 11月30日, 1971)

所謂非定型抗酸菌の分布が広く認められるにつれて、抗酸菌の分類上、種々の問題がおきて来ている。その中でも、*M. avium* と *M. intracellulare* の鑑別はむづかしい問題である。鑑別のための最も確実な方法はニワトリあるいはウサギに対する病原性の差異によるとされている。これに関して、著者らはマウスに少量菌接種を行ない、その肝および肺内の菌増殖の動態により鑑別が可能であると報告した。他方、*in vitro* の生化学的な試験によって両者を鑑別する方法が試みられた中で、僅かに、Arylsulfatase test のみが役立つと考えられているにすぎない。

さて、Arylsulfatase test は Whitehead らによって報告され、mycobacteria がフェノールフタレインの硫酸カリ塩を分解してフェノールフタレインを遊離させる反応を利用したものであるが、その Arylsulfatase 活性は mycobacteria の菌種によってかなり差があることも彼らによって示されている。Wayne は mycobacteria の rapid grower のなかのヒトに病原性をもつ *M. fortuitum* は Arylsulfatase test 陽性であるのに対し、非病原性の *M. phlei* や *M. smegmatis* は陰性であることから両者の鑑別が出来るかと報告した。また、Kubica も同様に *M. fortuitum* と *M. smegmatis* および *M. phlei* の鑑別が本法によって2、3日で可能であることを明らかにした。さらに、問題となっている *M. Avium* と *M. intracellulare* の鑑別も Arylsulfatase 活性に基づいて、適当な濃度の基質と2週間の培養によって出来るかと報告している。

ところで、本法の実施に際して、被検菌株は普通には固型培地から Dubos Tween-Albumine 液体培地に移され、rapid grower 以外のものは1週間培養したものが使用されている。他方、抗酸菌分類のための生化学的な試験法では被検菌はナイアシン test を始めとして、アミダーゼ、Tween 80 水解、耐熱性カタラーゼ、ジアミン酸化および硝酸還元¹⁰⁾の諸試験は何れも小川培地培養菌を用いて行なわれている。そこで、本報では、Arylsulfatase

test も同様に小川培地培養菌を用いて差支えないか否かを検討した。また、接種菌量を増大することによって培養期間の短縮の可能性もしらべた。かくして、検査室における抗酸菌分類のための Arylsulfatase test の簡易化を企てたのである。

材料と方法

被検菌株はわれわれの研究室に継代保存されている次の57株、内訳は *M. tuberculosis* 8株、*M. bovis* 4株、*M. kansasii* 6株、*M. marinum* 2株、*M. aquae* 2株、*M. scrofulaceum* 6株、*M. avium* 5株、*M. intracellulare* 13株、*M. gastris* 1株、*M. xenopi* 2株、*M. fortuitum* 1株、*M. abscessus* 1株および非病原性抗酸性雑菌6株で、以上の所謂非定型抗酸菌は日本結核病学会抗酸菌分類委員会、西独ポルステル研究所より分与を受けたものである。これに帯広畜産大学微生物教室より分与された、豚の腸間膜淋腺より分離した未同定の抗酸菌5株を加え計62株である。これら菌株は使用時に、あらかじめ小川培地に継代培養3週後また Dubos Tween-albumin 液体培地に1週間培養後、また実験によっては、保存培地よりそのまま、それぞれ Arylsulfatase test 用の接種菌とした。なお、接種に当り小川培地の菌は型の如く水晶玉入りコルベンにて手振り磨砕し菌液を調製した。また、Dubos 培地に均等に増殖した菌は光電比色的に濃度を調製して用いた。

Arylsulfatase test は米国 Communicable Disease Center¹⁰⁾ 法によった。即ち、基質は Tripotassium phenolphthalein disulfate (半井化学薬品製) の 0.08M 脱イオン蒸溜水溶液とし、100°C 30分コッホ釜で滅菌した。3日および2週法のために無菌 Tween-albumin broth 200ml に上記基質液をそれぞれ 2.5ml および 7.5ml 加えて 0.001M、0.003M の割合に基質を含む試験用培地を作り、これらを直径 16mm の中試験管に 2ml 宛分注した。この基質加培地 2ml に被検菌 0.05mg を 0.1ml に含ませて接種した。また、実

験によって、上記の4倍量0.2mgあるいは小川培地上の菌苔を白金耳で約数mgかきとり、基質加培地試験管壁でなるべく細かく磨砕しつつ接種した。

37°C (M. marinumでは30°C) に所定の期間培養後、遊離 phenolphthalein を検出するために2NのNa₂CO₃溶液を6滴培養試験管に滴下し、発色を次のように記録して判定した。無色(-), 微桃色(±), 淡桃色(+), 桃色(++) , 淡赤色(卅), 赤色(卍)。

結 果

- 1) Dubos Tween-albumin培地と小川培地培養菌の比較

表1に示すようにDubos培地と小川培地からの菌の示す Arylsulfatase 活性の間には殆ど差は認められなかった。また、表1の最後の2列に示した成績は、その前に示されている試験に用いられた小川培地培養のものを、さらに室温に1カ月間放置したものの菌苔を接種して得たものであるが、1週間目の判定ですでに2週間と同程度の活性が示された。なおまた、通常の接種菌量0.05mgよりは0.2mgの方が、いずれの培地の菌でもより強い活性を示した。

次に上の実験成績を確かめる目的で、別な菌株を用いて同様な実験を行なった結果を表2に示した。この結果でも、Dubos 培地と小川培地からの接種菌量が同じ場合

表1 Dubos 培地および小川培地培養菌による Arylsulfatase test (1)

| 菌 株 | | Dubos 培地 | | 小 川 培 地 | | | | | | | | | |
|--------------------------|--------------------|----------|---------|---------|---------|--------|---------|-------|------|--------|---------|-----------|---|
| | | 3 日 法 | | 2 週 法 | | 3 日 法 | | 2 週 法 | | | 1 週 | 2 週 | |
| | | 0.2 mg | 0.05 mg | 0.2 mg | 0.05 mg | 0.2 mg | 0.05 mg | 菌苔 | 1 mg | 0.2 mg | 0.05 mg | 室温1ヶ月放置菌苔 | |
| M. Kansas ii | P 22 | — | — | ++ | ++ | — | — | ++ | ++ | ++ | — | 卍 | 卍 |
| | B-8559 album | — | — | + | + | — | — | / | 卍 | ++ | + | 卍 | 卍 |
| | B-8047 aurantiacum | — | — | 卍 | 卍 | — | — | / | ++ | + | + | 卍 | 卍 |
| M. Marinum | B-439 | — | — | + | ± | — | — | / | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 |
| | B-438 | — | — | + | — | — | — | / | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 |
| M.Scroflaceum ATCC 19981 | | — | — | + | — | — | — | / | + | — | — | ++ | 卍 |
| M.Intracellulare | 甲 府 | — | — | ++ | ± | — | — | 卍 | 卍 | 卍 | + | 卍 | 卍 |
| | 新 倉 | — | — | — | — | — | — | + | + | ± | — | + | + |
| | 島 本 | — | — | + | — | — | — | + | + | + | — | + | + |
| | 蒲 生 | — | — | ++ | + | — | — | / | 卍 | 卍 | ++ | 卍 | 卍 |
| | P ₂ | — | — | 卍 | + | — | — | 卍 | 卍 | ++ | — | 卍 | 卍 |
| M.Avium | Kirchberg | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | Flamingo | — | — | — | — | — | — | ± | — | — | — | — | — |
| | 名古屋 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | E 38686 | — | — | — | — | — | — | / | — | — | — | — | — |
| M.Tuber culosis H37RV | | — | — | — | — | — | — | / | — | — | — | — | — |

表2 Dubos 培地および小川培地培養菌による Arylsulfatase test (II)

| 方法 | 接種菌の培地 | | Dubos 培地 | | 小川 培 地 | | |
|-------------|---------------------------|---------|----------|------|--------|-----|------|
| | 菌 株 | 接 種 菌 量 | 0.2 | 0.05 | 菌苔 | 0.2 | 0.05 |
| | | | mg | mg | | mg | mg |
| 2 週 法 | 帯 広 畜 大 株 | O-8 | + | — | ++ | ++ | + |
| | | O-A-1 | — | — | + | + | — |
| | | O-BII-2 | — | — | ++ | + | — |
| | | O-C-14 | — | — | ++ | + | — |
| | | O-4-14A | — | — | ++ | + | — |
| | M. Avium chevallier | | + | + | + | — | — |
| | M. Scroflaceum 19073 | | ± | — | ++ | + | ± |
| | M. Intracellulare | 上 田 | + | + | +++ | +++ | ++ |
| | | P 39 | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ |
| | | P 47 | + | ± | +++ | ++ | + |
| | | P 25 | +++ | + | +++ | +++ | +++ |
| | | P 7 | — | — | ++ | + | — |
| | M. Xenopi 19276 | | — | — | +++ | ++ | ± |
| | M. Bovis | Ravenel | — | — | — | — | — |
| | | BCG | — | — | — | — | — |
| | | 三 輪 | — | — | +++ | — | — |
| 3 日 法 | M. fortuitum ATCC 6391 | | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | M. Abscessus | | + | — | ++ | + | — |
| | M. Smegmatis | | — | — | — | — | — |
| | M. Phlei | | — | — | — | — | — |

には、*M. xenopi*, *M. intracellulare* の P7 および帯広畜大分与株を除き、両者の活性に差のないことが明らかにされた。なお、小川培地の菌苔を接種すると、反応は増強してみられた。また、*M. fortuitum*, *M. abscessus* と *M. smegmatis*, *M. phlei* は3日法で何れの接種菌でもそれぞれ陽性、陰性と差がみられた。

2) 小川培地菌苔接種による Arylsulfatase test

上の実験結果から菌苔を接種することによって反応の結果を早期に判定出来るのではないかと考えて行なった実験成績が表3である。これによると、3日目でも従来の方法によって本来陽性を示すと考えられる大半の菌株は陽性となったが、やはり、確実な陽性反応を呈するのには5日ないし7日を要した。他方、通常の方法で陰性であった菌株でも7日目では弱いながら陽性を示すこと

表3 小川培地菌苔接種による Arylsulfatase test

| 菌 株 | | 判 定 日 | | | 菌 株 | | 判 定 日 | | |
|------------------|--------------------|-------|-----|--------------|-----------------------|----------------|---------|-----|-----|
| | | 3日目 | 5日目 | 7日目 | | | 3日目 | 5日目 | 7日目 |
| M.Kansasii | P 22 | — | + | ++ | M.Avicium | Kirchberg | — | — | — |
| | B-8559 album | ++ | ++ | +++ | | Flamingo | — | — | ± |
| | B-8047 aurantiacum | ++ | +++ | +++ | | 名古屋 | — | — | — |
| | Hamiche | + | ++ | ++ | | E 38686 | — | — | — |
| | 1 2 4 7 8 | + | ++ | ++ | | M.Xenopi 19276 | ++ | +++ | +++ |
| M.Marinum | B-439 | ++ | +++ | +++ | 帯広畜大株 | O-8 | ++ | ++ | ++ |
| | B-438 | + | ++ | +++ | | O-A-1 | — | ± | + |
| M.Scroflaceum | ATCC19981 | + | + | + | | O-BII-2 | + | + | ++ |
| | 19073 | ++ | ++ | ++ | | O-C-14 | + | + | ++ |
| M.Intracellulare | 甲 府 | ++ | ++ | +++ | | | O-A-14A | — | + |
| | 新 倉 | + | + | + | M.Bovis | Revenel | — | — | — |
| | 島 本 | — | — | + | | 牛No.1 | — | — | + |
| | 蒲 生 | +++ | +++ | +++ | | 三 輪 | + | + | ++ |
| | P ₂ | ++ | ++ | ++ | | BCG | — | — | — |
| | 上 田 | + | ++ | ++ | | M.Tuberculosis | H37RV | — | — |
| | P 39 | ++ | ++ | +++ | 青山B | | — | — | — |
| | P 47 | + | + | + | 黒 野 | | — | — | — |
| | P 25 | ++ | ++ | +++ | M.fortuitum ATCC 6391 | +++ | +++ | +++ | |
| | P 7 | + | + | +++ | M.Abscessus | ++ | +++ | +++ | |
| | | | | M.Semegmatis | — | — | + | | |
| | | | | M.Phlei | — | + | ++ | | |

表4 Dubos 培地および小川培地培養菌による Arylsulfatase test (Ⅲ)

| 菌 株 | | 接種菌の培地 | | 小川培地 | |
|--------------------|----------------|--------|-----|-------------|--------------|
| | | 判定日と菌量 | | 0.2mg 2週 | 0.05mg 2週 |
| M.Kansasii Bostrum | | + | + | ++ | +++ |
| M. Scroflaceum | 大久保 | + | — | +++ | +++ |
| | 渡 辺 | ++ | ++ | — | — |
| | 松 本 | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | SN 292 | + | + | + | ++ |
| M. Aquae | P 38 | — | — | — | — |
| | 19277 | +++ | +++ | + | ++ |
| M. Intracellulare | 戸 田 | + | ± | ++ | ++ |
| | 100616 | ++ | ++ | — | — |
| | 二 宮 | — | — | — | — |
| M.Gastri A.15754 | | + | + | + | + |
| M.Xenopi (I.P) | | +++ | +++ | + | ++ |
| M.Tuberculosis | H ₂ | — | — | — | — |
| | Schacht | — | — | — | — |
| | Frankfurt | — | — | — | — |
| | 今村弱毒 喜文字 | — | — | — | — |
| | 多 田 | — | — | — | — |
| M. 607 | | ++ | ++ | — | — |
| M.Takeo | | ++ | ++ | — | — |
| M.Jucho | | ++ | ++ | + | + |
| M.Timothy | | +++ | +++ | — | + |

も判明した。

また、*M. fortuitum*, *M. abscessus* と *M. smegmatis*, *M. phlei* にも本実験では 2 週法用の 0.003M 基質加培地を用いたが 3 日目に判定すると両者の間に明らかな差があることも示された。

以上の実験結果の再確認のため、別の菌株について、通常の方法と小川培地菌苔接種による方法を比較した。なお、これに用いた小川培地の菌苔は新たに継代することなく、6 カ月以上 -20°C で保存されていたものを用いた。その成績は表 4 に示した。この表によると両方法で陽性の割合に殆ど差がないことがやはり示された。しかも、非病原性抗酸菌の如く増殖の早いものは Dubos 培地 2 週法で活性が強くみられるのに対し、小川培地菌苔接種法では 5 日で陰性に止まっていた。

考 按

本報の成績は既に報告されているように、Arylsulfatase test が *M. avium* と *M. intracellulare* の鑑別および非病原性抗酸菌の *M. smegmatis*, *M. phlei* と人に病原性をもつ *M. fortuitum* との鑑別に役立つ反応であることを再確認した。同時に従来行なわれている Dubos 培地培養菌を被検材料とする代りに小川培地の菌を以てしても殆ど同様の成績が得られることも明らかにされた。従って、本法によれば臨床検査室での routine の方法としては被検菌を Dubos 培地に一旦培養する手間が省かれ Arylsulfatase test を簡便化したことになる。

さて、Arylsulfatase test は Kubica¹¹⁾ が報告しているように、長期間培養を行えば菌の増殖のため、結局は多くの Mycobacteria の菌種が陽性反応を呈することから *M. tuberculosis*, *M. bovis* あるいは *M. avium* の如く Arylsulfatase を 欠くように見えるのは質的なものでなく量的なものであるという事実は本報における大量菌接種に際し表 3 に示された如く *M. bovis* の牛 No. 1 が陽性を呈したことによっても理解される。既に Kubica はこの点を考慮して基質の量を選んで鑑別に良好な条件を設定したのである。ところで、本報では基質は一定として、接種菌量について先づ検討した。そして、表 1, 2 および 4 に示す如く、従来の方法に用いられる 0.05mg は比較的用いた 0.2mg に比べて活性が弱いことが明らかになったので、接種菌量としては少ないように思われる。しかも、0.2mg としても本来、量的な酵素反応である本法を鑑別の目的に用いて、判定の混乱をおこすような量ではないことも明らかである。

次に、菌接種をより簡単にする目的も兼ねて、小川培地菌苔数 mg を白金耳で基質加培地に接種する方法を試みたが、正確に一定の接種菌量を期待出来ないにもかかわらず

らず、各実験結果の示す如く、鑑別の目的を果すために、これもまた充分であると思われる成績を得た。

ところで、培養期間であるが、われわれが菌苔を接種した場合には、前述の Arylsulfatase 反応が量的なものであることを考え、判定日数を短縮して、先づ 3 日とした。これでも、従来の 2 週法と著差のない成績であったが、3 日目では増殖の遅い菌種ではその後、短時日で、現わして来るはずの Arylsulfatase 活性が見られないままに陰性と判定されるおそれが生ずるので、さらに培養期間を延長して 5 日乃至 7 日目を判定日とすると、従来の方法に平行した成績が得られる。このようにして、判定日数が少なくとも 1 週間は短縮されることになる。

なお、小川培地菌苔は表 1 および 4 に示された如く、室温 1 カ月放置のものでも、 -20°C に 6 カ月保存したのものでも充分用いることが可能である。

最後に、また、われわれの方法によれば、*M. smegmatis*, *M. phlei* と *M. fortuitum* の鑑別に際しても、表 3 に示すように、通常用いられる基質濃度の低い 3 日法培地を用いないで、2 週法の基質 0.003 M 培地を使用して 3 日判定でよいことも明らかとなった。

総 括

Arylsulfatase test の接種菌および培養期間について検討を加え、Mycobacteria 鑑別法としての本法を次のように簡易化することが可能と思われる。

- 1) 接種菌は Dubos Tween-albumin broth 培養のものに代えて、小川培地のものでよい。
- 2) 接種菌量は培地上の菌苔数 mg を直接に基質加培地に添加する。
- 3) 培養期間は 5 日乃至 7 日とする。

文 献

- 1) Armstrong, A.L., Dunbar, F.P. and Cacciatore, R.: Amer. Rev. Resp. Dis., 95, 20, 1967.
- 2) Meissner, G.: Zbl. Bakt., I. Orig., 180, 510, 1966.
- 3) Engbaek, H.C.: Acta. Tuberc. Scand., 40, 35, 1961.
- 4) 占部 薫, 齋藤 肇, 田坂博信: 結核, 42, 511, 昭42.
- 5) 山本健一, 有馬 純, 布施裕章, 中本節朗, 高橋 義夫, 奥川春枝: 結核の研究, 第27・28集, 11, 昭43.
- 6) Whitehead, J.E.M. and Wildy, P.: J. Path. Bact., 65, 451, 1953.
- 7) Wayne, L.G.: Amer. J. Clin. Path., 36, 185,

- 1961.
- 8) Kubica, G.P. and Rigdon, A.L. : Amer. Rev. Resp. Dis., 83, 737, 1961.
- 9) Kubica, G.P. and Beam, R.E. : Amer. Rev. Resp. Dis., 83, 733, 1961.
- 10) 日本結核病学会抗酸菌分類委員会, 臨床材料から分離される Mycobacteria の分類試験法試案 未発表。
- 11) Kubica, G.P. and Vestal, A.L., : Amer. Rev. Resp. Dis., 83, 728, 1961.