

京 都 大 学
結 核 研 究 所 紀 要

第 9 卷 第 2 号

原 著

ノ カ ル デ イ ア に 関 す る 研 究

〔第 1 報〕 ノカルデシア培養菌の抗酸性に及ぼす培養日数、
培養基成分継代及び菌株の影響

(米国, ジョージア大学細菌学教室)

N. M. McClung

(京都大学結核研究所細菌血清学部 主任 植田教授)

上 坂 一 郎

ノカルデシアは周知の通りミコバクテリウムと最も近縁の微生物であつて、その中には組織内及び培養基上に於て抗酸性を示す菌種も数多く、殊に組織内に在つては抗酸性の程度も強く結核菌と区別できない場合もある¹⁾²⁾。その意味に於て結核研究者のゆるがせにする事のできない菌である。更にノカルデシアの抗酸性は本菌属の分類にとつて従来から極めて重要な性状として考へられ、Bergey の分類に於てもノカルデシア属分類の最初の Key は抗酸性の有無である³⁾。しかるにこの性状は培養基上で継代されると極めて変動し易くなる事も亦、事実であつて Gordon 等⁴⁾⁵⁾はノカルデシア分類に際して抗酸性の有無、強弱を全く無視して居る。

茲に於てノカルデシア培養菌の抗酸性は如何なる影響のもとに変動するか、その変動に及ぼす各種の要因を知ることはただにノカルデシア各 Species 間の鑑別同定の問題のみならず、ミコバクテリウムとの関連に於ても解決すべき基礎的な事項であると考へられる。

実 験 方 法

1) 使用菌株 *Nocardia asteroides* 52株, *N. brasiliensis* 12株, *N. madurae* 3株, *N. convoluta*, *N. pretoriana*, *N. tenuis convoluta*, *N. lutea*, *N. polychromogenes*, *N. rubra*, *N. blackwellii*, *N. minima*, *N. leishmanii*, *N. coeliaca*, *N. erythropolis*, *N. corallina*, *N. rangoonensis*, *N. transvalensis*, *N. farcinica*, *N. globerula*, *N. bostromi*, *N. rubropertincta*, 各 1 菌株を用いた。

2) 使用培養基 上記の各菌株は総て Bennett's agar 斜面に継代し、且、通常の抗酸性検査は本培地に発育した集落を用いた。Bennett's agar の組成は次の通りである。

酵母エキス	1.0g	肉エキス	1.0g
N. Z. アミン	2.0g	ブドウ糖	10.0g
寒 天	20.0g	蒸溜水を加えて	1ℓ とす。

pH 7.2-7.4

培養基成分の抗酸性に及ぼす影響を知る目的では各種の complex media の外に合成培養基に種々の炭素源を加えたものについて検討した。合成培養基の組成は次の通りである。

NaNO₃ 2.0g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, MnCl₂·4H₂O

0.008g, K_2HPO_4 0.8g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0002g, 蒸溜水 1ℓ

培養温度は常に 30°C で行つた。

3) 抗酸性の程度の判定 染色の方法は Ziehl-Neelsen 法を常法通り行つた。

ノカルディア培養菌の抗酸性はミコバクテリウムの場合と異なり、殆んど総ての菌体が抗酸性という事は寧ろ稀であつて、可成りの数の菌体乃至菌糸は非抗酸性に留まる。そこで標本の抗酸性の程度を表わすのに次の様な表示法に依つた。染色標本の全視野を検鏡して抗酸性の菌体（菌糸を含む）の数の全菌体（菌糸を含む）に対する比を求める。而してこれを次の各 Grade に分けた。

Grade-0 : 全視野中に抗酸性の菌体の全く認められない場合。

Grade-1 : 抗酸性菌体の全菌体に対する比が 1% 以下の場合。

Grade-2 : 同上比が 10% 以下の場合。

Grade-3 : 比が 10% と 30% の間にある場合。

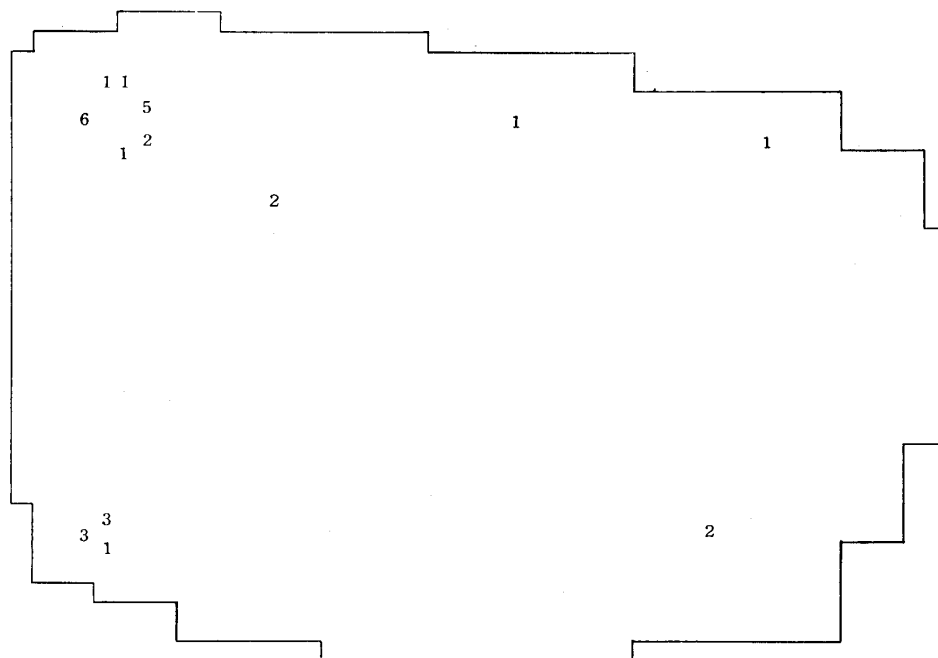
Grade-4 : 比が 30% と 80% の間にある場合。

Grade-5 : 比が 80% 以上の場合。即ち殆どが抗酸性の菌体より成る場合。

尚、菌塊は計算に入れず単個菌のみを数えた。

実 験 結 果

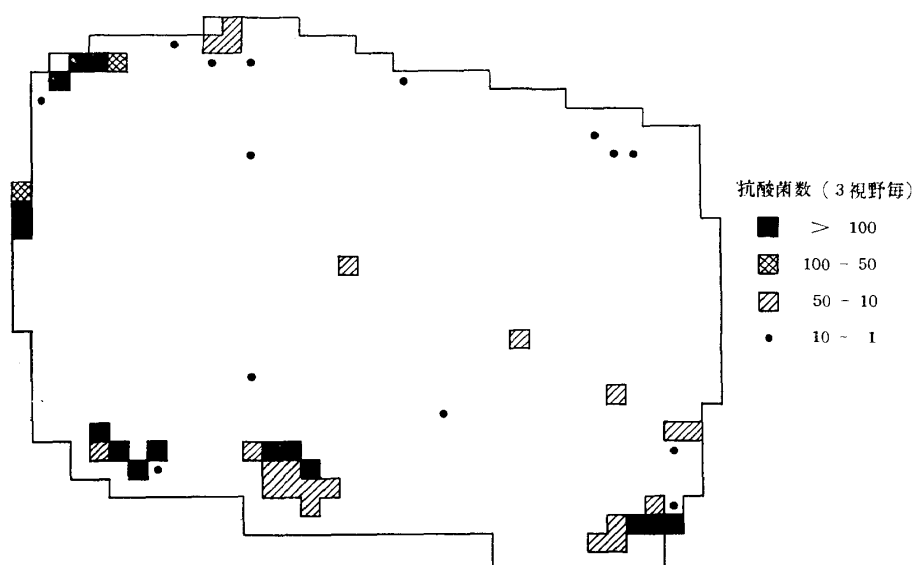
1. 塗抹標本上に於ける抗酸性菌体の分布



註：黒枠は被検視野，数字は抗酸菌数

第 1 図 *N. asteroides* No.166 Bennett's agar 1ヶ月培養，塗抹標本 Ziehl-Neelsen 染色 3842視野図

Bennett's agar 斜面に發育した集落から釣菌して Ziehl-Neelsen 染色を施して検鏡するに培養日数によつて抗酸性菌体の標本上に於ける分布が異なる事に気付いた。勿論，抗酸性の大なる場合 (Grade 3, 4, 5 等) には標本の何れの部分にも抗酸性菌体が多数見られるのは当然であるが，抗酸性の程度の小なる場合 (Grade 1, 2) には培養の若い時期 (培養 5 日，7 日) には抗酸性の菌体 (菌糸も含めて) は標本上に平等に分布して居り，且，同一の菌体或は菌糸にあつても抗酸性の部分と然らざる部分とが相隣して見られる場合が屢々であつたが，培養が古くなり，1, 2 或は 4 ヶ月になると抗酸性菌体は塗抹部の周辺にのみ見られる様になつた。第 1 図，第 2 図はその例である。第 1 図は *N. asteroides* No.166 の Bennett's agar 1ヶ月培養の塗抹標本であるが，全視野 (3842視野) 中に抗酸性の菌体は僅か 29 個しか認められなかつた。そしてその何れもが塗抹部の周辺にのみ存した。第 2 図はやや抗酸性菌体の多い *N. asteroides* No.177 の 1ヶ月培養の塗抹標本であるが全視野 (2829視野) の中，抗酸性の菌体は矢張り殆どが周辺部に存する。



第 2 図 *N. asteroides* No.177 Bennett's agar 1ヶ月培養、
塗抹標本 Ziehl-Neelsen 染色 2829視野図

2 培養日数による抗酸性の変動

ミコバクテリウムに於ては若い培養には非抗酸性乃至易染性の菌体が多く見られ、古くなるにつれて認め難くなる事は周知の如くであるが⁶⁾、ノカルディアに於ても Erikson⁷⁾は *Proactinomyces opaca* をブイヨン培養した処、始めの14日間は全く非抗酸性で次で抗酸性が現はれ始め、培養が古くなると再び非抗酸性となる事を認めて居る。これはその他のノカルディアに於ても真実であるかどうかを検討してみた。

第1表に見る如く *N. asteroides* に於て培養

5日目には抗酸性の Grade 0 即ち全く非抗酸性の株が59株中19株 (38%) もあつたのに2日後の7日目には21.5%に減少、更に1ヶ月後には9.6%となり残りの90.4%の菌株は強弱の差はあれ抗酸性の菌体を認めた。しかるに2ヶ月後には再び非抗酸性の菌株が増加して全体の19.2%を占め、4ヶ月後には21.7%に達した。

N. brasiliensis の抗酸性は *N. asteroides* よりも一般に強い事は表に見る如く培養5日目で Grade 3及び4の株が12株中11株を占める事からも窺はれるが、抗酸性の減弱は *N. asteroides*

第 1 表 培養日数による抗酸性の変動

<i>N. asteroides</i>												
培養日数	抗酸性の Grade 0		1		2		3		4		計	
	菌株数	%	菌株数	%	菌株数	%	菌株数	%	菌株数	%		
5 日	19	38.0	9	18.0	4	8.0	16	32.0	2	4.0	50	
7	11	21.5	13	23.5	6	11.7	19	37.4	2	3.9	51	
1 ヶ月	5	9.6	9	17.3	6	11.5	27	51.9	5	9.6	52	
2	10	19.2	4	7.7	8	15.4	22	42.3	8	15.4	52	
4	10	21.7	12	26.1	9	19.5	11	23.9	4	8.7	46	
<i>N. brasiliensis</i>												
7 日	0		1		0		6		5			
1 ヶ月	0		0		1		6		5			
2	2		0		0		9		1			
4 ※	6		1		1		1		0			

※ 4ヶ月目に3株は培養基枯渇して検査不能

第2表 2%グリセリンと1%ブドウ糖の抗酸性に及ぼす影響

N. asteroides

抗酸性の Grade	0	1	2	3	4	5	計
2%グリセリン	7	10	15	12	3	2	49
1%ブドウ糖	5	9	6	27	5	0	52

N. brasiliensis

抗酸性の Grade	0	1	2	3	4	5	計
2%グリセリン	0	3	2	0	3	4	12
1%ブドウ糖	0	0	1	6	5	0	12

その他の *Nocardia species*

抗酸性の Grade	0	1	2	3	4	5	計
2%グリセリン	11	0	0	0	1	2	14
1%ブドウ糖	7	2	0	3	1	1	14

註：使用培地：Bennett's agar 斜面

培養日数：1ヶ月

よりも早く現はれ4ヶ月後には全体の半数以上（6株）が非抗酸性となる。勿論、以上は大体の傾向を示すものであつて、菌株によつては早くから強い抗酸性を現はし、且、長期に持続するものも、逆に遅く抗酸性となつてすぐに消失する株もある。

3 培養基成分の抗酸性に及ぼす影響

(a) 炭素源の抗酸性に及ぼす影響

最も普通に使用されるグリセリンとブドウ糖の影響を見るために Bennett's agar にグリセリン2%或はブドウ糖1%を加へた培地でノカルディアの抗酸性を検した。

第2表に見る様に2%グリセリンと1%ブドウ糖との間には抗酸性に及ぼす影響で大差がない様である。即ち *N. asteroides* の場合49株中7株が2%グリセリンで非抗酸性であり、1%ブドウ糖では52株中5株が非抗酸性であつた（2%グリセリンでは52株中3株が1ヶ月後に発育しなかつた）。*N. brasiliensis* 及びその他の *Nocardia species*（14菌種について実験）に於ても両炭素源の間に著差があるとは思はれなかつた。

次に各種の炭素源について検討するために *N. brasiliensis* より3菌株、*N. madurae* 3

菌株その他の菌種（*N. asteroides* を除く）18菌種（18菌株）合計24菌株を用い、合成培養基に各種の炭素源を1%に加へたものについて抗酸性を検討した。まづ発育であるが4週培養後に第3表に見る如くグリセリンとマルトースでは被検菌株の総てが発育したが、その他の炭素源ことに Adonitol, Erythritol, 及び Rhamnose では半数以上が発育できなかつた。

第3表 各種炭素源の抗酸性と発育に及ぼす影響

炭 素 源	培養日数	抗酸性の Grade						計
		0	1	2	3	4	5	
Glycerol	1 ^w	14	2	2	1	4	1	24
	4	12	1	3	6	2	0	24
Maltose	4	12	3	2	6	1	0	24
Mannitol	4	10	2	3	3	1	0	19
Adonitol	4	4	0	1	0	2	0	7
Rhamnose	4	9	0	0	0	2	0	11
Raffinose	4	8	0	4	2	3	0	17
Lactose	4	9	2	0	2	1	0	14
Sorbitol	4	9	2	2	1	0	0	14
Inositol	4	8	0	1	2	1	0	12
Arabinose	4	5	3	1	2	1	0	12
Erythritol	4	4	0	0	0	2	0	6

第 4 表 パラフィン合成培養液, 2%及10%グリセリン合成寒天, 2%グリセリン Bennett's 及び Dubos 寒天培地に於る *N. asteroides* の抗酸性 (1ヶ月培養)

抗酸性の Grade	0	1	2	3	4	5	計
パラフィン合成液体培養基	8*	12	11	13	4	0	48
	16.6**	23.9	22.9	26.1	8.3	0	100
2%グリセリン合成寒天	17	13	4	2	3	0	39
	43.5	33.3	10.2	5.1	7.6	0	100
10%グリセリン合成寒天	23	18	6	2	0	0	49
	46.9	34.9	12.2	4.1	0	0	100
2%グリセリン Bennett's 寒天	7	10	15	12	3	2	49
	14.3	20.4	30.6	24.5	6.1	4.1	100
Dubos oleic albumin 寒天	1	7	15	8	13	6	50
	2.0	14.0	30.0	16.0	26.0	12.0	100

* 菌株数 ** 同パーセント

又抗酸性については何れの炭素源でも発育菌株の半数前後は非抗酸性で特に抗酸性に好影響を与へると思はれるものはなかつた。

(b) 合成培養基と Complex organic media との比較

パラフィン片加合成液体培養基, 2%及び10%グリセリン加合成寒天培地, 2%グリセリン加 Bennett's 寒天及び Dubos oleic albumin 寒天を用いて *N. asteroides* の4週間培養後の抗酸性を検した。

第4表に見る如く2%グリセリン合成寒天では約半数(43.5%)が非抗酸性であり, グリセリン濃度を10%に増加しても大差はなかつた。併し乍らパラフィン加合成培養基では非抗酸菌株は16.6%であり, グリセリン加合成培地の場合に比して明かに少なくこの点ではグリセリン Bennett's 寒天(14.3%)に比肩し得る。しかし Bennett's 寒天では Grade 5 の菌株が2株ありこの点から見ればパラフィン片加合成培液よりも好いと言ひ得られよう。

Dubos oleic albumin 寒天は被検培地の中では抗酸性に最もよい影響を与へる。即ち非抗酸性の菌株は僅かに1菌株で6株が Grade 5 であり, Grade 4 以上の菌株は19株(38.0%)に及んだ。

以上の結果から, (1)パラフィンは抗酸性に関してはグリセリンよりも好影響を与へる, (2) Complex organic media は合成培地より明かに抗酸性に好影響を与へる, (3) Complex organic

media の中でも Dubos 培地は特によい様である。

次に Dubos 培地が好影響を与へるのはその中の oleic albumin の為ではないかと考へて次の実験を行つた。

2%グリセリン加合成寒天培地に oleic albumin を10分の1量加へ斜面としたものに *N. asteroides* を培養した処1ヶ月後に非抗酸性 (Grade 0) の菌株は8(16%)で Grade 4 と5の合計は6株(12%)であつた(第5表)。この結果は oleic albumin を加へない2%グリセリン合成寒天の場合(第4表参照)に比べて著しく抗酸性菌株が増加して居る事が分る。即ち oleic albumin

第5表 2%グリセリン+10% oleic albumin 加合成寒天斜面上の *N. asteroides* の抗酸性 (1ヶ月培養)

	抗酸性の Grade						計
	0	1	2	3	4	5	
菌 株 数	8	13	15	8	5	1	50
同 %	16	26	30	16	10	2	100

第6表 牛乳培養基に於ける *N. asteroides* の抗酸性 (1ヶ月培養)

	抗酸性の Grade						計
	0	1	2	3	4	5	
菌 株 数	5	8	9	4	13	11	50
同 %	10	16	18	8	26	22	100

は抗酸性を著しく増強させると言い得る。

更に牛乳はノカルデアの抗酸性に好影響を与へると言はれる^{79) 10)} が牛乳に培養した場合を検討して見た。第6表に見る様に *N. asteroides* 1ヶ月培養の結果 Grade 5 が50株中11株 (22%) に及んで居る。5株の非抗酸性株があったとは言へ、牛乳も亦、抗酸性を強く増強せしめると言はれやう。

(4) 菌株と抗酸性の関係

全般的に言つて *N. asteroides* や *N. brasiliensis* が少く共 partially acid-fast である事は疑い得ない処であるが、個々の菌株に立入つて見ると必ずしも妥当しない。例へば No. 95 株 (*N. asteroides*) は何れの培地に於ても非抗酸性であり No. 161 株 (*N. asteroides*) は Dubos oleic albumin agar で僅か Grade 1 の抗酸性であつた。之に反して Nos. 93, 97, 123, 139, 及び176 (何れも *N. asteroides*) は何れの培地に於ても Grade 3 或はそれ以上の抗酸性を示した。その他の個々の菌株について使用培地の一を挙げてその抗酸性の詳細を述べる事は省略するが、概括的に言へば蛋白含有培地で Grade 3, 4, 5 の如く多くの抗酸性菌体を認めた菌株は合成培地に於ても (Grade 0 になる場合も勿論あるが) 少数乍ら抗酸性菌体を認める場合が多く、逆に蛋白含有培地で抗酸性の弱い菌株は合成培地では殆んど Grade 0 であつた。

即ち抗酸性はかなりの程度に於て菌株 (Strain) と関係のある性状と言ひ得るが Species に特有の性状とは言ひ得ない。

更に Bergey の分類に於て⁸⁾ 非抗酸性の群に入れられて居る *N. madurae*, *N. lutea* 及び *N. blackwellii* についても第7表に見る様に蛋白含有培地を用いる場合には時として強い抗酸性を呈する。唯、*N. madurae* では抗酸性の変動が激しく Dubos 培地 1週目では Grade 5 の抗酸性であつたのに4週日には0となる事もあり、この様に激しい変動は *N. asteroides* や *N. brasiliensis* では見られない処である。

尚、*N. blackwellii* は従来考へられて居た様な非抗酸性の species ではなくむしろ強い抗酸

第7表 所謂非抗酸性ノカルデアの抗酸性の Grade

	グリセリン 寒 天		Dubos寒天		牛 乳
	1週	4週	1週	4週	
<i>N. madurae</i>					
No. 743	0	3	5	0	5
No. 757	2	0	0	0	0
No. 637	4	4	0	0	1
<i>N. lutea</i>					
No. 192	4	0	4	2	
<i>N. blackwellii</i>					
No. 81	5	4	2	4	5

註：表中の数字は抗酸性の Grade

性を示した。

(5) 継代による抗酸性の変動

ノカルデア培養菌の抗酸性が variable であるといふ事は、例へ同一条件で継代を行つてもその都度、抗酸性が変化するものであるといふ印象を与へる。果してそうであろうか。

第8表 *N. asteroides* の継代による抗酸性の変動 (1ヶ月毎継代)

菌 株	継代回数 抗酸性の Grade			菌 株	継代回数 抗酸性の Grade		
	I	II	III		I	II	III
No. 10	1	3	3	No. 137	1	2	
54	2	4	4	138	1	1	
72	2	3	3	139	1	3	
73	3	3	3	144	1	1	
84	1	2	2	155	4	3	
93	4	4	4	156	4	3	
94	2	4	4	158	3	3	
95	0	0	0	158A	1	1	
96	4	3	4	161	0	0	
97	4	3	4	162	1	0	
111	3	3	3	163	0	1	
123	2	3	4	164	2	1	
124	4	3		165	3	4	
126	1	2		166	1	1	
127	4	3	3	167	1	0	
128	2	3	3	175		3	
129	3	4		176	2	3	
130	3	3	3	177	2	2	
131	4	3	4	179	1	1	
132	4	3	4	180	0	0	
133	3	2	3	181	1	2	
				185	1	3	

この疑問に答へる為に Bennett's agar に *N. asteroides* を培養し、正確に1ヶ月毎に継代してその都度、抗酸性を検した。

第8表の様にその変動は左程著しいものではない。しかし No. 10, 139 及び 185 は Grade 1 と 3 の間に変動している。前述した様に Grade 1 の如くごく少数の抗酸性菌体を含む場合にはそれらは標本の周辺部にのみ見られる事が多く中心部のみを検鏡して居ると Grade 0 と間違へられる可能性が多い。それ故変動のある事は確かであるが、それが実際よりも誇張して見られる場合も多いであらう。

以上は継代を2回或は3回のみ行つた実験の結果であるが、更に長期に亘つて継代した場合の変動については目下検討中である。

考 察

今回の実験で興味のある事の一つは1ヶ月以上の古い培養で少数の抗酸性菌体しか含まれない場合、塗抹標本の周辺部にのみ抗酸菌体が見られるといふ事実である。その理由については目下の処憶測の域を出ないが菌体内のリピド含量が同じく抗酸性菌体と言つても培養の老若によつて異なるのではないかと考へられる。即ち若い培養菌体のリピド含量は抗酸性の有無によつて大差がないが古くなると抗酸菌体内に多量のリピドが含有されそれが細胞膜の表面張力を低下せしめ塗抹部の周辺に菌が集まる様になるのではなからうか。何れにしてもこの事実はノカルディアの抗酸性を検する場合に標本の周辺部まで十分に検査しなければならぬ事を教へるものである。

ノカルディアの抗酸性が培養日数によつて変化することは既に Feistmantel⁶⁾ (*Streptothrix farcinica* について) や Erikson⁷⁾ (*Proactinomyces opaca* について) によつて認められている処である。*N. asteroides* や *N. brasiliensis* も同様に始め非抗酸性から抗酸性となり、次で再び抗酸性を失つて行く事が今回の実験で確められた。しかし抗酸性を獲得する時期、それを再び失ふ時期は菌株、培養基、等により異なるばかりでなく、継代の都度、多少共異なるもの

の如くである。

培養基成分の抗酸性に及ぼす影響についても亦、従来から研究されている^{7, 8)}。蛋白成分が抗酸性に好影響を及ぼす事はノカルディアが組織内で強い抗酸性であると言われる事と考へ併せる時興味深い。ノカルディアが組織内に侵入する時は非抗酸性乃至弱抗酸性であつても、組織に定着し増殖を開始すると組織内の蛋白或はその構成々分に影響されて抗酸性を獲得するのではなからうか。蛋白の構成々分(アミノ酸)のノカルディア抗酸性に及ぼす影響については後報で述べる。

最後に抗酸性菌種と言われる *N. asteroides* でも菌株によつては或は培養基、培養日数によつて非抗酸性となり得るものであり、逆に非抗酸性と言われる *N. madurae* でも培養基により、又培養時期によつては抗酸性となり得るものであつて Bergey の分類に見る如くこの性質をノカルディア分類の第1の Key にする事には賛成できない。むしろ抗酸性は菌株 (Strain) に関係する性状と見た方がより妥当である。

結 論

Nocardia asteroides 52菌株, *N. brasiliensis* 12菌株, *N. madurae* 3菌株, その他の *Nocardia species* 18菌種合計 85菌株の培養菌の抗酸性に及ぼす各種の影響を検した結果次の様な成績を得た。

(1) 抗酸性菌体の数が少ない場合、培養1ヶ月以上経過すると、その塗抹標本に於て抗酸性菌体は主として周辺部に見られる。

(2) 培養初期は一般に非抗酸性であるが日数の経過と共に抗酸性が強くなり、古くなると再び抗酸性は減弱乃至消失する。但、その時期は菌種、菌株、その他の原因により必ずしも一定しない。

(3) 培養基中の炭素源の中パラフィン抗酸性を増強するが、グリセリン、ブドウ糖その他の糖類の抗酸性に及ぼす影響は弱い。蛋白は一般に抗酸性増強作用が強い。ことに oleic albumin 及び牛乳の作用は強い。

(4) ノカルディアの抗酸性は菌種 (Species)

よりもむしろ菌株 (strain) により関係する性状である。この意味で抗酸性をノカルディア分類の第1の Key とする事に疑義がある。

引用文献

- 1) B. H. Webster Amer. Rev. Tub., 73: 485, 1956
- 2) C.E. Skinner et al Henrici's Molds, Yeasts, and Actinomycetes 2nd Ed., Wiley & Son, 1957
- 3) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th Ed., 1957
- 4) R. E. Gordon & J.M. Mihm J. Bact., 73: 15, 1957
- 5) R. E. Gordon & J. M. Mihm J. Gen. Microbiol., 20: 129, 1959
- 6) 植田三郎: 結核菌の研究 I, 南江堂, 昭和26年
- 7) D. Erikson J. Gen. Microbiol., 3: 361, 1949
- 8) C. Feistmantel Cbl. Bakt., I. Org., 31: 433 1902
- 9) H. L. Jensen Proc. Linnean Soc. N. S. Wales, 57: 364, 1932
- 10) W. W. Umbreit J. Bact., 38: 73, 1936