

ノカルディアの研究

〔第3報〕 ノカルディアの気菌糸と抗酸性の関係 並に抗煮沸性

(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

ノカルディアの中には気菌糸を容易に生ずるものと生じ難い菌株とがある。 *N. asteroides* に於ては気菌糸を生ずる菌株群を一つの type と認めて、是を gypsoides type と称することもある。しかし本菌の研究に従事して居て気付く事は、菌株によつて気菌糸産生に難易のある事は勿論認められるがそれと同時に培養条件によつても気菌糸の産生に大きい差異のある事である。どの様な培養条件によつて気菌糸が旺盛に産生されるか、又その場合抗酸性と如何なる関係があるかについて系統立つた研究はないので今回はこの研究を行った。

又、ノカルディアを臨床材料中で結核菌と鑑別する場合に抗煮沸性が問題となつてくる。現在迄にノカルディアの抗煮沸性について詳細な研究はないのでこの点についても検討した。

実験材料並に方法

(1) 使用菌株：第1報に於て述べたと大体同じ菌株を用いた。即ち *N. asteroides* 49株, *N. brasiliensis* 12株 (但気菌糸と抗酸性の関係を見る実験では No. 196 No.202を除く10株) *N. madurae* 2株, *N. farcinica*, *N. polychromogenes*, *Proactinomyces restrictus*, *N. blackwellii*, *N. leishmanii*, *N. eppingeri*, *N. alba*, *N. bostroemi*, *N. intracellularis* *N. transvalensis*, *N. pretoriana*, *N. tenuis convoluta* 各1株宛合計75株 (気菌糸と抗酸性の関係を見る実験では73株) である。

(2) 気菌糸の程度：気菌糸の程度を現わすに次の表示法を定めた。

0——気菌糸を認めず。

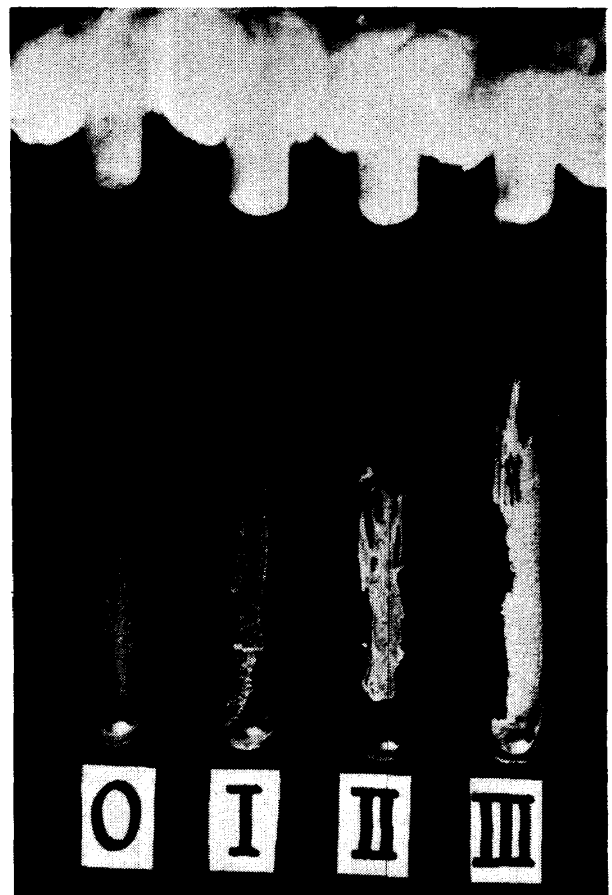
I——集落の周辺にのみ気菌糸を認める。

II——集落の大部分が気菌糸で掩はる。

III——集落全体が旺盛な気菌糸で掩はる。

第1図は気菌糸の程度を示したものである。

(3) 使用培地：気菌糸と抗酸性の関係を検する場合には次の3種の培地を使用した。



第1図 ノカルディア気菌糸産生の程度

(a) Kelner and Morton's media¹⁾. Kelner & Morton が抗菌性放線菌の孢子産生に良好であると称えた培地で次の組成から成る。5g typtone, 10g starch, 3g Difco beef extract, 2g glucose, 1.2g Na₂HPO₄, 0.8g KH₂PO₄, 0.1g FeSO₄·7H₂O, 15g 寒天。以上を1立の potato extract に溶解する。potato extract は 100g の細切した馬鈴薯を1立の水で浸出した上清である。

(b) Czapek 寒天の sucrose を1%乳糖に変えた培地。曾つて上坂²⁾が *N. kuroishi* の cell fragmentation に良好である事を認めた。pH7.0として使用。

(c) 1%グリセリン寒天。pH7.0

全被検菌株は1%グリセリン寒天斜面で継代され、上記3種の培地斜面に植継ぎ 30°C, 4週後にその発育、気菌糸産生の状態を検査した後、各々より塗抹標本を作成し、Ziehl-Neelsen 染色を行つて抗酸性の程度を検した。

(4) 抗酸性の程度：第1報³⁾で述べた如く全視野中に於ける抗酸菌体の数の全菌体に対する比からその程度を0, 1, 2, 3, 4, 5の5段階に分けた。

(5) 抗煮沸性の検査：Bennett's agar 斜面に1ヶ月培養した各菌株から6枚宛の塗抹標本を作り、1枚は Ziehl-Neelsen 染色を施し、他の5枚は石炭酸フクシン加温染色後、10秒、30秒、1分、5分及び10分間煮沸しメチレン青後染色を行つて抗煮沸性を検した。

実験成績

(1) ノカルディアの気菌糸産生と抗酸性

第1表は1%グリセリン寒天, Kelner & Morton 培地及び乳糖 Czapek 寒天斜面に各種ノカルディア73株を4週間培養した時の気菌糸と抗酸性の関係を示したものである。

グリセリン寒天の場合69株発育しその中21株(6+8+7)即30%に気菌糸を認めた。Kelner & Morton 培地では70株発育し31株(6+13+12)即ち44%に気菌糸を認めた。処が Czapek 寒天では52株しか発育しなかつたがその中41株(79%)といふ多数に気菌糸を認めた。

抗酸性を見ると Grade 3 以上の株がグリセリン寒天では69株中41株(9+27+5)で59%, Kelner & Morton 培地では70株中44株(63%)あつたのに対し乳糖 Czapek では52株中僅か16株(31%)に過ぎなかつた。又逆に非抗酸性に

第1表 各種培地に於ける気菌糸と抗酸性の相互関係

1%グリセリン寒天

		抗酸性の Grade						計
		0	1	2	3	4	5	
気菌糸	0	6	8	6	6	18	4	48
	I	0	0	2	1	3	0	6
	II	0	0	2	2	4	0	8
	III	0	0	4	0	2	1	7
計		6	8	14	9	27	5	69

$\gamma = +0.119$ non significant

Kelner & Morton 培地

		抗酸性の Grade						計
		0	1	2	3	4	5	
気菌糸	0	8	3	4	13	9	2	39
	I	3	0	1	1	1	0	6
	II	1	2	1	5	3	1	13
	III	2	0	1	3	5	1	12
計		14	5	7	22	18	4	70

$\gamma = +0.126$ non significant

乳糖 Czapek 寒天

		抗酸性の Grade						計
		0	1	2	3	4	5	
気菌糸	0	5	4	0	1	1	0	11
	I	10	1	5	4	1	0	21
	II	3	1	4	0	2	0	10
	III	0	2	1	2	4	1	10
計		18	8	10	7	8	1	52

$\gamma = +0.449^{**}$ highly significant

留まつた菌株 (Grade 0) から見ると、グリセリン寒天では6株(9%), Kelner & Morton 培地で14株(20%)であつたのに対し乳糖 Czapek 寒天では18株(29%)といふ多数にのぼつた。即ち乳糖 Czapek 寒天は他の2培地に比し発育、抗酸性には不適當であるが、気菌糸の産生には好適と言はれやう。

次に気菌糸産生と抗酸性の相関々係を検して見ると、表に見る如くグリセリン寒天では $\gamma = +0.119$, Kelner & Morton 培地では $\gamma = +$

第2表 ノカルディアの抗煮沸性

菌 種	被検菌 株 数	Kf				
		0.1*	0.3*	1	5	>10
<i>N. asteroides</i>	38	2	13	5	12	6
<i>N. brasiliensis</i>	12	1	7	3	1	0
そ の 他	5	2	1	1	1	0

* Kf 0.1, 0.3 は各々10秒, 30秒を示す

0.126, 乳糖 Czapek 寒天では $\gamma = +0.449$ であつた。これをt分布で検定するに乳糖 Czapek 寒天のみが highly significant であつた。即ち乳糖 Czapek 寒天を使用すると気菌糸の産生が旺盛な菌株程, 抗酸性も亦強くなる傾向が認められる。

(2) ノカルディアの抗煮沸性

抗煮沸性の検査に当つてはあまりに抗酸性の菌体の少ない材料(Grade1及び Grade 2 の一部)は抗煮沸性検査を行ふ際, たとへ赤染菌が存在しても見落す場合があり得る事を考慮して少く共 Grade 2 以上の抗酸性の標本について集計した。

その結果は第2表に示す様に *N. asteroides* 38株, *N. brasiliensis* 12株, その他のノカルディア5株について検討した。表に示す様に *N. asteroides* で Kf 10 以上を示す株が6株もあつた。これ以上の Kf を検しなかつたが斯様に高い Kf 値は雑菌性のミコバクテリウムでは見られない処である。斯様に高い Kf 値を示す菌株は検査時(培養1ヶ月目)に於て短桿菌, 類球状の菌及び重屈折性の顆粒を認める菌よりなり菌糸形はこの時には存在しなかつた。

N. brasiliensis の抗酸性は第1報⁹⁾で述べた様に *N. asteroides* よりもやや強いが抗煮沸性はやや弱い様で多くは1分以内で赤染菌を認められなくなつた。

その他のノカルディアの中, *N. intracellularis* (No.170) は抗酸性甚だ強く総ての菌体が赤染したが Kf は5に留まつた。

考 察

グリセリン寒天や Kelner & Morton 培地は複雑な組成の所謂 complex organic media であ

つて斯様な培地では合成培地よりもノカルディアの発育がよく且抗酸性も強い事は第1報⁹⁾に於て既に述べた処であつて, 今回の実験に於ても再び確認された。

一方気菌糸について見ると所謂 complex organic media よりも乳糖 Czapek 培地の様な poor な培地に於て旺盛に産生される事が分つた。この点から考へると発育に不適当な条件の下で気菌糸の産生が盛んになる様に思はれる。

グリセリン寒天や kelner & Morton 培地で気菌糸と抗酸性の相関を認めることができなかったのは両者に於ては半数以上の菌株が気菌糸を有しない為であつて, 乳糖ツアベック寒天では気菌糸の組分け(0, I, II, III)の何れの群にも大体平等に菌株が分布して居る為, 相関関係が認められたのである。

即ち気菌糸の有無は従来言はれた如くある菌株には常に認められると共に(今回の被検菌株中では Nos. 123, 138, 159, 175, 176, 179, 188, 193, 197, 198, 205, 206 の12株), 培養基の成分によつても著しく変動するものである。

抗煮沸性は周知の如く結核菌とその他の抗酸性の菌とを鑑別する方法として推賞されて居るが, 本実験に見る様に *N. asteroides* では Kf 10 以上の菌株が相当数存在する事が判明したのであるから菌種診断に当つては充分慎重なるを要する。

結 論

各種のノカルディアを用いて気菌糸と抗酸性の関係を検討した。又ノカルディアの抗煮沸性を検討した。

(1) グリセリン寒天, Kelner & Morton 培地の様な complex organic media に於てはノカルディアの発育はよく抗酸性も亦強いが気菌糸の産生は極めて貧弱である。之に反し乳糖 Czapek 培地の様な合成培地では発育よくなく抗酸性も弱い気菌糸の産生は旺盛である。

(2) 何れの培地でも気菌糸を産生する菌株も存在する。

(3) 乳糖加 Czapek 寒天上に於ては気菌糸の

産生と抗酸性の間に相関関係が認められた。即ち気菌糸を旺盛に産生する菌株程、抗酸性も亦強い傾向がある。

(4) *N. asteroides* に於て Bennett's agar 1ヶ月培養後に Kf 10 以上を示す株が6株ある。

引用文献

- 1) A. Kelner & H. E. Morton: J. Bact., 53
695, 1947
- 2) 上坂一郎: J. Antibiotics 5: 75, 1952
- 3) 上坂一郎: 京大結研紀要, 9: 113, 1960.