

## 鳥型結核菌の変異に関する研究

## 第 1 編

## 原株、変異株の生物学的並びに物質代謝の比較研究

岡山大学医学部微生物学教室 (主任: 村上 栄教授)

赤 木 和 彦

〔昭和 32 年 5 月 12 日受稿〕

## 目 次

1. 緒 言
2. 供試菌株の由来と使用培地
3. 実験成績
  - A. 培養性状
  - B. 染色性並びに抗煮沸性
  - C. 各種薬剤に対する抵抗性

- D. catalase の比較
- E. 物質代謝の比較
  - イ. 脱水素酵素反応の比較
  - ロ. 酸素消費量の比較
4. 総括並びに考案
5. 結 論

## 1. 緒 言

結核免疫が感染免疫によるものである限り結核菌の弱毒化は重要な問題である。しかし毒力の低下は如何にして起るものであるか、この問題に関しては、直接毒力の低下を究明する方法と、菌の非抗酸化を第一歩に撰んだものの二つの流れがある。

Fleischman<sup>1)</sup> は不適當な培地に継代を続けると菌の毒力のみならず生活力をも失うが、好適な培地に於ける継代では毒力に変化は起らないと述べている。本格的弱毒化は Calmette, Guerin<sup>2)</sup> が 5% グリセリン加牛胆汁馬鈴薯培地に毒力株を 13 年間継代することにより著明に毒力を低下せしめた BCG 株を人工的に得たことに始まる。但し原株の由来が明確でないため、対応する毒力株との比較研究は不可能である。Steenken<sup>3)</sup> が人型結核菌 H37 Rv 株 (毒力株) より無毒の H37 Ra 株の解離を報告して以来、この両株の使用により比較研究は極めて容易となり Martin<sup>4)</sup>, Asselineau<sup>5)</sup>, Seibert<sup>6)</sup>, Stein and Moore<sup>7)</sup> 等は特に菌体成分の比較分析を報告している。

一方我が国に於ては、弱毒化の第一歩とし

て結核菌の非抗酸化が長谷川一門<sup>8)9)</sup> により報告された。即ち結核菌培地に digitalin, digitonin, comvallamarin, digicorin, rodealin 等を添加することにより、速やかな非抗酸化が可能であり、又該菌はグリセリンを含みぬ普通寒天培地に良好な發育を示し、それをグリセリン加培地に還元することにより病原性も復歸すると述べ、その他培養性状、血清反応を比較検討している。

結核菌の抗酸性脂質と毒力の関係は極めて興味深く、Anderson<sup>10)</sup>, Choucroun<sup>11)</sup>, Bloch<sup>12)</sup>, Lederer<sup>13)</sup> 等により詳細に追究されている。又抗酸性脂質の量は培地中のグリセリンの濃度が高い程増加することを Long and Finer<sup>14)</sup> は染色試験で見ている。Chargaff and Dieryck<sup>15)</sup> は結核菌が脂質を合成するのにグリセリンが用いられることは明らかであると述べている。

今村<sup>16)</sup>等は培地からグリセリンを漸減することにより遂に普通寒天培地に發育し得る変異株を得ている。彼は変異株は毒力が低下し BCG の代用となり得る株のあることを暗示しているが、普通寒天に於ける發育は極めて不良のため、試験はすべてグリセリン加培地

に還元培養してから供試している。著者はかつて人型、牛型の両株を用い、これに rodealin, digitonin 等を作用せしめ長谷川等の試験を追試したが、完全に抗酸性を除去することも、又普通寒天に発育し得る変異菌も得られなかつた。

そこで伝染病研究所より分与された普通寒天に発育不能の鳥型 Avian. A 株を用い、その大量菌を直接普通寒天に移植し、発育の有無にかかわらず10~14日毎に普通寒天に継代することにより約2ケ年にして該培地に発育可能な変異株を得ることが出来た(詳細には次頁に於て述べる)。かかる方法を撰んだ理由は、今村等のグリセリン漸減による不適培地への適応化とは別に Yegian 等<sup>17)</sup>の述べる如く、細菌の突然変異を主眼においたためである。しかし極めて簡易な方法に頼つたため、突然変異を主張することは勿論出来ない。

以下変異株と原株との間に於いて生物学的性状、物質代謝による比較実験を試みた。

## 2. 供試菌株の由来と使用培地

標準株(Avian. A 株) 伝染病研究所より分与を受けた後4%グリセリン加寒天培地に継代しているものを供試した。標準株は20 mg per cc の生理的食塩水浮游液とし、その0.1ccを普通寒天培地に培養せるも全く発育は認められなかつた。

変異株 これは緒言に於て既説した如く、標準株の4%グリセリン加寒天培地に発育せた菌塊を、そのまま大量釣菌し、普通寒天の斜面に十分に塗沫、培養し、以下10~14日毎に発育の有無にかかわらず継代した。

普通寒天初代に於ては僅かに発育を認めたが、これは菌体内保存栄養物質の効果によるものと思われる。以後発育は全く見られなくなり、4代目頃より菌の膨化、Ziehl-Neelsen 氏染色による染色力の低下、崩壊像が次第に増加して来る。この時期より継代毎に加熱死菌を同時に添加した処、約1年6ヶ月の継代で培地表面に発育像が認められるに至つた。

この現象は残存菌が多く菌崩壊物質を栄

養源となし得ることが可能になつたためと思われるが、実験的根拠に立つものではない。以後6ヶ月にして一定の、殆んど安定した発育を見るに至つたので供試した。

使用培地：グリセリン加寒天培地並びに普通寒天培地の組成は下記の通りである。グリセリン加ブイオン培地と普通ブイオン培地は前寒天培地のそれぞれより、寒天を除いたものである。

4%グリセリン加寒天培地の組成・グリセリン40cc, ペプトン10g, 食塩4g, 肉汁1lの組成であり、NaOHにてpHを7.0に補正したものである。

普通寒天培地の組成・ペプトン10g, 食塩4g, 肉汁1lでpHは前培地同様に補正した。

## 3. 実験成績

### A. 培養性状

普通寒天培地上の変異株の発育を、グリセリン寒天培地上に発育せる標準株と比較すると極めて不良である。しかし変異株をグリセリン寒天培地に還元培養すると初代より発育は旺盛であり標準株との間に著差は見られない。

標準株、変異株の生理的食塩水浮游液1mg per ccの0.1ccを培地に移植し、日を追つて集落の性状、菌形を比較検討して見た。標準、変異、還元の何れの株にても、集落は乾燥、粗造で光沢なきR-型の発育形態を示した。標準株は培養10日目にして判然と集落の形態が認められ、時日の経過と共に著明な発育を示し、15日頃には集落は癒合し全斜面を覆い、以後皺壁、肥厚が著しく色調も淡黄白色まで変化して来るが、変異株に於ては培養10日では僅かに集落の形成が認められるにとどまり、肉眼的には形態は判明しない。以後集落の癒合、あるいは凝固水部に於ける僅かな菌膜の形成は認められるが、皺壁形成には至らず勿論肥厚感は見られない。集落の着色の程度も標準株の如く淡黄白色にまでは至らなかつた。還元株に於ける集落性状は変異株よりもむしろ

る標準株に近い性状を示した。

次に各株に於ける菌の形態を比較すると、標準株では、何れの時期のものも大体桿状形で均一性を示すが、変異株に於ては常に菌形は不定であり、典型的桿状のものよりも膨化したもの、球菌様形態を示すものが多く、極めて多様性に富んでいる。還元株は両株の中

間に位するが変異株の示した傾向に近い感がある。変異株を普通ブイオン培地に発育せしめると、発育は液全面に広がる程度にとどまる。更に普通ブイオン培地に於ける沈澱発育も可能である。但し標準株では普通ブイオン培地の液面は勿論、沈澱発育を認められない(第1表、第2表)。

第1表 標準株と変異株の培養性状の比較

培養日数	標準株 (glycerin-agar)					変異株 (agar)				
	集落性状			菌体性状		集落性状			菌体性状	
	色調	形態	発育度	形態	顆粒	色調	形態	発育度	形態	顆粒
10	灰白	R型	大針頭大	桿状均一	+	無色透明	R型	小針頭大	菌形不定球菌様のもの多し	+
15	灰白なるも所々に白色部を認む	R型	斜面全面を覆い菌膜形成著明	桿状均一	+	灰白	R型	大針頭大	菌形不定球菌様のもの多し	+
20	白色	R型	集落の皺壁著明	桿状均一	+	灰白	R型	集落癒合僅かに認む。菌膜形成僅かに認む	菌形不定球菌様のもの多し	+
25	淡黄白色	R型	肥厚感著明	桿状均一	+	灰白	R型	癒合著明なるも斜面覆はず	菌形不定球菌様のもの多し	+
30	淡黄白色	R型	肥厚感著明	桿状均一菌体内腔胞認むものあり	+	灰白	R型	肥厚感認めず	菌形不定球菌様のもの多し	+

第2表 還元株の培養性状

培養日数	還元株 (glycerin-agar 2代)				
	集落性状			菌体性状	
	色調	形態	発育度	形態	顆粒
10	灰白	R型	大針頭大	桿状形、膨化形入り乱れ菌体内に不染色部認むものあり	+
15	灰白なるも所々に白色部を認む	R型	全斜面を覆い菌膜形成著明	桿状形が多いが、短桿球菌様のものもしばしば認む	+
20	白色	R型	皺壁形成著明	菌形全く不定	+
25	淡黄白色	R型	肥厚感を認む	標準株に比し菌体内の充実感に乏しい	+
30	淡黄白色	R型	肥厚感著明	〃	+

## B. 染色性並びに抗煮沸性

1乃至数個の菌(菌浮液)から培養を開始した場合、標準株は培養15日にして Ziehl-Neelsen 氏染色により赤染し、しかも赤染度は一様であるが、変異株、還元株に於ては methylen blau で青染する菌体も大部認められ、この傾向は特に変異株に強い。又変異株、還元株中膨化した菌体には赤染度の弱いものが非常に多い。

以上の成績は抗煮沸性と重要な関係のあることを想定し、沸騰水中に於ける脱色試験を検討した。染谷<sup>18)</sup>は脱色試験に於て使用する沸騰水の pH が影響することを述べているので同一条件を撰ぶため蒸溜水を NaOH 液にて中性に補正したものを使用した。

各試験株とも培養日数の経過と共に抗酸性は強くなるが、何れの時期に於ても標準株は

変異株に比して、抗煮沸性は著しく高く、例えば培養20日の標準株は15分の煮沸に耐え得るが、変異株は僅か5分の煮沸に抵抗出来なかつた。還元株の抗煮沸性は標準株と変異株のほぼ中間に位している。グリセリンと菌の抗酸性とは深い関係はあるが、非病原性抗酸菌の多くがグリセリンを含まぬ普通寒天培地にもよく発育し、しかも抗酸性を有する如く、変異株も抗酸性を保持している。しかしその程度は標準株に比し遙かに弱い結果を得た(第3表, 第4表)。

第3表 煮沸試験(Kf)による脱色時間の比較

株 別 脱色時間 (分)	標 準 株						変 異 株					
	1'	5'	10'	15'	20'	30'	1'	5'	10'	15'	20'	30'
培養日数												
10	±	±	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-
15	±	±	+	±	-	-	+	±	-	-	-	-
20	±	±	+	+	-	-	+	±	-	-	-	-
25	±	±	±	+	±	-	±	+	±	-	-	-
30	±	±	±	+	±	-	+	+	±	-	-	-

第4表 還元株の抗煮沸試験

株 別 脱色時間 (分)	還 元 株					
	1'	5'	10'	15'	20'	30'
培養日数						
10	+	-	-	-	-	-
15	±	+	-	-	-	-
20	±	+	±	-	-	-
25	±	+	+	±	-	-
30	±	±	+	±	-	-

### C. 各種薬剤に対する抵抗力

結核菌の理化学的抵抗力を検討する場合、抗酸性物質を除外して論ずることは出来ないと思う。Jordan and Burrows<sup>19)</sup>は熱、乾燥、消毒薬品に対し抗酸性菌以外のものよりも一般に抵抗力の強いのは結核菌の有する蠟質によると述べ、Suyenaga<sup>20)</sup>は非抗酸性結核菌が抗酸性を有するものよりも gentianaviolette, methylen blau の殺菌作用に対し弱いことを述べ、Warnery<sup>21)</sup>は古い培養菌ほど H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> に対する抵抗力が強いことを確かめている。

著者は標準株と変異株を用い各種薬剤に対する抵抗力を比較検討した。標準株は10日培養菌を、変異株は発育が不良のため14日培養菌を使用した。供試薬剤に2% carbol, 10% NaOH, 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1% per cc streptomycin の4種である。各薬剤溶液1ccに対し1mg菌浮游液とし、carbolの場合は5, 10, 20分間、NaOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>では10, 30, 60分間、streptomycinでは60, 120, 240, 480分間、37°Cで作用させた後、直ちに氷冷水中に浸し、速かに0°Cにて10000 r. p. m.にて10分間遠心し、上清の作用薬液を除き、これと等量の生理的食塩水を加え、更に10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> mgと生理的食塩水にて稀釈し、その0.1ccを小川氏中性培地に移植し、成績は20日後に発育集落数を算定することにより判定した。

2% carbolは使用した薬剤中最も殺菌力が強力であつた。しかして両株の間に有意の差は明かに認められた。即ち10分間作用せしめると変異株では発育は全く認められなくなつたが、標準株に於ては20分間の作用でも僅かながら生存菌のあることが確かめられた。又 NaOHを用いた場合にも carbolの場合と大体に於て同一の傾向を示し有意の差が認められた(第5表)。

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の場合に於ては両株の間に、carbol, NaOHで見られた如き判然たる差は認め難いが僅かながら変異株が抵抗力が弱い様である。又 streptomycinでは殆んど差は認められない。即ち殺菌化学薬剤特に carbol, NaOHでは有意の差が認められるが、抗地物質である streptomycinでは全く差が示されない(第6表)。

### D. catalase の比較

グリセリン寒天、普通寒天にそれぞれ10日培養した標準株並びに変異株につき catalase の存在の有無を定性により検査した結果、両株共反応が陽性であることが確認出来た。なお変異株の前記グリセリンブイヨンに於ける沈澱発育菌に於ても微弱ながら陽性の結果を得た。

第 5 表 carbol, NaOH に対する抵抗性の比較

株 別		標 準 株				変 異 株			
薬 剤	稀釈度(mg)	10-1	10-2	10-3	10-4	10-1	10-2	10-3	10-4
	作用時間(分)								
2% carbol	5	卅	卅	350	40	卅	150	19	—
	10	500	70	3	—	—	—	—	—
	20	3	—	—	—	—	—	—	—
10% NaOH	10	卅	卅	卅	120	85	12	1	—
	30	卅	卅	85	1	6	1	—	—
	60	100	15	2	—	1	—	—	—
control		卅	卅	卅	200	卅	卅	卅	150

註 卅……集落全斜面を被い個立が認められないもの。

卅……集落個立はしているが計算不能のもの。

—……集落を認めないもの。

数字…集落数を示す。

第 6 表 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, streptomycin に対する抵抗性の比較

株 別		標 本 株				変 異 株			
薬 剤	稀釈度(mg)	10-1	10-2	10-3	10-4	10-1	10-2	10-3	10-4
	作用時間(分)								
5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	卅	卅	500	45	卅	卅	200	17
	30	卅	930	150	30	卅	260	45	12
	60	卅	600	90	20	卅	130	14	2
1γ/ml S. M	60	卅	卅	卅	98	卅	卅	700	80
	120	卅	卅	卅	96	卅	卅	卅	75
	240	卅	卅	卅	90	卅	卅	卅	80
	480	卅	卅	300	41	卅	1500	210	30
control		卅	卅	卅	200	卅	卅	卅	230

註. 参照事項は表 5 に準ず。

#### E. 物質代謝の比較

変異株がグリセリンを添加しない普通寒天培地に発育可能であり、しかも抗酸性の著しい低下、薬剤に対する抵抗性の減弱等より考えて、物質代謝に関しても従来と異なるものがあるのではないかと推察し、脱水素酵素反応並びに酸素の消費量の面より比較検討を加えた。

#### イ. 脱水素酵素反応の比較

供試株はグリセリン寒天並びに普通寒天にそれぞれ大量に培養し10日間発育させた標準株と変異株を使用した。

菌浮游液の作製：上記培養菌を遠心沈澱管

に集め、M/10 磷酸緩衝液 (0.85% NaCl 加), pH 7.0 に浮游させ 4000 r. p. m. で 20 分間遠心洗滌し、以後同様の操作を 5 回反復し、最後の沈澱菌を滅菌濾紙上に集め脱水、秤量し、氷冷しながら磨砕フラスコ中にて磨砕、上記緩衝液にて 20 mg per cc の菌浮游液となし供試した。

基質：各種糖、有機酸、アミノ酸で何れも市販の最純品であり、蒸留水にて M/10 溶液とし、pH は 7.0 に 10% NaOH 液にて補正した。

methylenblau：Merk 製品を撰び M/5000 溶液とした。

方法：Thunberg 氏<sup>22)</sup>法に従い，Thunberg 管の主管に前記緩衝液 0.5 cc，基質 0.5 cc，methylenblau 0.25cc，副管に菌浮游液 0.5cc を容れ，氷冷しながら真空ポンプにて水銀柱 3~5 mgHg にて約5分間吸引し，直ちに菌浮游液を主管内に注ぎ込み，その時より 37°C 恒温槽中にて，methylenblau が還元され leuco-methylenblau になるまでに要する時間を測定した。

成績：基質を添加しない場合に於ける Mb の脱色時間は各対照に見られる如く，変異株で確かに短縮されている（第7，8，9表）。

第7表 各種糖類の脱水素反応の比較

基 質	標準株	変異株
	脱色時間	脱色時間
glycerol	41'00"	29'00"
arabinose	41'00"	30'00"
xylose	41'00"	29'30"
rhamnose	41'00"	30'30"
glucose	34'00"	24'00"
mannose	32'30"	25'30"
galactose	31'00"	26'00"
fructose	34'30"	30'00"
sucrose	37'00"	29'30"
trehalose	33'00"	28'30"
maltose	38'00"	29'30"
lactose	40'00"	29'30"
control	47'00"	32'00"

第8表 各種有機酸の脱水素反応の比較

基 質	標準株	変異株
	脱色時間	脱色時間
pyruvate	7'00"	4'30"
lactate	15'09"	13'00"
acetate	37'30"	15'30"
citrate	38'00"	17'00"
succinate	27'00"	19'00"
malate	31'00"	19'30"
eumarate	34'00"	20'00"
tartrate	34'00"	21'00"
oxalate	41'00"	24'00"
n-butyrate	36'00"	17'30"
control	40'00"	28'00"

糖類に於ては，対照より Mb 還元速度を著しく速進すべき基質は見当らず，又標準株，

第9表 各種アミノ酸の脱水素反応の比較

基 質	標準株	変異株
	脱色時間	脱色時間
glycine	40'00"	17'30"
DL- $\alpha$ -alanine	38'00"	15'00"
asparagine	35'00"	20'30"
L-leucine	42'00"	15'30"
glutamate	32'00"	20'40"
L-histidine-HCl	20'00"	15'30"
DL-tryptophan	33'00"	23'00"
L-methionine	35'00"	22'00"
L-arginine-HCl	38'00"	28'00"
DL-valine	25'00"	18'30"
L-proline	27'00"	18'30"
DL-serine	35'00"	22'00"
L-lysine	37'00"	22'30"
control	46'00"	27'30"

変異株の間に有意の差を求めることは出来なかつた（第7表）。

有機酸を基質とした場合は，標準株，変異株とも pyruvate に於て著しく Mb 還元速度が速進され，特に変異株でその傾向は強い。lactate も両株にとり優れた基質であり得るが pyruvate 程還元速度の短縮は著しくない。標準株は pyruvate, lactate を除き他に還元速度を短縮すべき基質は認められないが，変異株に於ては，acetate, citrate, n-butyrate も還元速度短縮した（第8表）。

アミノ酸を基質に撰んだ場合はアミノ酸中，histidine, valine, proline は標準株，変異株共に還元速度を速進し，特に histidine の促進作用は著しい。arginine は両株共に促進作用は認められない。標準株では，alanine, asparagine, leucine は促進が殆んど認められないが，変異株では還元速度が短縮され得る結果が得られた（第9表）。

#### ロ. 酸素消費量の比較

供試株 標準株，変異株の10日培養菌を使用した。

菌浮游液の作製：前記脱水素酵素反応に於けると全く同一の作製法に従つたが，洗滌並びに最後の菌浮游液作製に用いた緩衝液は，M/50 磷酸緩衝液 pH 7.0 (0.85% NaCl 加)

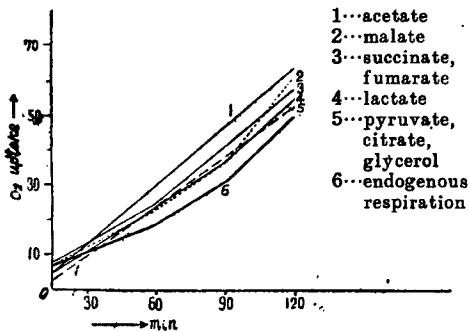
とした。なお菌浮游液濃度は 15 mg per cc とした。

基質 glycerol 並びに TCA, cycle に直接関与する有機酸を撰び蒸留水にて M/10 液となし, NaOH 液にて pH 7.0 に補正した。

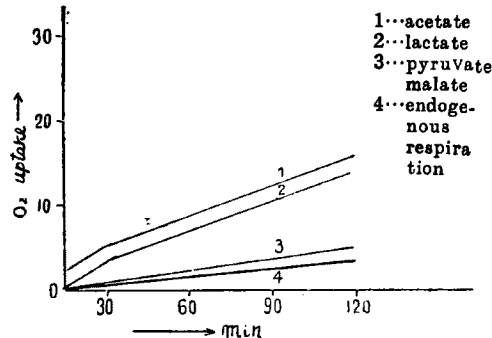
方法・Warburg 法に従い, 主室には M/50 磷酸緩衝液 pH 7.0 を 0.7cc, 菌浮游液 2.0cc, 副室は 20% KOH 液 0.5cc, 側室に基質 0.3cc を容れ 37.5°C で 15, 30, 60, 90, 120 分と酸素消費量を測定した。

成績：標準株と変異株の比較に於て, 基質相互間には有意の差は認められない。しかし変異株に於ては endogenous respiration が極めて低いが, 標準株に於ては著しく高く, 強度の休止菌とされざる限り, 基質による有効酸素消費量はうかがえない。pyruvate を基質とした場合の酸素消費が両株ともに高くないので測定後 pyruvate, lactate, glycerol を基質とせるものにつき pyruvate の定性を試みた結果, 基質, pyruvate に於ては, これが相当量利用されていることが認められた。

第 1 図 標準株の O<sub>2</sub> 消費に対する基質の影響



第 2 図 変異株の O<sub>2</sub> 消費に対する基質の影響



又 lactate を基質とせる場合に於ても Pyruvate が合成されていたが, glycerol の場合には痕跡程度であつた。acetate は両株共に酸素消費が高い結果を得た (第 1 図, 第 2 図)。

#### 4. 総括及び考案

今村<sup>16)</sup>等は培地中のグリセリン濃度を漸次減少することにより, 普通寒天に発育可能な変異株を得ることに成功している。しかし発育極めて不良のため, 一度グリセリン培地に還元培養したものを実験に使用している。人型, 牛型結核菌は分裂速度が弛かて発育に長期間を要するため, 著者は比較的発育の速かな鳥型結核菌 Avian. A 株を撰び今村とは異つた方法で変異菌を得た。即ち普通寒天培地に発育不能の Avian. A 株を大量, 直接普通寒天に移植し, 発育の有無にかかわらず継代し約 2 年にして発育し得る変異株を得た。変異株は諸実験に当り, グリセリン培地に還元培養の要なき程度に発育可能である。グリセリン培地に於ける標準株の発育は極めて旺盛で集落は肥厚感を持つが, 普通寒天上の変異株には肥厚感は全く認められない。しかし集落形態は両株ともに R 型であつた。又変異株の菌形は極めて不均一で膨化現象が起り, 又球菌様の変形したものが多数認められた。抗酸性の比較では変異株に著しい低下が見られた。

即ち抗酸性は発育日数と共に強化し, 標準株は 20 日培養以上になると 15 分間の煮沸にも耐えられるが, 変異株は何れの培養期間のものも 5 分間以上の煮沸には耐えられなかつた。しかし以上の変異株の諸性状はグリセリン培地に還元することにより, 次第に標準株に近い性状に逆変化を起して来る。

以上のことから結核菌とグリセリンは密接な関係のあることは確かであるが, 変異菌が普通寒天に発育しうる事実は, 山村<sup>23)</sup>の述べている如く, 結核菌は適応により C 源をよく利用し得る。このことが著者の場合にも適用出来ると思う。

化学薬品に対する抵抗性に於ても, これが

殺菌薬剤である場合には変異株は著しく抵抗性が弱い、抗生物質である場合 (streptomycin) には、標準株との間に著差は認められなかつた。結核菌の理化学的環境に対する抵抗性には、抗酸性が強く影響することを多くの研究者が述べているが、抗酸性脂質を含めた細胞膜の透過性が薬剤の種類により異なることも加味すべきであると思う。

次に脱水素酵素反応の比較に於て、無基質での Mb の還元速度は常に変異株が速かである。又糖類を基質とした場合は両株の間に有意の差は認められない。有機酸中 pyruvate, lactate は両株共に還元速度は対照より促進されるが、標準株はそれ以外には有効な基質は見られない。然るに変異株では acetate, citrate, n-butyrate も促進作用が認められた。アミノ酸中 histidine は両株共に還元速度が速進された。しかし alanine, asparagine, leucine は標準株では促進作用は殆んど認められないが、変異株では認められた。

酸素消費量の比較検討に於て基質添加による酸素消費量の差は殆んど判明し難いが、変異株に於ては endogenous respiration が低いにかかわらず標準株に於ては著しく高い結果を得た。物質代謝と変異との関係を明らかにするには一層詳細な試験を要することは勿論であるが、抗酸性の弱い変異菌が脱水素能力

が強い結果を得たことは、Bloch<sup>12)</sup> が病原性の弱い結核菌或は非病原性抗酸菌は脱水素能力が強いことを述べているが、このことをうらざけるものと思う。

## 5. 結 論

1. 普通寒天に發育不能の鳥型 Avian. A 株を直接普通寒天に移植、継代することにより、これに發育し得る変異株を得た。
2. 普通寒天上に於ける変異株の發育は、グリセリン培地の標準株に比較して不良である。
3. 変異株の菌形は極めて不均一性であり、特に球菌様のものを多数認めた。
4. 変異株は抗酸性が著しく低下している。
5. 殺菌性薬剤特に carbol, NaOH に対して変異株の抵抗性は著しく低下しているが、抗性物質に対しては、両株の間に著差を認めなかつた。
6. 脱水素酵素反応に於て、無基質での Mb 還元速度は変異株が常に速かであり、酸素消費量の比較では変異株の endogenous respiration は標準株よりも遙かに低い。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師村上教授に深甚の謝意を表すると共に、実験に終始御援助を下さつた微生物学教室岡好万氏に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Fleischman, L.: Zent. bl. f. Tbk-forsch., 1, 53, 1907.
- 2) Calmette, A., Boquet, A. et Negre, L.: Ann. Inst. Pasteur., 35, 561, 1921, 36, 626, 1922.
- 3) Steenken, J. R.: Am. Rev. Tuberc., 62, 22, 1950.
- 4) Martin, G. J.: J. Amer. Chem. Soc., 60, 768, 1938.
- 5) Asselineau, J. et al.: C. R. Ac. Sc., 230, 877, 1950.
- 6) Seibert, F. B. et al.: J. Amer. Chem. Soc., 72, 2678, 1950.
- 7) Stein and Moore: Cold. Spring. Harbor. Symp., 14, 179, 1950.
- 8) 長谷川, 西村: 東京医事新誌, 2911—2936, 1363, 昭和10.
- 9) 竹内他: 結核, 24, 7—8, 222, 1949.
- 10) Anderson, R. J.: J. Biol. Chem., 83, 505, 1929.
- 11) Choucroun, N.: Science., 98, 327, 1943.
- 12) Bloch, H.: Am. Rev. Tuberc., 67, 629, 1953.
- 13) Asselineau, J. and Lederer, E.: Nature., 166, 782, 1950.
- 14) Long, E. R. and Finner, L. L.: Am. Rev. Tuberc., 16, 523, 1927.
- 15) Chargaff, F. and Dieryck.: Bioch. Zeits.,



- 255, 219, 1932.
- 16) 今村他：阪大微生物病研究所年報, 2, 1, 1952.
- 17) Yegian, D., Budd, V., Vanderlinde, R. J.: J. Bact., 58, 257, 1949.
- 18) 染谷：結核, 25, 9—11, 435, 1950.
- 19) Jordan and Burrows.: 細菌学(訳), 2, 346.
- 20) Suyenaga.: Am. Rev. Tuberc., 3, 473, 1919, 4, 526, 1920, 12, 260, 1925.
- 21) Warnery, M.: C. R. Soc. Biol., 111, 575, 1932.
- 22) 岡 日本細菌学会中, 四国支部会, 1955.
- 23) 山村：酵素化学の進歩, 2, 269, 1950.

---

## Studies on the Variation of *Mycobacterium avium*

### I: Comparative studies on the biological and metabolic aspects of the original and variant strains

By

Kazuhiko Akagi

Department of Microbiology, Okayama University Medical School  
(Director: Professor Dr. Sakae Murakami)

A large quantity of avian tubercle bacillus, avian A strain which could not multiply on the plain broth agar media, was trans-inoculated on the plain broth agar media and was successively cultivated on them. By this procedure a variant strain was obtained which could multiply on the plain broth agar media. The author tried the comparative studies on the various natures of the original and variant strains, and obtained the following results:

- 1) The multiplying rate of the variant strain on the plain broth agar media is worse than that of the original strain on the glycerine media.
  - 2) The shape of the variant is full of diversity, and coccoid ones were particularly observed in large numbers.
  - 3) The acid-fastness of the variant strain is remarkably diminished.
  - 4) The variant strain showed a marked fall of resistance to phenol and caustic soda.
  - 5) In the absence of any substrate, the reduction rate of methylene blue is consistently speedier in the variant strain, while, as for the oxygen consumption, the endogenous respiration of the variant strain is remarkably lower than that of the original strain.
-