

ツベルクリン特にその製法に関する再検討

第3報 結核菌の発育経過と培地組成変化、「ツ」力価の推移との関係

京都大学結核研究所細菌血清学部(主任 植田教授)

白石正雄

(本稿の要旨は第25回日本結核病学会総会に於て演述した)

緒言

著者は第1報¹⁾において「ツ」製法の操作及び力価検定法について、さらに第2報²⁾において呈色反応、皮内反応、致死反応の間の関係について吟味した。けだし結核菌の発育経過と「ツ」産生状況を闡明することは、「ツ」をつくるにあつて最も重要なことと考えられる。結核菌の「ツ」産生量の推移に関しては Boquet et Bretay³⁾ の報告があり、「ツ」産生と培地成分の変化との関係については戸田⁴⁾ 貝原・杉山等⁵⁾ の報告があるがなお不明の点が多い。著者は本実験において菌の発育経過に伴う発育菌重量、単位菌量中の生菌数とその発育力を観察して、「ツ」力価及び培地組成変化の推移との関係を検討した。

実験方法

〔I〕結核菌の液体培養における発育菌重量、単位菌量中の生菌数とその発育力の測定

人型青山B株のソートン培地(pH 6.8) 200 cc(100 cc分注コルベン2個宛)上の発育を追つて、2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13 週における生のままの全菌量をスペーテルにて滅菌濾紙上にとり、37°C に2~3 時間乾燥した後、化学天秤にて秤量した。生菌数は上記菌塊中より 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mg の菌量の食塩水浮游液(0.1 cc)をつくり、上坂友田培地 10 宛宛に流し込んで37°C に培養、1 月後発生した平均集落数を以てしめた。菌の発育力は、上記培地上にて最初に集落を発見した日数を以てしめた(第1表(1), (2), (3), 第1図)。

〔II〕「ツ」力価測定法

上記の青山B株ソートン培養の各培養時期の培養濾液より、70—80°C の水浴上における蒸発濃縮法にてつくつた「ツ」の 10, 50, 100, 500 倍稀釈液 0.1 cc を結核海狸(フラックフルト株 1 mg 皮下接種後 13 日及び33 日)の背側の一方の皮内に注射、対照として対側の皮内に伝研旧「ツ」の同一稀釈液 0.1 cc を注射して、発赤

24 時間値及び 48 時間値(硬結又は浮腫と共に)を測定した。致死反応は感染 35 乃至 38 日後の結核海狸を各「ツ」について2乃至3頭宛、各培養時期の「ツ」0.15—0.50 cc(0.05—0.10 cc per 100 g Body-Weight)を皮下注射した。注射後1時間以内にアナヒラクシー死を呈しなかつたことを確かめたるえ、更に24時間以内の致死状況を観察、致死したとき直ちに剖検に付した。しかして内臓(肺、肝、脾、腎、副腎)における結核菌及び接種局所、近接淋巴腺の周囲における出血性変化、腹水の渾濁を確認しえたものを陽性とした。しかし24時間以内に「ツ」皮下注射にて致死しなかつた動物でも、過敏ショック症状が相当著明であつて、致死に近い衰弱状態になつてから回復した場合も同様致死反応陽性とした(第2表(b), [I], [II], 第2図)。

〔III〕培地組成変化の観察法

第2報におけると同様、青山B株ソートン培地培養の経過を追うて、培養濾液あるいは濃縮「ツ」(70—80°C 又は 100°C 蒸発濃縮)の倍数稀釈液 0.5 cc に各呈色反応試薬ニシヒドリン反応、ミロン反応、モーリツシュ反応、ビュレット反応、キサントプロテイン反応、アダムキウイツ反応、坂口反応、硫化鉛反応、ニランデル反応、デアゾ反応) 0.2 cc 宛を加え、反応陽性の最高稀釈倍数を求めて、培地組成の変化を追求した。蛋白沈澱量は各「ツ」の倍数稀釈液 0.5 cc に倍量の 20% 三塩化醋酸を加えて沈澱を生じた最高稀釈倍数をもつてしめた(第3表、第3図)。

〔IV〕蛋白沈澱剤によつてきた結核菌発育培地中の粗蛋白量の推移

上記三塩化醋酸による沈澱反応の強さによつて蛋白量の推移を求める一方、硫酸安門、燐タングステン酸、三塩化醋酸等の蛋白沈澱剤による沈澱を秤量して比較した。すなわち培養濾液 5 cc 宛をまず pH 7.0 に修正し、硫酸安門を完全飽和し、生じた沈澱を遠心、沈澱を 1% 苛性曹達液にて洗滌した後、沈澱全部を硫酸紙上に

のせ室温にて乾燥、秤量した。また同様培養濾液 5cc に 5% 燐タンゲステン酸 (3% の割合に濃硫酸加) を倍量加えて生じた沈澱を遠心し、沈澱を少量の蒸留水にて洗滌し、乾燥し秤量した。更に培養濾液 5cc に 20% 三塩化醋酸を倍量加えて生じた沈澱を遠心し、沈澱を少量のエーテルにて洗滌し、乾燥秤量した (第 4 表、第 4 図)。

実験成績

〔I〕 結核菌の液体培養における発育菌重量、単位菌量

第 1 表 青山 B 株 ソートン 培養経過における発育全菌量、生菌数及び増殖の速さの推移

(1) 発育全菌量の経過

2 週	3 週	4 週	5 週	6 週	7 週	8 週	10 週	13 週
0.9393 ^g	7.0739 ^g	5.9351 ^g	5.6767 ^g	5.4769 ^g	4.2731 ^g	3.6236 ^g	3.6236 ^g	3.4201 ^g
1.6527	3.6023	6.3139	6.1415	6.2361	6.5976	7.7624	7.7100	

(註) 上段の重量は毎週 2 日 孵卵器の停電のあつたときの発育菌重量(平均)、下段のそれは停電の全くなかつたときの発育菌重量

(2) 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶mg 中の生菌数(培地 10 本についての平均集落数)

	2 週	3 週	4 週	5 週	6 週	7 週	8 週	10 週	13 週
10 ⁻⁴ M mgδ	166±6.95 32.7±4.92	315±1.377 64.7±9.71	87±13.66 64.2±14.29	23±3.45 16.23±2.44	5	7	1.3	0	0
10 ⁻⁵ M mgδ	85±5.63 26.5±3.39	253±2.89 15.3±2.29	14±2.99 14.09±2.12	1.8	1	0	0	0	0
10 ⁻⁶ M mgδ	17±1.83 8.59±1.29	1.5	3.5	0.3	0	0	0	0	0

M: 平均値 σ: 標準偏差

(3) 増殖の速さ(集落初発日数)

	2 週	3 週	4 週	5 週	6 週	7 週	8 週	10 週	13 週
10 ⁻⁴ mg	14 日	14 日	16 日	16 日	23 日	19 日	28 日	>30 日	>30 日
10 ⁻⁵ mg	16	14	16	21	30	24	28	>30	>30
10 ⁻⁶ mg	16	22	16	22	30	24	>30	>30	>30

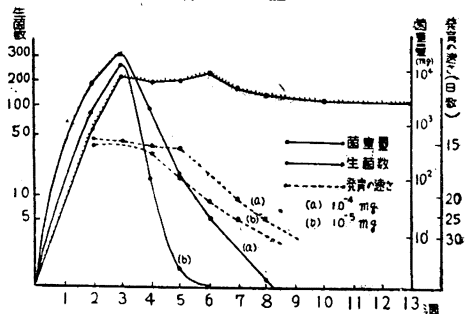
〔II〕 発育過程中的結核菌の形態変化

上記のような菌重量、生菌数の変化にともなつて菌体は形態学的にどのような変化をしめすであろうか。かかる目的をもつてソートン培地培養の青山 B 株菌膜の中央部と辺縁部より小菌塊をとり、卵白グリセリンを塗ったスライド硝子上に貼布し、乾燥固定後、チールネールゼン染色を行つて形態構造を観察した。すでに植田教授の説かれたように⁶⁾、発育初期菌膜の辺縁部に柔軟な繊維状体がくねり、その先端に少数の非抗酸性形を認めた。

中の生菌数とその発育力の推移

第 1 表(1)、(2)、(3)及び第 1 図にしめすように、青山 B 株 ソートン 培地上における発育の初期 2、3 週には菌重量の増加にともなつて生菌量も増加し、3 週にて最高値に達し、以後生菌数は急激に減少した。菌重量は 3 週以後若干減少したが、培地表面に残存した菌膜より薄い菌膜が拡がつて、再び菌量は僅かながら増量した。この増加は 6 週にて頂上に達し、以後 13 週にかけて減少の一路を辿つた。発育力は 4 週までは略々一定していたが、5 週以後急に衰えた。

第 1 図



それより菌膜中央部にかけて平等に赤染した桿菌が連なっていた。発育 4, 5 週より菌体中央または両端に濃赤色の大型顆粒が 1 個または小型のものが 2~3 個あらわれた。7 週以後顆粒構造となり、以後このまま経過した。

〔III〕 結核菌の発育にともなう液体培地組成の変化及び「ツ」力価(皮内反応、致死反応)の推移

第 2 表及び第 2 図にしめすように、青山 B 株ソートン培地 2, 3 週培養液より、70°-80°C 蒸発濃縮法にてつくつた「ツ」には多糖体は相当含まれていたが、蛋白量は極めて微量であった。これらの「ツ」の皮内反応にお

ける力価を、伝研「ツ」のそれを標準(1.0)として、第 2 表及び第 2 図にしめしたが、結核感染 13 日後の海猿皮内反応の 24 時間値は相当強く、48 時間値は微弱であった。感染 38 日後には、かゝる相違は目立なくなつた。また致死反応のあらわれなかつたことは注目に値する。5, 6 週以後の培養液よりつくつた「ツ」では蛋白量は相当増量し、糖質アミノ酸は一定値に達した。このころ培地 pH は 4.4-4.6 に一定し、皮内反応 24 時間値と 48 時間値の間に著しい差はみられなくなつた。致死反応も増強して一定値に達した。

第 2 表(a)青山 B 株ソートン培養における培地組成変化の推移
呈色反応及び蛋白沈澱反応(反応陽性最大稀釈倍数にてしめす)

	培養前	2 週	3 週	4 週	5 週	6 週	7 週	8 週	10 週	13 週	16 週
ニンヒドリン反応	80	80	40	40	20	20	20	20	20	20	40
モーリツシュ反応	0	20	20	40	40	40	40	160	160	160	160
三塩化酸	0	2	16	16	20	20	20	20	20	20	40

(b) 青山 B 株ソートン培養における「ツ」力価の推移

〔I〕 皮内反応(伝研「ツ」の力価を 1.0 とす)

感染経過	反応時間	2 週	3 週	4 週	5 週	6 週	7 週	8 週	10 週	13 週	16 週
13 日	24°	0.73	0.94	1.0	1.1	1.4	1.2	1.2	1.1	1.3	1.3
	48°	0.30	0.48	0.78	1.3	1.0	1.5	1.1	1.0	1.4	1.3
38 日	24°	0.88	0.94	1.0	1.1	1.0	1.1	0.91	1.0	1.1	1.0
	48°	0.60	0.73	0.98	0.94	1.0	1.0	0.97	1.0	0.84	0.97

〔II〕 致死反応

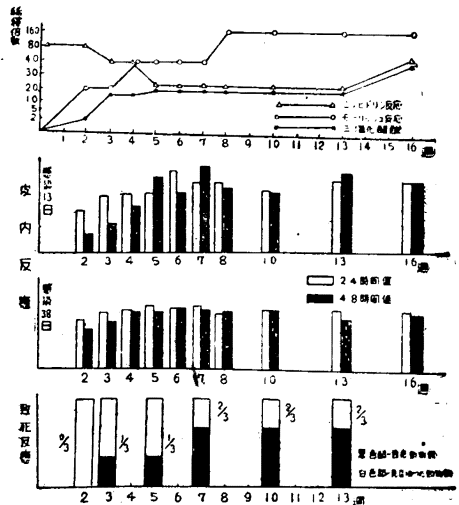
	注 射 量	2 週	3 週	5 週	7 週	10 週	13 週
致死致供試数	0.05cc (体重100g 当り)	0/5	1/5	1/5	2/5	2/5	2/5
	0.1cc (体重100g 当り)	0/5	2/5(1)	2/5(1)	2/5(1)	2/5(1)	2/5(2)

括弧内の数値は致死しなかつたがショック症状によつて致死反応陽性とした動物数をしめす。

〔IV〕 結核菌発育中の培地の呈色反応及び蛋白沈澱反応の推移

前節の成績と多少重複するが、第 3 表及び第 3 図にしめすように、青山 B 株ソートン培地培養の経過を追つて、培養濾液或は濃縮液(70°-80°C または 104°C)の呈色反応及び沈澱反応の推移を観察した。モーリツシュ反応は上記の如く、漸次増強して 3-5 週にて最高値に達した。ニンヒドリン反応は減弱し、途中(3-6 週)一旦 Plateau をつくつて再び減弱した。ミロン反応は 4 週ま

第 2 図



で増強し、4—6週にて最高値となり、6週以後減弱した。爾他の呈色反応ビュレット反応、キサントプロテイン反応、アダムキウィツ反応、ニランデル反応は弱陽性

のまま経過した。坂口反応、硫化鉛反応は陰性であつた。

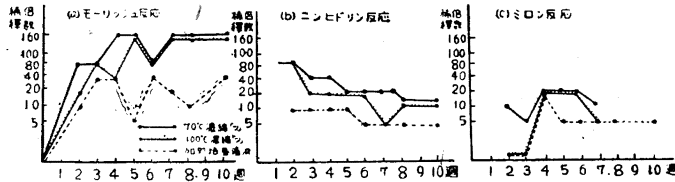
第4表及び第4図にしめすように、硫酸安門及び三塩

第3表 青山B株ソートン培養における呈色反応の推移

呈色反応	供試液	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週	10週
モーリツシュ反応	加熱培養濾液	10	40	40	5	40	20	10	40
	70°C濃縮液	80	80	160	160	80	160	160	160
	100°C濃縮液	20	80	40	160	80	160	160	160
ニンヒドリン反応	加熱培養濾液	10	10	10	10	5	5	5	5
	70°C濃縮液	80	40	40	20	20	20	10	10
	100°C濃縮液	80	20	20	20	20	5	10	10
ミロン反応	加熱培養濾液	0	0	20	5	5	5	5	5
	70°C濃縮液	10	5	20	20	20	10	/	/
	100°C濃縮液	0	0	20	20	20	5	/	/

(註) 数値は反応陽性最高稀釈倍数をしめす。

第3図



化醋酸による沈澱蛋白量は大体並行して2—5週にかけて増量し、5—8週にて大体一定した。燐タングステン酸による沈澱量にてはかかる変動を認めえなかつた。これは燐タングステン酸が第二燐酸加里、枸橼酸鉄安門、アン

モニア等の塩基と化合してできた塩類の沈澱が相当混入したためと考えられる。

(註) 以上の成績は毎週2日宛停電のために孵卵器の温度が動揺した時期にえられたものであつて停電のない

第4表 青山B株ソートン培養濾液における蛋白沈澱剤による粗蛋白量の推移

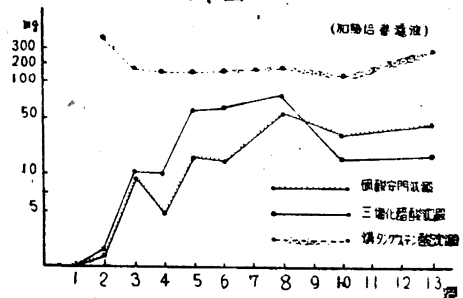
沈澱剤	供試液	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週	10週	13週
硫酸安門	加熱培養濾液	mg 0	mg 9.4	mg 4.5	mg 18.6	mg 16.0	mg 4.1	mg 75.3	mg 42.3	mg 47.6
5% 燐タングステン酸	加熱培養濾液	392.5	176.2	152.7	155.7	153.0	158.3	169.9	120.0	224.3
20%三塩化醋酸	加熱培養濾液	0	9.0	9.1	66.3	68.7	56.2	72.3	19.0	21.2

時期に施行した同じ実験で菌量の減少期はみられなかつた。

考 按

「ツ」は結核菌の増殖時に産生せられるものか、あるいは菌体の自家融解 (Autolysis) と共に外に出されるものかを闡明することは、「ツ」をつくるにあつて最も重要なことと考えられる。Boquet et Bretey³⁾、戸田⁴⁾貝

第4図



原・杉山⁹⁾等の成績から、「ツ」活性は菌の増殖と共に増強し、互に密接な関係にあるらしい。更に「ツ」活性は「ツ」蛋白量とある程度並行関係にあるが、「ツ」蛋白のみではあられされないという。第2表及び第2図、第3表及び第3図とを比較対照するとき、菌重量及び生菌数の旺盛な増加をみる2、3週の増殖期に「ツ」も旺盛に産生されたことは、先人の成績に一致するものである。

菌重量の変化は次の単分子触媒反応曲線⁷⁾ Monomolecular-Autocatalytic Reaction Curve) に大体一致する。

$$Y = \frac{2A}{1+e^{A-x}} \quad \begin{array}{l} X: \text{培養週数} \\ Y: \text{発育菌重量} \end{array} \quad A=6.3139$$

また、生菌数の変化は「(P)函数⁸⁾」 $\left(= \int_0^{\infty} x^{p-1} e^{-x} dx \right)$ をあらわす曲線にてしめされる⁹⁾。

$$Y = AX^a e^{-\frac{X^b}{a}} \quad \begin{array}{l} X: \text{培養週数} \\ Y: \text{生菌数} \end{array}$$

$$A = \frac{35}{9} \quad (10^{-4} \text{mg 曲線})$$

$$\text{又は} \frac{253}{81} \quad (10^{-5} \text{mg 曲線})$$

さらに結核菌の発育力に関しては、最近 G. P. Youmans & A. S. Youmans¹⁰⁾等は G. Hagues¹¹⁾の増殖率 $K = \frac{\log b - \log a}{t}$ (a 瓦の菌が t 時間後に bg に増殖した場合) は一定菌株については一定していると述べた。第1表3)より、青山B株ソートン培地培養4週までは発育力は略々一定していて、Youmans等の所見と一致した。第2表及び第2図の培地組成の変化と皮内反応及び致死反応の力価の推移とを比較対照するとき、皮内反応の24時間値(アルツス型)⁽¹²⁾⁽¹³⁾は糖質と密接に関係し、致死反応との関係は稀薄である。また致死反応は皮内反応の48時間値(ツベルクリン型)と並行し、蛋白体の出現(勿論24時間値とも関係あるか)と密接な関係にある。この結果は第2報の成績とも一致すると考えられる。

結核菌々体の自家融解は菌の発育に伴う形態変化を観察しても認められたのであるが、菌重量は6週より13週にかけて漸次減少し、ニンヒドリン反応及び三塩化醋酸沈澱反応、さらに「ツ」皮内反応力価が13週以後増強した事実等は菌の自家融解の促進に因るのではないかと考えられるが、詳細は後日改めて検討したい。

第3表及び第3図の培養濾液と濃縮液(70°—80°C及び104°C)との呈色反応を比較するとき、濃縮液の濾過の際相当量の蛋白、アミノ酸、糖質が失われることがわかる。しかし第2報に述べた如く、濃縮によつてかえつて「ツ」力価の増強をみるのは濃縮による膠質性の変化

(変性蛋白の出現)が大きな役割を果たしていると考えられる。

要するに菌量、生菌数の増加と共に、培地中に最初糖質が出現し、「ツ」活性はアルツス型反応の増強となつてあられ、蛋白の出現によつてツベルクリン型反応も増強し、最高頂の発育に達すると培地 pH、糖質量、蛋白量、アミノ酸量、「ツ」活性共に略々一定値となる。更に培養がすすんで菌体の自家融解が起るとアミノ酸、蛋白量が増加し「ツ」活性も若干増加するのである¹⁴⁾⁽¹⁵⁾。

結 論

1. 青山B株のソートン培地上における発育において、発育2、3週の頃は生菌数の増加にともなつて菌重量も増加し、最頂期をすぎると生菌数は急激に減少していった。菌重量は6週より13週にかけて漸次減少した。これは菌体の自家融解の促進に因るのではないかと考えられる。

2. 発育最高に達した3、4週の頃、培地 pH は4.4—4.6に達し、以後この値に一定した。モーリツシュ反応は漸次増強し、3—5週にて最高となり、以後一定となつた。ニンヒドリン反応途中 Plateau(3—6週)をつつて減弱し、ミロン反応は一旦最高値をつつて減弱した。

粗蛋白量(硫酸安門沈澱、三塩化醋酸沈澱ともに)は発育初期(2週)には微量であつたが、発育最盛期(3週)に達したのち、一定値に達して経過した。燐タンゲステン酸による沈澱量はかかる変化をしめさなかつた。

3. 「ツ」活性は生菌数及び菌重量の旺盛な増加と共に増強し、発育最盛期には「ツ」力価も大体最高値に達し、以後多少動揺はしめしたが略々一定し、13週以後僅かに増強した。これも培地のアミノ酸、蛋白量の増加と共に自家融解の促進によると考えられる。発育初期の蛋白を殆ど含まない「ツ」には多糖体がかかなり多く、皮内反応は24時間が48時間値より大であつた。致死反応はあられなかつた。菌の発育がすすんで、蛋白の多くなつた「ツ」では逆に皮内反応48時間値が増強し、また致死反応も増強し、皮内反応と同様殆ど一定値のまま推移した。すなわち多糖体は皮内反応24時間値に、また蛋白体は48時間値及び致死反応に密接に関係している。この結果は第2報の成績と一致している。

4. 培養濾液の加熱濃縮濾過の操作によつて相当量の蛋白質、糖質、アミノ酸が失われた。これは第1報の成績と一致した。

撰筆するにあたり植田教授の御指導御校閲を深謝する。

文 献

1) 白石正雄：結核 25:7, 295, 1950. 2) 白石正雄：結核, 25:8, 341, 1950. 3) Boquet, A et Breytey, J.C.R. Soc. Biol., 113:1412—1415, 1933 4) 戸田忠雄：結核菌と BCG, 75, 1948(南山堂) 5) 貝原・杉山：日本臨牀結核, 3:7, 549, 1942, 6) 植田三郎：24 回日本結核病学会特別講演、結核, 24:7, 8, 185, 1949. 7) 八木誠政、小泉清明：函教生物学 106 昭和 4 年(裳華房) 8) 佐藤良一郎：数理統計学, 214 昭和 22 年(培風館) 6) 林桂一：高等函数表、岩波書

店、10) G. P. Youmans & A. S. Youmans; J. Bact., 58:2, 247, 1949. 11) 橋谷義孝：酵母学, 273 昭和 24 年(岩波書店)、12) R. A. Cooke; Allergy in Theory and Practice. p. 25, 1947 (W. B. Saunders Company, Philadelphia, & London) 13) W. T. Vaughan and J. H. Black: Practice of Allergy. p. 26, 1948, 2 Ed (C. B. Mosby Company, Saint Louis) 14) R. Laporte; C. R., Soc. Biol. t. 132, p. 420, 1939. 15) Corper H. J. and Clark C.; Amer. Rev. Tuberc., 54:401, 1946.

肺結核患者の蛋白中間新陳代謝に及ぼす「ビタミン」

C の影響

国立岩国病院(指導 稻田進)

小 川 保 一

1 緒 言

肺結核の治療に関して「ビタミン」C (以後 V.C と略記) が好影響を及ぼすか否かについては夙に多数の学者により考究せられている。たとへば Hesserbach は肺結核の軽重は V.C の欠乏と並行し、西垣、²⁾辻本はそれぞれ患者血清中、脳脊髄液中の V.C 量は肺結核患者においては著明に減少をみると述べ、³⁾藤井は臨床的に、⁴⁾石田は実験的結核について副腎皮質「ホルモン」と V.C の併合療法は肺結核の進展を抑制し、また⁵⁾永山氏は空洞形成に V.C は抑制的效果を及ぼすと述べている。がしかし一方 Burkhard 等は V.C 欠乏と結核の進展とは全く関係がないといつており、また⁶⁾水谷等は蛋白代謝の面から、⁷⁾藤野は尿中「ウロビリ」を測定して肺結核患者に V.C は何等好影響を及ぼさぬと述べている。

かくの如く各諸家によつて異論がある所以は V.C の有する極めて複雑な生化学作用に基くものと思われるが、私もまた肺結核患者の血清沃度酸値、血漿「トリプトファン」量(以下血漿「ト」と略記)、赤血球沈降速度及び尿中「キヌレニン」(以下尿中「キ」と略記)量を測定して蛋白中間代謝の面から V.C の肺結核に及ぼす影響を追及したのでここに報告する。

2 実験方法

実験に供した肺結核患者はすべて国立岩国病院入院患者にて一定「カロリー」の賄いを受け、殊に検査中は可及的に食事摂取を一定ならしめるように注意した。しかし V.C 投与前後における患者血液について血清沃度酸値、血漿「ト」量並びに赤血球沈降速度を、また尿中への「キヌレニン」体排泄量を測定してその増減を追及した。

測定方法としては血清沃度酸値は⁸⁾西垣氏変法を用い、血漿「ト」量は⁹⁾今井氏改良法により赤血球沈降速度は Westergren 氏法に従い、尿中「キ」体の測定は¹⁰⁾古武、川瀬氏法を採用した。

なお採血は早朝空腹時を選び、患者の肘静脈より採血し、血液凝固阻止のため血液 1cc に対して蔞酸カリ 1.5mg の割に加えた。採尿は早朝八時より翌朝八時までの尿をとり実験に用いた。投与した V.C は武田製薬の「ビタミン」C を使用し 1 日量 300mg とし朝夕 2 回五日間連続静脈内に注射した。

3 実験成績

1) 健康人の血清沃度酸値、血漿「ト」量赤沈値及び尿中「キ」量