

明に此のワクチンの感染防禦力を知り得たのであるが、この際の免疫抗原とツベルクリンアレルギーに於ける抗原とが全く同一であるか否かはここで決定し得ないし、又アレルギーと免疫との関係は特に結核症に於ては諸家の意見が一致せず、今ここに論議を繰返す暇はない。Römer (1, 2, 3,) に依るモルモットに於ける動物実験から見ても、結核症に於ける免疫とアレルギーは密に關聯し合つており、例えば Koch の現象にしても、これを免疫とみるかアレルギー反応とみるかは非常に困難であつて、結局目的論的に考えれば、この現象によつて感染防禦された場合には免疫現象となるのであろう。我々の実験に於て、即ち皮下感染という条件のもとに於て、著明なる感染防禦が得られた事は、このワクチンのツベルクリン惹起能力と如何なる關係にあるかは将来更に分析的な研究を必要とするであらう。

IV 綜 括

①流動パラフィン中に浮遊せられたる結核加熱死菌は生食水浮遊のそれに比して、はるかに強いツベルクリンアレルギーをモルモットに与える。

②流バラ死菌ワクチン接種によつてモルモットは感染防禦力を得る。

③以上は乱切又は乱刺接種法によつても可能である。

参 考 文 献

①Römer : Beitr. Klin. Tbk., 11, 79, 1908.

②Römer : Beitr. Klin. Tbk., 13, 1, 1909.

③Römer u. Joseph : Beit. Klin. Tbk., 17, 279, 1910.

流バラ死菌ワクチンに関しては第一報に於ける文献参考。

稿を終るに臨み、御指導と実験の便を計られた柳沢部長室橋主任に深謝す。

結核菌並びに BCG の均等培養に関する研究

第1報 好適培地の検討

広島医科大学細菌学教室(主任占部教授)

松 尾 吉 恭

(この研究は文部省科学研究費によつた。占部)

は し が き

Koch の結核菌発見以来、結核菌並びに BCG の培養に関する研究は多方面にわたり詳細に行われているが、これを液体培地内に均等に培養することはきわめて困難であり、したがつて平等浮游液を作るには一定時間磨砕せねばならず、しかもなお大小にかかわらず菌塊の存在は否定できない現状である。

先人 1), 2), 3), 4) により行われた結核菌並びに BCG の均等培養に関する研究を通覧すると主として、振盪操作を加えること、非抗酸性型をうること及び R 型から S 型へ変異させることに太別され、そのいずれか、またはいくつかを併用することによりこれに成功したという報告は多数に上つている。しかし完全な均等培養を毎常確実に行うことはきわめて困難な事実のように思われる。

私は振盪によりこれをえようと企て、まずその第1階梯としてこのさい用うべき培地を種々検討中、最近に至つてこの方面に新たな知見を加える成績をあげることが

できたと考えるのでここに報告する次第である。

I 予 備 実 験

人型結核菌 Frankfurt 株(以下人 F 株)、牛型結核菌 B15 株及び BCG 株の各 1mg/cc 生塩水平等浮游液 1 滴 (1/4 注射針) を Kirchner 培地に移植して血温に保ち、1 日 2 回ずつとりだし毎分約 200 回、10 分間宛手振り法によつて振盪し、その後は再び血温に還して培養を行つた。

このようにすると振盪開始後 3~4 日頃から培液は濁濁し、静置すると濁濁は幾分減じて管底に雲架状物が堆積してくる。この雲架状物は培養日数がたつにつれて豊富となり、この中にも培液中にも多数の結核菌が証明されるが、その雲架状物の所見は一般に行われる静置培養にみられるような磊塊状の堆積ではなくて繊細な柔かい感じを与えるものである。これを軽く振盪すると培液中に拡散して肉眼的に均等な懸濁液となるのが認められ

る。

このような懸濁液から鈎菌して鏡検すると増殖した結核菌は多数が単孤菌の状態に分散しており、それに混じて大小の菌塊が証明されるが、静置培養にみられるよう

な著しく大きな菌塊は少なく、精々 500 個以上 1,000~2,000 個の菌体よりなる程度のものにすぎない。単孤菌と菌塊との分布状態は第 1 表に示すとおりである。

第 1 表 Kirchner 培地振盪培養菌液中の単孤菌と菌塊との分布状態

処 置	菌 株	単 孤 菌	菌 塊 中 の 菌 数							
			9 以下	10~19	20~29	30~39	40~49	50~100	100~500	500 以上
手 振 り	人 F (8 週)	3,000	239	124	76	32	46	58	45	13
			(37.76%)	(19.59%)	(12.01%)	(5.05%)	(7.29%)	116(18.32%)		
手 振 り	B C G (4 週)	3,000	246	183	62	35	51	32	33	9
			(37.79%)	(28.11%)	(9.52%)	(5.33%)	(7.83%)	74(11.37%)		

註：菌塊は単孤菌 3,000 個をかぞえる間にみとめられたもので()内は全菌塊数に対する該菌塊の頻度を示す

第 2 表 静置、振盪両培養菌の菌長比較(Kirchner 培地)

菌 株	培 養	0.4μ以下	0.5~0.9μ	1.0~1.9μ	2.0~2.9μ	3.0~3.9μ	4.0μ以上	平均菌長
人 F (8 週)	静 置	5%	8%	29%	44%	13%	3%	2.22 μ
	振 盪	6%	7%	32%	42%	11%	2%	1.98 μ
B C G (4 週)	静 置	6%	11%	53%	25%	4%	1%	1.56 μ
	振 盪	11%	15%	46%	22%	4%	2%	1.55 μ

註：各例とも菌体 200 個についての成績

このような結核菌の分布は培液の任意の部位から証明できる。これらの結核菌は第 2 表に示すように形態学的に多形態性を示しはしたが、一般に幾分菌長短縮の傾向がないでもなかつた。抗煮沸性は人 F 株では 12'30"、B C G 株では 1'50" で、対照静置培養のそれは各 13'30"、2'15" であつた。

興味あることには結核菌を移植しない Kirchner 培地に於ても振盪によつて同じように雲架状物が堆積し、培液の濁濁をも軽度ながら招来したのに、血清グリセリン肉汁では結核菌を移植しないさいには、この現象は殆どみられなかつた。この理由は審かでないが培液中の塩類と関係があるのかも知れない。

いずれにせよ以上の予備実験により、更に培液に検討も加え、かつ振盪時間及び振盪方法などにも工夫をこらせば結核菌並びに B C G の均等培養は必ずしも困難ではないと考えられたので以下のような本実験に入つていつた。

II 本 実 験

A. 供 試 菌

鳥型結核菌及び非病原性抗酸菌からは単に振盪するのみで比較的容易かつかなりの程度に均等培養がえられ、ことに S 型菌においては特に著明²⁾、⁴⁾であるのでこれらは研究の対象から故らに除外し、実験には主として人 F 株を用い、附隨的に人型菌 H₂ 株、同青山 B 株、牛型菌 R M 株、同 B 15 株 及び B C G 株をも使用した。

B. 供 試 培 地

1. 血液成分を含有しない培地

a) 3、5、10% グリセリン肉汁、Kirchner 基液、Sauton 培地。

b) 1% 活性炭加 Kirchner 基液、同 Lockemann 変法培地⁵⁾、同 Stauton 培地、同 グリセリン肉汁。

2. 血液成分含有培地

a) 10% 血清加 Kirchner 培地、15% 加熱濾過牛血

清アルブミン加 Kirchner 培地 (以下アルブミン Kirchner 培地)。

(注: 加熱濾過牛血清アルブミンの作り方⁶⁾—血清に 1 N HCL を加えて pH 2.0~2.5 にして 20 分間 65°~70°C に加熱、直ちに冷却後 1/10 N NaOH を加えて pH 6.5 にもどす。このさい生ずる豊富な沈澱は主として変性グロブリンであつて、アルブミンは大部分変化を受けずに液中に残つているので、これを遠心沈澱するか濾過すれば不溶性の蛋白は除かれてアルブミンがえられる。微細なコロイド状を呈して分離困難なさいには pH 5.0 にして加熱した血清にエーテルのような水に不溶性の揮発性溶媒を加えると効果的である。Dubos はこのようにしてえたアルブミンを細菌濾過管で除菌して用いているが、経験上、操作を無菌的に行えばその必要はなく、なお残つているかも知れない有機溶媒を除去する意味で 55°C 30 分 1~2 回加熱すれば十分である。]

b) 10%血清グリセリン肉汁、15%アルブミングリセリン肉汁。

c) 0.2% 寒天、0.5、1.0%ゲラチン、0.5、0.05、0.005%ロデアリン及び 0.5、1.0%サポニン各添加 Kirchner 培地; 0.5、1.0%サポニン加アルブミン Kirchner 培地、同血清グリセリン肉汁、同アルブミングリセリン肉汁。

3. 流動パラフィン添加培地

流動パラフィンを培液 4cc に対して駒込ピペットで 1~2 滴(約 0.04 cc)滴下した血清加 Kirchner 培地及びアルブミン Kirchner 培地。

C. 実験方法

上記の供試各菌株よりの各菌液を前出予備実験の場合

と同様に供試各培地にそれぞれ移植し、管口臘封後体温に保ち、毎日とりだし、室温で毎分 200 回転の電気振盪機に 4~8 時間かけて振盪し、その後は再び体温に選して静置培養した。

D. 実験成績

1. 血液成分を含有しない培地における成績

活性炭を添加した Lockemann 変法培地並びに同 Kirchner 基液では緩徐な発育の観察される場合もあつたが菌の分散状態は十分でなく、かつ炭末のため培液並びに染色標本が汚染されるので好適でなかつた。その他の培地ではいずれも発育が認められなかつた。

2. 血液成分含有培地に於ける成績

血清加 Kirchner 培地及びアルブミン Kirchner 培地では—菌株により、また同一菌株でも培養例により多少の差は認められたが—かなりの程度の拡散状態が観察され肉眼的に均等な濁濁を示した。

アルブミン Kirchner 培地では、Kirchner 培地に比べて振盪、静置両培養とも培養初期第 2 週迄は明かに発育が促進され、非乃至弱抗酸性型菌も 23~36% に出現したが、その後は Kirchner 培地のそれに平行した発育程度を示した抗酸性のある菌となつた。

第 3 表に示すように、両培地内ともに肉眼的には均等な濁濁を示しても顕微鏡的に仔細に観察すると、大多数は単弧菌であるが、その中に小菌塊も必ずしも少なからざる頻度で混在していた。その菌塊は培養日数がたつにつれ、大きいものでは 100~500 個あるいはそれ以上の菌体が集つて、Bloch⁷⁾ のいう特異な紐状(Cord-form)を形成した(図 1)。



図 1
Cord-form



図 2
Cord の分散、円滑化



図 3
流培地振盪培養図

血清グリセリン肉汁、アルブミングリセリン肉汁の場合もほぼ同様(第 3 表)の成績であつたが、後者においては非乃至弱抗酸性型菌が 25~48% という、より高い頻度に出現し、第 4 週以後も毎常視野にこれが認められ而

も形成したコードも柔かい感じであつた。

寒天、ゲラチン各添加 Kirchner 培地では Kirchner 培地に比べて発育がおくれたが菌の拡散状態及び Cord-form は量乃至頻度こそ少ないが Kirchner 培地同様に

第3表 各種培地振盪培養菌液中の単孤菌と菌塊との分布状態

処 置	培 地	菌 株	単孤菌	菌 塊 中 の 菌 数							
				9 ~ 迄	10 ~ 19	20 ~ 29	30 ~ 39	40 ~ 49	50 ~ 100	100 ~ 500	500 >
電	Kirchner	人	3,000	251	117	53	32	69	36	32	7
				(42.05%)	(19.60%)	(8.87%)	(5.36%)	(11.56%)	75 (12.56%)		
氣	15%アルブミン	F	3,000	238	88	43	54	52	33	16	5
	Kirchner			(44.99%)	(16.63%)	(8.13%)	(10.21%)	(9.83%)	54 (10.21%)		
振	10%血清	F	3,000	219	135	72	23	44	29	27	6
	グリセリン肉汁			(39.46%)	(24.32%)	(12.97%)	(4.14%)	(7.95%)	62 (11.16%)		
盪	15%アルブミン	G	3,000	252	122	61	30	56	35	29	7
	グリセリン肉汁			(42.57%)	(20.61%)	(10.30%)	(5.07%)	(9.46%)	71 (11.99%)		
機	0.2%寒天	B	3,000	226	98	93	24	42	43	33	7
	Kirchner			(39.93%)	(17.31%)	(16.43%)	(4.24%)	(7.42%)	83 (14.64%)		
機	0.5%ゲラチン	C	3,000	196	145	28	51	49	64	34	8
	Kirchner			(34.10%)	(25.21%)	(4.87%)	(8.87%)	(8.52%)	106 (18.43%)		
機	0.05%ロデアリン	D	3,000	185	102	80	24	54	47	40	6
	Kirchner			(34.39%)	(18.96%)	(14.87%)	(4.46%)	(10.04%)	93 (17.28%)		
機	0.5%サボン	E	3,000	247	122	57	35	58	42	28	7
	Kirchner			(41.45%)	(20.44%)	(9.57%)	(5.88%)	(9.74%)	77 (12.92%)		
機	流動パラフィン	F	3,000	391	123	51	48	9	4	3	0
	(流 入)			(62.16%)	(19.56%)	(8.11%)	(7.63%)	(1.43%)	7 (1.11%)		
機	Kirchner	G	3,000	323	81	18	5	10	6	0	0
	(流 入)			(76.36%)	(14.42%)	(4.25%)	(1.18%)	(2.37%)	6 (1.42%)		

註：数字は第1表に準ず

観察された。

またロデアリンを添加して竹内³⁾のいのように非抗酸性S型菌を求め、同時に振盪することによつて均等培養をえようと試みたが、非抗酸性型菌は全然出現しないわけではなかつたとしても毎常みられるというにはならず、その頻度も12~27%にすぎず、またこれによる均等培養も遂にえられなかつた。すなわちこのさいの菌の拡散状態は第3表に示すように、かなり大きい菌塊が相当の頻度において混在していた。

サボン添加培地による培養もまた占部¹⁾から先人の報告にもとづいて上記同様の意図の下に行つたのであるが、なるほどこのさい非乃至弱抗酸性型菌は多少なりとも多く出現し(16~48%)、ことに静置培養例では液面に非薄稍湿潤性の菌膜を形成しそこに非抗酸性型菌が多数観察されたが、それも培養日数がたつにつれてチリメン

ジワ様乾燥菌膜となり、完全な非抗酸性化はみられず次第に抗酸性型菌になつた。この振盪培養例でも完全な非抗酸性化はみられず、小菌塊も初めは柔かい感じであつたが次第にコードを形成するに至つた。なお菌の発育はサボン添加1%では多少抑制されたが同0.5%ではKirchner培地と変らなかつたし、単孤菌の分布も第3表に示すように大同小異であつた。しかし濁度はより軽度であつた。

3. 流動パラフィン添加による成績

Bloch⁷⁾によると、結核菌は密接に平行した排列をとりながら発育して特異な紐状(Cord-form)を形成するが(図1)、この現象は有毒株及びBCGに特異であつて、この菌性のコードはパラフィン油や石油エーテルのような炭水化物の中に濡らした菌を入れると容易に分散するという。

そこで試みに Kirchner 培地振盪培養結核菌液(前出) 1 白金耳を載物硝子上にとり、被覆硝子でおおつて鏡下に観察しながらその一端に流動パラフィン(以下流バ)をおいてみたところ、流バは徐々に被覆硝子下に侵入し、小菌塊に近づくときとサツとそのまわりをとりかこみ、次いで掃くように鏡下を通過する。このさい引きだすように菌塊をときほぐして不完全ながら単孤菌の状態を作り出すのがみられる。このことから流バに結核菌の形成コード緩解作用があるのかも知れぬと考えられたので次の実験を行つてみた。

すなわち、人 F 株を 4 週間振盪培養した Kirchner 培液 4 cc に駒込ビペットで流バ 1 滴を加え 4 時間振盪後載物硝子上にその 1 白金耳をとり、拭かないでそのまま染色鏡検した。その結果は単孤菌が全視野に豊富かつほぼ均等に分布し、それに混じてなおコードの形態を残している小菌塊が観察された(図 2)が、これらは従来のような棘状の突起を示さず、辺縁は円滑で個々の菌体も密着せず不規則にならび、全体として柔かい感じを与え、疎な結合状態をとる傾向を明かに示していた。

以上の知見から、5 分径試験管に Kirchner 培液 4cc を入れ、液面をおおつてしまわないように駒込ビペットで流バを 1~2 滴(約 0.04cc) 滴下し、前出同様にして人 F 株、BCG 株各菌液を移植して振盪培養した。

培養 1 週後、結核菌移植の有無にかかわらず培液は白濁して透明性を全く失い、数時間静置しても液面にやや鮮明な白輪を生ずるだけで沈渣はなく、白濁度は依然均等であつた。仔細に観察すると結核菌を移植しないものでは移植管に比べて白濁度が低い、その差は極めて軽微であつて、これによつて菌の増殖の有無を判定することは不可能であつた。鏡検所見は予期したように孤在の状態に増殖した多数の結核菌が証明され、その間に点々と微小菌塊が観察されたが、培養日数がたつにつれて単孤菌はますます豊富になつた。第 3 表に示すように前出の各種培地振盪培養菌の場合に比べて菌塊の混在は驚く程少く、その菌塊も菌数 10~20 個程度迄のものが多く大きいものでもその菌数は 100 個前後にすぎなかつた。

このような菌塊自体は束状の発育を示すものもあるにはあつたが極めて稀で、多くはいわゆるコードを形成せず、図 3 のような柔かい感じのする球状の疎な菌塊としてみられることが特異であつた。

このさいの結核菌の抗酸性は対照のそれと変らず、形態は顆粒状、毛状、彎曲状、球菌状、棍棒状等いわゆる多形態性を示し、かつ長短種々であつたが、一般に短桿状のものが多く、平均 1.5~2.0 μ の菌長をもつようであつた。

培養日数がたつにつれ、また培養を果ねるにつれて単孤菌はより豊富になり、反対に菌塊はその頻度を減じ、かつ小さくなる傾向を示すが、濁濁度については一度白濁すればそれ以後は証明できる程の白濁度の増加はみられなかつたから、これは先にも述べたように菌の増殖のめやすとはならないもののように思われた。

4. 振盪培養による結核菌並びに BCG の発育量

培養例により、また菌株によりあるいは供試培地により結核菌並びに BCG の発育量は多少の動揺を示しはしたが、前出の移植菌量で Kirchner 培液 4cc を用いた場合には、流バ添加の有無にかかわらず振盪培養 4 週で固形培地上発育の該菌よりの大体 1mg/cc 菌液に匹敵する発育量を示すようであつた。このさい対照静置培養管と発育量を比較することは比較的困難であつたが、その菌膜及び菌塊をできるだけ残らず釣菌して同量の平等浮遊液を作つて比較してみると、著しい差はなかつたが振盪培養管では多少発育が劣るようであつた。

む す び

私は結核菌並びに BCG の均等培養をうるために振盪法を援用し、まずそれに用うべき培地を種々検討して大体次のような成績をえた。

- (1) 血液成分を含有しない培地ではいずれも結核菌並びに BCG は発育しないかまたは発育豊富でなかつた。
- (2) 血液成分を含有する培地では添加物の如何にかかわらずかなりの程度の均等培養がえられたが、いずれもいまだ満足すべきものではなかつた。
- (3) 流動パラフィンに結核菌の形成コード緩解作用があると考えられたので、これを Kirchner 培地及びアルブミン Kirchner 培地に添加して振盪培養したところ、極めて容易かつほぼ完全に均等培養をうることに成功した。
- (4) 振盪培養による結核菌並びに BCG の発育量は培養 4 週で固形培地上培養該菌よりの大体 1mg/cc 菌液に匹敵する程度であつた。

〔流バ培地における各型各株振盪培養結核菌の形態学的、生物学的、並びに免疫学的事項について、ことに BCG についてはワクチンとしての価値などについても目下研究中であり、更によりよき均等培養を期して培地及び培養方法の改良についての実験をも引続き行つつもりである。〕

(稿を終るに当り、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師占部教授に深謝する。)

主要文献

- (1) 占部：満洲医学雑誌、25(2)、307—325、昭11。
 (2) 戸田：結核菌とBCG、昭24(南山堂)。
 (3) 竹内：化学療法研究所集報、1(3)、1—7、昭22。
 (4) 占部：福岡医科大学雑誌、29(12)、256—284、昭11。

- (5) 新津：抗酸菌病研究雑誌、5(1)、7—14、昭24。
 (6) R.J. Dubos：Am. Rev. Thec., 61(1)、66—76、1950。
 (7) H. Bloch：J. Exp. Med., 91(2)、197—217、1950。

Vole Bacillus (Wells) に関する研究

第1報 毒力に関する研究

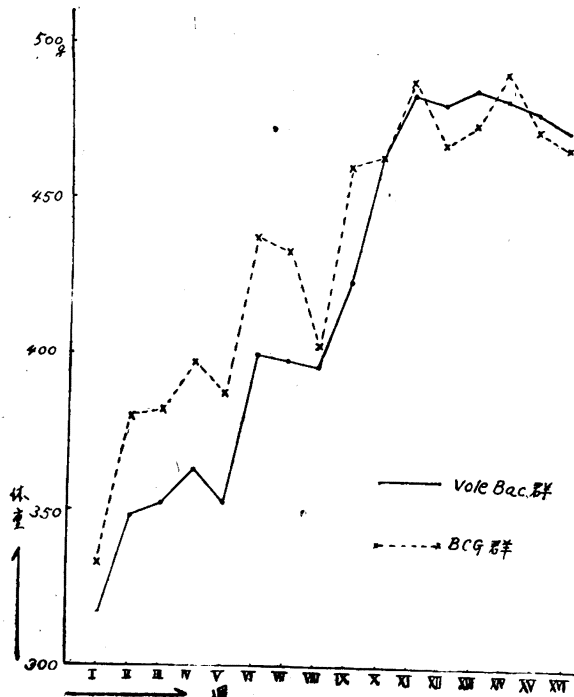
国立予防衛生研究所 結核部(部長 柳沢 謙)

室 橋 豊 穂 関 又 藏
 高 野 袈 娑 男

1 緒 言

1937年 A. Q. Wells によつてイングランドの Field Vole (*Microtus agrestis*) から分離されて以来、温血動物結核菌の1新株としての Vole Bacillus に関する研究は、主としてイギリス及びアメリカにおいて行われ、なかんづく Griffith, Brooke, Grasset, Birkhaug, Corper などにより、形態学的にも免疫学的にも詳細な研究が報告され、加之 Birkhaug や wells などによ

第1図 体重曲線



り、小規模ながら人体に接種を試みた成績さえも既に発表せられているが、わが国においてはこの菌株を入手し得なかつたために、これに関する研究は従来少しも行われていない。幸いにして昭和24年8月Dr. Aronsonの好意により柳沢博士宛分与をうけた菌株を用いて毒力に関する動物実験を行い、いささか成績を得たので報告しようと思う。

2 実験方法

分与された菌株をまず鶏卵培地(岡、片倉及び小川)に移植したが、初め発育速度はきわめて遅く、6週後において漸く集落の増加を認める程度であつたが、移植を重ねるに従い、3週頃から集落の増殖を認め得るようになった。鶏卵培地上の集落は白色で小さく、硬く、表面は粗で、長期間保存して大きくなつた集落は、その中央に特徴ある陥凹を形成する(培養については稿を改めて報告する)。

移植は鶏卵培地より更に通常の馬鈴薯培地や各種の液体培地へも試みたが、当初はそのいずれにも発育があまり思わしくなかつた。したがつて本実験を行うに当つては、鶏卵培地上の集落を掻き取り、吸湿秤量して所要濃度の菌液を調製することとした。

使用した Vole Bacillus は、岡、片倉培地35日培養のもの、BCG は牛胆汁加グリセリン馬鈴薯培地からグリセリン水馬鈴薯培地を経て Sauton 2代の10日培養のもので、共に手振法により2mg/ccの菌液に調製した。

体重300~350gの雄性モルモット30頭に予め