

結核菌並びに BCG の均等培養に関する研究

第2報 流動パラフィン加血清 Kirchner 液による 振盪培養菌の性状並びに均等度について

広島医科大学細菌学教室 (主任 占部教授)

松 尾 吉 恭

(昭和 26 年 7 月 29 日受付)

(この研究は文部省科学研究費によつた。占部)

先に報告したように私は 10% 血清加 Kirchner 液に微量の流動パラフィン(以下流パ)を添加した。私の所謂流パ加 Kirchner 液による振盪培養の結果、結核菌並びに BCG を該培養内に容易且つほぼ完全に均等發育させることに成功したが、今回はこの流パ加 Kirchner 液による振盪培養(以下流パ加 Kirchner 振培)結核菌並びに同 BCG の諸性状並びに均等度についてえた知見を報告する。

実験材料並びに方法

1. 供試菌液：卵培地上 3～4 週間培養の人型結核菌 Frankfurt 株(以下人 F)並びに同 BCG よりの生塩水による 30 分間手摺り平等浮游菌液
2. 供試培養液：5 分徑試験管に 4cc 容れた 10% 血清加 Kirchner 液に流パを駒込ビペットで 1 滴々下した私の所謂流パ加 Kirchner 液並びに对照として通常の 10% 血清加 Kirchner 液
3. 実験方法：供試菌液をそれぞれ 1/4 注射針で 1 滴ずつ供試培養液に移植後 37°C に培養し、毎日とりだし室温で 4～8 時間、毎分約 200 往復の電気水平振盪機にかけて振盪し、その後再び 37°C に静置培養することを繰返すこと BCG では 4 週、人 F では 8 週間に及んだ。对照培養にも同種各菌液を同量ずつ移植し同じ条件で振盪培養した(对照 I)ほかに、その 37°C における静置培養(对照 II)をも行つた。

実験成績

1. 流パ加 Kirchner 振培菌の菌長

成績は一括して表 1 に掲げた。

表 1 に示すように、人 F 並びに BCG のいずれもが振盪例においては静置例に比して菌長が多少なりとも短縮し、ことに流パ加例ではこの傾向がより大きいようであった。この点については抗酸菌の發育形式の変化ということがその 1 因としてとりあげられるのではなからうか。すなわち振盪という機械的刺戟と流パによる菌体の被包乃至は流パ自体の菌体に及ぼす未知の物理化学的要因と

第 1 表 流パ加 Kirchner 振培菌の菌長

菌種	菌長	0.4	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
人 F	流パ加 Kirchner 振培	6.0%	7.5%	22.5%	41.0%	11.5%	1.93		
	对照 I Kirchner 振培	6.0%	6.5%	33.5%	40.5%	12.0%	1.97		
	对照 II Kirchner 静培	5.5%	7.0%	29.0%	42.5%	12.5%	2.24		
	流パ加 Kirchner 振培	12.5%	14.0%	39.0%	27.5%	5.5%	1.53		
BCG	流パ加 Kirchner 振培	9.5%	16.0%	47.5%	21.5%	4.0%	1.55		
	对照 I Kirchner 振培	6.5%	12.0%	50.5%	26.5%	3.5%	1.58		
	对照 II Kirchner 静培								
	流パ加 Kirchner 振培								

註：各例とも菌体 200 個についての成績

が相俟つて、抗酸菌の發育形式の一環をなす伸延乃至分枝増殖による發育が行われにくくなるか、あるいは行われているとしても菌がなお幼若なうちに直に分裂するような状況下におかれる為に主として分裂増殖形式をとる場合が多くなり、従つて菌長が短縮するような結果を招来するのではないと思われる。

なお第 1 報で既に述べたように、流パ添加により結核菌の cord は緩解されて単孤菌の状態に分散し易くなるし、又たとえ菌塊として發育する場合にでも菌相互の排列は従来の菌塊に比して遂に疎になるものであるが、この原因が Bloch 2) のいう結核菌の cord-form 形成を司る cord-factor なるものの、流パによる障碍にあるものかどうかはとも角として、主として分枝並びに伸延増殖形式に基くと見受けられる cord 形成が流パによつて阻止乃至減殺される為に分裂増殖形式をとり易くなり、従つて菌長が短くなつたのではないかとも思われるが、以上の諸点に関しては今後の検討を俟たなければなお確言は許されない。

2. 流パ加 Kirchner 振培菌の Much 顆粒数

顆粒染色は Fontés の法によりその成績は表 2 に示した。

周知のように抗酸菌々体内顆粒の本態乃至意義については現在なお明らかでない(5～7)，表 2 の結果から判るように人 F、BCG 共に平均顆粒数は僅かずつの差ながら、流パ加 Kirchner 振培例 < Kirchner 振培例 < Kirchner 静培例の順となり、殊に BCG においては 3

第2表 流バ振 Kirchner 振培菌 Much 顆粒数

菌種	培養液	0	1	2	3	4	5	6	平均数
人F (8週)	流バ加 Kirchner 振培	15%	23.5%	40.5%	27.5%	5.0%	15%	0.5%	2.11
	対照 Kirchner 振培	20.	22.5.	38.0.	30.5.	45.	15.	10.	2.23
	流バ加 Kirchner 静培	15.	19.5.	37.5.	31.5.	20.	15.	15.	2.30
BCG (4週)	流バ加 Kirchner 振培	90.	45.5.	29.5.	12.5.	2.5.	1.0.	0.	1.57
	対照 Kirchner 振培	5.5.	40.5.	34.0.	16.5.	2.5.	0.5.	0.5.	1.80
	流バ加 Kirchner 静培	40.	19.5.	46.0.	22.0.	7.5.	0.5.	0.5.	2.09

註：各例とも菌体 200 コについての成績

培養例間にみられる顆粒数の差は人Fの場合に比してより顕著であつた。なお、無顆粒菌についてはBCGの場合、人Fに比してその頻度が一般に高く、殊に流バ加例では対照のほぼ2倍に当る頻度を示した。

近く第3報として報告する予定であるが、私は既に流バ加 Kirchner 振培菌液では同種静置培養よりの手摺り菌液に比して、菌の生存期間がより延長する事実を確めており、このことと上述の流バ加例における無顆粒菌の増加並びに顆粒数の減少という所見との間には一脈の関連性があるようにも考えられ興味ある所である。

3. 流バ加 Kirchner 振培菌の抗煮沸性

抗煮沸性検査は占部教授⁸⁾の術式に倣い、その結果は表3にまとめた。

第3表 流バ加 Kirchner 振培菌の抗煮沸性

菌種	培養液	人F (8週)						BCG (4週)					
		1'30"	1'45"	2'00"	2'15"	2'30"	2'45"	1'30"	1'45"	2'00"	2'15"	2'30"	2'45"
人F (8週)	流バ加 Kirchner 振培	+	±	±	±	±	-	+	±	±	±	±	-
	対照 Kirchner 振培	+	±	±	±	±	-	+	±	±	±	±	-
	流バ加 Kirchner 静培	+	±	±	±	-	-	+	±	±	±	±	-

註：記号は脱色の程度を示し、-：完全脱色、±：赤色調のみとめにくいもの、+：なお赤色調を呈するもの

表3で判るように人F、BCGのいずれにあつても、流バ加 Kirchner 振培例の抗煮沸性は対照のそれに較べて殆んどいふべき差は見出されなかつた。従つて振盪の如何、流バの有無は抗酸菌の抗煮沸性にさして影響を及ぼさないといつてよからう。

4. 流バ加 Kirchner 振培菌液の均等度

既に一部報告¹⁾したように、本培養法による結核菌並びにBCGの均等度は、なお充分完全とはいえないまでも—Dubos^{9)~12)}の培液にしてなお1,000~2,000コの菌体よりなる菌塊が認められる事実に徴するとき—かなりすぐれた均等度をもつことは明らかであつて、菌塊数は著しく少く、大きいものでもせいぜい100コ前後の菌体からなる程度の、しかも辺縁が円滑で菌の排列も極めて整然と球状の菌塊として認められるにすぎなかつた。

さて、流バ加 Kirchner 振培菌液を生塩水で10~100倍に稀釈し、その任意の部位から白金耳で釣菌して載物

硝子上におき、拭げずそのまま Ziehl-Neelsen 染色を施した標本及び卵培地上培養の同一菌株よりの手摺り1 mg/cc 菌液の同様の稀釈液から同じようにして作った標本の、それぞれ任意の視野を鏡検した結果表4のような所見がえられた。

第4表 流バ加 Kirchner 振培菌液の均等度

菌種	培養液	菌液濃度	菌塊中の菌数							
			925	10~192	20~292	30~392	40~492	50~1002	1002以上	
人F (8週)	流バ加 Kirchner 振培	2,000	296	83	34	32	6	5	2	162
	対照 手摺り 30分	2,000	225	172	94	36	21	5	4	352
	対照 手摺り 60分	2,000	216	181	82	23	14	4	2	306
BCG (4週)	流バ加 Kirchner 振培	2,000	214	42	12	4	6	3	1	68
	対照 手摺り 30分	2,000	288	64	16	8	6	4	1	99

註：菌塊数は単弧菌 2,000 コを数えるさいに見つかる数を以て示す

すなわち、任意の視野における単弧菌 2,000 コを数えるさいに同じ視野に混在する菌塊の数を、それを構成する菌数によつて表4の如く大別してみると、人F、BCG共にそれぞれの手摺り菌液に優るとも劣らぬ秀れた均等度をもつものであることが判つた。

従来結核菌液、殊にBCGワクチンの均等度に関しては10コ以内の菌体よりなる菌塊の混在は不可避のものとされており、従つてこのさい問題とされるのは10コ以上の菌体よりなる菌塊の混在程度であつて、この点よりすれば流バ加 Kirchner 振培BCG液は確に手摺りBCG液に優るものといつてよからう。しかも従来の方法によるワクチンではその作成手技上相当数の死菌の混在は免れえない所であり、均等度を良好にする為に操作時間を長くすれば死菌もまたそれに従つて増加し、生菌ワクチンとしての意義がそれだけ減殺されるということを考慮に入れるならば、流バ加 Kirchner 振培ワクチンはたとえ現在の段階ではやはり小菌塊の多少の混在は不可避であるにしても、このような人為的な死菌の混在はその作成過程よりしてより少ないものと考えられるから、この点からしても優れた特性を有するものと思われる。

5. 流バ加 Kirchner 振培 BCG 液の均等度及び菌発育量と移植菌量との関係

1 mg/cc の生塩水平等浮游手摺り BCG 液を1/10注射針で1滴から4滴迄各別に流バ加 Kirchner 液 400 ずつに移植した後前出同様振盪培養し、そのさいの菌の発育程度と均等度とを相互に、並びに移植に用いた手摺り菌液(対照)のそれと前出同様の検査術式によつて比較した。

第5表 流バ加 Kirohner 振培 BCG 液の均等度及び菌発育量と移植菌量との関係

菌液	単菌菌数	菌塊中の菌数								菌塊数/単菌菌数
		9.5以下	10~19.5	20~29.5	30~39.5	40~49.5	50~59.5	60~69.5	70以上	
1滴	8739	429	162	36	7	6	7	3		3.28%
			221							
2 "	10023	579	230	56	19	13	9	4		3.30%
			331							
3 "	12893	1038	391	140	67	29	22	7		5.09%
			656							
4 "	14937	1318	453	167	102	45	27	10		5.26%
			786							
1mg/cc 手摺菌液 (注)	7225	912	213	52	33	17	17	3		4.63%
			335							

註：菌数は手摺り 1mg/cc BCG 液の流バ加 Kirohner 液への移植量，菌数並びに菌塊数は $1/10$ 稀釈液塗抹 100 視野に見つかる数を示し，%は 10 コ以上の菌体よりなる菌塊数の単菌菌数に対する比率を示す

その所見は表5に一括して示したように，培養例により多少のずれは認められたが，菌液1及び2滴移植の場合には単菌菌数並びに菌塊の分布度は表4に示した結果とはほぼ同様で，その発育菌量からみれば 1mg/cc の手摺り菌液に匹敵し，その均等度においてはそれに優る成績を示すのみならず，10コ以上の菌体よりなる菌塊総数の単菌菌数に対する比率はそれぞれ 3.28, 3.30% で対照の 4.63% に較べてかなり低率であつたから，この点からしても均等度のより優れていることが窺われる。

しかるに菌液3及び4滴移植例では，なる程全体としての発育量は増加したが菌塊数もまたそれ以上に著しく増加し，単菌菌数に対するその比率はそれぞれ 5.09, 5.26% となり，先の場合に比して対照のそれよりも高率であり，従つて均等度の点では対照のそれにむしろ劣るという結果となつた。

勿論，私がこゝに用いた検査術式はあくまで顕微鏡的のものであるから，これのみによつて凡てを律することは危険を伴うものであることを認めるのに吝かではないが，既報の如く，流バ加 Kirohner 液は振盪によつて培養液が強く白濁する為菌の発育量を肉眼的に検知することは不可能であり，また光電比色計その他の理学的検査も行いえなかつたので，その含有生菌乃至発育菌量を知る為には卵培地への還元培養によるか，又は多数例の検査により不完全な点を可及的に補うよう心掛けつゝ行う鏡検法に俟たねばならなかつた。なお還元培養による発生集落数の計測成績(第3報)によると，流バ加 Kirohner 振培菌液中の生菌数は先の移植菌量を1滴として培養した場合には，1mg/cc の手摺り菌液の調製直後よりのそれとはほぼ同数かもしくはそれよりも多少とも多いことが確められたので，こゝに示した鏡検法に基く成績は，検査手技の点からすればやゝ不完全の憾みはあるにしても，

かなりの程度まで信憑性をもつものといつても過言ではあるまい。

総括的結語

周知のように供試した結核菌並びに BCG は液体培地内に静置培養されると，密接に平行した排列をとりつゝ堅い感じのする紐状の発育を行うものであるが，Middlebrook¹³⁾ らはこのような発育形式を示す菌を一括して cordforming organisms と呼び，この cord-form と抗酸菌の毒力との間には関連性があるのではないかということを示唆した。その後，Bloch²⁾ はかかる cordformation は毒力結核菌並びに BCG に特異なものであつてこれは菌体表面におけるある分泌物により行われるものであらうと推論し，数株の cord 形成菌から石油エーテルもしくは流バ可溶性の物質を抽出し，この抽出物が抗酸菌の cord 形成に重要な役割を演ずるものと考えてこれを cord-factor と称した。

この石油エーテル並びに流バ可溶性の cord-factor なるものが果して抗酸菌の毒力と関係があるか否かという点に関しては暫く措くとして，とにも角にも，流バ加 Kirohner 液による振盪培養結核菌は，その特異な cord-form を失つて培養液内に均等発育し，菌塊を作つて発育する場合にも球状の疎な排列を示すに至つた。この現象が，Bloch のいうように cord-factor が流バに移行した為に cord-form をとりえなくなつた結果として均等発育像を示したものであるか，あるいは単に菌体表面における油水系の表面張力の差によつて菌体が個々に分れ，それに更に振盪という操作が加わつて均等発育が促進されたものであるか，はたまたその他の理由によるものであるかなどという点については輕々に断じえない所であるが，いずれにしても流バ添加による振盪操作で結核菌並びに BCG の発育相に著しい変革がおこり，その形態学的性状に対してもある程度の影響を与えたことは興味ある点である。

いま，以上の成績を要約すると

1) 私の所謂流バ加 Kirohner 液による振盪培養の結果，結核菌並びに BCG は該培養液内に均等発育し，そのさい移植菌量が手摺り 1mg/cc 菌液 1~2 滴で培養期間4週の場合の菌発育量並びに菌液の均等度は，手摺り 1mg/cc 菌液の含菌量並びに均等度に優るとも劣らぬ結果を示したが，移植菌量がそれ以上になると発育菌量は増加するがその均等度は却つておちるようであつた。

2) 流バ加 Kirohner 液による振盪培養結核菌並びに BCG の菌長は培養例により多少の差は認められたが一般にやゝ短縮する傾向があつた。

3) 本培養菌の Much 顆粒数も亦減少し，殊に BCG では無顆粒菌の出現が著しかつた。

本培養によつて結核菌並びに BCG の抗煮沸性は左右

されることはなかつた。

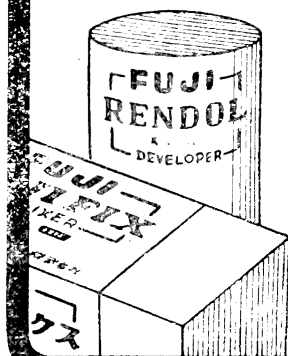
脱稿に当り、御懇篤な御指導並びに御校閲を賜つた恩師占部教授に満腔の謝意を捧げる。

文 献

- 1) 松尾：結核，26，324～329，昭26.
- 2) Bloch, H. : J. Exp. Med., 91, 197～217, 1950.
- 3) Bloch, H. : J. Exp. Med., 92, 507～526, 1950.
- 4) 戸田：結核菌とBCG，南山堂，昭24.
- 5) 占部：福岡医科大学雑誌，29，2983～3007，昭11.
- 6) 中村：東京医事新誌，2936，1713～1719，昭10.
- 7) 笠原・今：抗酸菌病研究雑誌，3，13～15，昭23.
- 8) 占部：福岡医科大学雑誌，29，2902～2918，昭11
- 9) Dubos, R.J. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 58, 361～362, 1945.
- 10) Dubos, R.J. & Davis, R.D. : J Exp. Med., 83, 409～423, 1946.
- 11) Dubos, R.J. & Middlebrook, G. : Am. Rev. Tbc., 56, 334～345, 1947.
- 12) Dubos, R.J., Fenner, F. & Piere, C. : Am. Rev. Tbc., 61, 66～76, 1950.
- 13) Middlebrook, G., Dubos, R.J. & Pierce, C.: J. Exp. Med., 86, 176～183, 1947.

富士X-レイフィルム

“富士X-レイフィルム”は増感紙感度に重点を置いて製造されていますから胸部撮影に最高の性能を発揮します。



“レントール”（富士X-レイフィルム用現像剤）

使用液：2,000 c.c

“フジフイツクス”（富士酸性硬膜定着剤）

使用液：4,000 c.c



富士フィルム