

# 液体培地における結核菌の発育による培地及び菌体の 生化学的变化に関する研究

## 第1報 人型結核菌青山 B 株の Sauton 培地における変化

国立予防衛生研究所結核部(部長 柳沢 謙)

浅見 望・関 又蔵・林 久子・細井正春・土屋皖司

(昭和 26 年 10 月 29 日 受付)

### I 緒 言

液体培地に結核菌を培養した場合の培地及び菌体の生化学的变化を詳細に追究した業績は比較的少ない。Johnson & Renfrew<sup>1),2),3)</sup> は人型菌, 牛型菌, 鳥型菌及びチモシー菌等を Long 培地に培養した場合の培地の変化をやや詳しく調べ, 貝原・杉山<sup>4)</sup> は人型菌 Frankfurt 株を Sauton 変法培地に培養した際の培地変化を報告し, 白石<sup>5)</sup> も人型菌青山 B 株を Sauton 培地に培養した場合の生菌量及び動物による力価等に就て発表した。このように培地組成の変化についてはやや詳しく調べられているが, ツベルクリンの有効成分の出現時期及びその質的相違と培地組成との関係についての報告は甚だ少ない。茲において我々は人型菌青山 B 株を Sauton 培地に培養した場合の培地及び菌体の変化と力価との関係について実験を行つたので, 今日までの成績を報告する。

### II 実験方法

#### 1. 実験材料

- 1) 使用菌株 : 人型菌青山 B 株
- 2) 培地 : Sauton 培地, その処方は一
 

アスパラギン (武田)	4.0g
第二磷酸加里(メルク)	0.5g
クエン酸 (岩井)	2.0g
クエン酸鉄アンモン(国産)	0.05g
硫酸マグネシウム(局法)	0.5g
グリセリン(ライオン油脂)	60cc
蒸溜水を加えて	1,000cc とする。

グリセリンの比重は 1.2 であるので 60cc は 50g となる。従つてこの培地の蒸発残量は 57.05g(5.7%)である。

3) 菌の培養 : 種継ぎ用 Sauton 培地に培養した 2 週培養のうすい菌膜を常法に従つて, 100cc の Sauton 培地に移植し, 37°C で培養した。尚移植にはできるだけ同一の膜を撰ぶようにした。

4) 液体の調製 : 毎週 3 本ずつの試料を殺菌しないて別々に濾過し, 濾液は液量及び pH 測定後 100°C 1 時間殺菌し, 冷後蒸溜水を加えて 100cc とした。この一部に石炭酸を加え, 他部はそのまま保存した。

5) 菌液の調製 : 濾紙上の菌体を常法に従つて濾紙で水分を除き, このうち 100mg を秤量して 500cc 肉厚コルベン (径 7mm 水晶球 70 個入り) に入れ, 手振法によつて 1cc=10mg の菌液を作る。残りで菌量を秤つた。

#### 2. 定量試験法

- 1) pH : 水素イオン濃度試験紙を用いた。
- 2) 蒸発残量 : 各試料 20cc を 100~102°C で恒量になるまで乾してから秤つた量である。
- 3) 菌量 : 初め湿潤量を秤つた後, 100~105°C で 3 時間乾燥して秤量した。
- 4) 結核菌の定量培養 : 上記の菌液を常法により 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> に稀釈したものを 10 本の岡・片倉培地に培養し, 6 週目における集落を数え培地 10 本の合計数を記した。

5) Dehydrogenase : Thunberg の方法を大林<sup>6)</sup>等が BCG 菌について行つた方法を用いた。

#### 3. 力価試験法

##### A. 動物の皮内反応法

- 1) 使用動物 : 現行のツベルクリン稀釈液基準に示された方法によつて感作したモルモット (青山 B 死菌流バラ 6mg) を使用した。
- 2) 試料 : 標準液としては予研標準「ツ」液 (2,000 倍) を用い, 各週別のもは常法の 2,000 倍稀釈に相当する液を用いた。なお 1~3 週のもは 100 倍稀釈相当液をも作つた。

3) 皮内反応術式 : 基準に従つた。

##### B. 人体の皮内反応法

- 1) 対象集団 : 新潟県高柳村の学童を用いた。この学童は数年来「ツ」を左右に, しかも同時に注射し, 陰性者には BCG の接種を実施してきたので, BCG 接種者と非接種者との含まれている集団である。

2) 試料及び皮内反応術式 : 動物の場合と同一試料を用い, 皮内反応は基準に拠つた。

### III 実験成績

Sauton 培地に青山 B 株を培養し 1~15 週までの各週の液体及び菌体の変化は第 1~3 表及び第 1~6 図に

示す如くである。以下各項目毎に検討してみる。

第1表 人型菌青山B株の Sauton 培地における各週の変化

1) pH: 培養前 7.2 の pH が3週までは弱アルカリ性を示し、4週から急に酸性側に変り、6週以降は pH 6.0 以下となつた。

2) 液量: 第2回の如く殆んど一直線に漸減し、15週では 30cc となつた。併し対照液でも 15 週では40cc まで減少した。

3) 蒸発残量: 培養前のこの量は 5.0%(計算値 5.7%) であつたものが、3週では 2.4% となり初めの 1/2 となり、更に減量し 10 週では最も少なく 0.6% となり、以後多少増量した。これは培地中の塩類及びグリセリンの減少と菌の新陳代謝物及び自家融解等の相乗されたものであるが、そのうちでも主なもののはグリセリンである。

4) 菌量: 湿潤量及び乾燥量ともに3週から急に増加し、5~6週が最高を示し、以後漸減し 15 週の乾燥量は最高時の 40% も減少した。これは一方菌の増殖と他方菌の自家融解との変動を示すものであつて、5 週までは菌の増殖が多く、6 週以後は菌の融解が多いことを示している。

5) 結核菌の定量培養: この測定を行つた2週の生菌数が最も多く、3週では稍々減少し、4週からは急に少なくなり、6 週以後は更に少ない。しかし 12 週でも少ないながら生菌は認められたが 15 週では  $10^{-4}$  でも集落はない。

6) Dehydrogenase: 2~6 週は5分以内で同一値を示し、このうち4週が最も多い。7 週以後は急に漸減し 10 週では 30 分以上となる。しかし 15 週では3時間でも靨色しない。この酵素作用と培養による生菌数との関係を見るのに、生菌数は4週から急に少なくなつていながらも拘らず酵素作用は7 週まで比較的多く証明されている。これは酵素作用あるも培地上に発育する力のない弱い菌か又は死滅直後の菌が多い為と考えられる。

7) 定性試験: 糖の反応は弱いながらも6 週から認められ、蛋白の反応中最も鋭敏な Tetra-bromphenolphthalein-ethyl ester Kalium による反応は2 週から証明されるが他の一般反応は4 週から認められた。

8) 力価試験: 動物の場合では1 週の Ratio 0.45 で、次で週が進むに従つて漸次力価を増し、6~7 週で Ratio 1.00 となり殆んど標準液と等力価である。更に力価は増しつゝ 15 週では Ratio 1.30 でかなり強い。然るに人体試験では3 週において既に Ratio 1.00 となり 5~7 週が最も強く、その後は徐々に低下し 15 週では再び4 週に近い力価となつた。また陽性率においても大体 Ratio と同様な傾向を示した。しかし硬結触知数は動物における如く週が進むに従つて漸次多くなつた。更に1~3 週 of 100 倍稀釈液を人体に用いた場合、1 週目において Ratio 1.20、陽性率及びその他の反応も標準液よりも多い。また2~3 週では総べての反応が更に強

週別	液量				菌量				力価 (Ratio)			
	pH	液量 (cc)	湿潤量 (%)	乾燥量 (%)	菌量 (10 <sup>8</sup> )	菌量 (10 <sup>7</sup> )	菌量 (10 <sup>6</sup> )	菌量 (10 <sup>5</sup> )	動物 (2000x)	人体 (40x)	2000x	100x
対照 0	7.2	96.2	5.01	—	—	—	—	—	0	0	0	0
XV	6.6	40.7	5.05	—	—	—	—	—	0	0	0	0
培養 I	1	75	91.8	5.64	0.190	0.035	—	—	0.43	0.50	0.28	1.20
	2	76	89.1	5.34	0.076	0.024	—	—	0.47	0.47	—	—
	3	76	88.9	5.61	0.100	0.028	—	—	—	—	—	—
II	1	77	85.5	4.74	0.264	0.084	170	6-55	0.66	0.61	0.76	1.49
	2	78	85.4	4.58	0.363	0.128	2930	6-33	0.63	0.53	—	—
	3	77	86.0	4.87	0.242	0.082	—	—	0.66	0.56	—	—
III	1	74	75.8	2.54	1.920	0.569	1000	4-21	0.65	0.65	1.05	2.44
	2	78	74.6	—	1.290	0.425	1590	3-08	—	—	—	—
	3	76	77.5	2.15	2.410	0.779	750	3-21	0.74	0.72	—	—
IV	1	6.5	71.0	—	2.213	0.765	100	3-07	—	—	—	—
	2	7.6	74.0	3.14	1.449	0.474	150	2-21	0.78	0.72	1.00	—
	3	6.6	72.4	2.44	2.107	0.706	280	2-05	0.80	0.72	—	—
V	1	6.2	70.5	—	2.511	0.716	140	5-00	0.99	0.89	1.24	—
	2	6.6	71.0	1.77	2.612	0.727	280	4-00	0.86	0.96	—	—
	3	6.4	73.9	—	2.353	0.681	230	4-35	0.97	0.96	—	—
VI	1	5.9	60.0	0.98	2.402	0.652	40	4-51	0.99	0.99	1.13	—
	2	6.2	58.4	1.36	2.574	0.685	20	3-26	0.91	1.03	—	—
	3	6.0	69.2	1.24	2.593	0.681	70	4-16	1.06	1.07	—	—
VII	1	5.9	62.5	0.92	2.377	0.623	80	7-23	1.09	1.12	1.21	—
	2	5.2	61.0	1.33	2.511	0.628	9	—	0.96	1.05	—	—
	3	5.3	59.4	—	2.551	0.620	8	—	1.05	1.03	—	—
VIII	1	5.8	53.0	0.63	2.961	0.656	70	17-18	1.19	1.03	1.17	—
	2	5.6	55.4	0.71	2.759	0.614	50	18-18	1.06	1.12	—	—
	3	6.4	62.5	0.65	2.615	0.581	110	16-11	1.13	1.11	—	—
IX	1	5.8	50.5	0.71	2.037	0.365	30	15-15	1.30	1.17	1.10	—
	2	6.0	58.6	0.67	1.910	0.344	20	13-45	1.05	1.24	—	—
	3	5.8	55.0	0.61	2.239	0.662	4	15-00	1.34	1.26	—	—
X	1	6.2	47.0	0.52	1.812	0.471	—	31-30	1.42	1.49	1.09	—
	2	5.7	51.1	0.84	1.800	0.469	—	36-35	1.16	1.18	—	—
	3	5.7	51.0	0.55	1.725	0.445	—	35-50	1.30	1.29	—	—
XII	1	5.9	48.0	0.66	1.932	0.397	30	32-15	1.40	1.54	1.09	—
	2	5.8	46.6	0.85	1.826	0.452	30	32-32	1.26	1.34	—	—
	3	6.0	48.0	0.59	2.596	0.519	30	23-65	1.33	1.29	—	—
XV	1	5.9	28.8	—	1.395	0.364	0	180分	—	—	—	—
	2	5.6	29.7	1.04	1.250	0.382	0	—	1.34	1.46	1.05	—
	3	5.2	40.5	0.97	1.649	0.476	0	—	1.13	1.18	—	—

第2表 各週別の定性反応試験

週別	糖反応				蛋白反応						
	フェーリング	ベネデクト	ニイランテ	モイリツシ	ミロ	坂	キサントプロテイン	スチグマチン酸	三塩化醋酸	飽和硫酸	T.B.P.
対照 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
培養 I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
IV	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
V	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+
VI	-	+	+	±	±	±	±	±	±	±	+
VII	-	+	+	±	±	±	±	±	±	±	+
VIII	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
IX	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
X	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
XII	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
XV	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±

註: 各週毎に3本の試料中反応の強い方を記載した  
T.B.P. = Tetra-bromphenolphthalein-ethyl ester Kalium

第3表 各週別の人体皮内反応試験(48時間判定)

希釈 倍数	週別	検 査 日	Ratio	T 陽 性	弱		強		二 重 赤 斑 数	水 泡 数
					交 渉 %	交 渉 %	交 渉 %	交 渉 %		
2,000倍	VI	69	0	T	36 0	55 0	6 0	15 0	1 0	0
	I	87	0.28	S T	66 22.8	75 9	10 4	15 2	2 1	0 0
					63 93	52 9	16 10	25 4	0 0	1 0
	II	119	0.76	S T	82 74.4	70 1	18 26	22 0	4 6	0 0
					82 93	70 1	18 10	22 3	4 0	0 0
	III	117	1.05	S T	82 74.4	70 1	18 26	22 0	4 6	0 0
					82 93	70 1	18 10	22 3	4 0	0 0
	IV	95	1.00	S T	91 87	95 8	11 11	12 1	4 4	0 0
					91 87	95 8	11 11	12 6	4 4	0 0
	V	91	1.24	S T	75 79	82 4	14 24	18 7	2 5	1 1
					75 87	82 4	14 24	18 7	2 5	1 1
	VI	90	1.13	S T	67 68	74 4	10 13	14 9	2 4	0 0
					67 68	74 4	10 13	14 9	2 4	0 0
	VII	87	1.21	S T	72 81	80 9	4 4	5 5	1 6	0 0
					72 81	80 9	4 4	5 5	1 6	0 0
VIII	100	1.17	S T	58 72	58 0	8 19	13 8	3 5	1 2	
				58 72	58 0	8 19	13 8	3 5	1 2	
IX	151	1.10	S T	91 107	60 2	16 35	17 6	3 8	0 0	
				91 107	60 2	16 35	17 6	3 8	0 0	
X	105	1.09	S T	41 56	39 0	8 18	19 5	3 11	0 1	
				41 56	39 0	8 18	19 5	3 11	0 1	
XII	142	1.09	S T	126 133	88 8	5 16	29 0	0 0	0 0	
				126 133	88 8	5 16	29 0	0 0	0 0	
XV	131	1.05	S T	122 123	93 1	4 38	25 2	5 5	0 0	
				122 123	93 1	4 38	25 2	5 5	0 0	
100倍	I	117	1.20	S T	81 86	69 2	29 41	35 8	0 4	0 0
					81 86	69 2	29 41	35 8	0 4	0 0
	II	96	1.49	S T	78 75	82 3	20 43	15 3	4 0	0 0
78 75					82 3	20 43	15 3	4 0	0 0	
III	139	2.44	S T	105 137	75 7	26 130	24 9	0 8	0 7	
				105 137	75 7	26 130	24 9	0 8	0 7	

くなっている。このように1週目において弱いながらも「ツ」有効物質の認められたことは興味ある事実である。また動物と人体との力価の相違は「ツ」反応の目安が動物では硬結により、人体では発赤によるためではないか。

IV 総括及び考按

1) 結核菌を液体培地に培養した場合の菌量の変化については Johnson, 貝原及び白石等の実験によつて量の最高に達するのは5~6週であつて、その後は漸次減少してゆき、その菌の減少は自家融解によるといわれている。我々の業績も大体先人のものと一致しており、菌の増殖の最高時はこの実験では5週であつた。この後は自家融解が増殖に優るため菌は漸次減少している。また菌を培養した際初め1~2週間その発育が甚だしく徐々であつて、3週位から急に菌の増殖することは甚だ興味ある事実である。これは初め菌が培地成分を徐々に分解して菌の発育に適する物質が生じた後において、菌は急速に分裂増殖を行うものであろう。故にこの中間分解産物の本態を究明すれば結核菌の発育速度を更に短縮することができるのではないか。

2) 液体培地に結核菌を培養した際、培地の変化はpHによつて容易に知ることができる。

この実験においてもpHは培養後3週までは弱アルカ

リ性を保ち、4週から酸性側に変り、6週以後はpH6.0以下となつた。このpHの酸性となる時と菌量の急増の時とが一致していることは前述のことを裏付けるものである。Johnsonは培地中のアスパラギンの分解によつて生ずるアンモニアが培養初期のアルカリ性を示しているといい、代居<sup>7)</sup>はソートン培地ではアンモニアはアミノ酸の絶えざるアミノ基脱により培地中に生成され、結核菌によく利用されるという。また太繩<sup>8)</sup>はグリセリンの分解によつて生ずる酸性物質が酸性を示すといつてゐる。かくの如く培地のpHの変化は培地成分特にアスパラギン及びグリセリンの分解によつて生ずる物質に起因するものである。次にグリセリンの変化をよく調べ、菌の発育によつてグリセリンの大部分が減少することを発表したのは太繩<sup>8)</sup>である。その後Johnson及び貝原も同様の成績を得ており、また笹川・山村<sup>9)</sup>は鳥型菌のグリセリン分解酵素は菌の旺盛期に強いことを報告している。我々の実験においても蒸発残量(主にグリセリンの量)は3週目で初めのものに減少し、6週以後は更に少なく、以下であつた。これらの業績から考えるに、菌はグリセリン分解酵素によつてグリセリンを種々なる有機酸に分解し、然る後菌はこのなかから自己に必要な物質を攝取して増殖するものであろう。故に8週以上培養した「ツ」液中には初め加えられたグリセリンの量以下しか存在していない。

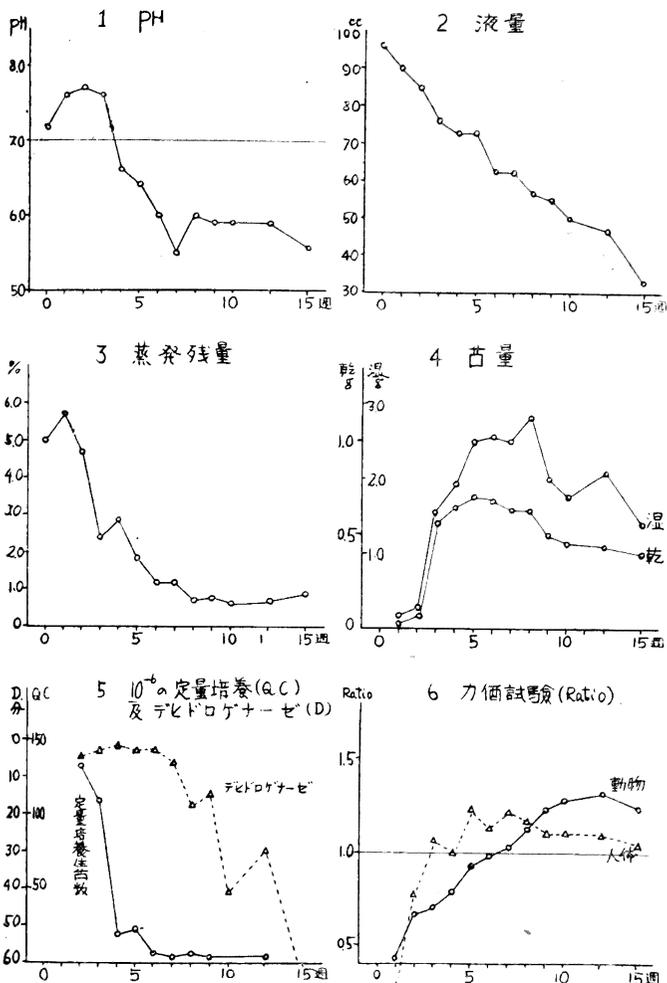
3) ツベルクリンの有効物質の出現時期及び質等に関する成績は比較的少ない。ただ、Boquet<sup>10)</sup>及び白石等のモルモットによる力価試験があるにすぎない。我々がモルモットを用いて調べた成績では、培養後6週において標準液(2,000倍)と同力価であつた。その後週の進むに従つて力価は漸次強くなつた。しかるに人体における成績では、培養後3週においてすでに標準液と同力価となり、6週目が最高を示し、以後力価は漸次低下の傾向であつた。この人体と動物とによる力価の相違はツベルクリン反応の計測の目安は、動物では硬結、人体では発赤であるという点に起因するものと思う。もしもこのことが事実であるならば、槽谷<sup>11)</sup>のいう如く、ツベルクリン中には硬結と発赤とを起す物質が存在し、その産生時期は初期には発赤物質が多く、後期にいたり硬結物質が出現してくることになる。しかし100倍稀釈液を用いた例では1週でも標準液よりも一般反応は強く現れている。故にこの発赤物質と硬結物質とに関しては今後更に追究する必要がある。

V 結 言

人型菌青山P株をSanton培地に培養し1~15週まで液体及び菌体の生化学的变化を追究した結果、次のことを結言する。

1) 液体のpHは培養後3週まで弱アルカリ性となり4週より弱酸性に移り、6週以後は6.0以下となつた。

第1~6図 各週別による各項目の変化



2) 蒸発残量は3週目で培養前の $\frac{1}{2}$ に減少し、6週以後は $\frac{1}{3}$ 以下まで減少した。

3) 糖の反応は6週から、蛋白の一般反応は4週から証明された。また最も鋭敏度の高い Tetra bromphenolphthalein-ethyl ester Kalium の反応は2週から認められた。

4) 菌体の乾燥量は3週から急に増加し、5週で最高に達し、6週より漸次減少し、15週では最高時の40%も減量した。

5) 結核菌の定量培養では4週から急に生菌数を減じている。しかし Dehydrogenase の作用は2週より6週

まで殆んど同一作用力を有し、7週より漸次減少した。

6) モルモットによる力価試験では6~7週で2,000倍稀釈標準液と等力価となり、以後週の進むに従い漸次力価は増加した。しかるに人体による試験では、3週ですでに標準液と等力価となり、5~7週で最高を示し、以後幾分か力価は低下の傾向を示した。

稿を終るに当り御指導と御助言とを賜つた柳沢部長に謹んで謝意を表す。なおこの研究費の一端は文部省総合研究、結核研究委員会の援助によつたので茲に謝意を表す。

### 文 献

- 1) Johnson, T.B. and Renfrew, A.G.: Am.Rev. Tuberc., 17, 508 (1928)
- 2) Renfrew, A.G., Bass, S.L. and Johnson, T.B.: Am. Rev. Tuberc., 20, 114 (1929)
- 3) Renfrew, A.G., Haring, K. M. and Johnson, T.B.: Am Rev. Tuberc., 22, 116(1930)
- 4) 貝原守一・杉山浩太郎・福岡医学誌, 36, 614(昭 18)
- 5) 白石正雄: 結核, 26, 268(昭 26)
- 6) 大林容二・続木正大・古屋さと代: 医学と生物学, 10, 311 (昭22).
- 7) 代居康敬: 福岡医学誌, 42, 29(昭 26)
- 8) 太細寿郎: 大阪医学誌, 22,1083 (大 12)
- 9) 笹川泰治・山村雄一: 結核, 24, 396(昭 24)
- 10) Boquet, A. et Brietey, J.: C.R. Société. Biologie., 113, 1412(1933)
- 11) 糟谷伊佐久: 東京医事新誌, 2973, 787(昭11)