

Vole Bacillus (Wells) に関する研究

第4報 液体培養に関する研究(1)

国立予防衛生研究所結核部(部長 柳沢 謙)

室橋豊穂・関又蔵・吉田幸之助・高野袈裟男

(昭和26年10月30日受付)

1 緒言

Vole Bacillus は通常鶏卵培地或は1%血清寒天培地によく発育するが、BCGや他の結核菌に比すれば著しく dysgonic であるといわれ^{1),2)}、我々も第1報³⁾において聊かこの点に触れておいた。就中馬鈴薯培地や液体培地における培養成績は従来の報告によれば殆んどいづれも否定的で、例えば Sauton, Long, Wong-Weinzirl 等には凡て充分な発育を見ることのできないといわれ²⁾僅かに Grasset 等の Tatera Afra の組織滲出液を加えた液体培地に良好な発育を営んだという報告⁴⁾をみるにすぎない。もしこのように通常用いられる培地のいづれも不適當であるとするならば、Vole Bacillus に関する凡ゆる実験は常に固形培地上の集落を掻き取ることから出発しなくてはならない。しかしそれは手技の上からも、菌の収量が少い点からも不便であるばかりでなく、菌の Growth phase や物質代謝やツベルクリン物質などについての研究を推進する上に極めて不利であるといわざるを得ない。この意味から、我々は之等の培地上における Vole Bacillus の発育経過を知ることが、たとえ dysgonic であるにせよ、まず必要であると考えたので、鶏卵培地への移植を行う傍、各種の培地への移植を試みた所、それ等の上においても集落或は菌膜が可成り良く発育しうることを確かめることができた。以下その成績を述べようと思う。

2 予備実験として行われ、現在も試みられつつある各種液体培地及び馬鈴薯培地における発育について

(1) Kirchner-Sy-Ser (K.S.S)培地* (PH 7.2)

鶏卵培地から移植した初代は発育が遅く、中試験管液面を被うに約4週を要した。Kirchner-Minas-Ser 培地

では殆んど発育がみられなかつた。

(2) Sauton 培地 (PH 7.2)

K.S.S 培地から移植した初代は発育が非常に遅く、3週で漸く 100cc コルベン(培地 30cc)の液面を被うにすぎなかつたが、L.B.P 培地(後述)から移植したものは比較的よく発育し、3代継代すると菌膜は4週で同容量コルベンの壁に登るようになった。

(3) 肝臓(モルモット)ブイヨン(L.B)培地** (PH 7.2)

著者の1人関の考案した培地である。K.S.S 培地初代培養から移植した菌膜は、Sauton 培地におけるよりも発育が遙かに良く、3週で 100cc 容量のコルベン全液面に拡がった。

以上の液体培地のいづれにおいても、BCGに較べれば菌膜の発育速度は明らかに遅く、且つ薄い菌膜は所々に疣様の厚い層を形成して粗硬な感を与え、BCGの菌膜とは明らかに相違している。

(4) 肝臓(モルモット)ブイヨン加馬鈴薯(L.B.P)培地

(3)のL.B培地をもつて処理した馬鈴薯培地である。鶏卵培地からの菌塊を塗抹培養した所、初代から発育は相当よく、代を累ねると共に良好となり、3週で培地全面を被うようになった。之は馬鈴薯培地の内最も優秀な成績を与えたものであり、液体培地に充分発育せしめ得なかつた期間中、馬鈴薯培地における発育の観察やモルモットに対する毒力実験などに専ら役立たせることができた。

(5) グリセリン水馬鈴薯(G.W.P)培地

初めは2、3代累代すると発育が見られなくなつたが、

* Kirchner 培地

アスパラギン	5.0g
第一磷酸加里	4.0g
第二磷酸曹達	3.0g
枸橼酸曹達	2.5g
硫酸マグネシウム	0.6g
グリセリン	20.0cc
蒸餾水	1000.0cc

に10%の割合に馬血清を加えたもの

** 肝臓(モルモット)ブイヨン培地

1) モルモット肝臓 1g } の割合で 60°~70°C, 60 分間浸出
蒸餾水 2cc }

2) 浸出液を 100°C, 60 分間加熱後濾過、原液とする

3) 原液 100cc }
第1磷酸加里 0.1g } 100°C, 60 分間滅菌 NaOH にて PH 7.2 に修正
グルタミン酸曹達 1.0g }
グリセリン 1.0cc }

繰返し努力を重ねる内、漸く生育せしめらるることを知つた。すなわち、鶏卵培地からの菌塊を塗抹、5週後辛じて増殖を認め得た集落をさらに累代し、以後3~4週毎に移植、現在11代に及んでいる。6代目から発育は促進して培養2週目には培地面のまを被うようになり、6週目には管底部液面に薄い菌膜を生じた。以後発育は頗る良く、移植後4週目には菌膜を生ずる。この菌膜は液体培地に移植することができる。

(6) Sauton 馬鈴薯 (S-P) 培地

鶏卵培地からの移植は凡て失敗した。G-W-P 培地 5週培養の第1代から移植したところ、初めは点々と僅かに発育する程度であつたが、3~4週毎に移植を累ねて3代目に至ると発育は漸次好転し、5代目には管底部液面に菌膜を生じた。この菌膜は G. W. P 培地におけるよりも稍々厚く、培地面の菌の発育も6代以後は一層良好で、現在10代に及んでいる。

(7) 牛胆汁馬鈴薯培地

鶏卵培地からの移植は凡て失敗に歸した。S-P 培地7代、G-W-P 培地8代の、馬鈴薯培地によく発育するようになった菌塊を塗抹培養したが、4~5代移植を累ねる内増殖を全く認め得なくなつた。

(8) グリセリンブイヨン馬鈴薯培地

S-P 培地7代、G-W-P 培地8代の3週培養を移植し現在8代に達している。増殖は思わしくなく、疎らに菌集落の増殖を認める程度である。

以上の試みから鶏卵培地以外のものにも菌が増殖しうることを知つたが、特に液体培地における発育は甚だ興味深く思われた。

3 Sauton 培地上の発育について (本実験は

1950年8月から開始された)

実験方法:

Sauton 培地 (培養時 PH 6.8)

を容量 300cc. の三角コルペン 48本に 100cc 宛分注、半数には BCG を、半数には Vole Bacillus を夫夫1渦巻白金耳 (径7mm) 宛移植、37°C にて培養、培養後 2, 3, 4, 5, 6, 8 及び 10 週の各時期に、両菌株共3本宛のコルペンを取り出して発育状態を比較した。コルペン3本について測定したのは、コルペン毎の発育状態の差異を考慮した為である。測定は培地 PH, コルペン1本(培地 100cc) 当りの菌重量 (湿潤菌量は濾紙 13 枚にはさみ 500g 5分間圧迫吸湿後測定、3本の培地の平均値を以て表わす) 及び菌体の長さについて行つた。

移植した菌膜は次のようにして準備された。BCG は Sauton 馬鈴薯培地から Sauton 培地に移植した初代の14日培養を用い、Vole Bacillus は小川培地上の集落から移植して生じた Sauton 培地上の菌膜を4代同培地に継代後、5代目の35日培養の菌膜を移植した。従つて BCG は Sauton 培地2代目、Vole Bacillus は6代目の菌膜が実験に供された訳である。

本実験開始の頃には、前述の馬鈴薯培養は、肝臓エキス加培地を除いては満足すべき成果を見ておらず、従つて Roux 試験管に底部の菌膜を利用することができなかつたので、Vole Bacillus を Sauton 培地に直接表面培養する為に次のような方法を用いた。

固形培地上の菌塊をとり、Sauton 培地を容れた試験管壁に塗布することによつて培地表面に薄い菌膜を作らしめ、之を次々に Sauton 培地に移植したのである。この方法によれば、Vole Bacillus の菌膜を Sauton 培地上に容易に作る事ができる。

なお、培養濾液については、動物及び人体に皮内反応を試みたが、之は稿を改めて報告する。

実験成績:

1) 培地 PH の変動

培養時の PH は 6.8 であつたが、BCG では 2~3 週頃には弱アルカリ性(7.4)を呈し、次で4週以後酸性に転じた。Vole Bacillus でもその経過は略々同様で、BCG よりも約1週遅れて酸性に転じた。

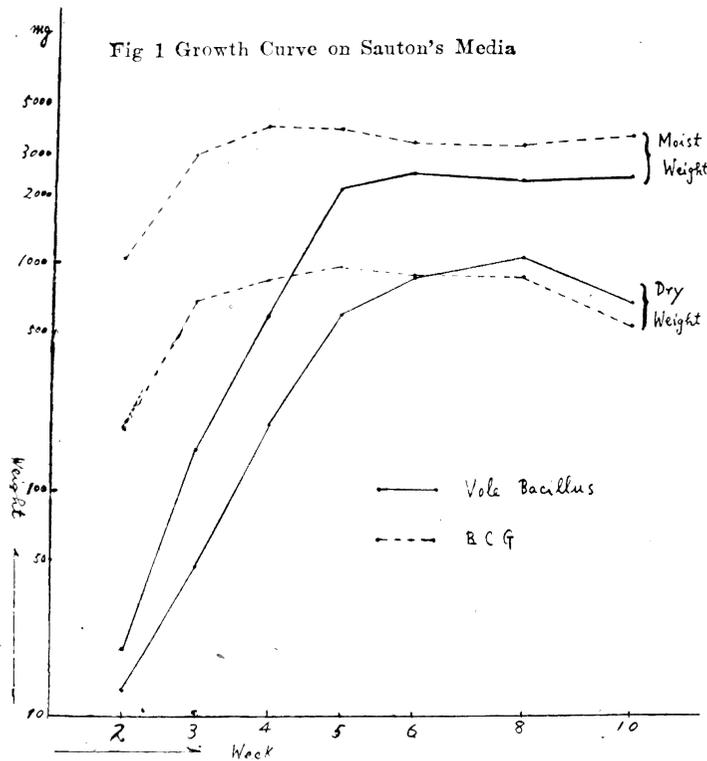
2) 菌膜の重量

菌膜の重量(培地1本当りの平均値)は、第1表、第1図に示す如くである。BCG と Vole Bacillus との Sauton 培地上における発育速度に大きな差違のあることが見られる。BCG は第1週から第2週にかけて急激

Table 1 Growth on Sauton's Media.

Period of cultivation (week)	Vole Bacillus				B. C. G.			
	weight of Bac. Mass (mg)		PH	Average Size (μ)	weight of Bac. Mass (mg)		PH	Average Size (μ)
	Moist	Dry			Moist	Dry		
2	20	13	7.2	1.925	1014	278	7.4	1.372
3	156	45	7.4	($n=1035$) ($\sigma=1.035$)	2933	671	7.4	($n=1032$) ($\sigma=0.488$)
4	573	193	7.6		3899	815	6.6	
5	2034	593	6.2	2.031	3808	947	5.4	1.607
6	2421	833	5.2	($n=1046$) ($\sigma=1.066$)	3289	856	5.2	($n=1050$) ($\sigma=0.502$)
8	2245	1019	5.2	2.072	3208	845	5.2	1.699
10	2312	660	5.2	($n=1132$) ($\sigma=1.072$)	3538	511	5.2	($n=1053$) ($\sigma=0.534$)
12	2250	646	5.2					

Note : n = Nos of measured Bacilli,
 σ = Standard Deviation



な増殖を示し、対数期 (Logarithmic Phase) にあることを思わせるが、第2週以後の重量増加程度は漸次減少し、第4週において菌重量は極値を示し、以後は漸く減少の傾向にある。Vole Bacillus は、2週迄の発育は極めて悪く、僅か 20mg にすぎないが、以後急速に増殖を始め、BCG の2~3週におけると略く同様な増加傾向を以て第5週迄増加し、以後は増加率を減じて第6週において菌重量は最大に達している。

湿润菌重量と乾燥菌重量とから、同一吸湿条件下における両菌株の湿润菌膜中に含まれる水分の割合を比較すると、Vole Bacillus の方が BCG に比して稍く少く、菌膜の粗鬆な外観とよく一致するように思われた。乾燥菌量からみると、6週以後は Vole Bacillus の方が BCG よりも稍く多いようである。

3) 菌体の長さ

培養後第2, 5及び8週目に両株共塗抹標本を作り、Ziehl-Neelsen 染色を施した後、1000個以上の菌体について長さを計測し、その平均値を求めた。第1表の如く、Vole Bacillus は BCG に比して明らかに長い。表中 σ の値からも知りうるように、Vole Bacillus では大小不同が著しく、大きいものは 6μ を超え、しかも甚だ多型性であることは BCG と相違する点である。両株共培養日数の増加と共に菌の長さを幾分増している。

4 Kirchner-Sy-Ser 培地上の発育について

(本実験は 1950年4月から行われた)

実験方法:

培養方法、培地分注量、観察方法等すべて前実験の場合と全く同様である。

移植した菌膜は次のように準備された。

BCG は牛胆汁馬鈴薯培地から Sauton 馬鈴薯培地に移植し、2代累代後、Sauton 培地に移植、4代目の菌膜を Kirchner-Sy-Ser 培地に移植して生じた菌膜を、Vole Bacillus は Sauton 培地7代目の菌膜を Kirchner-Sy-Ser 培地に移植して生じた24日培養の菌膜を、それぞれ用いた。従つて本実験には両株共 Kirchner-Sy-Ser 培地2代目の菌膜が供された訳である。

実験成績:

1) 培地 PH の変動

全経過を通じて、両株共アルカリ性に経過し、殆ど差異は認められなかつた。

2) 菌膜の重量

Sauton 培地の場合と異なり、Vole Bacillus の発育は極めて急速であつた。第2表、第2図に示すように、培養第2週における菌重量は BCG の $\frac{1}{2}$ 程度にすぎないが、以後の増加率は顕著で、3週以後の発育曲線は BCG のそれと殆んど差異がなかつた。湿润菌膜に含まれる水分の量は、Sauton 培地の場合程の差異を示さなかつたが、Vole Bacillus の方が、幾分少いようであつた。

3) 菌体の長さ

前実験の場合と同様に 1000個以上の菌体について測定した。測定は毎週の培養について行われた。BCG の第3週を除けば、Vole Bacillus は、常に BCG よりも大きく、且つ培養日数と共に長さは増大している。Sauton 培養の場合よりも一般に短形であるが、 σ の値からも知りうるように、BCG に比して大小不同がやや明らかであつた。

総括・考按

以上の実験から Vole Bacillus は Sauton あるいは Kirchner (Sy-Ser) 培地のような極く普通に用いられる液体培地に表面培養することも、馬鈴薯培地に発育せしめ、管底部液面に生じた薄い菌膜を液体培地に移植培養することもできることを知つた。之は Vole Bacillus に関する色々な実験を行うに当り、甚だ有用な知見であると思う。

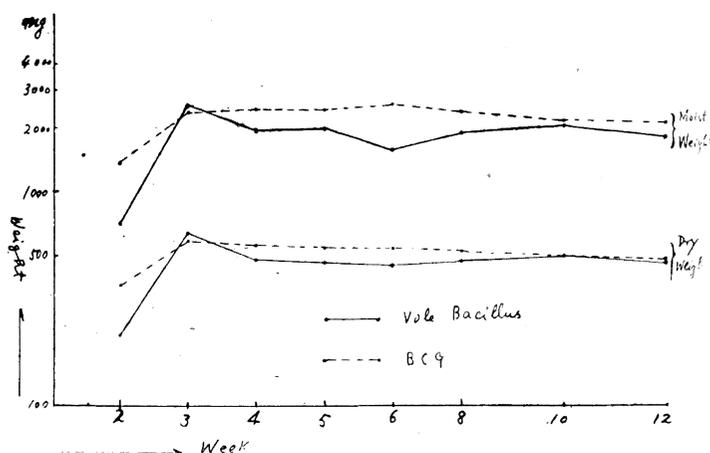
実験成績が示すように、Sauton 培地は Vole Bacil-

Table 2. Growth on Kirchner's Media (Sy-Ser)

Period of cultivation (week)	Vole Bacillus						B. C. G					
	Weight of Bac. Mass (mg)		pH	Average Size (μ)			Weight of Bac. Mass		pH	Average Size (μ)		
	Moist	Dry		M	n	σ	Moist	Dry		M	n	σ
2	704	210	7.0				1336	361	7.2			
3	2539	631	7.4	1.698	1054	0.560	2335	593	7.6	1.663	1053	0.396
4	1952	492	8.6	1.694	1075	0.438	2480	571	7.6	1.320	1051	0.408
5	1987	484	8.8	1.750	1049	0.460	2445	555	8.6	1.486	1195	0.286
6	1549	478	8.6	1.762	1091	0.560	2596	549	8.6	1.409	1141	0.293
8	1906	487	8.2	1.760	1059	0.560	2396	525	8.2	1.450	1163	0.372
10	2029	502	8.2	1.827	1100	0.574	2176	500	8.2	1.528	1100	0.384
12	1854	469	8.2	1.730	1264	0.482	2136	483	8.0	1.670	1000	0.500

Note : n = Nos of measured Bacilli,
 σ = Standard Deviation

Fig 2 Growth Curve on Kirchner's Media



lus の発育に対して、BCG に対する程促進的ではないように思われる。之に対して Kirchner(Sy-Ser)培地は、その発育曲線が示すように遙かに促進的であり、Sauton 培地よりも一層好適であるように思われる。このことが、培地成分として含まれる血清に基づくであろうことは想像に難くない。又モルモットの肝臓ブイオン培地及び同培地で処理した馬鈴薯培地における良好な発育は、未だ詳細な追求に欠けてはいるが興味深い点で、Vole Bacillus に対する感受性動物の臓器エキスを加えた培地に engonic な発育をみたという Grasset 等⁴⁾の報告と共に今後更に追求されるべきものと思う。

菌体の大きさが、培地成分や培養代数、培養日数等によって相違することは多くの菌について明らかにされているが、Vole Bacillus も亦前述のように、Sauton 培地と Kirchner 培地とでは相違し、更に又発育の旺盛の時期においては稍々小型であつた。しかし BCG に比すれ

ば勿論大きく、このことは、我々が他の培養条件下において検査した成績からも知ることができる。之について Brooke¹⁾は、組織内では 3.6 μ 、培養では 2.5 μ 、大きなものは 8~10 μ に及ぶと記載し、我々も 6.4 μ あるいは之を越すものを殆んど常に見ることができた。菌の多形性(S 字形、半円形等)や大小不同は BCG に比して顕著で、顆粒の染り方は一般に BCG よりも鮮明でやや大きいように感ぜられる。

液体培地表面培養の菌膜は、BCG とその性状を異にし、培養 2 週にして薄い菌膜が表面全体を被うが、次

で菌膜の処々に厚い疣様の盛り上つた層を形成しつつ、全体的に厚味を増加する。膜表面の皺襞は BCG のよう

菌 株	培養条件	最大	最小	M	σ	n
Vole Bacillus	Sauton 4週	6.4 μ	1.6 μ	2.77 μ	0.89	918
	小川 5週	5.6	1.6	2.12	0.60	877
BCG	小川 2週	3.2	1.2	1.72	0.23	743

に細かくなく、粗硬な感を与える。このような外観は、他の菌株の場合と明らかに相違するに思われる。

結 論

Vole Bacillus を馬鈴薯培地及び液体培地に移植し、その発育状態を観察した。

1) グリセリン水馬鈴薯、Sauton 馬鈴薯、肝臓ブイオン馬鈴薯等には相当よく発育し、管底部液面に菌膜を形成するようになった。

2) Sauton 培地における発育は2週迄は BCG に比して遙かに遅く、BCG では4週、Vole Bacillus では6週に最大菌量に達した。培地の PH は BCG では4週、Vole Bacillus では5週以後酸性を呈した。

3) Kirchner (Sy-Ser)培地における発育は相当良好で、3週以後の発育は BCG と殆んど同様であつた。PH は両株共常にアルカリ性を呈した。

4) Vole Bacillus は多型性で大小不同が著しく、菌体は BCG よりも長かつた。但し培養日数や培地により、長さには多少の違いがあり、発育旺盛な時期のものは幾分短かつた。

本研究は文部省科学研究費の援助によつて為され、総合研究結核研究委員会細菌科会、日本細菌学会総会、予

研伝研集談会においてその要旨が報告された。結核研究委員会今村委員長、戸田科会長に謝意を表す。

拙筆に臨み御校閲を戴いた柳沢部長に謝意を表す。

文 献

- 1) W. S. Brooke: Am. Rev. The 43, 806—816, 1941.
- 2) H.J. Corper and M.L. Cohn: Am. Journ, Clin. Path. 13, 18—27, 1943.
- 3) 室橋・関・高野: 結核, 26 卷, 7号, 329—336 1951.
- 4) E. Grasset, J.F. Murray and D.H.S. Davis: Am. Rev. The 53, 427—439 1946.