

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

## 第2報 人型結核菌H<sub>2</sub>及びH<sub>37</sub>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・細井 正春・土屋 皖司

上野 一恵・土田 誠三・三浦 馨

(昭和27年8月22日受付)

### I 緒 言

結核菌を液体培地に培養した場合、菌の発育に伴つて菌体及び液体がどのように変化してゆくかを調べる目的をもつて、第1報<sup>1)</sup>においては、人型菌青山B株の Sauton 培地における変化について報告した。今回は同様な実験を人型菌 H<sub>2</sub> 及び H<sub>37</sub> 株について行つたので、その成績をここに報告する。

### II 実験方法

1. 使用菌株: a) 人型菌 H<sub>2</sub> 株(予研保存のもの)、b) 人型菌 H<sub>37</sub> 株(これは昭和24年末に P. H. W. の好意によつて米国より分譲されたものである)。
2. 培地及び培養方法: 300ccの三角コルベンに Sauton 培地 100cc ずつを分注滅菌したものに、上記各菌株を移植後 37°C で培養した。
3. 液体及び菌体の分離及び調製: 毎週2本ずつの培養コルベンをフランキより取りだし、2個の内容を合せ、殺菌しないで、濾紙をもつて液体と菌体とに別ち、液体は滅菌水を加えて 200cc とした後、各試験に供した。また菌体は一部を常法に従つて 1cc=10mg の菌浮遊液を作り、残部は乾燥後秤量した。
4. pH, 蒸発残量, 乾燥菌量及び Dehydrogenase 等は第1報と同一方法によつた。

5. N量: Microkelydahl 法によつた。総N量は試料 5cc に生理的食塩水 5cc を加えたもの 2ccを酸化し、N/50 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で滴定した。蛋白N量は試料 5cc に 10% CCl<sub>3</sub>COOH 5cc を加えその濾液 2cc を酸化後滴定した価を、前の総N量から減じたものである。

6. 還元量: Hagendorn・Jensen 法によつた。

7. 定量培養: 培養基を小川培地にかえた他は前報と同一である。

8. 力価試験法: 標準液は予研の標準ツベルクリン 2,000 倍希釈液を用い、各週の試料も 2,000 倍希釈液としたものを用いた。なお感作動物は青山B死菌流動パラフィン乳剤の 6mg 筋肉内注射によつて感作した天竺鼠を各試料毎に5匹ずつ使用した。また人体試験のための対象集団は BCG 接種者及び非接種者を含む学童に対し各試料毎約 100 名ずつ用いた。

### III 実験成績

Sauton 培地に人型菌 H<sub>2</sub> 及び H<sub>37</sub> 株を培養し、1~14週までの液体及び菌体の生化学的变化は第1表から第5表に示す如くであり、これを図示すれば第1図から第10図の如くである。これらの図を見れば一目瞭然としておるので説明は省略する。

第1表 Sauton 培地 100cc に H<sub>2</sub> 株を培養した場合の変化

試料の 発育週	液 体						菌 体				力価 (Ratio)			
	pH	液量 g	蒸発残 量 %	還元量 mg/dl	総N量 mg/dl	蛋白N 量 mg/dl	乾燥量 g	定量培養		デヒドロ ゲナーゼ 分	動物(硬結)		人 体 (発赤)	
								10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>		24時	48時		48時
対 照	0	7.0	93.5	6.20	3	73.9								
	IV	7.0	85.0	6.15	7	73.9								
	VIII	7.0	77.5	5.93	8	73.9								
	XII	6.9	62.5	5.63	7	72.2					0	0		
培 養	I	7.7	91.8	6.02	10	73.1	0	0.069			0.20	0	0.36	
〃	II	8.6	87.8	5.72	8	61.6	0.56	0.061	2676	602	6-20	0.48	0.36	0.74
〃	III	8.7	83.0	5.05	10	46.8	0.28	0.200	1838	347	3-35	0.70	0.60	0.91
〃	IV	8.9	77.5	3.95	11	18.2	1.96	0.601	950	85	3-40	0.77	0.61	1.17
〃	V	5.5	67.4	2.03	48	8.9	1.68	1.032	70	6	8-30	0.84	0.63	1.07
〃	VI	5.4	67.0	1.80	48	11.2	2.24	1.048	33	4	11-35	0.80	0.55	1.21
〃	VII	5.4	64.1	1.78	64	12.6	3.36	1.165	5	2	23-30	0.81	0.80	1.11

〃	VII	5.2	62.3	1.35	57	12.6	1.96	1.058	6	0	46—35	0.82	0.84	1.11
〃	IX	5.1	55.5	1.53	79	14.3	1.96	1.013	0	0	—	1.16	1.07	1.11
〃	X	5.0	52.0	1.18	80	13.2	1.12	0.933	0	0	67—30	1.01	1.01	1.11
〃	XII	5.0	45.0	1.05	80	14.0	1.12	0.867	0	0	66—45	0.97	0.78	1.10
〃	XIV	5.0	40.3	1.35	100	16.0	0.56	0.858	0	0	180以上	0.87	0.94	1.03

註： 定量培養の生菌集落数は小川培地 10 本の合計数

第 2 表 Santon 培地 100cc に人型菌 H<sub>37</sub> 株を培養した場合の変化

試料の 発育週	液 体							菌 体			力価(Ratio)			
	pH	液量 g	蒸発残 量 %	還元量 mg/dl	総N量 mg/dl	蛋白N 量 mg/dl	乾燥量 c	定量培養		デヒドロ ゲナーゼ 分	動物(硬結)		人 体 (発赤)	
								10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>		24時	48時		48時
対 照	0	7.0	93.5	6.20	3	73.9								
	IV	7.0	85.0	6.15	7	73.9								
	VII	7.0	77.5	5.93	8	73.9								
	XII	6.9	62.5	5.63	7	72.2					0			
培 養	I	7.7	92.5	6.11	6	69.4	0	0.025				0.13	0	0.41
〃	II	8.5	88.2	5.49	5	50.4	0.56	0.171	2787	853	5—54	0.48	0.49	0.80
〃	III	8.5	82.5	4.54	7	24.9	1.40	0.459	2145	489	4—10	0.65	0.71	1.05
〃	IV	8.2	77.5	3.90	7	17.1	0.56	0.660	1464	163	3—55	0.78	0.80	1.00
〃	V	5.7	70.8	2.26	24	8.4	0.84	0.869	608	77	7—45	0.97	0.93	1.08
〃	VI	5.4	65.5	1.78	64	11.5	0.84	0.839	292	25	16—45	0.75	0.76	1.06
〃	VII	5.3	65.9	1.16	80	12.3	0.84	0.893	136	21	11—00	0.89	0.82	1.05
〃	VIII	5.3	60.8	1.17	45	15.1	1.40	0.792	124	32	58—20	0.96	0.94	1.01
〃	IX	5.2	56.3	0.94	56	17.9	1.40	0.593	97	18	—	0.86	0.85	1.28
〃	X	5.2	57.5	1.28	105	17.1	0.84	0.540	337	105	53—15	1.04	0.93	1.20
〃	XII	5.0	48.7	0.66	99	18.2	1.12	0.578	66	12	33—30	1.27	1.20	1.07
〃	XIV	5.1	49.8	1.55	94	20.7	1.96	0.525	166	—	42—50	1.19	1.10	1.22

註： 第 1 表に同じ

第 3 表 H<sub>2</sub> 株の各週ツベルクリンの人体皮内反応試験

週 別	Ratio	検査人員	ツベルクリンの種類	陽 性 者				硬 結		二重発赤	水 泡
				10—30mm以上	31mm以上	計	%	数	%		
対 照	0	77	S	57	12	69	89.5	45	58.4	7	1
			T	3	0	3	3.9	0	—	0	0
〃	VII	84	S	57	4	61	72.5	27	32.2	2	0
			T	8	0	8	9.5	0	—	0	0
I	0.35	102	S	51	19	70	68.6	63	61.5	21	1
			T	20	6	26	25.5	23	22.5	7	0
II	0.74	104	S	69	17	86	82.7	63	60.5	13	4
			T	37	18	55	52.9	40	38.4	14	2
III	0.91	100	S	75	15	90	90.0	61	61.0	12	4
			T	64	16	80	80.0	56	56.0	12	4
IV	1.17	98	S	73	17	90	91.8	68	69.4	10	5
			T	68	22	90	91.8	68	69.4	19	3
V	1.07	105	S	85	7	92	87.6	64	61.0	5	1
			T	66	20	86	81.9	57	54.2	13	1
VI	1.21	103	S	85	10	95	92.2	71	69.0	6	2
			T	61	25	86	83.5	68	66.0	10	9

VII	1.11	121	S	64	52	116	95.9	101	83.5	49	2
			T	43	66	109	90.0	99	81.8	48	3
VIII	1.11	120	S	94	24	118	98.3	74	61.5	12	2
			T	78	34	112	93.3	67	55.8	16	6
IX	1.11	97	S	71	24	95	97.9	67	69.0	14	4
			T	67	28	95	97.9	76	78.4	16	4
X	1.11	88	S	50	32	82	93.2	69	78.4	20	2
			T	46	39	85	96.6	63	71.6	23	3
XII	1.10	74	S	57	16	73	98.6	36	48.6	14	1
			T	55	18	73	98.6	34	46.0	17	1
XIV	1.03	87	S	77	7	84	96.5	32	36.8	7	2
			T	64	19	83	95.4	34	39.0	17	3

註： S……標準液 (OT 2,000 倍希釈液)

T……各試料の 2,000 倍希釈液

第 4 表 H<sub>37</sub> 株の各週ツベルクリンの人体皮内反応試験

週 別	Ratio	検査人員	ツベルクリンの種類	陽 性 者				硬 結		二重発赤	水 泡
				10—30mm以上	31mm以上	計	%	数	%		
0		77	S	57	12	69	89.5	45	58.4	7	1
			T	3	0	3	3.9	0	—	0	0

対照	Ⅴ	Ⅵ	Ⅶ	Ⅷ	Ⅷ	Ⅸ	Ⅹ	Ⅺ	Ⅻ		
	84	96	96	82	92	94	94	80	115	114	114
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	57	69	70	61	42	58	40	55	62	69	57
	4	15	14	18	50	35	48	24	51	44	56
	8	21	11	20	48	37	57	36	72	54	43
	0	9	11	20	48	37	57	36	72	54	43
	61	84	84	79	92	93	88	79	115	113	113
	72.5	87.5	87.5	96.3	100.0	98.9	93.6	98.8	100.0	99.1	99.1
	27	38	37	40	80	70	66	49	100	88	78
	32.2	39.6	38.5	48.8	87.0	74.5	90.3	61.3	87.0	77.2	68.4
	2	13	12	17	45	30	41	5	51	42	46
	0	2	4	4	6	0	4	2	5	3	2
	0	0	0	2	1	1	0	3	12	3	5
	0	0	0	2	1	1	0	3	12	3	5

註：第3表と同じ

IV 総括及び考察

1) Sauton 培地は人型菌 H<sub>2</sub> 及び H<sub>37</sub> 株を培養し、週を追って各検査項目を調べた場合、それらの変化は両株とも殆んど等しかった。なおこの両株の各検査項目の変化は前報の青山B株とも類似している。また H<sub>37</sub> 株の pH、菌量及び還元量等の変化はさきに Johnson<sup>2)</sup>等が H<sub>37</sub> 株について行つた成績と一致していた。

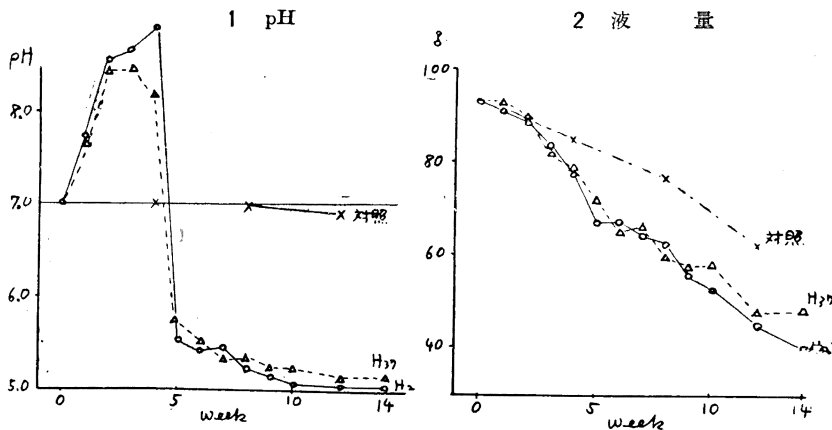
2) 今回新たに測定した総N量の変化は培地中のアスパラギンの変化を示すものであつて両株とも培養後4~5週において、アスパラギンが殆んど消費されるものと思われる。また蛋白N量は H<sub>2</sub> 株では培養後7週目が最高を示し、以後週の進むに従い、反つて減量している。しかし H<sub>37</sub> 株では全実験週においてあまり著しい変動は

なかつた。さらにまた蛋白の定性反応の結果も大体この定量成績と一致していた。すなわち培養の週が進むに従つて一度増加した蛋白質が何故に減少してゆくかということは、この実験だけでは証明できないが、後に述べる力価試験の成績等と合せ考えると、菌の発育の旺盛な時期と自家融解を

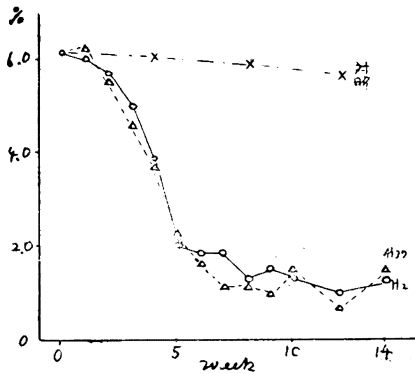
第5表 H<sub>2</sub> 及び H<sub>37</sub> 株を Sauton 培地に培養した場合における培養液の定性反応

菌株	発育週	糖 反 応				蛋 白 反 応							
		Rehling	Benedict	Nylander	Molisch	Ninhydrin	Bihret	Xanthoprotein	T.B.P.E.	Sulfosalicylic	Triehloroacetic	Ammon	Sat. Amm. Sulfat
対照		-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> I		-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> II		-	-	-	-	+	+	+	-	±	-	-	-
H <sub>2</sub> III		-	-	-	-	+	+	+	-	+	±	-	-
H <sub>2</sub> IV		-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
H <sub>2</sub> V		-	-	-	+	±	+	+	+	-	+	+	+
H <sub>2</sub> VI		-	-	-	+	-	+	+	-	+	±	+	±
H <sub>2</sub> VII		+	±	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
H <sub>2</sub> VIII		+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
H <sub>2</sub> IX		+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
H <sub>2</sub> X		+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	±
H <sub>2</sub> XI		+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
H <sub>2</sub> XII		+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
H <sub>2</sub> XIII		+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
H <sub>2</sub> XIV		+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	±
H <sub>37</sub> I		-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
H <sub>37</sub> II		-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
H <sub>37</sub> III		-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
H <sub>37</sub> IV		-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
H <sub>37</sub> V		-	-	-	+	-	+	+	±	+	+	-	-
H <sub>37</sub> VI		-	±	-	+	-	±	+	+	+	+	-	-
H <sub>37</sub> VII		+	+	+	+	-	±	+	-	+	+	-	-
H <sub>37</sub> VIII		+	+	+	+	-	±	+	-	+	+	-	-
H <sub>37</sub> IX		+	+	+	+	-	±	+	+	+	+	+	+
H <sub>37</sub> X		+	+	+	+	-	±	+	+	+	+	+	+
H <sub>37</sub> XI		+	+	+	+	-	±	+	+	+	+	+	+
H <sub>37</sub> XII		+	+	+	+	-	±	+	+	+	+	+	+
H <sub>37</sub> XIII		+	+	+	+	-	±	+	+	+	+	+	±
H <sub>37</sub> XIV		+	+	+	+	-	±	+	+	+	+	+	±

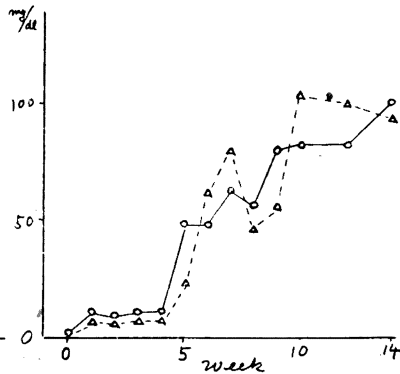
註：TBPE=Tetra bromphenolphthalein ethylester kalium



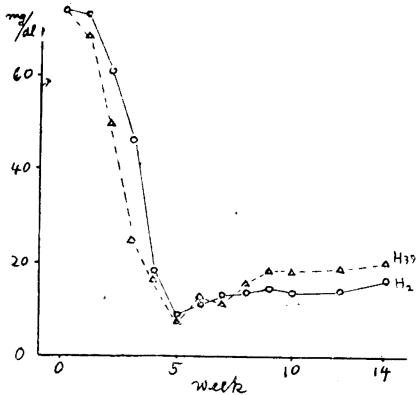
3 蒸発残量



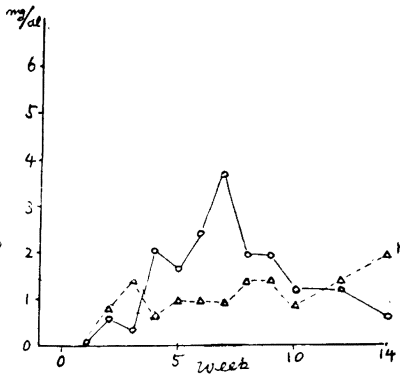
4 還元量



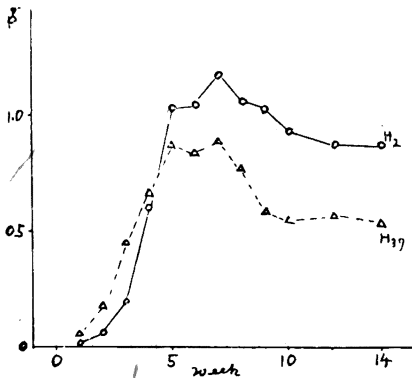
5 総 N 量



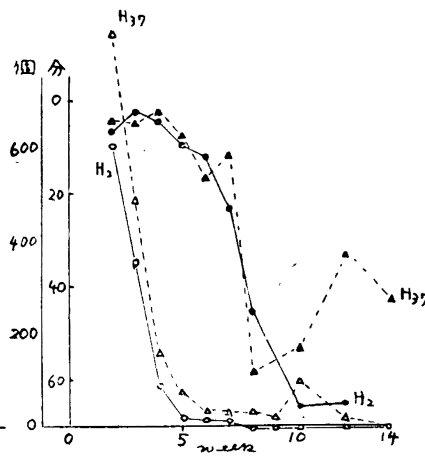
6 蛋白 N 量



7 菌 量



8 定量培養 Dehydrogenase



起す時期における蛋白質の量と質とに相違することを思わしめる。お今回の試料は濾液を縮しないものについて成績であるが今後濃縮についても同様の試験行つてみたいと思ふ。

3) 人体と動物とに力価試験の結果は両とも大体前報の青山B:と同様の傾向が見られすなわち人体では両株も、3週において既に準液と等力価を示し、の最高時期は H<sub>2</sub> 株は6週、H<sub>37</sub> 株では9であつた。その後 H<sub>2</sub> 株では徐々に力価の低下みられるが H<sub>37</sub> 株ではあまり力価の変化はなつた。しかるに動物で H<sub>2</sub> 株は培養週に比例して徐々に力価は上昇し週に到り、はじめて標準液と等しくなり、以後価はやや低下している。また H<sub>37</sub> 株でも力価上昇は徐々にあるが5に到り標準液と等しく、次で多少の変動はるが大体等力価を保ちつ、10週まで進み12及び14週目では急に力は高くなつている。かの如く培養の初期では体には強く、動物にはく反応している。このとは前報にも述べたように、菌の發育旺盛期と家融解期における濾中の有効因子の、化的・量的・質的相違びに人体と動物とに於る感作方法の相違及び内反応術式の差異等に因するものと考えらる。

## 4) 結核菌を液体培地に

培養し週毎に観察した場合、菌の發育曲線は徐徐に上昇してゆくものではなく、或時期において菌は急速に増殖していることが今までの実験によつて解つた。而して  $H_2$  及び  $H_{37}$  株では培養後5週目に菌体の急速な増加が見られた。又この時期においては他の項目にも相当大きな変動が認められる。その主なものはpH

の酸性化、蒸発残量(主にグリセリン)の半減、総N量(主にアスパラギン)の最低値、還元量の出現及び生菌数の減少等が菌の急速に増加する時期において平行して急変してゐる。これを一括すれば第6表の如くである。すなわち菌の發育と培地成分との間には相関関係の存することはこの表からも窺知できると思う。

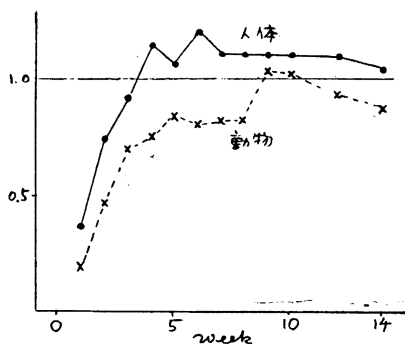
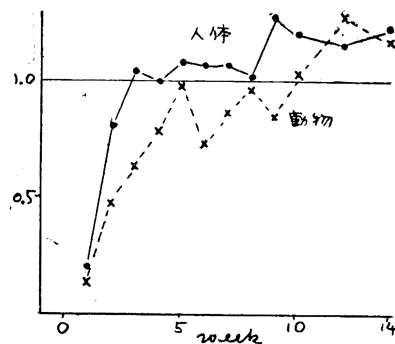
第6表 菌の發育に伴い各検査項目が急速な変化を起す時期

検査項目	内容	菌株		
		$H_2$ (週)	$H_{37}$ (週)	青山 B (週)
菌量	最高	7	7	5
	急増	5	5	3
pH	酸性化	5	5	4
蒸発残量	最初の $\frac{1}{2}$ 以下	5	5	3
総N量	最低	5	5	/
還元量	出現	5	5	/
定量培養	$10^6$ ~ $10^7$ 以下	4	5	6
Dehydrogenase	30分以上	8	8	10
糖反応	Molisch	5	5	4
	Benedict	7	7	6
蛋白反応	T.B.P.E.	2	2	2
	C Cl <sub>3</sub> COOH	3	3	3
力価試験	人体	4	3	3
	動物	9	5	6

## V 結 言

Sauton 培地に人型結核菌  $H_2$  及び  $H_{37}$  株を培養し週を追つて菌体と液体との変化を追求した結果次のことを結言とする。

1) 液体の pH は両株とも培養後 1~4 週ではアルカリ性を呈し、5 週より急に 5.5 の酸性となり、以後徐々に酸性度を増していた。蒸発残量は両株とも培養後かなり急に減少し 5 週では最初の  $\frac{1}{2}$  以下となり、以後漸

9  $H_2$  の力価試験10  $H_{37}$  の力価試験

次その量を減じていた。還元量は両株とも 5 週から出現し、週が進むに従つて漸次増量し、14 週では最高量(100 mg/dl) となつた。総N量は培養後かなり急に減少し、5 週では最も少なく、その後は幾分増加していた。

2) 菌体の乾燥量は両株とも 5 週で急速に増加し、7 週が最も多く、その後漸次減少していた。生菌数は 2 週後から徐々に減少し、5 週では  $10^{-5}$  において小川培地 10 本の合計が 100 コ以下となつた。これに反し Dehydrogenase は両株とも 7 週まで比較的強力な酵素作用を有するも 8 週からは急にその作用を減じていた。

3) 力価試験の結果、標準液と同力価となるのは、 $H_2$  株の人体試験では 4 週、動物試験では 9 週であつた。また  $H_{37}$  株の人体では、3 週、動物では 5 週であつた。その後  $H_2$  株では多少力価の低下を示したが、 $H_{37}$  株ではその後あまり著しい変動は認められなかつた。

4) 今回の検査項目の上では、 $H_2$  株と  $H_{37}$  株との変化は殆んど等しかつた。

5) 両株とも菌体の増殖に伴つて変化する項目は pH、蒸発残量、総 N 量、還元量及び生菌数等であつた。

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。また人体試験に御協力下さつた結核部諸君の御好意を感謝する。なおこの研究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ここに謝意を表す。

## 文 献

- 1) 浅見望外 4 名：結核，27；246，昭27
- 2) Johnson, T. B. and Renfrew, A. G.: Am. Rev. Tuberc. 17: 508, 1928.