

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3報 BCG 及び牛型菌牛₁₀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

第1及び2報¹⁾²⁾において人型結核菌青山B株、H₂株及び H₃₇株等の Sauton 培地における菌の発育に伴う、化学的变化並びに力価試験等について試験した結果、菌体の増殖と PH、蒸発残量、総N量及び定量培養等とが平行して変動しており、かつ菌量の急速に増加する時期は3株とも培養後4~5週であつた。さらに力価試験の結果、人体と動物とによつて有効物質の出現時期に相違のあることも大体において3株とも同一の傾向であつた。今回は BCG 及び牛型菌牛₁₀株について行つた同様の実験成績について、その大要を茲に報告する。

II 実験方法

1) 使用菌株：a) BCG (予研保存のもので、継代培養は Sauton 馬鈴薯又は胆汁馬鈴薯等) b) 牛型菌牛₁₀株 (家畜衛生試験場において家畜の診断用ツベルクリン液製造用菌株であつて、約拾数年前結核牛より分離され、その後グリセリン馬鈴薯又はグリセリンブイヨン等で継代培養されたもの)

2) 培地及び培養方法：300cc三角コルペンに Sauton 培地 100 cc ずつを分注滅菌したものに、上記両菌株を移植後 37°C で培養した。

3) 液体及び菌体の分離調製法：毎週2本ずつをフラ

ンキから取りだし、2本を合併後、濾紙をもつて濾過し、菌体の一部は常法により 1 cc=10 mg 菌浮游液を作り、残部は秤量した。液体は殺菌後水を加えて 200 cc となし、一部に石炭酸を加え、残部はそのまま冷蔵庫に保管した(詳細は第1報参照)。

4) 定性及び定量試験法：第1及び2報と同一方法によつた。

5) 力 価 試 験：a) 人体——大半がBCG接種者と少数の未接種者を含む学童を対象とした。b) 動物——i) 青山B感作群——青山B死菌流 パラ液 6mg 筋肉内注射後8週以上を経過したもの、ii) BCG 感作群——BCG生菌 30 mg 接種後 10 週以上を経過したもの。

なお人体の場合と青山B感作動物の場合におけるツベルクリン液は、標準液及び各週の試料ともに 2,000 倍稀釈液を用いたがBCG感作動物においては標準液及び各試料とも 500 倍稀釈液を用いた (これはBCG群の反応が弱い為)。

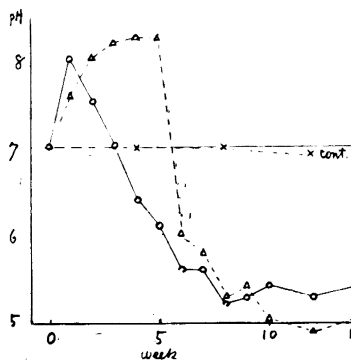
III 実験成績

Sauton 培地に BCG 及び牛₁₀株を培養し、1~14 週まで追究した成績は第1~5 表並びに第1~14 図の如くである。この表及び図によつて明らかであるので説明は省略する。

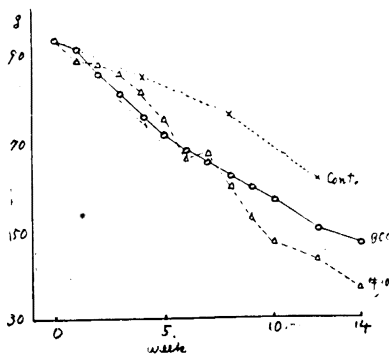
IV 総括及び考按

1) Sauton 培地に BCG 及び牛₁₀株等を培養し、週を追つてその変化を調べた成績と前報の人型菌 H₂株の変化とを比較すれば第6表の如くである。この表に示す如く菌の発育が急速に増加する時期は、BCG では 2~3 週、H₂株では 4~5 週、牛₁₀株では 6~8 週であつた。これは Sauton

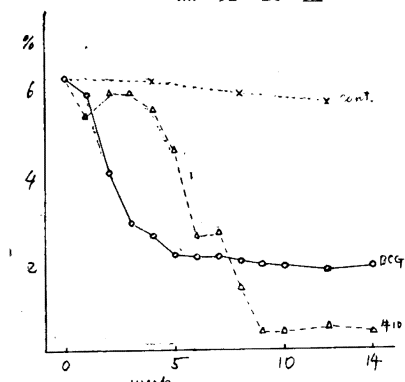
1 PH



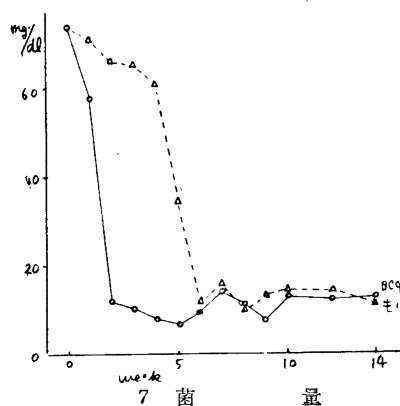
2 液 量



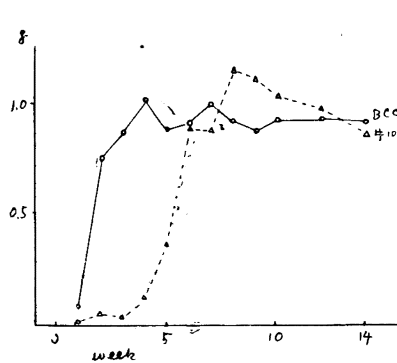
3 蒸 発 残 量



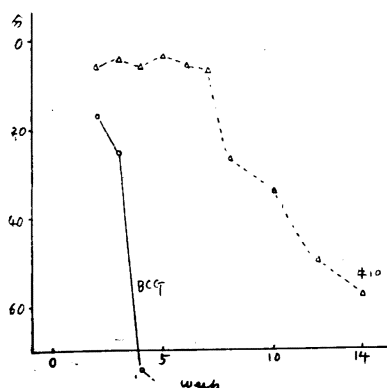
5 総 N 量



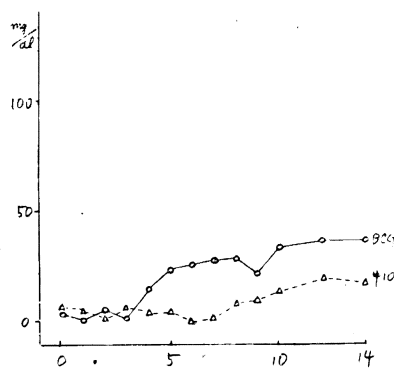
7 菌 量



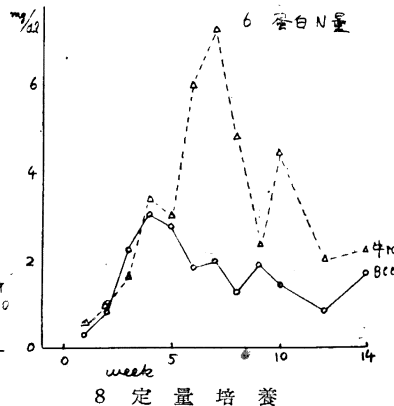
9 Dehydrogenase



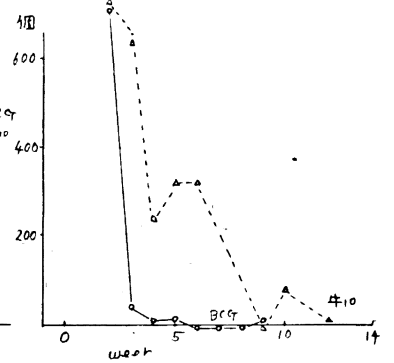
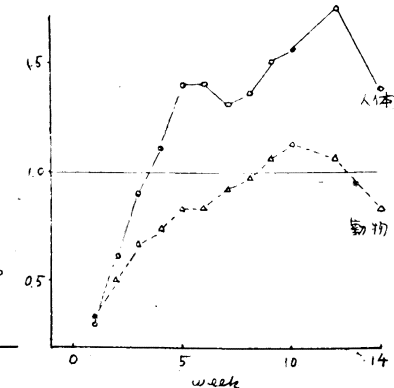
4 還 元 量



6 蛋 白 N 量



8 定 量 培 養

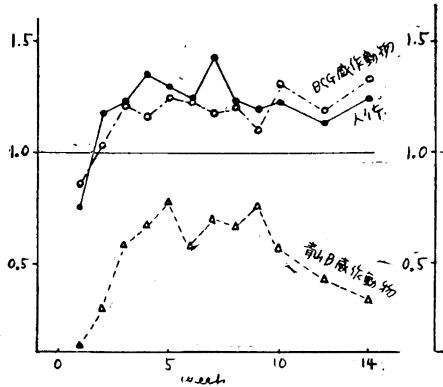
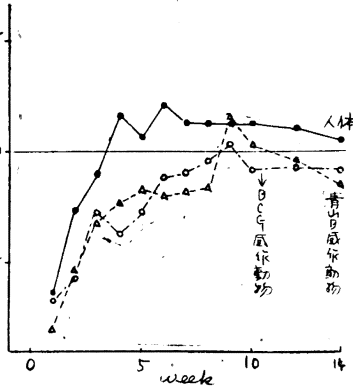
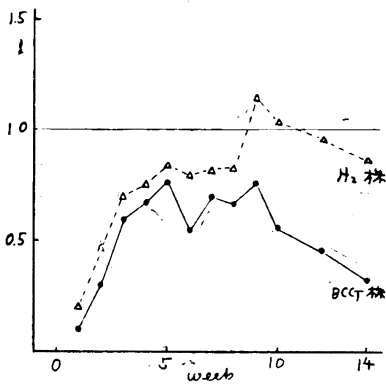
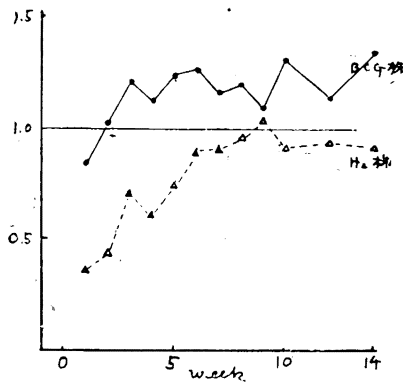
10 牛₁₀ 株, 力価試験

培地における3菌株の發育速度を示すものであつて、これだけの成績から菌型の相違とか性質とかを論ずることはできない。しかし何が故にBCGは早く牛₁₀株は遅いかということは興味ある問題である。

実験方法のところでも記しておいた如く、BCGの継代培養には主としてSauton 培地なり Sauton 馬鈴薯なりが多く用いられているのに反し、牛₁₀株では主としてグリセリンブイヨン又はグリセリン馬鈴薯等が多く用いられておるため Sauton 培地に發育しにくいのではないかと考えられる。故にグリセリンブイヨンには牛₁₀株はよく伸びるも、BCGは甚だ發育が悪いこと、並びに分離当初の菌が發育の遅いこと等は常に経験するところであるがその理由はまだ明らかでない。これは培地に対する各菌株の適応性並びに摂摂性が異なる為である。

2) 人体と動物とによる力価試験の相違は前掲の人間型菌の場合においても述べたのであるが、牛₁₀株においても人体では強く、動物では弱く表われている。またBCGにおいては人体では2週以後標準液よりやや強かつ同一値を保つてゐる。しかるに青山B感作動物では最高週でさえ標準液よりもずつと弱かつた。しかしこれをBCG感作動物に注射したところ殆んど人体の場合と同様曲線を描いているのが認められた。またH₂株をBCG感作動物に注射したが殆んど青山B感作動物と同一曲線であつ

11 BCG株の力価試験

12 H₂株の力価試験13 青山B感動物
に対する力価14 BCG感動物
に対する力価

た。さらに感動物別にこの関係を見れば、青山B感動物にはBCGは弱く、H₂株は中等度に反応し、BCG感動物にはBCGは強く、H₂株はやはり中等度に反応している。かくの如く両感動物に対する型特異性はBCGでは顕著であるがH₂株では明らかでなかつた。しかし今後各試料の濃度並びに動物の感作程度について再検討を行い、この型特異性の問題を解明したいと思う。

3) 今回まで5種類の結核菌株について、培養後週を追つて力価の変化を調べた結果、人体及び動物においても力価の最高に達する時期は8週前後であり、その後週が進むに従つて力価の低下を来すものが多かつた。この理由としては二つのことが考えられる。一は

第1表 Sauton 培地 100 cc に BCG を培養した場合の変化

発育週による 試料		液 体						菌 体			力 価 (Ratio)					
		PH	液 量	蒸発残量	還元量	総N量	蛋白N量	乾燥量	定量培養		デヒドロ ゲナーゼ 分	動物(硬結)		人 体 (発赤)		
			g	%	mg/dl	mg/dl	mg/dl		g	10 ⁻⁵		10 ⁻⁶	24時		24時	48時
対 照	O	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										
培 養	I	8.0	91.8	5.80	0	57.9	0.28	0.099				0.12	0.00	0.74		
	II	7.5	86.0	3.99	5	12.3	0.84	0.754	2570	713	17—45	0.30	0.27	1.18		
	III	7.0	80.8	2.90	2	10.4	2.24	0.865	139	34	25—40	0.59	0.51	1.25		
	IV	6.4	76.5	2.57	14	8.1	3.08	1.000	50	4	94—40	0.68	0.74	1.35		
	V	6.1	71.5	2.21	23	7.6	2.80	0.887	29	1	180以上	0.77	0.78	1.30		
	VI	5.6	69.2	2.17	26	10.1	1.68	0.930	13	0	〃	0.55	0.62	1.27		
	VII	5.6	66.3	2.12	28	14.6	1.96	0.996	6	0	〃	0.70	0.67	1.44		
	VIII	5.2	63.5	2.09	28	11.8	1.12	0.912	18	0	〃	0.67	0.46	1.25		
	IX	5.3	61.0	1.90	20	8.1	1.96	0.886	9	1	〃	0.76	0.53	1.21		
	X	5.4	57.0	1.85	34	13.7	1.40	0.926	—	—	〃	0.55	0.37	1.23		
	XI	5.3	50.6	1.75	36	12.6	0.84	0.922	3	—	〃	0.45	0.38	1.11		
	XIV	5.4	48.3	1.83	36	12.6	1.68	0.909	—	—	〃	0.32	0.28	1.26		

第2表 Sauton 培地 100 cc に牛型菌、牛₁₀株を培養した場合の変化

発育週による 試料	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 ⁻⁵	10 ⁻⁶		24時	48時	

対 照	O	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												
培 養	I	7.6	89.3	5.39	5	71.4	0.56	0.007								0.34	0.00	0.31
	II	8.0	88.5	5.96	3	67.8	0.84	0.056	4164	739	5-10	0.50	0.42	0.61				
	III	8.2	86.5	5.93	5	66.6	1.68	0.034	1291	640	4-30	0.68	0.70	0.91				
	IV	8.3	82.5	5.49	3	61.3	3.36	0.114	1767	231	5-10	0.74	0.66	1.11				
	V	8.3	75.5	4.56	5	35.8	3.02	0.369	1733	328	3-20	0.83	0.87	1.40				
	VI	6.0	68.7	2.68	0	11.8	6.16	0.918	1360	347	5-50	0.83	0.76	1.41				
	VII	5.8	68.0	2.63	3	14.0	7.28	0.895	—	—	5-35	0.93	0.82	1.32				
	VIII	5.2	60.5	1.38	9	10.4	4.76	1.158	—	—	26-30	0.98	0.91	1.36				
	IX	5.4	54.0	0.37	10	13.7	2.24	1.103	96	0	33-40	1.05	1.00	1.50				
	X	5.0	48.5	0.40	15	14.6	4.48	1.019	45	89	34-20	1.12	1.00	1.53				
	XI	4.9	44.9	0.49	20	12.6	1.96	0.986	82	5	50-30	1.07	1.11	1.66				
	XII	5.0	37.5	0.34	18	11.2	2.24	0.857	19	—	57-40	0.81	0.86	1.39				

第3表 BCG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	ツの種類	陽 性 者				硬 結		二重発赤	水 泡
				10~30mm	31mm以上	計	%	数	%		
対 照	0w	77	S	57	12	69	89.5	45	58.5	7	1
			T	3	0	3	3.9	0	—	0	0
照	VIIw	84	S	57	4	61	72.5	27	32.2	2	0
			T	8	0	8	9.5	0	—	0	0
I	0.74	98	S	64	4	68	61.2	25	25.5	4	0
			T	46	0	46	47.0	19	19.4	1	0
II	1.18	112	S	86	6	92	82.0	25	22.3	5	0
			T	72	14	86	76.7	37	33.0	9	0
III	1.25	107	S	90	3	93	86.9	12	11.2	1	0
			T	93	8	101	94.4	45	42.0	8	0
IV	1.35	121	S	114	3	117	96.7	13	10.7	2	0
			T	97	23	120	99.3	76	62.9	11	0
V	1.30	67	S	65	0	65	97.2	7	10.4	0	0
			T	61	6	67	100	27	40.4	4	0
VI	1.27	91	S	85	4	89	97.8	13	14.3	2	0
			T	76	13	89	97.8	38	41.8	13	0
VII	1.44	98	S	89	1	90	91.8	18	18.6	1	0
			T	75	19	94	95.9	54	55.1	2	0
VIII	1.25	124	S	84	3	87	77.4	8	6.5	3	0
			T	110	2	112	90.3	6	4.8	2	0
IX	1.21	90	S	75	2	77	85.6	2	2.2	2	0
			T	76	3	79	87.9	2	2.2	1	0
X	1.23	88	S	66	8	76	86.4	38	43.2	8	0
			T	60	18	78	88.6	45	51.1	17	0
XI	1.11	100	S	83	8	91	91.0	25	25.0	8	0
			T	80	14	94	94.0	35	35.0	14	0
XII	1.26	107	S	94	7	101	94.4	18	18.1	5	0
			T	86	19	105	98.1	49	45.8	15	0

第4表 牛₁₀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	ツの種類	陽 性 者				硬 結		二重発赤	水 泡
				10~30mm	31mm以上	計	%	数	%		

培養液から菌体の分離方法による誤差であつて、今回の実験では濾過後菌体及び濾紙を洗うことなく、濾液に水を加えて一定量とした。従つて週の進むに従つて液は濃縮され、かつ粘固となるため液体の一部は菌体及び濾紙に附着するので濾液の実量が少くなるのではないかと考えられる。つぎは濾液中の蛋白質の量的質的差異によるものであつて、蛋白N量が週の進むに従つて減少したり、各種の蛋白質の定性反応が培養時期によつて相違すること等によるものと考えられる。

V 結 言

Sauton 培地にBCG及び牛₁₀株を培養し、週を追つて菌体と液体との生化学的変化を追究した結果次のことを結言する。

1) BCGの菌量は培養2週後に於いて急に増加し、4週で最高を示し以後菌量の変化は少なかった。またこの菌量の変化と大体平行したのはPH、蒸発残量、総N量及び生菌数等であつた。

2) 牛₁₀株の菌量は培養後6週に於いて急に増加し、8週で最高に達し、以後漸次減量した。またPH、蒸発残量及び総N量等も大体菌量の変化と平行した。

3) 液体中の還元量はBCGでは少く、牛₁₀株では微量であつた。

4) BCGの培養濾液を人体(主にBCG接種集団)とBCG感作動物とに皮内注射した際、殆んど等しい力価の変化を呈し、培養2週にお

対照	0	77	S	57	12	69	89.6	45	58.5	7	1
	Ⅶ	84	T	3	0	3	3.9	0	—	0	0
I	0.31	77	S	57	12	69	89.5	38	49.4	7	1
			T	22	2	24	31.2	6	7.8	1	0
II	0.61	77	S	48	22	70	49.4	51	66.3	8	0
			T	42	11	53	68.8	17	22.1	1	0
III	0.91	86	S	55	19	74	86.1	54	62.8	17	0
			T	49	14	63	73.3	39	45.4	17	0
IV	1.11	92	S	72	10	82	89.2	28	30.4	4	1
			T	63	13	76	82.6	32	34.8	10	0
V	1.40	88	S	50	32	82	93.2	43	54.5	12	0
			T	39	48	87	99.1	70	79.5	28	0
VI	1.41	89	S	47	28	75	84.3	35	39.4	17	1
			T	38	46	84	94.4	61	68.5	27	0
VII	1.32	88	S	59	25	84	95.5	52	59.1	19	1
			T	38	47	85	96.6	64	72.7	38	3
VIII	1.36	95	S	64	0	64	67.4	10	10.5	0	0
			T	58	10	68	71.5	33	34.8	6	1
IX	1.50	102	S	69	1	60	68.6	13	12.7	0	0
			T	69	7	76	74.5	33	32.4	7	0
X	1.53	108	S	63	2	65	60.2	2	1.9	2	0
			T	81	4	85	78.6	8	7.4	4	0
XI	1.66	57	S	33	0	33	57.9	7	12.3	0	0
			T	44	4	48	84.2	32	56.2	0	0
XIV	1.39	115	S	87	3	90	78.2	11	9.6	2	0
			T	94	11	105	91.4	59	51.3	7	0

いてすでに標準液よりやや強くなり、以後力価の変化は少なかった。これに反し青山B感作動物に皮内注射した際、何れの週においても標準液よりは甚だしく低力価であつた。

5) 牛₁₀株の培養濾液を人体に注射した際、4週から標準液と等しくなり以後力価は漸次上昇し、9週以後の Ratio は 1.50 以上まで上昇した。しかるに青山B感作動物では培養後徐々に力価は上昇し、8週において標準液と等しくなり 10 週では Ratio 1.10 で最高を示した。

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る。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茲に謝意を表する。

文 献

- 1) 浅見 望他 4 名：結核 27, 5, 246~249, 昭 27.
- 2) 浅見 望他 4 名：結核 28, 3, 117~121, 昭 28.

第5表 BCG及び牛₁₀株を Sauton 培地に培養した場合における液体の定性反応

菌 株	発 育 週	糖 反 応		蛋 白 反 応	
		Molisch Nylander Benedict Fehling	Molisch Nylander Benedict Fehling	Sauton Ammon. Sulfat Alumen Trichloroacetic Sulfosilylic T.B.P.E. Xanthoprotein Biuret Kinydinin	Sauton Ammon. Sulfat Alumen Trichloroacetic Sulfosilylic T.B.P.E. Xanthoprotein Biuret Kinydinin
対照	0	----	----	+++	----
B C G	I	----	----	+++	----
	II	----	----	+++	----
	III	----	----	+++	----
	IV	----	----	+++	----
	V	----	----	+++	----
	VI	----	----	+++	----
	VII	+	+	+++	----
	VIII	+	+	+++	----
	IX	+	+	+++	----
	X	+	+	+++	----
	XI	+	+	+++	----
	XII	+	+	+++	----
	XIII	+	+	+++	----
	XIV	+	+	+++	----
牛 ₁₀	I	----	----	+++	----
	II	----	----	+++	----
	III	----	----	+++	----
	IV	----	----	+++	----
	V	----	----	+++	----

VI	----	++++	++++	++++	++++
VII	----	----	++++	++++	++++
VIII	----	----	++++	++++	++++
IX	+	+	++++	++++	++++
X	+	+	++++	++++	++++
XI	+	+	++++	++++	++++
XII	+	+	++++	++++	++++
XIII	+	+	++++	++++	++++
XIV	+	+	++++	++++	++++

第6表 菌体の発育に伴い急速な変化を起す時期

内 容		BCG	牛 ₁₀	H ₂
菌 量	最 高	4	8	7
	急 増	2	6	5
PH	酸 性 化	4	6	5
蒸 発 残 量	最初の1/2以下	3	6	5
総 N 量	最 低	2	6	5
還 元 量	出 現	4	10	5
定 量 培 養	10 ⁻⁶ 100コ以下	3	7~8	4
Dehydrogenase	30分 以 上	4	9	8
糖 反 応	Molisch	5	9	5
	Benedict	7	なし	7
蛋 白 反 応	T.B.P.E.	2	2	2
	CCl ₃ COOH	2	4	3
力 価 Ratio 1.00 以 上	人 体	2	4	4
	動 物	2	8	9
	青 山 B 感 作 BCG 感 作	2	8	8