

結核菌の深部発育に関する研究

～第3報 牛血清及び卵黄中結核菌深部発育因子について

九州大学医学部細菌学教室 (主任 戸田 忠雄教授)

三 淵 一 二

(昭和 27 年 10 月 6 日受付)

(本論文の要旨は昭和 27 年 4 月第 25 回日本細菌学会総会において報告した。)

結核菌の深部培養には血清又は血清アルブミンを始め黄卵、ムチン等の蛋白質を添加することは衆知の如くである。血清については血清アルブミン割合が結核菌深部発育に主要なる役割を演じているのであるが、なおそれ以外に結核菌深部発育に作用する他の蛋白成分の存在するだろうことを前報において指摘した¹⁾。Youmans²⁾によればアルブミン以外に Proantithrombin がより一層深部発育促進的であると報じている。しかしながら今日の知見よりみるに結核菌深部発育因子と考えられるものは総て蛋白割合であつて、その作用機作はなお解明されていない。私は今回これら蛋白割合中に非蛋白性結核菌発育因子が含まれているのではないかとこの考えの下に二、三の実験を試み、いささか興味ある知見をえたので報告する。

実 験

1) 透析乾燥牛血清のアルコール抽出

予め透析を行い無機物質等を可及的に除去した後凍結乾燥せる牛血清蛋白をエーテルにて抽出したが、エーテル中には微量の脂質を溶出するのみで、エーテル抽出処理血清蛋白の結核菌深部発育能には著しい変化を認めなかつた。そこで次に低温(5℃以下)において無水アルコールを以て抽出を試みた。この際アルコールは塩酸並びにアンモニアを以て種々の PH 値に変えて抽出を行った。この場合アルコールの PH が小さくなる程、すなわち酸性アルコールを用いる程抽出アルコールは黄色に着色し、一方その血清蛋白は著明に脱色されていくのを認めた。

アルコール処理後の血清蛋白はアルコール及びエーテルを以て洗い直ちに乾燥しその結核菌深部発育能を調べたところ、酸性アルコール処理の場合ことに HP 1～2 塩酸アルコール処理血清蛋白はその深部発育能が著しく減弱し殆んど消失する事実を認めた。

一方アルコール抽出部はすべて減圧濃縮し、その残留物をキルヒナー原液(以下キ原液とす)に添加し無蛋白状態で結核菌の深部発育を検討したが、これら抽出物には深部発育能を認めえなかつたのみならずこれら抽出物

を血清加キルヒナー培地(以下血清キ培地とす)に添加してみると、結核菌の深部発育は返つて阻害されるのを知つた。しかしながら塩酸々性アルコール処理蛋白の深部発育能の低下又は消失とアルコール抽出液の著しい青色の事実より、この塩酸々性アルコール抽出物中に深部発育因子がかくされているのではないかとさらにその分割を試みた。

2) 乾燥牛血清蛋白の酸性アルコール抽出成分の分割

PH 2 塩酸々性アルコール抽出部を減圧・濃縮・乾燥するに残留乾燥物は黄褐色の油脂状物質である。これをまずエーテルにて溶出すると褐色の色素及び大部分の脂質は溶出されあとに黄色物質を残す。次に無水エタノールにて溶出すると黄色物質が溶解し、さらにその残渣を無水メタノールにて溶出するとメタノールには無色物質が溶解してくる。なお最後に少量の白色物質を残した。

このように溶出分別した各割合は減圧下で蒸発乾固すると、エーテル可溶部は褐色脂質、エタノール部は淡黄色無晶形物質、メタノール部は白色結晶性物質で、なおメタノールにも不溶の残渣は少量の結晶性物質である。これら割合中エーテル可溶部は水に難溶の爲一定除外し、エタノール、メタノール可溶部及び残渣をキ原液に溶解し無蛋白のまま人型結核菌 10^{-3} mg ずつ接種してそれらの深部発育能を調べた。その結果はメタノール可溶部添加ではキ原液のみに結核菌を接種した場合到底認められない少量の深部発育菌塊を認めえたが、他のエタノール可溶部及び残渣添加では全く菌の発育を認めなかつた。然しながらメタノール可溶部の添加の場合の菌発育はキ血清培地の発育には到底及ばない。そこでエーテル可溶性の脂質が結核菌深部発育上重要な問題を残すこととなるのであるが、その取扱ひには困難を覚えた。種々実験の結果エーテル可溶部は油脂ばかりでなく磷脂質と思われるものの存在を知りえたので、脂質殊に磷脂質に主点をおいて次の実験を試みた。

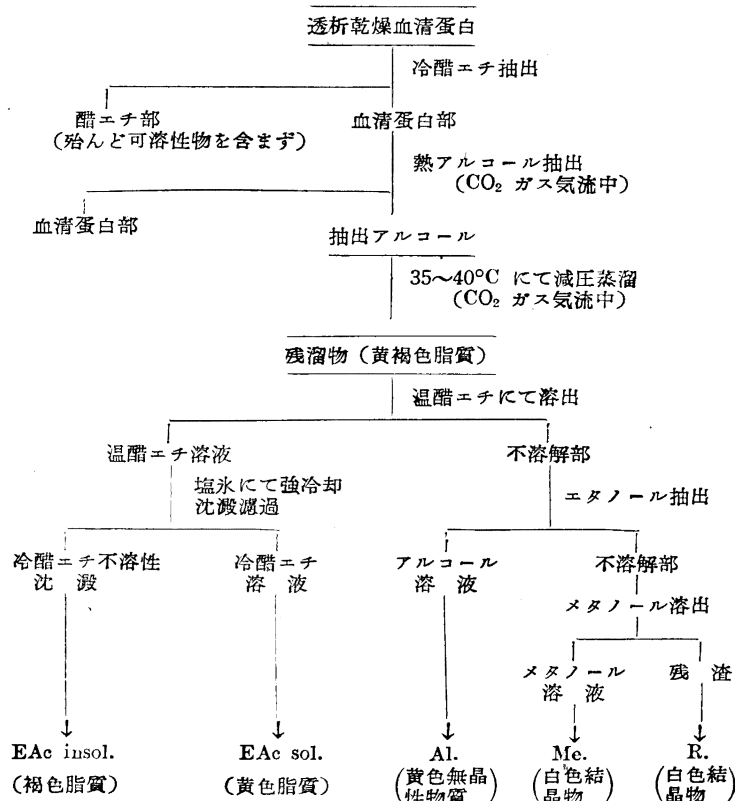
3) 乾燥牛血清蛋白中脂質殊に磷脂質の抽出

磷脂質の抽出方法には Mac Lean; Levene & Rolf 等の方法をはじめ、新しくは Pangborn; M. Faure;

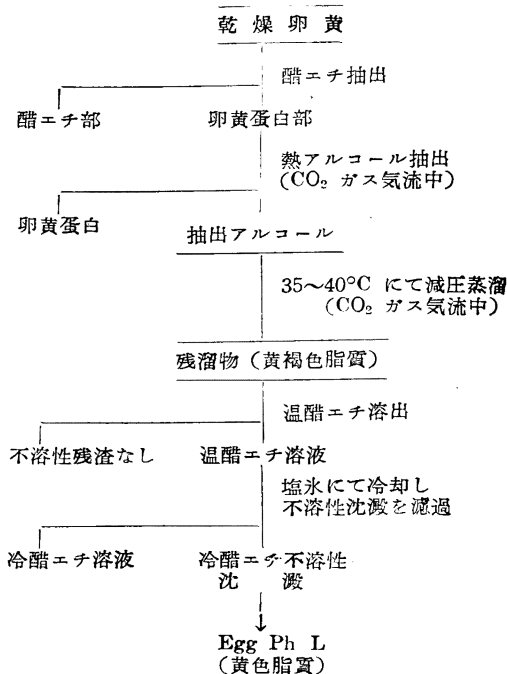
R. G. Sinclair 等の抽出法など数多くのものがみられるが³⁾, 燐脂質割合を取る目的で古い方法ではあるが, Haberman 法⁴⁾を用いて実験した。第1表にその抽出方法を示したが, 乾燥透析血清蛋白をまず醋酸エチルエステル(以下醋エチとす)にて冷抽出したが, 先に述べたエーテル冷抽出の場合と同様, 微量の脂質を溶解してくるのみであつた。次に蛋白部は炭酸ガス気流中で無水アルコールを以て温浸した。使用アルコールは自ら精製し化学的純粋なるものを抽出に用いた。アルコール温抽出液は黄色に着色してくるが, これは先に行つた塩酸性アルコール抽出の場合に非常に類似している。アルコール抽出液は濾別後脂質の空中酸化を防止する為炭酸ガス気流中で減圧乾燥したが, 乾燥物は黄褐色の大部分脂質よりなる無晶形物質である。

この乾燥物を無水醋エチ(精製せる化学的純品を使用)にて温時溶出するに醋エチ溶液は黄褐色で乾燥物中の大部分の脂質は溶解し, 残に淡黄色の不溶物を少量残した。次に温醋エチ溶液は塩水にて強冷却すると黄色の絮状沈澱を生ずるので冷却下炭酸ガス気流中で濾別した。冷醋エチ不溶物は黄褐色の脂質である(EAc insol.)。これは減圧下で溶媒を除き炭酸ガスを充填し冷蔵庫中に保存した。濾液の冷醋エチ可溶物は減圧下で乾燥すると黄色脂質であつた(EAc sol.)。

第1表



第2表



一方アルコール抽出物中の温醋エチ不溶性物質はまず温無水アルコール, 無水メタノールの順に溶出分離したが, 前述の酸性アルコール抽出物の分割の場合と同様にそれぞれ淡黄色無晶形物質(Al.), 白色結晶性物質(Me.)及び少量の結晶性の残渣(R.)に分れた。

4) 卵黄燐脂質の抽出

血清中結核菌深部発育因子がその脂質成分ことに燐脂質割合中に存在するのではないかとの推察より, 卵黄を主成分とするベスレドカ培地における卵黄の意義も又考察されるべきである。そこで凍結乾燥卵黄について血清蛋白の場合と同様にHaberman 法を以て燐脂質割合の抽出を試みた(Egg Ph L)(第2表)。

5) 牛血清抽出成分及び卵黄燐脂質割合による結核菌深部培養

牛血清より抽出割合した冷醋エチ不溶部(EAc insol.)及び可溶部(EAc sol.), エタノール可溶部(Al.) メタノール可溶部(Me.)並びに残渣(R.), さらに卵黄燐脂質割合(Egg Ph L)をキ原液にそれぞれ0.2, 0.1, 0.05 mg/cc の割に添加し無蛋白状態で培養を行つた。使用結

核菌は青山B株のソートン培地3週間培養菌であつて、培地5ccを含む各試験管に 10^{-3} mgずつ接種した。

この際培地作製に当り EAc insol., EAc sol., Egg Ph L は予め無水アルコールに溶解したものをキ原液に添加し、その後培地中のアルコール除去と滅菌を兼ねて 100°C 10分3回加熱した。脂質成分添加培地は白濁してくるが、 0.2mg/cc の濃度では微白濁程度で培養の観察に何ら支障をきたさない。

菌接種後 37°C に3週及び4週培養し結核菌の深部発育状態を観察した。なお対照としてキ原液のみと牛血清加キ培地とを用いた。培養結果は第3表に示す如くであつてEgg Ph L加キ原液は牛血清加キ培地と殆んど変わらない著明な結核菌深部発育を認めた。一方牛血清脂質の場合はEAc insol. 加の場合予期せる結核菌深部発育を認めることはできなかつたが、EAc sol. を加えた培地では低濃度添加の場合少量の肉眼的に認めうる菌発育を認めえた。

なお脂質以外の牛血清抽出部の Me. 劃分では前の酸性アルコール抽出の場合と同様微量ながら結核菌深部発育を肉眼的に認めえたが、Al. 劃分及び R. では深部発育を認めなかつた。

第3表 キルヒナー原液における結核菌深部培養

培養日数	2 週			3 週			4 週		
添加量 mg/cc	0.2	0.1	0.05	0.2	0.1	0.05	0.2	0.1	0.05
Egg Ph L	++	+	+	+++	++	++	+++	+++	+++
EAc insol.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAc sol.	-	-	+	-	-	++	-	-	++
Al.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Me.	-	-	-	-	+	+	+	+	+
R.	-	-	-	-	+	+	-	+	+
キルヒナー原液	-	-	-	-	-	-	-	-	+
キルヒナー血清加培地	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(註) 接種菌：人型結核菌青山B株 10^{-3} mg

6) 牛血清抽出成分及び卵黄磷脂質の牛血清加キ培地内結核菌深部発育に及ぼす影響

牛血清加キ培地に血清抽出成分及び卵黄磷脂質劃分をそれぞれ 0.2 , 0.1 , 0.05mg/cc 添加し、これに人型結核菌青山B株を 10^{-3}mg 接種し菌の深部発育への影響を調べた。その結果は第4表に示したがEgg Ph L添加は対照の血清加キ培地そのものの菌深部発育よりはるかに良好であつて、発育促進的に作用するものようである。

しかるに一方牛血清抽出成分添加の場合はEAc insol. 及びEAc sol. 劃分ともに添加濃度の高い程深部発育は低下する傾向を有し、牛血清磷脂質劃分には卵黄とは異つて相当の菌発育阻害因子の混在があるものようであつた。

Al., Me., R. 劃分添加は菌深部発育には著しい影響を認めることはできなかつた。

第4表 キルヒナー血清加培地における結核菌深部培養

培養日数	2 週		3 週		4 週	
添加量 mg/cc	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1
Egg Ph L	+++	++	+++	++	+++	+++
EAc insol.	-	+	+	++	++	++
EAc sol.	+	++	++	++	++	++
Al.	+	++	++	++	++	++
Me.	+	++	++	++	++	++
R.	+	++	++	++	++	++
キルヒナー血清加培地	++	++	++	++	+++	+++

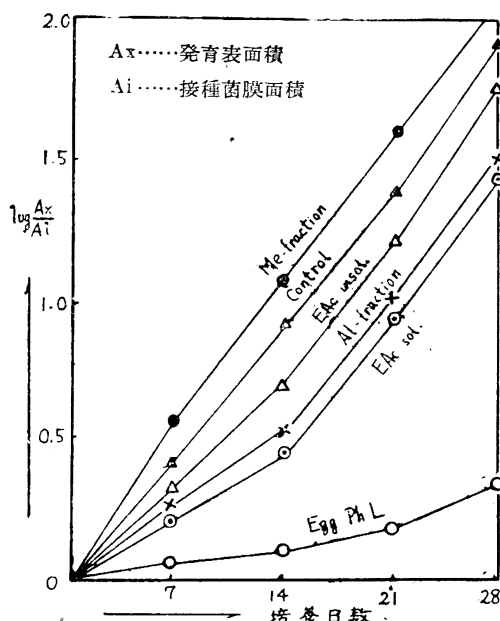
(註) 接種菌：人型結核菌青山B株 10^{-3}mg

7) 牛血清抽出成分及び卵黄磷脂質劃分の結核菌表面発育に及ぼす影響

これら各抽出成分をソートン培地に 0.1mg/cc の濃度に添加し結核菌のソートン培地上発育菌膜を各種の培地に接種し菌の表面発育状態を観察した。接種時の菌膜面積及び培養により発育増大せる菌膜の面積を測定し、この面積の増大率を算出して各培地における結核菌の表面発育率とした。結果は第1図(巻頭参照)に図示したが、先に無蛋白状態で良好なる結核菌深部発育能を有していたEgg Ph L 劃分は表面発育には返つて不良なる成績を示し、菌膜の増大は殆んど認められない。しかしながら表面菌は一部沈下し深部において菌塊の形成を惹起する傾向を有していた。又血清のEAc sol. 劃分も先にわずかながら深部発育能を有していたが、表面培養の場合Egg Ph L と類似して表面発育の低下をみとめた。このことは血清のEAc sol. 劃分と卵黄のEgg Ph L 劃分とは類以の化学的成分をもつのではないかと考えられる。血清のEAc insol. 劃分はEAc sol. 劃分よりやや弱い表面発育の低下をみた。しかし一方血清抽出劃分中Al. 劃分は表面発育を非常に良好となし、対照のソートン培地そのものの菌発育より菌膜の増大は著しかつた。Al. 劃分は対照よりやや菌膜の増大は低下している。

第1図 結核菌表面発育への影響

添加量……0.1 mg/cc



考 察

結核菌深部培養に用いられる血清又は卵黄の作用に関しては今日なお充分なる解明がなされていない。ただ血清中の蛋白成分（アルブミン劃分或いは又 proantithrombin²⁾）がその主要なる作用をなしていると報告されている程度であつて、その作用機作については全く不明である。私はいわゆる蛋白成分になお不明の結核菌発育因子が存在しているのではないかという考えの下に実験を進めた。すなわち乾燥透析牛血清蛋白及び乾燥卵黄より抽出を行い且つ抽出物の溶解性より数種の劃分に別した。これら各種劃分はすべてキルヒナー原液に添加し無蛋白状態で結核菌の深部培養を行い、それぞれの劃分の深部発育能を検討した。その結果劃分中の脂質成分殊に磷脂質劃分と考えられるものが血清そのものの添加の場合と殆んど変らない結核菌深部発育能を有していることを認めえた。特に卵黄磷脂質劃分はこれを添加することで無蛋白状態で著明に深部発育をなさしめるのみならず、血清と併用すると菌の深部発育に促進的に作用し、且つソートン培地にこれを添加する場合、結核菌はその表面発育よりもかえつて深部発育に傾く性状を有することを認めた。

しかしながら一方牛血清蛋白よりの脂質ことに磷脂質劃分では卵黄とことなつて、いささか予期に反し菌の充分なる深部発育能を認めえなかつた。Boissvain⁵⁾は血清中全脂質劃分が菌に有害であり、磷脂質は菌の深部発育に作用しないと報じているが、本実験においても牛血清脂質劃分は有害なる作用を認めえた。ただ、しかしな

が脂質劃分の添加量の小さいときは結核菌深部発育をなさしめる作用のあることを知りえた。この事実は注意されるべきことと考えられるのであつて、本実験で抽出に用いた血清蛋白はすなわち血清の総蛋白質であり、結核菌発育に有害とされているグロブリン劃分等を含有している。恐らくこれら阻害成分を除いて抽出を行つた場合卵黄磷脂質劃分と同様な結核菌深部発育性物質をうるのではないかと考えられる。このように結核菌深部発育には血清中又は卵黄中の脂質ことに磷脂質成分がその主要なる作用をなしているように考えうるのである。

磷脂質なる物質についていささか考察してみるに、本化合物は化学構造上不飽和脂酸であるオレイン酸、リノール酸を含有せる複雑なる物質である。結核菌々体には相当量(約 6.54%)の磷脂質を含有しているが⁶⁾、このことは結核菌の発育上磷脂質の重要性を考えさせられる。磷脂質は水中において親水性ゾルを形成する性状を有しているが、この性状により培地中の結核菌々体表面は著しい変化をうけるものと考えられるのである。すなわち磷脂質加ソートン培地では結核菌は表面発育よりかえつて深部発育へ傾くのであるが、この事実は結核菌々体表面が親水性と変化させられているように考えられる。Dubos 等の実用化せる Tween 80 の如く、その表面活性化と菌発育とは連関性があるもののようである。又オレイン酸は今日結核菌発育上必要なる物質と考えられている点より考察しても磷脂質の意義は深いものようである。

最近片山⁷⁾は簡易なる卵黄加深部培地を発表しているが本培地は卵黄蛋白を含有していることは勿論ながら、卵黄中磷脂質及び脂質等をコロイド状に含有している点誠に興味深いことと考えられた。

む す び

1) 牛血清蛋白を塩酸々性アルコール低温処理すると、処理蛋白は結核菌深部発育能が著しく低下又は消失する。そこで酸性アルコール抽出部を分割し各成分の深部発育能を検討し、脂質成分の重要性を認めた。

2) 牛血清蛋白及び卵黄より脂質ことに磷脂質劃分を分離しその結核菌に対する深部発育能を調べた。卵黄磷脂質劃分は無蛋白状態で結核菌をよく深部発育せしめる。牛血清脂質では卵黄磷脂質劃分程充分なる深部発育能をみなかつたが、わずかながら無蛋白状態で結核菌が深部発育しうるのを認めた。

3) 卵黄磷脂質劃分は血清と併用するとより一層深部発育を促進する。しかしながら表面発育は阻止され返つて菌は沈下し深部発育する傾向を有している。血清脂質は血清と併用すると高濃度添加では返つて発育阻害的で相当の阻害因子の混在をみとめた。

4) 結核菌深部発育には血清中又は卵黄中脂質ことに磷脂質劃分が主要なる作用をなしていると考えられる。

(本研究は文部省科学研究費によつた。)

(戸田教授の御指導御校閲と武谷助教授の御好意を感謝します。)

文 献

1) 三淵一二：結核，26：628，昭26.

2) Youmans, A.S., and Youmans, G. P. : J. Bact., 60: 561, 1950.

3) 原 一郎：日新医学，38：499，昭26.

4) 喜多源逸：油脂化学及試験法，505，昭7.

5) Boissvain, C.H. : Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med., 44: 110, 1940.

6) 戸田忠雄：結核菌とBCG，50，昭19.

7) 片山正治：大阪大学医学雑誌，4：27，昭26.

新刊

東大助教授 医学博士 坂本秀夫 著

人工気腹療法

A5判200頁 函入
定価300円 千実費

現在広く行われて、その適応症の範囲が極度に拡大されてきた人工気胸療法は、他の虚脱療法・直達療法の発達や、その遠隔成績等から深刻な再批判をうけるに至り、その適応症の選択を一層厳格、慎重にして正しく施行しなければならない方法となつてきた。それ故、人工気腹療法の今までの広汎な適応症中の一部は、当然人工気腹療法の適応症に代えるべきものが少なくない。

更に人工気腹療法は、その施行が簡単で危険がないのみならず、人工気胸療法で屢々起る無気肺、膿胸或いは肺膨脹不全等の合併症を起すことがなく、その他の合併症又は偶発症も比較的少ないので、この数年来、特にアメリカにおいて圧倒的に広く応用されてきている。

わが国においても2,3年来漸く本治療法が応用され始めているが、飽くまで正しい適応症を選んで、肺結核症の単独療法として、或いは化学療法と併行して或いは他の虚脱療法や直達療法の補助療法として、正しく施行されてゆくことを希望して、その人工気腹療法一般に関して多数の鮮明な図を挿んで詳述し実地医家の参考に供したのが本書の使命である。

内 容 目 次

第1章 人工気腹療法発達の歴史	第8章 偶発症と合併症
第2章 人工気腹の生体に及ぼす影響	第9章 人工気腹と化学療法との併用
第3章 人工気腹療法の作用機転	第10章 人工気腹と他の虚脱療法との併用
第4章 人工気腹療法の適応症	第11章 人工気腹療法の効果
第5章 人工気腹療法の禁忌	第12章 結 語
第6章 人工気腹の実施法	○ 文 献
第7章 人工気腹の完成・継続・完了	○ 索 引

東京都中央区(京橋局区内)銀座西7の1

発行所 株式会社 東西医学社

振替口座 東京 2818 番
電話銀座(57)2126—2129番