BCG の塩凝集反応に関する研究

第 1 報

北海道大学結核研究所予防部 (指導 高橋 義夫教授)

山 本 健 一

(昭和 27 年 10 月 10 日受付)

(本研究の一部は文部省科学研究費によつた。高橋)

I 緒 言

膠質化学的現象としての細菌の塩凝集は、Malvoz¹⁾ が 1897 年チフス菌の昇永水による凝集を報告して以来、種々の細菌について多数の業績が報告されているが、BCG に関しては殆んど研究がないようである。先にわれわれは BCG の自然凝集の機転を追求する意味において、BCG の酸凝集反応の研究を行つたが²⁾、さらに引き続いて、今回は BCG の塩凝集反応の研究を行つたので報告する。

II 実験方法

1) 供試 BCG 菌株：予研より分与された予研株 (所謂日本株、アメリカ株及びフランス株の 3 種類である。

2) 菌浮游液：上記の BCG のソートン培養 (ソートン移植 1 代乃至 3 代) 7 日乃至 21 日目の菌膜を集め、蒸留水で可及的充分に洗滌後、型の如く水晶玉入りコルベンを用いて手振法か、或いは水平振盪機によつて 1cc 10mg 含有の菌液を作り、これを毎分 2000 回転 10 分間遠心洗滌して可及的菌塊を除去し、かくして得た平等菌液を蒸留水で 5 倍に稀釈して用いた。

3) 供試塩類溶液：塩化第二鉄・硫酸銅・醋酸鉛及び醋酸亜鉛のモル溶液

4) 反応実施方法：凝集反应用小試験管に供試液 $m/10$ の溶液から 1, 2, 5 法を以て稀釈したもの 4cc を取り、これに菌浮游液 1cc を加えた。

5) 判定方法：反応実施後、試験管を直ちに 37°C フラン器内に放置し、1 時間、3 時間、6 時間及び 24 時間後に観察し、次のように判定を試載した。

- (-)；一様に濁濁せるもの
- (±)；僅かに細かな凝集塊らしきものが認められるが、それが真の凝集か否か疑わしいもの
- (+)；極めて小さな凝集塊が一様に認められるもの
- (++)；一部の凝集塊が試験管の底部に集り、(+) の時より大きな凝集塊が上部に一様に認められるもの
- (+++)；完全に凝集し、上清が全く透明となつたもの

III 実験成績

A) 生菌を使用した場合

成績は第 1 表である。すなわち塩化第二鉄では $m/5,000$ 及び $m/10,000$ 、硫酸銅及び醋酸鉛では $m/10$ から $m/5,000$ 、醋酸亜鉛では $m/10$ から $m/500$ の間でそれぞれ凝集が見られた。そしていずれの塩でも反応域は最初の 1 時間目でほぼ決り、以後反応の程度が増強するとともに、僅かながら反応域も拡大した。

第 1 表 BCG の塩凝集反応—生菌を使用した場合 (予研株 2 週培養)

塩類	濃度 判定 時間	濃度									
		$m/10$	$m/100$	$m/200$	$m/500$	$m/1,000$	$m/2,000$	$m/5,000$	$m/10,000$	$m/20,000$	$m/50,000$
塩化第二鉄	1 時	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-
	3 時	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-
	6 時	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-
	24 時	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-
硫酸銅	1 時	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-
	3 時	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
	6 時	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-
	24 時	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
醋酸鉛	1 時	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-
	3 時	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-
	6 時	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
	24 時	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
醋酸亜鉛	1 時	++	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	3 時	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
	6 時	+++	+++	++	±	-	-	-	-	-	-
	24 時	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-

B) 3 つの菌株による実験

成績は第 2 表であるが、3 菌株間に差異は殆んど認められなかつた。

C) 加熱死菌を使用した場合

所定の如く製造した BCG 菌液を重湯煎で 60°C 1 時間、及びコツホの釜で 100°C 1 時間それぞれ加熱したものについて同様に実験した成績が第 3 表である。すなわち 60°C 加熱の場合の反応域は、時間的に追求しても、生菌の場合と殆んど同様であつた。しかしながら 100°C

第2表 BCG の塩凝集反応—菌株別による反応(2週培養)

塩類	菌株	濃度		m/									
		判定時間	m/10	100	200	500	1,000	2,000	5,000	10,000	20,000	m/	
塩化第二鉄	アメリカ	1時	-	-	-	-	-	-	+	±	-		
		24時	-	-	-	-	-	-	+	+	-		
	フランス	1時	-	-	-	-	-	-	+	+	-		
		24時	-	-	-	-	-	-	+	+	-		
	予研	1時	-	-	-	-	-	-	+	+	-		
		24時	-	-	-	-	-	-	+	+	-		
硫酸	アメリカ	1時	+	+	+	+	+	+	-	-			
		24時	+	+	+	+	+	+	+	-			
	フランス	1時	+	+	+	+	+	+	-	-			
		24時	+	+	+	+	+	+	+	-			
	予研	1時	+	+	+	+	+	+	-	-			
		24時	+	+	+	+	+	+	+	-			
醋酸	アメリカ	1時	+	+	+	+	+	+	+	-	-		
		24時	+	+	+	+	+	+	+	+	-		
	フランス	1時	+	+	+	+	+	+	+	+	-		
		24時	+	+	+	+	+	+	+	+	-		
	予研	1時	+	+	+	+	+	+	+	+	-		
		24時	+	+	+	+	+	+	+	+	-		
醋酸亜鉛	アメリカ	1時	+	+	-	-	-	-	-	-			
		24時	+	+	+	+	-	-	-	-			
	フランス	1時	+	+	±	-	-	-	-	-			
		24時	+	+	+	+	-	-	-	-			
	予研	1時	+	+	±	-	-	-	-	-			
		24時	+	+	+	+	-	-	-	-			

第3表 加熱 BCG 菌液の塩凝集反応(予研株3週培養)

塩類	加熱温度	濃度		m/									
		判定時間	m/10	100	200	500	1,000	2,000	5,000	10,000	20,000	m/	
塩化第二鉄	生菌	1時	-	-	-	-	-	-	+	-	-		
		24時	-	-	-	-	-	-	+	+	-		
	60°C	1時	-	-	-	-	-	-	+	-	-		
		24時	-	-	-	-	-	-	+	+	-		
	100°C	1時	-	-	-	-	-	-	+	-	-		
		24時	-	-	-	-	-	-	+	±	-		
硫酸	生菌	1時	+	+	+	+	+	+	-	-			
		24時	+	+	+	+	+	+	+	-			

加熱の場合は、塩化第二鉄を除き、生菌の場合に比し反応域はやや拡大した。

D) 菌液に石炭酸又はフォルマリンを作用させた場合

所定の如く作った BCG 菌液に、石炭酸を 2% 及び 0.5% 又、フォルマリンを 1% 及び 0.5% の割合にそれぞれ加えて室温に 1 昼夜放置した後、各塩溶液において、その凝集状態を観察した。成績は第 4 表に示した如く、石炭酸及びフォルマリンで処置した菌液の凝集も、生菌の場合と比べて殆んど差がなかった。

IV 考 察

塩凝集反応において細菌が凝集するとき、その溶液の最小濃度すなわち凝集価は、塩類の陽イオン原子価に関するという事実は、既に鈴木³⁾、宮村⁴⁾、今成⁵⁾が種々の塩類と多数の細菌について認めるところであるが、われわれが行った BCG による実験でも同様である。すなわち矢張り膠質における Schulze 氏の法則に従い、重金属塩類の金属原子価に比例して凝集し、又同価の塩でも、その凝析価 $Zn < Pb < Cu$ の順と凝集価の大きさが一致している。塩化第二鉄が特異の凝集帯を作り、 $m/5,000$ から $m/10,000$ 付近で BCG 菌液を凝集させることは、他の鼠チフス・赤痢・脳脊髄膜炎などにおける実験⁶⁾、と同様である。

加熱死菌を用いての塩凝集においては、100°C 加熱死菌の凝集域が生菌及び 60°C 加熱死菌に比して拡大したが、これは加熱温度の差が菌体物質の変化に差を来した為であろうか。しかしながら石炭酸・フォルマリンによる死菌での実験では、それらが全く凝集域に影響を及ぼさず、生菌のそれと殆んど同じであつた。この点に関しては、宮村⁷⁾がサルモネラ・赤痢菌族において鞭毛を欠くものはフォルマリン・石炭酸によつて、塩凝集に影響を受けないと述べているのと軌を一にしている。

V 結 論

- 1) BCG も塩化第二鉄・硫酸銅・醋酸鉛及び醋酸亜鉛などの溶液中で凝集し、凝集の強さは、それらの金属原子価に比例した。特に塩化第二鉄は特異の凝集帯を示した。
- 2) 本凝集反応においては、使用せる 3 菌株間の差異は全く認められなかつた。
- 3) 加熱死菌の場合は、60°C 加熱死菌は生菌と全く同じ態度をとり、100°C 加熱死菌はやや凝集域を拡大した。
- 4) フォルマリン及び石炭酸は塩凝集域に見るべき影響を与えなかつた。

酸	60°C	1 時	+	+	+	+	+	+	-	-
		24 時	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
銅	100°C	1 時	-	-	-	-	-	-	-	-
		24 時	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
醋	生菌	1 時	+	+	+	+	+	+	±	-
		24 時	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
酸	60°C	1 時	±	±	-	-	-	-	-	-
		24 時	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
鉛	100°C	1 時	-	-	-	-	-	-	-	-
		24 時	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
醋	生菌	1 時	+	±	-	-	-	-	-	-
		24 時	卅	卅	卅	+	-	-	-	-
酸	60°C	1 時	±	±	±	-	-	-	-	-
		24 時	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-
鉛	100°C	1 時	+	+	±	±	-	-	-	-
		24 時	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-

終りに恩師高橋教授の御指導と御校閲を心から感謝する。

文 献

- 1) Malvoz. E: Ann. Inst. Pasteur, 11:582, 1897.
- 2) 山本健一: 結核に発表の予定
- 3) 鈴木保寿: 成医会雑誌, 45: 642, 大正 15.
- 4) 宮村定男: 北越医学雑誌, 54: 1422, 昭 14.
- 5) 宮村定男: 同上誌, 56: 182, 昭 16.
- 6) 今成昇次: 新潟医学雑誌, 63: 735, 昭 24.

第4表 フォルマリン, 石炭酸加 BCG 菌液の塩凝集反応

塩類	濃 度	濃 度									
		m/10	m/100	m/200	m/500	m/1,000	m/2,000	m/5,000	m/10,000	m/20,000	
塩化第二鉄	フォルリン 1 0.5 %	-	-	-	-	-	-	卅	卅	-	-
	カルボ 2 0.5 %	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	-
生菌		-	-	-	-	-	-	卅	卅	-	-
硫	フォルリン 1 0.5 %	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-
	カルボ 2 0.5 %	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-
銅	生菌	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-
醋	フォルリン 1 0.5 %	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-
	カルボ 2 0.5 %	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-
鉛	生菌	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-
醋	フォルリン 1 0.5 %	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	-	-
	カルボ 2 0.5 %	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-
鉛	生菌	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-

註: フランス株 7 日培養, 判定時間 24 時間目