

BCGの酸凝集反応に関する研究

第1報 形態学的研究

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)

(本研究は文部省科学研究費による。高橋)

I 緒 言

膠質化学的現象としての細菌の酸凝集反応は、大腸菌・赤痢菌・緑膿菌・肺炎双球菌・脾脱疽菌及び結核菌などその他多数の菌について行われているが、BCGに関してはあまり詳細な研究がなく、僅かに高橋・田淵の業績¹⁾があるのみである。

元来、BCGは、これを菌浮游液にした場合、極めて容易に自然凝集を起し、このことが人体接種の場合の膿瘍発生に極めて密接な関係をもつていると考えられている²⁾、又菌液の平等性を保持することは實際上かなり重要な事柄と思われるので、われわれは今回、BCGの自然凝集の機転を追求する意味において、まずその酸凝集の研究に着手したのである。

まず初めに反応其物を形態的に追求した。

II 実験方法

1) 使用したBCG菌株：当研究所に従来より保存してあつた2株(以下これをBCG(A)及び(B)株とす)、予研より分与された予研株(いわゆる日本株)、アメリカ株及びフランス株の計5種類である。

2) 菌浮游液：上記のBCGソートン培養(ソートン移植1代乃至3代)9日乃至21日目のものから、菌膜を型の如く、水晶玉入コルペンを用いて、手振法或いは水平振盪機による振盪法によつて、1cc 10mg含有の菌液をつくり、これを毎分2000回転10分間遠心沈澱して可及的菌塊を除去し、上清をとつて5倍に稀釈して用いた(菌液調製には実験により蒸溜水を用いるか、或いは $M/5$ Na_2HPO_4 と $M/15$ KH_2PO_4 の緩衝液 $1/100$ 容量を含むPH 7.0の蒸溜水又は生理的食塩水を用いた)。菌液は製造直後か、又は氷室に保存したものを使用した(製造後使用迄の日数は実験成績表にその都度示した)。

3) 使用した溶液：Michaelis及びMc Ilvaine³⁾の方法による緩衝液、並びに各種の酸の定規液である。

4) 水素イオン濃度の測定：比色計を用いた。

5) 反応実施方法：凝集反応用小試験管にまず供試液4ccを取り、これに菌浮游液1ccを加えた。

6) 判定方法：反応は室温又は37°Cフラン器内(いずれかは実験成績表にその都度示した)に放置し、30

分・1時間・3時間・6時間及び24時間後に、それぞれ試験管を静置した場合と、これを軽く振つた場合を、肉眼的に、時にルーペで対照試験管と比較観察し、次のように判定を記載した。

(-)：対照管と変りなく一様に濁らせるもの

(±)：僅かに細かな凝集塊が認められるが、真の凝集かどうか疑わしいもの

(+)：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に集り、(+)のとき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 緩衝液による酸凝集

使用したMichaelis及びMc Ilvaine緩衝液は第1及び第2表の通りで、PH域は各々1.8~5.0及び2.2~5.8である。

第1表

Michaelisの緩衝液

第2表

Mc Ilvaineの緩衝液

PH	1N	蒸	1N	1N	PH	0.2M	0.1M
	苛	溜	醋	酒		第	枸
	性	水	酸	石		1	橈
	ダ			酸		1	酸
	cc	cc	cc	cc		cc	cc
5.0	5	87.5	7.5		2.2	0.40	19.60
4.7	5	85	10		2.4	1.24	18.76
4.4	5	80	15		3.0	4.11	15.89
4.1	5	70	25		3.6	6.44	13.56
3.8	5	50	45		4.0	7.71	12.29
3.3	5	87.5		7.5	4.2	8.28	11.72
3.0	5	85		10	4.4	8.82	11.18
2.7	5	80		15	5.0	10.30	9.70
2.4	5	70		25	5.4	11.15	8.85
2.1	5	50		45	5.6	11.60	8.40
1.8	5	10		85	5.8	12.09	7.91

1) 生菌を使用した場合

菌液は蒸溜水で調製した。成績はMc Ilvaineの緩衝

液の場合は第3表, Michaelis の場合は第4表である。これ等の表に明らかのように、いずれの場合も、反応1時間後で PH 3.0 を中心としてその近くに凝集が見られ、時間とともに反応域が拡がり、反応も強度になり、24時間後には、Mc Ilvaine ではPH2.2~5.4, Michaelis では PH 1.8~4.7 の間に凝集が見られたが、最強の凝集は両者ともに PH 2.4~3.6 に現われている。

第3表 Mc Ilvaine 緩衝液における酸凝集
BCG(A)株 菌液製造直後 (37°C フラン器内)

時間	PH										対照 食塩水
	2.2	2.4	3.0	3.6	4.2	4.4	5.0	5.4	5.6	5.8	
1時	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
24	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

第4表 Michaelis の緩衝液における酸凝集
BCG予研株 菌液製造直後 (37°C フラン器内)

判定時間	PH										
	1.8	2.1	2.4	2.7	3.0	3.3	3.8	4.1	4.4	4.7	5.0
1時	-	±	+	+	+	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

次に菌液を緩衝生理的食塩水及び緩衝蒸溜水で作作り、Mc Ilvaine の緩衝液で実験を行つた成績が第5表である。この成績を見ると、菌液を製造する場合、単なる蒸溜水を用いても、緩衝蒸溜水或いは生理的食塩水を用いても、反応域には認むべき変化がないことがうかがわれる。

第5表 Mc Ilvaine 緩衝液において、菌浮游液を緩衝蒸溜水及び緩衝生理的食塩水で作つた場合の酸凝集
BCG予研株 菌液調製直後 (37°C フラン器内)

菌液	判定時間	PH										対照
		2.2	2.4	3.0	4.0	4.2	4.4	4.5	5.0	5.4	5.8	
緩衝蒸溜水	1時	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	±	+	+	±	-	-	-	-	-	
	6	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
	24	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
緩食塩生理的水	1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
	3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	

次に酸凝集に及ぼす温度の影響を検するために、所定の如く Mc Ilvaine 及び Michaelis の緩衝液に、菌液を加えたものの一部を直ちに37°Cフラン器内と、他を室

温(10°C~15°C)及び氷室(3°C~5°C)に放置して反応を追求した。その成績がそれぞれ第6 a, 第6 b 表である。これ等の成績から、温度が高いと、凝集域が拡大するのが明らかに見られる。

第6表 a 温度の酸凝集に及ぼす影響
(Mc Ilvaine 緩衝液の場合)

反応場所	判定時間	PH									
		2.2	2.4	3.0	4.0	4.2	4.4	5.0	5.4	5.8	
フラン器内	1時	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	24	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
室	1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	+	+	±	±	±	-	-	-	-
	24	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
氷室	1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	24	+	+	+	+	±	±	-	-	-	-

第6表 b 温度の酸凝集に及ぼす影響
(Michaelis 緩衝液の場合)

反応場所	判定時間	PH										
		1.8	2.1	2.4	2.7	3.0	3.3	3.8	4.1	4.4	4.7	5.0
フラン器内	1時	-	±	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
室	1	-	±	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	24	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
氷室	1	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	-	±	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	24	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

以上の実験成績から見ると、BCG生菌の酸凝集は、緩衝液の種類・菌株・反応時の温度により凝集域に多少の差を生ずるが、凝集至適 PH は一定であるといえよう。

2) 加熱死菌を使用した場合

所定の如く製造したBCG菌液を重湯煎でそれぞれ、60°C, 80°C 1時間、又コッホの釜で1時間加熱したものについて前回同様の実験をした。その成績は第7表である。これで見ると、60°C 加熱の場合は、反応域を時間的に追及しても、生菌の場合と全く同様であつた。こ

れに対し 100°C, 80°C 加熱の場合は, 反応域は生菌の場合よりやや狭い。しかしいずれの場合も凝集至適 PH は同一である。

第7表 加熱BCG菌浮游液の酸凝集 (Mc Ilvaine の緩衝液)

BCG予研株 菌液(緩衝蒸溜水)製造直後 (37°C フラン器内)

加温 熱度	PH 判定 時間	PH									対照 PH 7.0
		2.2	2.4	3.0	4.0	4.4	5.0	5.4	5.6	5.8	
100°C 加熱 死菌	1時	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	3	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	6	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	24	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
80°C 加熱 死菌	1	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	3	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	6	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	24	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
60°C 加熱 死菌	1	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-
	3	-	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	6	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	24	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
対照 生菌	1	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-
	3	-	±	+	±	-	-	-	-	-	-
	6	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	24	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

3) 菌液に石炭酸又はフォルマリンを作用させた場合
まずBCG緩衝蒸溜水浮游液に石炭酸及びフォルマリンをそれぞれ 2%, 0.5%, 0.1% の割合に加え, 室温に 18 時間放置した後, Mc Ilvaine の緩衝液で所定の如く

第8表 石炭酸, フォルマリンを作用させたBCG菌浮游液の酸凝集 (Mc Ilvaine の緩衝液)

BCGアメリカ株 菌液製造直後 (37°C フラン器内)

濃度 判定 時間	PH	PH									対照 緩衝 蒸溜水
		2.2	2.4	3.0	3.6	4.2	5.0	5.6	5.8		
石炭酸 2%	1時	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	3	+	+	+	+	+	+	+	±	-	
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	24	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
炭酸 0.5%	1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
	3	+	+	+	+	+	+	±	-	-	
	6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	24	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
炭酸 0.1%	1	-	+	+	+	+	-	-	-	-	
	3	-	+	+	+	+	-	-	-	-	
	6	-	+	+	+	+	+	+	-	-	
	24	-	+	+	+	+	+	+	+	-	

濃度 判定 時間	PH	PH								
		2.2	2.4	3.0	3.6	4.2	5.0	5.6	5.8	
フォルマリン 2%	1時	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	6	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	24	+	+	+	+	+	+	+	-	-
フォルマリン 0.5%	1	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	3	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	6	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	24	-	+	+	+	+	+	+	-	-
フォルマリン 0.1%	1	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	3	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	6	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	24	-	+	+	+	+	+	+	-	-
無処置 生菌	1	-	±	+	+	+	-	-	-	-
	3	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	6	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	24	-	+	+	+	+	+	+	+	-

酸凝集反応を試みた。その成績は第8表である (なおこれらの菌液中, 石炭酸 0.1% 加菌液以外はいずれも小川培地に集落を生じなかつた。又実験完了後各試験管のPHを更めて測定したが変化はなかつた)。この成績によると, フォルマリンを2%の割合に加えたものの反応は, 無処置の対照に比して反応域が低い方へ移動するのが見られたが, その他には大差はなかつた。

B 単なる酸液による酸凝集

本実験においては, 塩酸・硫酸・硝酸・氷醋酸・酒石酸及び枸橼酸等の定規液を蒸溜水で逐減稀釈して反応を

第9表 塩酸・硫酸及び硝酸による酸凝集

稀釈	PH								
	N/100	N/320	N/640	N/1280	N/2560	N/5120	N/10240	N/20480	
塩酸 判定 時間	2.2	2.6	3.0	3.2	3.4	3.8	4.6	5.0	
	1時	-	+	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-
	6	+	+	+	+	+	-	-	-
硫酸 判定 時間	2.2	2.6	2.2	2.6	2.8	3.0	3.6	4.0	
	1時	+	+	+	+	+	-	-	
	3	+	+	+	+	+	+	-	
	6	+	+	+	+	+	+	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-	-	-	-	
	3	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸 判定 時間	2.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.2	5.4		
	1時	-	-	-	-				

試みた。各試験管の PH は反応完結後に測定して記載した。用いた BCG は予研株で、菌液は蒸留水で作った。反応はすべて室温 10°C~15°C で観察した。成績は第 9, 10, 11 表である。これ等の成績に明らかに見られるように、いずれの酸溶液においても、凝集は PH 3.6 以下において認められ、最大凝集は PH 2.8 前後である。且つ反応域も大体同様であつて殆んど差が認められない。

C 酸凝集反応の可逆性並びに本反応と菌の生死に関する実験

第 10 表 氷醋酸による酸凝集

稀釈	N/5	N/10	N/20	N/50	N/100	N/200	N/500	N/1,000
PH	2.6	2.8	3.0	3.2	3.3	3.4	3.6	4.0
判定時間								
1 時	+	+	+	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	±	-	-
6	+	+	+	+	+	+	-	-
24	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-

第 11 表 酒石酸及び枸橼酸による酸凝集

稀釈	N/15	N/30	N/60	N/120	N/240	N/480	N/960	N/1920	N/3840	N/7680
PH	2.2	2.4	2.6	2.8	3.0	3.2	3.4	3.6	4.0	
判定時間										
酒石酸										
1 時	±	+	+	+	+	+	±	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
24	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-
枸橼酸										
PH	2.2	2.4	2.4	2.6	2.8	3.0	3.2	3.4	3.8	4.0
判定時間										
1 時	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
24	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-

第 12 表 氷醋酸による酸凝集と PH の変動による反応域変化

BCG(A)株 菌液製造後48時間氷室保存
反応室温 29°C

判定時間	1 時	3 時	6 時	PH	加えた緩衝液 cc	修正 PH	24 時	
濃度							修正	対照
10%	-	-	-	2.2	1	2.4	-	-
5	-	-	-	2.4	1	2.8	卅	-
1	±	+	卅	2.8	0.5	3.2	卅	卅
0.2	±	+	卅	3.3	0.5	3.8	卅	卅
0.02	-	±	+	4.7	0.5	4.4	-	卅
0.04	-	-	-	5.4	0.5	5.8	-	-
0.0008	-	-	-	5.8	0.5	7.0	-	-

まず 10% の氷醋酸を蒸留水で第 12 表に示す如く稀釈して、これ等に所定の如く菌液を加えた。次いで反応 6 時間目に緩衝液 (N/15 KHPO₄, N/15 Na₂HPO₄ をそれぞれ 3 対 7 の割合に混合したもの) を表の通りに加え、一方無処置の対照とともに反応 24 時間後に観察した。第 12 表に示されたその結果を見ると、氷醋酸液の PH 値の移動に伴つて反応域も移動し、最強の凝集は矢張り PH 3.3 前後に見られる。

次に Mc Ilvaine 緩衝液と酒石酸で酸凝集反応を行い、反応実施後 6 時間目に、予め滴定しておいたアンモニアの所定量を各試験管に加えて中性にもどし、反応実施後 24 時間目に観察した成績が第 13, 第 14 表である。表

第 13 表 Mc Ilvaine 緩衝液における酸凝集の可逆性

BCG(B)株 菌液製造 2 日目 反応室温 30~32°C

判定時間	1 時	3 時	6 時	アンモニア滴加数	24 時	修正 PH
PH						
2.4	±	+	+	7	-	8.0
3.0	+	卅	卅	5	-	7.0
3.6	+	卅	卅	4	-	6.8
4.2	-	±	+	4	-	7.6
5.0	-	-	±	4	-	7.8
5.4	-	-	-	3	-	7.8
6.0	-	-	-	3	-	7.8

第 14 表 酒石酸による酸凝集反応の可逆性

BCG(B)株 菌液製造直後 反応室温 28~30°C

稀釈	判定時間	1 時	3 時	6 時	アンモニア滴加数	24 時	修正 PH	
N/60	PH	2.6	-	±	+	6	-	8.0
N/120	PH	2.8	±	+	卅	6	-	8.2
N/240	PH	3.0	±	+	卅	5	-	8.2
N/480	PH	3.2	-	±	+	5	-	8.0
N/960	PH	3.4	-	-	-	4	-	8.0
N/1920	PH	3.8	-	-	-	4	-	8.2

第 15 表 Mc Ilvaine 緩衝液における酸凝集による菌の生死

BCG 予研株 菌液製造直後 反応室温 30°C

判定時間	凝集反応成績				培養成績	
	1 時	3 時	6 時	24 時	6 時	24 時
PH						
2.4	±	±	±	+	卅	+
3.0	±	+	+	卅	卅	+
3.6	±	+	+	卅	卅	卅
4.2	-	±	±	卅	卅	卅
5.0	-	±	±	卅	卅	卅
5.4	-	-	-	-	卅	卅
6.0	-	-	-	-	卅	卅

第 16 表 硫酸を用いた酸凝集による菌の生死
BCG(A)株 菌液製造直後 反応室温29~30°C

株 積	PH	判定時間			アンモニア修正 PH	修正後培養成績	
		1時	3時	6時		6時	24時
N/160	1.8	—	—	—	7.8	卅	卅
N/320	2.2	—	—	—	7.8	卅	卅
N/640	2.4	—	±	±	7.8	卅	卅
N/1280	2.6	±	+	卅	8.0	卅	卅
N/2560	3.6	±	+	卅	8.0	卅	卅
N/5120	4.4	—	—	—	8.2	卅	卅
N/10240	5.4	—	—	—	8.0	卅	卅

に示す如く反応6時間目に明らかに見られた凝集は、PHを中性にもどすと、24時間目では全く消失して、菌液は平等になった。

以上の事実は酸凝集反応が可逆反応である事を示している。

次に酸凝集によつてBCG菌の生死が如何に影響されるかを見る目的で、反応6時間目及び24時間目に各試験管の内容を蒸留水で100倍稀釈し、その0.1cc宛を小川培地に培養した。その成績が第15、第16表である(培養成績は集落数の多寡により卅、卅、+とした)。これ等の成績を見ると、酸凝集反応其物は直接BCG菌の生死に関せず、単に反応に使用した溶液のPHが低い程、すなわち酸度が高い程、菌の死滅が早く来ることが分る。

IV 考 察

BCGも Michaelis⁹⁾及びその後の人達⁵⁾⁻¹⁰⁾が他の細菌について認めた如く、酸凝集を起す。而して、その酸凝集反応の至適PHは、菌株・酸及び緩衝液の種類により、又反応の際の温度によつて反応域に多少の変動はあるが、3.0~3.6の附近である。

加熱死菌による酸凝集に関する研究は、大腸菌を用いて岡崎¹¹⁾が、チフス菌・パラチフス菌及びコレラ菌を用い長沢¹²⁾がそれぞれ報告し、いずれも生菌と多少異なると述べている。

又、フォルマリン或いは石炭酸による死菌を用いての塩凝集は宮村¹³⁾、空原¹⁴⁾が報告しているが、BCG加熱死菌及び石炭酸或いはフォルマリンによる死菌は生菌に比べて、反応域に多少の変化を呈するが、最強凝集反応を起す至適PHには変りはない。

BCGの酸凝集反応は、酸の種類、濃度、又緩衝液の如何に関せず常に同一のPH域において起ること、及

びPHの移動により反応域もこれと平行して移動することから考えれば、該反応は他の細菌の場合と同様に、単に水素イオン濃度の如何により決定されるものである。又本反応は可逆反応であり、反応其物は菌の生死に直接影響しないと考えられる。

V 結 論

1) BCGは酸凝集を起した。その最強凝集域はPH3.0~3.6であつた。この酸凝集反応は酸乃至は緩衝液の種類によらず単に水素イオン濃度により決定される。

2) 本凝集反応には菌株による差は認められなかつた。加熱・フォルマリン・石炭酸による死菌は反応域に多少の差を呈したが、最強凝集域は不変であつた。

3) 反応時の温度によつて凝集域に多少の差を生ずるが、最強凝集域には変化がなかつた。

4) BCGの酸凝集は可逆反応である。又、反応そのものによつて菌体が死滅することはなかつた。

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) 高橋・田淵：未発表(要旨第2回北海道地方結核病学会にて発表)
- 2) 高橋義夫：結核，27：149，昭27.
- 3) 安東洪次：比色的水素イオン濃度測定法及其の實際的応用：南江堂，大15.
- 4) Michaelis. L: Deutsh. med. Wshr. 37: 269, 1911.
- 5) Beniasch. M: Z. Imm. I. Abt (Orig.), 12: 268, 1912.
- 6) Sgalitzer. M: Z. Hyg, 76: 209, 1913.
- 7) Heimann.W: Z. Imm, I. Abt (Orig.), 16: 127, 1913.
- 8) Grieszykiewicz. M: Z. Imm. I. Abt(Orig.), 24: 482, 1916.
- 9) Eisenberg.: Zbl. Bak. Abt I. (Orig.), 83: 70, 1919.
- 10) 笠井経次郎：日本微生物学会雑誌，17：大12.
- 11) 岡崎 一：千葉医学会雑誌，15：1017，昭12.
- 12) 長沢修三郎：北越医学会雑誌，41：215，大15.
- 13) 宮村定男：北越医学会雑誌，56：182，昭16.
- 14) 空原 実：日本細菌学誌，6：95，昭26.