

液体培地における結核菌の発育に伴う液体及び菌体の生化学的变化に関する研究

第4報 人型菌青山B株を Sauton 培地に培養した Old Tuberculin の変化

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

(昭和 27 年 11 月 5 日受付)

I 緒 言

先きにわれわれ¹⁾²⁾は人型菌青山B株及び H₃₇・H₂ 株等を Sauton 培地 100cc に培養した後各週ごとに培養を中止し、殺菌することなく菌体と液体とに別ち、液体は殺菌後濃縮せず培養前培地量となしたものについて、培地成分中の種々なる項目を検査した成績を報告した。併しこの実験では培養後濾液を濃縮していないので実際の OT の製法とは違っているので、今回は培養後隔週毎に培地 1,000cc ずつを用い、常法によつて 1/10 に濃縮したものについて、各種項目を検査し第1報の濃縮しない場合と比較を行つたのでここに報告する。

II 実験方法

- 1) 菌株：人型菌青山B株
- 2) 培養方法：500cc 「ツ」コルペンに Sauton 培地 250cc を分注滅菌したもの多数に上記菌株を培養した。
- 3) 試料の調製：培養後隔週毎にコルペン4本(合計1,000cc)ずつの培養を中止し、殺菌後数週間放置し、次で濾紙で濾過し菌体はそのまま乾燥して菌量を測定した。濾液は水浴上で 1/10 に濃縮した。この濃縮液を用い

て各項目の試験を行つた。

4) 定性及び定量試験法：前2報に記載した方法によつたのでここでは省略する。

5) 力価試験法：予研標準ツベルクリン希釈液(2,000倍希釈)に対し、各週の原液も2,000倍の希釈液としたものを用いた。動物実験には人型菌青山B死菌流パラ6mg感作モルモットを用い、人体試験にはBCG接種者及び自然感染者の含まれている学童を用いた。

6) 血球凝集反応：Middlebrook³⁾の方法によつた。抗体としては牛10株死菌流パラ感作後24週目の家兎血清2種類(No. 6及び9)を用い、抗原としては各週の濃縮原液を30倍に希釈したものを用いた。

III 実験成績

Sauton 培地に青山B株を培養し、隔週毎に「ツ」原液を作り、その化学的变化を検査した成績は第1～3表並びに第1～6図の如くである。また第1報の実験中、今回と関係ある検査項目だけを比較のため表示すれば第4表の如くである。

1) 菌量及び液量：乾燥菌量は4週から急に増加し、

6週で最高を示し、以後10週まで比較の変動少なく、14週からは徐々に菌量を減少するも、20週に至つても最高時の20%しか減量していない。また液量も培養後8週までは漸減しているが、その後20週までは、あまり変化はない。これを前報と比較するの、今回の菌量及び液量とも14週以後における減少が少なかった。これは前報の場合は培地量が少な

第1表 Sauton 培地 1,000cc に青山B株培養後、1/10濃縮した場合の各週変化

週別	液		体					菌 体		力 価 (Ratio)		
	PHI *		液量	蒸発残量	還元量	総N量	蛋白N量	湿潤量	乾燥量	動 物		人 体
	前	後								24時	48時	
対照	7.2	5.4	1,000	54.2	59	749	0	0	0			
II	6.6	5.0	711	43.7	54	595	10	6.5	1.0	0.33	0.29	0.57
IV	6.2	5.0	611	25.6	159	289	17	48.4	6.9	0.82	0.71	1.06
VI	5.4	5.0	584	16.3	394	346	30	41.5	7.5	0.99	1.07	1.02
VIII	5.2	4.9	486	13.4	426	373	37	46.7	6.4	1.03	1.02	1.10
X**	5.1							49.7	7.5			
XV	5.1	5.0	483	14.8	550	410	34	41.8	6.3	1.10	1.10	1.02
XVI	5.1	5.0	577	15.1	574	464	44	44.5	6.7	1.09	1.05	1.09
XX	5.0	4.6	472	14.3	506	444	47	38.6	6.0	1.03	0.98	1.02

註：*前後とは濃縮前後のこと、**滅菌中破損

第 2 表 定 性 試 験

反 応 週 別	糖				蛋 白									
	フ エ ー リ ン グ	ベ ネ デ イ ク ト	ニ イ ラ ン デ ル	モ ー リ ッ シ ユ	ニ ン ヒ ド リ ン	ビ ユ レ ッ ト	坂 キ サ ン ト ア ロ テ	イ キ サ ン	T ・ B ・ P ・ E	ア ル メ ン	磷 ウ オ ル フ ラ ム	ズ ル フ オ サ リ チ	三 塩 化 醋 酸	飽 和 硫 安
対 照	-	-	-	-	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-
II	-	-	-	-	卅	卅	-	+	+	-	-	+	+	-
IV	+	+	卅	卅	卅	卅	-	卅	卅	+	+	卅	卅	+
VI	卅	卅	卅	卅	+	卅	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+
VII	卅	卅	卅	卅	+	+	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
XV	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+
XVI	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
XX	+	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

第 3 表 人 体 皮 内 反 応 成 績 (48 時 間 判 定)

週 別	検 査 人 員	Ratio	「ツ」の 区 分	陽 性		硬 結		二 重 発 赤	水 泡
				実 数	%	実 数	%		
II	79	0.57	S T	75	94.9	8	10.1	0	0
				46	58.2	0	0	0	0
IV	62	1.06	S T	53	65.5	5	8.1	0	0
				54	67.1	0	0	0	0
VI	39	1.02	S T	68	58.6	5	7.3	3	2
				68	58.6	0	0	0	0
VII	69	1.10	S T	62	89.9	2	2.9	1	0
				66	95.6	0	0	0	0
XV	61	1.02	S T	56	91.8	16	26.2	0	0
				51	83.6	12	19.7	0	0
XVI	83	1.09	S T	73	88.0	35	42.2	4	0
				76	91.6	22	26.5	1	0
XX	43	1.02	S T	38	90.5	2	4.6	0	0
				38	90.5	5	11.5	1	0

註： 1. 対象は学童， 2. S—標準液 T—試験液

第 4 表 Sauton 培地 100cc に青山 B 株培養後濃縮しないものの変化 (第 1 報の実験)

週 別	液 体			菌 体 乾 燥 量	力 価		定 性 反 応				
	PH	液 量	蒸 発 残 量		動 物	人 体	モ ー リ ッ シ ユ	ベ ネ デ イ ク ト	キ サ ン ト ア ロ テ	T ・ B ・ P ・ E	三 塩 化 醋 酸
対 照	7.2	96.2 ^g	5.01 [%]				-	-	-	-	-
II	7.7	85.6	4.73	0.098	0.66	0.76	-	-	-	+	-
IV	6.5	72.5	2.79	0.648	0.79	1.00	+	-	+	+	+
VI	6.0	60.8	1.19	0.673	0.99	1.13	卅	+	+	+	+
VII	5.8	57.0	0.66	0.617	1.13	1.17	卅	卅	卅	卅	+
X	5.7	49.7	0.54	0.468	1.29	1.09	卅	卅	+	卅	卅
XIV	5.6	32.7	1.00	0.407	1.24	1.05	卅	卅	+	卅	卅

いため、操作中の損失及び蒸発等による影響が大きい為と思われる。

2) PH: 培養の進むに従い PH は酸性度を増すも 6 週以後は殆んど同一値を示した。しかし濃縮後の PH はいずれも 5.0 前後であつた。なお前報では培養後 3 週まではアルカリ性を呈しその後酸性となつていたが、今回ではアルカリ性の時期を見ることができなかつた。これは殺菌の際の加熱と殺菌後ややながく菌体を分離せずに放置していたことに因るものと思われる。

3) 蒸発残量及び還元量: 蒸発残量は週を追つて減少し、8 週で最低を示し、以後幾分か増加している。これは大体前報と等しい。

還元量は 6 週から急に増加し、その後培養の進むに従つて漸次増量している。これも前に報告した H₂S 及び H₂SO₄ 株などの場合と等しい傾向を示した。

4) 総 N 量及び蛋白 N 量: 総 N 量は培養の進むに従つて減少し、4 週で最低を示し、その後漸次増量している。これに反し蛋白 N 量は週とともに増加し、8 週まではかなり急に増加するもその後の増加はやや緩慢である。

5) 力価: 動物では 6 週から、人体では 4 週から標準液と等しい力価を呈し、その後 20 週まで Ratio 1.00 から 1.10 の間を変動している。すなわち人体による力価試験の結果は大体前報と等しいが、動物では前報のものは 15 週まで週とともに力価は強まつていたが、今回ではあまり差を生じていない。これは濃縮による影響と考えられる。

6) 血球凝集反応: 免疫血清の種類により幾分相違はあるが、No. 9 血清では 6 週から、No. 6 血清では 8 週から 20 週まで 320 倍の血清に対して反応している。

IV 総括及び考按

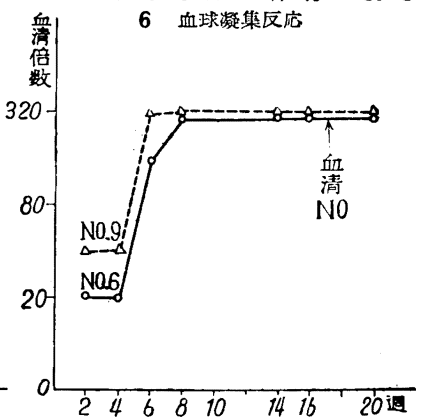
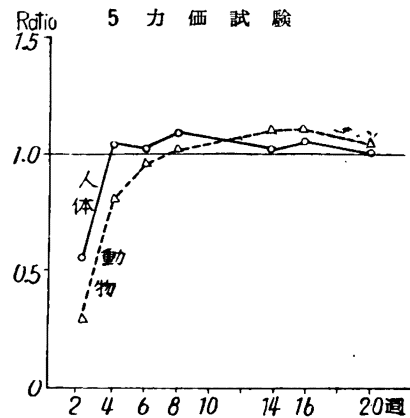
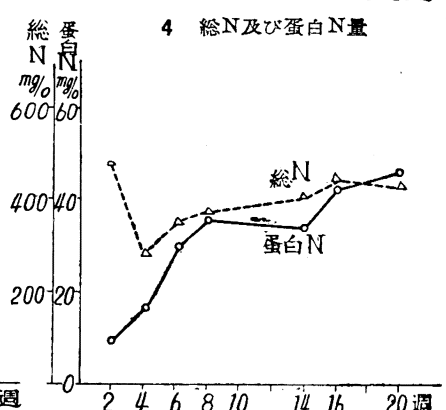
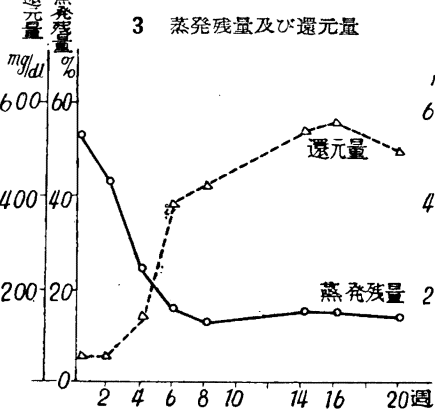
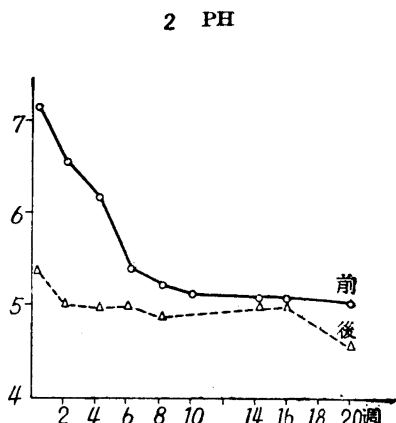
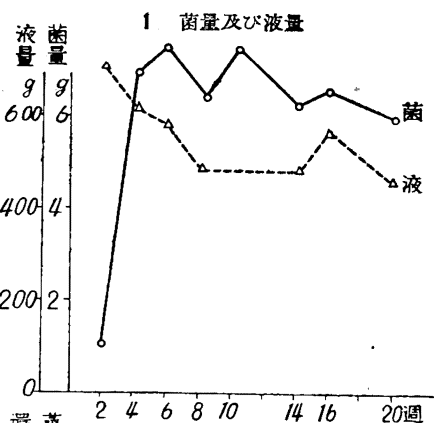
1) 第 1~2 報の実験は各菌株を培養後、濃縮しない場合の成績であつたが、今回は培養後普通の OT 製

造と同様な方法によつて、濃縮したものについて各週による変化を調べた結果、大体において前報の成績と類似していた。すなわち各検査項目の急速に変化するの、培養後4週目であり、6~8週以後20週までは殆んど一定の値を保つていた。また力価も動物及び人体ともに6~8週に至れば、一定の値となる。ただ人体では4週から標準液と等しくなるのに対し、動物では6週から標準液と等しくなっている。これは第1報にも述べた如く、培養初期には発赤を起す物質が多く、後期に至り硬結を起す物質が多く産生されて来るためと、人体とモルモットによる皮膚の反応性の相違とに起因するものと思われる。

2) 培養後各週の試料を抗原として、免疫血清に対する血球凝集反応を行つたのに、培養後6~8週から一定の値を保

つていることがわかつた。これは前述の各検査項目の安定する時期と同一であり、興味ある事実である。また血球凝集反応の抗原分析の結果、炭水化物分割が蛋白分割よりも強く反応すると Gernez et Jaegnaet⁴⁾ 及び Hilson & Elek⁵⁾ 等が報じている。われわれも抗原分析中であつてまだ結論には達しないが今までの成績からすれば、大体炭水化物分割の方が強く反応している。またこのことは濾液中の還元量の生現時期及び量等とも関係あるようである。

3) 従来OTの製造には8週培養のものが用いられ、わが国の基準も大体8週培養のものをを用いている。しか



し今回の実験並びに前報等から考按するに、Sauton 培地によく慣れた菌株であれば、培養後6週に至れば大体において濾液中の化学的成分並びに力価等が安定しさらにながく培養しても、あまり著しい変化は認められなかつた。これらのことから、OT製造には6週培養のものでもよいと思われる。

V 結 言

Sauton 培地に人型菌青山B株を培養後、2~20週まで隔週毎に培養を中止して、OTを製造し、数種の化学的性質並びに力価試験を行つた結果次のことを結言する。

1) 菌量は4週目頃において急速に増加し、6~10週で最高を示し、以後徐々に減少した。

2) PH・蒸発残渣・還元量・蛋白N量・血球凝集反応の抗元性等も4週目で急速に変化し、6~8週において一定値となり、その後の変動は僅少であつた。

3) 力価は人体試験では4週から、動物試験では6週から、標準液と等しくなり、その後の変化は少なかつた。

4) 以上の事実より、OTを製造する場合の培養日数は6週でもよいと思う。

稿を終るに当り、御指導と御校閲とを賜つた柳沢部長に謹んで謝意を表す。なおこの研究費の一端は文部省

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。

文 献

- 1) 浅見 望外 4名：結核，27，215，昭和27年。
- 2) 浅見 望外 5名：結核，28，117，昭和28年。
- 3) Middlebrook, G., : J. Clin. Invest., 29, 1480. 1950.
- 4) Gernez-Rienx, C. H. et Jacgaet, A. : Ann. de. L. Inst. Pasteur de Ciel, 3, 1. 1950.
- 5) Hilson, G. R. F. & Elek, S. D. : J. Clin. Path. 4, 158. 1951.