

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5報 人型菌 H₂ 及び H₃₇ 株を Dorset 培地に培養した場合の変化

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
上野一恵・土田誠三・三浦 馨

(昭和 27 年 11 月 5 日受付)

I 緒 言

Dorset¹⁾ が合成培地を調製し、人型菌を培養したところ、従来のグリセリン・ブイオン培地に比し、菌の発育は数倍良好であり、且つツベルクリン(以下「ツ」)の力価も強いことを報告した。Seibert²⁾ も PPD の精製には初めこの培地を用いたが、「ツ」が着色するのでこれを止め、後程は Long 培地を使用している。終戦後米国によつて紹介された「ツ」製造培地は、この Dorset 培地を用いる Michigan の方法であつた。われわれも従来のグリセリン・ブイオン培地から、この Dorset 培地にかえるため、種々の実験を行つたが、菌株によつて発育のよいもの、或いは甚だ悪いものなどあつた。殊にわが国の「ツ」製造用菌株である青山 B 株はこの培地に対し、時には良好な発育をなすこともあるが、多くの場合、発育は悪かつた。また牛型菌牛₁₀ 株及び BCG 等も青山 B 株以上に発育は不良であつた。しかるに今回の実験に使用した H₂ 及び H₃₇ 株は比較的発育が良好であつたので、この 2 種を Dorset 培地に培養した場合の変化と、先³⁾に報告した Sauton 培地における成績とを比較し、菌株と培地との関係等を追求するためこの実験を行つたので、その大要をここに報告する。

II 実験方法

- 1) 菌株；人型菌 H₂ 及び H₃₇ 株
- 2) 培地；Dorset 培地の処方は次の如くである。

アスパラギン	14.0g
磷酸水素カリ	1.8g
クエン酸ソーダ	0.9g
硫酸マグネシウム	1.5g
クエン酸鉄	0.3g
ブドウ糖	10.0g
グリセリン	100.0g
蒸留水を加えて	1,000cc とする
PH は 6.7~6.8	

これを 300cc の三角コルベンに 100cc ずつ分注し、

100°C 30分ずつ 3 回滅菌した。

3) 培養方法：グリセリン・ブイオン培地に継代培養した両菌株を上記培地に移植し、隔週毎に培養コルベン 2 個ずつを取り出して試験に供した。

4) 菌体及び液体の調製・定性及び定量試験・力価試験：第 2 報と同様なので省略する。

III 実験成績

これらの実験成績は第 1~5 表及び第 1~10 図の如くである。表及び図を見れば大体の傾向がわかるので、説明は省略する。但し先の Sauton 培地における比較は次の考按のところで述べる。

IV 総括及び考按

1) Dorset 培地における菌量は第 7 図に見る如く、2 つの山を描いている。すなわち第 1 の山は、H₂ 株では 6 週目に、H₃₇ 株では 5 週目にあり、第 2 の山は第 1 の山よりも高く、H₂ 株では 9 週目に、H₃₇ 株では 10 週目にある。また定量培養による生菌数もこの菌量と相関して増減している。すなわち両株とも培養当初には多数の生菌が認められるが、培養の進むに従つて生菌数を減じてゆき、菌量の第 2 の山のできる時期において、生菌数は再び増している。たとえば H₃₇ 株では 6 週目の生菌数は最も少なく、その後の週においてはまた増加している。また H₂ 株においても 10⁻⁵ の培養のところを見れば 7 週では零であるが 8~12 週では再び少数ながら生菌が認められる。かかる現象は先の Sauton 培地においては認められなかつたことである。これは両菌株とも急速な発育増殖をした後、培養後 5~6 週において培地成分の変化によつて、一方において菌の発育速度を減ずるか、或いは停止し、他方において死滅菌の自家融解が起るため、菌量は 1 時減少するものと思う。次で変化した培地に慣れた菌(或いは耐えた菌)が第 2 次の増殖をなすため第 2 の菌量の山が描かれるものと考えられる。このことは菌株によつても相違がある。すなわち本実験では H₂ 株よりも H₃₇ 株の方がより顕著に表れている。また

H₃₇ 株では後述する PH, 力価等の変化も大体にこの菌量と平行して 2 ッの山を描いている点からも肯定されると思う。

2) Dorset 培地と先の Sauton 培地とにおける両菌株の最大発育時期の菌量を比較すると次の如くである。

菌株	Sauton培地(S)		Dorset培地(D)		倍数(D/S)		
	週	菌量	週	菌量			
H ₂	7	1.165g	100	9	1.676g	100	1.44
H ₃₇	7	0.893g	77	10	2.335g	139	2.61

すなわち Sauton 培地では H₂ 株の菌量を 100 とすれば H₃₇ 株は 77 となり、後者の発育は劣っている。しかるに Dorset 培地ではこの反対であつて H₂ 株の 100 に対し H₃₇ 株は 139 となり、後者が明らかに前者より発育が良好である。この実験からすれば H₃₇ 株は Dorset 培地に対し好適であるとい得る。

また両培地における菌量を比較するに、Sauton 培地を 1 とした場合 Dorset 培地では、H₂ 株が 1.44 倍、H₃₇ 株が 2.61 倍の増量となり、両株とも Dorset 培地

第 1 表 人型菌 H₂ 株を Dorset 培地に培養した場合の変北

週別	液 体							菌 体				力 価		
	PH	液量	蒸発残量	還元量	総N量	蛋白N量	乾燥菌量	デヒドロゲナーゼ	定量培養		動 物		人体	
									10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	24h.	48h.		
対 照	0	6.8	95.0	12.2	831	251								
	4	5.8	87.8	11.7	813	248								
	8	5.6	74.3	13.0	869	226								
	12	5.2	63.6	11.2	807	250								
	1	6.8	93.8	12.3	807	253	0.56	0.003				0.32	0	0.34
	2	7.4	90.5	11.0	819	243	1.68	0.005	4—45	1008	96	0.41	0.32	0.56
	3	7.2	86.9	10.9	672	236	2.80	0.080	5—50	307	51	0.61	0.58	0.75
	4	6.4	80.1	9.6	423	204	2.24	0.347	6—50	299	26	0.76	0.79	0.91
	5	6.2	77.4	8.9	426	204	3.92	0.449	5—30	246	39	0.81	0.68	0.94
	6	6.4	79.0	6.6	175	152	4.48	1.330	5—40	133	29	0.77	0.73	1.20
	7	5.9	74.0	7.6	267	177	2.24	1.269	3—45	65	6	0.86	0.81	1.02
	8	5.6	63.5	6.6	199	157	2.80	1.135	11—45	0	0	0.86	0.88	0.99
	9	5.6	66.0	4.8	176	124	2.80	1.676	16—30	1	0	0.89	0.81	0.99
	10	5.4	59.8	5.8	300	151	3.92	1.359	26—30	4	0	0.91	0.84	0.98
	12	5.0	53.3	5.2	240	151	3.36	1.401	163—20	4	0	0.83	0.81	1.03
	14	4.8	40.0	3.8	244	134	5.60	1.342	180以上	0	0	0.90	0.82	1.13

第 2 表 人型菌 H₃₇ 株を Dorset 培地に培養した場合の変化

週別	液 体							菌 体				力 価		
	PH	液量	蒸発残量	還元量	総N量	蛋白N量	乾燥菌量	デヒドロゲナーゼ	定量培養		動 物		人体	
									10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	24h.	48h.		
1	7.0	84.3	12.8	693	247	1.68	0.124					0.44	0	0.48
2	6.8	90.0	10.7	336	239	1.68	0.165	5—50	2,703	377	0.40	0.28	0.45	
3	7.8	82.1	8.4	210	160	3.36	0.881	4—50	1,492	69	0.65	0.72	0.90	
4	7.0	76.0	7.2	216	132	10.64	1.463	14—50	187	27	0.90	0.82	1.44	
5	7.0	70.6	4.3	96	77	13.44	2.034	8—20	244	32	1.04	1.09	1.60	
6	6.6	59.0	4.6	150	106	21.84	1.785	16—50	229	35	1.14	1.28	1.51	
7	6.8	61.5	4.3	150	115	32.48	1.708	9—25	237	63	1.17	1.12	1.52	
8	6.8	56.5	3.6	96	73	30.24	1.853	12—30			1.21	1.33	1.73	
9	7.0	46.0	2.4	54	58	23.96	2.199	17—45	285	63	1.26	1.34	1.88	
10	6.8	42.5	1.6	63	51	19.04	2.335	26—50	316	55	1.22	1.43	1.67	
12	6.8	41.5	1.6	48	69	22.46	1.982	32—30	375	52	1.48	1.35	1.58	
14	5.0	29.0	1.1	54	51	24.64	1.742	180以上	375	93	1.37	1.35	1.65	

註：1, 対照は第 1 表と同じ 2, 定量培養は 10 本の総数を記した

第3表 Dorset 培地における H₂ 及び H₃₇ 株の定性反応

菌 株	週 別	糖				蛋 白							
		フ	ベ	ニ	モ	ニ	ビ	キ	T	ズ	三	ア	飽
		エ	ネ	イ	ー	ン	ユ	サ	ト	ル	フ	塩	和
		ー	デ	ラ	リ	ヒ	ー	ト	ー	オ	化	硫	
		リ	イ	ン	ツ	ド	レ	ー	ー	サ	醋	酸	
		ン	ク	デ	シ	リ	ッ	テ	ー	リ	メ	安	
		グ	ト	ル	ユ	ン	ト	ー	ー	チ	酸	母	
对照	0	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	-	-	-	-	
H ₂	1	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	-	-	-	-	
	2	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	-	-	-	-	
	3	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	+	-	
	4	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	卅	+	
	5	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	卅	+	
	6	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	卅	卅	
	7	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	
	8	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	
	9	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	
	10	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	
	12	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	
	14	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	
	H ₃₇	1	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	-	-	-	-
		2	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	-	-	-	-
3		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	+	+	
4		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	+	+	
5		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	卅	+	
6		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	+	
7		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	
8		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	
9		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	
10		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	
12		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	
14		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	卅	卅	卅	

が Sauton 培地よりも、はるかに発育が良好であった。

なお、われわれが Dorset 培地を使用し初めた頃に行つた実験ノートを参考に記せば次の如くである。この実験は各培地 100cc を 300cc の三角ホルベン 5本に培養し、培養9週後において殺菌したものの乾燥菌量（5本の平均量）である。

菌 株	Glycerol broth 培地		Sauton 培地		Dorset 培地	
	菌量	比	菌量	比	菌量	比
青山B	0.69g	100	0.65g	100	1.55g	100
Frankfurt	0.71	101	0.72	111	1.35	87
牛 ₁₀	0.87	126	0.92	141	0.79	51
B C G	0.71	101	1.08	166	0.27	17

この表で見る如くグルセリン・ブイオン培地ではこの4菌株による菌量差は少ないが、Sauton 培地ではB C Gの菌量が最も多く、牛₁₀株これに次ぎ、青山B及びフランクフルトの両株は少ない。これに反し Dorset 培地では青山B株が最もよく、フランクフルト株はこれに次ぎ、B C Gは甚だ悪かつた。

このように結核菌の発育は、その菌株と移植培地との間に、菌の増殖上密接な関係がある。なおかかる比較実

第4表 H₂ 株の人体皮内試験（48時間後判定）

週 別	検査人員	Ratio	区 分	陽 性		硬 結		二重発赤	水 泡
				数	%	数	%		
1	86	0.34	S	81	94.2	20	23.2	2	0
			T	24	27.9	15	17.5	2	0
2	90	0.56	S	84	93.3	16	17.8	4	9
			T	43	47.8	8	8.9	1	0
3	87	0.75	S	84	95.6	29	33.2	2	0
			T	66	75.9	17	19.5	2	0
4	87	0.91	S	74	85.1	19	21.8	2	0
			T	65	74.7	7	8.1	3	0
5	87	0.94	S	75	86.1	19	21.8	6	0
			T	67	77.0	18	20.7	7	0
6	70	1.20	S	59	84.3	21	30.0	4	0
			T	61	87.1	29	41.5	9	0
7	67	1.02	S	60	89.6	17	25.4	6	0
			T	56	83.6	17	25.4	9	1
8	95	0.99	S	79	83.2	25	26.3	0	5
			T	78	82.1	18	24.2	1	11
9	134	0.99	S	115	85.8	8	6.0	1	3
			T	115	85.8	9	6.7	1	2
10	93	0.98	S	89	95.7	3	3.2	0	0
			T	86	92.5	3	3.2	0	0
12	93	1.03	S	89	95.7	9	9.7	0	2
			T	86	92.5	8	8.6	0	1
14	101	1.13	S	94	93.1	18	17.8	0	3
			T	92	91.1	9	9.1	0	2

註：S...標準液
T...各週試料（いずれも2,000倍希釈液）

第5表 H₃₇ 株の人体皮内試験（48時間後判定）

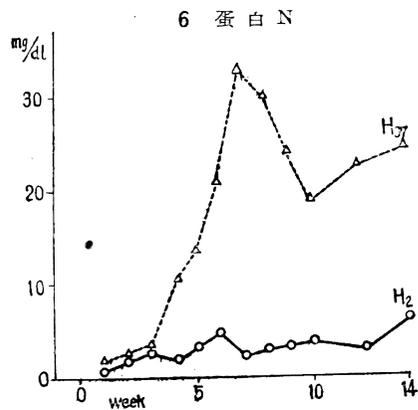
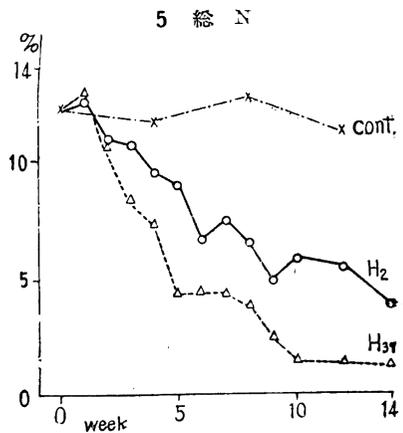
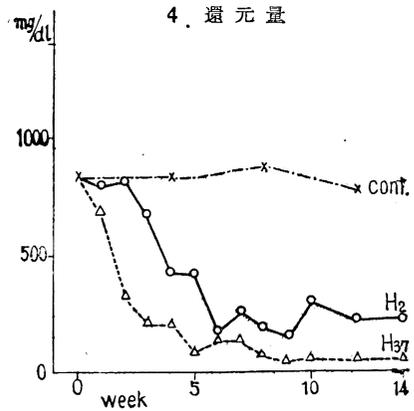
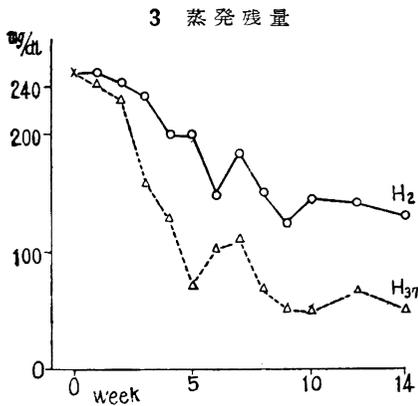
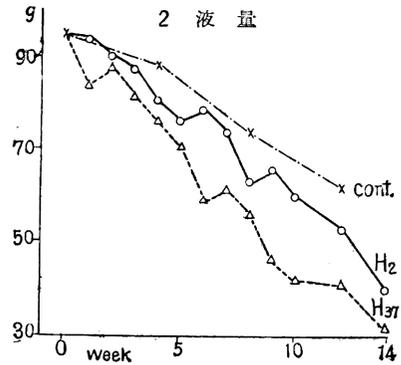
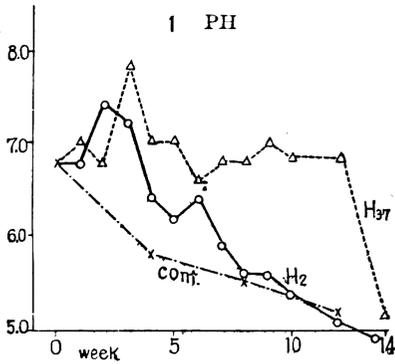
週 別	検査人員	Ratio	区 分	陽 性		硬 結		二重発赤	水 泡
				数	%	数	%		
1	110	0.48	S	51	46.3	20	18.2	10	1
			T	32	29.0	15	13.6	1	0
2	115	0.45	S	73	63.5	16	14.9	4	1
			T	40	34.8	6	5.2	0	0
3	118	0.90	S	107	90.7	33	28.0	6	1
			T	102	86.4	17	14.4	7	1
4	106	1.44	S	68	64.1	20	18.9	3	0
			T	80	75.7	33	31.1	9	0
5	72	1.60	S	59	81.9	5	6.9	0	0
			T	64	88.9	27	37.5	5	0
6	113	1.51	S	85	75.2	12	9.9	1	0
			T	108	89.3	21	10.6	5	0
7	65	1.52	S	65	100	20	30.8	0	0
			T	65	100	39	60.0	0	0
8	103	1.73	S	65	63.1	20	19.4	1	0
			T	92	89.3	39	37.8	1	4
9	58	1.88	S	47	81.0	9	15.5	0	0
			T	55	94.8	29	50.0	1	0
10	122	1.67	S	95	77.9	17	14.0	0	0
			T	108	88.5	60	49.2	0	0
12	83	1.57	S	74	89.2	32	38.5	0	0
			T	79	95.2	27	32.5	0	0
14	118	1.65	S	106	89.8	8	6.8	0	0
			T	117	99.2	23	19.5	0	0

験を行う際においては移植前の培地、その培地における継代回数、培養日数並びに移植菌量等甚だ微細の点まで注意を払って行つた実験でなければ、正しい比較をなし得ないのは勿論のことである。

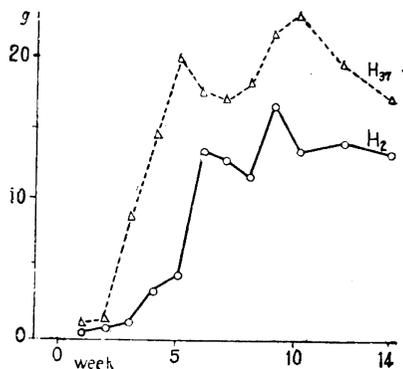
3) Dorset によれば培養8週後の「ツ」液の PH はアルカリ性となつている。しかるに今回の実験においては、H₂ 株では先の Sauton 培地の場合と等しく培養の進むに従つて酸性の度を加えている。ただ H₃₇ 株のみは20週まで中性近くを保つたに過ぎない。しかしわれわれが先に行つた実験ノートの PH の成績を示せば次の如くである。

菌 株	Glycerol broth培地	Sauton培地	Dorset培地
青山B	5.6	5.4	8.1
Frankfurt	5.4	5.4	9.2
牛10	5.6	5.4	6.8
B C G	5.4	5.8	6.0

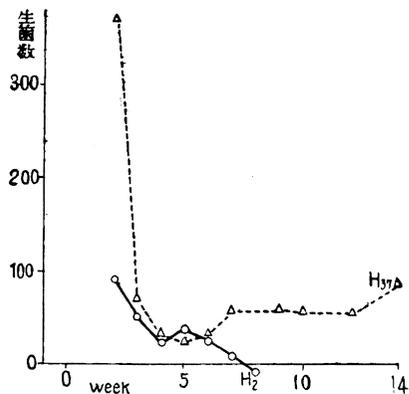
上の如くグリセリン・ブイヨン及び Sauton 培地9週培養のPHは、いずれの菌株も大体 5.4~5.6の間であるが、Dorset 培地の PH は人型菌の2株はアルカリ性であるが、牛10及びBCG株では6.8及び6.0であつた。しかしこの2菌株とも Sauton 培地に比すれば中性に傾



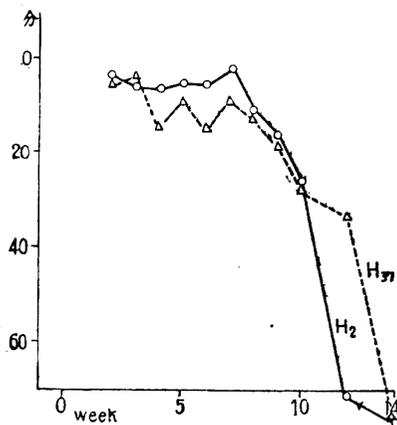
7 菌量



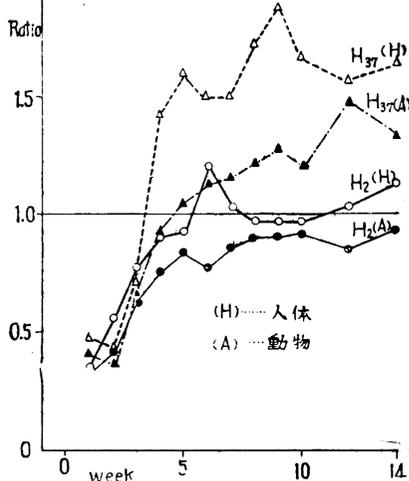
8 培養 10⁻⁶



9 Dehydrogenase



10 力価



いている。しかしこの実験の後、青山B株をDorset培地に培養を繰返してゆくと、あるときはアルカリ性となり、あるときは酸性となり、終末PHが培養毎に異り、常に一定ではなかつた。この原因の探求は行つていないが、考えられることは使用薬品の純度と培地の滅菌方法等がこの培地のPHを左右するものと思う。例えば今回の実験においても、菌を移植しない対照培地をフランキに12週間入れておいただけで初め6.8のPHが5.2まで酸性となつている。もしこの対照培地をながくフランキに入れて置いてもPHに変化を来さないようなDorset培地であれば、これに菌を移植した成績もおのずから今回の成績とは異なるであろう。

4) 最後に力価について検討してみるのに、H₂株では動物及び人体試験とも比較的弱い。H₃₇株ではH₂株よりはるかに力価は強く、特に人体試験では先に報告したいずれの菌株よりも強かつた。なお動物と人体による力価の差もこの培地では顕著である。これらの培養8週における成績を先のSauton培地のもののRatio及び蛋白Nとを比較すれば次の如くである。

菌株	Sauton 培地			Dorset 培地		
	動物	人体	蛋白N mg/dl	動物	人体	蛋白N mg/dl
H ₂	0.82	1.11	1.96	0.86	0.99	1.40
H ₃₇	0.96	1.01	2.80	1.21	1.73	30.24

上の如く、動物と人体とによる力価試験の結果はやや相違するも、大体においてSauton培地では両株の差は少ないのに反し、Dorset培地ではH₃₇株がH₂株に比し、はるかに強い。また「ツ」中の蛋白N量もSauton培地では両株の間に著しい差は認められないが、Dorset培地では、H₂株はSauton培地と等しいが、H₃₇株はSauton培地の10倍以上の蛋白N量を有している。すなわちこの蛋白N量と力価とは大体において平行していることが認められる。さらに菌量と力価との関係を見るに、H₃₇株では平行関係を有するも、H₂株ではDorset培地の菌量がSauton培地よりも多いのにも拘らず力価は等しいか、或いはやや弱く表れている。これは菌の発育は良好であつても濾液中の蛋白量が少なければ、力価の増加は来さないものと思う。故に力価と関係の深いのは

菌量よりも、むしろ「ツ」中の蛋白量であると思われる。

V 結 言

人型菌 H₂ 及び H₃₇ 株を Dorset 培地に培養し、週を追つて、菌の発育と培地中の成分の変化を調べた結果次のことを結言する。

- 1) 菌量は H₃₇ 株が H₂ 株より多く、また両株とも菌の増加には2つの山が認められた。
- 2) PH は H₂ 株では4週以後酸性となるも、H₃₇ 株では4週から12週まで中性を保つていた。
- 3) 培地中の葡萄糖は菌の発育に伴つて、減少してゆき、両株とも5～6週にいたれば初め加えられた量の1/8位まで減少し、その後 H₃₇ 株ではさらに徐々に減少するも、H₂ 株では幾分増加の傾向を示した。
- 4) 総N量は菌の発育するに従い減少するも、蛋白N量は漸次増加している。この変化は H₃₇ 株が H₂ 株よりも顕著であつた。

5) 定量培養による生菌数は、H₂ 株では培養週の進むに伴い漸減するも、H₃₇ 株では5週まで漸減し、その後14週まで比較的多数の生菌が認められた。

6) 力価は、H₂ 株では培養が進んでも比較的弱く、H₃₇ 株では人体による場合4週以後急速に高い力価を示したが、動物では漸次力価を増している。

終りに臨み常に御指導を賜つた柳沢部長に深謝する。また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ここに記して謝意を表する。

文 献

- 1) Dorset, M.: J. Am. Vet. Med. Ass., 103, 154, 1934.
- 2) Seibert, F. B.: Am. Rev. Tbc., 30, 713. 1934.
- 3) 浅見 望池 5名: 結核, 28, 3, 117, 昭 28.