

結核菌の深部発育に関する研究

第4報 深部発育因子としての磷脂質特に Lecithin 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 28 年 6 月 15 日受付)

(本論文の要旨は昭和 28 年 5 月第 26 回日本細菌学会総会において報告した。)

結核菌深部培養における添加血清の作用の本態に関しては今日なおあまりつまびらかでない。さきに第3報¹⁾において血清並びに卵黄中の結核菌深部発育因子を追究した結果、磷脂質劃分が深部発育にとって最も重要な因子であることを報告した。結核菌の発育と磷脂質については、Boissevain & Schultz²⁾は卵黄磷脂質劃分が結核菌の発育を促進することを認め、続いて Dubos³⁾は Sphingomyelin による結核菌の発育を報告している。

本邦においては鴻上⁴⁾は卵黄 Lecithin 培地を検討し、この場合結核菌は発育しないと述べ、吉永⁵⁾は Lecithin, Cephalin を培地に添加すると却つて菌の発育を阻害すると報じている。

本研究は深部発育有効因子である磷脂質劃分について追究し、深部発育因子が磷脂質そのものであることを認めたので、さらに磷脂質中特に Lecithin についてその作用を調べた。その結果血清中の結核菌深部発育因子として Lecithin の意義は重要であることを認め、血清の作用につきいささか考察したので報告する。

実 験

1 Lecithin の結核菌深部発育に及ぼす影響

結核菌の深部発育因子として磷脂質劃分の重要性を認めたが、先ずこの劃分中の有効因子が磷脂質そのものであるか、またはこの中に含有される磷脂質以外のものによるのであるかを追究した。すなわち磷脂質劃分として卵黄より抽出したものを用い (CCl₄ 法による磷脂質除去残液をさらに抽出した暗褐色脂質成分、一方磷脂質劃分中のアルミナ吸着性の黄色水溶性成分を分離し、それぞれの深部発育能を調べたが、ともに結核菌の深部発育性は認められなかつた。すなわち磷脂質劃分中の有効因子はその中に含まれる不純物中には殆んど存在せず、磷脂質そのものが主要因子であることを認めた。

このような結果から磷脂質中最も含量の多い代表的成分と考えられる Lecithin について、その深部発育促進性を考察した。Lecithin は化学的純粋な住友化学製純 Lecithin を使用して実験した (I.N.: 66. 23, N: 1.89%, P: 4.07%)。

Lecithin 加培地の調製法: 1~3% Lecithin alcohol

溶液の必要量をツベルクリン用注射器に正確にとり、あらかじめ滅菌した Kirohner 原液に急激に添加混合すると安定なコロイド溶液となる。Alcohol の除去のために 100°C 10 分程度 1~2 回加熱した後使用する。このようにして作った Lecithin 加原液は 0.04% 添加ではやや白濁し 0.02% 以下では微白濁ないしは殆んど透明で核発育観察上何らのさしざわりを認めないし、Lecithin のコロイドは安定で培養期間中沈澱を生ずることはない。培地に Lecithin を添加する場合、使用 Lecithin 溶液が 5% 以上の濃厚溶液であると培地の濁濁が著しくなることがあり、また Lecithin 添加の仕方が上述とは逆に Lecithin alcohol 溶液に培地を注入すると著しく濁濁してくる。

このように調製した Lecithin 加培地に人型結核菌青山 B 株の 10⁻³mg 接種し、その深部発育を検討してみると第1表及び写真 I に示す如く、Lecithin 添加の無蛋白「キ」原液で菌は明らかに深部発育を営む。この場合 Lecithin 添加量と深部発育には密接なる関係があるようで、添加量が多いと発育は却つて低下し 0.02% 添加が最適量であつた。Lecithin はこのように結核菌深部発育に有効な因子であることは明らかであるが、Lecithin 最適添加「キ」原液での菌の発育は血清加「キ」培地にくらべ相当劣つている。これは使用した培地の組成は血清にくらべて極めて単純であり栄養源にも相当の不慮があるものと考えられる。そこで Casein 酵素消化物である "Polytamin" (5% 注射液「武田」) をアミノ酸供給源として Lecithin 加「キ」原液に 5% の割合に添加すると菌の発育は旺盛となり、血清加「キ」培地に殆んど変わらなくなるのを認めた。

Lecithin 培地における菌の増殖は血清加培地と同様に深部は菌塊を形成してくるが、血清加培地にくらべ菌塊は幾分粗で絮状沈澱の如き形を呈している (写真 I 巻頭参照)

一方血清加培地にさらに Lecithin を添加した場合は、その添加量 0.02% を境として添加量の増大は却つて発育を阻止する傾向がみられるが、適量添加においては発育をやや促進するようである。

第1表 Lecithin の結核菌深部発育に及ぼす影響

No.	培地	添 加 物	3 週	4 週
L0	キ原液	Lecithin 0	—	—
L1	キ原液	Lecithin 0.01%	+	卅
L2	ヒナ	Lecithin 0.02%	卅	卅
L4	ナ	Lecithin 0.04%	+	卅
PL0	キ原液	Lecithin 0 "Polytamin" 5.0%	—	—
PL1	キ原液	Lecithin 0.01% "Polytamin" 5.0%	卅	卅
PL2	ヒナ	Lecithin 0.02% "Polytamin" 5.0%	卅	卅
PL4	ナ	Lecithin 0.04% "Polytamin" 5.0%	卅	卅
K	キ血清	Lecithin 0	卅	卅
KL1	ヒナ	Lecithin 0.01%	卅	卅
KL2	ナ	Lecithin 0.02%	卅	卅
KL4	ナ	Lecithin 0.04%	卅	卅

註) 接種菌: 人型結核菌青山 B 株 $10^{-3}mg$

第2表 Lecithin の結核菌深部発育に及ぼす影響

No.	培地	添 加 物	2 週	3 週	4 週
L2	キ原液	Lecithin 0	—	—	—
L2	キ原液	Lecithin 0.02%	±	卅	卅
PL2	ヒナ	Lecithin 0.02% "Polytamin" 5.0%	卅	卅	卅
K	キ血清	Lecithin 0	卅	卅	卅
KL2	ヒナ	Lecithin 0.02%	卅	卅	卅
KPL2	ナ	Lecithin 0.02% "Polytamin" 5.0%	卅	卅	卅

註) 接種菌: 人型結核菌青山 B 株 $10^{-3}mg$

Lecithin 最適量 0.02% 添加培地をもつて同様の実験をくりかえしてみたが、第2表にみられるがごとく Lecithin-"Polytamin" 加「キ」原液 (PL2 培地) は発育良好で殆んど血清と変わらない。血清に Lecithin さらにまた "Polytamin" を加えた培地 (KL2 培地または KPL2 培地) では対照の血清加「キ」培地よりやや良好なる発育を示し、Lecithin には結核菌深部発育促進性のあることを認めた。

第3表 血清及び血漿中の磷脂質含有量

	全磷脂質%	Lecithin%	Cephalin%	Sphingomyelin%
人血清	0.140	0.074	0.011	0.055
人血漿	0.208 0.165	0.150 0.117	0.011 0.014	0.044 0.035
牛血清	0.083 0.073	0.060 0.048	0.013 0.002	0.021 0.024

(Sinclair, R.G.: J. Biol. Chem., 174: 355, 1948)

このように Lecithin は深部発育に重要な因子となっているが、その最適の添加量は 0.02% であつて第3表にみられるごとく人または牛血清中の磷脂質含有量⁶⁾

より 10% 血清加培地中の磷脂質含有量を算出した 0.01~0.015% (総磷脂質として) の値に非常に近いことは興味あることと考えた。

2 Glycogen 培地における Lecithin の作用

Kirchner 原液中の Glycerin の代りに Glycogen を 0.3% 添加したものをを用いて実験を試みた。Glycogen は水に溶解し安定なコロイド溶液となり且つこの種 Starch, Glycogen には二、三の細菌に発育促進性のあることが知られており (Müller et al⁷⁾, Boissevain⁸⁾) また高分子であるために或程度保護作用のあることが考えられる。この血清を含まない Glycogen 原液には結核菌は発育しないが、これに血清を 10% 添加した場合でも菌は殆んど発育増殖しない現象を認めた。

かかる状態の Glycogen 原液または Glycogen 血清加培地に Lecithin を 0.02% 添加するときは両者ともに結核菌は発育増殖し菌塊を形成するにいたる。またこの Glycogen 血清培地に Pantothenic acid を添加

するとき結核菌の深部発育は回復して菌塊を形成し、この培地にさらに Lecithin, "Polytamin" を追加するときは菌の発育は良好となるのを認めた。これらの関係は第4表及び写真 II (巻頭参照) にみられるごとくである。

この事実の意義はなお検討を要し充分なる解明をえて

第4表 glycogen 培地における結核菌の発育

No.	Glycogen 培地 5ml 中添加物				培養日数	
	Lecithin %	0.1% Pantothenate ml	Bovine-serum ml	"Polytamin" ml	2 週	3 週
GL0	0	0	0	0	---	---
GL2	0.02	0	0	0	++	卅卅
GS	0	0	0.5	0	---	---
GSL2	0.02	0	0.5	0	卅卅	卅卅
GPS	0	0.1	0.5	0	卅卅	卅卅
GPSL2	0.02	0.1	0.5	0	卅卅	卅卅
GPPS	0	0.1	0.5	0.2	卅卅	卅卅
GPPSL2	0.02	0.1	0.5	0.2	卅卅	卅卅

註) 接種菌: 人型結核菌青山 B 株 $10^{-3}mg$

いないが、Lecithin は菌の栄養源摂取力または菌体の親水性化等にはたらいて深部発育促進的に作用するのではないかと考えられ、Pantothenic acid の作用は明ら

かでないが恐らく菌の代謝を促進し Glycogen 培地での発育をうながしているのではないかと考えられる。

3 Polytamin-Lecithin 加培地 (PL 培地)と血清加 Kirchner 培地との比較

Polytamin-Lecithin 加培地と血清加 Kirchner 培地を比較す検討するために人型結核菌の接種量をかえ菌の発育状況を調べた。培地は 5% に "Polytamin" を加えた Kirchner 原液に Lecithin をそれぞれ 0.01, 0.02, 0.04 及び 0.06% 添加した PL1, PL2, PL4 と PL6 培地を用い、まず Lecithin 添加量と発育を比較検討

した。接種菌は三週間培養の青山 B 株で、これらの培地に $10^{-3}mg$ より $10^{-8}mg$ まで接種菌量を遞減的にかえて培養し菌塊発現状態をしらべた。結果は第 5 表に示したが PL2 培地は発育良好で PL1 及び PL4 培地は発育やや低下し、PL6 培地では殆んど発育はみられなかつた。すなわち Lecithin 添加量は 0.02% を最適とすることをさらに確認しえたが、菌塊発現日数は血清にくらべて約 2~3 日遅れるようである。しかしながらこの培地は血清培地と同様に $10^{-6}mg$ の微量菌接種まで発育し、培養を長期に観察すると発育菌量は血清加のものよ

第 5 表 Lecithin 加培地と Kirchner 血清加培地との比較

培養日数	14					16					18					21					25					28				
接種菌量 mg	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
PL1	+					++					+++					++++					+++++									
PL2	++					+++					++++					+++++					+++++									
PL4	++					+++					++++					++++					++++									
PL6	+					++					++					++					++									
K	++					+++					+++					+++					+++									

{ PL1...Lecithin 0.01% 加培地
{ PL2...Lecithin 0.02% 加培地
PL4...Lecithin 0.04% 加培地
PL6...Lecithin 0.06% 加培地

K...Kirchner 血清加培地

第 6 表 Lecithin 加培地と Kirchner 血清加培地との比較

培養日数	10				12				14				16				18				20			
接種菌量 mg	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-7}
PL2					+				++				+++				++++				+++++			
PL2+B ₁					++				+++				++++				+++++				+++++			
PL2+B ₁ +Me					+++				++++				+++++				+++++				+++++			
K	++				+++				+++				+++				+++				+++			
KL1	++				+++				+++				+++				+++				+++			
KL2	++				+++				+++				+++				+++				+++			

{ PL2...Lecithin 0.02% 加培地
{ B₁...Vitamin 10γ/cc 添加
{ Me...Fe.amn.cit. 2γ/cc CuSO₄ 0.1γ/cc 添加

K...Kirchner 血清加培地
KL1...K培地に Lecithin 0.01% 添加
KL2...K培地に Lecithin 0.02% 添加

り著しく多くなる傾向を示していた。

元來血清の組成は複雑で非常に多くのものが含まれているに反し、PL2 培地はこれに比べ組成はいたつて簡単であるから補足物質として Vitamin B₁, 10γ/cc; Ferric ammonium citrate, 2γ/cc; CuSO₄, 0.1γ/cc をさらに添加し同様の実験を試みた。第 6 表にみられるごとく、この実験では PL2 培地は血清加 Kirchner 培地にくらべ約 4 日程遅れて発育するが、Vitamin B₁ 及び重金属塩

の微量添加によつて菌塊発現日数は短縮し次第に血清に近づきうることを知つた。一方血清加培地にさらに Lecithin を 0.01 及び 0.02% 添加した KL1 及び KL2 培地は対照の血清加 Kirchner 培地より菌発現日数が幾分短縮されるのを認めた。

このように PL 培地に種々なる発育物質を添加し血清培地に近づけうることを認めたが、なお血清そのものによる発育促進作用と同一なる培地は見出しえない。し

かしながら Lecithin は結核菌深部発育因子として重要なものであつて血清中の深部発育作用の有効因子となつてはいることはうかがえたものとする。

総括並びに考察

結核菌深部発育には卵黄または血清中の磷脂質劃分が重要な因子となつてはいることを先に報告したが¹⁾、さらに二、三の抽出法を以てこの劃分中の磷脂質以外の含有物を検討した結果、磷脂質そのものが深部発育有効因子なることを確めた。そこで化学的純粋な Lecithin を以て結核菌深部発育を追究し、Lecithin 加無蛋白培地に明らかに結核菌が深部発育することを認めた。また Lecithin の添加量は菌の発育に著しい影響を有し 0.02% 添加が最適で、これ以上高濃度添加は却つて菌の発育を阻害するのを認めた。実験に使用した Kirchner 原液は組成が単純でなお多くの栄養源の不足が考えられるので、Lecithin の最適添加「キ」原液に "Polytamin"(Casein 酵素消化物)、Vitamin B₁ さらにまた重金属塩の微量を添加するときは、結核菌の発育が血清加 Kirchner 培地に次第に近づいてくるのを認めた。なお Lecithin 培地は血清培地と同様、菌の微量接種においてもよく発育し、血清とひとしく 10^{-6} ~ 10^{-7} mg 菌接種まで明らかに発育を認める。また一方血清加培地にさらに Lecithin を 0.02% 添加すると、その菌の発現日数はやや短縮され明らかに発育促進的傾向を示していた。このように Lecithin は結核菌の深部発育に有効なる因子として作用することを認めた。

結核菌の発育因子として Lipid の重要性は早くより認められ、Boissevain 等²⁾は卵黄中磷脂質劃分の意義を詳細に検討し、これを寒天培地に加えれば無蛋白で卵培地に変わらない結核菌の発育を認めている。Dubos³⁾は高級脂肪酸の重要性を認め Sphingomyelin の作用を検討し、これの添加によつて結核菌は無蛋白培地によく発育することを認め、その作用の本態は血清と同じく保護的な作用と一面高級脂肪酸の供給源としての意義を報告している。また Pratt⁴⁾は *Mycobacterium phlei* について磷脂質劃分の発育促進性を論じている。

Lecithin と結核菌の発育については Boissevain 等²⁾は卵黄よりの分離 Lecithin に菌の発育性を証明しえなかつた。また鴻上⁴⁾は氏のアルカリ性卵黄培地をさらに追究すべく卵黄 Lecithin 培地を作り実験したが結核菌の深部発育を認めないと述べている。吉永⁵⁾は Lecithin にはかえつて菌の発育を阻害することを報告している。

一方培地に添加された血清の意義に関してはなおまだ不明の点が多いようであるが、Dubos¹⁰⁾ 始め多くの研究者は血清蛋白ことに Albumin を重要視し、蛋白はアミノ酸等の供給源として役立つのは勿論であるが、蛋白体による物理化学的保護作用が重要な役割をなし

ていると考えられている。Youmans 等¹¹⁾は血清中の Albumin に結核菌深部発育能のあるのは従来の研究と変わらないが、血清中の Proantithrombin が菌の発育に最も促進的であることを認めている。しかしながら血清蛋白による菌の発育促進性は複雑でなお不明であると述べている。他方勿論血清中の発育有効因子を探索せんとする試みも行われてはいるが¹⁰⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾、今日なおみろべきものがあまりないようである。

前報¹⁾で血清においても磷脂質劃分が深部発育有効因子であることを述べたが、磷脂質とくに Lecithin を中心にその作用を検討し、これが血清中の結核菌深部発育有効因子の重要な一つであることを本実験によつて認めえた。すなわち血清加 Kirchner 培地中に含まれる磷脂質含有量(0.01~0.015%)と大体同一濃度に Lecithin を Kirchner 原液に添加する場合(0.02%)結核菌は血清加培地と殆んど変わらない深部発育を営みうる。このことは Lecithin が血清中の深部発育因子として重要な役割をはたしているだろうということをおうかがわせるものではないかと考えられる。また Glycogen 培地においての菌の発育を観察すると、この培地に血清のみの添加では結核菌の発育は困難であるにかかわらず、これに Pantothenic acid または Lecithin を添加すると結核菌は深部発育を営むようになつてくる。この事実はなお検討を要することであるが、血清中に含まれる深部発育有効因子は恐らく蛋白との結合において存在していると考えられ、高分子の Glycogen 添加はその有効性をさらにおおい、その結果菌の発育を困難としているのではないかと思う。Pantothenic acid の添加は菌の代謝ことに解糖作用を促進しこの Glycogen の作用を排除するにあり、Lecithin 添加は発育有効因子の補足にあるは勿論ながらまた一面菌の栄養源摂取作用を良好とし結核菌の深部発育を可能ならしめているのではないかと想像される。

結核菌とはいささか異なるが他方別菌に、私は協同研究者川田と共に発育に血清を必須物質とするワイル氏病原体 *Leptospira icterohaemorrhagiae* の培養においても Lecithin が血清中の有効因子であるだろうという観点から実験を試み、この場合においてもまた Lecithin が *Leptospira* の発育に一つの重要な因子として作用することを認めている¹⁵⁾。

これらの結果から考察してみると血清中の菌発育に主要なる役割をはたしているものは磷脂質であつて、Lecithin は一つの重要因子となつてはいることが推測される。従つて血清のはたす役割は菌の発育促進因子としての磷脂質の供給源であつて(勿論これ以外のなお不明の因子も考えられる)、蛋白体はこれらの磷脂質の担体としての役をはたすものと考えられる。勿論蛋白はそれ自体一つの栄養源であつて、また一面物理化学的保護物質として

重要な作用をもつてはいるが、菌の発育増殖における血清添加の意義はむしろ発育因子である磷脂質等の供給こそ主要なるものではないかと考えられるようである。

血清中の Lecithin の結核菌深部発育因子としての意義はこのように大きい、その作用の機序については本実験では明らかでない。しかしながら恐らくその分子中の不飽和脂肪酸の菌の栄養上または菌の呼吸の上に及ぼす作用と、一面その表面活性的性状による菌の親水化或いはまた栄養源摂取力の増大等の作用はみのがせないものと考えられるが、この問題は今後の研究を必要とするものである。

む す び

結核菌深部培養の際添加使用される血清または卵黄中の深部発育促進因子は磷脂質が主要なるものである。

純 Lecithin を Kirchner 原液に 0.02% 添加すると結核菌はこの無蛋白培地に発育し、これに更に "Polytamin" 5%; Vitamin B₁ 10γ/cc; Ferric ammonium citrate 2γ/cc; CuSO₄ 0.1γ/cc 添加すると血清加 Kirchner 培地に殆んど近い結核菌の深部発育を認め、且つ血清加 Kirchner 培地と全く同様に微量菌接種でもよく発育する。

Lecithin 添加量は 0.02% が最適で、これ以上添加量が増すと却つて菌の発育を阻害する。

他方血清加 Kirchner 培地に Lecithin を 0.02% 添加すると結核菌の発育が稍々促進される。

このように Lecithin は結核菌深部発育にとつて重要な因子と考えられ、結核菌深部培地に血清を添加するのは発育因子としての磷脂質の供給にこそ意義を有しているのではないかと考える。

終りに臨み戸田教授の御指導と御校閲を深く感謝し、武

谷助教授の御援助に謝意を表します。

なお本研究にあたり磷脂質を分与され、また種々に御教示御援助を下さつた住友化学研究部松井平八郎氏に深甚の謝意を表します。

(本研究は文部省科学研究費によつた。)

文 献

- 1) 三淵一二：結核，28：193—197，昭28.
- 2) Boissevain, C.H., and Schultz, H.W.: Am. Rev. Tuberc., 38: 624—628, 1938.
- 3) Dubos, R.J.: J. Exp. Med., 88: 73—79, 1948.
- 4) 鴻上光明：結核，14：1—15，昭11.
- 5) 吉永敏夫：レプラ，19：3—10，昭25.
- 6) 原 一郎：日新医学，39：337—344，昭27.
- 7) Mueller, J.H. and Hinton, J.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 48: 330—333, 1941.
- 8) Boissevain, C.H.: Am. Rev. Tuberc., 23: 66—70, 1931.
- 9) Pratt, D.: J. Bact., 64: 651—658, 1952.
- 10) Dubos, S.J., and Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 57: 287—293, 1947.
- 11) Youmans, A.S., and Youmans, G.P.: J. Bact., 60: 561—568, 1950.
- 12) Hofman, K., and Axelrod, A.E.: Arch. Biochem., 14: 483, Letters of Editors, 1947.
- 13) Chang, S.L.: J. Infect. Dis., 81: 35—47, 1947.
- 14) Kligler, I.J., and Kaplan, D.: Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med., 48: 103—106, 1941.
- 15) 三淵一二・川田十三夫：医学と生物学，28：3，昭28.