

Vole Bacillus (Wells) に関する研究

第5報 液体培養に関する研究(Ⅱ)

国立予防衛生研究所結核部(部長 柳沢 謙)

室 橋 豊 穂・関 又 誠

(昭和 28 年 7 月 28 日受付)

1 緒 言

Vole bacillus が通常結核菌の培養に用いられる液体培地、例えば Sauton 培地や Kirchner 血清培地などにもよく発育しうるとは既に報告した¹⁾。この実験の出発点となつた臓器ブイオン培養についてもその際簡単に触れておいたが、その場合の発育過程を詳細に観察する上には、培地材料としての臓器を比較的大量必要とする関係上多少の困難を伴い、実験終了迄に稍々長い期間を必要とした。前報告に示された Sauton 培地や Kirchner 血清培地上の発育過程よりするならば、そして又そのようにして菌膜を得ることを以て足りるとするならば、このような培地成分の工夫は実際的には既に余り重要な意義を持ち得ないかも知れない。然し液体培地に eugonic な発育を営ましめる好適な条件を検索する為には、この問題は一応吟味されなくてはならぬと考える。前に述べた Kirchner 培地における発育と比較しうるために、本実験は、それと可及的近似な実験条件の下に、同様な観察方法を以て行われた。

2 実験方法

天竺鼠の肝及び脾から夫々浸出液を作り、これに塩類その他を加えた培地、並びに Sauton 培地の3種を、夫々 15 本宛の 100cc 容量のコルベンに 30cc 宛分注し、Sauton 培地 3代 4週培養の Vole bacillus 菌膜を、径 10mm の渦巻白金耳で 1 白金耳宛移植培養し、5週迄の発育状況を比較観察した。

観察は、培養後毎週、菌量、培地 PH、生菌単位数及び菌体の大きさなどに就いて、各培地共その都度 3 本宛のコルベンを取り出して行つた。菌量は夫々の種類の培地に就きコルベン 3 本から得られた総湿菌量の 1 本当り平均値と比較し、菌体の大きさは、各培養からの塗抹染色標本について測定した 1,000 個の菌体の平均値を以て表わした。又生菌単位数は、 10^{-4} 及び $10^{-5}mg$ の菌浮游液を接種した 5 本の小川培地に、10 週培養後に見られた発生集落数の平均値を以て判定した。

実験に用いた臓器ブイオン培地は著者の 1 人関の考案になるもので、組成及び製法は次の如くである。

第一磷酸加里	0.1g
ペプトン	0.5
グルタミン酸曹達	0.6
グリセリン	3.0

臓器浸出液 100.0cc

以上を加温溶解し、4% NaOH で PH を 7.2 に修正して加温、冷却後濾過して分注し、100°C で 1 時間滅菌する。

臓器浸出液の製法

肝又は脾(細切)	50g
蒸溜水	100cc

以上をコルベンに入れて、重湯煎で 65°~70°C、1 時間浸出、次で、100°C に上げて 30 分間処理後、室温に静置、冷却後濾過する。脾の濾液は琥珀黄色で、PH は凡そ 5.8、肝の濾液は淡黄色で僅かに螢石調を帯び、PH は凡そ 6.2 である。前報告予備実験に用いた培地との相違は、ペプトンを加え、グリセリン量を増し、グルタミン酸曹達を減量した点である。

3 実験成績

表及び図に示す如くである。培養 3 週目の菌膜は写真で示した。

1) 培地 PH の変動

培養直前の培地 PH は、Sauton 培地 6.8、臓器ブイオン培地は共に 7.2 であつた。Sauton 培地では、第 1 週目(7.6)から第 4 週目(7.4)迄は弱アルカリ性を呈したが、第 5 週に至つて酸性(5.2)に転じた。これに対して臓器ブイオン培地では終始アルカリ性に経過し、就中第 4 週目には 9.0(肝)及び 9.6(脾)を夫々示した。

2) 菌量

図に示した発育曲線から直ちに認めうるように、臓器ブイオン培地における発育は急速で、Sauton 培地のそれとは対蹠的な著しい相違を示した。すなわち、培養第 1 週から第 2 週にかけて急速に菌量を増し、第 2 週目には Sauton 培養の凡そ 5 倍(肝)乃至 9 倍(脾)となり、第 3 週目にはほぼ極値に達した。これは Sauton 培地上の発育が第 5 週迄直線的に上昇したのと著しく相違する点で、前報告に述べた Kirchner 血清培地の場合と相似している。

3) 菌体の大きさ

培地毎に毎回作製した塗抹染色標本について測定した値は表に示す如くである。第 1 週目には何れの培養のものも 1.73~1.78 μ 程度、第 2 週目には 1.5 μ 程度の短形になつたが、培地による差異は見られなかつた。このよう

な短形は、就中臓器培地では、その発育が急速な対数期に在るためと考えられる。第3週以後 Sauton 培養及び脾ブイオン培養では共に大きさを増し、第5週目には夫夫1.74 μ 、1.65 μ となつたが、肝ブイオン培養のみは1.53 μ に止まつた。

4) 生菌単位数

表に示すように、1mg 宛りの生菌単位数は Sauton 培養においては常に他の培養よりも稍々多く見られた。培養日数から見ると、どの培地の場合でも、第4週以後生菌単位数は減少し、Sauton 培養では第5週目 1mg 7.2 $\times 10^4$ 程度となり、又肝ブイオン培養では第5週目、脾ブイオン培養では第4週目から、10-4mg 接種でも菌集落を発生しなかつたが、この相違は、表面培養された菌膜の発育速度と関係しているように見える。但し、通常量にグリセリンを含んだ小川培地に定量培養して集落発生をみなかつたとしても、その成績そのままが、BCG 菌液を接種した場合と同じ意義を持つか否かに就いては、そのグリセリン耐容度などの立場から別に検討される必要があろう。

4 総括・考按

1949年にアメリカを経由して分与された Vole bacillus (D₁₅ 株)は、通常用いられる液体培地に表面培養することが甚だ困難だといわれ、Wells 自身²⁾は、グリセリンを含まない Douglas 馬鈴薯浸出液加肝ブイオン培地に僅かながら2回発育せしめ得たにすぎないという。然し我々の持つ菌株が Vole bac. D₁₆ である限りにおいて、Wells の記述にも拘らず、前報告¹⁾にも述べたように、通常の Sauton 培地にも、Kirchner 血清培地にも充分発育を営ましめることができるのである。又 Kirchner 血清培地における旺盛な発育や、dysgonic なりとはいえ Sauton 培地に継代しうるといふことは、この菌の生物学的性状を検索し、培地中に産生されるツベルクリン物質に就いて考察を進める上に甚だ有利なことであるに相違ない。それと同時に、この2種の液体培地に異なつた発育状態を示したということから、この菌の発育促進に要する物質や、或いは又これ等の培地に通常の方法を以てしては一般に dysgonic な発育しか営み得ない菌株(殊に分離直後の牛型菌)における物質代謝上の問題

を洞察する手懸

りを掴みうるかも

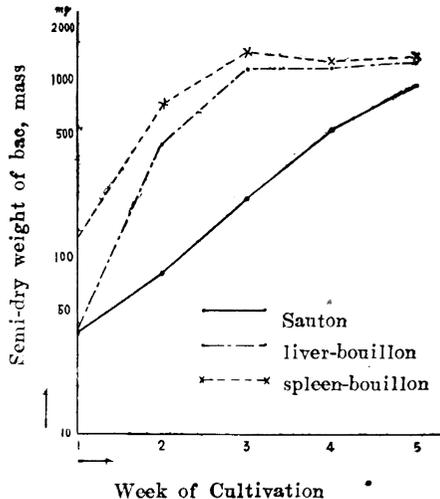
知れない。

Vole bac. がグリセリンを含む培地に発育し難いという Wells の主張は、勿論著者等も認めているが、而も例えば通常の小川培地に継代培養する場合に、次

培養日数 (W)	Sauton				liver-bouillon				Spleen-bouillon			
	PH	湿菌量 (mg)	生菌数	菌の長さ (μ)	PH	湿菌量 (mg)	生菌数	菌の長さ (μ)	PH	湿菌量 (mg)	生菌数	菌の長さ (μ)
1	7.6	38.3	45	1.783	7.8	40	2	1.732	8.2	130	19	1.745
2	7.8	85	41	1.578	7.8	446.5	29	1.524	7.8	712.5	10	1.585
3	7.8	212	55	1.655	8.2	1193	31	1.632	8.6	1500	19	1.714
4	7.4	530	31*	1.638	9.0	1207	25	1.508	9.6	1264	0*	1.657
5	5.2	903	7.2*	1.744	8.6	1295	0*	1.537	8.8	1312	0*	1.650

生菌数は 10-5mg 10 週培養小川培地5本の平均、* 10-4mg 培養の値

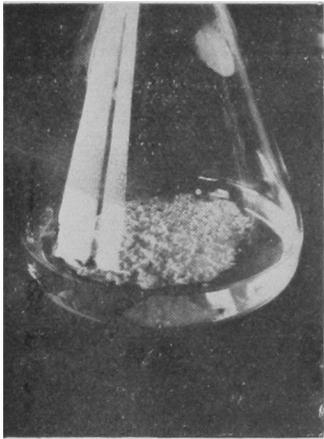
Growth Curve of Vole bacillus on Various liquid media.



第に集落が発生し易くなることや、種々の馬鈴薯培地にも、数代継代すれば、比較的良好な発育を営みうるというような BCG と異なる態度は、恐らくはグリセリン耐容度の相違によるものであろうこと、そして又、継代によつて良好な発育を漸次示すようになるのは、耐容度の比較的高い変異株が選択的に増殖する結果ではあるまいかということを想像せしめるのである。我々が液体培養を開始した当初の肝ブイオン培地は 1% に、Kirchner 血清培地は 2% に、又今回の実験に用いた臓器ブイオン培地は 3% に夫々グリセリンを含むものであつたこと、そしてそれ等の培地上では、5% にグリセリンを含む対照としての Sauton 培地上におけるよりも遙かに速かな発育を示したことなどを考えると、添加された臓器エキスや血清の影響が当然大きな因子であると考えとしても、同時に、含有されているグリセリン量の異同が、相当大的な条件として、その発育に重要な役割を演じていたように思われるのである。グリセリンを通常量

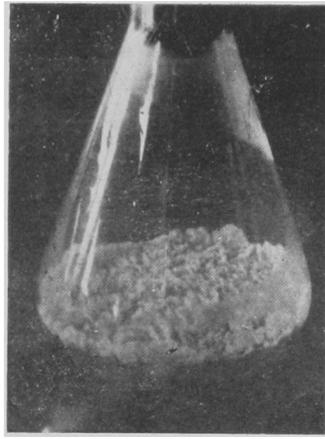
Cultivation of the Vole bacillus on the surface of liquid media (3 weeks old)

第 1 図



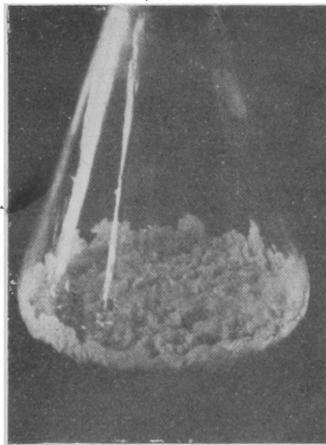
Sauton's medium

第 2 図



Liver-Bouillon medium

第 3 図



Spleen- Bouillon medium

に含む Sauton 培地に eugonic な発育を営んだ E. Grasset の変異株³⁾は、*Apodemus Sylvaticus* 通過によつて分離されたものであつて、このような変異株の存在することは、培地のグリセリン量に対する態度を異にした変異株によつて *Vole bac.* が構成されているのではあるまいかとの想像を可能ならしめるように思う。同時に、Wells が Sauton 培地に表面培養しえなかつた D_{15} 株が、現在我々の手によつて同培地に継代せしめられているということは、継代によつて、グリセリン耐容度の高いものを、偶然選択的に培養して来た結果ではなからうかと考えられるのである。

他方又、我々が臓器ブイオンを用いたのは、鶏卵培地以外には発育しえないという困難さを克服するために企てられたもので、天竺鼠において最も屢々結節を生じ易い脾や肝のエキス中に、発育促進的な物質が存在するであろうとの漠然たる予想から出発している。これと同様な試みとしては、E. Grasset⁴⁾等によつて行われた成績を挙げうる。彼等は *Vole bacillus* に対して天竺鼠よりも感受性の強い *Tatera Afra* の臓器や筋肉の浸出液を加えた、1% グリセリン加 Dorset 固形培地上に、他の固形培地におけるよりも良好な発育を見ている程度で、その培養から分離された集落を、グリセリンを含む通常の Sauton や上記浸出液を加えたグリセリン添加又は非添加の培地に移植しても、時に薄い菌膜を作りうるが継代培養することができなかつたと述べている^{3), 4)}。我々の場合には実験成績に述べたように、臓器エキスや血清を加えた場合(前報告)に、1~3% 程度にグリセリンを含むに拘らず、移植初代から eugonic な発育を営みえたが、このことから、これ等の添加物質が、菌の生活に必要な炭素源としてのグリセリンに対する耐容度の低さという不利な条件を乗り越えて、菌のグリセリン代謝に有利に作用するという何等かの役割を演じたのであろうと想像されるのである。そして前報告と本報告とに示されたように Sauton 培地における表面培養が、たとえ dysgonic なりとはいえ、継代も又可能であるということと共に、*Vole Bacillus D₁₅* に関する限り最初に

得られた液体培地表面培養の成績であるだけに、この成績は甚だ興味深く思われる所である。

この意味において、Tween-Albumin培地に *Vole Bac.* を深部培養した Dubos⁵⁾の成績や、分離直後の牛型菌に就いて同培地を用いて glycerol 代謝に関する考察を進めている Schaeffer の報告は極めて示唆に富むものであり、就中 *Vole bacillus* の液体培養に当つて、今後検討するべき点だと考える次第である。

5 結 論

Vole bacillus (D₁₅) を Sauton 培地並びに 3% グリセリン加肝或いは脾(天竺鼠)ブイオン培地に表面培養し、その発育状態を比較した。

Sauton 培地上の発育は甚だ dysgonic で、第5週迄漸増的に菌量を増加したが、他の2培地における発育は急速で、第3週目に極値に達した。このような発育の相違は、培地に加えられた臓器エキス並びにグリセリン添加量に関係しているように思われる。

本研究は文部省科学研究費の援助によつてなされ、総合研究結核研究委員会においてその要旨が報告された。委員長今村教授、細菌科会長戸田教授に謝意を表す。

拙筆に臨み、御校閲を戴いた柳沢部長に謝意を表す。

文 献

- 1) 室橋・関・吉田・高野：結核，27：36~40, 1952.
- 2) A. Q. Wells: The Murine Type of Tubercle Bacillus (Medical Research Council Special Report Series No. 259), 1946.
- 3) E. Grasset: Annales de l'Ints. Pasteur, Tom 78, No. 4, 444~456, 1950
- 4) E. Grasset, J. F. Murray and D. H. S. Davis: Americ. Rev. Tuberc., Vol. 53: 427~439, 1946.
- 5) R. J. Dubos: Proceed. Soc. Exp. Biol. a Med., Vol. 58: 361, 1945 (3)による
- 6) W. B. Schaeffer: J. Exp. Med., Vol. 96, No. 3: 207~219, 1952.