

結核菌菌株および培地成分とツベルクリン産生との関係

第 3 報

武 原 雄 平

九州大学医学部細菌学教室 (指導 戸田忠雄教授)
福岡県衛生研究所 (所長 真子憲治博士)

受付 昭和 32 年 5 月 27 日

I 緒 論

私は第 1 報¹⁾ および第 2 報²⁾ において結核菌菌株および培地成分中のアミノ酸を変えたとき、培地中の蛋白産生、菌量の移動、pH の移動および糖量の移動が週を経過にしたがつてどのように変るかについて述べ、SM 耐性菌を用いたときにこれらの移動がどのように変るかについて調べ、さらに培地に添加するアミノ酸の量および質を変えてツベルクリン産生との関係を見てきた。

今回は結核菌菌株および培地成分が変つたとき、培養液中の窒素量の移動を中心に培養液の性状およびツベルクリン産生との関係を調べたので、その結果について述べる。

II 実験方法

実験方法はほとんど前報と同じであるが、前報と異なる点は次の通りである。

1. 使用菌株：前報で用いた 3 株のほか京大に保存中の青山 B 株を載いてこれを追加した。

2. 培養法：300cc 入コルペンに 100cc ずつ分注したものおよび 200cc 入コルペンに 50cc ずつ分注したものの各 1 本ずつを 1 組とし、一方 2,000cc 入平底コルペンに 1,000cc ずつ分注したものを 2 本ずつを 1 組として第 1 報で述べた方法によつて培養し、2,000cc 入平底コルペンに培養したものは毎週その底部より 15cc ずつを取つて以下述べる実験に供した。

3. 蛋白定量法および窒素定量法：蛋白の定量法は沈澱法、窒素定量法および Folin の加銅法³⁾ の 3 方法を併用して実施した。このうち、窒素定量法はまず総窒素量を Micro Kjeldahl 法によつて測り、次に 20% トリクロル醋酸を同量 (定量的) 加えて沈澱量を測る。さらにこの上清液中の窒素量を測つて、初めの総窒素量から上述の除蛋白残液中の窒素量を引いた値を蛋白窒素量とした。

4. クロマトグラフィー：アミノ酸の検出には濾紙クロマトグラフィーを用いた。この場合濾紙は東洋濾紙 No. 50 および No. 131 を用いて円形法および一次元法によつてブタノール：醋酸：水 = 4 : 1 : 2 で展開し、所定の如くニンヒドリンにより呈色せしめた。

III 実験成績

1. pH の移動

pH の移動は 300cc 入コルペンと 200cc 入コルペンとに培養したものを各 1 本ずつを取つて混合したもの (pH-a とする) を図 1 a に示し、2,000cc 入コルペンに培養したものを各 2 本から 15cc ずつを取つて混合したもの (pH-b とする) を図 1 b に示す。

pH-a について、味の素を用いたソートンの変法培地 (以下 S-G-Na 培地) では九大青山 B 株は 1 週から 10 週まで pH 8.0 前後のアルカリ性を示し、H₃₇Rv 株および京大青山 B 株は一度アルカリ性から酸性となり 6~8 週で再びアルカリ性となつて終る。ただ予研青山 B 株は 6 週から酸性となつてそのまま終つている。ソートン原法培地 (以下 S-A 培地) では各菌株とも 2~3 週まではアルカリ性であるがそれから後酸性となつてそのまま終つている。

一方 pH-b については、ほとんど pH-a のときと同じような成績を示しているが、この場合 S-G-Na 培地を用いたものは一般にアルカリ性で終り、H₃₇Rv 株のみが 6~7 週で一度酸性となり、8 週から再びアルカリ性となる。S-A 培地を用いたものは一般に pH-a のときよりも酸性に転性する時期が多少おくれるようである。また、九大青山 B 株のみがアルカリ性で終つているが、これも菌の発育が悪かつたためであつて、菌の発育が良好であるときは酸性となつて終ることが多い。

2. 菌量の移動

菌量の移動は 300cc 入コルペンと 200cc 入コルペンとに培養したものを図 2 に示した。この菌量の移動も前報と同様、各菌株とも 3~4 週までの間に菌量は急速に増加し、その後、次第に減少する。菌株による菌量の差位はあまり認められないが、このうち、H₃₇Rv 株は比較的速く菌量が増加し、菌量も最も多い。京大青山 B 株も発育は早いようであるが菌量は他の株とほぼ同じ程度である。S-G-Na 培地と S-A 培地とでは S-G-Na 培地を用いたものの方がやや多いようである。しかしこの関係は菌株によつて変る。

3. アンモニア性窒素量の移動

ここでいうアンモニア性窒素量とは、毎週取出した培養液を窒素分解を行わず、取出したままで Micro Kjeldahl法で測つた窒素量のことである。したがってこのうちにはアミド類、その他の弱い窒素化合物はアンモニア性窒素量として測定されているものと考えられる。

アンモニア性窒素量の移動を300cc 入コルベンと200cc 入コルベンとに培養したものについて図3aに示し、2,000cc入コルベンに培養したものについて図3bに示した。この移動はS-G-Na培地を用いたものにおいては、初めは0.5mg/cc ぐらい含まれていたものが次第に減少し4~5週において、菌量が最も多くなった時期と一致して、これとは逆に最も少なくなり0.1mg/cc 以下となつて大体そのまま、または極めて僅かに増加して10週まで持続する。S-A培地を用いたものにおいては、初めの間は増加の傾向にあつて2~3週で最高となり、その後次第に減少して5~6週では0.4mg/cc となつて10週まではこの程度の量を持続する。2,000cc 入コルベンに培養したものもこれとほとんど同じような移動を行うようであるが前者より2~3週遅れて移動する。

4. 総窒素量の移動

総窒素量の移動を300cc 入コルベンと200cc 入コルベンとに培養し混合したものを図4aに示し、2,000cc入コルベンに培養したものの移動を図4bに示した。総窒素量は2週ごろから急速に減少し3~4週で最も少なくなり、

その後極めて僅かに増加しながら10週まで持続する。この最も少なくなる時期は菌量が最も増加した時期と一致し、3~4週までは菌量の移動と総窒素量の移動とは逆比例の関係にある。S-G-Na培地に培養したものとS-A培地に培養したものとでは4週の値を比較してみるとS-A培地では0.5~0.8mg/ccの窒素量を示し、S-G-Na培地に培養したものでは0.2~0.5mg/ccの窒素量を示している。おのおの週を通してこのようにS-A培地を用いたときとS-G-Na培地を用いたものには差が認められS-

図2 菌量の移動

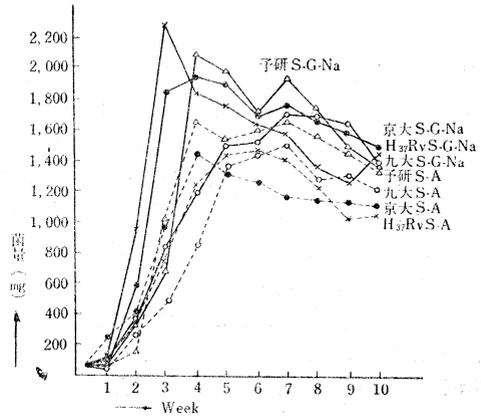


図3a アンモニア性窒素量の移動

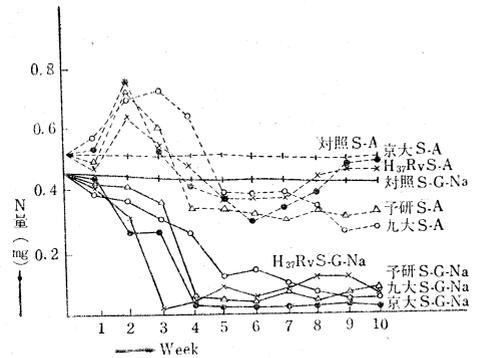


図3b アンモニア性窒素量の移動

図1a pHの移動

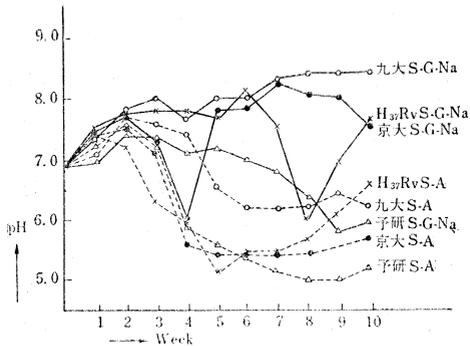


図1b pHの移動

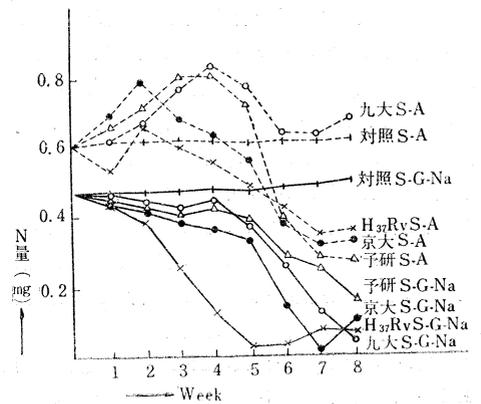
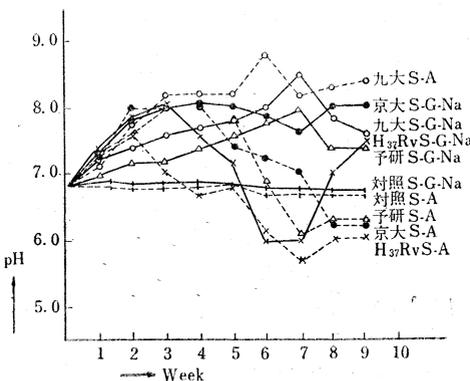


図4a 総窒素量の移動

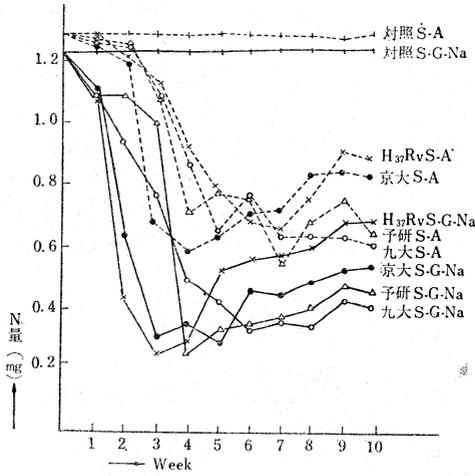
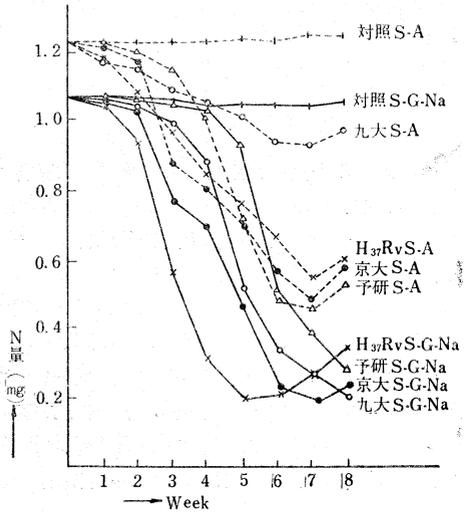


図4b 総窒素量の移動



A 培地に培養したときの方が総窒素量が多い。しかしこの差は前述のアンモニア性窒素量の場合とほぼ同じ程度であり、したがってこの場合の差はアンモニア性窒素量の差によるものと思われる。

5. 蛋白の産生および培養液中のアミノ酸のクロマトグラフィー

蛋白産生の移動は 300cc 入コルベンと 200cc 入コルベンとに培養したものの蛋白産生の移動を図5a に示し、2,000cc入コルベンに培養したものの移動を図5b に示した。蛋白の定量法は沈澱法、蛋白性窒素測定法およびFolinの加銅法の3方法で測定したがいずれも誤差の範囲内でほとんど同じ結果が得られたので、ここではFolinの加銅法による比色定量法によつてえた結果について述べる。

図5aに示すようにS-A培地に培養したものよりもS-G-Na培地に培養したものにおいて産生される蛋白量は

多く認められる。培地の種類および菌株の種類によつて多少異なるが、ほぼ6~8週ごろに一度蛋白量の減少が認められ、その後再び増加する。2,000cc入コルベンに培養したものについても、前者とほぼ同じような成績が得られたが、この場合には前記例よりも1~2週おくれて移動する。蛋白量が6~8週ごろ一度減少することから、その原因を知るために週毎に得られた培養液をそのままクロマトグラフィーで展開してみたので、その1, 2例を図6および図7に示した。この図からS-A培地を用

図5a 蛋白産生の移動

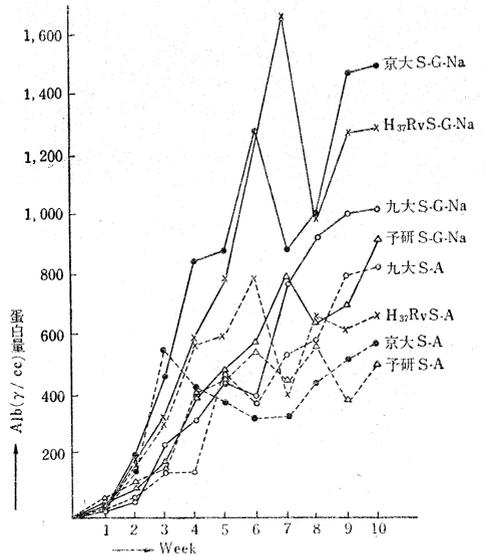


図5b 蛋白産生の移動

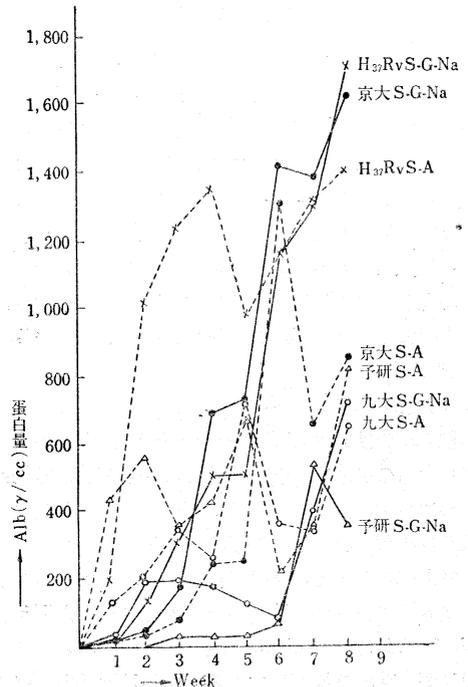


図6 九大青山B株における培養液の一次元クロマトグラフィー(ニンヒドリン呈色)

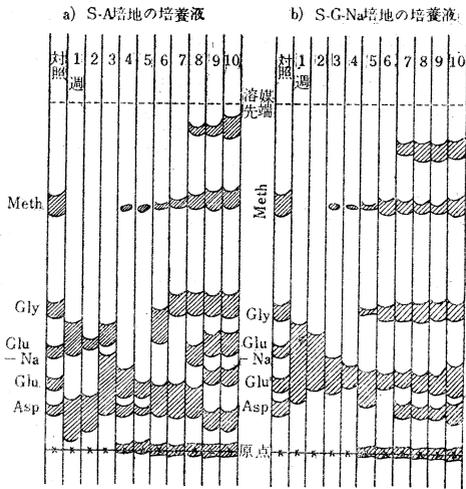
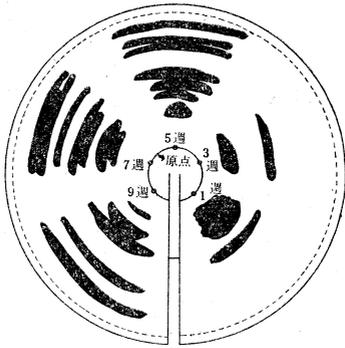


図7 京大青山B株の S-G-Na培地に培養したものの円型クロマトグラフィー

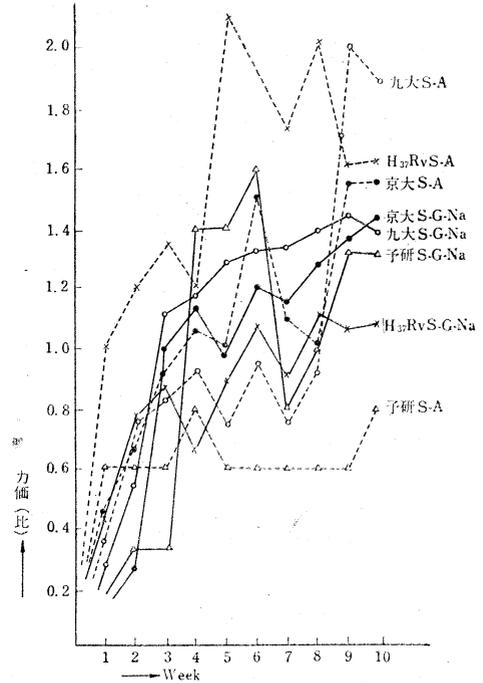


いたときのアスパラギンも、S-G-Na 培地を用いたときのグルタミン酸ソーダでも2~3週ごろ、一度グルタミン酸らしいアミノ酸に変わり、以後急激に減少し、4~5週で培地成分として用いたアミノ酸の量は最も少なくなり(クロマトグラフィーによる定性)同時にこのころから初めて培地成分として用いたアミノ酸以外の数種のアミノ酸が現われ始める。しかもこれらのアミノ酸が最も著明に確認される時期は図5a および図5bに示した蛋白産生の移動において、蛋白量の減少を示している時期とほぼ一致する。

6. 力価の移動

力価の移動は300cc入コルペンと200cc入コルペンとに培養したものについて調べた。すなわち前記の培養混合液を1/2に濃縮し、ツベルクリン製造基準にしたがつて力価試験を実施した。その結果を図8に示す。ツベルクリン力価と蛋白産生との関係は同種の培地に同じ菌株を用いて培養してえられる蛋白量と力価とはほとんど平行するが、S-A 培地とS-G-Na培地とに、すなわち異なった培地に同じ菌株を培養したもの、または同種の培地(例

図8 力価の移動(48時間比)



えばS-A培地のみを用いた場合)でも異なった菌株を用いて培養した場合には力価と蛋白量は必ずしも平衡するとは限らない。一般に同じ菌株を用いた場合にS-G-Na培地を用いて培養したものは蛋白量は多いが力価はその割に弱く、S-A培地に培養したものについては蛋白量は少ないが力価は蛋白量に比して強い。また同じ培地(例えばS-G-Na培地)について10週における蛋白量は京大青山B株、H₃₇Rv株、九大青山B株、予研青山B株の順に少なくなっているにもかかわらず力価は京大青山B株、九大青山B株、予研青山B株、H₃₇Rv株の順で弱くなっているごとくである。

さらにツベルクリンの力価も5~9週ごろ、一度弱くなる時期があるようであり、その後再び強くなる。この弱くなる時期は蛋白量の減少する時期と必ずしも一致するとは限らないが、しかし蛋白量の移動と相前後して力価もほぼこれと同じように移動するようである。

IV 考 案

1. pHの移動は第1報および第2報で述べたpHの移動とはほぼ同じように移動する。pHが結核菌の培養経過と共に移動して、初めはややアルカリ性となり、アスパラギンを用いた培地ではやがて酸性となる。この場合、pHとアンモニア性窒素の移動とはほとんど平行関係にあることから培地中のアンモニア量が培地のpHに重要な関係をもつものと考えられるが、しかしS-G-Na培地に培養した場合にはpHの移動アンモニア性窒素量の移動とは平行しないことから考えて、アンモニア以外の因

子も pH に重要な影響を与えることは明らかである。

2. アンモニア性窒素量の移動は S-A 培地では 2~3 週ごろまで増加し以後減少する。この増加の原因はアスパラギンの影響によるものと考えられる。もしクエン酸アンモンまたは菌そのものが化学変化、または菌自体の変化を起したためにアンモニアが増加したのと考えれば、それらのうちに含まれているアンモニアの量は極めて少ないものであり、一方 S-G-Na 培地においても増加しなければならない。しかし実際には S-G-Na 培地中ではアンモニア性窒素量の増加は認められない。その他の因子ではアスパラギンのほかには考えられないので、アスパラギンの影響によつて増加することは明らかである。

3. 総窒素量の移動は第 1 週から次第に減少し、3~4 週で最も少なくなり、それから僅かながら増加する。この総窒素量の移動は菌量の移動とはほぼ逆の関係にあることから培地中の窒素源がまず菌の増殖に伴つて消費され、培養の週が進むにつれて逆に菌の代謝産物および菌体由来する窒素化合物が培養液中に現われるためと考えられる。

4. 今日の実験でも蛋白量は 6~8 週ごろ、一度減少し、その後再び増加する。一方クロマトグラフィーで見ると蛋白量が減少した時期と相前後して培養液中に遊離された数種のアミノ酸が認められることから、一旦培地中に遊離された蛋白は、ある程度分解されるのではないかと考えられるが、この問題についてはさらに検討を要する。

5. ツベルクリンの方価は蛋白量とは比例しない。S-G-Na 培地に培養すれば蛋白量が多いが、方価はその割に弱く、S-A 培地に培養したものは蛋白量は少ないが、方価は同じ蛋白量に対して強く表われる。このことはすでに武谷⁴⁾が指摘しているようにツベルクリン蛋白中には Seibert⁵⁾のいう A, B, C 蛋白質があり、それらの蛋白がそれぞれ方価を異にし⁶⁾、S-A 培地と S-G-Na 培地とで産生された蛋白は、A, B, C 蛋白の蛋白構成を異にしているためであろうと考えられる。

V 結 論

以上の実験成績をまとめると次のようになる。

1. pH の移動は第 1 報および第 2 報で述べたものとはほぼ同じように移動する。京大青山 B 株の移動は H₃₇Rv 株の移動に非常によく似た pH の移動を示す。
2. 菌量の移動も前 2 報とほとんど変らない。京大青

山 B 株の移動は pH の場合と同じく H₃₇Rv 株によく似た移動を示すが、この場合には H₃₇Rv 株よりも最高菌量が少ない。

3. アンモニア性窒素量の移動は S-A 培地を用いたものは初めは増加し、2~3 週で最も多くなり、その後次第に減少して 10 週では約 0.4 mg/cc 程度となるが、S-G-Na 培地を用いたものでは初めから減少して 10 週では約 0.1 mg/cc 以下となる。

4. 総窒素量の移動は S-A 培地に培養したものでも、S-G-Na 培地に培養したものでも共に初めから減少し、3~4 週で最も少なくなり以後僅かに増加する。10 週後における総窒素量は S-A 培地に培養したものでは約 0.6 mg/cc であり、S-G-Na 培地に培養したものでは約 0.4 mg/cc 程度である。さらに総窒素量の移動と菌量の移動とは逆の関係にあり、菌量が最も多い時期には総窒素量は最も少ない。しかし逆比例の関係にある時期は 1 週から 4 週までの間である。

5. 蛋白量の移動は今回の実験でも S-G-Na 培地、S-A 培地どちらを用いて培養しても各菌株ともに蛋白量が一度減少し、以後再び増加する。また、培養液をペーパークロマトグラフィーで展開してみると蛋白量の減少と相前後して培地成分として用いたアミノ酸以外の数種のアミノ酸が認められる。

6. ツベルクリンの方価は同種の培地に同じ菌株を培養して得られる蛋白量とはほぼ平行するが、培地または菌株を異にすれば必ずしも蛋白量の多いものが強い方価を示すとは限らない。一般に S-G-Na 培地に培養したものは蛋白量が多いが、S-A 培地に培養したものの方が方価は比較的強い。

終りに臨み御懇切なる御指導と御校閲とを賜つた九大医学部戸田忠雄教授、武谷健二助教授、真子憲治所長ならびに坂本博士に心から感謝の意を表する。

VI 文 献

- 1) 武原雄平：結核，32：101，1957.
- 2) 武原雄平：結核，32：477，1957.
- 3) O. Folin, V. Ciocalteu : J. Biol. Chem., 73 : 627, 1927.
- 4) 武谷健二：日本細菌学雑誌，11：23，1956.
- 5) F.B. Seibert : Am. Rev. Tbc., 59 : 86, 1949.
- 6) 大友信也：結核，30：40，1955.