

## 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1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31年9月10日

## I 結 論

ツベルクリンに関しては極めて多くの研究発表があり特に最近では精製ツベルクリンの調製によつてその本態が追求されている。しかしながら結核菌の菌株および培地成分の変化とツベルクリン産生との関係を見たものは少なく、Johnson, Renfrew<sup>1)~3)</sup>, 具原<sup>4)</sup>および白石<sup>5)</sup>が2~3株の結核菌について、また最近では浅見<sup>6)~10)</sup>が数株の結核菌についてその菌量、生菌数および培地の液体変化を見ているだけである。

著者は診断用ツベルクリン稀釈液を製造中、たまたま人型結核菌九大青山B株と予研青山B株とにおいて、同時に調製した同一組成の培地におのおの結核菌を培養して産生されたツベルクリンの力価の差が甚しいことを知った。そこでその原因を知るために菌株および培地成分の変化とツベルクリン産生との関係を追求しているの、今日までの成績をとりまとめて報告する。

## II 実験方法

## 1. 実験材料

a) 使用菌株: 実験に用いた菌株は人型結核菌九大青山B株, 予研青山B株, 京大青山B株, 阪大青山B株, 化血研青山B株, 九大堀株および H<sub>37</sub>Rv 株の7株で、このうち週を追つて実験を行つたものは九大青山B株, 予研青山B株および H<sub>37</sub>Rv 株の3株である。

b) 使用培地: 実験に使用した培地はソートンの培地 (以下S-A培地) と、この培地中のアスパラギンを味の素 8g と置き変えたソートンの変法培地 (以下S-G-Na培地) との2種類である。

c) 培養法: 前記2種類の培地を 200cc の三角コルベンにそれぞれ50ccあて分注したものまたは2,000ccの平底コルベンに1,000ccあて分注したものを110°C, 30分で3日間滅菌し、これに予めS-A培地に3~4代継代培養した結核菌のおのおの菌膜を常法に従つて移植し37.5°Cで10週間培養した。なお移植に際してはできるだけ均一の膜を選ぶようにした。

d) 被検液の調製: 200cc コルベンに培養したものは1週毎に各2本あての培養液を混合し、直ちにpHを測定した後、これを100°Cで1時間殺菌し、冷却をまつて濾

過し液量およびpHを測り、また2,000cc コルベンに培養したものは液の低部よりピペットを用いて15ccを取り前者と同様にしてpHを測つた後殺菌し、加熱後のpHを測りそのままアンプルに封じて2~5°Cの冷蔵庫に保存し、そのつど取出して以下述べる実験に供した。

## 2. 各実験の測定方法

a) 菌量: 菌量は濾過した濾紙とともに37.5°Cに1週間放置して完全に水分を除去した後、化学天秤により秤量した。

b) pHの測定: pHは加熱の前後に各培養液5ccを取り液体比色計を用いて比色測定した。

c) 糖量: 糖の定量は還元糖量であつて、培養濾液を分解しないまま Shaffner-Hartmann<sup>11)</sup>の還元糖微量定量法に従つて測定し Glucose 量に置換して示した。

d) 蛋白量: ツベルクリン蛋白の測定は Seibert<sup>12)</sup>のツベルクリン蛋白測定法に従つて行つた。この際あらかじめ目盛を検定し、正確に0.1ccの目盛を有するスピッツグラスを選んで用いた。すなわちこのスピッツグラスに培養液2ccを取り、同じく同量の20%トリクロル醋酸を加えて生じた蛋白沈澱量に0.0674を乗してえた値をツベルクリン蛋白量とした。

e) 力価試験: 力価試験は感作動物および接種法ともに現行のツベルクリン稀釈液の製造基準に従つてこれを実施した。ただし原液の濾過はペルケフェルト濾過を1回だけ行いいずれも2,000倍に稀釈して接種した。

## III 実験成績 (その1)

菌株別によるツベルクリンの産生は表1に示す通りで同種の青山B株でも菌株により同一ではない。S-A培地 (S-A-Na培地についても同じ) を用いた場合、結核菌の菌膜が培地の表面をおおうのは普通3~4週であり沈み始めるのは8週以後であるが、京大青山B株は特に早々1~2週で菌膜が液面をおおい5~6週で沈み始め続いてその上に薄い菌膜を作る。また菌膜から見た結核菌の発育状態はそのときどきの条件により多少の変動はあるが、通常京大青山B株, H<sub>37</sub>Rv株, 阪大青山B株, 九大堀株が早く、予研青山B株, 九大青山B株の順である。したがつて菌量も九大青山B株は常に少ない。

液量はいずれも大体一定量の減少を示し、菌株による

表1 菌株別の培養液の性状の比較(培養10週)

菌 株	液 量 (cc)	乾燥菌量 (mg)	pH				力 価 (発 赤)				「ツ」蛋白沈澱量(mg)				
			加 熱		菌 共 加 熱		加 熱		菌 共 加 熱		加 熱		菌 共 加 熱		
			濾紙 濾過	「べ」 濾過	濾紙 濾過	「べ」 濾過	濾紙 濾過	「べ」 濾過	濾紙 濾過	「べ」 濾過	濾紙 濾過	「べ」 濾過	濾紙 濾過	「べ」 濾過	
予研青山B株	823	8.3	6.8	7.4	7.6	7.8	7.8	14.5	14.5	16.5	16.0	0.809	0.809	0.809	0.809
九大青山B株	820	7.5	8.2	9.0	8.8	9.1	8.9	17.5	16.5	18.0	17.5	0.974	0.939	0.989	0.974
H <sub>37</sub> Rv株	795	9.8	5.4	5.4	5.6	5.4	5.6	15.0	14.0	15.5	14.5	0.404	0.269	0.404	0.404
京大青山B株	820	9.4	8.0	9.0	8.9	9.4	8.2	15.5	14.0	16.0	14.5	0.472	0.539	0.539	0.539
阪大青山B株	840	9.5	8.2	8.8	9.1	9.2	8.2	13.0	12.0	15.0	13.0	0.269	0.269	0.404	0.404
化血研青山B株	845	9.4	8.2	9.0	9.0	9.2	8.5	15.5	15.0	16.0	16.0	0.404	0.674	0.674	0.674
九大 壱 株	802	9.1	7.8	9.2	9.0	9.4	8.4	13.0	13.0	15.5	14.5	0.404	0.404	0.539	0.404

注 1. 初期液量: 1000cc 2. 「べ」: ベルクフェルト濾過器 3. 使用培地: S-G-Na 培地

差は認められない。

pHは10週間培養において終末 pHが酸性のこともありアルカリ性のこともあるが、九大青山B株のS-G-Na培地に培養したものは常にアルカリ性を示す。また加熱によるpHの変化は終末 pHがアルカリ性である場合には加熱により僅かに高くなるが、終末 pHが酸性で終わった場合には加熱による変化はほとんど認められない。菌とともに加熱した場合にも前の場合とほとんど変わらない。さらにこれらを細菌濾過器を通してpHの変化を見たが、アルカリ性の場合も酸性の場合もともにほとんど変化は認められない。

菌量は実験に使用した7株のうち九大青山B株が他の株に比し常に少なく、予研青山B株、化血研青山B株がこれに次ぎ、H<sub>37</sub>Rv株において最も多い。しかし九大青山B株を除いた他の株は菌量の差は極めて少ない。また菌量と力価との関係は比例的でも反比例的でもなく、九大青山B株は菌量は少ないが力価は高く、阪大青山B株、H<sub>37</sub>Rv株は菌量は多いにもかかわらず力価は他の株とほとんど変わらない。

次に力価はいずれの菌株についても大差は認められない。ただ九大青山B株のみがやや強く、発赤と硬結とがほとんど一致する。したがって24時間後の判定値と48時間後の判定値とがほとんど変わらないが、他の菌株では発赤と硬結とが必ずしも一致せず、したがって24時間後の判定値と48時間後の判定値とが非常に異なることがある。次に加熱の方法と力価との関係は菌とともに加熱したものは除菌して加熱したものよりやや強い力価を示す。また、ベルクフェルト濾過器を用いて濾過を行えば、菌とともに加熱したもの、除菌して加熱したものともにのおの力価に対応して僅少ながら弱くなる。

蛋白量は菌株別により異なつた沈澱量を示し、また、同一菌株でも使用した培地の種類により異なつた沈澱量を示す。

力価と蛋白量との関係は、蛋白量の多いものが必ず強

い力価を示すとは限らない。例えば表1の予研青山B株において除菌して加熱した場合と菌とともに加熱した場合の両者の蛋白量と力価との関係を見ると蛋白量は変わらないが、菌とともに加熱すれば力価は強くなる。また、H<sub>37</sub>Rv株、化血研青山B株および九大壱株の除菌して加熱したものは同一の蛋白沈澱量を示しているが力価においては強弱が認められる。

しかしこの実験では例数も少なく、人体実験も行っていないので確定的に断定することはできない。

#### IV 実験成績(その2)

以上の実験結果からなお明確な培地の性状変化を知るために菌株別、培地成分別による結核菌の培養を行い1~10週の間を週を追つて培地の性状変化を見て表2から表5に示すような成績を得た。なおこの場合、培地は200cc入三角コルベンに50ccあて分注したものに培養して、毎週おのおの2本あてを取出して混合し、実験を行ったものである。

以下表を追つて検討する。

##### 1. pHの移動

pHは九大青山B株のS-G-Na培地では常にアルカリ性を示し、S-A培地では3~4週でアルカリ性から酸性に変わる。予研青山B株のS-G-Na培地では5~6週で、S-A培地では3~4週でアルカリ性から酸性に変つてくる。しかしときとしてはS-G-Na培地では常にアルカリ性で終ることもある。この場合は2,000ccコルベンを用いたときに多く認められる。H<sub>37</sub>Rv株のS-G-Na培地では3~5週でアルカリ性から酸性に変わり6~8週で再び酸性からアルカリ性に転性するが、ときには酸性のまま終ることもある。(2,000ccコルベンに培養したときに多い)しかしこの場合でも5週でpH 5.4ぐらいであつたものが中性近くまで上つてくる。

##### 2. 液量の移動

培地の液量は毎週、初期の液量100ccに対し3~4ccの

割合で減少するが、菌株の種類とか培地の種類には関係しないようである。

3. 菌量の移動

図1 pHの移動

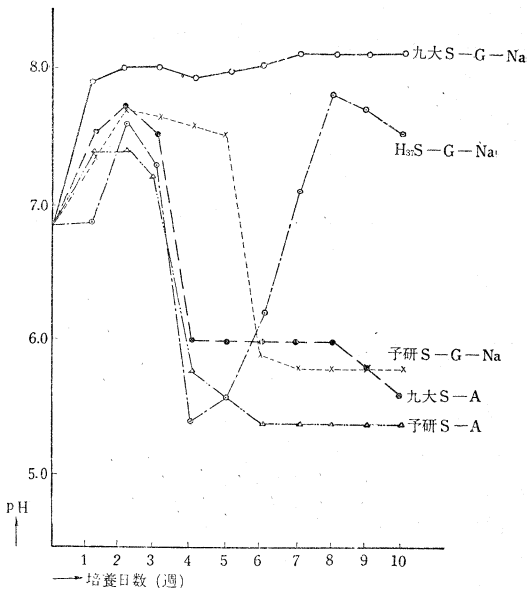


図2 菌量の移動

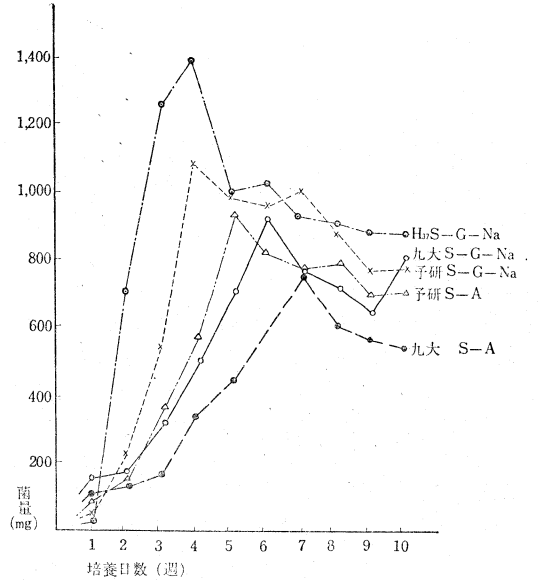


図3 還元糖の移動

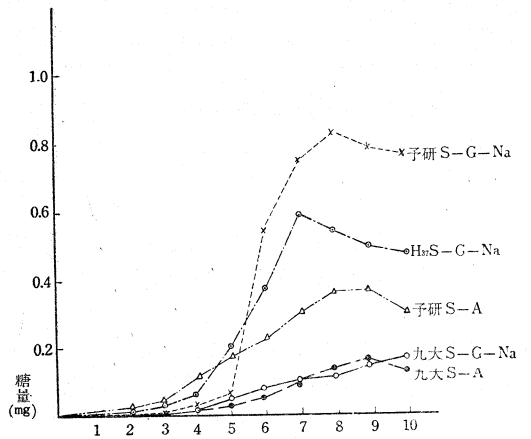
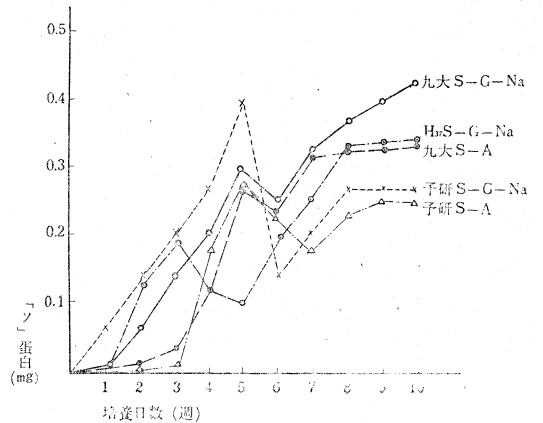


図4 「ツ」蛋白量の移動



菌量はどの菌株についても4~6週で最高量に達し、それ以後次第に減少してくる。この最高菌量は菌株により、また、培地の種類によつて変る。前の3株の菌株では H<sub>37</sub>-Rv 株が最も多く、予研青山B株、九大青山B株の順となり、また、これに従つて maximum となる時間も多いものが早く、少ないものが遅くなる。

次に培地別では S-G-Na培地の方がS-A培地よりも菌量が多い。

4. 糖量の移動

ここでいう糖量とは還元糖量であつて、かつ加水分解を行わず培養濾液をそのまま測定したものである。この値は予研青山B株に最も多く見られ、H<sub>37</sub>-Rv株、九大青山B株の順に少なくなる。また、培地別ではS-A培地に培養したものよりS-G-Na培地の方にやや多く認められるが量的には菌株別による糖量の如く著明な相違は認められない。糖量が最高量に達する時期はS-A培地、S-G-Na培地とも、どの菌株でも菌量が最高量に達した時期より2~3週遅れるようである。

5. 蛋白量の移動

蛋白の産生量は九大青山B株、H<sub>37</sub>-Rv株、予研青山B株の順に菌株により多少異なつた産生量を示し、S-A培地よりS-G-Na培地において僅かながら多い蛋白量が認められる。また、蛋白量と菌量との関係に平衡関係は認められない。例えば九大青山B株は6週以後では菌量は少ないが蛋白量が多い。しかし他の菌株では菌量に比較し蛋白量は少ない。次に結核菌による蛋白の産生は第1

週から認められ、以後は週を追って増加するものではなく、5~6週で一度減少、あるいは停滞し7週から再び増加する。

## V 考 案

1. 以上の実験結果から結核菌の菌株および培地の種類によつてツベルクリンの産生は異なつた値を示し、培地の性状も異なつてくるが、一般的にいつて培地の性状は4~6週で著しい変化をするので、この時期を培地性状の転換期と見ることが出来る。

2. pHの変化は培養の諸条件、例えば液量、液の深さ、菌膜の良否、培養温度等により変るものと考えられるが、これらの条件をいずれもほぼ同一状態で培養すれば各菌株は特異的に変化することがわかる。また、pHが酸性になりあるいはアルカリ性に転性する機序についてはS-A培地ではアンモニアにより、S-G-NaについてはNaイオンにより多少の影響は受けるものと思われるが、しかしただこれらのもののみによつて変るとは考えられないこともあるのでなお研究を要する。

3. 糖量は菌量が最高となる時期より2~3週遅れて急に増加することを知つた。その原因については今のところ明らかでないがこれについては後日改めて研究する予定である。ただ、今までの実験成績から明らかなことは、培養液中の還元糖量と力価との間に直接の関係は認められない。

4. 蛋白の産生はある時期で一度減少あるいは停滞するがその原因は不明である。S-A培地よりもS-G-Na培地においてやや多く認められるが力価とは必ずしも平行しない。このことはSeiber<sup>15)</sup>、Hechly-Watson<sup>14)</sup>、大友<sup>16)</sup>の分割ツベルクリン蛋白中のprotein A, protein B, protein Cの或るものは多く或るものは少ないというようなツベルクリン蛋白の構成に関係しているものと思われる。また、終末pHがアルカリ性であつた場合には酸性であつた場合よりも蛋白量が多く得られるが、これは大友<sup>17)</sup>が菌体よりツベルクリン活性因子を抽出する場合、酸性で抽出するよりも弱アルカリ性で抽出する場合に多く得られるといつているが、この実験成績と関連性があるものと思われる。

## VI 結 論

結核菌の菌株および培地成分とツベルクリン産生との関係を知るために培養液の液体の性状変化を追求し、次の結論を得た。

1. pHは培養条件をいずれもほぼ同じ状態で培養すれば各菌株はおのおの固有の変化をすることが認められ、S-G-Na培地を用いた場合に特にこの変化は著明に

なる。

2. 菌量は4~6週で最高量に達し、それから次第に減少する。最高菌量は各菌株ともほとんど変わらないが、九大青山B株のみがやや少ない。

3. 還元糖量は菌量が最高量に達する時期より2~3週遅れて急に増加し、その最高糖量は菌株により異なつた量を示す。

4. 蛋白量は第1週から認められ5~6週で一度減少、あるいは停滞し再び増加する。

5. 蛋白量と力価とは同一菌株を同一種類の培地に培養したときは平行するが、菌株または培地の種類を異にするときは必ずしも平行するとは限らない。

しかしながらツベルクリン産生の機序についてはなお不明の点が多く更に引続いているいろいろの角度から研究を進めて行く予定である。

終りに望み御懇切なる御指導ならびに御校閲を賜つた九大医学部戸田忠雄教授ならびに武谷助教授および本実験に種々お協力下さつた福岡県衛生研究所坂本さつき博士に対し心から感謝する。

## VII 文 献

- 1) Johnson, T.B. and Renfrew, A. G. : Am. Rev. Tuberc., 17: 508, 1928.
- 2) Johnson, T.B. and Renfrew, A.G. : Am. Rev. Tuberc., 20: 114, 1929.
- 3) Johnson, T.B. and Renfrew, A.G. : Am. Rev. Tuberc., 22: 116, 1930.
- 4) 貝原・杉山: 福岡医学誌, 36: 614, 昭18.
- 5) 白石: 結核, 26: 268, 昭26.
- 6) 浅見 望他: 結核, 27: 246, 昭27.
- 7) 浅見 望他: 結核, 28: 117, 昭28.
- 8) 浅見 望他: 結核, 28: 164, 昭28.
- 9) 浅見 望他: 結核, 28: 246, 昭28.
- 10) 浅見・細井: 結核, 29: 482, 昭29.
- 11) P.A. Schaffer and M. Somogyi : J. Biol. Chem., 100: 295, 1933.
- 12) Seibert, T.B.: J. Biol. Chem., 78: 345, 1928.
- 13) Seibert, T.B. : Am. Rev. Tuberc., 59: 86, 1949.
- 14) Hechly, R.J. and Watson, D.W. : Am. Rev. Tuberc., 63: 718, 1951.
- 15) 大友信也: 結核, 29: 356, 昭29.
- 16) 大友信也: 結核, 29: 486, 昭29.
- 17) 大友信也: 結核, 30: 40, 昭29.