

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 2 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 4 日

I 緒 論

私は先に第 1 報において結核菌菌株および培地成分と pH, 菌量, 糖量, 蛋白量およびツベルクリンの力価との関係について述べたが, 今回は結核菌のストレプトマイシン (以下 SM) 耐性株と感受性株との関係を pH, 菌量, 糖量および蛋白量の週毎の移動について調べ, さらにソートンの培地に添加するアミノ酸の量を変えて pH, 蛋白の産生量およびツベルクリンの力価がどのように変わるかを調べたのでその結果を取りまとめて報告する。

II 実験方法

実験材料および実験方法は共に第 1 報¹⁾と同様にして行つたが, 第 1 報と異なる点は次の 3 つである。

1) 使用培地: 使用した培地は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, この培地に 1000 γ /cc となるように SM を加えた SM 加ソートン変法培地 (以下 SM 加 S-G-Na 培地) の 2 種類の培地を用いた。

2) アミノ酸添加実験培地: アミノ酸の添加実験に用いた培地はソートンの培地からアスパラギンを除いたものに以下の実験で述べるようなアミノ酸量を添加したソートンの変法培地を使用した。

3) SM 耐性菌および感受性菌: 当所で保存している結核菌を感受性菌とし, この結核菌を予め SM 1 γ /cc から 1000 γ /cc までの量を加えて作った小川の培地に 1 γ /cc から次第に菌をならしつつ 10 γ /cc, 100 γ /cc, 1000 γ /cc と耐性を上げて継代培養し, SM 1000 γ /cc 加小川の培地に良好な生育を示すようになったら前記 1) で述べた SM 加 S-G-Na 培地に移植し, さらにこの培地を用いて 3~4 代, 継代培養して, 感受性株を S-G-Na 培地に培養したものと同程度の生育を示すようになった結核菌をもつて SM 耐性菌とした。

III 実験成績(その 1)

結核菌の培養を a) SM 耐性菌を SM 1000 γ /cc 加 S-G-Na 培地に培養したもの, b) SM 耐性菌を S-G-Na 培地に培養したもの, c) 感受性菌を S-G-Na 培地に培

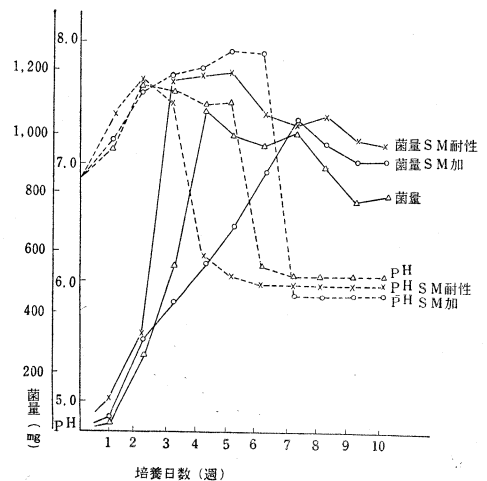
養したものの 3 種について行い, 週を追つて pH, 菌量, 糖量および蛋白量の移動を見た。

以下図を追つて述べる。

1. 予研青山 B 株: 予研青山 B 株の pH および菌量の移動を図 1 に示し, 糖量および蛋白量の移動を図 2 に示す。この図から明らかのように SM 耐性菌を SM 加 S-G-Na 培地に培養したものは他の二者と比較して pH, 菌量, 糖量および蛋白量のいずれも 2~3 週遅れて移動するが特に著しい差違は認められない。ただ糖量のみが SM 耐性菌を SM 加 S-G-Na 培地に培養したものにおいてやや少ないことが認められるが, これは菌量が 7 週で最高に達し, 糖量の移動は第 1 報において指摘した如く菌量の移動より 2~3 週遅れて移動するので, これと関連性があるものと思われ, SM の影響によるものではないものと考えられる。

2. 九大青山 B 株: 九大青山 B 株の pH および菌量の移動を図 3 に示し, 糖量および蛋白量の移動を図 4 に示す。この株の菌量, 糖量および蛋白量の移動はほとんど変わらない。ただこの場合 SM 耐性菌を S-G-Na 培地に培養したものにおいて pH が中性近くまで降つてきていることはやや

図 1 予研青山 B 株の pH および菌量の移動



注 無記号……感受性菌を S-G-Na 培地に培養したもの
SM 耐性……SM 耐性菌を S-G-Na 培地に培養したもの
SM 加……SM 耐性菌を SM 加 S-G-Na 培地に培養したもの

図2 予研青山B株の蛋白沈澱量および糖量の移動

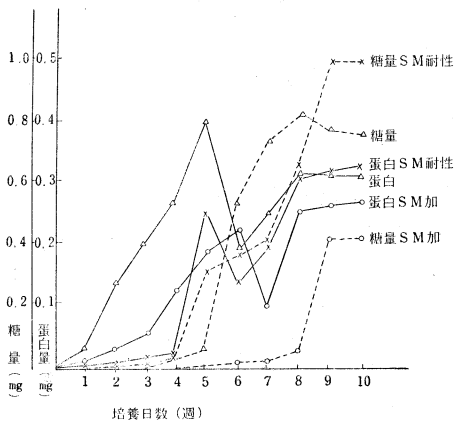


図3 九大青山B株の pH および菌量の移動

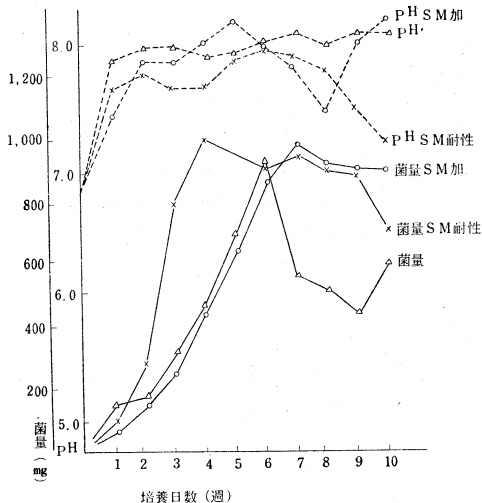


図4 九大青山B株の蛋白沈澱量および糖量の移動

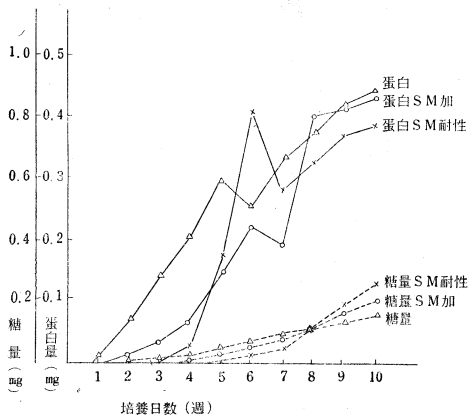


図5 H₃₇Rv株の pH および菌量の移動

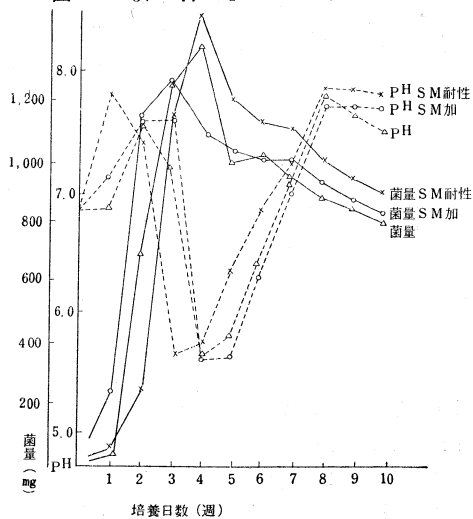
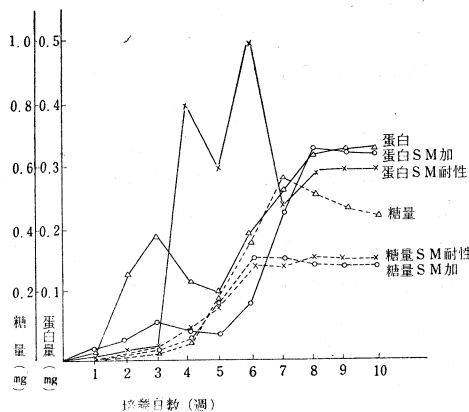


図6 H₃₇Rv株の蛋白沈澱量および糖量の移動



株は pH および菌量においては SM 耐性菌，感受性菌の間に相違は認められないが，糖量では感受性菌を S-G-Na 培地に培養したものにおいてやや多く認められ，蛋白産生の移動では SM 耐性菌を S-G-Na 培地に培養したものにおいて 4～6 週で急激に増加し，7 週で減少するがそれ以後は他の 2 種の培養法で生じた蛋白量と同様に移動する。

以上の実験成績から予研青山 B 株，九大青山 B 株および H₃₇Rv 株について前記 a, b, c の 3 方法で培養を行い，週毎に pH，菌量，糖量および蛋白量の移動を見たが，各菌株ともに SM 耐性菌，感受性菌の間に一定の相違は認められなかつた。

IV 実験成績(その2)

第1報の実験成績および前記実験(その1)の結果から結核菌をソートン培地(S-A 培地)あるいは S-G-Na 培地に培養する場合，10 週間培養において pH の移動が，ある菌株では酸性で終り，他の菌株ではアルカリ性で終る

注意を引く所見であるが，SM の影響によるものかどうかは不明である。

3. H₃₇Rv 株: H₃₇Rv 株の pH および菌量の移動を図 5 に示し，糖量および蛋白量の移動を図 6 に示す。この

ことが知られたので、その原因を知るために培地中のアミノ酸の添加量を変えて pH の変化を見、併せて蛋白量およびツベルクリンの力価をも見たので、その結果を図7から図9に示した。

1. アミノ酸の濃度と pH との関係(図7)：10週間培養におけるアミノ酸の濃度と pH との関係は、アミノ酸の濃度を高くすれば pH は高くなり、アミノ酸の濃度が 12g/l 以上ではアミノ酸の濃度が高くなつても pH はあまり高くなり一定の pH 値に近づくようである。またこの pH とアミノ酸の濃度との関係はアスパラギンを用いた場合でも味の素を用いた場合でも同じような傾向がある。次に同じ組成の培地(アミノ酸の添加量も含めた)を用いたときには予研青山B株よりも九大青山B株の方がやや高い pH を示す。

2. アミノ酸の濃度と蛋白産生との関係(図8)：アミノ酸の濃度と蛋白産生との関係はアミノ酸の濃度を高くしても一定濃度に達すると蛋白の産生量は最高となり、それ以上濃度を高くしても蛋白の産生はかえつて減少する。

蛋白の産生が最高に達するときのアミノ酸の濃度は S-A 培地を用いた場合、九大青山B株では 4g/l のアスパラギン添加で蛋白の産生は最高となり、予研青山B株の場合には 6g/l のアスパラギン添加で蛋白の産生は最高となる。S-G-Na 培地を用いた場合には九大青山B株では 8g/l の味の素添加で蛋白の産生は最高となり、予研青山B株では 12g/l の味の素添加で蛋白の産生は最高となる。

3. アミノ酸の濃度と力価との関係(図9)：ツベルク

図7 アミノ酸濃度と pH との関係

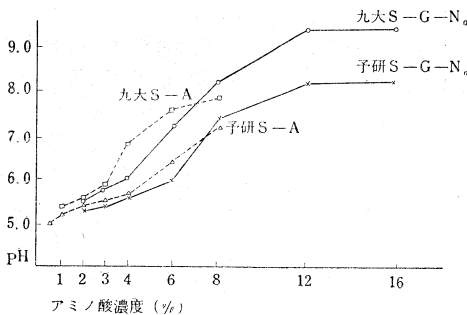


図8 アミノ酸濃度と蛋白産生との関係

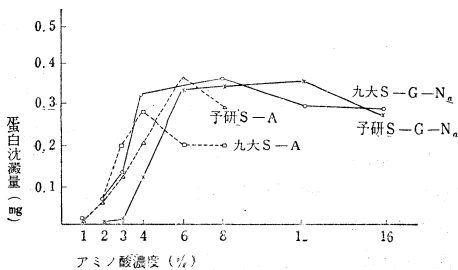
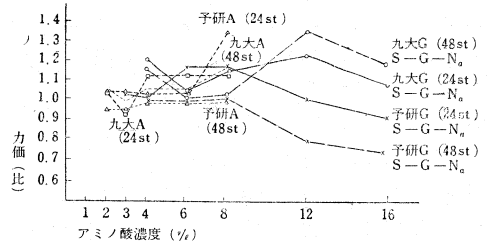


図9 アミノ酸濃度と力価との関係



リンの力価も蛋白の産生と同じようにアミノ酸の濃度が一定濃度に達すれば最高となり、それ以上のアミノ酸濃度ではかえつて弱くなる。S-A 培地を用いた場合、九大青山B株では24時間後の判定で 4g/l から 8g/l までのアスパラギン添加では力価はほとんど変わらないが、48時間後の判定では 8g/l のアスパラギン添加のときに最も強い力価を示す。予研青山B株では24時間後の判定でも48時間後の判定でも共に 8g/l のアスパラギンを添加したときに最も強い力価を示す。

これに対し、S-G-Na 培地を用いた場合には九大青山B株では24時間後の判定でも48時間後の判定でも共に12g/l の味の素を添加したときに最も強い力価を示している。しかしこの場合、普通一般的には24時間後の判定は48時間後の判定よりも発赤の大きさが大きいのであるが、12g/l の味の素添加では24時間後の判定よりも48時間後の判定の方が発赤の大きさが変わらないか、むしろ大きくなることが多い。また、予研青山B株では 8g/l のアミノ酸を添加したときに最も強い力価を示し、24時間後の判定よりも48時間後の判定の方が発赤が小さくなっている。

V 考 案

私は本実験の実験成績(その1)において結核菌 SM 耐性株のツベルクリン産生を見、実験成績(その2)において培地中のアミノ酸の濃度と pH、蛋白の産生および力価とのおのおのの関係を見た結果、結核菌の SM 耐性株と感受性株との間には pH の移動、菌量の移動、糖量の移動および蛋白産生の移動についての相違は認められなかった。

ソートンの培地を基礎にして、この培地中のをアスパラギンと味の素を用いて、その濃度を変えて pH、蛋白の産生およびツベルクリンの力価を見ると、アミノ酸の濃度を高くすれば結核菌培養後の培地の pH は高くなるが、12g/l 以上の濃度では pH の高まり方は極めて緩慢となる。しかしこの関係はブドウ糖のような糖類の存否多少によつて変つてくるようであるが今日までの実験では決定的な pH の変化の原因は掴みえていない。

アミノ酸の濃度と蛋白の産生との関係はアミノ酸の一定濃度で蛋白の産生は最高に達しそれ以上の濃度ではかえつて少なくなる。しかし Herrman²⁾、武谷³⁾らの培地

の窒素源としてアミノ酸と同時に NH_4Cl を用いて行つた実験があり、尿素分解に関する戸田⁴⁾、占部⁵⁾、広木⁶⁾の実験があり、また、山村⁷⁾、斎藤⁸⁾は結核菌のアミノ酸酸化について実験を行っているので、これらの研究との関係も考慮しつつ検討しなければならないと思う。

アミノ酸の濃度とツベルクリンの力価との関係はアミノ酸が一定濃度に達したときに最も強い力価を示し、それ以上の濃度ではかえつて弱くなる。この実験でも今回は力価試験に用いた動物数も少なく、人体実験も行っていないので今日までのところはその傾向を見たにすぎず確定的なことは言えない。

さらに蛋白の産生とツベルクリン力価との関係については、両者が必ずしも平行的な関係になく、蛋白量が多なくても力価はそれに比例して強くはなく、蛋白量は少なくても強い力価を示す場合もある。このことはおそらく Seibert⁹⁾、大友^{10)~12)}らが行つたツベルクリン蛋白の protein A, protein B, protein C の蛋白構成が結核菌の菌株により、またはアミノ酸の濃度によつて変わるであろうと想像されるが、このことも力価をいまいし検討した後さらに確めて見たい。ただ九大青山B株は長い間アミノ酸をアスパラギンの変りに味の素 8g/l を用いたソートンの変法培地および卵蛋白加固型培地に植継いたものであり、予研青山B株はソートン原法培地に植継いたものであるためであろうか、九大青山B株はアスパラギンを用いた培地では予研青山B株と比較して発育が悪く、味の素を用いた培地では逆に発育が良くなるように思われる。このことが蛋白の産生および力価に多少の影響は及ぼしていると充分考えられる。したがつてこの事実も考慮しつつさらに種々のアミノ酸を用いてアミノ酸の濃度と蛋白の産生、力価および菌量等の相互関係を追求しツベルクリン産生の機序を明らかにしたいと考えている。

VI 結 論

以上の実験から結核菌のSM耐性株と感受性株との間に蛋白産生、pHの移動、菌量の移動および糖量の移動について相違は認められない。

培地中のアミノ酸の濃度を高くすればこれにしたがつてpHは高くなり、蛋白の産生および力価は一定濃度のアミノ酸量で最高蛋白量または最も強い力価を示し、それ以上のアミノ酸の濃度ではかえつてそれぞれ減少し、または弱くなる。しかしながら考案でも述べたように蛋白の産生およびツベルクリン力価についてはなお検討を要す問題があるので目下実験を継続中である。

終りに臨み御懇切なる御指導ならびに御校閲を賜つた戸田教授および武谷助教授に対し深く謝意を表し、本実験の実施に当り種々お世話下さつた真子所長および坂本博士に厚くお礼を申上げる。

VII 文 献

- 1) 武原雄平：結核，32：101，昭和32.
- 2) R. Herrmann：Biochem. Zschr.，323：181，1952.
- 3) 武谷健二：日本細菌学雑誌，11：25，1956.
- 4) 戸田忠雄：日本微生物学誌，20：大15.
- 5) 占部 薫：日本微生物学誌，27：昭8.
- 6) 広木：満州医学雑誌，23：昭11.
- 7) 山村雄一：結核，27：450，昭27.
- 8) 斎藤正敏他：結核，31：393，昭31.
- 9) F.B. Seibert：Am. Rev. Tbc.，59：86，1949.
- 10) 大友信也：結核，29：356，昭29.
- 11) 大友信也：結核，29：486，昭29.
- 12) 大友信也：結核，30：40，昭30.