

## Mycobacterium 発育相の生物学的研究

東 村 道 雄

国立療養所大府荘

受付 昭和 35 年 4 月 1 日

微生物の発育環 (growth cycle) に関する生理学的あるいは生化学的研究は比較的多いが, *Mycobacterium* を材料としたものはないようである<sup>1)~5)</sup>。したがって本報では *Mycobacterium* の発育環を生理学的見地から観察することとした。形態学的立場からする *Mycobacterium* の発育環の研究は数多くの研究者によつてとりあげられ, この菌に関して「発育環」という語は形態的面からする発育環ととられやすい。そこで本報では混同をさけるため発育相 (growth phase) という語を使用した。

## 実験材料および方法

被検株: *Mycobacterium avium* 獣調株

培地: 変法 Sauton 培地; glycerin 40 ml, sodium glutamate 4.0 gm, sodium citrate 2.0 gm,  $K_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  0.5 gm,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 gm,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05 gm, Aq. dest. 960 ml (pH 7.0). glycerin broth; glycerin 40 ml, meat extract 10 gm, peptone 10 gm, Aq. dest. 960 ml (pH 7.0)。両培地とも 50 ml ずつ 200 ml 容量の Erlenmeyer flask に分注して 115°C 30 分滅菌した。培養温度は全実験を通じ 37°C。

接種: Sauton 培地 5 日培養菌をガラス玉とともに振盪して均一化し, その濃度 (mg/ml) を比濁法で測定し, 湿菌量 0.7 mg (0.7 mg/ml 菌液を 1.0 ml) を上記の変法 Sauton 培地および glycerin broth に接種し, 37°C に培養し, 日を追つて, 1 本ないし多数の flasks をとつて次の項目について測定を実施した。培養 1 日後の菌量は少量であったので, flask 20 本分の菌を遠心して集めて使用し, この結果から各 flask 当りの値を計算した。

全発育量: 培養の初期には比濁法 (Leitz's Rouy-photometer, filter 610 m $\mu$ , 使用) による比濁度を標準曲線と比較して, また培養の後期には, あらかじめ秤量した遠心管で菌を集め, 上清を捨て, 湿菌量を秤量することにより, 各 flask 当りの湿菌量をだした。乾燥菌量は発育相によらず湿菌量の 20 $\pm$ 2% であった。

湿菌量 1 mg 中に含まれる生菌単位: 菌液の濃度 (mg/ml) を測定したのち, 生理食塩水で 10 倍段階に稀釈し, その 0.1 ml ずつを Sauton 寒天培地 (Sauton 培地に 3% 寒天を加え 20 ml ずつ直径 9 cm 平板に

分注) 5 枚に接種し, 37°C 5 日後に集落数を数えた。集落数と稀釈度から湿菌量 mg 当りの生菌単位を算出した。

全生菌単位数: 各 flask に含まれる全生菌単位数である。次式により計算した (mg 当りの生菌単位数)  $\times$  (全発育量 (mg))。

RNA : DNA 比: 菌を Schneider 法<sup>6)</sup> で分画し, その核酸画分について, DNA 量を diphenylamine 反応, RNA 量を orcinol-HCl 反応で測定して求めた。

## 実験成績

実験成績は図 1, 2 に示すとおりで, 両培地ではほぼ同様な結果が得られた。

図 1 変法 Sauton 培地における発育曲線 (*M. avium* 獣調株)

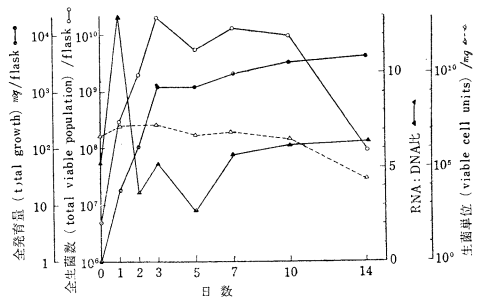
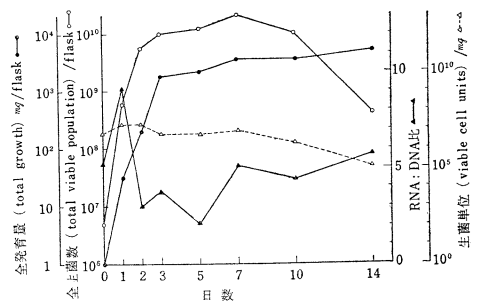


図 2 glycerin broth における発育曲線 (*M. avium* 獣調株)



## (1) 全発育量 (total growth)

全発育量は培養開始後ただちに直線的に増加し, 培養 3 日後に頭打ち状態となり, 以後は漸増した。図 1, 2

の曲線から考えると、

(a) 培養3日までが、対数期、

(b) 培養3日以後が、停止期  
と考えられ、誘導期は認められない。

これらの図は、培養日数に対して全発育量の対数をとつたものであるが、もし全発育量を実数で示せば、培養1~2日までが誘導期、培養2~3日までが対数期、以後が停止期と考えられ、誘導期があることになる。しかし一般細菌についての既報の同種の研究の成績は全発育量を対数として表わしてあるので、一般常識上は上記のごとき解釈でよいと思われる。

(2) 湿重量  $mg$  当りの生菌単位 (viable cell units/ $mg$ , wet weight, of cells)

単位重量  $mg$  当りの生菌単位数は接種後一たん増加し、ついで培養5日後 (Sauton 培地) ないし3日後 (glycerin broth) から漸減する。いずれの培地でも培養10日以後には著明に減少する。

この結果は、新しい培地に接種された菌が増殖し、新生菌は発育能力があるが、培養日数を経るにつれて発育能力を失う菌が増えてくることを示している。培養1~2日後の菌がほとんど全部生菌 (viable cells) であると仮定すれば、湿重量  $1 mg$  は約  $2 \times 10^7$  の菌数を含むものと考えられる。

(3) 全生菌単位数 (total viable population) の推移  
全生菌単位数 (全生菌数) の推移はもつとも興味ある結果を示した。flask 当りの生菌数は、新培地に接種後、直線的に増加し、培養3日後に頂点に達した。以後培養10日までは全菌量が漸増するにもかかわらず平衡状態となり、10日以後は比較的急速に減少した。

この結果を Buchanan (文献(1)より引用) の記載に従つて分けると次のごとくなる。

- (a) initial stationary phase, なし。
- (b) logarithmic growth phase, 培養 0~3 日。
- (c) maximum stationary phase, 培養 3~10 日。
- (d) logarithmic death phase, 培養 10~14 日。

全生菌数についても、全生菌数を対数で示すときは (図 1, 2), 誘導期に相当するものは認められなかつた。

以上のごとく、新培地に接種後、菌は直線的に増加するが、この時期すなわち logarithmic growth phase には全菌量の増加と全生菌数の増加は並行する。したがつて、この時期の培養はほとんど全部生菌からなると考えてよい。

次の maximum stationary phase では全菌量の増加はなお徐々に起こっているのに、全生菌数は横ばいとなる。これは、この時期には、新生菌の増加と既存菌の発育能力喪失とが平衡していると考えられる。既存菌は発育能力を失つても菌そのものが消えるわけではないから、新生菌の量だけ発育菌量 ( $mg$ ) が増加するわけで

あろう。

logarithmic death phase では全菌量は依然漸増しているのに、全生菌数が減るのであるから、先の平衡が破れて、菌の新生がある一方 (それだけ全菌量が増える)、他方ではそれを上まわつて既存菌の発育能力喪失が起こると考えられる。

(4) RNA : DNA 比

接種に用いられた菌自身の RNA : DNA 比は約 5 : 1 であつたが、新培地に接種後、ただちに比が上昇して、培養1日後には RNA : DNA 比は約2倍に増加した。しかし培養2日以後には再び減少してほぼ旧値に復し、以後著明な変動なしに経過した。

RNA : DNA 比が培養初期に増加することは一般細菌で認められているが<sup>3) 4)</sup>, Mycobacterium でも同様の所見が得られた。Hinshelwood<sup>9)</sup> は誘導期を細胞分裂に必要な中間産物を作る時期と考えたが、蛋白合成に密接な関係をもつ RNA の増加する時期を誘導期と考えることは妥当と考えられる。被検株で RNA : DNA 比の増加は培養 0~1 日 (ないしは 2 日以内) にのみ認められ、他の時期には認められないから、この時期は特殊な時期すなわち誘導期と考えてよいと思われる。すなわち前述のように発育曲線 (全発育量および全生菌数の曲線) からは誘導期に相当する期間は見出だしがたいにもかかわらず、生化学的な面からは誘導期の存在が認められた。

(5) Ziehl-Neelsen (ZN) 染色および Fontes (F) 染色所見との対応

上述の発育曲線および RNA : DNA 比と染色所見の間にはかなりの対応関係が認められた。RNA 量の増加があつた培養1日後の菌は、ZN 染色で非抗酸性または弱抗酸性菌であり、F 染色では菌全体が一樣に黒染する菌であつた (発育初期の非抗酸性菌が F 染色で一樣に黒染する菌——“black cells”——であることは前に指摘した<sup>10)</sup>)。培養2~3日の logarithmic growth phase の菌は一般に ZN 染色で一樣に fuchsin に染まる抗酸性菌であり、F 染色では顆粒数  $\times$  を有する菌であつた。maximum stationary phase に相当する時期には ZN 染色で抗酸性顆粒数  $\times$  を菌体内に有する菌が出現しはじめ、logarithmic death phase ではこのような形態が増加した。F 染色所見はこれらの時期も数  $\times$  の Fontes 顆粒をもつ菌である。著者は前に、抗酸性顆粒数  $\times$  をもつ菌 (抗酸性顆粒連続体) のかなりの部分が発育能力を失つた菌であることを報告したが<sup>11)</sup>、今の場合も、抗酸性顆粒連続体の出現と、発育曲線から考えられる発育能力喪失菌の出現とはかなりより対応関係を示した。

本報の成績では、全菌量ならびに全生菌数からみた発育曲線はいずれも誘導期の存在を示さなかつた。Rahn<sup>12)</sup>によれば、誘導期の長さは新培地への接種菌量によつて異なり、接種菌量が小であれば誘導期は延長するという。被検条件では培地 50 ml に約  $5 \times 10^6$  生菌数を接種したが、もし接種生菌数を約  $10^8$  にすれば、培養 1 日後の培地は透明であつて比濁度 0 となりあたかも誘導期が存在することくみえる。この場合、比濁度そのものを縦軸にとつて発育曲線を作れば誘導期にあたる時期が生じる。しかし比濁度 0 を生菌数 0 と考えるのはもちろん正しくない。われわれの条件では、0.01 mg/ml の菌液 (かりに 1 mg 中に  $10^7$  生菌数を含むとすれば  $10^5$  生菌数/ml の菌液) より薄い濃度では比濁度は 0 となる。菌液が透明にみえても実際には多数の生菌数が存在することになる。実際に少接種菌量を用いる場合でも発育曲線は、0 点と比濁可能な点とを結べば、0 点からの直線的上昇となつてしまふし、また比濁度 0 の場合に遠心して集菌し生菌数を測定すれば、かなりの生菌数を認めることができる。このように全生菌数の消長または全発育量の消長を対数をとつて曲線を作る場合、少なくとも被検株では、誘導期の存在を積極的に証明しがたいたことが分かつた。これらの事情は、単に *Mycobacterium* のみならず一般細菌にも通用することであつて、比濁度 0 をもつて発育量 0 とすることは不合理である。

以上のごとく被検株では発育曲線の面から誘導期の存在を認めることができなかつたが、生化学的な面からは RNA : DNA 比の高い時期として明らかに誘導期に相当する時期を認めえた。この所見から、著者は、誘導期の定義を発育曲線からきり離して RNA : DNA 比のごとき生化学的面から規定するほうが妥当ではないかと考える。細胞当りの DNA 量は一定と考えられるから、RNA : DNA 比の増加は RNA の増加すなわち新培地への適応期を示すものと考へてよからう。

興味ある所見は発育速度の二相性である。全発育菌量の推移を示す曲線は発育速度を示すものにほかならない。発育速度が速ければ、曲線は急上昇し、遅ければ緩徐に上昇する。菌量是对数で示してあるから発育速度一定のときは曲線は直線となるはずである。図 1, 2 をみるのに、発育曲線は培養 3 日後まで直線的に急上昇し、以後急に屈曲して再び直線的に緩徐に上昇している。すなわち発育期間を通じて発育速度は大概 2 種と考へられ、前者は logarithmic growth phase に相当し、後者は Fisher and Kirchheimer<sup>13)</sup> のいう arithmetic linear growth に相当すると考へられる。この発育曲線の二相性は興味あることと思われる。

## 結 論

*Mycobacterium avium* 獣調株の変法 Sauton 培地および glycerin broth における発育の生理を研究し次の結論を得た。

1) 全発育菌量の推移を示す発育曲線は二相性で、(a) logarithmic growth phase とそれに続く (b) arithmetic linear growth phase の二相に分ちえた。すなわち被検株の示しうる発育速度は、これら二相に相当する 2 種と考へられる。

2) 全生菌単位数の推移を示す発育曲線は三相性で、(a) logarithmic growth phase, (b) maximum stationary phase, (c) logarithmic death phase に分ちえた。

3) 発育曲線では誘導期に相当する時期を認めえなかつたが、生化学的にはこれを認めえた。すなわち培養初期に RNA : DNA 比が約 2 倍に増加する時期があり、これが誘導期にあると考へられた。誘導期の定義は発育曲線によるよりも生化学的に考へたほうがよいと思われる。

4) 発育曲線と染色所見とはかなりよく対応した。誘導期の菌は非抗酸性菌または弱抗酸性菌で Fontes 染色では一様に黒染した。logarithmic growth phase の菌は大部分が、fuchsin に一様に染まる抗酸性菌で Fontes 顆粒数  $\alpha$  を菌体内に有する。logarithmic death phase には抗酸性顆粒連続体が増加した。

勝沼荘長ならびに日比野教授の御校閲を謝す。

## 文 献

- 1) Burrows, W. : Jordan-Burrows Textbook of Bacteriology, 15th ed. Saunders, Philadelphia, p 36, 1950.
- 2) Gunsalus, I. : Bacterial Physiology, Academic Press, N.Y., p 101, 1951.
- 3) Leslie, I. : The Nucleic Acids, Vol. II, Academic Press, N.Y., p 1, 1955.
- 4) Hartsell, S.E. et al. : Bact. Revs., 23 : 250, 1959.
- 5) 林・三浦 : 核酸及び核蛋白質, 下巻, 共立出版, 東京, p 279, 1951.
- 6) Schneider, W.C. : J. Biol. Chem., 161 : 293, 1945.
- 7) Dische, Z. : Mikrochemie, 8 : 4, 1930.
- 8) Kerr, S.E. & Seraidarian, K. : J. Biol. Chem., 159 : 211, 1945.
- 9) Hinshelwood, C.N. : The Chemical Kinetics of the Bacterial Cell, Clarendon, Oxford, p 284, 1946, (2) より引用).
- 10) 東村 : 医学と生物学, 23 : 198, 1952.

- 11) 東村：医学と生物学，23：117，1952.
- 12) Rahn, O. : Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II, 16 : 417, 1906, (2) より引用).

- 13) Fisher, M.W. & Kirchheimer, W.F. : Am. Rev. Tuberc., 66 : 758, 1952.