

## グルコースによる発育阻害現象と結核菌毒力

金 井 興 美

国立予防衛生研究所結核部（部長 室橋豊穂）

受付 昭和 38 年 1 月 28 日

結核菌の毒力については、感受性ある宿主において増殖力強く、かつ長期間そにとどまつて病変をつくり、また最後にはその個体を倒しうるものを強毒と理解しているが<sup>1)</sup>、他方このような強毒株から、種々な集落解離の手段によつて、弱毒あるいは無毒といわれる安定な変異株たとえば BCG, H37R<sub>a</sub> といった株が分離されている。強毒株と無毒株の差異、すなわち宿主内での増殖力の程度差を支配する菌側の因子を菌の代謝形式上の問題として扱う試みはすでに以前より報告されているが、その一つの方向は結核菌のエネルギー代謝の形式に関係している。たとえば Guy ら<sup>2)</sup>は酸素分圧と発育との関係を毒力株と変異株とで比較し、また Geronimus ら<sup>3)</sup>は一定の基質に対する酸化能の強さが毒力の強さと逆の関係にあることを指摘した。さらに近年、結核菌にも解糖系の存在することが Bastarrachea ら<sup>4)</sup>によつて証明され、しかも Ramakrishnan ら<sup>5)</sup>によつて、この代謝経路が H37R<sub>V</sub> 株においては H37R<sub>a</sub> 株よりも一そう大きな比重で存在することを報告した。グルコースの代謝形式として、酸化的な経路の存在はこれまでも一般抗酸菌で見出されているが、結核菌においてはこの酸化的経路と解糖系とが共存し、しかも強毒株においては後者がその比重において優勢であるという報告<sup>6)</sup>は、酸素分圧の低い環境での発育において有毒株が無毒株よりも一そう可能性をもっているとする報告<sup>2)</sup>と矛盾しない。

著者もグルコース代謝形式において、有毒結核菌と無毒結核菌との間に差違が存在するであろうという推定を、感染論上の立場より設定し、過剰のグルコースを培地に加えることによつて、発育上の相違を有毒株、無毒株の間に求めて実験を行なつてきた。以下その大要を記する。

### 実験材料及方法

菌株：当研究室保存の人型、牛型の種々な毒力変異株を使用した。人型としては H37R<sub>V</sub> 株を有毒標準株とし、その弱毒変異株として H37R<sub>a</sub> 株、および H37R<sub>V</sub> 株より試験管内で分離された isoniazid 耐性 H37R<sub>V</sub> INH-R 株

を使用した。またわれわれが長い間標準人型株として保存してきた H2 株は、最近、勝山<sup>6)</sup>によつて、単孤菌培養を用いて H2R<sub>V</sub>, H2R<sub>a</sub> の 2 系統に集落解離され、その毒力差が実証されているのでこれらも比較の対象とした。さらに H2 原株より試験管内で分離された H2 INH-R 株も加えた。牛型結核菌として強毒 Ravenel 株と弱毒 BCG 株を選んだ。これらの株はすべて原液 1% に磷酸カリを含有する小川鶏卵培地上に 1~2 週間隔で継代保存されており、実験にさいしては、これより水晶球コルベン手振法によつて均等菌液を調製した。

培地：グリセリンを 2% に含有する標準小川培地、Kirchner 寒天培地を対照として、これらよりグリセリンを除き、代わりにグルコースを 5%, 7.5%, あるいは 10% に含有する培地を調製して用いた。小川培地のさいにはグルコースは原液中に添加してから全卵と混合し加熱凝固滅菌した。Kirchner 培地に加えるには濾過滅菌したグルコース溶液を使用し、濃縮基礎培地に馬血清とともに所定の量となるよう配慮した。菌液接種後 1 週目に綿栓を滅菌ゴム帽に代えて培地の乾燥を防いだが、このさいゴム帽には中心部に糸を通しておき、空気の流れに余裕を保つた。このような処置の代わりにゴム帽をコルク栓にするのも可能である。発育を連続的に追求するためには Tween-albumin 培地を使用した<sup>7)</sup>がその処法は次のごとくである。

基礎培地として KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 3.1 g, アスパラギン 2.0 g, 蒸溜水 950 cc, カゼイン水解物 2.0 g, クエン酸鉄アンモン 0.05 g, 硫酸マグネシウム 0.01 g, 塩化カルシウム 0.0005 g, 硫酸亜鉛 ZnSO<sub>4</sub> 0.0001 g, CuSO<sub>4</sub> 0.0001 g, クエン酸ソーダ 1.5 g を pH 6.5~6.8 に修正、この基礎培地 900 cc にグルコースの希望量（濾過滅菌）と Tween 80 を 0.5 cc, さらに牛アルブミン溶液（栄研）100 cc を加えた。

口径を揃えた中試験管に 5 cc 分注して用いたが、この場合は綿栓を cap に代えることなく、はじめに培地表面に相当する試験管外壁に目印をつけ、培養中にときどき蒸溜水を添加して蒸発水分を補充した。また通気を

促進するためには試験管を斜面に放置し、逆に通気を阻止するためには試験管は直立位として、さらに流動パラフィン 1 cc を重層した。

動物：体重 300~400 g の正常モルモットの雄を使用した。

実験成績

1) グルコース高濃度含有固形培地における有毒株、無毒株の発育差異

固形培地すなわち前述の小川培地、Kirchner 寒天培地に 5%, 7.5%, あるいは 10% と過剰のグルコースを含有せしめた場合をグリセリン標準濃度 (2%) の場合と比較した。なおグルコースの代わりに乳酸ソーダを 0.2% に加えた場合も一つの対照として設置し、さらに Kirchner 寒天の場合には斜面のみならず菌を混釈した高層寒天としても用いた。被検菌株は前記の 9 株であるが、これより 10 倍連続希釈蒸溜水菌液を調製して接種し、37°C で 3~4 週間放置後の発育を観察し、発育のみら

れた最少接種量を記載した。すなわち  $10^{-3}$  mg であれば 3 をもつて発育表示とした。したがってこの数字の大なるほどグルコースに対する発育上の耐性が強いことになる。前後 9 回行なした実験の成績を Table 1 として総括した。

一般的にまずグリセリン 2% の場合には有毒株、無毒株ともに同程度の発育のみられるのに、グルコース 7.5%, 10% の培地では、H37R<sub>v</sub>, H2, H2R<sub>v</sub>, Revenel 株に比べて H37R<sub>a</sub>, H2R<sub>a</sub>, H37R<sub>v</sub> INH-R, H2 INH-R, BCG 株は一そう顕著な発育阻止を受けることが示された。一つの対照としての乳酸ソーダ 0.2% の場合でも同様の傾向がみられた。ただし INH 耐性菌に関しては、有毒菌と差異のみられない場合もあつた。しかしこのような高濃度のグルコースの存在下では有毒株の発育といえどもある程度 dysgonic であり、無毒株がより顕著な発育阻害を受けることを強調すべきであろう。

2) Tween-albumin 培地における観察

この種の培地においては、結核菌も均等発育をするの

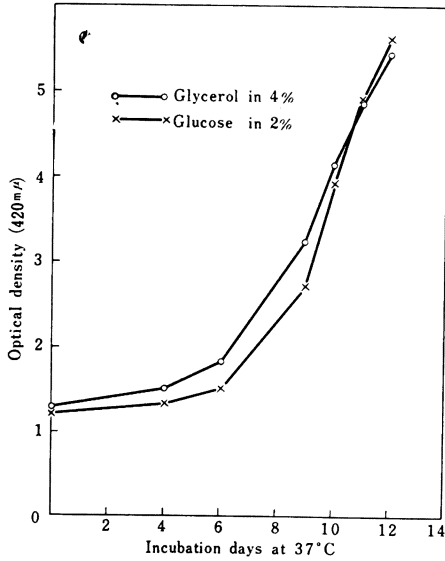
Table 1. Different Growth Response to Solid Media Containing High Concentrations of Glucose or Lactate among Virulent, Low-virulent, or Avirulent Strains of Tubercle Bacilli

| Exp. No. | Media employed                | Added carbohydrate (%)       | Highest of dilution inoculum ( $10^{-x}$ mg) of the below-indicated strains with which growth was obtained |                   |                         |    |                  |                  |          |         |     |
|----------|-------------------------------|------------------------------|--|-------------------|-------------------------|----|------------------|------------------|----------|---------|-----|
|          |                               |                              | H37R <sub>v</sub>  | H37R <sub>a</sub> | H37R <sub>v</sub> INH-R | H2 | H2R <sub>v</sub> | H2R <sub>a</sub> | H2 INH-R | Revenel | BCG |
| 1        | Ogawa egg medium              | Glycerol 2%                  | 6  | 6                 | 5                       | 6  | 6                | 6                | 6        |         |     |
|          |                               | Glucose 10%                  | 4  | 1                 | 2                       | 3  | 4                | 2                | 2        |         |     |
| 2        | Ogawa egg medium              | Glycerol 2%                  | 6  | 6                 | 6                       | 6  | 6                | 6                | 6        |         |     |
|          |                               | Glucose 10%                  | 4  | 3                 | 2                       | 4  | 4                | 2                | 2        |         |     |
| 3        | Ogawa egg medium              | Glycerol 2%                  | 6  | 6                 | 6                       | 6  | 6                | 6                | 6        | 6       | 6   |
|          |                               | Glucose 10%                  | 5  | 1                 | 1                       | 4  | 4                | 2                | 1        | 6       | 3   |
| 4        | Kirchner agar slant           | Glycerol 2%                  | 6  | 6                 | 6                       | 6  | 6                | 6                | 6        |         |     |
|          |                               | Glucose 10%                  | 4  | 1                 | 1                       | 3  | 4                | 1                | 1        |         |     |
| 5        | Kirchner agar slant           | Glycerol 2%                  | 6  | 6                 | 6                       | 6  | 6                | 6                | 4        | 6       | 6   |
|          |                               | Glucose 7.5%                 | 4  | 3                 | 1                       | 4  | 3                | 1                | 1        | 5       | 3   |
| 6        | Ogawa egg medium              | Glycerol 2%                  | 6  | 6                 |                         |    |                  |                  |          |         |     |
|          |                               | Glucose 10%                  | 4  | 1                 |                         |    |                  |                  |          |         |     |
| 7        | Ogawa egg medium              | Glycerol 2%                  | 6  | 6                 |                         | 6  | 6                | 6                | 6        |         |     |
|          |                               | Lactate 0.2%                 | 5  | 3                 |                         | 4  | 2                | 1                | 4        |         |     |
| 8        | Kirchner agar-bacilli mixture | Glycerol 2%                  | 6  | 6                 | 6                       | 6  | 6                | 6                | 6        | 6       | 6   |
|          |                               | Lactate 0.2%                 | 4  | 1                 | 4                       | 4  | 4                | 1                | 3        | 4       | 1   |
| 9        | Kirchner agar                 | Slant Glycerol 2%            | 6  | 6                 |                         | 6  | 6                | 5                | 4        |         |     |
|          |                               | Slant Glucose 5%             | 6  | 5                 |                         | 6  | 6                | 1                | 1        |         |     |
|          |                               | Bacilli-mixture Glucose 2.5% | 5  | 1                 |                         | 5  | 5                | 1                | 1        |         |     |
|          |                               | Bacilli-mixture Lactate 0.2% | 5  | 1                 |                         | 3  | 1                | 1                | 1        |         |     |

Note: Final reading of growth was made at the end of 3 or 4 week incubation at 37°C. Numerical indications in the table represent the x in  $10^{-x}$  mg of the size of inoculum, therefore the larger numbers mean higher tolerance to glucose or lactate.

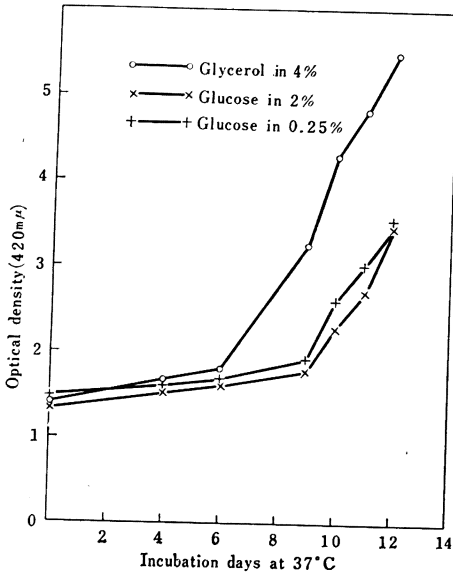
で、濁度の測定によつて発育を連続的に追求することができる。そこでこの環境におけるグルコース効果を検討した。予備実験において上記の固形培地よりもグルコースの発育阻害効果が強く表現され、7.5%では有毒株といえども全く発育しないことが明白となつた。そこでグルコース濃度を0.25, 0.5, 1, 2%とし、グリセリンを

Fig. 1. Growth of H37R<sub>V</sub> Tubercle Bacilli in Tween-albumin Liquid Medium Containing Glycerol in 4% or Glucose in 2%



Note: Size of inoculum is 0.1 mg containing  $12 \times 10^5$  viable units to each tube.

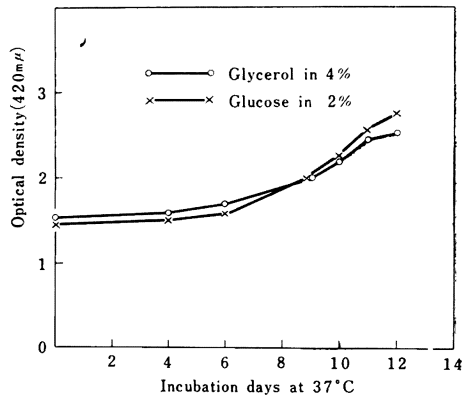
Fig. 2. Growth of H37R<sub>A</sub> Tubercle Bacilli in Tween-albumin Liquid Medium Containing Glycerol in 4% or Glucose in 2 or 0.25%



Note: Size of inoculum is 0.1 mg containing  $5 \times 10^5$  viable units to each tube.

4%として、それらにおける有毒株、無毒株の発育を比較した。有毒株として H37R<sub>V</sub>、無毒株として H37R<sub>A</sub>を選んだ。培種菌量は培地当り  $10^{-1}$  mg,  $10^{-2}$  mg,  $10^{-3}$  mg,  $10^{-4}$  mg の4種類とした。濁度の測定は Coleman 分光光度計を 420 mμ で用いて行なつた。まず H37R<sub>V</sub>  $10^{-1}$  mg 接種の場合は Fig. 1 に示すごとくで、グルコー

Fig. 3. Growth in Air-tight Condition of H37R<sub>A</sub> Tubercle Bacilli in Tween-albumin Liquid Medium Containing Glycerol in 4% or Glucose in 2%



Note: Size of inoculum is the same as that described in Fig. 2.

ス2%での発育はグリセリン4%の場合に比べて多少おくれるが、接種後12日目ではむしろ逆になっている。この傾向はグルコース0.25%, 0.5%, 1%においても全く同一であつた。また接種量が  $10^{-3}$  mg 以下と、17日目の観察において、グルコース0.25, 0.5, 1, 2%での発育はグリセリン4%の場合の約2倍の濁度を示した。次に H37R<sub>A</sub> 株  $10^{-1}$  mg 接種の場合は Fig. 2 に示されている。グリセリン4%での発育曲線は、Fig. 1 に示す H37R<sub>V</sub> の発育曲線とはほぼ同一であるが、グルコース0.25%と2%での発育曲線は、グリセリンの場合のほぼ1/2の濁度で終始している。すなわち H37R<sub>A</sub> 株はこの培培地環境でのグルコースによつて H37R<sub>V</sub> ではみられない強い発育阻害を受けることが示されている。また H37R<sub>A</sub> 株の場合も、接種量の減少に伴いグリセリンとグルコースとの間の差異が目立たなくなる傾向がみられた。以上の実験においては、前述のごとき方法で培地に対する空気の流通をよくならしめる条件が設定されたが、次に H37R<sub>A</sub> 株の場合について、培地上に流動パラフィンを加えて空気の流通を絶つて実験を行なつた。Fig. 3 に示す  $10^{-1}$  mg 接種の場合にもグリセリンとグルコースの間には全く意味する差異がみられなかつた。また当然ではあるが発育そのものもきわめて dysgonic であつた。

3) 使用した9株のモルモットにおける毒力  
使用9株を0.1 mg 皮下接種し、4週後に剖検して

Table 2. Virulence Test in Guinea Pigs of 9 Strains of Tubercle bacilli

| Strains                 | Body weight of animals at the time of infection (g) | Subcutaneous infection size (viable units) | Viable units recovered from the spleen 4 weeks after infection |
|-------------------------|---|--|--|
| H37R <sub>v</sub>       | 370   | 3×10 <sup>6</sup>                          | 67000  |
|                         | 340   |  | 154800   |
| H37R <sub>a</sub>       | 300   | 6×10 <sup>5</sup>                          | 120  |
|                         | 300   |  | 70   |
| H37R <sub>v</sub> INH-R | 340   | 4×10 <sup>6</sup>                          | 140  |
|                         | 350   |  | 110  |
| H 2                     | 340   | 3×10 <sup>6</sup>                          | 16000  |
|                         | 310   |  | 7200   |
| H 2 R <sub>v</sub>      | 360   | 17×10 <sup>6</sup>                         | 29000  |
|                         | 365   |  | 21600  |
| H 2 R <sub>a</sub>      | 310   | 2×10 <sup>6</sup>                          | 650  |
|                         | 320   |  | 1690   |
| H 2 INH-R               | 375   | 13×10 <sup>6</sup>                         | 70   |
|                         | 340   |  | 60   |
| Ravenel                 | 330   | 22×10 <sup>6</sup>                         | 6864000  |
|                         | 360   |  | 4352000  |
| BCG                     | 330   | 3×10 <sup>6</sup>                          | 280  |
|                         | 330   |  | 2280   |

定量培養法によつて全脾中の生菌単位数算出した。その数の多少より9株間の毒力の程度を比較した。1株につき体重300~400gの雄の正常モルモット2匹を使用した。Table 2に示した成績のごとく、Ravenel株がきわめて強い毒力を示し、H37R<sub>v</sub>、H 2 R<sub>v</sub>、H 2は近似した毒力を維持しており、他のものは弱毒、無毒といわれうるような生残菌数を示した。結核病変のひろがりも、これらの菌数に相当した程度差を表現しており、Ravenel株による感染動物は圧倒的に強い病変をもつていた。次にBCG株をグルコース10%小川培地に10代継代してから、その毒力をBCG原株と比較したが、毒力の上昇を示すような所見は全く得られなかつた。このグルコース継代による毒力変化の検討は、モルモットを用いて2回行なつたが、結果は同じであつた。

### 考 察

以上の実験で得られた所見を要約すれば、過剰のグルコースを含んだ培地環境において、毒力の弱い結核菌は毒力の強い結核菌よりも一そう強い発育阻害を受けるといふことであり、またこの現象の発現にはaerationと接種菌量が大いなる要因となつていふことが分かる。グルコースによる発育阻止という現象については最近Lyonら<sup>7)</sup>の報告があるが、彼らは積極的に培地をaerationし、この場合炭素源をグルコースにした場合のみ発育阻害がみられ、グリセリンの場合には阻害現象のみみられないことを強調した。彼らはこの実験に当たつては主としてH37R<sub>a</sub>を使用しているが、この阻害現象が毒力差と関係ある事実としては検討していない。

グルコースと酸素分圧という問題は、当然のこととして解糖系とWarburg-Dickens系の考慮を要求するが、これまであまりかえりみられなかつた解糖系の存在が、結核菌においてはBastarracheaら<sup>4)</sup>、Ramakrishnanら<sup>5)</sup>によつてその意義が認められ、ことにRamakrishnanら<sup>5)</sup>によつて毒力表現の一要因として取上げられたことは近年きわめて注目に値する報告といえよう。結核菌に関するこのような研究方向は、Guyら<sup>2)</sup>、またSeverとYoumans<sup>8)</sup>の注目しているような結核菌毒力、結核感染における酸素分圧の問題にその端を発しているように思われる。すなわち酸素分圧の低い結核病巣において結核菌が長期生残するためには、解糖系の存在は合目的であり、また、それがH37R<sub>v</sub>株においてはH37R<sub>a</sub>株におけるよりも、一そう機能的で比重が大であるというRamakrishnanら<sup>5)</sup>の報告は、結核菌毒力の問題に示唆するところが少なくない。

ただ、このような報告と著者の得たグルコース阻害現象とがいかなる関係にあるかを知ることは、いまのところ困難のようである。

またここでとくに指摘したいことは、グルコースによる阻害現象と毒力との関係を結核菌株間についてのみ論ずべきであつて抗酸雑菌phlei株等を含めてはその関係の成立しない事実である。すなわちH37R<sub>v</sub>とH37R<sub>a</sub>との毒力差異の問題は、結核菌と他の抗酸雑菌との毒力差異の問題とは全く別個の性質であることを認識すべきであつて、cord-factorによつて代表されうる毒力研究の方向は<sup>9)</sup>むしろ後者に属すべきものと著者は考えている。

### 総 括

固型培地あるいは液体培地に加えられた炭素源としてのグルコースは一定濃度以上になると結核菌の発育を阻止するが、この阻害は有毒株よりも無毒株において顕著にあらわれ、また空気の流通のよい環境において著明である。

室橋部長の御校閲に感謝します。

### 文 献

- 1) Rich, A. R.: The pathogenesis of Tuberculosis, Chales Thomas, Springfield Illinois, 1944.
- 2) Guy, L. R., Raffel, S. & Clifton, C. E.: J. Infect. Diseases, 94: 99, 1954.
- 3) Geronimus, L. H. & Birkeland, J. M.: Am. Rev. Tuberc., 64: 520, 1951.
- 4) Bastarrachea, F., Anderson, D. G. & Goldman, D. S.: J. Bacteriol., 82: 94, 1961.
- 5) Ramakrishnan, T., Indira, M. & Maller, R. K.:

Biochim. Biophys. Acta, 59 : 529, 1962.

- 6) 勝山茂 : 日本細菌学雑誌, 14 : 302, 昭34.  
 7) Lyon, R.H., Lichstein, H.C. & Hall, W.H.: Am. Rev. Resp. Dis., 83 : 255, 1961.  
 8) Sever, J.L. & Youmans, G.P.: J. Infect. Diseases, 101 : 193, 1957.  
 9) 山村雄一 : 結核, 36 : 400, 昭36.

#### Growth-Inhibition Phenomenon by Glucose in Relation to the Virulence of Tubercle Bacilli.

With regard to the virulence of tubercle bacilli, our understanding is that virulent tubercle bacilli can vigorously multiply in sensitive host and persist there in a prolonged period producing tuberculous lesion and sometimes inducing fatal outcome. On the other hand, low- or avirulent strains can be isolated as a stable variant from parent strains of high virulence by various means of colonial dissociation, as represented by BCG or H37R<sub>a</sub>. Research works have been reported by some investigators dealing with the mechanism of virulence, namely unknown factors in tubercle bacilli which govern the capacity of *in vivo* multiplication, as a problem of the pattern of bacterial metabolism. Some of those research works are concerned with the analysis of the relation between oxygen tension and growth, and consequently with the relation between degree of virulence and vigor of oxidative attack to certain substrates. Achievements in this field of research appear to be contributable to the understanding of many problems concerned with the pathogenesis of tuberculosis, such as infection, immunity, and natural resistance. The data as shown in this paper were obtained in the experiments conducted under the idea as described above.

Table 1 shows that avirulent strains receive growth-inhibitory effect more strongly than virulent strains in whole egg medium (Ogawa type) or Kirchner agar medium containing excessive amount of glucose or lactate, but such difference in growth response is not observed in the media containing the standard concentration of glycerol. Serial ten-time dilutions were prepared from the suspension of each strain and inoculated to the media as described above. After 3 or 4 week incubation at 37°C, reading of growth was made. When the minimum size of inoculum from which growth was obtained was 10<sup>-3</sup> mg, 3 was described in Table 1 as a symbol of growth. Therefore, the larger number means more tolerance to glucose and lactate. The differ-

ence in growth response between virulent and avirulent strains was usually observed in the glucose concentration of 7.5 to 10%. While incubation, the tubes of inoculated media must be prevented from drying by replacing cotton plug with gum cap. At the same time, however, air passage should be retained to some extent. For this purpose, a thread was put through the center of the gum cap into the tube.

Fig. 1, 2, 3 demonstrated the similar type of experiment conducted using Tween-albumin medium, where the difference in growth response was examined between H37R<sub>v</sub> and H37R<sub>a</sub> adding glucose or glycerol as carbohydrate source. In this type of medium, growth can be continuously pursued by measuring the increase of turbidity. Unlike the case of solid medium, glucose in 7% inhibited completely the growth of both H37R<sub>v</sub> and H37R<sub>a</sub>. Therefore, the effect of glucose in the concentration below 2% was compared with glycerol in 4%. The medium was dispensed into test tubes of medium size in the amount of 5 cc. After being inoculated, the tubes were placed in a slant position in an incubator at 37°C. This time, cotton plug was not replaced with gum cap and left as it was. Instead, while incubation, distilled water was occasionally added to the medium to make the medium amount constant. In the experiment shown in Fig. 3, however, the inoculated tubes were placed up-right and 1 cc of liquid paraffin was layered upon to prevent from evaporation and to secure an air-tight condition. Summarizing the results shown in Table 1, 2, and 3, it will be concluded again that H37R<sub>a</sub> receives a stronger inhibitory-effect by glucose of 0.25 to 2% than H37R<sub>v</sub>. However, when the medium was placed in the air-tight condition, the growth was rendered poor regardless of the degree of virulence and the growth difference due to the glucose effect can not be manifested. It was an additional finding that the growth of H37R<sub>v</sub> was more abundant in the medium containing glucose in the concentrations of 0.25 to 2% than in that of 4%

glycerol, when size of inoculum was reduced to  $10^{-9}$  mg. Table 2 shows the comparative degree of virulence of test strains by indicating the number of viable units recovered from the spleen of infected guinea pigs, 4 weeks after infection.

The significance of the results as presented above should be considered in reference to the papers as follows. Geronimus et al. reported that the degree of virulence is in a reverse relation to the vigor of the oxidative attack to some substrates. Guy et al. showed that strains of tubercle bacilli of higher

virulence have a stronger capacity to grow in an environment of low oxygen tension than those of lower virulence. More recently, Lyon et al. found that aeration can inhibit the growth of tubercle bacilli when the medium has glucose as carbohydrate source, but this is not true with glycerol medium. Particularly, much attention should be paid to the papers of Bartarrachae et al. and of Ramarkrishnam et al. who reported that glycolytic pathway exists in tubercle bacilli, especially in a more functional condition in H37R<sub>V</sub> than in H37R<sub>A</sub>.