

標準結核菌株 H₃₇Rv の毒力維持に関して

金 井 興 美

国立予防衛生研究所結核部

受付 昭和 41 年 7 月 23 日

STUDIES ON SUBCULTURE MEDIUM TO MAINTAIN THE
VIRULENCE OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
(STRAIN H₃₇Rv)*

Koomi KANAI

(Received for publication July 23, 1966)

During the past 15 years the present author has been making it a routine procedure to maintain laboratory stock strains of tubercle bacilli by subculturing them on glycerol egg medium of Ogawa type with one to two week intervals. This method was satisfactory at least to keep the growth vigorous and the viability at a high level so that they can be ready to use for *in vitro* experiments. However, the trouble was that the virulence of pathogenic strains was easily decreased during subculture in that way. The same thing happened with the standard laboratory strain H₃₇Rv.

On the other hand, Steenken¹⁾, Karlson²⁾, and Youmans and Youmans³⁾ were successful in maintaining the virulence of H₃₇Rv at a constant high level during subculture for many years. They employed Proskauer and Beck synthetic liquid medium for this purpose.

This situation led the author to an attempt to compare Sauton synthetic liquid medium and glycerol egg media (Ogawa type and Oka-Katakura type) regarding their effects on the virulence of H₃₇Rv during subculture on them.

The original H₃₇Rv strain of high virulence was furnished by Dr. Smith⁹⁾ of Department of Medical Microbiology, the University of Wisconsin, U. S. A. This strain was then subcultured for 14 months on three kinds of medium as above, with 10 to 14 day intervals on Sauton medium and with one week intervals on egg media. During the subculture period, virulence test was conducted six times in mice of dd strain and one time in guinea pigs. In mice, each culture was inoculated intravenously in the amount of 1 mg semi-dried weight, and in guinea pigs 0.01 mg was inoculated subcutaneously. The virulence for mice was evaluated by % 30 day survivals and that for guinea pigs was evaluated by macroscopical tuberculous changes in the lungs, liver and spleen, swelling of the lymphnodes, spleen weight, and viable counts in the spleen when sacrificed at 6 weeks of infection. The results are presented in Table 1, Fig. 3, Fig. 4, and Table 2. These tables and figures clearly indicate that the virulence of H₃₇Rv remained high on Sauton medium, but decreased in glycerol egg medium.

In addition to this experimental observations, Fig. 1 and 2 show a chance experience that another H₃₇Rv strain furnished by Dr. Youmans in Chicago lost its high virulence after 5 year subculture on Ogawa medium in this laboratory. Table 3 includes the similar experience concerning H₂ isolated by single cell culture using a micromanipulator⁴⁾⁻⁶⁾. Fig. 5 is an excep-

* From Department of Tuberculosis, National Institute of Health of Japan, Kamiosaki-chojamaru, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan

tional case that *M. bovis* (Ravenel strain) remained high in virulence for mice despite the subculture on Ogawa medium for many years.

As a conclusion, it will be stated that synthetic liquid medium such as Sauton medium or Proskauer & Beck medium can be recommended as subculture medium for maintenance of the virulence of $H_{37}Rv$. Egg medium is not satisfactory for this purpose.

1905年 Baldwin が Trudeau 研究所において、慢性肺結核患者の喀痰より分離した H_{37} 株は、1935年にいたり Steenken によつて集落解離を受け、強毒の $H_{37}Rv$ 、無毒の $H_{37}Ra$ の2系統となつた¹⁾。以来、それらは世界各国の研究室に広く分与されて、継代保存結核菌株として現在まで最もしばしば実験に供せられてきた。かくしてすでに60年の歴史をもつこの菌株が、結核菌、結核症研究のために果たした意義ははかりしれないものがあるし、その点では国際的な標準菌株としての資格を十分に備えているといえよう。

われわれの研究室保存の $H_{37}Rv$ 株のひとつは、1951年に Mayo Clinic の Karlson より分与を受けたものであるが、これは1940年に、かれが Trudeau 研究所より得たものに由来している。過去15年間、われわれはこの株を種々な実験目的に用いてきたし、また国内の多くの研究所に分与されて、それぞれ利用されたはずである。しかしながら培地継代による毒力低下の傾向は $H_{37}Rv$ でも例外でなく、動物実験をなすにあつてつねにわれわれを当惑させた問題であつた。このため1960年に Youmans より新たに $H_{37}Rv$ 株の分与を受けたが、これも現在毒力低下が著しい。培地継代によつて有毒菌株の毒力が低下する傾向は、細菌学教科書の記載する一般的現象であるにしても、一方では Steenken¹⁾、Karlson²⁾、Youmans ら³⁾ が、長年この株の毒力を維持している事実を知るならば、われわれは自己の継代技術に反省を加えるべきである。著者は1965年2月に、Smith (Madison) より新規に $H_{37}Rv$ の分与を受けたのを機会に、この点について検討することを計画した。ただしここで意図するところは、毒力維持に関する技術的な面のみであつて、毒力についての本質的な問題には立入らないつもりである。

1945年 H_{37} 株分離40周年を記念して Steenken と Gardner は、この株の由来と歴史について報告¹⁾した。その内容の大部分は、毒力変遷についての回顧的記述であつたが、結論としては $H_{37}Rv$ 株が当時なお分離当初の毒力を維持しえたのは、1920年来 Proskauer and Beck 合成液体培地での継代系があつたためであると述べ、鶏卵、肉エキス、ペプトン、血清等を主体とする種々な非合成培地での継代系は、すべて弱毒化したことを指摘した。不幸にしてわれわれは、単に経験的事実とし

て述べられたこの記載にあまり注目しなかつた。一方 Karlson は1965年10月世界抗結核連合ミュンヘン会議において、1940年以来 Proskauer and Beck 培地に継代してきた $H_{37}Rv$ が、この間モルモットにおける毒力に変化のなかつたことを報告²⁾し、Steenken, Gardner の経験にさらに25年の月日を加えてそれを再確認した。また同じく Proskauer and Beck 培地で $H_{37}Rv$ を継代している Youmans ら³⁾ は、過去10年以上にわたつて、そのマウスにおける毒力を維持している。以上の事実は少なくとも $H_{37}Rv$ の毒力維持に関するかぎり、合成培地が適当であることを示唆している。これに反しわが国においては、本来分離用培地であるべき小川培地が、その優秀性のため広く普通して菌株継代のためにも習慣的に用いられるようになっていた。したがつて $H_{37}Rv$ 株の毒力低下の要因として、まず継代用培地をその可能性にとりあげた。

実験材料ならびに方法

培地：原液に第1磷酸カリを1%に含む小川鶏卵培地、岡片倉培地、そして Sauton 合成液体培地を使用した。

菌株：1960年3月に Youmans より分与された $H_{37}Rv$ 株、1965年2月に Smith より分与された $H_{37}Rv$ 株、両者を区別するため、ここでは前者を $H_{37}Rv$ (Chicago)、後者を $H_{37}Rv$ (Madison) と記載する。次にわが国の保存結核菌株の代表としての H_2 株と、それより単個菌培養によつて集落解離された H_2Rv 、 H_2Ra 株^{4)~6)}。そしてさらに、以上の株に対する一つの対照として強毒 *M. bovis* (Ravenel) を使用した。動物接種にあつて、これらの菌株は手振法による蒸留水菌液として使用された。

実験動物：マウスは主として市販 dd 系の雄を使用し、一般に18~20g が感染時の体重であつた。10匹ずつをおが屑を入れた金属箱に収容し、固形飼料と水とで飼育した。モルモットは体重400g 前後の雄を使用し、一箱に5匹を収めて、おなじく固形飼料と水とで飼育した。

毒力判定法：マウスにおいては、1mg (半湿重量) を静注してその生存日数、生存率を追求し、主として30日生存率をもつて比較した。モルモットにおいては、皮

Fig. 1. Virulence of $H_{37}Rv$ (Chicago) Subcultured for Many Years on Modified Proscauer and Beck Medium, as Revealed by % Survivals of Intravenously Infected Mice (CF-1 and "Strong A")

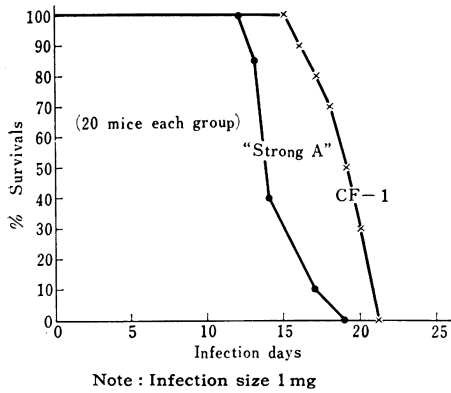
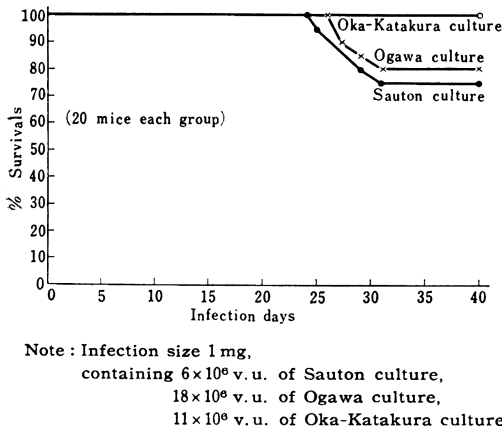


Fig. 2. Virulence of $H_{37}Rv$ (Chicago) on Three Kinds of Media after Serial Transfer on Ogawa Egg Medium for 5 Years, as Revealed by % Survivals of Intravenously Infected Mice (dd strain)

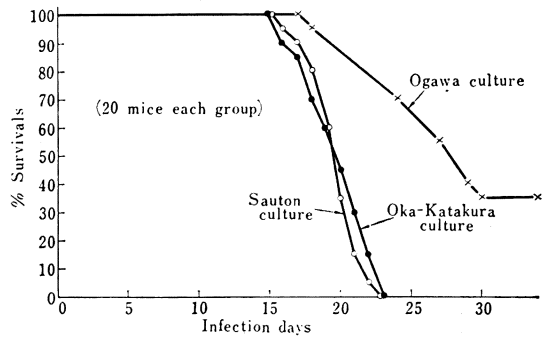


下または静脈内に注射し、体重変化、病巣の拡り、脾組織内感染菌数等を比較した。

実験成績

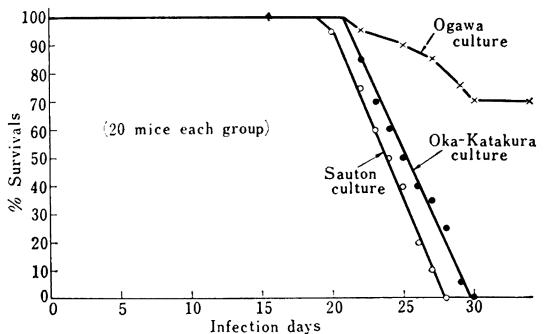
実験 1: $H_{37}Rv$ (Chicago) 株の毒力低下について前述のごとく、この株を 1960 年 3 月に米国において分与されたさいの毒力は、尾静脈にその 1 mg を接種されたマウスの生存曲線に示されている (Fig. 1)。CF-1, Strong A” のいずれの系統のマウスにおいても、3 週以内に全動物 20 匹が死亡している。この $H_{37}Rv$ (Chicago) は、それまでの 10 年以上の間 Proscauer and Beck 変法培地に継代されてきたものであつた。その後著者は 1965 年 5 月までの 5 年間、本研究室において小川培地上に 1

Fig. 3. Virulence of $H_{37}Rv$ (Madison) after Serial Transfer on Subculture Media (Sauton, Ogawa, and Oka-Katakura), as Revealed by % Survivals of Intravenously Infected Mice (dd)



Note: Subculture generations;
11 in Sauton culture
15 in Ogawa culture
15 in Oka-Katakura culture
Infection size;
 6×10^6 v. u. in Sauton culture
 16×10^6 v. u. in Ogawa culture
 6×10^6 v. u. in Oka-Katakura culture

Fig. 4. Virulence of $H_{37}Rv$ (Madison) after Serial Transfer on Subculture Media (Sauton, Ogawa, and Oka-Katakura), as Revealed by % Survivals of Intravenously Infected Mice (dd)



Note: Subculture generations;
18 in Sauton culture
28 in Ogawa culture
28 in Oka-Katakura culture
Infection size;
 6×10^6 v. u. in Sauton culture
 7×10^6 v. u. in Ogawa culture
 7×10^6 v. u. in Oka-Katakura culture

~2 週間隔でこの株を継代保存したが、ここにおいて Sauton 培地、岡片倉培地、小川培地の 3 種類の培地環境に一世代移植し、それぞれの発育について dd 系マウスを用いて毒力テストを行なつた。すなわち各培養より蒸留水菌液を調製し、それぞれ 20 匹の動物に 1 mg を静注して生存日数を追求した。Fig. 2 にその成績を図示したが、いずれの培養菌によつて感染を受けても、70%

以上の動物が生残し、これを Fig. 1 と比較するならば、マウスの系統が同じでないにしても、5年間における毒力低下の事実には疑問はないであろう。

実験 2: $H_{37}Rv$ (Madison) 株の毒力低下、ならびに毒力保持について。1965年2月、Smith (Madison) より新規に $H_{37}Rv$ 株の分与を受けた。この株は同年4月より1週ごとに岡片倉培地、および小川培地で継代培養され、また10~14日間隔で Sauton 合成液体培地上で14ヵ月継代された。この間6回にわたりこれら3種の継代系についてマウスにおける毒力を検討し、第5回目はモルモットにおける毒力をも比較した。成績は Table 1, Fig. 3, Fig. 4, Table 2 に示した。Table 1 はマウスにおける6回のテストについて、各培養の継代数、接種生菌数、ならびにそれによる感染マウスの30日生存率を示した。ここで明瞭なことは、Sauton 培地継代系が常に全動物を確実に感染死せしめたに反し、鶏卵培地による継代系は、その継代数とともに弱毒化し、岡片倉培養では41代において85%が生残し、50代においては90%が生残した。この弱毒化の傾向は小川培地継代によつてはいつそう急速で、15代において早くも35%のマウスが生残し、28代においては70%、それ以後では95%の生残率となつている。Fig. 3, 4 はそれぞれ第3回、第4回の毒力テストにおけるマウス死亡曲線を示したものである。第5回のテストでは、このさいとくに3種の培地における継代系はそれぞれまた3種の培地に1世代継代し、計9種の培養を用意し、その0.01mgを5匹のモルモットの皮下に接種し、また同じ1mgを20匹のマウスに静注接種した。モルモットについては6週後に剖検して、肉眼的病変度、脾重量、そして脾中感染菌数を定量培養によつて測定し、マウスに関しては30日生存率を観察した。したがつてこのマウスでの成

Table 1. Loss and Maintenance in Virulence of $H_{37}Rv$ (Madison) Tubercle Bacilli during Subculture on Three Kinds of Media, as Revealed by % 30 Days Survivals of Intravenously Infected Mice (dd)

Exp. No.	Sub-culture generation	Size of infection (v. u.)	Virulence (% 30 day survivals of mice)		
			Synthetic liquid		Glycerol egg
			Sauton	Oka-Katakura	Ogawa
1	1	6.3×10^6	0		
2	3	16×10^6	0		
3	11	6×10^6	0		
	15	6×10^6		0	
	15	16×10^6			35
4	18	6×10^6	0		
	28	7×10^6		0	
	28	7×10^6			70
5	27	24×10^6	0		
	41	24×10^6		85	
	41	26×10^6			95
6	35	9.5×10^6	0		
	50	13×10^6		90	
	50	13×10^6			95

Each mouse group was provided with 20 animals.

績の一部は Table 1 にも含まれたわけである。表 (Table 2) でみるごとく Sauton 培地上で26代継代された株は、感染直前の一代限り岡片倉培地、小川培地に移植されても、その毒力はきわめて強く、1mgの静注感染によつてマウスを例外なく30日以内に倒した。また0.01mgをモルモットの皮下に接種した場合も、6週後、肺、肝、脾に進展した結核結節がみられ、脾における総感染

Table 2. Virulence for Guinea Pigs and Mice of Different Subculture Strains of $H_{37}Rv$ (Madison)

Subculture		Medium for one generation subculture before infection	Virulence for guinea pigs (Autopsy at 6 week infection)				Virulence for mice		
Medium	Gener-ation		Size of subcutaneous infection (v. u.)	Gross lesions		Average spleen weight (g)	Average total viable counts of spleen (logarithms)	Size of intravenous infection (v. u.)	% 30 day survivals
				Lymph-nodes	Organs				
Sauton	26	Sauton	24×10^4	###	###	3.9	4.99	24×10^6	0
		Ogawa	10×10^4	##	##	1.4	4.32	10×10^6	0
		Oka-Katakura	11×10^4	+	##	1.2	4.83	11×10^6	0
Oka-Katakura	40	Sauton	23×10^4	-	##	0.9	3.12	23×10^6	100
		Ogawa	12×10^4	-	-	0.8	1.78	12×10^6	100
		Oka-Katakura	24×10^4	-	-	1.1	2.46	24×10^5	85
Ogawa	40	Sauton	42×10^4	-	-	0.9	1.36	42×10^6	75
		Ogawa	26×10^4	-	-	1.1	2.82	26×10^6	95
		Oka-Katakura	20×10^4	-	-	1.3	2.86	20×10^6	90

Each guinea pig group was provided with 5 animals, and each mouse group with 20.

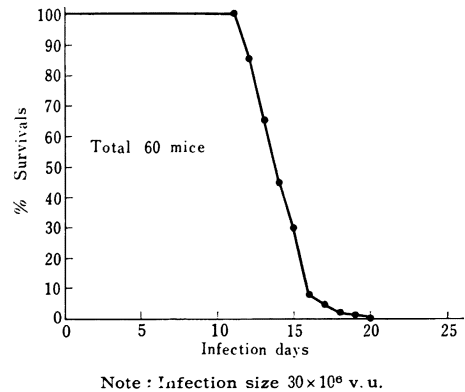
* Lungs, liver and spleen

The gross lesions are expressed in an arbitrary scale ranging from - to ##.

菌数は10万に近い。さらしつへき、そけい、えきか、後腹、門脈、気管、後胸骨におけるリンパ腺の腫脹も著しかった。脾の腫脹のみは、Sauton 継代で終止した場合が著しかった。他方岡片倉培地で40代継代した株は、感染直前に Sauton 培地に移しても、その1mgをもつてマウスを倒すことはできなかつた。しかしモルモットにおいては、内部器官に多少結節を生ぜしめ、脾における感染菌数は1,000を少し上まわつていた。岡片倉培地でのみ継代された株、また、感染直前にそれより小川培地に継代された株は、マウスにおいてそれぞれ85%、100%の30日生存率を許すほどに弱毒化し、モルモットにおいては、肉眼的病変を現出せしめず、脾における感染菌数も100を前後するほどであつた。小川培地での40代継代株も、感染直前の培地環境の種類にかかわらず、その毒力はマウス、モルモットのいずれにおいても岡片倉継代株と同じ程度に弱く、結核感染実験のためには、使用にたえないものであることが示された。

実験3：H₂株の継代保存と毒力低下。上述のH₃₇Rv株での経験にかんがみて、わが国の代表的保存結核菌株であるH₂についても検討を行なつた。幸いにして1954年5月に凍結乾燥されて氷室保存されたH₂原株があり、また、この株よりマイクロマンプレーターを用いた単菌培養によつて分離されたH₂Rv、H₂Ra (Katsuyama & Kanai, 1958)^{4)~6)}のうち、前者は1962年4月に一部凍結乾燥されて氷室保存され、一部は1966年3月まで小川培地で継代保存された。またH₂Ra株は分離以来小川培地で継代されてきた。そこで以上4系統の株の毒力をモルモット、マウスで比較検討した。これら4株は感染前に2代 Sauton 培地上に発育し、それより菌液を調製して実験に供した。各株ともその1mgを20匹のマ

Fig. 5. Virulence of Ravenel Strain (*M. bovis*) Obtained from Trudeau Laboratory and Subcultured Eversince on Ogawa Media for More than 10 Years, as Revealed by % Survivals of Intravenously Infected Mice (dd)



Note: Infection size 30×10⁶ v. u.

ウスの尾静脈中に、また5匹のモルモットの皮下に接種し、さらに0.1mgを5匹のモルモットの後肢の静脈中に接種した。かくしてマウスについてはその30日生存率を、モルモットについては7週後のリンパ腺腫脹、肺、肝、脾における結節性病変、脾重量、脾における総感染菌数を比較観察した。Table 3にまとめた成績の示すごとく、これら4株はマウスにおける毒力が弱く、1954年のH₂株、1962年のH₂Rv株によつては90%の生存率、他の2株においては100%が生残した。しかしモルモットにおいては、前2株と後2株との毒力差は、上述の各観察点ならびに体重上昇度においてきわめて顕著に表現された。H₂原株とH₂Rv株との間には、毒力に関する本質的な差異はないように思われるが、

Table 3. Virulence for Guinea Pigs and Mice of the Original H₂ Strain of Tubercle Bacilli and its Substrains (H₂Rv, H₂Ra) Maintained by Lyophilization or by Subculture on Ogawa Medium

Strain	Virulence for guinea pigs (Autopsy at 7 week infection)						Virulence for mice			
	Size of infection (v. u.)	Infection route	Average body weight increase (g)	Gross lesions		Average spleen weight (g)	Average total viable counts of spleen (logarithms)	Size of intravenous infection (v. u.)	Infection route	% 30 days survivals
				Lymph-nodes	Organs					
Original H ₂ lyophilized in May 1954	5×10 ⁶	sc	225	+++	+++	2.8	4.88	5×10 ⁶	iv	90
	5×10 ⁵	iv	50	+++	+++	7.6	5.67			
H ₂ Rv lyophilized in April 1962	15×10 ⁶	sc	220	+++	+++	3.9	5.36	15×10 ⁶	iv	90
	15×10 ⁵	iv	10	+	+++	4.9	5.10			
H ₂ Rv subcultured upto March 1966	60×10 ⁶	sc	260	—	—	1.0	1.69	60×10 ⁶	iv	100
	60×10 ⁵	iv	130	—	+	1.9	3.31			
H ₂ Ra subcultured upto March 1966	43×10 ⁶	sc	270	—	—	1.0	Undetectable	43×10 ⁶	iv	100
	43×10 ⁵	iv	225	—	—	1.0	Undetectable			

Note: Each experimental group was provided with 5 guinea pigs and 20 mice.

sc.....subcutaneously iv.....intravenously Organs.....Lungs, liver and spleen

The gross lesions are expressed in an arbitrary scale ranging from - to +++.

1958 年以来 8 年間小川培地で継代された $H_{27}Rv$ 株は、皮下接種によつてほとんど病変を作らないまでに弱毒化し、その脾感染菌数も、1962 年当時の同株による場合の 1/1,000 以下に止まつていた。また $H_{27}Ra$ 株は静脈に 0.1 mg を接種してすら、モルモットにおいて全く病変を作らず、7 週後には脾より感染菌を検出できなかつた。

実験 4: *M. bovis* (Ravenel) 株について。以上はすべて鶏卵培地継代による毒力低下の実例であつたが、他方、われわれは全く同一継代法によつても毒力の低下しなかつた株を知つている。それは *M. bovis* の Ravenel 株であるが、そのゆゑにこの株はマウス生存日数を指標とする感染実験にもつともしばしば用いられた。Fig. 5 はその一例であつて、本研究室で Trudeau 研究所より分与されて以来 10 年以上小川培地で継代されたにもかかわらず、その 1 mg の静注によつて、3 週以内に 60 匹の全マウスが死亡している。

考 察

微生物研究室においては、保存菌株の継代を絶やさなことが、研究者として一つの資格とすらみなされるが、動物実験を自己の研究手段とするかぎり、そのみでは不十分であつて、継代菌株の毒力を一定に保つことも要求される。培地継代による毒力低下、動物通過による毒力上昇、これらは毒力を異にする細菌細胞の混合集団が、環境条件による選択作用を受けて、その混合比率をかえるということと説明される。このことは古くから細菌学教科書に記載され⁷⁾、確立された事実として認められているが、その内容はごく大まかな原則論の域を出ないようである。 $H_{37}Rv$ についても、蛋白質を含まぬ合成培地での継代系がよくその毒力を維持し、鶏卵、血清等を含む培地での継代系において、むしろその毒力の低下する傾向は、われわれの常識的な印象とは逆である。またわれわれの経験⁸⁾によれば、一度弱毒化した有毒結核菌株は、動物通過によつても容易に弱力を回復しない。

岡片倉培地と小川培地とを比べると、後者のほうで毒力がより急速であつたが、この両培地の違いの一つは pH である。小川培地は苛性ソーダ処置を受けた病的材料の接種を前提として酸性であり、その凝固水ではかると pH 6.2 ほどである。この pH は Steenken¹⁾ が $H_{37}Ra$ を “aging” で分離したさいの鶏卵培地の pH と同一である。また Karlson²⁾ によれば Dubos 培地による継代 $H_{37}Rv$ も毒力の低下したことを述べている。

したがつて $H_{37}Rv$ 株の毒力維持のためには、合成培

地での継代が望ましい。ただ経験的事実を述べれば、この種の液体培地上の菌膜の継代には多少の注意が必要であり、雑菌混入を最大限に予防するのは当然として、菌膜の状態を常に薄く、平滑に、そして均一平等に保つことが大切である。しからざる場合には、菌膜は厚く不平等になる傾向を継代とともに強め、ついには発育のきわめて悪い状態となつて継代不能になりかねない。したがつて移植のためには、常に薄い平滑な部分を選んで、これを少量移すことが必要である。最近 Smith⁹⁾ はこの方法によつて $H_{37}Rv$ 株を Sauton 培地に継代保存し、これをモルモットの気道感染に使用して、進展結核症を発生せしめるのに成功している。

しかし上述の合成培地での継代とは別に、原株を凍結乾燥して氷室保存するか、あるいは岡片倉培地に発育せしめてこれを $-20^{\circ}C$ に保存し、実験にのぞんでこれを合成培地に移せる可能性を用意するのの一方法である。いずれにせよ鶏卵培地での習慣的な頻回継代は極力避けるべきである。

結 論

標準結核菌株 $H_{37}Rv$ の毒力維持のためには、継代用培地として合成液体培地が適当であり、鶏卵培地での頻回継代培養はさけるべきであることを、文献的に、経験的に、そして実験的に示した。実際には Sauton 合成培地で継代するか、あるいは岡片倉培地で発育せしめ、継代を極力さけて $-20^{\circ}C$ に保存し、用にのぞんで Sauton 培地に移して動物実験に使用すべきである。それと同時に原株の凍結乾燥保存が望ましい。

文 献

- 1) Steenken, W.: Amer. Rev. Tuberc., 54: 62, 1946.
- 2) Karlson, A. G.: The Report in the 18th International Tuberculosis Conference, Munich, Session IV, October 7, 1965.
- 3) Youmans, G. P. & Youmans, A. S.: J. Immunol., 78: 318, 1957.
- 4) Katsuyama, S. & Kanai, K.: Japan. J. Med. Sci. & Biol., 11: 109, 1958.
- 5) Katsuyama, S. & Kanai, K.: Japan. J. Med. Sci. & Biol., 11: 117, 1958.
- 6) Katsuyama, S. & Kanai, K.: Japan. J. Med. Sci. & Biol., 11: 307, 1958.
- 7) Dubos, R. J.: The bacterial cell, Harvard University Press, 1945.
- 8) Kanai, K.: Unpublished data.
- 9) Smith, D. W. et al.: J. Bacteriol., 91: 718, 1966.