

# 洗滌結核菌のクエン酸溶液中 Tuberculin 産生現象に関する研究

## 第 10 報

### 洗滌結核菌の Citrate-Tuberculin 産生能に及ぼす 培養 Medium の影響に就ての検索

金沢大学結核研究所薬理製剤部（主任：伊藤 亮教授）

清 水 嗣 郎  
石 田 昭 二  
浦 上 則 一  
向 坂 憲 一 郎

（受付：昭和32年2月6日）

## 緒 言

人体並びに動物の結核症では、病症の進展・退行が、個体の Tuberculin (「T」)—アレルギーと極めて密接な関係にあることは周知の事からであり、而も多数の学者がこの方面の研究に従事して来ているにも拘らず、in vitro 及び in vivo での結核菌の「T」産生機序や産生条件等に関する知見は甚だ僅少である。これは、主として従来「T」研究が専ら結核菌の長期培養液を対象として行われてきたことに因るものである。しかるに、洗滌結核菌をクエン酸溶液中に浸漬して得られる所謂「Citrate-Tuberculin

(CIT)」研究<sup>1)</sup>では、直接結核菌体を以つて種々の条件下で「T」産生を行うことが出来るのであつて、既にこの事実にもつづいて考査が進められた結果、結核菌の「T」産生が種々の内・外因子によつて影響されることが確められたのである<sup>1,2,3,4,5)</sup>。

私らは更に、結核菌の培養に使用した培地の性状が、結核菌の CIT 産生能にどのような影響を与えるかについて精査し、興味ある所見を得た。ここにその成果について報告する。

## 実 験 方 法

### 1 菌 株

教室保存の人型結核菌青山B株 (Sauton 培養) を使用した。菌を他の培地に培養実験するに際しては、先ず Sauton 培養より被検培地に移植した青山B菌を更に2～3代同一培地で継代培養を行つた後、実験に供用した。

### 2 培 地

本研究で使用した培地は次の4種の液体培地である。

#### 1) 合成培地 (組成は第1表参照)

- (a) Long 培地
- (b) Sauton 培地
- (c) Dorset 培地

#### 2) 4% Glycerin 加ブイオン培地 (pH 6.8)

内容約 100ml のコルベンに上記各培地 50ml 宛を分注滅菌し、之に菌を移植し、37°C の孵卵器中に納めて培養を行つた。

### 3 CIT 産生実験

洗滌結核菌を以つての CIT 産生は前回報告<sup>2)</sup>の方法に準じて行つた。

即ち、上記 Glycerin—ブイオン培地、Long—, Sauton—, 及び Dorset—培地を容れた多数のコルベンに一齊に青山B菌を移植し 37°C で培養を行う。一定日時後、夫々の培地列から2ヶ宛コルベンを取り出して、型の如く、菌体の分別、洗滌を行つた後、0.1M クエン酸液(中性) 20ml を注加して菌体を洗滌せしめ、コルベンを 37°C に 24 時間静置する。次でクエン酸液を菌体と分ち Seitz 無菌濾過板を通過せしめれば Citrate—Tuberculin が得られる。

一方菌体を分離した培養液自体も夫々 Seitz 濾過板を通過せしめた後、皮膚反応試験に供用した。

## 実験成績

第2表は人型結核菌青山B株を4種の液体培地、即ち Glycerin—ブイオン—, Long—, Sauton—並びに Dorset—培地に培養し、一定日時後(36, 47, 55及び70日)に各々の培養から分離した菌体を以つて行つた CIT 産生に就ての比較実験の成績を一括表示したものである。

今ここで CIT 標品を以つての「T」皮膚反応比較試験成績について見るに、Sauton—並びに Dorset—培地培養の菌体から得られた CIT (CIT-S 並びに CIT-D) では、培養の新旧の如何に関せず、いつれの実験例でも略々両者相匹敵して而も強力な「T」皮膚反応力を示しているのに対し、Glycerin—ブイオン—及び Long—培地に培養した菌体から得られた CIT (CIT-Gb 及び CIT-L) ではすべて甚だ微弱な「T」皮膚反応を呈しているのであつて、是等4種の CIT 標品の間には、その「T」活性力に於て顕著な差異のあることが明瞭である。

第3表は、第2表に於ける第2及び第3実験例の各 CIT 標品についてその「T」皮膚反応力を更に仔細に比較検討した成績を示したものである。

## 考 按

結核菌の長期培養濾液を「T」原料としている従来の「T」研究では、培地の性状が結核菌

実験使用済みの菌体は加熱殺菌後、濾紙間に圧して水分を可及的除去したものに就て秤量を行つた。

### 4 「T」皮膚反応検査

青山B菌を上記の様に4種の培地上に培養して夫々の青山B菌体から得られた CIT の4標品に就て、結核モルモット(人型結核菌 H<sub>2</sub> 0.1mg接種)に対する「T」皮膚反応試験を行つて各 CIT 標品の「T」活性を精細に比較検討した。而して比較試験を行うに当つては毎常、これら被検 CIT 標品の一定稀釈液(生理的食塩水で稀釈したもの)の 0.1ml 宛を同一モルモットの側腹部に皮内注射を行つた。成績判定は注射後24及び48時間目に行い、注射部位に於ける発赤・浸潤の大きさを測定した。

であるが、ここでは、CIT-Gb 並びに CIT-L にあつては、その 1:5 稀釈液は強い皮膚反応を示したが、1:20 稀釈液では反応極めて微弱であつて、他方、CIT-S 並びに CIT-D では、その 1:20~50 稀釈液は何れも強い反応を呈し、1:100~200 稀釈液に於ても尙「T」活性が認められる。即ち、この成績から CIT-Gb と CIT-L の「T」皮膚反応力が CIT-S 並びに CIT-D の「T」活力の 1/10~1/20 程度に相当するものであることが分る。

一方、菌体を分離した培養液では第4表に示した様に、培養日数の若いものでは、Long—培養濾液(CF-L)及び Glycerin—ブイオン培養濾液(CF-Gb)が Sauton—並びに Dorset—培養濾液(CF-S 及び CF-D)に比し「T」皮膚反応力に於て幾分劣る処があつたが、培養日数の旧くなるにつれて、これら4種の培養濾液は何れも強い「T」活性を示すに至つた。即ち、培養濾液に就ては上記 CIT 実験に於て実証された様な培地による「T」活性の顕著な差異関係は認められないという結果が得られたのである。

の「T」産生にどの様な影響を示すかの問題については殆んど考査が行はれていない。Seibert

等が長年に亘る「T」活性因子の研究に於て、頭初 Long 培地を使用し<sup>6)</sup>、中頃 Dorset 培地にきり換へ<sup>7)</sup>、更にその後に至つて再び Long 培地を起用<sup>8)</sup>するに至つたのも、主として菌発育の良否、或は精製「T」標品の着色の有無等の理由に由るものであつた。しかるに最近、宮城<sup>9)</sup>が結核菌の培養濾液からの *o*-Aminophenol Azo-Tuberculin (OA-Azo-T) の分離実験で、Sauton—、Dorset—、Long—の3合成培地についてしらべた結果、Dorset—培養濾液からは Sauton—培養濾液に於けると同じ強力「T」活性の OA-Azo-T が分離されたが、Long 培養濾液から分離された OA-Azo-T は前2者の1/5程度の微弱な「T」活性のものであつたと報告している。

しかし、これらの研究では何分にも結核菌の長期培養濾液を「T」原料としているので、〔培地の性状〕—〔菌の生物学的性状〕—〔「T」産生能〕の相関性について明細な考查研究を行うことは到底至難と言はねばならない。

しかるに洗滌結核菌体をクエン酸溶液で処理して得られる所謂 Citrate-Tuberculin では、この点甚だ有利であつて、これら3者の相関関係についての精細な検索も可能である。本研究はこの見地から4種の液体培地について、培地の性状が菌の「T」産生能に如何なる影響を及ぼすかについて検索して、Sauton—、Dorset—培地培養の結核菌が Glycerin—ブイオン—、Long—培地培養の菌体に比し、「T」産生能が強大であることを実証したものである。尙合成培地では Long 培地が Sauton—、Dorset—培地

より「T」産生現象に関しては劣るという事実は前記宮城の OA-Azo-T での研究成績とよく符合して興味ある結果である。

さて、培地の種類によつて、結核菌の「T」産生能に於けるこの様な顕著な差異が、どうしてもたらされたかについては現在尙不明という外ないのであるが、培地の影響が単に菌発育の良否によるものでないことは第1表の菌量の比較から明かな処である。しかし、近年細菌学の生化学的研究領域に於ける進歩によつて、培地の性状が菌の生物学的諸機能、殊に酵素機能に大きく影響することは細菌の適応酵素の例に見る様に、多数の研究で実証されている処であつて、私らの結核菌の CIT 産生実験でも、既に薬剤耐性菌についての研究で確められているのであつて、本研究の場合も恐らく培地組成の差異によつてもたらされた菌の生化学組成や代謝機能の相違が CIT 産生能に大きな影響を与へたものであらうと推断される。

尙最近、清水<sup>10)</sup>はペーパークロマトグラフ法によつて、青山B株の Streptomycin (SM)—耐性変異株—耐性獲得によつて CIT 産生能が著明に低下したもの—から得られた CIT が只に「T」活力が微弱であるのみならず、SM—感性母菌株から得られた CIT 中に検出されるグルタミン酸、アスパラギン酸の様な遊離アミノ酸を欠如しているという注目すべき実証を行つたのであるが、本研究では「T」活性の微弱な CIT-Gb や CIT-L が「T」活性の強力な CIT-S や CIT-D と同じく、これら遊離アミノ酸を多量に含んでいることが確められた。

## 結 論

1. 人型結核菌“青山B”を4種の液体培地—Glycerin—ブイオン—、Long—、Sauton—、Dorset—培地—に培養して、各々の培養から分離した洗滌菌体を以つて Citrate-Tuberculin 産生実験を行つた。

2. 結核モルモットに対して Sauton—並び

に Dorset—培養菌体から得られた Citrate-Tuberculin は、何れも等しく強力な「T」皮膚反応力を示したが、Glycerin—ブイオン並びに Long 培養菌体から得られた Citrate-Tuberculin の「T」活性は微弱であつた。

## 文 献

1) Ito, R. : Am. Rev. Tuberc., **67**, 526, 1953. 2) Imaki, A. : Japan. J. Tuberc., **3**, 1, 1955. 3) 今城昭雄, 他 : 金大結研年報, **13** (中), 79, 1956. 4) Imaki, A., et al. : Japan. J. Tuberc., **3**, 80, 1955. 5) 清水嗣郎, 他 : 金大結研年報, **13** (下), 53, 1956. 6) Seibert, F. B., and

Munday, B. : Am. Rev. Tuberc., **25**, 724, 1932. 7) Seibert, F. B. : Ibid., **30**, 713, 1934. 8) Seibert, F. B., and Glenn, J. T. : Ibid., **44**, 9, 1941. 9) Miyagi, T. : Ann. Rep. Tbc., Kanazawa, **11** (1), 83, 1953. 10) Shimizu, S. : (in press).

Table 1  
Formulae of Long's, Sauton's, and  
Dorset's synthetic medium

Constituents	Medium		
	Long	Sauton	Dorset
Asparagine	5.0 gm	4.0 gm	14.0 gm
Citric acid	.	2.0 gm	.
Sodium citrate	.	.	0.9 gm
Ammonium citrate	5.0 gm	.	.
Potassium monohydrogen phosphate	.	0.5 gm	1.8 gm
Potassium acid phosphate	3.0 gm	.	.
Magnesium sulfate	1.0 gm	0.5 gm	1.5 gm
Ferric ammonium citrate	0.05 gm	0.05 gm	.
Ferric citrate	.	.	0.3 gm
Dextrose	.	.	10.0 gm
Glycerol	50 gm	60 gm	100 gm
Sodium chloride	2.0 gm	.	.
Sodium carbonate (anhydrous)	3.0 gm	.	.
Water to make	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
pH	7.0	adjusted to 7.2 with ammonia	7.0

Table 2

Showing the data of the comparative experiments on the production of citrate-tuberculin with tubercle bacilli grown on glycerol-broth, Long's, Sauton's, and Dorset's medium

Exp. no.	Age of culture (days)	Wet weight of bacilli (gm)				Tuberculin skin tests with CIT				
		Medium				Dilution of CIT	Skin reaction (mm)			
		Glycerol-broth	Long	Sauton	Dorset		CIT-Gb	CIT-L	CIT-S	CIT-D
1	36	1.1	2.2	1.1	.	1:20	$\frac{6 \times 6}{3 \times 4}$	$\frac{3 \times 4}{0}$	$\frac{14 \times 14}{10 \times 11}$	.
						1:50	$\frac{5 \times 5}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{12 \times 13}{7 \times 8}$	.
2	47	1.2	1.8	1.2	1.2	1: 5	$\frac{14 \times 14}{10 \times 11}$	$\frac{14 \times 15}{12 \times 13}$	$\frac{17 \times 17}{15 \times 16}$	$\frac{17 \times 18}{14 \times 14}$
						1:20	$\frac{7 \times 8}{3 \times 4}$	$\frac{10 \times 10}{6 \times 7}$	$\frac{15 \times 15}{12 \times 12}$	$\frac{15 \times 16}{12 \times 13}$
						1:50	$\frac{4 \times 4}{0}$	$\frac{4 \times 5}{2 \times 3}$	$\frac{13 \times 14}{10 \times 11}$	$\frac{14 \times 14}{10 \times 11}$
3	55	1.1	1.9	1.2	1.0	1:20	$\frac{5 \times 7}{2 \times 2}$	$\frac{11 \times 11}{3 \times 3}$	$\frac{15 \times 16}{12 \times 12}$	$\frac{17 \times 17}{12 \times 13}$
						1:50	$\frac{5 \times 5}{0}$	$\frac{7 \times 8}{0}$	$\frac{13 \times 13}{10 \times 10}$	$\frac{15 \times 15}{10 \times 11}$
4	70	1.2	1.8	1.3	1.1	1: 5	$\frac{14 \times 15}{10 \times 10}$	$\frac{15 \times 15}{12 \times 13}$	$\frac{17 \times 19}{14 \times 14}$	$\frac{16 \times 17}{13 \times 13}$
						1:20	$\frac{5 \times 5}{0}$	$\frac{5 \times 7}{2 \times 3}$	$\frac{13 \times 14}{10 \times 11}$	$\frac{12 \times 13}{10 \times 11}$
						1:50	$\frac{3 \times 3}{0}$	$\frac{5 \times 5}{0}$	$\frac{7 \times 8}{6 \times 6}$	$\frac{9 \times 10}{5 \times 5}$

The figures in the top lines in the skin reaction column indicate 24-hour readings, and the figures in the lower lines indicate 48-hour readings.

CIT-Gb, etc. indicate CIT obtained from tubercle bacillus grown on glycerol-broth, etc.

Table 3

Comparison of tuberculin potencies of CIT samples  
obtained from tubercle bacilli grown on  
glycerol-broth, Long's, Sauton's,  
and Dorset's medium

Exp. no.	Tuberculin skin tests with CIT				
	Dilution of CIT	Skin reaction (mm)			
		CIT-Gb	CIT-L	CIT-S	CIT-D
2	1: 5	$\frac{15 \times 16}{13 \times 13}$	$\frac{13 \times 14}{12 \times 13}$	.	.
	1: 10	$\frac{12 \times 12}{9 \times 9}$	$\frac{10 \times 11}{7 \times 8}$	.	.
	1: 20	$\frac{9 \times 10}{5 \times 5}$	$\frac{8 \times 9}{4 \times 5}$	$\frac{15 \times 16}{12 \times 13}$	$\frac{16 \times 16}{12 \times 13}$
	1: 50	.	.	.	$\frac{14 \times 14}{10 \times 11}$
	1:100	.	.	.	$\frac{10 \times 12}{7 \times 8}$
	1:200	.	.	.	$\frac{9 \times 9}{5 \times 6}$
3	1: 5	$\frac{16 \times 17}{12 \times 13}$	$\frac{14 \times 14}{12 \times 13}$	.	.
	1: 10	$\frac{14 \times 15}{5 \times 6}$	$\frac{12 \times 12}{5 \times 5}$	.	.
	1: 20	$\frac{10 \times 10}{3 \times 4}$	$\frac{7 \times 8}{2 \times 3}$	$\frac{16 \times 17}{13 \times 15}$	$\frac{16 \times 16}{11 \times 11}$
	1: 50	.	.	.	$\frac{14 \times 14}{8 \times 9}$
	1:100	.	.	.	$\frac{12 \times 12}{6 \times 7}$
	1:200	.	.	.	$\frac{9 \times 10}{3 \times 4}$

Table 4

Comparative skin tests with culture-filtrates of  
tubercle bacilli grown on glycerol-broth,  
Long's, Sauton's, and Dorset's medium

Exp. no.	Tuberculin skin tests with culture-filtrate (CF)				
	Dilution of CF	Skin reaction (mm)			
		CF-Gb	CF-L	CF-S	CF-D
1	1: 50	$\frac{14 \times 14}{9 \times 10}$	$\frac{12 \times 13}{3 \times 4}$	$\frac{18 \times 19}{12 \times 12}$	.
2	1: 50	$\frac{16 \times 17}{12 \times 13}$	$\frac{15 \times 16}{13 \times 14}$	$\frac{17 \times 19}{13 \times 14}$	$\frac{18 \times 20}{14 \times 15}$
3	1: 50	$\frac{18 \times 18}{14 \times 15}$	$\frac{18 \times 18}{13 \times 14}$	$\frac{18 \times 19}{14 \times 14}$	$\frac{18 \times 19}{15 \times 15}$
	1:200	$\frac{14 \times 15}{12 \times 12}$	$\frac{14 \times 14}{8 \times 10}$	$\frac{17 \times 17}{13 \times 14}$	$\frac{15 \times 15}{12 \times 12}$
4	1: 50	$\frac{17 \times 18}{14 \times 15}$	$\frac{17 \times 18}{11 \times 13}$	$\frac{20 \times 20}{14 \times 15}$	$\frac{19 \times 20}{14 \times 14}$

CF-Gb, etc. indicate culture-filtrate of tubercle bacilli grown on glycerol-broth, etc.