

# 結核菌培養に関する研究

## 第 2 報

各種物質の結核菌の発育に及ぼす影響に関する研究

第2篇 ツベルクリン及び結核菌菌体成分に就いて

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

女 川 徹

(受付：昭和28年1月15日)

### 緒 言

先に私は<sup>25)</sup>は諸種物質の結核菌発育に及ぼす影響の中で他の如何なる物質よりもツベルクリン原液の添加により結核菌の発育が著明に促進

された極めて興味ある成績を得たので更にツベルクリンの結核菌発育促進因子が、その如何なる成分中に存するかについて研究を進めた。

### 第 I 実 驗

先づ私はツベルクリン中に存する結核菌発育促進物質の產生する状態を知らんとして、グ

リセリンブイヨン並にソートン培地を用いて次の如き実験を行つた。

### 実 驗 方 法

グリセリンブイヨン並にソートン培地を型の如く作製し（細菌学実習提要に依る）500ml 宛分注し滅菌した後、人型結核菌 H<sub>2</sub> 株を移植し、培養コルベンの綿栓を中心小穴を持つたゴム栓と取り換えその小孔より滅菌塩化ビニール管を挿入して管底に達せしめ毎週50ml 宛注射器を用い、ビニール管を通じて培養液を吸引取り殺菌後その濾液を 1/10 量に濃縮し（之をⅡ液とする）発育促進物質の產生と所謂ツベルクリン活性因子產生の関係を検索した。尙他方対照として50ml 宛両培地を分注したコルベンを7本準備し同様に人型結核

菌 H<sub>2</sub> 株を移植し、毎週その1個宛取り出し大量培養のものと比較した。（之をⅠ液とする）

発育状態の観察は増田培地を使用し、ツベルクリンの添加量は10～5%の濃度とし、成績の判定は第1篇に準じた。

尙ツベルクリン反応の術式は教室の由利<sup>1)</sup>の報告に準じて行つた。而して皮膚反応惹起力の比較には教室の粉末 o-Aminophenol Azo-Tuberculin (OA-Azo-T) 0.025γ/0.1ml をその都度溶解して使用し柳沢氏等の Ratio を算出して比較した。

### 実 驗 成 績

発育促進物質產生の状況は第1～2表、第1～2図に示す如く培養日数の進むに従つて増強し両培地共4週以後の濃縮培養濾液添加により発育の旺盛なる事を認めた。而してグリセリンブ

イヨンは多少ソートン培養に優り10%添加は5%添加より良好で、50ml 宛個々に培養せしⅠ液と大量培養より分割採取せしⅡ液との間には著明な差異は認めなかつた。

ツベルクリン反応活性因子の产生は濃縮培養液の2,000倍0.1mlをもつて比較するに第3~5表、第3図に示す如く培養3週目より増強し概ね4週培養以後は OA-Azo-T 0.025γ/0.1ml

の皮膚反応惹起力と等力値を示した。即ち第4~5図に示す如く、発育促進物質とツベルクリン反応活性因子の产生は概ね平行関係にある事を認めた。

## 第 II 実 験

次で私はツベルクリン中の結核菌発育促進物質分離の目的をもつて炭末、カオリン、O型血

球等にて吸着せしめ、吸着物質と残存液との両者を比較した。

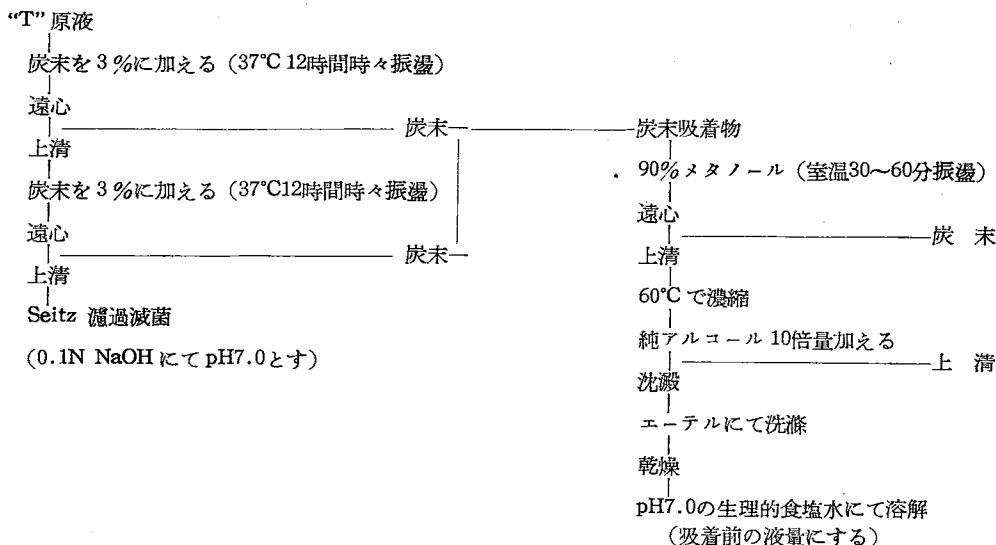
### 実験方法

使用培地、接種菌液、成績の判定は第I実験の方法に準じ、次に述べる如き方法に依つて作成せる物質の

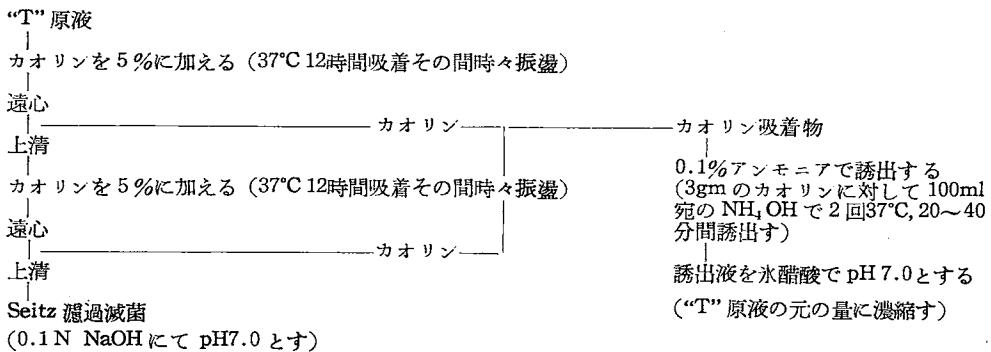
原液を増田培地に10~1%に添加し発育状況を比較観察した。

#### 添加物質

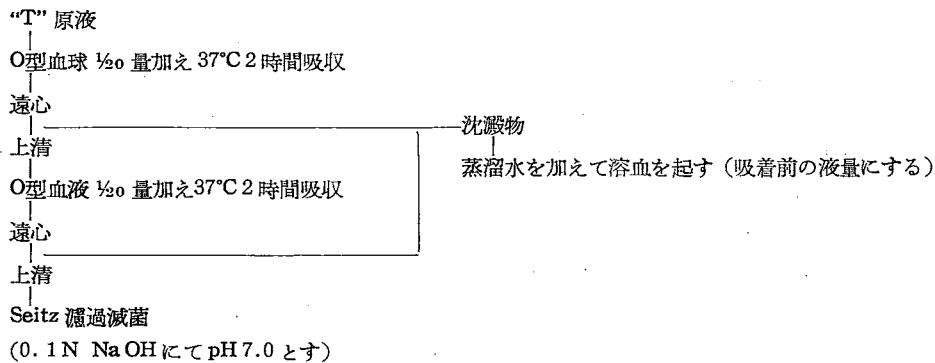
##### 1) ツベルクリン炭末吸着物質



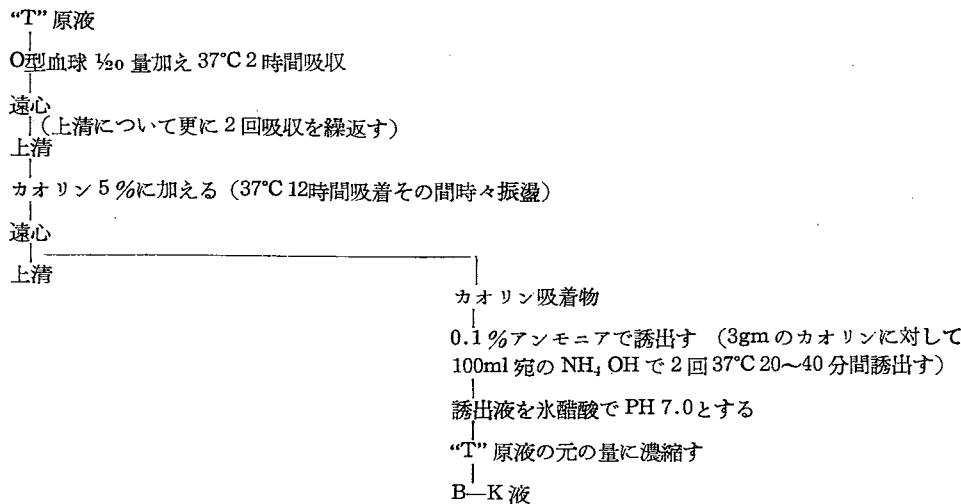
##### 2) ツベルクリン カオリン吸着物質



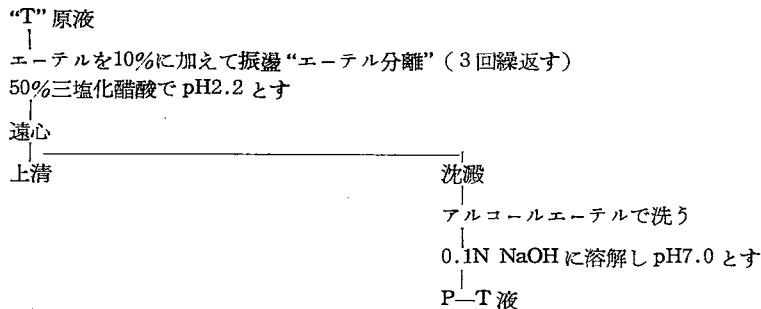
## 3) ツベルクリンO型血球吸着物



## 4) B-K 液 (“T”原液をO型血球にて吸収し更にカオリンに吸着せしめ誘出した液)



## 5) P-T 液 (精製ツベルクリン蛋白液)



## 6) チトラートツベルクリン

伊藤の創案に依るチトラート、ツベルクリンの製法に準じ Sauton 培地発育の人型結核菌 F 株の充分洗滌 (生理的食塩水) した菌体を無菌的に 0.1M クエン酸ソーダ水溶液 (培養 Sauton 培地と同量) 中に 37°C, 24 時間浸漬し、遠心沈殿に依り菌体を分離し、更にザイツにて濾過し、濾液を  $\frac{1}{10}$  に濃縮したものを使用す。このツベルクリンに依る皮膚反応惹起力は第 6 表に示す如くであつた。

## 実験成績

第7表、第6図に示す如く炭末吸着残存液の5%，O型血球吸着残存液の10~5%，カオリン吸着誘出液の5%に於ては結核菌の発育を著明に促進し発育確認日も早かつた。即ち発育促進物質は炭末及び赤血球にて吸着されることがなく残存し、カオリンにては大部分吸着される事を認めた。而して第8表、第7図に示す如く血球吸収残液を更にカオリンをもつて吸着せしめた所謂B-K液添加に於ては一層著明な発育を認めた。又試みに戸田教授<sup>27)</sup>の精製ツベルクリ

ンの製法に準じて作製せる所謂P-T液添加に於ても亦著明な発育促進を認めた。而してチートラートツベルクリンに於ては殆んどその作用を認めなかつた。先に教室の中島<sup>24)</sup>及び山下は旧ツベルクリンをもつて赤血球を感作し、Dubos反応を行い、その残液にて皮膚反応を行うに感作前と同様の反応惹起力を保有せる事を報告したが、私の発育促進物質も又皮膚反応惹起力を有する因子と極めて関係の深い物質であることを想像せしめた。

## 第二実験

此処に於て私は結核菌々体主成分であるプロテイン、ポリサツカリード、フォスフアチードの中、何れがその発育を促進せしめるかを知らんが為、教室の蔵<sup>13)14)</sup>及び秋山<sup>16)</sup>が分離した3物質の分譲を受け、それ等の100γ/mlを原液

とし、更に之を20~1%の割合に増田培地に添加してその発育状況を比較した。尙試みにOA-Azo-Tを2γ~0.02γ/ml、OA-Azo-Tbc-P(オルトアミノフェノールアゾ結核菌々体蛋白)を20γ~1γ/mlに増田培地に添加比較した。

## 実験方法

## 添加物質

## 1) 結核菌々体プロテイン

淡褐色の粉末でその性状は下記の如く蛋白反応は総て陽性にしてN量(アツオトメーター測定に依るmg%)は13.5である。

## 蛋白定性反応

Heller's test	+
Sulfosalicylic acid reaction	+
Picric acid reaction	+
Millon's test	+
Biuret reaction	+
Molisch's test	+

## 2) 結核菌々体ポリサツカリード

微黄白色の粉末にして、水に易溶、酸及びアルカリに可溶にして、アセトン、エーテル、クロロホルムには不溶の物質でその性状は次の如くである。

Ninhydrin reaction	-
Biuret reaction	-
Xanthoprotein reaction	-
Millon's test	-

Hopkins-Cole's test	-
Sakaguchi's test	-
Picric acid reaction	-
Tannic acid reaction	-
Sulfosalicylic acid reaction	-
Molisch's test	++
Saliwanoff's test	++
Tollens's test	++
Foulger's test	+
Trommer's test	±
N (%)	0.75
Reducing sugar	56.0

## 3) 結核菌々体フォスフアチード

淡黄色粉末状の物質で、エーテル、クロロホルム、ベンゼン可溶、アセトン、アルコール不溶の物質で特有の香氣を有し特別の結晶を認めない、その性状は次の如くである。

Ninhydrin reaction	-
Biuret reaction	-
Xanthoprotein reaction	-
Millon's test	-

Hopkins-Cole's test	—
Sakaguchi's test	—
Picric acid reaction	—
Tannic acid reaction	—
Sulfosalicylic acid reaction	—
P (%)	3.880
N (%)	0.154

- 4) OA-Azo-T  
 5) o-Aminophenol azo-Tuberculo-protein  
 (OA-Azo-Tbc-P)

### 実験成績

第9表、第8図に示す如く結核菌々体プロテインは他の何れよりも発育促進作用が著明で発育確認日も早かつた。

### 考按並に結論

今回の実験に於てはツベルクリン中、結核菌発育促進物質産生の時期を探究せしに、グリセリンブイヨン、ソートン培地共に4週間培養以後に於てその産生を認め、然も皮膚反応惹起因子の産生と極めて時期的に関係の深い事を知つた。

結核菌はその発育過程に於て代謝産物として各種ビタミン殊にB<sub>2</sub>産生については Rohner, Roulet<sup>4)</sup>, Bouisseuain 及び Street and Reeves<sup>5)</sup>等が認めている。

又楠瀬、山村等<sup>6)</sup>は鳥型結核菌から抽出した酵素中にフラビン、ラクトフラビン磷酸等が含まれていると報告し、又山村<sup>10)</sup>はアルギニン、アスパラギン等を Kirchner 無蛋白培地に添加するとビタミンB<sub>2</sub>産生量が増加すると報告している。尚結核菌はビタミンB<sub>1</sub>を合成する他、細菌発育素であるリボフラビン、葉酸、パンテン酸、ニコチン酸、ピリドキシン等を自体内で合成するという事も既に知られている処である。而して私は極めて簡単な物質に吸着せしめる事により発育促進物質を検索せしにツベ

ルクリン活性因子をも吸着するカオリンに依り、発育促進物質も亦その大部分は移行し、ツベルクリン因子の吸着不能な血球及び炭末に依つては発育促進物質も又残存する事を認めた。即ちツベルクリン活性因子と極めて関係のあるプロテインに關係せる物質である事は想像にかたくない処である。依て結核菌々体より分離せしプロテイン、ポリサツカリード、フォスファチードについて比較せしに、これ亦プロテインに依て最も良くその発育を促進せしめる事を認めた。

即ち以上の実験を総括考按するに、ツベルクリン中の発育促進物質は、ツベルクリン活性因子同様にツベルクリン中に含まるるプロテインと極めて関係の深い事を確認した。然れどもチトラート、ツベルクリン添加に依ては発育促進作用を認めない点よりすれば真のツベルクリン活性因子と発育促進物質とは同一物質に非ずして、ツベルクリン活性因子はプロテイン分層中に含有せられているものの如く想像されるが、詳細に関しては将来の研究に俟つ可きである。

### 全篇の総括

私は結核菌発育促進物質を探究する目的で増田培地を用いて諸種物質を一定濃度に添加して

実験した処、次の様な結果を得た。

- 1) ビタミン類の中 V.B<sub>1</sub>, V.B<sub>2</sub>, V.B<sub>12</sub>, V.C,

PABA, 葉酸, パントテン酸が結核菌の発育を促進した。

2) アミノ酸の中, アルギニン, グリココール, ロイチン, クレアチニン又アミノ酸製剤であるポリタミン, マリアミンが結核菌の発育を促進した。

3) ツベルクリン原液が上記の物質よりも一層著明に結核菌の発育を促進し, 而してその発育促進物質はツベルクリン活性因子並に結核菌々体プロテインに関係のある事を明らかにした。

以上の事実より考察するに, 既に吉田, 住友等<sup>21)</sup>はツベルクリン原液中にアミノ酸を含むと報告し, 又江口<sup>22)</sup>は人型結核菌々体中に 17

種のアミノ酸を確認し, 特にロイチン,  $\beta$ -アラニン等を多量に含むと報告している。而して Rühne, Proskauer 等は結核菌の発育に必要な要素である C, N, H, O, P の中 N の供給源としてアミノ酸が適當する事を指摘している。

アミノ酸が生体の最も重要な構成因子である蛋白質の分解産物である事は今更論を俟たぬ所であつて, 私はツベルクリン中の発育促進作用がプロテインと極めて深い関係のある事を証明したので, 結核菌に関係のあるアミノ酸の存在が大いに役立つているものとみられる。

又一方結核菌がその発育過程に於て產生する多数の発育素殊に V. B 群も亦その発育促進作用を高めているものと思考する次第である。

## 文

- 1) 由利健三: 金大結研年報, 8(上), 85, 1949.
- 2) 村田正夫: 結核, 17, 150, 1939.
- 3) Middlebrook, G. and Dubos, R. J.: J. Exper. Med., 88, 521, 1948.
- 4) Rohner & Roulet: Biochem. Z., 300, 148, 1949.
- 5) Street & Reeves: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 44, 641, 1940.
- 6) Rane, L., and Subbarow, Y.: J. Biol. Chem., 134, 455, 1940.
- 7) Badger, E.: J. Biol. Chem., 153, 183, 1944.
- 8) 糟谷伊佐久: 免疫化学,特にツベルクリンの免疫化学.
- 9) 仙場博: 札幌医科大学学紀要, 2(4), 117, 1951.
- 10) 山村雄一: 結核, 27(8), 1952.
- 11) 戸田忠雄: 東京医事新誌, 3113, 1, 1938.
- 12) 高田蒔: 結核の化学療法.
- 13) 藏尙之: 金大結研年報, 8(上), 113, 1949.
- 14) 藏尙之: 金大結研年報, 9(上), 86, 1950.
- 15) 秋山舜一: 金大結研年報, 10(上), 125, 133, 1951.
- 16) 今

## 献

- 野澤: 抗酸菌病研究雑誌, 7(3), 148, 1950.
- 17) 武谷健二: 医学と生物学, 20(5), 200, 1950.
- 18) 武田徳晴: 日本細菌学雑誌, 6(5), 369, 1950.
- 19) 武田徳晴: 自然, 7(1), 14, 1952.
- 20) 山田弘三: 日本医事新報, No. 14 86, 26, 1952.
- 21) 吉田長之, 住友健治: 岡山医学会雑誌, 62(3, 別巻), 3, 1950.
- 22) 岡本鑑, 柿下正道, 伊藤亮: 学研結核研究, 細菌学的研究科会, 1952.
- 23) 戸田忠雄, 他: 日本医事新報, No. 1434, 5, 1951.
- 24) 中島滋: 金大結研年報, 10(下), 312, 1952.
- 25) 女川徹: 金大結研年報, 10(下), 14, 1952.
- 26) 楠瀬正道, 他: 結核, 25(8), 45, 1950.
- 27) 戸田忠雄, 他: 結核, 25(9/10/11), 80, 1950.
- 28) 汀口臯月: 臨床と研究, 27(8), 50, 1949.
- 29) 戸田忠雄: 結核菌と BCG.
- 30) 柳沢謙: 結核とツベルクリン反応.
- 31) 細菌学実習提要.

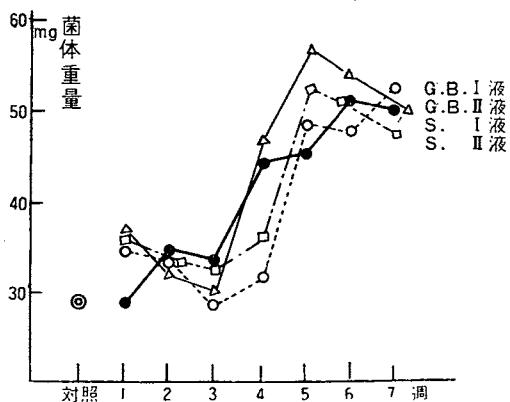
第1表 グリセリンブイヨン及びソート  
ン培地の各週培養濃縮濾液10%  
添加による菌体重量

培地 * 培養期間	G. B.		S.	
	I 液	II 液	I 液	II 液
1 週	35	37	29	36
2 "	34	33	35	34
3 "	29	30	34	33
4 "	32	47	44	37
5 "	49	57	45	52
6 "	48	54	51	51
7 "	52	50	50	48
対 照	29			

第2表 グリセリンブイヨン及びソート  
ン培地の各週培養濃縮濾液5%  
添加による菌体重量

培地 * 培養期間	G. B.		S.	
	I 液	II 液	I 液	II 液
1 週	34	36	32	32
2 "	30	33	32	33
3 "	29	33	28	29
4 "	39	44	40	36
5 "	48	40	48	35
6 "	46	42	45	38
7 "	43	38	46	40
対 照	29			

第1図



註: \* .....濾液作製迄の培養週

G.B. .... グリセリンブイヨン

S. .... ソートン培地

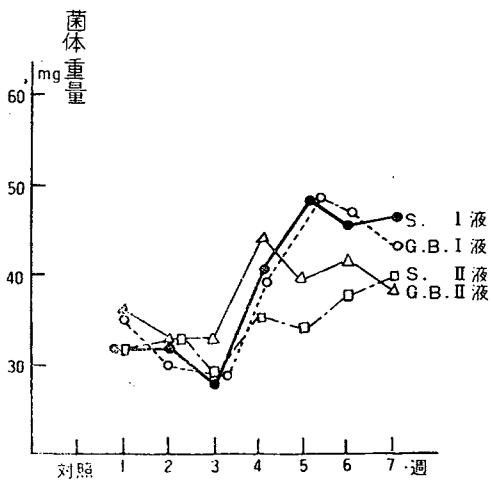
I 液.....個々のコルベントに於ける培養濃縮液

II 液.....大量培養より毎週採取せる培養濃縮液

成績判定.....5週間培養後各々4本の培地中に

発育した菌体の重量(mg)の平均  
したもの

第2図



第3表 グリセリンブイヨン及びソートン培地に於ける  
各週培養濾液の皮膚反応比較実験 (I液)

発赤径 人員		0—4 mm	5—9	10—14	15—19	20—24	25<	Ratio
"T"種類	A. T. 0.025γ		1	0	7	1	1	0
G. B.	1 W*	10名	2	4	4	0	0	0.54
	2 W		1	1	6	2	0	0.79
	A. T. 0.025γ		0	0	5	4	0	1
S.	1 W	10名	3	5	2	0	0	0.43
	2 W		0	3	7	0	0	0.78
	A. T. 0.025γ		0	2	6	1	1	0
G. B.	3 W	10名	1	2	6	0	1	0
	4 W		0	0	8	1	1	0.97
	A. T. 0.025γ		0	1	5	4	0	0
S.	3 W	10名	0	1	5	2	2	0
	4 W		0	2	4	2	1	1.07
	A. T. 0.025γ		0	0	6	4	0	0
G. S.	5 W	10名	0	1	4	5	0	0
	6 W		0	0	6	4	0	1.13
	A. T. 0.025γ		0	0	8	2	0	0
S.	5 W	10名	0	0	6	4	0	0.99
	6 W		0	0	8	2	0	0.91
	A. T. 0.025γ		0	1	6	3	0	0
G. B.	7 W	10名	0	1	7	2	0	0.92
	S W		0	1	6	3	0	0.97

註 "T" — ツベルクリン

A. T.—o-Aminophenol Azo-Tuberculin "Human"

\* — 培養日数

G. B.—グリセリンブイヨン培養

S.—ソートン培養

第4表 グリセリンブイヨン及びソートン培地に於ける  
各週培養濾液の皮膚反応比較実験 (Ⅱ液)

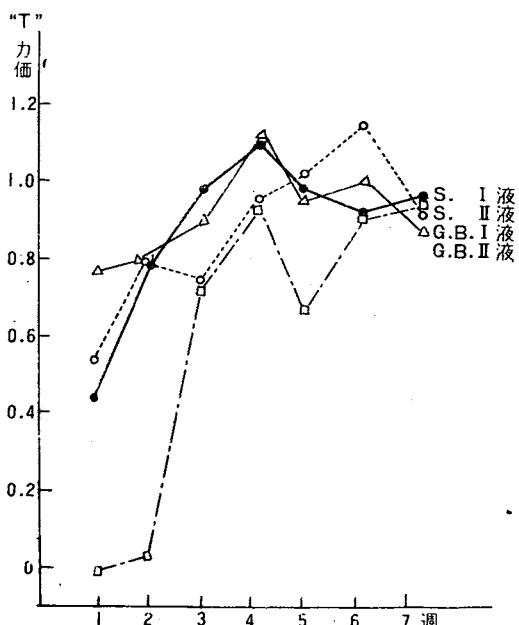
発赤径 人員 “T”種類		0—4 mm	5—9	10—14	15—19	20—24	25 <	Ratio
A. T. 0.025γ	1 W	0	1	5	4	0	0	
		1	1	7	1	0	0	0.75
		0	2	7	1	0	0	0.79
A. T. 0.025γ	2 W	0	1	6	3	0	0	
		10	0	0	0	0	0	0
		9	1	0	0	0	0	0.03
A. T. 0.025γ	3 W	0	0	6	4	0	0	
		0	2	5	3	0	0	0.89
		0	0	7	1	0	2	1.09
A. T. 0.025γ	4 W	0	0	6	3	1	0	
		0	5	4	1	0	0	0.72
		0	1	6	3	0	0	0.91
A. T. 0.025γ	5 W	0	1	8	1	0	0	
		0	0	7	3	0	0	0.97
		0	0	7	3	0	0	1.02
A. T. 0.025γ	6 W	0	0	7	2	0	1	
		0	5	4	1	0	0	0.67
		0	1	7	2	0	0	0.90
A. T. 0.025γ	7 W	0	0	5	4	1	0	
		0	0	8	2	0	0	0.89
		0	0	8	2	0	0	0.94

第5表 グリセリンブイヨン及びソートン培地に於ける各週培養濾液の皮膚反応惹起力比較

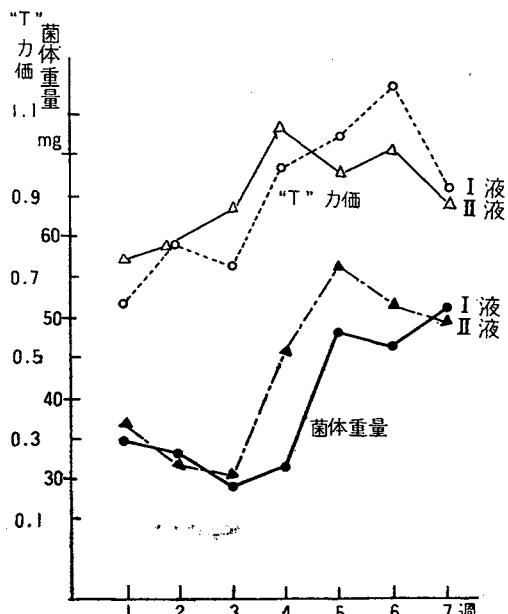
培地 培養 期間	G. B.		S.	
	I 液	II 液	I 液	II 液
1 過	0.54	0.75	0.43	0
2 "	0.79	0.79	0.78	0.03
3 "	0.74	0.89	0.99	0.72
4 "	0.97	1.09	1.07	0.91
5 "	1.04	0.97	0.99	0.67
6 "	1.13	1.02	0.91	0.90
7 "	0.92	0.89	0.97	0.94

註: OA-Azo-T 0.025g と各種養液 2,000倍  
0.1ml との皮膚反応比較 (Ratio)

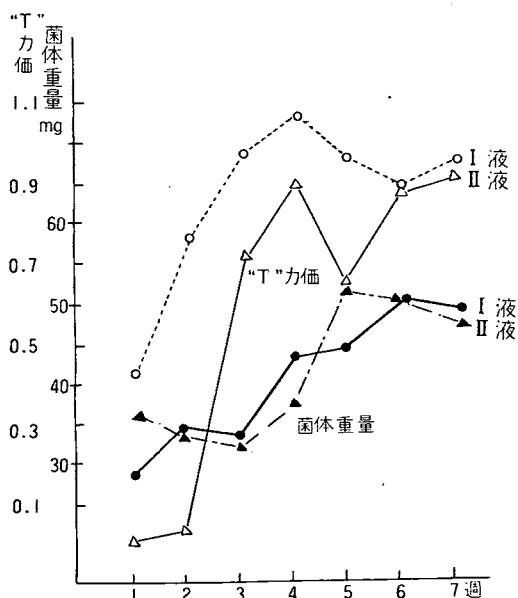
第3図



第4図 グリセリンブイヨン培地の各週培養濾液の "T" 力値と濃縮液10%添加培養の菌体重量比較



第5図 ソートン培地の各週培養濾液の "T" 力値と濃縮液10%添加培養の菌体重量比較



第7表 ツベルクリン並にその成分の  
結核菌発育に及ぼす影響  
(第1実験)

添加物質	添加量	発育状態	平均重量 mg	対照との差 mg	発育平均日
"T" 液 (グリセリン) (ダイヨン)	10%	卅	72	+43	9
	5%	卅	76	+47	9
	2%	卅	64	+35	10
	1%	廿	34	+ 5	11
"T" 液 (ソートン)	10%	卅	57	+28	9
	5%	卅	55	+26	10
	2%	卅	50	+21	11
	1%	卅	40	+11	11
"T" 液の炭末 吸着残存液	10%	卅	42	+13	10
	5%	卅	56	+27	10
	2%	卅	48	+19	11
	1%	卅	30	+ 1	11
"T" 液の炭末 吸着誘出液	10%	廿	35	+ 6	11
	5%	廿	34	+ 5	11
	2%	廿	32	+ 3	11
	1%	廿	30	+ 1	11
"T" 液のカオ リン吸着残存 液	10%	廿	35	+ 6	11
	5%	廿	34	+ 5	11
	2%	廿	32	+ 3	11
	1%	廿	30	+ 1	11
"T" 液のカオ リン吸着誘出 液	10%	廿	37	+ 8	10
	5%	廿	45	+16	10
	2%	廿	29	0	11
	1%	廿	30	+ 1	11
"T" 血球吸着 残存液	10%	廿	63	+34	9
	5%	廿	57	+28	9
	2%	廿	42	+13	11
	1%	廿	38	+ 9	11
"T" 液の血球 吸着誘出液	10%	廿	37	+ 8	11
	5%	廿	36	+ 7	11
	2%	廿	35	+ 6	11
	1%	廿	30	+ 1	11
対照		廿	29		11

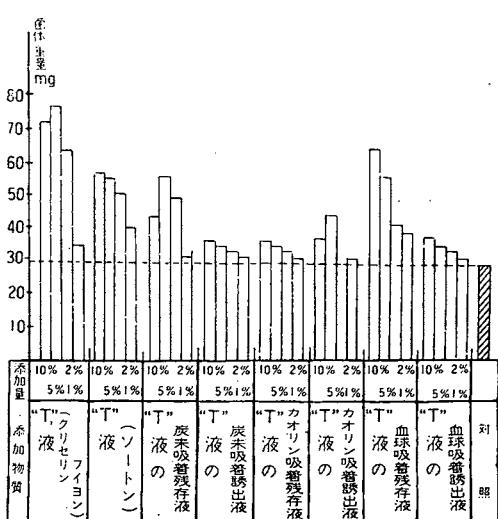
註：対照値も毎回の実験値を平均した  
ものである。

第6表  
チトラートツベルクリンを  
以てせる皮膚反応

被検者	性・年令	O.T. 1/2,000 0.1ml	C.T. 1/1,500 0.1ml
坂・隆	♂ 34	11×11 I.	11×11 I.
宮・芳	♀ 28	36×37 I.	28×28 I.
吉・外	♀ 21	16×15 I.	15×14 I.
豊・久	♂ 22	17×16 I.	15×14 I.
宮・正	♂ 18	10×11 I.	5×6

註：O.T.—標準旧ツベルクリン  
C.T.—チトラートツベルクリン

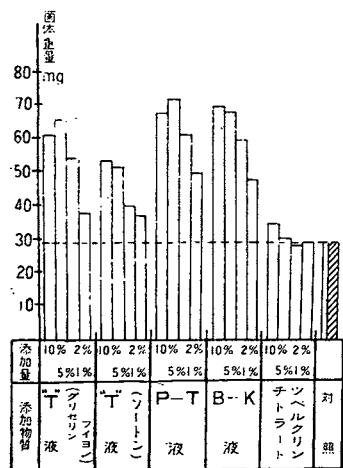
第6図



第8表 ツベルクリン並にその成分の結核  
菌発育に及ぼす影響(第2実験)

添加物質	添加量	発育状態	平均重量mg	対照との差mg	発育平均日
“T”液 (グリセリン) (ブイヨン)	10%	++	62	+35	10
	5%	++	66	+39	10
	2%	++	55	+28	10
	1%	++	38	+11	12
“T”液 (ソートン)	10%	++	54	+27	11
	5%	++	52	+25	11
	2%	++	40	+13	11
	1%	++	37	+10	12
P-T液	10%	++	68	+41	10
	5%	++	72	+45	10
	2%	++	62	+35	10
	1%	++	49	+22	11
B-K液	10%	++	70	+43	10
	5%	++	68	+41	10
	2%	++	60	+33	10
	1%	++	48	+21	10
チトラート ツベルクリン	10%	++	34	+7	12
	5%	++	30	+3	12
	2%	++	27	0	12
	1%	++	27	0	12
対照		++	27		12

第7図



第9表 結核菌菌体成分並にツベル  
クリン活性因子の結核菌発  
育に及ぼす影響

添加物質	添加量	発育状態	平均重量mg	対象との差mg	発育平均日
結核菌々体 蛋白	20%	++	56	+27	10
	10%	++	50	+21	10
	5%	++	39	+10	11
	1%	++	36	+7	11
結核菌々体 多糖体	20%	++	37	+8	11
	10%	++	35	+6	11
	5%	++	32	+3	11
	1%	++	30	+1	1
結核菌々体 磷脂質	20%	++	32	+3	11
	10%	++	33	+4	11
	5%	++	30	+1	11
	1%	++	30	+1	11
OA-Azo-T Tbc-P	2γ/ml	++	34	+5	11
	1γ/ml	++	32	+3	11
	0.2γ/ml	++	25	-4	11
	0.1γ/ml	++	27	-2	11
OA-Azo-Tbc-P	20γ/ml	++	29	0	11
	10γ/ml	++	30	+1	11
	5γ/ml	++	29	0	11
	1γ/ml	++	28	-1	11
対照		++	29		11

第8図

