

# フィルム培地を応用せる細菌学的研究

## 第 4 報

### 結核菌のフィルム培養に関する研究

#### 第 1 編 鳥型結核菌のフィルム培養に関する基礎的研究

金沢大学結核研究所細菌免疫部 (主任: 柿下正道教授)

村 田 敏 夫

(受付: 昭和29年3月1日)

#### Toshio MURATA : BACTERIOLOGICAL STUDIES ON FILMCULTURE REPORT IV.

Studies on the Growth of *Mycobacterium tuberculosis* Employing Filmculture  
Part I. Fundamental Studies on the Various Conditions of Filmculture of  
Avian Type Tubercle Bacilli

*Department of Bacteriology and Immunology, Research Institute of  
Tuberculosis, Kanazawa University.*

(Director : Prof. Masamichi KAKISHITA)

(Received for publication : March 1, 1954)

### 第 1 章 緒 言

Fisher<sup>1)</sup> は *Mycobacteria* の研究に於て、その發育状態を比濁法により検討し、15種の *Mycobacteria* に於て時間の経過と共に特有なる發育曲線を認め、これに“arithmetic linear growth”なる表現を提唱した。又奥原<sup>2)</sup>も結核菌の發育を推計学的に考察し、發育恒数を算出している。形態学的には最初 Koch<sup>3)</sup> は結核病原体として抗酸性、抗酒性の菌を発見し、その基本的形態は桿状にして不変であると記載した。然しその後本菌が普通の桿状形以外に延長形、短縮形、分枝形、糸状形、棍棒状形、膨隆形、顆粒状形、濾過形等の複雑な多形態の存在する事実を Metschnikoff<sup>4)</sup>, Klein<sup>5)</sup>, Coppen<sup>6)</sup>, Bruns<sup>7)</sup>, Dorset<sup>8)</sup>, Lehmann 及び Neumann<sup>9)</sup>, Möllgaard<sup>10)</sup> 等の研究により明らかにされた。又増殖形式に関しても種々の説があり、これを纏めて見ると大体次の様になる

- 1) 直接分裂により増殖するという説。  
(この説を支持するもの、Oerskov<sup>11)</sup>, Mayer<sup>12)</sup>, 工藤<sup>13)</sup>)
- 2) 結核菌は發育環により増殖するという説  
(この説を支持するもの、Fontes<sup>14)</sup>, 植田<sup>15)</sup>, 東村<sup>16)</sup>)
- 3) 側枝を形成して増殖するものがあるという説  
(この説を支持するもの、中村<sup>17)</sup>, 許<sup>18)</sup>, 占部<sup>19)</sup>, 戸田<sup>20)</sup>, 水野<sup>21)</sup>, 笹島<sup>22)</sup>)
- 4) 種々の顆粒を介して間接分裂により増殖するという説  
(この説を支持するもの、Spengler<sup>23)</sup>, Much<sup>24)</sup>, Kuhn<sup>26)</sup>, Gröh<sup>27)</sup>)
- 5) *Actinomyces* の如き高級菌類と同様の増殖をなすという説  
(この説を支持するもの、Metschnikoff<sup>4)</sup>,

Lebmann 及び Neumann<sup>9)</sup>, Dubos<sup>28)</sup>)

以上の如き諸説があり帰一する所がない。私は結核菌の発育を水野変法で形態学的に観察し、これを推計学的に処理しフィルム培養に於ける培養法の種々なる条件による菌の発育状態

の差を検討し、最短日数にて最大発育即ち豊富な発育を招来する条件を求め、これを当該菌の発育至適条件と決定した。

此処にその成績を報告し、諸賢の御批判を仰ぎたいと思う。

### 第2章 実験材料並に実験方法

- (1) 供試菌：鳥型結核菌（竹尾株）
- (2) 培養方法

1) 培養基：単個菌を分離培養すべき培地は菌発育に必要且つ充分なる栄養分を含み、而も、菌又は顆粒と混同される虞れのある顕微鏡的微粒子が完全に除去され、光学的に均等透明で、且つ、培地製作毎に変化のない等の条件を具備しなければならない。これ等の条件を満すために寒天加 Sauton 培地を用いた。而し、本培地上の菌発育状態と他の種類の培地上のそれとを比較検討するために寒天加 Kirchner 培地及び 4% Glycerin 寒天培地を一部に於て使用した。

2) 単個菌培養に要する菌液：単個菌培養に用うる菌液は寒天加 Sauton 培地上に発育せる 24~48 時間目の集落の少量を凹窩ガラスの陥凹部に取り、少量の Sauton 培養液を混じて、これを白金耳で軽く数回擦ると個々の菌は容易に菌苔より遊離し、単個菌培養に差支えない菌液が得られる。（斯様な操作は機械的作用の影響を少なくするためである）

3) 培養方法並に観察方法：フィルム培地標本作製は水野変法（寒天加 Kirchner の代りに寒天加 Sauton 培地を使用した）で行い、標本を杉山式加温箱中で顕微鏡下に於て、発育状態を観察した。

結核菌の菌長の発育、菌数の増加、顆粒数の変化に就ては時間的経過を追つて観察すると同時に顕微鏡写真を撮して正確を期した。

#### (3) 統計学的観察

フィルム培養で結核菌の発育状態を菌長、菌数、顆粒数に就て観察したところ、奥原<sup>2)</sup>の述べた如く全菌長（個々の菌の菌長の総和）、全菌数、全顆粒数（個々の菌の有する顆粒の総和）が 48 時間までの範囲内では時間に対し指数函数的に増大する事を確め得た。

それで各々の培養条件に於て全菌長、全菌数、全顆粒数に関する恒数（夫々成長恒数、増殖恒数、顆粒恒数と名付けた）を算出し、その相互間の差の検定は奥原の方法によつた。即ち

1) 直線の検定：時間の経過に伴つて細菌は増大するが各時間に於けるその長さを半対数グラフ上（菌長を対数值にする）にとり、それらの点を結ぶと略々直線に近くなる。これを直線と考えるか否かを検討するに増山<sup>37)</sup>の相関分析法を用いた。即ち、細菌の長さ Y を時間 X の函数と考え次の式を用いた。

$$Y = a + bX \quad a = b\bar{x} \quad b = c/S_x$$

$$\bar{x} = (x_1 + x_2 + \dots + x_N) / N$$

$$\bar{y} = (y_1 + y_2 + \dots + y_N) / N$$

$$S_x = (x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_N - \bar{x})^2$$

$$S_y = (y_1 - \bar{y})^2 + (y_2 - \bar{y})^2 + \dots + (y_N - \bar{y})^2$$

$$c = (x_1 - \bar{x})(y_1 - \bar{y}) + (x_2 - \bar{x})(y_2 - \bar{y}) + \dots$$

$$(x_N - \bar{x})(y_N - \bar{y})$$

$$\Delta = S_y - c^2/S_x$$

要因	変動	自由度	不偏分散
一次回帰	$c^2/S$	1	$c^2/S_x$
残差	$\Delta$	$N-2$	$\Delta/(N-2)$
全休	S	$N-1$	

$$F_0 = c^2/S_x \cdot (N-2)/\Delta \quad n_1 = 1 \quad n_2 = N-2$$

但し 5% の危険率をもつて検定した。

2) b（前記の種々の恒数）の差の有意性の検定には次の式を用いた。

$$F_0 = \frac{(b-b')^2}{\frac{1}{S_x} + \frac{1}{S_x'}} \cdot \frac{\Delta + \Delta'}{N + N' - 4} \quad n_1 = 1 \quad n_2 = N + N' - 4$$

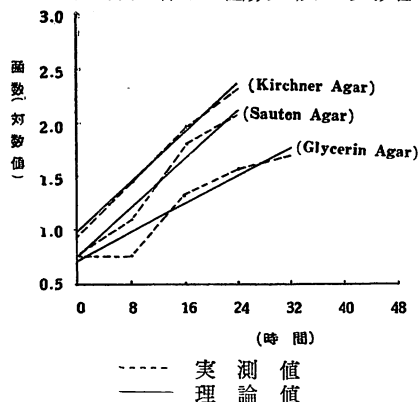
但し 5% の危険率をもつて比較した。

### 第3章 実験成績

#### 第1項 培地の種類による影響（培養温度 37°C） （第 1, 2, 3, 16, 17, 18 図及び第 1 表参照）

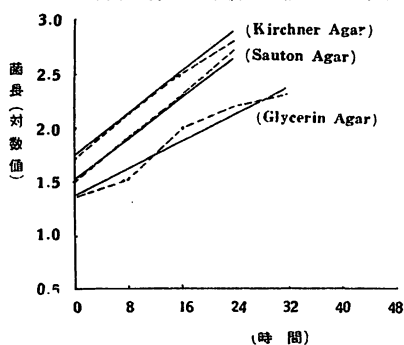
私は Sauton, Kirchner, Glycerin 寒天培地の 3% 寒天加培地を作製し、結核菌の発育形

第1図 各種培地の菌数に及ぼす影響



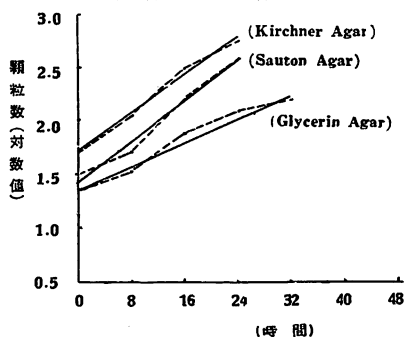
実験式  
 Sauton Agar  $\log Y = 0.749 + 0.058 X$   
 Kirchner Agar  $\log Y = 0.970 + 0.0576 X$   
 Glycerin Agar  $\log Y = 0.711 + 0.033 X$

第2図 各種培地の菌長に及ぼす影響



実験式  
 Sauton Agar  $\log Y = 1.502 + 0.052 X$   
 Kirchner Agar  $\log Y = 1.722 + 0.047 X$   
 Glycerin Agar  $\log Y = 1.408 + 0.030 X$

第3図 各種培地の顆粒数に及ぼす影響



実験式  
 Sauton Agar  $\log Y = 1.419 + 0.049 X$   
 Kirchner Agar  $\log Y = 1.692 + 0.046 X$   
 Glycerin Agar  $\log Y = 1.386 + 0.028 X$

第1表 各種培地の恒数に及ぼす影響

培地の種類	恒数	増殖恒数	成長恒数	顆粒恒数
Sauton Agar		5.8	5.2	4.9
Kirchner Agar		5.76	4.7	4.9
Glycerin Agar		3.3	3.0	2.8

式について比較吟味した。

寒天加 Sauton 培地に於ては菌数の繁殖状態は時間の経過と共に幾何級数的に増殖を示し、5%の危険率で  $\log Y = a + bX$  (Y: 菌数, X: 時間 a b: 恒数) と見做す事が出来る。此処に於て b は X 軸に対する傾斜を示す故、 $b \times 100 = B$  と置き、B を増殖恒数と名付けた。この B は増殖の速度を示すもので B が大なる程増殖の旺盛な事を示す。而して、増殖恒数は 5.8 である。又、菌長、顆粒数の時間の経過に伴う増加は共に 1% の危険率で直線と見做し得た。

同様な方法で成長恒数及び顆粒恒数を求めたところ成長恒数は 5.2、顆粒恒数は 4.9 でこの 3 つの恒数の大きさは増殖恒数 > 成長恒数 > 顆粒恒数の順位であつた。

寒天加 Kirchner 培地では菌数、菌長、顆粒数の三者共にその対数値は時間につれて直線的増加と見做す事が出来た。増殖恒数(5.76) > 成長恒数(4.7) > 顆粒恒数(4.6) で恒数の大きさの順位は寒天加 Sauton 培地に於けると同様であつた。Glycerin 寒天培地に於ても 3 者の対数値は時間に対して直線的増加と見做す事が出来た。又、増殖恒数(3.3) > 成長恒数(3.0) > 顆粒恒数(2.8) で 3 者の大きさの順位は前 2 者の場合と同様な関係であつた。

次に Sauton, Kirchner, Glycerin の 3 種の培地による増殖恒数、成長恒数、顆粒恒数の差を検定すると成長恒数並に顆粒恒数に於て Sauton と Glycerin, Kirchner と Glycerin 寒天培地の間に有意の差を認めた。

形態学的には 3 種の培地に増殖した所見は同一で差を認める事が出来なかつた。

発育前の菌の形態相の中最も多数を占めるも

のは正常形と見做される菌体の中央部に於て僅かに屈曲したものか、或は、真直な、長さ2~5 $\mu$ 、巾0.6 $\mu$ 位の中等大桿菌である。斯かる菌体に於ける顆粒は強い屈光性を有し、1~数個に及ぶ種々なものがあつたが、全然顆粒を欠如するものは認めなかつた。顆粒の位置は菌体内随所に存在していたが、時には菌体の一端、又は両端にのみ存在するものもあつた。顆粒は正球状にして菌体の巾と同じか稍々小さいものが多く認められた。而し、菌体中央に一個、或は菌体の両端、菌体の中央部と両端にあつて前者よりも黒く判然と認められる形や、菌体の巾より稍々大きく膨隆し突出しているものも認められたが、これ等は概ね成長及び発育しないか、又は成長発育に長時間を要した。その他短桿菌、単球菌形、双球菌形、或は顆粒のみが認められる、所謂“Splitter”、菌体中央部の縊れているもの、S字状のもの、棍棒状のもの、馬蹄形、顆粒連鎖形、輪郭の不規則のもの等が少数認められた。

次に好条件下の培養所見では戸田の分類の如く、a) 横分裂形式、b) 側枝形成分裂形式、c) 横分裂端伸長分裂形式、d) 菌体内顆粒よりの発芽形式、e) 伸延縊切分裂形式、f) 分枝形成分裂形式の6種の増殖形式が認められた。即ちフィルム培地移植後8時間以内に菌体に横分裂が起り初回分裂以後は横分裂、側枝形成分裂の2形式を主として反復増殖する。

この形式に次いで横分裂端伸長、菌体内顆粒よりの発芽の形式も少し認めた。又、分枝形成分裂形式の頻度は極めて稀であつた。

分裂が反復されて顕微鏡的集落を形成し菌数の増加に伴い伸延縊切分裂形式が屢々認められる様になる。又、一度分裂した母菌体は2度と分裂する傾向がない様に思われた。

菌長並に顆粒数は菌の分裂が旺盛なる時期は菌長、短く、顆粒数は少く、分裂緩慢なときは菌長、長く、顆粒数も多くなる傾向にあつた。菌移植後16時間目には肉眼的に認められる様な集落を形成するが、菌数が20~30個に増殖

すると顕微鏡的集落排列を示し、周辺部は凹凸不平にして菌相互間はフィルム面に平面的に特異的平行排列状態を呈する。肉眼的集落の状態になると菌長は稍短縮形となり顆粒数も少なく、強屈光性になつて来る。

更に周囲の集落と融合する様になると集落中心部の菌の排列状態は上下左右に錯走して、立体的となつて来る。而して、この部分の菌の形態は正常形の外短縮形、球菌形、膨隆形、棍棒状形等のものが見られる。又、周辺部の排列状態は平面的に特異的平行排列状態を呈していた。

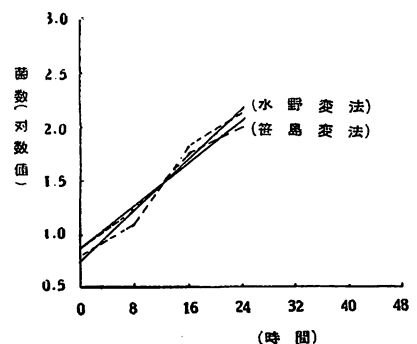
## 第2項 乾燥度による影響

(第4, 5, 6図及び第2表参照)

水野はフィルム培養を行うにあたり凹窩グラスに培養を添加する事が結核菌の発育に好影響を与えると述べている。

私は Sauton 寒天培地に Sauton 培養液を添加した水野変法と添加せぬ笹島変法を比較検討した。水野変法、笹島変法ともに菌数、菌長、顆粒数の対数値の増加は直線的発育を示した。増殖恒数、成長恒数、顆粒恒数の関係は笹島変法では増殖恒数(5.1) > 顆粒恒数(4.5) > 成長恒数(4.4)の順位となり、水野変法は増殖恒数(5.8) > 成長恒数(5.2) > 顆粒恒数(4.9)となつたが推計学的には両法間には各々の恒数に就て

第4図 乾燥度の菌数に及ぼす影響

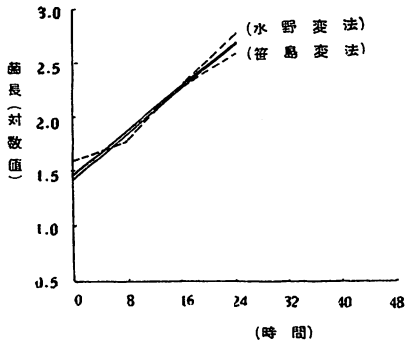


実験式

$$\text{水野変法 } \log Y = 0.749 + 0.058X$$

$$\text{笹島変法 } \log Y = 0.845 + 0.051X$$

第5図 乾燥度の菌長に及ぼす影響

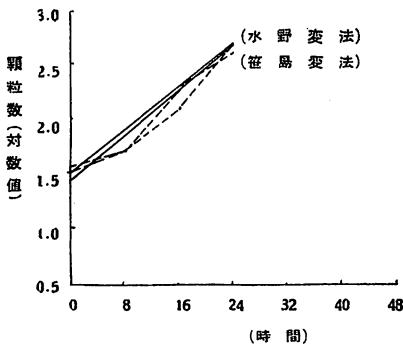


実験式

水野変法  $\log Y = 1.502 + 0.052X$

笹島変法  $\log Y = 1.455 + 0.044X$

第6図 乾燥度の顆粒数に及ぼす影響



実験式

水野変法  $\log Y = 1.419 + 0.049X$

笹島変法  $\log Y = 1.479 + 0.045X$

第2表 乾燥度の恒数に及ぼす影響

乾燥度	恒数	増殖恒数	成長恒数	顆粒恒数
水野変法		5.8	5.2	4.9
笹島変法		5.1	4.4	4.5

有意の差は認められなかつた。

形態学的観察に於ては前項に於ける成績と大差なく分裂形式にも特異的な異常分裂は認めなかつた。又、笹島変法は水野変法より菌の増殖の旺盛なる時期の菌長は短く、菌体内に含有する顆粒数は少くなる傾向にあつた。又菌の増殖が緩慢なる時期には菌長は長く、顆粒数は増加

の傾向にあつたが推計学的には両変法間には有意の差は認められなかつた。

第3項 pH による影響

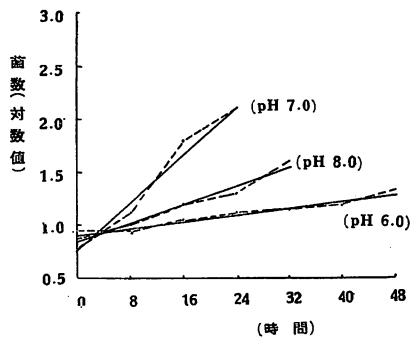
(第7, 8, 9, 19, 20, 21図及び第3表参照)

pH 7.0, pH 6.0, pH 8.0 の3種の寒天加 Sauton フィルム培地を用いて観察した。

pH 7.0 が最も発育がよく、次いで pH 8.0, pH 6.0 であつた。菌長の発育、菌数並に顆粒数の増加に就て、pH 7.0, pH 8.0, pH 6.0, の何れの培地でもその対数值は時間に伴つて直線の増加と見做す事が出来、増殖恒数、成長恒数、顆粒恒数に於ては pH 7.0 が最も大で次いで pH 8.0, pH 6.0 の順位であつた。又、その pH 7.0 と pH 8.0, pH 7.0 と pH 6.0, pH 8.0 と pH 6.0 の培地間に於ける恒数の差の検定に於て総ての場合に有意の差を認めた。

形態学的所見は pH 8.0 培地による増殖形式は pH 7.0 培地の場合と同様で、増殖は遅いが48時間目の菌の排列状態は平行排列の傾向があつた。pH 6.0 培地に於ては菌の発育並に増殖は非常に悪く特異的な増殖形式を示した。即ち菌体は異常に伸長し、同時に3~4個に分裂した。又、分裂した菌の排列が特異的の平行状態を呈せず糸毬状に丸くなり個々の菌は馬蹄形をなすものを多く認めた。菌長は pH 8.0 では分裂の進むに従い漸次短くなり顆粒数も減少してい

第7図 pH の菌数に及ぼす影響



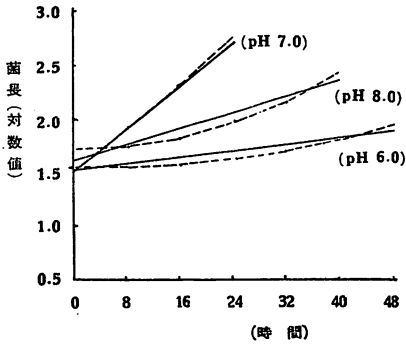
実験式

pH 6.0  $\log Y = 0.931 + 0.008X$

pH 7.0  $\log Y = 0.749 + 0.058X$

pH 8.0  $\log Y = 0.863 + 0.022X$

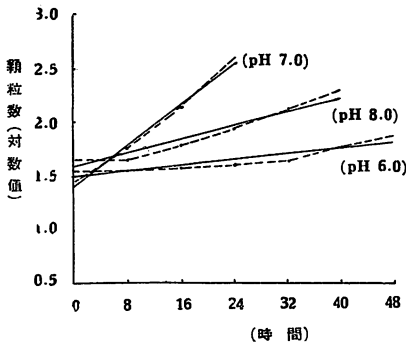
第8図 pH の菌長に及ぼす影響



実験式

pH 6.0  $\log Y = 1.486 + 0.008X$   
 pH 7.0  $\log Y = 1.502 + 0.052X$   
 pH 8.0  $\log Y = 1.619 + 0.018X$

第9図 pH の顆粒数に及ぼす影響



実験式

pH 6.0  $\log Y = 1.481 + 0.007X$   
 pH 7.0  $\log Y = 1.419 + 0.049X$   
 pH 8.0  $\log Y = 1.564 + 0.017X$

第3表 pH の恒数に及ぼす影響

pH	恒数	増殖恒数	成長恒数	顆粒恒数
pH 6.0	0.8	0.8	0.7	
pH 7.0	5.8	5.2	4.9	
pH 8.0	2.2	1.8	1.7	

るが、pH 6.0 では分裂の進むに従って菌長の短縮及び顆粒数の減少はあまり認められなかつた。

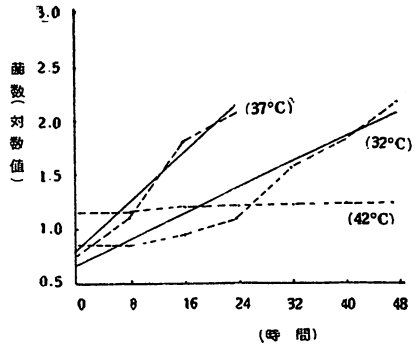
第4項 培養温度による影響

(第10, 11, 12図及び第4表参照)

温血動物結核菌の發育至適温度が37°C~38°Cなる事は既に一般の認める所である。本実験に於ても37°Cで最高の發育をなし菌数、菌長、顆粒数の対数值の増加は直線として証明する事が出来た。32°Cに於ても菌数、菌長、顆粒数の対数值の發育は直線となつた。42°Cでは菌の發育を認めなかつた。

37°Cと32°Cに於ける増殖恒数、成長恒数、顆粒恒数の比較に於て3者ともに夫々の間に有

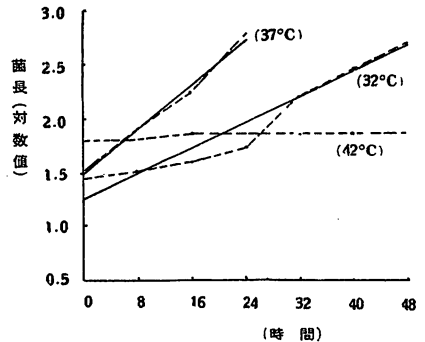
第10図 培養温度の菌数に及ぼす影響



実験式

32°C培養  $\log Y = 0.625 + 0.030X$   
 37°C培養  $\log Y = 0.749 + 0.058X$   
 42°C培養

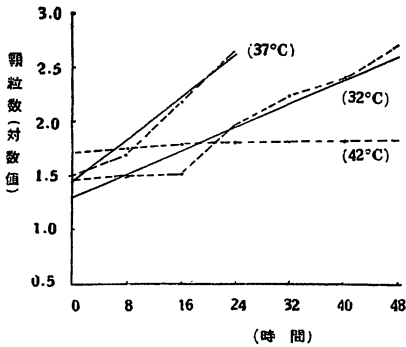
第11図 培養温度の菌長に及ぼす影響



実験式

32°C培養  $\log Y = 1.260 + 0.029X$   
 37°C培養  $\log Y = 1.502 + 0.052X$   
 42°C培養

第12図 培養温度の顆粒数に及ぼす影響



実験式

32°C培養  $\log Y = 1.279 + 0.027X$

37°C培養  $\log Y = 1.419 + 0.049X$

42°C培養

第4表 培養温度の恒数に及ぼす影響

培養温度	恒数	増殖恒数	成長恒数	顆粒恒数
32°C		3.0	2.9	2.7
37°C		5.8	5.2	4.9
42°C		/	/	/

意の差を認めた。42°C では結核菌が發育しないため比較する事が出来なかつた。

温度の変化による形態学的所見を見ると42°C に於て發育した。

32°C に於ける菌の發育状態は悪く一般に菌長は長く、顆粒数も増加した。

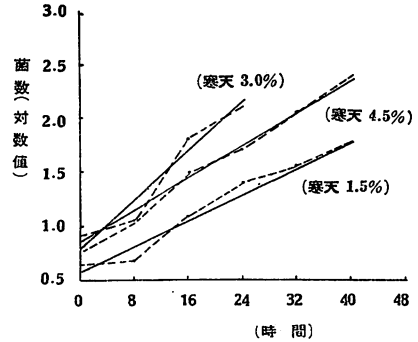
第5項 含有寒天量による影響

(第13, 14, 15, 22, 23図及び第5表参照)

寒天加 Sauton 培地中の寒天含有量の菌数増加に及ぼす影響を見ると3%, 4.5%, 1.5%含有の各培地に於ける菌の増加は半対数グラフで直線的に發育した。増殖恒数は3.0%含有では5.8, 4.5%含有は3.8, 1.5%含有は3.1であつた。

この3つの恒数に就て有意の差を検討すると3.0%と4.5%含有, 3.0%と1.5%含有, 4.5%と1.5%含有の間には夫々有意の差を認めた。菌長に於ても3者とも半対数グラフで直線的發

第13図 寒天含有量の菌数に及ぼす影響



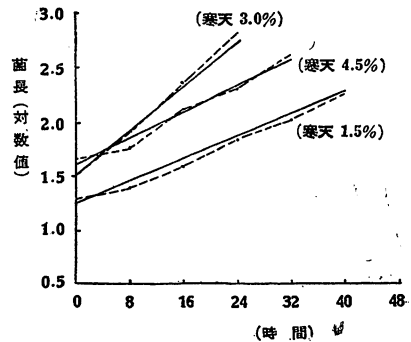
実験式

寒天1.5%  $\log Y = 0.561 + 0.031X$

寒天3.0%  $\log Y = 0.749 + 0.058X$

寒天4.5%  $\log Y = 0.844 + 0.038X$

第14図 寒天含有量の菌長に及ぼす影響



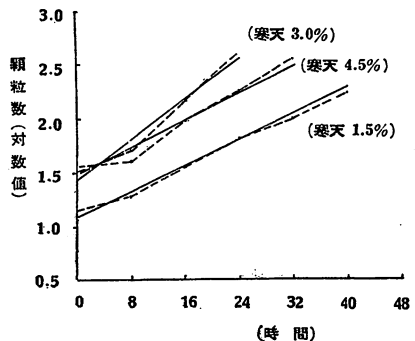
実験式

寒天1.5%  $\log Y = 1.242 + 0.025X$

寒天3.0%  $\log Y = 1.502 + 0.052X$

寒天4.5%  $\log Y = 1.593 + 0.031X$

第15図 寒天含有量の顆粒数に及ぼす影響



実験式

寒天1.5%  $\log Y = 1.126 + 0.027X$

寒天3.0%  $\log Y = 1.419 + 0.049X$

寒天4.5%  $\log Y = 1.478 + 0.032X$

第5表 寒天含有量の恒数に及ぼす影響

寒天含有量	恒数	増殖恒数	成長恒数	顆粒恒数
1.5%		3.1	2.5	2.7
3.0%		5.8	5.2	4.9
4.5%		3.8	3.1	3.2

育を示し、成長恒数は3.0%含有のものは5.2、4.5%含有のものは3.5、1.5%含有のものは2.5であつた。成長恒数間の有意の差の検定に於ては3.0%含有と4.5%含有、3.0%と1.5%含有、4.5%と1.5%含有の間には夫々有意の差を証明した。顆粒恒数の増加も半対数グラフで3者とも直線的發育を示し、これら恒数の差の有意性の有無は3.0%と4.5%含有、3.0%と1.5%含有の関係では有意の差があつたが、4.5%と1.5%

含有の比較では有意の差を認めなかつた。

菌数、菌長、顆粒数の各恒数の順位は3.0%含有のものでは増殖恒数>成長恒数>顆粒恒数の順位であつたが、4.5%と1.5%含有では増殖恒数>顆粒恒数>成長恒数の順位となつた。

1.5%含有培地の形態学的所見では顕微鏡的集落は特異的平行排列状態を呈し、集落中の菌長は短縮し、菌長に対する顆粒数の割合は多くなる傾向にあつた。

4.5%含有培地では分裂途上に異常伸長せるものが多く見られたが發育悪く48時間では顕微鏡的集落に於ける各菌は特異的平行排列状態の傾向が少なかつた。而して3.0%含有培地の發育が最も良好であつた。又1.5%含有培地は菌の固定が不充分なため観察に不自由を感じる事が多かつた。

#### 第4章 考 接

フィルム培養に於ける培地は Oerskov<sup>11)</sup>, Groh<sup>27)</sup> 等は寒天加 Sauton 培地を使用した。中村<sup>17)</sup>, 占部<sup>19)</sup>, 戸田<sup>20)</sup> は Glycerin 寒天培地を、工藤<sup>13)</sup>, 水野<sup>21)</sup>, 笹島<sup>22)</sup> は寒天加 Kirchner 培地を使用した。私は寒天加 Sauton, 寒天加 Kirchner, Glycerin 寒天の3種の培地を用いて鳥型結核菌の發育について比較観察した。その結果、寒天加 Sauton 及び寒天加 Kirchner 培地では増殖恒数、成長恒数、顆粒恒数の順位に大なる値を示し、両者の比較では夫々の恒数の間には有意の差を認めなかつた。Sauton と Glycerin 寒天培地、Kirchner と Glycerin 寒天培地との比較では増殖恒数には有意の差は認めなかつたが成長恒数及び顆粒恒数については差の有意性を認めた。然し乍ら形態学的には培地の相違による影響は認められなかつた。

發育形式に関する詳細は既に述べた通りであるが戸田<sup>20)</sup>の記載する如く菌体の顆粒を認めぬ個所よりも明らかに分枝する像を認めた。これは分裂端伸長形式による分裂形式に属すると思われる。又、發育開始前に於ても Koch の正常

形以外の変異形が屢々認められ結核菌の多形態を認める事が出来た。而し、Kuhn<sup>26)</sup> が主張する塵埃形式は認められなかつた。發育形式は Kuhn, 中村<sup>17)</sup>, 許<sup>18)</sup> が唱える如く横分裂形式、側枝形成分裂形式が大部分を占めていた。菌の發育旺盛なる時は菌長、短縮し顆粒数減少し、發育緩慢なる時は菌長伸長し、顆粒数も増加した。

以上の如く Sauton 及び Kirchner 培地が最も優れ、両者の菌の發育には有意の差は認めなかつたが、Sauton 培地は純化学的に調製し得る無蛋白培地で、しかも熱処理に於ても便利なる点からして Kirchner 培地より結核菌の發育状態を観察する基礎培地として優れている。

次に培地の乾燥度の問題に於て水野変法、笹島変法を比較したが水野<sup>21)</sup>が報告している様な菌の分裂に於ける差(増殖恒数の差の有意性)は認める事は出来なかつたが、笹島変法のとき顆粒恒数が成長恒数より大となつた。即ち、乾燥度の高低は顆粒数の増減に影響を与えるものと思われる。



培地の PH を種々に変化させた実験では増殖恒数、成長恒数、顆粒恒数の何れからみても最も發育の良いものは PH 7.0 にして、次いで PH 8.0, PH 6.0 であつた。

結核菌の發育至適温度に就ては Bergey<sup>30)</sup> は鳥型結核菌は 37°C のみならず 40°C~42°C に於て頗る良好なる發育を営むと述べ、占部<sup>21)</sup>は 42°C 迄發育すると云い、Kolle 及 Wassermann<sup>31)</sup>は 25°C~45°C の如き広範囲に於て發育可能であると報告している。私の実験では鳥型結核菌は 42°C で發育停止を認め最至適温度は 37°C であつた。

培地の寒天含有量による菌の發育状態は増殖恒数、成長恒数、顆粒恒数の何れからみても寒天含量 3.0% が最も優秀で、次いで 4.5%, 1.5% の順位であつた。4.5% と 1.5% 寒天培地の各

恒数の排列順位は増殖恒数>顆粒恒数>成長恒数の様な順位になり、3.0% 寒天培地の恒数排列順位は増殖恒数>成長恒数>顆粒恒数となつた。これは 4.5% 及び 1.5% 含量では菌長の成長率より顆粒の増加率が多い事を意味するもので前述の乾燥度による影響の場合と同様に寒天含量が結核菌の顆粒の増減に影響を与えるものと思考された。即ち、通常、寒天含量の少い程菌の發育は良好であるとされているが、このフィルム培地上の実験では前述の如く、菌の發育は 3.0%, 4.5%, 1.5% の順位によく、3.0% 含量で最高の發育を示した。3 者のうちで一番含量の少い 1.5% が最も不良な發育を示したことは、フィルム培地上に於ける菌の固定が良く行われなかつた故とも考えられる。

## 第 5 章 結 論

私はフィルム培養の各種の条件の下に結核菌の發育状態を観察し、その成績を推計学的に吟味し、次の様な結論を得た。

1) フィルム培養の最至適基礎的条件としては、PH 7.0 の湿潤なる 3.0% 寒天加 Sauton 培地を用い温度 37°C に培養することである。

2) 全菌長、全菌数、全顆粒数は培養 48 時間までの範囲内では時間に対して指数函数的に増大し、増殖恒数、成長恒数、顆粒恒数を算出する事が出来た。

3) 發育開始前に於ても Koch の正常型以外の変異型を屢々認めた。

4) 培地の寒天含量及び乾燥度は顆粒の増減に関係があつた。

5) 横分裂形式、側枝形成が分裂形式の大部分を占める塵埃形式は認めなかつた。

6) 菌の發育に最も影響を与えたものは培地の PH と培養温度であつて、PH 6.0 では異常發育形式を認め、42°C に於てはその發育を停止した。

7) 好条件下の培養では 24 時間で肉眼的集落となり、集落中心部は立体的に増殖し、周辺部は特異的平行排列状態を呈した。

## 文 献

- 1) Fisher, M. W.: Am. Rev. Tuberc., 66, 758, 1952. 2) 奥原政雄: 金沢大学結核研究所年報, 11 (下), 233, 1953. 3) Koch, R.: Berl. Klin. Wschr., 15, 19, 1884. 4) Metschnikoff, E.: Arch Virchow., Ref. CXIII 1888. 5) Klein, E.: Zbl. f. Bakt., 1 Abt. orig. 12, 905, 1892. 6) Copen, J.: Zbl. f. Bakt., 1 Abt. orig. 17, 70, 1895. 7)

- Bruns, H.: Zbl. f. Bakt., 1 Abt. orig. 17, 817, 1895. 8) Dorset, M.: Zbl. f. Bakt., 1 Abt. Ref. 31, 305, 1902. 9) Lehmann, K. B. u. Neumann, R. O.: Atlas u. Grundriss d. Bakteriologie u. Lehrbuch d. Spec. bakt. Diag., 4 Aufl., 1907. 10) Möllgaard, H.: Beit. Klin. Tbk., 77, 83, 1931. 11) Oerskov, J.: Zbl. f. Bakt., 1 Abt. orig. 123, 271, 1932.

- 12) Mayer, A.: *Beit. Klin. Tbk.*, 84, 335, 1934. 13) 工藤祐是 : 結核研究の進歩, 2, 177, 1953. 14) Fontes, A.: *Beit. Klin. Tbk.*, 77, 2, 1931. 15) 植田三郎 : 結核菌の研究, 1, 1951. 16) 東村道雄 : 医学と生物学, 26, 7, 1953. 17) 中村 : 東京医事新誌, 59, 1713, 1935. 18) 許達 : 実験医学, 19, 1346, 1935. 19) 占部薫 : 福岡医学会雑誌, 29, 106, 1936. 20) 戸田忠雄 : 実地医家と臨床, 14, 207, 1937. 21) 水野伝二 : 東京医事新誌, 66, 106, 1949. 22) 笹島吉平 : 金沢大学結核研究所年報, 10 (上), 113, 1951.
- 23) Spengler, C.: *Zschr. f. Hyg.*, 49, 541, 1905. 24) Much, H.: *Beit. Klin. Tbk.*, 8, 84, 1907. 25) Much, H.: *Beit. Klin. Tbk.*, 8, 357, 1907. 26) Kuhn, M. C.: *Zschr. f. Immun. forsch. orig.*, 74, 93, 1932. 27) Gröh, E.: *Zbl. f. Bakt.*, 1 Abt. orig. 128, 353, 1933. 28) Dutos, R.: *The Bacterial Cell*, 1949. 29) 増山元三郎 : 少数例の纏め方と実験計画の立て方, 1951. 30) Bergey, D. H.: *Manual of Determinative Bact.*, 4, 1943. 31) Kolle, W. u. Wassermann, A. V.: *Handbuch d. Path. Mikroorg.*, 2 Aufl., 1913.

### Summary

A series of experiments were carried out to find the optimal conditions for the growth of a strain of avian type of *Myc. tbc.* on the filmculture, and statistical treatment on some of the data obtained was also attempted.

1. Sauton's synthetic medium containing 3% agar (pH 7.0) was proved to be the best for culturing the tubercle bacilli on film, optimal temperature being 37°C.
2. The total number, the total length, and the total granules of the multiplying tubercle bacilli are all recorded as to increase logarithmically against the lapse of culture up to 48 hours.
3. To be noted is the fact that the content of granules in the bacillary body is greatly affected by the moistness and the agar content of the culture media.
4. Sidekinesis and branching were the most common type of multiplication of the organisms.
5. Under the adequate experimental condition, the multiplication of bacilli was so rapid that colonies of macroscopical size could be found on the film as early as 24 hours after incubation.

村田論文附圖 (1)

第16図

(1)



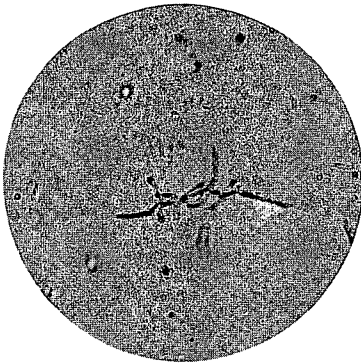
(1) — (移植直後)

(2)



(2) — (8時間後)

(3)



(3) — (16時間後)

第16図

Sauton Agar 培地に於て単個菌より集落形成をなすまでの各時間に於ける菌の増殖及び分裂状態 (1,500倍)

村田論文附圖 (2)

(4)



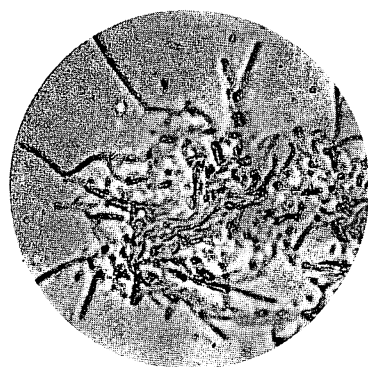
(4) — (24時間後)

(5)



(5) — (32時間後)

(6)



(6) — (40時間後)

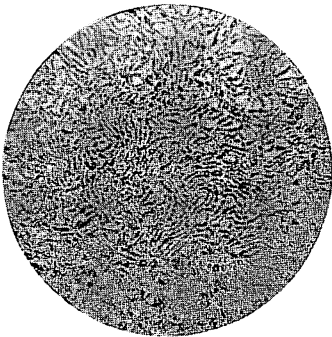
(7)



(7) — (48時間後)

集落周辺部は特異的平行排列状態であるが中央部は上下左右に菌体が錯走して集落を形成している

第17図



第 1 7 図

Sauton Agar 培地に移植後48時間目の相隣接する集落の融合部の特異的平行排列状態の像 (1,500倍)

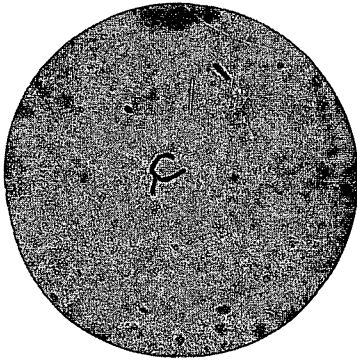
第18図



第 1 8 図

Sauton Agar 培地に移植後40時間目の集落中心部の像 (1,500倍)

第19図



第 1 9 図

pH 6.0 Sauton Agar 培地に於ける24時間目の菌発育状態の像 (1,500倍)



第20図

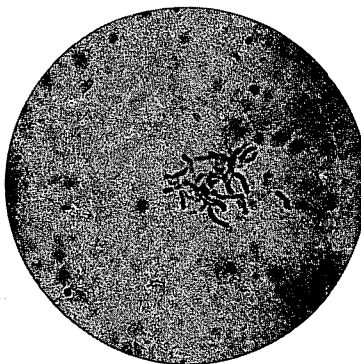


第 2 0 図

pH 6.0 Sauton Agar 培地に於ける48時間目の菌の糸球状に発育せる像 (1,500倍)



第21図



第 2 1 図

pH 6.0 Sauton Agar 培地に於ける48時間目の非特異的平行排列状態の像 (1,500倍)

第22図

(1)

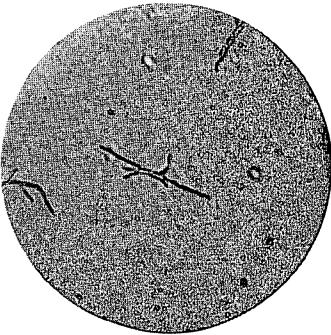


第 2 2 図

(1) — 寒天含有量 4.5% 培地に於ける16時間目の菌体の異常伸長せる像 (1,500倍)



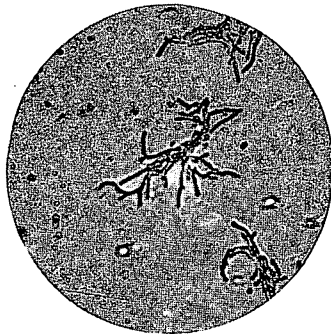
(2)



(2) — 上述の像の24時間目の異常伸長菌体により形成された小集落 (1,500倍)



第23図



第 2 3 図

寒天含有量 1.5% 培地に於ける48時間目の小集落中心部の短縮せる菌体の像 (1,500倍)