

Tween 80 加結核培地に対する血清の影響に 関する研究

昭和41年7月27日 受付

信州大学医学部細菌学教室

(主任：田崎忠勝教授)

鈴木 聖 山田 喜紹 田崎 忠勝

Studies on the Influence of Serum on the Tubercle Bacillus Medium containing Tween 80

Kiyoshi Suzuki, Yoshitsugu Yamada and Tadakatu Tazaki

Department of Bacteriology, Faculty of Medicine,

Shinshu University

(Director : Prof. T. Tazaki)

緒 言

Dubos 等の結核菌の液体培養に関する一連の報告の中に、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレイト (Tween 80) を加えると、接種菌量が少ない時は市販 Tween 80 中の遊離オレイン酸の為に菌の増殖が阻害され、牛血清をこの際添加すると、遊離オレイン酸が保護されて阻害が減少するが、しかし牛血清の代りに馬血清を使用すると、菌の発育阻害が著しくなることを見出している。Tween 80 を基質として馬血清中のリパーゼの活性度を測定し、馬血清中にはリパーゼが多く含まれ、Tween 80 から多くのオレイン酸が遊離される上、馬血清中には牛血清程アルブミン量が多くないので、遊離オレイン酸を保護しきれずに阻害が認められると説明している。この場合、馬血清濃度を2~5%にすると、菌の増殖の阻害が見られるが、更に馬血清量を増加して10%にするとかえつて菌の発育が認められる。この事実は添加アルブミン量が増加するので遊離オレイン酸を保護した為に、菌の発育が見られると推定している。一方柳沢^{②-④}及び小野^⑤は、Tween 80 加 Sauton 培地にモルモット血清を0.1%又はそれ以下に添加しても、結核菌の発育が顕著に阻止される事を見出している。

我々は、このモルモット血清を含んだ Tween 80 加 Sauton 培地に於る結核菌発育阻止作用について検討し、モルモット血清には馬血清をしのぐ程度にリパーゼが強く、この為に結核菌の発育が阻害されると考えられる結果を得たので報告する。

実験方法

培養法その他は青柳・水野に準じた^⑥。

1) 使用菌株：教室保存の (H37Rv) 株を一週間毎に Sauton 培地10ml (1% アトラス社製 Tween 80 加) に植えつぎ、その7日振盪培養のものを約20倍稀釈し、その0.5ml を接種した。(ε 0.07 に合した) これは乾燥菌量0.22mg/ml に相当する。

2) 培養法：径17~18mm, 水平部110~115mm, 高さ約70mmのL字管を使用し、振盪培養を行った。振巾は40mmで回転数は毎分44往復とした。

3) 菌の増殖度：L字管のまま光電光度計によつて測定し、吸光度を菌増殖の濁度とした。(560^mμ)

4) リパーゼ活性度及び遊離脂肪酸の測定：Davis の法^⑦に準じた。即ち培養液5ml 全量を共栓遠心管に移し、1.5ml の純水で3回容器を洗い共栓遠心管に合した。NaH₂PO₄ を飽和になるまで投じ、エチルエーテル、石油エーテル(5:1) を5ml 加え良く振盪した後遠心3000rpm 10分を行い、鮮明に分離したエーテル層を100ml 三角コルベンに移す。エーテル、石油エーテル混液を2回め5ml, 3回め3ml をもつて同様の操作を行い、エーテル層を全部三角コルベンに合し2 methyl 2,4 pentandiol 0.5g を加えエーテルをとばした後チモールブルーを指示薬としてN/50 NaOH 液で滴定し、その消費量からオレイン酸を算出した。N/50 NaOH 1ml はオレイン酸5.638mg に相当する。

5) モルモット血清：健康モルモットから採血し、2~3頭の血清を等量混じて実験に供した。採血は使用する日又はその前日に行い、使用時まで冷蔵した。

6) オレイン酸：市販試薬オレイン酸を6~5°C で固化する部分4°C で固化しない部分を捨て去りこれを繰返し、沃度価91.3のものを使用した。これを使用して培地中の脂肪酸測定回収率は99.2%であつた。(沃度価の測定は Wijis の試薬によつた。)

7) Tween 80 : Tween 80 10%溶液を 0.4N-NaOH で30分間沸騰させて加水分解を行つた後、遊離脂肪酸を測定するとオレイン酸として24.4%含有されており、末反応の遊離オレイン酸(加水分解せず測定した遊離酸量)を差引くと23.1%の結合オレイン酸が認められた。

実験結果及び討論

1) Tween 80 濃度とモルモット血清濃度の
相関関係の検討

モルモット血清と Tween 80 が共存することによつてはじめて阻害作用が認められることから、両者の濃度組合せを変えることによつて阻害度に変化があるかどうかを検討した。

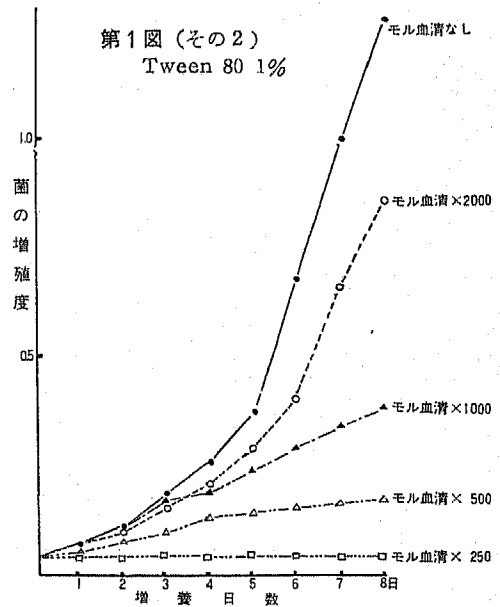
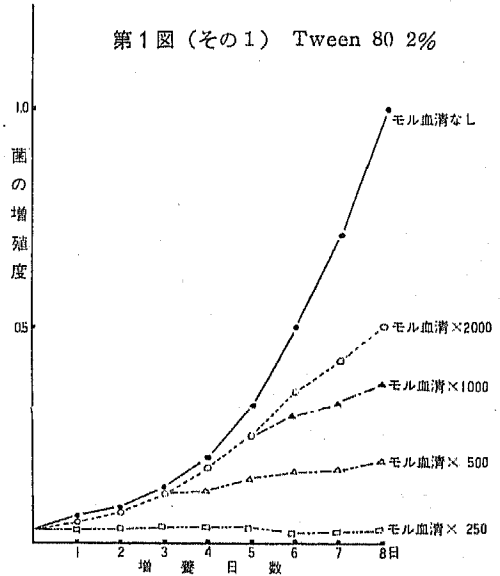
Tween 80 は2%, 1%, 0.5%, 0.25% (これ以下では菌塊になつてしまう。)とし、モルモット血清は×250, ×500, ×1000, ×2000倍稀釈と、モルモット血清を加えない場合の5段階とした。接種後8日間菌の増殖を測定し、第1図の様な結果を得た。実測値から接種前の値を差引き、Tween 80 2%, モルモット血清を添加しない場合の8日目の菌量を1.0として他をその割合で表示した。モルモット血清を加えない場合、Tween 80 が2% 添加されている場合は1% 又はそれ以下の場合より菌量が少なく、0.25%の場合より増殖速度も遅れている。本条件に於ても Aoyagi & Mizuno^⑥の結果の様に、Tween 80 は1%又はそれ以下が菌の培養に適している。後述の如く市販 Tween 80は遊離の脂肪酸(オレイン酸)を含んでいて、その阻害作用が認められると思われる。モルモット血清250倍稀釈の場合は Tween 80 の濃度の如何を問わず菌の増殖は全く認められなかつた。又、モルモット血清500倍稀釈の場合は僅かに菌の増殖が認められたが、Tween 80 の濃度の差の影響は認められなかつた。モルモット血清1000倍稀釈の場合、本実験範囲内では Tween 80 の濃度が少ない程モルモット血清の阻害作用が減少し、モルモット血清2000倍稀釈の場合はその傾向が更に顕著に現れている。

2) モルモット血清を 56°C に加熱した場合
の結核菌の増殖阻止作用に対する影響

次に、培地に添加するモルモット血清を加熱した場合の影響を検討した。

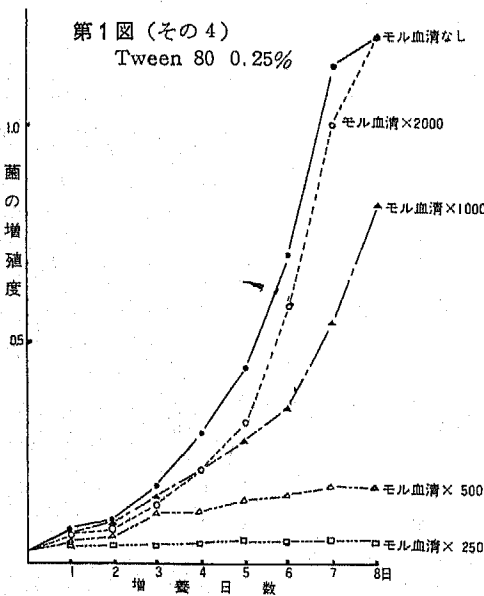
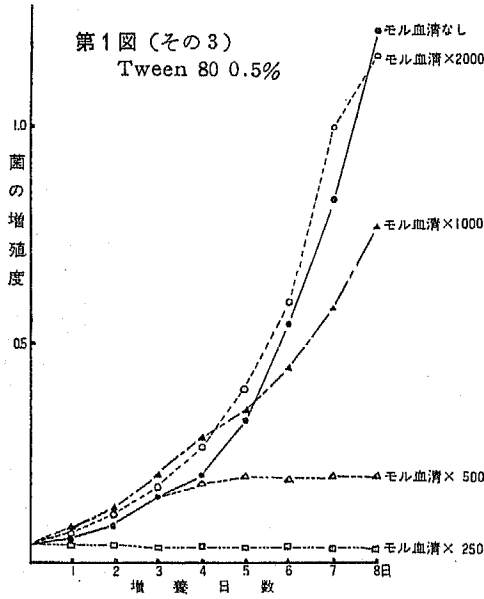
上述の如くにモルモット血清を採取し、生理食塩水で25倍に稀釈したものを 56°C の恒温水槽に入れ、10分、20分、30分後に一部を無菌的に取り出し直ちに水冷した後、1% Tween 80 加 Sauton 培地に添加した。各時間毎に血清の稀釈度は250倍、500倍及び

第1図 Tween 80 とモルモット血清の濃度を変えた場合の結核菌の増殖の度合



1000倍とした。上述の如く前培養した H37Rv を所定の稀釈を行い接種後培養し、毎日菌の増殖を測定し第2図の結果を得た。増殖の度合は第1図の実験に準じた。

血清を 56°C に加熱した場合、250倍の高段階では未だかなりの増殖阻害作用が認められるが、1000倍稀釈液になると10分、20分、30分の加熱でも阻害作用は



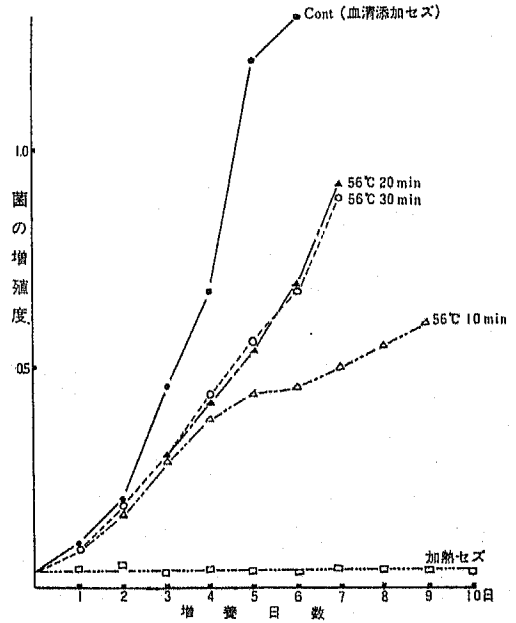
殆ど認められなかつた。これらの結果からもモルモット血清と Tween 80 が共存した場合、菌増殖阻害は 56°C 加熱により著しく影響を受ける結果を得たので、血清中のリパーゼの耐熱性を検討した。

3) モルモット血清中のリパーゼの測定

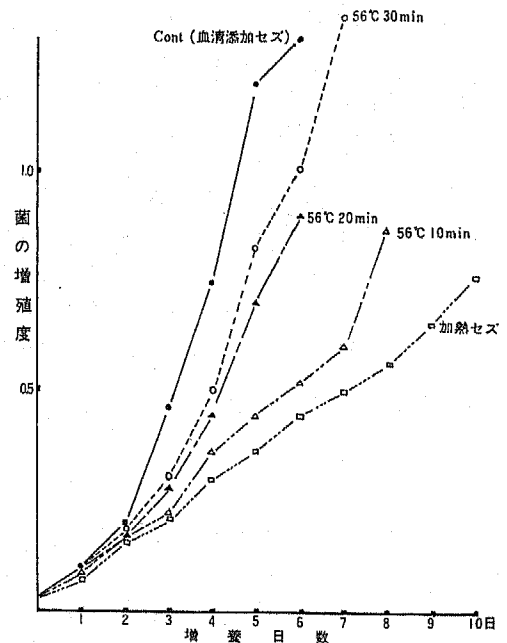
1% Tween 80 加 Sauton 培地にモルモット血清を 100 倍、200 倍、400 倍、800 倍になるように添加し、無菌的に 37°C に保存し 24 時間め、48 時間めの遊離オレイン酸量を測定した。

第2図 モルモット血清を 56°C 加熱した場合の結核菌増殖に対する影響

第2図(その1) モルモット血清 250 倍稀釈

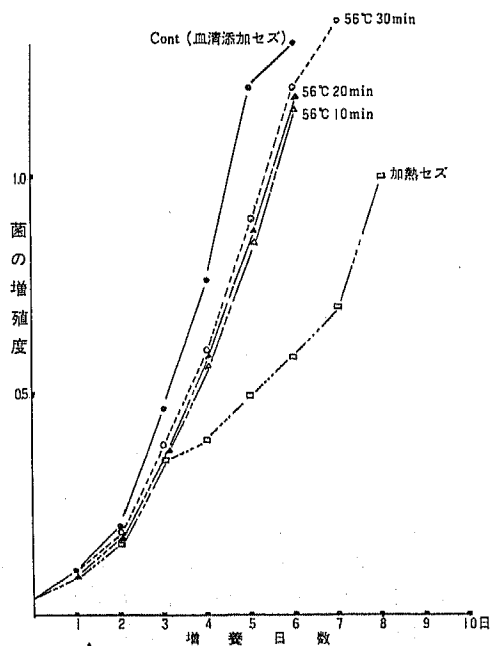


第2図(その2) モルモット血清 500 倍稀釈



第1表に示されているように、血清を添加しない培地からは僅かなオレイン酸を認めたが、血清を加えた

第2図 (その3) モルモット血清1000倍稀釈



培地からはかなりのオレイン酸が認められ、第5表のように本実験条件に於ては結核菌が増殖出来ない程度のオレイン酸量であることが認められた。

第1表に見られるように、モルモット血清は1% Tween 80 加 Sauton 培地中ではかなりの量のオレイン酸を遊離する。本実験条件で H37Rv が1% Tween 80 加 Sauton 培地での増殖は Generation time が23時間であつて、菌が2倍に増加するまでには菌の増殖を阻止するに充分な量のオレイン酸が遊離していることが認められる。

4) 各種動物血清中のリパーゼの比較

モルモット血清中のリパーゼの測定と同様に、前日採血し冷蔵しておいた牛、馬、家兎の血清を1% Tween 80 加 Sauton 培地に400倍、800倍になるように加え、無菌的に37°Cで24時間保存した後の培地中のオレイン酸量を測定した。牛、馬は1頭の血清であり、家兎は2羽の血清を等量混じて使用した。

第2表に見られる通り家兎血清中のリパーゼは一番弱く、牛血清がこれに次ぎ、馬血清はモルモット血清に匹敵する位強いことが認められた。Davis & Dubos^⑥は、馬血清が2~10%培地に添加されると結

第1表 モルモット血清中のリパーゼの測定 (遊離脂肪酸定量)

| | | 24時間目オレイン酸量 mg/ml | | 40時間目オレイン酸量 mg/ml | |
|---|--------------|-------------------|---------|-------------------|---------|
| | | 測定値 | 5の価を差引く | 測定値 | 5の価を差引く |
| 1 | モルモット血清 100倍 | 0.814 | 0.703 | 0.846 | 0.704 |
| 2 | // 200倍 | 0.744 | 0.633 | 0.748 | 0.606 |
| 3 | // 400倍 | 0.586 | 0.475 | 0.704 | 0.562 |
| 4 | // 800倍 | 0.299 | 0.188 | 0.564 | 0.422 |
| 5 | 血清添加せず | 0.111 | — | 0.142 | — |

第2表 各種動物の血清中のリパーゼの比較

| | 稀釈倍数 (Sauton 中) | 37°C 24hr後の遊離オレイン酸 mg/ml | 血清によつて遊離されたオレイン酸量 mg/ml |
|--------|-----------------|--------------------------|-------------------------|
| 牛 | 400倍 | 0.180 | 0.092 |
| | 800倍 | 0.152 | 0.064 |
| 馬 | 400倍 | 0.446 | 0.358 |
| | 800倍 | 0.300 | 0.212 |
| 家 兎 | 400倍 | 0.119 | 0.031 |
| | 800倍 | 0.106 | 0.018 |
| 血清添加せず | | 0.088 | |

核菌の増殖が阻害されるが10%以上加えた時は菌の増殖が見られる。これは血清中のアルブミンが多量に添加されてリパーゼによる遊離オレイン酸がアルブミンで保護され、かえつて菌の増殖を可能ならしめると述べている。我々はモルモット血清を10%添加しても著しい白濁が生じて菌の増殖は認められなかつた。又この場合の遊離オレイン酸も1,006mg/mlの多量で、結核菌の増殖が阻止されたことがうなづける。馬血清のアルブミンは牛血清の約 $\frac{3}{4}$ と言われ、又家兎の血清アルブミンは牛血清の約1.5倍もあると言われている。リパーゼ量とアルブミン量から考えるならば、家兎血清は Tween 80 加結核菌培養には或いは牛血清より優れた結果が得られると思われる。

5) モルモット血清を 56°C に加熱した場合の血清中のリパーゼ量の変化

モルモット血清を生理食塩水で25倍に希釈し、56°Cの恒温水槽に入れ10分、20分、30分後に取り出し、1% Tween 80 加 Sauton 培地に無菌的に添加し250倍希釈になるようにした。それを37°Cに48時間無菌的に保存する間に産生されたオレイン酸量を測定した。

第3表に見られる通り、モルモット血清中のリパーゼは56°C 30分の加熱により、その活性度は50%以下に低下することが認められた。

結核菌の増殖阻害作用も、モルモット血清を56°C 30分加熱した250倍希釈のものは血清を添加しない培

第3表 モルモット血清中のリパーゼの56°C耐熱性

| モルモット血清の加熱条件 | 遊離されたオレイン酸量 mg/ml |
|--------------|-------------------|
| 56°C 10分 | 0.322 |
| 56°C 20分 | 0.295 |
| 56°C 30分 | 0.221 |
| 加熱しない血清 | 0.522 |

第4表 モルモット血清中のリパーゼに対する非化ソーダ及アトキシルの影響

| | 24時間後の遊離オレイン酸量 mg/ml | 1. のオレイン酸量を差引く | |
|---|----------------------|----------------|------------------------------------|
| 1 | 0.142 | | Tween 80 1% 加 Sauton 培地 |
| 2 | 0.726 | 0.584 | 1) にモルモット血清200倍になる様に |
| 3 | 0.666 | 0.524 | 2) に非化ソーダ $7.1 \times 10^{-2}M$ 添加 |
| 4 | 0.219 | 0.077 | 2) にアトキシル $3 \times 10^{-2}M$ 添加 |
| 5 | 0.250 | 0.108 | 2) にアトキシル $1.5 \times 10^{-2}M$ |
| 6 | 0.406 | 0.263 | 2) にアトキシル $3 \times 10^{-3}M$ |

地での正常の増殖の約半分のカーブを示している。(第2図)

6) 非化ソーダ, アトキシル, キニンの影響

リパーゼの阻害剤として非化ソーダ, アトキシル, キニン等が考えられる。1% Tween 80 加 Sauton 培地にモルモット血清を加えた時の阻害作用に、これらリパーゼ阻害剤がどのような影響を示すか検討を行った。

モルモット血清800倍添加の場合、キニンを $10^{-9}M$, $5 \times 10^{-4}M$, $2.5 \times 10^{-4}M$, $1.25 \times 10^{-4}M$, $6.25 \times 10^{-6}M$ になるように加えたが、対照の血清を加えず、キニンを $1.25 \times 10^{-4}M$ に添加した場合で約50%の菌増殖阻害が認められ、 $5 \times 10^{-4}M$ では完全に菌増殖を阻害することを認めた。又、モルモット血清800倍希釈の場合でも菌の増殖は認められなかつたし、又、Sauton 培地中で Tween 80 からオレイン酸を遊離することを本条件では阻害しないので、キニンについては以後の検討を行わなかつた。(本実験条件ではキニンの Tween 80 加水分解阻害は $1.25 \times 10^{-3}M$ で僅かに認められ、 $2.5 \times 10^{-3}M$ で約50%阻害が認められた。)

a) 非化ソーダの影響

非化ソーダは $7.1 \times 10^{-3}M$ の濃度までは菌の増殖を阻害することは認められなかつた。しかしモルモット血清による菌の増殖阻害作用を抑制することは、この濃度では僅かしか認められなかつた。又リパーゼ阻害作用も第4表に見られる如く僅かしか認められなかつた。

Tween 80 加 1% Sauton 培地にモルモット血清を200倍になるように添加し、それに非化ソーダ $7.1 \times 10^{-2}M$ になるように添加し、菌を接種せず無菌的に37°Cに24時間保存した後、オレイン酸量を測定した。非化ソーダは $7.1 \times 10^{-2}M$ 以下で全く効果が無いことを予備試験で認めたので、 $7.1 \times 10^{-2}M$ のみについて検討した。

b) アトキシルの影響

Tween 80 1% 加 Sauton 培地にモルモット血清を200倍になるように加え、更にアトキシルを $3 \times 10^{-3}M$, $1.5 \times 10^{-2}M$, $3 \times 10^{-2}M$ になるように添加したものに菌を接種せず、無菌的に $37^{\circ}C$ に保存した。24時間後の遊離オレイン酸は第4表に見られる如くアトキシルの添加により著しく減少し、モルモット血清中のリパーゼの阻害を示した。又、1% Tween 80 加 Sauton 培地にモルモット血清400倍、800倍、1000倍になるように添加したものと、血清を加えないものと4段階とし、アトキシルは $6 \times 10^{-2}M$, $3 \times 10^{-2}M$, $1.5 \times 10^{-2}M$, $7.5 \times 10^{-3}M$, $3 \times 10^{-3}M$, $1.5 \times 10^{-3}M$, 無添加の7段階とし、夫々の組合せのものに1)の実験と同じ条件で H37Rv を接種し菌の増殖を測定した。11日間測定したので最終増殖度とその時の遊離オレイン酸量を第5表に示す。

第5表に見られる通り、本実験条件ではアトキシルも結核菌自体の増殖を阻害することを認めた。特に $6 \times 10^{-2}M$ では、かなりの阻害が認められた。しかし一方アトキシルはモルモット血清中のリパーゼが Tween 80 を加水分解しオレイン酸を遊離する作用も抑制することが認められ、モルモット血清が1600倍でアトキシルが $3 \times 10^{-2}M$ 添加された場合は、モルモット血清の阻害作用は殆ど認められなかつた。又、培養後高圧滅菌を行いオレイン酸を定量すると、アトキシルが $6 \times 10^{-2}M$ の高濃度の場合には Tween 80 の加水分解が阻害され遊離オレイン酸の産生も僅かであるが結核菌の増殖出来ないのは、アトキシルの菌増殖阻害によるものと思われる。又一方 $3 \times 10^{-3}M$ 又は $1.5 \times 10^{-3}M$ のアトキシルでは、モルモット血清中のリパーゼを阻害することが充分でなく、多量のオレイン酸の遊離が認められた。本実験条件では $3 \times 10^{-2}M$ アトキシル添加によつて菌の増殖抑制も著しくはなく、又血清中のリパーゼは阻害される為にかなりの量の菌増殖が認められた。又アトキシルと弗化ソーダの併用を試みたが、低濃度に於ても顕著な効果は得られなかつた。

Tween 80 加 Sauton 培地にモルモット血清を0.1%又はそれ以下に添加しても、結核菌が増殖阻害を受けることは、以上の実験からモルモット血清中のリパーゼが Tween 80 を加水分解し遊離されたオレイン酸が菌の増殖を阻害すると思われる。即ち $56^{\circ}C$ にモルモット血清を加熱した場合、菌増殖阻害作用が抑制され、又オレイン酸の遊離も減少し、その傾向が良く一致している。又アトキシル等リパーゼ阻害剤の影響も、菌増殖阻害作用とオレイン酸遊離阻害に対して

第5表 Tween 80 とモルモット血清の結核菌阻害に対するアトキシルの影響

| アトキシル濃度 | 血清濃度 (稀釈倍数) | 菌の増殖度 11日目 | 遊離 オレイン酸量 mg/ml |
|-----------------------|----------------|---------------|-----------------------|
| $6 \times 10^{-2}M$ | 400倍 | 増菌せず | 0.211 |
| | 800倍 | " | 0.222 |
| | 1,600倍 | " | 0.221 |
| | 0 | 0.24 | 0.160 |
| $3 \times 10^{-2}M$ | 400倍 | 増菌せず | 0.229 |
| | 800倍 | 0.19 | 0.222 |
| | 1,600倍 | 0.80 | 0.160 |
| | 0 | 0.82 | 0.162 |
| $1.5 \times 10^{-2}M$ | 400倍 | 増菌せず | 0.247 |
| | 800倍 | 0.12 | 0.234 |
| | 1,600倍 | 0.40 | 0.202 |
| | 0 | 0.82 | 0.178 |
| $7.5 \times 10^{-3}M$ | 400倍 | 増菌せず | 0.672 |
| | 800倍 | " | 0.420 |
| | 1,600倍 | 0.17 | 0.266 |
| | 0 | 0.86 | 0.192 |
| $3 \times 10^{-3}M$ | 400倍 | 増菌せず | 0.736 |
| | 800倍 | " | 0.616 |
| | 1,600倍 | " | 0.408 |
| | 0 | 1.2 | 0.224 |
| $1.5 \times 10^{-3}M$ | 400倍 | 増菌せず | 0.754 |
| | 800倍 | " | 0.616 |
| | 1,600倍 | " | 0.428 |
| | 0 | 1.1 | 0.236 |
| 0 | 400倍 | 増菌せず | 0.928 |
| | 800倍 | " | 0.828 |
| | 1,600倍 | " | 0.744 |
| | 0 | 1.3 | 0.226 |

一致した効果を示していることが認められた。

本実験条件では、モルモット血清の添加により、Tween 80 からのオレイン酸の遊離は、かなり緩慢であるが、結核菌の Generation time も本実験条件では約23時間を要するので、その間に菌の増殖を阻止するに充分なオレイン酸が生産されるものと思われる。

モルモット血清は馬血清をしのぐ Tween 80 加水分解能を有するので、0.1% 又はそれ以下の濃度で結核菌の増殖を阻害するに足るオレイン酸を Tween 80 から生産することが出来ると思われる。又、10% と言う高濃度にモルモット血清を加えても Davis &

Dubos の馬血清の場合のように菌の増殖は認められず、やはり阻害が認められた。又オレイン酸も多量に検出された。

モルモット血清は馬血清に比して多量のアルブミンを含んでいるが、Davis & Dubos の言う多量の馬血清を使用した時に認められた遊離オレイン酸の保護は見られなかつた。

又、第1図に見られる様に、Tween 80 の濃度が高い程モルモット血清の菌増殖阻害作用が強いことが認められるが、特別な相関関係が存在する為でなく、市販 Tween 80 にはかなりの遊離オレイン酸が含まれているので、Tween 80 濃度の高い程培地中のオレイン酸量が多いことと、2~0.25%位の間では基質濃度の高いほど生産物である遊離オレイン酸生産量が大であることも想像される。

要 約

1) ポリオキシエチレンソルビタンモノオレイト (Tween 80) 加 Sauton 培地にモルモット血清を添加した場合、Tween 80 とモルモット血清の濃度を変えた時の結核菌の発育阻害の程度を検討した。

2) モルモット血清を 56°C に10, 20, 30分加熱した場合の菌増殖阻害作用に対する影響を検討し、20分又は30分加熱により阻害作用が約半分に減少することを認めた。又この結果は、加熱によるリパーゼの破壊程度を良く一致することを認めた。

3) Tween 80 にモルモット血清を種々の濃度に添加し、遊離するオレイン酸量が血清濃度の高い程多いことを認めた。

4) 同じ条件で牛、馬、家兎血清のリパーゼ量をモルモットのそれと比較し、モルモットが著しく馬、牛がこれに次ぎ、家兎血清は Tween 80 からオレイン酸を遊離するリパーゼが非常に弱いことを認めた。

5) リパーゼの阻害剤として知られているアトキシル、非化ソーダ、キニンの効果を検討した。Tween 80 加 Sauton 培地にモルモット血清を添加したものに上記薬剤を入れると、アトキシルの場合はいく分菌の発育が見られるし、又オレイン酸の遊離も阻害されることが認められた。非化ソーダは、それ自身が菌の発育を阻害しない濃度範囲では、僅かにリパーゼを阻害するにすぎないし、又モルモット血清の菌発育阻害作用も僅かに抑制されるにすぎないことを認めた。

文 献

- ①Davis, B. D. & Dubos, R. J.: J. Bact 55: 11, 1948 ②柳沢雄次: 信州医誌, 8: 2354, 1959
 ③柳沢雄次: 信州医誌 9: 281, 1960 ④柳沢雄次: 信州医誌 9: 295, 1960 ⑤小野 昇: 信州医誌 9: 423 1660 ⑥小野 昇: 信州医誌, 9: 430. 1960 ⑦Archiball, R. M.: J. Biol. Chem, 165: 443, 1946 ⑧Aoyagi, T. & Mizuno D: J. Gen. Microbiol. 20: 173, 1959