

Tween80 加培地に対する血清の影響に関する研究

第2報 抗酸性菌並びに大腸菌に対するモルモット血清の影響

昭和35年1月30日受付

信州大学医学部細菌学教室(指導:田崎忠勝教授)

小野昇

Studies on the Influence of Serum Addition on the Medium
Containing Tween 80Report 2. Influence of Guinea-Pig Serum Addition on the
Culture of Acid-fast Bacteria and E. Coli,

Noboru Ono

Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, Shinshu University.
(Director: Prof. T. Tazaki)

緒言

結核免疫における液性因子の役割については今日不
定の見方が強いのであるが、血中抗体の防禦力を認め
た報告も多く、佐藤^①、伊藤^②、緒方^③、冲中^④、本
間^⑤等は免疫血清の抗菌力を認めている。

又正常動物血清についても Boissevain^⑥は、稀釈
されない血清は殺菌作用を示すが合成培地において稀
釈された人、馬、モルモット、家兎、羊の血清は結核
菌の増殖を促進すると述べ、三浦^⑦は、S.C.M.法を
用いた実験で、正常モルモット血清には結核菌増殖阻
止作用が存在すると報告している。

教室の柳沢^{⑧⑨}も、1% Tw80 加 Sauton 無蛋白
培地を用い、正常モルモット血清の示す結核菌増殖抑
制作用について、血清1000倍稀釈まで結核菌の増殖を
抑制し、Tw80 を添加しない血清単独添加の場合には
50倍稀釈まで抑制したにすぎなかつたためこれを Tw
80 と血清の協同作用による増殖抑制作用と報告を行つ
た。私も前報で此の増殖抑制作用を人型結核菌 H₂株、
牛型結核菌 Ravenel 株患者分離株5株を用いて実
験、確認し、更に Sauton 培地 Dubos 培地の何れ
の培地においても抑制作用が認められるが、この結核
菌増殖抑制作用は菌量の増加とともに減弱し、更に家
兎並びにモルモットの免疫前血清と免疫血清の示す抑
制作用には差が認められない事を報告した。

私は以上の Tw80 との協同作用による結核菌増殖
抑制作用について種々の抗酸性菌及び大腸菌を用いて
実験を行い、菌の種類、血清の種類、菌量の変化、試
験培地の種類等について考察を加え、興味ある知見を
得たので報告する。

実験材料並びに実験方法

- 1) 使用菌株、教室保存の大腸菌 B₂株 国立予防
衛生研究所より分与された、M. smegmatis 4172-101
株、M. phlei、鳥型結核菌 Kirchbag 株を用い、大
腸菌 B₂株のみは普通寒天斜面培地に、他は小川培地
に継代して使用した。
- 2) 使用血清、実験^①において非働性血清を用いた
以外は前報と同じ。
- 3) 試験管、抗酸性菌の振盪培養には前報同様の L
型試験管を使用した。大腸菌 B₂株については L 型
試験管と同様に特別に製作した中試験管を併用し、前
報と同様に処理して使用した。
- 4) 使用培地、Sauton 培地、Watson 培地、プイ
ヨン培地(肉エキスはミクニ印を使用した)。
- 5) 振盪培養器、L 型試験管の使用に際しては前報
と同様に行つたが中試験管の振盪には自家製の 37°C
恒温水槽振盪培養器を用い、1分間100往復の前後運
動を行うようにした。
- 6) 振盪培養法、前報同様に行つたが、菌の接種は
別に実験成績の項で示す。
- 7) 増殖度の測定、前報と同じ。

実験成績

I) 鳥型菌 Kirchbag 株、M. phlei、M. smegmatis
4172-101 株に対する増殖抑制作用。

前報に於て人型、牛型結核菌を使用して柳沢^{⑧⑨}が
報告した増殖抑制作用が再現し得ることを報告した
が、更に他の抗酸性菌においてもこの抑制作用が認め
られるか否か考察してみた。

実験は何れの菌も小川培地から 5mg を 1% Tw80
加 Sauton 培地で 24 時間振盪し均等な増殖を行はせ

た後その 10^{-1} 稀釈菌液 1ml をモルモット血清 10, 100, 1000 倍稀釈添加した試験培地に接種した。実験成績は図 I, (①②③) のように鳥型菌 Kirchbag 株

図 I の① 鳥型菌 Kirchbag 株に対する血清の影響

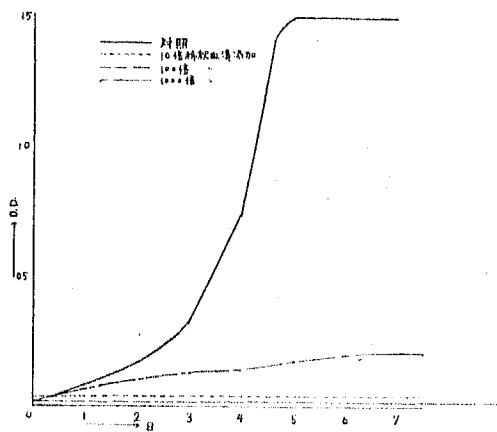
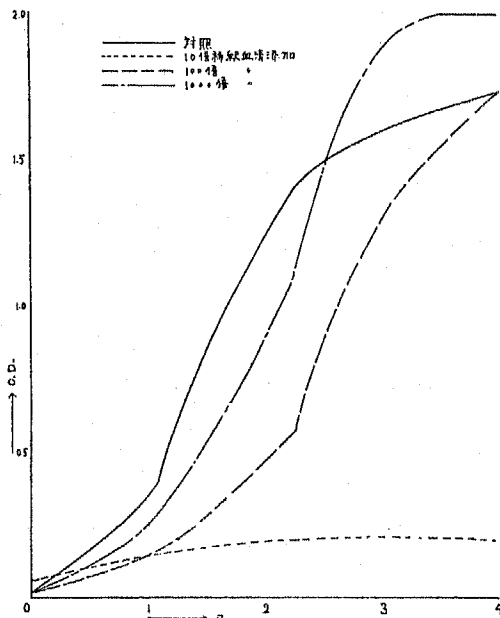
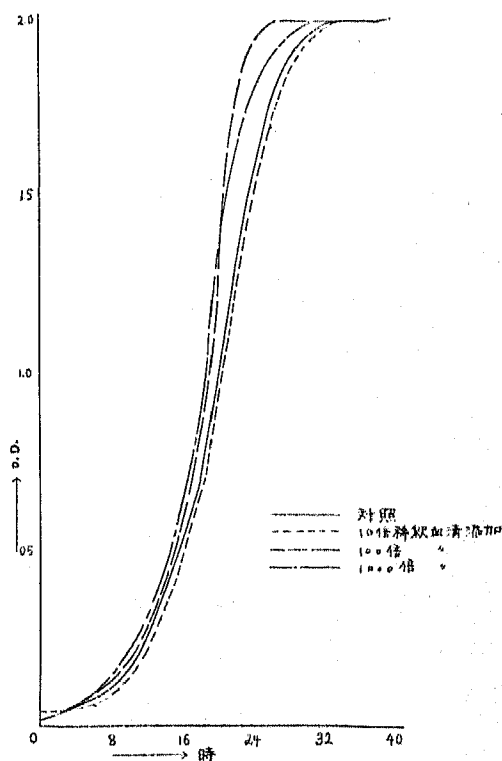


図 I の② *M. phlei* に対する血清の影響



は 10 倍, 100 倍稀釈血清では O.D. の増加が認められず, 1000 倍稀釈血清では軽度ながら O.D. の増加が認められその増殖抑制作用は減弱していた。*M. phlei* は 10 倍稀釈血清では 2 日間軽度の O.D. 増加をみたが 2 日目以降は O.D. の増加はなく増殖を抑制していた。100 倍, 1000 倍稀釈血清では増殖抑制作用はみら

図 I の③ *M. smegmatis* 4172-101 株に対する血清の影響



れなかつた。*M. smegmatis*, 4172-101 株は前 2 株にくらべて 10, 100, 1000 倍稀釈血清ともに対照とほぼ同様の O.D. 増加がみられ増殖抑制作用は認められなかつた。以上の実験成績から増殖抑制作用は鳥型菌 Kirchbag 株には認められるが, *M. phlei* では血清 100 倍稀釈で若干抑制したが 1000 倍稀釈では認められず, *M. smegmatis*, 4172-101 株では全く抑制しなかつた。

II) 大腸菌 *B_a* 株に対する増殖抑制作用。

実験 I) から同じ抗酸性菌でも *M. smegmatis*, 4172-101 株ではもはや増殖抑制作用が認められず, その理由を追求するために大腸菌 *B_a* 株を用いて菌量, 培地等を変えて考察を行った。

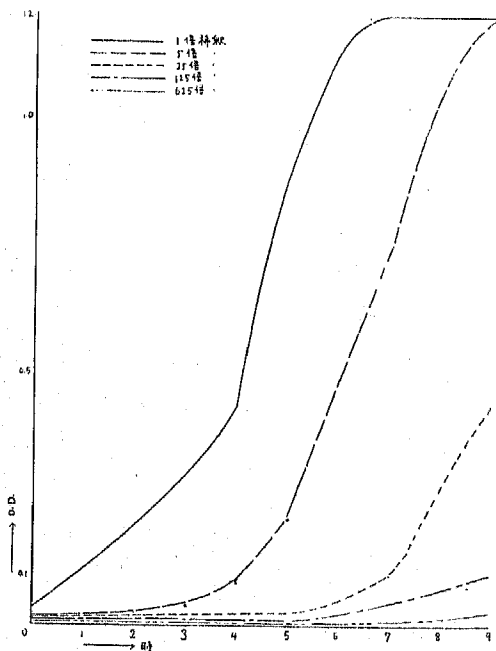
① 接種菌量による O.D. の変化, 並びに生菌数の消長。

普通寒天斜面培地 12 時間培養の菌で 0.2mg/1ml の菌液を作製し, その 1, 5, 25, 125, 625 倍の稀釈液各 1ml を 1% Tw80 加 Watson 培地に接種, 37°C 恒温水槽中で振盪し, O.D. 測定とともに 0, 2, 5, 7, 9 時に生菌数を検した。実験成績は 図 II, 表 I, に示

表I. 接種菌量に対する生菌数の消長

培養時間		0時間	2時間	5時間	7時間	9時間
接種菌液稀釈倍数	1倍	262×10^5	86×19^u	101×10^7	143×10^7	276×10^7
	5倍	40×10^5	150×10^5	181×10^6	86×10^7	20×10^8
	25倍	130×10^4	434×19^4	147×10^5	103×10^6	75×10^7
	125倍	180×10^3	52×10^4	272×10^4	154×10^5	1012×10^5
	625倍	40×10^3	67×10^3	381×10^3	108×10^4	115×10^5

図II. 接種菌量と O.D. 変化の関係 (大腸菌 B₃ 株)

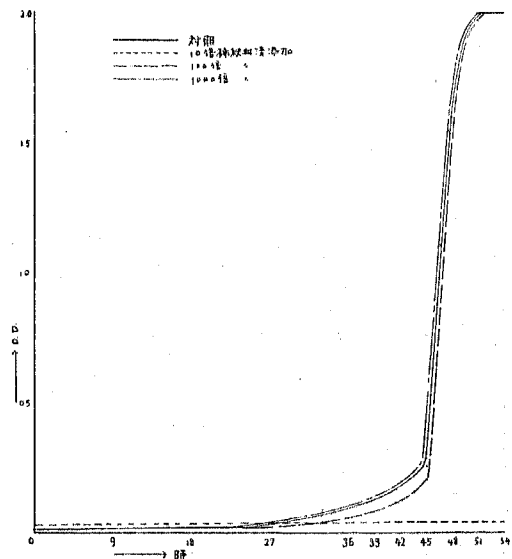


されるように25倍稀釈以下の接種では著明な調整期の延長をきたしたが尚増殖を認め、又生菌数の消長も O.D. の増加とほぼ一致した。

② 最少菌量に対する増殖抑制作用。

これ迄実験に使用した抗酸性菌のうち M. Smegmaris, 4172-101 株は、人、牛、鳥型結核菌に示された増殖抑制作用がみられなかつたが、M. smegmatis, 4172-101 株はこれ等の菌に比較して Generation Time が短いため増殖速度が速く、又前報に報告したように人型結核菌の場合接種菌量の増加に伴つて増殖抑制作用は減弱するので Watson 培地を用いて実験①の最少菌量を接種しL型試験管で振盪培養を行った。実験成績は図IIIに示されるように血清10倍稀釈添加の場合完全に増殖を抑制、100、1000倍稀釈では対照と

図III. 大腸菌 B₃ 株の最少菌量に対する血清の影響 (Watson 培地)



同様な O.D. 増加を示し増殖を抑制しなかつた。

③ 1% Tw80 加 Watson 培地における静置培養。

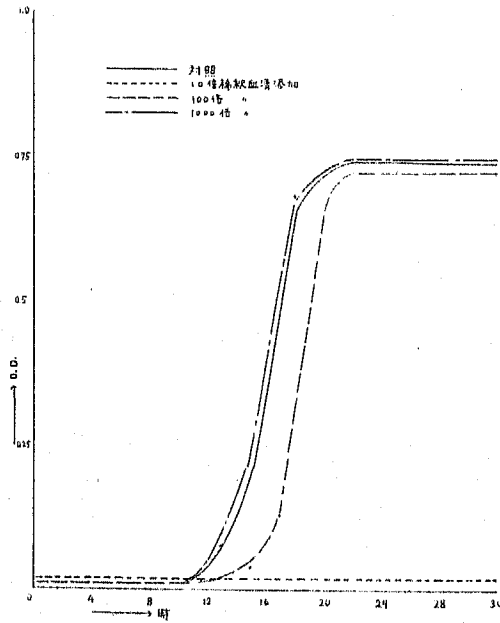
培養条件の変化による増殖抑制作用を検討するため 1% Tw80 加 Watson 培地に 125 倍稀釈菌液 1ml を接種して静置培養を行った。実験成績は図IVに示されるように実験②と同様の結果であり振盪培養と静置培養とは抑制作用に変化はみられなかつた。

④ 血清を 56°C, 30 分加熱して、非働性とした場合の抑制作用の変化。

56°C, 30 分加熱した非働性血清、10 倍稀釈を 1% Tw80 加 Watson 培地に添加し 0.2mg/1ml の 10^{-1} 稀釈菌液 1ml を接種、恒温水槽中で振盪培養を行った。働性血清は完全に増殖を抑制したが、非働性血清は対照同様に増殖を抑制しなかつた。

⑤ 1% Tw80 加 Sauton 培地を使用した場合の

図Ⅳ 静置培養の場合の血清の影響 (Watson培地)



増殖抑制作用。

増殖抑制作用と Sauton 培地との間に関係があるか否かを追求するため結核培地である Sauton 培地を使用して大腸菌 B₈ 株の振盪培養を行った。菌の接種には普通寒天斜面培地 12 時間培養の菌 0.5mg/1ml を用いた。実験成績からは、血清 10 倍稀釈は、1%

Tw80 加 Watson 培地では振盪、静置培養ともに、全く増殖を抑制していたのに反し 1% Tw80 加 Sauton 培地では対照と同様で抑制作用は全く認められなかった。

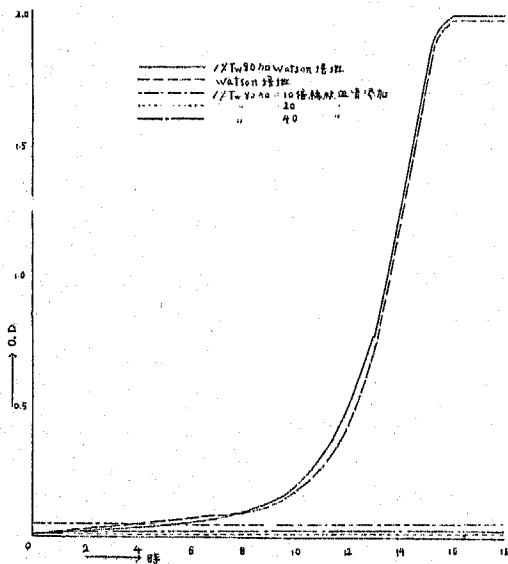
⑥ 最少菌量に対する 1% Tw80 加 Sauton 培地における増殖抑制作用

実験⑥においては、かなり大量の菌を使用したため実験①による 125 倍稀釈 1ml を用いて前と同様の実験を行った。実験成績では対照の 1% Tw80 のみの場合は O.D. 増加は僅少であり、血清添加した場合は増殖抑制作用は全くみられず逆に血清の添加濃度に応じて増殖を促進するようには思はれた。

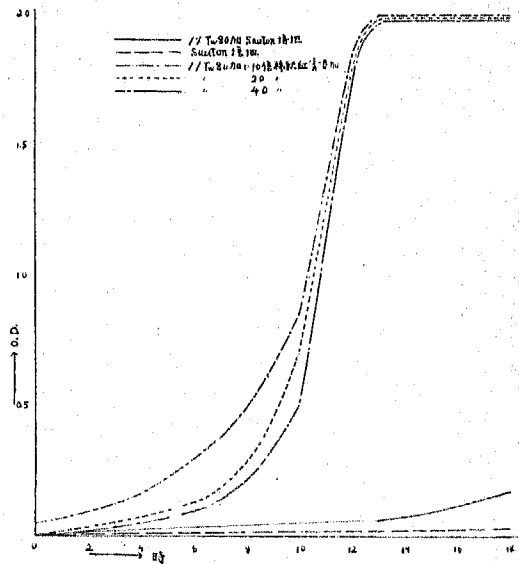
実験Ⅲ) 1% Tw80 加ブイヨン, Sauton, Watson 培地において大腸菌 B₈ 株の S 型並びに R 型に対する増殖抑制作用。

私は実験Ⅱ) において 1% Tw80 加 Watson 培地と Sauton 培地においてはモルモット血清の大腸菌 B₈ 株に対する増殖抑制作用について正反対の成績を得たが、従来培地の種類によつて血清の増殖抑制作用が全く消失することは報告がない。更に Thjøtta and Waaler⁽¹⁰⁾ は赤痢菌に対する正常モルモット側性血清の示す増殖抑制作用について R 型菌は S 型菌と比較して敏感な感性を示すことを報告している。私はこれ等の点を追求するため大腸菌 B₈ 株の S 型並びに R 型を用い、1% Tw80 加並びに非添加ブイヨン, Sauton, Watson 培地で 10, 20, 40 倍稀釈血清の増殖抑制作用を比較検討した。接種菌量は実験①の 125 倍稀釈

図Ⅴの① Watson 培地での血清の影響



図Ⅴの② Sauton 培地での血清の影響



1mlを用いた。実験の結果S型、R型については、R型は80倍稀釈血清でも抑制せずその増殖抑制作用に差は認められなかつた。又 Tw80 非添加の場合 Sauton, Watson 培地ともに著明な菌の凝集が認められ O.D. の測定は困難であつた。ブイヨン培地においては Tw80 の有無に関係なく 10, 20 倍稀釈血清でも増殖抑制作用は示さなかつた。1% Tw80 加 Sauton, 並びに Watson 培地での 10, 20, 40 倍稀釈血清の抑制作用は図 V (①②), 表 II に示されるように Sauton 培地では 10, 20, 40 倍稀釈血清はどれも抑制作用は示さず、Watson 培地では 10, 20, 40 倍稀釈血清は全く増殖を抑制していた。

表 II. Watson, 並びに Sauton 培地での生菌数消長の比較。

培地	培養間隔	0時間	14時間	18時間
1% Tw80 加 Watson 培地 (20倍稀釈血清添加)		2×10^5		13×10^7
1% Tw80 加 Watson 培地 (血清非添加)		2×10^5	192×10^7	
1% Tw80 加 Sauton 培地 (血清10倍稀釈添加)		2×10^5	302×10^7	

総括並びに考按

結核菌の培養を行うに当り、Dubos^① はその合成培地において、人、牛血清並びにアルブミンを10%に培地に加えて使用しているがその理由として、Tw80の解毒、微量接種結核菌の早期発育を促進すると述べ、このように血清並びに血清アルブミンに、結核菌増殖促進作用の存することは Schaefer^②等、Sattler and Youmans^③、により認められている。

一方、結核に対する防禦力として、液性因子の役割については、今日否定的な見方が強いのであるが、古く Lurie^④が免疫動物の体内では、正常動物に比し明らかに菌の増殖が阻止されることを報告して以来、数多くの報告があり、辻等^⑤は伊藤の考案した Chamber^⑥法を用いての実験で、正常モルモット体液中で人、牛型結核菌は良く発育するが M. smegmatis は増殖を阻止されると報告し、これを結核菌に対する自然抵抗力と関連づけている。又宝来^⑦、三浦^⑧も正常モルモット血清内には、結核菌増殖阻止作用があると報告している。教室の柳沢^⑨は Tw80 加 Sauton 無蛋白培地を用いて、健康モルモット血清の示す結核菌増殖抑制作用を研究、Tw80 と血清はその協同作用により血清 1000 倍稀釈迄結核菌の増殖を抑制し、この抑制作用は、高分子分劃中に含まれていることを報

告し、私も前報で此の抑制作用を人型結核菌 H₂ 株、牛型結核菌 Ravenel 株、患者分離株を用いて確認し、更にこれは Sauton 培地、Dubo 培地何れの培地においても、認められるが菌量の増加とともに、減弱し、家兎並びにモルモットの免疫血清の示す増殖抑制作用は、赤血球凝集反応の上昇があるにもかかわらず、免疫前のそれと比較して、有意の差が認められないことを報告した。

私は本報において更に、鳥型菌 Kirchbag 株、M. Phlei, M. Smegmatis, 4172-101 株及び大腸菌 B₉ 株、を使用して以上の増殖抑制作用を検討し鳥型菌 Kirchbag 株においては、人、牛型結核菌同様に抑制作用を認めたが M. Phlei では 10 倍稀釈血清にのみ抑制作用が認められ、M. Smegmatis, 4172-101 株においては 10 倍稀釈血清添加の場合にも対照と同様の O.D. 増加を示し、増殖抑制作用は全く認められなかつた。

結核菌の毒力を規定する因子として Bloch^⑩ の Cord factor は良く知られているが、Dubos and Middlebrook^⑪ は結核菌の強毒株と無毒株とが Neutral Red を結合する能力において差があり、これは Cord 形成とよく平行することを報告し「中性紅テスト」として知られている。又 Wilson et al^⑫ は人型無毒株が強毒、弱毒株又は鳥型菌よりも高い還元電位を示すことを基礎として、4種の色素を菌液と合して、その脱色により毒力を予知せんとする報告をなし「酸化還元色素テスト」として、知られている。更に Holmgren and Youmans^⑬ は種々の血清 Fraction を合成培地に加えて結核菌発育速度に及ぼす影響を検討し、プロアントロロンピンが強毒株のそれを著明に促進することから強毒、無毒株の間には何らかの酵素系の差があることを示唆している。辻^⑭等は菌の毒力は生体内の増殖の度合と平行すると考え、伊藤の Chamber 法^⑮によつて毒力のある菌は動物の体液中でよく発育し、これに反し非病原性の M. Smegmatis は増殖することが出来ず、又 M. Smegmatis が非病原性であるのは動物体液中の高分子物質（恐らくは蛋白）の発育阻止作用によると報告しているが、私の実験においても M. Smegmatis が 1% Tw80 加 Sauton 培地において 10 倍稀釈血清でもよく増殖し M. Phlei は抑制作用が著明に減弱して、他の結核菌と異つた反応を示したことは、両者の作用機序は全く異なるものと考えられるが、これ等の結果は興味あることであり、今後検討すべきものと考えられる。古く Buchner^⑯ は血清中に殺菌作用の存することを知り Alexin と命名しこの作用は血清 55°C, 30分加熱により消失することを報告したが、その後の研究によ

り Buchner が Alexin と仮定したものは補体であると推論され Buchner²²⁾ が Alexin と称したものは正常抗体と補体を総括したものに与えられた名称であると考えられるに至り、かゝる正常血清中に含まれる正常抗体は普通 normal bactericidin 或は normal bacteriolysin と呼ばれている。

更に近年 Pillemer²³⁾等は補体及び Mg⁺⁺ との協力作用によつて殺菌、ウイルス中和、赤血球溶解作用を示す新しい血清蛋白を純粋に分離し Properdin と命名したが此の Properdin と normal bactericidin の異同については未だ確たる報告はない。此の normal bactericidin について Mackie and Finkelstein²⁴⁾はグラム陰性菌に作用するのは正常抗体と補体よりなる易熱性の殺菌系であり、グラム陽性菌に作用するのは耐熱性の殺菌系であるとしている。本邦においても此の normal bactericidin に関して岡部²⁵⁾、林²⁶⁾、新井²⁷⁾、村上²⁸⁾等数多くの報告がなされている。

私の大腸菌 B₃ 株を用いての実験では 1% Tw80 加 Watson 培地を使用した場合、S 型、R 型とも 40 倍稀釈まで増殖を抑制し血清単独添加では菌は増殖を示したが凝集のため O.D. 測定は困難であつた。又、この抑制作用は血清を 56°C、30 分加熱して非活性とした場合消失した。一方 Sauton 培地を使用した場合は培地のみ、Tw80 のみ添加のときは増殖は不良にもかゝらず血清添加したときには著しい、増殖促進作用を示した。この作用機序に関しては、実験例数が少いため未だ不明であるが、しかしこの増殖抑制作用が培地の組成により影響されることは興味深いことである。従つてこれ迄論議されてきた正常血清中の菌増殖抑制物質に関しても化学療法剤のように培地が影響する場合もあるのではないかと云う疑問が生じた。

結 論

① Tw80 と血清の協同作用による結核菌増殖抑制作用は、人型菌 H₂ 株、牛型菌 Ravenel 株においても再現することが出来た。

② この増殖抑制作用は鳥型菌 Kirchbag 株では、人型菌 H₂ 株、牛型菌 Ravenel 株同様その作用を認めたが M. Phlei においては軽度で M. Smegmatis

4172-101 株においては認めることが出来なかつた。

③ 大腸菌 B₃ 株に対する増殖抑制作用は Watson 培地において認められたが Sauton 培地ではかえつて増殖促進作用を示した。しかしこの場合の作用機序については不明である。

稿を終るに当り終始御指導と御校閲を賜つた恩師田崎忠勝教授に深甚なる謝意を表するとともに種々御協力を戴いた細菌学教室の各位並びに試験菌株を分与された国立予防衛生研究所室橋部長に衷心より感謝の意を表します。

文 献

- ①佐藤理太郎、: 実験医学雑誌, 10; 871, 大15 ③伊藤次郎、: 結核, 8; 291, 昭5 ④緒方準一、: 結核, 10; 117, 昭7 ⑤沖中重雄、: 結核, 27; 554, 昭27 ⑥本間日臣、: 結核, 26; 117, 昭26 ⑦Boissevain, C. H., : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 44; 110, 1940 ⑧三浦博、: 大阪医誌, 7; 31, 昭31 ⑨柳沢雄次、: 信州医誌, 8; 2354, 昭34 ⑩柳沢雄次、: 信州医誌, 発表予定 ⑪Thjøtta, T., and Waaler, E., : J. Bact., 24; 301, 1932 ⑫Dubos, R. J., : Am. Rev. Tuberc., 63; 119, 1951 ⑬Schaefer, W. B. et al., : J. Bact., 58; 549, 1949 ⑭Sattler, T. H., and Youmans, G. P., : J. Bact., 56, 235, 1948 ⑮Lurie, M. B., : J. Exp. Med., 69; 555, 1939 ⑯辻周介, 他、: 結核研究の進歩, 8; 215, 昭29 ⑰辻周介, 伊藤薫、: 日本臨床結核, 13; 707, 昭29 ⑱宝来善次、: 結核, 17; 621, 昭14 ⑲Bloch, H., : J. Exp. Med, 91; 197, 1950 ⑳Dubos, R. J., and Middlebrook, G., : Am. Rev. Tuberc., 58; 698, 1948 ㉑Wilson, F. J., Kalish, C., and Fish, C. H., : Am. Rev. Tuberc., 65; 187, 1952 ㉒Holmgren, N. B., and Youmans, G. P., : Am. Rev. Tuberc., 66; 416, 1952 ㉓Buchner, H., : Zbl. Bact., Orig. I., 5; 817, 1889 ㉔Pillemer, L., : Science, 120; 279, 1954 ㉕Mackie, T. J., and Finkelstein, M. H., : J. Hyg., 32; 1, 1932 ㉖岡部巖夫、: 日大医誌, 16; 672, 昭32 ㉗林俊吉、: 日大医誌, 12; 112, 昭28 ㉘新井正男、: 日大医誌, 13; 65, 昭29 ㉙村上即、: 日大医誌, 15; 8, 昭31