

Tween-80 加結核菌培地に対する血清の影響に関する研究

第 2 報 各種動物血清の影響について

昭和36年 1月 8日 受付

信州大学医学部細菌学教室 (指導: 田崎忠勝教授)
国立上田療養所 (所長: 伊藤富久衛博士)

柳 沢 雄 次

Studies on the Influence of Serum on the Tubercle Bacillus Medium Containing Tween-80

Report II Influence of Several Animal Sera

Yūji Yanagisawa

Department of Bacteriology, Faculty of Medicine Shinshu University
(Director: Prof. T. Tazaki)
Ueda National Sanatorium
(Chief. Dr. F. Itō)

緒 言

私は、第一報^①において、Miller^②及び水野^{③④⑤}と同様に、振盪培養法を検討、結核菌の発育は Logarithmic であり、生菌数と濁度が一致したことを明らかにした。また、Sauton の無蛋白培地に Tween-80 (以下 Tw80) を添加し、モルモット血清の結核菌に対する影響について実験を行なったところ、Tw80 は 1% では、結核菌に障害を与えなかつた。しかるに血清単独の場合は 50 倍まで、血清に Tw80 を加えた場合、血清 10, 100, 1000 倍稀釈まで結核菌の増殖を抑制した。即ち、モルモット血清と Tw80 との協同作用について報告した。本報では、更にこれらのことを明瞭にするため、血清の種類、菌の種類を変え、更に、血清の透析及び超遠心法等によつて、結核菌の増殖抑制作用に関する実験を行ない、いささかの知見を得たので報告する。

実験材料方法

1) 実験材料: 牛, 馬, 鶏, 家兎, 山羊, モルモット血清を用いた。卵白に関しては卵白中の蛋白質 (アルブミン) は血清の 2 倍量含有しているので、添加は、血清の 2 分の 1 にした。

2) 使用菌株: 人型結核菌 H_{37Rv}, H₂₇, 青山 B 及び BCG 株, ストレプトマイシン, パラアミノサルチル酸, イソニコチン酸ヒドラジド各 10r/cc 耐性株 (北里製)

3) 実験方法

a) 培養方法は第一報^①と全く同様に行なつた。

b) 超遠心法: 日立製超遠心器を使用, 40000 RPM 5 時間行なつた。

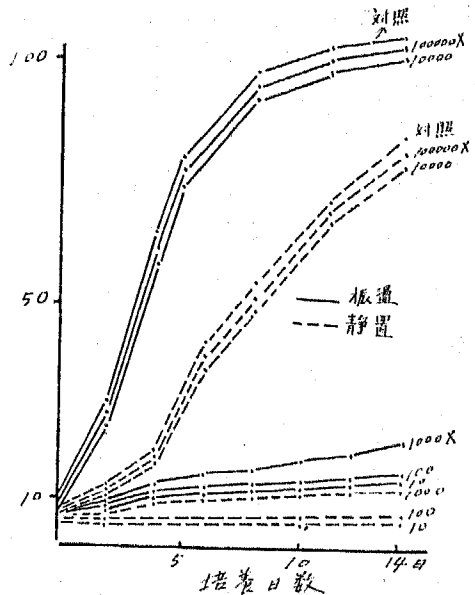
c) 血清透析: 辻^⑥の方法によつた。セロファン 300 番を用い, 3~5°C で 72 時間行なつた。

実験成績

I モルモット血清の結核菌に対する影響について。

A) 血清透析内液について (高分子分劃) (図 1)。

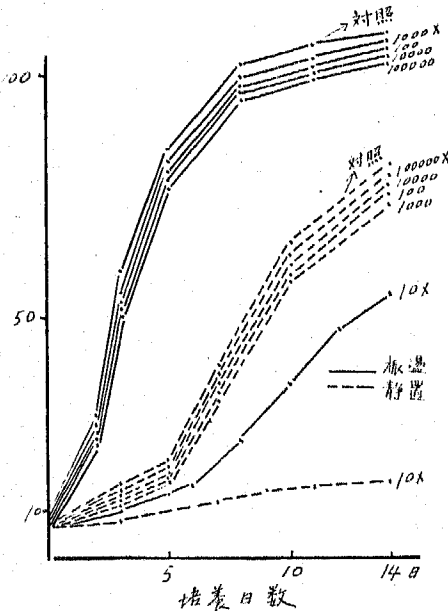
第 1 図 モルモット血清透析内液 (高分子分劃)



Tw80 加モルモット血清は 1000 倍まで、結核菌の増殖を阻止したことを第一報でのべたが、注⑥⑦⑧等は血清の低分子中に結核菌に対する増殖抑制作用があり、高分子中には非病原性菌に対する増殖抑制作用があるとのべているので本実験を行なつた。透析液は、血清の場合と同様に稀釈し添加した。静置培養と振盪培養を同時に行なつた。その結果、振盪培養では、透析液 10 → 100 倍稀釈添加の場合、濁濁度は何れも培養初期と変りがなく、2 週間後でも増殖が認められず、結核菌の発育を抑制していた。また、静置培養の場合も、振盪培養と全く同様の結果であつた。透析液 1 万倍及び 10 万倍稀釈添加の場合、対照と全く同様に Logarithmic に発育し、10 日後定常期に移行していた。即ち、透析液の添加量が少ない場合は、結核菌の増殖抑制は全く認められなかつた。

B) 血清透析外液について (低分子分劃) (図 2)。

第 2 図 モルモット血清透析外液低分子分劃

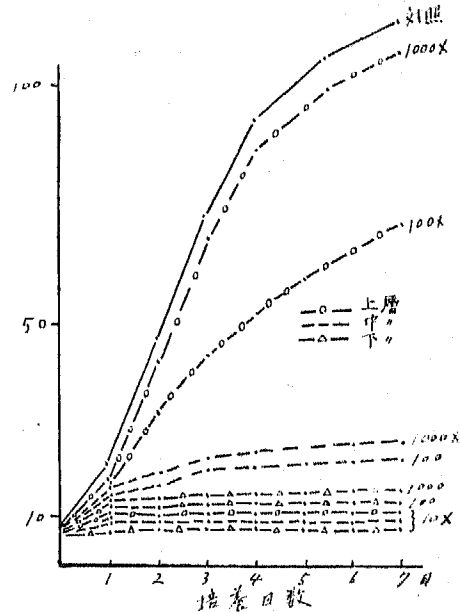


前項と全く同様の目的で実験を行なつた。その結果、振盪及び静置培養共に、対照に比べて増殖が遅れているが、実験を 7 日で打切つたので、恐らく 10 倍稀釈でも増殖を抑制しないものと推定される。

C) モルモット血清超遠心分劃について (図 3)。

Tw80 加モルモット血清は、1000 倍まで結核菌の増殖を抑制していた。この阻止因子は血清の透析によつて内液であることが判つた。更に、この点を明確にす

第 3 図 モルモット血清超遠心分劃



るため血清の超遠心分劃について実験を行なつた。超遠心法は Campbil^④ et al, 金箱^⑤の方法によつて、上、中、下の三層に分劃された。日立蛋白質計で総蛋白質を測定したところ、私が分劃したものは上層 0.2g/dl で蛋白質量少なく、中層 5g/dl, 下層は 12g/dl で蛋白質が濃縮されていた。各分劃量は 1:3:1 になつたので、添加実験は中層 1 に対して他は 3 倍に稀釈した。その結果、各分劃 10 倍稀釈添加の場合、濁濁度は何れでも培養初期と変りがなく、100 倍及び 1000 倍添加の場合も、上層を除いて、濁濁度は培養初期と全く変りがなかつた。しかも、濁濁度は 10 倍稀釈添加の場合に比べて有意の差はなかつた。上層 1000 倍稀釈添加の場合是对照と全く同様 Logarithmic の発育であり、100 倍稀釈添加の場合 Arithmetical であつた。即ち、各分劃添加実験においては、下層及び中層は、10 → 1000 倍まで結核菌の発育を抑制していた。上層は 10 倍稀釈以外は抑制作用はなかつた。

D) モルモット血清の結核菌増殖阻止作用に対する結核菌株の差異について

従来の実験においては、常に毒力人型結核菌 H₈₇RV 株を用いたが、果して、他の菌株の場合はどのような影響を及ぼすか否かについて実験した。その結果は表 1 に示した如く何れの菌株も H₈₇RV 株との差異を認めなかつた。

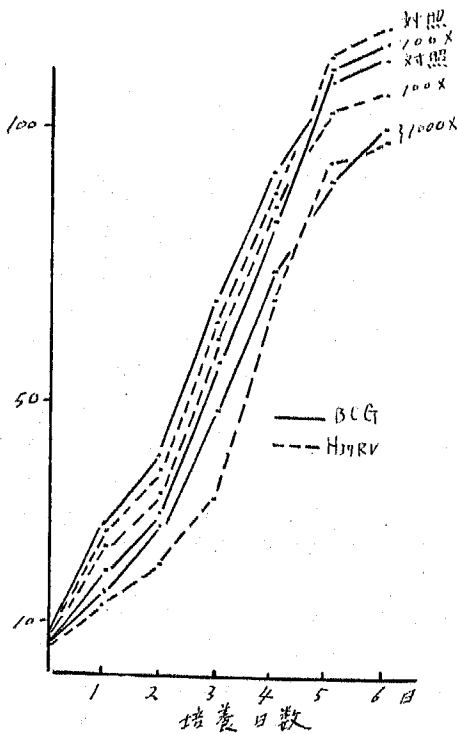
II 卵白の結核菌の増殖に及ぼす影響について (図 4)。

第1表 菌株の差異

菌株	血清稀釈	増殖阻止		
		10	100	1000倍
H ₂ 株		-	-	-
青山B株		-	-	-
B C G		-	-	-
患者分離株	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
耐性株	SM 10r/cc	-	-	-
	PAS 10r/cc	-	-	-
	JNH 10r/cc	-	-	-

対照は増殖(冊)
一印は増殖しないことを示す

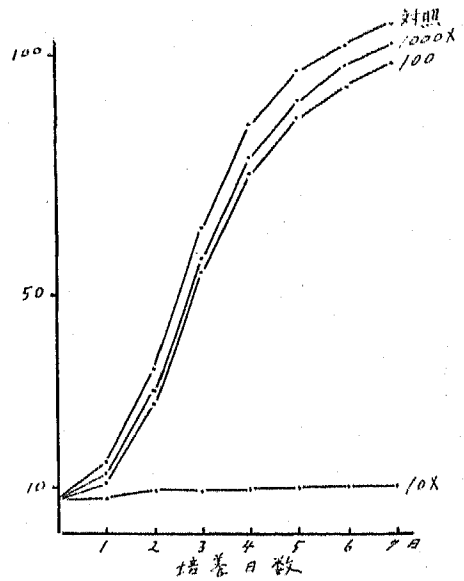
第4図 卵白の影響



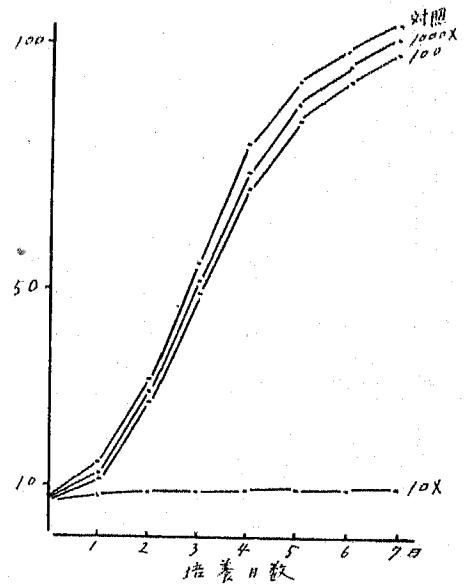
Nocard^⑩が卵白アルブミンは結核菌の発育を促進させることを報告しているので、私も、H_{37RV}株とBCG株を用いて実験を行なつた、その結果、卵白100倍及び1000倍稀釈添加の場合、結核菌の発育は対照培地とほぼ等しく、100倍添加の場合、1000倍のそれに比べて初期発育がやや促進的であつた。しかし、培養後6日では、両者の増殖がほぼ一致した。

Ⅲ H_{37RV}株に対する各種動物血清とTw80の

第5図 山羊血清の影響



第6図 家兎血清の影響



協同作用について

A) 山羊血清の影響について(図5)。

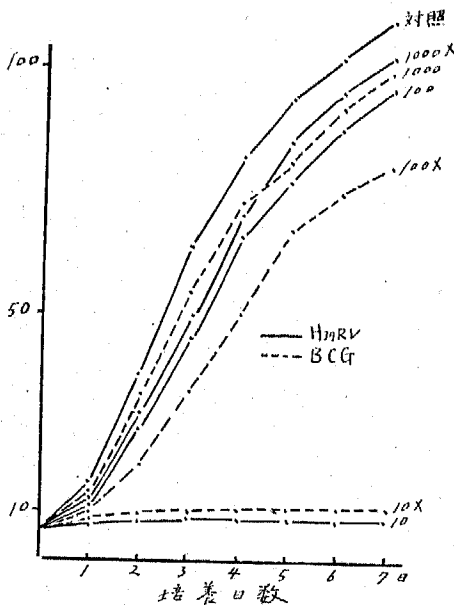
通常山羊の生体に対して、人型菌及鳥型菌は病原性がない。しかし、牛型菌だけが病原性をもっている。Tw80加モルモット血清が1000倍まで結核菌の増殖を抑制したので、山羊血清で実験を行なつた。その結果、山羊血清稀釈100, 1000倍稀釈添加の場合には対照培地と全く同様に発育増殖した。山羊血清稀釈10倍

添加の場合は、培養初期と変りなく、結核菌の増殖を阻止していた。即ち、山羊血清10倍稀釈まで、結核菌の増殖抑制作用があり、100, 1000倍では抑制作用を認めなかつた。

B) 家兎血清の影響について (図6)。

家兎は人型、牛型、鳥型の何れの菌に対しても感受性が強い、また、健康家兎75頭における結核菌の増殖は、血清内では、全血液内比べて増殖は一般に劣っており、全く増殖しないものは、34.7%であつたと宝来^⑩の報告があるので実験を行なつた。その結果、家兎血清100, 1000倍稀釈添加の場合、対照培地の発育と全く同様に、Logarithmicであつた。血清稀釈10倍添加の場合、培養初期から結核菌の発育は全く認められないし、7日後にも濁度の増加は認められなかつた。即ち、血清稀釈100, 1000倍では結核菌の増殖抑制作用はなく、血清稀釈10倍で抑制作用を認めた。

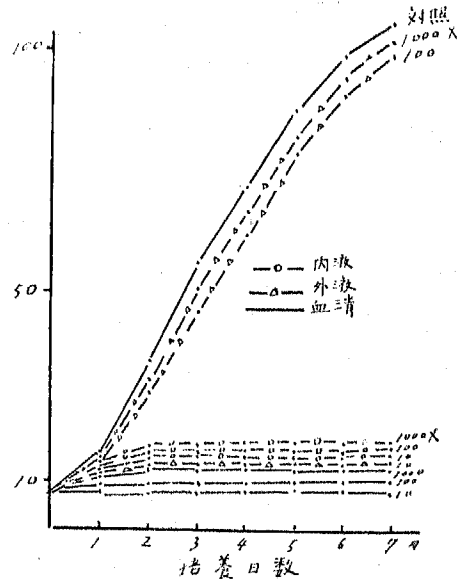
第7図 牛血清の影響



C) 牛血清の影響について (図7)。

牛の臓器に対して牛型菌は、病原性であり、人型菌及鳥型菌は非病原性である。また、Dubosの培地では牛血清を用いて培養しているので実験を行なつた、その結果、結核菌 H₃₇RV 株、及び BCG 株は、牛血清稀釈100, 1000倍添加の場合、増殖は Logarithmic であり対照と同様に発育した。10倍稀釈添加の場合、培養初期と変りなく、結核菌の発育を抑制し

第8図 馬血清及び透析液の影響



ていた。

D) 馬血清及び透析液の影響について (図8)。

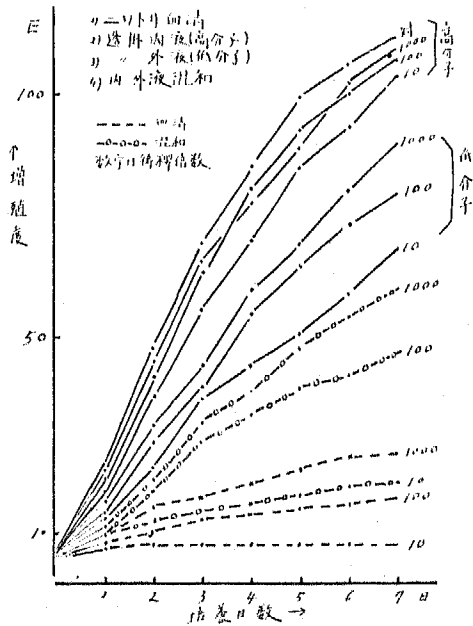
馬の体組織に対して、牛型、鳥型菌は病原性である。人型菌は非病原性であつて、病原性を現わしてもその程度は比較的軽い。また、馬血清を用いての結核菌の発育増殖に関する報告は見当たらないので実験を行なつた。その結果、馬血清稀釈10, 100, 1000倍添加の場合、何れも、結核菌の増殖を抑制した。また、透析外液10倍及び透析内液10, 100, 1000倍稀釈添加の場合も同様に増殖を抑制した、外液100, 1000倍稀釈添加の場合には対照培地と全く同様の発育であつた、これらの結果から、Tw80と協同作用を現す部分は、主に透析内液中に存在していたことがわかつた。

E) 鶏血清及び透析液の影響について (図9)。

通常鶏に対して病原性を有するといわれるものは、鳥型菌だけである。また、佐藤^⑪は、鶏の血清内において、結核菌は増殖しがたいことを報告しているので実験を行なつた。その結果、鶏血清稀釈10, 100, 1000倍添加の場合、何れも結核菌の増殖を抑制していたので、血清を透析して、添加実験を行なつたところ、意外な事実を見出した。即ち、透析内外液共、10, 100, 1000倍稀釈添加の場合、対照培地と同様に発育していた。これらのことから、鶏血清は透析して内、外両液に分けた場合、Tw80との協同作用が失なわれることがわかつた。また、両液を合わせた場合は、10倍稀釈以外は復帰しなかつた。

IV 結核菌増殖抑制作用に対する影響について。

第9図 ニワトリ血清及び透析液の影響



第2表 血清非働化の影響

血清	稀釈	非働化の影響			
		結核菌増殖状態			
		働性		非働性	
		100	1000	100	1000
卵白	+	+	+	+	
健康人	-	+	-	+	
結核患者	+	+	+	+	
家兎	+	+	+	+	
牛	+	+	+	+	
モルモット	-	-	-	-	

註 血清を添加しない対照は何れも増殖良好。
 + 増殖良好
 - 増殖せず

(a) 血清非働化の影響について、

血清の非働化について、第一報^①ではモルモット血清で行なつたが影響は認めなかつた。更に、卵白、健康人、結核患者、家兎、牛血清の場合について行なつたところ、表2に示すように、非働化の影響は全く認めなかつた。

(b) 5%炭酸ガス培養の場合について(表3)、

第一報^①でのべたように、モルモット血清は、5%炭酸ガス培養の場合、血清添加では幾分阻止作用の減弱が認められたので、健康人、家兎、馬血清につい

第3表 5%炭酸ガス培養の場合

血清種類	稀釈	結核菌の増殖度					
		CO ₂ (-)			5% CO ₂ (+)		
		対	100	1000	対	100	1000
健康人		100	10	100	100	10	100
家兎		100	100	100	90	80	80
馬		100	10	10	10.0	30	30

註 ① 最高増殖度を100とした。
 ② 判定は7日培養で行なつた。

でも行なつたところ、健康人血清の場合は変化なかつた。家兎血清の場合は幾分発育が悪く、馬血清は、モルモット血清の場合と全く同様であつた。

総括考按

体液の結核菌増殖阻止作用については、1924年 Wright^④が始めて SCC 法を用いて行なつたのに始まる。また同時に毛細管法によつて、血清内の結核菌増殖は阻止されることを見出した。しかし血漿内では、結核菌は増殖するが、予め毛細管に白血球を入れた場合、その増殖の割合は僅少である。但しこの場合は白血球が結核菌の攻撃に屈しない時であつて、もし屈すれば結核菌はより多く増殖する。即ち、Wright は血清内に結核菌が増殖しないのは、纖維素が栄養素として必須であり、且つ、白血球は元來結核菌の増殖には阻止的影響があり、纖維素は反対に助長的であると論じている。本邦では、本問題に関して今村^⑤を始め多くの研究報告がある。

全血液内の結核菌増殖阻止作用に関して、佐藤^⑥は健康モルモットの全血液内では人型結核菌は増殖するが、10%は増殖しない場合がある。しかし増殖しない場合でも死滅はしない。ラッテ、鶏、家兎の全血液内では人型結核菌は増殖しにくいことを報告している。伊藤^⑦は菌の毒力の面から健康モルモットの血液中で菌力の強いものは、弱いものに比べて増殖し易い傾向であることを認めている。緒方^⑧は更に判定方法に苦心を払つた結果、被検モルモットの中の28%は増殖しないことを経験した。西村^⑨は血液は大気に触れる場合はその pH に変動を来すことから、採血後も血液は流動パラフィン下に入れること、及び菌液との混和も流動パラフィン下で行なうことなど、今村、西村変法を応用した。この方法によれば動物血液でも培養成績は良好であり、緒方^⑧の成績と異なり、31頭の健康モルモット血液では常に結核菌は増殖することを認めた。宝来^⑩はこの方法によつて健康モルモット 107 頭

の殆んどすべてに菌増殖を認めた。また家兎75頭で全血液内において全く増殖しないものは殆んどないことを報告している。また辻本^⑥も同様の報告であつた。全血液の結核菌の増殖は培養方法の改善にしたがつて異なることを明らかにしている。血清内の増殖について、Dubos^⑨は培地に牛血清を添加した場合は、結核菌の早期発育を認めており、Pagel^⑫は健康或は免疫動物血清、更には健康人或は結核患者血清をキルヒナー液に加えて結核菌の深部培養を行ない、増殖のすぐれていることを認めている。Kallós 及び Nathan^⑬はキルヒナー液に健康並びに結核患者血清を加えて結核菌の深部培養を行ない、血清を50%に加えた場合結核菌の増殖を認めた。Zetterberg^⑭は25%牛血清を含むキルヒナー培地に結核菌を培養して、Dubos 培地と同様の結果を得た。古く Koch は凝固血液の血清内では、結核菌は増殖し、しかも^⑮、稀釈した血清の深部培養では結核菌は増殖することを報告、段階的に種々な量の結核菌を稀釈した血清内で培養して増殖を観察したが、健康及び免疫動物血清に、培養成績の差を認めなかつた。

しかるに、宝来^⑯は健康モルモット107頭中、18.6%を除き結核菌の血清内発育を認めるが、増殖程度は全血液内に比べて一般的に劣つており、及び健康家兎75頭においても、結核菌の増殖は全血液より一般的に劣つており、全く増殖を見ないのは34.7%に及んでいると報告している。三浦^⑰は SCM で行なつた実験では、健康モルモット血清にも阻止物質が存在するが、その本態は不明であること、また、オレイン酸も阻止に働くが5%炭酸ガス空気中培養の場合は血清中の阻止物質と同様阻止作用は消失すると言う。

私の場合は血清と Tw80 との協同作用と推定されるものである。従つて以上の諸家の成績とは必ずしも一致しない。この作用は菌の種類、血清の非働化、5%炭酸ガス培養には関係なく、血清の種類によつて違ふことが明らかになつた。

辻^{⑥⑦⑧}らは、毒力結核菌の増殖を抑制するのは、液体中の低分子であり、弱毒菌の増殖を抑制するのは、高分子であるとのべている。蛋白分割では、アルブミンは著明な発育促進、γグロブリンは軽度の発育抑制作用があり、また、低分子分割では、アミノ酸、有機酸に強力な抗菌作用のあることを報告、藤田^⑱も辻と同様、SCM 法を用いて各種動物血清の低分子分割中に抗結核菌因子の含まれていることを報告している。

Charlotte^⑲は、Chon の低温メタノール法で蛋白分割を行ない、結核マウスの実験から、Ⅱ～Ⅲ、及び

Ⅳ分割に抗菌作用の強いことを報告している。私の場合の有効成分は透析では内液、超遠心分割では中、下層に存在するものと考えられる。

Bjornesjo^⑳ 及び大島^㉑の尿中の抗結核物質並びに Dubos^{⑨⑩}のスペルミン等とは作用機序は異なると思われるが、Quentin^㉒記載の牛脾臓から分離した蛋白の示す抗菌作用と、私の場合とは類似点がある様に考えられる。

結 論

私は第一報と同様水野の方法による振盪培養を用いて血清と Tw80 との協同作用について検討、次の結果を得た。

A) 血清の種類

1) 鶏、馬血清は Tw80 と協同作用によつて結核菌の増殖を抑制した。

2) 山羊、家兎、牛血清は抑制しなかつた。

B) 人型結核菌の種類には関係がなかつた。

C) 以上の結核菌増殖抑制作用には、血清非働化、5%炭酸ガス培養等では影響なかつた。

D) 透析の結果

1) Tw80 加モルモット血清の結核菌抑制作用は高分子分割中に存在した。

2) 馬血清も (1) と同様であつた。

3) 鶏血清は透析の結果抑制作用は失なわれた。

E) モルモット血清の超遠心分割に Tw80 を加えた場合、その抑制作用は、中層と下層分割中に存在した。

終りに臨み御指導を戴いた恩師田崎教授に感謝致します。また実験の機会を与えられた国立上田療養所伊藤所長並びに職員一同に厚く御礼を申し上げます。

参 考 文 献

- ①柳沢雄次：信州医誌、8；2354、昭31。 ②Miller, I. L., and Roessler, W. G.: Am. Rev. Tuberc 73；716、1956。 ③青柳高明・水野伝一：日本細菌誌 11；629、昭31。 ④青柳高明・水野伝一：日本細菌誌 12；819、昭32。 ⑤Mizuno, D.: J. gen. Microbiol 20；180、1959。 ⑥辻周助・他：最新医学 11；1236、昭31。 ⑦辻周助・他：最新医学 11；1400、昭31。 ⑧辻周助・他：最新医学 12；1661、昭32。 ⑨Campbell, D. H.: Science 12；1091、1955。 ⑩金箱房枝・他：犯罪学誌 24；58、昭34。 ⑪Nocard, E.: Ann. Inst. Past. 1；19、1887。 ⑫宝来善次：結核 17；621、昭14。 ⑬佐藤理太郎：実験医学雑誌 10；871、昭10。 ⑭Wright, A. E.,

- : Lancet 2 ; 218, 1924. ⑩今村荒男 : 日本臨床結核 15 ; 60, 昭31. ⑪伊藤種次郎 : 結核 8 ; 15, 昭5. ⑫緒方準一 : 結核 10 ; 117, 昭7. ⑬西村英男 : 結核 13 ; 829, 昭10. ⑭辻本兵博 : 大阪大学医学雑誌 4 ; 263, 昭27. ⑮Dubos, R. J., : Pro. Soc. Exp. Biol & Med 63 ; 56, 1946. ⑯Pagel, W. : J. Path & Bact 53 ; 327, 1940. ⑰Kallós, P, & Nathan, E. : Zschr. Immunitforsh 76 ; 343, 1932. ⑱Zetterberg, B., : Acta. Path. Microbiol. Scand 82 ; 1, 1949. ⑲Kirchner, O. : Zschr. Immunitforsh 74 ; 56, 1932. ⑳三浦博 : 大阪大学医学雑誌 7 ; 31, 昭30. ㉑藤田 豊 : 京大結研紀要 7 ; 7, 昭34. ㉒Bjornesjo, K. B., : Acta, tuberc. Scandinav. 27 ; 123, 1952. ㉓大島駿作 : 京大結研紀要 7 ; 20, 昭34. ㉔Dubos, R. J., : Am. Rev. Tuberc 63 ; 119, 1951. ㉕Dubos, R. J., : Am. Rev. Tuberc 65 ; 637, 1952. ㉖Charlotte, E. et al. Am. Rev. Tuberc 76 ; 2, 1957. ㉗Quentin, E. B., : Am. Rev. Tuberc 78 ; 1, 1958.