

結核菌の増殖—Biophotometer による観察

京都大学結核胸部疾患研究所 内科学第1

川合 満・前川 暢夫

私共は Biophotometer (Bio-Log II) を用いて結核菌 H37Rv 株の増殖の様式を薬剤不添加の環境で振盪培養にて検討し、濁度と生菌単位との間の関係について若干の知見を得たのでその成績を報告する。

実験材料並びに実験方法

実験器機：JASCO JOUAN-QUETIN S.A 製 Biophotometer (BIO-LOG II) を用いた。

本機を簡単に説明すると、光源はタングステン、フィラメント電球（西独 オスラム社製 8017番 6V 15W 400~800m μ の波長）であって6個の試料入れセルを入れる恒温箱（37°C にして今回は使用したが 60°C まで上昇させても使用可能）が入っている。この恒温箱の中には数個の永久磁石が入っており、この往復運動により、セル内部に入れてある攪拌棒を自由な速度で駆動させ、振盪培養ができるようになっている。又正面には記録器がついており、6色のテープを夫々打刻することによって、吸光度 (DO) でも透過度 (T%) でも表わすことができるようになっている。

その原理は、光束が恒温箱の中に位置している6個の試料入りセルを逐次1個ずつ通過し、光電真空管の陰極を照射する。すると光電真空管は溶液の吸光度又は透過率の変化を電気信号に変え、この電気信号は処理され増巾されて6チャンネルの記

録器にそれぞれ in put される。而もこれらは20秒に1回夫々打刻されるので6個打ち終り再びもとの所を打刻するのに2分かかる訳である。即ち云い換えるならば、2分間に1回自動的に吸光度又は透過率が記録される訳である。

実験方法

Dubos 液体培地¹⁻⁵⁾に 37°C で7日間培養した人型結核菌 H37Rv-S 株及び H37Rv-R 3者 (SM. PAS INH) 株を比濁法にて 1mg/ml になるように調整し、以後10倍稀釈液を作成し、夫

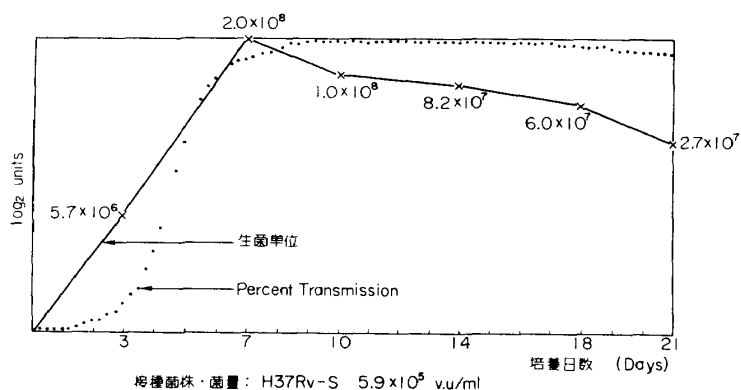


図1 培養日数と Percent Transmission, 生菌単位との関係

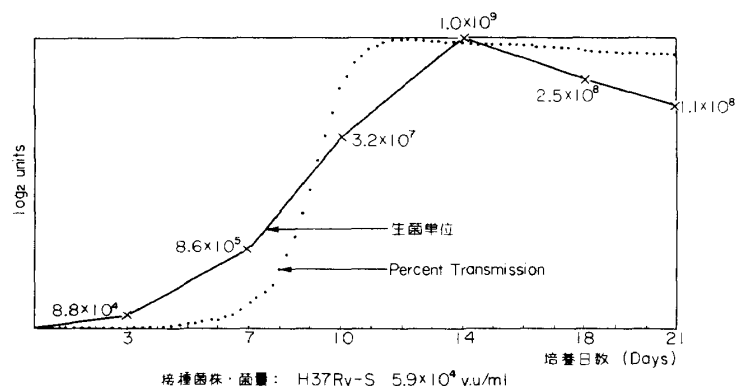


図2 培養日数と Percent Transmission, 生菌単位との関係

々その 0.1ml をセルに入れた Dubos 培地 9.9ml に接種し, 同時にその時の接種生菌単位を 1% 小川培地夫々 3 本ずつを用い以後通減10倍稀釈液を夫々定量培養し, かかる振盪培養時における T% と, 生菌単位との間に如何なる関係があるかを検討した。接種菌量は培地 10ml 当り H37Rv-S 株は 0.1mg, 0.01mg の 2 段階, H37Rv-R 3 者株は 0.1mg, 0.01mg, 0.001mg の 3 段階にした成績について今回は報告する。

実験成績

結核菌の培養は一般細菌の場合と異なり, 長期にわたるので, 記録紙に in put された点を 6 時間毎に読み取り, 更に control として入れてある結核菌接種の行なわれていない Dubos 培地の T% を引き, 培地自体の時間の変動を調整し, 各菌液濃度の状態を比較し易いように図示した。尚この図には同時に生菌単位を記載してあるが, 接種時の生菌単位を start におき, 最多数値に達したところを最上点にとり, 2 を底とする対数でとって見た。

H37Rv-S 株についてみると接種菌量 5.9×10^5 v.u./ml の場合図 1 に示したが, 約 3 日間のいわゆる lag phase の後, 約 3 日間の logarithmic phase を経て stationary phase という経過をとっている。接種菌量が 1/10 の 5×10^4 v.u./ml の場合図 2 に示したが, lag phase 7 日間, その後 logarithmic phase 3 日間を経て, その後 stationary phase をとっている。図 1 及び図 2 で注目すべき事は, logarithmic phase に入る時点の生菌単位が, 大体 10^6 v.u./ml であることである。

H37Rv-R 3 者耐性株の場合も感性菌と大体同じ経過をとっており, 図 3

で start したものは lag phase 3 日間, logarithmic phase 3 日間の後 stationary phase となっている。接種生菌量が 1/10 の 4.2×10^4 v.u./ml の場合, 図 4 で示したが lag phase 約 7 日間の後 logarithmic phase 3 日間, その後 stationary phase となっている。接種生菌量が最初の 1/100 の 4.2×10^3 v.u./ml の場合, 図 5 で示したが lag phase は更に延長して 13 日, logarithmic phase 3 日間, その後 stationary phase

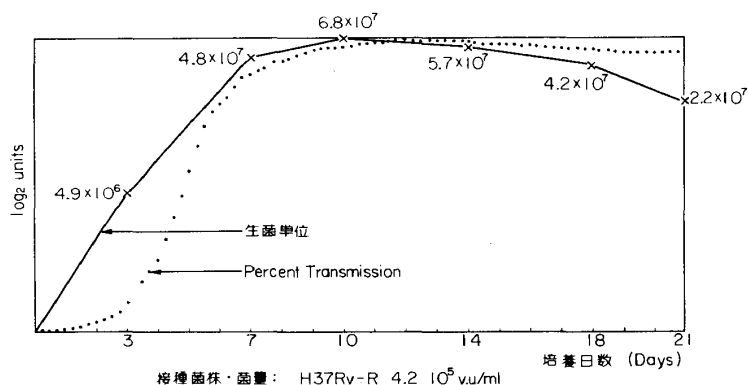


図 3 培養日数と Percent Transmission, 生菌単位との関係

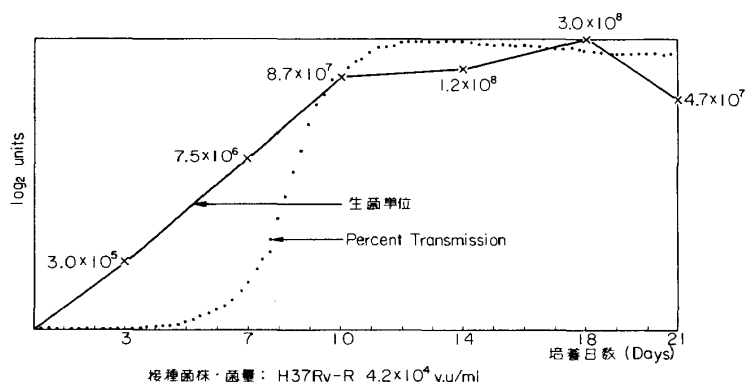


図 4 培養日数と Percent Transmission, 生菌単位との関係

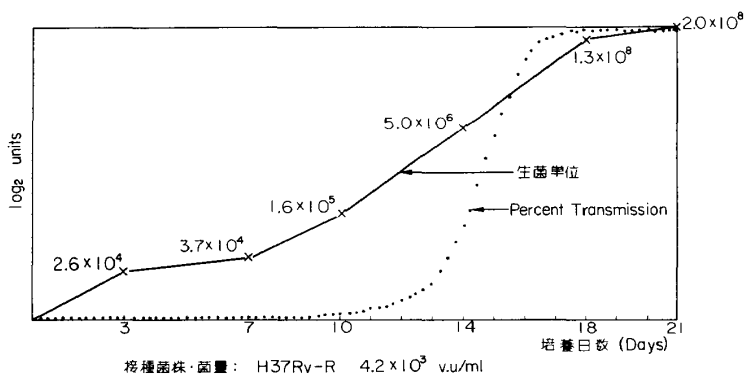


図 5 培養日数と Percent Transmission, 生菌単位との関係

となっている。即ち耐性菌の場合も感性菌と同様に logarithmic phase の始まる時点の生菌量はやはり 10^6 v.u/ml 前後であることに注目すべきだと考える。

即ち図1より図5までの成績を総括してみると、1) 接種生菌量によって lag phase の時間が変動し、而していずれの接種生菌量の場合も、培地 1ml 当り 10^6 v.u の生菌単位まで増加しないと、T%には表われてこないということである。2) 抗結核剤を使用せずそのまま培養した時の logarithmic phase の形は接種菌量の多少に関係せず同じような形をとっている。

更に結核菌の増殖形式が仮に2分裂によっていると考えてみると、その Generation Time は一般細菌の増殖サイクル lag phase, logarithmic phase, stationary phase がある故、今、ある培地に n_0 個の細菌を培養したとすると1世代後には細菌数は $2n_0$ 個、2世代後は $4n_0$ 個 ($=2^2 n_0$ 個) 従って、X世代後には、 $2^x n_0$ 個となる。X世代が経過した時点の細菌数を n 個とすると世代時間T、細菌数が n_0 から n まで対数的に増加した時間を t とすると $\frac{t}{T} = x$ が成立する。これを代入すると

$$\log n - \log n_0 = \frac{\log 2}{T} t$$

の公式が成立する。

この公式に logarithmic phase の各細菌生菌単位の値を代入して計算すると、H37Rv-S 株で平均14時間、H37Rv-R 3者耐性株で平均20時間となり、耐性株の方が感性株より Generation Time の長いことが明らかとなった。

総括 並びに考按

今までは光電比色計を用いて実験した場合は Dubos 培地を静置し、1日に1～2回程度振盪し、その Optical density 又はT%を測定しその生菌重量又は生菌単位との関係を比較検討している方法であって数多くの報告がなされているが⁶⁻¹⁰⁾、培養7日以内の場合、生菌数と濁度度が平行するかの如き報告も少なくない。今回の場合は、振盪培養で連続的にT%を測定して

いるので直接比較するわけにはいかないが、Biophotometer を用いて実験する場合、接種生菌量が少ない時はT%で検討すると生菌単位が 10^6 v.u/ml に増殖するまでは logarithmic phase にならない。即ち生菌単位は漸次増加してもT%には表われてこないということである。

今後、結核化学療法剤を最初より作用させて検討する場合に、lag phase が延長している場合に薬剤の効果によるものか、或は、接種生菌単位の少ないために延長しているものかは定量培養をしてみない限りわからない場合も存在する可能性がある。従ってかかる実験に際しては接種生菌単位を厳密に規定する必要がある。

しかし本機を使用すると薬剤を作用させる時期、濃度を自由にその増殖の様相に合わせて行ない得る点で非常に有用な機械であり、今後各種化学療法剤を作用させて、その増殖の様相、生菌単位、菌の形態、薬剤の効果判定に役立てると共に、更に一般細菌の検査にも役立ててゆきたいと考えている。

文 献

- 1) Dubos, R. J. : Rapid and submerged growth of mycobacteria in liquid media, Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 1945, 58, 351.
- 2) Dubos, R. J. : Effect of long chain fatty acids on bacterial growth, Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 1946, 63, 56.
- 3) Dubos, R. J., and Davis, B. D. : Factors affecting the growth of tubercle bacilli in liquid media, J. Exper. Med., 1946, 83, 409.
- 4) Dubos, R. J., Davis, B. D., Middlebrook, G., and Pierce, C. : The effect of water soluble lipids on the growth and biological properties of tubercle bacilli, Am. Rev. Tuberc., 1946, 54, 204.
- 5) Dubos, R. J., and Middlebrook, G. : Media for tubercle bacilli, Am. Rev. Tuberc., 1947, 56, 334.
- 6) Hurwitz, C., and Silverman, M. : Measurement of growth of tubercle bacilli by means of a spectrophotometer, Am. Rev. Tuberc., 1950, 62, 87.

- 7) Fisher, M. W., Kirchheimer, W. F., and Hess, A. R. : The arithmetic linear growth of mycobacterium tuberculosis var. hominis, J. Bact., 1951, 62, 319.
- 8) Fisher, M. W., Kirchheimer, W. F. : Studies on the growth of mycobacteria, Am. Rev. Tuberc., 1952, 66, 758.
- 9) 草間久子 : 人型結核菌の Dubos 液体培地における生菌数と混濁度との関係, 結核, 1958, 33, 185.
- 10) 津久間俊次, 東向一郎他四名 : 人型結核菌 H37Rv 株の栄研デュボス培地に於ける培養日数と混濁度, 生菌単位及び発育菌量の関係, 京大結研紀要, 1959, 8, 1.