菌株及び培地成分とツベルクリン産生との関係

武 谷 健 二

九州大学医学部細菌学教室 (主任 戸田教授)

(受付: 7月8日 1955年)

当教室保存のヒト型青山B株を用いて作製したツベルクリンは毎常標準ツベルクリンの5~10倍の力価を示し、またこれを用いてツベルクリン蛋白質を精製すると培養濾液 1 l 当り 1 g 以上の収量を得ることができ¹⁾、他の研究室における成績に比べて収量がきわめて多い。この原因を明らかにするためには、菌株と培地成分とのツベルクリン産生に及ぼす影響を検討する必要がある。一方、Herrmann²⁾はソートン培地中のアスパラギンをNH₄Clに変えた培地を用いれば、菌の収量は減少するが、ツベルクリン活性及びツベルクリン蛋白質の収量は変わらないとのべている。今回は当教室の青山B株を中心に菌株及び培地成分とツベルクリン産生との関係を追求すると同時に、Herrmann 成績の追試を行った。

実験方法

使用菌株としては、当教室において岡、片倉培地または小川培地に継代して約20年間保存した青山B株(九大青山B)及び予研より分与をうけ当教室にて約6ヵ月間、継代保存した青山B株(予研青山B)の2株を用いた。培地としては、ソートン原法培地(A培地)、そのアスパラギンを2gとしてNH₄Clを2g加えた培地(AC培地)ソートン・グルタミン酸ソーダ培地(G培地)及びそのグルタミン酸ソーダを4gとしてNH₄Clを2g加えた培地(GC培地)の4種を用いた。培地は1000ccの三角コルベンに350cc宛分注した。九大青山BはG培地に6代継代した菌膜を上述の4種の培地にそれぞれ3本宛うえ、予研青山BはG培地に3代継代した菌膜をA及びG培地に3本宛うえた。

37°C, 12週培養の後、100°C, 1時間滅菌し、pH及び菌量を測った。菌量は60°Cフラン器中で充分乾燥した後、乾燥菌重量し、それぞれ3本についての平均値を表に示した。培養濾液は各培地毎に集めて、これについてトリクロール醋酸沈澱量を測った。すなわち、3ccの試料に等量の20%トリクロール醋酸を加え、充分沈澱を生じた後、2,500回、20分間遠沈して沈澱管の目盛を読んだ。その後、培養濾液はそれぞれ、限外濾過によつて除

塩濃縮し、Seibert³⁾が非加熱培養濾液について行つた分割法に従つて蛋白及び多糖体分割しその収量を測った。この場合は加熱培養液から分割を分割したものであるから、われわれはそれぞれの割分名の前にhをつけて、hA, hB及びhC蛋白割分、hP_I及びhP_{II}多糖体割分と呼んでいる⁴⁾。

力価の判定には、流動パラフィン包埋死菌(九大青山B)5mg接種のモルモットを用い、各培地での培養濾液の10倍稀釈液0.1cc宛を皮内注射して48時間後の発赤を測り、6匹について発赤直径の平均値を求めた。

実験成績

1. 九大青山B株

その成績を第1表に示す。pHはG培地のみ強アルカリ性を示し、他は何れも弱酸性であつた。菌量はG培地とA培地とはほぼ等しかつたが、NH₄Clの入つた培地ではいずれもかなり少なかつた。トリクロール醋酸沈澱量はG培地のみ著しく多く、A培地がこれにつきNH₄Clの入つた培地ではきわめて少量であつた。

hA及びhB蛋白の収量はA培地が最も多く、他はほとんど同程度であるが、hC蛋白はG培地がきわめて大量で他の培地の10倍以上の収量を示した。hP_Iの収量はA培地がやゝ多く、hP_{II}はG培地がやゝ多い程度で、各培地間に大きな差は認められなかつた。当然予想されるように、蛋白割分の総収量とトリクロール醋酸沈澱量とはほぼ平行していた。力価はG, A, GC, AC培地の順に弱くなり、蛋白割分の質と量とから予想される結果にほぼ一致した。

以上、NH₄Clを加えた培地では菌収量が少いのみならず、ツベルクリン活性も弱く、蛋白量も少なく、Herrmannの成績とは一致しなかつた。

TAKEYA Kenji: How the yield of tuberculin is varied according to the strain of tubercle bacilli and the components of the medium used for its production. Department of Bacteriology, School of Medicine, Kyushu University. — Jap. J. of Bact., 11 (1), 23-25, 1956.

第1表 九大青山B株の各種ソートン変法培地12週培養後の諸性状

窒素源の種類	pH	菌収量 g	トリクロール 醋酸沈澱量	蛋白質 mg/l			多糖体量 mg/l		力価(発赤) mm モルモット6匹平均値
				hA	hB	hC	hI	hII	
グルタミン酸ソーダ(G)	8.8	3.36	8.8	26	19	1,241	141	2	19.6
アスパラギン(A)	5.7	3.59	1.7	68	48	287	287	<1	13.9
グルタミン酸ソーダ+塩化アンモン(GC)	5.5	2.61	0.8	27	19	64	161	<1	10.8
アスパラギン+塩化アンモン(AC)	5.2	2.03	0.5	25	13	26	89	<1	8.0

第2表 予研青山B株の各種ソートン変法培地12週培養後の諸性状

窒素源の種類	pH	菌収量 g	トリクロール 醋酸液量	蛋白質 mg/l			多糖体量 mg/l		力価(発赤) mm モルモット6匹平均値
				hA	hB	hC	hI	hII	
グルタミン酸ソーダ(G)	8.8	1.73	3.3	25	26	280	118	13	10.2
アスパラギン(A)	7.1	1.40	3.9	26	49	363	97	41	11.8

2. 予研青山B株

pH は九大青山B株による場合と同様G培地では強アルカリ性で、A培地では中性であつた。菌の収量はG培地の方がやゝ多く、トリクロール醋酸沈澱量はA培地の方が多かつた。蛋白割分の収量はいずれもA培地の方がやゝ多く、hPII もA培地の方が多かつた。力価は蛋白割分の質と量とから当然予想されるようにA培地が強かつた。

hPII の収量は予研青山B株の方が九大青山B株に比べて多い傾向が見られる。

考 按

G培地に継代した九大青山B株をG培地にうえた場合には、pH は強アルカリ性となり、hA 及び hB 蛋白に比べてきわめて大量の hC 蛋白が産生されることが明らかになつた。この成績は九大青山B株によるツベルクリンの活性が強いという従来の当教室における経験を裏書きするもので、九大青山B株の培養濾液から精製したPPDS はその電気泳動図において易動度の遅い hA 及び hB 蛋白を殆んど認めず、ほとんど hC 蛋白のみからなるという事実⁵⁾も今回の成績とよく一致する。

このような成績は九大青山B株を特にG培地にうえた場合に見られることで、A培地では認められない。pH がアルカリ性となることは、グルタミン酸ソーダを培地成分として含むことから一応説明できるわけで、このアルカリ性であるということが hC 蛋白の大量産生の原因であろうということがまず考えられる。このことは、菌体を集めて pH をかえた溶媒中で菌体蛋白を加熱抽

出すると、アルカリ性の場合には hC 蛋白が多量に抽出され、酸性ではむしろ hA 及び hB 蛋白の収量がやゝ増加するという教室の友の実験⁶⁾から当然予想されることである。事実、九大青山B株を用いてツベルクリンを作製した従来の経験からも、アルカリ性が強い程力価も一般に強い傾向がある。しかし、予研青山B株をG培地に培養した今回の実験では、pH は強アルカリ性を示したが hC 蛋白の収量はあまり多くなく、hC 蛋白の大量産生の問題を培地の pH のみで解釈することも困難と考えられた。

今回の実験では、予研青山B株のG培地培養は強アルカリ性の pH を示したが、別に行つた実験では中性乃至弱酸性を示す場合が少くない。また、同一培地に同一菌膜から培養を行つた場合にも、場合によつて pH 及び蛋白収量にかなりの相違を生ずることもよく経験することであるから、この問題は簡単に結論つけることはできない。特に実験を行うまでの液体培地の継代数及び継代に用いる培地の組成なども、菌の発育、pH や蛋白の収量に大きな影響を与えるものと考えられるので、今後これ等の点について詳細な検討を行いたいと考えている。

Herrmann はソートン培地のアスパラギンを NH_4Cl におきかえることによつて、菌収量は少なくなるが、ツベルクリン活性及び蛋白収量は変わらないとのべており、この事実はツベルクリン産生の機構を考える上に興味深いものと考えてその追試を行つたが、今回の実験では NH_4Cl 添加培地では菌収量の減少には平行して、ツベルクリン活性及び蛋白収量も減少し、Herrmann の

成績とは異つた結果が得られた。

むすび

当教室保存の九大青山B株を用いれば、常にきわめて強い力価のツベルクリンが産生され、これから得られる精製ツベルクリン蛋白質の収量もきわめて多い。これはきわめて大量の hC 蛋白質の産生によるもので、この際培地の窒素源としてグルタミン酸ソーダを使用すること及び培養終了時の pH がアルカリ性であることが必要と考えられる。しかし、予研青山B株では同一条件で培養しても hC 蛋白質の多量の産生は認められなかつた。

NH₄Cl を窒素源として用いれば、菌収量は少ないが、ツベルクリン産生量は変わらないという Herrmann の実

験を追試したが、菌収量の減少とともにツベルクリン力価も低下し否定的な結果が得られた。

戸田教授の御校閲を深謝します。本研究は文部省科学研究費に負う所が多い。

文 献

- 1) 武谷健二, 大友信也, 友安仏: 結核, 27, 286, 1952.
- 2) R. Herrmann: Biochem. Zschr., 323, 181, 1952.
- 3) F. B. Seibert: Am. Rev. Tbc., 59, 86, 1949.
- 4) 大友信也: 結核, 29, 356, 1954.
- 5) 武谷健二, 神中寛: 日本細菌学雑誌, 9, 660, 1954.
- 6) 大友信也: 結核, 30, 40, 1955.