



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	結核菌のGeneration timeについて：第1報 Small inoculum technique及び培養菌の窒素定量(Micro-Kjeldahl法)によるGeneration timeの測定
Author(s)	新明, 美仁; SHIMMYO, Yoshihito; 横井, 敏夫 他
Description	
Citation	結核の研究, 3, 50-56
Issue Date	1956-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26579
Type	departmental bulletin paper
File Information	3_P50-56.pdf



結核菌の Generation time について

第1報 Small inoculum technique 及び培養菌の窒素定量 (Micro-Kjeldahl法)による Generation time の測定

新明美仁 横井敏夫 信太隆夫

(北海道大学結核研究所細菌部 主任 大原 達教授)

(受付 昭和30年11月30日)

1. 緒 言

結核菌に対する血清、薬剤等の発育阻止作用、あるいは菌の物質代謝に必要な物質、成長因子などについて研究するような場合、被検物質の菌に対する影響は菌の Generation time が促進されるか遅延されるかを検べることによつて適確に判定することが出来る。然し菌の Generation time は用いられた培地、菌型、菌株及び測定の方法などによつて異なるものである。これを測る方法については Youmans らの業績に負う所が多く、彼等はすでに Micro-Kjeldahl 法¹⁾、Small inoculum technique²⁾、培養菌液の Turbidity 測定³⁾、更には感染菌量とマウスの Survival time との関係⁴⁾を調べる方法等によつて結核菌(殊に毒力菌)の Generation time を測定して居る。(尚、わが国では最近辻本⁵⁾が Slide Cell Culture 法を応用して結核菌の世代時間を求めており、われわれ⁶⁾もまたこれとは別個に同じく Slide Cell Culture 法によりBCGの世代時間の推定を行つた)。かくの如く Generation time の測定法は色々と研究されているが、細菌化学の最近における急速な発展から細菌の metabolism に関する研究の必要性が大きく浮び上つて来た今日、結核菌の研究において Generation time の測定を更に検討して見ることは決して無意義なことであるまい。上述の如き問題の外にも毒力菌と弱毒菌、あるいは菌型を異にするもの間の成長速度を比較することなども興味深いことであり、また菌の Metabolism に関連することであるが、培養基の適否を Generation time の上から検討して行くことなどもまた大きな意義のある問題と思われる。かかる観点から、われわれは結核菌の Generation time について2、3の検討を加えて見たいと思ひ、本報においては先づ Youmans 等の行つた Small inoculum technique 及び Micro-Kjeldahl 法による Generation time の測定を追試し比較して見た。

所謂 Small inoculum technique とは1947年に Youmans の発表したもので、その方法のアウトラインは次の如きものである。即ち種々なる段階に希釈した(普通 10^{-1} より 10^{-8} 迄)結核菌の Suspension を液体培地に接種し、夫々の接種菌の成長が肉眼的に初めて認められる時期を記録する。即ち各々の接種菌がある一定の量にまで成長するに要する時間を測定するわけである。この際結核菌の成長速度が接種菌数に関係なく同一であるならば、用いた接種量の対数と、これが一定量にまで増殖するに要する時間との関係を図に描くときには、直線関係が得らるべき筈であり、またかくして得られた直線の傾斜は菌の成長速度を表わす筈である。従つてこれから Generation time の計算が可能になつて来る。

Youmans はこの方法により Proskauer and Beck の変法培地、及びこれに Crystalline bovine albumin と Beef serum を加えたものを使用して、H₃₇R_v株の Generation time を求め、夫々19.9、17.3、14.4、時間等の値を得ている。これ等の値は後述の如くわれわれの得た実験結果とはやや異なるものであるが、これは勿論用いた培地、菌株及び菌の状態等の差によるものであつて、何れが正しく何れが誤りであるというべきものでないことを俟たない。

次の Micro-kjeldahl 窒素測定による Generation time の測定法も同じく Youmans の発表にかかると、Nitrogen は生細胞における比較的一定の成分であるから、Mueller⁷⁾の如く培養細菌の成長量の測定に対して窒素の測定を応用することは甚だ合理的なことである。但しこの場合細菌の増殖に平行して窒素も増加することが必要な条件であるが、この点に関して Hershey⁸⁾の調べた所によると、E. Coli の growing culture において、窒素の測定は細菌数に対しては常に比例はしないがその成長の総量に対しては平行関係が認められた。

以下上記2法による結核菌の **Generation time** の測定法について詳記する。

2. Small inoculum technique による **Generation time** の測定

I. 実験材料及び実験方法

大体 **Youmans** 等の方法に準じた。唯使用菌株が **BCG** であること、及び使用培地として **Youmans** 等の **Modified Proskauer and Beck** 培地に代り **Kirchner** 培地を用いた点の2つが僅かに異つて居る。

(1) 使用菌株：馬鈴薯グリセリン培地よりソートン培地へ移殖培養せる **BCG** 予研株を用いた。この際、われわれは同様な実験を3回くり返して行つたが、その第1回目には馬鈴薯グリセリン培地よりソートンへ移殖後、3代継代した8日間培養の菌、第2回目には移殖1代目で12日間培養のもの、第3回目には同じく1代目でソートン培養10日のものを使用した。

かく種々の状態の菌を用いたのは菌株、培地、測定法が同一でも、菌の状態の異なることにより成長速度に差があるか否かを見たいと思つたからである。

(2) 菌液の調製：上記の如き **BCG** のソートン培養の菌膜を型の如く水晶玉入りコルベンに取つて手振り法で磨砕し、**Kirchner** 液を以てこれを希釈、湿潤菌量として夫々 **Per cc 1mg, 10⁻¹mg, 10⁻²mg, 10⁻³mg, 10⁻⁴mg, 10⁻⁵mg, 10⁻⁶mg** 7の種の希釈菌液を作つた。

(3) 使用培地及び菌液の接種、培地は **Kirchner** 培地を用い、これを予め5ccづつ滅菌試験管70本に分注し、10本を1組としてその各組に上記の如くして作つた7種の希釈菌液を夫々0.1ccづつ接種した。尚、第2回目及び第3回目の実験に際しては **Kirchner** 培地に、0.05%の割に **Tween 80** を加えたものを用いた。これは本法と、次報において述べる予定の培養菌液の **Turbidity** から **Generation time** を測定する方法とを比較する目的で行つたものである。

(4) 判定方法：上記の如く菌液を接種した試験管を孵卵器に納め、毎日一定時間に取出して黒い背景の下で検し、肉眼的に初めて成長の認められた時期を記録した。

II. 実験成績

われわれは上記の如くして3回実験をくり返したが、その1例として第3回目の実験成績を示せば第1表の如くである。表中の数字は肉眼的に初めて菌の成長が認められた最初の日数を表わす。この日数は、本来同一の希釈についてはどの試験管においても同じであるべき筈であるが、表に見る如く多少日数に喰い違いのあるのは恐らく技術的な **Factor** によるものであろう。然しながら、かくの如く

他のものと異なる値を示す **Tube** は3回の実験を通じて10本の中1~3本に過ぎず、また1日以上のあるものは認められなかつたので、同一希釈についての菌成長時期を示すにはこれ等の値のモードをとるのが適当と考え、表の

第1表 菌増殖を肉眼的に認める迄の日数と接種菌量との関係 (Exp. 3)

接種菌量 (培地5cc中)	培地：Kirchner										モード
	試験管番号										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
10 ⁻¹ mg	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
10 ⁻² mg	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	4
10 ⁻³ mg	6	6	6	6	6	6	6	6	6	7	6
10 ⁻⁴ mg	8	8	8	8	8	8	8	8	8	9	8
10 ⁻⁵ mg	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
10 ⁻⁵ mg	12	12	12	12	12	12	12	13	13	13	12
10 ⁻⁷ mg	14	14	14	15	15	15	15	15	15	15	15

右欄にこれを示した。勿論、培地中における結核菌の標準菌量を何等かの客観的方法を以て測定し得れば甚だ理想的であろうが、液体培地中における菌の成長型式から見て、実際にかかる方法を見出すことは甚だ困難であらう。

次にこれ等3回の実験結果をまとめたものが第2表であつて表中の数字は第1表と同じく肉眼的に菌成長の認められた最初の日数を示すものである。この表においては上述の如く各希釈ごとに10本の試験管を観察し、これから得られた値のモードを記入した。次にこれ等の **data** を、図示するため縦軸に接種菌量の対数、横軸に日数をとつて結んで見ると第1図に見られるような直線関係が得られる。即ちこれは、肉眼的な菌成長の最初の出現時期と接種菌量との間に直接関係があることを示すものであり、また同時に成長速度が接種菌量に関係なく同一であるということを示すものでもある。更に第1図における夫々の **line** の傾斜は実際の成長速度を表わすものであつてこの **line** の傾斜、即ち **Growth rate constant** 及び **Generation time** は次の式によつて計算することが出来る。

$$K = \frac{\log a - \log b}{t}, \quad G = \frac{\log 2}{K}$$

但し **K=Growth rate constant**, **a=最大接種量** (即ちこの場合は **10⁻¹mg**), **b=最小接種量** (即ちこの場合は **10⁻⁷mg**), **t=日数**, **G=Generation time** である。第2表に示した **K** 及び **G** の値はかくの如くして求めたもので、その結果によれば、第1回目の実験では **K=0.333**, **G=21.7** 時間、第2回目では **K=0.375**, **G=19.2** 時間、第3回目は **K=0.461**, **G=15.6** 時間という値が得られた。尚、上記の計算式が **Generation time** の算出に使用せら

第2表 S. I. T. による BCG の K 及び G

接種菌量 (培地5cc中)	培地 : Kirchner		
	実 験 番 号	1	2
10 ⁻¹ mg	2	2	2
10 ⁻² mg	5	4	4
10 ⁻³ mg	8	7	6
10 ⁻⁴ mg	11	10	8
10 ⁻⁵ mg	14	13	10
10 ⁻⁶ mg	17	16	12
10 ⁻⁷ mg	20	18	15
K	0.333	0.375	0.461
G	21.7 時間	19.2 時間	15.6 時間

$$K = \frac{\log a - \log b}{t}$$

K = Growth rate constant

a = largest inoculum

b = smallest inoculum

t = time in days

$$G = \frac{\log 2}{K}$$

G Generation time

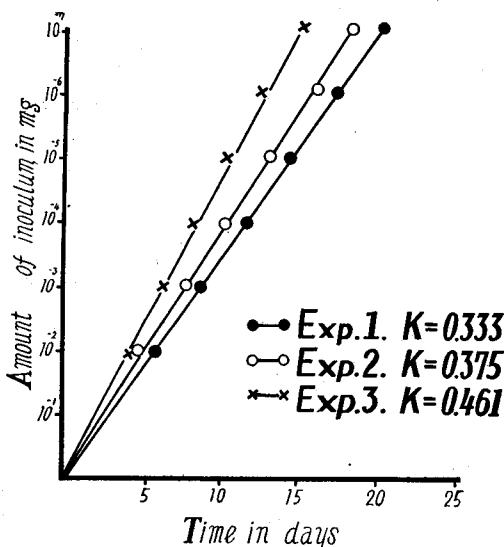


Fig. 1 菌増殖を肉眼的に認めるまでの日数と接種菌量との関係

れるのは次の理由による(文献9参照)。即ち周知の如く細菌の増殖曲線は、大体、休止期、対数的増殖期、静止期、減数期の4つの phase に分けて考えることが出来るが、この中対数的増殖期においては菌の分裂増殖が最も盛んで

菌数は略々対数的に増加すると考えられる。従つて、今最初の菌数を a, t 時間後の菌数を b, t 時間内の分裂回数を n とすれば、

$$b = a \times 2^n \quad \log b = \log a + n \log 2$$

$$n = \frac{\log b - \log a}{\log 2}$$

従て1世代時間を G とすれば、

$$G = \frac{t}{n} = \frac{t \log 2}{\log b - \log a}$$

而してこの $\frac{\log b - \log a}{t}$ は前出計算式の K に相当

する故に $G = \frac{\log 2}{K}$ によつて Generation time を求め得る。本計算式を用いて Generation time を算出するのは以下の Micro-Kjeldahl 法その他の場合においても同様である。

3. 培養菌の窒素定量 (Micro-Kjeldahl 法) による Generation time の測定

I. 実験材料及び実験方法

本実験も Small inoculum technique の場合と同様大体 Youmans に準じて行つた。

(1) 使用菌株: 馬鈴薯グリセリン培地よりソートン培地へ移殖培養せる BCG 予研株を使用した。実験は2回くり返して行いその第1回目には馬鈴薯グリセリン培地よりソートン移殖2代目で10日間培養のもの、第2回目には移殖1代目で8日間培養のものを用いた。

(2) 使用培地: Youmans の例にならない以下の如き組成のものを用いた。

asparagine	0.5 %
monopotassium phosphate	0.5 %
magnesium citrate	0.15%
potassium sulfate	0.05%
glycerol	2.0 %

以上を蒸留水に溶解し、苛性ソーダにて pH を 7.0 に調整後、コッホ蒸気釜を用いて 100°C 1時間づつ3日間3回にわたつて間歇滅菌を行い、これを 10 cc づつ滅菌試験管に分注した。これ等の培地を容れるべき試験管は予めクローム硫酸中に一昼夜浸し、後水道水及び蒸留水で十分に洗い、乾熱滅菌器で滅菌した。

(3) 菌液の調製及び培地への接種: 前述の如きソートン培養の BCG を濾紙で濾過して培地成分を除き更に滅菌蒸留水で菌をよく洗う。洗滌菌の適当量を水晶玉入りコルペンにとり、手振り法にて磨砕した後、0.01 mol の Phosphate buffer solution を以て適当に稀釈する。次にこ

の稀釈菌を滅菌コルベン移し、その一定量をとつて後述の如く遠心洗滌後これに含まれる窒素量を Micro-Kjeldahl 法にて測定する。これによつて前記滅菌コルベンに移した菌液を望ましい窒素濃度迄 0.01 mol の Phosphate buffer solution を以て再び稀釈し、その 1.0 cc づつを前述の如く 10 cc の培地を容れた試験管に夫々分注し、孵卵器に納める。われわれは、この際、第 1 回目の実験には菌液 1 cc 中に窒素量 0.06 mg、及び 0.03 mg、第 2 回目には同じく 0.02 mg 及び 0.015 mg 含まれるようなものを作り、これを夫々 30~40 本の試験管に接種した。

(4) 測定方法：2 日毎に培養試験管を取出してその全内容を遠心管に移し、3500 回転、60 分間遠心沈澱を行い、上清を吸引して捨て、更に 2 回蒸留水を以て遠心洗滌後、その沈渣、即ち培養試験管中の全菌量の窒素を Micro-Kjeldahl 法を以て測定した。

II. 実験成績

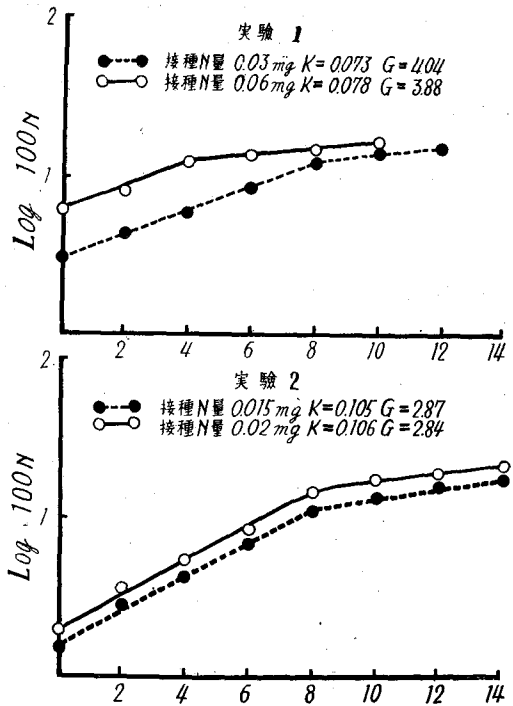
第 3 表の成績は上記の如き 2 回の実験結果を纏めたもので表中の数值は培養菌全体の窒素量を表わすものである。即ち左欄に記載の培養日数において、試験管ごとに菌の窒素量を Micro-Kjeldahl 法によつて測定し、これを 3~4 本の試験管について平均したものである。これ等の data を、縦軸に窒素量の 100 倍の対数、横軸に培養日数をとつて図示すると第 2 図に見る如き関係が得られる。而してその直線部分即ち logarithmic phase の data から最小自乗法によつて Growth rate constant (K) を求め更に Small inoculum technique の場合と同様に

$G = \frac{\log 2}{K}$ によつて、Generation time (G) を求めると第 3 表に示した如き数值、即ち第 1 回目の実験で最初の接種窒素量 0.06 mg のものでは K=0.078, G=3.88 日、同じく 0.03 mg のものでは K=0.073, G=4.0 日、第 2

第 3 表 培養日数と窒素量との関係

実験番号	1		2	
	0.03 mg	0.06 mg	0.015 mg	0.02 mg
2	0.043	0.08	0.029	0.036
4	0.062	0.123	0.043	0.055
6	0.083	0.134	0.067	0.087
8	0.123	0.145	0.111	0.148
10	0.041	0.152	0.137	0.169
12	0.152		0.159	0.195
14			0.187	0.216
K	0.073	0.078	0.105	0.106
G	4.04日	3.88日	2.87日	2.84日

第 2 図 窒素定量による BCG の發育曲線



回目の実験で接種窒素量 0.02 mg のものでは K=0.105, G=2.87 日、同じく 0.02 mg のものでは K=0.106, G=2.84 日という値が得られた。

以上の表及び図を見て判るようにわれわれの行つた実験では菌が対数的増殖を示すのは大体 8 日間であるが最初の接種量の多かつた場合、即ち第 1 回目の実験で接種窒素量が 0.06 mg のものでは僅か 4 日間しか対数的増殖を示さなかつた。(第 3 表において点線から上の部分が対数的増殖を示す) 尚われわれの行つた実験では培養直後より菌は対数的増殖を示し所謂 lag phase と思われるような時期は認められなかつた。

また、この対数的増殖を過ぎた後の窒素の測定値は arithmetic な増加を示すように思われた。

4. 総括並びに考按

Small inoculum technique による Generation time の測定法は Youmans の如く簡単でかつ比較的正確であり、判定方法に主観の混入する嫌いがあるとはいえ誤差は僅小であつて、緒言で述べた如き種々の目的に応用するには手頃な方法であると思われる。唯この際 Youmans 等の指摘する如く lag Phase の存在が方法の正確にある程度の影響を及ぼして来るのではないかということを考えねばなるまい。即ち、もし lag Phase の長さが接種菌量に

関係なく **Constant** であるとすればこれは勿論、成長速度の測定に何らの影響を与えないが、Winslow,¹⁰⁾ Topley¹¹⁾ 等のいう如く一般に **lag Phase** は接種菌の量と反比例するものとすれば、第1図における直線の傾斜はかかる **lag Phase** が存在する場合幾分緩くなるものと考えられる。然しながら細胞の数における増加と質量における増加とは本来差があるもので Hershley,⁹⁾ Winslow¹⁰⁾ 等によれば、細菌が最適な **Medium** に接種された時にはその質量の増加は最初から一定の速度で進行するが、これに反し **Plate count** によつて測定すれば細胞分裂の速度は所謂 **lag Phase** の存在を示す。即ち先づ質量がふえて次に数がふえると考えられる。(実際に、**Micro-Kjeldahl** 法でわれわれの行つた実験では窒素は最初から対数的増加を示した。) 然し Youmans の指摘しているように **Small inoculum technique** は本質的に細菌の質量の測定による成長速度の測定である。従つて **lag Phase** の存在あるいは欠如ということは注意を要する程大きくは測定の正確性に影響しないといえよう。

次にわれわれは **Small inoculum technique** の第2回目及び第3回目の実験において前述の如く **Tween 80** を 0.05% の割に加えた培地を用いた。これは第2報として報告する予定の培養菌液の **Turbidity** による **Generation time** の測定法と本法とを比較するために行つたのであるが、**Tween 80** が一般に菌の成長に遅延的影響をもつということは Fisher¹²⁾, Wong¹³⁾, Forrest¹⁴⁾, Kirby¹⁵⁾, Youmans¹⁶⁾ 等、すでに多くの文献に示されている。然しわれわれの行つた実験では第1回目の **Tween 80** を加えなかつた場合より第2、第3回目の **Tween 80** を加えた場合の方が、**Generation time** はむしろ短縮されて測定された。この場合に用いた菌の **age** は実験材料の項で述べた通りであるが、そのソートン培地における増殖状態を見るに、第1回目の実験に用いた菌は菌膜類粒状を呈してあまり成長状態の良好なものではなかつた。これに反し第2回及び第3回目の実験に用いた菌はソートン培地において薄膜を形成し成長状態良好のものであつた。要するに菌の **age** が若くかつソートン培地における成長の良好なも程、**Generation time** が短縮して求められるようであり、かかる点より考えると、**Tween 80** が **B.C.G.** の成長を促進することはあり得ぬとしても、少くとも 0.05% 位の濃度では菌の成長に影響を及ぼさないと見るか、あるいはそれよりもむしろ使用した菌の生理的状态の方を重要な **Factor** と考えるべきであろう。

次に培養菌の窒素測定 (**Micro-Kjeldahl** 法) による **Generation time** の測定は対数増殖期を過ぎた後も連続的に菌の成長状態を観察し得る点は **Small inoculum tech-**

nique より有利といえようが、後者に比し遙かに多大の労力と時間を要し、また用いる試薬等はすべて窒素の混入せぬ純品でなければならぬから、経済的にも難点を持つているといわなければならない。また窒素を測定するという手段そのものは合理的であつても培地中の菌を悉く遠心沈澱して探るといふ過程において多少とも誤差は免れ難いであろう。この遠心操作に関しては Youmans は **Super-Cel** の 2% **Suspension 1 cc** 及び **Potassium lauryl Sulfate** の飽和溶液 10 cc を加えて 3500 回転、5 分間の遠心を行つており、この **Potassium lauryl Sulfate** は **Wetting agent** として、また **Super-cel** は沈澱を固着させるものとして遠心を助けるといつている。一方わが国の文献を見ると片山¹⁷⁾ 等は濾過して培地成分を除いた菌体を、濾紙と共に硫酸で分解して窒素測定を行い、佐々木¹⁸⁾ は大腸菌についてであるが、4500 回転、40 分遠心沈澱後食塩水で 3 回遠心洗滌し、その沈澱について **Micro-Kjeldahl** 法を行つている。われわれは Youmans の例にならつて遠心を行わうとしたのであるが、われわれの入手した **Super-cel** 及び **Potassium lauryl Sulfate** は共に相当の窒素を検出する不純品であつた為これの使用を取り止めた。一方片山等の方法は余程精製して成分の一定せる濾紙を用いぬ限り濾紙中の窒素成分をも共に測ることになり、相当の誤差が起ると考えられる。但し片山等は **Generation time** の測定を行つているわけではなく、結核菌のアミノ酸代謝を調べる目的で単にその成長曲線を調べているに過ぎないから、かかる方法でも差支へはないのであろう。然しこの方法はわれわれの求める如き **Generation time** の測定には適当でないと考えられる。従つてわれわれは佐々木の行つたように単に遠心後洗滌の方法をとつたのであるが、この場合われわれは先づ 3500 回転、60 分遠心蒸溜水を以て再度同様な遠心洗滌をくり返した。勿論この方法を以てしても培地中の菌を完全に遠心沈澱し得たとはいへず、多少の誤差は免れ難いであろう。然し、本実験に着手する前にわれわれは予備実験として **Per cc 1 mg** の菌液をつくり、その 3 cc を 3500 回転、60 分遠心沈澱し、その上清 0.1 cc を取つて小川の培地に培養してみたところ生じて来た **Colony** 数は大体 10 数個、多くて 20~30 個であつた。今仮りに菌量 1 mg 中の生菌数を約 3000 万乃至 8000 万とすると 3 mg では約 9000 万乃至 2 億 4000 万であるが、上清 0.1 cc につき生じた **Colony** は僅か 20 個内外であるから、上清 3 cc では約 600 に過ぎず、総菌数に比べ沈澱しない菌はそれ程問題になるとは思われぬ。従つてわれわれの行つた方法でも、多少の誤差はあれ窒素の測定値に問題とされる程大きな影響を与えることはないと思ふ。

この Micro-Kjeldahl 法で得られた Generation time の値は先に第 3 表に示した如くであり、実験 1、と実験 2 の間には相当の開きがあるが、夫々の実験における 2 種の異なる稀釈の間の値は近似し、大体実験誤差の範囲内で一致していると見做してよいと思われる。即ち接種菌量に関係なく成長速度は一定であるということが出来、この点 Small inoculum technique において見たと同じ関係が成立して居る。

また、われわれの行つた実験では先に述べた如く認められた logarithmic phase は大体 8 日間であり、ただ実験 1 の最初の接種室素量 0.06 mg の如く比較的少量の菌を接種した場合にはその logarithmic phase が短縮しているのが認められた。この logarithmic phase を過ぎた後における室素の測定値は arithmetic の増加を示すように思われるのであるが、この logarithmic phase の後に所謂 arithmetic linear growth のつづくことに関しては、Fisher 及び Kirchheimer^{10), 11)} の報告があり、彼等はこの発育形式は非抗酸性菌には認められず、抗酸性菌の特徴であると述べている。然し Volk 及び Myrrik²¹⁾ はこれに反駁して、mycobacterium 及びその他の通性好気性菌は振盪して常に aerate した場合に logarithmic に発育するものであつて、aerate しない時のみ arithmetic linear growth を生ずるものであり、これは酸素消費の速度が酸素分散度を超えるためであるという。また Halpen 及び Kirchheimer¹²⁾ は後にかかる発育を示すのは酸素の消耗がその原因であるとしている。何れにせよわれわれの実験成績では (logarithmic phase の過ぎたあと余り長く実験をつづけて居ないので適確にはいえないが) arithmetic linear growth が存在するようと思われる data が示されて居る。

尚、実験 1 と実験 2 における Generation time の値の開きについては、Youmans も Growth rate constant 及び Generation time が接種菌の量及び接種に用いた culture の age に関係なく変化することを観察して居り、培地の化学的組成及び物理的成長条件が一定である以上、これは接種に用いた菌の Physiological state の相異を表わすものと思われると述べている。われわれの用いた菌については先に実験材料の項で述べた通りであるが、そのソートン培地における発育状態は実験 1 に用いた菌は菌膜顆粒状で余り良好のものではなかつたのに対し、実験 2 に用いた菌は薄膜状を呈し成長良好のものであつた。即ち用いた菌の age が若くソートン培地における成長状態の良いものの方が Generation time が短く与えられたことは Small inoculum technique の場合と同様である。

尚、以上の Small inoculum technique と Micro-

Kjeldahl 法、また、われわれの実験と Youmans 等のそれにおける成績とを比較することは、用いた菌株、培地、その他の条件等が異なるのであるから、妥当なことではないことは勿論であるが、ただ、Small inoculum technique と Micro-Kjeldahl 法を較べて前者の方がより簡便であり、かつ、毒力菌を用いるような場合にも危険が少ない点において種々の方面に応用し易い方法であると思う。

5. 結 論

Small inoculum technique 及び Micro-Kjeldahl 法による培養菌の室素測定によつて、BCG 予研株の Generation time の測定を行つた。その結果、前法にては 3 回実験をくり返して夫々 21.7 時間、19.2 時間、15.6 時間という値を、後法においては最初の総室素量を異にする 4 種の接種量について測定を行い夫々 4.04 日、3.88 日、2.87 日及び 2.84 日という数値を得た。これ等の方法は結核菌の成長速度についての種々の物質あるいは物理的条件等の影響を検するには広く応用され得るものと思う。

稿を終るに当り終始指導、御校閲を頂いた恩師大原教授、ならびに Micro-Kjeldahl 法について種々御教示を頂いた本研究所化学部西風助教授、関川講師に深甚なる感謝を捧げる。尚本論文の要旨は第 30 回日本結核病学会総会において述べた。

文 献

- 1) Youmans. G. P. : J. Bact. 51, 703—710, 1946.
- 2) Youmans. G. P., Youmans. A. S. : J. Bact. 58, 247—255, 1949.
- 3) Kirchheimer. W. F., Youmans. G. P. : Am. Rev. Tuberc. 66 (4), 486—496, 1952.
- 4) Youmans. G. P., Youmans, A. S. : Am. Rev. Tuberc. 64 (5), 534—540, 1951.
- 5) 辻本 : 大阪大学医学雑誌. 4 (4), 263, 昭 27.
- 6) 横井, 新明, 信太. : 結核の研究. 第 2 集, 88—96, 1954.
- 7) Mueller. J. H. : J. Bact. 29, 283—387, 1935.
- 8) Hershey. A. D. : J. Bact. 37, 285—299, 1939.
- 9) 中村 (豊) : 細菌学免疫学講本 (1) 第 13 版 205 頁 日本医書. 昭 28.
- 10) Winslow. C. E., Walker. H. H. : Bact Rev 3, 147—186, 1939.
- 11) Topley. W. W. C., Wilson. G. S. : Principles of bacteriology and immunity, Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 12) Fisher. M. W. : Am. Rev. Tuberc. 57, 58—52, 1948.
- 13) Wong. S. C., Hambly. A. S., Anderson. H. H. : J. Lab. Clin. Med. 32, 837—841, 1947.

- 14) Forrest. H. S, Hart. P. DA, Walker. J : Nature, 160, 94, 1947.
- 15) Kirby. W.M. M, Dubos. R. J : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 66, 120—122, 1947.
- 16) Youmans. A. S, Youmans. G. P : J. Bact. 56, 245—252, 1948.
- 17) 片山・田中・青木 : 結核. 29 (12) 472, 1954.
- 18) 佐々木 : J. Antibioitcs. 4, 155—160, 1950.
- 19) Fisher. M. W, Kirchheimer. W. F : J. Bact. 62, 319, 1951.
- 20) Fisher. M. W, Kirchheimer, W. F : Am. Rev. Tuberc. 66 (6) 758—761, 1952.
- 21) Volk. W. H, Myrrik, Q. N : J. Bact. 64 (4), 386, 1955.
- 22) Halpen. B, Kirchheimer. W. F : Am. Rev. Tuberc. 70 (4) 665—671, 1954.
- 23) 落合, 津田 : 有機微量小量定量分析法.