結核菌の Generation time について

第 2 報　培養菌液の Turbidity による Generation time の測定

新明美仁　信太隆夫　横井敏夫
（北海道大学結核究究所細菌部：主任　大原　達教授）

（受付　昭和 30 年 11 月 30 日）

1. 緒　　言

すでに前報において述べた如く，結核の研究においては色々な目的から菌の Growth rate 乃至 Generation time の測定が屢々必要となつてくる。然しながら，結核菌殊に人型菌の Growth rate が正確に調べられるようになつたのは比較的最近のことに属し，正しい意味では 1946 年における Youmans[1] の発表を以て最初の報告と見做すべきであろう。勿論それ以前にもに菌の Growth rate を求めんとする試みが全く無かつたわけではない。然し従来結核菌は薄膜の状態としてのみ培養されていたため，培養に当つて均一な inoculum が得難く，その上 Growth rate の測定は培地表面の菌苔を乾燥秤量するもので，技術的な困難と不正確さは Mueller[2] も指摘した通りである。今日では衆知の如く均等培養が容易となり，従つて Generation time も比較的正確に求められるようになつたが，測定の方法に関しては前記 Youmans 等[1),3~5)] の研究に負う所が極めて多い。我々は主として Youmans の方法[1),5)] に倣い，前報においては Small inoculum technique 及び培養菌の窒素測定（Micro-Kjeldahl 法）によつて結核菌の世代時間を計算した。本報においては培養菌液の Turbidity を測定することによつてこれを求めて見たので，ここにその成績を報告する。すでに Colorimeter または Nephelometer 等を用いて培養菌液の濁度を測り，これから菌の成長状態あるいは薬剤の菌に対する影響等を検しようという試みは，Wolinsky & Steenken[6)]，Fisher & Kirchheimer[7)8)]，Volk & Myrrik[9)] 等によつて成されているが，われわれは Spectrophotometer を用いて菌液の Turbidity から Growth curve を描き，これより Generation time を計算した。

以下その詳細について述べる。

2. 実験材料及び実験方法

（i）使用菌株：前報と同じく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。この際われわれは実験を 2 回繰り返して行つたが，その第 1 回目には馬鈴薯グリセリン培地よりソートン培地へ移殖 1 代目でソートン培養 12 日間の菌，第 2 回目には同じく 10 日間培養のものを用いた。尚第 1 回目に使用した菌は前報における Small inoculum technique の第 2 回目の実験に用いた菌と，また第 2 回目の実験に用いた菌はそれの第 3 回のものと夫々同一の菌である。

(ii) 使用培地：前報と同じく Kirchner 培地を用い，これに Tween 80 を 0.05 %の割に加えた。Tween 80 を加えたのは培地中になるべく菌が均等に成長することを目的としたものである。

(iii) 菌液の調製及び培地への接種：上記の如く培養した BCG の菌膜を型の如く水晶玉入りコルベンに取り手振り法で磨砕，Kirchner 培地を以て適当に稀釈した後，これを予め一定の Kirchner 培地を容れた数本の大型コルベンに夫々 per cc 10^{-1} mg，0.05 mg，10^{-2} mg（湿潤量）となるように加え，各々を約 4 cc づつ 30～40 本の試験管に分注した。このうちわれわれは，第 1 回目の実験には Kirchner 培地中に菌が per cc 10^{-1} mg 及び 10^{-2} mg のもの，第 2 回目の実験には同じく per cc 0.05 mg 及び 10^{-2} mg のものについて測定を行つた。

(iv) 分光光度計：Erma photoelectric spectrophotmeter Model IV を使用。

（v）測定方法，上記の如く分注した，各濃度に菌を含む Kirchner 培地を 37°C の孵卵機におき，毎日それぞれ 3～4 本づつを任意に取り出して turbidity を測つた。即ち各試験管をよく振盪して培養菌液を均等ならしめ，これを光学的に均一な Cuvette に移した後，Blank に菌を加えぬ Kirchner 培地をおいて分光光度計によつて夫々

Optical density の読みを記録した。この際われわれが用いた波長は 500 mμ, 550 mμ, 600 mμ 及び 650 mμ の4種である。尚実験を行うに先立ち，予備実験として波長別に菌液の濃度と Optical density の読みとの関係を調べたところ，大体以上の波長についてはある範囲内（大体菌液の濃度において per cc 0.1 乃至 4.0 mg の間，optical density として 0.02 乃至 0.7 の間）においては Lambert-Beer の法則に適合して Optical density は菌液の濃度に正比例することが知られた。即ち普通方眼紙の縦軸に Optical density, 横軸に turbidity を取つて図示すると，両者の間に原点（0）を通る直線関係が得られる。以上4種の波長のうちでは 500 mμ が実際の測定に当つて最も透過率の低い，即ち最も吸収度の高い波長であつた。

3. 実験成績

上記の如くわれわれは，第1回目の実験においては Kirchner 培地への接種菌量が夫々 per cc 10^{-1} mg 及び 10^{-2} mg の2種，第2回目の実験においては同じく 0.05 mg 及び 10^{-2} mg の2種につき，日を追つて Optical density を測つた。その成績は**第1表**及び**第2表**に示した通りである。**第1表**は実験1，第2表は実験2における成績で，表中の数値は Optical density の読みを表わし，

第1表 培養菌液（B. C. G）の O. D と培養日数との関係 （EXP. 1）

接種菌量 (per cc)	10^{-1}mg				10^{-2}mg			
波長 (mμ)	500	550	600	650	500	550	600	650
第1日	0.05	0.045	0.04	0.03				
2	0.085	0.065	0.055	0.055				
3	0.115	0.09	0.08	0.08	0.035			0.02
4	0.16	0.13	0.11	0.11	0.04			0.025
5	0.20	0.17	0.15	0.135	0.06	0.05	0.04	0.04
6	0.215	0.19	0.17	0.155	0.08	0.075	0.065	0.06
7	0.245	0.22	0.195	0.19	0.11	0.09	0.08	0.07
8	0.27	0.25	0.21	0.20	0.15	0.14	0.12	0.115
9	0.29	0.27	0.23	0.22	0.23	0.21	0.17	0.16
10	0.34	0.30	0.26	0.24	0.24	0.22	0.18	0.17
11	0.38	0.32	0.28	0.26	0.26	0.23	0.19	0.18
12	0.40	0.34	0.30	0.28	0.28	0.24	0.20	0.20
13					0.29	0.26	0.22	0.21
14					0.30	0.28	0.24	0.23

第2表 培養菌液（B. C. G）の O. D と培養日数との関係 （EXP. 2）

接種菌量 (per cc)	0.05 mg				10^{-2}mg			
波長 (mμ)	500	550	600	650	500	550	600	650
第1日	0.02	0.02	0.015	0.015				
2	0.03	0.03	0.02	0.02				
3	0.045	0.04	0.03	0.03	0.025	0.02	0.015	0.015
4	0.06	0.055	0.04	0.04	0.03	0.025	0.02	0.02
5	0.10	0.09	0.07	0.07	0.05	0.04	0.03	0.03
6	0.14	0.13	0.10	0.10	0.06	0.055	0.045	0.04
7	0.16	0.14	0.112	0.11	0.10	0.08	0.095	0.065
8	0.18	0.16	0.135	0.12	0.13	0.115	0.095	0.085
9	0.19	0.17	0.14	0.13	0.15	0.13	0.105	0.105
10	0.205	0.185	0.15	0.14	0.17	0.16	0.13	0.125
11	0.23	0.20	0.17	0.15	0.20	0.19	0.155	0.145
12	0.24	0.22	0.19	0.17				

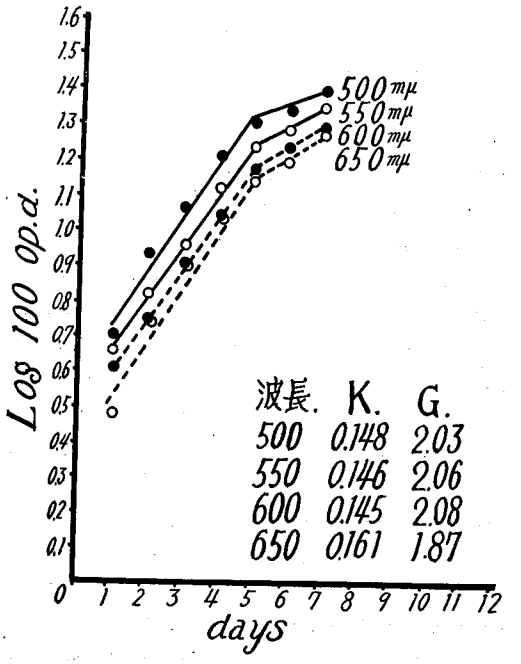

Fig. 1 培養菌液（BCG）の O. D と培養日数との関係（Exp 1. 接種菌量 Percc 10^{-1}mg）

かつこれ等 Optical density の値はそれぞれ3乃至4本の培養試験管について測つた値を平均したものである。尚これ等の表において点線を施した部分までが logarithmic

の成長を示す。

今縦軸に **Optical density** の 100 倍の対数，横軸に培養日数をり，各実験別及び菌量別に第 1 表及び第 2 表の

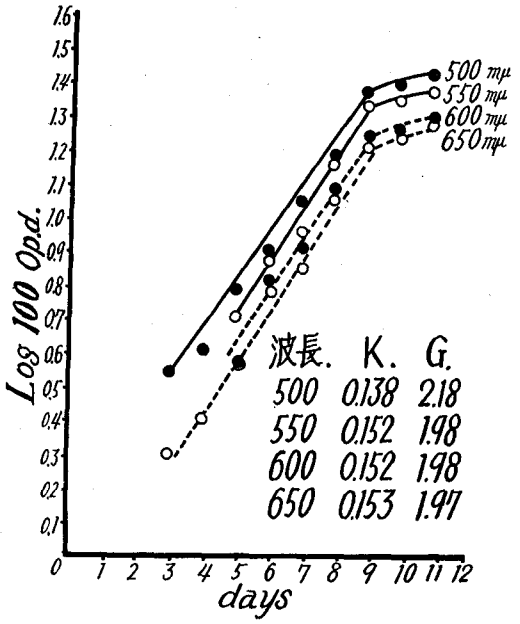

Fig. 2 培養菌液（B.C.G）の O.D と培養日数との関係 （Exp 1. 接種菌量 10^{-2} mg）

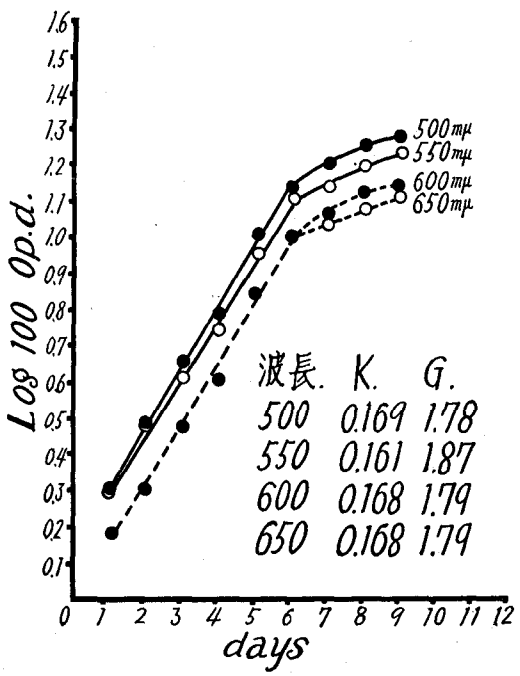

Fig. 3 培養菌液（B.C.G）の O.D と培養日数との関係（Exp 2 接種菌量 Per cc 0.05 mg）

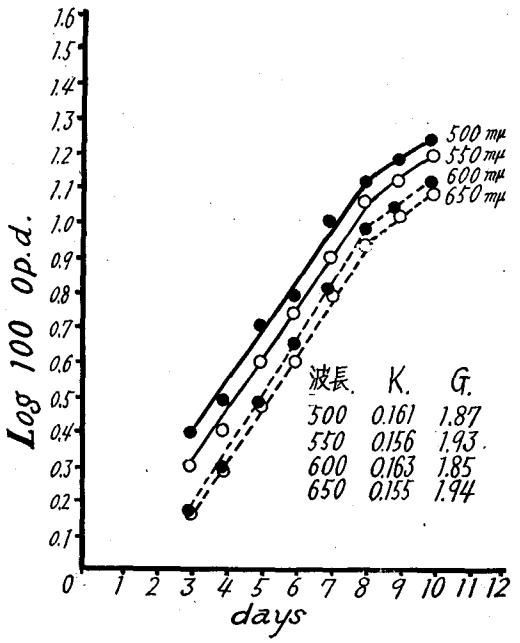

Fig. 4 培養菌液（BCG）の O.D と培養日数との関係 （Exp 2 接種菌量 Per cc 10^{-2} mg）

成績を plot して見ると，Fig 1, Fig 2, Fig 3 及び Fig 4 に示すような curve が得られる。これ等の図の直線部分，即ち logarithmic phase の data から第 1 報におけると同様に最小自乗法によつて Growth rate constant (K) を求め，更に $G=\frac{\log 2}{K}$ によつて Generation time（G）を求めると第 3 表に示す如き数値が得られる。個々の数値は表に見る通りであるが，全体を通覧して見ると，測定に用いた波長ならびに接種菌量に関係なく，何れ

第 3 表 培養菌液（BCG）の O.D. から得た K 及び G

実験番号	第 1 回				第 2 回			
接種菌量 (per cc)	10^{-1} mg		10^{-2} mg		0.05 mg		10^{-2} mg	
波長 (mμ)	K	G	K	G	K	G	K	G
		時間		時間		時間		時間
500	0.148	48.7	0.138	52.3	0.169	42.7	0.161	44.9
550	0.146	49.4	0.152	47.5	0.161	44.9	0.156	45.6
60.	0.145	49.9	0.152	47.5	0.168	43.0	0.163	44.4
650	0.161	44.9	0.153	47.3	0.168	43.0	0.155	46.6
平 均	0.150	48.2	0.149	48.6	0.167	43.4	0.158	45.4

K = Growth rate constant
G = Generation time

の場合も大体一定した値が得られており，第 3 表から見ても求むる BCG の Generation time は大体 48 時間内外

と見做される。尚以上の表ならびに図から明らかな如く本実験において菌が対数的増殖を示した期間は概ね7日前後であり，この **logarithmic** の成長期を過ぎたあとにおける **Optical density** の読みは，**arithmetic** な増加を示すように思われた。

4. 総括ならびに考按

最近 **Youmans** 等は結核菌の **metabolism** に関する一連の研究[10)~15)]において，培地の適否，発育促進ならびに阻止物質，菌の代謝過程等を **Generation time** の面から検討しているが，われわれも結核菌の物質代謝について研究せんとするに先立ち，まづ **Generation time** の測定法に比較検討を加える目的から前報ならびに本報の実験を試みた。即ち今回は培養菌液の **turbidity** から **Generation time** を求めんとし，以上の如く 500, 550, 600, 650 **mμ** 等種々の波長において菌の **optical density** を時間的に測定した。その成績は第3表に見る如く，何れの波長で測定しても菌の **Growth rate constant** 及び **Generation time** にさしたる影響は見られなかつた。表に示された多少の差は実験誤差の程度と見るべきで，波長の種類によつて著しい差異を認めるという程のものではない。このことは，**optical density** の読みが菌液の濃度と直線的比例関係にある範囲の波長を用いる限り，**Generation time** の測定には何れの波長る用いても差支えないことを示している。しかしながら吸収度の低い波長（例えばこの場合には 600, 650 **mμ** の波長）を用いた場合，**Optical density** の読みは多少低く表われるから，僅かの誤差でも **data** に与える影響が幾分大きいということはいえるかもしれない。従つてこの場合，求められる **Generation time** の値に対する誤差もまた大きくなるに反し，吸収度の高い波長（この場合500, 550 **mμ** の波長）で測定を行う時には **Optical density** の読みが高く与えられるから，多少の誤差があつても **data** に対する影響は前者よりも少いと考えられる。

次に波長別の外，接種菌量別に **Generation time** を眺めて見ると，実験1と実験2の間にやや差が認められるとはいえ，夫々の実験においては接種菌量に関係なく大体一致した **Generation time** の値が得られている。このことは第1報の **Micro-Kjeldahl** 法においても同じく認められた事実で，この範囲の菌量では接種量に関係なく成長速度は大体同一と考えて差支えないものと思われる。

尚前出の **Fig 1** 乃至 **Fig 4** において，理論的には縦軸に菌量の対数を取るべきであり，かつ **Generation time** の算出に当つては **Optical density** の値からその場合の菌量を計算して出し，その値より **Generation time** を求むべきであるが，実際には **Optical density** そのものを用いて差支えない。何となれば実験方法の項に述べた如く，ある一定の範囲内では **Optical density** と培養菌量との間に直線関係が存在するからである（このことをわれわれは予備実験において確かめた）。即ち菌量が2倍になれば **Optical density** の読みもまた2倍になるので，**Fig 1** 乃至 **Fig 4** の如く縦軸に **Optical density** の対数をとつた場合も菌量の対数をとつた場合も，得られた直線の傾斜即ち **Growth rate Constant** に変りはない。従つて **Generation time** の計算も前出の図のままで算出し得られることになる。

さて，かくして求めた **BCG** の **Generation time** は大体 48 時間であつた。これを第1報における **Small inoculum technique** 及び **Micro-Kjeldahl** 法によるそれと比較して見るに，前者では大体 20 時間内外，後者では3乃至4日内外で，何れも今回の値との間に可なり大きな喰い違いを示している。得られた値の大小から見ると，今回の **Turbidity** による **Generation time** は，丁度 **Small inoculum technique** 及び **Micro-Kjeldahl** 法から求められた値の中間に位する。いうまでもなく菌の **Generation time** は菌型，菌株ににによつて異り，また同じ菌株でも菌の発育状態，**age**，培地の種類，測定方法等によつて異るものであるから，それぞれの状態において測つた **Generation time** の値は何れが正しく何れが誤りというべきものではない。しかしわれわれが前報ならびに本報において用いた菌株は何れも同じ **BCG** 予研株であり，使用培地もまた同一である。そうなると上述の 20 時間から4日に至る **Generation time** の開きは，何に由来するかを当然考えて見なければならないであろう。殊に本実験において使用した菌はすでに実験材料の項で述べた如く，第1報の **Small inoculum technique** において用いた菌と同一のものである（即ちわれわれはこの2つの実験を同時に平行して行つた）。にも拘らず本報で得た値は概ね 48 時間であり **Small inocuulm technique** によつて得た値（20 時間内外）に比較すれば2倍以上の開きが認められた。かくの如く使用菌及び培地が同一であるにも拘らず測定値に相当の開きがあることを見れば，その原因は菌の生理的条件に関係するものではなく，専ら測定方法に帰因するものと考えなければならないであろう。

しからばいずれの測定値が真に近いものであり，いずれの方法がより優れたものであるか，という問題も起つて来るが，直ちにこれに解答を与えることは難しいといわねばなるまい。ただここで考えられることは，今回の方法と **Small inoculum technique** の場合において，初めの接種菌量に相当の開きがあるということである。後者においては名の示す通り極めて微量の菌量から **Generation time**

を算出したのであるが，今回の如き turbidity を測定する方法においては，単位容量における菌の濃度が一定度以上に達しない限り光学的に溷濁度を測定し得ない。従つてこの方法では最初の接種量としてある程度以上の菌量が必要になつてくる。とはいえ，直ちにこれを測定値の異る理由と考えることは，前述した如く本実験において菌の成長速度が接種菌量に関係なく同一であつたという事実と矛盾することになるかも知れない。然しこれはある一定の範囲内に於てのみ認められることであつて，ある程度以上大量の菌を接種した場合には，菌の増殖はなお対数的であるとしても，成長速度が多少遅くなるということは想像し得られるのではあるまいか。培地に少量の菌を接種した場合，多量の菌が培養された時よりも成長速度に対し好適の条件を与えるということはすでに Youmans[3] も指摘している所である。果して然りとするならば，turbidity を測定する本法よりも更に大量の菌を必要とする Micro-Kjeldahl 法において Generation time の値が一層大きなものになつたことも一応説明し得られるであろう。勿論このことのみによつて Generation time の開きを理解しようとするのは早計というべきで，例えば本報の方法は連続的な方法であるに対し，Small inoculum technique は非連続的な方法であるというようなことも関係しているかも知れない。然し何れにせよ，培養に用いた最初の菌量が最も少い Small inoculum technique，菌量中等度の本法，菌量最大の Micro-Kjeldahl 法という順に，求められた Generation time の値もまた同じ順序をとるという事実は興味深く思われる。

但し3つの方法を比較して見た場合，1つの方法で成長速度の早かつた菌は他の方法においても同様であつた。この場合は同一菌株，同一培地であつても測定された菌の生理的状態が違つていたものと考えるべきであろう。例えば本報において実験1よりも実験2に用いた菌の方がやや早い Growth rate を示したが，ソートン培地における実際の発育が後者は確かに良好なものであつた。

なお Kirchheimer & Youmans[4] は結核菌に対する Streptomycin の影響を検討するに当つて Generation time の測定を行つているが，この報告において彼等の求めた Generation time は 21.1 ± 0.2 時間であつた。この値は Nephelometer を用いて本報と同様に turbidity から算出したものであるが，我々の Small inoculum technique による値と大体近似して居る。従つて turbidity 測定による我々の値（48 時間内外）とは可なり開きがあるが，Youmans 等の用いた菌株は $H_{37}Rv$，使用培地は Dubos 変法培地であり，われわれの用いた BCG とは菌型菌株が異るのみならず，菌自身の生理的条件においても当然違いがあると思われるから，彼我の成績を直接比較すべきでないことはいう迄もなかろう。

次に本実験における BCG の成長曲線を眺めて見よう。上記の実験成績に見られる如く，われわれの実験では菌が logarithmic の増殖を示す期間は概ね7日前後であつた。然し実験1の如く接種菌が per cc 10^{-1} mg というような比較的多い菌量を最初から接種したものでは，その対数増殖期がやや短縮しているのを認めた。このことは第1報の Micro-Kjeldahl 法による Generation time 測定の成績と対照して，一般に最初の接種菌量の多いもの程 logarithmic phase は短くなると考えてよい可能性を示すものと思われる。かかる logarithmic の成長期を過ぎたあとの Optical density の読みは前述の如く arithmetic に増えるように思われるが，この点に関して Fisher[5]，Volk[9]，Halpen[16] 等の興味深い報告のあることは第1報において述べた。

尚最初の接種菌量が per cc 10^{-1} mg 及び 0.05 mg のものでは，Optical density の読みが培養後最初から日を追つて対数的に増加し，所謂 Lag phase と思われるような時期は存在しなかつた。但しこれよりうすい per cc 10^{-2} mg の菌液においては，培養後2日間程その Optical density を正確に読み得なかつた為，Lag phase の存否に関し明言し得ないのを遺憾とする。われわれの今回の方法は，前報において述べた Small inoculum technique や Micro-Kjeldahl 法などと同様に，本質的には細菌の質量の増加を測る方法である。かかる方法において細菌が好適な Medium に接種された場合，その質量の増加は最初から一定の速度で進行することは，すでに Herschey[17]，Winslow & Walker[15] 等によつても示されている。

然し最初の接種菌量が per cc 10^{-1} mg より濃いものでは，Optical density と培養日数との間に直線関係は得られなかつた。即ち対数的な増殖は認められなかつた。この事実と，最初の接種菌量の多いもの程その logarithmic phase が短縮するという前記の事実とは互に関連のある問題と思われる。この点は，菌量の多いために培地中の栄養分が比較的の不足を来し，菌が十分な栄養を得られないことに起因するとも考えられるし，また Halpen & Kirchheimer[16] や Volk & Myrrik[9] のいう如く，酸素の消耗，或いは培地中酸素の分散度と菌の酸素要求量の不均衡ということも考慮に入れなければならないであろう。また菌液の濃度の高いため Optical density の読みが不正確になることも考慮する必要があり，われわれの実験資料だけでは断定の出来ない問題である。

以上分光光度計によつて培養菌液の Optical density を測定しこれから Generation time を算出する方法は，

Small inoculum technique に比較しや多くの労力を要するとはいえ，Micro-Kjeldahl 法による培養菌液の窒素測定を以てする方法よりは遙かに簡単であり，かつ結核菌の成長状態を対数増殖期の前後に亘つて長く観察することが出来るという点においては Small inoculum technique より優つて居るともいい得る。従つて本報に記載した方法は前報の二者と共に結核菌の metabolism の研究や，種々なる物質あるいは物理化学的条件等の結核菌成長速度に与える影響等を検するのに広く用い得るものと考えられる。

5. 結　　論

BCG 予研株を 0.05 % Tween 加 Kirchner 培地に培養して turbidity の増加を日を追つて測定し，得たる Optical density の読みから Generation time を測定する方法について述べた。第1回目には接種時の菌量 per cc 10^{-1} mg 及び 10^{-2} mg，第2回には per cc 0.05 mg 及び 10^{-2} mg のものを用い，夫々 500，550，600 及び 650 mμ の4種の波長について2回実験を行つたが，得たる BCG の Generation time は概ね 48 時間であつた。この方法は結核菌に対する血清・薬剤等の影響を検する上に，あるいはまたその metabolism の研究等に，広く応用し得るものと考える。

稿を終るに臨み，終始御指導を頂いた大原教授に深く感謝する。

引 用 文 献

1) Youmans, G. P.: J. Bact. 51, 703, 1946.
2) Mueller, J. H.: J. Bact. 29, 383, 1935.
3) Youmans, G. P. & Youmans, A. S.: J. Bact. 58, 247, 1949
4) Kirchheimer, W. F. & Youmans, G. P.: Am. Rev. Tuberc. 66 (4), 486, 1952.
5) Youmans, G. P. & Youmans, A. S.: Am. Rev. Tuberc. 64 (5), 534, 1951.
6) Wolinsky, E. & Steenken, W.: Am. Rev. Tuberc. 55, 281, 1947.
7) Fisher, M. W. & Kirchheimer, W.F.: Am. Rev. Tuberc. 66 (6), 758, 1952.
8) Fisher, M. W. & Kirchheimer. W. F.: J. Bact. 62, 319, 1951.
9) Volk, W. A. & Myrrik, Q. N.: J. Bact. 64 (4), 386, 1953.
10) Youmans, G. P. & Youmans, A. S.: J. Bact. 65, 92, 1953.
11) Youmans, A. S. & Youmans, G. P.: J. Bact. 65, 96, 1953.
12) Youmans, A. S. & Youmans, G. P.: J. Bact 65, 100, 1953.
13) Youmans, A. S. & Youmans, G. P.: J. Bact. 67, 731, 1954.
14) Youmans, A. S. & Youmans, G. P.: J. Bact. 67, 734, 1954.
15) Holmgren, N. B., Millam, I. & Youmans, G. P.: J. Bact. 68, 405, 1954.
16) Halpen, B. & Kirchheimer, W. F.: Am. Rev. Tuberc. 70 (4), 665, 1954.
17) Hershey, A.D.: J. Bact. 37, 285, 1939.
18) Winslow, C. E. A. & Walker, H. H.: Bact. Rev. 3, 147, 1939.