



Title	液体培地中の結核菌發育に對する算定曲線(Verhulst)の適合性について
Author(s)	荻田, 友雄; OGITA, Tomowo
Description	
Citation	結核の研究, 4, 3-6
Issue Date	1956-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26590
Type	departmental bulletin paper
File Information	4_P3-6.pdf



液体培地中の結核菌發育に對する算定曲線 (Verhulst) の適合性について

荻田友雄

北海道大学結核研究所 細菌部 (主任: 大原 達教授)

(昭和 31 年 2 月 20 日受付)

1. まえがき

一般に細菌を液体培地中に培養した場合、増殖した菌数を一定時間毎にグラフ上に plot して行くと特定の曲線が得られる。この増殖曲線は多くの場合 sigmoid の形をとるが、Robertson¹⁾ 及び Rotka²⁾ はこれが Verhulst³⁾ によつて導かれた算定曲線 (logistic curve) に良く一致している事を報告した。わが国においては東大物療内科の佐々木⁴⁾ が黄色ブドウ球菌を用いてこれを確認している外、川上⁵⁾、川上・松山⁶⁾ 等は staphylococcus aureus の methylene blue 還元に対する penicillin の影響を調べた実験において、色素の褪色時間と penicillin 濃度との間に同様な関係式が成立するのを見て居る。著者は結核菌の如き發育の極めて緩徐なる菌を用いた場合にも、同様に Verhulst の算定式を満足するような増殖が認められるか否かを調べて見た。この実験においては、結核菌の菌数を直接測定する代りに、micro-Kjeldahl 法による菌体窒素の測定及び spectrophotometer による Optical density からこの関係を調べたが、予期した通り略々算定曲線に適合する事を知り得たので、その成績を茲に報告する。

2. 実験材料並びに実験方法

i) 使用菌株及び培地 : 馬鈴薯グリセリン培地より Sauton 培地へ移植せる BCG 予研株を使用。培養 10 日目の菌膜を無菌的に秤量し、型の如く手振り法によつて磨碎した後 Tween 80 を加えた Kirchner 培地に所定の濃度になる様移植し、日を追つて Optical density の測定及び菌体窒素の定量を行つた。Optical density 測定用の菌は培養液中の濃度が夫々 per cc 0.01 mg, 0.05 mg, 及び 0.1 mg (湿潤量) の 3 種, micro-Kjeldahl 定量用の菌は菌体窒素量が夫々 per cc 0.015 mgN, 0.02 mgN 及び 0.03 mgN の 3 種を用いた。

ii) 分光光度計 : Erma photoelectric spectro-

photometer model IV を使用。

iii) Optical density の測定法 : 上記 3 種の濃度に菌を含む Kirchner 培地を毎日夫々 3 乃至 4 本宛取り出し、よく振盪して菌液を均等ならしめた後、blank に菌を加えぬ Kirchner 培地を以て、分光光度計により夫々の optical density を読む。記録は 3~4 本の平均値を以て行つた。なお、用いた波長は 500 m μ , 550 m μ , 及び 630 m μ の 3 種である。

iv) 菌体窒素の定量 : 2 日毎に同じく夫々の濃度の培養菌液を 3 乃至 4 本宛取り出してその全内容を遠沈管に移し、3500 r.p.m. 60 分間遠心沈澱後上清を吸引して捨て、更に 2 回蒸溜水を以てよく洗う。最後の沈渣を分解コルベンにとつてこれに触媒粉末 (硫酸銅-硫酸カリ 1:3) 及び濃硫酸を加え、液が硫酸銅色を呈するまで加熱沸騰せしめる。これを蒸溜水で稀釈して Kjeldahl 装置の蒸溜コルベンに移し 30% 苛性カリを加える。これに水蒸気 (蒸溜水 + 硫酸一滴) を通して發生するアンモニア・ガスを methyl red で着色した n/100 HCl 中に導き、n/100 NaOH で滴定すれば、型の如き計算により菌体窒素を推定し得る。

v) Verhulst の算定式に對する適合性の検定。Verhulst は、生物の増殖する速度が、その時に存在する個体数 y と、これが飽和の値 L に達するまでの個体数の増加 ($L-y$) との関係から導かれるものと考え、微分方程式

$$\frac{dy}{dt} = K(L-y)$$

を解いて次の如き算定式を導き出した。

$$y = \frac{L}{1 + e^{-r(t-a)}}$$

ここに L は $t = \infty$ の時の y の値、即ち y の達し得る上限、 a は y が $\frac{L}{2}$ に達するまでの時間、 r は t が a なる時の發育速度に $\frac{4}{L}$ を乗じたものである。

即ち $L = y(t = \infty)$, $a = t\left(y = \frac{L}{2}\right)$, $r = \left(\frac{dy}{dt}\right)_{t=a} \times \frac{4}{L}$

実験値がかかる算定曲線に適合するか否かは佐々木⁴⁾に倣い、逆数定差図^{註1)}を作り、測定値が一直線上に並ぶか否かによつて検討した。

3. 実験成績

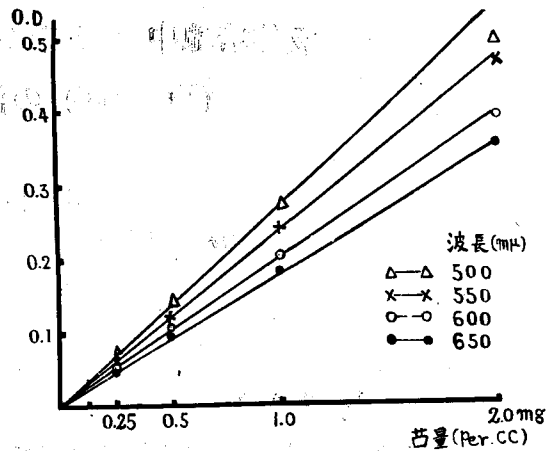
実験1. 培地中の菌数と Optical density の関係。
結核菌は他の細菌類に比較すると viable count における誤差が大きいため、今回の実験においては実際の菌数を数える代りに Optical density 及び菌体窒素量を増殖の指標として growth curve を求めた。故に先ず予備実験として、Optical density の読みは実際の菌数と parallel であるか否かを調べた。第1表がその成績である。この表は Kirchner 培地中の菌濃度が正確に per cc 0.125 mg, 0.25 mg, 0.5 mg, 1.0 mg, 及び 2.0mg となるような結核菌

第1表 培地中の菌量と Optical density の関係

波長 (mμ)	650	600	550	500
菌量(per cc)				
2.0 mg	0.35	0.39	0.46	0.49
1.0 mg	0.18	0.20	0.24	0.27
0.5 mg	0.095	0.10	0.12	0.135
0.25 mg	0.045	0.05	0.06	0.07
0.125 mg	0.025	0.025	0.03	0.035

浮游液を作り、500 mμ から 650 mμ までの波長において Optical density の読みを調べたものであるが、図示して見ると第1図の如く、菌量と Optical density の間には綺麗な直線関係が認められる。即ち一定の波長の範囲にお

第1図 第1表の図示



いては、菌量が2倍になれば Optical density の読みも2倍になるもので、この事から Optical density そのものを菌量の代りに用い得ることが明らかとなつた。

実験2. Optical density の読みによる定差図の作製。Kirchner 培地に植えた4つの sample について、24時間毎に測定した Optical density の読みとその逆数を纏めて見ると第2表の如くなる。表における Optical density の実測値をそのままグラフ上に plot するとS字状の曲線を得るが、その逆数を取つて定差図を描いて見ると第2図の如き直線が得られる。この事から見て、結核菌の発育は、Optical density によつて測定した場合大体において Verhulst の算定式を満足するものという事が出来る。

第2表 培養結核菌液の Optical Density

資料	接種量 mg	日数 測定量	日数												備考
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	0.05	O. D.	0.02	0.03	0.045	0.06	0.10	0.14	0.16	0.18	0.19	0.205	0.23	0.24	使用波長 500 mμ
		1/O.D.	50.0	33.0	22.0	16.6	10.0	7.10	6.25	5.55	5.26	4.90	4.35	4.17	
2	0.10	O. D.	0.05	0.085	0.13	0.17	0.20	0.25	0.27	0.29	0.34	0.38	0.40	0.40	"
		1/O.D.	20.0	11.76	7.68	5.90	5.00	4.00	3.70	3.45	2.94	2.63	2.50	2.50	
3	0.10	O. D.	0.03	0.055	0.08	0.11	0.135	0.155	0.19	0.20	0.22	0.24	0.26	0.28	"
		1/O.D.	33.3	18.18	12.50	9.09	7.40	6.45	5.26	5.00	4.55	4.17	3.85	3.57	
4	0.01	O. D.	0.018	0.03	0.05	0.075	0.11	0.14	0.18	0.22	0.23	0.24	0.26	0.28	550 mμ 最初の測定は3日目
		1/O.D.	55.5	33.3	20.0	13.33	9.09	7.10	5.50	4.55	4.35	4.17	3.85	3.57	

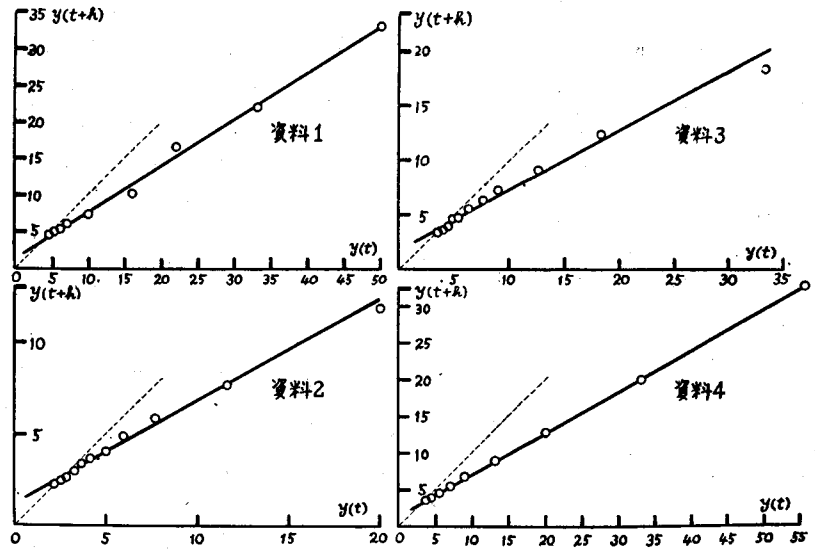
註：一般にある量 y が時間 t の函数である時、一定時間 h 毎に測定した y の値を夫々 a, b, c, ……とすれば、第1時点を横軸の座標、第2時点を縦軸の座標とする点

(a, b), (b, c), ……を順次グラフ上に plot したものを定差図という。

実験3. 菌体内窒素量測定による定差図の作製。

Micro-Kjeldahl 法によつて菌体窒素量を定量する場合は、測定技術上ある程度以上の菌量を必要とするので、この実験においては初接種量が窒素に換算して夫々0.015mg, 0.02 mg, 及び0.03 mgとなる程度の可なり大量の菌を培養した。その後の菌体内窒素の増加を2日目毎に測定した成績は第3表に示す如くである。この成績をそのままグラフ上に plot すれば拋物線様の曲線を得るが、窒素量の逆数を取つて実験2の場合と同

第2図 Optical Density による結核菌発育の等差図



第3表 培養結核菌液の窒素量

資料番号	接種量 mgN	日数 測定値	日数						
			2	4	6	8	10	12	14
1	0.03	N	0.043	0.062	0.083	0.123	0.141	0.152	
		N-1	23.25	16.13	12.04	8.13	7.04	6.58	
2	0.02	N	0.036	0.055	0.087	0.148	0.169	0.195	0.216
		N-1	27.77	18.18	11.49	6.75	5.91	5.13	4.67
3	0.015	N	0.029	0.043	0.067	0.111	0.137	0.159	0.187
		N-1	34.48	23.25	14.92	9.00	7.29	6.28	5.34

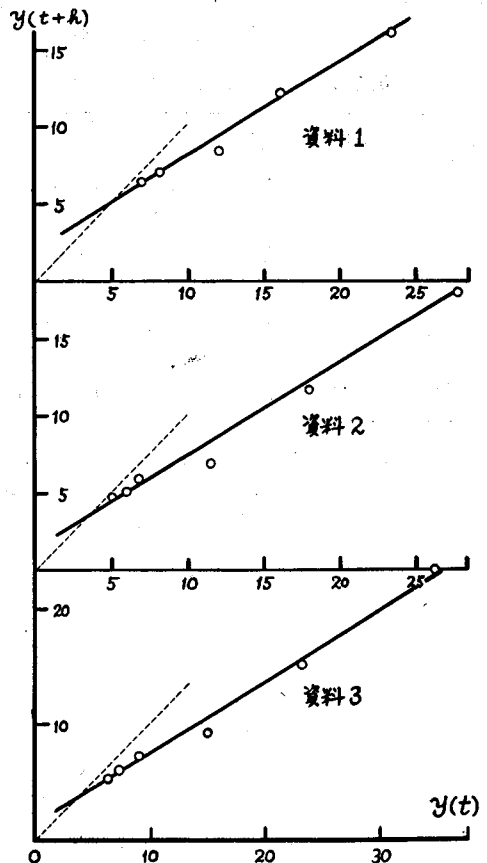
様に逆数定差図を作つて見ると第3図の如くなる。即ちこの場合も測定値は略々一直線上に並び、Verhulst の算定式が満足せられた事を示して居る。

4. 考 察

Verhulst によつて導かれた算定曲線は、人口増加、酵母の発育面積等によく適合することが知られている他、前述の如き学者によつて一般細菌の増殖にも適用されることが証明されている。今回の実験は、増殖速度において一般細菌とは稍趣きを異にする結核菌の発育もまた、この算定曲線に従うことを示したものである。その適合性を検討するに当つて逆数定差図⁷⁾を作り、測定値が一直線に並ぶか否かを見たのは次の理由による(文献⁷⁾参照)。

即ち一定時間 h の間隔をにおいて結核菌の発育を測定した場合、若しそれが算定曲線に従うならば

第3図 窒素定量による結核菌発育の等差図



$$y(t) = \frac{L}{1 + e^{-r(t-a)}} \quad (1)$$

$$y(t+h) = \frac{L}{1 + e^{-r(t+h-a)}} \quad (2)$$

$$(1)より \quad e^{-r(t-a)} = \frac{L}{y(t)} - 1 \quad (3)$$

$$(2)より \quad e^{-r(t-a)} e^{-rh} = \frac{L}{y(t+h)} - 1 \quad (4)$$

(3)を(4)に代入すれば

$$e^{-rh} \frac{L}{y(t)} - \frac{L}{y(t+h)} = e^{-rh} - 1 \quad (5)$$

となり、 $\frac{1}{y(t)}$ と $\frac{1}{y(t+h)}$ とは一次式の関係にある。従つて横軸を $\frac{1}{y(t)}$ 軸、縦軸を $\frac{1}{y(t+h)}$ 軸とし、相続く2つの実測値を夫々横座標、縦座標の値とする点を順次につないで逆数定差図を作るならば、これ等の諸点は一直線上に載る筈である。逆にいえば、定差図が一直線をなせば菌の発育が算定曲線に従うことが証明されたことになる。

尚 Verhulst の算定式には a, r 及び L の3個の常数が含まれて居るが、これ等はすべて直接定差図から求め得る。

即ち定差直線の方係数は(5)式より e^{-rh} であるが、 h は既知(われわれの場合、毎日あるいは隔日に測定を行

第4表 定差図より求めた a, r 及び L

測定法	資料番号	a	r	L
optical density	1	7.25	0.348	0.33
	2	5.00	0.549	0.40
	3	5.75	0.590	0.30
	4	8.63	0.549	0.30
micro-kjeldahl	1	6.85	0.275	0.20
	2	7.78	0.275	0.28
	3	10.05	0.235	0.28

つているので $h=1$ 、または $h=2$) であるから、定差直線の横軸に対する傾斜 θ を図から求めれば、 $\tan \theta = e^{-rh}$ によつて r を求め得る。 L は $t=\infty$ の時の y の値であ

りその場合 $y(t)=y(t+h)$ であるから、定差図の原点を通り両軸と 45° の角をなす直線と定差直線の交点を求めれば良い。この時の読みは $\frac{1}{L}$ の値を示すからこれより直ちに L を求め得る。

また a は $L = \frac{L}{2}$ なる時の a の値であるから、 $\frac{L}{2}$ を夾む2つの y の実測値から補間法によつて求められる。

かくして求めた a, r, L の値を一表に纏めたものが第4表である。この表から見ると、turbidity を指標とした場合も菌体窒素量を指標とした場合も、 L の値は可なり均一なものとして与えられて居る。即ち培地が一定ならば、接種菌量の大小に拘らず到達し得べき菌数の上限 L は一定である。 a はその半分の個数に達するまでの時間であるから最初の接種量に関係し、従つてこの場合一定の値が得られないのは当然である。なお佐々木⁴⁾によれば、plate count によつて菌数を測定した場合は、菌数そのものを用いるよりはその対数を用いた方が良く Verhulst の式に一致するといふが、著者の場合 Optical density 及び菌体窒素量は、対数をとらずにそのまま用いて良く算定式を満足することが出来た。

5. 結 論

結核菌 (BCG 予研株) の Kirchner 培地中における発育を turbidity 及び菌体窒素定量によつて調べた場合、その増殖の状態は Verhulst の算定曲線に大体一致する。

引用文献

- 1) Robertson: 佐々木 (文献4) より引用
- 2) Rotka: 佐々木 (文献4) より引用
- 3) Verhulst: 森田優三, 人口増加の分析, 昭19. より引用
- 4) 佐々木智也: J. Antibiotics 4(3), 155, 1950.
- 5) 川上保雄: J. Antibiotics, 2, 128, 1948.
- 6) 川上保雄・松山茂郎: J. Antibiotics, 2, 177, 1928.
- 7) 鳥居敏雄・高橋晁正・土肥一郎: 医学生物学のための推計学 (東京大学出版会), 118 ~ 128 頁, 1954.