

の、6号以上に分けてみると、その菌数合計は第2表の成績となつた。0号の場合は比較値を挙げることができないが、Osol法が最も多数の菌を立証し、次でJohanson法、Bender法であつた。1—5号の喀痰ではOsolは4倍近くの数字を示し、Johanson、Bender亦3倍程度、これが6号以上の群でOsol2倍以下、Johanson、Bender1倍半に満たない成績と比較すると、菌数少ない喀痰程Osol法の効果が高いことが認知され興味深く感じた。なお100例中Ziehl-Neelsen法陰性者は29名であり、その総てがOsol法で僅か1、2個のものもあるとしてもとにかく陽性に変つたが、Johanson法では4名、Bender法では11名なお陰性所見を示した。この外Gaffky各番号別に資料を整理し、これをOsol法による菌数で番号を附したものと対照する観察も行つたが、成績の傾向は全く同じであつたので省略する。勿論これによつて番号が1番も2番もときには数番も増加するものがある。しかし大体において低番号のものにおいてこの傾向が著しかつた。

第2表

染 色 法	Gaffky 0号 (29名)	1—5号 (49名)		6号以上 (22名)	
	菌数	菌数	Z. N. を100 として	菌数	Z. N. を100 として
Ziehl-Neelsen	0	515	100	5899	100
Osol法	113	2024	393	10433	177
Johanson法	90	1478	287	8320	141
Bender ピクリン酸法	58	1572	305	7364	125

(3) EgliやBenderの実験にならぬ、上記材料中の一部10例について、Ziehl-Neelsen、あるいはOsolで染色したものを普通視野及び暗視野顕微鏡で観察して成績を比較した。合計菌数はZiehl-Neelsen明視野314、同暗221、Osol明406、同暗607であつて、Ziehl-Neelsenでは暗視野で減少、Osolでは増加の数字がでてゐるが、暗視野法では結核菌たる認定に自信を持ち得ないものが時々現れ、例数が少ないこととともにこの成績に意義を与え難い。

## 結核菌の発育に関する研究

### 第二報 牛血清中結核菌深部発育促進因子について

九大医学部細菌学教室(主任 戸田忠雄教授)

#### 三 淵 一 二

#### まへがき

結核菌の深部培養基としてはKirchner血清加培地<sup>(1)</sup>をはじめ、その他多くの培養基が考案改良<sup>(2)(3)</sup>せられて

#### 要 約

結核菌のいわゆる非復染色法に属するOsol法を、その変法たるJohanson法、復染非復染色法の中間的存在と認められるBender法とともに、Ziehl-Neelsen法と比較する目的の実験を行つた。同一結核喀痰に対し4法同時に施行、その100例の合計菌数からそれらの成績を比較すると、Osol法は約2倍、Johanson法は約1.5倍、Bender法は約1.4倍、それぞれZiehl-Neelsen法にまさる効果を示している。染色法の優劣はただ単に目的菌検出の感受性だけで判ずべきものでなく、実施の容易、対照上の色調、同時に観察し得る他の所見など考慮に入れるべきであるが、これらは術式の改良いかによつては附加される可能性があり、この意味で非復染色法は今後大いに留意さるべきものと思ふ。

本法が何が故にZiehl-Neelsen法以上の菌数を立証するか、この点に関しては、細胞その他の組織成分中に封入されたものまで透見されるという在来の見方も受入れられるとして、植田教授が説かれるように、強度の加熱と強度の脱色、それと後染色を施さないことによる正常型ならざる結核菌体検出の可能性も一応考えるべきである。さらにこれは今のところ全くの想像であるが、Ziehl-Neelsen法ではいわゆる青色菌が見逃され易いのに對して、本法でこの菌体は所定の色調をとつて計算に入れられたと解し得る場合なしとも思えない。

#### 主要文献

- (1) 戸田忠雄；結核菌とBCG, 107, 3版, 昭22
- (2) Osol; Johansonより引用(Dtsch, Med, Wschr. 1927, 24)
- (3) Johanson, A.; Zbl, Bakter, I Orig, 141, 424, 1938
- (4) 植田三郎, 近藤達雄；日微生物誌, 34, 610, 昭15
- (5) 占部薫, 高木篤, 山田倫子；日医健保, 3286, 1254, 昭17
- (6) Egli; H.; 全科技聯科学技術蒐録, 第9部(10), 259, 昭19より(Schw, Med, Wschrより梅沢抄訳)。

いるが、これ等はほとんど総て血清または血漿を培地に添加したものである。一般に結核菌深部培養のために培地に血清を加えることが最も必要なことであつて、こ

の添加した血清は外界酸素の浸透し得ない培地の深部に結核菌を増殖発育せしめるのである。

この外、深部培養には臓器成分を用いた Boecker<sup>(4)</sup> や陽上<sup>(5)</sup>の培地、雞卵を主として作った Besredka<sup>(6)</sup>の培地があり、新しくは Bovine Albumin Fraction V と Tween 80 を併用した Dubos<sup>(7)</sup> の培地、ムチンを用いた中村<sup>(8)</sup>の培地があげられる。

一方結核菌発育促進因子に関する研究<sup>(9)</sup>はその他多くの細菌の発育促進因子の研究と相まつて今日迄数多くの報告がなされているが、結核菌の深部発育を可能とする因子についての研究はその数が少なく Dubos 等<sup>(7)</sup>の報告を見る程度である。

私は結核菌の深部発育に最も密接な関係にある血清について、血清中の深部発育促進因子がいかなる成分中にかつ、いかなる状態に存在しているのかを知らうと、二、三の実験を試みいささかの知見を得たので報告する。

補記：近着の J. Bakt., 60, 561, 1950. に Youmans の血漿割分と結核菌の発育に関する論文を見る機会を得かつ、今日までのこの種研究の概略を知り得たことは幸であつた。

## 実 験

血清は蛋白質をはじめ、種々の有機ならびに無機物質を含有する複雑な組成のものであるが、本実験においてはまず血清を非蛋白性成分と蛋白性成分に大別し、さらにこれ等を二、三の分離方法や分割方法をもつて、次のごとき諸成分に分別した。

### 非蛋白性血清成分

- 透析性血清成分
- アルコール除蛋白血清成分
- Eggleton 法血清濃縮成分
- 非熱凝固性血清成分

### 蛋白性血清成分

- 血清総蛋白
- 血清グロブリン
- 血清アルブミン

### Bovine Albumin Fraction V (U.S.A)

上記の分離調製した血清諸成分はこれを溶解後総て Seitz 細菌濾過器をもつて滅菌したのち滅菌キルヒネル原液に一定量加えて培地を作成した。培地は中型試験管に 5cc ずつ分注し培養に用いた。

接種結核菌は入型青山 B 菌で型のごとく菌浮遊液を作り試験管に  $10^{-3}$  mg, ずつ正確に接種、37°C 培養、各週毎に菌の深部発育状態を肉眼的に観察した。なお実験にはキルヒネル原液及びキルヒネル血清加培地を対照とし、菌の発育を比較した。

## I. 非蛋白性血清成分

### a. 透析性血清成分

牛血清をコロチオン膜に入れて三日間蒸溜水にて透析した。この間、日毎に蒸溜水は更新した。透析は室温 10°C 以下の冬季に行い防腐剤の使用をさけた。透析後その外液を合併し凍結乾燥法にて乾燥し白色粉末を使用血清の約 0.6~0.7% 得た。この成分には蛋白質を含有していない。水に易溶で無色透明液となる。

なお透析には蒸溜水の外に 1% グリセリン水、1% グリセリン加磷酸緩衝液、磷酸緩衝液 (pH 6.6) 及び醋酸酸性溶液 (pH 6.5) を使用し牛血清を透析した。透析後前同様に濃縮粉末化したが、この内グリセリン含有透析液は勿論粉末化しないので使用血清の二倍濃縮液に調製した。

### b. アルコール除蛋白<sup>(10)</sup> 血清成分

牛血清に 95% アルコールを 50~60% になるよう添加すると蛋白質は分離沈澱してくるので慮過除去すると、淡黄色の透明濾液をうる。濾液は低温減圧蒸溜 (37°C 以下) (アルコール分を除去した後凍結乾燥法に乾燥し、黄緑色吸湿性粉末を約 0.7% 得た。このようにして作った成分にはごく微量の蛋白を含有しており、また水溶液にする際微白濁を生ずるが、慮過除去し培養に供した。

除蛋白用アルコールとしてエタノール及びメタノールを用いたが両者とも同様に黄緑色粉末を得た。

### c. Eggleton 法<sup>(11)</sup> 血清濃縮成分

まず血清を 32°C に温めてこれに無水芒硝を溶解飽和せしめると蛋白質は全く塩析せられて沈澱してくる。そこで蛋白を慮過除去し、次に濾液を塩氷にて 0°C に冷却すると、溶存する芒硝は 10 分子の結晶水を溶液より奪い結晶となつて析出する。冷時直ちに結晶を慮別すれば使用血清に対し 4~5 倍の淡黄色濃縮除蛋白溶液をうる。保存のため凍結乾燥し白色粉末を得た。この粉末中には冷却結晶化の際除去できない芒硝をなお多少含有しているが、培養液に添加する場合その量は少なく結核菌の発育にさして影響がなかつたのでそのまま使用した。

なお、また濃縮操作を行う前予め血清を磷酸にて pH 6.5 とした後除蛋白濃縮した成分も作成し実験に供した。

### d. 非熱凝固性血清成分

牛血清に蒸溜水を等量加えた後磷酸にて pH 5.6 となし 85°C 30 分加熱、蛋白質を凝固沈澱せしめて慮過し黄色透明液を作つた。本成分は濃縮すると濁濁せる濃稠黄色溶液となり粉末化しないので水を加えて使用血清に対して 3 倍濃縮溶液となした。なおこの成分はその操作上完全除蛋白ではなく多少の蛋白を含有するが非蛋白成分の結核菌深部発育に対する影響を見る意味でそのまま培養に使用した。

## 非蛋白性血清成分と結核菌深部発育

培養成績は第一、第二表にこれを示したが、非蛋白性

第一表

血清透析性成分添加量		7日培養	14日培養	21日培養
蒸溜水透析性成分 (2倍濃縮液)	0.2cc	— — —	± ± —	± + ±
	0.5〃	— — —	± — ±	± ± ±
グリセリン水透析性成分 (2倍濃縮液)	0.2〃	— — —	± ± ±	+ ± +
	0.5〃	— — —	± ± —	± ± ±
グー緩衝液透析成分 (2倍濃縮液)	0.2〃	— — —	± ± ±	± + ±
	0.5〃	— — —	± ± ±	+ ± +
磷酸緩衝液透析性成分 (2倍濃縮液)	0.2〃	— — —	± — —	± ± ±
	0.5〃	— — —	— ± —	— ± —
醋酸緩衝液透析性成分 (2倍濃縮液)	0.2〃	— — —	— — —	— ± —
	0.5〃	— — —	— — —	— ± —
キルヒネル原液	—	— — —	— — ±	± ± —
キルヒネル血清加培地	—	+ + +	++ ++	+++ +++

第二表

血清非蛋白性成分添加量		7日培養	14日培養	21日培養
アルコール除蛋白血清成分 (2倍濃縮液)	0.2cc	— — —	± ± ±	+ ± ±
	0.5〃	± — —	± ± —	± ± ±
エグルトン血清濃縮成分 (pH 7.2 にて) (10倍濃縮液)	0.1〃	— — —	— — —	± ± —
	0.2〃	— — —	— ± ±	— ± ±
	0.5〃	— — —	± — ±	± ± ±
	0.7〃	— — —	± ± ±	± ± ±
エグルトン血清濃縮成分 (pH 6.5 にて) (10倍濃縮液)	0.05〃	— — —	± ± ±	± ± ±
	0.5〃	— — —	± ± ±	± ± ±
非熱凝固性血清成分 (3倍濃縮液)	0.5〃	— — —	± ± —	± ± ±
キルヒネル原液	—	— — —	— ± —	— ± ±
キルヒネル血清加培地	—	+ + +	++ ++	+++ +++

成分のみをキルヒネル原液に添加したのでは菌の深部発育はほとんど不能であつた。しかしながらこの内蒸溜水、グリセリン水及びグリセリン加磷酸緩衝液透析成分とアルコール除蛋白成分を添加した場合、僅少なから微小菌塊形成を認めることがしばしばあつた。一方キルヒネル原液のみの場合は肉眼的に認められる菌塊形成はほとんどない。

## II. 蛋白性血清成分

### a. 血清総蛋白質

牛血清をコロジオン膜に入れ透析外液に  $Cl^-$  イオン反応の消失する迄、蒸溜水にて充分透析した。透析は冬季室温 10°C 以下の時期に行い、透析中防腐剤は添加しなかつた。

透析血清は無機物質消失のためグロブリンが白色絮状の沈澱となつて沈下してくるが、除去することなくそのまま凍結乾燥し帯黄褐色の粉末を作つた。この粉末はキルヒネル原液には完全溶液を培養に用いた。

### b. 血清グロブリン割分

硫酸アンモニア法<sup>(12)</sup> を用いて牛血清より分離した。すなわちまず血清に等量の水を加えた後 2.1モルとなるよう硫酸を添加溶解し生ずる白色グロブリン沈澱を濾別し、沈澱は少量の水に溶かして再び硫酸にて沈澱せしめる。この操作を再三度繰返して充分精製し、透析により硫酸を完全除去した後凍結乾燥した。

### c. 血清アルブミン割分

牛血清よりグロブリンを沈澱除去した濾液に、さらに硫酸を加えて 2.8 モルとなしアルブミンを沈澱せしめ濾過しとり、水に溶解、硫酸にて沈澱を繰返し十分に精製後硫酸は透析にて除去して凍結乾燥した。淡黄色粉末で充分精製された状態にあつた。

### d. Bovine Albumin Fraction V (U.S.A.)

Dubos の培地に使用する Albumin Fraction V を前記調製した硫酸法によるアルブミン割分と比較するために実験に用いた。本品は淡黄色の粉末である。

### 血清蛋白成分と結核菌深部発育

四種の血清蛋白成分をキルヒネル原液にそれぞれ添加培養したがその

結果は第三表のごとくであつた。グロブリン割分添加の場合は結核菌の深部発育はほとんど不能であつて、一方アルブミン割分をキルヒネル原液に加える場合は硫酸法血清アルブミンも Albumin Fraction V もともに同程度よく深部発育を認めかつ血清そのものを用いた場合の発育と変らなかつた。しかしながら血清総蛋白添加の場合は血清そのものや、アルブミン割分添加の場合より深部発育はやゝ良好であつて、一週間培養においてすでに菌塊の形成を肉眼的に認めた。

### III. 非蛋白性血清アルブミンの混和培養

非蛋白性成分のみをキルヒネル原液に添加する場合結核菌深部発育はほとんど不能であるが、さらにこれを血

第三表

血清蛋白成分添加量		7日培養	14日培養	21日培養
血清総蛋白成分	0.6%	++ ++	+++ +++	++++ ++++
血清グロブリン 割合	0.2%	- - -	± ± ±	± ± ±
血清アルブミン 割合	0.5%	++ + ++	++ ++ ++	+++ +++
Bovin Albumin Fraction V	0.5%	++ ++ +	++ ++ ++	+++ +++
キルヒネル血清加培地	-	+ + +	++ ++ ++	+++ +++

第四表

血清非蛋白成分添加量		7日培養	14日培養	21日培養
アルブミン培地+透析性成分	0.2cc	+ ± ±	+ + ++	++ ++ ++
	0.5cc	+ ± +	++ + ++	++ ++ ++
アルブミン培地+アルコール除蛋白成分	0.2cc	+ + ±	++ ++ +	++ ++ ++
	0.5cc	+ ± +	++ ++ +	++ ++ ++
アルブミン培地	-	++ + ++	++ ++ ++	+++ +++

血清アルブミン割合と混合し培養実験を試みた。

第四表にその結果を示したが、非蛋白性成分添加は結核菌深部発育を阻害するものごとくアルブミン割合のみを添加せる場合の発育よりも低下した。

#### 考 察

結核菌深部培養に用いられる牛血清中にその深部発育促進因子がいかなる状態であつたか、いかなる成分中に保有せられているものかを知らうと血清を非蛋白性成分と蛋白性成分に大別し実験を試みた。

血清の非蛋白性成分の分離方法としてはまず透析法を用いたが、この場合キルヒネル原液成分のグリセリン、磷酸塩及び溶液の pH の相違が血清の透析性に影響を与える可能性が考えられるので蒸留水以外に1%グリセリン水、1%グリセリン加磷酸緩衝液 (pH 6.6)、磷酸緩衝液 (pH 6.6) 及び醋酸性蒸留水 (pH 5.6) 等を透析液として使用し血清の透析性成分を分離した。第二に Eggletone 除蛋白法を用い中性ならびに弱酸性において血清の非蛋白成分を分離し、第三にアルコール除蛋白法にて血清中アルコール可溶性物質の抽出もかねて非蛋白成分を分離した。さらに第四に血清を弱酸性にして85°C 30分加熱し蛋白質を凝固せしめて除去し非蛋白性成分を濾別した。このように血清に物理学的化学的操作をほどこして血清非蛋白性成分を分離して培養に用いたが、この内蒸留水、グリセリン水、グリセリン加磷酸緩衝液透析成分とアルコール除蛋白成分をキルヒネル原液に添加する場合、原液のみの培養では認められない微小菌塊形成を培地深部においてしばしば認めることがあつて、非蛋白性成分にわずかながら深部発育因子が含まれているのではないかと暗示せられる程度であつてほとんどどの方法

を用いても深部発育因子を非蛋白性に分離できなかつた。かつ、この非蛋白性成分はアルブミン加培地に添加すると結核菌深部発育をかえつて阻害する作用のあるのを認めた。

他方牛血清の蛋白性成分については血清を透析した総蛋白成分と硫酸塩析法によるグロブリン及び、アルブミン割合について培養実験を行つたが、これ等の内グロブリン割合をキルヒネル原液に加えた場合深部発育は不能であつて、アルブミン割合添加の場合よく深部に結核菌は発育しかつ、その発育は血清そのものを用いた場合と同程度であつた。しかしながら総蛋白成分を添加した場合はアルブミンや血清添加の際よりも深部発育はやゝ良好であつた。このことは血清中の非蛋白性成分の除去

により発育阻害因子の全く含まれていないためによるのではあるが、血清蛋白中グロブリンやアルブミン以外の異なる高分子化合物が結核菌の深部発育をさらに促進しているのではないかと考えられる。

以上の実験より牛血清中の結核菌深部発育促進因子はその非蛋白性成分中にはほとんど存在せず、存在するとしても極めて微量のものであり、発育因子は主として血清蛋白性成分中に存在していると考えられる。しかしその蛋白性成分中でアルブミン割合が結核菌深部発育に特に重要な因子となつているものと考察せられるが、なおアルブミン以外に促進する微量の不明蛋白成分の存在も考えられる。しかしながらこの蛋白性深部発育促進因子が蛋白そのものとして作用するものであるか否か、その作用機転については不明である。

#### む す び

1. 牛血清より非蛋白性成分を透析法、アルコール除蛋白法、Eggletone 法除蛋白法、熱凝固除蛋白法により分離しこれら各々をキルヒネル原液に添加結核菌の深部培養を行つたが、いずれの場合もほとんど菌深部発育は不能であつた。

2. 牛血清の蛋白性成分として血清を透析した総蛋白成分と硫酸法によつてグロブリン及びアルブミン割合を分離して培養に用いたが、これらの内グロブリン割合添加では結核菌深部発育は不能で、アルブミン割合添加の場合は血清そのものを用いた場合と同様によく深部発育を認めた。総蛋白成分添加はアルブミンや血清添加の場合よりも結核菌の深部発育がさらに良好であつた。

3. 非蛋白成分はこれをアルブミン加培地に添加する際かえつて結核菌の深部発育を阻害した。

4. 以上の実験より牛血清中の結核菌深部発育促進因子は非蛋白性成分中には存在せず、蛋白性成分中に含有せられることを認め、その蛋白成分中アルブミン劃分が深部発育に特に重要な因子であると考えられるが、さらにアルブミン以外の不明蛋白成分に促進因子が保有せられるようであつた。

この研究の第一報は「結核」第 26 巻第 8 号に発表。

本研究は文部省科学研究費の援助による。

戸田教授の御指導、御校閲と武谷助教授の御好意に深く感謝の意を表します。

#### 文 献

- (1) Kirchner, O. : Zbl. f. Bakter. orig. Bd., 124, 403, 1932.
- (2) 荻原 : 細菌学雑誌, 542 号, 235, 昭16.
- (3) 増田 : 日本医学及び健康保険, 3298号, 1891,

昭17.

- (4) Boecker, E. : Z. Hyg., 99, 121, 1923.
- (5) 鴻上 : 結核, 14, 1, 昭14.
- (6) Besredka, A. : Ann. Inst. Pasteur., 33, 291, 1921.
- (7) Dubos, R. J., and Middelbrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 56, 334, 1947.
- (8) 中村 : 日本臨床結核, 7, 350, 昭23.
- (9) 戸田 : 結核菌と BCG, p. 35, 昭19.
- (10) Guggenheim, M. : Die biogenen Amine, 4 p. 1940.
- (11) Eggleton, M. G., and Eggleton, P. : Nat-ure, 130, 275, 1932.
- (12) 近藤 : 化学実験学(第二部), 11巻, p. 751.

## 気 胸 肺 の 病 理 解 剖

国立東京療養所 <sup>エ</sup>江 <sup>バ</sup>波 <sup>ト</sup>戸 <sup>ト</sup>俊 <sup>ナ</sup>彌

### 1. ま え お き

この十数年、日本の結核治療において人工気胸術ほど普遍化された治療はないであろう。しかしその一方において反省なく用いられた結果として、いろいろの不都合なことが起つていると思われるが、失敗例のまとまつた報告のないのは不幸なことである。人工気胸術によつて病肺がたどる運命についてしつかりした知識を持たずにこれを日常不安なくほどこすことができるであろうか。臨床的、病態生理的のいろいろの成績も、機質的な変化との相関においてとりあげられねばならない。日本における気胸肺の病理解剖の報告が今まで常に少数例の報告であつたのは、勿論これが有効な治療としてわれわれの手に材料を与えがたかつたことにもよるが、また一面には組織化されていないこの国の結核治療体系の後進性と結びつくものであろう。しかし最近めだつて進歩した肺葉切除術の結果として多くの例の検索が可能となり、今後気胸肺の知見はきわだつてひろがつてくると思われる。私はそのきつかけとして 30 例の気胸肺の病理解剖について治癒機転とその限界を中心にして述べて見よう。

### 2. 材料と方法について

ここにとりあげられた 30 例のうち 10 例は剖検により 20 例は肺葉切除によつて得られた。剖検例のうち 8 例は事故による死亡でほぼ肺葉切除の 20 例と同じように生体のたどる経過中に突然たち切られた断面を示し、結核死の 2 例は生体のたどりついた終末的な面を示すものとして意味づけられる。また肺葉切除例はいずれも不

全気胸であつたことも注意しなければならない。全身臓器の検索できたのは 6 例でまだ気胸の影響を云々するに充分ではない。年齢は 19—42 歳の間で大部分 20—30 台である。男は 25 例、女は 5 例である。気胸側からいえば右が 14 例、左が 16 例である。しらべるにあつてはいずれもホルマリン固定で肉眼的に精査した上、主病巣、灌注気管支、肺門部、撒布巣、健常部等をそれぞれパラフィン切片として染色鏡検した。

### 3. 適応と気胸条件について

気胸肺の検索にあつてまずわれわれのなさねばならないことは、どんな適応で気胸が行われたかを見ることであろう。30 例をこれに従つて分けて見ると次のようになる。

空 洞	17例
浸 潤	8例
上葉炎	1例
不 明	4例

ここに不明とあるのは気胸前の X 線フィルムがわれわれの手もとにないものである。空洞が適応のもつとも大きい部分を占めていることは虚脱療法目的からいつて当然のことで、浸潤 8 例も断層写真のないのが大部分なので恐らく幾例かは空洞の中に含まれるであろう。次にわれわれが知らねばならないことは気胸がどのようにづけられたかということである。この 30 例はしきいに観察すれば完全気胸といわれるものはほとんどないが、一応臨床的な判定で完全、不完全を分けると次のようである。