

応既陽性健康成人血液を培地とする為、岡・片倉培養法の如く培養基の調製に日時を費される事も無く、且つ培養日数が少なくで判定出来る点、結核菌の早期発見上有意義と思考される。S.C.C. 法は岡・片倉培養法に比すれば菌発見能力が低い、本法は検体が極く少ないこと、顕微鏡使用による点よりして止むを得ざるものと思ふ。

4) 本法は培養日数が進むに従い増菌の程度も大となり8日間、10日間の培養にて油浸装置を使用せずして結核菌の聚落が発見せられる便がある。私は螢光顕微鏡法をS.C.C. 法に併用することにより、倍率200倍にて増殖せる菌聚落が光芒を放ちて存する状態を極めて容易に発見し得たので、S.C.C. 法に更に螢光顕微鏡法を併用する方法は最も適当したものと信ずる。

結 論

- 1) S.C.C. 法の菌発見能力は岡・片倉培養法に劣るが、田村氏集菌法に等しいか又はそれ以上である。
- 2) 培養日数が岡・片倉培養法より少なくすむ点、結核菌の早期発見上極めて有意義である。
- 3) 8日間、10日間培養すれば油浸装置を使用せず

して増殖せる菌塊を認める為、鏡檢上容易である。

拙筆に臨み恩師林教授の御懇篤なる御指導と御校閲を謹謝し、多大の御援助を戴いた矢崎教授並びに国立栃木療養所北村所長、小原医務課長に感謝の意を表す。

文 献

- 1) Uhlenhuth : Berliner Kl. Wsch. 1908, 1346.
- 2) Petroff : J. of. exp. med. 21. 1915.
- 3) 田村和夫 : 結核, 第17巻, 第11号, 913.
- 4) 野村勇吉 : 第20回日本結核病学会総会(第10番演説)
- 5) 高橋・内山 : 第18回日本結核病学会総会(第9番演説)
- 6) 林直敬 : 日本臨床結核, 第7巻, 第12号, 527.
- 7) 林茂・坂田壽茂 : 結核, 第21巻, 185.
- 8) 矢崎芳夫 : 成医会雑誌 第64巻, 第1号, 14.
- 9) Wright : Lancet Vol.1, 1924.
- 10) 緒方, 淡川 : 結核, 第10巻, 第5号.
- 11) 淡川 : 結核, 第11巻, 第2号.
- 12) 阪本 : 結核, 第11巻, 第1号.
- 13) 日置 : 結核, 第14巻, 第8号.

結核菌の發育に関する研究

第1報 活性炭末添加無蛋白深部培養

九大医学部細菌学教室(主任 戸田忠雄教授) 三 淵 一 二

(本論文の要旨は昭和24年第一回結核病学会九州地方学会に於て報告した。)

I ま え が き

結核菌は液体培地に於て一般に液表面に菌膜を形成して發育し、液面下に於ては非常に發育しにくい或は全く發育を停止することは衆知の事実である。

然るに Kirchner⁽¹⁾ は液体培地に血清を添加して結核菌の深部培養に成功し、その後萩原⁽²⁾、増田⁽³⁾ は血漿又は血清を主成分とする培地を考案改良し良好な培養成績を報告している。又新しくは Dubos⁽⁴⁾ により Tween 80 と牛アルブミンとを以て結核菌の迅速均等深部培養が報告せられ、結核菌深部培養に関して世の注意を引くに至つた。

一方 Youmans^(5,6) は血清や蛋白質成分を使用せずに培地の液深を浅くする事により結核菌が液表下に發育すると報告し、サルファミン剤や抗菌性物質の試験管内実験にこの培養法を応用している。尙又 Corper 等⁽⁷⁾ は Wong 培地に於て液深を1cm以下にすると結核菌が液深部に良く發育するが、3cm以上の深さになると最早深部發育は不能で液表面に於てのみ發育すると述べ、更に

Wong 培地にセルローズゴムを添加し菌の懸濁培養を行つた所、結核菌の深部液表下發育出来るのは液面より2cmの深さ迄であつたと報告している。

現在迄の結核菌深部培養法は上述の如く培地に血清又は蛋白質成分を添加するか又は培地の液層を浅くして酸素の浸透をはかり結核菌の深部發育を可能ならしめる二つの方法が行われている様に考えられる。

然して前方法に用いられる血清は空中酸素の浸透し得ない深部に於て良く結核菌を發育させるのであつて、その作用が如何なる機序に基いているのであるかは尙解明されていない。

さて他方活性炭末と結核菌培養に関しては、柳沢は活性炭末に菌の發育促進性ありと述べ、益子等⁽⁸⁾、多田隈等⁽⁹⁾ はグリセリン寒天に炭末を加えると結核菌が良く發育出来ると報告している。更に新津⁽¹⁰⁾ は炭末添加寒天培地の凝固水中に結核菌の發育する事実を認め、氏の活性炭末添加ロッケマン培地に結核菌が良く深部發育出来ると報じている。

活性炭末には元来種々の物質を吸着する作用のある事は良く知られている事実であるが、尙興味ある作用として Warburg⁽¹¹⁾ により見出された触媒の有機物酸化作用があり、この酸化作用は生体内酸化と非常に類似しているのである。

私はこの炭末の酸化作用に著眼し活性炭末を培地に添加すると血清の作用に代りうるのではないかと考えてキルヒネル原液に骨炭末を添加培養した所、結核菌が深部に發育出来るばかりでなく、血清加培地の場合と劣らない發育を見る事が出来た。ここに於て炭末の作用機転を知る事は或は血清の作用を知る為の一助となるのではないかと以下二、三の実験を試みたので報告する次第である。

II 実験方法

1. 活性炭末添加培地

予め乾熱滅菌した一定量の活性炭末（出来るだけ微粉にして使用）に滅菌キルヒネル原液を加え一定濃度の活性炭末懸濁液を作り、更にキルヒネル原液を以て之を無菌的に稀釈し所要濃度の活性炭末添加培地を作つた。本培地は血清その他の蛋白質を全く含有していない。

〔註〕 培地作製にあたり加熱滅菌を行わなかつたのは培地中のアミノ酸が炭末により分解されるのをさけ

第 一 表

培養日数	一 週			二 週			三 週			四 週		
試験管番号	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
蔗糖炭 自製	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	++	+	+	++	++	++
活性炭 片山	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	++	++	++
薬用炭 藤沢	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	++	++	++
骨 炭 メルク	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	++	+	+	+++	++	++
血 炭 カールバウム	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	++	++	++	+++	+++	+++
ヘモグロビン炭 自製				++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++
キルヒネル原液	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	-	±
血清加培地	(+)	(+)	(+)	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

()顕微鏡所見

んが為である。

2. 使用した活性炭末の種類

蔗糖炭末（自製）	灰分 0.31%
薬用炭末（藤沢）	—
活性炭末（片山）	—

骨炭末（メルク）	灰分2.72%, Fe : 0.46%
血炭末（カールバウム）	灰分21.6%, Fe : 3.98%
ヘモグロビン炭末（自製）	—, Fe : 5.0%

蔗糖炭末及びヘモグロビン炭末は Warburg⁽¹²⁾ の方法に準じて自製した。以上六種の活性炭は使用前総てその吸着能を薬局方試験⁽¹³⁾ により検査し、その吸着能の優秀なることを確認した上で培地に添加使用した。

3. 培養実験法

培養実験には常にキルヒネル血清加培地を対照となし結核菌の深部發育度を比較した。接種結核菌は青山B菌であつてソートン培地表面に三週間培養した菌苔より型の如く菌浮游液を作製し各試験管に正確に 10^{-3} mg の菌を接種、37°C で培養、一週間毎に深部發育を観察した。

III 実験結果

1. 炭末添加無蛋白培地に於ける結核菌發育状態

骨炭末を 0.1% 添加した無蛋白培地に結核菌を培養すると、一〜二週後試験管を軽く振り動かす際浮上する炭末懸濁液中に微小白色の菌塊を見出さう程度であるが、更に三〜四週間培養では管底に沈澱せる炭末の黒色表面に菌が白色斑状をなして増殖してくる。又炭末沈澱

部の周縁部にも屢々白色環状の發育層を明白に認めうる様になる。尙培養が進むと深部のみならず液表面にも菌膜を形成してくる。菌の發育量（肉眼的觀察）や菌塊発見日数は血清加培地に比べて稍々劣つてゐる。

塗抹染色標本として鏡検すると菌は初め炭末表面に出芽状に發育形之が次第に増殖分岐し互に結合して菌塊を形成してくる像を認める。尙菌塊内部には多くの微小炭末が含まれている像も見られる。結核菌の配列状態、染色性や菌箇々の形態等

は血清培地の場合と相違を認めない。

2. 各種活性炭末と結核菌の深部發育（第一表）

前記六種類の活性炭末を 0.05% 添加せる培地について比較培養すると、ヘモグロビン炭及び血炭培地は最も發育良好であつて顕微鏡的には一週間目に菌増殖像を認

めた。且つ全培養期間中発育は血清加培地のものと較べて殆ど大差なく同程度の発育を示していた。然して骨炭培地の発育はこれにつぎ、薬用炭、活性炭、蔗糖炭末と発育が悪くなっている。この事は活性炭末中の灰分、ことに鉄含有量と密接な関係がある様であつて、鉄含量の多い活性炭末程結核菌の深部発育を良好ならしめている様に考えられる。

3. 其他活性物質並びに空気含有物質添加と結核菌の発育 (第二表)

炭末以外の活性物質であるカオリン(メルク)及びアドソルビン(三共)と、吸着能はないが空気を含有する素焼

第 二 表

培 養 日 数	一 週			二 週			三 週			四 週		
試 験 管 番 号	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
カオリン メルク	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
アドソルビン 三共	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
硝子毛細管片	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
素焼陶器片	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
キルヒネル原液	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
血 清 加 培 地	+	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

陶器末、微小硝子毛細管片をキルヒネル原液に添加培養を試みたが、この場合総て結核菌深部発育は不能であつた。

4. 活性炭末添加量と結核菌の発育 (第三表)

各種活性炭末を、0.5mg/cc (0.05%) より 0.01mg/cc (0.0

第 三 表

培 養 日 数	一 週						二 週					
添加濃度 mg/cc	0.50	0.25	0.12	0.06	0.03	0.01	0.50	0.25	0.12	0.06	0.03	0.01
蔗 糖 炭	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—
活 性 炭	—	—	—	—	—	—	±	±	—	—	—	—
血 炭	±	—	—	—	—	—	++	++	+	+	+	—
ヘモグロビン炭	±	±	—	—	—	—	++	++	++	++	+	±
血 清 加 培 地	+						++					
培 養 日 数	三 週						四 週					
添加濃度 mg/cc	0.50	0.25	0.12	0.06	0.03	0.01	0.50	0.25	0.12	0.06	0.03	0.01
蔗 糖 炭	++	+	±	—	—	—	++	++	+	+	±	±
活 性 炭	++	+	+	+	+	±	+++	+++	++	++	++	+
血 炭	+++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++
ヘモグロビン炭	+++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++
血 清 加 培 地	+++						+++					

015%) の濃度に添加培養した所、ヘモグロビン炭及び血炭末培地では最も発育よく 0.01mg/cc の微量添加に於てすら良く発育するのを認めた。この際加えた炭末は管底にわずかに沈澱し菌が発育すると、炭末は殆ど菌塊に覆われて見られなくなる。(写真 I, II 参照)

5. 炭末添加培地の空気遮断培養

炭末培地上に流動パラフィンを重ね菌を培養した所菌の発育は空気遮断によつて低下したが対照とせる同様処置のキルヒネル血清加培地に於ても菌は深部発育が低下するのを認めた。

6. 培養液の深さと結核菌の発育 (第四表)

炭末添加培地とキルヒネル血清加培地を中試験管に 1cc, 2cc, 6cc, 12cc 入れると、液の深さはそれぞれ 1.0cm, 2.3cm, 4.2cm, 8.0 cm となる。これに菌を培養すると両培地共に液深の増大すると共に発育は低下してくるのであつて、結核菌の深部発育は液表面よりの空気浸透と密接な関連性がある事が窺われる。

7. 炭末散布表面培養(第五表)

ソートン培地の液面に予め滅菌した活性炭末を微量散布浮上せしめ、これに結核菌膜の 1cm 直径のものを浮かし表面培養した所、血炭散布培地では一週間目にすでに 2~3 倍の大きさに発育し増殖が旺んであつた。然

し乍ら培養が永くなる
と菌膜の大きさは殆ど
総ての培地に於て同一
大きさとなつたが、こ
れは添加炭末が微量な
る為発育と共に炭の有
効量の減少を来たした
為と思われ
るのであつて、血炭に
は確かに結核菌の発育

第 四 表

培 地 種 類	血 炭 培 地			血 清 加 培 地			キルヒネル原液		
試 験 管 番 号	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1 cc.....1.0cm	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	+	卅
3 cc.....2.3cm	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±
6 cc.....4.2cm	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-
12 cc.....8.0cm	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-

三 週 間 培 養

第 五 表

培 養 日 数	四 日			一 週			二 週			三 週		
試 験 管 番 号	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
蔗 糖 炭	1.2	1.5	1.2	1.7	2.0	1.6	2.5	3.0	2.2	3.5	4.0	3.2
活 性 炭	1.5	1.5	1.2	2.0	2.0	1.7	3.0	3.2	2.5	3.7	4.0	3.5
血 炭	2.0	1.7	2.0	3.0	2.4	2.7	4.0	3.1	3.5	4.7	3.8	4.2
対 照	1.5	1.0	1.3	2.0	1.5	2.2	2.8	2.5	3.0	4.0	3.5	4.0

数 値 菌 膜 の 直 径 cm

を促進する作用ありと考えられる。

8. 透析膜培養

小透析膜（コロデオ膜）を培地内に浸漬しその内部に炭末を入れて膜外部に結核菌を培養した。即ち菌と炭末が直接接触出来ない様にして培養を試みたところ、三〜四週間後に極く微量の菌発育を認める程度であつた。

9. その他の培地に炭末を添加した場合

キルヒネル原液以外にソートン培地、グリセリンブイヨン等に血炭末を添加すると同様に菌がよく深部に発育した。キルヒネル血清加培地に炭末を加えた場合には特に結核菌の深部発育を良好となしたとは思えなかつた。

IV 考 察

活性炭末添加により無蛋白状態で結核菌を深部培養する事が出来たのであるが、この活性炭末が果して如何なる作用により深部発育を促進しているものか以上の実験より考察してみると：—

1. 先ず活性炭末の菌吸着が問題となるが、炭以外の活性物質で深部発育の起らない事実より炭の菌吸着が発育の足場を提供しているのではない。

2. 次に最も問題となる事は炭末がその吸着性により相当量の空気を粒子内に含有している事である。この含有空気が菌の深部発育に役立っているのではないかと考えられるのであるが、炭以外の空気含有物質添加では結核菌は深部に発育する事が出来ないし、一方又ヘモグロビン炭や血炭では0.01~0.03mg/ccの如き極く微量の添加でさえよく深部発育を可能ならしめる事実から、単に

含有空気のみが深部発育の重要因子とは考えにくい様である。更に若し炭末含有空気が深部発育の最大因子であるとすれば空気遮断や培地液深の増大で菌発育量に差を認めえない筈であるが、実験ではこれらの方法で結核菌深部発育が低下してくる事実よりも此の事が窺い知られる。

3. 更に吸着性に関連し炭末が培地中の有害物質を吸着除去し、その為に発育を促しているのではないかと考えられるが、これは透析膜培養で結核菌が殆ど深部に発育しない事実より否定されると思われる。

4. 私は炭末散布表面培養に於て活性炭末中殊に血炭末が結核菌の発育を促進する事を知つたのであるが、一方ヘモグロビン炭や血炭は極く微量の添加でさえ良く菌の深部発育を可能ならしめる結果と合せ考えて、炭末には他の発育促進因子があるものの様に思われる。

然して六種類の灰分殊に鉄含量を異にする活性炭末の比較培養実験より明らかな如く、炭末中の鉄含量の多いもの程結核菌の深部発育が良好となる事実は、活性炭末の酸化作用はその中に含まれる鉄に最も関係していると言ふ Warburg⁽¹¹⁾⁽¹²⁾の記載と照し合せて非常に興味ある事実であつて、活性炭末による結核菌深部発育に於ても炭末の鉄による触媒的酸化作用が之に最も密接なる関係を有するのではないかと考えられるのである。

然し乍ら此の際、炭の酸化作用が結核菌発育に如何様に作用しているのか、即ち菌呼吸と一つの連なりを形成するのであるか又は炭末が培地に或種の酸化的傾向を附与し、その結果結核菌が深部発育出来るのであるかは本実験より知る事は出来ない。

V む す び

1. キルヒネル原液に血清を添加する代りに活性炭末を加えると無蛋白状態で結核菌が良く深部に発育出来る。

2. 炭末以外の活性物質のカオリンやアドソルビン及び空気含有物質である素焼陶器片や毛细管片の添加では菌は深部発育出来ない。

3. 灰分殊に鉄含量を異にする六種類の活性炭末：蔗糖炭、活性炭“片山”、薬用炭、骨炭、血炭、ヘモグロビン炭を比較培養したところ、これらの内、鉄含量の多い血炭及びヘモグロビン炭が最も発育良好で0.01~0.03mg/ccの微量添加で良く菌が深部発育出来た。

4. 活性炭末添加培地はキルヒネル血清培地と同様に

液深の増大や空気遮断により菌の深部発育が低下する。

5. 炭末を透析膜に入れ之を培地に浸漬し、その外部に菌を培養すると殆ど深部発育しなかつた。

6. 各種炭末をソートン培地上に撒布し結核菌を表面培養すると血炭は明らかにその発育を促進した。

7. 活性炭末による結核菌深部発育促進作用はその吸着性や含有空気の影響や有害物質の吸着除去によるのではなく、鉄含量の多い炭末程深部発育を良好とする事実より考えて活性炭の触媒の酸化作用に最も密接な関連性を有するものと考えられる。

(この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中川前助教授並びに武谷助教授の御好意を深謝します。)

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. Dubos, R. J., and Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 56, 334, 1947.

5. Youmans, Guy F.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 57, 122, 1944.

6. Youmans, Guy F.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 57, 119, 1944.

7. Corper, H. J., Cohn, M. L., and Frey, W. H.: Am. Rev. Tuberc., 58, 215, 1948.

8. 益子, 張, 西岡: 公衆衛生学雑誌, 2, 127, 昭 22.

9. 多田隈, 徳田, 道家: レブラ, 17, 49, 昭 23.

10. 新津: 抗酸菌病研究所雑誌, 5, 7, 昭 24.

11. Warburg, O.: Biochem. Zs., 113, 257, 1920.

12. Warburg, O.: Biochem. Zs., 136, 266, 1923.

13. 第五改正薬局法註解, 331頁, 昭 9.

実験的家兎肺結核症のレ線学的研究

国立健康保険療養所 (所長 久貝貞治)

千葉大学医学部病理学教室 (教授 石橋豊彦)

神 山 英 明・北 沢 幸 夫

(本論文の要旨は第 25 回日本結核病学会に追加発表し、又第 7 回日本結核病学会関東地方会に発表した。)

緒 言

吾々は以前から家兎の経気道性肺結核の研究に従事し既にその肺血管変化を中心とした成績を報告してきたが、更に実験的肺結核症の本態を追求する為に病理組織学的検査に併せて生存中の胸部レ線撮影を行い、その進展状況を追跡した。レ線を利用するかかる試みは既に Soper 等(1927)Burke (1935), Chien-Liang (1938)及び矢野(1937)に依つて行われ、尙昭和 25 年の放射線学会総会に於て日下部が報告しているが、吾々は独自の目的及び方法に依つて之を実施し、一定の成績を得たので茲に報告する次第である。

実 験 方 法

動物: 家兎 22 匹、之を感作群 9 匹、非感作群 13 匹の二群に分けた。

使用菌: 症状停止性の特定患者の喀痰より分離した初代人型菌 (K-1 号株) をペトラニヤーニ培地に 6 週間培養し発育良好な集落より釣菌した。

感作方法:

上記の結核菌 5mg を 1cc の生理的食塩水に浮遊せしめ、皮下接種し、3~4 週後 10 倍稀釈液に依るツベルクリン反応陽転を見て再感染した。

経気道感染方法:

上記結核菌 25mg を 5cc の生理的食塩水に浮遊し、頸部切開に依り、直接気管内に注入した。この際病変を一側に限界させようとして頭部を高く、約 40 度傾斜させ、更に左側を下にして約 60 度左に傾斜させた。

レントゲン撮影は初め日を逐つて行つたが後にはその必要を認めず 4~5 日間隔で適時行つた。

レ線条件: 500ma 発生装置, 二次電圧 31~36KV 1.3m, 0.05 秒 10~12.5mas である。

撮影時の体位は人間の場合と全く同様である。各症例に就て組織学的検査を行い、更に本実験以前に行つた実験例の感作群 19 匹、非感作群 23 匹の成績をも参照した。

実 験 成 績

非感作群: (第 1 表参照)

感染後、日を逐つて撮影しても直ちには異常陰影を認めず、最も早い場合は第 6 日に限局性の淡い均等陰影が現れた。多くは第 8 日頃に軽微な陰影を認め、更に 1~2 日後には一側肺野の半分以上を占める明瞭な陰影となり、その後漸次広汎且つ濃厚となり、感染第 13~第 19 日には一側全肺野に亘る均等陰影に発展する。少数例に於てこの陰影発現には 2~3 日のずれがある。又 5mg の菌を使用した他の実験例では陰影出現は感染後 3 週間