

結核菌並びに BCG の均等培養に関する研究

第 4 報 振盪培養の抗結核剤の抗菌価測定への応用

広島医科大学細菌学教室 (主任 占部教授)

松 尾 吉 恭

(昭和 26 年 9 月 12 日受付)

(この研究は文部省科学研究費によつた。占部)

先に私りは抗結核剤の抗菌価測定に当り用うべき培養の種類並びにその pH について Streptomycin, PAS-Natrium 及び Vitamin K₃ を用いて稀釈法による一連の検討を試みた結果, pH 6.8 の血清加 Kirchner 液を用うべきであると提唱したが, たとえ該液を用いた場合にあつてもその際培養内における結核菌発育の状況如何菌塊発育・均等発育等によつては, 添加抗結核剤の現わす抗菌乃至殺菌作用に多少の差を生じるであろうことは想像に難くない。

第 1 報²⁾ において私は血清加 Kirchner 液による振盪培養の結果結核菌並びに BCG のかなりの程度の均等発育がえられ, さらに³⁾ 流動パラフィン (以下流バ) 加 Kirchner 液による際にはその均等度は極めて良好となる旨報告したが, 如上の見解からかかる振盪培養法によれば或いは静置培養法によるよりも抗結核剤の抗菌価がより鋭敏に現われるのではないかと考えて以下の実験を行い, 興味ある知見をえた。

実 験 1

A) 実験材料並びに方法

1 供試菌: 卵培地上 4 週間培養の人型結核菌 Frankfurt 株 (以下人 F) よりの 1mg/cc 生塩水平等浮遊菌液

2 供試培養並びにその pH: 血清加 Kirchner 液の pH 6.2, 6.8 及び 7.2 の 3 段階階液

3 供試薬剤: Streptomycin Merck [Calcium chloride complex] Lot No. 1923 (以下 SM), PAS-Natrium [武田試製] (以下 PAS) 及び Vitamin K₃ [武田 Kativ—1.0cc 中 V.K₃ 5mg 含有] [以下 V.K₃]

4 実験方法: 各 pH の血清加 Kirchner 液 3.6cc に溜水による供試薬剤液 0.4cc を加え, 終末濃度が SM 並びに PAS ではそれぞれ 2γ/cc, 1γ/cc 及び 0.5γ/cc に, V.K₃ では 50γ/cc, 25γ/cc 及び 10γ/cc に含まれるようにし, 薬剤を添加しないものを対照とした (凡て 1 実験 3 本ずつ)。これらに供試菌液を 1/4 注射針で 1 滴宛移植してその半数は血温に静置培養し, 他は既報²⁾³⁾ の術式に従い振盪培養することいづれも 8 週間に及び, その間毎週静置例では管底並びに液面における菌の発育程度を肉眼的によみとり, 振盪例では培養の任意の部位から 1 白金耳ずつ釣菌して染色した標本の各視野に認めら

れる菌数の多寡を顕微鏡的によみとつた外に, 8 週後新しい血清加 Kirchner 液への還元培養によりその生死をも判定した。

B) 実験成績

実験成績は一括して表 1 に掲げた(次頁)。

表 1 によつて判るように SM, PAS 及び V.K₃ の人 F に対する発育完全阻止濃度は供試した限りの pH によつては左右されることなく, SM, PAS では 2γ/cc, V.K₃ では 50γ/cc の濃度であつたが, それらの発育抑制濃度域にあつては pH の差により, また培養法別により人 F の発育に差を生じる場合とそうでない場合とあることが判つた。

この関係をまとめると表 2 のような結果となつた。

第 2 表

培養法別		静置培養	振盪培養
薬	濃		
剤	度		
SM	1 γ/cc	6.8> 6.2> 7.2	6.8> 6.2≒ 7.2
	0.5 γ	6.8> 6.2> 7.2	6.8> 6.2≒ 7.2
PAS	1 γ	6.8> 6.2> 7.2	6.8> 6.2= 7.2
	0.5 γ	6.8> 6.2> 7.2	6.8> 6.2= 7.2
V.K ₃	25 γ	6.8> 6.2≒ 7.2	6.8= 6.2≒ 7.2
	10 γ	6.8> 6.2> 7.2	6.8= 6.2= 7.2
対	照	6.8> 6.2> 7.2	6.8> 6.2= 7.2

註: 表中数字は培養の pH を, 記号は発育良好 > 発育不良を示す

すなわち, 静置例では pH 6.8 の場合に SM, PAS 及び V.K₃ の抗菌価は凡て最も低く現われ, 次で pH 6.2, pH 7.2 の順となつていながら, 振盪例ではこれとやや趣を異にし SM, PAS では pH 6.8 の場合にはやはり抗菌価が最も低く現われてはいるものの, pH 6.2 と pH 7.2 とでは殆んど差が認められず, V.K₃ に至つては pH による差は全くみられないといつてよかつた。

このように抗結核剤の抗菌価が培養の pH によりやや左右されたことは既報¹⁾ の結果と同然であつたが, 静置例と振盪例との間に多少の差を生じた所以の 1 部は, 或

いは振盪例における判定が顕微鏡的のものである関係上必ずしも常に観察条件を同じくしえなかつたという点にあるのではなからうか。

液体培地内における SM の人型結核菌に対する最小阻止濃度は、用いられた培液の種類や菌株によつて諸家^{9)~18)}の成績にかなりの開きが認められるが、大体 0.2~2γ/cc のように考えられる。私の成績でも用いた SM の人 F に対する最小阻止濃度は 2γ/cc であつたが、その抑制濃度域において培液の pH が 6.8 の場合に SM の抗菌作用が最も低かつたのは、この人 F の発育が最も良好であつたこと、SM の活性が弱酸性培液中でやや低下したことが相俟つて招来された結果とみられるのであつて、菌の発育に良好な培地中では SM の抗菌価が低下するという Corper ら¹⁹⁾の見解と一致するところである。

PAS の阻止濃度について諸家^{10), 13), 14), 16), 20)~24)}の業績によれば 1~10γ/cc の間であるようで、私の場合供用した PAS の人 F に対する完全阻止濃度は 2γ/cc であつたがそれ以下の濃度では SM の場合と全く同様な成績がえられた。PAS もまたアルカリ側でその活性が増強される点よりしてこの成績も首肯されうと考える。

V.K₃ の人型結核菌に対する阻止作用についても先進^{25)~28)}の報告があるが、ここに示した成績ではその発育抑制濃度域における抗菌作用の現われ方は静置例につい

ては前二者同様 pH により多少の差がみられたにも拘らず、振盪例では 3pH 間に殆んど差を認めえなかつた。

以上の成績から抗結核剤の抗菌価を測定するには供試菌の発育に好適な条件下で行わべきで、pH 6.8 の血清加 Kirchner 液がこの目的にそうものといえるが、ここに用いた稀釈法によつては静置培養によつても振盪培養によつてもえられる成績間に特にいべき差は出ないものように思われた。

実験 II

A) 実験材料並びに方法

- 1 供試菌：実験 I に同じ
- 2 供試培液：pH 6.8 の血清加 Kirchner 液及び同流バ加 Kirchner 液
- 3 供試薬剤：実験 I と同じ Streptomycin (SM)
- 4 実験方法：供試培液における SM の終末濃度がそれぞれ 2γ/cc から 0.2γ ずつの差を以つて 1γ/cc に至るように 6 段階に区分し対照試験管には SM を添加しなかつた。それらの 1 半は静置培養し他の 1 半は振盪培養しつつ前出同様の観察を行つた。

B) 実験成績

成績は一括して表 3 に掲げた。

表 3 の結果から、pH 6.8 の血清加 Kirchner 液を用いた場合人 F に対する SM の抗菌価は静置培養によるよりも振盪培養による方が、また振盪培養による場合に

つても流バ加 Kirchner 液による方が流バ非添加液によるよりも、それぞれともにより高く現われるものと解釈される。

先に Dubos ら²⁹⁾により結核菌の液内拡散発育が行われるに及び氏等の培液による抗結核剤の抗菌価測定実験も数多く報告されており^{30)~35)}、これらの中には必ずしも成績の一致しなかつたものもあるようではあつたが、一般には抗結核剤の抗菌価は該

第 3 表

培養法別	SM 濃度 γ/cc	血清加 Kirchner						対照	流加パラフィン加血清 Kirchner							
		1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0		1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0	対照	
静置培養	2	-	-	-	-	-	-	卍	-	-	-	-	-	-	-	卍
	4	-	⊥	+	-	-	-	卍	+	+	-	-	-	-	-	卍
	6	-	卍	卍	+	⊥	-	卍	卍	卍	+	-	-	-	-	卍
	8	+	卍	卍	+	+	-	卍	卍	卍	+	+	-	-	-	卍
	還	(+) (-)							(+) (-)							
振盪培養	2	-	-	-	-	-	-	卍	-	-	-	-	-	-	-	卍
	4	卍	+	-	-	-	-	∞	卍	±	-	-	-	-	-	∞
	6	卍	卍	+	-	-	-	∞	卍	卍	-	-	-	-	-	∞
	8	卍	卍	卍	-	-	-	∞	卍	卍	-	-	-	-	-	∞
	還	(+) (-)							(+) (-)							

註：表中の記号はすべて第 1 表に準ず

培液内で結核菌が拡散発育するような状況下におかれると、より高く現われることが認められているようで、これは培液中の Tween 80 による結核菌の拡散発育に基くものと解釈されている。

ところで上述の私の成績からすると、振盪培養による方が静置培養によるよりも、また振盪培養に際して微量の流バを添加した培液による方がそうでない場合よりも、ともに SM の人 F に対する抗菌価のより高く現われることが首肯されるのであるが、既報²⁾のように血清加 Kirchner 液による振盪培養によつても結核菌のかなりの程度の均等培養がえられ、このさい流バ加液にあつてはその均等度は著しく良好となるのであつて、このことと Dubos の培液における成績とから均等に発育した結核菌は抗結核剤に対してより強い感受性を示すような所見を呈するものと考えて差支えなからう。

総括的結語

抗結核剤の抗菌価測定に当り用べき培液としては移植菌量を均一になしうる、しかも結核菌の発育に好適な pH 6.8 の血清加 Kirchner 液が適当であるということは既報¹⁾のように各種培液による数種抗結核剤の抗菌価測定に当つて確かめられたところであるが、今回の実験においてこのことは静置培養例についてのみならず、振盪培養例においても適用されることが判つた。

抗結核剤の抗菌価は実験 I におけるような倍数稀釈法による測定法にあつては静置・振盪両培養例の間に全く差を認めることができなかつたのに対して、実験 II のように薬剤稀釈を倍数法によらずその阻止濃度附近で小刻みにした場合には振盪培養による方が静置培養によるよりも、また同じく振盪培養にあつても微量の流バ添加の方が同非添加の場合よりも、それぞれともに抗菌価がより高く現われたということは興味あるところである。これは先にも述べたように結核菌の液内均等発育の程度如何に基くものと考えらる。

さて以上の成績を要約すると次のようになる。

1) 培液として血清加 Kirchner 液を用いた場合、静置・振盪両培養の別を問はず、稀釈法による抗結核剤の抗菌価は pH 6.8 の培液において求められるべきである。

2) pH 6.8 の血清加 Kirchner 液を用い、倍数稀釈法によつて抗結核剤の抗菌価を測定する場合には、静置培養によつた場合も振盪培養によつた場合も成績は大體一致した。

3) しかしながら薬剤をその阻止濃度附近で小刻みにして検討すれば、振盪培養によつた方が静置培養によつた場合に比して抗菌価がより高くでた。またこの際静置例にあつては血清加 Kirchner 液に微量の流バを添加しなくてもその阻止濃度は同一であつたのに反して、振盪例では結核菌の最も佳良な均等発育が期待できるところの流バ加 Kirchner 液による方が、均等発育が

それ程でもないところの同非添加液によるよりも抗菌価がより高く現われた。

4) 従つて抗結核剤の抗菌価を左右する諸因子の 1 として培液内の結核菌の発育様式をもあげることができるようであつて、結核菌が培液内に均等に発育する程その抗菌価は高く現われるものと思われる。

終始御懇篤な御指導、御校閲を賜つた恩師占部教授に満腔の謝意を捧げる。

文 献

- 1) 松尾 : J. Antibiotics, 投稿中,
- 2) 松尾 : 結核, 26, 234, 昭 26.
- 3) 松尾 : 結核, 27, 177, 昭 27.
- 4) Schatz, A., Bugie, E. & Waksman, S. A. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 55, 66, 1944.
- 5) Schatz, A. & Waksman, S. A. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 57, 244, 1944.
- 6) Middlebrook, G. & Yegian, D. : Am. Rev. Tbc. 54, 533, 1946.
- 7) Wolinsky, E. & Steenken, W. : Am. Rev. Tbc., 55, 281, 1947.
- 8) 黒屋 : 日本臨牀, 5, 659, 昭 22.
- 9) Waksman, S. A. : J. A. M. A., 135, 478, 1947.
- 10) Vennesland, K., Ebert, R. H. & Bloch, R. G. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 68, 250, 1948.
- 11) Williston, E. H. & Youmans, G. P. : Am. Rev. Tbc., 59, 336, 1949.
- 12) Sasano, K. T. : Am. Rev. Tbc., 59, 461, 1949.
- 13) Bloch, R. G., Vennesland, K., Ebert, R. H. & Gomori, G. : Am. Rev. Tbc., 59, 554, 1949.
- 14) 小野塚 : 抗研誌, 6, 183, 昭 25.
- 15) 中村 : 日本臨牀結核, 9, 604, 昭 25.
- 16) 水野 : 第 3 回日本細菌学会中国四国地方会記録, 27, 昭 25.
- 17) Owen, C. R., Adcock, J. Stow, R. M., Staudt, L. W. & Davey, W. N. : Am. Rev. Tbc., 61, 706, 1950.
- 18) Garrod, L. P. : Am. Rev. Tbc., 62, 582, 1950.
- 19) Corper, H. J. & Cohn, M. L. : J. A. M. A., 137, 357, 1948.
- 20) Lehmann, J. : Lancet, 250, 15, 1946.
- 21) Youmans, G. P., Raleigh, G. W. & Youmans, A. S. : J. Bact., 54, 409, 1947.
- 22) Graessle, O. E. & Pietrowski, J. J. : J. Bact., 57, 459, 1949.
- 23) Rogen, E. : Am. Rev. Tbc., 61, 226, 1950.
- 24) 本間 : 医学輯録, 23, 7, 昭 25.
- 25) 戸田・阿武 : 結核, 24, 65, 昭 24.

- 26) 占部・弓削：実験治療, 245, 39, 昭 24.
 27) 弓削：久留米医学会雑誌, 13, 336, 昭 25.
 28) Pope, H., & Smith, D. T.: Am. Rev. Tbc., 62 (part 2), 34, 1950.
 29) Dubos, R. J. & Davis, B.D.: J. Exp. Med., 83, 409, 1946.
 30) Steenken, W. & Wolinsky, E.: J. Bact., 57, 453, 1947.
 31) Knight, V. & Tompsett, R.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 73, 55, 1950.
 32) Youmans, A. S. & Youmans, G. P.: J. Bact., 56, 245, 1948.
 33) Fisher, M.W.: Am. Rev. Tbc., 57, 58, 1948.
 34) Wolinsky, E. & Steenken, W.: Am. Rev. Tbc., 58, 335, 1948.
 35) Pope, H.: J. Bact., 58, 223, 1949.

ジビドロ
 ストレプトマイシン
 協和

マイシリン協和
 ペニシリン協和

協和醸酵工業株式会社