

微量結核菌に対する熱に安定な液体培地

第2報 本培地の性状補遺および応用

今 村 邦 雄

福島県立医科大学細菌学教室 (指導 山根績助教授)

受 付 昭和 32 年 8 月 2 日

前報¹⁾においては著者は一種の結核菌均等発育の培地を調製し、その培地成分等につき種々検討を加えたが、本報においてはまず本培地における各種菌量における菌の発育態度を追究し、また本培地に発育した菌の動物に対する毒力を検討し、さらに本培地を用いる人型結核菌の薬剤耐性測定の結果を他培地のそれと比較考察することとする。

実験方法

菌株および純培養：人型結核菌H₃₇Rv株および当教室において結核患者喀痰より分離した結核菌、仮称第2株の2株を本培地に 37°C 1週間培養したもの。

菌量の決定：本培地で培養された菌を遠心集菌して、これを M/15 磷酸緩衝液で2回洗滌したものを電気乾燥器中に 90°C で8時間乾燥せしめ、さらにこれを五酸化リンの入ったデシケーター中で重量の変化のなくなるまで陰圧乾燥したものを化学天秤で秤量して、菌乾燥量を算出した。

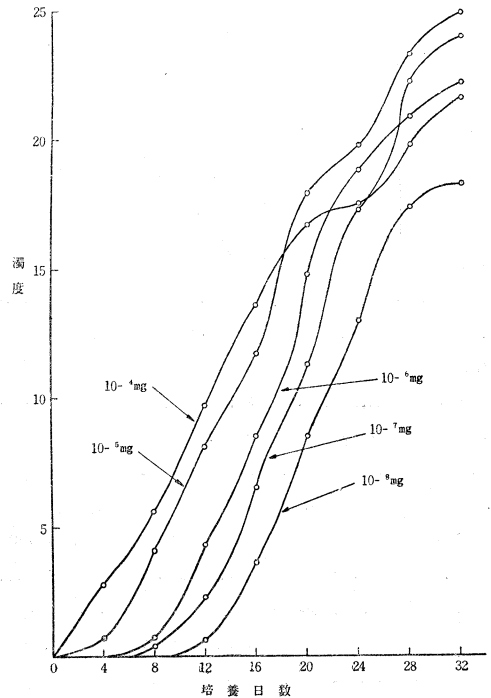
実験成績

I) 各菌量における菌の発育曲線：中試験管に 7 ml の割合に分注された本培地3本にそれぞれ 10⁻⁴mg, 10⁻⁵mg, 10⁻⁶mg, 10⁻⁷mg, 10⁻⁸mgの割合にH₃₇Rv株培養を接種して 37°C に孵温し、1日おきにその発育を日立光電光度計EPO-B型を用いて 640mμ のフィルターにより比濁した。この際可及的に培地成分の蒸去を防ぐため、試験管には薬包紙で包んだゴム栓を施した。

図は同一接種菌量の試験管3本の平均値を逐目的に図示したものである。図に見られるように、接種菌量が少ないほど増殖誘導期は延長するが、対数期よりいわゆる算術増殖線 (arithmetic growth line)²⁾における増殖率は接種菌量に無関係にほとんど同一であった。また10⁻⁴mg 接種群において、孵温20日より24日にかけて一種の diauxie と見られる曲線を示したが、これが原因についてはなんらか偶然的なものと考えられ、他のこの種の実験では見られなかった。一方、菌の示す濁度は孵温28日頃まではほぼ同一速度を示し、以後わずかにその進行が衰えるが、なお孵温32日頃まで少しずつ濁度は増加する。

本培地における生菌の増加を接種菌量10⁻⁴mgでTwe-

図 各種接種菌量による発育曲線



en 寒天平板中の colony count により行つたところでは、測定16日まで増加し、以後増加が見られなかったことより、16日以後の濁度の増加は死菌体の蓄積とも考えられ、また可及的注意したにもかかわらず、培地水分の蒸去による単位培地容量中の菌数の増加を示しているのかも知れないと考えられる。

II) 本培地による結核菌培養のマウスに対する毒力：本培地に1週間培養した H₃₇Rv 株を集菌洗滌した後に Tween 80 を 0.05% の割合に含む生理的食塩水に浮遊せしめ、一方これと同量の菌の浮遊液を遠心集菌して、同浮遊液中の菌体乾燥量を後に求め、同菌液および10倍稀釈浮遊液、100倍稀釈浮遊液を調製し、その 0.1ml を約 20g の D-D 系マウスの尾静脈より接種し、さらに対照として H₃₇Rv 株の Sauton 培地培養をメノウ乳鉢にて磨碎後、前者同様の処置で同数のマウスに接種して30日間観察した成績が表1である。観察期間中斃死しなかつたマウスも観察期間後直ちに全部剖検し、その肉眼的所見を

表 1 マウスに対する毒力

培養培地	接種菌稀 釈度	原 液		10 × 液		100 × 液	
		剖検	塗抹	剖検	塗抹	剖検	塗抹
本 培 地	0.1ml = 0.42mg	518		518		4	≡
		518		528		3	≡
	518		528		0	+	
	518		4	≡	0	+	
	0	≡	0	≡	0	-	
Sauton培地	0.1ml = 0.207mg	518		4	≡	3	≡
		520		2	≡	3	≡
	3	≡	2	≡	0	+	
	2	≡	2	≡	0	+	
	0	≡	0	-	0	-	

注：本文参照

記載すると共に、その肺の一部を磨砕してこれを塗抹染色鏡検して、結核菌の有無を定量的に観察記載した。

表中大活字で5と記載されているのは、全肺野および肝、腎等に結核結節を生じて斃死した例であり、4は両肺野に無数の結節を生じながら斃死しなかつた例、3は片肺野に多数の結節もしくは両肺野に少数の結節を有して斃死しなかつた例である。0は全然所見を有しなかつた例である。また大活字5の肩に附してある数字は接種後より斃死までの日数である。菌数項中の+印は塗抹染色標本中の結核菌の存在程度を示し、≡は全視野に多数の菌の見られるもの、≡は一視野平均2~3個の菌の見られるもの、+は全視野に2~5個の菌の見られるものであり、-は全然菌の見られなかつた例である。

斃死例は一般の他の培養法による先人³⁾の成績より少数であるが、20g という毒力検査用のマウスとしては少し大きなマウスを用いたことおよび観察期間がすこしく短期間であつた点より、成績が強毒の如く現われなかつたものと考えられ、このことは接種菌量が約1/2であるとはいえ、対照として用いた Sauton 培地培養菌の成績と比較する場合、ほぼ同等の毒力を有している点からも、本培地の培養菌のマウスに対する毒力は Sauton 培地培養菌の毒力に少なくとも劣らないものといえよう。

III) 本培地による結核菌の薬剤耐性測定：本培地 5cc に SM, INAH, P A S をそれぞれ 100γ, 10γ, 1γ, 0.1γ, 0.01γ/ml の割合に加え、これに本培地に 5 日間培養した H₃₇Rv 株および当教室において患者喀痰より分離された SM 耐性株の培養 0.1ml を接種して、37°C 5 日間孵温し、2 株の上記薬剤に対する感受性を調べた成績が表 2 である。

表に見られるように、対照実験として行われた小川培

表 2 薬剤耐性測定成績

培地	添加薬量 薬剤	100γ	10γ	1γ	0.1γ	0.01γ	0γ
		液体培地	SM	-	-	-	≡
	INAH	-	-	-	-	≡	≡
	P A S	-	±	+	≡	≡	≡
Tween* 寒天培地	SM	-	-	-	≡	≡	≡
	INAH	-	-	-	≡	≡	≡
	P A S	-	-	-	≡	≡	≡
小川培地	SM	-	-	≡	≡	≡	≡
	INAH	-	-	-	≡	≡	≡
	P A S	-	-	+	≡	≡	≡

注 H₃₇Rv 株を使用, * : I. Yamane : Nature, 179 : 45, 1957.

培地	添加薬量 薬剤	100γ	10γ	1γ	0.1γ	0.01γ	0γ
		液体培地	SM	-	≡	≡	≡
	INAH	-	-	-	≡	≡	≡
	P A S	+	+	≡	≡	≡	≡
Tween 寒天培地	SM	-	≡	≡	≡	≡	≡
	INAH	-	-	-	+	≡	≡
	P A S	-	-	+	≡	≡	≡
小川培地	SM	≡	≡	≡	≡	≡	≡
	INAH	-	-	-	≡	≡	≡
	P A S	-	-	+	≡	≡	≡

注 当教室にて患者喀痰より分離せる第 2 株を使用

地による現行療法における成績に比較して SM に対する菌の感受性が見かけ上一桁強く現われることは、Dubos 培地、YMY 培地と同様に含 Tween 80 培地の共通の所見であり、また P A S に対する感受性境界が鮮明に現われず、本薬剤の種々の濃度の稀釈系列に漸移的に発育が阻止されることを示している。このことは小川培地における耐性測定においても、耐性の測定をいわゆる間接法で孵温 14 日で行うか 21 日で行うかそれとも 28 日で行うかによつて耐性度の程度が種々異なることから、P A S に対する耐性測定に関して、他の抗結核剤のそれと本質的に異なる性質を示すものである。

このような感受性境界の不鮮明さを避けるため、培地 pH および培地成分を種々変化させて実験を行つたが、所期の結果を得られなかつた。他の菌種に関して一般に同様の成績が得られ、測定は 37°C 5~8 日で達成せられた。

考 察

結核菌の静置培養に関するいわゆる arithmetic linear growth curve なる現象は Fisher, Kirchner and Hess²⁾ によつて報告され、その後 Volk and Myrvick⁵⁾

により、本現象の原因の説明に関する実験が報告された。しかし微量菌接種時の arithmetic linear growth stadium 以前の lag-および lag-phase の解析的研究は未だ報告されていない。

比濁法で捕捉できる範囲では、図に見られる如く接種菌量の減少は単にその lag-phase を遅延せしめるだけで、その後続く短期の lag-phase および長期の arithmetic linear growth phase における発育速度に影響を与えるものではないことが明らかになった。

また Volk and Myrvick⁵⁾ は rotary shaker を用いての振盪培養では、BCG を使用して log-phase を持続させ arithmetic growth phase を消失せしめ、偏性好気性菌の submerged culture における arithmetic growth の生ずる原因を酸素の供給の不十分なことに帰せしめたが、著者の人型結核菌の実験⁶⁾ では微量菌の場合は、振盪することによりかえつて静置培養よりも菌収量が悪く $10^{-6} \sim 10^{-7} mg$ では全然菌が発育しない成績が得られているので、かならずしも Volk and Myrvick の考え方が正しいとは思われない。

培養された結核菌のマウスによる毒力検査は Lange⁷⁾ により初めて行われ、戦後水之江⁴⁾ によりその基礎的研究が行われた。著者は水之江の最も敏感といわれる静脈内接種法と水之江の用いた D-D 系マウスを使用した。ただ諸種の事情で約 20g 程度のマウスしか使用できず、また観察日数を 30 日と限定したために精密な定量的表現により毒力を表現することができなかつたが、少なくとも Sauton 培地培養のそれに劣らないことは明らかである。このことは Drea⁸⁾ の結核菌の深部培養がモルモットに対する毒力検査においても決して表面培養のそれに劣らない報告を参照してもほぼ推定に難くない。

Dubos およびその一門により創始されたいわゆる Tween-albumin medium は、その使用法の簡単なることおよび検定に要する時間が短時間であるため、すでに多くの研究者により化学療法剤に対する結核菌の感受性を検定する目的に用いられているが、SM に対する結核菌の感受性が Sauton 培地、Lockemann 培地等 Tween 80 を含有しない培地に比して、Dubos 培地を用いる場合には、見かけ上 10 倍の高感受性に検定されることは、すでに山根⁹⁾、Fisher¹⁰⁾ らにより報告されている。

本培地を用いた場合も、表 2 に見られるように小川培地の如く Tween 80 を含有しない培地のそれに比して 10 倍の高感受性が観察されており、また INAH のそれにおいても同様なことが見られる。このことは、薬剤に対す

る結核菌の耐性測定を行う場合使用培地を明確にしなければ、互いに多くのデータを比較検討することが無意味であることを教えるものではなからうか。

また P A S に対する感受性が著しく不鮮明である結果が本培地で見られるのは、P A S のもつ結核菌発育阻止の様式が他の SM、INAH に比較して全く異なるか、または本培地中で P A S が不安定で、培地成分と反応して無力な誘導体を形成するかのいずれかと考えられ、今後この問題に対しては、本質的な検討を加えなければならない。

総 括

1) 微量菌接種時における本培地中の結核菌の発育曲線は、接種菌量が減少するにつれてその lag-phase が延長するが log-phase およびいわゆる arithmetic linear growth phase における発育速度に変化はなかつた。

2) 本培地に培養された人型結核菌の静脈内接種によるマウスに対する毒力は Sauton 培地培養菌のそれと比較して低くない傾向を示した。

3) 本培地による薬剤の結核菌に対する耐性測定は培養 5 日で達成されるが、SM および INAH に対する耐性は、本培地を用いる場合、小川培地による成績に比較して 10 倍の高感受性を示し、P A S に対する耐性度は、その境界が不鮮明なる傾向を示した。

文 献

- 1) 今村邦雄：結核，32：422～424，1957.
- 2) Fisher, M.W., Kirchner, W.F. and Hess, A.Z. : J. Bact., 62: 319～322, 1951.
- 3) 水之江公英：日本細菌学雑誌，7：195～197，199～200，1952.
- 4) 東村道雄：医学と生物学，38：11～14，1956.
- 5) Volk, W.A. and Myrvick, Q.N. : J. Bact., 66: 386～388, 1953.
- 6) 今村邦雄：未発表.
- 7) Lange, B. : Zeitsch. Hyg. Infekt., 98: 229～232, 1922.
- 8) Drea, W.F. : Amer. Rev. Tuberc., 363～373, 1946.
- 9) 山根 績：抗研誌，6：75，1950.
- 10) Fisher, M.W. : Amer. Rev. Tuberc., 57: 58～60, 1948.