

結核の化学療法研究

第六十九報

キルヒネル培地使用時に發生する糸狀物質に就て

金沢大学医学部日置内科教室(主任 日置教授)

安 江 良 彦

Yoshihiko Yasue

(昭和26年9月8日受附)

緒 論

近年結核症に対する化学療法に於て愈々希望ある今後が約束されつつあるが如きは、幾多研究者の絶えざる努力に依るものであることには疑を容れないが、夫と云ふのも一は結核菌深部培養法の可能によつてその発達が齎らされたと解して過言ではあるまい。即ち近時薬剤の効力検定に使用せられる液狀培地の代表的なものとして“キルヒネル”培地、“デューボ”培地等が挙げられるが(二者を用ひたる場合所謂菌發育阻止価に相当の開きが認められる)、後者の使用は稍々特殊の目的をも有し、薬剤夫自身の結核菌發育阻止価を検するには依然前者を用ひる

ことが今日と雖も尙棄てられずにある。吾教室に於ても先に同培地に関する報告に接するや、夙くも本培地を採用し、多年に涉つて研究が続けられているが、特に最近優秀な抗結核薬剤を検定するに當つて、本來の結核菌集落とは趣を異にする処の糸狀物質の發生に遭遇して判定上の不便を味ふに至つた。即ち之が調査を著者に命ぜられたのであつたが、著者は此抗菌価判定を見誤らしめる原因の一端が実に血清に依ることを見出し得たので今その詳細に就て之を報告せんと欲するものである。

第1章 キルヒネル培地中糸狀物質發生に関する觀察

キルヒネル培地の使用に依り薬剤の抗菌力に関する試験管内実験を実施するにあたり、化合物を加へざるに先立つて予め血清加培地を調製し置くときは、実施上頗る支障が多い。その理由は、(1) 10%に含有せられる同培地中の粘調な血清のために、多数の試験管内分注の間に器具が汚染され、雑菌迷入の率が非常に大きい、その憂ひを除くための再度の完全滅菌が不可能なこと。(2) 化学藥品自身又はその溶媒の添加に際し白濁の累が以下の試験管内に波及し、正しい抗菌価測定に甚だしい支障を來すこ

とである。即ち此等の欠点を避けんがために、一般に次の方法が汎く採られている。(1) 滅菌基礎培地(血清を未だ含有せず)を無菌的に試験管に分注し、之に依り予め溶解せる藥品を更に逕減的に稀釈する。(2) 然る後一晝夜氷室に放置し無菌的に分離した血清を、10%の割合に各試験管内培地に加へ、更に培養すべき結核菌々液を滴下する。此方法に依れば、前法に於けるが如き支障を來すことは尠い。併し乍ら斯くして慎重を期すのも猶凡そ3週間培養後の時期に於て第二の支障に遭遇することが甚だ罕で

はないのである。夫は培養中肉眼的に普通結核菌集落と見違ひ易い、但し浮游せる軽い綿織維様の(長さ約0.5~10m.m.)糸状物質が出現することである。而して之が薬品含有濃度の高い所では勿論、薬品の抗菌力を判定すべき限界稀釈の所迄生じた場合に、検者をして結果の判定を頗る迷はしめるのである。今その発生条件を靜かに顧みて、夫等の由つて來る所を按ずると次の様なことになる。

(1) 糸状物質の発生は極めて不定である。培養基組成中最も変動し易いものと云へば採取する血清が毎常一定でないことである。

(2) 糸状物質の発生は從來余り注目されなかつたが、近時抗菌価の高い優秀な薬物が見出されるに従つて、その発生が余計に氣附かはれ出した傾向にある。

(3) 糸状物質の発生は結核菌集落の発生の既に最も盛んな処では却つて之を認めない。此事は宛も薬品濃度が既に稀薄であるからその影響を被らないのであるとも解されるが、薬品を

加へない場合にも糸状物質の発生が認められるから薬品の影響とは限らぬ。寧ろ菌の發育と關係がある。

(4) 一旦発生する場合には薬品の濃度の高い処では微細に分散していることが認められる丈で、その他は濃度の如何に拘はらず略々同分量に之を生ずる。斯る点は寧ろ組成成分の一定なる培養基と密接な關係にあることを想像せしめる。

斯くて当初觀察中は発生条件が一定の規則に支配されていないので、その実態を捕捉するのに甚だ苦しんだのであるが、纏れた糸目をほぐすには先ず絡んだ糸端から見出さなければならぬ。其処で上記の第一に考へられたこと、即ち最も変動性の多い培養基組成成分中血清の調査から始めることとし、先ず血清を非働化するに第一の成功として糸状物質の発生を殆んど見ないと云ふ事實を捕捉し得たのであつた。今その事實から次章に之を紹介する。

第2章 糸状物質発生と血清の働性との關係

先ず次の如き實驗を行ふ。

實驗方法

菌液を予め、次の如く用意しておく。結核菌は人型菌H₂株を用ひ、之をキルヒネル培地にて約1ヶ月培養し、菌塊管底に覆ふに至つて之をよく振盪し、その2.0c.c.を時前に硝子玉を入れ消毒した生理的食塩水10c.c.を含有したマイエルコルベン中に投じ、よく振盪し粗大な菌塊を細挫した後に之を2~3時間靜置し、その上澄液を爾後用ひる菌液とした。滅菌した除血清キルヒネル基礎溶液(A液と以下、略称す)と、結核菌の増殖を充分に阻止し得る処の濃度、即ち1万倍に「パラアミノサルチル」酸溶液を添加した除血清キルヒネル基礎溶液(B液と以下、略称す)を、試験管12本に2.0c.c.宛、即ちA液を6本、B液を6本分注する。A液、B液の夫々の2本に、無菌的操作のもとに分離した働性血清(一晝夜水室に放置された血清でも、採血後直ちに分離した血清でも結果は略々同じであつた。但し糸状物質の発生は新鮮血清よりも少し劣る。)を直ちに10%の割合に添加する。次に同様の組合

せで、A液、B液の夫々の2本に56度、30分、加温非働化する血清を10%に添加する。対照として血清を添加しないA液、B液の夫々2本を置く。働性血清及び非働性血清を添加したA液、B液の合計8本の内、働性血清添加A液、B液の各々1本へ、又非働性血清添加A液、B液の各々1本及び対照のA液、B液の各々1本へ、全部法の如く前記菌液を1~2滴々下し、直ちに37度の孵卵器内に收め、3週間培養を続ける。その成績は第I表に示される。

働性血清を添加したA液、B液の全部に糸状物質を見る。働性血清並に非働性血清添加A液に増殖した普通結核菌集落は新鮮な働性血清を添加した場合に於ては、非働性血清を添加した場合に於けるよりも、稍々發育量は少く、且つ膨化、分散せる菌集落を作る他多くの相違を認めない。以上の成績に依つて明白である如く糸状物質は結核菌及び稀釈含有されている薬品(此場合は、10,000倍「パラアミノサルチル」酸。但し他薬品の品種及び濃度との關係に就て

(第1表) 人型菌H₂株, 1万倍「パラアミノサルチル」酸及び血清と糸状物質発生の関係

基礎溶液	血清		非働性血清 (+)		対 照	
	働性血清 (+)	菌液 (-)	菌液 (+)	菌液 (-)	菌液 (+)	菌液 (-)
除血清キルヒネル 基礎溶液 (A液)	結核菌集落 (+) 糸状物質 (+)	糸状物質 (+)	結核菌集落 (++)	清 澄	清 澄	清 澄
10,000倍P.A.S.加 除血清キルヒネル 基礎溶液 (B液)	糸状物質 (+)	糸状物質 (+)	清 澄	清 澄	清 澄	清 澄

働性血清：健康人血清(氷室1晝夜放置)

非働性血清：健康人血清を56度, 30分, 加温非働化するもの。

対 照：血清を添加しない。

は後に論ず。)と関係なく、一応血清自身の中にその原因を有し、所謂働性血清を使用するか、又は非働性血清を使用するかに依つてその発生の有無が決定せられることが明白にされたわけである。非働化する爲、血清を一晝夜氷室に保存すると云ふ丈では此場合糸状物質の発生を打消すに不充分である。

然らば菌の発育が旺盛な時は働性血清を使用した場合でも糸状物質の発生を殆んど認めないと云ふことは発育せる菌が血清を非働性ならしめる役目を買つてゐるか、或は菌が血清に作用

して析出し得ざる迄に之を侵襲するとして解釈出来ぬことはない。之が強力な抗結核薬剤を加へ且つ働性血清を使用した場合糸状物質の発生が容易になつた一の理由で、多くの薬剤で抗菌価の高くないものを検していた場合には之に気附くことが寡かつたのである。併し夫にしても薬剤検定の際働性血清を使用し菌添加の有無に不拘、糸状物質を生じたり、生じなかつたり不定なことを経験したのは何故であらうか。血清の非働化に薬物も関与することが全然ないかどうか。之に関する実験を次章に紹介する。

第3章 糸状物質発生と種々化学薬品の関係

次の如き実験を行ふ。

実験方法

種々の薬品を法の如くキルヒネル基礎培地にて通減的に希釈し、働性血清を10%の割合に注射器にて滴

下する。但し対照は薬品を含まない。斯くして3週間培養し糸状物質発生の有無を観察した。

実験の結果は次の表に示される。

(第2表) 薬品添加キルヒネル培地に於ける糸状物質の消長

番号	薬 品 名	起始希 釈濃度	薬品の各特定希釈濃 度に於ける糸状物質 の消長
1	Chininum hydrochloricum	1000	1000(+)
2	Chininm sulfuricum	1000	1000(+)
3	Vucin hydrochloricum	1000	8000(-)<16000(+)
4	Eucupin bihydrochloricum	1000	1000(+)
5	Optochin hydrochloricum	1000	1000(+)
6	Isoamylapochinin-base	1000	1000(+)

要約すれば、特定濃度に於て血清を非働性化する薬品として、供試した薬品58種類の内、“Vucin bihydrochloricum” 8000倍、“2-4-Dibrom-6-nitrophenol kalium

7	Aethylapochinin-base	1000	1000(+)
8	Chineron hydrochloride	1000	1000(+)
9	8-Oxychinolin	1000	1000(+)
10	α -Naphtochinon	1000	1000(+)
11	β -Naphtochinon	1000	1000(+)
12	2-Methyl-1-4-naphtochinon	1000	1000(+)
13	2-Methyl-1-4-naphtochinon NaHSO ₂	1000	1000(+)
14	Specurin	1000	1000(+)
15	Citrinin	1000	1000(+)
16	2-4-Dibrom-6-nitrophenol kalium	1000	4000(-) < 8000(+)
17	3-Nitro-4-hydroxybensen-sulfonamid-Na	1000	1000(+)
18	Guaajacol	1000	1000(+)
19	Creosotum	1000	1000(+)
20	Fhimol	1000	1000(+)
21	Xylol	1000	1000(+)
22	Resorsin	1000	1000(+)
23	Methylenblau	1000	1000(+)
24	Macurocurom	1000	1000(+)
25	Acriflavin	1000	1000(+)
26	Tuberflavin	1000	1000(+)
27	Rodanin	10000	10000(+)
28	Eosin	1000	1000(+)
29	Crysoidin	1000	1000(+)
30	Congorot	10000	10000(+)
31	Phenolrot	10000	10000(+)
32	Arizanin	1000	1000(+)
33	Methlrot	10000	10000(+)
34	Malachitogruen	10000	10000(+)
35	Nitrophenol (meta)	1000	1000(+)
36	Acid picricum	1000	1000(+)
37	Acid picrinonitricum	1000	1000(+)
38	Dimethylaminobenzaldehyd	1000	1000(+)
39	p-aminosalicylicum	1000	1000(+)
40	Acid salicylicum	1000	1000(+)
41	Acid acetylsalicylicum	1000	1000(+)
42	Azetanilid	1000	1000(+)
43	o-Aminophenol	1000	1000(+)
44	Sulfamin	1000	1000(+)
45	Sulfathiazol	1000	1000(+)
46	2-4-Dimethyl-6-p-aminobenzol-sulfonamid pyrimidin	1000	2000(-) < 4000(+)
47	Sulfadiazine sodium	1000	2000(-) < 4000(+)
48	Sulfamerazin sodium	1000	2000(-) < 4000(+)
49	Pyrimisone	1000	2000(-) < 4000(+)
50	Promin	1000	4000(-) < 8000(+)
51	Formylsulfathiazol	1000	1000(+)
52	Sulzolin	1000	1000(+)

”4000倍, “Promin”
4000倍, “2-4-Dime-
thyl-6-p-aminoben-
zolsulfonamid pyrimi-
din” 2000倍, “Sulfa-
diazine sodium” 2000
倍, “Sulfamerazin so-
dium” 2000倍, “Pyri-
misone” 2000倍,
‘Cholsäure’ 2000倍
の8種類を得た。

即ち以上の実験に
依つて、薬物の抗菌
価検定の目的に働性
血清を使用した場合
菌の発育旺んなれば
無論糸状物質の発生
を見ないが、菌を投
入せざるに不拘その
発生を見ることは、
他に用ひた薬物の種
類にも多少関係する
ことが知られるので
あつて、糸状物質発
生には色々のものが
関係することが窺は
れるのである。

53	Tibione	1000	1000(+)
54	Urethanum	1000	1000(+)
55	Usninsäure	1000	1000(+)
56	Cholsäure	1000	2000(-) < 4000(+)
57	Penicillin	1000	1000(+)
58	Streptomycin	1000	1000(+)

第4章 キルヒネル培地添加血清非働性化の抗結核剤の 結核菌発育阻止価に及ぼす影響

著者は第1章に於て、非働性血清をキルヒネル培地に添加して使用すれば糸状物質の発生を見ず、従つて化学薬品の抗菌価の判定を明瞭ならしむることを確認した。茲に働性血清及び非働性血清添加キルヒネル培地を用ひて人型菌

H₂株の発育を3週間に亘り観察し、“Streptomycin”, “P.A.S.”, “Tibione”, “Sulzolin” に関する抗菌価の之に依つて被る影響を検査した。次に示される実験成績は同一健康人血清を用ひ同一条件で爲されたものである。

(第3表) 血清と薬品抗菌価との関係

試験管番号		対	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
稀釈濃度		照	1×10 ⁴	2×10 ⁴	4×10 ⁴	8×10 ⁴	16×10 ⁴	32×10 ⁴	64×10 ⁴	128×10 ⁴	256×10 ⁴	512×10 ⁴	1024×10 ⁴	2048×10 ⁴	4096×10 ⁴
薬品															
Streptomycin	働性血清	卍	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	卍	卍	卍
	糸状物質		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	非働性血清	卍	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	卍	卍	卍
P. A. S.	働性血清	卍	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	卍	卍
	糸状物質		卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	+
	非働性血清	卍	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	卍	卍	卍
Tibione	働性血清	卍	-	-	-	-	+	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	糸状物質		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	非働性血清	卍	-	-	+	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
Sulzolin	働性血清	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	卍	卍	卍	卍
	糸状物質		卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	+	-	-	-	-
	非働性血清	卍	-	-	-	-	-	-	+	卍	卍	卍	卍	卍	卍

働性血清：健康人岡田某の血液より分離した新鮮血清。

非働性血清：同1人血清を、56度、30分加温、非働化す。

糸状物質に於ける符合はその量をも加味して表す。又(±)は結核菌々塊であるか、糸状物質の微細なものであるか全く肉眼的にその鑑別困難なものである。

明瞭な普通結核菌々塊の発生を指標として求められた各薬品による発育阻止限界を比較す

ば、“Streptomycin”の働性血清添加キルヒネル培地(以下働血培と略称する)に於ては5,120,000

倍、非働性血清添加キルヒネル培地（以下非血培と略称する）に於ては 1,280,000倍, “P.A. S.” 働血培に於ては 5,120,000倍, 非血培に於ては 2,560,000倍, “Tibione” 働血培に於ては 80,000倍, 非血培に於ては 20,000倍, “Sulzolin” 働血培に於ては 640,000倍, 非血培に於ては 320,000倍であつた。即ち一般に非血培使用時に抗菌価は働血培に於けるよりも稍々低く出現するが、働血培に於て強く出ると云ふことが將して薬剤の本來の力を示すものか、糸状物質発生の爲集落発生の境界が不明瞭となり判定を誤らしむるに由るか、速かに断定を憚る処である。猶著者は上述実験に於て異なる健康人血清又は異なる結核患者の血清を用ひて各藥品の結核菌發育阻止濃度の相違を同様検索したが、第

3表に於けると略々等しい結果を得るに止まつた。詳細を略する。

考 按

著者は今發生する糸状物質の本態に就ては未だ之を明かにし得ないが、以上の事に依つて血清を加温に依つて非働化することが、藥物の抗結核菌価測定に際し、判定をしてより明瞭化することを知つた訳である。血清分離に際し通常行ふやうに氷室に24時間放置すると云ふこと丈では不充分の様である。

非働化に依つて藥物の抗菌価に及ぼす影響は多少存するが、判定を鮮明ならしむる上に於て試験実施上予め血清を加温に依つて非働化することが最も希ましい。

結 論

1) キルヒネル培地を使用し結核菌の培養を行ふに當つて往々發生する糸状物質の本源を添加する血清に求め、之に及ぼす種々の影響を少しく観察した。即ち藥物の抗菌価測定に際して、予め添加血清を56度、30分に加温、非働化

することに依つて成績の判定を明瞭ならしむることを茲に更めて注意したい。

2) 猶著者はキルヒネル培地に加ふべき働性血清又は非働性血清の二、三抗結核剤の結核菌發育阻止価に及ぼす影響を観察した。

文 献

- 1) O. Kirchner : Zbl. f. Bakt. Bd. 124, 1932.