

培地置換培養法による諸種 結核化学療法剤の静菌作用の検索

〔第1篇〕 培地置換培養法の基本的実験

京都大学結核研究所化学療法部（主任 教授 内藤益一）

神 田 瑞 雄

（受付 昭和33年12月20日）

【内 容 抄 録】

試験管内に於いて結核菌をそのまま培養しながら、培地のみを一定期間毎に置換してゆく方法を考案し、培地置換培養法（以下置換培養法）と命名した。その主たる目的は、静菌力試験の為の培養中に力価が変化する恐れのある薬剤の、より精確な試験管内静菌力を知る事である。

基礎実験として、INH を被検薬剤として、下記3種の置換培養法を比較検討した。(1)遠心沈澱を行なった沈降管内置換培養法。(2)遠心沈澱を行なわない沈降管内置換培養法。(3)シリコン被覆スライド培養法による置換培養法。

その比較検討の結果、3方法に於ける成績はほぼ一致し、3方法の内シリコン被覆スライド培養法による置換培養法が、最も操作が簡単で且つ置換培養法に最も適した方法である事がわかった。

緒 言

現在結核の化学療法剤として臨床的に用いられているものの多くは、先ず試験管内に於ける発育阻止力を検討され、更に動物に対する毒性検査や治療実験等の節にかけられた上で臨床的な検討が行なわれたものである。従つて試験管内に於ける静菌力の強さが一番最初の節になるわけであるが、試験管内の静菌力の強さと臨床的な治療効果とは必ずしも一致しない憾みがある。例えば、発育阻止最低濃度（以下 MIC）が 0.5 γ /cc 前後の PAS の臨床効果は、MIC が 50 γ /cc で臨床投与量が PAS の約1/100に過ぎ

ない TB1 の臨床効果と非常に大きい差はないようである。

この MIC と臨床効果との矛盾は静菌力の検査される場や拮抗作用其他の因子による事はもとより明らかであるが、より精確な試験管内静菌力を知る事もやはり重要な事であつて、当教室では内藤教授の指導のもとに種々の基本的な研究が為されている。例えば、培地差による試験管内静菌力の変動¹⁾、抗菌力に及ぼす培地 pH²⁾、血清濃度³⁾、瓦斯組成の影響⁴⁾、抗結核剤を投与した動物の血中抗菌力の消長^{5~11)}等に関する諸実験が行なわれ、夫々興味深い成績を得ている。著者がここに発表する培地置換培養法（以下置換培養法）もその一環として行なわれたものである。置換培養法とは、試験管内に於いて結核菌をそのまま培養しながら培地環境のみを所定の条件に合うように培地を置換してゆく方法である。卑近なたとえをすれば、金魚鉢、金魚、水、夫々試験管、結核菌、培地と仮定して金魚鉢の水を換えるのとよく似た方法である。

その目的とする所は静菌力試験の為の培養中に、力価が変化する恐れのある薬剤のより正しい試験管内静菌力を把握する事にある。

置換培養法として先ず考えられる方法は、遠心沈澱法（以下遠沈）により結核菌を沈降させ、その上清だけを新しい培地に置換する方法と、逆に結核菌を何者かに吸着させて新しい培地に移し換える方法とであろう。後者の方法は極めて困難な方法であるが、当教室の内藤等^{12~14)}によつてシリコン被覆スライド培養法

(以下 SSC) が考案されているので、此の方法を利用すれば可能ではないかと想定される。本法は結核菌が油水界面に吸着される性質^{15~18)}とシリコンが極めて安定な油性物質¹⁹⁾で一定の処理によりガラススライドに強固な疎水性皮膜を形成する性質とを利用したものであつて、結核菌は何等の接着操作を要せずシリコン被覆スライド(以下 SS) 表面に吸着されつつ増殖し、しかも簡単な操作では容易に脱落しないという利点があり、従来の SCM にくらべて極めて優秀な方法である。

本編に於いては、培養中に分解され易いといわれている INH^{20~22)} の MIC の変化を指標として以上の置換培養法の優劣を比較検討した成績に就いて記載する。

実験方法及び実験材料

1. 培 地

10%血清加 Kirchner 培地を使用した。血清は当教室に於いて加圧式ドイツ滅菌濾過器で滅菌し、56°C 30分間加温して非働化したもので、同一実験はすべて同一血清で作られた培地を 37°C に保存して使用した。本培地の pH は概ね 6.4~6.6 である。

2. 使用菌株及び菌液作成法

当教室保存の人型結核菌 H37Rv 株を上述の 10%血清加 Kirchner 培地に約 2 週間表面培養し、生じた菌膜をガラス球入り丸底コルベンにとり少量宛生理的食塩水を加えながら振盪して菌懸濁液を作り、20~30分間静置、上清を適当に希釈して所要の菌液とした。菌液濃度の判定は光電比色計によつた。

3. 被検液の調製

INH 5 mg を秤量、70% Ethanol 5 cc を加えて、1,000倍に溶解滅菌し、更に蒸留水で 10 γ/cc 迄希釈して用いた。

4. 普通培養法

小沈降管10本に10%血清加 Kirchner 培地を第1管に 3.6cc, 第2管以下第10管迄は 2 cc 宛分注し、第1管に被検薬液(10 γ/cc) 0.4 cc を加え、10倍に希釈しピペットにて攪拌、その 2 cc を第2管に移し以下第9管迄通減倍数希釈

を行ない、第10管は薬剤を含まない対照培地とした。次いで各管に ca. 0.5 mg/cc の菌液を駒込ピペットにて1滴宛接種(接種菌量培地 1 cc 当り ca. 0.01 mg) 37°C 孵卵器中にて培養した。

5. 遠心沈澱法による沈降管内置換培養法

普通培養法と同様に行なつて培養開始後、1週間に2回即ち3~4日毎に、3,000回転20分間の遠沈を行ない、ピペットで各管の上清を棄てた後、新らしく調製した同一希釈度に薬剤を含有する培地を該当管に 2 cc 宛注加する。即ち培地を置換する操作を繰返して培養をつづけた。

6. 遠沈を行なわない沈降管内置換培養法

5と同様の方法であるが培地置換に際して遠沈を行なわずに上清をとり棄て新らしい薬剤含有培地と置換する方法である。

7. SSC法(Siliconed Slide Culture Method)

シリコン被覆スライド(以下 SS) は東¹⁴⁾の方法を用いた。即ち縦に3切した清浄な上質のガラススライドを、“DC 200 Fluid”(350 Centistokes) のシリコンオイルの2%四塩化炭素溶液に瞬時浸した後室温にて風乾し、300°C 1時間熱処理したものである。内径約4分の硝子キャップ付小試験管を用いて、先述の普通培養法と同様に作成した薬剤希釈列に、ca. 0.01mg/cc の菌液に約5分間浸して結核菌を吸着させた SS を投入、培養を行なう。

8. SSC 法による置換培養法

SSC 法と同様に行なつて、培養を開始した後週2回即ち3~4日毎に新らしく調製した同様の薬剤希釈列に SS を入れ換える方法である。

9. 判 定 法

4週間培養後、肉眼的及び顕微鏡的に発育の有無を観察した。

(1) 肉眼的判定

沈降管内培養に於いては、管底に溜まつた菌塊の総量により発育状態の判定を行ない、発育なきものを(一)、最高度に発育せるものを(卅)、その間を発育量にしたがつて(+), (卅)に分けた。

SSC 法では、SS 上に肉眼的に集落を認めないものを(－)，集落数 10～100 を(+)，集落無数を(≡)，(+) 及び (≡) の中間を(≡)とした。

(2) 顕微鏡的判定

沈降管内培養に於いては沈渣の塗沫標本を、SSC 法では SS を、前者は加熱固定、後者は10%ホルマリン液固定を行ない、Ziehl-Neelsen 法で染色し、5×10の弱拡大で鏡検して菌発育の程度を判定した。即ち菌の発育を認めないものを(－)，主としてコンマ状～点状集落で分芽数 1～10の集落よりなっているものを(+)，主として唐草模様及びそれに近い良好な蛇状集落で分芽数 100 以上の集落よりなっているものを(≡)，(+) 及び (≡) の中間を(≡)とした。

実 験 成 績

表 1 に示した。即ち置換培養法では何れの方法によるも普通培養法に比して 1 管強い静菌力を示し、その判定成績は肉眼的に行なった場合も鏡検によつた場合も同じであつた。

又対照の薬剤を含まぬ培地での菌発育は、置換、非置換何れの方法にても殆んど同じであり、置換培養法の方が劣っている印象をうけなかつた。

唯沈降管内置換培養法に於いては、肉眼的に管底に沈渣を認めたものが染色すると結核菌で

はなく、培地中に混入した夾雑物（赤血球その他）であつた場合があり、菌発育量は必ずしも肉眼的な判定成績と一致しない事が経験された。

SSC 法では、静置換、置換の何れに於いても培養後10日程より SS 表面に白点状の微細な集落があらわれ、定量的な判定が容易であつた。唯東等の成績にもある如く、SS は培地中の塩類を吸着して次第に界面の疎水性を失ない、新らしく菌を吸着する能力が低下してゆくので置換培養法が長期間にわたると結核菌は SS に吸着されて発育するよりもむしろ培地内部に向つて発育する傾向があるが、もとの部分は脱落する事はないので判定に苦しむ事はなかつた。

何れの場合も、普通培養法では 2～3 週より菌膜形成をみた。

培養 4 週間後の鏡検所見では、何れの方法でもコード形成を認める。遠沈後置換培養法ではややその形が不整であるが、非遠沈ではこのような事はなかつた。就中 SSC 法ではコード形成有無の判定が極めて容易であつた。

猶鏡検に際して、発育阻止をうけている管では結核菌の非抗酸性化即ち Ziehl-Neelsen 法で青染されている場合があつた。この傾向は特に INH 含有濃度の高いものにみられた。

表 1 普通培養法と置換培養法の比較

培 養 法	判 定 方 法	培地中の INH 濃度 (γ/cc)										MIC (γ/cc)
		1.0	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.0156	0.0078	0.0039	対照	
普 通 培 養 法	肉 眼 鏡 検	—	—	—	—	—	—	≡	≡	≡	≡	0.0313
		—	—	—	—	—	—	≡	≡	≡	≡	0.0313
置 換 培 養 法 (遠 沈 後)	肉 眼 鏡 検	—	—	—	—	—	—	—	≡	≡	≡	0.0156
		—	—	—	—	—	—	—	≡	≡	≡	0.0156
置 換 培 養 法 (非 遠 沈)	肉 眼 鏡 検	—	—	—	—	—	—	—	≡	≡	≡	0.0156
		—	—	—	—	—	—	—	≡	≡	≡	0.0156
S S C 法	肉 眼 鏡 検	—	—	—	—	—	—	≡	≡	≡	≡	0.0313
		—	—	—	—	—	—	≡	≡	≡	≡	0.0313
置 換 培 養 法 (SSC 法による)	肉 眼 鏡 検	—	—	—	—	—	—	—	≡	≡	≡	0.0156
		—	—	—	—	—	—	—	≡	≡	≡	0.0156

総括及び考按

置換培養法の基本的実験として沈降管内培養法と SSC 法の 2 方法を比較検討した。

その結果沈降管内置換培養法にあつては遠沈後培地を置換しても、遠沈操作を省いて培地置換を行なつても、結核菌の発育量に殆んど影響なく、又 INH の発育阻止力は非置換に比べてどちらの方法でも 1 管強くあらわれるという同じ結果を得た。この事は、沈降管で結核菌を静置培養をすると、大部分の菌は管底に沈んで発育するので、操作の繁雑な遠沈操作を省略しても培地置換の成績に殆んど影響を与えない事を物語っている。

SSC 法による置換培養法は結核菌が吸着発育している SS を一定期間毎に新しい培地に置換してゆくのであるから、操作が最も簡単であつて、雑菌汚染の危険も少く、しかも結核菌は SS 上に典型的なコード形成をしながら発育する為顕微鏡的判定が容易確実であり、又培養 10 日頃より SS 上に微細な集落を形成するので判定期間を短縮出来、且つ肉眼的判定もかなり定量的に行なえる利点があり、その成績も他の置換培養法と全く同じである。従つて置換培養法による静菌作用の検索には、以上 3 方法の内この SSC 法による方法が最も適当な方法と思われる。

猶培地を置換する為、培養中の菌はその度に新しい培地環境に適応せねばならない。しかし薬剤を含まない対照培地に於ける菌発育は置換、非置換何れの場合も殆んど相違がないので、菌発育に対する薬剤以外の培地置換の影響は實際上無視しても差支えないと思われる。一方置換しない対照列の培地に於いては菌の新陳代謝産物の蓄積、培地 pH の変化、瓦斯特に酸素含有量及び栄養源の減少等の如く培地環境が変化するが、これ等の変化は殆んどすべて菌発育に伴う現象である。又故抗結核剤によつて菌発育が抑制されている培地の培地環境は、薬剤を除いては培養開始時と殆んどかわりはなく、従つて置換列に於ける新しい培地とも同様、薬剤を除いては有意の差がない筈である。著者

の目的とする置換培養法による抗結核剤静菌作用の比較検索にあつては、菌の未発育培地に於ける培地環境相違が問題となるのであつて、既に菌の発育を認めた培地に於ける培地環境の変化は殆んど判定成績に影響を与えないわけこの点は問題となるまいと思われる。

要約すると、置換列に於いても非置換列に於いても菌発育に影響する因子は、前述の如く種々存在するが、薬剤を除く他の因子は発育の有無の判定成績に対し無視して差支えないものと考えられる。

結 論

培地置換培養法に関する基本的実験を行ない、沈降管内培地置換培養法では遠心沈澱操作を省略し得る事、及びシリコン被覆スライド培養法を用いた培地置換培養法が培地置換培養法による静菌作用の検索には最も操作が簡易で適当な方法である事がわかつた。

又抗結核剤静菌作用を培地置換培養法により検索するに当つて、置換及非置換によつて生じる、薬剤以外の培地環境の差異は無視して差支えないものと考えられる。

(掲筆に当り、終始御指導及び御援助を賜つた当教室助手津久間俊次博士と実験に終始御協力を戴いた当教室東向一郎学兄とに深甚の謝意を表明します。)

文 献

- 1) 津久間他：胸疾，2：522，1958.
- 2) 伊藤篤：京結紀要，7：143，1958.
- 3) 山下：京結紀要掲載予定
- 4) 中西：京結紀要掲載予定
- 5) 志保田：京結紀要，1：135，1953.
- 6) 大田：ibid，3：149，1955.
- 7) 北川：ibid，5：49，1956.
- 8) 谷：ibid，5：83，1956.
- 9) 細木：ibid，6：37，1957.
- 10) 恒村：京結紀要掲載予定
- 11) 井本：京結紀要掲載予定
- 12) 内藤他：結核，31：103 (増刊号)，1956.
- 13) 内藤他：ibid，32：316 (増刊号)，1957.
- 14) 東：京結紀要掲載予定
- 15) Mudd：J. Exper. Med.，40：647，1924.
- 16) Lange：Dtsch. Med. Wschr.，35：435，1909.

- 17) 大岩：日本細菌学雑誌，6：455，1951.
- 18) 尾高：日微生物誌，28：785，1934.
- 19) 石川：シリコンとその応用，オーム社書店，1956.
- 20) 勝沼六郎：結進，1：51，1953.
- 21) Winder：Amer. Rev. Tuberc.，73：779，1956.
- 22) Mitchison：Lancet，263：858，1952.