

Silicone-Coated Slide への結核菌の附着に 影響する諸因子の検討補遺

京都大学結核研究所化学療法部（主任教授 内藤 益一）

内 藤 益 一・津久間 俊 次

池 田 宣 昭・久 世 文 幸

（昭39. 1.30日受付）

（本論文の要旨は昭和36年6月第23回日本結核病学会近畿地方会に於て発表した。）

第1章 緒 論

先きに当研究室の内藤、津久間、東等¹⁾が発表したシリコン被覆スライド培養法 (SSC) は、結核菌が油水界面に吸着される性質を応用した新しいスライド培養法で、スライド上の菌の定着が極めて良好なため、スライドからの菌の脱落という従来のスライド培養法にみられた現象が殆ど起らないという特徴をもっている。従ってスライド上に培養された結核菌は、肉眼的判定が可能なまで増殖してもスライドから脱落せず、固形培地での判定と同様、スライド上の集落の算定を肉眼的にも行いうるし、又、スライド上の結核菌及びその集落は、過大な発育、機械的な払拭、脂肪溶剤による洗滌等を加えない限り、普通の細菌学的操作では脱落しないので、結核研究の分野にいろいろと応用範囲の広いことが明らかとなり当研究室でも多くの新しい実験方法を生んだ。即ち、恒村の生体染色培養法²⁾、松島の迅速耐性検査法³⁾、井本の血液内結核菌培養法⁴⁾、神田の培地置換培養法⁵⁾、伊藤の殺菌力検査法⁶⁾、これらを利用した池田の薬剤間歇投与方式の試験管内研究⁷⁾、及び中井の薬剤交互投与方式の試験管内研究⁸⁾等がそれである。

さて、いずれの実験に於ても、もっとも基礎となるものは菌の接種である。SSCに於てはスライドへの菌附着（接種）にあたり次の3点に注意をはら必要がある。

(1) 単孤菌化。スライドに附着せる菌は出来

るだけ単孤菌に近いものでなければならない。

もし初めからスライドへ菌集塊が接種されれば、後の顕微鏡的判定に際して判定を誤る怖れがある。もっとも SSC にあっては肉眼的判定が可能であり、これのみによって判定する場合は単孤菌化はさして厳密を要しない。

(2) 菌附着の均等性。菌がスライド表面に平等に附着していないと集落の定量的判定に困難を生じたり、又判定を誤る可能性がある。

(3) 接種菌量の均一性。一連の実験を行うとき、いずれのスライドにもほぼ同数の結核菌を附着させる必要がある。

これ等の3点を満足させるためには、SSC に使用される菌液の各々について菌附着に関係ある諸因子を出来るだけ詳細に検討せねばならない。

すでに東^{9,10,11)}は結核菌を水に懸濁させた菌液について、菌液濃度、菌液へのスライド浸漬時間、菌液の温度、結核菌の生死、Subculture に使用された培地の種類、菌懸濁媒の pH、菌懸濁媒の成分等とスライドへの菌附着との関係について検討し、その成績を報告した。しかし、その後の経験で、東の成績の一部（菌液へのスライド浸漬時間と附着菌数）に疑問を生じ、又実際に SSC による実験を行うには、尚2、3の因子について追加検討する必要を認めた。更にこの方法で SSC に適した、よく分散した菌液を作るにはかなり熟練を要することから、後述する2種の菌液についても検討をすすめるこ

とになった。

辻, 山本¹²⁾は, 結核菌の分散媒として脂肪溶剤が極めて良好で, この中に分散させられた結核菌は殆ど単孤菌に近い状態になること, 石油エーテル, 石油ベンジン, ベンゾール, トリオール, エーテル, クロロホルム等の脂肪溶剤の中で結核菌に対する障害作用は石油ベンジンが最も弱いこと, 石油ベンジン菌液を用いると, mucin,¹²⁾ 血清¹²⁾, 卵白¹²⁾, 硅酸ゼリー¹³⁾等の特別な菌附着剤を用いなくても, 結核菌がスライドに附着しやすいことを証明し, スライド培養法に於ける石油ベンジン菌液の利用を提唱し, その優秀性は広く評価されている。

松島³⁾は, SSC による迅速耐性検査法に石油ベンジン菌液を使用し, SSC に於いても, 石油ベンジン菌液の有用なことを示唆した。

Tween-Albumin 培地培養菌液 (以下 T-A 菌液と略す) は, 一般に現在最もひろく用いられている菌液である。これは培養結核菌がすでに比較的細く分散しているために, 更めて菌を分散させる操作を特に必要としないこと, 生菌数が多いこと, 培養日数によって生菌数を大体予知し得ること等の利点があるためである。Fisher¹⁴⁾ や東¹⁵⁾ は Tween 80 が結核菌のシリコンスライドへの吸着を阻害することを証明し, Tween-Albumin 培地が SSC 用の培地としては不適当であることを明らかにした。しかし菌液としてなら使用出来るかも知れず, この点はなお検討の余地がある。

以上の点から, 著者等は, 石油ベンジン菌液及び T-A 菌液が SSC に利用出来るかどうか, 更にこの場合に於ける菌附着に關与する諸因子, 即ち菌液濃度と附着菌数, スライド浸漬時間と附着菌数, スライド浸漬回数と附着菌数, スライド浸漬中の菌液振盪が附着菌数に及ぼす影響, 同一菌液を反復使用した時のスライド浸漬枚数と附着菌数との関係等を検討し, 併せて, 既に東が報告した水性菌液についても補足, 再実験したのでここに報告する。

(SSC を応用した既発表論文の実験方法は多少とも本論文に記載した基礎実験の結果を利用している。本論文に記載した諸成績は, SSC

応用の基本となるべきものであるため, 実験を再三くりかえして成績を確めた。このため発表が非常におくれたことを附記しておく。)

第2章 実験材料と実験方法

Silicone-Coated Slide (SS) : SS とはスライドガラスに所定の処理を加えてその表面を Silicone の薄膜で被覆したもので, スライドガラスは普通のスライドガラスを縦に3切したもの (9×75mm) を使用した。即ち上記のスライドガラスをクロム硫酸中に24時間浸漬後, 流水中で数時間洗滌してから乾燥, 更に石油ベンジンで洗滌した後, 室温で乾燥させ, 次いでこれを粘度 350~500 centistokes の Dimethyl Silicone (Dow Corning 社製 'DC 200 Fluid') の2% (v/v) クロロホルム溶液に約1分間浸漬後, 室温で1及至2時間風乾し, 300°C 1時間熱処理を行なった。

菌及び菌液 : 本実験に使用した菌液は, 当研究室に継代保存してある H37Rv 株から作成したもので, 1%小川培地に培養約3週間目の集落と, Tween-Albumin 培地に培養約10日目の培養菌液を用いた。

(i) 石油ベンジン菌液作成方法

上述の, 1%小川培地に増殖した集落を白金耳にて釣取し, これを別に用意した約5ccの石油ベンジンを入れた滅菌試験管に移し, 石油ベンジン表面に近い試験管壁で白金耳によって菌塊を磨砕しつつ, 徐々に石油ベンジン中に分散させた。かかる方法で約1.0mg/ccの石油ベンジン菌液を作成し, これを更に所定の濃度迄石油ベンジンで希釈したものを実験に供した。

(ii) T-A 菌液作成方法

上述の, Tween-Albumin 培地で約10日間培養の培養菌液を, 同じく Tween-Albumin 培地で所定の濃度に希釈して実験に供した。

(iii) 蒸溜水菌液作成方法

上述の, 1%小川培地に増殖した集落を小川氏肉厚丸底ガラス玉入コルベンで約1分間振盪磨砕し, 蒸溜水で所定の濃度迄希釈して実験に供した。

以上の諸菌液の濃度判定には衛生検査指針記載¹⁵⁾の, 結核菌液 1.0mg/cc に相当する BaSO₄ 溶液を用いて肉眼的に比濁判定した。

SS 浸漬操作

上述の如くに作成した菌液は, いずれも小試験管に2cc宛分注し, 特に記載のないかぎり, 分注した菌液2ccはそれぞれSS1枚のみの使用に供し, 菌液の反復使用は避けた。

浸漬に際しては耳鼻科用ピンセットでSSの一端を挟み、他端を菌液中に浸漬し、特に記載のないかぎり約1～2秒にして引上げ、次の操作に移った。石油ベンジン菌液を用いた場合にのみ、SSを菌液から抜去した後、SS表面の石油ベンジンが蒸発するのを待って次の操作に移った。又石油ベンジンの結核菌障害作用に関する実験以外では、石油ベンジン菌液を用いた場合、SS浸漬操作は菌液作成後約20分以内に終了した。

判定方法

SS表面への附着菌数の判定は次の2つの方法で行った。

(i) SSを浸漬後、直ちに10%ホルマリン液に投入滅菌し、次いでZiehl-Neelsen氏法で染色を施し、強拡大で鏡検して附着菌単位数を算定した。(以下判定方法(i)とす)

(ii) SSを浸漬後、直ちに10%牛血清加キルヒナー培地に投入し約10日間培養後、10%ホルマリン液に投入滅菌し、Ziehl-Neelsen氏法で染色、弱拡大で鏡検して発育集落数を算定した。(以下判定方法(ii)とす)

石油ベンジン菌液に関する検討では主として判定方法(i)に、T-A菌液に関する検討及び蒸溜水菌液に関する検討では主として判定方法(ii)によった。なお鏡検算定に際しては、原則としてSSの断端及び菌附着部の上端を避け、中央部を任意の数視野算定した。

第3章 実験成績

第1節 石油ベンジン菌液に関する検討

実験1 菌液濃度と附着菌単位数

方法

第2章で記載した方法で1.0mg/cc、0.1mg/cc及び0.01mg/ccの石油ベンジン菌液を作成し、これにSSを各々5枚ずつ約1～2秒間浸漬し、判定方法(i)によってSS上の附着菌単位数を算定した。鏡検倍率は 7×40 又は 7×90 で行い、1スライドにつき3視野ずつ、5スライドで計15視野の附着菌単位数を求めた。尚表1には 7×40 倍に換算して示した。

成績

0.01mg/ccの菌液濃度では、結核菌はSS表面上に殆ど単弧菌として附着しているのがみられた。0.1mg/ccから1.0mg/ccへと菌液濃度が増加するに従い、結核菌はわづかながら集合する傾向がみられたが、多くは1菌単位中の菌数は4～5箇の範囲に止り、後述する、Tween-Albumin培地培養菌液や蒸溜水菌液を使用した時に比べて、単弧菌として附着しているものが圧倒的に多かった。又、SS表面への菌の附着状態は極めて均等に行われ、各スライド間の附着菌単位数の変動も、表1に示す様に極めて少く、各スライドについて3視野のみの合計をもって比較しても、その平均附着菌単位数との変動が、50%以上に達するものは殆ど見当らなかった。菌液濃度とSS上への附着菌単位数との間には大略比例関係が認められた。即ち菌液

表 1 菌液濃度と附着菌単位数

石油ベンジン菌液

菌液濃度 S S 番号	1.0mg/cc				0.1mg/cc				0.01mg/cc			
	附着菌単位数		計		附着菌単位数		計		附着菌単位数		計	
1	2448	2769	2188	7405	364	434	357	1155	63	78	67	208
2	2101	2050	2208	6359	237	235	211	683	92	101	114	307
3	2086	2387	2366	6839	281	287	292	860	98	114	125	337
4	1758	1489	1525	4772	222	211	236	669	26	48	34	108
5	1913	1688	1872	5473	386	361	358	1105	28	75	21	124
計	30848				4472				1084			
1 視野 平均	2057				298				72			
附着菌単位数比	28.6				4.1				1.0			

鏡検倍率 : 7×40

濃度が10倍になると附着菌単位数は約5倍になっている。又菌液濃度 1.0mg/cc で倍率 7×40 を用いると、附着菌単位数は1視野につき凡そ 2×10^3 箇である。勿論この数字は死菌単位数も含めた数であって、生菌単位数比については、別に考慮せねばならない。

実験2 SS 浸漬時間と附着菌単位数

方法

約 1.0mg/cc の石油ベンジン菌液を作成し、これを用いて SS 浸漬時間と附着菌単位数の関係を検討した。浸漬時間としては、1秒、2秒、5秒、10秒、30秒及び1分間を対象とし、それぞれ3 Slides ずつ検討した。附着菌単位数の算定には判定方法 (i) を用いた。

表2 浸漬時間と附着菌単位数
石油ベンジン菌液

浸 漬 時 間					
1 秒	2 秒	5 秒	10 秒	30秒	1 分
317	321	432	426	511	465

鏡検倍率： 7×90

成績

表2には、1 Slide につき3視野、5 Slides 計15視野から求めた1視野平均附着菌単位数を示した。本実験の範囲では、SS 浸漬時間と附着菌単位数との間に特別な関係はない。

実験3 SS 浸漬回数と附着菌単位数

方法

約 0.1mg/cc の石油ベンジン菌液を作成し、SS 浸漬回数と附着菌単位数との関係を検討した。SS 浸漬回数としては、1回、2回、5回及び10回を対象とし、それぞれ3 Slides ずつ検討した。附着菌単位数の算定には判定方法 (i) を用いた。尚1回の浸漬時間は1～2秒で、菌液からSSを抜去し、石油ベンジンの蒸発するのをまって次の浸漬操作に入った。

成績

表3には1 Slide 5視野ずつ、3 Slides、計15視野から算定した1視野平均附着菌単位数を示した。表に示す如く、SS 浸漬回数と附着菌単位数は凡そ比例することが明らかになった。

表3 SS 浸漬回数と附着菌単位数
石油ベンジン菌液

	浸 漬 回 数			
	1 回	2 回	5 回	10 回
附着菌単位数 (1視野平均)	148	313	671	1472
比	1.00	2.11	4.53	9.95

鏡検倍率： 7×40

実験4 SS 浸漬中の菌液振盪と附着菌単位数

方法

実験1、実験2及び実験3では、いずれも静置した菌液にSS 浸漬を行なったが、本実験では、SS 浸漬操作中に菌液を振盪した場合、SS 上への附着菌単位数は如何なる影響を受けるかを検討するために、次の比較実験を行った。即ち、菌液にSSを投入後、静かに3分間そのまま静置した場合と、SS 投入後3分間間断なく菌液を入れた小試験管を手で振盪した時との附着菌単位数の差を観察したものである。附着菌単位数算定には、第2章に記載した判定方法 (ii) を用いた。なお菌液濃度は 0.1mg/cc を用いた。

表4 SS 浸漬中の菌液振盪と附着菌単位数

SS 番号	静 置 浸 漬	振 盪 浸 漬
1	95	158
2	204	186
3	231	281
計	530	625

鏡検倍率： 7×10

成績

表4には、静置浸漬と振盪浸漬とを各々3 Slides ずつ行い、各 Slide につき5視野を 7×10 で鏡検算定した発育集落数を載げた。振盪浸漬を行った Slide では Slide の断端的5mm の中の部分には、静置浸漬したスライドに比べると明らかにより多くの集落数発育が認められた。しかし Slide 中央部の発育集落数は、静置浸漬と振盪浸漬の間に有意の差を認めなかつ

た。

実験5 同一菌液反復使用時の SS 浸漬枚数と附着菌単位数

方 法

小試験管に 5cc 注入した約 1.0mg/cc の石油ベンジン菌液に 137枚の SS を連続的に約 1 秒間づつ浸漬し、1 枚目、18枚目、35枚目、103枚目、120枚目及び137枚目の SS についてその附着菌単位数を算定した。判定方法 (i) を用い、1Slide につき 5 視野づつ算定し表 5 には、1 視野平均附着菌単位数を載げた。

表 5 同一菌液反復使用時の SS 浸漬枚数と附着菌単位数 石油ベンジン菌液

ス ラ イ ド 枚 数					
1 枚目	18枚目	35枚目	103枚目	120枚目	137枚目
258	278	384	287	274	229

鏡検倍率：7×90

成 績

表 5 に示す如く、いずれの SS も同程度の附着菌単位数を有し、本実験の範囲内では附着菌単位数の減少は認められなかった。即ちもし、石油ベンジン自体の結核菌障害作用による生菌単位数の経時的減少がないとすれば、菌液濃度 1.0mg/cc で、菌液量 5cc の石油ベンジン菌液は、少なくとも130枚程度の SS 連続浸漬が可能であることが明らかになった。

実験6 石油ベンジン菌液中の生菌単位数比について

方 法

第2章に記載した様に、1%小川培地に培養約3週目の集落で、約 0.5mg/cc の石油ベンジン菌液を作成し、これに20枚の SS を約 1 秒間浸漬し、その内10枚は直ちにカルボール・フクシンで染色し、7×90倍で10視野の附着菌単位数の合計をそれぞれの Slide について求めた。又他の10枚は菌液へ浸漬後直ちに10%牛血清加キルヒナー培地に投入し、約10日間培養後、染色し7×10倍で10視野の発育集落数の合計をそれぞれの Slide について求めた。

表 6 石油ベンジン菌液中の生菌単位数比

SS 番号	附着菌単位数	発育集落数
1	58887	2239
2	46980	1788
3	46575	1868
4	44631	1351
5	52164	1676
6	57915	1165
7	61065	1003
8	57105	7419
9	53460	569
10	41472	615
計	521154	13015
比	40.0	1.0

鏡検倍率：7×10

成 績

表 6 には同一倍率 7×10 に換算した附着菌単位数と発育集落数が示してある。両者の比は約 40 であり、かなり死菌の多いことが注目された。

実験7 石油ベンジンの結核菌障害作用 (i) 方 法

石油ベンジン自体の結核菌障害作用の凡その程度をみるために、石油ベンジン菌液作成後、それぞれ 5 分、10 分、15 分、20 分、30 分、60 分及び24時間経過した菌液に SS を浸漬し、直ちに10%牛血清加キルヒナー培地に投入し、約 2 週間培養後、SS 上の菌発育の状態を肉眼的に観察した。なお菌液は約 1.0mg/cc のものを使用した。

成 績

表 7 に示す如く、第 1 回目の実験では、石油ベンジン菌液作成後60分にしてかなり生菌数の減少が認められる。又実験 1 でも実験 2 でも一昼夜放置した菌液を使用したものでは著明な発育集落数の減少が認められ、これらの成績からすれば、石油ベンジン菌液を用いた時の SS 浸漬操作は、石油ベンジン菌液作成後30分以内

表 7 石油ベンジンの結核菌障害作用 (i)

	菌液作成後の経過時間						
	5分	10分	15分	20分	30分	60分	24時間
実験1	卅	卅	卅	卅	卅	+	+
実験2	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+

菌液濃度：1.0mg/cc

判定基準： { 卅：スライド全面に菌発育が認められ集落間隙透見不能
 十：集落は各箇に区別出来るが100以上で、肉眼的に集落数算定殆ど不能のもの

に終了するのが無難と思われる。

実験8 石油ベンジンの結核菌障害作用 (ii)

方法

前実験に引続いて、石油ベンジンの結核菌障害作用をより詳細に検討する目的で、約1.0mg/ccの石油ベンジン菌液作成後、それぞれ5分、10分、20分、25分、30分、45分、1時間、1時間30分、2時間、2時間30分及び3時間放置した菌液にSSを3枚ずつ浸漬し、直ちに10%牛血清加キルヒナー培地に投入、約2週間培養後SSを10%ホルマリン液に投入固定、更に染色後、SS上の菌発育状態を顕微鏡的に観察した。なお石油ベンジン菌液作成には、1%小川培地に約1ヶ月間培養の集落を用いた。

成績

各スライド別の5視野(5×40)の集落数の計及び肉眼的な判定を同時に表8に示した。肉眼的な判定では、いずれのSSも(卅)の発育を示し全く差異がなかったが、顕微鏡的に算定した

集落数で比較すると、菌液作成後1時間以上放置すると、放置時間が1時間以内のものに比べて、少しく集落数が減少している。従ってこの実験でも、石油ベンジン菌液を用いた時のSS浸漬操作は、石油ベンジン菌液作成後30分以内に終るのが良いことが明らかになった。

第2節 Tween-Albumin 培地培養

菌液に関する検討

実験1 菌液濃度と発育集落数

方法

第2章で記載した方法で、1.0mg/cc, 0.1mg/cc, 0.01mg/cc, 0.001mg/cc 及び 0.0001mg/cc の5種類の濃度のT-A菌液を作成し、これにSS各3枚ずつ約1～2秒間浸漬し、判定方法(ii)によってSS上に発育した集落数を算定した。鏡検倍率は7×10を用い、1スライドにつき5視野ずつ、3スライドで計15視野の発育集落数を求めた。

成績

表9に示す如く菌液濃度とSS上の発育集落数との間には大略比例関係が認められた。即ち菌液濃度が10倍になると発育集落数も約10倍になっている。しかし0.001mg/cc以下の濃度の菌液では発育集落数が少くこの関係は明らかではなかった。尚1mg/ccの菌液を使用すると1視野(7×10)につき、約300の発育集落数を得ることが出来る。

又、スライド表面の発育集落数の分散は均等で、特に0.01mg/cc以上の濃度の菌液を使用

表 8 石油ベンジンの結核菌障害作用 (ii)

スライド番号	菌液作成後の経過時間											
	5分	10分	15分	20分	25分	30分	45分	1時間	1時間30分	2時間	2時間30分	3時間
1	670 (卅)	613 (卅)	644 (卅)	643 (卅)	573 (卅)	551 (卅)	597 (卅)	602 (卅)	446 (卅)	408 (卅)	382 (卅)	327 (卅)
2	539 (卅)	637 (卅)	659 (卅)	654 (卅)	648 (卅)	616 (卅)	574 (卅)	555 (卅)	432 (卅)	393 (卅)	361 (卅)	338 (卅)
3	626 (卅)	480 (卅)	681 (卅)	640 (卅)	591 (卅)	602 (卅)	614 (卅)	495 (卅)	339 (卅)	408 (卅)	411 (卅)	428 (卅)
計	1835	1730	1984	1937	1812	1769	1785	1652	1217	1209	1154	1093

菌液濃度：1.0mg/cc

() 内は肉眼的判定

表 9 菌液濃度と発育集落数

T-A 菌液

菌液濃度	1.0mg/cc						0.1mg/cc						0.01mg/cc						0.001mg/cc						0.0001mg/cc											
SS番号	発 育 集 落 数						計						発育集落数						計						発育集落集						計					
1	320	364	352	388	368	1792	26	56	54	52	47	235	5	6	1	7	6	25	1	1	1	2	0	5	0	0	1	0	1	2						
2	204	244	272	248	280	1248	48	61	63	30	41	243	10	5	10	2	7	34	0	1	2	0	2	5	0	0	0	1	1	2						
3	284	432	332	312	276	1636	40	62	48	42	39	231	7	4	6	8	12	37	4	3	3	0	1	11	0	0	0	1	0	1						
計	4676						709						96						21						5											
1 視野平均	311.7						47.3						6.4						1.4																	
発育集落数比	222.7						33.3						4.6						1.0																	

鏡検倍率：7×10

表 10 浸漬時間と発育集落数

T-A 菌液

浸 漬 時 間									
1 秒	5 秒	10 秒	30 秒	1 分	5 分	10 分	30 分	1 時間	24 時間
689	747	523	525	628	637	742	981	2040	8688

鏡検倍率：7×10

した場合はその分散は極めて良好であった。

T-A 菌液中の菌の分散状態も、SS 浸漬後直ちに染色して凡その観察を同時に行ったが、分散状態は極めて良好なものであった。しかしながら石油ベンジン菌液と比較すると、1 菌単位中の菌数はかなり多く、単孤菌として存在するものはかなり少い。多くは4～5 箇の菌が1 菌単位をなしており、1 菌単位中の菌数が10 箇前後のものも稀に見られる。しかし単孤菌は少くても、1 菌単位中の菌数はほぼ一定しており、SS 表面に発育した集落の大きさも均等であり、各スライド上の菌発育は極めて平等にみられた。

実験 2 SS 浸漬時間と発育集落数

方 法

約 0.1mg/cc の T-A 菌液を作成し、これを用いて SS 浸漬時間と発育集落数との関係を検討した。浸漬時間としては1 秒、5 秒、10 秒、1 分、5 分、10 分、1 時間及び24 時間を対象とし、それぞれ 3 Slides ずつ検討した。附着菌単位数の算定には判定方法 (ii) を用いた。

成 績

表10には、1 Slide につき5 視野、3 Slides 計15視野から求めた合計発育集落数を示した。この成績では、浸漬時間30分以内では発育集落数は殆ど増加しないが、浸漬時間が一時間以上になると発育集落数は著明に増加している。

実験 3 SS 浸漬回数と発育集落数

方 法

約 0.1mg/cc の T-A 菌液を作成し、SS浸漬回数と発育集落数との関係を検討した。SS 浸漬回数としては、1 回、2 回、3 回、5 回及び10 回を対象とし、それぞれ 3 Slides ずつ検討した。判定方法は (ii) を用いた。尚 1 回の浸漬時間は1～2 秒で、菌液から SS を抜去後、直ちに次の浸漬操作に入った。

表11 SS 浸漬回数と発育集落数

T-A 菌液

	浸 漬 回 数				
	1 回	2 回	3 回	5 回	10 回
発 育 集 落 数 (15視野計)	524	592	458	578	530
比	1.00	1.17	0.87	1.10	1.01

鏡検倍率：7×10

成 績

表11には 1 Slide 5 視野ずつ 3 Slides 計15 視野の発育集落数の合計を示した。本実験の範囲では浸漬回数を増加しても発育集落数には殆ど影響しないことが明らかになった。

実験4 SS 浸漬中の菌液振盪と発育集落数
方 法

実験1, 実験2 及び実験3 では, いずれも静置した菌液に SS 浸漬を行なったが, 本実験では, SS 浸漬操作中に菌液を振盪した場合, SS 上の発育集落数は如何なる影響をうけるかを検討するために次の比較実験を行った。即ち, 約 0.1mg/cc の T-A 菌液を用い, 菌液に SS を投入後, 静かに 3 分間そのまま浸漬した場合と, SS 投入後 3 分間間断なく菌液を入れた小試験管を手で振盪した時との発育集落数の差を観察したのである。判定方法は(ii)を用いた。

表12 SS 浸漬中の菌液振盪と発育集落数
T-A 菌液

SS 番 号	静 置 浸 漬	振 盪 浸 漬
1	168	217
2	172	255
3	122	223
計	462	695

鏡検倍率: 7×10

成 績

表12には, 静置浸漬と振盪浸漬とを各々 3 Slides ずつ行い, 各スライドにつき 5 視野を 7×10 で算定した発育集落数を載げた。浸盪浸漬を行ったスライドではその断端的 5mm の巾の部分に極めて多数の集落が発育しているのを認めた。静止した菌液に浸漬した Slide の

発育集落数に比べてこの部分の発育集落数は明らかに多かったが, この原因は不明である。スライド中央の発育集落数は表12の如く, 振盪浸漬を行ったスライドに発育集落数がごく僅か多く認められたにすぎなかった。

実験5 同一菌液反復使用時の SS 浸漬枚数
と発育集落数

方 法

小試験管に 2cc 入れた約 0.1mg/cc の T-A 菌液に30枚の SS を連続的に約 1~2 秒間ずつ浸漬し, 1 枚目, 5 枚目, 10枚目, 15枚目, 20枚目, 25枚目及び30枚目のSS について発育集落数を算定した。なお同一実験を 3 回行なってある。発育集落数の判定は判定方法 (ii) によった。

成 績

表13には, 各スライドにつき 5 視野ずつの発育集落集を示したが, いずれの成績も, SS 連続浸漬30枚迄は発育集落数に有意の差は認められなかった。即ち菌液濃度 0.1mg/cc で菌液量 2cc の T-A の菌液には, 少くとも30枚の SS 連続浸漬が可能であることが明らかになった。

実験6 Tween-Albumin 培地培養菌液中の
生菌単位数比について

方 法

Tween-Albumin 培地で約10日間培養した培養菌液を用い, 生理的食塩水で稀釈して約 0.5 mg/cc の菌液を作成し, これに20枚の SS を約 1 秒間浸漬し, その内10枚は直ちにカルボール・フクシンで染色し, 7×90 倍で10視野の附着菌単位数の合計をそれぞれのスライドについて求めた。又他の10枚は菌液へ浸漬後直ちに10%牛血清加キルヒナー培地に投入し, 約10日間培養後染色し 7×10 倍で10視野の発育集落数の合計をそれぞれのスライドについて求めた。

表 13 同一菌液反復使用時の SS 浸漬枚数と発育集落数

T-A 菌液

実 験	1 枚 目	5 枚 目	10 枚 目	15 枚 目	20 枚 目	25 枚 目	30 枚 目
1	151	179	152	113	143	156	101
2	53	59	47	66	95	67	79
3	78	52	61	54	50	52	56

鏡検倍率: 7×10

表14 T-A 菌液中の生菌単位数比

SS 番号	附着菌単位数	発育集落数
1	3807	678
2	2106	816
3	1296	774
4	648	736
5	1215	898
6	567	852
7	1863	1060
8	3240	570
9	891	860
10	1296	952
計	1692	8196
比	2.1	1.0

鏡検倍率：7×10

成績

表14には同一倍率7×10に換算した附着菌単位数と発育集落数が示してある。両者の比は約2であり、死菌は極めて少い。

実験7 菌培養日数と発育集落数との関係

方法

種々の培養日数の T-A 菌液を用いて、菌培養日数（即ち菌令）と発育集落数との関係を検討した。即ち Tween-Albumin 培地で培養3日目、5日目、10日目、15日目及び20日目の菌液を使用し、これを同じ Tween-Albumin 培地で希釈、0.5mg/cc の濃度に統一し、各々に SS を5枚ずつ約1～2秒間浸漬し、直ちに10%牛血清加キルヒナー培地に投入、約10日間培養後、各スライドにつき5視野の発育集落数を7×10倍で顕微鏡下に算定し、合計集落数を比較検討した。

成績

表15に示す如く、培養日数の増加するに従って発育集落数はかなりの変動を示すことが明らかになった。即ち培養日数10日以内のものに比べて培養日数10日乃至15日のものでは明らかに発育集落数は多く、又培養日数がそれより長く

表15 菌培養日数と発育集落数

T-A 菌液

菌液作成に用いた菌の培養日数				
3 日	5 日	10 日	15 日	20 日
1096	780	2616	1824	1300

鏡検倍率：7×10

なると発育集落数は再び減少しているのが認められた。

実験8 Tween 80 の SS 上への結核菌附着に及ぼす影響について

方法

約1ヶ月グリセリンブイヨンで培養した H37 Rv の菌膜を用い、小川氏丸底ガラス玉入コルベンにてこれを振盪磨碎し、キルヒナー原液にて約 1.5mg/cc の菌液を作成する。これを 3.6 cc ずつ8本の小型試験管に分注する。別にキルヒナー原液を用いて、希釈度40倍、80倍、160倍、320倍、1280倍、5120倍、及び10240倍の Tween 80 溶液を作成、これらをそれぞれ 0.4cc ずつ既に菌液を分注した7本の小試験管に注入した。残る1本にはキルヒナー原液を 0.4cc 注入し、これを Tween 80 を含まない対照菌液とした。即ち Tween 80 を 0.25%、0.125%、0.0625%、0.0313%、0.0078%、0.0019% 及び 0.0009% の濃度で含む菌液を作成した訳である。これら8種類の菌液に、SS を5枚ずつ約1～2秒間浸漬し、直ちに10%牛血清加キルヒナー培地に投入し、10日間培養後、SS 上に発育した集落数を各スライドにつき5視野ずつ7×10倍で顕微鏡下に算定し、5 Slides 計15視野の合計を求めた。なお集落の性質として Cord 形成の程度も比較観察した。

成績

Tween 80 濃度と発育集落数との関係をみると表16に示す如く、Tween 80 の希釈度3200倍以下（0.03%以上）では、SS 上の発育集落の分布も比較的不均等で又集落数も少い。Cord 形成も著明で集落相互間の Cord による連絡がかなり頻繁にみられた。これに反して Tween 80 の希釈度3200倍以上（約0.03%以下）では、

表 16 菌液中 Tween 80 の濃度と発育集落数

	Tween 80 濃 度 % (v/v)							
	0.25	0.125	0.062	0.0313	0.0078	0.0019	0.0009	0
発 育 集 落 数	605	1075	999	1274	1710	1334	1503	1422
Cord 形 成	卅	卅	卅	卄	卄	卄	卄	卄

鏡検倍率：7×10

Cord 形成 卅：著明

卄：中等度

表 17 菌液濃度と発育集落数

蒸溜水菌液

菌液濃度	1.0 mg/cc						0.1 mg/cc						0.01 mg/cc						0.001 mg/cc						0.0001 mg/cc					
SS 番号	発 育 集 落 数						計						発 育 集 落 数						計						発 育 集 落 数					
1	296	284	312	228	200	1320	16	18	17	19	16	86	3	4	3	5	1	16	1	0	0	2	0	3	0	0	1	0	1	2
2	136	132	124	156	92	640	32	30	21	16	13	112	2	1	4	0	3	10	2	3	1	1	8	8	0	0	0	1	0	1
3	96	84	76	92	80	428	23	21	22	14	20	100	2	4	2	1	2	11	1	0	3	1	0	5	0	0	0	0	0	0
計	2388						298						37						16						3					
1 視野平均	159.2						19.9						2.5						1.1											
発育集落数比	145.01						8.1						2.3						1.0											

鏡検倍率：7×10

集落数も比較的多く、又かなり均等に発育しているのが認められ、Cord 形成も程度が軽かった。

第3節 蒸溜水菌液に関する検討

実験1 菌液濃度と発育集落数

方 法

第2章に記載した方法で、1.0mg/cc、0.1mg/cc、0.01mg/cc、0.001mg/cc 及び 0.0001mg/cc の5種類の濃度の蒸溜水菌液を作成し、これにSSを各3枚ずつ約1～2秒間浸漬し、判定方法(ii)によってSS上に発育した集落数を算定した。鏡検倍率は7×10を用い、1slideにつき5視野ずつ、3slidesで計15視野の発育集落数を求めた。

成 績

表17に示す如く、菌液濃度とSS上の発育集落数との間には大略比例関係が認められた。即ち菌液濃度が10倍になると発育集落数も約10倍になっている。しかし0.001mg/cc以下

の濃度の菌液では発育集落数が少く、この関係は明らかではなかった。尚1.0mg/ccの菌液を使用すると、1視野(7×10)につき約160の発育集落数を得ることが出来る。スライド表面の集落の均等性については、石油ベンジン又はT-A菌液を用いた場合に比較するとかなり不良で、過大に発育した集落や極く小さい集落も散見される。しかしスライド表面への集落の分散はかなり均等であった。蒸溜水菌液中の菌の分散状態も、SS浸漬後直ちに染色して凡その観察を行ったが、この所見も上の成績を裏付けるものであった。即ち1菌単位中の菌数はかなり多く、多くは10箇前後の菌が集合し、時に30～50箇の菌が1菌単位を作っている所見がみられた。

実験2 SS浸漬時間と発育集落数

方 法

約0.1mg/ccの蒸溜水菌液を用い、SS浸漬時間と発育集落数との関係を検討した。浸漬時

表 18 SS 浸漬時間と発育集落数

蒸溜水菌液

浸 漬 時 間									
1 秒	5 秒	10 秒	30 秒	1 分	5 分	10 分	30 分	1 時間	24 時間
133	159	238	365	456	512	731	749	1832	1692

鏡検倍率：7×10

間としては1秒，5秒，10秒，30秒，1分，5分，10分，1時間及び24時間を対象とし，各々につき3 Slides ずつ検討した。算定方法には判定方法(ii)を用いた。

成 績

表18には，1 Slide につき5視野，3 Slides 計15視野から求めた合計発育集落数を示した。この成績では，浸漬時間の延長するに従い発育集落数は次第に増加する傾向を示している。浸漬時間1秒のものに比べて，浸漬時間1分ですでに有意の増加がみられる。浸漬時間1時間では，浸漬時間1秒の10倍以上の発育集落数を認めた。しかし浸漬時間24時間のものは浸漬時間1時間のものに比べて発育集落数はやや少なくなっており，発育集落も浸漬時間1時間のものに比べてかなり小さかった。この原因としては，菌液放置による菌増殖能の低下が考えられる。

実験3 SS 浸漬回数と発育集落数

方 法

約0.1mg/ccの蒸溜水菌液を作成し，SS 浸漬回数と発育集落数との関係を検討した。SS 浸漬回数としては，1回，2回，3回，5回及び10回を対象とし，それぞれ3 Slides ずつ検討した。判定方法は(ii)を用いた。なお1回の浸漬時間は1～2秒で，菌液からSSを抜去後直ちに次の浸漬操作に入った。

成 績

表19には1 Slide 5視野ずつ，3 Slides 計

表 19 SS 浸漬回数と発育集落数

蒸溜水菌液

	浸 漬 回 数				
	1回	2回	3回	5回	10回
発 育 集 落 数 (15視野計)	134	266	425	432	500
比	1.00	1.99	3.17	3.23	3.73

鏡検倍率：7×10

15視野の発育集落数の合計を示した。この成績によれば，浸漬回数3回迄は，発育集落数は浸漬回数にほぼ比例して増加しているが，5回以上の浸漬ではその関係は明らかではなかった。しかし浸漬回数が増加するに従い発育集落数が増加する傾向は，浸漬回数5回以上でも見られる様である。

実験4 SS 浸漬中の菌液振盪と発育集落数 方 法

実験1，実験2及び実験3では，いずれも静置した菌液にSS 浸漬を行ったが，本実験では，SS 浸漬操作中に菌液を振盪した場合，SS上の発育集落数は如何なる影響を受けるかを検討するために次の比較を行った。即ち約0.1mg/ccの蒸溜水菌液を用い，菌液にSSを投入後，静かに3分間そのまま浸漬した場合と，SS投入後3分間間断なく菌液を入れた小試験管を手で振盪した時との発育集落数の差を観察したのである。

表20 SS 浸漬中の菌液振盪と発育集落数

蒸溜水菌液

SS 番 号	静 置 浸 漬	振 盪 浸 漬
1	312	213
2	24	161
計	55	374

鏡検倍率：7×10

成 績 表20には，1 Slide につき3視野の発育集落数の合計を示したが，菌液を振盪しつつ Slide を浸漬した方が発育集落数は明らかに多い。又振盪浸漬を行ったSSでも発育集落の分布に関しては特に不均等な箇所は認められなかった。

表 21 同一菌液反復使用時の SS 浸漬枚数と発育集落数

蒸溜水菌液

実 験	1 枚 目	5 枚 目	10 枚 目	15 枚 目	20 枚 目	25 枚 目	30 枚 目
1	105	55	67	37	53	53	93
2	102	54	69	67	88	54	105
3	49	41	87	38	39	77	63

鏡検倍率：7×10

実験 5 同一菌液反復使用時の SS 浸漬枚数と発育集落数

方 法

小試験管に 2cc 分注した 約 0.1mg/cc の蒸溜水菌液に30枚の SS を連続的に約 1 秒間づつ浸漬し、1 枚目、5 枚目、10枚目、15枚目、20 枚目、25枚目及び30枚目の SS について判定方法(ii)を用いて発育集落数を算定した。尚同一実験を 3 回行った。

成 績

表21には、各スライドにつき 5 視野づつの発育集落数を示したが、3 回の実験共、30枚目の SS 上の発育集落数は 1 枚目の SS 上の発育集落数と大差なく、菌液濃度 0.1mg/cc で菌液量 2cc の蒸溜水菌液には、少くとも30枚の SS の連続浸漬が可能であることが明らかになった。

実験 6 蒸溜水菌液中の生菌単位数比について

方 法

1%小川培地に培養約 3 週目の集落を用いて 約 0.5mg/cc の蒸溜水菌液を作成し、これに 20枚の SS を約 1 秒間浸漬し、その内10枚は直ちにカルボール・フクシンで染色し、7×90倍で10視野の附着菌単位数の合計をそれぞれの Slide について求めた。又他の10枚は菌液へ浸漬後直ちに10%牛血清加キルヒナー培地に投入し、約10日間培養後染色、7×10倍で10視野の発育集落数の合計をそれぞれのスライドについて求めた。

成 績

表22には同一倍率 7×10に換算した附着菌単位数と発育集落数が示してある。両者の比は約 7であった。

表 22 蒸溜水菌液中の生菌単位数比

SS 番 号	附着菌単位数	発 育 集 落 数
1	1620	271
2	1215	138
3	2268	348
4	1458	313
5	1458	160
6	1944	370
7	1539	213
8	1215	185
9	2187	176
10	1296	198
計	16200	2372
比	6.8	1.0

鏡検倍率：7×10

第 4 章 総括及び考按

一般の細菌学的検査でも菌の培養にはその接種条件が非常に重要な因子となっているが、SSC に於ても菌の接種、即ち SS への菌附着の問題は極めて重要である。そこで著者等は、SSC 用の菌液として、集落をガラス玉で磨砕、水又は食塩水に懸濁させる普通の水性菌液、Tween-Albumin 培地による深部均等培養液、及び石油ベンジン菌液の 3 種を取り上げ、これらの菌液を使用する場合、種々の因子が菌附着にどのような影響を与えるかを詳細に検討した。

得られた結果を総括すると次の様になる。

- 1) 附着菌からみた菌液中の菌の分散、SS 上の菌の分散状態、各スライドへの菌附着の平等性等について

附着菌からみた菌液中の菌の分散状態については、SS を菌液へ投入後、直ちに染色、鏡検することによって凡その観察が可能である。著者等が検討した3種の菌液の中で、石油ベンジン菌液に於て、菌液中の菌の分散状態が最も良好で殆ど単孤菌として浮游していること、従って SS 上の菌の分散状態が他の2種類の菌液を使用した時に比べて最も良好で、各スライドへの菌附着の平等性も極めて信頼し得るものであることが明かとなった。T-A 菌液中の菌分散状態もかなり良好なものであったが、SS 上へ附着した状態から推定するに単孤菌となって浮游している菌はかなり少ないものと思われ、多くは4~5箇、稀に10箇前後の菌が1菌単位となって SS に附着しているのがみられた。又蒸溜水菌液では1菌単位中の菌数は更に増加し、多くは10箇前後の菌が集合し、時に30~50箇の菌が1菌単位をなしてスライドに附着しているのがみられた。各スライド間の菌附着の平等性についても凡その良否は、菌液中の菌の分散状態の良否に平行する様であり、石油ベンジン菌液が最も良好で、次で T-A 菌液が載げられ、蒸溜水菌液が最も劣る様である。

2) 菌液濃度と附着菌単位数

菌液濃度と附着菌単位数との関係については、以上3種の菌液のいずれをとっても、菌液濃度の増加するに従い附着菌単位数もこれに応じて増加している。石油ベンジン菌液に於ては、菌液濃度が10倍になると附着菌単位数は約5倍に増加し、蒸溜水菌液及び T-A 菌液では、菌液濃度が10倍になると附着菌単位数もやはり凡そ10倍に増加するのが認められた。しかしこの関係は低濃度の菌液については明らかなではなかった。又石油ベンジン菌液と、蒸溜水菌液及び T-A 菌液との間に、その附着菌単位数増加の態度に少しく差があることについてはその原因は明確ではない。

3) SS 浸漬時間と附着菌単位数

SS 浸漬時間と附着菌単位数に関しては、T-A 菌液と蒸溜水菌液とを用いた場合に明らかな正相関が認められ、浸漬時間1~2秒のものに比べて前者に於ては浸漬時間1時間で、後者で

は1分間で附着菌数は有意の増加を示している。石油ベンジン菌液では、菌液を長時間放置すると石油ベンジン自体の結核菌障害作用によって生菌数の著明な減少を来すので、實際上長時間浸漬は不可能であり、浸漬時間は1分以内に止めたが、この範囲内では浸漬時間と附着菌単位数との相関関係はなかった。

4) SS 浸漬回数と附着菌単位数

T-A 菌液を用いた場合は、浸漬回数の如何にかかわらず附着菌単位数に有意の差はない如くであるが、石油ベンジン菌液を用いた場合は、附着菌単位数は浸漬回数に凡そ比例して増加している。蒸溜水菌液を用いた場合は、石油ベンジン菌液に於ける程明らかな関係は認められないが、浸漬回数1回のものに比べて2回以上のものが明らかに附着菌単位数は多く、浸漬回数と附着菌単位数との間に正相関が成り立つと思われる。

5) SS 浸漬中の菌液振盪と附着菌単位数

菌液振盪により附着菌単位数が最も大きく影響を受けるのは蒸溜水菌液であり、菌液を振盪することにより明らかに多くの附着菌単位数を得ることが出来た。T-A 菌液も菌液振盪により附着菌単位数をわずかに増加せしめることが出来たが、石油ベンジン菌液を用いた場合は、その影響は殆ど除外し得る程度のものであった。

6) 同一菌液の反復使用

同一菌液の反復使用に関する検討では、いずれの菌液でもかなりの SS を反復浸漬し得ることが明らかになった。しかし石油ベンジン菌液に於ては、生菌数のかなり速やかな経時的減少が認められるので、むしろ、石油ベンジン作成から SS 浸漬操作終了迄の時間を出来るだけ短縮することに努めるべきであろう。

T-A 菌液及び蒸溜水菌液では實際上実験の都度かなり多量の菌液を作成し得るので、著者等は同一菌液を反復使用する場合、SS 浸漬枚数は20~30枚程度に止めている。この程度の反復使用は充分可能であることが明らかになっている。

7) 諸種菌液中の生菌単位数

諸種菌液中に含まれる生菌単位数の検討については、実験条件を厳密な意味で同一にすることは不可能であり、又著者等の実験回数も充分とは云えず、厳密な比較は至難であるが、石油ベンジン菌液に最も死菌が多いこと、T-A菌液に最も死菌が少ないことは疑問がなさそうである。

ここで著者等が検討した3種の菌液について、SS表面に附着する生菌単位数についての凡その比較を述べておきたい。

石油ベンジン菌液についての附着菌単位数の検討は判定方法(i)、即ちSSを菌液へ浸漬後直ちに染色、算定を行ったので、生菌のみでなく勿論死菌も含まれている訳である。諸種の実験に際しては、附着している菌単位のうちで実際に集落を作成し得る生菌単位数が重要であるので、著者等は可及的に実験操作を同一にした上で、別に石油ベンジン菌液中の生菌単位数比の検討を行った。この成績によると、石油ベンジン菌液中の生菌単位数比は凡そ1/40であった。そこで表1から石油ベンジン菌液を用いた場合のSS上への附着生菌単位数を概算すると、1視野(倍率 7×10 に換算)につき菌液濃度1.0mg/ccでは約800、0.1mg/ccでは約120、又0.01mg/ccでは約30になる。

T-A菌液及び蒸溜水菌液については、附着菌単位数の算定に際して判定方法(ii)、即ちSSを浸漬後一定期間培養後、SS表面に發育した集落数を対象としているので、そのまま生菌単位数として上記の石油ベンジン菌液での成績と比較し得る訳である。即ち、T-A菌液では、1視野(7×10)につき菌液濃度1.0mg/ccで約300、0.1mg/ccで約50、0.01mg/ccでは約6の生菌単位が附着し、蒸溜水菌液では1視野(7×10)につき菌液濃度1.0mg/ccで約160、0.1mg/ccで約20、0.01mg/ccでは約3の生菌単位が附着することになる。

以上要するに、石油ベンジン菌液では死菌の多い反面菌附着の効率が3種の菌液のうちでは最も良く、死菌が多いという短所を補って余りあり、浸漬操作時間の制限があることに注意すれば、SS用の菌液としては最も優秀な菌液

であろう。石油ベンジン菌液に比べるとT-A菌液と蒸溜水菌液とは菌附着の効率がかなり悪く、附着菌単位数も石油ベンジン菌液に比べると半分以上である。

又T-A菌液と蒸溜水菌液との附着菌単位数をみると、前者の方が多いという成績を得ている。即ち前者は後者の約2倍になっている。著者等の成績では、T-A菌液の生菌単位数比は約1/2、蒸溜水菌液の生菌単位数比は約1/7であり、生菌単位数比のみから算定すると、著者等が得たT-A菌液を用いた場合の附着菌単位数は予想した数値よりは少い。この原因としてはやはりTween Albumin培地に含まれるTween 80(培地中に0.05%の割合で含まれる)の菌附着に対する阻止効果をあげねばならない。

以上の総括を簡単に表示すると表23の如くなる。

既に東^{10,11)}は、結核菌を水に懸濁させた菌液について、菌液濃度と附着菌単位数との関係及び浸漬時間と附着菌単位数との関係について報告している。即ち附着菌単位数は菌液濃度に略々比例すること、又附着菌単位数はSS浸漬時間には大して影響されないと結論している。菌液濃度と附着菌単位数との関係については著者等の成績でも同じ結果を得たが、浸漬時間と附着菌単位数との関係についてはこれに反して、著者等の成績では、浸漬時間が増加するに従い附着菌単位数も増加するという成績が得られた。

その他東¹¹⁾はTween 80を0.05%の割合で含む水性菌液についても検討し、Tween 80がSS上への菌附着を阻害すると報告しているが、著者等はこれについても再検討を行い、高濃度のTween 80を含む菌液はやはりSSC用の菌液として適当ではないが、培養10日間程度のT-A菌液をSSC用として使用することは可能であるとの結論を得た。

さて、SSC用の菌液としての適、不適を論ずるには、緒論にものべた様に(1)単孤菌化、(2)菌附着の均等性、(3)接種菌量の均一性の3点を特に注意せねばならない。著者等の検討した3

表 23 SS への結核菌附着に影響する諸因子の検討

総 括

因 子	菌 附 着 に 及 ぼ す 影 響		
	石 油 ベ ン ジ ン 菌 液	T-A 菌 液	液 蒸 溜 水 菌 液
菌 液 濃 度	菌液濃度が10倍になると附着菌単位数は約5倍になる。	菌液濃度が10倍になると附着菌単位数も約10倍になる。	菌液濃度が10倍になると附着菌単位数も約10倍になる。
浸 漬 時 間	1 分間以内では関係なし	浸漬時間と共に増加	浸漬時間と共に増加
浸 漬 回 数	浸漬回数に比例して増加	殆ど関係なし	浸漬回数と共に増加
菌 液 の 振 盪	殆ど関係なし	軽度増加	かなり著明に増加
1.0mg/cc の菌液使用時の平均附着菌単位数概数 (1視野, 7×10)	約 800	約 300	約 160

種の菌液の中では以上の3点から考えて石油ベンジン菌液が最も適当な菌液の様である。特に定量的な判定を要求される諸実験に於ては最も信頼し得る。SS 表面に發育した集落を顕微鏡的に観察しても又肉眼的に判定しても、いずれの集落も均等な發育を示し、極めて小さい集落とか、過大に發育した集落は殆ど認められない。しかしながら一方、石油ベンジン自体の結核菌障害作用がかなり強いものであることは非常に大きな欠点である。石油ベンジン自体の結核菌障害作用は、菌液作成から SS 浸漬操作終了迄の時間を30分以内に制限することで、殆どさけ得ることが判明したが、しかし多数の SS を浸漬しなければならない実験では、数回石油ベンジン菌液を新たに作成せねばならず、実験操作はかなり繁雑になるのをまぬがれない。著者等が石油ベンジンの長所を持ち、かつ結核菌障害作用のより少い菌懸濁媒を求めること切なる所以である。

T-A 菌液では、石油ベンジン菌液の持つ欠点、即ち菌懸濁媒自体の結核菌障害作用がないが、SS 上への菌附着の効率が石油ベンジン菌液に比べてかなり落ちるのが大きな欠点である。又 SS 浸漬の際、SS を菌液から抜去すると極く少量の菌液が小さい水滴となって SS 表面に附着し、SS を再び液体培地に投入する際、そ

の少量の菌液が培地内に混入し、試験管底にも菌の發育が僅かであるがみられることがある。しかしその管底の菌が同じ培地内にある SS 表面に重ねて附着するという可能性は強度の振盪でも行なつて、その菌塊を分散させない限り殆ど起らないものと思われる。しかしかかることは石油ベンジン菌液を用いた時は殆ど起らず、やはり T-A 菌液の一つの短所であろう。しかし T-A 菌液は、菌附着の均等性と各スライドへの接種菌量の均一性からみて石油ベンジン菌液について優秀な SSC 用菌液である。

蒸溜水菌液については、T-A 菌液と同様な欠点に加えて、菌附着の均等性と各スライド間の接種菌量の均一性について上記の2菌液に比べるとかなり劣る所がある。肉眼的判定に際してはさほどでもないが、顕微鏡で判定すると集落の大きさの不均等、SS 表面への附着の不均等性がかなり目につく。又上記2種の菌液に比べて菌液作成操作が一番繁雑である。

結局、以上の諸点を考慮した上で著者等は定量的に集落の算定を要求される様な実験では石油ベンジン菌液を、肉眼的な判定のみを要求される実験には T-A 菌液又は場合によっては蒸溜水菌液を使用するのも良い、との結論に達している。又いずれの菌液についても云えることであるが、菌液濃度が低くなるに従つて、成績

判定の際の誤差が大きくなる可能性があるのではやむを得ない場合以外は 0.1mg/cc 以上の菌液濃度で諸実験を行うのが良い。又石油ベンジン菌液を使用する時に限り、浸漬回数と附着菌単位数との間に比例関係が認められることは、低濃度の菌液を使用する際利用価値の多い性質と思われるので再び強調しておきたい。

終りに、本実験で得られた諸成績を界面現象の上から一応の説明を試みてみたい。

SS 表面で結核菌が発育し、通常の実験操作で菌脱落がみられないという画期的な利点は、SS 表面が強い撥水性（親油性）を示し、これと液体培地（水相）との界面に親油性である結核菌を吸着するという性質によっている。従って SS 浸漬操作に於て、SS 表面への結核菌の附着が、結核菌と SS 表面との吸着現象のみであるとすれば、菌附着の効率は石油ベンジン菌液に於て悪い筈であり、蒸溜水菌液に於てむしろ良くなければならないであろう。処が、石油ベンジン菌液を使用した場合、SS 表面への菌附着の効率は極めてよく、T-A 菌液と蒸溜水菌液のそれをはるかにしのぐものがある。従って石油ベンジン菌液を用いた場合の SS 表面への菌附着の機転は次の様に想像される。即ち浸漬終了後 SS を抜去すると、結核菌を均等に分散した石油ベンジンが、親油性である SS 表面に極めて均等に薄層を作った状態になると思われ、4～5 秒経過して石油ベンジンが蒸発した後は、SS 上にはもはや結核菌しか存在せず、しかも上記薄層中に含まれる結核菌のすべてがかなり強く SS 表面と結合されるのであろう。浸漬回数と附着菌数との関係に於ける特異な態度も、上の現象が反覆されるに過ぎないと考えれば理解し易い。しかし一度 SS 表面に密着した菌が、第 2 回、第 3 回の浸漬で再び石油ベンジン菌液に遊離しないのはいかなる機転によるのか説明の困難な事実である。

蒸溜水菌液では、浸漬時間 1 秒間と 1 分間の差が附着菌単位数の有意の増加として認められるのに、石油ベンジン菌液に於ては 1 秒間の浸漬でも 1 分間の浸漬でもほぼ同じ附着菌数しか得られないのは、前述した如く、石油ベンジン

菌液中に浸漬された SS 表面と結核菌はいまだ吸着に類する何らの機転にも関与していないと云う一つの裏付ともなろう。石油ベンジン菌液を使用した場合、菌液振盪の影響が附着菌数に表われ難いのも同じ様に理解出来る。

一方これに反して、蒸溜水菌液を用いた時の SS 表面への附着菌数の態度は、一応 SS 浸漬時に於ける SS 表面と結核菌との水を介して行われる吸着現象にその説明を求めてもよいであろう。SS 浸漬時間と附着菌数との関係も、浸漬回数と附着菌数との関係も両者共吸着現象で理解出来ると思われる。SS 表面に結核菌が吸着されるには、両者の距離が必要な程度近づかなくてはならない。かかる必要条件を満たす結核菌の数を増加させるのが、SS と菌液とのより長時間の接触であり、又より多く反覆する浸漬操作である。又菌液の振盪も吸着現象を促進さす一つの方法に他ならない。

T-A 菌液に於ても、SS 表面への菌附着はやはり吸着現象で説明されると思われるが、浸漬時間、浸漬回数及び菌液振盪の影響が蒸溜水菌液の場合ほど明らかでないのはやはり Tween 80 の影響ではないかと考えられる。

第 5 章 結 論

SSC に使用するため、著者等は、石油ベンジン菌液、T-A 菌液、及び蒸溜水菌液を取り上げ、その各々について、SS 表面への結核菌の附着に影響する諸因子を詳細に検討し、次の結論を得た。

石油ベンジン菌液、T-A 菌液、及び蒸溜水菌液はいずれも SSC 用の菌液として使用可能である。SS 上への菌附着の効率、菌附着の均等性、接種菌量の平等性からみて、以上 3 種の菌液の中では石油ベンジン菌液が最も優れ、次に T-A 菌液が載げられ、蒸溜水菌液は上記 2 種類の菌液に比べるとやや劣る様である。又集落数算定を要求される諸実験に於ては石油ベンジン菌液を使用することが望ましい。但し石油ベンジン菌液では菌液作成後、かなり速な菌液中生菌数の経時的減少があるので、菌液作成後 SS 浸漬操作終了迄の時間は 30 分以内に制限する必要がある。

文 献

- 1) 内藤, 津久間, 東, 外: 第31回日本結核病学会総会 (昭和31年5月) 及び第32回日本結核病学会総会 (昭和32年4月)
- 2) 恒村: 京大結研紀要, 7(3)増刊Ⅲ, 366 (昭34)
- 3) 松島: 京大結研紀要, 8(1)増刊Ⅱ, 584 (昭34)
- 4) 井本: 京大結研紀要, 7(3)増刊Ⅲ, 306 (昭34)
- 5) 神田: 京大結研紀要, 7(3)増刊Ⅰ, 328 (昭34)
- 6) 伊藤: 京大結研紀要, 7(1), 181 (昭33)
- 7) 池田: 京大結研紀要, 12(1), 21 (昭38)
- 8) 中井: 未発表
- 9) 東: 京大結研紀要, 7(3)増刊Ⅰ, 461 (昭34)
- 10) 東: 京大結研紀要, 7(3)増刊Ⅰ, 468 (昭34)
- 11) 東: 京大結研紀要, 7(3)増刊Ⅱ, 22 (昭34)
- 12) 山本: 京大結研紀要, 3(1), 42 (昭29)
- 13) 小谷, 外: 第7回日本結核病学会近畿地方会 (昭和28年5月)
- 14) Fisher, M.W. : J. Bact., 67, 613 (1950)
- 15) 衛生検査指針厚生省編纂Ⅰ, 22 (1958)