

寒性膿中の結核菌発育阻止力に関する実験的研究

京都大学医学部整形外科学教室（近藤鋭矢教授指導）

堤 正 二

原稿受付昭和33年8月11日

EXPERIMENTAL STUDY ON ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY IN COLD PUS

by

SEIJI TSUTSUMI

from the Orthopaedic Division, Kyoto University Medical School

(Director: Prof. Dr. EISHI KONDO)

In detecting the presence of mycobacterium tuberculosis in cold pus, a much higher percentage of positive result is gained by culture than by direct smear stain. In connection with this fact, Profs. KONDO and YAMADA suggested the probability of an anti-mycobacterial activity in cold pus, pointing out the fact that the most organisms found in cold pus by Ziehl-Heidenhein's stain (Ueda's modification) are non-acid-fast while acid-fast organisms are gradually destroyed. The author tried to follow up the nature of the anti-mycobacterial activity.

The method used in the investigation is the following: Cold pus is collected from patients who have been given no antibiotics and twice centrifuged at 3,000 rpm for 30 minutes. Its supernatant or pus serum and the specimens to be compared with pus serum are diluted 80%, 60%, 40%, 20% by adding Kirchner liquid medium. For control, distilled water is diluted in the same way. One drop of human type tubercle bacilli H 37 RV suspension 0.5 mg/cc is added to each of these tubes. After one week of incubation, the upper layer of the solution in each tube is discarded out and 0.2 cc of the solution is transferred from the bottom of each tube onto a glass slide, allowing the smear to air-dry. Fixed and stained by Ziehl-Neelsen's method, the preparations are examined under 80× power of the microscope. The growth rates of mycobacterium tuberculosis in different concentrations of each specimen are compared with each other to demonstrate the grades of the antibacterial activity of the respective specimens.

The undue pH of pus serum prohibits the growth of tubercle bacilli in it. With this experiment, however, the pH of pus serum can be set aside from consideration, as the specimen of each tube diluted with Kirchner's liquid medium is nearly neutral.

1) Pus serum, serum and spinal fluid were studied in comparison with each other and the strongest antibacterial activity was observed with pus serum.

2) The heat resistance of the antibacterial factor in pus serum was examined: The activity was not influenced by heating at 60°C for 30 minutes and decreased by heating at 100° C for 30 minutes.

3) Dialysis of pus serum was exercised to determine the gross molecular weight of the factor: A collodion bag containing 3 cc of pus serum was left in running water for dialysis, its content which increased 5 times in volume was corrected to 3 cc by low pressure concentration method and then its antibacterial activity was tested to prove that antibacterial activity was lost.

4) With the substance which passed through the collodion membrane, antibacterial activity was tested after the correction of its volume and a considerable grade of the activity was observed.

5) Hole method of pepton agar plate was adapted to observe the effect of pus serum on the growth of other organisms than tubercle bacilli: No activity against the growth of staphylococci and of esherichia coli was noticed and against bacillus subtilis was observed a mild grade of the activity which was lost by heating at 56° C for 30 minutes.

6) Hemagglutination test by Middlebrook-Dubos (M. D. test) was adapted to titer antibody in pus serum, and the titer of antibody was not significantly high.

From these facts it may be right to conclude that the anti-mycobacterial activity of pus serum can be ascribed to a factor of rather small molecular weight and that compounds of high molecular weight such as protein, enzyme, antibodies and etc. are excluded from the factor.

目 次

緒 言

第1章、寒性膿、血清、脊髄液の菌発育度の比較。

第1節、実験材料並に実験方法。

第2節、本実験方法に於ける膿清pH値の問題。

第3節、実験成績。

小括。

第2章、寒性膿が結核菌以外の微生物の発育に及ぼす影響。

第1節、ブドウ球菌、大腸菌、枯草菌の発育に及ぼす影響。

第2節、非病原性 *Mycobacterium*, *M. avium*, *Nocardia*, *Candida* 等の発育に及ぼす影響。

小括。

第3章、膿清の Middlebrook-Dubos 氏赤血球凝集反応。

小括

第4章、膿清加熱による阻止力の変化。

第1節、60度 30分加熱による阻止力の変化。

第2節、100度 30分加熱による阻止力の変化。

第3節、100度 10分加熱による阻止力の変化。

小括。

第5章、膿清透析による阻止力の変化。

第1節 流水中透析による阻止力の変化。

小括。

第2節、電気泳動法による膿清透析後の蛋白質分層の変化。

小括。

第3節、静水中並に流水中透析による阻止力の比較。

小括。

第4節、静水中透析後の膿清の蛋白濃度を透析前膿清のそれに近づけた場合の阻止力について。

小括。

第6章、膿清透析分層の阻止力。

小括。

第7章, エーテルによる阻止力の抽出。

小括。

第8章, 膿清抗菌力とストレプトマイシン抗菌力の比較,

結 言

寒性膿中の結核菌に就いては、曾つて塗抹染色の困難性から“寒性膿中には結核菌は証明されない”とまで云われたこともあつたが、1930年頃に至り Uhlenhuth の Antiformin 法に続いて Löwenstein, 住吉の硫酸処置法等優秀な結核菌分離培養法が発表せられ、更に Hohn によつて之を簡易化された卵黄培地上の培養法が発表せられて以来、臨床的に盛んに応用されるに至つた。そして冷膿中からは結核菌が高率に証明される様になり、Hohn は直接塗抹染色で 38.1%, 培養では 70.2% の検出率を挙げ、又本邦に於ける抗酸性菌検出率は直接塗抹染色で戸田の 6% 内外、永井の約 50% (種々の変型菌を混ず)、児玉 31% が報告されているが、一方培養成績では佐藤 95%, 加藤 96.6%, 市村 93.9%, 永井 100%, 側見 84.0%, 石橋 78.5%, 児玉 93%, 等の検出率を示している。要之寒性膿に於ては塗抹染色により抗酸菌は殆んど証明されないか、たとえ証明される場合があつても稀少で、その塗抹染色による証明率を培養成績と対比すると、そこに著明な差異を認める事が出来る。

近藤、山田両教授は此の事実に着目され、教室の児玉は Ziehl-Heydenhein 法 (植田氏法) を用いて寒性膿中の結核菌を検索した所、抗酸性型 3%, 非抗酸性型 (易染型) 93% の検出率を見、更に膿中に易染型の多く存する理由として、流注膿瘍中に於ては抗酸性型が速かに崩壊する事実を証明し、寒性膿中に結核菌発育阻止作用の存在する事を認めた。その後藤田はその阻止力の強さ、自家株菌に対する作用態度、或は阻止作用を受けた菌の形態を細菌学的に研究した。

さて、寒性膿についての研究報告を眺めてみると、非常に多方面に亘り集大成された観があるが、結核菌発育阻止力に関する限り、内外の文献を渉獵して見ても唯本邦に於ける近藤、山田両教授の提唱された病巣の自浄作用より発展した所の児玉、藤田の業績を見るのみである。

著者は之等恩師、先輩の業績を継承し、寒性膿中の

小括。

第9章, 膿清の枯草菌発育阻止力に就いての研究、

小括。

第10章, 総括並に考按。

結 論。

抗菌力の本態に就いて追求して結核治療の面に寄与せんと企てた次第である。茲に実験成績を総括して報告する。

第1章 寒性膿, 血清, 脊髄液 (体液) の結核菌発育度の比較

(実験目的) 寒性膿, 血清, 脊髄液の結核菌発育阻止力 (以下阻止力とする) について比較検討した。

第1節, 実験材料並に実験方法,

1. 被検液。

a) 寒性膿; 骨関節結核患者で未だ全く化学療法を受けていないか、或は抗結核剤投与終了後約 6 ヶ月以上を経過した患者の寒性膿を無菌的に穿刺し、採取後すみやかに 3000 回転, 30 分遠心分離し 1 時間静置, 更に 3000 回転, 30 分遠心分離を行う。かくして得られた寒性膿の上清 (以下膿清と略称) について種々の検査を行つた。尤も粘稠な膿汁の場合には上記処理でも未だ膿性分離が不十分の事もあるので、その時は更に 1 ~ 2 日冷蔵庫に放置後上記処理を行つた。次に膿清の一金耳を取り上坂、友田培地に塗り培養上結核菌の陰性なる事を確めた。

b) 血清; 脊椎カリエス患者並に健康人の血液約 5cc を採取し、2000 回転, 15 分遠心分離を行つて血清を得た。

c) 脊髄液; ツベルクリン反応陽性者の脊髄液 2.0 cc を採取して供試した。

2. 結核菌均等浮遊液

使用結核菌は京都大学結核研究所々蔵の強毒人型結核菌 H37RV 株で Sauton 培養基で 4 週間培養したものを一定量滅菌濾紙に取り、37°C で 1 時間乾燥後正確に秤量した。之を瑪瑙乳鉢に移し充分磨砕しつつ、徐々に生理的食塩水を加えて 0.5mg/cc の平等菌浮遊液を作製した。此の場合の菌液を載物ガラスに一滴移し乾燥、固定後、Ziehl-Neelsen 法で染色した標本を保存しておき、培養 1 週間後の標本と対比して菌発育度の参考とした。

3. 実験方法

1 組 4 本の小試験管を用いて膿清, 血清, 脊髄液の

表1 稀釈倍数率

試験管番号	I	II	III	IV
膿清又は被検液(cc.)	0.8	0.6	0.4	0.2
Kirchner 培地(cc.)	0.2	0.4	0.6	0.8
膿清の濃度(%)	80	60	40	20

2倍稀釈を(表1)の様に Kirchner 培養液で稀釈した。次いで各試験管に菌液を1滴づつ加えて、型の如く綿栓封蠟し37°Cで1週間培養する。対照として生理的食塩水を同様に Kirchner 培養液で稀釈し菌液を滴下したもの、並に Kirchner 培養液のみに菌液を滴下したものをを用いた。

4. 成績判定, (結核菌発育初期集落を 検鏡する方法)

1週間培養後各試験管を取り出して、上層の液を静かに捨て去り、次いで発育初期集落を壊さない様に注意しながら管底の残液0.1~0.2ccを駒込ビペットで徐々に吸引して載物ガラス上に滴下し、乾燥固定後、Ziehl-Neelsen 染色を行い検鏡する。此の場合発育初期集落、即ち結核菌特有な蛇行型集落は80倍拡大で充分に判定することができる。之に反して油浸系を用いればもつと早期に於ても発育度判定は可能ではあるが、此の場合には培養基中に混在する多少の未磨砕の菌塊との鑑別が困難になるので、かえつて成績の判定に不都合を生ずる怖れがある。そこで判定する場合には一応80倍で検鏡し、集落の発見されない標本は改めて油浸系にして、上記菌液標本と比較しながらその成績を検討した。

5. 判定基準

80倍拡大で検鏡し、結核菌の発育度に従つて次の如き基準を設けた。

(一)、菌の発育を全然認めない場合。

(土)、菌液染色標本に比し極僅かに集落を認める場合此の時は未だ蛇行型集落を形成していない。

(十)、明かに蛇行型集落を認める場合。

(廿)、菌集落数も増加し、蛇行型の長さも増して来た場合。

(卅)、菌集落数、及び蛇行型の増殖特に著明な場合。

第2節 本実験方法に於ける膿清 pH 値の問題

膿清を東洋濾紙株式会社製の水素イオン濃度試験で測定すると、大部分の pH 値が8.0を示す。然し膿清の Kirchner 液稀釈後の各試験管内の pH 値を測定した所、(表2)に示す如き成績を得た。即ち Kirchner 培

養液の濃度が高まるにつれて pH 値は急激に中性化して来る。要之 Kirchner 培養液の緩衝作用の為と考えられ、膿清60%+Kirchner 液40%(第2試験管、以後膿清の稀釈濃度を示す場合各試験管番号にて表わす)、膿清40%(第3試験管)、膿清20%(第4試験管)に於ては既に結核菌発育至適 pH 値に近い値を示しているの、阻止判定力に際して第2試験管以上では、膿清の pH 値は特に考慮する必要はないと考える。

第3節 実験成績(表3)

1. 寒性膿;上記方法で菌発育度を検するに第2、第3試験管まで阻止力を証明した。

2. 血清;第1試験管に於てのみ阻止力を認めた。

3. 脊髓液;阻止力は全く証明しなかつた。

表2 各試験管内に於ける膿清のpH値

患者名	膿清のpH値	試験管番号			
		I	II	III	IV
福島	8.2	7.6	7.2	6.8	6.6
岸本	7.8	7.2	6.8	6.6	6.6
安本	8.0	7.8	7.2	7.0	6.8

表3 菌発育度の比較

1. 膿 清

	I	II	III	IV
福島	—	—	—	+
高橋	—	—	+	++
対照	+	++	++	+++

2. 血 清

		I	II	III	IV
左近	脊椎カリエス	一	十	十	十
長浜	〃	土	十	十	十
吉田	ツ反応陽性	一	土	十	十
森田	〃	一	十	十	十
荻野	〃	一	十	十	十
堤	〃	土	十	十	土
対照		十	十	十	十

3. 脊髓液

	I	II	III	IV
蔭山	+	++	++	++
池本	+	+	++	++
対照	+	++	++	+++

小括

或る物質の結核菌に対する抗菌作用を追及する場合に固形培養基と液体培養基を用いる場合があるが、特に著者の使用した液体培養基で結核菌の発育初期集落を検鏡する方法は、短時日の培養期間で成績を判定し得るので、抗菌物質を選別してゆく場合に、抗菌力が培養日数と共に減弱すると思われる様な材料については適切な方法であると考え、近年盛んに応用されている Slide Cell Culture 法は強いて生体内の状態に近づけて菌の発育を見ると云うのであるが、植田教授も指摘されている様に、凝固し半ば乾燥した血液が果して生体内の状態を再現しているのが疑問に思われる。

さて膿清、血清、脊髄液の阻止力を比較する場合に先づ問題となる事は各々のpH値の差であろう。然るに本実験に於ては Kirchner 液の緩衝作用のために第2、第3、第4試験管に於ては既に中性値に近づくので、之は別段介意する必要はないと考える。そこで膿清の場合を見るに第2（膿清60%）、第3（膿清4%）試験管に於ては結核菌発育至適 pH値 に近づいているにかゝらず、菌の発育を証明しないと云う事は、明らかにpH値 以外に阻止力の本態を求めるべきであることを示唆している。又血液の結核菌発育阻止作用については Slide Cell Culture法 による多くの実験成績が発表されているが、本実験方法で比較した場合に膿清の阻止力が之より更に勝っていた事は非常に意義深い事と考える。

第2章 寒性膿が結核菌以外の微生物の発育に及ぼす影響

（実験目的）寒性膿が結核菌に対してのみ発育を阻止するのか、或は非特異的に他の微生物の増殖をも阻止し得るものであろうか。

第1節、ブドウ球菌、大腸菌、枯草菌の発育に及ぼす影響。

Gram 陽性細菌としてブドウ球菌（*Micrococcus pyogenes* veir, aureus Terajima）、Gram 陰性細菌として大腸菌（*E.coli communis*）、更に芽胞を有する細菌の代表として枯草菌（*P. C. I. 219*株）を撰んだ。

1、実験材料並に実験方法、

普通寒天培地では之等の菌の発育が旺盛な為に、若し膿清中に発育阻止力が存在していても非常に微弱な場合には之を見落す危険性もあると考えたので、培地としては栄養源の乏しいペプトン寒天培地を使用して微弱な抗菌力も証明し得る様に努めた。

a) 菌液作製

ブドウ球菌、大腸菌、枯草菌の1白金耳をブイヨン中で12時間37°Cで培養した菌液を使用した。

b) ペプトン寒天平板穿孔法、

ペプトン水（ペプトン10g、食塩3g、水1l）に3%の寒天末を加えて Peptonagar を作製し、之を Autoklav で滅菌、約43°Cに冷却するのを待つて、滅菌シャーレに3種の菌液0.5ccづつを滴下し、続いて Pepton agar 10ccを加えて充分混和し、固まるのを待つて「コルク栓抜き」（直径0.8cm）で穿孔し、之に膿清を滴下、12時間以上冷蔵庫に入れ膿清が寒天に滲透した上で16時間37°Cで培養し、孵卵器より取り出し、穿孔部周囲の発育阻止輪の有無により抗菌力を判定した。（図1）

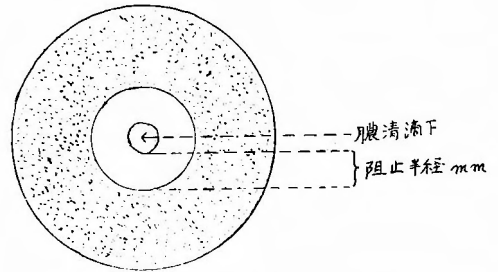


図1 ブドウ球菌等に対する抗菌力判定法

2. 実験成績

ブドウ球菌、大腸菌に対しては発育阻止力は認めなかつたが、枯草菌については全例に於て、極く軽度の発育阻止輪を証明した。（表4）

表4 膿清の枯草菌に対する発育阻止力

	ブドウ球菌	大腸菌	枯草菌
丹波	0	0	2mm
西村	0	0	2mm
竹岡	0	0	1.5mm

第2節 非病原性 *Mycobacterum*, *M. avium*, *Nocardia*, *Candida* 等の発育に及ぼす影響

1、実験材料並に実験方法（4%グリセリン寒天平板穿孔法）

先づ4%グリセリン寒天（ペプトン10g、肉エキス10g、食塩1g、グリセリン40cc、寒天30g、水1l）を作製し、型の如く滅菌シャーレに移し、凝固するのを待つて、「コルク栓抜き」で穿孔し、孔の辺縁に接して各種微生物を（図2）の如く線状に2本塗り、次に穿孔部に

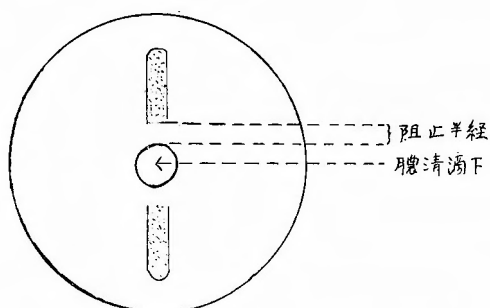


図2 非病原性ミコバクテリウム等に対する
抗菌力判定法

膿清を滴下，寒天に滲透した後で，30℃或は37℃の孵卵器で培養し，3～5日後にその阻止力を判定した。

実験に供した各種微生物の種類

a) 37℃で培養

1) <i>Mycobacterium</i>	sp.	230
2) "	"	229
3) "	"	247
4) "	"	211
5) "	"	209
6) "	"	269
7) "	"	260
8) "	"	258
9) "	"	222
10) "	"	296
11) "	"	220
12) "	"	193
13) "	"	219
14) "	"	241
15) "	"	215
16) <i>Mycobacterium</i>	phlei	
17) <i>Mycobacterium</i>	smegmatis	
18) <i>Mycobacterium</i>	avium	

b) 30℃で培養

19) <i>Nocardia</i>	sp.	227
20) "	"	244
21) "	"	288
22) "	"	343
23) "	"	286
24) "	"	269
25) "	"	293
26) "	"	284

27) <i>Nocardia</i>	mexicanus	
28) <i>Nocardia</i>	kuroishi	A422
29) <i>Streptomyces</i>	sp.	K163
30) "	griseus	K ₂
31) <i>Candida</i>	parakrusei	
32) "	kruesi	
33) "	tropicalis	
34) "	albicans	1002
35) "	"	1001

2, 実験成績

膿清が上記各種微生物に対して，その発育を阻止する様な作用は全く認めなかつた。

小括

寒性膿は人型結核菌F株（児玉，藤田），H 37 RV株（著者）のみならず，更に枯草菌に対しても発育阻止力の存在する事を確認した。然しながら，他の30数種の微生物について行つた実験成績では之を証明する事が出来なかつた。即ち膿清の結核菌に対する発育阻止力は殆んど特異的に結核菌にのみ作用するものと考えられる。若し膿清の結核菌に対すると同程度の抗菌力が認められる様な微生物を見出す事が出来れば，即ち発育阻止力を平板培地で証明する事が可能となれば，今後阻止力の本態を追及して行く上に於て，全ての点で非常に簡便且つ有利であると考えたが，遂に然るべき微生物は発見出来なかつた。（膿清の枯草菌の発育に及ぼす影響については第9章に於て詳述する）。

第3章 膿清の Middlebrook-Dubos 氏赤血球凝集反応

（実験目的）膿清の結核菌に対する阻止力はその抗体と如何なる関係にありや，その概略を知ろうとした。

第1節 実験材料並に実験方法。

1, 被検液

寒性膿の中でも特に漿液性のものを撰んで3000回転30分，遠心分離を2回繰返し，更に Filter paper No. 5B で濾過して可及的透明な膿清を得る様に努めた。（不透明な膿清では凝集値の判定が困難となる）此の膿清1容に同量の生理的食塩水（以下生食水）を加えて良く混和し，之を56℃, 30分加温して非動化したものを使用した。

2, 0型人血球採取

0型人血液5ccに3.5%クエン酸ソーダ5ccを加えて

血液凝固を防ぎながら充分振盪し、2000回転、15分遠心分離を行い、上清液を捨て、更に同量の生食水を加えて血球を良く洗滌し、再び遠心分離、此の様に3回血球を洗滌する。

3、感作血球作製

旧ツベルクリン液0.4ccに生食水5.6cc (1:15)を加えた液の中に、上記洗滌血球0.1ccを加えて37℃で2時間放置する。(15分毎に振盪)かくて主としてツベルクリン液の多糖類抗原が赤血球の表面に吸着されるので注意しながら1000回転6分間遠心分離を行い、上清液を捨て、更に6ccの生食水によつて3回反復洗滌し、遊離のツベルクリン抗原成分を洗い捨てる。次に生食水50ccに感作O型血球0.1ccを加えて0.2%の Suspension を作る。同時に対照として0.2%の未感作赤血球の Suspension も作製する。

4、実験方法

10本の試験管を用意し、非働化された膿清を(表5)に示す様に生食水で倍数稀釈し、之に感作血球の0.2% Suspension を0.4ccづつ滴下して、37℃孵卵器に2時間入れ、その後は1夜室温に放置し、翌朝その血球凝集反応を検した。

第2節 実験成績、

非常に透明な膿清を必要とするので、小数例しか出

来なかつたが、2例共凝集値は32倍まで陽性で、患者血清の凝集値も大体同様な値を示した。(表6)

小括

従来多くの研究者が補体結合反応、或は沈降反応によつて、結核症の抗体を試験管内で証明する方法を試みたが、Middlebrook-Dubos(1948)は大きな粒子である赤血球に抗原成分を吸着させる事によつて、赤血球の凝集反応の形で結核症の血清学的反応を表現する事に成功した。此の方法を膿清に應用して其の抗体量を検した所が、膿清中には結核症に対する抗体が特に増加しているとも思われなかつた。要之、膿清中の抗体が結核菌発育阻止作用に対して特に密接な関係があるとは考えられない。将又幾分なりとも阻止力に關与すると考えた場合でも、此の程度の凝集値では其れが阻止力の主役を演じるものであるとは思ふに難い。

第4章 膿清加熱による阻止力の変化

(実験目的) 菌発育阻止力の作用因子は耐熱性や否や。

第1節、60°30分加熱による阻止力の変化

1、実験材料並に実験方法。

第1章、第1節に準ずる。但し被検材料は非加熱膿清と、60°30分重盪煎中に加温した場合と2種類につ

表5 Middlebrook-Dubos氏赤血球凝集反応

		試 験 管 番 号									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
膿清 又は 血清 (cc) 食 塩 水 (cc) 0.2% 感作血球 (cc)	膿清	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	—	0.4
	又は 血清	—	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	—
	食塩水	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
											↓ ステル 0.2%未感作 血球

表6 成 績

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		2 ×	4 ×	8 ×	16 ×	32 ×	64 ×	128 ×	256 ×	対照	対照
乾 (膿 清)	膿 清	卅	卅	+	+	+	—	—	—	—	—
	血清	卅	卅	卅	+	+	—	—	—	溶血	—
岡 田	膿 清	卅	卅	+	+	±	—	—	—	—	—
	血清	卅	卅	+	+	±	—	—	—	—	—

いて菌発育度を比較した。

2. 実験成績.

対照の生食水の菌培養成績は第1試験管に於て既に結核菌は蛇行型に発育するが、非加熱膿清の菌発育度を見るに、第3或は第4試験管程度まで菌の発育は阻止されていた。然るに60°30分重湯煎中で加温した膿清も(表7)に示す如く、その菌発育度は略々非加熱例と同様の成績を示した。即ち60°30分加温処理を行つても膿清の菌発育阻止力には何等特別の影響を認めなかつた。

表7 60°30分加熱

患者名	処置	I	II	III	IV
関西	非加熱	—	—	±	+
	60° 30分	—	—	+	+
倉沢	非加熱	—	—	—	±
	60° 30分	—	—	—	—
細川	非加熱	—	±	±	+
	60° 30分	—	—	±	—
福島	非加熱	—	—	—	+
	60° 30分	—	—	—	+
丹波	非加熱	—	—	—	+
	60° 30分	—	—	—	+

第2節, 100°30分加熱による阻止力の変化

1. 実験材料並に実験方法

第1章, 第1節に準ずるが、膿清を100°30分重湯煎中で加温した場合、大部分の蛋白質は凝固するので、滅菌ガラス棒で凝固物を磨潰し、之を3000回転、20分遠心分離を行うと比較的透明な液を得る事が出来た。

(以下之を凝水と仮称する)かくして非加熱膿清と凝水とについて抗菌力を検した。

2. 凝水の蛋白反応

凝水に就いての蛋白反応は(表8)に示す如き成績を得た。即ち, Sulfosalicyl 酸試験(+), Biuret 反応(+)である。

表8 凝水の蛋白反応

Ninhydrin-R	+
Biuret	+
Xanthoprotein-R	+
Molisch-R	+
Sulfosalicyl酸-R	+
Millon-R	+

3. 実験成績

(表9)に示す如く膿清の阻止力は100°, 30分加熱により、始めて減弱、或は消失?した事を認めた。然し生食水の菌培養成績と対比した場合に、100°30分加熱膿清の菌発育度が若干阻害された感があるので、加熱しても幾分阻止力は残存するのではあるまいかと思われる。

表9 100° 30分 加熱

患者名	処置	I	II	III	IV
関西	非加熱	—	—	±	+
	100°30分	±	—	—	—
倉沢	非加熱	—	—	—	±
	100°30分	—	±	±	—
福島	非加熱	—	—	—	+
	100°30分	—	—	±	±
青谷	非加熱	—	±	±	+
	100°30分	—	+	—	—
足立	非加熱	—	—	+	+
	100°30分	±	—	+	±
安本	非加熱	—	+	±	+
	100°30分	+	+	±	+
丹波	非加熱	—	—	—	+
	100°30分	±	+	±	±

第3節 10°10分加熱による阻止力の変化

1. 実験材料, 並に実験方法

前節に準ずる。

2. 100° 10分加熱の場合も30分加熱と同様に阻止力は著明に減弱した。(表10)

表10 100° 10分 加熱

患者名	処置	I	II	III	IV
田中	非加熱	—	±	±	±
	100°10分	+	±	+	±

小括.

寒性膿の組成より考えると大部分は白血球の崩壊産物の集積されたものであるから、その阻止力に関しても、特に白血球の崩壊が重要な意味を有することが想像される。従来膿清中の結核菌発育阻止力に就いては白血球酵素に起因するのではあるまいかと考えられていた。そこで先づ酵素の性質を想起するに、之は温度により強く影響を受けるものであり、液の反応や混入

物次第では100°でも作用を失わないものもあるが、多くの場合、60°でその作用を消失すると云われている。然らば膿清の阻止力を示す本態が酵素であると仮定すれば、60°30分加熱処理により、その阻止力は消失或は減弱するであろうとの推定のもとに本実験を行つたのである。然るに予想に反しその阻止力には特別な変化は招来されなかつた。此の事実は膿清の示す阻止力は酵素以外の作用と見做すのが妥当ではあるまいかと想像せしめる。

次に膿清を100°30分加熱した場合の凝水では、阻止力は著しく減弱していると云う事実であるが、まず凝水の蛋白質成分に就いて考えるに、Tripeptid 或は、Polypeptid等は含有するも、凝固性蛋白、即ちAlbumin, Globulinの大部分は除外されていると考えて良い。要之60°30分加熱膿清と100°30分加熱凝水との組成々分を比較した場合に、特に大きな差異はAlbumin, Globulinの含有量の問題であろう。そこで之等の凝固性蛋白を含有しない後者に於て、阻止力が減弱している事実よりすれば、今後膿清の阻止力を究明するに就いて、Albumin, Globulinの存在に関しては特に留意しなければならない。然し阻止力の本態が蛋白質と仮定した場合60°の重疊煎中加温により膿清は既に非働化されていると考えられるが、將して之が阻止力を発揮しうであろうかと云う疑念が生じて来る。此の事については更に次章並びに総括に於て検討を加えたい。

第5章 膿清透析による阻止力の変化

第1節 流水中透析による阻止力の変化

(実験目的) 前章に於て阻止力の本態は酵素作用以外の化学作用と思われたので、然らば阻止物質の分子量はどの程度のものであろうかと考え半透膜を使つて透析実験を行つた。

1. 実験材料並に実験方法

a) コロチオン小袋作製

4%コロチオン溶液2cc~3ccを滅菌円錐フラスコに取り、そのフラスコを回転しながらコロチオン溶液を流し出す様にすれば、器の内面に薄いコロチオン層が出来来る。之を乾燥させて膜の内外に滅菌蒸溜水を注入して、徐々に器より剝離してゆけば容易に小袋が出来上る。此の時乾燥不足のまゝ水を入れると不透明な脆い膜が出来来る。乾燥し過ぎると膜は丈夫にはなるが透過性を失つて来るので、実験成績の正確を期するためには適度の乾燥が必要である。

b) 透 析

コロチオン小袋に膿清3ccを入れ、室温で流水中に12時間透析すれば、袋内の膿清は滲透圧の関係で約5倍に増量し、袋底に少量の白色沈澱物を生ずる。そこで袋内容を遠沈管に移し2000回転、15分間遠心分離により管底に沈澱物が貯り、上清液は非常に透明な液となる。此の透析後の膿清のpH値を東洋濾紙製水素イオン濃度試験紙で測定した所7.0乃至7.2程度であつた。

c) 透析後膿清の減圧濃縮

透析後膿清容量は滲透圧の関係上増量著しく、透析前のそれと対比する為には元の容量まで濃縮すを必要がある。そこで透析後膿清を蒸溜フラスコ、Liebig式冷却器、受器を使用して水流ポンプで減圧濃縮を行つた(無菌的操作)。此の場合重要な事は減圧時の加温温度であるが、之は減圧が長時間に及ぶので、出来るだけ低温度で阻止物質の破壊を防ぐと云う意味に於て30°Cと決定した。さて毛細管を蒸溜フラスコの底まで浸けて減圧すると、毛細管から小さい気泡が核となり沸騰が起るが、内容が蛋白質性であるので、一度出来た気泡が消失せず、次第に冷却器にまで移行して行くので、色々考へたが結局、先づ毛細管を液の中に浸けない程度に短くする事と、内容が30°Cに於て沸騰点に達しない程度で、且つ、最大減圧になる様に吸引し、而も突沸を防ぐ様に毛細管の太さを調節する事により透析後の増量した膿清を濃縮する事に成功した。かくて透析後膿清を約3ccまで濃縮して、透析前膿清とその阻止力を比較した。但し阻止力比較の術式は第1章、第1節に準ずる。

2. 実験成績

(表11)に示す如く透析前にはかなりの阻止力を証明していた膿清も、透析操作を行う事により阻止力は完全に消失した。即ち透析後の膿清の菌発育状況を見

表11 流水中透析の成績

患者名	処 置	pH値	I	II	III	IV
山 雄	透 析 前	7.8	—	+	+	++
	〃 後	7.0	+	+	++	+
丹 波	透 析 前	8.0	—	—	—	+
	〃 後	7.0		++	++	++
安 本	透 析 前	7.8	—	+	++	++
	〃 後	7.0	++	++	++	+++
対 照			+	+	++	+++

るに、対照蒸溜水より寧ろ旺盛な発育を示している。要之膿清の阻止力が全く消失した為に、隔膜内の蛋白質が優秀なる栄養源となつて此の様な状態を呈したものと考えられる。

小括

膿清の阻止力は透析操作により明らかに差異を証明したので、透析前後の膿清について検討して行く事とする。先づ透析後の膿清のpH値が透析前のそれに比し中性値に近い事であるが、之は第2、第3試験管に於ても菌発育状態に著明な差があるので第1章、第2節に述べた如く本実験に於てはpH値は関係しないと考える。次に減圧濃縮時の加温であるが、30°C程度であるので、その為に透析後の膿清の阻止力が破壊消失したとも考えられない。

然らば透析操作により明らかにその阻止力が消失したと云う事実就いては、第1にコロザオン膜を透過して阻止物質が流水中に脱出してしまつたか、第2に透析時に生ずる白色沈澱物それ自身が抗菌物質であつたのか、第3に沈澱物中に阻止物が含まれていたのか、と云う3つの事項が考えられる。然し第2、第3の事項についての阻止力検査は現在の所アルカリ溶液、塩類溶液にも不溶の為に不可能である。若し可溶であつたとしても一度変性したものが再溶解により作用を再現すると云う事は至難ではないかと考える。そこで先づ透析により生じた不溶解の白色沈澱物は如何なる分層に属するものであろうかを吟味する必要がある。

第2節 電気泳動法による膿清透析後の蛋白質分層の変化

(実験目的) 透析前後の膿清の蛋白質分層の変動を電気泳動法により観察すれば、透析時に生ずる白色沈澱物は如何なる分層に属するものかが決定出来ると考えた。

1. 実験材料並に実験方法

膿清総蛋白量測定には日立製蛋白屈折計を用い、電気泳動法としては日立製HT-A型 Ziselius 電気泳動装置を使用した。

a) Ziselius 型電気泳動装置

三分節セル、電極槽、恒温槽 (0~4°C)

b) 操作法

i) 試料の調節

イ) 透析前膿清 ; 寒性膿の遠心分離により得た膿清を Filter paper No. 5B で濾過し、可及的透明な試料を得る様に努めた。その時日立製蛋白屈折計で蛋白濃度を測定すると、6.9g/dlであつた。

ロ) 透析後膿清 ; 膿清を流水中で透析し、白色沈澱物(透析途中で生ずる)を除き、容量補正の上で蛋白濃度を測定したところ2.9g/dlであつた。

ii) 試料の透析

試料を泳動さす為には、蛋白質溶液と、蛋白質は含まないが、他の成分に関しては同一組成の溶液との間に界面を作る事が必要であるので、イ) ロ) の試料を緩衝液で蛋白濃度2.0~2.5g/dlに稀釈し、之をセロファン袋に入れ、大量の緩衝液に浸して氷室内で48時間透析を行つた。

iii) 緩衝液

pHやイオン強度のみでなく緩衝液の種類によつて電気泳動の分離の良否が決定される。試料により数種の緩衝液が発表されているが、著者は Veronal 緩衝液を使用した。(組成、0.1Nナエチルバルビツール酸リーダ + 0.02Nナエチルバルビツール酸、イオン強度0.1,pH8.6,比伝導度温度0.)

iv) 電 流

7.5mA,145V

v) 泳動時間

58分~1時間。

vi) 光学的観測装置

Schlieren円筒レンズ法で、乾板上に像を結ばせた。(乾板, Fuji PanF)

vii) 測定法,

重量法によりその下降脚値を採つた。

2. 実験成績

透析前後の膿清に就いての総蛋白量、各分層の重量

表12 透析による蛋白分層の変化(電気泳動法)

乾 氏	蛋白分層	透析前(6.9g/dl)		透析後(2.9g/dl)	
		百分率%	重量g/dl	百分率%	重量g/dl
	Albumin	29.7	2.05	38.8	1.13
	GlobulinL ₁	8.5	0.59	5.6	0.16
	〃 L ₂	6.0	0.41	6.0	0.17
	〃 β	9.0	0.62	9.8	0.28
	〃 γ	46.8	3.23	39.8	1.15
	A/G	0.42		0.64	

抗菌力の比較

乾 氏	処 置	総蛋白濃度	I	II	III	IV
			—	—	—	+
	透 析 前	6.9g/dl	—	—	—	+
	〃 後	2.9g/dl	++	++	+	++

A/G比を測定した結果は（表12）に示す通りである。A/G 比は透析前には 0.42、透析後では 0.64 となり Globulin 分屑の減少が目立ち、特に透析前に於ける γ -Globulin は、46.8%を占めているが、透析後には39.8%と著明に減少している。

小括

血清の γ -Globulin は 血清のそれに比し、著しく増加していることは既に諸家により報告されているが、本実験に於ても同様の成績を示し、A/G 比は0.42であつた。さて透析前後の血清の蛋白分屑を比較するに、透析後の血清では全般に各蛋白分屑重量が減少している。特に γ -Globulinの減少が著しい事は、透析中に生じた白色沈澱物の大部分が γ -Globulin であることを物語っている。之は血清透析途中に於て、先づ分子量の小さい塩類が脱出する為に γ -Globulin分屑の一部は難溶性となり析出沈澱したものであると考えられる。

そこで本章第1節に詳述した如き血清透析前後の阻止力の差異、並びに第2節の蛋白分屑、特に γ -Globulinの百分率の変化等を比較検討すれば、血清の阻止力の本態は恰も γ -Globulinであるかの概がある。然しこの白色沈澱物が、現在の所アルカリ溶液、塩類溶液に不溶性である以上、その抗菌力を検する事は不可能である為に、 γ -Globulin即、阻止力と速断する事は出来ない。結局血清の透析に当り隔膜内液中には阻止力の存在しない事が確認されているので、更にその外液中にも阻止力を認めないという事になれば、白色沈澱物 (γ -Globulin) は血清の阻止力追求に際して一層重要な因子として登場することになると考えられる。そこで隔膜外液の抗菌力測定実験を進める事とした。

第3節 静水中並に流水中透析による阻止力の比較

（実験目的）透析膜外液の阻止力を検する為には先づ静水中で透析を行わねばならない。この場合流水中透析の如く透析が完全に出来るものであろうか否かが問題となる。

1、実験材料並に実験方法

コロザオン小袋中に血清3ccを入れ、100ccの蒸留水を入れたビーカー中で48時間、室温で透析を行い、型の如く沈澱物を除去した後、減圧濃縮で3ccに補正し、日立製蛋白屈折計で総蛋白濃度を測定し、此の液と流水中で透析した血清との阻止力を比較した。此の場合静水中で透析した血清では、流水中のものに比し沈澱物も少く、又比較的不透明で、透析が完了されていない事を思わした。

2、実験成績

透析前の血清の蛋白濃度は 6.9g/dl であつたが、之を透析し容量補正の上でその濃度を測定すると、静水中で透析した血清は 4.0g/dl、流水中のそれは 2.9g/dl であつた。又、透析前の血清ではかなりの阻止力を認めていたが、流水中透析により阻止力は完全に消失し、静水中透析後の血清では第1試験管にのみ発育阻止力を認めた。此の事は、血清を静水中で透析した場合に阻止力は隔膜内液中に一部残存し、隔膜外液中に完全には移行し得ないと云う事を示すものであろうと考える。（表13）

表13 流水中と静水中透析の比較

患者名	処置	総蛋白濃度	I	II	III	IV
乾	透析前	6.9g/dl	—	—	—	+
	流水透析後	2.9g/dl	++	++	+	++
	静水透析後	4.0g/dl	—	++	+	++

小括

静水中透析では阻止力是一部透析膜内に残存する事が証明された。又蛋白濃度測定により、之が低下しているものほど、阻止力も減少している事が判明したので、或は阻止力の差は蛋白濃度に關係するのではなからうかと云う疑問も生じて来た。

第4節 静水透析後の血清の蛋白濃度を透析前血清のそれに近づけた場合の阻止力について

（実験目的）前節の血清の阻止力はその蛋白濃度に關係するのではあるまいかと云う疑問に対する解明を試みた。

1、実験材料並に実験方法

透析前 7.4g/dl の蛋白濃度を有した血清を静水透析後、減圧濃縮を高度に行い蛋白濃度を 7.0g/dl まで近づけ、血清の透析前後の阻止力を検した。

2、実験成績

透析前の血清では第3試験管まで阻止力を証明していたが、静水中透析後の蛋白濃度を7.0g/dlまで濃縮した血清でも第1試験管に於てのみ阻止力を証明し、依然として大部分の阻止力は消失している事を認めた。

（表14）

表14 総蛋白濃度を同じにした透析前後血清の抗菌力

患者名	処置	総蛋白濃度	I	II	III	IV
併	透析前	7.4g/dl	—	±	±	+
	静水透析後	7.0g/dl	—	++	++	++

小括

透析後の膿清の総蛋白濃度を可及的に透析前のそれに近づけて調整し阻止力を検したが、殆んど之を証明する事が出来なかつた。要之、一度透析すれば高度に濃縮しても阻止力を再現する事が出来ないと云う事は、阻止力に関与する因子の大部分が既に半透膜を通過して隔膜外液中に移行したからであろうと考えられ、たとえ総蛋白濃度、並に γ -Globulin が阻止力としての一因子であるとしても、それはさほど重要な因子ではあるまいと推測される。

第6章 膿清透析分屑の阻止力

(実験目的) 上述の成績により膿清の抗菌力は透析膜を通過し得ると考えられたので、その透析分屑について阻止力を検した。

第1節 実験材料並に実験方法

1) 被検液作製

コロチオン小袋に膿清3ccを入れて、蒸溜水100ccを入れたビーカー中で48時間、室温で静水透析を行い、隔膜外液(透析分屑)を集め、30℃恒温で水流ポンプを使用して、約3ccとなるまで減圧濃縮を行つた。この透析分屑溶液のpH値をイオン濃度試験紙で測定した所、pH8.8或はそれ以上の高値を示したので、2%HClでpH7.0に修正し、この溶液を Chamberland 型L3、(細菌濾過器)で濾過滅菌した。(温度による阻止力の変化を考慮して蒸気滅菌は使用しなかつた)。

2) 実験方法

濾過滅菌した透析分屑溶液を型の如く Kirchner 液で稀釈し、対照として蒸溜水を使用して、これ等の結核菌培養成績を比較した。

第2節 透析並に非透析分屑の蛋白反応

静水中で膿清を透析し、隔膜外液(透析分屑)について蛋白反応を検した所、(表15)の如く、隔膜外液には蛋白質及び Amino酸を含有しない事を確認した。

第3節 実験成績

膿清透析分屑の結核菌培養成績を見るに、対照に比し、明らかに発育が障害されている事が判明した。1例では第1試験管で結核菌の集落は全く証明されなかつたのに対し、対照蒸溜水では多数の蛇行型菌集落を認め、更に他の2例では元々膿清の阻止力が微弱であつた為か、第1試験管で極く僅かに菌集落を認めたが、対照と比較した場合、明らかに発育状態に差異のあることが認められた。(表16)

表 15

隔膜内溶液	蛋白反応	隔膜外溶液
+	Ninhydrin-R	—
+	Biuret-R	—
+	Xanthoprotein-R	—
+	Millon-R	—
±	Molisch-R	—

表16 膿清透析分屑の阻止力

患者名	処置	I	II	III	IV
乾氏	透析分屑	—	+	+	++
	対照	+	+	+	++
	膿清	—	—	—	+
加藤氏	透析分屑	±	+	++	++
	対照	+	+	++	++
	膿清	±	±	+	++
伴氏	透析分屑	±	+	++	++
	対照	+	++	++	++
	膿清	—	±	±	+

小括

本章に於いて遂に蛋白質、蛋白構成 Amino酸、或は遊離 Amino酸以外の膿清成分中に結核菌発育阻止作用が存在する事を確認し、而も之は半透膜を通過し得る程度の比較的分子量の小さい物質である事が判明した。

然しながら、透析前膿清と透析分屑の阻止力とを比較すると、後者の示す阻止力が前者に比し明らかに弱い、例えば透析前膿清では第3試験管まで阻止力を示していた場合でも、その透析分屑では第1試験管で発育を阻止するに過ぎない程度である。此の事に就いては静水中では透析を完了させる事が不可能であると言う事を考えれば(第5章、第3節)当然の成績かも知れない。然し、二種以上の阻止力が存在すると仮定し、その一部が隔膜を通過して隔膜外液に阻止力を証明したものか、或は実験操作中に自然に一部不活性化されたものかと言う問題については今後の研究に待ちたいと考える。

第7章 Ätherによる阻止力の抽出

(実験目的) 膿清中より結核菌発育阻止物質を抽出する目的で本実験を行つた。

第1節 実験材料並に実験方法

膿清10ccにÄther50ccを加え、分液漏斗で充分に振出を行い、静止後二層に分離するのを待つてÄther層のみを他器に移し、膿清層には更にÄther50ccを加え振出を行う。かくて3回抽出を行い抽出後のÄtherを集めて、約30°Cで減圧蒸溜し、その残渣に蒸溜水10ccを加え可及的充分に溶解させた。此の溶液に就いて阻止力を検すると共に蒸溜水を対照にとり菌培養も行った。

第2節 実験成績

従来通りの使用菌量 (0.5mg/cc 1滴) では、Äther可溶性分層の阻止力は殆んど証明されないもので、使用菌量を0.5mg/cc 1白金耳とした場合には、第1試験管に於て対照蒸溜水に比し、明らかに阻止力の存在する事を認めた。(表17)

表17 Äther 可溶分層の阻止力
(菌量 0.5mg/cc 1滴)

患者名	処 置	I	II	III	IV
伴	Äther 可溶分層	+	++	++	+++
	対 照	+	+	++	++

(菌量 0.5mg/cc 1白金耳)

患者名	処 置	I	II	III	IV
伴	Äther 可溶分層	-	+	+	++
	対 照	+	+	++	++

小括

阻止物質は脂溶性溶媒にも一部溶解するものと考えられるが、Ätherを抽出剤とした本実験では極めて少量しか移行しないものの如くである。

第8章 膿清抗菌力とストレプトマイシン抗菌力の比較

(実験目的)膿清の結核菌に対する発育阻止の最低濃度は60%~40%である事が判明したが、之をStreptomycin (以下S.M.)と比較した場合に何に相当するであろうか。

第1節 実験材料並に実験方法

Dihydrostreptomycin sulfate 1g を蒸溜水(但し4%NaOHでpH7.8に修正し、膿清のpH値に近づけた)で溶解し、10γ/cc, 1γ/cc, 0.1γ/cc, 0.01γ/ccの4種類の溶液を作製し、第1章、第1節で詳述した方法で結核菌培養実験を行つて膿清の阻止力と比較した。

第2節 実験成績

S. M. 10γ/cc 溶液では第1~第4試験管まで全然菌の発育は証明されず。0.1γ/cc, 0.01γ/cc 溶液では対照蒸溜水と全く同様な発育を認めた。然るに1γ/cc 溶液では第1試験管で菌集落を全く証明しないが、第2試験管に至り極僅かに弱い発育を示した。(膿清の場合は第2乃至第3試験管で発育を阻止していた。)(表18)

表18 Streptomycin の抗菌力

	I	II	III	IV
S.M.10γ/cc溶液	-	-	-	-
1γ/cc //	-	±	+	++
0.1γ/cc //	+	++	++	+++
0.01γ/cc //	+	++	++	+++

膿清の阻止力

	I	II	III	IV
松 沢	-	±	+	++
新 美	-	-	+	++

小括

膿清とS. M. の抗菌力を比較する場合、前者には組成、成分等の各種不明な複雑な因子が介入して来るので、厳密な意味では抗菌物質を純粹に抽出し得た後でなければ比較は出来ないのであるが、之は一応論外として結核菌に対する発育阻止力と云う点のみで比較して見た。先づ強毒人型結核菌 H37RV 株を用いたS.M. の結核菌発育阻止最低濃度は0.8γ/cc~0.6γ/ccでこの濃度はS.M.1γ/cc 溶液を80%~60%に稀釈したものである。次に膿清の抗菌力を見るに、之は60%~40%稀釈した濃度が発育阻止最低濃度である。然らば膿清の抗菌力は(勿論抗菌力に個人差があり一概には云えないが)発育阻止最低濃度から考えれば略々S.M. 1γ/cc に相当すると考えられる。そこで膿瘍腔内に之だけの抗菌力があつて、而も菌の増殖は停止しないのは如何なる理由によるものであろうか。之に就いては藤田の実験で、膿清は自家株菌に対しては発育阻止作用を示さないと云う興味深い成績がある。

第9章 膿清の枯草菌発育阻止力に就いての研究

(実験目的)第2章に於いて膿清が枯草菌の発育を阻止する事が判明したが、之は如何なる作用因子によるのであろうか。

第1節 膿清加熱による枯草菌発育阻止力の変化

1, 実験材料並に実験方法.

第2章ではペプトン寒天培地を使用したが生、本章に於てはS.M.濃度測定用培地 (Pepton 5g, 肉エキス5g, 寒天 20g, 水1l, pH7.6) を用い、被検液としては第4章で述べた様に非加熱膿清、56°30分加熱膿清、100°30分加熱凝水の3種類を作り、枯草菌加平板培地穿孔部に被検液を1〜2滴々下し、之を培養して阻止輪の有無により枯草菌発育阻止力を判定した。

2, 実験成績

S.M. 濃度測定用培地も Pepton 寒天培地と略々同様に非加熱膿清の場合には極軽度の発育阻止輪を証明した。(但し同時に Paper disc method も行つたがその場合には阻止輪は証明されなかつた) 56°30分加熱例では穿孔部周辺に於ては逆に旺盛な発育を認め、100°30分加熱例では全く枯草菌の発育は阻止されなかつた。

第2節 膿清透析による枯草菌発育阻止力の変化

1, 実験材料並に実験方法.

被検液は第5章、第1節の実験材料採取方法に準ずる。実験方法は前節に準じて行つた。

2, 実験成績

非透析分層(隔膜内溶液)では明らかに枯草菌の発育は阻止されるが、透析分層(隔膜外溶液)では阻止輪は証明されなかつた。

第3節、膿清のÄther可溶性分層が枯草菌の発育に及ぼす影響.

1. 実験材料並に実験成績

被検液は第7章、第1節に準ずる。実験方法は前節に準じて行つた。

2, 実験成績

Äther 可溶性分層では枯草菌の発育阻止は証明されないが、非可溶性分層では之を証明した。(表19)

小括

膿清の枯草菌発育阻止力の作用因子を究明するに、先づ56°30分加熱で既に不活性化されて阻止作用を証明しなくなる事は、その本態が非常に非耐熱性であつて、酵素作用、或は蛋白質の作用と考えられる。次に透析実験で阻止物質が隔膜を通過し得ない事から、分子量の大きい事が知られる。結局、脂溶性溶媒にも溶解しない事等を綜合すれば、比較的高分子量に属するもので、酵素、或は蛋白質にその本態を求めるのが妥当と考えられる。即ち膿清の結核菌の発育阻止に及ぼす作用因子とは趣を異にするものの如くである。

表19 膿清の枯草菌発育阻止力に就いて

1. 加熱による変化

	倉 沢	乾
非 加 熱	1.5mm	2mm
56° 30分 加熱	0	0
100° 30分 加熱	0	0

2. 透析による変化

	加 藤	倉 沢	丹 波
隔 膜 内 液	1mm	2mm	1mm
隔 膜 外 液	0	0	0

3. A"ther抽出による変化

	丹 波	西 村
A"ther非可溶	2mm	2mm
A"ther可 溶	0	0

第10章 総括並びに考按

結核症に対する化学療法 of 終局の目的は病巢中の結核菌を完全に死滅させる事である。近年ストレプトマイシン、パス、チビオン、ヒドラジッド等の優秀な抗結核剤が発見され、結核治療の劃期的進歩を來したが、之等薬剤を患者に長期間使用しても、その患者から結核菌を完全に撲滅し去る事は恐らく不可能に近からう。然るに病理学的、並に細菌学的の周知の事実として、全く治療を受けた事のない場合でも、或る一定の病巢に於ては菌が自然に消滅、或は発見されにくくなると云う事實がある。其の一定の病巢とは第一に寒性膿瘍中で、其の二は外部と交通のない乾酪組織中である。此の特定の病巢に於ける結核菌の検出率を見るに、寒性膿の場合には前述の如く塗抹染色 (Ziehl-Neelsen 染色) では抗酸性菌は殆んど証明困難な場合でも、培養によつて100%に近い陽性率を示している。又外部と交通のない肺乾酪病変部では染色陽性、培養陰性の場合が往々にして証明される。そこで、此の様な一見矛盾した事實について少しく文献的考察を試みてみたい。

先づ、寒性膿の菌検出率の問題については兎王 (1951) は従来の染色法の不備を指摘し、易染性型を染色するに摘した Ziehl-Heydenhein法 (植田氏法) を用いて93%に易染性型を証明した。且つ又膿汁中に易染性型と抗酸性型の連鎖を発見し、従つて流注膿内の易染性型は発育力を持つた結核菌であると述べた。

更に膿中に易染性型の多く存する理由として、流注膿瘍中に於ては抗酸性型が速かに崩壊する事実を指摘し、染色と培養との菌検出率の懸隔について解決の扉を開いた。近藤、山田両教授は之を膿瘍腔内の自浄作用と云つて重要視され、骨関節結核に対する病巣廓清術の手術理念の根拠とし、手術の目的はその自浄作用を人為的積極的に助長促進するにありとし、自然の経過にまかすれば、数年の長きにわたる大自然の営みを手術によつて僅か数時間の間に行わしめるにあると述べている。

次に閉鎖性肺病巣部の菌検出の問題については Joseph Hohn(1928, 1929), M. van Rems-dijk(1930) 桂(昭14), Patrick (Collard & Kevin Anderson (1953) 等は染色陽性、培養陰性の事実を指摘している。その成因については諸家の論説が報告されているが、未だ確証はない様である。R. J. Dubos(1953)は壊死組織殊に乾酪壊死を来した部分には、化学構造の不明の而も drug-inhibitor として働くと思われる組織成分の中間破壊物質が存在することを述べている。然も乾酪壊死部の反応は屢々酸性で、Streptomycin に対しては拮抗的に働く。且つ又炎症性の細胞が嫌気性代謝を行い、壊死の進行中に出て来る脂肪分解酵素の作用の為に病巣内及び、その周囲に有機酸が蓄積される。而してその Na 塩の生理的濃度中に結核菌を入れると、菌は通常の培地では発育出来なくなり、且つ又感染性を失う事を認めたと述べている。又本邦に於ても竹内(1941)、伊藤、岡崎(1940)等は乾酪壊死組織、或はその抽出物中に抗結核菌物質の存在する事を認めている。

又上記の問題とは少し意味を異にするが、各種の動物の組織成分の結核菌に対する抗菌力が最近盛んに論及される様になった。即ち J. G. Hirsch(1953) は正常状態に於て存在する Amines, Spermine, Spermidin が之等組織内の酵素 Spermine oxidase により変化を受けると結核菌の発育を阻止すること、即ち之は牛、羊の血清やモルモットの腎臓の抽出液に見出されるが、人、モルモット、兎の血清には Spermine activator は証明されないと述べている。又 R. J. Dubos, J. G. Hirsch(1954) は子牛の thymus の水溶液から分離された Thymus peptid は $300\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に於て H37RV 株の発育を阻止すると述べ、更に Robert A. Patnode(1954) は正常の兎の肺臓抽出液から脂肪酸を分離したものが、強力な抗菌作用のある事を証明している。又その他に血液、唾液の結核菌発

育阻止作用も報告されている。

さて、寒性膿の結核菌発育阻止物質は Dubos の述べる様な病巣内の有機酸であろうか、或は Hirsch の云う Spermine Oxidase 作用物質であろうか、又 Dubos, Hirsch Thymus peptid 様のものであろうか或は又全然未知の物質でもであろうか。

そこで先づ、寒性膿の成生機転により考えて見るに、膿汁と血液、体液、リンパ液等とは本質的に何等かの貌に於て連絡があるものを考えられるので、その各々について結核菌に対する発育阻止力を比較検討してみた。然るに血清の示した菌発育阻止力は一般健康人の保有すると思われる一種の防禦反応の限界内のものと考えるならば、結核膿の膿清には更に強い抗菌力を示した事実は、その中に何か特殊な抗菌性物質の存在を意味するものと考えた。そこで結核菌の発育阻止力が一種類であるか或は多数の作用の相加、相乗により表現されているものであるかはさておき、先づ抗菌作用を示す主要因子について追求することにした。

次に膿清の pH 値に就てであるが、永井、久保、鈴木、石橋、佐藤等によれば、之は大体アルカリ性移動を示しているが、一度混合感染を来した場合は酸性移動となり、同時に結核菌培養集落数は著明に増加することが知られている。此の事実より見ると膿清の pH 値は当然結核菌の発育を障害するものと考えられる。然るに第1章第2節により、膿清中には pH 値よりも更に強い阻止因子の存在する事をうかがい知る事が出来た。

そこで阻止物質の化学的性質を検索しようと試み、先づ膿清を 60°C 30分加熱したが、阻止力には特別な影響は認めなかつたので、作用因子としては酵素作用は一応除外として、之以外の化学作用にその本態を求めようとした。次に膿清を 100°C 30分加熱し、Albumin Globulin 等の凝固性蛋白質の大部分を除去した場合にその阻止力は減弱し、更に膿清を透析し、 γ -Globulin の沈澱物を除外した場合の阻止力も消失していたので膿清中の結核菌発育阻止力の主要因子は、一見その中に含有される γ -Globulin かと考えられた。然し現在までの成績を良く吟味するに、 γ -Globulin が阻止力の本態であると考えた場合、膿清中に特に多量の抗体が証明されても然るべきであるが、第3章の成績の如く高単位の凝集値は証明されない事や、更に第5章、第4節に詳述した成績を照合すれば、膿清の阻止力としては γ -Globulin は勿論否定出来ないけれども、恐らく主要因子としての価値は認められないであろうと考えた。

最後に膿清隔膜外液（透析分層）に結核菌発育阻止力の存在する事が判明したので、結局、阻止力の主要因子は隔膜を通過し透析分層に移行し得るものであつて、分子量の比較的小さい物質であらうと考えられる。然る時は第4章の60°30分加熱により膿清蛋白質は既に非働化されていても阻止力には変化を見ないと云う事実もうなずけるし、又100°30分で阻止力が減弱した事についても、この低分子量の阻止物質が凝固性蛋白質の沈澱物中に混入除外された為と考えることも出来る。

いづれにしても、半透膜を通過し、比較的純粋化された結核菌発育阻止物質を求め得た事は、今後の研究に一つの道しるべを建てたことにならうと思われる。

一方、児玉、藤田の研究により膿清は人型結核菌F株の発育を阻止する事を知つたが、著者はH37RV株に対しても同様の作用を有する事を認め、更に之は枯草菌に対しても、平板寒天穿孔法により阻止力を有する事を証明した。然し種々の実験成績から結核菌に対する阻止力とは全く異り、此の場合は酵素作用乃至は蛋白質にその本態を求めるべきであらうと云う見解に達した。

結 論

人型結核菌H37RV株を使用し、結核菌発育初期集落を検鏡する方法を用いて、寒性膿中の結核菌発育阻止力の作用因子を究明しようと試み、次の如き成績を得た。

1) 生体内に於て、寒性膿と何等かの貌で関連性があると考えられる血清、脊髄液について、結核菌発育阻止力を比較したところ、膿清の阻止力が他に比して特に強い事が判明した

2) 膿清の結核症に対する抗体量を知らうとしてMiddlebrook-Dubos氏赤血球凝集反応を試みたが、特に多量の抗体は証明し得なかつた。

3) 膿清中の結核菌発育阻止物質の化学的性質を検討する為、先づ膿清を60°30分加熱したが阻止力には何等の影響をも及ぼさなかつた。次に100°30分加熱に際しては、阻止力は著明に減弱した。

4) 阻止物質の分子量を決定する為に膿清を透析した所、隔膜内液中には既に阻止力は証明出来なかつたので、更に隔膜外液を容量補正の上で検した所、この分層に阻止力を証明したので、阻止物質は半透膜を通過し得るものであることを知つた。

5) 以上の事実より結核菌発育阻止作用の作用因子としては、酵素、蛋白、免疫物質等の高分子化合物は

一応考慮外に置き、その本態は分子量の比較的小さい物質であらうとの見解に到達した。

6) 又膿清には結核菌のほか枯草菌に対しても発育を阻止する因子が確認されたが、之は結核菌に対する因子とは異り、蛋白、或は酵素作用に属するものであらうと云うことが知られた。

稿を終るに臨み御懇篤なる御指導、御校閲を賜つた恩師近藤鋭矢教授に深謝し、終始御指導、御鞭撻を載いた徳島大学山田憲吾教授並びに御指導を載いた京都大学結核研究所植田三郎教授、上坂一郎助教授に衷心より感謝致します。

主 要 文 献

- 1) R.J. Dubos & B.D. Davis: Factors effecting the growth of tubercle bacilli in liquid media, J. Exp. Med, **83**, 409, 1946.
- 2) R.J. Dubos; The effect of sphingomyelin on the growth of tubercle bacilli, J. Exp. Med, **88**, 73, 1948.
- 3) R. J. Dubos; Viability of tubercle bacilli in vivo with and without chemotherapy, Amer. Rev. Tbc., **67**, 874, 1953.
- 4) J.G. Hirsch; The antimycobacterial activity of various amines related to spermin chemical structure, J. Exp. Med, **97**, 323, 1953.
- 5) J.G. Hirsch; The essential participation of enzyme in the inhibition of growth bacilli by spermine, J. Exp. Med. **97**, 327, 1953.
- 6) J. G. Hirsch; Spermin oxidase; an amin oxidase with specificity for spermine and spermidine, J. Exp Med, **97**, 345, 1953.
- 7) R. J. Dubos; Effect of ketone bodies and other metabolites on the survival and multiplication of staphylococci and tubercle bacilli, J. Exp. Med, **98**, 145, 1953.
- 8) R. J. Dubos & J. G. Hirsch; The antimycobacterial activity of a peptide preparation derived from calf thymus, J. Exp. Med, **99**, 55, 1954.
- 9) J. G. Hirsch; Mechanism involved in the antimycobacterial activity of certain basic peptides, J. Exp. Med, **99**, 79, 1954.
- 10) J.G. Hirsch & R. J. Dubos; Chemical studies on a basic peptide preparation derived from calf thymus, J. Exp Med, **99**, 65, 1954.
- 11) Robert A. Patnode; Tissue fatty acids and their possible relationship to the natural resistance of rabbits to infection with human-type tubercle bacilli, Amer. Rev. Tbc. **69**, 710, 1954.
- 12) 柳; 膿球の形態的分類, 日外会誌 **23**, 473, 大11.
- 13) 伊藤; 結核免疫動物血液の結核菌増殖阻止作用に関する知見, 結核, **8**, 290, 昭5.
- 14) 緒方; 健康成人血液の人型結核菌増殖阻止作用, 結核, **10**, 117, 昭7.
- 15) 浜野; 結核病原物質の結核菌毒素に対する吸着能に就て; 長崎医会誌, **15**, 408, 昭12.

16) 崎元；結核病巣ニ於ケル結核菌崩壊，長崎医学会誌，**16**，下，2254 昭13. 17) 上坂；友田；日本医学及健康保険，**33**，17，昭17. 18) 伊藤；結核性乾酪物質の生物学的意義について，化学療法研究所彙報，**1**，53，60，昭22. 19) 岡崎；結核性乾酪化物質濾液の実験的結核症に及ぼす治効作用について化学療法研究所彙報，**1**，145，昭22. 20) 大平；唾液の結核菌増殖阻止作用に関する研究，結核研究**4**，1,3，昭23. 21) 上坂，大岩；ペニシリンとブドウ球菌，抗菌物質研究，**2**，419，昭24. 22) 佐藤；混合感染による結核菌の消長，外科，**11**，499，昭24. 23) 児玉；骨関節結核症における結核菌の生態，整形外科，**2**，16 昭26. 24) 児玉；骨関節結核症における結核菌の研究補遺，整形外科，**2**，90，昭26. 25) 近藤，山田；骨関節結核の観血的療法，日整会誌，**25**，241，昭26. 26) 藤田；寒性膿の結核菌発育阻止作用について，京大結研年報，**3**，昭27. 27) 植田，上坂；結核治療剤の効果測定法なかなずく予備的な試験管内選別法のあり方について，日臨結核，**11**，122，昭27. 28) 笠井；関節結核におけ

る膿汁の化学的研究，外科宝函，**21**，58，昭27. 29) 鈴木；膿汁検査とその臨床的意義，日整会誌，**26**，1，昭27. 30) 松橋；Middlebrook. Dubos Hemagglutination, 医学のあゆみ，**15**，167，昭28. 31) 玉置；冷性膿について，日臨結核，**13**，551，昭29. 32) 近藤茂；骨関節結核の病巣内ストマイ濃度に就いて，京大結研紀要**2**，171，昭29. 33) 小川；細菌学的に見た結核症に対する化学療法の限界，最近医学，**9**，109，昭29. 34) 植田；病巣中結核菌の生死の問題に関連して，日臨結核，**14**，123，昭30. 35) 緒方，近藤；化学実験操作法，南江堂昭17. 36) 戸田；戸田新細菌学，南山堂，昭19. 37) 市原；新医化学提綱，日本医書，昭24. 38) 植田；結核菌検査の実際，南江堂，昭25. 39) 植田；結核菌の研究，南江堂，昭26. 40) 山田；結核新論，（医学春秋第Ⅱ集）昭27. 41) 片山；結核の化学療法；東西医学，昭27. 42) 杉本研究室；電気泳動技術，東京慈恵大編. 43) 永島，赤堀；蛋白質化学1及2，共立出版，昭29.

§ 膿清加熱による結核菌発育阻止力の変化 (第4章)

Fig.1~Fig.4 は各々第2試験管(膿清60%+キルヒナ液40%)の濃度に於ける結核菌発育状態を示す(8×10倍)

Fig.1 ; 非加熱例で80倍検鏡では結核菌のコロニーは認めず阻止力の存在を証明する.

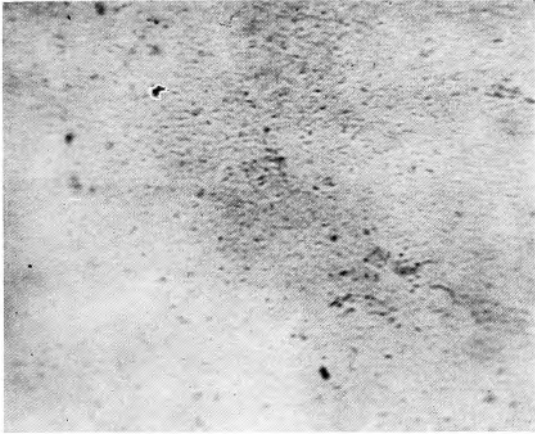


Fig.2 ; 60度30分加熱膿清でFig1同様菌の発育は証明しない.

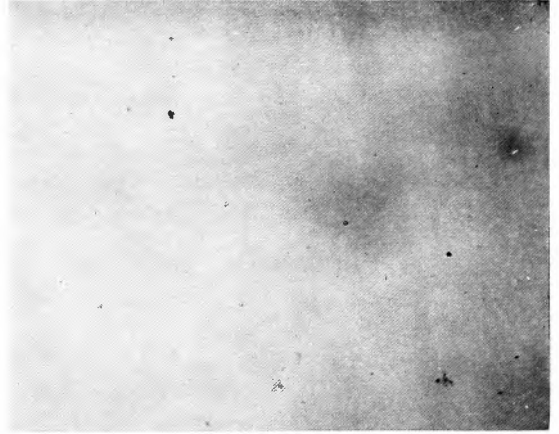


Fig.3 ; 100度30分加熱による凝水では結核菌は軽度の蛇行型発育を示す.



Fig.4 ; 対照蒸溜水では充分に発育する.



§ 膿清透析による結核菌発育阻止力の変化（第5章，第1節）

Fig. 5～Fig. 7 は各々第2 試験管の結核菌発育状態を示す（8×10倍）

Fig. 5；透析前膿清では結核菌の発育を認めない。

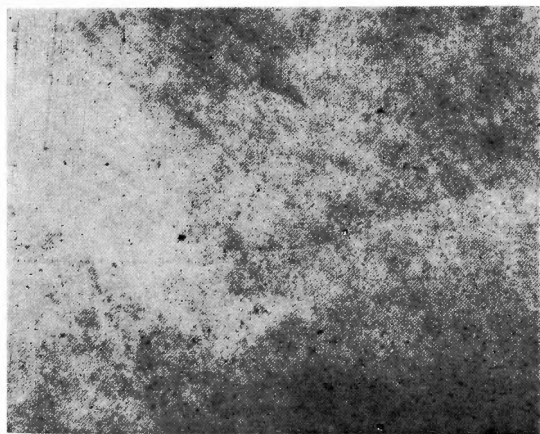


Fig. 6；透析後膿清では結核菌は旺盛な発育を示し阻止力は完全に消失したと考えられる。

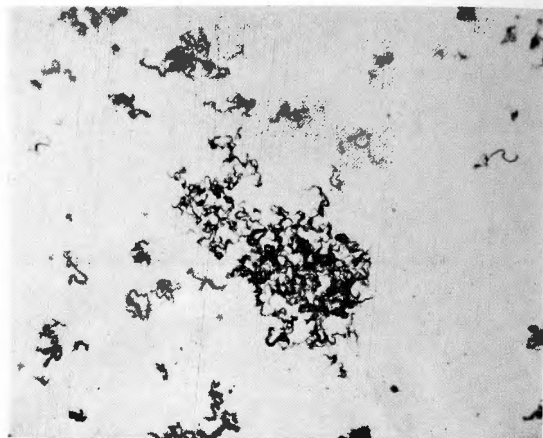
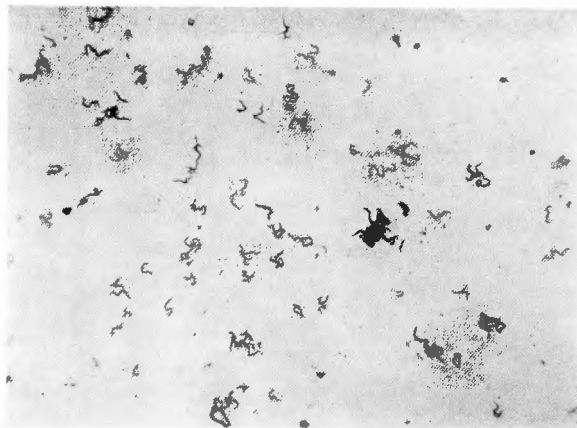


Fig. 7；対照蒸溜水の菌発育度を示す。



§ 電気泳動法による膿清透析前後の蛋白質組成の変化 (第5章, 第2節)

Fig8; 透析前膿清

蛋白濃度2.7%, 電流7.5mAmp, 145V.
泳動時間58分, スリット傾斜角 60°

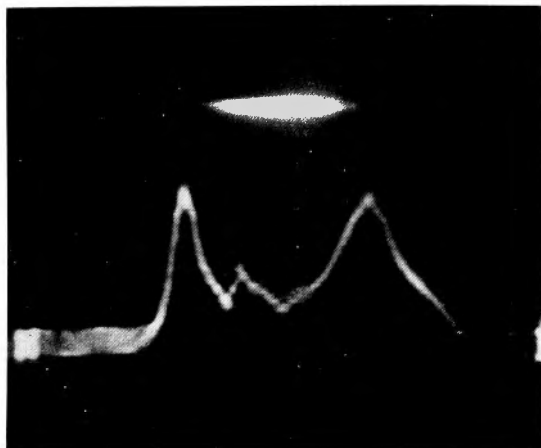
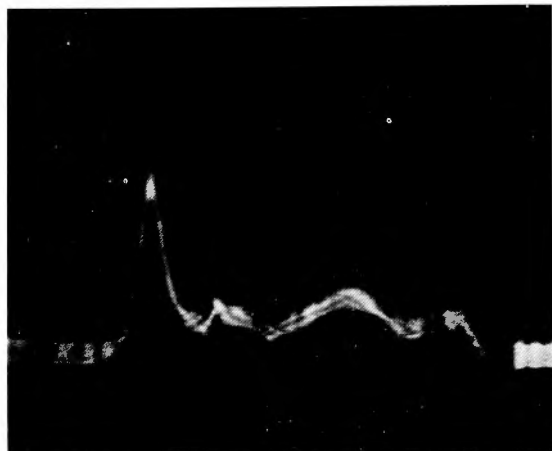


Fig9; 透析後膿清

蛋白濃度2.5%, 電流7.5mAmp, 145V.
泳動時間58分, スリット傾斜角 50°



§ 膿清透析分層の阻止力 (第6章)

Fig10, 11 は各々第1試験管 (被検液80% + キルヒナ液20%) の結核菌発育状態を示す (8×10倍)

Fig10; 透析分層 (隔膜外液) では結核菌の
コロニーを証明しない。



Fig11; 対照蒸溜水の菌発育度を示す。



§ 膿清の枯草菌発育阻止力に就いての研究 (第9章)

Fig. 12; 膿清加熱による枯草菌発育阻止力の変化を示す。非加熱例にのみ阻止輪を認める。



Fig. 13; 非透析分層 (隔膜内液) に阻止輪を認める。

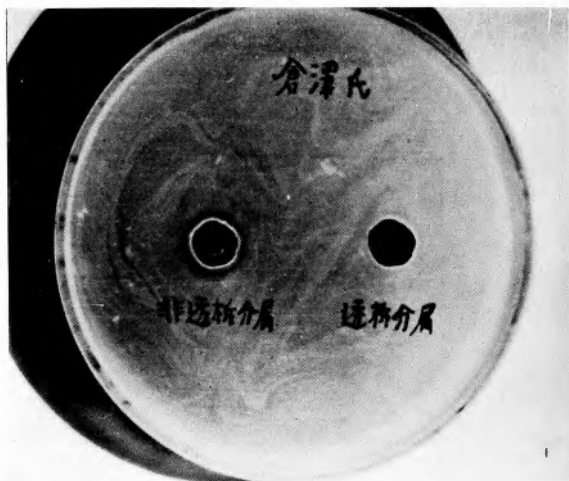


Fig. 14; エーテル非可溶性分層に阻止輪を認める。

