

結核菌の Silicone-Coated Slide Culture Method (SSC)

〔第2篇〕 Silicone-Coated Slide への結核菌の吸着 及び SSC に於ける結核菌の発育

京都大学結核研究所化学療法部（主任 教授 内藤益一）

副 手 東 向 一 郎

（本論文の要旨は昭和31年5月第31回日本結核病学会総会に於て発表した。）

〔内 容 抄 録〕

本篇の実験Ⅰでは Silicone-Coated Slide を結核菌液中に浸漬した場合、その浸漬時間及び菌液濃度が、菌の Silicone-Coated Slide への吸着に如何なる影響をあたえるかを検討した。その結果浸漬時間の長短による著しい差は見られなかったが、菌液濃度と吸着菌数は略々比例することが判明した。

実験Ⅱでは Silicone-Coated Slide Culture Method に於ける証明可能な最小接種菌量の限界、及び菌の発育を認めるのに要する培養日数を、固型培地によるそれ等と比較しつつ検討した所、固型培地を使用した場合に比し、最小接種菌量の点に於ては、勝るとも劣らぬ成績を得、又菌の発育確認所要日数の点では、顕微鏡的には $\frac{1}{3}$ ～ $\frac{1}{6}$ 、肉眼的にも $\frac{1}{2}$ ～ $\frac{1}{3}$ に短縮可能であることが証明された。一方接種菌量と発生した Colony 数が略々比例していたことから、Colony Count を液体培地中で短期間内に行うことの可能性が考えられた。

第1章 緒 論

著者は結核菌が油水系界面に吸着される現象を利用し、表面に Silicone の強靱な撥水性薄膜を形成させた Slide、即ち Silicone-Coated Slide (SS) を使用する Slide Culture Method の改良法、即ち Silicone-Coated Slide Culture Method (SSC) を考案し、第1篇¹⁾に於て SS の作成法について記載するとともに、作成条件を異にする数種の SS について、結核菌の吸着

数、発育度を検討した結果、各 SS 間に著差を認めなかったため、著者の採用した範囲内の条件によつて作成した各 SS はいずれも本法への使用に支障を来たさないであろうこと、及び1週間以内に結核菌の発育を、顕微鏡的には勿論、肉眼的にも認め得たことを報告した。

本篇においては SS を結核菌液に浸漬した場合、その菌液濃度、或は浸漬時間が SS への菌吸着に如何なる影響を及ぼすか、SSC により証明し得る最小菌量の限界はどうか、又菌の発育を証明するに要する時間はどうか等について検討を試みた。

第2章 実験材料

Silicone-Coated Slide (SS) : 第1篇で述べたものの中 Silicone-四塩化炭素溶液に浸漬後、300°C で1時間焼付処理を行つたもの。

培地 : Bovine-Albumin 液“栄研”を10%に加えた Kirchner 液体培地 (KAM と略称)。

菌及び菌液 : KAM で10日間培養した人型結核菌、H37Rv 株の菌膜をガラス玉入コルペン中で振盪磨砕し、生理的食塩水を加えて菌浮游液となし、試験管に移注して室温に約1時間静置し、大菌塊を可及的沈下せしめた後、その上清を生理的食塩水で稀釈し、光電比色計を用いて湿菌量 1 mg/cc なる如く調整した。これより更に生理的食塩水により通減10倍稀釈を行い、1 cc 中の湿菌量 10^0 より 10^{-9} mg までの10段階にわたる各種濃度の菌懸濁液を作成した。

第3章 実験 I (SS の菌液中浸漬時間と菌吸着との関係の検討)

実験方法：

第2章で述べた菌液の中、1.0及び0.1mg/ccの濃度のものを夫々2ccずつ小試験管(12×110mm)に分注し、SSを各管に1枚ずつ投入、1秒、1分、5分、1時間、6時間、及び12時間後に各菌液濃度について1枚ずつSSを取り出し、10% Formalin 液中に浸漬、固定、Ziehl-Neelsen 法による染色(後染色は省略)を行つて、SS 下端より約5mm、10mm、15mm、20mm、及び25mmの箇所を各々20視野ずつ10×90で鏡検して、吸着菌の数及び性状に就て検討した。浸漬時間10分以上のものは、その間37°CのIncubator中に静置した。

対照としてSilicone処理を行わないSlideに就いても同様に検討し、又普通のSlide上に当実験に用いた菌液を滴下、鏡検して菌塊の性状をSSへの吸着菌のそれと比較検討した。

実験成績：

第1表 Silicone-Coated Slide の菌液中浸漬時間と吸着菌数(100視野中)(10×90)

菌液濃度 (mg/cc)	浸漬 時間	1菌塊中の菌概数			合計 (A+B+C) D	A/D
		1~10	11~50	>51		
1.0	1秒	1,142	292	37	1,471	77.7
	1分	1,403	348	23	1,894	74.1
	5分	1,431	196	18	1,645	86.9
	1時間	1,753	270	18	2,041	85.8
	6時間	984	147	12	1,143	86.1
	12時間	1,327	166	16	1,509	87.9
0.1	1秒	87	28	3	118	73.7
	1分	119	56	4	179	66.4
	5分	182	21	0	203	89.6
	1時間	141	25	6	172	81.9
	6時間	210	45	2	257	81.7
	12時間	129	14	0	143	90.2

第1表に示す如く浸漬時間の最短(1秒)のものと最長(12時間)のものとの間にも吸着菌数に大差は認められなかったが、浸漬時間が長くなるにつれて吸着されている単個菌乃至菌数1~10よりなる小菌塊と、菌数11以上の大菌塊

との割合は、後者の方が多少減少する傾向が認められた。尤もSSに吸着した菌塊は該菌液を普通のSlide上に滴下、鏡検した場合のそれに比して、はるかに小さく、大半は単個菌乃至小菌塊状で菌数51以上より成る大菌塊は稀にしか発見出来なかつた。

又菌はSS上に概ね均等に分散吸着され、且つ菌液濃度と吸着菌数とは略々比例していた。

Silicone処理を行わないSlideを用いた対照では菌の吸着現象は認められなかった。

第4章 実験 II (SSC に於ける接種菌量及び培養日数と菌発育との関係の検討)

実験方法：

菌接種：第2章で述べた湿菌量 $10^0 \sim 10^{-9}$ mg/ccにわたる各濃度の菌液を2ccずつ夫々18ccのKAMに接種した。一方 KH_2PO_4 (岡・片倉)固型培地にも各濃度の菌液を0.2ccずつ接種し対照とした。

培養：上記の如く種々の濃度に菌を接種したKAMを夫々2ccずつ8本の小試験管(12×110mm)に分注し(培地1cc中の菌量は $10^{-1} \sim 10^{-10}$ mgであるから、1管即ち2cc中の菌量は $2 \times 10^{-1} \sim 2 \times 10^{-10}$ mg)、その各々に滅菌したSSを1枚ずつ投入し、37°Cで培養した。

判定：培養開始後1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 及び30日目の8回に試験管壁を通して肉眼的にSSを観察した後、各種菌濃度に就て1枚ずつSSを取り出し、10% Formalin 液に浸漬、固定、Ziehl-Neelsen 法による染色を施して、10×10で鏡検した。

同じく37°Cで培養した固型培地は5日目毎にColony発生の有無を観察した。

尚対照としてSilicone-Coatingを行わないSlideを、1ccあたり 10^{-1} mgなる如く菌を接種したKAMに投入、培養してSSにおけると同様に観察した。

実験成績：

第2表に示す如くSSCに於ては弱拡大で鏡検することにより、培地中菌濃度 10^{-7} mg/ccまでは培養5日間以内に、 10^{-9} mg/ccでは10日間以

第2表 接種菌量と Silicone-Coated Slide 上の菌発育状態

接種菌量 (mg/cc)	5 日 間 培 養			10 日 間 培 養		
	肉眼的 所 見	鏡 検 所 見 (10×10)		肉眼的 所 見	鏡 検 所 見 (10×10)	
		マイク コロニー数/視野	発 育 状 態		マイク コロニー数/視野	発 育 状 態
10 ⁻¹	卅	>100/ 1	卅	卅	>100/ 1	卅
10 ⁻²	卅	10~100/ 1	卅	卅	10~100/ 1	卅
10 ⁻³	+	1~ 10/ 1	卅	卅	10~100/ 1	卅
10 ⁻⁴	±	1~ 10/ 1	+	卅	1~ 10/ 1	卅
10 ⁻⁵	—	1/1~10	+	卅	1~ 10/ 1	卅
10 ⁻⁶	—	1/1~10	+	卅	1~ 10/ 1	卅
10 ⁻⁷	—	1/100<	+	+	1/ 1~ 10	卅
10 ⁻⁸	—	0/100<	—	±	1/ 10~100	+
10 ⁻⁹	—	0/100<	—	—	1/100<	+
10 ⁻¹⁰	—	0/100<	—	—	0/100<	—
10 ⁻¹	Silicone処理を行わない Slide 使用			—	1/100<	

肉眼的所見

卅 : Colony 数100以上
 卅 : Colony 数10~100
 + : Colony 数10以下
 — : Colony を認めない

鏡 検 所 見

卅 : 主として径 50 micron 以上の Colony よりなる
 卅 : 主として径 10~100 micron の Colony よりなる
 + : 主として径 10 micron 以下の Colony よりなる
 — : Colony を認めない

内に菌の発育を認め得たし、又肉眼的にも 10⁻³ mg/cc までは 5 日以内に、10⁻⁴~10⁻⁷mg/cc は 10 日以内に Slide 表面に点状乃至粟粒大の白色 Colony の形成されるのを認めることが出来た。

対照の Silicone 処理を行わない Slide では高濃度 (10⁻¹mg/cc) に菌を接種した培地中に浸漬培養したにもかかわらず、偶発的に Slide 面に附着していたものと思われる 1~2 の Microcolony を認め得たに過ぎなかつた。

第3表には SSC により菌の発育を確認する

第3表 菌の発育の確認に要する日数

接種菌量 (mg)	Silicone-Coated Slide Culture		岡・片倉培地
	顕 微 鏡 (10×10)	肉 眼	
2×10 ⁻¹	2日 (1/5)	5日 (1/2)	10日 (1)
2×10 ⁻²	3日 (1/3)	5日 (1/2)	10日 (1)
2×10 ⁻³	3日 (1/5)	5日 (1/3)	15日 (1)
2×10 ⁻⁴	5日 (1/4)	7日 (1/3)	20日 (1)
2×10 ⁻⁵	5日 (1/4)	7日 (1/3)	20日 (1)
2×10 ⁻⁶	5日 (1/6)	10日 (1/3)	30日 (1)
2×10 ⁻⁷	5日 (1/6)	10日 (1/3)	30日 (1)
2×10 ⁻⁸	7日 (1/6)	15日 (1/3)	40日 (1)
2×10 ⁻⁹	7日	(—)	(—)
2×10 ⁻¹⁰	(—)	(—)	(—)

() : 各判定法に於ける菌の発育確認に要する日数の割合

に要した日数を、岡・片倉培地によつたものと比較しつつ示した。即ち接種菌量により差はあるが、SSCによれば、岡・片倉培地による場合に比し、同一接種菌量について、肉眼的には $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ 、顕微鏡 (10×10) を使用すれば $\frac{1}{3}$ ~ $\frac{1}{6}$ の日数で菌の発育を確認し得たし、又接種菌量が 2×10⁻⁹mg では SSC により 7 日以内に菌の発育を認め得たにもかかわらず、岡・片倉培地では 40 日以上培養を続けても Colony の形成を見なかつた。

第5章 考 按

結核菌の研究を行うにあつて大きな障碍の 1 つはその発育の緩慢さにあるが、SSC によれば上述の実験成績に見られる如く結核菌の発育を証明するに要する期間を非常に短縮出来る。然しこれは従来の Slide Culture Method, 或は其の他の迅速法によつても既に可能であつた事柄である。本法の最も著しい特徴は実に結核菌が SS 表面に吸着されるという点にあり、この現象が従来の Slide Culture Method の最大の難点、即ち菌の Slide からの脱落、及び操作の繁雑等という点を一挙に解決する可能性をもたらししたのである。然し培養の目的によつては判

定の正確を期すために **Slide Culture Method** の今1つの重要な条件として、**Slide** 上の結核菌が単個菌乃至それに近い状態であることが望ましい。この点に関しては **Benzin** により結核菌の所謂 **Cord-factor** を除いて単個菌化せんとする辻・山本²⁾ の業績がある他、最近では **No-ufflard and Berteaux**³⁾ の報告がある。

SSC に於ては **SS** に吸着される菌塊の大きさは菌液側の条件に著しく左右されるであろうことは想像に難くないが、兎に角本篇実験Ⅰに於て、**SS** に吸着される菌塊は、該菌液中に懸濁する菌塊の大きさの割合から見ると、はるかに小さいものから成つていることが、該菌液を普通の **Slide** 上に塗抹、鏡検して、同一菌液中に浸漬した **SS** と比較することにより明らかに認められたのである。

第1篇¹⁾ の実験に於ては **SS** を一旦結核菌の生理的食塩水浮游液中に浸漬した後、液体培地中に移して培養したのであるが、本篇の実験Ⅱでは予かじめ種々の濃度に菌を接種した **KAM** 中に **SS** を投入し、そのまま培養して接種菌量及び培養日数と **SS** 上の菌発育との関係を検討した。実験Ⅰに於て、吸着菌数は菌液濃度に略比例していたが、本実験に於ても、**SS** 上に発生した **Colony** 数は肉眼的にも、顕微鏡的にも略々接種菌量に比例していることが認められた。この事実は従来固型培地を使用して **Colony Count** により行われて来た生菌数の検討を液体培地を使用しても行うことが可能であることを示唆するものであり、然も固型培地による場合に比し、はるかに短期間の中に判定を行ひ得ることが期待される。

SS 上の **Microcolony** は培養初期には **Cord** を形成し、典型的な蛇状発育を示して7日以内に肉眼的にも認め得る白点状の **Colony** となるが、10日以上培養すると **Colony** の中央部は円型に近い塊状の鏡検所見を呈するようになって来る。これは最初 **SS** 表面に沿つて平面的に発育した **Colony** が一定度以上に達すると、培地中に向つて、即ち **Slide** 面に直角の方向に立体的な発育を開始するためではないかと思われる。又この時期に至り **Slide** を側方から観察す

ると、肉眼的にも **Colony** が **Slide** 表面から培地中に突出した形状をなしているのが見られる。このように培養10日目頃からは **Colony** は横には余り大きくならないので、それ以後は肉眼的には **Colony** が殆んど発育を停止したような印象を受けるのであって、**SS** 上の **Colony** は粟粒大以上になることは殆んどない。**Colony** がこのように小さいことは **SSC** により肉眼的に **Colon Count** を行う場合に、固型培地による場合に比して、やや不便が感じられないでもないが、各 **Colony** が相互に融合して **Count** を不正確なものにすることがない点ではすぐれているとも云える。この **Colony** の培養液中に突出した部分は或る程度以上に達すると、その部分にかかる重力、或は培養液の動揺等により分離脱落する可能性もあるようであるが、培養10日以内には **SS** を鏡検しても、その表面に沿つて広がつた **Cord** の一部が分離逸脱したと思われるような像は全然発見出来なかつた。

Colony の分布状態に就て見ると **SS** 上に略々均等に発生していたが、培養液面直下にあつた部分では、その発育が他の部分におけるより稍々旺盛である。これは酸素供給の良否が主として関係するのではないかと考えられる。又固型培地等に於ても認められる現象であるが、**SSC** に於ても接種菌量の多い管では、少い管に比し、**Colony** の数が多いのみならず、その発育の程度も旺盛である。

結核菌を接種した培地に **SS** を浸漬して長期間培養すると **SS** 上に白色の **Colony** を生ずるばかりでなく、同時に培地中にも菌の発育を認め、殊に接種菌量の多い管では最後には液面に菌膜を生じてくる。これは接種された菌の一部で **SS** に吸着されずに液中に残存するもの、及び先述の如く一程度以上液中に発育突出した **Colony** の一部が遊離したものとの増殖によるものと思われる。

SSC を長期間行つていると培地中の塩の附着等により **SS** 表面の撥水性の低下が見られる(洗滌により回復する)⁴⁾ が、これが最初平面的であつた **SS** 上の **Colony** の発育が一定期間

以後立体的になること、並びに SS に吸着されずに液中に浮游を続ける菌のあること等の原因の1つではないかとも考えられる。然し一方濃厚な菌液中に浸漬した SS が撥水性を充分残している場合でも、液中には尚無数の菌が残存浮游している場合もある等の矛盾もあり、之等菌の SS への吸着の機序に関しては今尚充分明らかではない。

従来 Slide Culture Method の大きな難点の1つは複雑な操作に伴う高い雑菌混入率にあったが、SSC に於ては著者が現在迄に数百の試験管を用いて行つた種々の実験に於て殆んど雑菌の混入を見ない。これは主として本法に要する手技が非常に簡単なためであろうと思われる。

以上の如く SS を使用することにより、従来の Slide Culture Method の種々の短所を除き、極めて簡単な手技で、顕微鏡的に、或は肉眼的にさえ短期間に菌の発育を証明し得るばかりでなく、液体培地を使用しての Colony Count も行い得る可能性が示されたのであつて、本法は結核菌の種々な研究に対して極めて有用な手段たり得るのではないかと推定される。

第6章 結 論

(1) SS を菌液中に浸漬した場合、吸着する菌数は該菌液濃度に略々比例していたが、SS の浸漬時間には大して影響されなかつた。

(2) SS に吸着した菌塊は該菌液を Slide 上に塗抹、鏡検した場合のそれに比し、はるかに小さいものから成つていた。

(3) 吸着された菌は SS 表面に略々均等に分布していた。

(4) 結核菌を接種した培地中に SS を投入、培養した所、接種菌量によつて顕微鏡的には2～7日、肉眼的には5～15日で菌の発育を証明出来たが、この場合岡・片倉培地では10～40日を要した。又本実験においては、岡・片倉培地では接種菌量 $2 \times 10^{-8} \text{mg}$ までしか菌の発育を証明出来なかつたが、SSC では顕微鏡的には $2 \times 10^{-9} \text{mg}$ (10^{-9}mg/cc の含有培地) まで証明し得た。

(5) SS 上の結核菌は最初は SS 表面に沿つて平面的に典型的な蛇状発育を営むが、培養10日目前後からは培養液中に突出する如く立体的な発育を開始するらしい。この液中に突出した部分は一程度以上に達すると先端が分離脱落することもあるようであるが、培養10日以内の SS では菌の脱落した形跡は見られない。

(6) 培地中の結核菌の全てが SS に吸着されるわけではないが、接種菌量と発生した Colony 数とは略々比例して居り、又その分布状態は大体均等であつて、液体培地による Colony Count の可能性を示唆している。

(7) SSC に要する手技は簡単であり、従つて雑菌混入率は非常に低い。

(終りに臨み、当研究室津久間博士の御援助に深謝し、Silicone に関し種々御教示を頂いた姫路工業大学教授豊田実博士及び京都大学工学部電子工学科谷口一郎学士に対し感謝の意を表します)。

文 献

- 1) 東向一郎：京大結研紀要，7，461(1959)
- 2) 山本寿：京大結研紀要，3，42(1954)
- 3) Noufflard, H., and Berteaux, S. : Am. Rev. Tuberc., 72, 330 (1955)
- 4) Rochow, E.G. (信越化学中央研究所訳)：“シリコンの化学” p. 129, 丸善株式会社 (1955)