

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

〔第1篇〕 Silicone-Coated Slide の作成法及び作成条件が結核菌の吸着・発育に及ぼす影響の検討

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

（受付 昭和33年12月20日）

（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及び昭和32年4月第32回日本結核病学会総会に於いて発表した。）

〔内 容 抄 録〕

従来の Slide Culture Method は菌の発育の早期検出という点ではすぐれた方法の1つであつたが、Slide への菌の固着不十分、或は手技の繁雑等種々の難点があつた。著者は結核菌が油水界面に吸着される現象を応用して、Silicone で被覆した Slide に結核菌を吸着せしめて培養する新しい Slide Culture Method を考案したが、この方法により従来の Slide Culture Method の短所を除き得たばかりでなく、これまでの方法では望み得なかつた種々の利点を期待し得るに至つた。本篇に於ては Silicone-Coated Slide の作成法、及びこの作成条件が菌の Slide への吸着並に発育に及ぼす影響について検討したが、何れの作成法に於ても著差は認められなかつた。一方 Silicone の有する種々の特性が本法に用いて便なる所以を述べた。

第1章 緒 論

結核菌はその特性として非常に増殖が緩慢であり、これがこの菌の研究上の大きな障碍の1つになつているが、1882年 Robert Koch¹⁾ が時計皿に固着せしめた凝固血清上で結核菌を培養し、弱拡大で鏡検することにより1週間目に菌の発育を認め得たと報告して以来、結核菌の発育を早期に証明する1つの手段としてこの方法を利用することに努力がはらわれ、濾紙法²⁾、

遠沈管内培養法³⁾、或は Slide Culture 法等多くの所謂 Micro Culture Method が発表されて来た。就中 Slide Culture 法は多くの利点を有するため最も注目され種々の考案が加えられて来た。即ち Pryce (1941年)⁴⁾； Rosenberg (1943年)⁵⁾； Berry and Lowry (1949年)⁶⁾；最近では Noufflard and Berteaux (1955年)⁷⁾等の報告があり、吾国に於ても辻・米津の方法(1950年)⁸⁾、植田・山田及び岡田の方法(1951年)⁹⁾、辻・山本の方法(1952年)¹⁰⁾、内藤・中山の方法(1955年)¹¹⁾、最近では広谷の方法(1958)年¹²⁾等枚挙にいとまのない程種々の方法が発表されている。

かくの如く Micro Culture Method には数多の工夫が加えられて来たが、何れの方法も菌の固着不十分、培養中菌の培地中への離脱、手技の繁雑、菌発育の不確実なこと、高価・特殊な器具又は材料の必要なこと、或は高い雑菌混入率等の欠点の何れかを有し、それぞれ一長一短はあるが未だ一般的に応用されるに至つていない。特に Slide Culture 法に於いて、Slide に塗抹された菌、或はそれより増殖した菌が鏡検に至るまでの間の何れかの段階に於て Slide から離脱するおそれのあることは此の方法の最大の難点の1つであり、此点の改良に就ては上述の辻・山本によるベンジン法¹⁰⁾、或は特殊の培養装置を用いる Berry and Lowry の方法⁶⁾、植田・山田・岡田の方法⁹⁾ 及び内藤・中山の方法¹¹⁾ 等が報告されている他に、Muc-

in¹⁰⁾, 血清¹⁰⁾, 卵白¹⁰⁾, 珪酸ゼリー¹³⁾, 或は卵黄¹²⁾等の附着剤を用いて菌を Slide に固着せしめんとする試み等がある。然し何れも上述の如き Slide Culture 法の欠点の全てを除去するに至らず, 満足すべきものを見ない。

1953年著者は嫌気培養の目的で結核菌を接種した液体培地上に Dimethyl Silicone (所謂 Silicone Oil) を重積して培養を試みた際に, 培養液と Silicone Oil との界面に白い菌膜を生じ, 然もこの菌膜は強固に Silicone Oil に固着している現象を認めた¹⁴⁾。「——Silicone とは珪素 (Si) と酸素 (O) とそれに結合する有機基 (R) とから成る所謂有機珪素化合物の1つで, 一般的に $[R_2SiO]_n$ なる分子式で表わされる鎖状高分子化合物である。——」

1954年に至つて Myron W. Fisher¹⁵⁾ は結核菌の栄養源の究明に際し, 基礎実験としてガラス成分が培地中に溶出するのを避ける目的で, 内側を Silicone で被覆した試験管内で結核菌を液体培養した所, 菌の大部分が管壁に吸着されて発育する現象を認め, この現象を阻止するには Tween 培地を使用する必要があると報告している。

著者は Silicone と培養液との界面に結核菌が吸着, 発育する此の現象を利用して, Silicone で被覆した Slide に結核菌を吸着させ液体培地中に浸漬, 培養することを企図し, 基礎的な検討を行つた結果, この新しい Slide Culture 法, 即ち Silicone-Coated Slide Culture 法 (SSC) が従来の Slide Culture 法の欠点を補うばかりでなくこれまでの方法では期待出来なかつた種々の利便を有することを究明し得たのである。

本篇に於ては先ず Silicone-Coated Slide の作成法について検討して得た知見を報告する。

第2章 Silicone-Coated Slide (SS) の作成法

SS とは Slide Glass に所定の処理を加えてその表面を Silicone の薄膜 (Film) で被覆したものである。

I. 前処理¹⁶⁾¹⁷⁾

Silicone 処理を完全ならしめるためには先ず被処理 Slide の表面から次の何れかの方法により油脂類を完全に取り除くことが重要である。

- (1) 型の如くクローム硫酸液中に一定時間浸漬後水洗する。
- (2) Benzin, Benzol 等の溶剤で洗う。
- (3) 400°C で1時間, 或は 450°C で30分間加熱する。

以上の中, 出来れば第3番目の方法が望ましいと思われるが, 著者は最も広く常用されている第1の方法に第2の方法を併用した。

II. Silicone-Film 形成法

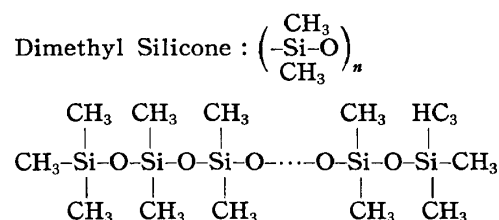
結核菌の培養を目的として Slide 上に Silicone Film を形成さす場合, この Film は培養・固定・染色等の操作に耐える強靱性と, Slide 表面に充分固着していることが要求されるわけであるが, このために適当と思われる処理法には次の2方法がある。

- (1) Dimethyl Silicone による方法¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾
- (2) Chlorosilane 蒸気による方法¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾

1. Dimethyl Silicone による Silicone Film 形成法:

Dimethyl Silicone (第1図) を有機溶剤に1

第1図



乃至3% (v/v) に溶かした処理液中に上記の如く清浄にした Slide を浸漬した後, 室温に放置して風乾する。次に一定の温度と時間で Silicone Film を Slide 表面に固着せしめて処理を終るのであるが, この焼付温度と時間との関係は第2図の如くである。かくして形成された Silicone Film は Silicone 分子が疎水性の有機基 (メチル基) を外側に向けて Slide 表面に固着しているような形となるものと想像されている (第3図)。

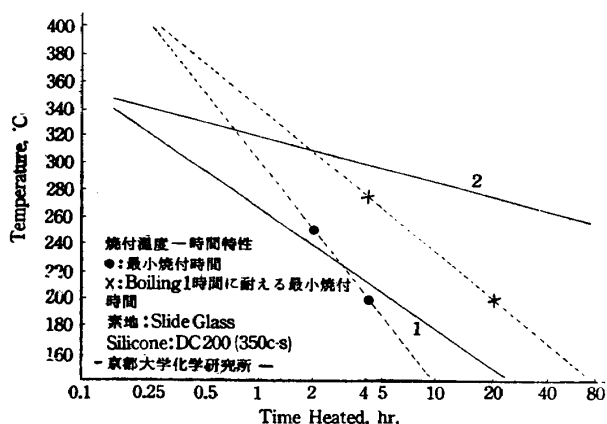
2. Chlorosilane 蒸気による Silicone-Film 形成法:

第 2 図

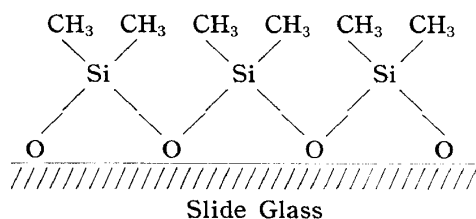
Optimum baking conditions for 774 Pyrex-br- and glass rods treated with a DC 200 fluid.

The times of baking should not be less than those given by curve 1 or greater than those given by curve 2.

—R.R. McGregor, "Silicones and their uses"—

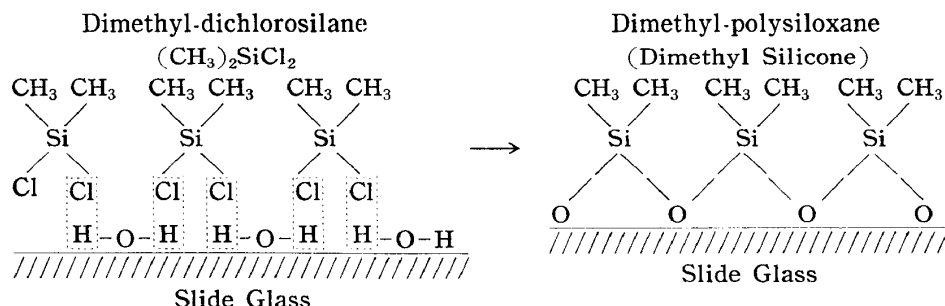


第 3 図



この場合の処理液は Chlorosilane であつて沸点は65乃至 70°C である。先ず清浄な Slide を相対湿度60乃至80%の容器中で表面に水分を吸着せしめた後、この容器中に Chlorosilane の蒸気を導入して数分間 Slide をさらすと、Chlorosilane 蒸気は容易に Slide 表面の吸着水と反応して加水分解し、非常に薄い、然し強靱な Silicone Film を形成するのであるが(第 4 図)、この加水分解に際し塩酸が発生するので反応槽内及び Slide 表面にこの酸が残溜しないように除去する必要がある。

第 4 図



以上の如き Silicone の諸性質及び、一般的な Silicone-Coating Method に基づき、著者は次の如く数種の異なつた条件下で作成した SS を用意し、その各々を一定の結核菌液中に浸漬した後、菌の吸着、発育状態を観察した。

第 3 章 実験材料及実験方法

1. Dimethyl Silicone による SS 作成:

普通の Slide を縦に 3 切したもの(9×75mm) をクローム硫酸液中に24時間浸漬、流水中で数時間洗滌してから乾燥、更に Benzin で洗滌した後、室温で乾燥させた。この Slide を粘度 350 centistokes の Dimethyl Silicone (Dow Corning 社製, "DC 200 Fluid") を四塩化炭素 (CCl₄) に 2% (v/v) に溶かした処理液中に 1 分間浸漬後、室温で 1 乃至 2 時間風乾し、第 2 図に基づき第 1 表の如き数種の異つた温度と時間で熱処理を行つた。

第 1 表 Silicone 焼付の条件

温 度	時 間
150°C	20時間
200°C	10時間
250°C	5時間
300°C	1時間

2. Chlorosilane 蒸気による SS 作成:

上記と同様の Slide を相対湿度80%の反応槽に入れ、Methyl Chlorosilane (東芝製 "TS-900") 蒸気を導入、15分間反応させた後、発生した塩酸を除去する目的で Slide を蒸溜水で洗滌し、最後に形成された Silicone Film の強度

を一層高めるため、200°C で1時間加熱処理を行つた。

3. 結核菌培養：

Kirchner's Albumin 培地† で10日間培養の人型有毒結核菌，H37Rv 株の菌膜をガラス玉入コルペンにとつて振盪磨砕し，生理的食塩水を加えて菌浮游液となした後，可及的単個菌乃至小菌塊よりなる均等な菌液を得る目的で一旦試験管に移し，1時間静置後，その上清を生理的食塩水で稀釈して，光電比色計により濃度0.01mg/cc なる菌液とし，小試験管（12×110 mm）に2cc づつ分注した。この菌液中に1時間乾熱滅菌した上記5種類のSSを夫々5分間浸漬後，上記小試験管に2cc づつ分注したKirchner's Albumin 培地に移し，37°C で培養した。

1週間目にSlideを取り出し，10% Formalin 液中に浸漬固定し，Ziehl-Neelsen 法で染色（後染色は省略）して，弱拡大（5×20）でSlideの下端より5mm から20mm までの間を鏡検，3視野おきに10視野中のColony 数を数えた。

第4章 実験成績

培養7日目にはSlide表面に発生した点状の白色Colonyを肉眼的にも明らかに認め得たが，これが結核菌より成るものであることを確認し，且つ可及的正確に各Slide間のColonyの数及び性状を比較検討するために固定・染色して弱拡大で鏡検した。その結果は第2表に示す如くで10視野中のColony数は大体350乃至400で，条件を異にして作成された各SS間に著差は見られなかつた。然し個々のColonyに

† Kirchner's Albumin 液体培地の組成：

第2 磷酸曹達 $[\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$	3.0gm
第1 磷酸加里 $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$	4.0gm
硫酸マグネシア $[\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$	0.6gm
クエン酸曹達 $[\text{Na}_3\text{-Citrate} \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$	2.5gm
Asparagine $[\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}]$	5.0gm
Glycerol	20.0ml
蒸溜水	1000.0ml

以上を pH 6.8~7.0 に調整，Autoclave で滅菌後，Albumin “榮研” 液を10%に加えたものの。

第2表 Silicone-Coated Slide の作成法の菌吸着に及ぼす影響

処 理 液	処 理 法	集落数	
		10視野*	
2% (v/v) Dimethyl Silicone** CCl ₄ 溶液	熱処理	150°C 20時間	348
		200°C 10時間	327
		250°C 5時間	318
		300°C 1時間	406
Chlorosilane***	Vapor Method	342	

*：5×20；**：Dow Corning, “DC 200 Fluid” (350c.s.)；***：東芝, “TS 900”

菌浮游液濃度：0.01 mg (湿菌量)/ml. (生理的食塩水)，培養期間：7日

就て見ると Dimethyl-Silicone 溶液に浸漬後，低温，長時間の焼付を行つたSlideに於けるより，高温・短時間焼付のもの，或は Chlorosilane 蒸気により Silicone-Coating を行つたものの方が多少 Cord-formation が良好であるように思われたが，その差は僅少であつた。

尚 SS 上の菌の染色性は Silicone 処理を行なわない普通のSlide上の菌のそれと何等差異は認められなかつた。

第5章 考 按

結核菌が油水系界面に集る現象は古くより知られ，1909年には Lange 等²²⁾，1924年には Mudd 等²³⁾，更に1934年には尾高²⁴⁾が抗酸性菌は他の菌に比し，疎水性面に親和性を有すると報告しているし，最近では1950年当研究所の大岩²⁵⁾が各種細菌・菌類の油水系における態度を検討して，一般細菌類は油水系界面に吸着され難いのに反して，結核菌，ジフテリー菌，Nocardia, 及び Penicillium は著明に吸着されるが，この現象は菌の抗酸性と無関係であると報告している。一方これ等結核菌の油水系界面への吸着現象を臨床的に応用しようとした試みに古くは喀痰中結核菌の集菌に Ligroin を用いた Lange and Nitsche の方法²²⁾，吾国では糞便内結核菌の集菌に Ether 或は Benzin 等を用いた尾高²⁴⁾の研究等，又最近では Palen 等²⁶⁾による Pentane を用いた報告等があるが，これ等の研究においては界面を形成する物質は，油相，水相共に液体であつたため，集つ

た菌を鏡検其の他詳細な観察に供するに至るまでに、複雑な操作が要求される等、多くの不便を免れ得なかつた。然るに SSC では、油相に当るのは Slide 表面に固着した流動性のない強靱な Silicone 被膜であり、菌は肉眼的にも認め得る白色の Colony を形成し、鏡検に際しても第3章に述べた如き極めて簡単な操作で足りるのである。

さて Dimethyl Silicone というのは珪素 (Si) と酸素 (O) とそれに結合する Methyl 基 (C-H_3) とからなる所謂有機珪素化合物の重合体の1つで一般的に $[(\text{CH}_3)_2\text{SiO}]_n$ なる分子式で表わされる物質であつて、この物質の強靱な薄膜をガラスの表面に形成さすには、上述の如く Dimethyl Silicone を用いる方法と、Chlorosilane 蒸気による方法とがあるが、いずれの方法によつたものでも Film は均等で且つ非常に薄いので、SS はその表面の強い撥水性以外には、一見普通の Slide と何等区別がつかない。然し Chlorosilane 蒸気によるものは気相で撥水処理を行うので、Silicone を焼付けたものに比し、当然、より一層均等、菲薄な Film が形成されていることが想像されるばかりでなく、大量の SS 作成の手段としては便利であろうが、この方法の欠点として処理過程において、適当な方法を講じないと、発生する塩酸のため眼、皮膚、或は衣類等を損傷される危険があり、一般の研究室での処理法としては不適当であろう。本篇の実験では、作成条件を異にする数種の SS を用いて、菌の吸着、発育状態を比較検討したのであるが、その結果各 SS 間に有意の差は認められなかつた。従つて普通には各研究室の設備にしたがつて、第2図に示された如き適当な時間と温度で Dimethyl Silicone の焼付を行つたもので充分であると考えられる。いずれにしろ、これ等の方法で形成された Silicone Film は次のような特性を持つている。即ち、

(1) 耐熱性が大きい：これはこの Film の骨格が強固な Siloxane 結合、即ち Si-O-Si よりなつてゐるためであり、このため結核菌培養の前処理としての Slide の加熱滅菌、或は染色前

の火焰固定等も可能である。

(2) 化学的に安定であり、且つ溶剤に対して強い：従つて菌の染色或は脱色操作に耐え、必要があれば Methanol 等による吸着菌の固定も行い得る。又若し喀痰等の病材に対して、SS を応用する場合を想定しても、アルカリ或は酸による病材の処理に対して何等支障を来さないであろうと思われる。然もこの Silicone Film は Slide Glass そのものの Si-O-Si と直接結合(副原子価結合)していると見てよいのであつて、炭化水素溶剤等により表面は容易にぬられるけれども溶けも離れもしない。ただ固体の Silicone 樹脂を分解するような強力な試薬(例えばフッ化水素、或は苛性アルカリのアルコール溶液等)の化学的作用のみが撥水膜をとり除く能力を持つてゐるのである²¹⁾。

(3) 表面張力が極めて小さく、撥水性が著しい：Dimethyl Silicone 分子の骨格たる Siloxane 結合は周囲を既述の如く Methyl 基によつて取りまかれたようになつてゐるため、この物質によつて被覆された Slide は、恰も Paraffin のような撥水性をあらわすのであつて、水との接触角は 100° 以上となる。従つて Slide 上に水を滴下してもこの水滴は球状となつて、連続的な水の膜は作らず、Slide 表面をぬらさない。又 Silicone の粘度によつて多少の差はあるが 350 Centistokes の Silicone の表面張力は大体 21 dyne/cm で Paraffin のそれと略々同じである。結核菌の SS 表面への吸着現象は未だ充分明らかではないが、主として Silicone Film の之等の性質に関連しておこるものであると想像される。この撥水性は培養中にある程度低下するが、これは培地中の塩の附着及び菌の吸着が原因と思われ洗滌すれば殆んど回復するものである。

Dimethyl Silicone は無色無臭、油状の液体であり、Slide を被覆しても何等着色せず、従つて鏡検に際しても普通の Slide と異なる所が無く、全然支障を来さない。又生体に Silicone を種々な方法で投与しても見るべき障害を来しないと報告されている²⁷⁾ ので、結核菌の発育に対しても化学的な影響はないで

あろうと予想されたが、事実 SS に吸着された結核菌は培養 1 週間以内に典型的な蛇状集落を形成してよく発育しているのが認められたのである。

以上より明らかなように、SS を用いれば、従来の Slide Culture Method に於ける如く、培養開始に先立ち菌の Slide への塗抹・乾燥等の複雑で且つ雑菌汚染、或は菌の発育不良等の危険を招くおそれのある操作は全く不要で、単に SS を菌液中に浸漬すれば、菌は Slide 表面に吸着され、培養 1 週間以内には肉眼的にも認め得る Colony を形成することが本実験において確かめられた次第である。

第6章 結 論

結核菌が油水系界面に吸着される現象を利用して、油性の新物質、Silicone で被覆した Slide を応用した結核菌培養の一新法、即ち Silicone-Coated Slide Culture Method (SSC) を考案した。

Silicone-Coated Slide (SS) の適当と思われる作成法には大別して Dimethyl Silicone を用いる方法と、Chlorosilane を用いる方法とがあるが、本篇に於ては作成条件を異にする数種の SS を菌液中に暫時浸漬した後 Kirchner's Albumin 培地中に移して Slide 上の結核菌の発育状態を比較検討した所、何れの SS にも表面に 1 週間以内に肉眼的にも認め得る Colony を生じ、且つ各 Slide 間に菌の吸着数、或は発育度等の点で著差を認めなかつた。従つて通常の研究には本篇に記載した何れの方法によつて作成した SS を使用しても支障はあるまいと考えられるが、作成法としては Chlorosilane 蒸気によるものは、処理過程で発生する塩酸から、人体・被服等を防禦する必要があるので、一般の研究室での方法としては、やや不適當ではないかと思われる。

いずれにしても形成された Silicone Film は無色で、物理・化学的な安定性が強いため、培養・固定・染色等の操作に耐え、且つ強固に Slide Glass に結合していて弗化水素等、特別な試薬の化学的作用による以外には剥離するこ

とはない。この Silicone Film の最も顕著な特性はその強い撥水性で、これが結核菌を吸着する最も重要な因子であろうと想像される。

SS は以上の如き性質を有するので、これを使用すれば従来の Slide Culture Method の種々の短所を除き、簡単な操作で菌の Slide からの離脱等のおそれもなしに結核菌の迅速培養を行い得るものと思われる。

(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) Koch, R. : Berl. Klin. Wchnschr., 19, 221 (1882)
- 2) Hoyt, A., Smith, C.R., and Gribkoff, G.P. : Am. Rev. Tuberc., 70, 916 (1954)
- 3) 山田修, 岡田博 : 結核, 27, 169 (1952)
- 4) Pryce, D.E. : J. Path. & Bact., 53, 327 (1941)
- 5) Rosenberg, K.S. : Lancet, 1, 615 (1943)
- 6) Berry, J.W., and Lowry, H. : Am. Rev. Tuberc., 60, 51 (1949)
- 7) Noufflard, H., and Berteaux, S. : Am. Rev. Tuberc., 72, 330 (1955)
- 8) 辻周介, 米津徹也, 山本寿 : 日結, 9, 463 (1950)
- 9) 山田修, 岡田博 : 結核研究, 7, 5 (1951)
- 10) 山本寿 : 京大結研紀要, 3, 42 (1954)
- 11) 中山建治 : 京大結研紀要, 4, 81 (1955)
- 12) 広谷文雄 : 医学と生物学, 45, 241 (1957)
- 13) 小谷尚三, 外 : 第7回日本結核病学会近畿地方学会講演 (昭和28年5月)
- 14) 東向一郎 : 未発表
- 15) Fisher, M.W. : J. Bact., 67, 613 (1954)
- 16) McGregor, R.R. : "Silicones and their uses", p. 58, McGraw-Hill Book Company, Inc. (1954)
- 17) 石川潔 : "シリコンとその応用", p. 136, オーム社書店 (1956)
- 18) Johansson, O.K., and Torok, J.J. : Proc. Inst. Radio Engrs., 34, 296 (1946)
- 19) Patnode, W.I. : U.S. Patent, 3, 206, 222 (December 22, 1942)
- 20) Norton, F.J. : Gen. Elec. Rev., 47, 6 (1944)

- 21) Rochow, E.G. (信越化学中央研究所訳) : “シリコーンの化学”, p. 129, 丸善株式会社 (1955)
- 22) Lange, L., and Nitsche, P. : Deutsche Med. Wchnschr., 35, 435 (1909)
- 23) Mudd, S., and Mudd, E. : J. Exptl. Med., 40, 647 (1924)
- 24) 尾高憲作 : 日微生物誌, 28, 785 (1934)
- 25) 大岩弘治 : 京大結研年報, 2, 188 (1950)
- 26) Palen, M.I., Wong, H.Y., and Leifson, E. : Am. Rev. Tuberc., 75, 148 (1957)
- 27) McGregor, R.R. : “Silicones and their uses”, p. 194, McGraw-Hill Book Company, Inc. (1954)