

人型結核菌の Dubos 液体培地における生菌数と濁度との関係

草 間 久 子

慶応義塾大学医学部細菌学教室 (主任 牛場大蔵教授)

受付 昭和 32 年 8 月 23 日

結核菌を均等に培養すること、すなわち homogenous culture は従来困難なるものとされていた。その大きな理由としては、結核菌そのものが他の細菌と異なる 1 つの特徴として細胞表面の疎水性であることがあげられる。この疎水性を除く目的で各種の表面活性物質が試みられたが、多くの表面活性物質は菌の増殖に対して阻止的に作用するので使用できなかつた。ところが Dubos, Middlebrook, Pierce¹⁾²⁾³⁾らによつて表面活性物質である 1 種のオレイン酸エステル Tween 80 と牛アルブミンフラクシオン V を用いて、結核菌を全く均等に発育せしめ、しかも菌の増殖を阻止する傾向が少なく、少量の菌量を接種しても比較的短時日中に均等に発育せしめることのできる事が考案発表された。Fenner, Leach⁴⁾長谷川⁵⁾らも Tween 80 と血清を用いて結核菌の均等培養に成功したと追試、発育しており、以来この Tween 80 と、牛アルブミンフラクシオン V を用いた、いわゆる Dubos 液体培地が広く結核菌の均等培養の目的に用いられている。私はこの Dubos 液体培地を使用して、人型結核菌 H₃₇Rv 株を薬剤添加および不加の環境で菌を培養すると、しばしば生菌数と濁度との間に不一致を経験した。その不一致は培養日数にて変化し、また添加薬剤の種類によつても異なる傾向にあつたので、両者の関係を基礎的に追究するために行つたのが本実験である。

実験材料ならびに方法

- 1) 供試菌株は当教室で 1% 小川培地に継代保存せる標準人型結核菌 H₃₇Rv 原株。
- 2) 培地は、濁度測定には市販されている Dubos 基礎培地 (栄研) に Difco 製アルブミンを 10% の割合に混合した Dubos 液体培地を、Dubos 液体培地中の生菌数測定には 1% 小川培地を使用した。
- 3) 添加薬剤は 3 種数で、ストレプトマイシン (明治製薬, Crystalline Dihydrostreptomycinsulfate, 以下 SM と略)。イソニコチン酸ヒドラジッド (中外製薬, 以下 INH と略)。パラアミノサリチル酸ナトリウム (武田製薬, 以下 P A S 略)。
- 4) 菌浮游液ならびに添加薬剤の稀釈にはいずれも滅菌蒸留水を使用した。
- 5) 濁度測定には日立製光電光度計を使用した。

Dubos 液体培地には マラカイト 緑が加えられているので、この緑色の障害を補う意味でフィルターは No. 45、波長 450 m μ のものを使用した。

6) 濁度測定に用いる試験管は外径 17 mm のものを選びさらに一定量の水を入れて水位の高さが同一のもので、また測定方向を定めたもの、試験管は化学的に清純なるものを必要とするので、クローム硫酸液に 24 時間浸した後、流水で十分に洗滌さらに蒸留水で洗滌したものを乾燥滅菌した。綿栓は脱脂綿を使用した。培地の作製は、まず Dubos 液体培地は Dubos 基礎培地 12 g を蒸留水 900 ml に溶解し、10% 苛性ソーダ液で pH 7.0 に補正後高圧滅菌冷却後、Difco 製アルブミンを 10% の割合に無菌的に混和して試験管に 4.5 ml ずつ分注し、薬剤添加の場合には薬剤稀釈液の 0.5 ml を、薬剤を添加しない場合には蒸留水の 0.5 ml を加え、全量 5 ml とした。また使用薬剤の滅菌は INH のみは Kirchner 液体培地原液に溶解して (Dubos 液体培地にはすでに Tween 80 が含有されているので INH の作用が不活化されるおそれがあるので) 高圧滅菌、P A S は蒸留水に溶解して Seitz で濾過滅菌、SM は注射用瓶に滅菌蒸留水を無菌的に注入して溶解した。添加薬剤濃度はそれぞれ単独薬剤で完全発育阻止濃度以下である濃度を用いたが、SM および P A S は 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 γ とし、INH は 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 γ に終末濃度となるように添加した。生菌数測定の 1% 小川培地の添加薬剤は SM のみ 2 倍量含有せしめ、P A S, INH はそのままの濃度を含有させて 85°C 1 時間滅菌凝固せしめた。

Dubos 液体培地に移植する菌液は 1% 小川培地 14 日間培養菌から手振法にて均等菌浮游液となし Optical Density (以下 O.D. と略) 0.194 となるように規定し、これの 0.1 ml を Dubos 液体培地に接種した。

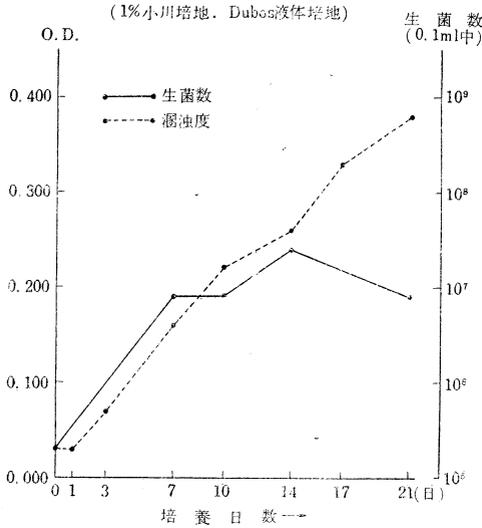
実験成績

薬剤不加 Dubos 液体培地の生菌数と濁度

薬剤の添加されない Dubos 液体培地に H₃₇Rv 原株の上述の基礎菌液を 0.1 ml 接種して毎日軽く振盪して濁度を測定すると共に、培養 7 日、10 日、14 日、21 日と濁度と生菌数との関係を目を追つて観察した。

その成績は図 1 に示すが、接種直後の生菌数は 2×10^5

図1 生菌数と濁濁度との関係 (薬剤無添加)



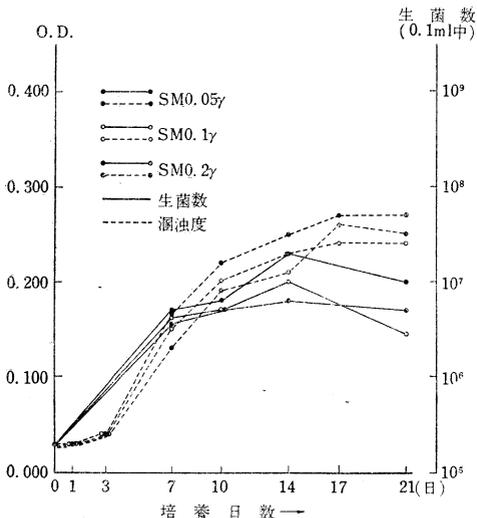
コでO. D. 0.036の読みを示している。濁濁度は培養1日より2日目までは増加がみられずlag phaseを示している。生菌数は培養初期に測定しなかつたのでlag phaseを明確に示すことはできないが、培養7日目までは生菌数、濁濁度とが共に平行して増殖曲線を示した。生菌数は培養7日より14日にいたつて最高に達し、それ以後より徐々に、しかも僅かに減少する傾向がみられる。これに反して濁濁度は培養7日目より一定の割合を保ちながら生菌数のカーブをよぎつて上昇し、培養21日目で最高に達し、生菌数と濁濁度との開きが著明に示された。

薬剤添加 Dubos 液体培地の生菌数と濁濁度

1) SM添加培地の生菌数と濁濁度

図2はSM濃度0.05, 0.1, 0.2 γ を含む試験管のみ、3日(濁濁度のみ)、7日、14日、17日(濁濁度のみ)21日

図2 SM添加培地における生菌数と濁濁度



間と目を追つて生菌数と濁濁度との関係を示したもので、SM 0.05 γ の存在下では生菌数の状態は図1の薬剤不加対照に比較して、培養7日、10日、14日、21日間と、ほぼ同じような程度の増殖を示し、生菌数の著しい変化はみられない。しいていえば全体的に僅かに生菌数が少ないようであるが誤差範囲程度であると思われる。これに反して濁濁度の読みは図1の薬剤不加対照に比較して菌のlag phaseと思われる日数が僅かに延長されたかと観察され、7日、10日、14日目と同じような程度の増加を示した。そして14日から17日目で最高に達しているが、濁濁度は一般に弱く、生菌数との開きは対照に比較して著明とはいはれない。SM 0.1 γ , 0.2 γ とSMの濃度が高くなるにしたがつて、14日目以後生菌数の増加は抑えられ減少の傾向にある。これに反して濁濁度の読みは低濃度の場合と僅かの差があるのみである。いずれにしても3者の生菌数と濁濁度の開きはさほど著明でなくむしろ少ない。

2) PAS添加培地の生菌数と濁濁度

図3 PAS添加培地における生菌数と濁濁度

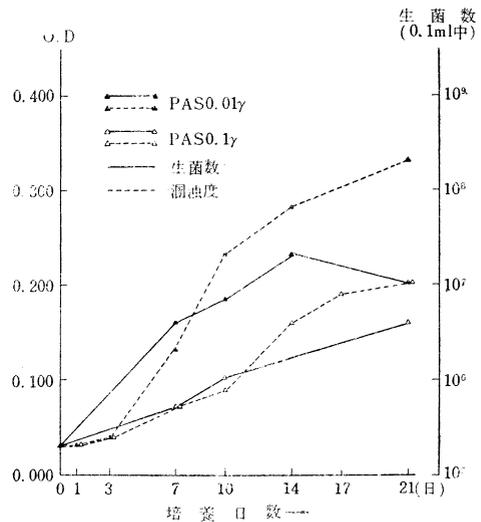


図3に示すものはPAS濃度0.01, 0.1 γ の生菌数と濁濁度の関係であるがPAS低濃度0.01 γ の存在下においては、図1の薬剤不加対照に比較するとやや減少しているが、図2のSM 0.05 γ におけるとほぼ同様で7日より14日目で最高に達して以後減少を示している。濁濁度の読みは薬剤不加対照に比較してはやや弱い程度であつて、SM 0.05 γ 添加時に比較すると比較的強い。生菌数と濁濁度の開きはSM添加の場合より著明であり21日目に最高の濁濁度を示している。PAS 0.1 γ の存在下においては生菌数、濁濁度両者共に10日目まで平行しているがその増加度は最も少なく、濁濁度も10日目以後においてはやや強く増加、培養21日目に至つて最高に達している。しかし他のいずれの場合よりも極めて低い値を示

し、O.D. 0.200を示す程度であった。生菌数においても10日目以後も徐々に増し21日目においてはじめて最高に達したが、他の場合の最高生菌数よりかなり少なく 5×10^6 程度であった。生菌数、濁濁度との開きは最も少なかった。

3) INH添加培地の生菌数と濁濁度

図4 INH添加培地における生菌数と濁濁度

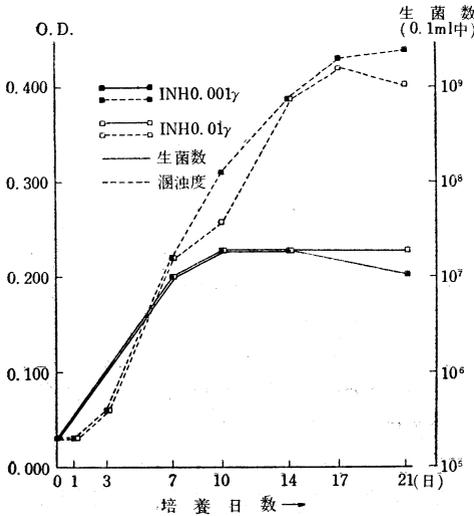


図4はINH存在下における生菌数と濁濁度を示す成績で、INH微量0.001γ, 0.01γ添加の場合である。濁濁度にあつては接種後のlag phaseと思われる時期は図1薬剤不加対照とほぼ同じであるが培養7日間で対照のそれよりやや強く、INH 0.001γの存在下においては培養10日目においてすでにO.D.の読みは0.310を示し対照のO.D. 0.22よりは、はるかに高い値を示し21日目でO.D. 0.44の最高を示した。また0.01γの存在下でも平行して著明な濁濁度を現わし17日目で最高に達している。生菌数においてもINH 0.001, 0.01γ共にまったく平行して7日目より10日目で最高に達しINHの添加にもかかわらずその開きはかえつて薬剤不加対照より生菌数はやや多くみられた。しかし対照の最高生菌数が得られた14日目では僅かの差でINH含有環境の場合の方が生菌数は少ない程度であった。生菌数と濁濁度の両者の開きは、SM, PAS, 含有の場合また薬剤不加の対照の場合よりも最も著明な開きを示している。

各種濃度薬剤添加時の濁濁度の比較

表1はSMまたはPAS 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5γ, INH 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1γ添加時の培養7日目と14日目の濁濁度の比較を示すものである。微量濃度各薬剤0.001γの存在下培養7日目においてはSM, PASにおいてはほぼ同じような

表1 各種濃度薬剤添加時の濁濁度

薬剤	濃度	濃度							
		0.001	0.005	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5	対照
SM	7日	0.161	0.161	0.161	0.168	0.149	0.131	0.061	0.161
	14日	0.237	0.237	0.237	0.252	0.229	0.215	0.144	0.260
PAS	7日	0.155	0.155	0.131	0.061	0.061	0.056	0.056	
	14日	0.244	0.237	0.284	0.201	0.161	0.097	0.066	
INH	7日	0.222	0.222	0.229	0.081	0.036			
	14日	0.398	0.379	0.398	0.076	0.061			

濁濁度の読みで薬剤不加対照の場合と一致する値であるが、INHの存在下においてはかなり強い濁りを示しており、薬剤不加対照の場合よりも強い値であった。培養14日目の場合も前者同様INHの存在下において著明な濁濁度を示している。ところが薬剤濃度が増加されてゆくと、例えば0.1γとなると、SMの存在下において培養7日目、14日目の濁濁度は強くかえつて薬剤不加対照に比較してやや強く、PAS, INHの順に濁濁度は弱くなっている傾向が現われている。また薬剤そのものの各濃度と濁濁度とを比較してみると、SMの0.001γより0.01γまでの濃度では培養7日目においても14日目においても各濃度間における差は見られなかった。0.5γの濃度においては培養7日目、14日目共に濁濁度の読みは低値を現わしている。PASの存在下の場合には、微量濃度0.001γより0.01γまでは培養7日目においても14日

目においても共に薬剤濃度による濁濁度の差は著明ではなかったが、PAS 0.05γ, 0.1γの存在下においては培養7日目において著明に濁濁度の低値を示し、0.2γ, 0.5γの含有においては、7日目、14日目共に濁濁度は急激に落ちて濁りが少なかった。INH微量濃度0.001γより0.01γの存在では培養7日目においても14日目においてもINH濃度による濁濁度の差は僅かにみられるのみでいずれも濁度は強く0.05γ, 0.1γと増してゆくと、他の薬剤SM, PASの場合と異なり濁濁度が急激に減少して最も弱い値を示した。

総括ならびに考案

DubosのいわゆるTween 80アルブミン液体培地において結核菌は比較的短時日中に均等なる増殖を営むことは前にもふれたようにすでにDubosらにより見出さ

れ、長谷川らによつても追試報告されているが、長谷川らは生菌数のみをみて、その溷濁度と生菌数との関係はみていない。今回の研究は Dubos 液体培地中の生菌数と溷濁度との関係を抗結核剤を添加しない環境と、完全発育阻止濃度以下の抗結核剤を添加した環境で検討した。その結果を総括すると、抗結核剤を添加しなくともまた添加した場合においても、Dubos 液体培地中において、結核菌 $H_{37}Rv$ 株の生菌数と溷濁度との最高に達する時日にずれがあり一般に溷濁度増加が生菌数増加をうまわり、両者の間に不一致をしばしばみることがわかった。さらにまた抗結核剤を添加した場合の成績を検討すると、上記の生菌数と溷濁度との間の開きに薬剤の種類そのものの特徴があるように思われた。すなわち I N H 添加時において注目すべきことは微量 0.001 γ を添加した場合に生菌数は薬剤不加対照に比較してより以上に増加したことであるが、これは I N H 高濃度においては殺菌的に作用を有するものであるのに反して、極めて低濃度においては、かえつて刺激的に作用した結果ではないかと想像される。このことは I N H 濃度が 0.05 γ 以上になるとそれらの溷濁度の急激な減少のみられたことからもうかがえよう。そしてこの際生菌数の増加に比べて溷濁度の増加が薬剤不加対照に比べさらに著明となつてくるが、これは 1 つには微量 I N H により増殖が刺激された結果、生じた死菌体の多いことが想像され、また 1 つには菌体の膨化ということも合せて想像される。S M の添加された環境においては S M 低濃度 0.05 γ 添加においても増殖しつつある菌に対して増殖阻的に作用して生菌数の増加が弱く、そのために薬剤不加対照よりも生菌数が少ないことは想像される。そして生菌数は少ないながらも対照と同様に増加して培養 7 日目より 14 日目で最高に達し、それ以後は減少の傾向をたどつてくるが、溷濁度の増加は対照に比べて弱かつた。これは S M 加 Dubos 液体培地中においては bacteriostatic に働く S M のために増加し得なかつた多くの菌が生菌数計算の際には小川培地上に発育し得たために溷濁度と生菌数との開きが他の群に比較して著しく少なくなつたものと考えられる。そしてこの際 S M 濃度が高くなるにしたがつて最高時の生菌数は減少しているが溷濁度との開きの程度

はいずれも少なく、3種の濃度でいずれも同程度であつたことが注目される。P A S の存在下においては生菌数と溷濁度との関係は I N H, S M, 添加時における関係の中間の位置を占めていた。

結 論

1) 生菌数と溷濁度との関係は薬剤の有無にかかわらず生菌数は培養 7 日目より 14 日目に最高に達し、その後幾分減少の傾向を示す場合が多いのに反して、溷濁度の読みは 7 日目以後において著明に増加し、14 日目より 21 日目以後において最高に達するような相違を認め、両者はかならずしも一致せず、生菌数と溷濁度が平行するのは培養 7 日以内にすぎない。

2) 生菌数と溷濁度との開きは I N H 添加時において最も著明で、S M 添加時において最も少なく、P A S 添加時においてはこの両者の中間に位する結果であつた。さらに I N H では微量添加により生菌数および溷濁度をむしろ増加せしめることが注目された。

3) 以上のことは結核菌の液体培地培養時における溷濁度と生菌数との関係を基礎的に明らかにすると共に、各薬剤の作用機序の差に示唆を与えるものと思われる。

稿を終るに当り、御懇篤な御指導御校閲を賜つた牛場教授に心から深謝いたします。

本実験は文部省科学研究費「結核菌の耐性研究班」の補助を受けた。

文 献

- 1) Dubos, R.J., Davis, B.D., Middlebrook, G., and Pierce, C.: Am. Rev. Tuberc., 54:204, 1946.
- 2) Dubos, R.J., and Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 56:334, 1947.
- 3) Pierce, C., Dubos, R.J., and Middlebrook, G.: J. Exper. Med., 86:159, 1947.
- 4) Fenner, F., and Leach, R.H.: Am. Rev. Tuberc., 68:342, 1953.
- 5) 長谷川弓彦:熊本医学会雑誌, 28:484~509, 昭29.