



Title	Slide Cell Culture法の基礎的研究
Author(s)	横井, 敏夫; 新明, 美仁; 信太, 隆夫
Citation	結核の研究, 2, 88-96
Issue Date	1955-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/26564
Type	bulletin (article)
File Information	2_P88-96.pdf



[Instructions for use](#)

Slide Cell Culture 法の基礎的研究

横井敏夫 新明美仁 信太隆夫

(北海道大學結核研究所細菌部 主任 大原達教授)

1. 緒 言

結核に於ける免疫は、それが所謂「感染免疫」と呼ばれる特異なものである点、及び多かれ少なかれこれにアレルギーが関与するものである点に於て、他の細菌性疾患に見られる免疫とは稍趣きを異にするものがある。従つて、結核に於ける免疫は甚だ難解な問題であると共に、古くから非常に多くの学者によつて活潑な論議の対象とされて来た。この問題の研究に當つて、沈降反応、凝集反応、補体結合反応等、血清反応を主とした研究方法も多いが、これ等の血清抗体が結核の眞の免疫にどれ程の役割を果しているかは甚だ疑わしい。この点から見れば、1923年 Wright¹⁾によつて考案された Slide Cell Culture 法 (以下 S.C.C. 法と略記) は、結核菌自体に対する全血液の影響を見る方法として、免疫学的に大きな意味を持つているものと考えられる。即ちこの方法によつて結核菌個体並びに免疫動物の血液は、結核菌の増殖を阻止する事が明らかにされたからである。然し従来の S.C.C. 法は判定に主観の混入する余地が多く、実験手技による成績の変動も亦、決して少ないとは云い得なかつた。従つて一方に於ては手技を改善すると共に、他方に於ては判定方法に客観的な基準を考案して、本法をより正確なものとするよう色々努力が払われて来たのは当然である。我が国に於ては佐藤²⁾、緒方³⁾、西村⁴⁾、内藤⁵⁾等によつて方法の改善が研究され、S.C.C. 法は現在に至るまで多方面に亘つて利用されて居る。即ち外山⁶⁾、長谷川⁷⁾、小野塚⁸⁾、戸塚⁹⁾、太田¹⁰⁾、水島¹¹⁾、松島¹²⁾、三崎¹³⁾、小谷¹⁴⁾、真山¹⁵⁾等は、化学療法剤、色素、有機物、無機物その他のものの結核菌に対する発育阻止作用を観察し、大塚¹⁶⁾、原¹⁷⁾等は外科的侵襲によつて、血液の持つ結核菌発育阻止作用、ひいては人体の抵抗力が如何に変動するか、を本法によつて調べた。更に肺結核症の種々なる状態及び時期について、その全血液の菌に及ぼす影響の変化を追求する等、本法を利用した業績は甚だ多い。我々もこの方法を結核免疫の研究に用い、免疫菌量と全血液の菌増殖阻止作用、或いは後者と血中抗体価との間に相関関係が有りや否やを追求して見たのであるが、予期に反し data は可なり区々で、他の血清反応の如く constant な結果が得られなかつた。その成績を通覧して見ると実験誤差と云うより

は寧ろ動物のもつ個体差が可なりの役割を演じている様に思われたので、本論文に於てはこの点を考慮の上、S.C.C. 法の基礎的な面について検討を加えて見る事にした。即ち術式に改良を加えると共に、S.C.C. 法を更に定量的な方法たらしめるべく判定方法に新しい基準を考案した。我々の成績では動物の血液間に個体差を認め得たのであるが、併せて菌の増殖状態、世代時間についても詳細に研究したので、得たる結果を茲に報告し度いと思う。

2. S.C.C. 法の術式並びに判定方法について

1) S.C.C. 法の術式

術式の大要は佐藤²⁾、緒方³⁾の報告に従つたが、菌液の調製並びに途中の操作に若干の改良を加えたので、これを簡単に記述する。

実験に使用した硝子器具は乾熱滅菌器で1時間滅菌し無菌箱はクレゾール石鹼液で1日前に消毒した。S.C.C. 法に使用するオブジェクトガラスは完全に脱脂されたものでなければならぬので次の如くして清拭した。

(i) 10% 重曹水、又は石鹼水で1時間煮沸した後水洗
(ii) 次でクローム硫酸中に浸し、微温にて2時間煮沸後1日間流水で水洗 (iii) 乾燥後これを5% 鹽酸アルコールにつけて保存し、使用時にガーゼで拭いて用いる。以上の操作で清拭したオブジェクトガラスは、菌浮游液と血液との混合液を滴下した場合大体完全な圓形を作る。

〔菌浮游液の調製〕 BCG 豫研株をグリセリン馬鈴薯培地に植え、2乃至3週培養の菌膜をソートン培地に移したものを1代目として、以後7日より8日目毎に継代、その3日目までのものを使用した。用いる菌の age は若いものが良く、我々は8日目の菌を用いた。菌膜を型の如く取り、水晶玉入りコルペン中で手振り法によつて磨砕し、ソートン液を以て1 cc 2 mg 含有の菌液を作る。これを豫め用意してある漏斗 (東洋濾紙 No. 2 を2枚重ねて漏斗内に挿入し、之を乾熱滅菌器で正確に120°C 1時間滅菌する) で無菌的に濾過し、その濾液を使用した (濾紙の滅菌は温度が高すぎると焦げてその透過性が悪く、一定の菌液が出来ないため、滅菌には細心の注意を要する)。かくして得た菌液は数回の実験により鏡檢の結果、殆んど常に1個宛ばらばらの菌から成る事を確かめた。この方法が従来のそれ

と異なると共に優れた點でもあると我々は考える。即ち従來行われた菌液調製法は、悉くが遠心によつて大きな菌塊を沈澱せしめ、その上清液を使用する方法であるが、操作が複雑で雑菌混入の機會も多い上、完全に1個宛の菌を得る事は困難であつた。これに反し著者等の濾過法は、簡便にして雑菌の混入を防止出来ると共に、その菌液と血液の混合液を滴下したものは、1個宛の菌が92%乃至93%の多數を占め、2~4個の菌が5~6%に見られる程度で5個以上の菌は見られなかつた。従つて1視野の菌数を15個乃至30個程度に調節する事も甚だ容易である。尙従來の方法では菌液の基汁は生理的食鹽水、ロツク液、ブイヨン等が使用されて來たが、著者等はソートン液を使用し、生理的食鹽水、Kirchner液より良好なる結果を得た。

〔培養操作〕 (i) 豫め菌液 0.11 cc を分注して置いた凝集管に海狗血液 1 cc を注入し、良く手で振つて十分に混合する。(ii) 更にこれを滅菌した毛細管ピペットですばやく混ぜた後、1/1 針付ツベルクリン注射器に吸引する。(iii) その1滴を型の如く紙片を貼つたスライド上に滴下し、その横に 1/2 針付注射器で食鹽水の1滴を滴らす(食鹽水は菌、血液の混合液に僅かに融合する位の距離に滴下するのが良い。この操作は我々の工夫によるものであるが、これが血液の乾くのを防ぎ、菌發育の均等なアレバートを得て後の觀察に基た便利である)。(iv) (iii) のスライド上に紙片を貼らない別のオブジェクトグラスを重ね、型の如くして封蠟、37°C の孵卵器に7日間培養する。この際水を満たした器を下に置き、適度の濕氣を興えると培養成績が良い。

内藤⁵⁾、西村⁴⁾、高橋¹⁸⁾等は、佐藤²⁾、緒方³⁾等の方法よりも流動パラフィンを使用する方が良好な菌増殖を見ると述べて居るが、著者等の食鹽水添加法も菌の増殖は極めて良好であつた。但し流動パラフィン使用法との比較は行つて居ない。標本に於ける菌の増殖状況は部位によつて異なり、従來の方法では周邊部に菌の増殖が最も著しいとされているが、我々の行つた食鹽水添加法では寧ろ最外周と中央部の中間に最大の菌増殖を認めた(次で菌の多いのは外周部で、中央部は最も菌が少ない)。又菌液と血液との混合割合については、血液等量より9倍量までのものを作つて調べたところ、8乃至9倍附近の割合が最も良好な結果を得た。培養操作の項で述べた所はこの割合である。

〔標本の作製〕 スライドセルを作つている標本の固形パラフィンを除き、2枚のスライドをはがすと血液の殆んどが一方のスライドグラスの方に附着する。端に附着した固形パラフィンはリグロインで拭き取り、更に5%鹽酸アルコールで完全に除去する。わずかの固形パラフィンが残つていても、染色時に熱せられて溶解し、菌の染色性が悪くなるから注意を要する。スライド上の菌・血液混合液を

自然乾燥せしめた後、水中に30分から1時間位浸して完全に溶血させ、溶血し終れば自然乾燥させて染色する。染色にはチール、ネールゼン法を用いたが、加温染色は10分位行うことが必要である。

2) 判定方法について

従來行われて來た判定には、佐藤²⁾、緒方³⁾、伊藤¹⁹⁾、波川²⁰⁾等の定性的な判定法、加納²¹⁾、辻本²²⁾等の定量的な判定法、などがある。加納の方法は1個1個に存在する菌を重要視せずに総括的な号数を以て表わし、辻本の方法は良法であるが、実際には菌数10個以上のものを正確に数え得ないと云う難点がある。著者等は判定に簡單であると共に、個々の菌を重視して次の様な判定方法を考案した。

即ち血液円板の一端より対称的な他端の方に顕微鏡の視野を移動させ、50視野を見る中に他端に達する様にする。菌増殖程度の判定は、個数に応じて次の如く(-), (+), (+), (+), (≡), (≡) の6段階に分類した。

- (-): 完全に1個の菌よりなるもの
- (+): 2個より4個までの菌よりなるもの
- (+): 5~10個の菌よりなる集落
- (≡): 11~30個の菌よりなる集落
- (≡): 31~50個の菌よりなる集落
- (≡): 51個以上の菌よりなる集落

以上の中我々は(+)以上の集落、即ち5個より10個までの菌を含む集落に於て、菌の増殖が起つたものと考えた。勿論2個乃至4個の菌より成る(+)の集落に於ても、一概に菌の増殖は無かつたものとする事は出来ないであらう。然し対照として觀察した操作直後の標本、並びに室溫(又は氷室)放置の標本中にも5~6%位の割合に2個乃至4個の菌が見られた為、一応これを除外して5個以上のものを(+)と判定した。標本判定の1例として動物 No. 1 に於ける実験成績を示せば第1表の如くなる。表に於て(-), (+), (+), (+), (+), (+) の各集落を50視野について總計すると右欄の数字を得る。即ちこの動物に於ては(-)の集落431個、(+), (+)の集落179個、(+), (+)の集落533個、(+), (+)の集落151個、(+), (+)の集落は夫々7個及び5個である。従つてこの標本50視野に於て数えた集落の總数は431+179+533+151+7+5=1306で、その中(+)以上と判定された集落の合計は696となる。厳密に云えば(-)の集落は1個の菌のみから成るものであるから集落と呼ぶのは不適當であるが、マイナスの意味を廣義に解釈すればかかる表現も許されるであらう。我々は(+)以上の集落数を全集落数で割り、その商に100を乗じた数値を「増菌率」と呼ぶ事にした。第1表の成績について見れば

$$\text{増菌率} = \frac{(+)\text{以上の集落数}}{\text{觀察した全集落数}} \times 100 = \frac{696}{1306} = 53.3(\%)$$

第1表 動物番號 No.1 の標本判定の結果表

増殖産	視 野 番 號										計	總 計
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
—	9	7	7	14	13	9	3	4	17	4	87	(-) 431 (±) 179 (+) 533 (++) 151 (+++) 7 (≡) 5 計 1,306 (+)以上の聚落 696 増菌率 53.3% 増殖指數 66.3
±	2	2	1	2	4	4	4	7	0	5	31	
+	16	7	17	9	16	16	6	4	5	23	119	
++	5	3	2	5	2	3	3	2	0	0	25	
+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
≡	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
—	9	16	8	9	4	9	9	8	5	3	80	
±	3	0	8	5	8	5	6	2	1	7	45	
+	0	1	3	11	3	13	14	16	7	10	78	
++	0	2	0	0	0	0	2	5	4	9	22	
+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
≡	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
—	8	6	11	4	8	9	13	8	6	12	85	
±	3	3	4	5	2	1	3	3	4	4	32	
+	15	17	17	12	19	10	17	12	11	10	140	
++	6	4	6	5	2	3	5	5	3	7	46	
+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
≡	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
—	6	9	12	10	9	8	10	9	11	8	92	
±	4	4	1	1	3	4	3	2	2	4	28	
+	16	15	8	14	5	12	13	7	4	18	112	
++	3	2	1	5	6	5	2	2	4	4	34	
+++	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	3	
≡	0	0	0	1	0	3	1	0	0	0	5	
—	9	6	8	7	10	11	9	13	6	8	87	
±	1	3	3	4	7	6	4	4	6	5	43	
+	10	7	12	14	11	7	7	8	5	3	84	
++	3	3	5	3	6	2	2	0	0	0	24	
+++	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	
≡	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

即ちこの数値は観察された菌 1306 個中増殖した菌が 696 個 (従つて全く増殖しないか又は増殖の疑わしい菌が 610 個) と云う意味で、血液中に S.C.C. 法によつて培養された全体の菌の中何パーセントが増殖するか、と云う事を示す数値である。我々は前述の如く 7 日間培養のプレバートに於て、最初 1 個 1 個ばらばらであつたものが 5 個以上の colony を作った場合のみ菌が増殖したと考え、7 日を経ても依然として 1 個のままのもの、又は 2 乃至 4 個程度にしが増えなかつたものは死んだ菌と考えた。従つて増菌率と

は血液中に培養された結核菌に対する発育許容率を示すものと考えられる。即ち増菌率 53.3 と云う事は、100 個中平均 53.3 個の菌が発育すると云う意味である。逆に云えば残りの菌が血液によつて殺されるものと考えられる。即ち

$$100 - \text{増菌率} = \text{菌増殖阻止率}$$

故に増菌率の低い血液ほど結核菌の増殖を阻止する能力が高いと見做し得る。但しこれには inoculate された菌が総て生菌であつたと云う条件が要る。我々はこの点を考慮して培養菌にはなるべく若い、age のものを用い途中の操作

にも気を付けたが、発育途上にある菌と雖も幾らかの死菌が混っている事を考えねばならないし、水晶玉で振盪する操作によつても多少の死菌が生ずる事は避けられないであろう。即ち S.C.C. を始めるに先立つて既に菌液中に死菌が含まれていることは否めないから、S.C.C. 法によつて増殖しなかつた菌の総てがその動物血液の菌増殖阻止力によつて殺されたものと判断するのは、早計とのそしりを免れないかも知れない。故に S.C.C. に用いられる菌浮游液は同時に定量培養を行つて生菌数は幾らであるかを調べて置く必要がある。而して異なつた菌浮游液を用いた場合、S.C.C. の成績を比較する時は、一応かかる生菌数の略々等しいものに就いて行くべきと考える。但し菌浮游液調製の条件を常に同じくし、生菌中に含まれる死菌の割合が実験の都度略々一定ならば、上述の増菌率は比率を以て表わされたものであるから、培養に用いられた菌量には理論上無関係の筈である。実際に於て我々が用いた 8 日目の菌から前述の操作で菌浮游液を作つた場合、定量培養による菌数は大体何時も一定して居た。のみならず定量培養の成績と比較して考察すれば、生菌浮游液と考へたものの中に必然的に混在する死菌の割合はさして多いものではない様である。かく考えるならば、上述の増菌率は厳密に云つて更に何パーセントか上廻るものである(始めからの死菌を除外するので)としても、これは実験誤差の範囲に数えて差支えないであろう。而もかかる実験誤差は同一の菌浮游液を作用する限りどの血液についても同じであるから、各血液間の増菌率を比較する上には何等妨げにならない。以上述べた増菌率は、要するに血液の持つ能力を、培養された結核菌の何パーセントを殺し何パーセントを増殖させるかと云う比率によつて表わしたものである。この数字は実際に観察した colony の状態から割り出したもので主観の混入する余地は少なく、菌に対する血液の働きを可なり客観的に示すものとする。

これと平行して我々は更に「増殖指数」と云う表現によつて血液の能力を表わす事を考へた。これは増殖の程度に(+)から(++)までの差のある事を考慮に入れて、プラスの程度に重みを与へたものである。即ち増菌率は接種された菌の中増殖能力ある菌の割合を示すものであるが、それが何個にまで増殖するかと云う程度を表わしたのではなかつた。故に我々は(++)には(+)の 4 倍、(+++)には 3 倍、(++++)には 2 倍の重みを与へ、これ等の指数を夫々の colony 数に乗じた後、増菌率と同様に計算した値を増殖指数と呼ぶ事にした。表 1 の例に於てこの値は 66.3 である。増菌率に於ける各 colony は、それが非常に多数の菌を含むものであつても少ないものであつても、(+)以上である限り同様に取扱われたが、増殖指数に於ては如何なる colony が多いかによつて

重みが違うから、理論的には増菌率の小さい血液でも、増殖指数は前者の大なるものよりかえつて大きいと云う場合も生ずるのである。故に我々は血液の能力を表現する場合、増菌率と増殖指数の両面から見て行く事が合理的ではないかと考える。

3. 実験方法

S.C.C. 法の基礎的研究として我々が今回行つた実験は 2 つの部分から成る。

第 1 の実験は前項に述べた判定方法により、動物間に個体差が認められるか否かを検討したもので、これは血液の示す増菌率に個体的な変動があるか否かによつて調べた。又、用いられた菌浮游液中の生菌数を S.C.C. 標本からの直接計算法並びに定量培養法によつて夫々測定し、両者の比(以下 A と略記)と増菌率との関係、及び後者と増殖指数の関係の求めた。

第 2 の実験は S.C.C. の標本を時間を追つて観察し、これから菌の世代時間を推定しようとするもので、我々の方法で作つた菌浮游液は殆んど 1 個宛らばらばの菌から成つていた為この実験を計画したものである。

以上の目的で用いられた実験材料及び実験方法は次の如くである。

i) 実験動物 健康成熟海豚雌雄混合 21 頭、重量 600 g 内外のものを使用した。

ii) S.C.C. のプレバートより生菌数を求める方法

茲に云う生菌数は定量培養法によつて求め得る生菌数とは少しく意味を異にする。即ち後者に於ては菌浮游液に含まれる生菌の数が得られるが、前者に於てはその中血液によつて殺されなかつた残りの生菌が、数えられる事になる。従つて増菌率を求めた時と同様に 5 個以上の菌より成る colony を生菌と考へた。S.C.C. 法によつて培養される以前既に菌浮游液中に混在していた死菌と、培養後血液によつて殺された死菌とを区別する事は必ずしも不可能ではないが、これには可なり誤差を伴なうから茲では便宜上両方の死菌を除いた残りの菌を数える事にした。その方法は、次に述べる如く大体に於て大原等²³⁾の行つた方法に準じたものである。

先ず検定した 1/1 針付ツベルクリン注射器に菌液、血液の混合液を正確に 1 cc 吸い上げ、ピストンを押す事なく自然にこれを滴下させて 1 cc が何滴から成るかを数える。次いで第 1 表の如くして数えた 1 視野平均(+)以上の colony 数(以下これを生菌数と記す)に、標本全体の視野数を乗じて混合液 1 滴中の総生菌数を計算する。標本の総視野数を求めるには予め顕微鏡 1 視野の直径をマイクロメーターで計測して面積を出し、標本 1 滴の面積(その長径と短径を

夫々 a, b, とすれば $1/4 \pi ab$ で表わされる) を前者で割ればよい。

今菌液と血液の混合比を d, 混合液 1 cc の滴数を t, 顕微鏡 1 視野の直径を c (単位 μ), 染色標本の長径, 短径を夫々 a, b (単位 mm), 1 視野に観察された平均生菌数を p とすれば

菌液 1 cc 中の生菌数 = (1 視野の平均生菌数) \times (視野数) \times (混合液の滴数) \times (菌液, 血液の混合比)

$$= p \left\{ \frac{1}{4} \pi ab \times 10^6 + \frac{1}{4} \pi c^2 \right\} \times t \times d = \frac{p t d ab}{c^2} \times 10^6$$

この式に於て 10^6 を乗じたものは染色標本の面積を μ の単位で計算した為である。

iii) 定量培養法 小川の培地を用い型の如く行つた。

iv) 世代時間の測定法 S.C.C. 法によつて BCG を培養し, 対照として培養直後の染色標本を観察するほか, 5 時間目から 125 時間まで時間を追つて観察, 1 個の菌が 2 個, 2 個の菌が 4 個となるに要する時間を測る。実際の分裂を catch する事は不可能であるから, 実験的には各時間毎に 1, 2, 4, ... 個の菌から成る colony の percentage を求め, これから世代時間を推定した。

4. 実験成績

実験 1 健康成熱海豚の全血に於ける菌増殖の個体差並びに各指数間の相関関係について

21 頭の子豚について, 第 1 表で示した如き増菌率及び増殖指数を夫々求め, 更に各動物毎に S.C.C. 標本による生菌数, 並びに之と定量培養法による生菌数との比 (A) を計算して纏めたものが第 2 表である。菌浮游液調製上の条件が一定して居れば, 増菌率, 増殖指数, 及び A の値は培養した菌量に無関係な筈であるから, この表に於ては濃度の異なる 2 種の菌液を使用して見た。即ち動物 No. 11 から 25 までの 12 頭に用いた菌液は, 定量培養による菌数が 1 cc 中 325 万, No. 1 から 10 までの 9 頭に用いた菌液は, 2600 万の濃度のものである。この表を一見して分る様に各々の動物に於ける増菌率, 増殖指数, A の値は大体平行しているが, かかる 3 つの値を動物相互の間で比較して見るとかなりの個体差が認められる。故に此の成績を個体差について眺めるため, 増菌率の程度に従つて全体を 5 群に分け, 各群に動物をあてはめて整理して見た。第 3 表はこの様にして纏めた増菌率と増殖指数との関係, 第 4 表は同じく増菌率と A との関係を示すものである (尚用いた動物は大体同じ条件のものを採んだが No. 21, 22, 25 の 3 頭は体重が 400 g 前後で稍小さかつたので第 3 表はこれを除外して纏めて見た)。今増菌率を (i) 20% 以下のもの, (ii) 21% から 40% までのもの, (iii) 41% から 60% までのもの, (iv)

第 2 表 各実験動物の実験成績結果表

動物 (No.)	増菌率 (%)	増殖指数	S.C.C. 法 の菌数 (万)	S.C.C. 法 の菌数 / 定量培養 法の菌数
1	47	122	975	0.37
2	44	120	1,305	0.5
3	70.5	104	2,101	0.81
4	82.7	222	2,606	1
5	70.1	82	1,824	0.7
6	47.5	52	1,477	0.57
7	59	71	2,835	1.1
8	69	160	2,081	0.77
10	79	162	1,298	0.5

定量培養法による菌数: $2,600 \times 10^4$

11	13	18	54.5	0.18
12	47.7	53.5	214.5	0.66
13	73.7	96.5	521.5	1.7
14	80.3	176.5	540	1.66
15	61	103	580	1.8
16	68	111.1	237	0.73
17	73.1	129	235	0.78
18	60	71	501.3	1.5
19	10.4	12.5	15.4	0.05
21	5.8	6.5	37.1	0.01
22	13.4	37.3	25.7	0.08
25	60	79.2	446	1.37

定量培養法による菌数: 325×10^4

第 3 表 健康「モルモット」に於ける
増菌率及び増殖指数

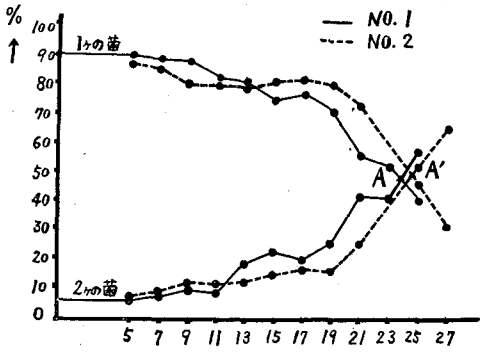
増菌率 (%)	0~20	21~40	41~60	61~80	81~100
頭数	2	0	6	8	2
百分率	11.1	0	33.3	44.5	11.1
平均増殖指数	15	0	83	118	199

第 4 表 $A = \frac{\text{S.C.C. 法による菌数}}{\text{定量培養法による菌数}}$ と増菌率

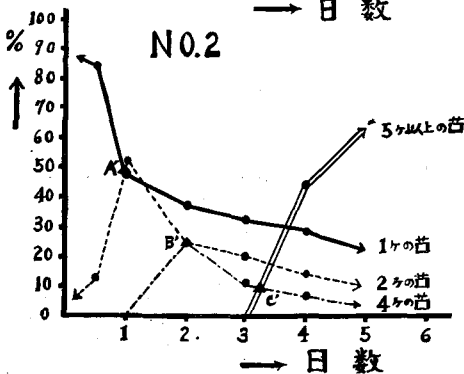
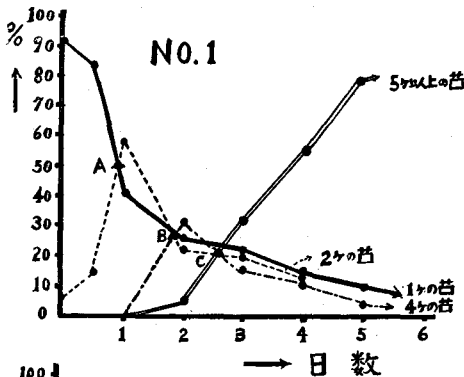
増菌率 (%)	0~20	21~40	41~60	61~80	81~100
頭数	4	0	7	8	2
平均 A	0.105	0	0.87	0.97	1.33

実験2 S.C.C. 法による BCG の増殖状態とその世代時間について

S.C.C. 法によつて BCG の世代時間を観察しようとする目的で、5時間目から始めて25時間まで2時間毎に11回、27時間より125時間まで10回、合計21回に亘つて染色標本を作り、菌の増殖状態を観察した。同じ体重の海豚2頭の血液を用い夫々別々に調べたが、これは用いる血液によつて世代時間が異なるかも知れないと考えたからである。菌の増殖状態を見るには、孤立した1個の菌、2個、3個、4個…等の菌から成る colony を数え、その percentage



第1圖 25時間以内の1箇及び2箇の菌の増殖状態と世代時間



第2圖 BCG の増殖状態と世代時間

の時間的推移を調べた。25時間以内の成績は第5表、それ以後の成績は第6表に纏められて居る。第1図及第2図はこれを図示したものである。両図とも縦軸に各状態の菌の百分率をとり、横軸には時間をとつた。第1図は培養直後から25時間までの1個及び2個の菌の消長を示したもので、3個以上の菌は25時間を経ても全体の1%以下しか認められなかつた為図から省いた。図に於て実線はNo. 1の海豚血液、点線はNo. 2の血液を用いた成績である。No. 1の動物について菌の消長を見ると、図に示されている如く5時間目にはその91.7%までが1個の孤立した菌から成るが、このpercentageは時間と共に少し宛減少し、19~21時間以後は急激に下降の傾向をとる。これに反し2個の菌は、5時間目に全体の5.7%しか観察されなかつたものが時間と共に少し宛増加し、殊に19~21時間以後急激に上昇して前者と点Aに於て交わる。この点は1個の菌と2個の菌が同率になる点で、横軸の読みを取ると約24時間、縦軸の読みを取ると約50%に相当する。この事は、最初1個であつた菌の約半数が、24時間経つと分裂して2個の菌となる事を示すもので、この場合世代時間は24時間であると考えられる。No. 2の動物に於ても同様で、1個の菌の消長を示すcurveと2個の菌のそれとは点A'に於て交叉し、時間にして約25時間、パーセントは同じく50%の点に相当する。その後の消長は第2図に見る如く、動物No. 1に於ける2個の菌のcurveと4個の菌のcurveは点B、4個の菌と5個以上の菌のそれは点Cに於て夫々交わる。B点の読みは時間にして48時間、パーセントにして25%、C点の読みは20%及び64時間に相当する。No. 2の動物では同じくこれがB', C'に於て交わり、前者の読みはpercentageが約25%、時間は約48時間、後者はこの値が夫々約10%、78時間であつた。この様にS.C.C.によつても菌はlogarithmicな増殖を示す事が証明され、従つてこれから世代時間を推定する事が可能である。尙125時間までのdataの詳細は第5表、第6表に記載した通りで、125時間になると11~20個から成るcolonyが最も多く(46.8%)5~10個のものがこれに次ぐ(25.0%)、1個の菌も尙9.6%に認められた。一定の誤差を許す範囲内で、これだけに相当する菌が死菌であつたと考えてよいであろう。2個から4個までの菌が殆んど見当たらないのは(総計で2.7%)この時期になると大部分はそれ以上に分裂してしまうためと考えられる。

5. 總括並びに考按

実験動物を使用する場合、純系の動物を使用すべきことが近来特に主張されて居る。この目的が、動物の総ゆる条件を一定にし、個体差を出来るだけ少なくして実験成績

の正確を期そうとする事にあるのは云う迄もない。然るに今日の我が国の実情に於ては、純系の動物を数多く使用する事は可なり困難である。従つて多くの場合、雑系と考えられる動物によつて実験しなければならず、必然的に個体差の有無が問題となつて来る。殊に結核に於ては S.C.C. 法の成績を指標として個体の免疫、抵抗を見て行こうとする試みが数多くなされているが、この様に変動の多い方法を用いる場合、特に個体差について慎重な注意が必要となつて来る。この点に就いては、海猿血液の結核菌増殖作用に個体的な差ありと唱える者もあり差無しと唱える者もあつて必ずしも一致を見ていない。例えば加納²¹⁾、辻本²²⁾等は菌増殖作用に個体的な差なしと云い、緒方²³⁾、宝来²⁴⁾、熊本²⁵⁾等は個体差ある事を認めて居る。特に緒方は 118 頭中 28% に於て、熊本は 65 頭中 4.5% に於て菌増殖傾向が認められなかつと報じて居る。西村²⁶⁾、宝来²⁴⁾等はこれに反しパラフィンを用いて全例に菌の増殖を認め、我々の実験に於ても程度の差はあれ菌増殖傾向を認めなかつた例は 1 例もなかつた。流動パラフィンと共に我々の用いた食塩水添加法も菌増殖には好適と考えられる。然し個体差については既述の実験成績から明らかな様に、我々もこれを認めるに吝かでない。これまで個体差を認めたものの判定方法には可なり主観的なものがある様に思われたので、我々は実験手技を一定にし判定にも客観的な基準を設けて比較したが、やはり動物個体間には相当な開きが認められた。但し我々の成績は、重量的に同じ動物を集めはしたが純系の動物によるものではなく、年齢、性別、環境等の点について更に検討を要するものと考ええる。然しそれにしても一見同じように見える動物間に、甚だしく増殖を抑えるものがある事は注意を要する。我々の得た成績から見れば、かかる個体差を考慮に入れない限り、免疫の程度、動物血液の菌発育阻止作用等を S.C.C. 法によつて比較する事は無意味である。かかる研究を行う場合は同一個体について菌に対する血液の作用の消長を調べるか、或いは極めて多数の動物から得た成績を平均して結論を求めるより他はないと考える。後者の方法を取つたにしても動物の持つ個体差は相当に大きいから、実験誤差も亦可なり大きいと見るべきであろう。

次に我々は S.C.C. を用いて BCG の世代時間を求めようと試みた。これまで結核菌の世代時間は色々な方法によつて測定されているが、その値は勿論、用いられた培地、菌型、菌株及び測定方法如何によつて異なるものである。世代時間の測定は Youmans 等に負う所多く、培養菌の窒素を測定して世代時間を求める法²⁶⁾ (Micro-Kjeldahl 法)、少量の菌を液体培地に植えて増殖による混濁が最初に認められた日数から求める法²⁷⁾ (Small inoculum technique)、

マウスに菌を接種してその survival time から求める法²⁸⁾、菌液の turbidity から Nephelometer によつて測定する法²⁹⁾、などが報告されて居る。この中動物体内に於ける世代時間は毒力菌の場合しか求められない。他の 3 者はすべての菌型、菌株に用い得るが、何れも菌の質量増加に主眼を置き、これから間接的に計算によつて求める方法である。世代時間とは云う迄もなく 1 個の菌が 2 個、2 個が 4 個に分裂するに要する時間であるから、S.C.C. 法はこれを顕微鏡下に観察し得る唯一の方法である。この方法は連続的な方法でない事、及び多大の労力を要すると云う欠点を持つが、1 個 1 個の菌の分裂状態を直接肉眼で見得ると云う点で意義のないものではない。我が国に於ては既に辻本²²⁾、の報告を見るが、我々も 5 時間から 125 時間に亘つて詳細に菌の増殖状態を観察し、前述の如く BCG の世代時間を 24 時間と推定した。尙辻本は培養と同時に菌が対数増殖期に入るものと仮定し、世代時間を計算によつて求めて 31 時間と報告して居る。但しこれは BCG でなく人型菌上池株に於けるものである。菌株によつて世代時間が異なる事は当然考え得るが、同一菌株でも S.C.C. 法の場合は血液によつて差が出ると考えられるので、1 つの菌株の妥当な世代時間を求めるには何頭かの血液について測定した値を平均するのが良いであろう。但し世代時間は菌株に固定したのではなく、条件によつて夫々の場合に異なる筈のものであるから、各動物について一定しなくても、何れが正しく何れが誤りと云うべきものではない。

菌に於ても一般的に云つて 1 個 1 個の菌が有する世代時間に遅速があると考えられるので、我々は 50% 致死量、50% 溶血などの考え方と同様に、全体の菌の中半数が分裂して倍になる時間を 1 世代時間と見做す事にした。かく考えて第 1 図の点 A 及び A' を眺めると、この点は丁度縦軸の読みが 50% であるから、1 個の菌が半数に減じ、それだけの分が 2 個に分裂した事を示す点である。時間で見ると A、A' 共に大体 24 時間に相当する。若し 24 時間を 1 世代時間と考えるならば、この時期に見られなかつた 4 個の菌 (厳密に云えば 0.2 乃至 0.9% に存在) が以後増加し、2 個の菌が減少して両者の curve が交叉する点は当然 48 時間目である筈である。而して実際に観察した点は第 2 図の B 及び B' で、両者は何れもこの理論値を完全に満足する事が出来た。即ち B、B' は 2 個の菌と 4 個の菌が同率に認められる点で、最初から数えて 2 世代目を示すものと見做し得る。従つてこの実験に於ける世代時間は約 24 時間と推定する事が出来る。同様にして 3 世代目の点 C、C' は夫々 64、78 時間の値を得た (理論的には 72 時間となる筈である)。2 代目まで 2 頭の動物の値が良く一致したのにここに來て多少の「ずれ」を認めた理由は、実際に 4 個の菌と 8

個の菌の交叉点を求める代りに、4個と5個以上の菌の交叉点を求めた為であろう（培養時間の経過と共に3個、5個などと云う2の倍数でない colony も現われて来るので交叉点に見られる夫々のパーセントも亦必ずしも理論通りではなくなつて来る）。然し何れにせよ以上の成種から見ると、菌は S.C.C. 法で培養した場合も一定時間の間 logarithmic な増殖を示す事が明らかである。これから世代時間を求める事は、染色標本を観察して分裂状態を見るものである点に於て直接的な方法であり、同時に又可なりの正確さを持つものと考えられる事が出来よう。

6. 結 論

1) S.C.C. 法の成績をより正確なものとするため、菌液の調製並びに途中の操作に改良を加え、その判定法に客観的定量的な方法を考案した。増菌率及び増殖指数の測定がこれで、実例につきその求め方を述べた。

2) S.C.C. 法に於ける菌増殖状態を21例の海豚についてこの方法で比較した結果、動物相互間に個体差あるを認めた。但し菌増殖傾向の見られないものは1例もなかつた。

3) S.C.C. による菌の増殖には対数的増殖期が認められ、これによつて求めた BCG の世代時間は約24時間であつた。

稿を終るに當り、終始御指導御校閲を忝うした恩師大原教授に衷心より感謝する。

文 献

- 1) Wright: Lancet Vol. 24, 365, 1923.
- 2) 佐藤: 實驗醫學雜誌. 10(8), 871, 大15.
- 3) 緒方: 結核. 10(3), 117, 昭7.
- 4) 西村: 結核. 13(9), 770, 昭10.
- 5) 内藤: 結核. 16(3), 192, 昭13.
- 6) 外山・他: 結核. 15(5), 519, 昭12.
- 7) 長谷川・他: 結核. 15(5), 515, 昭12.
- 8) 小野塚: 結核. 25(9, 10, 11), 453, 昭25.
- 9) 戸塚・他: 綜合醫學. 8(3), 111, 昭26.
- 10) 大田: 醫學と生物. 31(2), 80, 昭29.
- 11) 水嶋: 千葉醫學會雜誌. 27(3, 4), 129, 昭27.
- 12) 松島: 結核. 28(11), 793, 昭28.
- 13) 三崎: 十全醫學會雜誌. 55(9), 1059, 昭28.
- 14) 小谷・他: 大阪醫學會雜誌. 6(1), 13, 昭28.
- 15) 眞山: 抗酸菌病研究雜誌. 9(1), 49, 昭28.
- 16) 大塚: 醫學と生物學. 13(6), 403, 昭23.
- 17) 原: 名古屋市立大學醫學會雜誌. 4(1), 56, 昭28.
- 18) 高橋: 北海道醫學會雜誌. 27(1), 44, 昭27.
- 19) 伊藤: 結核. 8(3), 291, 昭5.
- 20) 澁川: 結核. 11(2), 63, 昭8.
- 21) 加納: 金澤醫科大學結核研究年報. 第4年, 143, 1946.
- 22) 辻本: 大阪大學醫學雜誌. 4(4), 263, 昭27.
- 23) 大原・他: 結核. 28(6), 289, 昭28.
- 24) 寶來: 結核. 17(6), 621, 昭14.
- 25) 熊本: 醫學研究. 14, 131, 1940.
- 26) Youmans: J. Bact. 51, 703, 1946.
- 27) Youmans et al: J. Bact. 58, 247, 1949.
- 28) Youmans et al: Am. Rev. tuberc 64(5), 534, 1951.
- 29) Kirchheimer & Youmans: Am. Rev. tuberc 66(6), 758, 1952.