髄膜炎菌の研究

〔II〕 フラン誘導体の髄膜炎菌に対する抗菌作用について

岩 崎 広 次

京都大学医学部微生物学教室(主任 木村康教授)

〔受付: 1月8日, 1951年〕

1944年米國の Eaton 研究所の Dodd & Stillman によりフラン誘導体が抗細菌性活性を有する事実が発見されて以来, フラン誘導体の化学療法における位置は益々重要視されている現状である。

わが國においてもアメリカの研究とは全く別個に本学薬学科西海枝助教授が1916年2-(5-Nitro)-furaldehyde semicarbazone を合成し当教室において各種細菌に対する抗菌性の強大な事を認めて以来, 引き続き現今に到る迄類似化合物の合成, 試験管内及び動物体内殺菌試験, 臨床的應用等の各分野にわたり広範な研究が進められている。

私は京都市及びその近郊において散发性に発生した髄膜炎患者のリコール及び鼻咽腔より髄膜炎菌の分離を行い, えられた若干の菌株を中心としてフラン誘導体, とくに 2-(5-Nitro)-furaldehyde semicarbazone がナイセリアの諸菌に対していかなる抗菌作用を及ぼすかについて実験を行つたので報告する。

実 験

I. 髄膜炎菌及び他のナイセリアの諸菌に対する抗菌作用

実験方法と実験材料

1) 供試薬剤 フラン誘導体の1つである2-(5-Nitro)-furaldehyde semicarbazone (以下Fと略す)の純粋な黄色結晶性粉末を用いた。

2) 使用菌株 髄膜炎菌は髄膜炎患者のリコールより分離した3株(LN₁, LN₂, LM)と鼻咽腔より分離した3株(RMa, RF, RY)を用いた。リン菌は教室保存の日赤株(N)平安株(He), 患者より分離した長谷川株(Ha)の3株であり, M. catarrhalis, M. perflavus, M. flavus, M. subflavus はいずれも健康医師の鼻咽腔より分離した菌株で各3株を任意に選び実験に使用した。

3) 稀釈法によりその抗菌価を判定した。使用培地はpH7.4の腹水ブイヨンを用い, 本培地6ccに18時間培養の各菌を移植し, 24時間乃至72時間後にその成績を檢した。

4) 接種菌量 pH7.4の腹水ブイヨン6ccに24時間

腹水素寒天培養の各菌を1白金耳移植し37°C18時間培養後, その0.05ccを各試験管に接種した。

実験成績

第1表に示す。第1表の成績より次の事が考えられる。

第1表 Neisseria の各菌に対する F の發育完全阻止濃度

菌 種	菌 株	24 時 間	72時間
Neisseria meningitidis intracellularis	LN ₁	$\frac{1}{3} \times 10^{-4}$	$\frac{1}{2} \times 10^{-4}$
	LN ₂	$\frac{1}{4} \times 10^{-4}$	$\frac{1}{2} \times 10^{-4}$
	LM	$\frac{1}{3} \times 10^{-4}$	$\frac{1}{2} \times 10^{-4}$
	RMa	$\frac{1}{5} \times 10^{-3}$	$\frac{1}{5} \times 10^{-3}$
	RF	$< \frac{1}{5} \times 10^{-3}$	$< \frac{1}{5} \times 10^{-3}$
	RY	$\frac{1}{5} \times 10^{-3}$	$< \frac{1}{5} \times 10^{-3}$
Neisseria gonorrhoeae	N	$\frac{1}{2} \times 10^{-4}$	1×10^{-4}
	He	1×10^{-4}	$\frac{1}{5} \times 10^{-3}$
	Ha	$\frac{1}{3} \times 10^{-4}$	$\frac{1}{2} \times 10^{-4}$
Neisseria catarrhalis	No. 4	$\frac{1}{16} \times 10^{-4}$	$\frac{1}{12} \times 10^{-4}$
	No. 1	$\frac{1}{12} \times 10^{-4}$	$\frac{1}{8} \times 10^{-4}$
	No. 3	$\frac{1}{12} \times 10^{-4}$	$\frac{1}{8} \times 10^{-4}$
Neisseria perflava	No. 2	$\frac{1}{6} \times 10^{-4}$	$\frac{1}{4} \times 10^{-4}$
	No. 10	$\frac{1}{3} \times 10^{-4}$	$\frac{1}{4} \times 10^{-4}$
	No. 6	$\frac{1}{4} \times 10^{-4}$	$\frac{1}{2} \times 10^{-4}$
Neisseria flavus	No. 8	$\frac{1}{3} \times 10^{-4}$	$\frac{1}{4} \times 10^{-4}$
	No. 15	$\frac{1}{4} \times 10^{-4}$	$\frac{1}{3} \times 10^{-4}$
	No. 5	$\frac{1}{3} \times 10^{-4}$	$\frac{1}{4} \times 10^{-4}$
Neisseri subflavus	No. 13	$\frac{1}{4} \times 10^{-4}$	$\frac{1}{4} \times 10^{-4}$
	No. 11	$\frac{1}{4} \times 10^{-4}$	$\frac{1}{3} \times 10^{-4}$
	No. 7	$\frac{1}{4} \times 10^{-4}$	$\frac{1}{3} \times 10^{-4}$

1) ナイセリアの各菌はカタル性球菌を除き一般にFに対する感受性は低い。なかんづく髄膜炎菌, リン菌に対して著明である。

IWASAKI, Kōji: Studies on meningococcus. II. On antimeningococcal activities of furan derivatives, Jap. J. Bact., 6(2), 127—131, 1951.

第2表 培地に対する血液、腹水添加と抗菌価(72時間後)

F の 稀 釋		$1/5 \times 10^{-3}$	$1/7.5 \times 10^{-3}$	1×10^{-4}	$1/1.5 \times 10^{-4}$	$1/2 \times 10^{-4}$	$1/3 \times 10^{-4}$	$1/4 \times 10^{-4}$	$1/6 \times 10^{-4}$	$1/8 \times 10^{-4}$	$1/12 \times 10^{-4}$	$1/16 \times 10^{-4}$	對 照
検 査 培 地	肉 汁	—	—	—	—	—	—	+	++	+++	+++	+++	+++
	腹 水	—	—	—	—	—	±	+	+++	+++	+++	+++	+++
	全 血	—	—	—	—	—	++	++	+++	+++	+++	+++	+++

第3表 接種菌の培養時間と抗菌価(72時間後)

F の 稀 釋		$1/5 \times 10^{-3}$	$1/7.5 \times 10^{-3}$	1×10^{-4}	$1/1.5 \times 10^{-4}$	$1/2 \times 10^{-4}$	$1/3 \times 10^{-4}$	$1/4 \times 10^{-4}$	$1/6 \times 10^{-4}$	$1/8 \times 10^{-4}$	$1/12 \times 10^{-4}$	$1/16 \times 10^{-4}$	對 照
接種菌材料の 培養時間	16 時 間	—	—	—	—	—	—	+	++	+++	+++	+++	+++
	24 時 間	—	—	—	—	—	—	+	+	++	+++	+++	+++
	48 時 間	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	+++	+++
	72 時 間	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	++	+++

第4表 接種菌数と抗菌価

判定時間	F の 稀 釋	$1/5 \times 10^{-3}$	$1/7.5 \times 10^{-3}$	1×10^{-4}	$1/1.5 \times 10^{-4}$	$1/2 \times 10^{-4}$	$1/3 \times 10^{-4}$	$1/4 \times 10^{-4}$	$1/6 \times 10^{-4}$	$1/8 \times 10^{-4}$	$1/12 \times 10^{-4}$	$1/16 \times 10^{-4}$	對 照
	菌液・ 稀 釋												
二十四時間後	原	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
	10^{-2}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
	10^{-4}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10^{-6}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10^{-8}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
四十八時間後	原	—	—	—	—	—	—	—	+	+	++	++	++
	10^{-2}	—	—	—	—	—	—	—	—	±	+	++	++
	10^{-4}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
	10^{-6}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	+	+
	10^{-8}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
百二十時間後	原	—	—	—	—	—	—	+(顆)	++	+++	+++	+++	+++
	10^{-2}	—	—	—	—	—	—	—	+(顆)	++	+++	+++	+++
	10^{-4}	—	—	—	—	—	—	—	—	++	+++	+++	+++
	10^{-6}	—	—	—	—	—	—	—	—	++	+++	+++	+++
	10^{-8}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	+++	+++

+(顆)……顆粒状發育

2) 髄膜炎菌の咽頭株は、リコール株及び他のナイスリアの菌に比して感受性が最も小である。

3) 同一の菌種であつても菌株によつてFに対する感受性に差が認められる。

II. 培地に対する腹水、血液の添加と抗菌価

以上の実験は腹水ブイオンを使用して行われた。しかし、検査する培地として血液を使用する時はブイオンにおいて認められるニトロフラン誘導体の殺菌能力を低下(Nitrofur aldehyde semicarbazone, Nitrofurfuryl propionate)もしくは全廃(Nitrofuryl methyl ketone)させ

第5表 Fを含有する Huntton のホルモンブイヨンに於ける髄膜炎菌の發育狀態

判定時間	Fの稀釈 菌液 稀釈	$1/6 \times 10^{-3}$	$1/7.5 \times 10^{-3}$	1×10^{-4}	$1/1.5 \times 10^{-4}$	$1/2 \times 10^{-4}$	$1/3 \times 10^{-4}$	$1/4 \times 10^{-4}$	$1/6 \times 10^{-4}$	$1/8 \times 10^{-4}$	$1/12 \times 10^{-4}$	$1/16 \times 10^{-4}$	對照
二十四時間後	原	—	—	—	—	—	—	—	+	++	(++)	(++)	(++)
	10^{-2}	—	—	—	—	—	—	—	+	++	(++)	(++)	(++)
	10^{-4}	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	(++)	(++)
	10^{-6}	—	—	—	—	—	—	—	—	±	+	(++)	(++)
	10^{-8}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
七十二時間後	原	—	—	—	—	—	—	++(顆)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
	10^{-2}	—	—	—	—	—	—	++(顆)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
	10^{-4}	—	—	—	—	—	—	—	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
	10^{-6}	—	—	—	—	—	—	—	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
	10^{-8}	—	—	—	—	—	—	—	—	(++)	(++)	(++)	(++)

++(顆)……顆粒狀發育

(++)……著明なる菌膜形成

る事実が1945年 Cramer & Dodd によつて認められている。当教室においても既に生垣氏により血液、血漿、血清等の体液の存在下においてはフラン誘導体はその滲透能が抑制されるという事実が見出されている。

ゆえに培地に腹水を添加した場合においては添加を行わない場合と比較して稀釈法においていかなる差が認められるかについて一應検討を行った。

実験方法

- 1) 使用菌株 髄膜炎菌 LN₂ 株(リコール株)
- 2) 使用培地 pH 7.4の肉汁ブイヨン, pH 7.4の腹水ブイヨン(新鮮腹水1分+肉汁ブイヨン3分), pH 7.4の全人血加ブイヨン(クエン酸ソーダ加入血を10%の割合に添加)以上3種の培地を用いた。
- 3) 接種菌量 髄膜炎菌 LN₂ 株の18時間肉汁ブイヨン培養を0.05 cc 宛各試験管に接種した。生菌数はほぼ 6×10^7 である。

実験成績

第2表に示す。第2表の成績は接種後3日のものである。即ち稀釈を比較的小さく区切る事により若干の相違は認められる。肉汁ブイヨン培地においては3万倍及びそれ以下の稀釈においては菌の發育を認めず、4万倍6万倍の稀釈においては發育は抑制される。腹水ブイヨンにおいては3万倍稀釈においてほとんど發育を認めず、4万倍の稀釈において發育は抑制され、全血加ブイヨンにおいては3万倍、4万倍の各稀釈はいずれも發育を抑制され、両者共6万倍以上の稀釈においては対照試験管とほとんど差のない旺盛な發育を認めた。

III 接種菌の培養時間と抗菌價

接種菌の新旧による抗菌價の差違を追求してみた。

実験方法

- 1) 使用菌株 髄膜炎菌 LN₂ 株(リコール株)
- 2) 使用培地組成

照内・肥田肉エキス	10 g
ポリペプトン	10 g
食塩	2 g
蒸留水	1 l

以上の培地900 ccに10%酵母浸出液100 ccを加えpHを7.4に修正する。

- 3) 稀釈法により抗菌價を判定した。

4) 接種菌量 上記酵母エキスブイヨン(pH 7.4)6 ccに24時間培養の菌を1白金耳接種し37°Cに培養を行い、16時間、24、48、72時間の各時間後適宜10%ブイヨン加生理的食塩水で稀釈し、その0.05 ccを各試験管に接種した。生菌数は $2.5 \times 10^8 - 3 \times 10^7$ /cc である。

実験成績

第3表に示す。成績は3日後のものである。即ち接種菌の新旧により軽度ではあるが差違が認められる。培養の新しい菌即ち16時間から24時間培養の菌を接種した場合には、古い菌即ち43時間から72時間培養の菌を用いた場合に比較してFに対する感受性はやや低いことが認められた。

IV 接種菌数と抗菌價

従来髄膜炎菌は比較的大量の菌数を移植するならば、條件の悪い培地においてもよく發育を営む事実が知られ

ている。この事は古来“栄養の持ちこし”という概念によつて漠然と認識されていた。1948年 Scherp & Fitting は Frantz の合成培地を用いる実験においてこの事を比較的明確にしている。即ち彼等は大量の菌量を移植する時は、ブドウ糖を含有しない合成培地に又炭酸ガスの特別に與えられていない気中においてもよく発育する事を認めている。彼等はまた少数の菌数によつては Frantz の合成培地及びブドウ糖を含有しない同培地に発育を認めない菌株においても、繰り返し同種培地に移植を行う事によつて短期間に発育し得るに到るのを認めた。

彼等はこの実験結果の意味づけを、良好な培地において正常な条件下で惹起されておりかつ変化を與えられた不良な培養条件において発育乃至存在しうる変異の選択という事に求めている。

以上の考え方をある程度肯定するならば、培地化学療法剤という広い意味における不良な条件下で髄膜炎菌の発育を営ましめるこの実験において、菌数がいかなる影響を與えるかという問題は直接この菌の化学療法剤に対する耐性の問題とも関連を有し検討すべき点と考えられる。

実験方法

- 1) 使用菌株 髄膜炎菌 LN₂ 株(リコール株)
- 2) 使用培地 酵母エキス加ブイオン(pH 7.4)
- 3) 希釈法により判定した。
- 4) 接種菌量 pH 7.4 の酵母エキス加ブイオンに髄膜炎菌を接種し血温 24 時間培養後、希釈しないあるいは 10%ブイオン加生理的食塩水で 10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-6} 、 10^{-8} に希釈した菌液をそれぞれ 0.05 cc 宛各試験管に接種した。

実験成績

血温に培養し 24, 48, 120 時間後に発育の有無と発育状況を檢した。成績は第 4 表に示す。

第 4 表の成績より、120 時間(5 日後)における F の完全発育阻止濃度は原液においては 3 万倍、 10^{-2} 希釈においては 4 万倍、 10^{-4} 及び 10^{-6} 希釈においては 6 万倍、菌の発育の認められる最大希釈 10^{-8} においては 8 万倍である。即ち希釈法によつて F の髄膜炎菌に対する抗菌價の判定を試みる時、接種菌量が少くとも 10^{-2} の差を有する時完全発育阻止濃度に差違が認められ、菌数の多い時は少い時に比して F による抗菌價が低く現れてくる。

V F の含有される培地における髄膜炎菌の発育状態

F を培地に混在せしめる時、ある濃度においては殺菌的に、より低い適当な濃度においては発育抑制的に作用

する。この発育阻止的な作用が、液状培地と固形培地においていかなる形で細菌発育状態の上に現われてくるかにつき次の実験を行つた。

第 5 表の如き各種濃度に F を含有せしめた 1 列の Huntton のホルモンブイオン(pH 7.4, 3 cc)に髄膜炎菌 LN₂ 株肉汁ブイオン 24 時間培養を希釈せずあるいは 10%ブイオン加食塩水で 10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-6} 、 10^{-8} に希釈しその 0.05 cc 宛を各試験管に接種し発育状態を檢した。

成績は第 5 表に示す。

Huntton のホルモンブイオンにおいては、リコール分離後短時日の菌株にあつては著明な菌膜を形成しこれが保存株及び多くの鼻咽腔株と異なる所以とされている(Rake)。F をこの培地に混じり髄膜炎菌の発育を檢する時第 5 表より明かなように、比較的高濃度の F によつて髄膜炎菌の発育はある程度阻止され、ことに菌膜の形成が遅れて現われてくる。

さらに興味のある点は、3 日以後、時に 4 日以後になつて大量の菌数(原液 $\sim 10^{-2}$ 希釈)を接種したものにおいて今迄発育を認めなかつた F の濃度において新しく菌の発育が認められる。この時に認められる発育は、より以上培養を続けても菌膜の形成は全く認められず、往々管底に比較的こわれにくい菌塊を形成し顆粒状の発育が認められる。かかる特異な発育状態は、少くとも培養 3 日以後において現われかつ大量の菌量が接種された時においてのみ現われてくる。さらにこの点を明かにする爲に、2%に寒天を含み 2%に可溶性澱粉を含有する pH 7.4 の澱粉加寒天培地 2 cc に等量の各種濃度の F を含む肉汁ブイオンを加えてよく混和し高層に固めた後、肉汁ブイオン 24 時間培養の菌液を白金線に取り穿刺培養を行い、固形培地における発育状態を檢した。

発育状態は第 1 図に示す。

即ち $1/4 \times 10^{-4}$ の濃度に F を含有する澱粉加培地においては高層の上面には全く菌苔を認めず穿刺線にそつた発育のみを認める。またこの発育は 3 日以後に初めて現われてくる。

総括と結論

私はナイセリアの諸菌特に主として髄膜炎菌を取りあげ、これが 2-(5-Nitro)-furaldehyde semicarbazone に対していかなる感受性を有し、またいかなる影響を蒙るかにつき検討を行つた。

その結果

- 1) pH 7.4 の腹水ブイオンを用いて希釈法によりその抗菌價を判定すると、髄膜炎菌に対する F の完全発育阻止濃度はリコール株において 2 万倍、鼻咽腔株におい

第1図 Fを含有する澱粉加寒天培地に於ける髄膜炎菌の發育狀態

ては5千倍から5千倍以下であり、鼻咽腔株は一般にリコール株に比して感受性が低い様に考えられる。

2) また同様の方法によりFの他のナイセリアの諸菌に対する抗菌性をも検した。リン菌は5,000—20,000倍稀釈において發育を認めず。Neisseria pharyngisの若干のものはおよそ4万倍稀釈において發育が完全に阻止される。ただしカタラ性球菌はさらにFに対する感受性が大であり8—12万倍稀釈がその發育完全阻止濃度であった。

なお同一の菌であつても菌株によつてFに対する感受性にはある程度の差違が認められる。

3) 培地に腹水または全血を混ざる時は、稀釈法によつても髄膜炎菌に対する抗菌性の減弱が認められる。

4) 培養短時間の菌を接種菌材料として用いる時は、比較的長時間培養した菌を用いた場合に比較してFの髄膜炎菌に対する抗菌力は低く現われる。

5) 接種菌量によつてもまたFの髄膜炎菌に対する抗菌力にはある程度の差違が生じてくる。即ち大量の菌を接種する時は、少量の接種を行つた時に比較してさらに高い濃度のFを含有する培地においても發育を認める。

6) Fの加えられた Huntton のホルモンブイヨン及び1%澱粉加寒天培地における髄膜炎菌の發育狀態を観

察した。その結果、發育可能の最大濃度にFを含有する培地において認められる2,3の發育上の特色につき記載し、これが大量の菌を接種した時においてのみ現われる事を認めた。

× × ×

拙筆に臨み終始変らぬ御指導と御校閲を賜りし恩師木村教授並に種々御指導と御助言を戴きし東助教授に衷心より感謝の意を捧げる。

参考文献

- 1) 木村康, 東昇, 五井次郎, 高橋酉藏, 西海枝東雄: 抗菌物質研究, 1(4): 31, 昭22(1947).
- 2) 木村康: 薬学研究, 20: 23, 昭23(1948).
- 3) 西海枝東雄: 薬学研究, 20: 24, 昭23(1948).
- 4) 東昇, 五井次郎, 西海枝東雄: 薬学研究, 20, 30, 昭23(1948).
- 5) 生垣賢: 抗菌物質研究, 2(6), 昭24(1949).
- 6) 西海枝東雄: 薬学研究, 21: 150, 昭24(1949).
- 7) Rake, G.: J. Exp. Med., 57: 549, 1933.
- 8) Cramer, D. L. & Dodd, M. C.: J. A. M. A. No. 9, 1945.
- 9) Miller, C. P. & Bohnhoff, M.: J. Inf. Dis., 81: 147, 194.
- 10) Demerec, M.: J. Bact., 56: 63, 1948.
- 11) Scherp, H. W. & Fitting, C.: J. Bact., 8, 1, 1948.