

「ストレプトマイシン重層定量法の一變法」

信州大学医学部皮膚泌尿器科学教室 (主任 橋本滿次教授)

谷 津 民 夫

On the Superposition Method for Streptomycin Assay with *S. aureus* (Terashima Strain)

Tamio Tanithu

Department of Dermatology & Urology, Faculty of Medicine, Shinshu University.

(Director: Prof. M. Hashimoto)

1) The author made an experiment with *Staphylococcus aureus* (Terashima strain) as the superposition method for assaying streptomycin by using the following media and at the same time was able to estimate well the lengths of inhibition zones without adding methylenbau as an indicator.

Medium:

Nutrient agar	$\left(\begin{array}{l} \text{Polypepton (Takeda)} \\ \text{Meat extract (Mikuni)} \\ \text{Agar} \end{array} \right)$	0.3%	100.0cc
		0.3%	
		0.9%	
	pH 8.0		
1% Sodium nitrate solution			2.0 cc
<i>Staphylococcus aureus</i> Terashima strain (24 hour's broth culture at 37°C)			0.5 cc

2) The lengths of inhibition zones correspond to the streptomycin concentration of from 2.5/8 to 20 u / cc, and Masuyama's empirical formula was found applicable.

緒 言

ストレプトマイシン (以下ストマイと略称) の定量法として、試験管稀釈法、スライドセル法、Cup法、Paper Disc法、重層法等があるが、本邦に於ては、主として重層法が用いられ、其の方法に關しては既に鳥居、川上氏等^{①②}が詳細に述べている。就中、培地の組成、被検菌株及び標示薬等に關して、種々改善が試みられているが、余は、石田氏等^{③④⑤⑥}の重層法の基礎条件を追試中、黄色葡萄状球菌寺島株を用いる場合、メチレン青標示薬を添加しなくとも、細菌の完全に發育を阻止される濃度より低い部分に寺島株の發育は却つて刺戟され、境界鮮明な帶狀集落を作り、發育阻止帶の長さの計測可能なことを知つた。

実験方法

1) 培地

肉エキス	3.0
ペプトン	3.0
寒天	9.0
滅菌蒸溜水	1000.0
pH	8.0

上記培地 100cc に肉エキス 1%, ペプトン 1%, 食塩 0.5% (pH 7.4%) の Bouillon に 37°C, 24 時間増菌せる黄色葡萄球菌株を 0.5cc, 1% 硝酸ソーダ 2cc を加えたものを測定用培地とした。なを寒天に寺島株並びに硝酸ソーダを加える際には寒天を 45°C に保つた。

3) 分注

培地は寒天が固まらない中に、且つよく振盪してこれを可及的速かに、滅菌小試験管 (口径 8~9 耗, 長さ約 80 耗) に 2.5cc 宛分注する。

3) 重層

被検液として標準ストマイを化学天秤にて精確に秤量しこれを Sørensen の磷酸緩衝液 (pH 8.0) にて倍数稀釈したものを、各々 0.4cc 宛稀釈系列毎に 3 本宛重層する。

4) 培養及び読み取り

37°C の孵卵器中に入れ、12 乃至 16 時間培養して、生じた阻止帯の長さをノウスを以つて、0.1 耗まで精確に測定する。

基礎条件の検討

1) 寒天の濃度

寒天の量を 0.7% より 1.1% の間を試みたが、量が少ないと培地の固まる時間が遅延し、多ければストマイの擴散度は悪く、結果として 0.9% が最も適當である。

2) 寒天の pH

pH 6.0 以下では阻止帯は短い、6.0 以上になると再び短くなるので、pH 8.0 に修正した。

3) 肉エキス並びにペプトンの量

石田氏等は、粉末グイオン 0.5% を用いているが、肉エキス (ミク=印) 0.3%, ポリペプトン (武田) 0.3% で充分に寺島株は發育し、感度も鋭敏となる。又感度増強のために無食塩とした。

4) 硝酸ソーダ

酸素供給源として菌の發育を促進せしめる爲に、1% 溶液を寒天に加えると靡かに菌の發育が良好となる。

5) 菌の濃度

薄い方が阻止帯の長さは長くなるが、0.5% 以下では菌の發育は不充分で、阻止帯が明瞭でない場合が多い。又 1.0% 以上では菌の發育は良好であるが、阻止

帯が短くなり、各稀釈倍数に於ける差が短縮される場合が多いので、0.5% が最も適當である。

6) 稀釈液

生理的食塩水を用いて見たが、阻止帯は明瞭でない。矢張り Sørensen の磷酸緩衝液 (pH 8.0) が適當である。

7) 分注速度

培地を多数の小試験管に分注する際に、手際よくやらないと寒天が固まつて、試験管壁に付着して重層液と混合し誤差を生じたりするので、鳥居、小島氏⑦の述べた如くに可及的速かに分注を終了すべきである。

8) 分注より重層までの間隔

分注試験管内の培地が固まつたならば、直ちに重層してよいが、室温が高い場合及び夏季期間は伸々固まらず、その際重層すると屢々阻止帯に傾斜を生じたりするので、約 1 乃至 2 時間冷蔵庫に入れて固まらせるるとよい。

9) 重層液量

0.3cc でも 0.4cc でも有意義の差は認められない。なお 0.3 乃至 0.4cc 重層すると液の高さは 5 乃至 10 耗となる。

10) 培養温度及び時間

培養の際に於ける温度は 37°C が良好である。阻止帯は大体 10 時間で生じ、12 時間で明瞭となるが、実験の便を考えに入れ 16 時間としている。

実験成績

1) 阻止帯の長ささとストマイ濃度の関係

デイハイドロストマイ (725u/mg) を使用して測定すると第 1 表に示す通りになる。

2) 實驗公式

ストマイ濃度の対数と阻止帯の長さの関係を図示すると第 1 図の如くになり、定差図 (第 2 図) を作つて見ると、殆んど一直線上にならぶ。即ち増山の實驗公式 ①⑧

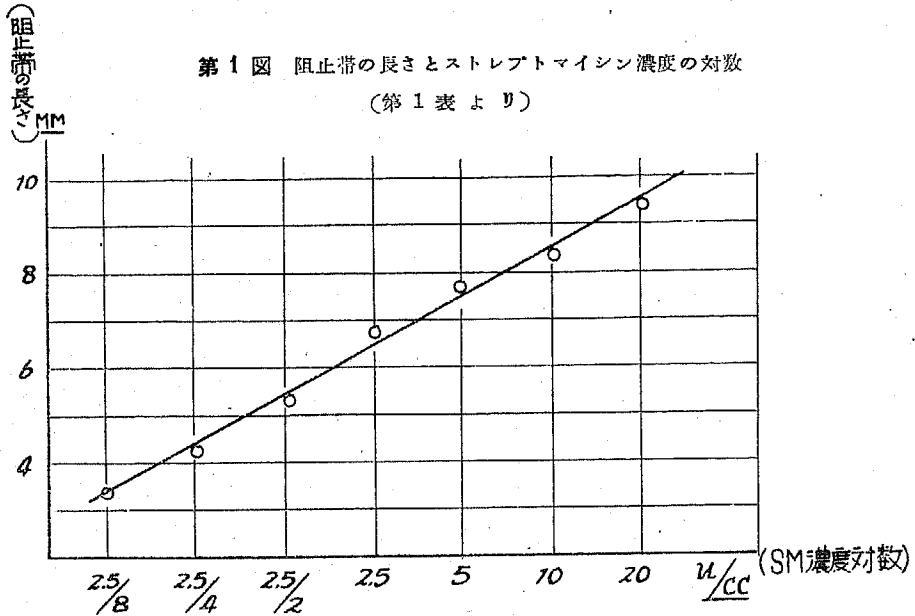
$$Y(X) = G(1 - e^{-r(X-M)})$$

に適合する事が證明された。

第 1 表 阻止帯の長ささとストレプトマイシン濃度の関係

(DIHYDROSTREPTOMYCIN 725u/mg)

濃度 (u-cc)	20	10	5	2.5	2.5/2	2.5/4	2.5/8
阻止帯の長さ (mm)	9.5	8.5	7.7	6.8	5.2	4.3	3.7
	9.5	8.5	7.8	6.8	5.7	4.2	3.5
	9.3	8.3	7.4	6.8	5.4	4.5	3.2
平均	9.43	8.43	7.63	6.80	5.43	4.33	3.46



3) 力価推定①

i) 標準液2階級, 被検液2階級の場合, 標準液高濃度, 低濃度の阻止帯の長さを夫々 S_H, S_L とし, 被検液高濃度, 低濃度のそれを U_H, U_L とし, 高濃度と低濃度の比 (H/L) を両者に共通に A とすると, 被検液の力価 (被検液の標準液に対する濃度比) θ は次の式により計算される。

$$\text{Log } \theta = \frac{\text{Log } \frac{S_H - S_L}{U_H - U_L}}{\text{Log } \frac{S_H - U_H}{S_L - U_L}} \times \text{Log } A$$

第1表の数値を用いて計算すると,
 $S_H=9.43, S_L=5.43, U_H=7.63, U_L=3.46, A=16,$

	S	U	差
H	9.43	7.63	1.80
L	5.43	3.46	1.97
差	4.00	4.17	

$$\text{Log } \theta = \frac{\text{Log } \frac{4.00}{4.17}}{\text{Log } \frac{1.97}{1.80}} \times \text{Log } 16$$

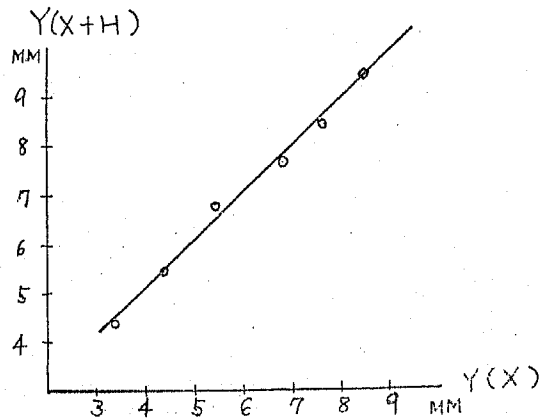
$\therefore \theta = 0.280$ (真の値は 0.250)

ii) 標準液3階級, 被検液1階級の場合.

標準液高濃度, 中濃度, 低濃度による阻止帯の長さを夫々 h, m, l とし, その濃度比を A , 被検液による阻止帯の長さを u とすると, 被検液の力価 θ (1 に対

第2図 定差図

(第1表より)



する濃度比) は次の式により計算される。

$$\text{Log } \theta = \frac{\text{Log } \frac{(G-u)(2m-1-h)}{(m-1)^2}}{\text{Log } \frac{h-m}{m-1}} \times \text{Log } A$$

$$G = \frac{(m^2 - 1)h}{(2m-1-h)}$$

第1表の数値を用いて計算すると,
 $h=8.43, m=7.63, l=6.80, u=5.43, A=2,$

$$\text{Log } \theta = \frac{\text{Log } \frac{0.84}{0.76}}{\text{Log } \frac{0.80}{0.87}} \times \text{Log } 2$$

$\therefore \theta = 0.442$ (真の値は 0.50)

総括並びに結語

- 1) 被検菌株として黄色葡萄状球菌寺島株を用いた。
- 2) 培地の組成を寺島株の感度増強のために、溜水 1000.0cc に対して、肉エキス 3.0g, ペプトン 3.0g, 寒天 9.0g, pH 8.0 とした。
- 3) メチレン青等標示薬を加えなかつた。
- 4) 稀釈液として Sørensen の燐酸緩衝液 (pH 8.0) を用いた。
- 5) 試験管は口径 8 乃至 9 耗, 長さ約 80 耗のものを用いた。
- 6) 培養温度及び時間は 37°C, 16 時間とした。
- 7) 阻止帯と温度の関係は, 実験公式 $Y(x) = G(1 - e^{-r(x-a)})$ に適合する。
- 8) 力価推定には, 増山の導いた公式を用いた。

本文の要旨は既に第 9 回皮膚科泌尿器科学会信州地方会に於て発表した。

稿を終るに臨み, 御校閲を賜つた恩師橋本教授に謝意を表し, 併せて實驗に當り終始御懇篤なる御指導御鞭撻を賜つた中村實助教授並びに御援助を戴いた中村邦昭学兄に深甚なる感謝を献げる次第である。

文 献

- | | |
|--|--|
| <p>① 鳥居, 川上, 小島: (重層によるペニシリン定量法に就いて)・ペニシリン I-5: 281, 1947</p> <p>② 鳥居, 川上: (血清中ストレプトマイシン定量法)・日本ペニシリン學術協議会パンフレット, 1949</p> <p>③ 石田, 片桐, 千田, 畑谷: (重層法によるストレプトマイシン定量法 1)・ペニシリン II-B: 79, 1949</p> <p>④ 清水: (重層法によるストレプトマイシン定量法 2), J. of antibiotic. 3, 10: 643, 1940</p> | <p>⑤ 清水: (全上 3) 全上, 3, 10: 651, 1940</p> <p>⑥ 石田, 片桐, 千田: (ストレプトマイシンの生物学的検定法に関する研究)・J. of antibiotic, III, B: 472 1940</p> <p>⑦ 鳥井, 小島: (重層法における誤差に就いて)・J. of antibiotic, III, 8: 526, 1940</p> <p>⑧ 増山: (一次元拡散を利用する定量法とその公式) 科学, 17(6): 158, 1947</p> |
|--|--|

動 脈 移 植

Arterial Homografts

Henry Swan. H. Mason Morfit.

Archives of Surgery. Vol. 62 No. 6 767-775. June. 1951.

著者等は右股部の肉腫の根治手術にともない, 腫物浸潤の爲股動脈をも併せて切除しなければならなかつた症例につき, 二例は他家保存動脈, 一例は自家静脈の移植により血管缺損部を補い手術を可能ならしめた。

実施にあたり次の諸点を注意している。

即ち, 血管供給者は 10 才から 35 才位の年齢層が適当で, 而も被移植者に悪影響を及ぼす様な疾患のないこと。血管は死後 4 時間以内に採取し, 保存は血液銀行用の冷蔵庫中に 4°C で貯え, 貯蔵液はリンゲル氏液中に 10% の割合に血漿を加え, 更に少量のペニシリン及びストレプトマイシンを加えること。貯蔵期間は 3 ヶ月を越えないこと。

著者等は更に, 手術時必要な血管を速かに手に入れることの困難な事から, 血管銀行の必要を強調している。

(信大星子外科 岩月抄)