

結核菌の定量的培養法について

(其の一) 菌浮游液を培養する場合

財団法人結核豫防會結核研究所 (所長 隈部英雄)

小川辰次・佐波 薫

1. 緒 論

従來迄の結核菌檢出方法としての培養の應用は、陰性か、陽性か、即ち定性と云ふ事が主とされて居た。しかし、定性と同時に、定量と云ふ事も必ず問題とされて來たが、一應は、白金耳中に含まれる菌の量と云ふ事で解決されて居た。然し、白金耳による定量の不正確である事は、日常、我々の經驗してゐる所である。最近、結核症に對する、化學療法劑、抗菌性物質の研究、外科的療法等の廣く行はれるに連れて、結核患者の病的材料中の結核菌の消長を、正確に知る事が必要となつて來た。一方又、動物を使用した、化學療

法劑、抗菌性物質及び免疫の研究等に於ても、動物臟器の結核菌を定量培養する事は、必要缺くべからざるものである事を證明してゐる。尙、動物に接種した生菌量の決定、其の他種々の實驗に於ても、純粹培養の菌浮游中の、生菌量を決定する事が必要である場合が多い、かう云ふ様な意味で、今後の培養は、定性より定量へと移り變らねばならない。我々は、此處で先づ第一に、菌浮游液の定量培養の方法に就いて、實驗したので御批判を仰ぎたい。

2. 實驗方法及び其の成績

實驗方法：小試験管に、7c.c. 前後分注した種々の組成の鶏卵培地に、純粹培養の菌株で菌浮游液を作り、滅菌蒸溜水で適當にうすめて、メスピペットで、0.1c.c. 宛培養する。培養したら培地を動かして、菌浮游液が斜面全體にうろほふ様にする。培地は直ちに斜面臺に並べ、37°C の孵卵器に放置し、培地内の液の乾燥するのを俟つて封緘し斜面臺より取り出して、たてて竹籠に入れ、37°C の孵卵器に放置して、聚落の有無を檢査し、更に數へられる状態になれば數へ、充分聚落が出つて、しかも融合しない適當の時期を撰んで比較する。

其の1 岡片倉培地より種々の組成を除去しての培養實驗：

第1表の様に、岡片倉培地より、第1磷酸加里を除去したもの……(1) 第2磷酸曹達……(2) 味の素……(3) グリセリン……(4) 第1磷酸加里、第2磷酸曹達、味の素……(5) 等を除去した培地を作り、本來の岡片倉培地……(6) と比較する。即ち之等の培地、10本宛を使用し、人型

第1表 岡片倉培地より種々の組成を除去しての比較培養

培地の種類 濃度 固水のPH	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
	7.8	6.8	6.8	6.8	7.5	6.8
培養菌量 5mg × 10 ⁻¹	—	卍	卍	卍	—	卍
1mg × 10 ⁻¹	—	卍	卍	卍	—	卍
1mg × 10 ⁻²	—	卍	卍	卍	—	卍
1mg × 10 ⁻³	—	157.8	101.2	133.9	—	78.5
1mg × 10 ⁻⁴	—	15.8	8.6	9.6	—	11.7

註 培地の種類 (6)は本來の岡片倉培地、岡片倉培地より次のものを除去したものを(1)~(5)とする
 (1) 第1磷酸加里
 (2) 第2磷酸曹達
 (3) 味の素
 (4) グリセリン
 (5) 第1磷酸加里、第2磷酸曹達、味の素
 卍…培地斜面に餘す所無く發育したものと
 卍…蓋た多數で數へられないもの
 卍…多數で數へられないもの
 數字は聚落數を示す

菌、吉田株で菌浮游液を作り、培養し、28日目に比較した。聚落数は、培地 10 本の平均数である。1)と 5) では $5\text{mg}\times 10^{-1}$, $1\text{mg}\times 10^{-1}$, $1\text{mg}\times 10^{-2}$ と云ふ様に、大量の菌を培養したのであるが、全然發育しない。之に反して、(2),(3),(4),(6) では、聚落の數へられない程、澤山發育してゐる。更に稀釋して培養すると、 $1\text{mg}\times 10^{-3}$, $1\text{mg}\times 10^{-4}$ で、漸く聚落が數へ得る程度となる。この成績を見ると、3) 4) 6) は大體差が無いが、2) は (6) に比して、多少多いのではないかと思はれる。之等培地の凝固水の P1⁰を見ると、1) は 7.8、5) は 7.5 であつて、其の他は何れも 6.8 である。之の成績から、第 1 磷酸加里は、培地に對しては、不可缺のものであるし、味の素や、グリセリンは發育には多少影響があるにしても、第 1 磷酸加里

程では無い事がわかる。又第 2 磷酸曹達は、この際、寧ろない方がよいのではないかと思はれる程である。

其の 2、第 1 磷酸加里培地と岡片倉培地：第 1 磷酸加里が、不可缺のものである事がわかつたので、更に追及して、岡片倉培地より第 2 磷酸曹達を除去し、基汁 100c.c. に對して、第 1 磷酸加里の加へる量を、0.1g, 0.3g, 0.5g, 1.0g, 2.0g, 3.0g として比較培養して見た。原液の PH は 0.1g~0.5g迄は 4.8、1.0g は 4.6、2.0g, 3.0g は 4.4 で、培地の凝固水の PH は、0.1g のものは 6.8、0.3g~1.0g は 6.6、2.0g, 3.0g では 6.2 である。比較培養の結果、1.0g 混入されたものが、聚落の數が最も多くて、發育もよい事がわかつた。之の培地と岡片倉培地とを比較すると次の様である。

第 2 表 第 1 磷酸加里培地と岡片倉培地の比較 (其の 1 BCG の培養)

稀釋度 検査日 培地の種類	10 ⁻⁶						10 ⁻⁷					
	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
第 1 磷酸加里培地	-	-	25	卅	卅	卅	-	-	13	22	23	23
	-	1	66	卅	卅	卅	-	-	4	14	16	16
	-	-	70	卅	卅	卅	-	-	3	11	11	11
	-	-	31	卅	卅	卅	-	-	17	23	30	30
	-	8	57	卅	卅	卅	-	-	7	12	12	13
	-	-	28	卅	卅	卅	-	-	8	16	18	18
	-	1	17	卅	卅	卅	-	-	6	13	14	14
	-	-	42	卅	卅	卅	-	-	6	16	49	60
	-	-	65	卅	卅	卅	-	-	4	4	5	5
-	1	55	卅	卅	卅	-	-	4	8	10	10	
平均	-	1.1	45.6	卅	卅	卅	-	-	7.2	14.4	18.3	20.0
岡片倉培地	-	-	-	72	卅	卅	-	-	-	2	12	14
	-	-	-	120	卅	卅	-	-	-	4	25	25
	-	-	-	36	卅	卅	-	-	-	5	21	21
	-	-	-	45	卅	卅	-	-	-	-	12	13
	-	-	-	23	150	卅	-	-	-	12	13	13
	-	-	-	113	卅	卅	-	-	-	9	13	14
平均	-	-	-	82.8	卅	卅	-	-	-	8.4	16.1	17.0

註 検査日の I、II、III 等の數字は週目を示す、聚落數は第 1 表の場合と同様である。

第3表 第1 磷酸加里培地と岡片倉培地の比較 (其の2、人型菌の培養)

培地の種類	稀釋度 検査日	10 ⁻⁷			10 ⁻⁸		
		7	12	22	7	12	22
第一 磷酸 加里 培地		—	—	230	—	—	32
		—	—	186	—	—	45
		—	—	156	—	—	28
		—	—	210	—	—	21
		—	—	218	—	—	23
平均		—	—	200	—	—	29.8
岡片 倉 培地		—	—	83	—	—	1
		—	—	120	—	—	4
		—	—	50	—	—	—
		—	—	65	—	—	12
		—	—	152	—	—	—
平均		—	—	95	—	—	3.4

註 検査日の7, 12等の数字は日目を示す。

第4表 第1 磷酸加里培地と岡片倉培地との比較 (其の3、手型菌の培養)

培地の種類	稀釋度 検査日	10 ⁻⁵				10 ⁻⁶				10 ⁻⁷			
		10	16	25	30	10	16	25	30	10	16	25	30
第一 磷酸 加里 培地		—	卅	卍	卍	—	卅	卍	卍	—	10	卅	卍
		—	卅	卍	卍	—	卅	卍	卍	—	31	卅	卍
		—	卅	卍	卍	—	卅	卍	卍	—	28	卅	卍
		—	卅	卍	卍	—	卅	卍	卍	—	34	卅	卍
		—	卅	卍	卍	—	卅	卍	卍	—	14	卅	卍
岡片 倉 培地		—	—	卅	卍	—	—	卅	卍	—	—	10	卅
		—	—	卅	卍	—	—	卅	卍	—	—	80	卅
		—	—	卅	卍	—	—	卅	卍	—	—	30	卅
		—	—	卅	卍	—	—	卅	卍	—	—	36	卅
		—	—	卅	卍	—	—	卅	卍	—	—	—	卅

註 検査日の数字は日目を示す。

第5表 第1 磷酸加里培地と岡片倉培地の比較 (其の4、鳥型菌の培養)

培地の種類	稀釋度 検査日	10 ⁻⁸		10 ⁻⁹		10 ⁻¹⁰	
加里 培地 第一 磷酸		25		14		3	
		36		24		2	
		20	35.8	26	20.0	1	1.8
		58		24		2	
		40		12		1	
培地 岡片 倉		44		42		—	
		32		27		2	
		42	32.4	4	21.3	—	1.0
		24		7		—	
		20		5		3	

註 〃を施したのは聚落の平均数を示す。

第2表は、1c.c. 中 40mg 含む BCG の原液を 10^{-6} 10^{-7} 倍に稀釋して、之を 0.1c.c. 宛培養した成績で、1 週間毎に 6 週間觀察した。此の表に依れば、一見して、第1 磷酸加里培地の方が 聚落の出方が早く、又同時期のものを比較すると、聚落の数も多い事がわかる。第3表は、人型菌、陸 F.T.P. の、グリセリン馬鈴薯培地、4 週間培養の菌株で、1c.c. 中 20mg の原液を作り、 10^{-7} 、 10^{-8} 倍に稀釋して、培養した成績である。之では 12 日後の觀察が 10 日後の 22 日となつてゐるので、聚落の出方が、早いかどうかは不明であるが、第1 磷酸加里培地の方が、聚落数の多い事は確實で

ある。第4表は、牛型菌、傳牛₂ のグリセリン馬鈴薯培地、25 日培養の菌株で、1c.c. 中 20mg 含む原液を作り、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 倍に稀釋して、比較培養したものである。この表でも、第1 磷酸加里地の方が、聚落の出方も早く、数も多い。第5表は、鳥型菌のグリセリン馬鈴薯培地、1 週間培養のもので、1c.c. 中 50mg の原液を作り、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 倍に稀釋して 4 日目に發育した聚落数を比較したものであるが、此の場合は兩者の間に差が無い。

其の3 岡片倉培地の基汁の PH を、種々に修正しての比較培養。

第6表 岡片倉培地の基汁の PH と種々に變へた培地及び小林培地への培養

培地の種類	岡片倉培地					第1磷酸加里培地	小林培地	
	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)		(紫)	(綠)
基汁の PH	5.0	6.0	6.4 (未修正)	7.0	8.4	3.4	6.2	
凝固水の PH	6.0	6.6	6.8	7.0	8.6	6.6	7.0	
實驗成績	第1實驗	156	46.4	1.4	—	—	145	/
	第2實驗	11.7	7.0	—	/	/	40.8	39.8 37.5

註：培地の種類

- (I) 基汁の PH を 5.0 と修正したもの
- (II) " " 6.0 "
- (III) 本來の岡片倉培地
- (IV) 基汁の PH を 7.0 と修正したもの
- (V) " " 8.4 "
- 小林培地 (紫) 本來の小林培地
- (綠) 色素をマラヒット綠使用のもの
- 第1 磷酸加里培地：前述

岡片倉培地の基汁の PH は 6.4 前後であるが、鹽酸及び苛性曹達で修正して、第6表の様に 5.0 ~ 8.4 の一聯の PH の基汁を作り、之等の基汁で一聯の岡片倉培地の變形を作り、之を (I) (II) (III) (IV) (V) とする。(III) は本來の岡片倉培地で、PH は修正してゐない。之等培地の凝固水の PH は 6.0 ~ 3.6 である。之に 1c.c. 中 40mg 含む BCG 原液の 1 日氷室に放置のものを 10^{-6} 倍に稀釋して、10 本宛の培地に培養し、31 日目に發育した聚落数を平均して記載して見た。其の成績は、第1 實驗であつて、本來の岡片倉培地の聚落数が 1.4 であるが、酸性となるに連れて、46.4、

156、と著明に増加して居り、反對にアルカリ性の場合には、全然發育してゐない。又同時に培養した第1 磷酸加里培地では 145 であつて、岡片倉培地 (I) と同様である。

其の4 小林培地(2)と第1 磷酸加里培地：小林培地は、基汁の中に、第1 磷酸加里、アスパラギン、グリセリンを含み、PH を 6.2 に修正し、之に鶏卵液を加へ、色素はゲンチアナ紫を使用してゐる。余等は、ゲンチアナ紫と、マラヒット綠と岡片倉培地の場合と同量に含むものを作り、其の3 に於ける岡片倉培地の (I) (II) (III) と、第1 磷酸加里培地を同時に使用して培養した。培地は 10

本宛使用し、1c.c. 中 50mg 含む BCG 原液を 1 日氷室に保存したものを、 10^{-7} 倍に稀釋して培養し、31 日目に發育した聚落數を、第 6 表、第 2 實驗の欄に記載した。其の成績は、小林培地は大體第 1 磷酸加里培地と發育の點では差が無かつた。又岡片倉培地は何れも多少發育が悪かつた。之は 1 日放置した菌液を用ひた爲かも知れない。

其の 5 第 1 磷酸曹達培地

第 1 磷酸加里の代りに、酸性である第 1 磷酸曹達を 1.0g 100c.c. の基汁にまぜると、基汁の PH は 4.6 前後、凝固水の PH は 7.0 程度であるが、之の培地も第 1 磷酸加里培地と同様によく發育する事がわかつた。尙、第 1 磷酸加里は量の多くなるに連れて、發育は悪いが、第 1 磷酸曹達では、100c.c. の基汁に對して 1g, 2g, 3g, 4g と増しても、發育の點に於ては、著明の差は無かつた。其の場合の基汁の PH は、夫々 4.6, 4.6, 4.4, 4.4 であつて、凝固水の PH は 7.0, 7.0, 6.6, 6.6 であつた。

其の 6 アルカリ性の磷酸鹽を用ひた培地

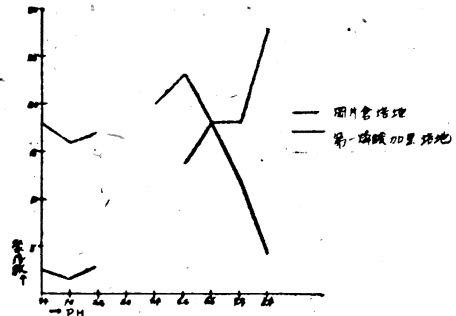
第 2 磷酸加里を 第 1 磷酸加里の代りに 1g~4g を基汁に加へて見ると、基汁の PH は 6.6~6.8 であり、凝固水の PH は 7.2~7.4 である。此の場合は岡片倉培地に比して發育が非常に悪くなる。同様にして、第 2 磷酸曹達を 0.1g 0.3g 0.5g と混入すると、基汁の PH は 7.6~8.2 となり、凝固水の PH は 7.2~7.4 となる。又第 3 磷酸曹達を 0.5g~2.0g 混入すると、基汁の PH は 7.2~8.4 となり、凝固水の PH は 9.0~9.6 以上となつて、結核菌は、全然發育しなくなる。

其の 7 結核菌の蒸溜水による菌浮游液の PH を種々に變へて、岡片倉培地と第 1 磷酸加里培地に培養した實驗

滅菌蒸溜水で稀釋した菌液の PH は 5.4 前後である。之を培養した成績は前述の様であるが、今度は菌液の PH を種々に變へて比較培養した。即ち 1N の鹽酸及び苛性曹達で、蒸溜水の PH を修正して、1.4~8.4 の一聯のものを得た。之等のものを 10c.c. 宛、滅菌試験管に取り、之を滅菌し之等に 1c.c. 中 40mg 含む BCG 原液を、 10^{-5} 倍にうすめたものを 0.1c.c. 宛加へ、よくまぜ、其の

0.1c.c. 宛を、岡片倉培地及び、第 1 磷酸加里培地 8 本宛に培養し、32 日目の聚落數を比較した。菌液の PH は、更に培養直後、試験液によつて測定し、之の價を PH 値とした。尙培養時には、PH 1.4~4.4 迄は、肉眼的に、極くかすかに凝集反應が認められた。其の成績は第 1 圖の様である。

第 1 圖 菌浮游液の PH と種々に變へての培養實驗



PH 3.0, 4.4 の部分の培養は、封蠟を忘れ、兩培地の 1~2 本に 2~3 ケの聚落を認めたのみであつたので、此の成績から除外した。太い點線は第 1 磷酸加里培地の、又、實線は岡片倉培地の聚落數を示してゐる。岡片倉培地では PH が、1.4, 1.8, 2.2 等では、聚落數 (8 本の平均値) 2.5 ケ、0.7 ケ、3.0 ケ 等で少いが、PH が 6.0, 6.6, 7.4 となるに連れて、數が増して 13.6 ケ、18.0 ケ、11.5 ケとなり、更に PH 8.4 では 4.0 ケとなつてゐる。即ち、中性、乃至弱酸性、弱アルカリ性で聚落の數が最も多く、酸性或ひはアルカリ性の増すに隨つて、聚落の數が徐々に減少して來る。次に磷酸加里培地では PH 1.4 より 7.4 までは、聚落數は 16 ケ乃至 21.4 ケであつて、大體平均してゐる。そして PH 8.4 では、聚落數が最も多くて 29.7 ケである。之は恐らくは實驗のまづかつたが爲であつて、大體は平行するものと考へてよいのではなからうか？尙、PH 6.6 の所では、岡片倉培地と磷酸加里培地の聚落數が一致してゐる。又何れの PH の場合でも、第 1 磷酸加里培地の方が、聚落の出方が早く、培養後 15 日目には、聚落の數が數へられる位の大きさに發育したが、岡片倉培地では、それより、1 週間後に、漸く聚落が數へられる程度であつた。

3. 總括及び考察

我々は以上の様に種々の實驗成績を示したが、之等の事から前處理をしない場合でも、培地のPHが、我々が想像してゐる以上に結核菌の發育に影響してゐる事がわかつた。從來迄は、鶏卵培地に於けるPHに就いては、餘り注意が拂はれなかつた。殊に前處理をしない場合に就いては、一向に検討されないうで、單に中性付近がよいとされてゐた。それで從來迄使用されてゐる培地も、大體中性付近である。著者の一人小川は先に定量的培養に於ける前處置と培地との關係を追及し、其の間に密接な關係のある事を證明したが、今回の實驗に依つて、培地のPHが不適當であれば、可なり大量の菌が植へられても發育しない事を明らかにした。又、前處置をしない場合は、岡片倉培地よりも酸性である培地が、より發育のよい事がわかり、隨つて岡片倉培地より第2磷酸曹達を除き、代りに酸性である第1磷酸加里を原液に1%に加へるか、第1磷酸曹達を1~3%に加へた方が成績のよい事がわかつた。尙この際、培地の基汁のPHを標準とした方が、培地の凝固水を測定して標準とするよりも、はつきりする様に思はれる。なぜ

なら岡片倉培地の凝固水のPHは6.8、1%に第1磷酸加里を加へたものは7.0、前後であつて、岡片倉培地との間に著明の差は無いが、基汁のPHは前者では6.2、後者では3.2であつて、其の間には可なりの差がある。又同一PHに於ても、磷酸鹽の量の少い時或は量の多い時は發育のおくれるのを見てゐる。我々は更に菌浮游液のPHを種々に變へて培養すると余等の培地では一般に測定し得るPH域では、大體平等に發育し、しかも岡片倉培地で最もよく發育した點と同様の線で發育する事を證明した。之は如何なる理由によるかは、今後の研究に俟つとして、余等の培地では、兎に角、PHを測定し得る程度のもは、大體同様に發育するものと考へてよい。我々の培地と似てゐるものに、小林氏の培地があるが、氏の出發點は作り方の簡單なものをとの理由であつて、第1磷酸加里を使用した事の理由に就いては一言も觸れてゐない。尙、外國で從來迄最も多く使用されてゐる Petragani⁽³⁾氏の培地は、岡片倉培地に正適してゐて、余等の培地と可なりの差がある。

4. 余等の培地の製法及び培養の方法

前處理をしないものを鶏卵培地に培養するのは、余等の酸性の磷酸鹽の入つた培地を使用するのが最も確實である事がわかつた。我々の培地は次の様にして作る。

基汁	第1磷酸加里	1.0g
	(或は第1磷酸曹達)	
	味の素	1.0g
	蒸溜水	100.0c.c.

基汁 100c.c. に對して、全卵液 200c.c. を加へ、更にグリセリン 2% とマラヒット綠液を各 6c.c. 宛加へ、小試験管に分注する。そして充分に凝固滅菌する。滅菌は唯1回で充分である事は、此の培地でも同様である。次に培養の方法であるが、純粹培養の菌浮游液を 0.1c.c. 0.2c.c. 0.3c.c.

0.4c.c. 0.5c.c. と培地に分注して培養して見ると、培養量の2倍、3倍等になるに隨つて、發育する聚落の数が2倍、3倍とは決してならないで、何時も、聚落数はずつと少い。之は結核菌が液の中に浮游されてゐると、其の生活力が弱つて來る爲ではないかと思はれる。生活力の弱らない中に、早く乾燥させて封蠟する事は、成績を確實にするものと思はれる。隨つて培地の中に凝固水の澤山あるものは、棄てた方がよい。又培地が、すつかり乾燥し切つて、0.1c.c. だけでは、斜面を漏ぼすのに困難を感じる場合は 0.2c.c. でもよいし、或ひは豫め、0.1c.c. 前後に滅菌蒸溜水を加へておいて、培養してもよい。

5. 結 論

結核菌の浮游液を培養する場合には、余等の第1磷酸加里、或ひは第1磷酸曹達の入つた培地を使用し、0.1c.c. 宛培養するのが最も確實である。(柳澤謙博士の御校閱を謝す)

参 考 文 献

- 1) 岡：日本臨牀結核 1: 59, 昭 15,
- 2) 小林：結核 7: 421, 昭 4,
- 3) Petragani: Zbl. Bakt. I. Ref., 85: 1927,

結核菌の定量的培養法について

(其の二) 動物臓器よりの培養法

財団法人結核豫防會結核研究所 (所長 隈部英雄)

小 川 辰 次

I 緒 論

實驗的に結核に感染させた動物の臓器から、塗抹標本を作り、或ひは組織標本を作つて、其の中に含まれてゐる菌量を比較する事は容易な事ではない。随つて我々は培養により定量的に之を測定するより外無い。定量培養の方法は今迄⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾ 2、3 發

表されたが、複雑で、しかも正確で無い。我々は昭和 19 年以來、種々の動物につき、臓器の定量培養を行つて來た。そして幾多の變遷をへて、現在稍見るべき方法に到達する事が出來たので、此處に發表し、諸先進の御批判を仰ぎ度い。

II 當初の培養方法

「臓器を無菌的に採り、適當に切つて秤量する。水を 1c.c. の割合に加へ、臓器硫酸水浮游液を作之を乳鉢で播り、臓器 0.1g に對して 2% の硫酸

り、直ちに 0.1c.c.宛、岡片倉培地に培養する。そ

第 1 表 剖檢する迄の期間と菌發育との關係

剖檢の時期	動物番號	肉眼所見	臓器使用量	聚 落 數		
				10 ⁻¹ 倍	10 ⁻² 倍	10 ⁻³ 倍
III 週	221	卅	0.7g	卍(卍, 卍, 卍,)	158(176, 162, 159,) (156, 138,)	14(20, 16, 14,) (12, 10,)
	227	卅	0.5g	卍(卍, 卍, 卍,)	107(125, 116, 111,) (95, 90,)	13(18, 12, 12,) (11, 10,)
VII 週	236	卅	0.5g		104.4(134, 111, 106,) (86, 85,)	8(12, 8, 8,) (7, 5,)
	247	卅	0.4g		60.8(67, 62, 63,) (58, 54,)	6(12, 11, 10,) (4, 1,)
XV 週	257	卅	0.6g		103(185, 158, 170,) (2, 0,)	6.8(22, 12, 0,) (0, 0,)
	258	卍	0.5g		9(72, 10, 7, 1,) (0, 0, 0, 0, 0,)	0
XXIII 週	261	卅	0.4g	卍, 卍, 90, 45,	31.5(65, 35, 20,) (6,)	1.7(7, 2, 1,) (0,)
	268	卅	0.6g	卍, 卍, 75, 0,	0,	0,

- 註 1) 括弧中の並列したものは培地に發育した聚落數を示し、括弧の外は平均聚落數を示す。
 2) 卍 卍 は聚落の數へられない事を示す。
 3) 肉眼的所見は佐藤、柳澤氏等の標準に依る。
 4) III 週目の聚落數は培養後 3 週目に又 XV 週, VII 週目 XXIII 週目のものは 5 週後の聚落數を示す。

して斜面蓋にねかせて37°Cの孵卵器で乾燥させ、封蠟して、たてて竹籠に入れて、37°Cの孵卵器に培養する」

臓器は無菌的にとれる故、硫酸の濃度は、なるべく低くし、しかも雑菌の入らない所と云ふ事で2%とし、又臓器其のものは結核菌の發育には何等影響はしないし、特に定量である故、一定に稀釋して一定量を植へた方が確實であると云ふ事がわかつたので、遠慮しないで稀釋したもの的一定量を植へる事にした。

臓器の稀釋度は、5倍量だとピペットが通りにくいので、10倍とし、1本の培地に植へる量はなるべく早く乾燥させ、しかもピペットで測定出来る最低の限度として0.1c.c.とした。我々は、發育した聚落の数を数へる事の出来る爲に、臓器の病變の程度により、 10^{-1} 倍から 10^{-2} 倍、 10^{-3} 倍と稀釋して培養してゐる。我々は此の方法により、實驗してゐる中に、注目すべき事實が認められた。

III 培養法の改良實驗

1. 硫酸處置による實驗

先づ第一に、人型菌下株を0.1mg皮下に接種して感染を行ひ、7週後に撲殺した天竺鼠の脾を滅菌蒸留水で 10^{-2} 倍稀釋とし、之を豫め4.5c.c.宛分注しておいた1~4%の硫酸水に、0.5c.c.宛加へて、 10^{-3} 倍稀釋として、4本の岡片倉培地に植へ、4週後に發育した聚落を比較して見た。其の成績は第2表の様である。

第2表 硫酸の濃度の菌發育に及ぼす影響

動物番號	肉眼所見	硫酸の濃度			
		1%	2%	3%	4%
Cup. 591	卍	82.5	13.0	10.8	4.5
Pro. 8	井	6.3	0.5	2.3	0
Ho. 33	卍	7.5	0.3	0.3	0
Hi 27	卍	10.8	7.5	4.3	3.0

註 1) 數字は平均聚落數を示す。

2) 肉眼所見は佐藤、柳澤氏等の標準による。

第1表は、人型菌下株を0.1mg皮下に接種し、種々の時期に撲殺した天竺鼠の脾を培養したものである。即ち3週、7週に於ては、同時に使用した培地には大體同數の聚落を認め、且つ 10^{-1} 倍稀釋のものは 10^{-2} 倍稀釋の約10倍の聚落を認め、又 10^{-3} 倍稀釋のものに比して約100倍の聚落數を認めるが、23週、15週に於ては、全く區々である。尙この時期に撲殺した動物に於ては、肉眼的に著明な病變を呈してゐるのにかかわらず、培養陰性を示したものが多かつた。此の事實は單に脾だけでなしに、肺、肝等に於ても認められた。之はいかなる理由によるのか今後の検討に俟たねばならないが、長い期間を經過した動物の臓器中の結核菌が、其の性状に何等かの變化を來し、其の結果、生活力が弱つてゐるのではなからうか？何れにせよ、此の様な菌を培養出来ないのでは、満足出来ない。随つて改良する餘地が多分にある様に思はれた。

即ち硫酸の濃度の濃くなるに連れて、聚落は減少してゐる。然し濃度の如何にかかわらず、4本の培地に同時に植へたものは、大體同數の聚落が認められたし、雑菌も皆陰性であつた。次に3mgの人型菌を靜脈に注射した家兎の肺、肝、腎等につき、14週迄の種々の經過のものにつき比較して見た。この場合も1%は2%に比して聚落が一般に多く且つ雑菌の點では差が無かつた。又1%に於ては勿論の事、2%に於ても、天竺鼠に見られた菌の發育の不揃の所見は見られなかつた。我々は其の後、長期間經過の天竺鼠について實驗する機會が無かつたので、1%硫酸水で岡片倉培地に植へた場合、生活力の弱つてゐると思はれる様な菌でも培養出来るか、どうかは、はつきりしなかつた。次にマウスにつき實驗する機會を得た。即ち、人型菌陸 F.T.P. の0.1mgを靜脈に注射して、11週後に撲殺し、肝を培養した。其の成績は、第6表(後掲)の様である。即ち、天竺鼠、23週、15週の所見と大體同様であつた。

我々は以前に菌浮游液の定量培養で、1%、2%

硫酸水を使用する時は、原液の中に、第2磷酸曹達が夫々1%、2%に混入された培地が岡片倉培地に比して成績がよい事を證明し得たので、先づ

前述の23週経過の天竺鼠の脾を2%硫酸水で處理して、兩者の培地を比較して見た。

其の成績は第3表で見る様に、第2磷酸曹達の

第 3 表

動物番號	肉眼所見	處理液	培地の種類	聚 落 數	
				10 ⁻¹ 倍	10 ⁻² 倍
256	+	2% H ₂ SO ₄	岡片倉	3.0 (12, 0, 0, 0)	1.0 (4, 1, 0, 0)
			Na ₂ HPO ₄	61.8 (65, 65, 54, 53)	3.3 (4, 4, 3, 2)
		2% NaOH	KH ₂ PO ₄	82.5 (108, 80, 78, 64)	5.0 (11, 5, 3, 1)
261	+	2% H ₂ SO ₄	岡片倉	###, ###, 90, 45	31.5 (65, 35, 20, 6)
			Na ₂ HPO ₄	### (###, ###, ###, ###)	142.0 (155, 150, 145, 118)
		2% NaOH	KH ₂ PO ₄	### (###, ###, ###, ###)	91.5 (108, 96, 88, 74)

註：1) () の中は培地斜面の聚落數を示し、外は平均値を示す。

2) ### は聚落の數へられない事を示す。

3) Na₂HPO₄ 培地 KH₂PO₄ 培地は原液に夫々2%に混入されたものである。

4) 肉眼所見は佐藤、柳澤氏等の標準による。

培地は、岡片倉培地に比して成績が良く、同時に培養した5本の培地には、大體同數の聚落が發育し、又聚落の平均數も、10⁻²倍稀釋のものは、10⁻¹倍稀釋のもの1/10となつてゐる。

次に菌接種後、3週、5週、14週等の、家兎の肝、肺、腎と1%硫酸水で處理して、之を岡片倉培地と、原液に1%の第2磷酸曹達の入つた培地

に植へて見ると、14週の様相に相當の長期間を経過したのもでも、兩培地の間に著明の差は認められなかつた。

2. 苛性曹達處理による實驗

我々は以前に菌浮游液の實驗で1%苛性曹達水で處理する場合は、原液に1%に第1磷酸加里の入つた培地がよく、2%苛性曹達水では2%に第

第4表 1%, 2% の苛性曹達水による處理の比較

動物番號	臓器の種類	肉眼所見	稀釋倍數	培地の種類 NaOHの濃度	KH ₂ PO ₄ 培地			岡片倉培地
					1%	2%	3%	
8號 (5週目) 剖檢	肝	-	10 ⁻²	1%	0.3	0.5	0.3	0
				2%	1.5	1.3	0.5	0
	肺	+	10 ⁻³	1%	251.0	225.3	140.8	132.5
				2%	213.0	187.5	173.0	87.5
9號 (4週目) 斃死	肝	+	10 ⁻³	1%	3.0	1.8	3.0	0.6
				2%	4.8	3.5	4.0	0
	肺	+	10 ⁻³	1%	86.2	47.6	42.8	16.0
				2%	76.6	67.6	42.6	6.2

註：1) 8號肝は4週目に其の他は3週目に發育した聚落を平均して記載した。

2) 肉眼所見は佐藤、柳澤氏等の標準による。

1 磷酸加里の入った培地がよく、且つ1%苛性曹達水處置の方が2%苛性曹達水に比して成績が良い事を述べた。天竺鼠の15週、23週経過のものを、2%硫酸水で處理して岡片倉培地に植へると發育が悪いが、同様のものを、第2磷酸曹達のみが入った培地に植へると發育が良くなる事は前述の様であるが、此の場合に同一材料の、一方を2%苛性曹達水で處理して、2%に入つた第1磷酸加里の培地に培養して見ると、第4表で見る様に2%硫酸水で處理して、第2磷酸曹達の培地に植えたものとの間に著明の差がなく、よく發育する事が證明された。次に3mgの菌を靜脈に接種した家兎につき實驗した。即ち第1磷酸加里の、1%、2%、3%に入つた培地と、岡片倉培地を併用し、1%、2%の苛性曹達水で同一の材料を同時に處理して培養した。其の成績は第4表の様である。

即ち、肝の様に聚落の数の少ないものは餘り差が無いが、大體に於て、岡片倉培地より、第1磷酸加里のみが入つた培地の方が成績がよい。そして2%苛性曹達水處理では大體、第1磷酸加里の1%、2%に入つた培地がよく、其の間には著明の差が無い。又1%苛性曹達水處理でも、大體1~2%に第1磷酸加里の入つたものがよい。其の中でも1%に第1磷酸加里の入つた培地がよい様に思はれる。そして1%と2%の苛性曹達水處理では1%の方が成績がよい。

第5表 硫酸處理と苛性曹達處理の比較

動物番號	臟器の種	肉眼所見	稀釋倍數	硫酸水		苛性曹達水		聚落の週計
				Na ₂ HPO ₄	岡片倉	KH ₂ PO ₄	岡片倉	
7	肝	卅	10 ⁻²	17.0	22.3	12.0	11.5	Ⅳ
8	肝	-	10 ⁻²	0.3	0.3	0.3	0	Ⅳ
	肺	卅	10 ⁻³	224.5	226.3	251.0	132.8	
9	肝	卅	10 ⁻³	6.0	7.5	3.0	0.6	Ⅱ
	肺	卅	10 ⁻³	77.0	107.0	86.2	16.0	

- 註：1) 數字は聚落數を示す。
 2) Na₂HPO₄, KH₂PO₄ 培地は原液に夫々1%に入つたものである。
 3) 肉眼所見は佐藤、柳澤氏等の標準による。

3. 苛性曹達と硫酸による處理の比較

我々は同一材料につき、一方は1%の硫酸水で處理して、岡片倉培地と第2磷酸曹達の1%に入つた培地に、他の一方は1%の苛性曹達水で處理して、岡片倉培地と、第1磷酸加里の1%に入つた培地に培養比較した。動物は家兎であつて、人型菌3mgを靜脈に注射したもので、菌接種後3週、4週、5週の様に短い期間に剖檢したものである。其の成績は第5表の様である。

第6表 1% H₂SO₄ 岡片倉培地使用と1% NaOH, KH₂PO₄ 培地使用との比較

撲殺迄の日數	動物番號	稀釋倍數 かんさつ日(週) 處理液	10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴		
			Ⅰ	Ⅱ	Ⅳ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅳ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅳ
3週	K ₃	1% H ₂ SO ₄	-	28	卅	-	23	42	-	-	-
			-	x	-	3	18	-	-	-	-
			-	104	卅	-	-	-	-	-	-
			-	47	卅	-	4	20	-	-	-
3週	K ₃	1% NaOH	+	卅	卅	-	44	56	-	-	-
			+	卅	卅	-	33	97	-	-	-
			+	卅	卅	-	30	72	-	-	-
			+	卅	卅	-	56	102	-	-	-
6週	K ₆	1% H ₂ SO ₄	-	12	43	-	1	2	-	-	-
			-	7	32	-	1	7	-	-	-
			x	-	-	-	1	8	-	-	-
			-	31	59	-	3	5	-	-	-
6週	K ₆	1% NaOH	-	68	97	-	4	18	-	-	-
			+	96	132	-	-	4	-	-	-
			-	92	120	-	5	7	-	-	-
			-	60	84	-	x	-	-	-	-
11週	K ₁₁	1% H ₂ SO ₄	-	1	3	-	-	-	-	-	-
			-	30	35	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	3	-	5	9
			-	-	-	-	-	-	-	-	-
11週	K ₁₁	1% NaOH	-	154	170	-	20	24	-	-	-
			-	120	143	-	15	16	-	-	-
			-	87	98	-	13	15	-	-	-
			-	138	140	-	14	21	-	-	-

- 註：1) Ⅱ週目で+を記したのは聚落が見えても小さくて數へられなかつた事を示す。
 2) 卅 卅 は聚落の數へられなかつた事を示す。
 3) xは雜菌の侵入を示す。

即ち苛性曹達で處理して岡片倉培地に培養したものを除けば、差が無い。次にマウスにつき、一方は1%の硫酸水で處理して岡片倉培地に植へ、他の一方は1%の苛性曹達水で處理して、1%に第1磷酸加里の入つた培地に培養した。マウスは人型菌、陸 F.T.P. と 0.1mg 靜脈に接種したもので3週、6週、11週に撲殺し、肝を用ひた。其の成績は第6表の様である。

IV 總括並びに考察

動物の臓器は無菌的に採取しても、途中の操作中に雑菌が入つて、其の儘培養したのでは結果が出て來ない。随つて何等か前處理をして培養する事となる。前處理したものを定量的に 0.1c.c. と云ふ様に大量の材料を中試験管に分注した培地に培養する事は、1白金耳宛培養する場合は可なり趣を異にしてゐる。我々は最切2%の硫酸水を使用して岡片倉培地に植へて居たが、この方法では動物の長期経過の培養には不適である事を發見した。それで硫酸の濃度を再検討した結果、1%の方が聚落の多い事及び1%でも雑菌は侵入しない事を認めた。しかし天竺鼠について、其の長期経過のものを1%で處理して岡片倉培地に培養する機会がなかつたので、この場合に生活力の弱つたと思はれる菌を培養出来るかどうかは、はつきりしないが、マウスの11週経過の培養に於ては、菌の發育が悪く、同時に培養した4本の培地に於ても、其の聚落數は不揃であつた。此の事實から天竺鼠の経過の長いものは、1%の硫酸水で處理しても、岡片倉培地に植へれば、菌の發育は悪く不揃になるのではなからうかと思はれる。次に天竺鼠、23週経過のものを2%の硫酸水で處理して岡片倉培地に植へて發育の悪い場合でも、同時に2%に第2磷酸曹達の入つた培地に培養すると著明に發育が良くなるのを見てゐる。随つてそれより濃度の低い1%の硫酸水を使用した場合には1%に第2磷酸曹達の入つた培地を用ひた方がよいのではなからうか？ それで家兎につき1%の硫酸水で處理し、岡片倉培地と1%に第2磷酸曹達の入つた培地を比較して見た。すると期待に反し、其の間に著明の差が見られなかつた。然し

即ち経過日數の如何にかかわらず、苛性曹達處理の方が成績がよく、且つ経過の長びくに連れて兩者の間の差が増加する様に思はれる。又1週の様長期経過のものでも同時に培養した培地には大體同數の聚落が發育した。尙、全例を通して、硫酸と苛性曹達では雑菌の侵入に就いては、全然差異を認めない。

之は、3週、4週、5週と云ふ様に菌接種後の期間が短いせいではなからうか？ 菌接種後の経過の長いものでは矢張り岡片倉培地よりも1%に第2磷酸曹達の入つた培地の方が良いのではないかと想像される。

次に天竺鼠、23週経過のもので、2%の硫酸水で處理して岡片倉培地に植へたものは發育が悪かつたが、2%の苛性曹達水で處理して、2%に第1磷酸加里のみの入つた培地に培養すると、2%硫酸水で處理して、2%に第2磷酸曹達の入つた培地に培養した時と同様に良く發育して、兩者の間には差が無かつた。又我々は同じ材料を1%の苛性曹達水と2%の苛性曹達水で處理して比較すると、1%の苛性曹達水で處理して、1%に第1磷酸加里のみの入つた培地に培養した方が成績が良かつた。我々は尙、マウス11週目のものにつき、1%硫酸水で處理して岡片倉培地に植へて發育の悪いものでも、1%に第1磷酸加里の入つた培地を使用して、1%の苛性曹達水で處理すると、發育のよくなる事を證明してゐる。しかも雑菌の點では差が無かつた。随つて、アルカリで處理する場合は1%の苛性曹達水を使用し、第1磷酸加里の1%に入つた培地に培養すればよいと云ふ事になる。

次に1%の苛性曹達水を使用して、第1磷酸加里の培地に植へる場合と、1%の硫酸水を使用して、第2磷酸曹達の培地に植へる場合とでは、どちらが良いかと云ふ事であるが、天竺鼠23週のものに於ては、2%の苛性曹達水と、2%の硫酸水とで處理し、夫々第1磷酸加里、第2磷酸曹達の培地に培養して見ると差が無かつた。随つて1

%の場合でも兩者の間には著明の差が無いのではなからうか？ 尙、苛性曹達で前處理をやると容易に均等となり、硫酸處理に比して手技の點では

簡單である様に思はれる。随つて我々は、1%の苛性曹達で處理し、第1磷酸加里のみの入った培地を使用してゐる。

V 培養の方法

培養する材料に使用する鋏とピンセットは剖檢用のものとは別にして、煮沸消毒しておき、各臓器は其の都度消毒されたもので處理する様にする。先づ適當量(1.0g~0.5g 前後)の臓器を切り採り、滅菌した硫酸紙に載せて秤量する。之を滅菌した磁製の乳鉢に移して、初めは乳棒で良くたたき潰す。それから乳棒でよく搗りつぶす。5分間位搗ると、チョコレート様のドロドロした臓器の粥が出来る。之に1%の苛性曹達水を、少量宛加へて、かきまぜながら結局 10^{-1} 倍に稀釋する。1本の培地に發育した聚落が數へる事の出来る様に臓器の病變の程度により、更に1%の苛性曹達水で 10^{-2} 倍、 10^{-3} 倍等に稀釋して、1c.c.のメスピベットで0.1c.c.宛培養する。培地は各稀釋について4~5本宛使用する。培養し終つたら、培地を手で動かして、其の液が培地の斜面全體にうるほふ様にする。そして斜面臺にねかせて、

37°C の孵卵器に1~2日放置して乾燥するのを俟つて封蠟し、今度は斜面臺から取り出して、立てて竹籠に入れて、37°Cの孵卵器に入れて放置し、1週間毎に見て、聚落の有無を檢査する。使用する培養基は次の様である。

第1磷酸加里	1.0g
原液 味の素	1.0g
蒸溜水	100.0c.c.

原液 100c.c. に對して全卵液を 200c.c. 加へ、之にグリセリン 6c.c. 2%マラヒット綠液 6c.c. を加へて、よくかきまぜ、6c.c. 前後中試験管に分離して、一回充分に滅菌凝固する。使用する培地はなるべく新しいものがよい。同じ一聯の實驗に製造した日の、2~3週間も違つたものを使用する事は、混亂を來す故、同一の日に製造したもののみを用ひる事が望ましい。

VI 結

動物臓器よりの結核菌の定量培養に於ては、1%の苛性曹達で前處理し、原液に1%に第1磷酸加里の入つた培地に0.1c.c. 植へるのが最も成績がよく、しかも簡單である。

論

主要文献

- 1) C. C. Wessels: Am. Rev. Tubere., 1941, 43, 459.
- 2) 細沼: 醫學と生物學、昭 17、2、618
- 3) 柳澤: 日本臨牀、昭 23、6、205

結核菌の定量的培養法について

(其の三) 臓器よりの結核菌培養に及ぼす二、三

の影響と非病原性抗酸性菌の出現

財団法人結核豫防會結核研究所 (所長 隈部英雄)

小川辰次・石井和夫

I 緒 論

我々は定量培養により、ある程度、臓器中の結核菌の多寡を數學的に測定する事が出来る様になつた。然し、我々の數字は、化學的の或ひは物理的の數字と云ふのにはまだ遠い。動物の個性の差等を考へると、いくら努力しても、それ迄には達し得ないかも知れないが、我々は化學的、或ひは

物理學的の正確さにまでもつてゆく心構が必要であると思ふ。それには培養に及ぼす種々の影響を可及的に除去し、判定を正確なものとする事が望ましい。此の意味で表題の様な事を実験したので参考に供する次第である。

II 豫 備 實 験

材料：人型菌下株を 0.1mg、左下腹部は下に接種した天竺鼠を 3 週後に屠殺、其の肝を使用する。肉眼的病變は+であつて、大體、病變は均等である。(佐藤、柳澤氏等の記載の方法に依る)

方法：同一臓器の離れた 3ヶ所から夫々 0.3g, 0.5g, 0.4g と採り、型の様に 2%の硫酸水で 10 倍に稀釋して、0.1c.c. 宛を夫々岡片倉培地に 10 本培養する。そして聚落の發育する迄の期間及び 3

週目に發育した聚落の數を比較する。

成績：聚落は 2 週目に全部發育した。聚落數は 0.3g の場合は平均 174ヶ、0.5g の場合は 219.4ヶ、0.4g の場合は 199.6ヶであつて、三者の間に著明な差は無いと見てよい。即ち同一臓器に於ては、病變が大體同様であれば、同様の培養成績を示す事は明らかである。

III 定量培養に及ぼす二、三の影響

1) 臓器保存の影響

材料：人型菌 F 株と 3mg 靜脈に注射した家兎を、3 週目に屠殺して、其の肝を使用した。肉眼的の病變は+ (佐藤、柳澤氏等の方法に依る) であつて、大體平等である。

方法：臓器の一部を剖檢の當日に培養し、残りは氷室(3°C)に保存し、翌日、翌々日に培養して比較して見た。臓器使用量は、當日 1.2g、2日目 1.1g 3日目 1.5g. であつて、型の如く 1%の硫酸水で處理して 10 倍稀釋とし、其の 0.1c.c. 宛を夫々 10 本の岡片倉培地に培養した。培養後は毎週 2 回宛檢查して、聚落の發育する迄の日數及び第 3 週目に發育した聚落の數と比較した。

成績：第 1 表の様である。

第 1 表 臓器の保存日數の培養に及ぼす影響

保存日數	當日	2 日	3 日
聚 落 數	176.8 (148~245)	123.6 (83~178)	150.5 (78~218)
發育日數	I 週	0	0
	II 週	10	3
	III 週	10	10

註：1) 聚落數は 10 本の培地の平均を示し () の中は最少と最多を示す。

2) 發育日數の欄の數字は發育した培地數を示す。

即ち聚落の數は著明の差は無いが、多少減少す

る傾向がある。又聚落の發育する迄の日数は、保存期間の永びくにつれて、おくれる傾向が認められる。又雑菌の侵入は何れの場合にも認められなかつた故、差が無いものと見てよい。尙我々は同様の材料を2%の硫酸水で處理して同様に保存の影響を見たが、1%の硫酸水使用の場合と全く同様の成績を得た。以上の結果から臓器は氷室に保存されても、ある程度發育が阻害される事は明瞭である。

2) 臓器と播り潰す時間の影響

材料：人型菌F株を3mg 靜脈に注射後、27日目に斃死した家兎の肝、肉眼所病變#。

方法：臓器を0.8g宛、3個とり出して、各を10分、20分、30分と乳鉢で播り潰して、1%の硫酸水で100倍に稀釋して、其の0.1c.c.宛を、夫々岡片倉培地10本に培養し、聚落の發育する迄の期間と、4週目に發育した聚落の数を比較した。成績：第2表の様である。

稀釋が餘りに過ぎたので、比較するには適當では無いが、播る時間の永びくに連れて、聚落の数が減少し、又發育する迄の日数も、おくれてゐる。即ち臓器を乳鉢で播りつぶす場合に、時間が

第2表 播る時間の培養に及ぼす影響

播る時間	10分	20分	30分
聚落数	8.7 (3~26)	5.0 (1~12)	0.8 (0~2)
發育日数	I週	0	0
	II週	10	5
	III週	10	9
	IV週	10	10

註：1) 2) 第1表の場合と同じ。

長くかかると、それだけ結核菌の發育が悪くなる事は明瞭である。

3) 培地分注量の影響

方法：長さ18cm、口莖1.8cmの中試験管に、4c.c., 5c.c., 6c.c., 7c.c.と4種の定量の異なる岡片倉培地を作り、之に手振法によつて、1c.c.中30mg含む様に調製されたBCGの原酸を、滅菌蒸留水で稀釋して、1c.c.中 10^{-1} mg含む様にし、之を1%の硫酸水で更に10倍に稀釋して 10^{-2} mgとし、直ちに容量を異にして作つた岡片倉培地9本に、0.1c.c.宛を培養し、4週目に發育した聚落の数を比較した。

成績：第3表の様である。

第3表 培地容量の培養に及ぼす影響

培地の容量	4c.c.	5c.c.	6c.c.	7c.c.
聚落の分類				
數へ得たもの	131.3(41~217)	189.9(162~225)	170.3(84~236)	188.5(87~223)
數へられなかつたもの	0	0	3	3

註：1) 數へ得たものの欄は聚落数を示し()の中は最少と最多を、外は平均値を示す。

2) 數へられなかつたものの欄の數字は培地數を示す。

即ち6c.c. 7c.c.の間では差は無いが5c.c. 4c.c.と少くなるに連れて、聚落の数が減少する傾向にあり、殊に4c.c.に於ては、此の傾向は強い。我々は以前の實驗に於て、臓器其のものは培養には影響しない事を知つたので、この實驗の結果は、直ちに臓器培養の場合に當てはまるものと考へてよい。

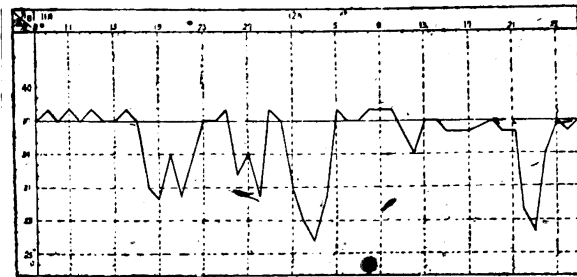
4) 停電による孵卵器温度變化の培養に及ぼす影響

我々は昭和22年11月初より12月に亘つて臓器の培養を實施した。たまたま、不定期の停電に

よつて孵卵器の温度は支離滅裂となり、培養の結果も全く不確實なものとなつた。唯此の場合、長い経過の後に、病變にほぼ相應すると思はれる程度の聚落の發育を見た。我々は今迄、孵卵器の温度に就いては、全く無關心であつたが、偶然にも上述の様な機會を得たので、此處に報告する。

温度の變化：停電の度々起つた11月8日より12月27日迄、9時、12時、16時の3回に亘つて孵卵器の温度を測定して見た。12時だけの温度を示せば次の様である。

第1圖 孵卵器の温度の變化



即ち第1圖で見る様に、37°C以下の事が23回、即ち約半分であつて、最も低かつたのは23°Cであつた。又37°Cより高い温度を示す事が度々で、37°Cを示した事は数へる程しか無い。尙第1圖には書いてゐないが42°Cを示した事が1度あり、40°Cを示した事が5回あつた。

方法：停電の頻繁にあつた期間に於ける材料としては、人型菌、陸F、柴野、柴田、今藤の4株を、

0.1mg宛、天竺鼠の左側下腹部皮下に接種し、5週、乃至6週後に屠殺して、其の肝、脾、肺、膝蓋淋腺、接種局所等を用ひ1%の硫酸水で處理して、岡片倉培地に植えた。又停電の無かつた時に培養した材料は、陸F 0.1mgを皮下に注射して、7週後に屠殺した天竺鼠の脾で、之を2%の硫酸水で處理して岡片倉培地に培養してゐる。そして之等の2群に就いて、夫々培養陽性の培地を集め、之等を前者では培養後7週目の聚落を、後者では培養後4週目に發育した聚落を1~10ケ、11~50ケ、51~100ケ、101~200ケ、201ケ以上、の様に5群に分けて、之等の群に屬する培地數を調べ、更に夫等の群の培地に就いて、何週目に初めて聚落が發育したかを調べて見た。そして、停電した場合と、停電しなかつた場合の發育の状態を比較して見た。

成績：第4表の様である。

第4表 孵卵器の温度の變化の培養に及ぼす影響

孵卵器の温度	發育迄の週 聚落數	I 週	II 週	III 週	IV 週	V 週	VI 週	VII 週
		變動の劇しかった場合	1~10				73 (32.6%)	123 (55%)
	11~50				17 (20%)	65 (76.5%)	1	2
	51~100				1	7	0	0
	101~200				5	4		
	201以上				21	4		
常に37°Cであつた場合	1~10		13 (22%)	43 (73%)	3 (5%)			
	11~50		40 (95%)	2 (5%)				
	51~100		5					
	101~200		10					
	201以上		19					

註：數字は培地數を示す。

即ち停電が無くて孵卵器が常に37°Cを保持してゐた場合は、聚落が51ケ以上であれば、2週目で聚落が發育してゐる。又11~50ケでも大多数は2週目で發育し、III週目で發育したのは2回だけである。最も少い1~10ケでは3週目に發育するものが大部分であつて、次に2週目で發育するが多く、4週目で發育するものは、極く少数で

ある。之に反して停電が多くて孵卵器の温度の變動が劇しかった場合は、51ケ以上の聚落のものでも、4週、5週に發育してゐる。又1~10ケ、11~50ケでは、4週、5週目で大部分發育してゐるが6週、7週に發育が遅れてゐるものがあり、之の傾向は、聚落の最も少い1~10ケに於て著明である。即ち停電の場合は大體、聚落の發育が2

週間遅れてみると見てよい。停電の場合は1%の硫酸水で処理しても、この様に發育が遅れたのであるからして、停電しない時の前處理と同様に、2%の硫酸水で處理しておたら、其の間の差は、もつと著明なものとなつたであらう。尙、聚落の數に就いては比較すべき材料が無いので不明であるが、發育のおくれる事を見ると、多少とも、影響するのではなからうか？

IV 非病原性抗酸性菌の出現

我々は、人型菌を皮下に接種した天竺鼠、靜脈内に接種した家兎、マウス、等を種々の時期に屠殺し、或ひは斃死したものに就いて1%、2%の硫酸水で處理して岡片倉培地に植へたり、或ひは1%苛性曹達水で處理して、第1磷酸加里の培地に植えたりして、臓器や皮膚を培養してゐる中に、種々の非病原性の抗酸性菌を検出した。

第5表 非病原性抗酸性菌の檢出表

動物の種類		天 竺 鼠										家 兎						總 計		
剖檢時の生死		斃 死					屠 殺					斃 死			屠 殺					
臓器の種類		脾	肝	肺	淋巴腺	接種局所	脾	肝	肺	淋巴腺	接種局所	脾	肝	肺	腎	脾	肝	肺	腎	
培養臓器數		35	34	34	26	21	470	129	120	40	40	6	7	8	6	12	10	9	9	1035
陽性臓器數	黄色の種類			1		1		1			3							1		7
	淡橙				1	8	3	3	12	3	9			1		1	1	1		43
	灰白				1	1														2
	合計 (%)	0	0	1	2	10	3	4	12	3	12	0	0	1	0	1	1	2	0	52 (5.0%)
		(7.5%)(48%)					(3.1%)(9.3%)(7.5%)(30%)													

註：1) 淋巴腺は左膝髌腺を示す。
2) 接種局所は左下腹部の皮膚を示す。

即ち第5表で見る様に1035回の培養中52回即ち5.0%に於て非病原性と思はれる抗酸性菌を検出した。之等の中、大部分のものは黄色を呈し、淡橙色、灰白色をとるものも少々あつた。聚落の外観は灰白色のものは潤潤性であり、其の他のものは寧ろ粘稠性であつて、聚落の乾燥してゐるものは1例も無かつた。聚落の數は、大多數は1ヶ、2ヶであつて、之等の菌以外に結核菌の聚落が認められた。又聚落の發育は、常に37°Cであつた孵卵器では、1週間前後に發育したものが多かつたが、停電の爲に孵卵器の温度が不定であつた場合は、2週目で發育したものが其の半分の11例であつて、次に多いのは、1週目、3週目であつて、夫々5例であつた。尙、發育が更に遅れて、

4週目に發育したものが2例、7週目に發育したものが1例あつた。即ち非病原性の抗酸性菌に於ても温度が不定であると發育が遅れる事が明らかである。臓器や皮膚の中で一番多く檢出されたのは接種局所の皮膚であつて、之は屠殺、斃死の別がない。次に接種局所の所屬淋巴腺、肺等に於て多い。そして脾、肝等では稀である。尙マウスは72匹につき脾、肝、肺、腎と培養したが、非病原性の抗酸性菌を見出す事が出来なかつた。之等の非病原性抗酸性菌が、接種局所、淋巴腺、肺等、直接、間接に外異とのつながりのある所に多いのは、自然界の抗酸性菌と関係があるものと思はれる。

IV 總括及び考察

我々は人工的な培地により、又其の操作により結核菌をつかまへ、更に之を定量しようと云ふのであるが、我々は之等の方法が可なり進歩したと思つても、結核菌に云はせれば、寧ろ、手技の不

完全に一驚して居るかも知れない。この様に考へると我々の手技にはある限度がある。それにしても、其の理想に向つて一步でも近づきたいと云ふのは我々の念願である。我々は身近に経験した二

三の事に就いて記したが、之は、我々の理想實現の足しの一片にしか過ぎない。我々は之等の事實を集積して、之を土臺とし、更に一步を進めたいと思つてゐる。結核菌の分離培養、殊に其の材料が汚染されてゐる時は、なるべく早く培養が終る事が理想である。此の事は定量培養に於ても當然あてはまる事である。我々は他の汚染された材料程では無いにしても、臓器の保存の永びくに連れて、發育の阻止される傾向のあるのを見た。又播る時間も餘りに永びくと發育の悪くなるのを見たが、之は BCG ワクチンの手振による製造に於て時間を長くかけると、それに相當して生菌量が減る事實と一致するものと思はれる。我々の經驗によれば、殊に苛性曹達水による處理では、5分前後で均等になる。丹念に時間をかけて播る事は禁物である。我々は又、培地の容量が餘りに少くなると發育が悪くなる事を見た。0.1c.c. と云ふ様な大量のものを植へるのであるからして、培地の容量が少ければ、苛性曹達の比較的の量が大きとなり、又培養した液の乾燥する期日も永びいて、發育が遅れるものと思はれる。我々の實驗では 6~7c.c. であればよい。次に孵卵器の溫度であるが、我々は 37°C の孵卵器を使用してゐるが、一般に之でよいとされ、溫度に就いては餘り實驗されてゐな

V 結

- 1) 臓器を氷室に保存しても結核菌の發育が遅れる傾向がある。
- 2) 臓器を乳鉢で播る時間が長くなると發育が悪くなる。

い様である。R. Koch.によれば哺乳動物の結核菌に於ては 42°C では3週間内にはすこしも發育しなかつたし、30°C では軽度の發育を示し、又 28°C~29°C では 42°C 同様にすこしも發育しなかつたと云ふ。

我々は今回の經驗によつて、停電が頻繁に起り、孵卵器の溫度の變化が劇しいと、かなり結核菌の發育を阻害するものであると云ふ一端を、うかがふ事が出来た。随つて成績の判定に當つては、慎重である事が必要である。尙、觀察に就いて注意しなければならぬのは非病原性の抗酸性菌の出現であるが、然し、之等のものは大多數は著色して居り、しかも聚落が濕潤乃至粘稠性であり、培養後、早期に發育する等の事を考慮に入れば、結核菌との鑑別は、さして面倒では無いと思はれるが、尙、疑はしい時は動物接種をやつて判定する事が正しい。

以上の事實は、現在我々が使用して居る手段とは違ひ、1%, 2%の硫酸水で處理して、岡片會培地を使用したものが大部分であるが、現在使用してゐる方法、即ち1%の苛性曹達水で處理して、第1磷酸が量の培地に植へる場合にも當然、當てはまるものと考へてよい。

論

- 3) 培養基の分注量が少いと發育が悪い。
- 4) 非病原性の抗酸性菌を5%に發見したが一番多いのは、菌接種局所の皮膚であり、次いで所屬淋巴腺、肺等に多い。

地方學會欄

日本結核病學會會則第 31 條に依り關東地方學會は昭和 24 年 1 月 22 日東京醫科大學に於て發會せられ會則並に役員の決定をみた。參會する者 320 名を越え會長には春木秀次郎博士が選舉せられ、引續き演説が行はれたが極めて眞摯盛會であつた。

演説要旨は本誌次號に掲載の豫定である。