

結核菌用培養基の比較、特に定量培養におけるその適否について

京都大学結核研究所細菌血清学部

(主任 植田 教授)

山 田 修

岡 田 博

(昭和26年4月5日受付)

緒 言

結核菌の培養は硫酸或はアルカリによる前処置法の案出によつて、著しく容易になつた。そして卵培養基の考案はこのような前処置法に都合よく適合したために、このような前処置法と卵培養基とを組合せ用いることによつて、今日では結核菌の培養は左程困難ではないと考えられている。併しながら、多量の結核菌を含有する材料を培養してただ単にその中に結核菌が含有せられることを証明すれば足りる場合は、現行の方法及び培養でよいかも知れないが、微量の結核菌を含有する材料中から、一個の生菌をも逸さないように培養するためには、現行の方法で万全であるかどうか。例えば酸で前処置した材料も、アルカリで前処置した材料も等しく同一組成の卵培養基に培養されているが、これで果してよいものであろうか。あるいはまた、硫酸あるいはアルカリによる前処置を加えることなく、菌液或は組織液等を培養する場合に、現在慣用されている色素加卵培養基で果して良いものであろうか。これ等の点に関連して、最近小川は、前処置法に応じて、使用する培養基の組成、就中その緩衝能に留意すべきことをあげ、2、3の改良培養基を発表した。余等は下記の如く、硫酸あるいは苛性曹達で前処置した喀痰を小川の培養基を始め、数種の培養基に定量培養法にならつて培養し、また何等前処置を加えない菌浮游液を定量的に培養して、それぞれの場合におけるこれ等培養基の適否を比較検討した。

その1 菌浮游液の培養

(1) 実験方法及び材料

供試結核菌は、当研究室保存の人型結核菌青山B株を上坂・友田培地に3週間培養したものであつて、乳鉢にて研磨し蒸留水を加えつゝ浮游液とし、0.1cc中に 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 及び 10^{-8} mg(乾燥重量)をそれぞれ含むようにし、直ちに供試した。供試培養基は、小川¹⁾ 2) 3) 4) の1%及び3%第1磷酸加里、3%第2磷酸曹達含有各卵培地、ペトロナニー⁶⁾、岡・片倉⁷⁾、2%寒天加キルヒナー培地⁸⁾、及び我々の研究室で日常慣用する下記の組成の上坂・友田培養基⁵⁾の7種である。

上坂・友田培養基の組成

ペプトン3gを水150cc中に加熱溶解し、その冷却を待つて、全卵4個、卵黄1個を加え、強く振盪し、滅菌ガーゼにて濾過、次いで全量の4%になる如く、グリセリンを加え、さらに2%マラヒット緑5ccを加えて振盪、約1時間静置後、分注し、1日1回85°C30分ずつ3回加熱して凝固滅菌する。

各培地は凝結水をヒベットで吸取つてから、上述の菌液0.1cc宛を加えて斜面を潤し、1昼夜孵卵器内に水平に保つた後、封蝋し、第6週に至る迄発育状況、集落数及びその形態を観察した。

(2) 実験成績

集落の発育状況を見るに、2週間以内に肉眼的にその形成を認められるものは、キルヒナー寒天と1% KH_2PO_4 培地のみである。しかもこれ等両培地及び上坂・友田培地は比較的一斉に集落がでるために、4週以後は著明な増加を示さないが、ペトロナニー、岡・片倉、及び3%磷酸塩培地では散発的に出始め、5週に至る迄は週毎に飛躍的に増加する傾向を示す(第1表参照)。各培地の集落数を比較すれば、上述の理由により、培養早期においては培地によつて、かなりの差があるが、第5週に至れば比較的その差は減少する。第1表に示すように集落数はキルヒナー寒天において最も多いが、1% KH_2PO_4 、ペトロナニー、上坂・友田及び岡・片倉培地もこれに近い成績を示す。これら4種の卵培地はいずれも近似のものと思ふに差支えないであろう。培地によつて週毎の増加率に特徴のあることは既に述べた。

次に集落の形態と発育の優劣を第4週の培養について述べると、集落には、培養基の種類によつて殆んど正円形隆起状の帯黄色不透明なもの、扁平不整形な乳白色半透明なもの及びそれ等の混在乃至移行形を呈するものがある。すなわち、キルヒナー寒天の集落は、乳白色、半透明、扁平菲薄にして辺縁及び表面は著しく不整かつ粗で比較的大きい。但し小さな正円形のものも多少混在する。早期の発育は他のいずれの培地よりも優秀であるが、3~4週間で多くは発育が停滞し、5週に至れば集落数は甚しく大小不同となる。また本培地の集落は極めて容易に剝離され、単に水を入れたのみで水面に浮べ

第1表 菌浮游液の場合

(人型青山B, 蒸溜水浮游液)

菌液	Kirchner 寒天	1% KH_2PO_4	Petragnani	上坂・友田	岡・片倉	3% KH_2PO_4	3% Na_2HPO_4
10 ⁻⁵ mg	243	220	184	174	173	71	65
10 ⁻⁶ mg	17	10	18	11	12	6	4
10 ⁻⁷ mg	2	4	2	1	2	0	0
10 ⁻⁸ mg	0.3	0	0	0.3	0	0	0

(註) 表中数字は5週間培養後の集落数(培養基3本の平均)

ることができる。上坂・友田培地では帯黄色不透明の小さな隆起した正円形でいわゆるS型であり、出現時期は早い。以後の発育は緩慢である。ペトラナー培地では帯黄乳白色の隆起した小さな正円形集落が多いが、扁平不整形で乳白色半透明のもの及びその中心に娘集落の如き半球を有するもの、すなわち、忽然と隆起せずに周囲に薄くまたは厚い層を有するものがある。比較的多形性を示すともいふべきか。発育は遅いが6週に至る迄絶えず発育して結局は大きな集落を形成するに至る。岡・片倉培地では大きな扁平不整形のいわゆるR型が多いが、その他の点ではペトラナーに似る。1% KH_2PO_4 培地は、比較的大きな黄色調の強い頗る扁平な集落を作る。またその中心部に小突起を有するものがあり、辺縁及び表面は粗である。出現時期は早いが発育は緩慢である。3% KH_2PO_4 培地の集落も黄色扁平で不整形であるが、その出現日数は3% Na_2HPO_4 培地とともに上記いずれの培地よりも遅い。3% Na_2HPO_4 培地では小さな円形隆起状が多く、所謂S型集落である。以上各種培地の集落を形態学的にいわゆるR型とS型に大別すれば第2表の如くである。雑菌混入は卵培地においては殆んど皆無であるが、キルヒナー寒天のみは汚染され易い。

第2表 培養基のPHと集落形態

(人型青山B, 4週間培養)

培 養 基	凝 結 水 PH	集 落
3% KH_2PO_4	5.0	R
1% KH_2PO_4	6.5	R
Kirchner 寒天	6.8	R S
岡・片倉	6.8	R S
Petragnani	6.8	S R
上坂・友田	7.0	S
3% Na_2HPO_4	7.2	S

その2 喀痰の培養

(1) 実験方法及び材料

i) 供試培養基は上述と同様の7種である。

ii) 当結核研究所臨床の入院患者の喀痰50例を用い、その中25例は前処置液として、5%硫酸水を使用し残りの25例は前処置液として4%苛性曹達水を使用した。

iii) 「スピットグラス」に上記の喀痰1ccを採り、これに5%硫酸水または4%苛性曹達水4ccを加え、よく振盪混和し、孵卵器内に30分間静置する。所要の培養基内の凝結水を捨て、これに上記「スピットグラス」内の上層液0.1ccずつを「メスピット」で流し込み、培養基を静かに上下に動揺させて上層液が斜面全体を潤うようにする。斜面を潤したならば培養基を横木(斜面台)にねかせ、その斜面を正しく水平にして、上層液が一方に偏しないように注意し、上層液が乾燥する迄孵卵器内に静置しておく。このようなものを各被検培養基についてそれぞれ3本宛作成する。上層液が乾燥したならば封蠟して試験管立に立て、孵卵器内に培養する。

(2) 実験成績

培養6週間後に発育した集落数を比較した。その成績は第3表及び第4表の如くであつた。各培地の優劣の決定には、同一喀痰において集落平均値の多いものより順次1, 2, 3, ……………7と点数をつけ、喀痰20例を合計して最も点数の少ないもの程優秀な培地と決定した。

硫酸水前処置による場合は3% Na_2HPO_4 培地が最も優秀であり、続いてペトラナー、上坂・友田、岡・片倉、2%寒天加キルヒナー、1% KH_2PO_4 、3% KH_2PO_4 培地の順序であつた。苛性曹達水前処置による場合には3% KH_2PO_4 培地が最も優秀であり、続いてペトラナー、岡・片倉、上坂・友田、1% KH_2PO_4 、2%寒天加キルヒナー、3% Na_2HPO_4 培地の順序であつた。

各培地に発育したコロニーの性状は2%寒天加キルヒナー培地を除いては各被検培地とも著しい差異は認められなかつた。すなわち2%寒天加キルヒナー培地に発育したコロニーのみは乳白色、半透明、扁平菲薄な帽針頭大の円形を呈していた。他の6種の被検培地に発育したコ

第3表 5%硫酸水前処置喀痰の場合

ガ フ キ ー	3% Na ₂ HPO ₄		Petraghani		岡・片倉		上坂・友田		Kirchner 寒天		1% KH ₂ PO ₄		3% KH ₂ PO ₄	
	PH	7.2	ca	6.8	ca	6.8	ca	7.0	ca	6.8	ca	6.5	ca	5.0
V	ca	700	ca	700	ca	700	ca	700	ca	700		194		111
IV	ca	500	ca	500	ca	500		332	※ca	400		112		63
IV	ca	500	ca	400		262		229		88		82		66
III		210		128	※	81		150	※	55		80		14
III		77		54		29		37		27		18		10
II		71		51		33		30		12		6		2
II		67		49		30		54		21		20		3
II		63		60		19	※	44		21		10		3
I		42		47		20		14		4		4		0
I		28		14		19		17		2		2		1
I		23		13		10		11		19		4		2
0		16		17		7		9		11		3		0
0		14		6		3		8		0		2		1
0		11		5		3		5		0		2		0
0		8		10		8		7		5		1		0
0		8		2		4		13		4		1		1
0		7		1		2		3		1		0		0
0		7		4		2		2		0		1		0
0		3		3		1		2		2		0		0
0		2		0		0		1		0		0		0

(註) 表中数字は培養基3本の平均集落数(但し※印は2本)

第4表 4%苛性曹達水前処置喀痰の場合

ガ フ キ ー	3% KH ₂ PO ₄		Petraghani		岡・片倉		上坂・友田		Kirchner 寒天		1% KH ₂ PO ₄		3% Na ₂ HPO ₄	
	PH	5.0	ca	6.8	ca	6.8	ca	7.0	ca	6.8	ca	6.5	ca	7.2
V	ca	600	ca	600	ca	600	ca	600	ca	600	ca	400		216
IV	ca	500	ca	400	ca	400	ca	400	ca	400	ca	400		133
III	ca	400		332		276		331		216		218		94
III		257		209		168		124	※	204		143		46
II		175		141		114		97		143		73		11
II		132		99		112		77		27		47		27
II		99		71		67		42		33		61		15
I		57		41		34		41		43		25		10

I	56	76	45	11	11	17	6
I	57	36	15	*	30	16	5
I	41	30	17	31	*	19	1
I	40	30	17	35	2	13	3
I	36	22	28	5	0	12	0
0	26	13	22	0	0	11	0
0	17	9	2	4	0	3	0
0	14	10	7	7	1	2	0
0	11	5	9	6	0	5	0
0	10	8	5	9	2	1	0
0	8	4	9	2	0	2	0
0	2	3	0	1	0	0	0

(註) 第1表と同じ

ローンは帯黄色、不透明な帽針頭大～粟粒大～半米粒大の隆起した円形を呈した。

また雑菌による汚染は硫酸水においては、岡・片倉培地に1本、上坂・友田培地に1本、2%寒天加キルヒナー培地に3本を認めた。苛性曹達水前処置のものにおいては、上坂・友田培地に1本、2%寒天加キルヒナー培地に2本を認めた。この雑菌汚染を来したものは、それを除外し、それぞれ残り2本の培地における平均値をもつて集落数を表わした。

総括並びに考按

菌浮游液培養の結果よりすれば、培養基によつて早期に集落ができ、その後の発育が比較的早く停滞するものと、集落形成は遅いが比較的遅く迄発育を継続するものがあり、結局集落数は前者の方が多い。すなわち生存菌数を最も正確かつ比較的短期間に知るには前者が適当しており、キルヒナー寒天、上坂・友田及び1%KH₂PO₄培地はこれに該当するものと考えられるが、ペトロナニー、岡・片倉培地もまた決してこれ等に劣るものではない。また培養基の組成の相違が、それぞれ特徴ある集落を発育せしめることが本実験から認知される。酸性培地では主としていわゆるR型を、塩基性培地では主としてS型集落を形成する傾向が見られるが、PHとの確実な関係についてはさらに検討を加えたい。

なお培養基には、たとえ幼弱なまたは相当機械的損傷を受けた菌体でも、一旦そのメヂウムに触れると、発育は旺盛でなくとも直ちに菌がこれに適応するものと、発育は旺盛であるが培地に適応するのに時間を要するために、上記の如き菌体の一部分は死滅し、乃至は遅れて発育するものがあるために、上述の如き結果が招来されるのではないかと考える。従つて比較的粗大な菌塊から

なる菌液を培養せば、集落の特徴はもとより、上述各種の所見もまた培養基によつて左程顕著な差異を示さないであろう。

喀痰の培養は、通常の如く白金耳で材料を培養基に移す方法では、また多少共成績が違つて来る事が予測できるが、上述の如く定量培養の方法による時は、小川の指摘するように硫酸処置材料の培養にはアルカリ性の第二磷酸曹達加培地が、また苛性曹達処置材料の培養には酸性の第一磷酸加里加培地が良好な成績を与えることは間違いない。併しながら、ペトロナニー、上坂・友田、岡・片倉の各培地が前処置法の如何を問わずいづれの場合にも平均した成績を与えることは見逃すことができない。すなわち小川の培地を予め用意する時には、利用すべき前処置法が自ら限定せられるが、上記3種の培養基ではそのようなことがなく、用に臨んで好む所の前処置法を利用し得る利点がある。これを要するにこれ等3種の培養基は喀痰の培養にもあるいはまた菌浮游液の培養にも用い易い培養基であるといふことができる。

結 論

主として定量培養について結核菌用培養基を比較した。菌浮游液を培養する場合には、キルヒナー寒天、1%KH₂PO₄培地、ペトロナニー、上坂・友田及び岡・片倉培地上の集落の発育はほぼ相似たものであることを知つた。併しながら培養基の種類によつて、それぞれ形態上特徴ある集落を形成する。

喀痰の培養においては、小川の培養基は前処置法と培養基との関係を顧慮して使用しなければならないが、ペトロナニー、岡・片倉、上坂・友田培地は前処置法の如何を問わず用い得るといふ点で便利であろう。

主要文献

- 1) 小川辰次外：結核，第24巻，第2号，13頁，昭24
- 2) 小川辰次外：結核，第24巻，第11号，11頁，昭24
- 3) 小川辰次外：結核，第25巻，第5号，33頁，昭25
- 4) 小川辰次外：結核，第25巻，第5号，207頁，昭25
- 5) 上坂一郎・友田 博：結核研究，第1巻，3号，244頁，昭16
日本医学及び健康保険 3311号，17頁，昭17
- 6) Petraghani, G., Zbl. Bakt. 1. Ref., 85: 1927
- 7) 岡・片倉：東北医学雑誌，21巻，692頁，昭12
- 8) Kirchner, O.; Zbl. Bakt. 1. Org., Bd. 124. S. 403, 1932.

新刊

医学博士 佐々貫之
医学博士 詫摩武人 共著
医学博士 塩沢総一
医学博士 坂本秀夫

新しい治療

第1集

A5判 300頁 上製 定価 350円 千実費

終戦後、米英医学の輸入と共に、治療界の進歩は実に目ざましいものが少くない。そして今までの治療法の中には、根本的に改めなければならないものが少くない。本書は古い治療法の中の真に優れたものを考慮しつつ、今日の新しい治療法を紹介の目的で編集されたものである。臨床医家は、これを自家薬籠中のものとするにより患者の治療成績も飛躍的に向上することを確信する。

内容目次：第1章スルフォオンアミド療法，第2章ペニシリン療法最近の趨勢，第3章ストレプトマイシン療法最近の趨勢，第4章オーレオマイシン療法，第5章クロロマイセチン（クロラムフェニコール）療法，第6章パラアミノサリチル酸療法，第7章コンテベン（チビオン）療法，第8章テラマイシン療法，第9章ナイトロジェン・マスタート療法，第10章ダイキマロール療法，第11章最近の駆梅療法，第12章先天梅毒の療法，第13章リウマチス療法と副腎皮質ホルモン，第14章貧血の療法，第15章乳児下痢症の療法，第16章小児肺炎及び膿胸の療法，第17章先天性心臓疾患の療法，第18章小児髄膜炎（結核性髄膜炎及び化膿性髄膜炎）の療法，第19章デフテリアの療法，第20章細菌性赤痢・疫痢及びアメーバ赤痢の療法，第21章百日咳の療法，第22章インフルエンザの療法，第23章ハイネ・メデン氏病の療法，第24章寄生虫病の療法，第25章蟻虫症の療法
新しい治療法は日進月歩である。更に第2集（一部脱稿），第3集と続刊して，世の待望に答える予定である。

東京都中央区銀座西7の1

株式会社 東西医学社

振替口座東京2818番
電話銀座(57)2126—2129番

品質管理実施

Q.C.P

結核

治療に不可欠のニツパスは自、他覚症状を速かに好轉せしめるので採用されてゐるが、特に本剤の製造には品質管理を実施して品質の改善に努力してゐる為何等懸念なく安心して服用し得る。

……とは Quality Controlled Product (品質管理)の略称で米國各製薬では殆んど品質管理は製社が初めて実施したものを採用して品質の均一、向上に努めて來る製品である。

ニツパス

肺結核(渗出性)、腸結核、喉頭結核、咽頭結核



100瓦、200錠、
500瓦、500錠

製造発売元 田邊製薬株式会社 大阪道修町