

結核菌培養早期証明法の考案

(その1) 湿室内 Slide culture 法

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 27 日受付)

緒 言

結核菌の培養法、殊に培養による早期検出法には幾多の考案がある。Dubos の培地を分離培養に応用して Foley¹⁾ は平均 10.6 日、Goldie²⁾ は 8 乃至 14 日、Dubos & Middlebrook³⁾ は 5 乃至 15 日で陽性成績を得たという。また培養早期に培養基斜面をかきとり、あるいは液体培養基では管底の培養液の少量を吸取つて塗抹染色する方法が試みられ、Johnston⁴⁾、瀬崎⁵⁾、増田⁶⁾ 等によれば検出日数を相当短縮し得たという。また最近 Berry & Lowry⁷⁾ は Price⁸⁾ の所謂 Slide culture 法を再検討(検出日数約 6 日)した。余等の経験からも、本法は優秀な方法であるが、唯本法には比較的多量の培養液を要し、しかも病原材料の一部は液中に流れ落ちて失うのみならず、載物硝子を液中から取り出す時に、流れ落ちた病原材料が載物硝子の到るところに附着して不潔かつ危険である。

上記の方法のこれ等の欠点に鑑み、余等は下記のごとき二種の培養早期検出法を考案した。それによれば上述の方法のごとき危険及び不備が除かれ簡易であつて、しかも成績の判定はより短時間で可能である。

1 実験材料並びに方法

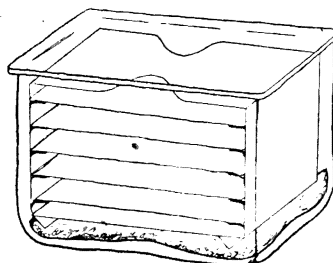
喀痰は当結核研究所臨床部の外来及び入院患者のもので、塗抹標本をチール・ネールセン法で染色し、100 視野を鏡検して陰性のもの 70 例を供試した。

喀痰約 1 あるいは 2 cc を遠心沈澱管に採り、4% NaOH 5cc を加えて振盪混和し、孵卵器に 20 分間静置後 3000 回転 20 分間遠心沈澱して上清を捨て、滅菌蒸溜水を加えて上記同様に遠心沈澱を繰り返えし、得た沈澱に等量乃至倍量のキルヒナー液を混和した。混和液の 1 滴を 6 枚の滅菌したスライド硝子上に滴下して後、それぞれの硝子を下記のごとき湿室内のスライド棚に納め 37°C に培養した。培養 24, 48, 72, 96, 168 時間後にスライド硝子を 1 枚宛取り出し、孵卵器内に放置、乾燥して後火焰で固定し、チール・ネールセン法で染色した。各標本とも常に 100 視野を鏡検した。同時にスライド硝子の 1 枚は保温することなく直ちにそのまま上記同様に固定、チール・ネールセン法

で染色して対照とした。また他方キルヒナー液を混和する直前の沈澱の 1 白金耳を 2 本の卵培養基(上坂一友田)¹⁰⁾ に培養し、その成績を湿室内 Slide culture 法によるそれと比較、対照した。

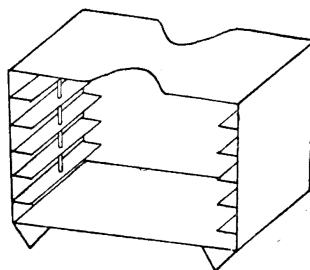
2 培養装置

第 1 図 湿室内硝子匣



湿室内硝子匣 高さ 7.5cm。縦 8cm。横 10cm。蓋(すり合せ)厚さ 0.4cm。縦 8.5cm。横 10.8cm。

第 2 図 スライド棚



スライド棚(真鍮製)高さ 6cm。縦 5.5cm。横 8cm。棚 5 段。前後計 10 段。棚の間隔 1.1cm。脚付き。

容器は第 1 図のごとき、高さ 7.5cm、縦 8cm、横 10cm の大きさの硝子匣の中に第 2 図のごとき真鍮製のスライド棚(高さ 6cm、縦 5.5cm、横 8cm、棚 5 段、前後計 10 段、棚の間隔 1.1cm、脚付き)を納め、硝子製のすり合せの蓋(厚さ 0.4cm、縦 8.5cm、横 10.8cm)を施したものである。

使用に際しては硝子匣の底部に少し許りの脱脂綿を敷き、棉花は 60 乃至 100cc の蒸溜水を以て充分に潤し、その上にスライド棚を置き、蓋をして蒸気釜で 100°C 30 分間滅菌する。

上記のごとき培養材料の 1 滴を予め滅菌したスライド硝子上に置き、スライド棚に納めて 37°C に培養する。スライド上の水滴が流れるのを避けるため硝子匣は常に水平に保つ。

3 実験成績

供試した喀痰70例中6例は培養直前のスライド硝子を染色して既に陽性を示したから除外し、残り64例の成績を示すと、第1表のごとく、被検64例中34例が上記の方法で陽性と成つたが、その内訳は24時間後に3例、48時間

第1表 各培養時間の陽性例数 (計64例)

培養時間	24	48	72	96	168	計
陽性	3	22	9	0	0	34
陰性						30

間後に22例、72時間後に9例が陽性となつた。それ以後に初めて陽性と成つた例はなかつた。

雑菌混入をみたものが8例あつたが、これは上述のごとき培養容器不足のために大型シャーレを代用した場合に見られたものであつた。しかもそれは結核菌の検出に障碍とはならなかつた。

第2表 培養48時間後、各例100視野中の集落数(計25例)

集落数	10以下	10以上	20以上	30以上
喀痰例数	16	6	2	1

第2表は培養48時間の集落数を数えたものである。集落は大多数単孤菌または2乃至5個の菌体から成つた。集落は多少とも樹枝状配列を呈するものが多く、また不規則な網目状、円形を呈するものもあつた。集落中の菌体は大多数赤色に染まり、淡赤色、淡紫色あるいは淡青色のものは稀であつた。

第3表 湿室内 S.C. 法と卵培養基培養法との検出例数

喀痰例数	湿室内S.C.法	卵培養基培養法
1	+	-
3	-	+
27	-	-
33	+	+
64	34	36

第3表は湿室内 S.C. 法と卵培養基培養法との成績を比較したものであるが、両方法共に陽性は33例であつて、その中湿室内 S.C. 法でのみ陽性のもの1例、またその逆の場合が3例あつた。今検出に要した日数をみると、第4表の如く湿室内 S.C. 法では平均2.2日で結果

第4表 湿室内S.C.法と卵培養基培養法との検出日数の比較

	被検喀痰	陽性例	平均検出日数
湿室内 S.C. 法	64	34	2.2
卵培養基培養法	64	36	20.6

を判定し得たのに比べ、卵培養基では平均20.6日を要した。

4 総括並びに考按

苛性曹達で処置し、1回蒸留水で洗滌した沈渣にキルヒナー培養基の等量乃至倍量を混和した液の1滴を滅菌スライド硝子上に置き、これを上述のごとくして湿室内に培養する方法によつて、卵培養基培養法に劣らない検出率を挙げ得た。しかも結果の判定は少数例においては24時間後に既に可能であつたが、大多数は48乃至72時間後に可能であつた。平均検出日数は2.2日であつた。要するにこのような結果を得たことは湿室内S.C.法においては材料中の微量の結核菌を発育せしめ、その初期集落を観察することが可能であるにほかならない。かくのごとくして培養法の欠点であるところの結果の判定に長時日を要する点が湿室内 S.C. 法では改められ、平均2.2日という短時日で結果が判明する。唯本法においては発育初期の集落を染色、観察して結果を判定するのであるから、つぎのことには充分留意しなければならない。

すなわち唾液あるいはその他に由来する非病原性ミコバクテリウムが培養材料中に混入した場合である。上記実験中にはそのような場合に遭遇しなかつたが、結核菌及び数種の非病原性ミコバクテリウムを供試した予備実験の結果から見れば、菌の形態、染色性、発育の速さすなわち集落の大きさ及び配列等に注意すれば鑑別は困難ではない。¹¹⁾¹²⁾ すなわち結核菌の集落は上記の時間には2、3ヶ乃至数ヶの菌体から成り、稀に10ヶあまりの菌体から成るが、非病原性ミコバクテリウムではそれ以上多数の20ヶあるいはそれ以上数の菌体から成る集落を見る場合が多い。また形が長大あるいは短小な場合、あるいは集落中に青染菌体が容易に見られる場合には、非病原性ミコバクテリウムが疑われる。このような場合には5乃至7日、培養の後に今一度染色検鏡すれば判別できる。

上記の培養法は喀痰その他の病原材料からの結核菌の検出のみに留まらず、抗生物質、化学療法剤あるいは消毒剤等の結核菌に対する殺菌あるいは増殖阻止力を検するためにも利用可能である。

結 論

染色陰性の喀痰を4%苛性曹達で前処置し、1回蒸留水を加えて洗滌した沈渣に等量乃至倍量のキルヒナー培養基を混和し、その1滴を滅菌スライド硝子上に置き、上掲のごとき湿室内に納め、37°C に培養する。24、48、72時間後にそれぞれスライド硝子を乾燥、固定し、チール・ネールゼン法で染色し、100視野内外を検鏡すれば、少数例は24時間後に、大多数例は48乃至72時間後に菌検出陽性である。その検出率は卵培養基に培養する方法のそれに劣らない。

文 献

- 1) Foley, G. E., Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.,

- 1946, 62: 298.
- 2) // J. Lab. & Clin. Med., 1947, 32: 842.
- 3) Goldie, H., Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 1947, 65: 210.
- 4) Dubos, R. J. and Middlebrook, G., Am. Rev. Tbc., 1947, 56: 334.
- 5) Johnston, L. M., Am. Rev. Tbc., 1940, 41: 120.
- 6) 瀬崎徹五郎：結核21巻，6号，93頁，（昭和18年）
- 7) 増田知貞：日本医学及び健康保険，3298号，13頁，（昭和17年）。
- 8) Berry, J.W. & Lowry, H. Am. Rev. Tbc. 1949, 60: 151.
- 9) Price, D. M., J. Path. & Bact., 1941, 53: 327.
- 10) 上坂一友田：結核研究1巻，3号，244頁（昭和18年）。
- 11) Middlebrook, G., Dubos, R.J. and Pierce, C., J. Exp. Med., 1947, 76: 175.
- 12) Dubos, R. J., Bact. Rev., 1948, 12: 173.

ジヒドロ
ストレプトマイシン 協和
ペニシリン 協和

協和醗酵工業株式会社