

牛型結核菌の分離培養に関する研究

とくに「キルヒナー寒天」と「テルル酸加里培地」について

国立公衆衛生院衛生微生物学部

(部長：染谷 四郎)

林 治

(昭和 27 年 1 月 22 日受付)

I 緒 言

およそ結核菌の分離用培地に関する研究は誠に多く、とくに固形培地の種類は殆んど枚挙に遑がないほどで最近まではその取捨選択に迷わざるを得ない有様であつた。しかるに人型結核菌(以後人型菌と略)¹⁾に関する限り培養基の改良と相俟つて、岡、小川、林²⁾²³⁾等により培地 pH と前処理液の種類及びこれが濃度との間に密接なる関係のあることが明らかにされ、以来固形培地による人型菌の分離培養法は比較的容易に実施できる条件が明らかにされた。これに反し牛型結核菌(以後牛型菌と略)の分離培養が人型菌に較べるとはるかに困難であることは従来の諸先人による報告例から見ても明らかで、例えば広木⁴⁾は牛結核材料より Petraghani 培地により 32 株の牛型菌を分離したが集落の出現は早くて 5 週、大部分は 6 週以後でしかも集落は菲薄微細であると述べている。山崎⁵⁾は同様に諸種皮膚結核症患者より 5 株の牛型菌を分離したが集落の発現は 4 週が 1 例で他はすべて 6 週以後であつた。

又占部・橋本⁶⁾も外科的結核症患者より同様にして 3 株の牛型菌を分離したが集落の発現はいずれも 6 週以後であつた。さらに最近柴田等⁷⁾は岡・片倉培地を用い、ツベルクリン反応陽性牛 37 頭より 28 株を分離したが大部分において集落の発現は 4 週以後である。

以上の如く、わが国における報告例を見ると牛型菌分離用培地として賞用されるのは Petraghani, 岡・片倉培地等で、これ等優れた培地を用いた際においても早くて 3~4 週、大部分は 5~6 週以後、中には月余に及んで始めて集落の発生が認められている。さらに各著者が述べる如く、初期発生の集落は微細湿潤で色調も培地のそれと類似の傾向にあるためその観察は容易でない。加うるにこれ等鶏卵培地に分離した菌株を継代培養すると菌株によつては発育不良のため所謂種切れをするものもあながち稀ではなく、これ等の点についてはひとたび本菌の分離培養を経験したものの等しく認めるところであろう。しかれば牛型菌は人型菌の如く固形培地上において早期に分離培養を行うことが全く困難なのであろうか。この原因については勿論菌型の相違という根本的の質的差が当然考えられるのであるが、さらに重要視しなければな

らないことは培地の適正化ではなからうか。もとより培地の優劣を左右する条件としてはまず栄養素及び発育促進物質が考えられるが、組成の大体類似している鶏卵培地にあつては前述の如き培地 pH と前処理液の種類との関係を充分考慮に入れて検討する必要がある。この点について著者はかねてより鶏卵を賦形剤とした種々組成の培地について牛型菌の分離実験を行つたのであるが、その結果良好と思われる成績を示したものでも従来の Petraghani, 岡・片倉, 小川培地と比較すると、とくに進歩したと思われる成績を得ることはできなかった。

たまたま著者は *Vole Bacillus* に関する研究中、培養性状に関する限り牛型菌と類似の性状を示して各種鶏卵培地上に発育不良の本菌が「所謂キルヒナー寒天」上において極めて良好なる発育を示すことから、分離後新鮮でいまだ鶏卵培地上に発育不良の牛型菌を培養したところ予期以上に良好なる発育が見られた。ここにおいて若干の予備実験を経てから牛結核材料よりの分離培養実験を行つた。

つぎに著者⁸⁾は、各種抗酸性菌の発育に対するテルル酸加里の影響状態により人型菌と非病原性抗酸性菌及びとくに人型菌と牛型菌の鑑別が *in vitro* により可能であることをさきに報告した。従来これが鑑別については *in vivo* による方法、すなわち家兎接種法が唯一の拠りどころとされており *in vitro* により鑑別が可能であるとすれば極めて有意義なことであると思う。この点著者のテルル酸加里培地(以後テルル培地と略)が分離培養にも応用できるか、また同時に菌型鑑別が可能であるか、さらにグリセリン嗜好性との関係はどうかであるかについて実験を行つた。

(本論文中、テルル培地に関してはすでに第 26 回結核病学会及び第 30 回日本獣医学会において報告した。)

II 実験方法

1) 培地の製法

A キルヒナー寒天培地

キルヒナー液体培地に Paper-agar を 1.5~1.7% (普通の寒天なら約 3%) に加え高压滅菌を行う。用に臨み溶解してから Malachite-green を 100 万倍の割に加え重蒸煎上にて 55~60°C に保温してから健康牛(馬)

血清を 10% に加えて試験管に分注、凝固させる（この場合グリセリンを加えたものと加えないものを作る）。なお対照培地としては小川氏の 1% 第 1 磷酸加里培地を用いた（Petraghani 及び岡・片倉培地についても比較実験したが小川培地より幾分劣る結果が得られたので省略する）。

B テルル酸加里培地

小川氏第 1 磷酸加里培地にテルル酸加里を 0.025% の割に加えよく混和したものを試験管に分注、加熱凝固滅菌する。

2) 供試材料

牛結核材料はいずれも生前の臨牀的観察及びツベルクリン反応により結核症と診断され屠殺されたものの内臓または淋巴腺 15 例と、病的材料を直接家兎に接種して全身結核で斃れたものの内臓 4 例（No. 1, 2 及び大宮 No. 1, 2）並びに結核牛より分離後鶏卵培地に 2 代継いだ牛型菌株を家兎に接種して全身結核で斃れた内臓 1 例（No 13）、計 20 例である。また人型菌対照として肺結核患者喀痰 10 例を用いた。

3) 培養方法

キルヒナー寒天に対しては、牛材料の適当大を滅菌磁製乳鉢でよく研磨、これに 4% 苛性曹達を 2cc 徐々に加えて均等乳剤として室温に 30 分放置してから滅菌蒸留水 6cc を加えて乳剤のアルカリ度を大体 1% としてその 0.1cc 宛を各培地 3~5 本宛に流注、斜面位として孵卵器に納め培地面が完全に乾燥するのをまつて綿栓をゴム帽と代えた。観察はキルヒナー寒天では培養 12 日後（喀痰の場合は 10 日）、テルル培地にあつては 3 週後からで集落発生の有無とその数を比較観察した。

なお予備実験として、キルヒナー寒天培養時における 4% 苛性曹達及び 5% 硫酸による材料の前処理法を比較し、さらに雑菌発生阻止剤として Malachite-green 及び Congo-red の添加適量を検討した。

テルル培地に対する培養法はキルヒナー寒天の場合と全く同様である。ただ純培養菌についてはメノール乳鉢にて型の如く均等なる蒸留水浮游液を作りその 10⁻⁴ の 0.1cc を流注培養した（この場合培養菌量が極端に多いと人型菌でも時にテルル培地に発育するものがある）成績の判定は対照小川培地とテルル培地に発生した集落数を計算、発育阻止の程度を比較観察した。

III 実験成績

1) 予備実験成績

A 前処理法について

患者喀痰 2 例について 4% 苛性曹達と 5% 硫酸で処理したものの培養成績を比較すると、硫酸法では極めて発育が悪いが、苛性曹達法では対照小川培地に比較して毫も遜色のない成績で、むしろ集落初発日及びその数において幾分優れている。

B 雑菌発生阻止剤について

供試材料は患者喀痰 5 例で、分離成績を見ると対照小川培地と色素を添加せぬキルヒナー寒天の培養 4 週後における平均集落数を比較すると両培地の間に差が見られない。しかるに培養初期、とくに 12 日後の成績では集落数において両培地の間に相当の開きがあり早期検出の意味からはキルヒナー寒天が勝つてゐることは明らかである。ただし雑菌の発生は供試培地総数中、小川培地が 0% であるのに対しキルヒナー寒天では実に 36% に雑菌の発生が見られており、このままでは到底分離培地として不適當である。一方色素を添加した培地の成績を見ると Malachite-green の 10⁻⁴~5×10⁻⁵ 加では結核菌の発育が全く阻止され、10⁻⁵ では色素非添加キルヒナー寒天の発生集落数に対し約 60%、5×10⁻⁶ では約 73% に発育、10⁻⁶ では発育に殆んど影響がなく、かつ雑菌の発生を阻止する。つぎに Congo-red では本実験に用いた程度の濃度すなわち、9×10⁻⁴~10⁻⁴ では菌の発育にとくに著しい影響を与えぬようであるが雑菌発生の阻止力が弱く実用上不適當であると認めた。以上の予備実験成績から見て以後の本実験には前処理法として 4% 苛性曹達法を用い、また培地には Malachite-green を 100 万倍の割に加えることとした。

2) テルル培地における分離培養成績

牛結核材料 6 例、キルヒナー寒天により牛材料から分離した菌株のうち 6 例及び患者喀痰 5 例の培養成績を示すと第 1 表の如くである。すなわち牛材料及びこれが由

第 1 表 テルル培地における培養成績

供試材料	培地 培養週数	小川培地				テルル培地			
		4週	5週	6週	7週	4週	5週	6週	7週
結核牛材料	大宮 1	—	122	141	158	22	122	144	140
	2	—	9	11	13	3	12	14	14
	小森田 12	約 600	—	—	—	約 600	—	—	—
	經堂 2	—	74	91	93	—	75	88	89
	初雪	2	30	49	54	6	62	67	71
小森田 7	4	103	117	118	—	178	102	104	
結核牛よりの分離菌	No. 1	220	222	223	224	190	195	195	195
	2	119	121	121	122	104	108	108	108
	3	約 500	—	—	—	約 500	—	—	—
	4	約 400	—	—	—	約 400	—	—	—
患者喀痰	5	39	41	41	41	40	42	42	42
	8	76	82	86	87	57	73	77	77
	No. 1	69	70	70	70	—	—	—	—
	2	約 400	—	—	—	—	—	—	—

註) 1) 数字は培地 4~5 本の平均集落数

来菌においては対照小川培地に集落が発生すると同時、または相前後してテルル培地にも灰黒色の集落が見られその数も両培地の間に差がない。一方人型菌に由来する

第2表 人型結核菌の発育に対するテルル酸加里の発育阻止作用の培地種類による差

培地	株数	培地										Loewenstein培地		
		0	0001	00025	0005	0.01	0025	0.05	0	0025	0.05	0	0025	0.05
人型菌	H37	46	44	46	41	21	-	-	45	-	-	40	-	-
馬場	79	79	77	64	37	-	-	72	-	-	68	-	-	
牛型菌	No. 1	約400	-	270	221	207	-	-	約350	-	-	約400	-	-
牛型菌	2	244	252	238	177	158	-	-	151	-	-	202	-	-
牛型菌	263株	326	319	331	318	324	319	207	294	303	216	301	297	201

註 1) 数字は培地5本の平均集落数 2) 人型菌400培養は培養8週、牛型菌rは5週後の観察成績

と思われる患者喀痰にあつては、対照小川培地に2~3週で集落が発生、4~5週でその数は最高に達するが、テルル培地にあつては培養8週後まで観察しても集落の発生は全然見られなかつた。

このようにテルル酸加里が人型菌の発育を阻止する濃度を知るために患者喀痰と保存菌株について予め実験を行い第2表の如き結果を得た。また本テルル培地が基礎培地の種類によつて成績に差が生じるか否かを検討した結果、小川、岡・片倉、Loewenstein培地では差がないようである。

3) キルヒナー-寒天による牛結核材料及び結核患者喀

痰よりの分離培養成績
A 牛結核材料及よりの分離成績を示すと第3表に示す如く、供試材料18例中、培養8週後の観察で培養陽性のもがキルヒナー-寒天では13例(72.2%)、小川培地では9例(50%)である。集落初発の時期を見るとキルヒナー-寒天ですすでに培養12日後に陽性のもが6例もあつてその平均所要日数は

わずか15.2日である。一方小川培地では大部分が4週以後でその平均日数は33.4日である。また同一材料の兩種培地上における発生集落数を比較すると大体同数のものもあるが多くの場合は2~10倍程度にキルヒナー-寒天の方が小川培地より多い。

雑菌の混入率は兩種培地の間に差が見られない。
B 患者喀痰5例についての分離成績は第4表に示す如く、培養5週後における発生集落数の比較では兩種培地の間に差が見られない。

しかるに培養初期、とくに10~14日頃の成績ではキルヒナー-寒天の方が小川培地より集落数が著明に多く、またその大きさも大であるため観察が容易であつた。本成績は牛材料にあつてはグリセリンを除いたもの。患者喀痰にあつてはグリセリンを加えた培地についての成績である。

IV 総括と考察

およそ人畜を問わず結核症の診断に菌の検出が決定的役割を有するものであるということには何人も異論のないことであろう。この見地から畜牛結核の細菌学的診断、ことに分離培養法については多くの研究者により検討されたがその成績を人型菌分離の場合と比較すると格段の相違が見られ、牛型菌の分離培養が容易でないことは今日なお常識とされているようである。戦後乳製品の需要が益々増加の途にあるわが国においても、畜牛数は年々増加し、また一方結核牛の発生も相当数存することが考えられ同時に牛型菌の人体感染問題を真剣に併せ考えるとき、牛型菌分離培養の確立は公衆衛生上極めて重要なことであると思う。ここにおいて著者は、まず結核牛よりの菌の分離を目的として培養基の改良及び菌型の簡易鑑別法に関する実験を行つた。その結果分離用培地として所謂キルヒナー-寒天を若干改良することによ

第3表 結核牛材料よりの分離培養成績

材料No.	培地区分	発育日数	12日	14日	17日	3週	4週	5週	6週	7週	8週
			+	+	+	+	+	+	+	+	+
No. 1	+	+	13.7	21.1	-	21.7	21.3	21.3	21.4	21.3	21.0
	-	-	-	-	-	-	-	2.0	2.5	2.0	2.0
2	+	+	-	-	-	-	-	2.2	1.4	1.5	1.5
	-	-	5	1.0	-	1.4	1.3	1.4	1.4	1.4	1.4
3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	0.3	0.3	0.3	-	-	-	1.3	1.3
4	+	+	-	-	-	-	0.3	0.2	0.3	0.3	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	4	1.8	5.9	8.7	11.4	12.7	12.9	12.9	13.1
	-	-	-	-	-	-	-	-	8	9	11
6	+	+	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
	-	-	-	-	-	∞	∞	∞	∞	5	5
7	+	+	1	7	2.6	4.0	5.1	5.2	5.3	5.3	5.3
	-	-	-	-	-	-	7	1.3	1.2	2.1	2.1
8	+	+	-	-	-	-	4	6	9	1.0	1.0
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	1	6	1.2	1.3	1.5	1.5	1.6
10	+	+	-	-	-	-	-	-	7	9	9
	-	-	-	-	4	6	-	-	6	6	6
11	+	+	-	0.3	0.3	0.3	-	1	1	1	1
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	-	1.5	9.4	10.1	12.2	12.4	12.5	12.6	12.6
	-	-	-	-	-	-	9	7.1	7.4	7.6	7.5
13	+	+	約300	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	約300	-	-	-	-	-	-	-	-
各培地43	+	+	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	-	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5
本中の菌	+	+	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	-	-	7	7	7	7	7	7	7	7	7
発生菌数	-	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5

註 1) 数字は培地3~5本の平均集落数。 2) G+はグリセリン加G-は不加。 3) グリセリン加培地に陰性の材料は7の凡例と省略した

第4表 患者喀痰よりの分離培養成績

培養No.	観察日数 培地	観察日数					
		10日	12日	14日	17日	3週	4週
1	キルヒナー-寒天	22	30	32	31	37	
	小川培地	14	16	30	30	32	
2	キルヒナー-寒天	31	39	44	44	43	
	小川培地	19	22	37	37	39	
3	キルヒナー-寒天	—	—	5	109	156	約200
	小川培地	—	—	—	29	74	144
4	キルヒナー-寒天	28	65	69	84	82	約100
	小川培地	—	20	56	90	109	116
5	キルヒナー-寒天	33	54	61	65	68	69
	小川培地	15	40	45	59	65	71

注) 数字は培地5本の平均算数値

り従来賞用されてきた各種鶏卵培地に比較してはるかに良好なる成績を得た。すなわち供試材料 18 例中、培養陽性のものがキルヒナー-寒天では 13 例、小川培地では 9 例である。ことに特記すべきことは集落の初発時期で、すでに培養 12 日後に陽性のものが 6 例、2 週が 3 例、17 日が 2 例、3 及び 4 週が各 1 例、平均所要日数はわずかに 15.2 日である。一方小川培地にあつては、2 週後陽性のもの 1 例、3 週が 1 例、4、5 及び 6 週が各 2 例、8 週が 1 例で、平均所要日数は 33.4 日である。またともに陽性成績を示した同一材料の発生集落数を比較すると大体同数のものもあつたが多くの場合は 2~10 倍にキルヒナー-寒天の方が多い。雑菌の混入率は両培地の間に差が見られなかつた。以上の如く人型菌の場合と同程度の日数で牛型菌の分離培養ができる培地はいまだその報告がないところで、この点 Peizer⁹⁾ が寒天を賦形剤の一部として応用した Agar "A" 及び "B" が、検出率及び集落初発日において Loewenstein-Jensen または Petrag-nani 培地より優れた成績を示すことが寒天を賦形剤とした点において、著者のキルヒナー-寒天と一脈相通じるものがあり興味をひく。

ここに重要なことは従来諸先人による報告例から見てあまりにも迅速なる発育を示したキルヒナー-寒天分離菌が、はたして牛型菌であるか否かという点である。この点については、結核牛から純粋に dysgonic の性状を示して分離されたこと、また一部分離菌については家兎接種実験によりその病原性の強いことから判断して、まず牛型菌であると判定して誤りはないものと思う。この菌型の問題に関連して望まれることは簡易鑑別法で、とくに in vitro により鑑別が可能であるとするならば極めて好都合なことである。この点について著者が報告したテルル培地法が分離培養と同時に菌型の鑑別が可能であるかを少数例ではあるが牛結核材料について実験した。その結果はグリセリン嗜好性成績ともよく一致して in vitro により菌型を鑑別することがある程度可能である

ことを思わせた。なお保存菌株による実験はさきに報告したところであるが最近柴田等が本法を追試して、ほぼ著者の成績と一致した結果を報告している。今回さらにキルヒナー-寒天によつて分離した菌株について再度実験を行つたが前回と全く同様の結果を得た。とくに継代培養によつてグリセリン嗜好性が変化し、このために鑑別することの不可能となつた牛型菌株でも著者のテルル培地法によれば牛型菌としての成績が得られることを再確認した。

以上の如く、キルヒナー-寒天及びテルル培地に関する実験成績から見て、両培地の併用は牛型菌の早期検出及び in vitro による菌型鑑別の目的をある程度満足させることができるものと信ずる。

V 結 論

キルヒナー-寒天及びテルル酸加里培地を用い肺結核患者喀痰及び畜牛結核臓器より結核菌の分離培養を試みつぎの如き成績を得た。

1) キルヒナー-寒天による肺結核患者喀痰よりの人型結核菌分離成績は小川培地より早期検出の意味から幾分優れている。

2) キルヒナー-寒天による畜牛結核臓器よりの牛型結核菌分離成績は、小川、岡・片倉及び Petrag-nani 培地より、はるかに優れている。

3) テルル酸加里培地の応用は、牛型結核菌の分離培養と同時に、菌型の鑑別が可能である。

以上の成績から、牛型結核菌の分離培養にはキルヒナー-寒天及びテルル酸加里培地の併用を推奨するものである。

稿を終るに臨み、御指導と御校閲を賜つた部長、築谷四郎博士に謹んで感謝の意を表す。また実験上種々の便宜を受けた国立予防衛生研究所獣疫研究部長、田嶋嘉雄博士及び遠藤元清技官に感謝す。

引用文献

- 1) 岡捨巳外：東北医学雑誌，21，692~696，昭 12.
- 2) 小川辰次：結核，24，403~409，昭 24.
- 3) 林 久子：結核，25，5~16，昭 25.
- 4) 広木彦吉：満洲医学雑誌，23，745~757，昭 10.
- 5) 山崎順：皮膚泌尿器科雑誌，43，439~475，昭 13.
- 6) 占部薫外：結核，19，695~701，昭 16.
- 7) 柴田重孝外：昭和 26 年第 30 回日本獣医学会総会報告.
- 8) 林 治：日本細菌学雑誌，5，441~448，昭 25.
- 9) L R. Peizer：Am. J. Clin. Path.，20，682~685，1950.