

喀痰中結核菌の分離培養法に関する比較研究

国立予防衛生研究所結核部(部長 柳沢 謙)

林 久 子

(昭和 27 年 10 月 22 日受付)

I 緒 言

喀痰よりの結核菌分離培養法は、わが国だけを見てもはなはだ多様であるが、はたしていずれが優れているかを決することはなかなか難しいように思われる。菌の検出率が高い方法が発見されても、その培地の作製技術、培養手技等の条件が複雑であつたり、それに要する費用があまりかさんでは、やはり実際に用いるのには適さない場合もある。

著者は最近わが国で培養成績が優れ、しかも培地の作製が簡便で、難しい技術を要せずに短時間に培養出来るので推賞されている小川法¹⁾と、米国で現今広く一般に用いられている Löwenstein-Jensen 法²⁾(以下 L-J 法と略す)及び Petragrani. McNabb 変法³⁾(以下 Pet 法と略す)について比較実験を行つたのでその成績を報告する。

II 実験方法

1) 培地製法

A 小川培地

第一磷酸加里	3.0gm
蒸 餾 水	100.0ml

上記原液を混和、100°C、1時間滅菌し、原液 100ml に対し、全卵液 200ml を加え、さらに 2% マラカイト緑 6ml、グリセリン 6ml を加え、試験管に分注して 90°C、1時間1回凝固滅菌す。

B Löwenstein-Jensen 培地

第一磷酸加里	2.4 gm
硫酸マグネシウム	0.24gm
クエン酸マグネシウム	0.6 gm
アスパラギン	3.6 gm
グリセリン	12.0 ml
蒸餾水	600.0 ml

以上原液を材料が溶けるまで加熱し、56°C の重湯煎中に2時間置いてから馬鈴薯澱粉 30gm を加え、煮沸水中で内容が透明になるまで強く振盪しながら熱する。さらに 15 分間熱してから 56°C の重湯煎中に1時間置き、これに全卵液 1000.0ml を混和、さらに 2% マラカイト緑 20.0ml を加えてから室温に1時間置いて後分注、凝固滅菌する。原液では第1日 85°C 40分、第2、3日 80°C 40分加温することになっているが、後述する

ように雑菌の混入する場合があるので、著者は第1日 90°C、1時間、第2日 85°C、30分で凝固滅菌を行つた。

C Petragrani 培地

牛 乳	900.0ml
馬鈴薯澱粉	36.0gm
ペプトン	6.0gm
馬 鈴 薯	鶏卵大のもの 6 個を細片にする

以上を2時間振盪しながら加温する。

これに全卵 24 個、卵黄 6 個、グリセリン 72.0ml、2% マラカイト緑 60.0ml の混和液を加え、両者をよく混ぜてから分注、凝固滅菌する。凝固条件は、原法では20分間の高圧滅菌を行うことになっているが、これでは培地面皸裂状態になるので L-J 培地の場合と同様にした。

2) 供試喀痰

Gaffky O~V号の結核患者喀痰を滅菌乳鉢に採り、凍結した後研磨し、健康者の喀痰及び蒸餾水で適当に稀釈してから、さらに凍結、研磨を数回くり返し行い、得た比較的均等な喀痰を2~3分し、それぞれの方法で培養を行つた。

3) 培養方法

A 小川法

喀痰に等量の 8% NaOH 水を加え、ピペットでよく攪拌混和してから直ちに3本の小川培地斜面に 0.1cc 宛流注、数日間斜面位に保つて 37°C に培養、培地面が乾燥するのを待つて綿栓をゴム帽にかえ、培養を続けた。

B Löwenstein-Jensen 法

喀痰に等量の 0.004% Phenol red 加 4% NaOH 水を加え、15分間振盪してから 3,000 回転 15分遠心沈澱を行う。沈澱に 2N. HCl を加えて中和し、3白金耳宛を3本の L-J 培地に塗抹、又は 0.1cc 宛を流注、培地面の乾燥するのを待つて綿栓をゴム帽にかえた。

C Petragrani 法(Mc Nabb 変法)

喀痰に等量の Bromeresol 加 3% HCl を加え、強く振盪した後、2時間室温に放置、3% NaOH 水で中和、30分高速度遠心を行つてから沈澱を 3 白金耳宛 3

本の Pet 培地に塗抹, これを他の場合と同様にして 37°C に培養した。

D B.C.G.の定量培養

馬鈴薯培地に培養した B.C.G.及び B.C.G.乾燥ワクチンのそれぞれ 10⁻³, 10⁻⁴mg の蒸餾水浮游液 0.1cc 宛を小川培地 (1%及び 3% 第一磷酸加里培地), L-J 培地並びに Pet 培地の各 3 本宛に流注, 37°C に培養した。

4) 観察方法

培養後 12 日, 以後 6 週まで毎週発生集落数, 集落の大きさ及び雑菌の発生等について観察, でき得る限り集落数を数えて培地 3 本の平均を記した。培養初期における不明瞭な集落は ± とし, 集落が密生して融合したものは ∞ として記載した。

III 実験成績

1) 小川法と Petraghani 法との比較

12 例の喀痰について得た成績は第 1 表に示すように集落の発生する時期, 及び各週における集落数も小川法が優れている。雑菌の混入は両法ともに見られなかつた。集落の大きさは全例において小川法によるのが発育がよい。

第 1 表 小川法及び Petraghani 法の比較

喀痰番号	培地	培 養 日 数				
		12日	2 週	3 週	5 週	6 週
1	小川	23	51	120	139	160
	Pet.	2	5	10	12	15
2	小川	0	12	246	248~∞	∞
	Pet.	0	7	29	34	40
3	小川	0	7	41	51	73
	Pet.	0	0~±	2	5	31
4	小川	0	0	0~±	110~∞	211~∞
	Pet.	0	0	0	±~24	33
5	小川	0	190	249~∞	270~∞	282~∞
	Pet.	0	29	99	122	131
6	小川	74	200	∞	∞	∞
	Pet.	24	55	99	128	139
7	小川	0	2	5	13	63
	Pet.	0	0	0	2	11
8	小川	0	71	219	149~∞	∞
	Pet.	0	14	26	48	182
9	小川	5	20	90	101	105
	Pet.	0	0	2	9	13
10	小川	0	0	3	21	23
	Pet.	0	0	0.3	19	19
11	小川	0	0	1	10	11
	Pet.	0	0	0	9	10
12	小川	0	0	59	71	79
	Pet.	0	0	19	30	31

註: 数字は培地 3 本の平均集落数

2) 小川法, Löwenstein-Jensen 法 (白金耳で培養した場合) 及び Petraghani 法の比較

第 2 表に示すように L-J 法と小川法とは殆んど成績に差が認められなかつたが, Pet 法は前 2 者に比較する

第 2 表 小川法, Löwenstein-Jensen 法 (白金耳で培養) 及び Petraghani 法の比較

喀痰番号	培地	培 養 日 数					
		12日	2 週	3 週	4 週	5 週	6 週
1	小川		79	98	113	118	118
	Löw.		94	116	120	121	124
	Pet.		9	20	60	96	110
2	小川		∞	∞	∞	∞	∞
	Löw.		243	255	∞	∞	∞
	Pet.		167	226	270~∞	315~∞	320~∞
3	小川		157	201	209	288	296
	Löw.		229	245	288	312	321
	Pet.		18	41	99	124	130
4	小川		118	150	157	177	183
	Löw.		115	143	150	152	157
	Pet.		18	55	77	113	122
5	小川	0	0	138	184	188	192
	Löw.	0	0	236	255	276	289
	Pet.	0	0	42	110	134	177
6	小川	2	160	234	∞	∞	∞
	Löw.	0	161	283~∞	∞	∞	∞
	Pet.	0	±~13	164	242~∞	∞	∞
7	小川	29	192	298~∞	∞	∞	∞
	Löw.	21	162	∞	∞	∞	∞
	Pet.	0	76	239	330	∞	∞
8	小川	2	37	159	177	188	192
	Löw.	0.3	40	217	234	245	248
	Pet.	0	2	125	160	211	217
9	小川	0	131	145	146	147	148
	Löw.	0	554	∞	∞	∞	∞
	Pet.	0	55	74	78	79	80
10	小川	0	2	2	2	3	5
	Löw.	0	19	24	31	33	33
	Pet.	0	0.3	0.3	1	1	2

第 3 表 小川法, Löwenstein (白金耳で培養した場合) 及び 0.1cc を流注した場合) 法の比較

喀痰番号	培 地	培 養 日 数					
		12日	2 週	3 週	4 週	5 週	6 週
1	小 川	0	0	0	0	0	0
	Löw.(0.1cc)	0	0	1	3	4	5
	Löw.(白金耳)	0	0	0.3	0.3	1	1
2	小 川	0	0	0	0	0	0
	Löw.(0.1cc)	0	0	0	1	1	1
	Löw.(白金耳)	0	0	0	1	1	1
3	小 川	0	0	2	3	3	3
	Löw.(0.1cc)	0	0	6	11	15	19
	Löw.(白金耳)	0	0	0.3	0.3	0.3	1
4	小 川	0	0	1	1	1	1
	Löw.(0.1cc)	0	0	1	3	3	3
	Löw.(白金耳)	0	0	0	0	1	1
5	小 川	0	0	0.3	0.3	0.3	0.3
	Löw.(0.1cc)	0	0	6	9	10	10
	Löw.(白金耳)	0	0	1	2	2	2
6	小 川	0	0	0	0.3	0.3	0.3
	Löw.(0.1cc)	0	0	0	4	4	4
	Löw.(白金耳)	0	0	1	1	1	1
7	小 川	0	0	27	35	39	46
	Löw.(0.1cc)	0	0	208	209	218	225
	Löw.(白金耳)	0	0	44	48	48	49

と相当劣り、第6週後のたとえ集落数が多い例でも培養初期における集落の発生は非常に遅れている。なお雑菌の発生はいずれにも見られなかつた。

3) 小川法と Löwenstein 法(白金耳で培養した場合及び 0.1cc を流注した場合)の比較

第3表に示すように、すべての例で L-J 法、とくに 0.1cc を流注した成績が集落の発生時期及びその数から見て優れている。雑菌の発生はどの方法にも見られなかつた。

4) 小川法, Löwenstein-Jensen 法 (0.1cc 流注) 及び Petraghani 法の比較

28 例についての成績は第4表に示すように菌数の比較の多い場合の成績を見ると L-J 法が他の2法に比較してかなり優れているが、第22例以下の如く、菌数の非常に少ない材料を用いた場合の成績では小川法と L-J 法との間に差を認めることはできなかつた。Pet 法は殆んど全例において他の培養法より劣つた成績であつた。略痰 28 例中小川法で集落発生を認め、Pet 法で認めないもの7例、この逆のものが1例であつた。小川法で集落発生を認め、L-J 法で認めなかつたもの2例、この逆のものが同様2例あつた。又 L-J 法で集落発生を認め、Pet 法で認めなかつたものが6例でこの逆のものは1例もなかつた。この場合にも雑菌の発生はいずれの法にも見られなかつた。

第4表 小川法 Löwenstein-Jensen 法(0.1cc流注) 及び Petraghani 法の比較

略痰番号	培地	培養日数					
		12日	2週	3週	4週	5週	6週
1	小川	0	113	118	127	139	140
	Löw.	0	475	∞	∞	∞	∞
	Pet.	0	55	69	71	72	74
2	小川	0	39	48	48	52	53
	Löw.	1	178	187	191	210~∞	∞
	Pet.	0	12	24	24	26	26
3	小川	0	2	2	3	3	3
	Löw.	0	2	2	3	3	3
	Pet.	0	0	2	2	2	2
4	小川	0	1	1	1	1	1
	Löw.	0	6	12	13	14	15
	Pet.	0	0	0.3	0.3	0.3	0.3
5	小川	0	5	37	56	99	103
	Löw.	0	2	46	49	73	79
	Pet.	0	0	9	47	72	76
6	小川	∞	∞	∞	∞	∞	∞
	Löw.	∞	∞	∞	∞	∞	∞
	Pet.	0	0	262	300~∞	∞	∞
7	小川	0	131	145	146	148	148
	Löw.	0	124	145	147	155	∞
	Pet.	0	55	74	78	79	80
8	小川	0	2	2	2	3	5
	Löw.	0	19	24	31	33	33
	Pet.	0	0.3	0.3	1	1	2
9	小川	0	0	10	12	12	13
	Löw.	0	0	122	127	127	137
	Pet.	0	0	4	13	17	20

10	小川	0	0	3	4	4	4
	Löw.	0	0	1	1	1	1
	Pet.	0	0	0.3	0.3	0.3	1
11	小川	0	0	2	3	4	4
	Löw.	0	±0	1	3	4	4
	Pet.	0	0	1	2	3	3
12	小川	0	0	14	15	15	15
	Löw.	0	±0	36	42	43	43
	Pet.	0	0	2	7	9	10
13	小川	0	±0	9	11	14	14
	Löw.	0	±	6	7	7	7
	Pet.	0	0	2	5	7	8
14	小川	32	89	186	215	217	122~∞
	Löw.	±~20	±~35	149	149	158	172
	Pet.	±~0	±~0	145	157	206	213
15	小川	±~0	0	72	78	83	87
	Löw.	83	204	∞	∞	∞	∞
	Pet.	0	0	74	99	100	100
16	小川	0	0	18	22	22	22
	Löw.	0	0	39	73	80	81
	Pet.	0	0	0	6	7	7
17	小川	0	0	0.3	0.3	1	1
	Löw.	0	0	1	1	1	1
	Pet.	0	0	0	0	0	0
18	小川	0	0	0	1	1	1
	Löw.	0	±~0	2	2	3	3
	Pet.	0	0	0	0.3	1	1
19	小川	0	0	2	3	3	3
	Löw.	0	0	1	3	3	3
	Pet.	0	0	0	0.3	0.3	0.3
20	小川	0	0	2	3	4	4
	Löw.	0	0	2	4	4	5
	Pet.	0	0	0	0	0	0
21	小川	0	31	97	112	119	123
	Löw.	0	±~19	101	119	133	141
	Pet.	0	0	11	21	26	26
22	小川	0	0	0	0.3	0.3	0.3
	Löw.	0	0	0	1	1	1
	Pet.	0	0	0	0	0	0
23	小川	0	0	0	0	0	0
	Löw.	0	0	0	1	1	1
	Pet.	0	0	0	0	0.3	0.3
24	小川	0	0	0	0	0	0
	Löw.	0	0	0	0.5	0.5	0.5
	Pet.	0	0	0	0	0	0
25	小川	0	0	0	1	1	1
	Löw.	0	0	0	0	0	0
	Pet.	0	0	0	0	0	0
26	小川	0	0	0.3	0.3	0.3	0.3
	Löw.	0	0	0	0	0	0
	Pet.	0	0	0	0	0	0
27	小川	0	0	0	0.3	0.3	0.3
	Löw.	0	0	0	0.3	0.3	0.3
	Pet.	0	0	0	0	0	0
28	小川	0	0	0.3	1	1	1
	Löw.	0	0	0.3	0.3	0.3	0.3
	Pet.	0	0	0	0	0	0

5) B.C.Gの定量培養

第1回目に行つた実験では第5表そのIに示すようにいずれの稀釈の場合にも L-J 培地に培養した成績が最も集落数が多く、又個々の集落の発育は Pet 培地が他の培地に比較して悪かつた。第II, IIIの実験では、1% 第一磷酸加里培地を加えて比較を行つたのであるが、わずかながら L-J 培地より第一磷酸加里培地の方が集落

数が多く、 10^{-4} mg 稀釈では他の培地よりもそれぞれ1週間早く集落の発生が見られた。3%第一磷酸加里培地では、やはり L-J 培地における成績よりも劣っている。

雑菌の発生はこの場合にも見られなかつた。

第5表 BCG定量培養成績

培養材料	培養量	培地	培養日数				
			12日	2週	3週	4週	
I 培養菌浮游液	10^{-4}	小川(3%)	0	30	65	65	
		Löw.	0	19	112	119	
		Pet.	0	1	14	17	
	10^{-5}	小川(3%)	0	0	12	12	
		Löw.	0	0	25	25	
		Pet.	0	0	10	10	
II 乾燥ワクチン	10^{-4}	小川(1%)	0	53	118	171	
		小川(3%)	0	0	97	151	
		Löw.	0	0	135	141	
		Pet.	0	0	21	58	
	10^{-5}	小川(1%)	0	0	57	66	
		小川(3%)	0	0	32	50	
		Löw.	0	0	60	71	
		Pet.	0	0	4	16	
	III 乾燥ワクチン	10^{-4}	小川(1%)	0	27	220~∞	∞
			小川(3%)	0	0	192	227
			Löw.	0	0	220~∞	∞
			Pet.	0	0	54	101
10^{-5}		小川(1%)	0	0	73	74	
		小川(3%)	0	0	22	39	
		Löw.	0	0	45	67	
		Pet.	0	0	10	18	

註：小川(1%)とは、1% KH_2PO_4 培地のこと

IV 総括並びに考按

喀痰よりの結核菌分離培養法について、小川法、L-J法、Pet法の3培養法を比較すると、L-J法で沈渣を0.1cc宛流注して培養した成績が、発生集落数、及び集落発生の速さにおいて他の方法よりも優れているようであつたが、非常に菌数の少ない材料の場合を見ると、小川法との間にあまり差が見られなかつた。

Pet法は他に比較して集落数も少なく、集落発生の時期も遅れる。又個々の集落の大きさを比較しても発育が劣っていた。Melvin²⁾もこのPet法がL-J法よりも劣ることを報告している。

BCGの定量培養成績では、1%及び3%第一磷酸加里培地、L-J培地、及びPet培地について比較したが、1%第一磷酸加里培地最も集落数が多く、集落発

生の時期も速いことが認められた。L-J培地はこれよりも幾分劣り、ついで3%第一磷酸加里培地、Pet培地の順序の成績を示した。

雑菌の発生は、著者が行つた実験例数では、どの培地にも混入を認めなかつたのであるが、初めてL-J培地を作製した当時、滅菌方法を原法通り、及び小川培地と同様に90°C、1時間1回にしたところ、全例に雑菌が発生することがあつたので、第1日90°C、1時間、第2日85°C、30分の条件で行うことにより雑菌発生を防ぐことができた。Pet培地の場合も原法では高压滅菌をするのであるが、実際に試みて見ると培地に皸裂が生じ、全く使用に耐えないため、当初小川培地と同様にして滅菌したのであるが、前記L-J培地の場合と同様に全例に雑菌の発生を見たので、滅菌条件を前記L-J培地と同様に2日間の間歇滅菌を行つた結果、雑菌の発生を防ぐことができた。

このことは両培地ともに馬鈴薯澱粉が入っているため、その中に存在する強力な細菌芽胞が、その汚染程度にもよるであろうが、90°C 1時間1回だけの滅菌では死滅しない場合があるものと思う。又L-J、Pet両培地の作製に当つて日本薬局法の馬鈴薯澱粉を用いると粘稠度が強いために加温しながら振盪しても固まつてしまい困難であつた。しかるにDifco製の可溶性澱粉を用いるとこのようなことがなく、容易に溶解混和することができた。

V 結 論

1) 喀痰中よりの結核菌分離培養法として、小川法、Löwenstein-Jensen法、並びにPetragnani (Mc Nabb変法)を比較すると、Löwenstein-Jensen法が小川法より幾分優れているようである。Petragnani法は前2法よりも相当劣つている。

2) BCGの定量培養では小川の1%第一磷酸加里培地が優れている。

稿を終るに臨み、柳沢部長の御指導と御校閲を深謝いたします。

引用文献

- 1) 小川辰次：日本臨床結核., 10, 460~464, 1951.
- 2) J. Melvin, G.C. Klein and W. Zoches : Am. Rev. Tuberc., 63, 459~469, 1951.
- 3) Diagnostic Procedures and Reagents., 42, 1945.