

## 結核菌の分離培養の培地改良に関する研究

## (第1報) 菌浮游液の培養

横浜医科大学衛生学教室 (主任 萩原兼文教授) (指導 穴戸昌夫助教授)

杉 田 暉 道

(受付 昭和 30 年 12 月 26 日)

## 緒 言

結核菌の培養による証明は、結核症の診断および予後判定等に際して、非常に重要な役目を持つていることは今更改めていうまでもなく、また公衆衛生学的に見てもこれを早期に検出することは極めて重要である。加うるに近來諸種の抗結核剤が出現するにおよんで、ますますその重要性を加うるに至つた。翻つて今日迄の諸先人のこの方面の研究をひもといて見るに、実に多くのまた並ならぬ努力の研究成果が報告されており、したがつてその培地の数もほとんど枚挙にいとまがない。古くから結核菌の培養に用いられている簡単な培地としては、5%グリセリン寒天、5%グリセリン馬鈴薯及び卵黄を基礎とした培地があるが、現在結核菌の分離培養の固形培地としては鶏卵を基礎としたものが最も良いとされ、我が国では岡・片倉の培地<sup>1)</sup>、これを改良した3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  培地<sup>2)</sup>、または卵黄を節約した占部山田・H 培地<sup>3)</sup>等が広く用いられ、諸外国では Petroff 培地<sup>4)</sup>、Hohn の培地<sup>5)</sup>、Petragani の培地<sup>6)</sup>、Löwenstein の培地<sup>7)</sup> Herrold の培地<sup>8)</sup>等が賞用されている。このように鶏卵を主成分とする他に寒天を賦形剤とする固形培地がある。最も古いのは Bordet-Gengou 培地で本来は百日咳菌の培養に用いられたが、これが結核菌の培地として優秀なことを最初に発表したのは Lucky Mishulow<sup>9)</sup>である。すなわち本培地は Herrold の卵黄寒天培地よりも発育が良く、人型菌では 12~15 日、牛型菌では 2~3 週位で発育すると称している。さらに氏は Corper の蔭酸法により Bordet-Gengou 培地と Löwenstein 培地に培養すると同時に動物接種も行い、3 者の検出率の優劣を比較している。成績は塗液標本陰性の材料 133 例中、Bordet-Gengou 培地で陽性のもの 15 例 (11.3%) Löwenstein 培地で陽性のもの 9 例 (6.8%)、またモットによる動物接種陽性のもの 13 例 (9.8%) である。わが国では和田<sup>10)</sup>が最も早く追試を行い、硫酸法で

処理した肺結核症の喀痰 28 例を Petragani, Löwenstein, Bordet-Gengou の 3 種の培地に分離培養したところ、Bordet-Gengou 培地が最も良く、Petragani, Löwenstein の培地の順に悪かつた。しかし雑菌の侵入は Bordet-Gengou 培地が最も多かつたと発表している。最近伊藤等<sup>11)</sup>は、Bordet-Gengou 培地と岡・片倉培地とを硫酸法の前処理によつて比較し、やはり前者の方が陽性率も良く集落の発育も早い、雑菌の侵入も多いことも認めている。それで氏は雑菌侵入防止の為にマラカイト緑、またはゲンチアナ紫を加えている。なお戦争中または戦後一時鶏卵が不足したので鶏卵を節約する目的で、種々の寒天培地が考案された。すなわち前述の占部山田・H 培地の他に上坂・友田の培地<sup>12)</sup>、小川等<sup>13)</sup>の培地等があるが従来鶏卵培地以上のものではないようである。以上述べて来た如く Bordet-Gengou 培地は、現在最も広く使用されている鶏卵培地と比較して極めて優秀なことが認められているが、雑菌の侵入の多いことが大きな欠点とされている。

最近 Tarshis 等<sup>14)</sup>、<sup>15)</sup>は血液銀行の血液とグリセリンを蒸留水中に加えてこれを寒天で固め、さらに汚染防止の為に Penicillin を加えた極めて簡単な培地を発表し、従来鶏卵培地と比較して初発集落発生迄の期間が短かく、また集落も見易く、かつ雑菌侵入率も極めて低いと述べている。わが国ではこれを宇野<sup>16)</sup>が追試改良し、グリセリンを除き  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  および味の素を少量加えた培地を作り、これを第 3 磷酸ソーダ処理法によつて 1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  培地と比較して、その成績は後者に匹敵しており、培地の製法も簡単で集落の発見も容易であるから結核菌の分離培養に適しているという。

筆者は馬鈴薯および血液銀行の血液を主成分とする培地を作り、推計学的実験計画法<sup>17)</sup>によつてまず結核菌浮游液を用いてその組成について種々なる検討を加えて改善し、さらにこれを現在最も広く行われている NaOH 水による前処理法に適応するように改良し、現在最も良

いとされている 3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地に優る培地を得たので、その第1報として菌浮游液の培養について述べる。

実験方法

1. 培地の製法

よく水洗した馬鈴薯(皮をむかなくてもよい)の細挫したもの 50g, グリセリン 8ml, 水道水 100ml を加えてアウトクラーフで 30 分間滅菌後フランネルで濾過しこれをグリセリン馬鈴薯抽出液とする。この液 50ml に 0.6% の食塩水 130ml, 粉末寒天(純正化学株式会社製) 6g を加えてアウトクラーフで 30 分間滅菌し, 滅菌中試験管に 5ml 宛分注しさらに同様に滅菌しておき使用時にこれを 50°C に溶解して血液を 1/3 量加えた(以下これを PBG 培地と略称する。これは筆者の作製する培地が馬鈴薯, 血液, グリセリンを主成分とするのでそれぞれの頭文字をとつたものである。)血液は血液銀行の採血後1カ月前後のものを使用した。この血液には抗凝固液が20%入っている(抗凝固液の組成は, クエン酸ナトリウム 0.66g, クエン酸 0.24g, ブドウ糖 0.66g を蒸留水を加えて 50ml としたものである。)

まず原法による培地において, 寒天量について検討し, 次に食塩水の必要性の有無について, さらに馬鈴薯の含有量について比較実験を行った。対照として 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地を用いた。

2. 菌液, 培養および観察方法

当教室保存の人型結核菌の 1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地に 3~4 週間培養した菌株を, 滅菌蒸留水を用いて 0.1ml 中に 10<sup>-5</sup>mg または 10<sup>-6</sup>mg の菌量を含む平等浮游液を作り, これを1本の試験管の 5ml 宛入っている各種の培地 3~5 本宛に 0.1ml 宛分注して3週間培養して, その間 10 日, 14日, 17日, 21日の4回にわたつて各試験管の集落について, その数および大きさを観察記録し, これらの3週後の集落数について一元配置法による検討を行った。

実験成績

1. 寒天量の相違による比較

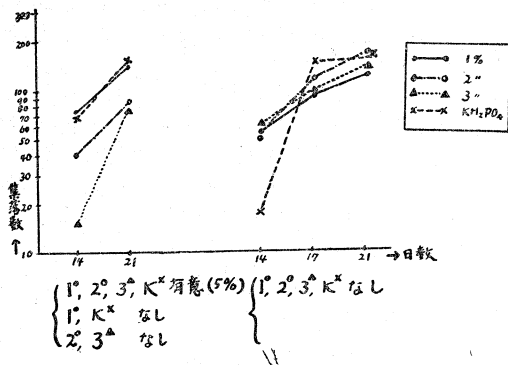
岡本株, H<sub>37</sub>Rv 株の 10<sup>-5</sup>mg を用いて寒天量を 1, 2, 3の各%となるようにして実験した。成績は表1および図1に示した通りで, 岡本株では寒天量が濃くなるにしたがつて集落数は減少しており, 1%寒天の PBG 培地は KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地よりやや劣る程度であつた。これを推計学的に検討すると, 全体を通じては 5%以下の危険率で有意の差が認められたが, 1%寒天の PBG 培地と KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地間および 2%寒天と 3%寒天の PBG 培地間には有意の差を見出し得なかつた。H<sub>37</sub>Rv株では, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地は最も集落数の多い2%寒天の PBG 培地間には有意の差を見出し得なかつた。H<sub>37</sub>Rv株では, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地は最も集落数の多い2%寒天の PBG 培地とほとんど変わりなく, 3%寒天の PB 培地は1%寒

第1表 寒天量による比較

菌株	岡 本		H <sub>37</sub> RV		
	14	21	14	17	23
1	1	81 200	34	150	180
	2	80 206	75	80	100
	3	80 106	82	120	180
	4	60 72	95	136	190
	5	85 135	0	0	0
	平均	75 144	57	98	130
2	1	60 70	31	41	200
	2	55 126	6	89	150
	3	61 140	23	93	150
	4	8 17	100	110	200
	5	23 67	120	150	200
	平均	41 84	56	121	180
3	1	5 28	0	46	75
	2	5 57	150	293	450
	3	25 103	160	181	200
	4	11 107	0	0	2
	5	31 100	0	0	0
	平均	15 79	62	104	145
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	80 220	3	153	200
	2	60 152	10	117	150
	3	108 169	0	94	200
	4	87 130	13	105	150
	5	4 119	49	150	170
	平均	68 158	17	155	174

第1図

(岡 本) (H<sub>37</sub>Rv)



天のそれよりやゝ優るようであるが, 推計学的処理の結果は全然有意の差を示さなかつた。

以上の成績より寒天量について検討すると, 1~2%の間がよいように思われる。その上 H<sub>37</sub>Rv株の 1%寒天 PBG 培地の 5 本目のように, 1%では寒天が固まりに

くくて培地がくずれ易く、その為に菌の発育が悪くなる  
ことが往々あるので、このようなことを考慮して次の実  
験を行った。

2. 食塩水を除いた場合と寒天量の相違による比較

本実験は PBG 培地の食塩水を除いてもよいのではな  
いかと考えて、金子株の  $10^{-5}mg$  を用いて 0.6% の食  
塩水 130ml を除いた PBG 培地で寒天量を 1.5% に  
したものと、原法によるPBG培地で寒天量を 1% および  
1.5%にしたものについて、BCGではさらに寒天量を  
2%及び3%にしたものを加えて  $10^{-5}mg$  および  $10^{-6}mg$   
の菌量を用いて比較した。成績は表 2 および図 2 に示す  
通りで、金子株は 1.5%寒天のPB培地が断然優れ、次い

第 2 表 寒天量および食塩水を除いた場合の比較

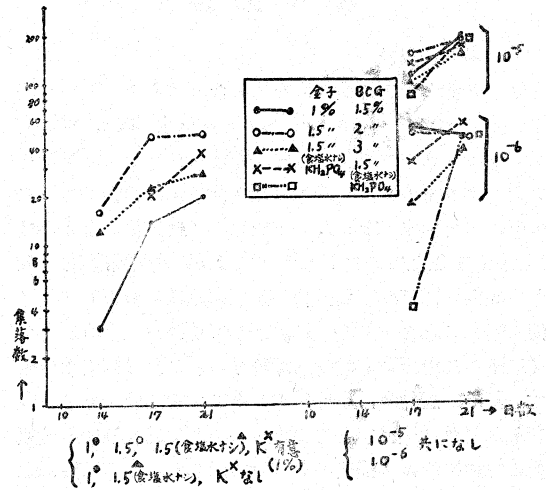
菌株	金 子				BCG $10^{-5}$				BCG $10^{-6}$				
	日数	10	14	17	21	10	14	17	21	10	14	17	21
1	1	0	0	20	28	0 +	162	200	0 +	65	45		
	2	0	10	15	24	0 +	180	210	0 +	67	55		
	3	0	0	7	11	0 +	134	178	0 +	51	45		
	4	0	3	18	20	0 +	170	203	0 +	45	45		
	5	0	0	8	12	0 +	142	220	0 +	41	50		
平均	0	3	14	20	0 +	118	202	0 +	54	48			
1.5	1	0	8	60	70	0 +	159	180	0 0	43	40		
	2	0	0	26	26	0 +	137	192	0 +	24	37		
	3	0	0	27	32	0 +	93	148	0 0	41	44		
	4	0	21	78	78	0 +	180	227	0 +	49	46		
	5	0	18	49	45	0 +	221	243	0 +	99	80		
平均	0	16	48	50	0 +	158	198	0 +	51	49			
1.5 % (食 塩水 ナシ)	1	0	3	14	20	0 0	135	180	0 0	1	93		
	2	0	10	24	29	0 0	184	182	0 0	50	51		
	3	0	21	37	40	0 0	67	100	0 0	6	7		
	4	0	17	17	20	0 0	120	238	0 0	28	46		
	5	0	10	24	30	0 0	79	103	0 0	7	44		
平均	0	12	23	28	0 0	117	161	0 0	18	40			
K H P O <sub>4</sub>	1	0	0	3	3	0 +	175	192	0 +	28	49		
	2	0	0	14	21	0 +	150	210	0 0	32	53		
	3	0	0	25	61	0 +	200	238	0 0	42	70		
	4	0	0	36	43	0 +	190	209	0 0	41	63		
	5	0	0	38	61	0 +	78	90	0 2	24	55		
平均	0	0	23	38	0 +	137	188	0 0	33	58			
K H P O <sub>4</sub>	1	0	0	82	190	0 0	82	190	0 0	0	48		
	2	0	0	93	141	0 0	93	141	0 0	7	72		
	3	0	0	61	219	0 0	61	219	0 0	10	74		
	4	0	0	120	230	0 0	120	230	0 0	2	30		
	5	0	0	79	180	0 0	79	180	0 0	3	20		
平均	0	0	87	196	0 0	87	196	0 0	4	49			

\* 集落発生せるも小さくて数えられぬもの。以下同じで

第 2 図

(金 子)

(BCG)



KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 培地、食塩水を除いた 1.5% 寒天の PBG 培  
地、1%寒天の PBG 培地の順に発育が悪い。これを推  
計学的に検討すると、全体を通じては 1%以下の危険率  
で有意であるが、1.5% 寒天の PBG 培地を除くと有意  
でなくなった。1%寒天の PBG 培地の発育の悪いの  
は、前実験と同様培地が相当くずれかゝっていた為と思  
われる。BCG では  $10^{-5}mg$  でも  $10^{-6}mg$  でも 1.5%寒天  
および 2%寒天の PBG 培地と KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 培地とはほとん  
ど優劣の差がなく、3%寒天の PBG 培地が最も悪かつ  
た。食塩水を除いた 1.5%寒天のものは、 $10^{-5}mg$  では  
3%寒天のものよりは発育が好く  $10^{-6}mg$  では最も発育  
が好かつた。しかしながら推計学的処理の結果は  $10^{-5}mg$   
でも  $10^{-6}mg$  の場合でも有意の差が認められなかつた。  
なお PBG 培地は初発集落の発生期間が KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 培地  
より 3 日程早かつた。また食塩水を除いた PBG 培地は  
他の培地に比較して集落が極めて大きかつた。

以上の成績から 1.5% 寒天の食塩水を除いた PBG 培  
地は、添加する馬鈴薯量を適当に加減すればさらによい  
成績を得るのではないかと考えて次の実験を行った。

3. 各馬鈴薯量による比較

(その 1) 1.5% 寒天で食塩水を除いた PBG 培地に  
おいて、馬鈴薯量を各 0g, 20g, 40g, 60g, 80g, 100g  
宛加えた培地を作り、H<sub>2</sub> 株、青山 B 株のそれぞれ  $10^{-5}$   
 $mg$  および  $10^{-6}mg$  を用いて比較した。成績は表 3 およ  
び図 3 のその 1 に示した。菌株 H<sub>2</sub> においては、馬鈴薯  
量が 20g の PBG 培地が最も優れ、次いで KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 培  
地、0g, 40g, 60g, 80g, 100g の各馬鈴薯量の PBG  
培地の順に悪かつた。これを推計学的に考察すると、全  
体を通じては 5%以下の危険率で有意となり、0, 20,  
40 の各 g の PBG 培地と KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 培地間では有意

第3表 (その1) 馬鈴薯量による比較

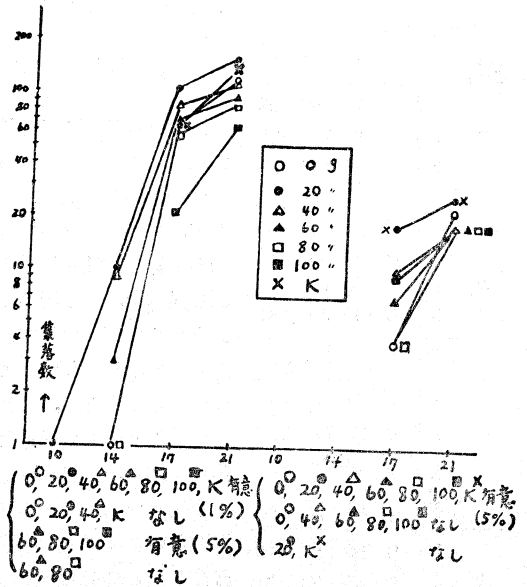
		H <sub>2</sub>				青山 B			
日数		10	14	17	21	10	14	17	21
0 (0%)	1	0	1	41	113	0	0	10	20
	2	0	1	61	120	0	0	3	22
	3	0	0	90	120	0	0	0	24
	平均	0	1	64	118	0	0	4	22
20 (13%)	1	0	8	112	163	0	0	16	26
	2	2	11	95	145	0	0	22	25
	3	0	10	98	160	0	0	17	30
	平均	1	10	102	156	0	0	18	27
40 (27%)	1	0	10	82	90	0	0	6	15
	2	0	8	75	113	0	0	10	18
	3	0	8	99	130	0	0	13	20
	平均	0	9	85	111	0	0	10	18
60 (40%)	1	0	0	53	84	0	0	4	20
	2	0	4	81	109	0	0	9	16
	3	0	3	73	92	0	0	9	17
	平均	0	3	69	95	0	0	7	18
80 (53%)	1	0	2	66	90	0	0	0	19
	2	0	2	40	75	0	0	10	15
	3	0	0	72	85	0	0	2	18
	平均	0	1	59	83	0	0	4	17
100 (67%)	1	0	0	11	62	0	0	9	24
	2	0	0	33	71	0	0	7	13
	3	0	0	20	52	0	0	12	19
	平均	0	0	21	62	0	0	9	17
K H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub>	1	0	1	52	124	0	0	22	30
	2	0	0	74	140	0	0	10	18
	3	0	0	70	131	0	0	19	23
	平均	0	0	65	132	0	0	17	27

でなく、60, 80, 100の各gのPBG培地間では5%以下の危険率で有意となつたが、60g, 80g間では有意の差を認めなかつた。青山B株では、20gの馬鈴薯量のPBG培地とKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>培地とが最も優れ同集落数をなし、次に0gの馬鈴薯量のPBG培地が良かった。推計学的に処理すると、全体を通じては5%以下の危険率で有意となつたが、0g, 40g, 60g, 80g, 100gの各培地間および20gのPBG培地とKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>培地間では有意ならなかつた。

(その2) PBG培地の原法による製法において、グリセリン馬鈴薯抽出液とこれに加える0.6%の食塩水との割合を種々変えた培地を作つて比較した。すなわちグ

第3図 (その1)

(H<sub>2</sub>) (青山B)



リセリン馬鈴薯抽出液を50mlと食塩水を150ml加えた培地を(a)とし、前者を100ml、後者も100ml加えた培地を(b)とし、前者を150ml、後者を50ml加えた培地を(c)とし、前者のみを200ml加え後者を加えない培地を(d)として、それぞれの培地について、青山B株の10<sup>-5</sup>mgを用いて比較したのが表3および図3のその2の成績である。すなわち(b)が最も優れ、次いで(a), (c), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>の順に悪いがその差は僅少で、(d)が最も悪かつた。推計学的処理においては、全体を通じては5%以下の危険率で有意であつたが(b)を除くとその差はなくなつた。

なおその1では、馬鈴薯量0gのPBG培地およびKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>培地の集落の大きさは他の培地よりも相当に小さく、その2でも(a)の培地の集落の大きさが他の培地よりも相当に小さかつた。また前実験の場合と同様に、馬鈴薯量が20g, 40g, 60gの各PBG培地および(a), (b), (c), (d)の培地の方が対照のKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>培地よりも初発集落の発生期間がやや短かつた。

以上の成績から、その1では馬鈴薯量が20g, 40gの各培地において、その2では(b), (c)の各培地において最も菌の発育が良い。今仮に添加した馬鈴薯量を培地全体量の%で表わしてみると、その1では0, 13, 27, 40, 53, 67の各%含有されたことになる。その2では(a)では8%, (b)では16%, (c)では25%, (d)では33%含有されたことになる。こういう風に考えると先の最も優れている馬鈴薯量は、その1では20, 40の各gであるから、13, 27の各%となり、その2では(b), (c)であるから16, 25の各%となつてその濃度はほぼ一致す

第3表(その2)馬鈴薯量による比較

		青 山 B			
日数		10	14	17	21
a	1	0	72	90	99
	2	0	80	110	120
	3	1	63	105	118
	平均	0	72	100	109
b	1	0	55	95	97
	2	7	75	120	117
	3	0	100	126	130
	平均	2	77	114	115
c	1	0	61	98	100
	2	0	70	110	105
	3	3	53	89	120
	平均	1	61	99	108
d	1	0	90	87	80
	2	0	41	68	72
	3	0	60	72	83
	平均	0	63	76	78
K H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub>	1	0	+	103	110
	2	0	+	111	120
	3	0	+	110	90
	平均	0	+	108	107
馬鈴薯 50g		A	B	馬鈴薯(%)	
グリセリン 8ml	a	50ml	150ml	8	
蒸溜水 100ml	b	100	100	16	
0.6% 食塩水		B	c	150	50
	d	200	0	25	33

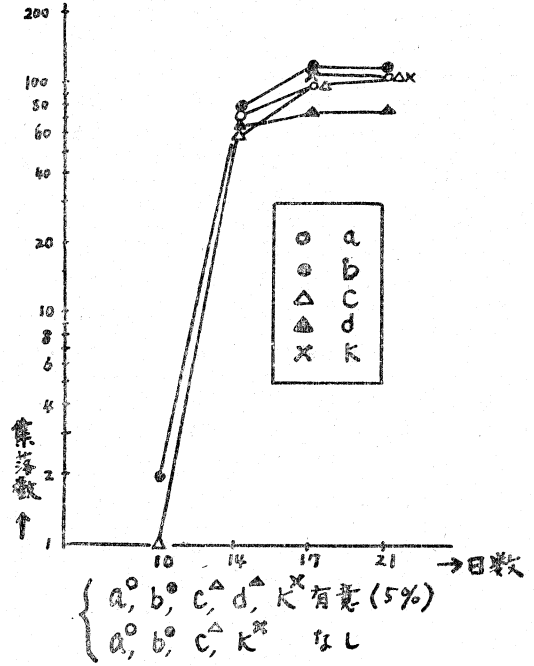
制する性質があると Hirsch<sup>13)</sup> が指摘していることから考えても含有量が低い方がよいことは明らかである。ただ1.5% 含有培地は作製した直後は、試験管を種々の方向に回転した際培地もそれにつれて滑り動く欠点があるが一両日放置すると動かなくなる。しかし培地は動いても培養には支障を来さない。次に食塩水を除いてもその集落数はあまり減少せず、かえって集落の大きさが大となつて遙かに KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 培地よりも見易くなることがわかつたので、さらに発育を良くする為に馬鈴薯量について検討したところ、これが大きな役割を果すことがわかつた。そうしてその量は 15~25% が最適のように思われる。かくして 1%KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 培地に匹敵する培地を作ることが出来た。この馬鈴薯について、現在行つていのように馬鈴薯そのものを使用する方が良いか、もし出来れば馬鈴薯澱粉を使用してもその成績が変わらなるとすればさらに好都合で、これについては次回に報告したい。なお血液、グリセリン等については第2報に報告

る。すなわち馬鈴薯量を15~25%添加するのが最も良いということになる。

総括および考察

筆者は結核菌の分離培地に用うる目的で Bordet-Gengou 培地の改変に着目して、当教室保存の結核菌株の平等浮遊液を用いて検討を試みた。まず培地の製法を極めて簡略化して、馬鈴薯を皮をむかないでよく洗滌するのみとし、これを用いてグリセリン馬鈴薯抽出液を作り、食塩水および粉末寒天を加えて滅菌後濾過しないで滅菌中試験管に分注したものを用いて種々の検討を行つた。第1に寒天の含有量について比較実験した結果 1.5% 量が最も優れていることがわかつた。これは Tarshis等<sup>14)</sup>、宇野<sup>15)</sup>も唱えており、寒天はある程度菌の発育を抑

第3図 (その2) (青山B)



する予定である。

最後に本実験のような場合に推計学的処理をなす場合には、多元配置法が最も理想的な興味ある方法であるが、種々の条件の不足から今回は最も簡単な一元配置法を用いた。しかしこれによつても、単に実験成績そのものより判断する従来の考察方法よりも、さらに正確に且幅を持たせることが出来ると思う。

結 論

結核菌の分離培地として Bordet-Gengou 培地を改変して用いる目的で、製法を極めて簡略化した PBG 培地を作り、結核菌浮遊液を用いて種々検討した結果、原法より食塩水を除き、馬鈴薯量を 15~25% すなわち23~38g/100ml にしてグリセリン馬鈴薯抽出液を作り寒天量を 1.5% にしたものが優れ、1% KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 培地に匹敵することがわかつた。

本研究は文部省の科学助成補助金による。ここに謝意を表す。本研究の御検閲を頂いた萩原兼文教授ならびに御懇篤なる御指導を賜つた矢戸昌夫助教授に厚く感謝の意を表す。

文 献

- 1) 岡・片倉：日誌，1，59，1940。
- 2) 小川等：結核，25，33，1950。
- 3) 戸田：結核菌と BCG，137，南山堂，東京 1946。
- 4) Petroff：J. Exp. Med.，21，38，1915。

- 5) Hohn: Zbl. f. Bakt. 1 Abt. Orig., 98, 460, 1926.
- 6) Petraghani: Zbl. f. Bakt. 1 Abt. Ref., 85, 1927.
- 7) Löwenstein: Zbl. f. Bakt. 1 Abt. Orig., 120, 127, 1931.
- 8) Herrold: J. Inf. Dis., 48, 236, 1931.
- 9) Lucky Mishlow: J. Inf. Dis., 51, 416, 1932.
- 10) 和田: 熊本医学雑誌, 13, 1, 1937.
- 11) 伊藤等: 基礎と臨床, 2, 145, 1949.
- 12) 上坂・友田: 日本医学及び健康保険, 3311, 2551, 1942.
- 13) 小川: 結核, 24, 144, 1949.
- 14) Tarshis et al: Am. J. Klini. Pathol., 21, 101, 1951.
- 15) 同人等, 同誌, 23, 661, 1953.
- 16) 宇野: 結核, 30, 12, 1955.
- 17) 増山: 少数例のまとめ方, 54, 河出書房, 東京, 1953.
- 18) Hirsch: Am. Rev. Tuberc. 70, 955, 1954.