

## 結核菌の分離培養の培地改良に関する研究

## 第2報 苛性ソーダ水で前処理された菌浮游液の培養

杉 田 暉 道

横浜医科大学衛生学教室—主任 萩原兼文教授

指導 栄戸昌夫助教授

受付 昭和31年1月30日

## 緒 言

第1報<sup>1)</sup>において Bordet-Gengou 培地を改変したいわゆる筆者のPBG培地が、菌浮游液の培養において1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  培地に匹敵することを述べたので、今回は最も普及されている前処理法の4%のNaOH水で処理した菌浮游液の培養に適応するように改良を行った成績について、さらにPBG培地の成分の馬鈴薯、グリセリン、血液についても諸種の検討を行ったのでこれらの成績についても述べる。

## 実 験 方 法

## 1. 培地の製法

第1報<sup>1)</sup>の成績より、馬鈴薯を30g、グリセリン8mlを水道水100mlに加えてグリセリン馬鈴薯抽出液を作り、これに血液銀行の血液を少量加えて寒天量を1.5%としたPBG培地を作製した。製法および血液成分等は第1報<sup>1)</sup>と同様である。まずNaOH水前処理による検討については、1%および4%のNaOH水で前処理した菌の平等浮游液を、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ が0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8の各%量含有するように作製したPBG培地に培養して比較実験を行った。次に培地の成分については、馬鈴薯、グリセリン、血液の3因子をそれぞれ種々の添加量にした培地に培養して比較実験を行った。対照には3% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 培地を用いた。また各種培地の凝固水のpHを比色紙で測定して比較検討を行った。

## 2. 菌液、培養および観察方法

1% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 培地に3~4週間培養した当教室保存の人型結核菌の菌株を、滅菌蒸溜水を用いて1mg/mlの菌量を含む平等浮游液とし、1%または4%NaOH水で0.1ml中に $10^{-3}\text{mg}$ または $10^{-4}\text{mg}$ の菌量を含むように希釈し、1本の試験管に5ml宛入っている各種の培地3本宛に0.1ml宛分注して4週間培養した。その間10日、14日、17日、21日、28日の5回にわたっ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4週後の集落数について一元配置法または多元配置法<sup>2)3)</sup>による検討を行った。

## 実 験 成 績

## 1. 1%および4%NaOH水前処理の場合の比較

1%NaOH水の場合には大谷株の $10^{-3}\text{mg}$ を用いて、4%NaOH水の場合には大谷株の $10^{-3}\text{mg}$ および田中株の $10^{-4}\text{mg}$ を用いて実験した。なお本実験は3週間で観察を終了した。実験成績は表1,2に示す通りで、1%

表 1 1%NaOH 水前処理

| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (%)      | 日数 |     |     |     |
|--|----|-----|-----|-----|
|  | 10 | 14  | 17  | 21  |
| 0  | -  | 450 | 600 | 600 |
|  | -  | 450 | 600 | 600 |
|  | -  | 450 | 600 | 600 |
| 平 均                                      | -  | 450 | 600 | 600 |
| 0.2                                      | -  | 180 | 400 | 480 |
|  | -  | 130 | 390 | 410 |
|  | -  | 150 | 320 | 400 |
| 平 均                                      | -  | 153 | 370 | 430 |
| 0.4                                      | -  | 300 | 380 | 400 |
|  | -  | 100 | 260 | 300 |
|  | -  | 89  | 295 | 310 |
| 平 均                                      | -  | 163 | 312 | 333 |
| 0.6                                      | -  | +   | 310 | 320 |
|  | -  | 2   | 305 | 330 |
|  | -  | 3   | 330 | 350 |
| 平 均                                      | -  | 2   | 315 | 330 |
| 0.8                                      | -  | 10  | 290 | 300 |
|  | -  | -   | 310 | 320 |
|  | -  | -   | 150 | 290 |
| 平 均                                      | -  | 3   | 250 | 303 |
| 1%<br>KH <sub>2</sub><br>PO <sub>4</sub> | -  | +   | 500 | 600 |
|  | -  | -   | 600 | 650 |
|  | -  | +   | 500 | 600 |
| 平 均                                      | -  | +   | 533 | 618 |

(註) +は集落が小さくて数えられないもの

全体では有意(1%)  
0, 1% $\text{KH}_2\text{PO}_4$  なし  
0.2, 0.4, 0.6, 0.8 なし

表2 4%NaOH水前処理

| 大 谷 株                              |    |     |     |     | 田 中 株 |    |    |     |    |
|------------------------------------|----|-----|-----|-----|-------|----|----|-----|----|
| 日数                                 | 10 | 14  | 17  | 21  | 10    | 14 | 17 | 21  |    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>    | 0  | —   | 500 | 600 | 600   | —  | —  | —   | 28 |
|                                    | —  | —   | 400 | 600 | 600   | —  | —  | 3   | 75 |
|                                    | —  | —   | 190 | 350 | 400   | —  | 1  | 4   | 39 |
|                                    | —  | —   | —   | —   | —     | —  | —  | 7   | 12 |
| 平均                                 | —  | 365 | 517 | 553 | —     | —  | 4  | 33  |    |
| 0.2                                | —  | —   | 180 | 250 | —     | 1  | 30 | 111 |    |
|                                    | —  | —   | 85  | 180 | —     | 1  | 11 | 135 |    |
|                                    | —  | 2   | 600 | 600 | —     | 5  | 32 | 132 |    |
|                                    | —  | 100 | 600 | 600 | —     | 3  | 53 | 105 |    |
| 平均                                 | —  | 34  | 185 | 343 | —     | 6  | 11 | 56  |    |
| 0.4                                | —  | 400 | 800 | 800 | —     | 7  | 40 | 137 |    |
|                                    | —  | 400 | 600 | 700 | —     | 2  | 46 | 185 |    |
|                                    | —  | 600 | 800 | 800 | —     | 3  | 41 | 187 |    |
|                                    | —  | —   | —   | —   | —     | 12 | 43 | 163 |    |
| 平均                                 | —  | 466 | 733 | 766 | —     | 9  | 52 | 168 |    |
| 0.6                                | —  | 350 | 600 | 700 | —     | 4  | 10 | 62  |    |
|                                    | —  | 400 | 800 | 800 | —     | 3  | 17 | 142 |    |
|                                    | —  | 400 | 600 | 600 | —     | 6  | 24 | 99  |    |
|                                    | —  | —   | —   | —   | —     | 3  | 45 | 178 |    |
| 平均                                 | —  | 383 | 666 | 700 | —     | 20 | 37 | 220 |    |
| 0.8                                | —  | 400 | 600 | 600 | —     | 4  | 18 | 55  |    |
|                                    | —  | 400 | 600 | 600 | —     | 8  | 22 | 85  |    |
|                                    | —  | 400 | 600 | 600 | —     | 12 | 29 | 108 |    |
|                                    | —  | —   | —   | —   | —     | 6  | 13 | 90  |    |
| 平均                                 | —  | 400 | 600 | 600 | —     | 4  | 21 | 111 |    |
| 3% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | —  | —   | 600 | 700 | —     | 3  | 72 | 170 |    |
|                                    | —  | —   | 700 | 800 | —     | 7  | 85 | 182 |    |
|                                    | —  | —   | 600 | 800 | —     | 1  | 82 | 152 |    |
|                                    | —  | —   | 600 | 800 | —     | 2  | 44 | 189 |    |
| 平均                                 | —  | —   | 633 | 766 | —     | —  | —  | 165 |    |

全体では有意(1%)  
 0, 0.2 なし  
 0.4, 0.6, 0.8, K なし  
 (3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

全体では有意(1%)  
 0.2, 0.4, 0.6, K なし  
 (3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)  
 0, 0.8 なし

NaOH水ではKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>の含有量が多くなるに従って発育が悪くなっており、4%NaOH水では、対照が最も良く次いでKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>の0.4%および0.6%含有されたものとなっているが、これら三者の優劣の差はあまりない。推計学的に検討すると、1%NaOH水では全体を通じては1%以下の危険率で有意の差を認めたが、0%と対照培地間および0.2, 0.4, 0.6, 0.8の各%間では有意の差を認めなかつた。4%NaOH水では大谷株では全体を通じては1%以下の危険率で有意の差を認めたが、0%と0.2%間および0.4%, 0.6%, 0.8%, 対照培地間では有意の差を認めなかつた。田中株では全体を通じては1%以下の危険率で有意の差を認めたが、0.2%, 0.4%, 0.6%, 対照培地間では有意の差がなく、0%と0.8%間では1%以下の危険率で有意の差を認めた。以上の成績より1%NaOH水による前処理の時はPBG培地にKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を全然添加しないものが、4%NaOH水による

前処理の時には0.4%にKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を添加するのが最もよいように考えられる。さらに各種濃度にKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を加え

表3 各種培地のpH

| 馬鈴薯(g)<br>培養 | 0   | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 3% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------------------------------|------------------------------------|
|              | 前   | 6.8 | 6.6 | 6.4 | 6.2 | 6.0                                | 5.8                                |
| 後            | 7.0 | 6.8 | 6.6 | 6.4 | 6.0 | 5.8                                | 5.8                                |

(註) 各種馬鈴薯のものは2本の培地のpHを示す。

たPBG培地のpHは表3の如く、培養前は6.6~5.8となつているが培養3週後には6.8~5.8となつている。そして培養前では0%のものが1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>培地のpHと、0.4%のものが3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>培地のpHとそれぞれほとんど一致している。なお、1%NaOH水の時の対照には1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>培地を用いた。また田中株ではそれぞれの培地に5本の試験管を用いた。

表4 H<sub>2</sub>株 17日後

| 馬鈴薯 (g)   |    | 0  |    |    |    | 10 |    |    |    | 30 |    |    |    | 50 |    |    |    | 3%<br>小川 |    |
|-----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----------|----|
| グリセリン (%) |    | 0  | 2  | 4  | 8  | 0  | 2  | 4  | 8  | 0  | 2  | 4  | 8  | 0  | 2  | 4  | 8  |          |    |
| 血         | 10 | 11 | 26 | 53 | 32 | 1  | 12 | 38 | 74 | 11 | 3  | 46 | 59 | 0  | 13 | 29 | 15 | 31       |    |
|           |    | 0  | 31 | 60 | 72 | 1  | 13 | 31 | 60 | 6  | 4  | 21 | 54 | 0  | 15 | 30 | 39 |          | 32 |
|           |    | 0  | 42 | 51 | 70 | 2  | 17 | 45 | 63 | 3  | 15 | 33 | 55 | 5  | 10 | 24 | 15 |          |    |
|           | 平均 | 4  | 33 | 56 | 65 | 1  | 14 | 33 | 66 | 7  | 7  | 33 | 66 | 2  | 13 | 23 | 23 | 36       |    |
| 液         | 20 | 2  | 11 | 29 | 31 | 5  | 15 | 30 | 43 | 4  | 12 | 43 | 55 | 2  | 14 | 56 | 6  | 6        |    |
|           |    | 10 | 17 | 36 | 64 | 5  | 16 | 36 | 29 | 1  | 14 | 45 | 35 | 6  | 23 | 45 | 12 |          | 12 |
|           |    | 4  | 13 | 36 | 50 | 1  | 15 | 36 | 64 | 3  | 16 | 48 | 36 | 1  | 21 | 46 | 15 |          |    |
|           | 平均 | 5  | 14 | 34 | 43 | 4  | 15 | 33 | 43 | 3  | 14 | 43 | 42 | 9  | 19 | 43 | 11 | 11       |    |
| 30        | 8  | 8  | 9  | 34 | 57 | 4  | 19 | 36 | 63 | 5  | 30 | 82 | 20 | 0  | 9  | 7  | 22 | 22       |    |
|           |    | 5  | 8  | 50 | 21 | 4  | 7  | 44 | 62 | 7  | 22 | 68 | 31 | 3  | 11 | 9  | 13 |          | 13 |
|           |    | 10 | 16 | 30 | 28 | 10 | 10 | 40 | 74 | 2  | 13 | 64 | 42 | 4  | 14 | 15 | 14 |          |    |
|           | 平均 | 8  | 11 | 33 | 33 | 6  | 12 | 40 | 66 | 5  | 22 | 71 | 31 | 2  | 11 | 10 | 16 | 16       |    |

表5 H<sub>2</sub>株 21日後

| 馬鈴薯 (g)   |    | 0  |    |    |    | 10 |    |    |    | 30 |    |    |     | 50 |    |    |    | 3%<br>小川 |    |
|-----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----------|----|
| グリセリン (%) |    | 0  | 2  | 4  | 8  | 0  | 2  | 4  | 8  | 0  | 2  | 4  | 8   | 0  | 2  | 4  | 8  |          |    |
| 血         | 10 | 24 | 36 | 57 | 36 | 11 | 16 | 45 | 70 | 12 | 11 | 49 | 100 | 0  | 14 | 49 | 21 | 61       |    |
|           |    | 0  | 42 | 61 | 57 | 2  | 22 | 45 | 64 | 8  | 12 | 20 | 79  | 6  | 17 | 51 | 41 |          | 65 |
|           |    | 15 | 44 | 57 | 69 | 4  | 28 | 42 | 77 | 14 | 14 | 42 | 107 | 6  | 13 | 30 | 22 |          |    |
|           | 平均 | 13 | 41 | 58 | 60 | 6  | 22 | 44 | 70 | 11 | 12 | 37 | 93  | 4  | 15 | 43 | 28 | 64       |    |
| 液         | 20 | 6  | 14 | 49 | 62 | 5  | 20 | 47 | 47 | 4  | 14 | 53 | 76  | 7  | 23 | 57 | 16 | 16       |    |
|           |    | 20 | 22 | 63 | 70 | 5  | 19 | 50 | 46 | 6  | 17 | 48 | 42  | 7  | 33 | 48 | 21 |          | 21 |
|           |    | 19 | 26 | 59 | 57 | 5  | 20 | 45 | 61 | 6  | 20 | 53 | 47  | 5  | 24 | 51 | 17 |          |    |
|           | 平均 | 15 | 21 | 57 | 63 | 5  | 20 | 47 | 61 | 5  | 17 | 53 | 55  | 6  | 30 | 52 | 18 | 18       |    |
| 30        | 22 | 12 | 12 | 60 | 53 | 8  | 20 | 55 | 72 | 8  | 30 | 89 | 32  | 0  | 12 | 17 | 31 | 31       |    |
|           |    | 16 | 13 | 59 | 33 | 12 | 14 | 56 | 73 | 9  | 34 | 60 | 42  | 5  | 17 | 13 | 25 |          | 25 |
|           |    | 22 | 16 | 57 | 51 | 12 | 16 | 45 | 88 | 5  | 20 | 60 | 47  | 4  | 18 | 27 | 29 |          |    |
|           | 平均 | 20 | 14 | 58 | 47 | 11 | 11 | 52 | 73 | 7  | 23 | 70 | 40  | 3  | 16 | 19 | 28 | 28       |    |

2. 馬鈴薯、グリセリン、血液の3因子の検討

1) の実験で4%NaOH水による前処理の時にはKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を0.4%含有したものが最もよいことがわかったのでこれを用いて実験した。まず馬鈴薯については、水道水100mlに対して馬鈴薯を0,10,30,50の各g宛加えて馬鈴薯抽出液を作り、これらの抽出液にグリセリンおよび血液を培地全体のそれぞれ0,2,4,8および10,20,30の各%となるように加えて比較実験した。すなわち馬鈴薯0g含有の培地は、グリセリン0%では血液を10,20,30の各%含有するもの3組ある。同様にしてグリセリン2%4%、8%のものもそれぞれ3組宛出来るから、馬鈴薯0gの培地は計12組となる。従つて馬鈴薯を0,10,30,50

の各g含有した培地ではそれぞれ12組出来るから総計48組の培地が出来るわけである。菌株はH<sub>2</sub>株およびH<sub>37</sub>Rv株を用いて10<sup>-4</sup>mgの培養量で実験を行つた。まずH<sub>2</sub>株の実験成績について述べると、培養後17日,21日,28日の成績が表4,5,6に示されている。培養後10日,14日はそれぞれの培地の優劣を論ずる程集落の発生を見なかつたのでその成績は省略した。これら3つの表を通覧してまずわかることは、グリセリンが0%および20%のものは非常に発育が悪いということである。次に各表のそれぞれの培地の集落数の平均値に丸を附してあるのは3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>培地と同程度かまたはそれ以上に発育したものであるが、これらを中心として各種培地の菌の発育状態を培養日数を追つて比較していくとおおのの培地の優劣がよくわかる。すなわち培養17日後ではグリセリンが4%および8%添加された培地では、馬鈴薯が0g~30gの培地において良好な発育を示すが特に10%および20%の血液添加の方が30%血液添加のものより良い成績を示した。培養後21日になると10%の血液量では先によい成績を示した培地の半数のものが対照の3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>培地より発育が劣り、その他のものはそのまま28日迄優秀な発育を示した。血液量20%、30%のものは17日に発育の好かつたものは、28日に至るも良好であつた。これを繰り返すによる3因子の多元配置法の要因分析を以て検討した成績が表7である。なおこの分析ではグリセリンを0%および2%含有したものは対照の3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>培地に比較して極めて悪かつたので、これらを除外して検討した。さて表の示す所によると、馬鈴薯、グリセリンおよび血液の3因子すべて5%または1%の危険率で有意の差を示し、おおのの因子の交互作用も1%以下の危険率で有意の差を示した。これらの有意の差を示した諸種の要因を追究すべく作製したのが表8である。これを簡単に説明すると、表をより見易くするために表6のグリセリンを4%および8%含有する培地のそれぞれの集落数より55を引いて3本の試験管の集落数の和を示したのが(その1)で、馬鈴薯と血液との関係を知るために(その1)の表の4%と8%のグリセリンの培地の集落数の和を示したのが

たものは対照の3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>培地に比較して極めて悪かつたので、これらを除外して検討した。さて表の示す所によると、馬鈴薯、グリセリンおよび血液の3因子すべて5%または1%の危険率で有意の差を示し、おおのの因子の交互作用も1%以下の危険率で有意の差を示した。これらの有意の差を示した諸種の要因を追究すべく作製したのが表8である。これを簡単に説明すると、表をより見易くするために表6のグリセリンを4%および8%含有する培地のそれぞれの集落数より55を引いて3本の試験管の集落数の和を示したのが(その1)で、馬鈴薯と血液との関係を知るために(その1)の表の4%と8%のグリセリンの培地の集落数の和を示したのが

表6 H<sub>2</sub> 株 28 日後

| 馬鈴薯 (g)   |    | 0  |    |    |    | 10 |    |    |    | 30 |    |    |     | 50 |    |    |    | 3%<br>小川 |
|-----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----------|
| グリセリン (%) |    | 0  | 2  | 4  | 8  | 0  | 2  | 4  | 8  | 0  | 2  | 4  | 8   | 0  | 2  | 4  | 8  |          |
| 血         | 10 | 53 | 48 | 51 | 59 | 16 | 24 | 48 | 70 | 24 | 18 | 55 | 105 | 3  | 25 | 57 | 44 | 94       |
|           |    | 40 | 46 | 60 | 68 | 3  | 28 | 55 | 70 | 20 | 16 | 45 | 80  | 11 | 36 | 52 | 56 | 71       |
|           |    | 38 | 60 | 63 | 75 | 9  | 30 | 45 | 78 | 23 | 27 | 48 | 105 | 9  | 29 | 48 | 36 | 61       |
|           | 平均 | 44 | 51 | 58 | Ⓞ  | 9  | 27 | 49 | Ⓞ  | 22 | 30 | 49 | Ⓞ   | 8  | 30 | 52 | 45 | 75       |
| 液         | 20 | 26 | 31 | 58 | 65 | 5  | 26 | 50 | 46 | 7  | 20 | 57 | 80  | 13 | 53 | 52 | 31 |          |
|           |    | 20 | 46 | 69 | 82 | 5  | 25 | 53 | 50 | 9  | 15 | 55 | 62  | 23 | 51 | 66 | 43 |          |
|           |    | 13 | 30 | 63 | 64 | 5  | 21 | 52 | 59 | 11 | 19 | 53 | 70  | 19 | 43 | 67 | 41 |          |
|           | 平均 | 20 | 36 | Ⓞ  | Ⓞ  | 5  | 24 | 52 | 52 | 9  | 18 | 55 | Ⓞ   | 18 | 49 | Ⓞ  | 38 |          |
|           | 30 | 42 | 18 | 61 | 57 | 14 | 28 | 62 | 90 | 14 | 34 | 85 | 37  | 9  | 21 | 29 | 44 |          |
|           |    | 19 | 20 | 59 | 42 | 17 | 17 | 70 | 84 | 12 | 34 | 80 | 53  | 6  | 31 | 30 | 36 |          |
|           |    | 40 | 36 | 65 | 68 | 13 | 26 | 52 | 96 | 12 | 35 | 64 | 55  | 4  | 28 | 44 | 27 |          |
|           | 平均 | 34 | 25 | Ⓞ  | 56 | 15 | 24 | Ⓞ  | Ⓞ  | 13 | 34 | Ⓞ  | 48  | 6  | 27 | 34 | 36 |          |

(その2)である。(その3)は馬鈴薯とグリセリンとの関係を知るために(その1)の各馬鈴薯量の培地において、血液の含有量を無視してグリセリンの4%と8%の培地について、それぞれの集落数を加えたもので、(その4)はグリセリンと血液との関係を見るために、(その1)のそれぞれの血液量の培地について、馬鈴薯量を無視してグリセリンの4%と8%の培地においてそれぞれの集落数を加えたものである。まず(その1)について検討すると、各培地の数値に丸を附してあるのは表6で丸を附してあるもので、これらに対照の3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>培地の集落数をも加えて一元配置法で検討すると5%以下の危険率で有意の差を示すが、84, 105, 125の数値を示す培地間およびこ

表7 H<sub>2</sub> 株

| 要因       | 変動    | 自由度 | 不偏分散 |    |
|----------|-------|-----|------|----|
| 馬鈴薯(P)   | 5418  | 3   | 1806 | ** |
| 血液(B)    | 165   | 1   | 165  | *  |
| グリセリン(G) | 486   | 2   | 243  | *  |
| P×B      | 2969  | 3   | 990  | ** |
| B×G      | 1550  | 2   | 775  | ** |
| G×P      | 1743  | 6   | 291  | ** |
| P×B×G    | 4941  | 6   | 824  | ** |
| R(PBG)   | 2784  | 48  | 58   |    |
| 計        | 20056 | 71  |      |    |

(その3)

| 馬鈴薯 (g)   | 0   | 10  | 30  | 50   | 和   |    |
|-----------|-----|-----|-----|------|-----|----|
| グリセリン (%) | 4   | 52  | -8  | 67   | -50 | 61 |
| 8         | 85  | 148 | 152 | -137 | 248 |    |
| 和         | 137 | 140 | 219 | -187 | 309 |    |

表8 H<sub>2</sub> 株 (その1)

| 馬鈴薯 (g)   |    | 0  |    | 10  |     | 30  |     | 50  |      | 和   | 3%<br>小川 |
|-----------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|----------|
| グリセリン (%) |    | 4  | 8  | 4   | 8   | 4   | 8   | 4   | 8    |     |          |
| 血液 (%)    | 10 | 9  | Ⓞ  | -17 | Ⓞ   | -17 | Ⓞ   | -8  | -29  | 155 | 61       |
|           | 20 | Ⓞ  | Ⓞ  | -10 | -10 | 0   | Ⓞ   | Ⓞ   | -50  | 68  |          |
|           | 30 | Ⓞ  | 2  | Ⓞ   | Ⓞ   | Ⓞ   | -20 | -62 | -58  | 88  |          |
| 和         |    | 52 | 85 | -8  | 148 | 67  | 152 | -50 | -137 | 309 |          |

(その2)

| 馬鈴薯 (g) |    | 0   | 10  | 30  | 50   | 和   |
|---------|----|-----|-----|-----|------|-----|
| 血液 (%)  | 10 | 46  | 36  | 108 | -37  | 153 |
|         | 20 | 71  | -20 | 47  | -30  | 68  |
|         | 30 | 20  | 124 | 64  | -120 | 88  |
| 和       |    | 137 | 140 | 219 | -187 | 309 |

(その4)

| グリセリン (%) | 4  | 8   | 和   |     |
|-----------|----|-----|-----|-----|
| 血液 (%)    | 10 | -33 | 166 | 153 |
| 20        | 35 | 33  | 68  |     |
| 30        | 59 | 29  | 88  |     |
| 和         | 61 | 248 | 309 |     |

の3つの培地を除いた残りのもの間では有意の差がなかった。すなわち馬鈴薯量が10g~30gで血液量が10%または30%含有するものが最も良いように思われ

る。次に(その2)、(その3)より馬鈴薯と血液およびグリセリンとの関係について見ると、馬鈴薯量が50gのものほどの血液量でもまたグリセリンとの関係においても他の馬鈴薯培地に比較して最も悪く、反対に馬鈴薯30gのものは最もよい。ところで推計学的には馬鈴薯量50gの培地を除くと0g, 10g, 30g間には有意の差を見出しえなかつた。血液量を(その2)、(その4)についてみると10%含有のものが最も良く20%と30%とはそれ程優劣の差がない。推計学的に処理しても同様の成績を得た。いまこれを最も発育の悪い馬鈴薯量50gの培地を除いたものについて検討すると表9になる。すなわち10%と30%の血液量の培地の集落数の和はほとんど同数で20%のものが最も悪い。推計学的処理においても同様の成績を

表9 H<sub>2</sub>株

| 馬鈴薯(g)   | 0     |        | 10      |         | 30 |   | 和   |
|----------|-------|--------|---------|---------|----|---|-----|
| グリセリン(%) | 4     | 8      | 4       | 8       | 4  | 8 |     |
| 血液(%)    | 10    | 9 37   | -17 55  | -17 125 |    |   | 190 |
|          | 20    | 25 46  | -10 -10 | 0 47    |    |   | 98  |
|          | 30    | 18 2   | 19 105  | 84 -20  |    |   | 208 |
| 和        | 52 85 | -8 148 | 67 152  |         |    |   | 496 |

得た。20%の血液量のものが他の培地に比較して意外に悪かつたのは、馬鈴薯を10g含有した培地が極めて悪かつたため、また30%の血液量のものは馬鈴薯量50gの

表10 H<sub>37</sub>Rv株 21日後

| 馬鈴薯(g)   | 0  |   |    |    | 10 |   |    |    | 30 |    |    |    | 50 |    |    |    | 3%<br>小川 |    |
|----------|----|---|----|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----------|----|
| グリセリン(%) | 0  | 2 | 4  | 8  | 0  | 2 | 4  | 8  | 0  | 2  | 4  | 8  | 0  | 2  | 4  | 8  |          |    |
| 血液(%)    | 10 | 0 | 0  | 6  | 4  | 1 | 3  | 7  | 4  | 0  | 6  | 9  | 4  | 0  | 6  | 2  | 0        | 5  |
|          |    | 5 | 0  | 8  | 2  | 5 | 4  | 9  | 6  | 4  | 6  | 7  | 4  | 0  | 3  | 2  | 0        | 4  |
|          |    | 0 | 2  | 11 | 9  | 9 | 2  | 11 | 4  | 6  | 2  | 4  | 0  | 6  | 4  | 2  | 0        | 12 |
| 平均       | 2  | 1 | ⑧  | 5  | 5  | 3 | ⑨  | 5  | 3  | 5  | ⑦  | 3  | 2  | 4  | 2  | 0  | 7        |    |
| 血液(%)    | 20 | 0 | 10 | 1  | 9  | 5 | 11 | 18 | 11 | 5  | 11 | 7  | 2  | 11 | 11 | 12 | 6        |    |
|          |    | 0 | 13 | 2  | 7  | 4 | 10 | 13 | 8  | 8  | 12 | 7  | 4  | 7  | 12 | 10 | 0        |    |
|          |    | 0 | 5  | 0  | 5  | 1 | 11 | 6  | 17 | 1  | 1  | 10 | 8  | 9  | 9  | 8  | 1        |    |
| 平均       | 0  | ⑩ | 1  | ⑦  | 3  | ⑪ | ⑫  | ⑫  | 5  | ⑬  | ⑭  | 5  | ⑮  | ⑯  | ⑰  | 2  |          |    |
| 血液(%)    | 30 | 6 | 12 | 11 | 8  | 8 | 2  | 30 | 17 | 15 | 25 | 14 | 17 | 1  | 10 | 4  | 9        |    |
|          |    | 9 | 0  | 16 | 14 | 9 | 2  | 25 | 14 | 5  | 29 | 14 | 13 | 2  | 9  | 4  | 8        |    |
|          |    | 8 | 4  | 6  | 11 | 7 | 5  | 20 | 14 | 11 | 24 | 21 | 12 | 12 | 8  | 8  | 10       |    |
| 平均       | ⑧  | 5 | ⑪  | ⑪  | ⑬  | 3 | ⑮  | ⑮  | ⑰  | ⑱  | ⑲  | ⑲  | 5  | ⑳  | 5  | ㉑  |          |    |

表11 H<sub>37</sub>Rv株 28日後

| 馬鈴薯(g)   | 0  |    |    |    | 10 |    |    |    | 30 |    |    |    | 50 |    |    |    | 3%<br>小川 |    |
|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----------|----|
| グリセリン(%) | 0  | 2  | 4  | 8  | 0  | 2  | 4  | 8  | 0  | 2  | 4  | 8  | 0  | 2  | 4  | 8  |          |    |
| 血液(%)    | 10 | 7  | 10 | 7  | 5  | 8  | 5  | 11 | 7  | 4  | 8  | 10 | 8  | 3  | 8  | 2  | 3        | 5  |
|          |    | 6  | 3  | 8  | 3  | 8  | 4  | 10 | 8  | 6  | 8  | 7  | 6  | 2  | 7  | 4  | 2        | 12 |
|          |    | 11 | 8  | 12 | 7  | 15 | 8  | 15 | 5  | 10 | 3  | 5  | 5  | 8  | 7  | 2  | 3        | 9  |
| 平均       | ⑧  | 7  | ⑩  | 5  | ⑩  | 6  | ⑫  | 7  | 7  | 6  | 7  | 6  | 4  | 7  | 3  | 3  | 9        |    |
| 血液(%)    | 20 | 3  | 14 | 3  | 10 | 5  | 15 | 20 | 10 | 8  | 10 | 8  | 6  | 17 | 10 | 11 | 10       |    |
|          |    | 7  | 18 | 6  | 14 | 6  | 11 | 13 | 12 | 9  | 12 | 8  | 8  | 15 | 12 | 12 | 3        |    |
|          |    | 7  | 12 | 4  | 14 | 2  | 13 | 10 | 21 | 9  | 5  | 11 | 14 | 12 | 13 | 8  | 4        |    |
| 平均       | 6  | ⑮  | 4  | ⑮  | 4  | ⑮  | ⑮  | ⑮  | ⑲  | ⑲  | ⑲  | ⑲  | ⑮  | ⑮  | ⑮  | 6  |          |    |
| 血液(%)    | 30 | 10 | 12 | 13 | 18 | 11 | 4  | 30 | 17 | 20 | 25 | 13 | 18 | 11 | 10 | 7  | 11       |    |
|          |    | 13 | 8  | 16 | 14 | 9  | 3  | 26 | 13 | 12 | 26 | 16 | 16 | 7  | 11 | 6  | 14       |    |
|          |    | 11 | 4  | 10 | 11 | 8  | 5  | 17 | 13 | 13 | 24 | 22 | 15 | 13 | 9  | 14 | 13       |    |
| 平均       | ⑮  | ⑮  | ⑮  | ⑮  | ⑲  | 4  | ⑲  | ⑲  | ⑮  | ⑲  | ⑲  | ⑲  | ⑮  | ⑮  | ⑲  | ⑮  |          |    |

表12 H<sub>37</sub>Rv株

| 要因       | 変動   | 自由度 | 不偏分散 |    |
|----------|------|-----|------|----|
| 馬鈴薯(P)   | 205  | 3   | 68   | ** |
| 血液(B)    | 1040 | 2   | 520  | ** |
| グリセリン(G) | 70   | 3   | 23   |    |
| P×B      | 378  | 6   | 63   | ** |
| B×G      | 233  | 6   | 39   | ** |
| G×P      | 560  | 9   | 62   | ** |
| P×B×G    | 815  | 18  | 45   | ** |
| R(PBG)   | 817  | 96  | 9    |    |
| 計        | 4116 | 143 |      |    |

培地が非常に悪かつたために前記の成績を示したのである。これらはもちろん表8, 9を見れば明らかである。グリセリンを(その3), (その4)について見ると8%の方が4%より遥かに良い。特に(その3)において馬鈴薯が10gおよび30gのもの、(その4)では血液量が10%のものが最も良い。推計学的処理においても同様の成績を得た。次にH<sub>37</sub>Rv株について述べると、本株は培養後21日に漸く集落の比較ができる程度に発育したので21日と28日の集落数について検討した。前者は表10に後者は表11に示されている。各表の平均値に丸が附してあるのはH<sub>2</sub>株の場合と同様に対照の3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>培地に匹敵するかまたはそれ以上により、培地を示すものである。これについて2つの表を比較するとH<sub>2</sub>株の時とは反対に28日の方が21日のそれよりも培地の数が増加している。また血液の含有量が多くなるに従って培地の集落数も増加していることがわかる。28日後の集落数を繰り返しの多元配置法により処理すると表12の如くグリセリンを除いてはすべて1%以下の危険率で有意の差を示した。これをH<sub>2</sub>株の場合と同様な方法で分析すると表13の(その1)~(その4)となる。(その1)は表11の各培地の集落数より8を引いて3本の試験管の集落数の和を示したもので、血液量の増加と共に培地の集落数も増加している。これは前にも述べたが推計学的処理でも同様の成績を得た。次に各数値に丸を附してあるのは、表11において丸を附してある

表 13 H<sub>37</sub>Rv 株 (その 1)

| 馬鈴薯 (g)   |    | 0  |    |     |    | 10  |     |    |    | 30 |    |    |    | 50 |    |     |     | 和   | 3%<br>小川 |
|-----------|----|----|----|-----|----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|----------|
| グリセリン (%) |    | 0  | 2  | 4   | 8  | 0   | 2   | 4  | 8  | 0  | 2  | 4  | 8  | 0  | 2  | 4   | 8   |     |          |
| 血液 (%)    | 10 | ①  | -3 | ③   | -9 | ⑦   | -7  | ⑩  | -4 | -4 | -3 | -2 | -5 | 11 | -2 | -16 | -16 | -60 | 2        |
|           | 20 | -7 | ⑥  | -11 | ⑬  | -11 | ⑮   | ⑱  | ⑲  | ⑳  | ㉑  | ㉒  | ㉓  | ㉔  | ㉕  | ㉖   | -7  | -7  |          |
|           | 30 | ⑭  | ⑰  | ⑲   | ⑳  | ㉑   | -12 | ㉒  | ㉓  | ㉔  | ㉕  | ㉖  | ㉗  | ㉘  | ㉙  | ㉚   | ㉛   | 14  |          |
| 和         |    | 5  | 17 | 7   | 24 | 0   | -4  | 80 | 34 | 19 | 49 | 28 | 24 | 16 | 15 | -6  | -9  | -9  |          |

(その 2)

(その 3)

(その 4)

| 馬鈴薯 (g) | 0 10 30 50 |    |     |     | 和   | 馬鈴薯 (g) | 0 10 30 50 |     |     |    | 和   | グリセリン (%) | 0 2 4 8 |        |    |     | 和   |     |     |     |
|---------|------------|----|-----|-----|-----|---------|------------|-----|-----|----|-----|-----------|---------|--------|----|-----|-----|-----|-----|-----|
|         | 0          | 10 | 30  | 50  |     |         | 0          | 10  | 30  | 50 |     |           | 0       | 2      | 4  | 8   |     |     |     |     |
| 血液 (%)  | 10         | -9 | 8   | -14 | -45 | -60     | グリセリン (%)  | 0   | 5   | 0  | 19  | 16        | 38      | 血液 (%) | 10 | -8  | -15 | -3  | -34 | -60 |
|         | 20         | 16 | 42  | 12  | 31  | 101     | 2          | 17  | -4  | 49 | 15  | 77        | 20      | 4      | 49 | 18  | 30  | 101 |     |     |
|         | 30         | 44 | 60  | 122 | 30  | 256     | 4          | 7   | 80  | 28 | -6  | 109       | 30      | 42     | 43 | 94  | 77  | 256 |     |     |
| 和       |            | 51 | 110 | 120 | 16  | 297     | 8          | 24  | 34  | 24 | -9  | 73        | 和       | 38     | 77 | 109 | 73  | 297 |     |     |
|         |            |    |     |     |     | 和       | 51         | 110 | 120 | 16 | 297 |           |         |        |    |     |     |     |     |     |

もので図示する如く31種類の培地がこれに該当する。これを対照の3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地を加えて一元配置法で処理すると1%以下の危険率で有意の差を示し、最も集落数の多い49の数値を示す2種類の培地を除いても5%以下の危険率で有意の差を示した。それでさらにこれを分析して0~20の数値の培地27種類について検討すると有意の差がない。また21以上の数値を示す培地についても43の数値を示す2種類の培地を除くと有意の差がなかった。すなわち馬鈴薯量が30gで血液を30%含有するものが最も良いことになる。(その2)では馬鈴薯量10gの所が他のものに比較して平均して集落数が多く、馬鈴薯量30gでは血液量30%において断然他を引き離して集落数が多い。これは(その1)の表においても明らかである。推計学的検討では馬鈴薯量10gと30g間では有意の差がなく、0gと50gでは有意の差を示した。すなわち10g~30gの馬鈴薯量が最も良いように思われる。次に

グリセリンについて見ると(その3)の表で馬鈴薯量が10g~30gの所ではグリセリンが2~8mlにおいて非常に集落数が多く、(その4)でも血液量が20%~30%の所ではやはりグリセリンが2~8mlにおいて極めて発育が良い。これは表12で述べたように、他の因子を無視してグリセリンのみを検討した時には僅かの差で有意の差を示さなかつたが、グリセリンと馬鈴薯および血液との交互作用を検討すると高度に有意の差を示すことから考えても明らかである。次に各種培地のpHは表14に示す通りで馬鈴薯およびグリセリンはpHにはほとんど影響がなく、血液量のみが影響することがわかる。そうして培養前では血液量が20%~30%ではpHがあまり変わらないように思われる。また培養後1ヵ月では3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地より多少アルカリ性に傾いていた。また集落の大きさは、第1報では馬鈴薯を加えた方が遥かに大であつたが本実験ではそれ程著明ではなかつた。

表 14 各 種 培 地 の pH

| 血液 (%) | 培養 | 馬鈴薯 (g) |     |     |     | 0   |     |     |     | 10  |     |     |     | 30  |     |     |     | 50  |  |  |  | 3%<br>KH <sub>2</sub><br>PO <sub>4</sub> |
|--------|----|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
|        |    | 0       | 2   | 4   | 8   | 0   | 2   | 4   | 8   | 0   | 2   | 4   | 8   | 0   | 2   | 4   | 8   |     |  |  |  |  |
| 10     | 前後 | 6.0     | 5.8 | 6.0 | 5.8 | 5.8 | 5.8 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 5.8 | 5.8 | 6.0 | 5.8 | 5.8 | 5.8 | 6.0 | 6.2 |  |  |  |  |
|        |    | 6.4     | 6.6 | 6.6 | 6.6 | 6.4 | 6.6 | 6.6 | 6.6 | 6.6 | 6.6 | 6.6 | 6.8 | 6.6 | 6.8 | 6.6 | 6.6 | 6.4 |  |  |  |  |
| 20     | 前後 | 6.0     | 6.2 | 6.2 | 6.2 | 6.2 | 6.0 | 6.2 | 6.2 | 6.0 | 6.0 | 6.2 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.2 | 6.2 |     |  |  |  |  |
|        |    | 6.4     | 6.6 | 6.6 | 6.6 | 6.6 | 6.6 | 6.6 | 6.6 | 6.6 | 6.6 | 6.6 | 6.6 | 6.8 | 6.6 | 6.8 | 6.6 |     |  |  |  |  |
| 30     | 前後 | 6.2     | 6.2 | 6.2 | 6.4 | 6.2 | 6.4 | 6.2 | 6.4 | 6.2 | 6.0 | 6.2 | 6.2 | 6.2 | 6.2 | 6.4 | 6.2 |     |  |  |  |  |
|        |    | 6.8     | 6.8 | 6.6 | 6.6 | 6.6 | 6.6 | 6.8 | 6.6 | 6.8 | 6.6 | 6.8 | 6.6 | 6.8 | 7.0 | 6.8 | 7.0 |     |  |  |  |  |

## 総括および考察

第1報に引き続いて今回は NaOH 水で前処理したものを培養する場合の培地の改変について実験を行つたのであるが、まず1% NaOH 水で前処理したものは  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を添加しない P B G 培地に培養するのが、培養前の培地の pH が 6.6~6.8 で中性に近く成績も最も良く、4% NaOH 水で前処理したものを培養する時は培地の pH をさらに酸性にして3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  培地の pH と同値の 6.2 にした場合が最も良好であることがわかつた。これは小川<sup>1)</sup>が行つた  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  培地における研究<sup>4)</sup>でも明らかな通り、培地の pH が中性に近い時には濃度の低い NaOH 水で前処理したものを、より酸性になるに従つて濃度の高い NaOH 水で前処理したものを培養する方が良いことを示している。

次に  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を 0.4% 添加した P B G 培地で、その成分の馬鈴薯、グリセリンおよび血液等について検討を行つた。特に馬鈴薯は第1報<sup>1)</sup>で既に 23g~38g 添加するのが最も良いと述べたが、培地をより酸性にした場合もその含有量に変化がないかどうかを再吟味するために追試を行つたわけである。その結果は第1報の成績と大差なく 10g~30g が最も良いことがわかつた。これを容量%で表わすと 10g の場合は含有血液量が 10%~30% と変化しているので 7%~9% となり、30g の場合は同様に 21%~27% となる。グリセリンについてみると  $\text{H}_2$  株では 8% が断然良く、 $\text{H}_{37}\text{Rv}$  株では 2%~8% が断然良かった。Tarshis<sup>5)</sup>によれば、グリセリンを 1% 添加する時には、しない場合よりも菌の発育は良いが 3% にした場合はかえつて発育が悪くなると述べている。筆者の実験では加えた方が加えない場合よりもよい成績をえているので、グリセリンを 2%~8% 添加した方が良くと思う。血液量についてみると、 $\text{H}_2$  株では 10% と 30% が同程度に良く、 $\text{H}_{37}\text{Rv}$  株では血液量の 30% が最も良かった。宇野<sup>6)</sup>は血液量を 15% に迄減量できると述べているが、筆者の実験においても前記の如く、 $\text{H}_2$  株では 10% でも 30% と同程度に発育が良かった。しかしこの量をあらゆる結核菌の分離培地に適用できるか否かということになるといささか疑問の点があるのではないかと思う。 $\text{H}_{37}\text{Rv}$  株の成績から考えても血液量は 30% にした方が無難ではないかと思う。次に馬鈴薯およびグリセリンの添加量に相当に幅があることがわかつたが、これは結核菌の発育要素の量は、決して厳密に決められるものでなく、ある程度幅を持つことを如実に示しているものだと思う。そうしてこのことは結核菌のみでなく他の細菌についても言えるのではないかと思う。

さて従来の培地の改良に関する研究においては、その必要な成分について、一度に各種濃度においてしかもそれぞれの成分の相互作用をも検討考察する方法があまり

なされていないようである。筆者は本題目の研究を、いわゆる一元配置法および多元配置法の実験計画法を用いて先に述べたことを幾分でも満たそうと考えて本実験を行つたわけであるが、その結果は実験成績に示される如くある程度満足な成績を得たのではないかと思う。例えば Tarshis<sup>7)</sup>の発表した培地には馬鈴薯が全然添加されていないが、本実験においても馬鈴薯量が 0g でも相当に菌の発育が良い培地があることがわかつた。しかし本実験成績から明らかな通り、また続木<sup>8)</sup>も述べるように馬鈴薯は 10g~30g 加えた方がよいように考えられる。ただ本実験法は数多くの菌についてできない憾みがあるので、代表菌株の  $\text{H}_2$  株および  $\text{H}_{37}\text{Rv}$  株について行つた。今後、今回の実験成績を基として実際の喀痰からの分離培養について検討したいと考えている。

本実験で馬鈴薯、グリセリンおよび血液を種々の濃度に加えた48組の培地に小川<sup>9)</sup>の研究から考察して全卵を加えた方が良いのではないかと思ひ、よく攪拌した全卵を無菌的に各種培地に 10% 宛加えたものを、さらに作製して同時に実験を行つたが、これらの培地は全然全卵を加えない培地に比較して極めて菌の発育が悪かつたので実験成績も省略した。Tarshis<sup>5)</sup>も Bordet-Gengou の培地に 25% の卵黄を加えて実験を行い、やはり卵黄を加えないものより悪かつたと述べている。

## 結 論

第1報に引き続いて 4% NaOH 水で前処理したものを培養することができるように P B G 培地をさらに改変する目的で本実験を行つた。その結果  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を 0.4% 添加すればよいことがわかつた。次に P B G 培地の成分の馬鈴薯、グリセリンおよび血液について検討を行つた所、馬鈴薯量は第1報と大差なく水道水 100ml に対して 10g~30g 加えて馬鈴薯エキスを作り、これに培地全体に対してグリセリンを 2%~8%、血液を 30% それぞれ添加し 1.5% 量の寒天で固めた培地が最も良く、かつ 3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  培地と比較してこれに劣らないばかりか、これよりも優れていることがわかつた。

本研究は文部省の科学助成補助金によつた。ここに謝意を表す。

本研究の御校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。

## 主 要 文 献

- 1) 杉田：結核に掲載予定
- 2) 増山：実験計画法大要，26，学術図書出版社，東京，1949。
- 3) 高橋他：医学及び生物学研究者の為の推計学入門，120，医学書院，東京，1951。

- 4) 小川 : 結核, 24: 403, 1949.
- 5) Tarshis et al. : Am. J. Clin. Pathol., 21, 101, 1951.
- 6) 宇野 : 結核, 30: 12, 1955.
- 7) Tarshis et al. : Am. J. Clin. Pathol., 23, 661, 1953.
- 8) 続木他 : 結核, 29: 23, 1954.
- 9) 小川他 : 結核, 24: 144, 1949.
- 10) Tarshis : J. Bact., 66, 448, 1953.