

Tween 寒天培地による人型結核菌の生菌計算の研究

第2報 混釈平板法および表面平板法による生菌計算の比較

後 藤 瀬 平

福島県立医科大学細菌学教室 (指導 助教授山根績)

受付 昭和 32 年 5 月 21 日

緒 言

著者は第1報¹⁾において、粉末化 Tween 寒天培地平板を用いて、H₃₇Rv株および患者の喀痰より分離した保存人型結核菌の生菌計算を行い、小川培地による成績と比較検討した結果、粉末化 Tween 寒天培地の方が小川培地に比べて遙かに優つてゐることを述べた。第1報においては、粉末化 Tween 寒天培地の混釈平板法を用いたが、米国等においては例えば、F. Fenner²⁾らは表面平板法を用いてゐるので、著者は両方法を比較しいずれが優秀であるかを知るため、小川培地を対照として、myco. tuberculosis H₃₇Rv 株および保存人型結核菌24株について実験を行つたのでその成績を報告する。

実験方法

実験に供した菌株は、小川培地に継代培養されている myco. tuberculosis H₃₇Rv 株および結核患者の喀痰から分離した24例の保存結核菌である。まず結核菌の培養法および結核菌浮游液の作製であるが、これは第1報と同様である。次に結核菌浮游液の稀釈法であるが、混釈平板法においては菌浮游液を、Tween 80 を0.05%の割合に含む滅菌生理的食塩水をもつて10万倍、100万倍、1,000万倍と稀釈し、その0.5ml、0.2ml、0.1mlをそれぞれ接種培養した。表面平板法においては上記の如く、3段階に稀釈した菌浮游液を、0.5mlずつ、凝固した粉末化 Tween 寒天培地平板2枚に静かに注加し、寒天表面に均等になるように塗布し培養した。小川培地においては上記3段階の菌浮游液を0.1mlずつ、中試験管3本に接種37°Cに培養し、逐目的に集落数を計算した。(表1)は当教室分離第18株を用いて行つた培養19日の成績を、各「シャーレ」について具体的に示したものであり、最右側に示した1mg当りの菌数は各稀釈度成績を原液に還元したものの平均値である。生菌計算は培養後一般に12日目より始め約1ヵ月間行い、菌量は各例共第1報におけると同様その含窒素量から逆算した乾燥量をもつて表わした。なお喀痰中の結核生菌の計算をも混釈および表面平板法により行つたが、喀痰の処理、稀釈法、培養法等の詳細は第3報に記載する予定である。

表1 混釈および表面平板法による培養法

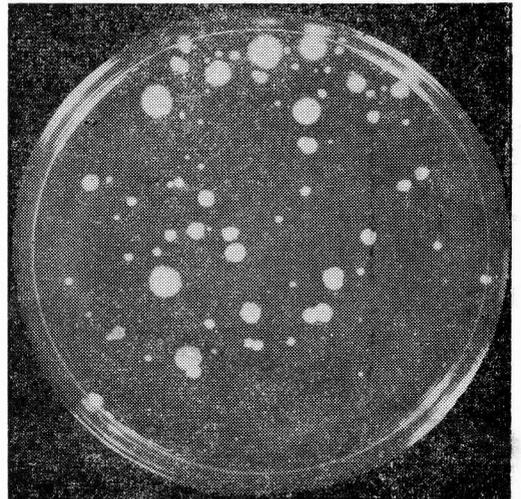
培地名	接種菌量 (ml)	稀釈度			1mg 中の平均菌数	
		10 万	100 万	1,000 万		
Tween 寒天培地	混釈 平板法	0.5	418	56	11	9,519
		0.2	208	18	4	
		0.1	109	20	1	
	表面 平板法	0.5	360	52	3	7,437
		0.5	358	43	12	
		0.1	25	2	0	
小川培地	0.1	30	1	0	1,420	
	0.1	25	0	0		
	0.1	25	0	0		

〔備考〕 1. 本表は培養19日目の成績である

2. 使用菌株は第18株(乾燥量1.42mg)で対照として小川培地を用いた

実験成績

粉末化 Tween 寒天培地は第1報において述べた如く透明であるため、生菌計算は簡単で正確である。混釈平板法においては集落は小さいが均等に発育し、日数が経過してもなかなか大きくならず癒合もしないので、1



〔附図 1〕

カ月間は正確に計算可能である。これに反し、(附図1)に見られるように表面平板法においては、集落は最初から比較的大きいが一般に均一に発育し難く、日数の経過に伴いますます大きくなり、容易に癒合し、集落の多い場合は計算不能になる場合が多く、しかも集落は「シャーレ」の辺縁に発育し易い。一般に混積平板法においては培養後11~12日ごろより集落を認めることができ、急速に増加し20日ごろ最高に達し、表面平板法においては培養後10~11日ごろより集落を認めることができ、その後急速に増加し19~20日ごろ最高に達し、以後増加の傾向をほとんど示さない。すなわち表面平板法においては混積平板法によるよりも、一般に幾分早く集落を認め、かつやや早く最高に達する傾向を示すが、生菌数においては混積平板法の方が一般に多い。(表2)は培養日数に

図1 H₃₇Rv株

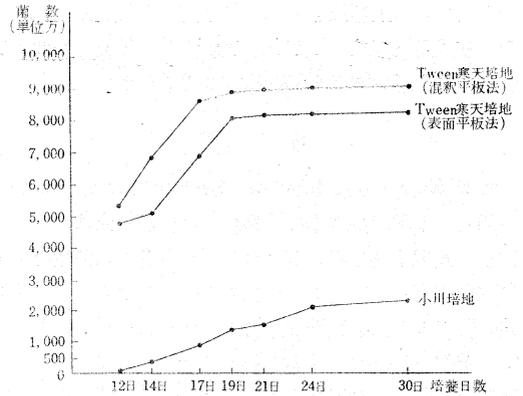


図2 第18株

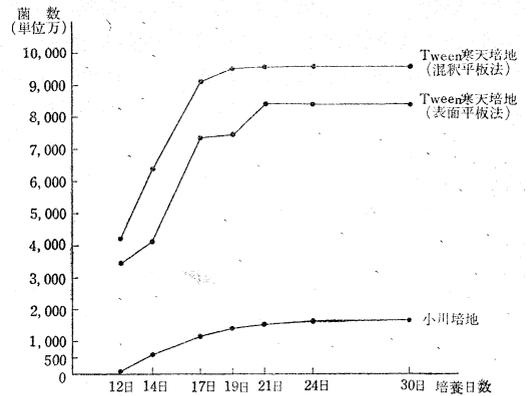


表2 培養日数に伴う1mg中の生菌数(単位万) 第18株

培養日数		12日	14日	17日	19日	21日	24日	30日
Tween寒天培地	混積平板法	4,224	6,348	9,107	9,519	9,541	9,544	9,544
	表面平板法	3,488	4,115	7,366	7,437	8,427	8,427	8,427
小川培地		117	516	1,246	1,420	1,514	1,608	1,679

H₃₇Rv 株

培養日数		12日	14日	17日	19日	21日	24日	30日
Tween寒天培地	混積平板法	5,366	6,851	8,585	8,944	8,952	8,952	8,952
	表面平板法	4,783	5,075	6,963	8,111	8,150	8,150	8,150
小川培地		140	447	867	1,443	1,565	2,132	2,281

伴う1mg中の生菌数の比較を示す例(H₃₇Rv株および当教室分離の第18株)であるが、混積、表面両平板法共、培養12日目に集落を認め、その後急速に増加し21日目に最高に達している。生菌数は混積平板法の方が多い。これに対して、小川培地では極めて早いもので培養後12~

14日ごろ漸く集落を認めることができ、日を追うて徐々に増加し、30日ごろ最高に達している。(図1)(図2)はH₃₇Rv株および当教室分離の第18株の混積、表面両平板法による菌の増殖状態を逐日的に図で示したものである。(表3)はH₃₇Rv株および被検24株の1mg中の生菌数を比較するもので、菌数はいずれも培養期間中最も多い場合の生菌数を表わすものであつて、被検24株中18株混積平板法の方が多く、8例中1例だけ小川培地の方が

表3 1mg中の生菌数の比較(単位万)

培養別	実験例												
	H ₃₇ Rv	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
混積平板法	8,952	5,090	2,106	1,566	10,909	2,392	928	862	2,255	4,060	5,742	4,431	1,297
表面平板法	8,150	3,249	2,505	1,597	7,922	866	529	245	835	1,912	3,671	3,437	1,534
小川培地	2,281	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

培養別	実験例												
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	平均
混積平板法	4,288	4,090	4,979	2,607	6,959	9,544	1,307	1,628	595	768	16,578	2,173	4,047
表面平板法	3,403	4,339	3,388	1,749	9,077	8,427	3,152	1,612	211	376	12,826	1,195	3,252
小川培地	—	—	17	260	2,620	1,679	—	615	98	4,394	—	383	—

〔備考〕 □印は表面平板法の方が生菌数の多いことを示す

混積，表面両平板法より多い。以上保存人型結核菌24株の1mg中の生菌数を平均すれば，混積平板法では4,047万，表面平板法では3,252万であつて，混積平板法の方が多く，H₃₇Rv株でも混積平板法の方が多い。

考 案

最近 Knoxら³⁾は Kirchner Sy-Ser培地に少量の寒天を加えた半凝固培地中で，微量の結核菌を発育せしめ，従来の固型培地を用いるよりも，より多数の集落を培養早期に発育せしめることを報告した。しかし，かれらの試験管による生菌計算は，管内における培地の量によつて，発育菌数がかかなり動揺することを示した。そこで Selkonら⁴⁾は，Middlebrookら⁵⁾が用いた7H-3液体培地にシリカを微量加えた1種の半凝固培地を作り，同培地中で集落を発育せしめるいわゆる deep countにより，Kirchner 改変培地よりも，より多くの菌数を発育せしめることを報告した。しかし Knox ら，Selkon らの培地は，いずれも血清または血清アルブミン等を含有しているため，これらの成分は他の培地成分と別個に濾過滅菌後，無菌的にこれに添加する必要がある。このような操作は煩瑣であり，routine laboratory workとしては，雑菌混入の危険をより高くするものである。著者の第1報より使用している培地は，粉末化されており，その全成分が120°C 20分の高圧滅菌に堪えるので，用に応じて溶解使用できるので前記2培地よりも実用的で便利である。著者は本報で粉末化 Tween寒天培地を用い myco. tuberculosis H₃₇Rv 株および保存株について，混積，表面両平板法により生菌数を比較したのであるが，その結果混積平板法では一般に11~12日ごろより，表面平板法では10~11日ごろより集落を認めることができ，その後両者共急速に増加するが，表面平板法ではやや早く最高に達する傾向がある。混積平板法と言つても，平板を上層，中層，下層と3層に分ければ，上層いわゆる表面では，表面平板法と同日数で発育し，中層，下層では幾分発育が遅れる。次に被検全株の成績を平均した1mg中の生菌数であるが，混積平板法の方が断然多かつた。しかし表面平板法においては，Tween 寒天培地に菌浮游液を注加し，水平の台に載せて培養するのであるが，どうしても少し傾くので「シャーレ」の辺縁に流れ易

く，したがつて集落も辺縁に多数現われ，しかも急速に増大し，かつ癒合する傾向が強いで計算不能となる結果，生菌数も見かけ上少なくなることがあり，したがつて数字に現われたほど生菌数は少なくないと思考せられる。それ故表面平板法を用いる場合には，正確に水平の台の上に載せて培養することが肝要であろう。なお菌株により生菌数に相当の差異を生じているが，これが原因については目下研究中である。

結 論

1. 混積平板法においては，培養後一般に11~12日目ごろより集落を認めることができ，その後急速に増加し，20日目ごろ最高に達するが，集落は癒合しない。これに対して，表面平板法においては培養後10~11日目ごろより集落が現われ，急速に増大し，各集落は癒合し易く，18~19日目ごろ最高に達することが多く，培養20日以後は両者共ほとんど増加の傾向を示さない。

2. 被検24株中18株は混積平板法の方が生菌数が多く，6株は少なく，被検全株の平均1mg中の生菌数は混積平板法の方が遙かに多い。それ故，人型結核菌の早期発見には表面平板法，長期間の生菌計算には混積平板法が適当と思考せられる。

3. 本培地を用いる表面，混積両平板法による生菌計算は，いずれも一般に小川培地による成績よりも優秀である傾向を示した。

稿を終るに臨み，懇切なる御指導御校閲を賜つた恩師山根助教授に深謝すると共に，御協力下さつた教室員兵藤三郎氏に謝意を表する。

文 献

- 1) 後藤順平：結核 (1957掲載予定)
- 2) Fenner, F. : Am. Rev. Tbc., 64: 353, 1951.
- 3) Knox, R. et al. : J. gen. microbiol., 15: 359, 1956.
- 4) Selkon, J.B. and Mitchison, D.A. : J. gen. microbiol., 16: 229, 1957.
- 5) Middlebrook, G. et al. : Am. Rev. Tbc., 70: 852, 1954.