

## Tween 寒天培地による人型結核菌の生菌計算の研究

## 第3報 喀痰中の生菌計算

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 6 月 17 日

## 緒 言

著者は第1報、第2報<sup>1)</sup>においては、Myco. tuberculosis H<sub>37</sub>Rv 株および結核患者の喀痰より分離した保存人型結核菌株について、すなわち小川培地、あるいは粉末化 Tween 寒天培地に継代培養され、さらに Tween 80 を炭素源とする均等培養培地に培養され、培地に馴れた結核菌について生菌計算を行つたが、本報においては、肺結核患者の喀痰そのままを粉末化 Tween 寒天培地および小川培地に培養し、果して保存人型結核菌株と同様の成績が得られるか否かを比較検討した。まず喀痰の塗抹標本にて、結核菌陽性の喀痰群について、次で陰性の喀痰群について、生菌計算を行つたのでその成績を報告する。

## 実験方法

目下福島医大附属病院に入院、抗結核剤を使用している肺結核患者の喀痰を実験に供した。材料処理法としては、喀痰を中試験管に約3ml取り、これに等量の8%NaOHを加え、よく振盪して均等化し、pH指示薬BTB溶液を数滴加え、約40分室温に放置し、さらにこれに4NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を8%NaOHの半分量を加えて中和した。次で処理した患者の喀痰を、粉末化 Tween 寒天培地に培養した場合、果して何日後に結核菌が発育するか、またどの位の生菌数が発生するかを知るため、第1回の実験では結核菌塗抹陽性の喀痰11例について、粉末化 Tween 寒天培地のみを用いて実験を試みた。すなわち中和した喀痰そのまま、および改変 Y.M.Y. 培地<sup>2)</sup>で10倍、100倍、1,000倍と喀痰を3段階に稀釈し、その各喀痰を0.5mlずつ、表面平板法により、粉末化 Tween 寒天培地平板各2枚に静かに注加、37°Cに培養し逐目的に生菌計算を行つた。第2回の実験では結核菌塗抹陰性の喀痰10例について、第1回の実験同様の実験を行つた。この両実験により、著者は喀痰そのままを粉末化 Tween 寒天培地に培養しても、保存菌株とはほぼ同様の成績を得られる確信を得たので、第3回の実験では、福島医大病院に入院中の結核菌塗抹陽性者の喀痰26例について、第1回の実験の如く、中性にした喀痰そのまま、10倍、100倍、1,000倍稀釈の喀痰の4種類を、粉末化 Tween 寒天培地

平板おのおの2枚に、表面平板法により0.5mlずつ注加し、一方小川培地では、3本の中試験管に0.1mlずつ塗布し、37°Cに培養逐目的に生菌計算を行つた。さらに塗抹陽性26例中15例について、第2報にならぬ、粉末化 Tween 寒天培地の混釈および表面平板法を行い、小川培地と比較検討した。第4回の実験では、健保福島療養所羽山荘に入院加療中の塗抹陰性者で、過去の検査成績で微量排菌者と推定される患者喀痰100例について、第3回と同様の実験を行つた。

## 実験成績

第1回の実験においては、喀痰をNaOH、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で処理した際、pHに余り関心をを用いず、ただ単に中性附近という程度で喀痰を処理したので、興味ある種々の成績が得られた。

いまこの成績をA、B、Cの3群に区別することとした。A群は粉末化 Tween 寒天培地が強度に青変した。すなわち処理した喀痰がpH 6.0以下であつた。B群は粉末化 Tween 寒天培地が軽度に青変した。すなわち処理した喀痰が弱酸性であつた。C群は粉末化 Tween 寒天培地が全く変色せず、Tween 寒天培地本来の色調を帯びていた。すなわち処理した喀痰は中性か、弱アルカリ性であつた。

A群に属する Tween 寒天培地では、集落は全く認められなかつた。これは結核菌の発育が、完全に阻止せられたことを示すものである。第1例(Gaffky 9号)、第2例(Gaffky 8号)、第3例(Gaffky 4号)、第5例(Gaffky 3号)、第6例(Gaffky 6号)、以下 Gaffky はGと略す。B群に属する Tween 寒天培地では、喀痰そのままを培養した場合は、集落は全然認められなかつたが、10倍、100倍、1,000倍と稀釈した平板培地では、[表1]に示す如く、保存菌株と同様、第4例では培養18日目に、第7例では15日目に集落が認められ、最初急速に、次で徐々に増加し、約30日で最高に達している。第4例(G 9号)、第7例(G 3号)。C群に属する Tween 寒天培地では、[表1]に示す如く、第11例を除くほか、喀痰そのまま、10倍、100倍、1,000倍稀釈いずれの平板にも集落が認められた。すなわち第8、第9、第10例は、培養16日目に集落が認められ、第9、第10例は保存株の如く、最初急

[表1] 第1回の実験 B群

⑤	④	③	②	1						10 <sup>-1</sup>						10 <sup>-2</sup>						10 <sup>-3</sup>																
				13	15	18	20	22	25	28	30	13	15	18	20	22	25	28	30	13	15	18	20	22	25	28	30	13	15	18	20	22	25	28	30			
4	9	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	多数	無数	"	"	"	"	"	0	0	53	177	215	267	281	282	0	0	11	29	44	72	89	91
7	3	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	多数	無数	"	"	"	"	"	0	37	181	230	275	373	377	378	0	6	16	21	24	30	35	36

① 稀釈度, ② 培養日数, ③ 接種略痰量 ml, ④ G番号, ⑤ 略痰番号

C 群

⑤	④	③	②	1						10 <sup>-1</sup>						10 <sup>-2</sup>						10 <sup>-3</sup>															
				16	18	20	23	25	27	30	16	18	20	23	25	27	30	16	18	20	23	25	27	30	16	18	20	23	25	27	30						
8	2	0.5	67	74	85	83	83	83	83	39	47	47	47	47	48	48	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
9	4	0.5	無数	"	"	"	"	"	"	多数	"	"	"	"	"	"	52	116	189	324	355	378	381	3	17	20	25	30	31	32							
10	9	0.5	無数	"	"	"	"	"	"	多数	"	"	"	"	"	"	27	61	121	164	178	196	200	0	3	21	30	37	37	38							
11	9	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[備考] 1. Tween 寒天培地のみを使用す 2. G は Gaffkyを表わす

[表2] 第2回の実験

⑤	④	③	②	1						10 <sup>-1</sup>						10 <sup>-2</sup>						10 <sup>-3</sup>															
				14	16	19	21	23	27	30	14	16	19	21	23	29	30	14	16	19	21	23	29	30	14	16	19	21	23	29	30						
1	0	0.5	1	1	2	6	19	148	148	0	0	0	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0.5	0	24	44	48	48	48	48	0	1	1	1	1	1	1	0	0	27	67	149	260	260	2	5	8	23	43	53	53							
3	0	0.5	0	0	1	13	46	70	70	0	0	1	2	5	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0.5	26	322	414	486	536	561	566	3	38	58	74	88	96	99	0	5	7	9	9	9	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0.5	31	43	70	165	202	243	256	0	3	3	5	9	18	22	0	2	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0.5	0	1	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[備考] 1. Tween 寒天培地のみを使用す 2. 略痰番号4,7,8,10は培養陰性であった 3. G は Gaffky を表わす

速に、次で徐々に増加し、30日ごろ最高に達し、生菌数は稀釈度にほぼ比例している。第8例も培養後16日目に集落を認めたが、生菌数は稀釈度に比例していない。第11例では集落は全く認められなかつた。

第2回の実験においては、塗抹陰性10例中6例に集落の発生を見、その発育状態および生菌数は[表2]に示す如くであるが、培養14~16日より集落が認められ、急速にあるいは徐々に増加し、30日ごろ最高に達しているが、生菌数と稀釈度との関係はいろいろである。

第3回の実験においては、粉末化 Tween 寒天培地では、塗抹陽性26例中全例に、小川培地では25例に集落の発生を見た。いま培養後始めて集落を認めるまでの日数を調べて見ると、粉末化 Tween 寒天培地では培養後10日目が1例、11日目が2例、12日目が6例、14日目が14例、16日目が2例、20日目が1例で平均13.5日である。これに対して小川培地では、14日目が6例、16日目が8

例、18日目が9例、20日目が1例、26日目が1例で平均16.8日であるが、集落の全然認められないものが1例あつた。よつて粉末化 Tween 寒天培地の方が、小川培地より3.3日早期に集落を認めることができた。次に集落の発育増加の状態を見ると、粉末化 Tween 寒天培地では、急速に増加するものと、徐々に増加するものがあるが、一般に急速に増加するものの方が多く、また培養後20日頃最高に達するものもあるが、30日ごろ最高に達するものの方が多い。小川培地では集落発生後徐々に増加し、観察期間30日以後もさらに増加するものと考えられる。生菌数の点においても、粉末化 Tween 寒天培地の方が小川培地よりも多いが、略痰中に含有されている結核菌が、均等に稀釈されないため、生菌数と稀釈度とは比例するものと、比例しないものがある。したがつて生菌数は、保存菌株の如き正確さを望むことはできないし、Gaffky 番号も生菌数と必ずしも比例しない。

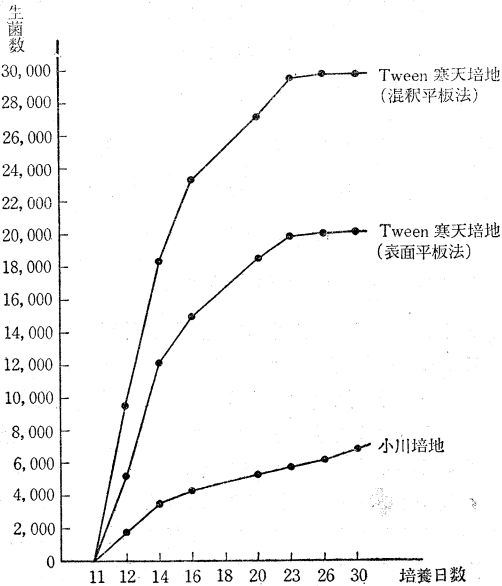
〔表 3〕 第3回の実験 培養日数に伴う喀痰0.5ml中の生菌数

喀痰番号	G番号	培養日数		11	12	14	16	20	23	26	30
		培地名									
26	6	Tween 寒天培地	混 釈	0	7,675	18,300	23,400	27,700	29,500	29,800	29,800
			表 面	12	5,190	12,100	15,000	18,500	19,900	20,000	20,000
		小川培地	0	0	3,500	4,300	5,200	5,700	6,050	6,900	

〔備考〕 1, 集落数が多数または無数で計算不能の場合は, 稀釈積数の多い処で生菌を計算して逆算せり 2, Gは Gaffkyを表わす

次に26例中15例について, 粉末化 Tween 寒天培地の表面, 混釈両平板法を行い, 対照として小川培地を用いて集落の発育状態および生菌数を比較検討した。本報では15例中喀痰番号第26について述べれば, 表面平板法においては培養11日目に, 混釈平板法においては12日目に集落を認め, その後急速に増加し, 両者共26日目に最高に達している。一方小川培地では14日目に集落を認め, その後徐々に増加し, 30日ごろ最高に達している。〔表3〕は喀痰番号第26の培養日数に伴う喀痰0.5ml中の生菌数を示すもので, これを図で示したものが〔図1〕である。これを見ても判るように, 喀痰のpHを正確に中性にして実験を行えば, 保存菌株とほぼ同様の成績が得られることは確実である。

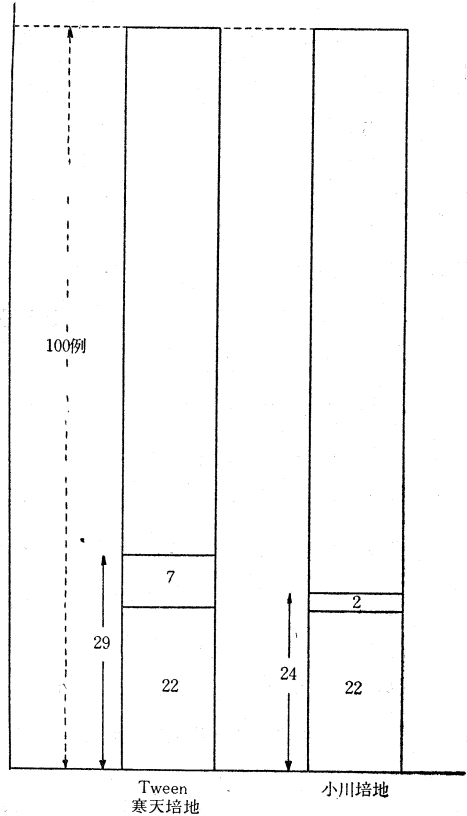
〔図 1〕 第3回の実験 喀痰中の結核生菌数の比較



〔備考〕 1. 喀痰番号26, Gaffky 6号 2. 表面平板法においては培養11日目にすでに12個の生菌を認めた

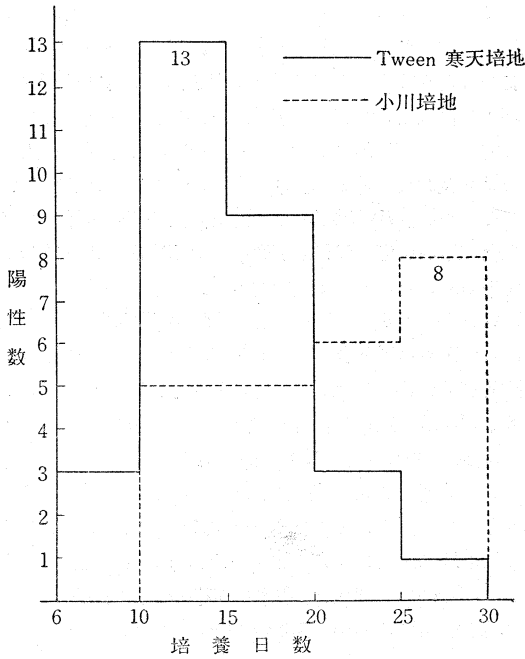
最後に第4回の実験においては, 塗抹陰性 100例中粉末化 Tween 寒天培地では29例, 小川培地では24例に集落の発育が認められ, そのうち両培地共通に集落を認めたものが22例で, 粉末化 Tween 寒天培地にのみ発育したものが7例, 小川培地にのみ発育したものが2例あつた〔図2〕。次に培養後集落を認めるまでの日数であるが,

〔図 2〕 第4回の実験

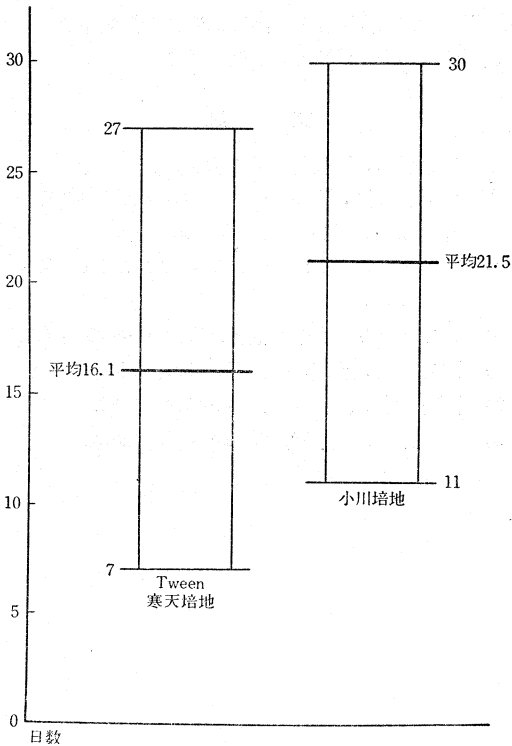


粉末化 Tween 寒天培地では培養後10日までが3例, 10~15日までが13例, 15~20日まで9例, 20~25日まで3例, 25~30日まで1例となり, 平均16.1日である。これに対して小川培地では, 培養後10日までは1例もなく, 10~20日まで5例, 20~25日まで6例, 25~30日まで8例で平均21.5日となり, 粉末化 Tween 寒天培地の方が5.4日早く集落が認められた〔図3, 図4〕。次に〔表4〕は両培地の生菌数を示すものであるが, 粉末化 Tween 寒天培地では, 100例中15例(平板数24枚)に無数の集落を認め, 14例(平板数24枚)に計算可能な集落(総数402個)を認めたので, 可数集落平均数は16.8個となる。小川培地では100例中6例(培地数26管)に無数の集落を認め, 18例(培地数26管)に計算可能な集落(総数221個)を認めたので, 可数集落平均数は 8.5個となり, 粉末化

〔図3〕 第4回の実験



〔図4〕 第4回の実験



Tween 寒天培地の方が8.3個多い。以上喀痰の塗抹陽性陰性にかかわらず、喀痰の pH を正確に中性にさえすれば、保存菌株と同様の成績が得られ、粉末化 Tween 寒天培地の方が、小川培地よりも早期に集落が発生し、か

〔表4〕 第4回の実験

	多数集落例	可数集落総数	可数集落平均数
Tween 寒天培地	24 枚 (15 例)	402 個 (24 枚) (14 例)	16.8 個
小川培地	12 管 (6 例)	221 個 (26 管) (18 例)	8.5 個

つ生菌数も多い。特に塗抹陰性の如き微量結核菌の検出には、粉末化 Tween 寒天培地は適当と思考せられる。

考 案

第1報、第2報で行った実験では、標準菌株および臨床分離株を、Tween 80 を炭素源とする液体培地<sup>2)</sup>に増菌培養したものを、Tween 寒天培地で Colony count を施行したものであり、したがって菌が Tween 80 に適応しているため、小川培地に比較して、Tween 寒天培地に優位の成績が出るという推測が一応成立する。しかし本報においては直接喀痰中の結核菌を定量培養しており、Tween 80 との接触の機会、全然ない菌を使用した実験成績であるので、前の推定は適用されえない実験である。しかも前述の如く、一般に小川培地に比較して、遥かに高い生菌検出率を示している。ただ喀痰のアルカリ処理後、これを中和する場合、むしろ pH 8.0 程度の弱アルカリで止めても差支えないが、酸性側にまで硫酸を多少過量に加えた場合、本培地において急激に集落検出率が落ちることは注意すべきであろう。寺山<sup>3)</sup>は結核菌検索用固形培地の pH は、6.4~6.6 がよいと述べているが、本培地においてははかなり高濃度の酸性側緩衝系が含有されているため、処理した喀痰が pH 6.0 以下の場合、Tween 寒天培地は強度に青変し、結核菌の発育は全く阻止せられ、弱酸性の場合でも喀痰そのままの場合では、発育が抑制または阻止せられ、集落は認められないで、かえって 10倍、100倍の稀釈において集落が認められる現象が起つた。これは本培地がいわゆるアルカリ処置用培地であるために見られる成績であり、一方稀釈により、喀痰の pH が中性あるいは中性に近くなったことを示すものである。これを要するに Tween 寒天培地には、小川培地より酸性側 pH に影響され易い傾向がある。

次に T. Zerbowski<sup>4)</sup> はアスバラギン添加ペトロニャーニー培地を利用して、喀痰中の結核菌を培養し、診断上適当な培養期間について述べている。これによれば培養後集落が発生するまでの期間が、1~2 週では 0.68%、3~4 週では 21.87%、8 週では 90% まで集落を認めることができるという。著者は塗抹陽性26例の喀痰では、粉末化 Tween 寒天培地においては、培養後平均13.5日、小川培地においては平均16.8日で集落を認め、また塗抹陰性100例の喀痰では、粉末化 Tween寒天培地において

は培養後平均16日、小川培地においては平均21.5日で集落を認め、その後両者共急速にあるいは徐々に増加し、約30日で最高に達するので、約1カ月間観察すればほとんど100%の集落を認めることができると思考せられる。

次に生菌数であるが、Tween寒天培地の方が一般に多くなっているが、Tween寒天培地では0.5ml、小川培地では0.1ml接種したので、結核菌の含有量が少ないことにも原因するのではなからうか。したがって微量結核菌の計算には、より多量の喀痰を塗抹しうる粉末化Tween寒天平板が適当である。また生菌数と稀釈度、Gaffky番号とは必ずしも比例しないのは、喀痰中の菌の分布が均等でないことに基因するものと考えられる。最近喀痰の塗抹陽性のものが、培養陰性になることが年々増加しているが、これが原因については、久保<sup>6)</sup>、西村<sup>7)</sup>、小酒井<sup>8)</sup>らは、結核菌の生死、抗結核剤の使用により、結核菌の性質に間接、直接に影響を与えるためではなからうかと述べている。著者も本実験において、塗抹陽性、培養陰性の結核菌を認めているが、ある培地たとえば粉末化Tween寒天培地には発育するが、小川培地には発育しない場合、およびこれと反対に小川培地には生えるが、粉末化 Tween 寒天培地には生えないものもある。それ故結核菌の陽性、陰性を決定するには、1種類の培地のみでなく、少なくとも2種類の培地を使用することが望ましい。最後に雑菌であるが、極めて少類例において認められたが、著者の経験により、結核菌の集落と雑菌の集落とは判然と区別できることが判明した。

## 結 論

1. 結核患者の喀痰を NaOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で処理した際、喀痰の pH を確実に中性あるいは弱アルカリ性にさえすれば、喀痰中の結核菌、すなわち本培地に馴れていない結核菌を用いても、保存結核菌とほとんど同様の成績が得られた。

2. 結核菌塗抹陽性の喀痰26例中、粉末化 Tween 寒天培地では全例に、小川培地では25例に集落の発生を見たが、小川培地の1例には集落は全く認めることができ

なかつた。Tween寒天培地では培養後平均13.5日で集落を認め、その後一般に急速に増加し、約20~30日で最高に達した。これに対して小川培地では、培養後平均16.8日で集落を認め、その後徐々に増加し、30日以後もなお増加の傾向を示した。生菌数は粉末化 Tween 寒天培地の方が、小川培地に比較して一般に多く、生菌数と喀痰の稀釈度および Gaffky 番号数とは必ずしも比例しない。

3. 結核菌塗抹陰性の微量排菌者の喀痰 100例中、粉末化 Tween 寒天培地には29例、小川培地には24例に集落を認め、そのうち22例は両培地に生え、7例は粉末化 Tween 寒天培地にのみ生え、2例は小川培地にのみ生えた。生菌数は粉末化 Tween 寒天培地の方が多い。それ故喀痰そのままを培養しても、粉末化 Tween 寒天培地は小川培地に比較し、結核菌の生え方が早く、かつ生菌数も多いので、小川培地に遥かに優っている。

4. 喀痰の結核菌塗抹陽性のものが、培養陰性になる場合があり、また粉末化 Tween寒天培地にのみ発育し、小川培地に発育しないものもあり、またこれと反対の場合もあるので、結核菌の陽性、陰性を決定するには、両培地を併用するのが理想的である。

稿を終るに臨み、御懇切な御指導、御校閲を賜った恩師山根助教授に深謝すると共に、常に御協力下さった教室員兵藤三郎氏に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 後藤瀬平：結核 (1957掲載予定)
- 2) 山根・今村：Nature, 179, 594~595, 1957.
- 3) 寺山和夫：医療, 10, 644~653, 昭31.
- 4) Zerbowski, T. : Beitr. Klin. Tub., 116, 96~99, 1956.
- 5) 久保田昭賢他：衛生検査, 5, 140~145, 昭31.
- 6) 西村 宏：結核, 31, 222~227, 昭31.
- 7) 西村 宏：結核, 32, 141~144, 昭32.
- 8) 小酒井望：診療室, 8, 285~288, 昭31.