

結核菌の分離培養の培地改良に関する研究

第3報 結核患者の喀痰の培養

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 矢戸昌夫助教授)

受付 昭和31年12月25日

前報¹⁾において Bordet-Gengou 培地を改変した P BG 培地が、菌浮游液の培養においては 1%KH₂PO₄培地に比較して、さらに 4% NaOH 水で前処理した菌浮游液の培養においては、KH₂PO₄を 0.4% 添加すれば 3% KH₂PO₄培地に比較して劣らないばかりか優れていることを報告したので、本報では実際に結核患者の喀痰を培養した成績について報告する。すでに報じた如く Bordet-Gengou 培地に喀痰を培養すると、雑菌の侵入による汚染率が鶏卵培地に比較して高いことを和田、伊藤らが述べているが、このことはこの P BG 培地においても当然考えられる。今回筆者はマラカイト緑 (以下 MG と略) を P BG 培地に添加することによつて、喀痰の培養成績を、汚染率の点においても、菌の陽性率においても、鶏卵培地よりも優れたものにするのでしたのでその大要を報告したい。

実験方法ならびに成績

実験 1: まず予備実験として、P BG 培地に MG を 0.02% 添加して直接鏡検で菌陰性の結核患者の喀痰 206 例を用いて検討を行つた。培地は第 2 報²⁾の成績より馬鈴薯 30g を水道水 100ml に加えて馬鈴薯抽出液を作り、これに培地全体に対してグリセリンを 4%、血液を 30%、KH₂PO₄ を 0.4% 加えて寒天濃度を 1.5% とし、MG を 0.02% 添加したものと、添加しないものの 2 種類の P BG 培地を作製した。対照には 3% KH₂PO₄ 培地を用いた。培養方法は 5 倍量の 4% NaOH 水を喀痰に加えて、型の如く充分攪拌均等化してから、0.1ml あてをそれぞれの培地に 1 本あて分注し、6 週間培養した。その間 14 日、21 日、28 日、35 日および 42 日後の 5 回に亘つて集落を観察した。

実験成績は表 1、2 および 3 に示す通りである。まず培養日数別による集落の発生培地数を表 1 について見ると、3% KH₂PO₄ 培地が最も良く次いで 0.02% MG 加 P BG 培地となり、MG 不加 P BG 培地が最も悪かつた。しかして 3% KH₂PO₄ 培地と 0.02% MG 加 P BG 培地との優劣の差は、極めて僅かであつた。次に初発集落の発生日数、集落数および発生培地数を表 2 について見ると、卅以上の集落数を示すものは、いずれの培地におい

表 1 培養日数別による集落の発生培地数

培地	培養日数 検査培地数	14	21	28	35	42
		3% KH ₂ PO ₄	206	11 5.3	25 12.1	33 16.0
M G 不 加 P B G	206	5 2.4	17 8.3	24 11.7	25 12.1	26 12.6
0.02 % MG 加 P B G	206	5 2.4	25 12.1	29 14.0	32 15.5	33 16.0

(注) ※はいずれも発生培地数を示すが、上は実数、下は百分率を表わす。以下同様

表 2 初発集落の発生日数、集落数および発生培地数

培地	培養日数 集落数	14	21	28	35	42
		3% KH ₂ PO ₄	+	1	3	3
	++		2	4		
	+++	2	2	1	1	
	卅	8	7			
M G 不 加 P B G	+		4	4	1	1
	++	1	2	1		
	+++	3	4	2		
	卅	1	2			
0.02 % MG 加 P B G	+	1	5	2	3	1
	++		9	1		
	+++	2	5	1		
	卅	2	1			

(注) + は集落数が 30 まで
++ " 100 " "
+++ " 200 " "
卅 " 200 以上) を示す。以下同様

表 3 汚 染 率

培 地	検査培地数	汚 染 数 (%)
3% KH ₂ PO ₄	206	2 (1.0)
M G 不 加 P B G	206	60 (29.1)
0.02 % MG 加 P B G	206	0 (0)

てもほとんど21日までに発現しており、その後発現するものは大半がH以下の集落数を示し、ことに+の集落数を示すものが多かった。次にこれらを各培地について比較すると、H以下のものは0.02%MG加PBG培地に最も多く、次の3%KH₂PO₄培地とMG不加PBG培地とはその数ほとんど変りなく、H以上のものは反対に3%KH₂PO₄培地に最も多く、次のMG不加PBG培地と0.02%MG加PBG培地とはその数においてほとんど変りがなかった。また0.02%MG加PBG培地の集落の大きさが、他の培地に比較して小さいものが多かった。以上の成績と、汚染についての表3の成績とを比較すると極めて興味深い。すなわち、3つの培地間でMG不加PBG培地が、その陽性率、初発集落の発生日数、集落数および発生培地数等のすべての点において最も劣っているのは、要するにその汚染率が最も高い(29.1%)ことに起因すると考えられ、0.02%MG加PBG培地の初発集落の発生日数が3%KH₂PO₄培地のそれより長く、集落の大きさも小さいのは、結核菌の発育を相当抑制するMGを最も多く含有しているためではないかと考えられる。以上のような成績から、MGの添加量を更に少なくすればどうなるであろうかと考えて次の実験を行った。

実験2: MGの添加量を0, 0.005, 0.01, 0.015および0.02の各%としたPBG培地を作製し、30例の直接鏡検で菌陰性の喀痰を4%NaOH水で前処理後、それぞれの培地に2本あて、0.1mlあて分注して6週間観察した。観察は培養後10日, 14日, 17日, 21日, 28日, 35日および42日の7回に亘って行った。

実験成績は表4, 5, 6に示す通りである。まず培養日別による集落の発生培地数を表4について見ると、10日後にしてすでにMG不加PBG培地と0.005%MG加PBG培地にそれぞれ4本および1本集落の発生を見、14日後では0.005%MG加PBG培地が最も良く、17日後では3%KH₂PO₄培地が最も良く50.0%の陽性率を示

表4 培養日別による集落の発生培地数

培地	検査培地数	培養日数						
		10	14	17	21	28	35	42
3%KH ₂ PO ₄	60		12 20.0	30 50.0	35 58.3	40 66.6	40 66.6	40 66.6
MG不加PBG	60	4 6.6	16 26.6	25 41.6	29 48.3	31 51.6	33 55.0	33 55.0
0.005%MG加PBG	60	1 1.6	20 33.3	29 48.3	34 56.6	39 65.0	39 65.0	39 65.0
0.01%MG加PBG	60		16 26.6	26 43.3	28 46.6	28 46.6	28 46.6	28 46.6
0.015%MG加PBG	60		5 8.3	19 31.6	24 40.0	26 43.3	27 45.0	28 46.6
0.02%MG加PBG	60		9 15.0	16 26.6	26 43.3	30 50.0	32 53.3	32 53.3

表5 初発集落の発生日数, 集落数および発生培地数

培地	集落数	培養日数						
		10	14	17	21	28	35	42
3%KH ₂ PO ₄	+ ++ +++ ++++		2	4	4	1	2	
			10	8				
MG不加PBG	+ ++ +++ ++++	1	1	2	4	2	2	
		1	4	4				
		2	6					
0.005%MG加PBG	+ ++ +++ ++++		3	4	2	5		
		1	8	1				
			8	2				
0.01%MG加PBG	+ ++ +++ ++++		1	3	5	1	2	
			7	3				
			5	1				
0.015%MG加PBG	+ ++ +++ ++++		1	2	5	4	2	1
			2	6	1			
			2	1				
0.02%MG加PBG	+ ++ +++ ++++		2	3	4	4		
			2	4	2			
			1	4				
			4				2	

表6 汚染率

培地	検査培地数	汚染数(%)
3%KH ₂ PO ₄	60	2 (3.3)
MG不加PBG	60	11 (18.3)
0.005%MG加PBG	60	0 (0)
0.01%MG加PBG	60	0 (0)
0.015%MG加PBG	60	0 (0)
0.02%MG加PBG	60	0 (0)

し、次いでは0.005%MG加PBG培地が48.3%の陽性率を示し、以後42日までこのまま持続し両者の差は極めて僅少であった。MG不加PBG培地は、実験1の場合よりも汚染率が低かった(18.3%)のために先の2つの培地の次に位し、以下MGの添加量が多くなるにしたがって陽性率が低くなる傾向が見られたが、28日後になると、MGの添加量の最も多い0.02%MG加PBG培地とMG不加PBG培地に次いで最も良かったことは注目に値す

る。次いで初発集落の発生日数、集落数および発生培地数を表5について見ると、Ⅲ以上の集落を示すものは、14日後では0.005%MG加PBG培地が最も多く、次いでMG不加PBG培地となり、0.015%MG加PBG培地が最も悪かった。17日後では、3%KH₂PO₄培地が最も良く、次いで0.005%MG加PBG培地が多かった。しかしてⅢ以上の集落数を示すものは、3%KH₂PO₄培地と0.02%MG加PBG培地とを除いてはすべて17日までに発現しており、その後発現するものはⅡ以下の集落数を示すものばかりであった。また集落の大きさがMGの添加量が多くなるにしたがって小さくなる傾向が見られた。雑菌侵入による汚染は、表6に示すように3%KH₂PO₄培地とMG不加PBG培地とに見られた。以上の成績から、MGの添加量をもう少し少なくすることができないかと考えて次の実験を行った。

実験3：MGの添加量を0.0025%および0.005%とした2種類のPBG培地を作製し、直接検鏡で菌陰性の喀痰95例を用いて検討を行った。本実験では各種の培地にそれぞれ1本あて培養を行った。

実験成績は表7、8、9に示す通りである。まず培養日数別による集落の発生培地数を表7について見ると、培養14日後では0.0025%MG加PBG培地が最も良かったが、17日後では0.005%MG加PBG培地と同率となり、その後は0.005%MG加PBG培地が最も良かった。次

表7 培養日数別による集落の発生培地数

培地	検査培地数	培養日数					
		14	17	21	28	35	42
3%KH ₂ PO ₄	95	15 13.6	21 22.1	24 25.2	27 28.4	29 30.5	30 31.5
0.0025% MG加PBG	95	16 16.8	24 25.2	24 25.2	28 29.4	29 30.5	30 31.5
0.005% MG加PBG	95	14 14.7	24 25.2	31 32.6	31 32.6	34 35.7	34 35.7

表8 初発集落の発生日数、集落数および発生培地数

培地	集落数	培養日数					
		14	17	21	28	35	42
3%KH ₂ PO ₄	+			1		2	1
	++		1		3		
	+++	1	2	2			
		12	5				
0.0025% MG加PBG	+	1	2		3	1	
	++	2	2				
	+++	4	2		1		1
		9	2				
0.005% MG加PBG	+	2		7		3	
	++	1	2				
	+++	4	6				
		7	2				

表9 汚染率

培地	検査培地数	汚染数(%)
3%KH ₂ PO ₄	95	6 (6.3)
0.0025% MG加PBG	95	13 (13.6)
0.005% MG加PBG	95	4 (4.2)

に初発集落の発生日数、集落数および発生培地数を表8について見ると、すでに述べた成績と同様な結果を示し、Ⅲ以上の集落数を示すものはほとんどが17日までに発現しており、3%KH₂PO₄培地が最も良く、次いで0.005%MG加PBG培地が多く、21日後に発現するのはⅠの集落数を示すものが圧倒的に多かった。各種の培地の汚染については、表9に示す如く、0.005%MG加PBG培地が最も低く4.2%の汚染率を示した。

総括および考察

結核菌の分離培地としての鶏卵培地において、MGが雑菌発育阻止のために最も広く使用されており、その添加量は0.04%となつていることは周知の通りであるが、PBG培地にもこの色素を添加すれば汚染の問題、解決できるのではないかと考えて、今回の実験を行ったわけである。ところで添加量をどの位にすれば最も適切かという問題に入るのであるが、著者は一般に細菌は、血液を主成分とする培地に培養されているものの方が、卵液を主成分とする培地に培養されているものよりも、MGに対してより鋭敏に反応するのではないかという推測の下に、まず予備実験として鶏卵培地に添加する量の半分に当たる0.02%をPBG培地に添加して実験を行つてみた。その成績は実験1のそれに示す如く、陽性率は意外に高く、3%KH₂PO₄培地に匹敵する位で、また汚染も全然見られなかった。ただし集落数が3%KH₂PO₄培地に比べるとかなり少なく、また集落の大きさも小さかつたので、MGの添加量を更に少なくしたらどうだろうかと考えて、実験2および3を行つたところ0.005%が最も良いことがわかつた。Tarshisら³⁾は彼らの血液培地において、MGは0.01%まで、Telluriteは0.005%まで、Penicillinは100単位/mlまで、それぞれ結核菌の発育を抑制しないとつて、PenicillinとMGを加えた血液培地、またはPenicillinとTelluriteを加えた血液培地を作製し、Löwenstein培地とそれぞれ喀痰の培養成績を比較して共にLöwenstein培地よりも優れていると報告している。また伊藤ら⁴⁾はBordet-Gengou培地にMGを0.025%添加して岡・片倉培地と比較し、その培養成績は、陽性率においても、また汚染率においても岡・片倉培地に劣らないと報じている。著者のPBG培

地に関する実験によれば、汚染を防ぐためには Tarshis らのような2種類の雑菌発育抑制物質を加える必要がなく、MGのみでしかも更に少量の添加量でよいと思われる。

次にPBG培地と3%KH₂PO₄培地とを種々な点について比較すると、まず製法については、前者は Koch 蒸気滅菌器さえあれば簡単に作製することができる。そして血液を加えない基礎培地を滅菌保存しておけば、随時必要に応じて短時間に作りうる。後者は凝固滅菌するのに時間を要し、その上、加熱の適否と鶏卵の質の相異等によつて培養成績に相当な変動が見られることは周知の事実である。次に培地の組成については、その主成分である血液は、鶏卵ほど容易に、かつ安価に需要を満たすことができない場合もある。次に集落の色彩については、前者は赤茶色の培地上に白色、または赤茶色に包まれた白色の集落を形成し、後者は淡緑色の培地上に黄色の集落を形成するので、前者の方がより識別し易い。最後に培養成績および汚染率については、今まで述べてきた如く前者は後者に比べて優れても劣らないことが認められた。以上述べたような優劣が2つの培地に認められたが、結核菌の分離培地として寒天を賦形剤とした培地

を、従来の鶏卵培地以上に実際化しようとした著者の目的は一応達せられたのではないかと思う。

結 論

第1報、第2報によつて改良されたPBG培地を更に実際の喀痰の培養について検討を行つた結果、MGをPBG培地に0.005%添加すれば、陽性率、また汚染率、その他種々の点において、3%KH₂PO₄培地よりも優れていることがわかつた。

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と御鞭撻を賜つた宍戸昌夫助教に厚く感謝の意を表する。

主要文献

- 1) 杉田：結核，31：164，1956.
- 2) 杉田：結核，31：294，1956.
- 3) Tarshis et al. : Acta Tub. Scand., 31：92，1955.
- 4) 伊藤他：基礎と臨床，2：145，1949.
- 5) 井村：結核，29：291，1956.