

Tween 寒天培地による人型結核菌の生菌計算の研究

第1報 混釈平板法による生菌計算

後 藤 瀬 平

福島県立医科大学細菌学教室 (主任 山根績助教授)

受 付 昭 和 31 年 12 月 25 日

I 緒 言

従来結核菌は腸内細菌の如く、培養が容易でなく、かつ均等性培養はほとんど不可能に近かつたので、生菌計算は容易でなかつた。ところが Dubos およびその共同研究者達¹⁾が界面活性剤 Tween 80 を培地成分に導入して、液体培地においては結核菌の均等性培養が可能となり、またこれに寒天を加えた固形培地においては微量の結核菌を培養しうようになったが、これらのいわゆる Dubos の培地はいずれも牛血漿成分が含まれ、これらは無菌的に培地中に加えられなければならない。F. Fenner²⁾, O'Hea, A.J.³⁾ はこの Dubos の培地を利用して表面平板法により結核菌の計算を行い、さらに J.P. Albericci, J.A. Fletcher⁴⁾ は Fenner, Martin らの均等性菌液の作製および生菌計算法に改良を加えて優秀な成績を得ている。

一方山根およびその共同研究者達は血清成分を含めぬ熱に安定な Tween 寒天培地⁵⁾および結核菌の均等性増菌用の改変 Y.M.Y. 培地⁶⁾(表1)を作るにおよび生菌計算

表 1 改変 Y.M.Y. 培地

KH ₂ PO ₄	1 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2 g
グルタミン酸ソーダ	3 g
クエン酸鉄安門	5 mg
6% Tween 80 100 cc	120°C 20分 100 cc 高压滅菌上清
卵 黄 10 g	
Chacoal 1 g	
0.2% マラカイトグリーン	0.5 cc
蒸 溜 水	900 cc

表 2 粉末化 Tween 寒天培地

KH ₂ PO ₄	3.0 g
Na ₂ HPO ₄	2.3 g
クエン酸鉄安門	0.1 g
グルタミン酸ソーダ	5.0 g
ポリペプトン	1.0 g
パントテン酸カルシウム	0.1 g
硫 安	0.5 g
卵黄抽出結晶	0.2 g
Tween 80	3.0 g
2% マラカイトグリーン	0.2 ml
脱脂寒天	9.0 g

がますます簡単確実になつた。さらに最近山根は粉末化 Tween 寒天培地⁷⁾(表2)を導き出すことに成功した。著者は最近結核患者の喀痰から分離した人型結核菌25例および Myco. tuberculosis H₃₇Rv 株を用いて、大腸菌、サルモネラ等に一般に用いられている寒天混釈平板法⁸⁾によつて、粉末化 Tween 寒天培地に培養し、小川培地を対照として生菌計算を行つたのでその成績を報告する。

II 実験方法

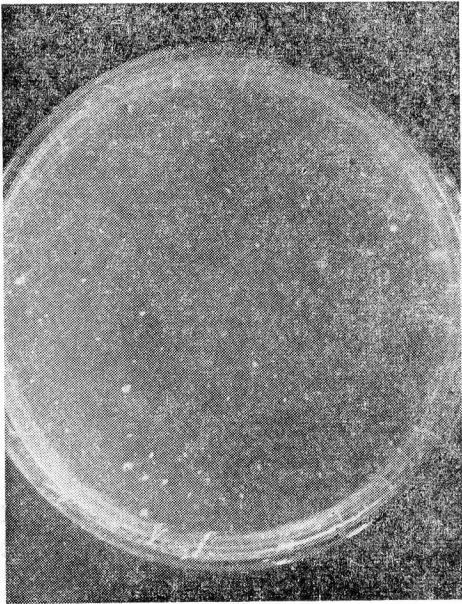
実験材料として使用した菌株は、最近結核患者の喀痰から分離した25例の保存結核菌および試験管内に継代培養されている Myco. tuberculosis H₃₇Rv 株である。まず改変 Y.M.Y. 培地を500ml のコルベンに200ml ずつ分注し、これに患者からの分離株および H₃₇Rv 株を一白金耳ずつ接種して、1 ないし 2 週間 37°C に静置培養し、培養期間中は毎日 1 回ずつ培養コルベンを静かに振盪して培地を攪拌した。かくして得た培養を遠心し、その沈渣に滅菌生理的食塩水を加えて菌体を洗滌し、これをさらに遠心し、上清を捨て、沈渣に 0.5% Tween 食塩水を加えて菌体を洗滌し、これを遠心して上清を捨て結核菌浮游液を作つた。この浮游液に 0.5% Tween 食塩水を加えて適度の濃度にし、寒天混釈平板法によつて粉末化 Tween 寒天培地に接種した。すなわち菌液を滅菌生理的食塩水をもつて 100 万倍、1,000 万倍、1 億倍と稀釈し、100 万倍菌液を 0.5mg/ml, 0.2mg/ml, 0.1mg/ml の 3 階段に分けて培養した。1,000 万倍、1 億倍の場合も同じ方法で培養を行つた。これと同時に、小川培地では大試験管および中試験管の 2 種類を用い、大試験管の場合は上記 100 万倍、1,000 万倍、1 億倍の稀釈菌液を 0.2mg/ml ずつ 2 本の試験管に、中試験管の場合は 0.1mg/ml ずつ 3 本の試験管に接種し、37°C に培養し日を追うて聚落の数を計算した。稀釈菌液の培養方法は表3に示す如くである。生菌計算は培養後一般に14日目頃より始め、約1カ月間行つた。なお菌量は各例とも乾燥量をもつて表わした。

III 実験成績

粉末化 Tween 寒天培地は透明であるため、聚落は非常に見易く、上部の聚落は正円形、中部の聚落は紡錘形、

表 3 混釈平板法による生菌数の求め方
(乾燥量 1,168mg)

培養 菌液 量(ml)	稀釈度	100万			1 mg中 菌 数
		23 日	23 日	23 日	
粉末化 Tween培地	0.5	283	39	1	5,505万
	0.2	113	19	1	
	0.1	81	7	0	
小川培地	0.2	88	6	0	1,605万
	0.2	32	2	0	



附 図 1

底部のものは丸く粗糲な形を呈している(附図1)。これに反し小川培地では表面にのみ聚落が認められほとんど正円形である。粉末化 Tween 寒天培地においては、大抵12日頃より聚落が認められ、急速に増加し、20日頃最高に達し、その後は聚落の増加はほとんど認められない。これに反し、小川培地においては早いもので14日か15日頃より聚落が認められ、日を追うて徐々に増加し、28日か30日頃最高に達するが、往々その後も極く少数増加することがある。表4は1例(菌株番号10)を示すものである。

表 4 培養日数に伴う 1 mg 中の生菌数 (単位万)

培養日数	16日	18日	21日	23日	25日	28日	30日
粉末化 Tween寒天培地	4,735	5,454	5,505	5,505	5,505	5,505	5,505
小川培地	454	796	1,396	1,605	1,627	2,098	2,098

るが、培養日数に伴う 1 皿中の生菌数を比較すると、粉末化 Tween 寒天培地では培養後16日から21日にかけて

急速に増加し、以後増加の傾向を示さない。これに反し、小川培地では16日から徐々に増加し28日に最高に達している。両培地における菌の増殖を逐目的に「グラフ」で示せば図1、図2の如くである。次に個々の被験例につ

図 1 菌株番号10

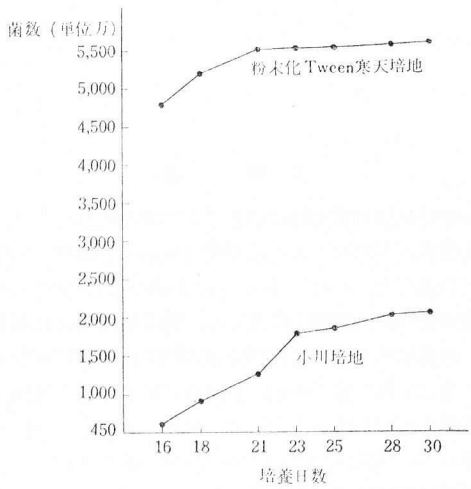
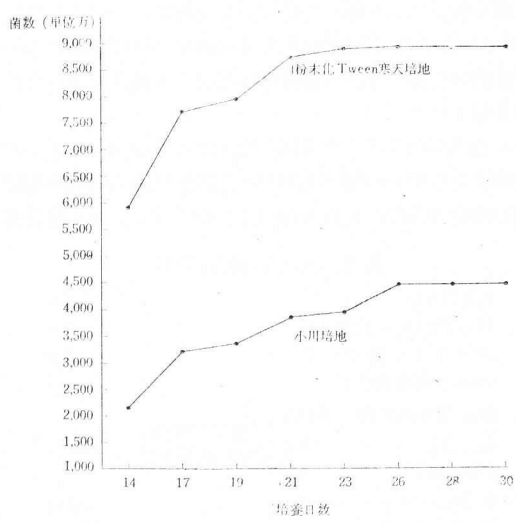


図 2 H₃₇Rv株



いて見ると、分離した結核菌株により、培地に対する培養の態度を異にし、さらに1皿中の生菌数にも多大の差異を生じているものがある。表5は25株およびH₃₇Rv株の1皿中の生菌数を示すものであつて、数字は培養期間中最も多い場合の生菌数を表わすものである。H₃₇Rv株では粉末化 Tween寒天培地の方が約4,400万も多くなっている。被験25株中18株は粉末化 Tween 寒天培地の方が多く、5株(第5、第12、第17、第18、第25株)は少なくない。しかも第6株では粉末化 Tween 寒天培地では約4億の生菌が認められているのに反して、小川培地では菌は全然発育していない。これと反対に第13

表 5 1mg 中の生菌数の比較(単位万)

菌株番号		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
培地名	粉末化 Tween 寒天培地	5,241	1,498	4,948	2,601	497	39,964	19,668	5,261	389	5,505	2,459	7,566	0
小川培地		4,529	514	17	867	877	0	19,364	4,779	139	2,098	1,595	11,012	6,773

菌株番号		14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	H ₃₇ Rv
培地名	粉末化 Tween 寒天培地	3,416	8,367	7,287	2,837	62	3,091	2,085	1,901	1,793	10,357	2,594	2,624	8,837
小川培地		2,164	7,326	6,729	4,568	3,518	2,637	370	780	305	6,080	1,721	3,989	4,455

株では小川培地では 6,773 万の生菌が認められているのに、粉末化 Tween 寒天培地では全然聚落が現れない。また第 3 株では小川培地では 60 日目に漸く聚落が認められたのである。以上分離した結核菌 25 例の 1 珽中の生菌数を平均すれば、粉末化 Tween 寒天培地では 5,680 万、小川培地では 3,710 万であり、粉末化 Tween 寒天培地の方が遙かに優っている。

IV 考 案

実験に使用した 25 例の臨床菌株および H₃₇Rv 株はいずれも保存株で、患者の喀痰を直接培地に接種して実験に供したものではない。したがって保存株の如く培地に馴れているものと、直接患者より分離し培地に馴れていないものとは、生菌計算の成績が大分違ってくるのではないかと思考せられる。これに関しては第二報で考察せられる。次に「ストレプトマイシン」「パス」「イソニコチン酸ヒドラジット」等の結核抗生剤を使用する関係上、従来の培地に対する態度が多少なりとも変つてきて、ある培地に培養する場合は生菌数が多く、ある培地に培養する場合は少なく、あるいは全く発育しない。例えば「ストレプトマイシン」を使用した結核菌は小川培地にはよく発育するが、粉末化 Tween 寒天培地には余り生えない(第 5, 12, 13, 17, 18, 25 株)。反対に「イソニコチン酸ヒドラジット」を使用した結核菌は、粉末化 Tween 寒天培地にはよく発育するが、小川培地には余り生えないといういわゆる抗生物質の使用により結核菌が培地に対する選択性を獲得するに到るのではないかと考えられ、また菌株により 1 珽中の生菌数が著しく両培地とも異なることは培養の均等性、保存性に関してさらに検討されるべきであろう。次に生菌計算に当つて両培地を比較すれば、粉末化 Tween 寒天培地は透明で聚落が余り大きくならずまた接着しないため、一平板内 1,000 個までの聚落の計算は可能である(計算に当つては落下光線より透過光線の方が便利である)。これに反し小川培地は不透明で、聚落がどんどん大きくなるため接着し、1 本の培地上 100 個以上の聚落の計算は不能で、1 ヲ月近くになると計算ができなくなる場合が往々ある。なお著者が実験した 25 例のうち 18 例において、粉末化 Tween

寒天培地の方が生菌数が多かつたのであるが、40 日間の培養では小川培地に生えないもの、粉末化 Tween 寒天培地に生えないもののおおの 1 例ずつあつたことは注目に値することである。また第 3 株では小川培地において培養 60 日目に漸く聚落が認められたので、結核菌の陰性、陽性を決定する場合は慎重を期さなければならない。

V 結 論

1. 粉末化 Tween 寒天培地では小川培地に比較し、一般に結核菌の発育がよく、かつ早く、大体培養 12 日頃より聚落を認めることができ、その後は急速に増加し、20 日頃最高に達し、それ以後はほとんど増加の傾向を示さない。これに反し小川培地では、結核菌の生え方が一般に遅く、早いもので 14 日か 15 日頃で、その後徐々に増加し、28 日か 30 日頃最高に達する。しかし時にはそれ以後にも極く少数増加することがある。それ故粉末化 Tween 寒天培地は人型結核菌の早期発見に適当と思考せられる。
2. 被験 25 例中 18 例は粉末化 Tween 寒天培地の方が生菌数が多く、5 例は少なく、1 例では生菌は全然認められなかつた。また小川培地においても全然生菌の認められないものが 1 例あつた。したがって粉末化 Tween 寒天培地および小川培地を併用すれば結核菌の発見には理想的である。
3. 粉末化 Tween 寒天培地は透明であるため、生菌計算は正確で便利で、さらにその製法が一般に簡単で経済的であるため小川培地に優っている。

稿を終るに当り、終始御懇篤なる御指導を戴き、御校閲を賜りました恩師山根績助教授に敬意を表すると共に、絶えず御協力下さいました福島医大細菌学教室兵藤三郎氏に感謝の意を表します。

文 献

1) Dubos, R.J., and Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 56: 335, 1947.
2) Fenner, F.: Am. Rev. Tuberc., 64: 353, 1951.

- 3) O'Hea, A.J. : J. Path. Bact., 69: 169, 1955.
- 4) Albericci, J.P., and Fletcher, J.A. : J. Gen. Microbiol., 14: 692, 1956.
- 5) Yamane, I., Hydo, S., Honda, T., and Kadoya, K. : Fukushima J. Med. Sci., 2: 35, 1955.
- 6) 今村: 結核, 発表予定.
- 7) Yamane, I. : J. Bact., 73: 1957 (to be published).
- 8) Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity (4th edition), P.P. 98, 1955, London.