

微量結核菌に対する熱に安定な液体培地

(第1報) 培地の調製と培養の性状

今 村 邦 雄

福島県立医科大学細菌学教室 (指導 山根績助教授)

受付 昭和32年2月25日

微量の結核菌を透明な液体培地に発育せしめることは1932年 Kirchner¹⁾によって牛血清を加えた培地により成功した。この培地はその後各方面で微量結核菌の検出に用いられているが、その発育が集落として発生することは培養を定量的研究に用いる場合に1つの大きな欠点となっていた。

ところが1945年 Dubos²⁾により発表された、界面活性剤 Tween 80および牛血清V分割を含む液体培地は、いわゆる均等培養の形で本菌の微量より発育せしめることが可能であるので、定量的に動物接種あるいは培養実験等に用いられ、従来の本菌の研究方法をより正確に、より容易に行うことを可能にした。

しかしながら上述の Kirchner 培地、Dubos 培地等はいずれも牛血清またはその成分の中に含有し、これらは濾過滅菌の後、高圧滅菌された他の培地成分に無菌的に添加されなければならない。このような操作は長期培養を必要とする人型結核菌にとって、しばしば雑菌混入の危険を伴うものである。

私は先に当教室の山根ら³⁾が発表した Tween 寒天培地の調製滅菌操作中に、その中に含まれる卵黄中の結核菌発育促進物質が Tween 80水溶液中に溶液の状態に抽出されることを確認し、しかも同抽出液が熱に安定なことを認めたので、同抽出液を含む高圧滅菌可能な液体培地を調製し、これに微量の人型結核菌を発育せしめたので報告する。

実験材料および方法

菌種: Mycobacterium var. tuberculosis hominis の H₃₇Rv株および当教室において患者喀痰より分離された2株。

接種菌液: 小川培地に累代培養された上述菌株を Dubos の培地(エイケン)に接種し、1週間培養したものを2,000廻転10分間遠心した上清を4,000廻転50分遠心し、菌を洗滌せしめた後、2回にわたり0.05%の Triton A 20を含む食塩水で洗滌し、その窒素量を Micro-kieldahl 法で測定する。上述の窒素量当り菌の乾燥量を算出した後、0.05% Triton 食塩水を用いて菌の含量が10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ mg/ml になるように各菌液を調製し、その0.1ml を各培地系列におのおの接種する。

卵黄抽出液の調製: Tween 80の10, 7, 6, 5, 2, 1, 0%の各水溶液100mlにそれぞれ卵黄10gおよび炭末1gを加え120°C 20分煮沸したものの遠心上清100mlを基礎培地に加える(卵黄は可及的2個以上を用いて混合した方が成績が一定となる)。

基礎培地: KH ₂ PO ₄	1g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2g
グルタミン酸ソーダ	3g
クエン酸ソーダ	1g
クエン酸アンモン鉄	5mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1g
0.2% マラカイトグリーン水溶液	0.5ml
Tween 80水溶液卵黄煮沸上清	100ml
蒸溜水	900ml

以上を混ざれば培地の pH は6.6~6.8になる。そこで pH を調整することなく、そのまま5mlずつ試験管に注し、120°C 20分滅菌し用に供する。

実験成績

1) 卵黄抽出液における Tween 80の濃度の菌の発育

表1 卵黄抽出液に用いる Tween 80の濃度の菌の発育に対する影響

接種菌量(mg)	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	
卵黄抽出液の Tween 濃度	10 %	+++	+++	+	-	-
		+++	+++	+	±	-
7 %	+++	+++	+	+	-	
	+++	+++	+	+	-	
6 %	+++	+++	+++	+	+	
	+++	+++	+++	+	-	
5 %	+++	+++	+++	+	±	
	+++	+++	+++	+	-	
2 %	+++	+++	+	-	-	
	+++	+++	+	-	-	
1 %	+++	+++	+	-	-	
	+++	+++	+	-	-	
0	+++	+++	-	-	-	
	+++	+++	-	-	-	
K	Dubos 培地	+++	+++	+++	+	+
		+++	+++	+++	+	±

に対する影響：上述各濃度の Tween 80水溶液による卵黄抽出液をそれぞれ10%の割合に含む培地に種々の菌量の $H_{37}Rv$ 株を接種し、 $37^{\circ}C$ 14日の培養成績は表1の如くである。表に見られるように5%および6%の Tween 80水溶液による卵黄抽出液は透明であり、これを含む培地では培養14日ですべて $10^{-8}mg$ まで $H_{37}Rv$ 株を發育せしめることができ、対照として用いた Dubos 培地と同程度まで微量菌を發育せしめることができる。臨床から分離された他の2株についても Tween 80の濃度に関して同様な成績が得られた。

次に5%またはそれ以下の濃度の Tween 80抽出液では、抽出液自体が相当濁濁してくるので、培養の visible growth の観察を不正確にするおそれがある。それ故 Tween 80の濃度としては6%が最も適当である。

2) 6% Tween 80卵黄抽出液の培地添加量の検討：

1)の実験では卵黄抽出液に使用する Tween 80溶液の濃度は6%が至適であることが決定したので、つぎに基礎培地に添加すべき抽出液の液量を表2の如く10%, 20%, 30%の各添加量について検討した。

表2 6% Tween 抽出液の基礎培地への添加量の影響

接種菌量(mg)		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
添加抽出液量	10%	+++	++	+	+	+	+
	20%	+++	+++	++	-	-	-
	30%	+++	+++	+	-	-	-
Dubos培地		+++	+++	+++	+++	+++	±
		+++	+++	+++	+++	+++	-

表にみられるように $H_{37}Rv$ 株培養14日の成績では、10%添加の成績が断然優秀で $10^{-9}mg$ の菌の發育を許し、むしろ Dubos の培地に優る成績を得た。これとほぼ同様の成績が他の臨床2株に関するも得られた。

それ故卵黄抽出液の基礎培地に対する含量は10%が至適であることが決定された。

3) 基礎培地組成の検討：山根ら⁴⁾が発表している YMY 培地の無機塩組成を基本として、種々培地成分を変更、菌を接種して Dubos 培地における菌の發育と比較検討した。

まず調製された培地の pH を調整することなく pH 6.6 ~ 6.8 にし、しかもでき上った培地が滅菌後も濁濁しないようにするためには、燐酸緩衝剤の組成を既述の如く KH_2PO_4 1g; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2g/l とすることが適当であることが明らかになり、さらに必須無機塩として添加さるべき $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g/l と上記燐酸塩が不溶性の塩をつくらないようにするためにクエン酸ソーダ 1g を加えた。グルタミン酸ソーダは最も有効な窒素源

として 3g 添加すれば充分であることが判明し、鉄はクエン酸アンモニの形が最もよいことも種々の2価、3価の鉄を改変添加して比較した結果決定された。

4) 培養の均等性の検討：本培地に $37^{\circ}C$ 10日間培養した培養は管底に沈着し、これを静かに手振した所見で肉眼的には Dubos 培地の培養と幾分異なり、後者の如く真に一面に濁濁した状態ではなく、極めて微細な顆粒状に見えるが、Kirchner 培地における培養の如く大小の集落となつて發育することはない。

この所見は顕微鏡下に見られる菌の状態にも対応するもので、Dubos 培地 1週間の發育菌の如くほとんど単個菌のみよりなることはなく、大部分 2~3個、稀に 4~5個の菌よりなる集塊状態をなしている。

このことは菌の發育が Dubos 培地よりも旺盛で Tween 80 が培地中より消失してゆくためと考えられ^{4,5)}、本培地の培養 5cc に 5% の Tween 水溶液を 0.5ml ほど添加することにより菌は単個菌の状態にはぐれてゆくのが観察される。

5) 本培地による菌の収量：本培地 150ml を 500ml 三角コルベンに分注滅菌したものに、Dubos 培地に $37^{\circ}C$ 1週間培養した $H_{37}Rv$ 株の菌液 2ml (菌量約 0.14mg/ml) を接種し $37^{\circ}C$ に 2週間培養すると、約 61mg (乾燥量) の菌が得られる。対照として用いた Dubos 培地の収量は約 32mg であり、約倍量の収量を得たわけである。

この際乾燥菌量の計算は、6,000回転30分遠心集菌したものを生理的食塩水により3回洗滌し、この一部の含窒素量を Micro-kiehlidahl 法で測定し、これを Stephenson の結核菌の含窒素量から逆算したものである。

考 察

Dubos の発表した Tween-albumin 培地は、人型結核菌をその微量より發育せしめうること、およびその培養がほぼ均等である点は以後の結核菌の定量的研究にある種の革命をもたらし、これを著しく容易ならしめ、多くの研究者³⁻⁹⁾はきそつてこの培地を使用するようになった。しかしながらこの培地に含まれる bovine plasma V (または牛血清)は他の培地成分の高圧滅菌後、無菌的に添加されなければその微量菌よりの發育能を喪失し、また培地の透明を保持しえないことは、本培地の致命的欠陥といつても過言ではない。

およそ細菌培養の培地の理想は、その培地が $120^{\circ}C$ 20分の高圧滅菌 1回ですぐ用に供しうる点にあると考えられる。著者はこのように高圧滅菌 1回で微量結核菌の發育を許し、しかも均等培養をうる培地を得んとして、微量結核菌の發育を可能ならしめる成分を卵黄中にもとめ、右成分が卵黄の Tween 水溶液で熱浸することにより透明な状態で抽出されることを確かめ、上述の培地を調製することに成功した。その微量より發育せしめる性質は、

Dubos 培地のそれに全く匹敵し、またその均等度も、Dubos 培地のそれとほぼ同様であるが Dubos 培地より発育収量が大いいためややこれに劣ると考えられるが、この場合滅菌 5% Tween 水溶液の少量を右培養に添加することによりその均等度が Dubos 培地同様になりうることは、この培地を本菌の発育実験に、または本菌の培養をそのまま動物接種材料として定量的に使用して差支えないことを示しているといえよう。

また本培地が微黄色を帯びた透明であることは、本培地の培養を比濁により定量することを少しもさまたげないことは次報で報告されよう。

要 約

1) KH_2PO_4 1g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2g, グルタミン酸ソーダ 3g, クエン酸ソーダ 1g, クエン酸鉄アンモン 5mg, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, 0.2% マラカイトグリーン溶液 0.5ml, Tween 80 水溶液 卵黄煮沸上清 100ml, 蒸溜水 900ml よりなる液体培地は 120°C 20分の高圧滅菌後、人型結核菌 H_3Rv 株他 2 株の菌を、その 10^{-8}mg の微量より培養 2 週間にして発育せしめることができた。

2) 本培地による培養はほぼ Dubos 培地同様に均等であり、定量的な培養実験、動物接種実験等に使用しうる。

(本報の一部は英国 Nature 誌上に予報として報告した。)

文 献

- 1) Kirchner, O. : Z.f. Bak. I. Abd. Org., 124: 403, 1932.
- 2) Dubos, R. J. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 58: 361, 1945.
- 3) Yamane et al. : Fukushima J. Med. Sci., 2: 13, 1955.
- 4) Yamane et al. : Fukushima J. Med. Sci., 1: 105, 1954.
- 5) Minami et al. : Fukushima J. Med. Sci., 1: 95, 1954.
- 6) Steenken, W. Jr. and Wolinsky, E. : Am. Rev. Tuberc., 73: 539, 1956.
- 7) Hain, E. und Groth, K. : Beitr. Klin. Tuberc., 115: 282, 1956.
- 8) Roessler, G. : Am. Rev. Tuberc., 73: 716, 1956.
- 9) Tarshis, M.S. and Elberg, S.S. : Am. Rev. Tuberc., 74: 84, 1956.
- 10) 今村: 結核に発表予定.