

結核菌定量培養法に関する研究補遺

第1篇 定量培養法の比較——菌液を材料とした場合

岡 田 博

京都大学結核研究所細菌血清学部（主任 植田三郎教授）

受付 昭和34年7月23日

緒 言

近時結核菌の定量培養法が化学療法剤の効果の判定、また結核菌の病原性、毒力の測定、さらにはまたワクチンの防御力賦与能の測定等のための動物実験における臓器内生菌数の算定に広く用いられ、また薬剤耐性に関連した population の研究等にもさかんに利用されている。そのような目的に用いられる定量培養法としては、寒天を含む培養基あるいは卵培養基が用いられ、その培養手技も多少ずつ異なっている。しかるに結核菌およびその他のミコバクテリウムは本来自然凝集を起こしやすいという特性をもっていることは周知のごとくである。この種の菌のこのような特性を顧慮する場合に、現行の種々の定量培養法が、このような困難をどのように回避し、その正確さを期しているかを知りたいと考え、この研究を企てた。今ここで結核菌定量培養の実施中に上記のような自然凝集が起こるかもしれない場合をあらかじめ推測してみると、

(1) 菌液を作成してから使用するまでの間に、すでに徐々に自然凝集が起こりつつあるのではないかということ……ミコバクテリウムの種類によつて多少の差はあろうが……もしそうであるとするならば、このような菌液を稀釈して使用する場合には、その誤差はかなり大きくなるのではないかということが懸念せられる。

(2) 菌液が固形培養基上に置かれたのちに、その菌液が急速にあるいは徐々に乾燥する過程において、自然凝集を起こすかもしれないし、また菌液は完全に乾燥するに先立つて、固形培養基の表面上で無数の微細な露滴状になるものと考えられるが、そのとき菌がそれぞれの露滴に吸引され多少とも集合することが推察される。

これとはまた別に、もし仮りに菌液中に発育力の弱い菌体があるとするならば、使用する培養基の優劣もまた成績に関係するのではないかということも考えられる。

上記推測の第1の点に関しては Dubos & Middlebrook¹⁾ の Tween 80 を含む培養基による培養は、要は均等な菌液を得たいという動機に発するものと思われるし、またその後は直接菌液に Tween 80 を添加して自然凝集を避けようという試みもあつて、今日すでに

広く使用されている。また培養基としては、Dubos は Tween 80 を含んだ平板寒天の表面に菌を培養する方法を考案し、さらに Yegian & Budd²⁾ は Tween 80 を加えた寒天の深部に菌液を培養する方法をはじめて試みているが、これは著者が上記推測の第2においてしたと同様に、Tween-albumin 寒天表面においてもまた起こる自然凝集を懸念したものであろう。事実氏らは寒天深部のほうが表面よりも、より多数の集落を発育せしめることを観察した。ただしこのような深部培養の方法は北米合衆国においてもその後ほとんど用いられないで、一般には平板表面に培養する方法が慣用されている。これはおそらくは手技が複雑な割合には集落数の増加がそれほど顕著でないとせられるためであろうか。

これとはまた別に、卵培養基、その他の斜面培養基の種類優劣についてはすでに小川ら^{3)~7)} および著者ら⁸⁾ の検討がある。

定量培養法が冒頭に述べたような広い用途を見出し、その正確さが要求され、かつ現在わが国においては卵培養基斜面上に培養する方法がとくに賞用されているが、しかも定量培養法は方法そのものになおいささか吟味の余地が残されているように思われるので、下記のごとく方法そのものの検討を試みた。

〔実験その1(A)〕 食塩水あるいは Tween-albumin medium 中で磨砕した菌液を卵培養基斜面上に接種した場合の集落数の比較

現在一般に使用されているような数種の方法で菌液を作成し、これを卵培養基（上坂・友田⁹⁾）斜面上に培養した場合、いずれの菌液がもつとも多数の集落を発育せしめるかを比較検討した。

〔方法〕 Sauton 培養基 2 週間培養の H37Rv 株を用い、滅菌生理食塩水（以下食塩水と略）あるいは Tween-albumin medium（以下 T.A.M. と略）を滴下しつつ乾燥菌塊を瑪瑙乳鉢中で磨砕して均等な 1 mg/cc 菌液を作り、上記それぞれの溶媒を用いて 10^{-3} mg/cc から 10^{-6} mg/cc にいたる稀釈菌液を得、それぞれの 0.1 cc 宛を 3 本宛の卵培養基斜面上に接種し、培養 1 カ月後にこれら 2 種の菌液からの発育集落数を比較した。なお

使用した T.A.M. は Difco の TB Broth Base に Dubos albumin および Tween 80 を加え, albumin および Tween 80 の最終濃度がそれぞれ 0.5% ならびに 0.05% になるように作成した Dubos 改良 T.A.M. である。

〔成績〕 上記2種の菌液の培養1ヵ月後における発育集落数は表1のごとくである。各濃度とも T.A.M. の

表1 菌液からの発育集落数

溶媒種類	菌液濃度 mg/0.1cc	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶			
		Tween-albumin medium	∞	156	71	8	∞	144
		∞	135	55	5			
食 塩 水		∞	109	31	1			
		∞	91	14	1			
		∞	73	7	0			

ほうが食塩水よりも、より多くの発育集落数を与えた。上記の結果に関しては、すでに緒言においてもふれたごとく、まず第1には菌液を作成してから培養基に移すまでの時間に、また第2には斜面上に移されたのち乾燥するまでの経過中に、それぞれ起こることが懸念される菌の自然凝集が菌液の溶媒の種類によつて相違したためではないかということが考えられる。第2の推測に関しては後出実験その2にゆずり、ここでは第1の推測の点について検討した。

〔実験その1(B)〕 3種の方法で作成した菌液中における菌の分散状態の比較

上記のごとき考察を確かめるために、ここでは菌液作成後一定時間における菌の分散状態をそれぞれの溶媒について比較した。

〔方法〕 Sauton 培養基2週間培養の H37Rv 株を用いて次の3種の菌液を作成し、30~40分以内にその分散状態を位相差顕微鏡で比較検討した。

T.A.M. 継代培養をそのまま菌液とした場合：H37Rv 株を 10 cc の T.A.M. に5日ごとに継代培養し、3代目培養5日後のものを軽く遠心沈澱してその上清 0.1 cc を供試した。

T.A.M. を溶媒とした菌液の場合：乾燥秤量した菌を T.A.M. を用い乳鉢中で磨砕して 1 mg/cc の T.A.M. 磨砕菌液を作りその 0.1 cc を供試した。

食塩水を溶媒とした菌液の場合：乾燥秤量した菌を食塩水で磨砕して均等な 1 mg/cc の菌液としその 0.1 cc を供試した。

〔成績〕 表2にみるごとく、上記3種の菌液間には菌の分散状態からみて大差のないことを知った。ただし強

表2 菌液中の菌の分散状態 (50視野)

菌液の種類	菌の状態 単個菌	菌塊 (2個以上の菌 体からなる)	単個菌 の割合 (%)
Tween-albumin medium 継代培養	2,714	86	96.9
Tween-albumin medium	2,910	67	97.8
食 塩 水	2,422	138	95.0

注：菌液は 1 mg/cc の 0.1 cc を使用

いていえば食塩水菌液において菌塊がわずかに多いようにみられた。この結果から上記時間の経過中にはいずれの溶媒においても、まだ自然凝集はそれほど顕著ではないことが判明した。ただし多少の自然凝集はこのような時間の経過中にも起こっており、したがって上記推測第1があたらないものでないことは分かるが、ここではまだ問題とするほどではない。

〔実験その2(A)〕 平板培養と深部培養との集落数の比較

上記実験によつて、T.A.M. を溶媒とした菌液は自然凝集を起こすことが少なく、菌体は比較的よく均等に分散し、したがってそれを卵培養基斜面に培養した場合は食塩水菌液に比しより多数の集落を発育せしめた。このようにして推測第1の点を吟味することができたが、次には推測第2の点、すなわち固形培養基上に置かれた菌液が乾燥にさいし、どの程度の自然凝集を起こすかを吟味したいと考え T.A.M. 磨砕菌液を用い、まず卵培養基平板、Tween-albumin 寒天平板培養基 (以下 T.A. 寒天平板と略)、同深部に培養し発育集落数を比較検討した。平板培養基については、接種された菌液の自然凝集を起こす頻度が培養基の種類によりどれほどの差異があるかを確かめようとしたものであり、これに対し深部培養では自然凝集を起こす暇がないと考えられるので、平板培養に比しより多数の集落をはたして与えうるか否かを確かめようとしたものである。

〔方法〕 上記実験その1と同様にして、Sauton 培養基2週間培養の H37Rv 株から T.A.M. 磨砕菌液を作成した。ただしこの場合の濃度は 10⁻⁴ および 10⁻⁵ mg/cc のものである。

T.A. 寒天深部培養法：上記稀釈菌液の 0.1 cc をそれぞれ5枚宛の滅菌シャーレに注ぎ、ついで Dubos albumin 1.7 cc を加え、さらに T.A. 寒天から albumin を除いたものを加熱融解し、その 15 cc 宛を流しこみよく混和し放置凝固せしめた。

T.A. 寒天平板培養法：1.7 cc 宛の Dubos albumin を入れた 10 枚のシャーレに T.A. 寒天から albumin を除いたものを加熱融解し、その 15 cc 宛を流しこみ放置して T.A. 寒天平板培養基を作った。2種の稀釈菌液

の 0.1 cc をそれぞれ5枚宛の平板に注ぎ全面を潤わしめた。

卵培養基平板培養法：10枚のシャーレに卵培養基液 17 cc 宛を流しこみ、滅菌凝固させ平板とした。菌の接種は上記 T.A. 寒天と同様にした。

上記のごとく菌液を接種した平板は乾燥を防止するためにビニール袋に包んで培養し、培養3週後における発育集落数を観察比較した。

〔成績〕表3にみるごとく T.A. 寒天深部に培養した場合が他の2者に比しより多数の集落を発育せしめ、

表3 平板深部と表面との集落数の比較

培養法		菌液濃度 mg/0.1cc	日 数	
			21 日	
			10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
T. A. 寒 天 深 部		A	227	33
		B	203	27
		C	186	25
		D	161	19
		E	c	c
T. A. 寒 天 平 板		A	119	22
		B	104	13
		C	82	10
		D	c	8
		E	c	c
卵培養基 平 板		A	94	17
		B	81	10
		C	66	9
		D	54	7
		E	51	6

注：表中cは雑菌混入のため観察不能を示す

しかも集落は融合することなく散在した。T.A. 寒天平板と卵培養基平板とを比較すれば前者が多少とも多い集落を発育せしめた。かくのごとく一定の均等な菌液を使用したにもかかわらず深部培養と表面培養とでは、その発育集落数にかなりの差異を招来したのは何に由来するのであろうか、その主因は推測の第2において述べたごとく、菌液を固形培養基表面に接種する場合には、その菌液が急速にあるいは徐々に乾燥する過程において自然凝集を起こすことが当然懸念されるし、また菌液は完全に乾燥するに先立つて固形培養基表面上で無数の微細な露滴状になり、そのとき菌はそれぞれの露滴に吸引され多少とも集合することが考えられる。一方深部に培養すれば上記のごとき懸念はほとんどなく、これらの相違が結果的に深部と表面培養との発育集落数にかくのごとき顕著な差を招来したのではないかと推測される。そこで菌液を固形培養基の表面に滴下し、その乾燥後菌液中

の菌液は培養基上にどのような状態で分散付着しているかを実際に確かめるために下記のごとき実験を行なった。

〔実験その2(B)〕2種の菌液を卵培養基平板およびT.A. 寒天平板に接種、乾燥したのちにおける平板上の菌の分散付着状態の吟味

(予備実験) 菌液が培養基面に乾燥付着した状態を実際に観察する方法とその比較

菌液を平板上に滴下乾燥後、これらの菌液中の菌の分散付着状態を調べる方法としては種々考えられるであろうが、著者はスライドガラスを培養基の表面に押付けたのち、これを固定染色して検鏡観察する方法がもつとも当を得たものであろうと判断した。しかして通常のスライドガラスを用いたのでは、はたして正確な結果が得られるかどうか不安がある。そこで卵白グリセリン、シリコンをもつて被覆したスライドガラスを用いるならば、さらにより正確な結果が得られるのではないかと考え、これら2種のスライドに転写する方法をあらかじめ比較検討するため下記のごとき予備実験を行なった。

Sauton 2 週間培養の H37Rv 株を用いて 1 mg/cc の食塩水菌液を作り、その 0.1 cc を卵培養基平板上に滴下し、それが乾燥してのち (37°C 約 40分)、下記のスライドを平板上に押付けてそれらに転写される菌数の多寡を比較した。

(1) 清拭しかつ火焰を通過して表面を焼いたスライドを培養基上に押付けたのち、これをはがしてメタノールで固定し、チール・ネールセン染色して検鏡。

(2) 卵白グリセリンで被覆したスライドをもつて上記と同様に転写し、火焰固定後チール・ネールセン染色して検鏡。

(3) 東¹⁰⁾はあらかじめシリコンを焼きつけたスライドをもつて S.C.M. を試み好成績を得ているが、著者はこれにヒントを得てシリコンを焼きつけた (200°C 10時間) スライドを菌液の付着した平板に押付けて転写した。この場合には固定はメタノールを用いて行ない、微加温した石炭酸フクシン液に一定時間漬したのち水洗し、メチレンブラウ液に漬して後染色し、水洗後検鏡した。

その成績は表4に示すごとく、シリコン被覆スライドを使用した場合が上記(1)通常のスライド(2)卵白グリセリン被覆スライドを用いた場合よりもより多数の菌数を示したので、下記の実験にはこのシリコン・スライドを使用することとした。ただしこの方法によつて培養基面に分散付着した菌のどれほどが転写観察せられるかは、対照実験が行ないがたいために知るべくもないが、比較的な観察には用いるのではないかと考える。

本実験

表 4 培養基表面上の菌のスライドガラスへの転写

方 法	単個菌	菌 塊 (2コ以上の菌 体からなる)
(1) スライドガラスを培養基に押付ける	936	88
(2) 卵白グリセリン被覆スライドガラスを押付ける	1,018	105
(3) シリコンを焼きつけたスライドガラスを押付ける	3,711	273

注：菌液は 1 mg/cc の 0.1cc を使用

上記予備実験の結果から、T.A.M. および食塩水を溶媒とした2種の磨砕菌液を T.A. 寒天平板および卵培養基平板に滴下し、乾燥後の菌の分散付着状態をシリコン・スライドを用いて比較検討した。

〔方法〕 Sauton 2 週間培養の H37Rv 株から T.A.M. および食塩水のそれぞれ均等な 1 mg/cc の菌液を作り、さらにこれらの菌液を上記それぞれの溶媒を用いて 10⁻⁴mg/cc の稀釈菌液を作成し、あらかじめこれらの菌液を位相差顕微鏡で観察して本実験の使用に耐えるようによく菌が分散しているかどうかを検討したが、表5のごとく十分実験に使用しうることを認めた。そこで

表 5 菌液中の菌の分散状態 (菌数 300 コ)

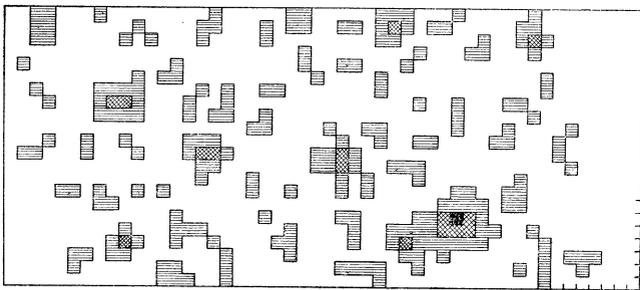
菌液の種類	菌の状態		
	単個菌	菌 塊 (2コ以上の菌 体からなる)	単個菌 の割合 (%)
Tween-albumin medium	292	8	97.3
食 塩 水	286	14	95.3

注：菌液は 10⁻⁴mg/cc の 0.1cc を使用し、すべて位相差顕微鏡により検鏡

これらの菌液を前述の実験その2 (A) と同様の方法で卵培養基および T.A. 寒天の平板上に滴下し、孵卵器内に放置して菌液を乾燥させた。乾燥後シリコン・スライドを平板上に軽く押付け、スライドは上記予備実験と同様にして固定・染色・検鏡した。

〔成績〕 各スライドは全面を観察 (倍率 800 倍) し、

図 1 10⁻⁴mg/cc T.A.M. 磨砕菌液を T.A. 寒天平板上に滴下、乾燥直後の菌分散状態



注：□は4視中菌数0 □は同菌数11~50コ
■は同菌数1~10コ ■は同菌数51コ以上

4 視野を1括して1柵目として図示したものが図1~4である。図1 (T.A. 寒天平板) と図2 (卵培養基平板) を比較すれば培養基の種類による差は少なく、この両図から認められることは平板上に乾燥付着した菌は自ら粗密の差を示すことが明らかとなった。さらに図3, 4, すなわち食塩水菌液を使用した場合はその傾向が一層顕著で、平板のある部分には比較的菌は分散し、またある部分では多数の菌が小面積中に集合付着していることを知った。あらかじめ位相差顕微鏡で観察したときには比較的よく分散していた菌が一たん平板上に置かれて乾燥付着したのちには、このような粗密の状態にあることは上記推測第2において懸念したことが事実となつて現われたのではなからうか。

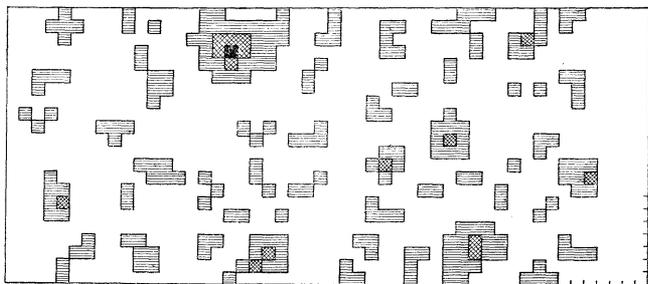
総括および考察

すでに緒言中にも述べたごとく、近時賞用されている定量培養法に関して著者は2つの懸念をもっている。それは(1)菌液中の菌体が時間の経過とともに自然凝集を起こし、このような菌液を培養した場合には正確に生菌数を知りえないのではないかとということ、(2)菌液が培養基面に置かれてのち、徐々に蒸発、濃縮する過程中に自然凝集が起こり、さらには培養基面に乾燥固着するさいに菌が機械的に集合することによって正しい生菌数を知りえないのではないかとということである。

このような懸念の当否を実証するために上記のごとき実験を試みたのであるが、まず上記推測第1の点については、実験その1からも明らかなごとく菌液作成後 30~40 分の経過中には自然凝集はまだそれほど顕著ではないことが分かった。すなわち菌液作成後比較的短時間内に培養に供するならば上記推測第1の懸念はそれほど重要視するほどのこともない。ただ強いていえば、やはり食塩水菌液においては T.A.M. 磨砕菌液におけるよりも自然凝集を起こす傾向がやや強いことを知りえたにすぎない。推測第2の点については上記実験その2において知りえたごとく、菌液が培養基表面に置かれてのち蒸発、濃縮し、乾燥固着するさいにおそらくは凝集ない

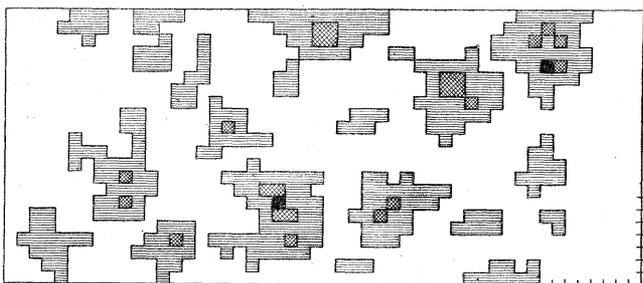
しは菌の集合が起こったことを明らかに示している。このことは結果からみて培養基表面に培養する方法が同深部に培養する方法に比し、より少ない集落数を与えた主因ではないかと判断したい。上記のごとき実験成績ならびに考察にたつてみると、現今広く賞用せられる卵培養基斜面あるいは平板上に菌液を……食塩水菌液においてとくに……注ぎ培養する方法が当を得たものであるかどうかは自ら明らかになる。すなわちたとえ食塩水菌液を避けて Tween 菌液を用いるとしても、培養基表面に培養す

図2 $10^{-4}mg/cc$ T.A.M. 磨碎菌液を卵培養基平板上に滴下，乾燥直後の菌分散状態



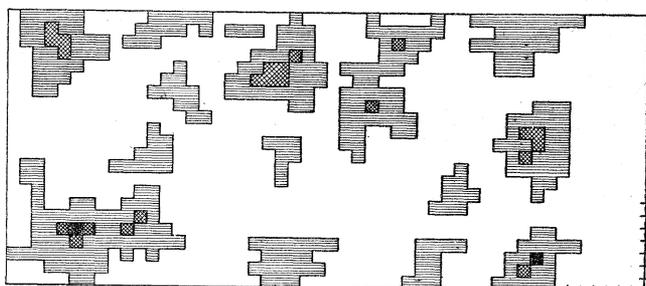
注：図1に同じ

図3 $10^{-4}mg/cc$ 食塩水菌液を T.A. 寒天平板上に滴下，乾燥直後の菌分散状態



注：図1に同じ

図4 $10^{-4}mg/cc$ 食塩水菌液を卵培養基平板上に滴下，乾燥直後の菌分散状態



注：図1に同じ

る方法で得られた数値はかなり大きい誤差を含むものとみななければならない。Yegian & Budd²⁾ はすでにこのような点を顧慮して吟味を加え、一定の見解を公けにしているにもかかわらず、このような深部培養法がその後ほとんど省りみられないのは不思議に思われる。もちろんこのような方法は手技が多少複雑ではあるが、それぞれの目的に適するように改変して利用すればよいのではないかと考える。なお培養基表面に菌液を注ぎ培養する方法では、培養基表面を水平に保つことが非常に困難である。菌液は大なり小なり培養基面のいずれか一側に偏して乾燥固着するものとみななければならない。このようなこともまた培養基表面に培養する方法の欠点を助長し

ていることが当然考えられる。ごく概略の数値を知ればよいような実験に供する場合は許されるとしても、正確な数値を必要とするような実験にこのような欠点をもった表面培養の方法をあえて利用することは当を得たこととはいいがたいのではないかと考える。

結 論

結核菌定量培養法の正確さに関し疑問があつたので、上記のごとくまず菌液の培養について吟味を試み次のごとき結論を得た。

1) 菌液作成後 30~40 分内には菌の自然凝集はそれほど顕著ではなかつた。強いていえば食塩水菌液は T.A.M. 菌液に比し凝集の傾向がやや強かつた。

2) 培養基表面に注がれた菌液は、それが蒸発、濃縮し、さらに培養基面に乾燥固着するさいに菌の凝集ないし集合が起つた。そのためか表面培養は深部培養に比しより少ない集落数を与えた。

3) 上記の成績ならびに考察は定量培養法のあり方について反省せしめる。深部培養法は手技が多少とも複雑ではあるが用途に適するように改変して利用すべきであろう。

稿を終るに臨み終始御指導ならびに御校閲を賜つた恩師植田教授に深甚の謝意を表します。なおあわせて終始御助言を賜つた上坂助教授、大岩博士の御好意を感謝いたします。

文 献

- 1) R.J. Dubos & G. Middlebrook : Am. Rev. Tbc., 56 : 1, 334, 1947.
- 2) D. Yegian & V. Budd : Am. Rev. Tbc., 64 : 1, 81, 1951.
- 3) 小川・佐波 : 結核, 24 : 45, 昭24.
- 4) 小川 : 結核, 24 : 51, 昭24.
- 5) 小川・石井 : 結核, 24 : 57, 昭24.
- 6) 小川 : 結核, 24 : 80, 昭24.
- 7) 小川・大島・鳴海 : 結核, 24 : 97, 昭24.
- 8) 山田・岡田 : 結核, 27 : 67, 昭27.
- 9) 上坂・友田 : 結核研究, 1 : 244, 昭16.
- 10) 東 : 京都大学結核研究所紀要, 7 : 3, 461, 昭34.