

結核菌定量培養法に関する研究補遺

第2篇 定量培養法の比較——感染動物臓器を材料とした場合

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

前篇においては菌液を材料とした場合の定量培養法について検討した。その結果は、Tween-albumin medium (以下 T.A.M. と略) あるいは生理食塩水 (以下食塩水と略) で磨砕したいずれの菌液においても、短時間内には懸念するほどの凝集は起こさなかつたが、これらの菌液を Tween-albumin 寒天培養基 (以下 T.A. 寒天と略) および卵培養基の表面に塗布培養した場合には、菌液が蒸発、濃縮し培養基表面に乾燥固着するさいに、かなりの凝集ないしは集合の起こることをみた。このことが斜面および平板上の培養が T.A. 寒天深部の培養に比較して劣る主因ではないかと考察した。

本篇においては、続いて感染動物の臓器組織を材料とした場合について検討した。感染動物においては、感染の経過につれて臓器組織内の菌の分散集合の状態が変化すること¹⁾はよく知られている。同様に摘出した人の病巣材料あるいは喀痰その他の病原材料においては、病期に応じてその中の菌の分散集合の状態が変化することもまた周知のごとくである。それゆえ、これらの材料を乳鉢中であるいはホモジナイザーにて磨砕する場合に、臓器組織中の菌が常によく分散せられるか否かをまず吟味されなければならない。ついで上記各種材料から作った乳剤を培養基表面に培養する場合、乳剤が時間の経過とともに蒸発、濃縮し、培養基面に乾燥固着する過程に凝集ないしは集合が起こらないかどうかを吟味されなければならない。とくにこの場合には、乳剤中には組織に由来する沈澱物その他が豊富に含まれ、それらのものに菌が吸着集合する懸念もある。すなわちこのような考え方からすれば、上記各種の材料の定量培養に、現状好んで使用されている方法に多少の不安が感じられるので、いささか検討を加えた。

方法および材料

(1) 感染動物臓器：Sauton培養基2週間培養の H₃₇Rv 株を乾燥、秤量後 10% グリセリンを除いた T.A.M. を用いて乳鉢中でよく磨砕して 10 mg/cc の T.A.M.

磨砕菌液を作成し、重量 600~700 g の 4 匹の健康海狸の心臓内に菌液 1 cc (10 mg) 宛を接種した。菌液接種 3 日、17 日、4 週、6 週後にそれぞれ 1 匹宛を屠殺し、肺、肝、脾を摘出して供試した。

(2) 臓器組織乳剤：摘出した肺、肝、脾の重量 0.1 g に対して 1 cc の割合に T.A.M. を加えてホモジナイザーを用い、あるいは海砂を加えて乳鉢中で磨砕して乳剤とし、これを原液とした。なおそれぞれの場合、T.A.M. をもつて適当に稀釈して供試した。ちなみに使用した T.A.M. は前篇において記載したと同様の Dubos 改良 T.A.M.²⁾ である。

(3) 培養基および培養方法：第1篇と同様に、T.A. 寒天平板表面、同深部および卵培養基 (上坂・友田)³⁾ 平板、さらには近時わが国において好んで用いられるように卵培養基³⁾ 斜面上に培養した。

〔実験その1〕 圧印標本による臓器組織中の菌の撒布状態の観察

〔方法〕 肺、肝、脾の一部を切断し、これら臓器の割面をスライドガラスに軽く押付けて圧印標本 (Impression smear) を作成 (各臓器につきおのおの 5 枚宛) し、乾燥、メタノール固定後チール・ネールセン染色を施し、感染後の日数につれて、臓器内での菌の撒布状態がどのように変化するかをうかがった。

〔成績〕 圧印標本中の菌の撒布状態は表 1 に示すごとく、接種 3 日後には肺においてはかなり多数の菌を認めたが、肝、脾では肺に比し菌数は少なかつた。しかし認めえた菌の状態は単個菌がもつとも多く、2~5 コの菌体から成る菌塊は、肺では単個菌の約 1/4、肝、脾では約 1/3 にすぎず、6 コ以上の菌体から成る菌塊は、肺および脾において少数を認めたにすぎなかつた。ちなみに、この時期においては、菌はまだ単個菌のままの状態、その約 40% はすでに細胞に貪喰されていた。17 日後においては、3 日後のそれに比し菌数は減少して非常に少なく、しかも単個菌よりもすでに発育して菌塊の像を呈するものが多かつた。またこれらの菌は貪喰細胞内にあるものと、しからざるものとが相半ばし、細胞内の菌もまた菌塊を呈し、増殖したと推測されるものが多

表 1 各種臓器断面の圧印標本における菌の撒布状態

| 感染後の日数 | 3 日 | | | | 17 日 | | | | 4 週 | | | | 6 週 | | | |
|--------|-----|----|---|---|------|----|----|---|-----|-----|----|---|-----|---|---|---|
| | A | B | C | D | A | B | C | D | A | B | C | D | A | B | C | D |
| 肺 | 229 | 54 | 7 | 0 | 33 | 52 | 17 | 2 | 91 | 112 | 31 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 肝 | 23 | 3 | 0 | 0 | 8 | 6 | 1 | 0 | 14 | 17 | 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 脾 | 51 | 7 | 1 | 0 | 14 | 9 | 2 | 0 | 26 | 31 | 10 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |

注：1) 表中の数値は標本1枚につき100視野を観察し、5枚の合計数を示す

- 2) A は単個菌
 B は 2~5 コまでの菌体から成る菌塊
 C は 6~10 コまでの " } を示す
 D は 11コ以上の "

かつた。次に各臓器とも4週後には、17日後よりも総体として菌数が増加し、しかもやや大きい菌塊がさらに増加した。菌は細胞内にあるものと細胞外に存在するものとが相半ばし、細胞内のもはその大多数が菌塊を呈した。6週後にはほとんど菌を認めず、肺標本中にわずかに2コの単個菌をみにすぎなかつた。

〔実験その2〕 位相差および染色検査による臓器組織乳剤中の菌分散状態の観察

〔方法〕 上記方法および材料の項において述べたごとく、H₃₇Rv 株 10 mg を心臓内に感染させた海猿を3日、17日、4週、6週後に屠殺して肺、肝、脾を摘出し、切半してその半分は0.1gに対してT.A.M.1

ccの割合に加え、ホモジナイザーで20,000回転2分間ホモジナイズし、また他の半分は乳鉢にとり、T.A.M.を上記同様の割合に加え、さらに海砂の適量を加えて約10分間丁寧に磨砕して乳剤とした。これら2種の臓器組織乳剤の10倍稀釈液のそれぞれ0.1ccをスライドガラス上に滴下し、カバーで被い位相差顕微鏡により、またこれら両乳剤原液の0.1ccをそれぞれスライドガラス上に滴下し、血液標本を作る要領で薄く塗抹し、チール・ネールセン染色により、実験その1の臓器圧印標本においてみた菌がどの程度までよく分散しているかを検討した。

〔成績〕 各臓器をホモジナイザーあるいは乳鉢を用いて乳剤とした場合の菌分散状態の成績は次のごとくであ

表 2 肺組織乳剤中の菌の分散状態 (位相差)

| 感染後の日数 | 菌の状態 | 3 日 | | | 17 日 | | | 4 週 | | | 6 週 | | |
|--------|---------|-----|---|----|------|---|----|-----|---|----|-----|---|-----|
| | | A | B | % | A | B | % | A | B | % | A | B | % |
| 乳剤 | ホモジナイザー | 75 | 4 | 95 | 27 | 2 | 93 | 51 | 3 | 94 | 19 | 1 | 95 |
| | 乳 鉢 | 67 | 5 | 93 | 31 | 3 | 91 | 71 | 5 | 93 | 6 | 0 | 100 |

注：1) 表中の数値は10倍稀釈液0.1cc中の菌数を示す。標本1枚につき100視野を観察し、5枚を合計

- 2) A は単個菌
 B は 2~5 コまでの菌体から成る菌塊 } を示す
 % は単個菌の割合

る。すなわち位相差顕微鏡による肺組織乳剤の成績は表2のごとくで、ホモジナイザーおよび乳鉢の両乳剤における菌の分散状態は、感染後の日数の如何を問わずほとんど同じ程度に分散し、ほぼ90%以上の菌が単個の状態を呈していた。またこれら乳剤(原液)の塗抹標本における菌の分散状態は表3、4に示すごとくで、位相差の場合とほとんど同じ傾向を示し、感染3日後から6週にいたるまではほぼ90%以上の菌が単個菌の状態に分散していた。またほとんどの細胞は磨砕することによって破壊し、一部ごく少数の細胞が残存したにすぎなかつた。実験その1の臓器断面の圧印標本では、感染後日数が経過するに従い臓器組織内では単個菌は減少し、菌

塊が増加していつたにもかかわらず、上記のごとくホモジナイザーおよび乳鉢で磨砕した場合にはいずれの時期の臓器組織から作った乳剤においてもほぼ90%以上の菌が単個の状態を呈した。以上のことから、ホモジナイザーあるいは乳鉢を用いて臓器を磨砕する場合には、臓器組織はもちろん、細胞をも破壊しつつ、その結果は菌塊をもまたほぼ単個菌に分散させることが判明した。ちなみに作成方法を異にする上記2種の乳剤の間には、この点からみてほとんど優劣のないことを知つた。

〔実験その3〕 臓器組織乳剤を培養基表面および深部に培養した場合の集落数の比較

表3 各種臓器組織乳剤中の菌の分散状態 (ホモジナイザー)

| 感染後の日数 | | 3日 | | 17日 | | 4週 | | 6週 | |
|--------|---|-----|---|-----|---|----|---|----|---|
| 菌の状態 | | A | B | A | B | A | B | A | B |
| 乳剤 | 肺 | 128 | 9 | 47 | 4 | 87 | 5 | 2 | 0 |
| | 肝 | 22 | 2 | 6 | 1 | 23 | 2 | 0 | 0 |
| | 脾 | 27 | 2 | 20 | 2 | 39 | 3 | 0 | 0 |

注: 1) 表中の数値は原液 0.1 cc 中の菌数を示す。標本 1 枚につき 100 視野を観察し, 5 枚を合計
 2) A は単個菌
 B は 2~5 コまでの菌体から成る菌塊 } を示す

表4 各種臓器組織乳剤中の菌の分散状態 (乳鉢)

| 感染後の日数 | | 3日 | | 17日 | | 4週 | | 6週 | |
|--------|---|-----|----|-----|---|----|---|----|---|
| 菌の状態 | | A | B | A | B | A | B | A | B |
| 乳剤 | 肺 | 119 | 12 | 52 | 6 | 69 | 4 | 0 | 0 |
| | 肝 | 13 | 1 | 9 | 2 | 14 | 1 | 0 | 0 |
| | 脾 | 32 | 4 | 24 | 3 | 33 | 2 | 0 | 0 |

注: 表3に同じ

〔方法〕 ホモジナイザーあるいは乳鉢を用いて作成した臓器組織乳剤を原液とし, さらに T.A.M. を用いて 100 倍, 1 万倍に希釈し, それぞれの 0.1 cc 宛を 3 枚の T.A. 寒天平板, 同深部, 卵培養基平板および 3 本の卵培養基斜面に培養した。平板は乾燥を防止するためビニール袋に包み, 斜面は型のごとく密栓して孵卵器に納め, 培養 1 カ月後における発育集落数を比較した。

〔成績〕 1 万倍希釈乳剤における成績は表 5, 6 に示すごとくで, T.A. 寒天深部に培養した場合が, 他の 3 者すなわち T.A. 寒天平板, 卵培養基平板および同斜面培養に比し, より多数の集落を発育させ, しかも集落は互いに融合することなく散在した。しかるに T.A. 寒天, 卵培養基平板および同斜面に培養したものでは, その発育集落数は上記の順序に多かつたが, しかしこれら 3 者の間には明確に優劣をつけうるほどの顕著な相違はなかつた。ちなみにホモジナイザー法と乳鉢法との間にもまた大差がなかつた。

それでは一定の乳剤を使用したにもかかわらず, 深部培養と表面培養との発育集落数にかくのごとき差異を招来したのはいかなる理由によるのであろうか, このことに関してはすでに第 1 篇においても検討したごとく, 乳剤においてもまた培養基の表面に置かれてのち蒸発, 濃縮し, 乾燥, 固着する経過中に自然凝集を起さずには機械的に菌が集合したためではないかということが疑われる。そこでこの点を確かめるために下記のごとき吟味を試みた。

表5 臓器組織乳剤 (ホモジナイザー) の発育集落数 (1 万倍希釈液)

| 感染後の日数 | | 3日 | | 17日 | | 4週 | | 6週 | |
|---------|-------|----|-----|-----|-------|----|--|----|--|
| 臓器 | | 3日 | | 17日 | | 4週 | | 6週 | |
| 培養法 | | 3日 | | 17日 | | 4週 | | 6週 | |
| T. 寒天深部 | A. 肺部 | 47 | 278 | 474 | 399 | | | | |
| | A. 肝部 | 4 | 29 | 127 | 132 | | | | |
| | A. 脾部 | 8 | 86 | 898 | 1,517 | | | | |
| T. 寒天平板 | A. 肺部 | 25 | 85 | 264 | 261 | | | | |
| | A. 肝部 | 3 | 17 | 62 | 77 | | | | |
| | A. 脾部 | 0 | 54 | 607 | 1,171 | | | | |
| 卵培養基平板 | A. 肺部 | 13 | 78 | 257 | 244 | | | | |
| | A. 肝部 | 0 | 13 | 63 | 69 | | | | |
| | A. 脾部 | 0 | 56 | 552 | 1,092 | | | | |
| 卵培養基斜面 | A. 肺部 | 14 | 65 | 241 | 229 | | | | |
| | A. 肝部 | 0 | 15 | 44 | 79 | | | | |
| | A. 脾部 | 0 | 47 | 517 | 1,062 | | | | |

注: 表中数字はそれぞれ3つの培養基における集落数の合計を示す

表6 臓器組織乳剤 (乳鉢) の発育集落数 (1 万倍希釈液)

| 感染後の日数 | | 3日 | | 17日 | | 4週 | | 6週 | |
|---------|-------|----|-----|-----|-------|----|--|----|--|
| 臓器 | | 3日 | | 17日 | | 4週 | | 6週 | |
| 培養法 | | 3日 | | 17日 | | 4週 | | 6週 | |
| T. 寒天深部 | A. 肺部 | 32 | 255 | 446 | 392 | | | | |
| | A. 肝部 | 2 | 20 | 120 | 112 | | | | |
| | A. 脾部 | 6 | 83 | 908 | 1,501 | | | | |
| T. 寒天平板 | A. 肺部 | 19 | 81 | 266 | 270 | | | | |
| | A. 肝部 | 0 | 12 | 57 | 74 | | | | |
| | A. 脾部 | 3 | 52 | 624 | 1,207 | | | | |
| 卵培養基平板 | A. 肺部 | 13 | 65 | 244 | 234 | | | | |
| | A. 肝部 | 0 | 9 | 59 | 76 | | | | |
| | A. 脾部 | 3 | 61 | 545 | 1,144 | | | | |
| 卵培養基斜面 | A. 肺部 | 11 | 66 | 227 | 213 | | | | |
| | A. 肝部 | 0 | 11 | 36 | 51 | | | | |
| | A. 脾部 | 0 | 49 | 526 | 1,116 | | | | |

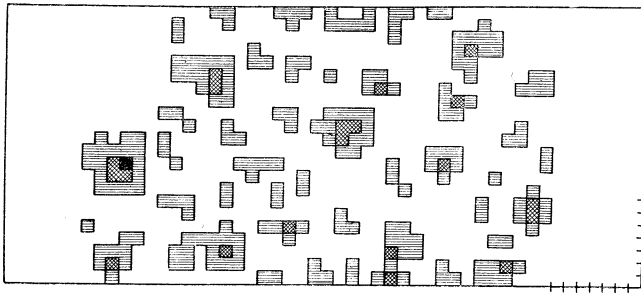
注: 表5に同じ

〔実験その4〕 臓器組織乳剤が培養基面に乾燥固着した直後の菌分散状態の吟味

〔方法〕 上記2種の臓器組織乳剤の原液 0.1 cc をそれぞれ T.A. 寒天および卵培養基の平板上に滴下し, 孵卵器内に放置して乳剤を乾燥させた直後 (約 60 分) 第 1 篇と同様にしてシリコン被覆スライド⁴⁾を平板上に軽く押付け, 菌をスライド上に転写する方法を試みた。

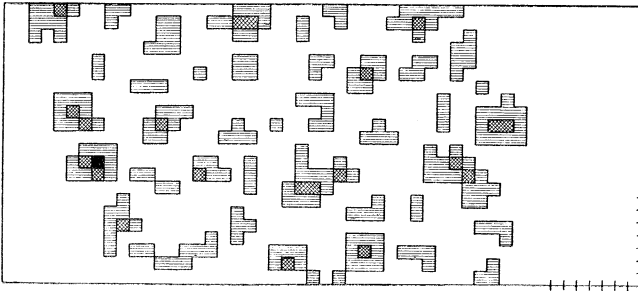
〔成績〕 各スライドは全面を観察 (倍率 800 倍) し,

図1 肺組織乳剤（ホモジナイザー）を T.A. 寒天平板上に滴下，乾燥直後の菌分散状態



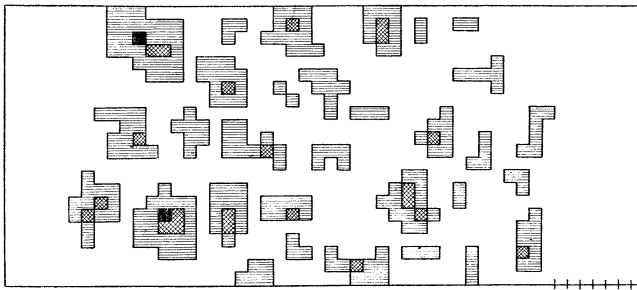
注：□ は4視野中菌数0 ■ は同菌数11~50コ
 ◻ は同菌数1~10コ ■ は同菌数51コ以上

図2 肺組織乳剤（ホモジナイザー）を卵培養基平板上に滴下，乾燥直後の菌分散状態



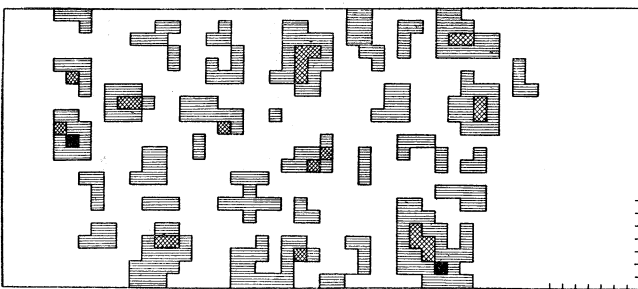
注：図1に同じ

図3 肺組織乳剤（乳鉢）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 肺組織乳剤（乳鉢）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

4視野を1括して1柘目として図示した。肺組織乳剤における単個菌の分散付着状態は、図1~4に示すごとくである。すなわちホモジナイザーによる乳剤を使用した図1（T.A. 寒天平板）および図2（卵培養基平板）を比較すれば、培養基の種類による差異は少なく、平板上に乾燥付着した菌はかなり顕著な粗密の差を示していることをうかがうことができた。さらに図3（T.A. 寒天平板）および図4（卵培養基平板）すなわち、乳鉢中で作った乳剤の場合もまた培養基の種類による差は、上記ホモジナイザーによる乳剤と同様少なかったが、菌が粗密の差を示しながら培養基面に固着する傾向は、ホモジナイザー乳剤に比し若干強いように思われた。ちなみに、上記の成績はもつぱら単個菌の分散集合の状態を観察したものであるが、そのほかにも小型の菌塊がかなりの数観察された。このような菌塊の出現する頻度は、上記実験その2における乳剤の場合に比し、幾分大きいようであった。すなわち、平板上に滴下する前には比較的よく分散していた乳剤中の菌が一たん平板上に置かれ、乳剤が蒸発、濃縮し、乾燥固着するときに自然凝集ないしは集合が起こるのではないかという懸念が上記のごとく事実となつて現われた。すなわち、均質な乳剤を培養したにもかかわらず、菌は平板上である部分では粗に分散し、ある部分では密に集合することを知りえた。さらに組織乳剤の場合は、組織由来する沈澱物等が含まれ、それに菌が吸着集合することが考えられること、および組織乳剤は平板上に置かれた場合には菌液に比し、拡がりにくいこと等もまた菌の凝集ないしは集合を若干助長するのではないかということは、上記の成績を判断するにあたって当然顧慮されなければならないであろう。肺以外の臓器組織乳剤においても、ほぼ類似の結果であつた（図示省略）。

総括および考案

上記実験結果から、臓器断面の圧印標本の所見と、乳剤を直接検鏡した所見とを対照すれば、臓器内で多少とも菌塊を形成していたものも、乳剤中ではよく単個に分散することを知つた。このことから上記懸念の1つ、すなわち組織中の菌塊がホモジナ

イザーあるいは乳鉢で磨砕することによつて、よく単個に分散するかどうかの懸念は一応無用であることを知りえた。ちなみに、作成方法を異にする上記2種の乳剤間には、この点からみてほとんど優劣はなく、十分定量培養に用いることを知つた。しかるにこのような均質な乳剤の一定量宛を、それぞれ T.A. 寒天平板、同深部、卵培養基平板および同斜面に培養した場合の発育集落数においては、臓器組織乳剤の作り方および濃度の如何にかかわらず、深部に培養したものが他の3者すなわち培養基表面の培養に比し、常により多数の集落を発育せしめた。

それではこのような差異は何によつて招来されたのであろうか、深部培養では乳剤混合直後に培養基の凝固が起り、菌の移動を許さないのに反し、培養基表面に培養する方法では、培養基面に置かれた乳剤が蒸発、濃縮し、乾燥凝固するまでに一定の時間を要する。この間に上記のごとき差異を招来した機転が潜在することは明らかである。そこで上記実験その4のごとく、シリコン被覆スライドを培養基面に押付けて、菌をスライド上に転写して観察する方法を考案して試みた。その結果は培養基面に置かれた乳剤中の菌は、乳剤が蒸発、濃縮し、乾燥固着するさいに、当初よく分散したそのままの状態では培養基面に固着しないということが明らかとなつた。乳剤が乾燥固着したときには、菌は培養基面のある部分では粗に散在し、またある部分ではやや密に集合することを知りえた。ときには狭い範囲に多数の菌が密接して集合するのを見ることができた。すなわち、培養基面に置かれた乳剤は、たとえそれが均質な乳剤であつても、乳剤が培養基面に乾燥固着するまでに均質ではなくなることに注意せねばならない。上記のごとく、平板あるいは斜面に培養する方法が常に深部に培養する方法に比して、より少ない集落数を与えるのはこのような機転、すなわち培養基に接種された乳剤が乾燥固着するまでに一定の時間を必要とするということに由因することを知ることができた。

上記のごとき実験成績ならびに考察にたつてみれば、現行の定量培養法、すなわち卵培養基斜面あるいは同平板に菌液あるいは感染動物臓器乳剤を塗布培養する方法は、一応再考の余地があるのではないかと思われる。すなわちこのような方法がはたして菌液あるいは臓器組織乳剤中の生菌数を正しく示すかどうかにはかなりの不安がある。当然 T.A. 寒天深部培養法が用いられるべきであると考え。ただしこの方法は手技が多少複雑となり、また他方濃厚な組織乳剤の培養に適しない欠点があるがこれらの点を適当に改変すれば十分用いるものと

考える。

もちろん上記の実験においては、ある一定濃度の菌液あるいは臓器乳剤を供試したにすぎないが、このような吟味においては供試する菌液の濃度が因より結果に係属するところが大であることが考えられるので、さらに各種濃度の菌液を材料とした場合にそれぞれの濃度においてはたして深部培養法と表面培養法との差異がどのように表現せられるかを後篇において検討したい。

結 論

結核菌感染海溟の種々の時期の臓器を材料として臓器内結核菌の定量培養法を検討し、次のごとき結論を得た。

- 1) 臓器断面の圧印標本からみれば、感染経過とともに臓器内結核菌の撒布状態は变化した。すなわち初期にはよく分散したが、感染の経過につれて次第に菌塊を形成した。
- 2) ホモジナイザーあるいは乳鉢を用い、感染後いずれの時期の臓器から乳剤を作成しても、菌は乳剤中でよく単個に分散した。
- 3) 均質な乳剤を培養した場合にも、平板および斜面培養は T.A. 寒天深部培養に比し、より少ない集落を与えた。
- 4) 培養基面に乾燥固着した菌を、スライドに転写する方法で吟味した結果は、平板では乳剤中の菌はその乾燥にさいし、培養基面にある部分では粗に散在し、ある部分では密に集合した。
- 5) 卵培養基斜面あるいは同平板を用いるところの現行の臓器内結核菌の定量培養法はたして正しい生菌数を示しているかどうか不安がある。

稿を終るにのぞ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) 植田三郎：結核菌の研究，1：54，昭26。
- 2) R.J. Dubos & G. Middlebrook：Am. Rev. Tbc., 56：334，1947。
- 3) 上坂・友田：結核研究，1：244，昭26。
- 4) 東向一郎：結核研究所紀要掲載予定。
- 5) M.N. Affleck & D.F. Gray：Am. Rev. Tbc., 75：517，1957。