

血液寒天培地の組成検討ならびに同培地による薬剤耐性検査について

第 1 報 血液寒天培地の組成検討

亀 崎 華 家

国立神奈川療養所

受 入 昭 和 34 年 8 月 11 日

緒 言

1950 年に Tarshis ならびに Frisch が発表した血液寒天培地¹⁾は、その組成が簡単であり、培地を容易に準備できること、主成分である血液の供給源を血液銀行の期限切れ保存血に求めているので入手容易かつ鶏卵培地よりも経済的であること、さらに接種材料中の結核菌が少数の場合にも早期に発育をもたらすなど、多くの利点が強調されて紹介された。さらに 1952 年には、培地中にペニシリンを加えることによつて従来の結核菌用寒天培地の弱点であつた汚染が多いという問題を解決に導いている²⁾。1953 年には血液やグリセリンの量について再検討し³⁾、1954 年には寒天の各種サンプルを比較検討している⁴⁾。これらの検討に基づいて Tarshis が推奨する血液寒天培地の組成は、人銀行血液 25~30 %、寒天 (Bacto-Agar) 1.5 %、グリセリン 1.0 %、ペニシリン 50~100 u/cc、蒸留水 74~69 cc であり、最終 pH は 6.8 である。

この培地について Clark⁵⁾ は、血液の代りに人血漿を使い、この培地は半透明で無色なので発生した集落数を容易に確かめられるということ以外には、血液を用いた場合と大差なかつたといつている。Whitcomb ら⁶⁾ は、Löwenstein 培地や ATS 培地に比べて、血液寒天培地の集落初発が早かつたと報告している。Hsiung ら⁷⁾ も Routine の結核菌分離において、Löwenstein 培地よりも早期に結核菌の発生を証明できたといつているが、この成績は接種後 5 ないし 7 日以内に、結核菌が培地表面を被うて、うすい膜 (Slight Film) を形成してきたときに、これをかきとつて抗酸性染色を行ない鏡検した場合の結果であり、肉眼的の初発日数では差がなかつたと報告している。宇野⁸⁾ は Tarshis の原法培地の組成を検討した結果、グリセリンを省き、味の素 0.5 % を加え、血液は 15 % に減量し、さらに磷酸一カリウムを 0.3 % に加えて、前処理過程を容易にしようとして試みている。寺山⁹⁾ は Tarshis の処方による培地と 3 % 小川培地とを比較して、培養陽性率、集落発生時期、発生集落数などにおいて、小川培地よりも劣り、製作簡便、価格低廉という以外には実用的な培地と認め

がたいと報告している。

著者は血液寒天培地が Tarshis のいうように数々の利点をもつにもかかわらず、わが国ではあまり利用されていないのは、小川培地に比べてどんな欠点があるのか、その組成について検討したので報告する。

実験方法ならびに実験結果

〔第 1 実験〕 血液および寒天量に対する検討

1. 実験方法

血液寒天培地の作製は、Tarshis の記載に従つた。血液は採血後 6~7 週の血液銀行保存血を用い、寒天は Bacto-Agar (Difco) を使つた。供試菌株は人型結核菌 H₃₇Rv 株で、3 % 小川培地に発育したものを 1~2 白金耳量とり、Dubos の Tween-Albumin 液体培地に 4 週間均等発育させたものを、1 cc × 10⁻⁵ に希釈し、その 0.1 cc ずつを接種した。実験の各組合せごとに培地 5 本を使用し、集落数はその合計をとり、また集落の初発日数をみるために、判定は接種後 1 日おきに 4 週まで行ない、以後は 1 週ごとに 17 週まで観察した。

2. 実験結果 (表 1~4)

第 1 実験では、血液と寒天の量について検討し、3 % 小川培地と比較した。血液はそれぞれ 15, 25, 30, 50 % とし、寒天はそれぞれ 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 % とし、これらの組合せのうちから、結核菌がもつともよく発育する組合せを求めた。表 1 は培養 4 週後の成績であるが、血液では 15 %、寒天では 2.0 % がよく、この両者を組合わせた培地では、初発日数 16 日、集落数 415 で、これは対照の 3 % 小川培地の成績 (初発日数が 18 日、集落数は 328) よりもやや優れている。ところが、培養 6 週間になると表 2 に示すように、寒天 1.5 % の群の集落数増加が目立ち、とくに血液 15 % の培地群では、寒天 1.5 % と 2.0 % との間にはほとんど集落数の差を認めない (396 と 432)。また 3 % 小川培地の集落数 (414) との差もなくなつていく。表 1 および表 2 の成績から考えると、血液量は 15 %、寒天量は 2.0 ないし 1.5 % がよいといえる。

次に表 1 によつて培地個々の発生集落数を検討すると、最良の組合せすなわち血液 15 % 寒天 2.0 % で

は大休集落数がそろっており (150~57, 平均 83), 3% 小川培地では (87~55, 平均 65.6) というようにさらに安定した成績を示している。これに反し, たとえば血液 50% 群に使用した計 20 本の培地の発生集落数を個々に検討してみると, 最良培地では 47 というように接種菌量に相応した集落数を発生している反面, 陰性例があまりにも多く (20 本中 17 本), 非常に不安定な培地といえる。そこでこの培地の安定性と血液ないし寒天量との関係を調べるため, 表 3 において集落不発育例の分布を検討してみた。まず培養 4 週後では, 血液量が 15, 25, 30, 50% とふえるにつれて未発育例がそれぞれ 1, 8, 15, 17 とふえているのに対し, 寒天量が 1.5, 2.0, 2.5, 3.0% とふえても未発育例は 11, 8, 11, 11 というようにほとんど一定している。さらに培養後 17 週たつてもなお陰性にとどまった 7 例では, 6 例までを血液 50% 群が占め, 残る 1 例も血液 30% 群であり, 寒天量と陰性例との間には特別の関係は認められない。すなわち血液量が増加すれば不発育例がふえるという結果であるが, しかし培養後 4 週での未発育 41 例も 17 週まで観察を続けければその大半 (41-7

=34例) が遅発集落を出現させたこと, および血液量が多くても培地個々のうちには比較的早期に接種菌量に相応する集落数を発生したのもあるということから, 要するに血液寒天培地においては, 血液量が増加するにつれて, 培地個々の性能の安定性が低下するといえる。

次に寒天量につき再検討した。すなわち培養 4 週後の成績 (表 1) では, 寒天 2.0% の成績がよく, Tarsishis が用いている寒天量 (1.5%) では発生集落数, 初発日数ともに劣っていたので, 寒天 2.0% の好成绩に再現性があるかどうかをみるため次の実験を行なった。血液量は 15% に一定し, 寒天量をそれぞれ 1.5%, 2.0%, 2.5% の群に分け, 人型結核菌 H₃₇Rv 株を接種 (菌量は後述の第 2 実験と同じ) し, 週を追って観察した。結果は表 4 に示すとおり, 寒天 1.5, 2.0, 2.5% 群を比較してみると, 集落初発日数はそれぞれ 16, 20, 20 であり, 発生集落数では培養 5 週で 78, 222, 56 を示し, 培養 6 週では 302, 379, 58 を示した。すなわち寒天 2.0% 群および 1.5% 群ではともに優れた結果を示したが, 2.0% 群でやや集落数が多かった。

表 1 血液および寒天量の各種組合せと集落発生

(H₃₇Rv 4週)

血液量 \ 寒天量	1.5 %	2.0 %	2.5 %	3.0 %	計
15 %	70(26, 25, 18, 1, 0) 20*	415(150, 76, 75, 57, 57) 16	138(44, 33, 27, 26, 8) 18	148(44, 35, 31, 24, 14) 20	771
25 %	27(21, 4, 2, 0, 0) 18	36(31, 3, 2, 0, 0) 18	13(5, 3, 3, 2, 0) 26	19(18, 1, 0, 0, 0) 18	95
30 %	5(4, 1, 0, 0, 0) 24	34(34, 0, 0, 0, 0) 24	0(0, 0, 0, 0, 0)	2(1, 1, 0, 0, 0) 24	41
50 %	0(0, 0, 0, 0, 0)	52(47, 3, 2, 0, 0) 20	0(0, 0, 0, 0, 0)	0(0, 0, 0, 0, 0)	52
計	102	537	151	169	959
3% 小川	328(80, 72, 66, 55, 55) 18	注: * 集落初発日数 () 内は培地 1 本づつの集落数			

表 2 血液および寒天量の各種組合せと発生集落数 (H₃₇Rv 6週)

血液量 \ 寒天量	1.5%	2.0%	2.5%	3.0%	計
15 %	396	432	266	250	1,344
25 %	236	47	173	26	482
30 %	8	82	8	18	116
50 %	0	70	1	2	73
計	640	631	448	296	2,015
3% 小川	414				

表 3 集落不発育例の検討

(4週および17週)

血液量 \ 寒天量	1.5%	2.0%	2.5%	3.0%	計
15 %	1				1
25 %	2	2	1	3	8
30 %	3	4(1)	5	3	15(1)
50 %	5(2)	2(1)	5(2)	5(1)	17(6)
計	11(2)	8(2)	11(2)	11(1)	41(7)

注: () 内は17週

表4 寒天量の再検討

判定週	3	4	5	6
寒天量				
1.5 %	11(6, 3, 2, 0, 0) 16*	58(24, 22, 15, 7, 0)	78(40, 17, 11, 7, 3)	302(100, 76, 72, 50, 4)
2.0 %	9(6, 3, 0, 0, 0) 20	45(22, 19, 4, 0, 0)	222(160, 40, 18, 2, 2)	379(160, 160, 22, 19, 18)
2.5 %	1(1, 0, 0, 0, 0) 20	15(11, 2, 2, 0, 0)	56(25, 12, 10, 7, 2)	58(21, 12, 11, 10, 4)

注：* 集落初発1数

表5 グリセリンおよび窒素源（味の素、アスパラギン）添加の影響

(4週)

窒素源(%)	なし	味の素 0.5	味の素 1.0	アスパラギン 0.5
グリセリン(%)				
0	43(14, 10, 8, 8, 3) 20*	89(40, 16, 14, 11, 8) 20	79(26, 23, 14, 11, 5) 20	
1.0	45(22, 19, 4, 0, 0) 20	241(110, 65, 35, 21, 10) 13	66(20, 13, 12, 11, 10) 16	324(79, 70, 60, 60, 55) 13
3% 小川	532(250, 108, 90, 66, 18) 13	注：* 集落初発日数		

〔第2実験〕 グリセリンおよび窒素源（味の素、アスパラギン）添加の影響に対する検討

1. 実験方法

本実験ではグリセリンの必要性と、味の素あるいはアスパラギンなどの窒素源を添加したときの影響を検討した。第1実験での結果から、血液は15%、寒天は2.0%とした培地に、ペニシリン 50 u/cc を加え、これにグリセリン 1.0% を加えたときの効果ならびに味の素 (0.5% および 1.0%) またはアスパラギン 0.5% を添加することによる結核菌発育への影響を調べた。供試菌株は人型結核菌 H₃₇Rv 株で Dubos-Albumin 培地に均等発育2週（第1実験では4週）のものを使つたほかは、すべて第1実験に準じて接種した。

2. 実験結果（表5）

培養4週後の発生集落数からみて、もつとも多かつたのは対照とした3% 小川培地（532）で、次にアスパラギン 0.5% とグリセリン 1.0% の組合せ（324）であり、ついでグリセリン 1.0%、味の素 0.5% を組合わせた培地（241）であつたが、これらの3培地では集落の発生も早く、いずれも接種後13日に集落が出現した。

さて表5でグリセリンの効果を見ると、グリセリン 1.0% を単独に加えた場合にはその効果が認められない。しかしグリセリン 1.0% に加えて味の素 0.5% が存するときには、グリセリン添加による好影響が認められる。また味の素 0.5% はグリセリンがなくても結核菌の発育を多少促進したが、グリセリンがあればその

効果は著明となつた。すなわちグリセリン 1.0% と味の素 0.5% との間には、結核菌の発育促進にあつて相乗的な効果が認められる。また発生集落数は窒素源の添加によつて増加し、これにグリセリンが加わると集落の発生時期が早くなるような傾向が認められた。

〔第3実験〕 酸性血液寒天培地とその前処理法に対する検討

1. 実験方法

Tarshis の血液寒天培地の pH は 6.8 であり、喀痰の前処理には中和を要するが、中和法よりも1段階操作が簡便なアルカリ法ですませるために、培地の組成に KH₂PO₄（磷酸一カルウム）を加えて培地 pH を酸性に変える試みがなされているので⁸⁾、追試してみた。この実験で用いた血液寒天培地は、第1および第2実験の結果から、血液は30% から15% に減量しアスパラギン 0.5% を加えた変法培地（寒天・グリセリン・ペニシリンの量は原法通り）とし、これに KH₂PO₄ をそれぞれ 0.3, 0.4, 0.5% に加えて酸性血液寒天培地（培地作製6日後の凝固水の pH は、Beckman の pH-Meter で計測して、それぞれ 6.13, 6.10, 5.93 であつた）を作り、3% 小川培地を対照とした。

供試病材はガフキー陽性の肺結核患者3名の3日連続早朝喀痰であり、その前処理は、pH 中性の血液寒天培地では中和法、すなわち4% NaOH 水5倍量を加えて希釈、20分間均等化してから0.004% BTB 加 N/1 HCl で中和し、その0.1 cc を接種した。酸性血液寒天培地および3% 小川培地ではアルカリ法すなわ

ち 4 % NaOH 水 5 倍量で希釈し、よくかきまぜて混和し 20 分間均等化してから、その 0.1 cc ずつを接種した。

2. 実験結果 (表 6)

表 6 には、12, 14 および 28 日の培養成績を示した。酸性血液寒天培地では集落の初発がやや遅れる傾向がある。すなわち、中性の血液寒天培地では、喀痰 3 件に用いた培地 15 本の全例に、培養 12 日で集落の初発をみたのに対し、0.3, 0.4 % に KH_2PO_4 を含む血液寒天培地では 15 本中各 5 本ずつ遅れ、0.5 % KH_2PO_4 の培地では、15 本中 8 本の初発が遅れた。さらに 3 % 小川培地でも 12 本中 3 本の集落発生が遅れた。接種菌量が多かつたので、発生集落数からこれら培地を比較

することは困難であるが、血液寒天培地による喀痰中結核菌の分離培養成績を、3 % 小川および 10 % 保存血加キルヒナー寒天培地と比較した結果は、別に報告する予定である 10)。

アルカリ法処理喀痰を接種した酸性培地群では、集落発生がやや遅れた培地があつたが、中和法処理喀痰を用いた中性培地では全例にそろつて発育した。中和法ではアルカリ法の段階がすんでから、0.004 % BTB 加 N/1 HCl で中和するとき、さらに十分にかきまぜて中和点を求めるので、喀痰の均等化がより完全になり、また遠心沈澱はしないので、アルカリ法に比べてそれほど面倒な操作ではないように思われる。そこで、血液寒天培地の組成中にあえて KH_2PO_4 を加える必要はない

表 6 酸性血液寒天培地と前処理法

判定日数	前処理 培地 KH_2PO_4 (%)	中和法		アルカリ法			
				15 % 血液寒天			3 % 小川
		0		0.3	0.4	0.5	1.0
ガフキ 1号	12	++ ++ ++ ++ ++	- - - - -	- - - - -	++ - - - -	++ - - - -	++ - - - -
	14	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++
	28	+++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	+++ ++ ++ ++
ガフキ 3号	12	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++
	14	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++
	28	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++
ガフキ 5号	12	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ - - - -	++ - - - -	++ ++ ++ ++
	14	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++
	28	+++ ++ ++ ++ ++	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++

ように思われる。

総括および考案

Tarshis が発表した血液寒天培地の組成を検討した結果、血液は 15 %、寒天は 2.0 ないし 1.5 %、グリセリンは 1.0 %、味の素またはアスパラギン 0.5 %、ペニシリン 50 u/cc、これに蒸留水 84 cc という組成が良好な培養成績を示した。各実験を通じ、3 % 小川培地と比較し、集落の初発日数では血液寒天培地がやや早いか、少なくとも同等であることを認め、また発生集落数では、発生当初はほとんど同数であるが、週を追うに従い 3 % 小川培地の集落数が増加するような傾向を認めた。

Tarshis は、その血液寒天培地の成分中で、結核菌の発育に本質的な役割を演ずるのは、血液の濃度であると、25 ないし 30 % が最良濃度であると述べている 3)。宇野は 15 % と 25 % との間で培養成績に著しい差を認めないから、血液量は 15 % に節約しようと述べて

いる 8)。著者の実験成績では、血液量が増加すると集落発生が遅延あるいは欠除してくる培地が多くなり、したがって培地個々の性能の安定性が低下してくる傾向がみられた (表 3)。この傾向は寒天量の増減とは関係がなかつた。Tarshis がいつているように 1)、血液の濃度は結核菌の発育に対する A Limiting Factor であるが、血液量がふえるにつれて培養成績がよくなったという宇野の成績 8) と比べて、著者の成績ではむしろ逆の傾向がみられた。このような傾向を生じた原因については、推定の域をでないが、培地作製時とくに血液を寒天基汁中に混入するさい、血液濃度がまずにつれて凝固しやすくなるので、培地内諸成分が十分に混合せず、このため生じた培地個々の成分の不均一が、その性能の不安定をもたらしたのであると考えられる。

次に寒天量については、Tarshis らはその終末濃度が 1.6 % までならば、ほかのどんな培地と比べても有効であつたといつており 12)、宇野は 1.5 % で培地作製がもつとも容易であつたと述べている 8)。著者が Bacto-

Agar (Difco) を用いて検討した2回の実験では、1.5%と2.0%との間にほとんど差がないようであり、2.5%、3.0%ではやや発育を抑制するようである。ただし1.5%では培地がやや軟弱となり、斜面形成に長時間を要し、また凝固水が多いので培養途中で試験管壁が水滴でくもつたり、培地表面に沈渣を生じたりして、集落の発見に困難を覚えた。

グリセリンに関して Tarshis らは、結核菌発育に対する本質的な価値を認めていない¹²⁾が、グリセリン1%の添加によつて培地の感度をいくらか高め、発育初期に発見容易なより大きい集落を得たと報告している。宇野⁸⁾は添加の必要なしとして省略している。著者はグリセリン0、1%の場合につき検討し、両者の間にほとんど差を認めなかつたが、これに窒素源が加わると相乗的な発育支持効果がみられ、かつ集落の初発を早めたので、グリセリン1.0%と窒素源とを一様に培地の組成中に加えた。

味の素の発育促進効果については、宇野が報告している⁹⁾が、著者の成績でも発生集落数の増加を認めた。

喀痰の前処理法を簡単にするため、培地の組成中に KH_2PO_4 を加えた酸性血液寒天培地では、集落の初発が不安定で、かつ第2報¹¹⁾で報告するようにジドロストレプトマイシンの抗菌活性に対して磷酸塩の拮抗が認められるので、組成簡単な中性培地に、より完全な均等化が得られる中和法処理喀痰を接種したほうがよいように思われる。

結 論

1) Tarshis の血液寒天培地の組成を検討して、血液は15%、寒天 (Bacto-Agar) は2.0ないし1.5%、グリセリン1.0%、味の素またはアスパラギン0.5%、ペニシリン50 u/cc、蒸留水84 ccの組成で良好な培養成績を得た。

2) 血液寒天培地の組成のうちで、結核菌の発育に対して本質的な役割を演ずるのは、血液量であるが、血液の濃度が濃くなるにつれて(25, 30, 50%)、培地個々の性能が安定性を欠くようになる傾向を認めた。

3) グリセリン1.0%と味の素0.5%とを一様に培地中に加えると、相乗的な発育促進効果を認めた。

4) 血液寒天培地の pH は中性とし、喀痰中結核菌の分離培養にあつては、中和法による処理喀痰の接種が適当である。

5) 小川培地に比べて血液寒天培地はその組成が簡単で経済的であり、集落初発がやや早く、発生集落数も小川培地に近い成績が得られるが、やや安定性にかける。また培地作製にあつては、凝固滅菌を要しないが、一方無菌操作を必要とする。

稿を終るにのぞみ御懇篤な御指導ならびに御校閲を賜つた慶大細菌学教室牛場大蔵教授に深甚の謝意を表します。また終始御指導、御鞭撻いただいた伊藤忠雄博士に深謝いたします。

なお本研究に対しては、厚生省より研究費の補助を受けたことを付記し、ここに感謝の意を表します。

本論文の要旨は第13回国立病院療養所総合医学会において発表した。

文 献

- 1) Tarshis, M.S., & Frisch, A.W. : Am. J. Clin. Path., 21 : 101, 1951.
- 2) Tarshis, M.S. : J. Lab. and Clin. Med., 40 : 628, 1952.
- 3) Tarshis, M.S. : Am. J. Clin. Path., 23 : 661, 1953.
- 4) Tarshis, M.S., Parker, M.V., & Dunham, W.B. : Acta Tuberc. Scandinav., 30 : 37, 1954.
- 5) Clark, M.E. : Am. J. Clin. Path., 23 : 671, 1953.
- 6) Whitcomb, F.C., McRoberts, C.C., Norman, J.O., & Halpert, B. : Am. Rev. Tuberc., 71 : 762, 1955.
- 7) Hsiung, G.D., & Haley, L.D. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 912, 1954.
- 8) 宇野久彌太 : 医療, 9 : 761, 昭30.
- 9) 寺山和夫 : 医療, 10 : 644, 昭31.
- 10) 亀崎華家 : 日本臨牀結核掲載予定.
- 11) 亀崎華家 : 結核掲載予定.
- 12) Frisch, A.W., & Tarshis, M.S. : Am. Rev. Tuberc., 64 : 551, 1951.