

結核菌の寒天高層混積培養法について

宇 都 宮 利 善

国立療養所村松晴嵐荘

受付 昭和 34 年 9 月 30 日

I 緒 言

結核菌の培養については一般に固形培地による表面培養に比して、深部培養のほうが栄養摂取の点で優れていると考えられており、培地としても Kirchner, Sauton および Dubos らによりきわめて優れた液体培地が考案されているが、液体培地では菌増殖の観察に不便であるため、これを半流動寒天培地に改良する試みがしばしば企てられた。しかしそれらは日常検査法の目的のものが多く菌発育についての基礎的研究はあまりかえりみられなかつた。

近年 J. Hirsch¹⁾ らによる卵黄中の結核菌発育促進物質の研究、寒天中の結核菌発育抑制物質の研究から寒天培地に関する研究が再び盛んになった。そのうち寒天高層培地については Knox²⁾ らが半流動寒天培地が生菌数算定に適することを報告し、西島³⁾ も類似の報告を行なつた。また Middlebrook⁴⁾ らは Catalase 陰性菌の研究に半流動寒天高層培地を用い、玉置⁵⁾、天野⁶⁾、岡本⁷⁾ らは酸化還元物質を含む高層培地内の酸素分圧または酸化還元電位の分布に基づいて数種の菌の鑑別を試みた。

著者は自家考案寒天高層培地⁸⁾を用いて一連の実験的研究を行なつた。すなわち 0.5% 寒天高層培地においては、結核菌は均等に発育するものではなく、限られた層に集落が発生することをみた。次に高層上に抗生剤溶液を重畳した場合、集落の発生する層が移動することを

観察し、結核菌の発育する場についての考案に寄与する所見を得たと考えるのでここに報告する。

II 研究材料ならびに方法

1. 培 地

a) 液体培地：各組成が Kirchner 培地の 2 倍のもの、ただし血清の代りにアルブミン(栄研)を 10% の割合に加えた。b) 寒天：0.1% Norite A で処理した 1% 寒天。

2. 供試菌株

H₃₇Rv 株、患者喀痰より一般的な方法により 3% 小川培地に分離継代培養した菌株、鳥型菌竹尾株および Mycobacterium 607 株 (以下 M 607 株と略)

3. 培養方法

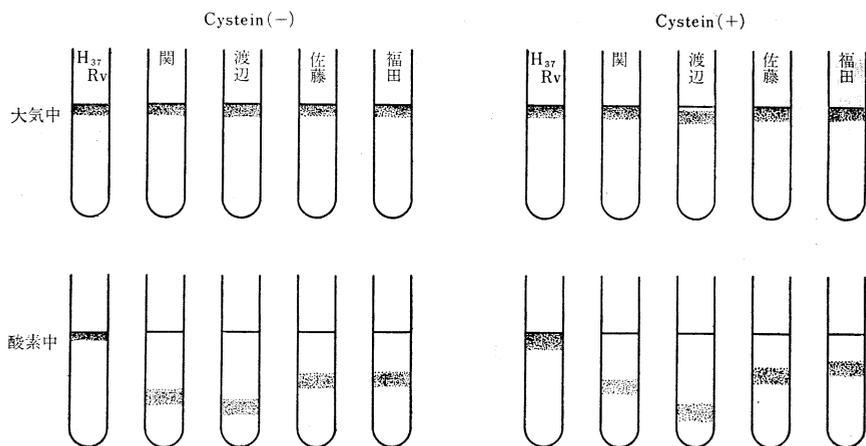
10 ml ずつ分注した上記液体培地に Dubos 培地に 10~14 日間培養した菌液 0.1 ml を混じて菌液を作製しておき、10 ml ずつ分注した寒天を溶解して 50°C に保温しながら両者を混和し、それぞれの試験管に等量に分けその後ただちに冷水中に浸漬して凝固させ 37°C の孵卵器中で培養する。

4. 培養環境の調整

酸素中の培養は培地を入れた試験管を培養瓶中に入れ、培養瓶中の空気をロータリーポンプで吸引したのち酸素で置換する。

III 実 験 成 績

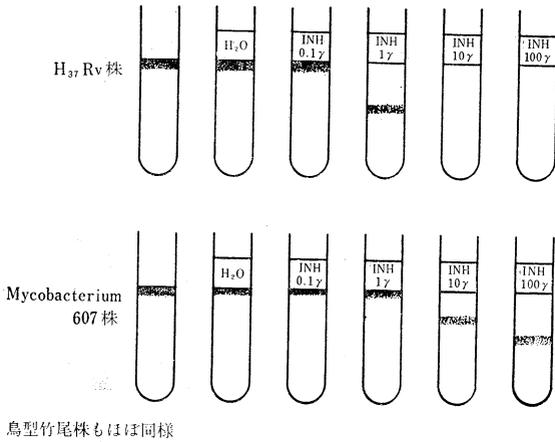
図 1 高層培地における結核菌の発育



1. 単なる高層混積培養

II-3 のように混積培養すると約 8 日後にはほとんどの試験管において結核菌の発育が肉眼的にみられる。発育の早い株では 6 日後に遅い株でも 10 日後には可視的になる。この場合結核菌は高層培地内において均等に発育するのではなく、培地のある部分に集落の層を発生する。一般には高層培地の表面および表面下 5 mm くらいの所までに発育し表層には次第に菌苔を生ずる。INH 耐性株のうち Cystein を含む培地で表面に菌苔を作ることなく、表面下数 mm の深さの部分に集落の密な層を現わす株もあつた (図 1, 渡辺株)。

図 2 INH 濃度による集落層の移動

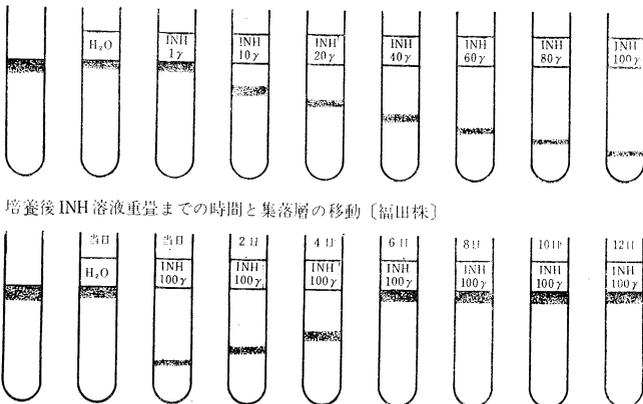


2. INH 溶液重量による集落層の移動

各種結核菌株を高層培地に混積して、種々の濃度の INH 溶液を重畳し、2 週間培養したのちの発育の状態は後述のごとくである。

a) H37Rv 株: INH 溶液を重畳しない場合、および H2O, INH 0.1 γ/cc 溶液を重畳した場合には表層に発育層が現われ、INH 1 γ/cc 溶液重量では約 1.8 cm の深部に発育層が現われ、10 γ/cc 溶液および 100 γ/cc 溶液を重畳した場合には発育層が現われない

図 3 INH 濃度と集落層の移動 [福田株]



培養後 INH 溶液重量までの時間と集落層の移動 [福田株]

(図 2)。

b) 鳥型菌竹尾株および M 607 株: 両者はほぼ同様の発育を示した。すなわち、M607 株では対照, H2O, INH 0.1 γ/cc 溶液および 1 γ/cc 溶液重量で表面および表面近くに発育層が現われ、10 γ/cc 溶液重量では約 0.6 cm, 100 γ/cc 溶液重量では約 1.7 cm の深部に発育層が現われた (図 2)。

c) 患者の喀痰より分離した菌株: ある菌株では対照のみ表層に発育し、INH 0.1 γ/cc 溶液重量で培地の深部に発育し、1 γ/cc 溶液ではさらに深部に、10 γ/cc 以上の高濃度溶液重量では発育が全く起こらない。また、ある菌株ではいずれも表層に発育するなど種々である。

3. 集落層の移動に関係する一般的条件

a) 集落層の移動に影響を及ぼす条件

(1) INH 溶液濃度と集落層の移動

患者の喀痰から分離した菌株 (福田株) を高層培地中に接種しただけのもの、さらに培地上に H2O, INH 1 γ/cc, 10 γ/cc, 20 γ/cc, 40 γ/cc, 60 γ/cc, 80 γ/cc, 100 γ/cc 溶液各 2 ml を重畳したものについてその発育を観察すると対照, H2O, 1 γ/cc 溶液重量では結核菌の発育は約 1 週後より表層に現われ、2 週後には 10 γ/cc 溶液重量では 1.4 cm, 20 γ/cc 溶液重量では 2.5 cm, 40 γ/cc 溶液重量では 2.8 cm, 60 γ/cc 溶液では 3.0 cm の深部に発育層が現われ、80 γ/cc 溶液および 100 γ/cc 溶液重量では 3 週後に 3.6 cm, 3.8 cm の深部に発育層が現われた。このように INH の効果は比較的敏感に表現されることを知った。鳥型菌竹尾株, M 607 株においても類似の所見を得た (図 3)。

(2) 混積培養から INH 溶液重量までの時間と集落層の移動 (福田株)

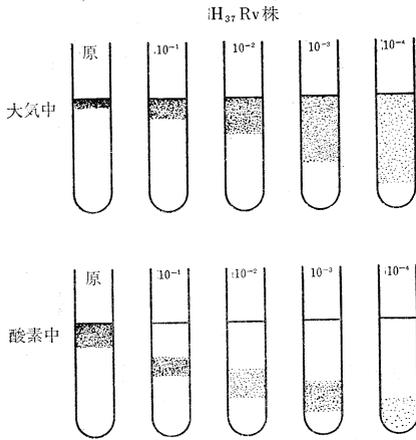
高層混積培養を行ない対照には何も重畳せず、その他は培養当日に H2O および INH 100 γ/cc 溶液 2 ml を重畳する。また、培養開始ののち順次に 2 日, 4 日, 6 日, 8 日, 10 日, 12 日後に INH 100 γ/cc 溶液 2 ml ずつ重畳すると、菌の発育は当日重量では 3.2 cm, 2 日後重量では 2.7 cm, 4 日後では 1.2 cm 深部に発育が現われ、6 日後および 8 日後に重畳したものでは表層に集落層が現われた。また 10 日後および 12 日後には重畳当時すでに表層に菌の発育層が現われており、重畳後再び深部には現われない (図 3)。

(3) 混積菌量と集落層の巾および INH 溶液重量による集落層の移動

同一菌株をそれぞれの試験管に菌量を異にして混積培養すると、H37Rv 株, 鳥型菌竹尾株, M 607 株, 患者喀痰分離菌株ともすべて菌量が多いほど高層培地の表面および表

面下に集落層が現われ菌量が減少するに従って培地の深部にまでも発育し、菌量の少ないほど菌の発育する層の巾が広い(図4)。

図4 菌量による集落層の移動



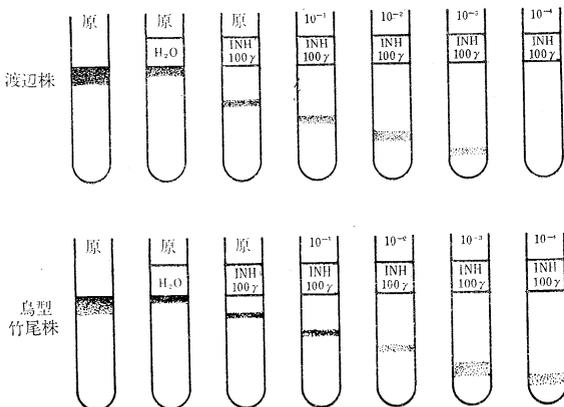
次にこれらの異なつた菌量を接種したとき大気中で培養すると、患者株(渡辺株)では何も重畳しない場合および H₂O 2 ml 重畳では高層培地の表層に発育層が現われ INH 100 γ /cc 溶液重畳の場合原液接種では 1.5 cm, 10 倍稀釈液接種では 2.5 cm, 100 倍液では 3.5 cm, 1,000 倍液では 4.0 cm の深部に集落層が現われた。すなわち菌量が減少するに従って深部に発育する傾向がある。H₃₇Rv 株においても INH 1 γ /cc 溶液を重畳した場合および鳥型菌竹尾株に INH 100 γ /cc 溶液を重畳した場合も同様の所見を得た(図5)。

b) 集落層の移動に関係しない条件

(1) 試験管の太さ: 種々の太さの試験管を用いて混釈培養を試みたが集落層の移動と試験管の太さとは無関係であつた。

(2) 重畳溶液の量: 重畳する溶液量を 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml と変えても集落層の移動には関係が

図5 菌量による集落層の移動



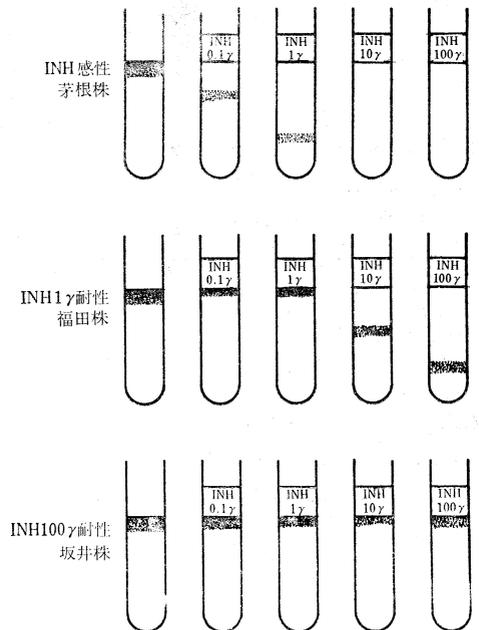
なかつた。

(3) INH 溶液重畳後 INH 溶液を除去すること: INH 溶液重畳後 48 時間後から 48 時間ごとに順次 INH 溶液を取り去り、2 週後の発育を観察すると、各試験管における発育層はいずれも同等の深さに現われた。INH 溶液除去までの時間との間にはなんらの関係を認めえなかつた。

4. 通常の検査法による INH 耐性と INH 溶液重畳による集落層の移動

通常の検査法による INH 感性菌(茅根株), INH 0.1 γ 耐性菌(久我株), 1 γ 耐性菌(福田株), 10 γ 耐性菌(渡辺株), 100 γ 耐性菌(坂井株)を用いて高層混釈培養を行ない、各種濃度の INH 溶液を重畳して観察すると INH 感性菌では 0.1 γ /cc 溶液重畳により培地深部に集落層が移動し、INH 10 γ /cc, 100 γ /cc 溶液重畳では発育層は培地のいずれの部分にも現われなかつた。INH 0.1 γ 耐性株では集落層の深部への移動は INH 1 γ /cc 溶液重畳より順次深部に発育層が現われ、100 γ /cc 溶液重畳では発育層は全く現われなかつた。INH 1 γ 耐性株では集落層の深部への移動は 10 γ /cc 溶液重畳よりはじまり 100 γ /cc 溶液重畳ではより一層深部に発育層が現われる。同様に 10 γ 耐性株では 100 γ /cc 溶液重畳においてのみ深部に発育が起こり、他の試験管では皆表面に発育層が現われた。100 γ 耐性株ではいずれの試験管においても発育層は表面に現われた。上記のごとく INH 耐性の程度と集落層の培地深部への移動とは平行するものである(図6)。

図6 INH 耐性と INH 溶液重畳による集落層の移動



5. 環境の酸素分圧と集落層の移動

a) 酸素環境内における結核菌の発育

供試菌株：H₃₇Rv 株，鳥型菌竹尾株，M 607 株，患者喀痰分離菌株（INH 1 γ 耐性菌福田株，佐藤株，INH 10 γ 耐性菌関株，渡辺株）

これらの菌株を混釈し，2 分して一方を大気中で培養し，他方を酸素環境中で培養した。H₃₇Rv 株，鳥型菌竹尾株，M 607 株等においてはそれぞれの間に相違を認めえなかつたが，患者喀痰分離菌株は大気中において高層培地の表面に発育したが酸素環境中においては培地の深部に集落層を現わした。これらの菌株の発育層の巾

は酸素中培養のものが大気中培養のものより広い。酸素環境中培養における集落層の深さは INH 耐性の度合とほぼ平行する（図 1）。

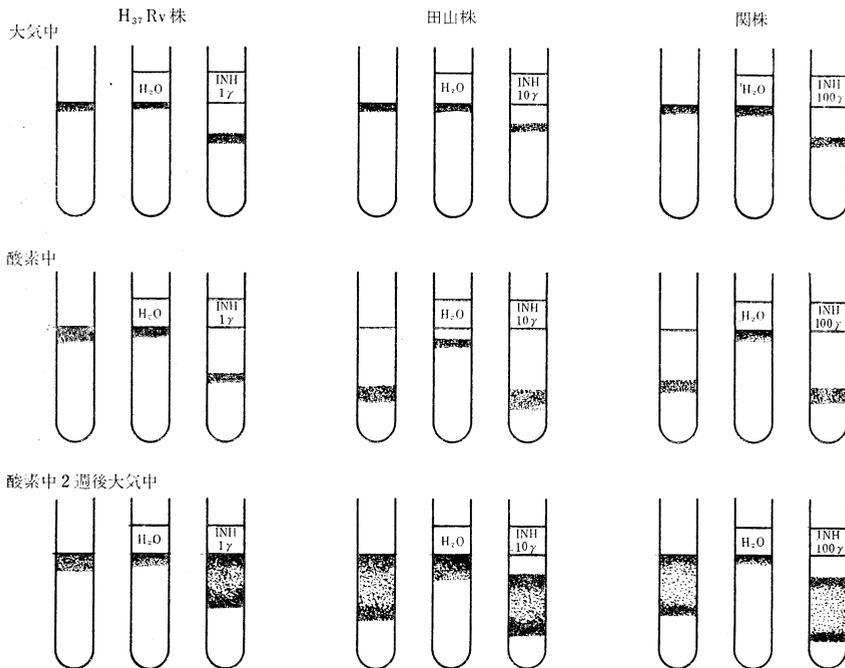
b) INH 溶液重疊後酸素中培養

供試菌株：H₃₇Rv 株，患者喀痰分離菌株（田山株，関株）

INH 溶液重疊後大気中培養において培地深部に集落層を現わすものが酸素中培養においては大気中培養における深さよりもさらに深部に発育層を現わした（図 7）。

c) 酸素中培養における菌量の差と集落層

図 7 培養環境による集落層の移動



供試菌株：H₃₇Rv 株，鳥型菌竹尾株，M 607 株，患者喀痰分離菌株（佐藤株）

各菌株の Dubos 液体培地培養を原菌液としておのこの 10 \times ，10² \times ，10³ \times ，10⁴ \times 希釈液を作り，それらの各 0.1 ml を混釈して酸素中で培養した。H₃₇Rv 株は原菌液接種では大気中培養と同様の発育を示したが，10 \times では 1.5 cm の深部に，10² \times では 2.5 cm の深さに集落層が現われ，10³ \times ，10⁴ \times では順次 3.5 cm，4.0 cm の深さに集落層が現われた（図 4）。鳥型菌竹尾株，M 607 株では菌量が少なくなるに従って集落層の下界が順次深部に広がる巾の広い集落層を現わした。患者喀痰分離菌株（佐藤株）の酸素中培養では H₃₇Rv 株と同様の傾向を示した。

6. 高層培地中の集落層以外の菌

a) 培地の集落層より下部に混釈された菌

高層混釈培養を行ない INH 溶液を重疊しないまま，または INH を重疊して結核菌の発育が培地の表層または培地の深部に現われたのち，培地の上部を集落層を含めて取除き，さらに培養を続けると再び残りの培地の表層に発育が始まる。

b) 培地の集落層より上部に混釈された菌

酸素環境中で培地深部に集落層を現わしたのち，酸素環境中より取出して大気中で培養を続けると前述の集落層の上部にも結核菌の発育が現われてくる（図 7）。

7. 酸化還元指示色素の培地内呈色

Methylene blue, Yanus green の 10 倍液約 0.1 ml を高層培地内に混釈しその呈色を観察すると，Methylene blue では培地全体が混釈直後に青色に染まり時間の経過により色の変化を示さないが，培地を pH 7.4~7.6 にすると混釈直後は青色が脱色し時間の経過に従って再

び上部より青変してくる。4日後には1.2 cmの深さまで青変し、その呈色帯には色の濃い層が2, 3入っている。Yanus green では混釈直後は培地全体が紫色に着色し、24時間後には0.7 cm以下は淡紅色を呈し、その後再び上層より紫に変色する。このように色素を混釈した培地に結核菌を混釈培養すると表層に発育した試験管では集落層下部の培地はMethylene blueでは無色、Yanus greenでは淡紅色を呈した。培地の深部に集落層を現わした試験管では集落層より上部の培地の色はそれぞれ青、紫を呈し、下部の培地は無色、淡紅色を示した。結核菌の集落層の発育した部分の培地の色はやはり着色しているが上部よりもややうすい色を呈した。

IV 総括ならびに考案

1. 0.5% 寒天高層混釈培養における結核菌の発育
 一般に結核菌は比較的多数のときは高層のきわめて表層から表面に発育し、それ以下の深部には発育層が現われない。このことから結核菌は増殖するために適当量の酸素を要求することが明らかであり、酸素は大気中から培地を透過して供給されるのである。寒天が0.1%くらいであるならば酸素は比較的深部まで供給されるけれども、0.5%になると深部まで供給されないし、また、透過してくる酸素を表層の菌が増殖のために消費するので深部の菌は増殖しえないのであると考えられる。混釈された菌量が比較的少ないときは、さらに深部まで発育層が現われた。この事実は混釈菌量が多ければ透過してくる酸素を摂取する菌が表層に多数存在するために、それ以下の深部の菌に対しては酸素供給が不足し、混釈菌量が少なければそれより深部の菌にも至適濃度の酸素供給があることを示すものであつて、ここに単個の菌の発育の端緒に必要な酸素量が暗示されていると考えられる。実験5, 6の成績はさらにこのことを示唆するものであつて、これらの事実は結核菌が発育の端緒において至適量より多いか、または少ない酸素が供給されるときは増殖を始めないで休止状態に止まることを示すと考えられる。Knox⁹⁾やPenikett¹⁰⁾らの論旨と一致する。

そこで酸化還元指示色素の1つであるYanus greenを用いて培地内の酸化還元電位をみると、混釈後約48時間にして表層より約1 cmまで紫色に染まり、深部は淡紅色に変色し数日放置してもこの状態は著しくは変化しない。結核菌は紫色の部分のうちでも表層近くのみ発育する。すなわち、Yanus greenが酸化されるに必要な酸化電位を与えるより多くの酸素を要求すると考えられる。

2. INHの高層培地内拡散および結核菌に対する作用

実験成績2において、INH溶液を重畳して培養するときは結核菌は高層培地のはなはだ深部にも発育しう

ることをみた。また、同一培地の菌を接種しない高層中のYanus greenの紫色に呈色する面よりもはるかに深部に増殖しうることがみられる。この事実は、集落層より表層側の菌はINHのために代謝が抑制せられて酸素を消費しないために、大気中から供給される酸素は深部にも達するのであるということでは説明できないことを示す。なぜならばYanus greenによる高層内部の観察が示すように大気中の酸素はそれほど深部には達しないと考えられるからである。ここに微量のINHはかえつて結核菌の増殖を支持するという草間¹¹⁾の研究成績を考えあわせると、本実験成績はINHの結核菌に対する作用機序について示唆するところがあるものと考えられる。さらにまた、実験成績3-b-(3)はINHが24時間にしてすでに集落層の位置を決定するだけ拡散し、それ以上長時間重畳しておいても集落層の位置が変わらないことを示す。また、実験成績3-a-(1)により菌がある状態に達したときにある量のINHに遭遇すれば増殖を続けることができると考えるか、あるいは個々の菌が時間とともにINHを摂取または不活化する能力を増していくのではないかと考えることができる。

3. INH耐性検査法について

実験成績4によつて、従来行なわれている表面培養による耐性検査の成績と重畳法による高層表面から集落層までの距離はよく比例することがみられた。しかしながら、高層培地上にINH溶液を重畳して培養を続ける場合、集落層の位置は重畳までの時間(実験成績3-a-(2))および混釈菌量(実験成績3-a-(3))によつて著しく影響されるものであつて、これらの成績は東村¹²⁾らの偽耐性やその他によつて論ぜられているごとく、遺伝子的でない耐性の表現があることを示す。したがつて重畳法を耐性検査に用いるためには、常に一定の条件を考慮しなければならないこともちろんである。

4. INH耐性菌と酸素要求量

MiddlebrookはSulphydryl化合物の研究中にこれらの化合物を含む寒天高層培地中では、Catalase陰性INH耐性菌は高層中間に集落層を現わし、Catalase作用の減弱している菌は同様の培養法で酸素環境中で培養すると、やはり高層中間に集落層を現わすことを観察して、これらの場合高層上部では、1) $2\text{GSH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{GS} \cdot \text{SG} + \text{H}_2\text{O}_2$ 、集落層の部では2) $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GS} \cdot \text{SG} + \text{H}_2\text{O}$ なる式で現わされる反応が起こり、上部ではCatalase陰性菌は H_2O_2 のために発育を阻害されると論じている。

INH耐性菌の中にはCysteinを含む培地において高層中間に集落層を作る株もあつた。またCysteinを含まない培地でも酸素環境で培養した場合INH耐性菌は深部に集落層を現わすことがみられ、高層表面から

集落層までの距離は耐性の度合いが高いほど深いようであった。すなわち、本培地は葡萄糖を含みこれが酸化還元物質として作用し、Middlebrook の論ずる式の反応を起こすものと考えられる。

しかしながら Yanus green を混濁して観察するに、本色素の変色する面は数日間ほぼ一定であつて高層上面から拡散してくる酸素は少なくともこの面まで達して、この間に H_2O_2 を生じていると考えられるのである。しかるに集落層のほうは耐性に応じて表面からの深さが異なっている。すなわち、結核菌は INH 耐性の度合いに応じて H_2O_2 により発育を阻害されやすいか、または酸素によつて発育を抑制されやすいか、あるいは INH 耐性菌ほど酸素の要求量が少ないと考えられるのである。しかしながら実験成績 6 にみられるように、このようにして抑制された菌もなお数週間休止状態にあり、死滅していないことは興味あることである。

V 結 論

結核菌の Kirchner 寒天 (寒天 0.5%) 高層混濁培養を試みて、次の結論にいたつた。

1) この培養法では結核菌は全層に均等には発育しないで、一般には高層の表面にだけ巾約 5 mm の集落層を現わす。

2) 高層混濁培養を酸素環境で行なうか、または高層上に INH 溶液を重畳すると集落層は深部に現われる。

3) 上記の場合、高層表面から集落層までの距離は、a) INH 濃度、b) 重畳の時期、c) 混濁菌量、d) 菌の INH 耐性等と一定の関係がある。諸条件が一定の場合、集落層の深さは通常の検査法による INH 耐性の度合いと平行する。

4) 結核菌は環境の酸素供給が多すぎても少なすぎても休止状態になるようであり、INH 耐性株は酸素要

求量が少ないと考えられる。

5) 結核菌は微量の INH に接するときは、酸素の少ない環境でも発育しうると考えさせる興味ある所見を得た。

稿を終るにあたり御指導を頂いた慶応大学牛場大蔵教授、終始御鞭撻を頂いた加納保之教授に深く感謝いたします。また終始御援助を頂いた当庄岡本亨吉博士に感謝いたします。

本論文の要旨は第34回日本結核病学会において発表した。

文 献

- 1) Hirsch, J.G. : Am. Rev. Tuberc., 70 : 955, 1954.
- 2) a) Knox, R. : Lancet, 16 : 110, 1955.
b) Knox, R. et al. : J. gen. Microbiol., 15 : 359, 1956.
c) Knox, R. et al. : J. gen. Microbiol., 16 : 647, 1957.
- 3) 西島重次 : 久留米医誌, 19 : 1413, 昭31.
- 4) Colemann, C.M. & Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 74 : 42, 1956.
- 5) 玉置道純 : (6) から引用.
- 6) 天野美実 : 原著, 昭19.
- 7) K. Okamoto : Jap. J. Med. Sc. Biol., 6 : 59, 1953.
- 8) 宇都宮利善 他 : 衛生検査, 8 : 25, 昭34.
- 9) Knox, R. et al. : J. gen. Microbiol., 17 : 9, 1957.
- 10) Penikett, E.J.K. : J. gen. Microbiol., 17 : 9, 1957.
- 11) 草間久子 : 結核, 33 : 185, 昭33.
- 12) 東村道雄 : 結核, 33 : 815, 昭33.