

# 重層培地による結核菌の定量培養

## 第2報 保存結核菌株および喀痰よりの定量培養

小 川 辰 次  
上 野 高 正\*  
高 倉 廉\*\*

北里研究所付属病院  
\* 虎の門病院  
\*\* 鬼子母神診療所

受付 昭和34年10月8日

### I 緒 論

われわれは第1報<sup>1)</sup>において液体培地と固形培地の混合した培地、すなわち重層培地を発表した。この培地は基礎実験では3%小川培地に比して集落が早く発育するし、集落数も多少多い。また集落は液中に撒布されたように発育する。それで今回は、この重層培地が3%小川培地同様に通常検査として使用できるかどうかを喀痰について検討するとともに、前処理しない人型および牛型結核菌の多数についても実験したので報告する。

### II 実験方法

#### a. 接種材料

##### 1. 菌株

##### 人型結核菌

大沢株…喀痰より3%小川培地で分離初代のも  
の、培養後36日

仲野株…保存菌株、グリセリン馬鈴薯培地、14日  
間培養

H<sub>37</sub>Rv株…保存菌株、1%小川培地、14日間培養  
牛型結核菌

R 14 株…保存菌株、グリセリン馬鈴薯培地、30  
日間培養

263 株……保存菌株、1%小川培地、35日間培養

BCG 株…グリセリン馬鈴薯培地、14日間培養  
乾燥 BCG ワクチン (266-A)

##### 2. 喀痰

朝の喀痰を採取した。化学療法薬は使用していない。

##### b. 培地

前処理しない菌液を接種する対照として1%小川培地<sup>2)</sup>、4%水酸化ナトリウムで処理した菌液および喀痰を培養する対照として3%小川培地<sup>3) 4)</sup>を用いたが、これらの対照培地はいずれも5cc宛分注して滅菌凝固した。また重層培地は第1報の処方に従って、1%

小川培地1ccの上に0.1%寒天加変法 Kirchner 培地を4cc重層して作つた。

##### c. 培養の方法

1. 菌株…型のように磨砕コルベンで1mg/ccの菌浮游液を作り、これをさらに蒸溜水で10倍宛に数段階に稀釈して、1ccのメスピペットで0.1cc宛を各稀釈段階について培養した。培地は5本宛使用した。培養後は1%小川培地では型のように斜面台にねかして1~2日37°Cの孵卵器に放置して、液の乾燥するのをまつて封蠟あるいはゴムのキャップにかえて立てて培養した。重層培地は培養したらよく振盪してまぜ、その日のうちに封蠟するか、ゴムのキャップにかえて37°Cの孵卵器に培養した。BCG乾燥ワクチンは滅菌蒸溜水で浮游液として同様に培養した。さらにH<sub>37</sub>Rv株と263株は4%水酸化ナトリウムで処理して同様に培養した。

2. 喀痰…塗抹陽性の喀痰は4%水酸化ナトリウムを約10倍量加えて十分に均等化し、塗抹陰性のものは約5倍に稀釈してその0.1cc宛を3~5本の培地に培養した。培養後の操作は菌株の場合に準ずる。

##### d. 比較の仕方

1週間ごとに観察して5週間観察し、その平均集落数、集落の発育するまでの期間、また喀痰についてはさらに陽性率、雑菌侵入率を比較した。

### III 成 績

#### a. 前処理しない菌液の実験

表1でみるように、大沢株、仲野株、R 14株およびBCG、乾燥BCGワクチンでは、両培地においては著明の差がないが、263株においては多少重層培地のほうが発育がよい。

#### b. 4%水酸化ナトリウムで処理した菌液の実験

その成績は表2のようである。すなわちH<sub>37</sub>Rv株では重層培地が多少よいという程度にすぎないが、263株においては重層培地のほうが著明に発育がよい。



**表 3** 4%水酸化ナトリウムで処理した喀痰を重層培地に接種した実験

1. 陽性例数の比較

実験総例数	塗抹検査成績と例数	培養成績と内容
190	(-) 147	3%小川培地(+)重層培地(+)...80
		" (-) " (+)...22
	" (+) " (-)...11	
	(-) 34	
(+) 43	(+) 42	3%小川培地(+)重層培地(+)...40
		" (-) " (+)... 1
	" (+) " (-)... 1	
	(-) 1	

注：数字は例数を示す。

**表 4** 4%水酸化ナトリウムで処理した喀痰を重層培地に接種した実験

2. 陽性率

塗抹検査成績と例数	培地の種類	培養陽性例数(陽性率)
(-) 147	重層培地	102 (69.4%)
	3%小川培地	91 (61.9%)
(+) 43	重層培地	41 (95.3%)
	3%小川培地	41 (95.3%)

時に発育した 120 例について、両培地における発育の遅速を比較したものであつて、表でみるように重層培地のほうが早かつたものが著明に多くて 67.5% であり、これに反して 3% 小川培地において早かつたものは

**表 5** 4%水酸化ナトリウムで処理した喀痰を重層培地に接種した実験

3. 集落の発育までの期間

比較材料と例数	検査の日(週)培地	I	II	III	IV	V	
		重層培地	0	37 (46.3%)	30 (37.5%)	9 (11.3%)	4 (5%)
塗抹検査(-)で、両培地に培養で(+)の例	80	3%小川培地	0	9 (11.3%)	34 (42.5%)	27 (32.5%)	10 (12.5%)
	塗抹検査(+)で、両培地に培養で(+)の例	40	重層培地	0	31 (77.5%)	9 (22.5%)	0
3%小川培地		0	14 (35.0%)	19 (47.5%)	7 (17.5%)	0	

注：欄中の数字は例数、( )の中は%を示す。

**表 6** 4%水酸化ナトリウムで処理した喀痰を重層培地に接種した実験

4. 発育の遅速

実験総例数	培地における発育の遅速
120	重層培地のほうが発育の早かつた例...81(67.5%)
	3% 小川培地のほうが早かつた例...7( 5.8%)
	両培地における発育の差のなかつた例32(26.7%)

すなわち培養してから 1~5 週まで観察し、1 週間ごとに発育した例数を集めてみたのが表 5 である。みると塗抹標本検査陰性例の培養では、重層培地は第 2 週で発育したものがもつとも多く、46.3% であつて、これは第 2 週の 3% 小川培地における陽性率 11.3% の約 4 倍である。3% 小川培地では 3 週で発育したものがもつとも多く、ついで多いのは 4 週である。これを総括すると、重層培地では 3 週までに 83.8% が発育しているのに、3% 小川培地では 53.8% が発育しているにすぎない。塗抹標本の検査で陽性の例では、重層培地においては 2 週でもつとも多く発育し 77.5% である。これは 3% 小川培地の 2 週における陽性率 35% の約 2 倍である。表 6 は重層培地と 3% 小川培地に同

5.8% にすぎない。なおわれわれのように、1 週間ごとの観察では 1 週間の開きのものが大部分である。

以上の実験成績から、重層培地は 3% 小川培地に比して明らかに発育が早いといふことができる。

3. 集落数

両培地に同時に発育した 120 例について集落数を比較した。その成績は表 7 のようである。すなわち集落数が多くて数えることのできなかつた例数はほとんど差が

**表 7** 4%水酸化ナトリウムで処理した喀痰を重層培地に接種した実験

5. 集落数

培地の種類	集落が多くて数えることのできなかつた例数	培地 1 本の平均集落数
重層培地	51 例	32.4 個
3%小川培地	49 例	20.5 個

ないが、数えることのできたものの培地 1 本の平均集落数は重層培地のほうが多少多い。

4. 雑菌侵入率

表 8 は 4 週あるいは 5 週の観察のうち、雑菌の侵入した培地数を比較したものである。雑菌侵入の培地

表8 4%水酸化ナトリウムで処理した喀痰を  
重層培地に接種した実験  
6. 雑菌侵入培地数

実験培地総数	培地の種類	雑菌侵入培地数 (侵入率)
718	重層培地	64 (8.9%)
	3%小川培地	44 (6.1%)

としたのは、雑菌の多少でも侵入したものは全部含めたものであつて、したがつて雑菌の少量の侵入のほかに、結核菌が同時に発育したのものも含めてある。成績は表8のようであつて、重層培地では8.9%、3%小川培地では6.1%であつて、重層培地のほうが多少多いが有意の差ではない。

#### IV 総括および考察

牛型263株は、重層培地では前処理の有無にかかわらず鶏卵培地に比して発育が優れていた。この事実は、おそらく混入された血清のためであろうが、重層培地も牛型結核菌の分離培養に使用できる可能性のあることを示すものと思われる。

次に前処理をしない多くの人型結核菌、牛型結核菌(牛型263株は除く)の発育は、1%小川培地と同等であつたのにかかわらず、前処理したH<sub>37</sub>Rv株が3%小川培地に比して優れた発育を示したことは、第1報の成績と全く一致するものである。

次に多数例の喀痰の培養においても重層培地は優れた発育を示したが、とくに著明なことは集落の発育するまでの期間が短縮されるということである。すなわち1週間ごとの観察では、2週目で検出できたものは、塗抹陽性例ではその約80%、塗抹陰性例でも50%であつた。

しかし集落の少ないものでは5週でようやく発育を認めたものもあつた。このように集落の少ないときは、初期の集落ではそれが結核菌の集落であるかどうかの判定がむづかしく、集落の大きくなるのをまつて結核菌と特定するためである。

次に陽性率は、重層培地では3%小川培地に比してわずかに優れている程度であるが、われわれの重層培地の変法である<sup>5) 6)</sup>三沢の重層培地では、喀痰よりの分離培養において3%小川培地の約2倍の陽性率を得ている。三沢の成績は、われわれのものに比して著明に優れているが、この事実はこの種の重層培地の優れている一面を物語るものであろう。

次に集落数は3%小川培地に比してわずかではあるが多いし、実際的には一番問題となる雑菌の侵入率は予期に反して少なく、喀痰の均等化が十分に行なわれればもつと少なくなるものと思われる。

以上のようなことからわれわれの重層培地は、喀痰等の可検材料よりの分離培養には使用できると思われるし、抗結核剤に対する耐性菌の検査においても、抗結核剤の熱に対する影響が除外できるので好都合と思われる。

#### V 結 論

人型結核菌、牛型結核菌、BCG、乾燥BCGワクチン等の菌浮遊液を前処理しないでそのまま、あるいは4%水酸化ナトリウムで前処理して、また喀痰を同様にして前処理して、その0.1cc宛を重層培地と対照培地の1%小川培地および3%小川培地に接種して比較した結果、次のような成績を得た。

1) 前処理をしない菌液の培養では、牛型結核菌263株の1株のみが重層培地において優れた発育を示したが、その他の牛型結核菌、人型結核菌、BCG、乾燥BCGワクチンでは、重層培地と1%小川培地とでは発育において大差なかつた。

2) 4%水酸化ナトリウムで前処理した牛型結核菌、263株および人型結核菌H<sub>37</sub>Rv株はともに重層培地においては、3%小川培地に比して優れた発育を示した。

3) 190例の喀痰を4%水酸化ナトリウムで処理して培養すると、重層培地は3%小川培地に比して優れた発育を示した。とくに著明なことは、集落が早く発育するという点である。また雑菌の侵入率は両培地において大差を認めなかつた。

本研究は結核予防会結核研究所在職中のものであつて、文部省科学研究費の補助を受けた。なお本研究の一部は、昭和25年11月、昭和26年7月、文部省科学研究費総合研究結核研究班細菌科会に発表した。(小川辰次)

#### 文 献

- 1) 小川：結核，35：187，昭35。
- 2) 小川・佐波：結核，24：13，昭24。
- 3) 小川：結核，24：11，昭24。
- 4) 小川・佐波・鈴木：結核，25：33，昭25。
- 5) 三沢・斎藤：抗酸菌病研究雑誌，9：10，昭28。
- 6) 三沢：The Science reports of the Research Institutes Tohoku University，4：77，1952。