

重層培地による結核菌の定量培養

第3報 重層培地の吟味

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 結 論

われわれは重層培地¹⁾²⁾を考案し、この培地が喀痰等の可検材料よりの結核菌の定量培養に優れた発育を示すことを述べた。このたび、重層培地が優れた発育を示すのは、何によるかを検討するために2~3の実験を行なつたので報告する。

II 実験方法と実験成績

a. 重層培地を種々に変法して培養した実験

血清やアルブミンを混入した液体培地は、固形培地に比して概して早い発育を示すことは周知の事実である。われわれの重層培地は、液体と固形の混合培地であるが、その大部分は液体培地が占めているので、われわれの重層培地の優れた発育はこの液体の部分だけによるものかどうかを検討するために実験した。

方法：まず製作後4日を経過した4本の重層培地と、重層培地より固形培地をはじめから除去した培地、すなわち液体の部分のみの培地を2本用意する。これら6本の培地に4%水酸化ナトリウムで適当に稀釈均等化した喀痰を0.1cc宛培養する。時により4%水酸化ナトリウムでさらに10倍宛に稀釈して何段階かの稀釈とし、その稀釈段階のおおのを前同様にして培養した。そして重層培地に培養したものの中の2本は1昼夜37°Cの孵卵器に放置した翌日、別の滅菌試験管に液体の部分のみを移して、さらに37°Cの孵卵器に培養した。重層培地に培養した他の2本と、液体培地だけのものに培養した2本は、そのままとして37°Cの孵卵器に培養した。このようにして17例の喀痰を培養し、3週で発育した集落数を数えて比較した。

成績：17例中の11例の集落数を示したのが表1である。

①~⑦の患者、ことに①、②のように数段階の稀釈を培養したものでは、はつきり分かるように(1)の重層培

表1 重層培地を種々にして培養した実験

患者番号および Gaffky 番号	培養の方法 稀釈倍数	培養の方法		
		(1)	(2)	(3)
① Gaffky 10号	10 ¹	■	■	■
	10 ²	■	■	+
	10 ³	■	■	+
	10 ⁴	33	13	11
② Gaffky 3号	10 ¹	■	■	■
	10 ²	63	36	-
③ Gaffky 7号	10 ³	■	■	+
④ Gaffky 6号	10 ²	■	■	■
⑤ Gaffky 0号	5	■	■	+
⑥ Gaffky 0号	5	■	■	+
⑦ Gaffky 10号	10 ²	■	■	■
⑧ Gaffky 10号	10 ²	■	■	■
⑨ Gaffky 8号	10 ²	■	■	■
⑩ Gaffky 3号	10 ²	■	■	■
⑪ Gaffky 2号	10 ²	■	■	■

注：I. 表中の記載は集落を示す。その表示は次のようである。

- 1) 数字は集落数を示す。
- 2) ■, ■, ■等は多数で数えられないことおよび+の数の多いほど集落数の多いことを示す。

II. 培養は次のようである。

- 1) 重層培地による方法
- 2) 重層培地に培養、1晩37°Cに培養、翌日液体の部分のみを別の試験管に入れて培養したもの
- 3) 最初から重層培地の液体の部分のみをとり出して、これに培養したもの

地に培養してそのままとしたものは、(2)の重層培地に培養して、これをさらに液体培地に移し変えたもの、(3)のはじめから液体培地だけに培養したものに比して集落が

多い。(1), (2), (3) の培養の仕方の中に著明の差のなかつたものは10例あつたが、⑤~⑩の患者の成績はその一部を示している。これらの例は、表1でみるように、集落数が多くて数えることのできないものだけであるから、さらに稀釈して集落の数えることのできるようにして培養したら、その中のあるものは差がでておつたのではないかと推定される。

以上の成績から、重層培地の底の1%小川培地は、重層培地中の一組成として必要なものであることが推定される。

b. 重層培地の浸出液による培養の実験

i. 保存期間を種々にして作つた浸出液培地に前処理した喀痰を培養した実験

重層培地中の1%小川培地より上清の液の中に発育を促進するものがでてくるかどうかを検討した。

方法：内容500ccの5コの三角コルベンの底に1%

小川培地を入れて凝固し、その上に無菌的に重層培地の液体培地を加えて、1%小川培地と液体培地との比を1:4, 1:5, 1:7, 1:10とする。さらに別に血清を除去した液体培地を1:4の割合に加えて、これらの全部を37°Cの孵卵器に、11日間保存する。そして、2日, 4日, 5日, 7日, 9日, 11日の6回にわたつてこれらのコルベンから無菌的に液のみをとり出して4cc宛、滅菌中試験管に分注する。これらを浸出液培地とよぶことにする。そしてこれらの保存期間を異にして得た種々の浸出液培地に、喀痰を4%水酸化ナトリウムで処理稀釈したものを原液として、さらに数段にわたつて稀釈し、各段階を2本の培地に0.1cc宛培養し、4週後に発育した集落数を比較した。なお、対照培地として血清の混入した重層培地、および血清を除去した重層培地を使用した。

成績：①の喀痰は10⁴倍稀釈のところを、②の喀

表2 重層培地の浸出液による培養の比較

その1 保存の期間を種々にして作つた浸出液に前処理した喀痰を培養した実験

培地の種類	患者番号および Gaffky 番号 血清の有無 固形と液体培地の比 保存期間(日)	① Gaffky 4号				② Gaffky 1号	③ Gaffky 4号
		(+) (−)				(−)	(−)
		1:4	1:5	1:7	1:10	1:4	1:4
重層培地の浸出液	2	10.0	8.0	2.5	19.3	—	—
	4	21.0	9.0	9.0	12.0	—	—
	5	16.4	23.3	19.0	12.0	—	3.3
	7	16.0	26.0	22.4	22.4	0.5	7.0
	9	23.5	29.0	24.2	20.3	3.0	10.0
	11					6.0	Ⅲ
対照培地	重層培地	20.0	20.0	20.0	20.0		
	血清除去の重層培地					17.0	Ⅲ

注：欄中の記載は集落を示す。その表示は表1に同じ。

痰は10⁴倍稀釈、③の喀痰は10²倍稀釈を0.1cc宛接種した。②、③の喀痰の培養では、血清の混入されてある浸出液培地では、接種菌量の多かつたために、混入比の差および保存日数による差は認められなかつたのでこの表から省いた。成績をみると、表2のように①の喀痰では、血清混入の浸出液培地においては、1:4では4日で、1:5, 1:7では5日で、1:10では7日保存で対照の重層培地とほぼ同数の集落を認めた。すなわちわれわれの重層培地で使用している1:4のところでは4日くらいで発育促進物質が液中にでてくるのが推定されるが、液体培地の混入量が多くなると、でてくる発育促

進物質は、沢山の液で稀釈されるために、比較的には少なくなり、したがつて1:4の浸出液培地と同程度の発育促進物質の濃度となるのには、長く保存する必要のあることを示している。次に血清除去の浸出液培地は、そのいずれの喀痰の培養においても、血清入りの浸出液培地に比して発育が著明に悪く、5~7日の保存ではじめて集落の発育を認める。保存期間が9~11日と長びくに従つて集落数は増すが、保存11日でも、対照の血清除去の重層培地に比して集落数は少ない。この成績は、1%小川培地より血清除去の液中に発育促進物質が移行することをさらに裏書きするものであるが、この場合

には発育促進物質は 11 日以後においても徐々にでてくることが推定されるし、あるいは 1% 小川培地が発育のうえに、なんらかの物理学的な役目を果たしているのかもしれない。

ii. 保存温度を異にして、また振盪の有無によつて得た血清除去の浸出液培地に、前処理しない菌液を培養した実験

重層培地の底の 1% 小川培地より上清の液体培地への発育促進物質の移行は、保存温度によつて差があるかどうか？ また振盪の有無によつて差があるかどうかと思ひ実験した。

方法：前同様にして三角コルベンの底に 1% 小川培地を入れて凝固し、その上に血清除去の Kirchner の基

礎培地を無菌的に加えその比を 1:4 とした。このようにして作ったコルベンを 6 コ用意し、2 つ宛を 1 群として 3 群に分け、各群を 37°C の孵卵器、20°C の室温、5°C の冷蔵庫に保存し、かつ 2 つ宛の一方はそのままとし、他の一方は毎日朝、昼、夜の 3 回にわたつて 10 分間宛強く振盪し、1 週間保存したのち、これらのコルベンより上清の液体培地のみをとり出し、中試験管に 4 cc 宛無菌的に分注して培地とし、これらの培地 2 本宛に、人型結核菌の青山 B 株、H₃₇Rv 株を 1 mg ~ 10⁻⁴ mg までの 5 段階を培養し、3 週間観察して、どの接種菌量まで発育するかをみた。なお対照培地として、本来の血清入りの Kirchner 液体培地、および血清の入っていない基礎培地を 4 cc 宛分注して用いた。

表 3 重層培地の浸出液による培養の比較

その 2 保存温度を異にして得た血清除去の浸出液に前処理しない菌液を培養した実験

使用菌株	振盪の有無 保存の場所	(-)			(+)			Kirchner の 液体培地	Kirchner の 基礎培地
		孵卵器 (37°C)	室温 (20°C)	冷蔵庫 (5°C)	孵卵器 (37°C)	室温 (20°C)	冷蔵庫 (5°C)		
		接種菌量							
青山 B	1 mg	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
	10 ⁻¹ mg	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■	■ ×	+ +
	10 ⁻² mg	+ +	■ +	+ +	■ ■	■ +	■ 8	■ ■	- -
	10 ⁻³ mg	- -	2 -	- -	■ -	■ +	2 3	+ ■	- -
	10 ⁻⁴ mg	- -	- -	- -	2 -	- -	1 -	5 +	- -
H ₃₇ Rv	1 mg	■ ■	■ ×	■ ■				■ ■	■ ■
	10 ⁻¹ mg	■ +	■ +	+ +				■ ■	+ +
	10 ⁻² mg	+ +	+ +	+ +				■ ■	- -
	10 ⁻³ mg	+ +	20 30	- -				+ +	- -
	10 ⁻⁴ mg	20 1	1 1	- -				+ +	- -

注：欄中の記載は集落を示す。その表示は表 1 に同じ。

成績：表 3 のようである。

まず保存温度によつて差があるかどうかであるが、青山 B 株では、振盪の有無にかかわらず保存温度による差はない。H₃₇Rv 株では、37°C、20°C の保存では 10⁻⁴ mg まで発育しているが、5°C では 10⁻² mg まで発育しているにすぎない。これらの成績は、保存の温度によつて浸出する促進物質の差はあるとしても、その程度はわずかであることを示すものであろう。

次に振盪の有無によつて発育促進物質の出方に差があるかどうかを青山 B 株によつて実験したが保存の温度の如何にかかわらず振盪しないものでは 10⁻² mg ~ 10⁻³ mg まで発育を示しているが、振盪したのものでは 10⁻³ mg ~ 10⁻⁴ mg まで発育している。すなわち振

盪することによつて発育促進物質の出方が増加してくることが推定できる。

なお保存の温度の如何にかかわらず、また振盪の有無にかかわらず、青山 B 株による実験でも、H₃₇Rv 株による実験でも、これらの浸出液培地は Kirchner 培地に比しては発育が悪いが、血清の入っていない基礎培地よりは発育がよい。

以上の成績から、発育促進物質の出方は、保存する温度による差はほとんどないこと、また振盪の有無によつて差のあることが分かつた。

III 総括および考察

一般に、液体培地は固形培地に比して集落が早く認め

られることは多くの研究者の等しく認めるところである。われわれの重層培地は、固形と液体の混合培地であるが、この培地は固形培地に比して陽性率は多少よいとしても、そう著明な差ではない。もつとも目だつことは、集落が早く発育するということである。したがって当然重層培地の中に併用されている1%小川培地の果たす役割について関心がもたれる。

われわれは喀痰および保存菌株等を接種材料として培養し、その集落数、あるいは接種菌の発育する稀釈限度を比較することにより種々実験した。その結果、固形培地と液体培地を併用したわれわれの重層培地は、液体だけの培地に比しても、また一たん重層培地に培養したものを、さらに上の液体培地のみを移し変えて培養を継続した場合に比しても優れていた。この事実は、1%小川培地は、重層培地においては、必要な1つの要素であることを示すものであるが、さらに1%小川培地の意味について検討した。すなわち1%小川培地を三角コルベンの底に固め、その上に液体培地を種々の比に加え37°Cの孵卵器に保存し、液のみをとり出して、この液を培地として使用してみると、いずれの比の場合でも、保存期間の長いものほど発育がよかつたし、また比を中心として成績を検討してみると、固形培地と液体培地の比の多くなるに従つて発育の悪くなる傾向を認めた。この事実は、1%小川培地より上の液体培地に、結核菌の発育を促進するようなものが徐々に滲出することを示すものであろう。なお、この物質は何であるかは検討していないが、保存の温度には無関係にでてくるし、振盪した場合に多くでてくるのが推定された。すなわち重層培地は、液体培地中の種々の要素と、固形培地よりでてくる発育促進物質とが相合して、液体培地単独のものよりもさらに優れた発育を示すものであろう。あるいはさらに固形培地が液体培地のささえとして、なんらかの物理学的な意味の発育促進を担っているのかもしれない。

IV 結 論

重層培地中の固形培地は必要なものかどうか？ 重層培地の発育の優れているのは何故か？ 等の問題を解決するために実験した。

1) 4% NaOH で前処理した喀痰を重層培地、重層培地中の液の部分のみの培地に培養し、重層培地に培養したものは、そのまま培養を継続したものと、培養した

翌日、液体の部分のみを別の試験管に移して培養を継続したものに分けた。その結果、重層培地に培養を継続したものもつとも発育がよく、次によいのは、重層培地に培養して、液体の部分のみを移し変えたものであり、最初から液体培地に培養したものは、もつとも発育がよくなかつた。

2) 三角コルベンの底に1%小川培地を固め、その上に液体培地を1:4, 1:5, 1:7, 1:10の比にして混入し、これを37°Cに保存し、11日の間の6回にわたつて、液の部分のみをとり出して4% NaOH で処理した喀痰を培養した。その結果1:4のように液体培地の比較的少ない場合には、4日保存で対照の重層培地と同程度に発育したが、1:10のように液体培地の多いところでは、7日保存で対照と同程度に発育した。血清の除去した液体培地を1:4の割に加えて実験したが、このときは保存期間の長びくとともに次第に発育はよくなつてくるが、11日の保存でも対照の培地に比して発育が遅れていた。

3) 前同様にして三角コルベンの底に、1%小川培地を入れて凝固し、その上に血清除去の液体培地を1:4に加えたものを2つ宛作り、これを1群としてこれらを37°Cの孵卵器、20°Cの室温、5°Cの冷蔵庫に保存し、2つのうちの1つはそのままとし、他方は振盪して1週間保存したのち、液の部分のみをとり出して、保存人型結核菌を培養したところ、発育は保存の温度によつて差はないが、振盪したもののほうが振盪しないものに比して優れた発育を示した。

以上の諸実験から1%小川培地は重層培地の1つの要素として必要であつて、この固形培地より液中に、長期間にわたつて発育促進物質がでてくるのが推定される。

本論文は結核予防会結核研究所在任中のものであつて、その一部は、昭和28年7月文部省科学研究費結核研究班細菌科会において報告した。なお文部省科学研究費の補助をうけた。厚く感謝する。(小川辰次)

文 献

- 1) 小川辰次 他：結核，35：187，昭35。
- 2) 小川辰次 他：結核，35：256，昭35。