

## 結核培地としての半流動寒天培地に関する研究

第1報 pH 5.8 半流動 Dubos および Kirchner 寒天培地による  
結核菌分離培養

大 川 日 出 夫

国立神奈川療養所

受付 昭和 35 年 6 月 6 日

## 緒 言

国立神奈川療養所細菌検査室においては、これからの結核菌培養法として、迅速な Micro-culture Method の確立が必要であることを痛感し、結核菌微細集落の早期検出法につき種々の実験を行なつてきた<sup>1) 2)</sup>。

Micro-culture Method に関する研究を重ねるうち、Knox<sup>3) 4)</sup> の半流動寒天培地に注目し、独自の立場で半流動 Dubos および Kirchner 寒天培地の検討をすすめ、保存菌株、新鮮分離菌株の培養で優れた成績を得、分離培養における成績もすでに発表したごとく良好な結果を示した<sup>1) 2)</sup>。

分離培養にあつては NaOH 水処理中和喀痰を接種しており、前処理過程が煩雑のきらいがあつた。この中和法も手順を十分検討すれば煩雑さは相当に軽減されるが、わが国の現状では中和法を Routine に採用するには困難があり、半流動寒天培地を Routine 化する第一歩として、NaOH 水処理喀痰を直接接種するべく、培地 pH の検討を行なつた。

pH 6.8, 0.1% 半流動寒天培地では NaOH 水処理喀痰を接種した場合、培地は至適 pH を得ないので、榮研 Dubos 培地における経験に基づき<sup>5)</sup> pH 5.8, 0.1% 半流動 Dubos および Kirchner 寒天培地を調製して、分離培養を行ない良好な成績を得ることができたので報告する。

## 実験方法および成績

## 実験方法：

pH 5.8, 0.1% 半流動 Dubos 寒天培地, N/1 HCl で pH を 5.8 に調製した 0.1% 半流動 Kirchner 寒天培地, N/1 NaOH で pH を 6.8 に調製した同 Dubos 寒天培地, pH 6.8 同 Kirchner 寒天培地および 3% 小川培地を準備した。

## 〔A〕

前日抗結核剤の投与を中止せしめて採取した早朝患者喀痰 30 件 (Gaffky—以下 G—10 号: 1, G 7 号: 1, G 6 号: 4, G 5 号: 3, G 2 号: 1, G 1 号: 5, G 0 号

: 15) を 0.002% BTB 加 N/1 NaOH で 5 倍稀釈 20 分間前処理し、2 分してその一方の 0.1 ml を pH 5.8 の両種半流動寒天培地および 3% 小川培地 2 本宛に接種した。他方はただちに N/1 HCl で中和してのち、0.1 ml を pH 6.8 の両種半流動寒天培地 2 本宛に接種、37°C に培養し、集落発生までは毎日観察して初発日数を記録し、7 週まで培養陽性率ならびに発生集落数を比較した。

## 〔B〕

G 6 号, G 5 号の患者喀痰をそれぞれ 1 件選び、0.002% BTB 加 N/1 NaOH 5 倍稀釈、20 分間前処理を行なつてのち、直接法の場合は N/1 NaOH で 10 倍数稀釈系列 5 段階 ( $10^{-2}$ ~ $10^{-6}$ ) を作り、中和法の場合は N/1 HCl で中和後生理食塩水で同様稀釈系列 5 段階を作り、上記同様に各種培地 2 本宛に接種して培養、初発日数および発生集落数を比較した。

## 成績：

## 〔A〕

## (i) 培養陽性率について

患者喀痰 30 件の培養において、半流動寒天培地ではいずれの場合も、3% 小川培地に比して集落の初発は 1~2 週早く、その発育も良好であつた。

すなわち培養陽性率は表 1 に示すごとく 2 週で pH 5.8 および 6.8 半流動 Dubos 寒天培地, pH 5.8 半流動 Kirchner 寒天培地は 30 件陽性 (100%), pH 6.8 半流動 Kirchner 寒天培地は 29 件 (96.7%) であつた。これに比較し 3% 小川培地では 2 週で 11 件 (36.7%) 陽性。5 週では pH 6.8 半流動 Kirchner 寒天培地は 30 件 (100%) となり、3% 小川培地では 22 件 (73.3%), 7 週で 3% 小川培地では 24 件 (80.0%) 陽性であつた。pH 6.8 と pH 5.8 との間には著明な差はなく、汚染培地本数も半流動寒天培地はおのの 1 本で差なく、3% 小川培地には認められなかつた。

## (ii) 集落初発日数について

集落の平均初発日数は同じく表 1 のごとくである。半流動寒天培地には培養 1 ないし 2 日のきわめて早期より微細集落の認められるものがあつたが、一般に半

表1 各種半流動寒天培地における中和法と直接法との比較

培地	陽性件数 (%)			平均 初発日数	汚染本数
	2 週	5 週	7 週		
pH 5.8 半流動 Dubos 寒天培地 *	** (100) 30	30	30	11 7.0	*** 本 1
pH 6.8 半流動 Dubos 寒天培地	30	30	30	7.1	1
pH 5.8 半流動 Kirchner 寒天培地	30	30	30	7.3	1
pH 6.8 半流動 Kirchner 寒天培地	(96.7) 29	30	30	7.6	1
3 % 小川培地	(36.7) 11	(73.3) 22	(80.0) 24	18.5	0

\* 1件につき培地2本使用, 以下同様。

\*\* G 陽性 15 件 (G 10 号: 1, G 7 号: 1, G 6 号: 4, G 5 号: 3, G 2 号: 1, G 1 号: 5), 陰性 15 件。

\*\*\* 培地 60 本中の汚染本数。

流動寒天培地の判定に熟達していない人によつても陽性と認められたときをもつて初発とした。また同一培養培地の2本に遅速があれば、早いほうの日付を初発日として計算した。

pH 5.8 半流動 Dubos, pH 6.8 半流動 Dubos, pH 5.8 半流動 Kirchner, pH 6.8 半流動 Kirchner 寒天培地はそれぞれ平均 7.0, 7.1, 7.3, 7.6 日で4者間に有意差はない。3% 小川培地では 18.5 日であつた。同一 pH では Dubos のほうが、同種培地では pH 5.8 のほうが早いように思えるが著差ではない。この成績は G 号数の多い場合ほぼ 1 週間で判定可能であることを示している。

(iii) 発生集落数について

半流動寒天培地では微細集落の計数は可能であるが、固型培地のごとく平面上に集落が存在するのと異なり立体的であるので、集落数の比較は厳密には期待できない。そこで陽性例を Knox に従つて集落数の多いほうより a, b, c, d, e, f の6段階 (図1) に分けて判定した。a, b, c, d, e, f のそれぞれは  $H_{37}R_v$  株 1 mg/ml の滅菌蒸留水浮遊液を10倍数稀釈し  $10^{-1}$  ~  $10^{-6}$  の6段階を作り、そのおのおの 0.1 ml を pH 6.8 半流動 Dubos 寒天培地に接種し 18 日間

図 1

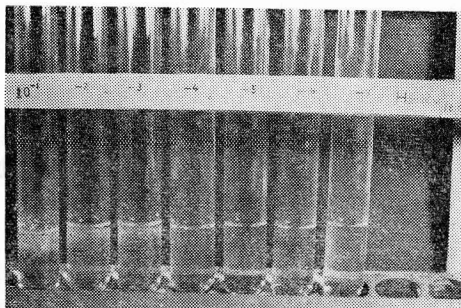


表2 各種半流動寒天培地における発生集落数の比較 (3週判定)

培地	集落数					
	a	b	c	d	e	f
pH 5.8 半流動 Dubos	12	9	11	12	6	9
pH 6.8 半流動 Dubos	14	1	12	7	8	17
pH 5.8 半流動 Kirchner	6	8	8	1	8	28
pH 6.8 半流動 Kirchner	2	4	1	2	10	41

注: pH 6.8 半流動 Kirchner 寒天培地のみ 60 本, 他は汚染のため 59 本 (pH 6.8 Kirchner も 6 週で 1 本汚染)。

培養したときの状態である。

この方法に従つて 3 週における各種半流動寒天培地の発生集落数を比較すると表2のようになる。

pH 5.8 半流動 Dubos 寒天培地と pH 6.8 同培地とを比較すると pH 5.8 に b, d が多く pH 6.8 に f が多い。この差は pH 6.8 の培地では中和法により接種菌量が pH 5.8 の培地の場合の 1/2 になっているので、a のように菌量の非常に多い場合には問題にならないが、少なくなるにつれて影響が現われたものと考えられる。

次に半流動 Kirchner 寒天培地でも pH 5.8 と pH 6.8 の間には Dubos におけると同様の傾向をみる。すなわち発生集落数が減少すると両者間の差が著明になった。

一方 pH 5.8 の Dubos と Kirchner とを比較したとき、Dubos に a, b, c, d が多く Kirchner に e, f が多い結果を得た。

[B]

10 倍数稀釈 5 段階で 4 種培地の比較を行なつたのは、ある稀釈段階では集落数の測定が可能で比較が容易に行なえるのではないかという期待のもとに施行したの

表3 階段稀釈による各種培地発生集落数の比較 (患者喀痰, G5号)

培地	稀釈	3					5				
		10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
pH 5.8 半流動 Dubos 寒天培地		b*	c	e	e	f	a	a	a	b	b
pH 6.8 半流動 Dubos 寒天培地		b	c	e	f	f	a	a	b	c	f
pH 5.8 半流動 Kirchner 寒天培地		c	d	f	f	f	a	c	e	f	f
pH 6.8 半流動 Kirchner 寒天培地		f	f	f	f	f	f	f	f	f	f
3% 小川培地		+	+	26.0	2.0	2.5	+	+	56.5	8.0	4.5

\* 培地 2 本に発生せる集落数の平均, 以下同様。

である。3 週および 5 週の成績を表 3 に示す。稀釈倍数の増加に伴って直接法と中和法との差が明瞭になってくる。5 週判定において 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> での Dubos pH 5.8 と pH 6.8 との間, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> での Kirchner pH 5.8 と pH 6.8 の間の差がそれである。

### 考 察

半流動寒天培地は固形培地の長所—集落算定が可能であること—と液体培地の長所—集落の早期検出—とを兼ね備えていると考えられる培地で, Drea<sup>6)</sup> によつて結核菌培養に用いられ, Middlebrook<sup>7)</sup> も使用し, Knox<sup>3) 4)</sup> により実用化の段階に移されたものである。

Drea は寒天を種々濃度に液体培地に加え, 寒天が 0.1~0.12% 以下でよい成績を得ている。Middlebrook は 0.2% に寒天を加えた培地で I NH に関する実験を行なっているが, 半流動寒天培地に対する検討は行なっていない。Knox は半流動寒天培地における結核菌培養に関する論文で 0.125% の寒天と血清またはアルブミンを含む Kirchner, Fisher および Dubos 培地の半流動寒天培地について実験を行ない, 保存菌株, 患者よりの分離菌株の培養に優れた成績を示すことを報告している。猪野ら<sup>8)</sup> は 0.1% 半流動 Dubos および Kirchner 寒天培地を用いて処理中和喀痰の培養が可能であることを示し, 義茂ら<sup>9) 10)</sup> は 0.2% の半流動 Dubos 寒天培地で NaOH 水前処理喀痰の分離培養を行なつて 3% 小川培地に比し, 初発日数短く, 陽性率, 発生集落数もよい結果を得たことを報じ, 井上ら<sup>11)</sup> は 0.125% 半流動 Kirchner, Youmans および Dubos 寒天培地により処理中和喀痰の分離培養を行ない同様の成績を得ている。

われわれも Micro-culture Method 研究の途上半流動寒天培地に注目して, 0.1% 半流動 Dubos および Kirchner 寒天培地を使用し, 保存菌株ならびに処理中和喀痰の培養を行ない 3% 小川培地と比較, 優秀な成績をあげたことはすでに発表した<sup>1) 2)</sup>。

分離培養にさいしては従来処理中和喀痰を接種してい

たのであるが, 中和法も改良によりいく分複雑さを減少した。0.002% B T B 加 N/1 NaOH を喀痰の 5 倍量加え 20 分処理後 N/1 HCl を N/1 NaOH と同量加え中和して目的を達しうるのである。この方法によれば呈色によつても中和が行なえ手間はそれほどかからず, また十分混和均等化される利点を同時に有している。しかしながら Routine として半流動寒天培地を使用するさいには, やはり NaOH 水処理喀痰を直接接種する方法の必要性を感じる。分離培養はわが国では 3% 小川培地へ NaOH 水処理喀痰を接種する方法で非常に簡略化されているためにそれ以上に手数のかかる方法は Routine に採用されにくかうと考えるからである。

pH 5.8 半流動 Dubos および Kirchner 寒天培地では NaOH 水処理喀痰を直接接種して後 2 日ないし 3 日で pH は 6.6~6.8 となり, この培地への直接接種法は可能と考えられ, pH 6.8 の両種半流動寒天培地との成績を比較した。その結果 pH5.8 の半流動 Dubos および Kirchner 寒天培地は使用可能であり, 中和法に比し接種菌量が 2 倍であるので発生集落数の少ない例では当然のことながら直接法が勝っている傾向を示している。pH 5.8 半流動 Dubos 寒天培地と同 Kirchner 寒天培地とを比較すると一般に Dubos 培地が Kirchner 培地に比し発生集落数が多く優れている。

集落初発日数はいずれの半流動寒天培地においても約 7 日で 3% 小川培地の 18.5 日より約 10 日早い。また初発は半流動寒天培地では前記のごと同培地の判定になれていないものが判定して陽性とした日をもつて初発としたので, ごく微細な集落はその数日前にすでに観察されうるものが多いことを付記しておく。

汚染に関しては本実験では, 4 種培地間には差はなく, 3% 小川培地とも著差はなかつたが, Routine として使用する場合は増加することが予想され, 培地に添加するマラカイト緑の量に関しては現在検討中である。

### 結 論

pH 5.8 半流動 Dubos および Kirchner 寒天培地へ

NaOH水で前処理した喀痰を直接接種した場合とpH 6.8の両種培地へ処理中和喀痰を接種した場合とを比較し、pH 5.8 半流動寒天培地は NaOH 水処理喀痰の直接接種法による結核菌分離培養に使用可能である結果を得た。

慶大細菌学教室牛場大蔵教授の御指導，御校閲に深謝し，あわせて伊藤忠雄博士の御指導に謝意を表します。

#### 文 献

- 1) 伊藤忠雄・亀崎華家・朝倉宏・杉山育男・綾部和三郎・大川日出夫：診断と治療，46：1349，昭33.
- 2) 伊藤忠雄・大川日出夫・杉山育男：呼吸器診療，14：813，昭34.
- 3) Knox, R. : Lancet, 6881 : 110, 1955.
- 4) Knox, R., Swait, E. & Woodroffe, R. : J. Gen. Microb., 15 : 359, 1956.
- 5) 伊藤忠雄：モダンメディア，3 (4) : 1, 昭32.
- 6) Drea, W.F. : J. Bact., 39 : 197, 1940.
- 7) Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc., 65 : 765, 1952.
- 8) 猪野茂・土屋一之進：福島県衛生研究所研究報告，第11集，81，昭31.
- 9) 義茂上・高椋卯吉・正司房：モダンメディア，2 (8) : 11, 昭31.
- 10) 義茂上・高椋卯吉・吉武昭男・井上忠是・正司房：臨床病理，7 : 54, 昭34.
- 11) 井上照・深川武比呂：医学と生物学，47 : 187, 昭33.