

結核培地としての半流動寒天培地に関する研究

第2報 pH5.8 半流動 Dubos および Kirchner 寒天培地の組成検討

大 川 口 出 夫

国立神奈川療養所

受付 昭和 35 年 9 月 20 日

緒 言

結核培地としての半流動寒天培地は Knox により実用化され¹⁾²⁾、国立神奈川療養所細菌検査室においても保存菌株の培養および分離培養に優れた成績を得ている³⁾⁴⁾。

著者は第1報で半流動 Dubos および Kirchner 寒天培地の pH を 5.8 とし、これに 4% NaOH 水で前処理した喀痰を直接接種、培養し、この培地は Routine として採用されうる可能性のあることを認めた⁵⁾。

そのさい、添加したマラカイト緑は 50×10^4 倍であったが、Routine として多数扱う場合には当然汚染の増加が予想されるので、添加するマラカイト緑濃度について検討を行なった。

また添加するアルブミンの代用として血清使用の可否ならびに添加するアルブミン濃度の問題についても実験を行なったので、その成績を報告する。

実験方法および成績

〔実験 I〕 マラカイト緑濃度の検討 (A)

1. 実験方法

pH 5.8 の 0.1% 半流動 Dubos および Kirchner 寒天培地を製作するにあたり、添加するマラカイト緑濃度を 50×10^4 倍、 20×10^4 倍、 10×10^4 倍、 5×10^4 倍、 1×10^4 倍、 5×10^3 倍の 6 段階とした。

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 22 件 (Gaffky—以下 G—5 号:4, G4 号:1, G3 号:1, G2 号:5, G1 号:2, G0 号:9) を 4% NaOH 水で 5 倍希釈 20 分間前処理し、その 0.1 ml を準備した各培地 2 本あてに注入、 37°C に培養した。毎週判定し 3 週まで観察、陽性率および汚染培地本数を比較した。

次に G5 号の患者喀痰 2 件に上記同様の前処理を行なったのち、4% NaOH 水で 10 倍数希釈系列 5 段階 (10^{-2} ~ 10^{-6}) を作り、その 0.1 ml を各種培地 2 本あてに接種して培養、発生集落数を比較した。

2. 実験成績

患者喀痰 22 件の培養成績は表 1 に示すごとく 3 週

表 1 マラカイト緑濃度と培養成績および汚染との関係 (患者喀痰 22 件, 3 週判定)

マラカイト緑濃度	培地		培養汚染	
	半流動 Dubos 寒天培地	半流動 Kirchner 寒天培地	陽性件数 (%)	汚染本数 (%)
50×10^4 倍	22/22* (100)	2/4† (4.5)	22	4 (9.1)
20×10^4 倍	22	0	22	0
10×10^4 倍	22	0	22	1 (2.3)
5×10^4 倍	22	0	22	0
1×10^4 倍	21 (95.4)	0	17 (77.2)	0
5×10^3 倍	14 (63.6)	0	0	1

* G5 号:4, G4 号:1, G3 号:1, G2 号:5, G1 号:2, G0 号:9

において 50×10^4 倍より 5×10^4 倍のマラカイト緑濃度では陽性率に差なく (22/22, 100%), 1×10^4 倍、 5×10^3 倍と濃度の上昇につれて陽性率は低下している。

汚染は 50×10^4 倍の半流動 Dubos, Kirchner 寒天培地にそれぞれ 2 本 (4.5%), 4 本 (9.1%) と認められるほかは、 10×10^4 倍と 5×10^3 倍の半流動 Kirchner 寒天培地におのおの 1 本 (2.3%) が数えられるにすぎなかった。

階段希釈を行なった 2 例の成績は表 2 に示す。発生集落数は第 1 報と同じく Knox に従って、a, b, c, d, e, f の 6 段階に分類し、計数可能のものは数で表わした⁵⁾。表 2 のごとく Dubos, Kirchner とも各希釈段階で 50×10^4 倍より 10×10^4 倍までは集落数に著差なく、 5×10^4 倍より濃度の上昇に伴って明らかに減少している。

〔実験 II〕 マラカイト緑濃度の検討 (B)

実験 I よりマラカイト緑濃度は 5×10^4 倍以上は不適當であることが分かったので、新たに次の実験を行なった。

1. 実験方法

マラカイト緑を 50×10^4 倍、 20×10^4 倍、 10×10^4 倍

表2 マラカイト緑濃度と発生集落数との関係 (3週判定)

マラカイト緑濃度	半流動 Dubos 寒天培地			半流動 Kirchner 寒天培地		
	第1例 (G5号)			第2例 (G5号)		
	例	稀釈		稀釈		
	-3	-4	-5	-3	-4	-5
50 × 10 ⁴ 倍	b*	d	36.5	c	42.5	10.5
20 × 10 ⁴ 倍	b	d	33.0	c	30.0	11.0
10 × 10 ⁴ 倍	b	d	27.0	c	42.5	11.5
5 × 10 ⁴ 倍	c	30.0	11.5	c	22.5	6.0
1 × 10 ⁴ 倍	0	2.5	3.5	0.5	0	0
5 × 10 ³ 倍	0	0	0	0	0	0

* 培地2本の平均集落数, 以下同様
 ** 汚染培地本数

の3段階に添加した半流動 Dubos 寒天培地および 3% 小川培地を準備した。

早朝患者喀痰 100件 (G8号:6, G7号:8, G6号:5, G5号:2, G4号:3, G3号:2, G2号:2, G1号:10, G0号:62) を前記同様に前処理し, 0.1 ml を各培地 2本あてに接種, 37°C に培養した。毎週判定 7週まで観察し, 陽性率ならびに汚染培地本数を比較した。

2. 実験成績

培養成績は表3のごとくである。培養陽性件数は 2週で半流動寒天培地のいずれも 100件中 44件 (44.0%), 3% 小川培地では 29件 (29.0%) で, 3種マラカイト緑濃度間では差を認めない。5週になると 50 × 10⁴ 倍および 10 × 10⁴ 倍の半流動寒天培地で各 1例を増し 45件 (45.0%) となり, 3% 小川培地では 43件 (43.0%) と陽性率の上昇をみた。この実験では過去に 3% 小川培地による Routine の培養で比較的汚染を起こしたことの多かつた患者喀痰数例を含んでいるために, 一般に汚染培地本数は多く, 50 × 10⁴ 倍に加えた半流動寒天培地では 200本中 43本 (21.5%), 20 × 10⁴ 倍では 23本 (11.5%), 10 × 10⁴ 倍では 9本 (4.5%), 3% 小川培地では 27本 (13.5%) であつた。50 × 10⁴ 倍では圧倒的に汚染が多く, 20 × 10⁴ 倍ではほぼ 3% 小川培地と等しく, 10 × 10⁴ 倍では 3% 小川培地に比し低率である。

〔実験Ⅲ〕 血清添加半流動 Dubos 寒天培地の検討

1. 実験方法

マラカイト緑を 20 × 10⁴ 倍に加えた pH 5.8 半流動 Dubos 寒天培地調製時, アルブミンの代りに牛血清を 10% および 5% に添加し, 10% アルブミン添加半流動 Dubos 寒天培地ならびに 3% 小川培地を対照として準備した。

表3 0.1% 半流動 Dubos 寒天培地における マラカイト緑濃度と培養成績との関係

培地	培養成績 件数	陽性件数 (%)			培地 本数	汚染培地 本数 (%)
		2週	5	7		
50 × 10 ⁴ 倍	* 100件	(44) 44	(-5) 45	(46) 46	210本	43 (21.5)
20 × 10 ⁴ 倍		44	44	45		23 (11.5)
10 × 10 ⁴ 倍		44	45	45		9 (4.5)
3%小川培地		(29) 29	(43) 43	45		27 (13.5)

* G 陽性 38件 (G8号:6, G7号:8, G6号:5, G5号:2, G4号:3, G3号:2, G2号:2, G1号:10)
 G 陰性 62件

早朝患者喀痰 19件 (G9号:1, G7号:1, G6号:2, G5号:3, G4号:1, G2号:1, G1号:1, G0号:9) を前記同様に前処理し, 0.1 ml を用意した各培地 2本あてに注入, 培養し, 集落初発まで毎日観察, 以後毎週判定し, 陽性率, 初発日数, 汚染培地本数を比較した。

G7号, G6号の患者喀痰を前述同様に処理後 10⁻² ~ 10⁻⁶ に稀釈し, その 0.1 ml を各種培地 2本あてに接種して培養, 発生集落数を比較した。

2. 実験成績

培養成績は表4にみられるごとく, アルブミン添加半流動 Dubos 寒天培地, 10% 血清添加同培地, 5% 血清添加同培地において陽性率は 2週でそれぞれ 19件中 16件 (84.2%) で差を認めないが, 平均初発日数はアルブミン添加培地 9.8日, 10% 血清添加培地 9.5日に比し, 5% 血清添加培地は 10.5日目でやや劣り, 汚染培地本数には差がなかつた。発生集落数は表5に示すごとく, アルブミン添加培地と 10% 血清添加培地では著差はないが 5% 血清添加培地では明らかに劣つていた。

〔実験Ⅳ〕 添加するアルブミン量の検討

1. 実験方法

pH 5.8 半流動 Dubos 寒天培地 (マラカイト緑 20 × 10⁴ 倍添加) 調製時, アルブミンの量を 7.5%, 5%, 2.5% とし, 10% に添加した培地および 3% 小川培地を対照として準備した。

早朝患者喀痰 16件 (G9号:1, G7号:2, G6号:2, G1号:2, G0号:9) を前記同様に前処理し, 0.1 ml を各培地 2本あてに注入, 培養し, 陽性率, 初発日数, 汚染培地本数を比較した。

G9号, G7号の患者喀痰を前述同様に処理後, 10⁻² ~ 10⁻⁶ に稀釈, その 0.1 ml を各培地 2本あてに接種

表4 血清添加半流動 Dubos 寒天培地における培養成績

培地	培養成績			陽性率 (%)		初発		汚染	
	件数	2週判定	5週判定	件数	平均初発日数	培地本数	汚染本数(%)		
アルブミン添加半流動 Dubos 寒天培地	19*	16 (84.2)**	17 (83.5)	17	9.8	38	1 (2.1)		
10% 血清添加半流動 Dubos 寒天培地		16	16	16	9.5		1		
5% 血清添加半流動 Dubos 寒天培地		16	17	17	10.5		0		
3% 小川培地		0 (52.6)	16	16	15.1		3 (7.9)		

* G9号:1 G7号:1, G6号:2, G5号:3, G4号:1, G2号:1 G1号:1, G0号:9
 ** 1件につき、培地2本使用。以下同様

表5 血清添加半流動 Dubos 寒天培地における発生集落数 (2週判定)

培地	例1 (G7号)			例2 (G6号)		
	稀釈	-2	-3	-4	-2	-3
アルブミン添加半流動 Dubos 寒天培地	b*	d	11.0	b	53.0	7.5
10% 血清添加半流動 Dubos 寒天培地	b	d	30.5	b	45.0	16.5
5% 血清添加半流動 Dubos 寒天培地	1.0	2.0	0	d	14.5	2.0
3% 小川培地	#	80.5	7.5	85.5	10.5	0

* 培地2本の平均集落数。以下同様

表6 アルブミン低濃度添加半流動 Dubos 寒天培地における培養成績

培地	培養成績			陽性率 (%)		初発		汚染	
	件数	2週判定	5週判定	件数	平均初発日数	培地本数	汚染本数(%)		
10% アルブミン添加半流動 Dubos 寒天培地	16*	11 (63.8)**	11	11	7.5	32	3 (9.4)		
7.5% アルブミン添加半流動 Dubos 寒天培地		11	11		7.7		0		
5% アルブミン添加半流動 Dubos 寒天培地		11	12 (75.0)	12	8.7		2 (6.3)		
2.5% アルブミン添加半流動 Dubos 寒天培地		11	11	11	8.0		2		
3% 小川培地		7 (43.6)	12	12	14.7		1 (3.1)		

* G9号:1, G7号:2, G6号:2, G1号:2, G1号:9
 ** 1件につき培地2本使用。以下同様

あることを先に報じた5)。

半流動寒天培地は液体培地同様、汚染されやすいうえに、汚染は多くの場合、培地全体に及び、判定を不能とする。これは固型培地と比較して非常な欠点とされ、Routine として日常検査室で多数扱うときにはさらに汚

し培養、発生集落数を比較した。

2. 実験成績

添加するアルブミンの量が 10%, 7.5%, 5%, 2.5% の4種半流動寒天培地間では表6のごとく陽性率、初発日数、汚染率について有意差を認めない。次に表7のごとく、発生集落数は 5%, 2.5% となるに及び、やや減少の傾向がみられるが著差ではない。

考 察

結核培地としての半流動寒天培地は固型培地と液体培地の中間の性質をもつものとして注目されており、pH を 5.8 にした 0.1% の半流動 Dubos および Kirchner 寒天培地は 4% NaOH 水で前処理した喀痰を直接接種し、培養して、Routine として用いる可能性が

染の増加が予想される。そこでマラカイト緑の濃度を高め、これが汚染ならびに発生集落数に及ぼす影響について検討した。マラカイト緑を 50×10⁴ 倍、20×10⁴ 倍、10×10⁴ 倍、5×10⁴ 倍、1×10⁴ 倍、5×10³ 倍に添加したとき、培養成績は 5×10⁴ 倍以上の濃度では、それ

表7 アルブミン低濃度添加半流動 Dubos 寒天培地における発生集落数(2週判定)

培地	例 稀釈	第1例 (G9号)			第2例 (G7号)		
		-4	-5	-6	-4	-5	-6
10%アルブミン添加 半流動Dubos寒天培地	* 88.5	27.0	5.5	d	23.0	5.0	
7.5%アルブミン添加 半流動Dubos寒天培地	69.5	19.5	10.5	d	21.5	4.5	
5%アルブミン添加 半流動Dubos寒天培地	61.0	22.5	5.5	d	23.5	7.5	
2.5%アルブミン添加 半流動Dubos寒天培地	57.0	23.5	8.0	d	16.0	5.5	
3%小川培地	26.0	4.0	2.0	10.5	0	0	

* 培地2本の平均集落数、以下同様

以下の濃度に比し明らかに劣っていた。50×10⁴ 倍より10×10⁴ 倍の間には著差はなかつたが、50×10⁴ 倍ではやはり汚染が頻発した。次に50×10⁴ 倍、20×10⁴ 倍、10×10⁴ 倍の3段階のマラカイト緑濃度で、患者喀痰100例につき分離培養を行ない3種培地間に培養陽性率、発生集落数の差を認めず、汚染は50×10⁴ 倍でもつとも多く、20×10⁴ 倍では対照に使用した3%小川培地と同程度、10×10⁴ 倍ではより低率であつた。要するに20×10⁴ 倍、10×10⁴ 倍の両者が添加濃度として適当であり、10×10⁴ 倍では個々の集落がやや小さい難点はあるが、集落と培地とのコントラストがつく利点も有しているので、兩種濃度を目的により使い分ける方法もとることができる。マラカイト緑濃度についてはKnox¹⁾は128,000倍に添加した培地も使用しており、小川ら⁶⁾は重層培地の一部に用いる半流動寒天培地の実験で10×10⁴ 倍と20×10⁴ 倍とが等しい成績を示すことを報じ、著者と同一の結論を得ている。

患者喀痰100例の分離培養の成績をみると半流動寒天培地の培養2週の成績は3%小川培地における5~7週の成績にほぼ匹敵している。このことは半流動寒天培地が集落早期検出の目的になつていていることを示し、最終判定までの期間を短縮できることを示している。

また培養判定にさいして注意すべき点は喀痰成分で集落とまぎらわしいものがあることである。これについては塗抹検鏡して確認する方法もとりうるし、培養を続けることにより結核菌集落ならば母集落からの連珠状の2次発育をみ、判定を下すことができる。

アルブミンを10%に添加した半流動Dubos寒天

培地ではRoutineに採用するには価格の点でも問題があつて、アルブミンの代用としての血清の使用、あるいは添加量の減少の可能性に検討を加えた。血清については5%添加では劣るが10%添加ではアルブミン10%添加とおおむね成績を同じくするゆえ、血清の入手が容易な所では血清を使用することができる。

アルブミンの量に関してはDubos寒天培地で室橋ら⁷⁾は純アルブミン量として0.025%まで下げても培養成績に影響を認めていない。半流動寒天培地では10%(純アルブミン量は0.5%)、7.5%、5%、2.5%(純アルブミン量0.125%)とも培養成績に著明な差はなかつたが、5%、2.5%と濃度の減少につれて、これは数字上の成績には現われないが、発生集落個々が縮小している。この点を考慮して半流動Dubos寒天培地における分離培養では2.5%程度が限界と思われる。

結 論

1) pH 5.8の0.1%半流動DubosおよびKirchner寒天培地を分離培養に使用するさい、添加するマラカイト緑濃度は、20×10⁴ 倍ならびに10×10⁴ 倍が適当である。

2) アルブミンの代りに血清を10%に添加したpH 5.8半流動Dubos寒天培地は分離培養に使用しうる。

3) 半流動Dubos寒天培地に添加するアルブミンの量は2.5%までに減少することが可能である。

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) Knox, R. : Lancet, 6881 : 110, 1955.
- 2) Knox, R., Swait, E. & Woodroffe, R. : J. Gen. Microb., 15 : 359, 1956.
- 3) 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.
- 4) 伊藤忠雄・大川日出夫・杉山育男 : 呼吸器診療, 14 : 813, 昭34.
- 5) 大川日出夫 : 結核, 35 : 630, 昭35.
- 6) 小川辰次・上野高正・高倉廉 : 結核, 35 : 187, 昭35.
- 7) 室橋豊穂・土屋まつ子 : 結核培地研究協議会報告書, 1~4, 昭35.