

結核菌用寒天培地の研究

第6報 保存全血液を用いた寒天培地の改良——その2

小川辰次・大谷典子

北里研究所附属病院 (院長 福住定吉)

受付 昭和37年5月19日

1 緒 論

先に小川¹⁾は、保存全血液寒天培地に可溶性澱粉を加え斜面に接種物をのりやすくし、さらにその組成を簡単にするに成功したが、これらの培地でも詳細にみれば、鶏卵培地に比して発育の劣るものがあること、雑菌の侵入の多いこと等が分かったので、その後さらに実験を重ね、従来の欠点をほぼ除きえたと思われる培地に到達することができたので、ここに発表する次第である。

2 実験の目標および実験方法

① 実験の目標

試作改良の途中であつた4% NaOH 処理液、0.1 cc 接種用の変法 III に準じた次のような基汁の培地

KH ₂ PO ₄	1.0 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.3 g
硫酸マグネシウム	0.06 g
クエン酸ナトリウム	0.25 g
アスパラギン	0.5 g
{(グルタミン酸ナトリウム)	{0.3 g}
グリセリン	1.5 cc
0.1% マラカイト緑	0.25 cc
可溶性澱粉	2.0 g
精製寒天	2.0 g
蒸溜水	100.0 cc

および中和した材料の0.1 cc 接種用の Kirchner に準じた培地、すなわち前者の基汁中の KH₂PO₄ 1.0 g を0.4 g にしたものを基準にし、これよりも発育のよい、雑菌の少ないしかも組成の簡単な培地を作ること为目标として、KH₂PO₄ の適量、Na₂HPO₄、硫酸マグネシウム、クエン酸ナトリウム、アスパラギン (グルタミン酸ナトリウム) 等の必要性の有無、さらには雑菌阻止剤としてのマラカイト緑、ペニシリンの適量等を決定した。

② 実験方法

接種には塗抹陽性の喀痰を用いた。すなわち、まず喀痰を中試験管にとり、4% NaOH 液を約10倍量入れ、よく振盪して均等化し、この部分を10¹倍稀釈と仮定し、さらに4% NaOH で10倍、100倍等に稀釈してこの部分を10²、10³倍稀釈と仮定した。そして、ガフキー号数に応じて次の3段階を0.1 cc 宛2~3本の試作培地および対照としての3% 小川培地に接種した。

ガフキー 1~3号	…… 10 ¹ ~10 ³ 倍稀釈
4~6号	…… 10 ² ~10 ⁴ 倍稀釈
7~10号	…… 10 ³ ~10 ⁵ 倍稀釈

また、中和した材料を接種する場合には、フェノールレッドを0.004% に混入した4% NaOH で喀痰を約10倍に稀釈し、1~2 cc を別の試験管にとり8% HCl で中和してこの部分を10¹倍稀釈と仮定し、さらに滅菌蒸溜水で10倍、100倍等に稀釈してこの部分をそれぞれ10²、10³倍と仮定して、4% NaOH 処理同様3段階を0.1 cc 宛試作培地および1% 小川培地に接種した。接種したら、斜面全体を接種物でうろおし、37°C の孵卵器に斜面を水平にしておかせ、寒天培地は2~3日、鶏卵培地は1~2日保存し、液のほぼ乾燥したところでゴムキャップにかえ、たてて培養した。

③ 観察および判定の方法

毎週観察して、発育のよいものはほぼ4週で、発育の悪いものはさらに観察を継続し7~8週までみて集落数を記録した。そして、これらの3段階接種の中で、最少10コ、最多200コまでの集落が発育した系列により、比較した例数の平均集落数を求め、試作培地の集落数の多少を比較した。

3 成 績

イ. 試作培地改良のための実験

① KH₂PO₄ の適量の決定

Table 1. Determination of Optimal Amount of Potassium Phosphate, Monobasic

Treatment	pH and average No. of colonies	Stored whole blood agar medium						3 % or 1 % Ogawa egg medium
		0	0.1 g	0.3 g	0.5 g	0.7 g	0.9 g	
4 % NaOH	Without specimen added	7.18	6.63	6.45	6.25	6.18	6.10	
	pH 0.1 cc 4 % NaOH added	8.45	8.00	7.53	7.04	6.81	6.63	
	Average No. of colonies (4 cases)	0	22.2	51.5	68.0	65.3	56.2	37.3
Neutralized	pH	7.18	6.70	6.50	6.25	6.18	6.10	
	Average No. of colonies (5 cases)	67.1	73.7	63.0	58.2	39.6	16.1	59.9

前述の 4 % NaOH 処理用および中和処理用の培地に混入されている KH_2PO_4 の量を、基汁 100 cc に対して表 1 のように 0, 0.1 g, 0.3 g, ... と 0.2 g 宛増量して 0.9 g まで混入した 6 種の保存全血液寒天培地を作り比較した。成績は表 1 のようであつて、4 % NaOH の前処理の 4 例の実験では、平均集落数のもつとも多いのは 0.5 g であつて、それより減量したところでは急に、それより増量したところでは徐々に集落数が減っている。0.5 g 混入されている培地の pH は 6.25, これに 4 % NaOH を 0.1 cc 混入すると 7.04 となる。

次に、中和処理接種の 5 例の実験では、0, 0.1 g が

もつとも多く、量の増加とともに次第に集落数が減少している。もつとも多い集落を示した 0, 0.1 g の培地の pH は、それぞれ 7.18, 6.70 である。

② Na_2HPO_4 , クエン酸ナトリウム, 硫酸マグネシウム, アスパラギン, グルタミン酸ナトリウム等の必要性の検討

① の実験成績から、 KH_2PO_4 の混入量を基汁 100 cc に対して 0.5 g, 0 g に減量した NaOH 用および中和用培地を基準として、 KH_2PO_4 以外の前述の塩類を除去したり加えたりして、その混入の必要性について検討した。まず、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を除去すると、可検材料を接種したときに斜面に集落と間違いやすい沈澱ができ

Table 2. Investigation of Necessity of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, Sodium Citrate, Magnesium Sulfate, and Asparagine or Sodium Glutamate in the Medium for Inoculation of 4 % NaOH Treated Specimen

Media		Stored whole blood agar medium				3 % Ogawa egg medium
		(1)	(2)	(3)	(4)	
Composition of basic solutions	KH_2PO_4	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.3	0.3	0.3	0.3	
	Sodium citrate	0.25	0	0	0	
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.06	0	0	0	
	Asparagine	0.5	0.5	0	Sodium 0.3 glutamate	
pH of media	Without Specimen added	6.30	6.17	6.16	6.15	
	0.1 cc 4 % NaOH added	7.19	7.15	7.11	7.13	
Average No. of colonies		71.3	70.2	66.6	69.1	57.7

Note: Figures in the row of composition indicate gram in 100 cc. basic solution.

Table 3. Investigation of Necessity of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, Sodium Citrate, Magnesium Sulfate, and Asparagine or Sodium Glutamate in the Medium for Inoculation of Neutralized Specimen

Media		Stored whole blood agar medium					1% Ogawa egg medium
Composition of basic solutions		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.3 g	0.3 g	0.3 g	0.3 g	0.3 g	
	Sodium citrate	0.25	0	0	0.25	0	
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.06	0	0	0	0.06	
	Asparagine	0.5	0.5	0	0	0	
pH of Media		7.13	6.90	6.88	7.10	7.10	
Average No. and size of colonies		31.8	29.1	26.3 (s)	28.2 (s)	23.5	28.2

Note: 1) As table 2.

2) (s) in the row of size of colonies indicates smaller colonies which predominate in comparison with colonies on other media.

るので、沈澱を起こさないためにこのものが必要であることが分かった。次に表2のように、4% NaOH 処理用の(1)培地を基準として、この培地よりクエン酸ナトリウムと硫酸マグネシウムを同時に除去した培地を(2)、クエン酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、アスパラギンを同時に除去した培地を(3)、さらにクエン酸ナトリウムと硫酸マグネシウムとを同時に除き、アスパラギンの代りにグルタミン酸ナトリウムを0.3g 混入した培地を(4)として、この4種の培地を6例について実験した。その成績は表2のようであつて、(2)、(4)は(1)と差がなく、(3)は前2者に比して集落数は大差ないが集落は小さい。以上の成績から、この場合クエン酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、アスパラギンのうち結核菌の発育に影響のあるのは、アスパラギンだけであること、またグルタミン酸ナトリウムはアスパラギンに代りうる事が分かった。

次に、中和用培地の(1)を基準にして硫酸マグネシウムとクエン酸ナトリウムを除去した(2)、硫酸マグネシウム、クエン酸ソーダおよびアスパラギンを同時に除去した(3)、硫酸マグネシウムとアスパラギンとを除いた(4)、クエン酸ソーダとアスパラギンとを除いた(5)の5種類の培地を5例によつて比較した。成績は表3のようであつて、(1)に匹敵する発育を示しているのは(2)だけであつて、(3)、(4)、(5)は集落が少ないか小さい。以上の成績から、中和用培地でも、発育に影響のあるのはアスパラギンだけであること、また他の実験成績からアスパラギンはグルタミン酸ナトリウムで代えられることが分かった。

③ マラカイト緑およびペニシリンの適量の決定

KH_2PO_4 を基汁 100 cc に対して 0.5 g とし、硫酸マグネシウムとクエン酸ナトリウムを除去し、さらにアスパラギンの代りにグルタミン酸ナトリウムを用いた

Table 4. Investigation of the Highest Concentration of Malachite Green and Penicillin not Affecting the Growth of Myco. Tuberculosis

Effect of malachite green	Media and amount of 0.1% malachite green		Stored whole blood agar medium					3% or 1% Ogawa egg medium
	Treatment	No. of cases tested	0	1 cc	3 cc	5 cc	7 cc	
			4% NaOH	5 cases	58.7	53.7	50.6	
	Neutralized	6 cases	57.9	50.9	54.5	51.3	52.3	50.5
Effect of penicillin	Amount of penicillin added		50 unit	100 unit	150 unit	Medium containing malachite green		
	Treatment	No. of cases Tested						
			4% NaOH	6 cases	48.7	42.1	42.3	40.1
	Neutralized	6 cases	60.0	67.4	62.1	62.2	37.1	

Note: Figure in columns indicate the average number of colonies.

4% NaOH 用培地および前述の4% NaOH 用培地から KH_2PO_4 を除去した中和用の培地を用いて、これらの雑菌阻止剤が結核菌の発育に影響のない最高の混入量につき検討した。すなわち、まず 0.1% マラカイト緑液を培地 100 cc に対して 0, 1 cc, 3 cc, 5 cc, 7 cc と混入した5種の培地を4% NaOH 用では5例、中和用では6例について比較した。成績は表4でみるように、4% NaOH 用では、マラカイト緑の混入量の増すにしたがつて集落数が減少するが、中和用では、著明な減少の傾向はみられない。

次に、0.1% マラカイト緑液を培地 100 cc に対して 3 cc 混入したものを基準として、ペニシリンを培地 1 cc につき 50 単位、100 単位、150 単位を混入した3種の培地を用いて4% NaOH 用および中和用のものをそれぞれ6例について比較した。成績は表4のようであつて、4% NaOH 用、中和用ともに150単位までの混入量では、集落数の著明な減少は認められないし、またマラカイト緑混入の培地と比較しても大差はない。

ロ. 試作培地の決定

以上の成績から、われわれは次のような培地に到達した。両培地とも可溶性澱粉、グリセリン、寒天等の量は、以前に検討したことがあるので、そのときの成績をそのまま用いた。

① 4% NaOH 用の培地

{	KH_2PO_4	0.5 g
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.3 g
	グルタミン酸ナトリウム	0.3 g
	可溶性澱粉	2.0 g
	グリセリン	1.5 cc
	精製寒天	2.0 cc
	蒸溜水	100.0 cc
	0.1% マラカイト緑	3.0 cc
	(あるいはペニシリン	100 単位/cc)

以上を溶解滅菌し、55~60°C に冷却してから保存全血液を 10% に加えてよく混合し、中試験管に 5 cc 宛分注して斜面として固める。pH はそのまま 6.25 前後、4% NaOH を 0.1 cc 加えると 7.04 前後である。この処方では既報²⁾ のものと異なるのは、雑菌阻止剤としてペニシリンをマラカイト緑の代りに用いた点である。この培地は今までの実験成績からでも分かるように、3% 小川培地や従来の保存全血液寒天培地に比して集落数が多い。

② 中和用培地では、4% NaOH 用培地と異なるのは、 KH_2PO_4 が 0.5 g のものが 0.1 g に減量されていることだけである。中和用培地では、 KH_2PO_4 は 0, 0.1 g 混入の両者に大差はないが、その後の研究によりある菌株では KH_2PO_4 が入つておつたほうが発育のよいものも認められたので、前回では KH_2PO_4 を除去したが、今

回 0.1 g 混入することに改良した。また既報の処方には、硫酸マグネシウムが混入されていたが、その後の研究により全く影響のないことが分かつたので、除くことにした。pH は 6.63 前後である。この培地も、今までの実験成績から分かるように、1% 小川培地や従来の保存全血液寒天培地に比して集落数が多い。

4 総括および考察

われわれの保存全血液混入の培地は、4% NaOH 用のものは血清混入の変法 III³⁾ Kirchner 寒天培地、鶏卵培地の 3% 小川培地に、中和用のものは血清混入の Kirchner 寒天培地、鶏卵培地の 1% 小川培地に相当するものである。保存全血液寒天培地の基汁に、保存全血液の代りに血清を加えて作った培地は発育が悪い、また鶏卵培地に混入することによつて結核菌の発育を促進した焦性ブドウ酸を加えても保存全血液寒天培地には影響ない。この事実は、混入するものが保存全血液、血清、鶏卵というように異なることによつて、結核菌の発育にもつともよい組成およびその量の組合せが存在することを意味するものであろう。各研究者によつて、保存全血液寒天培地における血液^{4)~9)} の混入する適量、混入される塩類の必要性、 KH_2PO_4 ⁶⁾⁷⁾¹⁰⁾¹¹⁾ の混入量等が区々であることは、同じ保存全血液寒天培地であつても、その内容が異なるためではなからうか。

4% NaOH 用および中和用ともに今回の改良によつて、従来の保存全血液寒天培地や対照の 3%, 1% 小川培地に比しても常に集落数が多い。しかもその組成は簡単になり、保存全血液の混入量も、Tarshis¹²⁾ の培地、F. C. Whitcomb¹³⁾、吉岡¹⁴⁾、杉田¹¹⁾ の培地では 30% であるのに比して、われわれのものは松村¹⁵⁾ 同様 10% であるから、培地の分注のときに楽である。また、雑菌の侵入阻止も考慮されている。

われわれの保存全血液寒天培地が、従来多くの学者によつて発表されている種々の保存全血液寒天培地や血清の混入した培地に比して、あるいは鶏卵培地に比して、どの程度の地位にあるかは、さらに検討してみたい。

5 結 論

改良の途中であつた 4% NaOH 処理液 0.1 cc 接種用および中和処理液 0.1 cc 接種用の培地は、その後の実験により鶏卵培地に比して発育の劣る菌株が多少みられたし、雑菌の侵入の多いことなども認めたので、従来の培地よりも発育の優れた、雑菌侵入率の少ないしかも組成の簡単な培地を作るために、培地中に混入されている KH_2PO_4 の適量、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、硫酸マグネシウム、クエン酸ナトリウム、アスパラギン(グルタミン酸ナトリウム)等の必要性の有無、雑菌阻止剤としてのマラカイト緑、ペニシリンの適量等につき検討した結

果、次のような培地に到達した。

1) 4% NaOH 処理液 0.1 cc 接種用培地

{	KH ₂ PO ₄	0.5 g
	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.3 g
	グルタミン酸ナトリウム	0.3 g
	可溶性澱粉	2.0 g
	グリセリン	1.5 cc
	精製寒天	2.0 g
	0.1% マラカイト緑 (あるいはペニシリン)	3.0 cc 100 単位/cc
	蒸溜水	100.0 cc

以上を溶解、滅菌して 55~60°C に冷却し、保存全血液を 10% に加えてよく混合し、中試験管に 5 cc 宛分注して斜面に固める。pH はそのまま 6.25 前後、4% NaOH を 0.1 cc 加えると 7.04 前後となる。

2) 中和処理液 0.1 cc 接種用培地

1) における KH₂PO₄ の 0.5 g が 0.1 g に変更されただけであつて、その他は全く同様である。

これらの培地は従来の保存全血液寒天培地に比較し、また 3% 小川、1% 小川培地に比して集落数が多い。

文 献

- 1) 小川・大谷：日本細菌学雑誌，16：403，昭36.
- 2) 小川・大谷：日本結核病学会第36回総会において発表，昭36.
- 3) 小川・島田 他：日本細菌学雑誌，14：171，昭34.
- 4) M. S. Tarshis et al.：Am. J. Clin. Pathol., 21：101，1951.
- 5) 亀崎：結核，35：99，昭35.
- 6) 宇野：結核，30(増刊号)：99，昭30.
- 7) 奥野・宇野：日結，14：983，昭30.
- 8) 占部：文部省結核研究特別委員会報告書，昭23.
- 9) 吉岡：原著広島医学，7：769，昭34.
- 10) 吉岡：原著広島医学，7：1541，昭34.
- 11) 杉田：結核，32：269，昭32.
- 12) M. S. Tarshis：J. Bact., 66：448，1953.
- 13) F. C. Whitcomb et al.：Am. Rev. Tbc., 71：762，1955.
- 14) 吉岡：原著広島医学，7：2051，昭34.
- 15) 松村：原著広島医学，6：1321，昭33.

Studies on Agar Culture Media for Mycobacterium Tuberculosis VI. Modification of agar culture media by using stored whole blood. 2.

The authors have been trying to improve two kinds of agar culture medium for Myco. tuberculosis, that is, the medium for inoculation of 0.1 cc of specimen treated with 4% NaOH and that for 0.1 cc of neutralized specimen. In the course of this study, some strains of Myco. tuberculosis were found to grow more poorly and contaminations by other organisms were experienced more frequently on these media than on the egg culture medium.

For the purpose of preparing a medium which is more suitable for the growth of the Myco. tuberculosis, less frequently contaminated by other organisms, and has more simple constituents than the conventional media, the following points were investigated: 1) a favorable amount of potassium phosphate, monobasic, and sodium phosphate, dibasic which were to be added in the medium; 2) whether or not an additional magnesium sulfate, sodium citrate, asparagine or sodium glutamate etc. were requisite for the growth of Myco. tuberculosis; and 3) an appropriate amount of malachite green or penicillin to inhibit the growth of contaminants. Consequently a modified medium was prepared, having the following composition.

1) A medium for inoculation of 0.1 cc of 4% NaOH treated specimen

KH ₂ PO ₄	0.5 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.3 g
Sodium glutamate	0.3 g
Soluble starch	2.0 g
Glycerine	1.5 cc
Purified agar	2.0 g
0.1% malachite green.....	3.0 cc
(or Penicillin	100 u/cc)
Distilled water	100.0 cc

These constituents were dissolved, sterilized in an autoclave and cooled to 55°C to 60°C, to which stored whole blood was added and mixed well to make its final concentration 10%. Five cubic centimeters of the medium was dispensed into each test tube to make a slant, whose pH would be around 6.25 and become around 7.04 after the addition of 0.1 cc of 4% NaOH.

2) A medium for inoculation of 0.1 cc of neutralized specimen

The amount of KH₂PO₄ in the medium 1) was reduced from 0.5 g to 0.1 g.

That of other constituents were the same as above. pH of this medium was around 6.63.

More colonies were noted on these media than on a conventional stored whole blood agar medium, 3% and 1% Ogawa egg media.