

結核菌用寒天培地の研究

第7報 われわれの保存全血液寒天培地の吟味

小川辰次・大谷典子

北里研究所付属病院 (院長 福住定吉)

受付 昭和37年5月23日

1. 緒 論

われわれは保存全血液寒天培地につきさらに実験を重ね、新しい培地に到達した¹⁾。そこでこの新しい培地を吟味するために、従来の保存全血液混入の寒天培地、血清混入の寒天培地、鶏卵培地等と比較するとともに、この保存全血液寒天培地が、保存によつて発育に影響あるかどうかあわせ検討したので報告する。

2. 方 法

i. 培 地

A. 小川の保存全血液寒天培地

a. 4% NaOH 処理液の 0.1 cc 接種用

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
精製寒天	2.0 g
グリセリン	1.5 cc
0.1% マラカイト線液 (あるいはペニシリンを 100 単位/cc)	3.0 cc
蒸溜水	100.0 cc

以上をオートクレーフで溶解滅菌し、55~60°C に冷却して血液銀行の保存全血液を 10% の割合に加え、5 cc 宛分注して斜面に固める。この培地を保存全血液寒天培地 II (以下 B II 培地と略す) とよぶことにする。

b. 中和処理液の 0.1 cc 接種用

KH ₂ PO ₄	0.1 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
精製寒天	2.0 g

グリセリン	1.5 cc
0.1% マラカイト線液 (あるいはペニシリンを 100 単位/cc)	3.0 cc
蒸溜水	100.0 cc

前同様にして保存全血液を 10% に加えて、斜面とする。この培地を全血液寒天培地 I (以下 B I 培地と略す) とよぶことにする。

B. 比較に用いた培地

a. 4% NaOH 処理液の 0.1 cc 接種用

イ. 保存全血液混入の寒天培地

① 宇野培地^{2) 3)} …… 基礎液に KH₂PO₄ が 0.3%、グルタミン酸ソーダが 0.5% に混入されている。血液は 15% に混入。

② 杉田培地⁴⁾ …… 馬鈴薯抽出液を基礎液とし、KH₂PO₄ が 0.4% に混入されている。保存全血液は 30% に混入。

ロ. 血清混入の寒天培地

① 変法 III Kirchner 寒天培地⁵⁾ …… 基汁の KH₂PO₄ が 2.5 倍に増量されている。その他は全く Kirchner 寒天培地と同様である。

ハ. 鶏卵培地

① 3% 小川培地

② 焦性ブドウ酸混入の 3% 小川培地⁶⁾ …… 3% 小川培地の基汁に焦性ブドウ酸が 0.25% に混入されている。

b. 中和処理液の 0.1 cc 接種用

イ. 保存全血液混入の寒天培地

① Tarshis 培地⁷⁾ …… 基汁には塩類は混入されていない。血液は約 25~30% に混入。

② 杉田培地⁸⁾ …… 馬鈴薯抽出液の基汁には塩類は混入されていない。血液は 30% に混入。

③ 亀崎培地⁹⁾ …… 基汁にはグルタミン酸ナト

リウムあるいはアスパラギンが 0.5 % に混入されている。保存全血液は 15 % に混入。

ロ. 血清混入の寒天培地

① Kirchner 寒天培地 …… 基汁には種々の塩類が混入されている。血清は 10 % に混入。

ハ. 鶏卵培地

① 1 % 小川培地

② 焦性ブドウ酸を混入した 1 % 小川培地⁶⁾ …… 1 % 小川培地の基汁に焦性ブドウ酸が 0.25 % ないし 0.125 % に混入されている。

培地に使用の寒天は、いずれもわが国で市販されている同一の脱脂寒天を用いた。そして中試験管に 5 cc 宛分注して斜面に固めた。また保存全血液は血液銀行の有効期限の切れたものを使用した。これらの培地は特別のことわりのないかぎり、いずれも製作後 1 週以内に使用した。なお保存の実験には、5°C の冷蔵庫に保存したものを、直後のものと比較した。

ii. 接種の方法

接種には塗抹陽性の喀痰を用いた。そしてガフキー号数によつて数段に希釈した。すなわちまず喀痰を中試験管にとり、これにフェノールレッドを 0.004 % に混入した 4 % NaOH 液を約 10 倍量入れ、よく振盪して均等化し、この均等液を 1~2 cc 2 本の中試験管にとり、一方は 8 % HCl (容量) で中和し、他は中和に要した

と同量の 4 % の NaOH を加え、両者の量を同一とした。この部分を 10¹ 倍希釈と仮定し、4 % NaOH 処理のほうは 4 % NaOH でさらに 10 倍、100 倍等に希釈し、この部分を 10² 倍、10³ 倍希釈と仮定した。一部はこのように処理したが、これは 4 % NaOH 処理と中和処理を比較するためである。他の一部は、4 % NaOH 処理と中和処理とを別々に行なつた。そしてガフキー番号に応じて次の 3 段階のものを 0.1 cc 宛 2~3 本の培地に接種した。1~3 号 …… 10¹~10³ 倍、4~6 号 …… 10²~10⁴ 倍、7~10 号 …… 10³~10⁵ 倍。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としてねかし、寒天培地は 2 日前後、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のキャップにかえ、立てて培養した。

iii. 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、発育の悪いものは更に観察を継続して 7~8 週までみて、集落数を記録した。そして最少 10 コ、最多 200 コまでの発育した集落数をもつて、比較した例数の平均集落数を求め、さらにこれを推計学的に検定した。

3. 成 績

i. 培地性能の比較

① 第 1 回目の実験

Table 1. Comparison of Efficacy of Various Media. Experiment I.

Treat-ment	Media No. of cases examined	Stored whole blood agar media			Egg medium	Statistical analysis	
		B II medium	Uno's	Sugita's	3 % Ogawa's		
4 % NaOH	5	59.1	42.5			***	
	11	64.6		67.1		*	
	30	71.7			52.4	**	
Treat-ment	Media No. of cases examined	Stored whole blood agar media				Egg medium	Statistical analysis
		B I medium	Tarshis'	Sugita's	Kame-saki's	1 % Ogawa's	
Neutral-ized	11	103.2	77.9			***	
	6	105.7		68.1		*	
	6	105.7			82.7	*	
	37	85.4			68.5	***	

Note: Figures indicate the average number of colonies.

* No significant difference was observed.

** Difference was observed at the 1% significance level.

*** Difference was observed at the 5% significance level.

この実験では、保存全血液混入の宇野、杉田の寒天培地（以上4% NaOH 用）Tarshis、杉田、亀崎の寒天培地（以上中和用）および鶏卵培地として3% 小川培地、1% 小川培地を比較した。

成績は表1のようで4% NaOH 処理では合計46例の喀痰で実験しているが、まず平均集落数は、B II 培地では杉田培地とは差がないが、宇野培地、3% 小川培地に比して多い。これを推計学的に検定すると、宇

野培地とは5% 以下の危険率で、3% 小川培地とは1% 以下の危険率で有意の差がある。次に中和処理では合計60例の喀痰で実験しているが、平均集落数はB I 培地が、他のいずれの培地に比しても多い。これを推計学的に検定すると、杉田培地、亀崎培地とは有意の差がないが、Tarshis 培地および1% 小川培地との間には、5% 以下の危険率で有意の差がある。

② 第2回目の実験

Table 2. Comparison of Efficacy of Various Media. Experiment 2.

Treatment	Media No. of cases examined	Stored whole blood agar media		Serum agar medium	Egg media		Statistical analysis
		B II medium		modification III Kirchner's	3% Ogawa-P	3% Ogawa's	
4% NaOH	17	90.4		57.2			**
	33	71.8			63.4		***
	62	72.8				58.1	**

Treatment	Media No. of cases examined	Stored whole blood agar medium		Serum agar medium	Egg media		Statistical analysis
		B I medium	Tarshis'	Kirchner's	1% Ogawa-P	1% Ogawa's	
Neutralized	32	78.7	50.3				**
	18	78.8		56.8			*
	35	71.0			62.9		**
	68	64.8				52.8	**

Notes: 1) Figures indicate the average number of colonies.
 2) "P" in 3% Ogawa-P- and 1% Ogawa-P-media indicates pyruvic acid added in the media.
 * No significant difference was observed.
 ** Difference was observed at the 1% significance level.
 *** Difference was observed at the 5% significance level.

この実験では血清混入の寒天培地、焦性ブドウ酸を混入した鶏卵培地を主として検討したが、さらに前回実験した Tarshis の培地および1%、3% 小川培地を再検討した。成績は表2のようであつて、まず4% NaOH 処理では、合計112例の喀痰で実験しているが、変法 III Kirchner 寒天培地、3% 小川培地、焦性ブドウ酸混入の3% 小川培地のいずれの培地に比べても、B II 培地の平均集落数が多い。推計学的に検定すると、変法 III Kirchner 寒天培地、および3% 小川培地とは1% 以下の危険率で、焦性ブドウ酸混入の3% 小川培地とは、5% 以下の危険率で有意の差がある。

次に中和処理では、合計153例の喀痰で実験しているが、われわれの B I 培地は Tarshis 培地、Kirchner

寒天培地、焦性ブドウ酸混入の1% 小川培地、1% 小川培地のいずれの培地に比しても平均集落数が多い。推計学的に検定すると、Kirchner 寒天培地とは有意の差はないが、その他の培地とは1% 以下の危険率で有意の差がある。

ii. 培地保存の影響

Table 3. Effect of Storage upon Efficacy of Media

Storage Period	Media	Immediately after	2 weeks	3 weeks	5 weeks
	BII medium	32.3	37.3	30.4	31.1
	BI medium	36.1	40.0	35.7	34.6

Note: Figures indicate the average number of colonies.

6 例の喀痰を用いて、製造直後の培地を標準にして、2 週、3 週、5 週の保存の影響をみた。成績は表 3 のようであつて、集落数のうえに多少の動揺がみられるが、4 % NaOH 処理したと中和処理したとを問わず、実験した範囲の保存では著明の差はない。これを推計学的に検定しても有意の差は認めない。

4. 総括および考察

今回の実験では、われわれは喀痰を材料として、計算できる集落数をもつて比較したが、これは発育の悪い菌株の多い昨今では、喀痰中に含まれている種々の生活力の結核菌について、はつきりした集落数を出して比較したほうがよいと考えたからである。これは B II および B I 培地とも、分離培養を目的とした培地であるからということにつける。このような方法によつて比較した成績をみると、この培地は、4 % NaOH 処理用の血液混入の杉田培地を除けば、実験した種々の培地に比して平均集落数が多い。推計学的に検定すると、血液混入の杉田培地 (4 % NaOH 用、中和用) 亀崎培地 (中和用) および血清混入の Kirchner 寒天培地 (中和用) とは有意の差を認めないが、その他の培地とは有意の差を認めている。ことに 3 % 小川培地、1 % 小川培地および Tarshis の寒天培地とは、2 回の実験において、ともに有意の差を認めている。また 1 % 小川培地や 3 % 小川培地と比して集落の多く発育する焦性ブドウ酸混入の培地とも有意の差を認めている。このような成績からこの培地は他の種々の培地に比しても遜色がないように思われるし、しかも保存によつても性能の低下することはない。また培地の組成が簡単で、保存全血液の混入量も 10 % であるから分注は容易である。

しかし以上の実験成績は、塗抹陽性の喀痰によつたのであるから、この実験の成績を一般の菌株にあてはめることは妥当でない。また雑菌の侵入状態の検討などについてもまだなされていない。それで今後、塗抹陰性の喀痰、その他の可検材料で、これらの点を検討したいと思つている。なお、4 % NaOH 処理と中和処理との問題については後日にふれることにする。

5. 結 論

4 % NaOH 処理および中和処理の材料を 0.1 cc 宛

接種する目的で試作した保存全血液寒天培地の性能を知るために、塗抹陽性の喀痰をガフキー号数によつて適当に何段階かに稀釈し、さらに中和して、その中の 3 段階を接種することによつて得た 10 ~ 200 コまでの集落数により、検査した例数の平均集落数を求めるとともに、推計学的に検定することにより、従来の他の種々の培地と比較し、さらに培地保存による影響を検討し、次のような成績を得た。

1. 4 % NaOH 接種用の培地を 158 例の喀痰で検討した。まず平均集落数でみると、われわれの B II 培地は、保存全血液混入の杉田の寒天培地とは差がなかつたが、保存全血液混入の宇野の寒天培地、血清混入の小川の変法 III Kirchner 寒天培地、鶏卵を主成分にした 3 % 小川培地および焦性ブドウ酸混入の 3 % 小川培地に比較して多かつた。次に推計学的に検定すると、杉田培地を除いては、いずれも有意の差を認めた。

2. 中和接種用培地を合計 213 例の喀痰で検討した。まず平均集落数でみると、われわれの B I 培地は、他のいずれの培地に比較しても集落数が多かつた。次に推計学的に検定すると、保存全血液混入の杉田および亀崎の寒天培地、血清混入の Kirchner 寒天培地とは有意の差がなかつたが、保存全血液混入の Tarshis、宇野の寒天培地、鶏卵を主成分にした 1 % 小川培地、焦性ブドウ酸混入の 1 % 小川培地とは有意の差を認めた。

3. 6 例の喀痰によつて保存の影響を検討した結果、われわれの培地は、5 週間の氷室保存でも、その性能には影響を認めなかつた。

文 献

- 1) 小川他：結核，37：611，昭 37.
- 2) 宇野：結核，30 (増刊号)：99，昭30.
- 3) 奥野他：日本臨床結核，14：983，昭30.
- 4) 杉田：結核，32：269，昭32.
- 5) 小川他：日本細菌学雑誌，14：171，昭34.
- 6) 小川：文部省科学研究費結核研究班細菌科会において発表，昭30.
- 7) Tarshis：Am. J. clin. Patho.，21：101，1951.
- 8) 杉田：結核，31：164，昭31.
- 9) 亀崎：結核，35：99，昭35.

Studies on Agar Culture Media for Mycobacterium Tuberculosis VII. Evaluation of our stored whole blood agar media

In order to see the effectiveness of our stored whole blood agar media which were prepared

for the inoculation of 0.1 cc. of specimens either treated with 4 % NaOH or neutralized, the authors made the following experiments.

Several serial ten-fold dilutions of the sputa were made according to their Gaffky scale,

and then neutralized. Three dilutions of these were inoculated on the culture media to obtain 10 to 200 colonies by which the average number of colonies of the tested cases was calculated. By the average number of colonies and the statistical analysis, the efficacy of the stored whole blood agar media was evaluated and compared with various conventional media. Furthermore, the effect of the storage of the media upon their efficacy was investigated. And the following results were obtained.

1. The medium for the inoculation of 4% NaOH treated specimen was examined with sputa from 158 cases. In regard to the average number of colonies, there was no difference in efficacy between our BII medium and Sugita's stored whole whole blood agar medium, but more colonies were noted on ours than Uno's stored whole blood agar medium, our modification III Kirchner's agar medium containing serum, 3% Ogawa's egg medium, and 3%

Ogawa's egg medium containing pyruvic acid. Secondly, However, statistically there was no significant difference between ours and others with the exception of Sugita's medium.

2. The medium for the neutralized specimens was tested with sputa from 213 cases. As to the average number of colonies, our BI medium showed more colonies than any other media. By the statistical analysis, there was no significant difference among ours, Sugita's and Kamesaki's agar media containing stored whole blood, and Kirchner's agar medium containing serum, while a significant difference was seen between ours and other media, such as, Tarshis' and Uno's agar media containing stored whole blood, 1% Ogawa's egg medium and 1% Ogawa's egg medium containing pyruvic acid.

3. The effect of the storage upon the efficacy of our media was tested with sputa from 6 cases. Their efficacy was unaltered after 5 weeks' storage in a refrigerator.