

3% 小川培地を用いての結核菌の分離培養時に おける雑菌の侵入について

第2報 侵入した雑菌の種類

小川 辰次・宮城 小枝子・立花 嘉子

北里研究所附属病院 (院長 福住定吉)

受付 昭和 37 年 3 月 27 日

I 諸 論

第1報¹⁾では雑菌の侵入率について報告したが、本文は第2報として昭和35年度の結核菌の分離培養にあたって侵入した雑菌763株の種類について報告する。

II 方 法

① 対象：昭和35年度に17,520本の3%小川培地を用いて結核菌の分離培養を行なったさいに侵入した結核菌以外の抗酸性雑菌およびその他の雑菌763株である。

② 同定の方法：まず集落の性状によつて雑菌らしいものは、普通染色によりその形態をみ、形態学的に細菌らしいものは5~7%血液平板培地に塗布培養し、一部を載せガラスに塗抹した。培養したものは37°Cの孵卵器に保存し、24~48時間、発育の遅いものは72時間まで培養を続け観察した。そして発育した集落の形態、大きさ、色、透明度、光沢、湿潤の程度、集落の周辺の正、不正、溶血の有無、およびその他の性状を詳細にみた。塗抹した載せガラスはグラム染色を施し、グラム陽性、あるいは陰性であるかを確かめるとともに、菌の形態、大きさ等をみた。以上の血液平板培養と、グラム染色の成績を総合して細菌の種類を同定を行なった。なお大腸菌らしいものはEMB培地に培養して蛍光またはエオジンの色素有無をみ、変形菌らしいものは尿素培地を用いてその分解を確かめた。また肺炎双球菌らしいものについては莢膜染色を実施し、莢膜の存在を確かめた。次に普通染色により酵母様細胞を認めたものはサブロー培地、サブローブイオン培地に培養して同定し、はつきり肉眼でカビと分かつたものは全部カビ群の中に入れた。結核菌あるいは非病原性抗酸性菌らしいもの

は、チールネールゼン染色により抗酸性の有無を確かめ、抗酸性のものはナイアシントストを実施し、陰性のものは非病原性抗酸性菌の中に入れた。

III 成 績

① 可検材料別にみた雑菌の種類

喀痰445株、胃液117株、喉頭粘液168株、その他33株の雑菌を同定した結果は表1のようであつて、これを15種の菌種に分けることができた。まず喀痰で多いのは α -連鎖球菌、緑膿菌、 γ -連鎖球菌、コリネバクテリア等であり、次に胃液で多いのは α -連鎖球菌、緑膿菌、 γ -連鎖球菌、コリネバクテリア等である。また喉頭粘液で多いのは α -連鎖球菌、コリネバクテリア、カビ、緑膿菌等である。以上の成績からみると、喀痰、胃液、喉頭粘液では、雑菌の種類およびその%はほぼ同じような傾向をみる事ができるが、胃液に非病原性抗酸性菌が少ないことや、喉頭粘液にカビの多いことが目だつた。なおその他の材料ではコリネバクテリア、緑膿菌、非病原性抗酸性菌が多い。

② 四季別にみた雑菌の種類

1カ年を3カ月ごとに区切つて四季に分け、季節のうつりかわりによつて、雑菌の種類がどのように変わつていくのかを検討した成績が表2である。この成績をみると、とくに7~9月の時季に多いのは緑膿菌、大腸菌群、カビ群であつて、1~3月の寒い時季に多かつたのはコリネバクテリアである。その他の菌株では四季による著明の差を認めることはできなかつた。次に35年度の雑菌の種類を平均して、数の多いものから並べてみると、 α -連鎖球菌、コリネバクテリア、緑膿菌、 γ -連鎖球菌、カビ群、非病原性抗酸性菌、大腸菌群、枯草菌、非溶血性白色ブドウ球菌、変形菌、 β -連鎖球菌、溶血性

Tatsuji OGAWA, Saeko MIYAGI and Yoshiko TACHIBANA (Kitasato Institute Hospital, Shiba Shirogane Sanko-cho, Minato-ku, Tokyo, Japan): The Contamination at the Time of the Selective Cultures of Mycobacterium Tuberculosis from Contaminated Materials on 3 Percent Ogawa Egg Media. II—Kekkaku, 37 (6): 274~277, 1962.

Table 1. Varieties of Contaminants in Various Sources of Specimens

Material No. of media used No. of media with contamination (%)	Sputum	Gastric contents	Laryngeal swab	Others
	Species (contaminants)	5,640	1,792	9,626
	445 (7.9)	117 (6.0)	168 (1.7)	33 (7.1)
Hemolytic staphylococcus aureus	1 (0.2)	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)
Hemolytic staphylococcus albus	6 (1.3)	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)
Non-hemolytic staphylococcus albus	11 (2.5)	2 (1.7)	2 (1.2)	1 (3.0)
β -streptococcus	4 (0.9)	3 (2.6)	1 (0.6)	0 (0)
α -streptococcus	223 (50.1)	48 (41.0)	38 (22.7)	3 (9.1)
γ -streptococcus	36 (8.1)	18 (15.4)	13 (7.7)	0 (0)
Diplococcus pneumoniae	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)
Corynebacterium	34 (7.6)	12 (10.2)	29 (17.3)	12 (36.3)
Bacillus subtilis	12 (2.7)	5 (4.3)	13 (7.7)	1 (3.0)
Proteus	6 (1.3)	1 (0.8)	3 (1.8)	3 (9.1)
Bacillus pyocyaneus	42 (9.4)	20 (17.1)	18 (10.7)	5 (15.2)
Escherichia coli	20 (4.5)	2 (1.7)	13 (7.7)	2 (6.0)
Non-pathogenic acid fast bacilli	27 (6.7)	1 (0.8)	10 (5.9)	4 (12.1)
Candida	1 (0.2)	0 (0)	1 (0.6)	0 (0)
Other fungi	22 (4.9)	5 (4.3)	24 (14.3)	2 (6.0)

Note: 1) Figures in the Column of contaminants indicate the number of the strain and those in parentheses indicate its percentage to the total number of contaminants.

2) Contamination rates represent percentage of media with contamination to the total number of media used.

白色ブドウ球菌, カンジダ, 溶血性黄色ブドウ球菌の順であつて, α -連鎖球菌から大腸菌まででその大部分を占めている。

③ 培地の腐蝕と雑菌の種類

763本の雑菌侵入のあつた培地の中で腐蝕したものは126本であつて, これは雑菌侵入培地数の16.5%であり, 使用培地数の0.7%に当たるが, 培地を腐蝕した雑菌の種類をみると, 表3でみるように7つの菌株である。もつとも腐蝕率の多かつたのは緑膿菌の99.4%であつて, 次に枯草菌の54.8%, 変形菌の46.1%, 大腸菌の43.2%等であつて, 溶血性黄色ブドウ球菌, 非溶血性ブドウ球菌, カビ等では1株だけ腐蝕されている。

IV 総括および考察

可検材料を前処理して結核菌の分離培養を行なつたときに侵入した雑菌の種類を系統的に検査した成績はあま

りない。われわれの同定した雑菌を, 外からまぎれこんだのではないかと思われるものと, 呼吸器系あるいは口腔内に常在する菌とに大別することができるがこのほかに口腔内にも外界にも存在する菌がある。外からと考えられるものは, 枯草菌, カビ群, 非病原性の抗酸性菌等であつて, これを合計すると16.5%となる。口腔内にも外界にも存在する菌と考えられるものとして変形菌, 緑膿菌, 大腸菌群, ブドウ球菌で, これを合計すると20.9%である。これらを除いたものは全部, 呼吸器系あるいは口腔内に常在する菌であつて62.6%となる。次に雑菌の中でもつとも多いのは α -連鎖球菌であつて, 次に多いものはコリネバクテリア, 緑膿菌, γ -連鎖球菌, カビ群, 非病原性抗酸性菌, 大腸菌群, 枯草菌等であつて, その他のものはずつと少ない。この成績は, 化学療法以前のものに比して変わつていられるが, 比較すべき成績がないのは残念である。なお可検材料別にみると, 喀痰, 胃液, 喉頭粘液はほぼ同じよ

Table 2. Varieties of Contaminants in Each Season

Season	Jan. ~ March	April ~ June	July ~ Sept.	Oct. ~ Dec.	Total
	No. of media used	4,330	4,594	4,141	4,455
No. of media with contamination (%)	161 (2.8)	182 (2.5)	163 (3.9)	257 (5.8)	763 (4.3)
Species (contaminants)					
Hemolytic staphylococcus aureus	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	1 (0.4)	2 (0.3)
Hemolytic staphylococcus albus	5 (3.1)	1 (0.5)	1 (0.6)	0 (0)	7 (0.9)
Non-hemolytic staphylococcus albus	5 (3.1)	5 (2.7)	2 (1.2)	4 (1.6)	16 (2.1)
β -streptococcus	2 (1.2)	3 (1.6)	1 (0.6)	2 (0.8)	8 (1.0)
α -streptococcus	51 (31.6)	95 (52.1)	46 (28.3)	120 (46.7)	312 (41.0)
γ -streptococcus	7 (4.3)	16 (8.8)	17 (10.4)	27 (10.5)	67 (8.8)
Diplococcus pneumoniae	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.4)	1 (0.1)
Corynebacterium	33 (20.5)	12 (6.6)	10 (6.1)	32 (12.4)	87 (11.4)
Bacillus subtilis	7 (4.3)	7 (3.8)	9 (5.5)	8 (3.1)	31 (4.1)
Proteus	6 (3.7)	3 (1.6)	1 (0.6)	3 (1.2)	13 (1.7)
Bacillus pyocyaneus	13 (8.1)	12 (6.6)	32 (19.7)	28 (10.8)	85 (11.2)
Escherichia coli	7 (4.3)	5 (2.7)	20 (12.3)	5 (1.9)	37 (4.8)
Non-pathogenic acid fast bacilli	12 (7.4)	13 (7.1)	7 (4.3)	10 (3.9)	42 (5.5)
Candida	1 (0.6)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)	2 (0.3)
Other fungi	12 (7.4)	8 (4.4)	17 (10.4)	16 (6.2)	53 (6.9)

Note: Figures in the column of contaminants indicate the number of the strain and figures in parentheses percentage to the total number of contaminants during a particular season.

Table 3. Liquefaction of the Medium and Varieties of Contaminants in 1960

Contaminants which liquefied medium	No. of media with contamination	No. of media liquefied
Hemolytic staphylococcus aureus	7	1 (14.2)
Non-hemolytic staphylococcus albus	16	1 (6.2)
Bacillus subtilis	31	17 (54.8)
Bacillus pyocyaneus	85	84 (99.4)
Proteus	13	6 (46.1)
Escherichia coli	37	16 (43.2)
Other fungi	53	1 (1.9)

うな雑菌の種類でその率もほぼ同じようであるが、胃液、喉頭粘液といつても本来の姿は略痰であつてみれば当然であるかもしれない。これらの成績は、D. Gale ら²¹のものと同様な点では差はないが、細かい点になると多少差がある。しかし技術的に異なるのでこれを比較する

ことは無理かもしれない。なお喉頭粘液においては外からと思われる枯草菌や変形菌が足尾町の集団検診²¹に比較すると少ない。この事実は、足尾町の喉頭粘液の検査は8月中に実施されたこと、採取が屋外でなされたことがあつたこと、多くの人の集まっている所で実施されたこと、一たん採取した喉頭粘液を東京に運搬するのに1~2日を要したことなどのためであろう。

次に雑菌の種類を四季別にみると、暑い7~9月中にとくに多くなっているのは緑膿菌、大腸菌であつて、その他の期間には雑菌の種類は差はみられない。このことは、第1報における雑菌の侵入率が季節によつて著明の差のないことから当然であろう。

次に培地を腐蝕する雑菌をみると、もつとも多いのは緑膿菌であつて、そのほとんど全部が、また枯草菌、変形菌、大腸菌がその半分を腐蝕しているが、その他のものは少ない。培地を腐蝕する雑菌が侵入することは分離培養が失敗したことを意味するが、われわれの方法ではその侵入率が0.71%であるからけつして多くはない。しかし分離培養を進歩させるには、これら雑菌の侵入

を阻止することが必要であるが、これらのことについてはさらに研究を進めたいと思つている。

V 結 論

昭和 35 年度に 17,520 本の 3% 小川培地を使用して、種々の材料からの結核菌の分離培養にあつて侵入した雑菌 763 株を同定して、次のような成績を得た。

1) 喀痰、胃液、喉頭粘液の 3 つの可検材料についてみると、雑菌の種類傾向はほとんど同じであつて、多いのは α -連鎖球菌、緑膿菌、コリネバクテリア等である。なお非病原性抗酸性菌が、喀痰、喉頭粘液ではそれぞれ 6.7%、5.9% を示しているのに、胃液では 0.8% にすぎなかつた。

2) 年間を平均してみるともつとも多いのは α -連鎖球菌であつて 40.8%、次にコリネバクテリア 11.4%、緑膿菌 11.2%、 γ -連鎖球菌の 8.8%、カビ群 6.9%、非病原性抗酸性菌 5.5%、大腸菌群 4.8%、枯草菌

4.1% の順であつて、少数にはブドウ球菌群、 β -連鎖球菌、変形菌、肺炎双球菌、カンジダ等がみられた。これを四季別にみると夏には緑膿菌、大腸菌群、カビ群が多少多く、冬にはコリネバクテリアが多少多い程度であつて、その他の菌株でははつきりした傾向は認められない。

3) 培地を腐蝕させる菌は緑膿菌、枯草菌、変形菌、大腸菌群等が主であつて、緑膿菌はそのほとんど全部を、枯草菌、変形菌、大腸菌群はその半分を腐蝕させた。また溶血性ブドウ球菌、非溶血性ブドウ球菌、カビ群もわずかであるが培地を腐蝕した。

文 献

- 1) 小川他：結核，37：248，昭37.
- 2) D. Gale et al.: Am. Rev. Resp. Dis., 80：95，1959.
- 3) 小川他：結核，35：835，昭35.

The Contamination at the Time of The Selective Cultures of Mycobacterium Tuberculosis from Contaminated Materials on 3 Percent Ogawa Egg Media.

During the year of 1960, 17,520 Ogawa egg culture media were used for the selective cultures of Mycobacterium tuberculosis from various sources of specimens. And contaminants, 763 strains, were identified and 15 species obtained. In order of frequency, α -streptococcus 40.8%, corynebacterium 11.4%, Bacillus pyocyaneus 11.2%, γ -streptococcus 8.8%, fungi 6.9%, non-pathogenic acid fast bacilli 5.5%, Escherichia coli 4.8%, and Bacillus subtilis 4.1% were the main contaminants. The remainder consisted of staphylococcus, β -streptococcus, proteus, Diplococcus pneumoniae, candida, etc. As to the contamination in particular seasons, B. pyocyaneus, E. coli and the other fungi were the common contaminants in summer, and con-

tamination by corynebacterium was somewhat more frequent in winter than in other seasons. No significant seasonal differences were present in other species. Regarding the sources of specimens such as sputum, gastric contents, and laryngeal swab, infrequent detection of non-pathogenic acid fast bacilli in gastric contents and frequent finding of fungi in the laryngeal swab attracted some attention, but there was no great difference in frequency of other species in various sources of specimens.

Micro-organisms which liquefied the medium were chiefly B. pyocyaneus, B. subtilis, proteus, and E. coli. B. pyocyaneus liquefied almost the entire medium and B. subtilis and proteus liquefied about half of the medium. Hemolytic staphylococcus, non-hemolytic staphylococcus and fungi liquefied only a small portion of the medium.