

渦巻白金耳接種による結核菌培養法

— 培 地 の 検 討 —

東 村 道 雄

国立療養所大府荘 (荘長 勝沼六郎博士)

受 付 昭 和 37 年 3 月 30 日

略痰中結核菌の培養は、略痰を酸またはアルカリで処理したのち、遠心して集菌する方法が従来広く行なわれていたし、現在でもわが国以外の諸国ではこの方法が使用されている。この遠心処理を省略してアルカリ処理した略痰を直接卵培地に接種する方法——現在わが国で広く採用されている方法——は小川^{1)~3)}に負うものである。この遠心操作の省略によつて操作が簡易化された結果、わが国の結核菌培養件数が著しく増加したことは否めない事実であろう。また最近、遠心中和を行なう方法と比較して菌検出率に遜色がないことも証明されるにいたつた。⁴⁾

以上のごとく、小川の方法は結核菌検査法の進歩に一時期を画したものであるが、あらゆる技術に共通する性質として、さらに改良の余地があると思われるし、またこれをなすことが後進学徒の務めであろう。

第 1 は接種操作の問題で、ピペットで 0.1 ml を接種する場合は、接種した略痰液が流れるためにただちに試験管を立てることができない。少なくとも一夜放置して培地面を乾かしたのちにゴム栓に変えてフラン器に入れなければならない。この操作はやや繁雑である。

第 2 は生菌数算定の過少評価の問題で、われわれが提唱した渦巻白金耳⁵⁾⁶⁾による 0.02 ml 接種の 5 倍量を接種するにもかかわらず、得られる集落数はほぼ同数 (小川原法) かまたはわずかにこれより多い程度 (略痰を同処理で比較) にすぎない点である⁷⁾⁸⁾。この事実は、0.1 ml ピペット接種では生菌数 (集落数) 算定の過少評価が起こることを示している。これはおそらく接種量がやや過大なために培地上で菌の凝集が起こつたり、管壁への吸着が起こつたりするためであろうと思われる。

小川法の改良法としてのわれわれの渦巻白金耳接種法^{5)~8)}

(1) 操作の簡易化

改良の第 1 は接種を渦巻白金耳接種としたことであ

る。渦巻白金耳は 1 塗抹で 0.02 ml (~ 0.025 ml) を接種する大きさとした。接種量を少なくして、しかもこれを渦巻白金耳で培地面に塗抹するため、接種菌液は大概卵培地面に吸着されてただちにゴム栓をしてフラン器に立位で納めることが可能である。したがつて、従来のごとく、一夜放置したのちにゴム栓に変えるという操作を省略することができる。

(2) 生菌数算定の正確性

すでに指摘したごとく、ピペットによる 0.1 ml 接種法の最大欠点は生菌数算定の過少判定にある。渦巻白金耳接種法はこの生菌数算定の面で優れている。この原因は比較的少量の菌液を培地面に塗抹するために菌の分布が均一となり凝集が起こりにくくなるためと思われる。

また正確な算定を行なうためには、集落融合の機会を可及的少なくするように培地面をできるだけ広くする必要があるのである。このためには中試験管 (17~18 × 170 mm) に 5~6 ml にの分注量では不十分で、8 ml の分注量が必要である。⁵⁾

(3) 培地の統一

ピペットで 0.1 ml を接種する方法では通常 3% 小川培地が使用されるが、3% 小川培地は pH が酸性に傾いているので Kanamycin の作用が弱い欠点がある。そこですべての検査を共通の培地で行なう意味で 1% 小川培地を採用した⁹⁾¹⁰⁾。渦巻白金耳接種では接種菌量が少ないので 3% 小川培地を必要とせず、むしろ 1% 小川培地のほうが好都合である。

(4) 結核菌検出率と発育量

いかに操作が簡易化されても菌検出率が劣るようでは本来の目的が失われる。しかし、渦巻白金耳接種法はピペット接種法に比較して菌検出率に差がないことが証明された⁷⁾⁸⁾。また常用される「8% NaOH 処理、3% 小川培地、ピペット (0.1 ml) 接種法」と「5% KOH 処理、1% 小川培地、渦巻白金耳接種法」とでは、菌

検出率、発育量ともに差がないことが証明された。⁸⁾

培地の再検討

上述のごとく、渦巻白金耳接種法は菌検出率において従来の方法と差がなく、しかも操作の簡易性と生菌数算定の正確さの点で従来の方法に勝るものと考えられる。この方法では接種菌量が少ないために培地を必ずしも1%小川培地に限る必要がないと思われる。そこで、小川培地以前にわが国で広く使用された岡・片倉培地¹¹⁾および欧米で広く使用されている Löwenstein-Jensen 培地¹²⁾¹³⁾を渦巻白金耳法に適用して1%小川培地と比較してみることにした。ただし、Löwenstein-Jensen 培地はやや複雑なため、その特質を硫酸マグネシウム、クエン酸ソーダおよび可溶性澱粉の添加にあると考えて、変法培地2種を試作して用いた。

実験材料および方法

喀痰材料 国立療養所大府荘入院中の患者277名の喀痰を検査材料とした。(300例を用いたが、23例ではいずれかの培地に多少とも雑菌の混入があつたので比較の対照から除外した。)

培地 (1)1%小川培地, (2)岡・片倉培地, (3)Löwenstein 変法培地, (4)Löwenstein 変法培地 G, の4種で構成は表1に示した。いずれも中試験管に8ml分注し、90°C60分滅菌(1回)して用いた。Löwenstein 変法培地は著者の変法である。同培地Gは、可溶性澱粉の代りにグルコースを用いたが、後述のごとく成績は前者より悪かつた。

Table 1. Composition of Media Tested

1 % Ogawa medium	Oka-Katakura Medium	Modified Löwenstein Medium	Modified Löwenstein medium G
KH ₂ PO ₄ , 1.0 g	KH ₂ PO ₄ , 0.5 g	KH ₂ PO ₄ , 1.0 g	KH ₂ PO ₄ , 1.0 g
Na-glutamate, 1.0 g	Na ₂ HPO ₄ , 0.5 g	Na-glutamate, 1.0 g	Na-glutamate, 1.0 g
Aq. dest., 100 ml	Na-glutamate, 1.0 g	MgSO ₄ , 0.1 g	MgSO ₄ , 0.1 g
Whole eggs, 200 ml	Aq. dest., 100 ml	Na-citrate, 0.1 g	Na-citrate, 0.1 g
Glycerol, 6 ml	Whole eggs, 200 ml	Soluble starch, 3.0 g	Glucose, 3.0 g
2 % M.G. 6 ml	Glycerol, 6 ml	Aq. dest., 100 ml	Aq. dest., 100 ml
	2 % M.G. 6 ml	Whole eggs, 200 ml	Whole eggs, 200 ml
		Glycerol, 6 ml	Glycerol, 6 ml
		2 % M.G. 6 ml	2 % M.G. 6 ml

M.G. = Malachite green solution.

All media were poured in 8 ml amounts into tubes, 17~18x170 mm, and slanted by sterilization at 90°C for 60 minutes.

喀痰の処理および接種 喀痰滅菌スピッツにとり、等量の5% KOHを加えて20分間パンピングしたのち、渦巻白金耳で0.02 mlずつ上記4種の培地(1本ずつ)に接種した。したがって、同一材料を同量、4培地のおおのに接種したわけである。接種後、ただちにゴム栓を施して37°Cに培養し、4週後と8週後に発育を検し、集落数を数えた。

実験結果

1. 結核菌陽性率

結核菌陽性率は表2のとおりで8週後に判定すると4培地とも大差はないが、4週後に判定するとLöwenstein 変法培地がやや優れた傾向を示した。しかし、その差は統計的有意差を示すにはいたらなかつた。

しかし、Löwenstein 変法培地で菌検出率がやや高かつたことは、次に示すように発育量の点で、この培地が他の培地よりはるかに優れていたことと関係があるように思われる。すなわち Löwenstein 変法培地の発育がよいために判定期間を早くすると検出率がやや高くなる

Table 2. Comparison of Positive Rate of Tubercle Bacilli #

Incubation period	Medium	Rate of positive sputum (No. of positive cases/total test cases)
4 weeks	1 % Ogawa med.	49/277=17.7% *
	Oka-Katakura med.	50/277=18.0%
	Modif. Löwenstein	63/277=22.7% *
	Modif. Löwenstein G	55/277=19.8%
8 weeks	1 % Ogawa med.	88/277=31.8%
	Oka-Katakura med.	85/277=30.7%
	Modif. Löwenstein	90/277=32.5%
	Modif. Löwenstein G	85/277=30.7%

* $\chi^2=1.86, 10\% < P < 25\%$. No significant difference at 10% level.

Four media each were inoculated with the same amount (0.02 ml) of the same sputum specimen.

傾向を示したものと思われる。

2. 結核菌発育量および集落数の比較

同一喀痰接種例で、結核菌の発育量ないし集落数に培

地間の差がある例をとって比較すると表3の結果となる。

Table 3. Comparison of Growth Amount or Colony Number among Four Media #

Incubation period	Comparison between 1% Ogawa medium and modified Löwenstein medium *	
4 weeks	More abundant growth in 1% Ogawa med. 1/31	} $\chi_0^2=50.6$ P << 0.1%
	More abundant growth in mod. Löwenstein 30/31	
8 weeks	More abundant growth in 1% Ogawa med. 13/51	} $\chi_0^2=23.4$ P < 0.1%
	More abundant growth in mod. Löwenstein 38/51	
Incubation period	Comparison between 1% Ogawa medium and modified Löwenstein medium G **	
4 weeks	More abundant growth in 1% Ogawa med. 5/21	} $\chi_0^2=9.52$ P < 0.5%
	More abundant growth in mod. Löwenstein G 16/21	
8 weeks	More abundant growth in 1% Ogawa med. 20/50	} $\chi_0^2=3.24$ 5% < P < 10%
	More abundant growth in mod. Löwenstein G 30/50	
Incubation period	Comparison between 1% Ogawa medium and Oka-Katakura medium ***	
4 weeks	More abundant growth in 1% Ogawa med. 9/22	} $\chi_0^2=0.82$ 25% < P < 50%
	More abundant growth in Oka-Katakura 13/22	
8 weeks	More abundant growth in 1% Ogawa med. 29/43	} $\chi_0^2=9.20$ P < 0.5%
	More abundant growth in Oka-Katakura 14/43	

These comparisons were made in the cases where cultures in different media from the same specimen showed different amounts of growth.

* A much more abundant growth in modified Löwenstein medium. This was more significant after 4 weeks of incubation.

** A significantly more abundant growth in modified Löwenstein medium G only after 4 weeks of incubation period.

*** No significant difference after 4 weeks of incubation. A significantly more abundant growth in 1% Ogawa medium after 8 weeks of incubation.

(1) Löwenstein 変法培地と1%小川培地の比較
検出率では両者の差は有意差に達しなかつたが、発育量ではLöwenstein 変法培地のほうがよい結果を示した。とくに4週判定の差は著しい。8週後には両者の差は短縮されるが、しかもなおかなり著明な差がある。

(2) Löwenstein 変法培地 G と1%小川培地の比較

Löwenstein 変法培地 G の成績は前のLöwenstein 変法培地に劣る。しかし4週後の発育量は1%小川培地より勝っている。8週後には両者の間に差はない。

(3) 岡・片倉培地と1%小川培地の比較
4週では両者の差はない。8週後には1%小川培地のほうが発育量が多い例が多い。

3. 雑菌混入率

雑菌が4種の中のどれか1つ以上に入つた例は300

例中の23例で、この23例は上述の比較から除外した。雑菌混入の起こつたのは、1%小川培地18、岡・片倉培地20、Löwenstein 変法培地23、Löwenstein 変法培地 G 18であつて、Löwenstein 変法培地にやや多い感じがあるが差はつきりしない。大部分は培地の一部を占める軽度の雑菌発生で、結核菌の判定不能程度の雑菌混入があつたのは2例、4培地ともに雑菌が入つたのが4例であつた。

考 察

以上の成績を通覧して、検出率の点でやや勝る傾向を示し、発育量の点で明らかに優れた成績を示したのはLöwenstein 変法培地であつた。この培地が1%小川培地と異なる点は、硫酸マグネシウム、クエン酸ソーダ、可溶性澱粉の添加である。可溶性澱粉が意義があることは、これをブドウ糖に変えた変法培地 G の成績が

劣ることから十分推定される。しかし、硫酸マグネシウムおよびクエン酸ソーダの添加も変法培地 G が他の培地よりなお若干勝る点から考えて、無意義ではないと思われる。Löwenstein 変法培地がとくに発育量ないし集落数の点で 1% 小川培地に勝る点は注目し値する。この程度の変法は 1% 小川培地作製に比してとくに面倒でもないので実用に供しうると思われる。

なお本研究の前にも小川培地の改良が多く試みられているが、臨床的統計に基づいた有意差を得るにいたっていないので、引用を省略させていただいた。

総 括

略痰に等量の 5% KOH (8% NaOH でも可) を加えて 20 分間前処理し、渦巻白金耳で卵培地に接種する方法が、操作の簡易さと生菌数算定の正確さの点で、ピペット接種法に勝り、しかも菌検出率の点で遜色がないことを前に報告したが、今回はこの渦巻白金耳接種と組み合わせる培地の検討を行なった。

1% 小川培地、岡・片倉培地、2 種の Löwenstein 変法培地 (著者変法) の 4 種の培地の中で、次の組成の Löwenstein 変法培地がもつとも優れていると考えられた。

原液 (1% KH_2PO_4 , 1% グルタミン酸ソーダ, 0.1% MgSO_4 , 0.1% クエン酸ソーダ, 3% 可溶性澱粉) 100 ml, 全卵 200 ml, グリセリン 6 ml, 2% マラヒット緑液 6 ml, 90 (~95)°C, 60 分 滅菌 1 回で使

用。

国立療養所大府荘検査室河西栄文、鬼頭義弘両氏の御協力を謝す。

文 献

- 1) 小川辰次・佐波薫：結核, 24 (No. 2) : 13, 昭24.
- 2) 小川辰次：結核, 24 (No. 2) : 19, 昭24.
- 3) 小川辰次・佐波薫・鈴木つき：結核, 25 : 207, 昭25.
- 4) 林治・小山憲次郎・森脇文子・大竹昭：日細, 16 : 949, 昭36.
- 5) 東村道雄・野田用：結核, 32 : 639, 昭32.
- 6) 東村道雄・野田用・中村栄一：結核, 33 : 43, 昭33.
- 7) 東村道雄：結核, 53 : 397, 昭35.
- 8) 東村道雄・河西栄文：結核, 36 : 38, 昭36.
- 9) 東村道雄：医学と生物学, 49 : 87, 昭33.
- 10) 東村道雄・安保孝・勝沼六郎：結核, 34 : 625, 昭34.
- 11) 岡捨己：日結, 1 : 829, 昭15.
- 12) Löwenstein, E. : Deutsch. Med. Woch., 56 : 1010, 1930.
- 13) Jensen, K. A. : Ztschr. f. Bakt. Abt. I., 125 : 222, 1932.

Cultivation of Tubercle Bacilli on Egg Media by Use of Spiral Loop Inoculation. Comparison of media.

For the isolation of tubercle bacilli from pathological specimens, methods of cultivation of tubercle bacilli on egg media are widely used, to which the residues obtained after centrifugation of acid- or alkali-treated specimens, with or without neutralization, were inoculated. Ogawa (Kekkaku, 24 (No. 2) : 13, 1949) proposed in 1949 a method to utilize 0.1 ml samples of a sputum fluid obtained after addition of one volume of 8% NaOH for inoculation. For this purpose, he proposed an egg medium containing a high concentration of KH_2PO_4 , which was named 3% Ogawa medium (this is a medium containing 3% KH_2PO_4 in its basal solution instead of 1% KH_2PO_4 in 1% Ogawa medium (Table 1)). His method proved to be as reliable

as the classical methods using centrifugation.

The author (Kekkaku, 35 : 397, 1960; 36 : 38, 1961) found that inoculation of 0.1 ml samples with a pipette is not reliable for counting viable numbers and gives much less numbers than actual ones. In order to avoid this default and to improve a complicated procedure allowing to stand tubes inoculated in an incubator for evaporation of inoculated material, the author proposed to use a spiral loop delivering 0.02 to 0.025 ml for inoculation. By this method of inoculation, the procedure of allowing to stand tubes before stoppering could be omitted and the tubes inoculated could be set up immediately into an incubator. In addition, more accurate data could be obtained for counting viable cell numbers probably derived from a homogeneous distribution of inoculated specimen within a slant. Rate of positive sputum

and growth amount of bacilli by this inoculation method using a 0.02 ml sample, unexpectedly, were almost similar to those by the Ogawa's original method.

Since the use of spiral loop inoculation made it unnecessary to use such a medium as proposed by Ogawa, in which an alkalified specimen is neutralized by an excess of KH_2PO_4 , several egg media were tested for combined use with spiral loop inoculation.

The media tested were four media shown in Table 1. Sterilization was made at 90 °C for 60 minutes (one day). Each sputum specimen of 277 patients (cases contaminated in any medium had been omitted from comparison) was added with one volume of 5 per cent potassium hydroxide and homogenized by pumping by a pipette for 20 minutes. Aliquots of the homogenized sputum immediately (without centrifugation) were inoculated to each of four media with a

spiral loop delivering 0.02 ml. The tubes inoculated were stoppered immediately and incubated at 37 °C. Count was made after 4 and 8 weeks.

The results are shown in Tables 2 and 3.

(1) *Rate of positive sputum.* The modified Löwenstein medium tended to give the highest rate of positive sputum, although the difference remained insignificant. The data were similar to each other after 8 week-incubation period.

(2) *Amount of growth and number of colonies.* The modified Löwenstein medium showed the most abundant growth. The difference from other media was highly significant.

In summary: Use of the modified Löwenstein medium in combination with a spiral loop inoculation of alkalified specimens (without centrifugation) is thought to be the best and simplest.