

## 結核培地としての半流動寒天培地に関する研究

## 第4報 とくに回転処理法を中心として

大川 日出夫

国立神奈川療養所

受付 昭和37年12月25日

## 緒 言

結核菌の培養方法は現在小川培地の使用により、NaOH水前処理病材の注入培養法が用いられ操作は簡易化されている。しかし菌発育のためのpHに関しては、分離培養においても耐性測定にさいしても十分な配慮を必要とする。したがって同系の培地でも直接法および間接法のために2種の耐性培地を用意するか、あるいは前処理後中和して接種するなどの方法を使い分けて用いているのが現状である。すなわち培地か前処理法かのどちらかで調整をしなければならない。それゆえ前処理に使用する薬剤の濃度を低下することができれば、培地pHおよび磷酸塩濃度などについての培地組成への制約は軽減され、統一万能培地の出現を容易にする。そしてこの統一培地の完成は当面の重要課題といえるであろう。

まず十分な攪拌、混和を行なうことにより前処理薬剤の濃度を下げることができると考え、モーターの回転を利用した回転処理法を考案した。回転処理法を採用して前処理に1% NaOH水あるいは2% NaOH水を使用することが可能となれば、1%小川培地を分離培養および耐性測定の直接、間接両法に用いる。この場合には1%小川培地が統一培地となるわけである。

さらに1%小川培地に比較して、より集落初発が早く、耐性検査にあつては加熱の影響、卵蛋白への吸着による影響がない半流動寒天培地<sup>1)~5)</sup>を回転処理法と組み合わせて使用すると、これはよりよい統一培地となるであろう。

そこで1% NaOH水および2% NaOH水を用いる回転処理法の実用性について実験し、この回転処理を行なつた喀痰を接種することができ、耐性検査間接法にも使用できる半流動寒天培地の最適のpH、最適の分注量について検討した。

## 実験方法ならびに成績

回転処理法に使用した回転器は図1に示す。

高さ約30cmの4脚の水平台の上に1/20馬力のモーターを固定して、モーターのプリー側面に直角に回転器のプリーを接触させた。その位置を上下することにより所要の回転数が得られる。回転器の軸の下端は滅菌割箸がパネで支えられ、中試験管に喀痰をとり、前処理液を加えた中にこの割箸を挿入し、モーターを始動すると割箸は所要の回転数で回転し、混和、攪拌し、均等な処理喀痰が得られるのである。

なお回転中材料の飛散については、色素(フクシン)を混入して試した範囲では試験管口から周囲への汚染は認められなかつた。しかし適当なフードを考案してかぶせることが好ましいであろう。このことによつて従来のピペットによる混和法よりも、さらに安全な操法となり得よう。

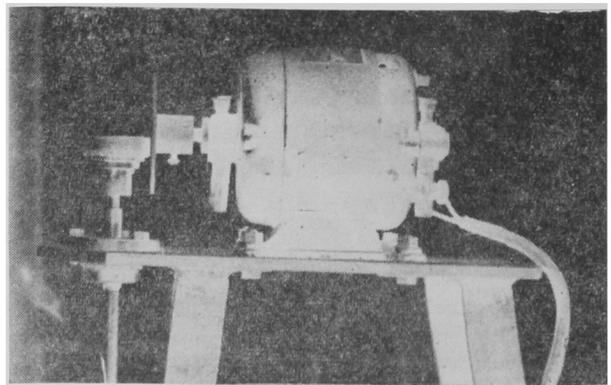
## 〔実験1〕1% NaOH水を用いる回転処理法

## (A) 基礎実験

## 1. 実験方法

塗抹陽性患者喀痰5件を用い、おのおの2分し、1方は1% NaOH水で5倍に希釈し、上記の回転器を1,000 r. p. m. 2分回転させ攪拌した(1%回転法)。他方は常法により4% NaOHで5倍に希釈し、ピペットでパンピングし混和均等化した。いずれも処理後 $10^{-2}$ から $10^{-7}$

Fig. 1.



にいたる6段階に希釈し、前処理開始後5分、10分、15分後におのおの0.1 mlを3%小川培地2本あてに接種、培養し、2週より6週まで毎週判定した。

2. 実験成績

1) 発生集落数 集落計数可能の段階で両処理法の発生集落数を比較したのが表1である。5件のうち回転法が多かつたもの2件、常法が多かつたもの2件、両法ともほぼ等しかつたもの1件であつた。前処理後接種までの時間の影響は5分、10分、15分の順に発生集落数減少の傾向が軽度ながら認められるけれども、著差はなかつた。

2) 汚染率 表1のごとく回転法は180本中10本(5.6%)、常法は5本(2.8%)に汚染が認められ、回転法15分後に接種した群に多かつたが判定に支障はなかつた。

Table 1. Comparison on Numbers of Developing Colonies and Cotaminated Tubes between the Homogenizer-method and the Pipette Method, Using 1% NaOH

Case No.	Treatment	Time of treatment		
		5 Min.	10 Min.	15 Min.
1	Homogenizer-Method	58.0*	45.5	74.0
	Pipette-Method	29.5	39.5	28.0
2	Homogenizer-Method	132.5	130.5	134.0
	Pipette-Method	83.5	71.5	57.0
3	Homogenizer-Method	23.0	28.0	19.0
	Pipette-Method	83.0	81.0	79.0
4	Homogenizer-Method	103.0	89.5	96.5
	Pipette-Method	116.0	139.0	116.5
5	Homogenizer-Method	31.0	33.5	32.0
	Pipette-Method	93.5	76.5	81.0
Number of contaminated tubes	Homogenizer-Method	2/60 Total	0 10/180 (5.6%)	8
	Pipette-Method	2 Total	2 5/180 (2.8%)	1

\* Mean colony number of two tubes.

(B) Routine

基礎実験結果をもとにして、回転処理法では前処理開始10分後に接種する方法をとつた。

1. 実験方法

前日抗結核剤の投与を中止した肺結核患者50件の早朝喀痰を用いた。喀痰を2分し、回転処理法は1% NaOH水で5倍に希釈、1,000 r. p. m. 2分間回転、8分間放置し、0.1 mlを1%小川培地2本あてに接種した。常法は4% NaOH水で5倍に希釈し10分間前処理後0.1 mlを3%小川培地2本あてに接種、培養し、陽性率、発生集落数、汚染率を比較した。

2. 実験成績

1) 陽性率 成績は表2に示す。回転法は50件中31件(62.0%)陽性で、常法は33件(66.0%)陽性であ

Table 2. Comparison on Culture-Positives, Contamination Rate and Colony Number between the Homogenizer-Method and the Pipette Method, using 1% NaOH

Results		Homogenizer-method	Pipette-method
Culture-positives (%)		31/50 (62.0)	33 (66.0)
Contamination	Completely	3/100 (3.0)	0
	Partially	19 (19.0)	11 (11.0)
Colony number	Case 1	40.5*	8.0
	2	48.5	52.5
	3	177.0	20.5
	4	26.5	0.5
	5	51.5	176.0

\* Mean colony number of two tubes.

つた。回転法の陽性31件のうち常法が陰性のもの2件、常法の陽性33件のうち回転法が陰性のものは4件であつた。

2) 発生集落数 集落数比較可能のもの5件を比較すると回転法が多いもの3件、常法が多いもの1件、ほぼ等しいもの1件であつた。

3) 汚染率 汚染が広範囲で判定に支障をきたしたものを完全汚染、一部に汚染があるが判定に支障のないものを部分汚染とした。回転法では部分汚染が100本中19本(19.0%)、完全汚染が3本(3.0%)であつた。常法では部分汚染が11本(11.0%)で完全汚染は認められなかつた。

〔実験2〕半流動Kirchner寒天培地における前処理法と分注量ならびにpHとの関係

1. 実験方法

寒天(Difco Bacto agar)を0.1%に加えアルブミン(栄研)を10%添加し、マラカイト緑を20万倍に加えた半流動Kirchner寒天培地を使用し、pHを5.8、6.2、6.5の3段階としそれぞれ5 ml、7 ml、8 ml分注の培地を調製した。

(A) 無処理

H<sub>37</sub>R<sub>v</sub>株10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>希釈の0.1 mlを上記各培地2本あて接種し37°Cに培養した。

(B) 1%回転法による前処理

実験1より1% NaOH水で喀痰を5倍に希釈し回転処理する場合、回転数は1,000 r. p. m. で2分間回転し処理時間は処理開始後10分がよいことが分かつた。そこでH<sub>37</sub>R<sub>v</sub>株菌量10<sup>-4</sup> mg/ml、10<sup>-5</sup> mg/mlの人工喀痰をつくり、1% NaOH水で喀痰を5倍に希釈し、1,000

r. p. m. で2分間回転処理し8分間放置してのち0.1 mlを各培地2本あて接種し培養した。

(C) 4% NaOH 水による前処理

上記人工喀痰を4% NaOH 水で5倍希釈、常法により処理し、10分間処理後0.1 mlを各培地2本あて接種し培養した。

2. 実験成績

3週後に判定を行なった成績は表3のごとくである。

Table 3. Effect of Volume, pH of Medium and Treatment of Specimen on the Colony Number in Semi-Solid Kirchner Agar Media (Results at 3 Weeks)

Specimen and treatment		pH	Volume of medium		
			5 ml	7 ml	8 ml
Cultured bacilli ( <i>H<sub>2</sub>R<sub>r</sub></i> )	Not treated 10 <sup>-6</sup> mg	5.8	24.5*	30.5	27.5
		6.2	31.5	30.5	30.0
		6.5	21.5	33.5	38.0
Sputum artificially mixed with cultured bacilli (10 <sup>-4</sup> mg/ml)	Homogenizer method using 1% NaOH 0.1 ml	5.8	48.5	43.0	62.5
		6.2	54.5	46.0	58.0
		6.5	47.0	58.5	64.5
	Pipette-method 0.1 ml	5.8	23.0	38.5	42.5
		6.2	16.5	31.5	43.5
		6.5	1.0	17.5	20.0

\* Mean colony number of two tubes.

無処理で菌液を接種した場合、7 ml および 8 ml 分注の培地では pH 6.2, 6.5 となるに従ってわずかながら発生集落数が増加している。1% 回転法では pH 5.8, 6.2, 6.5 とも使用でき、分注量は 8 ml とするのが適当である。4% NaOH 水処理の場合は、pH 5.8, 6.2 で 8 ml 分注のものが発生集落数多く、pH 6.5 はやや劣っていた。

結論としては1% 回転法を前処理として行なうならば、pH 6.2 または pH 6.5 で 8 ml 分注した半流動 Kirchner 寒天培地は保存菌株の培養はもちろん分離培養にも使用できる培地であり、常法による前処理を行なうとすれば、pH 6.2 で 8 ml 分注した半流動 Kirchner 寒天培地が、保存菌株の培養、分離培養両者に使用可能である。

[実験 3] 2% NaOH 水を用いる回転処理法

実験1で1% 回転法は陽性率、発生集落数で常法と差がなかつたが、汚染がやや多かつたので、2% NaOH 水を喀痰と等量加える(2% 等量回転法)か、あるいは2% NaOH 水で喀痰を5倍に希釈して(2% 5倍希釈回転法)のち回転処理する方法を試みた。

(A) 基礎実験

1. 実験方法

塗抹陽性患者喀痰1件を用い4分し、1つは1% 回転

法により前処理し、1つは2% NaOH 水を等量加え、1,000 r. p. m. 2分間回転処理し8分放置、1つは2% NaOH 水で喀痰を5倍希釈、同様に回転処理し、1つは常法により4% NaOH 水で喀痰を5倍希釈、10分間前処理し、いずれも10<sup>-3</sup> から10<sup>-6</sup> まで階段希釈を行ない、回転法は1% 小川培地および8 ml 分注した pH 6.2 の半流動 Kirchner 寒天培地3本あてに常法は3% 小川培地3本あてに接種し培養した。小川培地は5週後判定し、半流動寒天培地は3週後に判定した。なお基礎実験、Routine とも半流動 Kirchner 寒天培地のマラカイト緑濃度は10万倍とした。

2. 実験成績

発生集落数は表4、表5に示す。1% 小川培地においては1% 回転法で30.7、2% 等量回転法は55.0、2%

Table 4. Comparison on Culture-Positives, Contamination Rate and Colony Number between the Homogenizer-Method Using 1% NaOH or 2% NaOH and the Pipette Method on 1% Ogawa's Media (Results at 5 Weeks)

Results		Homogenizer-Method			Pipette Method
		1% NaOH 5 x	2% NaOH 2 x	2% NaOH 5 x	
Culture-positives (%)		18/20 (90.0)	18	18	18
Contamination rate	Completely	0/60	2 (3.3)	0	0
	Partially	5 (8.3)	9 (15.0)	4 (6.7)	2
Colony number 10 <sup>-3</sup>		30.7*	55.0	20.0	52.0

\* Mean colony number of three tubes.

Table 5. Comparison on Culture-Positives, Contamination Rate and Colony Number between the Homogenizer-Method Using 1% NaOH or 2% NaOH and the Pipette Method on Semi-Solid Kirchner Agar Media (Results at 3 weeks)

Results		Homogenizer-Method		
		1% NaOH 5 x	2% NaOH 2 x	2% NaOH 5 x
Culture-positives (%)		17/20 (85.0)	17	17
Contamination rate	Completely	1/60 (1.7)	0	1
	Partially	1	0	0
Colony number 10 <sup>-3</sup>		31.0*	61.7	25.0

\* Mean colony number of three tubes.

5倍希釈回転法は20.0, 常法は52.0であつた。半流動 Kirchner 寒天培地においては1%回転法31.0, 2%等量回転法61.7, 2%5倍希釈回転法25.0であつた。

### (B) Routine

#### 1. 実験方法

前日抗結核剤の投与を中止して採取した肺結核患者の早朝喀痰20件を用いた。基礎実験結果をもとにして喀痰を4分し、それぞれ1%回転法, 2%等量回転法, 2%5倍希釈回転法, 常法による前処理を行ない, 各回転処理法は1%小川培地ならびに半流動 Kirchner 寒天培地, 常法は3%小川培地のおおの3本あて0.1 ml を接種, 培養し, 小川培地は5週後, 半流動寒天培地は3週後に判定した。

#### 2. 実験成績

小川培地を使用した場合の成績は表4のごとくである。培養陽性率は各処理法とも20件中18件(90.0%)陽性で同率であつた。汚染率は完全汚染が2%等量回転法に60本中2本(3.3%)認められたほかはなく, 部分汚染は1%回転法5本(8.3%), 2%等量回転法9本(15.0%), 2%5倍希釈回転法4本(6.7%), 常法2本(3.3%)であつた。

つぎに半流動 Kirchner 寒天培地における成績は表5に示すごとくで陽性率は各処理法とも20件中17件(85.0%)で同率であつた。完全汚染は1%回転法および2%5倍希釈回転法に60本中1本(1.7%)認められ, 部分汚染は1%回転法に1本認められた。

### 考 察

耐性検査には直接法と間接法の2種があり, それぞれ特色をもっているが, 直接法は NaOH 水によつて病材を前処理したのち接種するので, 直接, 間接両法に同一の耐性培地を使用することは現状では困難である。そのため同系統の培地でも直接法用, 間接法用の2種類の培地を用意するかあるいは前処理後中和して接種する必要がある。そのうえ最近新たに出現する化学療法剤については Kirchner 寒天培地の使用がすすめられていて, それらを Routine として行なう検査関係者の負担はさらに増大している。

そこでどの薬剤に対しても直接, 間接両法に対しても同じ培地が使用でき, しかもこれが分離培養にも使用しうる統一万能培地の完成が強く望まれるところである。この点について一方では前処理に回転処理法を利用することにより, 他方では分量を増し pH を調整した pH 緩衝能力のやや強い半流動 Kirchner 寒天培地を利用することにより, 解決の糸口を求めた。

すなわち1%回転法によつて回転処理法における汚染の点が改善されれば実用化されうることを見出し<sup>6)</sup>, つぎにこの回転処理法を行なつたときは pH 6.2 または pH 6.5 で 8 ml 分注した半流動 Kirchner 寒天培地に接種する方法がもつとも良いことを知つた。前処理に常法を用いるときには pH 6.2 で 8 ml 分注した半流動 Kirchner 寒天培地が適当であつた。

また1% NaOH 水を使用した回転法では汚染が常法に比較してやや多かつたので, 2% NaOH 水を喀痰と等量加えるかまたは2% NaOH 水で喀痰を5倍に希釈し回転処理する方法を検討したところ<sup>7)</sup>, 1%小川培地へ接種した場合は汚染率をほぼ常法と等しい率まで下げることができ, マラカイト緑を10万倍に添加した半流動 Kirchner 寒天培地ではさらに低率となつた。

これを要するに 8 ml 分注し, pH を 6.2 とした半流動 Kirchner 寒天培地は間接法はそのまま直接法は1%または2% NaOH 水を用いた回転処理後に接種することにより両方法に使用でき, 分離培養にも使用できる統一万能培地となりうることを認めたのである。

### 結 論

2% NaOH 水を喀痰と等量加えるか, 2% NaOH 水で喀痰を5倍に希釈し 1,000 r. p. m. で2分間回転処理し8分放置する方法によつて, 処理病材は 8 ml 分注した pH 6.2 の半流動 Kirchner 寒天培地に接種, 培養でき, この培地は保存菌株の培養にも耐性培地としても使用でき, 統一万能培地となりうることを認めた。

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。

本論文の要旨は第37回結核病学会総会, 第17回国立病院療養所総合医学会において発表した。

### 文 献

- 1) Knox, R.: Lancet, 6881: 110, 1955.
- 2) Knox, R., Swait, E. & Woodroffe, R.: J. Gen. Microb., 15: 359, 1956.
- 3) 大川日出夫: 結核, 35: 630, 昭35.
- 4) 大川日出夫: 結核, 36: 13, 昭36.
- 5) 大川日出夫: 結核, 36: 753, 昭36.
- 6) 伊藤忠雄・亀崎華家・大川日出夫・杉山青男: 結核, 37: 443, 昭37.
- 7) 伊藤忠雄・亀崎華家・大川日出夫・杉山青男・綾部和三郎: 第17回国立病院療養所総合医学会, 昭37.

sputum and 1% or 2% NaOH are poured, and is rotated at 1000 r. p. m. for 2 minutes. After 8 minutes' rotation the homogenized sputum is inoculated into Ogawa's medium or semi-solid Kirchner agar medium. This method is called the homogenizer-method, and in this report the use of this method for the treatment of sputum is examined.

#### Methods and Results

1st Experiment : Sputum was divided into 2 parts. With one part, 1 ml of sputum and 4 ml of 1% NaOH were poured into a test tube, treated by the homogenizer-method, and were inoculated into 1% Ogawa's medium. With the other part, 1 ml of the sputum and 4 ml of 4% NaOH were poured into a test tube, homogenized by pumping with a pipette for 10 minutes (the pipette method), and were inoculated into 3% Ogawa's medium. The test tubes were incubated at 37°C for 6 weeks. The rate of positive cultures and the number of colonies were almost equal between the two methods, but the rate of contamination was higher in the homogenizer-method than in the pipette method.

2nd Experiment : 0.1% semi-solid Kirchner agar media containing albumin in 10% and malachite green in 5  $\gamma$ /ml were prepared with three grades of pH, such as 5.8, 6.2 and 6.5. These media were dispensed into test tubes in three different volumes, that is, 5 ml, 7 ml and 8 ml. Into these media were inoculated  $10^{-5}$  mg and  $10^{-6}$  mg of bacterial suspensions of human type tubercle bacilli  $H_{37}R_V$ . Also the sputum, artificially mixed with cultured bacilli ( $H_{37}R_V$   $10^{-4}$  mg/ml), was treated either by the homogenizer-method using 1% NaOH, or by the pipette method, and was inoculated into these media re-

spectively. Consequently, 8 ml of 0.1% semi-solid Kirchner agar media with pH 6.2 or 6.5 were found as suitable for the cultivation of sputum treated with homogenizer-method. Also 8 ml of 0.1% semi-solid Kirchner agar media (pH 6.2) were suitable for the cultivation of sputum treated by the pipette method.

3rd Experiment : the sputum was divided into 4 parts as follows : (1) The sputum was treated by the homogenizer-method using 1% NaOH. (2) 1 ml of the sputum and 1 ml of 2% NaOH were mixed in a test tube and treated by the homogenizer-method. (3) 1 ml of the sputum and 4 ml of 2% NaOH were mixed in a test tube and treated by the homogenizer-method. 0.1 ml of the homogenized sputum was inoculated into 1% Ogawa's medium and 8 ml of 0.1% semi-solid Kirchner medium (pH 6.2) containing 10  $\gamma$ /ml of malachite green, respectively. (4) The sputum was treated by the pipette method, and was inoculated into 3% Ogawa's medium.

The rate of positive cultures was almost equal among these four methods, but the contamination rate and the number of colonies were a little higher in the homogenizer-method using 2% NaOH (2) than in the other methods.

#### Discussion and Conclusion

When the sputum is treated by the homogenizer-method using 2% NaOH, it is successfully inoculated into 8 ml of 0.1% semi-solid Kirchner agar medium (pH 6.2). Also this medium is suitable for the cultivation of stock strains and for the testing of drug resistance (direct or indirect). So this medium is considered to be useful for a variety of purposes.