

## 菌検査（小川培地・ナイアシントテスト）

（財）広島県環境保健協会 齋藤 肇

### はじめに

わが国における結核菌（抗酸菌）検査法に関する優れた研究業績は多々あるが、なかでも小川辰次先生の“定量培養法の構築”（1949-1950年）と、抗酸菌の生化学的鑑別・同定法のパイオニア今野淳先生の“ナイアシントテストの発見”（1956年）を挙げることができよう。以下に両先生の業績の一端を紹介したい。

### 小川辰次先生の業績

小川は、検体中に結核菌が陽性か陰性かを目標とした従来のいわば定性的な培養法ではなく、一定量の検体中に存在する生菌数（単位）を求めることを目標とした定量培養法を開発した。

#### I. 小川培地（ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 培地）の開発

当時、代表的な卵培地としてはPetroff（1915年）、Petragnani（1927年）、Löwenstein（1931年）、岡・片倉（1940年）といった培地が知られていたが、わが国ではそれらの中でも発育支持能のすぐれた岡・片倉培地が一般に用いられていた。

岡・片倉培地の調整法は、原液（ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ および味の素の各1gを蒸留水100mlに溶解）、鶏卵液200ml（全卵4コ、卵黄1コ）、グリセリン6ml、2%マラカ



8人の外人講習生にかこまれた小川先生

イトグリーン6mlを混和後、ガーゼで濾過し、中試験管に5~7ml宛分注後、血清凝固器またはKoch釜で85、80および80℃、各40分で間欠滅菌する（凝固水のpH:6.8）。

小川は岡・片倉培地の各成分の控除ならびに培地の滅菌法が結核菌の発育に及ぼす効果について検討した。

#### （1）培地成分の控除

① $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ：菌の発育は全くみられない。 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ の最適添加量は1%である。

② $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ：菌の発育は多少とも良くなる。

③味の素：菌の発育には影響はない。

④グリセリン：1~5%の添加では菌の発育に差はみられない。10%では多少抑制される。

⑤マラカイトグリーン：培地全量の0.04%に用いられており、結核菌の発育に著しい影響はなく、雑菌の発育阻止力は強く、集落の観察は容易となる。

#### （2）培地の凝固滅菌

温度、時間は培地により異なるが、いずれも間欠滅菌が行われていた。小川は85~90℃、60分1回の滅菌で従来法に比べて何らの遜色もないことを明らかにした。

上述したような新知見をえた小川は下記組成の卵培地を開発し、岡・片倉培地よりも優れた菌発育支持能を有することを明らかにした。

#### 1%小川培地 （1% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 培地）

|                  |                                |        |
|------------------|--------------------------------|--------|
| 原液               | $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ..... | 1.0 g* |
|                  | 味の素（グルタミン酸ナトリウム）.....          | 1.0 g  |
|                  | 蒸留水.....                       | 100 ml |
| 全卵液.....         |                                | 200 ml |
| グリセリン.....       |                                | 6 ml   |
| 2%マラカイトグリーン..... |                                | 6 ml   |

濾過、分注し、90℃、60分1回凝固滅菌。

\*2.0g添加により2%小川培地、3.0g添加により3%小川培地を作りうる。

#### II. 小川培地による結核菌の定量培養法

##### （1）菌浮遊液

小川培地上発育集落を磨砕し、滅菌蒸留水による1mg/mlの菌浮遊液を調製し、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 希釈液の0.1mlを小

川培地に接種し、培地表面を潤おし、斜面台にねかし、37℃で培養する。その日数は菌株により異なるが、だいたい4週間前後である。

### (2) 喀痰

喀痰の塗抹染色で菌陰性の場合には4%NaOHで5～10倍に希釈し、菌陽性の場合にはその菌数の多少によって集落が数えられるように10倍希釈し\*、その0.1 ml宛を3%小川培地に接種・培養し、一定量中の喀痰内菌数を定量的に推定する。

\*概略の希釈倍数

Gaffky 1～3号：10<sup>1</sup>～10<sup>3</sup>倍／Gaffky 4～6号：10<sup>3</sup>～10<sup>5</sup>倍／  
Gaffky 7～10号：10<sup>4</sup>～10<sup>6</sup>倍

本法は従来の硫酸法よりも喀痰が容易に均等化され、また使用培地のpHは6.2であるが、培養後も同様のpH(6.2)に傾くため雑菌の迷入も少ない。本法によれば、一定量の喀痰中の生菌単位を知ることができ、かなり正確にその消長を知ることができる。しかし、採痰時によって排菌数にはかなりの変動があり、連続培養することが推奨されるという。

### (3) 実験動物由来検体

内臓の還元培養には従来は喀痰と同様硫酸処理し、その遠心沈渣を培養する方法が採用されてきた。その後、定量法が試みられたが培地の汚染率が高く、かつ操作もあまりにも煩雑で実用的でなかった。小川(1949年)は検体を1～2%H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で処理し、岡・片倉培地で培養する方法を開発したが、検体が均等になりにくく、また古い病巣の培養では菌の発育が不良であった。小川はその改良法として、内臓を可及的に汚染をさけて採取し、1%H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>よりも臓器を均等化しやすい1%NaOHを用い、1%小川培地に0.1 mlを接種することとした。

## Ⅲ. 抗酸菌分離培養法の現状

わが国における抗酸菌の分離培養法は1990年代に入り急速な進歩をとげ、なかでも液体培地ならびにその自動培養システムの導入など液体培養法には著しい進歩がみられた。他方、固形培地としては、わが国では卵をベースとした培地が主流をなしており、小川培地が汎用されている。

小川は喀痰、その他の検体からの結核菌の分離培養にはNaOHをその消化・汚染除去剤として用い、自己の開発した第1 磷酸カリ培地(小川培地)での培養法を開発した。その後、喀痰の消化・汚染除去には、NaOHの抗酸菌に対する傷害作用の軽減を図ったN-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウム(NALC-NaOH)法が用いられ、小川の用いた3%小川培地に代えて2%小川培地が用いられている。

### 〔主要参考文献〕

- 1) 小川辰次, 佐波 薫: 結核菌の定量的培養法について(その1) 菌浮遊液を培養する場合. 結核. 1949; 24: 13-18.
- 2) 小川辰次: 結核菌の定量的培養法について(その2) 動物臓器よりの培養法. 結核. 1949; 24: 19-24.
- 3) 小川辰次, 石井和夫: 結核菌の定量的培養法について(その3) 臓器よりの結核菌培養に及ぼす2, 3の影響と非病原性抗酸菌の出現. 結核. 1949; 24: 25-29.
- 4) 小川辰次, 大島登輝夫, 鳴海吾郎: 結核菌の定量培養に就いて(その4) 実験的結核症の天竺鼠臓器よりの培養……(1) 結核. 1949; 24: 80-84.
- 5) 小川辰次, 大島登輝夫, 鳴海吾郎: 結核菌の定量培養に就いて(その5) 実験的結核症の天竺鼠臓器よりの結核菌の定量培養……(2) 結核. 1949; 24: 97-101.
- 6) 小川辰次: 結核菌の定量培養に関する研究(その6) 前処理と鶏卵培地中に混入された磷酸塩との関係(第1報). 結核. 1949; 24: 403-409.
- 7) 小川辰次, 佐波 薫, 鈴木つき: 結核菌の定量培養に就いて(その7) 喀痰中結核菌の定量培養に就いて. 結核. 1950; 25: 207-214.
- 8) 小川辰次: 結核菌の定量培養に就いて(その8) 家兎の実験的結核症の臓器よりの培養. 結核. 1950; 25: 302-305.
- 9) 小川辰次, 工藤祐是, 高倉 廉, 他: 結核菌の定量培養に就いて(その9) 静脈播種によって感染した二十鼠の実験的結核症の臓器よりの培養. 結核. 1950; 25: 647-655.
- 10) 小川辰次: 「結核菌検索の基礎と応用」, 第2版, 保健同人社, 東京, 1952, 1-250.
- 11) Kent PT, Kubica GP: Isolation procedures. In: Public Health Mycobacteriology, A Guide for the Level III Laboratory, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, CDC, Atlanta, 1985, 31-56.
- 12) 工藤祐是, 斎藤 肇, 高橋 宏: 結核菌. 「微生物検査必携 細菌・真菌検査」, 第3版, 厚生省監修, 日本公衆衛生協会, 東京, 1987, F90-133.
- 13) Siddiqi SH: 「BACTEC 460 TB System 抗酸菌迅速検査装置. 製品および操作説明書」, 斎藤肇監修, 日本ベクトン・ディッキンソン, 東京, 1991, 1-73.
- 14) 斎藤 肇: 分離培養法. 「抗酸菌検査法 遺伝子技術による迅速診断」, 第1版, 斎藤 肇, 阿部千代治監修, 医歯薬出版, 東京, 1997, 6-33.
- 15) 斎藤 肇: 結核菌培地. 結核. 1998; 73: 329-337.
- 16) 斎藤 肇: 分離培養法. 「結核菌検査指針2007」, 初版, 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編集, 財団法人結核予防会, 東京, 2007. 31-50.