

結核菌の振盪培養に関する研究 (VI)

振盪培養による結核菌の発育形態並びに患者喀痰から
検出された結核菌の増殖とその形態について

昭和38年4月17日 受付

信州大学医学部戸塚内科

(指導: 戸塚忠政教授)

勝 又 昭 司 羽 田 忠 彦

Studies on Growth of Mycobacterium Tuberculosis with
Shaking Culture Method (VI)

Morphological Studies of Tubercle Bacilli in Sputa with
Shaking Culture

Shoji Katsumata and Tadahiko Hata

Department of Ist Internal Medicine, Faculty of Medicine,
Shinshu University

(Director: Prof. T. Tozuka)

はじめに

われわれは液体培地を用い結核菌を振盪しながら培養することにより、その発育を著明に促進できる事に着目し、これを臨床材料からの結核菌の迅速検出法^①、^②、SM, PAS, INAH に対する耐性検査法^③、更に Sulfamin に対する耐性検査法の迅速法として応用出来ることを報告した。

患者材料からの振盪培養による結核菌の迅速検出法の成績はすでに報告した如く^②、3~4日で判定可能であり、かつその検出率も小川培地による4週間培養のそれと大差はない。今回は振盪培養による結核菌の発育の形態学的研究と共に、検出された喀痰中の結核菌の増殖を半定量的及び形態学的に考察し、振盪培養による結核菌の迅速検出法に於いては、一般の臨床材料及び静置培養の場合と同様、その抗酸性及びその他の形態学的特徴を目標として結核菌を判別して何等支障のないことを確かめたので報告する。

材料及び方法

培地: 培養法並びに振盪培養装置は荒井^④、羽田^⑤の報告した方法により、振盪回数は1分間30回、水平面に13度上下運動を行なう。培養試験管は教室考案^⑥のL型試験管を用いた。

供試菌は教室保存の人型結核菌 H₃₇R_V で実験に当って小川培地より Dubos 液体培地 (栄研) に移植し1週間振盪培養して均等に発育した原液を荒井に従い接種培養した。

観察: 人型結核菌 H₃₇R_V の静置培養、振盪培養共に5本のL型試験管に培養し、毎日白金耳で菌液を1滴スライドグラス上に静かにおき、乾燥固定後、常法^⑦に従いチールネールゼン法で抗酸染色を行ない鏡見観察した。

患者喀痰は毎常排菌確実な肺結核患者の早朝痰を減菌シャーレに採取し、4% NaOH で前処置し均等化して後その0.2ccをスライドグラス上に静かにおき、そのまま乾燥固定した後チールネールゼン法で抗酸染色を行ない鏡見判定し、一方は同量を振盪培養し、4日後全量を遠心沈澱して上清をすて沈澱を駒込ピペットでできるだけ多く吸い上げて、スライドグラス上に静かにおき、抗酸染色を行ない鏡見した。

菌数の判定はガフキー番号^⑧により、増殖著明で菌塊を形成しているものは菌塊中の菌数を推定し、一視

表 1 ガフキー号数表

番号	結 核 菌 数	
1	全標本中に	1~4個
2	数視野中に	1個
3	各視野に概略	1個
4	"	2~3個
5	"	4~6個
6	"	7~12個
7	"	稍多数
8	"	多数
9	"	極めて多数
10	"	無数

野平均の数で現わした。

成 績

I 振盪培養による結核菌の發育

人型結核菌 $H_{87}R_v$ を用いてその發育を観察すると、比濁では既に報告した如く^⑥、振盪培養では2～3日目頃からその濁度は著明に増加し対数的な發育がみられる。形態学的に日を逐つてその發育を観察すると写真 Ia, Ib, Ic, Id でみられる如く、培養の当初は単在菌と菌塊を作る菌と混存して認められたが、培養2日目では単在菌は殆どなく、10数個乃至は数10個の塊状に集合し、赤染した桿状体が長軸方向に延びているのがみられるが、その先端に少数の青染又は未染菌が存在するようにみられる場合もあつたが明瞭ではない。しかしコードを形成しながら發育することは明らかであり、培養3日目では赤染菌はすでに網目状に融合して認められ顆粒は著明で、4日目以後にも網目状に相互に重なりあつて認められ、發育が旺盛であることを示している。

しかし、この観察は1個の菌の發育を追つたのではなく、ただ培地1滴を染色したものにすぎない。そこで対照として行なつた静置培養での $H_{87}R_v$ の發育と比較すると、静置培養における $H_{87}R_v$ の發育は写真 Ia, Ib, Ic, Id で示す如く、振盪培養の場合に比べて培養直前は殆ど変りはないが、2日目以降の發育は量的に著明の差があり、菌量が少ないと同時に菌塊一個あたりの菌数も少ない。4日目以後に漸くコード形成があきらかになり、長軸方向に重なりあつてのびている赤染菌が認められている。しかし植田^⑨等のべている青染菌、未染菌は明瞭ではない。以上の成績を要約すると単個菌を追及したものではないが、対照の静置培養の場合と比較して、振盪培養の場合も結核菌の發育は形態学的に静置培養の際の結核菌の性状と異なるものでなく、菌体は相互に連絡しつつ増殖、分裂を行ない、抗酸性、コード形成等には変化はないものと考えられる。

II 患者喀痰から検出した結核菌の増殖

1) 増殖の程度

結核菌の發育は振盪培養に於いても、顕微鏡下で単在することなく集合して現われることはIに述べたが、喀痰から検出する際、増殖の程度を定量的に表現することは困難である。そこで確実に結核菌陽性の患者喀痰を均等化して後、同一量を一方はそのまま鏡見し、一方は振盪培養後遠沈して、沈渣を鏡見し、半定量的にガフキー号数で比較した。

表2の如く総計23例中振盪培養のガフキー号数(以

下Gと略す)と喀痰のガフキー号数とが同じものの6例、即ち、G1, G2, G4, G8 それぞれ1例、G3が2例計6例であつた。これは振盪培養後遠沈した場合、全量を鏡見できないことを考えると、この中には実際はそれ以上のガフキー号数である可能性のあるものも含んでおり、即ち振盪培養により多少増殖した例も含まれる可能性があると思われる。しかし振盪培養後のGが喀痰のGより減少した例は一例も認められなかつた。振盪培養後Gが増加した例は喀痰 G1 より培養 G2 が1例、喀痰 G2 より培養 G3 が2例、培養 G4, G6 が夫々1例づつで喀痰 G3 以上で振盪培養を行なつたものは殆どすべて培養 G10 となり、振盪培養により著明に増殖することが確実である。

表2 患者喀痰から検出された結核菌の増殖

	振盪培養で検出された結核菌のガフキー号数										例数計
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
結核菌のガフキー号数の	1	1	1								2
	2		1	2	1	1					5
	3			2			1		1		4
	4				1			1			2
	5					1			3		4
	6								2		2
	7								1		1
	8							1	1		2
	9								1		1
例数計	1	2	4	2		2	1	2	9		23

2) 喀痰から検出された結核菌の形態

患者喀痰から振盪培養で検出された結核菌の形態は、写真 III(1), III(2), III(3), III(4) でみられる如く、単在菌として1個或は数個しかみとめられない場合もあつたが、5～6個乃至10数個の菌塊として検出される場合が多くまた III(4) の如くコード形成を示す場合もあり、形態は喀痰中の結核菌の場合とはほぼ同様であるが、やゝ膨隆した両端鈍、顆粒の著明な桿状菌として現われることが多く(これは、この様な菌が培養され易いことも考えられる)、チールネールゼン法で抗酸性は明瞭であつた。

写真 III(3) の如く、他の細菌の發育により汚染される場合もあつたが、抗酸染色で染め分けられ、判定にはさほど困難を伴わなかつた。

考 按

振盪培養がすでに結核菌の發育を促進することは明

らかであるが、一般に振盪培養とは培地をふり動かすことにより結核菌の分裂に物理的影響を与え、それによつて分裂増殖を促進するものと考えられがちであり、結核菌が相互に連絡を保ちながら増殖しているものを無理に離してバラバラにするのではないかと考えられ易く、コード形成^⑩に影響があるのではないかと、また形態学上変化を起すのではないかとすることも考えられる。

しかし多くの基礎実験^{⑪-⑭}によつて振盪培養は細菌の発育に物理的影響を与えるのではなく、酸素の溶解速度を早めるためと考えられ、細菌に対する器械的損傷を与えることが少ないよう、ゆるい振盪数を持つ振盪装置が使われている。

振盪培養による結核菌の形態学的変化に関して Aoyagi^{⑩⑭}は Imamura 人型無毒株と *M. smegmatis* を Sauton 培地で振盪培養を行ない、*M. smegmatis* では20代継代培養して菌の増殖度にも世代時間にも変化はなかつたが、菌の染色性は10代で抗酸性の喪失が認められ、Imamura 株は25代継代培養しても殆ど抗酸性の喪失は認められず、しかもこのような振盪培養によつてえられた均一な浮遊液では、単個菌になつているものが約半数で、残りは数個或は数10個の菌塊よりなつていると報告している。

今回われわれの検索によつて、振盪培養における結核菌の増殖は静置培養における結核菌の増殖と質的には何等相違なく、量的に振盪培養において発育の促進がみられるのみであり、病原性結核菌の形態学上の特長はそのまま存在することを明らかにした。従つて当教室で行なつている様に振盪培養を結核菌の迅速検出法として応用する際には、結核菌としての検出及び判別には形態学的に特別な顧慮を払う必要のないことを確認した。

次に現在われわれは振盪培養を結核菌の迅速培養に日常検査として利用し、かなりの好成績をあげているが、患者からの分離菌ですでに比濁により増殖の著明なことは報告^{⑩⑭⑮}されているにもかかわらず、喀痰中からはそのまま振盪培養して、結核菌が増殖するか否かは報告がなく、且つ又振盪培養による迅速検出の機作に関し、判定日数が4〜5日という短期間であるため、振盪培養により喀痰中の結核菌が増殖して検出され易くなつたのではなく、Tween 80 を含む Dubos 液体培地中で菌が遊離し易くなり、そこに操作中の遠心沈殿のため集菌によつて、この様な好成績が生まれたのではないかと、従つて迅速法として従来発表された遠沈管培養法^⑯と大差はないのではないかと云う反論もあるかもしれない。しかし、われわれの実

験では、半定量的ではあるが、喀痰中からの結核菌の増殖は著明に認められ、振盪培養による患者材料からの結核菌の検出は単なる集菌効果ではなく、確実に結核菌の増殖によることを認めてよいものである。

むすび

われわれは結核菌の振盪培養を行ない、喀痰から検出する際の結核菌の増殖の程度及びその形態学について観察した。振盪培養で増殖した結核菌は静置培養の場合と比較して染色性、コード形成、配列等に特別な変化なく、迅速検出法として振盪培養を利用するに際して抗酸性、コード形成等を目標として結核菌を判別するのに支障はないことを確かめた。

又、喀痰中の結核菌は振盪培養により増殖することが認められた。

稿を終るに当り、御指導御校閲いただいた戸塚忠政教授に深甚なる謝意を表するとともに、当科の振盪培養に終始御助言御教示いただいた細菌学教室田崎忠勝教授に感謝いたします。

文 献

- ①戸塚忠政・他：日本医事新報，1740：42，1957.
- ②羽田忠彦：信州医学雑誌，11：369，1962.
- ③荒井聖二：信州医学雑誌，8：1701，1959.
- ④羽田忠彦：結核，38：111，1963.
- ⑤羽田忠彦：信州医学雑誌，11：360，1962.
- ⑥荒井聖二：信州医学雑誌，8：1212，1959.
- ⑦伝研学友会：細菌学実習提要，昭和33年。丸善。
- ⑧金井 泉：臨床検査法提要，22版。昭和37年。金原出版。
- ⑨植田三郎：結核菌検査の実際，4版。昭和28年。南江堂。
- ⑩Middlebrook, G., Dubos, R. J. Pierce, C.: J. Exp. Med., 86:175, 1947.
- ⑪Volk, W. A., Myrvik, Q. N.: J. Bact. 66:336, 1953.
- ⑫Miller, I. L., Roesler, W. G.: Am. Rev. Tuberc., 73:716, 1956.
- ⑬Halpern, B., Kirchheimer, W. F.: Am. Rev. Tuberc., 70:665, 1954.
- ⑭松村 剛・他：化学の領域，10：65，1951.
- ⑮Aoyagi, T., Mizuno, D.: J. gen. Microbiol. 20:173, 1959.
- ⑯Aoyagi, T., Mizuno, D.: J. gen. Microbiol. 20:180, 1956.
- ⑰柳沢雄次：信州医学雑誌，8：2354，1959.
- ⑱山田 修，岡田 博：結核，28：169，1952.

写真説明

Ia 振盪培養直前の結核菌。単在菌と菌塊を作つて
いる菌の数は少ない。

Ib 振盪培養第2日目。菌数の少ない菌塊をなして

写真 Ia



写真 Ib



写真 Ic

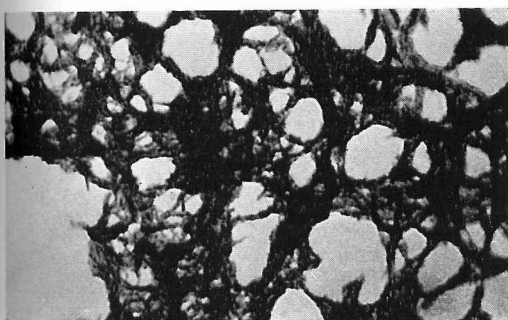


写真 Id

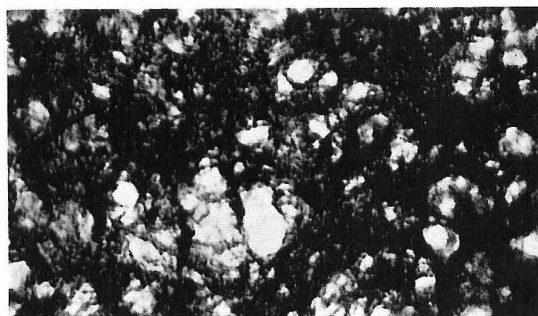


写真 IIa

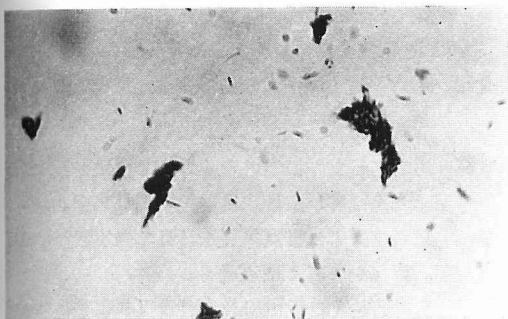


写真 IIb



写真 IIc

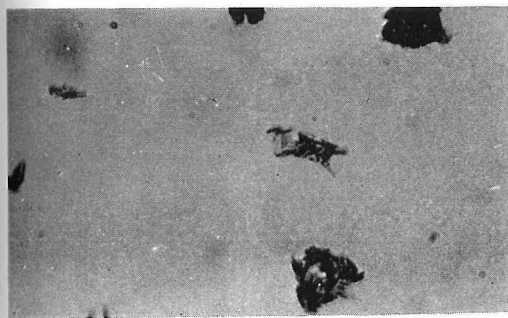
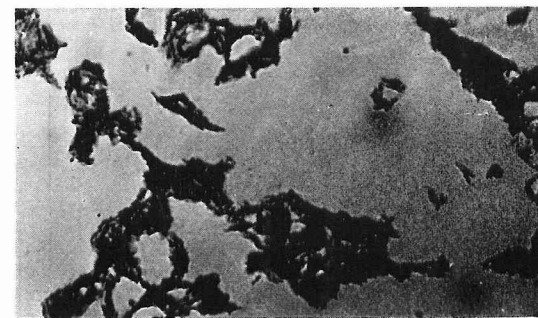
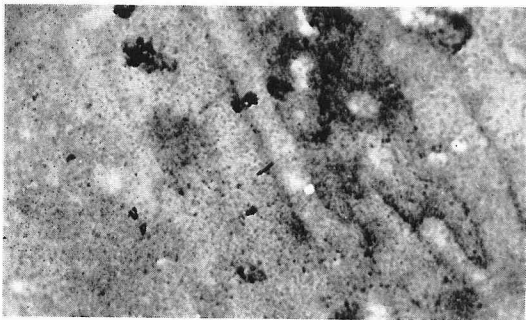


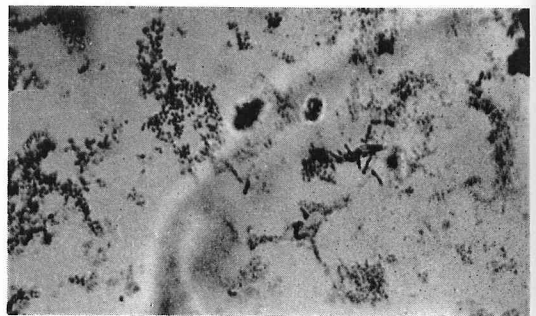
写真 IId



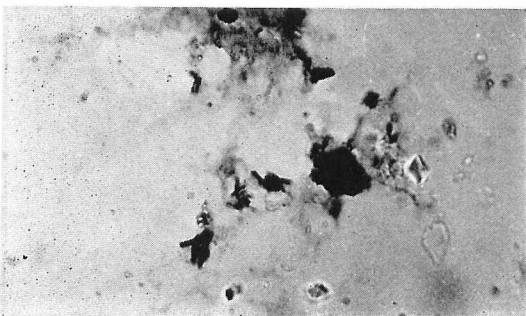
写真Ⅲ(1)



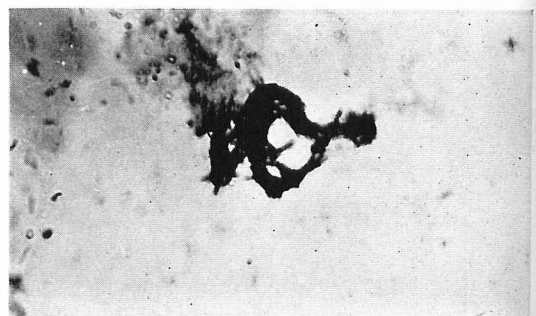
写真Ⅲ(2)



写真Ⅲ(3)



写真Ⅲ(4)



いるものもあるが数十個の菌がかたまつてコードを作る。

Ic. 振盪培養第3日目。長軸方向にのびた結核菌は互に重なり合つて網目状をなす。

Ia. 振盪培養第4日目。増殖著明で互に重なり合う。

IIa. 静置培養直前の結核菌。Iaと同様。

IIb. 静置培養第2日目。単個菌は減少したが、菌塊1個あたりの菌数はIbに比べて少ない。

IIc. 静置培養第3日目。菌塊1個あたりの菌数は少なく、Icに比べて著明に発育が少ない。

IIa. 静置培養第4日目。菌数漸く増加し、長軸方向に長くのびた菌塊が認められるが、増殖の程度はIaと比較すると著明に少ない。

III(1) 患者喀痰より振盪培養4日目にて検出された結核菌。抗酸性、単個菌。

III(2) 患者喀痰より振盪培養4日目にて検出された結核菌。雑菌は非抗酸性。抗酸性で顆粒著明。

III(3) 患者喀痰より振盪培養4日目にて検出された結核菌。菌塊を形成し増殖著明。

III(4) 患者喀痰より振盪培養4日目にて検出された結核菌。抗酸性、コード形成あり。