

高湿孵卵器による結核菌培養改良法について

昭和35年3月10日 受付

国立療養所甲府病院内科

小 沢 慶 三 山 本 泰 雄
大 久 保 幹 雄 塩 沢 勘 次

An Improved Method of Culturing Tubercle Bacilli by Means of a Moist Incubator

By

Keizō OZAWA, Yasuo YAMAMOTO, Mikio ŌKUBO and
Kanji SHIOZAWA

Department of Internal Medicine, Kōfu National Hospital

緒 論

近年結核による死亡率は著しく低減したといえ、決して楽観は許されない現況である。まして化学療法法の進歩により、菌の性状も変化し、塗抹陽性、培養陰性等の例を屢々認められる。私達臨床家は常に病巣に於ける菌の消長、変化を見守り治療予後の判定に役立ててゆかねばならない。元來結核菌の培養基での發育増殖は緩徐で、肉眼で認められる集落を形成するまでには早くとも十数日、時には数週間をも要する。そこで私達臨床医家にとつて少しでも早く且明瞭な増殖を認める様な培養法が望まれる事は論をまたない。一方結核の普遍性よりみて、僻地でも小施設でも容易に行い得る実用性が大事な要素と考えられる。

従来好氣的条件下で發育する結核菌には酸素の供給を十分に行う事が必要である。海老名^①、戸田^②、宇賀^③等はそれぞれ發育増殖に必要な酸素至適濃度を指摘し、又 Novy 及び Soule^④は至適酸素濃度、湿度の必要性を実験的に証明している。然し現在一般に行われている培養法は、培養日数が長期にわたるため、孵卵器内の培養基の乾燥を防ぎ、且カビの進入防止のため、試験管口を密封し培養する方法をとつてきた。この様な方法は上記諸氏の実験研究成績からみても、酸素供給が不充分、且湿度の問題に関しても疑問の個所があり、尚改善されるべき所があると考え、私達は乾燥を防止しつつ、しかも空氣の供給を充分に行う事が出来たら頭書の目的を達する事が出来ると考え、現在の培養法を一部変更し、試験管のゴム栓を綿栓にかえ、且孵卵器内に一定の湿度を与えて培養を行い、従来のゴム栓培養と比較対照しつつ、その發育増殖の状態を観察したところ、興味ある結果をえたのでここに報告する。

実験方法

当所入院患者50名を選び、その喀痰を3% KH_2PO_4

の小川培地に培養し、それぞれ同一人のものを二群に分け、一群の培養基は孵卵器内に水をみたした水槽を下部に入れて、その上部の金網の上に培養試験管をならべ37°C 恒温で常に高湿度に保たれている環境で、試験管口を空氣の流通を良くし、適当な湿度を保つため綿栓で培養、又他の一群は現在行われているゴム栓で密封し、普通孵卵器内に培養して、培養基内の菌の發育の状態及びカビの進入の有無等を比較対照しつつ観察した。この際高湿度孵卵器内に自記湿度計、及び温度計を入れて孵卵器内の湿度、温度を昼夜にわたつて測定し、この孵卵器内の湿度、温度の変化を追求した。

実験成績

自記湿度計は培養開始は90%に保つたが培養基の出し入れ、水の補給に際し2%から4%の下降を示し、4日目以後は80~86%を記し9、10日目に90~88%を示した後は培養日数の増加と共にやや下降80~82%を保ち、3週間後に再び86~88%を記し、それ以後は81~83%の湿度であつた。自記温度計は多少の上下はあつたがほぼ恒温であつた。表は兩孵卵器に於ける培養日数と肉眼的コロニー発見の時期及び發育の程度を示している。この他に雑菌(カビ)の進入、凝固水の状態もあわせ観察したので、次の六項目に分けて実験成績を比較してみた。

- 1): 發育の時期(肉眼にてコロニー発見の時期)。
- 2): 増殖の速度、及び程度。
- 3): 一方に發育し、他方に發育を認めないもの。
- 4): 雑菌(カビ)の進入。
- 5): 凝固水の状態。
- 6): 發育増殖したコロニーの性状。

培養陽性度(+), 2(+), 3(+), 4(+))は厚生省結核菌培養指針によつた。以下湿性孵卵器内綿栓培養基群をAとし、普通孵卵器内ゴム栓培養基群をBで表わ

す。

1): 発育の時期について

第13例のAで14日目に培地上に(+)程度の結核菌集落を認めたが、Bでは16日目に同程度の集落を認めた。第16例ではAは16日目に(+), Bでは18日目に(+)であつた。第27例に於てはAで10日目に(+), Bでは16日目に(+)であつた。尚ゴム栓培養基群で湿性綿栓培養基群より早く集落を認めたものはなかつた。

2): 発育増殖の速度、及び程度

第1例では発育の時期は同時期であるが、Aでは21日目に3(+), 第5週には培養基全面にわたる4(+)を示すが、Bの場合21日目に2(+), 第8週で3(+にとゞまつている。第5例に於ても発育の時期は同時期であるが、Aでは第6週に2(+), Bは(+)程度であつた。第8例の場合も発育の時期は同様同時期で、第5週Aは4(+), Bは3(+であつた。第11例では、Aは第4週目(+), 第6週に2(+となるが、Bでは第4週目10コロニーを認め、第6週でも23コロニーに過ぎなかつた。この様に発育時期はほぼ同時期であるが、週を追つてAの方が速く、かつ広範囲に増殖を示している例は、この他に第13, 14, 16, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 33, 37, 42, 45, 46の各例である。即ちAでは増殖速く5乃至6週目で4(+)に達するが、Bではせいぜい3(+)にとゞまつている。(写真1, 2, 3 参照)

3): 一方に発育し他方に発育しなかつたもの

第4例の場合Aで第3週目に(+)程度の集落を認め、第5週には2(+となつた。しかるにBでは第8週に至るも集落を認めず(ー)の結果に終つた。第7例もAで第5週に25コロニーを認め、6週目に(+)となつたが、Bでは8週観察(ー)であつた。第19例Aでは6週目に3コロニーを認めたが、Bでは8週にても(ー)であつた。第36例Aでは3週目(+), 4週で2(+), 5週目3(+であつたが、Bでは8週観察(ー)であつた。第38例Aでは6週目に1コロニー、8週目に2コロニーを認めたが、Bでは8週(ー)であつた。尚Bに陽性、Aに陰性の例は1例も認められなかつた(写真4, 5 参照)。

4): 雑菌(カビ)の進入

第35例ではBにのみ16日目に雑菌を認めた。第31例はAでは3週目にBでは6週目に雑菌を認めた。第11例はBにのみ4週に雑菌進入、第46例はAにのみ4週目に雑菌を、又第25例でもAにのみ5週目に雑菌進入を認めた。第6例ではAに6週目に雑菌進入、第2, 8, 26, 27, 28, 29, 48, 49例のA各例に第8週で始

めて雑菌を認めた。6週以後の雑菌の進入は殆んど培養基の上部にのみ限られていた。

5): 凝固水について

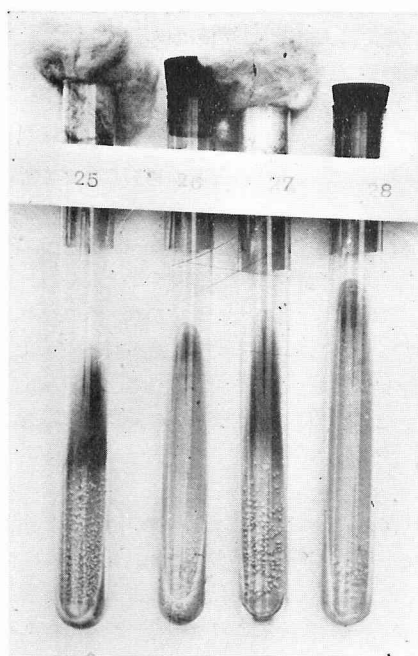
Aでは2週目頃より消失するが、B群例では漸次増量の傾向を示している。培養2週目頃凝固水が混濁したものA, B群に各1例ずつあつた。5週目頃は混濁例はB群でやゝ増加した。A群で培養陽性のものに併かに凝固水が認められた。A, B群共培養陰性のものに凝固水が消失している例が多かつた。

6): コロニーの性状について

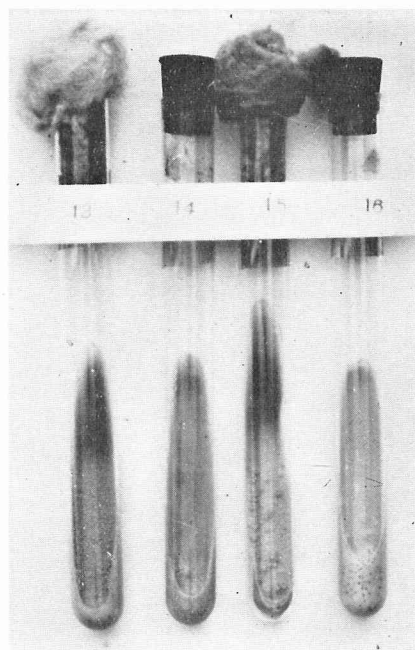
湿性綿栓培養基では、集落は培地の全面に平均して発育の傾向があり、乾燥して明瞭で、大きく、色は黄橙色で非常に見易い。これに反して普通ゴム栓培養基では前者に比して、より小さく、苔状に密集し、色は淡黄色で凝固水に浸されて見にくかつた。

総括及び考案

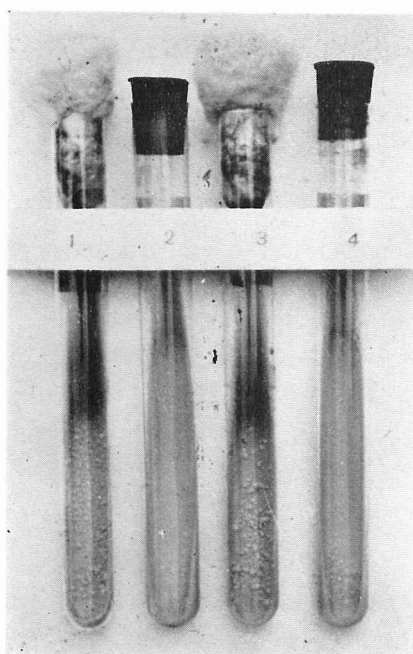
結核菌に酸素の供給は充分な事が必要で、海老名は人型結核菌に於ては酸素20%内外が発育に最適であり、この量は肺胞内の空気と似ているといふ、又戸田は中隔培養法で中隔内に H_2O_2 とチモナー株を入れ、徐々に酸素を放出させ常に20乃至30%の酸素の存在する培養環境で極めて良い発育増殖を得たと述べている。更に宇賀の研究によると、結核菌の酸素至適濃度は40~50%であるといつている。Novy及びSouleによると、密封せる試験管培養では1週間位で酸素は消費され、同時に発育は停止する。酸素の補給により再び発育を始める事を明らかにし、数回の酸素補給により、補給しないものと著しい相違のあること(組織中の結核菌の発育の緩徐なのは、酸素分圧の低いためと説明している)、即ち結核菌の良好なる発育にとつては培養試験管内に一定の酸素濃度のあること、更に一定の湿度が必要な事を実験的に明らかにし、且つ発育増殖の至適酸素濃度は40~50%であるといつている。但し試験管内至適湿度について明確な値を指摘したものはなく、私達実験の場合も試験管内湿度、及び酸素濃度を測定出来なかつたが、綿栓を通して酸素は供給され、しかも孵卵器内、即ち環境を高湿度恒温に保つ事により、一定湿度が与えられ菌の発育を促進し、培地の乾燥を防げ得たと思う。発育の時期については湿性綿栓培地の方が50例中3例に早期にコロニーを認めたが、他はすべて同時期であり、且早期といへ僅か2~3日の差で有意の優劣はつけられない。発育速度は湿性綿栓培地では酸素の供給が普通ゴム栓培地より、より充分なため速いものは4週、遅くても5~6週で培地全面をおう様に増殖する。更に集落の性状も大きく、乾燥して黄橙色で明瞭である。これに反し



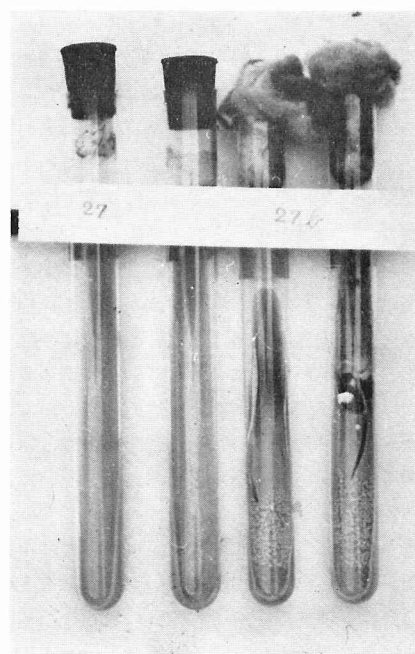
1



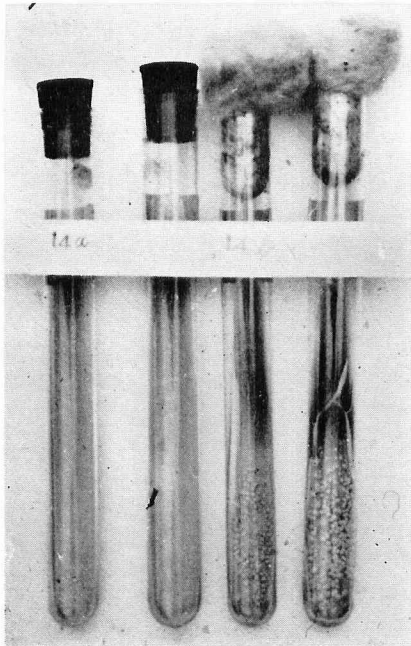
3



2



4



5

て普通ゴム栓培地の増殖速度は非常にゆるやかで、培地の $\frac{1}{2}$ 以下に密集して集落も小さく、凝固水に接して培地、コロニーともに湿潤し淡黄色で肉眼的に非常にみにくい。この場合8週目でもせいぜい3(+)が限度であつて、培地全面をおう発育程度のものは一例もなかつた。50例中24例陽性例があり、その中の5例に湿性綿栓培養で陽性、普通ゴム栓培養では陰性のものがあり、この反対例、即ち湿性綿栓培養陰性、普通ゴム栓培養陽性の例はなかつた。この様に菌量の少ない例に於て差が認められた事は、湿性綿栓培養の有利な点と思われる。雑菌(カビ)の進入はやはり湿性綿栓培養の方が圧倒的に多く、3週に1例、4週に2例、大多数は8週になり初めて認められたが、雑菌の進入は培地の上方で、しかも発育増殖程度は第6週と第8週では殆んど変化がみとめられていない。この結果から判明するごとく、培養基内の菌の発育に著しい悪影響をおよぼし判定に困難を感じるものは1例もなかつた。尚ゴム栓培養の場合も早期に雑菌進入の例は認められた。結局綿栓による空気の流通のために雑菌の進入は不利であるが、この程度はやむをえず、その為に判定に不便を感じる程の危惧はないと思う。凝固水は湿性綿栓培養では漸次消失の傾向を示し、環境を相当高湿度に保つにも拘らず、培地は乾燥してくる。

即ち培養上相当の湿度を補給する必要がある、私達実験の場合80~90%の環境の湿度で綿栓を通し適当な湿度が培地内にあたえられ、培地の乾燥亀裂による発育状態に悪影響はみられなかつた。これに反し普通ゴム栓培養では凝固水により下方が浸蝕され、時には混濁し成績の判定を困難にする事がある。これ等の事から普通ゴム栓培養基内は高湿度に過ぎるのではないだろうか。又普通ゴム栓培養で発育が培地の中央以下にのみ認められ、湿性綿栓培地の発育が培地全面に認められるのは、湿性綿栓培養の有利性によるものか、又は普通ゴム栓培地で蒸発した水分がゴム栓のため、試験管壁に沿つて下降し、移植した菌が同時に下降するためのものか、或は他の要素によつてこの様な状態になるのかこの点に関しては今後の実験に待ちたいと思ふ。

結 論

結核菌の培養に関しては、発育が出来るだけ早く、且増殖が良く又陽性率が大であり、実用的には何処の検査室に於ても容易に施行される方法である事が望ましい。私達はこの目的に沿うべく一新方法を試みた。それは水槽を下部に入れた孵卵器内で培養試験管を封ずるのに従来のゴム栓の代りに綿栓を用い、その口を封蠟せずに培養を行つた所、培養上必要と思われる一定の湿度と空気の補給を持続し得て、現在の培養法に対し、菌の増殖量、発育数、陽性率等に於て優る成績を得、且危惧されたカビ類も障害となり得ない事が判明した。この方法は今後更に改善される余地はあるが、現在のまゝでも上記の実用性に合致する有意の一新培養法であると考えらる。

参 考 文 献

- ①海老名・他:抗酸菌の発育に及ぼす瓦斯組成の影響. 結核, 15巻 1937
- ②宇賀:結核菌並びに数種抗酸性菌の酸素新陳代謝に就て. 実験医雑誌, 18巻 1934
- ③戸田:結核. 14巻 1936
- ④Novy and Soule: J. of Inf. Dis. Vol 36, 169 1925.