

結核菌の振盪培養に関する研究

—患者分離菌の増殖について—

昭和34年6月10日 受付

信州大学医学部戸塚内科教室 (指導: 戸塚忠政教授)

荒井 聖 二

Studies on Growth of Mycobacterium tuberculosis with Shaking Culture Method

— Stimulating Effect of Shaking to the Growth of Human Type Tubercle Bacilli Isolated from Patients —

Seiji Arai

Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Shinshu University
(Director: Prof. T. Tozuka)

緒 論

抗酸性菌の発育は一般の細菌に比較して遅く、培養に長時間を要する事は周知の事である。しかし近來培養法の進歩と共に次第に発育を促進せしめる事が可能となつて来ている。特に液体培地に於て酸素の供給を容易にする為に通気培養或は振盪培養を行う事により菌の発育を促進させ、Generation Time (以下 G. T.) を短縮させる事が試みられている。

しかし多くは非病原性の抗酸性菌の発育に留り、結核菌特に人型有毒菌の振盪培養についての報告は数が少く、Schaefer 等^①及び Kull 等^②の反対成績もあり、之に成功したのは Volk and Myrvik^③, Miller and Roessler^④等で、本邦に於ては青柳等^{⑤⑥}其の他 2・3 を数えるに過ぎない^{⑦⑧⑨}。

当教室に於ても既にこの振盪培養の将来性に着目して研究を進め、教室の員・勝又^⑩は初期の研究として培地中の酸素の問題と共に人型結核菌について、自作の振盪培養装置を用い、振盪培養が好成績を収めた事を報告し、更に戸塚等^⑪及び戸塚・著者等^⑫はこれを利用して臨床的に好成績をあげた事を報告した。

しかし乍ら現在までの所、主として分離后長期間継代保存された結核菌の振盪培養に関する報告が多く、未だ新鮮な患者分離株の振盪培養の可能性を検討した報告には接しない。新鮮な患者分離株の振盪培養が菌の増殖促進効果を示すか否かは、結核菌の早期培養、ひいては結核の早期治療或は薬剤耐性菌の早期検出という重要な問題に関聯するものであつて、臨床的な意義が極めて大きいと考えられる。著者はこの点を明らかにする目的で人型有毒結核菌の振盪培養を行い、諸研究者の行つた H₃₇Rv 株に対する発育促進効果は勿論、一般患者分離株に於ても明らかにその発育を促進

し得る成績を得たので報告する。

実験材料及び実験方法

使用菌株: 教室保存の人型結核菌 H₃₇Rv 及び患者分離株として、大和株、木戸株、三郎株、小林株、清水株を用いた。患者分離株は何れも喀痰中より小川培地に分離培養したもので、実験に當つて小川培地より Dubos 培地に移殖し一週間振盪培養し、均等に発育せしめたものを用いた。

培地: 培地は Dubos 液体培地 (榮研) を用いた。

処方は次の通りである。

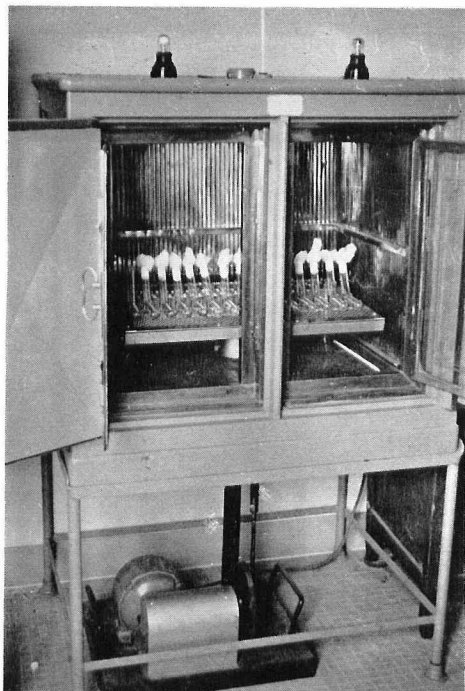
硫 酸 亜 鉛	0.0001g
硫 酸 銅	0.0001g
塩 化 カ ル シ ウ ム	0.0005g
マ ラ カ イ ト グ リ ー ン	0.002g
ク エ ン 酸 鉄 ア ン モ ニ ウ ム	0.01g
硫 酸 マ グ ネ シ ウ ム	0.1g
ポリソルベート (Tween 80)	0.5g
磷 酸 二 水 素 カ リ ウ ム	1.3g
ア ス パ ラ ギ ン	2.0g
磷 酸 ナ ト リ ウ ム	2.2g
ペ プ ト ン “ 榮 研 ”	5.2g
計	11.3127g

以上の 11.3g を蒸留水にて 900ml とし、これに更に Tween 80 を 0.5% の割合に加えて高圧滅菌器にて 120°C、15 分間滅菌后、5% 血清アルブミン (Fraction V) を 100ml の割合に加えた。

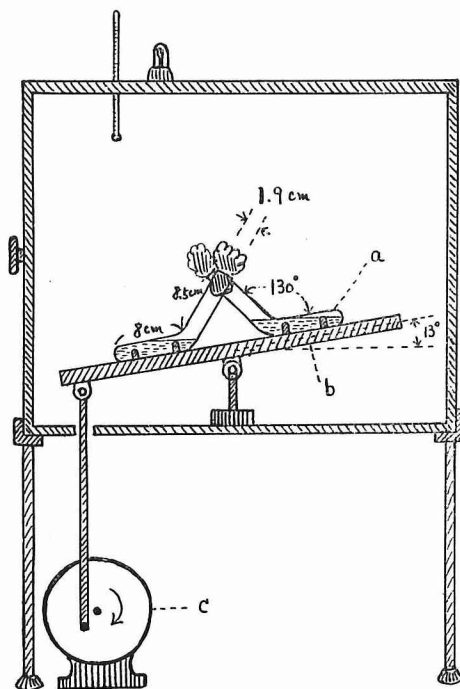
予備実験として上記の処方に Tween 80 を添加しない培地を用いて実験を繰り返したが、時により結核菌が粗大粒子状になり発育せず、0.5% が適当である事が判明したので上記の Tween 80 の量とした。尚実験により Albumin を加えない場合は上記組成をそのまま用いた。

培養: 培養には島津 AKA 光電比濁計の比濁用セル

写真



振盪装置側面図



a: L型試験管 b: 振盪台 c: モーター

と同質のガラスで特別に製作した別図の如きL型試験管を用い、之に上記培地を9ml入れ一週間振盪培養の菌液を1ml宛接種し、孵卵器内の振盪装置に液面を水平にとりつけ、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ にて7日間振盪し乍ら培養した。振盪装置は写真及び略図に示す如く、当教室で考案したもので、1分間に30回の振盪を持ち、水平面に対して 13° 上・下運動を行う。

観察：菌の発育は日数を追つて、島津AKA光電比濁計にL型試験管をそのまま差し込み、濁度標準管No.5をStandardとし、FilterなしでそのOptical Density (以下O. D.)を測定、計算した。

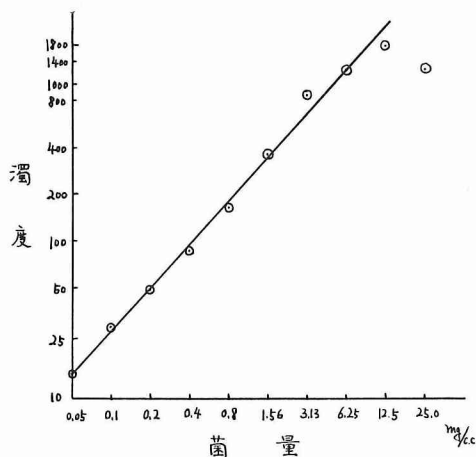
同様に接種した対照を静置のまま前者と同一条件の下に培養し、両者の発育を比較した。

実験成績

1) O. D. と菌数との関係

著者は以下の実験で主として比濁計の濁度で成績を表わしたが、その濁度は島津の濁度標準管No.5を100として表わしたものである。これと菌数との関係は「図1」に示す如く、菌数とO. D.とは直線的に比例するが、O. D.が1500を越えると菌数は多くともO. D.はそれに比例して多くはならない。この理由として、比濁計はその性質上一定程度以上に混濁が増加するとチンダル現象が起らず、見かけ上O. D.が落ちて

図1. 濁度と菌量との関係



来る事が知られている

実験上O. D.が1500乃至はそれ以上になると誤差が大きくなる事が判明したので、以下の実験では一部これ以上は測定しない場合もある。

2) 振盪培養と静置培養の増殖

人型結核菌 H₃₇Rv 及び新鮮な患者分離株が振盪培

養により菌の増殖が起るか否かを調べた成績は「図2」及び「3」に示す如くである。

患者分離株の木戸株は喀痰より分離培養したもので、SM, PAS, INAH 等の抗結核剤に対しすべて感受性である。

夫々5本の試験管を用い、その平均値で図示した。

図2. 振盪培養と静置培養の比較 (H₈₇Rv)

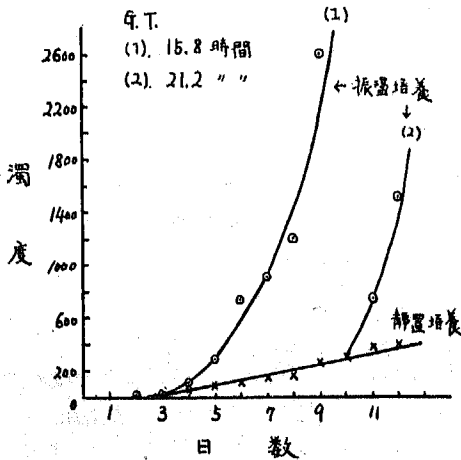
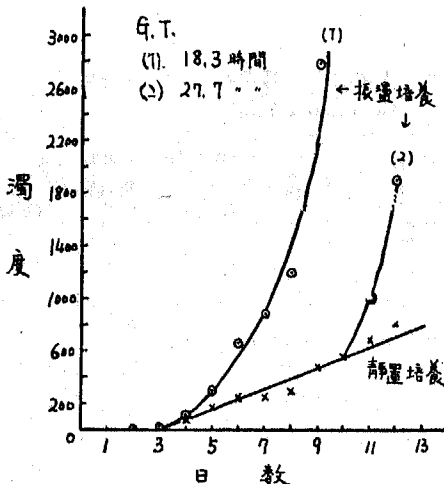


図3. 振盪培養と静置培養の比較 (患者分離株 木戸株)



接種菌量が以下の実験に於ける場合と比較して少なかった為に、2日後までは O. D. の増加は著明でなく、振盪培養に於ては3日目以後、O. D. が50を過ぎる頃から急激に発育が増加し、数日で比濁計の発育測定不能の点に達し、所謂対数的発育を示すのに対し、

静置培養では12日後まで測定したが、O. D. の増加は緩やかで、所謂算術的発育を示す。

静置培養の5本の中3本をとつて10日後に振盪培養を行つた所、直ちに対数的増殖を始め2日間で測定不能の状態に達した。

この振盪培養(1)及び(2)の Generation Time を求めると、夫々15.8時間と21.2時間となり、静置培養の36.6時間に比しかかなりの G. T. の短縮を見た。

患者分離株の木戸株に於ても全く同様の成績で、始めは H₈₇Rv と同様に接種菌量が少なかった為、2日後迄は O. D. の増加は著明でなく、3日後以後から急激な増殖を示し対数的発育をする。静置培養では H₈₇Rv のそれよりも発育は良好ではあるが、振盪培養に比し O. D. の増加は緩やかである。振盪培養(1)及び(2)の G. T. は夫々18.3時間と27.7時間であるのに対し、静置培養では30.6時間となり、患者分離株に於ても振盪培養により、急速に菌の増殖を示し G. T. の短縮が得られる事を認めた。

3) Albumin の存在の有無と O. D. との関係

次に Albumin の存在が O. D. にどの様に影響を及ぼすかについては「図4」に示す如く、H₈₇Rv 株に於て Albumin の存在は確かに菌の発育を維持するのに必要ではあるが、Albumin がなくても発育する事が可能である事を認めた。しかし振盪培養に於て Albumin を加えたものと、加えないものとの G. T. を求めると夫々12.7時間と23.3時間となり、Albumin を加えない場合の菌の増殖は、それを加えた場合に比し稍劣る結果を得た。之を参考として、以後は Albumin を添加して実験を行つた。

4) 患者分離株についての振盪培養

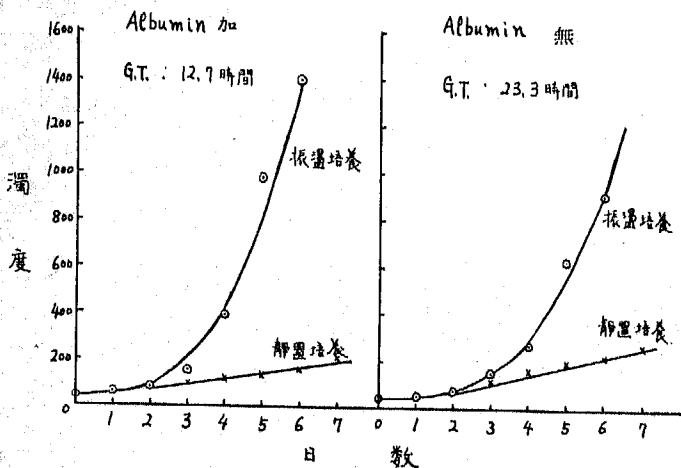
次に新鮮な患者分離株を使用し、之を振盪培養及び静置培養して、臨床的応用の可能性を検討した。成績は「表1」及び「図5」に示す。

患者分離株は何れも喀痰中より小川培地で分離培養されたもので、小川培地に1ヶ月発育した菌を Dubos 培地に接種し、1週間振盪培養して得られた均等菌液を、培養前の O. D. が50前後になる様に接種し、比濁計でその発育を観察した。

菌によりその発育開始時期に遅速があるが、2日乃至は3日後より急速に O. D. が増加し、発育の良好な場合は5日後(小林, 大和, 清水株)、遅くも7日乃至は8日後には既に比濁計の測定不能の域にまで増殖する。

この場合接種時の菌量に影響する事が多く、三郎株は少い菌量(O. D. にて15.9)を接種した場合で、2日後までは O. D. の増加は著明でないが、3日後(O. D. 181)以後は急速に O. D. が増加し logarithmic に

図4. Albuminの存在の有無とO. D.との関係 (H₃₇Rv)



増殖を見、以後は logarithmic な発育をなし、何れの場合に於ても O. D. が100を越えると急激に O. D. が増加する。しかし最初に小川培地からDubos培地に接種する際、充分注意して菌塊を均等に懸濁して接種しないと其の代の発育がよくない。しかしこの場合特に乳鉢にて均等化するような事をする必要はなかつた。

5) 振盪培養に於ける Generation Time (G. T.)

G. T. の計算には次の式^①を用いた。

$$K = \frac{\log b - \log a}{t}$$

$$G. T. = \frac{\log 2}{K}$$

t = 時間

a = 観察開始時の O. D.

b = t 時間後の O. D.

表1. 患者分離株に於けるOptical Density 大和株

装置時	1	2	3	4	5	6
振盪培養	26.9	106	287.5	900	1525	1675
静置培養	32.1	66.7	100	137.5	192.5	241

三邨株

装置時	1	2	3	4	5	6
振盪培養	15.9	57.2	78.2	181	405	820
静置培養	15.9	43.8	61.0	116.5	161	210

小林株

装置時	1	2	3	4	5	6
振盪培養	39.8	142	437.5	1181	1725	1800
静置培養	42.3	100	182.5	268.5	335	412.5

清水株

装置時	1	2	3	4	5	6
振盪培養	56	145	322	620	1100	1688
静置培養	59	100	193	315	463	569

H₃₇Rv 株及び患者分離株の振盪培養及び静置培養に於ける G. T. を求めると「表2」に示す如くて、H₃₇Rv の異つた時期の実験3回について G. T. を求めると夫々18.1, 17.3, 15.8時間、平均17.1時間となり、又同一時期の同一条件の下に於ける静置培養の G. T. は夫々90.0, 47.0, 36.6時間、平均57.9時間であり、振盪により G. T. の著しい短縮を得た。

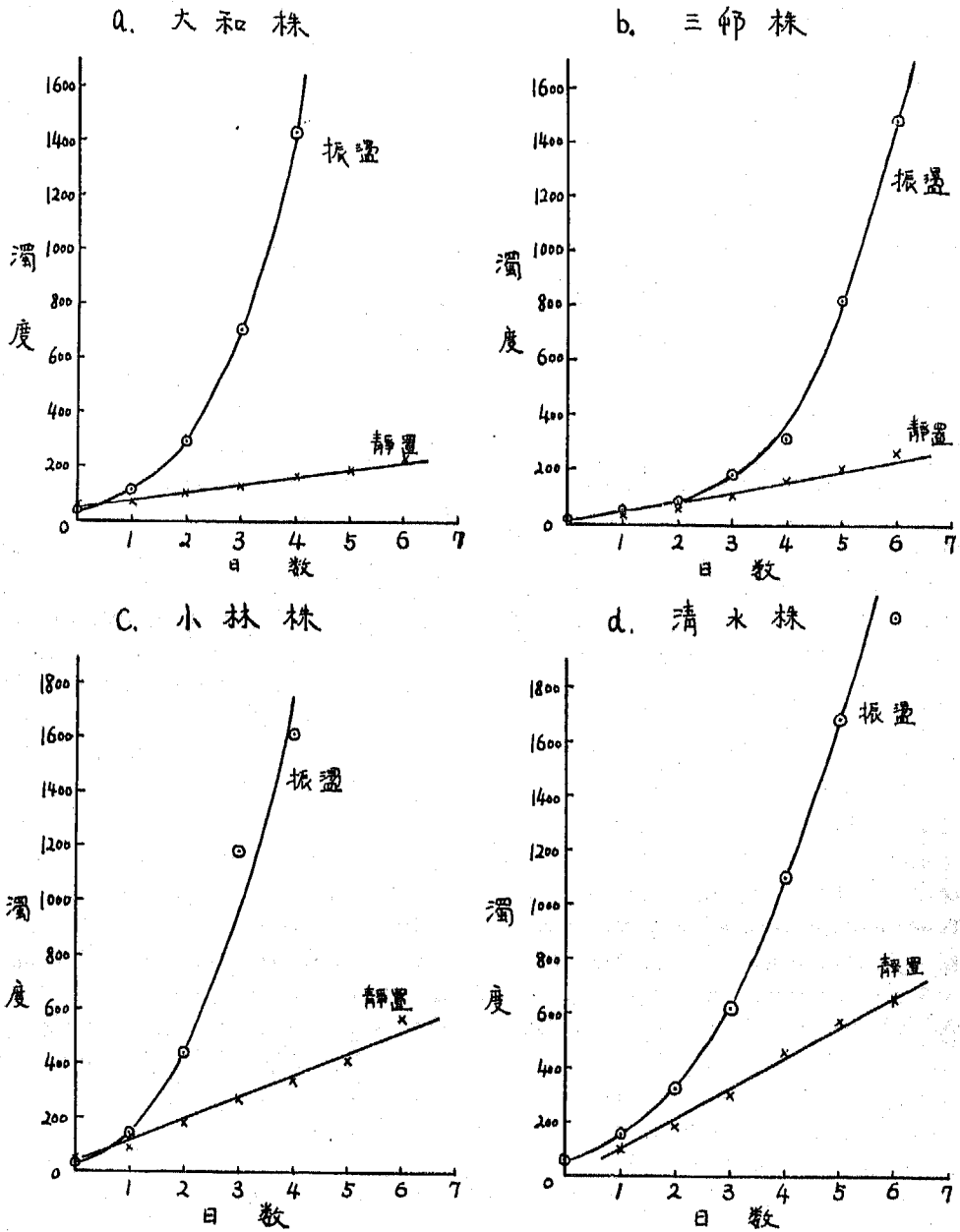
表2. 人型結核菌 H₃₇Rv 及び患者分離株の Generation Time

	Generation Time	
	振盪培養 (時間)	静置培養 (時間)
H ₃₇ Rv	18.1	90.0
"	17.3	47.0
"	15.8	36.6
	平均 17.1	平均 57.9
大和	18.7	55.2
小林	20.0	40.8
三邨	20.8	37.2
清水	24.6	37.9
木戸	18.3	30.6

発育する。又比較的接種菌量の多い大和株 (O. D. 26.9), 小林株 (O. D. 39.8), 清水株 (O. D. 56) にては1日後既に O. D. は夫々106, 142, 145と急激な

又患者分離株の振盪培養に於ける G. T. は、大和株18.7, 小林株20.0, 三邨株21.2及び20.3 (平均20.8), 清水株24.6, 木戸株18.3時間で、同一条件下に於ける静置培養の G. T. の夫々55.2, 40.8, 37.2, 37.9, 30.6時間に比較してかなりの G. T. の短縮を見た。

図 5. 患者分離株による振盪培養と静置培養の比較



考 察

Dubos 等⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾によつて抗酸性菌の培養に Tween 80が利用されて以来、抗酸性菌の液体培養は容易になり、且つ血清アルブミンを添加する事により、極く微量の菌を接種しても迅速に發育を促進させる事が認められて来た。

更に Tween 80 を加えた培地を振盪したり通気を

行つて、培地に酸素の供給を容易にする事により、抗酸性菌の發育をより一層促進させる事が出来るという事は多くの学者によつて試みられている⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽²⁰⁾。

その結果、Fischer 等⁽¹⁶⁾は抗酸性菌で振盪培養は静置培養に比し良好な成績が得られなかつたとし、Schaefer 等⁽¹⁾或は Kull and Grimm⁽²⁾は菌の凝集が起つて増殖が著明でなかつたと報告しているが、Volk

and Myrvik^③, Miller and Roessler^④は人型結核菌で振盪培養は静置培養に比し著明に菌の増殖が見られ、G. T. の短縮が得られたと報告している。

本邦に於ても青柳・水野^⑤, 川村・河合^{⑦⑧}及び土屋^⑨も人型結核菌で振盪培養の発育促進効果を認めている。著者等^{⑩⑪⑫}も又 H₃₇Rv 株を用い、振盪により培地中の酸素供給量を増加し、菌の発育を促進し得たので、之を利用して臨床的に患者喀痰中から結核菌を早期に培養し得ることを認め、振盪培養が菌の早期検出法として役立つ事を報告した。

以上の中多くの報告は主として人型結核菌の継代保存株を用いた実験が多く、新鮮な患者分離株を用いたものは殆どない。

本邦に於ては Monod 式振盪培養装置^⑬で逆 T 字型試験管を使用している所が多いが、教室の奥・勝又^⑭はワールブルグ検圧計の振盪装置を利用しかなり好成績を収めた。その後この振盪装置に種々検討を加え、新たに孵卵器内に振盪装置をとりつけ、水平面に対して13度上・下に運動し、振盪数は1分間に30回の比較的遅い速度で振盪する如くにし、Dubos 培地に1週間振盪培養した菌を用いる事により充分所期の目的に適する発育を得る事を認めた。

振盪培養に於ては種々の因子、即ち培地の組成及びその量乃至は表面積、又は振盪回数、試験管の型或は表面張力の問題等が関係し、その時の振盪条件に影響される事が多く、Schaefer 等^①及び Kull 等^②が振盪培養に成功しなかつた事に対し、土屋^⑨は Tween 80 の量が少なかつた為ではなからうかとしているが、之は Tween 80 の量のみの問題でなく、Miller 等^④が指摘している如く、Schaefer 等及び Kull 等の振盪回数は早過ぎたのではなからうかと思われる。

尚接種菌量の問題も之に関係するが、結核菌の静置培養に於て今村^⑮は接種菌量が少なくなるにつれてその誘導期は延長するが、log-phase 及び arithmetic linear growth phase に於ける発育速度はかわりない事を述べている。著者は接種時の O. D. をほぼ一定させて培養した為、振盪培養に於ては2日后から著明な増殖を示している。しかし三郎株の如く発育開始時の O. D. が少なかつた場合 (O. D. 15.9, 菌量 0.08mg/cc) は菌量の多い場合に比較して対数上昇期に入るのに約1日の遅延が見られた。菌量については著者は「図1」に示す如く O. D. と菌量とを対応させて考えたが、Fenner 等^{⑯⑰}, 草間^⑱及び土屋^⑨も示している如く O. D. と菌量とはほぼ一致していると考えてよいものと思う。著者の発育開始の際の菌量は 0.2mg/cc 前後であつた。

尚著者の L 型試験管は特別な型で角度がゆるく、逆 T 字型に比べて洗滌に便利であり、発育促進効果も逆 T 字型試験管の場合と比較して遜色がない結果を示しているが、之が G. T. の短縮に最も適切であるか否かは今後の検討に待たねばならない。

Schaefer 等^①及び Kull 等^②は 0.02~0.05% の Tween 80 を含む培地で振盪培養を行つた所、菌の凝集が起つた事を報告し、又土屋^⑨も Tween 80 の量が 0.02% 及び 0.25% では凝集が強く、O. D. の増加は極めて徐々である事を報告しているが、著者も同様な事実に気づき Tween 80 を 0.5% として H₃₇Rv 及び患者分離株について充分なる菌の発育を得る事が出来た。Miller 等^④は Tween 80 を 0.05% に含む培地にて振盪培養に成功している。又土屋^⑨は H₃₇Rv で特に 0.02% Tween-Albumin 培地の振盪培養で発育し得る特殊な系列を得た事を報告している。この様に Tween 80 の要求は菌株により差異があるにせよ本報に示した如く、一般的には小川培地より Dubos 培地に接種する際、充分に菌塊を均等化し、更に充分な菌量を接種するならば 0.5% Tween-Albumin 培地で振盪培養による発育促進効果は明らかに認められる。

Albumin の存否による菌増殖への影響について、土屋^⑨は結核菌の速かなる増殖を行わせるには Albumin は不可欠であると云い、又 Miller 等^④は Albumin を含まない培地では之を含む培地より発育が悪い事を報告している。之に対し青柳等^⑤及び川村等^⑥は Albumin を含まない培地にも O. D. の増加を認めたと報告している。著者も Albumin を含まない培地の振盪培養に於て、O. D. の増加を認めただけはあるが、しかし O. D. の増加の度は Albumin を加えた培地のそれよりも緩やかであり、G. T. に於ても同一条件下に求めると前者の 23.3 時間に比し、後者は 12.7 時間で Albumin を加えない培地に於ける菌の発育は稍劣るようであつた。

Halpern 等^⑳は振盪による酸素の供給の増大する事により、その logarithmic phase の延長と G. T. を短縮し得る事を述べ、又土屋^⑨も同様の事を認めている。Miller 等^④は人型菌に於て G. T. は 17.8 時間、土屋は 22.8 時間と云い、何れも G. T. の短縮を認め、著者も H₃₇Rv に於て最短 15.8 時間、最長 18.1 時間、患者分離株にては最短は木戸株の 18.3 時間、最長は清水株の 24.6 時間で他の報告者の成績と比べて何等遜色がなく、患者分離株にても略同様に良好の成績を収めた。

以上述べ来た如く、患者分離株に於ても振盪培養により速かなる発育、増殖を認め、之を利用して結核

菌の早期培養による早期診断, ひいては結核の早期治療或は薬剤耐性菌の早期検出に大いに役立たせる事が可能であると思われる。

結 語

小川培地に継代培養した人型結核菌 $H_{87}Rv$ 及び小川培地で分離培養した患者分離株を, 特殊 L 型試験管内の Tween-Albumin 培地に接種し, 教室で考案した振盪装置により毎分30回, 振盪角度13度で振盪培養を行い, 次の結果を得た

1) 振盪培養では静置培養に比し著明に logarithmic phase が延長し, 且つ Generation Time も短縮した。

2) 人型結核菌 $H_{87}Rv$ 株の Generation Time は最短15.8時間, 最長18.1時間で平均17.1時間, 患者分離株では木戸株18.3, 大和株18.7, 小林株20.0, 三郎株20.8, 清水株24.6時間であつた。

本論文の一部は第55回日本内科学会に於て報告した。

稿を終るに当り御懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師戸塚忠政教授に深く感謝致します。

文 献

- ①Schaefer, W. B. et al: J. Bact., 58; 549, 1949.
 ②Kull, F. C. and Grimm, M. R.: J. Bact., 64; 431, 1952. ③Volk, W. A. and Myrvik, Q. N.: J. Bact., 66; 386, 1953. ④Miller, I. L. and
 Roessler, W. G.: Am. Rev. Tuberc., 73; 716, 1956. ⑤青柳高明・水野伝一: 日本細菌誌, 11; 629, 1956. ⑥青柳高明・水野伝一: 日本細菌誌, 12; 819, 1957. ⑦川村 達・河合 道: 国立公衆衛生院研究報告, 5; 16, 昭和31年. ⑧川村 達・河合 道: 日本細菌誌, 12; 561, 1957. ⑨土屋皖司: 日本細菌誌, 14; 24, 1959. ⑩呉 真一・勝又昭司: 日内会誌, 46; 771, 1957. ⑪戸塚忠政・他: 日本医事新報, 1740; 42, 1957. ⑫戸塚忠政・荒井聖二・他: 日内会誌, 47; 433, 1958. ⑬Dubos, R. J. et al: Am. Rev. Tuberc., 54; 204, 1946. ⑭Dubos, R. J. and Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 56; 334, 1947. ⑮Dubos, R. J.: J. Exper. Med., 97; 377, 1953. ⑯Cohn, M. L.: Am. Rev. Tuberc., 49; 463, 1944. ⑰Kempner, W.: Am. Rev. Tuberc., 40; 157, 1939. ⑱Fischer, M. W. et al: J. Bact., 62; 319, 1951. ⑲松村剛・青柳高明・他: 化学の領域, 10; 65, 昭和31年. ⑳今村邦雄: 結核, 33; 99, 昭和33年. ㉑Fenner, F. and Leach, R. H.: Am. Rev. Tuberc., 68; 321, 1953. ㉒Fenner, F. and Leach, R. H.: Am. Rev. Tuberc., 68; 342, 1953. ㉓草間久子: 結核, 33; 185, 昭和33年. ㉔Halpern, B. and Kirchheimer, W. F.: Am. Rev. Tuberc., 70; 665, 1954.