

固型培地を使用する結核菌の臓器定量培養法における表面培養と深部培養の比較研究

京都大学結核研究所第2部（主任 教授 辻 周介）
京 都 府 立 洛 東 病 院（院長 京大名誉教授 岩井孝義）
市 田 新 路

（昭和34年6月25日受付）

I 緒 言

先に行つた研究において、著者¹⁾は家兎の皮下に接種された結核菌の局所における増殖を検討する事により、菌の病原性を解析しようと試みた。この際、病理組織学的に認めうる細胞内への菌の夥しい集積が、果して接種された菌の細胞内増殖によるものか否かを検討する目的で、菌接種局所の定量培養法を行なつた。この実験成績によれば、細胞内抗酸菌の増加と期を一にして、組織培養によつても局所における生菌数の増加を認める事が出来た。然し培養基上に算定された生菌数の増加は、顕微鏡下に認められた抗酸菌の数に比べればなお幾分不十分な成績で、菌の培養にあたり生じたコロニー数が果して培養当初の生菌数を意味するか否かが疑問であると考えた。即ち菌は培養当初に互いに凝集し、これによつて作られた菌集塊が発育してその後培養基上に1個のコロニーとして認められる可能性がある。この点は、すでに Yegian²⁾等により指摘された所であるから、著者もこの点を取り挙げて、先に行つた臓器定量培養の手技に関する再検討を行つた。

II 実験材料並びに方法

体重 2.5 kg 程度の白色健康家兎を使用し、夫々その10カ所を選んで皮下に鳥型菌 4121株の各 1 mg を、先の論文において報告した方法に従つて接種した。注射直後、1, 2, 4, 8, 11, 15日及び3, 6, 10週の後に於いて、接種局所の皮下組織を採取し、乳鉢にて海砂と共に充分に磨碎し、それを Dubos の tween albumin 培地で段階希釈し、得られた組織の均等

浮游液を次のように培養基に注入した。その1は固形培地での表面培養で、1%小川培地の斜面に上述組織浮游液の 0.1 cc を注入し、その培地斜面を水平に位置して孵卵器内に一昼夜静置した後、直立して4週間の培養を行つた。他の培養基は Yegian によつて指摘されている Dubos の albumin 寒天培地である。直径9cmのシャーレに前記組織均等浮游液の 0.1 cc を注入し、予め作成した Dubos の albumin 寒天培地を注入してよく組織浮游液と混和した後、室温にてこれを凝固させ、ビニールの袋に収めて 37°C で培養する。この場合 Dubos の寒天培地は使用直前に albumin を加えるように注意した。この培地におけるコロニーの発育はすでに10日目において明らかになり、コロニー数算定が出来るようになるが、念のため4週間培養して小川培地と比較した。

III 実験成績

動物に接種した菌液の生菌数を算定する為に、これを前記の小川及び Dubos の培地に培養した成績は第1表の如くである。菌液の生菌数は $3 \sim 5 \times 10^8 / \text{cc}$ を示しており、高濃度の菌液の培養では培養成績は Dubos 培地における

第1表 接種菌液の生菌数

稀釈倍数 培地の種類	10 ⁸ 10 ⁷ 10 ⁶ 10 ⁵ 10 ⁴				
	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
Dubos 培地	0	5	36	353	∞
小川培地	0	3	14	54	∞

注 上記数字は、稀釈菌液 0.1 cc 中より得たコロニー数を示す。

第2表 鳥型結核菌4121株接種局所家兎皮下網状織及び皮下結節壊死部における生菌数の消長

家兎 番号	培地 種類	組織の 稀釈 数	注射 直後	1 日	2	4	8	11	15	3 週	6	10
3	Dubos	10^7		0	0	0	1	0	(結節) 0	(結節) 0	(結節)	(結節)
		10^6		0	0	2	2	1	1	0	3	
		10^5		0	0	14	27	30	34	4	9	0
		10^4		8	13	154	313	286	0 340	6 14	116	1
		10^3				∞	∞	∞	0 ∞	52 93	27 ∞	13
		10^2						0		∞	131	145
	小 川	10^7		0	0	0	0	0		0		
		10^6		0	0	1	1	0	2	0	0	
		10^5		4	1	9	24	8	20	1	3	
		10^4		8	12	73	138	86	0 130	7	36	
		10^3				∞	∞	∞	0 ∞	24 44	9 ∞	
		10^2								50	∞	
4	Dubos	10^7	0	0	0	0	0	0	0	1		
		10^6	0	1	1	1	3	1	3	9	0	
		10^5	8	3	2	13	23	6	36	54	9	
		10^4	83	48	41	164	289	70	0 261	0 ∞	82	
		10^3	800			∞	∞	∞	0 ∞	1	∞	
		10^2						0		5		
	小 川	10^7	0	0	0	0	0	0	0	0		
		10^6	0	0	0	0	1	0	1	4	1	
		10^5	5	2	2	10	17	4	12	27	6	
		10^4	5	29	18	51	85	18	0 不明	0 ∞	59	
		10^3				∞	∞	∞	0 ∞	0	∞	
		10^2						3		1		

註 上記数字は、資料 0.1 cc より得たコロニー数を示す。

菌数が小川培地のそれに勝っている。定量培養の成績は第2表に示した如くである。表には4週間培養の判定成績が示されている。表に明らかなように菌は第1例においては接種後次第に増加して8日後に最高値に達し、以後次第に減少するが、接種後6週に至り再び増加の傾向を示している。他の動物においても殆んど同様の成績で、接種後8日目に最大の菌数を示しているが、菌の増加は第1例におけるほど著しいものではなかつた。菌の増加は、第1例においては接種後1日目に比し8日目には約100倍に達するが、第2例では10倍の order の菌数を示すにとどまつている。Dubos 培地と小川培地との成績を比較すると、高稀釈浮游液において発生したコロニー数は殆んど同様であるにかかわらず、低稀釈浮游液では小川培地より

Dubos の培地において数倍に及ぶ菌数が算定された。菌接種後15日以後においては、接種局所の病変として結節形成が著明である。それ故にこれを結節中心部と周囲の網状織とに分つて定量培養を行つたが、結節周囲網状織における菌数は日を追つて次第に増加の傾向を示しており、この成績でも Dubos 培地と小川培地との間に先に述べたような菌数の差が認められた。

IV 総括並びに考按

Dubos や Middlebrook³⁾ は、結核菌を培養するに当り、albumin と tween とを培地に添加する事が、菌の均等培養に好都合である事を発見した。Yegian²⁾ 等はこの方法を平板培養に應用して、固形培地における深部培養を志

し、これによつて菌の良好な発育をえたのみでなく、同じ菌浮游液よりえたコロニー数がその表面培養よりも多数である事を発見した。かくの如く深部培養によつて表面培養よりも多数の菌数をえる原因として、表面培養においては菌が凝集して菌塊を作り、多数の菌より一つのコロニーの発生する可能性の多い事によるものと推論している。著者はこの点に留意して、臓器の定量培養においてもかかる固形培地における深部培養が、従来行なわれて来た表面培養に比してどの程度の利点を有するかに関して検討を加えておく必要がある事に想達した。かくして行なつた上記の実験結果では、予期した如く Dubso の深部培地においては、従来著者の使用した小川培地におけるより多数の菌数を検出し得たのである。然し Dubos と小川培地との差は、菌の濃度の高い場合に著明であり、十分に稀釈された菌液では培地による差異が殆んど認められなかつた。従つて従来小川培地でなされて来た著者の実験は、組織浮游液の稀釈が充分なされており、これによつて得た成績は充分信頼のおけるものである事が今回の実験でも明らかにされたのである。定量培養における実験はこの意味で組織の均等浮游液の段階稀釈を充分に行い、稀薄な菌数での定量培養成績がえられるように注意を払う必要がある。

V 結 論

著者は家兎の皮下に鳥型菌を接種し、その後経時的に局所を採取し小川培地及び Dubos の

albumin 寒天培地の両者によつて、同時に菌の培養を行つてその成績を比較した。

1) 臓器の定量培養に当つては臓器の均等浮游液を十分に稀釈して、菌数の少ない稀釈液での培養成績を判定規準にするがよい。

2) 菌数の多い低稀釈濃度での定量培養は、深部培養の成績が表面培養の成績に勝っている。

3) 家兎皮下に接種された菌の推移に関する成績は、先に報ぜられたものと同様である。即ち注射後次第に増加し8日目前後に最大値となり以後次第に減少する。

文 献

- 1) 市田新路：家兎皮下組織における結核菌の増減を指標とした結核免疫の研究 第1報 皮下接種局所における組織反応と結核菌（結核性皮下炎症の病理組織学的研究），第2報 皮下接種局所における結核菌の消長（結核性皮下炎症の細菌学的研究），第3報 感作後のツベルクリン反応及び沈降抗体の推移（結核性皮下炎症の免疫血清学的研究），京結紀要，7，（3増1），291（昭和34）。
- 2) Yegian, D. & Budd, V. : The Growth of Enumeration of Mycobacteria in Transparent Agar Medium, Am. Rev. Tuberc., 64, 81 (1951).
- 3) Dubos, R. J. & Middlebrook, G. : Media for Tubercle Bacilli, Am. Rev. Tuberc., 56, 334 (1947).