結核菌の一新培養法とその應用 (續報)

喀痰中の結核菌の培養について

水 野 傳 二

京都大學醫學部微生物學教室 (主任 木村廉教授)

[受付: 5月30日, 1949年]

今回は、既報⁽¹⁾の培養法を特に喀痰中の結核菌について試みた結果を簡単に報告する。

I 培 養 試 験

(1) 試験方法 供試した喀痰は本學醫院隔離病舎における肺結核患者の早朝に喀出せるものである。直接塗抹染色標本においてガフキーⅢ~Ⅳ號のもの4例を使用した。いずれも喀出後直ちに

特にアルカリ法(ペトロフ法⁽²⁾)によつて集菌法を行つた。アルカリ法の利點は第Ⅲ節でのべる。

集菌後の菌材料は各5~10枚宛の被覆硝子に1小白金耳宛直接塗抹し、前同同様ギルヒナー培液にて培養した(培養操作は既報⁽¹⁾参照)。

染色には一定期間培養後、發育せる集落を被覆硝子と共に剝離し、これにチ・ネ・法を施した。

(2) 培養成績(附圖I参照) 培養2日間にし

て既に約半数例において小集落が認められる。この集落は2~10個前後の菌體からなり、種々の夾雜物に比べてやや強く光線を屈折し、個々の菌體

の特異の配列によつて一見枯れた樹枝を束ねたごとき像を呈している。以後かゝる集落を假に菌束という。この菌束の大部分は液膜内に見られ、時に液膜外周邊部の培液内にも見られる。個々の菌體を見ると菌束の尖端~周邊部において一般に長く(3~6 μ 前後)、桿菌狀又は乳頭狀をなし、多くは眞直であるが多少にかゝらず屈曲ないし彎

* Denji MIZUNO: A new culture method of tubercle bacillus and its application. Cultivation of tubercle bacillus in sputa. Japan J. Bact., 4(3): 123-126, 1949.

曲しているものもある。これらは一般に菌束の長軸と種々の角度をなしている。菌束の中心部においては個々の菌體は明らかに短く (3μ 以下)、しかも多くは並行狀に密に配列している爲に、それらの個々を區別することは容易ではない。又これらの菌體の間に大小様々の球狀形、又は乳頭形の見られるものもある。

培養 3 日間では、前述の如き菌束がいずれの培養器にも見られる。一般に夾雜物の濃厚な部に多い。それらの数は全視野に 5~6 個より各視野に 1~5 個の割に見られる。大きさも種々で、2~5 個の菌體よりなるものから 30~40 個よりなると思われるものまである。一般に夾雜物の中にあるものよりも液中のものがより大きく、液膜表面に浮遊せるものが更に大きい。多くは個々散在性に見られるが、2~3 個の菌束が交叉して不規則な像を呈しているものもある。多くは菌束の一部において多少にかゝらず屈曲ないし彎曲している。又全體として分岐狀をなすものも多い。菌束内における個々の菌體の配列は前日のものに準ずる。この場合菌束の中心部の個々の菌體は並行狀に、更に密に配列している。又側面より突出せる菌體ないし菌體の一部、又はこれらの集束よりなる分岐は菌束の先端の方に向くものが多い。

培養 4 日間では菌束は更に多くなり、大きさも種々で、培養 2~3 日間程度のものから長さ 40μ 位、中央部の幅 $3\sim 4\mu$ 位に達するものも見られる。これらの菌束は全體として不規則に分岐彎曲せる索狀を呈している。

培養 5 日間では更に大きな菌束が見られ、長さ $30\sim 40\mu$ 前後、中央部の幅 $3\sim 4\mu$ のものが最も多く、全長 60μ に達するものも見られる。しかし、いずれの培養器にも前日の所見に比べて、それらの数は殆んど増していない。又 10 箇以下の菌體よりなる小菌束は殆んど見られない。

培養 6 日間では個々の菌束は更に大きい。しかも前日と同様に、10 箇以下の菌體からなる所の小菌束は殆んど見られない。又菌束は前日の數に比べて依然として増していない。

培養 7 日間では長さ $50\sim 100\mu$ 位のものが多く、大きなものでは $50\sim 60\mu$ 平方、或いはそれに準ずる大きさの面積を占めている。しかし前日

と同様に、10 箇以下の菌體からなる小菌束は殆んど見られない。前日の彎曲又は分岐の像が更に多く見られる。そして彎曲の度は更に強くなり、菌束の一部が圓形に近くなり、或いは既に交叉し又は不規則な間隙を造るものが見られる。又この様な間隙は附圖の如く彎曲と分岐の兩部によつても造られている。従つて各集落は不規則に分岐彎曲せる索狀、又は網狀を呈している。

培養 10 日間では集落は更に大きくなり、 70μ 平方、或いはそれに準ずる大きさの面積を占めている。従つて一視野に入りきらぬものもある。集落はそれぞれ全體として不規則な網狀を呈するものが多い。しかも培養 2~3 日程度の小菌束は殆んど見られない。集落數の比較的多いものでは、被覆硝子の中央部に薄い菌膜として、肉眼的にも認めることが出来る。

(3) 染色所見 各培養日數にて發育せる菌束の各菌體は、殆んどすべて鮮紅色を呈している。唯、菌束の尖端部又は周邊部に突出せる菌體、又は菌體の一部で、時に淡赤色~淡紫色を呈するものがあり、ごく稀には淡青色を呈するものが見られる。

以上の如き菌束の外に、培養 2~4 日間のものでは鮮紅色を呈する個々の菌體がなお、多少にかゝらず、認められる。培養 5~10 日間のものでは、いずれの標本にもかゝる菌體は殆んど見られない。しかし約半数例において、前述の鮮紅色を呈する菌束の間に、淡紫色~淡青色を呈する所の個々の菌體が見られる。この様な單一菌は多くは散在性であるが、時には一視野中に 5~10 個、或いはそれ以上に見られることがある。

(4) 總括並に考案 前述の如く喀痰中の結核菌の發育も前回報告の培養菌の發育に殆んど劣っていない。初代培養の菌が何故に培養基に充分馴れた菌に劣らぬ發育を示すかについては、なお研究を要するものと思われる。

菌束の多くは種々の夾雜物の爲に液膜表面に沈下し得ず、従つて液膜中に發育するものが多い。このことの爲に、培養菌の場合に比べて培養上と觀察上に多少の不利がある。

前述の如く、發育せる菌束は培養 2~3 日間において認められる。又培養 5 日間以後にては、10

個以下の菌體よりなる小菌束は殆ど見られない。又培養5日間以後の染色所見においては、鮮紅色を呈する個々の菌が殆ど見られない。これらの事實より、増殖力を持った菌の大部分は2~5日間において菌束となる。即ち増殖を示すものと思われる。

培養5日間以後の染色標本において、大きな菌束の間に游離して見られる所の淡赤、淡紫~淡青色の菌體は、その培養所見上より増殖力を失つたもの、ないしは減弱されたものであることが察せられる。従つて増殖力を減弱~消失した菌體が弱抗酸性~非抗酸性を呈するであろうことが察せられる。この推察は陳舊培養において弱抗酸性~非抗酸性の菌が見られるという從來の報告の一致する。

II 菌束の發育過程について

培養2~3日間にして、被覆硝子に密着した夾雑物の表面又は周邊に附着固定せるところの小菌束を選び、これを顯微鏡に固定して培養した。そしてその發育狀況を一定時間毎に觀察した(附圖II参照)。菌束は時間と共にその長さと幅を増しつつ彎曲、屈曲、及び分岐を示している。その經過中には次のごとき特異な諸點が見られる。

(1) 個々の菌體は、いずれの場合も菌束の尖端部において長く、中心部において著しく短かいしかも菌束の伸長するにつれて、その尖端に次々と別の長い菌體が現われる。

(2) 菌束の側面に突出した個々の菌體ないし菌體の一部は、觀察日數とともに、もとの位置に見られなくなり、別の位置に同様のものが現われる。又菌束の側面にはその部の菌束より出て、それに殆んど並行狀を示す所の、乳頭形や菌束一部の伸長形が見られる。

(3) 個々の菌體は培養菌の場合に比べて、より強く集束している。

(4) 菌束はその中心部においても明らかにその長さを増している。

(5) 菌束の分岐はその側面より突出した菌體を基にして行われる。

(6) 菌束は發育しながら不規則に彎曲する傾向を示し、その彎曲度は時間と共に強くなる。

以上の諸點より次の事が察せられる。(1) 菌束の伸長は主にその尖端部における個々の菌體の發育増殖によつて行われる。(2) 菌束の側面より突出せる菌體は時間とともに菌束に並行狀に密着する。(3) この並行狀に密着した菌體と、既に菌束に並行狀を示すところの、乳頭形又は菌體一部の伸長形の發育とによつて、菌束はその幅を増す。(4) 菌束の中心部における菌體も發育~増殖を行っている。

以上の事實及び推察は、既報⁽³⁾の培養菌の發育増殖形式に一致している。そしてその發育のやや劣れる場合の形式になっている。これは初代培養であること、液中に發育することゝの爲であると思われる。

III 微量菌證明への應用について

臨牀診斷學上、染色標本によつて菌を證明出来ないものでも、培養によつてこれを證明できる場合も少なくない。そして集菌後の染色標本における菌陰性者の約1/3が培養によつて陽性になるといわれている。

私は特にこの種の研究にも本法を應用できると信じ、取敢えず次のごとき實驗を試みた。

(1) 集菌法の選擇についての實驗

本實驗における喀痰は直接塗抹標本においてガフキーⅢ號位のものを選んだ。これを二分して一方は硫酸法により、他方はアルカリ法(ペトロフ法)によつて夫々集菌法を施した。集菌後の菌材料は各々5枚宛前記のごとく培養した。培養日數による菌束數の發見率を表1によつて示す。數字

表 1

	硫 酸 法				アルカリ法			
	2日	3日	4日	5日	2日	3日	4日	5日
(1)	○	○	I	II	○	II	III	III
(2)	○	○	II	III	II	IV	V	V
(3)	○	○	○	I	II	IV	V	V
(4)	○	I	II	III	○	III	IV	IV
(5)	○	○	I	I	○	II	IV	IV

はガフキー號による。即ち硫酸法はアルカリ法に比べて菌束を發見できる培養日數は遙かに長く、しかも發見できる菌束數も少い。これは硫酸法においてはアルカリ法に比べて、細胞その他の有形

夾雄物が遙かに多く、これと發育せる小菌束との鑑別が困難な爲である。本實驗によつて少なくとも微量菌證明の爲には、硫酸法がアルカリ法に劣ることがわかる。

(2) 微量菌證明についての實驗

本實驗にはペトロフ法による集菌後のガフキー1號以下の喀痰を供試した。證明上の價值を調べる爲には、各菌材料を10枚宛の滅菌被覆硝子に1小白金耳宛塗抹し、内5枚を染色に他の5枚を培養に供して染色菌數と培養後の菌束數とを比較した。染色はネ・ネ・法により、培養後の觀察は前述の培養所見から、培養3日間と5日間において行つた。その結果の1例を表2に示す。數字は全標本中の染色菌數又は菌束數を示す。

表 2

集菌後の 染色菌數		培養後の菌束數		
			3日	5日
(1)	0	(1)	1	1
(2)	1	(2)	1	2
(3)	0	(3)	0	0
(4)	0	(4)	1	3
(5)	2	(5)	0	1

即ち集菌後の染色菌數が0~2菌であつて5例中3例が陰性であるに反し、培養後の菌束數は培養3日間で5例中3例が陽性となり、培養5日間では更に1例陽性となつた。しかも發見せる菌束數は染色標本の2倍以上である。

本實驗のごとく、私の培養法によれば集菌後の

染色標本による判定に比べて、著るしく菌の證明率が高い。これは恐らく結核菌の多形態性によるものと思われる。即ち染色標本にては定型的抗酸性を示さないものや、定型的桿菌形を示さないもの、即ち種々の顆粒形その他の異常形が見逃され易い爲であらうと思われる。

結 論

前回報告の結核菌培養法を喀痰中の結核菌について試みた結果、本法が更に次のごとき利點を有することを知つた。

(1) 本法によれば喀痰中の結核菌をも極めて容易に培養することができる。

(2) 集落發見までの培養期間は2~5日間にて足りる。

(3) 集落の發育過程を時間的に追求することができる。

(4) 微量菌の證明にも適している。

本培養法を組織培養の被覆硝子法にならつてデッキグラス法と命名する。

終に臨み御懇篤なる御指導と御校閲を賜りたる木村教授に對して滿腔の謝意を表す。

文 獻

- (1) 水野傳二：日本細菌學雜誌及び日本醫事新報に登載豫定(昭24)
- (2) 戸田忠雄：結核菌と B.C.G. 南山堂，昭22，p.122 及び p.17
- (3) 水野傳二：東京醫事新誌，66(3)，106~112，昭24.