

[原 著]

プラスチック容器を用いた小川培地の評価

青野昭男¹⁾・東 由桂¹⁾・桑原龍児¹⁾・御手洗 聡²⁾

1) 公益財団法人結核予防会複十字病院臨床検査部臨床技術科

2) 公益財団法人結核予防会結核研究所レファレンス部細菌検査科

(平成 22 年 3 月 31 日受付, 平成 22 年 7 月 12 日受理)

背景: 小川培地をはじめとする鶏卵を基礎とした培地は, ガラス容器にシリコンキャップを付けたものが多く生物学的安全性(バイオセーフティ)の面から推奨されるものではなく, 改善の必要がある。

目的: 筆者らは, 極東製薬工業にて新たに作製されたプラスチック容器 2%小川培地(プラ小川培地)と従来のガラス容器 2%小川培地(ガラス小川培地)の抗酸菌発育支持力について臨床検体を用いて比較し, プラ小川培地の有用性を検討した。

結果: プラ小川培地では 169 検体が培養陽性を示し結核菌群陽性が 164 検体, *Mycobacterium avium* complex (MAC) 陽性 1 検体, 結核菌群と MAC の混在が 2 検体, 結核菌群と *Mycobacterium abscessus* の混在が 2 検体で認められた。ガラス小川培地では 172 検体が培養陽性を示し, 結核菌群が 168 検体, MAC が 1 検体, 結核菌群と MAC の混在が 2 検体, 結核菌群と *M. abscessus* の混在が 1 検体であった。プラ小川培地とガラス小川培地の培養コロニー数の一致率は 93.3%であり, 培養週数の一致率は 90.7%であった。

考察: プラ小川培地とガラス小川培地の間に抗酸菌発育支持力に大きな差は認められなかった。プラ小川培地は斜面台や培地ラックなど改善の余地があるものの, 抗酸菌検査のバイオセーフティ管理に大きく貢献できるものと考ええる。

Key words: 小川培地, プラスチック容器

はじめに

わが国の抗酸菌検査には小川培地が最も多く用いられている。この小川培地は 1950 年に小川らにより Lewenstein-Jensen 培地の組成を単純化し, アルカリ処理した検査材料を pH の調整を行うことなく, 直接培地に接種できるように改良されたものである¹⁾。その後の 1973 年に工藤らにより改良が加えられた 2%小川変法培地も用いられるようになり, さらにこの 2%小川変法培地に可溶性デンプンとピルビン酸ナトリウムを加えた培地が作られ, 現在 2%小川培地として広く用いられている²⁾。

結核菌は日本細菌学会の病原細菌の危険度を示すバ

イオセーフティレベル³⁾で最も高いレベル 3 に分類される。小川培地をはじめとする鶏卵を基礎とした培地は, ガラス容器にシリコンキャップを付けたものが多く使用されている。ガラス容器は衝撃に弱く破損しやすいためバイオセーフティ管理上, 結核菌の培養に用いる培地の容器として適さない。またシリコンキャップは着脱が容易で操作がしやすい反面, 外れやすくガラス容器同様にバイオセーフティ管理上好ましくない。さらに菌株の輸送においてガラス容器は強度の面で, シリコンキャップは密閉性の点で不適切である。

極東製薬工業にて新たに作製されたプラスチック容器 2%小川培地(プラ小川培地)は従来のガラス容器 2%小川培地(ガラス小川培地)と比較し素材がプラスチックであること, またキャップがスクリュー式で密閉できるなどバイオセーフティ管理上優れた点が多い。そこで今回筆者らはプラ小川培地とガラス小川培地の抗酸菌発育支持力を比較しプラ小川の有用性について検討した。

著者連絡先: (〒204-8533) 東京都清瀬市松山 3-1-24
公益財団法人結核予防会結核研究所レファ
レンス部細菌検査科
青野昭男
TEL: 042-493-5762
FAX: 042-492-4600
E-mail: aono@jata.or.jp

対象と方法

複十字病院臨床検査部に抗酸菌症の診断あるいは治療経過観察を目的に提出された喀痰のうち、患者の同意が得られた 101 症例 231 検体を対象とした。

・培地

プラスチック容器 2%小川培地（プラ小川培地）

長さ約 8.6 cm、直径 2.5 cm の円筒形自立型ポリスチレン製容器で、2%小川培地 8.5 ml を培地表面が約 9 cm² の斜面状に凝固したもので、キャップはポリプロピレン製のスクリュウ式で密閉が可能である。

ガラス容器 2%小川培地（ガラス小川培地）

極東製薬工業より発売されている 2%小川培地で、長さ約 15.5 cm、直径 1.8 cm のガラス製試験管に 2%小川培地 7 ml を培地表面積が約 10 cm² の斜面状に凝固したもので、キャップはシリコン製である。キャップには空気を取り入れることを目的として内側壁に溝が切られており、さらにキャップ頭部にはスリットが入っているため密閉は不可能である。

・培地落下試験

プラ小川培地とガラス小川培地を 1.5 m の高さか



Fig. 1. Pictorial image of conventional glass-tubed and new plastic-bottled 2% Ogawa medium.

ら実験室の床に落下させ衝撃に対する耐久性を比較した。培地は立てた状態、横に寝かせた状態、逆さに立てた状態の 3 通りの状態で落下させた。3 通りの落とし方でプラ小川培地とガラス小川培地はそれぞれ 5 本用いた。

・検体の前処理

提出された喀痰は結核菌検査指針 2007⁴⁾に従って *N*-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウム (NALC-NaOH) 法により処理を行い、遠心集菌された沈渣を 1 ml の滅菌リン酸緩衝液 (pH 6.8) にて懸濁し処理済検体とした。この処理済検体を用いてプラ小川培地とガラス小川培地にそれぞれ 0.1 ml を接種し、同時に塗抹標本の作製を行った。

・塗抹および培養検査判定

塗抹標本は結核菌検査指針 2007⁴⁾に従いオーラミン O 染色で染色し、蛍光顕微鏡 200 倍拡大で観察・判定を行い (-), (±), (1+), (2+), (3+) の 5 段階に分類した。

培養は 37°C で実施した。検体を接種したプラ小川培地とガラス小川培地は、最初の 1 週間は培地表面が水平になるように斜面状に並べ、その後は立てて培養した。なおプラ小川のスクリュウキャップは、培養開始から培養終了まで閉めた状態で実施した。観察は 1 週から 8 週まで週 1 回実施した。判定は結核菌検査指針 2007⁴⁾に従い集落数を記録したが (3+) と (4+) はまとめて (3+) とし (-), (1+: 実数表記), (2+), (3+) の 4 段階に分類した。

・菌種同定

結核菌群の同定にはキャピリア TB (ベクトン・ディッキンソン) を、非結核性抗酸菌の同定にはアキュプローブ (極東製薬工業) を用い、アキュプローブで同定不能の場合に DDH マイコバクテリア '極東' (極東製薬工業) を使用した。使用法は、それぞれの添付文書に従った。

・倫理的配慮

本研究は公益財団法人結核予防会複十字病院における治験審査委員会の審査・承認を経て実施した。

結 果

培地落下試験においてプラ小川培地は立てた状態、寝かせた状態、逆さに立てた状態の 3 通りとも 5 本すべての培地で破損は認められなかった。これに対してガラス小川培地は立てた状態と逆さに立てた状態で 5 本すべてにおいて破損は認められなかったが、寝かせた状態では 5 本すべてにおいて中の培地が露出するほど容器が大きく破損した。

被験 231 検体のうち塗抹陰性を示したのが 82 検体 (35.5%), (±) が 23 検体 (10.0%), (1+) が 27 検体 (11.7%), (2+) が 37 検体 (16.0%) で、(3+) を示したのが 62 検体 (26.8%) であった。

培養の結果は、プラ小川培地で 169 検体 (73.2%) が培養陽性を示した。そのうち結核菌群が 164 検体 (97.0%), *Mycobacterium avium* complex (MAC) が 1 検体 (0.6%), 結核菌群と MAC の混在が 2 検体 (1.2%), 結核菌群と *M. abscessus* の混在が 2 検体 (1.2%) であった。ガラス小川培地では 172 検体 (74.5%) が培養陽性を示し、そのうち結核菌群が培養陽性を示したのが 168 検体 (97.6%), MAC が 1 検体 (0.6%), 結核菌群と MAC の混在が 2 検体 (1.2%), 結核菌群と *M. abscessus* の混在が 1 検体 (0.6%) であった。

プラ小川培地とガラス小川培地の培養コロニー数を比較したものを Table 1 に示したが、雑菌汚染を示したものを除いた 208 検体について、(-) から (3+) の分類で双方の培地の培養コロニー数の一致率は 93.3% であった (χ^2 検定; $p=0.981$)。不一致を示したものにプラ小川培地 (2+) でガラス小川培地 (3+) を示したものが 3 検体、プラ小川培地 (1+) でガラス小

川培地 (2+) を示したのが 2 検体、プラ小川培地 (1+) でガラス小川培地 (-) を示したものが 5 検体、プラ小川培地 (-) でガラス小川培地 (1+) を示したものが 4 検体認められた。なお、プラ小川培地 (1+) でガラス小川培地 (2+) を示した 2 検体のプラ小川培地 (1+) のコロニー実数は 105 コロニーと 120 コロニーであった。またプラ小川培地 (1+) でガラス小川培地 (-) を示した 5 検体のプラ小川培地 (1+) のコロニー実数はそれぞれ 1, 3, 5, 5, 35 コロニーであった。さらにプラ小川培地 (-) でガラス小川培地 (1+) を示した 4 検体のコロニー実数は全て 1 コロニーであった。また MAC が検出された 1 検体、結核菌群と MAC が混在して検出された 2 検体および結核菌群と *M. abscessus* が混在して検出された 1 検体の培養コロニー数はプラ小川とガラス小川ともにすべて (1+) であった。プラ小川で結核菌群と *M. abscessus* が混在して検出されたがガラス小川では結核菌群のみの検出であったもののプラ小川の *M. abscessus* のコロニー数は 1 コロニーであった。

プラ小川培地とガラス小川培地の双方で培養陽性を示した 161 検体について、培養週数を比較したものを Table 2 に示した。プラ小川培地とガラス小川培地の培養週数の一致率は 90.7% であった (χ^2 検定; $p=0.488$)。プラ小川培地とガラス小川培地の間で 2 週間以上の開きがあったものが 7 検体認められた。このうち、プラ小川培地で混在した *M. abscessus* のコロニーが結核菌群のコロニーに重なり、コロニーの確認が 2 週間遅れたものを 1 検体認めた。残り 6 検体 (プラ小川培地 4 検体、ガラス小川培地 2 検体) は、コロニーが培地の下方の一端に偏在し、さらに凝固水を被った状態で存在し、コロニー数は 1 から 52 コロニーであった。なおいずれか片方の培地でコロニーが凝固水を被った状態で発育していたものが 11 検体認

Table 1. Mutual comparison of positivity between conventional glass-tubed and new plastic-bottled 2% Ogawa medium

		Glass Ogawa			
		3+	2+	1+	-
Plastic Ogawa	3+	48	0	0	0
	2+	3	41	0	0
	1+	0	2	67	5
	-	0	0	4	38

Table 2. Mutual comparison of time to detection between conventional glass-tubed and new plastic-bottled 2% Ogawa medium

		Glass Ogawa							
		1 week	2 week	3 week	4 week	5 week	6 week	7 week	8 week
Plastic Ogawa	1 week	0	0	0	0	0	0	0	0
	2 week	0	61	5	0	0	0	0	0
	3 week	0	0	71	2	0	1	0	0
	4 week	0	0	0	12	0	0	0	0
	5 week	0	0	5	1	2	0	0	0
	6 week	0	0	0	0	0	0	0	1
	7 week	0	0	0	0	0	0	0	0
	8 week	0	0	0	0	0	0	0	0

められ、そのうち凝固水を被ったほうがコロニーの発育が遅れたケースが7検体（プラ小川培地5検体、ガラス小川培地2検体）、凝固水を被っても同様にコロニーの発育が認められたケースが4検体（すべてプラ小川培地）、凝固水が被ったほうがコロニーの発育が速かったものは認められなかった。またMACが検出された1検体、結核菌群とMACが混在して検出された2検体、結核菌群と*M. abscessus*が混在して検出された1検体の合計4検体において、プラ小川とガラス小川の培養週数はそれぞれすべて同じであった。

雑菌汚染はプラ小川培地が18検体(7.8%)でガラス小川培地が12検体(5.2%)であった(χ^2 検定; $p=0.257$)。

考 察

わが国において抗酸菌検査の固形培地には、小川培地が長い間用いられている。しかしこの小川培地は容器がガラス製試験管であるため、落下した際の衝撃などで破損しやすい。またゴムキャップは外れやすく密閉されないため、培地が大きく傾いた際には液漏れの原因となりうる。培養で発育した培地には大量の菌が存在し、菌の種類によっては細心の注意が要求される。特に結核菌は日本細菌学会の病原細菌の危険度を示すバイオセーフティレベルで最も危険度の高いレベル3に分類され、感染対策上最も重要視されなければならない菌の一つである。升田ら⁵⁾は医療従事者における業務上感染の全国調査から、最も危険性の高い感染症は結核であり、細菌検査は結核の発生頻度の高い部門の一つであると報告している。こうしたことから、小川培地の容器のプラスチック化および密閉化は必要不可欠なことと考える。さらに従来のガラス小川培地の容器は約15.5 cmと長く、釣菌の際にループ以外の柄の部分に結核菌が付着しやすく、気づかないうちに菌を飛散させるリスクが高い。このことからプラスチック化と併せて、より短い容器へ形状的な改良も必要と考える。

MGIT（ベクトン・ディッキンソン）は酸素透過性の問題から発売当初はガラス製の容器が用いられていた。しかし現在では酸素透過性の問題を解決した、より安全性の高いプラスチック容器へ変更されている。また、抗酸菌検査の培地に鶏卵培地を用いている国には韓国、シンガポールなどがある。これらの国々の鶏卵培地の容器にはすでにプラスチックが用いられており、むしろ日本のほうがバイオセーフティー上の対応が遅れている。

こうしたなか、極東製薬工業により新たに作製され

たプラ小川培地と従来のガラス小川培地の結核菌群を中心とした抗酸菌発育支持力について比較検討を行った。プラ小川培地で169検体が培養陽性を示し、ガラス小川培地では172検体が培養陽性を示した。雑菌汚染を除いた208検体の培養コロニー数の比較(Table 1)では、(-)から(3+)の分類で双方の培地の培養コロニー数の一致率は93.3%と高い値を示し、統計学的な有意差(χ^2 検定; $p=0.981$)は認められなかった。プラ小川培地(2+)でガラス小川培地(3+)を示したものが3検体、プラ小川培地(1+)でガラス小川培地(2+)を示したのが2検体認められ、プラ小川培地でよりコロニー数が少なく判定されたものが認められた。この原因として考えられることは、今回プラ小川培地の斜面台として用いた傾斜台（三和化研工業）は斜面台として専用のものではない。このためプラ小川培地を斜面に寝かせた際に一部の培地で培地面が正しく水平にならず、接種した処理済検体が偏ったことによりコロニーも偏って発育し、結果として培養コロニーが重なり合って発育しコロニー数が少なく判定された可能性が考えられた。

プラ小川培地とガラス小川培地の培養週数の比較(Table 2)では、双方の培地で培養陽性を示した161検体の培養週数の一致率は90.7%を示し、統計学的な有意差(χ^2 検定; $p=0.488$)は認められなかった。さらに培養週数の差が1週間以内の一致率では95.7%と高い値を示していた。プラ小川培地とガラス小川培地の間で2週間以上の開きがあった7検体のうち6検体は、発育したコロニーが培地の下方の端に凝固水を被った状態で偏在していた。このことから培養週数に差が出たものの多くは、培地の発育支持能に直接由来するものではなく、凝固水の影響により発育が遅れたものと考えられる。また、凝固水を被った状態で少数コロニーが発育してきた11検体のうちプラ小川培地は9検体に対してガラス小川培地は2検体と少なかった。この原因は培養コロニー数の比較の場合と同様に、プラ小川培地の斜面台が専用のものでないために、培地面が水平に保たれないものがあったと思われる。

以上のことから、プラ小川培地とガラス小川培地の間の抗酸菌発育支持力に大きな差は認められなかった。またプラ小川とガラス小川の容器のサイズを比較すると、ガラス小川が15.5 cmであるのに対しプラ小川は約半分の8.6 cmとより短くなっている。これは釣菌の際の危険性を軽減させ、より高い安全性能を有すると言える。こうしたことからプラ小川培地は抗酸菌検査のバイオセーフティー管理において大きく貢献

できるものとする。また培地落下試験の結果からブラ小川培地はガラス小川培地に比べ衝撃耐久性が高いものと思われる。しかしさらに強い衝撃が加わった場合など絶対に破損しないというものではなく、扱いは細心の注意が必要であることに変わりはない。

ブラ小川培地はスクリュウキャップであることからガラス小川に比べ高い安全性が確保できる反面、操作性や作業効率は低下する。培養スペースの問題から多くの施設では1週間ほど斜面台に寝かせた状態で培養し、その後培地をラックなどに立てて培養している。これを斜面台に寝かせたまま培養し、さらにそのまま観察が可能な省スペースで安定性のある専用の斜面台を考案するなどし、スクリュウキャップであるがゆえに低下するブラ小川培地の作業効率を補う工夫が

求められる。

文 献

- 1) 工藤祐是. 1970. 結核菌の培地と培養法: 結核菌の臨床細菌学. 結核予防会, 東京.
- 2) 阿部千代治. 1993. JATA ブックス No. 1 抗酸菌の検査. 結核予防会, 東京.
- 3) 日本細菌学会バイオセーフティ委員会. 2007. 病原細菌に関するバイオセーフティ指針 (第3版). 東京日本細菌学会, 東京.
- 4) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会. 2007. 結核菌検査指針 2007. 結核予防会, 東京.
- 5) 升田隆雄, 五十川豊治. 1991. 臨床検査におけるバイオハザード—本法における統計的考察—. 感染症学雑誌 65: 209-215.

Practical Evaluation of 2% Ogawa Medium in a New Screw-capped Plastic Bottle

Akio Aono,¹⁾ Yuka Azuma,¹⁾ Tatsuji Kuwahara,¹⁾ Satoshi Mitarai²⁾

¹⁾ Department of Clinical Laboratory, Fukujiji Hospital, Japan Anti-Tuberculosis Association

²⁾ Bacteriology division, Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

The 2% Ogawa medium for the culture of mycobacteria, which is commercially available in Japan, is considered to be inappropriate with respect to the bio-safety, because it is normally prepared in a glass tube with a rubber cap. It will break in case of accident, and the cap will come off easily. Recently, the 2% Ogawa medium in newly designed plastic bottle (plastic Ogawa) with screw cap was evaluated for its performance of initial isolation of mycobacterial strains. The 2% Ogawa media in the conventional glass tube (glass Ogawa) and the plastic Ogawa were compared for their growth supporting power using the clinical specimens. A total of 231 sputum specimens from 101 patients were subjected to the culture examination with the plastic and glass Ogawa media. The plastic and glass Ogawa recovered 169 and 172 of mycobacterial strains, respectively. The overall agreement of the number of colonies on these media was 93.3%, and the turn-around time was comparable in 90.7%. The discrepancy between two methods was due to the fewer colonies observed on the plastic Ogawa, which was kept in slanted position with inappropriate rack. The plastic Ogawa medium was considered to be equivalent to the glass one, and to be safe. It must be recommended that the plastic bottle can replace the glass Ogawa.