

[原 著]

プラスチック製容器を使用した抗酸菌用培地「工藤 PD 培地 (プラ)」の性能評価

五十嵐ゆり子<sup>1)</sup>・近松絹代<sup>1)</sup>・青野昭男<sup>1)</sup>・小嶋由香<sup>2)</sup>・菊池 眸<sup>2)</sup>・吉本雄太<sup>3)</sup>

玉井清子<sup>3)</sup>・森本耕三<sup>4)</sup>・山田博之<sup>1)</sup>・高木明子<sup>1)</sup>・御手洗聡<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部

<sup>2)</sup> 川崎市立井田病院検査科

<sup>3)</sup> 株式会社ミロクメディアカルラボラトリー

<sup>4)</sup> 公益財団法人結核予防会複十字病院呼吸器内科

(平成 29 年 8 月 21 日受付, 平成 29 年 10 月 10 日受理)

プラスチック容器を使用した工藤 PD 培地 (プラ) (日本ビーシージー製造) を, 既存のガラス容器を用いた工藤 PD 培地 (日本ビーシージー製造) および 2% 小川培地 SP (極東製薬工業, プラスチック製容器使用) と共に発育支持力を比較評価した。被検菌は *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium abscessus* の臨床分離株各 9 株, 同菌種の基準株 3 菌種の計 30 株を使用した。被検菌をマイコプロス (極東製薬工業) に接種し, OD<sub>530</sub> = 0.2 になるまで培養した。培養液をリン酸緩衝液で 10<sup>1</sup> 倍から 10<sup>8</sup> 倍の 8 段階に希釈し, 各希釈液 0.1 mL を各培地へ接種し, 37°C で培養した後, 集落数を半定量的にカウントした。算出した CFU を一元配置分散分析法で解析した結果, 3 菌種とも各培地どうしに有意差は無かった (p>0.05)。結果が培養陰性と培養陽性に乖離した場合は全て, 一方の培地が陰性で他方の培地が 1+ の結果であった。高さ 1.5 m から床へ培地を落下させ容器破損の有無を調べる落下試験では, ガラス容器製の工藤 PD 培地を横に寝かせた状態で落とした場合のみ容器が破損し, プラスチック容器の培地に破損は認められなかった。工藤 PD 培地 (プラ) は従来の工藤 PD 培地および 2% 小川培地 SP と同等の発育支持力を示した。ガラス容器を用いた培地は落下による破損といったバイオハザード上の問題があることから, プラスチック容器工藤 PD 培地は抗酸菌の安全な培養に有用であると考えられた。更なる安全性の向上のためにスクリーキャップへの変更が望まれる。

**Key words:** 抗酸菌培養, プラスチック容器, 工藤 PD 培地, 2% 小川培地

序 文

結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は Biosafety Level 3 に該当する病原微生物である<sup>1)</sup>。その感染経路は空气中を漂うエアロゾルに含まれる結核菌を吸い込むことによる空気感染である<sup>2)</sup>。抗酸菌検査において検査手技の過程で発生するエアロゾルは感染の原因と

なり, 特に同定検査や薬剤感受性試験は多量の菌を扱うため, 検査室における作業には細心の注意が必要とされる。後藤らの行った全国の臨床検査室を対象としたアンケート調査によると, 431 施設中 28 例の結核感染事故があったと報告されている<sup>3)</sup>。想定される危険は事前に排除することが望まれる。

2% 小川培地は抗酸菌の培養に多く用いられており, これは 1973 年に工藤ら<sup>4)</sup>が作成した 2% 小川変法培地に可溶性でんぷんとピルビン酸を加えた培地である<sup>5)</sup>。従来の市販の小川培地にはガラス容器 (試験管) が使用されており, 落下による破損の危険があるためバイオセーフティ上望ましくない。極東製薬工業は 2014 年にプラスチック容器を用いた小川培地を発売

著者連絡先: (〒204-8533) 東京都清瀬市松山 3-1-24  
結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科  
五十嵐ゆり子  
TEL: 042-493-5711 (ext. 397)  
FAX: 042-492-4600  
E-mail: igarashi@jata.or.jp



Fig. 1. Plastic Kudoh PD medium (left), glass Kudoh PD medium (center), plastic 2% Ogawa medium (right)

し、その性能は既存の培地と同等であることが示されている<sup>6)</sup>。

今回、工藤 PD 培地（日本ビーシー製造）がガラス試験管からプラスチック容器を用いた工藤 PD 培地（プラ）（日本ビーシー製造）へと変更された。工藤 PD 培地の組成は 2% 小川培地と同じである。この工藤 PD 培地（プラ）も、従来品と同等の発育支持力が示されれば安全性の向上が期待される。工藤 PD 培地（プラ）について、従来の工藤 PD 培地およびプラスチック容器を用いた 2% 小川培地（SP）（極東製薬工業）と共に比較評価したので報告する。

## 対象と方法

### 1. 臨床分離株

株式会社ミロクメディカルラボラトリーより分与された *M. tuberculosis* 9 株、川崎市立井田病院より分与された *Mycobacterium avium* 9 株、公益財団法人結核予防会複十字病院より分与された *Mycobacterium abscessus* 9 株の計 27 株、同菌種の基準株計 3 株 (*M. tuberculosis* ATCC 27294, *M. avium* ATCC 25291, *M. abscessus* ATCC 19977) を用いた。

### 2. 培地

使用した各培地を Fig. 1 に示した。

工藤 PD 培地（プラ）長さ 15.7 cm、直径 1.8 cm のポリカーボネート製試験管に工藤 PD 培地 6 ml 分注し、培養面積約 9 cm<sup>2</sup> に凝固した斜面培地である。キャップは天面に切れ目の入った合成ゴム製で、キャップを含めた全長は 16.0 cm、重さは約 18 g であ

る。

工藤 PD 培地（以下工藤 PD 培地〈ガラス〉）長さ約 15.7 cm、直径 1.8 cm のガラス製試験管に工藤 PD 培地 7 ml 分注し、培養面積約 9 cm<sup>2</sup> に凝固した斜面培地である。キャップは天面に切れ目の入った合成ゴム製で、キャップを含めた全長は 16.0 cm、重さは約 26 g である。

2% 小川培地（SP）長さ約 8.3 cm、直径 2.5 cm のポリスチレン製容器に小川培地を 7 ml 分注し、培養面積約 9 cm<sup>2</sup> に凝固した斜面培地である。キャップはポリプロピレン製スクリューキャップで、キャップを含めた全長は 8.5 cm、重さは約 22 g である。

### 3. 発育支持力の評価

被検菌をマイコプロス（極東製薬工業）に接種し、37°C のインキュベータにて OD<sub>530</sub>=0.2 になるまで培養した。得られた培養菌液をリン酸緩衝液（pH 6.8）で 10<sup>1</sup> 倍から 10<sup>8</sup> 倍の 8 段階に希釈し、各希釈液 0.1 mL を 3 種の培地へ接種し、37°C で培養した。*M. tuberculosis* と *M. avium* は 4 週間、*M. abscessus* のみ 2 週間培養し、集落数を「抗酸菌検査ガイド 2016<sup>5)</sup>」の記載法に基づき、半定量的に記録した（-, 1+ [コロニー数 200 未満, 実数], 2+, 3+, 4+）。各菌液について CFU を算出し、一元配置分散分析法（ANOVA）を用いて培地間の差を比較した。

### 4. 落下試験

各培地を床から 1.5 m の高さで真横から挟むように持ち、勢いを付けないようにゆっくりと指を開いて落下させ、容器の破損の有無を調べた。床は検査室でよく使用されているリノリウム製、落下させる際の培地の向きは、蓋を上にして試験管を立てた状態、蓋を下に向け逆さに立てた状態、横に寝かせた状態の 3 通りである。各培地について、未使用の培地を 5 本ずつ落下させた。

## 結 果

### 1. 発育支持力の評価

結果を Table 1 および Table 2 に示した。接種した全ての培地の陰性・陽性の一致率を求めたところ、工藤 PD 培地（プラ）に対する工藤 PD 培地（ガラス）と 2% 小川培地（SP）の一致率はそれぞれ *M. tuberculosis* で 97.5% と 92.5%、*M. avium* で 92.5% と 92.5%、*M. abscessus* で 93.8% と 95.0% であり、kappa 指数は *M. tuberculosis* と *M. abscessus* はほぼ完全な一致 (0.8 < κ), *M. avium* は高度の一致 (0.6 ≤ κ ≤ 0.8) を示した (Table 3)。培養結果を -, 1+, 2+, 3+, 4+ の 5 段階で評価した場合の工藤 PD 培地（プラ）に

対する工藤 PD 培地 (ガラス) と 2% 小川培地 (SP) の一致率はそれぞれ *M. tuberculosis* で 97.5% と 91.3%, *M. avium* で 92.5% と 85.0%, *M. abscessus* で 93.8% と 91.3% であった。工藤 PD 培地 (プラ) に対する工藤 PD 培地 (ガラス) および 2% 小川培地 (SP) の培養陽性度結果が陰性と陽性に乖離したのは、全て一方が陰性、他方が 1+ (コロニー数 1-199) の場合

のみであり、陽性度が 2 段階以上ずれることはなかった。

各培地毎に算出した CFU を ANOVA で解析した結果、3 種類の培地どうしの P 値は *M. tuberculosis* で 0.880, *M. avium* で 0.197, *M. abscessus* で 0.978, 全菌種合わせて解析した場合でも 0.333 であり、全て P 値 0.05 以上を以て有意差を認めなかった。

2. 落下試験

工藤 PD 培地 (プラ) および 2% 小川培地 (SP) は、どの向きで落下させた場合においても、試験管・蓋のいずれも破損は認められなかった。工藤 PD 培地 (ガラス) は試験管の底および蓋を下に向けた状態では容器は破損しなかったが、横に寝かせた状態では 5 本全てでガラスの試験管が破損し、培地が露出した (Fig. 2)。いずれもゴムキャップが緩む・外れるといった現象は認められなかった。

考 察

今回評価したプラスチック製工藤 PD 培地は、工藤 PD 培地 (ガラス) の試験管をガラス製からポリカーボネート製へ変更した培地である。ガラス試験管に比べ、ポリカーボネート製試験管は底に向かって若干細くなっているため、培地が蓋へ付いてしまわぬよう培

Table 1. Comparison of result of culture between Plastic Kudoh PD medium, Glass Kudoh PD medium, and Plastic 2% Ogawa medium

|                  | Glass Kudoh PD                    |    | Plastic 2% Ogawa |    |    |
|------------------|-----------------------------------|----|------------------|----|----|
|                  | -                                 | +  | -                | +  |    |
| Plastic Kudoh PD | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |    |                  |    |    |
|                  | -                                 | 20 | 1                | 17 | 4  |
|                  | +                                 | 1  | 58               | 2  | 57 |
|                  | <i>Mycobacterium avium</i>        |    |                  |    |    |
|                  | -                                 | 8  | 3                | 9  | 2  |
|                  | +                                 | 3  | 66               | 4  | 65 |
|                  | <i>Mycobacterium abscessus</i>    |    |                  |    |    |
|                  | -                                 | 14 | 3                | 15 | 2  |
|                  | +                                 | 2  | 61               | 2  | 61 |

Table 2. Comparison of positivity between Plastic Kudoh PD medium, glass Kudoh PD medium, and plastic 2% Ogawa medium

|                  | Glass Kudoh PD                    |    |    |    |    | Plastic 2% Ogawa |    |    |    |    |   |
|------------------|-----------------------------------|----|----|----|----|------------------|----|----|----|----|---|
|                  | -                                 | 1+ | 2+ | 3+ | 4+ | -                | 1+ | 2+ | 3+ | 4+ |   |
| Plastic Kudoh PD | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |   |
|                  | -                                 | 20 | 1  | 0  | 0  | 0                | 17 | 4  | 0  | 0  | 0 |
|                  | 1+                                | 1  | 23 | 0  | 0  | 0                | 2  | 21 | 1  | 0  | 0 |
|                  | 2+                                | 0  | 0  | 5  | 0  | 0                | 0  | 0  | 5  | 0  | 0 |
|                  | 3+                                | 0  | 0  | 0  | 10 | 0                | 0  | 0  | 0  | 10 | 0 |
| 4+               | 0                                 | 0  | 0  | 0  | 20 | 0                | 0  | 0  | 0  | 20 |   |
|                  | <i>Mycobacterium avium</i>        |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |   |
|                  | -                                 | 8  | 3  | 0  | 0  | 0                | 9  | 2  | 0  | 0  | 0 |
|                  | 1+                                | 3  | 25 | 0  | 0  | 0                | 4  | 24 | 0  | 0  | 0 |
|                  | 2+                                | 0  | 0  | 9  | 0  | 0                | 0  | 1  | 7  | 1  | 0 |
|                  | 3+                                | 0  | 0  | 0  | 15 | 0                | 0  | 0  | 0  | 11 | 4 |
| 4+               | 0                                 | 0  | 0  | 0  | 17 | 0                | 0  | 0  | 0  | 17 |   |
|                  | <i>Mycobacterium abscessus</i>    |    |    |    |    |                  |    |    |    |    |   |
|                  | -                                 | 14 | 3  | 0  | 0  | 0                | 15 | 2  | 0  | 0  | 0 |
|                  | 1+                                | 2  | 22 | 0  | 0  | 0                | 2  | 22 | 0  | 0  | 0 |
|                  | 2+                                | 0  | 0  | 10 | 0  | 0                | 0  | 0  | 9  | 1  | 0 |
|                  | 3+                                | 0  | 0  | 0  | 9  | 0                | 0  | 0  | 0  | 8  | 1 |
| 4+               | 0                                 | 0  | 0  | 0  | 20 | 0                | 0  | 0  | 1  | 19 |   |

Table 3. Concordance rate of result of culture between Plastic Kudoh PD medium, glass Kudoh PD medium, and plastic 2% Ogawa medium

|                                      | Concordance | 95% CI (Wilson score)             | Kappa coefficient |
|--------------------------------------|-------------|-----------------------------------|-------------------|
| Plastic Kudoh PD VS Glass Kudoh PD   |             | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |                   |
|                                      | 97.5%       | 0.91-0.99                         | 0.935             |
|                                      |             | <i>Mycobacterium avium</i>        |                   |
|                                      | 92.5%       | 0.85-0.97                         | 0.684             |
|                                      |             | <i>Mycobacterium abscessus</i>    |                   |
|                                      | 93.8%       | 0.86-0.97                         | 0.809             |
| Plastic Kudoh PD VS Plastic 2% Ogawa |             | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |                   |
|                                      | 92.5%       | 0.85-0.97                         | 0.800             |
|                                      |             | <i>Mycobacterium avium</i>        |                   |
|                                      | 92.5%       | 0.85-0.97                         | 0.706             |
|                                      |             | <i>Mycobacterium abscessus</i>    |                   |
|                                      | 95.0%       | 0.86-0.97                         | 0.851             |



Fig. 2. Broken glass Kudoh PD medium.

The glass Kudoh PD medium broke only when it dropped in horizontal position.

地の量は7 mLから6 mLへ変更されており、キャップは引き続き切れ目の入った合成ゴム製が使用されている。工藤PD培地（ガラス）から大きなサイズの変更は無いため、既存の試験管立てや斜面台を引き続き使用可能であった。

2015年に行われたバイオリスク管理に関するアンケート調査では、84施設中小川培地の破損が2例、落下したが破損しなかった1例を加えれば3例のヒヤリハット事例が報告されている<sup>7)</sup>。培地容器に用いる試験管は、汚染事故を防ぐために破損の恐れのない素材が望ましいことは明らかである。しかしながら、工藤PD培地（プラ）に用いられるポリカーボネートは酸素を透過することから、容器の変更により生じる試験管内の酸素濃度や湿度の変化が抗酸菌の発育に影響

する可能性は否定できない。今回その影響がどれほどか明らかにするべく、工藤PD培地（プラ）と既存の工藤PD培地（ガラス）、2%小川培地（SP）の発育支持力を比較検討した。工藤PD培地（プラ）と既存の培地は高度の一致を示し、またそれぞれの培地から算出したCFUをANOVAにて解析した結果、プラスチック製工藤PD培地と既存の培地の有意差は認められず、その発育支持力は同等であることが示された。なお *M. avium* の  $\kappa$  指数のみ高度の一致、他の2菌種はほぼ完全な一致を示した事については、*M. avium* の陽性結果の比率が高く、陽性結果の偶然の一致率が高い為であると考えられた。今回は臨床分離抗酸菌および基準株を用いたが、臨床検体を用いた比較検討においても、工藤PD培地（プラ）と2%小川培地（SP）の性能に差は認められなかったと報告されている<sup>8)</sup>。また落下試験の結果、工藤PD培地（ガラス）は落ちる向きによって容器が破損したが、工藤PD培地（プラ）と2%小川培地（SP）は落下による破損を認めなかった。落下による衝撃への耐久性は向上したが、より強い衝撃が加わった場合の破損や、思いがけずキャップが外れたり、キャップの切れ目から菌液が漏れたりする可能性は、検査室内の操作や施設外への輸送の際においても留意すべきである。切れ目の入ったゴムキャップは密閉性が無く、実験中・輸送中に汚染された凝固水が漏れたり、安全キャビネット外で不意にキャップが外れて培地が露出したりする可能性があり、また2%プラスチック小川培地と比べ試験管の径が短く口から底までの距離が長い為、コロニーが掻き取りづらく、白金耳や白金線の汚染部分もまた長くなるため、既存のガラス工藤培地と同様の

注意が必要である。

### 総括

工藤 PD 培地（プラ）は従来の工藤 PD 培地（ガラス）および 2% 小川培地（SP）と同等の発育支持力を持つことが示された。ガラス容器を用いた培地は落下による破損の危険といった、バイオハザード上問題があることから、工藤 PD 培地（プラ）は抗酸菌の培養に有用であると考えられた。しかしながらゴムキャップによる凝固水の漏れ等の危険が想定され、安全性をより向上させるためにもゴムキャップからスクリーキャップへの変更が望まれる。

**利益相反：**申告すべき利益相反はありません。

### 文献

- 1) 国立感染症研究所. 2010. 別紙1「病原体等のBSL分類等」. 国立感染症研究所 病原体等安全管理規程（第3版）. 国立感染症研究所.
- 2) Jensen, PA, LA Lambert, MF Iademarco. 2005. Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care settings, 2005. MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control .
- 3) 後藤美江子, 山下知成, 三澤成毅, 他. 2007. 臨床検査におけるバイオセーフティの現状. 感染症学雑誌 81: 39-44.
- 4) 工藤祐是, 工藤 禎. 1973. 遠隔地における結核菌分離培養法の検討と提案（その2）. 結核 48: 501-512.
- 5) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会. 2016. 抗酸菌検査ガイド 2016. 南江堂.
- 6) 青野昭男, 東 由桂, 桑原龍児, 他. 2010. プラスチック容器を用いた小川培地の評価. 日本臨床微生物学雑誌 20: 105.
- 7) 御手洗聡. 2015. 特定病原体3種・4種およびその他の取り扱いに関する国際管理基準の実効性の検討. 平成26年度厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「エビデンスに基づくバイオリスク管理の強化と国際標準化及び事故・ヒヤリハット事例の共有データベース構築に関する研究」（主任研究者 棚林 清）分担研究報告書.
- 8) 松井 謹, 吉多仁子, 小野原健一, 他. 2017. 抗酸菌培養における3種類のプラスチック培地を用いた比較検討. 日本臨床微生物学会雑誌 27 (Supplement 1) : 282.

## Evaluation of Kudoh PD medium in plastic bottle

Yuriko Igarashi<sup>1)</sup>, Kinuyo Chikamatsu<sup>1)</sup>, Akio Aono<sup>1)</sup>, Yuka Kojima<sup>2)</sup>, Hitomi Kikuchi<sup>2)</sup>,  
Yuta Yoshimoto<sup>3)</sup>, Kiyoko Tamai<sup>3)</sup>, Kozo Morimoto<sup>4)</sup>, Hiroyuki Yamada<sup>1)</sup>,  
Akiko Takaki<sup>1)</sup>, Satoshi Mitarai<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis,  
Japan Anti-Tuberculosis Association

<sup>2)</sup>Kawasaki Municipal Ida Hospital

<sup>3)</sup>Miroku Medical Laboratory Company Limited

<sup>4)</sup>Respiratory Medicine, Fukujuji Hospital, Japan Anti-Tuberculosis Association

We evaluated the growth support power of Kudoh PD medium in a new plastic bottle (Plastic Kudoh PD medium, Japan BCG Laboratory) with Kudoh PD medium in a glass bottle (Glass Kudoh PD medium, Japan BCG Laboratory) and 2% Ogawa medium SP (Plastic 2% Ogawa medium, Kyokuto Pharmaceutical). One type strain and 9 clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, and *Mycobacterium abscessus* were tested, respectively. Those strains and isolates were cultured in broth medium up to  $OD_{530} = 0.2$ . The bacterial culture was diluted in  $10^{-1} - 10^{-8}$  folds and 0.1 mL of each diluted sample was inoculated onto each medium. The samples were incubated at 37°C up to 8 weeks. We calculated CFU using the three mediums and one-way analysis of variance showed there was no significant difference between plastic Kudoh PD medium and other mediums ( $p > 0.05$ ). Even showing the different culture result in low concentration samples, the difference was within one degree. Drop test of three mediums showed the glass Kudoh PD medium broke only when it dropped in horizontal position. Plastic Kudoh PD medium showed equal growth supporting power to glass Kudoh PD medium and plastic 2% Ogawa medium, and it became safer than medium in the glass bottle. However, because plastic Kudoh PD medium still uses rubber cap, changing to sealable screw cap is desirable considering biohazard issue.