結核菌の分離培養における我々の定量培養法

第2報 中和法との比較

その2 喀痰による実験

小 川 辰 次 沢 井 武
中 島 康 次 本 田 祐

北里研究所付属病院 (院長 宗 武藤)

[受付: 10月17日・1957年]

緒 論

我々は先に、菌浮遊液、喀痰等を材料とした前処理の基礎実験で、4%NaOH水で処理したものと、之を更に中和したものとを同一の量として、前者は3%KH₂PO₄培地に、後者はLöwenstein-Jensen培地、1%KH₂PO₄培地に、0.1cc宛接種すると、発育する集落数は大差のない事を証明し、之を第1報¹⁾として報告した。今回は通常検査としての我々の方法、即ち中和しないで、NaOHで処理したものを、その儘うる方法と、外国で広く使用されている中和の方法とを喀痰について比較すると共に、之に関した2~3の実験をしたので報告する。

対象及び方法

(1) 対象: 入院中の肺結核症の患者である。大部分は化学療法中のものであつて、外科手術を受けたものも含まれている。

(2) 採取: 採取の前日は、化学療法等の投与を中止して、型の様に、その翌朝採取した。採取には、内容約15ccの目盛のある広口砲弾型の遠心沈澱管を用い、その中に直接吐き出させた。採取後はなるべく早く、以下の様な方法で比較した。

(3) 方法: 先ず塗抹標本を作り、Ziehl-Neelsen法で染色して鏡検し、菌の有無を決定した。次に

a. 小川²⁾等の方法にならつて、喀痰に等量のフェノールレッドの0.004%に混入して8%NaOH水を加えて、滅菌した後で充分かくはん均等化し、直ちにその0.1cc宛を、1ccのメスピペットで3%KH₂PO₄培地に注入した。注入したら培地をゆり動かして、分注した喀痰液が、斜面全体にうろうようにし、斜面を上にして斜面台に水平にねかし、一晚、37°Cに保存し、液のほぼ乾

燥するのをまつて、翌日ゴムキャップにかえ、そして37°Cの孵卵器に培養した。

註: フェノールレッドの混入したNaOH水は、本来の小川等の方法ではないが、後述の中和の指示薬としてアメリカその他で使用しているのを、そのまま採用した。

b. 次に、aの方法で培養を終つた喀痰の苛性曹達稀釈液に、遠心沈澱管の内容の一杯一杯になるまで4%NaOH水を加えて、振盪均等化し、直ちに1分間、3000廻転遠心器で、15分間遠心沈澱し、上清を静に棄て、沈澱を1ccのメスピペットでかくはん均等化し、0.1cc宛を3%KH₂PO₄培地に接種した。以下の操作は、aと同じである。

c. 更に残つた沈澱に8%HClを1滴宛加えて、中和し、中和した沈澱を、1ccのメスピペットで、かくはんし、その0.1cc宛を1%KH₂PO₄培地に接種した。

d. 次に、c同様にして中和した沈澱をLöwenstein-Jensen培地に接種した。

培地は各2~3本宛を使用した。培養後は1週間毎に8週まで観察し、結核菌集落の発育の有無、その数、雑菌発育の有無等を検査した。

以上の方法を同一材料について次の様に使用した。その実験例数は次の様である。

実験I……aとd……58例

OGAWA Tatsuji, SAWAI Takeshi, NAKAJIMA Koji and HONDA Atsushi: Ogawa's quantitative isolation culture for tubercle bacilli. 2nd report Comparison with Neutralization by treatment Experiments with Sputum. Clinic Department of Kitasato Institute—Jap. J. of Bact., 13(1), 71-76 1958.

実験Ⅱ…… a, c 及び d…… 127例

実験Ⅲ…… a, b, c 及び d…… 195例

この様な複雑な方法を実施したのは、我々の方法が、中和して Löwenstein-Jensen 培地にうる方法に比してどの様な差があるのかを明にすると共に、遠心すれば果して集菌されるかどうか、更に中和してうるのに、外国では Löwenstein-Jensen 培地が広く使用されているが、我々の 1% KH_2PO_4 培地ではどうか？等の点を知りたかつたからである。

(4) 培地の作り方：

イ. 3% KH_2PO_4 培地³⁾

KH_2PO_4 …………… 3.0 g

グルタミン酸曹達…… 1.0 g

蒸留水…………… 100cc

以上の様な組成の基汁 100ccに対して、全卵液 200ccを加え、更にグリセリン 6 cc, 2%マラカイト緑液 6 ccを加えてよくまぜ、5 cc宛中試験管に分注して、90°C, 1時間で滅菌凝固する。培地の pH は 6.71

ロ. 1% KH_2PO_4 培地⁴⁾

KH_2PO_4 …………… 1.0 g

グルタミン酸曹達…… 1.0 g

蒸留水…………… 100cc

基汁が以上の様に異なるだけであつて、その他は全く 3% KH_2PO_4 培地と同じである。培地の pH は 6.99

ハ. Löwenstein-Jensen 培地

アメリカの Federal Security Agency⁵⁾, Public Health Service や, National Tuberculosis Association⁶⁾ の処方になつた。この処方は, Jensen⁷⁾ によつて改良された Löwenstein 培地と多少異なるが、アメリカ等では、この処方が広く使用されているので、これを用いた。

第1 磷酸加里…………… 2.4 g

硫酸マグネシウム…… 0.24 g

枸橼酸マグネシウム…… 0.6 g

アスパラギン…………… 3.6 g

グリセリン…………… 12cc

蒸留水…………… 600cc

馬鈴薯澱粉…………… 30 g

鶏卵液…………… 1000cc

2%マラカイト緑液…………… 20cc

基汁をとくす。30 g 馬鈴薯澱粉を加えて内容が透明となるまで振盪しながら加温する。全卵1000ccに 600ccの基汁を加え、更に 2%マラカイト緑を加えてガーゼで濾し、分注して、10°C, 1時間でかためる。pH 7.1

成 績

(a) (b) (c) (d) 4つの培養方法の全部、あるいは2つ、3つの方法で同時に集落の發育したものは勿論の事、この中の1つの方法でも集落の發育したものを、全部培養陽性とする第1表の様で、実験総例数 380例中の 161例が培養陽性である。それで、この培養陽性の 161例を対象として種々検討して見た。

第1表 検査例数及び培養陽性例数の総括

培 養 塗 抹	(+)	(-)	不明	合計
(+)	73	8	0	81
(-)	85	209	1	295
未 検 査	0	0	1	4
合 計	161	217	2	380

註：1) 表中の数字は例数を示す。

2) 不明とは、雑菌混入の爲に成績の判定できなかったもの

(1) 陽性率の比較

まず比較した何れかの方法で、陽性となつたものの総数を出して、次にその比較した箇々の方法によつては、その中のどれ位が陽性であつたかを検討した。尚、塗抹検査を実施しなかつた培養陽性の3例は、対象から省いてある。

まず、「その1」から見てゆくと、(a) と (d) とでは実験Ⅰ、Ⅱ及びⅢでみる様に、明に (a) の方がよいし、次に (a) と (b) とでは、実験Ⅲでみる様に、著明の差はないが、(c) と (d) とでは、実験Ⅱ及びⅢで見る様に、(c) の方が多少よい。この差は、塗抹陽性のものに比して、塗抹陰性のものが著明である。

「その2」は実験Ⅰ、Ⅱ、Ⅲの中の (a) と (d) とだけを合計したもの、実験Ⅱ及びⅢの中の (a) (c) 及び (d) の比較を集めたもの、及び実験Ⅲの成績を、一つにまとめて、その内訳の陽性率を見たものであつて「その1」の場合と全く同様の傾向を認める。

(2) 集落数の比較

実験Ⅰ、Ⅱ、Ⅲにおいて、塗抹陽性、塗抹陰性のいかに問はず、使用した培養方法の何れの方法でも陽性のものと、この中の2つあるいは3つの方法で陽性のものと及び1つの方法でのみ陽性のものの中、集落の数える事のできるもののみを集めて、集落数を平均してみた。この場合、使用した方法の中で、陰性を示したものは、零として計算した。

第 2 表 陽 性 率

その 1. 箇々の成績 (陽性例)

塗抹検査	実験番号	培養の方法 何れかの方法で陽性となつたものゝ合計	何れかの方法で陽性となつたものゝ内訳 (陽性例)			
			(a)	(b)	(c)	(d)
(十)	I	10	10			9
	II	22	22		21	21
	III	41	40	39	38	36
(一)	I	16	14			11
	II	29	29		21	23
	III	40	39	37	35	29

その 2. 合計した成績 (陽性例及び陽性率)

塗抹検査	実験番号	培養の方法 何れかの方法で陽性となつたものゝ合計	何れかの方法で陽性となつたものゝ内訳 (陽性例及び陽性率)			
			(a)	(b)	(c)	(d)
(十)	I, II, III	73	72 (98.6%)			67 (91.8%)
	II, III	63	62 (98.4%)		59 (93.7%)	58 (92.1%)
	III	41	40 (97.6%)	39 (95.1%)	38 (92.7%)	36 (87.8%)
(一)	I, II, III	85	82 (96.5%)			62 (72.9%)
	II, III	69	68 (98.6%)		56 (81.2%)	50 (72.5%)
	III	40	39 (97.5%)	37 (92.5%)	35 (87.5%)	29 (72.5%)

註: 1) 表中の数字は例数を示す。

2) 培養の方法

a……8% NaOH を等量加えて, 3% KH_2PO_4 培地に 0.1 cc 接種b……a に更に 4% NaOH を加えて, 遠心した沈渣を 3% KH_2PO_4 培地に 0.1 cc 宛接種c……b の沈渣を中和し, その 0.1 cc 宛を 1% KH_2PO_4 培地に接種

d……中和した沈渣を Löwenstein-Jensen 培地に 0.1 cc 宛接種

3) 実験番号 I, II, III とは, I と II と III を合計した事を II, III とは II と III を合計した事を示す。

「その 1」から見てゆくと, (a) と (d) とでは, 実験 I では, (a) は (d) の約 2 倍, 実験 II 及び III では (a) は (d) の 4 倍以上の集落数を示している。(a) と (b) とでは実験 III でみる様に, 殆んど差がないし, (c) と (d) では, 実験 II, III でみる様に著明の差はない。

次に「その 2」では, 実験 I, II, III の中で (a) と (d) の比較した部分を集めたもの実験, II 及び III の中の (a), (c) (d) の部分を集めたもの及び実験 III の (a) (b) (c) (d) を同時に比較したものを示したが, 「その 1」の成績と殆んど同じ様な傾向を示している。

(3) 集落の発育する迄の期間の比較

塗抹の陽性, 陰性のいかに問わず, 平行して実施した 2 つの方法, あるいは 3 つ, 4 つの方法で同時に陽性を示したのものについて, 最初の集落の発育するまでの期間を週で比較したのが第 4 表である。同時に接種した 2 本あるいは 3 本の培地に, 集落がばらばらに発育する事がある。この時は, 最も早く発育した培地の週をもつて, また同時に接種した 2 本, 3 本の培地の中で, 1 本のみに発育した場合は, その 1 本の発育した週をもつて, 初発集落の発育した週とした。

第3表 集 落 数

その1 箇々の成績

実験 番号	対 象 例 数	培 養 方 法			
		(a)	(b)	(c)	(d)
I	16	13.2			6.9
II	25	28.6		7.1	6.3
III	45	38.0	32.8	8.5	9.3

その2 合計した成績

実験 番号	対 象 例 数	培 養 方 法			
		(a)	(b)	(c)	(d)
I, II, III	86	29.5			7.9
II, III	70	34.9		8.0	8.3
III	45	38.0	32.8	8.5	9.3

註：1) 表中の数字は平均集落数を示す。

2) 培養の方法

a, b, c, dは第2表の註に同じ

3) 実験番号, I, II, III 及び II, III は第2表の註に同じ。

育例数を見ても(d)は(a)に比して明におくれている。次に(a)と(b)との比較は、実験Ⅲでみる様に、著明の差はないし、(c)と(d)とでは、実験Ⅱ、Ⅲでみる様に、(c)の方が(d)に比して多少早い。しかしその差は僅少である。

これを総括してみると、(a)(b)が早く、(c)(d)が之よりもおけると云う事になる。この事は、集落数の比較で明かな様に、(a)(b)が(c)(d)に比して集落数が多いのであるから当然かも知れない。

(4) 雑菌の侵入の比較

1週間毎に観察して雑菌の侵入の率が、(a)(b)(c)(d)の様に培養の異なる事によつて差があるかどうかまた侵入の傾向に違いがあるかどうかを比較したのが、第5表である。

まず侵入の率から見てゆくと、(a)と(d)とでは、実験Ⅰ、Ⅱでは、(d)の方が多少多いが、実験Ⅲでは、(a)の方が多い。何れも少差であるから、(a)と(d)とでは、差がないと考へてよい。次に(a)と(b)との比較は、実験Ⅲでみる様に、殆んど差がない。また(c)と(d)とでは、実験Ⅱでは、殆んど差がない。しかし実験Ⅲでは、(c)の方が多少少い。差があつたとしても僅であるから、(c)と(d)とでは、差がないと見てよからう。

第4表 集 落 の 発 育 す る 迄 の 期 間

実験 番号	検 査 例 数	集落発育までの期間(週) 培 養 方 法	1	2	3	4	5	6	7	8
			週	週	週	週	週	週	週	週
I	19	(a)	0	2	6	2	8	1	1	0
		(d)	0	1	6	1	4	4	0	2
II	39	(a)	0	10	16	10	2	0	1	0
		(c)	0	6	17	10	4	1	1	0
		(d)	0	8	14	6	5	2	2	2
III	63	(a)	0	17	28	14	4	0	0	0
		(b)	0	19	27	11	5	1	0	0
		(c)	0	14	24	15	7	3	0	0
		(d)	0	14	28	10	5	2	0	2

註：1) 表中の数字は例数を示す。

2) 培養方法は、第1表に同じ。

先ず(a)と(d)とを比較すると、(a)では、最もおくれたものでも、実験Ⅰ、Ⅱでは7週、実験Ⅲでは5週であるが(d)では、実験Ⅰ、Ⅱ、Ⅲでみる様に、8週で発育しているものがある。また週別に表示された発

以上を総括すると、(a)(b)(c)(d)の間には、大差がないと云う事ができる。尚、侵入培地数が少いので雑菌侵入の傾向に違いがあるかどうかをつかむ事はできなかった。

第5表 雑菌の侵入

実験番号	使用培地総数 (実験例数)	雑菌発育までの期間		1 週	2 週	3 週	4 週	5 週	6 週	7 週	8 週
		培養方法	雑菌侵入培地 総数(侵入率)								
I	174 (58 例)	(a)	11 (6.3 %)	5	2	3	0	1	0	0	0
		(d)	15 (8.6 %)	4	4	5	0	1	0	0	1
II	381 (127 例)	(a)	8 (2.1 %)	0	2	4	1	1	0	0	0
		(c)	13 (3.4 %)	1	1	4	2	3	2	0	0
		(d)	12 (3.1 %)	0	0	3	4	1	3	1	0
III	535 (195 例)	(a)	31 (5.8 %)	5	8	9	7	1	1	0	0
		(b)	34 (6.4 %)	7	11	6	4	2	1	2	1
		(c)	19 (3.6 %)	3	6	3	2	2	1	2	0
		(d)	24 (4.5 %)	4	5	7	3	2	2	1	0

註: 1) 表中の数字は培地数を示す。 2) 培養方法は第1表に同じ

総括及び考案

外国では、喀痰の前処理に中和法が行われ、そして培養基は Löwenstein-Jensen 培地を使用している所が多い。しかし我が国では、Hohn⁹⁾の流れをくんで、酸で前処理をした沈渣を、そのまま白金耳で塗抹培養する方法が行われていた。岡片倉⁹⁾培地を使用して行う方法は、最近迄の代表と考えられよう。その後我々は、8% NaOH を喀痰に等量に加えて、均等化し、遠心しないで直ちに 0.1cc宛を 3% KH₂PO₄ 培地とよぶ酸性の培地に接種する事が簡単であり、岡片倉培地¹⁰⁾を使用する硫酸法に比しても劣らず、且、ある程度まで定量的に実施できる事を発表した。この方法は¹¹⁻¹⁷⁾、わが国で、多くの追試が行はれたが、何れも我々の成績と一致した。そして現在では、硫酸法に代つて、余等の方法が広く使用されている。

しかし外国で行われている前述の方法との比較は、林¹⁸⁾の成績だけである。即ち氏は、28例の喀痰について比較した結果、喀痰の中の菌数の多い時は Löwenstein-Jensen による中和法が良く、菌数の少い時は、両者の間に差がなかったと云う。

氏の実験した例数はこの様に少く、その成績も余りはずつきりしない。それで我々は、380例の喀痰を使用して比較した結果、我々の実施している方法は、陽性率においては、塗抹陽性の材料では両者間に大差はないが、塗抹陰性の喀痰では、明に中和法に比して、すぐれているし、集落数も Löwenstein-Jensen 培地に比して 2~4 倍も多い。また集落の発育する迄の期間も早い。この成

績は、林の成績と異なるが、どこに原因があるのかわからない。

更に我々は、遠心した沈渣を、そのまま、0.1cc宛、3% KH₂PO₄ 培地に接種しても、特に良好な成績をあげる事には成功しなかつたし、中和した沈渣を接種するのには、複雑な Löwenstein-Jensen 培地でなくても、1% KH₂PO₄ 培地の様な簡単なものでも間に合う事を認めた。

以上の事実は、培養基が適当であれば、遠心や中和と云つた様な複雑な手数をかけるよりも、処理時間になるべく少くして、菌の弱らない状態において植えた方が、より妥当である事を示すものであろう。

我々の中和の方法は、アメリカ等で実施しているものと著明の差はないが、次の点異なる。即ち中和する前の処理には、我々は 8% NaOH を喀痰に等量を加えたから中の苛性曹達の濃度は 4% である。しかしアメリカ等で実施しているのは、3~4% の NaOH と喀痰に等量加えているので、喀痰の中の濃度は、1.5% 乃至 2.0% となり、我々のものに比して濃度は低い。また我々の方では、直ちに遠心しているのに、アメリカ等では、10~15 分間、振盪器にかけている。この様に我々の方法では NaOH の濃度は濃い、処理時間を殆んどとつていない。随つて、アメリカ等の方法を正確に実施し比較したとしても、そう大きな差は、ないものと推定される。

結 論

380例の喀痰について

(a) 8% NaOH を等量加えて、その 0.1cc を 3%

KH₂PO₄ 培地に接種する。

(b) 上述の喀痰稀釈液に 4%NaOH を加えて更に稀釈し、遠心した沈渣を 0.1cc宛、3%KH₂PO₄ 培地に接種する。

(c) 上述の沈渣に 8% HCl を加えて中和し、中和した沈渣を 1%KH₂PO₄ 培地に 0.1cc宛接種する。

(d) 上述の中和した沈渣を Löwenstein-Jensen 培地に 0.1cc宛接種する。

の 4 方法を比較し、之等の方法の中の 1 つの方法にても陽性となった 161 例について検討した結果、次の様な成績を得た。

1. 我々が通常検査に使用している (a) の方法は、

(d) に比して、陽性率、集落数、集落の発育する迄の期間においてすぐれている。また雑菌の侵入率は差がない。

2. (a) と (b) とでは、殆んど差がない。

3. (c) と (d) とでは、陽性率、集落の発育する迄の期間では、(c) の方がすぐれているが、集落数、雑菌の侵入率においては差がない。

(この研究の一部は、昭和32年4月、日本細菌学会総会において発表した)。

文 献

- 1) 小川, 小関: 日本細菌学雑誌, 12, 703, 1957.
- 2) 小川, 佐波, 鈴木: 結核, 25(5), 33, 1950.

- 3) 小川: 結核, 24(11), 11, 1949.
- 4) 小川, 佐波: 結核, 24(2), 13, 1949.
- 5) "Laboratory methods" 1951, by Federal Security Agency, Public Health Service, Division of Chronic Disease and Tuberculosis, Communicable Disease Center.
- 6) "Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis" 1955. by Committee on Revision of Diagnostic Standards, American Trudeau Society, Medical Section, National Tuberculosis Association, Williams Schwartz, M.D., Chairman.
- 7) Jensen: Zbl. Bakt., Abt. I Orig., 125, 222, 1932.
- 8) Hohn: Zbl. Bakt., Abt. I Orig., 98, 460, 1926.
- 9) 岡: 日本臨床結核, 1(7), 59, 1940.
- 10) 小川, 木野: 文部省科学研究費, 総合研究, 結核研究班, 細菌学の研究科会, 昭和26年11月発表.
- 11) 山田, 岡田: 結核, 27(2), 67, 1952.
- 12) 染谷, 林: 文部省科学研究費, 総合研究, 結核研究班, 細菌学の研究科会, 昭和28年6月発表.
- 13) 占部, 井村: 文部省科学研究費, 総合研究, 結核研究班, 細菌学の研究科会, 昭和28年7月発表.
- 14) 牛場, 阿部: 同上, 昭和28年7月発表.
- 15) 岡始, 万, 吉岡等: 岡山医学会雑誌, 65(10), 1785, 1953.
- 16) 木島: 結核診療室, 4(4), 42, 1953.
- 17) 井村: 結核, 2(8), 13, 1954.
- 18) 林久子: 結核, 28(5), 217, 1953.