結核菌の分離培養における我々の定量培養法

第4報 喉頭粘液よりの結核菌培養における

平沢らの方法と W.H.O. の方法との比較

小 川 辰 次 齊 藤 直 蔵 遠 山 和 明

中 島 康 次 本 田 祐

北里研究所附属病院

[受付: 9月10日・1958年]

緒 論

我々は先に集落数の比較による基礎実験¹⁾, 及び喀痰²⁾, 胃液³⁾を材料とする比較により, 我々が実施している方法即ち水酸化ナトリウムで処理したものをそのまま3%小川培地に接種する方法は, 外国で広く実施されている中和法即ち中和して Löwenstein-Jensen 培地に接種する方法に比べて遜色のないことを証明した。今回は更に喉頭粘液を材料として我々の実施している分離培養法即ち水酸化ナトリウムで処理した液をそのまま3%小川培地に接種する平沢ら⁴⁾の方法と, 外国で広く使用されている W.H.O. の中和して Löwenstein-Jensen 培地に綿棒で塗抹する方法とを比較したので報告する。尚我々は更に方法を確実にしようと思い2%水酸化ナトリウムで処理して1%小川培地に接種する方法を試みたので併せて報告する。

実験方法

1) 対象 入院中の肺結核症の患者で, 殆んどすべて化学療法中のものであるが, この中には肺切除術後の患者も少数含まれている。尚採取当日の朝のみ投薬は中止した。

2) 喉頭粘液採取の方法

喉頭綿棒は直径 1.6 mm, 長さ 25cm のニツケル・クロームの棒で, 先の方 2~3cm の所を螺旋状にねじっておき脱脂綿を小指頭大に巻きつけ落ちないように細い糸で結んでおく。そして採取しやすいように先端 2~3cm の所を約 120度位に曲げておき 5~6 本づつ紙に包み乾熱滅菌しておく。術者は予防衣, マスク, 帽子, 額帯鏡をつけ, 患者に小さく切ったガーゼを渡し自の舌をつまんで前に出させる。次に間接喉頭鏡でみながら綿

棒で会厭の後方を拭う。馴れると間接喉頭鏡を使わないでも楽にとれるので, 大部分の患者は喉頭鏡を使わずに, 2 本宛採取した。粘液のついた綿棒は直ぐ滅菌中試験管に入れておく。採取時間は午前の安静時間後即ち午前 11 時~12 時の間に採取した。

3) 培養の方法

培地はすべて 1 本の喉頭綿棒について 2 本の培地に培養し, 液が針面全体にうるおうようにして斜面台にねかし, 1 晩孵卵器に放置, 翌日, 液のほど乾燥した所でゴムのキャップに変え, 立て 3 週間培養した。

a) 平沢ら⁴⁾の方法

採取した綿棒の入っている中試験管に 4% 水酸化ナトリウムを 1 cc 入れて綿棒を振盪して粘液を洗いおとし, 1 cc のメスピペットの先で綿の中にしみこんだ液をしぼり, 管底にたまった液を吸い上げその 0.1cc 宛を 3% 小川培地の斜面に流しこむ。

b) W.H.O. の方法⁵⁾

滅菌した中試験管を 2 本用意する。一方には 5% 稀酸水を 5 cc 入れ, 他の一方には 5% クエン酸ナトリウム水を 5 cc 宛入れておき, 先ず前者に綿棒を 10 分間浸して処理, 次に後者に 10 分間浸して中和し, 綿棒をとり出し Löwenstein-Jensen 培地の斜面の上をくるくる廻し乍ら塗抹培養する。

c) 2% 水酸化ナトリウムで処理し 1% 小川培地に接

OGAWA Tatsuji, SAITO Naozo, TOYAMA Kazuaki, NAKAJIMA Koji HON A Atsushi: Ogawa's quantitative isolation culture for tubercle bacilli. 4th report. Comparison of W.H.O. Method with Hirasawa's Method in isolating Tubercle Bacilli from Laryngeal Swab. Hospital of the Kitasato Institute—Jap. J. of Bact., 14 (5), 375-378, 1959.

種する方法は a) に準ずる。

4) 培 地

実験に使用した培地は、3%小川培地⁶⁾、1%小川培地⁷⁾、Löwenstein-Jensen 培地⁸⁾であるが、これらは型の如く作った。

5) 研究方法

(1) 平沢らの方法と 2% NaOH 法(1%小川培地)との比較

入院患者 222例を対象として綿棒は 2本宛採取した。そして第1本目は 4% NaOH 処理して 3%小川培地に、第2本目は 2% NaOH で処理して 1%小川培地に接種、次の第2例では前と逆に第1本目は 1%小川培地に、第2本目は 3%小川培地というように交互に培養した。それは、我々の前の実験⁹⁾で、喉頭綿棒第1本目と第2本目とは後者の方が集落数が少くなる事が判っていたので、可及的その影響をなくする為である。

(2) 平沢らの方法と W.H.O. の方法との比較

入院患者 258例を対象として比較した。

採取方法、培養方法等は(1)と同様である。

成 績

(1) 平沢らの方法と 2% NaOH 法(1%小川培地)との比較

1) 陽性率

表 1 陽 性 率

培 養 法	成 績	培養法 3%小川培地 (4%NaOH 処理)		計
		+	-	
1%小川培地	+	55 (24.8%)	4 (1.8%)	59 (26.6%)
(2%NaOH 処理)	-	18 (8.1%)	145 (65.3%)	163 (73.4%)
計		73 (32.9%)	149 (67.1%)	222 (100%)

註: () 外の数字は例数を示す。

表1のようである。平沢らの方法(32.9%)の方が、2% NaOH 法(26.6%)に比べてやや良いが著明の差はない。しかし、平沢らの方法で陽性で、2% NaOH 法で出ないものが 8.1%(逆の場合は 1.8%)があるが、推計学的に両方法の陽性率の間には 5%の危険率でも有意の差が認められない。

2) 集落数

4週又は8週で両方とも集落の数えられる場合は、表 2 a. のように著明の差はない。又両方無数の場合は 2段

表 2 集 落 数

a) 両方共数えられる場合

培 地	平均集落数	例 数
3%小川培地	36.1	38
1%小川培地	28.2	

b) 両方共無数であった場合及び一方が無数で片方が数えられる場合

	3%培地 > 1%培地	3%培地 < 1%培地	3%培地 = 1%培地
例 数	2	3	12
総 例 数	17		

註: 3%培地は 3%小川培地を
1%培地は 1%小川培地を示す。

階の差のあったものを又片方が無数で他の一方が数えられる場合を差があるとして比較してみると表 2 b. のようになる。即ちこの場合でも殆ど差がない。

3) 雑菌混入率

表 3 のように、両方とも 1%内外で差は認められない。

(2) 平沢らの方法と W.H.O. の方法との比較

1) 陽性率

表 3 雑 菌 混 入 率

使用培地	雑菌混入本数 (混入率)	試験管総数
3%小川培地	10 (1.1%)	888
1%小川培地	9 (1.0%)	

表 4 陽 性 率

培 養 法	成 績	培養法 3%小川培地 (4% NaOH 処理)		計
		+	-	
L-J 培地	+	114 (44.1%)	4 (1.6%)	118 (45.7%)
(中 和)	-	33 (12.8%)	107 (41.5%)	140 (54.3%)
計		147 (56.9%)	111 (43.1%)	258 (100%)

註: 1) () 外の数字は例数を示す

2) L-J 培地は Löwenstein-Jensen 培地を示す。

表 5 集 落 数

a) 両方数えられる場合

培 地	平均集落数	例 数
3 %小川培地	29.7	21
1 %小川培地	8.1	

b) 両方共無数であつた場合及び一方が無数で片方が数えられる場合

	3 %培地 > L-J 培地	3 %培地 < L-J 培地	3 %培地 = 1 %培地
例 数	36	6	51
総 例 数	93		

表4のように、検査総数 258 例中、平沢らの方法で陽性は 147例 (56.9%) に対し、W.H.O. の方法は 118 例 (45.7%) であり、又平沢らの方法では陽性だが、W.H.O. の方法では陰性のものが 33例 (12.8%) あり、その逆の場合は 4 例 (1.6%) であつた。推計学的にも両方法の陽性率の間には 2% の危険率で有意の差を認め平沢らの方法がすぐれている。

2) 集落数

表 5 a) のように、8 週で集落数の数えられる 21 例の平均集落数は平沢らの方法では 29.7 であり、W.H.O. 法では 8.1 であり、平沢らの方法の方が 3 倍以上多い。又 8 週で集落の数えられない場合でも表 5 b) のようにやはり平沢らの方法が集落数が多い場合が多い。

3) 雑菌混入率

表 6 のように、平沢らの方法 1.1% に対して、W.H.O. の方法は 3.5% で平沢らの方法の方が雑菌混入は少ない。

表 6 雑 菌 混 入 率

培 地	雑菌混入本数 (混 入 率)	試験管総数
3 %小川培地	11 (1.1%)	1032
L-J 培地	37 (3.5%)	

註: L-J 培地は Löwenstein-Jensen 培地を示す。

総括及び考案

我々の所で、通常検査に用いている平沢らの方法は、

前処理に 4 % NaOH 液を使い 3 % 小川培地に接種する方法であるが前処理による水酸化ナトリウムの障害をなるべく少なくするために、先ず前処理を 2 % NaOH に濃度を下げて 1 % 小川培地に接種する方法を試みたが、この方法は平沢らの方法に比してすぐれた成績を示さなかつた。この理由ははつきりしないが、あるいは 1 % NaOH で処理した方がよかつたのかも知れない。この点更に研究してみたいと思つている。

次に外国で広く行われている中和法^{10) 11) 12) 13)}には色々あるが、その一つとして W.H.O. の方法を取りあげて実験してみた。この方法については、既に平沢ら⁴⁾が氏らの方法と比較し、氏らの方法が遜色ないことを証明しているが、氏らの実験では中和法には 1 % 小川培地を使用しているし又例数も少ないので我々は Löwenstein-Jensen 培地を使用し、比較の方法に注意し、例数を多くして更に正確に比較した。その結果、平沢らの方法が陽性率も良いし、集落数も多い。その上、雑菌混入率も少ない。この成績は平沢らの成績と全く一致するものである。これは我々の実施している水酸化ナトリウムで前処理してそのまゝうる方法は、喉頭粘液においても外国で実施している中和法に比して遜色ないことを証明するものである。

結 論

1) 222 例で平沢らの方法即ち 4 % NaOH で前処理し、3 % 小川培地に 0.1 cc 接種する方法と、NaOH の濃度を 2 % に下げて 1 % 小川培地に 0.1 cc 接種する方法を比較したが、平沢らの方法に比して特にすぐれた成績は認められなかつた。

2) 258 例で、平沢らの方法と、W.H.O. の中和して Löwenstein-Jensen 培地に接種する方法とを比較したが平沢らの方法は、陽性率、集落数も多く又雑菌混入率も少くすぐれている。

(本稿の要旨は昭和 33 年 4 月 7 日、第 31 回日本細菌学会総会(岡山)において発表した。尙推計学的検討について御教示を頂いた当研究所田子勝彦副部長に深謝する)。

文 献

- 1) 小川, 小関: 日本細菌学雑誌, 12 (9), 703, 1957.
- 2) 小川, 沢井, 本田, 中島: 日本細菌学雑誌, 13 (1), 71, 1958.
- 3) 小川, 本田, 中島, 沢井: 日本細菌学雑誌, 13 (2), 221, 1958.
- 4) 平沢, 長田, 小川: 結核, 30 (10), 579, 昭 30.

- 5) Roberts: 結核予防会結核研究所への手紙, 1953.
- 6) 小川: 結核, 24(11), 11, 昭 24.
- 7) 小川: 結核, 24(2), 19, 昭 24.
- 8) Löwenstein-Jensen: 引用 Edgar M. Medlar
ら, Am. J. Pub. Health, 41(3), 292, 1951.
- 9) 齊藤, 大島, 本庄, 中島: 結核, 33(3), 200,
33.
- 10) Tonge et al: Amer. Rev. Tbc., 73(6), 930,
1956.
- 11) A. Lind et al: Acta. tbc. scand., 31(2), 178,
1955.
- 12) Nassau: Proceedings of the Royal Society of
Med., 34, 397, 1941.
- 13) "Routine bacteriological Examination for Tu-
bercle Bacilli" States Serum Institute, Copen-
hagen, 1952.