

# 結核における酸性加熱沈降反応

## 第2報 喀痰について

国立東京療養所（所長 砂原 茂一）

小 西 忠 正

（昭和27年2月22日受付）

### I 緒 言

前報において結核酸性加熱沈降反応の術式及び免疫血清の調製、それを用いての基礎実験成績について述べた。本報においてはこれに引続き本反応を以ての喀痰検査成績を述べる。

そもそも結核喀痰の血清学的研究の多くは喀痰中抗体物質の検索に関するものである。すなわち椎葉<sup>1)</sup>、小林<sup>2)</sup>、大谷・根本<sup>3)</sup>等は結核喀痰中に喰菌性抗体を証明し、日置<sup>4)</sup>、阪本<sup>5)</sup>は結核菌増殖阻止物質を証明し、阪本<sup>5)</sup>、Karwacki<sup>6)</sup>等は対結核菌補体結合性抗体を、更に阪本<sup>5)</sup>は凝集素・沈降素（非特異性）をも証明した。

一方喀痰中結核菌抗原物質の証明に関しては Pitacarin<sup>7)</sup>、Phannenstiel<sup>8)</sup>は結核喀痰醋酸抽出液（中性）と結核患者血清との沈降反応で87/90は陽性反応を得た。同様にPhaginolie<sup>9)</sup>も結核喀痰生理的食塩水抽出液と結核患者血清との沈降反応を行つたが、この場合は10/93の少数にしか陽性例を得なかつた。芳賀<sup>10)</sup>は肺結核喀痰のアルカリ抽出液（中性）を以てビルケー反応陽性の肺結核患者に自家及び他家皮内反応を試み、それぞれ25.0%、38.3%の陽性率を得、これより開放性肺結核患者喀痰中にはツベルクリン様物質が排泄せられていと結論した。又同時にこれら喀痰液を抗原としていわゆる自家補体結合反応も行い、皮内反応よりもやや高い陽性率を得た。小林<sup>11)</sup>も肺結核喀痰のグリセリン液抽出液を以て患者自身及び他患者に皮内反応を行い、約85.0%のかなり高い陽性率を得た。しかして非結核喀痰でも遙かに弱いながらも陽性反応が見られるが、これは単なる非特異性蛋白反応によるものであつて、畢竟本反応は喀痰中のツベルクリン物質の存在を証するものであり、特に活動性、重症乃至末期肺結核喀痰ほどツベルクリン物質の排泄が甚しいと指摘した。その他日置<sup>12)</sup>は結核喀痰生理的食塩水抽出液と抗人血清家兎免疫血清との間に沈降反応を行い、結核喀痰中に抗原性蛋白質を100%証明した。がこれは特に結核に限られた反応ではない。

私は酸性加熱沈降反応を以て結核喀痰中の結核菌抗原物質を証明せんとし、若干の成績を得たのでここに報告する次第である。

### II 実験方法

第1報において詳述したから簡略に記す。

1) 免疫血清：結核家兎血清(a)及び結核加熱死菌免疫血清 No.5,6 の3種を用いた。

2) 被検喀痰の酸性加熱処理法：新鮮喀痰の膿性部をピペットで1~2cc採り、これに滅菌生理的食塩水5.0ccを加え、十分に均等化した後100°C 5~10分加熱、6% HCl で PH 3.0~3.2 となし、100°C、1~2時間加熱する。これを遠心沈澱して上清を4% NaOH で正しく中和、さらに100°C、5~10分加熱、遠心沈澱して清澄な上清を得た。本上清液を抗原として用いた。ただし上清は清澄であることと、正しく中性であることが必要である。

3) 沈降反応術式：いわゆる“普通の重層法沈降反応”（緒方）であり、両液層間に現われる白輪を室温において4時間迄観察した。白輪が直後、30分後、それ以後に現われるものを、それぞれ卍、卅、+、として記載し、反応出現せぬものを-とした。疑わしい反応はすべて陰性とした。

### III 実験成績

肺結核患者喀痰156例、304回；非結核性呼吸器患者喀痰或いは含嗽液26例、35回；健康者喀痰或いは含嗽液27例、28回、合計209例、367回の本反応検査成績を以下逐次述べる。

1) 肺結核喀痰の反応成績

(i) 綜 合 成 績

本療養所入所患者計156例、304回についての反応検査成績を綜合表示すると第3表の如くになつた。なお患者は重・中等・軽症の各症例を含んでおり、現在迄少なくとも3カ月間平均月1回の培養で結核菌陰性のものを菌陰性例とした。又反応は1回でも陽性に出れば、これを陽性例とした。

第3表によれば例数及び回数上それぞれ、91.7%、86.7%、——No.5,6血清では95.0%、89.4%——の高い陽性率を示し、結核菌陽性率82.1%よりもかなり高い値である。反応と結核菌との陽、陰性一致はそれぞれ80.1%、6.4%、菌陽性・反応陰性3例、これに反して菌陰性・反応陽性は18例の多きに達している。すなわち本反応は

第 3 表 肺結核喀痰の本反応総合成績

喀結核中菌	免血清	例数	回数	+		-	
				例数	回数	例数	回数
+	5,6	83	169	82 (98.8)	159 (94.1)	1 (1.2)	10 (5.9)
	a	45	86	43 (95.5)	78 (90.7)	2 (4.5)	8 (9.3)
	計	128	255	125 (97.6)	237 (93.0)	3 (2.4)	18 (7.0)
-	5,6	17	30	13 (76.4)	19 (63.3)	4 (23.6)	11 (36.7)
	a	11	19	5 (45.4)	8 (42.1)	6 (54.6)	11 (57.9)
	計	28	49	18 (64.3)	27 (55.1)	10 (35.7)	22 (44.9)
合	5,6	100	199	95 (95.0)	178 (89.4)	5 (5.0)	21 (10.6)
	a	56	105	48 (85.7)	86 (81.9)	8 (14.3)	19 (18.1)
	計	156	304	143 (92.3)	264 (86.7)	13 (7.7)	40 (13.3)

培養検査(月に1回程度)と比較的よく一致するが、更に一層鋭敏のようである。なお No.5,6 と (a) 血清との成績を比較するに、一見前者の方が優秀であるかに見えるが、量及び質において検査例が異つているために本表のみを以て優劣を断じ難い。いずれの血清によるものかなり優秀な成績をあげうるものといえよう。

#### (ii) 本反応と喀痰中結核菌との関係

本反応と喀痰中結核菌の存否、菌量との関係を、肺結核喀痰 156 例、304 回の検査でしらべた。この中 No.5,6 血清による 100 例、199 回の検査成績を別記した。(a) 血清による 56 例、105 回の成績はこれとほぼ同様であるので省略した。なお検査はすべて毎月少なくとも 1 回は行い、少なくとも 3 カ月間に結核菌を連続的に証明したものを「持続的陽性」とし、最長 1 年間に時々菌陽性で、且つそれが現在に迄至つていると認められるものを「時々陽性」とし、過去少なくとも 3 カ月培養で菌陰性のものを「培養陰性」とした。塗抹検査はチール・ネルゼン染色法により、集菌法は 8% NaOH を用い、培養は小川<sup>18)</sup>の定量培養法(3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 加酸性鶏卵培地に 4% NaOH 喀痰溶液 0.1 cc を流し込む)により判定は 2 カ月後に、培養試験管(平均 2 本宛)におけるコロニー数を平均した。

以上の成績は第 4 表の如くになつた。

すなわち塗抹、集菌持続的及び培養持続的陽性計 71 例において本反応も 100.0% 陽性を示した。集菌時々陽性 21 例中 1 例が (a) 血清により、培養時々陽性 36 例中 2 例が (a) 及び No.5,6 血清により各 1 例宛陰性であつたが、これ等はいずれもただ 1 回の検査にすぎなかつたものである。一方培養陰性 28 例中 60~70% が本反応陽性を示したことが注目される。畢竟本反応は喀痰中結核

菌とかなり密接な関係を有し、菌陽性喀痰では殆んど 100% に、菌を証明しえないような喀痰でもなお 60~70% に陽性反応を呈して結核菌乃至成分の存在を指示している。

本反応と結核菌量との関係をみるに、塗抹及び集菌陽性等の菌量の大なる症例では本反応度も高く、培養陽性或いは陰性の比較的菌量の小なる例では反応度は低い、という大凡の傾向を指摘できよう。しかしながら両者の関係を真に検討するためには上記の如く症例別によることなく、各喀痰個々について検討しなけ

ればならない。元來塗抹及び集菌法におけるガフキー数はかかる目的にはいささか非定量的で意味が少なく、定量培養法(小川)によるコロニー数を目安とするのが最も妥当であろう。かく定量培養法によるコロニー数と本反応度との関係は第 6 表に示されてある。本表によれば両者の間にはあまり著明ではないが、或程度の平行関係が認められる。

次に喀痰中結核菌の比較的少量なるいわゆる微量排菌例 14 例において本反応が如何に反応するかをしらべた。すなわち毎週乃至数日毎に反応を検し、同時にその喀痰を定量培養した長沢の成績と対比比較した。その成績は第 5,6 及び 7 表に示されてある。ただし表中培養成績の数字はコロニー数(平均値)を現す。

これらによれば計 14 例中本反応と培養との陽性一致は 11 例、陰性一致は 2 例、培養陰性・反応陽性 1 例である。又培養陽性喀痰 20 コ中、本反応陽性 18、陰性 2; 培養陰性喀痰 24 コ中、反応陽性 11(45.8%)、陰性 13(54.2%)を示した。すなわち本反応はコロニー数の小或いは 0 の喀痰においてもかなりよく陽性反応を呈し、結核菌抗原物質の排泄を証明している(以上第 5, 6 表)。又第 7 表にみる如く結核菌或いは成分の発見率(陽性数/検査数)をみても培養法の 26% 弱に対して本反応は 65% 弱の高率を示している。かくの如く本反応は症例別にみても喀痰別にみても培養法よりも鋭敏である。

又第 5,7 表より、本反応は稀に菌陽性の例よりも、持続的菌陽性例に陽性に出現し易いこと、及びただ 1 回の検査に止ることなく、頻回検査することが陽性率を高める上にも判定上にも大切であることが指摘される。

#### (iii) 本反応と喀痰中雑菌との関係

本反応が喀痰中の結核菌以外の細菌に対して如何に反

第 4 表 本反応と喀痰中結核菌との関係

結核菌	反 応	+				-	合 計
		冊	冊	+	計		
塗 抹(+)	例	15(75.0)	4(20.0)	1( 5.0)	20(100.0)	0	20
	回	25(75.7)	7(21.2)	1( 3.1)	33(100.0)	0	33
集	例	8(57.1)	5(35.7)	1( 7.2)	14(100.0)	0	14
	回	12(48.0)	11(44.0)	2( 8.0)	25(100.0)	0	25
菌	例	2(12.5)	10(62.5)	4(25.0)	16(100.0)	0	16
	回	3(19.1)	12(57.1)	5(28.8)	20(95.2)	1( 4.8)	21
時々(+)	例	5(13.2)	19(50.0)	11(28.9)	35(92.1)	3( 7.9)	38
	回	6(12.5)	23(47.5)	13(27.5)	42(87.5)	6(12.5)	48
培	例	4(27.2)	5(34.5)	2(18.8)	11(100.0)	0	11
	回	4(30.9)	6(46.1)	3(23.0)	13(100.0)	0	13
養	例	7(35.0)	8(40.0)	4(20.0)	19(95.0)	1( 5.0)	20
	回	7(29.1)	9(37.6)	7(29.1)	23(95.8)	1( 4.2)	24
時々(+)	例	2( 9.5)	11(52.3)	8(38.1)	21(95.4)	1( 4.6)	22
	回	4(11.1)	18(50.0)	12(33.8)	34(94.4)	2( 5.6)	36
(-)	例	3( 6.7)	20(44.4)	17(37.8)	40(88.9)	5(11.1)	45
	回	5( 7.3)	30(44.1)	24(35.8)	59(86.7)	9(13.3)	68
合 計	例	1( 6.0)	4(23.4)	8(47.0)	13(76.4)	4(23.6)	17
	回	3(10.8)	6(21.4)	9(32.1)	18(64.8)	10(35.7)	28
合 計	例	1( 3.3)	6(20.0)	12(40.0)	19(63.3)	11(36.7)	30
	回	3( 6.1)	8(16.3)	16(32.6)	27(55.0)	22(45.0)	49
合 計	例	32(32.0)	39(39.0)	24(24.0)	95(95.0)	5( 5.0)	100
	回	51(32.8)	60(38.4)	32(20.5)	143(91.7)	13( 8.3)	156
合 計	例	51(25.6)	76(38.1)	51(25.6)	178(89.4)	21(10.6)	199
	回	78(25.6)	113(37.1)	73(24.0)	264(86.7)	40(13.3)	304

註：但し No.5,6 血清成績/総合成績；( )内は %

応するかを検討するために少数ながら次の実験を行った。すなわち少なくとも3カ月以上平均毎月1回の培養で結核菌陰性の喀痰を採り、塗抹標本を作り、グラム染色及びチール・ネルゼン染色を施して検鏡、少なくとも10以上の視野において最も多い細菌を決定して第8表の如くに分類した。しかしてこの喀痰を同時に培養し、結核菌陽性であればこれを除外した。

かくの如く検査した14の喀痰の反応成績は第8表の如くなつた。

本表によれば14例中1例が反応陽性を呈した。この1例は連続定量培養で時々結核菌を証明するもので、本表における陽性反応が果して結核菌以外の細菌によるものか否かは速に断定しえない。又逆に本反応陰性5例において結核菌以外の抗酸性菌、コロニーを培養検出したことを附記する。

## 2) 非結核喀痰の反応成績

肺結核以外の呼吸器疾患計26例、35回；健康者27例、28回、合計53例、63回における喀痰の本反応検査成績をみるに第9表の如くなつた。ただし健康者その他で喀痰の喀出なきものは数回の生理的食塩水含嗽液を以て本反応を検した。

第9表によれば53例中4例、7回が陽性反応を呈した。ただしこの中※1例及び※※の中の1例計2例は本反応検査時にレ線にも異常を認めなかつたにもかかわらず、本反応検査後約1~2月後に2例とも発病し、やがて結核菌陽性となつたものである。すなわち本反応がその最も早期な診断をなしたわけである。他2例はともにツ反応陽性、喀痰を喀出するもので、本反応各1回宛陽性であつた。この陽性反応が如何なる機転によるものか、反応操作或いは抗原抽出操作の不備によるものかも

第 5 表 本反応と定量培養成績との比較 (1)

1	日 培 反	31日連日 0.5 0.5 0 1.0 0.5 0.5 0 0 1 0 0 2.5 0 0 11 5 0.5 0 0 0 0.5 5 25.5 4 0 0.5 0 0 2.5 0.5 1 + # # #	
2	日 培 反	26日連日 0 0 0 <sub>1</sub> 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 <sub>2</sub> 0 0 0 0 0 0 0 3 - - + +	
3	日 培 反	31日連日 0 0 0 0 0.5 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 - # + -	
4	日 培 反	31日連日 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 - + + -	
5	日 培 反	45日 3~4 日毎 0 0 0 0 0 # 80 77 0 125 37.5 0 25 0 # + # #	
6	日 培 反	23日 1~5 日毎 1.5 5.5 0 3 7 0.5 0 + + #	
7	日 培 反	25日 3~4 日毎 0 0 0 0 11.5 0.5 0 31.5 + - +	
8	日 培 反	28日 3~4 日毎 0 150 0 200 0 # 0 # 0 # # #	
9	日 培 反	25日 3~4 日毎 0 0 0 0 0 0 0 0 + -	
10	日 培 反	5日 連日 140 57.5 0 2.5 0 # # #	
11	日 培 反	9日 連日 0 0 0 0 0 1 0 0 + # -	
12	日 培 反	31日 7日毎 0 3 1.5 0 <sub>1</sub> 11 - # + +	
13	日 培 反	31日 7日毎 0 0 <sub>2</sub> 0 0 0 - - -	(この前2カ月連日) すべて0
14	日 培 反	31日 7日毎 0 0 0 <sub>0.5</sub> 0 0 - - -	(この前2カ月連日) すべて0

註： 但し ×…雑菌， #…コロニー 201 以上

第 6 表 本反応と定量培養成績との比較 (2)

反応 コー ニ	+				-	合計	
	冊	冊	+	計			
~201 (冊)	2(2)	1		3 (2)		3 (2)	
200~101		1		1		1	
100~51		1(1)		1 (1)		1 (1)	
50~20	1(1)	1	1(1)	3 (2)		3 (2)	
11 以 下	11		1(1)	1	2 (1)	2 (1)	
	5		1(1)		1 (1)	1 (1)	
	3			1(1)	1 (1)	1	
	2.5	1	1		2	2	
	1.5		1	1	2	2	
	0.5		1(2)	1(1)	2 (3)	1	3 (3)
+	合計	4(3)	9(5)	5(3)	18(11)	2	20(11)
0			3	10(1)	13 (1)	15(2)	28 (3)
合計	4(3)	12(5)	15(4)	31(12)	17(2)	48(14)	

註：但し ( ) 内は例数

第 7 表 本反応と定量培養成績との比較 (3)

症 例	結核菌乃至成分証明率					
	培 養			本 反 応		
	回 数	陽 性 数	%	回 数	陽 性 数	%
1	31	18	58.1	4	4	100
2	26	2	7.7	4	2	50
3	31	3	9.6	4	2	50
4	31	1	3.2	4	2	50
5	14	6	42.9	4	4	100
6	7	5	71.4	3	3	100
7	8	3	37.5	3	2	66.7
8	9	4	44.4	3	3	100
9	8	0	0	2	1	50
10	5	3	60	3	3	100
11	8	1	12.5	3	2	66.7
12	5	3	60	4	3	75
13	5	0	0	4	0	0
14	5	0	0	3	0	0
計	193	49	25.4	48	30	64.6

第 8 表 本反応と喀痰中雑菌との関係

喀痰中細菌	反応		
	例数	+	-
双球菌	5	1	4
葡萄状球菌	3	0	3
連鎖状球菌	2	0	2
以上の混合型	2	0	2
その他細菌	2	0	2
合計	14	1(7.1)	13(92.9)

しれないし、潜在性肺結核であるかもしれない。更に経過を観察するつもりであるが、とにかく現在のところは非特異反応と見做す外はない。以上本反応はかなり結核特異的であるといえる。

3) 附：肺結核患者の胸部レ線所見、血沈、発熱等の諸所見と本反応との関係は必ずしも平行的なものでない。要するに病態の開放性、閉鎖性の別によるものの如くである。又ストレプトマイシン投与後、或いは虚脱療法施行後の本反応の反応態度は結核菌の排出経過と概ね平行する如くであるが、詳細は後報を

期したい。

IV 考 察

1) 鋭敏さについて：上記実験成績にみる如く本反応は喀痰の結核菌乃至成分を塗抹、集菌法は勿論、培養法よりもより鋭敏に証明するものであるといえよう。ここにこれを例証すべき個々の若干例をあげれば、前述の如く本反応陽性の健康者及び気管支炎各 1 例は 1~2 月後に発病したし、肺結核軽症或いは手術後のもので本反応陽性出現当時には菌陰性であつたのにやがて 1~2 月後にまた培養陽性或いは集菌陽性、更には塗抹陽性に逆転した 5 例を経験している。又一旦軽快した例で本反応陽性検査後やはり 1~2 月後にシェーブを起した 3 例もある。これらの事実よりしても本反応が病態の発生・推移・増悪等をかなり鋭敏に随つてかなり早期に指示しうることが分る。

2) 特異性について：上述の如く本反応は肺結核喀痰において結核菌の存否とかなり密接な関係を有したこと、結核菌以外の諸細菌含有喀痰及び非結核性呼吸器疾患喀痰、健康者喀痰等において本反応は非常に高率に陰性であつたこと——非特異反応は高々 4%——等より本反応は甚だ特異性に富むものといえる。又第 9 表中慢性気管支炎の 1 例の如きは 1 カ月余に亘る血痰と微熱とを主訴とし、肺結核の疑いを以て来診したのであるが、レ線検査、喀痰培養頻回検査等の精密検査で結核を否定され、現在迄 2 年余健康に経過している。本例において本

第 9 表 非結核性呼吸器疾患及び健康者喀痰反応成績

疾 患	反 応		+		-	合 計	
			冊, 冊	計			
非結核性呼吸器疾患	咽 喉 頭 炎				3 (4)	3 (4)	
	気管支炎	急 性		1 (1)	1 (1)	9 (10)	10 (11)
		慢 性		1※(3)	1 (3)	3 (4)	4 (7)
	気管支喘息				3 (5)	3 (5)	
	肺 炎				2 (3)	2 (3)	
	肺 壞 疽				1 (1)	1 (1)	
	気管支拡張症				2 (3)	2 (3)	
	百 日 咳				1 (1)	1 (1)	
小 計			2 (4)	2 (4)	24 (31)	26 (35)	
健康者	ツベルクリン反応	+		2※※(3)	2 (3)	15 (15)	17 (18)
		-				10 (10)	10 (10)
合 計			4 (7)	4 (7)	49 (56)	53 (63)	

註： 但し ( ) 内は検査回数

反応は数回の検査ですべて陰性であつて興味ある 1 例であつた。

3) 操作について：本反応は血清学的方法としては比較的簡単である。ただし優秀な免疫血清をうる事が最も工夫を要することで、これが本反応の重要な問題である。又酸性加熱抽出操作は厳正に行い、特に中性の抽出液を以て反応を検査しなければならない。

4) これは要するに本反応は他の諸検査法特に培養法に比しより鋭敏であり且つ時間をはるかに節約できる長所を有する。しかしながら一方得られる免疫血清によつて成績が変動する恐れがある。

そもそも喀痰中の結核菌乃至成分を証明する方法は現在培養法、動物実験法等をおいて他になく、それとても増殖可能な生結核菌の一定量が必要である。結核菌崩壊成分の証明に至つては未だに方法がない。これが本反応を企てた所以であり、本反応が独自なる所以であつて、結核病竈の存在及び推移を推定、診断する方法として有用であり、培養所見がたとえ陰性でも本反応が陽性ならば結核菌の存在を疑ふべきであり、或いは諸種治療法による効果・安静度・作業療法等の諸判定に際しては、本陽性反応例では病竈が未だ治癒、閉鎖していないということを考慮すべきではなからうか。爾後益々検討するつもりであるが上記諸種の点で本反応は有用であると信ずる。

#### V 結 語

酸性加熱沈降反応を肺結核喀痰 156 例、非結核性呼吸器疾患及び健康者喀痰或いは含嗽液それぞれ 26 例、27 例、合計 209 例に試みて次のことが結論された。

1) 肺結核喀痰では 92.3~95.0% の陽性率を得た。本反応は結核菌陽性喀痰では 99% 弱に、菌陰性喀痰でも 60~70% に陽性であつた。連続定量培養成績と比較してもこれより陽性率が高かつた。又本反応は一般に結核菌の多い喀痰において高度に反応するようである。

2) 非結核性呼吸器疾患及び健康者喀痰或いは含嗽液では 2 例 (約 4%) (後に結核を発症した 2 例を除く) に陽性反応を呈し、結核菌以外の細菌含有喀痰 1 例にも陽性反応を呈した。これを今非特異反応としても本反応は甚だ特異性に富むものといえよう。

3) これを要するに本反応は喀痰中結核菌或いは菌成分を証明する方法として特異且つ鋭敏であり、独自なものである。しかして肺結核の早期診断上、病勢判定上、更には予後を卜する上にも有用たり得よう。

#### 文 献

- 1) 椎葉：細菌学・誌，295 号，大 9。
- 2) 小林：同上，338 号，大 13。
- 3) 大谷・根本：同上，271，大 7；262 号，大 6。
- 4) 日置：結核，14：734，昭 11。
- 5) 阪本：同上，11：3，昭 8。
- 6) Karwacki：Zbl. f. Tbk.，5：365，1911。
- 7) Piticarín：Zschr. f. Tbk.，29：327，1923；Ergebn. d. Hyg. u. Bakt. 6，1923。
- 8) Phannenstiél：Ergebn. d. Hyg. u. Bakt.，6，1923。
- 9) Phaginolie：Zit. bei (5)。
- 10) 芳賀：結核，5：235，昭 2。
- 11) 小林：同上，9：1123，昭 6。
- 12) 日置：同上，14：724，昭 11。
- 13) 小川：同上，25：207，昭 25。