

喀痰沈渣及び喀痰液よりの結核菌培養に際しての前処置法並びに培地の種類の検討

(その8)結核菌検査法改良に関する研究

広島大学医学部細菌学教室(主任 占部教授)

和田内科教室(主任 和田教授)

井村 氏 宏

(昭和 29 年 3 月 8 日受付)

(この研究の一部は文部省科学研究費によつた。占部)

緒 言

先に¹⁾は結核喀痰より結核菌分離培養を行うに当つて、4% NaOH 水、5% H₂SO₄ 水及び占部^{2),3)}の所謂「迅速アルカリ法」の3種の前処置法を用いてそれぞれ喀痰液を作製し、3% Na₂HPO₄ 培地、岡・片倉培地及び3% KH₂PO₄ 培地に定量培養を行い、前処置法の如何によつてその際に併せ使用する培地の種類の選択が必要であることを明らかにしたのであるが、この度は移植材料が従来の如き喀痰沈渣である場合と喀痰液である場合とで、如何なる前処置法とどの培地を組合せるのが最も有利であるかという点について検討すべく、次のような実験を行つたのでその成績の概要を報告する。

第1章 実験の材料及び方法

材 料：抗結核剤を使用中の結核患者喀痰（但し直接鏡検で結核菌陰性のもの）計 30 例。

方 法：滅菌シャーレに採つた喀痰を予め注射器によつて機械的に強く混和し充分均等化した後 3 枚の滅菌シャーレの各々に 1.2 cc 宛分注し、その 1 には 5 倍量の 4% NaOH 水を加えて更に 4~5 分間充分攪拌均等化してから、その 0.3 cc 宛を 3% Na₂HPO₄ 卵培地（以下アルカリ性培地）、岡・片倉培地及び 3% KH₂PO₄ 卵培地（以下酸性培地）各 1 本にピペットで移植する他に、その 1 cc 宛は 3,000 回転 20 分遠沈しその沈渣を上述 3 種培地各 1 本に全量移植し、喀痰液移植では 3~4 日間培地面を水平に保つたまま 37°C に放置し、喀痰液が培地斜面上に平等に乾涸するのをまつて、又沈渣移植ではそのまま直ちに、それぞれ封蠟し 37°C に収めて引続き 8 週間にわたつて培養を続け、毎週集落の発生状況を観察した。

その 2 には 5% H₂SO₄ 水を加えて、その後は上述 NaOH 水の場合と同様にした。

その 3 にはその半量の 8% NaOH 水を加えて充分均等化した後に 10% H₂SO₄ 水を加えた NaOH 水の半量加えて中和（迅速アルカリ法）した喀痰液を一方では 0.3 cc 宛そのまま上述と同様にして 3 種培地へ移植培養し又他方ではこの喀痰液 0.3 cc 宛を 3,000 rpm 20 分間遠沈して得られた沈渣全量を各別に 3 種培地に移植した。

第2章 実験成績

I 集落の初発日数、発生数及び発生培地数

(表 1 参照)

1) 4% NaOH 水前処置の場合：喀痰沈渣並びに喀痰液を移植した供試 3 種培地計各々 90 本中培養 8 週までに集落発生の認められたものは、両材料より共に 27 本 (30%) であつた。このうち喀痰沈渣では陽性培地計 27 本中酸性培地が 24 本 (88.9%)、岡・片倉培地が 3 本 (11.1%) を占め、アルカリ性培地では集落発生は全く認められなかつた。一方喀痰液でも陽性培地計 27 本中酸性培地が 25 本 (92.6%)、岡・片倉培地が 2 本 (7.4%) を占め、アルカリ性培地では上記の喀痰沈渣の場合と同様集落発生は全例認められなかつた。

培養日数からみると、喀痰沈渣では 4 週後にいたつて集落の初発したものが集落陽性培地 27 本中 10 本 (37.0%) で最も多く、次いで 3 週後の 6 本 (22.2%)、6 週後の 5 本 (18.6%)、2 週後の 4 本 (14.8%)、5 週後の 2 本 (7.4%) の順であり、培養 1 週以内及び 7 週以後の集落初発は全くなかつた。又喀痰液では集落初発培地 27 本中集落初発を最も多く認めたのは 3 週後の 9 本 (33.3%) であり、次いで 4 週後の 7 本 (25.9%)、5 週後の 5 本 (18.6%)、6 週後の 3 本 (11.1%)、2 週後の 2 本 (7.4%)、7 週後の 1 本 (3.7%) の順で 1 週以内及び 8 週以後には初発集落は認められなかつた。以上よりみれば移植材料が喀痰液であつても又は喀痰沈渣であつてもその間に特にいう程の優劣の差はないものようであつたが、それでも沈渣では初発集落例の最多が 4 週後において甞めて見られたのに対して、喀痰液ではそれが既に 3 週後に見られた事よりすれば或いは移植材料としては前者に比して後者が多少とも好適と考えられないでもないであろう。なお移植材料の如何を問わず一般に発生集落数の多かつたもの程集落発現に要する時間は短いようであつた。

2) 5% H₂SO₄ 水前処置の場合：この場合培養全期間を通じて集落の発生した培地数は材料が沈渣の時では供試培地 90 本中 50 本 (55.6%)、喀痰液の際では 90 本中 44 本 (48.9%) で、これを各種培地に就いてみると、沈渣ではアルカリ性培地において集落発生例最も多く陽

表 1 集落の初発日数、発生数及び発生培地数

発生集落数	前處置法 移 植 材 料	4% NaOH 水		5% H ₂ SO ₄ 水		迅速アルカリ法 (8% NaOH 水 + 10% H ₂ SO ₄ 水)	
		A	B	A	B	A	B
0	3% Na ₂ HPO ₄	0	0	0	0	0	0
	岡・片倉	0	0	0	0	0	0
	3% KH ₂ PO ₄	0	0	0	0	0	0
1~10	3% Na ₂ HPO ₄	0	0	IV ₁ , V ₅ , VI ₃ , VII ₁ , VIII ₂	IV ₃ , V ₅ , VI ₂ , VII ₂	III ₁ , IV ₁ , V ₂ , VI ₂	III ₁ , IV ₁ , V ₂ , VI ₁ , VII ₁
	岡・片倉	IV ₂	III ₂	III ₁ , IV ₃ , V ₂ , VI ₂	IV ₁ , V ₄ , VI ₂	IV ₂ , VI ₁	VI ₂ , V ₃ , VI ₁ , VII ₂
	3% KH ₂ PO ₄	IV ₆ , V ₁ , VI ₂	III ₁ , IV ₅ , V ₂ , VI ₃ , VII ₁	IV ₃ , V ₂ , VI ₁	III ₁ , IV ₁ , VI ₁	III ₁ , IV ₃ , V ₃ , VI ₁ , VII ₁ , VIII ₁	III ₂ , IV ₃ , VI ₁ , VII ₂
11~50	3% Na ₂ HPO ₄	0	0	V ₂	V ₁	IV ₁ , V ₁ , VI ₁	III ₁ , VI ₁
	岡・片倉	0	0	IV ₁	IV ₁	III ₁ , IV ₃ , VI ₁	V ₁ , VI ₁
	3% KH ₂ PO ₄	IV ₁ , VI ₂	III ₁ , IV ₁ , V ₂	III ₁	V ₁	IV ₁	0
51~100	3% Na ₂ HPO ₄	0	0	II ₁	0	V ₁	0
	岡・片倉	0	0	0	0	V ₁	0
	3% KH ₂ PO ₄	0	0	II ₁	0	0	VI ₁
101~150	3% Na ₂ HPO ₄	0	0	0	V ₁	0	0
	岡・片倉	0	0	0	0	II ₁ , IV ₁ , VI ₁	IV ₂
	3% KH ₂ PO ₄	III ₁ , V ₁	III ₁ , V ₁	V ₁	V ₁	III ₁ , VI ₁	III ₁
151以上	3% Na ₂ HPO ₄	0	0	II ₁ , III ₂ , IV ₁ , V ₁ , VI ₁	II ₂ , III ₂	II ₁	II ₁ , III ₁ , VI ₁
	岡・片倉	VI ₁	0	II ₁ , III ₂ , IV ₁ , VI ₁	II ₂ , III ₃ , IV ₁ , V ₁	II ₁ , III ₃	II ₂ , III ₅ , VI ₁
	3% KH ₂ PO ₄	II ₄ , III ₅ , IV ₁	II ₂ , III ₄ , IV ₁	II ₁ , III ₃ , IV ₁ , VI ₁	II ₁ , III ₂ , IV ₂ , VI ₁	II ₄ , III ₂ , IV ₂	II ₂ , III ₆ , IV ₂ , VI ₁

註：1) Aは喀痰沈渣，Bは喀痰液 以下同じ

2) アラビア数字は結核菌集落発生培地数を，ローマ数字は培養週を示す

性培地 50 本中 21 本(42.0%)を占め，次で酸性培地の 15 本(30.0%)，岡・片倉培地の 14 本(28.0%)の順であり，喀痰液の場合にも同じくアルカリ性培地に集落発生例最も多く陽性培地 44 本中 18 本(40.9%)を占め，次で岡・片倉培地の 15 本(34.1%)，酸性培地の 11 本(25.0%)であった。

培養期間別にこれを見ると，沈渣よりの集落発生培地 50 本中 5 週後において集落の発生したものが 13 本(26.0%)で最も多く，次で 4 週後の 11 本(22.0%)，3 週及び 6 週後の 9 本(18.0%)，2 週後の 5 本(10.0%)，8 週後の 2 本(4.0%)，7 週後の 1 本(2.0%)の順であり 1 週以内の集落初発はみられなかった。又喀痰液では陽性培地 44 本中 5 週後に集落の初発したものが 14 本(31.8%)で最も多く，次で 4 週後の 9 本(20.5%)，3 週後の 8 本(18.2%)，6 週後の 6 本(13.6%)，2 週後の 5 本(11.4%)，7 週後の 2 本(4.6%)の順で，1 週以内及び 8 週後には集落の初発は認められなかった。

以上よりみれば 5% H₂SO₄ 水前処置の場合にも移植材料が喀痰沈渣と喀痰液とで成績に著差はなく，初発集落の最も多かつたのは共に 5 週後であった。

3) 迅速アルカリ法を以つて前処置した場合：培養全期間を通じて集落の陽性であった培地数は両移植材料よ

りそれぞれ供試 3 種培地各 90 本中 49 本(54.4%)及び 54 本(60.0%)であった。なお喀痰沈渣では陽性培地 49 本中酸性培地が 22 本(44.9%)で最も多く，次で岡・片倉培地の 16 本(32.7%)，アルカリ性培地の 11 本(22.4%)の順であり，他方喀痰液では陽性培地 54 本中酸性培地に陽性例最も多く 22 本(40.7%)，次で岡・片倉培地の 21 本(38.9%)，アルカリ性培地の 11 本(20.4%)の順であった。

これを培養週別にみると，喀痰沈渣では陽性例が 4 週後に最も多く陽性培地 49 本中 15 本(30.6%)を占め，次で 5 週後の 10 本(20.4%)，2，6 及び 7 週後のそれぞれ 5 本(9.3%)の順であり，1 週以内及び 8 週以後に集落の初発したものはなかった。

従つてこの前処置法によつた場合にも両移植材料別による成績の優劣の差は特に著明ではなかったが，それでも先の 4% NaOH 水前処置の場合と同様に，材料が喀痰沈渣であった際には 4 週後に集落の初発するものが最も多かつたのに比して，喀痰液の場合にはより早く 3 週後に集落初発例が最も多かつた。なお集落数の多いもの程集落の初発する時期が早かつたことは前述両前処置法の場合と同様であった。

II 肉眼的集落発生の培地数とその所要日数

(表2参照)

表2に示したように 4%NaOH 水前処置の場合には、喀痰沈渣移植の際には酸性培地では計 30 本中培養 8 週後迄に 24 本 (80.0%) に又岡・片倉培地では30本中 3 本 (10.0%) にそれぞれ集落の発生があつたが、アルカリ性培地では遂に終始集落発生皆無に終つた。又喀痰液移植の場合には各培地 30 本ずつのうち酸性培地では25本 (83.3%) に、岡・片倉培地では2本(6.7%)に

それぞれ集落発生し、アルカリ性培地では喀痰沈渣の場合同様に全く集落は発生しなかつた。

5% H_2SO_4 水前処置の際には、沈渣材料では集落発生例の最も多かつたのはアルカリ性培地であつて供試30本中 21 本 (70.0%) に、次では酸性培地であつて30本中 15 本 (50.0%) に、又岡・片倉培地では 30 本中14本 (46.7%) にそれぞれ集落発生があつた。喀痰液でも同様に集落発生例の最も多いのはアルカリ性培地であつて

表2 肉眼的に結核菌の発育が認められた培地数と其の所要日数との関係

前 處 置	培 地	培 養 材 料	培 養 週 数	1 2 3 4 5 6 7 8								
				1	2	3	4	5	6	7	8	
4 % NaOH 水	3% Na_2HPO_4	A	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		B	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	岡・片倉	A	30	0	0	0	2 (6.7%)	2 (6.7%)	3 (10.0%)	3 (10.0%)	3 (10.0%)	3 (10.0%)
		B	30	0	0	2 (6.7%)	2 (6.7%)	2 (6.7%)	2 (6.7%)	2 (6.7%)	2 (6.7%)	2 (6.7%)
	3% KH_2PO_4	A	30	0	4 (13.3%)	10 (33.3%)	18 (60.0%)	20 (66.7%)	24 (80.0%)	24 (80.0%)	24 (80.0%)	24 (80.0%)
		B	30	0	2 (6.7%)	9 (30.0%)	16 (53.3%)	21 (70.0%)	24 (80.0%)	25 (83.3%)	25 (83.3%)	25 (83.3%)
5 % H_2SO_4 水	3% Na_2HPO_4	A	30	0	2 (6.7%)	4 (13.3%)	6 (20.0%)	14 (46.7%)	18 (60.0%)	19 (63.3%)	21 (70.0%)	
		B	30	0	2 (6.7%)	4 (13.3%)	7 (23.3%)	14 (46.7%)	16 (53.3%)	18 (60.0%)	18 (60.0%)	
	岡・片倉	A	30	0	1 (3.3%)	4 (13.3%)	9 (30.0%)	11 (36.7%)	14 (46.7%)	14 (46.7%)	14 (46.7%)	
		B	30	0	2 (6.7%)	5 (16.7%)	8 (26.7%)	13 (43.3%)	15 (50.0%)	15 (50.0%)	15 (50.0%)	
	3% KH_2PO_4	A	30	0	2 (6.7%)	6 (20.0%)	10 (33.3%)	13 (43.3%)	15 (50.0%)	15 (50.0%)	15 (50.0%)	
		B	30	0	1 (3.3%)	4 (13.3%)	7 (23.3%)	9 (30.0%)	11 (36.7%)	11 (36.7%)	11 (36.7%)	
迅 速 アルカリ法 (8%NaOH水 + 10% H_2SO_4 水)	3% Na_2HPO_4	A	30	0	1 (3.3%)	2 (6.7%)	4 (13.3%)	8 (26.7%)	11 (36.7%)	11 (36.7%)	11 (36.7%)	
		B	30	0	1 (3.3%)	4 (13.3%)	6 (20.0%)	8 (26.7%)	10 (33.3%)	11 (36.7%)	11 (36.7%)	
	岡・片倉	A	30	0	2 (6.7%)	6 (20.0%)	12 (40.0%)	14 (46.7%)	16 (53.3%)	16 (53.3%)	16 (53.3%)	
		B	30	0	2 (6.7%)	7 (23.3%)	12 (40.0%)	17 (56.7%)	19 (63.3%)	21 (70.0%)	21 (70.0%)	
	3% KH_2PO_4	A	30	0	4 (13.3%)	8 (26.7%)	15 (50.0%)	19 (63.3%)	20 (66.7%)	21 (70.0%)	22 (73.3%)	
		B	30	0	2 (6.7%)	11 (36.7%)	16 (53.3%)	19 (63.3%)	20 (66.7%)	22 (73.3%)	22 (73.3%)	

供試 30 本中18本 (60.0%) に陽性であり、次で岡・片倉培地では 30 本中 15 本 (50.0%) に、又酸性培地では 30 本中 11 本 (36.7%) にそれぞれ集落の発生がみられた。

更に迅速アルカリ法前処置の場合には沈渣では酸性培地において供試培地 30 本中 22 本 (73.3%) に集落発生陽性で最も多く、岡・片倉培地は 30 本中 16 本 (53.3%) 陽性にこれに次ぎ、アルカリ性培地では 30 本中漸く11本 (36.7%) に陽性であるに過ぎなかつた。又喀痰液移植のさいにも沈渣移植の場合と似た関係がみられ、酸性培地において 30 本中 22 本(73.3%)、岡・片倉培地では 30 本中 21 本 (70.0%) 又アルカリ性培地では30本中 11 本 (36.7%) にそれぞれ集落発生があつた。

次に、前処置別に成績を比較してみると 4%NaOH 水法及び迅速アルカリ法では、移植材料の如何に拘わらず共に酸性培地に集落陽性例 (率) 最も高く、アルカリ性培地では陽性例 (率) は 0 又又は殆んど問題にならぬ程の低率を示すに過ぎなかつた。ところが 5% H_2SO_4 水

法ではこれに反して兩種移植材料共にアルカリ性培地が他の 2 種培地よりも優れた成績を示した。

次に全体としての成績を通覧すると、結局のところ移植材料としては喀痰沈渣を用いても喀痰液を用いてもいずれの際にも 4% NaOH 水により前処置後酸性培地に移植した場合が培養陽性例が最も高いことが分つた。

III 雑菌迷入頻度 (表3参照)

表3に示したように、4%NaOH 水前処置のものには移植材料の如何を問わず全く雑菌混生なく、5% H_2SO_4 水前処置の際には喀痰沈渣及び喀痰液共に岡・片倉培地並びに酸性培地にそれぞれ 1 例ずつ雑菌混生が見られ、迅速アルカリ法前処置では沈渣材料では岡・片倉培地に 2 例、酸性培地に 1 例、又喀痰液では酸性培地に 2 例、岡・片倉培地に 1 例それぞれ雑菌が混生した。

今回の実験では上記のように迅速アルカリ法による前処置の際に雑菌迷入率が最も高かつたが、これは喀痰均等化の操作をシャーレ内で行つた為に雑菌迷入の機会がより多くしかも中和したため雑菌の生残したものがより

表 3 雑菌迷入頻度

前處置法		4% NaOH 水						5% H ₂ SO ₄ 水						迅速アルカリ法 (8% NaOH 水 + 10% H ₂ SO ₄ 水)					
培 地	種 類	3%Na ₂ HPO ₄		岡・片倉		3%KH ₂ PO ₄		3%Na ₂ HPO ₄		岡・片倉		3%KH ₂ PO ₄		3%Na ₂ HPO ₄		岡・片倉		3%KH ₂ PO ₄	
	培養材料	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
	數	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
雑 菌 迷 入	數	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	2	1	1	2
	%	0	0	0	0	0	0	0	0	3.3%	3.3%	3.3%	3.3%	0	0	6.7%	3.3%	3.3%	6.7%
	計	0						4 (2.2%)						6 (3.7%)					

多かつたことによるものと思われる。

総 括 的 結 語

以上の結核喀痰 30 例を供試して 4%NaOH 水法, 5% H₂SO₄ 水法及び迅速アルカリ法による前処置の各喀痰沈渣並びに喀痰液よりの 3% Na₂HPO₄ 培地, 岡・片倉培地及び 3%KH₂PO₄ 培地による定量培養実験の結果よりすれば喀痰沈渣を移植する場合にあつては 3% KH₂PO₄ 培地では 4%NaOH 水前処置の際に集落発生陽性率最も高く, 次いで迅速アルカリ法, 5%H₂SO₄ 水法によるものの順であり, 3%Na₂HPO₄ 培地では 5% H₂SO₄ 水法において集落発生率最も高く続いて迅速アルカリ法であり 4%NaOH 水法では成績全く陰性に終わった。岡・片倉培地では迅速アルカリ法, 次いで 5%H₂SO₄ 水法, 4%NaOH 水法の順に集落発生率が高かつた。

次に喀痰液移植の場合であるが, これも上記の喀痰沈渣移植の際と全く同様の傾向を示した。なお, 全成績を通じて培養陽性率の最高を示したのは 4%NaOH 水法による喀痰液又は喀痰沈渣を 3%KH₂PO₄ 培地に移植した場合であつた。

以上の事実は小川(4), (5)の指摘した喀痰に対してほどこそ前処置法如何によつて用うべき培地を選択すべきであるということ私の前報(1)と共に示唆するものであると考えられる。

さて結核喀痰培養に當つて必ずしも遠沈を必要としないことについては既に 2, 3 の報告(緒方(6), 小川(7), (8), 水野(9), (10))があるが, 私の今回の実験においては 5% H₂SO₄ 水前処置後に 3% Na₂HPO₄ 培地及び 3%KH₂PO₄ 培地に移植した際には寧ろ喀痰沈渣移植の方が喀痰液移植の場合よりも若干成績がよいような傾向を示し, 迅速アルカリ法で前処置後岡・片倉培地に移植した際には喀痰液の方に集落陽性率が稍々高いようであつたが, その他の場合では両者間に大差は認められなかつた。この 5% H₂SO₄ 水法で前処置した場合喀痰沈渣移植の方が喀痰液移植に比してむしろ多少とも優れている

ような成績の得られた原因については, 喀痰液では移植量が 0.3 cc であつたのに対して喀痰沈渣の移植量は喀痰液 1 cc より得られた沈渣全量であつた為に前者に比して後者において移植菌量がより大であつたであろうこと, 及び H₂SO₄ 水法では生ずる沈澱量が多いので遠沈によつて多量の菌を含む沈渣が生じたことによるのではないかと思われる。

次に集落の初発日数, 初発数及び発生培地数の点から見るに, いずれの前処置の場合にも発生集落数の多い例程集落初発も比較的早い傾向がみられたことは山内(11)の報告と符合するところであり, 又 5% H₂SO₄ 水で前処置した場合には両材料とも 5 週後に同様に集落初発例が最も多くなつた。4%NaOH 水及び迅速アルカリ法で前処置した際にはいずれも, 喀痰沈渣では 4 週後に集落初発例が最多に達したのに対して喀痰液では既に 3 週後においてそれがみられた。従つて後 2 者では喀痰液移植の方が沈渣移植に比して多少とも優れており且つ喀痰に対する前処置には酸性剤によるよりもアルカリ剤を使用した方がより有利であるとも云い得るのではあるまいか。

文 献

- 1) 井村氏宏: 広島医学, 5, 457, 昭27.
- 2) 占部薫: 実地医家と臨牀, 19, 212, 昭17.
- 3) 占部薫: 医界週報, 445, 1, 昭18.
- 4) 小川辰次: 結核菌検索の基礎と応用, 保健同人社 東京, 昭27.
- 5) 小川辰次: 結核, 24, 403, 昭24.
- 6) 緒方久雄: 熊本医会誌, 23, 283, 昭25.
- 7) 小川辰次他: 結核, 26, 86, 昭26.
- 8) 小川辰次: 日結, 10, 460, 昭26.
- 9) 水野護: 綜合医学, 9, 98, 昭27.
- 10) 水野護: 綜合医学, 9, 805, 昭27.
- 11) 山内開蔵: 結核研究, 2, 37, 昭19.