

## 喉頭粘液よりの結核菌の分離培養

結核予防会・結核研究所（所長 隈部英雄）

平 沢 亥佐吉・長 田 進

北里研究所附属病院

小 川 辰 次

（受付 昭和 30 年 5 月 20 日）

### （1）緒 論

喀痰の欠除している際の結核菌検査の材料としては我国では従来合嗽水、咽喉粘液、胃液糞便等が用いられて来たが、最近は特に胃液が用いられるようになって来た。喀痰の欠除している場合に、喉頭粘液を培養することは、我国ではほとんど行われていない。しかし外国では広く行われているようである。すなわち(1)M.A. Soltys, (2) T. Holmes & J. L. Livingston (1952), (3) Henry S. Willis (1952) 等の書いた教科書にはいずれも喉頭粘液についてふれているし、英国の(4)(5) Tuberculosis Chemotherapy Trials Committee (1952, 1953) でも結核症に対する化学療法剤の検討においては喀痰や胃液と共に喉頭粘液を検査することになっているし、(6) Copenhagen の国立血清研究所の出している結核菌の普通検査のプリントも喉頭粘液についてふれている。又 W.H.O. でも集団検診には喉頭粘液の培養を採用している。

われわれは W.H.O. の Dr. Loberls の依頼により喉頭粘液を培養する機会を得たので報告し皆様の批判を仰ぎたい。

### （2）喉頭粘液の培養方法に関する検討

#### a) 実験方法

W.H.O. の Dr. Roberts の指示に従い、最初は、Nassau 氏法によつたが、実験を重ねてゆく中に氏の方法が大分複雑なためこれを簡単にしようと思ひ、次のような(2)―(4)の三法について Nassau 氏法との比較を行つた。すなわち基礎的な実験は塗抹陽性の喀痰を滅菌蒸溜水で適当に稀釈均質化したものに、下記喉頭綿棒 2 本宛を同時にひたし、1 本は Nassau 氏法、もう 1 本はわれわれの考案した方法で培養して集落数の比較を行つた。次に同一患者について 2 本の喉頭粘液をとり、1 本は Nassau 氏法、もう 1 本はわれわれの方法により培養して陽性率、集落数、雑菌侵入率について比較を行つた。

#### (i) 喉頭綿棒の作り方

W.H.O. の Dr. Roberts の指示にしたがつた。すなわち、綿棒は直径 1.6 mm、長さ 250 mm のクロームニッケルの一端の 2~3 cm を平たくつぶし螺旋状にねぢつてをく。これを 5 本 1 組にして紙でまき乾熱滅菌してをく。別に脱脂綿を紙につみ乾熱滅菌してをき、これを使用に先立つて無菌的にまきつけて綿棒をつくり先端の 3 cm 位の所を 120 度にまげてをく。

#### (ii) 喉頭粘液のとり方

患者を深く椅子にかけさせ、滅菌ガーゼで舌をつまんでひきださせる。術者は外科用ますく、帽子をつけて患者の前に立ち、綿をまきつけた部分を滅菌蒸溜水にひたしてから、綿棒を喉頭鏡照明の下に直接喉頭中にさしこむ。このさい綿が口腔咽喉粘膜にふれないよう注意する。喉頭中に綿棒が入ると患者は大低咳反射をおこすが、咳嗽がない時は必ず 2~3 回自分でせきをさせる。咳嗽を確認した後綿棒をひき出し滅菌中試験管中に入れる。一人の患者からおのおの 2 本宛喉頭粘液をとる。なおこの手技にさいし敏感な患者は時に嘔吐をすることがあるためバケツを用意してをく。

#### (iii) 前処理の方法

① Nassau 氏法……………喉頭粘液を採取した綿棒を入れた中試験管中に滅菌した 5% 尿酸水を綿球の上まで（約 5 cc）入れる。10 分間室温にそのまま放置した後、綿棒をとり出し滅菌した 5% クエン酸ソーダを入れたもう 1 本の滅菌中試験管中にうつす。10 分後綿棒をとり出し固型培地の斜面に綿球をこすりつけるようにくるくる廻しながら塗抹し、37°C に培養する。1 本の綿棒で 2 本の培地を塗抹した。なおこの場合、培地は 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地を用いた。

② 1% NaOH で処理后、綿棒を塗抹培養する方法……………綿棒を入れた中試験管中に 1% NaOH を 5 cc 宛分注、そのまま室温に 10 分間放置した後、綿棒をとり出して 3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地に Nassau 氏法に準じ塗抹培養した。なお 3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地をこゝで用いたのは、1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地は中和したのを植える Nassau 氏法の場合に適當であるが 1% NaOH で処理したものを 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地に塗抹すると接種量が 0.1 cc 以上となる

ため、発育が悪くなるからである。

④ 4%NaOH 中で洗いおとして、その 0.1 cc 宛培養する方法……喉頭粘液をとつた綿棒を入れた中試験管中に 4%NaOH を 1cc 宛分注し直ちにこの中で綿棒を強力に振盪して粘液を充分洗いおとし綿棒をすてる。この液を充分振盪して、その 0.1 cc をメス、ピペットで 3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地 2 本に分注培養する。

④ 1%NaOH 中で洗いおとして、その 0.1 cc 宛培養する方法……③の 4%NaOH の代りに 1%NaOH を用いて、培地は 1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地を用いる。

以上各方法共、観察は全て 8 週間行つた。

実験成績

① Nassau 法と 1%NaOH で処理後塗抹培養する方法との比較。

第 1 表 Nassau 法と 1%NaOH 法との比較略痰による基礎実験

方法	可検材料	ガフキー 8 号	ガフキー 5 号
	稀釈倍数	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
Nassau 法		13	8
1%NaOH 法		92	8

(表中の数字は培地 4 本の平均集落数)

綿棒 1 本につき培地 4 本に夫々塗抹したが、表中の数字は、培地 4 本の平均集落数である。表に見る如く両方の集落数の間には有意の差を認めない。

第 2 表 a

1%NaOH 法と Nassau 法との比較

(1) 陽性率の比較

処理法	処理法	Nassau 法		計
	成績	+	-	
1%NaOH 法	+	13	4	17
	-	8	83	91
計		21	87	108

第 2 表 b

(2) 集落数の比較

集落数	1~10	11~50	51以上	計
Nassau 法	11	4	6	21
1%NaOH 法	8	1	8	17

第 2 表 c

(3) 雑菌侵入率の比較

方法	培地数	雑菌侵入培地数	侵入率 (%)
Nassau 法	216	12	5.6
1%NaOH 法		25	11.6

第 2 表には、同一患者でひきついでとつた 2 本の喉頭粘液を 1 本は Nassau 氏法、1 本は 1%NaOH で処理培養した成績をのせた。

第 2 表に見る如く、陽性例は両法陽性は、108 名中 13 名、Nassau 法のみ陽性 8 名、1%NaOH 法のみ陽性 4 名で、やゝ Nassau 氏法の方がすぐれていた。次に集落数を比較した。即ち第 2 表 b に見る如く Nassau 氏法陽性例 21、1%NaOH 法陽性例 17 の集落数を比較したが両法の間には、ほとんど差が見られなかつた。

培地の雑菌侵入率は、Nassau 氏法の 5.6% に対し 1%NaOH 法は、11.6% で、明らかに 1%NaOH 法の方が、雑菌の汚染率が高く危険率 5% 以下で両者の間に有意の差を認めた。

② Nassau 氏法と 4%NaOH 中で洗いおとしてその 0.1cc を培養する方法

第 3 表 Nassau 法と 4%NaOH 法との比較

略痰についての基礎実験

方法	可検材料	ガフキー 6 号	ガフキー 4 号	ガフキー 8 号
	稀釈倍数	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>
Nassau 法		11	43	34
4%NaOH 法		85	30	78

(表中の数字は培地 4 本の平均集落数)

基礎実験ではやゝ 4%NaOH 法の方がマロニー数が多い。

第 4 表 a

4%NaOH 法と Nassau 法との比較

(1) 陽性率の比較

処理法	処理法	Nassau 法		計
	成績	+	-	
4%NaOH 法	+	12	2	14
	-	4	99	103
計		16	111	116

第 4 表 b  
(2) 集落数の比較

集 落 数	1~10	11~50	51以上	計
Nassau 法	9	4	3	16
4%NaOH法	6	3	5	14

第 4 表 c  
(3) 雑菌侵入率の比較

方 法	培 地 数	雑 菌 侵 入 率 培 地 数	侵入率(%)
Nassau 法	232	11	4.7
4%NaOH法		2	0.8

次に入院患者における比較では、第 4 表 a に見る如く Nassau 氏は 116 人、中陽性 16 人、4%NaOH 法は、14 人陽性であるが、両者の間には推計学的に有意の差は見られない。またこの陽性例の集落数を両法比較して見たが第 4 表 b のように有意の差は見られなかつた。

次に雑菌の侵入率は、第 4 表 c のように 4%NaOH 法が少く、5%以下の危険率で両法間には有意の差が認められる。

小括：

われわれは Nassau 氏法と、われわれの考案した 2, 3 の方法について比較した結果、Nassau 氏はクエン酸ソーダで中和した後塗抹するので操作がやゝ複雑である。1%NaOH で処理して塗抹する方法は雑菌が入つて実用にならないが、4%NaOH 中で洗いおとしてその 0.1cc を培養する方法は Nassau 氏法に比し簡単であり、陽性率も大差なく、しかも雑菌の侵入は非常にすくない。今后われわれはこの方法で実験を進めたいと思つている。

### (3) 喉頭粘液と喀痰との培養成績との比較

#### a) 実験方法

私達は同一患者の喀痰と喉頭粘液の培養成績の比較を試みた。対象は結核研究所入所患者で、喀痰中の結核菌が塗抹陽性のような多量の菌を喀出しているものは除外して比較した。

喀痰は早朝痰をとり、8%NaOH で 2 倍に稀釈し 1cc のメスピベットでその 0.1cc 宛を 3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地 2 本に培養した。

一方喉頭粘液は喀痰をとつたと同じ日の午前 11 時から正午までの間に、1 人の患者から 2 本宛とり、1 本は Nassau 氏法で処理し、1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地 2 本に塗抹培養し、1 本は前記 4%NaOH 水で処理し 3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 培地に 0.1cc 宛培養した。すなわち合計 4 本の培地を使用したことになる。

なお喀痰、喉頭粘液ともに観察はいずれも 8 週まで行つた。

#### b) 成績

第 5 表  
喉頭粘液と喀痰との陽性率の比較

可検材料	可検材料 成績	喉 頭 粘 液		計
		+	-	
喀 痰	+	31 (11.9%)	9 (3.4%)	40 (15.3%)
	-	16 (6.1%)	205 (78.6%)	221 (84.7%)
計		47 (18.0%)	214 (82.0%)	261 (100%)

培地に雑菌が入つたため比較不可能となつたものを除き 261 例について比較を行つた。261 例中、喉頭粘液と喀痰共に陽性であつたもの 31 例 (11.9%) 喉頭粘液のみ陽性 16 例 (6.1%)、喀痰のみ陽性 9 (3.4%)。すなわち喉頭粘液陽性例 47 (18.0%)、喀痰陽性 40 (15.3%) でやや喉頭粘液の陽性率が高い。しかし推計学的には有意の差はない。

第 6 表  
喉頭粘液と喀痰との集落数の比較

喉 頭 粘 液	0	1~10	11~50	51以上	計 (喀痰)
喀 痰	205	10	0	6	221
1~10	5	5	1	1	12
11~50	2	0	1	0	3
51以上	2	8	6	9	25
計(喉頭 粘液)	214	23	8	16	261

次に第 6 表に示す如く集落数の比較を行つたが、喀痰の方が集落の多い例が多い。

小括：

われわれの成績では陽性率は喉頭粘液の方が高く、一方集落数の比較では、集落数が、喀痰の方に多いという一見矛盾した如き成績を得た。これは、喀痰は培地 2 本しか使用しないのに比し、喉頭粘液は 4 本培地を使用したため集落がすくないものが比較的よく検出出来たのではないかと考えられる。要するにわれわれの成績では喉頭粘液の培養は喀痰培養に匹敵し、喀痰の欠除している場合には喉頭粘液の培養も使用し得ることを示している。

#### (4) 総括および考案

われわれは喉頭粘液が喀痰欠除の場合、喀痰の使用し得るかどうか検討するために、同一患者について喀痰を採

取した日に喉頭粘液をとつて、培養によつて両者を比較した。その結果は両者の検出率にはほとんど差がなかつた。このことは喉頭粘液が実際に使用し得ることを示している。しかしわれわれの成績は、喀痰は培地2本、一方喉頭粘液は2本採取し、1本の綿棒で2本の培地に培養しているため計4本使用したことになる。このように培地を沢山使用すれば集落のすくないものを検出出来ることはすでに小川等が、喀痰の培養で証明している。事実両者の集落数の比較(第6表)において、喉頭粘液では喀痰に比し集落のすくないものが多い。このことは採取出来る粘液の量がすくないためであつて喉頭粘液の培養ではすくなくとも2本以上綿棒を使用すべきであるということを暗示しているといえようし、また一面においては、微量排菌がなく検出出来るということも出来るのではないか。

次に培養の方法に関しては Nassau の外、多くのべられている。すなわち1)Chaves, Peizer & Widelock, (8)Adler, (9)Saenz, (10)Armstrong 等の方法がある。これらの方法はいずれも中和して植える方法であるが、しかしわれわれは4%NaOHで処理し3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>培地に培養した。こうすれば中和することもなく、手技は大分はぶけるし雑菌の侵入もすくなく、陽性率も Nassau 氏法に比して大差ない。

喉頭粘液と喉頭粘液との結核菌の検出の比較については多くなされている。

胃液の方がすぐれているとするもの Chaves, Peizer & Widelock, 喉頭粘液がすぐれているとするもの Armstrong & Foster, Saenz 等があり区々であるが、Dr. Roberts の手紙によれば喉頭粘液連絡2回の培養は1回の胃液培養に匹敵するといつている。このようにくいちがつた成績の出るのは、採取の巧拙、培養方法のちがうこと等によると思われる。

要するに喉頭粘液の培養が実際に使用し得ることからして、しかもその方法の簡単なること患者にあたえる苦痛のすくないことも考慮して、われわれは今後外来、集

検、小児等に広く使用していく考えである。

## 緒 論

①261人の入院患者につき、喀痰と喉頭粘液を同じ日に採取して培養した結果、喀痰は40人(15.3%)、喉頭粘液は47人(18.0%)に結核菌を検出し得た。

②喉頭粘液を採取した綿棒を4%NaOHを1cc入れた中試験管中で洗いおとし、これをメスピペットで0.1cc 3%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>培地に培養する方法は、Nassau氏法に比し簡単であり陽性率も同じである。

(この研究に要した費用の一部は文部省科学研究費、結核研究班(班長 今村荒男)の補助を受けた。厚く感謝の意を表する。 小川辰次)

## 文 献

- 1) M.A. Soltys & et al.: "Tubercle Bacillus and Laboratory Method", 1952.
- 2) T. Holmes Sellors and J. L. Livingstone: "Modern Practice in Tuberculosis" 1952
- 3) Stuart Willis: "Diagnostic and Experimental Methods in Tuberculosis". 1952.
- 4), 5) Tuberculosis Chemotherapy Trials Committee: Brit. Med. J. 4787, 735, 1952. Brit. Med. J. 4809, 521, 1953.
- 6) Stoles, Seruminstitut, Copenhagen.: "Routine Bacteriological Examination for Tubercle Bacilli." 1952
- 7) 小川辰次: 臨床病理, 1巻, 1号, 12頁, 昭28
- 8) Adler: (10)より引用
- 9) Armstrong and Foster: Lancet, 1, 301, 1952 (No.6702). Annotationより引用
- 10) Saenz, Jr.: Rev. de la Tuberc. 17, 9, 926 1953
- 11) Chaves, A. D., Peizer, L. R., and Widelock, L.: Am. Rev. Tuberc. 67, 598, 1953.