

3% KH_2PO_4 培地による胃液よりの結核菌の分離培養 並びに胃液培養と喀痰培養との比較

結核予防会結核研究所 (所長 隈部英雄)

古久保文造

(受付 昭和 29 年 10 月 29 日)

(本論文の一部は、昭和 28 年 7 月 11 日 文部省科研費結核研究班細菌科会、昭和 28 年 9 月 12 日 第 23 回日本結核病学会関東地方学会及び昭和 28 年 11 月 10 日 文部省科研費結核研究班細菌科会において発表した。)

I 緒 論

近時化学療法や外科療法が盛んになるにつれて、喀痰の排出のないものが多くなって来、又病状によつては、最初から喀痰の排出のないものあり、故意に出さないものもある。このような患者に、胃液よりの結核菌の検出を行う事は、診断、治療、予後の判定等を更に確実にするものである。わが国においては、胃液よりの培養は、大山法が従来広く行われており、厚生省の検査指針¹⁾でも大山法を採用しているが、この方法は操作が余りに煩雑である。それで我々は種々研究した結果、従来の方法に比してもつと簡単な、しかも確実な 3% KH_2PO_4 培地による方法を考案したので大山法との比較を行つた。又時を同じくしてわれわれの方法と考えを同じくした彦坂の方法が発表されたのでこれと比較した。なお小川は喀痰の培養において硫酸マグネシアを用いて集菌すると検出率を高める事を実験している²⁾ので、これを応用して胃液を培養してみた。次に同一患者につき、胃液による結核菌の検出と喀痰よりの検出との比較検討を行つたのでここに報告する。

II 方法に関する実験

1) 実験方法

1) 胃液 (胃洗液) 採取方法

早朝空腹時に、滅菌ネラトンカテーテルを鼻腔或いは口腔より挿入し、滅菌した 50 cc の注射器で胃液を採取す。胃液採取不能の時は、滅菌微温水 100 cc を注入して、注射器で吸引、注入を繰返して後 50 cc を滅菌大試験管 (直径 3 cm, 長さ 21 cm) に採取する。抗結核剤等を服用中の患者では、1~2 日間投薬を中止して採取した。

註: われわれは初め十二指腸ゾンデを使用した³⁾が、先端の金属球に不便を感じる⁴⁾ので、寧ろネラトンカテーテル 7~8 号 (内径 2.5 mm, 外径 4.5 mm, 長さ 1 m) のものを使用し、カテーテルの先端にオリブ油を少量つけて鼻腔よりの送込に用いている。

肺径質の人には、1% プロカイン液 (1~2 滴の

アドレナリンを入れたもの) を下鼻道に綿棒にて少量塗布すれば一層楽である。

かくして得たる胃液或いは胃洗液を滅菌大試験管に入れ、充分振盪攪拌して或いはホモチナイザーにて均等化した上 20 cc 宛に二分し、われわれの 20% NaOH 法を基準にして、次のような諸方法と比較した。

2 培養方法

i 3% KH_2PO_4 培地に 20% NaOH 水で処理した液を 0.1 cc 宛植える方法 (古久保法)

採取した胃液 20 cc に 1/4 量の 20% NaOH 水を加えると、NaOH 水の濃度は胃液によつて 5 倍に稀釈されるから 4% となる。これを充分振盪し、3000 回転 10 分遠心し、沈渣を 3% KH_2PO_4 培地に 1 cc のメスピベットで吸い上げ 0.1 cc 宛培養し、培地を動かして斜面を平等にうるおし、斜面台の上にねかし、一晚 37°C に放置し乾燥するのをまつて封鎖し、たてて培養する。

ii 大山法²⁾

採取した胃液 20 cc に約半量の 2% NaOH 水を加えて均等化してから、2.5% ZnSO_4 を 2~3 cc 加えると雲状の濁濁が出来る。これを遠心沈澱する。沈渣に約 5 倍量の 4% H_2SO_4 を加え、30 分放置した後、さらに遠心し、この沈渣を 1% KH_2PO_4 培地に塗抹培養する。

iii 3% KH_2PO_4 培地に 25% NaOH 水で処理した液を 0.1 cc 宛植える方法 (彦坂法)²⁾

採取した胃液 20 cc に 1/5 量の 25% NaOH 水を加えて遠心し、沈渣を 3% KH_2PO_4 培地に 0.1 cc 宛培養する。

iv 硫酸マグネシア集菌による 20% NaOH 法

前記 i により 20% NaOH 水を加えて均等にしたもののの中に、更に 1% MgSO_4 を 3~5 cc 加えると、水酸化マグネシウムの絮状沈澱を生じ混濁して来る。これを遠心して沈渣を 0.1 cc 宛 3% KH_2PO_4 培地に培養する。

培地はいずれの方法でも 8 本宛使用し、1 週間毎に観察し 8 週迄観察して、集落の發育の認められないものを陰性とした。培地は大山法のみは 1% KH_2PO_4 培地⁵⁾を使用した。原著では岡・片倉培地を使用する事になっているが、われわれの基礎実験では、岡・片倉培地と

1% KH₂PO₄ 培地とは差がなかつたので1% KH₂PO₄ 培地を使用した。その他の方法ではすべて3% KH₂PO₄ 培地を使用した。

註：3% KH₂PO₄ 培地の組成⁵⁾

KH ₂ PO ₄	3.0 g
蒸留水	100 cc

上記のような組成の基汁を作り、この基汁100 cc に対して、全卵液200 ccを加え、よく攪拌し、これに更にグリセリン6 cc, 2% マラカイト緑液6 ccを加え、よくまぜ、5 ccずつ、滅菌試験管に分注して、血清凝固器で90°C 1時間で滅菌凝固する。

2) 実験成績

1 20% NaOH 法と大山法との比較

実験例 47 例(喀痰中の塗抹陽性2例)で陽性率は第1表のようで、20% NaOH 法がよく、次に両方法で同時に発育した13例を示したのが第2表であつて、20% NaOH 法は3週で大部分陽性であるに反し、大山法では集落の発育したものは約半数であり、しかも集落数は少ない。しかし、4, 5週と培養期間の長びくにつれて、集落数の差が少なくなり、6週では殆んど差がなく、僅かに(7)(9)(11)の3例においてのみ20% NaOH

第1表 20% NaOH 法と大山法との陽性率の比較

検査例数	培養の方法	陽性例数 (陽性率)
47	20% NaOH 法	17 (36.2%)
	大山法	13 (27.7%)

第2表 20% NaOH 法と大山法で同時に発育した13例の比較

患者番号	20% NaOH 法						大山法					
	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
(2)			112	##	###	###			101.7	##	###	###
(4)			—	+	##	##			—	+	##	##
(11)			107.3	123	132.3	132.3			—	0.3	0.3	0.7
(6)			28	48.5	58	59.5			14	45.3	53.3	53.7
(12)			35.7	41.3	59.7	54			4.7	17	39.3	41.7
(7)			26	36.7	48	48.9			5.7	16.3	22.3	22.3
(8)			9.7	18.3	22.3	24.7			0.7	13.7	13.7	23
(9)			2	4	6	12			—	—	0.3	0.3
(1)			1	2	3.7	3.7			—	—	1	1
(19)			2.7	2.7	3.4	3.4			0.3	0.3	1	1
(3)			0.3	1	1	1			—	0.6	0.6	0.6
(5)			0.3	0.3	0.3	0.3			—	0.3	0.3	0.3
(10)			0.3	0.3	0.3	0.3			—	0.3	0.3	0.3

註：1) 観察日は培養後の経過週である。2) 表中の数字は、平均集落数を示す。3) ++, ##, ### は集落が多くて数えられない事を示す。又、+の数の多いもの程、集落の多い事を示す。

法において集落数が多い。次に雑菌侵入率は、培地数141本中、20% NaOH 法では3本(2.1%)、大山法では9本(3.5%)で著明の差は認められない。

2 20% NaOH 法と25% NaOH 法との比較

実験例 34 例(喀痰中の塗抹陽性3例)で陽性率は第3表の通りで差は認められない。次に両方法で同時に発育した12例を示したのが第4表の通りで、20% NaOH 法も25% NaOH 法も集落数、発育迄の期間にも差は認められない。又雑菌侵入率は培地数102本中、両方法共2本(1.9%)で差は認められない。

第3表 20% NaOH 法と25% NaOH 法との陽性率の比較

検査例数	培養の方法	陽性例数 (陽性率)
34	20% NaOH 法	12 (35.3%)
	25% NaOH 法	12 (35.3%)

第4表 20% NaOH 法と25% NaOH 法で同時に発育した12例の比較

患者番号	20% NaOH 法						25% NaOH 法					
	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
(9)			++	##	###	###			++	##	###	###
(11)			++	##	##	##			++	++	++	++
(4)			—	+	+	##			—	+	+	##
(1)			106	++	++	++			15	27	31.7	31.7
(8)			32.7	48.7	57.3	56.7			26	26	29	31
(12)			9.3	19.7	22	23.7			5	13	13.7	21
(7)			—	11	18	21			—	8.7	15	19.3
(3)			2.3	4.3	4.3	4.3			1.3	3	3	3
(10)			—	2	3.3	3.3			—	4.3	6.7	6.7
(6)			—	—	2.3	2.3			—	1	1.7	1.7
(2)			—	—	1.3	1.3			—	1.7	2	2
(5)			—	—	0.7	0.7			—	1.3	1.3	1.3

註：1) 観察日は培養後の経過週である。2) 表中の数字は、平均集落数を示す。3) ++, ##, ### は集落が多くて数えられない事を示す。又、+の数の多いもの程、集落の多い事を示す。

3 20% NaOH 法と硫酸マグネシウム集菌による20% NaOH 法との比較

実験例 56 例(喀痰中の塗抹陽性2例)で陽性率は第5表の通りで差は認められない。次に両方法で同時に発育した9例を示したのが第6表の通りで、集落数、発育迄の期間も著明の差は認められない。又雑菌侵入率は培地数168本中、20% NaOH 法3本(1.8%)、硫酸マグネシウム集菌による法2本(1.2%)で差は認められない。

第5表 20% NaOH 法と硫酸マグネシア集菌による 20% NaOH 法との陽性率の比較

検査例数	培養の方法	陽性例数 (陽性率)
56	20% NaOH 法	11 (19.6%)
	硫酸マグネシア集菌による 20% NaOH 法	10 (17.9%)

第6表 20% NaOH 法と硫酸マグネシア集菌による 20% NaOH 法で同時に発育した9例の比較

患者番号	20% NaOH 法						硫酸マグネシア集菌による 20% NaOH 法					
	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
(1)	—	—	32.7	++	++	++	—	—	33.7	++	++	++
(7)	—	—	76	++	++	++	—	—	61	++	++	++
(3)	—	—	—	24	54.7	80.3	—	—	17	31.7	38.7	71.3
(5)	—	—	—	10.7	27.3	43.7	—	—	12	29	53	—
(2)	—	—	2	8.7	10.3	12.3	—	—	0.3	1.7	1.7	16.7
(9)	—	—	—	1.6	2.7	2.7	—	—	3.3	3.7	3.7	—
(4)	—	—	—	1.3	1.3	1.7	—	—	0.7	0.7	0.7	—
(6)	—	—	—	0.7	0.7	0.7	—	—	1	3.3	5	—
(8)	—	—	—	—	0.3	0.3	—	—	—	2.3	2.3	—

註: 1) 観察日は培養後の経過日である。2) 表中の数字は、平均集落数を示す。3) ++, +++ は集落が多くて数えられない事を示す。又 + の数の多いもの程、集落の多い事を示す。

III 喀痰の代用としての胃液培養の価値

1) 胃液と喀痰との培養比較

同一患者について、胃液を採取すると同時に喀痰を採取して培養の比較を行った。喀痰の培養方法は小川等⁷⁾に従い、8% NaOH 水を等量混入し、型の如く 0.1 cc 宛 3% KH₂PO₄ 培地に培養した。実験例 268 例で重症 6 例、中等症 167 例、軽症 71 例、外科手術(肺葉切除、肺区域切除、胸廓成形術)を加えたもの 24 例で重症、中等症、軽症の分類は、アメリカ結核協会の JOHN D. Steele et al⁷⁾の分類によつたものである。同分類によれば外科手術を加えたものには、手術を行う直前の状態によつて決めた分類を、患者の生涯続けるようになっているが、われわれは特に外科手術を加えたものを別項の欄に設けて区別した。成績は第7表の通りで重症例では大部分一致しているが、中等症、軽症、外科手術を加えたものでは、第7表にみる如く、胃液の方がはるかに検出率がすぐれている。これを総計すると 268 例中、胃液と喀痰共に陽性のものは 37 例 (13.8%)、胃液のみ陽性のもの 41 例 (15.3%)、喀痰のみ陽性のもの 4 例 (1.5%) であつて、胃液のみ陽性のものは、喀痰のみ陽性のものに比して、はるかに検出率がすぐれている。次に同時に発育した 37 例の胃液と喀痰との集落数を比較したのが第8表の通りであつて、著明の差はない。

第7表 胃液と喀痰との培養比較

臨床分類	検査例数	培養成績		
		胃液	喀痰	例数 (%)
重症	6 (6)	+	+	5 (83.3%)
		+	—	1 (16.7%)
		—	—	0
中等症	167 (8)	+	+	26 (15.6%)
		+	—	28 (16.8%)
		—	+	4 (2.4%)
		—	—	109 (65.3%)
軽症	71 (0)	+	+	3 (4.2%)
		+	—	9 (12.7%)
		—	+	0
		—	—	59 (83.1%)
外科手術を加えたもの	24 (0)	+	+	3 (12.5%)
		+	—	3 (12.5%)
		—	—	18 (75.0%)
合計	268 (14)	+	+	37 (13.8%)
		+	—	41 (15.3%)
		—	+	4 (1.5%)
		—	—	186 (69.4%)

註: 1) 表中の + は陽性を示し、— は陰性を示す。2) 検査例数の欄の () の中は喀痰中の結核菌の塗抹陽性例数を示す。

第8表 同時に発育した胃液と喀痰との集落数の比較

検査例数	集落数 可検材料	1~10	11~50	51~100	101~150	151以上
		37	胃液	9(24.3%)	10(27.0%)	9(21.6%)
	喀痰	7(13.0%)	9(24.3%)	6(16.2%)	10(27.0%)	5(13.5%)

2) 喀痰欠除せる患者よりの胃液培養

実験例 114 例で中等症 54 例、軽症 52 例、外科手術を加えたもの 8 例で成績は第9表の通りで、喀痰の欠除せる患者から 22 例 (19.3%) に陽性である。

第9表 喀痰欠除せる患者よりの胃液培養

臨床分類	検査例数	陽性例数 (陽性率)
重症		
中等症	54	15 (27.8%)
軽症	52	7 (13.5%)
外科手術を加えたもの	8	0
合計	114	22 (19.3%)

3) 胃液培養と喀痰の連続培養との比較

喀痰の連続培養と、その期間中にただ 1 回採取した胃液との培養比較で、喀痰の連続培養は、喀痰を毎日培養して 3 日に及ぶもの 17 例、4 日に及ぶもの 14 例、5 日に及ぶもの 3 例、6 日に及ぶもの 4 例、7 日に及ぶもの 2 例、7 日以上に及ぶもの 1 例の 41 例で、成績は第 10

表の通りで、胃液陽性で喀痰陰性のもの7例、胃液陰性で喀痰陽性のもの3例、これを合計すると胃液陽性12例(29.3%)、喀痰陽性8例(19.5%)で、ただ1回の胃液よりの検出でも、喀痰よりはるかにすぐれている。

第10表 胃液と喀痰の連続培養との比較

検査例数	培 養 成 績		
	胃 液	喀 痰	例 数 (%)
41	+	+	5 (12.2%)
	+	-	7 (17.1%)
	-	+	3 (7.3%)
	-	-	26 (63.4%)

註：表中の+は陽性を示し、-は陰性を示す。

IV 総括及び考察

小川⁸⁾は先に喀痰量の多い時は、16%、20%のNaOH水を喀痰量の1/3量、1/4量等に加えNaOH水を4倍、5倍等に稀釈してNaOH水が4%になるようにして培養すればよからうとの事を述べたが、20%NaOH水による培養法は、この主旨によつたものであつて、20%NaOH水を胃液の1/4量加える事により、NaOH水の濃度は4%になり、胃液中に混入している粘液及び喀痰は全く溶解され、遠心沈澱により充分集菌ができ、これを直ちに0.1cc 3% KH_2PO_4 培地に植えるようにしたものである。この方法は従来わが国で専ら行われていた大山法が、2回遠心するのに比して簡単であり、しかも培養成績もすぐれている。彦坂の25%NaOH法は、われわれと全く同じ考のように思われるが、両者の比較においては殆んど差をみない。随つて20%を使用しても25%を使用しても、要するに培養される材料中のNaOH水の濃度が4%であれば、どちらでもよいと思われる。なお硫酸マグネシアによる集菌培養法⁹⁾を胃液に応用してみたが、その結果は期待に反し、良好な成績は得られなかつた。アメリカ¹⁰⁾やデンマーク¹¹⁾では大体において、喀痰同様中和して植えているが、小川¹²⁾の喀痰における実験では、4%NaOH水で処理してその0.1ccを3% KH_2PO_4 培地に植える方法と、これを中和してその0.1ccを1% KH_2PO_4 培地に植える場合とでは、殆んど差を認めていない。随つて胃液の場合においても、そう差がないものと推定できる。菌の検出の上に差がないものとするれば、中和して1% KH_2PO_4 培地に植える事は、単に操作を繁雑にするに過ぎない事となる。われわれは胃液を20cc使用して実験したのであるが、これは遠心管の容積が20cc用いるのに適當であつたが為であつて、成績を確実にしたいなら、もつと多量の胃液を使用すればよい。すなわち容積の大きい遠心管を用いる事ができるなら、30cc~40ccも使用する事が出来るであろうし、又もつと材料を多く使用したいな

ら、3~4本の遠心管に分けて使用する事もよいであろう。次に268例の患者について、胃液と喀痰を同時に採取して比較したのであるが、両材料のいずれかが陽性であつたものは、82例すなわち約30%に過ぎない。これは表でも分るよう中等症、軽症や外科手術を加えたものが比較的かつた事と、化学療法等を使用しているものが大部分であつた為と思われる。比較成績は前述のように、重症例を除けば、その何れの場合分においても、胃液よりの検出率が喀痰に比してすぐれている。これを総計すれば、胃液のみ陽性のもの41例(15.3%)、喀痰のみ陽性のもの4例(1.5%)であつて、胃液による検出は著明にすぐれている。この成績は、諸先進の大山、鈴木¹³⁾、河辺¹⁴⁾、彦坂等の成績と全く一致するものである。次に喀痰の欠除している患者や、1週間前後の喀痰の連続培養で陰性の患者の胃液培養において、屢々結核菌を発見する。従つてわれわれは喀痰らしい喀痰の出ない人、或いは喀痰の欠除している人には、必ず胃液よりの結核菌の培養を試みる事は、通常検査として実施させるべきであり、事実アメリカにおいては、かなり以前より実施しているし、コペンハーゲン(デンマーク)の血清研究所の結核部の成績を見ると、胃液検査の件数が喀痰検査の件数に匹敵している。

V 結 論

- 1) 胃液(胃洗滌液)に1/4量の20%NaOH水を加えて、3000回転10分遠心し、沈渣を0.1cc宛3% KH_2PO_4 培地に培養するわれわれの方法は、従来の方法に比してすぐれている。
- 2) 268例の胃液と喀痰との比較では、胃液と喀痰共に陽性のもの37例(13.8%)、胃液のみに陽性のもの41例(15.3%)、喀痰のみに陽性のもの4例(1.5%)であつて、胃液の方の検出が著明にすぐれている。
- 3) 114例の喀痰欠除せる患者よりも22例(19.3%)に検出できた。
- 4) 同一患者について、喀痰を3日~7日等に亘つて連日培養した成績と、その間に単に1回だけの胃液を培養した成績を41例について比較すると、胃液、喀痰共に陽性のものは5例(12.2%)、胃液のみに陽性のもの7例(17.1%)、喀痰のみに陽性のもの3例(7.3%)であつて、ただ1回の胃液すら、3~7回の連続培養以上の成績を示した。

本研究は文部省科学研究費の補助を受けた。厚く感謝の意を表す。(小川辰次)

文 献

- 1) 厚生省編纂：衛生検査指針〔1〕、120頁、1950。
- 2) 大山：Tohoku Journal of Exp. Med., 36, 5-6, 505, 1940。

- 3) 彦坂・日本結核病学会関東地方会, 昭 28 年 2 月 発表.
- 4) 小川: 結核, 24 卷, 2 号, 13 頁, 昭 24.
- 5) 小川: 綜合研究結核研究委員会細菌学的研究科会 昭 25 年 11 月発表.
- 6) 小川・木野等: 綜合研究結核研究委員会細菌学的 研究科会, 昭 26 年 7 月発表.
- 7) JOHN D. Steele et al.: Am. Rev. Tbc., 61-5, 760, 1950.
- 8) 小川: “結核菌検索の基礎と応用”, 129 頁, 昭 26.
- 9) 小川・岩井・西野: 文部省科学研究費結核研究班 細菌科会報告, 昭 27 年 6 月発表.
- 10) Federal Security Agency. public Health Service Communicable disease Center. “Laboratory diagnosis of Tuberculosis”, 1951.
- 11) States Serum Institut. Copenhagen, Routine bacteriological examination for Tubercle Bacille, 1952.
- 12) 小川: 文部省科学研究費結核研究班細菌科会報告 昭 29 年 2 月発表.
- 13) 鈴木: 日本気管食道科学会会報, 3 卷, 2 号, 102 頁, 昭 27.
- 14) 河辺等: 臨床病理, 1 卷, 1 号, 48 頁, 昭 28.