

結核菌の培養に関する研究

第2報 喀痰放置における成績

国立療養所天竜荘 (荘長 中村健治)

近藤 弘・伊藤 善朗

北里研究所

水之江 公英

(受付 昭和 29 年 11 月 8 日)

1 緒 言

近時結核患者の診療に際し排菌状態の検査、抗結核剤の耐性検査並びに集団検診等において、益々結核菌の培養が重要視される傾向にあるが、培養設備のない施設よりの依頼・輸送或いは設備があつても即時培養出来ない場合が起り得る。その際喀痰放置によつて陽性率が如何に低下するかは、排菌の有無を調べる上においては、重要な問題であろう。私達は四季にわたつて、国立療養所天竜荘入荘患者の喀痰を用いて、次の実験成績を得たのでここに報告する。

2 実験材料並びに方法

国立療養所天竜荘入荘患者の中大量排菌者(ガフキー氏表 II-VI号)で、早朝喀出の喀痰量多いものを選び、その早朝喀出喀痰を滅菌制管でシャーレに5等分し、24時間以内、48時間、3日、5日、7日と室温に放置後、各例共岡・片倉、小川兩培地を各々2本ずつ使用し、それぞれ原法の前処置にて培養、観察した。2本の試験管の中2本とも又は1本でも陽性に出た例を陽性例とした。陰性率及び汚染率は試験管数を以つて現した。

3 実験成績

A 予備実験

先ず小川¹⁾の定量培養にならない、大量排菌者10例の喀痰を放置、各時期に 10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-6} に稀釈(4%苛性ソーダにて稀釈)、小川培地2本ずつに培養した。その成績は第1表の如し(室温 18°C)。すなわち陽性率においては各倍稀釈において例数並びに試験管数とも3日迄は90~100%であるが、5日になると30~40%に減少する。陰性率においては稀釈倍数の増すにつれ、3日以内においても少数(5~10%以下)増加するが、5日になると30~70%と急激に上昇する。汚染率においても又同様5日に至り増加する(5~40%)。しかし稀釈倍数の進む程汚染率が少なくなつていく。次にやはり大量排菌者10例の喀痰を各々ほぼ2等分して、室温(26°C)並びに氷室(8°C)に放置して、同様方法にて培養し、その成績を比較してみた。第2表に示す如く、陽性率においては各倍稀釈において例数、試験管数とも48時間、3日で5~10%、5日で5~50%の差が認められる。陰性率においては差は認められなかつた。汚染率においては各倍稀釈の48時間、3日で5~25%、5日で10~

第1表 喀痰放置時の定量培養成績(4月実施)

稀釈培 例数並 試験管 数	10^{-2}					10^{-4}					10^{-6}				
	例数		試験管数			例数		試験管数			例数		試験管数		
	陽性	陰性	陽性	陰性	汚染	陽性	陰性	陽性	陰性	汚染	陽性	陰性	陽性	陰性	汚染
24時間 以内	10 (100%)	0 (0%)	19 (95%)	1 (5%)	0 (0%)	10 (100%)	0 (0%)	19 (95%)	1 (5%)	0 (0%)	10 (100%)	0 (0%)	17 (85%)	1 (5%)	2 (10%)
48時間	10 (100%)	0 (0%)	20 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0 (0%)	19 (95%)	1 (5%)	0 (0%)	9 (90%)	0 (0%)	18 (90%)	2 (10%)	0 (0%)
3日	10 (100%)	0 (0%)	20 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0 (0%)	20 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0 (0%)	19 (95%)	1 (5%)	0 (0%)
5日	4 (40%)	3 (30%)	7 (35%)	5 (25%)	8 (40%)	4 (40%)	5 (50%)	8 (40%)	8 (40%)	4 (20%)	3 (30%)	7 (70%)	5 (25%)	14 (70%)	1 (5%)
7日	3 (30%)	0 (0%)	5 (25%)	0 (0%)	15 (75%)	5 (50%)	2 (20%)	8 (40%)	4 (20%)	8 (40%)	6 (60%)	4 (40%)	12 (60%)	8 (40%)	0 (0%)

第2表 喀痰放置時の定量培養成績 (7月実施)
室温放置と氷室放置との比較

喀痰 放置 期間	稀釈倍数 例, 試験管数 陽, 陰性汚染別 室温氷室放置別	10 ⁻²					10 ⁻⁴					10 ⁻⁶				
		例数		試験管数			例数		試験管数			例数		試験管数		
		陽性	陰性	陽性	陰性	汚染	陽性	陰性	陽性	陰性	汚染	陽性	陰性	陽性	陰性	汚染
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
24 時間 以 内	室温放置	8 (80)	0 (0)	14 (70)	0 (0)	6 (30)	10 (100)	0 (0)	20 (100)	0 (0)	0 (0)	10 (100)	0 (0)	19 (95)	1 (5)	0 (0)
	氷室放置	7 (70)	0 (0)	14 (70)	0 (0)	6 (30)	8 (80)	0 (0)	14 (70)	0 (0)	6 (30)	8 (80)	1 (10)	14 (70)	1 (5)	5 (25)
48 時間	室温放置	8 (80)	0 (0)	15 (75)	0 (0)	5 (25)	9 (90)	1 (10)	18 (90)	1 (5)	1 (5)	9 (90)	1 (10)	14 (70)	3 (15)	3 (15)
	氷室放置	7 (70)	0 (0)	13 (65)	0 (0)	7 (35)	10 (100)	0 (0)	18 (90)	1 (5)	1 (5)	8 (80)	2 (20)	14 (70)	3 (15)	3 (15)
3 日	室温放置	8 (80)	0 (0)	14 (70)	0 (0)	6 (30)	9 (90)	0 (0)	17 (85)	0 (0)	3 (15)	8 (80)	0 (0)	15 (75)	1 (5)	4 (20)
	氷室放置	4 (40)	0 (0)	8 (40)	0 (0)	12 (60)	8 (80)	0 (0)	13 (65)	1 (5)	6 (30)	8 (80)	0 (0)	12 (60)	0 (0)	8 (40)
5 日	室温放置	9 (90)	0 (0)	15 (75)	0 (0)	5 (25)	7 (70)	2 (20)	13 (65)	3 (15)	4 (20)	8 (80)	2 (20)	13 (65)	6 (30)	1 (5)
	氷室放置	7 (70)	0 (0)	13 (65)	0 (0)	7 (35)	6 (60)	2 (20)	10 (50)	4 (20)	6 (30)	5 (50)	5 (50)	8 (40)	8 (40)	4 (20)
7 日	室温放置	7 (70)	0 (0)	12 (60)	0 (0)	8 (40)	8 (80)	2 (20)	16 (80)	3 (15)	1 (5)	5 (50)	5 (50)	10 (50)	6 (30)	4 (20)
	氷室放置	7 (70)	0 (0)	13 (65)	0 (0)	7 (35)	6 (60)	2 (20)	10 (50)	4 (20)	6 (30)	5 (50)	5 (50)	8 (40)	8 (40)	4 (20)

注：() 内は%

第3表 喀痰放置時の定量培養における集落数の消長

喀痰放置期間	培養成績 稀釈倍数	(-)	(+)	(++)	(+++)	(####)	C
		% (%)	% (%)	% (%)	% (%)	% (%)	% (%)
24 時間 以 内	10 ⁻²	1 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	19 (95)	0 (0)
	10 ⁻⁴	1 (5)	2 (10)	5 (25)	8 (40)	4 (20)	0 (0)
	10 ⁻⁶	2 (10)	6 (30)	6 (30)	3 (15)	2 (10)	1 (5)
48 時間	10 ⁻²	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	20 (100)	0 (0)
	10 ⁻⁴	1 (5)	0 (0)	4 (20)	11 (55)	4 (20)	0 (0)
	10 ⁻⁶	2 (10)	2 (10)	11 (55)	5 (25)	0 (0)	0 (0)
3 日	10 ⁻²	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	20 (100)	0 (0)
	10 ⁻⁴	0 (0)	2 (10)	8 (40)	8 (40)	2 (10)	0 (0)
	10 ⁻⁶	1 (5)	6 (30)	10 (50)	3 (15)	0 (0)	0 (0)
5 日	10 ⁻²	5 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (35)	8 (40)
	10 ⁻⁴	7 (35)	1 (5)	3 (15)	2 (10)	2 (10)	5 (25)
	10 ⁻⁶	14 (70)	2 (10)	1 (5)	2 (10)	0 (0)	1 (5)
7 日	10 ⁻²	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (25)	15 (75)
	10 ⁻⁴	2 (10)	1 (5)	2 (10)	3 (15)	1 (5)	11 (55)
	10 ⁻⁶	8 (40)	7 (35)	2 (10)	3 (15)	0 (0)	0 (0)

注 (-)：結核菌陰性 (++)：集落数 100 個以内 (####)：集落は菌苔をなし個々の集落判別不能
(+)：集落数 10 個以内 (###)：(++) と (####) の中間 C：雑菌による汚染にて判別不能

35% の差を生じている。なお稀釈による培地の集落数から見た成績は第3表の如し。すなわち 10⁻² 倍の陽性にでる場合は (####) [集落は菌苔をなし個々の集落判別不能] が殆んど 100% を占め、5 日になり陰性、汚染が

増加してもなお且つ陽性のものは (####) であった。次に 10⁻⁴ 倍では前者と同じく陽性に出るものは (++) [集落数 100 個以内] から (###) [(++) と (####) の中間] の間に多かつたが、5 日になると陰性が多くなってきた。

B 喀痰放置の四季における成績

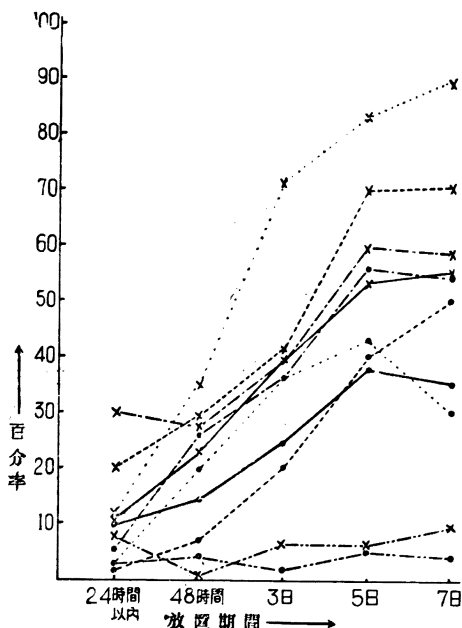
春・夏・秋・冬と四季にわたり、各季節とも 70 例について検査した成績は次の如くである。

(i) 陽性率

(a) 春 (室温 20°C)

第 1 図の如く、岡・片倉、小川両培地とも 24 時間以内では陽性例は各々 68 例 (97.1%) 及び 58 例 (82.9%)、試験管数の陽性数は 134 本 (95.8%) 及び 108 本 (77.2%) であつて 3 日ではやや下り、5 日では陽性例数 44 例 (62.8%) 及び 26 例 (37.2%)、陽性試験管数 81 本 (57.9%) 及び 40 本 (28.6%) と約 1/2 及びそれ以下に低下した。

第 1 図 各季節の陽性率 (例数)



(b) 夏 (室温 32°C)

春と異り第 1 図の如く、48 時間では岡・片倉培地では約 10%、小川培地では約 20% 陽性率の低下が認められる。3 日にして既に岡・片倉培地では陽性例数 45 例 (64.3%)、小川培地では 20 例 (28.6%)、陽性試験管数 84 本 (60.0%) 及び 34 本 (24.3%) と特に小川氏法において激減している。

(c) 秋 (室温 18°C)

春と同じく第 1 図の如く 3 日においては陽性例数、試験管数共 10~20% 低下するも、5 日では陽性例数 32 例 (45.7%) 及び 31 例 (44.3%)、陽性試験管数 59 本 (42.1%) 及び 54 本 (38.6%) に減じ、24 時間以内の陽性例数 65 例 (92.9%) 及び 57 例 (81.4%)、陽性試験管数 124 本 (88.6%) 及び 87 本 (62.1%) の約 1/2 に低下した。

(d) 冬 (室温 4°C)

春秋と比較して、顕著な差はないが、第 1 図の如く、5 日になると、陽性例数 60 例 (85.7%) 及び 61 例 (87.1%)、陽性試験管数 118 本 (84.3%) 及び 110 本 (78.6%) で約 10% 程度低下した。

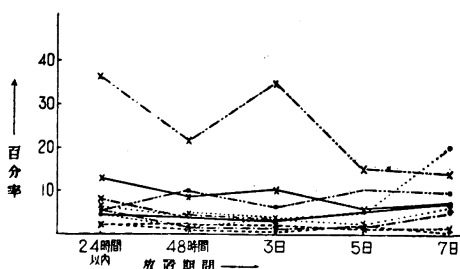
(e) 四季の平均

以上四季を一括してみると第 1 図の如し。すなわち、24 時間以内の岡・片倉培地での陽性 257 例 (91.8%)、479 本 (85.5%)、小川培地での陽性 234 例 (83.6%)、424 本 (75.7%) に対し、3 日では岡・片倉培地の陽性 221 例 (78.9%)、403 本 (72.0%) と例数、試験管数とも約 10%、小川氏培地では陽性 160 例 (57.1%)、279 本 (49.8%) と約 20% 低下しており、5 日に至ると両培地とも陽性 174 例 (62.1%)、325 本 58.0%)、129 例 (46.0%)、228 本 (40.7%) と約 30% 低下した成績を得た。

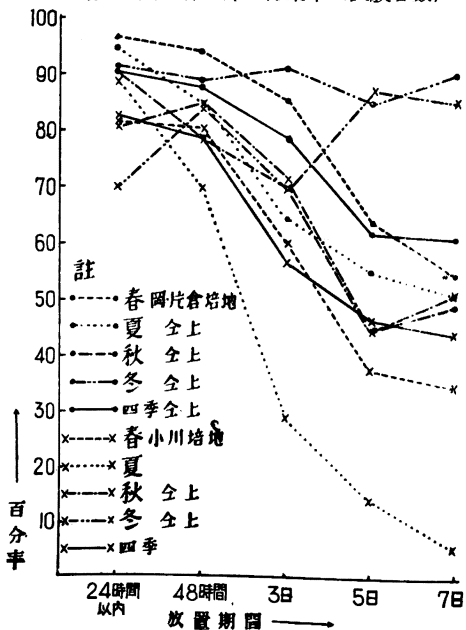
(ii) 陰性率

夏季 (第 2 図) においてのみ 7 日に至り、始めて岡・片倉培地の陰性例数が 24 時間以内より約 19% 又小川

第 2 図 各季節の陰性率 (試験管数)



第 3 図 各季節の汚染率 (試験管数)



培地では若干増加せる以外、春・秋・冬並びに四季の平均においても、7日に至るも陰性例数、試験管数とも著動がなかつた。

(iii) 汚染率

一般に私達の実験では小川培地の方が岡・片倉培地に比較すると汚染率が高かつた。

冬(第3図)においては両培地とも7日間汚染例数、試験管数とも著変はないが若干多くなる傾向を示している。春においては48時間でやや汚染率が増加し、3日になると急増し、5日7日と益々増加し、7日では実験試験管数の半数及びそれ以上に汚染を認めた。夏及び秋では48時間でも既にかんりの高率に、3日では実験試験管の約35%に、5日では約40~50%に汚染を認めた。四季の成績を一括すると両培地とも48時間でやや増加、3日では汚染試験管数約3倍、5日に至ると汚染試験管数ではそれぞれ約3倍及び約5倍の増加をみた。

4 考 案

喀痰を分割して比較する場合に小川等²⁾は乳鉢を使用する方が割箸使用より誤差が少ないと報告しているが、私達の実験は大量排菌者なのでその点顧慮しないで割箸を以つてシャーレに5等分した。

又喀痰放置については戸田³⁾は0.5%硫酸加生理的食塩水を約10cc注加しておくことにより5日間迄、又Corper及びStoner⁴⁾は23%第三磷酸曹達溶液の処理、グリセリン卵黄培地使用で7日間、林⁵⁾は同じく23%第三磷酸曹達溶液で処理、鶏卵培地使用で11日間結核菌を障害することなく良好な成績を得たと報告している。私達は何等薬液を使用することなくシャーレに入れ室温放置で実験した。喀痰放置時の定量培養では汚染が起らなければ、当然陽性に出るべきものが陽性に出ない率すなわち陰性率が5日、7日になつて来ると、急に稀釈の高い方で、 10^{-4} より 10^{-3} に高率になつて来る。これは喀痰中で雑菌の増殖、又は他の原因等でいたみつけられた結核菌が喀痰量に対して、苛性ソーダ量が多くなるに従つて、直接に苛性ソーダの影響を受けて、培地上で発育不能になる為であろう。汚染率では5日になると急激に増加して、陰性率とは逆に稀釈の低い方で、すなわち 10^{-2} が最も、次に 10^{-4} 、 10^{-6} では殆んど汚染が起つていない。これは喀痰量に比し苛性ソーダ量が増すにつれて、混入増殖した雑菌と苛性ソーダが直接接触して、雑菌の増殖を阻止するのであろう。従つて、陽性率において、5日、7日放置で 10^{-2} に低いのは主として汚染による影響であり、 10^{-3} で低下するのは陰性率の高くなるためであり、 10^{-4} では両者の少し宛の影響をうけて、5日になつて陽性率が低くなるのであろう。集落数の消長も上述の成績を詳しく裏書している成績を示している。

各季節では、陰性率は夏季においてのみ7日になつて増加している。その際苛性ソーダ前処置小川培地より硫酸前処置岡・片倉培地の方が増加の率が高い所からみると、8%苛性ソーダよりも4%硫酸の方が結核菌に与える障害は大であらうか。又汚染率をみると冬では5日、7日と若干増加している程度であるが、四季を平均してみると、48時間で若干増加、3日になると、岡・片倉培地では約20%に、小川培地では30%以上に増し、5日では岡・片倉培地では30%以上、小川培地では50%にまで達している。殊に夏季では他の季節に比し高度で、岡・片倉培地では3日に30%、5日では40%に、小川培地では3日で約70%近く、5日では80%以上にも達した。一般に小川培地の方で汚染率の高いのは、硫酸の方が上述のように、結核菌に対する作用も強いと思われるので、それと同様に雑菌に対する障害度も大きいためであらうか。又雑菌の中にはアルカリに強いものと、酸に強いものとがあると思われるが、ここではアルカリに強い菌が雑菌の大部分を占めているのであろうか。冬季に汚染の少ないのは室温の低いためであらう。陽性率では最も変動の少ないのは冬季で、5日、7日で若干低率になるのみであつて、最も低下しているのは夏季で既に48時間で、岡・片倉培地では10%、3日で30%、5日で40%、7日で45%低下している。小川培地では48時間で20%、3日で60%、5日で約75%、7日で85%低下している。前述の陰性率、汚染率からみて5日迄の低下は主として汚染による低下であるが、7日の低率なのは汚染と同時に、結核菌の障害によつて、培地上に発育不能な点が加わつての結果であらう。春秋では両培地とも48時間で若干低くなり、3日には春では10%、秋では20%以上に低率となり、5日には春は90%以上、秋は45%以上低下がみられた。この両季節においては陰性率に変動のないところから、この低下は主として汚染による低下と考えられる。この汚染すなわち雑菌の増殖は低温、すなわち氷室に保存することによつて防止できることは第二予備実験で明らかである。但しこの成績で、 10^{-4} の3日において汚染率が室温放置より氷室放置が10%高く、従つて陽性率も5~10%低くなつており、他の倍数稀釈の氷室放置において、汚染率の低さと陽性率の高さに著明な差を認められなかつたのは、この実験を夏季に行い、喀痰採取より氷室保存までに幾つかの時間を経ているため、その間の雑菌増殖により若干このような成績が出たものと思われ、冬季の成績と併せて考えて、汚染による陽性率低下は氷室に保存することによつて防止し得る。

5 結 論

1) 喀痰中の結核菌の培養には、喀痰採取後24時間以内に培養すべきで、若し当日培養不可能の場合は氷室

に保存すべきであらう。

2) 喀痰を放置して陽性率の低下する主なる原因は汚染によるものと思われる。

なお拙筆に臨み御懇切な御指導、御校閲を戴いた国立療養所天竜荘長中村博士並びに北里研究所水之江博士に心から感謝の意を表します。

文 献

- 1) 小川：結核菌検索の基礎と応用，P. 167，昭 26.
- 2) 小川 他 2 名：結核，26-1，34~40，昭 26.
- 3) 戸田：結核菌と B. C. G.，P. 161，昭 21.
- 4) M. J. Corper and R. E. Stoner：J. Lab. Clin. Med.，31，1364~1371，1946.
- 5) 林：結核，26-6，249~257，昭 26.