

化学療法時代における集菌法の意義

I. 田村集菌法による喀痰中結核菌の検出

門 屋 桂 太 郎

福島医大補内科教室 (主任 楠 信男教授)
健康保険福島療養所 (所長 津川秀一博士)

受付 昭和 33 年 8 月 7 日

緒 言

鏡検陽性にして培養陰性の結果を生ずる場合のあることは結核菌培養の早い時代から知られている (Hohn¹⁾ Dimtza²⁾)。当時は、しかしこれは培養手技の不完全のゆえとして、あるいは疑問のままにあまり問題とされずにあつた。この問題をとりあげて精細な検討を加えたのは桂教授およびその門下 (桂³⁾ Katsura und Wun-Chen Wang⁴⁾, 王^{5) 6)}) であつて、氏らは単純塗抹、集菌、培養の 3 方法を併試しつつ臨床例を追求し、一般に培養が鏡検に優越する例は経過不良であり、逆の例では経過良好であつて菌の生活力の減弱していることを報じ、鏡検陽性培養陰性なる現象に臨床的意味づけをしたのである。その後化学療法の時代に入るや、年とともに培養成績の劣化、鏡検陽性培養陰性例の多いことが広く注意されるにいたり、一方では喀痰のみならず、長期の化学療法を受けた被包乾酪巣に見出される菌もまた鏡検陽性培養陰性である場合が多いことが知られ、そのような菌の変化の本質、病原性や耐性との関連、培養上の工夫等に関して多数の研究がなされるようになった。著者らもまたこの点の改善を試み、先に Tween 80 などを含む寒天培地によつて培養成績を高めうることを報じたが、これによつても塗抹陽性培養陰性の例をしばしば経験したのであつた。ところで、塗抹鏡検という方法は熱心に行われればともかくとして、一般的には有力な方法ではないから、この非力な塗抹の成績と、理由はともかくとして、貧弱化した培養成績とを組み合わせた現今流布の菌検出法をもつては、その間に検出されざる多数の排菌例を残す危険が少なくないはずである。もしその危険が大きいものならば結核の診断、治療のうえに重大な障害をもたらすことは自明である。よつて著者らはこの点の解明のために、近來はあまり広く用いられていない集菌法をとりあげ、単純塗抹法および培養法の成績を比較検討した。集菌法としては簡にして要を得ていると思われる田村法を用いたが、予想以上の菌検出を単純塗抹および培養ともに陰性の例の中に見出す結果となり、集菌法の意義がこの化学療法時代においてさら

に重要化したことが痛感された。

実 験 材 料

羽山荘健康保険福島療養所に入所し、化学療法実施中の肺結核患者のうち、比較的排菌数の少ない患者 100 名を選んで対象とした。すなわち 12 名を除いては月 1 回の検痰では 3~6 ヶ月以上塗抹培養ともにほとんど常に陰性を続けていたものである。

結核菌に対する抗結核剤の影響をなるべく少なくするために、早朝あらかじめ冷水で口を 3~5 回洗わせてから喀痰を出させ、かつ喀痰は喀出後 3 時間以内に実験に供した。ただし抗結核剤の不活性化および採痰に先行しての抗結核剤の投与中止は行わなかつた。

実 験 方 法

普通の単純塗抹法 (単塗法)、田村法^{8)~12)} を少しく改変した集菌法、培養法を次記のごとく併試した。滅菌シャーレに採つた 1~3 cc の喀痰の可及的膿性の部分をとつて単純塗抹標本を作り、残余の喀痰に 8% 苛性ソーダ溶液を喀痰の性状および量によつて 1~3 滴滴下し、白金耳で約 3 分間喀痰が完全に均等化するまで混和する。ついで均等化した喀痰の半分を滅菌試験管にとり、ほぼ等量の 4% 苛性ソーダ溶液を加えて混和均等化し約 30 分後に培養に供した。残りの半分は容量約 30 cc を有する肉厚の、先が比較的尖つたスピッツグラスに移し、喀痰の約 10~20 倍の蒸溜水で徐々に攪拌しながら稀釈均等化し、3,000 回転 20 分間遠心し、沈渣を毛细管ピペットでよく混和後採取し、載物硝子に約 1.5 cm 平方に辺縁を可及的直線的に、少しく盛り上げる程度にたつぷり塗り、37°C の孵卵器中に入れて自然乾燥させる。このようにすると結核菌は乾燥する間に辺縁に集まり、菌が多数に存在するときは塗抹の中央部にも多少はみられるが、少数ならばほとんど辺縁にのみ見出される。したがつて鏡検にさいしては辺縁に沿つて直線的に視野をずらしてゆけばよい。この集菌法で田村の原法と異なるところは、(1)原法が 25% 苛性ソーダ溶液で喀痰を均等化するのに対し、著者らは喀痰の半分を培

養に付する関係上、できるだけ前処理による侵襲を少なくする考えから、8% 苛性ソーダ溶液を使用したこと、(2)沈渣を塗抹するさい、原法では約1cm × 3cmの矩形に塗るとあるのを約1.5cm²としたこと、(3)喀痰を均等化するさい、割箸でなく白金耳を使用したこと、(4)沈渣塗抹後の乾燥には50~70℃の電熱乾燥器または緩やかな火焰を用いるのに対して37℃の孵卵器を利用したことである。

単塗法および集菌法の染色は原法に準じてテール・戸田法(ピクリン酸使用)を採用した。水洗の場合には可及的短時間にして菌の流失を防ぐ必要がある。この染色法はテール・ネールゼン法と異なつて喀痰中の細胞、雑菌等はほとんど鏡検不能であるが、結核菌自体はむしろ見やすく、少々厚く塗つても識別しやすい利点がある。

単塗法は、倍率1,000倍で100視野の菌数を算出してGaffky号数に当てはめ、集菌法は原法に準じて塗抹の2辺の菌数を算出して菌数/2R(RはRand)のごとく記入した。培地としては著者ら⁷⁾が先に報告したTween寒天培地2本および小川培地2本計4本を使用し、60日間培養観察した。

実験成績

1) 基礎実験

Tween液体培地に7日間発育したH₃₇Rv株菌液から10², 10³, 10⁴, 10⁵倍菌液を作り、それぞれの方法による検出可能限度を5回実験した。成績は表1のごとくで、0.1ccを使用すると集菌法は10³倍液、小川培地は10⁴倍液、Tween寒天培地は10⁵倍液が検出する限度であり、集菌に菌液2ccを使用した場合は10⁴倍液でも2回検出できた。

表1 基礎実験

検出方法	稀釈倍数および用量 (cc)							
	10 ²		10 ³		10 ⁴		10 ⁵	
	0.1	2	0.1	2	0.1	2	0.1	2
Tween								
寒天培地	+	/	+	/	+	/	±	/
小川氏地	+	/	+	/	+	/	-	/
田村氏法	+	+	+	+	-	±	-	-

2) 臨床成績

検査総数は1,500回で、表2に示すように菌陽性率は単塗によつて11%、培養によつて17%、集菌によつて35%であり、集菌が断然高い。このうち単塗陽性培養陰性例は5%、逆に単塗陰性培養陽性例は10%、集菌陽性培養陰性例は22%、逆に集菌陰性培養陽性例は3%を占める。総括するに928回は単塗法、集菌法、培養法のいずれでも陰性で、572回はいずれかの方法

で陽性の結果を示した。この572回について3検出法

表2 成績総括表

	集菌(+)		集菌(-)		計
	培養(-)	培養(+)	培養(+)	培養(-)	
単塗(+)	68	102	0	0	170 (11%)
単塗(-)	256	98	48	928	1,330 (89%)
計	324 (22%)	200 (13%)	48 (3%)	928 (62%)	1,560 (100%)
	524 (35%)	248 (17%)	976 (65%)		

の比較を図示すると図1を得る。単塗による検出率は572回に対して30%、集菌では92%、培養では43%であつて集菌によるものがはなはだ高率である。さらに集菌のみによつて検出された回数数は45%(図中D)、培養のみによつては8%(図中E)、単塗のみによつては0であつた。また集菌陽性培養陰性は57%(図中A+D)、逆に培養陽性集菌陰性は8%(E)であり、単塗陽性培養陰性は12%(A)、逆に培養陽性単塗陰性は25%(C+E)であつた。かくして現在のごとく単塗と培養のみを用いる検査によつては、菌陽性たりうる例の約半数が見逃がされるという結果になる。なお表2中単塗陽性で集菌陰性という例はないが、これは慣れないうちはときとして染色にさいし菌の流失を来すという失敗があるが、習熟すればこのようなことが起らないものである。

図1 単塗、集菌、培養の成績の関連

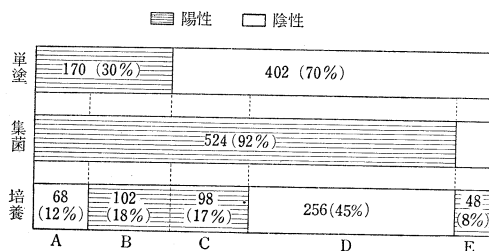


表3 集菌数と培養陽性率

集菌数	培養(+)	培養(-)	培養陽性率
0	48	928	5%
1~10	59	217	21%
11~20	36	40	47%
21~50	30	33	48%
51~100	11	11	50%
101以上	64	23	74%

集菌数と培養との関係は表 3 に示してあるが集菌数の多いほど培養陽性率が高い。集菌数 0 では約 5% の培養陽性率を示すにすぎないが、集菌数が 11 コ以上になると培養陽性率が約半数になり、101 コ以上になると約 70% を示す。集菌数は 2 辺のものである。

表 4 は同一喀痰の集菌数とコロニー数を比較したものである。集菌数は 2 辺の菌数を 2 倍して全集菌数とみなし、コロニーの数は Tween 寒天培地と小川培地の中でより多い方のもの 2 本分のものである。表に明らかかなように、両者の間の関係は非常に密接ではなく集菌数がコロニー数より多かつたものがその逆、およびほぼ同程度のものよりやや多く認められ、相当多数の菌が認められても培養陰性の場合すら少なくない。表 3 に示すように集菌数が 51~100 コでなおかつ培養陽性率 50% であることが如実にこれを証明している。

表 4 集菌数とコロニー数との関係

集菌数 (4 R)	コロニー数				
	1~20	21~40	41~60	61~100	101以上
1~20	65	10	6	1	9
21~40	7	4	0	2	7
41~60	5	3	4	0	4
61~100	1	0	2	3	3
101以上	11	1	3	2	47

集菌数とコロニー初発日数との関係は表 5 のごとくで、集菌数が多いほどコロニー初発日数が早くなっている。たとえば集菌数 0 と 101 コ以上のものを比較してみると、前者では 30 日以内に初発するものは 35% にすぎないが後者では 85% を示す。集菌数は 2 辺のものであり、コロニー初発日数は Tween, 小川両培地のうちで早い方をとつた。

表 5 集菌数とコロニー初発日数

初発 日数	集菌数						
	0	1~10	11~20	21~50	51~100	101以上	計
15以内	1	1	1	2	1	10	16
16~30	16	28	16	21	8	44	135
31~45	18	25	16	6	1	7	71
46~60	13	7	3	1	1	3	28
計	48	59	36	30	11	64	248

コロニー数とコロニー初発日数との関係は表 6 に示してあるが、コロニー数が 1~10 コのものは 30 日以内に初発するものが約 40%、101 コ以上では約 90%

でコロニー数の多いものほどその初発日数が早くなっている。コロニー数は Tween 寒天培地と小川培地のうち多い方を、また初発日数は両者のうち早い方をとつた。

表 6 コロニー数と初発日数

初発日数	コロニー数				
	1~10	11~20	21~50	51~100	101以上
15以内	1	0	1	2	12
16~30	39	13	14	10	57
31~45	39	12	11	3	6
46~60	22	3	1	1	1
計	101	28	27	16	76

考 案

鏡検陽性にして培養陰性の原因としては培養手技の拙劣は別問題として、抗結核剤の喀痰中への混入と菌の生活力の減弱または死滅の 2 つが考えられるわけであるが、ことに菌の生活力の減弱が主であり、いずれにせよ、近年の培養成績不良化に抗結核剤が大きい影響を及ぼしていることに諸家^{15)~23)}の意見は一致している。これに対処すべく、ヘミン、PABA、塩酸チヌステイン、活性炭素などが培地に混入されたり、あるいは長期培養、アルブミン水による洗滌が用いられ、あるいは喀痰採取前の抗結核剤投与中止または含嗽などの方法が行われているが、培養問題を解決する方法は生まれていない。

いかほどまでに化学療法の前後において様子が違っているかを数字的に拾つてみると、小川¹⁶⁾は化学療法以前に鏡検陽性培養陰性例は 1.1% にすぎないが以後は 19.6% であるとし、Yegian ら¹⁵⁾は 1.5% に対し 22% とし、Peizer ら²²⁾は 1952 年までは 2.4% であつたのに、近年は 9% であると報じている。著者らの結果によれば、単塗陽性で培養陰性の例は被検総数中の 5% に、集菌陽性で培養陰性の例は 22% に見出され、その逆に培養陽性で単塗陰性は 10%、同じく集菌陰性は 3% であつた。また 3 検出法のいずれかによる陽性例総数に対する比率は集菌 92%、培養 43%、単塗 30% であつた。これらの数字はしかし被検者が撰択されたこと、すなわち大部分は数ヶ月にわたつて普通の検査方法では単塗、培養ともに大體陰性をつづけた例をえらんだことから、あまり一般的とは認めがたいとしても、それならばそれだけに単塗と培養をもつてしては見逃されてしまう排菌例が多数に存在することを意味する。すなわち実際の排菌と培養の結果との解離は以前よりもさらに増大したことが認められ、ここに直接菌を見るための高能率の方法が要請されるし、また Hedvall

19) もいうように、現在においては培養の有する意義は以前と同じではないのである。

このように培養をはるかに上回る集菌陽性率を結果したことは、前述のごとく被検例が多くは長期の化学療法をうけ、かつ撰択されたものだからであるが、また1つには田村集菌法の優秀性によるものであろう。その能率高き所以は次の点にあるであろう。この集菌法はアルカリを用いて喀痰を処理し遠心するという原理においては多くの他の方法と大して変らないが、(1)大量の水をもつて稀釈して、比重の差を利用するところの遠心による集菌という操作を可及的能率的にしたこと、(2)塗抹にさいしては単に沈渣を塗りひろげるというのではなくて、矩形にもり上げておいて、これが乾燥する間に、液体表面の性質に従つて菌が辺縁に自然に集中してゆく現象を利用したこと、すなわちここでも自動的に集菌が行われること、したがって鏡検は辺縁にそつて直線的に行えばよいこと、この簡単な物理的現象を巧みに意識的に利用した2点は本法の最大特徴であろう。さらに他の1つの理由は、使用される喀痰量が培養に用いられるそれよりもかなり多いことである。たとえば出発点の喀痰量が2ccであるとすると、集菌にはその半分1ccが使われ、培養には残り1ccが4%苛性ソーダ液で倍に稀釈されたのち4本の培地に0.1ccずつうえられるのであるから、出発点の喀痰量で計算すれば0.2ccを用いたことになる。したがって培養と集菌の使用喀痰量は1:5である。実際にはそのように厳密には行いがたいからおおよそ1:2~7であろう。

田村集菌法による菌検出数の倍率は、田村⁸⁾によれば単塗の約37倍である。著者らの成績では、単塗は100視野、集菌は正方形の2辺をみるという条件のもとで、Gaffky 1号相当に対し、集菌は最低2/2R、最高88/2R、通常20~40/2R、平均30.8/2Rであつておおよそ田村の成績に一致する。なお田村法の能率は田村⁸⁾によればアンチフォルミン法の8倍であり、林および坂田¹¹⁾によれば(矩形に塗ることを始めたのは彼らである)平均単塗法の100倍であつた。これらの数字は単塗に蛍光染色を施した場合の倍率数に比してはるかに高い。最近中島ら²⁴⁾が発表した成績によると、集菌成績は単塗に比してあまりよくなり、培養陽性例の最高67.3%に止まっている。このように田村集菌法が高能率を示す理由は、諸多の集菌法が「集菌」なる操作をただ遠心のみにかけて、その他の点に対する配慮がほとんどないのに反し、本法では既述のごとき工夫が加えられているからであろう。本集菌法は普遍化されておらないが、その特徴が再確認され、広く日常の検査として推薦されるべきものと考えられる。

集菌数と培養の結果とを比較してみると、集菌数の多いものほど培養陽性率は高く、集菌数とコロニー数とを

対照すれば全体としては集菌数の多い方がコロニー数も多い。しかし必ずしもそうとは限らず相当多数の菌が見出されても培養陰性のことすら少なくない。このことは小川¹⁶⁾、Hedvall¹⁹⁾、西村ら²⁵⁾その他多くの人々の観察するところと同様であつて、菌のpopulationを組成する、培養しうる菌および培養しえない菌の割合いかに従うものであろう。コロニー初発日数が集菌数およびコロニー数の少ないものに一般に長いのは、菌が消失してゆく場合にその生活力が減弱する、少なくとも培地上の増殖力が減弱することを意味するものであろう。化学療法によりコロニー初発日数がおそくなつたことは小川¹⁶⁾、西村ら²⁵⁾も報じており、化学療法以前の時代にも王²⁶⁾はコロニー初発日数のおくれるほど菌の増殖力は弱く、そのような例の鏡検成績は培養成績を凌ぐこと、その臨床経過はかいて良好なることを観察している。

総 括

大部分は数ヶ月間従来の方法によつてはほとんど菌の証明されなかつた100名の結核患者について田村集菌法、単純塗抹、培養の3方法を併用して喀痰検査を行い次の結果を得た。

- 1) 1,500回の検索中572回にいずれかの方法によつて結核菌が証明された。そのうち集菌によつて検出された回数は92%、培養では43%、単塗では30%であつた。集菌のみによつて検出されたものは45%、培養のみによるものは8%、単塗のみによるものは0であつた。また集菌陽性にして培養陰性のものは57%、逆に培養陽性にして集菌陰性のものは8%あり、単塗陽性にして培養陰性のものは12%、逆に培養陽性にして単塗陰性のものは25%であつた。
- 2) 田村集菌法は操作が簡単で能率が非常に高いから、ことに培養成績の貧弱化した今日の化学療法時代においては本法の優秀性が再認識され、広く日常の検査方法として用いられてよいものと考えられる。
- 3) 田村集菌法の能率高き主な理由は、遠心、塗抹、乾燥の操作に特殊の工夫が加えられてあることにある。
- 4) コロニー数は集菌数の多いものに多い傾向にあるが、必ずしも比例はせず、かなり多数の菌が見出されても培養陰性のことも少なくない。コロニー初発日数は集菌数およびコロニー数の少ないものの方において、多いものに比して一般に長かつた。

本論文の一部の要旨は昭和32年10月13日第16回日本結核病学会東北地方会において発表した。

文 献

- 1) J. Hohn: Zbl. Bakt. I. Orig., 98: 460, 1929.

- 2) A. Dimtza : Arch. klin. chir., 150 : 646, 1928.
- 3) 桂重鴻 : 日本臨牀結核, 4 : 74, 昭18.
- 4) S. Katsura u Wun-chen Wang : Beitr. Klin. Tbk., 107 : 171, 1952.
- 5) 王文杰 : 新潟医誌, 64 : 257, 昭25.
- 6) 王文杰 : 新潟医誌, 64 : 624, 昭25.
- 7) 門屋桂太郎 : 日本臨牀結核, 16 : 140, 昭32.
- 8) 田村和夫 : 結核, 17 : 913, 昭14.
- 9) K. Tamura : Beitr. Klin. Tbk., 93 : 623, 1939.
- 10) 佐々木国勲 他 : 結核, 21 : 23, 昭18.
- 11) 林 茂 他 : 結核, 21 : 185, 昭18.
- 12) 林 茂 : 結核, 21 : 193, 昭18.
- 13) B. Fruhlinger et al. : Am. Rev. Tub., 68 : 42, 1953.
- 14) L. R. Peizer et al. : Am. Rev. Tub., 69 : 1022, 1954.
- 15) D. Yegian et al. : Am. Rev. Tub., 71 : 860, 1955.
- 16) 小川辰次 他 : 日本医事新報, -1590, 17, 昭29.
- 17) 龜山禧 : 結核, 30 : 712, 昭30.
- 18) 椿名恵子 他 : 結核, 30 : 598, 昭30.
- 19) E. Hedvall : Dis. of Chest, 28 : 391, 1955.
- 20) R. Knox et al. : Am. Rev. Tub., 73 : 726, 1956.
- 21) 寺山和夫 : 呼吸器診療, 11 : 207, 昭31.
- 22) L. R. Peizer et al. : Am. Rev. Tub., 74 : 428, 1956.
- 23) E. L. Duerr et al. : Dis. of Chest, 30 : 306, 1956.
- 24) 中島康次 他 : 結核, 33 : 113, 昭33.
- 25) 西村宏 他 : 結核, 32 : 141, 昭32.
- 26) 王文杰 : 新潟医誌, 64 : 693, 昭25.