

結核菌培養の研究

三輪太郎・鈴木喜久夫・権田三郎・川口幸太郎・神谷俊彦・小川喜代子

国立療養所梅森光風園（所長 青井節郎博士）

受付 昭和32年12月20日

ここ数年来化学療法はめざましく、結核症の様相を大きく変えるに到つた。化学療法の効果の判定には喀痰中結核菌の検索は欠くべからざるものであるが、近年喀痰中結核菌培養陽性率の低下が目立っている。さらに化学療法後に切除された閉鎖性病巣から塗抹陽性培養陰性菌が高率に検出され、その生死を繞つて内外の研究者の間に論議が続けられている。

喀痰培養による結核菌の生死の決定は病巣内結核菌の態度の一面を知るとともに化学療法の効果の限界という大きな問題の解決に寄与するものと思われる。

われわれは主として病巣内結核菌の研究を続けてきたが、同時に喀痰内結核菌検出についても種々な考察を行いとくに塗抹陽性培養陰性菌の存在に注目し、2, 3の実験を併せ行つてこれらの点につき解明を試みた。

供試喀痰は当国立療養所入所患者のもので一般の培養には3%小川培地を用い実験菌株は H₃₇Rv, ソートン培地継代培養のものを用いた。

I 排菌の実態

1. 培養陽性率の推移

年間6,000~8,000件の喀痰培養の成績を表1に示す。

表1 結核菌培養陽性率の年間推移

年度		昭27	28	29	30	31
陽性率 %	平均	33	31	22	19	17
月間	最高	35	36	27	25	22
	最低	26	23	12	12	12

昭和27年から昭和31年の5年間で陽性率はほぼ半減をきたしている。

2. 塗抹陽性培養陰性菌の検出

同一喀痰を用いての塗抹培養同時検査成績は表2で、327例中塗抹陽性培養陰性は33例(11%)でこれは全塗抹陽性例中の17%に当る。

また塗抹陽性でありながら培養50コロニー以下の微量菌検出例は21例であり、両者の合計54例は塗抹陽性例中の26%を占めている。これらの例は表3でみられるように化学療法とのつながりが深く、塗抹陽性培養また陽性

表2 塗抹培養同時検査成績

培養	ガフキー									計
	0	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
(-)	75	1	12	9	5	0	3	2	1	33
+	46	0	10	6	2	2	1	0	0	21
++	8	0	10	10	13	10	4	2	0	49
+++	2	1	9	8	10	12	10	12	2	64
++++	0	0	1	3	3	4	8	9	1	29
計	131	2	42	36	33	28	26	25	4	196

培養(+)は1~50コロニー

表3 菌の状態と化学療法

菌の状態	例数	化療あり	化療なし
塗抹(+)培養(-)または微量菌	54	37 69% (うちINAH30)	17 31%
塗抹(+)培養(+)	142	66 46% (うちINAH46)	76 54%

例と比し明らかな差がみとめられる。とくにINAHとの関係が深いようであり、塗抹陽性培養陰性例で化学療法中のものの81%がINAH使用中のものである。

3. 発育遅延例

昭和27年4月から31年3月までの4年間で、発育が遅く2ヵ月判定で漸く陽性となつた例のうち、これを2回

表4 発育遅延例の療法別分類

年度		昭27~29年	昭29~31年
治療法			
胸	成	24	19
肋	外	5	0
充	填	2 (53%)	1 (21%)
気	胸	28	0
気	腹	11	1
空	切	4	3
化	療	12 (9%)	59 (59%)
な	し	46	17
計		132	100

以上繰返したものは232例で、これらを療法別により分類すると表4のごとく27~29年には虚脱療法例が、29~31年には化学療法例が圧倒的に多くなっている。

以上の結果から近頃化学療法と関連して生えにくい菌や、遅くなって漸く生える菌が増加してきた事実を確かめた。

II 培養方法について

これらの培養しにくい菌を生えやすくするための試みとしては

- 1) 弱つた菌をさらに障害するような前処理を避ける。
- 2) 喀痰内混入の化学療法剤を非活性化する。
- 3) 発育の早い培地、微量菌検出能の良い培地を使用する。
- 4) 培養頻度を多くする……等々が考えられる。

1. 前処理について

a) 苛性ソーダ：苛性ソーダ濃度と菌発育との関係は

表5 NaOH濃度と菌発育

濃度 %	処理分	菌株 培地	H ₃₇ Rv		喀 痰	
			1% KH ₂ PO ₄	3% KH ₂ PO ₄	1% KH ₂ PO ₄	3% KH ₂ PO ₄
			0	15	30	0
0	0	0	+	+	+	+
	15	0	+	+	+	+
	30	0	+	+	+	+
0.5	0	0	+	+	+	+
	15	0	+	+	+	+
	30	0	+	+	+	+
1.0	0	0	+	+	+	+
	15	0	+	+	+	+
	30	0	+	+	+	+
2.0	0	0	+	+	+	+
	15	0	+	+	+	+
	30	0	+	+	+	+
4.0	0	0	+	+	+	+
	15	0	+	+	+	+
	30	0	+	+	+	+

Cは汚染, 数字はコロニー数

表6 前処理NaOH濃度と陽性率, 汚染率

NaOH濃度 %	陽性率 %	汚染率 %
1.0	5	28
2.0	22	4
4.0	20	2

表5で示すように低ければそれだけ発育が良いが、実際に喀痰培養の際用いると表6のように汚染が多く1%処理では実用に適しない。

b) ペニシリンおよびトリコマイシン：苛性ソーダを用いない時の菌発育は当然ながら良好でありこの状態に近づけたいために汚染防止剤として菌阻害作用のない濃度のペニシリンを用いた。しかし250単位/ccでもなお汚染を防ぎえない時もあり、これらからカンディダを検出したことから抗カンディダ剤であるトリコマイシン(三洋)を使用した。これらを組み合わせて用いた結果を表7に示す。少量のNaOH併用により喀痰の均質化は甚だ容

表7 ペニシリン, トリコマイシン含有培地

培地 NaOH	培地								
	K	P	P ₅₀	P ₅₀	P ₅₀	T	T	T	
%	100	100	T ₁₀₀	T ₁₀₀	T ₁₀₀	100	100	100	
症例	0	0	0	1.0	2.0	0	1.0	2.0	
1	C	+	+	+	20	C	20	-	
2	C	+	C	+	+	C	C	+	
3	C	+	C	+	+	C	+	+	
4	C	-	+	+	+	C	+	+	
5	C	+	C	+	+	C	+	+	
6	C	C	-	-	-	C	C	-	
7	C	-	C	-	-	C	C	-	
8	C	+	C	+	+	C	+	+	
9	C	+	C	+	+	C	+	+	
10	C	+	C	+	+	C	C	C	
汚染率 %	100	40	50	0	0	100	40	10	

P…ペニシリン 数字は単位/cc C…汚染

T…トリコマイシン

易となつた。

2. 化学療法剤の非活性化について

内服剤であるINAH, PASについて考察を加えた。INAHについては焦性ブドウ酸, ヘミン, アルブミン, PASにはパラアミノ安息香酸(PABA)を用いた。

a) 焦性ブドウ酸：0.25%焦性ブドウ酸加小川培地¹⁾を用い610例に培養を行った。その結果は表8に示す。

表8 焦性ブドウ酸加培地の効果

I NAH使用 効果	I NAH使用	
	I NAH使用中	I NAHなし
陽性化	9	1
促進, 増強	40	10
不変	72	30
計	121	41

全陽性例の37%に発育増強をみ、I NAH服用中の陽

性例の40%強に効果をみた。しかし陽性化せしめた例は10例5%にすぎなかつた。

これらの結果から焦性ブドウ酸の抗INAH作用は不確実なものであることがわかつた。

b) ヘミン：ヘマチンを苛性ソーダ溶液として培地に混入使用した。濃度は1γ/ccである。H₃₇Rvの十分発育した斜面に1~100γ/cc濃度のINAHを接触させ時間を追つてヘマチン加培地に還元培養した。ヘマチン培地では112例中57例(51%)に発育増強をみ、うち26%には強い発育促進作用をみた。

c) アルブミン：アルブミンを含むデュボス、キルヒナー培地をそれぞれ2%寒天として上記のINAH接触菌を培養したがとくに効果はみられなかつた。アルブミンを用いて洗滌培養したものもまた同じであつた。

d) PABA：10, 50, 100γ/cc PABA加小川培地を用いPAS服用中患者喀痰を培養した結果は表9で集落早発を3例にみた。

表9 PABAの効果

症例	判定											
	PABA 2γ/cc			PABA 50γ/cc			PABA 100γ/cc			対照		
	0	10	50	100	0	10	50	100	0	10	50	100
1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	-	-	-	-	5	6	6	10	7	10	9	11
4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	2	1	2	2	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	1	-	1	+	+	+	+
7	-	-	-	-	2	5	10	10	2	5	11	19
8	-	-	-	-	-	-	1	-	+	+	+	+
9	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
10	-	2	-	2	+	+	+	+	+	+	+	+

3. 培地について

高性能、とくに微量菌検出能のすぐれたものが要求されるが臨床的に用いやすいためには判定のやさしいもの、汚染の少ないものでなければならぬ。そのために主として固型培地を用いた。

a) 有機酸の添加培地：表10のように1%小川培地に有機酸を加えて菌発育をみるとわずかではあるが各培地とも対照に比し発育促進がみられ、少数菌に対してもその作用がみとめられた。これらの培地を100例の喀痰培養に用いた結果、陽性化6, 促進21計27例に効果をみ、全陽性例中の48%を占めた。中でも焦性ブドウ酸、琥珀酸加培地は良い成績をえた。

b) 寒天培地の使用：グリセリン血液寒天²⁾は臨床的に用いると汚染が多く、またNaOHを前処理に用いる時は緩衝能がなく実用しにくい。デュボス培地のアルブミ

表10 有機酸の効果

培地	濃度 %	菌液10mg/cc			
		10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
コハク酸	0.1	17	+	21	26
	0.2	16	+	20	+
	0.3	16	+	18	30
	0.4	17	+	18	21
リンゴ酸	0.1	17	+	20	17
	0.2	16	+	18	20
	0.3	17	+	18	+
	0.4	17	+	18	22
アギスンバラ酸	0.1	17	+	18	27
	0.2	17	+	18	+
	0.3	17	+	18	23
	0.4	18	+	18	12
酒石酸	0.1	18	+	18	36
	0.2	18	+	20	+
	0.3	16	+	20	37
	0.4	18	+	20	23
クエン酸	0.1	16	+	18	19
	0.2	17	+	18	21
	0.3	17	+	18	31
	0.4	18	+	17	25
焦ブドウ性酸	0.1	16	+	17	37
	0.2	16	+	17	+
	0.3	16	+	18	40
	0.4	17	+	20	46
対照	0	20	+	22	22
		22	+	22	19

前列の数字は集落初発日数

後列の数字は集落数(50までの場合)

ンに代えて全血を用いた時もほぼ同様であつた。

培地に加えた寒天は血液寒天の1%の他はすべて2%

表11 寒天培地の性能、小川培地と比較して

培地	発育の早さ	発育の量	汚染
血液グリセリン寒天	+1	+1	多
Dubos 寒天	+2	≡	
Kirchner "	+2	≡	
血液加 Dubos "	+1	-1	やや多
炭末加 Dubos "	-1	-1	
" Kirchner	+1	-1	
ソートン 寒天	-2	-3	
炭末加ソートン "	-1	-2	

≡……小川とはほぼ等しい
+1……やや良好、促進
+2……著明 " "

-1……やや遅延、劣る
-2……相当 " "
-3……きわめて " "

とした。表11はこれら各種の培地を小川 KH_2PO_4 培地と比較したものであるが、デュボス、キルヒナー培地も寒天培地とした時は小川培地以上のもではなかつた。

4. 培養頻度について

a) 連続培養：毎月1回の培養で陰性者、1年間に1～2回の陽性者および微量排菌者18例について喀痰の全量毎日培養を1ヵ月間行い、その12例67%に菌を検出した。培養回数20回、20日目で陽性率は最高に達したがそれ以後は陽性例の増加はみられなかつた。また排菌の型については3例の突発的1回のみ排菌を除いては数日にわたる排菌が続きその間に比較的大量排菌の日が混つていた。

3回以上の連続培養を行つた250例の陽性率は38%で高いが、毎日法と毎週法との間にはとくに差はみられなかつた。

b) 連続3日後週1回培養法：当療養所で行つている結核教室（1ヵ月間の結核ドック）での1年間の入所者118例は主として軽症であり、非結核、健康者も混つているが、これらに連続3日とその後は毎週1回3週間、計6回の培養を施行した成績が表12である。

表 12 連続培養と菌検出

排菌 のあり方	排菌量 塗抹(+)	培養(+)	培養(±) 微量菌	計
全期間を通じ (+)	11	3	2	16
始めの3回で (+)	5	0	3	8
後の3回で (+)	0	3	5	8
計	16	6	10	32

大量排菌例は初期に、微量排菌例は培養回数が多くなるにつれて検出されてくる。

III 総括および考案

すでに小川³⁾らは近頃の結核菌培養陽性率の低下を指摘したが、われわれの療養所での観察もまたこの5年間に陽性率が約50%低下したことを認めえた。塗抹陽性培養陰性でも、発育遅延例でも、これらが化学療法剤、ことにI N A H投与と密接なつながりにあることは否定しがたい。Collard⁴⁾、瀬倉⁵⁾、寺山⁶⁾らもI N A Hとの関連を注意している。

しかし昭和29年以前における発育遅延例が虚脱療法と関連があつたように、化学療法以外の影響、すなわち病巣の物理化学的環境、菌傷害物質の存在が考えられる。このことはDubos⁷⁾、Hirsch⁸⁾らの唱えるところであり、われわれもまた化学療法が唯一の原因でないと考えている。

これらの観点から行つたわれわれの観察、実験の結果について考察を加える。

1) 伊藤⁹⁾は前処理のNaOHによつて50～80%、Gray¹⁰⁾は80%、Yegian¹¹⁾は50%の菌が殺されるといい、これに関する小川¹²⁾の詳細な報告もある。小川は4%以下のNaOH、 H_2SO_4 で菌が新たに培養陽性となる場合はごくまれであるとしているが、最近の弱つた菌、増殖能の劣る菌と考えられている場合は如何なものであろうか。われわれは切除リンパ腺や病巣からNaOH処理なしの場合にのみ少数菌発育をみた例を経験している。この意味でわれわれは2%、1%のNaOHを用い、またNaOHを使わない目的でSommermeyer¹³⁾のすすめるヘニシリン前処理を行い、またトリコマイシンを用いてみたが喀痰の均質化が困難であり、したがつて培養操作もむずかしくなり少量の低濃度NaOHを併用せざるをえなかつた。

前処理にアルブミン洗滌を行うHobby¹⁴⁾の方法も用いたがとくにすぐれた結果はえられなかつた。

2) 化学療法剤については、I N A Hの病巣内浸透度の高いこと、経口投与のためI N A H、P A Sの大量が喀痰内に混入することは否定しがたくFrühlinger¹⁵⁾もすでにP A Sについてこれを指摘した。

焦性ブドウ酸加培地についてはDubos¹⁶⁾、Schaefer¹⁷⁾らの抗I N A H作用の報告はあるが臨床的に用いた報告はない。われわれは本剤の結核菌発育促進作用と抗I N A H作用に期待したが、その効果は再現性に乏しく、かつとくにI N A H服用者にのみ著明な効果をもたらすというものでもなかつた。

ヘミンについてはFisher¹⁸⁾、岡¹⁹⁾の報告があり、もつとも有効な拮抗剤とされているが、これまた絶対的なものではなかつた。もちろん実験の不備もあると思われるが、I N A H接触菌の発育をなお50%促進したことは今後検討の必要があろう。

PABAについてはDuerr²⁰⁾はPABA加培地で著明な早期発育例をみているが、本研究の結果は香しくなかつた。

これらの薬剤不活性化はいずれも不確実な結果に終り、結局培養施行前24～48時間の投薬中止という姑息的手段を採らざるをえなかつた。

3) 培地についてはAckart²¹⁾、Gerundo²²⁾は2基酸が菌の発育を促進するといひ、小川¹⁾も焦性ブドウ酸にこの作用があることを認めている。

Dubos⁷⁾、Hirsch⁸⁾らの乳酸を始めとする病巣内結核菌発育阻止物質、毒物質の中和に効果があるという点からもまたケトージスと菌増殖という点からみても、さらに前述の抗I N A H作用をも期待して焦性ブドウ酸を用いたがその結果はわずかな促進をみるに止まつた。

発育の早い培地はまた微量菌検出能にもすぐれているの見地からデュボス、キルヒナー液体培地が優秀なことは岡¹⁹⁾らもみとめている。

しかし臨床的には汚染も多く判定が困難である。その

ため寒天培地としたが、その結果は小川培地に劣ることとなつた。これらの実験の中から活性炭末は血清代用となり、そのうえ高压滅菌可能なため使いやすいことをたしかめえた。

ことにソートン寒天培地に活性炭末を加えるときは原法培地に比し著明な強化培地となつた。

4) 培養頻度については長沢²³⁾の精密な報告があるが、われわれの観察もほぼこれと一致した。培養頻度ができる限り多く、かつ排菌の波をつかみやすくするために3日連続後週1回を3回、計6回の連続培養法を行つたがその結果はかなり良好であつた。

結局、前処理、化学療法剤の不活性化、培地の改良等と相まつて、培養回数を多くするという原始的方法がもつとも有効な結果を得たといえる。

これらの過程で出現した塗抹陽性培養陰性菌の本態については酸素の問題、乳酸その他菌の発育を阻止する物質の存在等、多方面にわたるさらに精密な実験と観察が必要であり、われわれも1, 2の実験を中心に解明に努めている。

IV 結 論

われわれの療養所の喀痰培養成績によると陽性率は5年前に比し半減し、また塗抹陽性培養陰性菌の出現も多く、それらは化学療法剤とともにI N A Hとのつながりが深いということが明らかとなつた。

これらの菌の生死に関連して生えにくい菌をより生えやすくするため培養方法について種々検討したがとくに著効ある方法、培地はなく、結局培養前24~48時間の投薬中止と培養頻度を多くする方法とがもつとも有効であり、薬剤の不活性化は効果が不確実であつた。しかしこれらの問題はなお検討を要するものと思われる。

終りに御指導御校閲を賜つた青井所長、青山教授に深甚の謝意を表するとともに直接御指導いただいた松原助教授に厚く感謝する。

本論文の要旨は日本結核病学会東海地方会7回, 8回,

9回にそれぞれ発表した。

V 文 献

- 1) 小川辰次: 臨床病理, 2 (5): 363, 昭29.
- 2) Tarshis, M. et al.: Am. J. Clin. Path., 21 (2): 101, 1953.
- 3) 小川辰次: 日医新報, —1950, 17, 昭29.
- 4) Collard, P.: Lancet, —6778, 155, 1953.
- 5) 瀬倉敬: 臨床内科小児科, 11 (4): 213, 昭31.
- 6) 寺山和夫: 呼吸器診療, 11 (3): 207, 昭31.
- 7) Dubos, R.: J. Exp. Med., 97 (3): 357, 1953.
- 8) Hirsch, J.: J. Exp. Med., 97 (3): 323, 1953.
- 9) 伊藤忠雄: 慶応医学, 30 (11, 12): 335, 昭28.
- 10) Gray, D.: Am. Rev. Tuberc., 69(6): 991, 1954.
- 11) Yegian, D. et al.: Am. J. Clin. Path., 22 (5): 456, 1952.
- 12) 小川辰次: 結核菌検索の基礎と応用, 保健同人社, 東京, 昭26.
- 13) Sommermeyer, L. et al.: Am. Rev. Tuberc., 67 (4): 530, 1953.
- 14) Hobby, G.: Am. Rev. Tuberc., 70 (2): 191, 1954.
- 15) Frühlinger, B. et al.: Am. Rev. Tuberc., 68 (1): 42, 1953.
- 16) Dubos, R.: J. Exp. Med., 92 (4): 319, 1950.
- 17) Schaefer, W.: Am. Rev. Tuberc., 68 (2): 273, 1953.
- 18) Fisher, M.: Am. Rev. Tuberc., 69 (3): 469, 1954.
- 19) 岡捨己: 日医新報, —1635, 3, 昭30.
- 20) Duerr, E.: Am. Rev. Tuberc., 75 (3): 506, 1957.
- 21) Ackart, B. et al.: J. Bact., 62 (1): 75, 1951.
- 22) Gerundo, M.: Am. Rev. Tuberc., 55 (6): 552, 1947.
- 23) 長沢誠司: 結核, 29 (3): 108, 昭29.