

胃液および喀痰よりの結核菌の検出に関する知的補遺

第 1 報 材料保存の検出に及ぼす影響

本 田 祐

北里研究所附属病院 (指導 小川辰次)

受 付 昭 和 34 年 4 月 30 日

I 緒 論

胃液は、喀痰の欠如した場合の結核菌の可検材料として、広く使用されている。ことに化学療法下の現在においては、喀痰の代用としての有力な対象であつて、それらの成績は肺結核患者の病状の判定、治療、あるいは管理等の方針の決定に大きな役目を果たしている。この胃液よりの結核菌の検出については、以前にはかなりの研究もされていたが、しかし現在ではほとんど研究されていない。それは胃液の検査は、ほぼ完成されたものとしてみられているためかもしれない。それで私は胃液よりの結核菌の通常検査の成績を正確にするために、次のような基礎的な種々の実験をした。すなわち、

① 外国では、保存した胃液よりの菌の検査をしている所が多いが^{1)~3)}、それは正しいか？

② 胃液よりの菌の培養が、喀痰よりも優れていると称されているが^{4)~13)}、それが本当か？

③ 胃液よりの菌の検査において、塗抹染色してみることは、非病原性抗酸性菌の混入が多いから、あまり意味がないと称している人もあるが^{14)~16)}、それは本当か？

④ 蛍光法は胃液の塗抹検査に有望か？

⑤ 最近、可検材料よりの菌の検出率が悪くなつているので、長期培養も実施されているが、喀痰、胃液の場合にはそれはどの程度に検出率を増してくるのであるか？

私は同一の患者について、胃液を採取すると同時に喀痰を採取し、喀痰を基準としてこれと比較しながら実験した。それは喀痰は可検材料として、もつともしばしば検査されるものであり、これと比較することにより、胃液検査の地位がうかがい知ることができるのではないかと推定したためである。

そこでまず第 1 に胃液および喀痰の保存による検出への影響につき、実験したので報告する。

II 実験方法

i) 対象：同一の患者について、早朝空腹時に同時に採取した胃液および喀痰各 22 例であつて、これらはいずれも従来までの毎月の喀痰塗抹検査で陽性的のものである。

ii) 実験方法の概略：採取前日は患者に結核化学療法剤の投与を中止した。採取後喀痰は材料少量の場合には、滅菌蒸留水を加え適宜稀釈し、胃液はそのままそれぞれホモジナイザーにかけ、均等化したただちに塗抹培養、残部は 0.5 cc ずつ滅菌中試験管に分注して適当数に分け、その半数ずつを、室温 (22°~31°C) および氷室 (5°C) に保存、24 時間後および 48 時間後に、両者を 1 本ずつとり、塗抹染色するとともに培養した。

iii) 染色方法：毎回 2 枚の載せガラスを使用、材料をそれぞれに 1 白金耳宛塗抹し、1 枚はチール・ピクリン酸法 1 枚は蛍光法で染色した。

(i) チール・ピクリン酸法 (戸田・三友¹⁷⁾)：石炭酸フクシン液で 2 分間加温染色、液をすて 3% 塩酸アルコールで 1 分間脱色後水洗、続いて 0.5% ピクリン酸で 30 秒染色水洗した。

(ii) 蛍光法 (ロダミン・オーラミン法、矢崎・津金¹⁸⁾)：0.1% ロダミン液で 1 分間染色、液をすて 0.1% オーラミン液 (石炭酸 5% 含有) で 15 分間染色、水洗、1% 塩酸アルコールで 1 分間脱色、水洗後、10 倍稀釈レフレル氏メチレン青液で 20 秒染色、水洗した。

チール・ピクリン酸法で、染色した標本の鏡検は、菌の形態をより精密に観察するために、双眼顕微鏡を使用、その拡大率は 675 倍である。菌の陰性が陽性かは、20 視野鏡検して決定、なお、陽性的場合には 10 視野をみて 1 視野の平均菌数をだし、その菌数表示は Lawrason Brown の修正したガフキー番号で示した。

次に蛍光法により染色した標本は、200 倍で 20 視野鏡検、菌の陰性が陽性かを決定した。なおこのさい疑わしいものは、450 倍で観察桿菌であることを確定した。また陽性的場合にはさらに 450 倍で鏡検し、菌数表示をチール・ピクリン酸法の場合と同様にして行なつた。

iv) 培養の方法 (小川の定量培養法¹⁹⁾)：胃液、喀痰ともに 8% NaOH を等量加えてよく振盪し、その 0.1 cc ずつを 3% 小川培地 2 本に接種し、斜面全体をうるおし、斜面を上にして水平として 37°C の孵卵器に保存、液のほぼ乾燥するのをまつて、ゴムのキャップに替え、立てて 37°C の孵卵器で培養を継続した。そして 1 週ごとに観察し 8 週まで継続した。

III 実験成績

i) 塗抹染色検査に及ぼす影響

a) 喀痰

塗抹染色各回陰性または剝離したものの多い例を除いた12例についての成績は表1のようである。判定は3号以上の差のあるものをもつて差があつたと解釈した。これはガフキー番号と集落数との関係をみた小川²⁰⁾

表1 喀痰保存の塗抹染色検査に及ぼす影響

患者番号	染色法		チール・ピクリン酸法				蛍光法				
	保存法	時間	室温 (22°~31°C)		氷室 (5°C)		室温 (22°~31°C)		氷室 (5°C)		
			直後	24	48	24	48	直後	24	48	24
(1)	III		IV		III		IV	VI		V	
(3)	IV		III		IV		IV	IV			
(7)	剝			(-)	I	II	剝	()	(-)	(-)	(-)
(8)	(-)		I	(-)	(-)	(-)	剝		(-)		剝
(9)	IV		IV		V						
(11)	IV		III		V		VI	(-)	剝	VI	II
(14)			II	I	II	(-)	V	IV	IV	V	(-)
(15)	剝		II		II		IV	III		III	
(16)	VI		VII		VII		V	VII		IX	
(17)	VIII		()	VI	IX	VIII	X	IX	IX	IX	X
(18)	IV		(-)	IV	IV	IV	VII	VIII	V	III	VII
(19)	VII				V		VIII				VII

注: 1) ローマ数字はガフキー番号

2) 剝・剝離の意

3) (-)は陰性を示す

4) 空欄は実施しないことを示している

表2 胃液保存の塗抹染色検査に及ぼす影響

患者番号	染色法		チール・ピクリン酸法				蛍光法				
	保存法	時間	室温 (22°~31°C)		氷室 (5°C)		室温 (22°~31°C)		氷室 (5°C)		
			直後	24	48	24	48	直後	24	48	24
(3)	I		(-)		(-)		II	I		(-)	
(6)	I		(-)	I	(-)	I	()	II	II	(-)	(-)
(7)	剝		I	I	(-)	I	I	III	(-)	(-)	II
(13)	I		I	(-)	(-)	I	II	IV	III	I	I
(14)	I		()	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
(15)	II		(-)				II	II		III	
(16)	I		III				V	VI		V	
(18)	II		(-)	(-)	I	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	II

注: 表1に同じ

の実験によれば、3号以上の差のあつたときにはじめて集落数に差をみる場合が多いからである。

(A)チール・ピクリン酸法; 合計12例中10例は室温および氷室でも、直後と24時間および48時間とは差がない。他の2例すなわち(17)(18)は室温の24時間保存の成績が陰性となつているので、ガフキー番号が直後に比して、減少したといえるが、しかし48時間の成績が再び直後程度の、ガフキー番号となつているので、この2例は技術上の誤差によるものと思われる。

このように考えると、全例とも室温、氷室の如何にかかわらず、また24時間、48時間の保存時間の如何にかかわらず、ガフキー番号には差がないと解釈される。

(B)蛍光法; 表示した例のうち(7)(8)の2例は全部陰性、(9)は検査してないので、この3例を除いた9例が比較できる。保存により減少を認められるものは、(11)の室温24時間保存および氷室48時間の保存、(14)の氷室48時間の保存、および(18)の氷室24時間の保存のもの3例であるが、これらの例はいず

れもチール・ピクリン酸法においては、ガフキー番号の低下をみていない。したがってこのような成績を示したのは、技術上の誤差ではないかと思われる。このように考えると、蛍光法でも保存によりあまり影響はないもののように思われる。

b) 胃液

塗抹染色各回陰性または剝離の多い例を除いた8例が比較の対象である。その成績は表2のようである。

喀痰の場合と同様、3号以上の差のあつたものを差とした。

(i)チール・ピクリン酸法；ガフキー番号数がいずれも少ないので、比較することは困難であるが、室温でも氷室でも、また保存時間が24時間でも48時間でも、直後とそう大差はないもののように思われる。

(ii)蛍光法；チール・ピクリン酸法と同様の例であるが、このうち(14)はすべて陰性なので除外した。すると7例であるが、この場合でもガフキー番号が低いので比較しにくい。チール・ピクリン酸法と同様、室温に保存しても氷室に保存しても、またその保存時間が変わることによつても、直後と大差はないものようである。

c) 胃液と喀痰の比較

(i)チール・ピクリン酸法；同じ患者より同時に採取した胃液と喀痰6例〔表1および表2の(3)(7)(14)(15)(16)(18)〕について、保存による影響がどちらが著しいかを、チール・ピクリン酸法により比較してみた。その結果は室温と氷室との保存の違いによつても、両者に著しい差は認められない。このことは胃液のみ、喀痰のみの比較において、とくに保存によりガフキー番号数の減少したものが、なかつたことから当然であろう。

(ii)蛍光法；4例〔表1および表2の(3)(15)(16)(17)〕により比較したが、蛍光法においてもほぼ同様の成績を得た。

ii) 培養に及ぼす影響

a) 喀痰

22例中の培養陽性を示した19例が、比較の対象であるが、この22例中の17例は塗抹陽性のものであつて4例は塗抹陰性、他の1例は塗抹検査を実施しなかつたものである。培養陽性を示したものは塗抹陽性17例と塗抹陰性の2例とである。

実験の方法は前に述べたように、0.5cc宛分けて、これを氷室(5°C)と室温(22°~31°C)に表3のように、1時間より48時間まで保存して培養し保存の影響

表3 喀痰保存の培養に及ぼす影響

患者番号	保存法		室温 (22°~31°C)							氷室 (5°C)						
	経過時間	直後	1	3	5	8	10	24	48	1	3	5	8	10	24	48
(1)		■	■	■	■			■		■	■	■			■	
(3)		■	■	■	■			■		■	■	■		■	■	
(5)		■	■	■		■		■	■	■	■		■	■	■	
(9)		■		■	■	■		■	■	■	■		■	■	■	
(11)		■	■	■		■		■	■	■	■		■	■	■	
(16)		■	■					■	■	■	■			■	■	
(17)		■	■	■		■		■	■	■	■		■	■	■	
(18)		■	■	■		■		■	■	■	■		■	■	■	
(19)		■	■			■		■	■	■	■		■	■	■	
(21)		■	■	■		■		■	■	■	■		■	■	■	
(22)		■	■	■		■		■	■	■	■		■	■	■	
(7)		■	■	■		■		■	130	■	■		■	■	■	
(14)		■	■	■		■		■	■	■	■		■	■	■	
(15)		■	■	■				■	119	■	■			■	■	
(2)	1.5	-	2.5	2.0		1	1			0.5	1.5	1.0	-	2		
(4)	0.5	1.5	-		-		1	0.5		1	0.5		-	1	1	
(6)	53	20.5	15		32		16	12		22.5	25		19	27.5	22.5	
(8)	6	5	6		3.5		6	0.5		3	5		4	9	2	
(13)	4	5.5	1		1		3	1		4	2.5		2	1.5	2	

注：1) 集落数 ■ 菌膜の発育 ■ 斜面全体に発育しているが集落の孤々になっているもの
 ■ 集落が斜面の1/2程度の発育 ■ 集落が斜面の1/3程度の発育 数字は集落数を示す
 2) 集落数は培養2本の平均値
 3) -は陰性を示す
 4) 空欄は実施しないことを示している

をみた。発育した集落数は、

■……菌膜様の発育

■……斜面全体に発育しているが集落の孤々になつて
いるもの

■……集落が斜面の1/2程度のもの

■……集落が斜面の1/4程度のもの

に分け集落の計算できるものは150コまで算え2本の
平均値を示した。そしてこの場合減少と認めたものは、
無数では2段階以上減少したもの、または有数となつた
もの、算えることのできたものでは、2倍以上の差のあ
つたものとした。また直後培養で集落数の10コ以下の
ものは判定できないものとして除外した。

成績は表3にみるように、比較できるのは直後の集
落数の無数のものが14例〔(1)~(15)〕有数のものが
1例(6)であるが、これらのものでは集落数が減少し
たと思われるのは、室温保存では無数のものうち(21)
(7)(15)であり、有数のものでは(6)である。す
なわち4例に集落数の減少をみたが、この4例中3時
間で減少したものが2例、24時間で減少したもの2
例、48時間で減少したものは3例である。次に氷室保

存では、無数のものでは、減少したのは(21)であり、
有数のものでは減少したものはない。なお(21)は1時
間および24時間で減少している。すなわち喀痰におい
ては、室温保存では15例中の4例26.7%が48時
間内のある時間において減少を示したことになり、氷室
では15例中1例6.7%が48時間内のある時間内
において減少を示したことになる。

以上の成績から喀痰においては、保存すれば室温でも
氷室でも集落数が減少するものがあること、その影響は
室温の方が著明であることが分かった。

b) 胃液

喀痰の場合と同様の仮定で保存の影響をみた。採取直
後培養陽性となつたのは塗抹陽性11例中の10例、塗
抹陰性11例中の5例、合計15例であつてうち2例
は、直後の集落数が10コ以下であつたので、比較の対
象となつたのは13例〔(1)(3)(5)(11)(16)(17)
(18)(21)(22)(7)(10)(15)(13)〕である。塗抹陽
性培養陰性のものは1例であつた。成績は表4に示す
ようである。

直後に比して集落数の減少をみたのは、室温では(1)

表4 胃液保存の培養に及ぼす影響

患者番号	保存法		室温 (22°~31°C)						氷室 (5°C)							
	経過時間	直後	1	3	5	8	10	24	48	1	3	5	8	10	24	48
			(1)	■	■	128	110				12.5		■	■	■	
(3)	88	90	95	97.5			105	70.5		99	95	100		115	74	
(5)	■	+	+			108		90	37	+	137		+		143	86
(11)	+	+	+			+		+	25	+	+		+		119	67
(16)	■	■	■					■	■	■	■				■	■
(17)	13	4	5.5		-			-	-	13	8		8		4.5	4
(18)	29	32	12		24			15	18	15	25		17		16	23
(19)	-S	-			-			0.5	-	2	1S		-		1.5	0.5
(21)	47	44	22		38			15	5.5	41	34		54		36	29
(22)	82	66	52		50			53	12	34	43		28		46	34
(7)	■	■	■					■	■	■	■				■	■
(10)	■	■	■		■			+	63	■	■		■		■	■
(15)	■	+	+					+	-S	+	+				+	+
(6)	3	5	8		7			10	4	3.5	4.5		3		4	2
(13)	35	26	32		32			31	27	23	26		28		25	23

- 注: 1) 集落数の表示は表3と同じ
- 2) S……雑菌侵入を意味する
- 3) 集落数は培地2本の平均値
- 4) -は陰性を示す
- 5) 空欄は実施しないことを示している

(5)(11)(17)(18)(21)(22)(10)の8例で、13例
に対して61.5%であつて、内訳をみると保存1時間
で減少したものは2例、3時間で減少した4例、8時
間で2例、24時間で4例、48時間で6例である。
同様にして氷室保存の影響をみると減少したのは、(5)

(11)(17)(22)の4例、すなわち13例に対して
30.8%である。この4例をみると1時間で減少した
ものは1例、3時間1例、8時間1例、24時間3例、
48時間4例である。以上の成績から胃液は室温でも氷
室でも保存すれば集落数の低下するものが多いこと、こ

とに室温保存で著明であること、また保存の影響は室温でも氷室でも時間の長びくにしたがって著しいということが分かった。

c) 胃液および喀痰の比較

(i)集落数；室温でも氷室でも集落数の減少は胃液において著明であることは、前述の成績においてはつきり示されている。なお同一患者についての胃液と喀痰とを同時に保存したものは11例〔表1および表2の(1)

(3) (5) (11) (16) (17) (18) (21) (22) (7) (15)]であるが、そのうちの1例(21)のみが同じように減少しているのみであつて、他の10例は全く区々である。したがって集落数の減少は、結核菌自体の性状によるということよりも、胃液あるいは喀痰による影響と解さるべきであろう。

(ii)雑菌侵入率；同一患者より同時に採取した胃液喀痰各22例について、雑菌侵入の状態を表5に示した。

表5 喀痰、胃液保存による雑菌侵入の比較

材料		経過時間		直 後	1	3	5	8	10	24	48	計
		保存法										
喀 痰	室 温	0		2	0	0	0	0	0	1	1	4
	氷 室			0	0	0	0	0	0	0	0	0
胃 液	室 温	1		0	0	0	0	0	0	2	5	7
	氷 室			1	1	0	0	0	0	0	2	4

注：表中数字は例数を示す

これは、各材料を室温および氷室に保存した場合、48時間後までの各時間に培養した材料中、何例に雑菌が侵入したかを示したものである。成績は喀痰では室温で延べ4例、氷室では1例もない。胃液では室温で延べ7例、氷室で延べ4例の雑菌侵入例がみられる。すなわち胃液は喀痰に比べ、室温、氷室とも雑菌侵入率の大であることが分かる。また胃液、喀痰とも室温保存の方が氷室保存に比べ、雑菌侵入例が多くこの点両者は同様であつた。また時間的には胃液においては、48時間後に室温、氷室とも雑菌侵入例数の増加をきたしているが、喀痰にはそのような傾向はみられない。

IV 総括および考察

私は同一患者より採取した胃液および喀痰を用い、室温(21°~32°C)および氷室(5°C)保存の塗抹による検査および培養による検査の影響をみた。染色法としてはチール・ピクリン酸法および蛍光法を用いた。

塗抹では例数も少ないし、また培養では無数の集落を認めたものが多いので比較にやや困難であるが、胃液、喀痰ともにチール・ピクリン酸法たと蛍光法たとを問わず室温でも氷室でも、ガフキー番号の減少を認めない。この成績はSprickら²¹⁾(1946)の成績と全く同様である。しかし、胃液、喀痰とも室温保存のものでは保存時間の長びくとともに、崩潰を思わせるような菌の所見がみられた。次に培養検査に及ぼす影響をみると、胃液、喀痰ともに、室温、氷室のいずれを問わず集落数の減少するものを認めたが、その傾向は胃液は喀痰よりがいて著明であり、また室温は氷室より影響が著明である。また保存時間の長いほど影響されやすい。この私の成績は

実験的に健康者の胃液に喀痰を混入して37°Cに保存し1時間より68時間までの種々の時間、動物接種したC.H. Kramer¹⁾(1946)の成績や、胃液に菌液を混入して37°Cおよび氷室に保存して直後と24時間後に培養したV.H. Schwarting²²⁾(1948)の成績、および結核患者の胃液を室温あるいは氷室に24時間、48時間保存して培養したSprickら²¹⁾(1946)やSchwarting²²⁾(1948)、Kalberら²⁾(1949)等の成績とほぼ一致する。なお私の実験では雑菌の侵入も保存時間の長びくとともに多くなっている。

以上の事実からでも分かるように、外国で実施されているように、郵送して実施する方法は成績を不確実にするものであろう。したがって胃液、喀痰とくに胃液は採取直後に検査するのが望ましいが、万やむをえず保存の必要がある場合には氷室に保存すべきであろう。しかしこのようにしても、喀痰はともかくとして、胃液では影響されるものがあることは銘記しなければならない。

V 結 論

22例の結核患者から胃液および喀痰を同時に採取、室温および氷室に保存して、塗抹(24時間および48時間)および培養(1~48時間)がいかに影響されるかを実験した。

- 1) 胃液、喀痰ともにチール・ピクリン酸法、蛍光法による塗抹標本の検査では、室温に保存しても氷室に保存しても48時間までは菌数のうえには著明な影響はない。
- 2) 培養では胃液、喀痰ともに、室温保存でも氷室保存でも集落数は減少するものがあるが、その影響は胃液は喀痰より著しい。また室温が氷室よりも著明であり、保

存時間の長びくにしたがって、その影響は明らかとなる。

3) 胃液、喀痰ともに保存時間の長びくとともに、雑菌の侵入数が多くなるが、その影響のされ方は、喀痰よりは胃液が著明であり、また氷室よりは室温においてはなほだしい。

稿を終わるに臨み、終始懇切な御指導、御校閲を賜わつた東京慈恵会医科大学矢崎芳夫教授および北里研究所附属病院小川辰次部長に深く謝意を表します。

文 献

- 1) C.H. Kramer : Am. Rev. Tuberc., 53 : 385, 1946.
- 2) P. Kalber, & R. Lundholm : Journal of Clinical Pathology, 19 : 685, 1949.
- 3) A.D. Chaves, L.R. Peizer, & D. Widelock : Am. Rev. Tuberc., 67 : 598, 1953.
- 4) 古久保 : 結核, 30 : 194, 昭30.
- 5) 神沢・菅野・林 : 胸部疾患, 1 : 287, 昭32.
- 6) 彦坂 : 日結, 13 : 459, 昭28.
- 7) 松久保・高津・稲生 : 日結, 16 : 597, 昭32.
- 8) D. Ulmar, & G.G. Ornstein : J.A.M.A., 101 : 835, 1933.
- 9) A. Stadnickenko, S.J. Cohen, & H.C. Sweany : J.A.M.A., 114 : 634, 1940.
- 10) 橋本 : 日結, 16 : 368, 昭32.
- 11) 大山 : 結核, 18 : 1167, 昭15.
- 12) D. Hata et al. : Dis. Chest, 18 : 352, 1950.
- 13) J. Holm et al. : Acta tuberc. scand., 15 : 47, 1941.
- 14) W. Poper, & W.H. Ordway : Am. Rev. Tuberc., 43 : 543, 1941.
- 15) H. Mac Vandiviere : Am. Rev. Tbc., 65 : 617, 1952.
- 16) アメリカ連邦政府 : Laboratory diagnosis of Tuberculosis by Public Health Service. Communicable Disease Center, Atolanta Georgia, 1951.
- 17) 戸田・三友 : 戸田著「結核菌とBCG」昭19より.
- 18) 矢崎・津金 : The Jikeikai Medical Journal, 1 : 110, 1954.
- 19) 小川 : 小川著「結核菌検索の基礎と応用」126, 昭26.
- 20) 小川 : 小川著「結核菌検索の基礎と応用」169, 昭26.
- 21) M.G. Sprick, & J.W. Towey : Pub. Health Rep., 61 : 648, 1946.
- 22) V.H. Schwarting : Am. Rev. Tuberc., 58 : 123, 1948.