

喉頭粘液よりの結核菌の培養

第4報 喉頭粘液よりの結核菌の培養を集団検診に併用する試み

その2 検査に関連した手技の能率の概略, 検出された抗酸性菌の性状, ならびに侵入した雑菌の種類

小川辰次・沢井武・斉藤直蔵
宮城小枝子・大谷典子・立花嘉子*
遠山和明・本田祐**

* 北里研究所付属病院

** 篠田病院林間荘

受付 昭和35年7月9日

I 緒 論

足尾町の集団検診に喉頭粘液よりの結核菌の培養を併用した成績を第3報¹⁾として報告した。その成績は従来の喀痰の培養に比して遜色がない。しかし集検に役立つようなものであつても、普通の場合と違つて一時に沢山の件数を処理しなければならない集検の場合には、その手技が簡単でなければ使用することは難しい。それで今回はまず検査に関連した手技の能率について概略を御報告申し上げるとともに、検出された抗酸性菌の性状および結核菌と非病原性の抗酸性菌の鑑別を主とした試験管内実験成績、さらに侵入した雑菌の種類等につき御報告申し上げ参考にとつて供したいと思う。

II 実験方法

(1) 検査に関連した手技の能率の概略

われわれは試験研究、本研究中に実施された種々の手技のうち

- ① 喉頭粘液の採取
- ② 凝固水の追加混入
- ③ 喉頭粘液の培養
- ④ ゴムキャップの交換および整理

の4つの手技をとりあげて、随時、時間を測定し、はたして1人1時間でどの程度の仕事を処理することができるかを検討した。

①は試験研究のときに行なつた。この場合は被検者が間接撮影後比較的連続してきたので、採取者は大体休むことなしに採取できたので、このようなときの能率を2回にわたつて観察、平均してみた。

②は8月の本研究で観察した。一時に沢山の培地を使用するので培養1週間前までに必ず培地を準備するようにしていたが、実際に集検にきた人は最初の推

定よりも少ないことが多かつたので採取した人員も予定より少なく、回を重ねるに従い製造後2週前後の凝固水のなくなつた培地を使用することになつた。それで培養前に0.1cc~0.2cc 宛滅菌蒸溜水を補給したが、この仕事の能率を5回にわたつて観察平均してみた。

③は試験研究および本研究の一般検診の8回につき観察した。1回の培養はもつとも多いときで414例、もつとも少ないときで198例で、これらの材料を常時4~5人で培養した。

④は1人あるいは2人で実施した。綿栓をゴムキャップに変えて、2人分すなわち4本の培地をゴム輪で一緒にして、番号順に50人分ずつを1つの籠に入れて37°Cの孵卵室に入れ観察担当者の手に渡した。このようにして実施した5回を平均した。

(2) 検出した抗酸性菌の性状ならびに結核菌および非病原性抗酸性菌の鑑別を主とした試験管内実験

① 着色の有無と集落の性状

2ヵ月間観察後に着色のはつきりしているものと薄黄色の着色のものに区別した。また集落が湿潤のものと乾燥したものに分けてS型、R型とした。

② ナイアシンテスト(今野)⁹⁾

1代継代した1%小川培地上の集落を2~3白金耳とつて4%アニリンアルコール液1ccに入れさらに10%BrCN液1ccを加えて振盪して黄色を呈するものを陽性、無色のものを陰性とした。

③ 集落数

数えられるものは2ヵ月目のものを平均した。融合したものは融合前の観察週で数えたものを記録した。

④ 集落の発育するまでの期間

毎週観察した。

⑤ 耐性の検査

1% 小川培地に, SM, PAS, INH のおのおのを培地 1 cc について 100 γ, 10 γ, 1 γ, 0 に流してみにより混入した一連の培地に, 1 代継代した菌株の 10⁻³mg 宛を接種し, 結核菌は 3 週間, 結核菌以外の抗酸性菌は 2 週間で判定し, 発育した最高濃度をもつて耐性値とし, その場合の耐性値が SM, PAS では 10 γ, INH では 1 γ 以上を示した場合は, その菌は耐性菌であると決定した。

⑥ 結核菌以外の抗酸性菌についての光着色性

Runyon⁸⁾ の方法に準じて行なつた。すなわち 3 本の 1% 小川培地の斜面になるべく平等に塗抹し, 1 本は室温に, 他の 2 本は 37°C で培養し, 4~5 日中に室温で発育したものを rapid grower とし, 室温で発育しないで 37°C に発育したものについては, 4~5 日培養後 1 本は晴れた日に日光に 3 時間直射し, 再び孵卵器内に入れ, 他の 1 本は対照として 37°C の暗室の中でのみ培養を継続し, 24 時間後に判定した。そして着色の強まつたものを Photochromogen

とし, 着色の強まらないものを Non photochromogen とし, さらに暗室だけで着色の強まつたものを Sco-ttochromogen とした。

(3) 侵入した雑菌の種類

3% 小川培地に発育した雑菌をまず血液寒天培地に塗抹培養し, この培地で集落の性状と塗抹染色標本の検査から枯草菌, コリネバクテリア, α-連鎖球菌, γ-連鎖球菌のように同定できるものはそのままとし, 肺炎双球菌, 肺炎桿菌らしいものはさらに炭膜染色して同定し, また変形菌らしいものは尿素培地に培養して尿素分解を確認し, 大腸菌らしいものはエオジンメチレン青寒天培地および Kligler 培地に培養して菌株を同定した。なおかび類は 3% 小川培地から直接塗抹した無染色標本によりその形態を確かめた。

III 実験成績

(1) 検査に関連した手技の能率の概略

成績は表 1 に示すように, まず (1) 喉頭粘液の採取

表 1 検査に関連した手技の能率の概略

手技の種類	実験回数	実施した延べ件数	従事した延べ人数	要した延べ時間	1 人 1 時間で可能であつた件数平均 (最少~最多)
(1) 喉頭粘液の採取	2 回	291 件	2 人	3 時間 40 分	79 件 (78 ~ 80 件)
(2) 凝固水混入	5 回	2,836 件	6 人	10 時間 30 分	246 件 (189 ~ 330 件)
(3) 喉頭粘液の培養	8 回	2,536 件	36 人	22 時間 30 分	262 件 (18.5 ~ 33 件)
(4) ゴムキャップの交換および培地の整理	5 回	3,508 件	11 人	12 時間 30 分	149 件 (114 ~ 203 件)

は約 80 件は容易であつて十分, 間接撮影, ツベルクリン反応と歩調をあわせることができる。(2) 培地に凝固水を追加することは 246 件, (3) 喉頭粘液の培養は 26 件, (4) 培養した培地のキャップ交換および整理は 149 件であつた。このように手技は簡単であつた。なお滅菌試験管は学生アルバイトを使用して 7 月中旬ころまでに準備した。採取用具の準備, 培養基の製造, 培地の整理, 後始末等は研究室所属の 2 人の技術者があつた。このほかに滅菌試験管その他採取に必要な用具の入つた運搬袋を上野駅へ輸送すること, および採取した喉頭粘液の入つた運搬袋を上野駅より病院まで運搬することならびに上述の準備, 製造, 培養等の手伝いには別に 2 人の学生を臨時に 1 カ月にわたつて使用した。このために仕事は順調に進行し, とくに夜遅くまで仕事を継続する必要はほとんどなかつた。

(2) 検出された抗酸性菌の性状と, 結核菌と非病原性抗酸性菌の鑑別を主とした試験管内実験

① 集落の着色, 性状, ナリアシントテスト

表 2 に示すように結核菌と推定された 15 株は全部淡

表 2 検出された結核菌および結核菌以外の抗酸性菌の性状

① 集落の性状

菌の種類	検査事例数	検査事項		集落の性状		ナリアシントテスト	
		着色の有無		S型	R型	+	-
		+	-				
結核菌	15	0	15	0	15	15	0
結核菌以外の抗酸性菌	11	6	5	11	0	0	11

注: 表中の数字は株数を示す。

黄色で集落はいずれも R 型でナリアシントテストは全部陽性であつた。結核菌以外の抗酸性菌は 11 株中 5 株は結核菌同様淡黄色であつたが, 残りの 6 株は黄色であつた。集落は全部が S 型でナリアシントテストも全部陰性であつた。なおこの抗酸性菌 11 株全部が Runyon の Non photochromogen に属するものと推定された。なお病巣を認めないものから検出された結核菌らしい 2 株は, 全く結核菌に一致した性状を呈した。

ナイアシンテストも陽性であった。

② 集落数

発育した平均集落数を表3のように分けて株数を示したが、結核菌は集落の少ないものから多いものまで

表3 検出された結核菌および結核菌以外の抗酸性菌の性状

② 集落数

集落数の区分	菌の種類	
	結核菌	結核菌以外の抗酸性菌
1 ~ 10	4	11
11 ~ 50	2	0
51 ~ 100	4	0
101 以上	5	0
合計	15	11

注：表中の数字は株数を示す。

種々の段階がみられたが、結核菌以外の抗酸性菌はその全部が3以下であつて、2本培養したものの1本に1コ集落を認めたのが大部分である。病巣を認めないものから検出された結核菌の2株のうち1株は無数であり、他の1株は1コであつた。

表5 検出された結核菌および結核菌以外の抗酸性菌の性状

④ 抗結核剤に対する耐性

菌の種類	化学療法の有無	有						無			
		耐性の有無および耐性の種類	(+)			(-)			(+)		
			1剤耐性	2剤耐性	3剤耐性	(-)	1剤耐性	2剤耐性	3剤耐性		
結核菌	12	1	4	1	0	2	2	2	0		
結核菌以外の抗酸性菌	9	0	0	0	0	1	2	2	4		

注：表中の数字は株数を示す。

いないものから検出されたが、2株は1剤に、2株は2剤に、4株は3剤に耐性であつた。残りの1株は耐性がない。

以上の成績から結核菌と推定された菌株はやはり結核菌であり、その他の抗酸性菌は非病原性のもので推定される。なお病巣を認めないものから検出された2株の結核菌と推定された抗酸性菌は上述のように結核菌に一致する性状や試験管内成績を示した。

(3) 侵入した雑菌の種類と発育までの期間

本実験のさい侵入した雑菌170株中110株について種類を検査した。血液寒天培地に2代培養して発育しなかつたものが3株あつたので107株について同定した。その結果は表6に示すように、枯草菌が45.4%で約半数を占め、次にα-連鎖球菌が多くて19.1%

表4 検出された結核菌および結核菌以外の抗酸性菌の性状

③ 集落の発育までの期間

菌の種類	集落の発育するまでの期間(週)						
	I	II	III	IV	VI	VIII	合計
結核菌	0	9	1	4	1	0	15
結核菌以外の抗酸性菌	0	3	3	5	0	0	11

注：表中の数字は株数を示す。

③ 集落の発育するまでの期間

表4に示すように結核菌と結核菌以外の抗酸性菌の間には、発育するまでの期間において著明の差はない。

④ 抗結核剤に対する耐性

結核菌15株中12株、結核菌以外の抗酸性菌11株中9株について検査した。成績は表5に示すように、結核菌では化学療法を施行していた6株中4株は1剤に、1株は2剤に、化学療法をやつていなかった6株中2株は1剤に、2株は2剤に耐性があつた。結核菌以外の抗酸性菌はいずれも化学療法をして

以下大腸菌群の9.1%、変形菌の7.3%、γ-連鎖球菌とコリネバクテリアのそれぞれ6.4%、肺炎双球菌の2.7%、緑膿菌、肺炎桿菌、アスマルギールス、かび類がそれぞれ1株である。これらの雑菌は培養の早い時期に発育するものが多いが、傾向として特有なものはない。

IV 総括および考察

喉頭粘液より結核菌を検出する手技の簡単であることは、以前よりの研究ではほぼ推定されていたところであつたが、今回の実験ではさらにこれを確認することができた。まず採取は1人1時間で約80件も可能であつた。採取の難しいのはごくわずかの人があつて、神経質な2~3人の人が1回でとれなかつた程度である。この

表6 雑菌の種類

雑菌の種類	発育までの期間(週)							合計
	I	II	III	IV	VI	VIII		
枯草菌	15	7	5	10	9	4	50 (45.4%)	
α -連鎖球菌	3	8	3	4	3	0	21 (19.1%)	
大腸菌	8	1	0	0	1	0	10 (9.1%)	
変形菌	7	0	0	1	0	0	8 (7.3%)	
γ -連鎖球菌	0	3	2	0	1	1	7 (6.4%)	
コリネバクテリア	1	4	2	0	0	0	7 (6.4%)	
肺炎双球菌	0	0	2	0	1	0	3 (2.7%)	
緑膿菌	0	1	0	0	0	0	1	
肺炎桿菌	0	1	0	0	0	0	1	
アスペルギールス	0	1	0	0	0	0	1	
かび類	0	1	0	0	0	0	1	
2代培養で発育しなかったもの	0	0	2	0	0	0	3	
発育した合計例数	34	27	14	15	15	5	110	

注：表中の数字は株数を示す。

人たちにしても説明することによつて2回目に全部採取できた。4才以下の幼児は今度の検査から除外されたが、それは喉頭まで綿棒を入れることは難しかろうとのためであつたが、4才以上の小さい子供では採取することは可能であつた。したがつて喉頭粘液の採取は一般集検としてツベルクリン反応や間接撮影と併行してやつた場合でも、また精密検診として実施された場合でも予定者のほとんど全員を短時間のうちに採取することができた。この成績は厚生省の昭和33年²⁾、34年³⁾の結核実態調査の場合の喀痰採取率すなわち採取予定者の68.6%、82.4%に比して優れているし、昭和15年の貝田⁴⁾の約1/3、昭和28年⁵⁾の実態調査、昭和32年の小川朝⁶⁾等の1/2に比べると雲泥の差である。また培養は最低1人1時間で26件可能であるから、400件の培養でも4人でやれば4時間で完了することができる。熊谷⁷⁾らは喀痰の1日の培養可能数は200人程度であつて、400~500人は難しいといつているが、われわれの場合はアルカリで処理してそのままうるから前述のように能率は比較にならないほどよい。その他の手技もいずれも容易であつて、喀痰の培養に比してとくにそれ以上の繁雑さはない。したがつて手技の点からいっても喉頭粘液は集団検診に併用することは可能である。しかし手技が簡単であるだけに慎重に実施しなければならないし、ことに採取の上手下手はその成績を左右すると思われるので、あわてずに十分の量を採取する必要があろう。次にわれわれの検出した抗酸性菌であるが、種々の成績を総合して考えてみると、結核菌と推定された15株はやはり結核菌であつて、結核菌以外の抗酸性菌の11株はいずれも非病原性のもので推定されるものであつて、病原性を人に示す結核菌以外の抗酸性菌すなわち非定型的抗酸性菌は1株もみられなかつた。最後に

雑菌の種類であるが、同定できたものの半分は枯草菌である。この菌は自然界に広く存在する菌であり、大腸菌、変形菌、緑膿菌、アスペルギールス、かび類も本来は口腔外のものであるが、これらの菌は時により口腔に混入することもありうる。また α -連鎖球菌、 γ -連鎖球菌、コリネバクテリア、肺炎双球菌、肺炎桿菌等は口腔内の常在菌である。これを要するに、雑菌は、口腔内および口腔外の種々のものが混入されていることがわかる。

V 結 論

足尾町で実施された結核集団検診の中に喉頭粘液よりの培養を併用したときの手技の能率、検出された抗酸性菌、侵入した雑菌等についてさらに検索し次のような成績を得た。

1) 検査に関連した手技の能率：1人1時間で可能な件数をみたが、喉頭粘液の採取は79件、培養は26件であり、その他の手技についても喀痰の培養以上の繁雑なものは何もなかつた。

2) 検出された抗酸性菌のうち15株は結核菌であり、11株は非病原性のものであつて、すべて Non photochromogen に属するものであつた。そして非定型的抗酸性菌と推定されるものは1株もなかつた。

3) 侵入した雑菌：8月の本研究のさい侵入した170株中の107株について同定を行なつた。その結果約1/2は外から侵入したと思われる枯草菌であつて、残りは α -連鎖球菌、大腸菌、変形菌、 γ -連鎖球菌、コリネバクテリア、肺炎双球菌等のものであつた。

本研究は結核無菌化研究会(会長田宮猛雄)の多大の御援助によつて実施されたものである。材料の輸送は国鉄東京保健管理所長千葉博士の御厚意を受けた。なお予

防衛生研究所副所長柳沢博士，同所結核部長室橋博士より種々の御助言を受けた。これらのことに対して厚く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 小川 他：結核，35：775，昭35.
- 2) 昭和33年度実態調査：結核予防会，昭35.
- 3) 昭和34年度実態調査：尾村，34回日本結核病学会において発表，昭35.
- 4) 貝田：結核，19：843，昭16.
- 5) 昭和28年度実態調査：結核実態調査I，結核予防会，昭28.
- 6) 小川朝：結核，33（増刊号）：187，昭33.
- 7) 熊谷：日結，2：465，昭16.
- 8) Ernest H. Runyon：Bulletin of the International Union Against Tuberculosis，29：69，1959.
- 9) 今野 他：日結，17：504，昭33.