

原 著

遠隔地における結核菌分離培養法の検討と提案 (その 2)

工 藤 祐 是

結核予防会結核研究所附属療養所

工 藤 禎

国立療養所東京病院

受付 昭和 48 年 8 月 16 日

STUDIES ON THE ISOLATION CULTURE TECHNIQUE OF TUBERCLE
BACILLI APPLICABLE IN REMOTE AREAS (PART 2)*

Sukeyoshi KUDOH and Tei KUDOH

(Received for publication August 16, 1973)

III. Application of 2% modified medium to clinical examination

1. The method of alkali treatment swab culture without neutralization using 2% modified medium was compared with WHO swab culture method using L-J medium on sputum specimens. As shown in table 2 and fig.1, there were not so much differences between both methods excluding a huge amount of contaminations occurred only in WHO swab culture due to the old stock of citrate solution.

2. The comparison of inoculation procedures between swab and pipette was done on 2% modified medium. The results were almost same, while the numbers of colony were superior in the pipette than swab (table 3). This means 2% modified medium has some latitude for buffering activity to alkali inoculum.

3. It was provided that 2% modified medium can be employed instead of 3% or 1% Ogawa medium with pretreatment by 4% or 2% sodium hydroxid in routine examination (table 4 and 5).

4. The viable units of tubercle bacilli in the colonies grown on 2% modified medium were remarkably superior than 3% or 1% Ogawa medium in old culture (table 6).

5. Applicability of 2% modified medium to the drug sensitivity test was examined comparing with 1% Ogawa and L-J medium. Of ten antituberculous drugs examined, SM, KM, VM, CPM and EB were shown some differences by these media according to their PH (fig. 2).

IV. Preservabilities of sputa and inoculated media

Experiments were made to dissolve which is more reasonable to transport sputum itself or inoculated medium.

1. Isolation culture from sputa stored at 37°C

The sputa which were mixed with or without 1% boric acid solution and stored at 37°C were periodically cultured by WHO swab and 2% modified culture method. The

* From the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 180-04 Japan.

reduction of numbers of colony or positivity are observed within five days of storage in any condition, though some control of contamination can be appeared by adding of preservative.

2. Isolation culture in inoculated media kept at room temperature after inoculation

The acid egg media which were inoculated by sputum specimens with the alkali treatment without neutralization were stored at room temperature, and moved periodically into 37°C incubator. As seen in table 8, tubercle bacilli in sputum can keep their living activities on the medium stored even at room temperature for fairly long time such as twenty days.

3. Comparison of incubation immediate or one week after inoculation

The inoculated media were divided into two groups. One was incubated immediately after inoculation and another was after storage for one week at room temperature. The results from both groups were just same as shown in table 9.

4. Viable units in bacillary suspension stored at various temperature

The bacillary suspensions made from H₃₇Rv strain and the media inoculated by this suspensions were stored at various temperatures. Fig. 3 shows that the viable units of tubercle bacilli can be enoughly maintained on the surface of medium even twenty days after inoculation at the high temperature, while the decrease of colonies is occurred more fastly at the higher temperature in bacillary suspensions.

Through those studies, it is concluded that the method of alkali treatment swab culture without neutralization using 2% modified medium is the most simple, economical and reliable technique for isolation of tubercle bacilli and the transportation of inoculated media will make possible the isolation culture in any rural and non-equipped area.

III. 2% 変法培地の臨床検査における性能

意図：本論文その1IIに述べたような検討を経て、アルカリ処理中和なしスワブ法による結核菌分離培養用の培地として、新たに2% 変法培地が工夫された。この培地を用いたアルカリ処理中和なしスワブ法と、L-J培地を用いた酸処理中和スワブ法であるWHOスワブ法¹⁾を臨床材料について比較することにした。

更に2% 変法培地は、前に触れたように、前処理アルカリ濃度をかなり幅広く選んでも、十分な結核菌発育を支持しうるように思われたので、この培地をわが国で現在広く行われているアルカリ処理喀痰0.1mlピペット接種法²⁾にも応用してみた。これは目的により3%小川培地、1%小川培地を使い分ける煩雑さが、本培地を用いることにより耐性検査も含めて1種類で済むのではないかと期待したからである。したがって本項の2以下は本論文の標題とは直接の関係をもたない派生的な検討である。

以下の各実験に用いられた各培地の組成を表1に示す。

1. 2% 変法培地スワブ法とWHOスワブ法の比較 方法：当所入院患者から採取した日常検査用の喀痰か

ら、なるべく膿様のものを1日に20検体選り本実験に供した。

20cmの竹ヒゴの先端に少量の脱脂綿を巻き糸で縛つたスワブをあらかじめ滅菌しておき、1検体に3本ずつを用いた。別に長さ約100mm径約25mmの滅菌試験管を3本ずつ用意した。

喀痰のなるべく汚い部分を3本のスワブに付着させ、2本を1本の試験管、他の1本を別の1本の試験管に収めた。2本のスワブを収めた試験管にはその高さの2/3まで5% 稀酸水を満たし、そのまま静置した。1本のスワブを収めたほうの試験管には2~3mlの4%水酸化ナトリウム水を加し、直ちにこのスワブで1~2分間攪拌し、そのままのスワブで用意した2% 変法培地1本へ塗擦接種し、更にこのスワブを喀痰液に浸し、もう1本の培地に接種した。稀酸水を満たしたほうの2本のスワブは35分間静置した後引上げ、あらかじめ5%クエン酸ナトリウム水を入れたもう1本の試験管に移し、更に10分後、それぞれ1本のスワブで1本ずつのL-J培地へ塗擦接種した。

本実験に用いた各培地は乾熱滅菌した綿栓つき試験管に作られ、接種後の培地は1~2日37°Cに寝かせて放置後封蠟した。また前処理用の水酸化ナトリウム水、稀酸

Table 1. Composition of Egg Media

	3% Ogawa(1%)	2% Modified(1%)	Loewenstein-J
Potassium phosphate Monobasic(KH ₂ PO ₄)	3g(1g)	2g(1g)	0.4g
Sodium gultamate	1g	0.5g	0.6g ※
Magnesium citrate	—	0.1g	0.1g
Magnesium sulfate	—	—	0.04g
Glycerol	6ml	4ml	2ml
Distilled water	100ml	100ml	100ml
	(100°C	30min)	
Egg homoginate	200ml	200ml	170ml
2% Malachite green	6ml	4ml	3.3ml
	(90°C 60min in slant) ※※		
Final pH	6.2(6.5)	6.4(6.5~6.6)	6.6

※ Asparagine is used instead of sodium gultamate in L-J medium.

※※ Original procedure of coagulation for L-J medium is 85°C 40min.

水、クエン酸ナトリウム水はいずれも十分洗浄後、アルコールとエーテルで消毒したポリエチレン製噴水瓶に入れて注加したが、後には硝酸水とクエン酸ナトリウム水は後述の理由で綿栓つきフラスコに入れ、ピペットで注加した。

また本実験は12月から2月の冬期に実施したが室温は23°C前後で、一切のバーナーの類はあえて使用しなかつた。

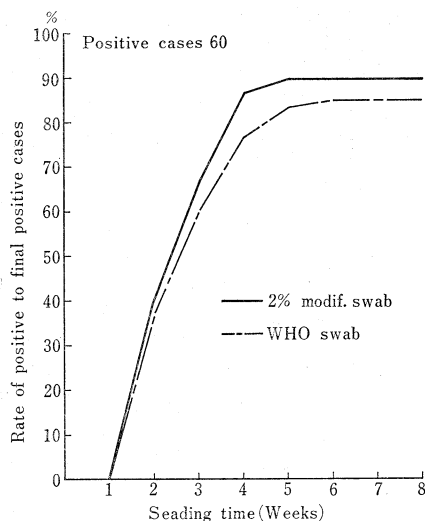
成績：表2にみるように、検体302例中陽性率は2%変法スワブ17.8%に対しWHOスワブ16.8%、集落数の比較では両法のいずれかで最終的に陽性のもの合計60例中、2%変法スワブのほうが多いもの18、WHOスワブに多いもの12である。発育速度を各判定時(毎週)における陽性数のこの60例に対する%で示すと図1のようになる。また汚染率では判定可能な部分汚染が2%変法スワブ5.6%、WHOスワブ4.6%、判定不能な全面汚染はそれぞれ0.66%と0.99%であった。

以上の成績は推計学的に検討するまでもなく、この両法の間には陽性率、汚染率すべての点で結核菌の検出率には差のないことを示している。

しかし、本実験の間に3回分60検体が、WHOスワブ法にのみ培養後2日目に培地全面を覆う汚染を起し廃棄した。この原因はクエン酸ナトリウム水の汚染に基づくものと考えられたので、午後は噴水瓶の使用を止め使用前に毎回高圧滅菌して用いた。この事故はクエン酸ナトリウム水を最初滅菌してから約1カ月後に起つた。水酸化ナトリウム水は最初の滅菌のまま噴水瓶に入れて3カ月にわたり引続き使用した。廃棄した分はこの集計から除いてある。

2. 2% 変法培地によるスワブ接種法とピペット接種法の比較

Fig. 1. Growth Rate



方法：当所入院患者より採取した喀痰の日常検査に先立ち、1実験と同様に1本のスワブで膿様痰をとり、前処理して2本の2%変法培地にうえた。同じ痰の残りに痰の量の4倍の4%水酸化ナトリウム水を加え、攪拌機で2分間混和し、ピペットでその0.1mlをとり、同じく2本の2%変法培地へ流入接種した。

成績：表3のように2%変法培地を用いてのスワブ法：ピペット法は陽性率16.2%：17.2%、集落数は陽性総数120例中22：62、汚染率は部分汚染9.1%：13.7%、全面汚染0.32%：1.1%である。

この成績では両法の間には陽性率には差がなく、集落数もピペット法に多い。これは接種量の差が反映しているものと思われる。また汚染率ではピペット法のほうがやや多い。

Table 2. Comparative Studies between 2% Modified Swab and WHO Swab Culture Method

Positivity			Numbers of colony						Contamination rate				
WHO swab	2% Modif. swab		2% Modif. swab						2% Modif. swab				
	-	+	Total (%)	1-10	11-200	+	##	###	Total	-	P.C.	C.C.	Total (%)
-	242	9	251	242	8	1			251	269	14	2	285
+	6	45	51 (16.9)	6	11	2	18		19	12	2	0	14 (4.6)
Total (%)	248	54	302	3	12	2	1	18	18	2	1	0	3 (0.99)
		(17.9)		4	2			6	6	17	2		19 (6.3)
				12	2	1	2	5	5	283	17	2	302
				1	2			3	3				
Total	248	22	15	8	4	5	302						

$\lambda^2 = 0.103745$ no signif.
Completely contaminated cases were regarded as negative in Table 2, 3.

Table 3. Comparative Studies between Swab and Pipett Inoculation with 2% Modified Medium

Positivity			Numbers of colony						Contamination rate				
Pipett	Swab		Swab						Swab				
	-	+	Total (%)	1-10	11-200	+	##	###	Total	-	P.C.	C.C.	Total (%)
-	492	15	507	492	12	2	1	22	507	489	31	1	521
+	21	84	105 (17.2)	18	11	1	1		31	62	22	0	84 (13.7)
Total (%)	513	99	612	3	10	7	1	21	21	3	3	1	7 (1.1)
		(16.2)		1	9	6	2	18	18	56	2		58 (9.5)
				1	4	13	3	23	23	554	91	2	612
				62	1	2	9	12	12				
Total	513	35	23	21	7	13	612						

$\lambda^2 = 0.211752$ no signif.
 $\lambda^2 = 8.32174$ significant.

Table 4. Comparative Studies between 2% Modified and 3% Ogawa Medium

Positivity		3% Ogawa · 4% NaOH				Total (%)			
		-	+	Total	(%)	-	+	Total	(%)
2% Modif. · 4% NaOH	-	1,864	7	1,871	85	(4.3)			
	+	11	74	85	(4.3)				
Total	⊗	1,875	81	1,956	(4.1)				
$\lambda^2 = 0.106632$ no signif. Completely contaminated cases were regarded as negative in Table 4.5.									

Numbers of colony		3% Ogawa · 4% NaOH				Total	
		1~10	11~200	#	#	Total	(%)
2% Modif. · 4% NaOH	-	1,864	4	3	1,871		
	+	9	20	7	29		
Total	⊗	1	1	20	22		
2% Modif. · 4% NaOH	-	1	3	14	18		
	+	15	16	16	31		
Total	⊗	1,875	25	26	14	16	1,956

Contamination rate		3% Ogawa · 4% NaOH		Total (%)	
		P.C.	C.C.	Total	(%)
2% Modif. · 4% NaOH	-	1,675	90	12	1,777
	+	88	74	3	165
Total	⊗	1,765	164	27	1,956
$\lambda^2 = 0.429834$ no signif.					

Table 5. Comparative Studies between 2% Modified and 1% Ogawa Medium

Positivity		1% Ogawa · 2% NaOH				Total (%)			
		-	+	Total	(%)	-	+	Total	(%)
2% Modif. · 2% NaOH	-	39	0	39	31	(44.3)			
	+	2	29	31	(44.3)				
Total	⊗	41	29	70	(41.4)				
$\lambda^2 = 0.116664$ no signif.									

Numbers of colony		1% Ogawa · 2% NaOH				Total	
		1~10	11~200	#	#	Total	(%)
2% Modif. · 2% NaOH	-	39	0	39			
	+	1	1	2			
Total	⊗	1	7	8			
2% Modif. · 2% NaOH	-	3	1	6	7		
	+	14	14	14	14		
Total	⊗	41	1	8	6	14	70

Contamination rate		1% Ogawa · 2% NaOH		Total (%)	
		P.C.	C.C.	Total	(%)
2% Modif. · 2% NaOH	-	51	5	2	58
	+	2	8	1	11
Total	⊗	53	13	4	70
$\lambda^2 = 1.087291$ no signif.					

3. ピペット接種による 2% 変法培地と小川培地の比較

方法：当臨床検査科では 1969 年末までは次の術式により、結核菌分離培養法を実施していた。一般の結核菌分離培養は喀痰にその 4 倍量の 4% 水酸化ナトリウム水を加えて攪拌したものを 0.1 ml ずつ 2 本の 3% 小川培地に、直接法薬剤耐性検査を必要とするものは喀痰にその 4 倍量の 2% 水酸化ナトリウム水を加え攪拌したものを 37°C に 30 分収容し、その 0.1 ml ずつを 1% 小川培地に流入する。接種した培地は 37°C で 1~2 日間斜面を水平に保つた後、封蠟して培養を続ける。

このような日常検査の 2 本の小川培地の 1 本（直接耐性検査では対照培地の 1 本）を 2% 変法培地に変え、前処理は従来通りとして一定期間検査を続けた。

成績：表 4、表 5 にみられるように 2% 変法培地の成績は前処理が 4% 水酸化ナトリウム水処理直後でも 2% 水酸化ナトリウム水処理 30 分加温後でも、そのおのこの原法である。それぞれ 3% 小川培地と 1% 小川培地に接種した場合に比べほとんど差がないといえる。すなわち 3% 小川培地と 2% 変法培地の比較では、陽性率 4.19% : 4.33%，汚染率 9.75% : 9.10%，1% 小川培地と 2% 変法培地では陽性率 41.4% : 44.3%，汚染率 24.3% : 17.1% である。このうち 2% 水酸化ナトリウム処理における汚染が目立つが、両培地の間には有意の差は見出されない。

4. 培養終了後の集落中生菌数の小川培地と 2% 変法培地の比較

方法：3 実験において 6 または 8 週目の最終判定時にみられる集落の外観に、小川培地と 2% 変法培地ではかなり差があるように思われた。すなわち小川培地、特に 3% 小川培地上の古くなつた集落は強い褐色味をもつようになり、陳旧培養菌といった印象を与えるが、2% 変法培地上の集落は、この時期でも初発生時と同様に淡黄

白色で若々しく感ぜられた。

これら同一喀痰を培養した双方の培地上に発育した集落を最終判定時から、更に 2~3 カ月間室温に保存した後、集落を掻きとり (10~20 mg) 正確に秤量し、これを手振法で 1 mg/ml の水浮遊菌液とし、これから 10 進希釈により 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴/ml の各菌液を作り、1% 小川培地にその 0.1 ml ずつを接種して生菌単位を測定した。

成績：表 6 に示すように、最終判定後 2~3 カ月間放置された培養菌集落中の生菌単位は培地によつて著明な差が認められた。この実験では 3% 小川培地の 3 例は 10⁻² mg 接種では全く集落の発生をみず、同じ材料から 2% 変法培地に生えた集落では多数の生菌が証明された。

5. 薬剤耐性検査における L-J, 1% 小川および 2% 変法培地の比較

方法：結核菌検査における培地を 1 種類に限定して薬剤耐性検査も含む多目的に利用したいという観点から、2% 変法培地に各抗結核薬を含有せしめて薬剤耐性検査に用いた場合の成績を、従来繁用されている 1% 小川培地（国内）および L-J 培地（外国）と比較してみた。

検討した抗結核薬は INH, PAS, TH, CS, EB, SM, KM, VM, CPM, RFP の 10 剤である。

型通りの希釈原液より純水で倍数希釈とし、既知の阻止濃度³⁾ の前後 5 段階の濃度に各薬剤を含む培地を準備した。

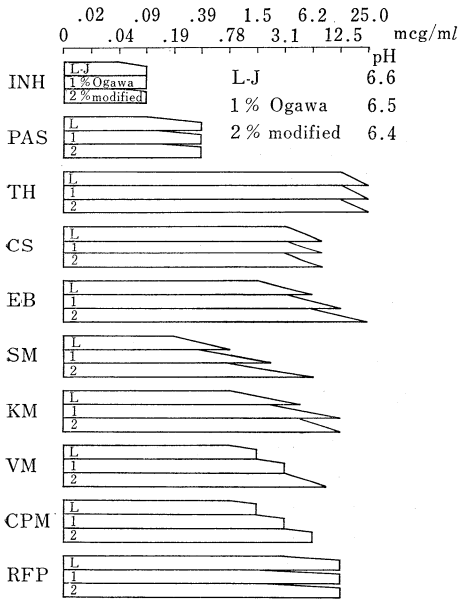
指示菌液として、ソートン培養 4 週の H₃₇R₇ 株を摩砕し 10⁻², 10⁻³ mg/ml の水浮遊菌液とし、その 0.1 ml ずつを流入接種した。

成績：図 2 は培養 6 週後の結核菌発育阻止状態を棒グラフに示したものである。図中、同じ幅のバーナーは対照培地と同程度の発育を示し、楔状の部分は集落数の減少を意味する。

Table 6. Viable Units in Colonies grown on Ogawa and 2% Modified Media after Long Storage

Strains	Months from inoculation		Ogawa medium		2% Modified medium	
	Incubator	Room temperature	Numbers of colony	Viable unit	Numbers of colony	Viable unit
3%	1	2	2	0	1	7×10 ²
	2	1.5	2.5	0	0	8×10 ³
	3	1.5	3	0	0	1×10 ²
1%	1	2	46	14×10 ²	45	20×10 ²
	2	1.5	3	0	0	3×10 ³
	3	1.5	2.5	0	0	20×10 ²
	4	2	2	3×10 ³	+	16×10 ³
	5	1.5	3	0	6×10 ⁴	0

Fig. 2. Comparison among L-J, 1% Ogawa and 2% Modified Media on Drug Sensitivity Test



この成績から、3培地とも全く差のない薬剤は INH, PAS, TH, CS, RFP で、他の EB, SM, KM, VM, CPM ではこれらの培地間かなりの発育阻止濃度の差がみられる。

わが国の現行法すなわち1%小川培地²⁾を対照として修正するとすれば、2%変法培地ではこれらの薬剤はほぼ2倍量加える必要がありそうである。しかし現在のわが国の検査法では SM, KM, VM, CPM では10倍または4倍の濃度段階で、特に修正しないで用いても差支えないと思われるが、EBは濃度段階の検査濃度なので、これだけは2倍量加えることになろう。

考察:2%変法培地を用いる中和なしスワブ法と、L-J培地を用いるWHOの中和スワブ法の比較では、陽性率、集落数、汚染率、発育速度のいずれの点からみても、ほとんど差がないことが明らかである。この成績は本論文その1Iに述べた小川法との比較の際にみられたWHOスワブ法の結果とはかなり異なっている。特に今回の実験ではWHOスワブ法の汚染率が著しく改善されている。これは使用器具の滅菌が徹底していたことと、術者が20年以上の熟練者であつたことによるであろう。したがってWHOスワブ法も好い条件下で実施すれば、特に高い汚染率を示すわけではないと思われる。しかしこのことは十分な条件を整えられない遠隔僻地には、この術式が不適当であることを意味するともいえる。偶然起つたクエン酸ナトリウム水の汚染は、その1つの証拠であろう。

以上の検討から設備、資材を十分に用意できない場所

での喀痰からの結核菌分離培養法として、中和なしスワブ法は単純な操作で熟練を要せず、しかも高い精度の成績を期待できる術式であると考えられる。本法に用いる培地は3%小川培地でもよいが、新たに工夫した2%変法培地のほうが合理的であるように思われる。

次に2%変法培地を現行臨床検査にそのまま応用して、多目的に使用できないかを検討した。この培地は0.05mlの4%水酸化ナトリウム水処理喀痰を接種するのに適合した培地として開発したが、ピペットで0.1ml流入接種しても成績はほとんど変らなかつた。ただしピペット接種のほうに汚染が有意の差をもつて多かつた。

また、実際の日常検査の場に2%変法培地を持ち込み、将来の4%水酸化ナトリウム水処理後3%小川培地接種および2%水酸化ナトリウム水処理37°C30分加温後1%小川培地接種と比較した。同じ2%変法培地に4%と2%の異なつた濃度のアルカリ処理喀痰を接種したにかかわらず、もとの両小川法に全く遜色のない成績を示した。

またこれらの培地に発育した集落中の生菌数を測定比較したが、2%変法培地上の集落には小川培地上のものに比べ、培養終了後2、3ヵ月保存した後でも生菌数の多いことが明らかにされた。これは間接法薬剤耐性検査に手間取り、初代分離の菌株が長く放置されたような場合に有利な点である。

更に2%変法培地を薬剤耐性検査に用いて、従来の培地と成績を比較した。半数の抗結核薬において、主としてpHの差によると思われる発育阻止濃度の差がみられた。この差は図2にみるように1%小川培地とL-J培地の間にもみられ、吉原⁴⁾や東村⁵⁾も一部の薬剤について指摘しているが、わが国の1%小川培地を基準にすると、EBのみ倍量を加えれば、このまま使用しうるものと考えられる。

IV. 喀痰と接種後培地の保存性について

意図:培養設備のない場所で、採取した喀痰から結核菌を分離培養しようとするれば、採取した喀痰を設備のある検査機関まで輸送し、そこで前処理接種と培養を行うか、あるいは現地で喀痰を前処理接種して、その接種された培地を検査機関に輸送し、そのフラン器で培養するといういずれかの方法をとることになる。

前者では輸送に時間を要したり、高温の場合には、冷却や防腐剤の添加により喀痰の変質を防ぐ必要があり、後者では現地の不十分な無菌操作でも汚染の起りにくいような方法を考慮しなければならない。

本項ではこれらの方法の得失を検討し、遠隔僻地に適した方法を確立しようとした。

1. 喀痰を37°Cに保存した場合の培養成績

方法:塗抹陽性で痰量の多い患者8名を選び、その半

Table 7. Storage of Sputa and Results of Culture
—Numbers of colony and contaminations—

Method	Days of storage										
	Specimen	Immed.	3	5	7	10	12	14	17	21	
WHO swab culture	Sputum	101	37	29	16	4	×	×	-×	-×	
		+++	+	×	30×	28	-×	-×	-	-	
		46	20	3	4	-	-×	-×	-	-	
		135	19×	30	-×	-×	-	-	-	-	
		+	98	×	-	-	×	-×	-×	-×	
		26	3×	-	-	-×	-×	-	-	-	
	Saline	400	×	-×	-×	-×	-	×	-×	-×	
		3	-	-×	-×	-×	-×	-×	-×	-×	
		Sputum	101	82	18×	4×	0.5×	0.5×	0.5	-	-×
			+++	+++	104	10	1.5×	-×	0.5	-	-×
			46	10	5	4	-	-	-	-	-
			135	223	17	6	-	0.5	-	-	-
+	+		95	0.5	-	-	-	-	-		
26	1.5		-×	-×	-	-	-	-	-×		
1% Boric acid	400	260	-×	-×	-×	-	-	-	-		
	3	-	-×	-×	-×	-×	-	-	-		
	Sputum	107	137	130	37	11	13	6	0.5	-	
		+++	+++	+	85	1	-	-	-	-	
		17	27	11	6	0.5	-	-	-	-	
		70	175×	145	14	-	-	-	-	-×	
+		+	-	-	×	×	×	×	×		
21		10	3	0.5	-	-	-	-	-		
Saline	282	26	-	-	-	-	-	-	-		
	2	-	-×	-×	-	-×	-×	-×	-		
	Sputum	107	167	42	14	2	1	-	-	-	
		+++	+	300	114	4	-	-	-	-	
		17	9	3	-	0.5	-	-	-	-	
		70	260	137	27	4	-	-	-	-	
+		+	+	13	-	-	-	-	-		
21		8	3	0.5	-	-	-	-	-		
1% Boric acid	282	250	-	-	-	-	-	-	-		
	2	-	-×	-	-	-	-	-	-		

-× : Partially contaminated
× : Completely contaminated

日分の喀痰を集め実験に供した。

喀痰はそのまま攪拌機で均質化し、これを折半して一方へは滅菌生理的食塩水、他方へは滅菌1% 硼酸水を喀痰と等量加え攪拌した。この混合均質液を 37°C のフラン器に收容し、経時的に直後、3、5、7、10、12、14、17、21 日目に次の方法で分離培養を行った。

これは熱帯における悪条件を想定したものである。

培養は WHO スwab法 (中和、L-J 培地) と 2% 変法Swab法 (中和なし、2% 変法培地) でそれぞれ1本ずつのSwabを用いて平行して実施した。

なおこの1% 硼酸水はわが国で喀痰の防腐剤として推奨²⁾ されているものである。

成績：表7は多くの問題を提示している。

喀痰の保存において最も懸念される汚染の増加は、防腐剤の添加によつて、かなり抑制されることがわかる。特に硼酸水を加えた場合は、時日が経つにつれ、反て汚染が少なくなる傾向すらみられる。

術式では酸性培地にアルカリ処理中和なして接種する2% 変法培地Swab法のほうが、WHO Swab法よりも明らかに汚染が少ない。

一方、発育集落数の推移をみると、5日保存あたりから、それまで陽性であったものが陰性となつている例が目立つ。10日以上になれば、大部分が陰性化し、このような喀痰検査はほとんど意味がないといえる。もちろんこのデータは 37°C に保存した場合のものであり、更に保存温度が低くければ後述の基礎実験にみられるよう

Table 8. Storage of Inoculated Media and Results of Culture —Numbers of colony—

Conditions			Days after inoculation								
			Immed.	1	2	3	4	5	6	9	12
Room temperature	Bangkok 30~23°C	Ogawa med. pipett 0.1ml	52	92	62	100	40				
			45	37	30	39	30				
			139	182	†	†	122				
	Tokyo 27~12°C	2% mod. med. pipett 0.05ml	6	5	6	6	6	5			
			53	42	36	37	37	32			
	Tokyo 28~14°C	2% mod. med. swab	2			1			0	1	3.5
9.5					5.5			8.5	3.5	2	
172					152			116	99	84	
			299			240		185	210	186	
Refrigerator	Bangkok 4~8°C	Ogawa med.	36	44	25	27	20				
			148	190	200	150	120				
	Tokyo 5~8°C	2% mod. med. pipett 0.05ml	6	9	6	5	7	3			
			48	61	48	40	43	47			
			19	50	18	19	28	18			

Table 9. Comparison between Cultures Immediately and One week in Room-temperature after Inoculation

		One week		
		-	+	Total (%)
Immediately	-	141	2	143
	+	3	32	35(19.7)
	Total (%)	144	34 (19.1)	178

$\lambda^2=0.017977$ no signif.

		One week			
		-	P. C.	C. C.	Total (%)
Immediately	-	158	4	0	162
	P. C.	5	9	0	14
	C. C.	1	0	1	2
	Total (%)	164	13 (7.9)	1	178

$\lambda^2=0.1456032$ no signif.

P.C.: Partially contaminated.

C.C.: Completely contaminated.

に、集落数の減少はもつと緩慢であると思われる。

2. 接種培地を室温に放置した場合の培養成績

方法：患者の塗抹陽性痰をアルカリ処理中となし法で、一時に大量の培地に接種しておき、室温または氷室に保存し、経時的に取り出して 37°C のフラン器に移し、培養を行い、培養開始より毎週、集落の発生状態を観察した。この実験は 1964, 1969, 1972 年の 3 回にわたって 10 例ずつ検討した。したがって術式は少しずつ異なっている。

成績：集落数を正確に算定しえたものの最終結果だけを表 8 に掲げた。

この成績は、一たん接種された喀痰中の結核菌は、至適温度で増殖していない状態でも、かなり長期にわたつ

て培地上で生命を保っていることを示している。ただし氷室に保存した場合は集落の発生がやや遅れる傾向がある。しかしこの実験日数の範囲では、いずれの場合も最終判定時の集落数は、接種後直ちにフラン器に収めた場合とほとんど変わらないと考えてよい。

3. 接種直後培養と 1 週間室温放置後培養の比較

方法：当臨床検査科の日常検査用喀痰から塗抹陽性痰と膿様痰を選び、型通り 1 本のスワブで 2% 変法培地 4 本へ接種した。このうち 2 本は直ちに 37°C のフラン器へ、他の 2 本は室温に 1 週間放置した後 37°C へ移し培養した。培地管口はいずれも接種直後に封蝋した。このときの室温は 23~17°C であつた。

成績：表 9 にみるように、接種直後培養でも、1 週間

室温放置後培養でも、陽性率、汚染率とも全く差が認められない。

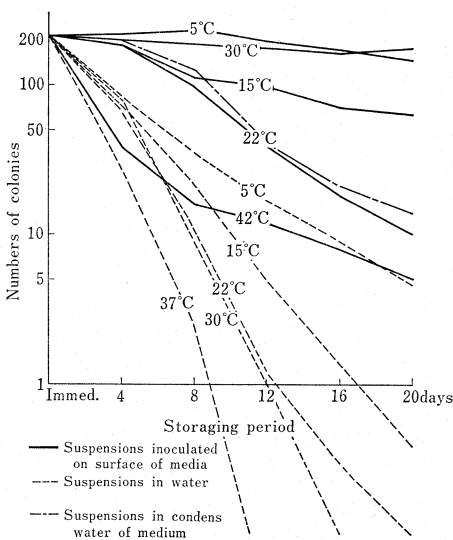
4. 保存温度による結核菌生残数の推移

方法：本項における以上の略痰による成績を裏付けるために、結核菌浮遊液による基礎的検討を行った。

ソートン培養3週の $H_{37}R_V$ 株から摩砕により 10^{-1} , 10^{-2} mg/ml の菌液を作り、これを更に純水と1% 変法培地(2% 変法培地の磷酸二水素カリを1gとしたもの)から集めた凝固水でそれぞれ10倍に希釈し 10^{-2} , 10^{-3} mg/ml の菌液とした。この純水浮遊液を各濃度78本ずつの1% 変法培地へ0.1 ml ずつ接種した(接種菌量はそれぞれ 10^{-4} , 10^{-5} mg/培地)。これらのうち3本は直ちに $37^{\circ}C$ へ取め、菌液作製直後の菌数測定用とした。他は斜面を浸し、寝かせた位置で、15本ずつ 5° , 15° , 22° , 30° , $42^{\circ}C$ の条件に放置した。これら接種後各温度におかれた各培地は4, 8, 12, 16, 20日目に3本ずつを $37^{\circ}C$ に移して培養を開始した。一方残りの菌液は各濃度25本ずつの小試験管に分注し、その5本ずつを 5° , 15° , 22° , 30° , $37^{\circ}C$ に取め、4, 8, 12, 16, 20日目にそれぞれ1本の試験管からメスピペットで0.1 ml ずつを吸上げ、3本の1% 変法培地へ流入接種し、型通り生菌数の算定を行った。培地凝固水に浮遊した菌液は $22^{\circ}C$ についてののみ同様に培養した。封蠟は培地の乾燥状態に応じて1~4日後に行つた。実験期間中の温度の変動はすべて $\pm 0.5^{\circ}C$ 以内に留つた。

成績：集落数が適当で正確に算えることのできた 10^{-5} mg 接種について、各3本の培地に発育した集落数の平均を経時的に結んだ折線グラフで現すと図3のようになる。

Fig. 3. Survival Rate of Tubercle Bacilli in Bacillary Suspension under Various Temperature



縦軸に集落数の対数を、横軸に保存日数をとると、破線で示した結核菌水浮遊液では、従来もい伝えられているように、生菌数の低下は保存温度の高いほど速やかで、生菌数が原の菌液の1/10になるのは $5^{\circ}C$ では11日であるが、 $37^{\circ}C$ になると4日となる。

しかし、実線で示すように、この菌液が一たん培地に接種されると、結核菌の発育しない温度におかれても、菌液のままに放置された場合に比べると遙かに長い間生菌数が維持されている。培地上では菌液の場合と異なり、 $22^{\circ}C$ よりも $30^{\circ}C$ のほうが良い成績を示している。この実験では $5^{\circ}C$ と $30^{\circ}C$ におかれた培地上の集落数は、接種後20日を経てフラン器に移しても、菌接種直後フラン器に収めた場合の集落数とほとんど変っていない。

また培地より採取した凝固水に浮遊した菌液での消長は、培地に接種された菌液のそれと同じような経過をたっている。

考察：遠隔地で採取された略痰は、培養を必要とする場合は、一般に略痰そのものが中央検査機関に輸送される。しかし輸送に時間を要すると、略痰の変質による成績の劣化が懸念される。

略痰の保存については、わが国では2, 3日という短期間について検討したものが散見^{6)~8)}されるが、交通不便な発展途上国や離島の多い国、旧植民地や現植民地をもつ国では1週間以上の輸送期間を要する場合がむしろ普通である。たとえばグリーンランドの調査ではコペンハーゲンに7日以内に着いたものは20%にすぎず、43日が5%もあつたと報告されている⁹⁾。またアルジェリアでは最短3日、最長15日かかり¹⁰⁾、インドネシアでは国内の離島の調査でも2週間では着かない所が多いという¹¹⁾。

したがって諸外国の略痰や菌液保存についての検討には長期間のものがみられる¹²⁾¹³⁾。

成績は、2, 3日の短期間ならばあまり大きな変動はないとするもの⁷⁾のほかはいずれも保存期間が長くなるほど汚染がふえ、発生集落数が減るとし、温度の高いほど急速に著明に成績が下がることに一致している⁸⁾⁹⁾¹²⁾¹³⁾。したがって、これを防ぐには輸送中略痰を低温に保つか、防腐剤を添加することが必要となる。防腐剤については、伊藤ら⁸⁾が室温では磷酸三ナトリウム (Na_3PO_4) で24時間、硼酸水で72時間が限度であると報告している。

われわれの検討は $37^{\circ}C$ という悪条件における実験であるが、防腐剤の効果および酸性培地中和なし接種の有効性は少なくとも汚染については認められる。しかし問題は汚染よりも集落数ないし陽性率の低下にあると思われる。これは防腐剤の添加をもつても防ぎえないと思われる。陽性率をも低下しないように長期間保存するには、Engbaeck¹²⁾らのいうように $4^{\circ}C$ 付近に略痰を冷蔵

するほかないと思われるが、これは容易なことではない。(フリーザーで凍結させると菌数の減少はかえって著しくなるといふ報告もある¹⁴⁾)

以上のように喀痰を長時間輸送するには、多くの問題があると思われたので、今一つの方法、すなわち現地で接種を終えた培地を輸送する方法について検討することにした。

このような方式は小川ら¹⁵⁾が昭和25年長野県御代田村の結核集団発生の際に試み、よい成績を収めている。しかしこのときは現地に小さい検査室を設け、フラン器を持ち込み接種後培地の乾燥封蝋までを終えてから輸送したもので輸送期間は1日であつた。外国でのこのような試みは表面的には少なく、パプア・ニューギニアの検査で、接種から培養までに10日間の遅延があつたという記載¹⁶⁾がみられるくらいである。しかし、このような方式は実際にはかなり広く行われているらしく、たとえば前述のタイ国 C. C. C. の検査室では、WHO スワブ法で現地接種を試み、汚染が多く失敗したというし、またわが国の学生医学調査隊が外国で現地接種し、持帰つた培地が全部汚染されてデータにならなかつたという話も聞いている¹⁷⁾。

したがつて、この方式を採用する場合は、現地の設備資材の全くない環境において、無菌操作などの基礎知識をもたない人が実施することを前提としなければならない。

これまで述べてきた4%水酸化ナトリウム水処理中となしスワブ法は、この条件を十分満たしうる術式と考えられる。

この方法で喀痰が培地に接種されると、接種後20日間室温に放置してから培養しても、生菌数の低下がほとんどみられない。また日常検査材料で接種培地を1週間室温に放置してから培養しても、陽性率、汚染率とも接種直後培養と全く変わらない。

菌液による基礎実験でも、これらの関係は明白である。菌液そのものを各温度に保存すれば、温度が高いほど急速に生菌数の減ることは、Sula ら¹⁸⁾も述べているところであるが、培地上でこのように長期に生菌数が維持されることについては、これまで報告をみない。

この機作を説明する手掛りは、この実験中の凝固水に浮遊させた菌液の消長が培地上の菌のそれと全く一致するという点に見出される。多分培地上の豊富な蛋白ないしアミノ酸が保護作用をもっているのであろう。これは張、大林¹⁹⁾のグルタミン酸ナトリウムをアジュバントとする耐熱性 BCG ワクチンの研究を想起させるものである。

総 括

本論文その1、その2の検討を通じて、設備、資材が

全くなく、熟練した技術者のいない環境での結核菌分離培養法として、以下の術式を推奨したい。

1) 使用する培地、器材は設備の整つた中央機関において、十分な滅菌操作によつて準備されなければならない。(特に培地用の瓶や試験管をあとで加熱するからとあらかじめ滅菌せずに用いると汚染は多くなる)

2) 培地はマカトニ瓶または試験管に作つた2%変法培地または3%小川培地を用いる(ネジ蓋付瓶のほうが長期保存に耐える)。1検体に2本ずつ使用する。

3) 椰子葉線維または竹ヒゴを20cmに切り、一端に脱脂綿の小片を巻きつけ、木綿糸でしばり、綿棒(スワブ)を作る(脱脂綿は0.1g以下、耳を掃除するくらい。大きすぎると成績は悪くなる)。数10本を紙に包み乾熱滅菌しておく。

4) 高圧滅菌した4%水酸化ナトリウム水(NaOH)とこれを入れる消毒したポリエチレン製噴水瓶を用意する。1コで足りる。

5) 短い滅菌試験管(うち25mm×100mmくらいがよい)を紙に包んで乾熱滅菌する。1検体に1本。

6) 採痰容器は何でもよいが蠟引紙コップが、その場で焼却できるので理想的である。なければ水を透しにくい紙片でもよい。

7) 以上の2)3)4)5)6)の資材を現地に運ぶ。他に必要なものは手洗用消毒液くらいのもので、培養だけのためであれば、アルコールランプやバーナーの類は一切不要である。

8) 接種の手順は、まず採取された喀痰のなるべく膿様の部分をスワブに十分に付着させ(あらかじめスワブを湿す必要はない)、5)の試験管に入れる。4)の噴水瓶に入れた4%水酸化ナトリウム水をおおよそ2~3mlこの試験管に注加する。次いで、このスワブをもつて十分に攪拌する。試験管の壁に喀痰が付着しているので、試験管の上方までスワブで洗い落とすようにする。1~2分間攪拌したら、このスワブを引上げ、直ちに1本の培地をとり、培地表面で絞るようにして、全面に塗擦接種する。もう一度試験管内の液に浸し、もう1本の培地にも接種する。使用済のスワブや採痰容器は現地で焼却する。

9) 接種した培地はネジ蓋ならば蓋を締め、綿栓ならばビニール袋に入れて口を気密に閉じて乾燥を防ぐ。時間に余裕があれば、しばらく培地斜面を水平にして寝かせておくのが望ましい。

10) これらの培地は適宜に中央検査機関に送られ綿栓の場合は封蝋し、フラン器に収容し型通り培養を続ける。

11) 発育の有無の観察は4週、8週の2回でよい。低温に長くおいた培地では観察を10週くらいまで延長すべきである。

なお、本法のために新たに工夫した2%変法培地は、わが国の標準法²⁾において、3%または1%小川培地と同様に使用することができ、結核菌用培地の一元化に役立つものと思われる。

またあえて付け加えると、わが国で広く用いられ、ここで採用したアルカリ処理中和なし酸性培地直接接種という術式は、諸外国ではほとんど採用していないが、Dixonら¹⁹⁾の簡便法の比較実験では、外国でこの方式を応用した唯一のものである Marks 法（小川法とほとんど同じで、処理時間、接種量がやや異なる。小川法の1950年に対し、1959年に発表された）のみが良い成績を示し、集菌中和法のいわゆる標準法とほぼ同程度であった。

結 論

設備のない遠隔地で、喀痰から結核菌の分離培養を行うには多くの問題があり、従来その信頼性は十分とはいえない難かつた。

この問題について、われわれは海外技術協力に端を発し、多くの検討を重ねてきたが、次のような術式に到達した。

中央機関で正しく用意された培地や器具を現地に運び、現地でアルカリ処理中和なしスワブ法によつて、酸性卵培地に喀痰を接種し、この培地を十分な設備のある中央機関に輸送して、培養、判定を行う。

この方法は現在世界で最も単純で経済的な結核菌分離培養法であると思われるが、比較的安全で習熟を要せず、しかもいかなる遠隔僻地においても、高い精度と十分な信頼性が期待できるものである。

なお、本方式により適した培地として2%変法培地（仮称）を考案したが、わが国の現行法にも小川培地の代りに用いる。

本論文の一部または要旨は第44, 47, 48回日本結核病学会総会および第21回国際結核会議（モスクワ）で発表した。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、本課題の意義に深い理解を寄

せられ激励された結核研究所岩崎所長ならびに付属療養所小池所長に改めて感謝の意を表します。また長期にわたり、その優れた技術を駆使して手伝つてくれた細島澄子技師、材料の提供に協力した臨床検査室の酒井秀子技師以下のスタッフにも深く感謝します。

主 要 文 献

- 1) Laboratory Procedures for the Bacteriological Diagnosis of Tuberculosis in WHO Associated Projects : WHO/TB/Techn. Guide/67. 7, 11, 1967.
- 2) 衛生検査指針, 結核菌検査指針 : 日本公衆衛生協会, 1972 版.
- 3) 工藤祐是・工藤禎 : 結核, 43 : 9, 1968.
- 4) 吉原宜方 : 京大結研紀要, 12 : 52, 1963.
- 5) 東村純雄 : 結核, 39 : 60, 1964.
- 6) 本田祐 : 結核, 34 : 705, 1959.
- 7) 小沼正哉 : 日本公衆衛生雑誌, 7 : 621, 1960.
- 8) 伊藤忠雄 他 : 呼吸器診療, 15 : 772, 1960.
- 9) Engbaeck, H. C. and Bentzon, M. W. : Acta, Tuberc. Scand., 45 : 89, 1964.
- 10) Boulahbal, F. : Essais de milieux antiseptiques pour la conservation de crachats tuberculeux au cours de transport, Etude au laboratoire et sur le terrain, Communication à la Commission des Méthodes diagnostiques de l' U. I. C. T. Paris, Septembre 1972.
- 11) Erwin, P. : 著者宛私信, 1972.
- 12) Engbaeck, H. C., Bentzon, M. W. : Acta, Tuberc. Scand., 45 : 97, 1964.
- 13) Sula et al. : Bull. Wld H. Org., 23 : 635, 1960.
- 14) Henkel, W. and Meissner, G. : Zbl. f. Bakt. I Orig., 193 : 502, 1964.
- 15) Ogawa, T., Kudoh, S. and Kino, C. : Kitasato Arch. of Exp. Med., 35 : 21, 1962.
- 16) Becker, A. : Amer. Rev. Resp. Dis., 84 : 281, 1961.
- 17) 田中義郎 : 著者宛私信, 1973.
- 18) Cho, C. and Obayashi, Y. : Bull. Wld H. Org., 14 : 657, 1956.
- 19) Dixon, J. M. S. and Miller, D. C. : Tubercle, 45 : 106, 1964.