

原 著

## 喀痰中結核菌の一証明法

高橋義郎

高橋内科医院

受付 平成2年6月14日

## A METHOD OF DETECTING TUBERCLE BACILLI IN SPUTUM

Yoshiro TAKAHASHI \*

(Received for publication June 14, 1990)

Tubercle bacilli were injected intravenously to mice after dusts were injected into their subcutaneous tissue. Out of 23 kinds of dusts tested, a quartz dust enhanced most the growth of mycobacteria injected intravenously in mice. Based on this a mixture of the sputum from patients with pulmonary tuberculosis and finely powdered crystalline silica was inoculated subcutaneously into the flanks of mice.

Growth of tubercle bacilli was demonstrated occasionally for the sputum specimens from smear-positive and culture-negative cases, and even for smear- and culture negative cases. When a sputum specimen which yielded many colonies on routine egg medium were tested, the growth of bacteria became visible as early as 2 weeks after inoculation.

On the other hand, it took 3 to 4 weeks for the visible growth of bacilli, when a sputum specimen yielded only a few or no colonies on culture medium.

In this method, the bacilli appeared earlier and more frequently than in the routine culture method on egg medium.

Thus an inoculation into mice with a mixture of the sputum and quartz powder was shown to be a sensitive method for the diagnosis of pulmonary tuberculosis.

**Key words :** Detection of tubercle bacilli, Smear-positive and culture-negative (SP CN) tubercle bacilli, Quartz dust, Mice inoculation

**キーワード:** 結核菌証明, SPCN, 石英粉, マウス接種

珪肺症に結核が合併しやすく、かつ珪肺結核は、治癒しがたいことは多くの人たちの認めるところである。生体内で、いずれの粉塵が結核菌の増殖を促進させ、結核合併や珪肺結核の難治性に関与するかを見るために、われわれは、各種粉塵の生食浮遊液をマウスの皮下に注射した後、数時間以内に結核菌を静注し、各種粉塵の結核

菌増殖に及ぼす影響を検討した。検査した23種類の粉塵のうち、石英（結晶性遊離珪酸）粉に最も強い増菌作用のあることを定量培養で確認した<sup>1)</sup>。

この事実を喀痰中結核菌の検出に役立てようとした。すなわち、肺結核患者の喀痰と結晶性遊離珪酸微粉との混合物をマウスの皮下に注射して、結核菌の早期検出と、

\* From the Takahashi Physician's Office, 4-6-15 Daimon, Shiojiri-City 399-07 Japan.

塗抹陽性培養陰性結核菌の生死についても検討したので報告する。

## 実験方法

### 1. 喀痰中結核菌培養

2%あるいは、4%の水酸化ナトリウム溶液で処理した喀痰を、1%あるいは、3%小川培地に培養した。一部の検体では、Tween 卵培地、あるいは、工藤PD培地に8週間培養し、菌の生育のない場合には、5%アルブミン0.1mlを滴下し、さらに8週間計16週間培養した。以前の1960年度には、小川培地が乾燥する9週間で培養期間を打ち切っていた。

### 2. 動物実験

結晶性遊離珪酸微粉は、天然石英あるいは、人工水晶をクラッシャーで粗粉化し、さらに、めのう乳鉢で細粉化したものである。粒子の大きさは、大部分(92%)が3 $\mu$ 以下で、二酸化珪素99.31%のほか、微量の酸化第二鉄、酸化アルミニウムを含んでいた。

培養に使用したものと同一の水酸化ナトリウム処理の喀痰2mlに、滅菌した上記微粉200mgあるいは、350mgを加えて、混合した後、BTBを指示薬として、10%あるいは、20%塩酸で、pHをほぼ7.0に修正。その0.1~0.2mlを4週齢のddYマウスの左右側腹部皮下に注射した。その後、2週、3週、および4週目に屠殺し、注射局所を摘出し、載物硝子に塗抹、抗酸菌染色後検鏡し、ガフキー表を用いて増菌の度合いを判定した。さらに、注射局所を1%水酸化ナトリウム溶液、あるいは、1%セシルピリジウム-2%塩化ナトリウム溶液で処理後、小川培地、一部の検体では、Tween 卵培地、あるいは、工藤PD培地を用いて還元培養を試みた。

## 実験成績

表1に1960年度および1989年度の実験成績を示す。

### A. 菌証明率

表1 培養陽性例と本法陽性例との比較  
(S=塗抹 C=培養)

検体の種類	被検例数	培養(+)	局所(+)	例
1960年				
S(+)+C(+)	10	10	10	
S(-)+C(+)	5	5	4	
S(+)+C(-)	2	0	2	
S(-)+C(-)	6	0	2	
計	23	15	18	
1989年				
S(+)+C(+)	10	10	10	
S(-)+C(+)	2	2	2	
S(+)+C(-)	6	0	2	
S(-)+C(-)	18	0	1	
計	36	12	15	

1) 1960年度の成績では、塗抹培養ともに陽性(以下SPCP)のもの10検体中10例が本法でも増菌を証明できたが、塗抹陰性培養陽性(以下SNCP)の検体5例中4例に菌を証明できたのみであった。しかし、本法で陰性であった1検体は、6本の小川培地にわずか1個の集落が発生しただけの検体であった。

比較的長期にわたり、塗抹陽性培養陰性(以下SPCN)を示した2例は、本法では2例とも増菌を認め、また、塗抹培養とも陰性(以下SNCN)のもの、6検体中2例に増菌を認め、培養陰性であっても、本法では生菌を証明することができた。

2) 1960年には、天然石英粉を使用したのが、1989年度には、高純度の二酸化珪素を含む人工水晶粉を使用した以外は、ほぼ同様の手技を用いた。SPCNを示した6例(表2-2 No. 32~37)は、強力化学療法中の検体であったが、2検体に増菌を認め、同様にSNCNを示した18例中1例に増菌を認めた。その他のSPCP、SNCPを示したものは、培養法と本法とは、すべて一致していた。

総計59検体中、培養法では27例、本法では33例に結核菌を証明することができた。

### B. 本法の菌証明に要する期間

表2-1に示すごとく、培地に無数の集落の発生した検体では、大部分が接種後2週間で、著明な増菌を認めた。しかし、日がたつにしたがいで、皮下局所が破れ、排

表2-1 培地発生集落数と本法との関係  
集落多数の場合

検体No.	集落数	塗抹G号	注射局所のG号			還元培養
			2週	3週	4週	
1	卅	VI	VI	X	/	+
2	卅	VII	X	IV	V	+
3	卅	IV	III	V	I	+
4	卅	V	VII	X	IX	+
5	卅	X	VI	X	/	/
6	卅	VI	X	X	X	/
7	卅	IV	V	VII	X	+
8	卅	II	II	X	V	+
9	卅	II	VI	VIII	X	/
10	卅	II	IV	VIII	X	/
11	卅	II	IV	/	VI	+
12	卅	II	III	I	IV	+
13	卅	I	III	VIII	III	/
14	卅	IV	II	VIII	V	+
15	卅	II	II	VIII	VII	+
16	卅	II	I?	III	/	+
17	卅	0	VII	X	X	+

(斜線実施せず)

表2-2 集落数少数あるいは陰性の場合

検体No.	* 集落数	塗抹G号	注射局所のG号			還元培養
			2週	3週	4週	
18	50/2	I	I	III	VIII	/
19	22/2	VII	I	/	V	/
20	5/2	II	II	/	/	/
21	28/3	I	0	0	IV	+
22	** d5/3	0	0	I ?	I	+
23	56/2	0	0	0	IV	+
24	3/5	0	0	0	III	+
25	12/2	0	0	I ?	II	+
26	3/2	0	0	0	V	/
27	0/3	0	0	0	IX	+
28	0/4	0	0	0	III	-
29	0/4	0	I	III	X	+
30	0/4	II	II	II	VII	-
31	0/3	III	II	VII	X	/
32	0/6	II	I ?	III	VI	+
33	0/6	V	I	III	IV	+
34	0/2	I	0	0	/	/
35	0/2	I	0	0	0	-
36	0/2	II	0	0	0	-
37	0/2	V	0	0	0	-
38	1/6	0	0	0	0	-
39	0/2	0	0	0	0	/
59	0/6	0	0	0	0	/

\* 発生集落総数/使用培地総本数      \*\* dysgonic 汚染培地は除外したため使用培地数は一定ではない

膿し、局所は縮小、あるいは、消失する傾向にあり、検査不能の場合があった。また、3週あるいは4週後にガフキー号数が逆に減少するものもあった。

培地に発生する集落数の少ない検体 (No. 18~26) では、表2-2のごとく、3~4週後にはじめて増菌を

認める例が多かった。SNCNの検体も同じ傾向であったが、SPCNの検体は2週後から陽性を示した。No. 18の検体の皮下局所を、チールネルゼン染色した顕微鏡写真を示すと、図1, 2, 3である。接種後3週までは、ガフキーIII号以下であったが、4週後には急速に増菌し、ガフキーVIII号を示し、菌塊も存在していた。

チールネルゼン染色では、皮下局所に残存する結晶性遊離珪酸が乱反射して検鏡をさまたげるが、蛍光染色では、検鏡の妨害とはならなかった。

考 察

赤崎ら<sup>2)</sup>は珪肺屍の80.7%に何らかの型の結核性変化を認めたと報告し、Gye<sup>3)</sup>やSomeyaら<sup>4)</sup>は、動物の皮下に石英粉と結核菌と一緒に注射すると、その部分で菌は増殖し、あるいは、長期にわたり停滞していると発表している。また、Vorwaldら<sup>5)</sup>も、肺切除した結核組織と結晶性遊離珪酸微粉との混合物を、モルモットの皮下に注射すると、切除標本の菌発見に好結果を与えると報告している。*in vitro*で、石英粉は単核喰細胞を強く破壊するために、結核菌の著明な増殖を促し、珪肺結核患者に進行性肺結核を引き起こす要因の一つであろうとしている<sup>6)</sup>。

われわれ<sup>7)</sup>も各種粉塵の結核菌増殖に及ぼす影響を、マウスの皮下を用いて検討した。すなわち、各種粉塵の生食浮遊液をマウスの皮下に注射した後、数時間以内に、BCG 0.01mg、あるいは、人型結核菌0.01mgを、尾静脈内に注射した場合、石英粉注射局所に最も著明な増菌を認めた。人型結核菌を用いた場合には、感染後1日目には、1~2個の菌が存在していたが、3週後には、2,300、6週後には110万にまで増菌することを定量培養で確認した。しかし、10週後には、皮下膿瘍が破れ、体外に排膿するためか、菌数は逆に減少した。

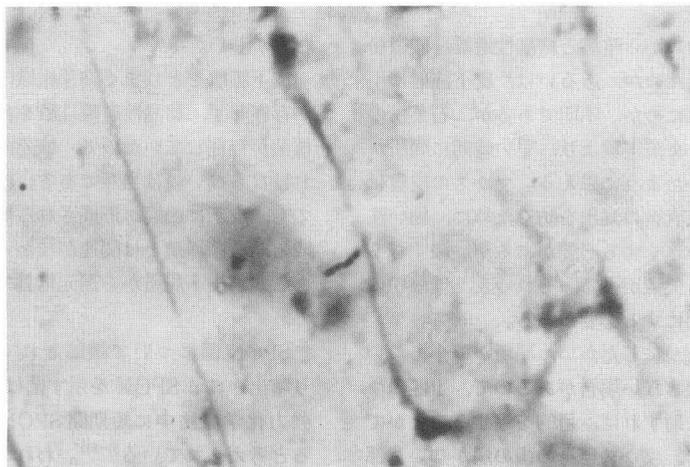


図1 検体 No. 18 の抗酸菌染色 2 週後

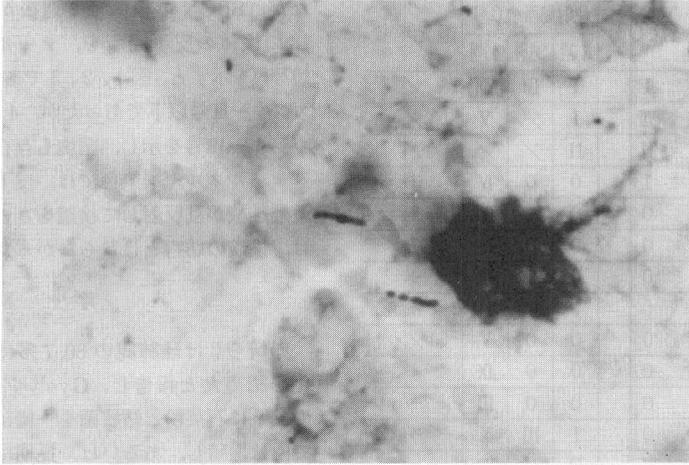


図2 検体 No.18 の抗酸菌染色 3 週後

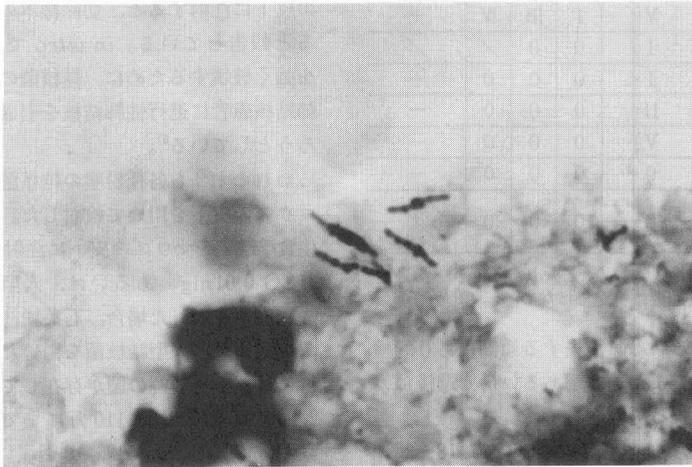


図3 検体 No. 18 の抗酸菌染色 4 週後

今回の実験では、始めから喀痰と結晶性遊離珪酸微粉との混合物を注射したためか、あるいは、皮下注射に用いた注射針が太すぎたためか、不明であるが、石英粉のみを単独に皮下注射した前実験より、早い時期に局所が消失するものが多かったように思える。マウスの皮膚はうすいので、検体注入直後の漏出を防ぐために、細い注射針を用いて針痕を小さくする必要があるが、細すぎると針がつまってしまう欠点がある。それゆえ、珪酸粉の粒子は、可及的に微細にする必要がある。

皮下注射後、週がたつにしたがい、局所が縮小あるいは、消失して、検鏡できない場合があるので、1匹のマウスの腹部4箇所注射すれば、目的を達することができるであろう。ことに、マウス自身の歯の届かない背部皮下を用いれば、さらに有効と思われるが、注射手技は

むずかしい。

皮下膿瘍をとりまく肉芽組織内には、結核菌は少数しか存在せず、結晶性遊離珪酸を含む膿瘍内には多数の結核菌が存在していたので、壊死内容物を塗抹検鏡しなければならぬのは当然である。結核菌が存在していなくても、皮下に膿瘍が形成される場合もあるので、膿瘍形成と結核菌増殖とは関連がなかった。また、原因不明であるが、皮下局所から還元培養できなかつた検体もあった。

SPCN菌について議論されているが、長期間にわたり喀出されるSPCNを示す菌は、生菌の可能性が高く、強力化学療法中に短期間SPCNを示す菌は、死菌であると考えられている<sup>8)~11)</sup>。われわれの検体でも、長期間喀出のもの2例中2例、強力化学療法中のもの6例中2

例に生菌を認めることができた。

通常の結核菌培養では、3～5週後に菌が検出されるが、なかには、7～8週、あるいはそれ以後に発育を認めることがある。本法は、一般に行われている結核菌培養法に比べ、手技がやや複雑であるが、培養法より比較的短期間に、また、比較的高率に生菌を証明できた。臨床上、たとえ結核菌を証明できても、直ちに肺癌を否定できないが、逆に、空洞のある患者に排菌がなければ、肺癌を念頭におかなければならない。また、喀痰中結核菌がSPCNを示す場合に、本法は、その生死を判定する一つの方法となるであろう。

### 結 語

肺結核患者の喀痰と結晶性遊離珪酸の微粉との混合物を、マウスの皮下に注射すると、一般に行われている結核菌培養法より、比較的短期間に、かつ、比較的高率に結核菌を検出することができた。本法は早期に肺結核を確診する一助となるであろう。

1. 喀痰中結核菌がSPCNを示しても、また、たとえ、塗抹培養ともに陰性であっても、それらの検体の一部には生菌が存在していた。

2. 結核菌検出可能期間は、培地に発生する集落数の多い検体では、2週間。少ない検体または、培養陰性検体では、前者より遅れて検出される傾向にあった。

本論文の要旨は、第36回および第65回日本結核病学会総会において発表した。稿を終えるにあたり、御指導いただいた東北大学名誉教授、海老名敏明先生、御校閲をいただいた、宮城県結核予防会、高世幸弘先生、また実験を御支援くださった健康保険岡谷塩嶺病院臨床検査技師、大森浩氏に深甚の謝意を表します。

### 文 献

1) Takahashi, Y. : Influence of various dusts,

especially of quartz dust, on the multiplication of tubercle bacilli in mice, *Sci Rep Res Inst Tohoku Univ (Med)*, 9 : 322-336, 1960.

- 2) 赤崎兼義, 斎藤 謙, 佐藤一郎他: 珪肺症37例の剖検所見に就て, *日病会誌*, 37 : 31-35, 1950.
- 3) Gye, W. E., Kettle, E. H. : Silicosis and miner's phthisis, *Brit J Exper Path*, 3 : 241-251, 1922.
- 4) Someya, S., Kusama, H., Ohi, T. : Influence of various dusts on reaction of guinea pigs against BCG inoculation. 1. Influence of quartz dust, *Ann Rep Jap Assoc Tuberc*, 1 : 56-62, 1956.
- 5) Vorwald, A. J., Dworski, M., Pratt, P. C. : The use of quartz dust for challenging the Viability of tubercle bacilli in tuberculous lesions, *Am Rev Tuberc*, 69 : 841-842, 1954.
- 6) Ebina, T., Takahashi, Y., Hasuike, T. : Effect of quartz powder on tubercle bacilli and phagocytes, *Am Rev Resp Dis*, 82 : 516-527, 1960.
- 7) 高橋義郎: 石英粉の結核菌増殖に及ぼす影響. 1. 動物の皮下組織内に各種粉塵中に石英粉が存在する場合, *抗酸菌病研究雑誌*, 13 : 324-338, 1958.
- 8) 工藤祐是: 喀痰における抗酸菌塗抹陽性培養陰性—抗酸菌検出における諸問題に関連して—, *結核*, 56 : 291-299, 1981.
- 9) 青柳昭雄: 塗抹陽性培養陰性結核菌, *結核*, 59 : 531-538, 1984.
- 10) 束村道雄, 外山春雄: 塗抹陽性培養陰性結核菌の成因および臨床的意義に関する研究, *結核*, 59 : 451-459, 1984.
- 11) 高橋 宏: 塗抹陽性培養陰性とその対策, *結核*, 65 : 29-33, 1990.