

結核臓器内の菌数測定法について

定量培養法と直接計算法の比較

北海道大学結核研究所細菌部

大原 達・中川 哲二

横井 敏夫・新谷 昭二

(昭和 28 年 1 月 30 日受付)

1 まえがき

結核の研究を行うに当つて、結核菌の体内における消長、例えばその増殖状態や分布状態を調べたり、或いは免疫動物の菌に対する防禦力を調べたりする等、色々の目的から臓器内結核菌数の測定を必要とする場合がしばしば起つてくる。この際染色標本による直接計算法と定量培養法の 2 つが考えられるが、最近盛んに行われているのは殆んど後者ばかりである。結核において、最初に定量培養法を実験に用いて生体内結核菌の消長を調べたのは Lange¹⁾ で、彼は結核臓器の一定量をすり潰して emulsion とし、これを serum egg medium に植えて発生する集落数から生菌数を測定した。その後定量培養に関する研究はかなり多く、外国では Max B. Lurie²⁾ の等がこの方法で結核菌の生体内における運命を克明に調べ、わが国では小川^{3)~11)} による定量培養の詳細な研究が発表されている。しかしこの方法の大きな欠点は、臓器乳剤の適当な稀釈倍数を見付けるのが難かしいこと、及び結果判定までに少なくとも 1 カ月を要することである。臓器内の菌数を正確に知るといふことは極めて困難な問題で、いずれの方法によつてもかなりの誤差を許さなければならないが、同じ程度の誤差で済むならば直接計算法は極く短時間内に結果が判定できるという点で培養法に遙かに優るものといわなければならない。われわれは結核臓器内の菌数を計算するに当つてこの 2 つの方法を比較して見たので、その成績をここに報告する。

2 実験方法

i) 実験動物：体重 3 kg 前後の健康なる成熟家兎 21 頭を用いこれに人型菌仲野株を静脈内に感染せしめた。接種菌量は第 1 表の通りである。

ii) 直接計算法：結核感染臓器を正確に秤量して乳鉢でよくすり潰し 100 倍量の水を加えて均等な乳剤とする。これを検定した注射器に正確に 1 cc 吸い上げピストンを押すことなしに自然にこれを滴下させ全体が何滴になるかを数える。これを 3 回繰返して平均を取るが、滴数は殆んど一定して 1 回しか測らなくてもさしたる誤差は見られない程度である。次に任意の 10 滴を 1 滴宛宛々にオブジェクト・ガラス上に滴下し自然乾燥した

後型の如く Ziehl-Neelsen 法によつて染色、各 1 滴毎に縦径と横径を測定した後鏡検する（上の測定で 1 cc が 1 滴とすればこの注射器でオブジェクト・ガラスに落した 1 滴は $1/1$ cc である）。この染色標本に用いるオブジェクト・ガラスは完全に脱脂されたきれいなものでなければならないので次の如くして清拭する。(1) 10% Na_2HCO_3 水で 10 分間煮沸した後水洗、(2) クローム硫酸に 1 日間浸した後流水中に 2 時間置いて前者をよく洗い流す、(3) さらに蒸留水で 3 回水洗、(4) これを 5% 塩酸アルコールにつけて保存、用に臨んで 1 枚宛ピンセットで取り出し、新しいガーゼで拭いて用いる。

以上の操作でオブジェクト・ガラスは完全に脱脂され臓器乳剤をはじくというようにはなくなる。静かに落した 1 滴は大体完全な円形であるが、乾燥染色後には正確にいうと円ではなく多少不規則な形を取るもので、前述の如く縦径と横径を測り、その面積を楕円と考へて近似的に求めた。

菌数計算は各 1 滴の標本について任意の 10 視野を扨んで菌数を数え、これを平均して 1 視野の平均菌数を求める。この際数える視野は at random のものでなければならないのは勿論であるが周辺部と中央部を均等に採るようにする。一般に菌は周辺部に偏つて多数染め出されるからである。1 滴の標本における 1 視野の平均菌数が分つたならばこれからその 1 滴の標本全視野の菌数を計算によつて求めさらに任意の 10 滴について同様に計算した値を平均する。この値は臓器乳剤 $1/1$ cc に含まれる結核菌の絶対数である。標本の全視野の菌数を計算するには予め顕微鏡の視野の直径をマイクロメーターで測定してその面積を出し、標本 1 滴の面積（その長径及び短径をそれぞれ a, b とすれば $1/4\pi ab$ として求められる）をこれで割り（標本における視野の数が求められる）、これに 1 視野の平均菌数を乗ずれば良い。

以上を数式で表わせば臓器 1g における菌数は次のようにして計算できる。

すなわち臓器乳剤 1 滴をオブジェクト・ガラスに滴下して自然乾燥・染色した時の長径を a_i 、短径を b_i （単位いずれも mm）（ $i=1, 2, \dots, 10$ 、以下同じ）、顕微鏡 1 視

野の直径を e (単位 μ)、1 視野における平均菌数を p_i 、
乳剤 1 滴の顕微鏡下における視野数を q_i とすれば

臓器 1g における菌数 = (1 視野の平均菌数) × (視
野数) × (乳剤 1 cc の滴数) × (乳剤の稀釈倍数)

$$= \frac{1}{10} \sum_{i=1}^{10} p_i q_i \times t \times 100$$

$$= \frac{1}{10} (p_1 q_1 + p_2 q_2 + p_3 q_3 + \dots + p_{10} q_{10}) \times t \times 100$$

$q_i = (1 \text{ 滴の面積}) / (\text{顕微鏡 1 視野の面積})$

$$= \frac{1}{4} \pi a_i b_i / \frac{1}{4} c^2 \pi \text{ であるからこれを代入して}$$

$$\text{求める菌数} = \frac{1}{10} \sum_{i=1}^{10} p_i a_i b_i \times 10^8$$

$$= \frac{1}{10 c^2} (p_1 a_1 b_1 + p_2 a_2 b_2 + p_3 a_3 b_3 + \dots + p_{10} a_{10} b_{10}) \times 10^8$$

最後に計算値を 10^8 倍する理由は標本の面積の単位が mm^2 、顕微鏡視野の面積の単位が μ^2 、稀釈倍数が 10^2 であるからである。

iii) 定量培養法：培養法は大体小川の方法⁵⁾に準じた。すなわち臓器をすり潰して 1% NaOH を少し宛加え、臓器の種類、病変の程度に応じて適当と思われる稀釈濃度の乳剤を 3~4 階段作り、その 0.1cc を小川培地に加え、液が培地の斜面全体にうるおうようにする。これを斜面台に寝かせて 37°C の孵卵器に 1~2 日放置し培養基面が乾燥してから封蝋して培養を続ける。一つの濃度について 5 本宛の培地に植え、発生する colony 数は 1 週毎に記録した。

3 実験成績

実験 1) 臓器内結核菌の分布：人型菌仲野株を静脈内に接種した後結核死するのを待つて解剖し、肺・肝・脾の 3 臓器における結核菌数を定量培養法により比較して見た。その結果は第 1 表に示す通りである。この表から、菌を静脈内に感染せしめた場合、結核菌は肺において最大の増殖を示すことが分る。すなわち肝、脾における菌の増殖は肺に較べると遙かに少なく、その order は表の如く 2~4 桁違っている。菌の増殖と比例して肉眼的の病変も肺と他の 2 つの臓器の間には著明な差があり、肺全面が侵されて殆んど健常の部分認めないような強い病変の動物でも肝、脾には極く少数の結節を辛うじて認めるに過ぎないものもあつた。なお第 1 表における数値の単位は万で臓器 1g 中の菌数を示したものである。実際的には例えば肺の場合、 10^{-3} から 10^{-6} 倍稀釈のものを作り主として 10^{-4} 及び 10^{-5} の 2 段階を 5 本宛の小川培地に植えたが、病変の程度に応じて菌数が少ないと予想されるものには 10^{-3} 、多いと予想されるものには 10^{-6} をも併せ培養した (培養量は 0.1cc なので実際の倍数はそれぞれ 1 桁宛下がる。第 3 表の order はかかる最終的のものである)。この場合理論的には 10^{-5} で a 個の colony を作るならば 10^{-4} では大体 $10a$ 個、

第 1 表 定量培養法による臓器内結核菌数の比較

家兎番号	接種菌量	生存日数	培養日数	肺 (単位万)	肝 (万)	脾 (万)
16	$1/20mg$	79	IV 週	1414	0 (-4)	8.6
17	$1/20$	112	IV	251	0.08	0 (-4)
18	$1/20$	124	V	530	0.81	0.5
19	$1/20$	109	IV	1403	0.01	0 (-4)
20	$1/20$	111	IV	453	0.038	0 (-4)
38	20	29	V	117	6.6	卅 (-3)
76	$1/20$	75	IV	1199	0.02	0.06
100	$1/10$	65	V	1560	0.105	0 (-3)
101	$1/10$	95	V	128	0.622	0.09
120	$1/10$	125	V	12410	0.007	0 (-2)
121	$1/10$	99	V	1338	0.1	2.16
128	$1/10$	63	V	124	0.047	0 (-3)
139	$1/20$	71	V	7957	0.49	0 (-4)
140	$1/20$	81	V	83	0.023	7.3
141	$1/20$	85	V	434	0.047	0 (-4)
142	$1/20$	45	V	648	0.49	3.25
145	$1/10$	81	V	234	0.013	0.04
202	20	31	IV	192	2.1	5.8
250	20	22	IV	162	0.94	0 (-2)
252	$1/20$	91	V	107	0.013	0.049
270	20	62	V	132	0.28	卅 (-3)

10^{-3} では大体 $100a$ 個位の colony を生ずる筈であるが実際的には必ずしもそうでなく、例えば 10^{-5} で 31 個の colony、 10^{-4} で 64 個というようになりかなりの喰違いが認められる。従つて 10^{-4} をもととして計算した場合と 10^{-5} から計算した場合とでは菌数の桁が 1 つ違う訳であり、しかもいずれが真の値を示しているかは分らない。止むを得ずわれわれはそれぞれの稀釈倍数から計算された菌数の平均値を取つてその臓器 1g における菌数とした。又表において colony 数が零の場合括弧の中に書いてあるのはその時の稀釈倍数である。0 (-3) とあるのは 10^{-3} において菌の発育が認められなかつたことを示し、もつと濃い稀釈のものからは発育したかも知れないがそれを行わなかつたものである。(卅)の場合も同様にこれよりうすい濃度では菌数を数えられたであろうがこの部分が scale out したものである。

実験 2) 定量培養法及び直接計算法による肺臓内結核菌数の比較：上の実験によつて静脈内感染の場合結核菌の大部分は肺に固定せられその菌数は肝、脾に較べて圧倒的に多い事を知つたので肺の乳剤を以て直接計算法と定量培養法を比較して見ることにした。比較の 1 例として家兎 No. 100 の実測値を挙げて見ると第 2 表の如くで、直接計算法では総計 100 の視野を数え、定量培養法では 1 稀釈 5 本宛を観察した。このような表を 21 例集め、臓器 1g における菌数を計算して総括したものが第 3 表である。この表から明かなように、直接計算法

第2表 直接計算法と定量培養法の1例
(家兎 No. 100)

視野 原本	視野										平均	縦径×横径
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J		
1	5	2	5	4	9	2	11	20	3	7	6.8	5.4×5.8
2	17	8	4	6	8	5	9	7	8	8	8.2	6.0×5.8
3	7	7	12	6	8	2	4	6	16	3	7.1	5.5×5.5
4	8	4	7	14	13	7	4	8	6	10	8.1	5.5×5.8
5	4	6	4	11	7	8	3	5	7	8	6.3	5.5×6.0
6	1	4	6	3	13	8	7	3	4	6	5.5	5.2×5.2
7	4	11	10	4	4	3	6	4	6	5	5.7	5.5×6.0
8	5	9	7	6	8	6	4	7	10	7	6.9	6.0×5.8
9	6	6	7	4	8	5	7	7	8	6	6.4	5.8×5.2
10	3	4	8	13	1	10	5	4	5	8	6.1	6.0×5.4
標本濃度 10 ⁻² , 1cc=115滴, 顕微鏡 Olympus, Ocular 5×												
肺	週	10 ⁻⁶					平均	10 ⁻⁷			平均	
	IV	7	22	17	19	4	13.8	1	0	0	4	1
V	13	23	17	23	10	17.2	1	1	0	4	1	1.4
肝	週	10 ⁻²					平均	10 ⁻³			平均	
	IV	14	3	5	8	5	7.0	1	1	0	1	1
V	15	7	6	12	5	9.0	1	1	1	2	1	1.2
脾	週	10 ⁻²					平均	10 ⁻³			平均	
	IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

による菌数は定量培養法による値よりも常に多い。その比を取つて見ると直接計算法による値は培養法の1.1倍乃至6.0倍に当り、平均して3.1倍の値を示している。

4 総括並びに考按

結核研究に當つて臓器内の結核菌数を測定することはしばしば必要となつてくる。従来この目的で用いられてきたいわゆる定量培養法は判定までに少なくとも4週間を要するのでわれわれはもつと短時間内に判定し得る方法として染色による直接計算法を採り上げ両者を比較して見た。臓器としては肺を選んだが、静脈内に結核菌を感染せしめた場合その増殖は肺において極めて旺盛なのに反し肝及び脾におけるそれは極めて少ないからである。定量培養法によるコロニー数から求めた臓器1g中の菌数と染色した菌数から計算した値を較べて見ると常に後者の方が大きい。すなわち直接計算法による菌数は定量培養法による菌数の平均3.1倍を示している。このように直接計算法の値の方が大きい理由の一つとして、培養法では生菌のみしか数えられないが直接計算法においては生菌プラス死菌の総数が現われてくるということが考えられる。しかも一方において定量培養法では一個のcolonyが常に一個の菌から得られたものであるという保証はない。数個の菌が集つて一個のcolonyを作るとい

第3表 肺における定量培養法と直接計算法の比較

家兎 番号	培養 日数	定量培養法				直接計算法		
		10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	平均値 (A)	平均値 (B)	
16	IV	502	64.0	31.0		1414	3820	2.7
17	IV		36.2	1.4		251	1381	5.5
18	V			6.6	0.4	530	2136	4.0
19	IV		129.0	23.2	0.6	1403	8359	5.9
20	IV		46.0	5.0	0.4	453	1868	4.1
38	V	87	14.6			117	307	2.6
76	IV		136.4	10.3		1199	1337	1.1
100	V		75.4	17.2	1.4	1560	5772	3.7
101	V		11.6	1.4		128	269	2.1
120	V			94.2	15.4	12410	20035	1.6
121	V		139.6	12.8		1338	2769	2.0
128	V		12.8	1.2		124	168	1.4
139	V		222.0	78.5	13.8	7957	13090	1.6
140	V		12.5	0.4		83	363	4.3
141	V		50.7	3.6		434	2350	5.4
142	V		60.4	7.4	0.6	648	810	1.2
145	V		32.3	1.8	0.2	234	372	1.6
202	IV	113.0	27.0			192	209	1.1
250	IV	88.0	23.6			162	303	1.9
252	V	101.2	14.0	0.8		107	649	6.0
270	V	122.6	14.2			132	777	5.8
平均								3.1

う場合も考えられるから培養法による値は実際の生菌数の何分の一かの値を取るものと想像される。すなわち結核菌は他の菌に較べると遙かに均等になり難く、臓器乳剤を染色して見てもしばしば数個の菌が塊状をなして密集している像が観察される。従つてある場合には一個の菌が一個のcolonyを作り、或時は数個の菌がただ一個のcolonyしか作らぬこともあるに違いない。この2つを考え併せると直接計算法が定量培養法よりも大きい値を取るのは当然であるが、その差が死菌の数によるものとは断定できず、又いづれが眞の生菌数に近い値を示しているかも遠かに決めることはできない。しかし第3表で見る如く2つの方法によつて示される数値の間には或程度の誤差を許す範囲内において常に平行関係があり、両数値のcurveがクロスするというようなことはない。われわれの実験では定量培養法の値を大体3倍したものが直接計算法の値であつた。このことが分れば臓器内の菌数を計算するに當つて結果的にはどちらの方法を用いても差支えない訳である。しかし方法論的に見ると直接計算法の方が時間的・経済的の点において、遙かに定量培養法を凌駕しているものといえるだろう。すなわち直接計算法においては培養基を作る手間を要せず、又定量培養法の如き4~5週間に亘る長い観察期間も要せず、僅か数時間のうちに結果を判定し得るからである。

しかし直接計算法にも計算の労が煩わしいことの他に一つの大きな欠点を持つている。これは臓器内に菌数が一定量以上ないと数えられないという点である。直接計算法では染色した場合 1 視野に数個或いは十数個乃至数十個の菌があることが望ましい。数視野乃至数十視野に 1 個しか菌がないというような場合は数え方により極めて誤差が大きくなるからである。具体的にいうとわれわれの場合肝、脾の如き菌数が少ない臓器では直接計算法による測定が殆んどできなかつた。染色標本を作る臓器乳剤の濃度は 10^{-2} 稀釈以下が適当であるが、肝、脾では 10^{-1} でも菌を数えることは困難である。しかも 10^{-1} 稀釈では乳剤としてかなり濃厚で綺麗な標本は得られず、これ以上濃いものを作ることは殆んど不可能といつてよい。すなわち臓器 1g 当り 10 万以下の order の菌は定量培養法では測定できるが直接計算法では数えることができない。かくの如くいずれの方法にもそれぞれ長所と短所が見出されるが、かなり多数の菌の存在が予想される場合には直接計算法が甚だ手軽であり、もつと積極的に利用すべき方法であると思う。

なお最近 (Canetti¹²) は「結核病巣中のコッホの菌は生きていますか死んでいるのか?」という奇抜な標題の下に次のような観察を發表している。すなわち多数例の陳旧と考えられる結核病巣から組織片を取つてその一半を培養し、他の一半は塗株標本にして染色し、それぞれから、もとの組織片に含まれていた菌数を算出して比較したところ、後者から得られる菌数が前者よりも常に多いことはわれわれの data と同じであるがその数値にはかなり顕著な開きが認められた。例えば 6:1, 10:1 というようなわれわれの成績に近いものから 1万:1, 6万:1 というような大きな開きのものまでその比は千差万別であつてわれわれのように限られた範囲のものではない。このことから Canetti は結核病巣中の Koch の菌は大部分死んだものではなからうかという推測を下し

ているのは注目すべきであるが幾分結論を急ぎ過ぎた嫌疑がないでもない。われわれの 21 例の data と実験条件が必ずしも同じでないので直接の比較はできないが、これはさらに検討すべき問題を含んでいるものと思う。

5 結 論

結核菌を家兎静脈内に感染せしめると菌は大部分肺に固定せられここで最も活潑に増殖する。動物が斃死するのを待つて肺の乳剤を作り定量培養並びに染色によつて臓器内の菌数を測定しその値を比較して見た。その結果は直接計算法による値の方が定量培養法の値より常に多く、平均して 3.1 倍の値を示したが、これ等 2 つの方法によつて計算された数値は毎常大体において良く平行する。従つて臓器内の菌数測定にはいずれの方法を用いても差支えない訳であり、極めて短時間内に判定し得るといふ点において直接計算法はもつと広く用いらるべき方法であると信ずる。

引用文献

- 1) Lange, B.: Z. Tuberk, 46, 96, 1926.
- 2) Lurie, M. B.: J. Exper. Med. 48, 155, 1928.
- 3) Lurie, M. B.: J. Exper. Med. 55, 31, 1932.
- 4) 小川辰次・佐波 薫: 結核, 24(2), 13, 昭 24.
- 5) 小川辰次: 結核, 24(2), 19, 昭 24.
- 6) 小川辰次・石井和夫: 結核, 24(2), 25, 昭 24.
- 7) 小川辰次・大島登輝夫・鳴海吾郎: 結核, 24(3), 20, 昭 24.
- 8) 小川辰次・大島登輝夫・鳴海吾郎: 結核, 24(4), 5, 昭 24.
- 9) 小川辰次: 結核, 24, 403, 昭 24.
- 10) 小川辰次・佐波 薫・鈴木つき: 結核, 25, 207, 昭 25.
- 11) 小川辰次: 結核, 25, 302, 昭 25.
- 12) Canetti: Rev. de la Tuberc, 10, 26, 1946.