

# 小川培地斜面と渦巻白金耳接種を用いる結核菌生菌数の測定

## (第 1 報)

東 村 道 雄・野 田 用

国立療養所大府荘 (荘長 勝沼六郎博士)

受付 昭和 32 年 6 月 14 日

1951年に Fenner<sup>1)</sup>は Dubos oleic-acid-albumin-agar medium による結核菌生菌数測定法の基礎的 data を発表した。その要点は、Tween-albumin liquid medium の菌液を Whatman No. 42 濾紙で濾過した後、bovine albumin の 0.1% 水溶液で稀釈し、oleic acid-albumin-agar medium の平板培地に 0.02cc ずつ滴下接種することにある。そして、この培地は Löwenstein 培地よりも測定誤差が少ないと述べた。

最近結核菌の薬剤耐性その他を研究するために、結核菌生菌数を定量的に算定する必要がある。しかし Fenner の方法は、たしかによい方法であるとしても、(1) 平板を用いるために操作が面倒で汚染が起り易く、また培養の際の培地の乾燥防止方法が面倒である。(2) 接種に滴下法を用いると、集落融合が起り易く、集落数算定がやや困難である。(3) 培地が小川培地などの卵培地よりも高価であるという点で難点がある。私たちは操作が簡単で費用もあまりかからないという点で、中試験管に分注した 1% 小川培地を用いている。そして接種には渦巻白金耳を使用しているが、この方法は操作が簡単であるため結局頻回大量の実験を行うことができる。以下、主として生菌単位当りの耐性菌出現率を測定することを例として、私たちの常用している方法の基礎を説明したい。

耐性の研究では、固形培地上で生育可能菌数を測定し、つづいてその集落の population 構成を分析したいことが多い。この目的のためには、固形培地に生育した集落を実験材料とすることが必要となる。ここに述べる方法は、この目的に適うものでもある。

この報告では、小川培地に生育した集落を用いる基礎的実験の場合を例とするが、病的材料についても同じ原理で取り扱うことができる。

### (1) 被検株の採取

被検株として Mycobacterium tuberculosis var. hominis 青山 B 株を用いた。

(a) 被検株は 1% 小川培地に本報で述べる方法で接種し、各生菌単位 (single viable units) から発育した分離集落 (discrete colonies または single colonies) を菌液の材料とする。(b) この集落は試験管当りの集落数 20~50 のものから約 100 個とつて用い、(c) 37°C 6 週培養の

ものを使用する。(d) 集落の採取は、ヘラまたは白金耳でなるべく集落全体を採取する。

ただし、生菌単位当りの耐性菌出現率測定の時以外は、被検株採取の条件を上述のように厳重にする必要はない。

#### (1a) 分離集落を使用する理由

生菌単位当りの耐性菌出現率は、発育時期 (growth phase) によつて異なる<sup>2)</sup>。したがつて比較のためには同一 phase の株を用いる必要がある。ところが同じ培養日数の株でも集落の大きさ (colony size) は試験管当りの集落数が少ないほど大きく、多いほど小さい。したがつて集落の大小により growth phase が違つているものと思われる。したがつて被検株の採取を各生菌単位から発育した分離集落に限定し、一定の colony size のものを実験に用いる。

#### (1b) 試験管当りの集落数 20~50 のもの約 100 個を使用する理由

同じ分離集落を用いても、colony size は集落数に逆比例して変化するので、同じ growth phase の株を使用するには条件を一定しておかねばならない。それで、ここでは 20~50 個の数をえらんだ。試験管当りの集落数 (以下たんに集落数) が 10 以下の時は、colony size が大きくなるし、100 以上では小さくなるので混合して用いないようにする。

集落約 100 個をとる理由は、次のようである。発育の出発点となる viable cells は母集団である bacterial population から任意にとられた sample であり、適当な大きさであることが望ましい。しかし一方、耐性菌出現率をしらべる場合には、最初の出発点が突然変異菌 (mutants) を含まぬこと、すなわち感性菌のみであることが望ましい。この点、約 100 個の viable cells には mutants を含む確率は極めて小さく、ほとんど無視できよう。これらの点を考えて、各生菌単位から発育した分離集落約 100 個を集めて材料とした。

#### (1c) 6 週培養を使用する理由

6 週培養を用いる理由は growth phase を一定とすることであることはもちろんである。しかし時期を一定にしておけば何週培養でもよいようであるが、対数期 (log phase) の培養では種々の要素の動揺が大きいと思われ

るので、停止期 (stationary phase) の培養を用いる方が安定した条件をうることになる。この点を考慮して、特に停止期であると思われる6週培養を用いることにした。

その他の重要な理由は、各生菌単位 (single viable units) から発育した分離集落の6週培養を用いる場合は、本報で述べる条件では、実用的に、生菌単位=生育可能菌数 (single viable units=single viable cells, 以下生育可能菌をたんに生菌という) とみなしうるからである。

本報の方法で測定した湿菌量 1 mg 当りの生菌単位の平均値およびその95%信頼限界 (以下( )内に95%信頼限界を示す。その算出方法は後述する。) は4週培養で、85.90 (51.80-120.0)  $\times 5 \times 10^5$ /mg, 6週培養で 15.77 (10.43-20.17)  $\times 5 \times 10^5$ /mgである。

したがって6週培養と4週培養の mg 当りの生菌単位の比は、平均 1:5.43 (1:2.66-11.6) となる。したがって、かりに4週培養の菌のすべてが生育可能であったとしても、6週培養の菌で生育可能なものは、その総菌数の 1:5.43 (1:2.66-11.6) にすぎないことになる。したがって6週培養の株を用いた場合には、実験に用いる菌液中に、5.43 (2.66-11.6) の菌の集団 (clumps) があっても、その clumps の中で生育可能なものはただ1個しかないことになり、生菌単位数=生菌数とみなしうることになる。実際に私たちが用いる菌液は、ほとんど大部分が単個菌または2-5個の菌の小 clumps からできているので、この条件で測定した生菌単位数 (集落数) は事実上生菌数に等しいか、非常に近いと考えてよいと思われる。なおこの点については第2報で詳述する。

#### (1d) 集落全体 (whole colony) を採取する理由

同一集落であつても、集落の表面と培地に接する底部とでは、growth phaseが違つていると思われる。したがって、ある集落では一部だけをとり、ある集落では全体をとつたのでは、あつめてできた株の growth phaseが不揃いになる。したがって growth phaseのそろつた株をうるには、なるだけ集落全体 (whole colony) をとつて集めなければならない。この点、集落数20-50の試験管からは白金耳で比較的容易に集落全体を拾うことができる。

### (2) 接種菌液の作製

(a) 集落を滅菌ナス型コルペンに入れて、ガラス玉とともに10分間振盪する。この際、水分を添加することなく、少量を数個のコルペンで振盪する。(b) コルペンに適当量の滅菌生理的食塩水を加えて、振盪し菌液をつくる。これらを集めて、試験管で30分放置した後、上半部の菌液を滅菌ピペットで別の試験管に移す。菌液の濃度は湿菌量 1-3mg/ccまたは20-30mg/ccとする。(c) この菌液を原液 ( $10^0$ 液) として、これから10進法で  $10^{-1}$

$\sim 10^{-6}$ 液を作る。稀釈には生理的食塩水を用い、10ccと1ccのメスピペットによつて稀釈する。または駒込ピペットによる容量法による。

(2a) 集落をガラス玉とともに振盪する時には、培地からとつた集落をそのまま乾燥したコルペンに移して振盪する。液体は全く加えない。水分が多いと細かい分散の菌液をうることができない。

(2b) 湿菌量 1-3mg/cc の菌液からは、 $10^{-4}$  または  $10^{-5}$  稀釈液で、20-30mg/cc の菌液からは  $10^{-5}$  または  $10^{-6}$  液で算定に都合のよい集落数がえられる。

本文で30分放置すると述べたが、30分放置すると菌の沈澱が起つて、20-30mg/ccの菌液をうることは困難である。したがって、20-30mg/cc液の時は、30分放置しないで10進法稀釈に移る。そして原液接種の時には、ピペットで混合する必要がある。原液接種は耐性菌をうるためにのみ用いられるので、たとえ凝集が起つていても、生菌数  $10^6$  以上に1個の出現率の耐性菌が凝集し合つて、実際より少ない数値を与える確率は極めて少ないと考えられる。

#### (2c) 生菌単位数 (集落数) を生菌数と (実際的に) みなしうる理由

この方法で作つた  $10^{-1}$  または  $10^{-2}$  液の菌の分散状態を、Ziehl-Neelsen 法染色標本で鏡検してみると、ほとんど大部分は、単個菌または2-5個の小集団からなつている。しかし少数の数10個の菌からなる小菌塊も混じている。もし、このような菌塊から発育した集落があれば、早期に集落発生が認められるか、不揃いに大きい集落が混じる筈である。ところが、実際にはこのような現象をみることは、非常に稀である。これは、菌塊の混在が少数であるので、総生菌数算定の試験管の中には入つてこないものと思われる。しかし、この菌液には2-5個の集団は相当多い。これらの集団から発育したものが生菌単位 (集落) を作る率は相当多いと思われる。ところが、前述 (1c) したように6週培養を用いると生育可能菌は5.43 (2.66-11.6) に1個しかないので、たとえ2-5個の菌の集団があつても、生菌単位を作るのは、その中の1生菌細胞であると考えてよい。

### (3) 培地の作製

培地は1%小川培地を使用する。原液 (1% sodium glutamate および 1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 100cc, 全卵液 200cc, Glycerine 6cc, 2% Malachite green 水溶液 6cc を混じて各試験管 (内径17-18mm, 長さ170mm) に8ccまたは10cc ずつ分注し、88°C 60分滅菌して斜面に仕上げる。傾斜は斜面の長さが11-11.5cmになるようにする。

Dihydrostreptomycin sulfate (DHSM), isonicotinic acid hydrazide (INAH), sodium p-aminosalicylate (PAS) などの薬剤は、滅菌前に適当量を添加する。試験

管の数は、各稀釈液にたいして20本、少なくとも10本とする。通常、総生菌数測定のためには各稀釈液にたいして10本、耐性菌数測定のためには、原液を試験管20本に接種する。

### (3a) 分注量を8cc(10cc)とする理由

分注量を4, 6, 8, 10, 12ccとし、各組を100本の試験管とし、同一菌液を等量接種し、37°C 4週後、各試験管の平均集落数を算えると表1の通りとなる。分注4

表1 培地分注量と平均集落数の関係

分注量	平均集落数 (95%信頼域)
4 cc	90.6 (86.21~94.99)
6 cc	99.8 (95.59~106.01)
8 cc	141.4 (135.06~147.74)
10 cc	132.2 (125.14~139.26)
12 cc	141.4 (132.50~150.30)

ccと6ccの間には有意の差がないが、6ccと8ccの間には高度に有意の差がある。しかし8cc以上の間では有意の差がない。これは、6cc以下では、集落の発育が小さく、また接種面が小さいために集落融合が起るためと考えられる。この成績を考慮して、分注量を8ccまたは10ccとした。

(3b) 培地に添加された薬剤が滅菌によって受ける影響については、DHSMについては小川、芳賀<sup>8)</sup>、INAHおよびPASについてはDrummond et al.<sup>9)</sup>、土屋<sup>10)</sup>の研究がある。INAHおよびPASは滅菌によって影響を受けないものと思つてよい。実際に私たちの経験でも卵培地によって得られる成績は、安定で再現性のあるものである。tibione, viomycin, cycloserine, sulfonamidesなどは熱にたいして安定であるので、滅菌による力価減弱を考慮しなくてよい。

### (4) 接 種

菌液を培地に等量接種するためには、渦巻白金耳を用いる。渦巻白金耳で1回にすくいあげる量は0.02ccとする。渦巻白金耳で菌液をすくいあげて、試験管壁にふれないように培地上にもつてきて、塗り込むような気持で数回培地表面をこする。この際、試験管下部の凝固水にふれぬようにし、培地の上部(培地の薄い部)および辺縁部には塗抹しないようにする。接種を終った試験管は直ちにゴム栓をして孵卵器に格納して37°Cに培養する。

#### (4a) 渦巻白金耳の作製

渦巻白金耳を作るには、渦巻の間に表面張力によって液が常に張られるように加減する。作つたら、これで水をすくいとつて、試験管外にとり出した培地上に5回または10回、毎回場所をかえて液をもち(塗らない)、これをマイクロピペットで吸つて量を測り、1回にとる液の量を計算しておく。毎回の接種量の変動は後述の分布誤差

に含まれるが、後述するように他の方法にまさるとも劣ることはない。

(4b) 培地の凝固水は除かないでよい。渦巻白金耳による0.02cc接種では、培地を放置乾燥させる必要がなく、そのまま立てて格納してよい。この点は先の接種量の均等性ととともに、この方法の最大の利点の1つである。渦巻白金耳による接種法は、ピペット法または滴下法に比較して、(i) 接種操作が簡単迅速であり、(ii) 培地の乾燥を待つ必要がない、(iii) 集落融合が起り難いので精度が高い点ですぐれている。私たちの研究室では、基礎的実験にも、病的材料からの定量培養にも、ここ3年来使用している。

### (5) 判定および計算

(a) 集落数すなわち生菌単位数(上述の方法では生育可能菌数とみなしうる)の算定は、37°C 3週および4週後に行う。PAS含有培地では4週後では算定ができないので、6週後に算定する。(b) 計算の基礎としては、できれば試験管当り集落数20~50のものを用いる。もしこの間の数がえられない時は、5~100(やむをえぬ場合は150まで)の間の数をとる。

(5a) 4週後判定を原則としているが、集落数が多いと融合することがあるので、3週後にも算定しておく。PAS含有培地ではPAS耐性菌でも発育が遅れるので、判定を6週後にする<sup>11)~12)</sup>。PAS耐性菌を多量に接種すれば4週後でも十分発育が認められるが、単個菌からの発育では集落形成が十分でない。これが、PAS耐性菌がone-step selectionで感性株中にみられないと誤られ易い原因となる。

(5b) 平均集落数20~50(または5~100)を計算の基礎とする理由

平均集落数が多いと集落融合が起つて(たとえ単個菌からの発育でも、接種された場所が接近していると集落が融合して1個の集落となる)、実際の値より小さい数値を与える。上述の培地ではおおよそ200までは算定できるが、集落融合を考えると上限が低い方がよい。しかし、平均集落数が小さいとPoisson分布となり、大きいと正規分布に近づく<sup>1)~5)</sup>。平均値4以下であるとPoisson分布に近づくので、一応下限を5、上限を100とした。平均集落数の採用する範囲を狭くとれば、それだけ測定条件が揃うので、できれば20~50の範囲をとりたい。

### (6) 統計的処理(測定誤差)

$x_i$  = 各試験管の集落数,  $n$  = 試験管の本数, とすれば,

$$(1) \text{ 平均値: } \bar{x} = \sum x_i / n$$

$$(2) \text{ 分散: } S^2 = \sum (x_i - \bar{x})^2 / (n-1)$$

$$(3) \text{ 標準偏差: } S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$(4) \text{ 標準誤差: } SE = S / \sqrt{n}$$

- (5) 変動係数(%分布誤差) :  $C\bar{x} = \frac{SE}{\bar{x}} \times 100\%$
- (6) 平均値の信頼限界 = (Student の  $t$ )  $\times$  (標準誤差)

これらの数値を適用するためには、正規分布であることが前提なので、念のため毎回正規性の検定を行う。なお、以上はもちろん、分布誤差 (distribution error) に関する処理である。

(a) 例えば、PAS 耐性株の同一菌液を対照培地と PAS 100 $\gamma$  培地に接種して、PAS 100 $\gamma$  耐性菌の含有率を検査する場合は、誤差は分布誤差だけを考えればよいから、2つの培地の集落数の平均値の差の有意性は容易に検定できる。

(b) 感性株中に含まれる SM 20 $\gamma$ 耐性菌の総生菌数当りの出現率の場合は、原液を SM20 $\gamma$ 培地に接種して耐性菌数を数え、10<sup>-5</sup>液を SMなし培地に接種して総生菌数を数えるので分布誤差のほか稀釈誤差 (dilution error) を考慮しなければならない。したがって総誤差は Jennison and Wadsworth<sup>12)</sup>によれば、

$$\text{総誤差} = \sqrt{(\text{分布誤差})^2 + (\text{稀釈誤差})^2}$$

となる。しかし、稀釈誤差を毎回実測することは困難なので、例えば稀釈に標準偏差 0.2cc の10cc のメスピペットと標準偏差 0.02cc の1cc のメスピペットを用いる場合は、Jennison and Wadsworth の表<sup>12)</sup>により10<sup>-5</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-2</sup>稀釈液の作製にそれぞれ、14.2%、11.4%、8.4%、5.6%の標準偏差を挿入する方法がよく用いられている(例えば文献1および14)。すなわち、(%総誤差) =  $\sqrt{(\% \text{分布誤差})^2 + (\% \text{稀釈誤差})^2}$  (稀釈誤差については第2報で検討する)。

(c) Fenner 法との比較

Fenner<sup>1)</sup>は滴下法で Dubos の oleic-acid-albumin-agar 培地と Löwenstein 培地の分布誤差の平均を比較して前者が後者よりまきついていると報告している。この原因は滴の培地上でのひろがり方に関係していると想像

表2 Fenner 法とわれわれの方法における分布誤差の比較

方法	培地	%分布誤差 (平均)	%分布誤差 (範囲)
Fenner	Dubos 培地	6.6%	1.8~17.3%
	Löwenstein 培地	18.4%	6.6~40.1%
東村・野田(†)	小川培地 (*1)	7.09%	3.58~11.7%
	小川培地 (*2)	8.44%	3.58~15.7%

(†) 各実験列は10本の試験管 (eplicates) からなる

(\*1) 実験列27列 (平均集落数20~100) の平均値および最小, 最大値

(\*2) 実験列45列 (平均集落数 5~100) の平均値および最小, 最大値

される。ところが、私たちの方法では表2に示すように、Fenner の Dubos 寒天培地を用いるのとはほぼ等しい成績となっている。これは Fenner の方法では、0.02cc の滴が直径15mm の範囲に拡がるにすぎないのたいして、私たちの方法でははるかに広い範囲に拡げて接種するため、集落融合が起りにくいと思われる。このように最も重要な測定誤差の点で差がなければ、操作が簡単な点で私たちの方法の方が用い易いと思われる。

結 論

中試験管に分注した小川培地と渦巻白金耳を用いる結核菌の生菌数算定法の術式とその理論的根拠を記述した。方法は本文(1~6)に述べた。この方法の特徴は、(1) 平板法と比較して雑菌による汚染率が少なく、(2) 接種が簡単で、接種後直ちに孵卵器に格納できる、(3) 6週培養の分離集落を使用することにより、生菌単位数を生育可能菌数とみなしうる、(4) 測定誤差が Fenner 法と差がない、という点にある。

(勝沼六郎在長と日比野進教授の御指導に感謝の意を表す)

文献は第2報にまとめて掲げる。