

喀痰塗抹標本からの検出結核菌菌数に基づいた培養集落数の推定法について

室橋豊穂・吉田幸之助

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳沢 謙)

受付 昭和32年7月23日

1. 緒言

喀痰中結核菌の生菌数を培養によつて定めようとする場合に、定量的測定に都合のよい、数える程度の集落数を発生せしめるような喀痰稀釈度の決定法は、実際上必要であるにもかかわらず、今日までのところ明らかにされていない。その理由は、菌検出に最も簡易普遍的な塗抹染色法がいわば定性的な方法にすぎず、定量的測定法たる培養法との関連を掴むことが不可能と考えられていること、臨床上遭遇するいわゆる塗抹陽性、培養陰性例のために、染色による検出菌数との関連において培養集落数の予想を立てること自体が、方法論的に無意味であるかの如き印象を与えていることなどに主として基づいていると思う。しかし、もし塗抹標本からの菌検出に当つて、これを定量的に扱うことができ、その結果を手懸りとして、その喀痰の培養から得られるであろう集落数を直接推定する方法が定められれば、定性的測定方法を定量化しようという点で有意義なばかりでなく、日常の臨床検査に利するところが多かろうと思う。

そこで幾つかの仮定を設けて推定式を作り、実測値とどの程度まで一致するか、したがつてこの方法による予想がどの程度まで利用しうるかを検討しようと考えた。

2. 推定式の設定

塗抹および定量培養される菌液が、一定の範囲内の分散を有する均等な単孤菌菌液であると仮定すれば、その一定量の塗抹材料中の菌数を足場にして、菌液一定容積中の総菌数を求めることは可能である。そこで、菌液が均等であるとの仮定の下に、推定式を次のようにして設定した。

1) 一白金耳で採取塗抹される量を容積に換算する。日常用いる白金耳 (内径約3mm, 針金の太さ約0.7mm) の容積を v とすれば、

$$v = 0.15^2 \times 0.07 \times \pi = 0.0049 \approx 0.005 (ml)$$

である。水について実測すると、10回の計測値の平均において、1.0mlは201.0 \pm 1.1白金耳に当る。また、正常人喀痰を2%NaOHで均等化して遠沈し、その沈渣に水を加えて1mlとなし、同様に計測すると、6回の測定値の平均において、1.0mlは201.4 \pm 0.18白金耳に相当す

る。したがつて、0.1mlをほぼ20白金耳と見做しうるので、 $0.1 (ml) \approx 20 (v)$ と仮定する。

2) 検査に用いる顕微鏡の一視野面積 (S_1) は、同一装置を用いる限り一定であるから、塗抹面積 (S) を一定にすれば、鏡検総視野数 (K) は、 $K = \frac{S}{S_1}$ となり、恒数で表わされる。視野の広さ (視野数と呼ばれる) は、顕微鏡固有で、装置によりそれぞれ多少宛の差はあるが、日本工業規格 (J I S)¹⁾ によれば、拡大率と視野数 (視野直径) との間には次の関係があり、したがつて、油浸対物鏡100倍、接眼鏡10倍 (拡大率1,000倍) のときは、視野の直径 $2\gamma \approx 0.138mm$ となる。

$$\text{視野数 (直径)} = \frac{130}{\text{倍率} + 2}$$

実際には、視野周辺部まで鮮明に見出すことはできないし、全塗抹面を悉く見ることもなく、また塗抹面そのものに相当の誤差があるので、一応、 $\gamma \approx 0.06mm$ と仮定する。

これに相応して、一白金耳の材料を半径 $R \approx 6mm$ の円形になるように塗抹すると、塗抹面の鏡検総視野数 (K) は、

$$K = \frac{S}{S_1} = \left(\frac{R}{\gamma} \right)^2 = 10^4$$

となるので、計算には甚だ都合がよい。

この場合、塗抹面の厚さは $10^{-5}mm$ のorderになるので、塗抹の厚さによる検出誤差は除きうる訳である。

鏡検視野数は、成績の精度を増す上からはなるべく多い方がよいが、ある程度よく均等化された材料であれば、一標本について、at randomに50視野すなわち全塗抹面積の $\frac{1}{200}$ の検索を行えば充分であると思われる。

3) 一視野平均検出菌数を n_1 とし、それらの菌がすべて増殖可能なりと仮定すると、0.1ml中に存する生菌数、したがつて推定発生集落数は次の式で求められる。ただし、この場合、1集落は1個の菌から生ずるものと仮定する。

$$N_{100} = 20 \cdot n_1 \cdot \frac{S}{S_1} = 20 \cdot n_1 \cdot K = 2 \cdot 10^5 \cdot n_1 \quad (1)$$

菌数が極めて少ないときはほとんど全視野を検索せねばならないが、その場合の検出菌数を n とすると、推定式は次の如くなる。

$$N_{100} = 20 \cdot n \quad (2)$$

4) しかし、実際上、いわゆる塗抹陽性、培養陰性なる

場合が存在するので、検出菌のすべてに増殖可能という平等な資格を与えることは不合理である。そこで、malachitegreen-fuchsin 染色による菌体の分別染色が、菌の培養成績とかなりよく平行する²⁾ことから、この分別染色が培養前の状態における菌の生、死をある程度まで示しうるものと仮定して、緑に染まる菌を増殖可能な菌と見做し、その割合を $\alpha\%$ 、またそれらの菌の培養基における reproducibility (増殖可能性) を $\beta\%$ として推定式を立てると、

$$N = 20 \cdot n_1 \cdot \alpha \cdot \beta \tag{3}$$

菌数の極めて少ない場合には、

$$N = 20 \cdot n \cdot \alpha \cdot \beta \cdot 10^{-4} \tag{4}$$

となる。

この場合には、 n_1 あるいは n および α を実測によって求め、 β には適当な値(20~80)を与えて推定値の上、下限を算出することとする。

(1)~(4)の推定式によつて、推定発生集落数 N あるいは N_{100} が求められるれば、その数に応じて、集落計数に適当な集落数(通常2桁の数)となるように計算によつて稀積度を決めればよい訳である。なお、推定式(1)、(2)は推定式(3)、(4)における $\alpha=100$ 、 $\beta=100$ の特殊な場合にすぎない。

3. 実験方法

喀痰約 2 ml に 2% NaOH または 1% KOH を 4 倍量(濃厚な喀痰のときは適宜増量)を加えて約 10 分間フラン器におき、白金耳で攪拌後、3,000 rpm、20 分間遠沈する。沈渣に 0.5~0.6 ml の滅菌蒸溜水を加えて沈渣原液とし、その一白金耳を半径約 6 mm の円形になるように塗抹する。残りは 10 倍段階稀釈し、各段階毎に 0.1 ml を 1 本宛の小川培地に培養する。遠沈沈渣を用いたのは菌の分散度をなるべく均等にするためである。

塗抹標本は、乾燥固定後 malachitegreen-fuchsin 法²⁾で染色し、緑に染まる菌、赤く染まる菌ならびにその合計を数え、1 視野平均菌数 n_1 を算定し、推定式(1)~(4)によつて、推定集落数ならびに適切な稀積段階を定めた。

4. 実験成績

31 例の喀痰について得た成績は表 1 の如くである。表中 β に 20~80 の値を与えたのは、每常行っている単孤菌 slide culture 成績からみて、緑にそまる菌のすべてが必ずしも増殖可能ではないことから、上、下限を仮定した訳である。また推定値としては概略の範囲を知りうれば充分なので、計算によつて得た数値の少数点以下はすべて切り上げた。小川培地による実測値(VU)は、培養 4 週目の計数である。稀積度は集落数の分母に記した。

検出菌数についてみると、直接塗抹(n_d)と沈渣塗抹(n_1)とは著しく相違するもののあるのに気付く。こ

表 1 喀痰からの検出結核菌菌数と、集落推定値ならびに集落実測値との関係

喀痰 No.	n_d	n_1	α	N		VU (小川)	N_{100} ($\alpha, \beta=100$)
				$\beta=20$	$\beta=80$		
1	0.5	30.0	50	6~	24/5	15/-5	60/-5
2	1.4	1.3	80	5~	17/-4	3/-4	30/-4
3	0.6	0.8	75	3~	11/-4	19/-1	16/-4
4	∞	42.0	95	16~	64/5	2/-5	9/-6
5	10.3	17.3	75	6~	21/5	25/-5	35/-5
6	14.0	30.0	75	9~	34/5	21/-6	60/-5
7	7.1	16.0	60	38~	154/4	45/-4	32/-5
8	0.1	0.2	90	8~	29/3	3/-3	40/-3
9	/	0.6	15	4~	15/3	13/-3	12/-4
10	/	4.5	95	17~	69/4	19/-4	9/-5
11	1/S	1/S	100	4~	15/0	0/0	20/0
12	14.8	9.0	25	9~	36/4	5/-4	8/-5
13	33.2	11.0	75	33~	132/4	45/-4	22/-5
14	∞	(200)	50	4~	16-6	67/-6	40/-6
15	G II	1.3	10	6~	21/3	29/3	30/-4
16	∞	29.5	50	6~	24/5	15/-6	60/-5
17	1/S	1/S	100	4~	15/0	6/0	20/0
18	G II	0.2	70	6~	23/3	11/3	40/3
19	/	1.4	70	4~	16/4	27/5	30/-4
20	∞	19.7	85	7~	27/5	25/-6	39/-5
21	G II	0.3	60	8~	29/3	80/3	60/3
22	1 S	2/S	50	4~	15/0	10/3	40/0
23	∞	61.6	80	2~	8/6	39/6	13/6
24	∞	30.0	80	10~	39/5	14/-6	60/-5
25	/	10/S	100	4~	15/-1	0/0	20/-1
26	4.9	3.6	95	14~	54/4	23/3	60/-4
27	15.3	27.5	70	8~	31/5	48/-5	55/-5
28	0.4	4.0	90	15~	58/4	12/-6	80/-4
29	/	0.8	85	3~	11/4	15/-5	16/-4
30	∞	12.8	80	4~	17/5	57/5	26/5
31	∞	53.0	80	2~	7/6	26/6	11/6

注 n_d : 直接塗抹 1 視野平均菌数 n_1 : 沈渣塗抹 1 視野平均菌数
 α : 緑に染まる菌の割合 β : 同上菌の reproducibility
 VU: 実測集落数(小川培地, 4 週) N, N_{100} : 推定集落数

これは材料中の菌分布の不均一さを示すもので、直接塗抹材料では定量的測定に役立ちえないことがわかる。

検出菌数 (n_1) と緑にそまる菌の割合 (α) との間には特定の関係は認められない。

推定集落数 (N) と実測集落数 (VU) との関係を見ると、実測値の方が大きいもの (20, 22, 27, 28, 29) や、小さいもの (3, 11, 25) があるが、過半数において、推定値は実測値によく近似している。そこで、推定値 N あるいは N_{100} について実測値と同一 order の値を示したものを一致例と見做すと、表2の如くで、 N_{100} は一般に実測値より大きく推定しているが、 N は実測値にほぼ近い値を多くの場合に示すことがわかる。

表2 実測集落数 (VU) と推定値 (N, N_{100}) との関係

推定式(1),(2)による場合			計	推定式(3),(4)による場合		
$VU < N_{100}$	$VU \approx N_{100}$	$VU > N_{100}$		$VU < N$	$VU \approx N$	$VU > N$
16	7	8	31	5	16	10

また緑にそまる菌の割合 α と実測ならびに推定集落数 (N) との関係は表3の如くである。 α の非常に小さい例 (9, 12, 15) では、推定値 (N) と実測値とが特によく一致していることがわかる。

表3 緑にそまる菌の割合 (α) と実測集落数 (VU) および推定値 (N) との関係

α (%)	$VU < N$	$VU \approx N$	$VU > N$	計
~ 10		1		1
11 ~ 20		1		1
21 ~ 30		1		1
31 ~ 50		2	2	4
51 ~ 70		3	1	4
71 ~ 80	1	5	4	10
81 ~ 100	4	3	3	10
計	5	16	10	31

次に、算定し易い集落数をえた実測時稀釈度と推定式によつて指示された稀釈度とを、一視野平均菌数 n_1 の多少によつて分けると、推定式(1),(2)による推定値 N_{100} からは実際にえられる稀釈度と一致したものの16例、また(3),(4)による推定値 N からはやや実際の稀釈度と一致したものの20例であり、 N の方が実測値に近い値を示すことがわかる。

しかし N と N_{100} との差は 2 order 以内で、実測値の大半は N と N_{100} の間に存するから、 N による推定稀釈度以外にその前後各 1 段階についても培養を行つておけば、数えうる集落数をうることは可能であろう。

5. 総括考案

直接塗抹染色によつて喀痰中から検出される結核菌菌数と培養検出菌数とに関して、Cummings³⁾ は、喀痰 1ml 中に10万個以上の菌が存在せねば鏡検により検出しえずといい、海老名⁴⁾ は、5万個以上の菌の存在を必要とすると述べている。しかし喀痰中結核菌の分布がそのままでは極めて不平等であることを考えると⁵⁾、かかる材料の直接塗抹標本における菌検出数を培養集落数と直接関係づけようとするには大きな無理があると思う。そのいずれも、研究材料として非結核と思われる喀痰に培養菌を混入したものをを用いているが、培養菌が容易には単菌菌に離れ難いこと、喀痰に人為的に菌を混入する場合に菌分布を容易には均等化しえぬことなどを考えると、その研究方法自体にまず問題があらう。従来定性的方法としてののみ用いられてきた染色鏡検法と、定量法としての培養法との間に一定の関係を見出そうとするには、前者を定量化する方法をまず考えなくてはならない。

本実験に当り、幾つかの仮定の下に、染色による菌検出法を定量化しようと企てた。もちろん予備実験的に行つたために、いろいろの点で吟味が欠けているが、実験成績をみると、偶然にしては推定値が実測値に余りにもよく近似しており、したがつて、推定式設定への幾つかの仮設に著しい誤りのなかつたことを示すように思う。

鏡検所見と定量培養成績との間にある関係を見出そうとする試みは、喀痰中結核菌の耐性 population を分離培地で直接測定しようとする目的から種々工夫されている。小酒井⁶⁾ は、直接塗抹材料について、Gaffky I ~ III号の場合は 2 ~ 3 倍および 20 ~ 30 倍に、IV ~ VI号の場合は 2 ~ 3 倍および 200 ~ 300 倍に、VII号以上の場合は 2 ~ 3 倍および 2,000 ~ 3,000 倍にそれぞれ稀釈培養を行えば、多くの場合に数え易い集落を期待しようと言ひ、Middlebrook⁷⁾ は、均等化および集菌操作を行つた材料について、20視野鏡検で20個以下の場合にはそのまま、一視野10個以下の場合には10倍に、10個以上の場合には100倍にそれぞれ稀釈培養すべきことを述べている。これらの考慮は、共に日常検査における定性的測定法を定量的測定法への足場たらしめようとする方向に一歩を進めたと言ひるのであらう。しかし、それらは多分に経験的なもののように察せられる。ことに、何等の処置をうけぬ喀痰中結核菌の分布の不均一さを考えると、その非特定の一部を塗抹した標本の測定から定量的測定への指示を与えることは前者の場合甚だむづかしい。また後者のように、たとえ均等化や集菌操作が行われても、たとえば1視野宛1個以下の場合にはそのまま培養するということでは、少数の例外を除いて、培養集落数は算定可能な集落数を恐らくは遥かに越すであらうし、したがつて稀

積培養の意味を成さぬと思う。

実験成績に述べたように、本実験の範囲では、われわれの推定式は必ずしもすべての例に対して適正な指示を与えなかつた。それは variation の大きい材料を扱う以上当然なことである。しかし、懸け離れた値を示した少数例を除けば、約半数では実測値(VU)と推定値(N)とよく近似し、また近似しないものでもおよそ1稀積段階以内の差にすぎないから、推定式(3)、(4)による推定は實際上可能であると思う。この場合、検出菌中に malachitegreen 染色性の菌が大部分を占めるものでは、推定式(1)、(2)あるいは(3)、(4)のいずれによるもほぼ近似した値となるが、fuchsin 染色性の菌が甚だ多い場合には、推定式(3)、(4)によらなければ実測値に近い推定値は定めえない。また、数え易い集落数を的確に得ようとするには、推定値Nによつて示される稀積段階の前後各1段階においても培養を行つておけば、多くの場合に失敗はなからうと思う。

以上述べた推定方法は、臨床検査の実際にはやや煩雑であるかも知れない。しかし、定性的検査法を定量化しうる意味において、また鏡検によつて求められる推定値が、次に行う培養における労力、資材を著しく節約せしめうる意味において、この試みには実際的な価値があると思う。もちろん、菌液の均等度や、小川培地の培地差などについての吟味が必要であるが、これらについては改めて検討する予定である。

なお、malachitegreen-fuchsin 法によつて赤く染まる菌の多い場合には、実測集落数も明らかに少ないが、このことは、少数例ながら、本分別染色の機序に対する著者らの考察²⁾を裏付けるもののように思われる。

結 論

塗抹染色による喀痰中結核菌の検出を定量化するために、均等化した喀痰沈渣を malachitegreen-fuchsin 法で染色し、その鏡検によつて計数された菌数に基づき、推定式によつて生菌数を算定し、その推定値を、培養して得られた実測値と比較した。

推定集落数は過半数例において実測集落数と近似し、特に緑にそまる菌の割合の少ない場合には、実測値も推

定値も共に少なく、よく近似する。このことは、malachitegreen-fuchsin 法による分別染色が菌の生、死を判別する上に役立つことを示すように思う。

大多数例において、推定値と実測値との間に余り大きい開きがないので、推定値によつて指示される稀積段階およびその前後1段階において培養を行えば、計数に容易な集落の発生を期待することができると思う。

擱筆に臨み御校閲戴いた柳沢部長、喀痰材料を提供された北里研究所付属病院小川辰次博士に謝意を表す。

本研究の概要は第11回日本公衆衛生学会総会において報告された。

文 献

- 1) 日本工業規格：顕微鏡及びその部品，B. 7132，P. 2，1955.
- 2) 室橋豊穂・吉田幸之助：抗酸性菌の生，死に関する細胞化学的研究，結核研究の進歩，17輯，160～172，1957.
- 3) Cummings, M.M.: The laboratory diagnosis of tuberculosis, Am. J. Publ. Health, 39: 361～366, 1949.
- 4) 海老名敏明・渡辺喜太郎・八鍬英一・金上晴夫：結核菌検出と結核菌数，抗研誌，2(1)：33，1945.
- 5) 室橋豊穂・吉田幸之助：ホールベルグ法による結核菌の染色（Carbolfuchsin 法との比較）日本医事新報，1582：3474～3479，1954.
- 6) 小酒井望・石川哲也・飯村利子：小川培地による直接耐性測定法の検討，臨床病理，4(4)：278～282，1956.
- 7) Middlebrook, G., Cohn, M.L. & Schaefer, W.B.: Studies on isoniazid and tubercle bacilli, III. Isolation, drug-susceptibility, and catalasetesting of tubercle bacilli from isoniazid treated patients, Am. Rev. Tuberc., 70: 852～872, 1954.