

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

Ⅱ 推定グラフを用いる推定法の簡易化

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 11 月 7 日

緒 言

均等化された喀痰塗抹標本からの検出菌数に基づいて培養してえられる集落数を推定する方法については前報告¹⁾に述べた。予備的に行つた約30例の喀痰の成績によると、推定値は実測値とかなりよく近似しているので、日常の検査にこれを応用することは可能と思われる。しかし一時に多数例を扱う場合を考えると、推定値の上、下限を計算することは煩鎖にすぎるので、この計算を省略しうる簡易化された方法が望ましい。そこで、推定式をグラフに表わし、これによつて推定値を定めることにした。推定式によれば、集落数は鏡検出菌数の一次函数で表わされているので、直線グラフに書き直すことができる。したがつて、一視野平均菌数を知れば、推定集落数を直ちに求める事ができる。

本報告においては、主として喀痰から得た実測集落数を推定グラフに plot して、推定直線に対する分布をしらべ、前報告に述べた推定方式の当否に吟味を加えることにした。

実験材料ならびに方法

1. 喀痰中の結核菌分布をなるべく均等ならしめるために、次の方法を用いた。

喀痰約 1 ml に 2% NaOH 約 4 倍量を加え、 $\frac{1}{16}$ hp の小型モーターに接続した白金耳で 1 分内外攪拌する。NaOH を添加して軽く振盪するのみで容易に均等化されるような場合には攪拌を行なかつた。

2. 喀痰58例中始めの30例では、攪拌均等化したものから 1 白金耳 (前報告)¹⁾ をとつて直径約 12mm の円形に塗抹した。後の28例では、攪拌均等化後 3,000rpm, 20分間遠洗し、洗渣に蒸留水を加えて 0.4~0.5ml の再浮游液を作り、その 1 白金耳を同様に塗抹した。

3. 標本は、乾燥、火焰固定後、malachitegreen-fuchsine染色²⁾を施し、at random の50視野を鏡検して、分別染色された菌を別々に計数し、赤、緑両者を併せた 1 視野平均菌数 n_1 および緑にそまる菌のみの平均菌数 n_0 を求めた。菌の極めて少ない場合にはほとんど全視野を

鏡検し、全視野 1 個であれば n_1 あるいは $n_0 = \frac{1}{10^4}$ 個とした。次で前報告の推定式に従い、計数に適した 2 桁の集落数をうるような稀釈度を決め、均等化した材料をその段階に稀釈して 0.1ml 宛を小川培地 2 本に培養した。なお、集落の生じ難い場合を考慮し、非稀釈段階をも培養しておいた。

4. 集落数としては大多数例では 4 週培養の値を計数したが、発育の遅い少数例では 6~8 週の値をとつた。

表 1 検出菌数、その分散および実測集落数
a. NaOHにて均等化のみを行つた場合

喀痰 No	50視野菌数 Σn_1	1視野菌数 n_1	緑染菌の割合 α (%)	50視野緑染菌数 Σn_0	1視野緑染菌数 n_0	標準偏差 σ	0.1ml中菌単位数 $VU = \frac{1}{N \times 10^4}$
1~3, 6	0	0	0	0	0	0	0
4	164	3.3	35	91	1.8	0.86	15×10^3
5	14	0.28	85	12	0.24	0.45	25×10^3
7	40	0.8	12	5	0.1	0.30	6×10^3
8	11	0.22	100	11	0.22	0.45	2×10^3
9	10	0.20	30	3	0.06	0.2	8×10^3
10	77	1.44	36	45	0.90	0.69	20×10^3
11	198	3.96	98	194	3.88	0.93	48×10^3
12	54	1.08	90	48	0.96	0.67	12×10^3
13	66	1.32	95	62	1.24	0.76	39×10^3
14	628	12.60	74	467	9.34	0.94	35×10^3
15	15	0.3	73	11	0.22	0.45	6×10^3
16	172	3.44	90	157	3.14	0.76	52×10^3
17	61	1.22	93	57	1.44	0.70	12×10^3
18	727	14.54	90	666	13.32	1.35	14×10^3
19	60	1.20	70	42	0.84	0.69	70×10^3
20	317	6.34	78	250	5.00	1.11	76×10^3
* 21	1	1/10 ⁴	100	1	1/10 ⁴	—	2×10^3
22	4	0.08	100	4	0.08	0.26	0
23	3	0.06	100	3	0.06	0.22	0
24	31	0.62	90	28	0.52	0.63	12×10^3
25	12	0.24	83	10	0.20	0.42	0
26	9	0.18	22	2	0.04	—	8×10^3
27	177	3.54	41	73	1.46	0.81	8×10^3
28	37	0.74	90	33	0.66	0.66	56×10^3
29	6	0.12	83	5	0.10	—	0
30	738	14.76	45	332	6.64	0.82	30×10^3

* : 全視野鏡検 1 個

N : 計数された集落数

σ : $\sqrt{n_0}$ を確率変数とする標準偏差

表1 検出菌数, その分散および実測集落数

b. 均等化後, 遠沈, 再浮遊を行った場合

喀痰 No	50視野 菌数 Σn ₁	1視野 菌数 n ₁	總染菌 の割合 α (%)	50視野 染菌数 Σn ₀	1視野 染菌数 n ₀	標準偏差 σ ₀	0.1ml中 生菌単位 数 VU= N×10 ^p
31	335	6.7	75	254	5.08	0.72	18×10 ⁴
32	282	5.64	97	274	5.48	0.58	12×10 ⁴
33	146	2.92	85	124	2.46	1.03	16×10 ⁴
34	304	6.08	90	274	5.48	1.09	32×10 ⁴
* 35	1513	60.05	90	1383	55.3	0.82	12×10 ⁵
36	1085	21.68	88	961	19.22	1.12	28×10 ⁵
37	3	0.06	100	3	0.06	—	0
38	15	0.3	73	11	0.22	0.44	40×10 ²
39	77	1.54	13	10	0.20	0.41	19×10 ³
40	314	6.28	93	294	5.88	0.88	17×10 ⁵
41	216	4.32	43	93	1.86	0.65	59×10 ⁴
42	117	2.34	87	102	2.04	0.65	72×10 ⁴
43	283	5.66	61	173	3.46	0.80	95×10 ⁴
* 44	446	17.84	95	428	17.10	1.07	23×10 ⁵
**45	695	17.37	91	639	15.97	0.95	18×10 ⁵
46	38	0.76	48	32	0.64	0.65	52×10 ³
47	24	0.48	75	18	0.36	0.50	48×10 ³
48	215	4.30	94	202	4.04	0.91	44×10 ⁴
49	42	0.48	19	8	0.16	0.38	15×10 ³
50	57	1.14	45	26	0.52	0.66	38×10 ³
* 51	847	33.88	98	815	32.60	0.89	39×10 ⁵
52	253	5.06	97	248	4.96	0.65	10×10 ⁴
53	15	0.30	6	1	0.02	0.51	10×10 ³
54	255	5.10	92	235	4.70	1.13	7×10 ⁵
55	494	9.88	72	359	7.18	0.97	74×10 ⁴
56	415	8.30	90	383	7.66	0.78	65×10 ⁴
57	228	4.56	90	205	4.01	0.84	59×10 ⁴
58	20	0.40	55	11	0.22	0.34	3×10 ³

* : 25視野鏡検
** : 40視野鏡検

5. 喀痰の対照として, 均等なBCG菌液を1~0.1mg/mlに稀釈し, 濾紙で濾過して得た単弧菌菌液についても実験を行った。

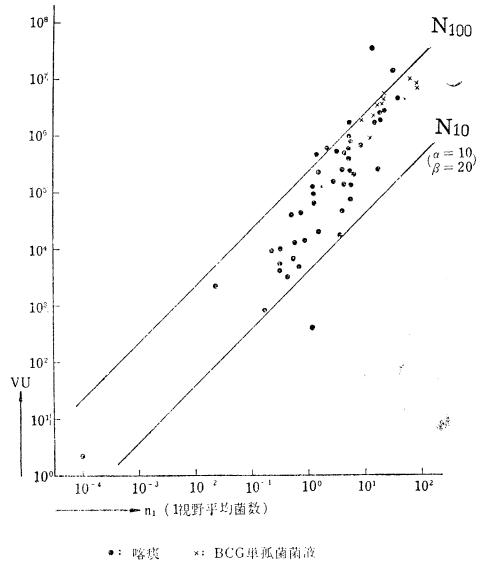
実験成績ならびに推定式の吟味

均等化した材料をそのまま実験に供した始めの30例の成績は表1-aの如く, 均等化後遠沈沈渣を再浮遊液とした後の28例の成績は表1-bの如くである。全視野鏡検により菌(-)でかつ培養陰性のものは, 前者4例, 後者になく, これらは非稀釈段階においても集落を生じなかつた。したがって, 培養された原液0.1ml中には増殖可能な菌を少なくとも含まないと推測される。また鏡検上10⁻²程度に菌を検出しながら, 培養陰性のものは前者に4例, 後者に1例あつた。これらは検査順位が近接していることや, 同一orderに菌を検出した他の例の成績との相違などからみて, 例えば薬剤の混入というような喀痰採取時の特殊な条件によるのかも知れない。そこで集落を生じなかつたこれら9例を除く49例について, 実測値を推定グラフにplotしてみた。

まず, 鏡検にて検出された菌のすべてが増殖可能な

と仮定すると, 前報告の推定式¹⁾ $N_{100} = 2 \cdot 10^5 \cdot n_1$ が適用されることになる。この式のn₁に10^p (p: -4~+2の整数)を与えれば, 1視野平均菌数のすべてを増殖可能なりと仮定する場合の上限値を示す直線がえられる。これに実測集落数をplotすると図1の如くである。

図1 1視野宛検出菌数のすべてを増殖可能と仮定した場合の集落数推定直線(N₁₀₀)に対する実測集落数の分布

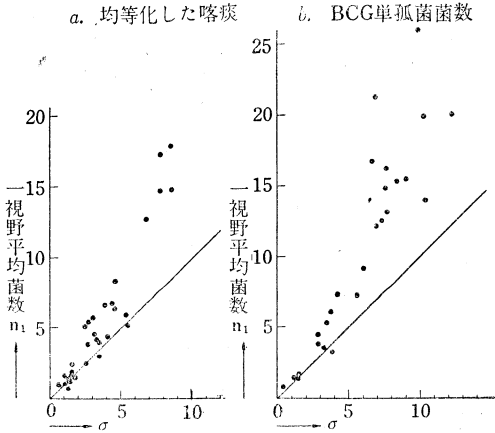


すなわち, 大多数例はN₁₀₀の直線の下方に分布し, ある菌数における集落数の開きはおよそ10²orderに近くなっている。この開きは, 推定式設定のために設けた仮定とは全く無関係で, 主として実測時の実験誤差に由来すると推定されるので, 諸条件について吟味してみる。

(1) 菌液の均等度: 各試料50視野鏡検検出菌数から1視野平均菌数および標準偏差を求めると図2-aの如く分布し, 偏差は意外に小さい。対照のBCG単弧菌菌液についてしらべると図2-bの如くである。すなわち, 前述の方法で均等化された喀痰中の結核菌の分布と, BCG単弧菌菌液の分布とは, 塗抹標本上においてほとんど相違がない。したがって菌液としての均等度にはほとんど差のないことが推測される。一般に, 肉眼的に均等な同一BCG菌液の同一量から生ずる集落数が10²orderの差を生ずることは全くありえないという幾多の事実から, 前記程度の均等度であれば, 集落数に与える変動はせいぜい2~3倍程であると考えられる。

次に, 各視野菌数の平方根を求め, 50視野における菌の分散をしらべると, 喀痰34例においては $\sigma = 0.76$ (平均) (表1-a, b), BCG単弧菌菌液25例においては $\sigma = 0.85$ (平均) であるから, 菌のバラツキは小さく, ほぼ2倍以内の変動と推定される。したがって, 実測集落数の分散に対してこれは大きな影響を与えるとは思わ

図2 単孤菌の分布



れない。

(2) 小川培地の培地差: 同一菌液を10本の小川培地に接種して、10例のBCG菌液について集落数の分散をしらべると次の如くである。各培地上の集落数の平方根をとり、これから $\hat{\sigma}$ を求めると、 $\hat{\sigma}=0.38\sim 0.98$, 平均0.72である。したがって、培地差に基づく集落数のバラツキもほぼ2倍程度と推測される。

(3) 実測集落数のバラツキに対しては、推定式は無関係である。しかし、実測値の分布に対して推定直線が上方に存在することは、推定式設定条件に何等かの修正を加える必要のあることを示すように思う。しかし推定式の諸要因のうち最も大きい影響があると思われる総視野数 $K = \frac{S}{s} = 10^4$ の算定に当つて、塗抹面積の半径に $\pm 1\text{ mm}$ の誤差があつたとしても、Kに与える開きは1.34~0.68程度であるから、直線の位置に多少の変更を加えるにすぎない。

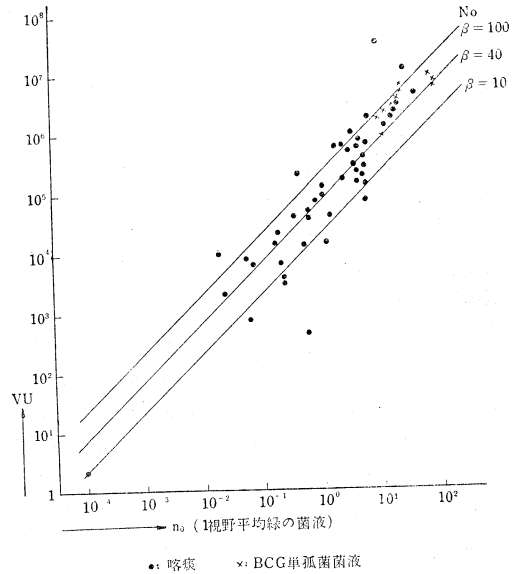
菌液中の菌の分散や、培地差の大きさを考えると、たとえそれらの最大値が組み合わさつたとしても、図1にみるような実測集落数の分布の幅の説明は困難であり、単なる実験誤差としてののみ片付けられないことがわかる。そこで別の要因を吟味してみよう。

前述した推定式および推定直線は、検出菌のすべてが増殖可能なりとの前提に立っている。しかし、塗抹陽性、培養陰性なる事実や、菌の分別染色と増殖との関係についてのわれわれの考察²⁾からすると、検出菌のすべてに増殖可能という平等な資格を仮定した点がまず問題にされなくてはならない。そこで、malachitegreen fuchsin法で緑にそめ分けられる菌のみを vitality を備えた菌と仮定すると、前報告の推定式 (3) $N = 20 \cdot \alpha \cdot \beta \cdot n_1$ から推定直線がえられる訳である。緑の菌数を n_0 とすれば、 $n_0 = \frac{n_1 \cdot \alpha}{100}$ であるから推定式 (1) に代入して $N_0 = 2 \cdot 10^5 \cdot n_0$ をうるが、このようにして態々緑にそまる菌の割合 (α) を計算する必要はない。標本から直接、緑にそまる菌数の1視野平均値 n_0 を計数すれば、横

軸 n_1 を n_0 に変えるのみで、図1と同じ直線がえられるわけである。この場合、推定式は $N_0 = 2 \cdot 10^5 \cdot \beta \cdot n_0$ となり、図3の最上部の直線 N_0 は $\beta = 100\%$ すなわち緑にそまる菌のすべてが増殖可能であると仮定した場合、すなわち上限値を与えることになる。

このグラフに実測値を plot すると図3の如くである。検出菌のうち緑にそまるもののみはすべて増殖可能とする仮説が正しいならば、実測値は N_0 の直線に沿って甚だ近く分布すべきであろう。図をみると図1の場合より

図3 緑に染まる菌のみを計数した場合の集落数推定直線 (N_0) に対する実測集落数の分布



も N_0 の直線に甚だ近く分布する例が著しく増加し、かつ実測値相互の開きが明らかに縮小されている。その開きは 10^1 orderか、それを僅かに越す程度にすぎない。これからみると、実測値の分布の説明としては、検出菌のある割合のみが増殖しうることを、すなわち、われわれの考察に基づけば、緑にそまる菌のみから増殖が行われるという仮定の下に、事実を一層よく説明しうる事がわかる。

前報告や図3の推定直線において、 β なる値を考えに入れた。これを仮に菌の reproducibility としたが、ここにいる reproducibility とは、菌自体の vitality に基づく分裂・増殖能力ある vitality を備えた菌を分裂・増殖せしめるに足る培地性能などを主として意味するもので、もし実測上実験誤差を全く含まぬと仮定すれば、集落数の分散は専ら β の大小によつて左右されることになる。そこで β に種々の値を入れて推定直線を平行移動すると、 $\beta = 40$ とした場合すなわち N_0 , $\beta = 40$ をほぼ分布の中央と見做すことができる。この分布からみれば、検出菌のすべてを増殖可能と考えずに、緑にそまる菌をま

ず選び出して、そのうちの増殖しうる割合を仮定する方が、実測値の分布を説明する上に都合がよいように思われる。

次に、グラフを用いて集落数を推定し、さらに適切な稀釈度を定める方法を述べる。

図1の場合には、 $N_{100} = 2 \cdot 10^5 \cdot n_1$ の直線は推定値の上限のみを示し、その下方に分布するものに対して分布の限界を示さない。そこで、検出菌数のすべて (n_1) を集落数推定への手懸りに用いるとして、そのうちの $\alpha_1\%$ が分裂能力を備え、さらに培地性能などによりそのうちの $\beta_1\%$ のみが増殖しうると仮定して $\alpha_1 = 10$, $\beta_1 = 20$ とおくと、発育の極度に悪い場合の下限の推定直線がえられる。図1に示したように、実測値のほとんどがこの2直線の間に分布する。そこで、Ziehl-Neelsen 法または Victoria blue 法で染色した標本をみる場合には1視野平均菌数 n_1 を求め、 n_1 に対する集落数を図1の2本の推定直線上に求める。上限値の直線から、2桁の集落数となるような稀釈度を定め、また集落数の少ない場合を予想して、下限値の直線から稀釈度の下限を定めこの2段階の稀釈度において培養を行えば、計数に適した集落数が期待できることになる。

しかし、図3のグラフを用いると推定は一層容易である。すなわち malachitegreen-fuchsin 染色で緑にそまる菌数 n_0 を計数し、これに相当する集落数を $N_{0, f=100}$ の直線上に求めて、これが計数に適した2桁の集落数となるような稀釈度を直ちに定めることができる。この場合前述のように実測値の分布が狭いことからみて、多くはこの一段階稀釈で事足りるが、集落の少ない場合もありうるので、万全を期する上からは、今一低い稀釈度をも培養しておけばよい。

かくて培養集落数の order が簡単に推定できるとなると、検出菌数の order さえわかれば、培養すべき稀釈段階の決定が、グラフを用いずとも可能となる。われわれの実験条件¹⁾における1視野平均菌数をその order に従って分類すると、全視野中1個 (10^{-4}) から1視野100 (10^2)個までの間を6段階に分けることができる。これを号数に表わせば次の表の如くである。この表は malachitegreen-fuchsin 法によつて緑にそまる菌の1視野平

均数 n_0 を計数する場合に適用される。もし通常の抗酸染色法で菌の計数を行う場合には、各号数とも、この表で指示される稀釈段階より一段低い段階をも培養する必要がある。例えばⅢ号の場合 n_0 が計数されたときには 10^2 および 10^3 稀釈であるが、 n_1 すなわち1視野中の全菌数が計数されたときは、 10^1 , 10^2 および 10^3 となる訳である。

したがつてこの号数を用いる上からは malachitegreen-fuchsin 染色による方が、手数を多少ながら省きうるので都合がよい。また、直接塗抹標本において長く慣用されている Gaffky 号数は、菌の定量的測定への手懸りとはなり難いものに対して、ここにわれわれの提案する号数は、菌の多寡を定量的に示すのみならず、計数し易い集落数をうるような稀釈段階をも直ちに示すことができるので、実際の使用には便利であると思う。

総 括

前報告に述べた集落数推定方法は実際に当つて煩鎖なところから、グラフを用いて推定法の簡易化を図ると共に、実測集落数をこれに plot して、推定方法の当否に吟味を加えた。推定式 (1), (3) による2つのグラフのいずれも集落数推定に役立つが、malachitegreen-fuchsin 染色によつて増殖可能と思われる菌数を直接計数し、図3のグラフによつて推定値を定める方が一層適切である。前述したように、図1において培養条件による実験誤差からは説明し難い程度の大きな分散を示した実測値が、viable とと思われる菌数 n_0 を定めたことによつて図3に見るように、実験誤差の程度にまでその分散を縮めえたことをみると、malachitegreen-fuchsin 染色の意義が、この事実によつてある程度説明されたと考えてよいであろう。また、推定式に菌の reproducibility なる観念を用いたが、それは毎常観察している単孤菌の Slide culture において、現在の培地条件や培養技術における限り、必ずしもすべての菌が macrocolony を生じえず、またたとえこれを生じて、macrocolony にまでは必ずしも増殖しえない事実に基づいて、われわれに未知な因子による発育の不可能性を考慮したが故である。これを単に実験誤差と見做して了解することもできようが、必ずしもすべての単孤菌が viable でありさらに reproducible であるという観念は妥当でないことを念頭におく必要であろう。

以上述べたところから、われわれの推定方法によつて喀痰中の生菌数、したがつて培養して発生するであろう集落数を著しい誤りなしに推定しうるとすれば、結核菌菌数の消長を定量的に追求することを容易ならしめ、培養に伴う労力や資材を著しく節約せしめる意味で、実際に利するところがあるであろう。さらに重要な意義は、従来定性的方法としてのみ用いられてきた塗抹染色方法

1 視野平均菌数 n_0	号数	適切な集落数をうるための稀釈段階
$10^{-4} \sim 10^{-3}$ (全視野) 1 ~ 10	I	$10^0 \sim 10^1$
$10^{-3} \sim 10^{-2}$	II	$10^1 \sim 10^2$
$10^{-2} \sim 10^{-1}$	III	$10^2 \sim 10^3$
$10^{-1} \sim 10^0$	IV	$10^3 \sim 10^4$
$10^0 \sim 10^1$	V	$10^4 \sim 10^5$
$10^1 \sim 10^2$	VI	$10^5 \sim 10^6$
$10^2 \rightarrow$	VII	$10^6 \sim$

を定量化しえたという点にあると思う。

われわれの実験に関する限り、推定値が実測値とよく近似した点からみて、推定方式に大きな誤りのないことが考えられるが、さらにこの方法による推定集落数の信頼区間や、計数すべき視野数の限度などについて、推計学的検討を加える必要があると思う。これについては改めて報告する予定である。

なお、喀痰の均等化方法は、菌の分散からみると、アルカリを加えて機械的に homogenize する前記の方法で実際的には充分であり、必ずしも遠沈を必要としないように思う。

結 論

均等化された喀痰の塗抹標本からの1視野平均検出菌数に基づいて培養集落数を推定し、進んで、計数に適した集落数をうるような稀積度を定める方法を、推定式から導かれた推定用グラフを用いて簡易化しようと企てた。喀痰およびBCG単菌菌液についてえた実測値をグラフにplotすると、大多数はその推定直線の近くに分布するので、このグラフによつて集落数を推定し、適切

な培養稀積度を定めることが極めて容易にできることが判つた。この事実に基づき、1視野検出平均菌数のorderをI—VII号の7段階に区分し、グラフを用いるよりも一層簡便に、適切な稀積段階を定める方法を提案した。

菌検出に当つて、通常の抗酸性染色を用いるよりも、malachitegreen-fuchsin染色を用いる方が、爾後の集落数推定に対しては便利が多い。

欄筆に臨み御校閲戴いた柳沢部長、喀痰を多数御世話下さつた社会保険中央病院石原房雄博士、有益な御助言を戴いた労働衛生研究所興重治博士に深く感謝する。

文 献

- 1) 室橋豊穂・吉田幸之助：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について、結核, 33 (2), 95~98, 1958.
- 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号, 160—172, 1957.