

1% 小川培地と渦巻白金耳接種を用いる結核菌検査法

第3報 喀痰についての検討

東 村 道 雄

国立療養所大府荘

受付 昭和34年12月26日

結 言

臨床的ならびに基礎的実験に今日一般に使用されている結核菌生菌数の測定法は、(1) 喀痰をアルカリ処理して3% 小川培地にピベットで0.1 ml 接種する方法、または(2) 一たん小川培地に発育した結核菌集落から菌液を作つて同じくピベットで0.1 ml を1% 小川培地に接種する方法である¹⁾。しかし、この方法では接種量が0.1 ml であるために、そのまま試験管(培地)を立てると菌液が流れてしまうので、1夜放置して菌液を蒸発させてからゴム栓をしておす面倒がある。この面倒をなくすためにわれわれは1 白金耳 0.02 ml の渦巻白金耳で菌液をとつて培地面に接種し、ただちにゴム栓をして培養する方法(渦巻白金耳接種法)²⁾を提唱した。(注:ただちに試験管を立てて培養する方法は卵培地との組合せでのみ可能である。これは卵培地と菌液との吸着力が比較的強いためであつて、寒天培地では0.02 ml を万遍に塗布したとしても、菌液と培地の吸着力が弱いので、立てると流れる可能性が多い。)われわれはさらに全実験を1% 小川培地(pH 6.8 で中性に近い)で行なうことを渦巻白金耳接種と組合せて提唱した^{2) 3)}。

われわれの渦巻白金耳(接種)法とメスピベット(接種)法とを比較した場合の懸念は、渦巻白金耳法では接種量が少ないために検出率が劣るのではないかということであつた。しかしその後両者の比較実験を行なつたところ、渦巻白金耳法の検出率がピベット法にほぼ匹敵する成績を示すことを知つたので報告する。

実験成績ならびに考察

既述²⁾のごとくふつふの中試験管(170×17~18 mm)を用いるときは、培地分注量5 ml の成績は培地分注量8 ml の場合よりも有意差を示して劣るので、本実験では1% 小川培地、3% 小川培地ともに8 ml 分注とし、90°C 60分滅菌して斜面とした。また結核菌材料としては全実験を通じて肺結核患者喀痰を用いた。

(1) 生菌数(単位)測定誤差——1% 小川培地、渦巻白金耳(0.02 ml)接種法と3% 小川培地、メスピベット(0.1 ml)接種法との比較

集落数測定にさいいて「測定誤差」が大であれば、すなわち集落数測定にさいいて個々の培地の集落数間の変動が大であれば、標準偏差が大となり、小であれば標準偏差が小となる。そこで標準偏差の大きさを集落数平均値から indifferent にして比較するために、% 標準偏差{(標準偏差)÷(集落数平均値)}×100%を算出して測定誤差を示した。測定誤差が大であれば%は大となり、小であれば%も小となる。

表1 1%小川培地、渦巻白金耳(0.02 ml)接種法と3%小川培地、メスピベット(0.1 ml)接種法との生菌数(単位)測定誤差の比較*

実験	1% 小川培地, 渦巻白金耳接種		3% 小川培地, メスピベット接種	
	集落数*	変異係数‡	集落数*	変異係数‡
1	78.2 ± 13.5	17.3 %	197.7 ± 56.9	28.7 %
2	31.8 ± 8.62	27.1 %	54.8 ± 20.7	37.7 %
3	10.1 ± 3.55	35.2 %	21.8 ± 5.25	24.1 %
	変異係数平均値(26.5 ± 8.97)%		変異係数平均値(30.2 ± 6.81)%	

* (培地20本の平均値) ± (標準偏差)

‡ 変異係数 = 標準偏差 ÷ (標準偏差) ÷ (集落数平均値) × 100%

1% 小川培地、渦巻白金耳法では喀痰に等量の5% KOH 加、3% 小川培地、メスピベット法では喀痰に等量の8% NaOH 加15分間パンピングした。集落数算定は6週後。

実験結果は表1のごとくであつた。すなわち測定誤差の点では両者に有意の差はなかつたが、渦巻白金耳法のほうがピベット法よりも誤差が少ない傾向を示した。

(表1に示すごとく、集落数は一般にピベット法のほうが多かつたので、もともと測定誤差の点では有利であるはずであつた。にもかかわらず実測測定誤差は逆にピベット法のほうが大きい値を示した。したがつて、測定誤差は渦巻白金耳法のほうが少ない可能性が多い。)

(2) 結核菌検出率——1% 小川培地、渦巻白金耳(0.02 ml)接種法と3% 小川培地、メスピベット(0.1 ml)接種法との比較

患者喀痰59例について比較したが、結果は表2のとおりで両者に有意の差はなかつた。しかし検出率はピベット法のほうが高い傾向を示した。これはやはり0.02

表 2 1%小川培地, 渦巻白金耳 (0.02 ml) 接種法と3%小川培地, メスビベット (0.1 ml) 接種法との結核菌検出率の比較*

	培養(+)	培養(-)	陽 性 率 *
1%小川培地, 渦巻白金耳	47 例	12 例	79.7 % (47/59)
3%小川培地, メスビベット	51 例	8 例	86.3 % (51/59)

* χ^2 -test, 危険率 25 % でも有意の差なし。

‡ 患者 59 例 (過去に培養陽性であったもののみ) について比較した。喀痰に等量の 8 % NaOH を加えて 15~20 分間パンピングした。判定は 6 週後。

ml 接種と 0.1 ml 接種との接種量の差に起因するものであろうが、問題は、ビベット法の場合に 5 倍の接種量を用いたにもかかわらず、検出率が有意の差を示さなかったことであつて (危険率 25 % でも有意差なし)、これはビベット法では集落数算定の過少評価が起つていことを考えさせる。

この理由としては、ビベット接種では、接種量が培地面に比較して過大であるため、培地周囲の試験管壁に付着 (吸着) したり、菌の集合を起こしたりすることが考えられる。これに対して、渦巻白金耳接種では管壁に付着させることなく培地面に一樣に塗抹するのであるから、菌の集合も起こりがたいし、もちろん試験管壁への吸着も起こらない。またビベット自身に吸着される結核菌のほうが渦巻白金耳に吸着されるものより多いことも考えられる。

以上の結果から考えられることは、ビベット法では実際に 0.1 ml 中に含まれる結核菌生菌数よりも小さい値を数えていることであつて、ビベット法の欠点として、生菌数算定値を過小評価する危険性が多いことが指摘される。

(3) 1%小川培地使用のさいの渦巻白金耳 (0.02 ml) 接種法とメスビベット (0.1 ml) 接種法との比較

(a) 結核菌検出率の比較

表 3 1%小川培地 使用時における 渦巻白金耳 (0.02 ml) 接種法とメスビベット (0.1 ml) 接種法との結核菌検出率の比較*

	培養(+)	培養(-)	陽 性 率
1%小川培地, 渦巻白金耳	85 例	337 例	20.1 % (85/422)
1%小川培地, メスビベット	76 例	346 例	18.0 % (76/422)

* χ^2 -test, 有意の差なし (50% > P > 25%)

‡ 患者 422 例で比較した。喀痰に等量の 5 % KOH を加えて均一化した。判定は 6 週後。

全実験を 1%小川培地で行なうという提案は小川 (政敏) 4) により昭和 30 年 11 月に行なわれ、われわれも同年から全検査を 1%小川培地使用に変え、同時

に渦巻白金耳接種を実施して今日にいたつている。1%小川培地使用のさいの喀痰の処理は、はじめわれわれは 8 % NaOH 等量を用いたが、のち小川 (政敏) に従つて 5 % KOH 等量に変えた。

1%小川培地使用のさいの渦巻白金耳法とビベット法の比較成績は表 3 のとおりで、結核菌検出率では両者に差がなく、むしろ意外にも渦巻白金耳法のほうが高い傾向を示した。これは 1%小川培地使用のさいには、小川 (政敏) 原法の 0.1 ml 接種ではアルカリを十分中和しきれないことを暗示している。

(b) 発育量または集落数の比較

表 4 1%小川培地 使用時における 渦巻白金耳 (0.02 ml) 接種法とメスビベット (0.1 ml) 接種法との発育量または集落数の比較*

例数	喀 痰 稀 釈 度			
	10 ⁰	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
渦 巻 > ビ ベ ヲ ヲ ヲ	3 例	17 例	13 例	31 例
渦 巻 = ビ ベ ヲ ヲ ヲ	56	18	0	4
渦 巻 < ビ ベ ヲ ヲ ヲ	6	28	44	25
計	65	63	57	60

* 培養陽性例についてのみ比較した。喀痰に等量の 5 % KOH を加えて 15 分間パンピングしたのち、生理的食塩水で稀釈し、同一稀釈液から渦巻白金耳 (0.02 ml) またはメスビベット (0.1 ml) で 1%小川培地に接種した。集落数算定は 6 週後。

表 5 1%小川培地 使用時における 渦巻白金耳 (0.02 ml) 接種法とメスビベット (0.1 ml) 接種法との発育集落数の比較*

稀 釈 度	集 落 数 総 和		判 定
	渦巻白金耳 接種	メスビベット 接種	
10 ⁻²	2,690	2,861	<
10 ⁻³	2,114	2,398	<
10 ⁻⁴	1,042	913	>

* 表 4 と同一例。患者 65 例の喀痰について分離集落を与えたものについて集落数を総計した。10⁻²液接種時には 19 例に集落融合がみられたので、これを除いて 46 例について総計した。

喀痰液を種々の濃度に稀釈して、渦巻白金耳法とビベット法との発育量または集落数の比較を行なうと、やはり 0.1 ml 接種のビベット法のほうが 0.02 ml 接種の渦巻白金耳法よりも発育量または集落数が大きい傾向を示した。しかし、その差は表 4, 5 に示すごとく意外にも僅少の範囲にとどまった。しかも喀痰中の結核菌数が少ない場合には渦巻白金耳のほうがむしろ集落数が大きいという意外な結果になつた。しかし、このような現象は、1%小川培地、渦巻白金耳法と 3%小川培地、ビベット法の比較の場合 (表 2 の実験) にはみられなかつた。したがつて、この現象の原因は、0.1 ml をビベットで接種する場合には 1%小川培地では中和不足

であるためであることを暗示すると思われる。同時にいうことは、1% 小川培地使用のさいには小川(政敏)原法⁴⁾のごとく0.1 ml をピペットで接種するよりは、渦巻白金耳で0.02 ml を接種するほうが合理的であるということである。

以上から次のごとく結論されよう。

結 論

1) 1% 小川培地、渦巻白金耳(0.02 ml)接種法は3% 小川培地、メスピペット(0.1 ml)接種法と比較して、喀痰中結核菌検出率に有意の差がなく、また生菌数(単位)測定誤差にも有意の差がない。(検出率ではやや劣る傾向が暗示されたが、測定誤差ではやや勝る傾向が暗示された。)

2) 中試験管分注の小川培地使用時、メスピペットで0.1 ml 接種すると、おそらく培地周囲の試験管壁への菌の吸着と培地上で起こる菌の集合とから、実際より過少な生菌数測定値が与えられると考えられる。このことは、渦巻白金耳接種法が0.02 ml 接種を用いるにもかかわらず、0.1 ml 接種のメスピペット法に比較して、検出率に有意の差がなく、集落数においても僅少の差しか示さないことから想像される。

3) 1% 小川培地を用いるさいに、渦巻白金耳(0.02 ml)接種とメスピペット(0.1 ml)接種の間に、結核菌検出率に有意の差はない。しかし発育量ないし集落数

は後者のほうが一般に多い傾向を示したが、喀痰中菌数が少ない場合には前者のほうがかえって多い傾向を示した。

4) 渦巻白金耳接種法では接種後ただちにゴム栓をして試験管を立てて孵卵器に格納しうる。メスピペット接種法のごとく培地を乾かせてからゴム栓をする面倒がない。また渦巻白金耳は焼灼滅菌によりただちに次々と使用しうる利点もある。

御校閲を賜わった国立療養所大府荘長勝沼六郎博士ならびに名古屋大学日比野進教授に感謝の意を表す。また本実験は当荘検査室河西栄文氏の協力によるものである。ここに感謝の意を表す。

文 献

- 1) 小川辰次・佐波薫：結核，24：13，昭24；
小川辰次：結核，24：19，昭24；
小川辰次・佐波薫・鈴木つき：結核，25：207，昭25。
- 2) 東村道雄・野田用：結核，32：639，昭32；
東村道雄・野田用・中村栄一：結核，33：43，昭33。
- 3) 東村道雄：医学と生物学，49(2)：87，昭33。
- 4) 小川政敏：厚生省医務局研究発表会，昭和30年11月(医療，10(増刊号)：105，昭31)。