

結核化学療法時代の塗抹陽性喀痰のガフキー号数と集落数，ならびにわれわれの定量培養法によつて計算できる集落数を得ることに成功した率

小 川 辰 次・大 谷 典 子

北里研究所附属病院 (院長 福住定吉)

受 付 昭 和 37 年 4 月 21 日

I 緒 論

われわれ¹⁾は化学療法の行なわれていなくなつた 1951 年に喀痰のガフキー号数と発育する集落数について，また塗抹陽性の喀痰をガフキー号数によつて所定のように希釈し，所定の 3 段階を定量培養法により接種すれば，大部分の例において計算できる集落数を得ることができると発表した。結核症に対する化学療法の広く行なわれている昨今では，塗抹陽性のものでも培養陰性のものが増加しているし，培養陽性のものであつても集落数が少ない等のことは認められているが，ガフキー号数と集落数の関係，および計算できる集落数を得るための希釈倍数と接種段階についての研究はなされていない。それでわれわれは，化学療法時代の塗抹陽性の喀痰を用いて，前述の点を追及し，さらに，これらの成績と化学療法以前の成績と比較検討した。

なおこの実験は最初から前述の目的のために行なわれたものではなくて，われわれが試作した寒天培地の検討のために標準培地として使用した 3 % 小川培地の成績を集めたものである。

II 実験方法

① 対 象：入院中の肺結核症患者の喀痰であつて，化学療法の行なわれたものか，化学療法中のものが大部分であつて，SM, PAS, INH 等に対して耐性を示すものが多かつた。喀痰の採取前日は化学療法剤の投与を中止した。例数は 1958 年 6 月より 1960 年 6 月までの 86 例，1960 年 8 月より 1961 年 10 月までの 233 例，合計 319 例で，ガフキー号数と集落数の研究には 319 例の全例を使用した，計算できる集落数と希釈倍数および接種段階の研究には，後者の 233 例を使用した。

② 塗抹染色および培養の方法：まず採取した喀痰の膿様の部分を載せガラスに塗抹して Ziehl-Neelsen 法で染色，鏡検し，型のごとくガフキー号数を決め，次に喀痰に 4 % NaOH を加えてガフキー 1 号～3 号までは 10^1 , 10^2 , 10^3 倍，4 号～6 号まではさらに 10^4 倍，7 号以上はさらに 10^5 倍希釈して，1 号～3 号は 10^1 , 10^2 , 10^3 倍希釈を，4 号～6 号は 10^2 , 10^3 , 10^4 倍希釈を，7 号以上は 10^3 , 10^4 , 10^5 倍希釈の各 3 段階の所を 3 % 小川培地 2～3 本宛にメスピペットにより 0.1 cc 接種した。なおピペットは希釈ごとに変えた。そして 37°C の孵卵器に培養し，1 週ごとに観察して，大部分は 1 カ月，発育の遅れたものは 2 カ月後に，発育した集落数の平均値を求めた。

③ 判 定：接種した 3 段階の中で，集落のもつとも多く数えることのできる希釈段階より逆算して 1 cc 中の集落数を出し，集落数を表 1 のように区分して，ガフキー号数と発育した集落数の分布の状態を観察した。それとともに，前述の 3 段階の接種により 10～200 集落までのいわゆる計算できる集落数の得られた率を計算した。また 2 段階，1 段階の接種のときの成功率をみた。

次に化学療法時代における上述の方法によつて得た成績を，化学療法以前の成績と比較した。

III 成 績

① 化学療法時代のガフキー号数と集落数

表 1 でみるように，所定の希釈倍数の接種で，集落の数えられなかつたものが 8 例，また 10^2 倍以上の希釈の接種で全然集落の発育しなかつたものが 8 例あるので，一応これらはこの表の数から除いたが，これらを前者は計算できた数のさらに 10 倍多い集落数と仮定し，集落の発育しなかつたものは，数えられたものの 1/10 少ないものと仮定して，それぞれの項に含ませて

Table 1. Gaffky Scale and the Number of Colonies in the Pre-chemotherapeutic and Chemotherapeutic Eras

Gaffky scale \ No. of colonies	0	$\sim 10^2$	$\sim 10^3$	$\sim 10^4$	$\sim 10^5$	$\sim 10^6$	$\sim 10^7$	$\sim 10^8$	$\sim 10^9$	$\sim 10^{10}$	Total
I	6 (2)	3	5 (3)	7 (7)	3 (8)	(4)	(1)				24 (25)
II	9	4	8 (2)	17 (4)	12 (4)	1 (8)	(2)				51 (20)
III	3	3	4 (2)	12 (2)	9 (3)	2 (4)	(3) (2)	(1)			33 (14)
IV			4	6 (3)	19 (6)	14 (7)	(1) (1)				43 (17)
V		(1)	3	8 (1)	12 (3)	14 (7)	3 (2) (1)	(2)			40 (15)
VI		(4) 1	2	6 (1)	15 (2)	19 (9)	2 (5) (2)	(2)			45 (19)
VII		(3)	1	3	5 (1)	26 (2)	14 (11) (1)	(6)	(4)		49 (24)
VIII				1	4	17 (2)	5 (6)	(9)	(1)		27 (18)
IX					1	1 (1)	1 (2)	(8)	(2)	(1)	3 (14)
X						2	1 (5)	(9)	(3)	(1)	3 (18)
Total	(18) (2)	11	27 (7)	60 (13)	80 (27)	96 (44)	26 (37)	(37)	(10)	(2)	318 (184)

Note: 1. Figures indicate the number of cases.

2. Figures in the circle show the results obtained in the pre-chemotherapeutic era and those without circle the corresponding results in the chemotherapeutic era.

3. Figures in the parentheses in the columns of 10^7 and 10^8 indicate the number of cases in which colonies could not be counted by the arranged dilution method. Those in the column of 10^2 indicate the number of cases with no growth by the dilution method.

みた。この表をみると、ガフキー号数の高くなるに従って、集落数の多い例が次第にふえているが、同じガフキー号数でもかなりの幅に分布している。そして1号～3号、4号～6号、7号～8号は、ほとんど同じような分布を示しているが、9号、10号は例数が少ないので傾向は分からない。

② 集落計算に成功した率

a. 現在行なっている段階接種

3段階接種の成功率は表2のようであつて、1号～3号で約70%、4号～6号で約80%、7号以上で約90%であつて、ガフキー号数の高くなるにつれて成功率は増してくる。これを平均すると、78.2%である。

b. 2段階接種

表3にみるようであつて、この場合に表のように接種の段階を稀釈の低いほうと高いほうとの2種類にして計算してみると、1号～3号で約40～60%、4号～6号で約45～65%、7号以上では約70%であつて、低いほうをとつても、高いほうをとつてもガフキー号数の高くなるにつれて成功率は増えてくるが、3段階の接種に比して成功率は約20%の減少である。

c. 1段階接種

稀釈のすべての段階について検討した。成績は表4のようであつて、もつとも成功率の多い所をとつてみると、1号～3号では 10^2 倍稀釈で30%～40%、4号～6号では 10^3 倍稀釈で35%～45%、7号以上は 10^4 倍稀釈で50%～60%であつて、ガフキー号数の高くなるにつれて成功率の増すことは前同様であ

る。9号、10号は例数が少ないのではつきりしない。このもつとも多い成功率を2段階接種の場合に比較すると、約20%の減少である。

③ 化学療法以前の成績との比較

われわれの得たガフキー号数と集落数の成績を、同様の方法で実施された化学療法以前の成績と比較すると、表1でみるように一見して集落数が著明に減少していることが目につく。すなわち集落のもつとも多い所をみると、化学療法時代では 10^7 どまりであるのに反して、化学療法以前では、 10^9 、 10^{10} である。また集落のもつと

Table 2. Rate of Success in Obtaining Countable Number of Colonies by a Three-step Dilution Method

Gaffky scale	Dilution for inoculation	Number of cases tested	Number of cases with countable colonies (%)
I	10 ¹ , 10 ² , 10 ³	20	13 (65.0)
II		38	26 (68.4)
III		29	20 (69.0)
IV	10 ² , 10 ³ , 10 ⁴	35	28 (80.0)
V		29	25 (86.3)
IV		42	33 (78.6)
VII	10 ³ , 10 ⁴ , 10 ⁵	37	33 (89.2)
VIII		15	13 (86.7)
IX		2	2
X		1	1
Total		248	194 (78.2)

Table 3. Rate of Success in Obtaining Countable Number of Colonies by a Two-step Dilution Method

Gaffky scale	Number of cases tested	Dilution for inoculation	Number of cases with countable colonies (%)	Dilution for inoculation	Number of cases with countable colonies (%)
I	20	10 ¹ , 10 ²	8 (40.0)	10 ² , 10 ³	11 (55.0)
II	38		18 (47.4)		20 (52.6)
III	29		14 (48.3)		18 (62.1)
IV	35	10 ² , 10 ³	20 (57.1)	10 ³ , 10 ⁴	23 (65.7)
V	29		18 (62.1)		19 (65.5)
VI	42		19 (45.2)		28 (66.7)
VII	37	10 ³ , 10 ⁴	27 (73.0)	10 ⁴ , 10 ⁵	27 (73.0)
VIII	15		10 (66.7)		11 (73.3)
IX	2		2		1
X	1		0		1

Table 4. Rate of Success in Obtaining Countable Number of Colonies by a One-step Dilution Method

Gaffky scale	Number of cases tested	Dilution for inoculation	Number of cases with countable colonies (%)	Dilution for inoculation	Number of cases with countable colonies (%)	Dilution for inoculation	Number of cases with countable colonies (%)
I	20	10 ¹	4 (20.0)	10 ²	6 (30.0)	10 ³	5 (25.0)
II	38		7 (18.4)		12 (31.6)		8 (21.1)
III	29		4 (13.8)		12 (41.4)		7 (24.1)
IV	35	10 ²	7 (20.0)	10 ³	15 (42.9)	10 ⁴	12 (34.3)
V	29		5 (17.2)		13 (44.8)		11 (37.9)
VI	42		5 (11.9)		15 (35.7)		17 (40.5)
VII	37	10 ³	7 (18.9)	10 ⁴	21 (56.8)	10 ⁵	9 (24.3)
VIII	15		2 (13.3)		8 (53.3)		5 (33.3)
IX	2		1		1		2
X	1		0		1		1

も少ない所を比較してみると、化学療法下では零であるのに、化学療法以前ではガフキー 2 号の零の 2 例を除けば 10³ である。かつ培養陽性のものが化学療法時代に多い。

次に計算できる集落を得ることに成功した率であるが、化学療法以前では、ガフキー 1 号～3 号は 10¹～10³ 倍希釈、4 号は 10²～10⁴ 倍希釈、5 号～6 号は 10³～10⁵ 倍希釈、7 号以上は 10⁴～10⁶ 倍希釈の各 3 段階と接種することにより、大部分の例において計算できる集落を得ることに成功した。化学療法の広く行なわれている現在では、前の成績をみても分かるように集落数が減っているの、ほぼ 1 段階ずつ希釈を下げた所の 3 段階を接種したのであるが、成功率は平均 78.2 % にすぎなかった。

IV 総括および考察

4 % NaOH の前処理によつて、略痰中の結核菌はあ

る程度殺されるし、その殺される程度も菌株によつて異なると思われるので、発育した集落数そのままがガフキー号数の集落を代表するものではない。今 4 % NaOH によつて集落数が 1/10 に減少すると仮定すれば、その分布図は、前述の分布図を 1 桁、数の多い右の項にずらしたものとなる。しかし比較の問題ならそのままでもよいと思われるので、発育した集落数をそのまま使用して論じてきた。この分布図で特徴的なことは、かなりの幅のあることである。この点は化学療法以前の成績も全く同様である。この事実は、ガフキー号数を決めるときに均等化した略痰を用いないで、通常検査のときと同様に、一部の単純塗抹によつたことや、略痰中の結核菌の 4 % NaOH に堪える力が菌株によつて様々であることがその主因をなしているものと思われる。次にわれわれは、化学療法下では、塗抹陽性の略痰の集落数は、化学療法のなかった時代のものに比してかなり少ないことを認めたが、この成績は、前に発表したわれわれ²⁾の成績をさ

らに裏書きするものであつて、また本田³⁾の成績とも全く符号する。塗抹陽性喀痰中の集落数をはつきりつかむことは、単に臨床のうえだけではなくて、実験室の研究においても必要である。われわれは、このようなときに、以前から喀痰を段階稀釈してその2, 3段階と接種する定量培養法を実施しているが、前述のように以前には3段階の接種でほとんど計算できる集落を得ることに成功したが、化学療法下の現在ではさらに注意した3段階の接種をしたのであるがほぼ80%の成功を示す程度であることが分かった。これをさらに成功させるためには、4段階あるいは5段階を接種する必要があるが、塗抹陽性、培養陰性のものが多いから、このような接種を行なつても、ある程度の失敗は覚悟しなければならないだろう。次に2段階の接種では3段階の接種に比べて約20%成功率が減るし、1段階の接種では、さらに20%程度の成功率の低下がみられる。以上の成績から推定すると、小酒井ら⁴⁾のガフキー1号～3号では 4×10^2 あるいは 10^3 倍稀釈、4号～8号では 4×10^3 あるいは 10^4 倍、9号以上は 4×10^4 倍稀釈のような1段階接種では成功率は少なく、東村⁵⁾のガフキー号数の如何にかかわらず2倍、 2×10^2 倍、 2×10^3 倍の稀釈の3段階を渦巻白金耳で接種する方法でも、100%数えることのできる集落数を得ることに成功するとは思われない。

V 結 論

化学療法時代の1958年～1961年において319例の塗抹陽性の喀痰を、そのガフキー号数に応じて4% NaOHで種々の段階に稀釈し、ガフキー1号～3号は $10^1 \sim 10^3$ 倍、4号～6号は $10^2 \sim 10^4$ 倍、7号以上は $10^3 \sim 10^5$ 倍稀釈の各3段階を0.1 cc宛3%小川倍地に接種し、集落の数えることのできる稀釈段階より逆

算して1 cc中の集落数を決め、ガフキー号数と集落数の関係を求めるとともに、それをほぼ同様の方法で実施した化学療法以前の1951年の成績と比較した。

次に以上のような3稀釈段階を接種した248例の成績から、計算できる集落数を得ることに成功した率、さらに2段階の接種、1段階の接種によつての成功率を求め、次のような成績を得た。

1) いずれのガフキー号数においても、その分布は広く、1号では $0 \sim 10^5$ 、2号、3号では $0 \sim 10^6$ 、4号では $10^3 \sim 10^6$ 、5号では $10^3 \sim 10^7$ 、6号では $10^2 \sim 10^7$ 、8号では $10^3 \sim 10^7$ の集落数の分布であつて、ガフキー号数の高くなるとともに、集落数の多いものが増してくる。9号、10号は例数が少ないので成績の検討から除外した。

2) 化学療法時代の塗抹陽性の喀痰の集落数は、化学療法以前のものに比べてかなり少なく、また塗抹陽性、培養陰性のものが多かつた。

3) 計算できる集落数を得ることに成功した率は、3段階の接種でガフキー1号～3号で約70%、4号～6号で約80%、7号以上は約90%であつた。そして2段階の接種では3段階の接種に比して約20%、1段階だけの接種では、2段階よりもさらに約20%の成功率の減少が認められた。

文 献

- 1) 小川：結核菌検索の基礎と応用、保健同人社発行、122, 昭26.
- 2) 小川：日本医事新報、4297: 1754, 昭25.
- 3) 本田：結核、34: 830, 昭34.
- 4) 小酒井他：臨床病理、1: 33, 昭28.
- 5) 東村：衛生検査、9: 40, 昭35.

Relation between Gaffky Scale and the Number of Colonies in the Tuberculosis Chemotherapeutic Era, and Chances of Success in Obtaining Countable Number of Colonies by Quantitative Culture Methods

During the tuberculosis chemotherapeutic era from 1958 to 1961, 319 sputa with positive smears were diluted serially with 4% NaOH according to their Gaffky scale, namely 10^1 , 10^2 and 10^3 dilutions for the sputa with Gaffky No. 1, 2, and 3, 10^2 , 10^3 and 10^4 dilutions for No. 4, 5 and 6, and 10^3 , 10^4 and 10^5 dilutions for above No. 7. One

tenth cubic centimeter each of diluted sputa was inoculated on the 3% Ogawa egg media, then the number of colonies per c.c. of sputum was determined by counting backward from the gradation of dilution with which one could enumerate colonies. The relation between Gaffky scale and the number of colonies was studied and the results were compared with those obtained in 1951 during the pre-chemotherapeutic era.

The rate of success in enumerating colonies by a three-step dilution method applied to 248 cases was calculated, and also the corresponding rates

by two-step and one-step dilution methods, were obtained, with the following results.

1. In any Gaffky number, there was wide distribution of the number of colonies: 0 to 10^5 colonies in Gaffky No.1 sputum, 0 to 10^6 in No.2 and 3, 10^3 to 10^6 in No.4, 10^3 to 10^7 in No.5, 10^2 to 10^7 in No.6 and 10^3 to 10^7 in No.8. In general, the number of colonies increased with increasing Gaffky number. Because of a small number of cases available with Gaffky No. 9 and 10, they were excluded from evaluating the results.

2. The number of colonies obtained from the sputum with positive smears during the chemotherapeutic era was smaller than that in the

pre-chemotherapeutic era. And the sputum with positive smears and negative cultures were more frequently encountered in the former group than the latter.

3. The rate of success in enumerating the colonies by the three-step dilution method was about 70 % in Gaffky No. 1 to 3, about 80 % in No. 4 to 6 and about 90 % in higher Gaffky scale. By the two-step dilution method, the corresponding rate decreased by 20 % of that by the former method, and this rate decreased further by 20 % when one-step dilution method was applied.