

渦巻白金耳接種による喀痰中結核菌の定量培養法

東村道雄・東村純雄

国立療養所大府荘（荘長 勝沼六助）

名古屋大学医学部日比野内科教室（教授 日比野進）

受付 昭和 37 年 11 月 12 日

最近、小川、大谷¹⁾は彼らの方法により喀痰中結核菌の定量培養を行なつて、喀痰単位容積 (*ml*) 中の結核菌生菌数が、化学療法時代ではそれ以前の時代に比較して減少しているという興味ある結果を発表した。しかしながら、その報告に示された定量培養の成功率は三段階希釈法をもつてしても平均 78%にとどまり、あまりよい成功率ではない。一方、われわれは耐性菌含有率を定量的に測定する目的で、昭和30年から定量培養を開始し^{3)~5)}、昭和33年にいわゆる“actual count法”なる三段階接種法⁶⁾⁷⁾（ただし希釈方法が小川らの方法と異なる）を発表し、これをほぼ完成した方法として今日まで実用に供している⁸⁾⁹⁾。われわれの方法⁶⁾⁷⁾の成功率は小川ら¹⁾の方法に比してはるかに高く 98%に達するので、その成績を紹介するとともに、成功の原因について考察を加えたい。

実験方法

(1) 対象

国立療養所大府荘入院中の患者を検査対象とした。採痰当日は化学療法を中止して、24時間痰を目盛りつきコップに集痰した。これは1日排菌数（生菌単位）を測定するためである。検査は昭和30年から37年の7年間にわたり2,000例以上について行なつたが、全例を統計対象としても意義が少ないと思われるので、昭和30~31年の検査例から238例、昭和33~37年の検査例から500例、計738例を無作為に抽出した。昭和33年以降と30~31年とを分けたのは、33年以降にSM・PAS・INH3者併用例が増加したためである¹⁰⁾。

(2) 塗抹染色法と喀痰の処理法

採取した喀痰の膿様部をとつて塗抹、固定し、Ziehl-Neelsen法により染色鏡検してGaffky号数を決めた。染色標本をとつた喀痰はGaffky号数の決定とは無関係に次のごとく操作した。すなわち、喀痰量と等量の5% KOHを加えて15~20分間振盪液化またはパンピングに

よつて均等化した。このさい一部の重症有空洞患者の濃厚な喀痰では、等量の5% KOHによつては十分な均等化が不能な場合があるので、このような例ではさらに2容ないし8容のKOH液を追加した。このような例は少数であるが同時に結核菌数も多いので、均等化のために5% KOH液を追加することにより喀痰希釈度も自然に増加し、actual countの成功を助ける一因となつた。

小川らの方法¹⁾との相違は、(a) Gaffky号数に無関係に一定の希釈操作を行なう、(b) 希釈に用いるアルカリ添加量が異なる、(c) 次に述べるように希釈段階が異なる、(d) 渦巻白金耳接種を用いる、(e) 培地は8*ml*分注で培地面積が通常の5*ml*分注より広いなどの点である。(e)については文献4にその理由を示した。

(3) 定量培養法

方法は文献6, 7に既報した。要点を述べれば、上記の喀痰原液を生理食水で10進法で希釈し、喀痰原液、100倍希釈液および1,000倍希釈液を接種に用いる（10倍希釈液はすてる）。これらの液を渦巻白金耳で1白金耳（0.02*ml*）ずつ、薬剤なしの1%小川培地またはLöwenstein変法培地¹¹⁾に接種し、ただちにゴム栓を施して37°Cに培養する。渦巻白金耳は渦巻の大きさを0.02*ml*がすくえるように調製する。これには水をすくつてみて木板上に水をおき、その量をマイクロベットで測つて1白金耳接種で0.02*ml*になるようにする。ただし換算倍率を変えれば必ずしも0.02*ml*でなくてもよい。上述のごとく接種された培地は6週培養後に集落数を数える。培地当り集落数が50にもつとも近いものをつつて計算の基礎とする。喀痰単位容積 (*ml*) 当りの結核菌生菌単位数（以下生菌数）は次式により計算される。

$$a = 50 \times 2 \times 10^n = a \times 10^{n+2}$$

ここに、*a*は培地当り集落数、50倍するのは0.02*ml*接種を*ml*当りに換算するため、2倍するのは5% KOHを等量加えたため（等量以上加えた場合はそれを修正）、 10^n 倍するのは喀痰液の希釈度 10^{-n} を修正するためで

ある。

以上の操作により、喀痰 1 ml 中の結核菌生菌数および1日排菌数(上述の値に喀痰量をかける)が計算されるが、通常は以上の操作は耐性培地を幾種か用いて、耐性菌含有率を調べるか、または“actual count法”により耐性度測定をあわせ行なつた。(“actual count法”の耐性度は、50集落に近い発育を薬剤なし培地で示す接種量で発育可能の最高濃度を耐性度とする。)

実験成績

(1) Gaffky 号数と結核菌生菌数の関係

昭和30~31年の検査例234例と昭和33~37年の検査例266例、計500例の測定結果を図1にプロットして示した。同症例を表1に表示してある。前者の234例は実際には10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴の5段階希釈を用いて測定したのであるが、この中の10⁰、10⁻²、10⁻³の3段階を用いたものとして、これらから得た数値を採用

Fig. 1. Relationship between the Viable Number of Tubercle Bacilli and the Gaffky Number of Sputum

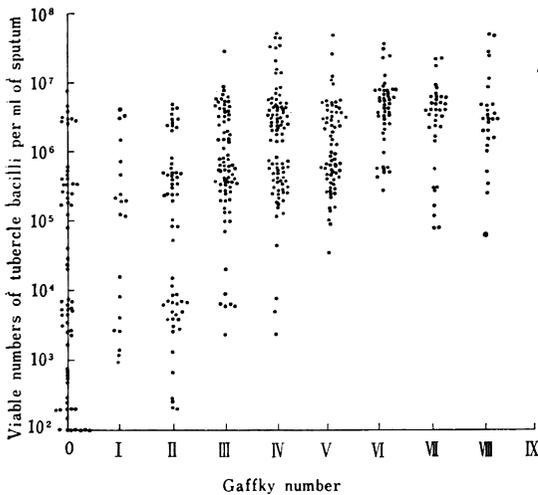


Table 1. Relationship Between the Viable Number of Tubercle Baccilli per ml of Sputum and the Gaffky Number

Viable Number of Tubercle Baccilli per ml of Sputum	Number of cases										Total
	Gaffky Number										
	0	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
10 ⁷ —9.9×10 ⁷				1	10	5	6	5	6	1	34
10 ⁶ —9.9×10 ⁶	9	4	13	30	42	32	31	24	17		202
10 ⁵ —9.9×10 ⁵	17	8	20	39	35	33	8	8	3		171
10 ⁴ —9.9×10 ⁴	5	1	5	2	1	1			1		16
10 ³ —9.9×10 ³	16	6	18	6	3						49
10 ² —9.9×10 ²	20	1	5	1		1					28
Total	67	20	61	79	91	71	46	37	27	1	500

した。われわれの方法で検査しうる最高値は、培地当り集落数150までをとれば、 $150 \times 10^{8+2} = 1.5 \times 10^7$ まで、小川らのごとく200までとつても 2.0×10^7 までであるが、前述したごとく、生菌数の多い例では実際問題として等量5% KOH 添加では均等化に不十分で、それ以上のアルカリ液を加えたので自然に希釈度が調節される結果となつた。ただし、こうした例は例外的で、それも昭和31年までの例に多い。図1にみるごとく、最高の単位容積当りの生菌数は $5 \times 10^7/ml$ (対数でプロットされている)であつて、このような例はアルカリ液を数倍量加えた例である。一方、図1および表1の生菌数 $10^3/ml$ 以下の例は原液接種でも培地当り集落数が10以下の場合である。このような例は原液接種でもこの集落数しか与えなかつたのであるから、いわば不可抗力に属し、方法自体の欠陥とはいえない。しかし、次の表では actual count 不成功例に加えた。このように少ない集落数は渦巻白金耳で0.02 ml 接種されるためではない。既報したごとく⁸⁾、集落数の少ない場合にはメスピペットで0.1 ml 接種しても渦巻白金耳接種以上の集落数は得られないからである。

図1および表1の成績から注目されるのは、小川、大谷¹⁾も指摘しているごとく、Gaffky 号数と生菌数とはある程度の比例関係があるとはいえ、同一 Gaffky 号数に属しても生菌数の変動範囲ははなはだ広いことである。換言すれば Gaffky 号数から生菌数の多寡を推定することははなはだ困難である。したがつて Gaffky 号数から actual count のための希釈度を割り出すこともはなはだ困難であるといえる。それにもかかわらず小川²⁾が“東村の actual count 法も Gaffky 号数により希釈度をかえるとよい”と述べているのは首尾が一貫しない。われわれも一度 Gaffky 号数から希釈度を定める方法を用いたことがあるが⁶⁾、現行法に劣るので廃止した。

表1および図1は培養陽性の例を全部記入したので、Gaffky 陽性例のみ記入した小川ら¹⁾の例とはやや対象を異にする。われわれの成績で注目されるのは Gaffky 0 すなわち塗抹陰性でありながらその生菌数は $0 \sim 10^2 \sim 10^7/ml$ の動揺を示したことである。この原因としては、(a) Gaffky 号数の決定には全日痰の一部のみを塗抹したことおよび (b) 喀痰には非抗酸結核菌(Ziehl-Neelsen 法で紅染しない菌) がかなり混在することが考えられる。一コ痰をとつた小川ら¹⁾の Gaffky I号の例でも生菌数の動揺が大きいので、後者の可能性は十分ありうることのように思われる。この可能性は化学療法前の時代に植田¹²⁾によつて強調されたところである。

(2) 定量培養の成功率

われわれの方法で培地当り10~150集落の“actual count”を得る率、すなわち定量培養の成功率は表2のごとくである。

Table 2. Rate of Success in Actual Count of Viable Tubercle Bacilli in Sputum

No. of Cases	Rate of "actual count" cases per the total cases	
433 Gaffky-positive cases in 1955~1962 taken at Random	Cases, in which 10 to 150 colonies per medium were obtained	425/433 (98.0%)
	Cases, in which 5 to 150 colonies per medium were obtained	427/433 (98.6%)
238 Culture-positive cases in 1955~1956 taken at Random	Cases, in which 10 to 150 colonies per medium were obtained	230/238* (96.8%)
	Cases, in which 5 to 150 colonies per medium were obtained	232/238* (97.5%)
500 Culture-positive cases in 1958~1962 taken at Random	Cases, in which 10 to 150 colonies per medium were obtained	489/500 (97.8%)
	Cases, in which 5 to 150 colonies per medium were obtained	496/500 (99.2%)

* Four among eight failure cases were those showing colony numbers ranging from 151 to 180 per medium.

成功率は昭和33~37年の測定成績から無作為にとつた500例では成功率は98%、もし若干条件をゆるめて5~150集落/培地をとれば成功率は99%となる。ただし原液接種で培地当り10集落以下の例は不可抗力ゆえ失敗例に数えていない。

一方昭和30~31年の238例を対象にすると、統計的有意差はないが成功率97%となる。この失敗例3%中には10⁻³希釈でも培地あたり集落数が150を越すものが若干あつた。このような例は昭和33年以降の例には見当たらないから、33年以降では喀痰単位容積中の結核菌生菌数は若干減少の傾向があることが示唆される。

上述の統計は培養陽性のもの全部をとつたものがあるが、成功率の比較には小川ら¹⁾の行なつたごとく Gaffky 陽性例のみを対象とするのが合理的と思われる。そこで小川、大谷¹⁾と同じく Gaffky 陽性者のみに対象をしぼり、培地当り集落数10~200を actual count 成功とみなすと、小川、大谷の方法の成功率は78%であるが、われわれの方法ではやはり成功率98%となつて、われわれの方法のほうがはるかに成功率が高い。たとえば、図1および表1の例で、Gaffky 0号のものを除くと433例となり、このうちで不成功例は1ml当り生菌数9×10²以下(培地当り集落数9以下)の例は8例で、成功率は(433-8)÷433=98%となる。

このようにわれわれの方法のほうが、Gaffky 号数を基礎とする小川らの方法よりも成功率が高い理由は後に考察する。

(3) 喀痰液希釈度と集落数の関係

喀痰液を十進法で希釈した場合、10倍希釈につれて

“生菌数”も1/10に減少すると考えることはまず当然であろう。ただし単位容積の生菌数が5以下になると、菌の分布は Poisson 分布に近づくから1/10にならないことがありうる。しかし、10倍希釈について単位容積の接種によつて得られる“集落数”も1/10になると考えるのは誤りである。実際には次のようになることが多い。10⁻²液を接種して100集落を得た場合は、10⁻³液を接種すると多くの場合25集落くらいの値が得られ、1/10の10集落とはならない。この原因として、東村¹⁸⁾はPAS耐性菌についての観察から、高濃度の菌液を使うときには菌の集束化や集落融合が起こることを考えた。換言すれば、定量培養の基礎としては、薄い菌液を接種するほうが真実に近い値を示すと考えられる。したがつて培地当りの集落数が5以下のごとき過少にならないかぎり、培地当り集落数が少ない希釈度を計算の基礎としたほうがよいと思われる(ただし現在までは便宜上50集落に近い値をとつてきた)。

それでは実際に10倍希釈で起こる集落数の減少はどのくらいかという点、表3のごとく平均約1/4の減少と

Table 3. Ratio of Colony Number in a Given Dilution of Sputum Fluid Against the Colony Number in Its Ten-fold Dilution

Colony number per medium		Ratio	Average of ratio in twenty cases taken at random
Original	10-fold Dilution		
12	2	6.0	3.8 ± 1.73*
93	21	4.4	
57	29	2.0	
72	25	2.9	
25	24	1.0	
101	23	4.4	
76	34	2.2	
60	10	6.0	
30	11	3.0	
40	20	2.0	
84	33	2.5	
50	14	3.6	
70	22	3.2	
12	2	6.0	
126	60	2.1	
88	39	2.3	
41	8	5.1	
58	8	7.3	
90	19	4.7	
90	20	4.5	

* The ratio estimated is much less than the ratio expected (=10). This is considered to be due to confluence of colonies and clumping of bacilli in a concentrated cell suspension.

なる。換言すれば、10倍濃い菌液を接種しても得られる集落数は10倍にはならず、3.8倍増加するにすぎないということである。

以上の結果から、希釈度に応じて集落数も10分の1に減じてゆくと考えるのは誤りであることは明らかであ

る。定量培養の基礎とする集落数は希釈度の高い液を用いたときの値をとるのがよいといえる。

考 察

小川、大谷¹⁾の成績が3段階希釈法を用いて定量培養成功率78であるのに、われわれの方法が同数の3段階接種を用いて98%の成功率を得た理由は次のごとく考えられる。

(1) Gaffky 号数と喀痰単位容積当りの生菌数の関係
この関係は小川ら¹⁾の成績でもまたわれわれの成績でも同様で、同一 Gaffky 号数の喀痰でも生菌数含有率はなはだ異なる。したがって Gaffky 号数(この号数自体はなはだ不安定なものである)を基礎として喀痰希釈度を定める小川ら¹⁾の方法で失敗例が多くなるのは当然と思われる。

一方、われわれの方法は次のようにして成立した。われわれが昭和30年に定量培養による耐性検査を開始したときには、Gaffky 号数と関係なく一様に五段階希釈法を用いた⁹⁾。すなわち均一化した喀痰液を 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} に希釈し、原液とあわせて5段階の希釈液を接種に用いた。しかし、これを用いる間に 10^{-4} 液と 10^{-1} 液とが不用のことが多いのに気づき、これを省略して現行法としたものである。すなわち5段階希釈の経験から、これとほとんど同じ効果をもつことを実用的に割り出したのが、 10^0 、 10^{-2} 、 10^{-3} の3段階である。したがって、3段階を用いるが、その効果は5段階希釈とほとんど変わらぬことを経験している。この点、同じ3段階でも 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} とか 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} のごとく連続した希釈段階を用いる小川らの方法とは希釈度が異なっている。この点が小川らの成功率とわれわれの成功率とに大差が生じた最大の原因と思われる。

(2) メスピベット接種法と渦巻白金耳接種法の差

小川らの接種法はメスピベットによる0.1 ml 接種法であり、われわれの方法は渦巻白金耳による0.02 ml 接種法である。したがってわれわれの希釈度をただちにスピベット接種法に適用しても同じ成績が得られない可能性が強い。この両者の接種法の比較については前に詳述したので省略する⁹⁾。結論をいえばメスピベット接種法は5倍の接種量を用いながら渦巻白金耳法を僅かに上回る集落数しか与えない。すなわち、0.1 ml の接種量は現行の卵培地斜面には大にすぎて菌の凝集、集落融合による生菌数の過小評価が起こることが考えられる。0.02 ml の渦巻白金耳接種は生菌数が少ない場合に見不利にみえるかもしれないが、事実は生菌数が少ない場合にかえって有利である⁹⁾。

(3) 喀痰液希釈度と集落数の関係

小川²⁾はわれわれの方法の成功率を自分の方法と同じ80%と推定しているが、この推定は次の3点で誤りがあ

る。第1に小川の Gaffky 号数に基づく連続的3段階希釈法の効率とわれわれの 10^0 、 10^{-2} 、 10^{-3} の 10^{-1} がとんだ3段階とを同一に評価するのは正しくない。第2にスピベット接種と渦巻白金耳接種とを同一効率とみることも正しくない⁹⁾。第3には、小川はこの推定にさいして、10倍希釈によつて集落数も1/10に減じると考えているが、これは既報¹²⁾および本報に述べたごとく正しくない。小川²⁾は Gaffky 号数から希釈度を推定することをすすめているが、成功率が78%では意味が少なく、Gaffky 号数と生菌数との関係があまり密でないという小川自身の成績¹⁾およびわれわれの成績からみても、Gaffky 号数からの希釈度決定はあまりよい方法ではないように思われる。また操作自体についても、Gaffky 号数を決めてから希釈をするということを実際に行なう操作として案外面倒なものではなからうか。むしろ Gaffky 号数にかかわらず一定の方法で希釈を行ない、これとは別にゆづくり鏡検を実施するほうが見方によつては便利かもしれない。

結 論

(1) 喀痰に等量の5% KOH (または8% NaOH) を加えて均一化し、この喀痰原液とその100倍および1,000倍希釈液を渦巻白金耳で卵培地(1%小川培地または Löwenstein 変法培地)に0.02 ml ずつ接種する方法により定量培養(actual count)に98%の高い成功率を得た。(ただしごく濃厚な喀痰では等量の5% KOH では均一化が困難でさらに多量の KOH 液を添加する。このさいには希釈倍数を修正する。)

この方法の成功率は小川などの3段階希釈法の78%の成功率より高い。この原因としては喀痰希釈度の選択法および渦巻白金耳接種の採用が考えられる。

(2) Gaffky 号数が同じでも喀痰単位容積(ml)中の結核菌生菌数の分布はなはだ幅が広い。この所見は小川などの成績と一致した。したがって、Gaffky 号数から定量培養の希釈度を推定する方法は成功率が低いと思われる。

(3) 喀痰の希釈度と集落数の減少とは比例しない。喀痰を10倍に希釈しても集落数の減少は平均約1/4になるにすぎない。この原因としては、喀痰液が濃いと菌の凝集や集落融合が起こつて、集落数が過小評価されると思われる。したがって定量培養のさいには、高い希釈度で得た集落数を計算の基礎とすべきである。

文 献

- 1) 小川辰次, 大谷典子: 結核, 37: 577, 昭37.
- 2) 小川辰次: 日衛技誌, 11: 1, 昭37.
- 3) 東村道雄, 河西栄文: Chemotherapy, 4: 227, 昭31.
- 4) 東村道雄, 野田用: 結核, 32: 639, 昭32.

- 5) 東村道雄, 野田用, 中村栄一: 結核, 33: 43, 昭33.
 6) 東村道雄: 医学と生物学, 49: 87, 昭33.
 7) 東村道雄, 安保孝, 勝沼六郎: 結核, 34: 625, 昭34.
 8) 東村道雄: 結核, 35: 397, 昭35.

- 9) 東村道雄, 河西栄文: 結核, 36: 38, 昭36.
 10) 安保孝, 東村道雄: 医療, 15: 849, 昭36.
 11) 東村道雄: 結核, 37: 278, 昭37.
 12) 植田三郎: 結核, 24: 185, 昭24.
 13) 東村道雄: 医学と生物学, 38: 11, 昭31.

Enumeration of Viable Tubercle Bacilli in Sputum by Spiral Loop Inoculation

Enumeration of viable tubercle bacilli in sputum is thought to be important as basis of determination of viable tubercle bacilli excreted in sputa per day, determination of viable numbers of tubercle bacilli per ml of sputum, and of quantitative expression of content of drug-resistant bacilli, which are useful for clinical purposes. Recently, Ogawa and Ootani (Kekkaku, 37: 577~581, 1962) reported on the method of enumeration of viable tubercle bacilli in sputum, by which was obtained successful actual count at a rate of 78 per cent of the test cases. They employed three different dilutions of sputum fluid, such as 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} (a continuous series), and pipette inoculation. The degree of dilution was determined according to the Gaffky number of smears stained by the Ziehl-Neelsen method. On the other hand, the present authors had reported an improved method of enumeration of viable numbers of tubercle bacilli occurring in sputa (Tsukamura, M.: Medicine & Biology, 49: 87~90, 1958; Tsukamura, M. et al.: Kekkaku, 34: 625~633, 1959). This method proved to be successful for determination of viable numbers at a rate as high as 98 per cent.

Method

Sputa expectorated during 24 hours was added with one volume of 5 per cent of potassium hydroxide solution and homogenized by vigorous shaking or pumping. The resulted sputum fluid was diluted with saline to make up 100-dilution and 1000-dilution. Each one-fiftieth ml sample of these dilutions (10^0 , 10^{-2} and 10^{-3}) was inoculated with a spiral loop delivering 0.02 ml to egg medium (Ogawa egg medium or modified Löwenstein medium). Count was made after 6 weeks of incubation and the dilution, on which the number of colonies nearest to fifty was counted, was used as the basis of calculation.

Results

(1) Rate of success in enumeration.

Rate of success in "actual count", i. e., in obtaining colony numbers ranging from 10 to 150 per medium on anyone of three dilutions (10^0 , 10^{-2} and 10^{-3}) was 98 per cent. This rate was much higher than the rate obtained by Ogawa and Ootani, which remained 78 per cent. Origin of this success was thought to be due to the use of the dilution series of 10^0 , 10^{-2} and 10^{-3} as well as the use of a spiral loop inoculation, which had proved to be superior to pipette inoculation for the purpose of colony count. (Tsukamura, M.: Kekkaku, 35, 397~399, 1960). (Table 2)

(2) Relationship between the Gaffky number and the viable number of tubercle bacilli in one ml of sputum.

Correlation of the Gaffky number with the viable number per ml of sputum was never close. Sputa showing the same number of Gaffky degrees exhibited a wide variation in the viable number (Fig. 1 and Table 1). Accordingly, such method of enumeration, as presented by Ogawa and Ootani appeared to be never highly successful.

There were a considerable number of Gaffky-negative sputa, which contained more than 10^6 viable numbers per ml of sputum. This finding suggests that there are a considerable number of viable tubercle bacilli remaining unstained by the Ziehl-Neelsen method.

(3) Relationship between the number of dilution and the colony number obtainable.

It was found that the number of dilution was never proportional to the decrease in colony number obtained by the dilution, though this was noted by the senior author previously (Tsukamura, M.: Medicine & Biology, 38: 11~14, 1956). A ten-fold dilution of sputum resulted never one-tenth of colony numbers but resulted only one-fourth of colony numbers (Table 3). This less decrease in colony

numbers, in other words, less colony count by use of a higher concentration of sputum fluid is considered to be due to clumping of tubercle bacilli in high concentrations and or due to confluence of colonies that takes place when many viable bacilli

were inoculated to a limited dimension of medium surface. Therefore, it is desired to utilize data obtained by inoculation of highly diluted sputum fluid as the basis of calculation, unless it is too little as below as less than five per medium.