Hanks 菌数カウント法改良の試み：

Hanks, sea-sand 変法

中 村 昌 弘 武 田 朋 子

(久留米大学医学部微生物学教室細菌学講座)

(受付：1982年12月17日)

液体培地を用いて、らい菌および鼠らい菌の培養実験を行う場合、それらの増殖を判定する方法としては、菌数カウント法^(1,2)、沈渣の直接塗抹法⁽³⁾および ATP 測定法⁽⁴⁾がある。

われわれは増菌の程度をおおまかに知る方法として、沈渣の直接塗抹法 (SSM: Sediment smear method) を好んで用いるが、これはあくまで概略の目安であって、増菌の程度を記載するには、“0” time に比して、十、廿、卅などの任意の標準を設けざるを得ず、普遍妥当性を欠く。従って計数的に判定するには菌数カウント法を用うべきことは当然である。

Shepard⁽⁵⁾ によるらい菌の mouse-foot-pad 法による増菌成功の鍵は、その判定に菌数カウント法を導入したことであり、若し、菌数を計数しなかったならば、らい菌の増殖を見逃した可能性がある。

鼠らい菌では小川・本村⁽⁶⁾による固形培地での集落形成の成功は、集落発生の有無という批判の余地なき判定で行いうるが、液体培地での増菌判定は肉眼で沈渣の経時的増加を一応は観察できるとしても、やはり抗酸菌染色によって、その沈渣が果して抗酸菌であるかどうかを確かめないと納得がいかぬし、また誤りを犯すことになる。現に NC 培地⁽⁷⁾ NC-5 培地⁽⁸⁾および ND-5 培地⁽⁹⁾における鼠らい菌の増菌は菌数計算^(1,2)により、“0” time の菌数が培養日数と共に対数的に増加することで認められたし、Dhople & Hanks^(10,11)も Hanks 法⁽¹⁾で菌数を算え、同時に、ATP 微量測定法による ATP の増加が菌数増加と平行したことで、Nakamura system を追試確認した。

しかし、最近になり ND-5 培地の改良⁽¹²⁾が進んで、鼠らい菌の増殖が著明になると、Hanks 法による菌数カウントのためのスポットの中にしばしば菌塊が出現し、スポットの円の赤道部にこの菌塊がたまたま存在す

ると、菌数が過剰評価 over-estimate されることになる。だからといって、現に存在する菌塊を除外してカウントすることは出来ないで菌数が不揃いになる。

本報では、この菌塊をなるべくほぐす目的で標本作製操作中に海砂 sea sand を加えたのでその試みについて述べる。

材料と方法

供試鼠らい菌

C₃H マウス皮下に接種して生じた鼠らい菌ハワイ株 (M-71) のレプロームをガラスホモジナイザーで磨砕、1%牛血清アルブミン加 Sørensen buffer (pH 7.0) に浮遊したものを、適当に稀釈して培養に供した。

供試液体培地 (NDLA 培地)⁽¹²⁾

培地の処方および作製法は次のとおりである。

Dubos 粉末 (榮研)	0.5g
Adenosine	5.0mg
Thymidine	8.0mg
Thioglycolate	1.0mg
Succinamide	42.0mg
Dextran (分子量10-20万)	84.0mg
DL-aspartic acid	10.0mg
Liposome (1)	0.6ml
Aq	39.0ml

以上を pH 6.0 に補正し、autoclave で滅菌する。これに下記の supplement を無菌的に加う。

ビタミン K ₃	0.5ml
PABA	0.5ml
仔牛血清	5.0ml

〔註〕 (1) Liposome (1) とは卵レシチン80mg とコレステロール10mg を 2ml のクロロホルムに溶かし、クロロホルムを N₂ ガスでとばし、これに

Aq 10ml を加え超音波(海上電機 T.A. 4280型)を5分間かけたもの。

(2) ビタミン K₃(¹³)はメナジオン (Menadion Sigma) を1 mg/ml Aq にとかしたものを Aq で1,000倍に稀釈し, ミリポアフィルターで濾過したもの

(3) PABA (パラアミノ安息香酸) は1 mg/ml にとかしたもので, 同じく濾過滅菌

鼠らい菌培養法

適当に稀釈された鼠らい菌液の0.2ml を上記培地に接種, よくピペットで混ぜ, その5 ml 宛を中試験管 (10.5×1.3cm) に分注, ゴム栓で密栓して, 30°C で培養する。

菌数カウント :

(1) Hanks 法

次の順序で標本を作製する。

培養試験管 (5 ml)
↓
3,000rpm, 20分
↓
上清 4 ml を除去
↓
3,000rpm, 20分
↓
上清を毛細管ピペットで除去
↓
沈 渣
↓
+
0.3ml TES buffer (0.05M)*
↓
0.03ml クロロホルムを加う
↓
1.2ml の0.5%石炭酸・3%血清水**を加う
↓
0.03ml を凹窩ガラスに注ぐ。
↓
Standard pin-head*** で8-10スポットの smear を作る
↓
乾燥, Ziehl- 戸田染色

* 0.05M TES : 1.146g/100ml Aq (pH 7.4)

** 石炭酸・血清水 : 仔牛血清3.0ml, Aq 97.0 ml, skim milk 0.3g, 溶解
石炭酸0.5ml

*** Hanks 研究室より分与をうけたもの。

(2) Hanks, sea-sand 法

次の順序で標本を作製する。

培養試験管 (5 ml)
↓
3,000rpm, 20分
↓
上清 4 ml を除去
↓

3,000rpm, 20分

上清を毛細管ピペットで除去

沈 渣

+
1.5ml 石炭酸・血清水を加う

+
約0.3g sea-sand (海砂)

↓
Vibro shaker で15秒攪拌

↓
上清の0.03ml を凹窩ガラスに注ぐ

↓
Standard pin-head で8-10スポットの smear を作る

↓
乾燥, 染色

染色法 :

スライド・ガラスを2分間, フォルマリンガスで固定, 次に火焰で軽く加熱, フォルマリンガスをとばし, Ziehl 液で2分間加温染色, 水洗, 一旦乾燥し, 戸田液で30秒間染色, 水洗, 乾燥。

〔註〕 Ziehl 液で染色, 水洗後, 一旦乾燥した方が戸田液をかけた場合, smear の脱落が防げる。

戸田液 : メチレン青1g をメタノール100ml にとかし, これに50ml の10%食塩水を加え, 更に350 ml のメタノールを追加, ろ紙でこして 褐色ビン保存。

菌数カウント :

染色されたスポットの赤道部を接眼部に正方形の枠を入れた顕微鏡を用いて1,000倍拡大で菌数を算える。視野数と総菌数より, 下記の Formula でml 当りの菌数を算出する。

Hanks' Formula

数えた視野数	conversion factor = D	数えた総菌数	菌数/ml
20	0.140	× A	= B × 10 ⁶
21	0.147		
22	0.154		
23	0.161		
24	0.168		
25	0.175		
26	0.182		
27	0.189		
28	0.196		
29	0.203		
30	0.210		
31	0.217		
32	0.224		
33	0.231		
34	0.238		
35	0.245

図 1 Hanks; pin-head 法で作製された菌数カウントのスポット塗抹
上：40倍拡大 下1000倍拡大

図 2 Hanks sea-sand 法で作製された菌数カウントのスポット塗抹
上：40倍拡大 下1,000倍拡大

成 績

1. スポットの光顕による観察所見

Hanks 法と Hanks, sea-sand 法によって作製したスポットを40倍拡大の顕微鏡で観察した所見は 図1 (上) と 図2 (上) のとおりである。

Hanks 法では 菌塊が処々にみられる。この菌塊がたまたまた赤道部に存在すると菌数は大幅に増加する。その拡大所見は図1 (下) のとおりである。Hanks, sea-sand 法では大菌塊の存在はないが、これを拡大すると cord 形成の菌の集団が見え、これもその存在する場所によって菌数に大きい影響を与える(図2 (下))。

2. 菌数カウント成績

Hanks 法と Hanks, sea-sand 法で同一培養条件の試験管の菌数をカウントした成績を表1に示す。成績の示すとおり duplicate smear の菌数のバラツキが sea-sand を加えた方法の方が多少、少い。また、菌塊の出現がこれも比較して、sea-sand 法の方が少い。しかし、培養4週、6週の所見のように、なお、duplicate で大差あるものもあって、菌塊のほぐれが完全にっていないことを示している。

表 1 鼠らい菌培養実験における Hanks 法と Hanks, sea-sand 変法との菌数計算値の比較

培養 期間(週)	方 法			Hanks, sea-sand 変 法		
	菌数 /視野	× 10 ⁶	菌塊*	菌数 /視野	× 10 ⁶	菌塊*
0	143/24	24.0	—	347/23	55.9	—
	183/23	29.5		565/28	110.7	
1	262/24	44.0	—	316/24	53.1	—
	143/23	23.0		293/25	51.3	
2	207/26	37.7	—	226/25	41.1	—
	118/26	21.5		363/29	73.7	
3	766/28	150.1	+	177/26	32.2	—
	1342/29	272.4		421/26	76.6	
4	2358/26	429.2	++	1502/27	295.2	+
	437/27	82.6		286/24	48.0	
5	540/26	98.3	++	2092/25	366.1	++
	1363/26	248.1		1585/25	277.4	
6	1284/26	234.1	+	722/24	121.3	—
	832/28	163.1		351/24	59.0	
7	345/26	62.8	—	362/26	65.9	—
	514/27	97.7		539/26	98.1	

* 菌塊は弱拡大（40倍）で認められた菌集団

3. Sea-sand 法にクロロホルムを加える効果

Hanks 法ではクロロホルムを加えて、菌塊をほぐすことを企画しているのですが、更にその効果をあげるために sea-sand を加えた試みも行った。換言すれば sea-sand 法にクロロホルムを加えたことになる。結果は鼠らい菌の抗酸性が極度に低下して、菌数カウントができない菌体が出現した。従って、クロロホルムと sea-sand を同時に使用できないことになる。

考 察

固形培地における細菌の培養では集落の形成が指標であるので、集落数を肉眼で、或は弱拡大の顕微鏡下で数えることによって、viable cell を直截的に算出することができる。

しかし、液体培地における増菌は沈渣の極端な増加、濁度の増加、或は菌膜の形成がある場合は論外として、鼠らい菌などのように fastidious な細菌では、増菌の判定が非常に困難である。ことに、癩菌では未だ、増菌、培養に全く成功していないので、培養実験を行う場合、軽微な増菌の徴候、僅少な菌数の増加でも見逃すことは許されない。

このために、ATP 測定法や菌数カウント法が増菌判定に用いられるが、routine には後者の方法が一般研究室には適している。従って現在まで Hanks 法を用いて、鼠らい菌の増菌を判定していたが、培地の改良が進んで、鼠らい菌が cord を形成しながら増殖してくるようになると、菌塊が生じ、菌数カウントに甚しいむらが出る。このエラーを是正するために菌塊をほぐす努力を行いつつあり、本報ではその一部を報告した。

本報の要点は Hanks 法で菌塊をほぐす目的に用いられるクロロホルムの代りに、海砂を用いたもので、機械的に cord を解きほぐす予定であったが、その目的を完全に満足させることはできなかった。目的を達したために、海砂の処理にクロロホルムを添加したら、鼠らい菌は抗酸性を喪失し、菌数を数えることができなくなった。両者の併用処理は余りに強力であったのであろう。今後更に改良を加うべきである。

菌数の増加は SSM で、一応は判定できるが、そのデータの表示は他を納得させることに乏しい。しかし、抗酸菌は一般に cord 形成を伴って増菌するので、菌塊の出現は避けられない。ことに鼠らい菌では継代培養の場合、一定量以上の接種菌量を必要とするため、その中にどうしても菌塊が初めから含まれている。従って 2 代培養の増菌判定にはやはり正確な単個菌を数える方法が望

ましい。Hanks 法は homogeneous growth の細菌、または鼠らい菌でも菌塊を形成するほどの増菌以前のものには用いられるが、それ以降のものでは使用できないのではないと思う。ことに人らい菌の場合は初めから単独菌の菌液を作製することが困難なため、考慮を要する問題である。

結 論

鼠らい菌増殖培地が改良されて、鼠らい菌が菌塊を形成しながら増菌すると、菌数カウントのさい、Hanks 法で作製されたスポット塗抹にしばしば菌塊が存在し、その存在部位によっては菌数カウントに大幅な増加が生じ、over-estimate される。従って Hanks 法で用いられている菌集団の散在のための化学操作としてのクロロホルム処理に代えて、更に強力な機械的操作として、海砂による菌塊の散在を試みた。得られた結果は Hanks 法よりも、やや効果的に菌塊を散在することができたが、完全に単個菌にすることは不可能であった。クロロホルムの併行は鼠らい菌の抗酸性を著しく脱却して菌数カウントの評価を低下した。

謝 辞

本研究の一部は日米医学協らい専門部会研究費および笹川記念保健協力財団研究費によった。ここに謝意を表す。

文 献

- 1) Hanks, J. H.: Microscopic counts of Mycobacteria, conversion factors for pinhead method. Internat. J. Leprosy, **36**, 76-77 (1968).
- 2) Shepard, C. C., and McRae, D. H.: A method for counting acid-fast bacteria, Internat. J. Leprosy, **36**, 78-82 (1968).
- 3) 中村昌弘: 無細胞液体培地における鼠癩菌の増菌 第13報 増菌判定法, SSM (Sediment Smear Method) の紹介. 日本らい学会雑誌, **46**, 98-103 (1977).
- 4) Dhople, A. M., and Hanks, J. H.: Quantitative extraction of adenosine triphosphate from cultivable and host-grown microbes: Calculation of adenosine triphosphate pools. Appl. Microbiol., **26**, 399-403 (1973).
- 5) Shepard, C. C.: The experimental disease that follows the infection of human leprosy bacilli into foot pads mice. J. Exp. Med., **112**, 445-454 (1960).
- 6) 小川辰次, 本村恵子: 鼠らいに関する研究 第1報 鼠らい菌培養の試み. レブラ, **38**, 246-

- 254 (1969).
- 7) Nakamura, M.: Multiplication of *M. lepraemurium* in cell-free medium containing α -ketoglutaric acid and cytochrome c. J. Gen. Microbiol., **73**, 193-195 (1972).
- 8) Nakamura, M.: Quantitative multiplication of *M. lepraemurium* in a cell-free liquid medium (NC-5). J. Gen. Microbiol., **82**, 385-391 (1974).
- 9) Nakamura, M.: A new cell-free liquid medium for rapidly culturing *M. lepraemurium* (ND-5 medium). Proc. Jap. Acad., **51**, 707-711 (1975).
- 10) Dhople, A. M., and Hanks, J. H.: Factors that influence the growth of *M. lepraemurium* in the Nakamura's system. Internat. J. Leprosy, **44**, 18-26 (1976).
- 11) Dhople, A. M., and Hanks, J. H.: In vitro growth of *M. lepraemurium*, an obligate intracellular microbe, Science, **22**, 379-381 (1977).
- 12) Nakamura, M.: Stimulation of growth of *Mycobacterium lepraemurium* in cell-free liquid medium by DL-aspartic acid. Internat. J. Leprosy, **50**, 193-199 (1982).
- 13) 中村昌弘: ビタミン K₃ および B₁₂ の無細胞液体培地における鼠らい菌の増殖促進効果. 日本らい学会雑誌, **50**, 135-158 (1981).

An Attempt to Modify the Hanks Bacillary Counting Method: Hanks Sea-sand Method.

MASAHIRO NAKAMURA and TOMOKO TAKEDA

(Department of Microbiology, Kurume University

School of Medicine, Kurume, 830 Japan)

The Hanks bacillary counting method is useful for evaluating the growth of *M. lepraemurium* *in vitro*. However, when the growth of bacilli is remarkably stimulated and clusters are formed, the Hanks method is inappropriate to use, because complete dispersion of the cluster is not performed by the method. The present paper describes an attempt to improve the Hanks' method in which sea-sand was used as a mechanical dispersion substituted for chemical treatment, chloroform. The results obtained indicated that the sea-sand procedure was slightly superior than the Hanks' method, but that dispersion of the cluster was not enough even if the sea-sand procedure was employed. In addition, a combination use of sea-sand with chloroform significantly reduced acid-fastness of *M. lepraemurium*. consequently, the number of bacilli was lower-estimated. Therefore, a more sufficient method for counting mycobacterial growth should be established in the future.