

菌量測定法ノ比較研究補遺

第1報 總菌數測定法(鏡檢的菌數測定法) 及生菌數測定法(平板培養測定法)

金澤醫科大學細菌學教室(谷教授指導)

泉 俊 一

Syuniti Ichumi

(昭和16年7月28日受附 特別掲載)

内 容 抄 録

余ハ大腸菌ニ就テ各種ノ菌量測定法ヲ實施シ、本編ニ於テハ鏡檢的總菌數測定法及ビ平板培養ニ依ル生菌數測定法ヲ取扱ヒ、鏡檢的測定ニハ、覆蓋硝子、「トーマ・ツアイス」計算室及ビ「リープライヒ」計算室ヲ用ヒタ。

1) 最モ適當ナ可檢菌量

鏡檢的測定法ニ於テ、1區劃内ノ菌數ハ、「トーマ・ツアイス」計算室デ約15個、「リープライヒ」計算室デ約30個位ガ最モ適當デアル。亦平板培養法ニ於テハ、集落數ガ200~500個ノ平板ガ最モ適當デアル。

2) 菌數算出式

a) 鏡檢的測定法

圓形覆蓋硝子(直径18mm)ヲ用ヒ、「ライツ」顯微鏡ノOc. 4, Ob. 7, 筒長130mm(倍率625倍, 視野ノ面積 5.5×10^{-2} qmm)ノ下ニ鏡檢スル時ハ、菌液1cc中ノ總菌數 $= \frac{\text{鏡檢總菌數}}{\text{鏡檢視野數}} \times \frac{\text{菌液稀釋倍數}}{\text{塗抹液量(cc)}} \times 4.6 \times 10^8$ 同様ニ計算室ヲ用ヒル時ハ、1cc中ノ總菌數 $= \frac{\text{鏡檢總菌數}}{\text{鏡檢區劃數}}$

菌液稀釋倍數 $\times 4 \times 10^6$

b) 平板培養法

1cc中ノ生菌數 $= \text{平均集落數} \times \frac{\text{菌液稀釋倍數}}{\text{培養菌液量(cc)}}$

3) 誤差

a) 鏡檢的測定法

1區劃内ノ平均菌數ガ、「トーマ・ツアイス」計算室デ15個及ビ「リープライヒ」計算室デ30個ノ時、其ノ變異係數ハ各々22.4及ビ18.5デアツタ。亦各區劃内ノ菌數ノ度數分布ハ2項正規曲線ニ從フ。

b) 生菌數測定法

平板培養法ニ於テ、同一稀釋倍數ヲ以テ菌液ヲn回稀釋スル時、各回ノ「ピペット」ニ依ル誤差ヲ各々kトスレバ、推定生菌數ノ誤差(變異係數)ハ大體次ノ様ニナル。

$$\sqrt{2n^2k^2 + \frac{(10)^4}{\text{平均集落數}}}$$

目 次

第1章 緒言

第2章 總菌數測定法(鏡檢的計算法)

第1節 實驗材料及ビ實驗方法

第1項 實驗材料

第2項 實驗方法

第1目 可檢材料ノ處理

第2目 覆蓋硝子法

第3目 計算室法

第4目 鏡檢視野數及ビ菌數算出式

第2節 實驗成績

第1項 覆蓋硝子法ト計算室法トノ比較

第2項 兩計算室法ノ比較

第3章 生菌數測定法(平板培養法)

第1節 實驗材料及ビ實驗方法

第1項 實驗材料

第2項 實驗方法

第2節 實驗成績

第1項 全面通算ト省略計算

第2項 培養操作ニ要スル時間ト集落數

第3項 集落發生ノ時間的關係

第4項 培養菌量ト集落數

第4章 總括並ニ考按

第5章 結論

第1章 緒 言

吾々ガ日常微生物ヲ取扱フ場合ニ於テ、其數量ニ餘リ頓着スル必要ノナイ場合モ多イガ、又、出來ルナラバ、取扱フ菌量ヲ正確ニ知リタイト思フ場合モ少クナイ。例ヘバ、感染菌量ノ問題、「ワクチン」内ノ菌量、殺菌試験時ニ於ル試験前後ノ菌數ノ變化、衛生的検査材料中ノ含有菌數、其他色々ノ場合ヲ擧ゲル事ガ出來ル。

所ガ此目的ニ副フ様ナ方法ハ、仕事自身ガ地味ナ所爲カ、案外ニ、研究ガ徹底シテ居ナイ様ニ思ハレルノデ、茲ニ改メテ検討ノ材料トシテ採上ゲテ見タノデアアル。

今日菌量測定法トシテ使用サレテキル方法ハ、大體次ノ5方法ニ分類出來ル。

- 1) 鏡檢の菌數測定法(總菌數測定法)
- 2) 生菌數測定法
- 3) 容量測定法
- 4) 重量測定法
- 5) 濁濁度測定法

之等ノ諸方法ニ關スル文獻ヲ列擧シテ見ルト、大體次ノ如キモノデアアル。

1) 鏡檢の菌數測定法

a) 覆蓋硝子法

Klein⁽¹⁾, Hehewerth⁽²⁾ 等ハ、一定量ノ菌ヲ、一定大ノ覆蓋硝子上ニ塗抹シ、一定ノ倍率デ、約50視野ニ就テ菌數ヲ測定シ、之ヨリ原材料中ノ菌數ヲ測定シタ。Breed⁽³⁾ 及ビ Hanks a. Tames⁽⁴⁾ 等ハ同様ナ方法デ牛乳中ノ細菌數ヲ測定シタ。

Wright⁽⁵⁾ ハ一定量ノ菌液ヲ、一定量ノ人血液ト混和シ、血球數ト細菌數トノ比ニ依ツテ菌數

ヲ算出シ、又 Sommer⁽⁶⁾, Fries⁽⁷⁾ ハ血液ノ代リニ、濃度既知ノ釀母菌液ヲ使用シタ。

b) 計算室法

Winterberg⁽⁸⁾, Glynn⁽⁹⁾, Tensen⁽¹⁰⁾, Steiner⁽¹¹⁾, Tennison⁽¹²⁾ 等ハ血球計算室ヲ用ヒ、Glynn, Wilson⁽¹³⁾, Liebreich⁽¹⁴⁾ 等ハ、特ニ深サノ淺イ計算室ヲ使用シテ菌數ヲ測定シタ。

亦、Troester⁽¹⁵⁾, Wilson 等ハ無染色ノ状態デ、暗視野法ニ依ツテ鏡檢シタ。

2) 生菌數測定法

可檢材料カラ、菌ヲ培養シテ、發生スル集落數ヨリ、生菌數ヲ測定スル方法ハ、從來カラヨク行ハレテキル。即チ、Neisser⁽¹⁶⁾, Gotschlich u. Weigang⁽¹⁷⁾, Hehewerth, Kromholz⁽¹⁸⁾, Dichtl⁽¹⁹⁾, Wilson, Tennison 等ハコノ方法ヲ検討シタ。

亦、Seifert⁽²⁰⁾, Henrici⁽²¹⁾ 等ハ染色ニ依ル菌ノ生死鑑別ヲ試ミテキルガ、Bickert⁽²²⁾ ハ種々ノ鑑別染色法ヲ追試シタガ、満足スベキ成績ヲ得ラレナカツタ。

3) 容量測定法

本法ハ可檢材料カラ菌全部ヲ取出シ、ソノ容量ヲ測定シテ菌量ヲ測定スル方法デアツテ、Rosenthal⁽²³⁾, Dichtl, Schmidt⁽²⁴⁾, Hopkins⁽²⁵⁾, 岩田⁽²⁶⁾ 等ハ、菌液ヲ遠心シ、菌ヲ分離沈降サセテ菌容量ヲ測定シタ。

4) 重量測定法

Brown⁽²⁷⁾, Wilson a. Dixon⁽²⁸⁾, Wohlfeil⁽²⁹⁾, 岩田等ハ菌ヲ秤量シ、重量ヲ以テ菌量ヲ表ハサウトシタ。

5) 濁濁度測定法

Bujwid⁽³⁰⁾, Muntner⁽³¹⁾, Dold⁽³²⁾, 岩田等ハ、菌ノ濃度ニ應ジテ菌液ノ濁濁度ガ増強スル事實カラ、菌液ノ濁濁度ニ依ツテ菌量ヲ知ラントシ、種々ノ機械ガ考案サレテキル。

余ハ以上各種ノ菌量測定法ニ就テ實驗シ、ソノ正確度ニ關シテ、イサ、カ知見ヲ得タノデ、本編ニ於テハ鏡檢的總菌數測定法及ピ平板培養

ニ依ル生菌數測定法ニ就テ報告シ、大方ノ御叱正ヲ乞ハントスルモノデアル。

余ハ次ノ様ナ略記號ヲ使用シタ。

M = 算術平均

$$\sigma = \text{標準偏差} \left(\sqrt{\frac{\sum f d^2}{n-1}} \right)$$

$$m = \text{標準誤差} \left(\sqrt{\frac{\sigma}{n}} \right)$$

$$V = \text{變異係數} \left(\frac{100\sigma}{M} \right)$$

第2章 總菌數測定法(鏡檢的測定法)

第1節 實驗材料及ピ實驗方法

第1項 實驗材料

大腸菌ヲ使用シ、37°C「ブイヨン」培養ノ菌ニ就テ實驗シタ。

亦計算室トシテハ「リーブライヒ計算室及ピ「トーマ・ツアイス計算室ヲ用ヒタ。

第2項 實驗方法

鏡檢的菌數計算ヲ實施スルニハ、先ヅ次ノ基礎的諸條件ヲ充分ニ檢討シテオカネバナラス。

第1目 可檢材料ノ處理

原材料ノ一小部分ダケヲ檢査シ、蓋然率ヲ以テ原材料中ノ全菌數ヲ推定スルノデアルカラ、先ヅ原材料中ノ細菌ヲ全ク平等ニ分布サセ、次デ採取スル可檢部分ノ分量ハ出來ル限リ正確ニ採ラネバナラス。

1) 平等ナ菌浮游液ヲ得ル方法

普通、葡萄狀球菌、連鎖狀球菌等ハ其名ノ様ニ各々葡萄狀或ハ連鎖狀ノ菌集團ヲ形成スル。

然シ、大腸菌、「チフス菌等ノ液體培養ニ於テモ、大多數ノ菌ハ箇々ニ分離シテ居ルガ、一部ハヤハリ塊狀ニ集合シテ居ル。

カ、ル菌集團ハ、鏡檢的菌數計算ノ場合ニ非常ナ妨ゲトナルバカリデナク、他方生菌數ヲ計算スル場合ニ於テモ、誤差ヲ來ス原因トシテ最モ重大ナモノデアル。

此様ナ菌集團ヲ無クスル方法トシテハ次ノ諸方法ガアル。

a) 木綿、「ガーゼ」等デ濾過

此方法デハ菌浮游液(以下菌液ト略稱)ノ濃度ガ著シク低下シ、亦無菌的ニ操作スル事ハ稍々困難デアル。

b) 分割的遠心

之ハ Perrin⁽³³⁾ノ唱導シタ方法デ、菌液ヲ約2000回

5分間遠心シテ其ノ上澄液ヲ他ノ遠心管ニ移シ採リ、之ニ、更ニ同様ナ操作ヲ加ヘル。スルト、粒子ノ粗大ナ菌集團ハ、大部分沈渣トナツテ除去サレテ、平等ナ菌液ヲ得ル事ガ出來ル。

然シ此等ノ方法デハ可檢菌液中ノ總菌數ヲ知ル事ハ出來ナイ。コノ場合ニハ次ノ方法ガ適當デアル。

c) 菌液中ニ小硝子球ヲ加ヘテ振盪

前ノ方法ハ菌集團ヲ除去スルノデアツタガ、コノ方法ニ於テハ、相互ニ附着集合シテキル菌ヲ機械的ニ分離サセルノデアル。葡萄狀球菌ノ様ニ、菌塊ヲ作ル傾向ノ強イ菌ニ於テハ、必ズ實施スベキ方法デアル。

2) 可檢材料ノ採り方

一般ニ可檢材料ガ固形ノ時ハ、白金耳、液體ノ時ハ、白金耳亦ハ「ピペット」ガ用ヒラレテ居ル。

白金耳ニ依ツテ鈎取サレル量ハ、可檢物ノ粘着度ニ依ツテ非常ナ差違ヲ生ズル。

亦「ピペット」ヲ用ヒル時ハ、可檢菌液ノ粘着力、毛管現象等ニ依ツテ菌液ノ一部ガ「ピペット」内ニ殘留スル。

岩田ハ、一定菌量ヲ採取スルノニ、白金耳ヲ用ヒテ非常ニ大キナ誤差(變異係數 25.97)ヲ得タ爲ニ、白金耳ヲ廢シテ「ピペット」ヲ使用シタ。

余モ之ニ倣ツテ、專ラ「ピペット」ヲ用ヒ、然モ可檢液ノ「ピペット」内殘留ニ依ル誤差ヲ除ク爲ニ、ナルベク Vollpipette ヲ用ヒナイデ Messpipette ヲ使用シタ。即チ余ノ使用シタモノハ次ノ通りデアル。

Messpipette: 10.0, 2.0, 及ビ 1.0cc

(各々 0.1cc 迄目盛シテアル)

Vollpipette: 0.1cc (0.005cc 迄分割)

0.1cc (分割目盛ナシ)

「ピペット」ニ於テハ、次ノ2種ノ誤差ヲ考ヘネバナラス。

a) 可檢液ノ「ピペット」ノ尖端外壁附着ニ依ル誤差例ヘバ、「ピペット」ニ、菌液ヲ1.0cc吸ヒ取り、之カラ順次ニ0.1cc宛分注シテ菌數ヲ檢査スル時ハ、ヤ、モスレバ第1回分注時ノ菌數ガ意外ニ多イ事ガアル。之ハ「ピペット」ノ尖端ノ外壁ニ附着シテ居タ菌液ガ加ハツタ爲デアル。故ニ順次ニ分注スル場合ニハ、滅菌「ガーゼ」デ「ピペット」ノ尖端ヲ拭クカ亦ハ先ヅ菌液ノ少量ヲ流出サセテ、外壁ニ附着シタ菌液ヲ可及的除去シタ方ガヨイ。

第1表 0.1ccノVollpipetteニ於ル残留菌數

實 驗 番 號	充分ニ吹出シタ時ノ生菌數	残留生菌數
1	2328	12×10
2	2208	10×10
3	2307	16×10
4	2046	11×10
5	2553	16×10
6	2055	14×10
7	2520	10×10
8	2421	12×10
9	2304	10×10
10	2451	12×10
總 計	23193	1230
残留菌百分率		5.3%

b) 菌液ノ「ピペット」内残留ニ依ル誤差
余ハ0.1ccノVollpipette(最高目盛迄ノ長サ約10cm)デ、菌液0.1ccヲ正確ニ吸ヒ取り(ナルベク其レ以上迄吸ヒ上ゲナイ様ニ注意スル)、之ヲ出來ルダケ充分ニ射出シテ培養シ、次ニ、ソノ「ピペット」内ノ残留菌液ヲ1.0ccノ滅菌ブイヨンデ稀釋シ、之カラ亦0.1ccヲ培養スル。即チ残留菌ノ、更ニ $\frac{1}{10}$ 量ヲ培養シテ見ルト、第1表ノ様ニ、約5.3%ノ残留菌ヲ認メタ。但シ右ノ「ピペット」内ニハ未ダ若干ノ菌ガ残存シテ居ルト考ヘネバナラス。

此様ニシテ、順次稀釋シテ射出スル毎ニ、大約5%ノ菌ガ残留スルト假定シ、實際ノ生菌數ニ對スル第1回射出ニ於ル生菌數ノ比率ヲX%トスレバ次ノ様ナ關係ガ成立スル。

$$X + \frac{X}{20} + \frac{X}{(20)^2} + \frac{X}{(20)^3} + \dots + \frac{X}{(20)^n} = 100$$

上式ノ第3項以下ハ非常ニ小サクテ、殆ド度外視シテモヨイカラX=95トナル。

從ツテ、Vollpipetteヲ用ヒテ菌液ヲ稀釋スル場合ニハ、先ヅ菌液ヲ稀釋液中ヘ射出シテカラ、更ニ其ノ稀釋菌液ヲ、右「ピペット」デ吸取リ、再ビ之ヲ其ノ稀釋菌液中ヘ射出シタ。

コノ様ニスレバ、上式ノ第2項ニ相當スル菌量モ大部分射出サレルカラ、残留率ハ5%ヨリ遙ニ小サクナル筈デアル。

其外、「ピペット」、計算室等ガ清淨デナイト、可檢菌液中ヘノ異物混入、採取液量ノ變化等ヲ來シ、亦標本面上ニ於ル菌ノ分布モ不整トナル。

3) 染色法

菌ヲ染色シテ鏡檢ノ計算ヲ行フ場合ニハ、染色液ハ次ノ様ナ條件ヲ具備シテ居ナケレバナラス。

a) 鏡檢上、菌體ト紛ラハシイ粗大ナ色素顆粒ヤ不純ナ夾雜物ヲ含メデ居テハナラス。

b) 染色液ハ、可檢菌液中ノスペテノ菌ヲ染色出來ルダケノ濃度ヲ持タネバナラス。

然シ濃厚過ギテ、染色後乾燥標本ヲ水洗シナケレバナラス時ハ、若干ノ菌ガ流失スル事ニナル。故ニ、餘分ノ色素ガ殆ド沈着シナイデ、水洗ノ必要ガナイト非常ニ好都合デアル。

c) 可檢菌液ガ濃厚過ギテ、稀釋シテ鏡檢シタイ場合ニ、染色液ヲ以テ、同時ニ稀釋出來レバ便利デアル。

d) 染色液中デ、菌ガ増殖スルト、菌數ヲ過大ニ評價スル懼ガアルカラ、染色液ハ、或程度ノ發育防止作用ガナケネバナラス。

e) 菌ノ分子運動及ビ固有運動ハ、鏡檢計算上非常ナ妨ゲトナルカラ、菌運動ヲ阻止スル様ナ染色液ガ望マシイ。

以上ノ様ナ諸條件ガ必要デアルガ、水洗ヲ要シナイデ、其儘鏡檢シ得ルモノトシテ、諸家ノ使用シタ染色液ヲ舉ゲレバ次ノ様デアル。

イ) Hehewerth

エールリツヒ氏「アニリン」水「ゲンチアナ」紫液ヲ「アニリン」水デ2倍ニ薄メタモノ

ロ) Sommer

「フクシン」酒精飽和溶液 1.0cc
淨 水 150.0cc

ハ) Glynn

「チオニン」青酒精飽和溶液 1.0cc
1%石炭酸水 40.0cc

ニ) Callison⁽⁸⁴⁾

鹽 酸 2.0cc

0.002%昇汞水	100.0cc
1%「フクシン」水溶液	適宜量
ホ) Horváth ⁽³⁵⁾	
酒精	10.0cc
「グリセリン」	30.0cc
蒸溜水	60.0cc
「ゲンチアナ」紫酒精飽和溶液	10滴
へ) Scott u. Scott ⁽³⁶⁾	
ギームザ氏液	5.0cc
食鹽	0.1gr
「フォルマリン」	4.0cc
蒸溜水	100.0cc
ト) Kühne ⁽³⁷⁾	
「メチレン」青	1.5gr
溶性石炭酸	5.0cc
96%酒精	10.0cc
蒸溜水	95.0cc

以上ノ内デ、Sommer, Callison等ノ「フクシン」ヲ主劑トシタ染色液ハ、標本ガ稍々見難ク、亦 Kühne 氏液ハ染色力ガ稍々弱イ。依ツテ余ハ、比較的染色力ノ強イ「ゲンチアナ」紫ト、菌運動ヲ抑制スル「グリセリン」トヲ含有スル Horváth 氏液ヲ適當ト撰ンダ。然シ、コノ染色液ヲ、組成上カラ考ヘルト、菌増殖抑制力ガ稍々不十分デアリ、亦ソノ中ニ、10%ニ含マレテキル酒精ハ、標本作製後ニ蒸發シテ去リ、可檢液ヲ濃縮サセル懼ガアル。依ツテ余ハ酒精ヲ除キ、代リニ石炭酸ヲ加ヘテ次ノ様ニ改變シタ。

「グリセリン」	30.0cc
石炭酸	2.5cc
「ゲンチアナ」紫原液	2.0cc
蒸溜水	70.0cc

コノ改變染色液ニ、大腸菌液ヲ等量ニ加ヘテ検査シタ所、次ノ様ニ結果ヲ得タ。菌ノ運動ハ1—2分後ニ於テハ殆ド止ツテシマヒ、計算ノ妨ゲトナラヌ。亦、ソノ菌液ヲ覆蓋硝子デ擴ゲテ、普通顯微鏡及ビ暗視野法ヲ用ヒテ、菌數計算ヲ行ツタ所、兩回共ニ同等ノ成績ヲ得タ。依ツテ此ノ改變染色液ノ染色能力ハ充分ナモノト認メタ。亦、Horváth 氏液及ビソノ改變液ノ菌増殖抑制作用ハ第2表ノ様デアツタ。

即チ大腸菌ノ 37°C 24時間「ブイヨン」培養ヲ、之等染色液ヲ用ヒテ各々2倍及ビ10倍ニ稀釋シ、5分後、10分後等ニ、之等カラ1白金耳宛取ツテ、新鮮「ブイヨン」ニ移植培養シ、濁濁發來ノ有無ヲ検査シタ。

2倍稀釋菌液デハ、Horváth 氏液ニ於テハ40分後、

第2表 Horváth 氏液及ビ其改變液ノ菌増殖抑制作用

稀釋液		Horváth氏液		改變液	
菌液ノ稀釋倍数		2	10	2	10
稀釋ヨリ培養迄ノ時間	5分	+	+	+	+
	10分	+	+	+	—
	15分	+	+	+	—
	20分	+	+	+	—
	30分	+	—	+	—
	40分	+	—	—	—
60分	—	—	—	—	

備考 (+)ハ「ブイヨン」ニ濁濁發來スルヲ示ス

其改變液ニ於テハ30分後迄「ブイヨン」ノ濁濁ヲ來シタ。然シ、10倍稀釋菌液デハ前者ハ20分後ノモノ迄濁濁シテ來タガ、後者ニ於テハ僅カ10分後ニハ既ニ濁濁ヲ來サナカツタ。

一般ニハ、菌液ヲ10乃至20倍ニ稀釋シテ鏡檢スル場合ガ多イ。依ツテ、コノ改變液ハ、實用上充分ナ殺菌力ヲ持チ、菌ノ増殖ヲ抑制スルト同時ニ、操作中ニ感染ヲ來ス様ナ危険ヲ無クスルモノト見做シ得ル。

第2目 覆蓋硝子使用ニ依ル鏡檢ノ計算法

1) 標本作製法

a) 稀釋

豫メ載物硝子ニ塗抹スル前ニ、前述ノ様ニ「ピペット」ヲ以テ稀釋染色シタ。

b) 塗抹方法

Klein, Hehewerth 等ハ、菌液ヲ白金耳デ、載物硝子上ニ塗抹シテ、一定面積ニ擴ゲタガ、白金耳デ塗抹スルト、菌液ノ一部ガ、白金耳ニ附着殘留スル爲、正確ナ分量ヲ塗抹デキナイ。

從ツテ余ハ、白金耳ヲ用ヒナイデ、「ピペット」ヲ利用シタ。

亦載物硝子ノ上デ、菌液ヲ一定面積ノ廣サニ平等ニ塗抹スル事ハ困難デアルカラ、余ハ覆蓋硝子ヲ利用シタ。

即チ、載物硝子ノ上ニ、「ピペット」デ菌液ノ一定量(例ヘバ0.005又ハ0.01cc)ヲ採リ、直チニ之ヲ直径18mmノ圓形覆蓋硝子デ覆ツタ。

但シ此際ニハ菌液ノ滴下サレタ部分ニ濃厚ニ沈着シテ居ルカラ、之ヲ其儘覆蓋硝子デ覆ハナイデ、覆蓋硝子ノ一端ヲ攝子デ保持シナガラ、殆ド全面ガ菌液ト接觸スル程ニ伏セテカラ、又急ニ之ヲ起ス。此ノ操作ニ

依ツテ、載物硝子上ニ沈着シテ居タ菌ガ再び浮游シテ來ルカラ、之ヲ2、3回繰返シテカラ覆蓋硝子ヲ伏セル。スルト菌ハ兩硝子ノ間ニ平等ニ浮游分布シテ來ル。

然シ此ノ方法ニ於テハ、覆蓋硝子ハ固定サレテ居ナイカラ、油浸レンズヲ用ヒルト、覆蓋硝子モ共ニ移動シテヨクナイ。

從ツテ一般ニ乾燥系デ鏡檢シナケレバナラナイ。特ニ油浸「レンズ」ヲ用ヒル場合ニハ、「ワゼリン」デ覆蓋硝子ヲ固定スルガヨイ。

但シ Wámoscher⁽⁸⁸⁾ 等ハ、暗視野装置ニ依ル菌數計算ヲ行ツタガ、此場合ニハ原材料ヲ其儘染色シナイデ、鏡檢デキル利點ガアル。

2) 顯微鏡ノ視野ノ面積

余ノ使用シタ「ライツ製顯微鏡(筒長130mm、以下同様)ニ於テ、接眼レンズ」(以下 Oc.ト略稱)4、接物レンズ」7(以下 Ob.ト略稱)ノ時ノ倍率ハ625倍、同ジク Oc.4、Ob.1/12ノ時ハ1050倍デアル。

第3表 顯微鏡(「ライツ」)ノ倍率ト視野ノ面積

接眼「レンズ」		Oc. 4	
接物「レンズ」		Ob. 7	Ob. $\frac{1}{12}$
視野ノ直径		0.26mm	0.16mm
視野ノ面積		$5.5 \times 10^{-2} \text{mm}^2$	$2.0 \times 10^{-2} \text{mm}^2$
Oc.M.ノ面積		$1.5 \times 10^{-2} //$	$7.0 \times 10^{-3} //$
方硝形覆蓋硝子	硝子ノ面積 視野ノ面積	5.9×10^3	1.6×10^4
	硝子ノ面積 Oc.M.ノ面積	2.1×10^4	4.7×10^4
圓硝形覆蓋硝子	硝子ノ面積 視野ノ面積	4.6×10^3	1.3×10^4
	硝子ノ面積 Oc.M.ノ面積	1.6×10^4	3.7×10^4

備考 但シ筒長ハ130mm デアル

今接物測微計デ、兩者ニ於ル視野ノ直径ヲ測定スルト、第3表ノ様ニ、前者ニ於テハ0.26mm、後者ニ於テハ0.16mmデアツタ。之カラ1視野ノ面積ヲ計算スルト、前者ニ於テハ、約 0.055mm^2 、後者ニ於テハ約 0.02mm^2 トナル。今一邊或ハ直径ガ18mmノ覆蓋硝子ヲ用ヒテ、菌液ヲ擴ゲル時ハ、ソノ面積ト1視野ノ面

積トノ關係ハ次ノ様ニナル。即チ正方形覆蓋硝子ニ於テハOc.4、Ob.7ノ時ニハ、1視野ノ面積ノ約5900倍、亦Oc.4、Ob.1/12ノ時ハ約16000倍トナル。

同様ニ圓形覆蓋硝子ニ於テハ、各々大約4600倍及ビ13000倍トナル。

以上ノ様ニ、1視野ノ面積ト覆蓋硝子ノ面積トノ比ガ判明スレバ、之ニ依ツテ可檢液中ノ菌數ガ求メ得ラレル。然シ1視野内ニ相當多數ノ菌ガ存在スルト計算ガ困難トナル。コノ様ナ場合ニハ Skar⁽⁸⁹⁾ニ倣ツテ、網狀接眼測微計ヲ用ヒ、1視野ヲ更ニ細分シテ、計算ヲ容易ナラシメタ。

余ノ使用シタ接眼網狀測微計(以下 Oc.M.ト略稱)ノ目盛ハ、一邊ガ1cmノ正方形デ、各邊共ニ10等分サレテ、都合100箇ノ小正方形ニ分割サレテ居ル。鏡檢時ニ於ル Oc.M 全體ノ面積ヲ同様ニ測定シタ所、Oc.4、Ob.7デハ 0.015mm^2 、Oc.4、Ob.1/12デハ 0.007mm^2 デ、覆蓋硝子ノ面積トノ關係モ、第3表ニ示ス通りデアル。

第3目 計算室ニ依ル菌數計算法

1) 計算室

a) 「トーマ・ツアイス」血球計算室

一般ニ血球計算ニ使用セラレル「トーマ・ツアイス」計算室ハ、深サガ0.1mmデ、底面ニハ邊ノ長サ1.0mmノ正方形ガ描カレテアル。ソノ各邊ハ更ニ20箇ニ等分サレテ居ルカラ、都合400箇ノ小區劃(面積 $\frac{1}{400} \text{mm}^2$)ニ細分サレル。コノ計算室ヲ細菌數計算ニ使用スル時ハ、稍々深過ギテ不便デアル。

b) 「リープライヒ」計算室

Liebreichノ考案ニ依ルモノデ、底面ガ廣ク、深サガ淺クテ細菌ノ計算ニ至便デアル。即チ底面ニハ横10mm、縦3mmノ短形ガ描カレ、各邊ハ更ニ1/10mm宛ニ等分サレテ居ル。依ツテ都合3000箇ノ正方形(面積 $\frac{1}{100} \text{mm}^2$)ニ細分サレテ居ル。ソノ深サハ0.025mmデアツテ、「トーマ・ツアイス」計算室ノ1/4デアル。

兩計算室ノ容積ハ、ソノ1小區劃ヲ底面トスル時ハ、兩者共ニ相等シク、 $\frac{1}{4000} \text{mm}^3$ デアル。

余ハコノ「リープライヒ」計算室2枚ト、「トーマ・ツアイス」計算室4枚ヲ併用シタ。

2) 菌液ノ稀釋度

菌液ヲ稀釋スル程、計算室ノ菌數ガ減リ、且ツ精密度ハ減退スル。然シ1視野内ノ菌數ガアマリニ多過ギルト、鏡檢上、計算ガ困難トナル。余ノ經驗デハ、「トーマ・ツアイス」計算室デハ、大體一小區劃内ニ、菌

數10~15個内、「リープライヒ」計算室デハ、20~30個内ガ適當ト思ハレル。

3) 顕微鏡倍率

油浸「レンズ」ハ、一般ニ焦點距離ガ短イ爲ニ、計算室底部ノ菌ヲ見ヤウトスルト、兎角覆蓋硝子ニ衝撃ヲ與ヘ易イ。依ツテ、計算室使用ノ場合ニモ、専ラOc.4、Ob.7ノ乾燥系(倍率625倍)デ鏡檢シタ。

4) 標本ヲ作ツテカラ鏡檢ヲ初メル迄ノ時間

標本作製直後デハ、未ダ大多數ノ菌ガ浮游シテ居テ、鏡檢計算ガ煩雜デアルカラ、シバラク時間ヲ經テ、菌ガ室底ヘ沈降シテカラ鏡檢シタ方ガヨイ。即チ「トーマ・ツアイス」計算室ニ於テハ、作製ヨリ5~10分程經テカラ鏡檢スルト、計算ガ容易デアル。然シ「リープライヒ」計算室デハ淺イカラ作製直後カラ鏡檢シテモヨイ。

5) 計算室内ニ於ル菌ノ分布

「リープライヒ」計算室ハ非常ニ淺イ爲ニ、菌ハ擴ラナイデ、菌液滴下部ニ集積シ易イカラ、コノ場合モ亦、覆蓋硝子ヲ動カシテ、菌ヲ均等ニ分布サセル様ニ努メネバナラヌ。

第4目 鏡檢視野數及ビ菌數算出式

1) 鏡檢視野數

多數ノ視野ニ就テ調べル程、正確ナ信頼度ノ高イ成績ヲ求メ得ルノデアルガ、其レニ應ジテ多大ノ勞力ヲ要シ、亦余ノ經驗デハ40~50視野以上ヲ計算スルト、ソノ間ニ標本モ次第ニ乾燥濃縮シテ來テ、菌數ヲ過大ニ評價シ易イ。依ツテ、第4及ビ第5表ニ示シタ3種鏡檢ノ計算法ノ比較ハ次ノ様ニ行ツタ。

a) 覆蓋硝子法

左右及ビ上下ノ方向ニ、各々10視野宛及ビ右上、右下、左上、左下ノ各4分ノ1象限ニ5視野宛、合計40視野鏡檢スル。

b) 「トーマ・ツアイス」計算室

20横列ノ中カラ、5列間隔ニ4列ヲ撰ビ、各横列ニ就テ、10區劃間隔ニ、10區劃計算スル。即チ合計40區劃計算スル。

c) 「リープライヒ」計算室

5列間隔ニ7横列、亦ハ10列間隔ニ4横列ヲ撰ビ、各列ニ就テ同様ニ10區劃計算スル。即チ40或ハ70區劃計算スル。

2) 菌數算出式

原菌液1.0cc中ノ菌數ハ次ノ様ニナル。

a) 覆蓋硝子法

圓形覆蓋硝子ヲ用ヒ、Oc.4 (Oc.M併用)、Ob.7ノ下ニ鏡檢スル時ハ、

$$1 \text{ 視野内ノ平均菌數} \times 4.6 \times 10^3 \times \frac{\text{菌液稀釋倍數}}{\text{塗抹液量(cc)}}$$

b) 計算法

$$1 \text{ 區劃内ノ平均菌數} \times \text{菌液稀釋倍數} \times 4 \times 10^6$$

第2節 實驗成績

第1項 覆蓋硝子法ト計算法トノ比較

同一材料ニ就テ、以上3種ノ鏡檢ノ計算法ヲ實施シテ、之等ヲ相互ニ比較シタ。

即チ大腸菌ノ、37°C、24時間「ブイヨン」培養0.2ccニ染色液1.8ccヲ加ヘ、之ニ就テ實驗シタ所、第4及ビ第5表ニ示ス様ナ成績ヲ得タ。

但シ、覆蓋硝子法ニ於テハ、0.05ccヲ塗抹シ、亦「トーマ・ツアイス」計算室ニ於テハ、右ノ稀釋菌液ノ菌數ガ多過ギタノデ、更ニ其レヲ2倍ニ稀釋シタ。

第4表 覆蓋硝子ヲ用ヒテノ菌數計算

實驗 番號	一視野中ノ菌數		1/4000mm ³ 中ノ菌數		V
	M	m	M	m	
1	35.40	1.05	28.83	0.86	18.8
2	32.72	1.35	26.65	1.10	26.1
3	36.20	0.85	29.48	0.69	14.9
4	33.95	2.15	27.65	1.75	40.2
5	41.27	1.66	33.61	1.35	25.6
6	32.27	1.63	26.28	1.33	32.0
7	38.47	1.29	31.33	1.05	21.2
8	43.60	1.37	35.50	1.12	19.1
9	35.32	1.26	28.76	1.03	22.6
10	35.37	0.80	28.80	0.65	14.3
平均	36.46	1.34	29.69	1.09	23.5

第1目 覆蓋硝子法(第4表)

1視野中ノ平均菌數ハ最大43.60(實驗8)、最小32.27(實驗6)、平均36.46デアル。計算法ト比較スル爲ニ之ヲ1/4000mm³中ノ菌數ニ換算スルト、最大35.50、最小26.28、平均29.69トナル。其際標準誤差ハ最大1.75(實驗4)、最小0.65(實驗10)デ平均1.09トナル。以上ハ40視野鏡檢ニ於ル成績デアルガ、今、假ニ、之等全部ヲ一括シテ、1回ニ400視野鏡檢シタト假定スレバ、標準誤差ハ減少シテ0.38トナリ、40視

第 5 表 計算室=依ル菌數計算

實驗 番號	「リーブライヒ」計算室						「トーマ・ツァイス」計算室				
	70區劃鏡檢			40區劃鏡檢			40 區 劃 鏡 檢				
	1/4000mm ³ 中ノ菌數			〃			2倍稀釋ニ於ケル1/4000mm ³ 中ノ菌數		1/4000mm ³ 中ノ菌數		
	M	m	V	M	m	V	M	m	M	m	V
1	34.27	0.73	17.9	34.65	0.74	13.8	15.92	0.45	31.84	0.90	20.1
2	28.35	0.25	7.4	28.52	0.86	20.6	16.22	0.53	32.44	1.06	23.1
3	31.21	0.92	24.7	32.23	1.53	24.5	15.28	0.50	30.56	1.00	23.4
4	31.71	0.63	16.8	32.50	0.77	15.1	15.68	0.51	31.36	1.02	23.1
平均	31.39	0.63	16.7	31.90	0.97	18.5	15.77	0.50	31.54	1.00	22.4

野鏡檢時=比較シテ約1/3トナル。

亦變異係數=就テ考ヘルト、實驗 8 ノ變異係數ハ、實驗 7 ヤ 9 ノ夫レヨリモ小サイ。然シソレ等各々ノ平均值 (29.69) ト、全部ヲ一括シテ平均值トノ差ハ、逆=實驗 8 ノ方が大キイ。

即チ實驗 8 = 於テハ、各視野中ノ菌數ガ比較的均等ナノデアアルガ、割合=菌數ノ多イ視野ヲ鏡檢シタ爲ニ、ソノ平均值モ亦大キクナツタノデアアル。從ツテ鏡檢視野數ハ40視野位デハ未ダ不充分ト思ハレル。

第 2 目 計算室法(第 5 表)

1) 「リーブライヒ」計算室

70及ビ40區劃鏡檢ヲ各々4回宛行ツタ。

イ) 70視野鏡檢

1 區劃内ノ平均菌數ハ最大 34.27 (實驗 1)、最小 28.35(實驗 2)、平均 31.39トナツタ。標準誤差ハ最大 0.92(實驗 3)、最小 0.25(實驗 2)、平均 0.63トナツタ。

亦之等 4 回ノ實驗ヲ一括スルト、標準誤差ハ 0.41 = 減少スル。

實驗 2 ノ變異係數ハ、實驗 3 及ビ 4 ノ夫レヨリモ小サイガ、各々ノ平均值ト總平均值(31.39)トノ差ハ逆=實驗 2 ノ方が大キイ。從ツテ、コノ場合モ、覆蓋硝子法=於ルト同様ニ、鏡檢區劃數ガ、70位デハ、各區劃内ノ菌數ガ比較的均等デアツテモ、ソノ平均值ハ特=正確デアルト斷言スル事ハ出來ナイ。

ロ) 40區劃鏡檢

1 區劃内ノ平均菌數ハ、最大 34.65(實驗 1)、最小 28.52、平均 31.90デアアル。標準誤差ハ 0.74 ~ 1.53 (平均 0.97)デアアルガ、之等全部ヲ一括スルト 0.53 = 減少スル。

2) 「トーマ・ツァイス」計算室(第 5 表)

1 區劃内ノ平均菌數ハ、最大 16.22(實驗 2)、最小 15.28(實驗 3)、平均 15.77デアアル。標準誤差ハ、最大 0.53(實驗 2)、最小 0.45(實驗 1)、平均 0.50トナリ、全體ヲ一括シタ場合=ハ 0.25トナル。變異係數ハ 20.1 ~ 23.4 デ皆殆ド相似テ居ル。

第 3 目 之等兩方法ノ比較

以上ノ様= 1 視野(或ハ 1 區劃)内ノ菌數ハ大小種々デアアル。

今第 4 表 及ビ 第 5 表ノ實驗= 於テ、1 視野(或ハ 1 區劃)内ノ菌數ヲ横軸=採リ、ソレ等ノ出現頻度ヲ縦軸=トツテ、菌ノ分布状態ヲ圖示スルト第 1 乃至第 4 圖ノ様=ナル。

亦正規曲線ノ方程式=依リ、ソレ等ノ理論的度數分布ヲ求メテ併記シタ。

$$\text{正規曲線ノ方程式: } y = \frac{n}{\sqrt{2\pi} \cdot \sigma} \cdot e^{-\frac{d^2}{2\sigma^2}}$$

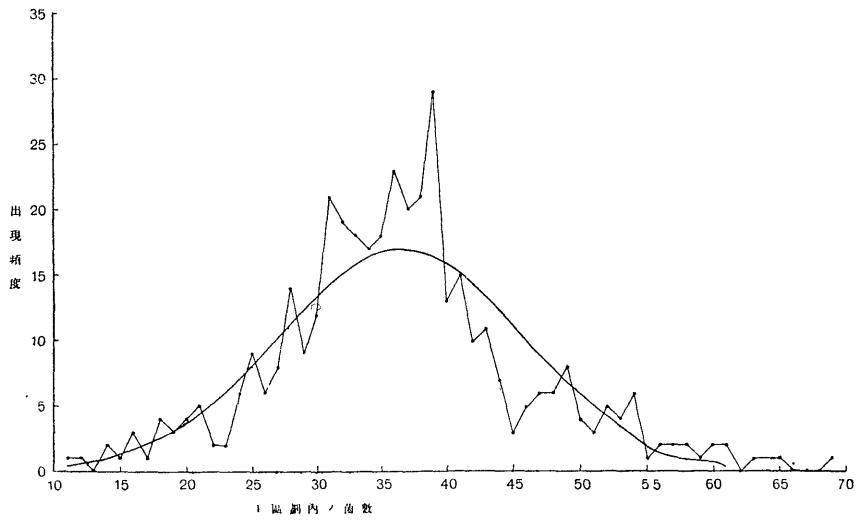
(但シ n ハ項數、σ ハ標準偏差、y ハ正規線上ノ任意ノ項ノ縱坐標、d ハソノ項ノ M ヨリノ偏差、e ハ自然對數ノ底デアアル)

第 1 圖: 覆蓋硝子=於ル 40 視野計算

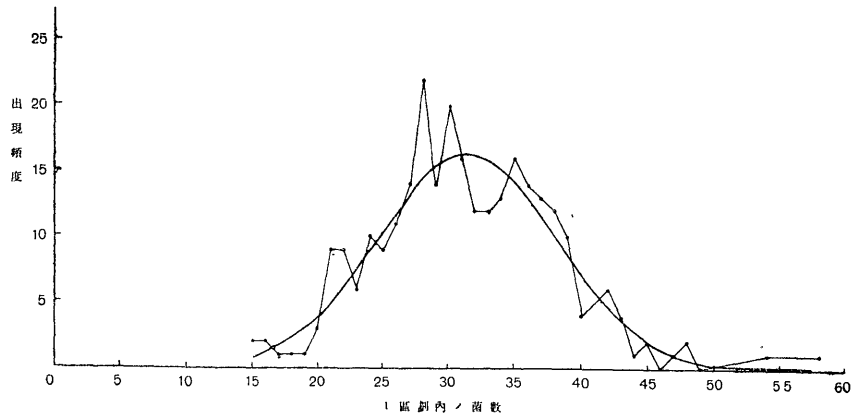
第 2 圖: 「リ」計算室=於ル 280 區劃計算

第 3 圖: 「リ」計算室=於ル 160 區劃計算

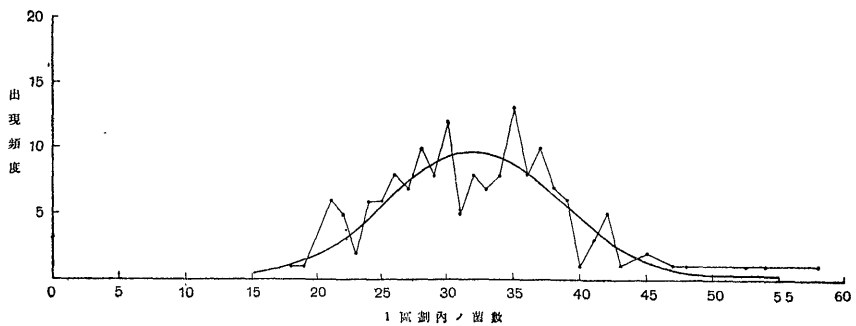
第 1 圖 覆蓋硝子ニ於ル 400 視野鏡檢



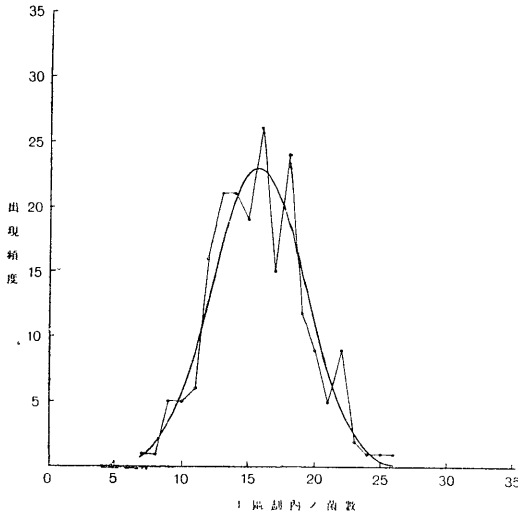
第 2 圖 「リ計算室ニ於ル 280 視野鏡檢



第 3 圖 「リ計算室ニ於ル 160 視野鏡檢



第4圖 「ト計算室ニ於ル160視野鏡檢



第4圖：「ト計算室ニ於ル160區劃計算

以上ノ中デ第1圖以外ノ3圖ハ皆、實測度數曲線ガ正規曲線ニ近イ形ヲ示シテ居ル。例ヘバ第2圖ニ於テ、實測度數ヲ、1區劃内ノ菌數ノ多寡ニ應ジテ14群ニ分ケ、Pearsonノ「カイ」自乗檢査ヲ行フト、

$$X^2 = \sum \frac{(f - f_t)^2}{f_t} \approx 11.5 \text{ トナル。}$$

(但シフハ實測度數、 f_t ハソノ理論度數デアル)

$n=14$ (度數群ノ群數)、 $X^2 = 11.5$ ノ時ハ、Pearsonノ表ニ依リ $P \approx 0.6$ トナル。

即チ、「リーブライヒ」計算室内ニ於ル菌ノ分布状態ハ、本來ハ正規分布ニ一致スルノデアルガ、コノ場合ニ、可檢區劃ノ撰擇ニ依リ、偶然ニコノ程度ノ差ガ起ツタモノト見做シ得ル確率ハ0.6デアル。同様ニシテ、第1圖ニ於テハ $P \approx 0.5$ 、第3圖及ビ第4圖ニ於テハ $P \approx 0.6$ トナル。

從ツテ、一般ニ計算室ニ於テハ、菌ノ分布ハ、正規分布ニ一致スル。亦覆蓋硝子法ニ於テモ、多數ノ視野ヲ計算スルト同様ニ正規分布ニ近ヅク。

之等3方法ニ依ル、菌液 $\frac{1}{4000} \text{mm}^3$ 中ノ菌數ハ、「トーマ・ツァイス」計算室デハ 31.54、「リーブライヒ」計算室デハ 31.39 (70視野鏡檢) 及ビ 31.90 (40視野鏡檢)、亦覆蓋硝子法デハ 29.69デアル。

今、最モ一般的ナ「トーマ・ツァイス」計算室ニ依ル平均値ヲ規準トシテ、之等ノ平均値ノ差ヲ、各々ノ標準誤差ヲ以テ吟味スルト、第6表ノ最右行ノ數值ハ總テ 3.0 以下トナル。

第6表 3種計算法ニ依ル平均値ノ比較

種類	勞力		M	m	最大百分率偏差	$\frac{M \sim M_1}{\sqrt{m^2 + m_1^2}}$
	標本作製	鏡檢				
「トーマ・ツァイス」	容易	稍困難	31.54	0.99	+3.48(實驗2)	
「リーブライヒ」	"	容易	31.39 (70視野鏡檢)	0.63	-9.37(" 2)	0.08(有意ナラズ)
			31.90 (40視野鏡檢)	0.97	-10.09(" 2)	0.10(")
覆蓋硝子	困難	困難	29.69	1.09	+19.58(" 8)	1.20(")

備考 1 此ノ場合ノ M, m ハ總テ第4表及ビ第5表ニ於ル各標本ノ M, m ノ平均値デアル

2 總テ「ト計算室ニ依ル平均値ト比較シタ

從ツテ、之等ノ平均値ノ差ハ、有意義トハ斷定出來ナイ。特ニ「リーブライヒ」計算室ニ於テハ、0.08 及ビ 0.10トナルカラ、之等ノ兩計算室ニ依ツテ、殆ド同一ノ成績ヲ得ルモノト見做ス事ガ出來ル。

次ニ、之等ノ方法ニ於テ要スル勞力ヲ比較ス

レバ、標本作製ハ、兩計算室共ニ至極容易デアル。然シ覆蓋硝子法ニ於テハ、菌ノ均等ニ分布シタ標本ヲ作ルノハ、非常ニ困難デアツテ、作ツタ標本ヲ先ヅ弱擴大デ鏡檢シ、菌ノ分布状態ヲ見ルト、稍々良好ト思ハレルモノハ、10枚ノ中3~4枚位シカ無イ。第4表ノ成績ハ、總テ

第7表 40區劃計算=於ル各計算室ノ比較

實驗 番號	「トーマ・ツァイス」計算室		「リープライヒ」計算室		「トーマ・ツァイス」計算室		「リープライヒ」計算室		百分率偏差		平均偏差		V								
	菌數	偏差	菌數	偏差	菌數	偏差	菌數	偏差	1	2	1	2									
1	211	-5.5	217	+0.5	214	-2.5	222	+5.5	226	+9.5	208	-8.5	216.5	-2.5	+0.5	-1.1	+2.5	+4.3	-3.9	2.46	3.09
2	212	-11.0	218	-5.0	223	0	236	+13.0	248	+25.0	201	-22.0	223.0	-4.9	-2.2	0	+5.8	+11.2	-9.8	5.65	7.50
3	239	+5.0	242	+8.0	241	+7.0	206	-28.0	200	-34.0	276	+42.0	234.0	+2.1	+3.4	+3.0	-11.9	-14.1	+17.9	8.73	11.70
4	358	+11.2	337	-9.8	348	+45.0	340	-6.8	370	+45.0	328	-18.8	346.8	+3.2	+2.8	+0.3	1.9	+6.6	-5.4	3.36	4.35
5	312	-35.0	349	+2.0	392	+1.2	328	-19.0	392	+23.2	309	-38.0	347.0	-10.1	-0.6	+12.9	-5.4	+12.9	-10.9	8.80	10.80
6	421	+35.0	388	+2.0	366	-20.0	380	-6.0	385	-1.0	376	-10.0	386.0	+9.1	+0.5	-5.2	1.5	+0.3	-2.6	3.03	4.80
7	418	+8.2	380	-29.2	442	+32.2	434	+24.2	409	-0.8	376	-38.8	409.8	+2.0	+7.2	+7.8	+5.0	-0.2	-8.0	5.03	6.40
8	423	-26.0	453	+4.0	481	+32.0	431	-18.0	427	-22.0	479	+30.0	449.0	+5.7	+0.9	+7.1	-4.0	-4.9	+7.0	4.93	6.09
9	453	+2.2	435	-15.8	453	+2.2	436	-14.8	497	+46.2	431	-19.8	450.8	+0.5	+3.5	+0.4	-3.8	+10.2	-4.4	3.80	5.50
10	688	-3.3	686	-	669	-22.3	720	+23.7	604	-87.3	781	+89.7	691.3	+0.5	-0.7	-3.2	+4.1	-12.6	+12.9	5.67	9.50
										正偏差~負偏差		平均菌數		百分率偏差		平均偏差		V			
										-0.7		3.1		-1.1		6.9		最小2.46 最大8.80		3.09 11.70	
										3.1		2.3		4.1		2.3		8.6		平均5.15	

良好ト思ハレル標準=就テ行ツタノデアルガ、而モ、最大百分率偏差ハ+19.58%デ相當=大キイ。他方、計算室=於テハソノ値ハ遙=小サク、「リープライヒ」計算室デハ約10%、「トーマ・ツァイス」計算室デハ約4%デアル。亦、鏡檢時ノ勞力ハ、覆蓋硝子法=於テハ、接眼測微計ヲ用ヒタ爲=相當=眼ガ疲レタ。他方「リープライヒ」計算室=於テハ、最モ容易デアリ、「トーマ・ツァイス」計算室=於テハ、比較的深イ爲=稍困難ヲ感ジタ。依ツテ、以後ノ實驗=於テハ、覆蓋硝子法ヲ廢シテ、専ラ計算室ヲ用ヒタ。

第2項 兩計算室法ノ比較

次ニ、1區劃内ノ菌數ガ、5~15個ノ稀薄ナ菌液=就テ、菌數計算ヲ行ツタ(第7表)。

即チ、之等6枚ノ計算室ヲ併用シ、各々40區劃宛計算シ、之等6個ノ數值カラ、平均菌數ヲ求メテ見タ。其際ノ平均偏差ハ最小2.46%(實驗1)、最大8.8%(實驗5)、平均5.15%デアツタ。

亦、最大偏差ハ、「トーマ・ツァイス」計算室=於テハ、11.9%(實驗3ノ計算室4)、「リープライヒ」計算室=於テハ、17.9%(實驗3ノ計算室2)デアル。之等ノ偏差ヲ、各計算室毎=平均スルト、前者=於テハ3.1%、2.3%、4.1%及ビ2.3%、後者=於テハ6.9%及ビ8.6%トナル。

即チ前者ノ方ガ、一般=後者ヨリモ、比較的一定シタ値ヲ示ス。

亦、各計算室別ニ、正偏差ト負偏差トノ差ヲ求メルト、前者デハ-0.7%、-1.1%、+2.2%、-1.1%、後者デハ+1.3%及ビ+0.3%トナリ、共ニ非常ニ小サナ數值トナル。從ツテ各計算室共ニ、ソノ容量ハ、皆相等シイ事ヲ更ニ確認シタ譯デアル。

第3章 生菌數測定法

第1節 實驗材料竝ニ實驗方法

第1項 實驗材料

1) 菌種 :

一般ニ 37°C, 12時間「ブイオン」培養ノ大腸菌ヲ用ヒタ。

2) 培地 : 普通寒天 (1%) 及ビ弱「アルカリ」性「ブイオン」ヲ用ヒ, 共ニ全實驗ヲ通ジテ, 其ノ組成ヤ P_H ヲ可及ノ一定ナラシメル様ニ心懸ケタ。

3) 稀釋液 : 一般ニ, 可檢菌ノ培養ニ用ヒタモノト同様ノ「ブイオン」ヲ用ヒタ。

4) 平板 : 常ニ, ペトリー氏皿ヲ使用シ, ソノ内徑ハ 8.5~9.0cm デ面積ハホボ 60cm² デアル。

5) 平板觀察用具 : ウォルフビュエー氏集落計算板及ビ「ルーペ」(倍率 8 倍) ヲ用ヒタ。

第2項 實驗方法

1) 一定量 (5~20cc) ノ滅菌「ブイオン」ヲ, 豫メ 37°C ニ温メテ置キ, 之ニ一定量 (0.1~1.0cc) ノ菌液ヲ加ヘテ, 適當ノ濃度ニ稀釋スル。コノ稀釋液ノ一定量 (0.01~0.1cc) ヲ平板内ニ採リ, 之ニ, 水浴中デ 47°C ニ保ツタ寒天 15cc ヲ加ヘテ, 充分ニ混和スル室温, 20~30 分ヲ經テ, 寒天ガ凝固スルト, 之ヲ 37°C ノ孵卵器ニ納メテ培養シ, 24時間後ニ觀察スル。但シ寒天表面ノ過剩ノ凝固水ヲ除ク爲ニ, 孵卵器中デ最初ノ 20~30 分間ハ, 平板ノ蓋ヲ半開ニシテ置ク必要ガアル。

2) 可檢菌液ノ均等化ニ就テハ, コノ場合ニハ強烈ナ振盪ヲ行ハナカッタ。即チ菌液ヲ比較ノ大キイ容器ニ入レテ, 之ヲソノ儘手デ約 10 分間振盪スルニ止メタ。

3) 集落數計算ノ際ニハ次ノ様ナ平板ハ, 之ヲ除外シタ。

a) 雜菌ノ迷入シタモノ

b) 集落ノ分布ガ不均等デ, 一局所ニ集合偏在スルモノ

c) 集落ガ癒合シテ菌苔トナレルモノ (カカル現象ハ寒天ノ表面丈ケデハナク, 底面ニ於テモシバシバ起ル)

4) total count ト group count

前述ノ様ニ, 培養ニ依ツテ生菌數ヲ測定スル場合ニハ, 強力ナ振盪ヲ行ツテ各菌ヲ總テ個々ニ分離サセル事ハ出來ナイ。從ツテ生菌數ト總菌數ヲ比較スル際ニハ, Glynn, Tennison 等ノ行ツタ様ニ, 各菌ヲ總テ 1 單位トシテ計算 (total count) スル外ニ, 1 個ノ菌集團ヲ 1 單位トシテ計算 (group count) スル必要ガアル。但シ group count ハ total count ト異リ, 培養ニ用ヒル菌液中ニ於ル菌ノ分離状態ヲ知ル爲ニ行フノデアアルカラ, 菌液ヲ其儘鏡檢スルベキデアツテ, 其以上ノ振盪ヲ加ヘテハナラヌ。

第2節 實驗成績

第1項 平板全面通算トウォルフビュエー

第 8 表 平板全面通算及ビウォルフビュエー氏計算板ニ依ル 20 區劃計算

實驗 番號	觀察 平板 數	20 區 劃 計 算							平 板 全 面 通 算					$\frac{M_1 \times 3}{M_2} \times 100$
		最大及 最小 集落數	最大百分 率 偏 差	M ₁	σ ₁	m ₁	V ₁	最大及 最小 集落數	最大百分 率 偏 差	M ₂	σ ₂	m ₂	V ₂	
1	6	71 51	+18.98	59.67	6.7	2.99	11.22	204 165	+12.60	181.17	13.19	5.89	7.26	98.8
2	9	126 100	+11.94	112.56	8.05	2.82	2.89	344 274	+12.00	305.33	24.16	8.54	7.91	110.5
3	9	143 108	+15.11	124.22	9.47	3.34	7.62	410 303	+19.45	343.11	29.2	10.32	8.51	108.6
4	7	185 139	-16.19	165.85	14.36	5.86	8.05	520 412	+14.14	455.55	36.6	14.94	8.03	109.2
5	9	221 162	-16.55	194.11	20.1	7.11	10.35	625 509	-12.81	583.77	27.9	9.86	4.77	99.7
6	7	259 204	-12.88	234.14	16.79	6.85	7.17	771 637	+11.37	692.28	53.2	21.7	7.68	101.4
7	10	400 323	+12.95	354.12	23.32	7.77	6.57	1211 963	+13.62	1065.8	66.4	2.13	4.13	99.6
8	6	554 475	+ 8.96	508.40	27.9	13.95	5.48	1566 1458	+ 4.55	1497.8	40.7	20.35	2.71	101.8
9	6	559 526	- 3.62	545.75	13.67	7.90	2.50	1753 1613	- 5.96	1679.50	51.8	29.9	3.08	97.4

氏集落計算板=依ル省略計算トノ比較

平板全面=亙ツテ、集落數ヲ計算スレバ、最も正確デアルガ、之ハ集落數ノ非常=多イ場合ニハ大變煩勞デアル。余ハウォールフヒューゲル氏計算板ヲ用ヒテ、平板上=X字型=20區劃ヲ撰ビ、ソノ中ノ集落數ヲ計算シタ。此ノ1區劃ノ面積ハ1cm²、亦平板ノ面積ハ約60cm²デアルカラ、求メタ集落數ヲ3倍スルト全集落數トナル譯デアル。余ハ同一ノ平板=就テ全面通算及ビ上述ノ省略計算ヲ併用シテ第8表ノ様ナ成績ヲ得タ。1平板内ノ總集落數ハ大約200乃至2000個デ、各組ノ平板數ハ6乃至10枚デアル。

1) 最大百分率偏差

省略計算=於テハ3.62~18.98% (平均13.13%)、全面通算=於テハ4.55~19.45% (平均11.81%)トナル。

2) 變異係數

簡略計算=於テハ2.50~11.22 (平均7.21)、全面通算=於テハ2.71~8.51 (平均6.01)トナリ、後者ノ方ガ稍小サイ。

3) 兩平均值ノ比較

「ペトリー氏皿ノ面積ヲ總テ60cm²ト見做スナラバ、全面通算=依ル平均值ト、此ノ20區劃計算=依ル平均值ノ3倍ト一致スル筈デアル。前者=對スル後者ノ百分率ハ、表示ノ様=最大110.5% (實驗2)、最小17.4% (實驗9)、平均103.0%トナツテ後者ノ方ガ僅=大キイ。

此ノ兩平均值群ノ差ガ、之以上、即チ3%以上=大キイ値ヲ示ス場合ノ確率ハ、次ノPearson's Z-Value=依ツテ知ル事ガ出來ル。

$$Z = \frac{\bar{d}}{\sqrt{\frac{\sum(d-d)^2}{n}}}$$

(但シnハ實驗例數、dハ之等兩系列ノ差、 \bar{d} ハ差ノ平均デアル)

コノ場合=ハnハ9、 \bar{d} ハ3.0デアルカラ、

$$Z = \frac{3.0}{\sqrt{\frac{20.15}{9}}} \approx 0.23 \text{ トナル。}$$

Pearson氏確率表=依ツテ、Z=0.23、n=9ノ部ヲ求メルト、P=0.75ヲ得ル。即チ、集落ノ

分布平等ナ平板=於テハ、兩計算法=依ル平均値ノ差ハ、概シテ(100回中75回、即チ4回中3回)3%以内デアル。

第2項 平板培養作製=要スル時間ト集落數

余ハ、37°C=保温シタ「ブイヨン」デ、菌液ヲ稀釋シ、15分間以内=、逐次、10枚ノ平板ヲ作ツタ所、各平板ノ集落數ハ培養ノ順序=依ツテ増大或ハ減少スル様ナ一定ノ時間的關係ハ認めラレナカツタ。

第9表 平板培養作製=要スル時間ト集落數

實驗番號	1	2	3	4	5	平均	
平板集落數	1777.0	609.7	320.4	231.9	160.7		
平板番號	1	101.6	95.4	90.8	99.6	99.5	97.4
	2	97.0	96.9	98.6	99.1	107.0	99.9
	3	104.1	100.2	103.3	103.4	99.5	102.1
	4	95.6	99.2	101.7	105.2	94.5	99.2
	5	111.9	102.0	102.9	93.1	94.5	104.7
	6	106.2	99.0	101.4	101.3	106.4	102.8
	7	85.0	104.6	102.3	99.6	88.9	96.0
	8	104.4	108.2	105.4	94.4	100.8	102.6
	9	97.0	98.5	98.0	101.3	100.1	99.0
	10	96.7	95.6	95.1	101.3	108.2	99.5

備考：平板番號ハ培養ノ順序=從ヒ各平板ノ集落數ハ平均集落數=對スル百分率ヲ以テ示ス。
平均培養10枚ヲ作製スル=要スル時間ハ總テ15分間以内デアル

第3項 集落發生ノ時間的關係

大腸菌等ヲ、37°Cデ寒天=培養スル場合=ハ、普通24時間後=觀察スルヲ例トシテ居ル。余ハ念ノ爲ニ、24時間ヨリ以後=、更=集落ガ發生スル事ガアルカ否カラ検査シタ。

即チ24時間後ノ觀察ノ際=、平板ノ裏面カラ各集落=朱筆デ附標シテ置キ、次回ノ觀察=於テハ、其等以外ノ集落ノ有無ヲ注意スルノデアル。

但シ、常=「ルーペ」(倍率8倍)ヲ以テ觀察スル。亦平板全面ヲ通算スル便宜上、總集落數ガ概ネ100個以内ノ平板=就テ検査シタ。

第10表 集落發生ノ時間的關係

實驗番號	1	2	3	4	5	6
觀察平板數	10	12	11	6	10	9
24時間後ノ平均集落數	8.4	11.2	15.4	16.1	36.2	77.7
24時間後ノ總集落數	82	132	169	96	361	699
以後ノ增加數	2	3	0	1	1	5
增加總數×100 總集落數	2.5	2.2	0	1.0	0.2	0.7
晚期發生集落ノ所在部位	深部	深部	深部	深部	深部	深部

備考： 1 可檢菌：スベテ大腸菌ノ 37°C 12時間「ブイヨン培養」ヲ用フ
 2 菌液稀釋度：10~100万倍
 3 24, 48及ビ72時間後ニ觀察ス

ソノ結果、第9表ニ示ス様ニ、僅少乍ラモ24時間以後ニ至ツテ、初メテ認め得ル様ニナル集落ノアル事ヲ確メタ。而シテ總集落ニ對スル晚期發生集落數ノ百分率ハ、最高2.5%、平均1.1%デアツタ。

第4項 培養菌量ト集落數

菌ガ發育シテ集落ヲ形成スルニハ、一定量ノ區域ト榮養素ヲ必要トスル事ハ、想像ニ難クナイ。從ツテ培養サレル菌ノ量ガ、培地ノ量ニ比較シテ、非常ニ多イ時ニハ、一部ノ菌ガ發育増殖出來ナイデ死滅スル懼ガアル。一方、集落計算ニ依ツテ菌數ヲ求メル場合ニハ、總テノ菌ガ、個々獨立ノ集落ヲ形成スル事ヲ必要トスル。茲ニ於テ、余ハ次ノ様ニ實驗ヲ行ツテ、培養菌量ト集落數トノ關係ヲ吟味シタ。

1) 同一稀釋菌液カラ逐次遞減量ヲ培養 (第11表實驗1)

10000倍稀釋菌液カラ、0.4cc, 0.2cc 及ビ 0.1cc 宛ヲ採ツテ培養シ、I, II, IIIニ示ス様ニ成績ヲ得タ。之ヨリ原菌液 1cc 中ノ菌數ヲ求メ、Iニ依ル菌數ヲ100トスルト、II, IIIハ各々100及ビ95トナリ、大體ニ於テ3者共ニヨク一致スル。

2) 菌液ヲ逐次ニ稀釋シテ其等稀釋菌液ノ等量ヲ培養

a) 逐次2倍稀釋(同表實驗2~6)

例ヘバ、實驗3ニ於テハ、4000倍稀釋菌液ヲ、更ニ稀釋シテ8000倍及ビ16000倍稀釋菌液ヲ作り、各々カラ0.1cc宛ヲ採ツテ培養スル。

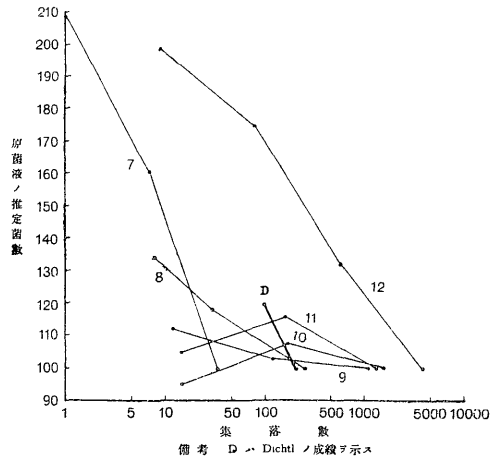
Iニ依ル原菌液 1cc 中ノ菌數ヲ100トスルト、II, IIIニ依ル菌數ハ、99~107各々(平均102)及ビ89~123(平均108)トナル。即チ2倍稀釋ニ於テハ、左程變化ハナイガ、4倍稀釋ニ於テハ稍々顯著ナ増加ヲ示ス。

b) 逐次10倍稀釋(實驗7~12)

前ト同様ニシテ、Iニ依ル原菌液 1cc 中ノ生菌數ヲ100トスレバ、II及ビIIIニ依ル推定生菌數ハ103~161(平均123)及ビ105~209(平均138)トナリ顯著ナ増加ヲ示ス。

原菌液ノ推定生菌數ヲ縱軸ニ取り、ソノ際ノ1平板内ノ平均集落數ノ對數ヲ橫軸ニ取ルト第5圖ノ様ニナル。

第5圖 集落數ト原菌液ノ推定菌數



即チ、コノ圖ハ逐次10倍稀釋法ニ依ツテ、培養シテ求メタ原菌液中ノ推定菌數ノ増加傾向曲線デアアル。之等ノ線ハ大體ニ於テ互ニ平行シテ居リ、1平板内ノ菌數ガ少クナルニツレテ上昇(即チ原菌液中ノ推定菌數ガ増加)スル傾向ガアル。然シ實驗10及ビ11ニ於テハ1平板内ノ集落數ガ100個以下ニナルト、傾向線ハ逆ニ下降シテ來ル。コノ様ニ原菌液中ノ菌數ヲ求メルト、培養菌量ノ多寡ニ依ツテ、大小幾多ノ數值ヲ得

第 1 1 表 培養菌量と集落數

實驗 番號	第 1 次 培 養 (I)							第 2 次 培 養 (II)							第 3 次 培 養 (III)							原菌液ノ 推定菌數		
	觀察 平板 數	最大及 最小 集落數	最大百 分率偏 差	M ₁	σ_1	m ₁	V ₁	觀察 平板 數	最大及 最小 集落數	最大百 分率偏 差	M ₂	σ_2	m ₂	V ₂	觀察 平板 數	最大及 最小 集落數	最大百 分率偏 差	M ₃	σ_3	m ₃	V ₃	I	II	III
1 (對照)	10	1014 873	- 9.4	964.2	40.1	13.6	4.15	10	522 429	-11.0	482.1	28.1	9.4	5.82	5	258 216	+ 12.6	229.2	14.8	7.4	6.46	100	100	95
2	7	771 622	+13.1	692.3	53.2	21.7	7.68	9	410 303	+19.5	343.1	29.2	10.3	8.51	6	196 90	- 40.9	152.4	26.4	11.8	17.30	〃	99	110
3	10	1980 1746	+8.24	1829.1	70.0	23.3	3.82	5	996 879	+ 8.2	920.4	90.0	45.0	9.78	4	603 466	- 16.9	561.0	80.8	29.3	14.40	〃	101	123
4	6	2721 2526	+ 4.4	2606.5	63.9	28.6	2.45	8	1680 1257	+19.6	1404.8	117.0	18.7	8.32	11	732 648	- 7.0	696.5	23.9	7.6	3.43	〃	107	105
5	〃	4215 3744	- 6.8	4018.5	426	190.5	10.6	6	2307 1662	-17.4	2011.0	295.0	127.4	14.66	5	1275 1077	+ 12.0	1138.2	71.1	35.6	6.24	〃	101	111
6	10	5970 4533	-15.0	5331.0	373	124.4	7.00	〃	2883 2328	-13.6	2695.0	340.7	152.4	12.64	3	1239 1092	- 7.5	1187.0	82.1	57.9	6.91	〃	101	89
7	〃	60 22	-48.8	43.0	9.9	3.3	23.02	10	11 3	+59.4	6.9	2.3	0.7	33.33	10	2 0	-100.0	0.9	0.8	0.388	89	〃	161	209
8	9	344 274	+12.7	305.3	24.2	8.5	7.96	〃	50 25	+38.5	36.1	7.2	2.4	19.94	〃	16 2	+ 90.0	8.2	3.6	1.24	43.90	〃	118	134
9	10	1211 963	- 9.6	1065.8	66.4	22.1	6.22	7	118 96	-12.8	110.1	6.8	2.8	6.17	〃	27 5	+ 80.0	12.0	6.9	2.2	56.00	〃	103	112
10	5	1566 1458	+ 4.6	1497.8	40.7	20.4	2.71	6	191 153	+11.4	171.5	12.1	5.4	7.05	〃	20 7	- 55.4	15.4	4.2	1.3	27.27	〃	116	105
11	4	1753 1613	+ 4.4	1679.5	51.8	30.0	3.08	〃	204 165	+12.6	181.2	13.2	5.9	7.26	6	18 10	- 37.5	16.0	5.0	2.2	31.25	〃	107	95
12	9	5010 4167	+13.2	4424.7	237.0	83.8	5.35	9	625 509	-12.8	583.8	27.9	9.9	4.77	9	97 63	+ 24.9	77.7	13.3	4.2	17.12	〃	132	175

備 考 : 實驗 9ノIIIハIIノ5倍稀釋デアル

實驗12ノ第4次10倍稀釋ニ於テハ(M 8.8), (σ 2.7), (V 30.0)トナツタ(表略)

ル。之等ノ數値ノ中デ最モ大キイ數値ガ、眞ノ生菌數ニ一番近イノデアルカラ、培養菌量ハナルベク少量ニシナケレバナラス。

Hehewerth ヤ Dichtl モ同様ナ事實ヲ認メテ居ル。

3) 生菌數ト總菌數

第11表ノ實驗第8, 及ビ9ニ就テ、同時ニ鏡檢的總菌數計算ヲ行ヒ、第12表ノ様ナ成績ヲ得タ。

亦下欄ニハ Tennison ノ成績ヲ併記シタ。コノ表デ見ルト、group count = 依ル總菌數ニ對スル生菌數ノ比率ハ、1平板内ノ集落數ノ多イ時程、低イ値ヲ示シテ居ル。換言スレバ集落數ノ少イ時程、高イ値ヲ示シテ居ル。1平板内ノ集落數ガ大約1000個ノ時ハ、ソノ比率ハ93% (實驗9ノI)トナリ、大約100個ノ時ハ、97% (實驗9ノII)トナル。

集落數ガ100個以内ノ時ハ、ソノ比率ハ100%以上トナツテ、生菌數ノ數値ハ、遂ニ group count ノ數値ヨリ大キクナツテ來ル。

之ハ、菌液ヲ逐次稀釋シテ行ク中ニ、集團ヲ形成シテ居タ菌ノ一部ガ次第ニ分離シテ行ク爲トモ考ヘラレル。

之等ノ第一次培養ニ依ル生菌數ノ total count = 對スル比ハ、group count ノ total count = 對スル比ニ非常ニ近イ。ソノ差ハ實驗8ニ於テハ、total count ノ5% (66~71%)、實驗9ニ於テハ4% (62~66%)ニ過ギナイ。而モ之等兩例共ニ、培養5及ビ7時間ノ幼弱ナ抵抗ノ弱イ菌ニ就テノ實驗デアル。從ツテコノ兩例ニ於テ、共ニ總テノ菌ガ生キテ居タト假定シテモ、余ノ培養手技ニ依ツテ、集落形成ニ到ラズニ死滅シテ終ル菌量ハ、順調ニ行ケバ大約10%以内ト想像出來ル。

但シ、培養ニ用ヒル菌液ハ鏡檢ニ用ヒル菌液ヨリモ、非常ニ高度ニ稀釋サレテキルカラ、稀釋操作中ニ、菌集團ガ次第ニ分解シテ行クニ拘ラズ、結果ニ於テ group count = 近イ數値ヲ示スノハ、稀釋操作中ニ、大部分ノ菌ガ障碍ヲ受ケテ、發育不能ニ終ルタメカトモ考ヘラレル。

第12表 生菌數ト總菌數

實驗例	總菌數			生菌數											
	total count	group count	group C total C × 100	第1次		第2次		第3次							
第11表 8	1.79 × 10 ⁸	1.28 × 10 ⁸	71	集落數	生菌數	集落數	生菌數	集落數	生菌數						
				305.3	1.21 × 10 ⁸	66	95	36.1	1.44 × 10 ⁸	80	112	8.2	1.64 × 10 ⁸	92	128
第11表 9	1.72 × 10 ⁸	1.14 × 10 ⁸	66	集落數	生菌數	集落數	生菌數	集落數	生菌數						
				1065.8	1.06 × 10 ⁸	62	93	110.1	1.11 × 10 ⁸	64	97	12.01	2.0 × 10 ⁸	69	105
Tennison	0.57 × 10 ⁸	0.36 × 10 ⁸	63	生菌數 total C × 100 = 75			生菌數 total C × 100 = 118								

備考: Tennisonノ例ハ、22°C 18時間培養ニ就テデアル

然シ、Wilson ノ豚「コレラ」菌ニ就テノ實驗デハ、リッゲル氏液デ稀釋シテ、10分間以內ニ培養スルナラバ、殆ド生菌ノ減少ヲ見テキナイ。余ノ實驗(第9表)ニ於テモ同様デアル。從ツテ第12表ノ第一次培養ニ依ル生菌數ノ total countニ對スル比ト、group countノ total countニ對スル比トノ差ハ培養ニ際シテ死滅シテ終ル菌量ヲ示スモノト思ハレル。

スルト原菌液 1cc 中ノ生菌數ハ次ノ様ニナル。

$$\text{平均集落數} \times \frac{\text{稀釋倍數}}{\text{培養菌數量(cc)}} \times \frac{100}{90} \times \frac{\text{total count}}{\text{group count}}$$

但シ、コノ式ハ、第12表ノ第三次培養ノ様ニ、生菌數ガ group count ヨリ大キイ數値ヲ示ス場合ニハ適用デキナイ。

故ニ、group count ヲ併用シテ、生菌數ヲ求メル時ハ、培養ニ用ヒル菌液ニ加ヘル振盪操作ハ、主トシテ group count ヲヤル前ニ行フベキデアツテ、ソレ以後ハナルベク菌集團ヲ分解サセヌ様ニ心懸ケネバナラス。然シ、之ハ實際シ不可能ナ事デアルカラ、group count ヲ併用シ

テ生菌數ヲ推定スル事ハ非常ニ困難ナ事ト思ハレル。

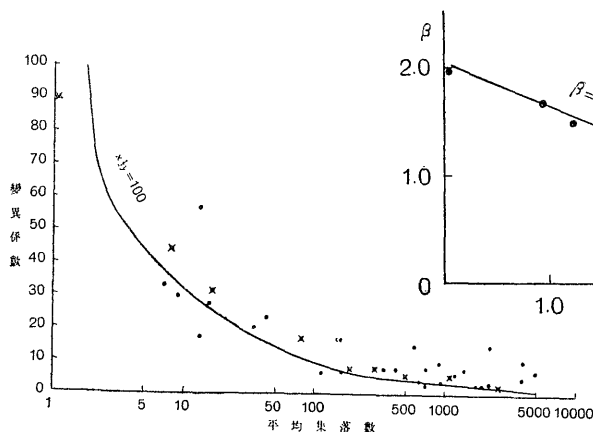
更ニ亦、余ハ第一次、第二次、第三次ト稀釋ノ順ニ培養シタノデアルカラ、後者程、生菌數ノ多クナルノハ、集落ガ多過ギルト、相互ニ抑制シ合ツテ發育ヲ妨ゲタリ、或ハ癒合シタリスル事モ重大ナ關係ヲ持ツト思ハレル。

然シ、第11表ノ實驗1ハ、同一稀釋菌液カラ培養シタモノデアツテ、3組共ニ、生菌數ハ殆ド等シク増大ノ傾向ハナイ。他方、實驗2カラ6迄ノ5例中、實驗6以外ノ4例ハ多少増大スル傾向ヲ示シテキル(之等ハ逐次稀釋ニ依ルモノデアル)。從ツテ、コノ集落數増大ノ傾向ハ、集落相互ノ抑制或ハ癒合ダケデハ説明出來ナイ。菌集團ノ分解モ重大ナ意義ヲモツト思ハレル。

4) 平均集落數ト變異係數

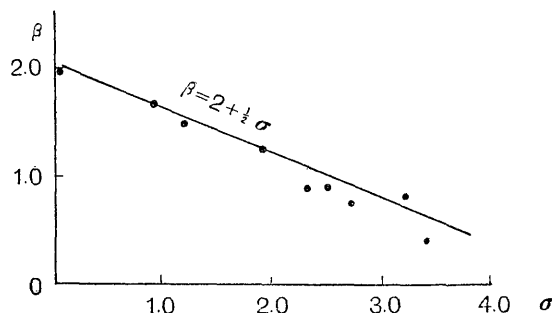
第11表ノ37組ノ觀察例ニ於テ、平均集落數ヲ横軸ニ、ソノ變異係數ヲ、縦軸ニ取ルト、兩者ノ關係ハ第6圖ノ様ニナル。

第6圖 平均集落數ト變異係數



即チ、平均集落數ガ1000個以上ノ時ハ、ソノ變異係數ハ、概シテ5内外デアルガ、100個位ノ時ハ10内外トナリ、更ニ10個位ノ時ハ20乃至60ニ増大スル。即チ一般ニ平均集落數ガ減少スルト、ソノ變異係數ハ逆ニ増大スル傾向ガアル。

第7圖



從ツテ、平均集落數ガ少ナイ時ハ、正確ナ菌數ヲ得ルニハ、觀察平板數ヲ更ニ増サネバナラス。然シ培養操作ハナルベク速ニ完了シナケレバナラスカラ、一般ニ20~30板以上ノ平板培養ヲ作ル事ハ困難デアル。

故ニ、生菌數測定ニハ、余ノ經驗デハ集落數

ガ少クトモ100個以上ノ平板ヲ作ラネバナラス。亦集落數ガアマリ多イト、計算ガ繁雜トナリ、更ニ、實際ノ生菌數ニ對スル集落數ノ割合ガ低下スルカラ、集落數ハ500個以下ガ適當ト思ハレル。

第6圖ヲ見ルト、度數分布ハ右下カラ左上ニ向ツテ曲線狀ヲナシテ居ル。從ツテ變異係數ヲ y 、集落數ヲ x トスレバ、

$$y = ax^b \quad (A)$$

ナル形ノ實驗公式ガ考ヘラレル。

上式ノ對數ヲ取レバ、

$$\log_{10}y = \log_{10}a + b \log_{10}x$$

$$\alpha = \log_{10}x, \quad \beta = \log_{10}y \quad \text{ト置ケバ、}$$

$$\beta = \log_{10}a + b\alpha \quad (B) \quad \text{トナル。}$$

(B) ハーツノ直線ヲ表ス方程式デアル。

故ニコノ場合ニ(A)ガ成立スルナラバ、各實驗値カラ α 、 β ヲ求メテ、之等ヲ直角座標ニ取ル時ハ、夫等ノ點ハ一直線上ニナケネバナラス。

第6圖ノ \times 附標シタ諸點ニ就テ、 α 、 β ヲ求メルト第7圖ノ様ニナリ、諸點ハ概ネ一直線上ニ排列スル。

次デ($x=480$, $y=5.8$)、($x=8.2$, $y=44.0$)ノ2點ノ値カラ α 及ビ β ヲ求メ、之等ヲ(B)ニ代

入スルト、 $a \approx 100$ 、 $b \approx -0.5$ トナル。

從ツテコノ場合ノ實驗公式ハ、

$$x^{\frac{1}{2}}y = 100 \quad \text{トナル。}$$

之ニ依ルト、平均集落數ガ、2000個、1000個、500個、200個、100個、50個等ノ時ハ、ソノ變異係數ハ各々2.2、3.3、4.4、7.1、10.0、14.3等トナル。

コノ様ニ、1平板内ノ集落數ノ變異係數ハ平均集落數ノ平方根ニ逆比例スルノデアアルガ、前者ニ就テ言ヘバ、1平板内ノ集落數ハ、各々皆平均值ト見做ス事ガ出來ル。

從ツテ、ソノ變異係數ハ標準誤差ト同様ニ、被檢物(Sample)ノ任意撰擇ニ依ツテ得ラレル多クノ平均值ノ作ル度數分布ノ撒布度ヲ示ス。

亦後者即チ平均集落數ハ、觀察平板數ガ割合ニ少數デアアルカラ Sampleノ總數、即チ培養シタ總生菌數ト同様ニ見做ス事ガ出來ル。

他方標準誤差(m)ハ次ノ公式ニ表サレル。

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (\text{但シ } n \text{ ハ Sampleノ總數})$$

從ツテ、コノ實驗ニ於テハ、集落數ノ變異係數ハ、ソノ平均集落數ノ平方根ニ逆比例シタノデアアルガ、理論的ニモソノ様ニナル筈デアル。

第4章 總括竝ニ考按

第1節 可檢材料ヲ撰擇採取スル際

ニ生ズル誤差

第1項 固形培地使用ノ菌量

固形培養ノ菌ヲ白金耳ニ依ツテ一定菌量ヲ鈎取スル事ハ、非常ニ困難デアル。例ヘバ Singer u. Hoder⁽⁴⁰⁾ハ12~14ノ變異係數ヲ示シテ居ル。然シ、之ヲ秤量シテ、濕潤重量、乾燥重量等ヲ求メルト、一層正確ニ、菌量ヲ知ル事ガ出來ル。

亦 Gotschlich⁽⁴¹⁾ガ注意シタ様ニ、固形培地ノ菌苔ニ於テハ、中央部ハ周邊部ヨリモ生菌ガ少イ。生菌數測定ニ際シテハ、特ニコノ點ニ注意シナケレバナラス。

第2項 液體培地使用ノ菌量

岩田ハ液體培養ヨリ白金耳ヲ以テ、一定量ノ

積リデ菌液ヲ採取スル際ニ、變異係數25.97ナル誤差ヲ得タ。亦「ピペット」内部ニ残留スル菌量ハ、菌液ノ粘度、「ピペット」ノ形狀等ニ依ツテ異ルガ、岩田ハ平均5.5%、余ハ平均5.3%ノ残留率ヲ得タ。「ピペット」ノ管腔ガ太クテ短イ程残留率ハ低下スル。

陳舊ナ液體培養ニ於テハ、大部分ノ菌ハ底部ニ沈降集合シテ居ル。カハル菌液ヲ均等化シ、菌ヲ平等ニ浮游サセルニハ、種々ノ方法ガ行ハレテ居ル。即チ Rosenthalハ、菌液ヲ綿デ濾過シ、Perrinハ分劃遠心ヲ行ツタ。更ニ菌液全體ヲ平等ニスルニハ、Viehoever⁽⁴²⁾ハ5%ノ硫酸及ビ酸化第1銅ノ「アンモニア」水溶液ヲ加ヘ、余ハ硝子球ヲ加ヘテ振盪シタ。然シ生菌數測定

＝際シテハ、此様ナ強烈ナ物理化學的操作ヲ加ヘテハナラナイ。佐藤⁽⁴³⁾＝依レバ振盪作用ハ、一般＝菌＝對シテ有害デアル。從ツテ大腸菌＝於テハ、余モ亦 Wilson ト同様ニ、約10分間手デ強ク振盪スル程度ニ止メタ。

第2節 鏡檢の菌數測定法

純粹培養ヲ鏡檢シテ、菌體ヲ識別スルニハ、約500倍ノ擴大デ充分デアル。余ハ Steiner ト同様ニ、乾燥系ヲ以テ鏡檢シタ (Oc. 4×Ob. 7, 倍率約625倍)。Wilson, Troester 等ハ無染色ノ儘、暗視野裝置ニ依ツテ鏡檢シタガ、一般ニハ染色標本ガ用ヒラレテ居ル。

亦、鏡檢中ノ菌増殖ヲ抑制スル爲ニ、Steiner ハ標本ヲ「エーテル」蒸氣中ニ入レ、Gotschlich ハ 56°C 15分間加熱シ、岩田ハ昇汞ヲ60萬分ノ1量添加シタ。余ハ Horváth 氏液ヲ改變シテ、大體前述ノ希望條件ニ適合スル染色液ヲ得タ。コノ染色液ハ、石炭酸ヲ2.5%ノ多量ニ含ンデ居ル。之ハ菌液ノ稀釋倍數ノ小サイ場合ヲ考慮シタ爲デアルガ、稀釋倍數ノ大キイ場合 (例ヘバ菌液 0.5cc + 染色後 9.5cc) ニハ今少シ石炭酸ノ量ヲ減ラシテモヨイ。

第1項 普通ノ載物硝子ヲ用ヒタ場合

Hehewerth ノ注意シタ様ニ、染色操作ハ、豫メ塗抹スル以前ニ行ツタ方ガヨイ。

亦 Klein, Hehewerth ノ様ニ白金耳ヲ用ヒテ塗抹スルト、菌ノ一部ガ之ニ附着殘留スルカラ、余ハ「ピペット」ヲ用ヒテ稀釋染色菌液ノ一定量 (0.005 亦ハ 0.01cc) ヲ載物硝子上ニ滴下シタ。

亦菌液ヲ載物硝子ノ上デ一定大ノ面積ニ塗抹スル事ハ非常ニ困難デアル爲、余ハ覆蓋硝子 (面積一定) デ擴ゲル事ニシタ。

塗抹面ニ於ル菌ノ分布状態ニ就テハ、Hanks a. James⁽⁴⁴⁾ ハ牛乳ニ於テハ中央部ニ多イト云ヒ、Hehewerth 等ハ、「ブイヨン」等ニ於テハ周邊部ニ多イト云フ。

更ニ Hanks 及ビ James ニ依レバ、標本ヲ乾燥サセル時ハ、ソノ時ノ溫度ノ如何ヤ載物硝子ガ水平ニ置カレルカ否カ等ニ依ツテモ、菌ノ分

布状態ハ著シク變化スル。

依ツテ余ハ、菌液ヲ載物硝子ト覆蓋硝子トノ間デ均等ニ擴ゲ、之ヲ乾燥サセナイデ、濕潤ノ儘鏡檢シタ。亦覆蓋硝子トシテハ、面積ノ割合ニ周邊ノ最モ短イ、圓形覆蓋硝子ヲ用ヒタ。

鏡檢ニ際シテハ、Skar 等ニ做ヒ、網狀接眼測微計ヲ用ヒテ、1視野ヲ更ニ細分シテ菌數計算ヲ容易ニシタ。

覆蓋硝子ノ面積ト1視野ノ面積トノ關係ハ前掲ノ第2表ノ様デアル。

第2項 計算室ニ依ル方法

「トーマ・ツァイス」血球計算用計算室ハ、深サガ 0.1mm デアル。Winterberg, Soltmann⁽⁴⁴⁾ Tennison 等ハ、之ト同様ノ深サ 0.1mm ノ計算室デ菌數計算ヲ行ツタ。然シ菌數計算ノ爲ニハ、今少シ淺イ計算室ガ必要デ、Steiner ハ 0.01 mm, Glynn ハ 0.02mm, Liebreich ハ 0.025mm ノ計算室ヲ用ヒタ。

「リープライヒ」計算室ハ、深サガ「トーマ・ツァイス」計算室ノ 1/4 デアルガ、1區劃ノ面積ハ後者ノ4倍ダカラ容積ハ相等シイ。亦 Prausnitz⁽⁴⁵⁾ ニ依レバ、計算室ノ餘リ淺過ギルモノハ菌ガ周邊部ヘ行ツテヨクナイ。

油浸レンズハ、一般ニ焦點距離ガ短イ爲ニ、油浸裝置デ鏡檢スルト、兎角、覆蓋硝子ニ衝擊ヲ與ヘ易イ。依ツテ余ハ、一般ニ乾燥系デ鏡檢シタ。

「トーマ・ツァイス」計算室ハ深イ爲ニ、標本作製後、5～10分ヲ經テカラ鏡檢シナイト、菌ガ浮游シテ居テ計算ガ面倒デアル。

然シ一般ニ濕潤状態デ鏡檢スル場合ニハ、標本ヲ作ツテカラ、アマリ時間ガタツト、菌液ハ蒸發濃縮シテ來ルカラ、可及的速ニ鏡檢ヲ終了シナケレバナラス。

第3項 之等3方法ノ比較

之等3方法ニ依ル平均菌數ハ、鏡檢視野ガ多クナレバ、殆ド相等シクナル (第6表)。亦、1區劃内ノ菌數ノ度數分布モ、同時ニ次第ニ2項分布曲線ニ近ヅイテ來ル (第1～4圖)。然シ標本ノ作製ハ、計算室法ニ於テハ容易デアルガ、

覆蓋硝子法ニ於テハ、非常ニ困難デアル。鏡檢時ノ勞力モ亦之ト同様デアル。コノ様ニ、覆蓋硝子法ニ於テハ、菌ノ均等ニ分布シタ良好ナ標本ヲ作ルノガ、非常ニ難シイ爲ニ、計算室程簡便デナク、亦正確ナ菌數ヲ得ガタイ。

イ。「トーマツアイス」計算室4枚、「リブライヒ」計算室2枚、合計6枚ヲ併用シ、各々40區劃宛計算スルト(第7表)、平均偏差ハ2.46~8.80% (平均5.15%)デアツタ。

亦兩計算室ノ偏差ハ、前者ハ平均2.3~4.1%、後者ハ6.9~8.6%デアツタ。即チ鏡檢區劃數ガ比較的少ナイ場合ニハ、深サノ深イ「トーマツアイス」計算室ノ方が概シテ正確ナ値ヲ示ス。

第3節 生菌數測定法

第1項 一般的事項

培養法ニ依ツテ、生菌ヲ測定スルニハ、次ノ二ツノ條件ヲ考慮シナケレバナラス。

1) 總テノ生菌ガ、殘ラズ、集落ヲ形成スルカ否カ。

2) 各生菌ハ、各々獨立ノ集落ヲ形成スルカ否カ。

稀釋液ヤ培地ノ性質及ビ培養操作等ノ如何ハ、發生スル集落ノ數ニ重大ナ影響ヲ及ボスモノデアツテ、Schermann, James a. William⁽⁴⁶⁾ 岩田等ニ依レバ、一般ニ、菌ヲ新鮮培地ニ移植スル際ニハ、多少ナリトモ、菌ノ一部ガ死滅シテ集落ヲ形成シナイデ終ルト云フ。

Wilsonハ生理的食鹽水、水道水、リッゲル氏液中ニ於ル菌ノ死滅順序ヲ調べタ所、菌ノ死滅ハ前掲ノ順序ニ從ツテ速デアツタ。然シ、菌ヲ之等ノ液中ヘ浮游後、5~10分間以內ニ、移植培養スルナラバ、蒸溜水以外ノ三者ニ於テハ殆ド集落數ノ減少ヲ見ナイト云フ。

余ハ、37°Cニ保温シタ「ブイヨン」ヲ用ヒテ菌液ヲ稀釋シ、15分間以內ニ、逐次10枚ノ平板ニ培養シタ所、集落數ノ著シイ増減ヲ認メナカツタ(第9表参照)。從ツテ15分以內ニ培養ヲ終ヘルナラ、實際上ハ殆ド支障ナイモノト思ハレル。

亦、菌液ヲ稀釋スルノニ用ヒル食鹽水等ノ温

度ハ、一般ニハ、室温又ハ37°Cニ保タレテ居ルガ、Glynnハコノ稀釋培養操作ヲ氷ノ上デ行ツテ居ル。然シ要スルニ菌ヲ移植培養スル際ニ起ル菌ノ死滅ハ、急激ナ環境ノ變化ニ基クノデアルカラ、余ハ稀釋液トシテハ専ラ37°Cニ保ツタ「ブイヨン」ヲ用ヒ、常ニ稀釋後15分間以內ニ、新培地ヘ移植シ終ル様ニ努メタ。

亦 Singer u. Hoder 及ビ岩田等ニ依レバ、寒天自身ハ、菌ノ發育ニ有害デアルカラ、余ハナルベク培地ノ寒天含量ヲ減ジ、常ニ1.0%ノ寒天培地(pH 7.2)ヲ用ヒタ。

他方、1個ノ生菌カラ、個々獨立ノ集落ヲ形成サセルニハ、各菌ハ既ニ菌液中ニ於テ、個々別々ニ分離シテ居ラナケレバナラナイ。

然シ、大腸菌ノ様ニ、比較的個々ニ分離スル傾向ノアル菌ニ於テモ、培養後5~6時間ニ於テハ既ニ相當多數ノ菌ガ集ツテ菌塊ヲ形成シテ居ル。コノ様ニ集合シタ菌ヲ分離サセルニ、強烈ナ振盪作用ハ、生菌ニ有害デアルカラ、余モWilsonノ様ニ、5~10分間、手デ振盪スル程度ニ止メタ。Tennisonモ、コノ様ニシテ培養シ、ホボ鏡檢的ニ得タ總菌數ニ近イ生菌數ヲ得テ居ル。

以上ノ様ニ、可檢菌ニナルベク、外的刺戟ヲ與ヘナイ事ト、菌ヲ個々ニ分離サセル事トハ、全ク相反シタ要求デアツテ、生菌數ノ測定ニ於テハナルベク前者ヲ強調シナケレバナラス。亦、菌液ノ稀釋後ナルベク速ニ培養シナケレバナラナイカラ、培養例數ヲ多クスル事ハ出來ナイ。Wilsonハ、稀釋後10分以內ニ培養シテ居ルガ、余ハ、一般ニ3組ノ稀釋菌液(例ヘバ1000倍液、10000倍液及ビ100000倍液)ヲ作ツテ培養シタ爲ニ、終了迄ニ約15分ヲ要シ、各組ニ就テ、10枚以上ノ平板ヲ作ル事ハ出來ナカツタ。

亦集落分布ノ平等ナ平板ヲ得ルニハ、豫メ平板中ヘ1-2ccノ「ブイヨン」ヲ入レテ置キ、菌液ヲコノ中ヘ吹込ムガヨイ。

培養時間ニ就テハ、Wilsonハ、大腸菌ヲ37°Cニ培養スルト、24時間以後ハ殆ド集落ノ發生ヲ見ナイト云ツテ居ル。余ノ實驗ニ於テモ同様

デ、總集落數=對スル 晩期發生率ハ、平均 1.1 %デ、而モ總テ深部集落デアツタ(第10表)。

然シ、コノ實驗ハ、總テ集落數 100 個以下ノ平板ヲ、蟲眼鏡(倍率 8 倍)デ觀察シタノデアツテ、之ヲ Neisser ノ様ニ、顯微鏡ノ弱擴大(40~70 倍)デ觀察スレバ、24 時間目ニ於テ、既ニ發見出來タカモ知レナイ。亦、モツト集落數ノ多イ平板デハ、各菌ノ條件ガ一層悪クナルカラ、晩期發生率ハ今少シ大キクナルカモ知レナイ。然シ、24 時間以後ニナルト、集落が大キクナツタリ、互ニ癒合シタリシテ觀察ニ不便デアル。依ツテ余ハ一般ニ 24 時間後ニ觀察スルヲ例トシタ。

亦平板ノ觀察方法ニ就テハ、Neisser ハ顯微鏡ノ弱擴大デ 30 視野ヲ鏡檢シ、集落數 1500 個以上ノ平板ニ於テハ約 12%、ソレ以下ノ平板デハ約 25%ノ平均偏差ヲ得タ。然シコノ方法デハ、一局所ニ偏スル事ナク、平板ノ各部ヲ平等ニ觀察スル事ハ困難デアルカラ、余ハ ウォルフヒューゲル氏集落計算板ヲ用ヒ、蟲眼鏡ヲ併用シタ。コノ計算板デ、X 字型ニ 20cm²ヲ見ルトベトリ一氏平板ノ約 1/3ヲ見タ事ニナル。コノ際ノ集落數ハ、同様ニ總集落數ノ約 1/3トナツタ(第 8 表)。

亦、培養菌量ト培地ノ量トノ關係モ、發生集落數ト大ナル關係ガアル。即チ、一般ニ、前者ガ比較的多クナルト集落數ハ減少スル。Winterberg ハ、同一菌量ヲベトリ一氏平板及ビ ニコッホ氏平板ニ培養スルト、比較的大キイベトリ一氏平板ノ方ガ集落數ガ多イト云フ。

亦、菌液ヲ逐次稀釋シテ、等液量宛培養スルト、稀釋度ノ大キイ程、集落數ハ比較的多クナル。

第 5 圖ハ余ノ成績ニ、Dichtl ノ成績ヲ併記シタモノデアツテ、Dichtl モ同様ナ傾向ヲ認メテキル。亦、第 6 圖ノ様ニ、集落數ガ 100 個以内トナルト、變異係數モ非常ニ大キクナツテ、正確ナ平均値ヲ知り難クナル。

更ニ、第 12 表ノ Tennison 及ビ余ノ成績ノ様ニ、集落數ガ 100 個以内ニナルト、生菌數ガ group count ニ依ル總菌數ヨリ多クナル事ガア

ル。之ハ菌液ヲ逐次稀釋スル中ニ、菌集團ガ分離シタ爲ト思ハレル。

以上ノ諸點ヲ考慮スルト、生菌數測定法ニ於テハ、200 個乃至 500 個ノ平板ガ適當デアリ、亦、同時ニ鏡檢的ニ total count 及ビ group count ヲ行ツテ、可檢液中ニ於ル菌ノ分散状態ヲ檢討シテ置カネバナラス。

第 2 項 平板培養法ニ於ル生菌數算出式

余ハ培養操作ヲ、一般ニ、次ノ様ニ行ツタ。

- 1) 菌液 1.0cc + 「ブイヨン」 9.0cc → 10 倍稀釋
- 2) 菌液(10 倍) 0.5cc + 「ブイヨン」 9.5cc → 200 倍稀釋
- 3) 菌液(200 倍) 0.5cc + 「ブイヨン」 9.5cc → 4000 倍稀釋
- 4) 菌液(4000 倍) 1.0cc + 「ブイヨン」 9.0cc → 40000 倍稀釋
- 5) 菌液(40000 倍) 1.0cc + 「ブイヨン」 9.0cc → 400000 倍稀釋

原菌液ノ濃度ニ應ジテ、3, 4, 5 等カラ 0.1 cc 宛培養スル。0.1cc ノ Vollpipette, 1.0cc 及ビ 10.0cc ノ Messpipette ヲ用ヒル。

6) 鏡檢的ニ、total count 及ビ group count ヲ行フ。

第 1 表ノ様ニ、0.1cc ノ Vollpipette ニ於テハ平均 5%ノ残留菌ヲ生ズル。然シ余ノ行ツタ様ニシテ、残留菌ヲ更ニ吹キ出セバ、ソノ量ハ一層小サクナル筈デアル。亦菌集團カラハ、1 個ノ集落シカ出來ナイカラ、Tennison ハ鏡檢的ニ total count 及ビ group count ノ兩方ヲ行ツタ。尙集落ヲ作ラナイデ、死滅シテ終ル菌量ハ、順調ニ行ケバ、10%以内デアルガ(第 3 章第 2 節第 2 項ノ 3), コノ減少率中ニハ、「ピペツト」ニ依ル減少モ含マレテ居ル。之等ノ理由ニ依リ、集落數ハ生菌數ヨリモ、一般ニ小サイ數値ヲトル。故ニ、下記ノ(A)式ニ依ツテ求メタ生菌數ハ、「生菌數ノ最小限度」ヲ示スモノデ、實際ノ生菌數ハ、常ニ之ヨリ多ク、Tennison ニ從ツテ total count ト group count トノ比率ヲ適用スレバ、(B)式ノ様ニ推定サレル。

「生菌數ノ最小限度」

$$\begin{aligned} & \text{平均集落數} \times \frac{\text{菌液稀釋倍數}}{\text{培養菌液量(cc)}} \quad (A) \\ \text{「推定生菌數」} & \\ & \left(\text{平均集落數} \times \frac{\text{菌液稀釋倍數}}{\text{培養菌液量(cc)}} \right) \times \left(\frac{\text{total count}}{\text{group count}} \right) \\ & \times \frac{100}{90} \quad (B) \end{aligned}$$

然シ、余ノ實驗第12表ノ様ニ、total count ト group count トノ比カラ生菌數ヲ推定スル事ハ困難デアリ、亦培養操作時ニ於ル死滅菌量ヲ正確ニ知ル事モ出来ナイカラ、我々ハ、現在ノ所デハ、(A)式ヲ以テ満足スベキデアルト思フ。

亦、ソノ誤差ニ就テ考ヘルト、菌液ヲ稀釋スル際ニ生ズル誤差ト、平板上ニ於ル集落ノ分布ニ依ル誤差トニツアル。

$I = f(x, y, z, \dots)$ ナル場合、其等ノ誤差ヲ夫々 $\Delta I, \Delta x, \Delta y, \Delta z, \dots$ トスレバ、

$$\Delta I = \pm \sqrt{\left(\Delta x \frac{\sigma I}{\sigma x} \right)^2 + \left(\Delta y \frac{\sigma I}{\sigma y} \right)^2 + \left(\Delta z \frac{\sigma I}{\sigma z} \right)^2 + \dots}$$

トナル。(但シ $\frac{\sigma I}{\sigma x}, \frac{\sigma I}{\sigma y}, \frac{\sigma I}{\sigma z}, \dots$ ハ I ノ x, y, z, \dots ニ關スル偏導函數デアル)。

$$\begin{aligned} \Delta I &= \pm \sqrt{\left(m \frac{x_1^{m-1} x_2^n}{u^m v^n} \Delta x_1 \right)^2 + \left(n \frac{x_1^m x_2^{n-1}}{u^m v^n} \Delta x_2 \right)^2 + \left(-m \frac{x_1^m x_2^n}{u^{m+1} v^n} \Delta u \right)^2 + \left(-n \frac{x_1^m x_2^n}{u^m v^{n+1}} \Delta v \right)^2} \\ \Delta I &= \pm I \sqrt{\left(\frac{m}{x_1} \Delta x_1 \right)^2 + \left(\frac{n}{x_2} \Delta x_2 \right)^2 + \left(\frac{m}{u} \Delta u \right)^2 + \left(\frac{n}{v} \Delta v \right)^2} \end{aligned}$$

前述ノ假定ニ從ヒ、

$$\begin{aligned} \Delta x_1 &= a, \quad \Delta x_2 = b, \quad \Delta y_1 = c, \quad \Delta y_2 = d \text{ デアルカラ,} \\ \Delta u &= \Delta(x_1 + y_1) = \sqrt{a^2 + c^2} \end{aligned}$$

$$\Delta I = \pm I \sqrt{\left(\frac{m}{1} a \right)^2 + \left(\frac{n}{0.5} b \right)^2 + \left(\frac{m}{10} \sqrt{a^2 + c^2} \right)^2 + \left(\frac{n}{10} \sqrt{b^2 + d^2} \right)^2}$$

$$\text{故ニ、} \frac{\Delta I}{I} \times 100 = \pm \sqrt{(100ma)^2 + (200nb)^2 + (10m\sqrt{a^2 + c^2})^2 + (10n\sqrt{b^2 + d^2})^2}$$

Wilson ハ、熟練者ガ、正確ナ「ピペット」デ、
一定量ノ液ヲ取ル時ハ、ソノ誤差ガ大約1%ト見做シテ居ル。余ノ場合ニ之ヲ k% トスレバ、

$$\frac{\Delta I}{I} \times 100 = \pm k \sqrt{(100m \times 0.01)^2 + (200n \times 0.005)^2 + (10m\sqrt{(0.01)^2 + (0.09)^2})^2 + (10n\sqrt{(0.005)^2 + (0.095)^2})^2}$$

コノ式ノ左邊ハ變異係數 (V) ヲ表ス。

$$\text{亦 } \sqrt{(0.01)^2 + (0.09)^2} \approx 0.1, \quad \sqrt{(0.005)^2 + (0.095)^2} \approx 0.1$$

即チ各回ノ稀釋倍數ガ相當ニ大キイ時ハ、

$$V \approx k\sqrt{2(m^2 + n^2)}$$

余モ Wilson ト同様ニ、Messpipette = 依ル誤差ヲ大體1%ニ止メル事ガ出来ルト思フ。

$$\text{從ツテ、} V \approx \sqrt{2(m^2 + n^2)}$$

稀釋 = 依ル誤差ハ次ノ様ニナル。

1.0cc ノ Messpipette デ 1.0cc ヲ取ル時、採取液量ハ正確ニ 1.0cc デハナイ。之ヲ x_1 トシ、ソノ標準偏差ヲ a cc トスル。

同様ニ 0.5cc ヲ取ル時、ソノ採取液量ヲ x_2 cc トシ、ソノ標準偏差ヲ b cc トスル。

亦 10.0cc ノ Messpipette デ、9.0cc 及ビ 9.5cc ヲ取ル時、ソノ採取液量及ビソノ標準偏差ヲ $y_1, y_2,$ 及ビ c, d トスル。

スルト 前述ノ様ニシテ、10倍稀釋ヲ行フ時ハ、稀釋度ハ $\frac{x_1}{x_1 + y_1}$ トナリ、亦 20倍稀釋ヲ行フ時ハ $\frac{x_2}{x_2 + y_2}$ トナル。

依ツテ 10倍稀釋ヲ m 回、20倍稀釋ヲ n 回行フ時ハ、ソノ稀釋度ヲ I トスレバ、

$$I = \left(\frac{x_1}{x_1 + y_1} \right)^m \times \left(\frac{x_2}{x_2 + y_2} \right)^n \quad \text{トナル。}$$

更ニ、 $x_1 + y_1 = u, \quad x_2 + y_2 = v$ トセバ、

$$I = \frac{x_1^m x_2^n}{u^m v^n} \quad \text{トナル。從ツテ、}$$

$$\Delta v = \Delta(x_2 + y_2) = \sqrt{b^2 + d^2}$$

亦、 $x_1 = 1.0, \quad x_2 = 0.5, \quad u = 10.0, \quad v = 10.0$ デアル。

之等ヲ上式ニ代入スルト、

$$a = 0.01\text{kcc}, \quad b = 0.005\text{kcc}$$

$$c = 0.09\text{kcc}, \quad d = 0.095\text{kcc}$$

之等ヲ上式ニ代入スレバ、

上式ニ於テ、 $m = 0$ トスレバ、

$$V \approx \sqrt{2kn} \approx \sqrt{2n} \quad \text{トナル。}$$

之ハ、同一稀釋方法ヲ、逐次 n 回行ツタ場合ノ V ヲ示スモノデアル。

亦、第6圖ノ様ニ、上述ノ稀釋方法ヲ作ツタ

稀釋菌液ヲ、0.1cc 宛培養シタ 場合ノ 變異係數 (y) ハ、 $y = 100x \frac{-1}{2}$ デアツタ (x = 平均集落數)。

之等兩者ヲ 綜合スレバ、

$$V = \sqrt{2(m^2 + n^2) + \frac{(100)^2}{x}} \quad \text{トナル。}$$

例ヘバ 10倍稀釋ヲ 1回、20倍稀釋ヲ 3回行ヒ、平均集落數約300個ヲ得タトスレバ、

$$V = \sqrt{2[(1)^2 + (3)^2] + (5)^2} = \sqrt{35} = 6 \text{トナル}$$

但シ、之ハ 比較的順調ニ 行ツタ 場合デアツテ、實際ニ於テハ、モツト誤差ノ大キイ場合ガ多イト思ハレル。

第3項 諸家ノ實驗成績

第13表ハ、諸家ノ實驗成績デ、併セテ余ノ成績ヲ記載シタ。但シ岩田及ビ余ノ生菌數測定ニ於ル誤差ハ變異係數、他ハ總テ平均偏差デアツ

第13表 諸家ノ實驗成績

	實驗者	年代	可檢材料	使用器具	摘要	誤差	
總菌數	Hehewerth	1901	大腸菌葡萄狀球菌	白金耳	覆蓋硝子	染色 水洗(-)	19%
	Glynn	1913	"	不明	"	" " (-)	15 "
	Sommer	1923	豚丹毒菌	白金耳	"	" " (-)	3 "
	Hanks a. James	1940	牛乳細菌	不明	"	" " (+)	10 "
總菌數	Winterberg	1898	大腸菌葡萄狀球菌	「ピペット」	計算室	無染色	2~13 "
	Glynn	1913	"	"	"	染色	5 "
	Wilson	1922	「チフス」菌	"	"	暗視野鏡檢	5 "
	Tennison	1937	大腸菌	dropping pipette	"	染色	4 "
	泉	1941	"	「ピペット」	"	"	5 "
生菌數	Neisser	1895	「コレラ」菌	白金耳	平板	部分的計算	12~25 "
	Hehewerth	1901	大腸菌葡萄狀球菌	"	"	"	32 "
	Dichtl	1920	鼠チフス菌葡萄狀球菌	"	"	合面通算	5 "
	Wilson	1922	豚コレラ菌	dropping pipette	試験管	"	7~20 "
	岩田	1929	大腸菌	「ピペット」	平板	"	20 "
	Tennison	1937	"	"	"	"	4 "
泉	1941	"	"	"	"	5~10 "	

備考：1 使用器具欄ノ第1行ハ總テ可檢材料採取用具ヲ示ス

2 岩田及ビ余ノ生菌數測定法ニ於ル誤差ハ變異係數、他ハ總テ平均誤差ヲ以テ示ス

テ、總菌數測定法ニ於テハ一般ニ40~70視野(或ハ區劃)ニ就テ計算シ、亦生菌數測定法ニ於テハ Neisser 及ビ Hehewerth ハ顯微鏡ノ弱擴大(40~70倍)ヲ以テ平板ノ一部分ニ就テ計算シテキル。

之等ノ兩方法ハ共ニ、原材料ノ一部分ニ就テ測定スルノデアルカラ、次ノ二ツノ誤差ガ考ヘラレル。

1) 可檢材料ノ採取ニ於ル誤差

原材料中ニ於ル菌ノ分布ガ不均等デアルカ、或ハ採取量ガ不正確ナラバ、可檢材料中ノ菌量ヲ如何程精密ニ測定シテモ、ソノ實驗ハ結局不

正確ニ終ル。

2) 標本中ニ於ル菌分布ノ如何ニ依ル誤差鏡檢ノ總菌數測定法ニ於テハ、更ニ標本ノ一部分ニ就テ測定スルノデアルカラ、コノ誤差ハ特ニ重大デアル。

先ヅ、可檢材料ノ採取ニ就テ云ヘバ、以前ハ白金耳ガ多ク用ヒラレタガ、誤差ガ大キイ爲ニ、近來ハ主ニ「ピペット」ガ使用サレル様ニナツテ來タ。

亦、標本中ノ菌分布ノ如何ニ依ル誤差ニ就テ云ヘバ、平板培養ニ依ツテ生菌數ヲ測定スル時ハ、集落分布ノ平等ナ平板ヲ作り難イ爲ニ、コ

ノ誤差ハ非常ニ大キイ。然シ、鏡檢的測定法ニ於テハ、血球計算室ヲ應用スルト、菌ノ分布ハ非常ニ平等トナリ、從ツテ計算室ヲ用ヒタ諸家ノ誤差ハ覆蓋硝子法ニ依ル諸家ノ誤差ニ比較シテ遙ニ小サクナツタ。更ニ細部ニ關シテ述べレバ次ノ様デアアル。

a) 鏡檢的測定法

イ) 覆蓋硝子法: Hehewerth 及ビ Glynn ハ、染色後ノ水洗ヲ行ツテキナイガ、Sommer 及ビ Hanks a. James ハ水洗シテキル。水洗ハ菌ノ流失ヲ來スカラ避ケネバナラヌ。

Sommer ハ、Wright ニ倣ヒ、菌液ト濃度既知ノ酵母菌液トヲ混合シ、兩者ノ比ニ依ツテ菌數ヲ求メタノデアアルガ、コノ方法デハ菌ガ酵母菌ノ下ニナツテ見エナカツタリスル爲ニ、菌數ヲ過少ニ評價シ易イト云ハレテキル。

亦、Hanks a. James ハ牛乳中ノ菌數ヲ測定シタガ、正確ニ測定ハ非常ニ困難デ、1視野ノ菌數ガ20~40個ノ時、各標本ニ就テ44視野宛鏡檢シテ平均偏差10%ヲ得ル頻度ヲ求メル事ガ出來ナカツタ。余ノ覆蓋硝子法ニ就テノ實驗モ之ト同様デ、第4表ハ菌分布ノ平等ニ標本バカリヲ撰ンデ40視野宛鏡檢シテ平均誤差8.1%ヲ得タノデアアルガ、作製シタ總テノ標本ニ就テ計算スレバ誤差ハ更ニ大キクナル筈デアアル。

ロ) 計算室法: コノ場合ニハ菌ノ分布ハ一

$$\text{total percentage error} = \pm \sqrt{(\text{percentage dilution error})^2 + (\text{percentage distribution error})^2}$$

dilution error ハ標本作製迄ノ菌液稀釋ニ依ル誤差ヲ示シ、distribution error ハ標本相互ノ比較ニ依ツテ求メ得ルモノデアツテ、コノ式ハ平板培養法バカリデナク、鏡檢的測定法ニモ適用シ得ルモノト思フ。

菌量測定法ニ就テハ、以上ノ様ニ諸家ノ業績ガアルガ、余ノ實驗ニ依ツテ多少ナリトモ補足シ得タト思ハレル所ハ、次ノ二點デアアル。

1) 生菌數ヲ測定スル場合ニ、菌液ヲ稀釋スル程集落數ノ増大スルノハ、主トシテ、菌集團ノ分解ニ依ル。Hehewerth, Glynn, Dichtl,

般ニ平等デアリ、亦覆蓋硝子法ノ様ニ一定量ノ菌液ヲ塗抹スル必要モナイカラ、誤差ハ非常ニ小サク、一般ニ5%以下デアアル。

b) 平板培養法

生菌數測定法ニ於ル、平板培養ノ作製法及ビ平板數ハ、大體各實驗者共ニ同様ノデアアルカラ、各實驗者ニ依ツテ大小幾多ノ誤差ヲ生ジタノハ、主トシテ、1平板内ノ集落數ノ多寡及ビ集落ノ計算方法ノ如何ニ依ルモノデアアル。集落數ノ多イ程、誤差ガ小サクナルノハ論ヲ待タナイ。亦、Neisser 及ビ Hehewerth ハ顯微鏡ノ弱擴大(40~70倍)ヲ以テ約30視野ニ就テ計算シ、全集落數ヲ算出シタ。Neisser ハコノ方法デ、集落數ガ1500個以上ノ場合ニハ約12%ノ平均誤差ヲ得タ。然シ、Wilson ニ依レバ、集落數ガ多過ギルト、集落發生率ガ低下シ、亦計算モ困難トナル。Dichtl, Wilson 等ハ集落數100~400個ノ平板ヲ作り、全集落ヲ計算シタ。

總菌數及ビ生菌數測定法ニ關スル諸家ノ成績ハ大體以上ノ様デアアルガ、ソノ中 Wilson 及ビ Tennison a. Wadworth 以外ノ諸家ニハ、可檢材料採取ニ於ル誤差ニ就テノ檢討ガ稍々不充分ト思ハレル者ガ多イ。

Tennison a. Wadworth ハ之ヲ考慮シ、全體ノ誤差ヲ次ノ様ニ表シタ。

Tennison 等モコノ事實ヲ認メテキルガ、明確ニ説明ヲ與ヘテキナイ様デアアル。從ツテ、Glynn, Tennison 等ノ様ニ、最初ニ group count ヲ行ツテモ、以後ノ稀釋操作ニ依ツテ菌集團ガ更ニ分解スレバ、最初ノ group count ハ無意義トナル。

2) 平板培養法ニ於ル、集落數ノ變異係數ハ、集落數ト一定ノ數的關係ガアル。Tennison a. Wadworth ハ、dilution error 及ビ distribution error ヲ考慮シタガ、distribution error ニ就テハ充分ニ檢討ヲシテキナイ。余ハコノ點ニ就テ幾分カ補足シ得タト思フ。

第5章 結 論

1) 鏡檢の菌數計算法モ生菌數計算法モ、共ニ、常ニ原材料ノ一部分ノ菌數カラ、總菌數ヲ推定スルノデアルカラ、可檢材料ヲ採取スル前ニ、先ヅ原材料中ノ菌分布ヲ均等ニシナケレバナラス、亦各菌ガ總テ個々ニ分離シテ居ナイト菌數ヲ過少ニ評價シ易イ。之ガ爲ニ余ハ、液體培養ニ於テハ常ニ振盪操作ヲ加ヘタ。然シ生菌數測定法ニ於テハ、強烈ナ振盪操作ハ避ケナケレバナラス。

2) 覆蓋硝子法ニ於テハ、菌ヲ平等ニ分布サセル事ガ困難ナ爲ニ、良好ナ標本ヲ作製シ難ク、從ツテ計算室法ニ比ベテ正確度ガ劣ル。

3) 一區劃内ノ菌數ハ「リーブライヒ」計算室デハ約30個、「トーマ・ツァイス」計算室デハ約15個位ガ適當デ、ソノ際ノ變異係數ハ、各々18.5及ビ22.4デアツタ。亦ソノ度數分布ハ正規曲線ニ從フ。

4) 生菌數ノ總菌數ニ對スル割合ヲ求メル時ハ、total countノ外ニ、group countモ行ハネバナラス。

5) 平板培養ノ集落數計算ニ於テ、ウェルフヒューゲル集落計算板ヲ用ヒテ、X字型ニ20區

劃計算スルト、殆ド正確ニ全集落數ヲ知り得ル。

6) 大腸菌ノ37°C寒天平板培養ノ集落計算ニハ、培養シテカラ24時間後ガ適當デアル。

7) 一般ニ、集落數ガ少クナル程、原材料中ノ推定菌數ガ大キクナル傾向ガアル。之ハ主トシテ、菌塊ノ分離ニ基クモノデアル。

8) 生菌數計算ニハ、集落數200乃至500ノ平板ガ最モ適當デ、ソノ際ノ變異係數ハ、5.0乃至10.0デアル。

9) 平板培養法ニ於テ、同一稀釋倍數ヲ以テ菌液ヲn回稀釋シ、各回ノ「ピペット」ニ依ル誤差(變異係數)ヲ各々kトスレバ、原菌1cc液中ノ推定生菌數及ビソノ誤差(變異係數)ハ次ノ様ニナル。

$$\text{生菌數} = \text{平均集落數} \times \frac{\text{菌液稀釋倍數}}{\text{培養菌液量(cc)}}$$

$$\text{誤差} = \sqrt{2n^2k^2 + \frac{(10)^4}{\text{平均集落數}}}$$

擱筆スルニ當リ終始御懇篤ナル御指導ト御校閲ノ勞ヲ賜リタル恩師谷教授ニ衷心銘謝シ、種々御懇切ナル御教示ヲ賜ハリシ大谷教授ニ滿腔ノ謝意ヲ表ス。

文 獻

1) Klein: Zbl. f. Bact., 1. Abt., Orig., 27, 834, (1900). 2) Hehewerth: Arch. f. Hyg., 39, 321, (1901). 3) Breed: 竹内著, 近世細菌學及免疫學. 前編, 472頁(第8版)ニ依ル. 4) Hanks a. James: J. Bact., 39, 297, (1940). 5) Wright: zit. nach Klein, Kolle, Krans u. Uhlenhuth. Handb. d. path. microorg., 3. Aufl. (1930), 161. 6) Sommer: Zbl. f. Bact., 1. Abt., orig., 30, 468, (1923) 7) Fries: ebenda, 86, 90 (1921). 8) Winterberg: Z. Hyg., 29, 75 (1898). 9) Glynn: J. of path., 18, 379 (1913) 10) Jensen: Zbl. f. Bact., 1. Abt., Orig., 107, 1 (1928) 11) Steiner: Zbl. f. Bact., 1.

Abt., Orig., 113, 306 (1929). 12) Tennison: J. Bact., 33, 461 (1937). 13) Wilson: ebenda, 7, 405 (1922). 14) Liebreich: D. m. W., 1916, 1, 453. 15) Troester: Zbl. f. Bact., 1. Abt., Orig., 88, 252 (1922). 16) Neisser: Z. Hyg., 20, 119 (1895). 17) Gotschlich u. Weigang: ebenda, 20, 376 (1895). 18) Krombholz: Arch. f. Hyg., 84, 151 (1915). 19) Dichtl: ebenda, 89, 47 (1920). 20) Seifert: Zbl. f. Bact., 1. Abt., Orig., 88, 151 (1922) 21) Henrici: Morphologie variation and the rate of growth of bacteria (1928) 22) Bickert: Zbl. f. Bact. I. Abt. Orig., 117, 548 (1930). 23) Rosen-

thal: B. kl. W., 1913, 2, 1751. 24)
 Schmidt: Z. Hyg., 111, 543 (1930). 25)
 Hopkins: 竹内著, 細菌學及免疫學實習. (第4版), 257頁 = 依ル. 26) 岩田, 衛生傳染誌, 24, 447, (1928). 27) Brown: zit. nach Prausnitz., Kolle, Kraus u. Uhlenhuth. Handb. d. path. Microorg., 3. Aufl. (1930), III/1, 538. 28) Wilson a. Dixon: J. of Hyg., 12, 49 (1912) 29) Wohlfeil: Zbl. f. Bact., 1. Abt., Orig., 127, 492 (1933). 30) Bujwid: ebenda, 77, 286 (1916). 31) Muntner: Z. Hyg., 106, 50 (1926). 32) Dold: D. m. W., 1925, 2, 1851. 33) Perrin: Kolloidchem. Beih., 1, 221 (1909). 34) Callison: Jour. of med. research, 27, 225 (1912). 35) Horváth: Zbl. Hyg., 10, 809 (1925). 36) Scott u. Scott: zit. nach Prausnitz., Kolle, Kraus u. Uhlenhuth, Handb. d. path. Microorg., 3. Aufl., III/1, 534. 37) Kühne: zit. nach Lehmann u. Neumann, Atlas u. Grundriss d. Bact., 1, 7 (1926) 38) Wámoscher: Z. Hyg., 106, 191 (1926) 39) Skar: zit nach Klein, Kolle, Kraus u. Uhlenhuth, Handb. d. path. Microorg. 3. Aufl., X, 163. 40) Singer u. Hoder: Arch. f. Hyg., 94, 353 (1924) 41) Gotschlich: Handb. d. hygienischen Untersuchungsmethoden, 1, 455 (1926). 42) Viehoveer: zit nach ebenda, 1, 456. 43) 佐藤, 千葉醫大雜誌, 17, 254, (1940). 44) Soltmann: Z. Hyg., 80, 323

(1915). 45) Prausnitz: Kolle, Kraus u. Uhlenhuth, Handb. d. path. Microorg., 3. Anfl., III/1, 534. 46) Schermann, James a. William: J. Bact., 9, 303 (1924).

爾余ノ参考文献

1) 細菌學的一般檢査術式. 谷友次著, 「メモ」用微生物檢査法. 2) 計算法, 古屋芳雄著, 醫學統計法. 3) 血球計算 = 於ル誤差, 宮村直夫, 十全會雜誌, 1935, 40, 2056. 4) 生菌數計算法 = 於ル諸注意. a) 稀釋液 = 就テ, Butterfield, J. Bact., 23, 355 (1932) b) 發育菌量ト培地量, Milton, J. Bact., 4, 234 (1919) Kolbmüller, Z. Hyg., 118, 687 (1936) c) 2種以上ノ菌ノ混合培養, Anderson, J. Bact., 130, 207 (1935). 5) 種々ノ菌 = 就テノ菌數計算. a) 大腸菌, Tonney, J. inf. D. 48, 413 (1931). b) 嫌氣性菌, Reymann, Zbl. f. Bact., 1. Abt., Ref., 101, 438 (1927). c) 結核菌, Jennings, J. inf. D., 39, 310 (1926). d) Bacteriophage., Schlesinger, Z. Hyg., 115, 774 (1933) e) Herpesvirus., Herzberg, Zbl. f. Bact., 1. Abt. Ref., 105, 57 (1927) 6) 種々ノ材料 = 就テノ菌數計算. a) 空氣中ノ菌數, Emmerich, Arch. f. Hyg., 1, 169 (1883). b) 牛乳中ノ菌數, 里正義, 乳學, 後編, 1114, (文明堂). c) 水道水, 湖水等中ノ菌數, Greenwood, J. of Hyg., 16, 37 (1916). Henrici, J. Bct., 32, 265 (1936). Hotsckkiss, ebenda, 32, 423 (1369) d) 糞便中ノ菌數, Mc. Neal, J. of inf. D., 6, 571 (1909).