

咯痰中結核菌の検査法, 特に螢光顕微鏡 装置による検出法について

第 1 報

国立予防衛生研究所結核部(部長 柳沢 謙)

榛 名 恵 子

(受付 昭和 25 年 8 月 14 日)

緒 言

1882 年 Koch の結核菌発見以来結核症においては結核菌の検出がその診断・経過及び治癒の判定に欠くことのできない指針となつてゐる。さて結核菌の検出方法に関しては多数の研究者により種々の方法が考案検討され、その生物学的性状の進歩とともに多数の新知見が加えられてきた。1904 年 Köhler により螢光顕微鏡が発見され、さらにこれを 1937 年 Hagemann¹⁾ が始めて結核菌の検出に応用して以来咯痰・膿・髄液・胃液・尿管等あらゆる検査材料よりの結核菌の検出率において螢光顕微鏡法が従来の鏡検法より遙かによい成績を示している。わが国においては 1904 年工藤²⁾ により始めて紹介されて以来、螢光顕微鏡装置にその光源及び Filter の改良がなされるとともに漸次使用され、最近矢崎によりさらに改良が加えられて広く実用されるようになってきた。

従つて私は螢光顕微鏡装置に考慮を払い、299 例の咯痰について Ziehl-Neelsen 氏法・松岡氏法・螢光顕微鏡法の検出率を比較し、さらにその培養法との関係をも検討した。松岡氏法は第 27 回日本結核病学会総会においてその新染色法による成績が発表され、その検出率が培養法を遙かに凌ぐ優秀性を強調された方法であるのとともに追試することにした。なお動物実験と塗抹法及び培養法との関係についての検討は第 II 報に報告することにした。

検 査 材 料

大多数が国立東京第二病院入院患者の咯痰で、一部は集団検診時胸部 X 線像で陰影を認めたものの咯痰である。これらの材料は早朝採取を行い、その日のうちに検査を行つた。

実 験 方 法

1) 塗抹検査法: 各咯痰(なるべく膿様の部分)より集菌法を行わずに 3 枚ずつ塗抹標本を作成し、次の方法により染色鏡検した。

(a) Ziehl-Neelsen 氏法(以下 Z-N 法と略称する)
: 原法による。

(b) 松岡氏法(以下 M 法と略称する): 松岡氏の方法による。

(c) 螢光顕微鏡法(以下 FI 法と略称する): 0.1% Auramin-O 石炭酸溶液で 15 分間室温で染色し、1% 塩酸 alcohol 溶液で脱色後、10 倍稀釈 Methylene-blue 溶液で後染色した。

螢光顕微鏡装置は螢光顕微鏡に関する研究協議会で規定された A' 型装置を用いた。すなわち光源は超高压水銀燈東芝製 SHL-100u.v., 光源 Filter はイワキ BG 12, 接眼 Filter はイワキ Y 4, また顕微鏡は千代田製を使用した。油浸用 oil には流動 Paraffin を用いた。

なお鏡検はいずれの染色法においても 450~500 倍拡大で 50 視野ずつ検査し、Gaffky 氏の分類法に従つて分類した。

2) 培養検査法: 塗抹標本作成の残部に 4% NaOH 溶液を略々等容量加えて前処置 15 分以後に小川培地 2 本に培養し、6 週目まで観察して判定した。

実 験 成 績

1) 塗抹染色法(Z-N 法・M 法・FI 法) と培養法との比較(表 1):

検査例 299 例中培養陽性例についてその検出率を見ると、Z-N 法 74 例(61.2%)・M 法 76 例(62.8%)・FI 法 92 例(76.0%)であつた。培養陰性例においても同様の検出率の増加を示した。培養法をも含めた検出率の順位を見ると、Z-N 法が最も悪くて 299 例中陽性は 95

表 1 培養法・塗抹法の検出率比較

	培養陽性例	培養陰性例	計
培養法	(121例)	(178例)	$\frac{121}{299}$ 40.5
Z-N 法	$\frac{74}{121}$ 61.2	$\frac{21}{178}$ 11.8	$\frac{95}{299}$ 31.8
M 法	$\frac{76}{121}$ 62.8	$\frac{43}{178}$ 24.2	$\frac{119}{299}$ 39.8
(G-F を含む)	$\frac{83}{121}$ 68.6	$\frac{54}{178}$ 30.3	$\frac{137}{299}$ 46.0
FI 法	$\frac{92}{121}$ 76.0	$\frac{54}{178}$ 30.3	$\frac{146}{299}$ 48.8

表2 F1法とZ-N法との相関 (Gaffky 号数別による)

	Gaffky	F1 法				計	陽性例	陽性率	
		0	I~III	IV~VI	VII~X				
Z-N 法	培養陽性例	0	28	18	1	0	47	19	40.4
		I~III	0	17	5	0	22	22	100.0
		IV~VI	1	7	16	8	32	31	96.9
		VII~X	0	1	2	17	20	20	100.0
	計	29	43	24	25	121	92	76.0	
	陽性例	1	25	23	25	74			
	陽性率	3.5	58.1	95.8	100.0	61.2			
Z-N 法	培養陰性例	0	121	34	2	0	157	36	22.9
		I~III	3	12	1	0	16	13	81.2
		IV~VI	0	1	0	0	1	1	100.0
		VII~X	0	0	0	4	4	4	100.0
	計	124	47	3	4	178	54	30.3	
	陽性例	3	13	1	4	21			
	陽性率	2.4	27.7	33.3	100.0	11.8			
Z-N 法	総計	0	149	52	3	0	204	55	27.0
		I~III	3	29	6	0	38	35	92.1
		IV~VI	1	8	16	8	33	32	97.0
		VII~X	0	1	2	21	24	24	100.0
	計	153	90	27	29	299	146	48.8	
	陽性例	4	38	24	29	95			
	陽性率	2.6	42.2	88.9	100.0	31.8			

表3 F1法とM法との相関 (Gaffky 号数別による)

	Gaffky	F1 法				計	陽性例	陽性率	
		0	I~III	IV~VI	VII~X				
M 法	培養陽性例	0	26	18	1	0	45	19	42.2
		I~III	2	21	6	1	30	28	93.3
		IV~VI	1	4	14	7	26	25	96.2
		VII~X	0	0	3	17	20	20	100.0
	計	29	43	24	25	121	92	76.0	
	陽性例	3	25	23	25	76			
	陽性率	10.3	58.1	65.8	100.0	62.8			
M 法	培養陰性例	0	111	23	1	0	135	24	17.8
		I~III	11	23	1	1	36	25	69.5
		IV~VI	2	0	0	0	2	0	0
		VII~X	0	1	1	3	5	5	100.0
	計	124	47	3	4	178	54	30.3	
	陽性例	13	24	2	4	43			
	陽性率	10.5	51.1	66.7	100.0	24.2			
M 法	総計	0	137	41	2	0	180	43	23.9
		I~III	13	44	7	2	66	53	80.3
		IV~VI	3	4	14	7	28	25	89.3
		VII~X	0	1	4	20	25	25	100.0
	計	153	90	27	29	299	146	48.8	
	陽性例	16	49	25	29	119			
	陽性率	10.5	54.5	92.6	100.0	39.8			

例 (31.8%), M法之につき 119 例 (39.8%), F1 法最もよく 146 例 (48.8%) であり, 培養法 121 例 (40.5%) よりよい検出率を示している。

2) 塗抹 3 法の比較 (Gaffky 号数による検出率の相関について):

a) F1 法と Z-N 法(表 2):

培養陽性例においては, Z-N 法で陰性例中 F1 法で陽性のもの 19 例 (40.4%), F1 法陰性で Z-N 法陽性のもの 1 例 (3.5%) あるのみであつて, 殊に Gaffky 号数の低いもの, すなわち Gaffky I~III 号の喀痰においては, Z-N 法陰性例中 F1 法陽性例は 1 例も認められなかつた。

培養陰性例においては, Z-N 法で陰性例中 F1 法で陽性のもの 36 例 (22.9%), この中 Gaffky I~III 号のものは 34 例であるが, F1 法陰性中 Z-N 法陽性例は 3 例認め, 全部 Gaffky I~III 号の喀痰であつた。

全例 299 例についてこれを見ると, Z-N 法陰性例中 F1 法陽性のもの 55 例 (27.0%) この中 Gaffky III 号以下のものが 52 例であるが, F1 法陰性例中 Z-N 法陽性のもの 4 例 (2.6%), この中 Gaffky III 号以下のものが 3 例あつた。なお Gaffky I~III 号, IV~VI 号, VII~X 号群において F1 法陽性例はそれぞれ 35 例 (92.1%), 32 例 (97.0%), 24 例 (100%) であり, Z-N 法ではそれぞれ 38 例 (42.2%), 24 例 (88.9%), 29 例 (100%) であつた。

b) E1 法と M 法(表 3):

培養陽性例においては, M 法陰性例中 F1 法陽性のもの 19 例 (42.2%), F1 法陰性例中 M 法陽性のもの 3 例 (10.3%) であつた。培養陰性例においては前者は 24 例 (17.8%), 後者は 13 例 (10.5%) となつた。

両者の総計を見ると, M 法陰性例中 F1 法陽性のもの 43 例 (23.9%), この中 Gaffky III 号以下のものは 41 例であり, F1 法陰性例中 M 法陽性のもの 16 例 (10.5%), この中 Gaffky III 号以下のもの 13 例となつた。Gaffky I~III 号・IV~VI 号・VII~X 号群において F1 法による陽性例はそれぞれ 53 (80.3%)・25 (89.3%)・25 (100.0%) 例であり, M 法ではそれぞれ 49 (54.5%)・25 (92.6%)・29 (100.0%) 例が陽性であつた。

表4 Z-N 法と M 法との相関 (Gaffky 号数別による)

	Gaffky	Z-N 法				計	陽性例	陽性率	
		0	I~III	IV~VI	VII~X				
M	培養陽性例	0	38	6	1	0	45	7	5.5
		I~III	9	15	5	1	30	21	70.0
		IV~VI	0	0	20	6	26	26	100.0
		VII~X	0	0	7	13	20	20	100.0
		計	47	21	33	20	121	47	61.2
	陽性例	9	15	32	20	76			
	陽性率	19.1	71.5	97.0	100.0	62.8			
	培養陰性例	0	131	4	0	0	135	4	3.0
		I~III	25	10	0	1	36	11	30.6
		IV~VI	1	0	1	0	2	1	50.0
VII~X		0	2	0	3	5	5	100.0	
計		157	16	1	4	178	21	11.8	
陽性例	26	12	1	4	43				
陽性率	15.6	75.0	100.0	100.0	24.2				
法	総	0	169	10	1	0	180	11	6.1
		I~III	34	25	5	2	66	32	48.5
		IV~VI	1	0	21	6	28	27	96.5
		VII~X	0	2	7	16	25	25	100.0
		計	204	37	34	24	299	95	31.8
	陽性例	35	27	33	24	119			
	陽性率	17.2	73.0	97.1	100.0	39.8			
	計	0	169	10	1	0	180	11	6.1
		I~III	34	25	5	2	66	32	48.5
		IV~VI	1	0	21	6	28	27	96.5
VII~X		0	2	7	16	25	25	100.0	
計		204	37	34	24	299	95	31.8	
陽性例	35	27	33	24	119				
陽性率	17.2	73.0	97.1	100.0	39.8				

表5 培養法と塗抹3法との比較検討 (特にその相関関係について)

培養法	Z-N法	M法	F1法	例数	陽性率	
陽性例	+	+	+	66(+2)	54.5(56.2)	
	+	+	-	1(+0)	0.8(0.8)	
	+	-	+	7	5.8	
	+	-	-	0	0	
	121例	-	+	+	7(+2)	5.8(7.4)
40.5%	-	+	+	2(+3)	1.7(4.1)	
	-	-	+	14	11.6	
	-	-	-	24	19.8	
	陰性例	+	+	+	14(+1)	7.9(8.4)
		+	+	-	3(+0)	1.7(1.7)
+		-	+	4	2.3	
+		-	-	0	0	
178例		-	+	+	16(+5)	9.0(11.8)
49.5%	-	+	-	10(+5)	5.6(8.4)	
	-	-	+	20	11.2	
	-	-	-	111	62.4	

註: ()内の数字はM法G-F陽性例を含む

c) M法と Z-N 法(表4) .

培養陽性例及び陰性例において, M法陰性例中 Z-N 法陽性のものはそれぞれ7 (5.5%)・4 (3.0%) 例で, この中 Gaffky Ⅲ号以下のものは, それぞれ6例, 4例であり, 反対に M 法陽性, Z-N 法陰性例はそれぞれ9 (19.1%)・26(15.6%)例で, この中 Gaffky Ⅲ号以下

のものはそれぞれ9例・25例であった。

両者総計では前者は 11 例 (6.1%), 後者は 35 例 (17.2%) となり, 此の中 Gaffky Ⅲ号以下のものは前者は 10 例, 後者は 34 例の多数があつた。なお Gaffky I~Ⅲ号・Ⅳ~Ⅵ号・Ⅶ~Ⅹ号群においては, Z-N による陽性例はそれぞれ32 (48.5%)・27(96.5%)・25 (100.0%) 例であり, M法では夫々 27 (73.0%)・33(97.1%)・24(100.0%)例であつた。

3) 培養法と塗抹3法のそれぞれの比較検討(表5)特にその相関々係について:

Z-N 法・M法・F1 法の三者のいずれか一法のみ陽性の例について検討してみると, まず培養陽性例ではそれぞれ0・2(1.7%)・14 (11.6%) 例であり, 培養陰性例においてはそれぞれ0・10(5.6%)・20 (11.2%) 例であつた。すなわち Z-N 法のみが陽性であつた例は認められないが, M法及び F1 法では比較的多数例に陽性例が認められた。

4) 培養陰性塗抹陽性例の検討(表5・6・7):

培養陰性例中, それぞれの塗抹法で陽性

表6 培養陰性塗抹陽性例の号数

染色法	Z-N 法			M 法			F1 法		
	0	I~III	IV~VI	0	I~III	IV~VI	0	I~III	IV~VI
Gaffky									
I~III	16			36			47		
IV~VI	1			2			3		
VII~X	4			5			4		
計	21			43			54		

註: M法 G-F を含まず

表7 培養陰性・塗抹3法中いずれか陽性例における化学治療剤使用の関係

塗の抹組合せ法	Z-N法	+				-				計
	M 法	+	+	-	-	+	+	-	-	
	F1 法	+	-	+	-	+	-	+	-	
薬剤使用までの期間	前日まで使用	2	1	1		3	5	5		17
	3~10日	1				1				2
	11~30日	1				2	3	1		7
	1ヵ月~1年以上	6	2	1		7		6		22
	計					1	1	2	4	
計	10	3	3	0	14	10	16	0		

表8 M法 G-F のみの検討

培養法	+	+	+	+	計	-	-	-	-	計
Z-N法	+	+	-	-		+	+	-	-	
F1法	+	-	+	-		+	-	+	-	
例数	2	0	2	3	7	1	0	5*	5	11

註：培養陰性例中、Z-N法・F1法陽性の例(*)
5例の中、8週目まで培養を観察していると、2例においては少数のコロニーを認めてきた

であるものはZ-N法で21例、M法で43例、F1法で54例みられたが、かかる例の各塗抹法におけるGaffky号数を見ると(表6)、その80%以上がGaffkyⅢ号以下のもので占められていた。すなわちZ-N法16例、M法36例、F1法47例であつた。この関係は表5の各塗抹法別による培養陰性例の相関表によつても明らかである。

次に塗抹陽性で培養陰性の喀痰を喀出する患者についてその化学治療剤の使用状態を調査してみた。(表7)のように調査例は56例で使用者の大部分が2種以上の薬剤を用いていた。そこでこれらの薬剤の使用状態を喀痰検査までの日数別に分類してみると、検査の前日まで使用したものは17例あつた。これ等の成績では塗抹陽性で培養陰性例が特に化学治療剤の影響を受けたために培養陰性となつたものだと考えられない。

5) M法の検討(特にいわゆる桑実型のみ検出された例について)(表1・5・6・8)：

M法による喀痰中の結核菌の検出率は、いわゆる桑実型(以下G型と略称す)を加えない場合は119例(39.8%)が陽性となり、これにG型を加えると18例の増加が見られた。表8の相関表に示す如く、培養陽性例は7例でありこの中Z-N法或いはF1法で陽性のものは4例であつた。しかし培養陰性のものが11例も見られこの中塗抹法のいずれによつても陰性のものが5例あつた。しかしこれだけの成績からではG型が結核菌であるか否かを意味づけることはできないと考える。

考 按

Hagemann¹⁾, Finke³⁾, Jung⁴⁾, Zimmerman⁵⁾, Wilson⁶⁾, 蕤茂⁷⁾, 高椋⁸⁾, 馬場⁹⁾, 矢崎¹⁰⁾, 渡辺¹¹⁾, 高田¹²⁾, 小川¹³⁾等はそれぞれ塗抹法の結核菌検出の比較成績においてF1法の優秀性を発表している。また更に培養法と塗抹染色法にF1法との比較において、培養法>F1法¹⁴⁾の成績を示すものも多いが、高椋・馬場・Didion・蕤茂⁷⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾等は培養法>F1法の成績を発表している。私の成績でも培養法40.5%・Z-N法31.8%・M法39.8%・F1法48.8%法となつて、F1法が最も検出率の高いことを認めた。しかし培養成績においてはその培養時の条件が種々考慮されるので、培養陽性例

のみについて塗抹染色3法を比較するとZ-N法<M法<F1法となつて塗抹法の中では勿論F1法が最もよい成績であることを認めた。

これ等の3塗抹染色法の検出率のGaffky号別による相関々係からは、培養の如何にかかわらず特にGaffkyⅢ号以外の患者例において著明に高率となつていることを認めた。このことは塗抹標本中の菌数の少ない例ではF1法が特に見え易いことを示している。さらにそれぞれの塗抹染色法と培養法との個々の相関々係から、特にF1法の検出率が高い様相を明らかに認めた。

今回培養陰性例に相当数の塗抹陽性例を認めたので、それをGaffky号別に分類して検討してみるといずれの塗抹法においてもその80%以上がGaffkyⅢ号以下のもので占められていた。これを各染色法別に個々に相関関係を取つてみると、かかる例は塗抹法で検出率の高いもの程多く見られていることがわかつた。すなわちF1法のみ陽性であつたものが最も多く、培養陽性例で14例、培養陰性例で20例が見られたのに反し、Z-N法のみ陽性であつた例は培養成績の如何にかかわらず1例も見出されなかつた。このことは、高椋・Wilson・Hagemann²⁰⁾等によつても種々検討されているように、螢光顕微鏡は光源として紫外線に近い可視線及びこれより短波長のものを使用するためにその解像力が大となること、さらに螢光色素で染められた結核菌が暗視野中に輝いて見えるために標本深部の菌も検出され見附け易いこと等が、少数菌含有の標本の検出に際して非常に有利になるためであると考えられる。

次に結核患者に対する化学治療剤の使用が盛となつた現在、使用薬剤により菌数減少とともに菌形態の変化を見、さらに菌体の性状の変化のためにF1法で検出されても培養法では陰性となるのではないかということは一応考えられることであり、伊藤²²⁾・高椋・Tison²¹⁾等が同様の意見を述べている。

このように培養法よりF1法が良い成績を示したことは、結核菌以外のものの誤認なども考慮されるが、螢光法実施にあたり注意して検査すればこれらの問題は除外されることであつて、勿論F1法の優秀性を示すものであると考えられる。殊に結核菌検出に際し少数菌含有喀痰よりの検出率が高く、培養法に比較して即時検出し得る点、又手技の簡単なことからみても、F1法はよい方法であり、今後の顕微鏡装置及び光源の改良進歩に従いなおよりよい検出率が得られるであろうと思われる。

結 語

各種結核菌塗抹染色法のうち、Z-N法・M法・F1法による喀痰299例の検出率を比較し、培養法との関係をも検討した。

1) 塗抹染色法と培養法の比較により、Z-N法(95例・31.8%)<M法(119例・39.8%)=培養法(121例40.5%)<Fl法(146例・48.8%)の成績を得た。但し松岡氏のG型を陽性例に加えるとM法は137例・46.0%となり培養法よりよい値となつた。

2) 塗抹3法の比較と培養法との相関々係、及び個々の染色法と培養法との相関々係より、塗抹標本に菌数の少ない例において特にFl法が遙かに高い陽性率を示していることを認めた。

3) 培養陰性例中の塗抹陽性例についてみると、いずれの塗抹法においても大部分がGaffky III号以下の菌数の少ない喀痰であり、且つFl法が最も多数例を占めた。なおこの例における成績と化学治療剤使用との関係は認められなかつた。

この論文の要旨は第29回結核病学会において報告した。

終りに臨み柳沢部長・前田博士の御指導と御校閲を感謝するとともに研究室諸氏の御援助を深謝します。なお検査材料を提供されました国立第2病院の宮田先生に深謝します。

文 献

- 1) Hagemann: Dtsch. Med. Wshr., 63: 514, 1937.
- 2) 工藤得安: 植物及動物, 8巻, 10号: 1657, 昭15, 10.
- 3) Finke: Arch.f.Hyg., 123: Seit 1~406, 1940.
- 4) Jung: Deutsches Tuberk-BI., 14: 65-69, 1940.
- 5) Wilson: Am. Rev. Tuberc., 65: 709, 1952.
- 6) Zimmermann: Zshr.f.Hyg. u Luf., 122: 624, 1940.
- 7) 蓑茂: 日医大誌, 19巻, 9号: -115-1127, 1952.
- 8) 高椋: 日医大誌, 19巻, 6号: -68-800, 1952.
- 9) 馬場他: 結核診療, 第6巻, 2号, : 38, 1954.
- 10) 矢崎: 成医学会誌, 64巻, 1号: 14, 1949.
- 11) 渡辺: 東北医学誌, 37巻, 426号: 117, 昭23, 4.
- 12) 高田他: 結核, 27巻, 9号: 559, 1952.
- 13) 小川: 最新医学, 4巻, 9号: 532, 昭24, 9.
- 14) 大森: 医療, 9巻, 1号: 60, 1953,
- 15) Didion: Klin. Woche., II 18, 1938.
- 16) 蓑茂他: 日医大誌, 19巻, 5号: -94-708, 1952.
- 17) 蓑茂: 日医大誌, 19巻, 4号: -481-15, 1952.
- 18) 蓑茂: 日医大誌, 18巻, 12号, : -120-1316, 1951.
- 19) 蓑茂: 日医大誌, 19巻, 10号: -1-1130, 1952.
- 20) Hagemann: Munchen. Med. Wcheushr., 85: 1066, 1938.
- 21) F.Tison: Rev. de. la. Tub., 17-9: 943~958, 1953.
- 22) 伊藤他: 成医学会誌, 65巻, 4号: 157, 1951.
- 23) 工藤得安: 螢光顕微鏡学, 杏林書院, 1950.
- 24) 北川: 日医大誌, 19巻, 1号, : 1952.
- 25) 飛舗他: 日医大誌, 19巻, 4号: 481~15-1, 1952.
- 26) 矢崎: 医学のあゆみ, 16巻, 5号: 279, 1953.
- 27) 松岡・中島: 結核新染色法(松岡法)の臨床的意義: 1952.
- 28) 松岡: 結核, 27巻, 9号: 617, 1952.
- 29) 岡田: 臨床, 5巻, 8号: 767, 1952.
- 30) 古賀: 京都医誌, 37巻, 下: 1550, 1930.
- 31) Lampert, H.: Lancet, 2: 818, 1944.
- 32) 和田: 医学と生物学, 第2巻: 326, 昭17年.
- 33) 高木: 日本病理学会誌, 40巻: 378, 昭26年.
- 34) 木村他: 日本病理学会誌, 40巻: 377, 昭26年.
- 35) Gray. D.F.: Am. Rev. Tuberc., 68: 82, 1953.
- 36) 小川: 日本細菌学誌, 7巻, 6号: 641, 1952.
- 37) Gray, D.F.: Am. Rev. Tuberc., 65: 572, 1952.
- 38) 市川他: 結核, 28巻, 4号, 161, 1953.
- 39) 植田: 京大大学結核研究所年報2号: 187, 1951.
- 40) 児玉: 京大大学結核研究所年報2号: 187, 1951.
- 41) 小川: 臨床病理, 1巻, 1号: 12, 1953.