

結核菌染色証明法の改良に関する研究

第1報 アルカリ剤加 Ziehl 石炭酸フクシン液の検討

広島大学医学部細菌学教室 (主任 占部教授)

中 林 進

(受付 昭和 30 年 5 月 25 日)

(この研究の要旨は日本結核病学会中国四国地方学会第4回総会(昭和 28 年 11 月 1 日)で発表した)

は し が き

繊維染色界では羊毛、絹などの繊維の染色に際しそれに附着する種々の不純物例えば、蠟質、脂肪質、蛋白質、樹脂等を除去する目的で予め主としてアルカリ剤を精練剤として用い、しかる後染色を行つて好結果を得ておる¹⁾²⁾が、このアルカリ剤はこのように精練剤として用いられる他にまた繊維染色に当つて促染剤としても使用される場合もある¹⁾。私はこの点に示唆をえてこのようなアルカリ剤が結核菌染色にさいしても利用できないかと考え結核菌の染色証明法改良実験の第1楷程としてまず次のような実験を試みた。

実 験 I

1) 供試材料

Gaffky No. I ~ II号程度の結核喀痰を注射筒により 200 回前後バンピングを施した後さらに乳鉢内で約 10 分間研磨し充分均等化したものを1白金耳量ずつスライド硝子中央部に 1.5 cm 平方に略均等な厚さに塗抹し乾燥火焔固定したものを使用した。

2) 染色液

a) Ziehl (以下 Z と略す) 原法液: 日新化学製塩基性フクシン, 10 g を純酒精 100 cc に飽和させたもの(フクシン原液) 10 cc + 5% 石炭酸水 90 cc

b) アルカリ剤添加 Z 変法液

i) 苛性ソーダ加 Z 変法液: Z 原法液に苛性ソーダを 0.02, 0.04, および 0.06% の割合に加えたもの。

ii) 苛性カリ加 Z 変法液: Z 原法液に苛性カリを 0.02, 0.04, 0.08, および 0.1% の割合に加えたもの。

iii) 重炭酸ソーダ Z 加変法液: Z 原法液に重炭酸ソーダを 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, および 0.1% の割合に加えたもの。

iv) アンモニヤ加 Z 変法液: Z 原法液に 25%アンモニヤ水を 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 および 0.1% の割合に加えたもの。

c) アルカリ加フクシン液: 苛性ソーダ加フクシン液 (10%フクシン酒精 10 cc + 餾水 90 cc) に苛性ソーダを 0.02, および 0.04

%の割合に加えたもの。

3) 染色法

上記の各種染色液で加温染色 2 分間後軽く水洗し 3% 塩酸酒精で脱色 20 秒, 水洗, Löffler カリメチレン青液で 20 秒間復染, 水洗, 乾燥。

4) 成績判定

上記の各種染色液による染色標本 5 枚ずつをつくり 1 標本 100 視野ずつ計 500 視野内の結核菌数を計算し常に Z 原法液による成績を対照とし比較した。

実 験 成 績

1) 苛性ソーダ加 Z 変法液による成績

この成績はまとめて表 1 に示した。

すなわち Z 原法液を用いて染色した際の 500 視野に見なかつた結核菌の合計数は 70 コであつたのに較べて、苛性ソーダを 0.02% の割合に添加した Z 変法液によつた場合には 106 コ (すなわち前者の 1.5 倍) 同 0.04% 添加の Z 変法液では 147 コ (2.1 倍) 同 0.06% 添加 Z 変法液では 222 コ (3.2 倍) であつた。

他方石炭酸を含まないフクシン液に苛性ソーダを 0.02% の割合に加えた場合にあつても 131 コ (すなわち Z 原法液使用のさいの (1.9 倍) となり同 0.04% 添加の場合には 82 コ (1.2 倍) となつた。

因に苛性ソーダを Z 原法液に対して 0.08 % 以上に又フクシン液に対して 0.06% 以上に加えた場合についてころみたがこれらの場合には加温染色中にフクシンの色調が速に脱色されてしまつて問題にならなかつた。なお、Z 原法液又はフクシン液に苛性ソーダを添加した際には混和後 10 分以内に染色に用いないと染色能が急速

表 1 Ziehl 液又はフクシン液に苛性ソーダを添加した場合

染色液	Ziehl 原法液	Ziehl 液に対する NaOH の添加量			フクシン液に対する NaOH の添加量	
		0.02%	0.04%	0.06%	0.02%	0.04%
5 標本 500 視野内の合計菌数	70	106	147	222	131	82
100 視野内の平均菌数	14.0	20.2	29.4	44.4	26.2	16.4
菌 検 出 比	1.0	1.5	2.1	3.2	1.9	1.2

表2 Ziehl 液に苛性カリを添加した場合

染色液	Ziehl 原法液	Ziehl 液に対する KOH の添加量				
		0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.1 %
5 標本 500 視野内の合計菌数	47	62	71	115	102	87
100 視野内の平均菌数	9.4	12.4	14.2	23.0	20.4	17.4
菌 検 出 比	1.0	1.3	1.5	2.4	2.2	1.9

表3 Ziehl 液に重炭酸ソーダを添加した場合

染色液	Ziehl 原法液	Ziehl 液に対する NaHCO ₃ の添加量				
		0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.1 %
5 標本 500 視野内の合計菌数	256	486	644	558	586	507
100 視野の平均菌数	51.2	97.2	128.8	116.6	117.2	101.4
菌 検 出 比	1.0	1.9	2.5	2.2	2.3	2.0

表4 Ziehl 液に 25% アンモヤ水を添加した場合

染色液	Ziehl 原法液	Ziehl 液に対する NH ₄ OH の添加量				
		0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.1 %
5 標本 500 視野の合計菌数	287	334	542	456	537	480
100 視野の平均菌数	57.4	66.8	108.4	91.5	107.4	96.0
菌 検 出 比	1.0	1.2	1.9	1.6	1.9	1.7

表5 アルカリ加 Ziehl 変法液を用いた場合の結核菌検出成績 (その1)

染色液	Ziehl 原法液	Ziehl 液に対する添加アルカリ剤の種類と割合			
		0.06% NaOH	0.06% KOH	0.06% NaHCO ₃	0.06% NH ₄ OH
6 標本 600 視野の合計菌数	119	324	207	282	151
100 視野内の平均菌数	19.8	54.0	34.5	47.0	25.2
菌 検 出 比	1.0	2.7	1.7	2.4	1.3

に低下することもわかった。

2) 苛性カリ加Z変法液による成績

この成績は表2に示したようであつて対照のZ原法液使用の場合5標本計500視野内に見出された結核菌の数は計47コであつたのに対して苛性カリを0.06%の割合に加えたZ変法液使用の場合には115コ(前者の2.4倍)となつたが同0.08%加えた場合では102コ(2.2倍)同0.1%添加の場合には87コ(1.9倍)となつた。すなわち表2でわかるように結核菌の検出能はZ液に対する苛性カリの添加の割合が0.06%まではその添加量に比例して上昇するが0.06%を超えるとその添加量に逆比例するものように見受けられた。

3) 重炭酸ソーダ添加Z変法液による成績

重炭酸ソーダを加えたZ液を用いた場合の成績は表3にかかげた。

すなわち対照としたZ原法液による5標本計500視野内に見出された結核菌数は計256コであつたのに対し、重炭酸ソーダを0.04%加えた場合では644コ(前者の2.5倍)となつたがこれを峠としてこの前後の添加量では検出能が多少にかかわらず低下していた。

4) 25%アンモヤ水添加Z変法液による成績

表4に成績を示したように、対照としたZ原法液による500視野内の検出結核菌数計287コに対し、アンモヤ水0.04%添加のZ変法液によつた場合では結核菌検出数は542コ(前者の1.9倍)となり、同0.08%の添加の場合もこれとほぼ同じ検出能を示した。

5) アルカリ剤加Z変法液による結核菌の染色所見

以上実験の結果供用各種アルカリ剤添加Z変法液による結核菌の染色成績において共通した点は第一に喀痰内結核菌の検出率が多かれ少かれZ原法液によつた場合に比してまきつていたということをあげることができるが、その他にZ原法液使用の場合に比して結核菌がかなり膨大して見えしかもより濃赤染しかつ顆粒もより多くより美麗に染め出されるといふ点をもあげることができる。

実 験 II

実 験 方 法

1 供試材料：前出の実験1の場合と同様のものを用いた。

2 染色液：日新化学製の塩基性フクシン 4.0gを無水酒精 20cc に加えてできるだけよく溶かした後10%石炭酸水(加温溶解) 80cc を加える—これでフクシンは完全に溶ける—第1液とよぶ。別に0.12%アルカリ剤(苛性ソーダ, 苛性カリ, 重炭酸ソーダ, アンモヤ水)溶液を用意これを第2液とする。使用直前に第1, 2両液を等量混和し時を移さず染色に用いる。—混和後10分以上も経つと染色力は著しく低下する—この場合アルカリ剤添加量はいずれも総液量の0.06%となるが、この割合が実験1の結果から見て最も良好であつたところよりこのようにしたわけである。なおこの際の石炭酸の全液に対する含有の割合が4%ということになっている。

3 染色法：第1, 2両液の混合液を混合直後直に塗

表6 アルカリ加 Ziehl 変法液を用いた場合の結核菌検出成績 (その2)

染色液 復染	Zieh 原法液		Ziehl 液に対する添加アルカリ剤の種類と割合							
			0.06%NaOH		0.06%KOH		0.06% NaHCO ₃		0.06%NH ₄ OH	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
6 標本 600視野内の合計 菌数	380	487	726	1122	774	932	882	904	748	869
100 視野内の平均菌数	63.0	81.0	154.3	187.0	129.0	155.3	147.0	150.7	124.7	145.0
菌 検 出 比	1.0	1.3	2.4	3.0	2.0	2.5	2.3	2.4	2.0	2.3

抹標本上に満載し、2分間加温染色した後20秒間3%塩酸酒精で脱色し水洗し Löffler のカリメチレン青で20秒間復染し水洗乾燥して鏡検に供した。

4 成績

上記各染色液による染色標本を6枚ずつ作り各種本100視野ずつ計600視野の結核菌数を計算し、その結果を対照たるZ原法液による同種標本における所見と比較した。

実験成績

成績はまとめて表5にかかげた。

すなわち対照として用いた、Z原法液による600視野中の結核菌数は119コであつたが、苛性ソーダを0.06%に添加したZ変法液で染色したのものにおいては324コ(Z原法液染色のさいの2.7倍)であり、苛性カリ添加Z変法液使用の場合は207コ(同1.7倍)であり、さらに重炭酸ソーダの添加Z変法液では282コ(同2.4倍)であり、またアンモニヤ水添加Z変法液使用の場合は151コ(同1.3倍)となつた。

以上により今回の実験の限りでは0.06%の割合に苛性ソーダを加えたZ変法液を用いた場合が最も優れた成績の得られることがわかつたがこのことはさきの実験Ⅰの場合とほぼ揆を一にするものであるといつてよからう。

実験 III

実験方法

1) 供試材料: 実験Ⅰと同様のものを用いた。

2) 実験方法: 染色法とか成績判定とかはさきの実験Ⅰの場合とほぼ同様であつたが、ただ染色液の石炭酸含有量がさきの実験Ⅱでは4%であつたのに対して本実験ではZ原法液におけるそれと完全に符合するように4.5%になるようにした点がかかるのみで染色液のその他の組成とか作り方なども実験Ⅱと全く同様にした。なお本実験においてはさらにLöfflerのカリメチレン青による復染の有無が結核菌検出率にどの程度影響するものであるかについても追究する目的で同一供試材料について

の同一染色液による標本を3%塩酸酒精で20秒間脱色後水洗し一方ではそのまま乾燥鏡検し他方ではさらにLöffler液で20秒間復染し水洗乾燥鏡検し両々比較した。

実験成績

実験の結果は表6のようになつた。

すなわち苛性ソーダを0.06%の割合に加えたZ変法液を用いたさいの結核菌検出率はLöffler液で復染したさいはZ原法液使用、Löffler液復染のものに比して2.4倍の又復染しなかつた場合には3.0倍の結核菌検出能を示し又苛性カリを加えたZ変法液においては復染した場合には同2.0倍、復染しなかつた場合には同2.5倍、重炭酸ソーダを加えたZ変法液使用のさいには復染では同2.3倍非復染では同2.4倍、アンモニヤ水添加Z変法液使用のさいには復染した場合には同2.0倍復染しなかつたものでは同2.3倍にそれぞれ結核菌検出能が向上した。

以上により本実験においてもさきの実験Ⅱの場合と同様結核菌の検出能はZ原法液を用いる場合に比してアルカリ加Z変法液を用いた場合多少にかかわらず向上し、中でも苛性ソーダ0.06%加Z変法液においてもつともその効果が勝ることが判つたのみならずその他にZ原法液、アルカリ加Z変法液の別なく、ともに復染を施したものよりも非復染のものにおける方が結核菌の検出能においてかなりすぐれていることも明らかにすることができた。

総括ならびに考案

結核菌の染色にKoch⁴⁾が当初メチレン青に苛性ソーダを加えたものを用いたことは周知のことであり、又Ehrlich⁵⁾はアルカリ剤の存在においてのみ結核菌の被膜は染色液を浸透させるとの仮定のもとに種々の観察を行つたといわれている。Fielding⁵⁾は重炭酸ソーダその他を用いて結核菌の被染性を増強せしめ得るとのべ、又一方わが国においては劉⁷⁾は苛性ソーダの代りに苛性カリを用いて結核菌が良染されたといひ、最近では大池・鈴木⁶⁾等はアルカリその他の物質をZ液に加えて

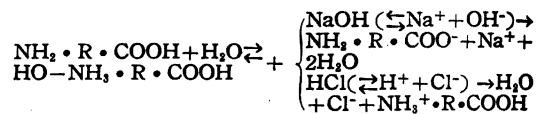
結核菌を染色して好結果を得たと報告している。私は羊毛、木綿、絹等のセニの染色にさいしてアルカリ剤が精練剤としてセニに附着する不純物を除去する目的に用いられていること¹⁾²⁾、羊毛、絹においては塩基性染料を用いる場合溶液をアルカリ性とした方がセニ蛋白との化学的結合が容易に行われる、すなわちアルカリ剤が促染的作用を有すること¹⁾²⁾³⁾を知り、結核菌染色にさいしても如上のことが応用できるのではないかと考えた。よつて苛性ソーダ、苛性カリ、重炭酸ソーダ、アンモニヤ水等の各種アルカリ剤をZ液に添加してアルカリ加Z変法液を試作しこれ等による結核菌の染色法について実験を行つて見た結果、これ等アルカリ剤を添加したZ液を用いたさいにはいずれの場合にあつてもZ原法液使用のさいに比して結核菌の検出率を多少にかかわらず高めうることがわかつた、又いずれの供用アルカリ剤にあつても添加量が0.04乃至0.08%の間で最高の検出成績を示し、これより濃度が下るに従い、又逆に上るに従い、ともに検出率が減少することも知られた。最もすぐれた成績を示したものはZ液に苛性ソーダが0.06%の割合に加えられた場合であつて、Z原法液使用のさいの約3.2倍の検出率を示したが、その他にも重炭酸ソーダ0.04%添加の場合では同じく2.5倍、苛性カリ0.06%添加の場合では同じく2.4倍の好成績を示し、なおアンモニヤ水でさえもこれを0.04%の割合にZ液に加えると同じく1.9倍の検出率を示した。次に供用アルカリ剤の種類による優劣を比較する目的で同一添加濃度、例えば0.06%の割合の添加濃度について相互に比較して見たところ苛性ソーダが最も優り次は重炭酸ソーダであり、続いて苛性カリ、アンモニヤ水の順序であることもわかつた。なおこれ等アルカリ加Z変法液による結核菌の被染状態についてみるに、いずれのアルカリ剤添加のさいにも共通して、Z原法液によつた場合に比して一般に結核菌の菌体は多少とも膨大した状態を示し且つ紫赤色により濃染され、しかも顆粒がより多く且つ美しく染色されることが認められた。

次に、アルカリ加Z変法液における石炭酸の濃度であるが、すでに内山⁸⁾⁹⁾、小河¹⁰⁾等はZ液における石炭酸添加量を原法より増量することの有利性を認めているが、私の如上のアルカリ加Z変法液にあつても石炭酸添加量が4%よりも4.5%となつた場合の方がより良好な成績の期待できることがわかつた。

その他すでに占部¹¹⁾によつても指摘されているように結核菌の検出率が復染した場合に比して非復染の場合においてよりすぐれているということが私のアルカリ加Z変法液使用のさいにも認められた。

いずれにもせよ以上のようにZ液にアルカリ剤を加えた場合には結核菌の被染性が非常によくなる事実が判明したが、この機作乃至理由はどうかであろうか。この説

明として次のように考えることは許されないだろうか。すなわち結核菌体と同様その主成分が蛋白質であるところの動物セニ(羊毛、絹等)の染料による被染性を高める目的には一般に①セニの精練と②蛋白セニと染料とのイオン結合の促進とが主として考えられており、そのさい①の精練の目的にはアルカリ剤が主として用いられるのであるが、これによりセニ表面の蠟質、脂質などが除去せられ、ために染料のセニへの滲透が助長促進せられて染着がよくなるとされてお¹⁾、又②の染料とセニ蛋白とのイオン結合促進の目的には、用いる染料が塩基性のものであるさいにはセニを浸す溶液をアルカリ性とする(酸性染料のときには溶液を酸性とする)と次のような根拠に立脚して両者のイオン結合が容易になりよく染着するようになるといわれている¹⁾²⁾³⁾のである。すなわち蛋白(セニ)はその表面に遊離の酸性基(-COOH)と塩基性基(-NH₂)とが存在するいわゆる化学的両性物質である²⁾¹²⁾ので溶液がアルカリ又は酸であるさいには次のような化学変化がおこり、セニは前の場合には陰イオンに後の場合には陽イオンにそれぞれ荷電する。



ところで塩基性染料 $\text{R} \cdot \text{NH}_2\text{HCl}$ は溶液にすると

$\text{R} \cdot \text{NH}_2\text{HCl} \rightleftharpoons \text{R} \cdot \text{NH}_3^+ + \text{Cl}^-$ のように解離しこの $\text{R} \cdot \text{NH}_3^+$ が上記の予めアルカリ性溶液中で $\text{NH}_2 \cdot \text{R} \cdot \text{COO}^-$ の形となつているセニ蛋白と容易にイオン結合し $\text{NH}_2 \cdot \text{R} \cdot \text{COO}^- \cdot \text{R} \cdot \text{NH}_3^+$ となり染色が促進せられるのである。

このようにして塩基性染料による蛋白セニの被染性促進のためにアルカリ剤が利用されるわけであるが、これとは似たことが上記の私のアルカリ加Z変法液による結核菌染色の場合にもおこるのではないだろうか。すなわち一方では結核菌体表面の蠟質、脂質のようなものがまずZ液内のアルカリ剤によつて少なくともある程度除去され色素に対する菌体の滲透性がたかめられる上に他方ではさらにこれに加えるにアルカリ剤添加でアルカリ性になつているZ液に結核菌が浸されることにより如上のセニ蛋白の場合と同様にして菌体は陰イオンに荷電し、これに陽イオン荷電の塩基性色素(フクシン)液の迅速強力な結合がおこりかくしてこれ等両々相俟つて結核菌の被染性が非常にたかまることとなりその結果としてZ原法液による場合よりもより高い結核菌の検出率が期待できるようになるものと解される。

結 論

1) 喀痰内結核菌の染色検査にあたり、アルカリ剤加

Ziehl 変法液を用いると Ziehl 原法液を用いる場合に比して結核菌の検出率を高めることができる。

2) アルカリ剤加 Ziehl 変法液のうち苛性ソーダを 0.06%の割合に添加したものが最も秀れており、それによる結核菌検出率は Ziehl 原法液によつた場合の 2.4 乃至 3.2 倍であり、重炭酸ソーダ添加、苛性カリ添加の順序でこれにつづき、アンモニヤ水添加が最も劣つていたがそれとても Ziehl 原法液に比して 1.3 倍乃至 2.0 倍の検出率を示した。

3) この結核菌検出率向上の理由は、Z 液内のアルカリ剤が菌体に対して精練剤として作用し色素に対する透過性をたかめることのほかに、塩基性フクシンと結核菌とのイオン結合をも促進せしめるためと考えられる。

4) アルカリ剤添加 Ziehl 変法液によると結核菌はより濃染し菌体はやや膨大し、多数の顆粒を鮮明に染色することができる。

5) アルカリ剤添加 Ziehl 変法液は保存に耐えない。

稿を終るに当り、御懇篤な御指導並びに御校閲を賜つた恩師占部教授に満腔の謝意を捧げる。

文 献

- 1) 佐藤吉彦：最新染色法（第1巻）精練漂白及び浸染篇，14，137～141，丸善，東京，昭28。
- 2) 加藤信八郎：染料と染色，20～22，41～42，日本化学会，昭25。
- 3) 理科事典：10，254，平凡社，東京，昭27。
- 4) W. Kolle & A. Wassermann：Pathogenen Microorganismen，II，89，1903。
- 5) J.W. Fielding：Austral. J. Exp. Biology & Med. Science Vol. XII. 1-5 1934。
- 6) 大池・鈴木：抗酸菌病研究雑誌，7(1)，13～18 昭26。
- 7) 劉：東京医事新誌，12，3152号，昭14。
- 8) 内山義夫：臨床と研究，21(10)，93～96，昭19。
- 9) 内山義夫：久留米医学会雑誌，9(1～4)，1～3，昭21。
- 10) 小河衆生・矢野深：久留米医学会雑誌，13(3～4)，48～50，昭25。
- 11) 占部薫：医学週報，(445)，1～4，昭18。
- 12) 赤堀四郎・奥村重雄：解説有機化学，269～271，共立出版社，東京，昭28。