

# 喀痰中の結核菌の検査法, 殊に螢光顕微鏡装置による検出法について

## 第Ⅱ報 動物実験との比較

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳沢 謙)

榛 名 恵 子・前 田 道 明

(受付 昭和 30 年 5 月 31 日)

さきに私は第1報において結核患者喀痰の各塗抹検査法 Ziehl-Neelsen 法・松岡法・螢光顕微鏡法一の比較およびこれらの塗抹染色法と培養法との関係を検討した結果, 螢光法による検出率が高いことを報告した。なおこの際培養陰性の例について被検者が使用した治療剤との関係を調査検討してみたが, 特にこれとの関係を認めうるような結果は得られなかつた。また第1報で報告した如く結核患者の喀痰中 Gaffky 号数の低いものでは塗抹陽性で培養陰性の例がかなり多数に認められたので, その意義の検討を行うために, 各塗抹染色法および培養法と併せて動物実験を行った。

### 実験方法

検査材料は国立東京第二病院入院中の結核患者の喀痰で, 螢光顕微鏡法で Gaffky IV 号以上を示したものを除いた 46 例を使用した。なお喀痰は早朝採取を行い, その日のうちに使用した。

- 1) 塗抹検査法: 第 I 報に述べた如く, 集菌法を行わず, Ziehl-Neelsen 法 (Z・N 法)・松岡法 (M 法)・螢光顕微鏡法 (F1 法) により染色鏡検した。なお染色および鏡検の手技は前報と同様に行つた。
- 2) 培養検査法: 4%NaOH 液前処置後, 1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 小川培地各 3 本に 0.1 cc ずつ培養し, 6 週間目に判定を行つた。
- 3) 動物接種法: 前述の培養残部を 3.8 %HCl 液でほぼ中和し, その 0.5 cc すなわち喀痰量 0.15 cc~0.2cc ずつを各 3 匹ずつのモルモットの腹壁皮下に接種し, 100 倍稀釈 Tuberculin 液による Tuberculin 反応(ツ反応)の推移を追及し, ツ反応陽転成績を検査するとともに, 10 週間目に解剖し, 一部の疑わしい淋巴腺・臓器および総ての例の脾臓を再び小川培地各 3 本ずつに培養して, 6 週間目の培養成績を剖検所見に加味して判定し, これらの成績を比較検討した。

### 実験成績

- a) 動物実験成績と培養成績との比較検討 (表 1) 培養成績では 46 例中 13 例 (28.3%) が陽性で, これ

を動物実験成績との各相関々係について各塗抹染色法別に記すと, 表 1 の如くになつた。すなわち, 動物実験成績陽性 14 例 (30.4%) の中, 培養陰性は 4 例であつたが, このうち塗抹 F1 法では 2 例に陽性が認められ, Z・N 法では全例陰性であつた。またツ反応陽性は 33 例 (71.8%) に見られ, このうち培養陰性が 20 例もあつた。

また動物実験陰性で塗抹・培養ともに陽性のものは 2 例あつたが, ツ反応陽転成績からはかかるものは 1 例も認められなかつた。

b) 塗抹染色法を中心とした動物実験成績および培養成績の比較 (表 1・2)

表 1 動物実験と培養・塗抹法との関係

		臓器培養成績による判定	ツベルクリン反応による判定			
動物実験成績	++--	計	++--			
培養法成績	+-+-		+-+-			
例数	104 329	46	1320 013			
塗抹法成績	松岡法	Z・M・F (+)	4 0 1 0	5	5 0 0 0	5
	桑実型を除く	Z・F (+)	2 0 0 1	3	2 1 0 0	3
		M・F (+)	0 2 0 4	6	0 1 0 5	6
		M (+)	0 0 0 1	1	0 1 0 0	1
		F (+)	1 2 1 5	9	2 6 0 1	9
		Z (+)	0 0 0 0	0	0 0 0 0	0
		3 染色法 (-)	3 0 1 18	22	4 1 1 0 7	22
相関	松岡法	Z・M・F (+)	6 0 1 1	8	7 1 0 0	8
	桑実型を加える	Z・F (+)	0 0 0 0	0	0 0 0 0	0
		M・F (+)	0 3 0 5	8	0 7 0 1	8
		M (+)	1 0 0 3	4	1 2 0 1	4
		F (+)	1 1 1 4	7	2 4 0 1	7
		Z (+)	0 0 0 0	0	0 0 0 0	0
		3 染色法 (-)	2 0 1 16	19	3 6 0 1 0	19

注: Z・M・F(+) とは Z・N 法, M 法, F1 法のいずれによつても陽性であつたもの  
3 染色法(-) とはいずれの染色法によつても陰性であつたもの

表2 染色法と動物実験・培養法との比較

臓器培養	++--	計	++--	計
培養法	+-+-		+-+-	
染色法	+		-	
Z・N 法	6 0 1 1	8	4 4 2 2 8	38
M 法	4 2 1 5	12	6 2 2 2 4	34
M法(桑実型を含む)	7 3 1 9	20	3 1 2 2 0	26
Fl 法	7 4 2 10	23	3 0 1 1 9	23
ツ 反 応	++--	計	++--	計
培養法	+-+-		+-+-	
染色法	+		-	
Z・N 法	7 1 0 0	8	6 1 9 0 1 3	38
M 法	5 6 0 1	12	8 1 4 0 1 2	34
M法(桑実型を含む)	8 1 0 0 2	20	5 1 0 0 1 1	26
Fl 法	9 1 2 0 2	23	4 8 0 1 1	23

注: 数字は例数

表 3

	Z・N法	M法 (桑実型を含む時)	Fl法
臓器培養成績による判定(陽性例)	0	2 (3)	4
ツ反応陽転成績による判定(陽性例)	1	6 (10)	12
計	1	7 (12)	14

表2において見られるように、Z・N法陽性8例(17.5%) M法陽性12例(26.1%)これにM法のいわゆる桑実型を陽性例として加えると20例(43.5%)陽性となり、最もよい成績を示したFl法では23例(50.0%)陽性であった。

この塗抹3法および培養法に動物実験成績を加味して比較検討すると、次のような順位が得られた。すなわち、Z・N法<M法(桑実型を加えず)≦培養法≦剖検所見を加味した臓器培養成績<Fl法<ツ反応陽転成績。

c) 塗抹陽性・培養陰性例における動物実験成績による検討(表3)

塗抹陽性で培養陰性のものは、Z・N法では、1例、M法では7例、M法のいわゆる桑実型を陽性とする、12例、Fl法では14例が認められた。すなわち塗抹法で検出率の高いもの程塗抹陽性で培養陰性の例が多数に認められた。そこでこれら各例の動物実験成績との関係を見ると、表3の如くであつて、剖検時の肉眼的所見に臓器培養成績を加味した判定法で見ると、Fl法14例中4例のみが陽性であるにすぎなかつたが、ツ反応陽転成績で判定してみると、Fl法14例中12例が陽性であつた。すなわち剖検所見を加えた臓器培養成績よりも、ツ

表4 松岡法桑実型のみ検討(18例)

培養法	++++	計	----	計
チール法	++--		++--	
發光法	+-+-		+-+-	
例 数	2 0 2 3	7	1 0 5 5	11

注: 培養陰性例中 Z・N 法陰性, Fl 法陽性の例5例\*  
中8週目まで培養を観察すると、2例において少数の Colonie を認めた

表5 M法桑実型と動物試験との関係(8例)

培養法	動物試験	剖検所見による判定		ツ反応による判定	
		++--	計	++--	計
例 数		3 0 0 5	8	3 0 4 1	8
塗抹法	Z・F (-)	1 0 0 2	3	1 0 1 1	3
	Z・F (+)	2 0 0 1	3	2 0 1 0	3
	F (+)	0 0 0 2	2	0 0 2 0	2

注: 1) Z・F(-)とはZ・N法, Fl法では菌は認められなかつたが、M法では桑実型のみを認めたもの  
2) Z・F(+)とはM法では桑実型を認めたが、Z・N法, Fl法でもともに菌を認めたもの  
3) F(+)とはM法では桑実型だけを認め、Fl法で陽性であつたがZ・N法では陰性であつたもの

反応陽転成績が塗抹陽性成績と極めて一致する成績がみられた。

d) M法のいわゆる桑実型の検討

M法において特にいわゆる桑実型のみ検出された例についてその意義の検討を加えてみた。M法による喀痰中の結核菌の検出率は調査例299例中陽性119例(39.8%)となり、いわゆる桑実型を加えた場合には137例(46.0%)が陽性となつた。すなわちZ・N法の陽性率(95例・31.8%)に比し相当の開きが認められた。次に137例のうち桑実型のみを認めたもの18例について培養法と塗抹染色法との相関関係をみると、表4の如くであり、7例が培養陽性であつた。なおM法では桑実型のみを認めたが同一材料をZ・N法およびFl法で検査して陰性であつたもの8例についての培養成績は、3例が陽性であつた。

次に動物実験を行つた46例中の桑実型の検出成績を検討してみると、表5でみられるように、M法で桑実型のみ検出された8例中、剖検所見および培養法で陽性のもは3例であつた。なお染色法で桑実型のみを認め、Z・N法およびFl法では陰性であつた3例中、剖検所見および培養法で陽性であつたものは1例であつて他の

2例は陰性であつた。またツ反応の成績から桑実型を検討してみると、培養陰性5例中ツ反応陽転例が4例に認められた。

## 考 案

喀痰中の結核菌検索の判定に際し、塗抹染色法・培養法・剖検所見ならびに臓器培養成績およびツ反応陽転成績の各判定法による検査成績を比較検討してみると、その検出率は塗抹染色法中 Z・N 法 17.5 %・M法 26.1 %・FI 法 50.0 %、培養法 28.3 %、動物実験成績中剖検所見ならびに臓器培養成績 30.4 %、ツ反応陽転成績 71.8 %と極めてばらばらな成績であつて、塗抹染色法で陽性のもでも臓器培養所見で陰性の例があり、かかる例は塗抹染色法3法のうちその陽性率の高いもの程数多く見出された。すなわち塗抹染色法で最もよい検出率を示した FI 法は、動物実験成績の判定法のうちツ反応による判定法と最も平行する関係がみられた。また FI 法が塗抹染色法のうち検出率が極めて良いことはさきに第1報において述べた如くであるが、表2においても、培養陽性例中臓器培養成績でみると、陽性のも 13 例のうち、塗抹法陽性例は Z・N 法 7 例・M法 6 例・FI 法 11 例であり、一方ツ反応成績からみるとツ反応陽性 33 例中塗抹陽性例は Z・N 法 8 例・M法 11 例・FI 法 23 例であつて、やはり塗抹法中では FI 法の検出率が最も高くなつていた。FI法での検出率が高い理由を考察してみると、FI法では他の染色法よりもコントラストがつきやすいので結核菌を発見し易いこと、さらに他の染色法よりも蛍光色素 Auramin が結核菌に吸着され易いので他の染色法で染まり難い結核菌でも蛍光処理されてくることなどが考えられよう。われわれは FI 法では鏡検に際し確実に桿菌と認められるもののみを結核菌として判定しているが、小川らも述べている如く FI 法の検出率が高いからとて、従来のように塗抹陽性の場合に培養を行わないのは極めて危険であろう。すなわち塗抹法で認められた菌の生死は明らかでないからである。

次に第1報において塗抹陽性・培養陰性の例がかなり多数認められたが、今回の実験例でも、塗抹法で明らかに桿状をなす菌のみを塗抹陽性としても、被検数46例中かかる例は Z・N 法では1例・M法では7例・FI法では14例と相当数が認められている。また塗抹法で高い Gaffky 号数を示す材料においても、なお培養陰性の例が屢々認められた。塗抹陽性でありながら培養法で陰性であることは、喀痰中の菌が死んでいるのかあるいは生え得ないことであるから、化学治療剤の普及に伴う菌自身の喀痰中における性状の変化、培地の問題、培養時の前処置の影響、あるいは極めて微量の化学治療剤が検査材料中に存するかまたは菌に吸着しているためかなどを検討する必要がある。しかし、化学治療剤による

喀痰中結核菌の培養成績への影響は、さきに第1報で述べた如くわれわれの調査例では認められなかつた。また培地の改良についてはさらに考究を要するであろうが、培養時の前処置の影響は充分考慮しなければならぬ。すなわち小川培地を用いる場合には NaOH 液によつて培地上で増殖しうる能力を失う菌もあることを考えておくべきである。かかる喀痰中の菌の生態についてさらに検討を加えるために、動物実験を試みたのであつたが、その成績は表3の如く剖検時の肉眼的所見に臓器培養成績を加味した判定法では陽性を示すものがすくなく、ツ反応陽転成績を指標とすると培養は陰性であつても各塗抹陽性成績と極めて一致する成績が得られた。

動物実験成績において結核菌が陽性であつたか否かを判定する方法として、従来から用いられている剖検所見および臓器培養成績によつて判定する場合では、動物体内で増殖し難い菌によつては病変を示してこないで、陽性の成績が得られないものと考えられる。また動物実験におけるツ反応をその判定指標にしてみても、被検材料中に多量に死菌を含む場合には、その成績に影響を及ぼすことが考えられるので、これによつても生きて菌の陽性の有無を判定することは出来ない。要するに喀痰中で増殖能力の弱い菌は動物接種によつて必ずしも菌の生存を証明しうるような成績を示してこないものである。例えば、化学療法を受けた患者喀痰の結核菌中には、弱毒化されてモルモットに接種してもその臓器に肉眼的病変を示してこないものがある。

以上のことから考えて、塗抹法で陽性であることは菌の生死を問わず菌を鏡検し得たことであるし、また培養で生えてこないこと、あるいは動物接種において陽性成績とならないことは、菌の生死、あるいは生きていながらも菌の増殖能力と極めて関係の深いものであるから、菌の生死をきめ得る新たな方法が発見されない限り、これらに関係づけることは困難である。したがつて塗抹陽性培養陰性例の意義については、動物実験成績の判定法としてのツ反応陽転成績の意義の検討と共に、さらに考究すべき問題と考える。しかしとも角かかる例が相当認められる現在においては、今後喀痰中の結核菌の検査に当つては、塗抹陽性例でも陰性の場合と同様に必ず培養することが必要であろう。

最後に松岡のいわゆる桑実型について検討を加えてみた。桑実型のみを認めたものの培養成績および動物実験成績から考えてみると、M法で桑実型のみを認めた18例中7例が培養陽性であり、またM法で桑実型のみを認めても Z・N 法および FI 法で陽性であつたものは10例あつた。すなわちM法による染色標本を鏡検した視野中には桑実型以外のものは認められなくても同一患者の同時期の他種染色標本中には明らかに桿菌を認めたものが18例中10例に認められたことから考えると、その

材料中には桑実型のみしか認められなかつたことが極めて困難であると考え。これより考えると、18例中7例が培養陽性になつたとしてもそれが桑実型から起つたと断定しうる根拠がない。またM法桑実型のみでZ・N法・FI法で陰性であつた8例中3例が培養陽性であつたが、さきにM法では桑実型のみでも他種染色法で桿菌のみみとめられたものが18例中10例あつたことと比較して、ほぼ同率であり8例中に桑実型以外が確実になかつたと言いうる根拠もない。動物実験の成績でも同様に以上のような関係が考えられる。われわれが検討して来た例数はすくないけれども、塗抹標本で検鏡した量は培養した量よりもはるかにすくなく、また動物に接種したものは培養量よりも多かつたことなどの量的関係も考慮すると、培養あるいは動物接種に用いた被検材料中には結核菌は全くなかつたという根拠は全くないのである。以上のことから桑実型を認めた被検材料が結核菌陽性であると断定し得る成績は得られなかつた。

### 結 語

- 1) 喀痰からの結核菌の検出に際し、塗抹法で少数の結核菌を見出した例に培養陰性例が相当数認められたので、FI法により Gaffky 4号以上を除いた46例を選び、その動物実験成績と塗抹法(Z・N法・M法・FI法)および培養法とによる菌検出法を比較検討してみた結果、その陽性率は  $Z \cdot N \text{ 法} \leq M \text{ 法} \leq \text{培養法} \leq \text{動物剖検所見ならびに臓器培養成績} < FI \text{ 法} < \text{ツ反応陽転成績の順になつた}$ 。
- 2) 塗抹陽性・培養陰性例は塗抹法の検出率の高いもの程多くかつ塗抹法陽性の半数以上に認められたが、このうち接種動物の臓器培養法により陽性となつた例は、ごく少数のみであつた。しかし接種動物のツ反応による判定では、かかる例のほとんどが陽性の成績を示した。
- 3) 極めて高い陽性率を示した動物実験成績の判定法としてのツ反応陽転成績の意義についてはさらに検討を要するものと考え。
- 4) 現在の患者喀痰中には、塗抹陽性・培養陰性の例が

かなり認められるので、その検査に当つては、塗抹成績の如何にかかわらず必ず同時に培養を行うべきであると考え。

- 5) FI法の結核菌検出率は動物接種を行つた場合のツ反応陽転成績による検出率にはおよばなかつたが、Z・N法・M法はもとより、培養法・動物剖検所見ならびに臓器培養法による判定法よりはよい成績を示した。しかし、この際の陽性は菌の生死を問わず材料中に菌が存在するか否かを判定したものであると解さなければならぬ。
- 6) M法の桑実型についていささか検討を加えてみたが、これが結核菌であるか否かを断定する証拠は掴めなかつた。

終りに臨み柳沢部長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下さいました国立東京第二病院の宮田先生に深謝します。

### 文 献

- 1) 小川：最近医学，9巻，8号，109，昭29。
- 2) 蓑茂・高掠：日医大誌，20巻，10号，883，1953。
- 3) 橋本：結核の臨牀，2巻，4号，61—369，昭29。
- 4) 蓑茂他：日医大誌，20巻，1号，64，1953。
- 5) 蓑茂他：日本臨床結核，8～5，369，1954。
- 6) Frublinger B., Bala G.: Amer. Rev. Tuberc., 68, 42, 1953.
- 7) Beck & Yegian: Amer. Rev. Tuberc., 66, 44, 1952.
- 8) D. Yegian: Amer. Rev. Tuberc., 66, 629, 1952.
- 9) P. Collard & K. Anderson et al: Lancet, 6778, 155, 1953.
- 10) Medullar: Amer. Rev. Tuberc., 66, 36, 1952.
- 11) 水溜：慶応医学，31—9，317，昭29。
- 12) 鯉坂：久留米医学雑誌，17—5,6，197，昭29。
- 13) 榛名：結核，30，30，1955。