

結核菌染色証明法改良に関する研究

第2報 酸またはアルカリ集菌前処置が Ziehl 液ならびにアルカリ加 Ziehl 変法液の結核菌染色能に及ぼす影響

中 林 進

広島大学医学部細菌学教室—主任 占部薫教授

受付 昭和 30 年 12 月 26 日

緒 言

前報¹⁾において私は結核菌の染色にさいし Ziehl 液（以下 Z 液と略）にアルカリ剤を加えて染色するとその染色能が増強され、なかんずく苛性ソーダを 0.06% の割合に加えたものがもつとも秀れていることをみとめ、この理由としては菌表面の蠟質あるいは脂質等がアルカリ剤によつてある程度除去され染料の浸透性が高まると共に結核菌の蛋白質と塩基性染料とのイオン結合の増強により染料の染着が促進されるということなどがあげられるのではなからうかと述べた。ところが、他方かかる見地よりすると、アルカリ剤に代うるに酸剤をもつてすれば前記諸作用が阻害されしたがって Z 液の染色能にもなんらかの変化が見られるようになるのではないかということも考えられたので、今回はこのような点を究明する第 1 階梯として喀痰処置にアルカリ剤を用いた場合と、酸剤を用いた場合とについて Z 液ならびにアルカリ加 Z 変法液による結核菌の主として染色証明能の推移について比較検討してみた。

実 験 I

A. 実験の材料と方法

1) 実験材料: Gaffky I—Ⅱ 号の結核喀痰に注射器によるパンピングを約 5 分間ほどして充分均等化したもの。

2) 前処置法: ① Petroff のアルカリ法（以下アルカリ法と略）—上記の均等化した喀痰を遠洗管に採り 4% 苛性ソーダ水をそれと同等量加えときとき振盪しつづ 38°C 30 分間放置後、3,000r.p.m. 20 分間遠洗。

② 占部の迅速アルカリ中和法²⁾（以下中和法と略）—遠洗管に採つた上記の均等化喀痰液の約半量の 8% 苛性ソーダ水を加え、硝子棒をもつて攪拌すること 5 分間、ついで加えた苛性ソーダ水の約半量の 10% 硫酸水を加えた後上と同じようにして遠洗。

③ 住吉—Hohn の硫酸法（以下硫酸法と略）—同様にして約 5 倍量の 5% 硫酸水を加え充分振盪し室温に 20 分間放置した後上と同様に遠洗。

3) 塗抹・染色法: 上記の 3 種の前処置法をほどこした材料よりの遠洗沈渣の 1 白金耳量ずつを 1.5cm 平方の広さに可及的均等になるようにスライド硝子上に塗抹したものをそれぞれ 20 枚ずつつくり、それらを法にしたがつて乾燥、火固固定後直ちに次の 4 種のアルカリ加 Z 変法液および Z 原法液でそれぞれ 2 分間加温染色、水洗、20 秒間 3% 塩酸酒精で脱色、水洗、20 秒間 Löffler のカリメチレン青液で復染、鏡検する。

4) 染色液: ① Z 原法液、② アルカリ加 Z 変法液: 塩基性フクシン（日新化学社）4.0g に無水アルコール 20cc を加え（フクシンは完溶しない）これにあらかじめ加温溶解した 16% 石炭酸水—石炭酸水を 16% とした理由は、実験の結果この場合がもつとも良好であつたこと³⁾による—を徐々に加えながら攪拌すれば、フクシンは完全に溶解する。これの濾紙で濾過したものを第 1 液とする。別に 0.12% アルカリ (NaOH, KOH, NaHCO₃, または NH₄OH) 溶液を用意する。これを第 2 液とよぶ。第 1, 2 液ともに保存にたえる。使用に当つてはその直前に第 1, 2 両液を等量ずつ混和して直ちに染色に供する。この混合液は短時間（10 分間位）後にはもはや使用に堪えなくなる。

5) 成績のよみとり: 各材料よりの同一染色標本 5 枚ずつについて各 100 視野宛を鏡検し、計 500 視野に見つかる結核菌数を計算し常にそれぞれ Z 原法液による同種標本の成績と対比した。

B. 実験成績

1) アルカリ前処置法を施した喀痰についての各種染色液による結核菌の検出頻度: この成績は一括して表 1 に示した。すなわち、対照とした Z 原法液の検出菌数計 165 に対し NaOH を加えた Z 変法液では 363 〇 (Z 原法液の 2.2 倍), KOH 加 Z 変法液では 215 〇 (同じく 1.3 倍), NaHCO₃ 加 Z 変法液では 215 〇 (同じく 1.4 倍), NH₄OH 加 Z 変法液では 195 〇 (同じく 1.2 倍) であつた。

2) 中和前処置法を施した喀痰についての各種染色液による結核菌の検出頻度: この所見は表 2 に示したように Z 原法液で染色したさいは検出菌数 95 〇であつたのに対し NaOH 加 Z 変法液では 204 〇 (Z 原法液の 2.1 倍),

表 1 アルカリ法前処置喀痰についての
各種染色液による結核菌の鏡検成績

標本No.	染色液 Ziehl 原法液 (対照)	NaOH加 Z変法液	KOH加 Z変法液	NaHCO ₃ 加 Z変法液	NH ₄ OH 加 Z変法液
1	40	100	47	59	49
2	34	59	33	51	39
3	18	77	57	45	40
4	42	61	51	37	32
5	31	66	27	37	35
500 視野中 の合計菌数	165	363	215	229	195
検 出 比	1.0	2.2	1.3	1.4	1.2

表 2 迅速アルカリ中和法前処置喀痰につい
ての各種染色液による結核菌の鏡検成績

標本No.	染色液 Ziehl 原法液 (対照)	NaOH加 Z変法液	KOH加 Z変法液	NaHCO ₃ 加 Z変法液	NH ₄ OH 加 Z変法液
1	36	30	19	45	24
2	16	39	34	30	31
3	10	67	12	30	22
4	22	34	15	56	9
5	11	34	29	24	26
500 視野中 の合計菌数	95	204	109	185	112
検 出 比	1.0	2.1	1.1	1.9	1.2

表 3 硫酸法前処置喀痰についての各
種染色液による結核菌の鏡検成績

標本No.	染色液 Ziehl 原法液 (対照)	NaOH加 Z変法液	KOH加 Z変法液	NaHCO ₃ 加 Z変法液	NH ₄ OH 加 Z変法液
1	1	17	9	11	12
2	3	16	7	16	14
3	1	24	9	16	12
4	1	24	10	16	20
5	1	20	8	19	23
500 視野中 の合計菌数	7	101	43	78	81
検 出 比	1.0	14.4	6.1	11.1	11.5

KOH加 Z 変法液では109コ (同じく1.1倍), NaHCO₃ 加 Z 変法液では185コ (同じく1.9倍), NH₄OH加 Z 変法液のさいは112コ (同じく1.2倍) であった。

3) 硫酸前処置を施した喀痰についての各種染色液による結核菌の検出頻度: これはまとめて表3に示した。

すなわち Z 原法液の場合は 500 視野中に見出された結核菌数は漸く合計 7 コにすぎなかったのに対して, NaOH 加 Z 変法液では101コ (Z 原法液の場合の14.4倍), KOH 加 Z 変法液のさいは 43 コ (同じく 6.1倍) であり, NaHCO₃ 加 Z 変法液の場合は 78 コ (同じく 11.1倍), NH₄OH 加 Z 変法液の場合は 81 コ (同じく 11.5倍) であった。

C. 実験 I の小括

喀痰に対する前処置法がアルカリ法, 中和法または硫酸法のいずれであつても, それらよりの結核菌の染色能は Z 原法液に比してアルカリ加 Z 変法液の方が多少にかかわらずよりすぐれていた。そしてこの場合 Z 液に加えられるアルカリ剤としては NaOH が最もよく NaHCO₃ が大体のところこれについているようであつた。なお喀痰液よりの結核菌のアルカリ加 Z 変法液によつた場合の Z 原法液によつた場合に対する検出比は, アルカリ前処置法の際と中和法の際とはいずれもほぼ同程度であつたのに対して, 硫酸法によつた場合のそれは遙かに大となつたこと例えば NaOH 加 Z 変法液によつたさいには, Z 原法液によつた場合に比してアルカリ法および中和法ではそれぞれ 2.2倍および 2.1倍であつたのに対して, 硫酸法では実に 14.4倍ということからでも窺われこの点注目しに値するものと考えられる。

実 験 II

A. 実験の材料と方法

- 1) 実験材料: 実験 I と同様均等化した Gaffky II 号程度の結核喀痰を使用した。
- 2) 前処置法: 前記の均等化した結核喀痰を正確に 0.5 g ずつ 3 等分しそれぞれ遠沈管に採り, 1 つは実験 I 同様アルカリ法にしたがい, 今 1 つは中和法にしたがい, 残りの 1 つは硫酸法にしたがいそれぞれ前処置し, いずれも 3,000 r.p.m. 20 分間遠沈した後上澄液を充分捨て得られた各沈渣を秤量し, それらの各重量の比較からして濃縮の割合を一応よみとつてから, これらの沈渣を攪拌して再び均等化し, それらの 1 白金耳量ずつを同一スライド硝子上におのおの径ほぼ 1.5cm の円形内に可及的均等な厚さに塗抹, 乾燥後火固固定した。
- 3) 染色法: かくして作成された 3 種前処置法よりの各標本はともにそれぞれ 1 つは Z 原法液で他は NaOH 加 Z 変法液 (日新化学社製塩基性フクシン 4.0g を無水酒精 20 cc にできるだけ溶解さらに加温溶解した 11.25% 石炭酸水 80cc を加え完溶せしめ filtrate したもの) にこれと同量の 0.12% 苛性ソーダ液を加え混和後直ちに使用) でそれぞれ 2 分間加温染色, 水洗, 20 秒間 3% 塩酸酒精で脱色, 水洗, 20 秒間 Löffler のカリメチレン青液で復染鏡検した。

B. 実験成績

成績はまとめて表4に示した。すなわち検出された結

表4 結核喀痰前処置法別とZ液ならびにアルカリ加Z変法液の染色能との関係(その1)

前処置法 沈渣の重量(比) 染色液	Petroff の アルカリ法		占部の迅速 アルカリ中和法		住吉—Hohn の硫酸法		
	520 mg (1.0)		792 mg (1.5)		990 mg (1.9)		
	NaOH加 Z変法液	Z原法液	NaOH加 Z変法液	Z原法液	NaOH加 Z変法液	Z原法液	
標本No.							
1	126	76	45	12	3	1	
2	90	21	51	52	1	3	
3	115	99	48	70	8	1	
4	112	69	75	36	10	1	
5	101	23	29	8	9	0	
6	67	85	34	25	11	1	
7	155	57	46	10	15	1	
8	119	68	75	19	2	2	
9	102	109	74	10	0	1	
10	67	65	46	12	3	2	
一 中 の 合 計 視 野 数	直読値 (比)	1054 (1.6)	672 (1.0)	523 (2.1)	254 (1.0)	62 (4.8)	13 (1.0)
	従量 補正值 (比)	1054 (1.6)	672 (1.0)	797 (2.1)	387 (1.0)	118 (4.8)	25 (1.0)

核菌数はアルカリ前処置法の場合にはZ原法液では672コであつたがNaOH加Z原法液では1054コ(Z原法液のさいの1.6×)中和法のさいにはZ原法液では254コであつたがNaOH加Z変法液では523コ(Z原法液のさいの2.0×)また硫酸法の場合にはZ原法液では13コであつたがNaOH加Z変法液のさいには62コ(Z原法液の4.8×)であつた。ところが同一量の喀痰液より各集菌法によつて得られた喀痰沈渣の重量はアルカリ法では520mg、中和法では792mg(アルカリ法の1.5倍)および硫酸法では990mg(アルカリ法の1.9倍)であつたのでいま以上の各検出菌数値をそれぞれの沈渣のこの重量比からわり出してアルカリ前処置による値を基準として補正值としてみると中和法の場合にはZ原法液では387コ(非補正值の1:1.5)であつたのに対してNaOH加Z変法液を用いたさいには797コ(Z原法液のさいの2.1×)となりまた硫酸法によつた喀痰ではZ原法液では25コ(非補正值の1:1.9)であつたがNaOH加Z変法液を用いたさいには118コ(Z原法液のさいの4.8×)ということになった。すなわち10標本計1,000視野中の検出結核菌数は各前処置法共にZ原法液によつたものよりもNaOH加Z変法液で染色したさいの方が多少にかかわらずすべてより多数であつたことは実験Iのさいとほぼ類似した。次にアルカリ法、中和法、硫酸法の3前処置法相互間の菌検出度を比較してみたところこれも表4にあるように、直読値

ではZ原法液で染色した場合は総計アルカリ法672コ、中和法254コおよび硫酸法13コとなり、これを補正值で示すとそれぞれ672コ、387コならびに25コということになったが検出能の順序は前の直読値によつた場合と不変であつた。またNaOH加Z変法液で染色したものでは直読値および補正值はそれぞれ1,054コおよび1,054コ、523コおよび797コならびに62コおよび118コとなりこのさいにも直読値、補正值のいずれにおいても結核菌検出能はアルカリ法>中和法>硫酸法の順を示すことにかわりはなかつた。

C. 実験Ⅱの小括

実験Ⅱにおいてもさきの同Iの場合と同様喀痰に対する前処置法がアルカリ法、中和法または硫酸法のいずれであつてもそれらよりの結核菌の染出能はZ原法液に比してNaOH加Z変法液の方がまさつておりしかもZ原法液に対するNaOH加Z変法液の染出能比はアルカリ法では1.6倍であつたのに対して中和法では2.1倍とややまさりさらに硫酸法では4.8倍の染出能の著しい増強ぶりを示した。

実 験 Ⅲ

本実験では前処置法に用いられる硫酸ならびに苛性ソーダの結核菌検出率に及ぼす影響についての検討を目的としたので中和法は除外して実験を試みた。

A. 実験の材料と方法

1) 実験材料: Gaffky IV号程度の結核喀痰を前同様にして均等化して使用した。

2) 前処置法: 喀痰に対する硫酸ならびに苛性ソーダ前処置法は実験Ⅱの場合と同一方法によつた。なお、今回対照として用いた喀痰は上記の均等化喀痰液を単に3,000 r.p.m. 20分間遠沈した沈渣そのものである。

3) 染色法: 前出の実験Ⅱと同じ方法によつた。

B. 実験成績

これはまとめて表5に示した。表5に示すように苛性ソーダで処置した喀痰のNaOH加Z変法液による染色標本およびZ原法液による染色標本よりの結核菌検出数はそれぞれ補正值3,774コおよび2,000コであつたのに対して硫酸処置喀痰よりのそれらはわずかにそれぞれ63コおよび8コにすぎずこれを対照である無処置の喀痰液のZ原法液染色の場合の1,247コに比べるとアルカリ前処置の場合はその検出比はそれぞれ3:1および1.6:1となり、硫酸前処置のさいはそれぞれ0.05:1および0.006:1となつた。

表 5 結核喀痰前処置法別とZ液ならびにアルカリ加Z変法液の染色能との関係(その2)

標本No.	前処置法 沈渣の重量(比) 染色液	直接遠沈法(対照)		Petroff のアルカリ法		住吉—Hohn の硫酸法	
		500mg (1.0)		100 mg (0.2)		200 mg (0.4)	
		Z原法液	NaOH加Z変法液	Z原法液	NaOH加Z変法液	Z原法液	Z原法液
1		253	3470	2387	19	6	
2		281	4852	2729	27	5	
3		268	2220	2220	35	6	
4		226	2236	1744	27	2	
5		219	4892	920	50	1	
五の 〇合 〇計 視菌 野数 中	直読値	1247	18870	10000	158	20	
	従量補正值	1247	3774	2000	63	8	
	検出比	1.0	3.0	1.6	0.05	0.006	

C. 実験Ⅲの小括

以上の成績よりして、今回の実験においても、さきの実験Ⅰおよび同Ⅱの場合と同様に、前処置法がアルカリ法であると硫酸法であるとを問わずともに喀痰よりの結核菌の染出能はZ原法液に比してNaOH加Z変法液がまさっており、この傾向は硫酸処置喀痰において特に著明であつた。なお、対照とした無処置の喀痰沈渣よりの結核菌検出頻度に比してアルカリ法をほどこしたものからではZ原法液で1.6倍のまたNaOH加Z変法液では3.0倍の検出頻度の向上がみられたが、硫酸法をほどこした喀痰からではこれとは逆にそれぞれ0.006倍および0.05倍とかえつて著明に鏡検による検出頻度が低下することが認められたことは鏡検のための喀痰集菌法としては硫酸前処置法が用いられるべきでないことを示唆するものと考えられ注目に値しよう。

考案ならびに総括

アルカリ剤の結核菌の被染性に及ぼす影響についての報告としてはすでに古く Koch が苛性ソーダを用いて結核菌の染色能を高めたことにみられるがその後Fielding⁴⁾は重炭酸ソーダをZ液に加えてその染色能を増強せしめ、劉⁵⁾は苛性カリを用いると結核菌が良染するといひ、大池、鈴木⁶⁾もアルカリ剤を喀痰の前処置液として用いるとその中の結核菌の染出数が増加したと報告している。また Hallberg⁷⁾も結核菌の染色液中に苛性カリを添加していたことも近年になつてわが国でも知られるようになった。私¹⁾は前報において苛性ソーダ、苛性カリ、重炭酸ソーダ、アンモニヤ等のアルカリ剤をZ液に添加して用いると結核菌の染出率を高めうることを報告し、この機作としてアルカリ剤がセンイ染色のさいの如く精練作用を有し、かつ塩基性フクシンと結核菌とのイ

オン結合をも強めることがあげられるのではないかと述べたが、さらに今回の以上の諸実験の成績よりすると喀痰に対する前処置法がアルカリ法、中和法または硫酸法のいずれであつても前報における無処置喀痰における場合とほぼ同様にアルカリ加Z変法液で染色したものはZ原法液で染色したものに比して結核菌の染出数が勝るものであることがわかつた。ところが喀痰前処置法のアルカリ法、中和法および硫酸法の相互間ではZ原法液による喀痰内結核菌の染出能に対するアルカリ加Z変法液のその比は前2者の場合よりも硫酸法の場合においてはるかに大きく顕現されるものであることも認められた。ところでこの硫酸法の場合には他の前処置法に比してZ原法液によつた場合には結核菌の被染性が著しく減弱し、かつ標本全休も不鮮明となることがみられたが、このさい酸によつて前処置された喀痰がアルカリ加Z変法液で染色されるという、結核菌の被染性がある程度復元せしめられるかの如き印象が与えられたこと等から私は酸を喀痰に対して前処置液として使用したさいには、その中の結核菌の被染性を低下させるか、またはフクシンの染色能を阻害するか、するところの何等かの因子が働くようになるのではないかと考えたい。由來結核菌を酸でもつて処置した実験は多数見うけられるが、そのうち Bomtemps⁸⁾は5%の乳酸、枸橼酸、酒石酸等によつてその抗酸性が脱却されるといひ、植田⁹⁾等は5%硝酸で7時間、10%硫酸では48時間で結核菌は全くその被染性を失つたと述べ、森¹⁰⁾も純硫酸、濃塩酸、乳酸および酒石酸によつて結核菌の抗酸性を脱却せしめたと報告し、浦郷¹¹⁾は5%硝酸水の4~5時間の作用で結核菌は染らなくなるといつており、これらの諸業績ではすべて結核菌の抗酸性を脱却せしめるとか、被染性を失わしめるとかのためにはそれぞれかなり長時間結核菌を酸に曝露することによつてその目的を達しているようであるが、私の今回の実験では硫酸の結核菌への直接作用時間はせいぜい50~60分にすぎないので如上の諸家の場合とは趣を異にするものといわねばなるまいが、それはそれとしてもこの際の結核菌の染出率は喀痰をアルカリをもつて前処置した場合、ならびに無処置の場合に比して驚くほど劣つていた事実は何によつて説明すべきであろうか。私のこの場合にももちろん多少とも硫酸によつて結核菌の抗酸性に減弱的影響をうけるとか、菌そのものに形態的变化ないし破壊をこうむるとかのことが全くなかつたとはいへないであろうが、私はそれにもましてこのさい酸により、染料の染着が妨げられる何らかの因子が働いたことが、この主要因子ではないかと考えたのである。すなわちこの際には前報¹⁾にすでに報告したところのZ液にアルカリ剤を加えた場合とは全く逆の

化学結合が染料と菌体との間に生じるとは、当然想像されるところであり、したがって酸によつて前処置されることにより菌体表面は陽性に荷電するようになり、これにカチオン染料であるところの塩基性フクシンをかけるわけだから、その結果として染料と菌体とのイオン結合が抑制されることになり、これが如上の硫酸前処置の喀痰中の結核菌がアルカリ前処置のそれに比しては、もちろんのこと無処置のそれに比べても、はるかにZ液で染色されがたくなることの機作の主要な部分を占めるのではないかと考えるのである。

結 論

1) Petroff のアルカリ法、占部の迅速アルカリ中和法または住吉—Hohn の硫酸法のいずれの前処置法によつて処理された喀痰に対しても、アルカリ加Z変法液はZ原法液にまさつた結核菌染色能を発揮しうる。この傾向は硫酸処置喀痰において特に著しい。

2) アルカリ前処置法は喀痰内の結核菌の被染性に良好な影響をもたらすが、硫酸前処置法は逆に喀痰内結核菌の染出率を著しく低下せしめる。

3) この硫酸前処置による結核菌染出率の低下の主因

は硫酸が塩基性フクシンと結核菌体とのイオン結合を阻害することにあるように考えられる。

稿を終るにあたり恩師占部教授に深甚の謝意を表します。

主 要 文 献

- 1) 中林：結核，30：593，昭30.
- 2) 占部：医界週報，(445)，1，昭18.
- 3) 中林：未発表
- 4) Fielding：Australian J. Exp. Biol. and Med. Science，12，1，1934.
- 5) 劉：東京医事新誌，(3152)，2384，昭14.
- 6) 大池・鈴木：抗酸菌病研究雑誌，7：13，昭26.
- 7) Hallberg：Acta Med. Scandinav.，108，12，1941.
- 8) Bomtemps：Zeitsch. f. Imm-forsh，15，436，1912.
- 9) 植田：日本微生物学病理学雑誌，30：1924，昭11.
- 10) 森：結核，16：20，昭13.
- 11) 浦郷：久留米医学雑誌，14：570，昭26.