

結核菌染色証明法の改良に関する研究

第3報 結核菌の被染性に及ぼす苛性ソーダならびに硫酸の影響

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31年2月22日

緒 言

私はさきに結核菌の染色証明にあたり Ziehl (以下Zと略) 液に少量のアルカリ剤を加えるときは結核菌の検出率が増加すること¹⁾および集菌前処置液としてアルカリ剤を用いたさいもその検出率が增大するが酸剤を用いたさいは逆に低下すること²⁾を報告したが、今回はさらにそのさい酸およびアルカリ剤の濃度とか作用時間とか、Z液の染色能に対していかなる影響を及ぼすものであるか、また酸前処置によりZ液の結核菌への染色能が減弱された場合アルカリ剤によつてどの程度それが復元されうるかという点に関して検討したので以下報告する。

第1章 結核菌の被染性と前処置液として用いた苛性ソーダならびに硫酸の濃度との関係

A. 塗抹喀痰標本に苛性ソーダまたは硫酸を作用させた場合

実験方法ならびに材料

Gaffky II号程度の結核喀痰に5分間程度注射器でパンピングを施すことにより充分均等化しその1白金耳量ずつをスライド硝子上に採り室温で乾燥せしめた。次にあらかじめ準備しておいた4%、2%、1%、0.5%、0.25%、0.125%の6種の苛性ソーダ液ならびに同硫酸液および対照として蒸留水をそれぞれ4白金耳量ずつ前

記塗抹乾燥喀痰標本上に重積し30分間室温に放置して乾燥硬化している喀痰を再び軟化させ攪拌しながら径1.5cmの円形内にできるだけ均等な厚さにのばし室温乾燥後火焰上を5~6回通過させて固定しおのおのZ原法液で2分間加温染色し20秒間3%塩酸酒精で脱色、20秒間Löf fler のカリメチレン青液で復染、乾燥、鏡検した。

実験成績

成績は表1および図2に示したように1標本100視野ずつ5標本計500視野中の結核菌数についてみるに対照(蒸溜水加)では101コであつたのに対し4%苛性ソーダ液を用いたさいは344コ(対照の3.41倍)、2%のそれでは389コ(同じく3.85倍)、1%では499コ(同じく4.9⁴倍)、0.5%では186コ(同じく1.84倍)、0.25%では164コ(同じく1.62倍)、0.125%では121コ(同じく1.20倍)となり1%の苛性ソーダで処置したさいが最高の菌検出数を示しこれより濃度が増減するに従い菌検出数も減少し、0.125%に至つてはほとんど対照に近い検出数を示した。他方硫酸を加えた場合では苛性ソーダの場合と反対に0.125%においては86コ(対照の0.85倍)、0.25%では13コ(同じく0.13倍)となり、0.5%以上ではもはや結核菌を検出するに至らなかつた。

そこでさらに以上の実験成績のうち苛性ソーダを作用せしめた場合について分散分析法の二元配置法によつて検定および推定を行つて見た結果次のような結果をえた。

表1 喀痰塗抹標本に苛性ソーダならびに硫酸を作用させた場合

標本 No.	処置濃度	苛性ソーダで30分処理						無処理対照	硫酸で30分処理					
		4%	2%	1%	0.5%	0.25%	0.125%		0.125%	0.25%	0.5%	1%	2%	4%
1		40	79	88	28	33	23	25	23	2	0	0	0	0
2		64	85	96	38	27	22	28	15	4	0	0	0	0
3		65	85	116	42	27	19	16	15	3	0	0	0	0
4		100	68	102	37	38	27	16	25	3	0	0	0	0
5		75	72	97	41	39	30	16	8	1	0	0	0	0
5標本500視野の合計		344	389	499	186	164	121	101	86	13	0	0	0	0
平均菌数		68.8	77.8	99.8	37.2	32.8	24.2	20.2	17.2	2.6	0	0	0	0
検出比		3.41	3.85	4.94	1.84	1.62	1.20	1.0	0.85	0.13	0	0	0	0

%苛性ソーダを含有)が最も検出率がよくその前後の濃度ではかえって減少を示していたことは前記Aの場合とほぼ軌を一にした。他方硫酸を加えた場合では0.5%加

(0.25%硫酸を作用させたことになる)のさいには44コ、1%の硫酸を加えた場合(同じく0.5%作用)ではわずかに11コとなり2%加(同じく1%作用)のさいでは結

表4 試験管内で苛性ソーダまたは硫酸を作用させた場合

標本 No.	処置 濃度	苛 性 ソ ー ダ				対 照	硫 酸		
		2 %	1 %	0.5 %	0.25%		0.25%	0.5 %	2 %
1		21	39	35	21	15	11	5	0
2		25	45	25	26	25	11	0	0
3		14	37	27	14	13	8	2	0
4		22	31	21	27	12	7	1	0
5		31	34	15	17	16	7	3	0
500視野中の合計菌数		115	184	119	105	81	44	11	0

図3

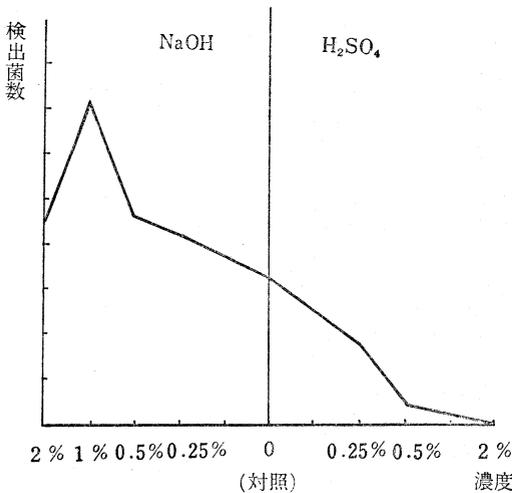
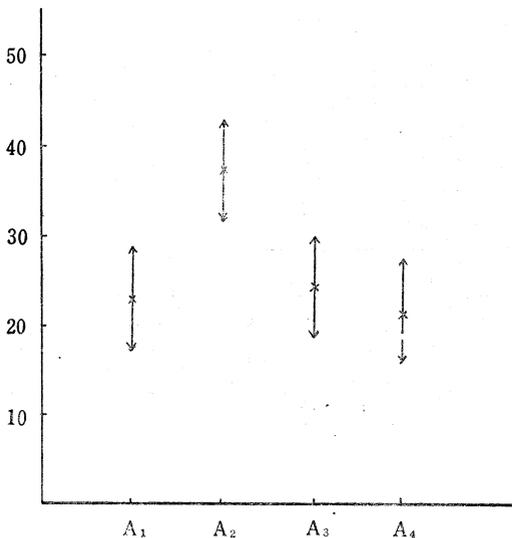


図4



核菌は全く認められなかつた。

次にこれを前実験Aの場合と同様にして分散分析を行った結果はその分析表は略すが図4のようになった。

すなわち図4よりして結論として $A_2 > A_3, A_1, A_4$ となり A_2 (2%苛性ソーダ加の場合=1%苛性ソーダ作用となる)が最大でありその他の場合では相互間の差はほとんど認められず、すべて A_2 よりはるかに劣つたことになる。

第2章 苛性ソーダの作用時間と結核菌の被染状態ならびに培養成績

実験材料と方法

Gaffky III号程度の結核喀痰を採りこれに5分間注射器でパンピングを施して充分均等化したものを材料とし、①その一部を採りそれと等量の蒸溜水を加えさらに5分間注射器によるパンピングを施し充分均等化しその1白金耳量ずつスライド硝子上1.5cmの円形内に塗抹し乾燥、火焰固定したものを対照として用いる。②残りの材料にそれと等量の4%苛性ソーダを加え注射器をもつて5分間パンピングを行い充分均等化したものを10分、30分、1時間、2時間、6時間、12時間、1日、2日、4日、5日、10日、20日後それぞれ1白金耳量ずつスライド硝子上に採り径1.5cmの円形内にはほぼ均等な厚さになるよう塗抹、乾燥、火焰固定し直ちにZ-N法に準じて染色鏡検した。ほかに2白金耳量ずつを小川培地に移植し2ヵ月間培養しその結果を前記染色成績と比較した。

実験成績

実験成績は表5に示したが、これで見られるように1標本100視野ずつ5標本計500視野内に検出された結核菌数は対照501コに対し苛性ソーダを作用させたものでは、10分間作用にあつては843コ、30分間では934コ、1時間では894コ、2時間では1305コ、3時間では1234コと漸増の一途を辿り2~3時間作用で最高の検出成績を示したが苛性ソーダの作用時間が6時間にもなると急激に減

少して281コとなり、12時間では86コ、24時間では45コと逆に漸減し20日目では僅か1コ検出されたにすぎなかつた。

また培養2カ月後の成績では苛性ソーダ作用2時間目まではほとんど対照における集落発生量と近似の佳良の

発育を示したが3時間目頃よりその発生量が多少とも減少し6時間目よりのものでは明らかにさらに肉眼的に減少を示し12時間目以後では急速に減少した。すなわち培養成績は上記の鏡検成績と、苛性ソーダ作用時間3時間頃までは必ずしも平行しなかつたが同6時間以後ではほ

表5 苛性ソーダの作用時間と結核菌の被染状態および培養成績

標本No.	NaOHの作用時間															
	対照	10分	30分	1時間	2時間	3時間	6時間	12時間	1日	2日	3日	4日	5日	10日	20日	
1	80	183	198	160	329	290	65	12	10	3	4	6	3	1	0	
2	96	136	261	162	180	253	75	23	6	3	4	0	0	1	0	
3	118	142	173	108	209	210	45	9	13	0	1	1	1	0	0	
4	95	191	155	211	330	219	52	12	7	4	3	1	1	2	1	
5	112	191	147	253	257	262	44	30	9	3	0	0	2	0	0	
500視野中の合計菌数	501	843	934	894	1305	1234	281	86	45	13	12	8	7	4	1	
培養2カ月のコロニー数	無数	無数	無数	無数	無数	多数	やや多数	87コ	52コ	38コ	32コ	24コ	30コ	12コ	3コ	

ば平行したようであつた。

第3章 硫酸の作用時間と結核菌の被染性との関係
ならびに苛性ソーダによる被染性の復元状態

A. 硫酸を比較的短時間作用させた場合

実験材料と方法

Gaffky III号程度の結核喀痰をパンピングにより充分均等化したものを材料とし、①その一部を採り1白金耳量ずつスライド硝子上に径1.5cmの広さに塗抹火焰固定したものを対照とし②さらに残りの喀痰液に5%の硫酸を等量加え室温において充分攪拌して、直後、10分、20分、30分、1時間および2時間後にそれぞれその1白金耳量ずつをスライド硝子にとり、一方ではそれをそのま

ま径1.5cmの円形内にほぼ均等にひろげた後また他方ではそれに4%苛性ソーダを1白金耳量ずつ加えて両者を混合しながら同様に径1.5cmの円形内にできるだけ均等に拡げた後いずれも室温で乾燥後火焰固定しZ-N法により2分間加温染色後水洗、20秒間3%塩酸酒精をもって脱色、水洗、20秒間Löfflerのカリメチレン青液で復染、乾燥後鏡検した。

実験成績

成績はまとめて表6に示した。この表6において対照以外のものにあつては同量の硫酸添加のため塗抹に用いた喀痰の容量が対照のその1/2であるところから、実際に検出された菌数を2倍したものを補正值として()内に示した。

表6 硫酸の作用時間と結核菌の被染性との関係ならびに苛性ソーダによる被染性の復元状態

硫酸のみを作用させた場合	H ₂ SO ₄ の作用時間							
	標本 No.	対 照	直 後	10 分	20 分	30 分	1 時間	2 時間
1		108	5	3	0	0	0	0
2		154	4	5	0	0	0	0
3		114	3	4	0	0	0	0
4		173	4	3	0	0	0	0
5		194	3	2	0	0	0	0
500視野中の合計菌数		743	17 (34)	17 (34)	0	0	0	0
硫酸ソーダ作用を加えた苛性	1		134	62	85	82	75	28
	2		167	74	60	56	55	31
	3		79	111	47	60	70	27
	4		79	85	53	79	56	26
	5		125	39	97	67	55	27
	500視野中の合計菌数		743	534 (1068)	371 (742)	342 (684)	344 (688)	311 (622)

注 ()内は材料の量-対照の1/2容-を考慮に入れての補正值。

すなわち対照における検出菌数計は743コであつたがこれに対して硫酸を作用させたままの標本群においては作用直後の補正菌数は34コであり作用10分後のそれも34コとなり作用20分以上ではもはや結核菌は検出されなかつた。

ところが硫酸作用一定時間後に苛性ソーダを加えてアルカリ性とした標本群(表6下段)についてみるに、硫酸作用直後に苛性ソーダを加えた場合の検出菌補正值は1068コ、10分間後苛性ソーダを加えたものにおいては同742コ、20分間後では同じく684コ、30分間後では同じく688コ、1時間後では同じく622コ、2時間後では同じく278コであつた。すなわち硫酸添加直後に苛性ソーダを加えたさいはむしろ対照より検出菌数はかえつて、増加し、硫酸添加後10分~30分で苛性ソーダを加えたものがほぼ対照とならびその後は減少の傾向を示していた。

B. 硫酸を長期間作用させた場合

実験材料ならびに方法

表7 10%の硫酸水(5%の硫酸を作用させたことになる)中に浸した結核喀痰をさらに苛性ソーダでアルカリ性としたさいの結核菌被染性の復元状態

標本No.	H ₂ SO ₄ の作用時間		対照	直後	10分	30分	1時間	2時間	4時間	8時間	12時間	1日	2日	3日	4日	5日	10日	15日	20日	25日	35日	50日
	1	33	32	32	34	24	29	29	25	25	32	20	24	21	11	9	15	10	14	11	4	
2	25	45	46	29	34	30	29	17	27	10	11*	15	12	12	16	8	8	8	3	4		
3	23	53	40	33	21	20	26	25	21	30	18	21	11	12	17	13	6	7	10	2		
4	36	46	49	30	35	28	24	40	22	21	28	20	13	15	13	11	15	10	7	3		
5	33	32	36	22	33	31	29	29	28	12	27	19	18	19	9	14	13	5	3	3		
500 視野中の合計菌数	150	208	205	148	147	138	137	136	121	105	104	99	75	69	64	61	52	44	34	16		

になつた。

すなわち硫酸添加の直後および10分後に苛性ソーダを混じた場合にはかえつて対照と較べて検出菌数多く対照の150コに対してそれぞれ208コおよび203コであつたがこの成績は前出の第3章Aのそれとほぼ軌を一にしているものとみてよからう。ところが硫酸添加30分後においては対照の程度に検出数が低下しその後は硫酸の作用時間の経過とともに減少し、さらに1日および2日後には対照の約3分の2の検出菌数となりその後は経日とともにさらに著しく検出菌数が減少した。なお、硫酸添加10日目頃よりは結核菌は著明に膨大したように見受けられなかには菌体の両極のみが濃染し菌体内部は淡染するようになり濃淡のむりを生じているもの等も認められたが、一般には被染性、形態等に特にいほどの変化は認められなかつた。

総括ならびに考案

私¹⁾はさきに種々のアルカリ剤をZ液に添加して結核喀痰を染色すると結核菌の検出数が増加することについ

Gaffky II号程度の結核喀痰をパンピングにより充分均等化したものを材料とし、①その1ccに同量の蒸溜水を加え攪拌しつつ充分均等化したものを1白金耳量ずつスライド硝子上にとり径1.5cmの円形内にはほぼ均等な厚さに塗抹、乾燥後火焰固定したものを対照とし、②残りの1ccには等量の10%硫酸水(5%の硫酸を作用させることになる)を加え充分攪拌して均等化したものを冷蔵庫(5°C)内に10分より50日間にわたつて保存し表7のような種々の時間毎にその1白金耳量と4%苛性ソーダ1白金耳量とをスライド硝子上でよく混和し(pHは7.8前後となつた)径1.5cmの円形内に拡げ乾燥、火焰固定し、それぞれZ原法液で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、水洗、乾燥、鏡検した。

実験成績

成績は各標本毎100視野ずつ5標本計500視野内の結核菌検出数をもつてしたが、これをまとめると表7のよう

てのべたが、他方結核菌とアルカリ剤との関係についてはすでに Koch 以来多数の文献に見られるところであり、なかでも Fielding⁵⁾はZ液に重炭酸ソーダを加え、大池、鈴木⁴⁾は苛性ソーダでまた劉⁶⁾は苛性カリでそれぞれ喀痰を前処理して結核菌を染色した結果検出菌数を増加しうることを報告している。なおわが国で近年注目されるに至つた Hallberg⁶⁾の方法もその染色液の処方中に苛性カリをいれているがこれも全く同一理由によるものと解せられる。

私はこのアルカリ剤添加によるZ液の結核菌染色能の増強の理由として、センイ染色のさい考えられているところの①アルカリ剤が精練作用を有することおよび②アルカリ剤がセンイ蛋白と塩基性染料とのイオン結合を促進せしめること⁷⁾⁻⁹⁾を主として挙げうるのではないかと考えこのことについても、すでに第1報¹⁾において報告したところである(もつとも中西¹⁰⁾は他の理由から塩基性染料の結核菌への染着理由として、イオン結合によるのではないかと述べている)がこの推定よりすると逆に酸剤を作用させた場合は塩基性染料と結核菌との結合

は阻害されひいては、菌への染料の染着は緩慢となり従つて短時間内の染色では検出菌数も減少する筈であると考へられ、さらにはこのさいアルカリ剤を追加すれば再び塩基性染料と結核菌との結合が促進されて結核菌がよく染色されうる状態に立歸るのではなからうかとも想像されるところから、今回は種々の角度より酸剤ならびにアルカリ剤のZ液の結核菌染色能に及ぼす影響について検討の歩を進めるにいたつたものである。

結核菌に酸剤を作用させての研究業績もすでに多数の先人によつて報告されているが、中でも Boissevain¹¹⁾らは10%塩酸中で結核菌を煮沸するときは僅か5分間でその抗酸性が脱脚されるとのべ、Sabraze's¹²⁾は硝酸、塩酸、蓆酸等を結核喀痰に作用させると喀痰中の結核菌の証明は困難になる旨のべている。また植田¹³⁾は結核菌は5%硫酸に24時間またはそれ以上さらされてもなお染色され、10%硫酸でも48時間後なおその半数例において染色されるが、5%硝酸では7時間以上耐えうるものは8例中1例にすぎなかつたとのべ、浦郷¹⁴⁾は5%硝酸に4~5時間もさらすともはや結核菌は全く染めえられなくなると報告し、森¹⁵⁾は硫酸、塩酸等を用いて結核菌を破壊または抗酸性を失わしめると報告している。なお、Blumenberg¹⁶⁾らも乳酸および醋酸を用いて同様の実験を行つている。

私は第2報²⁾において結核喀痰に前処置剤としてアルカリ剤を作用せしめたさいにはそのうちの結核菌の検出率が増加するが反対に酸剤で前処置すると逆に著しく菌検出率が低下することについて述べたが、今回、さらに掘り下げて、結核喀痰に対する前処置剤としての酸およびアルカリの濃度とか作用時間とかがZ液の染色能に対していかなる影響を及ぼすか、さらに酸による前処置のために減弱したZ液の結核菌への染色能がアルカリによつて、どのように復元するものであるか等の点について検討した結果大体以下に要約するような成績ないし知見がえられたのである。

すなわち、まず喀痰を染色直前に苛性ソーダで前処置するに當つてその濃度が結核菌検出能にいかような影響を及ぼすかについて、検討する目的を以て0.125%ないし4%の苛性ソーダをもつて喀痰を前処理してから染色してみたところ、結核菌の検出数は1%の苛性ソーダによる処理の場合が最高を示し苛性ソーダの濃度がそれより増加してもまた反対に減少しても漸次低下を來すことがわかつた。続いて苛性ソーダの作用時間の結核菌の被染性に対する影響を追求した結果によると喀痰に対して同量の4%苛性ソーダを2~3時間作用させて後染色した場合、結核菌の検出数は最高を示し作用時間がそれより短くても、または反対に永くても漸次検出菌数は低下し、ことに作用時間が6時間以上の長期に及ぶと急激に検出数が減少することがわかつた。

次に、喀痰を5%硫酸で前処理してから染色してみた結果では前記の苛性ソーダによつた場合とは著しく趣を異にして結核菌の検出数は処理時間10分程度の短時間後すでに著減し20分以上の処理では全く検出できないことがわかつた。しかるにこの硫酸処理材料に重ねて苛性ソーダ処理を施して染色すると再び結核菌が多数染め出されるようになることも認められた。

さて以上の今回の実験結果は次のように説明することができるのではないかと考へる。すなわち喀痰内の結核菌のZ液による染色検出数が、喀痰をあらかじめ硫酸で前処理したさいには甚しく低下し苛性ソーダで前処理すると逆に著しく増加することおよび酸処理で低下した菌検出数がアルカリ処理を追加することによつて復元恢復することは、もともと陽性荷電の塩基性染料よりなるZ液を以つて結核菌を染出するさい結核菌があらかじめ硫酸を以つて前処理されることにより陽性荷電の状態におかれていた場合には染料の染着が悪くなり逆にこれをあらかじめ苛性ソーダで前処理することにより陰性荷電とするさいには、染着が良くなるということである程度まで説明がつくのではあるまいか。

なお、如上の知見よりすれば、実地上において結核喀痰を硫酸をもつて前処理することは、それよりの結核菌の鏡檢陽性率を低下させる結果を招くものと考えられるので、喀痰よりの結核菌の染色証明にあつてはその集菌処置には硫酸法はさけて苛性ソーダ法を用いるべきであり、もし硫酸法によつて集菌した場合にはその沈渣よりの塗抹標本に苛性ソーダを添加して中性あるいはアルカリ性とした後に染色すべきであろう。

結 論

1) 喀痰を苛性ソーダで処理する場合には、その処理時間が2、3時間頃まではそのうちの結核菌の被染性は一般に漸増する。

2) 喀痰中の結核菌は硫酸処理によりその被染性を急速かつ著明に阻害される。ただしこれは苛性ソーダによる再処理によつて相当程度恢復、復元する。このことは硫酸処理(比較的短時間内)によつて結核菌そのものが破壊されとか、あるいはその抗酸性を失うとかのために被染性が低下するのではなくて、むしろ結核菌の荷電状態に変化がおりフクシンのイオン結合が阻害される結果に基づくものであることを示唆するものと考えられる。

3) 硫酸でも苛性ソーダでもそれを喀痰に長時間作用させるとそのうちの結核菌の被染性は急速かつ著明に減弱するが、これは結核菌が硫酸あるいは苛性ソーダにより破壊されあるいは抗酸性を失わされることのためではないかと思われる。

稿を終るにのぞみ御指導御校閲をたまわつた恩師占部

教授に深甚の謝意を表します。

この研究の一部は昭和29年11月13日第7回日本細菌学会中・四国支部総会において発表した。

主要文献

- 1) 中林：結核，30：593，昭30.
- 2) 中林：結核へ投稿中。
- 3) Fielding：Australian J. Exp. Biol. and Med. Science，12：1，1934.
- 4) 大池・鈴木：抗酸菌病研究雑誌，7：13，昭26.
- 5) 劉：東京医事新誌，3152，2384，昭14.
- 6) Hallberg：Acta Med. Scandinav.，108：12，1953.
- 7) 佐藤：最新染色法，第1巻精練漂白及浸染編，14，丸善，東京，昭28.
- 8) 理科事典：10，254，平凡社，東京，昭27.
- 9) 加藤：染料と染色，20，日本化学会，昭25.
- 10) 中西：医学と生物学，33：234，昭29.
- 11) Boissevain and Shaefer：Am. Rev. Tbc.，16：749，1927.
- 12) Sabraze's：Ann. Inst. Pasteur，17：303，1903.
- 13) 植田：日本微生物学病理学雑誌，30：1924，昭11.
- 14) 浦郷：久留米医学会雑誌，14：570，昭26.
- 15) 森：結核，16：20，昭13.
- 16) Blumenberg u Möhrke：Zsch. Hyg. u Inf-kht.，105：186，1926.