

結核菌染色証明法の改良に関する研究

第4報 界面活性剤の結核菌の被染性に及ぼす影響

中 林 進

広島大学医学部細菌学教室一主任 占部薫教授

受付 昭和31年3月28日

近時界面活性剤に関する研究は異常の進歩発展を遂げ、センイ染色界においても本剤が広く応用されつつあるが、これら界面活性剤の特性ともいべきものは浸透、分散、洗浄、乳化、起泡、可溶性等の諸作用である¹⁾。私はさきに第1報²⁾、第2報³⁾および第3報⁴⁾において結核菌染色にさいして材料をアルカリ剤をもって前処置するかあるいはアルカリ剤を Ziehl (以下Zと略)液に加えるとその染色能が増強されることを報告したが、そのさいにおける染色能増強の機作より考へて、前記諸作用を有する界面活性剤もまたあるいは結核菌染色のさいに援用してしかるべきものではあるまいかと思つたので、以下の実験を行った。

実 験 I

実験材料ならびに方法

1) 実験材料: Gaffky II号程度の結核喀痰に注射器をもつて5分間パンピングを施して、充分均等化したのちその1白金耳量ずつをスライド硝子上、径1.5cmの円形内にできるだけ均等な厚さになるよう塗抹し、乾燥後火焔固定したものを使用した。

2) 供試界面活性剤: イ) アニオン活性剤-Monogen (第一工業, 脂肪族高級アルコール硫酸エステルソーダ塩), Soapless-soap, (Alkylarylsulfonate), Leopol Bx (竹本油脂, アルキルナフタレンスルホン酸系), ロ) ノニオン活性剤-Tween 20 (Polyoxyethylene sorbitan monolaurate), Tween 80 (Polyoxyethylene sorbitan monooleate), Nissan nonion 5~6 (日本油脂, Polyethylene glycol monostearate), ハ) カチオン活性剤-Osvan (武田薬工, Alkyldimethyl benzyl ammonium chloride), Lazal (塩野義製薬, Alkyltrimethyl ammonium chloride) および Alkyldimethyl benzyl ammonium chloride) 以上8種のそれぞれ0.2%水溶液を使用した。

3) 染色液:

イ) 界面活性剤加Z変法液

第1液: 塩基性フクシン(日新化学) 2g, 無水酒精 20cc, 11.25%石炭酸水 80cc

第2液: 0.2%界面活性剤水溶液

第1液と第2液とを等量混和する。したがって界面活性剤の終末濃度はおのおの0.1%となる。なお実験によつては石炭酸水の代りに蒸溜水を用いたこともある。

ロ) Z原法液(対照)

4) 染色方法: 標本はそれぞれ上記界面活性剤加Z変法液ならびにZ液で2分間加温染色, 水洗, 3%塩酸酒精で20秒間脱色(脱色困難な場合はさらに脱色を繰返した), 水洗後 Löffler のカリメチレン青液で20秒間復染, 乾燥, 鏡検した。

5) 成績の比較判定: 1標本100視野ずつ5標本計500視野内の検出菌数をもつてした。

実験成績

実験Iの成績はまとめて表1に示した。

すなわち, 500視野内の合計結核菌数はZ-N法においては100コであつたのに対して0.1%モノゲン加Z変法液のさいは358コ(対照の3.58倍), 0.1%ソープレスソープ加Z変法液のさいは338コ(同じく3.38倍), 0.1%レオポールB X加Z変法液のさいは306コ(同じく3.06倍)でありこれらアニオン活性剤添加のさいにはいずれの場合もZ-N法の3倍以上の検出成績であつた。

ノニオン活性剤添加液では Tween 20 の場合は155コ(同じく1.55倍), Tween 80 のさいは147コ(同じく1.47倍), ニッサンノニオンを用いたさいは155コ(同じく1.55倍)であつてこのさいにはアニオン活性剤より劣つてはいたが, それでもなおZ-N法のほぼ1.5倍程度の検出成績であつた。

ところがいわゆる逆性石鹼カチオン活性剤を使用した場合においては, ラザールでは85コ(対照の0.85倍), オスバンでは132コ(同じく1.32倍)でとくに活性剤添加の効果は認められないといつてもよかつた。

以上の成績から界面活性剤はその種類によつては染料の結核菌への染着を促進することが明らかとなつたのでアニオン中の Alkylarylsulfonate (いわゆるソープレスソープ) とノニオン中の Tween 80 についてZ液からその重要な構成成分である石炭酸をのぞいた場合にもこれら活性剤が, 石炭酸に代用されるかどうかという点について検討をこころみてみた。

成績はまとめて表2に示した。

表 1 各種界面活性剤の結核菌検出率に及ぼす影響

標本 No.	Z-N法 (対照)	界面活性剤			アニオン 0.1% 加			ノニオン 0.1% 加			カチオン 0.1% 加	
		ソープレスソープ	モノゲン	レオポール BX	Tween 20	Tween 80	ニッサンノニオン	ラザール	オスパン			
1	20	70	80	71	25	29	24	14	22			
2	21	71	92	53	33	36	30	18	24			
3	19	61	73	75	42	30	44	22	29			
4	19	57	57	58	32	25	30	16	29			
5	21	79	56	49	23	27	27	15	28			
500 視野中の合計菌数	100	338	358	306	155	147	155	85	132			
検出比	1.0	3.38	3.58	3.06	1.55	1.47	1.55	0.85	1.32			

注 本表はF検定の結果すべて等分散と認めがたいので平均値の差の検定は Welch の方法によつた

表 2 界面活性剤を Ziehl 液並びにフクシン液に添加した場合

標本 No.	Z-N法 (対照)	界面活性剤		0.1% Alkylarylsulfonate (ソープレスソープ)		0.1% Polyoxyethylenoleate (Tween 80)	
		Ziehl 原法液	石炭酸を含みぬフクシン液	Ziehl 原法液	石炭酸を含みぬフクシン液		
1	30	239	94	81	44		
2	66	243	83	30	59		
3	32	219	91	89	50		
4	45	185	98	54	43		
5	46	147	54	60	28		
6	63	141	41	105	62		
600 視野中の合計菌数	282	1174	461	419	286		
検出比	1.0	4.2	1.6	1.49	1.0		

すなわち、アニオン活性剤であるソープレスソープを 0.1% 含有する石炭酸加 Z 変法液を用いたさいは 6 標本 600 視野内に検出された結核菌数は 1,174 コで対照とした Z-N法の 282 コに対して 4.1 倍、同じく石炭酸を除いたフクシン液のさいは 461 コで (同じく Z-N法の 1.6 倍) であつた。

他方ノニオン活性剤である Tween 80 を 0.1% 含有する石炭酸加 Z 変法液を用いたさいは 419 コ (Z-N法の 1.48 倍)、石炭酸を除いた場合は 286 コ (Z-N法と同程度) であつた。

以上より石炭酸加フクシン液にさらに界面活性剤を添加すればその染色能が著しく増強されたことは表 1 の場合と変りがなかつたが、石炭酸を加えてないフクシン液であつてもこれに界面活性剤を添加すれば優に Z 原法液とはほぼ同程度あるいは多少ともそれを凌ぐ染色能を発揮しうるものであることがわかつた。

なお、以上表 1 および表 2 に示した成績よりすれば一

般に染料の結核菌への染着力を増強せしめる界面活性剤の作用の程度はアニオン活性剤がもつともすぐれ、ついでノニオン活性剤であり、カチオン活性剤ではとるに足りないものであることおよびこれらのアニオン、ノニオン両活性剤ことに前者は石炭酸非含有フクシン液の結核菌に対する染着力を Z 液のみまたは多少ともそれ以上に発揮させる作用のあることがわかつた。

ところで、既報²⁾のアルカリ加 Z 変法液においてもその調製直後には優に Z 原法液をしのぐ染色能が認められたにかかわらず保存によつて速かにその染色能に著減の起ることをすでに経験したが今回の最も成績の秀れていたアニオン活性剤加 Z 液においてもその添加濃度が 0.1% という濃度では長期の保存に耐えないことがみとめられた。

そこで、さらにこれの保存の問題に関して検討する目的で以下の実験 II をこころみるに至つた。

実 験 II

実験材料ならびに方法

- 1) 実験材料：前出「実験 I」の場合と同じ。
- 2) 染色液：塩基性フクシン(日新化学) 4g, 無水酒精 20cc, 10%石炭酸水 80cc にモノゲンが 0.01より 0.05% の割合にふくまれるように加える。なお、このさい 10% の石炭酸水(実際の含有量は 8% となる), 80cc および 無水酒精 20cc を用いたのは 1 つにはフクシンを完溶せしめるためにはこれだけの液量が必要であつたためであり, 2 つにはこのようにしたものの染色力が比較的良好であつたことによるのである。

以上の染色液は調製後 2 日以内に使用できるようにしたものと, 調製後 1 カ月間室温, 明所に放置したものがそれと同時に同種材料に使用できるようにしたものを留意した。

3) 脱色復染液：マラカイト緑 0.5 g, 3% 塩酸酒精 100 cc。

4) 染色方法：上記の材料を前記の染色液(モノゲン加 Z 変法液)で 1 分間加温染色(実験の結果加温時間は 1 分間で充分であることがわかつた)後 1 分間室温に放置してから水洗後 20 秒間脱色復染液で処置(脱色がこれで充分でないときにはさらにこの処置を繰返す)水洗する。別に Z 原法液で 2 分間加温染色し脱色復染は前記同様にしたものを対照とした。

したがつて, 今回の実験では復染色の有無による菌の検出差は少なくとも考慮外においてもよいものと考え

る。

5) 成績の比較判定：実験 I と同じ。

実験成績

実験 II の表 3 にまとめて示した。

表 3 モノゲンの Z 液への添加濃度ならびに保存性の検討成績

モノゲンの濃度	0.01 %		0.02 %		0.03 %		0.04 %		0.05 %		
	新	旧	新	旧	新	旧	新	旧	新	旧	
標本 No.											
1	38	83	100	65	92	77	91	60	123	74	
2	44	123	112	103	72	110	60	145	65	126	
3	50	115	82	88	74	85	101	91	85	107	
4	45	80	91	120	69	111	59	125	59	134	
5	44	119	103	142	74	130	96	128	93	94	
500 視野中の合計菌数	219	529	471	553	352	526	393	580	362	584	302
検出比	1.0	2.4	2.2	2.5	1.6	2.4	1.8	2.6	1.7	2.7	1.4

↑ $F_0=1.17$ $t_0=9.2$ ↑ $F_0=11.6$ $t_0=3.89$ ↑ $F_0=4.94$ $t_0=3.46$ ↑

(等分散でないので Welch の方法による)

注：表中(新)はモノゲン加 Z 変法液調製後 2 日以内, (旧)は 1 カ月を経過保存した

すなわち, 0.01%モノゲン加 Z 変法液の場合は 500 視野中の合計結核菌検出数は 1 カ月の保存後(以下旧)では対照 Z-N 法の 219 コに対して 471 コ(対照の 2.2 倍)であつたのに対して調製後 2 日以内のもの(以下新)では 529 コ(同じく 2.4 倍)であり, 0.02%モノゲン加 Z 変法液では旧 352 コ(同じく 1.6 倍), 新 553 コ(同じく 2.5 倍), 0.03%モノゲン加 Z 変法液の場合は旧 393 コ(同じく 1.8 倍), 新 526 コ(同じく 2.4 倍), 0.04%モノゲン加 Z 変法液では旧 362 コ(同じく 1.7 倍), 新 580 コ(同じく 2.6 倍)また 0.05%モノゲン加 Z 変法液のさいには旧 302 コ(同じく 1.4 倍)および新 584 コ(同じく 2.7 倍)であつた。

すなわち表 3 の成績からして調製後日の浅い場合には Z 液へのモノゲンの添加濃度の増加とともに結核菌の検出数も一般にわずかずつながら増加したが, 1 カ月を経たものでは逆に検出数の減少することが明らかとなつた。

なお, これらのうち最も検出能の低下の少かつたものは 0.01% の割合にモノゲンが添加されたさいであつて, このものでは保存の有無にかかわらずとも対照の約 2 倍という検出成績を示し, それらの検出率こそモノゲンの高濃度添加直後の染色液に比してやや劣るとはいえ 1 カ月位はとにかく保存に耐えうることがみとめられた。なおその後さらにこれを 3 カ月保存して検討してみたがこのさいにも 1 カ月保存液に比してとくにいうべき染色能の低下はみられなかつた。

実 験 III

実験 II の結果より 0.01%モノゲン加 Z 変法液はその染色能が Z 原法液よりも増強されているのみならず少なくともある程度保存に耐えることが判つたが, これはすべて従来より行われている加温染色手技によつての所見であつた。そこで次には本染色液について染色温度とその

染色能との関係をその調製直後のものと、1カ月間室温に保存したものをを用いて種々検討してみた。

実験材料ならびに方法

- 1) 実験材料：実験Iと同じ。
- 2) 染色方法：上記の実験材料（塗抹標本）を0.01%モノゲン加Z変法液（実験IIの2）参照）をもつてそれぞれ30秒間加温染色→1分30秒間室温に放置した後に、1分加温染色→1分室温放置した後におよび2分加温染色した後にならびにあらかじめ20°C、25°C、30°Cおよ

び35°Cに保温した本染色液で各別に5分間浴染した後にそれぞれ水洗しさらに実験IIと同様にして脱色復染した。対照としては同条件の標本をZ原法液で2分間加温染色後水洗し上と同様にして脱色復染したものをあてた。

なお、本実験は室温約10°Cの冬季に実施した。

実験成績

調製直後（2日以内）の染色液を用いた場合の成績はまとめて表4に示した。

表4 0.01%モノゲン加 Ziehl 変法液（調製後2日以内）による結核菌検出成績

標本 No.	染色法 対照 Z-N法	加 温 染 色			低 温 染 色		
		30秒加温1分30秒室温	1分加温1分室温	2分加温	25°C5分間	30°C5分間	35°C5分間
1	95	80	209	197	122	116	106
2	47	112	176	307	152	114	151
3	55	138	167	249	103	70	104
4	66	135	199	110	80	113	128
5	44	126	245	196	72	119	148
6	67	219	205	117	123	105	108
600視野内の合計菌数	372	810	1191	1176	652	637	745
検出比	1.0	2.2	3.2	3.2	1.8	1.7	2.0

すなわち、対照のZ原法液による染色標本では1標本100視野ずつ6標本計600視野内に検出された結核菌総数は372コであつたのに対して、モノゲン加Z変法液で30秒加温染色後1分30秒間室温に放置したものでは810コ（対照の2.2倍）、1分加温後1分間室温に放置したものでは1,191コ（同じく3.2倍）、2分加温後水洗のものでは1,176コ（同じく3.2倍）であつた。なお、これらの加温染色標本では菌は強く濃染し自然光線ではほとんど黒赤色に近く感じられたが、人工光線によると美しい赤色を示した。他方低温染色すなわち、25°C、5分間処置のものでは652コ（対照であるZ-N法の1.8倍）、30°C、5分間のものでは637コ（同じく1.8倍）、35°C、5分間

のものでは745コ（同じく2.0倍）であつた。このさいの結核菌の被染状態は上記の加温染色のさいに比してやや弱く淡赤色を呈した。

以上のように、0.01%モノゲン添加後短期間内に染色に供せられたさいにはいわゆる加温染色の例においてはもとよりのこと25°Cという比較的低温染色例においてさえもZ-N法にまさる成績のえられたことは本染色液による室温染色の可能性を充分物語るものであるといつて差支えなからう。

そこで本染色液を1カ月間保存した後においてもなお、低温染色のさいその染色能が充分保有されているかどうかについて、さらに検討した結果表5のような成績

表5 0.01%モノゲン加 Ziehl 変法液（調製後1カ月）による結核菌検出成績

標本 No.	染色法 対照 Z-N法	加 温 染 色			低 温 染 色			
		30秒加温1分30秒室温	1分加温1分室温	2分加温	20°C5分間	25°C5分間	30°C5分間	35°C5分間
1	124	316	345	345	46	120	213	245
2	142	356	322	324	42	120	165	301
3	118	234	300	316	65	124	166	202
4	191	215	299	301	57	142	179	208
5	112	344	295	325	67	117	212	154
500視野中の合計菌数	687	1465	1557	1609	277	623	935	1108
検出比	1.0	2.1	2.3	2.3	0.4	0.9	1.4	1.6

$F_0 = 10.14 \quad t_0 = 0.80$ (差を認めず)
 (等分散でないで Welch の方法による)
 $F_0 = 1.79 \quad t_0 = 2.80$

がえられた。

すなわち、対照としたZ原法液による染色のさいには100視野ずつ5標本計500視野中に認められた結核菌数は687コであつたが、1カ月保存の0.01%モノゲン加Z変法液を用いて染色した場合、30秒間加温1分30秒室温放置のさいは1,465コ(対照の2.1倍)、1分加温1分室温放置のさいは1,557コ(同じく2.3倍)また2分加温のさいには1,609コ(同じく2.3倍)であつた。さらに低温染色においては20°Cのモノゲン加Z変法液中で5分間浴染したさいには277コ(対照の0.4倍)、25°Cのそのさいには623コ(同じく0.9倍)、30°Cのそのさいには935コ(同じく1.4倍)、35°Cでは1,108コ(同じく1.6倍)であつた。

すなわち1カ月保存後においても0.01%モノゲン加Z変法液は調製後2日以内のものの場合(表4)とほぼ同様に加温染色例にあつてはその加温時間を短縮することが可能であり、また低温染色にさいしてもその染色力は新しく調製されたものに比すればすでにかなり劣つたがそれにしてもなおかつこれによる室温染色の可能性が多少とも示唆されるように思われた。

総括ならびに考案

界面活性剤の歴史は古くセニ用石鹼としてすでに9世紀に工業化されたものにさかのぼることができるが、硫酸化油としては独乙のロート油(1864年)およびモノポール石鹼(1896年)があり、石鹼と硫酸化油兼備のものとしては1930年独乙において硫酸化高級アルコールGardinolおよび脂肪酸縮合体Igeponが相次いで市販されセニ工業界に一大革命をもたらし、わが国においては1934年に工業化された⁵⁾。なお、カチオン活性剤は1922年スイスにおいてまたノニオン活性剤は1932年ドイツにおいてそれぞれ工業化されたがわが国においては戦後になつて急速にこれらのものが発達してきた⁵⁾。

さて、結核菌染色にさいして界面活性剤を応用した報告としてはまずRandolphおよびMikell⁶⁾(1944)のPropylenglycolの使用をあげることができよう。その他ChermockおよびMuller⁷⁾(1946)はTergitolを種々の固定剤に添加し後染色に用いており近くはAubelt⁸⁾(1950)のTween 80ならびにPropylenglycolを石炭酸フクシン液に加えると冷染が可能であるとの報告、Konrad Hummel⁹⁾(1953)の脂肪酸含有物中のCremophor Ap 8290を同様に石炭酸フクシン液に加えると室温染色が可能であるとの報告などもある。他方わが国においては大池・鈴木¹⁰⁾がその実験中ロート油をもつて標本を前処理してZiehl液で染色すれば結核菌の検出数を増加すると報告しているがこれは界面活性剤としての系統的な研究でなかつたことがおしまれる。また吉田ら¹¹⁾はこれは結核菌を供試しての研究ではないが、カチオン活性剤

といわれるオロナインを利用したCell wallの染色に関する研究について報告している。

ところで、私は前述の今回の界面活性剤の結核菌染色法への利用に関する研究にあたりまず、供試界面活性剤のうちアニオン、ノニオンおよびカチオン各活性剤のいずれのものが結核菌染色にあたり最も適切であろうかという点について検討してみた。その結果によるとこれら3者のうちアニオン活性剤が最も有効であり、ノニオンこれにつき、カチオン活性剤はあまり問題にならないことがわかつた。なお、前2者はともにZiehl液における石炭酸に代りうる性能を有することもわかつた。ところが最も有効と思われたこのアニオン活性剤と塩基性フクシン液とを混合すると前報²⁾におけるアルカリ剤を添加した場合と似てフクシン液が混濁してくるのみならずその添加量が大量になると終にはフクシン液は無色に近づいてくることがわかつた(ノニオン活性剤にはこのようなことはなかつたが染色能増強の点においてアニオン活性剤に劣るので用いながつた)。そこでアニオン活性剤のうちでも最もすぐれていたモノゲンをとり上げそのフクシン液を混濁せしめない添加濃度を検討してみた。その結果これを0.01%ないし0.05%の割合に加えたさいにはZ液に混濁が生じないことがわかつた。そこでさらにこの0.01~0.05%モノゲン加Z変法液の保存性についても検討してみたところ0.01%添加のものでは添加後2日以内のものとして1カ月を経過したものとの間に結核菌の染色能上ほとんどいほどの差はなくてともにZ-N法の2倍程度の染色能を保持していることが認められた。

次に結核菌の冷染法についてであるがKonrad Hummel⁹⁾はCremophor AP-8290を、DesbordesおよびE. Fournier¹²⁾はTween 80, Tween 20またはAntarox A-400をまたAubelt⁸⁾もTween 80をそれぞれ添加することによつて室温で結核菌を染色することができると報告している。ところが私の今回の追究によるとTween 20またはTween 80のいずれをZ液に添加しての室温染色法でもすべてZ-N(2分間加温染色)法には及ばなかつた。しかるに0.01%の割合にモノゲンを加えたZ変法液によつたさいには染色液調製後比較的短期間内においては室温染色であつてもZ-N加温染色法にかなりまさり、調製後1カ月経過したものにおいてもそれによる室温染色法はなお、Z-N法に匹敵する結核菌染色能を示しうることがわかつた。

結 論

界面活性剤をZiehl液に添加して結核菌染色に用いる場合次のようなことがわかつた。

1) 界面活性剤の中アニオン活性剤を添加した場合が最も染色能すぐれノニオン活性剤これにつきカチオン活性剤添加は最も劣る。

2) アニオン活性剤ならびにノニオン活性剤は Ziehl 液中の石炭酸に代用できる。

3) 0.01%モノゲン加Z変法液による結核菌の検出能はZ原法液に比して加温染色では3倍以上に増強されこれによる室温(低温)染色にあつてもZ原法液による加温染色に匹敵するかあるいはそれ以上の染色能を示す。

4) 0.01%モノゲン加Z変法液は少なくとも1カ月間は保存可能である。

稿を終るに臨み恩師占部教授の御懇篤なる御指導と御校閲に深く謝意を表します。

本研究の要旨は昭和29年11月13日第7回日本細菌学会中・四国支部総会ならびに昭和30年4月2日第14回日本医学総会結核病学会において発表した。

主要文献

1) 山本俤一：界面活性剤と其応用，3版，理工出版社，昭28.

- 2) 中林 進：結核，30：593，昭30.
- 3) 中林 進：結核へ投稿中.
- 4) 中林 進：結核へ投稿中.
- 5) 新野昌生・モノゲン物語，第一工業社，昭28.
- 6) Randolph and Mikell：Am. Rev. Tbc.，49，109，1944.
- 7) Chermock and Muller：Science，103，731，1946.
- 8) Aubelt：Canad. J. Pubi. Health，41，31，1950.
- 9) Konrad Hummel：Klinische Wochenschrift，31，862，1953.
- 10) 大池彌三郎・鈴木正代：抗酸菌病研究雑誌，7，13，昭26.
- 11) 吉田長之他：大塚薬報，56，2，昭30.
- 12) Desbordes et Fournier：Ann. Inst. Past.，82，21，268，1952. (医界展望，192，4，昭29，より引用)