

結核菌染色証明法の改良に関する研究

第5報 結核菌の室温染色法のための界面活性剤ならびにキシロールの利用

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

緒 言

第4報¹⁾において Ziehl (以下Zと略) 液に種々の界面活性剤特にアニオン活性剤またはノニオン活性剤を加えて結核菌を染色するときはその染色能を増強せしめうることをのべさらにこれらの界面活性剤のうち、特に脂肪族高級アルコール硫酸エステル塩(モノゲン)を用いて種々実験を試みた結果加温染色時において染色能の見べき増強があつたのみならず、低温染色時においてさえも Z-N 法に匹敵するかあるいはそれ以上の染色能が發揮されることについてものべたが、今回は前記モノゲン加Z変法液を中心としての室温染色法について種々検討を加えた結果以下述べるような成績をえたので報告する。

実 験 I

1. 実験材料: Gaffky III~IV号程度の結核喀痰に注射器をもつて5分間パンピングをほどこすことにより充分均等化し、その1白金耳量ずつを載物硝子上に採り径1.5cmの円形内にほぼ均等な厚さに塗抹、乾燥、火焰固定したものを用いた。

2. 使用染色液および薬剤: 本実験では前報⁴⁾の0.01

%モノゲン加Z変法液(以下M液と略)の染色能をさらに増強せしめる目的であらかじめ下記のような種々の薬剤をもつて前処置した塗抹標本について染色をこころみた。

a) M液は次のような処方によつた。すなわち塩基性フクシン4.0+無水酒精20cc, 10%石炭酸水80cc, モノゲン0.01gにより第4報¹⁾と同じようにしてつくり、今回は専ら調製後1ヵ月以上経過したものを使用し、

b) 前処置液としては次のような薬物を使用した。

①5%タンニン酸水溶液, ②キシロール, ③1%NaOH H加70%酒精液, 1% NaOH 加ホルマリン液, ⑤石油ベンジン, ⑥30%丁字油酒精液。

3. 染色法: 染色は次の方法によつた。

a) Z原法液で2分間加温染色(これを対照とした)

b) 前出の前処置液を塗抹標本に満載し1分間作用させた後これを捨て水洗することなくこれにM液を満載し5分間室温(室温約31°C, 夏期)染色後水洗した。

a), b), とともに水洗後0.5%マラカイト緑加3%塩酸酒精をもつて脱色復染しフクシン液が完全にマラカイト緑と置き代るまでこれを繰り返した。

実験成績

実験Iの成績はまとめて表1に示した。

表1 0.01%モノゲン加Z変法液で室温染色したさいの各種前処置液の結核菌検出率に及ぼす影響

染色法 標本 No.	Z原法液 (対 照) 2分加温	標 本 前 処 置 剤 の 区 別 (1分間前処置)							
		無 処 置	5%タン ニン酸	キシロー ル	1%NaOH 酒 精 液	1%NaOH ホルマリン液	ベンジン	30%丁字 油酒精液	アセトン
0.01%モノゲン加Z変法液にて5分間室温(31°C)染色									
1	222	195	95	285	135	78	44	92	67
2	226	201	57	204	236	165	92	104	179
3	192	199	58	247	86	110	29	137	62
4	279	337	56	277	222	99	24	126	99
5	179	269	127	262	211	146	29	100	117
500視野中の 合計菌数 検 出 比	1098 1.0	1199 1.1	391 0.4	1275 1.2	890 0.8	596 0.5	218 0.2	559 0.5	524 0.5

↑ $F_0=1.48 < F_{44}(0.05)=6.39$ ↑
 $t_0=8.827 > t_8(0.01)=3.355$

すなわち、結核菌検出比の数字の上からは前処置を施さなかつたものとキシロールで前処置したものとみやや対照にまさつていたように見受けられたが、検定の結果キシロールと対照との間のみ明らかに有意の差が認められた。その他の場合は全て逆に菌検出数が低下していた。なお、このうち NaOH 加液で標本を前処置したものでは菌そのものの被染状態は良好であつたが、標本が流失しやすく問題にならなかつた。また無処置標本をM液で染色したさいには結核菌へのフクシン染着の濃さがZ原法液による加温染色の場合に較べて淡いうらみがあつたが、標本をキシロールで前処置した後M液で染めたさいにはZ液による加温染色のさいよりもむしろ結核菌はより濃染されておりしかも上記のように検出率も有意の差をもつてより高かつたのでキシロールによる標本前処置法の有利性が考えられた。

実 験 II

実験 I の成績の結果キシロールで標本を前処置した後に染色することが或程度結核菌の室温染色にやや好結果をもたらすことがわかつたが、このほかにさらにドデシル・アミン・ポリエチレングリコールの誘導体であるミ

ヨシ油脂のペレテックス LA 系のもの(ノニオン活性剤)について、そのM液の染色能増強能について予備実験を行つてみたところ、ある程度有望ではないかと思われるような所見がえられたので引続き次のような実験を試みた。

実験材料および方法

1. 実験材料: 実験 I と同じようにしてつくつた塗抹標本。

2. 染色液ならびに染色法:

a) 染色液—①Z原法液(対照として用いた), ②M液(実験 I と同じ), ③M液 100cc+10% ペレテックス 1cc, ④M液100cc+10% ペレテックス10cc+キシロール 2cc, ⑤M液100cc+10% ペレテックス 1cc+キシロール 1cc。

b) 染色方法—Z原法液(対照)の場合のみ2分間加温染色し、その他の場合は5分間室温(室温28°C, 晩夏)染色した後いずれも水洗しさらに0.5% マラカイト緑加3%塩酸酒精で脱色復染することを完全にフクシンの赤味がなくなるまで繰り返した。

実験成績

実験IIの成績は表2にまとめて示した。

表 2 ペレテックスおよびキシロールの検討

標本 No.	加温非加温別 染色液	室 温 (28°C) 5 分 間 染 色					
		Ziehl 原法液 対 照	0.01%モノゲン加Z変法液 (M液と仮称)	M 液 10 cc 10%ペレテックス 0.1 cc		M 液 10 cc 10%ペレテックス 1 cc キシロ 0.2 cc	M 液 10 cc 10%ペレテックス 0.1 cc キシロ 0.1 cc
				非前処置	キシロール 前処置 1分		
1		141	150	137	259	294	258
2		178	159	225	222	254	239
3		126	137	150	272	211	251
4		185	177	186	209	232	296
5		157	213	171	197	250	245
500視野中の合計菌数		787	816	869	1159	1241	1289
検 出 比		1.0	1.0	1.1	1.5	1.6	1.6

↑ $F_0=1.797 < F_{44}(0.05)=6.39$ ↑ $t_0=4.105 > t_s(0.01)=3.355$ ↑

↑ $F_0=1.664 < F_{44}(0.05)=6.39$ ↑ $t_0=5.142 > t_s(0.01)=3.355$ ↑

↑ $F_0=1.122 < F_{44}(0.05)=6.39$ ↑ $t_0=6.766 > t_s(0.01)=3.355$ ↑

すなわち、室温28°C、5分間染色のさいのM液による成績は対照にほぼ匹敵し、ペレテックス加M液によつた場合もまたほぼ同等であつたが、同じペレテックス加M液であつても標本をキシロールで前処置してから染めると対照の1.5倍に結核菌検出比が上昇したことは注目し値しよう。その他ペレテックス・キシロール加M液においても室温5分間染色でなおかつ対照の1.6倍程度のすぐれた菌検出比を示しうることがみられた。

なお、以上の各染色液のうち結核菌のもつとも濃染するのは④液すなわちM液10cc+10%ペレテックス1cc+キシロール 0.2ccの液であり、これはさらにキシロール前

処置標本を ③液すなわちM液 10cc+10% ペレテックス0.1ccの液で染めた場合とともに顆粒の染出においても最もすぐれていた。ところが、M液に加えるキシロールの量はこの意味では2%の方が良いように思われたがキシロールの添加量が多くなると染色後の脱色が困難になる傾向があることおよび放置するとキシロールが染色液から分離するという2つの欠点があられるようになることがわかつた。ただし、これらの欠点のうちの後者は使用前によく振盪することによつて充分除かれる。

実 験 III

本実験を行うに先立ちキシロールを分散し完全にo/wの型とする作用があつてしかもこれを染色液に添加してもその染色能に悪影響を及ぼさないような薬物を追求する必要があると考えられた。そこでアニオン活性剤に混合する界面活性剤としてはアニオンまたはノニオンが好都合であるけれども塩基性フクシンに影響を与えないものとしてはノニオン活性剤の方がよいところから種々のノニオン活性剤につきまずキシロールの分散性を調べたところレオポール N (Polyoxyethylen alkyl ether 竹本油脂) が良いことがわかつた。すなわち、これを水100:1に対し8滴加えることにより2ccのキシロールを完全に水中に分散せしめうることがわかつたのでこれを用いて以下のようなAおよびBの2種の実験を行つてみた。

A. Ziehl-Neelsen 法, Hallberg 法ならびに界面活性剤, キシロール加Z変法液による染色法との比較実験特に染色時間の検討

I. 実験材料ならびに方法

1. 実験材料: 材料としては Gaffky IV号程度の結核喀痰を使用し実験 I と同様にしてつくつた標本。

2. 供試染色液:

- a) Z 原法液 (対照)
- b) 塩基性フクシン (日新化学) 4 g
- 無水酒精 20 cc
- 10%石炭酸水 80 cc
- 1%モノゲン溶液 1 cc
- 10%ペレテックス LA 系 1 cc

- キシロール 2 cc
- レオポール N 8滴

以上をよく混和振盪後濾過し1昼夜室温に放置後使用する。これを仮りに「界面活性剤キシロール加Z変法液」と呼ぶこととする。

c) Hallberg の液-Hallberg の原法²⁾³⁾による。

3) 染色法:

a) Z-N法: Z-N原法通りとし2分間加温染色後水洗, 3%塩酸酒精で脱色水洗, Löffler のカリメチレン青液で復染(これを対照1とした)。

b) Z原法液をもつて2分間加温染色, 水洗後0.5%マラカイト緑加3%塩酸酒精で脱色復染, 水洗, 乾燥(これを対照2とした。これにより復染による差をなくして実際の各染色能を比較したいと考えた)。

c) 界面活性剤キシロール加Z変法液をもつてそれぞれ3分間, 5分間, 10分間室温染色(室温約24°C, 秋期), 水洗, 0.5%マラカイト緑加3%塩酸酒精で脱色復染(フクシンの色が完全に消失するまで復染を繰り返す)。

d) Hallberg の方法: Hallberg 液で蒸気の立つ程度まで加温染色後5分間そのまま放置, 水洗, 25%塩酸で作つた3%塩酸酒精で完全に脱色, 水洗, 2%のピスマルク褐で復染, 水洗, 乾燥。

II. 実験成績

実験IIIのAの成績(各法とも5標本100視野ずつ, 計500視野の結核菌数について比較したもの)はまとめて表3に示した。

表3 界面活性剤・キシロール加Z変法液による室温(24°C)染色成績(染色時間の検討)

標本 No.	復 染		0.5%マラカイト緑加3%塩酸酒精で脱色復染				Hallberg 加温後5分間 室温放置 d	
	染色液 加温非加温別 染色法別	Löffler メチレン青	Ziehl 原法液	Ziehl 原法液	界面活性剤加 Z 変法液			
		Z-N法 (対照1) = a	(対照2) = b	c	c'	c''		
		2分間加温染色	室温3分	室温5分	室温10分			
1		100	205	306	335	369	205	
2		97	172	176	339	354	276	
3		135	175	326	344	458	205	
4		80	170	145	383	378	302	
5		117	185	175	334	317	238	
500視野中の合計菌数		529	905	1126	1735	1856	1224	
検 出 比		1.0	1.7	2.1	3.3	3.5	2.3	
			1.0	1.2	1.9	2.0	1.4	

すなわち, 染色法 a = Z-N 法 (対照1) では検出菌数計529コであつたのに対して同 b = 対照2の0.5%マラカイト緑加3%塩酸酒精で復染脱色したものは903コとなり対照1の1.7倍であつた。ところが界面活性剤キシロール加Z変法液をもつて3分間室温染色したさい(同 c)の検出菌数は1,126コで対照1の2.1倍, 対照

2の1.2倍であつた, 同じく5分間室温染色したさい(同 c')では1,735コ(対照1の3.3倍, 対照2の1.9倍)を示し同じく10分間室温染色したさいは1,856コ(対照1の3.5倍, 対照2の2.0倍)となつていた。また Hallberg の方法(同 d)では1,224コ(対照1の2.3倍, 対照2の1.4倍)であつた。

B. 重染色による結核菌検出数の比較

I. 実験材料ならびに方法

実験材料：前実験(A)に引続き同一材料を使用した。
 実験方法：前実験中対照2として用いた標本を一旦3%塩酸酒精で20秒間脱色水洗，乾燥した後再び界面活性剤キシロール加Z変法液をもつて5分間室温(約24°C)染色後水洗し0.5%マラカイト緑加3%塩酸酒精をもつて脱色復染，水洗，乾燥後当初Z液で染色し鏡検したと

表4 界面活性剤・キシロール加Z変法液とZ液との重染色実験

標本 No.	染色法		Ziehl 原法液
	加温	非加温別	
	2分加温	室温(24°C)5分間	
1	205	318	
2	172	406	
3	175	399	
4	170	326	
5	183	334	
500視野中の合計菌数			903→1783
検出比			1.0→2.0
Z-N法を1.0とせるさいの検出比*			1.7→3.4

* 表3の染色法aおよび同b参照

すなわち，まずZ原法液染色のものをさらに界面活性剤キシロール加Z変法液で再び染色した各標本における検出菌数の推移を表4の1について見るに，標本No.1では前者203コ，後者318コ，同No.2ではそれぞれ172コと406コ，同No.3ではそれぞれ175コと399コ，同No.4ではそれぞれ170コと326コまた，同No.5ではそれぞれ183コと334コといった具合にいずれにおいても後者において検出菌数はかなり増加しその合計菌数は前者903コであるのに対して後者では1,783コとなった。この検出比をみると1.0:2.0となりまたこれを表3の対照1(染色法a)の検出比を1.0としてみると実に3.4ということになった。

次にあらかじめ界面活性剤キシロール加Z変法液で染色した標本をさらにZ原法液をもつて重染色したさいの成績を表4の2についてみるにあのおの100視野中に見出される結核菌数の動きを見るに標本No.1では前者386コが後者143コとなり，同No.2では同じく345コが172コに，No.3では同じく349コが167コに，同No.4では同じく388コが171コにまた同No.5では同じく410コが145コになった。これら5標本より検出された合計菌数は前者では1,878コであったのに後者では798コに激減した。したがってこの検出比は2.4:1.0となり，さらにこれを表3の対照1を1.0としてみると前者では3.6となり後者では漸く1.5の比となった。

以上の実験結果よりして結核菌の染色にあたり界面活

同じ場所を鏡検した。そのほかに同一材料による同時作成の他の標本を界面活性剤キシロール加Z変法液で前記と同様にして室温(24°C)染色，鏡検後3%塩酸酒精で20秒間脱色しZ液で再び2分間加温染色，水洗0.5%マラカイト緑加3%塩酸酒精で脱色復染したものについて前記と同様に同一場所を鏡検した。

実験成績

成績はまとめて表4の1および同4の2に示した。

標本 No.	染色法		Ziehl 原法液
	加温	非加温別	
	2分加温	室温(24°C)5分間	
1	386	143	
2	345	172	
3	349	167	
4	388	171	
5	410	145	
500視野中の合計菌数			1878→798
検出比			2.4→1.0
Z-N法を1.0とせるさいの検出比*			3.6→1.5

* 表3の染色法aおよび同c参照

性剤キシロール加Z変法液を用いるさいには染色温度が室温であつてもなお，Z-Nの加温染色法に比して2~3倍以上の染色効果を，あげうるものであることがわかつた。

実験IV

本実験は実験IIIに類似したものであるが，気候の変化に伴い室温もこれにつれて変化するのでいつも前述の実験のように24°C~30°Cという室温は期待できがたいところから，この実験では室温のより低いさいにおける自案の界面活性剤キシロール加Z変法液による染色法の効果について検討し併せてこれとZ-N原法およびHallberg法の各効果との比較も行つた。

実験材料ならびに方法

1. 実験材料：Gaffky II号程度の結核喀痰の既述の実験のように5分間注射器をもつてするパンピングにより充分均等化したものを1白金耳量ずつ載物硝子上に径1.5cmの円形内にほぼ均等な厚さに塗抹，乾燥，火焰固定したものを使用した。

2. 染色法：

a) Z-N法-Z液により原法通り2分間加温染色し復染もLöfflerのカリメチレン青で行つた。=対照。

b) 界面活性剤キシロール加Z変法液による染色法—実験III Aに用いた本染色液(調製後1ヵ月以内のもの)を以て2分間加温染色，20°C室温(昼間の温度)5分間

染色, 18°C (夜間温度) 5分間染色, 15°C (早朝温度) 5分間染色および 10°C (特に冷蔵庫内で 10°C に保たれた染色液による) 5分間染色をそれぞれ各別に行つた後水洗し 0.5% マラカイト緑加 3% 塩酸酒精で赤色の完全

に消失するまで脱色復染した。

c) Hallberg 法—実験Ⅲと同様に原法に従つた。

実験成績

実験Ⅳの成績は一括して表 5 に示した。

表 5 界面活性剤・キシロール加 Z 変法液による比較的低室温下における染色成績

標本 No.	染色法 2分間加温対照 Z-N 法	加温後 5分放置 Hallberg法	界面活性剤・キシロール加 Z 変法液				
			2分加温	20°C 5分間	18°C 5分間	15°C 5分間	10°C 5分間
1	35	97	108	104	144	109	99
2	35	80	117	134	129	144	162
3	35	72	124	172	168	169	145
4	36	102	119	125	113	137	125
5	34	95	128	152	131	130	145
500視野中の合計菌数	175	446	596	687	685	689	672
検出比	1.0	2.5	3.4	3.9	3.9	3.9	3.8

すなわち、各標本とも 100 視野ずつ 5 標本計 500 視野を観察しての結核菌検出合計数を比較すると、対照たる Z-N 原法のそれは 175 コ、Hallberg 法では 446 コ (対照の 2.5 倍) であつたが、界面活性剤キシロール加 Z 変法液の場合では、2 分間加温染色のさいは 596 コ (対照の 3.4 倍)、20°C、5 分間室温染色のさいは 687 コ (対照の 3.9 倍)、18°C、5 分間室温染色では 685 コ (対照の 3.9 倍) 15°C 5 分間染色では 689 コ (対照の 3.9 倍) また 10°C、5 分間染色では 672 コ (対照の 3.8 倍) であつた。

以上の成績が示すように Z-N 原法、Hallberg 法ならびに界面活性剤キシロール加 Z 変法液による法の 3 法の染色効果は、Z-N 原法 < Hallberg 法 < 界面活性剤キシロール加 Z 変法液による方法の順序であつたが、さらに界面活性剤キシロール加 Z 変法液による染色法における染色温度差と染色効果との関係についてみるにこれらの間にはほとんどいほどの差は認められなかつた。ところがただここで注目されることは同法で加温染色した場合の方が室温染色の場合に比べて検出菌数が多少とも劣り、かつ被染状態もやや劣つていたことである。これはあるいは界面活性剤およびキシロールを添加するこ

とによりその染着力が異常に増強されているために加温染色では標本の結核菌以外の部分も脱色に耐えて赤色が残るためではないかとも思われる。

実験 V

結核喀痰 30 例について前記 3 種染色法による鏡検成績とそれらよりの培養成績とを比較した。

実験材料ならびに方法

実験材料：前述と全く同様にして均等化した結核喀痰液 30 例より一方では塗抹標本を作り下記の染色に供し他方では残りの同一材料を Petroff のアルカリ集菌法に従い、集菌後各 2 本あての小川培地に移植し 2 カ月間培養した。

染色法：① Z-N 原法による 2 分間加温染色法、② Hallberg 法および ③ 界面活性剤キシロール加 Z 変法液による 5 分間室温 (10 月~12 月) 染色法。

成績判定：塗抹染色標本ではおのおの 500 視野中の結核菌数を数え、培養成績では各例 2 本あての培地のうち集落発生の数ないし量の多い方の成績をとつた。

実験成績

表 6 Z-N 法, Hallberg 法および界面活性剤・キシロール加 Z 変法液による室温染色法による鏡検と培養との比較

標本 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Z-N 法	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
Hallberg	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—	—	—	—	1	—
界・キ	—	—	—	—	2	—	—	—	2	—	—	2	—	3	—
培養	—	—	—	—	コロ=2	—	—	—	コロ=2	—	—	コロ=1	—	—	—

標本 No.	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	計
Z-N 法	127	36	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	3	1	6
Hallberg	497	97	1	2	—	—	—	—	—	—	—	—	1	8	1	9
界・キ	360	104	4	3	—	—	—	—	—	—	—	1	2	35	2	12
培養	冊	冊	コロ=3	—	—	—	—	—	—	—	コロ=2	コロ=10	冊	冊	—	10

この成績は表6に示したように喀痰30例中鏡検または培養のいずれかに陽性を示したものが計14例であつたがそのうち Z-N 法では6例が、Hallberg法では9例が、界面活性剤キシロール加Z変法液による室温染色法では12例がおよび培養では10例がそれぞれ陽性であつた。

すなわち、界面活性剤キシロール加Z変法液によつた場合は Z-N 法によつた場合の2倍の陽性を示しかつ培養成績よりもより秀れていた。なお、培養法でのみ陽性であつたものは1例 (No. 26) であつたのに対して、培養陰性、鏡検陽性例が4例 (No. 14, 19, 21および30) もあつた。これは供試した染色法のすぐれたものであつたため許りではなく恐らくは供試喀痰の大多数例が化学療法実施中の患者よりのものであつたことにもよるのではあるまいか。

総括ならびに考察

以上私は界面活性剤およびキシロールを添加したZ変法液を用いれば室温染色によつてもすぐれた結核菌の検出率が期待できることについて実験的に証明しえたことに関して述べたのであるが、すでに Chermock および Muller⁴⁾ (1946) も界面活性剤の一つである Tergitol を添加すると結核菌の室温染色が可能であると報告している。そこで私もまずこの Tergitol の効果について予備実験的に検討してみたのであつたがその結果によるとこれに対しては余り大きな期待はかけられないと思われるような成績しかえられなかつた。また Aubert⁵⁾ (1950) は (Tween 80 を利用して結核菌の冷染をこころみて報告しているが、このものもまた私の実験の限りではすでに第4報¹⁾ において報告しているように加温染色ではかなりよい成績が得られるが冷染では予期の成績に反することを知つた。

さらに Hoffmann⁶⁾ (1952) は喀痰中の結核菌証明にあたり Sputosol 等の利用について報告し Konrad Hummel⁷⁾ (1953) は Cremophor AP 8290 と称する脂肪酸含有化合物を Ziehl 液に加えて用い、Karaila⁸⁾ (1954) は Fuchsin-saturated methylic alcohol 40ml, Phenol liquefact 10ml, Xylol 20ml, Tween 80 (1 Drop/10ml) 7 drops の液による3分間 (室温) 染色法を提示しているしさらに Döhl⁹⁾ (1955) も Sputosol を用いた成績について報告している。

ところで私は、結核菌染色証明法の改良に関する一連の研究に当り、まず結核菌の難染性が未処理の羊毛、絹糸等の難染性と一脈通ずるものがあるように思われたので、これらのセンイの染色に当つてはまず精練剤が使用されることに示唆をえてその精練剤であるところのアルカリ剤を Ziehl 液に加えての結核菌の染色法を工夫しこころみた結果ややみるべき成果をあげたことについてはすでに第1報¹⁰⁾ 第2報¹¹⁾ および第3報¹²⁾ に述べた

ところであるがそれに続いてやはりセンイ染色のさいに近時その滲透性助長の作用^{13) 14)} の故を以つて染着促進の目的からセンイ染色界に汎用されるようになった界面活性剤を前述のセンイ染色のさいと同じ理由からとおよび前に紹介した諸先人^{4)~9)} の業績による示唆からもして改めて結核菌染色に援用することを思いたち種々検討するに至つたものである。その結果の1部はすでに第4報¹⁾ において述べたようにZ液に0.01%の割合に界面活性剤の一つであるところのモノゲンを加えて用いれば加温染色ではもちろんのこと室温染色においても Z-N 加温染色法を多少とも凌ぐ成績が期待できることを知りえたのであつたが、さらに今回はこれを中心として室温染色時その染色能をより助長せしめうるような補助剤ないし媒染剤の探索をもタンニン酸、キシロール、苛性ソーダ、ベンジン、丁字油、アセトン、ペレテックスLA系等を供試して実施したのである。その結果それらのうちキシロールが或程度期待できるように考えられたほかに、さらにペレテックスLA系 (ドデシル・アミン・ポリエチレングリコールの誘導体) もややすぐれているように思われた。そこでこの両者をさきの0.01%モノゲン加Z変法液に添加してみたところ非常に秀れた染色能促進作用を発揮した。ところがこのようにして調製したZ変法液では、なる程結核菌低温染色能においてはきわめてすぐれてはいたものの他面放置すればフクシン液とキシロールとが分離するので、使用時毎に振盪して用いなければならないという点およびキシロールのために、染色液が載物硝子面に粘着して脱色が困難となるという点にその短所を蔵していることがわかつた。

よつてこのキシロールを完全にフクシン液内に分散しうるものを探索した結果この目的にはノニオン活性剤であるレオポールNが適当であることがわかつたので、続いてこれをさきの染色液すなわち、石炭酸フクシン液にモノゲン、ペレテックスおよびキシロールの少量ずつを加えた染色液にさらに、少量追加して検討した (実験 III, IV) とところ前述の2短所が除かれたのみならず驚くべき秀れた染色能を示すことがわかつた。すなわち、この染色液を以て、24°C 前後の室温下で3分、5分および10分間染色したさいにはともにZ原法液による2分間加温染色のさいに較べてそれぞれ1.2倍、1.9倍および2.0倍の結核菌染出能を示し (表3) またそれ以下の温度 (10~20°C) で5分間染色したさいにもなおかつ Z-N 法をはるかに凌ぐ結核菌検出能をあげることができた (表5) のである。

ところで以上のように私のいわゆる界面活性剤キシロール加Z変法液が室温染色によつてもなおよくZ原法液による加温染色の効果を凌ぎうるのはどのような機転によるものであろうか。この点に関して私は次のように考えたい。

すなわち、まずこの染色液に加えられている界面活性剤の本来の作用機転の一つであるところの滲透作用が、このさい相当の役割を演じているであろうことはいうまでもあるまいが、その他に界面活性剤の親水基¹⁴⁾が結核菌体の表面を覆い、そのために結核菌が親水性に変わり染色されやすくなるということも一つの因子となるのではないかと考えられることは、次のような知見からも充分想像される。

すなわち、Dubos¹⁷⁾はもともと疎水性であるところの結核菌体表面は界面活性剤を加えることにより、親水性に変化させられるとの見地より種々の界面活性剤をLong 培液に加えることをこころみた結果、遂に彼のTween-Albumin 培液に成功しておるし¹⁶⁾ 17) また教室の占部・谷¹⁸⁾および谷¹⁹⁾は卵培地に界面活性剤であるIgepon T に類似の構造式をもつ¹⁴⁾ところの胆汁または胆汁酸塩を加えることにより牛型結核菌およびBCGを容易にS型さらにはMucoid型にまで変化せしめえているのである。

なお、以上の他にもアニオン活性剤ではその親水性の極性基は陰性荷電である¹⁴⁾ところからアニオン活性剤加Z変法液に浸された場合の結核菌体表面は親水性になるのみならず同時に、陰性荷電となる筈でもあるから本来陽性荷電であるところの塩基性染料(フクシン)と結核菌との結合がさらに容易かつ強固となつてくることもまた見逃せない1因子と考えられる。

なお、横手²⁰⁾によると界面活性剤と石炭酸とを併用することにより石炭酸の消毒効果は増強されるというがこれは界面活性剤の存在の下に石炭酸が菌体内に浸透し易くなるものと解されるので、この機作もまた、私のいわゆる界面活性剤キシロール加Z変法液の結核菌染色能の強盛であることの1因となつているのかも知れない。その他この染色液にはキシロールをも加えてあるが、このキシロールのフクシン染着力に対する効果はすでにE. Karaila⁸⁾によつても認められているところであり、しかも私の場合これをPolyoxyethylen系界面活性剤で分散あるいは可溶化しているので一層その効果は高められている筈であるから、これまたこの染色液の染色能増強の1因になつているものと考えられる。

結 論

私は界面活性剤ならびにキシロールを応用しての結核菌室温染色について次のような結論をえた。

- 1) 石炭酸フクシン液に脂肪族高級アルコール硫酸エステル塩(モノゲン)、ドデシル・アミン・ポリエチレングリコール誘導体(ペレテックスLA系)、ポリオキシエチレンアルキルアリアルエーテル(レオポールN)およびキシロールの少量ずつを添加試作した「界面活性剤キシロール加Z変法液」によれば10°Cないし30°Cの室温で、5分間染色した場合結核菌の鏡検陽性率は慣用のZ-N(加温)染色法によつた場合の3倍以上を示す。
- 2) 本変法液による室温染色標本においては結核菌の被染状態はきわめて美麗であり顆粒も多数染出され、したがつて菌の検出も容易である。

稿を終るにのぞみ恩師占部教授に厚く感謝の意を表します。

主要文献

- 1) 中林：結核へ投稿中
- 2) 室橋・吉田：日本医事新報，1582，34，昭30.
- 3) 平本・斎藤・陳：結核の臨床，3，364，昭30.
- 4) Chermock and Muller：Science，103，731，1946.
- 5) Aubert：Canad. J. Publ. Health，41，31，1950.
- 6) Hoffmann：Tbk-arzt，6，168，1952.
- 7) Konrad Hummel：Klinische Wochenschrift，31，862，1953.
- 8) E. Karaila：Acta. Path. et microbiol. Scandinav.，35，175，1954.
- 9) W. Döll：Tbk-arzt，9，108，1955.
- 10) 中林：結核，30，593，昭30.
- 11) 中林：結核へ投稿中
- 12) 中林：結核へ投稿中
- 13) 新野：モノゲン物語，第一工業社，昭28.
- 14) 山本：界面活性剤と其応用，3版，理工出版社，昭28.
- 15) Dubos：Am. Scientist，37，353，1949.
- 16) Dubos：Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.，58，361，1945.
- 17) Dubos：J. Exp. Med.，83，409，1946.
- 18) 占部・谷：日本細菌学雑誌，8，483，昭28.
- 19) 谷：日本細菌学雑誌，8，124，昭28.
- 20) 横手：北海道医学雑誌，29，873，昭29.