

結核菌の顆粒染色について

工藤 祐 是

結核予防会結核研究所 (所長 隈部 英雄)

工藤 禎

国立療養所清瀬病院 (院長 島村喜久治)

受付 昭和31年8月7日

緒 言

結核菌菌体内異染部分に関しては Much¹⁾²⁾ 以来多数の研究があり、現在もなお菌の発育過程との関係や、その生物学的意義についての報告は枚挙にいとまがない。結核菌の顆粒といわれるものは、非染標本、チール・ネールゼン染色、さらに各種の細胞化学的染色法によつても見出され、これら相互間の異同についても論ぜられているが、狭義にはグラム陽性顆粒すなわち Much の顆粒を指す場合が多い。

この顆粒を染め出す手技としては、創始者 Much から Weiss³⁾、Fontés⁴⁾更に最近では隈部⁵⁾の方法に至る多くのものが知られている。しかるにこれらの方法は Z-N 法に較べると操作がやや複雑で、安定した成績を得るには熟練を要する。よつて、より簡便確実な方法を得べく、従来の方法の各因子をそれぞれ検討の上、総合して以下の一案を得た。本法は昭和25年11月文部省科学研究総合結核研究協議会に概略を発表し、その後今日まで常用して好成績を収めているが、今回はその基礎的検討の過程と、本法による二、三の知見を併せて報告し、御追試と御批判を仰ぐ次第である。

なお、この顆粒染色は結核菌の質的検索の一つとして結核症の経過や治療効果判定の資料となりうる。特に化学療法における喀痰や肺組織中の結核菌の形態変化を追求するに、今後益々必要な手技になると思われる。

実 験

I. 染色法の検討

最初 Much は結核菌にグラム染色を施し、この顆粒を検討したが、球菌のそれよりも強力に行う必要を認めた。さらに Weiss は Much の方法のメチル紫液を石炭酸フクシン液に混じて抗酸性染色との二重染色を考案した。また Fontés は、この同時染色を別々に分け、メチル紫をクリスタル紫に替えた。隈部は組織内結核菌で、石炭酸の代りにアニリン水を推奨した。他の方法もすべて原理は同一で必須の因子に要約すると、石炭酸フクシン液および石炭酸パラロザニン色素液 (メチル紫、クリスタル紫、ゲンチアナ紫) で染め、これに沃度

液をかけ (沃度化)、それを一ないし数種の脱色剤で脱色、水洗、後染色 (行わないものも多い) という順序である。それで、これら各因子別に最適条件を見出すべく実験を行った。

方法としては、培養菌液、喀痰および組織切片中の結核菌の各方法による染色状態を、顆粒の濃さならびに鮮明さ、菌体抗酸性の強さならびに紫色調の残存程度、および標本面の脱色状態の各点について比較検討した。

イ. 脱色剤; 石炭酸フクシン液と石炭酸クリスタル紫液を 3:1 に混和した液で加温染色 5 分、ルゴール液をかけ室温に 5 分後、次の各脱色剤で 30 秒、1 分およびそれぞれの標本に応じて色素の流出しなくなるまでの各時間を較べた。

被検脱色剤は 3% 塩酸アルコール、1% 塩酸アルコールおよびそのおのおのとアセトンを 1:1、2:1、3:1 に混じたもの、さらに対照として、Weiss の法 (5% 塩酸水、3% 硝酸水、アセトン、アルコールを別々に使用)、Fontés の法 (アセトン・アルコール混和液) を用いた。

以上のうち、3% および 1% 塩酸アルコールとアセトンをそれぞれ 1:1 ないし 2:1 に混じたものが最もキレイな標本を与え、Fontés の法がこれに次いだ。また塩酸の濃度は 3% でも 1% でも大差ないが、塩酸を加えないと脱色が悪いし、塩酸アルコールだけでも紫色調の抜けが悪く、アセトンはどうしても必要である。脱色時間は劃一的に決めずに色素の流出しなくなるまでとしなると、標本によつて甚しいムラが起る。

ロ. 石炭酸フクシン液と石炭酸クリスタル紫液の混合比; 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1 の混合液で染め、沃度化、3% 塩酸アルコール・アセトン (2:1) 脱色の方法と比較し、2:1 ないし 3:1 の割合が適当であることを知った。しかし混合液で染めると、Fontés 法のように別々に行う場合に比べ、抗酸性の色調がやや薄い欠点がある (後述)。

ハ. 沃度化; ルゴール氏液の沃度がパラロザニン色素と結合して、アルコール不溶性の沃度パラロザニンを形成するといわれるが、この際加温によつてその結合を促進せしめようとして、3:1 混合液で染めた後、ルゴ

ール液を室温1, 3, 5, 10分間および弱加温30秒, 1分, 2分間の各時間かけて沃度化を行い, 2:1脱色剤で脱色した各標本を比較すると室温1分では明らかに不十分であるが, 3分以上ではほとんど差がなく, さらに加温すると, 30秒でも十分な効果がえられた。

ニ. 沃度と脱色剤の混合; すべて操作の回数を少なくすることは, 時間が経済であるばかりでなく, 成績を不安定にする因子を少なくすることになるので, 沃度化と脱色も同時に行えれば好都合である。この点についてZ-N法に沃度を併用している方法がある⁶⁾ので, これに用いられている沃度加脱色剤に更にアセトンを加えたものと, 他に工夫したものを試用した。

処方 a) 15%塩酸水	50	b) 沃度	0.2
純アルコール	50	塩酸	3.
沃度丁幾	25	アセトン	100
アセトン	50		

その結果, 以上のような方法も必ずしも不可能ではないと思われる。a) の処方では脱色, 沃度化を別々に行うよりも, むしろ菌体および顆粒が濃く染まるが, 色素粒の沈着により標本を汚し易い。このことは組織中の顆粒状菌を染める場合に大きな欠点となる。b) は顆粒も菌体も淡染して不適當である。したがって, やはり別々に行う方がよい。

ホ. 後染色; 以上の検討はすべて後染色をせずに行つ

表

製 品 名	外 見	純アルコール に 7g/100cc	右 上 清 を 1000 倍 稀 釈	石炭酸フクシン液と混じ染色	
				顆 粒	菌 体
A. Kristal Violett Grüber	粉	沈澱なし	同じ色調 濃さに	細く, やや淡い	やや淡染
B. Kristal Violett Merck	塊	沈澱なし		Aよりやや濃い	Aよりやや濃い
C. クリスタル バイオレット 特殊化学	粉	細粉あり	差なし	Bより更に濃い	紫味あり, 抗酸性強し
D. Methyl Violett 6B Grüber	粉	粗塊あり	やや淡い	Cと同程度	Cと同程度
E. Gentiana Violett Merck	粉	細塊あり	赤味が強い	Bとほぼ同じ	Cと同じ
F. ゲンチアナ紫 和光純薬	粉	"	やや赤味あり	淡い	やや淡い
G. ゲンチアナ紫 純正化学	塊	"	赤味あり	淡く赤味強い	甚しく淡染

た。すなわち表に示した各色素をそれぞれ化学天秤で秤量し純アルコール100ccに対し7gの割に加えて, 振盪混和し密閉して3日後その性状を比較観察した。この液の上清1cc あてをメルク製フクシンと化学用石炭酸により作られた石炭酸フクシン液 100cc に加えて瀧過した染色液で型通りに菌液および喀痰を染色した。成績は表に示した通りであるが, このうち幾分優れていると思われるものはBのメルク製クリスタルバイオレットで, 他のものも大体において使用しうる。ただゲンチアナ紫はその本来の色調に赤味があるので, 重染色には避けた方がよい。よつてクリスタル紫またはメチール紫が用いられるべきである。また純アルコールに対する溶解状態には幾分

だが, 菌浮游液の場合を除き後染色は必要と思われる。よつて10倍稀釈レフレル氏メチール青液, 0.1%マラカイト緑水溶液, 1%ピクリン酸水溶液のおのおのについて種々の時間で比較した。結局, 1%ピクリン酸水溶液で5秒間染めるのが最も適當であつた。その他は幾分か菌体を再び染めるため, 顆粒の鮮明さが低下する。

へ. 再び色素混合比; ロに述べたように混合法では抗酸性染色が弱い。これはフクシンが更に加えられる石炭酸クリスタル紫によつて稀釈されることも原因ではないかと思われる。それ故に石炭酸フクシン液に, 直接クリスタル紫のアルコール冷飽和液を加えることとした。石炭酸フクシン液100ccに対してクリスタル紫液0.1ccから2ccに至る0.1cc間隔の各濃度を比較するにおおよそ0.5ccないし1cc位が適當であつた。

この際クリスタル紫が少なく顆粒は淡く小さくなり, 多ければ顆粒は大きくなるが, 他の菌体部分も紫色となり, 顆粒が不鮮明となる。この方法によつて前述の抗酸性染色の淡染はかなり救われるが, 一般にZ-N法に比べるとやや薄いように思われる。これには顆粒が濃染されるための対比的な見掛け上の現象も加わっている。

ト. パラロザニリン色素の選択; 以上より一案をえたが, さらに本法に用いるべきパラロザニリン色素のうち, より適したものを求めるため, 以下の比較を行つ

差があつても必ずしも染色結果とは併行しないし, 外国製, 和製の差も特に強調する程ではなかつた。

II. 顆粒染色法の一案

以上の基礎的な検討より以下の方法を考案した。

試薬;

- A液 石炭酸フクシン液 100cc
(型通りのチール氏液)
クリスタル紫またはメチール紫純アルコール飽和液 1cc
(7g/100ccの上清)

以上を混和後, 瀧紙瀧過

- B液 ルゴール氏液

(沃度加里 2, 沃度 1, 水 300)

C液 3%塩酸アルコール 2容
アセトン 1容

以上を混和

D液 1%ピクリン酸水溶液

操作;

菌液は卵白グリセリンで接着, 組織切片は脱パラフィンを行い湿つたままで, 喀痰その他の臨床材料はできるだけムラなく塗抹, 乾燥, 固定しておく。

1. A液を満載3ないし5分間加温(少し強目に),
2. A液を捨てB液をかけ30秒間軽く加温, 3. B液を捨て, C液をかけ標本を揺り動かしながら色素の流れ出なくなるまで脱色, 4. 水洗後D液で5秒間染色, 水洗, 乾燥。

注意;

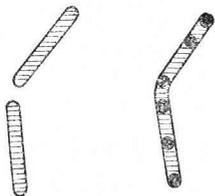
- 1) 染色液は十分量用い, 操作途中で乾かさないようにする。
- 2) A液の染色後軽く水洗しても良い。
- 3) B液によつてできる金属光沢ある膜を標本面に附着させぬようB液で洗い流す。
- 4) 脱色水洗後, 標本面は白または淡紅色である。不十分ならば脱色を繰返して良い。
- 5) 菌液の場合は後染色の必要はない。
- 6) 検鏡は強目の人工光線を用い, 倍率は油浸対物に接眼×10位が望ましい。

検鏡所見;

標本は全体として淡い黄色調を帯び, 喀痰や組織切片では細胞その他がすべて黄色に染まっている。その中に淡紅ないし濃赤色の菌体に1ないし数個の暗紫色の顆粒を有する結核菌がみられる。

本法で結核菌を染めると, 菌体が Z-N 法の場合よりもやや大きくみえる。しかし実際に計測すると, 両者間の長さには大差がないが, 本法では幅が幾分増している。これは石炭酸フクシンのみで染め沃度化を行つても同様な結果をえることから, 沃度化色素の沈着によるものと推定される。また Z-N 法で淡染ないし染まらない

Fig. 1



Ziehl's Stain this method に遭遇する。(図1)

本法による顆粒は, Weiss 法および Fontés 法によつて染まるものと全く同一である。

顆粒は菌体の随処に現われ, 甚しい大小不同がある。一個の菌体上の顆粒の位置とその大小との間には何等の関連性がなく, 顆粒相互間の間隔も全く不定である。

また顆粒は菌体幅の中央にあるとは限らず一側に偏て

みえるものがむしろ大部分である。そしてしばしば菌体側縁よりも外へハミ出している。

IV. 本法による二, 三の実験

1. 顆粒の脱色による縮小について

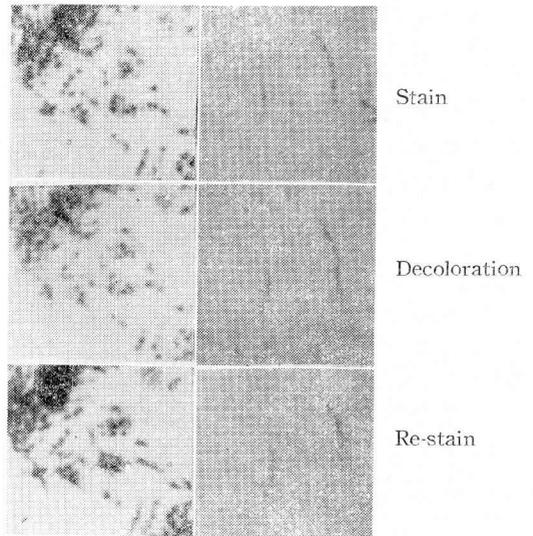
方法; 人型菌, 陸F, KH₁ の菌液および患者喀痰中結核菌 2種の塗抹標本を準備し, 本法により染める。検鏡して適当な結核菌を求め, これを中心に, マルキール・アパレートで印をつけ, ツエデル油を除き, 3%塩酸アルコール・アセトンで2~5分位強力に脱色する。再び同一の個所を観察後, さらに脱色を繰返すか, 本法によつて再び染色する。

成績; 染色された顆粒は, 脱色を再び強く行うことによつて縮小する。特にその小さいものは全く消失して, 顆粒の数が減少する。しかし大なるものは脱色操作の繰返のみによつては, 完全に不可視にすることはできない。このようにして一部の顆粒の消失した菌を再度本法で染めると, 以前あつた場所あるいは多少ズレて, 顆粒が再び染め出される。

考察; 以上の所見は, この顆粒がなんらかの物質に色素が滲透染色しているのではなくて, ある核になるものの上に沈着し, 被膜を形成していると思われる。よつて脱色操作により色素被膜が外層より除去され縮小し, さらに消失し, これを再染すると同一部位に再び色素が沈着してくるよう考えられる。すなわち染色により現われた顆粒は被染物質の実際の大きさを示すのではなく, 色素被膜の大きさを現わしているのであろう。(図2)

Fig. 2

I Exp. II Exp.



2. Z-N法による顆粒状濃染部分との関係

方法; 陳旧培養菌や病的材料中の結核菌を Z-N 法で染めると, しばしば濃淡不正の像を示し, 濃染する部分は顆粒状にみえる。したがつてこのような結核菌を前述

のようにマークし本法によつて再染色を行つた。

成績；Z-N 法による顆粒状の部分にはほとんど例外なく、本法による顆粒が出現する。しかしその中間の部分にも微小なムッフ氏顆粒がしばしば存在するので、両者のすべてが一致しているわけではない。また位相差顕微鏡による生菌の高密度部分も一部はムッフの顆粒と一致するが一致しないものもあり、これら三者の關係は甚だ複雑であつて一貫した原則は見出せない。

3. 休止菌における顆粒の増減

方法；ソートン培養の結核菌菌膜を水で数回洗滌し、これより結核菌水浮游液を作つて室温に放置し、一部をとつて定期的に本法で染色した。そして菌を200個みて、その中の顆粒数を算定した。

成績；図3に示すように一個の結核菌にある顆粒数の分布を日を逐つて算定すると、一般に徐々に増加の傾向があり、さらに日を経ると逆に減少する。すなわち結核菌の顆粒は菌の増殖しない状態においても増加しうる。後に減少するのは、菌体の断裂（このことに関しては前報に詳述した⁷）するために一個の菌体上の顆粒が減少するのであつて、顆粒の絶対数が減つたものとは思われない。

Fig. 3

		Number of granule on unity cell					Mean	
Date of exami.		1	2	3				
I Exp	Start	42%	50.5%	7.5			1.65	
	2. day	33	55.5	10			1.5 1.80	
	4. day	9.5	65	22.5			2.5 2.17	
	6. day	8	61	27	4		2.27	
	8. day	12.5	50	27	8.5	2	2.37	
	10. day	16	47	26.5	10.5		2.31	
	20. day	15	56.5	23.5	5		2.18	
	26. day	32	51	16.5			0.5 1.85	
	II Exp	Start	31.5%	40%	16.5	7.5	3	1.5 2.24
		3.5 day	25.5	26.5	30.5	7	6	1 3.34
1.5 day		10	30.5	33.5	15.5	7	2 3.82	
10. day		17	27	28.5	15	5.5	6 3.77	
16. day		19	22	35	14	6	3 3.72	
31. day		8	30	36.5	17.5	4	4 2.91	

考察；顆粒は菌体内に始め一様に分布していたある特定の物質が数個処に凝縮することによつて形成されるように思われる。この機転が菌が發育を止め老化に陥る過程にも、さらに続けられると推定することにより以上の

現象が証明される⁷。

4. 抗酸性菌の各菌株における顆粒

方法；以下の各菌株（保存株は1% KH₂PO₄培地、臨床株は3% KH₂PO₄培地に4週培養）を塗抹して本法で同時に染色した。

菌株；人型結核菌—KH₁, H₃₇Rv, 陸F, SF, 青山B, DT, C, Pn, 芝野, 辻本, H₃₇Ra, KH₁-SM∞, KH₁-I NH100, 牛型結核菌—大井, 弁天舎, 大宮, 牛金沢, 芝23, 屠牛, 263, 三輪, RO, R14, 一鳥型結核菌—AV, AVT, 一抗酸性雑菌—(白色)モルI, モルII, モルIII, 14, 21, (有色)1~13, 15~20 22~27, 一癩菌—全生園より分与せられた結節癩の上膊部結節より作つた塗抹標本, 一臨床材料—患者喀痰, 20名分。

成績；

イ. 染色状態には多少の差があるが、被検材料のすべてに本法による顆粒が見出された。すなわちすべての抗酸性菌は顆粒を有すると考えられる。

ロ. 顆粒の性状は菌型と直接の関連はないが、一般に集落のR型のものに明瞭かつ濃く染出され、湿潤で柔いS型の場合には淡い小さな顆粒が多数みられる。それ故に人型、牛型結核菌と鳥型結核菌、抗酸性雑菌の大まかな区別は認められる。

ハ. 抗酸性を失つた菌を多く含む菌株における観察で、その菌が元来抗酸性菌であつたならば、抗酸性を失つてもなお、顆粒が認められるという事実を知ることができた。

ニ. 人型結核菌の保存株を試験管内でSM 100,000γとINH 100γの耐性にしたのもでも、原感性株との間に顆粒の特別な差を認めない。また臨床的に獲得された喀痰中の耐性菌についても同様である。

5. 顆粒は加熱固定を行わない標本ではしばしば明瞭のことがある。結核菌を加熱すると顆粒はむしろ明瞭かつ濃く、数も増加する。

流動パラフィン中で抽出した死結核菌の菌体をエーテルで洗い、本法を実施すると抗酸性は十分保持されているにもかかわらず顆粒は全く染まらなくなる。

結 語

結核菌顆粒染色法を分析的に検討し、最適条件を見出し、その結果を総合して、簡便、確実な一法を考案した。

本法を用い二、三の実験を行つた。その結果顆粒は菌体内に始め均等に分布していたある物質が数カ所へ凝縮し、その部分へ色素が外皮状に沈着したものであるとして、この凝縮機転は菌が生長しない状態でも行われうるのであろう。抗酸性菌族にはすべてこの顆粒が見出されると考えてよい。

本研究は当研究室の豊原、吉川、高橋の諸君の絶大な協力によつてなされた。ここに深い謝意を表する。

主要文献

- 1) Much: Beitr. Klin. Tbk., 8: 85, 1907.
- 2) Much: ibid, 8: 357, 1907.
- 3) Weiss: Berl. Klin. Wschr., 46: 1797, 1909.
- 4) Fontés: Beitr. Klin. Tbk., Bd 77, 2te Heft 83, 1931.
- 5) 隈部: 人体内における結核菌の生態, 1949.
- 6) 今泉: 東京医事新誌, 3017号, 22, 1937.
- 7) 工藤: 結核研究の進歩, 2号, 177, 1953.