

# 切除肺病巣内の結核菌の生、死について

室橋 豊穂・吉田 幸之助

加納 保之・浜野 三吾

国立予防衛生研究所結核部 (部長 柳沢 謙)

国立療養所村松晴嵐荘 (荘長 木村猛明)

受付 昭和 32 年 7 月 23 日

## 緒 言

切除肺病巣中に見出される結核菌が必ずしも培養陽性とは限らないことを Medlar<sup>1)</sup>が知見して以来、極めて多くの研究者によつてこの事実に関する知見が発表されている<sup>2)~22)</sup>。それらに共通する点は、塗抹染色陽性でありながら培養陰性のものが相当存在すること、そのような菌はいわゆる空洞よりも被包乾酪巣や濃縮空洞に多くみられること、形態上、菌が短桿菌状ないし顆粒状をなす場合が多いことなどである。塗抹陽性、培養陰性なる事実が、菌の死を直接示すか否かは充分議論の余地のあるところで、Hobby<sup>23)</sup>のように、材料を Albumin 加 Dubos 培地で処理してしかも 9~12 週以上の長期間液体培養を続けることによつて培養陽性率を高めたとという報告をみると、われわれの現在持つ培養方法の未熟なために、発育しうべき菌をも死菌と見做しているのではないかとの疑念を懐かざるをえない。その反面、Hobby らの方法を追試した Bernstein<sup>24)</sup>の成績によれば、少しも培養成績の向上が見られず、またわが国における追試者の成績からも、Hobby らの所説をそのまま肯定せしむるに足るものを見出しえないこととて、培養によつて発育せしめえない菌は死菌と見做しうるのであるまいかとの考えも否定することができない。

日常行われる培養方法が、菌の生存、増殖に対して最適の条件を備えているとはもちろん言えないので、病巣という特殊な、不利な環境条件の下に、種々な程度の異なつた生理状態に在るであろう菌のすべてを発育せしめる能力に欠けるところあるは想像に難くないが、そのような菌の内には、すでに代謝を行へず、非可逆的な化学変化のみが菌体内で進行しているものも存在すると思われるわけである。この後者はすなわち死菌と見做さるべきものであろう。したがつて、培養以前の状態において、菌体内に起りつつある物質的变化をもし何等かの方法で掴みうるならば、病巣内結核菌の生、死という当面の難かしい問題を解明する上に一つの方法を提供することになると思う。

Malachitegreen-fuchsin 染色法における結核菌の染色機序の考察に基づき、菌体内物質中に高重合 DNA の

変化をこの方法である程度知りうる如く思われることから、室橋・吉田<sup>25)</sup>は、この染色方法が菌の生、死を識別する指標として役立つのではないかと考えている。そこで、病巣内結核菌の生、死の問題を、菌自体の観点から検討しようと考え、この知見の応用を試みたので、その成績を報告する。

## 実験材料ならびに方法

材料は、国立療養所村松晴嵐荘において切除をうけた肺結核患者 30 例からの 36 病巣である。

まず、晴嵐荘において、切除した病巣内容が無菌的にとり出し、Dubos 培地 5ml を加えて均等化し、遠沈。沈渣の一部を 8 枚の載せ硝子に塗抹する。残余全量を 1% 小川培地および Dubos 培地にそれぞれ培養、12 週間観察する。小川培地培養で集落発生をみたもののみについて、さらに、間接法により、SM, PAS, INH に対する耐性検査を行う。

塗抹標本中 4 枚は、晴嵐荘において、Ziehl-Neelsen 法、Hallberg 同時法変法 (Victoria blue 法)、蛍光法および Malachitegreen-fuchsin 法をもつて染色鏡検し、残る 4 枚は未固定のまま予研に渡される。予研においては、2 枚の標本につき、Malachitegreen-fuchsin 法および Victoria blue 法の単独または交叉染色によつて菌検索を行うと共に、残り 2 枚を Kirchner 培地に slide culture して、7 日目および 10 日目における microcolony の発生をしらべる。予研に渡される標本は、材料採取後 2~3 日目に培養されることになるので、菌にとつては発育に極めて不利な条件にあると思われるが、顕微鏡の所見によれば、かなりよく発育しうるものも存在する。

Slide culture は次のように行う。まず標本を 6%  $H_2SO_4$  に 10 分間浸した後、滅菌蒸溜水に挿入して 10 分間宛 2 回洗い、直ちに、5γ/ml に Malachitegreen を含む Kirchner-Sy-Ser 培地<sup>26)</sup>に挿入して培養する。

Malachitegreen-fuchsin 染色には後染色を施さず、1% Malachitegreen 加温染色後、水洗、Peiffer 液 3~5 分冷染、水洗後 8%  $HNO_3$  で瞬間的に脱色、水洗、吸湿するのみとした。この方法で、淡紫色の背景に、緑と赤とに染め分けられた菌を見出すことができる。

実験成績

切除された病巣をその性質によつて分けると、被包乾酪菌22例、空洞14例である。被包乾酪菌には、乾酪化組織の白亜化したもの、硬膏様の硬いもの、軟膏様の軟かいものなどがあるが、例数が少ないので一括した。また、浄化空洞、硬壁空洞その他すべての空洞を一括して空洞とした。

これらの病巣内容から染色検出された菌の多少は表1の如くである。便宜上、Gaffky 号数 I ~ III号該当のものを+、IV ~ VI号のものを++、VII号以上のものを+++と表わした。

表1 病巣の種類と検出菌数

病巣の種類	Victoria blue法				M-F 法 (緑にそまる菌)				計
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
被包乾酪菌	4*	8	5	5	16*	4	1	1	22
空洞	1*	5	5	3	4*	3	4	3	14
計	5	13	10	8	20	7	5	4	
			31				16		

\* 印各1例は蛍光法のみ(+)

いずれの方法によつても菌の見えぬものは被包乾酪菌の3例、また蛍光法のみによつてわずかに1~2個の菌の見えたものは被包乾酪菌、空洞各1例である。病巣数が少ないので比較はむづかしいが、一般に検出菌数の多いものは空洞が多いようである。ところが、Malachitegreen-fuchsin 法で染めてみると、緑にそまる菌の割合は症例毎に著しく相違し、Victoria blue法で菌の検出された31例中15例では、緑にそまる菌を全く見出しえず、すべて fuchsin による赤い染まりを示していた。これを病巣別にみると、空洞14例中13例では Victoria blue 法で菌が見出され、そのうち10例には緑にそまる菌が相当多数見出された。これに対し、被包乾酪菌22例では、Victoria blue法陽性18例中の12例において、緑にそまる菌を全く見出しえなかつた。すなわち、Malachitegreen-fuchsin 法に対する染色性が、被包乾酪菌内の菌と空洞内の菌と異なる傾向を示すことがわかる。

Victoria blue染色性と Malachitegreen-fuchsin 染色性とを比較すると表2の如くである。特に Victoria blue 法で++~+++程度に菌の検出された7例において、Malachitegreen-fuchsin 法では fuchsin に染まる菌のみしか見えなかつた点は注目に値する。

表2には培養成績をも併記した。10例の培養陽性例中、小川培地培養、slide culture共に陽性のもの3例、いずれか一方に陽性のもの7例で、蛍光法のみでわずかに菌を検出した2例中の1例を除けば、培養陽性例は、Victoria blue 法による検出菌数の多少にかかわら

表2 菌の染色性と培養成績

染色方法	M-F 法(緑にそまる菌)				計
	-	+	++	+++	
Victoria blue 法	-	5*			5
	+	8	5		13
	++	5	1	4	10
	+++	2	1	1	4
計	20	7	5	4	36

31  
16

\* 印内2例は蛍光法のみ(+)

・小川培地(+), △ Slide Culture(+), ▲ 小川, S.C. 共(+)

ず、すべて緑にそまる菌を含んでいることがわかる。したがって培養陽性なる事実は、Victoria blue 法あるいは Ziehl-Neelsen 法による抗酸性染色所見とは必ずしも平行しないが、Malachitegreen-fuchsin法によつて緑にそまる菌の有無と密接に関係しているように見える。

術前化学療法の間別に見ると、過半数(22例)は12~18カ月の治療を受けている。表3に示すように、被包乾酪菌では、18カ月未満の治療で培養陽性例が甚だ少なくなっているが、空洞では、24カ月に及ぶ治療にもかかわらず、14例中8例に、しかも多数に、生存可能な菌の存在していることがわかる。

表3 化学療法の期間と培養との関係

病巣の種類	化学療法の期間(月)			計
	12 >	12 ~ 18	19 ~ 24	
被包乾酪菌	5 △	14 △	3	22 △△
空洞	1	8 △△	5 ▲▲	14 ▲▲▲▲
計	6 △	22 △△▲	8 ▲▲	36 △△▲▲▲▲

各培養法のいずれかに陽性成績を示した症例を一括すれば表4-aの如くである。発病後手術に至るまでの臨床検査で菌の検出されなかつたものが意外に多いことは、菌検索上注意すべき点である。また小川培地と Slide culture との間の培養成績の食い違いは、培養日時および培養条件の異なることと、後者では顕微鏡的に発育型ないしは微小集落をもつて成績を判定したことによると思う。なお12週に及ぶ Dubos 培地培養によつても、特に培養陽性成績を増すことはできなかつた。

菌を培養したこれらの症例に共通する点は、Malachitegreen-fuchsin 法で緑にそまる菌が相当多く見られることと、多少にかかわらず、定型的な桿状菌の存在することである。

これに対して、検出菌数が++~+++でありながら培養陰性であった症例を一括すると表4-bの如くである。すな

表 4-a 培養陽性の症例

症 例	病 巣	治療 期間(月)	菌 染 色 性			菌 形 態	培 養			術前菌検査 (咯痰、胃液)
			Victoria blue	M-F Green	Pinc		小 川	Dubos	S. C.	
■	固い被包巣	10	卍	+	卍	桿状<細小,塊	-	-	+	発病以来(-)
■	"	17	∞	∞	+	顆粒状,塊	-	-	±	"
■	空 洞	9	+	+	+	桿状>顆粒状	+	-	-	12M前(+)>(-)
■	"	16	卍	卍	+	桿状>顆粒状	-	-	+	発病以来(-)
■	"	12	卍	卍	+	桿状	卍	卍	-	3M前(+)>(-)
■	"	13	∞	卍	+	桿状	卍	-	-	(+)
■	"	19	∞	卍	卍	桿状>顆粒状	卍	卍	卍	発病以来(-)
■	"	23	∞	卍	+	桿状<顆粒状,塊	卍	卍	卍	5M前(+)>(-)
■	"	18	∞	卍	+	桿状>顆粒状	卍	卍	卍	(+)
■	"	24	-*	-	-	(顆粒状)	卍	-	-	4M前(+)>(-)

表 4-b 塗抹染色(卍~卍), 培養(-)の症例

■ I	被包巣,白亜	20	卍	-	卍	顆粒状	-	-	-	発病以来(-)
■ II	" "	20	卍	-	卍	"	-	-	-	"
■	固い被包巣	13	卍	卍	+	桿状<顆粒状	-	-	-	"
■ II	"	15	卍	-	卍	顆粒状	-	-	-	15M前(+)>(-)
■ I	"	16	卍	+	卍	"	-	-	-	発病以来(-)
■ II	"	16	卍	-	卍	"	-	-	-	"
■	軟い被包巣	15	∞	-	∞	顆粒状,塊	-	-	-	11M前(+)>(-)
■	"	22	卍	-	卍	顆粒状	-	-	-	発病以来(-)
■	空 洞	12	卍	-	卍	"	-	-	-	"
■	"	20	卍	+	卍	"	-	-	-	"

わち、Victoria blue 法で菌数が相当多いにかかわらず、Malachitegreen-fuchsin法では緑に染まる菌が全く見えないかあるいは少なく、かつ菌の形態が多くは短くないし顆粒状をなしている。ことに第7例(■)の如きは、無数の菌が宛ら毛糸玉のような菌塊をなして赤く染まつ

ていた。

分離7株はいずれかの薬剤に対してかなりの高濃度耐性を示し、SM 1000γ/ml, PAS 100γ/ml, INH 100γ/ml(各1株), 3剤共10γ/ml以上耐性(2株)などがみられたことは注目すべき点である。

表 5 分離株の薬剤耐性

症 例	耐 性 度 (γ/ml)			病 巣	全化学療法 期間(月)	術前化学療法の種類および期間(月)
	S M	PAS	INH			
■	10	* 1(10)	0.1	空 洞	9<	PAS単, INH単→SM・PAS(9)
■	1	100	0.1	"	12	SM・PAS(1)→SM・PAS・INH(5)→INH・PAS(6)
■	10	10	1	"	13	SM・PAS(6)→SM・PAS・INH(7)
■	10(100)	10	10	"	19	SM・PAS(13)→NH・PAS(6)
■	10	10	100	"	23	SM・PAS(9)→INH・PAS(8)→SM・PAS・INH(6)
■	1000	1(10)	0.1(1)	"	18	SM・PAS(6)→SM・PAS・INH(6)→INH・PAS(6)
■	100	10	0.1	"	24	SM・PAS(9)→SM・PAS・INH(6)

\* ( ) は不完全耐性

総 括 考 案

切除肺病巣から検出される菌の染色性と培養成績とに中心をおいて検索を試みた。症例数は必ずしも多くはないが、ほぼ一定の傾向のあることがわかる。すなわち、

培養によって陽性となるものは空洞に多く、化学療法が12~24か月に及ぶにかかわらず、生存可能な菌をなお多数に含んでいる。また菌の染色性は培養成績と密接な関係を示し、Victoria blue 法 Ziehl-Neelsen 法で抗酸・アルコール性にそまる菌が多数ありながら malachit-

egreen染色性を持つ菌の見えない場合には培養陰性である。

塗抹陽性、培養陰性なる事実が、薬剤耐性検査に端を発して Medlar らによつて報告され、以来多数の報告によつて高率に存在することが確かめられたが、化学療法以前にも同様の現象はいわゆる自然治癒の場合に存在していた筈である<sup>27)</sup>。ただ後者の場合、その頻度が現在ほどにはもちろん多くなかつたがために、最近まで余り注目を惹かなかつたのであろう。しかし一面、菌検索に当つて塗抹染色鏡検という方法が、検出精度の低い粗雑な方法として蔑視されてきたことも大きな原因の1つとして反省されなくてはならない。鏡検によつて検出されなくとも培養によつて菌を検出するという多くの事実は、培養法に高い精度を持つ検索方法としての地位を与えたが、これに頼るの余り、培養される以前の菌自体についての観察が、甚しく忽かにされてきたことは見逃しえない。事実、単孤菌を Kirchner あるいは Dubos 培地で培養して Microcolony の発生を観察すると、この培地条件下では発育しえない単孤菌が常に多数存在する点からみても、培養陰性ということが菌陰性ということと同じ意味を持たないことは明らかである。したがつて、菌検索に当つては、検索の目的を異にするこの2つの方法が適切に組み合わされなくてはならぬことはいままでもない。

塗抹陽性、培養陰性なる現象に対しては、原因を主として培養法に求める考えと、主として菌側に求める考えとがある。前者の立場において Hobby ら<sup>25)</sup>は、牛 Albumin 加 Dubos 培地処理によつて培養陽性率を高めえたというが、Bernstein ら<sup>24)</sup>やわが国の追試者の成績<sup>15)</sup> 17, 19) では必ずしも肯定的な成績をえていない。ただ、染谷ら<sup>15)</sup>は Hobby らの方法によつて2ヵ月培養後27例中4例に陽性成績をえているが、同一方法で培養陰性の3例が1% NaOH処理、Kirchner 培地培養で陽性を示しているところをみると、Hobbyらの方法によつて、従来培養不可能であつた菌の多くを培養陽性たらしめるとは言いえないと思う。

菌側の条件としては、菌の形態と染色性が主として問題となる。形態がいわゆる定型の桿状菌であるか、短小形、顆粒形あるいは菌塊状であるかによつて、生存の可能性の有無をほぼ推察しうるのであるまいかとの見解が多く<sup>8, 11) 14, 16, 17, 22)</sup>、われわれの観察成績もこれに類している。ただ後者に属するもののすべてが生存・増殖不可能であるか否かという点になると、現在の培養条件では的確な証明を提示しえない。また菌の染色性について、いわゆる易染性と培養陰性との間に平行関係があるいは認められる<sup>8, 17)</sup>といい、あるいは認められない<sup>14, 15)</sup>という。われわれはこれについて検討を加えなかつたので、その当否は明らかでない。

実験成績に述べたように、われわれの観察によれば、病巣内結核菌が通常の培地に発育しうる場合には菌数の多いことが必ずしも必要条件ではなく、Malachitegreen 染色性を持つ菌の存在がまず必要であると考えられる。室橋・吉田の研究によれば<sup>26)</sup>、高重合DNAが重合度の低下と共に Malachitegreen 染色性を失うことからみると、菌の死に伴つて起る菌体内物質の非可逆的化学変化の結果として、DNAの低重合化が当然起るであろうと考えられるので、菌体内DNAが Malachitegreen 染色性を保持しているか否かが、菌の生死を示す1つの表現となりうるように思われる。もちろん Malachitegreen 染色性を持つもののすべてが生存・増殖可能であるか否かは、われわれの現在持つ培養条件に頼る限り明らかにしえないが、Malachitegreen 染色性を失つた菌は、恐らくは増殖不可能であろうと室橋らは考えている。したがつて、検査材料をこの方法で染色した場合に、赤く染まる菌のみが見出される場合には、培養が陰性に終ることを予想して差支えないと思う。

なお、Malachitegreen-fuchsin 法による病巣内結核菌の染色に当つては、菌以外の物質の濃染をさけるために、均等化あるいは酵素による消化法等を用いれば、分別染色される菌の検出は容易になると思う。

## 結 論

肺結核患者30例から外科的切除によつて得た36病巣について、結核菌の染色性と培養成績との関係をしらべ、菌の生死の問題を考察した。

36病巣のうち、22例は被包乾酪巣、14例は空洞である。これらのうち、31例は Victoria blue法で菌が検出され、一般に空洞の方に菌が多く見られた。

菌の検出された31例中16例には、Malachitegreen-fuchsin 法による染色で緑にそまる菌が見出され、このうち9例および蛍光法のみ陽性の1例が、培養陽性であつた。

菌の Malachitegreen 染色性と培養陽性との間には密接な関係が存在する。したがつて、Malachitegreen-fuchsin 染色によつて、病巣内の結核菌の培養の可能性をほぼ推察しうると思う。

摺筆に臨み御校閲戴いた柳沢部長、木村荘長に謝意を表する。

本研究は一部文部省科学研究費の補助によつた。

## 文 献

- 1) Medlar, E.M. et al. : Am. Rev. Tuberc., 66, 36~43, 1952.
- 2) Beck, F. & Yegian, D. : Am. Rev. Tuberc., 66, 44~51, 1952.

- 3) Yegian, D. : Am. Rev. Tuberc., 66, 629~631, 1952 (note).
- 4) Report of panel discussion survival and revival of tubercle bacilli in healed tuberculosis : Am. Rev. Tuberc., 68, 477~495, 1953.
- 5) Granville, G.E. et al. : Am. Rev. Tuberc., 68, 729~733, 1953.
- 6) Falk, A. et al. : Am. Rev. Tuberc., 70, 689~700, 1954.
- 7) 芳賀敏彦 : 日本臨床結核, 12, 652~655, 1953.
- 8) 伊藤義昭・吉田昇 : 結核, 29, 138~142, 1954.
- 9) 赤倉一郎他 : 結核, 29(増), 271, 1954.
- 10) 島田源三郎 : 医療, 8 (3), 24~26, 1954.
- 11) 古城雄二他 : 結核, 29(増), 305, 1954; 30(増), 148, 1955.
- 12) 小川辰次 : 最新医学, 9, 1137, 1954.
- 13) Poumon, 10 (6), 497~564, 1954. (Canetti, G., Tison, F., Chadourne, P., Gernez-Rieux, Ch., Meyer, A., Brouet, G., Bical, R. 等の論文)
- 14) 切除肺と結核菌の問題(特輯), 結核診療, 8(3), 120~232, 1955. (a. 牛場, b. 岡等, c. 塩沢, d. 島村, e. 須藤等, f. 加納等, g. 宮本, h. 香川等, i. 伊藤, j. 貝田等, k. 江波戸氏等の論文)
- 15) 染谷四郎他 : 結核診療, 9(5), 723~728, 1955.
- 16) 西村 宏 : 結核, 31, 222~227, 1956.
- 17) 伊藤義昭 : 結核, 31, 424~430, 551~554, 1956.
- 18) 佐野竹次郎 : 結核研究の進歩, 16, 225~243, 1956.
- 19) 久保田昭賢他 : 衛生検査, 5 (4), 140~145, 1956.
- 20) 寺山和夫 : 呼吸器診療, 11 (3), 207~211, 1956.
- 21) 久保田三郎 : 日新医学, 44 (3), 155~162, 1957.
- 22) 小久保文造 : 結核研究の進歩, 18, 190~217, 1957.
- 23) Hobby, G.L. et al. : Am. Rev. Tuberc., 70, 191~218, 1954.
- 24) Bernstein, S. & Steenken, W. JR : Am. Rev. Tuberc., 70, 370~372, 1954 (note).
- 25) 室橋豊穂・吉田幸之助 : 結核研究の進歩, 17, 160~172, 1957.
- 26) 室橋豊穂・吉田幸之助 : 結核研究の進歩, 12, 239~243, 1955.