

結核菌検索における蛍光法と培養法

中島 康次・本田 結・沢井 武・小川 辰次

北里研究所付属病院(院長 宗 武藤)

受付 昭和32年8月5日

1 緒 論

わが国では結核菌の検索に蛍光顕微鏡が漸次使用されつつあり、これに関する研究も多い。これらの研究の中で、蛍光法は、培養法に比して検出率が、すぐれているか、あるいはこれに匹敵すると発表している研究者と、その反対に、蛍光法は培養法に比して劣るという成績を発表している研究者とある。それでわれわれは、喀痰および胃液について、この点を追及したので報告する。

2 方 法

材料は入院して化学療法を実施している患者よりのものが大部分であつて、最初は、検査室に提出された材料をそのまま用いたが検出率が低いので、実験中途より、培養、塗抹等で、結核菌の出そうな患者の材料を選んで使用した。なお材料の採取前24時間は、化学療法との投与を中止した。

a 喀痰:

(i) 20ccまで目盛のある滅菌遠心沈澱管に採取した喀痰を、まず1白金耳宛とり、載せガラスの上に1cm平方に丸く広げて塗抹し、乾燥、固定、染色する。次に、喀痰に0.004%に phenol red の混入してある8%NaOHを等量加えて、滅菌した割箸で、充分かくはん均等化し型の如く、1cc のメスピペットで、0.1cc 宛を3%KH₂PO₄ 培地に培養する。

(ii) 残りの NaOH 処理液にさらに phenol red の0.004%に混入した4%NaOH液を加えて、全量、約20ccとし、充分かくはんして均等化する。これを1分間、3000回転の遠心器で10分間遠沈し、上清を棄て、できた沈澱を1ccのメスピペットでよくまぜて、その0.1cc宛を3%KH₂PO₄ 培地に培養すると共に、メスピペットに吸い上げた沈澱の1滴を、載せガラスに滴下し、前同様約1cm平方の円形に広げて、塗抹、乾燥、固定し、染色する。

(iii) 前述の残りの沈澱に、赤色の消失するまで、8% HCl を1滴宛加えて中和し、これをLöwenstein-Jensen 培地および1%KH₂PO₄ 培地に、前同様にして0.1cc宛接種すると共に、塗抹、染色した。

b 胃液:

約10ccの胃液を採取する。まず Homogeneizer にか

けて均等化し、これを(i)、(ii)と2分して、20ccの目盛のある遠心沈澱管に入れる。

(iv) 古久保法¹⁾により、20%NaOHを胃液の4量加えて、充分にかきまぜて均等化し、直ちに1分間3000回転の遠心器で10分間遠心し、上清を棄て、得た沈澱を、1ccのメスピペットで、0.1cc宛を3%KH₂PO₄ 培地に接種すると共に、その1滴を前同様にして載せガラスに塗抹、乾燥、固定して染色する。

(v) Phenol red の0.004%に混入してある4%NaOHを、胃液の2~3倍加えてよく均等化し、室温に10分間放置し、1分間3000回転の遠心器で10分間遠心し、上清を棄て、得た沈澱を8%HClで中和して、その沈澱を、前同様にして、0.1cc宛をLöwenstein-Jensen 培地および1%KH₂PO₄ 培地に接種すると共に、その1滴を載せガラスに塗抹、染色する。

染色は同一材料について、蛍光法と共に、対照の意味で Ziehl-Neelsen 法を実施したものもあり、またどちらか一方のみを実施したものもある。蛍光染色は矢崎、津金²⁾のロダミン-オーラミン複染色法により、装置は蛍光顕微鏡研究協議会で試作したものを用い、200倍の拡大で見て決定したが、疑わしいものは、流動パラフィンによつて油浸にし、500倍の拡大のみでみた。そして桿菌型と顆粒型との2つに区別して記載した。Ziehl-Neelsen 法の染色では、500倍の拡大で見た。なお蛍光法では、全塗抹面を見、Ziehl-Neelsen 法では約5分間見て、菌の発見できない時は陰性とした。

矢崎、津金のロダミン-オーラミン複染色法は次のようである。

標本を塗抹、染色、固定し、ロダミン液を標本面に充分滴下して60秒~90秒染色し、液を傾けて棄て、次にオーラミン液を前同様充分に標本面に滴下、室温で15分染色する。水洗後、1%塩酸アルコールで肉眼で色なくなるまで脱色、さらに水洗して、メチレン青原液の100倍稀釈液で、10秒~30秒染色し、水洗後、自然乾燥し鏡検する。

注: ロダミン液……ロダミンBの0.1%の蒸溜水溶液

オーラミン液……5%の石炭酸液の中に0.1%にオーラミン0を溶かす。

次に培養は、1つの材料について、2本~3本の培地を

使用した。そして2ヵ月観察した。なお中和の場合にはL5wenstein-Jensen 培地と1%KH₂PO₄ 培地を同時に同本数使用したので、4本あるいは6本の培地を使用したことになる。そしてこれら使用培地中の1本にでも集落の発育した時は、すべて陽性とした。

これらの研究は、喀痰でも、胃液でも、同一の材料について(イ)の(イ)あるいは(イ)と平行して実験したものもあるが、このうちの(イ)のみ、(イ)のみ、あるいは(イ)のみについて実施したものもある。したがって処理の異なることによる検出率の点を比較することは妥当でない。このようにして、蛍光法による検出と培養による検出、および対照としての Ziehl-Neelsen 法と培養との検出率を比較すると共に、顆粒型についてのわれわれの成績を示した。

なおNaOH 処理による沈渣の塗抹標本は、はくりし易いので、慎重に染色したが、それでもはくりしたものがあるので、これらは実験例から除外した。

表1 Ziehl-Neelsen 染色と培養による陽性率

材料の種類	塗抹と培養の方法	検査例数	培養陽性例数 (陽性率)	塗抹	
				陽性例数(陰性率)	培養に対する陽性の比
喀痰	単純塗抹と8%NaOH処理	330	140 (42.8%)	58 (17.6%)	41.5
	8% NaOH 処理後集菌	56	28 (50.0%)	9 (16.1%)	32.0
	集菌した沈渣を中和	80	32 (40.0%)	14 (17.5%)	43.8
胃液	20% NaOH 処理後集菌	174	29 (16.6%)	14 (8.0%)	48.2
	4% NaOH 処理集菌後中和	109	41 (37.6%)	15 (13.8%)	36.6

(2) 蛍光染色と培養による陽性率の比較

(1) と同様にして蛍光染色の培養に対する陽性の比を求めて見ると、表2のように桿菌のみを陽性とした場合は、喀痰の単純塗抹では、53.3、8%NaOH 集菌では、67.3、中和では、60 であつて、胃液では、20%NaOH 処理で 75.8、中和で 60.7、である。すなわち最も少なく、培養の1/2、多い時は、培養の3/4の検出率である。次に顆粒型も陽性としてみると、桿菌型のみを陽性とした時に比して、少ないところでも5%、多いところでは11%も陽性率が増している。したがって、培養に対する陽性の比も多くなつて、最も多いものは、胃液の20% NaOH 処理であつて、培養に匹敵する。最も少ないも

のは、単純塗抹の66.2 であつて、その他のものでは、80.0前後である。すなわちこのように、蛍光染色による陽性率は Ziehl-Neelsen 法に比して増しているし、ことに顆粒型も陽性としてとると、培養にまで接近してくる。

(3) 蛍光染色における桿菌型と顆粒型の培養陰性例の比較

表3で見ると、蛍光染色で桿菌のみを陽性とする、喀痰の単純塗抹では37例である。これを培養して見ると、13.5%が培養陰性を示した。同じ材料の中の顆粒型のみを陽性のは8例であつて、これを培養して見ると、62.5%が陰性を示した。同様にして見てゆくと、

表2 蛍光染色と培養による陽性率

材料の種類	塗抹と培養の方法	検査例数	培養陽性例数 (陽性率)	桿菌型		桿菌型+顆粒型	
				塗抹陽性例数 (陽性率)	培養に対する陽性の比	塗抹陽性例数 (陽性率)	培養に対する陽性の比
喀痰	単純塗抹と8%NaOH処理	152	68 (44.7%)	37 (24.4%)	53.3	45 (33.8%)	66.2
	8%NaOH処理後集菌	150	67 (44.7%)	46 (30.7%)	67.3	55 (36.7%)	82.0
	集菌した沈渣を中和	163	73 (44.8%)	45 (27.1%)	60.0	62 (38%)	85.1
胃液	20%NaOH処理後集菌	220	54 (24.5%)	41 (18.6%)	75.8	59 (26.8%)	109.3
	4%NaOH処理集菌後中和	205	61 (29.8%)	37 (18.1%)	60.7	49 (23.8%)	80.3

表3 蛍光染色における桿菌型と顆粒の培養陰性例

材料の種類	塗抹と培養の方法	検査例数	桿菌型		顆粒型	
			塗抹陽性例数	塗抹陽性培養陰性例数(陰性率)	塗抹陽性例数	塗抹陽性培養陰性例数(陰性率)
喀痰	単塗抹と8% NaOH 処理	152	57	5 (13.5%)	8	5 (62.5%)
	8% NaOH 処理後集菌	150	46	6 (13.0%)	9	6 (66.7%)
	集菌した沈渣を中和	163	45	4 (8.9%)	17	11 (64.7%)
胃液	20% NaOH 処理後集菌	220	41	10 (24.4%)	18	14 (77.8%)
	4% NaOH 処理集菌後中和	205	37	14 (37.0%)	12	9 (75.0%)
合計		890	206	39 (18.9%)	64	45 (70%)

喀痰の8% NaOH 処理でも、中和でもまた胃液の20% NaOH 処理でも 中和でも、いずれも顆粒型の培養陰性率は、桿菌型に比して著明に多い。喀痰、胃液のそれぞれの前処理のものを合計して見ると、検査例数が890であつて、桿菌型のみつかつたもの206例、顆粒型の見つかつたもの64例であつて、これらを培養して見ると、桿菌型では18.9%のみが陰性を示したのに対して、顆粒型では70%すなわち桿菌型の約3倍以上の陰性率を示した。

4 総括および考察

Ziehl-Neelsen 法に比して蛍光法がすぐれていることは諸先進の成績と一致する。しかし喀痰における成績が培養に匹敵するとか、培養以上であつたとする上坂⁵⁾三友、中村⁴⁾、小酒井⁵⁾、小川政⁶⁾、柳沢、榛名⁷⁾、らの成績とは異なり、蛍光法より培養の方がすぐれていると発表した藁茂⁸⁾、工藤⁹⁾、馬場¹⁰⁾、佐々木¹¹⁾、David G. Freiman¹²⁾ らの成績と一致した。また胃液においても Jensen u. Ghode¹³⁾ や、三友、中村のように蛍光法が培養に比して数等すぐれていると発表した成績とは全く異なり、われわれの成績は、培養法がすぐれていた。しかしそのいずれの場合においても、培養による成績に接近していることは事実であつて、このことは蛍光法のすぐれている一面を語ると共に、培養しても発育してこないものが多くなつているからであろう。なお研究者によつて、蛍光法と培養法の比較の成績が相違しているので蛍光法が常に培養法よりもすぐれているとはいえないだろう。これはいろいろの条件に左右されていると思われるが中でも、対象が違つていることが大きな原因ではなからうか？

次に顆粒型は、結核菌であるかどうか問題となつているが、工藤は喀痰において585例の検査中に38例を発見している。この数は同じ材料で桿菌を認めた例が69例であるから、桿菌型の約1/2弱となる。Jensen u. Ghode は439例の胃液から蛍光陽性のものを126例発見したが、そのうちの半数は球菌(顆粒型と同じと思われる)であつ

たという。われわれの顆粒型の桿菌型に対する検出の比率は、工藤や、Jensen u. Ghode のように多くはないがしかし喀痰、胃液の別なく、また前処理の方法のいかにかわらず常に発見されている。発見された顆粒型の数は、大部分は全標本に2~3コ、あるいは、1コといつたように少なく、桿菌型のように、1視野に何コも見つかることはない。また顆粒型陽性のものでも、同じ材料より塗抹標本を作り Ziehl-Neelsen 法で染色したものでは、1例も陽性を示したものはない。これら顆粒型の陽性のものを培養すると、その70%は集落が発育してこない。

また内科の病室に結核症以外の疾患で入院している12例の喀痰を採取して蛍光染色をして見ると、そのうちの3例に顆粒型を見たが、これらは培養しても結核菌の集落は発育しなかつた。

以上のようなことから顆粒型は結核菌でないとは断定できないが、蛍光顕微鏡研究協議会で提案したように、一まず結核菌のわくの外においた方が無難のように思われる。なお Jensen u. Ghode らの取り扱つた患者は、いずれも、チピワンを服用しているが、われわれはチピワンそのものが蛍光を発するのを見ているので、このようなことも、蛍光染色では陽性例の多かつた1つの条件であろう。

最後に、表題とは多少かけはなれるが、塗抹陽性、培養陰性の例が、胃液の方が喀痰の2倍も多い。この事実は、胃液が喀痰に比して結核菌の検出率が良いといつたことと矛盾するようであるが、この点はさらに研究したい。また塗抹陽性培養陰性の臨床上の意味についてもさらに検討したいと思つている。

5 結 論

入院して化学療法を実施している肺結核症の患者の胃液、喀痰を材料として、これらを、単純塗抹後、アルカリ処理して培養し、あるいは、アルカリ処理して遠沈したもの、さらに沈渣を中和したものについて、塗抹標本を作ると共に培養し、塗抹したものを蛍光染色、あるいは

は Ziehl-Neelsen 染色をし、次のような成績を得た。

① 培養陽性を 100 とした場合の Ziehl-Neelsen 染色の陽性比は、最も少ないもので 32、最も多いもので 48.2であつた。

② 蛍光染色による培養に対する陽性比は桿菌のみを陽性にとれば、53.3~75.8 であつて、さらに顆粒型を陽性として、桿菌型と一緒にして陽性とする、胃液の 20% NaOH 処理では、培養に匹敵する検出率を示したが、これを除くと、その陽性比は、66.2~85.1 であつて、Ziehl-Neelsen 法よりもよく、ことに顆粒型を入れると、陽性比はさらに良くなる。

③ 顆粒型のみを培養すると、70%が陰性を示した。

④ 桿菌のみを陽性とした場合でも、桿菌と顆粒型と一緒にしたもの陽性とした場合でも、塗抹陽性、培養陰性例が、胃液の方が喀痰の 2 倍もあつた。

主要文献

- 1) 古久保：結核，30：194，昭 30.
- 2) 矢崎・津金：The Jikeikai Medical Journal, Vo.1 1：No. 2, 110, 1954.
- 3) 上坂：結核研究，1：4，259，昭18.
- 4) 三友・中村：結核，27：9（総会号），559，昭 27.
- 5) 小酒井：
- 6) 小川 政：
- 7) 柳沢・榛名：
- 8) 養 茂：

} 蛍光顕微鏡研究協議会
昭和29年3月発表

- 9) 工 藤：文部省科学研究費結核研究班細菌科会
昭和28年7月発表
- 10) 馬 場：
- 11) 佐々木：

} 蛍光顕微鏡研究協議会
昭和29年3月発表

- 12) David, G. Freiman：Am. Rev. Tuberc., 48：435, 1943.
- 13) Jensen u. Ghode：Tuberkulosearzt, 5~6：346, 1951.