

結核菌発見 100 周年記念総説

結核菌検査の変遷と今後

工藤 祐 是

財団法人結核予防会結核研究所

受付 昭和 57 年 10 月 1 日

はじめに

結核症が伝染病である以上、その対策が細菌学的対応を中心とせざるをえないのは自明の理である。そして細菌学的手技の開発と向上が、結核病学の進展に、これまで大きな役割を果たし、今後もそうであることに疑いはない。

結核菌発見後の 100 年を、結核菌に対する有効な化学療法の出現するまでの前 2/3 と、その後の 1/3 の時期に分けることができよう。この前期には結核菌検査の研究は主としてより鋭敏な菌検出法の探求に向けられ、後期はこれに分離菌の各種性状試験が加わり著しく複雑化した時期と言えらる。

この分野の研究は、以前の華やかさに比べると、最近はかなり衰退しているように思われる。これは先進諸国における結核への関心の低下や、医学研究の高度分化による実利的研究軽視の傾向と無縁ではないであろう。

しかし、結核菌検査には手技的にも未解決の難問が多く、さらに地球的視点からみればその応用実施面での障壁が多数立ちだかっているのが実情である。

結核菌発見 100 年に当たり、この分野の過去の発展の跡をたどり、問題点を探ることは意味のあることと思われる。

以下に主な手技別に筆者の私見を述べることにする。

塗抹染色法

Koch の結核菌発見の公式発表は 1882 年 3 月であるが¹⁾、彼がこの研究に従事したのは発表の前 6 ないし 8 カ月間であつたと言われている。彼が結核菌を鏡下に初めて捉えた際のエピソードは、本誌創刊号の冒頭に北里初代会長が興味深く述べている²⁾。コッホがアルカリ性メチレンブラウ液とバスピンまたはビスマルクブラウン液を結核菌の検出に用いたのは、一見偶然のようにみえるが、後述の Weigert や Ehrlich と以前から知識の交

流のあつたことが大いに役立つと思われる³⁾。現在結核菌の染色法として不動の地位を確保している抗酸性染色法の原理、すなわち、媒染剤を加えた塩基性アニリン色素を用い、長時間あるいは加温により強力に染色、脱色剤により抗酸菌以外を脱色、背景混在物を複染色するという方式は、その各因子が既に最初の方法にすべて備わっていた。(アルカリ化による染着力の増強、長時間の浸漬、丁寧な水洗とビスマルクブラウン液のもつ脱色力を利用した脱色と複染色)。しかし、現在この方法を追試してみると、組織内とくに新しい壊死部の結核菌はその存在を判別しうる程度には染まるが、かくたん材料などでは明確に染め分けることはかなり困難である。これをかくたんのような臨床材料中の結核菌をも明確に染め出せるように改良したのはエールリッヒの業績である。彼は多くの組織染色に名を残したワイゲルトのいところで、彼もアニリン色素による細胞組織染色の研究に没頭していたが、コッホの菌発見第一報を聞き、その席から研究室に直行して菌染色を追試したと伝えられる。そして 1 週間くらいに間に、アニリンを媒染剤としたフクシンまたはメチルバイオレット溶液で染め、これを 3 倍希釈硝酸で脱色し、後染色を加えるという現在の抗酸性染色と全く異なる方法を提唱した。この発表はコッホの口頭発表後わずか 40 日足らずの 5 月 1 日に行なわれている。この方法は現在でも臨床検査として十分な実用性がある。直接加温による染色時間の短縮と確実化は Rindfleisch によつて工夫され、さらに同じ年の 8 月 12 日には Ziehl が媒染剤のアニリンをより安定で扱いやすい同じ芳香族の石炭酸に変え、脱色もやや薄い鉍酸とした方法を発表した。Neelsen(1883) は単にチールのゲンチアナバイオレットよりフクシンが、エールリッヒの硝酸より硫酸がよいと述べているにすぎない。

このようにして、現在抗酸性染色法の代表として世界的に著明な Ziehl-Neelsen 法は、実にコッホの結核菌発見と同じ年に確立されているのである(Z-N 法の原著は存在せず、Johne の総説論文(1885)の脚注に記載さ

れているのが、今に伝えられたものようである)⁴⁾⁵⁾。

この後も、より優れた方法を求めて無数の提案が行なわれている。そのなかでやや見るべきものとしては、脱色と複染色を同時に行なうことにより術式を簡便にした Gabbett(1887)の工夫や、脱色剤に酸もアルカリも用いない Eberspächer(1936)の方法があるものの、原理的には Z-N 法と異なるものではない。

Z-N 法はその後少しずつ処方や操作を変え、現在 Z-N 法と称している手技も各国、各機関によりかなりの相異がみられ、また多くの考案者の名を冠せられた方法も、そのほとんどが Z-N 法の変法にすぎず、多くは脱色剤(酸、アルカリ、アルコールの組み合わせ)と複染色(メチレンブルー、マラカイトグリーン、ピクリン酸、ピスマルクブラウンあるいは複染色をせず)にいく分かの工夫を加えている程度である。

このような抗酸性染色法のうちで、唯一のユニークな考案は蛍光顕微鏡法である。この方法は Hagemann(1937)⁶⁾が初めて抗酸菌染色に応用し、その有効性を主張したものである。多くの追試者もこの方法が従来の Z-N 法に比べ臨床材料中の結核菌検出率が高く、観察時間も短縮できるなどの利点を認めているが、光源にアーク灯を用いる煩雑さや結核菌の質的判別ができるという主張から、臨床検査用としてはあまり普及しなかつた。しかし主にドイツでこの装置に用いる光源ランプやフィルター改良が進められ、わが国でも戦後逸早く矢崎⁷⁾によつて新しい装置が紹介された。その優れた性能は蛍光顕微鏡研究協議会によつて確認され⁸⁾、[急速に全国に普及した。現在この方法はわが国では結核を扱う医療機関の38%が採用している(1980年113施設アンケート調査一筆者)。

これらの抗酸菌染色法の優劣を判定することは極めて難しい問題であることが、実際に取り組んだ研究者たちによつて述べられている。Z-N 法系統の染色法について、Pottenger⁹⁾は同一方法でも染色の強さ(加温や染色時間の差)や複染色の濃さ(各色素液を希釈したり、複染色を行なわないと菌数が増す)を変えると、方法の差よりも大きな影響を検出精度に与えうると結論づけている。また Engbeckら¹⁰⁾も広く用いられているいくつかの方法を塗抹標本と比較し、同一標本内の視野ごとの分布にバラつきが大きすぎ、いずれの方法が優れているとはいえないと言っている。要するに Z-N 法の方式を踏襲した方法である限り、これらの方法の間には本質的な差はないと考えるべきであろう。ただし、蛍光顕微鏡については、Z-N 法よりも大よそ20%程度の陽性率の向上が得られるというのが諸家の一致した見解である⁸⁾¹¹⁾(このことは現在の進歩した装置を用いても同じである)。

結核菌の形態観察のうちで、ある程度臨床検査にとり入れられたものとして、顆粒染色法がある。これは

Much(1907)が抗酸菌にグラム染色法を施し、その意義について述べたものであるが、その後いくつかの手技的改善が行なわれ、本邦では隈部が病巣内結核菌の観察に改良法を提案し¹²⁾、筆者もさらに安定した成績を与えうる方法を発表し、従来の報告も述べているように生体内の結核菌の活動状況とある程度に関連のあることを示唆した¹³⁾。しかし最近では臨床検査に本法が用いられることは少ないようである。

これらの染色法の改善の努力とは別に、臨床検査としての塗抹染色法の分野におけるいま一方の流れとして、臨床材料中の微量の結核菌をも捉えることによつて、検査精度を向上させようとする試みがある。一般に集菌法(concentration method)と呼ばれている。多くは材料をそのまま、あるいはアルカリなどで溶解し、遠心沈殿により結核菌を沈渣中に集めようとするものである。一部では材料に脂溶剤を加え、結核菌の親和性を利用して遠心により逆に浮上させるとか、電極を挿入通電して、結核菌を一方の電極へ誘引集菌しようとする企てもあつた。あるいはまた尿などの微量菌に対し、白濁を生じさせたり、凝固物を作り、これに結核菌を捕捉させて遠心するなどの方法も行なわれた。これらの工夫もこの100年間の前半には、かなりの数の発表がみられる。しかし、かくたんの場合は検出率が10~50%くらい向上するとは言うものの、操作が複雑で時間のかかることが問題であつた。その後、簡便でより精度の高い分離培養法が臨床検査に広くとり入れられたことによつて、いつの間にか塗抹染色検査の世界から姿を消した。(一面では微量菌を染色のために集めることは、迷入した自然界抗酸菌を高頻度に検出するおそれもある)。現在では集菌法は尿、髄液、胸腹水のような粘稠度が低く、菌量の少ない材料については用いられているが、かくたんでは分離培養の前処理として応用されているにすぎない。

以上のように、結核菌塗抹染色法の手技は、菌発見当時から100年を経た今日、蛍光顕微鏡法を除けば(これも原理的には抗酸菌染色法の一つである)、ほとんど進歩がなかつたと言える。これはあとに続く研究者たちの怠慢というよりは、当初に優れた方法が確立されてしまつたことによると思われる。

この手技は WHO の専門委員会の勧告¹⁴⁾を待つまでもなく、結核対策の前提となる患者発見に最も重要な役割を担うもので、その技術的改善の努力は今後も続けられねばならないが、それ以上に現在開発途上国で直面する実施上の諸問題を解決することが急務であると思われる。たとえば、染色液の調製は僻地ではかなり煩わしく、これらの国では中央供給とせざるをえないが、保存期間に限度がある。できれば粉末化して、水さえあればどこでも即座に試薬が得られるようにしたい。また脱色剤にしても強酸やアルカリは国によつては輸送に制限があり、

アルコールは飲用が問題となつたことがある (WHO の国際共同研究用試薬には、わざわざアルコールを含まない処方記載されている)。さらに適当な加熱手段が入手しにくい僻地では、冷染法の改良さえも望まれるのである。このような粉末化の努力や不便な地域に適した試薬処方の改善の試みは現在も細々と続けられているが (たとえば紙片に色素を浸みこませたものなど¹⁵⁾), Z-N法の染色効果に匹敵するものは得られていない。蛍光法が優れていると言つても、電気設備のない地域にとつては画餅以下であるが、これとても自然光や電池を用いる方法が開発されるならば、その益するところは大きいに違いない。

分離培養法

100年前に確立された塗抹染色法とは異なり、分離培養法が臨床診断にとり入れられたのは比較的近年のことに属する。

コッホ¹⁾は結核菌の分離培養に成功して、純培養菌による動物感染実験を多数行なつているが、そのほとんどは結核材料接種により感染を起こした動物の病巣よりの分離である。彼の創案になる牛や羊の加熱凝固血清が培地として用いられ、これに病巣の碎いた材料を塗りつけたものようである。この培地の結核菌発育支持力は極めて貧弱であり、微小な集落がまれに発育するというのが実情であつたと思われる。汚染も多く、慎重な植え継ぎによつて実験に必要な収量を確保した。当時かくたんなどの夾雑菌を含む臨床材料から直接結核菌を分離培養するということは至難の業で、北里はかくたんの膿様部を滅菌水中で繰り返し洗つて後、培地に接種することにより初めて直接分離に成功したが、95%は失敗したと言われる。

当然この後、培地と接種方法の改良は多数発表されているが、培地に関する著明な進歩としては、NocardとRoux¹⁶⁾の結核菌のグリセリン嗜好性の発見(1887)とDorset¹⁷⁾の凝固卵培地の創案であろう(1902)。前者は長期培養による培地の乾燥を防ぐことを目的に加えたらしいが、これによつて結核菌の発育が著しく促進され、集落が大きくなることを見出した。培地基剤として当初は前述のように凝固血清が用いられたのであるが、グリセリンを加えると、普通寒天培地や馬鈴薯培地でも結核菌が発育しうることが知られるようになった。さらに凝固卵が培地基剤として安定していることが見出され、これとグリセリン添加を結びつけることによつて、現在の凝固卵培地の祖型とも言うべきLubenauの培地(1908)が出現した。ひき続いてより発育支持力の高い培地を求めて、無数の培地が発表されている。

しかし、これらの培地の進歩とともに、結核菌分離培養が臨床診断に役立つ検査法として確立されるためには、

臨床材料からの直接分離術式の開発が必要であつた。

材料中に混在する雑菌を除くために、初期には雑多な試みが行なわれている。熱湯で洗つたり、過酸化水素水やフォルマリンなども用いられている。1908年になつてUhrenhuthら¹⁸⁾はアンチフォルミンが一般の細菌類に強い溶解消毒作用をもつているに拘らず、抗酸菌はこれに抵抗力があることから、かくたんの結核菌培養における前処理法への応用を提案した。ここでやつと臨床検査としての培養法の道が拓けることになつた。その後Petroff¹⁹⁾はアンチフォルミン中のNaOHだけで充分前処理ができるとして、NaOH処理の材料を全卵とグリセリン牛肉エキスにゲンチアナバイオレットを加えた彼の培地に接種して好成績を挙げ、世界的にも広く用いられるようになった(1915)。培地に色素を加え、雑菌の迷入を防ぎ、集落の発見を見やすくするという工夫もペトロフの始めたものである。この培養法は現在広く用いられている臨床材料からの結核菌分離法とほとんど同じである。その後の一時期はこの分野の研究の最も盛んな時代で、多数の発表が行なわれている。そのうちでわが国の住吉²⁰⁾による硫酸処理、グリセリン馬鈴薯培地接種は、アルカリによる前処理よりも汚染が少ないとして、世界的にも広く注目を浴びた(1924)。引き続いて発表されたHohn(1926~29)の方法はルベノーの改良培地に住吉の前処理を組み合わせたものである。次いでPetragnani(1927)、Löwenstein(1930~1933)、流血中結核菌の分離に適しているとして発表、この間に処方を4回変えている)などのそれぞれ特長のある培地が発表されている。レーウエンスタインの培地はその後Jensen²¹⁾により改良が加えられ、現在は諸外国において標準法として広く用いられている(Löwenstein-Jensen法)²²⁾。一方、わが国でもホーンの卵培地の後、小林²³⁾の全卵培地が発表され(1929)、鈴木²⁴⁾の銀杏培地(1930)、さらにレーウエンスタイン培地を簡略化した岡・片倉の培地(1939)²⁴⁾へと発展していった。住吉の硫酸法は臨床材料の前処理法として、かなり長い間主流を占めていたが、近年は再びアルカリが多く採用されている。

結核の化学療法の出現とはほぼ時期を同じくして、わが国では臨床材料とくにかくたんの分離培養が急速に普及した。勿論、それは化学療法が薬剤と結核菌との直接の関係を重視すべき治療法であることにもよるが、小川法という画期的な手技の開発によるところが大きい。小川はそれまで発表された多くの結核菌用培地の組成を検討し、その単純化を企図していた。たまたまBCG生菌単位測定用として新たに開発した1%リン酸カリ培地が、当時広く用いられていた岡・片倉培地よりも安定性のあることが認められ、これを感染動物の臓器内菌数測定に応用して、いわゆる定量培養法の手技を確立した。次いで臓器の均質化に酸よりも優れているアルカリをかくた

んの前処理にも用いようとしたが、従来の培地では酸に比べ、発育が著しく悪かつた。広範な基礎検討から前処理と培地組成の適合点を見出だし、培養法を最終的に確立したのは1950年(昭25)のことである²⁵⁾。この際、処理材料を中和や洗浄をせずに培地に直接接種しても結核菌の培養が可能であることも見出だした。このことは既に酸処理遠心沈渣の場合には知られていたが、凝固卵培地の強大な吸着作用を積極的に利用した極めてユニークな発想であつた。そしてさらに労多くして功少ない遠心集菌を廃し、アルカリ処理かくだんの0.1mlという大量を流入接種する方式をとつた。このことは操作を著しく簡便化するとともに、外界からの汚染を防止し、成績を安定なものとした。この方法はわが国の衛生検査指針の1953年版に早くからとり入れられ、その後標準法として急速に全国に普及した。小川法はかくだんを対象として開発されたものであつたが、他の材料についても小川培地に適した方法が次々に確立されている(糞便—工藤²⁶⁾、胃内容—古久保²⁷⁾、喉頭粘液—平沢²⁸⁾)。当初、本法は細菌学の常識を超えた乱暴な方法とみられたらしく、欧文で発表されなかつたこともあつて諸外国ではこの方法の追試すら試みようとはしなかつたようであるが1959年になつてMarksがこれとほとんど同じ方法を発表した。Dixon²⁹⁾によれば、多数の簡便法を比較した結果、いわゆる標準法とされているL-J法に匹敵したものは、実にこのアルカリ処理直接接種法のみであつたと言う。WHO共同研究用の技術手引²²⁾にも今では小川・マークス法として記載され、開発途上国のかなりの部分で本法が普及し始めている(韓国の全土、インドネシアの大部分、タイの一部、ネパールその他)。

以上のように臨床材料からの結核菌分離培養では、卵培地が世界の主流を占めているが、一部にはコッホ以来の血清を中心とした培地の流れがある。この系統での古い業績としてはProskauer, Beck³⁰⁾の培地(1894)が挙げられる。これはアスパラギン、クエン酸マグネシウム、リン酸カリ、グリセリンから成る塩類溶液に馬血清を加えた液状培地である。その後、これらの塩類組成は結核菌の研究に欠くことのできない合成培地(成分の明らかでない天然物質を含まない)の確立へ連なつてゆく(Sauton 1912, Lockemann 1919, Long 1924, Henley Le Duc 1930)。P-B培地はKirchner(1932)³¹⁾により改良され、わが国でも薬剤の発育阻止濃度の測定などに広く用いられている。これらの液体培地に一つの変革をもたらしたのは、戦後間もないDubos, Middlebrookら³²⁾³³⁾の結核菌発育因子に関する一連の分析的な研究である。これらを通じて菌発育に牛血清アルブミンが優れていることが見出だされ、さらにそれまで極めて困難であつた結核菌の均等分散培養が水溶性脂質ツィーン80の添加によつて可能となつた。この培地は培地組成が複雑で取扱いも

難しいが、その後数次の改良を経て7H9, 7H10, 7H11などの培地が生まれ、現在最も優れた結核菌培養用培地として広く用いられている。プロスカウエル・ベックやキルヒナーの培地は分離用培地としても推奨されていたが、実際に用いると汚染が卵培地とは比べものにならないほど多く、これらの垂流であるSulaの培地(凍結乾燥粉末として一時広く配布された)も含めて臨床検査に用いることは無理であつた。しかし、デュボス系統の培地が菌発育に優れているところから、これらに寒天を加えた培地が、現在の米国で標準的結核菌分離用培地の1つとして登載されている³⁴⁾。この方法は優れているとはいえ、複雑な前処理と厳重な無菌操作が求められ、高度な熟練と設備を必要とするので、結核対策のオペレショナルな手技としてはとり上げにくい。

以上述べた以外にもこの分野では前処理法の工夫が多数発表されている。先年IUAT(国際結核予防連合)の科学委員会で分離培養法の比較研究がとり上げられ、参加者の研究室で用いている前処理法の報告を求めたところ、筆者を含めてすべての研究室の手技が異なつていた(1975)。近年の抗酸菌の変貌に対応すべく、各国の研究機関が抗酸菌により傷害の少ない前処理法を求めて苦心しているように思われる。

結核菌分離法はこの100年間に着実に進歩してきた。そのうちで凝固卵を中心とする技術は小川法でほぼ頭打ちの感がある。しかし、最近の化学療法の影響によると思われる発育劣勢の菌株や増加傾向にある結核菌以外の抗酸菌をも広く検出するためには、さらに検討の余地がある。現にピルビン酸や血清の添加によつて発育を促進しうる菌株もかなり見出だされている。また、緑膿菌などの混合感染による汚染例の対策も積極的に検討されなければならない。一方、アルブミン寒天培地による分離は今後さらに発展する余地が多く、ますます複雑化する抗酸菌学の中心的担い手となるものと思われる。そしてこの方面から臨床検査における培養検出期間の短縮が期待できるかもしれない。

結核菌分離培養法は直接塗染染色法よりも結核菌検出能力が高く、かつ次の段階の検査に必要な生菌が入手できることから、多くの開発途上国においても基礎データの収集には重要な手技となる。新鮮な材料を必要とする分離培養を、悪条件下に高い精度で実施するという困難な問題を解決することも、現に結核対策を最も強く必要としているのが、そのような国々であることを考えれば、緊急の課題であると言えよう。このような考え方に基づく筆者らの提案³⁵⁾³⁶⁾が、これらの国々で検討され始めている³⁷⁾³⁸⁾。今後進めるべき1つの方向を示しているものと思われる。

薬剤感受性試験

結核菌の薬剤感受性試験は、当然ストレプトマイシンの臨床応用とともにその歴史が始まる(基礎的な最小阻止濃度の測定はそれ以前の抗結核性をもつとされた薬剤については試みられているが、臨床検査としてはではない)。したがって、その歴史は丁度1/3世紀を経たことになる。

この検査法の原理は比較的単純ではあるが、成績に与える複雑な因子が極めて多く、未解決の問題を抱えた検査であると言える。これらの技術的問題点を解決し、その判定値の臨床適合性を高めようとする努力が、本検査法の歴史そのものであった。しかし、このことは各国各機関で異なつた術式や成績判定法を生む結果となり、今や各国のデータを比較することは、ほとんど不可能に近い。1961年ごろWHO専門委員会が調査したところによると、各国で行なわれている方式は大よそ次の3つに分けられるとしている。1) absolute concentration method, 2) proportion method, 3) resistance ratio method³⁹⁾。これらのうち2)はパストゥール研一派のCanettiやGrossetがその合理性を主張しているもので、わが国でも篠田らの臨床効果との関連における詳細な研究がある。3)はイギリスのMRCによつて推奨され、英連邦などではこの発想に基づいた簡便法を用いているところもある。この2), 3)は理論的な合理性はあるであろうが、臨床検査法としては菌量を適切に調整する必要があるとか、対照菌株の成績と細かく対比するなどの煩雑さがあり、大量の培地を必要とする。1)の方法はアメリカのV.A.や西ドイツのMeissnerらが採用し、わが国もこれに従っている。やや精度に欠ける点はあるが、臨床的な目安を得るには、これで充分であると考えられる。ただドイツやわが国では卵培地を用いているが、アメリカは最近ではアルブミン寒天培地を主に用いている³⁴⁾(以前は卵培地)。これは発育が速く判定までの期間を短縮できるばかりでなく、卵培地のような一部の薬剤の培地作製時における活性低下がない点では有利であるが、汚染の機会が多いので操作に慎重を要する。卵培地での活性低下は⁴⁰⁾、これを判定規準設定に折り込めば臨床的にはさしたる支障はないであろう。またわが国のように検査濃度を高くそして粗く設定している場合は、検査ごとの判定値の変動はあまり問題にならないようである⁴¹⁾。各国での検査濃度はかなり区々でわが国よりも一般に低い。

薬剤感受性試験の成績を変動させる因子ははなはだ多い。接種菌量、培地性能、培養条件、培養日数などであるが、これらに厳しい条件を課すると、薬剤感受性試験は臨床検査としては実施不能とならざるを得ない。たとえこれらが理想的に実施されたとしても、示された成績

の解釈が各国間に相当の距りがあり、各国で発表される成績の比較を困難にしている。早くからWHOやIUATがこのような混沌とした本検査法の術式を統一すべく努力を重ねてきたが、国境の壁は厚く現在では断念したようにみえる。

わが国では1953年以来、一定の術式が衛生検査指針にとり入れられ、全国的にほぼ同一の規準に従つて検査が実施されているのは幸いなことである。この30年間における変更としては新しく加わつた薬剤の検査法を改版ごとに追加記載したことと、1972年版から培地に添加する薬剤濃度をそのまま表示するように改めたことくらいである(以前は卵培地に吸着の大きい薬剤は、その活性低下を見越して表示濃度の2倍とか10倍を加えていた)。

薬剤感受性試験のもつ宿命的な弱点は、分離培養と同様に時間がかかりすぎることである。この検査が始められた当初には、わが国でもいくつかの迅速検査法が発表されている(馬場、二村、辻、山本、小川の方法など)。これらは臨床材料の直接接種を目標としていたが、菌量が多くないと旨くゆかず、汚染も多いことから、衛生検査指針の1956、1958年版に採用されたが、1964年版からは姿を消した。これに代わつてわが国では簡便法の提案が行なわれている。増大する薬剤数が検査実施の大きな負担となり、本検査の普及が妨げられる傾向がみえてきたからである。小川(政)⁴²⁾は首曲り試験管により(1957)、次いでSchmiedel⁴³⁾も全く同じ考えのもとに凹みつき試験管を用いる(1958)直立拡散法を発表している。これは急性感染症の細菌に広く用いられている拡散法を結核菌の性質を考慮に入れて応用したもので、現在でも一部の検査機関では用いられている(筆者も普通の斜面培地によるディスク法を提案した⁴⁴⁾)。また川村⁴⁵⁾は少量の薬剤含有卵培地を一つの器具に小さくセットしたマイクロタイター法を考案し、その実用性を強調した。

今後のキメ細かい結核対策に、本検査法の重要性は増すものと思われる。しかし以上述べたように解決すべき問題点が多々あり、一層の検討が必要である。たとえば希釈法を中心とするにしても、現在のように各薬剤の2~3段階濃度を検査する必要があるのか(アメリカでは既にアルブミン寒天培地による1濃度法をとつている)、直接法による検査も続けるべきか(結果が早く分かるというが、世界的には生えた菌を用いる間接法のみを実施しているところが多く、直接法は例外的である)、検査すべき薬剤数は繁用される3~4剤でよいのではないか(それで耐性の場合、さらに他の薬剤を検査する)、そしてより合理的なアルブミン寒天培地に変える必要はないかなどの点、さらに現在の検査濃度と耐性規準を再検討する必要はないのか(諸外国に比べ高すぎる)等々が、当面臨床検査として解決すべき問題点であろう。

同定試験

結核菌以外にも抗酸性をもつ細菌が自然界に多数存在することは、結核菌の発見から、時を経ず、次々に知られている。最も古い記載は Alvaréz & Tavel (1885) のスメグマ菌であろう。引き続いてバター菌、チモン菌、牛乳菌などのいわゆる自然界抗酸菌が発表されている。そして当初人間の結核菌と同じであると考えられていた動物に結核類似の変化を起こす細菌についても、鳥類ではノカルド・ルウ (1887) が、また牛の真珠腫の原因菌についてはコッホ (1901) がそれぞれ異なつた菌型であることを明らかにした。このようにして異なつた名称を冠せられた菌株は算え切れなほどあり、その都度人や動物への関連が述べられている。しかし長い間、抗酸菌学の中心は結核と癩であり、他の抗酸菌は鳥型結核菌、バラ結核菌、牛型結核菌、鼠癩菌、Vole 菌などの特別な意義をもつ菌種以外は、いわゆる非病原菌あるいは雑菌として、結核菌検査の際の迷入を鑑別除外することに主眼を置いていた。この時代には動物への病原性以外には集落の性状や抗酸性の強さ(抗煮沸性など)が鑑別の主な根拠となつている。ただ一部の研究者が酵素反応や免疫反応での群別を、均等菌液を作りやすい迅速発育S型菌株について試みていたようである¹¹⁾。

このような状態が長く続いていたが、1953年、Buhler, Pollak⁴⁶⁾ の yellow bacillus の発表が契機となつて、結核菌以外の抗酸菌の人における臨床的意義が見直され、米国の広範な調査に引き続き⁴⁷⁾⁴⁸⁾、各国から多くのデータが発表された。今や結核菌、癩菌以外の抗酸菌の人感染いわゆる非定型抗酸菌症は、結核の減少した国々の感染症の分野に大きな比重を占めるに至つている(結核まん延の高い国では、ツ反応への影響の可能性を除けば、実際上はさしたる問題ではない)。

一方、抗酸菌種同定に必要な手技の開発は長らく低迷していたが、これらへの臨床的関心の高まりに伴い、急速な進展をみた。そのうちで、人型結核菌が他に比べ多量のニコチン酸を産生することに着目した今野⁴⁹⁾のナイアシンテストの確立は特筆に値する(1956)。これは単に極めて高い特異性をもつ反応というだけでなく、抗酸菌の同定に化学的手法を導入しうることを示したことに大きな意義がある。その後多数の酵素反応や薬剤による発育阻害の差などを用いた同定手技が発表されている。そして、同定手技の増加は、結果として菌株間の細かい差異を際立たせることになり、新しい菌種名の提案が相踵ぐことになつた。現在、国際的に登録されている菌種名は40を超えているという。これらの菌種はいずれ統廃合されるであろうことは、Bergey の細菌鑑定便覧所載のミコバクテリア種名が1923年の初版以来、改訂ごとにかなり変動していることからうかがわれる。

現在の同定試験法には、発育性状(発育速度、発育温度域、集落の発色と形態)やナイアシンテストのように比較的安定しているもの以外は、成績の変動しやすいものが多く、検査に際し条件を厳しく設定することが必要である。また同一菌種内でも菌株により差がみられる反応もあり⁵⁰⁾、大きな幅をもつて判定すべきであると思われる。したがつて、一部の明白な特徴をもつ菌種以外は、種名までを決める同定試験は、日常臨床検査にとり入れるほど成熟していないとも言えよう。

この分野における今後の課題は、臨床的に意義の多い菌種を同定すべき、できるだけ少ない数の必須の同定キイを確立することである。それと同時に臨床検査としての同定試験は、まず結核菌とそれ以外の抗酸菌を鑑別し、結核菌以外の抗酸菌であれば、その例が非定型抗酸菌症を起こしているか否かを臨床所見から決定し、しかる後に菌種名を追求するという手順に従うべきであることを広く知つてもらふ必要がある。なお、わが国の肺の非定型抗酸菌症の大部分から *M. intracellulare* が検出されるが、この菌種は現在の同定に用いられる試験管内反応の大部分に陰性である。したがつて代謝活性の弱い異なつた菌種が、この菌種名の下に混在している疑いがある(このことは血清型が多数に分かれることや、抗結核薬への感受性に大きな幅がみられることから推定される)。これを解明することも、臨床との関連の深い菌種だけに重要であると筆者は考えている。

同定試験の一部として、結核菌の型別(または亜群別)が未解決のまま残されている。比較的有望視されたファージ型別も、その特異性の不足や不安定性のため足踏み状態である。血清型もいま一步であるし、抗結核薬による最小発育阻止濃度も補助的なものである。結核の感染経路(集団発生や家族内感染における)の解明の決め手となるだけに、一層の進歩を望みたいものである。

むすび

主観的な記述となつたが、この100年間の結核菌(抗酸菌)臨床検査における先人の偉業を偲び、現在の問題点を筆者なりに考察してみた。

このように早急に解決しなければならない問題が、この分野には未だに多く残されている。いずれも困難な課題で、多くの研究者の地道な努力が必要と思われる。しかし、残念なことにこのような分野に関心をもつ人の減少が、急速に進んでいるのが実情である。結核絶滅を目指す国でも、結核制圧の緒についた国でも、このような対策の成果に直結する実技の向上は、何よりも優先すべき研究課題であると考えるのは筆者のみの偏つた考えであろうか。

参 考 文 献

- 1) Koch, R.: Die Aithologie der Tuberkulose, Berl Klin Wschr, 19: 221, 1882.
- 2) 北里柴三郎: 創刊の辞, 結核, 1: 1, 1923.
- 3) Krause, A.: Introduction to the ethiology of tuberculosis, (Amer. Rev. Tbc. 1932, 菌発見50年記念誌より転載), Bull IUAT, 56: 100, 1981.
- 4) Bishop, P. J. and Neumann, G.: The history of the Ziehl-Neelsen stain, Tubercle, 51: 196, 1970.
- 5) Bulloch, W.: History. Acid Fast Bacteria, 154, London His Majesty's Stationary Office, 1930.
- 6) Hagemann, P.K.H.: Fluoreszenzfärbung von Tuberkel bakterien mit Auramin, Münch Med Wschr, 28: 1066, 1938.
- 7) 矢崎芳夫: 紫外線による結核菌の観察, 成医会雑誌, 64: 1949.
- 8) 蛍光顕微鏡研究協議会: 蛍光顕微鏡による結核菌の検査法に関する研究, 日本医事新報, 1588: 28, 1954.
- 9) Pottenger, J.E.: Controlled staining of Mycobacterium Tuberculosis, Counterstains in demonstrating Mycobacterium tuberculosis in sputum, Present practice in staining Mycobacterium tuberculosis in representative institutions, Am Rev Tuberc, 45: 549, 558, 568, 1942.
- 10) Engbaek, H.C. et al.: Comparison of various staining methods for demonstration of tubercle bacilli in sputum by direct microscopy, Bull IUAT, 52 (1968 Meeting) 94.
- 11) 戸田忠雄: 結核菌と BCG (南山堂) 128, 19表より引用, 1944.
- 12) 隈部英雄: 人体内における結核菌の生態, モノグラフ保健同人社, 1949.
- 13) 工藤祐是・工藤 禎: 結核菌の顆粒染色について, 結核, 32: 26, 1957.
- 14) WHO Expert Committee on Tuberculosis: Ninth Report. WHO Technical Report Series, 552: 14, 1974.
- 15) Varughese et al.: Comparison of strip and Ziehl-Neelsen method for staining acid-fast bacteria, Bull Wld Hlth Org, 51: 83, 1974.
- 16) Nocard, M.M. et Roux, E.: Sur la culture de bacille de la Tuberculose, Ann de l'Inst Past, 1: 19, 1887.
- 17) Dorset, M.: The use of eggs as a medium for the cultivation of the Bacillus tuberculosis, Amer Med, 13: 555, 1902.
- 18) Uhlenhuth, P. und Xylander: Antiformin, ein bakterienauflösendes Desinfektionsmittel, Berl Klin Wschr, 29: 1346-43 (abst), 1908.
- 19) Petroff, S.A.: A new rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacillus directly from the sputum and feces, J Exp Med, 21: 38, 1915.
- 20) 住吉弥太郎: 結核菌ノ分離培養法, 結核, 3: 16, 1924.
- 21) Jensen, K.A.: Towards a standardization of Laboratory Methods, Bull IUAT, 24: 78, 1954.
- 22) WHO: Laboratory Procedures for the Bacteriological Diagnosis of Tuberculosis in WHO-assisted Projects, WHO/TB/Techn. Guide/67.7, 1967.
- 23) 小林諒雄: 喀痰中ニ於ケル結核菌ノ二三分離培養法の比較実験, 並ニ私案培養基ニ就テ, 結核, 7: 471, 1929.
- 24) 岡 捨己: 結核培養法の諸問題と「岡=片倉」=培地の製法に就テ, 日本臨床結核, 1: 829, 1940.
- 25) 小川辰次他: 結核菌の定量培養について, その7, 喀痰中結核菌の定量培養について, 結核, 25: 207, 1950.
- 26) 工藤祐是: 糞便内結核菌の培養について, 結核, 26: 78, 1951.
- 27) 古久保文造: 3% KH₂PO₄ 培地による胃液よりの結核菌の分離培養並びに胃液培養と喀痰培養の比較, 結核, 30: 194, 1955.
- 28) 平沢玄佐吉他: 喉頭粘液よりの結核菌の分離培養, 結核, 30: 579, 1955.
- 29) Dixon, J.M.S. and Miller, D.C.: Simple methods for the isolation of tubercle bacilli from sputum, Tubercle, 45: 106, 1964.
- 30) Proskauer, B. und Beck, M.: Beiträge zur Ernährungsphysiologie des Tuberkelbazillen, Ztschft f Hyg Infkhten, 18: 128, 1894.
- 31) Kirchner, O.: Die Leistungsfähigkeit der Tiefen Kultur des Tuberkelbazillen nach Verwendung besonderes geeingeter flüssiger Nährboden, Zblt Bakt I Orig, 124: 403, 1932.
- 32) Dubos, R.J. and Davis, B.D.: Factors affecting the growth of tubercle bacilli in liquid media, J Exp Med, 83: 409, 1946.
- 33) Dubos, R.J. and Middlebrook, G.: Media for tubercle bacilli, Amer Rev Tuberc, 56: 334, 1947.
- 34) Procedures for the Isolation and Identification of Mycobacteria, 1975 Edition, U.S. Dpt. Health, Education and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control, 1975.
- 35) 工藤祐是・工藤 禎: 遠隔地における結核菌分離培養法の検討と提案 (その1), 結核, 48: 453 (その2), 結核, 48: 501, 1973.
- 36) Kudoh, S. and Kudoh, T.: A simple technique for culturing tubercle bacilli, Bull Wld Hlth Org, 51: 71, 1974.
- 37) Rasmin, R. Erwin, P. et al.: Experiences in culturing acid fast bacilli by modified Kudoh's method in Persahabatan hospital Jakarta, complementary to microscopic examination in case-finding and diagnostic method, PARU, 1: 11, 1980.
- 38) Sathianathan, S. and Khalil, A.: A simple diagnostic culture method for use in a tuberculosis control programme, Bull Wld Hlth Org, 59: 919, 1981.
- 39) Meissner, G.: The absolute-concentration method of testing the susceptibility of Myc. tuberculosis to antibacterial drugs. Mitchison, D.A.: The resistance ratio method of testing the susceptibility of Myc. tuberculosis to antibacterial drugs.; Canetti, G. and Grosset, J.: The proportion method of testing the susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to antibacterial drugs.; WHO/TB/Tech. Information, 6: 13, 20, 24, 1967.

- 40) 工藤祐是・工藤 禎：抗結核薬の試験管内抗菌濃度と卵培地におけるその表現，結核，43：9，1968.
- 41) Kudoh, S.: Multiple drug resistant strains of tubercle bacilli, Reports on Medical Research Problems of the Japan Anti-tuberculosis Association, 19: 9, 1971.
- 42) 小川政敏：直立拡散法による結核菌の耐性測定と体液中の薬剤濃度の生物学的定量法について，日本臨床結核，16：417，1957.
- 43) Schmiedel, A.: Der Vertikaldiffusionstest als Methode zur Resistenzbestimmung von Tuberkelbakterien und zur INH-Spiegeltestung, Zschr f Tbk, 112: 48, 1958.
- 44) Kudoh, S. et al: A new disc technique for drug sensitivity test of tubercle bacilli, Acta Tuberc Scand, 46: 207, 1965.
- 45) 川村 達：結核菌耐性スペクトル検査法，近代医学社刊，1971.
- 46) Buhler, V.B. and Pollack, A.: Human infection with atypical acid-fast organisms; Report two cases with pathologic findings, Am J Clin Path, 23: 363, 1953.
- 47) Timpe, A. and Runyon, E.H.: The relationship of "Atypical" acid-fast bacteria to human disease, A preliminary report, J Lab & Clin Med, 44: 202, 1954.
- 48) Veterans Administration Hospital, Sunmount, New York; Veterans Administration- National Tuberculosis Association Cooperative Study of Mycobacteria (correspondence), Am Rev Tuberc, 72: 866, 1955.
- 49) Konno, K.: New chemical method of differentiate human-type tubercle bacilli from other mycobacteria, Science, 124: 985, 1956.
- 50) Kubica, G.P.: Differential Identification of Mycobacteria, VII Key features for Identification of clinically significant mycobacteria, Am Rev Resp Dis, 107: 9, 1973.