

短 報

蛍光基質分解による抗酸菌の生死鑑別

— FDA/EB 染色法 —

中 村 玲 子 ・ 木ノ本 雅 通

国立予防衛生研究所・細胞免疫

受付 平成元年11月6日

DETECTION OF VIABLE OR NON-VIABLE MYCOBACTERIA
BY HYDROLYSIS OF FLUOROGENIC SUBSTRATE

Reiko M. NAKAMURA* and Masamichi KINOMOTO

(Received for publication November 6, 1989)

Acid-fast staining is broadly used for the detection of mycobacteria in smears or pathological preparations, but it does not distinguish viable and non-viable bacteria. Enzymatic hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA) was reported as a tool to detect viable mammalian cells or protozoa¹⁾²⁾. We have applied this method to mycobacteria samples to detect viable or non-viable bacteria in the smear. *Mycobacterium bovis* BCG (Tokyo), 20 mg/ml suspension of standard vaccine, was used as the sample of viable bacteria. A part of the same suspension was heated at 100°C for 30 min and used as the sample of non-viable bacteria. Three samples, viable, non-viable, and 1:1 mixture of the two, were stained with acid-fast staining and FDA-EB (ethidium bromide) mixture, respectively. For FDA/EB staining, stock solution of FDA (5 mg/ml acetone) was diluted 1:50 in PBS and 25 μ l of FDA and 25 μ l of EB (20 μ g/ml PBS) were mixed with 50 μ l of bacterial suspension. Preparations were observed with either light or fluorescein microscope. Living bacteria were stained in yellow green in FDA/EB staining while non-viable bacteria were red. Mixed sample of live and dead bacilli showed differential staining with green or red in FDA/EB staining, but no difference was shown in acid-fast staining between viable and non-viable bacteria.

Key words : Mycobacteria, Viable and non-viable bacteria, FDA

キーワード : 抗酸菌, 生菌・死菌, FDA

緒 言

抗酸菌は抗酸染色 (Ziehl-Neelsen 法など) により

容易に他の菌と区別されるが、この染色法では生菌も死菌も同じように赤く染まって区別することは困難である。塗抹標本に検出される菌が生菌か死菌か、あるいは

* From the Department of Cellular Immunology, National Institute of Health, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

in vitro で化学療法剤に感受性のある菌かどうかは、培地上にコロニーを形成するか否かで判定しなくてはならないが、結核菌をはじめ抗酸菌のコロニー形成には時間がかかる。もし、生菌と死菌を簡単に判別できれば、診断や研究の上で有用であると考えられる。

蛍光物質 Fluorescein-diacetate (FDA) は、アセチル基の2個ついたエステルで、容易に細胞膜を通過するが、細胞内のエステラーゼで分解されると透過性のない蛍光物質となり細胞内に蓄積される。そのため、エステラーゼ活性のある生細胞のみがこの色素に染まること、この方法により細胞の生死を判別できることを、Rotman & Papermaster が動物細胞を用いて報告した¹⁾。その後 Jackson らは、この方法が寄生原虫 *Leishmania* にも応用でき、生きた原虫は FDA で黄緑色に染まるが死んだ原虫は染まらないことを報告した²⁾。われわれは、FDA を用いる染色法が抗酸菌にも応用できるのではないかと考え、BCG を材料として生菌死菌の染色による鑑別を試みたので、その結果を報告する。

材料と方法

抗酸菌 : *Mycobacterium bovis* BCG (Tokyo 株) を用いた。標準生ワクチンを 20 mg/ml の濃度になるように蒸留水に懸濁したものを生菌の標本とした。同じ材料を 100°C 30 分加熱したものを死菌標本とした。この生菌標本の生菌数は、小川培地 4 週培養のコロニー数から算出すると 3.4×10^7 /mg (6.8×10^8 /ml) であった。

蛍光物質 : Fluorescein diacetate (FDA ; Sigma F-7378) は 5 mg/ml のアセトン溶液として -20°C に保存、使用に際しては PBS で希釈して用いた。対照染色のために Ethidium bromide (EB ; Sigma E-8751) を用い 20 μ g/ml の濃度に PBS に溶解し、-20°C に保存した。

FDA/EB 染色法 : FDA の保存溶液 20 μ l を 1 ml の PBS で希釈する。この FDA 液 25 μ l と 20 倍希釈の EB 液 25 μ l をとり、結核菌液 50 μ l と混合し、室温で 2 分間放置する。この時、標本に光を当てない方がよい。この菌液 1 滴をスライドグラスに載せ、カバーをして、落射型蛍光顕微鏡 (Olympus BH 2-RFL) で Blue filter を用いて観察した。FDA が分解してできる蛍光物質を持つ菌は黄緑色に光る。蛍光物質の蓄積のない菌は、EB により核酸が染色されて赤く見える。

塗抹標本と抗酸染色 : 対照として抗酸染色を行った。Cytospin II (Shandon) で 700 rpm、7 分間遠心して塗抹標本とした菌を火炎固定後、Sigma 社の Accustain キットにより染色した。この染色は基本的には Ziehl-Neelsen 法と同じである。

結果および考察

同一標品についての抗酸染色と FDA/EB 染色の結果を図の a ~ f に示した。a ~ c は抗酸染色、d ~ f は FDA/EB 染色で染めた生菌 (a, d)、死菌 (b, e)、および生菌と死菌を 1 : 1 に混合した標本 (c, f) である。a ~ c は $\times 100$ の対物レンズ、d ~ f は $\times 40$ の対物レンズを使っている。写真にみられるように、抗酸染色では生菌と死菌を区別することは困難である。生菌は比較的濃染するが、c のように両者が混在する場合の判別は不可能である。

一方、FDA/EB 染色では、生菌はすべて黄緑色に (d)、死菌はすべて赤橙色に (e) 発色し、両者の混合では黄緑色の菌と赤橙色の菌がはっきりと区別できた (f)。図には示さないが、生菌と死菌の割合を変えると緑色の菌と赤い菌の割合もそれに応じて変化した。小川培地上の古いコロニー (数カ月保存) には赤い菌が多く、新しいコロニー (4 週培養) には黄緑色の菌が多いことが知られた。これらの事実は、結核菌においても FDA/EB 染色法により、生細胞と死細胞の判別が可能であることを示している。

結核菌のエステラーゼ活性については、山村らの報告³⁾、および Cohen らの報告⁴⁾にあるように、その存在が明らかにされている。したがって、酵素活性を持つ生菌のみが、FDA を分解蓄積して、緑色の蛍光を示したものと理解できる。死菌はその能力がないため、EB の赤色を呈するのみである。この結果は、動物細胞や原虫でみられた結果と一致する。結核菌の生死の鑑別は、室橋ら⁵⁾の染色法による報告があるが、一般に用いられるに至らなかった。

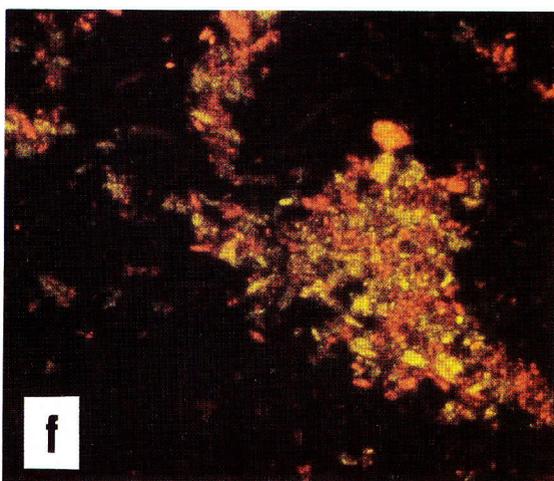
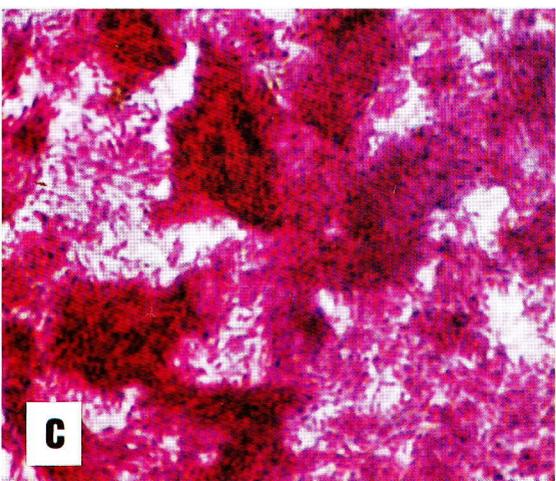
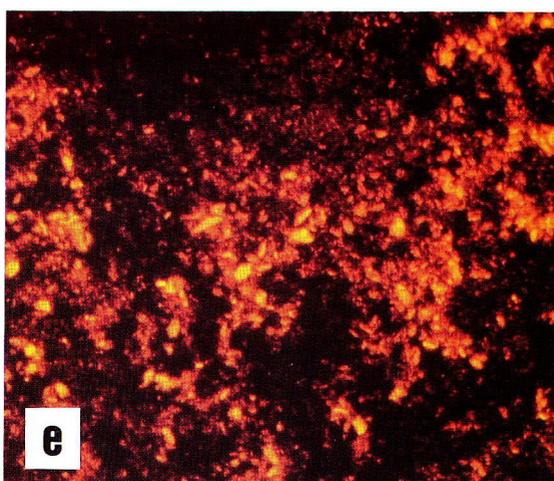
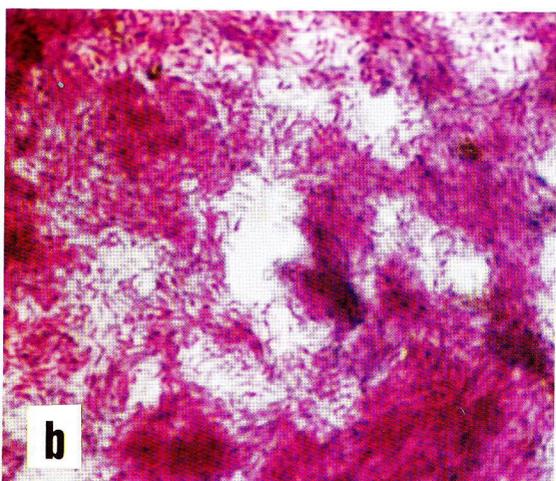
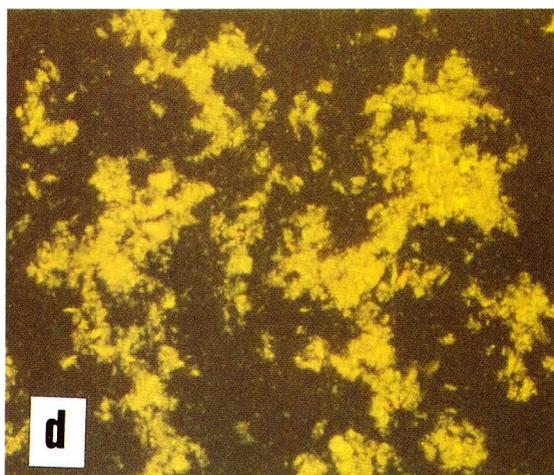
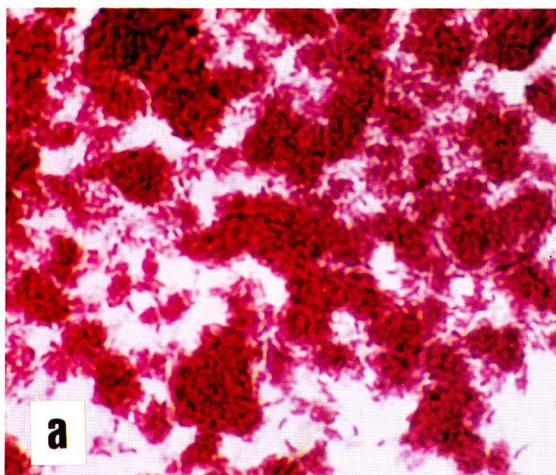
FDA/EB 染色法は極めて簡便で再現性のある方法で、抗酸染色とあわせて利用すれば、喀痰からの検出菌の生死鑑別や、*in vitro* の抗結核剤の殺菌効果の判定などに広く応用できるものと思われる。酵素活性が鑑別の基準になるため、静菌効果が問題となる場合にコロニー形成との不一致が生ずる可能性や、消毒薬の効果と平行するか否かなどまだ多くの問題点を残しているが、著者らは UV 照射した BCG 菌が FDA 染色性を失うことを確認しており (未発表)、薬剤の効果についても検討中である。今後、いろいろな条件を設定して FDA/EB 染色法の有効性を確認していきたい。

謝 辞

有益な御討論を頂きました当研究所の高橋宏先生、結核研究所の戸井田一郎先生に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Rotman, B. & B. W. Papermaster : Mem-



- brane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters, Proc Natl Acad Sci US, 55 : 134-141, 1966.
- 2) Jackson, P. R., M. G. Pappus & B. D. Hansen : Fluorogenic substrate detection of viable intracellular and extracellular pathogenic protozoa, Science, 227 : 435-438, 1985.
 - 3) 山村雄一, 小倉克彦, 今津史郎 : 結核菌及び各種抗酸菌のエステラーゼについて (第1報), 結核, 28 : 51-54, 1953.
 - 4) Cohen, S., J. B. Kushnick & C. V. Purdy : Observations on mycobacterial esterases with a series of synthetic substrates, J Bacteriol, 66 : 266-273, 1953.
 - 5) 室橋豊穂 : 結核菌の染色—malachite green—Fuchsin 法をめぐって—, 結核研究の進歩, 26 : 16-24, 1959.