

原 著

FDA/EB 染色法による結核菌の生死判別とコロニー形成能

木ノ本 雅 通 ・ 竹 川 真理子 ・ 中 村 玲 子

国立予防衛生研究所細胞免疫部

受付 平成2年11月5日

CONSISTENCY IN VIABILITIES OF MYCOBACTERIA DETECTED BY FDA/EB STAINING AND COLONY FORMING UNITS ON THE MEDIUM

Masamichi KINOMOTO*, Mariko TAKEKAWA and Reiko M. NAKAMURA

(Received for publication November 5, 1990)

We have previously reported that the staining of mycobacteria with fluorescein diacetate (FDA) and ethidium bromide (EB) detects viable bacteria and distinguish them from heat-killed bacteria¹⁾. Whether this method can be applied to clinical specimens has been an important question. In the present experiment, we treated mycobacteria with either UV-irradiation, 70% ethanol, 0.2% benzalconium chloride, 5% saponated cresol solution, or 5% phenol for 24 hours, and stained with FDA/EB to evaluate the effect of sterilization. We also stained samples of sputum from a tuberculosis patient with FDA/EB after treatment with 4% NaOH for 30 min. and neutralized with 1N H₂SO₄. All the samples were determined for the colony forming units on 1% Ogawa egg media. A good correlation was observed between the results of FDA/EB staining and colony formation. We believe that FDA/EB staining is useful method to detect viable mycobacteria in clinical samples.

Key words : Mycobacteria, FDA/EB staining, Viability

キーワードズ : 抗酸菌, FDA/EB 染色, 生死

緒 言

われわれは既に FDA/EB 染色法により, BCG の生菌と死菌を判別できることを報告した¹⁾。この染色法は生細胞がエステラーゼにより FDA を分解して緑色の蛍光物質を細胞内に蓄積する反応を利用したものであるが, この判別法が加熱による死菌のみでなく, 消毒薬や UV による殺菌をも生菌と区別することができるか, また実際の患者材料中の生菌を検出することができるか, は重要な問題点であった。今回, われわれはこれらの疑問に

答える目的で, 各種の殺菌法により処理した菌液につき FDA/EB 染色と還元培養によるコロニー形成の結果を比較した。その結果, FDA/EB 染色法は生菌の検出法として信頼できる方法であると考えられるので報告する。

材料と方法

抗酸菌 : *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 株の凍結乾燥ワクチンを 20mg/ml の生理食塩水懸濁液とし, これを生菌材料とした。同じ菌液を 100°C 30 分間加熱したものを死菌材料とした。

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

患者材料：結核患者の喀痰を用いた。抗酸染色（Ziehl-Neelsen）で抗酸菌を確認したところガフキー9号であった。喀痰を4% NaOHで処理し、 $1\text{NH}_2\text{SO}_4$ で中和して用いた。

消毒薬：70%エチルアルコール、0.2%塩化ベンザルコニウム、5%クレゾール石鹼液、5%フェノール液を用いた。処理時間は各々24時間とした。

UV照射：菌液を35mmプラスチックシャーレに1ml加え、7cmの距離から殺菌灯（15W）で1分間、10分間および24時間照射した。

FDA/EB染色：Fluorescein diacetate (FDA, Sigma) は5mg/mlの濃度でアセトンに溶解し、分注して -20°C に保存した。Ethidium bromide (EB, Sigma) は20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でPBSに溶解し、 -20°C に保存した。使用に際し、FDAは20 μl を1mlのPBSに、またEBは50 μl を1mlのPBSで希釈して用いた。染色は希釈したFDAとEBをそれぞれ25 μl ずつ、プラスチック・チューブ（Falcon 2054）にとり、これに検体（菌液）50 μl を加えてよく混ぜ、室温に2分間放置した。

検鏡：染色した材料を枠付スライドグラス（松浪S-6113界線なし）に1滴とり、18 \times 18mmのカバーグラスをかけて直ちに、蛍光顕微鏡（オリンパスBH2-RFL）でブルーフィルターをかけて検鏡した。

還元培養：菌液を適宜希釈し、1%小川培地に0.1mlを接種し、 37°C 4週間培養してコロニー形成の有無を観察した。

結 果

消毒薬の殺菌効果の判定：アルコール、クレゾール、およびフェノール処理菌液には、FDA/EB染色で緑色の蛍光を発する生菌は認められなかった。これらの菌液

の還元培養にはコロニーが出現しなかった。しかし、0.2%塩化ベンザルコニウム処理の菌液には、FDA/EB染色で緑色に光る菌が赤色に染まった死菌の中に見出され、還元培養でもコロニーが出現した。これらの結果は、FDA/EB染色が生菌の存在を示す確実な染色法であることを示していると同時に、FDA/EB染色により消毒薬の殺菌効果を判定することができることを示している（表）。対照として用いたBCG生菌液はほぼ100%FDAで緑色に染まり、死菌は100%EBで赤色に染まった。

UV照射後の菌液のFDA/EB染色と集落形成：UVを7cmの距離から1分、10分および24時間照射した材料につき、それぞれFDA/EB染色を行った。検鏡による観察に加え、顕微鏡写真につき、緑色に染まる菌と赤い菌を数えて、緑色の菌の割合を算出した。UV1分間照射後の菌は、ほとんどすべて緑色に染まった。UV10分間照射後の菌液を照射直後にFDA/EBで染色したところ、約60~70%の菌が緑色に染まっていた。ところが同じ菌液をUV10分間照射後 4°C に24~48時間保存し、それからFDA/EB染色を行うと多数の菌が赤色に染まるのが分かった。これらを還元培養すると、UV1分間照射の菌液からは対照と同程度に、培地全面を覆うコロニーが出現した。

UV10分間照射直後の菌液と、それと同じ菌液を48時間後に培養したところ、両菌液共におよそ $10^5/\text{ml}$ の生菌が認められた。照射前の生菌単位数が約 $10^8/\text{ml}$ であるのでおよそ0.1%の菌が生残したことになる。これは菌液が濃厚であったため、UVに照射されなかった菌があったと考えられる。同じ距離で24時間照射した菌液は水分が蒸発し、湿菌の状態となったが、これを滅菌水に再浮遊させて検鏡したところ、FDA/EB染色で緑色に染まる菌は認められず、還元培養でもコロニーは出

表 FDA/EB染色と還元培養成績

材 料 (処理条件)	FDA/EB染色		還元 培養
	緑色菌 (%)	赤色菌 (%)	
BCG 生菌 (無処理)	100	0	+
BCG 死菌 (加熱処理)	0	100	-
生菌 + 70%アルコール	0	100	-
生菌 + 5%クレゾール	0	100	-
生菌 + 5%フェノール	0	100	-
生菌 + 0.2%塩化ベンザルコニウム	< 10	> 90	+
生菌 + UV 1分間 (直後染色, 培養)	> 90	< 10	+
生菌 + UV 10分間 (直後染色, 培養)	> 60	< 40	+
生菌 + UV 10分間 (1日後染色)	< 40	> 60	(せず)
生菌 + UV 10分間 (2日後染色, 培養)	< 20	> 80	+
生菌 + UV 24時間 (直後染色, 培養)	0	100	-

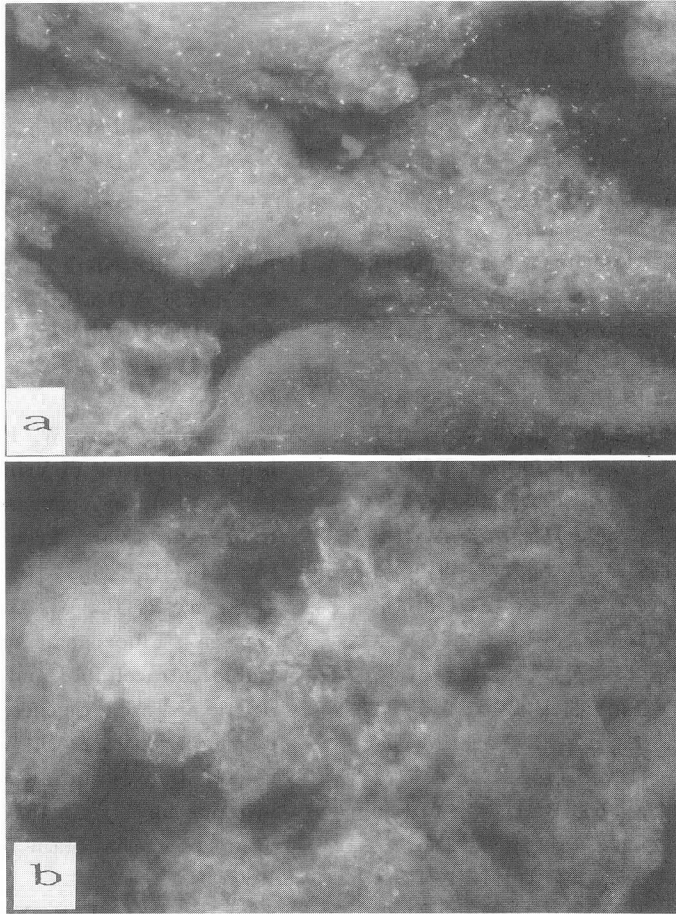


図1 喀痰材料のFDA/EB染色

緑色の蛍光を発する菌はよく見えるが、赤染色の死菌は喀痰材料中の粘液と区別できないので、写真には見えない。

現しなかった(表)。

このように、UV照射直後にFDA/EB染色を行うと、還元培養の結果と定量性の点で矛盾することが分かったが、これは菌体内に残存するエステラーゼ活性により、FDAの還元が起こるためと理解できる。照射後48時間以上たつと、エステラーゼ活性が極めて低下して、FDA/EB染色で生菌と認められる菌の数が減少する。

患者喀痰中の結核菌：ガフキー9号の喀痰0.3mlをファルコン・チューブ(F2059)にとり、常法に従って4%NaOHを等量加えて30分間処理した²⁾。この材料を中和するに当たり、pH指示薬(ブロム・チモール・ブルー(BTB))を1滴加え、pHの判定を容易にした。1N H₂SO₄を約0.25ml加えてよく攪拌し、さらにBTBの標準液に比較しながら0.1N H₂SO₄で微調整してpH7になるように修正した。中和後の材料50 μ lをとり、FDA/EB染色をチューブの中で行い、染色後の

試料を裨付スライドグラスに1滴をとり、カバーグラスをかけた。これまでの操作はすべて安全キャビネットの中で行った。FDA/EB染色により、この喀痰には赤く染まった粘液の中に多数の緑色の蛍光を発する桿菌の存在が認められた。球菌は認められず、アルカリ処理により雑菌は除去されたものと見られた(図1-a)。なお、この材料は還元培養で強陽性を示した。またこの材料を加熱処理後FDA/EB染色したものには緑色に光る菌は全く認められなかった(図1-b)。

考 察

FDA/EB染色法は既に述べたように生細胞がエステラーゼでFDAを分解して緑色の蛍光物質を細胞内に蓄積することを利用した生細胞の鑑別法であり^{3,4)}、抗酸菌の生死判別にも利用できる。さらにこの染色法が実際の臨床検査に利用できるかが、われわれの興味の対象で

あったが、今回の実験の結果、FDA/EB 染色による生菌死菌の判別と、小川培地での還元培養結果は一致し、また喀痰材料からも生菌が検出できることから、この染色法が実地に応用される可能性が十分あると考えられた。

われわれの行った方法は、喀痰材料の処理から染色までの操作を安全キャビネットの中で行い、遠心操作などもせずに行うことができ、また枠付きのスライドグラスを用いて、生菌材料が流れ出る危険をなくし、安全性に十分、配慮している。ここで強調したいのは、染色に際して、アルカリ処理した材料を確実に中和することが重要であるという点である。試料がアルカリ性の場合は顕微鏡視野は全体が蛍光を発し、菌が判別できない。また酸性では視野全体が暗くなり同じく、菌の判別が困難である。そこでBTBを加えて色調の変化をみながらpH7に調整することを工夫したところ、簡単でかつ再現性のある結果を得ることができた。pHの調整は喀痰を処理する際に用いるNaOH液の当量と見合う酸を用いればよく、量的な関係は特に問題ではない。ただし中和操作にともなって、菌液が希釈されすぎると、菌の検出に不利となるのでこの点の配慮は必要であろう。

FDA/EB染色の実地応用を考えると、生菌と死菌の割合が0.1%であっても生菌を簡単に確認できるという有利さがあるが、一方、生菌と死菌の数を正確に算定することはむずかしく、生菌数は還元培養には及ばない。しかし、ガフキー数に相当する目安として、生菌が10%、50%、90%などという程度の確認は可能であり、菌の生死の迅速な判別ができる点は何より評価されるべきであろう。ただ、FDA/EB染色では抗酸菌か否かの判定はできないので、必ず抗酸染色と組み合わせて用いることが必要である。

UV照射の場合、照射直後のFDA/EB染色と還元培養の結果が定量性の点で、一致しなかったが、これはUVによる菌DNAの損傷、その結果としての菌の増殖能力の消失と、菌体内の酵素活性の消失との間に時間的なずれがあるためと考えられる。この場合、照射した菌液を4°Cに1日以上保存してからFDA/EB染色を行うと緑色に染まる菌の数は少なくなり、その呈色も弱く、すぐ褪色する。つまりFDA/EB染色による生菌の判別には、このような残存酵素活性を考慮に入れる必要があるであろう。

抗酸菌のFDA/EB染色を試みた報告はいくつかあり^{5)~10)}、特に築山らは、らい菌を用いて詳しく解析を行っている。この方法が有望と考えられていたにもかかわらず一般化しなかったのは、明瞭に染め分けるには確実な中和が必要であることと、強毒菌を生菌のまま取り扱うための安全性に問題があったためと考えられる。今回、われわれの行った手技はこれらを解決する可能性があり、今後さらに検討して臨床検査に応用される方法を開発し

たいと考えている。

謝 辞

本研究の一部は、日米医学協力の援助を得た。細胞免疫部の高橋宏先生、山崎利雄技官には材料の提供に御協力頂いたことを感謝します。

文 献

- 1) 中村玲子, 木ノ本雅通: 蛍光基質分解による抗酸菌の生死鑑別—FDA/EB染色法—, 結核, 65: 365~368, 1990.
- 2) 日本公衆衛生協会編: 結核菌検査指針, 21~24, 1979.
- 3) Rotman, B. & B. W. Papermaster: Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters, Proc Natl Acad Sci US, 55: 134-141, 1966.
- 4) Jackson, P. R., M. G. Pappus & B. D. Hansen: Fluorogenic substrate detection of viable intracellular and extracellular pathogenic protozoa. Science, 227: 435-438, 1985.
- 5) Jarnagin, J. L. & D. W. Luchsinger: The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria, Stain Technol, 55: 253-258, 1980.
- 6) Kvac, J. T. & J. R. Veras: A fluorescent staining procedure for determining the viability of mycobacterial cells, Int J Leprosy, 50: 183-192, 1982.
- 7) Kvac, J. T., G. Mungia & S. H. Strand: Staining tissue-derived Mycobacterium leprae with fluorescein diacetate and ethidium bromide, Int J Leprosy, 52: 176-182, 1984.
- 8) 築山文昭: 蛍光染色法による抗酸菌の生死判別の試み, 広島大学医学雑誌, 33: 551~567, 1985.
- 9) Tsukiyama, F., M. Katoh, T. Nomura & Y. Matsuo: Use of fluorescent staining method for determining the viability of Mycobacterium lepraemurium, Hiroshima J Med Sci, 34: 161-163, 1985.
- 10) Bhagria, A. & P. R. Mahadevan: A rapid method for viability and drug sensitivity of Mycobacterium leprae cultured in macrophages and using fluorescein diacetate, Indian J Lep, 59: 9-19, 1987.