

原 著

## FDA/EB 染色法による抗酸菌の生死鑑別の臨床応用

原 田 賢 ・ 沼 田 紀 義

(株) 三菱油化ビーシーエル・臨床細菌

受付 平成3年8月2日

APPLICATION OF FDA/EB STAINING FOR THE DETECTION OF VIABLE OR  
NON-VIABLE MYCOBACTERIA IN CLINICAL SPECIMENS

Satoshi HARADA\* and Noriyoshi NUMATA

(Received for publication August 2, 1991)

Two-hundred sputum specimens from tuberculosis patients were examined for viable or non-viable mycobacteria by a combination of fluorescein diacetate ethidium bromide (FDA/EB) staining, Ziehl-Neelsen staining, and the use of cultures in 3% Ogawa egg medium. The sputum specimens were treated with 3% NaOH for 10 min and washed in PBS. The bacteria was then harvested by centrifugation at 6,000 rpm for 5 min. Each sample was subjected to FDA/EB staining, Ziehl-Neelsen staining and cultures to compare the staining-method results and the results of colony formation.

Ziehl-Neelsen staining method revealed acid-fast bacteria in the specimens, distributed from Gaffky 1 to Gaffky 8. The number of FDA-positive specimens and culture-positive specimens were identical in all Gaffky grades, suggesting that the FDA staining method well reflected the presence of viable mycobacteria in the specimens.

We concluded that FDA staining is a valuable method to detect viable mycobacteria in sputum specimens on the first day of examination. It is therefore advantageous for doctors and patients to be immediately informed of culture results rather than waiting for several weeks.

**Key words :** FDA/EB staining, Sputum specimens, Viable mycobacteria

**キーワード :** FDA/EB 染色, 喀痰材料, 生菌

## 緒 言

従来抗酸菌染色は、一般に Ziehl-Neelsen 法、蛍光染色法などにより他の菌と区別してきた。しかし、火炎固定を実施するために抗酸菌であることは確認できるが、生菌か死菌かは確認できない。塗抹標本で、抗酸菌が認

められたとしても生菌であるか否かは、培地上のコロニーでの判定を余儀なくされてきた。特に Smear positive culture negative (SPCN) の場合、生菌がないのか、または、培地その他何らかの条件により菌が生えてこなかったのかは判定できない。また、分離培養には 4 週以上を要し、菌の同定や薬剤耐性の判定にはさらに

\* From the Mitsubishi Yuka Bio-Clinical Laboratory, Inc. 3-30-1 Shimura, Itabashiku, Tokyo 174 Japan.

時間がかかる。したがって、医師は結核を疑わせる患者にどのような治療を実施するかを決定するのが困難である。少なくとも、生菌の排菌があるか否かが速やかに判定できれば、臨床的に有利であろう。

抗酸菌は、加水分解酵素の Esterase 活性をもっている<sup>1)</sup>。蛍光物質である Fluorescein diacetate (FDA) は容易に細胞膜を通過するが、Esterase により分解されると透過性が弱い蛍光物質になり細胞内に蓄積される。

したがって Esterase 活性のある生細胞のみがこの色素に染色される。FDA 染色を用いた細胞の生死判定については、Rotman & Papermaster<sup>2)</sup> が動物細胞で、Jackson<sup>3)</sup> らは寄生虫の *Leishmania* で、築山<sup>1)</sup> は *Mycobacterium lepraemurium* と *M. smegmatis* について、中村・木ノ本<sup>4)</sup> は *Mycobacterium bovis* BCG (Tokyo 株) でそれぞれ報告した。われわれは臨床材料喀痰から抗酸菌を検出し、FDA 染色によりその抗酸菌の生菌・死菌鑑別を試み、分離培養の結果と比較検討したので、報告する。

#### 材料および方法

検体：抗酸菌染色 (Ziehl-Neelsen 染色) で陽性の患者喀痰 200 検体を用いた。同一患者から複数回にわたって供与されたものは含まれていない。すべて塗抹陽性でガフキー 1 号からガフキー 8 号までであった。喀痰は 3% NaOH で室温 10 分間処理した後、6000 rpm 5 分遠心して集菌し、15ml の PBS に浮液して再び 6000 rpm 5 分遠心した。この処置により、菌を洗浄し、懸濁液を中性にすることが可能である。最終的には 2 回目の遠心沈渣を 0.5ml の PBS に懸濁し、検体とした。

染色液：FDA/EB 染色には、Fluorescein diacetate (FDA ; Sigma 社) をアセトンで 5 mg/ml に溶解し、 $-20^{\circ}\text{C}$  に保存、使用に際して 20  $\mu\text{l}$  を PBS 1 ml にとかした。Ethidium Bromide (EB ; Sigma 社)

は PBS に 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度に溶解し、分注して  $-20^{\circ}\text{C}$  に保存した。染色にあたっては、検体 (洗浄した菌の最終懸濁液 50  $\mu\text{l}$  と FDA の希釈液 25  $\mu\text{l}$  , EB 保存液 25  $\mu\text{l}$  をプラスチックチューブ内で混ぜ、室温で 2 分間放置した後、蛍光顕微鏡 (Olympus BH-2) で blue filter (波長 515 nm) で観察した。対物レンズは  $\times 100$  を用いた。Ziehl-Neelsen 染色液は Günther の変法を用いた。

菌の生死判定：生菌はエステラーゼ活性があるため FDA が速やかに正常細胞に浸透、細胞内に生成、蓄積された fluorescein は強い黄緑色の蛍光を発する。これに対して死菌は、FDA 分解物質の蓄積がなく、EB が傷害された細胞膜を通過して細胞内に入り、核酸と結合して赤く染まり、容易に区別される。しかし、中には極めて薄い黄色を呈する菌があり判定が困難であるが、緑色の蛍光を発していないものは少なくとも生菌ではないとみなした。

#### 結 果

検体による生菌の比率の差：塗抹判定で同じガフキー号数であっても、FDA/EB 染色による生菌、死菌の比が著しく異なるものがみられた。図 1 と図 3 はガフキー 6 号の同一検体をそれぞれ Ziehl-Neelsen 染色と FDA/EB 染色したものであるが、FDA/EB 染色で明るく光っている菌 (染色=生菌) が多数あることが認められる。視野にみられる明るい菌の数は、Ziehl-Neelsen 染色の場合の菌の数とほぼ同程度である。

これに対して図 2 と図 4 はガフキー 4 号の検体を 2 分して Ziehl-Neelsen 染色、FDA/EB 染色を施したものであるが、FDA/EB 染色で明るく光っている菌の数は、Ziehl-Neelsen 染色でみられる菌数よりもはるかに少ない。白黒写真では赤く染まっている菌 (死菌) はほとんど見えないが、実際の観察では EB で赤く染まっ

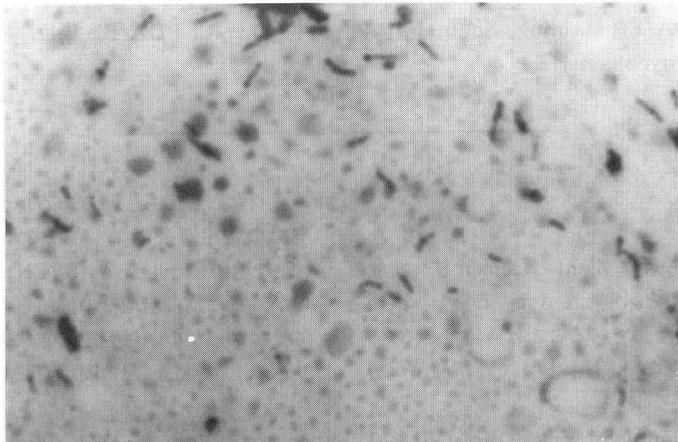


図 1 ガフキー 6 号の検体、Ziehl-Neelsen 染色

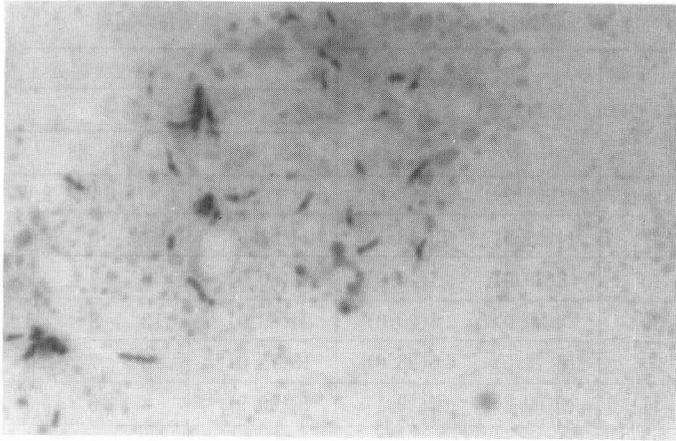


図2 ガフキー4号の検体, Ziehl-Neelsen 染色

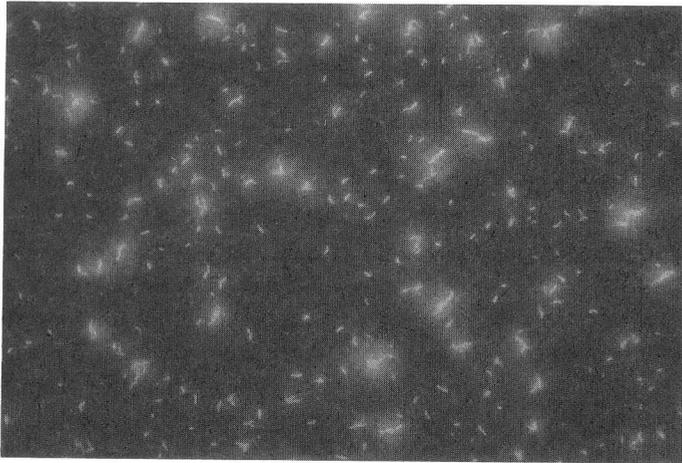


図3 ガフキー6号の検体, FDA/EB 染色  
ほとんどすべての菌は生菌である。

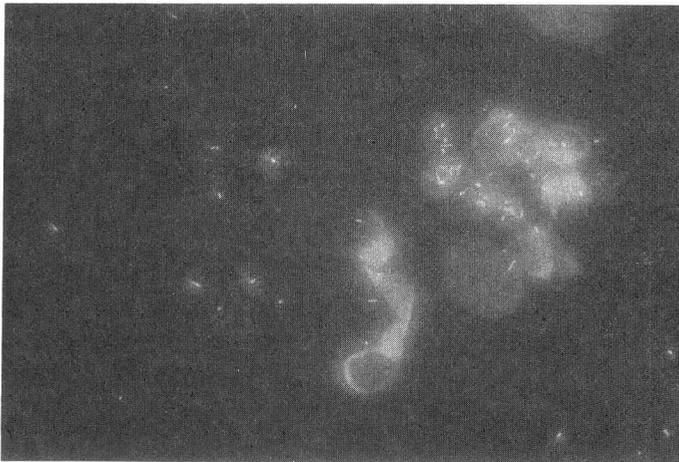


図4 ガフキー4号の検体, FDA/EB 染色  
生菌もあるが, 死菌(赤く染まる菌)の割合が多い標本である。赤い菌は, この写真では見えない。

表 喀痰材料の抗酸菌の FDA 染色と分離培養の結果

検 体		F D A 染色		培 養				
				陽 性 例			陰 性 例	
				総数(%)	内 別			
ガフキー号数	検 体 数	陽性例(%)	陰性例(%)	8 W まで(%)	4 W	6 W	8 W	8 W まで(%)
1	27	14(51.9)	13(48.1)	14(51.9)	2	5	7	13(48.1)
2	10	3(30.0)	7(70.0)	3(30.0)	0	2	1	7(70.0)
3	30	24(80.0)	6(20.0)	24(80.0)	12	8	4	6(20.0)
4	20	15(75.0)	5(25.0)	15(75.0)	8	7	0	5(25.0)
5	11	10(90.9)	1(9.1)	10(90.9)	4	6	0	1(9.1)
6	43	42(97.7)	1(2.3)	42(97.7)	38	3	1	1(2.3)
7	21	20(95.2)	1(4.8)	20(95.2)	16	4	0	1(4.8)
8	38	36(94.7)	2(5.3)	36(94.7)	34	2	0	2(5.3)
総 数	200	164(82.0)	36(18.0)	164(82.0)	-	-	-	36(18.0)

た菌が視野に多数認められた。上掲の表で判定不能とした例は、生菌と認められる菌が1個も見いだせなかった例である。

FDA 染色の結果と培養成績：Ziehl-Neelsen 染色で抗酸菌を確認したガフキー1号からガフキー8号までの検体(200人の患者の喀痰材料)につき、FDA 染色による生菌の有無と、小川培地での分離培養の結果を比較した(表)。

検体はアルカリ処理後遠心集菌してPBSで洗浄し、FDA/EB染色を行うと同時に一部で再度Ziehl-Neelsen染色して抗酸菌の存在を確認した。FDA染色で緑色に染まる生菌を確認したものは陽性とし、薄黄色の菌があっても緑色の蛍光を発していないものは陰性とした。FDA/EB染色を行った同じ検体の一部を小川培地に培養し、4, 6, 8週にコロニーの出現を観察し、コロニーが1個以上出現したものを陽性とした。

表には4週でコロニーを認めた例数、6週で初めてコロニーを認めた例数、8週で初めてコロニーを認めた例数を記録してある。8週で観察を打ち切った。

表にみられるように、ガフキー1号の検体27例中、FDA染色陽性、即ち生菌を認めたのが14例であり、一方、培養陽性も14例であった。ガフキー2号～8号のいずれの場合も、FDA染色で生菌を認めた検体数と、培養陽性検体数は完全に一致した。

## 考 察

FDA染色による生菌検出数と培養による生菌検出数は、完全に一致した。この結果により、FDA染色は生菌を検出し、培養の結果を十分な信頼度をもって予測するこ

とができると考える。FDA染色は抗酸菌の生死を判別するのに適しており、4～8週後の培養の結果を培養初日に予測することが可能である。検査の即日に生菌があるかどうか判定できるので、治療のために有用な情報を迅速に送ることができ、検査室レベルで今後活用できる方法であると思われる。われわれは遠心操作で集菌することにより、ガフキー1号という微量の菌を有する検体でも、FDA/EB染色による判定を可能とした。しかし、結核生菌を扱うので、安全性に関してさらに検討が必要であろう。

FDA染色で生死の判定が不能であった薄黄色の菌を含む検体は、結果的には培養陰性であった。化学療法を長く続けている患者の喀痰にはこのような菌が見られ、一方、化学療法を始める前の患者材料には強い緑色蛍光を発する菌が多く認められた。今後、化学療法を行っている患者の治療経過予後とFDA染色との関連は極めて興味ある点で、同一患者について経過を追いながら検査結果と対照していくことを考えている。

## 謝 辞

本稿を終えるに臨み、終始FDA/EB染色法の手技の教示と原稿の推敲に対して御懇切な御指導を賜りました、国立予防研究所細胞免疫部・結核室長中村玲子先生および木ノ本雅通先生に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 築山文昭：蛍光染色法による抗酸菌の生死判定の試み、広島大学医学雑誌、33：551～567、1985。
- 2) 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.

3) Jackson, P. R., M. G. Pappus & B. D. Hansen : Fluorogenic substrate detection of

viable intracellular and extracellular pathogenic protozoa, Science, 227 : 435-438, 1985.

4) 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.