

原 著

バイオハザード対策を考慮したスライド法
による抗酸菌の生死鑑別検査法の開発

木ノ本雅通

国立感染症研究所細菌・血液製剤部

DEVELOPMENT OF SLIDE-METHOD TO DISTINGUISH ALIVE AND
DEAD MYCOBACTERIA BY FLUORESCENT STAINING

— A Trial for Solving the Biohazard Problem in TB Laboratories —

*Masamichi KINOMOTO

*Department of Bacterial and Blood Products, National Institute of Infectious Diseases

An acid-fast staining can detect mycobacteria in clinical specimens rapidly and specifically. It equally stains living and dead bacteria.

It would be of more clinical use if the viability of mycobacteria in a sample was determined by the staining. In the present paper, the problems of FDA/EB staining, which detects live or dead bacteria, were solved by establishing a new technique, a slide-method.

An air-dried smear of *Mycobacterium bovis* BCG (Tokyo 172) on a glass slide was covered by a filter paper fully soaked in the staining solution (500 μ g FDA and 40 μ g EB per ml PBS). This was kept in an incubator at 37°C for 20 min. The filter paper was removed after incubation and the slide was examined using a fluorescent microscope with a blue filter. Live bacteria were stained greenish yellow taking the FDA stain in while dead bacteria were stained red with EB. This new slide technique eliminated the problems associated with FDA/EB staining. Moreover, stained smears appeared to be more stable compared with the conventional tube method.

To overcome the biohazard problems in smear examination of tubercle bacilli, heating of the slides on a heat block at 100°C for 20 min or passing air dried smears in a flame 5 to 30 times was tried to kill the bacteria. The heat-treated slides were stained with FDA/EB and the number of green and red bacteria were counted. Samples of the smeared bacteria were taken after heating and cultured on a solid medium to determine the presence of any colony-forming unit.

It was found that no CFU was observed after heating and the morphology of the stained sample was the same to that before heating.

These facts suggest that the above mentioned method is a simple, safe yet inexpensive

*〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1

* Gakuen 4-7-1, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011
Japan.

(Received 27 Jan. 1999/Accepted 18 May 1999)

diagnostic tool for mycobacterial clinical specimens.

Key words : Mycobacteria, Rapid diagnosis, Fluorescein staining, Esterase activity, Slide method

キーワード : 抗酸菌, 迅速検査, 蛍光染色, エステラーゼ活性, スライド法

緒言

結核症は、単一の感染症としては世界で患者死亡数の最も多い疾患であり、その数は年間約300万人と推定されている¹⁾。特に、アジアおよびアフリカ地域を中心とする発展途上国では結核死亡率の高さは、わが国の1950年代に相当する現状にある²⁾。一方、工業先進国においても HIV 感染の蔓延や世界的な交通網の発展に伴い、結核感染の機会が増大するとともに、近年は非定型抗酸菌症や薬剤耐性結核菌の出現により、新たな予防・治療対策が急務となっている³⁾。

基本的結核対策のひとつは、患者材料からいかに迅速に菌を検出するかということであろう。近年、遺伝子操作技術および生化学的応用した抗酸菌の迅速検出法が開発され、一部はすでに臨床検査⁴⁾に導入されている。しかしながら世界ではこれらの最新技術が従来法としての塗抹法や培養法にとってかわる現状にはない。これら従来法の簡便かつ安価であるという特長を活かした新たな検査法の開発も期待されている³⁾。

従来の塗抹検査法は抗酸性染色により抗酸菌を迅速に確認することはできるものの、その菌の生死は判別できないので、生菌の確認には数週間を要する培養法による集落の発現を待たなければならない。このことより古くから、塗抹標本で直接、結核菌の生死を判別する試み⁵⁾がなされてきたが、それが日常の臨床検査に導入されることはなかった。

Rotmanら⁶⁾は動物細胞を用いて蛍光基質のひとつである fluorescein diacetate (FDA) 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、これが細胞内に蓄積されることにより蛍光顕微鏡下で生細胞のみが緑色の蛍光を発して観察されることを報告した。その後、この原理を Jarnagin⁷⁾らをはじめ、Kvachら⁸⁾は FDA/EB 染色法として抗酸菌に適用し、築山ら⁹⁾はそれを追試するとともに詳細な解析を行い、また著者ら¹⁰⁾も喀痰材料を用いて、この染色法が臨床検査における結核菌の迅速検出法として有用であることを報告した。しかしながら、これまでの小試験管内で染色する方法(チューブ法)は被検材料が希釈されること、染色標本の保存ができないこと、観察時におけるバ

イオハザード対策などの点で実用性に欠ける面があった。本報ではこれらの問題点を解決し、塗抹標本で抗酸菌の生死を迅速かつ安全に判別するための実用的な臨床検査法を検討したので報告する。

材料および方法

抗酸菌 : *Mycobacterium bovis* BCG (Tokyo 172株) の真空凍結乾燥菌を生理食塩水で20mg/mlの濃度に再浮遊させたものを生菌とし、目的に応じて適宜、希釈して実験に供した。また菌液の一部を分け取り、100℃で30分間煮沸したものを死菌とした。さらに両者を等量に混合したものを調製し、生死混合菌として実験に供した。これらは1%小川培地に接種し、37℃で4週間培養して生死を確認するとともに、定量培養法により生菌単位数を算定した。

蛍光基質と保存染色液(原液) : 蛍光基質としては、fluorescein diacetate 粉末 (FDA, Sigma F-7378), ethidium bromide 粉末 (EB, Sigma E-8751) および propidium iodide 粉末 (PI, Sigma P-4170) を準備した。FDA は、5mg/mlの濃度でアセトンに溶解した。EB および PI は、死菌などの染色液として phosphate buffered saline (PBS) でそれぞれ2mg/ml および1mg/mlの濃度に調製した。PI は EB に代わる染色液として検討した。これらの染色液は原液として1ml用プラスチック製マイクロチューブに適量を小分けし、密栓して-20℃で遮光保存した。この保存条件で各原液は、少なくとも2年間実験に使用できた。

蛍光染色液の調製 : 実験の都度、各原液を PBS で希釈して蛍光染色液とした。スライド法には、FDA 原液を10倍に(500 μ g/ml)、EB 原液を50倍に(40 μ g/ml)、PI 原液を10倍に(100 μ g/ml)それぞれ希釈した。チューブ法には、FDA 原液を50倍(100 μ g/ml)、EB 原液を20倍(100 μ g/ml)に希釈して用いた。なお、チューブ法では PI を使用しなかった。希釈染色液はあらかじめ、適当な容器(小チューブあるいは小型シャーレ)に必要な量を等量に混合しておき、手順の簡素化を図った。これらの蛍光染色液は冷暗所保存で約6時間は実験に使用できた。

スライド法による染色 : この方法は染色標本の保存、

材料の希釈回避およびバイオハザード対策を意図して考案した塗抹蛍光染色法である。被検菌液を径3mmの白金耳でスライドガラス(MATSUNAMI, 76×26mm, MASコート付き)に径約10mmに拡げ、室温で自然乾燥させた。染色は、混合染色液を十分に含ませた濾紙片(定性濾紙No.1, アドバンテック東洋, 約15mm正方形に切断)を乾燥した塗抹標本に静かに載せ、37℃の孵卵器内で濾紙片が完全に乾燥するまで(約20分間)静置して行った。乾燥した濾紙片は標本から自然に剥離するが、剥離しない場合でも力を加えずにピンセットで簡単に取り除くことができた。封入には、市販の無色ネイルエナメル(成分: オキシベンゾン, ハイム化学)を用い、菌の塗抹面にエナメルが直接触れないように注意しながら、あらかじめその周囲を薄く数ミリの幅で囲い、エナメルを自然乾燥させた後、カバーガラスを接着し、さらに同じエナメルでカバーガラスの周辺を固着して封じた。

チューブ法による染色: これは、Kvachら⁸⁾の原法を一部改変した方法である。小チューブ(FALCON No. 2054, BECTON DIKINSON)を用い、菌液50 μ lと混合染色液の50 μ lを混和し、室温で2分間静置して染色した。ついで材料の一滴をスライドガラスに滴下し、カバーガラスをかけて染色標本とした。

染色標本の観察: 染色標本の観察は、落射型蛍光顕微鏡(Olympus, BH2-RFL)を用い、水銀ランプ(USHIO INC, USH-102 D)を光源としてブルーフィルター(ダイクロイックミラー, DM500, B-G)および補助吸収フィルター(0-515あるいは0-530)の下で行った。FDAを分解して黄緑色の蛍光を発する桿菌は、菌体内にエステラーゼ活性を有する生菌、EBまたはPIにより赤橙色に染色される桿菌を死菌と判定した。

塗抹標本の加熱処理: 加熱処理は、スライド法による塗抹標本について行い、エステラーゼ活性が維持された状態で集落形成能を抑制する条件を把握することを目的とした。方法は、ブンゼンバーナーで火焰加熱を行う場合と電気加温装置(Dry Thermo Unit, DTU-2C, TAITEC Co.)を用いる場合の2通りで試みた。火焰加熱は材料の塗抹面を上側にした状態で毎秒1回の速さで最低5回から最高30回まで火焰を通過させて処理した。電気加熱では100℃に設定した装置のプレート上に塗抹標本を静置し、それにアルミ箔を被せた状態で最短5分から最長5時間まで加熱処理を施した。

加熱材料の培養と染色: 加熱処理標本から還元培養による菌の検出と蛍光染色による染色性を観察した。還元培養は、スライドガラスに固定されている被検材料に70 μ lのPBSを滴下し、固着している菌をマイクロピペットの先端で剥離、再浮遊させ、懸濁した菌液を1%小川培地に20 μ l宛接種し、37℃で4週間静置して行った。

蛍光染色は、培養材料採取後のスライドガラス上に付着、残存している菌液を室温で再乾燥させ、前述のスライド法により行った。

結 果

1. 染色結果

チューブ法によるFDA/EB染色の場合は、染色直後の標本では生菌と死菌が鮮明に判別できる⁸⁾が、染色後約30分放置してから検鏡すると、図1(文末カラー頁)のように生菌(A)、死菌(B)および生死混合菌(C)の各標本とも、FDAの非特異的水解により菌液全体の緑色蛍光が強くなり、生菌と死菌の識別は困難な状態となる。一方、スライド法によるFDA/EB染色標本は、図2(文末カラー頁)の生菌(X)、死菌(Y)および生死混合菌(Z)に示す通り、染色7日後においても、チューブ法で生じたような色調の変化はなく、黄緑色の生菌と赤橙色の死菌が、染色直後の標本(図には示していない)と同様に明瞭に識別することができた。

この染色標本をさらに放置(室温)しておくと、死菌等の赤色は褪せし黄変するが、緑色に蛍光染色された菌は1カ月後においても識別は可能であった。なお、スライド法のFDA/EB染色標本を抗酸性染色(Ziehl-Neelsen法)で重染色を試みたところ、菌は赤く抗酸性に染まることが分かった。このことは、同一の塗抹標本で菌の生死判別と抗酸性の同定が同時にできるスライド法の利便性を示している。

2. 加熱処理材料の還元培養と染色結果

1) 火焰による加熱処理標本

加熱条件の検討結果: 表1に、抗酸性染色法に準じた操作で火焰中を5回通過させた生菌液(10mg/ml)の塗抹標本におけるエステラーゼ活性と集落形成能を調べ

表1 塗抹菌のエステラーゼ活性と集落形成能に及ぼす火焰処理の影響

塗抹標本No.	エステラーゼ活性 (FDA/EB染色法)	集落形成能 (還元培養法)
1	+	+
2	+	+
3	+	+
対 照	+	+

塗抹菌: *M. bovis* BCG 生菌液(濃度10mg/ml)

火焰処理: 塗抹標本を火焰中に5回通過

エステラーゼ活性: 黄緑色に蛍光染色された菌

集落形成能: 塗抹標本上の材料を還元培養

対照: 火焰処理しない生菌塗抹標本

表2 塗抹菌のエステラーゼ活性の持続と集落形成能に及ぼす火焰処理の影響

火焰処理 回数	集落形成能 (37℃, 4週)	エステラーゼ活性と持続			
		火焰処理後の経過時間			
		直後	3	24	72
10	+	+	+	+	+
20	-	+	+	+	+
30	-	+	+	+	+
対照	+	+	+	+	+

塗抹菌: *M. bovis* BCG 生菌液 (濃度10mg/ml)
 集落形成能: 火焰処理直後の塗抹標本材料を還元培養
 エステラーゼ活性: 黄緑色に蛍光染色された菌
 対照: 火焰処理をせずに室温放置した生菌塗抹標本

表3 火焰処理前における被検材料の状態とその火焰処理後の染色性

染色性 [FDA/PI 染色]	被検材料の状態と染色結果				
	液状	湿菌	乾燥	対照 1	対照 2
緑染菌 (%)	>30	50	>80	>80	0
赤染菌 (%)	<70	50	<20	<20	100
計 (%)	100	100	100	100	100

材料: *M. bovis* BCG 生菌液 (10mg/ml)
 液状: 菌液滴下直後に火焰で加熱乾燥
 湿菌: 菌液塗抹直後に火焰中を20回通過処理
 乾燥: 塗抹菌液を室温乾燥後, 火焰中を20回通過処理
 対照 1: 生菌液の非加熱塗抹標本
 対照 2: 煮沸死菌液 (10mg/ml, 100℃, 20分) の塗抹標本

た結果を示す。この条件では、緑色菌(生菌のエステラーゼ活性を示す)と還元培養された集落が共に多数認められた。また、緑色菌と集落の出現頻度は火焰処理をしない対照標本とそれぞれ同程度であったことから、この加熱条件は菌に影響を及ぼさないことが分かった。

次に火焰加熱回数を増やした標本について同様に蛍光染色と還元培養を行った。その結果を表2に示す。この際、エステラーゼ活性の経時的変化の有無を調べるため、加熱処理直後、3時間後、24時間後および72時間後の各標本についても観察した。この結果、緑色に蛍光染色された菌は、火焰加熱回数および処理後の時間経過等に関わらず、すべての標本から多数認められ、菌体内のエステラーゼは相当の耐熱性のあることが示唆された。一方、加熱処理直後の標本について行った還元培養の成績では、火焰加熱20回以上では集落形成能が抑止されることが分かった。

ここで集落形成能とエステラーゼ活性の両成績が理論的に一致しなかった理由が、塗抹標本の乾燥状態(含水量)と関係があるのではないかと考え、含水量の異なる

3種の標本について検討した。すなわち、生菌液(10mg/ml)をスライドガラスに、①一滴、滴下した直後の菌液、②1白菌耳を塗抹した直後の湿菌、③1白金耳を塗抹し約10分間乾燥、の各状態で、①については火焰で加熱、②および③についてはそれぞれ火焰中を20回通過させ、染色はEBをPIに代えたFDA/PI染色で行った。

その成績は表3に示すとおり、緑色に蛍光染色された菌の全体に占める割合は、液状標本で30%、湿菌標本で50%、乾燥標本では対照1の非加熱標本と同程度の80%と観察され、対照2の煮沸死菌に緑色菌は認められなかった。この結果から、標本中の菌のエステラーゼ活性は加熱時における被検材料の水分の多寡に影響される可能性が示唆された。なお、成績には示さないが、塗抹標本の生菌濃度は染色結果に影響を及ぼさないことが分かった。

塗抹標本の菌数算定: 表4は、表1および表2に示した結果を定量的に確認するため、0.1mg/mlの塗抹標本で菌数を調べた成績である。菌数の算定にあたっては、顕微鏡の光源スポットを絞り、凝集している菌塊を避け、

表4 火焰処理による塗抹菌の集落形成能と染色標本の菌数算定

実験 No	火焰処理 (通過回数)	集落 形成能	染色性と菌数		
			緑染菌数 (%)	赤染菌数 (%)	総数 (%)
I	5	+	nd	nd	nd
	10	+	nd	nd	nd
	15	+	257 (84.8)	46 (15.2)	303 (100.0)
	20	-	268 (83.8)	52 (16.2)	320 (100.0)
	25	-	315 (84.0)	60 (16.0)	375 (100.0)
	30	-	284 (81.6)	64 (18.4)	348 (100.0)
	対照	+	274 (83.8)	53 (16.2)	327 (100.0)
II	10	nd	419 (82.8)	87 (17.2)	506 (100.0)
	15	nd	484 (83.5)	96 (16.5)	580 (100.0)
	20	nd	500 (84.8)	90 (15.2)	590 (100.0)
	30	nd	424 (80.9)	100 (19.1)	524 (100.0)
	対照	nd	397 (85.0)	70 (15.0)	467 (100.0)

塗抹標本: *M. bovis* BCG 生菌液 (0.1mg/ml, VU=4×10⁷ cfu/mg) を 5μl 塗抹

集落形成能: 塗抹菌を還元培養 (37℃, 4週)

染色法: FDA/EB 染色

nd: 染色または還元培養せず

菌が均等に分散している視野について倍率200倍で鏡検した。この結果、菌のエステラーゼ活性は、火焰加熱30回の標本で低下傾向(約81%)がうかがえたが、25回以内では非加熱対照標本と同程度(84~85%)に維持され、加熱の影響は認められなかった。なお、集落形成能は火焰加熱20回以上の処理により抑止されることが再確認された。

2) 恒温器による加熱処理標本

表5は、恒温器を用いた加熱処理標本における集落形成能と染色性を定量的に調べた成績である。集落形成能は、生菌液10mg/ml, 1mg/mlおよび0.1mg/mlの各塗抹標本について(実験Ⅲを除く)検討した。染色性は実験ⅠおよびⅡでは1mg/ml, 実験Ⅲでは0.1mg/mlの各塗抹標本について検討した。菌数の算定は火焰処理標本と同様に行った。

この結果、実験Ⅰの還元培養成績(いずれも培地3本の平均値)は、10mg/mlの塗抹標本において加熱時間が10分までは(+++)と判定されたが、20分で96個、30分で49個、45分で43個、60分で15個に減少した。生菌1mg/mlの塗抹標本では、5分で16個、10分で6.6個、20分以上の加熱では0~1個に減少した。なお、0.1mg/mlの塗抹標本では5分間の加熱処理ですでに集落は検出されなかった。

実験Ⅱでは、30分間の加熱で10mg/mlの加熱標本からのみ20個の集落が検出されたが、60分以上の加熱およ

び濃度1mg/mlと0.1mg/mlの加熱標本からは、いずれも集落すなわち生菌は検出されなかった。一方、染色結果は、実験Ⅰ、ⅡおよびⅢのすべてから多数の緑色菌が認められ、エステラーゼ活性の残存が示されたが、その割合は加熱時間の長短による差が認められた。前述の火焰処理実験と本実験ⅠおよびⅡの非加熱対照標本の成績(83~85%)を基準に、菌のエステラーゼ活性に影響を及ぼす加熱時間を推測すると、30分以上では影響が生じるが、20分以内ではそのないことが判明した。

考 察

抗酸菌は、他の細菌に比べて発育速度が遅いという特色があり、それ故に診断、治療につながる迅速検査法の開発が強く求められてきた。特に結核が蔓延している発展途上国では、迅速性に加えてコストがかからず、通常の検査室レベルで行うことができる簡便な結核菌検査法が必要とされており、本研究はこれを視野に入れ、実用に供することをめどに検討を進めた。

抗酸菌の酵素作用に関する研究^{11)~13)}は長い歴史があり、その一部は現在、抗酸菌鑑別法¹⁴⁾として利用されているが、抗酸菌に多く含まれているエステラーゼ活性を応用した検査法の開発は論じられていなかった。その理由のひとつには、エステラーゼに対応する適当な基質に関する研究報告がなかったためと推察されるが、Rotmanら⁶⁾によって示された蛍光基質 FDA の有用性は、植

表5 恒温器を用いた塗抹菌の集落形成能と染色性

実験 No.	加熱時間 (分)	塗抹菌濃度 (mg/ml)			染色性と菌数		
		と検出集落数 (CFU)			緑染菌数 (%)	赤染菌数 (%)	総数 (%)
<100℃>		10	1	0.1			
I	5	卍	16.0	0	330 (83.5)	65 (16.5)	395 (100.0)
	10	卍	6.6	0	401 (82.3)	86 (17.7)	487 (100.0)
	20	96.0	0.7	0	326 (83.0)	67 (17.0)	393 (100.0)
	30	49.0	0.3	0	311 (72.7)	117 (27.3)	428 (100.0)
	45	42.7	0.3	0	214 (56.3)	166 (43.7)	380 (100.0)
	60	15.3	0	0	169 (46.8)	192 (53.2)	361 (100.0)
	対照	卍	卍	6.6	305 (84.0)	58 (16.0)	363 (100.0)
	II	30	20.0	0	0	382 (74.0)	134 (26.0)
60		0	0	0	251 (47.9)	273 (52.1)	524 (100.0)
120		0	0	0	195 (37.1)	330 (62.9)	525 (100.0)
180		0	0	0	146 (27.0)	394 (73.0)	540 (100.0)
240		0	0	0	173 (33.0)	352 (67.0)	525 (100.0)
300		0	0	0	52 (10.0)	474 (90.0)	526 (100.0)
対照		卍	99.0	3.0	427 (83.7)	83 (16.3)	510 (100.0)
III		20				437 (84.7)	79 (15.3)
	30				409 (77.5)	119 (22.5)	528 (100.0)
	40	(培養せず)			304 (54.2)	257 (45.8)	561 (100.0)
	50				289 (48.2)	311 (51.8)	600 (100.0)
	60				290 (46.9)	328 (53.1)	618 (100.0)

塗抹標本: *M. bovis* BCG 生菌液 (VU=4×10⁷ cfu/mg, 10mg/ml, 1mg/ml, 0.1mg/ml)

検出集落数: 塗抹菌を還元培養 (37℃, 4週)

染色: 還元培養材料採取後の乾燥標本を FDA/EB 染色

菌数算定: 実験No. I および II は 1mg/ml, III は 0.1mg/ml の染色標本による

物¹⁵⁾, 哺乳動物^{16)~20)}, 細菌および原虫^{21)~28)}などの各種細胞の生死鑑別法に応用され, 近年は腫瘍細胞の薬剤効果判定^{29)~32)}にも利用されている。

蛍光物質 FDA は, 2 個のアセチル基がついた非極性の脂肪酸エステルでその性質は, 細胞膜を容易に通過して細胞内に浸透し, そこに存在するエステラーゼによって速やかに水解されて極性の fluorescein を遊離する。遊離した fluorescein は, FDA と同じような速さでは細胞内から漏出せず, 細胞内に蓄積される。しかし, 死細胞あるいは細胞膜が機械的に傷害された細胞では, そこに残存しているエステラーゼで FDA が水解されたとしても, 生じた fluorescein は細胞内に蓄積されずに細胞外へ漏出する。一方, EB は, 損傷された細胞膜では速やかに通過し, 核酸に結合して細胞を赤く染めるが, 正常な細胞膜に対しては極めて遅い速度でしか通過しないので死細胞を確認する各種実験^{33)~38)}に古くから汎用されている。1990年代に入り, FDA/EB 染色法を抗

酸菌の生死迅速判別に応用する研究^{39)~41)}は続けられ, 著者らもこの方法が結核菌の生死を短時間で判定できること, 手技が簡単で試薬類のコストも安価であることなどの利点を認め, これを日常の臨床検査に導入するべく改良研究を重ね, その結果を本学会で発表してきた^{42)~47)}。また, 原田ら⁴⁸⁾は, 臨床材料を用いて FDA 染色と分離培養による抗酸菌の生菌検出数が完全に一致することを報告した。このように FDA/EB 染色法の利用価値は高いが, 従来のチューブ法では染色標本の安定および生菌の取扱いに伴う安全性などに関する点で, 実用上の問題が残されていると考えられた。

本スライド法は, 蛍光染色の安定性を妨げる原因となる水分を除いた上で濾紙を用いる染色法によって生菌死菌の分別ができることを示した。同時に封入方法にも工夫を加えて, 染色標本の長時間保存を可能にした。本操作でスライドガラスに塗抹された菌が濾紙に吸着されて剥離することが懸念されたが, 抗酸菌が有するガラスへ

の強い吸着性に加え、剥離防止処理がなされているスライドガラスの使用と加熱処理により、菌はより強くガラスに固定されると考えられる。同じ材料で抗酸性染色標本と蛍光染色スライド法を比較したところ、FDA染色標本における菌数の減少は認められなかった。スライド法の染色時間は、チューブ法よりも長くなっているが、これは濾紙の乾燥に必要な時間である。さらに室温で乾燥、染色しても結果に影響はないことが知られた。染色液の濃度は、FDA、EB溶液ともに比較的濃厚に調製して使用したが、染色性の良否は色素の濃度よりも両色素のバランスによる。したがって、より希薄な濃度でも染色可能と思われるので、さらに詳細な検討が必要であろう。なお、細胞傷害性のあることで知られているEBに代えて使用したPIは、EBよりも濃度を濃くすることで同様の染色性が示され、代用が可能であったが、EBとの試薬コスト差の大きい点が難点と考えられる。FDA/EB染色法の最大の問題点は、バイオハザード対策であった。高レベルの危険度に分類⁴⁹⁾されている結核菌に接する臨床検査の場では、特にこの対策は重要である。このためには適切な設備機器の使用は当然のこととして、本染色法で期待される対策は、前述したとおり、エステラーゼ活性を低下させずに生菌の発育能を抑制することであり、このような条件に適する方法が実現可能かどうか最大の関心事であった。著者は、抗酸菌から抽出されたエステラーゼに40℃から70~80℃までの耐熱性があるとの報告⁹⁾¹³⁾に着目し、菌体内に留まっている状態のエステラーゼは、さらに高温に耐えるのではないかと考え、集落形成能との関係をみながら種々の条件で塗抹標本の加熱を試みた。その結果、表1に示したとおり、通常火焰固定では菌の発育能は抑制されないことはもとより、エステラーゼ活性が失活しないことを見いだした。さらに抗酸菌以外の細菌および喀痰等に混在する細胞のエステラーゼ活性は弱く、いったん、緑色蛍光を発しても、それは速やかに褪色することが分かった(結果は示していない)。この結果は、抗酸菌の細胞膜の特異性とエステラーゼの強力な耐熱性を示唆する知見であった。同時に、この結果は、著者らがこれまでに述べてきた「死菌はエステラーゼ活性がない」とする表現が、集落を形成しないすべての菌に適合するものではないことを示している(表2)。FDA/EB染色法は、生きた細胞がエステラーゼ活性を持つことを前提に開発されたものであるが、スライド法においてもその前提は変わらない。つまり、スライド法では加熱、乾燥する前の菌の状態を検出していることになると考えられる。本実験により、菌体内のエステラーゼ活性は加熱処理後も長時間にわたり残存し、その持続は14日後においても約50%維持されることが認められた(成績は表示していない)。加

熱前に塗抹標本を乾燥させておくことは、本法では極めて重要である(表3)。これは、水分が存在した状態で加熱すると菌の細胞膜が傷害されやすくなり、エステラーゼおよび染色液などの漏出入が起り、染色性に影響を与えるためと考えられるからである。なお、表3の成績で液状標本が対照2と同じように赤染菌が100%とはならず、緑染菌が30%程度認められたが、この理由は単に加熱時間の不足によるものと考えられる。また、乾燥標本と対照1に認められた20%程度の赤染菌は、実験材料が凍結乾燥菌であるため、凍結乾燥過程で生じた死菌の混在によるものと考えられる。事実、凍結乾燥菌で100%の生菌液は調製できない。これらの観察結果は、菌数を算定した表4の成績によって裏付けられた。火焰加熱は通常の検査室レベルで例外なく行うことができる簡単な操作といえるが、火焰の強弱あるいは通過速度などの不安定要素がある。恒温器の使用は操作と結果の安定化に有利な方法である。加熱処理条件について、最も重視されるべき安全対策の面から考察を加えると、表5に示した還元培養の成績から、加熱による菌の生存率は、加熱時間の長短はもとより菌液濃度に関係することが示唆された。濃厚菌液(10mg/ml)では、60分の加熱によっても多数の菌が還元培養されたが、1mg/mlの濃度では20分の加熱で3本のうち2本に各1個宛、30分および45分では同じく3本のうち各1本から各1個の集落が検出されたに過ぎず、これらを非加熱対照標本の成績と比較すると、20分以上の加熱によって少なくとも99%以上の菌が死滅するものと推察される。ここで、加熱処理によって菌がより強くスライドガラスに固着し、還元培養される菌数が少なくなるという可能性については、本操作に示したとおり、菌をスライドガラスから物理的に剥離することによって回避したと考えている。本実験に用いた材料の生菌単位数は 4×10^7 V. U. (viable unit)/mgで、10mg/mlまたは1mg/mlという濃度であったが、実際の臨床材料を想定すれば、このような濃厚菌液が通常検査室レベルで取り扱われることはないであろう。すなわち、実際的には1mg/ml以下の濃度と考えられるので、加熱による菌の生残率はさらに低下するものと推察され、安全性はより高まるといえよう。よって、菌のエステラーゼ活性を維持した状態で集落形成能を抑制する塗抹標本の加温器による加熱条件は、実用的には100℃、20分間の処理で十分に対応できるものと結論される。

このように、スライド法は、エステラーゼ活性を低下させずに感染の危険性を防止するという相反する条件を同時に満たしながら、同一標本を繰り返し観察できるため、患者の経過観察などに際しても役立つ手段と考えられる。さらに、被検材料は染色液で希釈されることがな

いので菌の検出率は低下せず、同じ材料で抗酸性染色との比較判定ができるなど抗酸菌の生死を迅速に判別する簡便で安全かつ安価な方法である。

今後は、機器を用いる判定法の開発や薬剤感受性テスト等への応用、あるいは未だ解決をみていない塗抹陽性/培養陰性などの問題解明への応用の可能性が考えられ、検討中である。

謝 辞

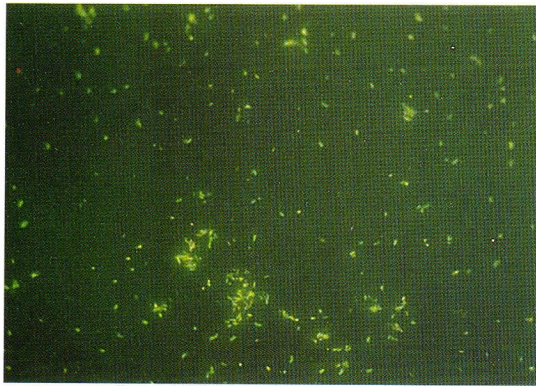
本稿を終えるに臨み、ご親切なご指導とご教示を賜りました兵庫医科大学細菌学教室 田村俊秀教授に深く謝意を表します。また、本実験の遂行と本稿の推敲にあたり、終始貴重なご助言とご協力を賜った国立感染症研究所細菌・血液製剤部長 荒川宜親博士ならびに元国立予防衛生研究所細菌部結核抗酸菌室長 中村玲子博士に厚く御礼申し上げます。

文 献

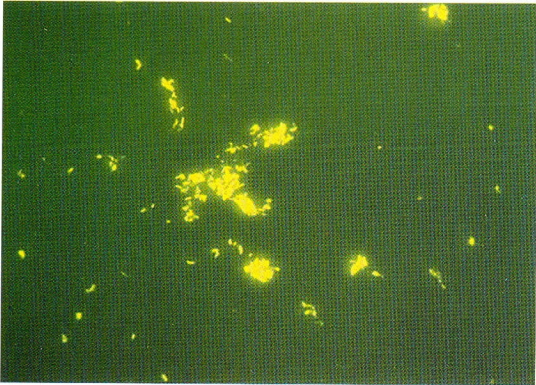
- 1) World Health Organization: Weekly Epidemiological Record, No.17, Geneva. 1997; 117-122.
- 2) 厚生省: 結核の統計, 結核予防会, 東京, 1997.
- 3) 結核予防委員会: 1990年代の結核対策および研究について. 結核. 1991; 66: 323-350.
- 4) 阿部千代治, 高橋光良, 鹿住祐子, 他: 結核菌の迅速検出・同定法. 日本細菌学雑誌. 1998; 53: 635-684.
- 5) 室橋豊穂, 吉田幸之助: 抗酸性菌の生死に関する細胞化学的研究. 結核研究の進歩. 1957; 17: 160-172.
- 6) Rotman B & BW Papermaster: Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. Proc Natl Acad Sci US. 1966; 55: 134-141.
- 7) JL Jarnagin, DW Luchsinger: The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of *Mycobacteria*. Stain Technol. 1980; 55: 253-258.
- 8) JT Kvach, JR Veras: A fluorescent staining procedure for determining the viability of Mycobacterial cells. Int J Lepr. 1982; 50: 183-192.
- 9) 築山文昭: 蛍光染色法による抗酸菌の生死判定の試み. 広島医大雑誌. 1985; 33: 551-567.
- 10) 木ノ本雅通, 竹川真理子, 中村玲子: FDA/EB染色法による結核菌の生死判別とコロニー形成能. 結核. 1991; 66: 485-488.
- 11) 戸田忠雄: 結核菌の酵素作用, 「結核とBCG (抗酸菌学)」, 南山堂, 東京, 1947, 44-46.
- 12) S Cohen, JB Kushnick, CV Purdy: Observations on mycobacterial esterases with a series of synthetic substrates. J Bact. 1953; 66: 266-273.
- 13) 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. 1953; 28: 51-54.
- 14) 厚生省: 結核菌検査指針. 日本公衆衛生協会, 東京, 1976.
- 15) JM Widholm: The use of fluorescein diacetate and phenosafranin for determining viability of cultured plant cells. Stain Technol. 1972; 47: 189-194.
- 16) J Szollosi, P Kertai, S Somogyi, et al.: Characterization of living normal and leukemic mouse lymphocytes by fluorescein diacetate. J Histochem Cytochem. 1981; 29: 503-510.
- 17) RJ Hutz, FJ Demayo, WR Dukelow: The use of vital dyes to assess embryonic viability in the hamster, *Mesocricetus auratus*. Stain Technol. 1985; 60: 163-167.
- 18) DWR Gray, PJ Morris: The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a viability stain for isolated islets of langerhans. Stain Technol. 1987; 62: 373-381.
- 19) Eleni ND, Colin JS: A fluorometric assay for determining cell growth in lymphocyte proliferation and lymphokine assays. J Immunol Methods. 1987; 105: 55-62.
- 20) Dominique S, Rudi P, Francis V, et al.: A highly reliable, sensitive, flow cyto-metric/fluorometric assay for the evaluation of the anti-HIV activity of anti-viral compounds in MT-4 cells. J Immunol Methods. 1988; 114: 27-32.
- 21) JT Kvach, G Munguia, SH Strand: Staining tissue-derived *Mycobacterium leprae* with fluorescein diacetate and ethidium bromide. Int J Lepr. 1984; 52: 176-182.
- 22) F Tsukiyama, M Katoh, Y Matsuo: Modification of the fluorescent staining method for Mycobacterial cells. Hiroshima J Med Sci.

- 1984; 33: 293-295.
- 23) Jackson PR, MG Pappus, BD Hansen: Fluorogenic substrate detection of viable intracellular and extracellular pathogenic protozoa. *Science*. 1985; 227: 435-438.
- 24) 築山文昭, 野村俊也: 蛍光染色法による乳酸桿菌の生死判定の試み. 広島医大雑誌. 1985; 33: 403-406.
- 25) PR Mahadevan, R Jagannathan, A Bhagaria, et al.: Host-pathogen interaction-new *in vitro* drug test systems against *Mycobacterium leprae*-possibilities and limitations. *Lepr Rev*. 1986; 57: 182-200.
- 26) A Bhagria, PR Mahadevan: A rapid method for viability and drug sensitivity of *Mycobacterium leprae* cultured in macrophages and using fluorescein diacetate. *Indian J Lepr*. 1987; 59: 9-19.
- 27) N Mor, M Resnick, F Sibaq, et al.: Reduction of tellurite and deesterification of fluorescein diacetate are not well correlated with the viability of *Mycobacteria*. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol*. 1988; 139: 279-288.
- 28) J Marolia, PR Mahadevan: Reactive oxygen intermediates inactivate *Mycobacterium leprae* in the phagocytes from human peripheral blood. *Int J Lepr*. 1989; 57: 483-491.
- 29) R Larsson, P Nygren: Pharmacological modification of multi-drug resistance (MDR) *in vitro* detected by a novel fluoro metric microculture cytotoxicity assay. reversal of resistance and selective cytotoxic actions of cyclosporin A and verapamil on MDR leukemia T-cells. *Int J Cancer*. 1990; 46: 67-72.
- 30) R Larsson, J Kristensen, C Sandberg, et al.: Laboratory determination of chemotherapeutic drug resistance in tumor cells from patients with leukemia, using a fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA). *Int J Cancer*. 1992; 50: 177-185.
- 31) J Neyts, R Snoeck, D Schols, et al.: Sensitive, reproducible and convenient fluorometric assay for the *in vitro* evaluation of anti-cytomegalovirus agents. *J Virol Methods*. 1991; 35: 27-38.
- 32) P Nygreg, H Fridborg, K Csoka, et al.: Detection of tumor-specific cytotoxic drug activity *in vitro* using the fluorometric microculture cytotoxicity assay and primary cultures of tumor cells from patients. *Int J Cancer*. 1994; 56: 715-720.
- 33) MJ Waring: Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol*. 1965; 13: 269-282.
- 34) JB LePecq, C Paoletti: A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. 1967; 27: 87-106.
- 35) M Eddidin: A rapid, quantitative fluorescence assay for cell damage by cytotoxic antibodies. *J Immun*. 1970; 104: 1303-1306.
- 36) DH Hollander, LE Litton, YW Liang: Ethidium bromide counterstain for differentiation of quinacrine stained interphase bodies and brilliant metaphase bands. *Exptl. Cell Res*. 1976; 99: 174-175.
- 37) WA Franklin, JD Locker: Ethidium bromide: A nucleic acid stain for tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 1981; 29: 571-576.
- 38) T Hough, P Bernhardt, RB Knox, et al.: Applications of fluorochromes to pollen biology. II. The DNA Probes ethidium bromide and hoechst 33258 in conjunction with the callose-specific aniline blue fluorochrome. *Stain Technol*. 1985; 60: 155-162.
- 39) N Ramasesh, LB Adams, Scotto GF: Effects of activated macrophages on *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun*. 1991; 59: 2864-2869.
- 40) MA Norden, TA Kurzynski, SE Bownds: Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) by flow cytometry. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 1231-1237.
- 41) SE Brownds, TA Kurzynski, MA Norden, et al.: Rapid susceptibility testing for nontuberculosis *Mycobacteria* using flow cytometry. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 1386-1390.
- 42) 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. 1989; 65: 365-368.
- 43) 木ノ本雅通, 中村玲子: 蛍光基質 FDA による結核生菌の特異的検出法. 結核. 1990; 65: 175-176.

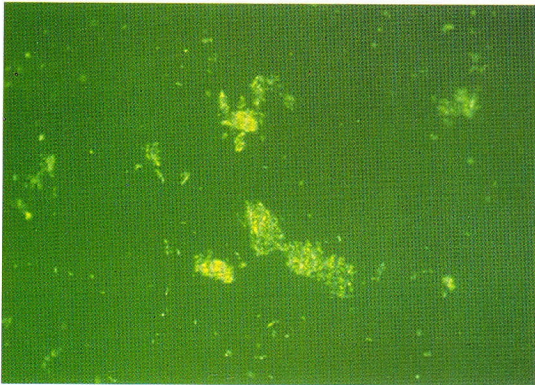
- 44) 木ノ本雅通, 中村玲子: FDA/EB 染色による抗結核剤処理菌液の染色性について. 結核. 1992; 67: 272-273.
- 45) 木ノ本雅通, 中村玲子: 抗結核薬剤感受性試験における FDA/EB 染色法の応用. 結核. 1993; 68: 266.
- 46) 木ノ本雅通, 中村玲子: 結核菌の薬剤感受性テストにおける FDA/EB 染色法の応用と染色結果の数値化の検討. 結核. 1994; 69: 276.
- 47) 木ノ本雅通, 中村玲子: 結核菌の迅速判定における FDA/EB 染色法の改良. 結核. 1995; 70: 237.
- 48) 原田 賢, 沼田紀義: FDA/EB 染色法による抗酸菌の生死鑑別の臨床応用. 結核. 1992; 67: 113-117.
- 49) 国立予防衛生研究所: 国立予防衛生研究所病原体等安全管理規程 (改定版), 1992; 19.



(A)

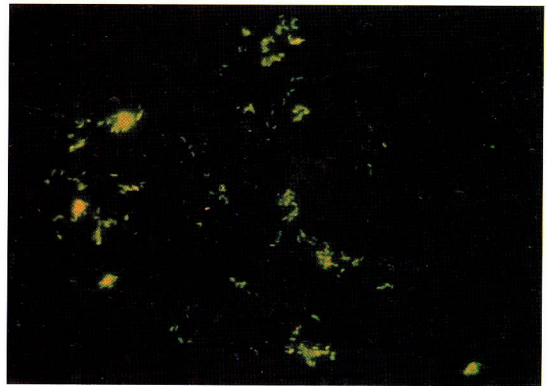


(B)

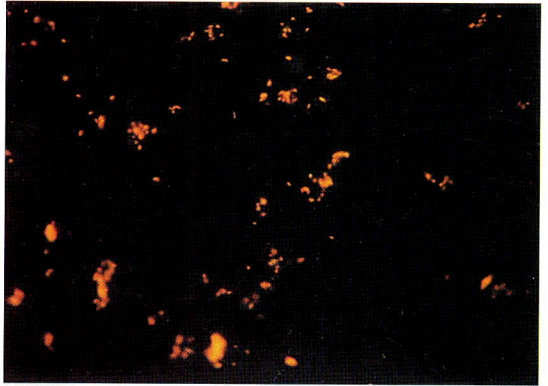


(C)

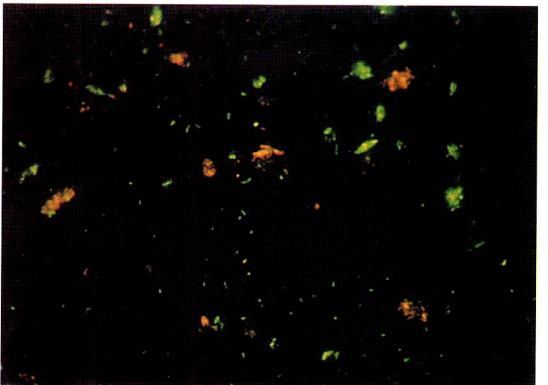
- 図1 チューブ法による *M. bovis* BCG 菌液の FDA/EB 染色30分後の標本 (倍率400)。FDA の分解によりバックグラウンドが緑色蛍光を発生し、生菌と死菌の判別が困難となる。
- (A) 生菌液：染色直後は黄緑色の菌が鮮明に識別できる。
 - (B) 煮沸死菌液：染色直後は赤橙色の菌が識別できる。
 - (C) 生死混合菌液：染色直後は黄緑色と赤橙色の菌がより鮮明に判別できる。



(X)



(Y)



(Z)

- 図2 スライド法による *M. bovis* BCG 菌液の FDA/EB 染色7日後の標本 (倍率400)。染色直後の染色性 (色調) が保持されており、生菌と死菌の識別が可能。
- (X) 生菌液：染色直後と同様、黄緑色に染色された菌を認める。
 - (Y) 煮沸死菌液：染色直後と同様、100%赤橙色に染色された菌を認める。
 - (Z) 生死混合菌液：染色直後と同様、黄緑色と赤橙色に染色された菌が判別できる。