HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Ziehl-Neelsen法, Alexander法, Hallberg法, 3染色法の比較検討及びそれらの方法並びに培養法に依る肺病巣内結核菌の検索
Author(s)	望月, 孝二; MOCHIZUKI, Koji; 永山, 能為 他
Description	
Citation	結核の研究, 3, 23-30
Issue Date	1956-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26576
Type	departmental bulletin paper
File Information	3_P23-30.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Ziehl-Neelsen 法，Alexander 法，Hallebrg 法，3 染色法の比較検討及びそれらの方法並びに培養法に依る肺病巣内結核菌の検索

望月孝二　永山能為
国立北海道第二療養所（所長　近藤角五郎博士）
北海道大学結核研究所予防部（主任　高橋義夫教授）

（受付　昭和30年11月30日）

I 緒　言

近年切除肺の細菌学的研究が進むにつれて，結核病巣中の結核菌には塗抹陽性であるにもかかわらず，培養陰性のものが相当数あることが明らかになつた。また化学療法を受けている肺結核患者喀痰においても同様な事実があることは，小川[1]，Patrick Collard,[2] 等が指摘しているが，われわれも屢々経験している。

このように化学療法，肺切除術等，肺結核治療の進歩変遷につれて，結核細菌学の面に，従来の概念では説明し得ない様な多くの事実が登場して来た。それにつれて従来の結核菌検索手技に再検討が加えられ，多くの改良工夫がなされて来た。然し塗抹染色手技の面においては，必ずしも著しい進歩があつたとはいい難い。特に肺病巣内結核菌の検索にあたつては培養の面では多くの努力がなされているにもかかわらず，塗抹染色の面では依然として Ziehl-Neelsen 法のみが行われている状態である。

然し Ziehl-Neelsen 法はその菌検出率において必しも満足すべきものではなく，結核菌の抗酸性型，非抗酸性型の鑑別にも不適当であつて，Ziehl-Neelsen 法のみをもつて化学療法の影響下にある結核菌，あるいは更に複雑な様相を呈する病巣内結核菌の検索を行うことは必しも妥当とはいえない。そこで Ziehl-Neelsen 法のこのような欠点を補う補助的染色法を考え，あるいは更に Ziehl-Neelsen 法より優れた染色法を工夫して，病的材料中の菌陽性率を高め更にそれらの菌の性状を明らかにすることが必要であろう。そこでわれわれはこの目的のために結核菌の抗酸性型，非抗酸性型の鑑別が容易であるといわれる Alexander 法[3] 及び Ziehl-Neelsen 法よりその検出率が著しく優れているといわれる Hallberg 法[4] の2染色法を取りあげて比較検討を加えた。

本実験においては先づ患者喀痰，剖検材料及び切除肺より得た病巣を材料として，両染色法による菌陽性率及び検出率を Ziehl-Neelsen 法と比較検討して，両染色法の価値を批判し，次いでこれら染色法を Ziehl-Neelsen 法に併用して結核病巣の細菌学的検索を行い，従来余り行われていなかつた病巣内結核菌の形態，染色性に特に詳細な検討を加えた。

II 実験方法

A 染色方法

1）Alexandn 法

この方法は E, G, Alexander により 1944 年発表されたもので，[3] 大体次のような手技により染色する。

1. 意注深く火焔固定
2. Ziehl の Carbol fuchsin 液で加温染色（3分間）
3. 3％塩酸アルコールで脱色（1分3～分）
4. 水洗
5. よく熟した Loeffler の methylen blue 溶液を載物硝子に充分かけ，新しく作つた4％苛性ソーダ溶液を6乃至8滴ピペットで滴下して染色（1分間）
6. 水洗
7. 約 0.25％の Sodium Hydrosulfite 溶液で methy yleu blue を還元脱色（数秒間）
8. 速に水洗
9. 1％ acid green 液と1％ acid yellow 液を等量加えたもので染色（数秒間）
10. 水洗乾燥

Alexander によればこの方法では抗酸性菌は Carbol fuchsin により赤染し，非抗酸性型の結核菌は Methylen bleu により青染し，標本の素地及び抗酸性菌以外の菌は一旦 Methylen bleu で青染された後 Sodium hydrssulfite により還元脱色され，最後の複染液により緑染され，

従つてこの方法に依り抗酸性菌の抗酸性型と非抗酸性型との鑑別が容易であるという。

尚，われわれは複染液に用いる acid green と acid yellow が入手困難であつたため，複染色液として静注用の 0.5 % Trypaflavine 液を約5倍に稀釈したものを用いた。これによれば結核菌以外の雑菌及び素地は黄染するわけで，結核菌は淡黄色の素地に赤染または青染して現われ，その検出は極めて容易である。

2) Hallberg 法

この方法は 1939 年，Hallberg により発表[4] されたものであるが菌検出率は Ziehl-Neelsen 法より高いといわれ今日北欧及びドイツでは結核菌検索に広く用いられている。わが国には室橋[5] により 1953 年初めて紹介された。本実験において使用した方法は室橋による連続染色法[6] で，その手技は以下の通りである。

塗抹，乾燥，火焔固定後

1. 充分量の night bleu 液で加温染色（3分間）
2. 5分間放置冷却
3. 塩酸アルコールで脱色（25 %塩酸 3 c.c. を 70 % アルコール 100 c.c. に加えたもの）
4. 水洗
5. Pyronin 水溶液で複染

この方法によると Ziehl-Neelsen 法とはまつたく逆に Pyronin により赤染した素地に night bleu により青染した結核菌を見ることが出来る。

B. 培養方法

小川の 1 %酸性培地を用いて，小川の方法[7] に依り定量培養を行い，判定は総て 8 週後に行つた。

III 実験 1. Alexander 法及び Hallberg 法による菌陽性率及び検出率の比較

a) 検査材料及び方法

i) 喀痰を材料とした場合

結核菌塗抹陽性と判定された肺結核患者 55 名の喀痰を採取し，一つの材料の出来るだけ同一個所より，1 白金耳あて 3 枚の塗抹標本を作り，それぞれ Ziehl-Neelsen 法（Z 法）Alexander 法（A 法）及び Hallberg 法（H 法）で染色した。

ii) 病巣組織を材料とした場合。

剖検，肺葉切除または肺区域切除により得た結核病巣部位を無菌的に磨砕して材料とし，喀痰の場合と同様にして 3 枚の塗抹標本を作り，3 染色法で染色した。同時に同一材料を 1 %苛性ソーダ溶液で前処理後小川の 1 %酸性培養した。

以上のようにして 3 染色法及び培養法による菌陽性率及び各染色法ごとの総検出菌数の比を求めた。

b) 実験成績

1) 陽性率

i) 喀痰を材料とした場合

3 染色法による上記喀痰内結核菌の陽性率は**表 1** の如く，Z 法では 67.3 %，A 法では 80 %，H法では 78.2 %であつた。本実験ではあらかじめ塗抹陽性と思われる喀痰を対象として検査したためか，3 染色法とも陽性率は著しく高率であり，3 染色法の間には有意の差は認められなかつた。

表 1 各種染色法に依る菌陽性率
（喀痰を材料とした場合）

方法	陽性	陰性	計
Ziehl 法	37 (67.3)	18 (32.7)	55 (100)
Alexander 法	44 (80.0)	11 (20.0)	55 (100)
Hallberg 法	43 (78.2)	12 (21.8)	55 (100)

（ ）内は百分率

ii) 結核病巣を材料とした場合

331 病巣について 3 染色法及び培養法を実施し，その陽性率を比較した成績は**表 2** の如くで，Z 法 46.2 %，A 法 53.2 %，H 法 48.6 %，培養法 51.6 %で Z 法と各方法との間には有意の差は認められなかつたが，病巣内結核菌検索に関する限り培養法が染色法に比し優れた陽性率を示さなかつたことは興味あることである。

表 2 各種検査法に依る菌陽性率
（結核病巣組織を材料とした場合）

方法	陽性	陰性	計
Ziehl 法	153 (46.2)	178 (53.8)	331 (100)
Alexander 法	176 (53.2)	155 (46.8)	331 (100)
Hallberg 法	161 (48.6)	170 (51.4)	331 (100)
培養	171 (51.6)	160 (48.4)	331 (100)

（ ）内は百分率

2) 3 染色法による総検出菌数の比

i) 喀痰を材料とした場合

3 染色法による各染色標本の 100 視野中の菌数を算え，各染色法ごとに各標本の菌数の和を求め，これをもつて総検出菌数とし各法の比率を調べた。**表 3** に示した如く

Z 法では総検出菌数は 33,077 個，A 法では 38,744 個，H 法では 48,404 個で，Z 法による総検出菌数を 1.0 として検出比を求めると，A法では 1.18，H法では 1.47 であつて，A 法は約 1.2 倍，H 法は約 1.5 倍の検出率を有することが判つた。

表 3　各種染色法に依る総検出菌数の比
（喀痰を材料とした場合）　検査例数 55

方法	全視野中の総菌数	1視野中の平均菌数	検出比
Ziehl 法	33077	6.01	1.00
Alexander 法	38744	6.87	1.18
Hallberg 法	48404	8.62	1.47

ii）結核病巣を材料とした場合

総検査例 331 標本中，甚しく菌数が多くて菌数を算えることが困難なもの，また菌の形態が甚しく変型して菌数の比較に適さない標本をのぞき，残りの 252 標本について各染色法の総検出菌数の比を喀痰の場合と同様にして求めた。**表 4** に示す如く Z 法では総検出菌数，4,090 個，A 法では 6,553個，H法では 6,213個で，Z 法による総検出菌数を 1.0 とすると検出比はA法では1.60，H法では1.52 となり，両法とも僅かながら Z 法をしのぐ成績であつた。

表 4　各種染色法に依る総検出菌数の比
（結核病巣組織を材料とした場合）
検査例数 252

方法	全視野中の総菌数	1視野中の平均菌数	検出比
Ziehl 法	4090	1.62	1.00
Alexander 法	6553	2.60	1.60
Hallberg 法	6213	2.46	1.52

c）考　按

i）Alexander 法に対する考察

この方法においては **Carbol fuchsin** により染まる赤い菌と **Methylen bleu** により染まる青い菌とが黄色の素地に浮び出る為に，抗酸性の菌と弱抗酸性あるいは非抗酸性の菌との鑑別が極めて容易であり，然も他の染色法に比して染色手技が極めて簡単であることはこの染色法の大きな特色といわねばならない。然し余り厚い塗抹標本を作ると一度 **Methlen bleu** で染まつた素地の **Sodium hydrosulfite** に依る還元脱色が不充分で，素地が濃緑色となり青染菌の検出が非常に困難となることがある。また手技の中，第二の段階，即ち **Methylen bleu** を充分標本にそそぎ，それに 4 %苛性ソーダを滴下する場合，苛性ソーダの量が多過ぎると総ての菌が濃染することがある。また滴下の量が少な過ぎると青染した菌は全く見られない。このような第二段階の操作による染色の不安定性をのぞく為に本実験では予め **Methylen bleu** 染色液中に 20 %の割合に 4 %苛性ソーダを加えたものを作つて第二の染色液として使用した。この方法に依ると上記のような染色の不安定さはなく手技も極めて簡単である。また **Alexander**[5] はこの方法により抗酸性型，非抗酸性型の結核菌の鑑別が出来るといつているが，Z 法で赤染する菌の中にも A 法により青染する菌が相当数あることは交叉染色等の方法より明らかなところであり，A 法によつて結核菌の抗酸性型，非抗酸性型の鑑別が可能であるというよりもむしろ A 法は結核菌の抗酸性の程度を知る染色法であるという方が妥当ではなかろうか。

次にこの方法による菌陽性率を Z 法と比較した本実験成績を見るとその間には有意の差は認められない。またその検出比においては Z 法よりやや優れてはいるがこれも必しも満足すべき成績ではない。このことは病巣等に屢々見られる菌体の著しく変型した青染菌と，所謂塵様物質との鑑別が困難な場合があり，この為本実験では明らかに結核菌に由来したものであると断定し得るもののみを取り，鑑別がやや困難なのは総て除外したためであろう。然し除外されたものの中にも恐らく結核菌に由来するものも相当数あることが考えられるから本実験成績は A 法の示す最少限界のものではないかと思う。また喀痰を材料とした場合に比して，病巣組織を材料とした場合に A 法による菌検出比の高いのは，病巣組織中には Z 法では検出されず A 法によつてのみ染色される弱抗酸性乃至非抗酸性の菌が相当数存在する為であろう。然し A 法による検出菌数は同一材料を Z 法で染色した時の検出菌数に A 法による青染菌数を加えた数を加えた数に等しくなるとは限らない。これは Z 法により赤染する菌の中に A 法では青染して来る菌も存在する為であろう。また喀痰を材料とした場合でも，55 例中半数近く多少にかかわらず青染菌を証明し得たが，これは化学療法によつて菌の染色性が変化したためではなかろうか。

ともあれ，この染色法は **Alexander** もいう如く Z 法の補助的染色法として重要にして興味ある染色法であると思う。

ii）Halberg 法に対する考察

この方法については室橋[1] のいう如く手技が簡単で菌がやや太目に濃青色に染まり，淡紅色の素地に浮び出て極めて美麗な標本を得ることが出来，菌体と素地の色調の対比が明瞭なために厚目の標本からの検出にも適しており，然も菌体周囲の状態も明瞭に出来る利点がある。然し Z 法では屢々見られる菌体内の顆粒がこの方法では判別困難で，菌形態の観察にはやや不利のように思われる。これは

菌体が一ように太目に青染して見えるためであろう。

本実験成績より見ると，その菌陽性率はZ法に比して著しく優れているとはいい難い。また検出菌数の比がZ法に対して約1.5倍という成績は，大体室橋の報告と一致するところであるが，Hallberg[4]及びその追試者達の3倍から4倍という成績に較べると遙かに劣る。その理由としては吾々はZ法，A法による菌検索に便ならしめる為，比較的薄い塗抹標本を作つた為と思はれる。即ちH法による場合には後染色で素地が淡く染まるために厚目の標本からも検出が容易であり，この点がこの方法による検出率が優れている大きな理由であろう。

これを要するにH法はZ法に決して劣る染色法ではなく，その検出率が寧ろZ法を凌ぐものがあり，また費用の低廉，手技の簡単などの利点から見て，日常結核菌検索の方法として優れた染色法であるように思はれる。

IV 実験2 病巣内結核菌の検索

a) 検査材料及び方法

使用した材料は剖検例，肺切除及び肺区域切除例から得た総計331部位の結核病巣である。剖検例では8乃至10部位，肺切除例では3乃至4部位，区域切除例では1乃至2部位について検索した。

標本は剖検時または手術直後無菌約に各病巣を可及的独立して切開し，肉眼的病理所見を記載し，後乳鉢で無菌的に磨砕し，少量の1%苛性ソーダ液で乳状として，先づ出来るだけ同一個所より3枚の塗抹標本を作り，後定量培養を実施した。塗抹標本は可及的薄く作成し，3枚の標本を夫々Z法，A法，及びH法で染色し，菌数，菌の形態を観察し，またA法による赤染菌と青染菌の菌数の比率を調べた。定量培養は小川の1%酸性培地3～5本を用いて行い，培養8週後に現れた集落数を算え，組織1g中に含まれる菌数を算出した。

b) 実験成績

1) 各種病巣内結核菌の塗抹染色ならびに培養成績

総検査例331の中，肉眼的に病巣の性状を明らかになし得た283部位について結核菌の染色及び培養の関係を見たのが**表5**である。塗抹については3染色法の中1染色法だけでも陽性のものがあれば塗抹陽性とした。表に明らかなように空洞の液状内容物では14例中全例，塗抹培養ともに陽性の成績を示し，非常に多くの生菌数が検出された。開放性空洞（開放性，閉鎖性の別が不明なるものを含む）について見ると50例中，塗抹培養とも陽性が36例（72.0%），塗抹陰性，培養陽性が5例（10.0%），塗抹陽性，培養陰性が4例（8.0%）塗抹，培養ともに陰性が5

表5 各種病巣内結核菌の塗抹染色並に培養成績

方法＼病巣の性状		空洞内の液状容	空洞 開放又は不明性	空洞 閉鎖性	撒布巣 古い又は不明	撒布巣 新しい	乾酪巣 崩壊あり又は不明	乾酪巣 崩壊なし	健康部	気管支	膿胸液	石灰化巣	肺門淋巴腺	腎空洞	腎空洞内容	計
培養(+)	塗抹(+)	14 (100)	36 (72.0)	1 (5.8)	6 (16.3)	4 (44.4)	18 (29.0)	13 (21.7)	1 (6.7)	1 (50.0)	2 (50.0)	0	1 (16.7)	0	1 (33.4)	98 (34.7)
	塗抹(−)	0	5 (10.0)	2 (11.8)	7 (18.9)	3 (33.3)	6 (9.7)	6 (10.0)	2 (13.3)	0	1 (25.0)	0	0	0	0	32 (11.4)
培養(−)	塗抹(+)	0	4 (8.0)	9 (52.9)	7 (18.9)	0	31 (50.0)	19 (31.7)	3 (20.0)	0.	0	0	1 (16.7)	0	0	74 (26.2)
	塗抹(−)	0	5 (10.0)	5 (29.5)	17 (45.9)	2 (22.3)	·7 (11.3)	22 (36.6)	9 (60.0)	1 (50.0)	1 (25.0)	2 (100)	4 (66.6)	2 (100)	2 (66.6)	79 (27.7)
計		14 (100)	50 (100)	17 (100)	37 (100)	9 (100)	62 (100)	60 (100)	15 (100)	2 (100)	4 (100)	2 (100)	6 (100)	2 (100)	3 (100)	283 (100)

（ ）内は百分率

例（10.0%）で，塗抹，培養ともに陽性を示すものが多く見られた。一方，閉鎖性空洞では17例中塗抹，培養ともに陽性が1例（5.8%）塗抹陰性，培養陽性が2例（11.8%），塗抹陽性，培養陰性が9例（52.9%）塗抹，培養ともに陰性が5例（29.5%）で，開放性空洞の場合に較べて塗抹陽性，培養陰性のものが可成多い成績を得た。

古い撒布巣（新旧の不明なるものを含む）では，上記の関係が夫々16.3%，18.9%，18.9%，45.9%であり，新しい撒布巣では44.4%，33.3%，0%，22.3%で，ここでも新旧の間には明らかに逆の関係が見出された。小豆大以上の乾酪巣中崩壊あるもの（崩壊の有無の不明なるものを含む）では29.0%，9.7%，50.0%，11.3%であり，

崩壊のないものでは 21.7 %，10.0 %，31.7 %，36.6 % で，この間には明らかな差はない。ここに注意すべきことは乾酪巣または閉鎖性空洞等には塗抹陽性，培養陰性例が相当数あることである。肺門淋巴腺では塗抹，培養ともに陽性が 1 例，塗抹陽性，培養陰性例が 1 例あつたが，石灰化巣では全例が塗抹，培養ともに陰性であつた。

次に空洞，撒布巣，乾酪巣の菌数を定量培養によつて測定した成績を**表 6** に示した。ここで組織 1 g 中の生菌数を 100 から 1,000 まで，1,000 から 1 万まで，1 万から 10 万まで，10 万以上，の 4 段階に分けて見ると，1 万以上の生菌数が認められるものは開放性空洞では 50 例中 27 例（54.0 %）閉鎖性空洞では 17 例中 1 例もなく，古い撒布巣では 37 例中 2 例（5.4 %），新しい撒布巣では 9 例中 5 例（55.4 %）崩壊のある乾酪巣では 62 例中 6 例（9.7 %）崩壊のない乾酪巣では 60 例中 1 例（1.7 %）であつた。以上の成績から開放性空洞及び新しい撒布巣に多数の生菌数の見られることが多く，これに比して閉鎖性空洞，古い撒布巣及び乾酪巣では生菌数は比較的少ないことがわかる。尚，乾酪巣の中でも崩壊のあるものの方が無いものよりも生菌数の多い傾向が見られることは興味あることである。

表 6　主なる病巣内の生菌数

病巣の性状 ／ ※生菌数	空洞 開放性又は不明	空洞 閉鎖性	撒布巣 古い又は不明	撒布巣 新しい	乾酪巣 崩壊あり又は不明	乾酪巣 崩壊なし	計
10 万 <	20 (40.0)	0	1 (2.7)	3 (33.2)	2 (3.2)	0	26 (11.1)
1 万～10 万	7 (14.0)	0	1 (2.7)	2 (22.2)	4 (6.5)	1 (1.7)	15 (5.9)
1000～1 万	8 (16.0)	1 (5.9)	4 (10.8)	2 (22.2)	10 (16.1)	9 (15.0)	34 (14.9)
100～1000	6 (12.0)	2 (11.7)	7 (18.9)	0	8 (12.9)	9 (15.0)	32 (13.6)
(－)	9 (18.0)	14 (82.4)	24 (64.9)	2 (22.2)	38 (61.3)	41 (68.3)	128 (54.5)
計	50 (100)	17 (100)	37 (100)	9 (100)	62 (100)	60 (100)	235 (100)

（ ）内は百分率　※組織中 1 g の生菌数

2）各種病巣と菌の形態

種々の病巣の菌の形態を詳細に観察するに際し，便宜上菌の形態に基いて検査材料を 4 つの型に分類した。この分類は主として Z 法による所見に依つたが，Z 法で陰性で A 法あるいは H 法で陽性の場合にはそれらの所見をも加えてなされた。Ⅰ型は Koch の桿菌の多いもの，あるいは Cord 形成の見られものの，または菌体が集束をなして個々の菌体が明らかに区別されるもの，Ⅱ型は菌が塊状をなして個々の菌体が明らかでないもの，Ⅲ型は糸状に細く長い菌，あるいは菌体が切れ切れになり多く連珠状をなしているもの，Ⅳ型は顆粒状をなしているものである。（**図 1**）

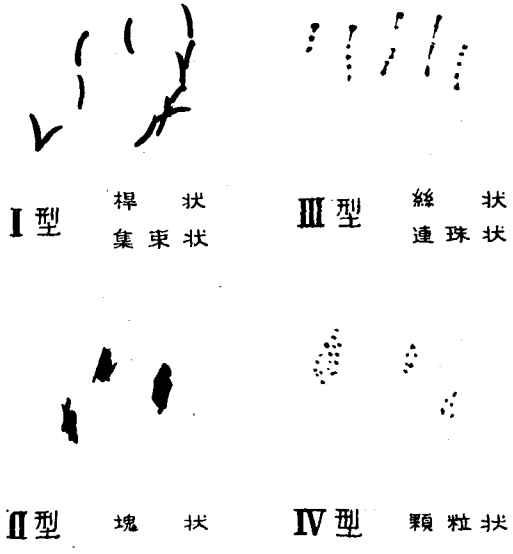

図　1

このように分類された 4 つの型の材料がどの病巣に多く見られるかを調べたのが**表 7** である。

表 7　各種病巣と菌の形態

病巣の性状 ／ 菌の形態	空洞内容液状	空洞 開放性又は不明	空洞 閉鎖性	撒布性 古い又は不明	撒布性 新しい	乾酪性 崩壊あり又は不明	乾酪性 崩壊なし	其他	計
Ⅰ型 桿菌又は集束状	14 (100)	32 (82.1)	1 (11.1)	4 (30.8)	3 (75.0)	10 (21.7)	4 (12.5)	6 (60.0)	74 (44.3)
Ⅱ型 塊状	0	4 (10.3)	1 (11.1)	2 (15.3)	0	7 (15.2)	1 (3.1)	0	15 (9.0)
Ⅲ型 糸状又は連珠状	0	3 (7.6)	2 (22.2)	5 (38.6)	1 (25.0)	20 (43.5)	14 (43.8)	3 (30.0)	48 (28.6)
Ⅳ型 顆粒状	0	0	5 (55.6)	2 (15.3)	0	9 (19.6)	13 (40.6)	1 (10.0)	30 (18.1)
計	14 (100)	39 (100)	9 (100)	13 (100)	4 (100)	46 (100)	32 (100)	10 (100)	167 (100)

（ ）内は百分率

これで見ると空洞内容では全例Ⅰ型であり，開放性空洞及び新しい撒布巣では大部分がⅠ型である。これに反し閉鎖性空洞，古い撒布巣及び乾酪巣では大部分がⅡ，Ⅲ，

IV 型であつて，菌の形態の変形したものが多いことが判つた。

3) 菌の形態と増殖力

前項に示したように菌の形態に基いて分類された検査材料について生菌数を調べ成績を表8に示した。

表 8 菌の形態と生菌数

菌の形態＼生菌数	10万＜	1万～10万	1000～1万	100～1000	(−)	計
I 型 桿菌 集束状	40 (54.1)	9 (12.2)	9 (12.2)	7 (9.3)	9 (12.2)	74 (100)
II 型 塊状	2 (13.3)	2 (13.3)	4 (26.6)	1 (6.8)	6 (40.0)	15 (100)
III 型 糸状 連珠状	2 (4.2)	2 (4.2)	5 (10.4)	8 (16.6)	31 (64.6)	48 (100)
IV 型 顆粒状	0	0	4 (13.3)	4 (13.3)	22 (73.4)	30 (100)
計	44 (26.3)	13 (4.3)	22 (13.2)	20 (11.9)	68 (44.3)	167 (100)

( ) 内は百分率

これによると I 型では 74 例中 10 万以上の生菌数を有するものが 40 例 (54.1 %) で，これに比し培養陰性は僅かに 9 例 (12.2 %) で，この型の材料中には菌が極めて多いことがわかる。II 型では生菌数の少ないものが比較的多く，培養陰性は約半数に見られた。III 型では培養陰性例が 64.6 % で非常に多く，たとえ培養陰性でも生菌数の少ないものが圧倒的に外かつた。IV 型では培養陰性が 73.4 % で，陽性 8 例も生菌数 1 万以下のものばかりであつた。菌の形態が変形した標本では培養陰性例が非常に多いが，たとえ培養陽性でも生菌数の少ないものが多いことがわかる。

4) 菌の形態と染色性

上記の如く分類された検査材料について，染色性特に赤染菌と青染菌との割合を調べた。ここで赤染菌とは Z 法または A 法の Carbol fuchsin により赤染する菌をいい，青染菌とは A 法の Methylen bleu により青染した菌をいう。**表 9** に示すように I 型では赤染菌のみ見られるものあるいは赤染菌が青染菌より多いものが圧倒的に多い。II 型，III 型では青染菌が赤染菌と大体同数かまたは青染菌の方が多いものが半数以上を占めていた。IV 型では青染菌の方が多いものが圧倒的に多く，青染菌のみ見られるもの 10 例，全例が IV 型に属していた。即ち菌の形態と染色性の間にも密接な関係があることがわかつた。

表 9 菌の形態と染色性

菌の形態＼染色性	赤染菌のみ	赤染菌＞青染菌	赤染菌＝青染菌	赤染菌＜青染菌	青染菌のみ	計
I 型 桿菌 集束状	28 (37.8)	31 (41.9)	8 (10.8)	7 (9.5)	0	74 (100)
II 型 塊状	3 (20.0)	3 (20.0)	6 (40.0)	3 (20.0)	0	15 (100)
III 型 糸状 連珠状	12 (25.0)	11 (22.9)	8 (16.7)	17 (35.4)	0	48 (100)
IV 型 顆粒状	3 (10.0)	5 (16.6)	5 (16.6)	7 (23.5)	10 (33.3)	30 (100)
計	46 (27.5)	50 (29.9)	27 (16.1)	34 (20.3)	10 (6.2)	167 (100)

( ) 内は百分率

5) 各種病巣と染色性

各種病巣内の菌の染色性を上記のように赤染菌と青染菌との割合の点から検討して見た。

表 10 各種病巣と染色性

染色性＼病巣の性状	液状内容の空洞	空洞 開放性 又は不明	空洞 閉鎖性	撒布巣 古い 又は不明	撒布巣 新しい	乾酪巣 崩壊あり 又は不明	乾酪巣 崩壊なし	其他	計
赤染菌のみ	1 (7.1)	16 (41.0)	2 (22.2)	5 (38.4)	1 (25.0)	9 (19.6)	8 (25.0)	4 (40.0)	46 (27.5)
赤染菌＞青染菌	12 (85.8)	12 (30.8)	0	2 (15.4)	2 (50.0)	10 (21.7)	9 (28.1)	2 (20.0)	49 (29.3)
赤染菌＝青染菌	0	7 (17.7)	1 (11.2)	3 (23.1)	0	12 (26.1)	4 (12.5)	1 (10.0)	28 (16.8)
赤染菌＜青染菌	1 (7.1)	4 (10.5)	4 (44.4)	2 (15.4)	1 (25.0)	13 (28.3)	7 (21.9)	2 (20.0)	34 (20.4
青染菌	0	0	2 (22.2)	1 (7.7)	0	2 (5.3)	4 (12.5)	1 (10.0)	10 (6.0)
	14 (100)	39 (100)	9 (100)	13 (100)	4 (100)	46 (100)	32 (100)	10 (100)	167 (100)

( ) 内は百分率

表 10 に示すように空洞内容，開放性空洞のように生菌数の多い病巣には赤染菌のみのもの，または赤染菌が青染菌より多いものが大部分を占めている。閉鎖性空洞，乾酪巣等ではその反対に青染菌の方が赤染菌より多いものの方が多い。

6) 染色性と増殖力

赤染菌と青染菌の増殖力を検討する目的で両者の比率と生菌数との関係を調べた。

表 11 染色性と生菌数

染色菌＼生菌数	10万＜	1万～10万	1000～1万	100～1000	(−)	計
赤染菌のみ	10 (21.7)	5 (10.8)	10 (21.7)	8 (17.6)	13 (28.2)	46 (100)
赤染菌＞青染菌	22 (44.8)	5 (10.4)	3 (6.1)	3 (6.1)	16 (32.6)	49 (100)
赤染菌＝青染菌	5 (17.8)	1 (3.7)	3 (10.7)	5 (17.8)	14 (50.0)	28 (100)
赤染菌＜青染菌	7 (20.6)	2 (5.7)	4 (11.8)	3 (8.8)	18 (52.9)	34 (100)
青染菌のみ	0	0	2 (20.0)	1 (10.0)	7 (70.0)	10 (100)
計	44 (26.3)	13 (8.8)	22 (13.1)	20 (11.9)	68 (40.7)	167 (100)

( ) 内は百分率

表 11 に示すように青染菌のみの場合，または青染菌が赤染菌と大体同数かあるいは多い場合には培養陰性例が多いかまたは培養陽性でも生菌数が少ない傾向が見られ，これに反して赤染菌のみの場合，または赤染菌が青染菌より多い場合には生菌数の多い傾向が明らかに認められた。特に青染菌のみの 10 例中 7 例 (70.0 %) が培養陰性であることは興味あることである。

c) 考　按

肺病巣の細菌学的研究はこれまで Medlar[9~20] を初め多くの研究者達によつて報告されている。それらに依ると空洞例では塗抹，培養ともに陽性のものが圧倒的に多いのに反し，乾酪巣，非空洞例では塗抹陽性，培養陰性例が相当数あるという。

本実験においても開放性空洞においては塗抹，培養ともに陽性率は 80 %以上であるにもかかわらず，閉鎖性空洞，乾酪巣，あるいは古い撒布巣等では培養陽性率はいずれも 40 %以下であり，特に塗抹陽性，培養陰性例が 50 % 以上の高率に認められた。更にわれわれはこれら病巣内の結核菌の性状を詳細に比較検討する目的で，培養実験と平行して Z 法，A 法，及び H 法の 3 染色法を行い，菌の増殖力，形態ならびに染色性を調べた。それによると閉鎖性病巣，就中，乾酪巣内の結核菌は著しくその形態の変形したものが多く，而も染色性も変化している。このように形態と染色性に変化を来した菌は一般に著しく増殖力が弱いことを示し，特に乾酪巣中に多数存在する顆粒状の形態を有する菌は多くの場合弱抗酸性か非抗酸性で培養成績も陰性のことが多かつた。乾酪巣内結核菌の形態的変化については膿部[21] によりすでに指摘されたところであり，このことは化学療法の盛んに行われている現在では それが菌に及ぼす影響をも考えなければならないであろう。然し著著等は病巣が閉鎖性であるということがその最も大きな要因であるように考える。即ち病巣の閉鎖に依る酸素の欠乏，酸素分圧の低下は好気性菌である結核菌の性状に大きな影響をあたえることは充分想像し得るところであつて，事実 Dubos[2)~21)] は試験管内の酸素分圧を種々に変える培養実験からこのことを裏付け，酸素分圧の低下は組織細胞の新陳代謝を変化させ，ある種の代謝産物，例えば乳酸の如きものが結核菌に有害に作用することを述べている。更に彼は生体内には抗結核性に作用する種々なる塩基性物質の存在することを指摘し，プロクミン，ヒストン，リゾチーム，スペルミン，スペルミヂン等をあげている。

然らばこのように閉鎖性病巣内においてその形態と染色性を変え，しかも増殖力を失つた結核菌は死滅してしまつたものなのであろうか，あるいは尚生残しているものなのであろうか。Koch[25] は 1884 年，結核病巣が壊死に陥入り，しかも軟化しない時，結核菌は速に消失するといつている。また Hohn[26] は塗抹染色標本からの結核菌推定数と培養に依つて得られる生菌数が必しも平行しない場合があることを示し，それらの菌はおそらく古い結核病巣に由来するもので，その大部分が死菌であるかあるいは生活力が衰えている菌であろうと推測している。最近 Steenken[13] は海猽の皮下または睾丸に生菌の浮游液を接種した実験において，壊死巣では 1 年後塗抹では無数の結核菌を証明したにも拘らず，培養し得る菌量は漸次減少する傾向があつたことを述べ，更に特殊な培地に壊死物質を接種しても菌の増殖力を高めることは出来なかつたと報告し，これらの菌は死滅していると見做し得ると結論している。Yegian[10] も同様に特殊な培地を用いても菌陽性率を高め得なかつたことより，これらの菌は再生能力のないものであると結論している。一方 Hobby[7] は乾酪巣を albumin で洗滌し，結核菌に有害な物質を除去した後，Tween 80 を除いた Dubos 培地に長期間培養し陽性率を高め得たことより，これら病巣内の菌は生残していると結論している。尚最近染谷[28] は Hobby と同様の実験を更に詳細に行い乾酪巣内の菌は固形培地には発育困難でも Kirchuer あるいは Dubos の如き液体培地には発育してくることを確めている。また Dubos[24] は自らの経験と一般生物学的現象よりの類推からこのような菌は死滅しているのではなく，単に増殖力を失つて一時新陳代謝停止状態 (metabolic guiescence) あるいは休眠状態 (dormant) にあるに過ぎず，菌の Life cycle 中のいまだわれわれに未知の状態にあるのではないかと述べている。

乾酪巣内の菌が Dubos のいう dormant の状態にあるという考え方は結核菌の life cycle についての従来の一聯の研究からみても興味深いものがある。即ち Kahn[29]

[30]は単個菌より出発し Long 培地上の形態の変化を時間的に光学顕微鏡で観察し，抗酸性桿菌は球菌状の段階，fein dust の段階を経て再び典型的桿状菌となつたと述べ，抗酸性はこの過程中 granular phase で失はれ，桿菌の状態では再び現れることを報告している。また最近 Rosenthal[31]は B. C. G. 菌について光学顕微鏡，位相差顕微鏡，電子顕微鏡を用いて，一度顆粒型を経て再び桿菌となる結核菌の life cycle を観察し，またZ法による染色で青染した基質の中に非抗酸性の顆粒が認められるような段階があることを述べている。更に彼は抗酸性菌の再生にあたつてはこの granular method と fission method があることを想像し，前者は発育条件が理想的でない時に起り，後者は一般に発育条件がより好適な時に起るだろうといつている。然しこのような結核菌の life cycle が組織内でも起り得るかどうかは疑問であり，本実験において観察された形態と染色性に変化をきたした結核菌がこのような Life cycle の一段階にある菌であると断言することは論勿出来ない。然し乾酪巣，閉鎖性空洞等発育条件の悪いところでは結核菌は granular method を取り，開放性空洞，特に空洞の液状内容等発育条件の好適のところでは fission method を取つて再生すると考えることもあながち無理ではないのではあるまいか。事実吾々の観察においても空洞の液状内容等菌の増殖が盛んなところでは菌はあるいは Cord を形成し，あるいは集落をなして fission method を取つて再生していると思はれるような所見を呈している。

何れにせよ結核病巣内の結核菌の生理的な状態は決して単純なものではなく，種々なる段階からなる複雑な過程であると考えられるのであつて，本実験よりただちにこれら形態と染色性に変化をきたした菌が結核菌の life cycle のある段階にあるものかどうかを結論し，またその生死を結論づけることは出来ないであろう。今後染色方法，培養方法を改良し更に詳細な幾多の実験が試みられなければならない。

V 結　　論

55 例の肺結核患者喀痰及び 331 例の結核病巣について Ziehl-Neelsen 法，Alexander 法，Hallberg 法の 3 染色法を行い，結核菌陽性率及び検出菌数を比較し，次にこれ等染色法ならびに培養法を用いて結核病巣内結核菌の性状，特にその増殖力，形態，染色性について検索し次の成績を得た。

1. 各染色法の陽性率はほぼ等しくその間に有意の差は認められず，検出菌数の比率は喀痰では Hallberg 法が一番高く，Alexander 法これにつぎ，結核病巣では Alexander 法，Hallberg 法，Ziehl-Neelsen 法の順となつた。

2. 病巣別に結核菌の培養，塗抹染色の関係を見ると，開放性空洞では塗抹，培養ともに陽性のものが圧倒的に多く，しかも生菌数は著しく多かつた。これに反し閉鎖性空洞ならびに乾酪巣では塗抹陽性，培養陰性のものが可成多くかつ生菌数は少なくなかつた。

3. 菌の形態と増殖力及び Alexander 法による菌の染色性の間には相関関係が見出された。即ち菌の形態が塊状，連球状，顆粒状に変型すると Methylen bleu に好色性の菌が多くなり，然も定量培養による生菌数も減少してきた。

擱筆するにあたり御懇切なる御指導，御校閲を賜つた高橋教授，ならびに近藤所長，有馬助教授，常に変らざる御援助を賜つた山本講師，久世学士，病理部門森川助教授札幌医科大学病理教室に對し深甚なる謝意を表する。

文　　献

1) 小川其他：日本医事新報，1950, 17, 1954.
2) Collard, R. et al : Lancet 6778, 155, 1953.
3) Alexander, J. F. : Science 99, 307, 1944.
4) Hallberg, V. : Nord. Med. 4, 164, 1940.
5) 室　橋：臨床，6, 721, 1953.
6) 室　橋：日本医事新報，1582, 30, 1954.
7) 小　川：結核菌検索の基礎と応用，保健同人社，1952.
8) 占部其他：文部省結核研究班報告，1954.
9) Medlar, D, M. et al : Am. Rev. Tuberc. 66, 36, 1952.
10) Beck, F. et al : Am. Rev. Tuberc. 66, 44, 1952.
11) Steele, J, D. et al : J. Thoracic. Surg. 26, 459, 1953.
12) Granville, G, E. et al : Am Rev. Tubere. 68, 726, 1953.
13) Panel discussion : Am. Rev. Tuberc. 68, 477, 1953.
14) 伊藤其他：結核，28, 442, 1953.
15) 芳　賀　：日本臨床結核，12, 652, 1953.
16) Dickie, H, A. et al : Am. Rev. Tuberc. 70, 102, 1954,
17) Bernstein, S. etal : Am. Rev. Tuberc. 70, 370, 1954.
18) Falk, A. et al : Am. Rev. Tuberc. 70, 689, 1954.
19) 伊藤其他：結核，29, 138, 1954.
20) 赤　倉：日本臨床結核，13, 867, 1954.
21) 隈　部：人体内における結核菌の生態，保健同人社，1949.
22) Dubos, R.et al : J. Exp. Med. 98, 145, 1953.
23) Dubos, R. et al : J. Exp. Med. 99, 55, 1954.
24) Dubos, R. : Am. Rev. Tuberc. 67, 874, 1953.
25) Koch, R. : Die Aetiologie der Tbk, Berlin 1884,
26) Hohn, J. : Zentralbl. f. Bake, 98, 460, 1926.
27) Hobby, G,L.et al : Am, Rev. Tuberc. 70, 191, 1954.
28) 染　谷：文部省結核研究班報告，1955.
29) Kahn, M. C. : Am. Rev. Tuberc. 20, 150, 1929.
30) Kahn, M. C. : Tubercle 202, 1930.
31) Roseuthal, S. R. : Ann. Inst. Pasteur. 88, 479, 1955.