

[原 著]

臨床検体における改良型アクリジンオレンジ蛍光染色液の抗酸菌染色性評価及び  
抗酸菌基準株に対する染色像の比較

五十嵐ゆり子<sup>1)</sup>・近松絹代<sup>1)</sup>・青野昭男<sup>1)</sup>・本橋加津恵<sup>2)</sup>・中井ひとみ<sup>2)</sup>  
青井秀樹<sup>2)</sup>・水野和重<sup>2)</sup>・山田博之<sup>1)</sup>・高木明子<sup>1)</sup>・御手洗聡<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部

<sup>2)</sup> 公益財団法人結核予防会複十字病院臨床検査部

(平成 30 年 4 月 9 日受付, 平成 30 年 10 月 19 日受理)

アクリジンオレンジ蛍光染色液であるアクリスティン(極東製薬工業)の改良型製品を用いて, 抗酸菌の染色性能について従来法との比較評価をした。結核診療中および非結核性抗酸菌(NTM)症診療中の患者から採取した喀痰計 202 検体を対象とし, アクリスティン及び改良型アクリスティン, オーラミン O 染色の 3 通りの方法で染色を行った。アクリスティンと改良型アクリスティンでは一致率 93.6% ( $\kappa=0.783$ ), 改良型アクリスティンとオーラミン O 染色では一致率 93.6% ( $\kappa=0.749$ ), アクリスティンとオーラミン O 染色は一致率 92.1% ( $\kappa=0.719$ ) であった。アクリスティンと改良型アクリスティンの塗抹陽性度を比較すると改良型アクリスティンの方が陽性度の高い検体は 35 検体, 低い検体は 5 検体であった。抗酸菌基準株を用いた染色像の比較では, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium gordonae* の 3 菌種において, アクリスティンよりも改良型アクリスティン及びオーラミン O 染色, チール・ネールゼン染色の方が強い発色を認めた。

改良型アクリスティンは従来のアクリスティンより塗抹陽性度の高い検体が多く, 一部の NTM 基準株に対する染色もアクリスティンでは不十分であったが改良型では十分な染色像が観察できたことから, アクリスティンから染色液成分を変更したことによって染色性能が向上したと考えられた。他方, 迅速発育菌に対してはアクリスティン, オーラミン O 染色と同じく染色が不十分であることに留意して使用すべきと考えられた。

**Key words:** 抗酸菌, 塗抹検査, 蛍光染色

はじめに

抗酸菌の塗抹鏡検は迅速かつ安価な検査法として, 臨床上有るいは感染対策上重要な位置を占めている。患者の排菌の有無が分かるほか, 検体に含まれる菌量から感染リスクや治療経過の評価といった多くの情報が得られる。従来のチール・ネールゼン法による抗酸菌塗抹検査は検出感度の点で不十分であり, 感度向上と簡易化を目的として蛍光染色法が広く用いられるに至っている。

抗酸菌の蛍光染色において主に用いられるのはオーラミン O 染色である。オーラミン O 染色は輝度が高く背景の発色が抑えられるが, ハレーションにより形態の観察が困難な場合があることに加え, オーラミン O に発がん性があることから使用者は特定化学物質健康診断の対象となる<sup>1)</sup>。抗酸菌蛍光染色用の染色液は複数市販されているが, その中にアクリジンオレンジを使用した蛍光染色液アクリスティン(極東

製薬工業)がある。アクリスティンの特徴は脱色液と対比染色液を合わせた溶液を使用し, 脱色と対比染色を同時に行うことで染色工程が短縮されている点にある。またアクリジンオレンジにも毒性(生殖細胞変異原性)はあるもののオーラミンと比べて低いものであり, 特定化学物質健康診断の対象とはならない。しかしながら, 脱色と対比染色を同時に行うことにより双方の効果が不十分となる場合があり, 特に残渣が多い検体の場合は背景の発色により形態観察が困難になるといった問題点が存在する。

今回, 従来型アクリスティン(以降アクリスティン)の改良型製品(以降改良型アクリスティン)が開発され, 染色液の組成や染色工程が変更された。まず蛍光染色液中のアクリジンオレンジ濃度が従来よりも高く設定されている。またアクリスティンと同様に脱色兼対比染色液を使用しているが, 対比染色に用いる色素が従来のメチレンブルーからエリオクロームブラック T へと変更されている。エリオクロームブラック T の色は pH に依存するため, (pH < 6: 赤, 7-11: 青, > 11: 橙) 脱色・対比染色後の洗浄は水洗ではなく pH 8.0 の Tris-HCl/EDTA 緩衝液を用いて洗浄する。従来のアクリスティンから性能の向上が認められれば, 抗酸菌塗抹検査用の蛍光染色液として有用であると思われる。今回この改良型アクリスティンの性能を既存の染色液と比較評価したの

著者連絡先: (〒204-8533) 東京都清瀬市松山 3-1-24  
結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科  
五十嵐ゆり子  
TEL: 042-493-5711(ext. 397)  
FAX: 042-492-4600  
E-mail: igarashi@jata.or.jp

Table 1. Comparison of smear positivity using modified Acris-tain, conventional Acris-tain, and Auramine O stain.

a)							
		Modified Acris-tain					Total
		3+	2+	1+	±	-	
Conven-tional Acris-tain	3+	38	0	0	0	0	38
	2+	6	45	2	0	0	53
	1+	0	8	42	0	0	50
	±	0	0	11	7	3	21
	-	0	0	4	6	30	40
Total		44	53	59	13	33	202
b)							
		Modified Acris-tain					Total
		3+	2+	1+	±	-	
Aura-mine O stain	3+	42	0	0	0	0	42
	2+	2	49	2	0	0	53
	1+	0	4	48	1	1	54
	±	0	0	9	8	8	25
	-	0	0	0	4	24	28
Total		44	53	59	13	33	202
c)							
		Auramine O stain					Total
		3+	2+	1+	±	-	
Conven-tional Acris-tain	3+	38	0	0	0	0	38
	2+	4	46	3	0	0	53
	1+	0	7	40	3	0	50
	±	0	0	7	12	2	21
	-	0	0	4	10	26	40
Total		42	53	54	25	28	202

で報告する。

## 対象と方法

### 臨床検体に対する染色性能の評価

公益財団法人結核予防会複十字病院にて結核及び非結核性抗酸菌症を診療中の患者から各々喀痰 187 検体と喀痰 15 検体の計 202 検体を採取した。喀痰を NALC-NaOH 処理した後、リン酸緩衝液 (pH 6.8) で懸濁し、懸濁液 0.1 mL を MAS コート処理済スライドガラス (松波硝子工業) へ 2×3 cm の楕円形に塗抹し、同じ検体を用いて塗抹標本を 3 枚ずつ作成した。塗抹標本を火炎固定し、オーラミン O 染色法 (0.1% オーラミン O 染色液, 武藤化学), アクリスティン, 改良型アクリスティンの 3 通りの方法で染色した。オーラミン O 染色法は抗酸菌検査ガイド 2016, アクリスティンは添付文書に従って各々実施した。改良型アクリスティンの染色方法は簡潔には以下の通りである。(1) 蛍光染色液を塗抹標本へ満載し, 15 分間染色した。(2) 十分水洗した。(3) 脱色兼対比染色液を満載し, 2 分間静置した。(4) 脱色兼対比染色液を洗浄液で洗い流した。

各染色方法で染色した塗抹標本を常温で乾燥させた後, LED 蛍光顕微鏡 (オリンパス BX-51, FRAEN 励起フィルター Royal Blue 450nm) にて 200 倍拡大で 30 視野観察した。

Table 2. Comparison of acid-fast staining between modified Acris-tain, conventional Acris-tain, and Auramine O stain.

a)				
		Modified Acris-tain		Total
		+	-	
Conventional Acris-tain	+	159 (78.7)	3 (1.5)	162 (80.2)
	-	10 (5.0)	30 (14.9)	40 (19.8)
Total		169 (83.7)	33 (16.3)	202 (100)
b)				
		Modified Acris-tain		Total
		+	-	
Auramine O stain	+	165 (81.7)	9 (4.5)	174 (86.1)
	-	4 (2.0)	24 (11.9)	28 (13.9)
Total		169 (83.7)	33 (16.3)	202 (100)
c)				
		Auramine O stain		Total
		+	-	
Conventional Acris-tain	+	160 (79.2)	2 (1.0)	162 (80.2)
	-	14 (6.9)	26 (12.9)	40 (19.8)
Total		174 (86.1)	28 (13.9)	202 (100)

なお, 菌体の確認は 500 倍に拡大して行った。観察の結果は抗酸菌検査ガイド 2016<sup>2)</sup>に従い記録した。有意差の検定にはカイ二乗検定を用い,  $p < 0.05$  を以て有意とした。

### 抗酸菌基準株に対する染色像の比較

結核研究所抗酸菌部で保有する抗酸菌基準株 8 株 (*Mycobacterium tuberculosis* ATCC 27294, *Mycobacterium avium* ATCC 25291, *Mycobacterium intracellulare* ATCC 13950, *Mycobacterium gordonae* ATCC 14470, *Mycobacterium kansasii* ATCC 12478, *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977, *Mycobacterium fortuitum* ATCC 06841, *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752) を使用した。対象株をマイコプロス (極東製薬工業) へ接種し, *M. chelonae* のみ 30°C, それ以外の抗酸菌は 37°C にて  $OD_{530} = 0.2$  になるまで培養した。培養菌液 0.1 mL を 4 枚ずつスライドガラスへ塗抹し, 臨床検体に対する染色性能の評価と同様のアクリスティン, 改良型アクリスティン, オーラミン O 染色の 3 方法, およびチール・ネールゼン染色 (チール・カルボンフクシン液, 武藤化学) を行い, LED 蛍光顕微鏡で染色像を観察した。なおチール・ネールゼン染色は抗酸菌検査ガイド 2016 に従って染色・観察を行った。

## 結 果

### 臨床検体に対する染色性能の評価

結核および非結核性抗酸菌症診療中の患者検体 202 検体に対する各染色方法の結果を Table 1 及び Table 2 に示した。改良型アクリスティンとアクリスティンは陽性一致 159 検体, 陰性一致 30 検体, 一致率は 93.6% (95% CI 90.2-96.9, kappa=0.783), 陽性率, 改良型アクリスティンとオーラミン O 染色は陽性一致 165 検体, 陰性一致 24 検体, 一致率は 93.6% (95% CI 90.2-96.9, kappa=0.749), オーラミン O 染色とアク

リスティンは陽性一致 160 検体、陰性一致 26 検体、一致率は 92.1% (95% CI 74.9-100, kappa=0.719) であり、kappa > 0.6 を以ていずれも十分な一致を示した。カイ二乗検定の結果、改良型アクリスティンとアクリスティンで  $p=0.37$ 、改良型アクリスティンとオーラミン O 染色では  $p=0.49$ 、アクリスティンとオーラミン O 染色で  $p=0.11$  を以ていずれも有意差を認めなかった。改良型アクリスティンがアクリスティンよりも塗抹陽性度が高い検体は 35 検体、低い検体は 5 検体、改良型アクリスティンがオーラミン O 染色と比べ塗抹陽性度が高い検体は 19 検体、低い検体は 12 検体、アクリスティンがオーラミン O 染色と比べ塗抹陽性度が高い検体は 8 検体、低い検体は 32 検体であった。陽性と陰性に結果が乖離した例は多くは一方が ± (菌数 1-2/30 視野) の場合であったが、アクリスティン陰性かつ改良型アクリスティン 1+ を 4 検体 (菌数は 30 視野中 3 が 1 検体, 8 が 1 検体, 10 が 2 検体)、改良型アクリスティン陰性かつオーラミン O 染色 1+ を 1 検体 (菌数は 30 視野中 3)、アクリスティン陰性かつオーラミン O 染色 1+ を 4 検体 (菌数は 30 視野中 3 が 2 検体, 7 が 1 検体, 10 が 1 検体) 認めた。残渣が多い場合、アクリスティンでは背景が強く発色し、観察に多く時間を費やした例を複数経験した。脱色不足の可能性を考慮し、背景が強く発色した検体を用いて再度塗抹標本を作成し、添付文書に記載された脱色時間の範囲内で脱色を 30 秒と 45 秒、1 分の 3 通りに変えて検討したが、背景の発色に変化は認められなかった。残渣があまりにも多く観察が困難な場合は脱色工程から再度やり直す事で背景の発色を抑えることができたが、他の検体と条件を同じくするために、脱色をやり直した場合の結果は採用しなかった。

#### 抗酸菌基準株に対する染色像の比較

抗酸菌基準株 8 菌種を染色した結果を Figure 1 に示した。*M. tuberculosis* と *M. kansasii* はいずれの染色方法でも明瞭な染色像が得られた。*M. gordonae*, *M. avium*, *M. intracellulare* の 3 菌種においてはアクリスティンのみ十分染色されず、緑色の弱い蛍光を発する菌体が一部に認められた。迅速発育菌 3 種、即ち *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* はどの蛍光染色法においても菌体の染色性が不均一であったり、発色が弱いものが殆どであった。チール・ネールゼン染色は迅速発育菌に対しても明瞭な染色像を認めたが、一部不均一に染まる菌体も認められた。アクリスティンは *M. tuberculosis* と *M. kansasii* を除く基準株において、明らかに他の染色法より発色が弱い菌体が多く認められた。改良型アクリスティンは総じて、蛍光色は異なるもののオーラミン O 染色と同様に迅速発育菌以外の抗酸菌基準株に対し明瞭な染色像が得られた。

#### 考 察

抗酸菌症診療中の患者検体を用いた試験の結果、改良型アクリスティンとアクリスティン、および改良型アクリスティンとオーラミン O 染色の一致率は同じであり、有意差検定の結果改良型アクリスティンとアクリスティン、オーラミン O 染色との間に有意差は認めなかった。陽性と陰性に結果が乖離した例の多くは一方が ± であり、一方が 1+ の場合であっても観察された菌数は 30 視野中 10 未満の検体のみで

あった。これらの結果は、塗抹スライドを全視野ではなく 30 視野観察したものであり、有意差検定からも結果の乖離は誤差の範囲であることが示された。しかしながら改良型アクリスティンよりもアクリスティンの方が高い塗抹陽性度を示した検体は 5 検体、一方アクリスティンよりも改良型アクリスティンの方が高い塗抹陽性度を示した検体は 35 検体であり、前者の 7 倍であった。またオーラミン O 染色と比較して、より高い塗抹陽性度を示した検体はアクリスティンでは 8 検体、改良型アクリスティンでは 19 検体であり、前者の倍以上であった。加えて、仮にオーラミン O 染色を基準とした場合、アクリスティンよりも改良型アクリスティンとの一致率の方が高く、アクリスティンの感度は 92.0%、改良型アクリスティンの感度は 94.8% であり、染色液の改良によって検出感度が上昇していると考えられた。

検体中の残渣が多い場合、アクリスティンでは背景が強く発色し、観察に多く時間を費やした例を複数経験したが、改良型アクリスティンにおいてはそういった現象は確認されなかった。明瞭な染色像が得られることが塗抹検査の精度向上、観察時間の短縮や観察者の負担軽減に繋がることは明らかと考えられた。アクリスティンとオーラミン・ローダミン染色、チール・ネールゼン染色の比較評価<sup>3)</sup>においては 3 者の性能は同等であり、MAS コートスライドグラスを使用してアクリスティンで染色すると非特異的蛍光が少ないと報告されている。しかしながら今回アクリスティンで染色した際、残渣が強く染色された検体が複数認められ、そういった場合は脱色工程からやり直すことで背景の発色を抑えることができた。前述の研究では少ないとされていた非特異的蛍光が今回認められた理由のひとつとして、使用している検体が異なることが考えられた。さらにもし染色手技が原因であれば、改良型アクリスティンでは検査者の熟練度に関係なく安定した結果が得られるようになったものと考えられた。

抗酸菌基準株に対するそれぞれの染色像を比較したところ、遅発育菌である *M. avium*, *M. intracellulare* および *M. gordonae* の 3 菌種において、アクリスティンと比べて改良型アクリスティンを含む他の抗酸菌染色法の方が強い発色を認めた。基準株のみの検討ではあるが、アクリスティンの改良によって非結核性抗酸菌の染色性能が向上しているものと考えられた。迅速発育菌である *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* を蛍光染色法 3 法で染めた場合、いずれの方法でも 1 視野あたり 0~1 個明瞭に染まった菌体を認める程度であった。迅速発育菌が蛍光染色法で染まらない原因として、①蛍光色素が菌体内に浸透しない、②蛍光色素がターゲットに吸着しない、③脱色され易い、の 3 通りが考えられるが、脱色せずに水洗のみ行った場合では非常に強い蛍光を発すること、またオーラミン O 色素は抗酸菌の細胞壁の主成分であるミコール酸と結合する一方<sup>4)</sup>、アクリジンオレンジは DNA の二重らせん構造の架橋部分と結合し、それぞれターゲットが異なるにもかかわらずどちらの染色法も迅速発育菌の染まりが悪いことから、脱色され易いということが主な原因であると考えられた。またチール・ネールゼン染色との違いとして加温が挙げられるが、蛍光染色液を加温しても迅速発育菌は染まらなかった (データ記載なし)。抗酸菌の抗酸性は不安定なものであり、結核菌であっても飢餓状態<sup>5)</sup>や、ミ

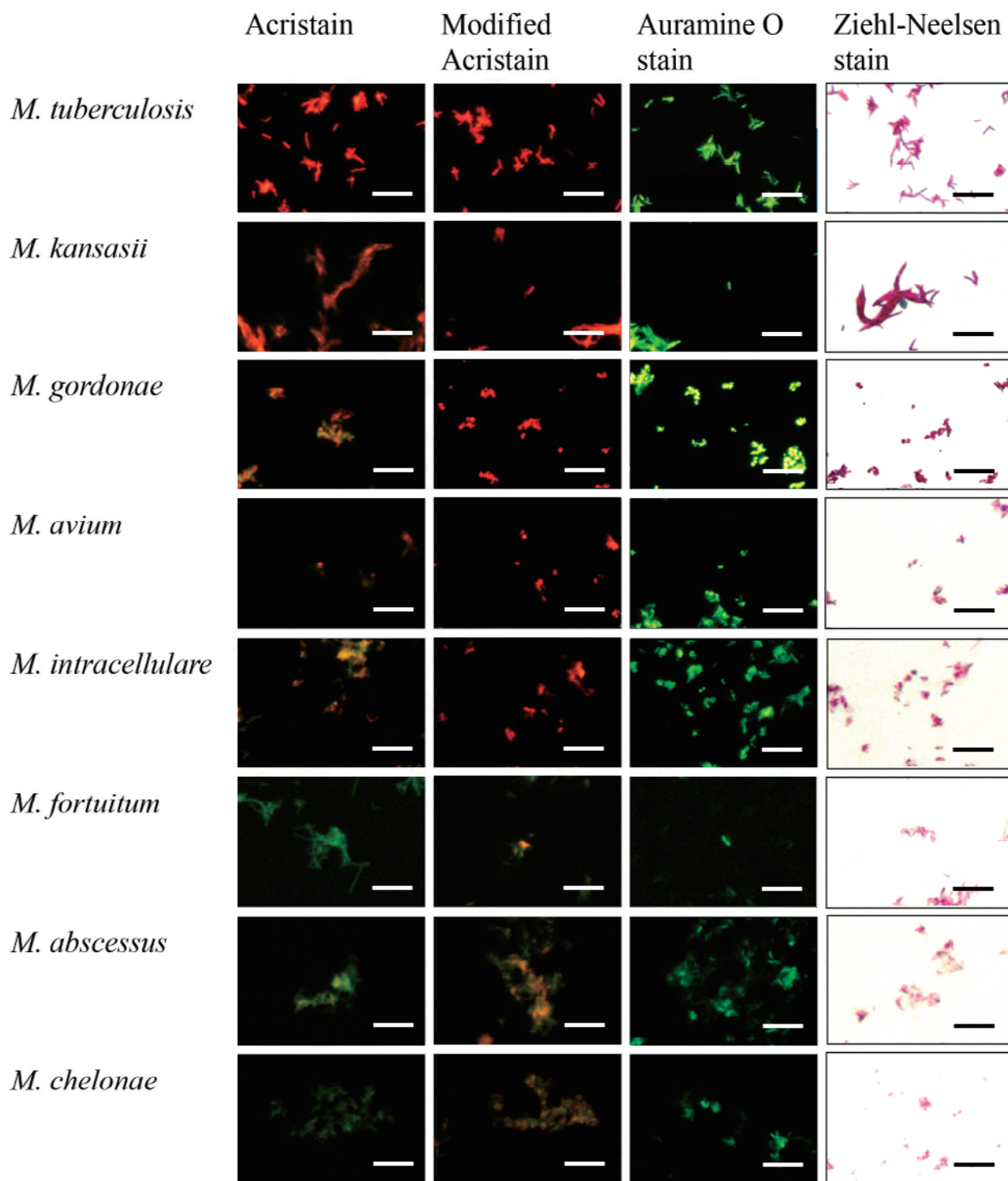


Figure 1. Stained images of *Mycobacterium* type strains using Acristain, modified Acristain, Auramine O stain, and Ziehl-Neelsen stain. Scale bar = 10.0  $\mu$ m.

コル酸の $\beta$ 鎖の伸長反応を行う *kasB* 遺伝子の欠失<sup>6)</sup>, それに伴う細胞壁の脂質の密度低下<sup>7)</sup>といった要因で抗酸性が失われると報告されている。また *M. fortuitum* の臨床分離株を対象としてオーラミン・ローダミン染色, アクリスティン, チール・ネールゼン染色の3法を実施した研究<sup>8)</sup>では, チール・ネールゼン染色で塗抹陽性となった株の半数以上が蛍光法で陰性だったと報告されている。American Thoracic

Society (ATS) と Infectious Diseases Society of America (IDSA) の発表した非結核性抗酸菌症のガイドライン<sup>9)</sup>においても, 迅速発育菌はチール・ネールゼン染色もしくはキノヨン染色が有効であるが, 蛍光染色法では多くの場合染まらないと記載されており, 迅速発育菌の塗抹検査において蛍光染色法のみでの判断は避けるべきと考えられた。

## 総 括

抗酸菌症患者の喀痰検体において、改良型アクリスティンはアクリスティンとの間で陽性率に有意差を認めなかったが、アクリスティンより高い塗抹陽性度を示す検体が多く認められた。また抗酸菌基準株のみを用いた試験ではあるが、*M. avium*, *M. intracellulare* および *M. gordonae* の3菌種においてアクリスティンよりも改良型アクリスティンを含むその他の染色方法で明らかに強い発色を認めた。改良型アクリスティンはアクリスティンと比べ染色性能の向上が認められ、オーラミンO染色と同等の染色性能を持ちつつも毒性の低いアクリジンオレンジを使用しており、また常温保存が可能なことから、抗酸菌塗抹検査に有用であると考えられた。一方、改良型アクリスティンにおいても他の蛍光染色法と同じく迅速発育抗酸菌の染色で偽陰性を示す可能性が示され、注意が必要と考えられた。

**利益相反：**申告すべき利益相反はありません。

## 文 献

- 1) 厚生労働省特定化学物質等中毒予防規則（昭和四十七年労働省令第三十九号）2017.
- 2) 日本結核病学会. 2016. 抗酸菌検査ガイド2016日本結核病

- 学会抗酸菌. 南江堂.
- 3) 平野和重, 浜崎園望, 青野昭男, 他. 2003. アクリジンオレンジ抗酸菌蛍光染色液, アクリスティンの評価. 臨床と微生物 30: 201-205.
  - 4) Richards, OW. 1941. The Staining of Acid-Fast Tubercle Bacteria. Science 93: 190.
  - 5) Nyka, W. 1974. Studies on the effect of starvation on mycobacteria. Infect Immun 9: 843-850.
  - 6) Bhatt, A, N Fujiwara, K Bhatt, et al. 2007. Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. Proc Natl Acad Sci 104: 5157-5162.
  - 7) Yamada, H, A Bhatt, R Danev, et al. 2012. Non-acid-fastness in *Mycobacterium tuberculosis*  $\Delta$ *kasB* mutant correlates with the cell envelope electron density. Tuberculosis 92: 351-357.
  - 8) 吉田志緒美, 露口一成, 鈴木克洋, 他. 2013. *Mycobacterium fortuitum* を対象とした Ziehl-Neelsen 染色法と蛍光染色法における抗酸性の比較検討. 結核 88: 461-467.
  - 9) Griffith, DE, T Aksamit, BA Brown-Elliott, et al. 2007. An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med 175: 367-416.

## Clinical evaluation of modified acridine orange staining solution for acid-fast bacilli smear microscopy and stained images of *Mycobacterium* type strains

Yuriko Igarashi<sup>1)</sup>, Kinuyo Chikamatsu<sup>1)</sup>, Akio Aono<sup>1)</sup>, Katsue Motohashi<sup>2)</sup>, Hitomi Nakai<sup>2)</sup>, Hideki Aoi<sup>2)</sup>, Kazue Mizuno<sup>2)</sup>, Hiroyuki Yamada<sup>1)</sup>, Akiko Takaki<sup>1)</sup>, Satoshi Mitarai<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

<sup>2)</sup>Department of Clinical Microbiology, Fukujiji Hospital, Japan Anti-Tuberculosis Association

Modified Acristain (Kyokuto Pharmaceutical, Tokyo, Japan), acid-fast fluorescence staining solution using acridine orange, was modified. We evaluated the modified Acristain comparing with conventional staining methods. A total of 202 clinical samples were tested, including 187 and 15 sputa from tuberculosis and non-tuberculosis mycobacterium infection patients, respectively. Clinical samples were processed by conventional N-acetyl-L-cysteine and NaOH pretreatment method and re-suspended in phosphate buffer. Smear samples using these suspensions were examined with three staining methods; modified Acristain, conventional Acristain (Kyokuto Pharmaceutical) and Auramine O (Mutoh Chemicals) staining. The modified Acristain showed 93.6% of overall agreement between Acristain and Auramine O stain. Acristain showed 92.1% of overall agreement with Auramine O stain. Comparing the modified Acristain with the conventional Acristain, 35 samples showed higher smear positivity in the modified Acristain and 5 samples were vice versa.

In conclusion, the modified Acristain was considered useful as acid-fast fluorescence staining solution for smear microscopy with appropriate accuracy. The modified Acristain could reduce nonspecific glowing background and showed stronger fluorescence in several *Mycobacterium* type-strains compared with the conventional Acristain, and it showed high concordance among conventional acid-fast bacilli staining methods.