

組織切片内ノ結核菌及ビ癩菌ノ一新染色法 (三色染色法)

(昭和16年8月13日受領)

九州帝國大學醫學部細菌學教室(戸田教授)

助教 醫學博士 占 部 薫

(コノ研究ハ文部省科學研究費ニヨツタ)

はしがき

従來、組織切片内ノ結核菌ヤ癩菌其他ノ抗酸性菌ノ染色法トシテハ、一般ニ、Ziehl-Neelsen法又ハソノ色々ナ變法ガ用ヒラレテキルヤウデアアル。コレラノ方法ガ、抗酸性菌ソノモノ、檢出トカ觀察トカニ、極メテ割切ナ方法デアルコトニ異論ハナイ。併シ、コレラノ染色法デハ、菌ハ赤ク染リ、組織ハ複染色液ノ色調ニ應ジテ、核モ原形質モ一多少ノ濃淡ノ差ハアルニセヨ一青、黄、綠或ハ褐色等ノウチノドレカノ一色ニ染メ揚ゲラレテ了ヒ、ソノ結果、病理組織學の所見トカ、菌ト組織細胞トノ間ノ正確ナ關係相トカハ、殆ド犠牲ニサレナケレバナラナイトイフ不利ハ認メナケレバナラヌ。デアルカラ、實際上多クノ場合、同一種類ノ組織切片ニ就テ、一方デハ、菌ノ檢索ヲ目的トスル Ziehl-Neelsen 法又ハソノ類似法ヲ施シタ染色標本ヲ作り、他方ニハ、組織像ノ觀察ニ必要ナ「ヘマトキシリン、エオジン」染色法其他ヲ施シタ標本ヲモ作ツテ、先ヅ各別ニソレゾレノ目的ニ副ツタ觀察ヲ行ヒ、更ニ兩々相照ラシ合ハセ乍ラ、菌ノ組織細胞或ハ病變トノ關係等ヲ窺フコトガ行ハレテキルガ、コンナ煩瑣ナ方法ニヨツテモ猶成績ノ正鵠ガ期待出來ナイコトモ屢々經驗サセラレトコロデアアル。

以上ノヤウナ不利不便ヲ避ケル目的デ、組織切

片内ノ抗酸性菌ヲ、先ヅ、石炭酸「フクシン」液デ染メ、次デ「ヘマトキシリン」デ細胞核ヲ染色シ、細胞原形質ハ、石炭酸「フクシン」デ淡紅染サレタ状態ノマ、デ觀察スル方法モ行ハレテキル(Konrich⁽¹⁾、其他)ガ、コレハ「エオジン」染色ヲ併用シタ際ノ組織所見ニ匹敵ス可クモナイコトハ言フ迄モナイ。ソノ他、同ジ目的デ H.S. Willis⁽²⁾ハ、菌ヲ石炭酸「フクシン」デ、細胞核ヲ「ヘマトキシリン」デ、ソシテ細胞原形質ヲ Orange G 液デソレゾレ各別ニ染色スル方法ヲ案出シテ居リ、又最近デハ G. L. Fite⁽³⁾ガ、抗酸性菌ハ黑青染、核ハ褐染、結締組織纖維ハ赤染ソシテ筋纖維ハ黄染スルトコロノ「「フクシン・フォルムアルデヒド」法」、トイフ複雑ナ染色法ヲ發表シテキル。

私ハ、平常觀察ニ狎レテキルトコロノ「ヘマトキシリン、エオジン」染色標本中ニ、抗酸性菌ヲ、紫色、紅色以外ノ色素デ簡單ニ染メ出スコトガ出來タラ、日常ノ結核及ビ癩ノ細菌學の又ハ病理組織學の研究上、病原菌ト病變組織像トノ關係或ハ病原菌ノ環境等ノ觀察追究ニ、如何ニモ便利ダラウトノ考ノ下ニ、種々實驗シタ結果、先ヅコレナラバト思ハレル程度ノ染色法ガ得ラレタノデ、以下ソノ大要ヲ紹介シ、江湖ノ追試ト批判トヲ仰ギタイト思フ。

抗酸性菌ニ對スル染色々素ノ選擇

組織が「ヘマトキシリン」ト「エオジン」トニ染メラレルノデアアルカラ、抗酸性菌ハ紫色及ビ紅色以外ノ色調ニ染色サレナケレバナラナイト考ヘテ、先ヅ教室所藏ノ多種多様な色素ノウチカラ、次ノヤウナ多數ノ色素ヲトリアゲテ供試シタ。

1. 黒色系色素: Nigrosin, Wollschwarz, Naphtolschwanz, Janusschwarz, Alizarinblack-S.
2. 緑色系色素: Malachitgrün, Echtgrün, Chromgrün, Aethylgrün, Jodgrün, Naphtolgrün, Smaragdgrün, Diamantgrün, Viktoriagrün, Brillantgrün, Lichtgrün.
3. 橙、黄色系色素: Orange G., Methylorange, Orange I, Orange R, Chrysoidin, Martingelb, Naphthylamingelb, Mikado Goldgelb 2 R.
4. 青色系色素: Methylenblau, Nilblau, Viktoriablaue, Echtblau, Janusblau, Nachtblau.

以上ノ多數ノ色素ノウチ、日常一般ニヨク使用サレルモノテ目的ニ適フモノガ見付カレバ、コレニ越シタコトハナイト考ヘ、「メチレン」青トカ「マラヒット」緑等ニハ大イニ期待ヲカケテ試ミタガ、ドウモコレラハ染色力ガ比較的弱クテ、染色後封鎖迄ニ酸、酒精、「キシロール」等ノ脱色性ノアル薬液ヲ通過サセル機會ガ多イタメカ、脱色サレ易ク、一、二ノ媒染法ヲモ試ミタガソレデモ思ハシイ成績ガ得ラレナカツタ。トコロガ「トリアリールメタン」系色素デアアル Nachtblau (Grübler) 及ビ「オキサチン」系色素デアアル Nilblau (Grübler) ノ二ツノ色素ハ、ソノ染色力ガ非常ニ強大テ、ソレラノ純酒精飽和液 (5 gr : 100cc) ノ 10—20cc ニ對シテ 5% 石炭酸水 100cc ヲ加ヘタ染色液デ、組織内ノ抗酸性菌ヲ加温染色スルト、酸、酒精、「キシロール」ノヤウナ脱色劑ニ充分強ク耐エテ、最後迄菌ハ脱色セラレナイテ濃染ノマ、殘ルコトガ判ツタノデ、專ラコノ二種類ノ色素ヲ用ヒテ染色實驗ヲ進メテ行ツタ。

染メ方

イ、抗酸性菌ノ染色液

「ナハト」青液: 原液(「ナハト」青粉末 5 gr ヲ純酒精 100cc ニ飽和サセタモノ) 10cc ヲ 5%、石炭酸水 100cc ニ加ヘタ濾紙デ 1 回濾過シテ作

ル。

「ニール」青液: 原液(「ニール」青粉末 5 gr ヲ純酒精 100cc ニ飽和サセタモノ) 20cc ヲ 5% 石炭酸水 100cc ニ加ヘ濾過シテ作ル。

ロ、染メ方ノ實際

「バラフィン」切片標本ニ就テ述ベル。

1. 一般ノ「バラフィン」切片ノ場合ト同様ニシテ、脱「バラフィン」カラ順次脱「キシロール」ヲ行ヒ、水洗シテ脱酒精。
2. 「ナハト」青液又ハ「ニール」青液ヲモツテ、火焰上デ加温染色 1—2 分間、若クハ 37°C ノ孵卵器内デ 15—30 分間染色。
3. 色素液ヲ傾瀉シ、輕ク水洗。
4. 3% 鹽酸酒精デ脱色 10—30 秒(組織ガ殆ド無色ニナル迄)。次デ充分水洗。
5. Lugol 液(沃度 1 gr, 沃度加里 2 gr, 蒸餾水 300cc) デ 10—15 分間室温處置。輕ク水洗。
6. 「ヘマトキシリン」液ニ 5—15 分間浸漬。輕ク水洗。
7. 1% 鹽酸酒精デ 5—20 秒分別。
8. 流水デ 30 分—1 時間水洗。
9. 「エオジン」液デ 15—30 秒染色。輕ク水洗。
10. 濾紙ノ間ニ挟ンデ充分脱水。
11. 無水酒精中ニ 5—15 秒。「クレオソート・キシロール」中ニ寸時(透化)。
12. 濾紙デ「クレオソート・キシロール」ヲ除去シ、直チニ中性バルサムデ封鎖スル。

ハ、染色所見(著色圖 1、2、3 参照)

組織ハ普通ノ「ヘマトキシリン・エオジン」染色標本ト較ベテ大差ノナイ染り方デアアルガ、唯核ガ多少紫褐色ニ染ルコトガ屢々アル。併シ組織細胞ノ性質、種類、核ノ細胞構造等ハ凡テ普通ノ「ヘマトキシリン・エオジン」染色標本ノ場合ト同様ニ極メテ鮮明ニ觀察サレル。

結核菌或ハ癩菌ハ紅染原形質ノ内外其他隨所ニ美シク鮮ヤカデ濃厚ナ「コバルト」色ニ染メ出サレ、周圍ノ紅色ト鮮明ナ對照ヲナシテ(著色圖

参照)、多少浮キ上ツタヤウナ感ジデ眼ニ映ジテ來ルカラ假令1個々々散在シテキルヤウナ菌デモ見逃サレルコトハナク又周圍ノ環境ト菌トノ關係、或ハ細胞ノ種類、變化等ト菌トノ關係ノヤウナモノモ充分ニ追究スルコトガ出來ル。

尙、染色サレタコレヲノ菌ハ、石炭酸「フクシン」染色ノ場合ニ較ベテ多少太ク見エルカラ、乾燥系400倍程度ノ擴大率デ鏡檢シテモ孤在菌迄モガ明カニ探シ出サレル。從ツテ油浸系ニヨル鏡檢ヨリモ遙カニ短時間デ充分ニ全視野ニ互ル菌ノ檢索ガ可能デアル。

菌ノ斷裂型ヲ顆粒モ、本染色法デ觀察スルコトガ出來ル。但シ、顆粒ハ菌體ガ強く濃染シタ際ニハ可成リ認メ難クナルヤウダ。

尙、石炭酸「フクシン」染色デ斷裂型ノ菌ガ多數見エルヤウナモノデモ、コレヲ「ナハト」青デ染メテ見ルト完全ナ桿菌狀ノモノガ多數ヲ占メテキルコトガアル。コレハ前者ノ染色力ガ弱イタメニ菌體ノ一部ガ充分ニ染ラナイ結果ガアラウト考ヘラレルノデアルガ、コンナコトハ病竈部ノ抗酸性菌ノ形態ト病期トノ關係等ニツイテ研究スル際ニハ充分注意サレネバナラヌコトガラウ。

ニ、染色上ノ注意事項ソノ他

1. “染メ方”ニ於ケル、凡テノ操作時間ハ、組織切片ノ厚サ、菌ノ種類、室温、「ヘマトキシリン」及ビ「エオジン」ノ染色力一癖一等ノ如何ニヨツテ適宜加減サレナケレバナラヌコトハ無論デアル。

2. 本法ニヨル染色標本中ノ抗酸性菌ハ、人癩菌ノヤウナ最も脱色セラレ易イモノニ於テモ、染色後今日テ既ニ2ヶ月ニナルガ、染色直後ニ較ベルト多少ハ脱色サレテハキルモノハ、尙比較的ヨク保存サレ、充分觀察ニ堪エル状態デアル。コレハ、Lugol液ニヨル處置ノオ蔭デアツテ、コノ處置ヲ省略シタ場合ニハ、最も脱色サレ難イ結核菌デモ40日後ニハ可成リノ程度迄脱色サレ、人癩菌ノ如キハ2週間後ニハ既ニ殆ド全ク脱色サレル。

Lugol液ノ代リニ、10%食鹽水ヲ以テ30分位處置シテモ相當ノ程度迄所期ノ目的ハ達セラレル。

短時日ノ保存テ、コト足リルヤウナ場合ニハ勿論

Lugol液又ハ食鹽水ニヨル處置ヲ省略シテモヨイ。

3. 「ニール」青ニ比シテ、「ナハト」青ノ方ガ染色力ガ強イカラ、人癩菌ヲ染メル時ニハコレヲ以テ、火焰上ノ加温染色デハ2分間、体温ニヨル染色デハ30分間以上染色シタ方ガ安全デアル。若シ「ニール」青ヲ用ヘル場合ニハ、ヨリ永イ染色時間ヲ與ヘタガヨイ。結核菌及ビ鼠癩菌ハ「ニール」青デモヨク染ル。コノヤウナ差ハ、コレヲ三菌ノ被染性ノ強弱ニ基クモノトミルヨリモ、ムシロ、ソレヲノ脱色劑ニ對スル抵抗力ノ差ニ因ルモノト考ヘタ方ガ妥當ノヤウデアル。種々實驗シテ對比シタ結果、脱色劑ニ對シテ最も強く耐エルノハ、結核菌デ、次ガ鼠癩菌、最も弱イノガ人癩菌トイフ成績ヲ得タ。

4. 「ヘマトキシリン」ニヨル染色時間ハ問題ニハナラヌガ、「エオジン」液殊ニ「エオジン」酒精液テノ染色時間ハ、許サレル範圍内テ短縮スルコトガ肝要デアル。何故カトイフニ、第一ニ「エオジン」酒精液ニ永ク染色標本ヲ浸シテオクト、青染シタ菌ガ多少ニ不拘脱色サレル懸念ガアリ、第二ニ「エオジン」染色時間ガ永クテ「エオジン」ガ著キスギルト、稀酒精ヨリ漸次濃酒精ヘト段々ニ移シテ、脱水ト共ニ餘分ノ「エオジン」ヲ除去シナケレバナラナクナルガ、ソノ際菌モ少シツ、脱色サレルコトヲ免レ得ナイ筈ダカラデアル。

5. 標本ノ封鎖ハ、Lugol液處置ヲ行ツタ染色標本テハ中性「バルサム」テ行フト、菌ノ脱色ガ最も緩徐ダカラ、安全デアル。多少成績ガ劣ル場合モアルガコレト大差ガナイコトガ多イ「チエーデルン」油ヲ代用スルコトモ許サレル。Lugol液處置ヲ省略シタ標本テハ中性「バルサム」ヨリモ「チエーデルン」油ノ方ガ菌ノ脱色ガ遅イカラ後者デ封シ可キダ。

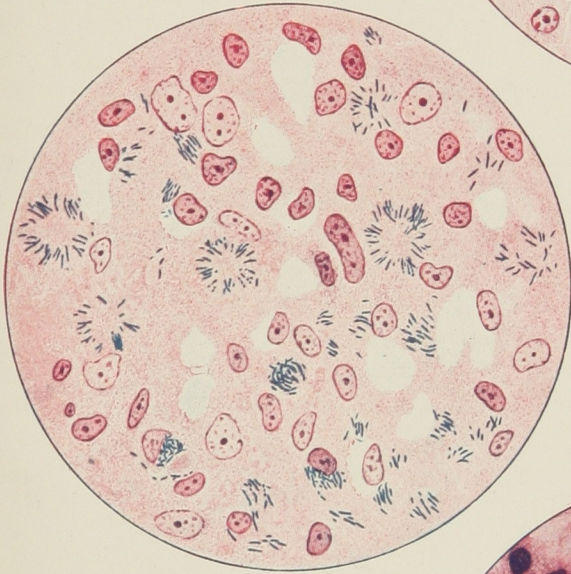
酸報「バルサム」ハ何レノ場合デモ2—3日テ菌ヲ脱色サセルカラ使用嚴禁デアル。尤モ、鼠癩肉芽ノ様ニ細胞内ニ菌ガ一杯詰ツテキテ、組織像ノ觀察ニ支障ガアルヤウナ場合ニハ、同一種類ノ組織切片ヲ一枚載物硝子面ノ二ヶ所ニ別々ニ貼リツケ、前記ノ方法テ染色シタ後、一方ハ中性「バルサム」テ封ジ、他方ハ酸性「バルサム」テ封ジテ置クト2—3日後ニハ後者ハ菌ガ完全ニ脱色サレテ了フカラ、コレニヨツテ仔細ナ組織學的觀察ガ可能トナリ、前者ニヨツテ菌ノ狀況及ビ菌ト環境トノ間ノ關係モ窺フコトガ出來ルカラ重寶デアラウ。

古 部 論 文 附 圖

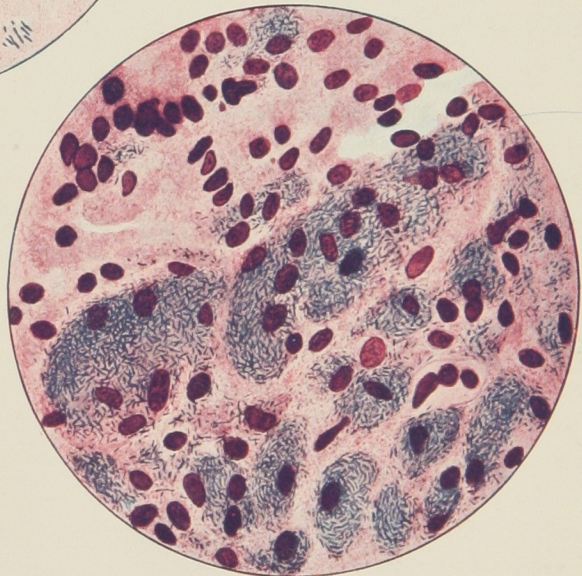
第 1 圖



第 2 圖



第 3 圖



the nature of the antigen. This is because the antigen used for the complement-fixation test serves our purpose better in proportion to the weakness of its anti-complementary reaction, namely the width of the useable dose of antigen. (By the author.)

The "Three-Colors Method" of Staining Acid-Fast Bacilli in Paraffin Sections.

By

Assist. Prof. Dr. **Kaoru Urabe.**

*From the Bacteriological Department (Prof. Dr. T. Toda) of the Kyushū
Imperial University, Hukuoka, Japan.*

The following method is given by the Author and is found to be the reliable means of staining acid-fast bacilli in sections.

Method: Begin with sections dry and adherent to the slide.

Then treat in the following way:

1. Place in xylol 1 minute
2. Second jar of xylol..... 1 minute
3. Alcohol, absolute 1 minute
4. Alcohol, 95%..... 1 minute
5. Alcohol, 80%..... 1 minute
6. Water 1 minute
7. Stain in, Nachtblau (Gruebler) 0.5 g., alcohol abs. 10 cc., phenol crystals 5,0 g. and distilled water to make 100,0 cc., or Nilblau (Gruebler) 1,0 g., alcohol abs. 20,0 cc., phenol crystals 5,0 g. and distilled water to make 100,0 cc., at 37°C for from 15 to 30 minutes, or steam for from 1 to 2 minutes. The longer periods are recommended for lepra bacilli.
8. Wash in water
9. Decolorized in 1% Hcl-alcohol . . . 1/2 to 1 minute (until blue disappears)
10. Wash thoroughly in water
11. Place in Lugol's fluid . . . 10 to 15 minute at room temperature
12. Water 1/2 minute
13. Stain in hematoxylin 5 minute or longer
14. Decolorize in 1% Hcl-alcohol 10 to 15 seconds
15. Wash in running water until hematoxylin is blue, usually . . . 30 to 60 minutes
16. Stain in eosin 15 to 30 seconds
17. Water 1/2 minute
18. Blot with filter paper
19. Dehydrate in alcohol, absolute 10 seconds
20. Clear in xylol 5 seconds
21. Blot with filter paper and mount in neutral balsam.

By these staining procedures acid-fast bacilli (tubercle bacilli as well as human and rat leprosy bacilli) stain clear beautiful marine blue, nuclei brown-violet and the cytoplasm red.

(Author's abstract.)