

Rickettsia Prowazeki の簡易染色法

(次亜塩素酸の媒染を應用)

金沢医科大学細菌学教室(主任 谷教授)

眞 田 一 富

Kazutomi Sanada

(昭和24年11月2日受附)

第1章 緒 言

従来, Rickettsia (R と略記) 特に (Rickettsia Prowazeki (RP と略記) の染色液として Giemsa 液が使用せられ, その後種々なるR染色法が報告されたが, 孰れもその染色所見の不鮮明乃至は技術の繁雜なるために, 一般に普及するに至らなかつた。

之等のR染色法中には Castaneda 法^{1, 2)} (1930, 1936), 二木法³⁾ (1933), 細川法⁴⁾ (1934), 波多野・高松等の Illuminol R 染色法⁵⁾ (1935), 伊藤法⁶⁾ (1935), 緒方・宮田・寺昌等の Azur II, Victoriablau 4 R 加 Illuminol R 染色法⁸⁾ (1935), 最近に於ては Macchiavello 法⁹⁾ 及同菱法¹⁰⁾ (1939, 1945) 等があり, 殊に Macchiavello 法は良法であるとされておるが, 脱色時の技術的困難と pH に注意しなければ良結果を得られない難点がある。Giemsa 法に匹敵するものと

しては, 緒方等の Illuminol R 染色法があるが, 氏等も指摘して居る様に同法は Giemsa 液の主要成分である Azur II を使用すること, 及 Illuminol R が感光性色素であるために早期に褪色する欠点を有しておる⁸⁾。

そこで私は, Giemsa 液の第一の欠点たる染色時間の比較的長いことと, 國産 Giemsa 液の優秀なものの入手困難な現況よりして RP の実地検出に際し, より簡単に而も短時間に RP を染色し得る様な他の方法を得ようと考え研究を重ねるに及び, 偶々谷教授指導の下に盛永が報告せる Leptospira 及 Treponema の染色に於ける次亜塩素酸媒染法⁹⁾ (谷・盛永染色法) を用ひて好成绩を得, 更に該法の固定と媒染を一操作に簡約して RP 染色に適する条件を検査したので茲に報告するものである。

第2章 実験材料及実験方法

(I) 實驗材料

- a) 供試 RP. 教室保存の伊藤株及 Breinl 株
- b) 次亜鹽素含有液は工業用晒粉 (丸石製) を用ひた。

(II) 實驗方法

- a) 塗抹標本作製方法
RP の孵化鶏卵々黄囊内培養に於ける卵黄囊の胎仔に近い部分の小片を採り, 生理的食鹽水で充分洗滌したる後, 可及的に卵黄を除去し, 豫め滅菌したシャーレ中の濾紙で水分を除き清拭載物硝子上に薄く塗抹す

る。

b) 染色方法

前記塗抹標本を室温にて乾燥後, 次亜鹽酸水溶液 (晒粉液) を Ruge 變法液で稀釋した固定媒染液にて 1~10分間處置し, 次で石炭酸 ゲンチアナ 紫等の色素を以て大體30秒~10分間染色し, 水染乾燥後檢鏡した。

c) 染色成績の判定標準

淨水 1cc に I 滴の割合の Giemsa 液 (Glubler 製) にて30分間室温にて染色した RP 塗抹標本の染色濃度

及鮮明度を基準として之を卅なる記號で記載し、順次染色度の低下に従つて卅, 卅, 卅, 卅, 卅 及 一とした。卅は辛うじて RP の染色像を認め得る程度のもの

である。一は不染性を示し、卅, 卅は Giemsa 液染色法より優るものを示す。

第3章 実験成績

第1節 晒粉水溶液と Ruge 変法

液との好適混合比

谷・盛永染色法に於ては、先づ Ruge 変法液 (0.2% 氷醋酸加20%ホルマリン水) にて2分間固定をなし、次で有効塩素量約0.05%の晒粉液で2分間処置する。即ち固定と媒染を別々に行うのであるが、私は之を第1表に示す様に、1%有効塩素量含有晒粉水溶液を Ruge 変法液にて5倍、10倍、20倍、40倍に稀釈し、その有効塩素量 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.025%含有の4

種の固定媒染液を作り、夫々1~10分間室温処置、水洗後石炭酸ゲンチアナ紫液で30秒間室温で染色をなし次の如き成績を得た。

尚、晒粉の有効鹽素量は製造過程及保存期間により相違するけれども、約30%内外の含有量を有してをる⁹⁾。故に晒粉 10g を乳鉢に採り少量の蒸溜水を加へて磨碎泥状としたものをコルベンに移し、更に蒸溜水を加えて全量を 300cc となし、充分振盪後濾紙にて濾過、かくし有効鹽素量約1%の液を得る。之を原液として保存し、用に臨み Ruge 變法液で所要濃度に稀釋して用ひた。

第1表 1%晒粉水溶液と Ruge 變法液との好適混合比

群 別	稀釋度	有効鹽素 濃度(%)	作 用 時 間					
			1 分	2 分	3 分	4 分	5 分	10 分
I	5 倍	0.2	卅	卅	卅	卅	卅	卅
II	10 倍	0.1	卅	卅	卅	卅	卅	卅
III	20 倍	0.05	卅	卅	卅	卅	卅	卅
IV	40 倍	0.025	卅	卅	卅	卅	卅	卅
對 照	Ruge 變法液 (晒粉媒染なし)		+	卅	卅	卅	卅	卅
	火焰固定		+ 或 -					

第1表Iに於ては作用時間1分でRPは既に濃紫染するが塗抹面は一般に清明でなく、4分以上作用する時はRPはGiemsa法に比して形態が膨大して見え、而もR特有の兩極染色様の像等は見られず、全体一様に濃紫染するだけである。

IIでは2分間処置でGiemsa液の濃度に達し、3~4分で染色度が最高となり、極染色像も見られるが標本面は尙清明度に於て欠ける所があり、10分間ではRは一様に濃紫染し、RP特有の像を見ることが困難である。

IIIに於ては2分間でGiemsa液に匹敵する成績を示し、3~4分間では染色度が更に良好

となり塗抹面も清明でRPの形態も良く、10分間の所見はIIの場合と同様であつた。

IVでは標本面は清明であるけれども染色度はIIIに比較して劣る成績を示した。

即ち以上の結果から1%有効塩素量含有晒粉水溶液をRuge變法液で20倍に稀釈した有効塩素量0.05%含有の固定媒染液で、3~4分間前処置したものが最も良好であり、又塗抹面も清明であつた。

対照として火焰固定のみの場合とRuge變法液で前処置1, 2, 3, 4, 5, 10分間後晒粉液の媒染を行はずに染色せる場合に就き実験を行つたが、前者に於ては塗抹面は清明でなく

RP は辛うじてその染色像を認め得る程度で、中には不染性の場合もあり、後者に於ては2分間処置で \pm となるが更に作用時間を延長してもRPの染色度にはさしたる変化はなかつた。

R染色に於ては、塗抹材料が全て卵黄囊等の如き組織材料であるために蛋白質の含有が多く、従つて塗抹面を清明ならしめることは特に必要なのであるが、この点に関しては本固定媒染液はその中に存する醋酸並にホルマリン水中に自然分解により生ずる蟻酸の蛋白質溶解作用により⁹⁾、塗抹面を清明ならしめることを知つた。

第2節 本固定媒染液と染色時間との関係

第1項 各種色素の染色能力

色素は主として Triphenylmethane 系の比較的手近なものに就て実験した。色素液は全て使

用直前に新製し、0.5%水溶液とした。

染色法は0.05%有効塩素量保有の固定媒染液で室温前処置3分間、水洗後各種0.5%色素液で5~30分間室温で染色した。

その成績は第2表に示した如く本実験に於て、対照(火焰固定のみ)では Victoriablau 4R, Methylviolett, Gentianaviolett, Krystalviolett, Fuchisin の順に可染度が低下し、染色時間30分でも Malachitgrün, Wasserblau は不染性であつた。本固定媒染液を作用させる時はRPの染色度は各色素とも著しく上昇する。この場合では Gentianaviolett の可染度は Victoriablau 4R, Methylviolett 等のそれに匹敵するか、或は幾分良好なものもあつた。比較的染色度の弱い Methylenblau, Malachitgrün に於ても、本固定媒染液の前処置によればその可染度を+或は \pm 程度に迄上昇せしめ得る。但し、酸性色素

第2表 各種色素の染色能力

化学上の分類	色素名 (製造會社名)	色素の性状	染色 時間(分)	RP 染色濃度	
				本 法	對 照 (火焰固定)
Triphenyl- methane 及 Diphenyl- naphthyl- methane	Fuchsin (Merk)	鹽基性	5	\pm	+
			30	\pm	\pm
	Gentianaviolett (Grübler)	鹽基性	5	\pm	\pm
			30	\pm	\pm
	Victoriablau 4R (Grübler)	鹽基性	5	\pm	\pm
			30	\pm	\pm
	Malachitgrün (片山)	鹽基性	5	-	-
30			-	-	
Methylviolett (Grübler)	鹽基性	5	\pm	\pm	
		30	\pm	\pm	
Krystalviolett (片山)	鹽基性	5	\pm	\pm	
		30	\pm	\pm	
Wasserblau (Grübler)	酸性	5	-	-	
		30	-	-	
Thiazine	Methylenblau (Merk)	鹽基性	5	+	-
			30	\pm	\pm

たる Wasserblau は本法でも不染性を示した。

以上の結果から観ても最も手近で、而も入手容易と云う点から RP の染色液として、石炭酸ゲンチアナ紫液を撰んだ。

第2項 石炭酸ゲンチアナ紫液の染色時間

第1項と同様に本固定媒染液により3分間前処置したる後、石炭酸ゲンチアナ紫液で10秒、30秒、45秒、1分、2分、5分間夫々染色してその最適染色時間を検討した。(第3表参照)

第3表 石炭酸ゲンチアナ紫液の染色時間

染色時間	本固定媒染液3分間前処置		対 照	
	RPの染色度及形態	RPの色調	(火焰固定)	
10秒	卅 染色不良 形態稍不良	赤 紫	—	
30秒	卅 染色良好 形態良好	赤 紫	+	
45秒	卅 染色良好 形態良好	赤 紫	+	
1分	卅 染色良好 形態良	紫	+	
2分	卅 染色稍不良 形態稍不良	紫	+	
5分	卅 染色不良 形態不良	紫	+	

即ち10秒染色では染色度・形態ともに不充分であるが、30秒染色では既に Giemsa 法に於けるよりも RP の染色濃度大となり、RP は赤紫色に染色され、Giemsa 法に見る如く菌体内に於て濃淡二様の像を識別し得る。即ち桿菌型に於ては両極染色の像を呈し、この部は濃赤紫又は紫色で中央部は淡染する。勿論、中には全体殆ど同一調に染色されるものもある。RP は組織球及諸種細胞の原形質に比して濃染し、又、後者等はRよりも紫調を採る傾向があるから容易に之を識別し得る。

45秒染色に於ても同様であるが RP は30秒のそれに較べて紫調が稍強く、1分以上の染色では RP は紫色の同一調に染色され染色濃度は更

に上昇するが、30秒染色に見られる様な定型的 RP 像は得られない。即ち30秒~45秒間の染色が最も良好であつた。

第3節 本固定媒染液の有効期間

本固定媒染液中に於ける有効塩素量は保存期間によつて相違することは勿論であるが、本液を褐色瓶に入れゴム栓にて密閉して氷室内に保存し、製造直後、1週間、2週間、3週間、1ヶ月、2ヶ月の6回に亘つてその有効度を検討して見た。毎回 RP 塗抹標本を本法により3分間前処置し石炭酸ゲンチアナ紫液で30秒間染色した。(第5表参照)

第5表 本固定媒染液の有効期間

貯藏期間	直後	1週間	2週間	3週間	1ヶ月	2ヶ月
RP 染色度	卅	卅	卅	卅	卅	卅
對 照	卅	卅	卅	卅	卅	卅

註： 対照は Ruge 變法液のみによる前処置後媒染を行はしないもの。

本実験では第5表の如く保存1週間のものは製造直後に比して媒染能力が稍劣り、2週間後には卅程度に迄染色能の低下を來たし、3週間以上2ヶ月の場合に於ては、対照として使用した Ruge 變法液のみの処置の場合と同程度であつた。対照にあつては最初より染色度低く卅程度で、2ヶ月に亘るも殆ど変化はなかつた。

以上の成績及本液を室温に放置することより考え、本固定媒染液は製後少くとも1週間は保存し得るが、それ以上長期に亘れば媒染能力の低下を來たすから、使用直前に1%有効塩素量含有晒粉原液を Ruge 變法液で稀釈新製した方が良い。

上表に示した様に、Ruge 變法液は長期間保存するも餘り變化はなく、又、盛永⁹⁾によれば1%有効鹽素量含有の晒粉原液も氷室内に保存する時は數ヶ月間は有効であり、その有効鹽素量の損失は1週間約0.7%、1ヶ月後に至つて漸く約2.5%の損失を來たすのみで、實際の染色に當つてはこの程度の損失は左程考慮に入れる必要はない。

第5節 他の R 染色法との比較

今日迄 R の染色法として報告せられて居るものの中、伊藤の Victoriablau 4R 法、波多野等の Illuminol R 法、緒方・宮田等の Azul II, Victoriablau 4R 加 Illuminol R 法、Macchiavello 法、及 Giemsa 法等に就き RP の染色を行い、本法と比較した。

その結果は伊藤の Victoriablau 4R 染色法及波多野等の Illuminol R 染色法は染色濃度、RP の形態共に稍、Giemsa 法のそれよりも劣り、Macchiavello 法は染色一般に淡に過ぎ RP 特有の両極染色像を見ることが困難で、脱色時往々にして脱色の行き過ぎを來たし RP も Methyleneblau により青染することが多く、この点に技術的の困難がある。次に、緒方・宮田等の Azur II, Victoriablau 4R 加 Illuminol R 染色法は、染色濃度、形態共に Giemsa 法に匹敵し美麗であるが、Illuminol R が感光性色素であるために早期に褪色する欠点を有してゐる。私の方法では短時間の固定媒染、染色で染色濃度に於ては Giemsa 液の濃度に優り、RP の配

列、形態等も第2節、第2項に記載した如く良好であつた。唯、本法で注意すべきことは材料の蛋白が多いために塗抹を可及的に薄く行うことである。

RP 検出の優劣に就ては、最も普通に用ひられる Giemsa 法と本法を同一材料により比較検討した。即ち Ehrlich の Quadratische Okularblende を用ひて毎50視野の平均値を算出した。

Giemsa 法では50視野中1視野の平均 RP 検出数は 273、本法に於ては 278 個で、これらの差は僅少であり、全く同一値を得たと言つて良からう。

以上の諸方法は孰れも RP 接種卵の同一卵黄囊の10倍乳剤に就て実験を行つたもので、発見し得る RP 数は大体同様であるが、その染色操作の簡易、染色時間等を比較するならば、本固定媒染法は操作簡單で特殊な色素を必要とせず、且又、短時間に染色し得る点に於て他の方法に優るものである。尙、本法による RP 染色標本は2ヶ月以上の時日を経過するも褪色することはなかつた。

第4章 総括竝に考按

以上行つた実験を總括、考按すれば次の如くである。

1) 晒粉水溶液(次亜塩素酸)の媒染作用はその中に含有する遊離塩素の酸化作用に帰因するものである。私の RP 固定媒染液の主作用も以上の作用によることは勿論であるが、更に本液に含まれる醋酸竝にホルマリン水中に自然分解により生ずる蟻酸によつて蛋白質の溶解を來たし⁹⁾、塗抹面を清明ならしめる作用をも有する。R 染色の如き塗抹材料が蛋白質含有の大なるものにあつては、本法の利用は特に當を得たものと思考される。

本法に於ては、1%有効塩素量含有晒粉水溶液を Ruge 麥法液で20倍に稀釈したもの、即ち有効塩素量 0.05% を含有する液で3~4分間固定媒染を爲したものは RP の染色度竝に形態配

列が最も良好で、その作用時間10分間のものに於ては RP は一様に濃紫染する。

0.1% 含有のものでは4分以上処置する時は RP は濃染に過ぎ、形態膨大し染色不良である。0.025% 以下では標本面は清明ではあるが、染色度は 0.05% のものに比して劣る。

2) 本法に於て如何なる色素を使用すれば最も良好に RP を染色し得るかと云ふに、酸性色素たる Wasserblau の他は本固定媒染液の前処置によりその染色度を増強した。本法の前処置をした後 0.5% の各種色素液で5分間染色をする時は、Giemsa 液室温30分間染色の染色濃度に優るか、或は匹敵すると思はれる色素はその RP 染色性の強いものから列記すれば、Victoriablau 4R, Gentianaviolett, Methylviolett, Kristalviolett, Fuchsin の順となり、比較的染

色力の弱い Methylenblau 及 Malachitgrün も本固定媒染液の作用によつて染色力を増強せしめ得る。即ち入手容易、而も手近な色素といふ点から RP の染色液として石炭酸ゲンチアナ紫液を選んだ。

3) 本法に於ける RP 染色至適時間は石炭酸ゲンチアナ紫液に於ては、30秒~45秒間の場合が染色濃度、RP の形態配列とも最も良好であつた。1分間以上では RP は同一調に濃染され良好とは云い難い。

4) 本固定媒染液の保存有効期間は、本液を褐色瓶に入れゴム栓にて密閉して氷室内に保存すれば、1週間後に至るも尙製造直後に比して大差はないけれども、爾後時間の経過と共に漸次媒染能力の低下を示した。室温に保存することを考慮すれば、使用の都度晒粉原液を Ruge 変法液にて稀釈新製の方が安全である。尙、Ruge 変法液は長期間保存するも大した変化はなく、1%有効塩素量含有晒粉原液も氷室内に保存すれば数ヶ月間は有効で使用に適する。

5) 諸種 R 染色法を比較するに、RP の形態を美麗に表現し得るものとしては、Giemsa 法が今日迄最良とせられて來たが、唯、該染色法は相当の熟練に待たねば、常に一定した成績が得難いことと染色時間に長時間を要し、又、現況では國産品の良品を得難いことが遺憾とせられておる。

他の R 染色法中、伊藤の Victoriablau 4R 染色法、波多野等の Illuminol R 染色法は RP の染色濃度、形態ともに稍、Giemsa 法に劣り、緒方等の Azur II, Victoriablau 4R 加 Illuminol R 染色法は Giemsa 染色法に匹敵するも、Illuminol R が感光性色素であるために早期に褪色する欠点を有しておる。Macchiavello 染色法はその染色所見は美麗であるが、脱色時に技術的困難があり、往々後染色により RP も亦青染され検出が容易でないことがある。

本固定媒染法は RP の検出数に於ても以上の

諸法に劣らず、短時間で且容易に染色され、RP の形態も良好で、特殊の色素を必要とせず、その染色標本はバルサム封入をせず2ヶ月間保存しても褪色する様なことはなかつた。

6) 以上の成績より本染色法の術式を次の如くにした。

(1) 塗抹、乾燥

可及的薄く塗抹し、室温にて乾燥せしめる。

(2) 固定媒染

有効塩素量1%含有晒粉原液を Ruge 変法液で20倍に稀釈し、該液で3~4分間室温処置、水洗。

a) 晒粉原液の製法——市販晒粉は約30%内外の有効鹽素を含有するから晒粉 10g を乳鉢にて磨碎し、300c.c の淨水を少量ずつ加えて溶解せしめ、濾紙で1回濾過したものを褐色瓶に入れて氷室内に保存する。

b) Ruge 變法液の製法——20%ホルマリン水に0.2%の割に氷醋酸を加える。

染色の都度、晒粉原液を Ruge 變法液で稀釋使用する。

(3) 染色

石炭酸ゲンチアナ紫液で室温30秒~45秒間染色。

(4) 水洗、乾燥、鏡檢

7) 染色所見

RP は Giemsa 法に見る如く菌体に於て濃淡二様に識別し得られる。即ち桿菌型に於ては兩極染色の像を呈し、この部は濃紫赤色で中央部は淡染する。勿論中には全体殆ど同一調に紫赤染するものもあるが、RP は組織球或は諸種細胞の原形質に比して赤調が強いから容易に之を識別し得る。

從來、Aniline 系色素では難染性とせられて居た RP を、單染色により、簡単に、而も短時間の染色により之を染色することは私等の久しく待望する所であつた。本染色法はその一半を果し得たものと信ずる。

第5章 結 論

1) 谷・盛永染色法の固定と媒染を一操作に簡易化してR染色に應用することによりRPの簡易染色法に成功した。

2) 本固定媒染液で3～4分間前処置した場合RPの被染色性は最も良好である。

3) 本法によれば石炭酸 ゲンチアナ 紫液30秒

～45秒間の染色で充分である。

4) 本法は Giemsa 法等と同等な検出率を有し、特殊な色素を必要とせず、且、短時間で染色し得る特長を有する。

(摺筆に臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師谷教授に深く感謝の意を表するものである。)

主 要 文 献

1) **Castaneda**: Jour. of infekt. dis. **47**, 416 (1930). 2) **Castaneda**: Jour. of exp. med. **64**, 689 (1936). 3) **Zinsser**: Jour. of exp. Med. **69**, 181 (1939). 4) **二木**: 十全會雜誌, **38**, 1007 (昭8). 5) **細川, 藤野, 登田**: 日新醫學, **23**, 2474 (昭9). 6) **伊藤**:

北越醫學會雜誌, **50**, 303 (昭10). 7) **波多野, 高松**: 東京醫事新誌, **2934**, 1581 (昭10). 8) **緒方, 宮田, 寺邑**: 東京醫事新誌, **2945**, 2245 (昭10). 9) **盛永**: 十全會雜誌, **47**, 2627 (昭17). 10) **北岡**: 醫學のあゆみ, **1**, 317 (昭21).