

關東廳大連療病院

(院長豊田太郎博士)

所謂滿洲チフス」ノ研究

第3編 Rickettsia Prowazeki ノ簡易染色法

二 木 保 男

(昭和8年1月26日受附 特別掲載)

緒 言

余ハ前2編ニ於テ所謂滿洲チフス」ハ發疹チフス」ノ輕症ナルモノニ附セラレタル病名ニシテ、發疹チフス」ニ包括サル可キ疾患ナルヲ説キ、且又其病原ハ Rickettsia Prowazeki ナル事ヲ記載セリ。此發疹チフス」ノ病原體ナル Rickettsia Prowazeki (以下 Rickettsia ト略記ス)ノ研究ニ主要ナル點ノ一ツハ其檢出法ナル事ハ今更多言ヲ要セザル所ナリ、現在ニ於テハ病血ヲ吸血セシ鼠、又ハ罹患動物ヨリノ塗沫標本、或ハ組織培養ニヨリテ増殖セシメタル Rickettsia ノ塗沫標本ヲ「メチール酒精(時ニハ其他固定液モ應用セラル)ニテ固定シ Giemsa 氏液ヲ以テ染色スル方法最モ廣ク應用セラレツ、アリ。然ルニ1930年 M. R. Castaneda 氏ハ一新染色法ヲ發表シ余等モ本法ヲ追試シ比較的良好ナル染色法ナル事ハ既ニ前編ニ記載セシ所ニシテ、標本ヲ長ク保存セントスル目的ニハ素ヨリ Giemsa 染色法ニ適當ナルモ、一時的ニ然モ短時間内ニ Rickettsia ノ有無ヲ識ラント欲スルガ如キ場合ニハ Castaneda 氏法ハ極メテ便利ナル染色法ナリ。然レドモ實際上ニ於テ Castaneda 氏法ヲ追試スルニ尙多少ノ缺點アリ。

余ハ上述ノ缺點ヲ補ハンガ爲メニ Castaneda 氏染色法ヲ改良シ容易ニ鮮明ナル標本ヲ作ル事ヲ得タルヲ以テ其方法ヲ述べ且 Giemsa 氏染色法ニ際シテモ Castaneda 氏ノ Buffer-Formaldehyd-Solution ハ優秀ナル固定液ト稱スルヲ得可ク此點ヲモ併セテ記載ス可シ。

第1. Castaneda 氏染色法及其缺點

順序トシテ Castaneda 氏染色法ヲ紹介ノ爲メ簡記セバ次ノ如シ。

1. Castaneda's Buffer Solution

23.86瓦ノ Sodium phosphate ヲ1立ノ水ニ溶解シ(a液)、11.34瓦ノ monopotassium phosphate ヲ1立ノ水ニ溶解ス(b液)。(a)液ノ88分ト(b)液ノ12分トモ混ジ Berkefeld ノ濾過管ニテ濾過シ此濾液ノ Ph ヲ7.6ナラシム。

2. 染 色.

染色ニ際シ前記 Buffer Solution ノ20耗ニ「フォルマリン」1.0耗ト10滴ノ methylenblue 水溶液(1%)或ハ3滴ノ Loeffler's methylenblue ヲ加フ。本混合液ニテ3分間染色シ水洗後稀薄 Safranin 水溶液ニテ數秒間染色シ鏡檢ス。

即染色ハ僅ニ數分間ニテ足ル此際 Rickettsia ハ青色ニ其他ノ細胞等ハ Safranin ニテ赤色ニ染色シ Rickettsia ノ發見モ比較的容易ナリ。只本法ノ缺點トスル所ハ Safranin 染色ノ時間ノ長短ニヨリテ染色成績ノ一定セザル點ニシテ短キニ失スレバ標本ノ大部分ハ尙青色ヲ呈シ、又塗沫標本ノ薄キ部分ハ既ニ十分赤染セシ後ニ於テモ厚キ部分ニ於テハ容易ニ methylenblue ハ脱色セズシテ鏡檢ニ際シ青染セル Rickettsia ノ檢出困難ナル場合尠カラズ。又長時間 Safranin 染色ヲ行フ時ハ Rickettsia モ漸次赤染シ發見困難トナル。從ツテ本法ニヨリテハ Rickettsia ヲ青染セシムルハ容易ナルモ他ノ物質ノ青色ヲ脱色シ赤染セシムルニハ熟練ヲ要シ、且最初標本ノ塗沫ニ際シテモ細心ノ注意ヲ要スル等ノ缺點アリ。

第2. 余ノ改良染色法

1. Castaneda's Buffer—Formaldehyd—Solution+ methylenblue (Loeffler) ニテ3分間染色ス。

2. 水洗。

3. 0.1% Phloxin ヲ注加シ30秒ヲ經テ。

4. 水洗。

5. 0.5% Eosin 水溶液ヲ注ギ肉眼的ニ十分青色ノ消失スルマデ脱色セシム(標本ノ厚サニヨリテ多少ノ差異アルモ普通1分内外ニテ可ナリ)

6. 水洗。

7. 0.2% Safranin 水溶液ニテ數秒間染色ス。

8. 水洗, 乾燥, 鏡檢。

本法ニヨリテ染色スル時ハ從來ノ Castaneda 氏法ニ比シ Rickettsia ハ濃青色ヲ呈シ其他ノ物質ノ着色ハ殆ンド完全ニ脱色スルノミナラズ濃 Safranin 赤色ヲ呈シ Rickettsia ヲ多數ニ帶荷スル細胞ハ既ニ弱擴大ニテ容易ニ發見スル事ヲ得。又標本面ニテ細胞密集シ從來ノ方法ニテハ Rickettsia ノ檢出困難ナリシ部ニ於テモ容易ニ檢出スル事ヲ得。Giemsa 染色標本ニ於テモ細胞密集セル部ニ於テハ Rickettsia ノ檢出困難ナルモ、余ノ上述ノ方法ヲ以テセバ多少細胞ノ重複セル部分ニ於テモ尙容易ニ檢出スル事ヲ得可シ。

0.1% Phloxin 水溶液ヲ注加セシ後ハ標本ハ一般ニ帶紫青色トナリ、Eosin ヲ注加セシ後ハ急速ニ青色ハ脱色ス。此場合 Phloxin ヲ作用セシメズシテ最初ヨリ Eosin ヲ作用セシムルモ methylenblue ハ脱色スルモ Phloxin ヲ作用セシメタル場合ニ比シ著シク長時間ヲ要シ Rickettsia ノ脱色セシムル恐アリ。Eosin ヲ作用セシムル時間ハ極メテ薄キ標本ニ於テハ40—50秒ニテ足ル事アルモ一般ニハ1分内外ヲ適當トス、要ハ標本ノ下ニ白紙ヲ置キ上ヨリ透見シ肉眼的ニ青色ヲ認メ得ザルニ到ルヲ適度トス。水洗後尙青色殘存セシ時ハ更ニ Eosin ヲ注加ス可シ。長時間 Eosin ヲ作用セシムル時ハ Rickettsia ノ脱色セシム可シ。余ノ方法ノ要點ハ Castaneda's Buffer—Formaldehyd+ methylenblue ニテ染色セシ後 Phloxin 及ビ Eosin ニテ Rickettsia 以外ノ物質ヲ完全ニ脱色セシメタル點ニシテ其後ハ濃 Safranin 溶液ニテ短時間重染色シ Rickettsia ノ檢出ヲ容易ナラシメタリ。Rickettsia ハ此 Eosin ニヨル

脱色ニ對シ細胞等ニ比シ脱色シ難キモノト考フル事ヲ得ルモ、細胞内ニ存在スル Rickettsia ハ脱色シ難キモ細胞外ニ存在スル Rickettsia ハ既ニ脱色シ赤染スル點ヨリ考フレバ Rickettsiaモ他ノ細胞等ニ比シ著シク脱色シ難キモノニ非ザル事ハ明カニシテ細胞内ニ存在スル事ガ Rickettsia ノ脱色シ難キ一因ナル事明カナリ、從テ本染色法ニヨリテ檢出シ得ラル、ハ細胞内ニ存在スル Rickettsia ノミニシテ細胞外ノモノハ檢出容易ナラズ、一般ニハ Rickettsia 細胞内ニ存在スル事多キヲ以テ 日常實驗室内ニ於ケルノ檢査ニハ本法ハ極メテ短時間内ニ然モ容易ニ檢出シ得ラル、利益アリ。

尙之等ノ外注意ス可キ點ハ Castaneda 氏ノ Buffer Solution ハ製造後日數ヲ經過セシモノ程効果大ニシテ、1 週ニテハ殆ンド價値無ク其後漸次効果増加シ 1 年以上ヲ經過セシモノニ於テモ極メテ良好ナル結果ヲ得タリ、又標本ハ塗沫セシ當日ニ於テ最モ其被染性良好ニシテ翌日ハ既ニ多少染色不良トナリ 20 日以上經過セシモノニアリテハ其染色著シク不良トナル、又本法ニヨリテ染色セシ標本ハ長期間ノ保存ニ堪ヘズシテ既ニ 2—3 週後ニ Rickettsia ハ不明瞭トナル、又 Giemsa 氏染色ニヨリテハ Rickettsia ハ Polfärbung ヲ呈スル事アルモ本法ニヨリテハ平等ニ青染ス。

以上述ベタル余ノ Rickettsia 染色改良法ハ Castaneda 氏染色法ニ比シ細胞内ノ Rickettsia ヲ濃青色ニ、其他ノ細胞或ハ滲出物等ヲ濃赤色ニ染色シ兩者ノ判別ヲ一層鮮明ニ染出シ得ル優秀ナル染色法ナリト信ズ。

第3. Giemsa 染色ニ Castaneda's Buffer-Formaldehyd Solution

ヲ固定液トシテノ應用

上述ノ方法ニヨリテハ細胞内ノ Rickettsia ハ容易ニ檢出シ得ラル、モ細胞外ニ存スル Rickettsia ハ發見スル事極メテ困難ナリ、又標本ハ比較的早く脱色スルヲ以テ保存ノ目的ニハ適當ナラズ、從來 Rickettsia ヲ Giemsa 氏液ニテ染色スルニ當リ最モヨク利用サレタル methyl-alkohol 固定ニヨリテハ Rickettsia ノ收縮比較的強ク特ニ細胞外ニ存在スル Rickettsia ニ於テ甚シク其染色モ不良ナル事少カラズ、又其他ノ固定法ニヨリテハ染色ノ不良トナルモノ或ハ手數ト時間ヲ要シ日々ノ實驗ニ應用シ難キモノ等多シ。

余ハ Castaneda's Buffer-Formaldehyd Solution ハ標本ヲ固定スルト共ニ Rickettsia ノ可染性ヲ増加スル點ヲ利用シ本液ヲ以テ固定セシ標本ニ Giemsa 染色ヲ施セシニ methyl-alkohol 固定法ニヨルヨリモ一層良好ナル標本ヲ作ル事ヲ得タリ。

即前述ノ Buffer-Formaldehyd Solution (methylenblue ヲ加ヘズ) ニテ 3 分間固定シ水洗セシ後 Giemsa 氏液 (3 兎 1 滴ノ割合) ニテ一夜染色シ無水酒精ニテ短時間脱色シ鏡檢スルモノニシテ Giemsa 氏液 1 兎 1 滴ノ溶液中ニテハ既ニ 10 分位ニテ染色シ得ルモ稀薄液ニテ長時間染色セシ時ニ於テ標本ハ寧ろ美麗ナリ、斯クノ如クシテ染色セシ Rickettsia ハ收縮少ク特ニ細胞ノ内外共ニ其染色良好ナリ、從來ノ Rickettsia ニ關スル業績ニハ細胞内ノ Rickettsia ニハ多大ノ注意ヲ拂ヒ細胞外ニ存在スル Rickettsia ハ比較的等閑ニ附セラレタル感アルモノ少カラズ、細胞外ニ存在スル Rickettsia ニモ注意シ研究ヲ進ムル事ハ又肝要

ナル事ト信ズ、要スルニ比較的簡易ニ標本ヲ固定スル事ヲ得ルノミナラズ細胞ノ内外共ニ存在スル Rickettsia ヲ平等ニ濃染セシメ得ル點ニ於テ Castaneda's Buffer Formaldehyd Solution ヲ敢テ推奨セントスルモノナリ。

結 辭

本編ニ於テハ Rickettsia Prowazeki ノ塗沫標本ノ固定染色法ニ就テ述ベタルモノニシテ Castaneda 氏染色法ヲ改良シ簡易ニ且 Rickettsia ノ檢出容易ナル標本ヲ作り得ル方法ヲ記載シ、且 Giemsa 染色ヲ行フニ當リテモ標本固定ニハ Castaneda's Buffer-Formaldehyd Solution ノ優秀ナル固定液ナル事ヲ述ベタルモノニシテ、發疹チフス」研究者ノ追試批判ヲ俟ツモノナリ。

引 用 書 目

- 1) M. R. Castaneda; The Jour. of Infectious Dis, Vol. 47, 1930.

欄筆スルニ臨ミ御懇篤ナル御指導ト御校閲ヲ賜ハリシ 院長豊田太郎博士並ビニ御校閲ヲ忝クセシ金澤醫科大學教授谷友次博士ニ滿腔ノ謝意ヲ捧グ

二 木 論 文 附 圖

