

## 組織内結核菌複染色法ニ就テ

岡山醫科大學津田外科教室 (主任津田教授)

助手 西山逸平

### 緒 言

組織標本ニ於テ結核菌染色ヲ施サズトモ病理組織學的ニ夫レガ結核病竈タル事ヲ診斷シ得ルハ、宛モ咳痰中ニ結核菌ノ證明無クトモ臨牀的ニ肺結核症タルノ診斷ヲ下シ得ルガ如シ。然レドモ組織中ニ結核菌ヲ證明シ得レバ其ノ結核組織タルノ診斷ノ尙ホ一層確實タルコトハ論ヲ俟タズ。從來ノ組織内結核菌染色法ハ可ナリ困難ニシテ、今假リニ容易ニ染色シ得タリトシテモ、是レガ檢索ニハ最初ヨリ油浸装置ニ據ルノ外ナク徒ラニ無用ノ勞力ト時間トヲ浪費スルニ過ギズ。若シ今短時間ニ染色シ得テ而モ少クトモ弱擴大ニテ該菌存在部位ヲ略ボ見當付ケ得バ勞力時間ノ節約ハ勿論此ノ方面ノ研究ニモ亦利スル處不尠也。

菌テ之ガ染色ニ就キ文獻ヲ徵スルニ、古クヨリ行ハレ現今尙ホ使用サレツツアル方法ハ 1885 年 Ziehl 氏ノ發表セル法竝ニ爾來續出セル之ガ變法タリ。然ルニ 1907 年ニ至リテ Much 氏ハ Gram 染色ヲ用ヒテ Ziehl 氏法ニヨリテ染色セザル結核菌ノ存在ヲ主張セリ。遂ニ 1909 年 Knoll 氏ハ之等染色ノ缺陷ヲ補フ可ク兩染色ヲ併用セルノ法ヲ發表シ、續キテ Hatano, Weiss, 津田氏法等ノ複染色法現ルニ到レリ。然レドモ檢索ノ難易ハ獨リ菌染色法其ノモノニノミ據ルニ非スシテ、之ガ周圍ノ組織染色ノ濃淡ニ大ナル關係ヲ有スルモノナリ。此點ヲ考慮シ組織染色ニ比較の色調ノ淡色素ヲ應用セルモノアリ、即チ 1907 年 Spengler 氏ハ Pikrinsäure ヲ 1920 年 Konrich 氏ハ Malachitgrün ヲ 1924 年津田氏ハ Bismarckbraun ヲ使用セリ。此内前二者ハ菌ニ單染色ヲ施シタルニ反シ、津田氏法ハ複染色法ヲ行ヘリ。

一般ニ組織ヲ濃染スレバ其ノ構造ノ檢索ニ便ナルモ菌檢索ニ甚ダ不便ナリ。之ニ反シ組織ヲ淡染セバ菌檢索容易ナルモ其ノ構造稍々不明瞭タルヲ免レズ。然レドモ組織内ノ菌染色ヲ目的トセル以上ハ後者ヲ選ブ可キハ勿論ニシテ、組織構造ノ精細ナル檢査ニハ前者ヲ選ブト雖モ亦全カラズ。何レモ普通組織染色ヲ要ス可シ。此處ニ於テ余ハ津田氏ヲ變法シ、專ラ菌ト組織トノ色調ノ對稱ニ考慮ヲ拂ヒ Bismarckbraun ニ替フルニ Auramin ヲ以テシ、染色法ヲ更ニ簡便ニシ、檢索ヲ容易ナラシメント努力セリ。

### 染 色 法

#### I 津田氏法

- 1) 石炭酸「フクシン」液内 2 時間染色 (40°C.)
- 2) 0.5—1.0% 鹽酸「アルコホール」ニテ脱色。
- 3) 70%「アルコホール」ニ 2—3 分間次イデ水洗乾燥。

- 4) 「ビスマルクブラウン」液内 5 分間染色水洗乾燥.
- 5) 「アニリン」水「メチール」紫液内 10 分間染色水洗乾燥.
- 6) 沃度沃度加里液 (1:2:300) 内 10 分間水洗乾燥.
- 7) 「アニリン」油「キシロール」(90:10, 50:50, 30:70) 分別乾燥.
- 8) 「キシロール」透明「バルサム」封入.  
「アニリン」水「メチール」紫液  
原液 I. 「アニリン」油 9 ccm 純「アルコール」33 ccm 「メチール」紫過剰.

II. 「メチール」紫飽和水溶液.

用 = 臨ミ兩原液ヲ 3:27 ノ比ニ混ジ濾過ス. 濾液ハ 1 週間ノ保存ニ堪ユ.

II 余ノ變法

- 1) 石炭酸「フクシン」液内 30 分間染色 (40°C.)
- 2) 1% 鹽酸「アルコール」ニテ脱色.
- 3) 70% 「アルコール」ニ 2—3 分間次イデ水洗乾燥.
- 4) 「アニリン」水「メチール」紫液 (前法 = 同ジ). 3—5 分間染色水洗乾燥.
- 5) 沃度沃度加里液 (前法 = 同ジ). 3—5 分間水洗乾燥.
- 6) 「アウラミン」油内ニテ分別及ビ後染色.
- 7) 「アニリン」油「キシロール」(50:50, 30:70) 分別乾燥.
- 8) 「キシロール」透明「バルサム」封入.

「アウラミン」ハ「アニリン」油中極メテ溶解シ易ク, 用 = 臨ミテ此ノ飽和液ヲ純「アニリン」油ニテ 3 倍稀釋ス.

組織固定ニハ主トシテ昇汞水醋酸水ヲ使用シ, 「バラフィン」包埋切片ハ 3—5  $\mu$  出來得ル限り薄キヲ可トス.

## 考 按

Ziehl 氏染色法ニテ石炭酸「フクシン」ノ脱色不充分ナル場合ニハ細胞原形質ニ汚穢赤色ノ顆粒ヲ生ジ結核菌ト誤マルコトアリ. 尙ホ Much 氏ノ稱フルガ如ク Ziehl = 染色セザル所謂 Much 氏顆粒ノ存在スルヲ認メラレシ今日結核菌ノ單染色法ニノミ據リテ菌ノ有無ヲ論ゼントスルガ如キ事ノ不都合ナルコトアリ. 此處ニ於テ此ノ兩染色ヲ併用セル複染色法出デタリ. 即チ Knoll, Hatano, Weiss, 津田氏法等是レナリ. 然ルニ Knoll, Hatano 氏法ハ組織ニ特別ノ染色ヲ施サズ, 故ニ組織ハ稍々淡紅色菌ハ單紫色ヲ呈ス. Weiss 氏法ハ組織ニ Safranin 染色ヲ施セル爲メ赤染ス. 斯ノ如ク組織染色ガ菌染色ト類似セル色調タル時ハ菌檢索上甚ダシク困難ヲ感ズル所ニシテ, 之等染色ニ於テ弱擴大ニテ菌存在部位ノ見當ヲツケ得ザル點モ亦此處ニ存ス. 之ニ反シ津田氏法ハ Bismarckbraun ヲ組織染色ニ使用セル爲メ檢索著シク便トナレリ,

然レドモ Bismarckbraun ハ稍々染色シガタキト色調ノ不快ナルガ爲メニ Konrich 氏ノ Malachitgrün 及ビ Spengler 氏ノ Pikrinsäure ノ併用ヲ試ミタリ。然レドモ何レモ複染色法ニハ不便ナリ。遂ニ余ハ Auramin ヲ使用スルコトニヨリテ Pikrinsäure 染色法ト同ジク黄色ニ染マレル組織ニ複染セル結核菌ヲ現スコトニ成功セリ。即チ余ノ變法ニ據レバ結核菌ハ Ziehl 及ビ Gram ノ複染色ヲ表ハシ、尙ホ僅ニ單ニ Ziehl ノミ或ハ Gram ノミニ染色セルモノアリ。加之組織ノ色調ノ對稱宜シキヲ得シガ故ニ菌體ハ周圍組織ヨリ判然ト區別セラレ且又 Gram 法ヲ併用セルガ故ニ他染色ニ比シ菌體著シク膨大セルノ感アリ。尙ホ Auramin ヲ Anilinöl 中ニ溶解シタルガ故ニ染色時間ヲ著シク短縮スル事ヲ得タリ。

### 結 論

本染色法ハ組織内結核菌ヲ Ziehl & Gram 氏法ニテ染色シ組織染色ニハ澄明淡黄金色ナル Auramin ヲ以テセルガ故ニ既ニ弱擴大ニテ菌存在ヲ證明シ組織中ノ菌ヲ檢索スルニ最モ好都合ナリ。而モ複雑ナル複染色法ヲ比較の簡便ニ確實ニ行ヒ得テ推獎シ得ベキモノト信ズ。

終ニ臨ミ御指導御校閲ノ勞ヲ賜リタル恩師津田教授ニ深謝ス。(2. 5. 30. 受稿)

### 文 獻

- 1) Herxheimer, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. VIII, Methoden der experimentellen morphologischen Forschung. Heft I, 1921.
- 2) Kolle u. Hetsch, Die experimentelle Bakteriologie und Infektionskrankheiten. Bd. II, 1922.
- 3) Kraus-Uhrenhuth, Handbuch der mikroskopischen Technik. Bd. I, 1923.
- 4) Knoll, Beitr. z. Klin. d. Tuberk. Bd. 14, 1909.
- 5) Konrich, Deutsch. med. Wochenschr. S. 741, Nr. 27, 1920.
- 6) Much, Beitr. z. Klin. d. Tuberk. Bd. 8, 1907.
- 7) Schmorl, Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden. 1925.
- 8) Spengler, Deutsch. med. Wochenschr. S. 337, 1907.
- 9) Tsuda, Virchow's Archiv f. pathol. Anatomie u. Physiologie u. f. klin. Medizin. Bd. 251, 1924.
- 10) Weiss, Münch. med. Wochenschr. Nr. 9, 1907.

*Kurze Inhaltsangabe.***Über die Doppelfärbung der Tuberkelbazillen im Schnitte.**

Von

Dr. Itsuhei Nishiyama.

*Aus der chirurgischen Universitätsklinik zu Okayama.**(Vorstand: Prof. Seiji Tsuda).*

Eingegangen am 30. Mai 1927.

Die Doppelfärbung der Tuberkelbazillen im Schnitte ist sehr mannigfaltig angegeben. Aber die gefärbten Bazillen haben die schlechte Kontrastfarbe zur Farbe des Gewebes und daher ist sehr zeitraubend, die Bazillen zu finden. Ich habe Tsuda'sche Färbungsmethode modifiziert und habe Auramin anstatt Bismarckbraun angewendet. Auramin ist in Anilinöl sehr gut löslich und die konzentrierte Auramin-Anilinöl-lösung ist zur Differenzierung und Nachfärbung brauchbar. Auramin färbt das Gewebe hellgelb und daher kann man leicht, selbst bei der schwachen Vergrößerung die nach Gram & Ziehl rotviolett gefärbten Bazillen in der hellgelben Grundfarbe des Gewebes zu orientieren.

Zur Färbung braucht man folgende Flüssigkeiten:

- 1) Überfärben mit Karbolfuchsin  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 40°C.
- 2) Entfärben in 1.0 proz. Salzsäurealkohol.
- 3) Auswaschen in 70 proz. Alkohol 2—3 Min. und in Wasser, trocknen.
- 4) Färben in Anilinwassermethylviolettlösung 3—5 Min. und kurz waschen, trocknen (Nach Gram'sche Färbung).
- 5) Jodjodkalilösung (1 : 2 : 300) 3—5 Min. und kurz waschen, trocknen.
- 6) Differenzierung und Nachfärbung in der Auramin-Anilinöl-lösung (Gesättigtes Auramin-Anilinöl 1 : Anilinöl 2).
- 7) Abspülen in Anilinöl-Xylol (50 : 50, 30 : 70), trocknen.
- 8) Xylol und Balsam. (*Autoreferat*).

