

New Development in Bacterial Capsule Identification with Modified Indian-ink Method

小島, 夫美子

九州大学医学部保健学科 検査技術科学専攻 | 大阪大学大学院医学系研究科 医療技術科学 生体情報科学
専攻

山田, 巖

九州大学医学部保健学科 検査技術科学専攻

中上, 佳子

九州大学医学部保健学科 検査技術科学専攻

岩谷, 良則

大阪大学大学院医学系研究科 医療技術科学 生体情報科学専攻

他

<https://doi.org/10.15017/3205>

出版情報 : 九州大学医学部保健学科紀要. 3, pp.51-56, 2004-02. School of Health Sciences, Faculty
of Medicine, Kyushu University

バージョン :

権利関係 :



墨汁染色変法による細菌莢膜の識別法の開発

小島夫美子^{1,2)}, 山田 巖¹⁾, 中上 佳子¹⁾,
岩谷 良則²⁾, 藤本 秀士¹⁾

New Development in Bacterial Capsule Identification with Modified Indian-ink Method

Fumiko Kojima, Iwao Yamada, Yoshiko Nakagami,
Yoshinori Iwatani, Shuji Fujimoto

Abstract

The capsule of pathogenic bacteria is one of the most important virulence factors. Hiss's method, a standard bacterial capsule stain, is used for capsule identification. However it was difficult to stain the capsules of some bacteria such as *Streptococcus pneumoniae*. This paper presents a stain method based on both Gram stain and Indian-ink stain. The proposed stain method allowed clear identification of the capsule of *S. pneumoniae*. This method is easy and simple in use, and can be extended to other bacterial species and/or clinical specimens.

Key word: *Streptococcus pneumoniae* 肺炎球菌, capsule 莢膜, Indian-ink method 墨汁染色

緒 言

感染症の確定診断に微生物検査は必須である。近年、医学検査技術の進歩と発展は目覚ましく、微生物の検査に関しても、以前に比べて、簡単でかつ精度の高い技術が開発され臨床応用されてきた。病原体を確認するための手段として、塗抹鏡検による方法、分離培養法、免疫学的な抗原検出法^{1, 2, 3)}などに加え、最近では、DNA 診断法^{4, 5)}も利用されつつある。このようななかでも、塗抹鏡検検査は、容易で、特殊な器材を必要とせず、病原体を形態学的に直接証明でき、感染症診断の最初に行う検査として欠くことができない⁶⁾。通常、鏡検検査で細菌を識別するためには、まずグラム染色⁷⁾を行い、グラム染色性や形態、

大きさについて調べる。次に、菌種によっては、特殊染色を行い、芽胞、莢膜、鞭毛などの特殊な構造の有無を調べ、おおまかに菌種の分類や同定を行っている。

莢膜は一部の細菌に存在する菌体外側の多糖よりなる膜様構造である。肺炎球菌、肺炎桿菌、髄膜炎菌など多くの細菌感染症で莢膜は、菌体を宿主の生体防御機構から守り、感染を成立させる役目を担う重要な病原因子である^{8, 9)}。通常、莢膜の証明法としてもっぱら使用されているのは、Hiss の莢膜染色¹⁰⁾であるが、次のような欠点がある。生体材料中のものを直接塗抹して染色するような場合には明瞭な莢膜が認められるが、培地から培養した菌を使用して塗抹染色した場合に

1) 九州大学医学部保健学科 検査技術科学専攻

2) 大阪大学大学院医学系研究科 医療技術科学 生体情報科学専攻

は、あまりよい結果が得られず、塗抹方法や莢膜形成用液体培地を使用するなどいくらかの工夫を必要とする¹¹⁾。さらに、肺炎球菌など菌種によっては、それでもなお莢膜の証明が困難であることも少なくない。また、硫酸銅を試薬として使用、排出するため廃液の処理がやっかいである。

一方、病原体そのものを染色せずに周囲の背景を染め出す方法として陰性染色がある。この染色法の中で、とくに墨汁法¹²⁾は、おもにクリプトコッカスのように厚い莢膜の検出を目的とするような場合によく用いられる。しかし、この方法では、細菌の莢膜、菌体ともに染色されず、区別がつかないために肺炎球菌や肺炎桿菌などの莢膜の有無の鑑別には適用しにくい。このような理由から、我々は、Hiss 染色より手技が簡便で、特別な試薬を必要とせず、そのうえ、これまでの染色法では、証明しにくかった培養菌の莢膜を確認する新しい方法について検討した。今回、我々が考案した、墨汁法を改良した新しい莢膜確認法は、培養した肺炎球菌であるにも関わらず、莢膜と菌体とともに比較的明瞭に区別することができた。この方法は、病院細菌検査室などにおいて細菌莢膜の有無を調べるのに有用であると考えられる。

対象と方法

1. 対象

喀痰から分離された肺炎球菌莢膜保有株 2 株 (ムコイドタイプとノンムコイドタイプ)、および眼科受診患者の眼脂から分離された肺炎球菌莢膜非保有株 2 株を対象とした。これらの菌株は分離後にマイクロバンクバイアル (アスカ純薬) に凍結 (-80℃) 保存しておき、使用時に 1 株毎にウマ血液寒天培地 (バイタルメディア極東) 上に、マイクロチップで数滴垂らし、35℃、5% CO₂ 下で 18 ~ 24 時間培養した。生えてきた菌を塗り広げ、さらに同一条件下にて 18 ~ 24 時間、二次培養を行い、これを試検菌とした。また、コントロールとして肺炎桿菌株 1 株 (教室保存株) を肺炎球菌と同一条件にて培養し、試検菌とした。

2. 染色方法

1) Hiss の莢膜染色

山田が報告した方法に従った¹¹⁾。十分に脱脂したスライドガラス上に、4 倍に希釈したヒト血清を 1 白金耳載せ、その上に、培地上のコロニーから白金耳でごく少量釣菌したものを載せ、スライドガラス上で混ぜながら均一に塗り広げて、自然乾燥を行った。この塗抹標本に、予め 50℃ に加温しておいたゲンチアナ紫水溶液 (ゲンチアナ紫 0.25g を 99.5% エタノール 5 ml に溶解し、さらにそれを精製水にて 5% にしたものを) を載せ、1 分間染色した。この染色液を 20% 硫酸銅液で洗い流し、水洗せずにそのまま濾紙で吸湿、乾燥し、強拡大 (1000 倍、油浸) にて鏡検観察を行った。

2) 墨汁染色

十分に脱脂したスライドガラス上に、ニグロシン液 (ニグロシン 10g を蒸留水 100ml に溶かし、30 分煮沸後、濾過したもの) を 1 白金耳載せ、これに培養菌をごく少量混和し、カバーガラスを用いて薄層塗抹標本を作製し、自然乾燥後、強拡大 (1000 倍、油浸) にて鏡検観察した。

3) グラム染色

培養菌の塗抹を行う際に、①滅菌生理食塩水で普通に塗抹したものと、背景を染め出す工夫として、喀痰成分の変わりになるような② 0.5% および 1% ムチン液、③ 0.1% および 1% ゼラチン液、④ ヒト血漿のそれぞれで菌を塗抹し、乾燥した。次に塗抹面を上にして、火炎中をゆっくりと 3 回ほど通過させ、火炎固定を行った。塗抹面にクリスタル紫液を載せ、2 分間染色した。その後、ルゴール液を注いでクリスタル紫を洗い去り、さらに新しいルゴール液を加えて 2 分間媒染した。スライドガラスを傾瀉し、ルゴール液を捨て、その上から 99% エタノールで脱色した。水洗後、パフェル液で 30 秒間、後染色した。水洗後は濾紙で吸湿、乾燥し、強拡大 (1000 倍、油浸) にて鏡検観察した。

4) 今回考案した墨汁染色変法

この方法は基本的に、まず初めに菌体を染色し、その後、墨汁で背景を染色する 2 重染色法である。

A 菌体の染色

ギムザ染色液, クリスタル紫, パイフェル, ゲンチアナ紫の各水溶液を用いて菌体の染色を行った。前述の染色液のうち1種類をスライドガラス上に一滴載せ, そこに滅菌した竹串で, ごく少量釣菌した培養菌を混ぜ合わせ, 2分間放置して染色した。なお, クリスタル紫については, その後, ルゴール液で媒染操作(1分)を加える方法についても検討した。

B 背景の染色

操作Aで菌体を染色した後, 固定は行わず, ニグロシン液を一滴おき, カバーガラスを用いて軽く混和し, そのまま薄層塗抹標本を作製し, 自然乾燥した。引き終わりの部分を強拡大(1000倍, 油浸)にて鏡検観察した。

結 果

1. Hissの莢膜染色

肺炎桿菌では, Hissの染色により, 菌体が濃紫色, 莢膜は薄い紫に染色され, 明瞭に莢膜の存在を確認することができた。一方, 肺炎球菌では, 喀痰分離菌株, 眼脂分離菌株ともに菌体は濃紫色に染色されたが, 莢膜は不明瞭で, はっきりと確認できなかった。偶然にも, 塗抹の過程で釣菌しようとして, 血液寒天培地の一部が肺炎球菌喀痰分離菌と一緒に混入, 塗抹された標本において, 寒天部分が背景となって薄いピンクに染色され, その上に存在していた肺炎球菌の数個に, 莢膜が確認された。

2. 墨汁染色

墨汁染色によって, 肺炎球菌・肺炎桿菌ともに背景は均一に黒～灰色(引き初め～引き終わり)に染色された。しかし菌体も莢膜も全く染色されず, 全体が透明に抜けた形で観察され, 莢膜は確認できなかった。

3. グラム染色

肺炎球菌では, 対象と方法に挙げたグラム染色の①～④のどの塗抹法でもグラム陽性球菌として菌体が紫色に染まった。①の蒸留水で塗抹したものは, 不染色の莢膜と染色されない背景との区別をつけることはできず, 莢膜の確認はできなかった。②のムチンはグラム陰性に染色されたが, 結晶状となり, 背景をうまく染めることができず, 莢膜の確認はできなかった。③のゼラチンは粒状になり, 染色されず, 莢膜の確認はできなかった。④の血漿はグラム陰性に染色されたが, 均一には染色されず, 莢膜の確認はできなかった。(すべて結果は示さず)

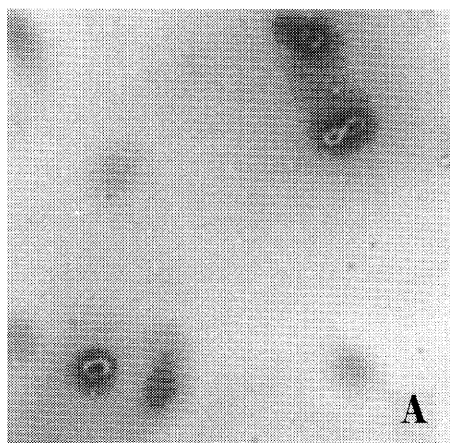
4. 今回考案した染色法

我々が考案した染色法(墨汁染色変法)における, 検討結果(染色性)を表1に示す。菌体の染色は, クリスタル紫, ゲンチアナ紫, パイフェルのどれを使用しても, 色合いの濃淡に差はあるものの, 2～3分の染色時間で, それぞれの染色液の色が通常より, やや淡く染色され, その後のニグロシン染色によって, 莢膜は灰色～黒の背景の中に不染帯として抜けた形で確認された。この中で, ゲンチアナ紫は肺炎桿菌の, またクリスタル

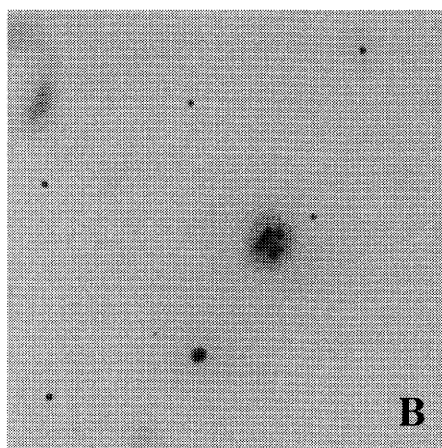
表1 考案した染色法による染色性の検討結果

| No. | 染色液 | 染色時間(分) | 媒染 | ニグロシンとの接触時間(分) | 染色性 | | 莢膜の確認 |
|-----|--------|---------|----|----------------|------|----|-------|
| | | | | | 菌体 | 背景 | |
| 1 | クリスタル紫 | 2 | ND | 1 | — | + | 不可 |
| 2 | クリスタル紫 | 2 | ND | すぐ | +(淡) | + | 可※ |
| 3 | クリスタル紫 | 2 | D | 1 | + | — | 不可 |
| 4 | クリスタル紫 | 2 | D | すぐ | +(濃) | + | 可 |
| 5 | クリスタル紫 | 3 | ND | 1 | — | + | 不可 |
| 6 | パイフェル | 1 | ND | すぐ | +(淡) | + | 可※ |
| 7 | パイフェル | 2 | ND | 1 | — | + | 不可 |
| 8 | パイフェル | 2 | ND | すぐ | +(淡) | + | 可※ |
| 9 | ギムザ液 | 1 | ND | 1 | — | + | 不可 |
| 10 | ゲンチアナ紫 | 2 | ND | すぐ | + | + | 可※ |

※は結果に安定性がなかったもの
+: 染色される, —: 染色されない
D: 実施, ND: 実施せず



Aは、喀痰から分離された肺炎球菌の染色像である。菌体はクリスタル紫によって濃紫色に染色され、その周囲に不染性（透明）の荚膜が認められる。



Bは、眼脂から分離された肺炎球菌の染色像である。菌体はクリスタル紫によって濃紫色に染色されたが、荚膜は認められない。

図1. 考案した墨汁染色変法による荚膜染色

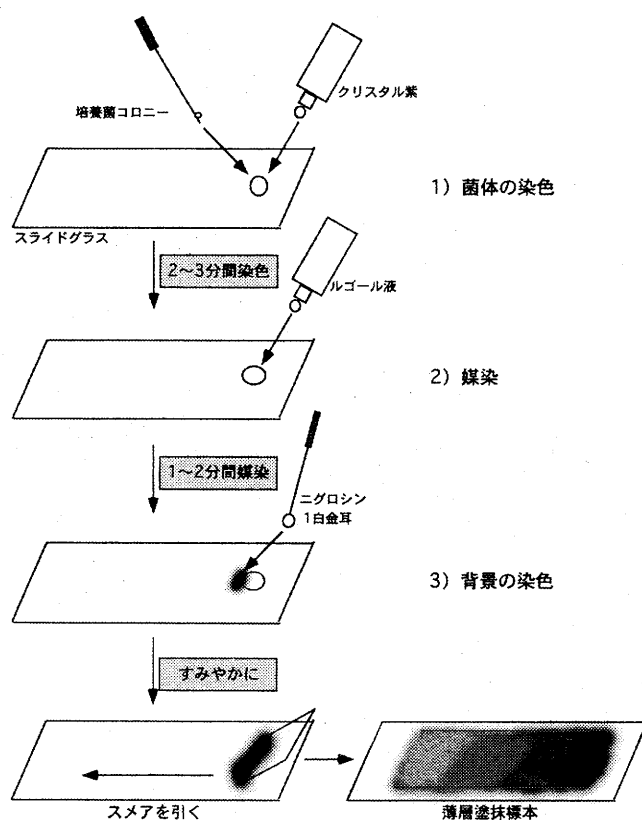


図2 考案した染色法の手順

紫やパイクフェルは肺炎球菌のそれぞれの菌体を相対的に、より鮮明に染色していた。しかし、これらの結果は不安定で、同じようにやって、菌体が染まらない場合もみられ再現性に乏しかった。また、クリスタル紫を使用した時、荚膜と背景の境

界部が濃紫色に輪郭を描き、その中が薄い紫で全体が染まってしまうものもみられた。さらに、この方法は、ニグロシンとの接触時間が長くなると、それに伴って菌体の染まりが悪くなった。

菌体の染色において媒染操作を加えたものは、

しなかったものに比べ、菌体の染まりがよく、十分に濃染した菌体が観察され、そのうえニグロシンによる染色の影響も受けにくく、安定した結果が得られた(図1A)。最も染色性が安定して、菌体の染まりも良く、莢膜の存在も明瞭に確認できた方法は、1) スライドガラス上にクリスタル紫を1滴載せ、そこに肺炎球菌を滅菌竹串で釣菌し、混和し、そのまま2~3分間染色する。2) その上にルゴール液をクリスタル紫と同量載せ、1~2分間媒染する。3) その後、ニグロシンを軽く混ぜ、できるだけ速やかに塗抹標本とする方法であった(図2)。次に、この方法を用いて、眼脂から得られた肺炎球菌を染色し、形態および莢膜についての観察を行ってみたところ、菌体はグラム陽性に染まり喀痰分離株と同じであったが、菌体の周りに莢膜構造は全く見られなかった(図1B)。

考 察

肺炎球菌は、ヒトの口腔や上気道に常在しており、病原性が強く、肺炎の主要な原因菌となる他、小児を中心とした髄膜炎、中耳炎、結膜炎など様々な感染症の原因菌となる¹³⁾。本菌はグラム陽性の双球菌で、多糖体から成る莢膜を有している。この莢膜は肺炎球菌の病原因子のひとつであり⁹⁾、分離菌株における莢膜の証明は大変重要である。通常、臨床検査室内では、喀痰など臨床材料を直接塗抹し、グラム染色によって、莢膜の確認を行うことが多い。喀痰はムチンと呼ばれる粘液性物質の中に剥離した上皮細胞が含まれているので、それらが背景として染め出されることにより、莢膜は菌体とムチンとの間の染色されない部分、つまり透明帯として観察可能である。しかし、すべての検査材料が直接塗抹に適しているわけではなく、髄液検体などでは背景が染色されにくいし、培養した菌を染色しなければならないこともある。莢膜染色として一般的な Hiss 染色でも本菌莢膜は染色されにくい。

そこで今回、我々は、肺炎球菌の莢膜の有無あるいは違いをみるために、従来の染色法に代わる、培養菌でも莢膜の有無を確認できる新しい染色法

を考案することを目的とし、検討を行った。1988年に荒井らが、墨汁法とクリスタル紫による染色法を組み合わせた莢膜検出法を検討し、その有用性について報告している¹⁴⁾。この方法では、先に墨汁で塗抹標本を作製し、それをメタノールで固定した後、後染色としてグラム染色を行っている。実際に施行してみると、確かに莢膜は確認できたが、墨汁で染色した後、固定をするときにアルコールを使用するため、その後の染色操作中に墨汁が溶け出してしまった。また、菌体が全体に淡く染まってしまう傾向にあり、鑑別しにくかった。我々は、固定操作による莢膜の変性を避けるために、菌をアルコールや火炎で固定せず、先に菌体を染色し、次にニグロシンで背景を染める方法を検討した。最初、菌の固定をしないため、染色液と菌を混和する際に白金耳を使用すると、混和後、白金耳の方に染色液が吸い取られてしまうという問題が生じたが、これは、白金耳でなく、滅菌した竹串や白金線あるいはチップの先端など、できるだけ先端が細いものを使用して混和することで改善された。染色液の種類、染色時間については結果に示した通り、どの染色液を使用しても、菌体の染色は可能であるが、全体に薄く染色される、あるいは同じ肺炎球菌を使用しているにもかかわらず、日によって菌体が染まったり染まらなかったりするなど不安定な結果となった。この原因を確かめるために、染色時間を長くしてみたり、染色液と菌の混和方法を変えたり、あるいは培養を液体培養(ブレインハートインフュージョン液体培地)にしてみたりと様々な検討を行ったが、結果はそれほど変わらなかった。それに対して、ニグロシンで一定時間、染色すると菌体が染まらず、混ぜてすぐにスミアを引くと、菌体が明瞭に染色された。つまり染色した菌体とニグロシンとの接触時間をできるだけ短くした方がうまくいった。その理由として、最初の染色で菌体は一旦染まるものの、ニグロシン液との接触により、先に染まっていたクリスタル紫などの染色液が水溶液のため溶け出してしまふからではないかと考えられた。そこで最初の染色をもっと強固にするために、菌体の染色後に媒染操作を加えてみた。その結果、

媒染を行うことによって、菌体の染まりが明瞭になり、本来の染色液の色に菌体が染色された。媒染剤の持つ特性によって、色素と菌体の親和性が強化されたことがわかった。

以上のことから図2に紹介した方法が今回検討したなかで最も簡便で安定した方法である。今回考案した染色法の最大の特徴は、短時間で、特別な試薬も技術も必要とせず、簡単に実施できることである。従来のHissの莢膜染色法は、操作上で、血清による前処置を必要とする、あるいは染色液を加温するなどの煩雑なところが欠点であった。これに対して、今回の新染色法は、グラム染色液と墨汁さえあれば簡単に実施可能である。また硫酸銅などの廃液処理の心配をする必要もない。ただし、本法は火炎固定あるいはアルコール固定などの菌の固定処理を行わず、菌が生きたままの状態での染色を行うため取り扱いには十分な注意を必要とする。また、菌体を染める染色液に関して、各種染色液による結果にそれほど差が見られなかったことから、クリスタル紫以外の染色液でも十分染色可能であり、この点についてはまだ改良の余地があると思われる。

結 語

従来の染色法では、肺炎球菌のとくに培養菌からの莢膜証明は難しいとされている。そこで、菌体、莢膜ともに明瞭に証明できる新しい染色法について検討したところ、我々の考案した墨汁染色変法が、培養した肺炎球菌であるにも関わらず、短時間で簡単な操作で、莢膜を菌体とともに染色できた。本法は細菌莢膜の有無の鑑別に有用であると考えられる。

参考文献

- 1) 小林隆夫, 松本哲哉, 山口恵三: 病原微生物の迅速検査 - 尿中肺炎球菌抗原検出. 臨床検査 47: 181-183, 2003
- 2) 小栗豊子, 三澤成毅, 中村文子他: スライド凝集反応による肺炎球菌の血清型別. 感染症学雑誌 76: 479, 2002
- 3) 齊藤剛, 永井英明, 新井智, 岡部信彦, 高野昇一: 肺炎球菌莢膜多糖類特異的抗体のELISA法による定量. 日本細菌学雑誌 58: 261, 2003
- 4) 岡田淳, 設楽政次, 伊藤武他.: 微生物学 / 臨床微生物学, 医歯薬出版, 東京, 2000, pp46-48
- 5) 千葉菜穂子, 生方公子: 臨床検査材料からの肺炎球菌分離時におけるPCRの有用性. 感染症学雑誌 73: 379, 1999
- 6) 佐藤匡, 青島正大, 大曲貴夫, 多田寛, 蝶名林直彦: 市中肺炎診療における喀痰グラム染色の有用性. 日本呼吸器学会雑誌 40: 558-563, 2002
- 7) 成瀬順: グラム染色, 新染色法のすべて (Medical Technology 別冊), 医歯薬出版, 東京, 1999, pp332-334
- 8) 松本慶蔵: 細菌感染症はいかにして成立するか - 呼吸器感染症の成立 新たなる視点から -. 化学療法の領域 18: 26-33, 2001
- 9) Paton JC and Moron JK: *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide, Gram-Positive Pathogens, ASM Press, Washington, D.C. 2000, pp201
- 10) 小栗豊子: 莢膜染色, 新染色法のすべて (Medical Technology 別冊), 医歯薬出版, 東京, 1999, pp341-342
- 11) 山田巖: 肺炎桿菌の保存菌を培養して形成された莢膜の耐熱性について. 九大医学部保健学科紀要 1: 111-115, 2003
- 12) 板羽秀之: *Cryptococcus neoformans* による髄膜炎, カラーアトラス微生物検査 (Medical Technology 別冊), 医歯薬出版, 東京, 1996, pp68
- 13) 山本直樹, 山岡昇司, 堀内三吉監訳: 一目でわかる微生物学と感染症, メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, 2002, pp23
- 14) 荒井美子, 関啓子, 生貝初他: 墨汁法とクリスタル紫による染色法を組み合わせた細菌莢膜の簡便な検出法. 臨床検査 32: 88-90, 1988