Modification of Harada's method for rapid staining of mycobacteria

Kunio Kawatsu, Shinzo Izumi, Maeda Yumi,
Khalid Iqbal Butt, Tiesheng Wang

(National Institute for Leprosy, Tokyo.)

I. Periodic Acid-Carbol Pararosaniline Stain

II. Periodic Acid-Methenamine Silver Stain

III. Periodic Acid-Gelatin Methenamine Silver Stain

Summary

Harada employed periodic acid-carbol pararosaniline and periodic acid-methenamine silver stain for demonstrating chromophobic bacilli which do not get stained with conventional carbol fuchsin or counter stain. This staining method takes considerable time for complete oxidation with periodic acid. We have succeeded in reducing the oxidation time

by using hydrogen peroxide treatment prior to periodic acid and with the use of acidified sodium hydrogen sulfite treatment before carbol-pararosaniline stain. We also found that in methenamine silver stain, combined use of semicarbazide and microwave treatment can shorten the whole staining time up to four hours without losing its sensitivity.

原田法の染色時間短縮の試み

- I. 過よう素酸・カルボール・パラローサニリン染色法について¹⁾。
- II. 過よう素酸・メセナミン銀染色法について^{2,3)}。
- III. 過よう素酸・ゼラチン・メセナミン銀染色法について⁴⁾。

川津邦雄, 和泉眞蔵, 前田百美, K. I. Butt, 王 鉄生

(国立多摩研究所・第5研究室)

はじめに

らいや結核の病巣内の菌が、従来用いられているカルボール・フクシン法 (Ziehl-Neelsen, 以下 Z-N) では菌の検出が困難な症例 (chromophobic 型) があり, Nyka⁵⁾ は結核菌染色に、過よう素酸と塩化第2水銀の添加ホルマリン固定のパラフィン切片で菌の検出を高めた。しかし、これでは特別の固定法を必要とする上、背景のいろいろな組織との区別が不明瞭な染色法であった。

原田等は、一般的なホルマリン固定パラフィン

切片に対して、過よう素酸の長時間酸化で抗酸菌はもち論chromophobic型を含むマイコバクテリアを明瞭に染め分る。

I. 過よう素酸・カルボール・パラローザニリン法¹⁾ (PA-CPR法)。

II. 過よう素酸・メセナミン銀法^{2,3)} (PA-MS法)。

III. 過よう素酸・ゼラチン・メセナミン銀法⁴⁾ (PA-GMS法)。

の3方法を考察した。これ等は、既にらいの組織

学的検索に広く用いられている。

しかし、3法いずれの染色手技も過よう素酸酸化時間が16時間以上と長い点が問題とされ改良法の報告⁶⁾もある。

私達は、この3法のそれぞれについて過よう素酸酸化時間を1時間に短縮し、脱パラフィン操作からの染色全工程時間を4～5時間に、しかも染色結果も良好な方法に改良した。また、メセナミン銀を用いるPA-MS法・PA-GMS法に対してマイクロウェーブの照射⁷⁾で銀の還元時間をも短縮したので、これ等3法の改良法について報告する。

材料および

表4に示す人体生検10例および剖検5例とタイ53株接種九帯アルマジロの皮膚3例およびヌードマラス足底2例を、それぞれ15%磷酸緩衝ホルマリンで固定し、型の通り3μ～4μのパラフィン連続切片を作製し、卵白グリセリンで貼付し標本として用いた。尚今回用いた標本はFite法に対し全例桿状あるいは顆粒状の菌陽性例を用いた。

試薬は全て特級を用いた。ゼラチン^{19, 20)}はベクトンディキンス社製BBL結晶ゼラチンを用いた。色素は原田^{8, 9, 10)}にしたがいクローマ社製とメルク社製を用い調製した。

染色施行にあたって、それぞれの実験のオリジナル3法に対応する改良法との間で、連続切片の順番が概ね隣接するように振分け、染色を施し結果を対比し解析した。

I. 過よう素酸・カルボール・パラローザニン法について (PA-CPR法)。

改良法を表1に示す、この手順で染色した。

結果

抗酸菌は赤、核は黒～灰色、細胞質・筋線維は緑色～緑黄色、膠原線維は青。

改良法は脱パラフィン操作から始まる染色全工程時間（以下染色全工程）を4～5時間に短縮できた。

菌の染色性では、表4に示すように、Fite法で顆粒状に染まる人体例で原田のオリジナル（以下オリジナル法）法も改良法でも桿状菌として染まる例もあり菌数もFite法より両者共多く染まった。

また、アルマジロ例でFite法では検出しにくい、らい肉芽腫から少しはなれた筋間質に点在する単個菌も両者共よく染め出し全く遜色のない結果を得た。しかも赤の冴は改良法の方がよい。

考察

原田はその染色メカニズム¹¹⁾から過よう素酸酸化時間は16～24時間必要とした。

広井等⁶⁾はZ-Nの変法の一つの考えから、1%塩酸70%エタノールでの脱色時間を5～10分と長くすることで過よう素酸酸化時間を1時間でよしとしている。

私達は原田の染色メカニズムを基本に過よう素酸酸化効果の予備実験で、過よう素酸酸化時間が短いと菌は染まるが組織の共染が強く、酸化時間が長くなるに順い組織の共染が弱くなり4日以上酸化すると菌も染色性を失うことを確認した。これはメセナミン銀に対しても同様の反応を示した。

一方、過よう素酸とパラローザニンによるPAS反応でのSO₂の役割が重要である反面、重亜硫酸ナトリウム (NaHSO₃) がアルデヒドの封鎖反応¹⁾を持つことで、この2つの反応の組み合わせを考え、表1に示す手法のように過よう素酸酸化後、塩酸加重亜硫酸ナトリウム溶液に浸漬することにした。

また、カルボール・フクシンによる真菌染色に過酸化水素溶液に浸漬方法⁵⁾があり、3%過酸化水素溶液（含有31%過酸化水素原液1に留水9）に浸漬後過よう素酸酸化では、1時間にしても組織の共染が少なくオリジナルと全く同様の染色性を示すことがわかった。この過酸化水素溶液への浸漬を省略する場合は、過よう素酸酸化時間は2時間に延長した方が結果がよい。

この過よう素酸酸化時間の短縮は夏場などの気温の高い時の切片の剥離を防ぐと共に、免疫組織化学染色や神経線維染色などとの重染色も可能とし応用範囲が広がった。

しかし、操作が増えた分繁雑となったことは否めない。

表 1

I. Modified Periodic Acid-Carbol Pararosaniline Stain

1. Deparaffinize sections in xylene and hydrate through graded alcohols to water. Then bring sections to distilled water.
2. Treat by 3% hydrogen peroxide in water for 60 min.
3. Wash in running tap water for 5 min.
4. Oxidise in 10% periodic acid solution for 60 min.
5. Wash in running tap water for 5 min.
6. Place sections in acidified sodium hydrogen sulfite for 10 min. (Add 5ml of 1N HCl to 100ml of 0.6% NaHSO₃ to prepare acidified NaHSO₃ solution)
7. Wash in running tap water for 5 min.
8. Treat with carbol pararosaniline solution for 60 min.
9. Wash in running tap water for 5 min.
10. Decolorize in 1% HCl-70% ethanol.
11. Wash in running tap water for 5 min.
12. Stain in Weigert's acid iron hematoxylin for 2 min.
13. Wash in tap water for 5 min.
14. Stain in 0.04% methylene blue in saturated picric acid solution for 5 min.
15. Dehydrate and differentiate in alcohol.
16. Clear in xylene and mount in resin.

Preparations

Carbol pararosaniline solution :

Absolute alcohol 10ml

5% Carbol 100ml

Pararosaniline HCl 1gm

Weigert iron hematoxylin solution :

I. Hematoxylin 1gm

95% ethanol 100ml

II. Ferric chloride (FeCl₃·6H₂O) 2.48gm

HCl (23-24%) 1ml

Distilled water 95ml

Mix equal amounts of solution I and II.

(Steps, 2, 3, 5, and 6 have been added to Harada's protocol and in step 4 oxidation is carried out only for 60 min.)

表 4

Differences in stain pattern of leprosy bacilli by original and modified Harada's stain

Specimen	Total No.	Staining pattern	Fite Stain	P-Rosaniline Stain	MS Stain	GMS Stain
				O M	O M	O M
Skin (biopsy)	10	G R	3 7	1 1 9 9	0 0 10 10	0 0 10 10
Skin (autopsy)	5	G R	2 3	0 0 5 5	0 0 5 5	0 0 5 5
Armadillo skin	3	G R	0 3	0 0 3 3	0 0 3 3	0 0 3 3
Nude mouse foot pad	2	G R	0 2	0 0 2 2	0 0 2 2	0 0 2 2

G=Granular
R=Rod shaped
O=Original method
M=Modified method

MS Stain=Methenamine-Silver Stain
GMS Stain=Gelatin-Methenamine Silver Stain

Ⅱ. 過よう素酸・メセナミン銀法について (PA-MS法)。

改良法を表 2 に示す。この手順により染色を施した。

結果

抗酸菌は黒、核は淡赤色～赤色、細胞質は淡青～青、結合組織は濃青色。

改良法は、前項のPA-CPR法同様過酸化水素溶液への浸漬操作を加えたことで、過よう素酸酸化時間を 1 時間にでき、しかもマイクロウェーブ照射を取り入れ染色全工程を 4 時間以内に短縮できた。

菌の染色性は、表 4 に示すように、Fite法で顆粒状に染まる人体例で、オリジナル法も改良法も桿状菌として染まり、両者全く遜色のな結果である。しかも改良法は、結合組織や弾性線維などの共染傾向が弱く、菌の黒化度が強く非特異銀粒子の付着が少ない。しかし末梢神経の髄鞘が染まる傾向が見られた。

考察

過よう素酸・メセナミン銀による染色メカニズム³⁾は、過よう素酸酸化で生じたアルデヒドによ

りメセナミン銀複合体が還元され可視性金属銀となるとしている。また一方、メセナミン銀を基調とする染色法で、チオセミカルバジッドが還元作用を促進し染色効果を高めるとの報告^{13, 14)}があり、逆にチオセミカルバジッドがアルデヒド封鎖反応²⁾を示すことも知られている。

私達は予備実験で10%過よう素酸酸化4時間後セミカルバジッド法¹²⁾でのアルデヒド封鎖でメセナミン銀に対して、らい菌が染色性を失うことを確認した。

この相反する反応を示すセミカルバジッド塩酸塩 (NH₂NHCONH₂ · HCl) を用いることで、表 2 に示す手法のように過よう素酸酸化時間の短縮を可能とした。また、手法のように過酸化水素溶液への浸漬は組織の共染を弱める上で非常に有効である。

メセナミン銀での染色時間短縮に小林⁷⁾のマイクロウェーブの照射は画期的で、1 時間以内に短縮できた。しかしマイクロウェーブ照射時間を長くしての染色時間短縮は液温を異常に上昇させ組織の共染を招く。

私達は、予め40℃前後に温めて置いた改良ゼラチン・メセナミン銀液に、前処置を施した切片を

浸し60℃孵卵器内で10分程度液になじませた後マイクロウェーブ（家庭用三菱電子レンジRR-10AF500W・250Wの弱で）を1分間照射し（染色バット1個の場合）、また孵卵器内に戻し適度の色調になるのを待って次の操作ステップへ進めている。照射後の染色時間は25分前後である。

このマイクロウェーブの利用は染色液液温調整

に、ゼラチン溶解にも有効である。

改良ゼラチン添加メセナミン銀染色液は、オリジナルに比べ銀濃度が高いので、非特異銀顆粒防止¹⁶⁾にゼラチンを添加した。それにより非特異銀粒子の付着を押えていると思われるが反面末梢神経の髄鞘が染まるものと考えられる。

表 2

II. Modified periodic Acid-Methenamine Silver Stain

1. Deparaffinize sections in xylene and hydrate through graded alcohols to water. Finally rinse in distilled water.
2. Treat by 3% hydrogen peroxide in water for 60 min.
3. Wash in running tap water for 5 min.
4. Oxidise in 10% periodic acid solution for 60 min.
5. Wash in running tap water for 5 min.
6. Place in 2% semi-carbazide ($\text{NH}_2\text{NHCONH}_2$) solution for 10 min.
7. Wash in running water for 5 min., then in distilled water.
8. Place sections in previously warmed modified methenamine silver solution at 60℃ for 60 min. (Irradiate in microwave for 1 min. during this procedure)
9. Rinse in distilled water warmed to 60℃ and then successively in several changes of distilled water at decreasing temperature upto room temperature.
10. Tone in 0.1% aqueous gold chloride for 10-15 min.
11. Wash in 4-5 changes of distilled water.
12. Place in 2% sodium thiosulfate solution for 3 min.
13. Wash in running water for 5 min.
14. Stain nucleus with nuclear fast red solution for 5-10 min.
15. Wash in running water for 5 min.
16. Stain in 0.04% methyl blue in saturated picric acid solution for 5 min.
17. Dehydrate and differentiate in alcohol.
18. Clear in xylene and mount in resin.

Modified methenamine solution

3% methenamine solution 85ml

5% silver nitrate 7.5ml

5% borax solution 4ml

5% gelatin solution 5ml

{After the sections are placed in pre-warmed methenamine solution for approximately 10 min. at 60℃, the coplin jar is transferred to a microwave (household Mitsubishi-electronic oven RR-10 AF) and irradiated for 1 min. Then again incubated for about 40-50 min. at 60℃. If the sections are not irradiated using microwave, then 2 hours of incubation is necessary}

Nuclear fast red solution :

Dissolve 0.1% of nuclear fast red in 5% aluminium sulfate solution with heating for 5 min. Leave it to cool and then filter.

(In Harada's original method, Step 2, 3, 5 and 6 are not performed and in step 4, the duration of oxidation is reduced to 60 min. in this procedure)

Ⅲ. 過よう素酸・ゼラチン・メセナミン銀法について (PA・GMS法)。

改良法を表3に示す。表3の手順にしたがい染色を施した。

結果

らい菌は黒、末梢神経の髄鞘も黒、その他は前項のPA-MSとほぼ同様に染まる。

改良法は、前項のPA-MS法と同様に染色全工程時間を5時間以内に短縮できた。

染色性では、表4に示すように改良法もオリジナル法と全く同様に、らい菌と末梢神経の髄鞘とも選択的に染め出すことができた。

しかし、改良法はらい菌はセミカルバジットの還元作用効果で黒化度は強く、反面髄鞘はやや弱く染まる。結合織や弾性線維などの共染は改良法の方が少ない。これは過酸化水素溶液への浸漬の影響と考える。

考察

この染色法は、出倉¹⁷⁾のゼラチン加メセナミン銀による末梢神経の髄鞘染色法と、原田法^{2,3)}とを合せた染色法で、出倉法での前処置(媒染)の80%エタノールに原田は過よう素酸を加え16~24時間浸漬することで両者の効果を得ている。

片岡は¹⁸⁾出倉の染色メカニズムの解明で80%エタノールの前処置は3~16時間は必要とした。私達は硝酸銀量とゼラチン量を増しセミカルバジッド溶液を5%にすることで、それにかえた。

菌の染色性はオリジナルのそれより優れ、末梢神経の髄鞘の染色性も一応の成果が得られた。また結合織や弾性線維の共染も改良法の方が少ない。この染色手技でもマイクロウェーブの照射は染色時間の短縮に有効であるが長い照射は共染を招くのでやめるべきである。

しかし、オリジナル法も改良法にしても、同様に末梢神経内の菌も髄鞘とも黒く染まり鑑別が困難な場合がありこの染色法での問題点である。

表3

Ⅲ. Modified Periodic Acid-Gelatin Methenamine Silver Stain

1. Deparaffinize sections in xylene and hydrate through graded alcohols to water. Finally rinse in distilled water.
2. Treat by 3% hydrogen peroxide in water for 60 min.
3. Wash in running tap water for 5 min.
4. Oxidise in 10% periodic acid solution for 60 min.
5. Wash in running tap water for 5 min.
6. Place in 5% semi-carbazide solution for 10 min.
7. Wash in running water for 5 min. then rinse in distilled water.
8. Place sections in previously warmed modified gelatin methenamine silver solution for 60 min. in the incubator at 60°C (Irradiate in microwave for 1 min. during this procedure)
9. Rinse in distilled water warmed to 60°C and then successively in several changes of distilled water at decreasing temperature upto room temperature.
10. Tone in 0.1% aqueous gold chloride for 10-15 min.
11. Wash in 4-5 changes of distilled water.
12. Place in 2% sodium thiosulfate solution for 3 min.
13. Wash in running water for 5 min.
14. Stain nucleus with nuclear fast red solution for 5-10 min.
15. Wash in running water for 5 min.
16. Stain in 0.04% methyl blue in saturated picric acid solution for 5 min.
17. Dehydrate and differentiate in alcohol.
18. Clear in xylene and mount in resin.

Modified gelatin-methenamine silver solution :

4% methenamine solution	50ml
5% silver nitrate solution	7.5ml
5% borax solution	5ml
2% gelatin solution	40ml

(In Harada's original method, Step 2, 3, 5 and 6 are not performed and in step 4, the duration of oxidation is reduced to 60 min. in this method)

最後に今回の実験ではFite法での菌陽性例を対称に比較検討したが、むしろchromophobic型で対比した方がより明確な答えが出たかもしれない。

この報告要旨は第65回日本らい学会で報告したものに、さらに改良を加えた。

文献

- 1) HARADA. K. A Modified allochrome procedure for demonstrating Mycobacteria in tissue sections. *Int. J. Lep.* **45**, 49 1997.
- 2) HARADA. K ; Periodic acid-methenamine silver stain for mycobacteria. *Stain Technol.* **51**, 278, 1976.
- 3) HARADA. K ; An allochrome periodic acid-methenamine silver stain for demonstrating mycobacteria. *Jap. J. Lep* **48**, 171 1979.
- 4) HARADA. K and SUZUKI K ; Periodic Acid-ethanol gelatin methenamine silver stain for demonstrating M leprae and Myelin in peripheral nerve fibers of Leprosy patients. *Int. J of Lep.* **54** 84 ~ 87 1986.
- 5) NYKA, W ; Method for staining both acid-fast and chromophobic tubercle bacilli with carbol fuchsin. *J. Bact.* **93** 1458 1967.
- 6) 広井禎之, 富永晋, 小林美紀 ; 抗酸菌染色法とその特異性に関する検討 *病理技術* **45** 18 1992
- 7) 小松三恵, 片岡光枝, 新井孝司, 若松恭子, 松並平晋, 山中宣昭, マイクロウェーブを用いたPAM染色の検討, *病理技術* **43** 9 1991
- 8) HARADA. K, GIDOH, S, Tsutsumi S ; Staining mycobacteria with carbol fuchsin : Properties of staining solutions prepared with different samples of basic fuchsin, *Microsc. Acta.* **78** 21 1976
- 9) WHO : A guide to leprosy control p.71 198
- 10) 原田澄, 儀同政一, 堤貞衛, ; 東南アジア及び日本の癩施設での抗酸性菌の石炭酸フクシン染色について (特に石炭酸フクシン溶液に使用される塩基性フクシンの効果について, 日本らい学会雑誌, **49** 183 1980
- 11) HARADA. K ; Staining mycobacteria with periodic acid-carbol pararosaniline : Principle and practice of the method. *Microsc. Acta.* **79** 224 1977.
- 12) 菅井健二編 : 脂肪の組織化学, 新しい組織学研究法, 医歯薬出版 385~518 1959 (第二版)
- 13) 林勇, 當銘良也, 吉川英一, 前沢直樹, 山本光枝, 佐藤雄一 : チオセミカルバジド (TSC) を用いた新しい過よう素酸メセナミン銀 (PAM) 染色, *病理技術*, **38**, 5 ~ 7 1988
- 14) PAM染色コンペ : *病理技術* : **42** 19 ~ 23 1990
- 15) 引野利明 : 組織内ノカルジア検索のための抗酸菌染色 : *臨床検査* : **36** 7 798~799 1992
- 16) 小川勝, 中野嘉与, 鈴木喜久雄, 佐々木直志, 佐原千絵子, 林祥剛, 細綱線維鍍銀法の検討, — 一非特異銀顆粒除去法の検討 : *病理技術* : **39**, 26 ~ 38 199
- 17) 出倉善四郎, 鈴木喜久雄, 川並注一 ; 新しい髓鞘染色法の試み : I ゼラチン添加PAM染色による手技, *病理と臨床*, **1** 349~354 1983
- 18) 片岡光枝, 新井孝司, 大泉由里子, 赤羽信子, 若松恭子, 益田幸成, 佐野順次郎, 石崎正通, 川並注一, 矢島権八, 出倉善四郎, ゼラチン・メセナミン銀法の手技の確立とメカニズム解明の試み : *病理と臨床*, **1**. 507~513 1983
- 19) 川津邦雄 : 病理組織染色 (神経線維染色) における染色性から見た各種ゼラチンと銀との関係 : *日本医学写真学会雑誌*. **29** 12~17 1991
- 20) 川津邦雄, 前田百美 ; ゼラチン銀を用いた神経線維染色法について ; *日本医学写真学会雑誌* ; **29** 169~173 1991