口腔微生物の生態学的研究

3. 定量的簡易グラム染色法

徳島大学医学部細菌学教室 (指導: 吉田 長之教授)

福井公明・中西恒子・太田房雄・森本泰自

九州歯科大学口腔細菌学教室 (指導: 大曲 靖夫教授)

内山長司・中野長幸・柳本滋常 藤橋 忠・原 光寿・宮崎禎之

本論文の要旨は、昭和46年4年、第44回日本細菌学会総会 (東京) および昭和46年10月、第13回歯科基礎医学会 (東京) で発表した。

Studies on Oral Microorganisms

3. A Quantitative Gram Stain

By

Komei Fukui, Tsuneko Nakanishi, Fusao Ota and Yasuyori Morimoto

Department of Bacteriology (Director: Prof. Nagayuki Yoshida)

School of Medicine, University of Tokushima, Tokushima, Japan.

Choji Uchiyama, Nagayuki Nakano, Shigetsune Yanagimoto, Tadashi Fujihashi,
Mitsutoshi Hara and Yoshiyuki Miyazaki

Department of Oral Bacteriology (Director: Prof. Yasuo Ohmagari)

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

A new quantitative method of gram stain modifying after Hucker was devised and established. It is also rapid and simple as follows.

1. Prepare a thin film of the material to be examined and dry in air.
2. Fix with absolute alcohol for 60 sec after being flamed.
3. Stain with 0.2% crystal violet solution for 60 sec.
4. Wash with water.
5. Stain with Lugol solution for 60 sec.
6. Wash gently with tap water.
7. Decolorize with the mixture of 70ml of 95% ethanol and 30ml of acetone for 90 sec.
8. Wash with water and dry in air.
9. Decolorize with 5 ml of 0.3% HCl in 70% ethanol.
10. The latter decolorizing solution is measured for absorbance at 580 m μ .

This method showed a clear linear relationship between the concentration of bacteria and the extinction of crystal violet at 580 m μ .

口腔内微生物には無数のグラム陰性ならびに陽性菌が存在し、またグラム不定のものもかなりある。このグラム不定のものは、培養時間、培養温度、培地の種類などにかなりの影響をうける。またムチンの存在はさらに染色性を複雑にするようである。

そこで口腔微生物の生態を知ろうとするとき、グラム染色性は1つの興味ある現象といえる。しかし動的な状

態を知るためには、簡単で短時間でできる定量法が望ましい。

グラム染色の定量的方法はかなり多く考案されている。その主なものに Micro-Kjeldahl 法によりクリスタル紫のN量を測定する方法 (Kennedy and Barbaro, 1953, 1954)¹⁾ や ペーパー クロマトグラフ による方法 (Bartholomew, et al., 1965)²⁾ や、その他の方法

(Wensinck et al., 1965)³⁾ がある。しかし、いずれも煩雑な手技を必要とし、菌の増殖にともなう動的状态をとらえるためには、より簡単な方法を検討する必要があると感じた。

そこで簡単なグラム染色法を考案し、検討した結果、グラム陽性菌ならびに不定菌については、十分使用しうると考えたので報告する。

実験材料および実験方法

1 供試菌ならびに培養法：教室保存の *Staphylococcus aureus* 209P *Escherichia coli* (0111), *Bacillus subtilis*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Shigella sonnei* などを用いた。菌液は 37°C で普通寒天に 24 時間培養したものを、普通ブイヨンに移植し、37°C で必要時間振盪培養したものをを用いた。

2 染色材料：Hucker の変法⁴⁾ を用い、クリスタル紫は 1/10 濃度とした。クリスタル紫液の組成は、クリスタル紫 0.2g, 萘酸アンモニウム 0.8g, 蒸留水 100ml である。ルゴール液は規定のものを使用し、脱色液はアルコール、アセトン、塩酸などについて検討した。後染色は規定のサフラニンを使用した。

3 判定法：クリスタル紫は 570~580m μ の波長に最大の吸収がみられる。その測定には日立光電比色計 101 型を用いた。

染色終了後、細菌が保持するクリスタル紫量を約 5 ml の 1% 塩酸加 70% エチルアルコールで脱色し、試験管に入れ密封して、比色計で測定する。この色素保持量により、グラム陽性度を測定した。

実験成績

メスピペットで菌液 0.1ml を、あらかじめエーテルアルコール混合液で脱脂した清浄なスライドガラス上におき、薄くぬりひろげ自然乾燥したらのについて、以下の検討を行なった。

1 固定の検討

表 1 にしめすように 10% ホルマリン 5 分間のものは、細菌のクリスタル紫保持量はとくに低い。他のものはあまり差はみられなかった。また、固定直後に染色しなくても、実験の都合で一夜放置しても差はみなかった。

本法は塗抹菌が剝離すると、結果は全く不安定になる。できるだけ簡単なようにと考えて火焰固定後さらに純アルコールで再固定することにした。

2 染色液の検討

図 1 にみるように、クリスタル紫の濃度が直線となる

Table 1. Crystal violet retention of bacterial cells after various fixations.

Fixation	Crystal violet retained in cells (580m μ)			
	Stained immediately after decolorization		Allowed to stand overnight before staining	
Flame	0.70	0.68	0.72	0.76
Methanol for 60sec	0.66	0.72	0.84	0.82
Ethanol (100%) for 60 sec	0.62	0.68	0.78	0.82
10% formalin for 5 min	0.35	0.35	0.44	0.41
Carnoy for 60sec	0.68	0.68	0.72	0.70
2% osmic acid evaporated for 5 min	0.70	0.70	0.72	0.74

Bacterial conc. smeared : Optical density = 0.52 (660m μ)

Volume of bacterial suspension : 0.1ml

Bacterium tested : *Staphylococcus aureus*

のは 8 μ g/ml 以下の濃度までである。本報に用いた原法の 1/10 のクリスタル紫は 2,000 μ g/ml であるので十分の濃度と考えられる。結局、クリスタル紫 0.2g, 純アルコール 2.0ml, 萘酸アンモニウム 0.8g, 蒸留水 100ml の組成のものを用いた。またこの図は一定量の菌液に含まれるクリスタル紫量を知るための検量線となる。なお本法

Fig. 1. Relationship between the concentration of crystal violet and its extinction at 580 m μ .

には石炭酸ゲンチアナ紫などは、スライドに汚れが附着するので不適当である。

ルゴール液、サフラニン液は原法に従った。

3 第一回脱色条件の検討

この条件を定めるのに、大腸菌がほとんど脱色される時間を知る必要がある。図2にみるように、30～60秒で急激に脱色され、90秒以後は比較的安定である。この試料はルゴール処理後十分乾燥して用いており、もし日常検査におけるように濾紙で軽く圧迫する程度で行なえば、60秒でほとんど脱色されてしまう。そこで脱色時間を90秒とした。

Fig. 2. Relationship between the time decolorization and the dose of crystal violet retained in the cell.

4 最終脱色液の検討

この場合は細菌が保持するクリスタル紫を完全に遊離させることが望ましい。そのためには、使用するアルコールは100%より70%の方が脱色され易く、また酸性にすることでさらに脱色され易いことはよく知られている。しかし変色して定量できなくなるおそれもあるのでこの点をとくに重視して検討した。

図3は70%エタノールを溶媒としたクリスタル紫が、塩酸濃度による変色をしめしている。0.70%の塩酸濃度

Fig. 3. Effect of HCl concentration on the extinction of crystal violet in 70% ethyl alcohol at 580mμ.

では安定であるので、0.35%を用いることにした。この0.35%は市販の塩酸(約35%)を原液とすると、1%加えればよい。

図4は、クリスタル紫におよぼすアルコール濃度の影響(図4a)と同じく0.35%含まれるアルコール濃度の影響(図4b)をしめす。

アルコールは30%まで安定である(図4a)。しかし塩酸が含まれると60%までは安定であるが、それ以下の濃度では急激に変色する(図4b)。

結局0.35%塩酸加70%エチルアルコール液を最終脱色液とした。

5 菌液濃度と紫保持量との比較検討

グラム陽性菌として *S. aureus*, *M. lysodeikticus*, および *B. subtilis* をえらびグラム陰性菌として *E. coli* および *S. sonnei* をえらび、菌液濃度とクリスタル紫保持量との間に、上記条件で染色した場合、直線関係が成立するか否かを検討した。

図5にしめすように、グラム陽性菌では、ある菌液濃度範囲内では直線関係が成立する。

Fig. 4. Effect of the concentration of alcohol or alcohol with 0.35% HCl on the extinction of crystal violet at 580m μ .

グラム陰性菌でも、非常にわずかではあるが、色素を保持することが判った。

考 察

本法は第一回脱色後、細菌の保持するクリスタル紫量をもってグラム陽性度としている。グラム現象は第1回脱色時に、この染色機序の特色があるという点から考えれば、本実験のようにクリスタル紫保持量を測定することで十分であるといえる。実際煩雑な方法ではあるが、今までに報告されたものはクリスタル紫量を測定したものがほとんどである^{1), 2), 3), 5), 6)}。

しかし、一方では後染色保持量も考慮にいれてサフランイン、エオジンY、フクシンなども定量した方法⁷⁾がある。

わたくしどもも一応試みたが、後染色後の水洗に問題があり、水洗条件が定まり難いことがわかった。また水洗したぐらいでは落ちないスライドの後染色色素による汚れが、定量に強く影響した。またクリスタル紫と後染色色素はそれぞれ特有の吸収のピークがあるが、お互いに近いために本法では弁別できなかった。

しかし、微生物の経時的な生態を追求するのには、本法のような簡易迅速法で十分と考えられる。

Fig. 5. Relationship between the concentration of gram-negative or-positive bacteria and the crystal violet retained in bacterial cell.

- : *Staphylococcus aureus* 209P
- : *Micrococcus lysodeikticus*
- △— : *Bacillus subtilis*
- ×— : *Shigella sonnei* *Escherichia coli* (0111)

結 論

グラム現象を迅速かつ簡易に定量的測定をするためのグラム染色法を考案した。

- 1 メスピペットで菌液 0.1ml を清浄なスライドグラス上におきうすくのばす。自然乾燥
- 2 火焰固定後、純アルコールで60秒間重固定
- 3 0.2%クリスタル紫染色 60秒
- 4 水洗
- 5 ルゴール液処理 60秒
- 6 水洗
- 7 95%エタノール 70ml, アセトン 30mlの混合液にて第1回脱色 90秒
- 8 水洗
- 9 乾燥(確実に)
- 10 0.35%塩酸加70%エタノール 5.0mlの中にスライドを入れて完全脱色
- 11 脱色液を580m μ で吸光度測定

本法で菌濃度とクリスタル紫保持量との関係は、ある濃度では直線関係が成立し、定量に用いられることがわかった。

引 用 文 献

1. Kennedy, E.R. and Barbaro, J.F. : Quantitative adsorption of crystal violet, J. Bacteriol. 65 : 678-680, 1953.
2. Bartholomew, J.W., et al. : Analysis of the mechanism of gram differentiation by use of a filter-paper chromatographic technique, J. Bacteriol. 90 : 766-777, 1965.
3. Wensinck, F. and Boeve, J.J. : Quantitative analysis of the gram reaction, J. gen. Microbiol. 17 : 401-413, 1957.
4. Hucker, G.J. and Conn, H.J. : Further studies on the methods of gram staining, N.Y. (Geneva) Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. 128 : 1-34, 1927.
5. Scherrer, R. : Cell structure and quantitative gram stain of *Bacillus megaterium*, J. gen. Microbiol. 31 : 135-145, 1963.
6. Borzani, W. and Vairo, M.L.R. : Quantitative adsorption of crystal violet by dead microorganisms, J. Bacteriol. 77 : 757-759, 1959.
7. Barbaro, J.F. and Kennedy, E.R. : A quantitative gram reaction, J. Bacteriol. 67 : 603-607, 1954.