

アンモニア銀を用いた組織内真菌染色

藤田 正志¹⁾・村石 佳重²⁾・横内 幸²⁾・大原関 利章²⁾・高橋 啓²⁾

1) 帝京短期大学 ライフケア学科 2) 東邦大学医療センター大橋病院 病理部

【抄録】

一般的に真菌の染色法は、無水クロム酸・メセナミン銀を使用するグロコット染色が用いられている。しかしながら、ムチンを多量に含む検体では、ムチンが黒色に共染し真菌の同定が困難になる事がある。そこで今回、グロコット染色と過ヨウ素酸・アンモニア銀を使用した真菌染色を行い、真菌の検出に最適な反応時間と反応温度について検討した。

菌体の染色性が良好かつムチンの共染を抑えたのは過ヨウ素酸・アンモニア銀法では、65℃ / 15～2分、70℃ / 10～15分、75℃ / 5～15分、80℃ / 5～15分であった。グロコット染色では、今回の条件の範囲内で良好な染色結果を得ることは出来なかった。

過ヨウ素酸・アンモニア銀法は、ムチンが共染しない至適温度・時間の幅が広く、また銀液の調整が容易である事や染色時間が短いことで日常業務に取り入れ易いと考える。

【キーワード】 グロコット染色, 真菌, アンモニア銀, メセナミン銀, ムチン共染

I. はじめに

臨床的に真菌症を疑う症例数は年々増加傾向にあり、副鼻腔真菌症もその一つである。副鼻腔真菌症では、培養が陰性になる頻度が高く、かつ最終報告までに長時間を要することが多い。このため、菌体を標本上で証明出来る病理組織学的検索は診断的価値が高い。しかし、副鼻腔真菌症、特にアレルギー性真菌性副鼻腔炎 (AFRS) のように粘稠性の高い分泌物中に真菌が存在する疾患では、従来法である無水クロム酸・メセナミン銀を用いたグロコット染色は背景のムチンの共染のため、真菌の観察が困難になることが多い。

そこで、AFRS 症例に対して、グロコット染色と近頃用いられている過ヨウ素酸・アンモニア銀法を行い、真菌の検出に最適な銀液の反応時間と反応温度について検討を行った。

II. 原理

グロコット染色は、真菌中の多糖類が無水クロム酸で酸化され、生じたアルデヒド基とメセナミン銀錯塩を結合させる¹⁾。

過ヨウ素酸・アンモニア銀法は、真菌中の多糖類を過ヨウ素酸で酸化し、アルデヒド基が生じる。次にアンモニア銀イオンでアルデヒド基が酸化されると、銀イオンは遊離の銀に還元される。トレーン (Tollen) 反応とよばれ、アルデヒド基の検出に利用されている²⁾。

III. 材料と方法

副鼻腔ムチンの多い AFRS 症例のパラフィン組織切片を用い、グロコット染色と過ヨウ素酸・アンモニア銀染色 (Table.1) を下記の条件で行った。

銀液の反応時間は、5, 10, 15, 20, 25 分、反応時間は、65, 70, 75, 80, 85, 90℃とし、それぞれの条件における真菌と背景のムチンの染色性の判定を行った。

判定基準は、ムチンの染色性を 0, 1, 2, 3, 菌の染色性を弱△, 適○, 過×とした。(Figure 1)

IV. 結果

(Table.2-5) (Figure 2, 3) を参照

グロコット染色は、ムチンの共染を抑え真菌

Table 1. 染色工程

メセナミン銀法(グロコット染色)				過ヨウ素酸・アンモニア銀法			
酸化剤	5% 無水クロム酸		60分	酸化剤	0.5% 過ヨウ素酸		10分
還元	1% 亜硫酸水素ナトリウム		1分	還元	2% シュウ酸		1分
予備加温			15分	予備加温			15分
鍍銀	メセナミン銀	65°C	30~40分	鍍銀	アンモニア銀	65°C	15分以内
置換	0.1% 塩化金		5分	置換	0.1% 塩化金		3分
定着	2% チオ硫酸ナトリウム		3分	定着	2% チオ硫酸ナトリウム		3分
後染色	ライトグリーン		3分	後染色	ライトグリーン		3分
メセナミン銀使用液 ・5% 硝酸銀 ・ヘキサメチレンテトラミン ・ホウ砂 ・ゼラチン				アンモニア銀使用液 ・10% 硝酸銀 ・アンモニア水			
染色工程時間			約180分	染色工程時間			約30分

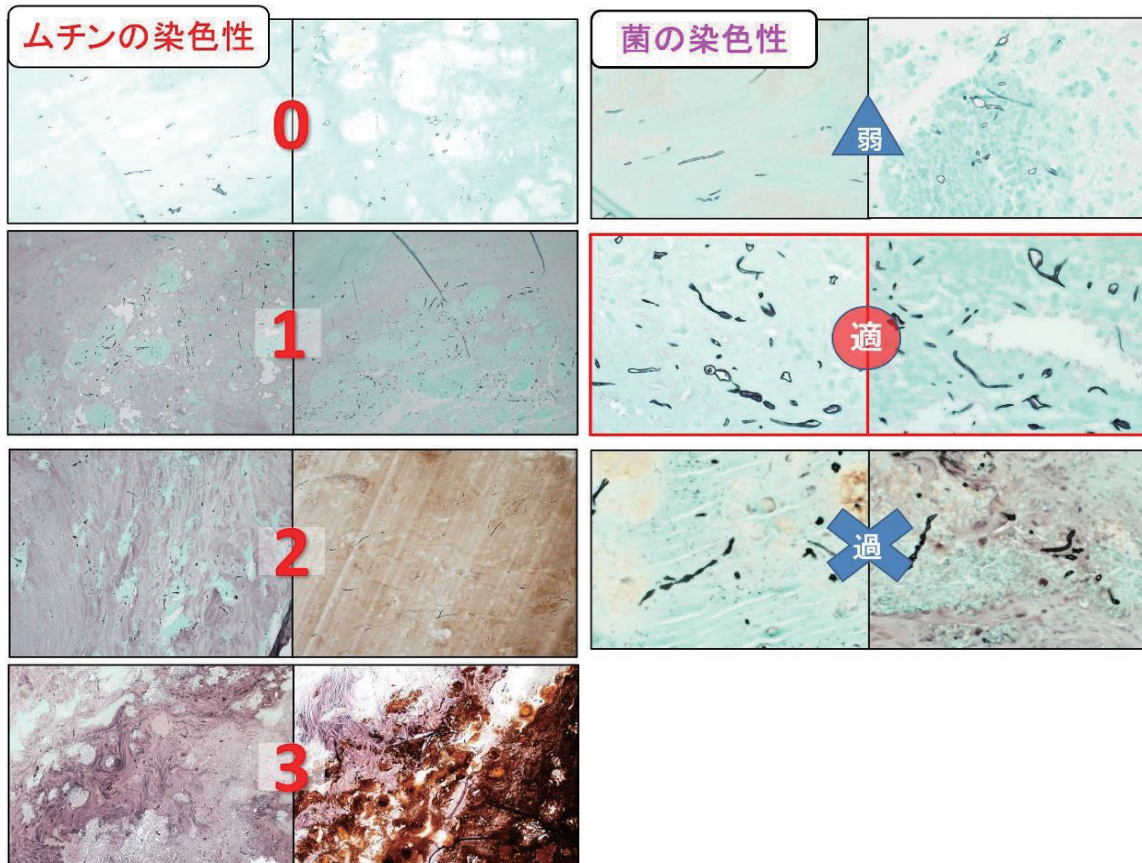


Figure 1. ムチン染色性・菌の染色性の判定

Table 2. ムチン染色性 過ヨウ素酸・アンモニア銀法

	65°C	70	75	80	85	90
5min	0	0	1	1	1	2
10	1	1	1	1	2	2
15	1	1	1	1	2	3
20	1	1	1	2	3	3
25	1	2	2	2	3	3

Table 3. ムチン染色性 無水クロム酸・メセナミン銀法

	65°C	70	75	80	85	90
5min	0	0	1	1	1	1
10	1	1	2	2	2	2
15	2	2	3	3	3	3
20	3	3	3	3	3	3
25	3	3	3	3	3	3

Table 4. 菌の染色性 過ヨウ素酸・アンモニア銀法

	65°C	70	75	80	85	90
5min	△	△	○	○	×	×
10	△	○	○	○	×	×
15	○	○	○	○	×	×
20	○	×	×	×	×	×
25	○	×	×	×	×	×

Table 5. 菌の染色性 無水クロム酸・メセナミン銀法

	65°C	70	75	80	85	90
5min	△	△	△	△	△	△
10	△	△	△	△	△	×
15	△	△	△	○	×	×
20	△	△	△	×	×	×
25	△	○	○	×	×	×

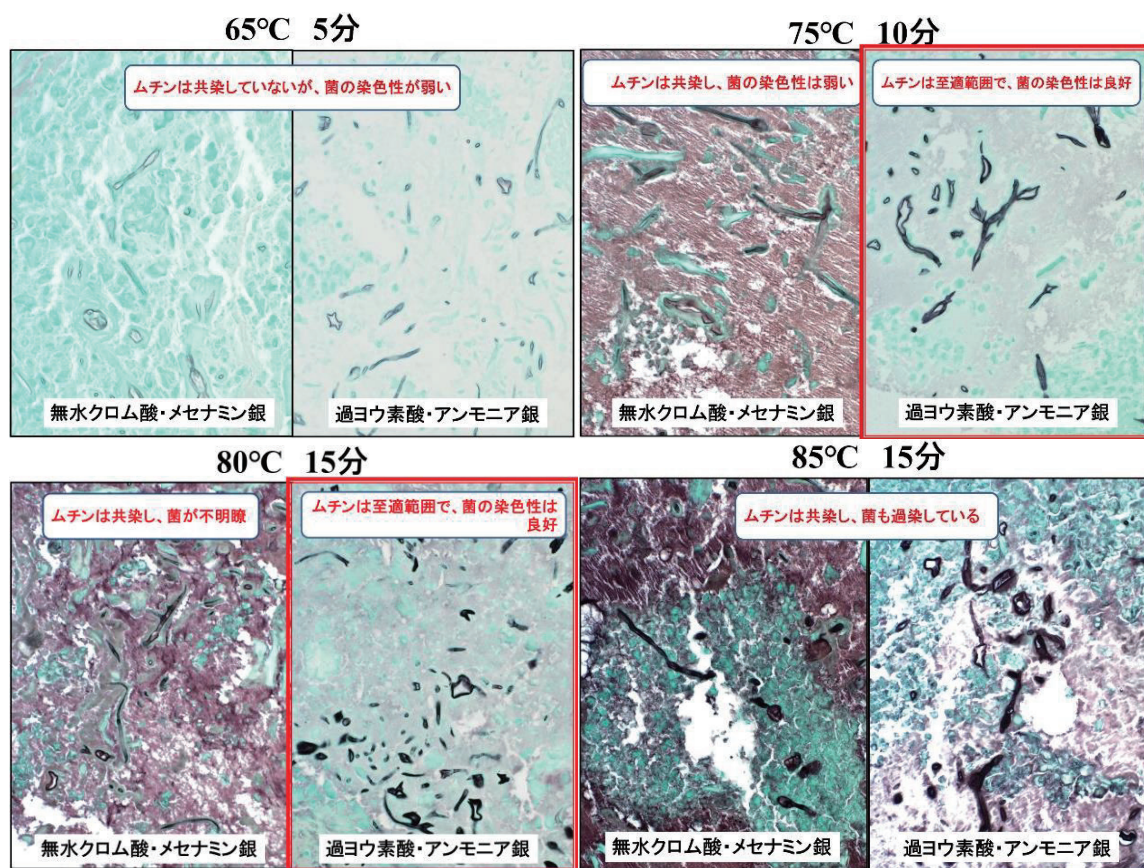


Figure 2. 各染色法での反応時間，反応温度おいての染色態度

真菌の染色性が良好かつムチンの共染が乏しい 銀反応の反応温度/反応時間

グロコット染色

過ヨウ素酸・アンモニア銀

		反応温度					
		65/05	70/05	75/05	80/05	85/05	90/05
反応時間	65/10	65/10	70/10	75/10	80/10	85/10	90/10
	65/15	65/15	70/15	75/15	80/15	85/15	90/15
	65/20	65/20	70/20	75/20	80/20	85/20	90/20
	65/25	65/25	70/25	75/25	80/25	85/25	90/25
	65/05	65/05	70/05	75/05	80/05	85/05	90/05

真菌の染色性が○かつムチン染色性が0または1にとどまる条件を示す。

Figure 3. 各染色法での反応温度と反応時間

を明瞭に観察できる条件が無かった。

過ヨウ素酸・アンモニア銀法は 65°C / 15～25 分, 70°C / 10～15 分, 75°C / 5～15 分, 80°C / 5～15 分でムチンの共染を抑え, 真菌を明瞭に染め出した。

V. 考察

真菌を証明するために一般的に取り入れられているグロコット染色は, 染色法の工夫に様々な報告^{3) 4)}はあるが, 酸化時間やメセナミン銀液の反応時間が長いなどの理由から安定した染色結果を得ることがしばしば困難である。それに比較して過ヨウ素酸・アンモニア銀は酸化時間や反応時間が短く短時間の行程で染色出来る事から近頃取り入れられている染色法である^{5) 6)}。さらに, 試薬調整が簡単で硝酸銀とアンモニアのみで作製できるのも利点である。今回の検討で, 過ヨウ素酸・アンモニア銀法は背景のムチンの共染を抑え真菌を明瞭に観察出来る反応時間・反応温度の条件が広がった。この事は多忙な日常業務内でも失敗の無い標本が作製出来るため, グロコット染色に代わる染色として有用である。

現在, 東邦大学医療センター大橋病院の病理部では真菌の証明に過ヨウ素酸・アンモニア銀液法を取り入れており, ムチンを含む検体はもちろん肺検体に対しても肺胞組織の共染が少ないため用いられている。しかしながら, 過ヨウ素酸・アンモニア銀法はアスペルギルス属やカンジダ属などの真菌, 多くの細菌などの証明は可能であるが, 放線菌は染め出されない事を経験しており, この証明の為にはグロコット染色が適している。

今回得られた至適条件は真菌の種類や状態また, ムチンの性状によって変化する可能性があり, さらに検討する必要があると考える。

本論文の要旨は第 57 回日本臨床細胞学会総会 (2016 年, 5, 横浜市) で発表した。なお, 本論文に関して, 開示すべき利益相反関連事項はない。

【文献】

- 1) 中島 研 (2013.4) 知っておきたい特殊染色 — 染色のコツと鏡検のポイント 2. グロコット染色
Medical Technology Vol41. No4.429-438
- 2) 山本 伸晃, 當銘 良也 (2003.12) アンモニ

ア銀液を用いた組織内真菌染色法 — クロム酸アンモニア銀法 — *Medical Technology* Vol31.No.12.1329-1332

- 3) 鳥居 洋祐, 大西 崇文, 長友 忠相, 佐藤 元 (2018) 施行者間の少ないグロコット染色の工夫 — クロム酸アンモニア銀法における菌体ごとの至適時間の検討 医学検査 Vol.67. No2.221-227
- 4) 川端 弥生, 五十嵐 久喜, 梶村 春彦 (2022) 接合菌類 (ムコール菌) 同定を目的としたグロコット染色 — 熱処理および過ヨウ素酸による酸化についての検討 — 医学検査 Vol71. No1.53-60
- 5) 中山 晴雄, 篠崎 稔, 三宅 洋子, 井手 忠, 大久保 陽一郎, 渋谷 和俊 (2008.7) 変貌した深在真菌症治療と必須検査 2. 真菌の検査法 3 病理組織検査 *Medical Technology* Vol36.No7.707-712
- 6) 三宅 洋子, 佐々木 久美子, 篠崎 稔, 若山 恵, 井手 忠, 根本 哲生, 渋谷 和俊 (2010) 真菌検査法 カラーアトラス 真菌の形態 — グロコット染色細胞診標本をよむ — 深在性真菌症～ SFI Forum ～ Vol6.No2.26-29

Fungal staining in tissues using silver ammonia

Masashi FUJITA¹⁾ • Yoshie MURAISHI²⁾ • Yuki YOKOUCHI²⁾

Toshiaki OOHARASEKI²⁾ • Kei TAKAHASHI²⁾

1) Department of Life Care, Teikyo Junior College

2) Department of Pathology, Toho University Ohashi Medical Center

【abstract】

In general, the staining method for fungi is Glocott staining using chromic anhydride and mecenamine silver. However, in a sample containing a large amount of mucin, the mucin may co-stain with black and identify the fungus may be difficult. Therefore, we performed fungal staining using glocot staining and iodineic acid and silver ammonia, and examined the optimal reaction time and reaction temperature for fungal detection.

The stainability of the cells was good and the co-staining of mucin was suppressed by the silver perperiodic acid and ammonia method at 65°C/15~25 min, 70°C/10~15 min, 75°C/5~15 min, and 80°C/5~15 min. Glocott staining did not produce good staining results within the range of these conditions.

The iodine acid-ammonia silver method is considered to be easy to incorporate into daily work because it has a wide range of optimum temperatures and times when mucin does not co-stain, and it is easy to adjust the silver solution and the dyeing time is short.

【Key words】 Glocott stain, methenamine-silver nitrate solution, Ammoniacal-silver solution, Fungus, dyeing C0-dye d