

学内実習における鞭毛染色実施の試み～鞭毛染色のコツ～

中 屋 祐 子*[§]

要 旨 現在、微生物検査室において全自動細菌同定感受性検査装置や質量分析装置の導入により、正確で簡便且つ迅速に菌の同定が行われるようになった。これに伴い、鑑別試験のための鞭毛染色はほとんど行われていないと推察される。また、鞭毛はフィラメント状の構造物であるため、取り扱いに慎重さを要し、染色は一般に難しいとされている。これらに関連し、教育現場においても、鞭毛染色を実施している施設は少ないと考えられる。一方、国家試験では、細菌の形態と染色法および染色法と目的菌を結ぶ問題などが出題されている。学内実習の目的は、座学で学んだ知識をもとに、方法や技術を修得し、自ら観察することで理解と記憶に繋げる事である。本稿では、既に確立されている Leifson 染色法の留意点に注意しながら染色液の調製法、菌液の調製法、染色法について詳細に記載した。記載した手順に従って鞭毛染色を実施することで、必ず優良な染色像が得られるため、多くの教育施設での実施を期待したい。

キーワード 鞭毛染色、Leifson 法、教育目的、学生実習

I. 緒 言

現在、微生物検査室において、全自動細菌同定感受性検査装置や質量分析装置の導入により、正確で簡便且つ迅速に菌の同定が行われるようになった。これに伴い、鑑別試験のための鞭毛染色はほとんど行われていないと推察される。このことに関連し、教育現場においても、鞭毛染色を実施している教育施設は少ないと考えられる。一方、国家試験では、細菌の形態と染色法および染色法と目的菌を結ぶ問題や、菌種による鞭毛の有無などが出題されている。また、染色法としての出題ではないものの、グラム陰性桿菌の鑑別試験において運動性を有する細菌か否かを問う問題も出題

されている。

菌種によって異なるが、鞭毛は太さ 12 ～ 30 nm、長さ 3 ～ 12 μ m のフィラメント状の構造物である。その構造上、物理的衝撃や酸に弱く、菌液の慎重な取り扱いが重要であることから、鞭毛染色は一般に難しいとされており、学内実習で実施されない原因の一つと考えられる。代表的な鞭毛染色法の一つに Leifson 法がある。この染色法に関するいくつかの文献があるが、染色液や菌液の調製について、共通する留意事項が記載されている。例えば、1) 糖分解によって産生された酸が鞭毛を傷害するため、使用する培地は糖を含まない培地を用いる¹⁾。2) 死滅期では鞭毛は菌体よりも速やかに破壊されるため、対数増殖期を使用

* 女子栄養大学微生物学・臨床検査学研究室 [§] ayuko@eiyo.ac.jp

する²³⁾。3) 鞭毛は酸によって傷害されるため、ホルマリン固定の際はホルマリンのpHを中性に調整する²⁾。4) 鞭毛のホルマリン固定後、培地成分や中性ホルマリン除去のための洗浄工程において、ピペットは用いずデカンテーションやスポイトで上清を除去する⁴⁾。5) 染色液を調製する容器は染色液がclearであることが確認可能な透明のガラス容器でなければならない²⁾。6) 透明な染色液を使用する^{1) 2) 5)}。7) スライドガラスは清浄、脱脂が十分な市販品を用いる⁴⁾。などがあり、難しいとされている鞭毛染色も、これらの留意点を着実に守ることで優良な染色像を得ることが出来ると報告されている²⁾。

近年、学生達の間で、その場限りの勉強法が多く見受けられるように感じる。微生物検査室で鞭毛染色を実施する機会がなくなったとはいえ、教育現場での実習の目的は、座学で学んだ知識をもとに、技術を修得し、自ら観察することで理解と記憶に繋げる事である。Leifson法での鞭毛染色は、フィラメント構造物に染色液中のタンニン酸を付着させて強調し、染色するという原理に基づいている。この原理を理解し、染色像を観察することによって、鞭毛を有する細菌種を把握することが重要であると考え。そのため、学内実習で鞭毛染色が実施出来るよう、前述した留意事項に注意しながら染色液の調製法、菌液の調製法、染色法について詳細に記載した。

II. 材料と方法

1. 色素原液の調製

95% Ethanol (富士フィルム和光純薬株式会社、051-00476) 100 mLを準備し、約1/3量を予め蓋つきの透明なガラス容器に入れる。次いで秤量したパラロザリニン酢酸塩 (Sigma-Aldrich、215945-5G) 0.9 g とパラローズアニリン塩酸塩 (富士フィルム和光純薬株式会社、164-09491) 0.3 g を入れ攪拌する。この時、95% Ethanol より先に色素を入れると溶解し難いので注意する。さらに残りの95% Ethanol を少しずつ加えて溶解させる。溶解出来たか否か確認し易いという点で透明なガラス容器を推奨する。なお、蓋は必須ではなく、三角フラス

コでもよい。95% Ethanol の蒸発を防ぐために密栓する。三角フラスコを使用した場合には、パラフィルム等で密封する。37℃のふ卵器で24時間静置し、完全に溶解したものを色素原液とする。

2. 3% タンニン酸水溶液の調製

必要量の1/3程度の精製水を予め容器に入れておき、秤量したタンニン酸 (富士フィルム和光純薬株式会社、201-06332) を入れ攪拌する。さらに残りの精製水で溶解する。この時、精製水より先にタンニン酸を入れると溶解し難い。なお、この場合に用いる容器は特に指定しない。参考までに本実験では遠沈管 (IWAKI、2345-050) を用いた。

3. 1.5% NaCl 水溶液の調製

必要量の1/3程度の精製水を予め容器に入れておき、秤量したNaCl (富士フィルム和光純薬株式会社、191-1665) を入れ攪拌する。さらに残りの精製水で溶解する。なお、この場合も、用いる容器は特に指定しない。本実験では3% タンニン酸水溶液の調製で使用したものと同様の容器を用いた。

4. 色素原液、3% タンニン酸水溶液、1.5% NaCl 水溶液を混合した Leifson 法染色液の調製

蓋つきの透明なガラス容器に、上述した色素原液、3% タンニン酸水溶液、1.5% NaCl 水溶液を等量混合する。この時、混合液は混濁する。これを4℃で3日間静置させる。3日間静置した染色液は、全量の上層3/4程度が透明であり、下層1/4程度が混濁している。使用可能な染色液は上層部の透明部分のみであるため、この確認は必ず行う。上層部と下層部の染色液が混ざらないよう、冷蔵ショーケースから慎重に取り出し、蛍光灯の光にかざすか、あるいは懐中電灯の光をあてて確認する。従って、この段階で使用する蓋つきの透明ガラス容器は必須である。-20℃での長期間の保存が可能であるため、上層部の透明部分のみを5 mL 用のチップやメスピペットを用いて遠沈管 (IWAKI、2325-015) に小分けにするとよい。下層部および上層部と下層部の境界部分は使用出来ないため処分する。

5. 供試菌株

供試菌株には、鞭毛を有する代表的な菌株であ

る *Escherichia coli* ATCC 25922 を用いた。

6. *Escherichia coli* ATCC 25922 の増殖曲線の作成

本実験では、いくつかの文献と同様に、トリプトソイ寒天培地、ハートインフュージョンブイヨン (HI) 培地、ブレインハートインフュージョンブイヨン (BHI) 培地を使用した^{2) 4) 5)}。

本菌をトリプトソイ寒天培地 (栄研化学株式会社、E-MC83) に画線塗抹し、37℃で一夜培養した。次いで培養集落を 4 mL の HI 培地 (栄研化学株式会社、E-MC04) および 4 mL の BHI 培地 (栄研化学株式会社、E-MC62) にそれぞれ接種し 37℃で一夜培養した。2 種の液体培地を用いた理由は、留意事項 1) に、糖分解によって産生された酸が鞭毛を傷害するとあるため、ブドウ糖を含有しない HI 培地とブドウ糖を含有する BHI 培地を用い、鞭毛の保有状況に違いがあるか否かを観察するためである。2 種の一夜培養菌液を新たな 10 mL の HI 培地と 10 mL の BHI 培地にそれぞれ 1/40 量接種し、培養温度 35℃、振盪速度 30 rpm、吸光度波長 660 nm、測定間隔 10 min の条件で振盪温度勾配培養装置 (ADVANTEC、TVS 126MA) を用いて 22.8 時間培養し、増殖曲線を作図した。

7. 増殖曲線に基づいた対数増殖期と定常期における培養の停止

増殖曲線に基づいて、HI 培地および BHI 培地共に対数増殖期は $\text{Log of OD}_{660} = 2.7$ で培養を停止させ、定常期については HI 培地は $\text{Log of OD}_{660} = 3.3$ 、BHI 培地は $\text{Log of OD}_{660} = 3.4$ で培養を停止した。なお、定常期では、一部の菌で死滅が始まり、増加する生菌数と死滅菌がおおよそ同数の状態となる。留意事項 2) で、死滅菌では、鞭毛は菌体より速やかに破壊されるため対数増殖期を使用するとされている。そのため対数増殖期と定常期で鞭毛の保有状況に違いがあるか否かを観察するために、十分な定常期を経たところで培養を停止させた。

8. 生菌における運動性の確認

増殖を停止させた 2 種の培養菌液をそれぞれスライドガラスにスポイト (栄研化学株式会社、

CB2000) で 1 滴滴下し、カバーガラスをかけ光学顕微鏡を用いて総合倍率 400 倍で鏡検した。菌液の流れにより同じ方向に移動する非運動性菌、あるいは菌自身が様々な方向へと移動する運動性菌か否かを確認した。この段階で運動性が認められない場合には、この先の操作を実施することは無意味である。

9. 鞭毛固定液 (10% 中性ホルマリン液) の調製と鞭毛の固定

ホルムアルデヒド (富士フィルム和光純薬株式会社、KCJ5120) と水酸化ナトリウム (富士フィルム和光純薬株式会社、197-02125) を用いて、10% ホルマリン水溶液と 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液を調製した。10% ホルマリンは強酸性であり、これによって鞭毛が傷害されるため 10% ホルマリン量の 1/20 量のブロムチモールブルー溶液 (武藤化学株式会社、8749-2) を添加し、0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液を用いて、おおよそ pH7.0 になるように調製した (10% 中性ホルマリン液)。なお、pH は東洋水素イオン濃度試験紙標準変色表 (東洋濾紙株式会社) で確認した。

増殖を停止させた HI 培養菌液と BHI 培養菌液を滅菌済み PS 製スクリュースピッツ (オリジンサイエンス、26102-1-10) にスポイトでそれぞれ 3 mL 移した。これに 10% 中性ホルマリン液を 500 μL 入れ、ピペットは用いずに丁寧に転倒混和した。鞭毛を十分に固定するため 10% 中性ホルマリン加培養菌液を 5 分間静置した。

10. 培地成分とホルマリンの洗浄操作および菌液の濃度調整

鞭毛固定した培養菌液を、3000 rpm、15 分間、25℃で遠心し、上清を除去した。この際、物理的衝撃による菌体から鞭毛の剥離を防ぐため、ピペットを用いずデカンテーションで除去した。次いで、沈殿物に 4 mL の精製水を加え転倒混和し、この操作を 2 回繰り返す、最後に 2 mL の精製水を入れ転倒混和した。菌塊を沈殿させるため、5 ~ 10 分間静置した。

菌体が密集していない美しい標本の作製には McFarland (McF) no. 0.5 程度がよいとされている。新たな滅菌済み PS 製スクリュースピッツを準備

し、3 mL の精製水を入れた。次いで 2 mL の菌懸濁液を 3 mL の精製水におおよそ McF no. 0.5 になるようにスポイトを用いて調製し、これを染色に用いた。

11. 菌の塗抹と染色

-20℃に保存した染色液を用いる場合には室温に戻し、丁寧に転倒混和し、蛍光灯の光などにかけ、濁りがなくなことを再確認した。スライドガラス(松波硝子工業株式会社、水切放フロスト、S2226)をガスバーナーで温め、ガラス鉛筆で面積の3/4程度の枠を書き、おおよそ McF no. 0.5 に調製した菌懸濁液の上層部からスポイトで半滴スライドガラスの一端に滴下した。スライドガラスを傾けて伝わせ、自然乾燥させた。

塗抹乾燥させたスライドガラスをステンレス棒やガラス棒などの、はしごの上に置き、1 mL の染色液を載せた。懐中電灯を用いてスライドガラスの下から光を当て、霧のような混濁が染色液全体に及ぶまで(染色の終末点)染色した。終末点は、室温や染色液の温度によって異なるが、おおよそ 5 ～ 20 分程度である。終末点に達したスライドガラスは、洗瓶を用いて染色液を吹き飛ばすように洗浄し、次いでスライドガラスを手を持ち、さら

に精製水で表裏をよく洗い、乾燥させた。

12. 鏡検

標本は、光学顕微鏡(OLYMPUS、BX40)で総合倍率 1,000 倍、油浸レンズを用いて観察した。互いの菌の鞭毛が絡み合い観察し難い視野もあるため、個々の菌が分散している視野を見つけ観察した。写真撮影は、顕微鏡撮影システム(Cannon、EOS R10 スーパーシステム)を用いた。

III. 結 果

1. 対数増殖期と定常期および HI 培地と BHI 培地の生菌における運動性の確認

対数増殖期と定常期における運動性の比較では、HI 培地と BHI 培地共に運動性が認められたが、対数増殖期より定常期で活発な運動性が認められ、その割合も定常期の方が圧倒的に多かった。さらに、HI 培地と BHI 培地における運動性の比較では、顕著な差は認められなかった。

2. 対数増殖期と定常期および HI 培地と BHI 培地における鞭毛染色像の比較

図 1 に、HI 培地と BHI 培地を用いて *Escherichia coli* ATCC 25922 を 35℃、振盪速度 30 rpm、22.8 時間培養した際の増殖曲線を示した。

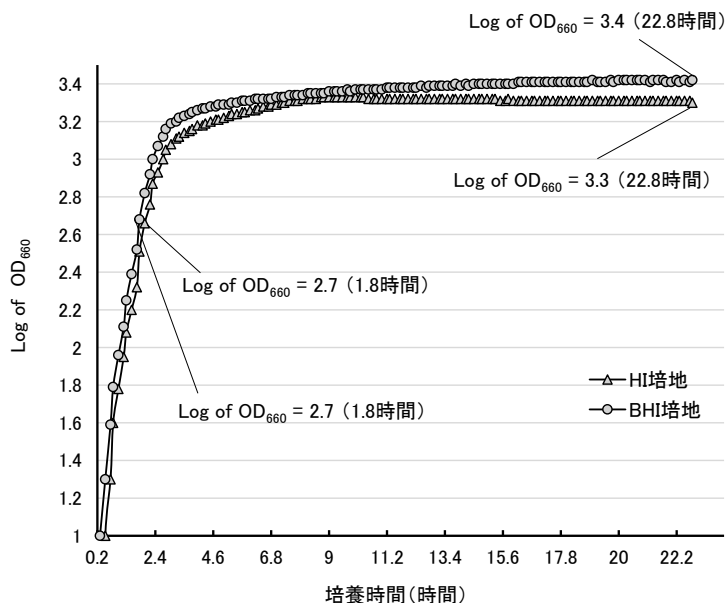


図 1 HI 培地と BHI 培地を用いた *Escherichia coli* ATCC25922 の増殖曲線

また、この増殖曲線に基づき、2種の培地における対数増殖期と定常期の鞭毛染色像を図2に示した。図2aの顕微鏡像は総合倍率1,000倍で観察し、鞭毛が染色された菌体が多数認められた視野(弱拡大像)を示し、図2bは、菌体と鞭毛が単体で確認可能な強拡大像を示した。HI培地とBHI培地、共に対数増殖期でも定常期でも鞭毛保有菌の染色像が観察できた。しかし、対数増殖期より定常期の方が鞭毛の保有率は圧倒的に高く、標本全体の7割程度が鞭毛を保有した像が認められた。さらに、鞭毛が長いうえに1つの菌体における鞭毛数も多いように見受けられた。

IV. 考 察

本稿では、学生達が自ら鞭毛染色を行い、原理を理解し、観察することで記憶に繋げることを目的としている。学内実習でLeifson法による鞭毛染色を実施できるよう、前述した留意点に注意しながら染色液の調製法、菌液の調製法、染色法について詳細に記載した。

今回、対数増殖期と定常期、またHI培地とBHI培地において鞭毛の保有状況の比較を行っ

た。比較のために、正確な保有率を示すことが出来れば、鞭毛染色の実施を検討するための指標となり得ると考えたが叶わなかった。その理由として、1視野に鞭毛保有菌と非保有菌が均一に分散しておらず、さらに、鞭毛保有菌においては、鞭毛同士が絡み合い、菌体同士が重なりあって正確にカウントすることが困難であった。しかし、定常期では、全視野のおおよそ7割程度で鞭毛保有菌が認められ、学生達が観察するためには十分であることが示唆された。

最後に、各教育施設によって実習スケジュールは様々であると思われる。本実験の目的から、すべての工程の実施が理想であるが、染色液は-20℃で長期保存が可能であり、染色のみでも記憶の定着につながると考える。また、今回の実験では増殖曲線を作図したが、培養開始から1.8(対数増殖期)～22.8(定常期)時間まで鞭毛保有菌は十分に観察可能である。従って、増殖曲線を作成し、これに基づいた菌液を用いる必要はなく、実習開始時間から遡って培養を開始すればよいと考える。そのため、菌液は本稿の方法に示したよりも簡単に準備可能であるため、多くの教育施設で

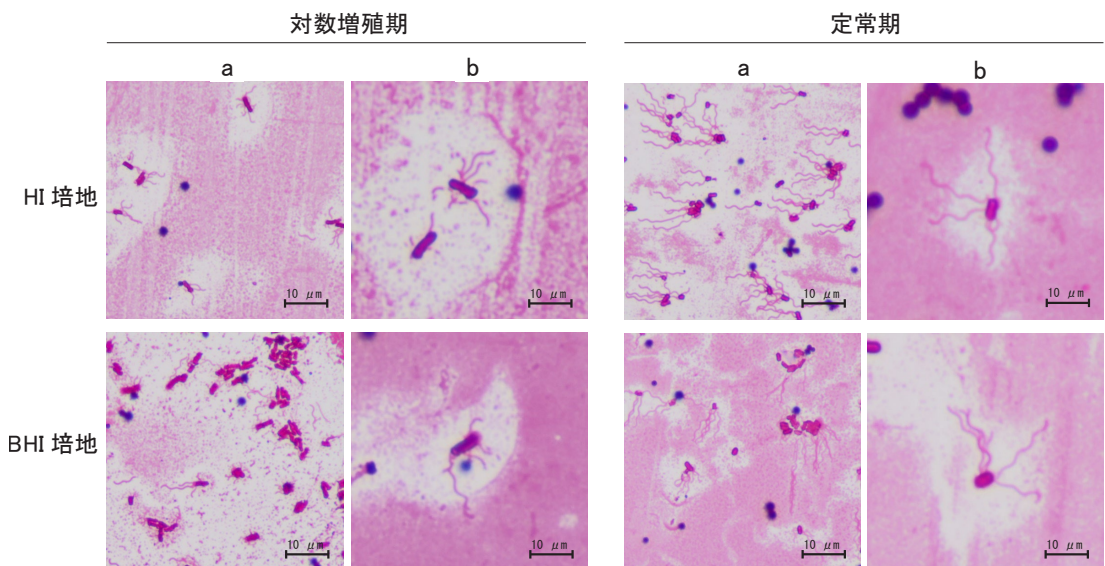


図2 HI培地およびBHI培地で増殖させた対数増殖期と定常期の鞭毛染色像
a. x1,000で観察し、鞭毛が染色された菌体が多数認められた視野の弱拡大像
b. 菌体と鞭毛が単体で確認可能な強拡大像

の実施を期待したい。

V. 結 語

学生に Leifson 法による鞭毛染色の原理や鞭毛の機能について理解させ、記憶に繋げることを目的とし、一般に難しいとされる鞭毛染色の方法について詳細に記載した。本稿で述べた手順に従って実施することで必ず優良な染色像が得られるため、多くの教育施設での実施を期待したい。

COI

投稿論文に関連し、発表者らに開示すべき COI 関係にある企業などはありません。

文 献

- 1) 増谷喬之, 桜木麗子, 藪内英子. 鞭毛染色法. 検査と技術 1981; 9: 345-52.
- 2) 藪内英子. プドウ糖非発酵グラム陰性桿菌. 編集 小酒井望, 日常検査シリーズ 14. 東京: 医学書院 1977; p29-46.
- 3) 広明竹雄. 急がば廻れ鞭毛染色のコツ. 臨床検査 1967; 11: 516.
- 4) 設楽政次, 梅津静子. 細菌の特殊染色法 - 鞭毛染色 (Leifson 法). 検査と技術 1995; 23: 891-5.
- 5) 小栗豊子. 鞭毛染色 (レイフソン法). 検査と技術 1987; 15: 363-70.