

# *Pneumocystis carinii* および *Pneumocystis carinii* 肺炎の研究 I. *P. carinii* の染色法の比較検討\*

荻野賢二 吉田幸雄 竹内滋  
猪飼剛 山田稔

京都府立医科大学医動物学教室

(昭和52年3月4日 受領)

*Pneumocystis carinii* 肺炎は、かつて未熟児、栄養不良児、先天性免疫不全児など、主として幼小児に起こる疾患と考えられていたが、その後、白血病、悪性リンパ腫、各種内臓癌および腎移植などの治療法が進歩し、大量の免疫抑制剤が使用されるようになってから年令を問わず急激に増加の傾向を示してきた。欧米では Chagas (1909) による病原体の認識および Delanoë 夫妻 (1912) による病原体の命名にはじまり、Vaněk und Jírovec (1952) 以来、膨大な研究が行われてきたが、わが国では吉村ら (1961) が最初の症例を報告してから現在まで約 100 例の臨床報告があるのみで、日本病理剖検輯報の例を加えてもせいぜい 200 例余りである。それらの中には若干の電顕的研究がみられるが、その他はほとんどすべて症例報告であり、*P. carinii* に関する研究は未開拓といってよい。われわれは 1973 年以來 *P. carinii* ならびに *P. carinii* 肺炎に関する研究を行い、既に若干の報告 (吉田ら, 1974; 高松ら, 1975; 楠・吉田, 1975; 吉田ら, 1976 a, b, c; 吉田ら, 1977 a, b, c, d) を行ってきたが、以下に順次基礎的研究の結果を報告してゆきたい。

今回の報告は *P. carinii* の染色性に関するものである。従来、肺塗抹標本および肺組織切片標本中から *P. carinii* を検出する染色法として、前者には Giemsa 染色と Toluidine blue-O 染色、後者には HE 染色、Gomori's methenamine 銀染色 (Grocott 変法) および Toluidine blue-O 染色などが用いられてきた。われわれは *P. carinii* 研究のまず第一歩として本病原体の

各種染色法による染色性の特性ならびに優劣を確立しておくことが大切と考え以下の実験を行った。また *P. carinii* なる微生物はラットから見出されたものにつかされた種名であり、これが人から見出される種と同一か否かという議論もあるので、今回は人とラットの両方から得た材料について各種染色上の差異についても検討した。

## 材料ならびに方法

材料：染色実験に用いた肺材料は人体肺およびラット肺である。人体肺は急性骨髄性白血病の治療のためプレドニンなど副腎皮質ステロイド、抗癌剤の長期大量投与を受け、*Pneumocystis* 肺炎を併発して死亡した 2 症例および先天性免疫不全で死亡した 1 症例の肺である。ラット肺は、酢酸コーチゾン 25mg を体重 200g 前後のラットに週 1~2 回宛数週間注射し実験的に *P. carinii* を増殖せしめ、ほぼ極期に屠殺したものの肺である。それぞれの肺から必ず、塗抹標本 (スタンプ標本) および組織切片標本作製した。肺組織標本は 10% ホルマリンあるいは中性ホルマリン固定の後、パラフィンで包埋し、7 $\mu$  の切片を作成した。

染色法：肺塗抹標本に対しては (1) Giemsa 染色、(2) May-Grünwald 染色、(3) Wright 染色、(4) Pappenheim 染色、(5) Gram 染色、(6) Gram 染色 Weigert 変法、(7) PAS 染色、(8) Gomori's methenamine 銀染色 Grocott 変法 (以下 GMS 染色と略す)、(9) methenamine 銀染色急速法、(10) Toluidine blue-O 染色、(11) Papanicolaou 染色などの諸方法を用いた。

一方、組織切片標本には、(12) Hematoxyline Eo-

\* 本研究は文部省科学研究、試験研究 (187040号) の補助を受けて行われた。記して謝意を表す。

sin 染色 (以下 HE 染色と略す), (13) Giemsa 染色, (14) Gram 染色, (15) Gram 染色 Weigert 変法, (16) MacCallum-Goodpasture 染色, (17) PAS 染色, (18) Gridley 染色, (19) GMS 染色, (20) Toluidine blue-O 染色, (21) Alcian blue 染色, (22) Masson's trichrom 染色, などの染色法を使用し比較検討した。

なお (1), (2), (3), (4) については佐野 (1972), (6), (7), (8), (15), (16), (17), (18), (19), (21) については Emmons *et al.* (1970), (5), (11), (12), (13), (22) については Gurr (1956), (9) については Smith and Hughes (1972), (10), (20) については Chalvardjian and Grawe (1963), (14) については Mc Manus and Mowry (1960) を参照した。

## 成 績

*P. carinii* は現在のところ cyst (嚢子) と trophozoite (栄養型) の stage が知られ, cyst の中には 1 ないし 8 個の intracystic body (嚢子内小体) がみられる。従って染色法は, 主として cyst wall, trophozoite, intracystic body を目標に染色し, さらにこれらが集団をなして宿主側の反応物質と共に形成する蜂窩状泡沫様物質を染め出そうとするものであるが, それらの特性, 術語, 生活史などについては吉田 (1976c, 1977e) を参照されたい。なお電顕所見から trophozoite は thin wall cyst をへて thick wall cyst に発育すると推定されているが, 光顕染色上はこれら移行型は時に trophozoite, 時に cyst として染色され見落されることはないと考え。

### A. 肺塗抹標本の染色

#### 1. Giemsa 染色 (Figs. 1~6)

もつとも基本的な染色法で, その特徴はまず cyst wall は染色されず透明で, intracystic body が非常によく観察できることである。cyst の大きさは直径約 7  $\mu$  で, 通常 8 個の intracystic body を蔵する成熟 cyst として認識されるが, 時には分裂過程と思われる 2 個ないし 4 個のものもみられる (Fig. 4)。成熟 cyst でも intracystic body が球形のもの, アメーバ状のもの, 三日月状のものなどがあるが, 後者の方がより成熟したものと思われる。球形の intracystic body は一様に青染されているが (Fig. 1), 三日月状のものは細胞質は青く, 核は紫紅色に染色される (Figs. 2, 3)。三日月状の intracystic body の大きさは長径 1~2  $\mu$ , 短径 0.5~1  $\mu$  である。次に Giemsa 染色では trophozoite も染色さ

れ検出されることが特徴である。すなわち本染色によると trophozoite は径が 2~5  $\mu$  の大ききで紅染する核と, それをとりまく青染性でアメーバ状の細胞質から成っており, 集塊をなして存在することが多い (Fig. 5)。Fig. 6 は cyst および trophozoite の集団である。

以上の如く Giemsa 染色は intracystic body および trophozoite を検出し得て, 本症検索上不可欠の染色法であるが, 欠点として, これら病原体が周囲の組織とほぼ同様に染まり色調上のコントラストに乏しく, 100 倍ないし 400 倍では仲々検出し難く, 1,000 倍で探索しなければ見逃しやすい。従って少数寄生の場合は診断に極めて長時間を要し, 特に疫学調査などの場合, 大量の標本を見るには相当の労力を要し, (8), (10) などの方法の方が優れている。しかし真菌などとの鑑別上, 本染色は必ず実施しておく必要がある。

#### 2. May-Grünwald

Giemsa 染色と同様に 8 つの intracystic body をもつ cyst が染色されるが, cyst wall は染まらない。しかしながら色調はうすく, trophozoite は Giemsa 染色より見出しにくい。

#### 3. Wright 染色

May-Grünwald 染色とほとんど同様に染色され, intracystic body および trophozoite の染色性は Giemsa 染色より劣る。

#### 4. Pappenheim 染色 (May-Grünwald-Giemsa 染色)

Giemsa 染色と同様に trophozoite および intracystic body が染色される。細胞質は Giemsa 染色よりも少しうすい青色で, 核は紫紅色に染まっている。形態, 生活史の研究では Giemsa 染色と同様の価値があると思われる。

#### 5. PAS 染色 (Fig. 7)

肺塗抹標本中には PAS 反応陽性の細胞や物質が多く, *P. carinii* を識別することは容易でない。cyst の形態は円形から半月形まで種々で, 輪郭ははつきりと桃色を呈するが周囲の PAS 陽性物質に比べると陽性度は少なく内部は点状あるいは線状のしわ様構造がみられる。

#### 6. Gram 染色

本法によつて *P. carinii* を検出することは出来なかつた。

#### 7. Gram 染色 Weigert 変法 (Fig. 8)

Cyst は Gram 陽性の青黒色に染まる円形ないし三日月形の物質を含んでおり, 周囲の細胞とは比較的鑑別し

やすい。cyst wall の輪郭は余りはつきりしておらず、cyst wall 以外の内部の構造が染色されているものと思われる。色調は一様でなく青黒色の中に赤色をした点が散在するなど複雑である。

#### 8. GMS 染色 (Fig. 9)

Cyst wall は黒色に染まり、円形、半月形、カップ状など種々の形態がみられる。この染色では背景が淡緑色で、その中に黒色の cyst がくつきりとした輪郭で浮かび、コントラストが強いのでたやすく見出される。このため 100 ~ 200 倍の弱拡大でも簡単に観察されるが、cyst wall のみが濃染し intracystic body はほとんど識別されない。従つて真菌との鑑別が困難な事が多い。また染色に長時間を要するという欠点もある。

#### 9. Methenamine 銀染色急速法 (Fig.10)

長時間を要するという GMS 染色の欠点を補つた染色法であり、わずかに 5 分間で染色が終る。しかし染色液はその都度調製せねばならず、煮沸を要するなど操作が複雑であり、しかも染色にむらがあるという欠点がある。cyst は淡褐色に染まり、円形ないし半月形を呈するが、周囲の細胞などもそれより少し薄い色調に染まつており、鑑別もたやすくはない。従つて直ちに GMS 染色の代わりに使える染色法というわけにはいかない。

#### 10. Toluidine blue-O 染色 (Figs.11, 12)

cyst wall が鮮やかな紫色に染まり、背景は淡青色で、非常に他の成分と見分けやすい。油浸レンズを用いて観察すると輪郭は濃い紫色を呈するが、内部はやや淡い赤紫色を呈し、点状あるいは線状に染まつたしわ様構造が見える。しかし Giemsa 染色のように intracystic body を識別することはできない。この染色でも真菌との鑑別は困難なことが多いが、操作が簡単でしかも染色時間が約 20 分で済むことなど利点が多く、現時点では cyst wall 染色法としては最もすぐれた方法と考える。

#### 11. Papanicolaou 染色 (Fig.13)

一般に細胞診によく使用されている染色法であるが、cyst は非常に淡く桃色に染まつており、内部に紫色あるいは赤色に染まつた intracystic body を見ることができない。しかしやや鑑別が困難で Giemsa 染色の代わりになる程の利点はない。

### B. 肺組織切片の染色

#### 1. HE 染色 (Figs.14, 15)

弱拡大では肺胞中にエオジン好性の蜂窩状泡沫様物質がみられ (Fig.14)、油浸レンズで観察すると、その網目の大きさは 5 ~ 10 $\mu$  程度である。この網目の中に濃青色に染まる intracystic body が 1 ~ 数個見られることが

ある (Fig.15)。この染色で *P. carinii* の存在および形態を詳細に観察することはむづかしい。しかしながら本法はもつとも基本的な染色法であり、特有の蜂窩状泡沫様物質を検索し、かつ、周囲の組織反応を知る上で不可欠の染色法である。

#### 2. Giemsa 染色 (Fig.16)

濃青色に染まつた泡沫様物質は、直径 5 ~ 10 $\mu$  の球状の cyst の連続として見られ、この中に濃青色に染まつた 1 ~ 数個の intracystic body が観察される。

#### 3. Gram 染色

この方法では *P. carinii* は全く染色されていない。

#### 4. Gram 染色 Weigert 変法および MacCallum-Goodpasture 法 (Fig.17)

両者は類似の染色法であり、アニリンを分別に用いている。共に *P. carinii* の cyst が肺胞内で Gram 陽性として濃青色ないし淡青色に染色されて点在している。形態は三日月形ないし円形で色調には濃淡がある。cyst wall 以外の内部構造が染色されているものと思われる。

#### 5. PAS 染色 (Fig.18)

蜂窩状泡沫様物質が PAS 陽性の赤桃色に染色されている。強拡大で観察すると円形、三日月形など種々の形の cyst が PAS 陽性に染色され、intracystic body も同様に PAS 陽性に染まつて観察される。周囲の肺組織中にも PAS 陽性物質が充満し、色調上のコントラストは乏しいが強拡大で観察すれば cyst を見出すことが出来る。

#### 6. Gridley 染色 (Fig.19)

Cyst wall のみが染まり、三日月形、コップ形、円形など種々の形の cyst が赤褐色に染色されている。この染色では背景が metanil yellow で黄色に染まり、割合に鑑別しやすい。

#### 7. GMS 染色 (Figs.20, 21)

本染色法によると、周囲組織が light green で緑色に染まり、その中に黒色に染まつた種々の形の cyst が染め出され、コントラストが強く、弱拡大でも容易に cyst を見出すことができる。強拡大では cyst は均一な黒色ではなく、内部に点状、コマ状あるいはしわ状の濃い部分が見られる。この染色に HE を counter staining すると (Fig.20)、周囲組織と *P. carinii* の関係がよく理解できる。染色に長時間を要するのが欠点である。

#### 8. Toluidine blue-O 染色 (Figs.22, 23)

Cyst は紫色ないし赤紫色に異調染色されている。背景は一様に青染し部分的に metanil yellow で黄色に染まり、弱拡大でも容易に cyst が観察される。強拡大の所

見は塗抹標本の場合と同様である。染色操作は簡単で、要する時間も短かくてすみ、現時点では組織切片中に cyst を検出する最も良い方法といえよう。

#### 9. Alcian blue 染色

酸性粘液多糖類中のムコイド硫酸のみ選択的に暗青色に染める染色法であるが、cyst および intracystic body は染色されておらず、肺胞内のいわゆる蜂窩状泡沫様物質がわずかに淡桃色に染まっている程度である。周囲の細胞核はケルエンヒトロードで赤く染まっている。

#### 10. Masson's trichrom 染色

蜂窩状泡沫様物質が薄い青色または緑色に染色されている。その中に黒色の顆粒状の intracystic body と思われるものが観察できる。

#### C. ヒトおよびラットに見い出された *P. carinii* の染色性の差異について

*P. carinii* なる寄生体はもともとラットから発見され、記載された生物であり、ヒトから見い出されるものが直ちに *P. carinii* であると即断するわけにいかない。そこで本研究ではヒトから得た材料とラットから得た材料について、上記各染色法を実施し比較してみた所、全く差異を見い出すことは出来なかつた。

### 考 察

*P. carinii* の形態ならびに生活史の研究、あるいは *P. carinii* 肺炎の診断などのための染色法については、Chagas がこの寄生体を見い出して以来、塗抹標本については Giemsa 染色、組織切片標本については HE 染色が主として用いられてきた。しかしその他、既述のような種々の染色法も試みられ現在に至っている。

これらの染色法を分類して考察を加えてみると、まず Neutral stain の中で thiazine eosinate を用いる染色法であるが、これは Romanowsky (1891) によつて開発され、血液成分やマラリア原虫を染色するのに適していると報告された。以後多くの研究者によつて改良され、現在では Giemsa 染色、Wright 染色、May-Grünwald 染色、Pappenheim 染色などが一般に使用されている。この中でも原虫、特にマラリア原虫に対しては Giemsa 染色が最も良い染色法とされている。

Giemsa 染色は *P. carinii* に対しても trophozoite や intracystic body を鮮やかに染色し、形態や生活史の研究には欠くことの出来ない染色法であり、その染色性が *P. carinii* の原虫説の1つの根拠ともなっている。しかしながら cyst wall が染色されず、周囲組織とのコントラストが弱いので、1,000 倍拡大で検索しないと見逃され易

い欠点もある。この点 cyst wall を強く染める Toluidine blue-O 染色や GMS 染色の方が優れているが、これらは真菌の cell wall をも同様に染色し、時に *P. carinii* との鑑別の困難なことがある。従つて *P. carinii* の診断に際しては常にこれらの両染色を組合わせて行うことが必要である。

次に HE 染色は衆知の如く組織切片標本において、もつとも基本的な染色法であり、*P. carinii* の研究の初期段階においては専ら本法が用いられ、Van der Meer et Brug (1942) が記載した“rayons de miel”, Vaněk und Jirovec (1952) が“Wabenstruktur”と表現した物質(これは現在蜂窩状泡沫様物質と言われている)は *P. carinii* 肺炎の特徴的な病理像である。そしてこの中に *P. carinii* の intracystic body が存在することが確認されているが非常に検出し難いものであり (Fig. 15)、この染色のみで *P. carinii* 肺炎と診断することは困難で、他の染色法すなわち、Gram 染色 Weigert 変法、GMS 染色、Toluidine blue-O 染色等の助けが必要である。

Gram 染色の中で、アニリンを分別に使用しない方法では *P. carinii* は染色されず、Weigert 変法や MacCallum-Goodpasture 法のようなアニリンを使用した方法で染色されてくる。この染色法は細菌同定には不可欠のものであるが、これらの方法を用いて、Giese (1953a, b), Pliess (1953), Jirovec und Vaněk (1954, 1955/56), Ricken (1958) らが生活史の研究をすすめた。これらの報告の中で彼等は“Napf- od. Sicherformen”と形容される物質の形態について論述しているが、Jirovec (1960) は、これらは thin wall cyst または thick wall cyst の内容の一部が染まっているものと考えている。従つて、cyst wall の染色法で染まる三日月形ないしコップ状のものとは全く別のものである。Vavra et al. (1968, 1970), Campbell (1972) らの電顕的観察によると、これら三日月形ないしコップ状のものは intracystic body が脱出したあとの cyst の残骸であると考えられている。

次に、主として cyst wall を染める染色法について述べてみると、この中には PAS 染色、Gridley 染色、GMS 染色、Toluidine blue-O 染色などがある。これらの染色法はいずれも組織中の多糖類を染めるものとして開発され、cell wall が多糖類である真菌に対しても用いられている。組織内真菌を証明する染色法の歴史は、*P. carinii* の染色法のそれより古く、この歴史を知る事が、

*P. carinii* 研究の歴史を知る上で非常に重要だと思われるので、以下に述べることにする。Lewis and Hopper (1943) は “An Introduction to Medical Mycology” の診断の項で、「真菌の診断は、病理学的には主として、周囲の組織反応を考慮に入れてなされている」と述べているが、このように、それまでは組織中の真菌を直接染める方法は知られていなかったのである。1947年に Lillie は Bauer, Feulgen, Gram および Gram-Weigert 各染色法を用いて、組織中の種々の寄生体の染色性を比較した。この中で Bauer 法が真菌の証明に使用し得ることが紹介されている。この方法は、多糖類を染める方法として Bauer が1933年に開発したものであるが、後に Hotchkiss (1948), McManus (1948) はこの染色理論を更にすすめ PAS 反応へと発展させた。次に Kligman *et al.* (1951) は Hotchkiss-McManus 法を modify した方法を発表し、真菌の鑑別法として利用した。Gridley 染色は Gridley (1953) によって開発されたもので、PAS 反応に類似するが、これよりも真菌を特異的に染める方法で、真菌は暗青紫色に染め出される。

この後 Grocott (1955) が、塗抹および組織切片標本中の真菌染色法として、Gomori の methenamine 銀染色を少し変えて使用しはじめた。この方法の主要な化学的反応はクロム酸で前処理することによりアルデヒド群の遊離をひきおこし、次の methenamine-silver complex の還元により多糖類を染め出すのである。

続いて Kelly *et al.* (1962) は、多糖類のある種のものに sulfation することで生じた硫酸エステルが適当な染色液で異調染色されるという Kramer and Windrum (1954) の報告を真菌に応用し、sulfation toluidine blue 染色法を開発した。すなわちこの染色法は、真菌の cell wall 中の水酸基 (-OH) を硫酸でエステル化し、硫酸エステル基 (-OSO<sub>3</sub>) を形成し、これを toluidine blue で異調染色させるといふ反応にもとづいている。

以上述べた真菌染色法の概略は、そのまま *P. carinii* の染色法の歴史といえる。すなわち1950年以前には組織中の *P. carinii* を満足に染色する方法がなく、この頃、乳幼児の間に流行していた *P. carinii* 肺炎の病原体を見い出すことができなかつた。Vaněk und Jirovec (1952) の報告以後は、以上述べた染色法を用いて *P. carinii* 肺炎の研究が一段と進展した。例えば Hamperl (1952) ははじめて PAS 反応を *P. carinii* の証明に利用し、その後 Baar (1955), Ricken (1958) らが診断、研究に役立てた。現在では GMS 染色が最も普及し

た *P. carinii* の染色法である。この理由は、この染色法が操作に長時間を要するけれども組織切片上で黒色の cyst としてたやすく鑑別され得るからである。しかし、生検材料、肺吸引液中の *P. carinii* を早急に検出する方法としては時間がかかりすぎるので、Smith and Hughes (1972) は methenamine 銀染色急速法を開発した。この方法に要する時間はわずかに5分間であるが、染色液の調整や染色法がかなり複雑であり、染色にむらが多く、あまりすすめられる方法ではない。

GMS 染色のように *P. carinii* 肺炎の診断法としてはまだまだあまり普及していないが、これと同等あるいはそれ以上の利点があると思われる染色法に Chalvardjian and Grawe (1963) により報告された Toluidine blue-O 染色法がある。この染色法は上述した Kelly *et al.* (1962) の方法と類似しているが、*P. carinii* に対してはより染色性がよいと思われる。これより以前に Bruns und Böttger (1955) は Toluidine blue-O を用いた染色を行なっているが、この場合はホルマリン固定凍結切片に対して行なつたもので、*P. carinii* は異調染色されるが、パラフィン切片の場合は全く染色されなかつたと報告している。彼らの方法は sulfation を行なわず方法は簡単であるが、パラフィン切片には用いられないという大きな欠点がある。この点 Chalvardjian and Grawe (1963) の Toluidine blue-O 染色は、組織パラフィン切片、塗抹標本両者において、短時間でしかも確実に染色できるよい方法である。以上述べてきた様に cyst wall の化学成分は多糖類であるが、この点に関して Bruns (1955) は中性粘液多糖類であると報告し、Baar (1955), Opferkuch (1959) は中性粘液蛋白であると報告している。

最後にヒトおよびラットをはじめとする種々の動物から見い出された *P. carinii* が同一のものか否かについて Ricken (1958), Opferkuch (1959), Sheldon (1959) らはその染色性および形態の点から観察し、全く差異はないとしたが、われわれの今回の研究においても、差異は見られなかつた。

## 結 語

1. われわれは *P. carinii* および *P. carinii* 肺炎に関する種々の研究を行なう第1段階として、従来、細菌や真菌に用いられてきた種々の染色法のうち22種をえらび、*P. carinii* に対する染色性の特徴、さらにどれが *P. carinii* の検出に適しているかなどについて比較検討した。

2. まず肺塗抹標本に対する Giemsa 染色は, intracystic body および trophozoite を鮮やかに染色し, 検出し得る点から *P. carinii* の研究および本肺炎の診断, とくに真菌との鑑別において欠かすことの出来ない基本的な染色法であり, 肺生検, 剖検肺など生の材料については是非とも実施すべき染色法である.

3. 肺組織切片標本の染色法として基本的なものは HE 染色であるが, これだけで診断を下すことは困難であり, GMS 染色, Toluidine blue-O 染色などで *P. carinii* の cyst を証明することが必要である. また HE 染色と GMS 染色を組み合わせることにより *P. carinii* と周囲肺組織との関係を明らかにすることも有意義である.

4. *P. carinii* の cyst wall を染色する目的ならば Toluidine blue-O 染色が最も簡便であり, 塗抹標本と組織切片標本の両方に使用でき, 操作も GMS 染色よりはるかに簡単である.

5. Gram 染色 Weigert 変法, MacCallum-Goodpasture 染色法では, *P. carinii* は Gram 陽性に染まるが, その染色性は多様である.

6. 今回の種々の染色法を試みた限りでは, 人の肺中に見い出された *P. carinii* とラット肺から見い出されたそれとの間には染色性において全く差異はみられなかった.

#### 参考文献

- 1) Baar, H. S. (1955) : Interstitial plasmacellular pneumonia due to *Pneumocystis carinii*. J. Clin. Path., 8, 19-24.
- 2) Bauer, H. (1933) : Mikroskopische-chemischer Nachweis von Glycogen und einigen anderen Polysacchariden. Z. Mikr. Anat. Forsch., 33, 143-160.
- 3) Bruns, G. und Böttger, D. (1955) : Die Toluidinblau-Färbung der *Pneumocystis carinii*. Acta Histochem., 1, 25-28.
- 4) Bruns, G. (1955) : Die Membranhülle der *Pneumocystis carinii*. Naturwissenschaften, 42, 610.
- 5) Campbell, W. G. Jr. (1972) : Ultrastructure of *Pneumocystis* in human lung. Arch. Path., 93, 312-324.
- 6) Chagas, C. (1909) : Nova tripanozomíaze humana. Mem. Inst. Oswald Cruz, I, 159-218.
- 7) Chalvardjian, A. M. and Grawe, L. A. (1963) : A new procedure for the identification of *Pneumocystis carinii* cysts in tissue sections and smears. J. Clin. Path., 16, 383-384.
- 8) Delanoë, M. et Mme. (1912) : Sur les rapports des kystes de Carinii du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. C. R. Acad. Sci., 155, 658-660.
- 9) Emmons, C. W., Binford, C. H. and Utz, J. P. (1970) : Medical mycology, 2nd ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 907 pp.
- 10) Giese, W. (1953a) : Pathogenese und Ätiologie der interstitiellen plasmazellulären Säuglingspneumonie. Verh. dtsh. Path. Ges., 36, 284-289.
- 11) Giese, W. (1953b) : Die Ätiologie der interstitiellen plasmazellulären Säuglingspneumonie. Mschr. Kinderhk., 101, 147-149.
- 12) Gridley, M. F. (1953) : A stain for fungi in tissue sections. Amer. J. Clin. Path., 23, 303-307.
- 13) Grocott, R. G. (1955) : A stain for fungi in tissue sections and smears. Amer. J. Clin. Path., 25, 975-978.
- 14) Gurr, E. (1956) : A practical manual of medical and biological staining techniques, 2nd ed. Interscience Publishers, New York, 451 pp.
- 15) Hamperl, H. (1952) : Zur Frage des Parasitennachweises bei der interstitiellen plasmazellulären Pneumonie. Klin. Wschr., 30, 820-822.
- 16) Hotchkiss, R. D. (1948) : A microchemical reaction resulting in the staining of the polysaccharide structures in fixed tissue preparations. Arch. Biochem., 16, 131-141.
- 17) Jírovec, O. und Vaněk, J. (1954) : Zur Morphologie der *Pneumocystis carinii* und zur Pathogenese der Pneumocystis-Pneumonie. Zbl. allge. Path., 92, 424-437.
- 18) Jírovec, O. und Vaněk, J. (1955/56) : Weitere Beiträge zur Morphologie von *Pneumocystis carinii*. Zbl. allge. Path., 94, 499-517.
- 19) Jírovec, O. (1960) : Das Problem der Pneumocystis-Pneumonie vom parasitologischen Standpunkte. Mschr. Kinderhk., 108, 136-142.
- 20) Kelly, J. W., Morgan, P. N. and Saini, N. (1962) : Detection of tissue fungi by sulfation and metachromatic staining. Arch. Path., 73, 82-85.
- 21) Kligman, A. M., Mescon, H. and DeLamater, E. D. (1951) : The Hotchkiss-McManus stain for the histopathologic diagnosis of fungus diseases. Amer. J. Clin. Path., 21, 86-91.
- 22) Kramer, H. and Windrum, G. M. (1954) : Sulphation techniques in histochemistry with

- special reference to metachromasia. J. Histochem. Cytochem., 2, 196-208.
- 23) 楠智一・吉田幸雄 (1975) : *Pneumocystis carinii* 肺炎, 小児科診療, 38, 935-940.
- 24) Lewis, G. M. and Hopper, M. E. (1943) : An introduction to medical mycology. 2nd ed., The Year Book Publishers, Chicago, 366 pp.
- 25) Lillie, R. D. (1947) : Reactions of various parasitic organisms in tissues to the Bauer, Feulgen, Gram and Gram-Weigert methods. J. Lab. Clin. Med., 32, 76-88.
- 26) McManus, J. F. A. (1948) : Histological and histochemical uses of periodic acid. Stain Technol., 23, 99-108.
- 27) McManus, J. F. A. and Mowry, K. W. (1960) : Staining methods, histologic and histochemical. Paul B. Hoeber, Inc., New York, 423 pp.
- 28) Opferkuch, W. (1959) : Zur Histochemie der *Pneumocystis carinii*. Virch. Arch. Path. Anat., 332, 364-373.
- 29) Pliess, G. (1953) : Die *Pneumocystis carinii* und ihre Bedeutung bei der interstitiellen plasmacellulären Säuglingspneumonie. Frankfurt. Z. Path., 64, 185-208.
- 30) Ricken, D. (1958) : Histologische Untersuchungen bei experimenteller *Pneumocystis*-Pneumonie. Virch. Arch. Path. Anat., 331, 713-728.
- 31) Romanowsky, D. L. (1891) : Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria. St. Petersburg Med. Wschr., 16, 207-302; 307-315. (Lillie, R. D. 1969 による)
- 32) 佐野豊 (1972) : 組織学研究法. 第4版, 907頁, 南山堂, 東京.
- 33) Sheldon, W. H. (1959) : Experimental pulmonary *Pneumocystis carinii* infection in rabbits. J. Exp. Med., 110, 147-160.
- 34) Smith, J. W. and Hughes, W. T. (1972) : A rapid staining technique for *Pneumocystis carinii*. J. Clin. Path., 25, 269-271.
- 35) 高松哲郎・新川正治・乾明彦・今宿晋作・沢田淳・楠智一・荻野賢二・有菌直樹・吉田幸雄 (1975) : 急性白血病の経過中に発症した *Pneumocystis carinii* 肺炎と思われる小児の1例, とくに Pyrimethamine と Sulfamonomethoxine による治療について, 京府医大誌, 84, 853-860.
- 36) Van der Meer, G. et Brug. S. L. (1942) : Infection a *Pneumocystis* chez l'homme et chez les animaux. Ann. Soc. Belge. Med. Trop., 22, 301-307.
- 37) Vaněk, J. und Jirovec, O. (1952) : Parasitäre Pneumonie. Interstitielle Plasmazellenpneumonie der Frühgeborenen, verursacht durch *Pneumocystis carinii*. Zbl. Bakt. Orig. I., 158, 120-127.
- 38) Vavra, J., Kucěra, K. and Levine, N. D. (1968) : An interpretation of the fine structure of *Pneumocystis carinii*. J. Protozool., 15, 12-13.
- 39) Vavra, J. and Kucěra, K. (1970) : *Pneumocystis carinii* Delanoë, its ultrastructure and ultrastructural affinities. J. Protozool., 17, 463-483.
- 40) 吉村義之・平野崇広・岡島弘幸・内田成忠・加藤新・河野通正 (1961) : いわゆる *Pneumocystis carinii* によると思われる間質性形質細胞性肺炎の一部検例, 医学のあゆみ, 38, 158-160.
- 41) 吉田幸雄・荻野賢二・有菌直樹・近藤力王至・松野喜六 (1974) : *Pneumocystis carinii* および *Pneumocystis* 肺炎に関する研究 (1) Cortisone 処理ラットにおける原虫の出現. 寄生虫誌, 23 (増), 23.
- 42) 吉田幸雄・荻野賢二・有菌直樹 (1976a) : *Pneumocystis carinii* 肺炎, 成人3症例, 寄生虫誌, 25 (増), 34.
- 43) 吉田幸雄・有菌直樹・和気光江・永井信也・児玉義史・木村俊介 (1976b) : *Pneumocystis carinii* 肺炎の2例, とくに Pyrimethamine と Sulfamonomethoxine による治療について. 寄生虫誌, 25 (2), 56.
- 44) 吉田幸雄・楠智一・伊地知浜夫 (1976c) : ニューモチスチス・カリニ肺炎について. 日本医事新報, 2735, 29-34.
- 45) 吉田幸雄・荻野賢二・竹内滋・猪飼剛・有菌直樹・東道伸二郎 (1977a) : *Pneumocystis carinii* および *Pneumocystis* 肺炎の研究 (3) 肺生検による生前診断と化学療法に成功した1症例. 寄生虫誌, 26 (増), 84.
- 46) 吉田幸雄・猪飼剛・荻野賢二・竹内滋・有菌直樹・山田稔 (1977b) : *Pneumocystis carinii* および *Pneumocystis* 肺炎の研究 (4) 集シスト法. 寄生虫誌, 26 (増), 32.
- 47) 吉田幸雄・荻野賢二・猪飼剛・竹内滋・有菌直樹・山田稔 (1977c) : *Pneumocystis carinii* および *Pneumocystis* 肺炎の研究 (5) 人における潜在感染. 寄生虫誌, 26 (増), 74.
- 48) 吉田幸雄・竹内滋・荻野賢二・猪飼剛・有菌直樹・山田稔 (1977d) : *Pneumocystis carinii* および *Pneumocystis* 肺炎の研究 (6) Pyrimethamine + Sulfamonomethoxine および Trimethoprim + Sulfamethoxazol の治療効果に関する動物実験. 寄生虫誌, 26 (増), 87.
- 49) 吉田幸雄 (1977e) : 図説人体寄生虫学. 第1版 254頁, 南山堂, 東京.

**Abstract**

STUDIES ON *PNEUMOCYSTIS CARINII* AND *PNEUMOCYSTIS  
CARINII* PNEUMONIA

I. EVALUATION OF SEVERAL KINDS OF STAINING METHOD IN  
THE IDENTIFICATION OF *P. CARINII*

KENJI OGINO, YUKIO YOSHIDA, SHIGERU TAKEUCHI, TSUYOSHI IKAI  
AND

MINORU YAMADA

(*Department of Medical Zoology, Kyoto Prefectural  
University of Medicine, Kyoto, Japan*)

As the first step of the study on *Pneumocystis carinii* and *Pneumocystis carinii* pneumonia, several staining methods as mentioned below were compared from the points of their practical usefulness: those are Giemsa, May-Grünwald, Wright, Pappenheim, Gram, Gram (Weigert modification), PAS, Gomori's methenamine silver, Methenamine silver (rapid modification), Toluidine blue-O and Papanicolaou, for the lung smears, and HE, Giemsa, Gram, Gram (Weigert modification), PAS, Gridley, Gomori's methenamine silver, Toluidine blue-O, Alcian blue, and Masson's trichrom, for the lung sections.

Of those methods, for lung smears, Giemsa staining is the most reliable method because it can well reveal the intracystic body and trophozoite that makes possible to differentiate *P. carinii* from fungi. However, Giemsa stained preparation requires much time to find out the parasite in light infections because the cyst wall is not stained by this method. In order to cover this weakness, either Gomori's methenamine silver or Toluidine blue-O stains should be employed at the same time. Although both of these two methods strongly stain the cyst wall, and makes it easy to find out the cysts even in light infections, these are sometimes unable to differentiate *P. carinii* from fungi. In comparison of these two methods, Toluidine blue-O is much convenient than the other because it takes only 20 minutes in full staining procedure.

In the staining the lung sections, HE is essential to know the host reactions, but it seldom stains the parasite. On the contrary, Gomori's methenamine silver and Toluidine blue-O only stain the cyst wall. Therefore, the combination of both procedures (intracystic body staining and cyst wall staining) is required in order to confirm the diagnosis.

As far as studied by the staining methods mentioned above, no difference was found on the staining property between *P. carinii* from the rats and men.



### Explanation of figures

- Figs. 1-23 *Pneumocystis carinii* stained by several kinds of staining methods.  
 Figs. 1-13 smears of the lungs.  
 Figs. 14-23 sections of the lungs.  
 Figs. 2-4 specimens from rats.  
 Figs. 1, 5-23 specimens from men.  
 Figs. 1-6 Giemsa stains.  
 Fig. 1 mature cyst with 8 spherical intracystic bodies (1,300×).  
 Fig. 2 mature cyst with 8 crescent-shaped intracystic bodies (2,500×).  
 Fig. 3 two mature cysts with amoeboid intracystic bodies (left) and crescent-shaped ones (right) (1,300×).  
 Fig. 4 immature cyst with 2 semilunar intracystic bodies (1,300×).  
 Fig. 5 trophozoites (arrows) escaped from cyst (1,300×).  
 Fig. 6 a mass of cysts and trophozoites (1,300×).  
 Fig. 7 PAS stain (arrow shows cyst) (600×).  
 Fig. 8 Gram stain (Weigert modification) (600×).  
 Fig. 9 Gomori's methenamine silver stain (600×).  
 Fig. 10 Methenamine silver stain (rapid modification) (arrows show cysts) (600×).  
 Fig. 11 Toluidine blue-O stain (600×).  
 Fig. 12 Toluidine blue-O stain (1,300×).  
 Fig. 13 Papanicolaou stain (600×).  
 Fig. 14 HE stain showing dilated alveoli containing honeycomb substance (100×).  
 Fig. 15 HE stain occasionally visible intracystic body (arrow) (1,300×).  
 Fig. 16 Giemsa stain (arrow shows cyst with intracystic body) (600×).  
 Fig. 17 MacCallum-Goodpasture stain (1,300×).  
 Fig. 18 PAS stain (arrow shows cyst) (600×).  
 Fig. 19 Gridley stain (600×).  
 Figs. 20-21 Gomori's methenamine silver stain with HE counter stain (20 : 200×, 21 : 1,300×).  
 Figs. 22-23 Toluidine blue-O stain (22 : 300×, 23 : 1,300×).

