

Cyanine 系色素 Metachromasia 反応の組織化学的研究

[第2篇] Cyanine 系色素による Metachromasia 染色 手技と染色所見

京都大学結核研究所病理学部 (主任教授 高松 英雄)

岡 田 彰

(昭39. 2.10受付)

緒 言

Cyanine 系色素の中には、軟骨基質、臍帯、気管枝粘液腺等の特定の組織要素に対して異染色性を示すものが多数あって、その中の数種類ものは特に染色性に優れていることが明らかになった。然し、本反応の組織化学的な利用のためには更にその染色手技についての検討が必要であり、又本法が従来の Thiazine 色素を用いた Metachromasia 染色法と如何なる関係にあるかを比較検討することも必要である。

此目的のために、前篇の実験によって得られた染色の条件に基いて、健常白鼠の全身諸臓器を材料として、Cyanine Metachromasia 染色法を検討した。

実験材料

色素：第一篇に於て、NK77, NK2, NK193, NK193, NK1235, NK498 の色素が著明な異染色性を示すことが判明したが、このうち NK2 及び NK498 は標本作成後比較的短時間で褪色し、長期間の保存に適しないために除外して、本実験には NK77, NK193, NK1235 の各色素を用いた。

組織：成熟健常白鼠の肝、腎、胃、脾、脾、舌の諸臓器組織を Carnoy氏液で数時間固定し、paraffine 包埋切片として用いた。

染色手技

染色液作成：NK77 及び NK193 は夫々 5mg を 5cc の methanol に溶解し、NK1235 は 10mg を 10cc の propylene glycol で加温溶解せしめ、各々溜水で 100cc の溶液になるように稀釈した。

染色、(イ)型の如く脱パラフィンを行った切片を各染色液中に 20~30 分間浸して染色する。(ロ) 90% alcohol を 2 回通して分別し、(ハ)純 alcohol を通して Xylene で透明化し、caedax で封入する。

染色所見

各色素の溶液の色調と metachromasia の色調は表 I に示した。

表 I 各色素溶液の色調と反応の色調

	NK 77	N 193	NK 1253
溶液の色調	赤紅色	コバルト青色	紫味青色
反応の色調	黄橙色	赤 色	赤 色

肝 (イ) NK77 染色法、肝細胞の核及び形質には比較的濃い赤色に染る顆粒が認められ、細胞の形態は明確に染められる。星細胞は肝細胞に比してより濃染する。血液細胞の中に僅に赤橙色を示した細胞を認めるが、その他には反応は認められない。

(ロ) NK193染色法、小葉間結合織、肝動脈壁は緑色を帯びた青色に、肝細胞及び星細胞の核は濃い青色、核小体は紺色、形質内の微細顆粒は僅に赤味を帯びた青色に、極めて多彩に且明確に染め分けられるが、強い Metachromasia は認められない。

(ハ) NK1235 染色法、染色所見は NK193 と略々類似するが、肝細胞内の微細顆粒が NK193 より稍々強く赤味を帯びる。然しその他に著明

な応反は認めない。

腎 (イ) NK77 染色法, 組織構造は明瞭に染色される。腎皮質には反応を認めないが, 腎髄質, 腎乳頭部の間質組織に橙色の陽性反応を示す。

(ロ) NK193 染色法, 腎小体, 尿細管, 間質組織等単染色でありながら極めて多彩に染色される。即ち糸球体の蓋細胞と球鞘上皮細胞の核は稍々赤味を帯びた濃い青色に染り, 尿細管細胞の核の少数の顆粒及び核膜は濃い青色, 形質内の微細顆粒は僅に赤味を帯び, その内腔には緑色の無構造に染る物質を含む。此様な構造は主管, Henle 氏係蹄厚部の細胞に著明である。腎乳頭の間質組織には著明な赤色の metachromasia 反応を認める。

(ハ) NK1235 染色法, NK193 と略同様の所見であって, 乳頭部の metachromasia 反応も極めて著明であるが, 一般に NK193 程多彩的でない。

胃 (イ) NK77 染色法, 胃底腺及び粘膜下結合織に軽度の反応が認められる。

(ロ) NK 193 染色法, 胃腺細胞には, 中央に濃染した円形の核を持ち緑色を帯びた比較的大きな細胞と, それより更に強く紺色に染る不整形の核を持つ不整形の細胞と, 更に赤色に metachromasia 反応を示す胞体を持ち偏在した扁平な核を有する細胞とが認められる。粘膜下結合織は淡い紫色に染る。

(ハ) NK1235 染色法, 胃小窩, 腺腔に metachromasia 反応陽性であるが, 胃腺細胞の形態は明瞭でない。粘膜下結合織は赤味を帯びる。

舌 舌腺には強く metachromasia 陽性反応を示すものと, 反応陰性のものと二種類の腺組織が認められ, 三染色法共同様の所見であった。粘膜固有板には NK193 及び NK1235 に弱い反応を認めたが NK77 では陰性であった。

脾. 膵 共に陽性反応を示す要素は認められなかった。

考 按

I. 染色手技について Metachromasia 反応に限らず, 染色反応は極めて変化の多い反応であるために, その最適の条件を決定することは

決して容易ではない。Kramer 及び Windrum¹⁾ は固定標本での metachromasia 染色法について検討し, toluidine blue 及び azur A についての一つの方式を報告しており, この方式は Kelly²⁾ や Pearce³⁾ 等によっても引用されている。組織の固定, 包埋及び脱パラフィン等の chromotrope についての処理に関しては cyanine metachromasia についても適用し得るが, 染色及び封入については条件が異なるのは当然である。

溶剤; NK193 は冷水に溶解し, NK77 及び NK1235 は加温すれば可成り水に可溶性である。然し NK77 及び NK193 は Methanol に, NK1235 は propylene glycol に良く溶解され, 且染色性も水に溶解した場合に比して良好であった。

色素溶液の濃度及び染色時間; L. Lison⁴⁾ は組織標本の metachromasia 反応では, 色素溶液の濃度が濃厚であるときはすべての要素が metachromasia の色調に染色される傾向があるために, 薄い濃度の色素溶液で, 且染色がそれ程強くないことを条件とする可きことを述べている。実験に用いた色素はいずれも, 組織染色に於いて, toluidine blue や azur A に比して可成り薄い濃度で良く染色する。中でも NK193 は実験例よりも更に薄い濃度でも良結果が得られた。染料溶液の濃度と収着量の関係にはいくつかの関係式が用いられている⁵⁾が, 種々の収着要素を含む組織切片に適用することは困難であり, 又染色時間についても, 組織染色のように低温度での染色では収着平衡に達する時間は可成りの長時間を要することが知られていて⁶⁾, 組織条件として染色平衡を論ずることは適当ではない。従って本反応の染色法に於ける溶液の濃度及び染色時間については経験的に適当な条件を決定して, この条件に於ける反応について検討するべきであろう。更に, 此場合染浴の温度は出来る限り一定にする必要がある。

水素イオン濃度; 本実験に用いた色素溶液の pH 値は NK77 は 5.8, NK193 は 5.5, NK1235 は 4.8 であった。metachromasia 反応に於ける pH 値の影響に関する研究は多数あるが, 反応の至適 pH について検討したものは少い。J. A.

Szirmai と E. A. Balazs⁷⁾ が行った metachromasia 陽性物質の定量法の研究によれば, azur A が軟骨と最も強い反応を示す時の pH 値は 4.5 ~ 6.0 であり, 鶏冠では 5.0 ~ 6.5 であった。

反応を抑制する pH の値に関する報告は多数あって, 此事によって反応物質を区別する方法が行われている。(大野⁸⁾, Landsmer 及び Giel⁹⁾ 等) そして是等の pH の値は夫々研究者によって, 又は色素の種類によって多少の差異があり, これを cyanine 色素について検討することは興味ある問題であるが, 本実験に於いては各色素についての最も明らかな反応を示し得る pH 値を検討するに止めて, 反応陽性要素の決定に関する pH 値についての検討は今後の課題とするつもりである。

封入; 従来特に alcohol の影響が重要視されている¹⁰⁾。本実験でも低濃度の ethanol ではかなり強い反応の褪色が認められるが, 反応の陰性化は認められなかった。又著者の方法では alcohol による褪色もかなり防ぐことが出来た。封入剤については balsam, Apathy のゴム漿, caedax, glycerin 等を用いて検討した結果, caedax¹¹⁾ が最も良結果が得られた。

II. 染色所見について, cyanine 系色素による metachromasia 反応は人の軟骨組織, 大動脈壁, 粘液腺, 白鼠の腎乳頭部の間質, 肥胖細胞等に強い反応が示されることを観察したが, 此等の反応部位は従来の塩基性色素によって認められた所見と略々一致する。(表 II) 又弱反応を観察し得た組織はすべて Hale 氏法によって陽性を示すことが知られており¹²⁾, 酸性多糖類を含むとされている組織であった。従って cyanine 系色素による metachromasia 反応も亦, 酸性粘液多糖類, 特に chondroitin 硫酸, mucoitin 硫酸に強く示されることは明らかである。更に cyanine 系色素は本実験例に於いて観察された如く, 従来の色素に比較して組織の構造が極めて明瞭に染色される。この事は既に波多野, 高松の Illuminol-R 染色法¹³⁾によっても観察されているが, 此等の色素は他の色素に比較して大きな分子量 (450~650) を持っていて直接染色性に優れていることによるものと考え得る。特に NK193 は種々の組織を多彩な色調に染め分けるため, 反応陽性の組織との識別が容易である。

表 II 白鼠の諸臓器に於ける Cyanine Metachromasia 反応

		NK77 染色法	NK193 染色法	NK1225 染色法
肝	陽性反応	ナシ	ナシ	ナシ
	弱陽性反応	血液細胞	肝細胞形質内顆粒	肝細胞形質内顆粒
腎	陽性反応	髓質間質腎乳頭部	髓質間質腎乳頭部	髓質間質腎乳頭部
	弱陽性反応	ナシ	球鞘上皮細胞 尿管細胞	尿管細胞
胃	陽性反応	ナシ	ナシ	胃小窩, 胃腺腔
	弱陽性反応	胃腺細胞 粘膜下結合織	胃腺細胞 粘膜下結合織	粘膜下結合織
舌	陽性反応	舌腺(粘液腺)	舌腺(粘液腺)	舌腺(粘液腺)
	弱陽性反応	ナシ	粘膜固有層	粘膜固有層
脾・膵	陽性反応	ナシ	ナシ	ナシ
	弱陽性反応	ナシ	ナシ	ナシ

総 括

健常白鼠の諸臓器について, NK77, NK193, NK1235 の Cyanine 系色素を夫々用いて metachromasia 反応を検討し, 併せて各染色手法について検討を行った結果

1. 是等の色素は酸性粘液多糖類を含む組織に強い陽性反応を示すことが明らかになった。
2. 本反応の強さは各色素によって異り, 且種々の物理化学的因子によって影響されるために, 各色素について染色条件を定める必要があり, 夫々の色素についての染色法を示した。
NK193染色法は最も優れた成績が得られた。

引 用 文 献

- 1) H. Kramer and G. M. Windrum., J. Histochem. Cytochem. 3, 227-237 (1955).
- 2) J.W. Kelly., act histochem suppl. 1 (1958).
- 3) Pearce., Histochemistry 248-254 (1960).
- 4) L. Lison., Histochem et Cytochem. (1953).
- 5) 6) 安藤進, 染色の理論 (1954)
- 7) Szirmai J.A., J. Histochem. Cytochem. 4, 96-105 (1956).
- 8) 大野乾, 医学と生物学 19 (6) 326-328 (1951)
- 9) Landsmeer, Giel., J. Histochem, Cytochem 4, 69-78 (1956).
- 10) J.W. Kelly, act. histochem. suppl I (1958). (Ausprach: sylven)
- 11) Schiebler T.H., S. Schiessler., Histochem I 6 (1959).
- 12) Ritter H.B., et al. Am. J. Path., 155 (4) : 639-645, (1950).
- 13) 波多野, 高松, 東京医事新報, No2 934 (1935).