

# 臨 床

## KLUEVER-BARRERA 染色の経験

京都大学医学部外科学教室第1講座 (指導: 荒木千里教授)

小 島 稔 豊

〔原稿受付 昭和33年6月9日〕

## EXPERIENCES OF THE KLUEVER-BARRERA STAIN IN OUR NEUROSURGICAL LABORATORY

by

TOSHIATSU KOJIMA

From the 1st Surgical Division, Kyoto University Medical School  
(Director : Prof. Dr. CHISATO ARAKI)

A new combined staining of cells and fibers in the nervous system was described by KLÜVER and BARRERA in 1953. The technicalities of the methods for celloidin sections are described with some modifications due to our experiences for two years.

### 緒 言

中枢神経組織に於いて、細胞構築像と有髄線維構築像とを同一切片上で観察する為には、従来 Pal-Karmin 法などが行われて来たが、満足すべきものではなく、細胞像に対しては別に Nissl 染色を行う必要があった。所が1953年、シカゴ大学の Klüver 教授と Barrera 女史は従来の方法と全く違った染法を考案発表した。我が国にはその翌々年、小池上教授によつて紹介され、本法は操作が甚だ簡単であり、又染め上がりも Pal-Karmin 法その他の到底及ばぬ程の鮮明な像が得られ、上記2つの構築像を同時に同程度に検索し得る長所を具えているものとして推奨している。本法の特質については原著に譲るが、著者の教室でも本法を追試した結果、非常に優れた方法であることがわかり、現在数人の研究者によつて活用されている。本法はパラフィン切片、凍結切片、ツエロイジン切片の何れにも応用されるが、特に前2者に於いて優秀な成績が得られるようである。しかし大きい標本や連続切片の場合には、どうしてもツエロイジン包埋に頼らねばなら

ず、著者は専らツエロイジン切片について本法を活用して来た。この際従来の方法と違つて、クローム酸前処置をする必要がないので、他の染色をも行い得る利点がある。確かに本法は操作は簡単であり、染め上がりも美しいが、かと云つて毎常そうだとは限らない。著者は2年間本法と取り組み、多少の工夫を試みた点もあるので、既にこの染色に慣れた人には冗長に過ぎるかも知れないが、著者の経験を主体にして、出来る限り具体的に実際上の手技について述べ、これから本法を行わんとする人達の参考に供しようと思う。

### 染 め 方

初めに著者の教室で現在慣用されている方式(原法とは多少違っている。)を列挙し、次に各項について詳述する。

- 1) ホルマリン固定、ツエロイジン包埋。
- 2) 20~30 $\mu$ の切片とする。
- 3) 0.1% Luxol Fast Blue MBS液(95%アルコール1000ccに1.0g溶かし、10%醋酸5.0ccを加う。)で約18時間、57°Cの孵卵器に入れ染色する。

4) 95%アルコールで洗い、蒸留水に移す。

5) 0.05%炭酸リチウム液に一寸入れてから70%アルコールに移し弁色する。次に蒸留水に移す。この操作を3~5回繰返すと髄質は濃い緑青色、灰白質は無色或いは薄い緑青色になる。

6) 0.2%クレシルエヒト紫液(本液30ccに対し使用前に10%醋酸5滴を加う。)で加温染色。

7) 冷えるまで待つて、一寸水洗し、95%アルコールで弁色。

8) 純アルコールで脱水、キシロールで透化、バルサムで封入する。

1) 染色は総てそうであるように、本法に於いても最初の固定が大切なことは云う迄もなく、又適当な固定期間の後に早期に包埋されることが望ましい。殊に固定の良否はクレシルエヒト紫(以下ク紫と略。)液で重染色を行う時に大いに関係する。しかし第1段階のLuxol Fast Blue MBS(以下MBSと略。)染色は固定の余りよくない材料でも、又ホルマリン水中に数年放置されたような材料でも充分よく染まるようである。

2) 切片の厚さは20 $\mu$ (15~25 $\mu$ )が適当であろう。時に大きい標本や脆い材料では30 $\mu$ の切片とすることもあがるが、鏡検上20 $\mu$ の切片に比べるとやゝ見難い。

3) MBS液は予め作つて置いたものでよく、原著には1年経つたものでも使用に堪えるだろうと記載されているが、著者が比較した所では、作つて直ぐのものゝ方が僅かの差ではあるが濃く染まつてよいように思う。又1度使つたMBS液を2度3度と使用しても充分よく染まる。しかしMBSはそれ程高価ではなく、又0.1%の稀薄液でよいのであるから、大切な材料ならその都度新調した方がよいと思う。次に原著には1度漉してから使用するよう記載されているが、漉過液でも僅かに沈澱は認められるし、実際に漉さなくとも染色には何ら支障はなく、最近では著者はこの操作を省略している。又醋酸を加えるのは恐らく伴染を防ぐのが目的であろうが、実際には加えた所で大した意味はないように思う。しかし原法を尊重してこの操作は省いていない。染色時間は原著には16~24時間と記載されているが、著者の教室では何時の間にか18時間が標準になつてゐる。これは孵卵器に夕方入れ、翌朝取り出すわけで、その日の中に爾後の操作を完了することが出来るので、實際上便利なからではあるが、これ以上長く孵卵器に入れて置いても、徒らに次の弁色に時間が掛かるだけで、1層濃く染まると云うような

ことがなかつたからである。最低何時間で染まるかと云う問題を検討する必要に迫られたことはないが、原著には5時間と記載されている。孵卵器の温度は原著通り57°C(55~60°C)を使用している。1時孵卵器の故障で45°Cを使用したことがあつたが、特に染まりが悪かつたとは思へなかつた。又偶々室温に放置されたような場合でも染まつており、兎に角MBSは髄鞘に対して強力な親和力を有している。尚孵卵器中では染色液の蒸発を防ぐ為に、蓋のよく合つた容器を使用する必要がある。普通のシャーレではすつかり蒸発して、からからになることがある。又特に本法に限つたことではないが、染色液に1時に多数の切片を重ねて入れるようなことは出来るだけ避けたい。切片が重なると染色液が均等に作用せず、重なつた部分だけ染まりが薄くなり、切片にむらを生ずる。これはわかりきつたことであるが、初めの頃1度や2度は誰しも苦い経験を持つもので、このむらをうつかりして脱髄所見と誤ることがないとは云えない。著者は底の広い容器に充分量のMBS液を入れ、切片を1枚1枚丁寧に並べるようにしている。殊に大きい切片の場合には、めんどうでも1枚ごとに容器を別にした方が間違いない。

4) 切片を95%アルコールに移す。切片は全体が濃緑色に染まり、多少MBSの沈澱が附着していることもあるが、これは洗うような気持で暫く切片を動かしていると容易にとれる。次に蒸留水に移す。こゝで蒸留水中に数日置いておいても差支えない。

5) 切片を0.05%炭酸リチウム液に入れると、数秒後に切片が青味を帯び、もやが出始める。こゝで直ちに70%アルコールに移し、切片を絶えず動かしていると、次第に弁色が進み、髄質と灰白質が区別出来るようになってくる。しかし1定時間(普通10~20分)後には弁色の速度が落ち、極めて徐々にしかもやがなくなる。こゝで蒸留水に移す。そして再び0.05%炭酸リチウム液を通して70%アルコールに入れると弁色が著明に進行する。以上の操作を何回か繰返す。0.05%炭酸リチウム液に長く入れて置くと、髄質部まで脱色する傾向があるから、こゝでの操作は速に行つた方がよい。70%アルコールは色付いてくるから適宜交換する。少し慣れれば20~30枚の切片を1度に行うことが出来る。この弁色に要する時間は70%アルコールの温度によつて左右され、夏は早く、冬期には長時間を要する。従つて冬期には70%アルコールを少し温めるとよい。又切片によつてはなかなか弁色されないことがあるが、このような場合でも70%アルコールを温

めると速かに弁色する。しかし加温し過ぎると髄質部まで脱色するから注意しなければならない。大体この操作は3~5回繰返せば充分で、灰白質部の色は完全に落ちてしまい、弁色の目的を達する。従つてこれ以上操作を繰返す必要はないわけであるが、更に繰返したからと云つて、原著に注意されているように髄質部も脱色すると云うようなことは実際にはないから、著者は念には念を入れて余分に数回反復している。尚著者の経験によると、この操作は短時間づゝ頻回行つた方がよい。即ち70%アルコールに入れておく時間を短く精々5分位にして、そのかわり何回も時には10回以上操作を繰返すわけである。この方が確かに髄鞘が濃く染まる。弁色が出来たかどうかは、慣れゝば肉眼で充分見当がつくが、著者は切片を時々載せガラスにすくつて必ず鏡検する習慣をつけている。そして神経細胞が完全に脱色されていることを確かめる。脱色が不充分だと、次にク紫液で重染色をした時、緑と紫の色調が重なつて細胞の構像像がよくわからないからである。しかし神経細胞の核だけは脱色されずに残つてることが多い。これまで除こうとすると髄質部の色まで薄くなるから、これは止むを得ない。従つてク紫液で重染色をすると核は特に濃染するから、本法で神経細胞の核の構造まで見ようとするのは無理である。又充分弁色した積りでも、中には脱色の不十分な細胞が残つており、従つてク紫液で重染色をしても総ての細胞が平等に美しく染まらないのが普通で、中にどうしても緑と紫の色調の重なつた細胞が認められる。このことは大きい標本の場合に屢々経験されることであるが、本法が重染色法である以上、或る程度は止むを得ないことだと思う。弁色が終れば、直ぐ引き続いてク紫液の重染色を行うが、都合によつてはこのまゝ数日蒸溜水中に貯蔵して置いても差支えない。又髄鞘だけ見たい場合には、漸強アルコール列を通してキシロールで透化、バルサムで封入すればよい。

6) ク紫は Grüber 製のものをを用い、溶かしてから1年位経つたものを使用する。Grüber製以外のものは感心しない。ク染色は即ち Nissl 染色であり、ホルマリン固定の材料で Nissl 染色を行う際の工夫が、この場合にもそのまゝあてはまるわけであるが、実際には一般の Nissl 染色と異なる点が2,3ある。その1つはク紫液の濃度の問題である。普通 Nissl 染色には1.0%の液を使用するが、本法では0.1%液を用うように原著には記載されている。又本法では醋酸を加えることが普通の Nissl 染色の場合と違つている。ホル

マリン固定の材料で Nissl 染色を行うと、屢々神経細胞以外の部分の伴染に悩まされ、細胞以外の基地をすつかり脱色しようとする、一旦染まつた細胞まで薄くなつてしまうことがある。本法が低濃度のク紫液を使用するのは、恐らくこの伴染を防ぐのが目的であろう。又同じ意味で醋酸を加えるのであろうが、Nissl 染色でもこれは試みられたことがある(横地、前川)。しかし濃度が低いと必然的に神経細胞の染まりも悪くなるので、著者の教室では初めの頃この濃度を種々変えて検討した結果、0.2%液を標準とするようになった。次に Nissl 染色ではク紫液を室温ないしは微温に温めて染めるように成書には書かれており、又本法の原著にも単に0.1%ク紫液で3分間染色と記載されているが、著者の経験では、このようにして満足する程染まつたことは1度もない。少くとも著者の教室では、0.2%ク紫液を10分位掛けて徐々にそして可成り強く温めている。加温すればする程神経細胞が濃く染まることは事実である。しかし沸騰するまで加温してはいけない。ク紫液の入つた容器が辛うじて手で持てる程度まで温める。そして切片を引き上げて見て、ツエロイジンの衣が辛うじてすけて見える程度に色付くまで何回か加温する。加温が足りないと一般に染まりが薄く、従つて次にアルコールで弁色する際の時間は早くてすむが、染め上がりはえてして赤味に乏しく、又短時間で褪色してしまう傾向がある。しかし逆に加温し過ぎると、髄質部や基地が伴染し、又切片にク紫液の沈澱が1面に附着して甚だ不快である。正しく固定し包埋した材料なら、0.2%或いは0.1%のク紫液を使用し、1回加温したのみでアルコールで弁色すると、神経細胞は明るい赤紫色に染まり、而も先にMBS液で染まつた髄鞘は緑青色のまゝ残つて、簡単に美しい標本が出来上がるのが普通である。しかし固定のよくない材料の場合には、数回強く加温しても、神経細胞は薄く暗青色に染まるだけで赤味に乏しく、而も伴染のため髄鞘も青紫色になり(この髄質部の伴染は所見を見る上にはそれ程支障はない。)、又切片には1面にク紫液の沈澱が附着して、なかなか期待通りの標本は出来ない。先述したように最初の固定が大切な所以である。しかし我々は固定のよい材料のみを毎常取り扱えるとは限らないので、著者はこのような場合種々工夫を凝らしてみた。ホルマリン固定の材料で Nissl 染色を行う場合の工夫として、これまでに富山変法や小池上変法等が発表されているが、MBS 染色を行つた切片について著者が追試した所では決して芳しいものではなかつた。それ

よりむしろ、1.0%のク紫液を用いて、1度強く加温したゞけの方が結果がよいように思う。少くともク紫液の濃度を上げ、又強く加温するようにすると、神経細胞は先ず先ず染まってくれる。たゞこの場合、先に述べたように髄質部も伴染して青紫色になり、又切片に附着するク紫液の沈澱に悩まされることがある。このような場合、切片に附着するク紫液の沈澱に対しては、ク紫液を予め1度強く加温してから漉したものを染色液として使用すると、或る程度防ぐことが出来る。しかし加温しないでたゞ漉したゞけの液では全々染まらないから注意を要する。次に髄質部や基地の伴染に対しては、次項で著者の工夫を述べる。ク紫液は何回でも使用出来るが、次第に染まりは悪くなるようである。尚こゝでは MRS 染色の場合のように、切片を1枚1枚並べる必要はない。多数の切片を重ねて染色して何ら支障はない。

7) 加温したク紫液が1応冷えてから切片を取り出し、蒸留水で1寸洗つて95%アルコールに入れ弁色する。この場合、Nissl 染色の際の習慣からそうしているが、必ずしも冷えるのを待つ必要はないようである。普通弁色に要する時間は30~60分がよく、数分間で弁色し終るようなのは細胞の染まりが赤味に乏しく、又短期間で褪色したりするので感心しない。逆に1時間以上も掛かる場合には、えてして切片の周囲のみが早く脱色され、中央の部分はなかなか色が落ちないから、染まりが切片全体に均等でなくなる。即ち30~60分で弁色出来るように、ク紫液の濃度や加温を適宜加減する必要があるわけである。しかし時にはどうしても脱色されないものや、伴染がひどくて美しい標本の出来ない場合がある。このような時には試みてよいと思われるので著者の工夫を述べる。著者は偶々凍結切片で Nissl 染色を行つていた際、クレオソートキシロールでク紫が著明に且つ速かに脱色されることに気付き、これを本法に応用した所、甚だ良好な結果を得た。即ち95%アルコールで一応弁色し、純アルコールを通してクレオソートキシロールに入れると再び著明に脱色されてくる。而も神経細胞は余り脱色されず、又赤味が増して見違える程美しい標本が出来ることがある。頃合いをみてキシロールに移せば弁色は停止する。弁色には95%アルコールの代りに普通の Nissl 染色の際のように漸強アルコール列を使用し、70%アルコールで主に弁色するようにしてもよい。又冬期には弁色に長時間を要するのでアルコールを加温するとよいことがあり、この場合には95%アルコールは引火する危

険があるから、70%アルコールを使用した方がよいと思う。弁色が出来たかどうかを勘に頼ると、後で後悔することがあり、弁色中時マアルコールから切片を載せガラスにすくつて鏡検してみることが大切である。著者は1度に多数の切片を取り扱う場合には、大体の見当で純アルコールを通してキシロールに入れ、こゝで切片をためて置くが、封入する前にはやはり1枚1枚鏡検し、弁色の不十分なものがあれば、再びアルコールに戻すようにしている。

8) 普通 Nissl 染色には封入にツエーデル油を使用するが、著者は本法では専らバルサムを用いている。原著には何れとも指定していない。

### 染め上がり

髄鞘及び脳柔膜は緑青色に、神経細胞、膠質細胞、脳室上衣細胞、血管壁細胞は赤紫色に、赤血球は黄緑色に染まる。よく染まつた標本では2年を経た現在少しも褪色していない。

こゝで他の髄鞘染色或いは Nissl 染色を単独に行つた場合との比較であるが、先ず髄鞘の染まりは、著者はかたわら巢鴨法も行つて来たが、巢鴨法に比しきして遜色ないように思う。たゞ緑青色であるため、コントラストが弱く、多少見難い嫌いはある。又弁色の仕方にもよるが、本法でも終脳皮質の細い切線々維まで染め出すことが出来る。次に神経細胞の染まりも、Nissl 染色を単独に行つた場合と殆んど変らない。むしろ原著でも指摘しているように、細胞内の Nissl 小体は一般の Nissl 染色以上によく染まつたと思われる場合がある。たゞ著者の経験では、先述したように核が濃染すること、及び大きい標本では MBS の脱色の不十分な細胞が1部残り、それらはク紫液で重染色をすると、紫青色になってしまうが、これは本法が重染色法である以上止むを得ないと思う。赤血球が黄緑色に染まるので出血巣を見たい場合にも本法は活用出来る。

### 結 語

著者の2年間の経験を主体にして、ツエロイジン切片に於ける Klüver-Barrera 染色の実際上の手技について述べた。この小著が、これから本染色を行わんとする方達にとつて少しでも参考になれば幸である。

(稿を終るに当り、京大外科第1研究室に在つて、著者と共に日夜工夫を重ねた尾形、林、藤田、大谷の諸氏に厚く感謝の意を表する。)

## 文 献

1) Klüver, H. & Barrera, E.: A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J. of Neuropath. & Experim. Neurol.*, **12**, 400, 1953. 2) Romeis, B.: *Mikroskopische Technik*. München u. Berlin Ordenburg, 15. Aufl., 1948. 3) 小池上春芳:

脳神経組織の新染色法 (Klüver-Barrera) 法及び Nissl 染色の変法について. *東京医誌*, **72**, 153, 昭30. 4) 武谷止孝: 脳の病理組織標本の作り方. 東京・京都, 日本医書出版, 昭26. 5) 鯉崎徹: ホルマリン材料の Nissl 染色法の1考案 (富山氏法). *神経誌*, **38**, 403, 昭10.