和歌山県立医科大学, 第2解剖学教室 (主任: 高木教授).
II. Dept. of Anat., Wakayama Med. College (Director: Prof. K. TAKAGI).

核酸染色法, 特に膵細胞の Methyl Green-Pyronin 染色について.

Histochemical Research on Nucleic Acid, Especially on
the Methyl Green-Pyronin Staining of the Pancreatic
Cells.

鈴木 達夫 Tatsuo SUZUKI.

[昭和 29 年 3 月 24 日原稿受付.]

核酸 (DNA 及び RNA) の組織化学的研究にあたっては, 先ず安定な染色が可能である事が第 1 条件と言わなければならない. DNA に就ては, 1924 年 Feulgen, Rosenbeck に依って提唱された Feulgen 反応なる比較的安定な染色法が存在し斯学に寄与している. 一方 RNA に関しては, Pappenheim-Unna に依る所謂 Methyl green-Pyronin 染色法, Thiazin, Oxazin 系色素の Metachromasie を応用せる方法, May-Grünwald-Giemsa 法或は pyronin と methyl green の単独染色法等, 数に於ては多くがあるが, 何れも固定法, 色素の濃度及び PH, 染色時間, 弁色, 脱水等に就て今日尚創意工夫がなされつつあり, 未だ安定した域には達して居ない. 余は東西諸家の提唱する之等諸法を追試すると共に, 特に methyl green-pyronin 染色に関して検討し度いと考えていた.

時恰も本教室藤江氏がラッテ膵細胞の実験細胞学的研究を行うに当り, 余は其の核酸部門を担当する機会を得た. 此処に於て, 各種核酸染色法の追試をラッテ膵細胞にて行った処, 現在の方法では到底満足なる結果を得る事が出来ない事を知り, 膵細胞の如き特に RNA 含有の多い細胞に対しては, 特別の工夫を心要とする事を痛感した. 之が本研究を始めた所以である.

I. Methyl green-pyronin 染色法の検討.

抑々 methyl green-pyronin 染色法 (以下 M-P 染色法と略す) は, 1899 年 Pappenheim により提唱され, 1902 年 Unna により改修された方法で, 初めは皮膚科, 或は内科領域に於けるアメーバ赤痢の病原体鑑別, 梅毒ゴム腫の Plasma 細胞浸潤像の鑑定等に利用されていたが, Brachet (1940) が此の方法で核酸を染色し, Caspersson (1941) がそれを RNA と確認し

て以来、RNA 染色法として脚光を浴びるに至った。而して一般に核中の緑色は DNA の含有を示し、cytoplasm の赤色は RNA の存在を示すとされている。さて組織中では DNA は RNA より遙かに強い重合状態で存在する。此の重合度の差異が methyl green (M.) 及び pyronin (P.) に対する親和性に影響を及ぼして来る。従って、例えば DNA と雖も高度に polymeriz されたものと、depolymeriz されたものでは明かに染色性に差異を生じる。故に M-P 染色法は、両核酸の重合及び縮合状態を示す状態染色とも言えるわけで、一般に M. は高度重合の核酸に親和性を持ち、P. は縮合状態即ち低重合の核酸に対し選択的な親和性を有すると云い得る。之を今一步具体的に言うと、M. 好性のものには、DNA (polymerized)、DRNP (desoxyribonucleoprotein) があり、P. 好性のものには RNA, DNA (depolymerized)、RNP (ribonucleoprotein) がある。此の事実は、本染色法が複雑なる染色結果を示す原因の一つと思われる。かかる処から Kurnick, Jacobson, Webb 等は M. と P. の夫々による単独染色法を提唱して居るが、余の経験では両核酸の特異的な染め分けは不可能で、M. 好性の核小体や P. 好性の核膜を認める事もあり、之は又 Taft 等も認めて居る処である。要するに DNA (depolymerized)、RNA, RNP, は P. 好性で、DNA (polymerized)、DRNP, は M. 好性であるが、此の染色上の特異性は M. と P. の混合液で染めた時初めて得られる様に思われ、所謂 M. と P. の単独の染色では此の点満足を得難い。ラッテ脾細胞に於ては、従来の M-P 染色法によると、M. と P. の調和を保つ事が困難である。即ち脱水に ethanol を用いると P. が急速に落ち、之を防ぐと脱水が不十分になる。又水洗によつては、特に M. が落ち易いし、又之が簡に過ぎると核に余分の P. が残り易い。又 M. は如何なる商社のものも相当の crystal violet を含んで居るから、之は chloroform により徹底的に抽出除去せられる必要がある (分液漏斗を用い chloroform 層が全く無色になる迄抽出する)。若し之を怠ると M-P 染色は満足な結果を得ない。その理由を以下に述べる。M. の構造式は

の如くで, triphenolmethane に属する色素であり, 而も 2 つの dimethylaminogroup を持つ. 斯る triphenolmethane に属するものとしては, ethyl green, malachit green, crystal violet, victoria blue 等があり, crystal violet が methyl green に極めて近似の構造式を有する事は注目に値する. 即ち

の如くで dimethylaminogroup を 3 つ有する点が異なるのみである. 上記 4 つの色素の中, ethyl green, malachit green は構造上 methyl green の範疇に属し, victoria blue は crystal violet の範疇に属して居る. 尚興味深い事は ethyl green の RNA に対する態度は methyl green のそれに一致するし, malachit green も又それに準ずる. 之に反して crystal violet や victoria blue は核酸に対し選択的親和性を示さず, RNA, DNA を問はず略々同様の親和性を示す. 即ち 2 つの dimethylaminogroup を有する triphenolmethane 色素は高重合の核酸に特異的に親和性を示し, 3 つの dimethylaminogroup を持つものは普遍的染性を示す. 即ち同じ triphenolmethane 系色素でありながら, dimethylaminogroup の数により核酸染色の上にかかる差異を現す事は興味深い. 従って M-P 染色に於て, chloroform に依る M. の精製が不完全な場合は甚だ複雑な染色像となり, RNA, DNA の判然たる区別がなされない. 此所に於て M. の精製の徹底が M-P 染色の要諦であると言う事が出来る.

一方低重合核酸に親和性を有する P. に関して一言すると, P. は xanthylum 塩に属し, 次の如き構造式を有する.

此の塩に属する色素は, 前記 triphenolmethane 系色素の如く染色に混乱を来すが如きものは無く, 従って染色機構に関しては論議される必要が無

い様であるが、念のため butanol による精製法（柴谷）を用いる事は無意味ではないと思われる。

II. 余の考案した M-P 染色法.

a) 固定法.

核酸染色のための固定には Zenker, Carnoy, formalin, 醋酸アルコール, Rossman 等各種の固定液が使われて居るが、同一材料より作成した標本に就て M-P 染色と、Feulgen 染色を共に行う場合を考えると、Zenker 液が最も良好の様である。Zenker 液に就ては重クロム酸カリの混在に対して異論を唱える人も有る様であるが、近時 Kurnick, Taft, Hardy の諸氏は、核酸染色に本固定液を賞用して居る。余も又本液の美点を屢々経験したので、以下専ら Zenker 液を使用する事とした。

b) 染色法.

染色液.

1. 0.8% pyronin (溶媒は醋酸緩衝液 PH 4.1)

2. 0.25% methyl green (crystal violet 完全抽出, 溶媒は上に同じ)

1 と 2 の 1:3 の割合の混合液中に 20—30 分間染色 (30 分以上は無意味. 5 分以下は不十分). M. の濃度は 0.5% 以下でないと cytoplasm 中に M. が残り易い.

水洗.

蒸溜水中にて震盪しつつ約 5 秒.

弁色, 脱水, 封入.

1. Isopropylalkohol と n-Butanol の等量混合液に 30 秒乃至 1 分.

2. n-Butanol に 30 秒乃至 1 分.

3. Xylol 2 回, 各々 3 分.

4. 中性バルサム封入.

但し弁色及び脱水には Ethanol, Isopropylalkohol, Aceton, 3 級 Butanol, n-Butanol 等が用いられているが、M. と P. の弁別には Isopropylalkohol と n-Butanol が最適の様である。なお弁色及び脱水前の水洗は、特に M. の染色性に影響する処大で、あまり長きに失すると M. が落ちる。之も染色上熟練を要する処である。最後に封入は中性 Balsam, Zeder 油, Clarit 等が使われているが、何れも大差無く、余は中性 Balsam を用いている。切片の厚さは 4—5 μ , 嚴重に暗所に保存すれば少くとも 3 ケ月は褪色しない。

本染色標本に於ける着色物質に就ては、余は Erickson, Pollister 等の唱

える過塩素酸, トリクロール酸, $1N$ HCl による RNA 消化同定法及び Feulgen 反応の併用を試みて, RNA 及び DNA である事を確認する事が出来た。

III. 染色成績.

核酸染色標本を天然色にて図示する事は, 印刷技術上不可能に近いので, 余は色調の表現を「万国色調標準表 Guide to colour standard」に示された色相番号を用いて行う事にした. 文中色相 3, 色相22と言うが如きは之である. 図1は余の方法にて染色した膵の顕微鏡写真であり, 図2は図1の一部を拡大模写し, 膵細胞を模型的に示した説明図である.

図 1. 空腹ラッテ膵細胞. Methyl green-Pyronin 染色, Zenker 固定, パラフィン包埋, 4μ . $1000\times$.

Fig. 1. Pancreatic cells in a starved rat. Fixed by ZENKER's fluid, sectioned 4μ in paraffin, stained with methyl green-pyronin. $1000\times$.

図 2. 図 1 の一部を拡大模写せるもの, **A** 細胞膜 (染らず), **B** 分泌顆粒 (染らず), **C** 分泌顆粒間質部 (pink, 色相 1), **D** 核周囲部 (pink, 色相 1), **E** 核膜, クロマチン, クロマチン殻, ヘテロクロマチン, (light blue, 色相 16), **F** 核小体 (pink, 色相 1), **G** 赤血球 (M. 或は P. に染らず pale yellowish brown 乃至 dark orange, 色相 7 乃至 4).

Fig. 2. Magnified reproduction of cells in fig. 1. **A** cell membrane (not stained), **B** secretion granules (not stained), **C** intergranular substance (pink, colour number after "Guide to colour standard" 1), **D** perinuclear part (pink, colour number 1), **E** nuclear membrane, chromatin, chromatin shell, heterochromatin (light blue, colour number 16), **F** nucleolus (pink, colour number 1), **G** erythrocytes (not stained by methyl green or pyronin, generally, pale yellowish brown—dark orange, colour number 7—4).

P. で染め, 次に M. を重ね染める方法に於ては, 核小体 (図 2, F) が light blue (色相 16) を示したり, 核膜 (図 2, E) が red (色相 1) に染まる場合が多く, RNA と DNA が判然と区別され難いのみならず信がけない。

b) 余の M-P 染色による成績.

対照と同一材料に余の方法を適用すると, 腺細胞に於ては細胞膜, 分泌顆粒は染色されず, 又赤血球は M. 及び P. に染らず, 大抵 pale yellowish brown (色相 7) 乃至 dark orange (色相 4) を呈し, 分泌顆粒間質, 核

a) 対 照.

従来諸家に依って使われて居る M-P 染色法, 特に M. の混合量が少々多きに過ぎると思われる方法を空腹ラッテ腺細胞に適用した場合, その染色像は, 核周囲部 (図 2, D) が reddish purple (色相 22) を呈し易く, ために DNA, RNA の弁別が甚だ困難である. 又 methyl green として購入したものを精製する事なく使用して M-P 染色を行うと, 細胞膜 (図 2, A) が red (色相 1) に濃染し, 分泌顆粒 (図 2, B), 顆粒間質 (図 2, C) 共に red (色相 1) に染まり, 核周囲部 (図 2, D) も reddish purple (色相 22) を呈し, 更に腺細胞附近に見られる赤血球 (図 2, G) も red (色相 1) に染色される. 之等は良好なる染色結果でない事は, 細胞膜, 赤血球には核酸の含まれて居ないと言う事実が証明している. 又 M. と P. の分離染色法, 即ち先ず

周囲部及び核小体 (図 2, C, D, F) は pink (色相1) に, 又核膜, クロマチン, クロマチン殻及びヘテロクロマチン (図 2, E) は何れも light-blue (色相16) 乃至 light green (色相12) に染色せられ, RNA, DNA が判然と区別される.

IV. 結 語.

以上を要するに, 膵細胞の如く RNA 含有量の多い細胞の methyl green-pyronin 染色に於いては, 染色液, 濃度, 染色時間, 水洗, 弁色, 脱水等に特別の工夫を要する. 此処に紹介した余の方法は, 核酸染色に関する従来の諸法中最良のものであるというわけではないが, 理論的に改良すべき処はすべて改良し尽し, 少くとも膵細胞の核酸染色には最適の方法であると確信する.

稿を終るに当り, 御指導と御校閲を賜った 高木教授, 藤江助教授に満腔の謝意を表する.

Author's Abstract.

There are many methods, on how to stain desoxyribose and ribose nucleic acids (DNA and RNA). However, it is very difficult to obtain a constant result, especially, in cells such as pancreatic cells which contains much RNA. The usual methods can not be applied here, and there seems to be much room for discussion concerning its fixation, concentration of stain, staining time, washing after staining, differentiation and dehydration of sections, etc.

The author suggests a new modified method by using methyl green and pyronin for staining nucleic acid in pancreatic cells. The author believes that this method of staining is the best for RNA in the pancreatic cells, because the result gotten from this method of staining was always constant, and the differentiation between RNA and DNA was very clear. Furthermore, the process was not complicated.

文 献.

- Abolins, L.:** Exp. Cell Res. 3 (1951). P. 1. — **Byron, S. a. W. F. Alexander:** Stain Technol. 27 (1952). P. 147. — **Cerioti, G.:** Stain Technol. 27 (1952). P. 233. — **Kurnick, N. B.:** Stain Technol. 27 (1952). P. 233. — **J. gen. Physiol.** 33 (1950), P. 243. — **Leshner, S.:** Exp. Cell. Res. 2 (1951). P. 577. — **日本色彩研究所:** 色の標準 Guide to colour standard. 日本色彩社. 昭 27. — **柴谷篤弘:** 科学. 19 (昭24). 頁 519. — **Taft, E. B.:** Exp. Cell Res. 2 (1951). P. 163.
-