A ELASTIC FIBER STAIN, ON ALDEHYDE-FUCHSIN TRICHROME STAIN

K. SUGAI, K. FUKUSHI and K. KAWATSU

Laboratory of Pathology, National Institute for Leprosy Research

(President: R. KOBAYASHI, Director: Y. YOSHIE)

Up to now, Weigert's resorcinfuchsin is used to stain elastic fibers histopathologically. Difficulty is present in the preparation of this staining solution. Gomori's aldehyde-fuchsin (1950) is a newer dye, derived from Schiff reagent, and applied to differential staining of β cells of Langerhans' islets and hypophysis and elastic fibers. The preparation of this dye is very simple, and finest fibers are easily stained. By counter staining of trichrome, numerous tissue elements are discernible, the details of morphology of cells and stainabilities of protoplasm are rich and clear.

In this paper this excellent staining method is introduced.

弾性線維染色法, 殊にアルデハイド

フクシンートリクローム染色法について

菅井健治・福士勝成・川津邦雄

(昭和31年10月11日受稿)

国立らい研究所・病理学研究室(所長: 小林六造, 研究部長: 義江義雄)

現在, 病理組織顕微鏡標本について弾性線維を研べる場合には, 普通ワイゲルトの弾性線維染色液, 即ちWEIGERT's Resorcinfuchsin¹⁾ を用いているが, 此の液は出来不出来があり, 共染が少く, 而も繊細な線維まで鮮明に染め得る様な WEIGERT 染色液を作る事は中々困難であり, 仮に可成優秀なものを作り上げたとしても蒸発が早く, 為に濃度が変わり易く液の保存には余程の注意が必要となつて来る。

戦後アメリカの医学雑誌が入手出来る様になり, 弾性線維染色として VERHOEFF's elastic-tissue stain^{2) 3)} 法が屢々用いられている事を知り, 私共も之れについて追試を行つてみた。嘗て病理学会等でも此の染色法による標本を散見したが, 現在では殆んど見受けられない様である。私共は今回, 此の染色法を記述するのが主な目的ではないが, 興味を抱かれる向もあると思うので簡単にその方法を記しておこう。

始めに次の如き原液を調整しておく。ルゴール液(ヨード10g, ヨードカリ20g, 蒸溜水500cc), 10%過塩化鉄一水溶液, 5%ヘマトキシリン-エタノール溶液等で

ある。染色液を作るには5%ヘマトキシリン-エタノール溶液60ccに, 24ccのルゴール液及び24ccの10%過塩化鉄一水溶液を加え, 良く混合し, 濾過して使用する。使用液は新鮮なものが良く, 使用前に作る様にする。実施法としては, 脱パラ後水洗して,

1. 染色液に入れる。15~60分。
2. 水洗。
3. 2%過塩化鉄一水溶液(10%過塩化鉄一水溶液を薄めて作れば良い)に入れて脱色, 分別をする。数秒。一寸水洗して顕微鏡下に染まり具合をチェックする。血管壁の弾性線維が黒く浮き出て, 周囲の淡青灰色地から識別出来る。落し過ぎの場合は再び染色液に戻す。
4. 水洗。5分。
5. 95%アルコールに入れてヨードを除く。5分。
6. 水洗。5分。
7. 後染色。van GIESON(酸性フクシン-ピクリン酸)液に入れる。5分。
8. 95%アルコールで分別。

9. 無水アルコール（或はアセトン）で脱水。キシロールで透徹。バルサムで封入。

結果。弾性線維及び核は黒色。結合織は赤色。筋組織や原形質は黄色に夫々染まる。

此の染色法は弾性線維や核が黒色に染まり、顕微鏡写真の為には効果的であるが、一般に標本が汚く、たとえ van GIESON 液をかけても決して美麗なものとは言へない嫌いがある。

弾性線維の為の染色液が容易に調整出来、而も貯蔵しても比較的安定で、出来た標本が美麗で、長期保存にたえるものでありたいと願うのは当然であるが、此の様な要望に答えてくれるものとして私共は次の染色法をあげたい。

それは GOMORI によって提唱されたアルデハイドフクシン⁴⁾法である。此の場合後染色としてはトリクローム法⁵⁾が好ましい。以下染色液の作り方及び実施法に就いて記してみよう。

1. 固定は目的とする被染色体が濃く出るので (murky shades), Zenker—フォルモールが望ましいが、他の如何なる固定液でも良い。

2. 脱パラ。LUGOL 液で処理する。10~30分。(昇汞を含まない固定液を使用した場合もルゴール処理を行う様にする。此の処理によって、アルデハイドフクシンと弾性線維との親和性が増し、染色時間を早め、且染着が濃厚になるからである。)

3. 1~3%重亜硫酸水 (NaHSO_3) でヨードを除去する。

4. アルデハイドフクシンで染色する。15~30分。液が古くなると時間がかかる。(場合に依っては所謂 overnight する。慣れるまでは時々染色液から切片を取り出して、一寸アルコールで染色液を落し、顕微鏡下に血管壁弾性線維をみながら行い、適當のところでは染色を止める。過染せぬ様にする。)

アルデハイドフクシン液の作り方: 濃 HCL 1cc とパラアルデハイド 1cc を 0.5%塩基性フクシン—アルコール溶液 100 cc (この場合アルコールは60~70%エタノールを使用する) に加える。液は室温で約24時間放置すると暗赤色より濃紫色となり、恰かもゲンチアナ紫色の様になる。ここで使用する。液は室温だと約1~2ヶ月で効力が減ずるが、氷室に貯えれば約6ヶ月は充分使用出来る。

5. 60~70% アルコール (原著には濃度は記載してない) を入れた染色バットを2箇用意し、順次これに通して余分の染色液を落す。(この時、弾性線維は

紫色にくつきりと染め出される。膝ランゲルハンス島β細胞や肥肝細胞顆粒も亦紫色に染まる。)

6. WEIGERT 鉄—ヘマトキシリンで核を染める。5~10分。

7. 水洗。10~20分。(核は黒色をとる。鉄—ヘマトキシリンは後段トリクローム染色で使用する酸性液及び分別液で落される為、やや過染気味に染め上げる様にする。だからと言つて核のディテールが全く分らなくなる程時間をかけるのを好まない。)

8. トリクローム混合液で染色。3~7分。切片を顕微鏡下に観察し、適時染色を中止する。(筋肉や細胞原形質は赤く、結合織が緑色に、赤血球は橙色に染まる。)

トリクローム混合液の作り方: 先づ氷醋酸 3cc を 50%エタノール 300cc に加え、この酸性アルコールを 50cc 宛4つのビーカー、又は三角コルペンに移し、第一の容器に酸性フクシン 0.5g 及びボンソー 2R 1.0g を溶かす。第二の容器にライト緑 SF (yellowish) 0.45g を、第三の容器にオレンジ G 0.75g 及び燐タングステン酸 1.5g を第四の容器に燐モリブデン酸 1.5g を夫々溶かす。燐タングステン酸は容易に溶解するが、燐モリブデン酸は加温して溶かす様にする。之等の溶液を別の容器に集め、余つた酸性アルコールを追加してよく混合し濾紙でこす。

9. 0.2%醋酸—水溶液で短時間分別。スライドを持つて4~5回バットを往復させる程度で良い。

10. 95%, 100% アルコールを通す。キシロール透徹。バルサム封入。

結果: 核は黒色。弾性線維・肥肝細胞 (mast cells)・胃粘膜の主細胞 (chief cells)・膝ランゲルハンス島β細胞・脳下垂体前葉のβ細胞・粘膜上皮皮質緑・粘液は紫色。結合織線維は稍青味を帯びた緑色。カルシウムは深紅色。ヒヤリンは淡青色。コロイドは橙色か淡紅色。ケラチンは橙赤色。赤血球は橙色。ヘモジデリン、リボフスチンは橙緑色。前立腺小体は青緑色、その或物は中心が橙褐色に染まる。神経膠質は黄赤色。軸索はピンク。内及び外神経鞘は緑色に夫々染まる。

GOMORI⁴⁾は SCHIFF—試薬が濃度の高い氫酸にあうと、強く脱色を行なはなければ塩基性フクシン自身は或るアルデハイドと結合して濃紫色を呈する事に注目し、更に formaldehyde, paraldehyde (trimer acetaldehyde), propionaldehyde, n-butyraldehyde, benzaldehyde, dimethylamino-p-benzaldehyde, vanillin 及び furfural 等の

色々のアルデハイドを塩基性フクシンの強酸溶液に加えてみて、此の中の paraldehyde, propionaldehyde 及び butyraldehyde が著明に変色し、就中 paraldehyde: (C_2H_4O)₃ が弾性線維を最も強く染色する事を知つた。aldehyde-fuchsin は此の様に“新しい色素”として認識される様になつたのである。

SCHIFF—試薬は確かに用いる 固定法・分別法及び対染色法等に十分の注意を向けない可成多角的な染色性を示す為にはその意義が不明確になる様に感じられる。此の多角的な一面を取り上げたのが GOMORI のアルデハイドフクシンに他ならないが、SCHIFF の試薬によつて弾性線維が紫色に着色する事は GOMORI 以前に FEULGEN & VOIT (1924) 等によつて既に発見されており、フェニールヒドラジン、或いは重亜硫酸ソーダで処理すると、反応は陰性になる事も認められている⁶⁾。

GOMORI⁴⁾ は 60% アルコールに溶かした SCHIFF—試薬にパラアルデハイドを加えると β 細胞だけを強く染め、弾性線維を染め出さず、又古い染色液では弾性線維のみが染まり、 β 細胞は染まらなくなる(私共の経験では、氷室内保存約6ヶ月の液が此の様な傾向を示した)事を奇異な現象として述べ、此の染色法がオルセインやレゾルシンフクシン等と必ずしも全く同一の染色性を持つものではないらしいと結んでいる。

アルデハイドフクシンによる被染色体に関しては、アルデハイド化合物が問題であることは推定されるが、弾性線維にプラズマロジエーンが強く吸着した FEULGEN & VOIT (1924) 為とも、脂肪体の代謝によつて生じた未知物質が吸着した (VERNE, 1928-9) 為とも考へられているが、事実は脂肪体である証明もなく、推定の根拠も薄く、その性質は未だ不明である⁶⁾。

後染色のトリクローム法については既に原田⁷⁾によつて GOLDNER—変法が本誌上に記載されてをり、その染色液の作り方及び染色法については省略するが、此の染色法が瀕細胞を観察する場合 LILLIE の allochrome 法と共に優秀な方法である事は原田⁸⁾によつて述べられてをり、此の点私共も同感である。

MASSON⁹⁾ のトリクロームはその後 GOLDNER¹⁰⁾ によつて変法が、次いで POLLAK⁵⁾ によつて混合液による迅速法が発表され、又 SHORR¹¹⁾ はトリクロームを塗沫標本に応用している。併し GOMORI¹²⁾ は種々の acid triphenylmethane 系色素と sulfonated red azo-及び diazo-系色素を 0.5~1.0% 隣タングステン酸或は隣モリブデン酸及び 1.0% 醋酸混合液中に種々の割合で組合わせて色調のニュアンスを調べ、例へば隣タングステン

酸は赤味を、隣モリブデン酸は緑味を増す傾向があり、混合液はアルコールを加えると赤味を抑えて、緑味を出し、短時間の染色では赤味を帯びるものも、長時間では緑味が強調され、BOUIN 液で 56~60°C., 2~5 分処理 (bouinize) すると赤味が増し、筋線維や上皮の細胞間橋の線維が良く出る様になり、0.2% 醋酸で分別する場合は急激な変色を起さずに更にデリケートの色調をもたらすが、流水では赤味が落ちるといっている。

今回後染色のトリクローム法としては POLLAK⁵⁾ による迅速法を採用したが、之は簡便であるといふ点を心掛けたからであるが、一方 GOLDNER¹⁰⁾ 変法は染色上のステップが多いけれども、その都度コントロール出来る点で捨てがたいものがあると思う。

又 GOMORI¹²⁾ の迅速法の為の混合液は 0.6 g の chromotrope 2 R, 0.3 g の fast green CFC 或は light green SF, 0.6-0.7 g の隣タングステン酸及び 1 cc の氷醋酸を 100 cc の蒸留水に溶かして作る(実施法は POLLAK⁵⁾ の迅速法と変らない)。

此の処方から伺われる様に orange-G の如き黄色色素を用いていない。その理由としては orange-G によつて赤色色素がすつかり置換されてしまい、同時に此等の色調を現出し得ないからだと述べている。併し私共はやはり orange-G を使用する事によつて可成デリケートな色調の段階が把握出来る様に思つているので POLLAK⁵⁾ 法をとりあげておいた。

注意としては多くの染色液を同一切片に使用する為、美麗な標本である為には少くとも 5 ミクロンを超えない厚さの切片である事が望まれるのは勿論である。

尚塩基性フクシンは国産化学薬品研究所製の fuchsin red を使用した。之は basic fuchsin, brilliant fuchsin, rubine, magenta red 等と呼ばれるものであつて、Fuchsin pulver (MERCK) は此のアルデハイドフクシン法には不適である事を附け加えておく。

以上現在余り用いられていない弾性線維染色としてのアルデハイドフクシン法及びその後染色としてのトリクローム法について記述した。

(本法の実施に際して、いろいろと御指示下さつた東大病理・斎藤守助教授並に文献をお世話下さつた伝染病研究所病理・青山友三学士に心からの謝意を表明する次第である。)

主要参考文献

1. 緒方知三郎編：病理組織顕微鏡標本の作り方手ほどき、9 版、p. 152~156、南山堂 (昭和 30)

2. VERHOEFF, F. H.: Verhoeff's elastic-tissue stain J. A. M. A., 50: 876~877 (1908)
3. McCLUNG, R. J.: McClung's handbook of microscopical technique, for workers in animal and plant tissues, 3rd ed., p. 261-262, Paul B. Hoeber, Inc. (1950)
4. GOMORI, G.: Aldehyde-fuchsin: A new stain for elastic tissue, Am. J. Clin. Path., 20: 665~666 (1950)
5. POLLAK, O.: A rapid trichrome stain, Arch. Path., 38: 294 (1944)
6. LISON, L.: Histochimie et cytochimie animales, principes et méthodes, Gauthier-Villars (1953)
今泉正訳: 組織化学および細胞化学, 理論と方法, p 347~348, 白水社 (1954)
7. 原田澄: 癩組織の染色について (其の1), レブラ, 24: 118~122 (昭和30)
8. 原田澄: 癩の組織化学的研究 (等1報), とくに癩細胞の形成について, レブラ, 24: 277~282 (昭和30)
9. MASSON, P.: Trichrome stainings and their preliminary technique, J. Tech. Methods, 12: 75~90 (1929)
10. GOLDNER, J.: A modification of the Masson trichrome technique for routine laboratory purpose, Am. J. Path., 14: 237~243 (1938)
11. SHORR, E.: A new technic for staining vaginal smears, III. A single differential stain, Science, 94: 545~546 (1941)
12. GOMORI, G.: A rapid one-step trichrome stain, Am. J. Path., 20: 661~664 (1950)