

HBs 抗原染色の改良法と染色機構

千馬正敬, 山下裕人, 板倉英世

長崎大学熱帯医学研究所病理学部門

Modified Staining Method for Hepatitis B Surface Antigen (HBs Ag) and Its Mechanism
Masachika SENBA, Hiroto YAMASHITA, Hideyo ITAKURA (Department of Pathology,
Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University.)

Abstract: HBs Ag in the hepatocytes have been stained by orcein methods. However, not only HBs Ag but also degenerative and necrotic cytoplasm of hepatocytes are occasionally stained by the method, that makes it difficult to identify HBs Ag. Moreover, orcein dyes have different staining properties from lots to lots, that causes difficulty in obtaining a stable result. Therefore, we tried to modify the orcein method and found that the procedure using a sensitizer (ferric ammonium sulfate or uranium nitrate) after oxidizing solution gave stable and satisfactory results. By this method, in the hepatocytes, only HBs Ag are stained positively. The mechanism of function of the sensitizer is not clear, but we considered that Fe or U ions occupy small gaps in the protein molecular structure in the cells before orcein molecules occupy these gaps and that the method does not give a false positive result. It is also suggested that various HBs-staining-dyes can react with SO₃H groups which are formed by the oxidization of SS groups of proteins. We have developed a new staining method for HBs Ag, using Resorcin-fuchsin. The results of our method were also discussed.

Tropical Medicine, 22(3), 181-187, October, 1980

はじめに

パラフィン切片における HBs 抗原の染色は現在オルセイン法(志方ら, 1973; Shikata, *et al*, 1974; 志方ら, 1975), アルデヒド・フクシン法(志方ら, 1973; Shikata, *et al*, 1974; 志方ら, 1975), アルデヒド・チオニン法(志方ら, 1973; Shikata, *et al*, 1974; 志方ら, 1975), ピクトリア青法(田中ら, 1979), 等が報告されている。

中でもオルセイン色素による志方・赤塚・鶴沢法は色素による HBs 抗原染色法の最初であり広く行

われてきた。実際にはオルセイン色素はマーカークロット番号で染色性にかかなりの差があり常時安定した結果を得ることがむずかしい。しかし酸化処理の後に増感液に入れることによりコントラストの良い標本を常に得ることができるようになったので報告する(千馬ら, 1979)。レゾルシン・フクシン法(千馬ら, 1979)も同様の前処置を行うとオルセイン染色同様に実に微量の HSs 抗原も検出可能である。レゾルシン・フクシン法のみは染色液を製作してただちに使用できる唯一の染色法であり約1年間使用できる。また増感液の意義や染色機構に若干の

考察を加えたので報告する。

方法と結果

1. オルセインによる染色法

- (1) 脱パラフィン, 水洗
 - (2) 酸化液 5分
酸化液: 過マンガン酸カリ・硫酸混合液各0.3%
 - (3) 水洗
 - (4) 還元液 (脱色) 1分
還元液: 2% 蔞酸液
 - (5) 水洗
 - (6) 増感液 1分
増感液: 2% 硫酸第二鉄アンモニウム液 (または 1% 硝酸ウラニル 20秒)
 - (7) 水洗
 - (8) オルセイン液 5~20分
オルセイン液: 80% アルコール液 100ml にオルセイン (メルク社) 1g を溶かし濃塩酸 1.2ml を加えたもの。2~3 日後に使用できる。
 - (9) 純アルコールで分別
 - (10) 1% 塩酸アルコールで分別 5分
 - (11) 水洗
 - (12) ヘマトキシリンで核染色 (カラッチの場合 3分, 塩酸アルコールで分別)
 - (13) 水洗
 - (14) 脱水, 透徹, 封入
- 結果
HBs 抗原: 茶色
弾力線維: 茶色
変性および壊死に陥った細胞質: 染まらない。

2. レゾルシン・フクシンによる染色法

- (1) 脱パラフィン, 水洗
- (2) 酸化液 5分
酸化液: 過マンガン酸カリ・硫酸混合液各0.3%
- (3) 水洗
- (4) 還元液 (脱色) 1分
還元液: 2% 蔞酸液
- (5) 水洗
- (6) 増感液 20秒
増感液: 1% 硝酸ウラニル液
- (7) 水洗
- (8) レゾルシン・フクシン液 1~3時間
レゾルシン・フクシン液: 磁製 蒸発皿 (直径 25

cm) に塩基性 フクシン (メルク社) 2g, レゾルシン 5g, 蒸留水 200ml を入れよくかきまぜながら, 液が半量になるまで30分くらいかかって煮る。これに29% 塩化第二鉄水溶液 25ml をまき散らすようにして加え, 一層強くかきまぜながらさらに5分くらい煮る。これを冷却後濾過し, 残渣を10数回水で洗った後, 濾紙と共に純アルコール 200ml の中に入れ, 砂浴または水浴で温めて溶かし, さらに2~5分煮沸する。蒸発した量を純アルコールで補って200ml とする。これに塩酸 4ml を加える。

- (9) 純アルコールで分別
- (10) 1% 塩酸アルコールで分別 5分
- (11) 水洗
- (12) ケルンエヒトロート液 5分
ケルンエヒトロート液: 5% 硫酸アルミニウム液 100ml を温め, ケルンエヒトロート 0.1g をこれに溶解させ, 冷却後に濾過する。
- (13) 水洗
- (14) 1% 塩酸アルコールで分別
- (15) 水洗
- (16) 飽和ピクリン酸 30秒
- (17) 水洗
- (18) 脱水, 透徹, 封入

結果

HBs 抗原: 黒青色~黒色
弾力線維: 黒青色~黒色
変性および壊死に陥った細胞質: 染まらない。

考 察

従来のオルセイン法では肝細胞の細胞質が共染して, 退行変性や壊死に陥った細胞が染め出され HBs 抗原の判定が困難な場合があった。また細胞質が共染した場合, 非常にうすく染まる HBs 抗原の検出が困難であった。しかし増感液を加えることにより, この様な欠点がなくなり常にコントラストの良い標本が得られる様になった。

オルセイン染色法における増感液の意義は共染を防ぐことにある。従来の方法では蛋白分子構造の立体的な間隙の中にオルセイン色素が入るために肝細胞が共染していたと思われる。

オルセイン染色液に入れる前に硫酸第二鉄アンモニウムまたは硝酸ウラニルに入れると, 蛋白の立体

的な間隙の中に鉄原子やウラン原子が入るためにオルセイン色素が入る間隙がなくなる。したがって細胞質はオルセイン色素によって共染しないと考えられる (Fig. 1)。

なお細胞組織の蛋白の立体的な間隙に Fe 原子が

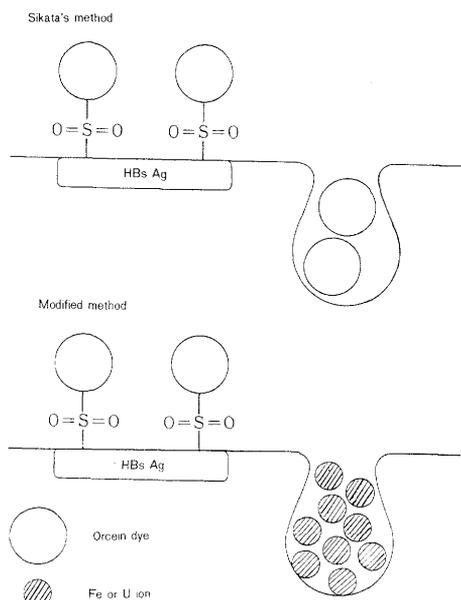


Fig. 1. Significance of sensitizer solution in HBs Ag staining method.

入っているかどうか、調べるため3個の鉄が染まらない、すなわち鉄沈着が無い肝臓のパラフィン切片を用いて、オルセイン染色法(1)~(8)の操作の後に3個の鉄の証明法であるプレシアン青染色法 (Luna, 1960) を行なった。この結果、細胞質は均一に青色に染まり、鉄が細胞質に吸着したことを証明した。

しかしながらオルセイン染色液に20分以上入れると細胞質もわずかながら染まり始める。このことは大分子の物質は細胞組織への吸着性が強いので小分子の物質を追い出してしまうためと考えられる。

また、硫酸第二鉄アンモニウム液には1分位が良い、この理由は3個の鉄はヒドロキシル基を基質に移すことによって酸化剤として働くために、パラフィン切片が酸化されアルデヒド基を生じ、PAS 陽性物質がオルセイン色素によって染まることになる。



なお、剖検材料に比べ生検材料では細胞質がHBs抗原染色液によって少し染まることがある。この理由は生検材料には多くのグリコーゲンがあり、酸化によりCHO基を生じるためにHBs抗原染色液と反応すると考えられる。

レゾルシン・フクシン染色法の増感液はオルセイン染色法に使用した硫酸第二鉄アンモニウムを使用すると細胞質が少し黒っぽく染まる。硝酸ウラニルを使用すると細胞質は染まらずコントラストのよい

Table 1. Reaction of HBs Ag staining dyes with functional groups

Reagent name	Functional group	Or	Rf	Af	At	Vb
Ethylmercaptan	SH group	+	+	+	+	+
Oxide ethyl mercaptan	SS group	+	+	+	+	+
Benzensulfonic acid	SO ₃ H group	+	+	+	+	+
Formaldehyde	CHO group	+	+	-	-	+
Acetone	CO group	+	+	+	+	-
Acetic acid	COOH group	-	-	-	-	-
Aniline	NH group	-	-	-	-	-
Distilled water		-	-	-	-	-

+ : positive - : negative

Or : Orcein solution

Rf : Resorsin fuchsin solution

Af : Aldehyde fuchsin solution

At : Aldehyde thionin solution

Vb : Victoria blue solution

標本が得られる。この理由はレゾルシン・フクシン液に1~3時間入れるためにレゾルシン・フクシンの大分子の物質は鉄原子の小さな分子の物質を追いついてしまうためである。ゆえに鉄原子(原子量55.8)をもつ硫酸第二鉄アンモニウムよりウラン原子(原子量238)をもつ硝酸ウラニルを使用した方が長時間の染色に適すると考えられる。

レゾルシン・フクシン染色法における増感液の意義はオルセイン染色法における増感液の意義と同様と考えられる。

硝酸ウラニル液に1分以上入れるとHBs抗原の染まりが悪くなるので20~30秒くらいがよい。

オルセイン色素はメーカーやロット番号で染色性にかかなりの差があり常時安定した結果を得ることが難しい。この理由はオルセイン色素が α -Amino-orcein, β -Amino-orcein, γ -Amino-orcein, α -Hydroxy-orcein, β -Hydroxy-orcein, γ -Hydroxy-orcein, β -Amino-orceimin, γ -Amino-orceimin, 等の混合により構成されている(Windholz, 1976)ためと考えられる。特に細胞質が共染するのは、このなかで分子量の小さい α -Amino-orcein, と β -Hydroxy-orcein を多く含むメーカーやロット番号のものと考えられる。

オルセイン色素は購入後すぐ使用すると染色性が悪い場合がある。しかし約1年間経るとよく染まるようになる。

オルセイン染色液に入れる塩酸の量は従来は1mlであったが1.2mlにした方が染色性がよい。また染まり過ぎる場合は更に0.2ml塩酸を加えるとよい。

レゾルシン・フクシン液に使用する塩基性フクシンはダイヤモンドフクシン(メルク社:現在製造中止), フクシン(メルク社)などがよい結果を得た。

レゾルシン・フクシン染色の後に核をケルンエヒトロートで染める。このままでもHBs抗原は見えるが細胞質を飽和ピクリン酸で黄色に対比染色を行うと見やすい。対比染色を行うためには細胞質にケルンエヒトロートがやや薄く共染するために1%塩酸アルコールで細胞質を分別の後に対比染色を行うと美しい標本が得られる。

HBs抗原染色液は幾つかの官能基と結合できるのではないかと考えたので、官能基をもつ薬品を試

験官に10mlずつ5本に入れオルセイン染色液, アルデヒド・フクシン染色液, アルデヒド・チオニン染色液, ビクトリア青染色液, レゾルシン・フクシン染色液を各0.2mlずつ加えて混ぜて, スライドグラスにこれらの染色液を1滴のせてカバーグラスをかけた顕微鏡で観察を行った。対照は薬品の代わりに蒸留水を用いて同様に行った。官能基とHBs抗原染色液が反応しているかどうかは凝集を起こすもの

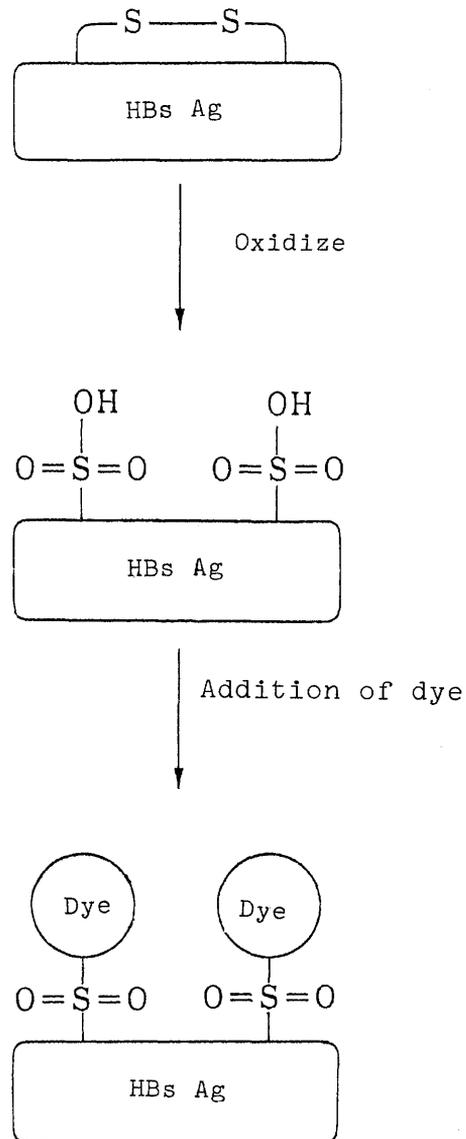


Fig. 2. Mechanism of HBs Ag staining method.

を陽性と判定した。結果は Table 1. のごとくである。

Table 1. より、これら HBs 抗原染色可能色素は SH基, SS基, SO₃H 基に反応を起こすことが分る。ちなみに HBs 抗原における SS 基を有するシステインはポリオウィルス, ヘルペスウィルスに比べて多い (Dressman, et al, 1972)。Table 1. の結果により色素による HBs 抗原染色ではシステイン酸を酸化することによってスルホン酸となし、このスルホン酸が色素と反応を起こすと考えられる (Fig. 2)。

SH基および SS基に HBs 抗原染色可能色素が反応を起こすならば、パラフィン切片を酸化する必要はないと考えられる。しかしながら酸化なしで HBs 抗原は染色されない。この理由は HBs 抗原染色液を 60 °C に温めて染色を行うと HBs 抗原は酸化なしに染色されることから組織中の SH 基や SS 基は反応を起こすのに高い温度が必要と思われる。しかし SH 基や SS 基を酸化してスルホン基に変えることにより室温で容易に染色されるようになる。

胆汁色素がオルセイン染色液, レゾルシン・フクシン染色液, アルデヒド・フクシン染色液, アルデヒド・フクシン染色液, アルデヒド・チオニン染色液で染色される。しかしビクトリア青染色液のみでは染色されない。この理由は胆汁色素のなかには CO 基が存在するために、CO 基と反応を起こす HBs 抗原染色液は胆汁を染める。しかしビクトリア青染色液のみは CO 基と反応を起こさないために胆汁を染めないと考えられる。

オルセイン染色はトリプトファンを染めるという説 (志方ら, 1975) があるためにトリプトファンのインドール基などを証明する テトラゾニウム 反応 (山田, 1975) を HBs 抗原陽性のパラフィン切片を用いて行い、同じ切片のオルセイン染色と比較を行った。この結果 テトラゾニウム 反応陽性部分と HBs 抗原陽性部分との一致は見られなかった。

ま と め

従来のオルセイン法では肝細胞の細胞質が共染して、退行変性や壊死に陥った細胞が染め出され HBs

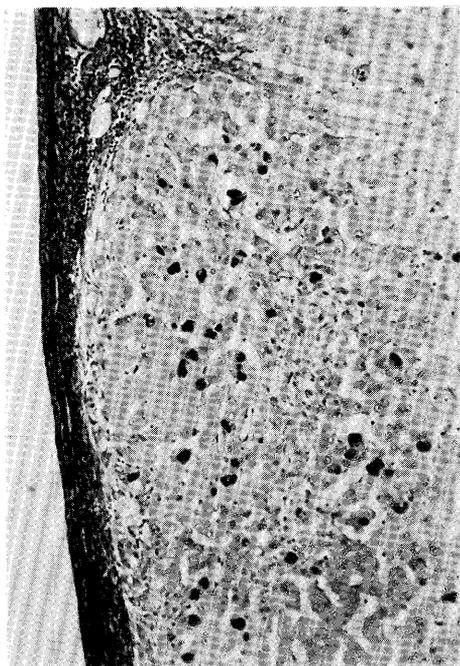


Photo. 1. Well recognized inclusion type of HBs Ag in liver clls. (Modified orcein method X 100)

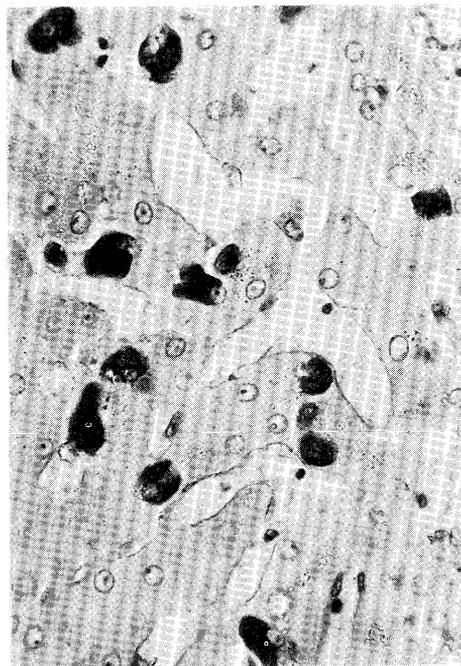


Photo. 2. Higher magnification of Photo. 1. (Modified orcein method X400)

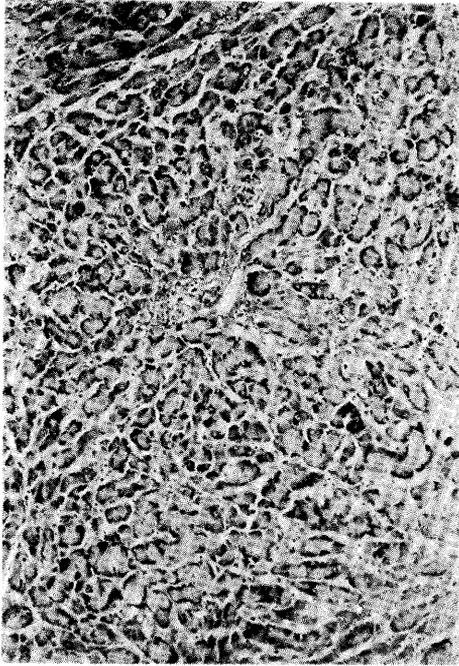


Photo. 3. HBs Ag in peripheral areas of the hepatocytes.
(Modified orcein method X100)

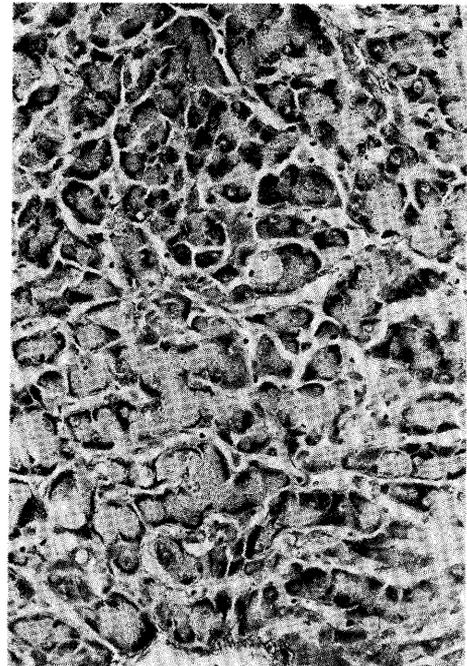


Photo. 4. Higher magnification of Photo. 3
(Modified orcein method X200)

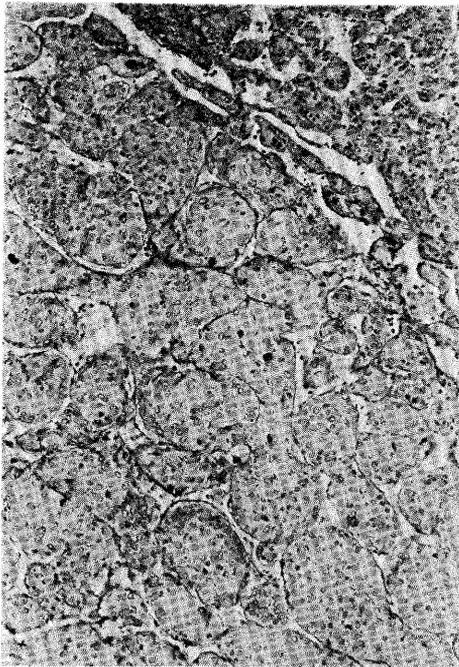


Photo. 5. Inclusion type of HBs Ag localized in hepatocellular carcinoma.
(Modified orcein method X 100)

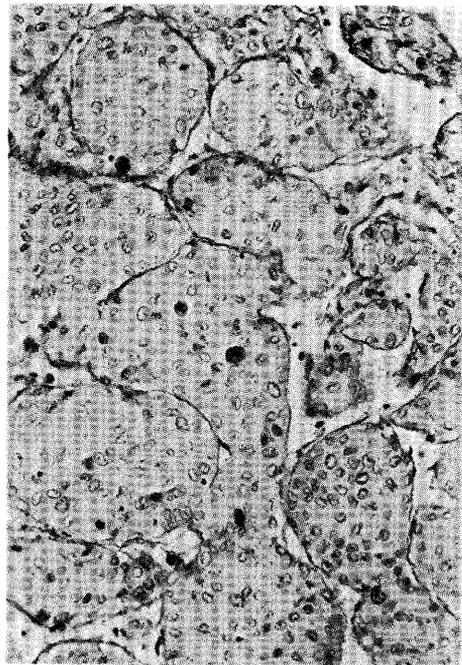


Photo. 6. Higher magnification of Photo. 5.
(Modified orcein method X200)

抗原の判定が困難な場合があった。また細胞質が共染した場合、非常にうすく染まる HBs 抗原の検出が困難であった。しかし増感液を加えることにより、この様な欠点がなくなり常にコントラストの良い標本が得られる様になった。

オルセイン染色法における増感液の意義は共染を防ぐことにある。従来の方法では蛋白の立体的な間隙の中にオルセイン色素が入るために肝細胞が共染していたのでオルセイン染色液に入れる前に硫酸第二鉄アンモニウムまたは硝酸ウラニルに入れると、蛋白の立体的な間隙の中に Fe原子や U原子が入るためにオルセイン色素が入る間隙がない。したがっ

て細胞質はオルセイン色素によって共染しないと考えられる。

レゾルシン・フクシン染色液でも HBs 抗原をコントラストよく染め出すことができるようになった。この方法は、パラフィン切片を酸化し、増感液に入れ、細胞質をピクリン酸で黄色に染めることによってオルセイン染色法とほぼ同様の結果が得られるようになった。この増感液の意義はオルセイン染色法と同様と考えている。

全ての色素による HBs 抗原染色法では SH基、SS基を酸化してスルホン基となし、このスルホン基と色素とを反応させていると考えられる。

文 献

- 1) Basolo, F. & Pearson, R. G. (1971): 無機反応機構。溶液内における金属錯体。466, 東京化学同人, 東京。
- 2) Dressman, J. R., Hollinger, F. B., Suriano, J. R., Fujioka, R. S., Brunschwing, J. P. & Melnick, J. L. (1972): Biophysical and biochemical heterogeneity of purified hepatitis B antigen. *J. Virol.*, 10(3), 469-476.
- 3) Luna, L. G. (Editor), (1960): *Manual of histologic staining method*. 3rd ed., 179-180, McGraw-Hill, New York.
- 4) 千馬正敬, 板倉英世 (1979): オルセインによる HBs 抗原染色の改良法。肝臓, 20(6), 623.
- 5) 志方俊夫, 鶴沢輝子, 吉原なみ子, 赤塚俊隆 (1973): オーストラリア抗原の染色性に関する研究 (第1報)。肝臓, 14(8), 425-431.
- 6) Shikata, T., Uzawa, T., Yoshizawa, N., Akatsuka, T., & Yamazaki, S. (1974): Staining method of australia antigen in parafin section. *J. Exp. Med.*, 44(1), 25-36.
- 7) 志方俊夫, 鶴沢輝子 (1975): パラフィン切片における HBs 抗原の染色法。臨床検査, 19(6), 590-196.
- 8) 田中 薫, 森 亘 (1979): ビクトリア青・ケルンエヒト赤染色による組織内 HBs 抗原の観察。肝臓, 20(3), 306.
- 9) Windholz, M. (Editor), (1976): *The merck index*. 9th ed., 6706, Merck & Co., Inc., U. S. A.
- 10) 山田和順 (1975): 新組織化学。441-442, 朝倉書店, 東京。