

結合組織の鍍銀染色法の改良 : 特に Kaposi's Sarcoma における結合組織線維の染色について

千馬正敬, 板倉英世

長崎大学熱帯医学研究所病理学部門

A Reliable Silver Impregnation Technique in Histologic Sections: Staining of Connective Tissue of Kaposi's Sarcoma.

Masachika SENBA, Hideyo ITAKURA (Department of Pathology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University)

Abstract: Reticulum fiber is generally identified by silver impregnation staining methods which have wide variations. The staining reactions are nonspecific to reticulum fiber and depend upon unknown complex physical and chemical factors, thus capricious results are to be expected. Therefore, the authors tried to modify the silver impregnation method and found that the procedure using an oxidize solution (0.3g potassium permanganate and 0.3ml sulfuric acid were dissolved in 100ml of distilled water) gave stable and satisfactory results. This method has proved superior to others in demonstrating a specific staining for reticulum fiber. Excellent results have been obtained in illustrating connective tissue structure of Kaposi's sarcoma.

Tropical Medicine, 23(4), 189-192, December, 1981

はじめに

鍍銀染色法は今日まで多くの改良法(Luna., 1960)が行われてきた。これまで日常、染色室にて行われている染色法の中では他の染色法に比べて一般に難しく、技術者の習熟以外によい結果を得ることはできないように思われていた。鍍銀染色の欠点は、細網線維以外に網内系細胞や線維細胞の細胞質や核が銀粒子で染まること、染色操作中パラフィン切片が容易に剝離してしまうことなどであった。本法は上記の3つの欠点を改良するために開発した方法である。また、従来鍍銀染色を行うためにはその都度7 μ 前後の厚さのパラフィン切片が必要であった。しかし、本法では細網線維のみが特異的に染色されるために日常の染色に用いられる4 μ 前後の厚さの

パラフィン切片で細網線維の細い構築まで観察することができる。なお、本法は技術的にも簡易であり、しかも安定で満足な結果を得ることができる。

材 料

東アフリカ・ケニア国の剖検例および生検例のKaposi肉腫を使用した。

方法と結果

- (1) 脱パラフィン
- (2) 水洗
- (3) 酸化液 2~3分
酸化液: 0.3%過マンガン酸カリウム・0.6%塩酸 (または0.3%硫酸) 等量混合液

- (4) 水洗
- (5) 還元液 (脱色) 1分 (切片が白くなればよい)
還元液: 2%シュウ酸液
- (6) 水洗
- (7) 硬膜液 1分
硬膜液: 2%硫酸第二鉄アンモニウム液 (または1%硝酸ウラニル)
- (8) 蒸留水洗
- (9) アンモニア銀液 5分
アンモニア銀液: 10%硝酸銀液20mlに、水酸化ナトリウム 0.4gを加える。黒褐色の沈澱ができる。よく振盪しながらアンモニア水を滴下し、完全に透明になる直前で止める。蒸留水を加えて全量を100mgとし、これを原液として冷暗所に保存する。使用に際しては原液を5倍に希釈する。原液は密栓して冷暗所におけば1ヶ月は充分に使用できる。
- (10) 蒸留水洗 30秒
- (11) 95%アルコール 1秒
- (12) 現像液 1分
現像液: 5%ホルマリン
- (13) 水洗
- (14) 塩化金酸液 5分
塩化金酸液: 0.5%塩化金酸液
- (15) 水洗
- (16) 色出し液 3分
色出し液: 2%シュウ酸液
- (17) 水洗
- (18) 定着液 5分
定着液: 10%チオ硫酸ナトリウム液
- (19) 洗滌液 1分
洗滌液: 0.2%酢酸水
- (20) 水洗
- (21) ケルンエヒトロートで核染色 5分
ケルンエヒトロート液: 5%硫酸アルミニウム水溶液 100mlを温め、これにケルンエヒトロート 0.1gを溶解させ、冷却の後に濾過する。
- (22) 水洗
- (23) 脱水、透徹、封入

結果

細網線維: 黒色
膠原線維: 赤色
核: 赤色
細胞質: 桃色

考 察

Kaposi肉腫の組織中にはしばしば鉄沈着があり、従来の細網線維染色法では、それらのものが共染し、結合組織の構築がわかりにくかった。

著者らは鍍銀染色法において従来酸化剤として使用されてきた過マンガン酸カリウム液に塩酸または硫酸を加えることにより細胞質に付着する銀粒子を取り除くことができるようになった。このためにKaposi's肉腫の結合組織の構築の観察が容易となった。

過マンガン酸カリウム・塩酸 (または硫酸) 混合液での酸化時間は一般に2~3分ぐらいがよく、酸化時間が2分より短くなるにしたがって細胞質が黒っぽく染まり、酸化時間が3分より長くなるにしたがって細胞質は透明となるが剥離しやすくなる。

硝酸銀とアンモニア水を混合すると黒色の雷酸銀C: NOAgが沈殿する。この沈殿物に衝撃を与えると爆発する (実験化学便覧編集委員会編, 1954)。したがって一度使用した液を翌日に用いるのは危険である。公害防止のために、この液を溜める時はチオ硫酸ナトリウム液を加えると雷酸銀は生成されないので安全である。

従来の鍍銀染色法ではチオ硫酸ナトリウム液の後の水洗でパラフィン切片が剥離しやすかった (金子, 1971; 高浜ら, 1972)。しかし、チオ硫酸ナトリウム液の後に酢酸水でパラフィン切片を洗うことにより、パラフィン切片が剥離し難くなった。酢酸水を使用すると20%チオ硫酸ナトリウム液を用いてもパラフィン切片は剥離しない。この液の後に水洗を行ってもパラフィン切片は剥離することはない。このために、チオ硫酸ナトリウム液の濃度を上げ、時間を長く行うことにより核をよく染めることができるようになった。



Fig. 1 Cutaneous type of Kaposi's sarcoma of the foot.

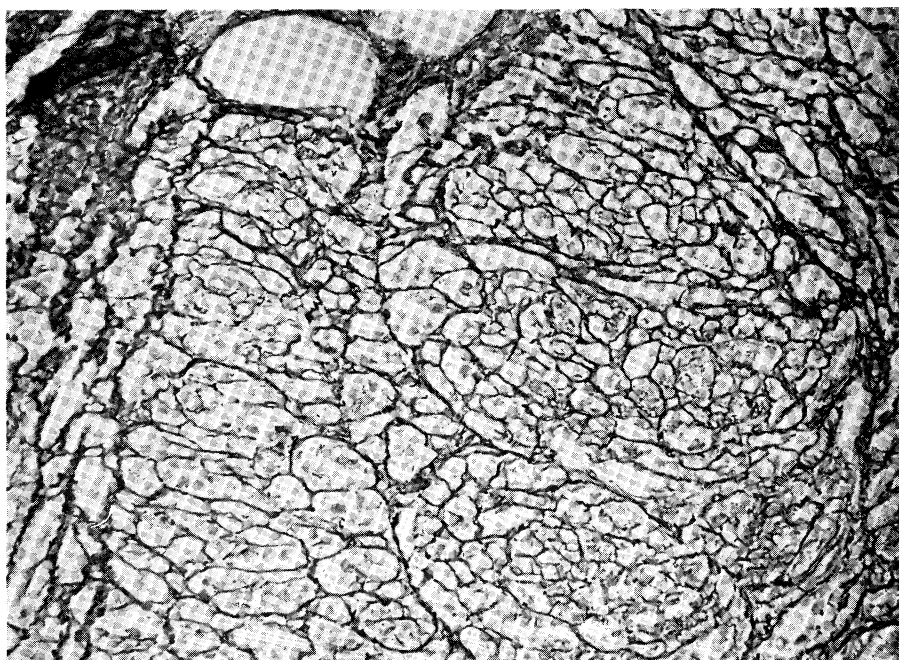


Fig. 2 Well-recognized reticulum fibers of typical Kaposi's sarcoma. (Original magnification $\times 200$).

謝 辞

稿を終るにあたり有益な助言を賜った長崎大学医学部附属原爆後障害医療研究施設異常代謝部門
小池正彦教授 および 長崎大学医学部附属原爆後障害医療研究施設放射線生物物理学部門 奥村 寛
助教授に深く感謝する。

文 献

- 1) 実験化学便覧編集委員会編 (1954) : 実験化学便覧 (新版) , 604, 共立出版, 東京.
- 2) 金子 仁 (1971) : 組織標本, 49-52, 医学書院, 東京.
- 3) Luna, L. G. (Editor) (1960): Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed., 87-93, McGraw-Hill book Co., New York.
- 4) 高浜素秀, 三友善夫, 高山昇二郎 (1972) : 臨床検査講座, 病理学. 217-218, 医歯薬出版, 東京.