

# メチルグリーン・ピロニン染色法 における脱水法の比較

東京女子医科大学第二解剖学教室 (主任 飯沼守夫教授)

八十田敏男・藤沢伸好  
ヤソダ トシオ フジサワ ノブヨシ

(受付 昭和 34 年 10 月 8 日)

## 緒 言

Unna-Pappenheim のメチルグリーン・ピロニン染色は、Brachet がリボヌクレアーゼによるリボ核酸の除去法を併用することを提唱するにおよんで今日好んで組織化学的核酸検出のために用いられるようになった。しかしこの染色法の最大の欠点は、染色成績がしばしば不定となることである。この欠点を除くために純度の高い試薬を用いることはもちろん必要であるが、柴谷<sup>6)</sup>は両色素の適当な混合比が重要な条件であることを報告した。また染色のおこなわれる条件が、細胞構成要素に対する両色素の選択的染色性にいかに影響するものであるかについて、Lison<sup>1)</sup>は Gerola et Vannini による次の実験を示した。すなわち、Unna の古い処方<sup>2)</sup>の代りに色素をこれと同じ濃度 (Methylgreen 0.15%・Pyronin 0.25%) にして色素溶液の pH を低い値 pH 1.5 から高い値 pH 11.5 までいろいろに変えてみると、すべての細胞構成要素は、ピロニンのみに親和性を有する場合から、メチルグリーンに対する親和性が次第に増加し、どんな固定液で組織を固定しても pH をいろいろ変えればリボ核酸はよく染色されるという。染色をおこなうにあたって組織の種類と、使用した固定液とにより染色性は多少変化するものであり、この点を考慮せねばならないことはもちろんであるが、同時に使用する色素の純度とさらに両色素の混合比を常に一定となるよう心がける必要がある。この染色法のより重要な問題は染色後の分別脱水操作にある。指定された処方通りの色素液を用いても、必ずしも染色成績が常に同一であ

るとは断言できない。従来のアルコールによる脱水法を安易に使用することはこの染色法の場合適当と思えない。染色成績を不定とする要素の大部分が分別脱水にあり、この欠点を除くために多くの研究者<sup>2) 3) 9) 10)</sup>がそれぞれ独自の脱水法を提案している。実際にあたつていずれの方法を用うべきか大いに困惑するところである。そこで筆者らは、多くの分別脱水法について得た所見を比較検討すると共に、用いられた各試薬および新たに入手した 2, 3 の試薬に対するメチルグリーンおよびピロニン両色素の溶解度について検索し、容易に一定の染色効果をあげることのできる方法を見出したので報告する。なお使用した固定液によつて生ずる染色の差異についても考察した。

## 材料および方法

マウスの諸臓器を用い、固定液としては、純アルコール、10%ホルマリン、およびツェンケルホルマリン液を使用した。パラフィン包埋の組織は 5 $\mu$  の切片とし、上記の 3 種の固定法をおこなつた同一組織の切片は同一のスライドにそれぞれを貼付し、染色、分別脱水、およびその条件ができるだけ同一になるよう企てた。混合色素液の調製は、柴谷<sup>7)</sup>の提案する精製試薬を用い、常に新調したものを実験の用に供した。染色条件は液温 16°C、染色時間 10~40 分とし、分別脱水完了後はいずれの場合もトルオールにて透明にし、ダマール樹脂で封入し検鏡した。染色後は(6)の方法を除き、直ちに溜水で迅速に水洗し、附着する水分を濾紙でできるだけ除去し、下記のそれぞれの脱水法をおこなつた。

1) 低濃度より無水に至る、エチルアルコールを通す一般的な分別脱水法。この際はできるだけ手早く操作

する。

- 2) 水洗後直ちに無水エチルアルコール中に投入し、5秒づつ2回無水アルコールを通す間に脱水させる方法。
- 3) Taft,<sup>10)</sup> による第3級ブチルアルコール3容と無水エチルアルコール1容との混合液中に2分間浸漬する方法。
- 4) Stein et Gerarde<sup>9)</sup> の提案する第3級ブチルアルコール中で長時間(1~24時間)脱水させる方法。
- 5) Rosa,<sup>3)</sup> のトリエチル燐酸とトルオールの等分混合液中で5分間分別脱水をおこなう方法。
- 6) 染色後の水洗をはぶき、染色液を軽く濾紙で除き、直ちにイソプロピルアルコール、またはイソブチルアルコール中に投入し、数秒乃至10秒間で切片およびスライドガラスに附着する余分の色素液を洗い落とし、次いで、Rosaの混合液中に5分以上浸漬し、充分に脱水を完了させる。

以上の諸法による分別脱水を試みたものについて、染色効果を比較した。またメチルグリンおよびピロニン両色素の、水、エチル、ノルマルプロピル、イソプロピル、ノルマルブチル、イソブチル、第2級および第3級ブチルの各アルコール、チクロヘキサノール、メチルチクロヘキサノールおよびトリエチル燐酸などに対する溶解度を比較し、分別脱水中に両色素が組織外に溶出する程度を知るための参考とした。

### 自家所見および考察

組織化学では、切片上にあらわれる染色性の差異を見出すことが重要である。分別脱水に使用される溶液は組織上に非特異的に附着する色素のみを洗い落すものでなければならない。弱い化学的結合をおこなっている色素が切片から溶出されてしまうならば、この方法による核酸の組織化学は重大な誤りを提起することになる。しばしば認められる不定の染色成績の原因は、ここにある。分別脱水に用いられる各種の溶媒に対する、メチルグリン、ピロニン両色素の溶解度を比較すると、前者は溜水およびエチルアルコールに対して著しくよく溶ける、特に水に著しい。プロピルアルコールの各種にも溶解着色を示すが、水およびエチルアルコールよりは遙かに弱い。ブチルアルコールの溶解着色はさらに弱く、チクロヘキサノール、メチルチクロヘキサノール、およびトリエチル燐酸には殆んど溶解しない。ピロニンもメチルグリンと同様の順序で溶解性を減ずるが、メチルグリンよりもやや溶解が大であり着色の度が強い。すなわち、関<sup>4)</sup>のいうごとく、ピロニンはメチルグ

リンよりよく溶け、かつ両色素とも極性の強い溶媒ほど溶解度が大であることを示している。以上は色素そのものの溶解度であり、これが組織切片上に染着した色素について同じ関係にあると速断することはできないにしても、非特異的に着染した色素については上記の結果をあてはめても不都合でないと考える。

実際に染色後の水洗およびアルコール脱水の経過中に多量の色素が組織切片上より脱出することをしばしば経験する。すなわち、(1)の方法による分別脱水では、殆んど核小体からピロニンは褪色し、核形質に対するメチルグリンも僅かに痕跡をとどめるにすぎない場合が多い。(2)の方法は同じく、エチルアルコールを用いたものであるが、この程度の脱水時間では充分に脱水を完了させることができない。したがって直ちに検鏡の用に供するだけの場合には用が足りるが、長い保存にはとうてい耐えられない。(3)の方法では、両色素とも前法に比較して良好に保存され、肝細胞の赤染された核小体はその辺縁を濃染のメチルグリン色素にとりまかれて、美しい染め分けが認められる。しかし、(4)の場合ほどピロニン染色性はよくない。(4)の第3級ブチルアルコールは、25°Cの高い融点のため冬期の使用には不便であり、脱水時間が長いことも欠点である。(5)の方法によれば、染色標本の色素の着色三ヶ月後においても変わらないし、染色効果も前記のいずれの場合におけるより良好である。この方法によれば、脱水中に組織切片上より色素の溶出を殆んどみないので、染色直後の溜水洗滌にのみ意を用いれば、充分な結果が得られるものと考えられる。固定液による染色性の差異としては、10%ホルマリン固定の場合には、両色素ともに良好に着染し、均衡のとれた染め分けをみせ、組織の固定もすぐれている。メチルグリンの染色性は、アルコール固定の場合によく、ツェンケルホルマリン固定のものでは低下する。ピロニンの染色性は、いずれの固定液によるも大差ない。染色時間は各組織により異なるが、20分乃至25分が最もよい。上記の結果より、メチルグリン・ピロニン染色の際に使用する脱水剤は、極性の強い液体の場合ほど組織に対する染色性を弱め、脱水操作中に褪色または不染という結果をひきおこす危険がある。柴谷<sup>5) 8)</sup>によれば、ピロニンとリボ核酸との化学的結合は弱く、染色

によつて生じた次のような反応が逆行して組織切片から色素が溶媒中にとけ出し、うしなわれてしまうものであるという。

色素・Cl+蛋白・核酸 $\rightleftharpoons$ 色素・核酸+蛋白・Cl  
このことから染色後における脱水には、溶解作用の強大な脱水剤を用いることを避けなければならない。染色成績を不定にする原因として、試葉の純度および色素の混合比の問題をのぞけば、実際に染色操作をおこなう場合に、もつとも注意すべき事柄は染色後の水洗および分別脱水操作である。染色直後の水洗については、いずれの方法においても極めて短時間におこなうよう指示してある。溜水は、両色素に対して著しい溶解作用を示し、組織切片において弱い化学的結合をおこなっている色素までも溶出せしめる最高の溶媒とみられるからである。筆者らは、色素の溶解試験および実際の染色効果の比較にもとづいて、染色後の水洗をおこなわず、直ちにイソプロピルアルコール、またはブチルアルコールに投入し、その後トリエチル燐酸とトルオールの等分混合液中で脱水を十分に完了させる(6)の方法により、溜水水洗に意を用いなくとも簡単に一定の染色効果が得られることを知つた。この方法によれば染色結果のすぐれることはもちろん、両色素の染色効果を長く保存することができる。

核酸の染め分けに常用するメチルグリン・ピロニン染色は、リボヌクレアーゼによるリボ核酸(RNA)の選択的除去法を併用して、RNAを決定することに意義があり、デスオキシリボヌクレアーゼによるデスオキシリボ核酸(DNA)の決定法は、Lison<sup>1)</sup>によると、その作用が余りにも複雑で正確を期し得ないから、他の正確な Feulgen 反応によるべきであるという。すなわち、DNAを単独に検索する場合には、メチルグリン・ピロニン染色は適当でない。しかし、RNAとD

NAを同一切片上に同時に検出するためには最も便利な方法である。

色素の純度について柴谷<sup>7)</sup>は、低分子核酸染色のためのピロニン精製法を考案し、これにより市販のピロニンガ核酸以外に細胞ゼンたいを一様に赤く染めだす性質を除き、低分子核酸(主にRNA)を選択的に染色することができると報告した。市販のメチルグリンには、必ずメチルバイオレットが混在するので、これはクロロホルムで精製しなければならない。

## 結 語

Unna・Pappenheim メチルグリン・ピロニン染色の欠点とされる、染色成績の不定は、精製した色素とその混合比の問題を除けば、分別脱水に多くの原因がある。これは筆者らの方法により充分に避けることができる。しかもこの方法によれば、同時に多数の切片を一定した染色結果に上げることができる。また標本は長期の保存に耐える。

## 文 献

- 1) 今泉 正: Lison 組織化学および細胞化学 理論と方法 白水社 東京 昭 29 251 頁
- 2) 岡本耕造・上田政雄・前田隆英: 顕微鏡的組織化学 第1版 医学書院 東京 昭 30 147 頁
- 3) Rosa, C.G.: Stain Techn. 25 165 (1950)
- 4) 関 正次: 組織検査法と物化学 第2版 杏林書院 東京 昭 29 106 頁
- 5) 柴谷篤弘: 医学と生物学 13 297 (1948)
- 6) 柴谷篤弘: 医学と生物学 14 357 (1949)
- 7) 柴谷篤弘: 科学 19 519 (1949)
- 8) 柴谷篤弘: 江上不二夫編 核酸及核蛋白質 共立出版社 東京 昭 26 下巻 39 頁
- 9) Stein, R.J. & Gerarde, H.W.: Science, 111 256 (1950)
- 10) Taft, E.B.: Stain Techn. 26 205 (1951)