



マイクロウェーブ照射による染色法の改良 : 3. グロ コット染色

田中, 路子
奥野, 万里子
渡邊, 信

(Citation)

神戸大学医学部保健学科紀要, 10:91-98

(Issue Date)

1994-12-28

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/00188124>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00188124>



マイクロウェーブ照射による染色法の改良

3. グロコット染色

田中路子¹, 奥野万里子², 渡邊 信¹

緒 言

グロコット染色は, 真菌を染め出すのに最適な方法として広く利用されており, 放線菌やノカルジア等の染まりにくいとされる菌にも優れた染色性を示す¹⁻⁵⁾。近年, 検査法の迅速化が試みられ, 真菌染色においても種々の迅速化が報告されている⁶⁻¹²⁾。

そこで, 今回我々はマイクロウェーブ (MW) 照射を用いてグロコット染色法の時間短縮を試み, 良好な結果を得たので報告する。

材料と方法

1. 材 料

ホルマリン固定・パラフィン包埋したカンジダ症の腎臓を 3 μm に薄切して使用した。MW 照射には日立電子レンジ MR-A330, 周波数 2450MHz, 高周波出力 500W, 加熱室有効寸法: 幅 270mm × 奥行き 284mm × 高さ 173mm, ターンテーブル直径 260mm を使用した。照射時, 染色バットは蓋をしてターンテーブルの中央におき, 500W で照射した。また, 熱吸収用水を用いる場合は, ビーカーに入れ染色バットの横に置いた¹³⁾。

2. 染色液

原法¹⁴⁾に準じて調合した。メセナミン銀液は, 3%メセナミン水溶液 100ml に 5%硝酸銀水溶液 5ml を加えメセナミン銀原液とし, 使用時蒸留水 25ml に, メセナミン銀原液 25ml と 5%ホウ砂水溶液 2ml を混合した。

3. 染色方法

現在広く用いられている方法¹⁻⁵⁾に準じて行った。(図1)

4. MW照射による酸化法の検討

図1の染色法の手順の中の2. の5%無水クロム酸水溶液 (クロム酸) に室温で1時間処理

1. 脱パラフィン, 水洗, 蒸留水水洗
2. 5%無水クロム酸水溶液 (酸化) 1時間
3. 軽く流水水洗
4. 1%重亜硫酸ナトリウム水溶液 1分
5. 流水水洗, 蒸留水水洗
6. メセナミン銀液 (鍍銀)

45~60℃, 30~60分

銀液はあらかじめ45℃に加温しておく。

過染に注意し染め上がりは顕微鏡下で確認する。

7. 蒸留水水洗 2~3回
8. 0.1%塩化金水溶液 5分
9. 蒸留水水洗 2回
10. 2%チオ硫酸ナトリウム水溶液 2分
11. 流水水洗
12. ライトグリーン (後染色)
13. 脱水, 透徹, 封入

図1 グロコット染色法

1. 神戸大学医学部保健学科
Faculty of Health Science, Kobe University School of Medicine
2. 神戸大学医学部附属病院病理部
Department of Pathology, Kobe University Hospital

(酸化)する所を、次のようにMW照射を用いて行った。その後の操作は、従来通りに行った。また、今回使用した横型耐熱バットは、切片が最大10枚入るものであり、同一染色バット中の染色液に温度差が生じた場合、それが酸化力に影響するかどうかを観察するために同時に切片を8枚入れてMW照射を行った。染色バットの両端は、温度計を挿入するために空けた。

1) 酸化温度の設定

クロム酸による酸化は、原法では室温で行っている。Kokら⁹⁾およびChurukianら¹⁰⁾の方法を参考にして、今回の検討では酸化温度は60℃に設定した。

2) MW酸化法の設定

a. MW酸化法1

染色バットにクロム酸100mlと切片8枚を入れMW照射を40秒行い、液温を約60℃にした(図2)。

b. MW酸化法2

染色バットにクロム酸100mlと切片8枚を入れ、その横に熱吸収用水300mlをビーカーに入れて置き、MW照射を90秒行い液温を約60℃にした(図3)。

MW酸化法1および2の検討の結果、MW酸化法2が良好であったので、以下の検討はMW酸化法2で行った。(結果参照)

5. MW照射による鍍銀法の検討

MW酸化法2の方法で酸化を行った後、次のようにMW照射を用いて鍍銀を行った。その後の操作は従来通りに行った。

1) 鍍銀温度の設定

鍍銀温度は原法によると45~50℃であり、現在では40~60℃とする方法¹⁾、45~60℃とする方法^{1, 2)}、58~60℃とする方法^{3, 5)}がある。また、迅速法では80℃以上で行われている^{6, 9, 10, 12)}。そこで、メセナミン銀液(銀液)を60℃以上に加温するとどうなるかを調べるために、横型耐熱バットに銀液100mlを入れ、熱吸収用水は用いずにMW照射を行い、液温60℃~80℃で検討した。その結果、60℃が最適であったので、以下の検討は60℃で行った。

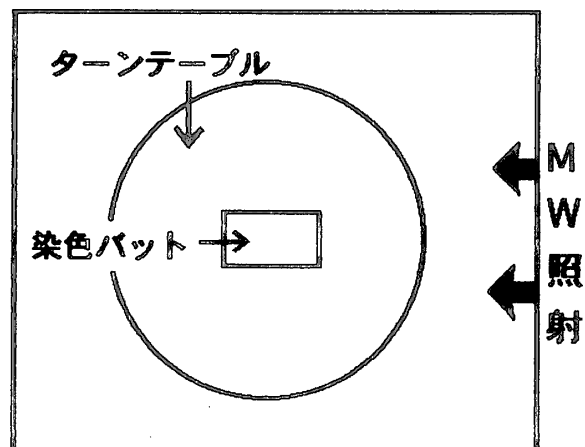


図2 染色バットのみの場合のMW照射方法。庫内を真上から見た図。

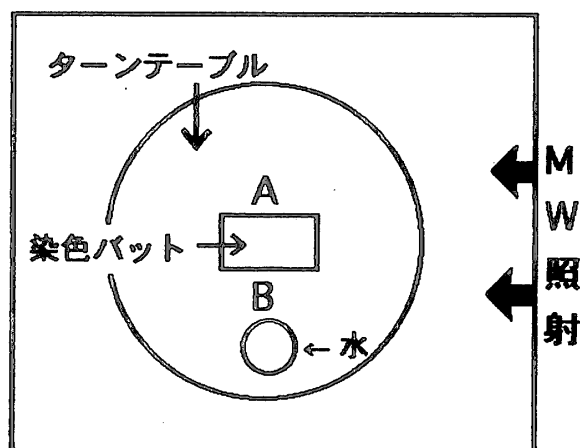


図3 熱吸収用水を用いた場合のMW照射方法。庫内を真上から見た図

(結果参照)

2) MW鍍銀法1

染色バットに銀液100mlと切片8枚を入れ、ターンテーブルの中央に置き、その横に300mlの水をビーカーに入れてならべ、MW照射を90秒行い液温を約60℃に上昇させた(図3)。MW照射後、組織全体が黄褐色調を呈し真菌が茶褐色になるまで室温放置した。染め上がりは鏡検して確認した。

3) MW鍍銀法2

MW鍍銀法1と同じく銀液と水をターンテー

ブルに並べ（図3）MW照射を最初50秒行い、その後染色バットの向きを180度回転させて変え、さらに20秒照射した。再び、染色バットの向きを180度回転させて20秒照射し、この操作をさらにもう1度行いあわせてMW照射を1分50秒行い最終的に液温を60℃近くまで上昇させた。MW照射後、組織全体が黄褐色調を呈し、真菌が茶褐色になるまで室温放置した。

4) MW鍍銀法3

染色カゴ分離式の染色バットを用いて、銀液300mlと切片8枚を入れMW照射を2分10秒行い液温を約60℃まで上昇させた。MW照射後、染色カゴをゆっくりと上下させて液温を均一にし、組織全体が黄褐色調を呈し、真菌が茶褐色になるまで室温放置した。

結 果

1. MW照射による酸化法の検討

1) MW酸化法1

MW照射40秒で液温は約60℃になった。染色バットの両端の温度差が3～5℃生じ、それぞれの液面近く（表層部）と液面低部（深部）の温度差も3～5℃認められた（表1）。染色バットのどちら側の液温が高くなるかは、MW照射毎に異なった。その後、従来通り鍍銀を行った所、60℃のフラン器中で30分間の鍍銀により、結合組織の共染はなく、全行程を従来法で行ったもの（図4）に等しく真菌が明瞭に染め出された。8枚の切片間に染色性の差は認められなかった。また、MW照射後、切片がはがれかけたものが見られた。

2) MW酸化法2

MW照射90秒で液温は約60℃になった。同一染色バット中にMW酸化法1で見られたような温度差が生じた（表2）。この時、水を入れたビーカーに近いB側の液温がA側に較べて低くなった。そして、従来通り鍍銀を行った所、図4に等しく真菌が明瞭に染め出された。8枚の切片間に染色性の差は認められなかった。

2. MW照射による鍍銀法の検討

表1 MW酸化法1による液温変化

	高い側	低い側
表層部	63℃	58℃
深部	58℃	55℃

表2 MW酸化法2による液温変化

	A側	B側
表層部	63℃	57℃
深部	58℃	55℃

表3 MW鍍銀法1による液温変化

	A側	B側
表層部	63℃	57℃
深部	62℃	56℃



図4 従来法で染色したもの。真菌は良好な染色性を示している。

1) 鍍銀温度の設定

MW照射40秒で銀液は約60℃、60秒で約70℃、80秒で約80℃になった。60℃では銀液に変化は起こらなかったが、70～80℃では、MW照射後数秒間で銀粒子が析出し、銀液は黒くなった。従って、60℃が最適と考えた。

2) MW鍍銀法1

MW照射 90 秒により銀液は約 60℃に上昇した。この時、染色バットの両端とそれぞれの表層部と深部で、温度差が生じた（表 3）。しかし、表層部と深部との温度差はMW酸化法 1 および 2 に較べて小さくなった。そして、そのままの状態、切片を室温に放置することにより、切片は温度の高い側から低い側にかけて段階的に着色し始め、最も速いもので 2 分、最も遅いもので 5～6 分で真菌が明瞭に染まった（図 5）。8 枚の切片の染色時間を等しくした場合、放置時間 2 分では、温度の低い側の切片は、図 6 の様に染色性が悪く薄く、放置時間 6 分では温度の高い側の切片は図 7 の様に過染した。また、それぞれの切片において、表層部の着色は深部に較べてやや強くなった。

3) MW 鍍銀法 2

最初の MW 照射 50 秒で、銀液は約 45℃になった。さらに、染色バットの向きを 180 度回転させて MW 照射を 20 秒行うことにより、液温は、約 50℃になった。そして、2 度目の 20 秒照射により液温は約 55℃になり、3 度目の 20 秒照射で 60℃近くなった。最初の 50 秒照射で染色バットの両端に約 2℃、それぞれの表層部と深部に約 1℃の温度差が生じた。染色バットの向きを 180 度回転させて 20 秒ずつ MW 照射することにより、温度差はこれ以上広がらなかった。また、液温が 60℃近くなった時点での温度差は、染色バットの両端および表層部と深部において 0～1℃であった（表 4）。この状態で切片を放置することにより 2～3 分で真菌が図 5 に等しく明瞭に染まった。MW 鍍銀法 1 で見られた 8 枚の切片間での染色性の差や、同一切片内での染色性の差は見られなかった。

4) MW 鍍銀法 3

MW 照射 2 分 10 秒で、銀液は約 60℃になった。MW 照射後、染色カゴをゆっくりと上下させ液温を均一にさせてから室温に放置することにより、1～2 分で真菌が図 5 に等しく明瞭に染まった。切片間の染色性の差や同一切片間での染色性の差は見られなかった。

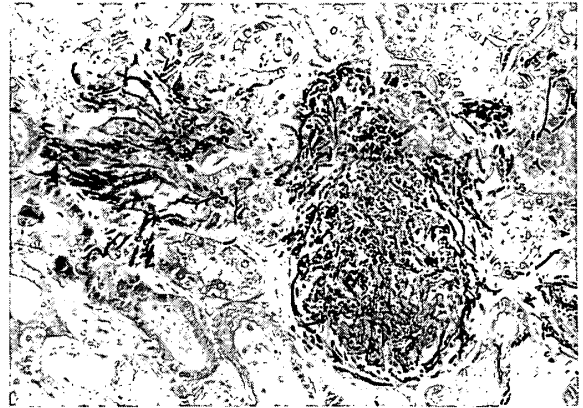


図 5 MW 鍍銀法 1 で良好な染色性を示したもの。図 4 と同様真菌は良好な染色性を示している。



図 6 MW 鍍銀法 1 で 2 分間放置したもの。染色性が悪く真菌の着色は薄い。

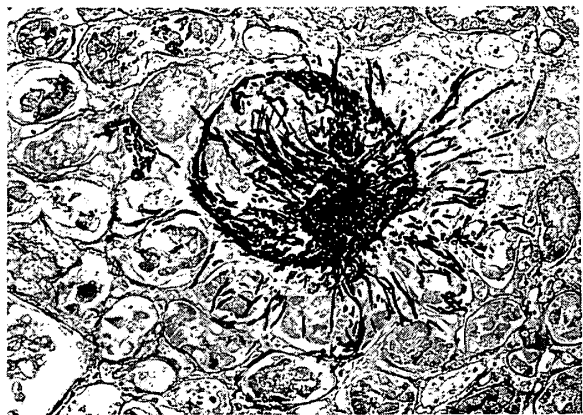


図 7 MW 鍍銀法 1 で 6 分間放置したもの。真菌は過染し、尿細管の基底膜が共染している。

表4 MW鍍銀法2による液温変化

		50秒	180度回転1回目 20秒	180度回転2回目 20秒	180度回転3回目 20秒
A側	表層部	47℃	50℃	55℃	58℃
	深部	46℃	49℃	55℃	58℃
B側	表層部	45℃	51℃	53℃	58℃
	深部	44℃	50℃	52℃	57℃

考 察

グロコット染色は、1955年 Grocott が発表した方法で、Gomori のグリコーゲンとムチンに対するメセナミン銀法を、組織内真菌染色に応用した方法である¹⁴⁾。この染色法は、真菌に含まれる多糖類をクロム酸で酸化させ、生じたアルデヒド基にメセナミン銀を反応させることによる。本染色法は、真菌の大多数および *Pneumocystis carinii* の嚢子を明瞭に染め出すが、染色に要する時間が長いという欠点があり、本法の迅速法が多く試みられている⁶⁻¹²⁾。それらは、電子レンジ⁶⁻⁸⁾、ホットプレート¹⁶⁾、アルコールランプ⁹⁾、ウォーター・バス¹⁰⁾等を用いて染色液の温度を上昇させ、染色時間の短縮をはかっている。ウォーター・バスを用いた方法は、酸化が43-58℃で約10分、鍍銀が43-58℃で約25分と迅速法の中では比較的時間を要している¹¹⁾。また、ホットプレート、アルコールランプを用いた方法は、染色時間は短い、切片を水平に置きその上に液をのせ、切片の下から直接加温するため複数の切片を染める場合は手技がやや煩雑となる^{9, 10)}。そして、染色バットを用いてMW照射を行う方法⁷⁾は、同時に複数の切片を染めることができるが、染色液の表層部から加温されやすく、温度差が生じ均一に染色されにくいという指摘がある⁸⁾。また、組織の染色性が悪く発色に時間をかけた場合、染色バットを用いると、バットの内側に銀鏡反応が生じ発色の程度を確認しにくいと言われている⁹⁾。

そこで、今回我々は染色バットを用いてMW照射を行い、この時生じる染色液の温度差を解消し、同時に複数の切片を均一かつ迅速に染色する方法を検討した。

今回の検討では、先ず最初に酸化時間の短縮を試みた。温度は、現在行われている迅速法^{6, 10)}を参考に60℃に設定し、MW照射時間は溶液100mlで行う場合最も短い時間である40秒と、熱吸収用水300mlを用い90秒に延長させた場合で比較した。その結果、MW照射40秒でも酸化が起こることが確認できた。またこの時、同一染色バット内において温度差が生じたが、それは染色結果には影響しなかった。しかし、MW照射40秒で約60℃に液温を上昇させた場合、切片がはがれかけたものが見られたため、熱吸収用水300mlを用いてMW照射時間を90秒に延長させ、緩やかに温度変化を起こさせる方が良好であると思われた¹⁶⁾。従って、MW鍍銀法の検討では熱吸収用水を300ml用いて酸化及び鍍銀を行った。

MW鍍銀法では、最初に鍍銀温度の設定を行った。現在一般的に行われている方法¹⁻⁵⁾では、原法¹⁴⁾よりも鍍銀温度を高く設定しており、福島は、鍍銀温度が50℃では着色が薄く、60℃の方が真菌の着色が良いとしている⁵⁾。そこで、染色時間の短縮という目的から、60℃以上の温度設定も検討したが、鍍銀温度は60℃が最適であった。次に、MW照射による鍍銀時間の短縮化を試みた^{15, 16)}。MW鍍銀法1は、前川らの方法⁷⁾を参考にしたが、この方法では同一染色

バットの両端において温度差が生じ、温度が高い側から順に鍍銀が進み茶褐色に着色した。また液の表層部と深部にも温度差が生じたため、同一切片内に濃淡が生じた。しかし、MW鍍銀法1で生じた液の表層部と深部との液温差は、MW酸化法1および2で生じた温度差と比較すると小さくなったが、これは液の組成の違いによりMW照射の影響に差が生じたものと思われた。そこで、MW鍍銀法2は、MW鍍銀法1で生じた温度差を無くすために工夫を加えた。MW照射を断続的に行うことにより染色バットの両端および表層部と深部において温度差は殆ど無くなった。これは、染色バットの向きを変えることによりMW照射が均一化されたことと、染色バットの向きを変える操作やその間の時間経過が液温の均一化に働いたのではないかと考えられる。そして、MW鍍銀法3では、染色カゴ分離式の染色バットを使用してMW照射直後に銀液を攪拌し、液温を均一にする方法を試みた。またこれは容量が大きく、銀液300mlを入れることにより熱吸収用水を用いることなくMW照射時間は2分10秒に延長した。この方法では、8枚の切片が同時にMW照射後約1~2分で染まった。

以上のことから、MW鍍銀法2、3の方法でMW照射を行うことにより、同時に複数の切片を均一に染色することができた。また、従来法では、酸化に1時間、鍍銀に約30分要していたが、MWを用いることにより酸化は90秒、鍍銀は5分以内で行うことができ、大幅な時間短縮が行えた。

結 語

1. MW照射によりグロコット染色の時間短縮ができた。
2. 鍍銀温度は約60°Cが適当であった。
3. 染色バットの向きを変えながらMW照射を行うこと、あるいは分離式染色バットを用いることにより、染色バットの中の温度差

が解消され、同一染色バット中の複数の切片が均一に染色された。

謝辞：この研究は神戸大学医療技術短期大学部衛生技術学科の学生諸君の基礎研究に依るところが大きい。ここに彼らの名前を記入し、深甚なる謝意をあらわす。

浅野未来、天野靖子、岡珠代、押条智子、小谷幸代、小林良子、西郷真澄、鈴木朗、高橋さおり、仲治智子、山下祐子、山本裕子、横江朋子

参考文献

1. 阿部美知子、久米光：グロコット染色変法 検査と技術 17：702, 1989
2. 奥平雅彦、久米光、畠山恵子他：病原性真菌の組織学的染色法 Medical technology 14：206, 1986
3. 引野利明、福田利夫：組織内真菌染色法 検査と技術 18：1579, 1990
4. 岩波実、直江史朗：グロコット染色 染色法のすべて、医歯薬出版、1988、.p. 89
5. 福島範子：真菌類の日常染色 病理組織標本作製技術下巻、医歯薬出版、1981、p. 170
6. Kok, L. P., Boon, M. E.: Grocott's Methenamine Silver-Nitrate Method. Microwave Cook Book for Microscopist, Coulomb Press Lyden, 1992, P. 205
7. 前川宣子、今井教嗣、安田正利他：家庭用電子レンジの病理組織検査への応用 第30回近畿臨床検査学会抄録集、1990、P. 157
8. 鳥居良貴、織田みほ、山本格士：染色-マイクロウェーブを用いての各種染色法の検討- 医学検査 41：474, 1992
9. 引野利明、福田利夫、中島孝：迅速グロコット染色法の考案 病理と臨床 7：1557, 1989
10. 吉田幸雄：Pneumocystis carinii 感染症 小児医学 22：1029, 1989
11. Churukian, C. J., Schenk, E. A.: Rapid Grocott's methenamine-silver Nitrate method for Fungi and Pneumocystis

stiscarinii. Am. J. clin. Path. 68 : 427, 1977

12. Smith, J. W., Hughes, W. t.: A rapid staining technique for *Pneumocystis carinii*. J. Clin. Path. 25 : 269, 1972
13. 水平敏和, 村中恒夫, 長谷川博司 : マイクロウェーブ照射による生物試料の固定・染色法の基本とその応用, 学際企画, 1993, P. 28
14. Grocott, R. G.: A stain for fungi in section and smears, Using Gomori's methenamine-silber nitrate technic. Am. J. Clin. Path. 25 : 975, 1955
15. 田中路子, 奥野万里子, 渡邊信 : マイクロウェーブ照射による染色法の改良 1. グルメリウス染色 神大医保健紀要投稿中
16. 田中路子, 奥野万里子, 渡邊信 : マイクロウェーブ照射による染色法の改良 2. LEB染色 神大医保健紀要投稿中

Application of Microwave Irradiation to Staining Process (3). Grocott's Methenamine Silver Method.

Michiko Tanaka¹, Mariko Okuno² and Makoto Watanabe¹

ABSTRACT : Grocott's methenamine silver method is a well-known method to stain fungi. This method takes long, about 3 hours, to complete the process. In this study, the authors applied microwave irradiation (MWI) (500W) to speed it up. Among the staining processes, 2 steps were taken by MWI. First of all, the oxidation by chromic acid with slide inside was heated up to 60°C by MWI. In this step, the heat absorption water (300ml) at MWI was effective to prevent the specimen from detaching from the slide glass, although MWI time was prolonged. Secondly, the methenamine silver solution with slide inside was heated up to 60°C by MWI. After MWI, the solution was left at room temperature for 2 minutes. In this step, the temperature distribution affected the quality of the stain. To avoid it, the authors frequently changed the position of the container at MWI or stirred the solution gently after MWI. By this method, the quality of the stain was compatible with the conventional method and the time needed was shortened within 10 minutes.

Key words : Grocott's method,
Microwave irradiation,
Oxidation,
Methenamine silver.

1. Faculty of Health Science, Kobe University School of Medicine
2. Department of Pathology, Kobe University Hospital