



アザン染色法におけるリタングステン酸による媒染方法の検討

田中, 路子
奥野, 万里子

(Citation)

神戸大学医療技術短期大学部紀要, 9:105-111

(Issue Date)

1993

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/80070240>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/80070240>



アザン染色法におけるリントングステン酸による媒染方法の検討

田 中 路 子¹, 奥 野 万里子²

緒 言

アザン染色は、1900年に Mallory が結合組織の細線維および細網線維の染色法として発表した原法を、1915年に Heidenhain が改良した方法で、現在、膠原線維染色の代表的染色法として広く用いられている¹⁾。

しかし、アザン染色は染色完了までに長時間を要し、中でもリントングステン酸による媒染時間は、1時間から3時間、または一晩と幅が広い。そして、その作用機序についての詳しい説明はなされていない¹⁻⁴⁾。

そこで今回我々は、アザン染色の中でも、リントングステン酸の媒染効果について、媒染時間がアゾカルミンG脱色と、アニリンブルー・オレンジG混合液の結合組織への取り込まれ方に、どのように影響を及ぼすかを検討し、また、家庭用電子レンジを用いることによる媒染時間短縮についても同時に検討を行った。

材料と方法

1. 材料

ホルマリン固定、パラフィン包埋した大腸を、3μmに薄切し使用した。

2. 試薬調整

Heidenhain のアザン染色法に従い試薬調整を行った¹⁾。

1) アゾカルミンG液：アゾカルミンG 0.1g

を蒸留水 100mlに溶かし、酢酸 1 mlを加えた。

2) アニリンアルコール：95%エチルアルコール 100mlにアニリン 0.1mlを加えた。

3) 酢酸アルコール：95%エチルアルコール 100mlに酢酸 1 mlを加えた。

4) アニリンブルー・オレンジG混合液：水溶性アニリンブルー0.5g, オレンジG 2 g を蒸留水 100mlに溶かし、酢酸 8 mlを加え煮沸後、冷却、濾過し、使用時蒸留水で3倍に希釈した。

3. 染色方法

Heidenhain のアザン染色法に従い、以下の通り染色を行った¹⁾。

1) 脱パラフィン、水洗

2) アゾカルミンG液 60℃ 50分
さらに室温 10分

3) アニリンアルコールで核が際だつまで分別

5) 酢酸アルコールで分別停止

6) 軽く水洗

7) 5%リントングステン酸水溶液で媒染

1～3時間、または一晩

8) 軽く水洗

9) アニリンブルー・オレンジG混合液 60分

10) スライドガラスについでいる余分な液を拭き取り

11) 純アルコール中で分別、脱水

12) キシレン透徹

13) 封入

4. 染色法の比較

1) 媒染時間の違いによる染色結果の比較

1. 神戸大学医療技術短期大学部
School of Allied Medical Sciences, Kobe University
2. 神戸大学医学部付属病院病理部
Department of Pathology, Kobe University Hospital

リタングステン酸の媒染時間を、0分（媒染なし）・10分・20分・30分・40分・50分・1時間・2時間・3時間・一晚と変化させ、それ以外は従来通りの染色を行い、染色結果を比較した。

2) マイクロ波（以下MW）照射による媒染時間短縮についての検討

家庭用電子レンジ（日立MR-A330）を使用し、500WにてMWを連続照射することにより、リタングステン酸の媒染時間の短縮を検討した。横型の耐熱性プラスチックドーゼに5%リタングステン酸水溶液100mlと切片3枚を入れ、MWを照射した。照射時間は、予備実験を行ったところ、40秒の照射により、液温は60℃に達し組織は剥がれ易くなり、50秒では、液温は約70℃になり組織が剥がれたことから10秒・20秒・30秒・40秒の4通りを設定した。それ以外は従来通りの染色を行い染色結果を観察した。この時、MW照射前のリタングステン酸水溶液の液温と、照射直後の液温を温度計にて測定した。また、MW照射時に発生する熱を、200mlの蒸留水をビーカーに入れて加えることにより吸収させ、温度上昇を抑さえる方法が行われており^{5, 6)}、予備実験を行ったところ、組織が剥がれ易くなる60℃まで液温が上昇する時間は、200mlの蒸留水を加えることにより60秒に延長し、また蒸留水100mlでは50秒に延長した。そこで、MW照射後の液温が同じであっても、照射秒数が異なる場合、どのように染色結果に影響を及ぼすかを、今回は、熱吸収用の蒸留水を100ml加えた場合と、200ml加えた場合の2通りについて検討を行った。

結 果

1. 媒染時間の違いによる染色結果の比較

媒染時間が0分では、アニリンブルーが組織全体に強く共染し、青色になった。また、粘膜上皮の核が不明瞭になった（図1）。媒染時間10分では、アニリンブルーが筋層にやや共染し、

アゾカルミンGの赤色と重なり赤紫色になった。媒染時間20分から3時間では、アニリンブルーの共染は見られず良好な染色性を示した（図2）。媒染時間一晚の場合は、図2と同様に良好な染色性を示したが、アニリンブルーの着色が弱くなった。

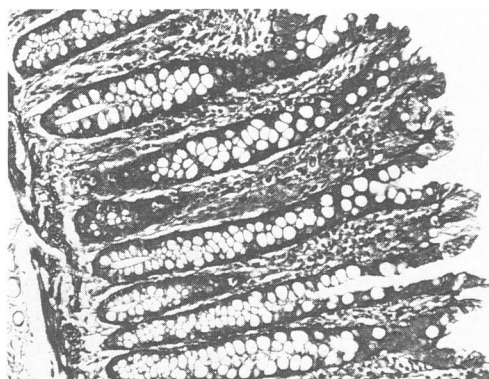


図1：アニリンブルーの共染が強い。粘膜上皮の核が不明瞭である。

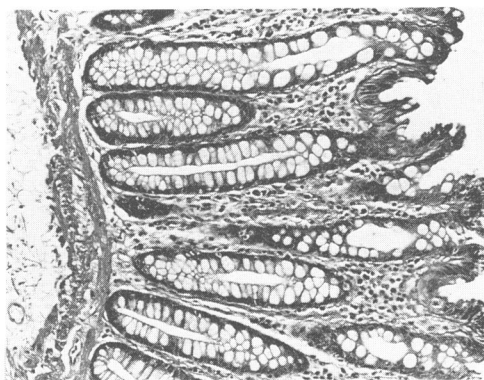


図2：良好な染色性を示している。

2. MW照射による媒染時間短縮についての検討

リタングステン酸100mlのみでMW照射を行った場合、照射時間10秒では、良好な染色結果を示すものもあったがアニリンブルーがやや共染した。この時の液温は34～35℃であった。照射時間20秒では、良好な染色性を示した。こ

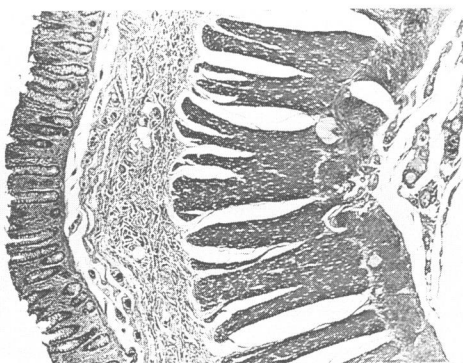


図3：良好な染色性を示している。
(MW照射を行っている。)

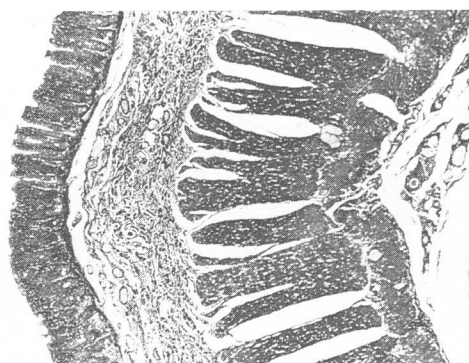


図4：アニリンブルーが強く共染している。
(MW照射を行っている。)

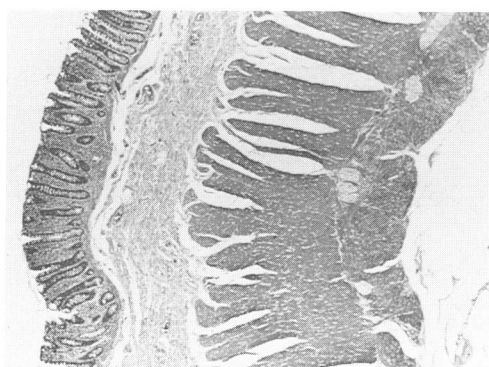


図5：アニリンブルーの染まりが悪く、膠原線維の構造が分かりにくい。(MW照射を行っている。)

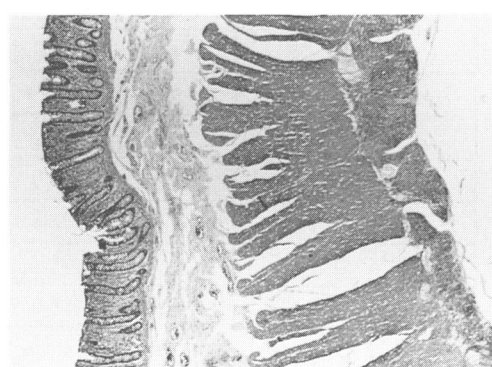


図6：アニリンブルーが殆ど染まっておらず、膠原線維の構造が壊れている。(MW照射を行っている。)

の時の液温は44～49℃であった。照射時間30秒では、良好な染色性を示すもの、アニリンブルーの染色性が悪いもの、膠原線維の構造が壊れアニリンブルーが殆ど染まっていないものが見られた。この時の液温は54～56℃であった。照射時間40秒では、アニリンブルーは殆ど染まらなくなった。この時の液温は60℃であった。

次にリンタングステン酸100mlに蒸留水100mlを加えMW照射を行った場合、照射時間10秒では、良好な染色性を示すものもあったが、アニリンブルーが強く共染した。この時の液温は30～31℃であった。照射時間20秒では、良好な

染色性を示すものもあったが、アニリンブルーがやや共染した。この時の液温は40～41℃であった。照射時間30秒では、良好な染色性を示した。この時の液温は46～49℃であった。照射時間40秒では良好な染色性を示すもの、アニリンブルーの染色性が悪いもの、膠原線維の構造が壊れアニリンブルーが殆ど染まっていないものがあった。この時の液温は52～56℃であった。照射時間50秒では、アニリンブルーが殆ど染まらなくなった。この時の液温は60℃であった。

最後にリンタングステン酸100mlに蒸留水200mlを加えMW照射を行った場合、照射時間10秒

では、良好な染色性を示すものもあったが、アニリンブルーが強く共染した。この時の液温は29～30℃であった。照射時間20秒では、アニリンブルーが強く共染したものの、やや共染したものの、良好な染色性を示したのが見られた。この時の液温は37～40℃であった。照射時間30秒では、アニリンブルーがやや共染するものと、

良好な染色性を示すものが見られた。この時の液温は41～46℃であった。照射時間40秒では、良好な染色性を示すもの、アニリンブルーの染色性が悪いものが見られた。この時の液温は50～53℃であった。照射時間50秒では、アニリンブルーの染色性が悪いもの、膠原線維の構造が壊れアニリンブルーが殆ど染まっていないもの

表 1 : MW照射による染色結果の判定

リタングステン酸 100mlのみ						
M W 照射 時間 秒	24℃ の 時 * ¹		25℃ の 時		26℃ の 時	
	結 果	℃ * ²	結 果	℃	結 果	℃
1 0	△	34	○	35	△	35
2 0	○	44	○	45	○	49
3 0	○	54	◆	56	▲	56
4 0	◆	60 ↑	◆	60 ↑	◆	60 ↑
リタングステン酸 100ml + 熱吸収用蒸留水 100ml						
1 0	×	30	×	31	○	31
2 0	△	40	△	41	○	41
3 0	○	46	○	48	○	49
4 0	○	52	▲	58	◆	56
5 0	◆	60 ↑	◆	60 ↑	◆	60 ↑
リタングステン酸 100ml + 熱吸収用蒸留水 200ml						
1 0	×	29	×	29	○	30
2 0	×	37	△	39	○	40
3 0	△	41	○	44	○	46
4 0	○	50	○	50	▲	53
5 0	▲	56	▲	56	◆	57
6 0	◆	60 ↑	◆	60 ↑	◆	60 ↑

* 1・・・MW照射前の液温

* 2・・・MW照射直後の液温

×…… アニリンブルーによる共染が強い。

△…… アニリンブルーがやや共染している。

○…… 良好な染色性を示している。

▲…… アニリンブルーの染まりが悪く、膠原線維の構造が分かりにくい。

◆…… アニリンブルーが殆ど染まっておらず、膠原線維の構造が壊れている。

が見られた。この時の液温は、56～57℃であった。照射時間60秒では、アニリンブルーが殆ど染まらなくなった。この時の液温は60℃以上であった。

以上を表1にまとめた。良好な染色性を示したものを○(図3)、アニリンブルーが強く共染したものを×(図4)、アニリンブルーがやや共染しているものを△、アニリンブルーの染色性が悪いものを▲(図5)、膠原線維の構造が壊れアニリンブルーがほとんど染まっていないものを◆(図6)とした。

良好な染色性を示したものは、MW照射直後の液温が45℃前後であり、MWの照射秒数は、20～40秒であった。

考 察

アザン染色は、アニリンブルーで膠原線維を青く、アゾカルミンGで筋線維を赤く、オレンジGで細胞質その他を橙黄色に染める染色法で、酸性色素のみを用いた物理的染色機構による方法である。これは、色素粒子の大きさの違いによる組織への取り込まれ方の差を利用したものであり、アザン染色の場合、アニリンブルーが非常に大きな粒子であるため、それよりも小さな粒子であるアゾカルミンGとオレンジGとの組み合わせにより染め分けている⁷⁾。そして、リタングステン酸は媒染剤として使われており、結合組織に対する媒染剤として働いている。また、アゾカルミンGの脱色作用も有している¹⁻⁴⁾。

今回の我々の検討の結果、リタングステン酸の媒染を行わない場合、アニリンブルーが組織全体に共染し、20分以上リタングステン酸で媒染を行うことによりアニリンブルーの共染は見られなくなり、良好な染色結果を得ることができた。しかし、一晚おいた場合については、同様に良好な染色結果を示したが、アニリンブルーの着色が弱くなったことから、リタングステン酸で媒染を行うことにより、アニリンブ

ルーの共染を抑え、その結果、膠原線維に対して媒染剤としての役割を果たしていると思われる。また、アゾカルミンGの脱色作用については、媒染を1～3時間行ったものと一晚の場合では、等しく良好な染色性を示したことから一晚では過剰な脱色はおこらないと言える。

つぎに、MW照射による媒染時間の短縮について検討を行った。MW作用の応用は、近年病理組織検査の中で広く利用価値が高まっている。MWは最初、生物試料の固定の目的で用いられ、次いで、組織標本作製過程に利用され、組織・細胞化学染色にも応用されており、これらはすべて、MWの照射により分子の拡散や結合の速度が高められる現象を利用している⁸⁾。Boonらはアザン染色におけるリタングステン酸の媒染時間は、温度調節機能を備えた Microwave Processor を使用して、40℃に温度を保ちながら、7分間照射するとしている⁹⁾。また、50℃に温度設定を行うという報告もある⁸⁾。しかし、今回我々は、安価で取扱いが単純なことから家庭用の電子レンジを使用して検討を行った。現在市販されている家庭用電子レンジの多くは出力が500Wで、それに解凍用の低出力選択機能が備わっている。しかし解凍用の低出力を選択した場合、実際の出力は500WのままでMWの照射・休止の繰り返しにより平均出力が低くなるよう調節されているため一定した照射を行うことはできない。そこで今回は、500Wによる連続照射にて検討を行った¹¹⁾。また、熱吸収用の蒸留水を同時に加えMW照射を行うことにより、温度上昇を抑え、照射秒数を延長させた場合について染色結果を比較した。その結果、MWの照射秒数に関係なく、液温が45℃前後まで上昇したときに良好な染色性を示した。そして、液温が約50℃以上になると膠原線維ははがれ易くなりアニリンブルーの着色も弱まり構造が分かりにくくなった。したがって、MWの照射秒数には関係なく、温度上昇に注意することにより家庭用電子レンジを使用することによって大幅な媒染時間の短縮ができた。今回

の検討では、リントングステン酸の媒染作用についてのみであったが、アゾカルミンGとアニリンブルー・オレンジG混合液にもMW照射を応用するとさらに時間の短縮が行えると思われた。

結 語

アザン染色において、リントングステン酸水溶液による媒染効果について、媒染時間が染色結果にどのように影響するかを検討した。また、MW照射による媒染時間の時間短縮についても検討を行った。結果は以下の通りであった。

1. リントングステン酸水溶液による媒染時間が20分以上の場合、良好な染色結果がえられた。
2. 媒染を一晩行くと、アゾカルミンGの脱色程度は1時間媒染を行ったものと差はなかったが、アニリンブルーの着色が弱くなった。
3. MW照射により、媒染時間の短縮が可能であった。良好な染色性を示したときの液温は45℃前後であった。
4. MW照射により液温が上昇し約50℃以上になると、膠原線維の構造が壊れアニリンブルーが染まらなくなった。

謝 辞

本研究の実施にあたり、本学衛生技術学科9期生で形態学特論選択の学生諸氏、および兵庫県臨床検査協同組合病理の西田一彦氏のご協力に感謝します。

参 考 文 献

1. 渡辺恒彦, 成松一久: 膠原性線維の染色病理組織標本作成技術下巻, 医歯薬出版, 1981, p. 45
2. 佐野 豊: アザン染色, 組織学研究法, 南山堂, 1974, p. 220
3. 金子 仁: アザン・マロリー染色 組織標本, 医学書院, 1978, p. 48
4. 渡辺陽之輔, 坂口 弘, 細田泰弘: 膠原線維染色病理組織標本の作り方, 医学書院, 1986, p. 81
5. 村上健一, 根本由美子, 大谷明夫: マイクロウェーブ照射を利用した固定法 医学検査, 40: 1552, 1991
6. 水平敏弘: マイクロウェーブ照射による生物試料の固定法 医学のあゆみ 149: 907, 1989
7. 川又國士, 井出 禎, 市川文雄他: アザン染色・ワンギーソン染色 Medical Technolog, 17: 357, 1989
8. Boon, M. E., Kok, L. P.: Major improvement in microscopic-image quality of cryostat sections Am J Clin Pathol, 88: 620, 1987
9. Boon, M. E., Kok, L. P.: Microwave cookbook of pathology. 2nd., Coulomb-press Leyden, Leiden, 1988, P. 140
10. 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: 272, 1992
11. 角田卓士, 森元秀起, 室谷昌弘田: マイクロウェーブ固定法の応用 組織細胞化学— 学際企画, 1990, p. 35

Improvement of Azan Stain with a Modified Phosphotungstic Acid Treatment

Michiko Tanaka¹ and Mariko Okuno²

ABSTRACT : Azan stain is an excellent method for staining connective tissue. But this method needs about 1 day to finish. Especially the duration of placing sections in 5 % phosphotungstic acid solution is a time consuming step. This step requires from 1 — 3 hours to overnight. We examined the effect of the duration of phosphotungstic acid treatment on staining. When tissue sections were in 5 % phosphotungstic acid solution for more than 20 minutes, sections were well stained. Moreover, microwave irradiation during phosphotungstic acid treatment made the duration of placing time shorten dramatically to 20 seconds.

Key Word : Azan stain,
Phosphotungstic acid,
Microwave irradiation.

1. School of Allied Medical Sciences, Kobe University
2. Department of Pathology, Kobe University Hospital