

マイクロウェーブ照射を利用したクリューバー・バレラ染色変法

崎山順子 藤川亜弥 山地佐知子 浅野真由美 遠藤 浩

要 約

クリューバー・バレラ (KB) 染色は中枢神経系の白質における重要成分である髓鞘を選択的に染色する方法として日常的に広く使われている。

しかし現在の所、ルクソール・ファスト青 (LFB) 染色後の0.05%炭酸リチウム及び70%アルコールによる分別時間が確定されていないので、分別の良否を経験的にしか判断せざるをえないという欠点がある。

そこで、本研究において、マイクロウェーブ照射を LFB 染色に応用することで、その後の分別について検討した結果、従来の0.05%炭酸リチウムでは良好な結果が得られなかったが分別液として、0.05%炭酸水素ナトリウムおよび70%アルコールを用いることで分別時間の確定が可能となった。

キーワード：クリューバー・バレラ染色, マイクロウェーブ照射, ルクソール・ファスト青液

はじめに

1953年, Kluver と Barerra¹⁾により提唱された中枢神経系の白質における重要成分である髓鞘を選択的に染めるクリューバー・バレラ (KB) 染色の原理は十分には解明されていないが、銅フタロシアニンのアミン塩であるスルホン化されたアルコール可溶性のルクソール・ファスト青 (LFB) と髓鞘との特異的な親和性を利用した染色法である。また、この染色法は神経線維の髓鞘を LFB で染色した後、クレシル紫によるニッスル染色を施すため、同一の切片上で髓鞘と神経細胞が観察できる利点があるので、今日日常検査に広く用いられている。

染色手技自体は比較的簡単で、失敗の危険性の少ない染色法と言われているが、本染色の要諦である炭酸リチウム及び70%アルコールで行う LFB 染色の分別は、分別時間の確定がされておらず、その結果を経験的判断に頼るという欠点がある。

そこで、本研究では最近病理検査の種々の分野

に応用されているマイクロウェーブ (MW) 照射を LFB 染色に利用することで、その後の分別時間の確定を行い、染色者の経験の違いにより生じる染色結果の差をなくする目的で標準化への試みを行ったので報告する。

材料および方法

1. 組織

病理解剖により摘出された人の大脳を、10%緩衝ホルマリン液にて固定し、通常の方法でパラフィン包埋した後、8 μ m の切片として本実験に用いた。

2. 使用した機械

1) MW : MW 迅速試料固定装置 MWF-2

(日新株式会社)

周波数2450MHz, 高周波出力500W

加熱室有効寸法 : 幅268×奥行265×高さ180mm

ターンテーブル直径 : 260mm

2) 家庭用 MW : 日立電子レンジ MR-M240型

(日立家電株式会社)

周波数2450MHz, 高周波出力500W

加熱室有効寸法：幅270×奥行280×高さ170mm

ターンテーブル直径：260mm

3. 染色液

1) LFB (MBSN) : SIGMA, SOLVENT BLUE MBSN

2) LFB (MBS) : CHROMA, Luxol Fast Blue MBS

LFB 色素としてメーカーの異なる 2 種類を用い染色結果の比較を行った。

3) クレシル紫 : CHROMA, Cresyl Fast Violet
すべて染色液の調整は, 原法¹⁾に準じて行った。

4. 染色方法

原法に準じて行った。(図1)

1. 脱パラフィン後, 95%アルコールになじませる
2. LFB 染色 57℃ 一晚 (16~24時間)
3. 95%アルコールで余分な液を洗う
4. 蒸留水になじませる
5. 0.05%炭酸リチウム水溶液にて分別
6. 70%アルコール
白質と灰白質の区別がつくまで分別
7. 蒸留水になじませる
分別が不十分な場合は5~7を繰り返す
8. クレシル紫染色 6分
9. 95%アルコールで分別
10. 100%アルコールから脱水, 透徹, 封入

図1 クリューバー・バララ染色 (原法)

5. MW 照射による LFB 染色及び分別の検討

1) MW 照射時の熱吸収水量の設定

LFB 液は95%アルコール溶液であるため, 沸点が低い (約78℃)²⁾。そこで原法の57℃に近づける方法を検討した。一般的に MW 照射を利用した染色法および抗原賦活法などでは, 液温上昇を防ぐ目的で染色バットの周囲に熱吸収用の水 (熱吸収水) を設置している³⁻⁴⁾。田中ら⁵⁾も MW 照射による染色法の改良において, LFB 液100ml に対して熱吸収水を置かない状態 (0ml), 100ml, 300ml について検討している。田中らの方法を参考として, 熱吸収水0ml, 300ml, 800ml, 1200ml での LFB 染色時間の確定と染色性の検討を行った。また, この時の MW 照射方法は, 図2に示すごとく染

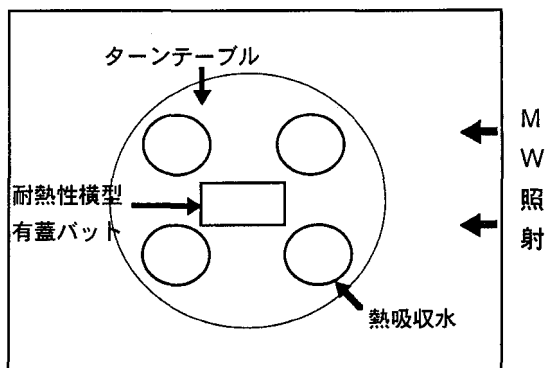


図2 熱吸収水を用いた MW 照射法
MW 内を真上から見た図

色バットには MW 照射時の LFB 染色液の液温を一定にするために, 耐熱性横型有蓋バットを用い, これをターンテーブルの中央に設置し, その周囲に300mlの耐熱ビーカーにそれぞれ必要量の熱吸収水を等分して入れて行った。

2) MW 照射による LFB 染色後の放置時間

熱吸収水800ml, MW 照射時間140秒での LFB 染色後, LFB 液中に 0 分, 5 分, 10 分間室温に放置してから以下原法通り行い, その時の染色性を検討した。

3) LFB 染色の分別液・分別時間の検討

熱吸収水800ml, MW 照射時間140秒での LFB 染色後室温に 5 分間放置した。その後の炭酸リチウムおよび70%アルコールによる分別を時間の確定を目的として検討した。分別液として炭酸リチウム以外に炭酸カリウム, 炭酸ナトリウム, 炭酸水素ナトリウムを用い以下原法通りに行い, その染色性についても検討した。

4) 機種異なる MW での検討

今回の検討には MW を用いたが, 一般的に検査室に常備されているとは限らないので, 家庭用電子レンジとして普及している家庭用 MW での LFB 染色の検討も行った。

結果及び考察

1. MW 照射時の熱吸収水量の設定

表1に示すように, 熱吸収水を 0 ml, 300ml,

表1 MW照射時の熱吸収水量

熱吸収水	照射時間	染色結果			
		白質・灰白質の染め分け		髄鞘	
		LFB①	LFB②	LFB①	LFB②
0ml	21秒	不明瞭	不明瞭	不良	不良
300ml	60秒	不明瞭	不明瞭	不良	不良
800ml	140秒	明瞭	明瞭	良	良
1200ml	190秒	明瞭	明瞭	良	良

800ml および1200ml 置いた場合、LFB 液温が約57～60℃に達するのに要する時間は、それぞれ21秒、60秒、140秒、190秒であった。この時、液内での温度差は殆ど認められず、なおかつLFB 液の減少も殆ど見られなかった。

次に、それぞれの熱吸収水量でのMW照射時間を設定しLFB染色を行い、以下原法通りに行った。染色結果はすべての熱吸収水量においてMW照射直後は、組織全体が青色に染色されたが、分別により熱吸収水0ml、300mlでは白質、灰白質ともすばやく脱色されてしまい、顕微鏡での観察においても髄鞘は殆ど染色されていなかった。一方、熱吸収水800ml、1200mlでは0ml、300mlに較べ分別後の白質、灰白質の区別も明瞭で、髄鞘の染色性も良好であった。この点については、LFB (MBSN)、LFB (MBS)とも差は認められなかった。現在まで、MW照射を利用したLFB染色法はいくつかの方法⁶⁻⁷⁾が報告されている。なかでも田中らは、LFB液のMW照射による温度上昇度を測定し、熱吸収水を用いることでLFB液が約60℃に達する時間を延長する試みをしている。そしてMW照射時間の違いによる染色性を比較した結果、MW照射時間が長いほど染色性が良くなったと報告している。今回の我々の検討においても、田中らが用いた熱吸収水量0ml、300mlでは白質、灰白質の染め分けは不明瞭で髄鞘も殆ど染色されなかったが800ml、1200mlの熱吸収水を用いることによりMW照射時間をさらに延長することで、良好な染色性を得ることができた。また、熱吸収水を用いてMW照射を行うと、染色液内の温度が不均一になると言われているが、本研究では耐熱性横型有蓋バットを使用することで、縦

型バットで生じるような液内温度の差は見られなかった。また染色液の溶媒が95%アルコールと高濃度であるため、蒸発および引火の危険性が危惧されたが、熱吸収水を用いることで過度の温度上昇を予防できるので、アルコール、¹⁴⁾の溶媒を用いた染色法でもMW照射が可能と思われた。但し高濃度のアルコールは、常温でも容易に引火する恐れがあるので細心の注意が必要な事は言うまでもないことと考える。以上の結果から以後の検討には、良好な染色性の得られた熱吸収水800ml、MW照射時間140秒の条件で行うこととした。

2. LFB染色後の放置時間

約60℃の染色液から直ちに切片を取り出すことは乾燥しやすいので、通常法ではLFB染色後、室温まで冷却してから次の操作に移るよう指示されている。今回も、MW照射直後に次の操作に直ちに移ると乾燥傾向が見られたので、照射後5分および10分間室温に放置した後の染色性について検討した。その結果は5分間以上の放置により、乾燥の危険性は確実に減少した。田中らは、熱吸収水300mlで50秒MW照射を行った場合、白質、灰白質の染め分けは不明瞭であったが、照射後5分間放置することで髄鞘が青く染色され、白質、灰白質の境界が明瞭になったと報告している。本研究においても、MW照射後放置時間0分では分別操作の影響を受けやすく、染色性の再現性にやや不安が見られたが、5分間以上放置することで、組織へのLFB色素の結合が安定し、分別操作の影響も少なく安定した染色性が得られた。そこで、MW照射でのLFB染色は前述(1)で得られた染色条件に、染色後5分間の室温放置という条件を加えて以下の検討を行った。

表2 分別液の違いによる分別時間と染色結果

分別液	LFB	分別時間	染色結果			
			70%アルコール 分別時間	白質・灰白質 の染め分け	髄鞘の 染色性	再現性
炭酸リチウム	①	5秒	5秒	明瞭	良	不良
	②	10秒	10秒	明瞭	良	不良
炭酸カリウム	①	5秒	5秒	明瞭	良	不良
	②	10秒	10秒	明瞭	良	不良
炭酸ナトリウム	①	5秒	5秒	明瞭	良	不良
	②	10秒	10秒	明瞭	良	不良
炭酸水素 ナトリウム	①	4分	1分	明瞭	良	良
	②	7分	2分	明瞭	良	良

3. LFB 染色の分別液・分別時間の検討

MW 照射による LFB 染色は、熱吸収水800ml, 照射時間140秒, 染色後5分間以上の室温放置という条件で良好な染色結果を得ることが分かったが、その後の本染色の要諦である炭酸リチウムおよび70%アルコールでのLFB染色の分別は、表2に示すように非常に短時間であるので、LFB (MBSN), LFB (MBS) 共に初心者では再現性のある安定した染色結果を得ることが困難であった。そこで、炭酸リチウム以外の分別液として炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムを用いた結果、表2に示すようにLFB (MBSN), LFB (MBS) 共に再現性のある染色結果が得られたのは炭酸水素ナトリウムであった。これは炭酸水素ナトリウムのみ pH が約8.6で、他の炭酸リチウム pH11.0, 炭酸カリウム pH10.8, 炭酸ナトリウム pH10.9に較べアルカリ性が弱いことが分別の違いに大きく影響していると思われた。MW 照射による LFB 染色は、原法および通常法と異なり染色時間が非常に短いため、従来の炭酸リチウムでの分別は分別能力が高すぎる傾向が見られ、そのため初心者では再現性を得るのが困難であった。同様に炭酸カリウムおよび炭酸ナトリウムも、炭酸リチウムとほぼ同等の分別能力を有するため、初心者では再現性のある安定した染色結果を得るのが困難であった。その点、原法および通常法での60℃、一晚のLFB染色の分別には適さない(データ未掲載)分別能力の弱い炭酸水素ナトリウムが、染色時間の短いMW照射によるLFB染色の分別には、作用が緩和なことから初心者でも操

作しやすい点が利点と思われた。

今回の異なる LFB 色素の検討に関しては、多くの KB 染色⁸⁻⁹⁾は LFB 色素に LFB (MBS) を用いているが、中には MBS, MBSN どちらでもよいとしているもの¹⁰⁾もある。しかし、一般的に LFB (MBSN), LFB (MBS) の染色性については、特に記載されたものはない。本研究では、上記(1), (2)の検討において両者に差は殆ど見られなかったが、分別に関しては、LFB (MBS) のほうが LFB (MBSN) より分別に抵抗性が強い傾向が見られたので、LFB (MBS) の分別時間を長く設定する必要があった。

4. 機種異なる MW での LFB 染色

前述の検討の結果、良好な染色性の得られた KB 染色法を図3に示す。次に何処でも手に入りやすい家庭用 MW を用い、図3に示す染色法の検討を行った。家庭用 MW では熱吸収水800mlを用いた場合、LFB液が約60℃に達するまでに210秒を要したので、MW照射時間を210秒に設定し、以下図3の通り行い染色性を検討した。LFB (MBSN), LFB (MBS) とともに、MWを用いた時とはほぼ同等の再現性のある安定した結果が得られた。家庭用 MW は、本研究に用いた MW ほど照射時間の設定を厳密にできるタイマーが付いていない。そこで、我々は熱吸収水800mlでのLFB液温が約60℃になるまでのMW照射時間を厳密に設定して行ったことはいうまでもない。このように熱吸収水800mlでのLFB液が60℃に達するまでの照射時間は、機種により異なると思われるので、照射時間は使用する機種により設定する必要

1. 脱パラフィン後, 95%アルコールになじませる
2. MW照射によるLFB染色
熱吸収水量 800ml
照射時間 140秒
3. 室温放置 5分
4. 95%アルコールにて余分な液を洗う
5. 蒸留水になじませる
6. 0.05%炭酸水素ナトリウム水溶液で分別
LFB色素① 4分
LFB色素② 7分
7. 70%アルコールで分別
LFB色素① 1分
LFB色素② 2分
8. クレシル紫染色 6分
9. 95%アルコールで分別
10. 100%アルコールから脱水, 透徹, 封入

図3 MW照射を用いたKB染色

がある。

一般的に病理検査の分野で用いられている多くの染色法は, 経験的に行われてきたものが多く, 最近になって染色法の原理が解明されつつあるのが現状で, なお不明な点が多い。色素の種類の違いによる染色性の違いとか, 分別の原理など不明な点が多い。本研究においてもそのあたりの化学的な解明は未だ十分とはいえないので, 今後この点の解明が必要であろうと思われる。

最後に, 本研究によりLFB染色にMW照射を利用することで, LFB染色の時間の短縮のみなら

ず, LFB染色の分別時間の確定も可能となる事から, 染色者の経験の違いにより生じる染色結果の差をなくす事が可能であると思われる。

文 献

- 1) Kluver H and Barrera E: A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropath exp Neurol* 12: 400-403, 1953.
- 2) 東京化成工業(株)編: 取り扱い試薬ラボガイド. 講談社, 東京, 79, 1989.
- 3) 水平敏知(編): 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, 東京, 27-31, 1993.
- 4) Sakiyama J, Ichimura M, Tohge H, Endo H, Kawakami K and Kawatani Y: Retrieval of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunoreactivity on formalin fixed tissues. *Bull Sch Health Sci, Okayama Univ* 7: 9-15, 1996.
- 5) 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. クリューバー・パレラ染色. *神大医保健紀要* 10: 85-90, 1994.
- 6) Kok LP and Boon ME: *Luxol Fast Blue. Microwave Cook Book for Microscopist*. Coulomb Press Leyden, Leiden. 225, 1992.
- 7) 鳥居良貴, 織田みほ, 山本格士: 病理検査の迅速化 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.
- 8) 月刊 *Medical Technology* 別冊: 染色法のすべて. 医歯薬出版, 東京, 119-122, 1988.
- 9) 春日 孟, 松原 修: 病理学/病理組織細胞学. 医歯薬出版, 東京, 357-358, 1996.
- 10) 佐野 豊 (著): 組織学研究法. 南山堂, 東京, 367-369, 1981.

(Original)

Modified Method of Kluver-Barrera's Staining with Microwave Irradiation

Junko SAKIYAMA, Aya FUJIKAWA, Sachiko YAMAJI,
Mayumi ASANO and Hiroshi ENDO

Abstract

Kluver-Barrera's (KB) staining is the well-known and widely used method for staining the Schwann's sheath of the central nervous systems. On the contrary, the optimum time is not established yet, which incubated with 0.05% lithium carbonate and 70% alcohol after luxol fast blue staining. The modified method was studied that was stained with the microwave irradiation and used 0.05% sodium bicarbonate in stead of 0.05% lithium carbonate. This method was simple and useful to differentiate Schwann's sheath from other components.

Key words : Kluver-Barrera's staining, Microwave irradiation, Luxol fast blue solution

School of Health Sciences, Okayama University