

講 座

パラフィン切片による脂肪染色法の検討

武田 泰典 佐藤 香穂子
佐島 三重子 鈴木 鍾美

岩手医科大学歯学部口腔病理学講座*

[受付: 1981年9月9日]

はじめに

脂質は蛋白質とともに主要な生体構成要素として体内に広く存在し、また糖類とともにエネルギー源としても重要である。一方、変性、中毒性疾患、代謝性疾患、ある種の腫瘍性病変などをはじめとする種々の疾患時には脂質の分布状態、量、種類に変動がみられ、形態学的にも様々の病像として観察される。

しかし、脂肪をはじめとするほとんどの脂質は種々の有機溶剤に可溶性のため、通常のパラフィン切片での同定は不可能である。そのために病理組織学的に脂肪の検出を試みる場合には凍結切片による染色法が一般におこなわれている。しかし、凍結切片の作製はその操作がやや煩雑なこと、脆弱な組織や軟化巣などの壊れ易いものは扱い難いこと、染色時 diffusion がおこり細胞内や組織内の脂肪の局在性が明瞭でないこと、ブロックの永久保存が不可能なことなどの種々の問題点がある。したがって、これらの点を解消するために Luna¹⁾ は脂質の固定作用のある四酸化オスミウムと重クロム酸カリ混合液で固定した後にパラフィン切片を作製し、脂肪染色をおこなう方法を紹介している。さらにこの方法は諏訪ら²⁾ により改良が試みられて

いるが、固定液の浸透性や保存性などに関する検討は十分なされていない。

よって筆者らは今回前述のようなパラフィン切片による脂肪染色法を紹介するとともに、本法に関する2, 3の点について検討を加え若干の改良を試みた。

方 法

臓器はあらかじめ10%ホルマリンにて固定・保存されていた脂肪変性の著明なヒト肝臓を用いた。この肝臓は再固定液の浸透性を検討する目的で厚さ3, 4, 5 mmの三種類に分けて切り出し、再固定後にそれぞれをその中央部で厚さに対して平行に二分割し、その割面を薄切面とした。また、再固定液の保存性を検討するために、液調製直後、調製3日後、1週間後、2週間後、4週間後のものそれぞれを用いて前記の切り出し臓器を再固定した。この際、再固定液は4°C冷暗所に保存した。さらにキシロール・アルコール系列における脱パラフィン時間の影響についても検討した。

試薬(再固定液、その他)の調製法ならびに操作順は次の通りである:

- 1) 再固定: ホルマリン再定材料を切り出し、再固定液にて室温、振盪器上で24時間再固

A histologic staining method for fats on paraffin sections.

Yasunori TAKEDA, Kaoko SATOH, Mieko SASHIMA and Atsumi SUZUKI

(Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

*岩手県盛岡市内丸19-1 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 6 : 151-156, 1981

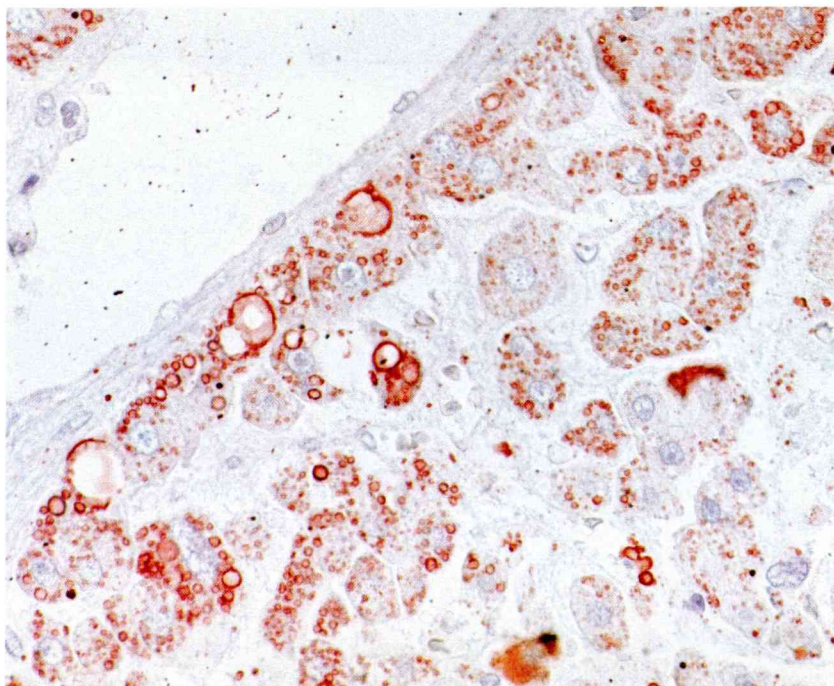


図1 Oil red O

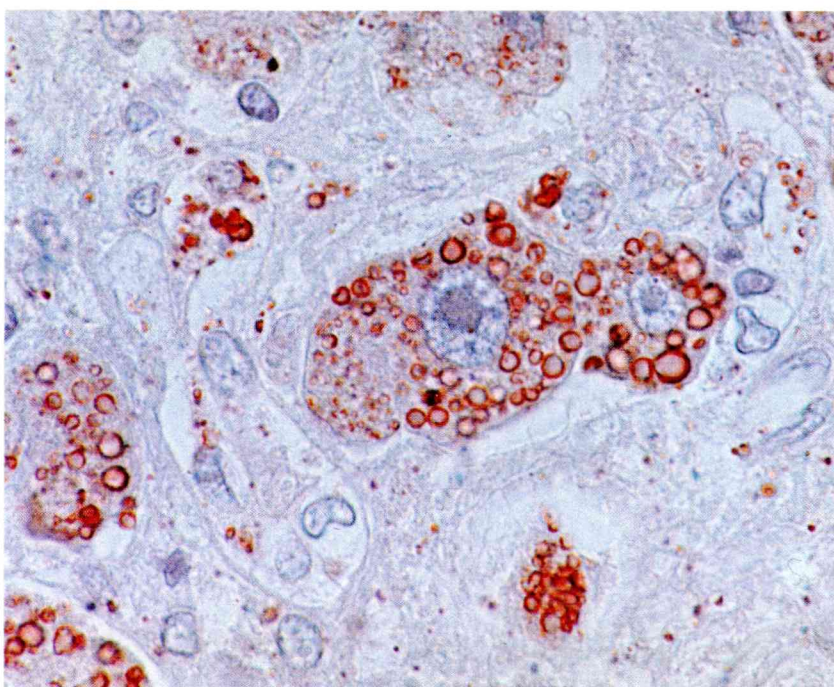


図2 Oil red O

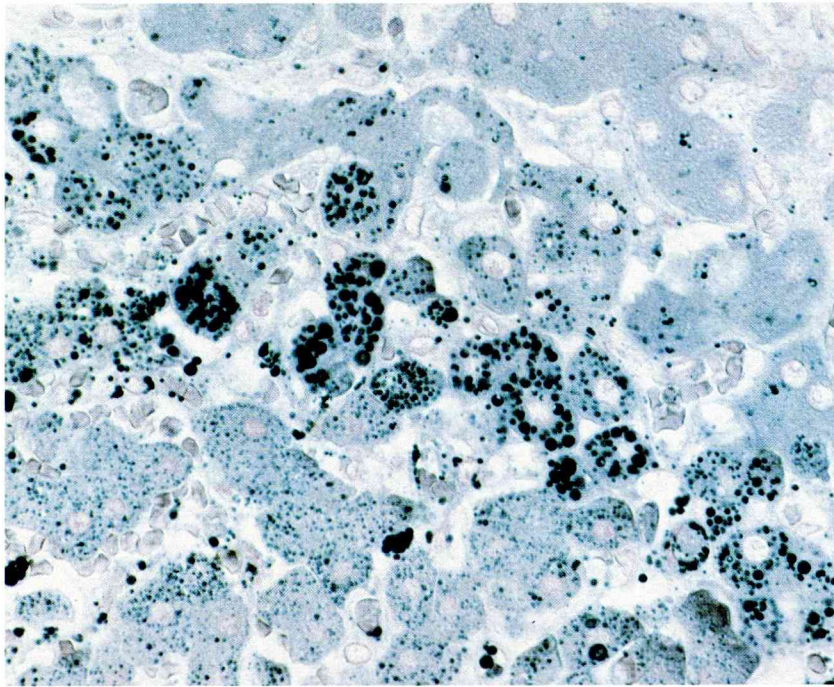


図3 Sudan black B

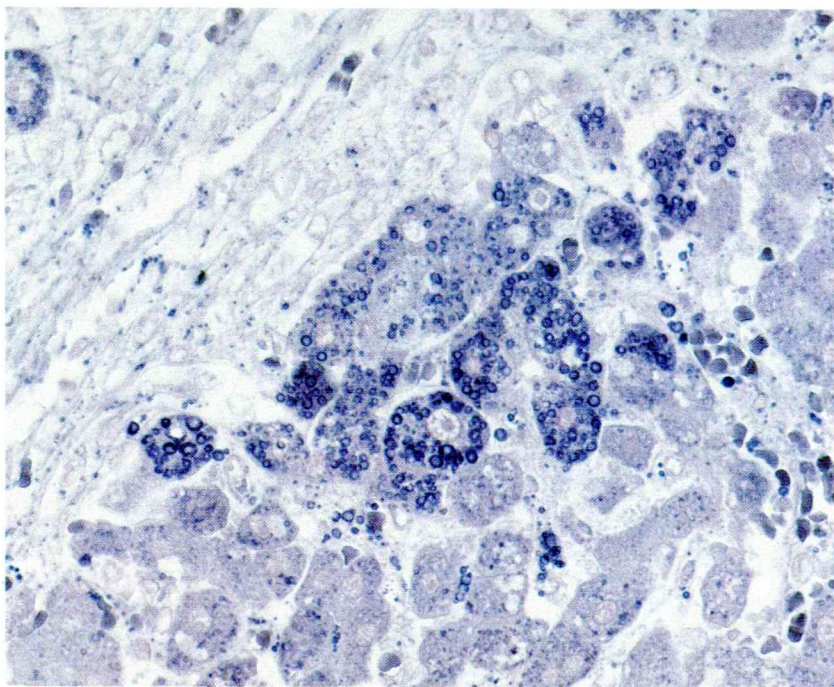


図4 Neil blue

定。

再固定液の処法：

50%重クロム酸カリ液 50ml }
 2%四酸化オスミウム液 50ml } を混合
 氷酢酸 10滴 }

- 2) 流水水洗 1 時間。
- 3) アルコール・キシロール系列で脱水，パラフィン包埋，薄切，キシロール・アルコール系列で脱パラフィン，流水水洗。
- 4) 1%過ヨウ素酸・塩酸溶液 (0.1 N-NaCl 100ccとNaIO₄ 1 g) 5 分間。
- 5) 流水水洗 10 分間。
- 6) 3%過酸化水素水 30 分間。
 (註Luna および諏訪らは30%過酸化水素水を使用しているが，切片が剝離し易いため
 に筆者らは3%のものを使用した(検討結果の項参照)。
- 7) 流水水洗 10 分間。
- 8) 脂肪染色。
- 9) 核染色 (ヘマトキシリンで20分間，あるいはケルンエヒトロードで10分間)。
- 10) 水溶性封入剤 (グリセリンゼラチン) で封入。

なお，今回の脂肪染色には Sudan III, Sudan black B, Oil red O, Neil blue の各色素を用いた。

結 果

1. 染色性について：染色結果は図1～4に示すとおりである(これらの標本はすべて厚さ3mmに切り出した材料を調製直後の固定液で再固定したもの)。これらの染色状態は通常の脂肪染色法に用いられている凍結切片法にくらべて Oil red O ならびに Sudan III 染色では脂肪滴の赤色の色調がその鮮やかさでやや劣っていたが，Sudan black B ならびに Neile blue 染色ではそれぞれの脂肪滴が暗緑色～黒緑色，深青色の色調に鮮やかに染出され，かつこれらは細胞胞体内での局在性が極めて明瞭であり，diffusion もほとんどみられなかった。

2. 材料の厚さと固定液の浸透性について：3mm, 4mm, 5mmの厚さに切り出したそれぞれの材料について染色をおこなった結果，厚さ3mmのものでは良好な染色性が得られ(図1～4)，十分に固定液が浸透していたものと考えられた。しかし，厚さ4mm, 5mmのものではその染色性は不良であった。

3. 固定液の保存性について：固定液調製直後，調製3日後，1週間後，2週間後，4週間後のものそれぞれを用いて固定液の保存性を検討した。その結果，調製直後のものを用いた場合には良好な染色性が得られた(図1～4)が，

表1 脱パラフィン時間と染色性との関係について

		脱パラフィン時間と染色性		
脱 パ ラ フ ィ ン 系 列	キシロール I	10 分	5 分	2 分
	ク II	10 分	5 分	2 分
	100% アルコール I	10 分	5 分	2 分
	ク II	5 分	4～5秒	4～5秒
	90% アルコール	5 分	4～5秒	4～5秒
	80% アルコール	5 分	4～5秒	4～5秒
	70% アルコール	5 分	4～5秒	4～5秒
染色性	胞体内脂肪滴 胞体外大脂肪滴	染色性不良 溶 出	染色性不良 溶 出	染色性良 一部溶出

調製3日後のものでは染色性はやや劣り、1週間以降のものでは染色性は低下し不良であった。

4. 脱パラフィン系列の浸漬時間ならびにその他の操作について：脱パラフィン系列の浸漬時間と染色結果との関係を比較すると表1の通りであった。すなわち、浸漬時間をキシロール I, II, 100%アルコール I をそれぞれ2分、その他を数秒としたものでは良好な染色性が得られた。しかし、胞体外の大脂肪滴は多少とも溶出する傾向がみられた。次に過酸化水素水による酸化の段階で、Luna の原法および諏訪らの方法では局方オキシドール (30% 過酸化水素水) を用いているが、過酸化水素水が高濃度の場合には切片が剥離し易かったために、筆者らは低濃度のものを用いた。その結果、切片は剥離することなく、かつ染色性にも何ら影響はみられなかった。

考 察

病理組織学的な脂肪の検出法としては、脂溶性色素による染色法、屈折率を利用した方法、ベンツピレンやフォスフィン 3 R などの脂溶性蛍光色素による方法などがある³⁾。一般の病理組織学的検索ではこれらのうち脂溶性色素による染色がおこなわれている。しかし、この脂溶性色素による染色は凍結切片によらねばならないために冒頭で挙げた種々の難点もある。

一方、古くから四酸化オスミウムは不飽和脂肪酸を還元して黒色の二酸化オスミウムに変化すること⁴⁾、また、重クロム酸塩も類脂質の安定固定剤であることが知られており⁵⁾⁶⁾、Smith-Dietrich 反応、Baker 反応あるいは Müller 液として髓鞘染色に応用されてしる。したがって、四酸化オスミウムと重クロム酸塩の両方を含んだ固定液を用いることによってより確実な脂肪の固定作用が期待され、Marchi 染色ならびに Swank and Davenport 変法として変性神経線維の病理組織学的検索に用いられている⁷⁾。さらに、この方法によりパラフィン操作でも脂肪の溶出を防ぐことができることが明

らかにされ、Luna は神経組織以外の諸臓器病変における脂肪の同定にも応用できうることを紹介している⁸⁾。

このようなパラフィン切片による脂肪の染色法に対して、今回筆者らがさらに検討を加えた結果、四酸化オスミウムと重クロム酸カリ混合液を固定液として用いる方法では通常用いられている凍結切片法にくらべて、1) 赤色の色調の鮮やかさがやや劣ること、2) 固定液の浸透性が弱いためにブロックをできる限り薄くせねばならないこと、3) 再固定や後処理に時間を要すること、4) 細胞外の大脂肪滴は多少とも溶出をまぬがれないこと、5) 他の染色に用いる場合には染色時間をやや長くせねばならないことなど、未だ検討の余地も少なくない。一方、凍結切片法に比較して、1) 薄切や染色の過程が技術的に容易なこと、2) 脆弱な材料に対しても利用できること、3) 切片が薄くかつ染色後の脂肪の diffusion がほとんどなく脂肪の局在性が明瞭であり、組織所見を精密に検索できること、4) 連続切片の作製が容易なこと、5) 他の染色との対比が可能なこと、6) ブロックの永久保存ができることなどの多くの利点が挙げられる。しかもこの方法によると骨、歯牙などの検索も容易であり、硬組織を扱うことの多い口腔領域の種々の研究にも役立つものと考えられる。

また、今回筆者らが固定液の浸透性と保存性、脱パラフィン系列の浸漬時間などについて検討を加えた結果から、その過程で次の点に注意を要するものと考えられた。すなわち、1) 固定液の浸透性が弱いために切り出し材料の厚さは3 mm 以下とすること、2) 固定液は保存性がないために調製直後のものを使用すること、そしてその調製にあたってはあらかじめ2%四酸化オスミウム液を作成し冷暗所に保存しておき、使用時に重クロム酸カリとの混合液とすること、3) 脱パラフィン操作により脂肪の溶出をできる限り防止するために、キシロール、無水アルコールの浸漬は可及的に短時間(約2分)とし、かつ他のアルコール系列も数秒

以内とすること、4) 切片の剝離を防止するために低濃度の過酸化水素水を使用することなどである。また、臓器の脱水系列やパラフィン包埋時の操作などについても今後検討を要するものと考えられた。

日常、変性性疾患や代謝性疾患が疑われた場合の病理組織検査、あるいは細胞内や組織内の脂肪の分布・性状を検索するにあたってH・E染色をはじめとする種々の染色標本との対比を必要とする場合が少なくない。このような場合、当然パラフィン切片による連続切片が最も有用な手段となる。したがって、脂肪のパラフィン切片による染色法の改良に関する検討の意義は非常に大きく、今後さらに検討を加えられるべき問題であろう。

ま と め

四酸化オスミウムと重クロム酸カリ混合の固定液で固定し、通法の如くパラフィン包埋をおこない、数種の脂肪染色を試みた結果、以下の成績であった。

1. 凍結切片法にくらべ多くの利点があった。とくに技術的に容易なこと、精密な組織所見が得られること、他染色との対比が可能なことな

どの点が挙げられた。

2. 切り出し材料の厚さは3 mm以下で、かつ固定液は調製直後のものを使用した場合に良好な染色性が得られた。

3. 脱パラフィン系列の浸漬時間は必要最少限にとどめた場合に良好な染色性が得られた。

4. 過酸化水素水は低濃度のものでも良好な染色性が得られ、かつ切片の剝離を防止することができた。

文 献

- 1) Luna, L. G. : Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd. ed., McGraw-Hill, New York, 140-151, 1960.
- 2) 諏訪幸次, 他 : パラフィン切片による脂肪染色の試み, 臨床検査, 20 : 141-144, 1976.
- 3) 森井外吉 : 脂質, 小川・武内・森編 : 新組織化学, 朝倉書店, 東京, 581-611, 1975.
- 4) Pearse, A. G. E. : Histochemistry, Theoretical and applied, 1st. ed., Little, Brown Comp., Boston, 165-189, 1953.
- 5) 佐野 豊 : 組織学研究法, 第5版, 南山堂, 東京, 473-504, 1973.
- 6) 関 正次 : 組織検査法, 第3版, 杏林書院, 東京, 56-68, 1961.
- 7) Lillie, R. D. : Histopathological technic and practical histochemistry, 1st. ed., McGraw-Hill, New York, 300-332, 1953.