

Ⅱ．病理組織検査

(戸田 好信)

Ⅲ．ヘマトキシリン・ エオジン染色 (HE 染色)

Hematoxylin Eosin (HE) 染色

[脱パラフィン → ヘマトキシリン →
水洗 → エオジン → 脱水 → 封入]

<準備するもの>

・染色バット	20 個
・染色バット (HE 染色用)	2～3 個/班
・ピンセット	2～3 本/班
・マッペ	
・キシレン	脱パラ用 透徹用
・エタノール	脱パラ用 透徹用
・蒸留水	
・ヘマトキシリン	
・エオジン	
・封入剤	6 班分

<染色手順>

(1) キシレン・Ⅰ	3 分
(2) キシレン・Ⅱ	3 分
(3) キシレン・Ⅲ	3 分
(4) 100%エタノール	2 分
(5) 100%エタノール	2 分
(6) 90%エタノール	2 分
(7) 70%エタノール	1 分
(8) 流水水洗	2 分
(9) ヘマトキシリン	5 分
(10) 流水水洗 (色だし)	10 分

<40℃くらいのお湯なら5分程度>

(11) エオジン	3～5 分
(12) 軽く水洗	1～2 秒
(13) 70%エタノール	10～30 秒

<様子をみながら>

(14) 100%エタノール	1 分
(15) 100%エタノール	3 分
(16) 100%エタノール	3 分
(17) キシレン・Ⅰ	3 分
(18) キシレン・Ⅱ	3 分
(19) キシレン・Ⅲ	3 分
(20) 封入	

注意事項

- 1) 脱パラフィン時の液温には十分注意する。最近では冷暖房を完備している部屋が多いが、とくに 20～25℃以下ではキシレンの脱パラ作用は 30℃近くの場合に比して、かなりの差がある。注意深く浸す時間を決定すべきである。
- 2) 脱パラフィンの純アルコール (100%) はきわめてキシレンの混入する汚れが著しいので常に注意する必要がある。汚れに応じて順次交換が必要である。70%アルコールも同様である。アルコールへのキシレンの混入は程度問題ではあるが、汚れたアルコールを水面上に数的落としてみて、白濁するようなら速やかに新調する。また、キシレンのパラフィンによる汚れの判定は、新調したアルコールにキシレンから移した切片を入れた時、液面にパラフィンが浮くか否かによる。
- 3) 脱パラ後の水洗は充分に行う。この段階で切片やスライドグラスが白濁し、水をはじくのは脱パラ列での処理の不十分さによる。脱パラフィンを逆に、多少時間をかけて順次キシレン・Ⅱまで戻し、液が汚れていたら速やかに新調し、再度行う必要がある。
- 4) ヘマトキシリン液で、マイヤーの液の場合はそのまま次に移ってよいが、ハリスのような退行性染色液の場合には軽く水洗した後、0.5～1.0%塩酸アルコール (70%アルコール使用) で脱色分別を行う。その後、充分水洗による色だし定着を行う。
- 5) ヘマトキシリン液に浸す時間の決定は、ある程度固定条件の整った材料、たとえば日常ルーチンで流している生検材料とか、比較的短い死後時間の剖検材料もしくは通常行っている動物実験材料等を染めてみて、その染まり具合を判断して決定しておくといよい。とくに外部からの材料の固定条件の良否を知る手がかりともなる。また、ヘマトキシリンの過染は後のエオジン色素ののりを悪くするので注意する。
- 6) ヘマトキシリンの色だしは完全に行うことが大切である。とくに流水水洗の際、水道水の液温にも気を使う必要がある。夏期と冬期では地方にもよるが、かなりの差がある。充分に切片の色具合をみて打ち切る時を判断することである。この判定はごく初期の初心者は鏡検によって行うべきである。その肉眼による色合いを認識しマスターするようにすることである。短時間で完了したい場合には、切片を軽く水で水洗した後、35～40℃くらいのぬるま湯にて行うといよい。また、弱アルカリ性水溶液を用いる方法もあるが、後のエオジンの染まりが悪くない程度に水洗せねばならず、時間的にはやや不利である。ただし、いずれの場合においても切片の剥離が生じないように注意が必要である。なお、弱アルカリ性液は飽和炭酸リチウム溶液を作っておき、必要に応じて水道水 100 ml に

対し2〜4滴程度加えるのがよい。

- 7) エオジン液での後染色は必要以上に浸しすぎないようにする。とくに酸を含む液では、必要限度内でできるだけ短時間に染めるようにする。なぜなら、せっかく充分流水水洗した青紫色の核が、ふたたび酸によって赤褐色味を帯びる可能性があるからである。しかし、エオジンは多少、後の脱水ラインで脱色させることをふまえ、濃いめに染めるようにする方がよい。ただ、エオジン液から切片を出したとき、一定の濃さの赤味を帯びていても固定条件の悪い場合には、次の脱水ラインできわめて短時間に脱色されてしまうこともあり、充分注意する。そのような場合には、脱色力の強い70、80%アルコールを飛び越して90%アルコールから脱色分別、脱水を行うとよい。
- 8) 好みにもよるが、エチルエオジンで染めると細胞膜やミエリン鞘等の脂質を含む部分が明瞭に表現される傾向がある。したがって、“メリハリ”のある染色効果を望む向きには有効である。
- 9) エオジン液の後の水洗は、通常余分の液を流し去る程度にする。
- 10) 脱水・脱色分別ラインでは、前半を早めに通して、後の純アルコールでゆっくりと脱色分別した方が細胞質や繊維が美しく細かな部分まで分別され、シャープな感じの像が得られる。ただし、標本における赤味はかなりの幅があり、鏡検する者の好みにも左右される。しかし、自ずと限度はあり、その範囲内で染まるように注意しなければならない。
- 11) 封入剤は使いやすいものを用いればよく、良質のものを使うことである。市販のものの中には、多少屈折率に違いが見られるし、pH 度、変色、退色等にも注意する。メーカーによっては、同一銘柄品でも年月の経過に伴って成分的に変化した製品に変わることがあるので、充分気配りが必要である。
- 12) 封入操作での注意点は、清潔なカバーガラスを使うことが大切であり、封入後指紋等を付けないようにすることである。また、カバーガラスを用いたらかならず1度は軽くピンセットの先で押し、余分の封入剤を除くことが必要である。
- 13) カゴを用いて染める場合、とくにその液の切り方には充分な注意を払う必要がある
- 14) 色素以外の薬品類は国産の特級もしくは1級で充分間に合う。

【メモ】

染色態度

- ・青藍色〜淡青藍色：細胞核、石灰化部、一部の細菌・真菌、粘液その他
- ・赤〜濃赤色：細胞質、間質、各種繊維、好エオジン性顆粒、赤血球、角化細胞、その他

IV. マッソン・トリクローム染色

Masson's trichrome staining

今回の実習ではゴモリ変法で行う

目的

アザン染色と同様に膠原線維の染め分けを目的とする。鉄ヘマトキシリンで核を黒く、ボンソー・キシリジン、酸フクシン、アゾフロキシシンで細胞質を赤く、アニリン青で膠原線維を青く染めるので 3 色染色 (tri-chromestain) とよばれる。アザン染色に比べ、短時間で染め上がるので実用的である。

原理

分子量の異なる色素の配合で、細胞分子的構造の違いによる色素の取り込まれ方の差を利用している。

準備するもの

1) 固定

アザン染色と同様で、水銀を含むヘリー液、ツェンカー・ホルマリン液等で染色性はよいとされるが日常的ではない。ホルマリン固定標本は媒染剤を使用することで良好な染色性を示す。

2) 切片の厚さ

腎 1.5 μ m, その他 2 ~ 3 μ m 薄い切片がよい。

3) 試薬

・媒染剤 (アザン染色の媒染剤)

10%重クロム酸カリウム水溶液と 10%トリクロール酢酸水溶液の等量混合液

・ワイゲルトの鉄ヘマトキシリン

1 液 ヘマトキシリン 1g

95%エタノール 100ml

少し温めると溶けやすい。

2 液 塩化第二鉄 2g

蒸留水 95ml

濃塩酸(約 23%) 1ml

塩化第二鉄を溶解後、濃塩酸を加える。普通の濃塩酸は 35%ほどであり、原液 10ml に蒸留水 5ml を加え、約 23%として使用する。1 液、2 液を等量混合して使用するが、混和直後は共染が起こりやすく、濁った色に染まりやすいので、使用 30 分前には作製する。また、時間の経過とともに共染してくるので、その都度調製するのが望ましい。

・ 0.75%オレンジ G 水溶液

オレンジ G 0.75g/蒸留水 100ml/氷酢酸 2~3 滴

・ ボンソー・キシリジン/酸フクシン/アゾフロキシシン混合液

ボンソー・キシリジン 0.6g/酸フクシン 0.2g/

アゾフロキシシン 0.1g/蒸留水 500ml/氷酢酸 1.0 ~ 1.2ml

・ 2.5%リントングステン酸水溶液

リントングステン酸 2.5g/蒸留水 100ml

・ アニリン青液

アニリン青 0.4g/蒸留水 100ml/氷酢酸 8ml

湯煎で 20~30 分間煮沸し、冷却後濾過して使用する。

・ 第 2 媒染

2.5%リントングステン酸水溶液と 2.5%リンモリブデン酸水溶液の等量混合液

染色操作

1) 脱パラ :

キシレン I、II、III 各 5 分

エタノール I、II、III 各 2 分

70%エタノール 2 分

2) 脱アルコール・洗浄 :

流水水洗 → 蒸留水 3 分

3) 第 1 媒染 :

10%重クロム酸カリウム

10%トリクロール酢酸

等量混合液 (* 1) 30~40 分

4) 洗浄 :

流水水洗 → 蒸留水 3 分

5) 核染色 :

鉄ヘマトキシリン (* 2) 1 枚ずつ 10 分

6) 色出し : 流水水洗 5~10 分

7) 第 2 媒染 :

2.5%リントングステン酸

2.5%リンモリブデン酸

等量混合液 (* 3) 1 分

8) 染色 : 0.75%オレンジ G 液 (* 4) 2 分

9) 洗浄 : 1%酢酸水 I, II 各 2 秒

10) 染色(細胞質) :

ボンソー・キシリジン/酸フクシン/アゾフロキシシン混合液 20~30 分

11) 洗浄 : 1%酢酸水 I, II 各 2 秒

12) 媒染 : 2.5%リントングステン酸 10 分

13) 洗浄 : 1%酢酸水 I, II 各 2 秒

14) 染色(結合組織) : アニリン青 (* 5) 3 分以上

15) 洗浄 :

1%酢酸水 I, II (* 2, 軽く洗う) 各 2 秒

16) 分別・脱水

純エタノール I, II, III (* 7)

17) 透徹 : キシロール I, II, III 各 3 分

注意事項

- *1: 長時間いれるとアニリン青の染まりがやや悪くなる。臓器, 切片の厚さにより変化するので時間を調整する。
- *2: 長めに染めて 0,5~1%の塩酸アルコールで分別する方がよい。できれば1液, 2液とも使用時作製がよい。2倍カラッチのヘマトキシリンで代用してもよいが, 鉄ヘマトキシリンより染色に時間を要する。
- *3: 第1媒染が効果的であるほど鉄ヘマトキシリンが赤色調となる。黒色を保つため第2媒染を用いているが, 長すぎるとアニリン青の染色性が悪くなりやすい。1分を超えないこと。
- *4: ここのオレンジGを省略し, アニリン青をアザン染色のアニリン青・オレンジG混合液に代えても, ほぼ同様の染色性を示す。この場合は原液を使用する方がよい。
- *5: アニリン青は臓器, 症例, 切片の厚さにより染色時間が異なるため, 鏡検しながら調節する。染まりが不十分であれば, 再度アニリン青へ入れる。
- *6: 1%酢酸水は長く入れるとアニリン青が落ちる。2槽用意し, 1つ目で洗い2つ目で止める。青と赤のバランスがよいのがポイントである。
- *7: 1枚ずつ丁寧に分別する。イソプロピルアルコールがよい。過染ぎみの場合は, ややアニリン青が落ちやすい純エタノールを用いる。

マッソン ゴモリ変法

- | | |
|-----------------|------|
| 1. 脱パラ | |
| 2. 飽和ピクリン酸 | 10分 |
| 3. 流水洗 色が抜けるまで | 約10分 |
| 4. ヘマトキシリンで核染 | 8分 |
| 5. 流水洗 | 10分 |
| 6. マッソン染色 | 10分 |
| 7. 0.1%酢酸水溶液で洗う | 10秒 |
| 8. 95%アルコール | 1分 |
| 9. 100%アルコール | 1分 |
| 10. 100%アルコール | 1分 |
| 11. キシロール1 | 1分 |
| 12. キシロール2 | 1分 |
| 13. キシロール3 | 1分 |

染色態度

膠原線維, 細網線維, 腎糸球体基底膜—鮮やかな青
 核—紫黒色～紫赤色
 細胞質—淡赤色～紫赤色
 赤血球—橙黄色～橙赤色
 線維素, 免疫タンパク—赤～赤橙色
 粘液—青
 細胞分泌顆粒—好塩基性—青
 好酸性—赤