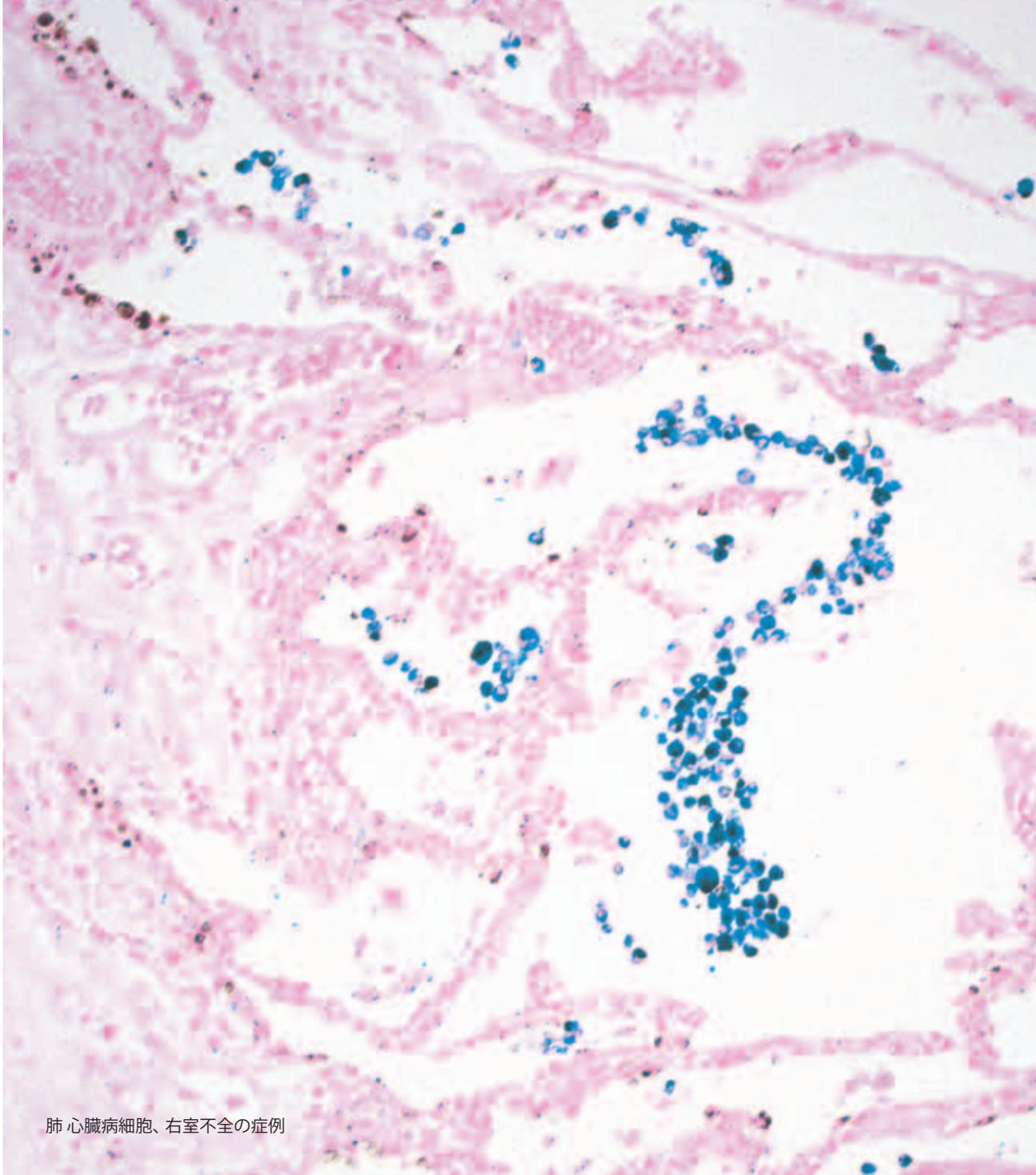


Trouble shooting

組織内無機物の染色法 / 鉄・銅・カルシウム

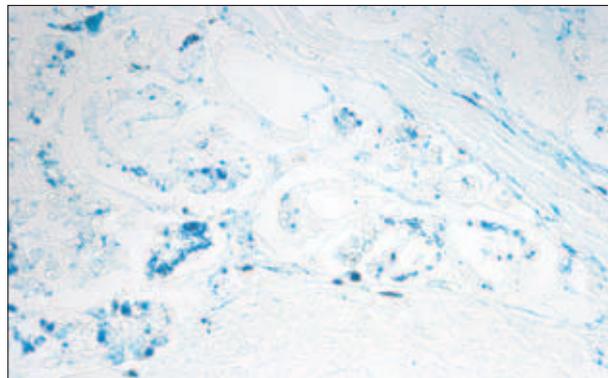


肺 心臓病細胞、右室不全の症例

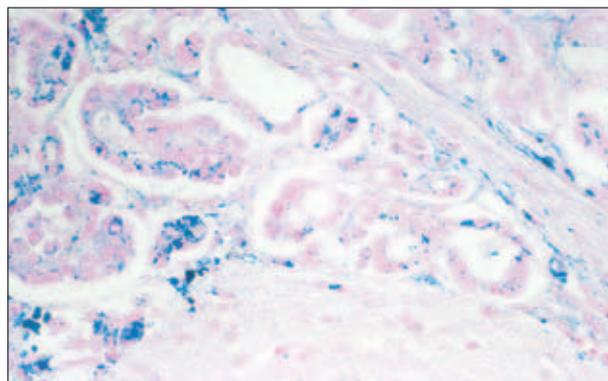
A. 鉄染色 / ベルリンブルー反応

標準的染色法 ^{*1}

- Step 1) 脱パラフィン
- 2) 流水水洗
- 3) 蒸留水水洗 十数秒 ^{注1}
- 4) ベルリンブルー
反応液 15 ~ 30分
- 5) 蒸留水水洗 十数秒 ^{注2}
- 6) 流水水洗
- 7) 後染色 (ケルンエヒトロート)
- 8) 流水水洗
- 9) 脱水、透徹、封入



Step 4) の状態: ヘモジデリンが青藍色に染色される。



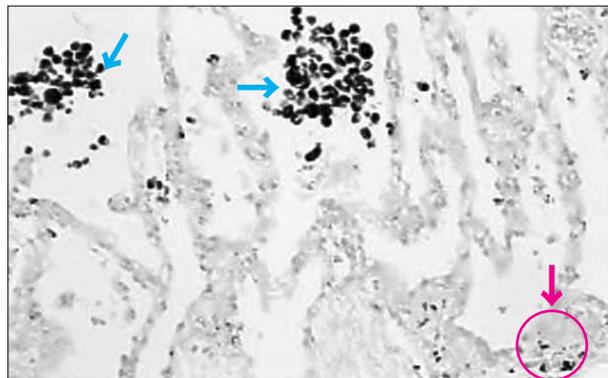
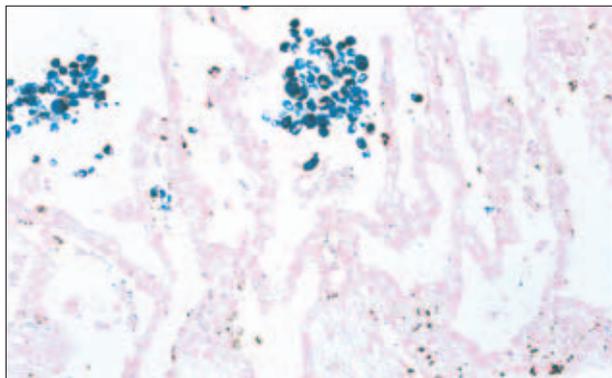
Step 7) の状態: 組織内のヘモジデリン沈着部位が確認される。

注1: 水道水中の鉄持ち込みを防ぐため、
予め蒸留水で十分に洗浄する。

注2: 標本上に残ったベルリンブルー反応液を
除去する目的で行う。

結果

ヘモジデリン (3 価鉄イオン) : 青藍色



(→) 炭粉沈着

(→) 表紙と同一症例で、心臓病細胞 (マクロファージに貪食された鉄) の集まり。

試薬

2% フェロシアン化カリウム水溶液	フェロシアン化カリウム	2 g
	蒸留水	100 mL
2% 塩酸水溶液	濃塩酸	2 mL
	蒸留水	98 mL
ベルリンブルー反応液	2% フェロシアン化カリウム水溶液	50 mL
	2% 塩酸水溶液	50 mL
ケルンエヒトロート	ケルンエヒトロート	0.1 g
	硫酸アルミニウム	5 g
	蒸留水	100 mL

調製法

ベルリンブルー反応液

使用直前に 2% フェロシアン化カリウム水溶液と 2% 塩酸水溶液を等量混合する。

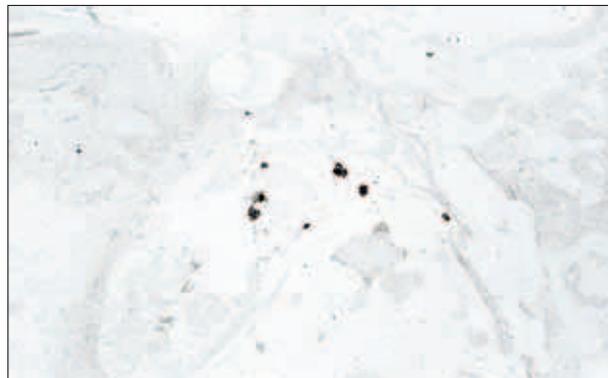
ケルンエヒトロート

蒸留水 100 mL にケルンエヒトロート 0.1 g、硫酸アルミニウム 5 g を加え、加温式マグネチックスターラーにて加温溶解する。液が沸騰したら放置し、室温にまで冷却した後、ろ過する。

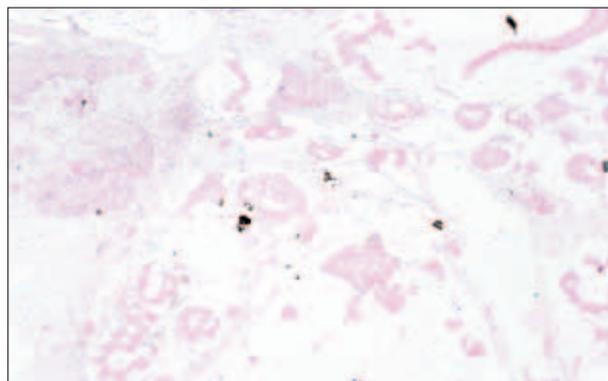
B. カルシウム / コッサ染色法

標準的染色法 ^{*2}

- Step
- 1) 脱パラフィン
 - 2) 流水水洗
 - 3) 蒸留水水洗 十数秒
 - 4) 5% 硝酸銀
水溶液 1 ~ 2 時間 ^{注1}
 - 5) 蒸留水水洗 3 回
 - 6) 5% チオ硫酸
ナトリウム 2 ~ 3 分
 - 7) 流水水洗
 - 8) 後染色 (ケルンエヒトロート)
 - 9) 流水水洗
 - 10) 脱水、透徹、封入



Step4) の状態 : カルシウムが黒褐色に染色される。



Step8) の状態 : 組織内のカルシウム沈着部位が確認される。

注 1 : 硝酸銀の反応は直射日光下、蛍光灯下、間接光下で行われ、直射日光下では 30 分 ~ 1 時間、蛍光灯、間接光下では 1 ~ 2 時間程度反応させる。反応時間は条件により異なるため顕微鏡下での確認が必要である。

結 果

カルシウム : 黒褐色

カルシウムの消化法

切片を2枚用意し Step 2) の後、1枚は処理液で20分程度反応させ、残りの1枚は蒸留水で待機する。処理液には pH4.5 クエン酸緩衝液^{*3} や 1% 塩酸水溶液^{*4} を使用し、陰性化を確認する。

試薬

5% 硝酸銀水溶液	硝酸銀	5 g
	蒸留水	100 mL
5% チオ硫酸ナトリウム	チオ硫酸ナトリウム	5 g
	蒸留水	100 mL
ケルンエヒトロート	ケルンエヒトロート	0.1 g
	硫酸アルミニウム	5 g
	蒸留水	100 mL

調製法

5% 硝酸銀水溶液

蒸留水 100 mL に、硝酸銀 5 g を溶解する。

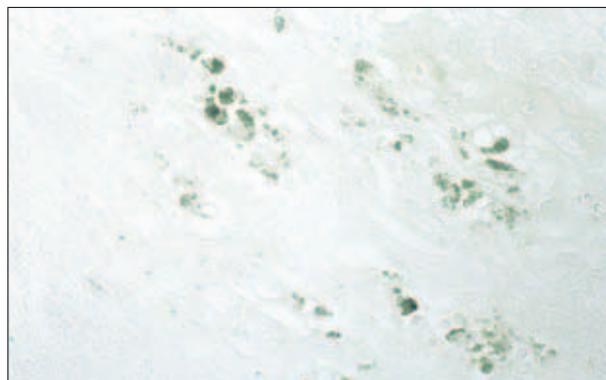
5% チオ硫酸ナトリウム

蒸留水 100 mL に、チオ硫酸ナトリウム 5 g を溶解する。

C. 銅 / ルベアン酸染色法

標準的染色法 ^{*5}

- Step
- 1) 脱パラフィン
 - 2) 流水水洗
 - 3) 蒸留水水洗・・・十数秒
 - 4) ルベアン酸反応液・・・36℃、
12～24時間
 - 5) 流水水洗
 - 6) 脱水、透徹、封入



ルベアン酸染色法：銅が黒緑色に染色される。

結果

銅：黒緑色

試薬

0.1% ルベアン酸エタノール溶液	ルベアン酸	0.1 g
	エタノール	100 mL
5% 酢酸ナトリウム水溶液	酢酸ナトリウム	5 g
	蒸留水	100 mL
ケルンエヒトロート	ケルンエヒトロート	0.1 g
	硫酸アルミニウム	5 g
	蒸留水	100 mL

調製法

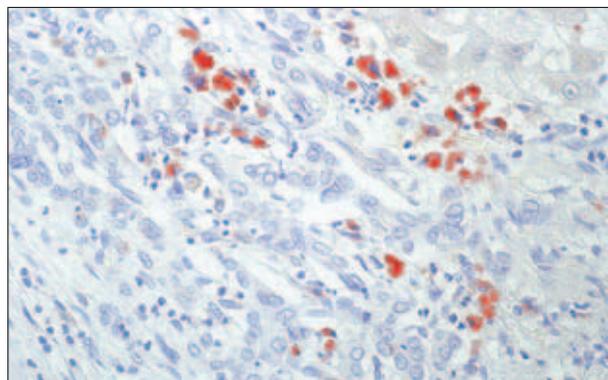
ルベアン酸反応液

5% 酢酸ナトリウム水溶液 100 mL に 0.1% ルベアン水素酸エタノール溶液 2～5 mL 加える。
この液は、使用時に調製する。

D. 銅 / ロダニン染色法 (パラジメチルアミノベンジリデンロダニン:PDMABR法)

標準的染色法 ^{*5}

- Step
- 1) 脱パラフィン
 - 2) ロダニン染色液・・・37℃、
24時間以上
 - 3) 水洗・・・・・・・・・・2～3分
 - 4) ヘマトキシリンで核染・・・3分
 - 5) 色だし
 - 6) 手早く脱水、透徹、封入



ロダニン染色法：銅が赤色に染色される。

結果

銅 ^注：赤～赤褐色

試薬

PDMABR 飽和アルコール溶液 (0.05% で飽和となる)	3 mL
10% 酢酸ナトリウム水溶液	100 mL

調製法

PDMABR は 0.1 g を蒸留水 100 mL に加え、37℃、一晩放置。その後、室温にて上清 3 mL を 10% 酢酸ナトリウム水溶液 100 mL に加える。

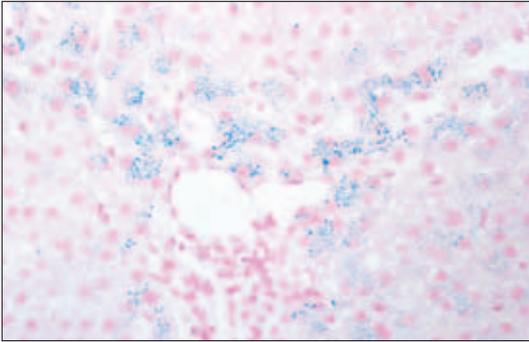
注：金、銀、水銀、パラジウムも反応するので必要ある場合は下記の方法で鑑別する。

PDMABR 飽和アルコール溶液・・・・・・・・・・	3～10 mL	} 37℃、一晩染色する。
1N 塩酸・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1～4 mL	
蒸留水・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	100 mL	

銅であれば反応は見られず、他の金属は赤紫色に反応する。ルベアン酸法もロダニン法も共に陽性コントロールを使用する。

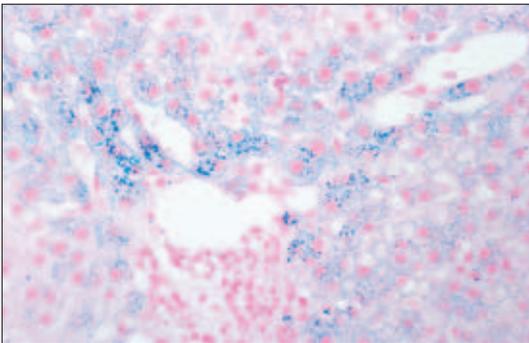
E. トラブルと対処法

E-1 トラブルと対処法（ベルリンブルー反応）



反応弱（水道水にて作製した酸性ホルマリンにて固定）

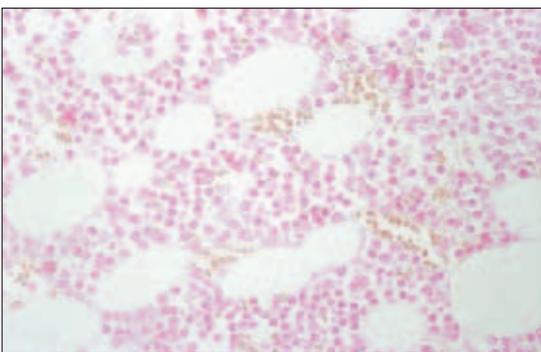
トラブル-1: 反応が弱い標本



適正標本（中性緩衝ホルマリンにて固定）

対処法-1:

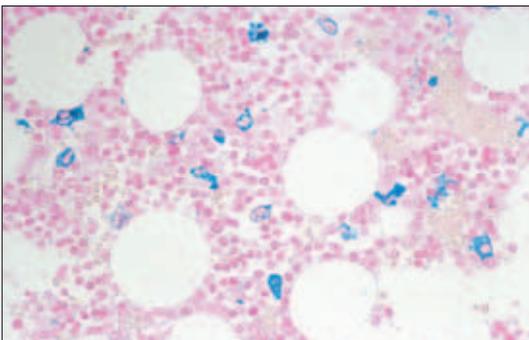
鉄は酸により溶出しやすく、pHが酸性の固定液（蟻酸の混在したホルマリン等）にて長時間固定を行うと鉄が溶出し、反応が減弱するため、中性緩衝ホルマリンの使用が望ましい。



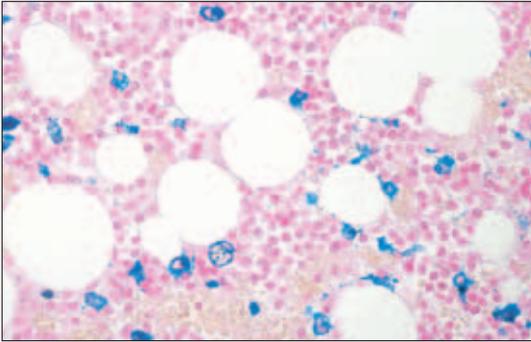
10% 塩酸 (pH0.04) (6時間: 骨髄) 反応は陰性である。

トラブル-2: 脱灰による反応の減弱

脱灰液の種類により、反応に差があるので注意する。



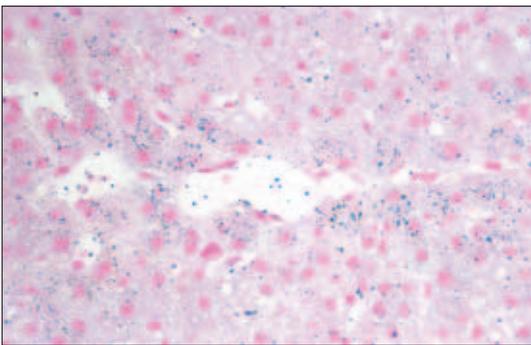
10% 蟻酸 (pH1.4) (6時間: 骨髄) EDTA より劣るが、反応は陽性である。



14%EDTA2K(pH7.0) (6 時間 : 骨髓)

対処法 -2:

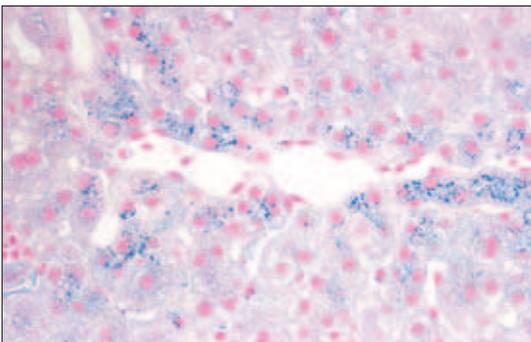
組織を脱灰する場合は、塩酸、蟻酸などの酸性脱灰液は避け、中性脱灰液の EDTA を使用する。



染色顆粒

トラブル -3: 染色顆粒の沈着

試薬調製から染色工程での鉄の混入は、フェロシアン化カリウムを消費し、染色の劣化を招く。使用する器材、染色切片は蒸留水による十分な洗浄が必要である。



適正標本

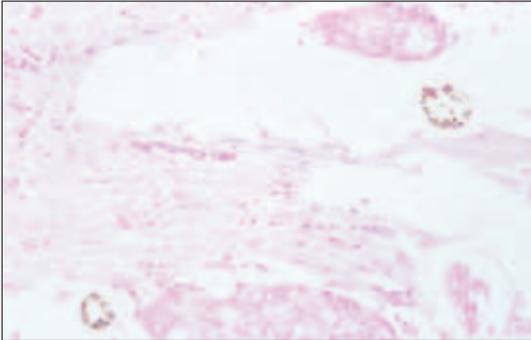
対処法 -3:

反応試薬への鉄の混入に起因する。

市販の塩酸も GR グレード (特級相当) で、鉄 Max.0.1 ppm、Suprapur グレードで鉄 Max.10.0 ppb 含有。鉄試験用無鉄の塩酸で、0.7 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ 含有しているため、できる限り無鉄塩酸 (含有量 7 ppb) を使用することが望ましい。しかし、ベルリンブルーの感度は $0.002\ \gamma = 0.002\ \mu\text{g}(2\ \text{ng})$ とされ、市販のいずれの塩酸を使用しても鉄の混入は避けられない。市販の精製水もやはり鉄含有量が $0.1\ \mu\text{g}/100\text{ mL}$ で検出感度を上まわってしまう。組織化学の分野では、使用直前に調製する。

E. トラブルと対処法

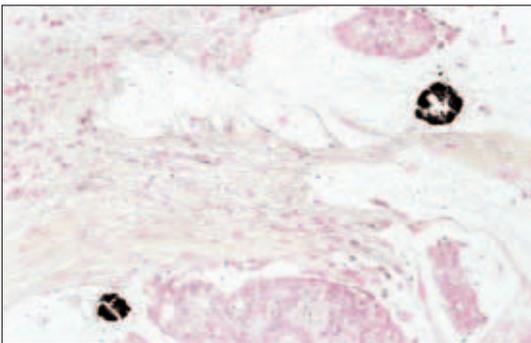
E-2 トラブルと対処法（コッサ染色法）



反応減弱

トラブル-1: 反応の減弱

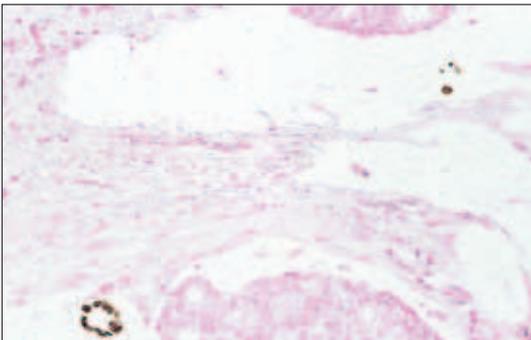
カルシウム沈着部の色調が、赤褐色で反応時間が短い。



反応過剰

トラブル-2: 反応過剰、共染

カルシウム沈着部は、濃く反応しているが、結合組織も銀がかぶり共染している。



適正標本

対処法-1、2:

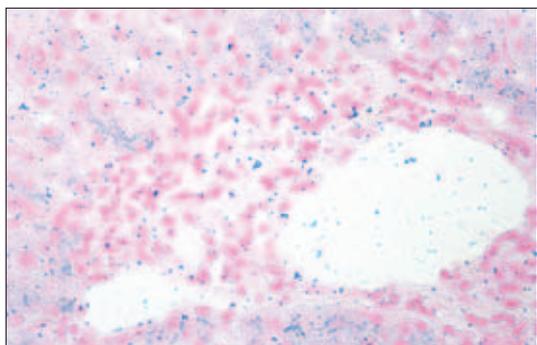
染色時間等を調製し、顕微鏡にて染色強度の確認を行い染色を進める。

カルシウム沈着部がよく反応しており、結合組織の染着部もない。

F. その他 / トラブル及び注意点

ベルリンブルー反応液について

フェロシアン化カリウムと酸の混合液を長時間放置すると Ferrocyanhydric acid が形成され、さらに分解することにより 3 価の鉄塩を生じる。これがベルリンブルー染色液と反応し、プルシアンブルーとなる。^{*6}



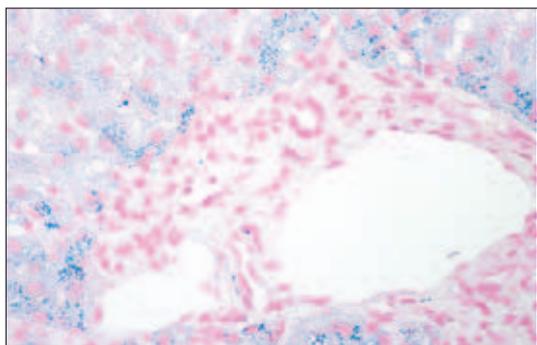
調製後長時間放置、反応減弱



調製後長時間放置、染色顆粒析出

左：調製直後、中：2 時間（着色）、右：3 時間以上
（沈殿物析出）

染色液を調製後放置した場合、経時的に液が着色し約 2 時間後には染色顆粒の析出、及び染色液の劣化が始まる。



調製後直ちに使用

G. 操作の難易度（やや難）

ベルリンブルー反応、ルベアン酸染色法は、試薬調製に注意を払えば染色性は安定しており、比較的易しい染色である。また、コッサ染色は反応条件により鍍銀時間が異なり、染色強度の確認が必要でありやや難しい染色である。

H. 予備知識

ベルリンブルー反応法の原理

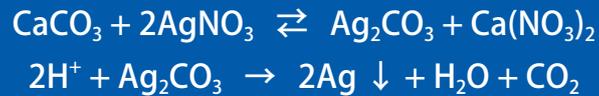
3価の鉄は蛋白質との複合体を形成し、生体内に存在する。これを酸で分解することにより、続くフェロシアン化カリウムとの反応が促される。

3価の鉄イオン (Fe^{3+}) がフェロシアン化カリウム (黄血塩) $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ と結合し、青藍色のフェロシアン化鉄 (ベルリンブルー) $[\text{KFe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$ が形成される。



コッサ染色法の原理^{*7}

カルシウムは生体内では主にリン酸塩、及び炭酸塩として沈着している。これらのカルシウムが銀で置換されることに基づく反応で、生体内のリン酸カルシウムや炭酸カルシウムを証明する方法である。



ルベアン酸染色法の原理

銅がルベアン酸と反応し、複合体を形成する。



生体内色素 (Endogenous pigment)^{*8}

1. 血色素由来 (Hematogenous pigment)

1) ヘモジデリン (Hemosiderins)

ヘモジデリンは細胞質内に見られる黄褐色顆粒で、蛋白質と結合した水酸化鉄を含む。ヘモグロビンやミオグロビンにチトクロームオキシダーゼやペルオキシダーゼが作用し、生成される。

鉄は小腸から吸収され、生体内の約 30% は細網内皮系 (特に骨髄) に貯蔵され、赤血球のヘモグロビン生成時に利用される。出血に伴う喪失や摂取不足により鉄欠乏が起こる一方で、鉄の過剰状態になると細網内皮系組織 (骨髄、肝、脾) への鉄沈着をきたす (ヘモジデロシス)。

2) ヘモグロビン (Hemoglobin)

ヘモグロビンは赤血球中に存在し、酸素、二酸化炭素の輸送に関っている。ヘモグロビンはグロビン蛋白 4 分子と赤い色素であるヘム 4 分子から成っており、ヘムはさらにプロトポルフィリンと鉄イオンから成る。

3) 胆汁色素 (Bile pigment)

胆汁色素は、肝細胞内の黄褐色小顆粒として認められ、一般的に抱合、非抱合ビリルビンの両者をさす。ヘモグロビン中のプロトポルフィリンは、細網内皮系の貪食細胞にてビリベルジンとなる。その後肝臓で非水溶性のビリルビンとなり、グルクロン酸との結合により水溶性のビリルビンとなる。このビリルビンは胆道を経て十二指腸に排出される。

胆汁色素の沈着は胆石、癌、代謝異常といった様々な要因によって引き起こされる。

4) ポルフィリン (Porphyrins)

エリスロポエチン性プロトポルフィリン症患者の肝臓に沈着する赤褐色顆粒で、顆粒中央部には暗調のマルタ十字が確認される。

2. 非血色素由来 (Non-Hematogenous pigment)

1) メラニン (Melanins)

メラニンは褐～黒色の色素で皮膚、脳、毛髪などに見られる。チロシンへのチロシナーゼ作用に始まりドーパ、ドーパキノン等の中間生成物を経てメラニンとなる。メラニンは正常でも存在するが、特に悪性黒色腫の診断に重要となる。

2) リポフスチン (Lipofuscins)

黄褐～赤褐色の色素で生体内に広く分布する。脂肪、リポ蛋白の酸化により生成され、生成の過程で受けた酸化の度合により、その形態、反応性、染色性に多様性が見られる。

3) クロマフィン (Chromaffin)

副腎髄質に見られる暗褐色の顆粒で、特に副腎の褐色細胞腫 (Pheochromocytoma) に認められる。クロムを含有する固定液が推奨される。

4) 偽メラノーシス (Pseudomelanosis, Melanosis coli)

大腸、虫垂粘膜固有層のマクロファージ内に見られる。

5) Dubin-Johnson 色素 (Dubin-Johnson pigment)

Dubin-Johnson 症候群患者の肝臓に黒褐色顆粒として認められる。組織化学的にはリポフスチンに類似するが、電顕的に鑑別される。

6) セロイド型リポフスチン (Ceroid-type lipofuscins)

早期の酸化段階で生じたリポフスチンと考えられている。

7) Hamazaki-Weisenberg 小体 (Hamazaki-Weisenberg bodies)

リンパ節洞に見られる黄褐色の紡錘形の小体で、大型のリソゾーム余剰体と考えられている。

I. 予備知識

3. 生体内金属 (Endogenous minerals)

1) カルシウム (Calcium)

カルシウムは生体内ではイオンとして血液に見られる一方で、不溶性の塩類 (磷酸塩、炭酸塩) として骨や歯に含まれる。病的な沈着には結核の乾酪壊死巣、梗塞、アテロームの血管壁や膀胱のマラコプラキアが知られている。固定はカルシウムを含む固定液、酸性固定液は避け、中性緩衝ホルマリンやアルコール系の固定液を使用する。

2) 銅 (Copper)

多くの酵素に含まれ、機能的に重要である。肝臓への沈着は Wilson 病や PBC、様々な肝疾患に見られる。銅は他の金属類と同様、ヘマトキシリンと青色のレーキを形成する。

3) 尿酸、尿酸塩 (Uric acid, Urate)

尿酸沈着はプリン代謝の破綻により惹起され、特に通風などで血中尿酸が過飽和になった場合、生体へ沈着する。

Pseudogout に見られる Calcium pyrophosphate crystal(CPPC) は偏光にて Positive birefringence を示し、飽和炭酸リチウム処理後のグロコット染色にて耐性を示す点で尿酸塩と鑑別される。

生体内色素の検出法

	対象	染色法	試薬	
血色素由来	ヘモジデリン	ベルリンブルー染色法	フェロシアン化カリウム	
			塩酸	
	ヘモグロビン	Leuco Patent blue V 染色法	Patent blue V	
	胆汁色素	Fouchet 法	塩化第二鉄	
トリクロロ酢酸				
Gmelin 法		硝酸		
非血色素由来	メラニン	Masson-Fontana 染色法	アンモニア銀	
		Schmorl 反応	塩化第二鉄	
		DOPA oxidase 法	フェロシアン化カリウム	
		漂白法	DOPA	
	リポフスチン	Schmorl 反応	酸性過マンガン酸カリウム	
			塩化第二鉄	
		Ziehl-Neelsen 染色法	フェロシアン化カリウム	
			石炭酸フクシン	
			Sudan black B 染色法	Sudan black B
			Aldehyde fuchsin 染色法	アルデヒドフクシン
カルシウム	アリザリンレッド染色法	アリザリンレッド S		
		硝酸銀		
	コッサ染色法	硝酸銀		
		ルベアン酸染色法	ルベアン酸	
銅	ロダニン染色法	p-dimethylaminobenzylidenerhodanin		
	ゴモリ染色法	ヘマトキシリン		

J. 参考文献

- * 1. 田村 猛, 他: 組織内金属の染色法. 検査と技術, Vol.19,no.11,934-938,1991
- * 2. 新染色法のすべて, Medical technology 別冊, 医歯薬出版, 120-123,1999
- ※ 3. C.F.A.Culling.et al.:Cellular Pathology Technique,Fourth Edition 294-297,1986
- ※ 4. Linda L.Vacca:Laboratory Manual of Histochemistry,408,1985
- * 5. 病理標本の作り方, 病理研究会編, 文光堂, 174-177,1992
- * 6. L.Lison. 今泉 正 訳: 組織化学および細胞化学 増訂,636-642,1961
- * 7. Dezna C.Sheehan.et.al.:Theory and Practice of Histotechnology,Second Edition,226-227,1980
- ※ 8. John D Bancroft.et.al.:Theory and Practice of Histological techniques,Fifth Edition,243-268,1996

試薬および関連製品

金属発色試薬 / 色素 / 染色液 / 一般試薬

製品名 (英名)	(和名)	注文番号	包装単位
5-(4-Dimethylaminobenzylidene)-rhodanin	5-(4-ジメチルアミノベンジリデン)ロダニン GR 分析用 (パラジメチルアミノベンジリデンロダニン)	1.03059.0005	5 g
Hydrochloric acid 32%	塩酸 32% GR 分析用 (鉄 :max. 0.1ppm)	1.00319.1000	1 L
Mayer's hemalum solution	マイヤーヘマトキシリン染色液 マイヤー原法より多量のヘマトキシリンを含み、染色力が強く迅速に(約30秒~1分)核染色が可能。	1.09249.0500	500 mL
Nuclear fast red (C.I. 60760) 核染色用	ヌクレアファーストレッド (ケルンエヒトロート)	1.15939.0025	25 g
Potassium hexacyanoferrate(II) trihydrate	フェロシアン化カリウム・三水和物 GR 分析用	1.04984.0100 1.04984.0500	100 g 500 g
Rubeanic acid	ルベアン酸 GR 分析用	1.00629.0010 1.00629.0100	10 g 100 g
Silver nitrate	硝酸銀 GR 分析用	1.01512.0025 1.01512.0100 1.01512.0250	25 g 100 g 250 g
Sodium thiosulfate pentahydrate	チオ硫酸ナトリウム・五水和物 GR 分析用	1.06516.0500	500 g

包埋剤

製品名 (英名)	(和名)	注文番号	包装単位
Histosec® 60 ペレットタイプ 凝固点 58~60°C	ヒストセック 60	1.01676.2500 1.01676.2504	2.5 kg 4 × 2.5 kg
Histosec® without DMSO ペレットタイプ 凝固点 56~58°C	ヒストセック DMSO フリー	1.15161.2500 1.15161.2504	2.5 kg 4 × 2.5 kg
Histosec® ペレットタイプ DMSO 含有 凝固点 56~58°C	ヒストセック	1.11609.2500 1.11609.2504	2.5 kg 4 × 2.5 kg

代用キシレン

製品名 (英名)	(和名)	注文番号	包装単位
Neo-Clear™ (xylene substitute)	ネオクリア	1.09843.5000 1.09843.5004	5 L 4 × 5L
Neo-Mount™	ネオマウント	1.09016.0500	500 mL

関連製品のご紹介

Neo-Clear™ 代用キシレン ネオクリア

病理標本作製に広く利用される高有害性のキシレンに代わる溶媒として、新しい低毒性溶媒ネオクリアを開発しました。ネオクリアは環境にやさしい脂肪族飽和炭化水素を成分とする溶媒です。従来のキシレンに代えて、パラフィン包埋、脱バラ、また透徹用としてご利用ください。専用の封入剤ネオマウントもご用意しております。



特長

- 低有害性
- 無臭ないし低臭性
- 環境への影響が小さい
- 使用条件はキシレンとほぼ同じ
- 染色標本への影響がほとんどない
- 厳しい品質管理により安定した品質

	ネオクリア	キシレン
成分	脂肪族飽和炭化水素	芳香族炭化水素
許容濃度(MAK)	1000 mg/m ³	221mg/m ³
沸点	140~165°C	137~143°C
揮発性	やや揮発しにくい	揮発しやすい
比重	0.74-0.75(20°C)	0.86(20°C)
臭い	マイルド	強い刺激臭
毒劇物取締法	指定なし	劇物
PRTR法	該当しない	該当

注) 許容濃度:化学薬品を扱う職場における作業環境上の許容濃度(ドイツないしEU内での規定)

協力：



順天堂大学 細胞病理イメージング研究部門 末吉 徳芳（写真左）

1972年 順天堂大学医学部病理学講座就職
1980年 東洋公衆衛生学院卒業
1992年 一級臨床病理技術士資格認定
1994年 順天堂大学大学院医学研究科研究基盤センター細胞病理イメージング研究部門配属
現在に至る

順天堂大学 医学部附属練馬病院臨床検査科臨床検査室 青木 裕志（写真右）

1989年 東京電子専門学校卒業
同年順天堂大学医学部附属順天堂医院臨床検査部就職
2001年 一級臨床病理技術士資格認定
2005年 順天堂大学医学部附属練馬病院臨床検査科病理検査室配属
現在に至る

順天堂大学 医学部附属順天堂浦安病院検査科 小谷津 純一

順天堂大学 医学部附属順天堂浦安病院検査科 川島 徹

順天堂大学 伊豆長岡病院検査科 服部 進

編集：

メルク株式会社

東京本社 試薬・ライフサイエンス事業部
〒153-8927

東京都目黒区下目黒1-8-1 アルコタワー5F

Tel:0120-189-390 /Fax:0120-189-350

E-mail:service@merck.co.jp

<http://www.merck.co.jp>

平成17年12月24日発行 EAM61-0512-5000