

Trouble shooting

病原微生物の染色 / グラム染色・グルコット染色
チールネルゼン染色・オルセイン染色

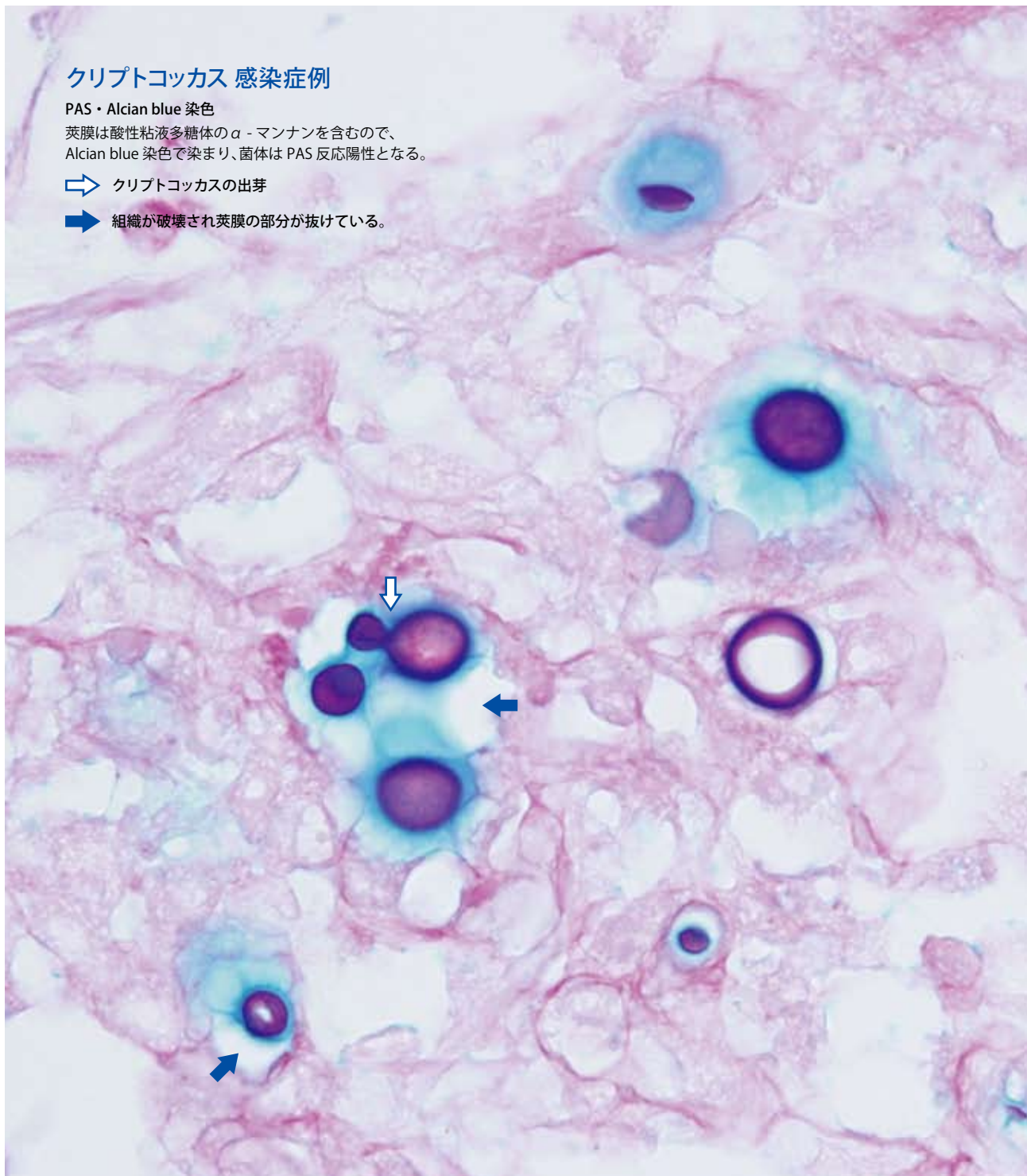
クリプトコッカス 感染症例

PAS・Alcian blue 染色

荚膜は酸性粘液多糖体の α -マンナンを含むので、
Alcian blue 染色で染まり、菌体はPAS 反応陽性となる。

⇨ クリプトコッカスの出芽

➡ 組織が破壊され荚膜の部分が抜けている。



A. グラム染色 / 標準的染色法

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
4) クリスタル紫液…………… 2 分
5) 流水水洗
6) グラムのルゴール液…………… 2 分
7) 流水水洗
8) 濾紙で水分を吸取る^{注1}
9) アセトン…………… 1 ～ 2 秒^{注2}
10) 流水水洗
11) サフラニンO液…………… 3 分^{注3}
12) 脱水、透徹、封入

注1. 切片を傷つけぬよう注意深く行い、切片を乾燥させない。

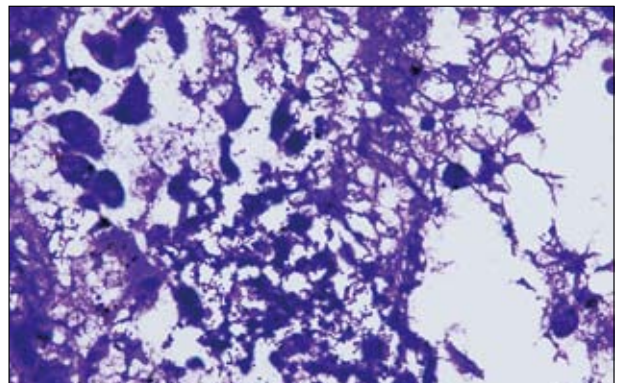
注2. 染色ムラにならぬよう切片を動かし、余分な色素が落ち、切片が白くなったら分別を止める。

注3. 染色時間は短くても良く、濃染すると陰性菌と組織との区別が困難となる。

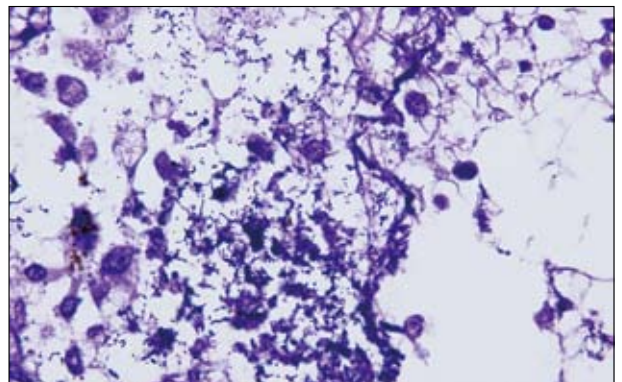
結 果

グラム陽性菌：青紫

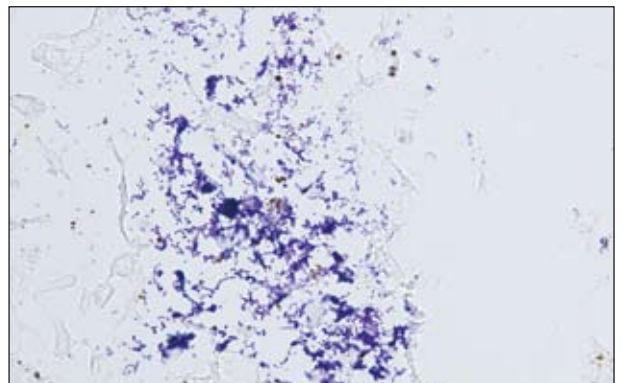
グラム陰性菌：赤



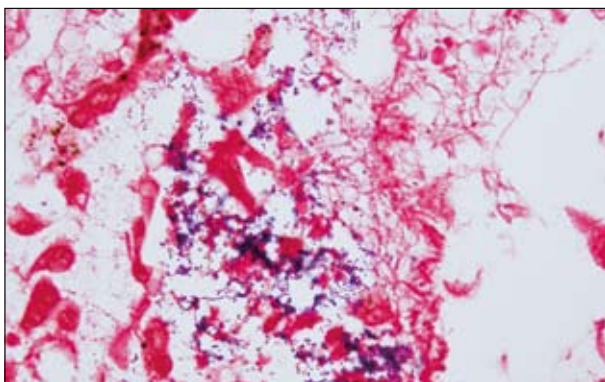
Step 4) の状態 対物 × 100



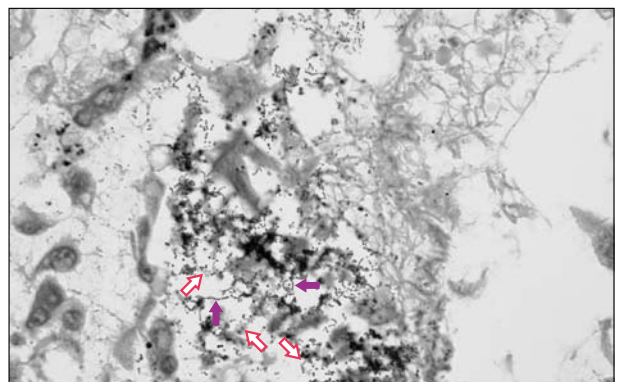
Step 6) の状態 対物 × 100



Step 9) の状態 対物 × 100



Step 11) の状態 対物 × 100



⇐：Gram 陰性桿菌がサフラニンで赤色調に染色されている。
⇐：Gram 陽性球菌がクリスタル紫で青色に染色されている。

試 薬

クリスタル紫液	クリスタル紫	0.5 g
	25% エタノール	100 mL
グラムのルゴール液	ヨウ素	1 g
	ヨウ化カリウム	2 g
	蒸留水	300 mL
サフラニンO液	サフラニンO	1 g
	蒸留水	100 mL

調 製 法

グラムのルゴール液

約 100 mL の蒸留水にヨウ化カリウム 2 g を加える。完全に溶解してから、ヨウ素 1g を加える。さらに蒸留水を添加し、全量を 300 mL とする。

B. 真菌染色 / グロコット染色

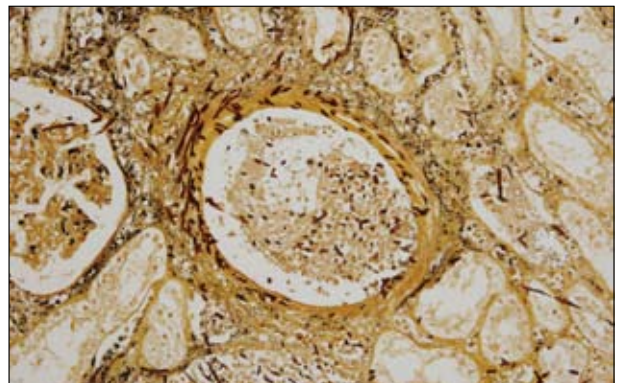
標準的染色法

*2

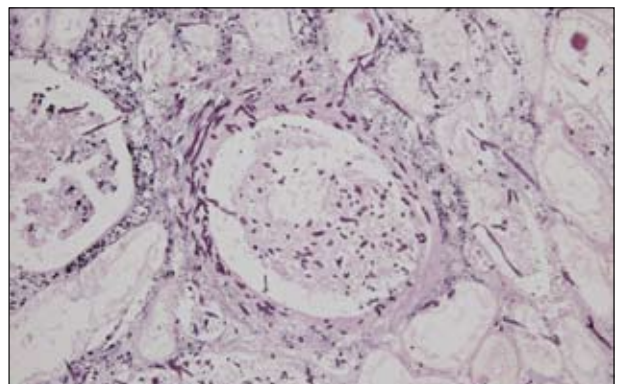
- Step 1) 脱パラフィン
2) 流水水洗
3) 5% クロム酸
水溶液 45 ～ 60 分
4) 流水水洗 数十秒
5) 1% 亜硫酸水素
ナトリウム 1 分
6) 流水水洗 10 分
7) 蒸留水水洗 4 回
8) メセナミン銀液 58 ～ 60℃、
45 ～ 60分^{注1}
9) 蒸留水水洗 6 回
10) 0.1% 塩化金酸
水溶液 2 ～ 5 分
11) 蒸留水水洗
12) 5% チオ硫酸
ナトリウム 2 ～ 5 分
13) 流水水洗 5 分
14) ライトグリーン 30 ～ 45 秒
15) 流水水洗^{注2}
16) 脱水、透徹、封入

注1. 鏡検中に反応が進行するため、切片は蒸留水に移してから反応の確認を行う。真菌が黒褐色、膠原線維が茶褐色となったら反応を終了する。切片の辺縁が濃染する傾向にあるため、全体のバランスを確認する。

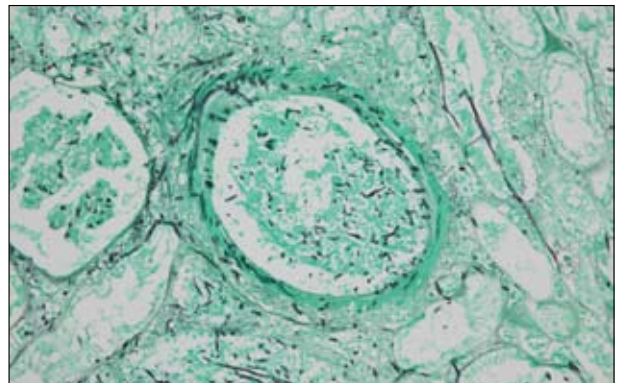
注2 ライトグリーンを適当な濃さに落とす。



Step 8) の状態 対物 × 20



Step 10) の状態 対物 × 20



Step 14) の状態 対物 × 20

結 果

真菌：黒色

試 薬

5% クロム酸水溶液	クロム酸	5 g
	蒸留水	100 mL
1 %亜硫酸水素ナトリウム	亜硫酸水素ナトリウム	1 g
	蒸留水	100 mL
メセナミン銀保存液 A)100 mL に B)5 mL を混和後、 冷暗所に保存する。	A) 3% メセナミン水溶液	
	ヘキサメチレンテトラミン	3 g
	蒸留水	100 mL
	B) 5 %硝酸銀水溶液	
	硝酸銀	5 g
	蒸留水	100 mL
5 %硼砂水溶液	四硼酸ナトリウム (硼砂)	5 g
	蒸留水	100 mL
0.1% 塩化金酸水溶液	2% 塩化金酸水溶液 (保存液)	5 mL
	蒸留水	95 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
ライトグリーン原液	ライトグリーン S.F.	0.2 g
	氷酢酸	0.2 mL
	蒸留水	100 mL

調 製 法

メセナミン銀液

メセナミン銀保存液 25 mL に、蒸留水 25 mL、5% 硼砂水溶液 2 mL を混和する。

ライトグリーン使用液

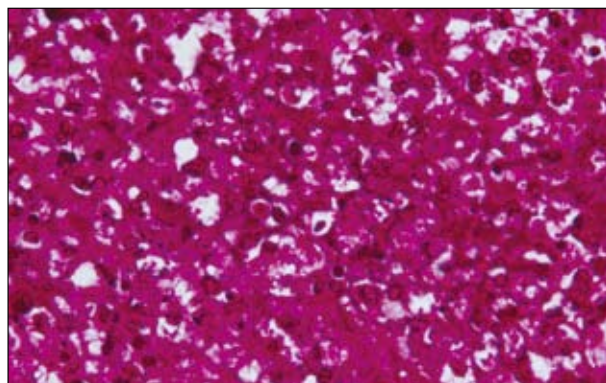
ライトグリーン原液 10 mL に、蒸留水 50 mL を混和する。

C. 抗酸菌染色 / チールネルゼン染色

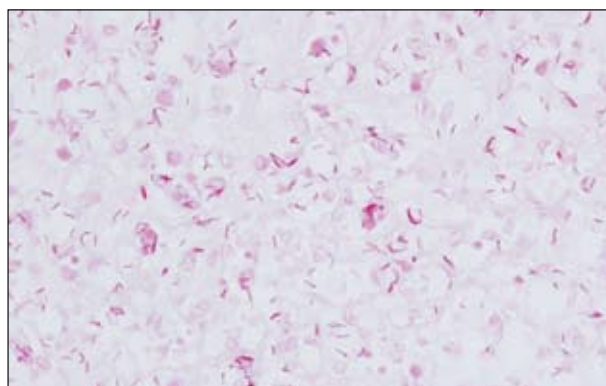
標準的染色法

*3

- Step 1) 脱パラフィン
2) 流水水洗
3) 蒸留水水洗
4) 石炭酸
フクシン液 56 ~ 60℃、
30分
5) 流水水洗
6) 1% 塩酸
70% アルコール 10 秒^{注1}
7) 流水水洗
8) メチレン青液 30 秒
9) 流水水洗 数回
10) 脱水、透徹、封入^{注2}



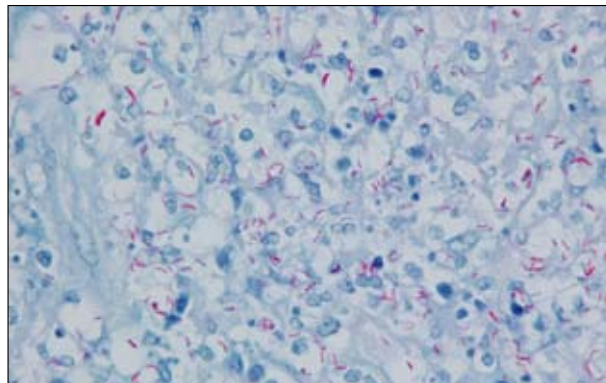
Step 4) の状態 対物 × 100



Step 6) の状態 対物 × 100

注1. 切片が白くなったら分別を停止する。過剰に分別を行うと菌体も脱色される。

注2. メチレン青が染色ムラになり易いため、アルコール槽では切片を動かす。



Step 8) の状態 対物 × 100

結果

抗酸菌、アクチノマイセス、ラッセル小体：赤

試 薬

塩基性フクシン保存液	塩基性フクシン	1 g
	エタノール	10 mL
5% 石炭酸水溶液 注3	石炭酸 (フェノール)	5 g
	蒸留水	95 mL
メチレン青液	メチレン青	0.25 g
	1% 酢酸アルコール	100 mL

注3. 石炭酸 (フェノール) は湯煎にて溶解し、蒸留水も予め約 60℃に加温しておく。

調 製 法

石炭酸フクシン液

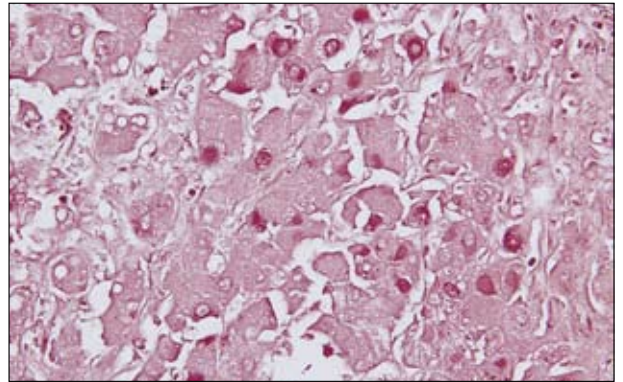
塩基性フクシン保存液 10 mL に 5% 石炭酸水溶液 95 mL を混和し、濾過後に使用する。

D. HBs 抗原染色法 / オルセイン染色

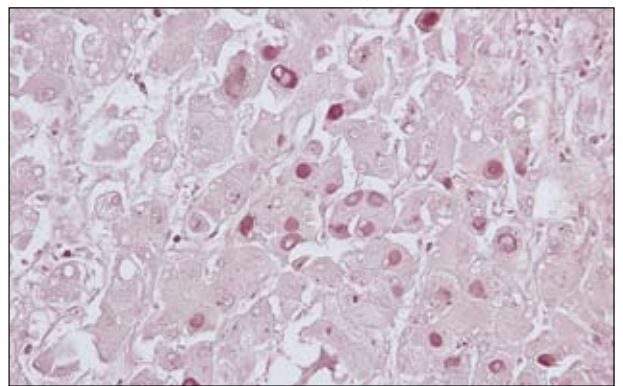
標準的染色法

*4

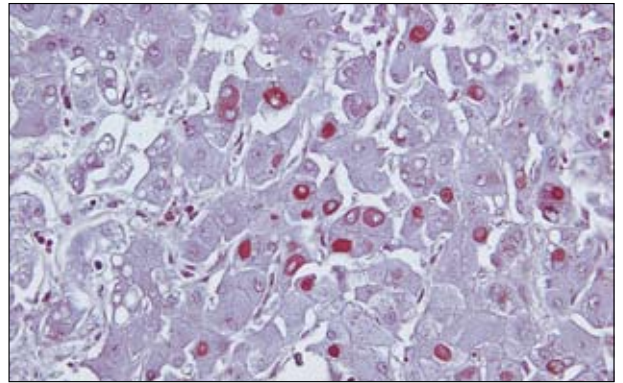
- Step 1) 脱パラフィン
2) 流水水洗
3) 蒸留水水洗
4) 酸性過マンガン酸
カリウム液 5 分
5) 流水水洗
6) 3% シュウ酸
水溶液 30 秒
7) 流水水洗 5 分
8) 70% エタノール 2 ~ 3 回
9) オルセイン液 4 時間
(37°C、90 分)
10) 70% エタノール 数回
11) 流水水洗
12) マイヤーヘマトキシリン 3 分
13) 流水水洗
14) 脱水、透徹、封入



Step 9) の状態 対物 × 40



Step 10) の状態 対物 × 40



Step 12) の状態 対物 × 40

結 果

HBs 抗原、弾性線維：茶褐色

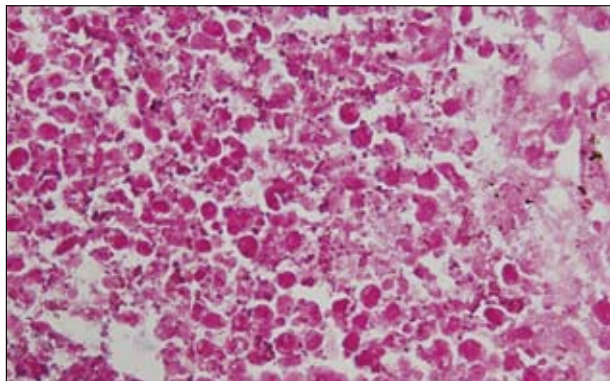
試 薬

酸性過マンガン酸カリウム液	過マンガン酸カリウム	0.15 g
	濃硫酸	0.15 mL
	蒸留水	100 mL
還元液	シュウ酸	3 g
	蒸留水	100 mL
オルセイン液	オルセイン	1 g
	70% エタノール	100 mL
	濃塩酸	1 mL

E. トラブルと対処法

E-1

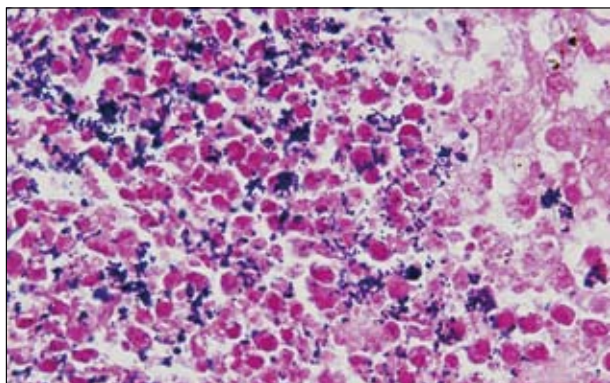
トラブルと対処法（グラム染色）



対物 × 100

トラブル - 1 : 脱色過剰

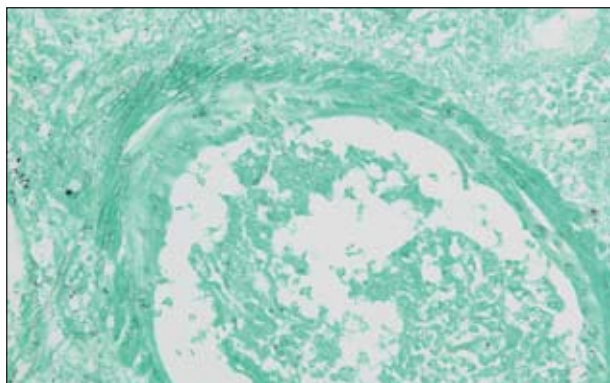
脱色操作が過剰で、グラム陽性菌がクリスタル紫に染まらず、サフラニンで赤く染色された標本。



対物 × 100

対処法 - 1 :

脱色操作は素早く行う。

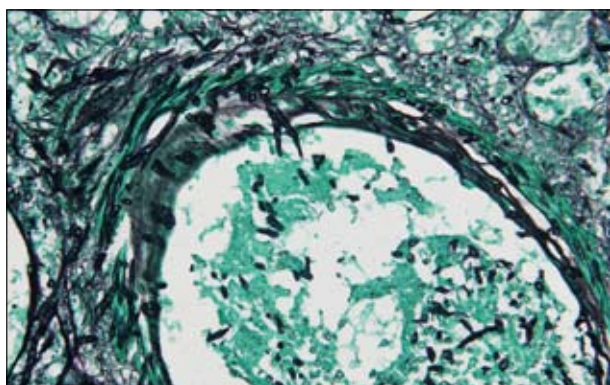


対物 × 40

トラブル - 1：反応減弱

真菌の色調が薄く、不明瞭である。

鍍銀時間が短い標本



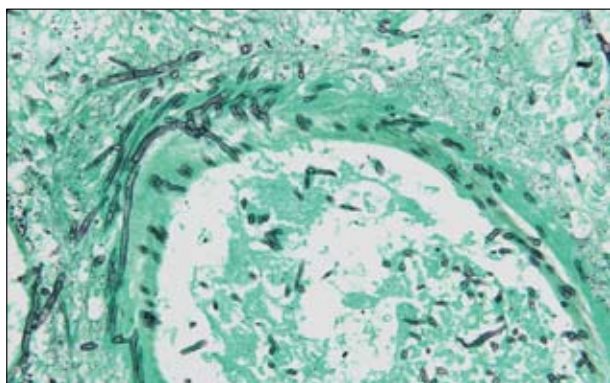
対物 × 40

トラブル - 2：反応過剰

結合組織が着色し、真菌の確認が困難である。

真菌菌糸は濃染し、隔壁も確認出来ない。

鍍銀時間が長い標本。



対物 × 40

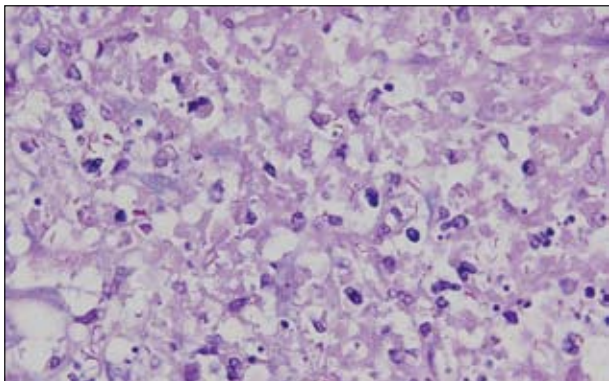
対処法 - 1, 2：

染色法 Step 8) において、顕微鏡にて染色強度を確認する。背景とのコントラストも良好で、隔壁の観察も容易である。

E. トラブルと対処法

E-3

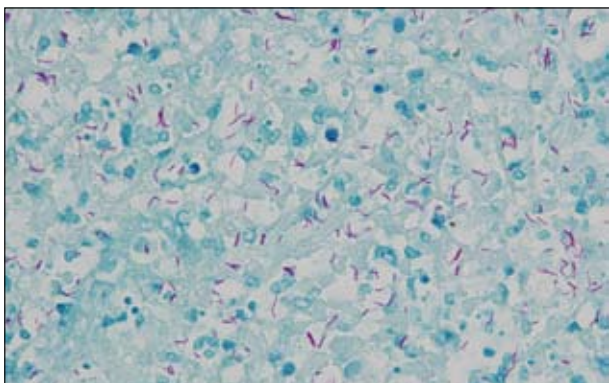
トラブルと対処法（チールネルゼン染色）



対物 × 100

トラブル - 1：分別不良

背景が着色し、抗酸菌が不明瞭である。分別が不足した標本。



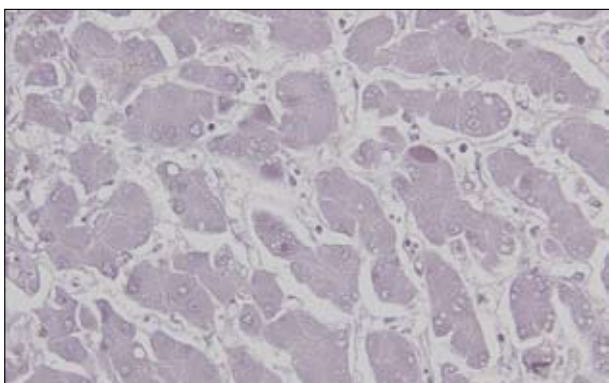
対物 × 100

対処法 - 1：

切片が薄いピンク～白くなるまで分別を行う。
抗酸菌が明瞭に観察出来る。

E-4

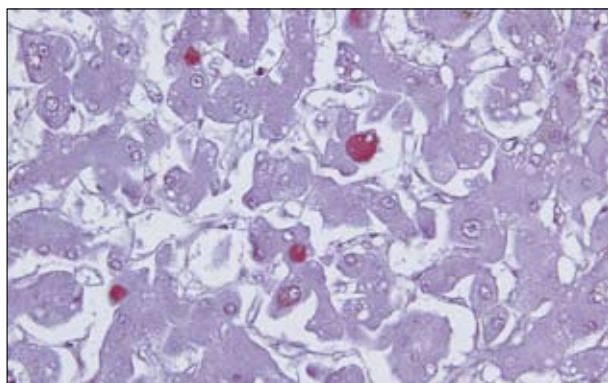
トラブルと対処法（オルセイン染色）



対物 × 40

トラブル - 1：反応減弱

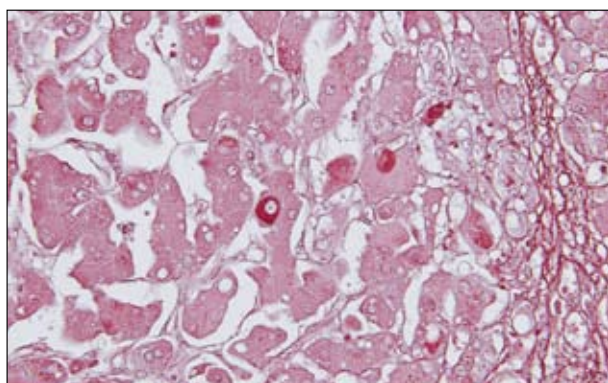
HBs 抗原の呈色が弱く、不明瞭である。



対物 × 40

対処法 - 1 :

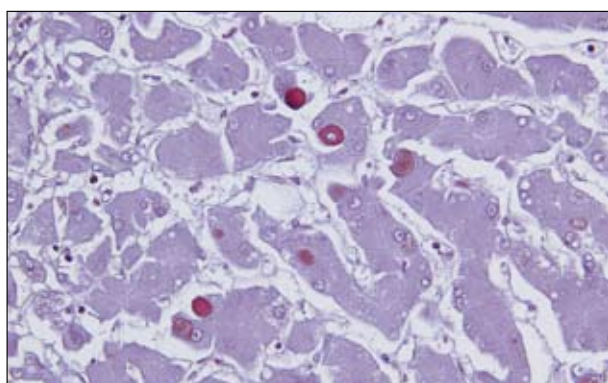
酸化処理の不足、或いは酸化過剰の場合色調が薄くなるため、酸化処理は2～5分に留める。



対物 × 40

トラブル - 2 : 反応過剰

分別不十分、或いは染色時間が長いため、背景に共染が見られる。



対物 × 40

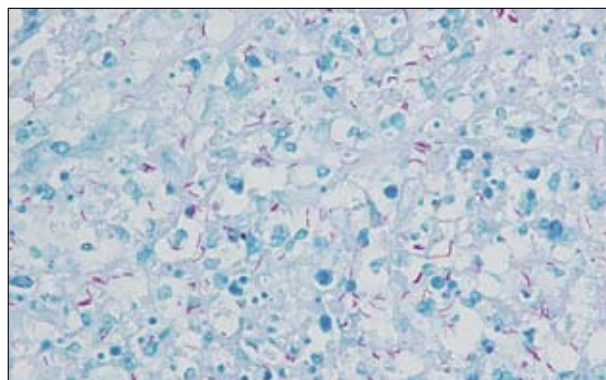
対処法 - 2 :

分別は十分に行う。

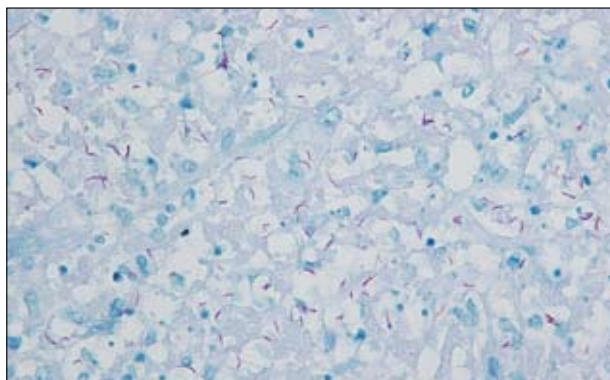
F. その他 / トラブル及び注意点

チールネルゼン染色液について

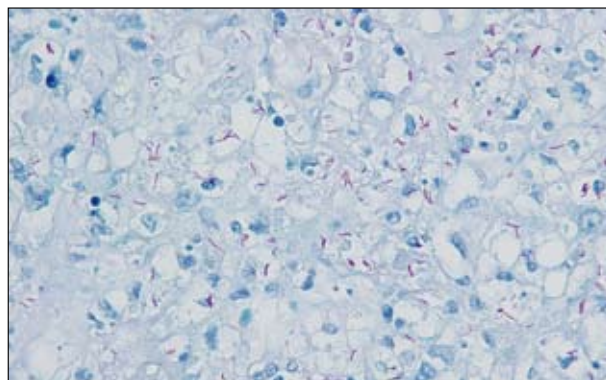
塩基性フクシンは4種類の Magenta の混合物でメーカー、及びロット間に差がある。
シッフ試薬の調製には一般的に Pararosanilin 含有量の多い色素で安定した染色性が得られる一方、チールネルゼン染色では組成との相関性は少ないとされている^{*5} が、塩基性フクシンの種類により若干の染色性の相違が見られる。



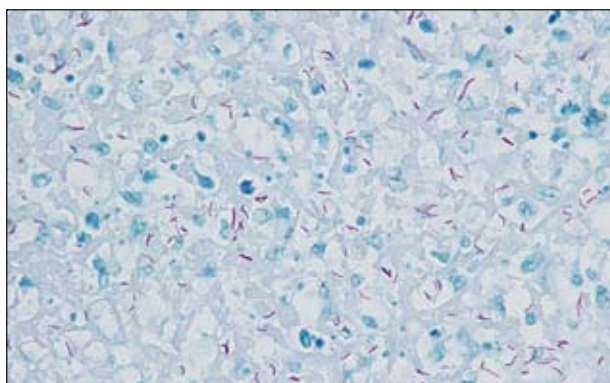
DIAMOND FUCHSIN (C社) 対物 × 100
C.I.42510



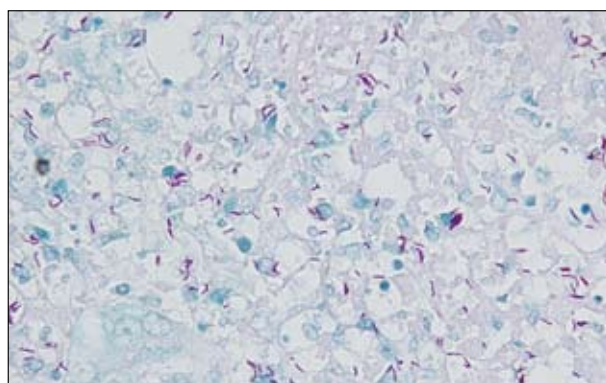
PARAROSANILINE (S社) 対物 × 100
C.I.42500



PARAFUCHSHIN (C社) 対物 × 100
C.I. 不明



FUCHSIN (Merck) 対物 × 100
C.I.42510



NEWFUCHSUN (Merck) 対物 × 100
C.I.42520

G. 操作の難易度（難）

グラム染色は分別操作に慣れを要す上、染色性が安定しない。また、グロコット染色も反応終点の見極めが難しく、操作の難易度は何れも難しい。チールネルゼン染色、オルセイン染色は反応時間を厳守すれば染色性は安定し、比較的容易な染色の部類に入る。

H. 予備知識

グラム染色法の原理^{*6}

細胞壁の構造に起因するとされている。グラム陽性菌はリポ蛋白、及び多糖体が豊富な3～4層構造で15～25 nmの厚い細胞壁を有している。グラム陰性菌は脂質含有量が豊富な2層構造で8～12.5 nmの薄い細胞壁を有している。

クリスタル紫での染色後、細胞内に色素が形成される。アルコールなどの分別処理により細胞壁の脂質が溶出し、障害を受け、細胞壁の薄いグラム陰性菌は容易に脱色され、続く後染色により赤く染色される。

またグラム陽性菌はリボ核酸マグネシウムを有している。この物質はクリスタル紫、ヨウ素と結合し、脱色されにくい複合体を形成することが知られている。グラム陰性菌はこの物質を欠いており脱色され易いとされている。

グロコット染色法の原理

真菌細胞壁の主成分であるセルロース、キチンをはじめとする多糖体は、酸化によりアルデヒド基を生じる。組織内には酸化によりアルデヒド基を生じる他の成分も含まれるが、クロム酸の強い酸化力により多くの成分は過剰に酸化されカルボキシル基へと変化し染色性を失う。しかし、真菌の細胞壁成分にはアルデヒド基が残るため、続くメセナミン銀で染色される。

H. 予備知識

チールネルゼン染色法の原理

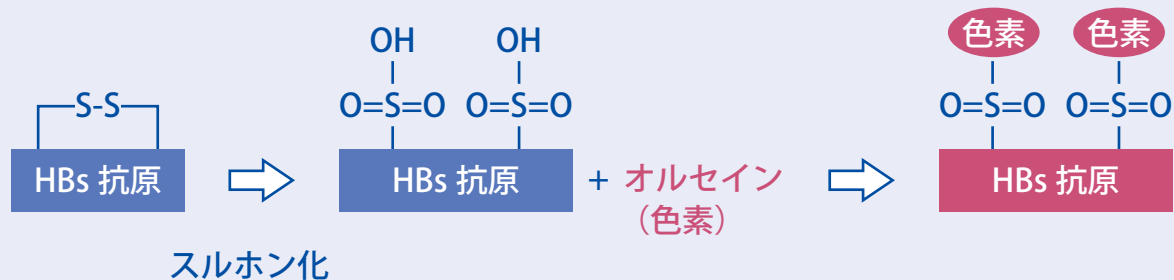
抗酸菌の細胞壁に含まれる脂質成分のミコール酸と細胞質内の多糖体により酸性溶液に対する抗酸性が得られる。しかし、酸性溶液による処理時間が長い場合、抗酸性は失われる。染色液調製に使用される石炭酸(フェノール)はメチル基(-CH₃)の数が多い塩基性フクシンほど溶解性が高くなり染色性が向上する。

(シリーズ No.5 参照)

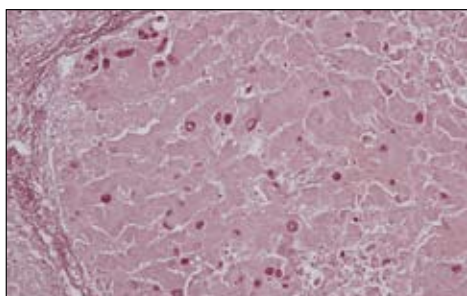
オルセイン染色法の原理

HBs 抗原の構成成分には SS 基を有するシステインが多く含まれている。SS 基は酸化処理によりスルホン基となり染色性を示す。^{*7}

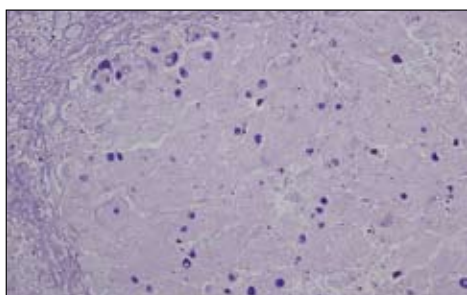
スルホン基は他に弾性線維成分にも含まれているため、HBs 抗原の検出には、弾性線維染色色素が用いられる。



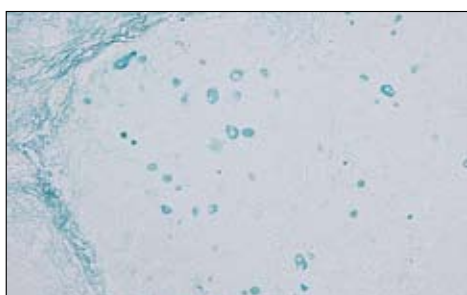
酸化あり



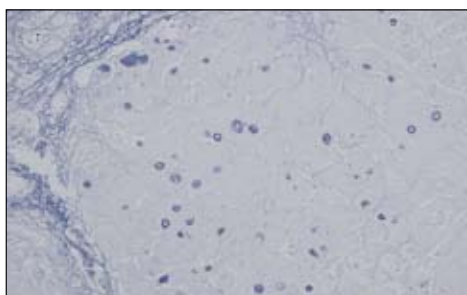
オルセイン染色



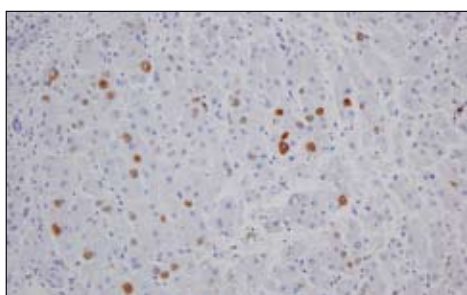
アルデヒドフクシン染色



ビクトリアブルー染色

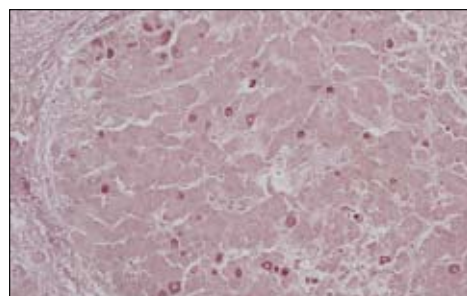


レゾルシンフクシン染色



酵素抗体法

酸化なし



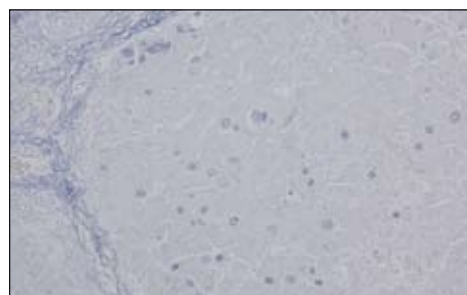
オルセイン染色



アルデヒドフクシン染色



ビクトリアブルー染色



レゾルシンフクシン染色

方法によっては酸化処理なしでも染色されているものもあるが、やはり酸化処理 (p.15) した方が染色性が向上する。

当然ながら、酵素抗体法では弾性線維が染色されずコントラストが明瞭である。

I. 参考文献

- * 1. Bancroft, J.D.et.al : Theory and practice of Histological techniques,Fifth Edition,327-329,1996
- * 2. Sheehan, D.C.et.al : Theory and practice of Histotechnology,Second Edition,245-246,1980
- * 3. Bancroft, J.D.et.al : Theory and practice of Histological techniques,Fifth Edition,329-331,1996
- * 4. 新染色法のすべて, Medical technology 別冊, 医歯薬出版, 108-111,1999
- * 5. 前田君子, 他: 塩基性フクシンの組成と染色性について. 臨床検査,Vol.28,no.7,835-840
- * 6. Sheehan, D.C.et.al : Theory and practice of Histotechnology,Second Edition,233-235,1980
- * 7. 千馬正敬, 他: HBs 抗原染色法. Medical Technology,Vol.9,no.5,417-420,1981

試薬および関連製品

染色液 / 色素 / 無機試薬

製品名 (英名)	(和名)	注文番号	包装単位
Crystal violet (C.I.42555)	クリスタルバイオレット	1.15940.0025	25 g
グラム染色		1.15940.0100	100 g
Fuchsin (C.I.42510)	フクシン	1.15937.0025	25 g
チールネルゼン・カルボールフクシン染色液調製用塩基性フクシン		1.15937.0100	100g
Gram-color Stain set	グラムカラー	1.11885.0001	1 set
ハッカー変法グラム染色用セット。1 セットの構成 (クリスタルバイオレット染色液、ルゴール (PVP 加)、サフラニン染色液各 500 mL × 1、脱色液 500 mL × 2)			
Gram's crystal violet solution	グラム・クリスタルバイオレット染色液	1.09218.0500	500 mL
ハッカー変法グラム染色用クリスタルバイオレット染色液			
Gram's decolorizing solution	グラム・アセトン-エタノール液	1.10218.0500	500 mL
ハッカー変法グラム染色用脱色液		1.10218.2500	2.5 L
Gram's safranin solution	グラム・サフラニン染色液	1.09217.0500	500 mL
ハッカー変法グラム染色用サフラニン染色液			
Hydrochloric acid in ethanol	塩酸エタノール液	1.00327.1000	1 L
チール・ネルゼン染色、Tb カラー染色用脱色液			
Light green SF yellowish (C.I. 42095)	ライトグリーン SF イエロー	1.15941.0025	25 g
グロコット染色対比染色			
Lugol's solution (diluted iodine-potassium iodide solution)	ルゴール溶液	1.09261.1000	1 L
ハッカー変法グラム染色用 1% ヨウ素・ヨウ化カリウム溶液		1.09261.2500	2.5 L
Löffler's methylene blue solution	レフレルメチレンブルー染色液	1.01287.0100	100 mL
一般細菌染色。抗酸菌染色の対比染色では、本液を精製水で約 10 倍に希釈して使用。		1.01287.0500	500 mL
Mayer's hemalum solution	マイヤーヘマトキシリン染色液	1.09249.0500	500 mL
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。			
Methenamine	メセナミン GR 分析用	1.04343.0100	100 g
メセナミン銀調製用		1.04343.0500	500 g
Methylene blue (C.I.52010)	メチレンブルー	1.15943.0025	25 g
細菌染色用		1.15943.0100	100 g
Nuclear fast red (C.I. 60760)	ヌクレアファーストレッド (ケルンエヒトロート)	1.15935.0025	25 g
核染色用			
Orcein	オルセイン	1.07100.0005	5 g
HBs 抗原、弾性線維、染色体染色用		1.07100.0025	25 g
Safraine O (C.I.50240)	サフラニン O	1.15948.0025	25 g
グラム染色対比染色			
Tb-color carbol fuchsin solution	TB - カラー・カルボールフクシン染色液	1.08512.0500	500 mL
コールド式抗酸菌染色液。チール・ネルゼンカルボールフクシン染色液の改良品。		1.08512.2500	2.5 L
Tetrachloroauric(III) acid · 3H ₂ O	塩化金酸・三水合物 GR 分析用	1.01582.0001	1 g
鍍銀染色調色用			
Ziehl-Neelsen carbol-fuchsin solution	チール・ネルゼンカルボールフクシン染色液	1.09215.0100	100 mL
抗酸菌染色用 (要加温)。メチレンブルーで対比染色。抗酸菌は赤色。バックグラウンドは明るい青色。		1.09215.0500	500 mL

組織学用包埋剤 ヒストセック 60

HISTOSEC® 60 (凝固点：58～60℃)

高度に精製されたパラフィンに合成ポリマーを添加した、薄切性・浸透性に優れた使い易いペレットタイプの組織学専用の高品質包埋剤（凝固点：58℃～60℃）です。

● 薄切が容易

ポリマーを少量含むため適度な粘性があり、ヒビ割れなどがほとんどおこりません。また凝固点が高めで（s.p.58～60℃）、硬めのパラフィンなので薄切りが容易です。硬組織・軟組織の包埋や連続薄切にも適します。

● 厳しい品質管理

厳密な品質管理により、ロット間のバラツキがありません。

● 染色への影響がない

ポリマーそれ自身は、反応性を有さないパラフィン類似物質です。キシレンに溶けやすく、脱パラ工程においてパラフィンと共にポリマーも除去されますので、免疫組織化学法などの染色においても影響を及ぼすことなく使用できます。

● すぐれた浸透性

組織内への浸透性が特に優れ、大割切片標本の作成に应用できます。

製品名	注文番号	包装単位
ヒストセック 60	1.01676.2500	2.5 kg
DMSO を含有しないつぶ状（白色～乳白色）の高品質包埋剤です。	1.01676.2504	2.5 kg × 4



代用キシレン ネオクリア

Neo-Clear™

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、新しい低有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、脱パラ、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。

- 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

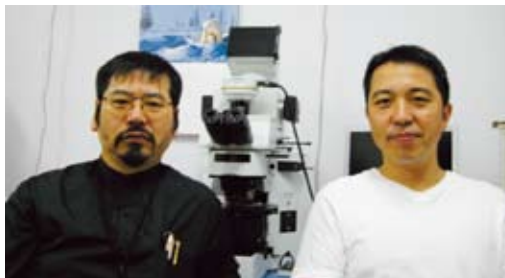


製品名	注文番号	包装単位
ネオクリア	1.09843.5000	5 L
	1.09843.5004	5 L × 4
ネオマウント	1.09016.0500	500 mL

ネオマウントはネオクリア専用の合成速乾性封入剤です。

	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℃	137～143℃
揮発性	やや揮発しにくい	揮発しやすい
比重	0.74-0.75(20℃)	0.86 (20℃)
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

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 静岡病院検査科 服部 進

本カタログに記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。また化粧品や食品など他の用途には使用しないください。

編集：

メルク株式会社

パフォーマンス・ライフサイエンス化学品事業部

〒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 18 年 12 月 24 日発行 EAM73-0612-5000