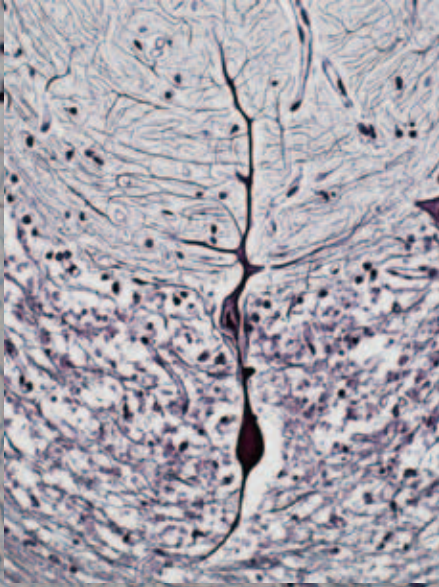


Trouble shooting

中枢神経の染色法 / ● 髄鞘染色 / クリュバー・バレラ染色 ● 神経原線維染色 / ボディアン染色
● ニッスル染色 / クレシル紫染色 ● グリア染色法 / ホルツァー染色法



Torpedo

Purkinje 細胞軸索の一部が顆粒層で紡錘形に膨れているものは Torpedo と呼ばれていて、HE 染色では好酸性に染まり、本態はさまざまな原因による小脳皮質の障害に伴って起こる Purkinje 細胞の変性によるものとされている。小脳顆粒層の比較的 Purkinje 細胞寄りに多く形成される。名前の由来は 19 世紀頃に鉄甲艦の水線下を攻撃するために考えられた爆発物の呼び名で、元々の意味はシビレエイの意味。水雷小体と訳されているようだ。

A. 髄鞘染色 / クリューバー・バレラ染色

標準的染色法 ^{*1}

Step 1) 脱パラフィン

- 2) 流水水洗
- 3) 95%エタノール.....数十秒
- 4) ルクソール・ファースト青液.....56 ~ 60℃、12 ~ 24 時間^{注1}
- 5) 95%エタノール.....数十秒
- 6) 蒸留水水洗
- 7) 炭酸リチウム水溶液.....5 ~ 10 秒^{注2}
- 8) 70%エタノール.....3 槽^{注3}
- 9) 蒸留水水洗.....数回
- 10) クレシル紫染色液.....1 ~ 5 分^{注4}
- 11) 95%エタノール.....2 ~ 3 槽^{注5}
- 12) 脱水、透徹、封入

注1. 液温を室温に戻した後、次の操作に移る。

注2. 炭酸リチウム濃度が濃く、浸漬時間が長いほど分別が進む。即ち、最初の分別は0.1%程度の濃度を使用し、ある程度分別された後は0.05%を使用する。炭酸リチウム液は着色してきたら新調する。

注3. 染色ムラを防ぐため、切片を揺り動かす。分別が不十分な場合は Step6) ~ 8) を繰り返す。
分別は肉眼的に皮質（灰白質）がほぼ白くなり、顕微鏡学的に髄鞘以外の成分が脱色されていることを確認する。70%エタノールは着色してきたら新調する。

注4. クレシル紫染色注解（p.5）を参照。

注5. 顕微鏡で観察しながら分別を行う。

結 果

髄鞘：青

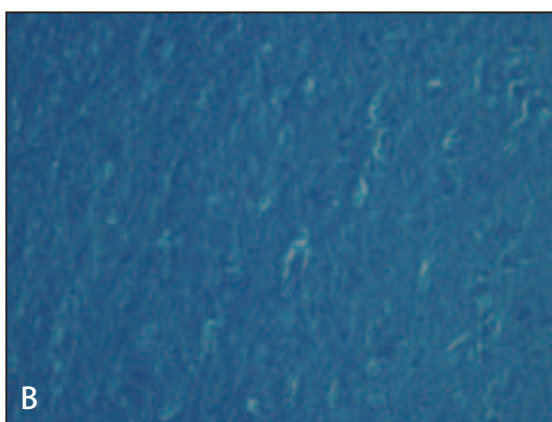
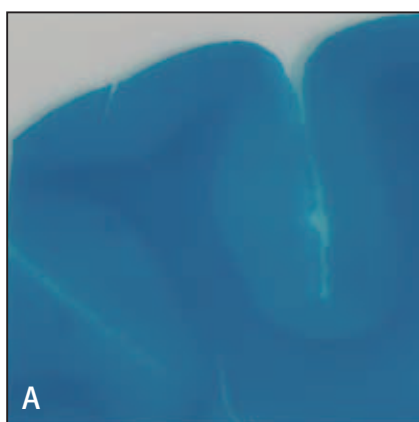
ニッスル小体（顆粒）：紫

試 薬

ルクソール・ファースト青液 染色液は使用直後から使用でき、1年以上の保存も可能である。また、繰り返しの使用も可能である。	Luxol Fast Blue	0.1 g
	95%エタノール	100 mL
	10%酢酸水	0.5 mL
炭酸リチウム水溶液	炭酸リチウム	0.05 g
	蒸留水	100 mL
クレシル紫保存液	クレシル紫	0.1 g
	蒸留水	100 mL

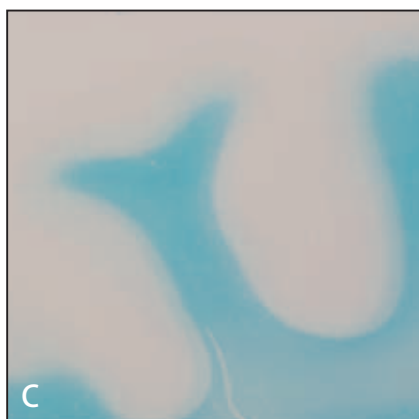
ルーペ像

強拡大像



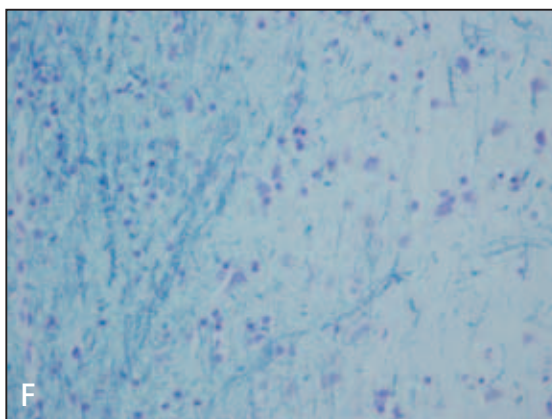
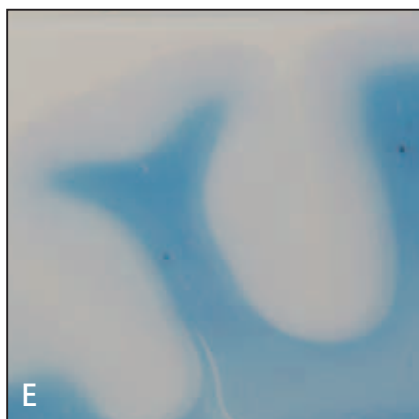
Step 4) の状態 :

A), B) 皮質および髄質が LFB にて染色されている。



Step 8) の状態 :

C) 肉眼的には皮質が白色、皮髄境界部を強拡大にて観察し、D) 髄鞘以外の組織成分が脱色されるまで分別する。



Step 11) の状態 :

E), F) 神経細胞および髄鞘が明瞭に観察される。

調製法

クレシル紫染色液

クレシル紫保存液 30 mL に、10%酢酸水 5 滴を加え、濾過後使用する。

B. 神経原線維染色 / ボディアン染色（石川変法）

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 数十秒
- 4) プロテイン銀液 37℃、18～30 時間^{注1}
- 5) 蒸留水水洗 10～30 秒、3 回
- 6) 還元液 10 分
- 7) 蒸留水水洗 20 秒、3 回
- 8) 0.5% 塩化金水溶液 50 分
- 9) 蒸留水水洗 20 秒、3 回
- 10) 2% シュウ酸水溶液 5～30 分
- 11) 蒸留水水洗 1 分、3 回
- 12) 5% チオ硫酸ナトリウム水溶液 5 分
- 13) 流水水洗 10 分
- 14) 脱水、透徹、封入

注1. 銅片は蒸留水で洗浄後に使用する。表面が汚れている場合は希塩酸（約5%）で洗浄し、蒸留水で数回洗浄後使用する。
また、染色性が弱い場合はプロテイン銀の濃度を2～3%と濃くする。

結 果

神経原線維、軸索、樹状突起、神経終末：黒～黒褐色

試 薬

プロテイン銀液		プロテイン銀	1 g
		蒸留水	100 mL
		銅片	4 ～ 6 g
還元液	a 液 注 2	ハイドロキノン	1 g
		無水硫酸ナトリウム	4 g
		蒸留水	100 mL
	b 液 注 3	メトール	0.25 g
		ハイドロキノン	1 g
		ホルマリン原液	3 mL
		蒸留水	100 mL
0.5%塩化金水溶液		テトラクロロ塩化金酸（Ⅲ）	1 g（アンプル）
		蒸留水	200 mL
2%シュウ酸水溶液		シュウ酸	2 g
		蒸留水	100 mL
5%チオ硫酸ナトリウム水溶液		チオ硫酸ナトリウム	5 g
		蒸留水	100 mL

注2,3. a, b どちらの液を使用しても良いが用時調製する。a 液は背景が灰白調で、b 液は赤味をおびる。

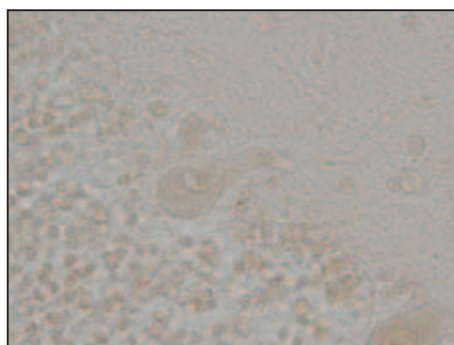
調 製 法

プロテイン銀

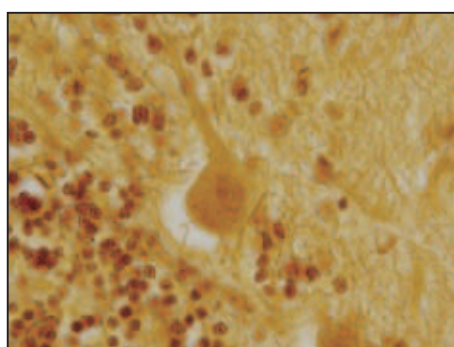
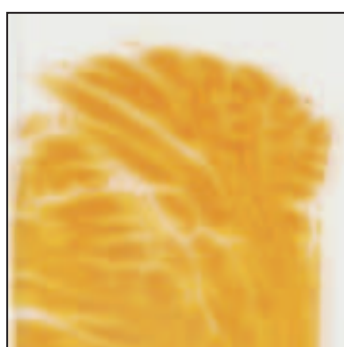
蒸留水 100 mL にプロテイン銀 1 g を浮かべ、そのまま放置し自然溶解させる。

ルーペ像

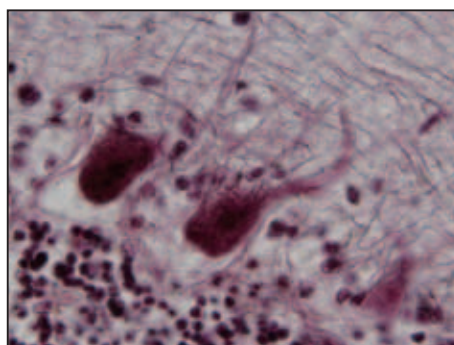
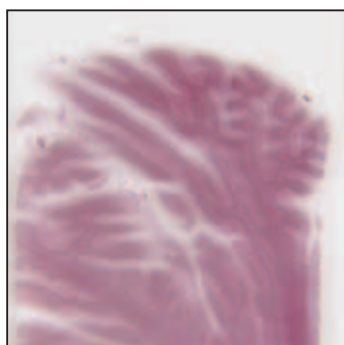
強拡大像



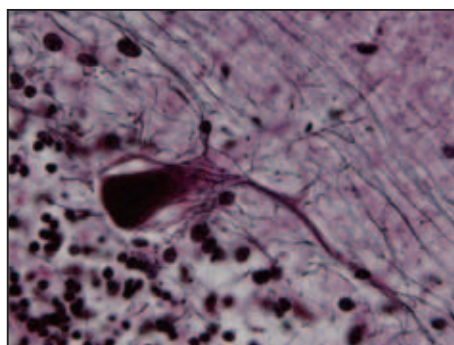
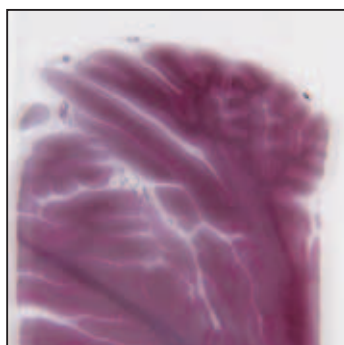
Step 4) の状態



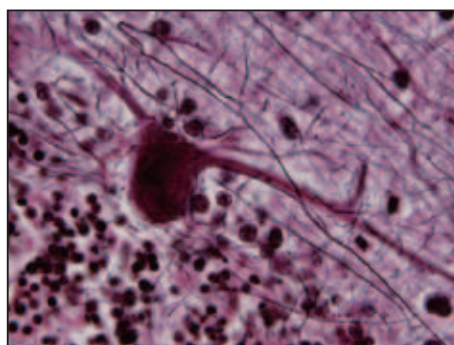
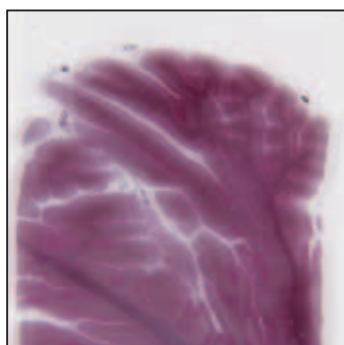
Step 6) の状態



Step 8) の状態



Step 10) の状態



Step 12) の状態

C. ニッスル染色 / クレシル紫染色

標準的染色法

Step 1) 脱パラフィン

2) 流水水洗

3) 蒸留水水洗

4) クレシル紫染色液.....5 ～ 10 分^{注1}

5) 流水水洗

6) 95%エタノール.....2 ～ 3 槽

7) 脱水、透徹、封入

^{注1} 染色性が弱い場合は 37℃に加温して染色する。酢酸を添加しないクレシル紫水溶液で染色後、4%酢酸水で分別しても良い。

結 果

ニッスル小体（顆粒）：紫

試 薬

クレシル紫保存液

クレシル紫

0.1 g

蒸留水

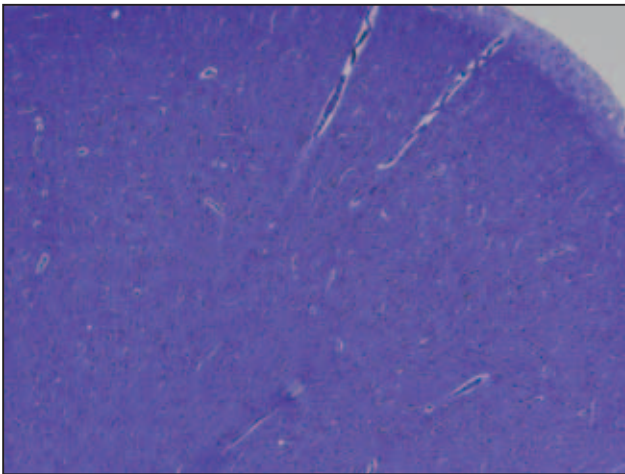
100 mL

調 製 法

クレシル紫染色液

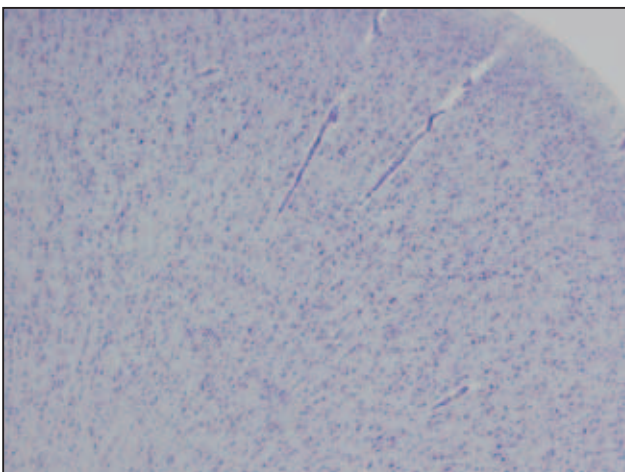
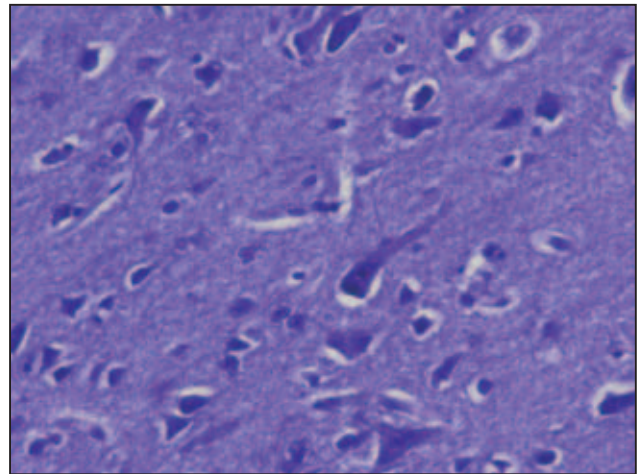
クレシル紫保存液 30 mL に、10%酢酸水 5 滴を加え、濾過後使用する。

弱拡大像

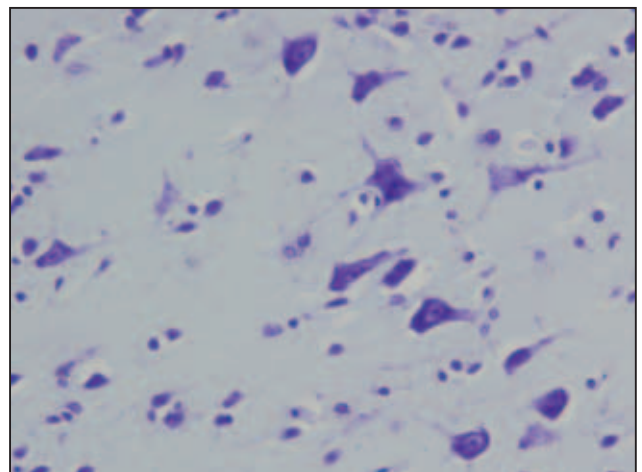


Step 4) の状態：クレシル紫で組織全体が染色される。

強拡大像



Step 6) の状態：背景が脱色され、ニッスル顆粒が観察出来る。



D. グリア染色法 / ホルツァー染色法

標準的染色法 ^{*1}

Step 1) 脱パラフィン

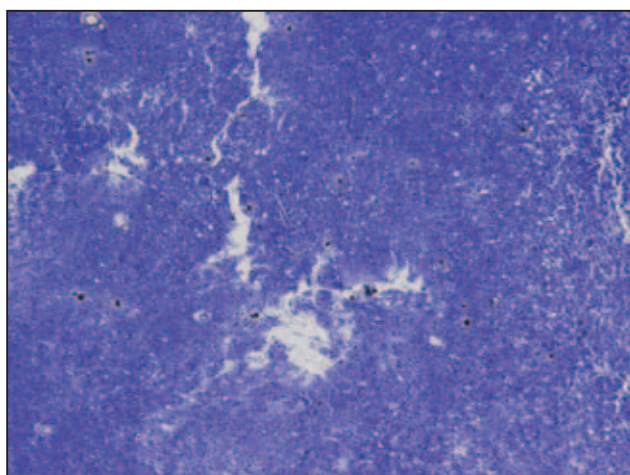
- 2) 流水水洗
- 3) 蒸留水水洗
- 4) 0.25%過マンガン酸カリウム水溶液 10 分
- 5) 流水水洗 数秒
- 6) 1%シュウ酸水溶液 30 秒
- 7) 流水水洗 5 分
- 8) 蒸留水水洗
- 9) リンタングステン酸アルコール液 1 分、3 回
- 10) 濾紙で押え、余分な液を除く
- 11) アルコールクロロホルム液 1 分
- 12) 5%クリスタル紫アルコールクロロホルム液 1 分
- 13) アルコールクロロホルム液 30 秒
- 14) 100%エタノール 30 秒
- 15) 濾紙で押え、余分な液を除く
- 16) 蒸留水水洗
- 17) 10%臭化カリウム水溶液 1 分
- 18) 蒸留水水洗
- 19) アニリンクロロホルム液 数 10 秒^{注1}
- 20) キシレン
- 21) 透徹、封入

^{注1} アニリンクロロホルム液に浸した後、一度切片上の液を濾紙で除き分別を行うと脱色され易い。
分別にシャーレを用い、揺り動かしながら行うと染色ムラが少ない。

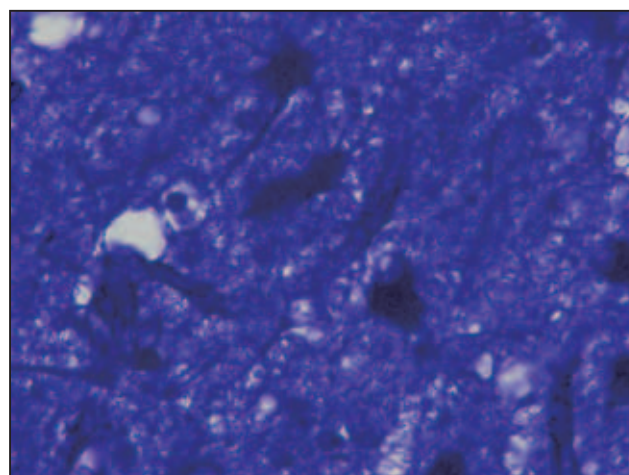
結 果

グリア線維：青紫

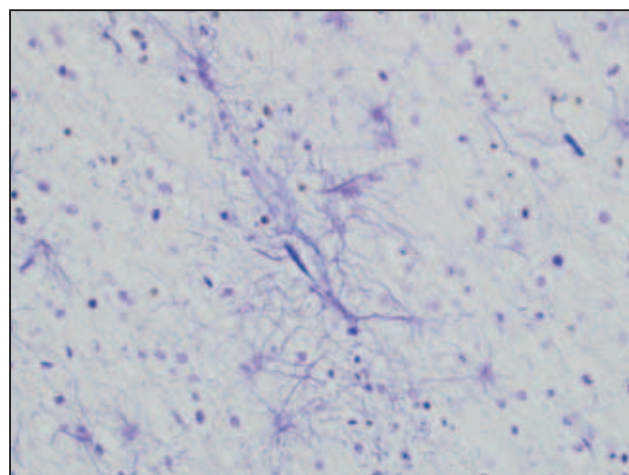
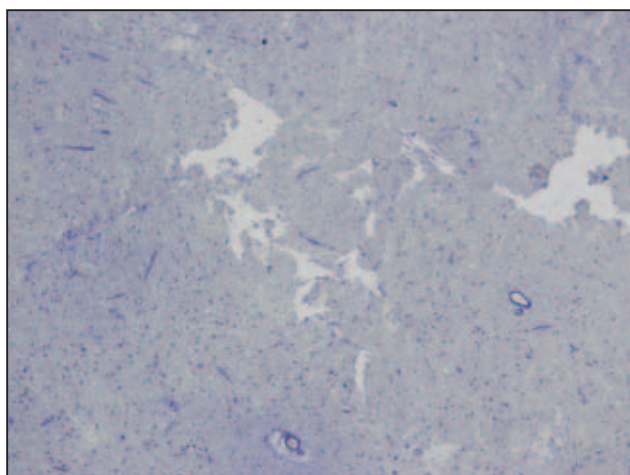
弱拡大像



強拡大像



Step 12) の状態：クリスタル紫で組織全体が染色される。



Step 19) の状態：背景が脱色され、神経膠細胞とのコントラストが明瞭である。

試薬

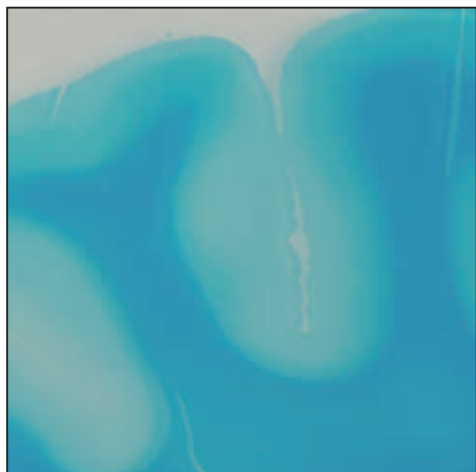
0.25% 過マンガン酸カリウム	過マンガン酸カリウム	0.25 g
	蒸留水	100 mL
1% シュウ酸水溶液	シュウ酸	1.0 g
	蒸留水	100 mL
リントングステン酸 アルコール液	リントングステン酸ナトリウム	1.0 g
使用時 1 液：2 液を 1：2 の 割合で混合し、使用液とする。	蒸留水	100 mL
	95% エタノール	200 mL
アルコールクロロホルム液	エタノール	40 mL
	クロロホルム	160 mL
5% クリスタル紫 アルコールクロロホルム液	クリスタル紫	5 g
	アルコールクロロホルム液	100 mL
10% 臭化カリウム水溶液	臭化カリウム	10 g
	蒸留水	100 mL
アニリンクロロホルム液	アニリン	40 mL
	クロロホルム	60 mL
	1% 酢酸水	10 滴

E. トラブルと対処法

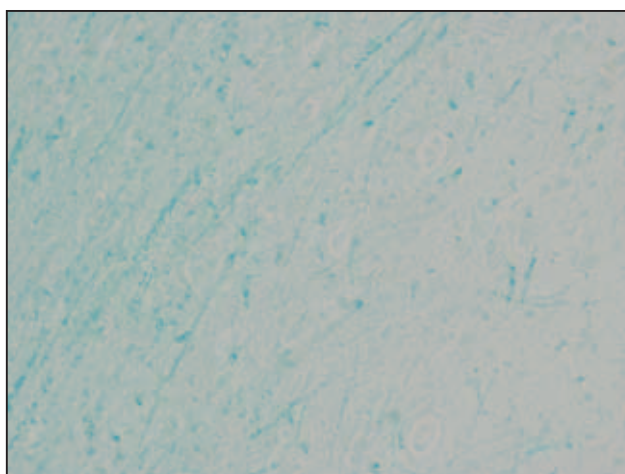
E-1 トラブルと対処法 — クリューバー・バレラ染色

ルーペ像

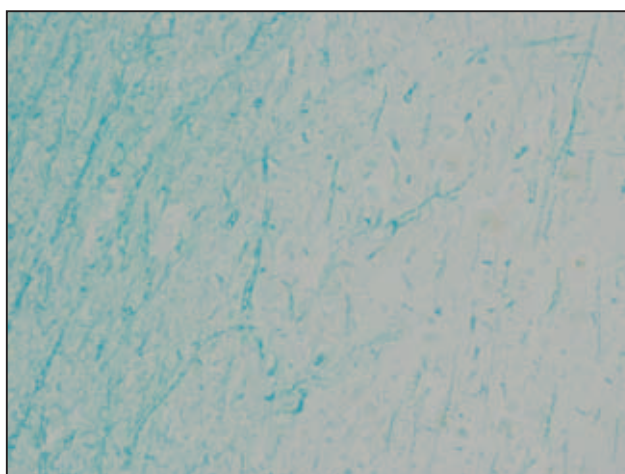
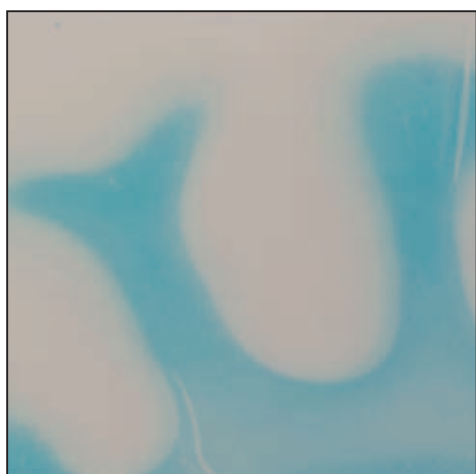
強拡大像



トラブル-1：分別不足 ▶ 背景への共染が強い。



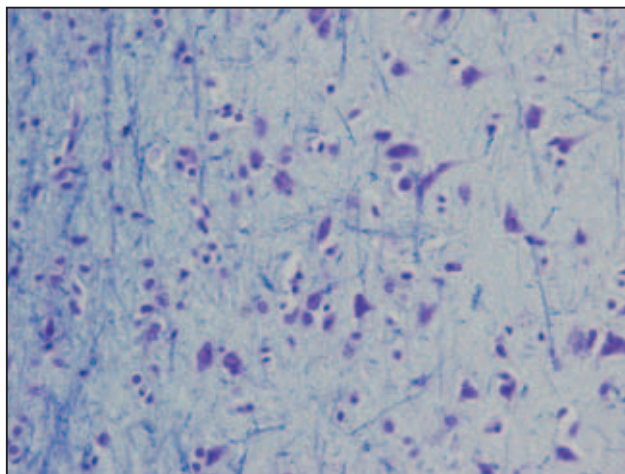
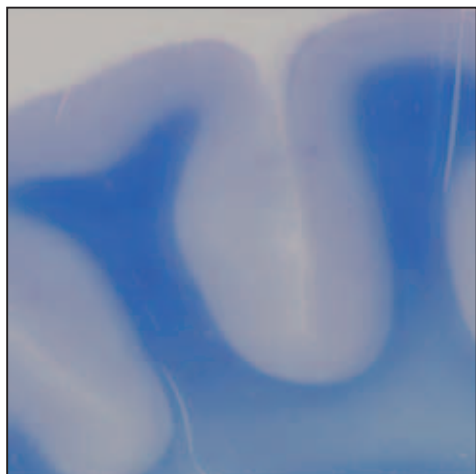
トラブル-2：分別過剰 ▶ 髄鞘まで脱色されている。



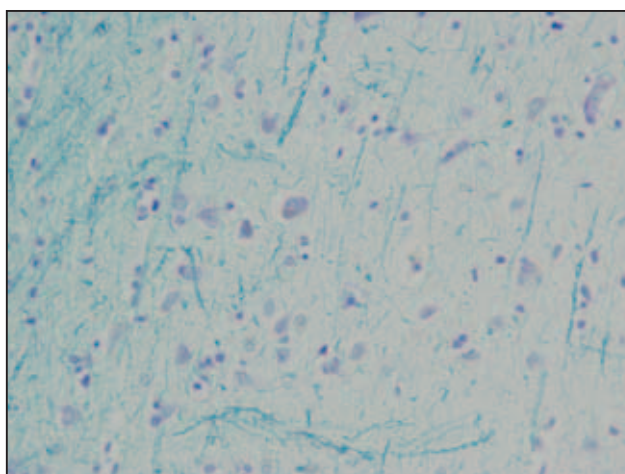
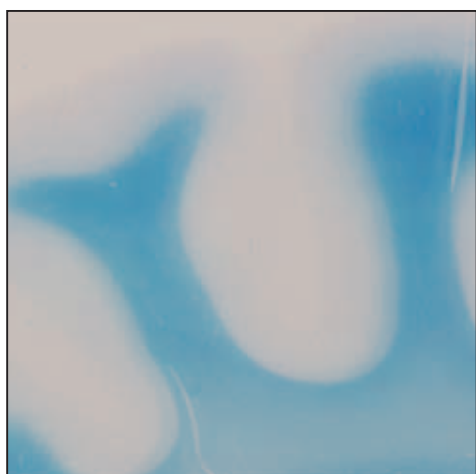
対処法-1、2：▶ 肉眼的に皮質がほぼ白くなるまで分別し、その後炭酸リチウム濃度を薄くし、顕微鏡的に皮髄境界を観察しながら分別の終点を決定する。

ルーペ像

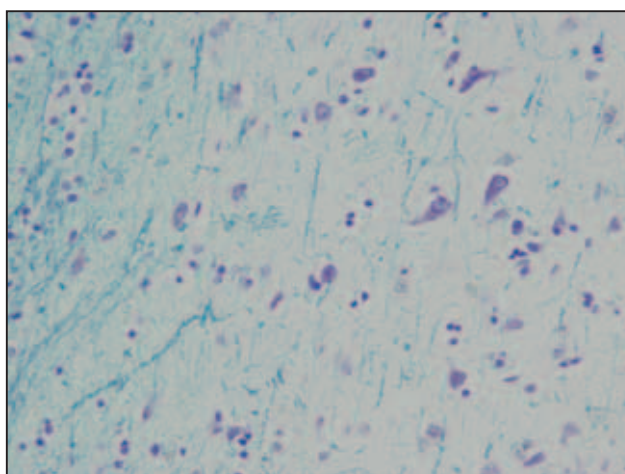
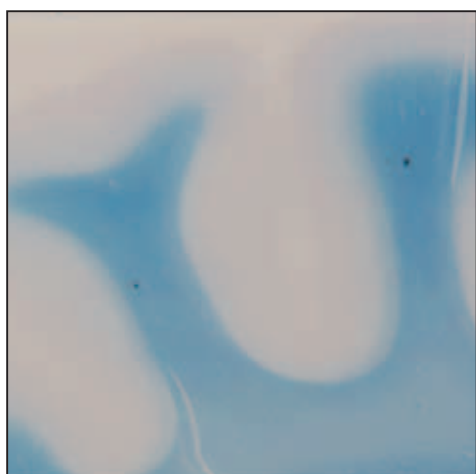
強拡大像



トラブル-3：酢酸添加不足 ▶ クレシル紫の背景への共染が強い。



トラブル-4：酢酸添加過剰 ▶ クレシル紫の染色性が弱い。

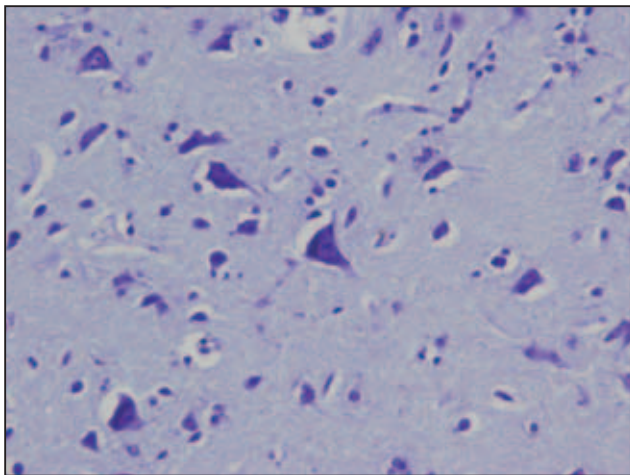


対処法-3、4： ▶ E-1 対処法 -1、2 を参照。

E. トラブルと対処法

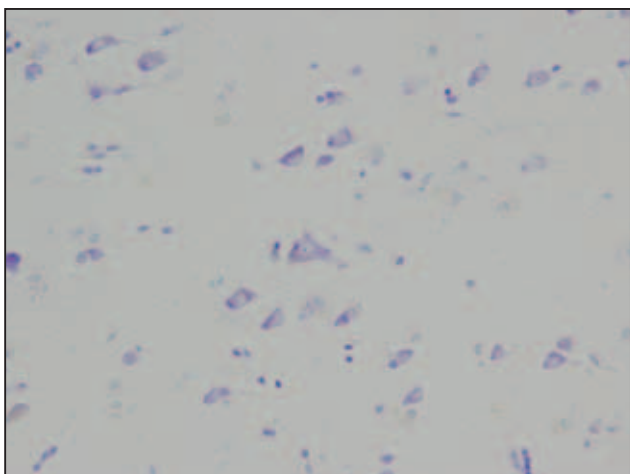
E-2

トラブルと対処法 — クレシル紫染色



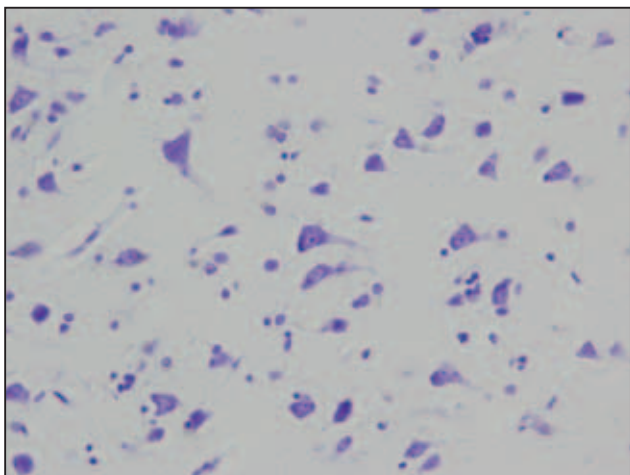
トラブル-1：酢酸添加不足・分別不足

▶ クレシル紫の背景への共染が強い。



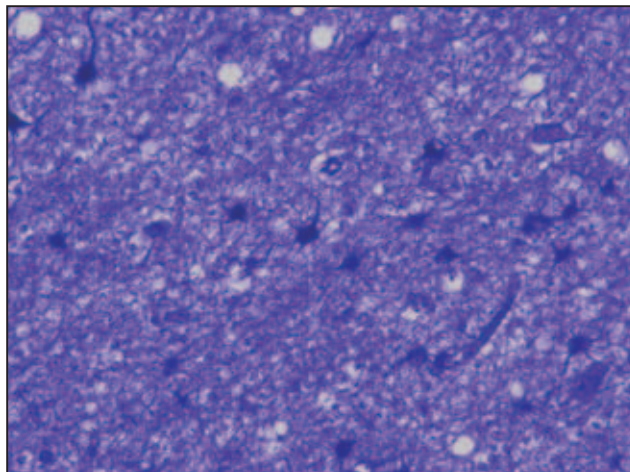
トラブル-2：酢酸添加過剰・分別過剰

▶ クレシル紫の染色性が弱い。

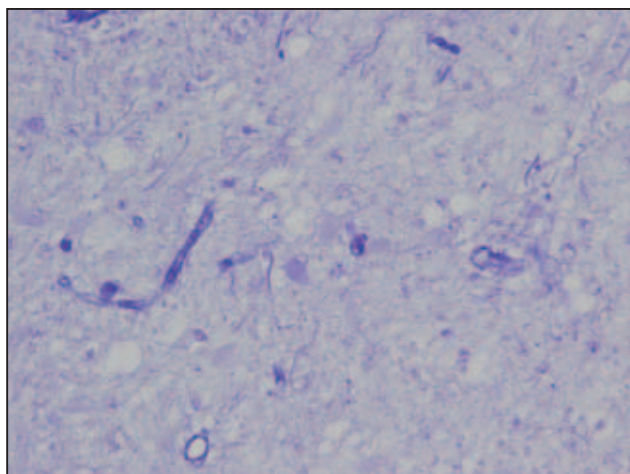


対処法-1、2：

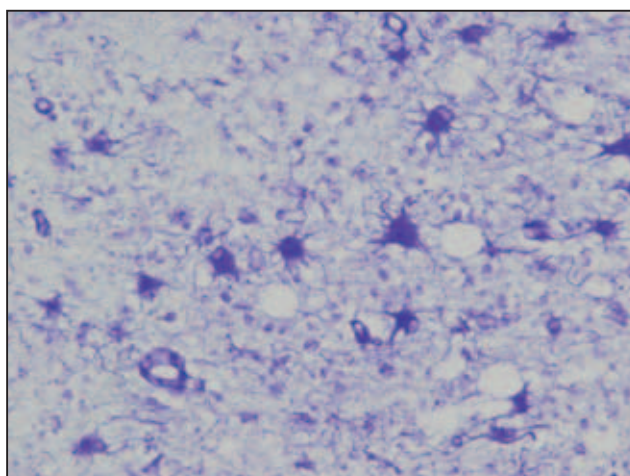
▶ 共染はクレシル紫後、約4%酢酸水で分別する。
または、1%塩酸アルコールで脱色後、適当な酢酸添加量のクレシル紫で再染色する。
染色不足は適当な酢酸添加量のクレシル紫で再染色する。



トラブル - 1 : 分別不良



トラブル - 2 : 分別過剰

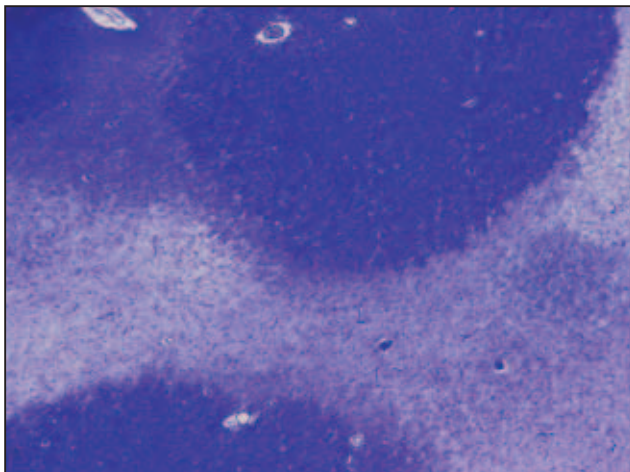
**対処法 - 1、2 :**

- ▶ アニリンクロロホルム液に漬けた後、スライドガラスに息を吹きかけながら分別操作を行うと分別が進む。また、分別は顕微鏡で確認しながら素早く行う。

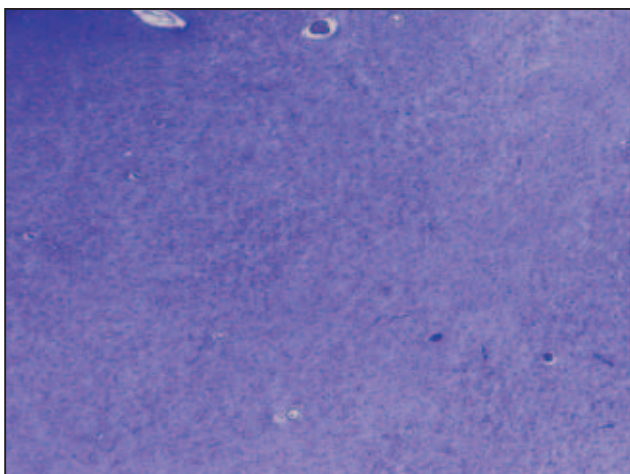
E. トラブルと対処法

E-3

トラブルと対処法 — ホルツァー染色



トラブル - 3 : 染色ムラ



対処法 - 3 :

- ▶ Step18) 後に切片上に水滴を残したまま分別操作を行うと、水滴部分の分別が不良となる。分別液に移る前には濾紙で水気を除く。また、分別中の切片は良く動かす。

F. その他 / トラブル及び注意点

新生児の髄鞘染色について*²

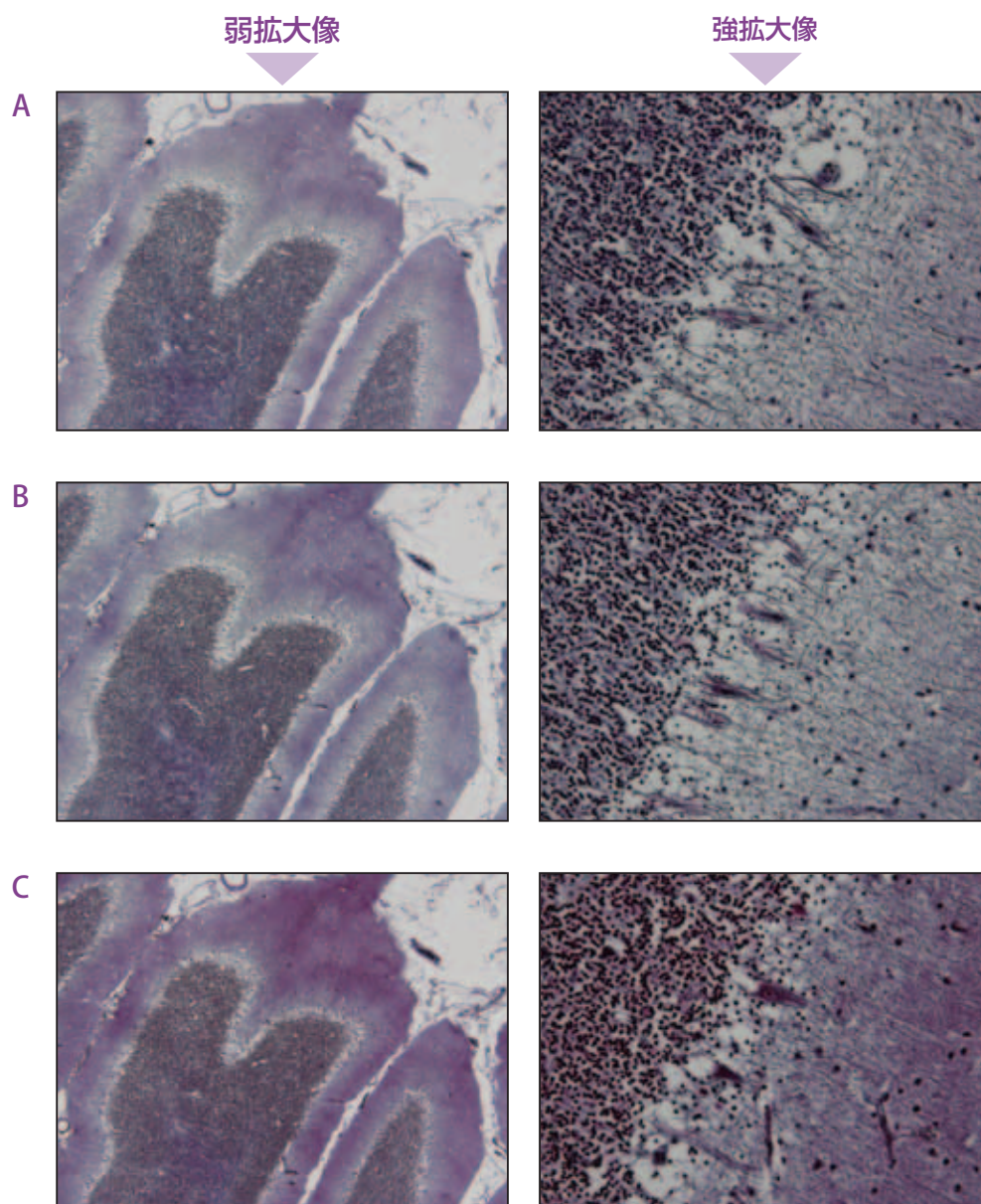
新生児と成人の髄鞘脂質量には差がある。軸索周囲に髄鞘形成が目立ち始めるのは出生後2～3ヶ月で5歳前後まで続く。したがってこの間は銅フタロシアニン（Copper phthalocyanine, 以下CuPC）の染色性が安定しないため、分別には注意を要する。

	髄質		皮質	
	成人	新生児（1週）	成人	新生児（1週）
総リン脂質	6.3	2.77	3.85	2.5
スフィンゴミエリン	2.1	0.52	0.98	0.54
コレステロール・エステル	0.08	0.00	0.00	0.02
セレブロシッド	5.8	0.32	1.68	0.37
水	72.9	87.7	82.2	90.4

表：正常脳の脂質（g/100 g 新鮮脳）*³

プロテイン銀について*⁴

プロテイン銀はアルブミン、ペプトン、アルブモースなどと銀の化合物で、製品の性状はメーカーあるいはロット毎に異なる。写真は同一メーカーから市販された、ロットの違うプロテイン銀を使用し、同一条件で染色したものである。背景の着色の程度、神経原線維の染色性が異なる。



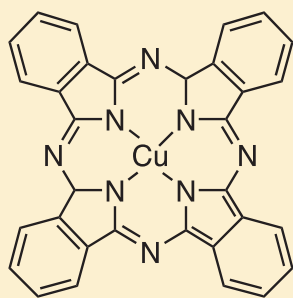
G. 操作の難易度（難）

脳染色は分別操作に慣れを要す上、試薬のロット間差が見られるなど染色性が安定しない。操作の難易度は何れも難しい。

H. 予備知識

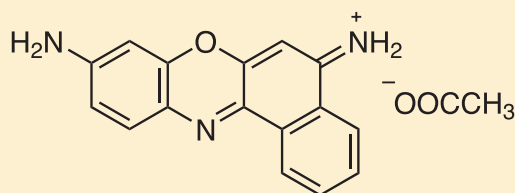
ルクソール・ファースト青について*⁵

ルクソール・ファースト青（Luxol fast blue）はアルコールに溶ける CuPC のアミン塩である。CuPC はリン脂質、特にコリンを含むスフィンゴミエリンやレシチンなどと強い親和性を持つことが知られている。CuPC は脱灰後の石灰沈着部でラックを形成する。これは、組織中の骨基質が金属に対し強い親和性をもって Cu を強く引きつけると考えられている。また、赤血球の細胞膜、好酸球顆粒、弾性線維、結核菌、ケラチンおよびケラトヒアリン、リポフスチンなども染色される。



クレシル紫について*⁶

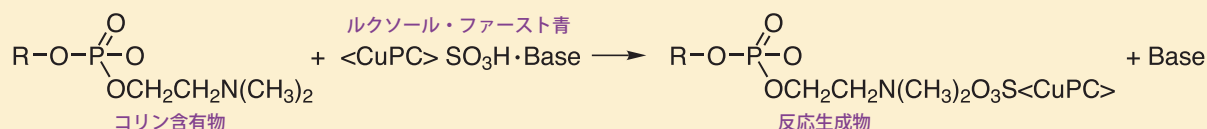
ニッスル小体は発達した粗面小胞体で、多数のリボゾームを含んでいる。構造中にリン酸基を持つため好塩基性の性質を有し、塩基性色素で染色される。



クレシル紫は染色液の pH により染色性が異なる。pH2.5 以下の領域ではニッスル顆粒中のリン酸基の解離（イオン化）が妨げられ、色素と反応することが出来ない。一方で pH4.0 以上の領域では組織中蛋白質のカルボキシル基が解離し、色素と容易に結合するため共染を起こす。

クリューバー・バレラ染色法の原理*⁷

CuPC と生体内物質の反応は酸と塩基による塩の形成反応に基づき、リポ蛋白の塩基性基が色素の塩基性基に置換されることにより染色される。



ボディアン染色法の原理*⁷

プロテイン銀は組織中に浸み込み、組織成分との親和性を示すが、銅片を使用することにより結合組織成分を染めにくくすると考えられている。すなわち、銅は銀と比較し結合組織成分に反応し易く、銀を置換するため神経線維のみが染色される。銀は続く還元操作により可視化され、さらに塩化金により鍍金され安定する。シュウ酸は塩化金を還元し、陽性部位と背景とのコントラストを際立たせる。

I. 参考文献

- * 1. 新染色法のすべて, Medical technology 別冊, 医歯薬出版, 159-161,1999
- * 2. 向井 紀二: 中枢および末梢神経組織の新しい染色法. 臨床検査, Vol.2, No.9,530-538,1958
- * 3. Cumings,J.N.:The diagnostic value of lipid estimations in the cerebral lipidoses.Cerebral Lipidoses,112-121,Blackwell,1957.
- * 4. 佐野 豊: 組織学研究法 理論と術式, 355-358,1985
- * 5. R.D.LILLIE,M.D.;H.J.CONNS Biological Stains Ninth Edition,455-457.
- * 6. 畠 榮 他: クレシル紫の検討, 病理技術 44,11-14,1981
- * 7. Sheehan,D.C.et.al:Theory and practice of Histotechnology,Second Edition,252-266,1980

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
Lithium carbonate GR for analysis ACS,Reag. Ph Eur	炭酸リチウム 分析用 GR ACS	1.05680.0250	250 g
Silver protein ポディアン染色用 (別名 Albumose Silver)	プロテイン銀	1.07447.0025	25 g
Tetrachloroauric (III) acid trihydrate 99.5%, GR for analysis	塩化金酸・三水和物 99.5% 分析用 GR (テトラクロロ金酸)	1.01582.0001	1 g
		1.01582.0005	5 g
Oxalic acid dihydrate GR for analysis ACS,ISO,Reag. Ph Eur	シュウ酸・二水和物 分析用 GR ACS,ISO,Reag. Ph Eur	1.00495.0100	100 g
		1.00495.0500	500 g
Sodium thiosulfate pentahydrate GR for analysis ACS,ISO	チオ硫酸ナトリウム・五水和物 分析用 GR ACS,ISO	1.06516.0500	500 g
Hydroquinone for synthesis	ヒドロキノン 合成用	8.22333.0250	250 g
Sodium sulfate anhydrous, coarse granules GR for analysis 0.63 - 2.0 mm ACS	硫酸ナトリウム (無水) (粗粒状) 分析用 GR 0.63 - 2.0 mm ACS	1.06637.0500	500 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
Crystal violet (C.I. 42555) 核染色・グラム染色	クリスタルバイオレット Certistain®	1.15940.0025	25 g
		1.15940.0100	100 g
Potassium bromide GR for analysis ACS,Reag. Ph Eur	臭化カリウム 分析用 GR ACS,Reag. Ph Eur	1.04905.0500	500 g
Aniline GR for analysis	アニリン 分析用 GR	1.01261.0250	250 mL
		1.01261.1000	1 L
Chloroform GR for analysis ACS,ISO,Reag. Ph Eur	クロロホルム 分析用 GR ACS,ISO,Reag. Ph Eur	1.02445.0250	250 mL
		1.02445.1000	1L

包埋剤

製品名 (英名)	(和名)	注文番号	包装単位
Histosec® 60 ベレットタイプ 凝固点 58 ~ 60°C	ヒストセック 60	1.01676.2500	2.5 kg
		1.01676.2504	4×2.5 kg
Histosec® without DMSO ベレットタイプ 凝固点 56 ~ 58°C	ヒストセック DMSO フリー	1.15161.2500	2.5 kg
		1.15161.2504	4×2.5 kg
Histosec® ベレットタイプ DMSO 含有 凝固点 56 ~ 58°C	ヒストセック	1.11609.2500	2.5 kg
		1.11609.2504	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	5 L
		1.09843.5004	4×5 L
Neo-Mount™	ネオマウント	1.09016.0500	500 mL

速乾性合成封入剤

DPX デーピーエックス

速乾性に優れ、ほぼ中性の合成封入剤です。

標本がほぼ褪色しません

ポリスチレンを成分とする本封入剤はほぼ中性のため、
標本の褪色がほとんどありません。永久保存用封入剤として最適です。

屈折率が高く、ベッケラインが生じません ($n_D^{20} = 1.518 \sim 1.521$)

屈折率が封入剤として最も適した範囲にあり、低倍率での鏡検でもベッケラインの問題はありません。

一定の粘度 (600~700mPa・s/20℃)

粘度がほぼ一定です。

製品名	注文番号	包装単位
DPX non-aqueous mounting medium	1.01979.0100.1049	100 mL
デーピーエックス	1.01979.0500	500 mL
● 主成分：ポリスチレンポリマー 約 21.8%、キシレン 約 69.7% ● 品質規格：キシレン 約 69.7%、屈折率 (n_D^{20}) → 1.518~1.521、粘度 (20℃) → 600~700 mPa・s、顕微鏡用途適合試験 → 封入剤として適合		

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

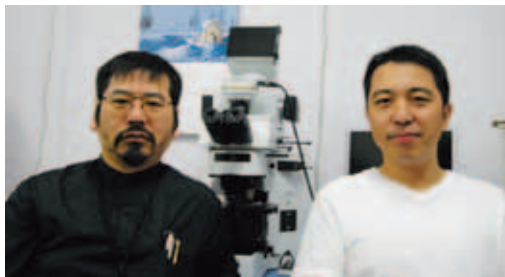
ポリマーそれ自身は、反応性を有さないパラフィン類似物質です。キシレンに溶けやすく、脱パラ工程においてパラフィンと共にポリマーも除去されますので、免疫組織化学法などの染色においても影響を及ぼすことなく使用できます。

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
応用できます。

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

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 一級臨床検査士認定
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 一級臨床検査士認定
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

順天堂大学 医学部附属練馬病院臨床検査科臨床検査室 浅見 志帆

順天堂大学 医学部附属練馬病院臨床検査科臨床検査室 鈴木 さやか

本誌記載の製品は試験・研究用です。ヒトまたは動物の疾病の治療・予防、化粧品・食品など他の用途には使用しないでください。

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 19 年 12 月 24 日発行 EAM104-0712-5000