

パニコロウ染色の理論

精度管理時の質問・疑問事項を中心に

- ・各種アルコール類の違い/固定・脱水・色素の溶解
- ・アルカリ色出しのOG染色への影響
- ・リンタンゲステン酸の役割や効果
- ・染色液使用開始後の注意点と染色液の継ぎ足し、他

千葉県臨床衛生検査技師会

第3回病理・細胞診検査研究班合同研修会

平成22年 1月 30日

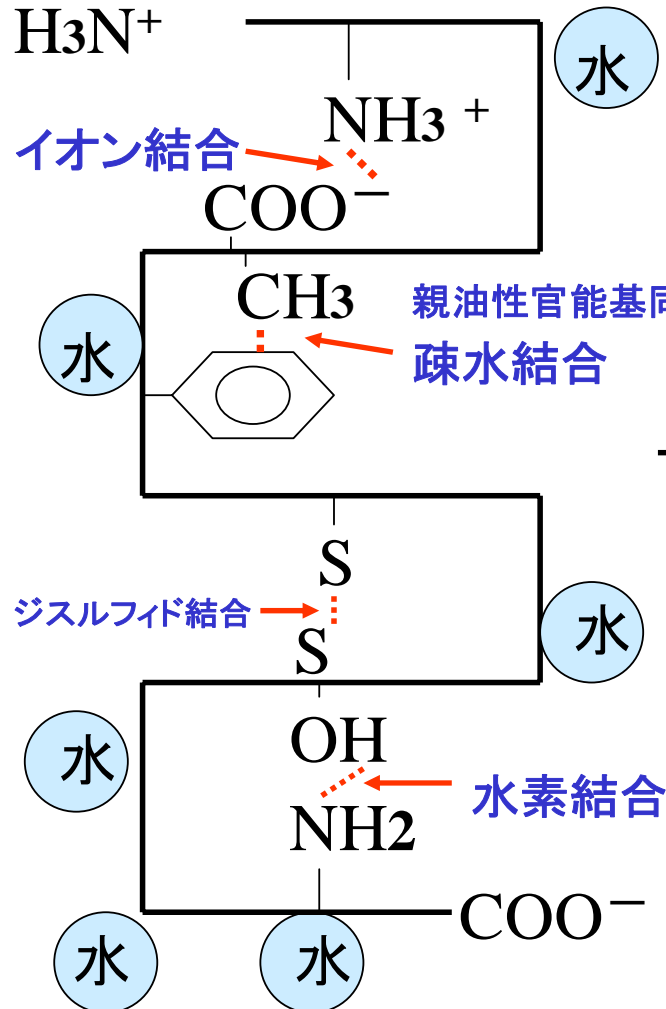


サクラファインテックジャパン株式会社

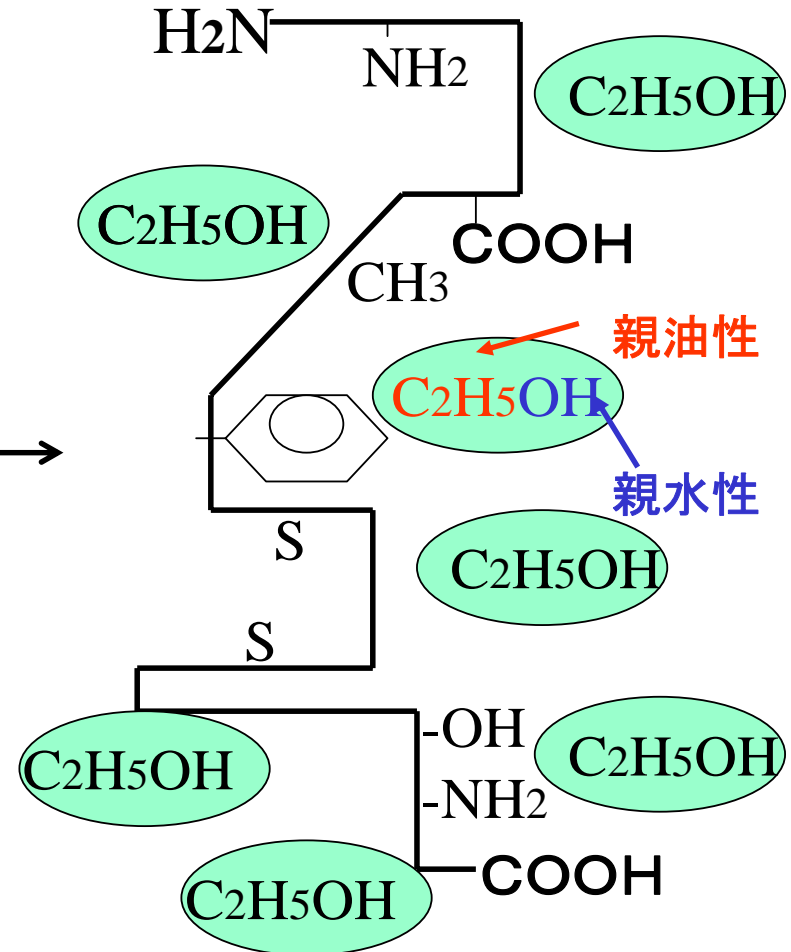
渡辺 明朗

エタノール固定/各種アルコール類の違い

蛋白質の三次構造



アルコール固定蛋白質



各種アルコール類(メタノール CH_3OH 、エタノール $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 、イソプロピルアルコール $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$)の固定原理は同じで、蛋白とは反応しなく、主に脱水作用により蛋白質の三次構造を変化させて、固定する。

各種アルコール類の特性と用途

	イソプロピルアルコール	変性アルコール	エタノール	95%エタノール	メタノール	サコマノ液
		<ul style="list-style-type: none"> エタノール 88.5% イソプロピルアルコール 11% メタノール 約0.5% 				<ul style="list-style-type: none"> エタノール 49% 水 49% PEG1540 約2%
	(CH ₃) ₂ CHOH		C ₂ H ₅ OH		CH ₃ OH	
固定力 細胞の収縮 (親油性)	○	○	○ (>)	○	○	△
	大 ←					→ 小
	(スプレー式固定剤の主成分)			(細胞収縮度: 95%エタノールとメタノールはほぼ同じ)		
				(浸透速度: エタノール < メタノール (小分子で粘性が小))		

- ・Pap染色標本: 95%エタノール湿固定塗抹を基本
- ・エタノール濃度: 約95%で可、但し水分が多くなると固定力低下 (繰り返し使用 → 水分混入注意)
- ・95%エタノールと95%変性アルコールで、固定力ほぼ同じ
- ・95%エタノールとエタノール/エーテル (1/1)

固定力	95%エタノール > エタノール/エーテル
浸透力	95%エタノール < エタノール/エーテル

エーテルはエタノールの浸透性を向上させる効果はあるが、固定効果は小さい

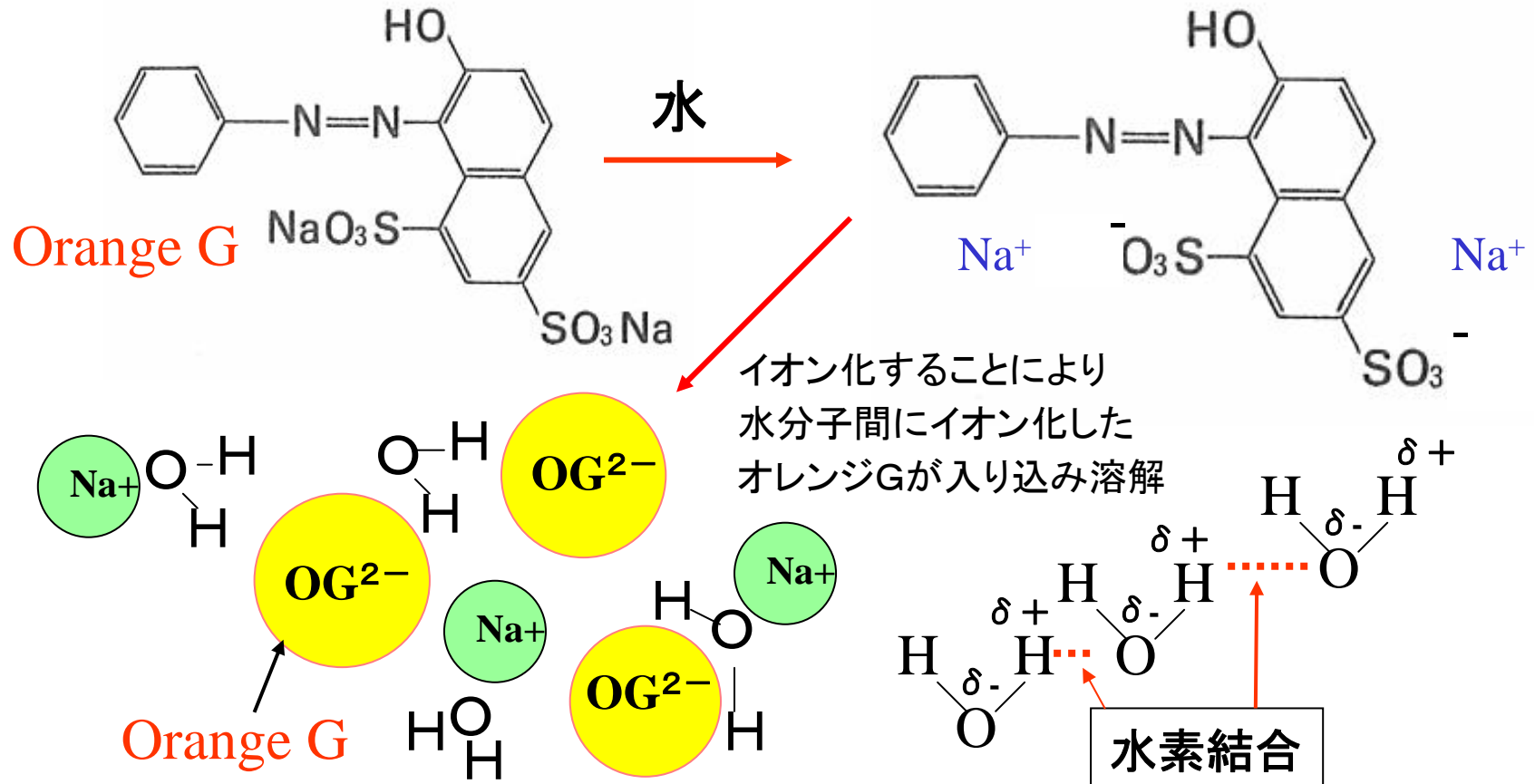
- ・固定時間 (湿固定では、細胞内水分と固定液の置換ないし脱水に時間がかかる)

固定時間	短い (例、3分)	適切 (10~30分)	長い
固定	固定不十分	(1~2日位なら、染色にほぼ影響なし)	
	・問題点: 核の染まり薄い (ホルマリンは、固定時間により蛋白の架橋度が高くなり染色に影響)		

各種アルコール類への酸性色素の溶解性と洗浄力

酸性色素(オレンジG, エオシン、ライトグリーン)の溶解性

イソプロピルアルコール<変性アルコール<エタノール<メタノール<<水



アルコール類に難溶→色素同士の静電気性親和が強いので、アルコール類に難溶。

OG-EA間とEA染色後の洗浄 →100%エタノールより95%エタノールor95%変性アルコールがベター

(100%エタノールor100%変性アルコールだと、洗浄が不十分になるリスクあり)

洗浄力: 変性アルコール< エタノール

エタノールと変性アルコールの違い(染色への影響)/再生エタノール/pH

1)エタノールと変性アルコールの違い(染色への影響)

エタノールと変性アルコールは染色液用溶媒としてほぼ同じように使用可。が、溶媒の色素の溶解性や細胞・組織成分溶出のリスクの違いを考慮する必要あり。

変性アルコール

スタンⅢ脂肪染色

エタノール 88.5%
イソプロピルアルコール 11%
メタノール 約0.5%

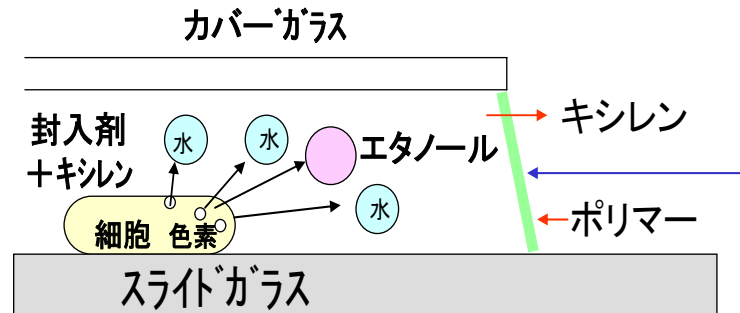
スタンⅢ溶解 : 70%エタノール < 70%変性アルコール

脂質溶出リスク: 70%エタノール < 70%変性アルコール

2)再生エタノールと再生変性アルコール → 水混入の可能性大

蒸留による再生の場合、水とエタノールが“共沸”するので、アルコールに水が少量混入することが多い。水分が混入したエタノールで脱水

→ 退色の原因



Eosin Yの溶解性 水→約30-40%

エタノール→約1%

カバーガラスの縁の部分のキシレンが蒸発し、封入剤が固化するが、細胞の存在する中心部分には、透徹及び封入剤由来のキシレンが長期間蒸発することなく残留する。

3)有機溶媒(キシレン、エタノール)のpH

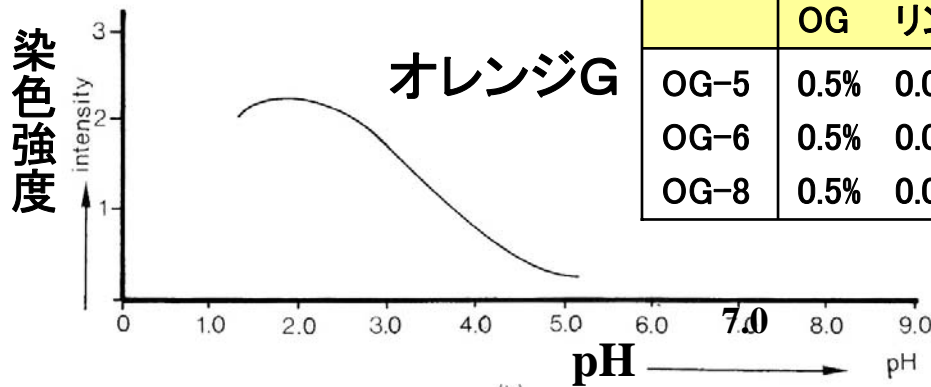
pHは水溶媒中水素イオン H^+ 濃度の指標であり、有機溶媒は正確なpH測定は困難。

基本的に、キシレンとエタノールそのものは中性と考えて可。

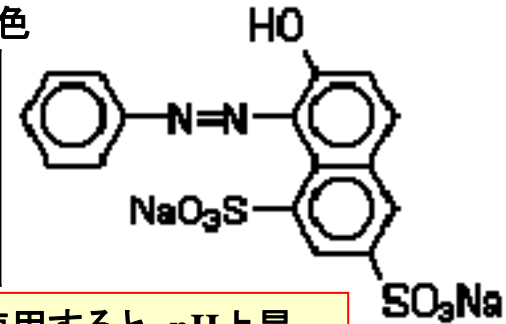
OG、EA後のエタノールと再生エタノールは、基本的に中性と考えて可。

pH値と3種類の酸性色素の染色強度/リンタングステン酸の効果

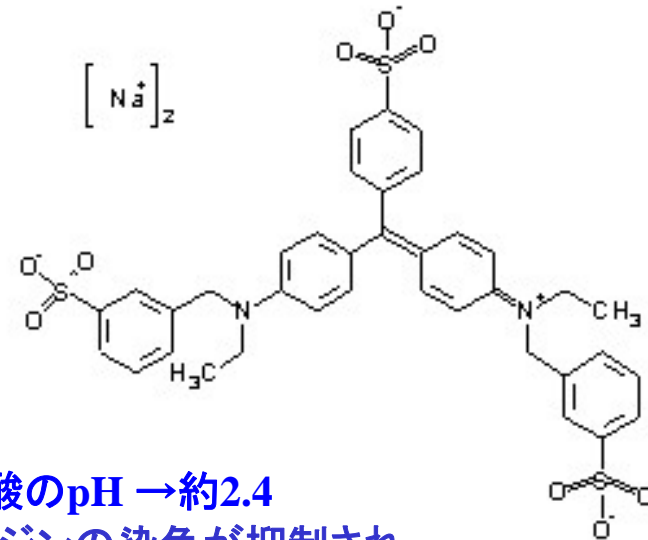
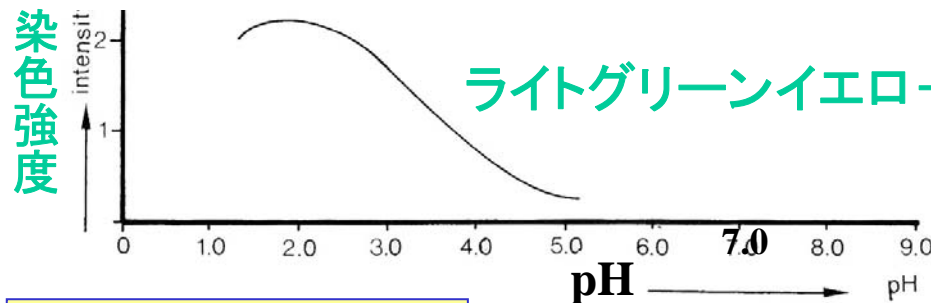
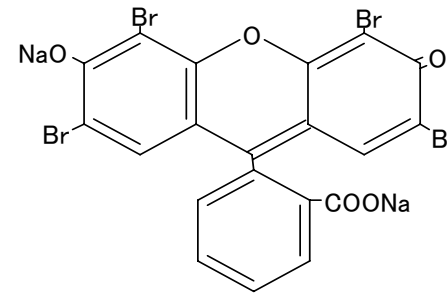
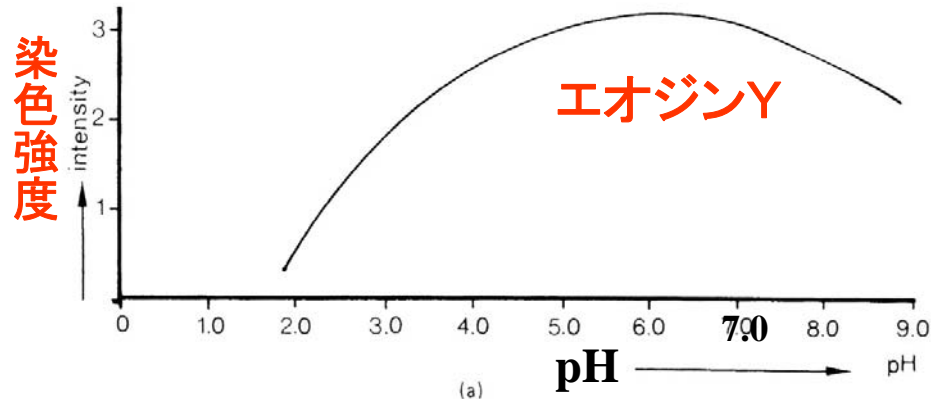
OGの目的→扁平上皮癌細胞細胞質の染色



	OG	リンタン	pH	染色力
OG-5	0.5%	0.025%	低	強
OG-6	0.5%	0.015%	↑	↑
OG-8	0.5%	0.010%	高	弱



色出しにアルカリを使用すると、pH上昇に伴い、オレンジGの染まりが抑制される



OG-EA間のリンタン/酢酸の効果

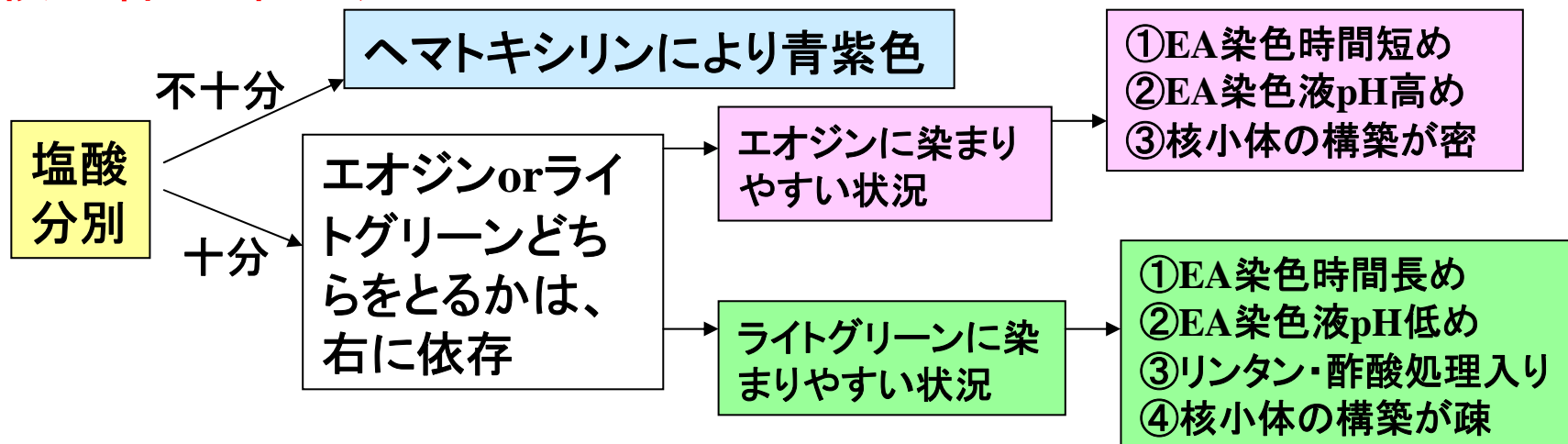
[P(W3O10)4]³⁻リンタングステン酸のpH → 約2.4

染色の透明感とpH低下によるエオジンの染色が抑制され、オレンジGとライトグリーンの染まりが優勢

核小体の主要成分と親和する色素

細胞部位	成分	結合する色素
核 クロマチン	DNA リン酸基=PO ₄ ⁻ ヒストン 塩基性蛋白質-NH ₃ ⁺	ヘマトキシリン エオジン、ライトグリーン
核小体	DNA リン酸基=PO ₄ ⁻ RNA リン酸基=PO ₄ ⁻ 塩基性蛋白質 -NH ₃ ⁺	ヘマトキシリン ヘマトキシリン エオジン、ライトグリーン
細胞質	蛋白質 COO ⁻ 、-NH ₃ ⁺	エオジン、ライトグリーン オレンジG、ヘマトキシリン
	RNA リン酸基=PO ₄ ⁻	ヘマトキシリン
	糖、脂質	

核小体の染まり



染色液使用開始後の注意点と染色液の継ぎ足し

1) 染色液使用開始後の注意点(経時的問題)

	染色力の低下 (色素の消費 & 液の持込)	液の持込による染色液の特性 の変化	ギルヘマトキシリン (Half-oxidized hematoxylin)	アル コール の蒸発
ヘマトキシリン	○	pH上昇→共染のリスク	経時的にヘマテイン濃度が増大し、染色強度が増大する→使用時点でヘマトキシリンの染色強度異なることあり。	
OG	○	(色出し用アルカリの持込) →pHの上昇→OG染色の抑制		○ (濃縮)
EA	○	(OG後のリンタンの持込) →pH低下→エオジン染色抑制		○ (濃縮)

2) 染色液の継ぎ足し

原則的に、一定期間染色液継ぎ足し可

例、ヘマトキシリン 1~4週間

OG,EA 1~3週間

但し、継ぎ足しにより、染色液中の試薬成分(媒染剤、リンタンゲステン剤、他)の分量比が変化し、pHの変化や染色強度が変化

→定期的に染色液の全交換がベター

- ・ヘマトキシリン液の継ぎ足し→媒染剤のヘマトキシリンに対する濃度比が上昇 →染色強度抑制
- ・EA液の継ぎ足し→OG後にリンタン使用の場合、EA液のpHが低下→エオジンの染色抑制

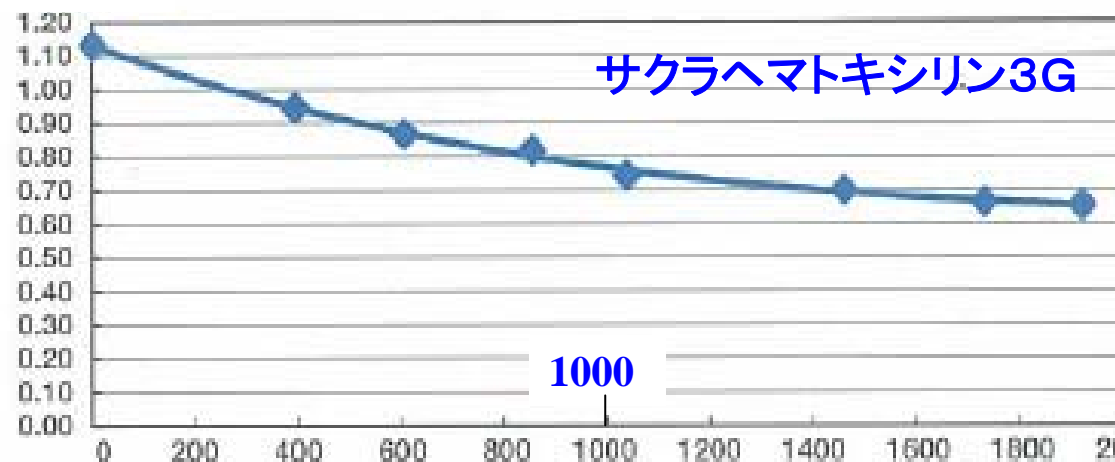
染色可能枚数と染色操作過程の染色カゴの上下

1. 染色可能枚数 (推定: 約800~1500枚/各Pap染色液500ml)

色素濃度低下による染色力の低下の原因 { ①染色による色素濃度の消費
②液の持込

サクラ自動染色装置DRS-2000(染色槽:650ml、染色カゴ:40枚)におけるHE染色標本枚数とサクラヘマトキシリン3Gとサクラエオジンの吸光度変化

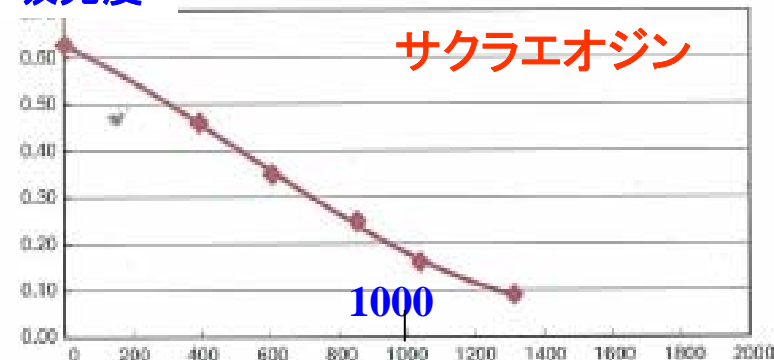
吸光度



染色標本累計枚数

染色可能枚数: 約1400-1500/650mlヘマトキシリン3G

吸光度



染色標本累計枚数

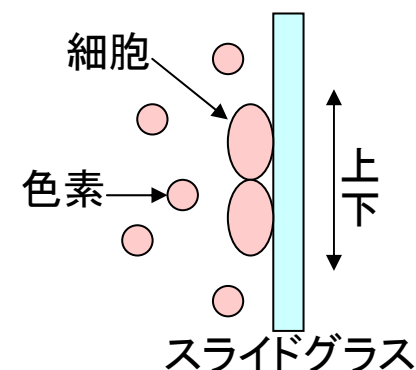
染色可能枚数: 約600-700/650mlエオジン

2. 染色カゴの上下がベター

①色素が細胞成分とより速く接触し、より速くかつ均一な染色

②脱水、透徹においても、溶媒と細胞内溶媒がより速く交換

但し、染色カゴ上下は、細胞剥離のリスク高くなる。



ヘマトキシリン染色液の種類と染色強度/切片と塗抹細胞の違い

1. ヘマトキシリンの種類と染色強度（染色力）

染色液	ヘマトキシリン	染色力
マイヤー	1 g/L	弱 ↓ 強
2倍カラッチ	2 g/L	
ギル IV、V	4g, 5g/L	
ハリス	5 g/L	



サクラ染色液シリーズ

2. 切片と塗抹細胞の違い

<p>切片4 μm</p> <p>色素 DNA DNA</p>	<p>ミクロトームで薄切され組織成分がむき出しになり染まりやすく、ヘマトキシリン濃度低くて可(マイヤーヘマトキシリン)。</p>
<p>切片2 μm</p> <p>色素 DNA</p>	<p>薄い切片では、ヘマトキシリンが親和すべき核DNA量が少なくなるので、濃く染めるにはヘマトキシリン濃度の高く染色力の強い染色液が適す(例、2倍カラッチ)。</p>
<p>塗抹細胞</p> <p>色素</p>	<p>重積細胞の一つ一つに色素が入り込むためには、色素濃度の高く染色力が強い染色液が適す(例、ギルIV、V、ハリス)。但し、色素濃度が高いと共染や過染のリスクが高くなる。</p>