

脂肪染色の原理とポイント

1. 脂質の種類と特性
2. 脂肪染色用各種色素の特徴と染色の原理
3. 脂肪染色のポイント

第95回日本病理組織技術学会

2017年3月5日



渡辺 明朗

脂質: 生体組織からクロロホルムなどの有機溶媒で抽出される成分
 生体の主要脂質である中性脂肪は、極性の低い原子団などで構成され、リン脂質などは中極性の原子団ないし官能基を有する。

アルキル基	-CH ₂ CH ₃	低	強	弱
フェニル基				
エステル結合	-CO・OCH ₃			
酸アミド基	-CO・NH-			
カルボニル基	-C=O			
ヒドロキシル基	-OH			
アミノ基	-NH ₂			
カルボキシル基	-COOH			
第4級アンモニウム基				
リン酸基	-OPO(OH) ₂	高	弱	強
硫酸基	-OSO ₃ H			

極性: メタノール分子中の酸素原子(O)は、電気陰性度[隣接する原子から負(-)の性質の電子を引き寄せ、自分自身陰性になろうとする性質]が強く、そのため隣接する水素原子(H)から電子を引き寄せ、電氣的に負(-)の性質を有し、逆に電子密度が低くなる水素原子(H)は、電氣的に正(+)の性質を有するようになる。このように一つの分子内で、電氣的に正(+)の部分と負(-)の部分とが分かれて存在するような性質を“極性”という。

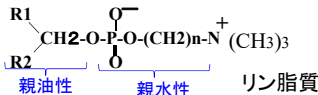
脂質の種類とその極性及び親油性/ホルマリン固定

脂質は種類により、その極性や親油性が異なる。

脂質の種類と主要脂質	極性	親油性	ホルマリン固定
極めて極性の低い脂質 中性脂肪(トリグリセリド) 脂肪酸エステル コレステロールエステル	低	大	濃
少し極性を有する脂質 コレステロール 脂肪酸	極性	親油性	↑
中性度の極性を有する脂質 糖脂質 リン脂質	中	中	淡



ホルマリン固定について
 ①複合脂質のリポ蛋白質部分にホルマリンでメチレン架橋が形成され、固定される。
 ②その他の脂質(左表)ホルマリンでは固定・保持されない。が、組織蛋白をホルマリンで固定することにより蛋白質分子・分子間で高度にメチレン架橋されると、蛋白質内部に存在する脂質はトラップされ、溶出しにくくなる効果がある。



β-ナフトール系油溶性色素の特性(色調、他)

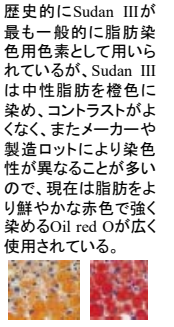
1896年: Daddi が脂肪染色にSudan IIIを使用
 油溶性色素の脂肪への溶解という物理的要素が染色に関与

メチル基CH₃の数により、色調及び親油性が異なる。

Sudan III
 MW=352 λmax=503nm (Ethanol)
 Sudan IV
 MW=380 λmax=520nm (Ethanol)
 Oil red O
 MW=409 λmax=531nm (Chloroform)

低 ↑ 極大 中 ↑ 中 中 ↑ 中
 色 ↑ 親油性(疎水性) ↓ 溶解性 ↓
 長 ↑ 色調 ↓ 赤 ↓ 大 ↓ 大

歴史的にSudan IIIが最も一般的に脂肪染色用色素として用いられているが、Sudan IIIは中性脂肪を橙色に染め、コントラストがよくなく、またメーカーや製造ロットにより染色性が異なることが多いので、現在は脂肪をより鮮やかな赤色で強く染めるOil red Oが広く使用されている。



Sudan black Bの特性と脂質染色

1935年: Lisonがミエリン染色に使用
 (ミエリンの主要成分→リン脂質)

Sudan black B

 中性脂肪 溶解 (分配)
 中性脂肪への溶解性は劣るので、染まりは淡い
 イオン結合
 $\text{R}_1\text{-CH}_2\text{-O-P-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$
 リン脂質
 -OOC-R
 脂肪酸
 低極性の中性脂肪への溶解と中極性脂質(リン脂質など)とのイオン結合が染色に関与。

Sudan black B溶液の経時変化(1958年 Fredricsson)
 Sudan black BはpH 4以下では不安定で水溶液中で徐々に分解し、茶色ないし赤色の分解物が生成。飽和Sudan black B 70%エタノール溶液でも約4週間しか安定でなく、経時的に分解し、脂質の染まりが淡くなり、またバックグラウンドが灰色に共染。従って、Sudan black B溶液は、あまり作り置きしない方がよい。

Nile blue(塩基性色素)の色素成分/Nile blueとNile red

Nile blue

 Nile blueのImino-base(推定)
 Nile red

 Nile blueは酸化(熟成)により、その酸化体である赤色のNile redが生じる。調製したNile blue染色液の少量をとり、キシレンを少量添加して混和し、キシレン層の赤色が淡く、Nile redの濃度が低い場合は、Nile blue染色液を37°Cで1~2週間放置して、Nile blueを酸化してNile redを生じさせてから使用するとよい。

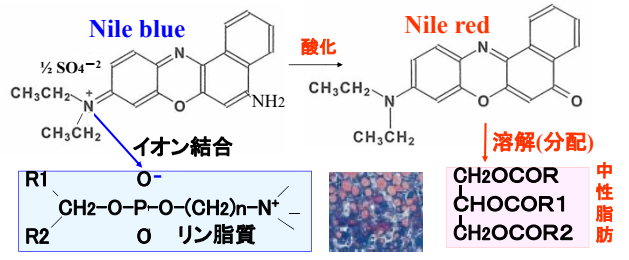
Nile blue染色液の検査
 キシレン添加 混合
 A液: Nile blue飽和水溶液を約10日間室温保温後、同量のキシレンを添加
 B液: Nile blue飽和水溶液を約10日間37°C保温後、同量のキシレンを添加

TLC(Silica gel)によるNile blue色素成分の分析
 Nile blue染色液
 キシレン層
 Nile red
 Nile blue

脂肪染色 の原理とポイント

Nile blue (塩基性色素) の特性と脂肪 (脂質) 染色

正 (+) に荷電する Nile blue は中極性の脂質 (特にリン脂質と遊離脂肪酸) を濃い青色に染める。本来 Nile blue は極性の低い中性脂肪にはあまり溶解しないのでごく淡くしか染めない。しかし、Nile blue には Nile blue が酸化されて生じる赤色で極性の低い Nile red が含まれ、この Nile red が低極性の中性脂肪を赤色に染色する。



核DNA-PO4⁻
負 (-) 荷電の核DNAリン酸基などへも親和すると考えられる。

参考: 親油性の大きい Nile red は、リン脂質中親油性アルキル基 R₁, R₂ に多少疎水結合で親和すると考えられる。

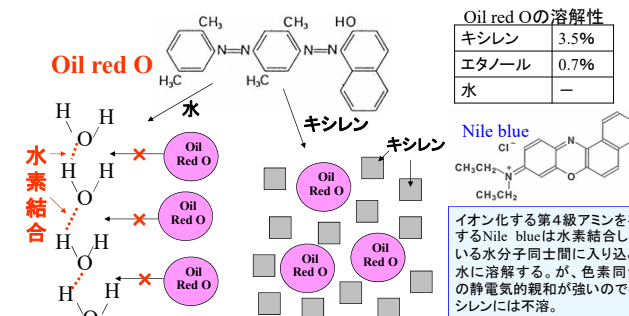
脂肪 (脂質) 染色用色素の種類と溶解性

色素	C.I. generic name	エタノール	キシレン	水
Sudan III	Solvent red 23	0.2%	0.3%	—
Sudan IV	Solvent red 24	0.3%	3.5%	—
Oil red O	Solvent red 27	0.7%	3.5%	—
Sudan black B	Solvent black 3	3%	2.5%	—
Nile blue sulfate	Basic blue 12	3%	—	2%

注-1) C.I. generic name (色素の性状の分類に基づく名称) と溶解性
Oil red O などは油や有機溶媒に溶解するので、カラーインデックスでは Solvent dye (油溶性色素) に分類される。塩基性色素に分類される Nile blue は溶媒への溶解性において、油溶性色素とは大きく異なる。Nile blue は水溶性なので、水性封入剤で封入後経時的に溶出・褪色する。

注-2) 色素の溶解性のデータないし文献値 (表の数値は Biological Stains から引用) 色素は、メーカーや製造ロットにより純度や不純物の種類及び量等が異なり、そのため溶解性の数値が文献や書籍により異なることが多い。文献上の数値は、特定メーカーの特定製造ロットの色素の溶解性に基づいた数値である。そこで、文献上の色素の溶解性の数値は一つの参考値として理解した方がよい。
また、特に Sudan III において問題となるが、70% エタノールに溶解しやすい Sudan III が良い色素とは判定できない。含有する不純物成分が溶解しやすい場合、本来の Sudan III の濃度が低く、そのため中性脂肪の染まりが淡くなる場合がある。

油溶性色素 Oil red O の溶解性/キシレンに易溶、水に不溶



Oil red O の溶解性

キシレン	3.5%
エタノール	0.7%
水	—

低極性の油溶性色素 (例、Oil red O) は、水分子と親和できる極性の官能基をほぼ有しないので、Oil red O を水に添加した場合、水素結合で親和している水分子間に入りこむことができず、Oil red O は水には溶解しない。しかし、無極性溶媒 (例、キシレン) 中へはファンデル・ワールスの分散力 (分子間に働く弱い引力) 等により Oil red O がキシレンへ拡散し、溶解する。

脂肪染色のポイント

脂質、特に中性脂肪の染色では「溶解」(分配) という物理的機構が大きく関与するが、溶媒に溶けている色素が脂質の方へ浸透溶解するその分配率 (k=C₂/C₁) を脂質側に有利にし、より濃く脂質を染色する要素として次がある。



① 色素の選択

脂質の極性と種類	最適色素
低極性 中性脂肪、他	Oil red O
中極性 リン脂質、他	Nile blue, Sudan Black B

脂質の種類により、より適した色素を選択する。

② 温度

中性脂肪などは、常温では固体なので、色素が溶媒から脂肪へは浸透・溶解しにくく、染色が困難。そこで、染色温度を高くし (例、37°C)、固体状の脂肪を半液状にすると、色素が脂肪へ浸透・溶解しやすくなる。但し、温度を高くしすぎると、液化した脂肪が脱落するリスクが大きくなると考えられる。



③ 溶媒の選択

脂質を溶出させず、色素に対して溶解が優れ、しかも脂質へより多くその色素を分配させる溶媒が理想的である。
Sudan III では70% エタノール、Oil red O では、色素の溶解または脂質への分配にすぐれる60% イソプロピルアルコールが一般的に使用される。但し、本溶媒系では、低極性の中性脂肪は溶解しないが、中極性のリン脂質は少し溶解すると考えられる。
また欧米の文献では、プロピレングリコールが、Oil red O 染色のさいの溶媒として使用されている例がある。

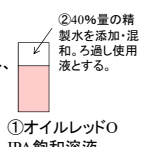
アルコール類の特性

	エタノール (EtOH)	イソプロピルアルコール (IPA) (C ₂ H ₅ OH)
極性・親水性	EtOH > IPA	
親油性	EtOH < IPA	
中性脂肪溶解性	EtOH < IPA	
Oil red O 溶解性	EtOH < IPA	

低 ← アルコール類濃度 → 高
低 ← Oil red O の濃度 → 高
弱 ← Oil red O 染色強度 → 強
小 ← 脂肪の溶解リスク → 高

④ 染色液の調製法 (オイルレッドO染色液)

60% イソプロピルアルコール (IPA) へ Oil red O を加えて飽和溶液を作成するより、まず色素が溶解しやすい① IPA のほぼ飽和溶液を作成し、その後② 所定量の精製水を添加する方法が Oil red O 飽和60% イソプロピルアルコール溶液を調製しやすい。
Oil red O 飽和イソプロピルアルコール溶液 (Oil red O 原液) は min. 1 年安定である。



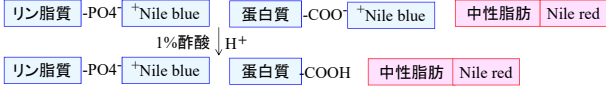
Oil red O 染色の染色操作とポイント

染色操作	特記事項
① 凍結切片の作成	切片の厚さ: 5~10µm (貼付法)
② 蒸留水洗	2~3分
③ 60% イソプロピルアルコール	約1分 蒸留水洗から直接染色液へ移ると、水に不溶性オイルレッドOが切片中に析出する。そこでオイルレッドO染色液と同じ溶媒組成の60% イソプロピルアルコールに切片を馴染ませる。また本処理を入れた方がオイルレッドO染色液を保持しやすくなる。
④ オイルレッドO染色液 37°C、10~15分	37°C に加温することにより、固体状の脂肪がやや半液状になり、オイルレッドOが溶け込みやすくなる。
⑤ 60% イソプロピルアルコール	約2分 切片に浸み込んでいる染色液を洗い流す。この洗いをせず直接水洗 (処理時間は、切片の厚さに依存。厚めの場合、時間を長くする) が析出し、鏡検上障害となる。 (Sudan III の結晶析出例)
⑥ 軽く水洗後、蒸留水洗 (約2~3分)	イソプロピルアルコールを洗い流す。
⑦ マイヤーヘマトキシリンで核染色 (約2~3分)、流水水洗で色出し (5-10分)	
⑧ 軽く蒸留水洗し、水溶性封入剤で封入。クリスタルマウントで封入すると乾燥・固化後キシレンを通して通常通りの非水溶性封入剤を用いて封入すると永久標本となる。	

Nile blue染色の染色操作とポイント

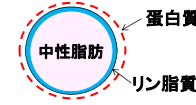
染色操作	特記事項
① 凍結切片の作成	切片の厚さ: 5~10μm(貼付法)
② 蒸留水洗	2~3分
③ ナイル青染色液で染色 60°C 5~20分	切片の厚さにより、染色時間を増減する。
④ 蒸留水で軽く洗う 5~10秒	Nile blueは水溶性なので、本洗いは切片上の余分な染色液を除去する程度に手短に行う。
⑤ 1%酢酸水で分別 ^注 10~20分	1%酢酸水で切片に赤味がでてくるまで分別。必要に応じて分別時間を増減する。
⑥ 蒸留水洗 約10~15秒	Nile blueは水溶性なので、本洗いは手短に行う。
⑦ グリセリン等で封入	

注: 酢酸分別



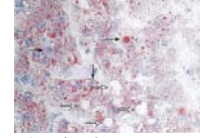
酢酸分別: 生体部位の負(-)荷電の成分官能基(リン脂質リン酸基PO₄⁻、蛋白質カルボキシル基COO⁻など)に親和している塩基性色素のNile blueは、酸性の酢酸水の水素イオンH⁺と置換し、特に蛋白質などに親和しているNile blueが徐々に溶出し分別される。
Nile blue硫酸酸性染色液使用の場合、蛋白質への染色は抑制されるので、分別時間は短くなる。

脂肪滴の構造



発達した脂肪細胞は、その内部の大部分が巨大な脂肪滴で占められる。中性脂肪の塊の周りにリン脂質の一重層が取り囲み、さらにその表面に種々の蛋白質が親和して形成されている。リン脂質の親油性部分が中性脂肪側に、また親水性部分が蛋白質側に位置している。

脂肪滴の変位や脱落



脂肪滴の変位(→)、や空砲がみられる。

写真引用文献
末吉徳芳: 染色の際に生じるアーティファクト 検査と技術. Vol.33 70, 2005

脂肪滴の変位や脱落の原因	左記のリスクの低減法
①封入時、カラーガラスを圧迫(気泡などを追い出すため)	①カラーガラスをかけるさい、上から押さない。
②切片の厚さが薄い。	②切片の厚さを厚くする。
③通常のスライドガラスの表面は親水性のため、疎水性の中性脂肪の接着は弱い。 OH OH 親水性シラノール基 Si Si ガラス表面	③表面が疎水性のコーティングガラス(例、APSコート)又はより強力なコーティングガラスを使用。
④染色工程で切片を激しく上下。	④切片は静かに上下する。
⑤染色時等で温度が高いと脂肪滴が液化し、脱落・変位しやすい。	⑤温度をあまり高くない。
⑥ホルマリン固定が不十分	⑥リン脂質を介して存在する蛋白質の十分な固定によりリスク低減。
⑦シュクロース置換処理が不十分で、氷晶が形成。	⑦シュクロース置換により、氷晶形成を防ぐ。