

鉄ヘマトキシリンの染色メカニズムと特徴

ヘマトキシリン

塩化第二鉄
 FeCl_3

酸化

ヘマテイン

レーキ

媒染剤
 Fe^{3+}

媒染第二鉄 (Fe^{3+}) は
酸化剤及び媒染剤として機能
 $\text{Fe}^{3+} + e^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}$
分別されやすい
鉄 Fe < アルミニウム Al
イオン化傾向 $\text{Fe} < \text{Al}$
 Al を含む媒染剤だと、強い酸性のフン
ギーソソ液の染色過程で分別・脱色

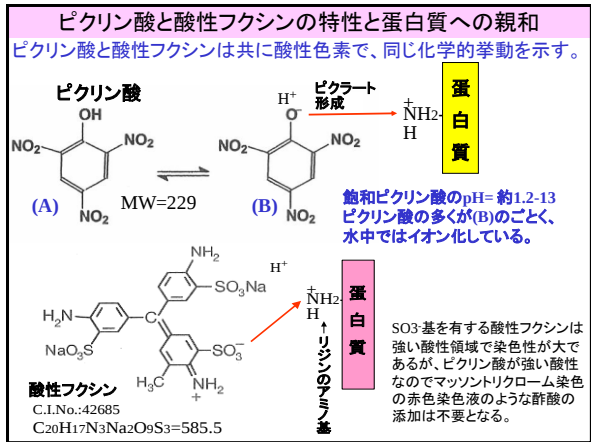
核DNA PO_4^-

細胞核

黒褐色 Fe^{2+}

鉄ヘマトキシリンの非安定・非耐酸性

- ① 高温でのヘマトキシリン 0.5%
- ② 過剰の酸化剤 (塩化第二鉄)



酸性色素
ピクリン酸
MW=229

分子サイズ
小

染色部位の構築の疎密
密
(赤血球、筋繊維、細胞質)

酸性フクシン
MW=585.5

大

疎
(膠原線維)

ワンギンソン液の調製・最適混合比

飽和ピクリン酸溶液	100ml	一般的に酸性色素は安定。 ワンギンソン液は長期間安定
1%酸性フクシン	10～15ml	

ワンギンソン液の調製上の注意点

①ピクリン酸の溶解度 1.2g/100ml水(室温)、約6.7g(100℃)→温度により溶解度が異なる。
自家製と市販の飽和ピクリン酸、作製時期により濃度異なる可能性あり。

②酸性フクシンの色素含有量→メーカーや製造ロットにより大きく異なる。
メルク、米国Biological Stain Commission: 酸性フクシンの色素含有量 min. 60%
混合最適比は、飽和ピクリン酸と1%酸性フクシンの真の濃度や染色時間等に依存。
メーカーやロットが異なる場合→飽和ピクリン酸/1%酸性フクシン最適混合比 要再検討

	ビクリン酸	酸性フクシン
分子量	229	585.5
分子サイズ	小	大
拡散・染色速度	速い	遅い

ワンギンソン液/染色時間(通常5分)

ビクリン酸

ビクリン酸優勢

酸性フクシン

酸性フクシン優勢

分子サイズの異なる色素が2種類以上一つの染色液に含まれる場合、染色時間により色のバランスが変化する。
参考: ババニコロウ EA 染色でも同様の現象あり。

小さい色素は拡散速度が速く、短時間で組織部位を染める。大きい色素は拡散が遅く染色に時間がかかり、染色時間が長くなるにしたがい、先に染着部位に入り込んだ小さい色素を追いつ出し、代わりに入り込む。

シリウスレッドの酸性フクシンに対する利点

① 褐色しにくい ② より鮮やかな赤色

③ ピクリン酸と分子量が大きく異なり、染色の選択性がよくなり、膠原繊維がよりクリアに染まる

		分子量の比較	
ピクリン酸	229	酸性フクシン	585.5
		シリウスレッド	1,373

蛋白質

3Na⁺

3Na⁺

Sirius red F3B C.I.No.:35780
C₄₅H₂₆N₁₀Na₆O₂₁S₆1.7373

注意1) Sirius red F3Bはメーカーや製造ロットにより、色素含有量が大きく異なる。
(通常色素含有量: 約30%)メーカーやロット異なる場合、最量混合比要再検討

2) Sirius red F3B(C.I.No.35780)とSirius red 4B(C.I.No. 28160)は異なる色素

EVG染色操作	染色のポイント
① 脱パラフィン、水洗 (水洗省略可)	弾性線維は親油性官能基を有するアミド酸の含有量が多く、パラフィンが疎水結合十分に弾性線維に強く親和。したがって、脱パラ操作は十分に行う必要がある。脱パラが不十分だとパラフィンが残留し、その結果、色素のレゾルシフクシンが弾性線維の壁面に浸透困難。
② 1%塩酸70%アルコール 5~10drips	レゾルシフクシン液と同じ溶媒組成の1%塩酸70%エタノールに馴染ませる。 水洗からすぐ染色液へ入ると、レゾルシフクシンは水には難溶なので切片に色素の沈着物が生じたり、また色が染色液中へ多く持ち込まれ染色液中のエタノール濃度が減少すると色素の沈殿が生じたり、また共染が生じやすくなる。
③ レゾルシフクシン液 前田変法 →約1~3時間 原法 →約1時間~1晩 共染対策	染色液の処方や希釈濃度により染色時間が異なる。 A)レゾルシフクシン液の染色時間を短くする B)染色液が古くなると共に染傾向 → 染色液を早めに交換 C)分別十分に実施 D)染色液の色素濃度を低くする(染色液の希釈)?
④ 軽く水洗 (余分な染色液を落とす)	鏡検して弾性線維が染まっているか確認。(水洗省略可)
⑤ エタノールで分別 2~3槽 各2~3秒 (又は1%塩酸70%エタノールで分別)	弱 ← 分別力 → 強 低 ← エタノール濃度 → 高 低 ← 塩酸濃度 → 高

⑥

ワイゲルト鉄ヘマトキシリン
2～5分

⑦

軽く水洗

⑧

0.5%塩酸水で分別
1～3dips

少し濃い目に染める(強酸性のピクリン酸を含む
ワンギーソン液での染色操作過程でヘマトキシリンが
少し分別され、溶出するため)

余分な染色液を落とす程度に水洗

塩酸分別を入れた方が、バックの共染しているヘ
マトキシリンがとれるので、ピクリン酸の黄色が鮮
やかになる。が、少し残存して、くすみの原因にな
る場合あり。

He

Fe³⁺

PO₄⁻

DNA

核

PO₄⁻

DNA

核

Fe³⁺

He

細胞質

細胞質

細胞質

細胞質

He

Fe³⁺

PO₄⁻

DNA

核

PO₄⁻

DNA

核

Fe³⁺

He

細胞質

細胞質

He

Fe³⁺

PO₄⁻

DNA

核

PO₄⁻

DNA

核

Fe³⁺

He

細胞質

細胞質

He

Fe³⁺

PO₄⁻

DNA

核

PO₄⁻

DNA

核

Fe³⁺

He

細胞質

細胞質

解決法

サクラの標本道場 初心者編
(EVG染色のヘマトキシリン液)

HE用ヘマトキシリンを使用し、
飽和ピクリン酸水溶液(原液の
pH:約1.6)のpHを、水酸化ナ
トリウムでpH2.5に調節した後、
シリウスレッド溶液と混合して
ピクロ・シリウスレッドを調製し
て使用。鉄ヘマで問題となる
背景の共染は生じにくい。

執筆:東邦大学 佐々木久美子 前田明
敬称略

⑨

水洗(色出し)
5～10分

⑩

ワンギーソン液
約5分

⑪

A法→軽く水洗後、素早くエタノール(2槽、各3-5秒)で脱水
B法→直接エタノールで脱水(2槽、各3-5秒)

HE染色時より、短めでOK。長く水洗しても、次のワン
ギーソン液が強酸性のため、色出しの効果が弱い。

ピクリン酸の黄色と酸性フクシンの赤色のバランスは、ワ
ンギーソン液中各色素の濃度及び染色時間に依存する。

色素の溶解性

	ピクリン酸	酸性フクシン
水	約1.2%	約10-12%
エタノール	約8.3%	約0.1-0.3%

A法 軽く水洗(OH⁻)

B法(直接エタノールで脱水)

A法の水洗の効果→コントラストが良くなる。
切片に物理的に存在するワンギーソン染色
液で、特に水に溶解しやすい酸性フクシンが
溶出除去され、また水の中の水酸基OH⁻が
組織に親和してる過染ぎみの負(-)のピクリン
酸や酸性フクシンと置換すると考えられる。
ピクリン酸は水よりもエタノールにより溶解しやすいので、エタノールによる脱水は速や
かに行なう。エタノールでの脱水を長くするとピクリン酸が溶出し、黄色が淡くなる。

B法:A法に比べると、コントラスト
が少し悪いことが多い。
エタノールに難溶性酸性フクシン
(物理的に切片中に存在)の洗浄
除去が不十分になるためと考えら
れる

⑫

透徹、封入

ピクリン酸はキシレンに溶解しやすく、キシレンに
よる透徹も手短に行なう。
また、封入剤の溶媒は通常キシレンであり、その
ため封入後ピクリン酸が封入剤中残留するキシ
レンへ経時的に溶出し、脱色ないし退色してくる。

カバーガラス

EVG染色切片

ピクリン酸

封入剤由来キシレン

スライドガラス

キシレンの蒸発

透徹用キシレン

封入剤中キシレン含有量:約50%±α

カバーガラスの中心部分では、透徹及び封入剤由来の
キシレンが長期間残留し、そのためキシレンに溶解しや
すいピクリン酸が経時的に溶出。

参考:ピクリン酸のベンゼンへの溶解性(約10%/室温)

3