

マッソン・トリクローム染色の原理と染色のポイント

- ・マッソン・トリクローム染色の原理
- ・リントングステン酸の役割
- ・染色液酢酸酸性の理由
- ・1%酢酸水洗浄の理由/酸性色素の溶解性
- ・マッソン・トリクローム染色のポイント

第101回日本病理組織技術学会

2020年 3月 1日

渡辺 明朗

マッソン・トリクローム染色(原法と変法の違い)

1929年 Masson Trichrome staining (MT染色) (Tri: 3 chrom:色素)

Mallory染色(酸フクシン/オレンジG・アニリン青)などを基にして考案された染色法

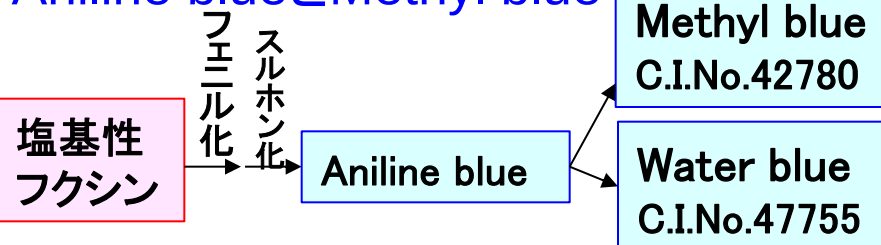
	MT 染色原法	MT 染色変法	
細胞核	Hematoxylin	Hematoxylin	
膠原線維	Aniline blue	Aniline blue	
細胞質	Acid fuchsin	赤紫色のAcid fuchsinへ、コントラスト改善のため、赤色調が強い他の赤色酸性色素1~2点を混合使用。	
		赤色酸性色素	吸収極大波長
		Acid fuchsin	546nm
		Ponceau xylidine	503nm
		Azophloxine	540, 502nm
		Biebrich Scarlet	505nm
赤血球		Orange G	



Ponceau xylidineの別名

- ・Ponceau de xylidine
- ・Ponceau 2R

Aniline blueとMethyl blue

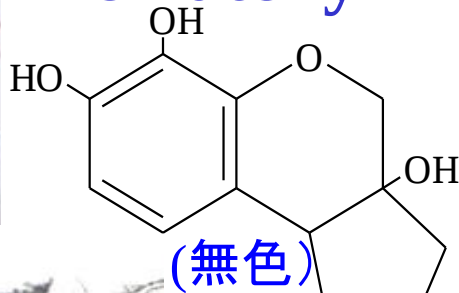


塩基性フクシンをフェニル化し、さらにスルホン化して生成する色素混合物をAniline blueと称し、Methyl blue (C.I.42780)とWater blue(C.I.47755)の混合物である。市販品のAniline blue, Methyl blue, Water blueのほとんどが、C.I.42780とC.I.42755の混合物であり、Aniline blueとMethyl blueは共にMT染色に使用可。

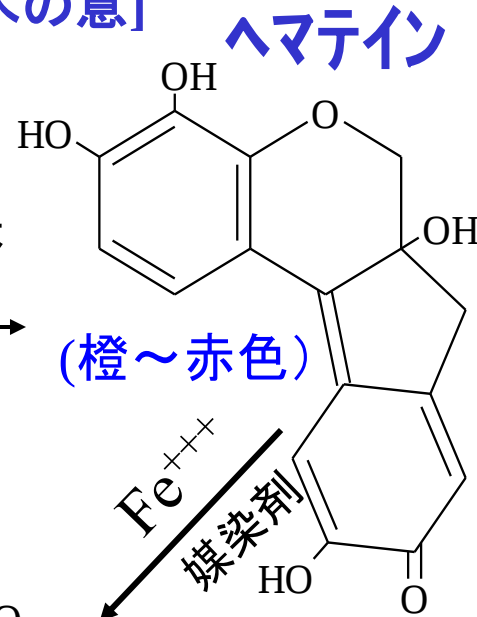
鉄ヘマトキシリンの染色メカニズムと特徴

[Hema:血液の意(赤色)+ Xyl:木の意]

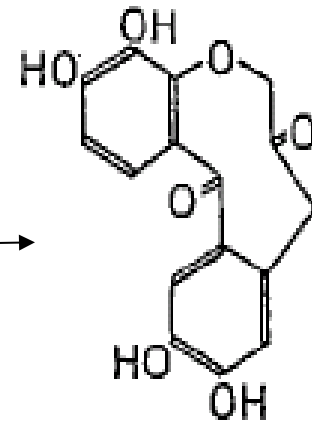
Hematoxylinヘマトキシリン



塩化第二鉄
 FeCl_3
酸化

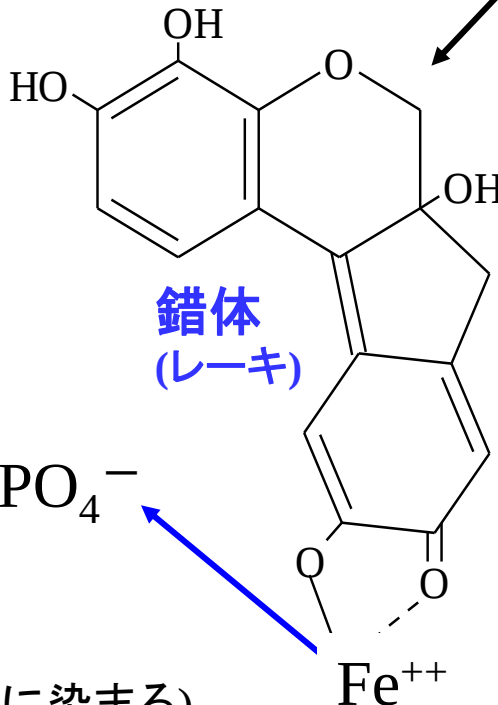


過剰酸化



オキシヘマテイン

Fe^{+++}
媒染剤



核DNA PO_4^-

細胞核

(黒褐色に染まる)

塩化第二鉄(Fe^{3+})は
酸化剤及び媒染剤として機能



イオン化傾向と分別されやすさ

アルミニウムAl > 鉄Fe

媒染剤がAlだと、酢酸酸性染色液や
酢酸水洗浄過程で分別・脱色する。

鉄ヘマトキシリンの不安定・非耐久性
(混合調製後、約1~3週間間安定)

- ①高濃度のヘマトキシリン 0.5%
ヘマテイン濃度上昇→過染・共染
- ②過剰の酸化剤(塩化第二鉄)
オキシヘマテイン生成→染色強度低下



ヘマトキシロンカンペチアナム

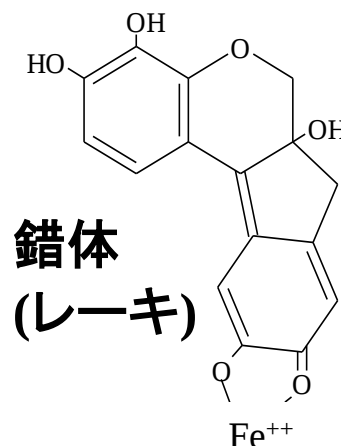
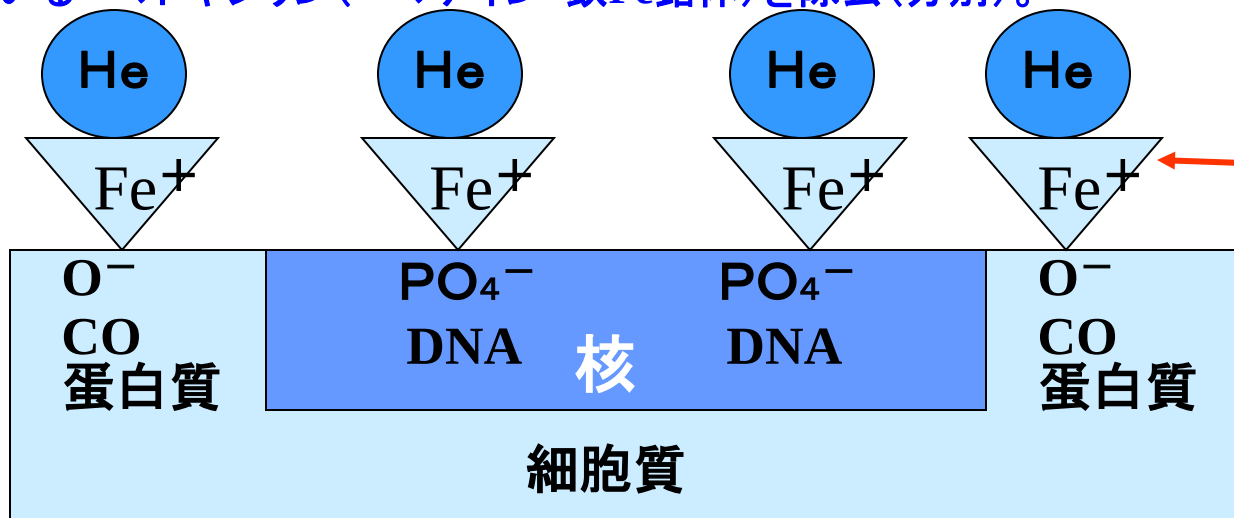


Karl Weigert
(1845-1904)

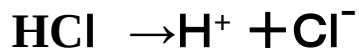
分別(Differentiation)(鉄ヘマで共染が強い場合)

共染している切片を塩酸水(アルコール)に浸し、不必要な部位に親和しているヘマトキシリン(ヘマテイン・鉄 Fe 錯体)を除去(分別)。

共染状態

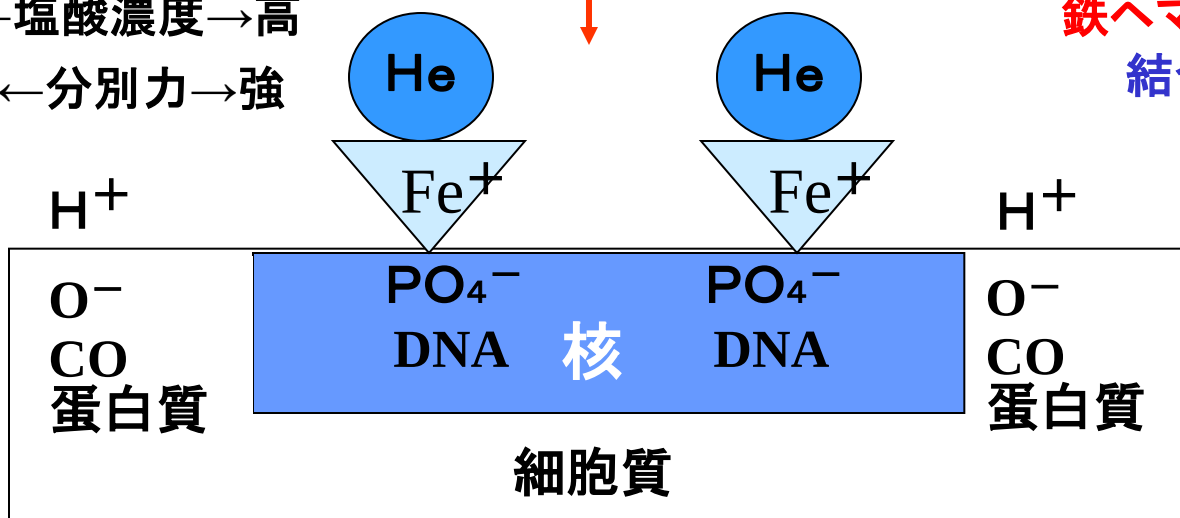


共染	分別
強い	要分別
弱い	分別不要



低 ← 塩酸濃度 → 高
穏やか ← 分別力 → 強

分別 ↓ H^+ (塩酸)



鉄ヘマは分別されにくい →
結合組織のくすみの原因

カラッチヘマトキシリン
→ 分別されやすいので、
共染・過染ぎみに染色し、
分別操作を省く。
(核染後、酸溶液にさらされ
分別されるため)

分別後色出ししても、染色過程で切片を酢酸酸性染色液や酢酸水に長くさらすので色出し効果は低い。

異なる酸性色素の染色には、色素分子サイズと組織部位の構築の疎密が染色に関与

Baker 染色の 三要素

分子量

452.4

(0.75%オレンジG 染色時間:通常1分)

585.5

2880

800

染色部位の構築の疎密

The diagram illustrates the density of staining sites in three tissue components. On the left, four circles represent different staining targets: a small yellow circle, a medium red circle, a large white circle, and a large blue circle. On the right, three rectangular blocks represent tissue components: a yellow block labeled '密' (dense), a red block labeled '中' (medium), and a blue block labeled '疎' (sparse). Arrows indicate the relationship between the circles and the blocks: the yellow circle points to the yellow block; the red circle points to the red block; the white circle points to the blue block; and the blue circle points to the blue block. The yellow block has a large white semi-circular cutout, the red block has a smaller white semi-circular cutout, and the blue block has a large white semi-circular cutout.

密
(赤血球)

中
(細胞質)
(線維素)

疎
(膠原線維)

分子サイズの異なる酸性色素を段階的に染める場合、小さい色素から順次染色する。先に大きい色素を使用すると、分別されにくい大きい色素が構築の中の部位へも入り込み、染め分けが困難になる。

パパニコロウ染色の原理/細胞質構成蛋白質の種類と濃度の違いと構築の疎密

MT染色同様Pap染色も色素の分子サイズと染色部位の構築の疎密が染色に関与。
(扁平上皮細胞では細胞質中の蛋白**ケラチン**濃度差が構築の疎密の差をもたらす。)

酸性色素

①OG-6

オレンジG

分子量=452.4

②EA-50(Eosin-Azure)

エオシンY

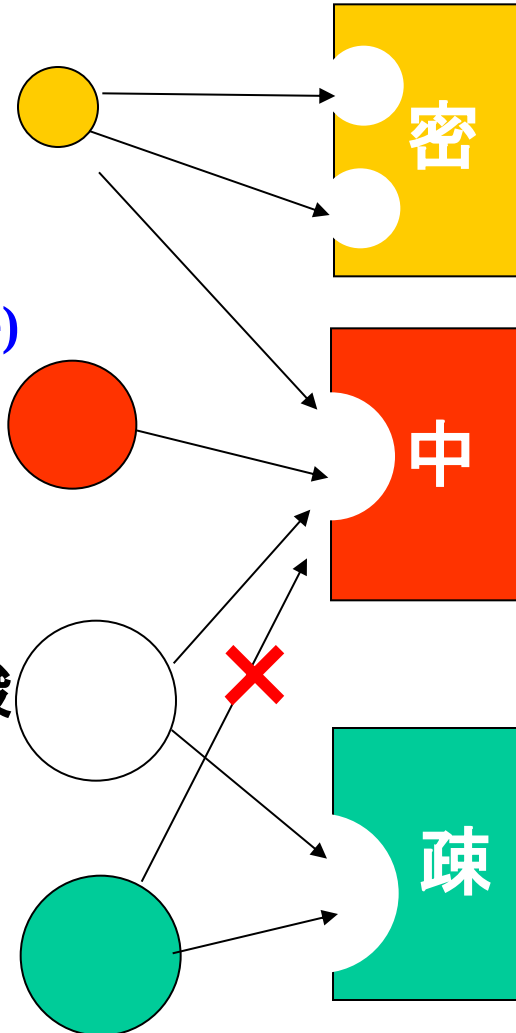
分子量=691.9

リタングステン酸
(pH調整、染色の
選択性に関与)

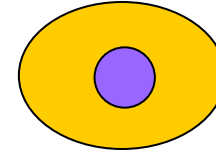
ライトグリーン

分子量=792.9

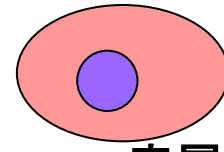
染色部位の
構築の疎密



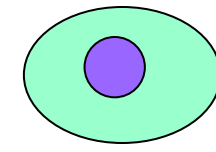
Keratinized
cytoplasma



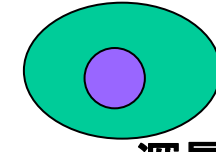
角質化
細胞質



表層



中層



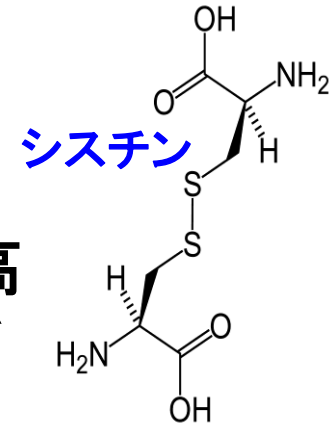
深層

扁平上皮細胞

高

ケラチン濃度

低



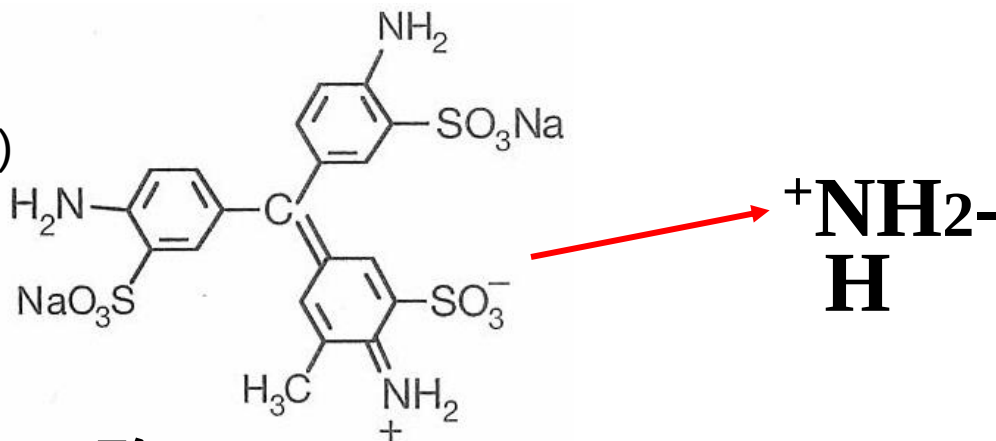
ケラチン：
ジスルフィドS-S結合をもつ
アミノ酸のシスチンを多く有し、高度に架橋された構築密の構造を有する蛋白質

リンタングステン酸の特性と役割 / 染色の選択性に関与

酸フクシンやアニリン青と同じ負(－)荷電のリンタングステン酸は選択的染色に関与する。

酸フクシン

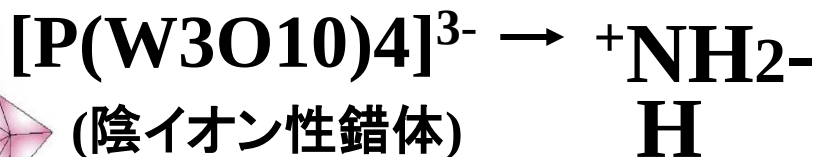
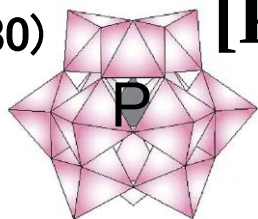
(分子量:585.5)



蛋白質

リンタングステン酸

(分子量:2880)



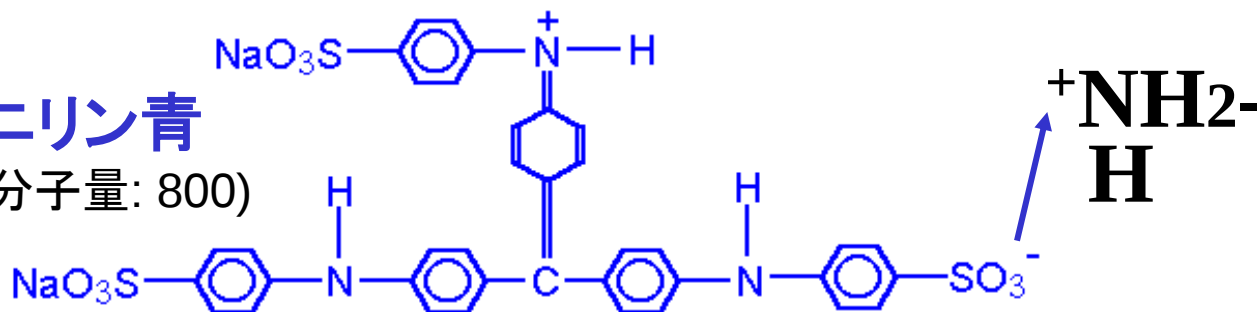
蛋白質

(染色において、他の酸性色素と染着部位の席の奪い合いをする)

(BakerはColorless anionic dye、無色の陰イオン性色素と命名)

アニリン青

(分子量: 800)



蛋白質

EVG 染色では酸フクシンが膠原線維に入り込むように、MT 染色でも酸フクシンが構築疎の膠原線維に多く入り込む。そこでリンタングステン酸に切片を浸すと、リンタングステン酸は構築疎の部位に入り込んだ酸フクシンを追い出し、色素同士が重ならないよう、選択的染色に関与する。

リンタングステン酸処理時間と染色結果の違い

- オレンジG
- ▲ 酸フクシン
- アニリン青

□ リンタングステン酸(PTA)

構築密
赤血球

構築中間
細胞質

構築疎
膠原線維

①

オレンジG

②

酸フクシン

③

PTA

A 処理不足

PTA

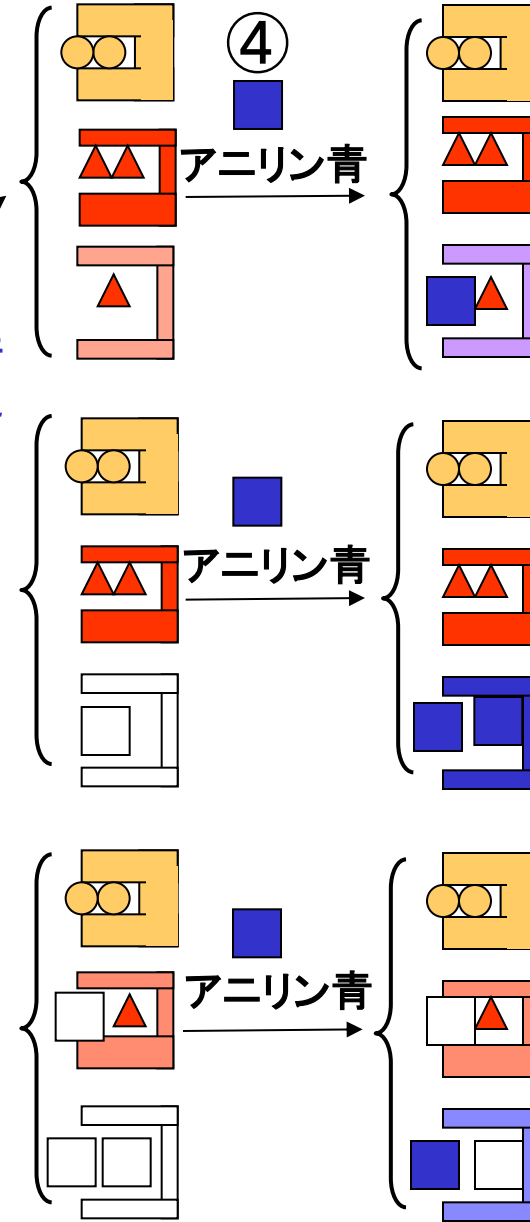
B 適切処理

PTA

C 過剰処理

リンタン処理時間と染色結果
(2.5%リンタンで通常15-30分)

- A: 短い時間→構築疎の部位に赤と青の重なり
- B: 適切な時間→赤と青の染め分け良好
- C: 長い時間→構築中の部位の赤が弱く、また構築疎の部位の青も弱くなる



リンタンに切片を浸すと、構築疎の部位へ入り込んでいた酸フクシンをリンタンが追い出して、リンタンがその部位に入り込み、その後アニリン青に切片を浸すと、膠原線維等に入り込んだリンタンに代わりアニリン青が少しずつ入り込む。またアニリン青の染色条件(色素濃度、pH値、染色時間、分別、他)にも染色結果が依存する。

染色液の酢酸酸性条件の理由/①組織蛋白の好酸性化

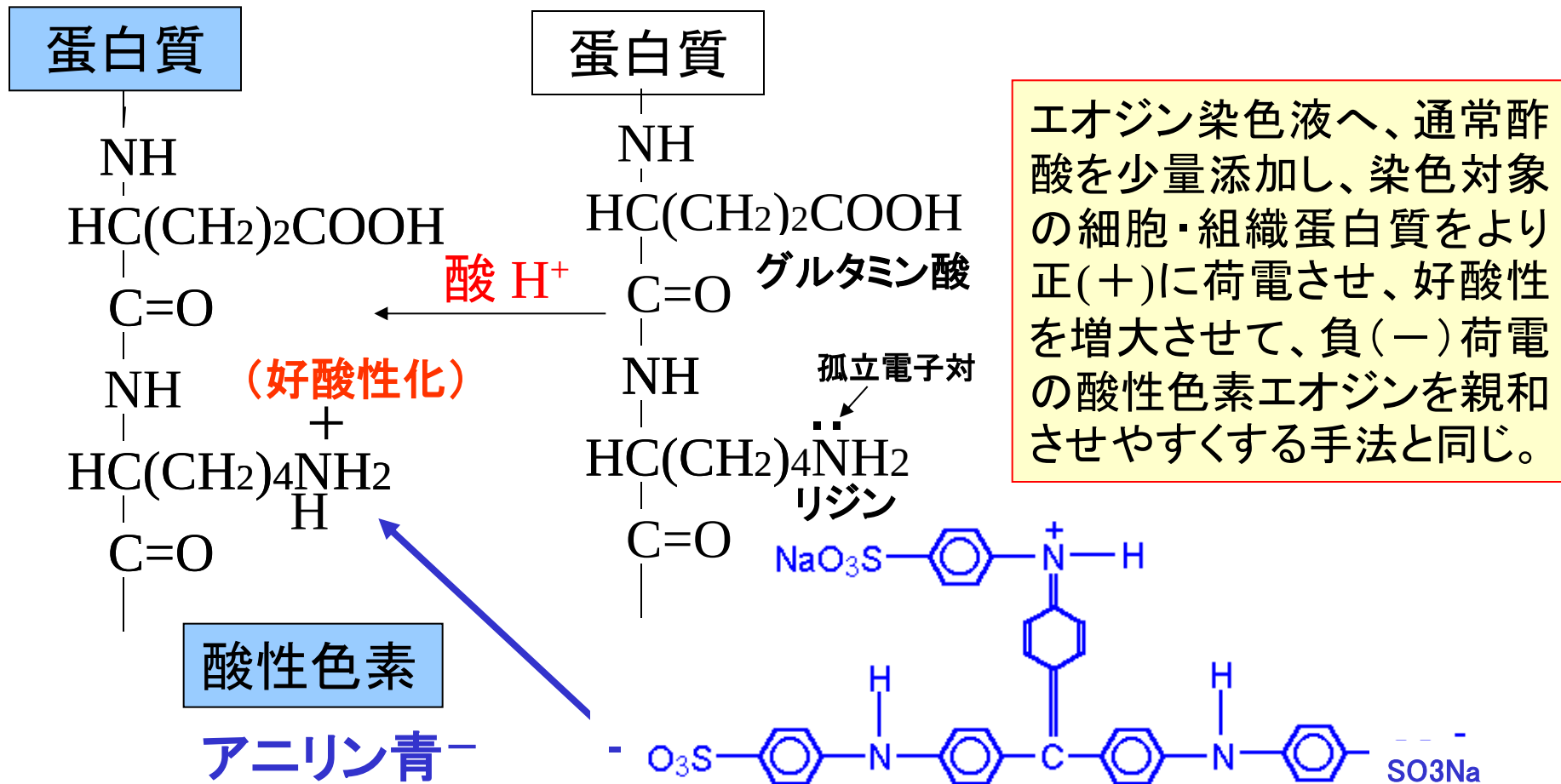
約0.4%**酸フクシン**・0.5%**ポンソー2R** in **1%酢酸**(約pH 2.8)

0.4%**アニリン青** or **メチル青** in **約7.4%酢酸**(約pH 2.3)

(参考: 酸のpH値→下記HPで酸の種類、濃度等を入力してpH値を入手可能)

<https://sensorex.com/ph-calculator/>

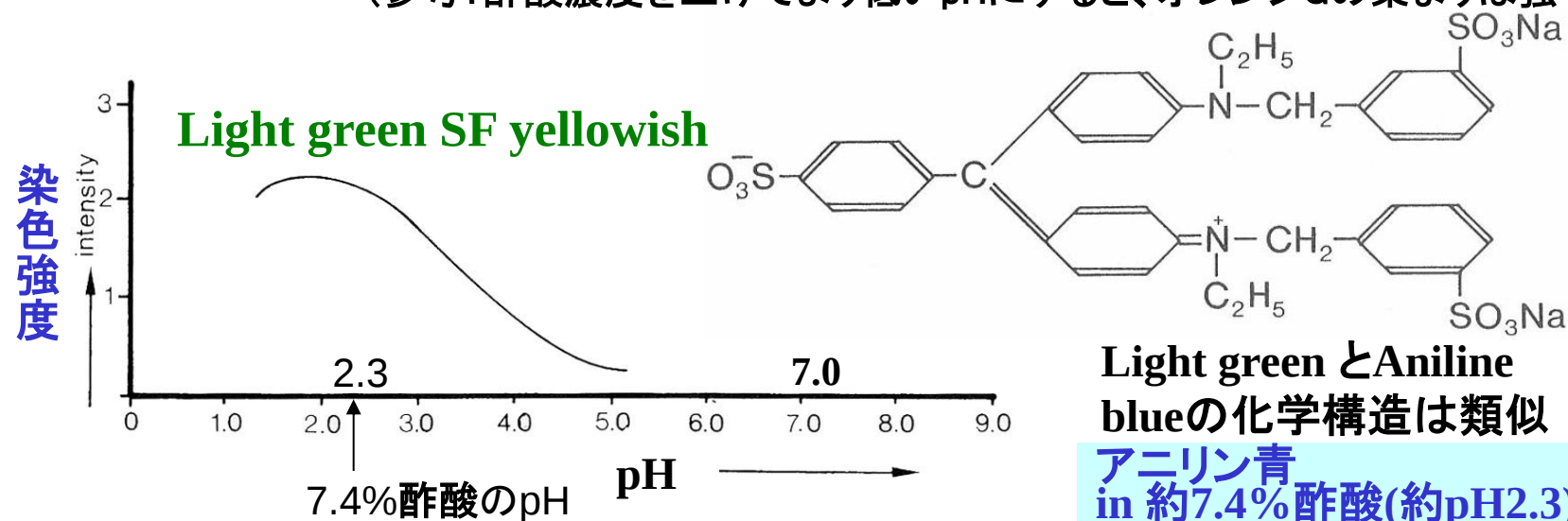
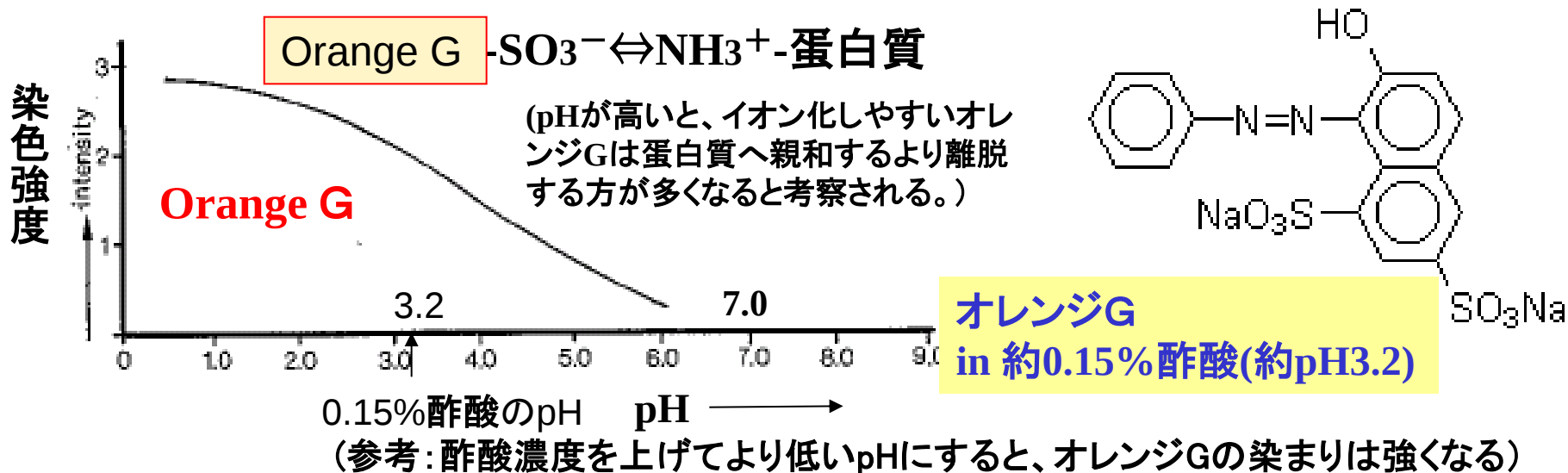
1) 組織蛋白の好酸性化 → 酸性色素がより結合しやすい



染色液の酢酸酸性条件の理由/②酸性色素の染色強度の増大

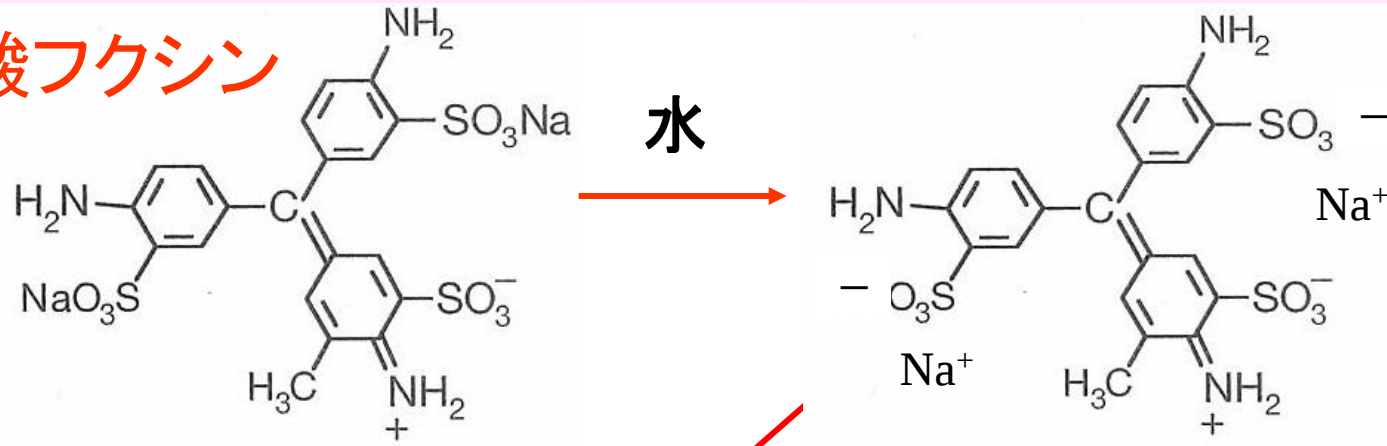
2) 色素はpHによりその染色強度が変化する。

SO₃Na基を有する酸性色素はpHが低い方が染色力が強い。

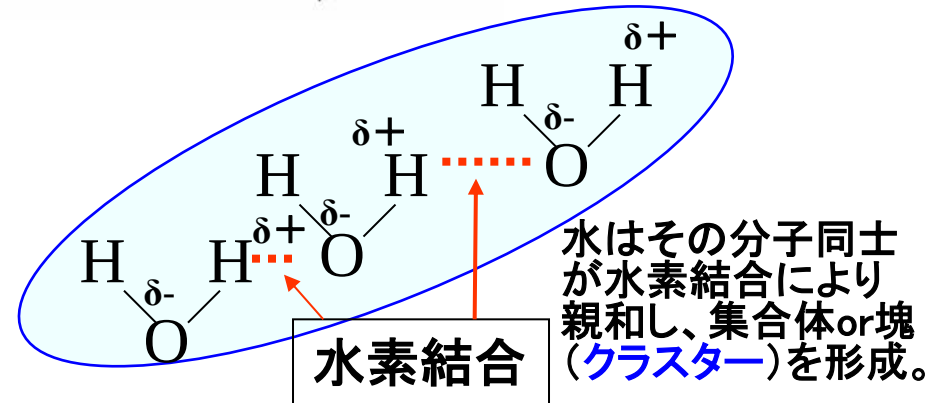
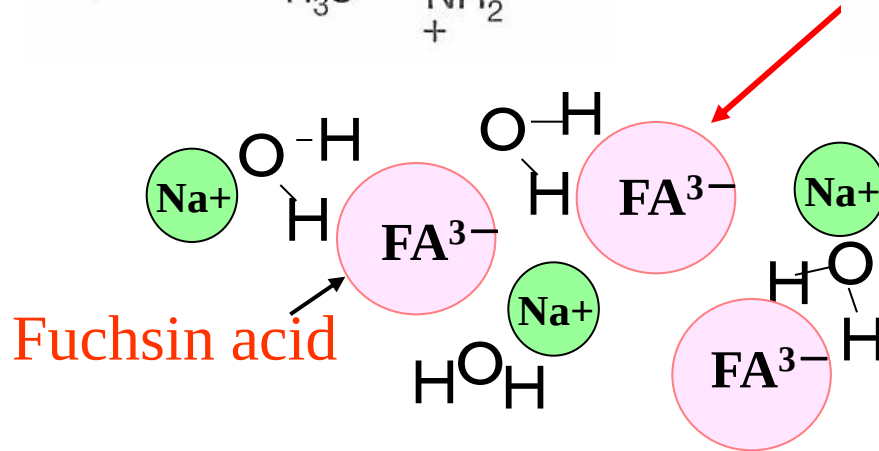


何故洗浄に1%酢酸を使用？ / 酸性色素の溶解性と洗浄条件

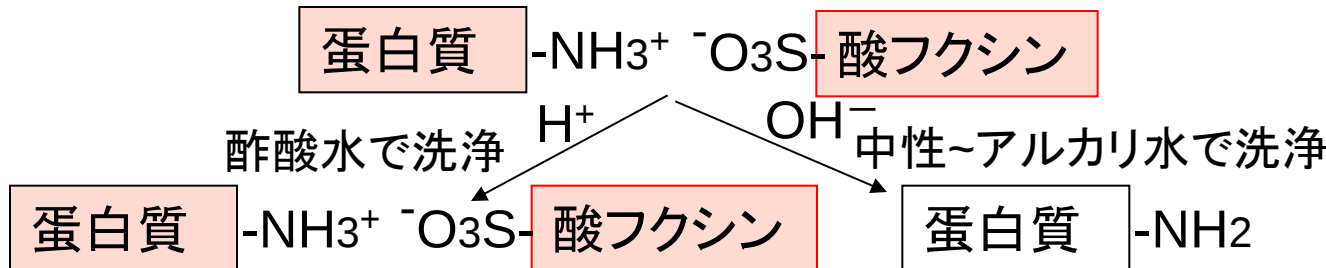
酸フクシン



イオン化することにより、水素結合している水分子間にイオン化した酸フクシンが入り込み拡散、溶解



酸性酢酸水洗浄の理由



参考: 酸性色素は色素分子同士の静電氣的親和性が大→アル (色素が溶出・脱色) コールに難溶なのでアルコール脱水過程で色素は溶出しにくい。

H^+ 濃度の高い酢酸酸性水での洗浄下、 H^+ と蛋白に親和した負(-)の酸フクシンとは置換しなく保持される。 OH^- 濃度が高い水だと同じ負(-) 荷電の酸フクシンが容易に溶出する。

酸性色素の色素含有量と水やアルコール類への溶解性/酸性色素水溶液の安定性

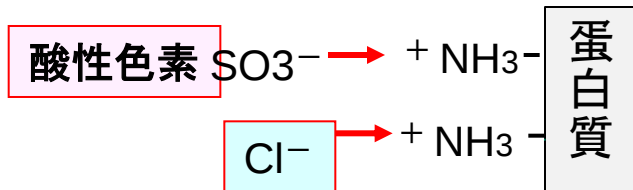
酸性色素	含有量 ^{注-1}	溶解性 ^{注-2}	
		水	エタノール
Orange G	min.80%	10.9%	0.2%
Ponceau xylydine	—	5 %	0.1%
Acid fuchsin	min.60%	10-12.5%	0.1-0.3%
Aniline blue WS	—	7 %	0.4%

注-1) 色素含有量の引用:
 米国Biological Stain Commission
 の色素品質規格
 2) 色素溶解性の引用:
 Conn's Biological Stains,
 10th ed. 2002

- 色素含有量や不純物の種類及び量→**メーカー**や**製造ロット**により異なる(特に、非汎用色素)
 →染色強度が異なり、また溶解性が異なる(文献上の色素溶解性数値は一つの参考値)
 不純物として無機化合物(例、Na₂SO₄、NaCl)の量が多いと、下図のごとく無機物の負(ー)イオン(例、Cl⁻)は、染色にて同じ負(ー)荷電の酸性色素と組織成分部位への親和を競合するので染色が抑制される。

- 酸性色素染色液の染色強度は下記に依存

①色素濃度 ②染色液のpH値 ③溶媒組成、他



酸性色素のアルコール類への溶解性

酸性色素は色素分子同士の静電氣的親和性が大きく、炭素数が多く極性の低いアルコール類(例イソプロピルアルコール)ほど難溶となる。

Isopropyl alcohol < 変性アルコール < Ethanol < Methanol ≪ 水
 (CH₃)₂CHOH C₂H₅OH CH₃OH

酸性色素 SO₃⁻Na⁺

ドライゾール(関東化学)	
エタノール	88%
イソプロピルアルコール	9%
メタノール	3%

酸性色素水溶液・染色液は比較的長期間安定

例: 酸フクシン染色液は約1年安定

参考: アミノ基(NH₂)を有する塩基性色素は、水溶液中で経時的に酸化されキノン系になり染色性を失うので、一般的に塩基性色素水溶液・染色液は安定期間が短い。

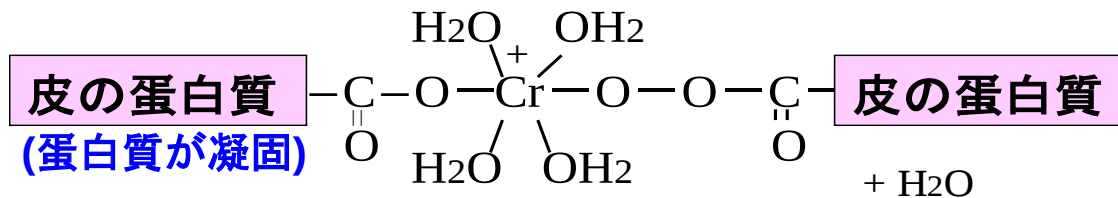
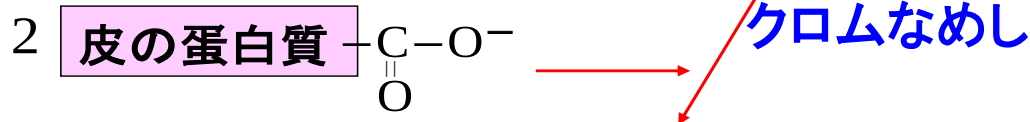
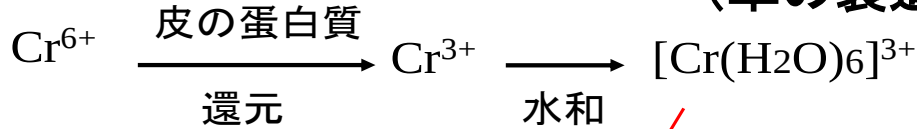
重クロム酸カリウム/トリクロロ酢酸酸化処理の効果の考察

ホルマリン固定標本で赤色で強く染まるよう導入された手法(欧米ではブアン液が使用される)

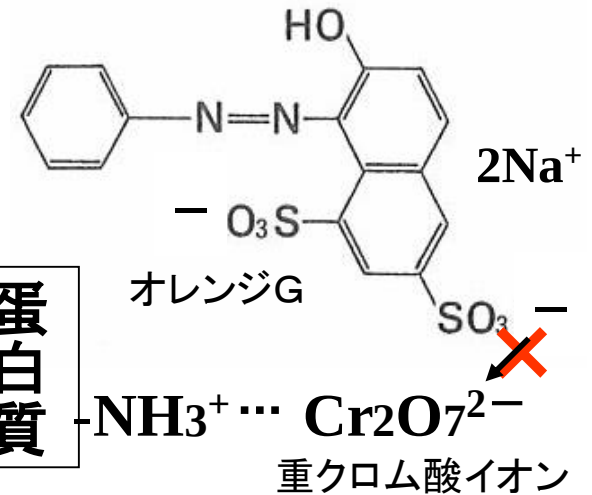
1) 重クロム酸カリウム(固定作用)と皮のなめし

(ツェンカー液成分)

(革の製造)



2) 媒染剤の可能性は小

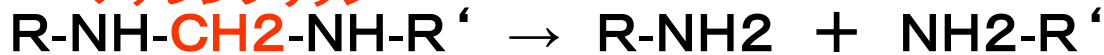


3) 強酸化剤・重クロム酸カリウム/トリクロロ酢酸の効果の考察

①ホルマリン固定による蛋白分子内・分子間のメチレンブリッジの開裂

→好酸性の増大→酸性色素(酸フクシン、アニリン青)の親和性が大

メチレンブリッジ



②蛋白質中負(一)荷電の2つのCOO⁻のCrによる架橋→組織蛋白質の好酸性化

③蛋白質の酸化分解(処理時間:通常15-40分) → 構築の疎密への寄与

処理時間短め → 構築疎 → 青色が優勢

処理時間長め → 分解物が構築疎の間隙を一部埋める(?) → 赤色の染まりが強く、
アニリン青の淡い染色

マッソン・トリクローム染色のポイント

染色操作	染色のポイント/特記事項							
①脱パラ、流水水洗、 蒸留水水洗	水道水には有機物や種々イオンが含まれ、切片を水洗後直接酸化剤水溶液へ入れると、その有機物の酸化に酸化剤が消費され、酸化剤の酸化力を低下させる。従って、酸化剤溶液へ浸す前に、切片を蒸留水又は精製水で洗ってから次にすすむ。							
	水道水中不純物の種類(項目)	水道法上水質基準値						
	有機物	max. 5mg/L						
②酸化剤水溶液処理 15～40分 (10%重クロム酸カリウム・10%トリクロロ酢酸等量混合液)	<table><tr><td>短</td><td>← 酸化剤処理時間 →</td><td>長</td></tr><tr><td>青色がやや強い</td><td></td><td>赤色がやや強い</td></tr></table>		短	← 酸化剤処理時間 →	長	青色がやや強い		赤色がやや強い
	短	← 酸化剤処理時間 →	長					
青色がやや強い		赤色がやや強い						
	・検体による処理時間の違い 腎臓(2μm):約30分 心・肺・肝臓:約20分							
③流水水洗 3分、 蒸留水水洗 3～5秒	強酸性のトリクロロ酢酸(約1.6%→約pH1.2)が切片に残留し酸(H+)が核DNAに親和すると、ヘマトキシリンの核への親和が阻害されるので、切片を十分に水洗し酸を除去する。また重クロム酸が除去されると切片の色がとれる。そしてヘマトキシリン染色液へ入る前に、水道水由来の種々イオンなどを蒸留水で洗い流す。							

④核染

鉄ヘマトキシリン 5～10分

カラッチヘマトキシリン
(2倍処方) 20～30分

- ・核染時間は切片の厚さや鉄ヘマトキシリンの染色強度(調製後の経時変化)などに依存。
- ・核染の後の染色過程で酸を多く使用し分別されるので、その分核を過染ぎみに濃く染めておく。
- ・鉄ヘマトキシリンで共染が強く見られる時は、0.5%塩酸水又は0.5%塩酸アルコールで分別。
- ・カラッチのような媒染剤がアルミニウムの場合は鉄に比べ、核染後の酢酸を含む染色液や1%酢酸で分別されやすいので、分別をしない。

⑤色出し(水洗) 5～10分

色出しをしても、本操作後酢酸水や染色液の酸に長く浸漬するので、色出しの効果は弱い。

⑥2.5%リンモリブデン酸・ 2.5%リンタングステン酸等 量混合液 30～60秒 (鉄ヘマトキシリンの核染の 場合のみ)

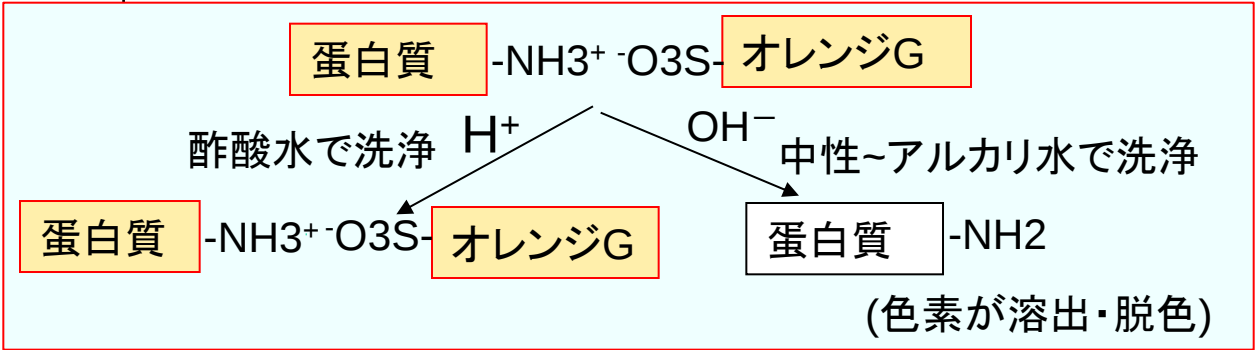
- ・鉄ヘマトキシリンの本来の色(黒色にする)をだす効果があると成書で説明されている。
- ・酸性のリンタングステン酸やリンモリブデン酸により、組織の好酸性が増大し、オレンジGが染まりやすくなると考察される。

⑦0.75%オレンジG液 約1分

アニリン青染色のさい、アニリン青・オレンジG染色液を使用する方法もあるが、オレンジG単独染色の方が染め分けに優れる。アニリン青・オレンジG染色液使用の場合、先に使用する赤色色素が構築密の部位へ入り込み、赤とオレンジの混合色になることが多い。

⑧洗淨(1%酢酸水 I, II)
各2～3秒

オレンジGは水に溶解しやすいので、洗淨に水を使用するとオレンジGが落ちてしまう。そこでオレンジGが溶解しにくい酸性の酢酸水を洗淨に使用する。



低	←	酢酸濃度	→	高
大	←	酸性色素溶出のリスク	→	小
小	←	ヘマトキシリン(媒染剤:Al)溶出リスク	→	大

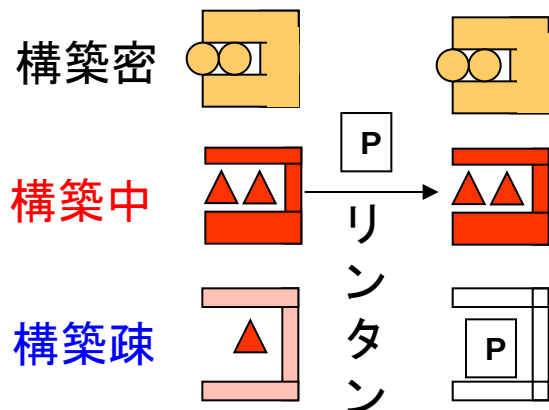
⑨ポンソーキシリジン・酸フクシン染色液 20～30分

短	← 染色時間 →	長
オレンジ色 が優勢		赤色 が優勢

- ・1枚ずつ染色することが望ましい。
- ・本混合色素溶液は染色枚数が多い時、また経時的に赤色のくすみが生じる傾向があり、その場合は混合液を新調する。
- ・剖検など、死亡変化の強い組織では赤の染まりが悪い。この場合、ポンソーキシリジンと酸フクシンの色素濃度を高める(例、2倍)。

⑩洗淨(1%酢酸水 I, II) 各2～3秒 切片をゆすりながらよく洗う。

⑪2.5%リンタングステン酸水溶液 15～30分



構築疎の部位(例、膠原線維)へ入り込んでいたポンソーキシリジンや酸フクシンを追い出し、代わってリンタングステン酸がその部位に入り込み、その後アニリン青染色液に切片を浸すと、膠原線維に親和しているリンタングステン酸に代わりアニリン青が少しずつ入り込む。
リンタングステン酸を通さないと、膠原線維に入り込んでいた赤色の色素と青色のアニリン青が重なり、その結果透明感のないくすんだ色調を呈するようになる。

リンタン処理時間	染色結果
短い時間	構築疎の部位に赤と青の重なり
適切な時間	赤と青の染め分け良好
長い時間	構築中の部位の赤が弱く、また構築疎の部位の青も弱くなる

⑫洗浄(1%酢酸水 I, II) 各2-3秒

酸性色素が難溶な酸性酢酸水で洗い、余分なリンタン液や色素液などを切片から洗い流す。

⑬アニリン青染色液 3～10分

臓器や症例また切片の厚さにより染色時間が異なり、鏡検しながら染色時間を調節する。
腎糸球体基底膜の染色には20-30分。

⑭洗淨
(1%酢酸水Ⅰ,Ⅱ)
各2-3秒

1%酢酸水の洗淨が赤と青のバランスをとるポイントの一つとなる。軽く洗う程度の方がよい。長く洗うとアニリン青が少しおちる。鏡検して染まりが淡い場合は、再度アニリン青染色液へ入れる。

⑮脱水

1枚ずつ脱水することが望ましい。(染色カゴで複数枚染色する場合、色落ちした色素が再度組織を染めて共染が生じないように、1枚おきに標本を染色カゴを入れる。)

エタノール又は
イソプロピル
アルコール(IPA)

アニリン青の過染の
程度によるアルコール
類の選択

過染の 程度	適する脱水用 アルコール類
小	IPA
大	エタノール

酸性色素	エタノール への溶解性 ^注
Acid fuchsin Ponceau xylydine Aniline blue WS	0.1-0.3% 0.1% 0.4%

エタノール脱水操作で、アニリン青が酸フクシンなどより少し多く溶出・分別される

注: 引用 Conn's Biological Stains, 10th ed. 2002

アニリン青の溶解性 (炭素数の多いアルコール類に難溶)	
エタノール C ₂ H ₅ OH (約0.4%)	> イソプロピルアルコール(IPA) (CH ₃) ₂ CHOH

⑯キシレン透徹、封入