

HE染色の原理とポイント

1. ヘマトキシリン

染色メカニズム、ヘマトキシリン染色液の種類と特性、
分別と色出しの原理

2. エオジン

染色メカニズム、溶解性と水洗の染色への影響

3. HE染色に影響を与える因子

第107回日本病理組織技術学会

2023年 3月 5日

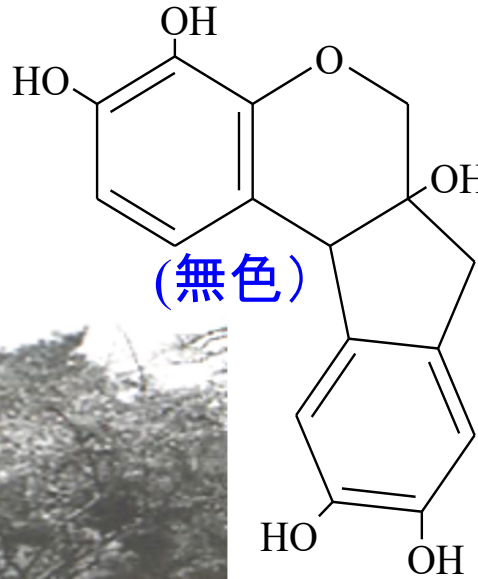
渡辺 明朗

ヘマトキシリンの染色メカニズム

[Hema:ギリシャ語で血液の意)+ Xyl:ギリシャ語で木の意]



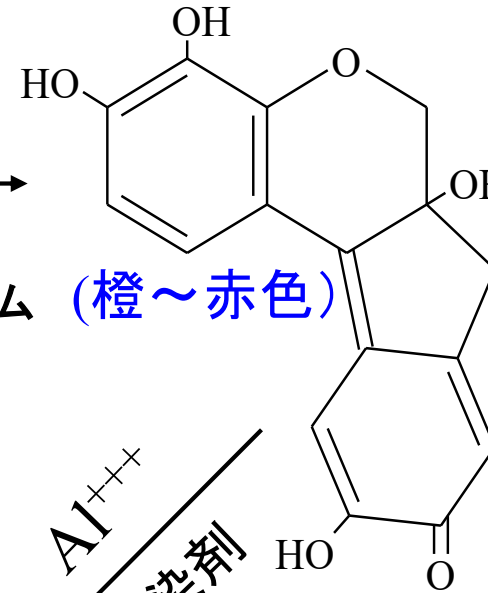
ヘマトキシリン



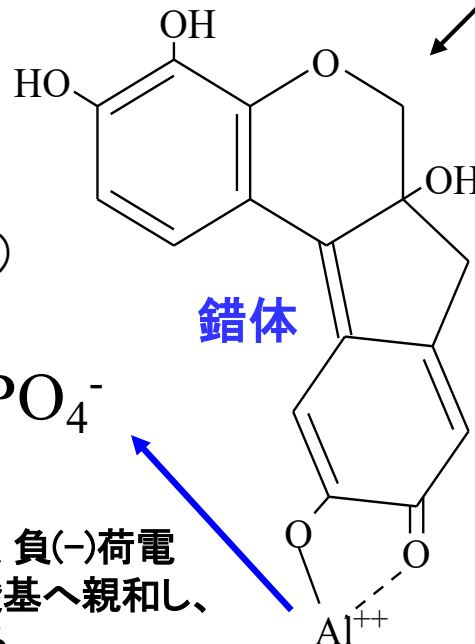
(無色)



ヘマテイン



Al^{+++}
媒染剤



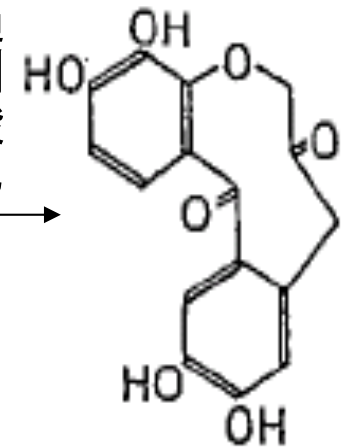
錯体

核DNA PO_4^-

正(+)荷電の錯体が、負(-)荷電の細胞核DNAリン酸基へ親和し、核が黒褐色に染まる。

オキシヘマテイン

過剰酸化

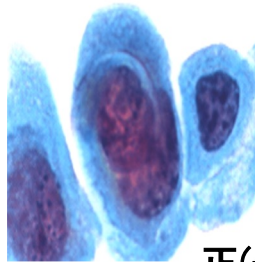


(液は黄褐色を呈す)

過剰酸化が起こる条件
①酸化剤の量が過剰
②経時的空気酸化(時間が必要)



ヘマトキシロンカンペチアナム
(メキシコ・カタン半島に産生する木)



溶剤: 染色液の安定性・耐久性改善のため(沈殿が生じにくい、カビが発生しにくいなど)、有機溶剤が約5-20%濃度で添加される。
例: グリセリン、エチレングリコール
(カラッチ) (ギル)

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. ヘマトキシリン染色液の種類と染色強度(染色力)の因子

用途	ヘマトキシリン染色液	ヘマトキシリン	染色力
切片	マイヤー	1 g/L	弱 ↓ 強
	2倍カラッチ	2 g/L	
	3倍マイヤー	3 g/L	
塗抹	ギル V	5 g/L	

染色強度の因子	弱 ← 染色強度 → 強 (小 ← 共染リスク → 大)
①ヘマトキシリン濃度	低 ← 濃度 → 高 ^注
②酸(クエン酸)の添加	有 (低 ← pH値 → 無高)

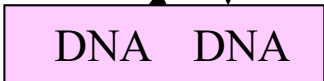
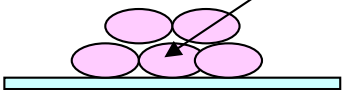
注)ヘマトキシリン濃度の高い染色液の問題点:

経時的にヘマテイン濃度が上昇

液表面に金属光沢さらに沈殿(水や溶剤に溶解しにくいヘマテイン・Al錯体)が生じる。

Tween 20などの非イオン性中性界面活性剤少量添加により沈殿形成抑制可能。但し、添加量が多いとヘマトキシリンの染色も弱くなる。

2. 切片の厚さの違いと塗抹細胞の染色に適したヘマトキシリン染色液

切片 $4\mu\text{m}$ 	ミクログ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、色素濃度低く染色強度弱めの染色液で可(例、原法マイヤー)。切片が厚いほど色素と親和する組織成分濃度が高くなり、色素により濃染するようになる。
切片 $2\mu\text{m}$ 	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が高く染色力の強い染色液が適す(例、2倍カラッチ、3倍マイヤー)。
塗抹細胞 	重積細胞の一つ一つに、その親油性の細胞膜から水溶性色素が入り込み、細胞核を強く染めるためには、色素濃度が高く染色力が強い染色液が適す(例、ギルヘマトキシリン V)。

ヘマトキシリン染色液のpHと染色の選択性

pH値が染色の選択性に関与する。

ヘマトキシリン染色液	pH値	酸の添加	特 徴
マイヤー(原法)	2.4～2.5	クエン酸(1g/L)	進行性染色液
カラッチ(原法)	2.7～2.8		退行性染色液

生体部位(成分)

(成分の酸性官能基)

細胞質(蛋白質)

-COOH

細胞核(DNA)

-PO₄H

粘液(酸性ムコ物質)

-SO₄H

ヘマトキシリン濃度の高い染色液使用中経時的共染リスク→

- ①ヘマテイン濃度の上昇
- ②水の持込による液のpH上昇

ヘマトキシリン染色液のpH

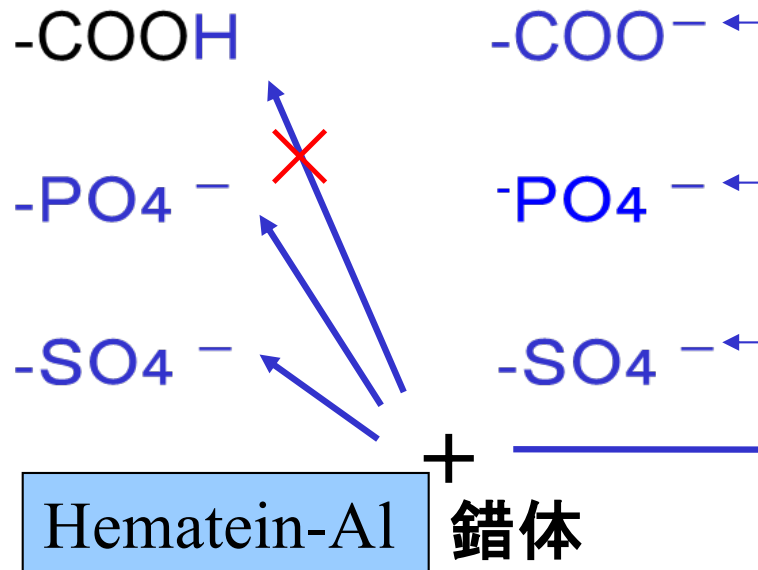
pH2.4

マイヤー

pH2.8

カラッチ

高←水素イオン濃度(H⁺)→低

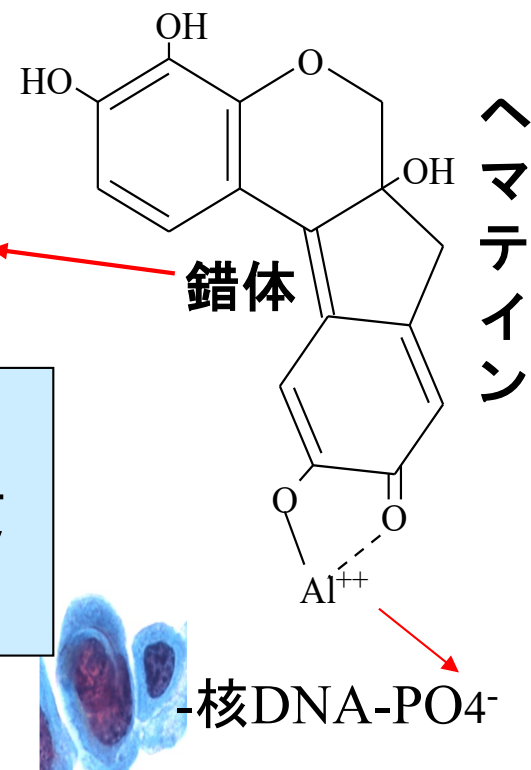
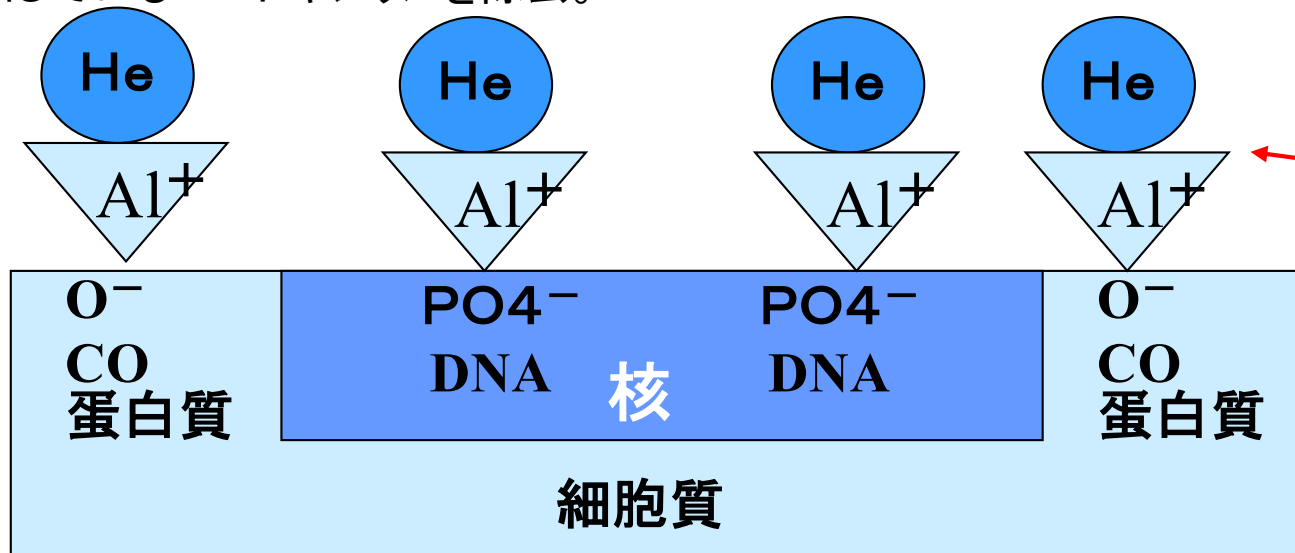


pHが低くなると、カルボキシル基のイオン化が抑制されるので、蛋白質を主成分とする細胞質に正(+)荷電のヘマテイン・Al錯体は親和しにくく、染まりにくくなる。

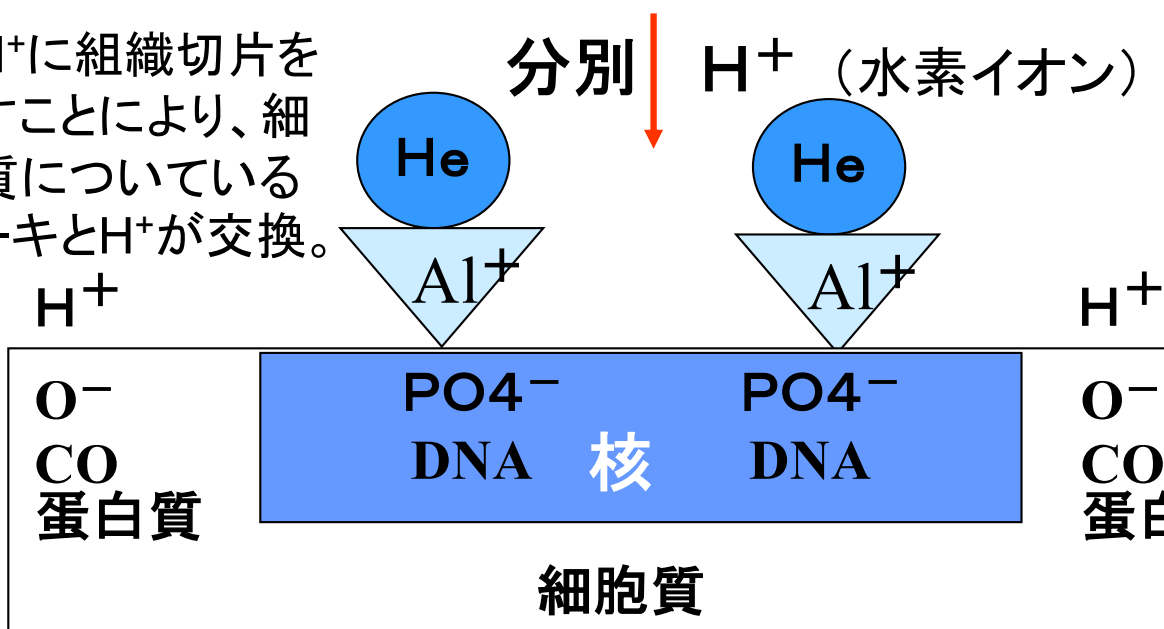
塩酸分別(HCl-Differentiation)

共染している切片を塩酸水(塩酸アルコール)に浸し、不必要な部位に親和しているヘマトキシリンを除去。

共染状態



酸H⁺に組織切片を浸すことにより、細胞質についているレーキとH⁺が交換。



分別力は下記に依存

分別力	弱(穏やか)⇔強
分別時間	短い ⇔ 長い
分別回数	少ない⇔ 多い
塩酸濃度	薄い ⇔ 濃い
温度	低い ⇔ 高い
溶媒	水・エタノール⇔水

自動染色装置使用の場合、許容範囲の広い穏やかな分別条件の方が分別の再現性がよい(例、0.25%塩酸水)。

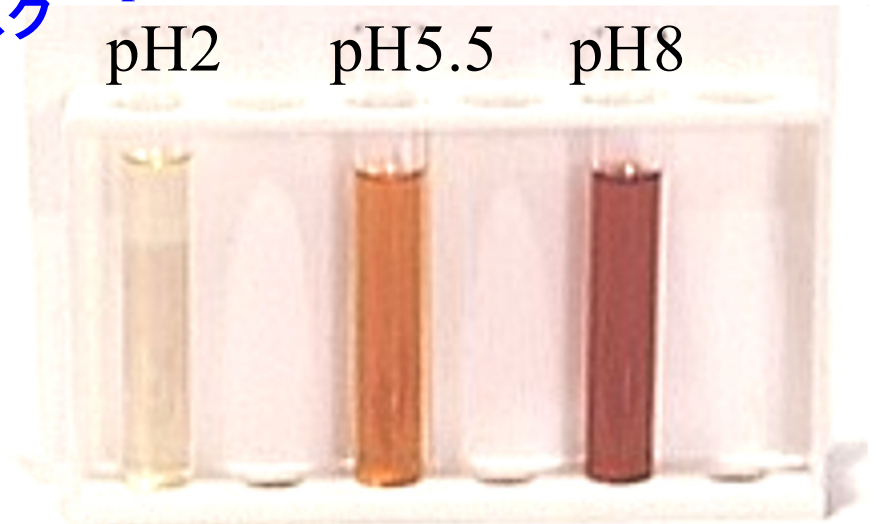
色出し(Blueing)

ヘマトキシリン染色液のpH:2.4-2.8
分別用0.5%塩酸のpH :約1.2

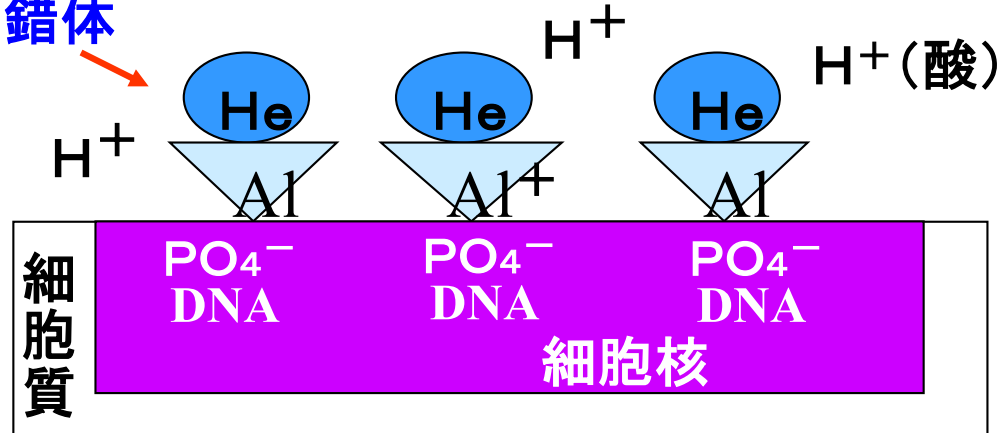
問題点
核が赤紫色
脱色のリスク

pH指示薬としてのHematoxylin
ヘマトキシリン水溶液のpHと色調
(pHにより色が変わる)

pH2 pH5.5 pH8



錯体

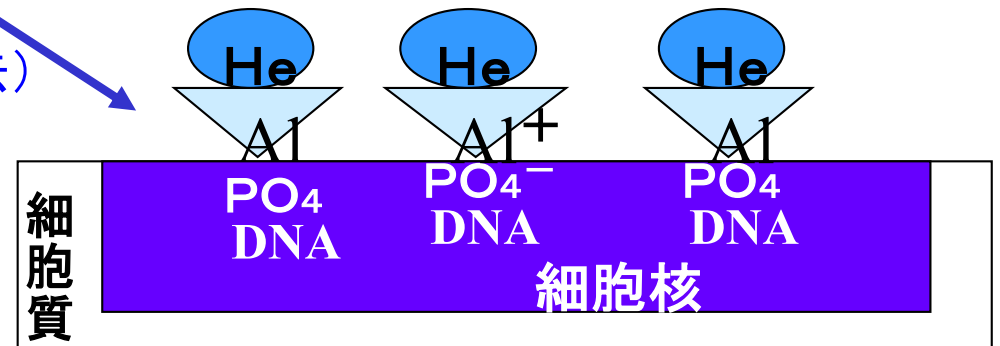
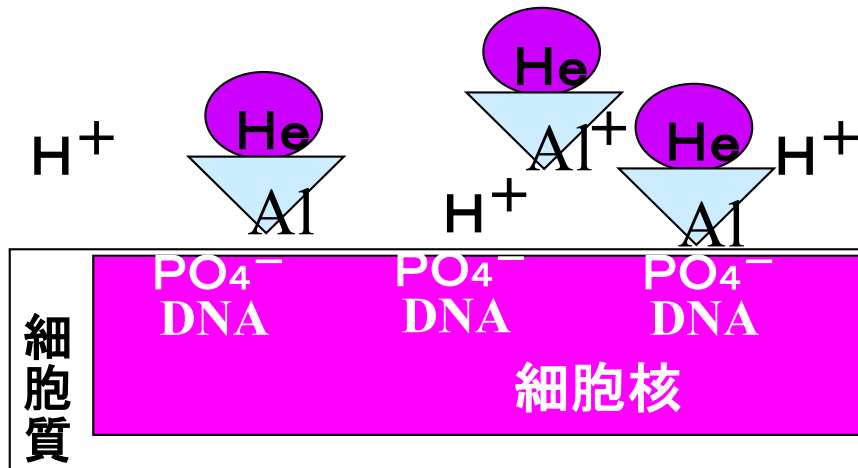


核染ないし塩酸分別
のままだと、酸のため
核の色が赤紫色を呈
し、また脱色する。

H⁺ 酸

中和
(酸の除去)

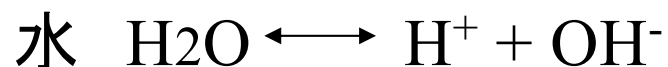
色だし(Blueing)



酸H⁺を除去ないし中和する“色出し”操作をすることにより、核がヘマトキシリン本来の青色になる。

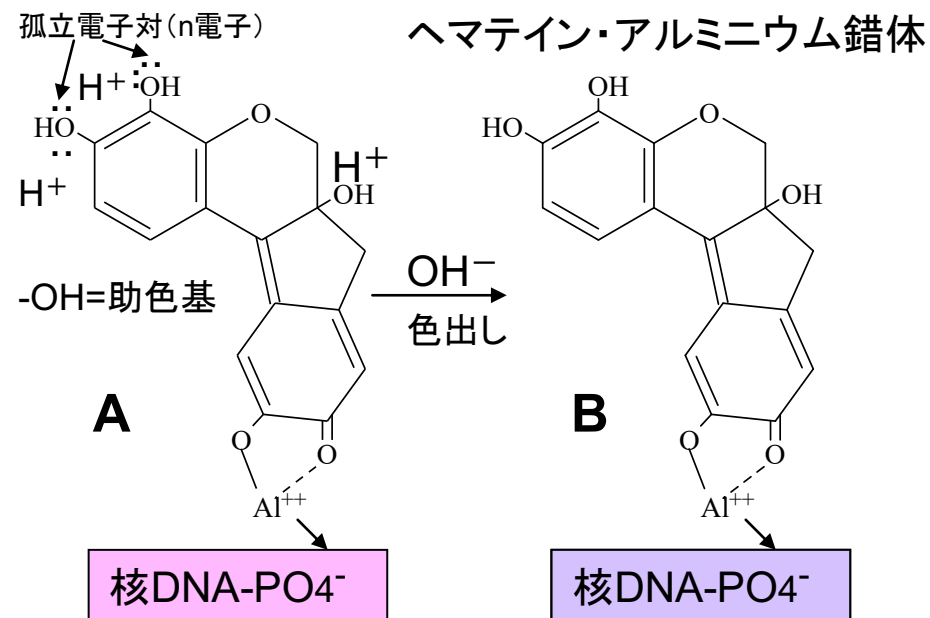
色だし条件 ①流水水洗 ②温水
③弱アルカリ水 (希アンモニア水、
飽和炭酸リチウム2-3滴→100ml精製水)

1. 色出しの原理



pH7の場合、 H^+ 及び OH^- の濃度 = 10^{-7}

水酸イオン OH^- がヘマテインの酸素原子等に親和している水素イオン H^+ を除去して、ヘマテインの色が変化し、核が青色となる。pHが高いほど色出し力は強くなる。が、切片・塗抹剥離リスクが大きくなる。



2. 色出しの条件とポイント

流水水洗	水温が低い冬期は OH^- の動きが遅く反応性低下し、色出しに時間かかる。 水道水のpHは変動(水道法上の水質基準: 水道水のpH=5.8-8.6)。
ぬるま湯	水温が高いと、 OH^- の動きが速く、酸 H^+ の除去に要する時間が短くなる。
蒸留水	経時的に CO_2 が溶け込み、pHが低下するので注意。
弱アリカリ	pH8-9の弱アルカリにより、色出し時間を短縮できかつ再現性がよい。 (pH9の水は、pH7の水に比べ、 OH^- 濃度は100倍となる。) 問題点: 組織蛋白の好酸性の低下。酸性色素エオジンの染色が少し抑制される。またアルカリにより組織蛋白が分解するので、切片剥離のリスクがあり。
緩衝液	例、pH7リン酸緩衝液を使用。 OH^- が中和に消費されると同時に、その分 OH^- が生成されるようリン酸緩衝剤成分の平衡が移行し、pHが一定。

エオジン/名称と成分組成及び製造ロット等による違い

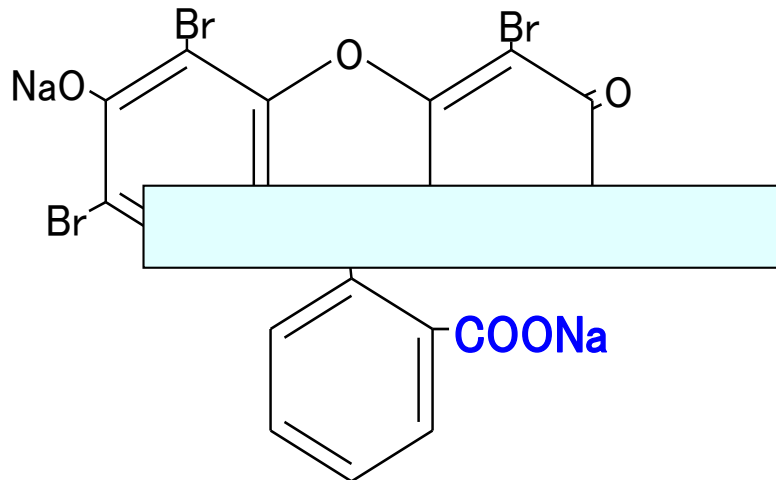
1871年 Caro エオジンの製造

英 Eosin **Y**(yellowish) エオシンY

独 Eosin **G**(gelblich) エオジンG

Eosin Yの正式名称

Tetrabromofluorescein Sodium



小 ← 臭素の数(1~4) → 多
オレンジ ← 色調 → 赤色
強 ← 蛍光強度 → 弱

Eosin Yの品質規格上の色素含有量例

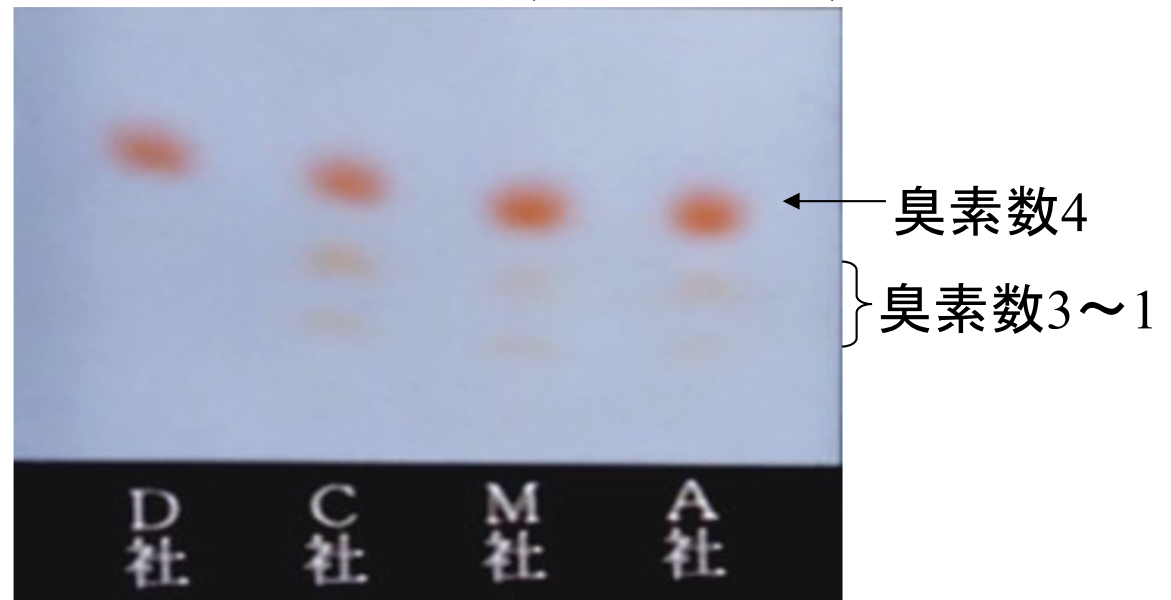
Merck No.1.15935 Eosin Y → min.85%

エオジンは製造メーカーや製造ロットにより、下記が異なる。

①色素成分組成とその比率

②色素含有量と不純物の種類とその量

4社のEosin YのTLC(薄層クロマト)



製造(塩析)由来の無機物の量の違いと染色強度

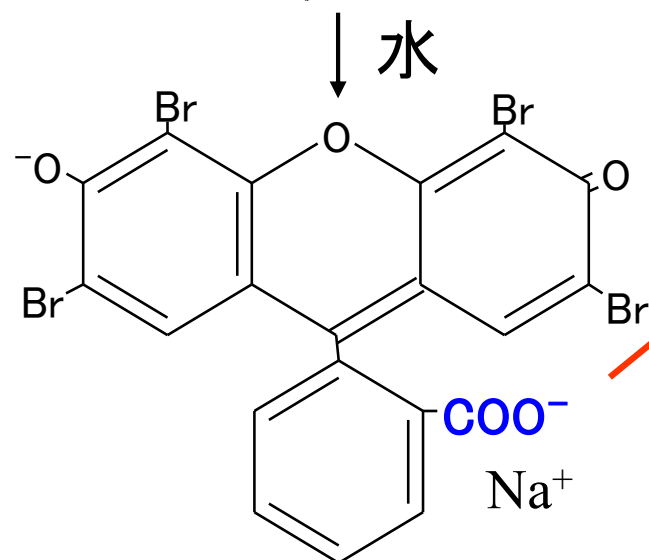
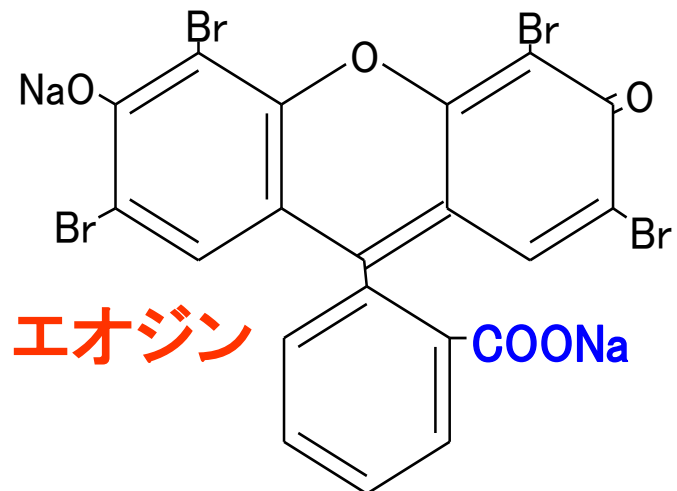
少い ← NaCl, Na₂SO₄ → 多い

強い ← 染色強度 → 弱い

エオジンと同じ負荷電の不純物(Cl⁻など)は、染色にてエオジンと競争し、染色強度を低下させる。

エオジンの染色メカニズム/酢酸添加の効果/染色強度の因子

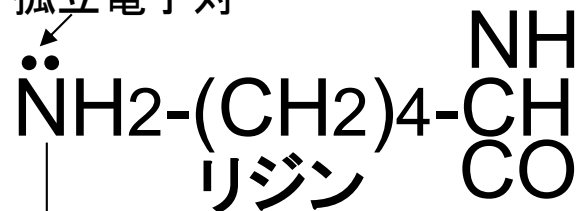
酸性官能基 COONa



色素本体は負(−)に荷電し、正(+)の生体成分(主に蛋白質)に親和

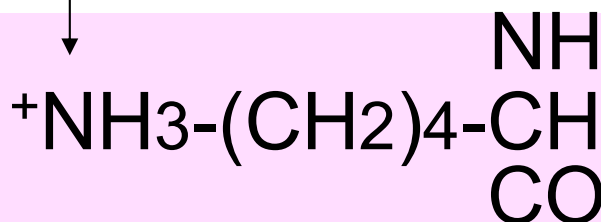
(結合に関与しない電子) 蛋白質

孤立電子対



酢酸
 H^+

HE染色用エオジン染色液へ、通常酢酸を少量添加し、染色対象の蛋白質のアミノ基を正(+)に荷電させ、好酸性を増大させる。

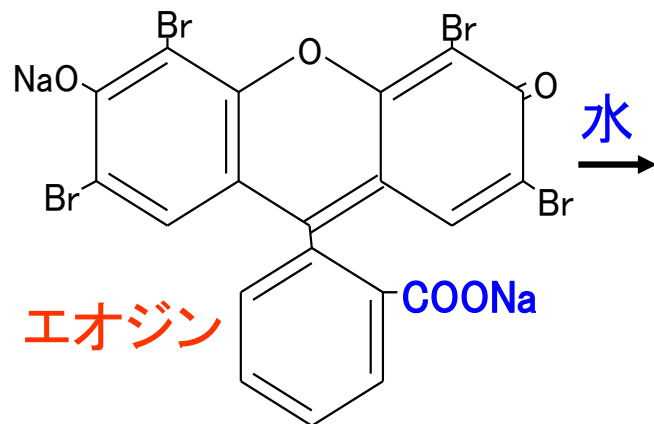


参考: 酸性脱灰液による組織蛋白の超好酸性化→エオジンの過染・共染の原因

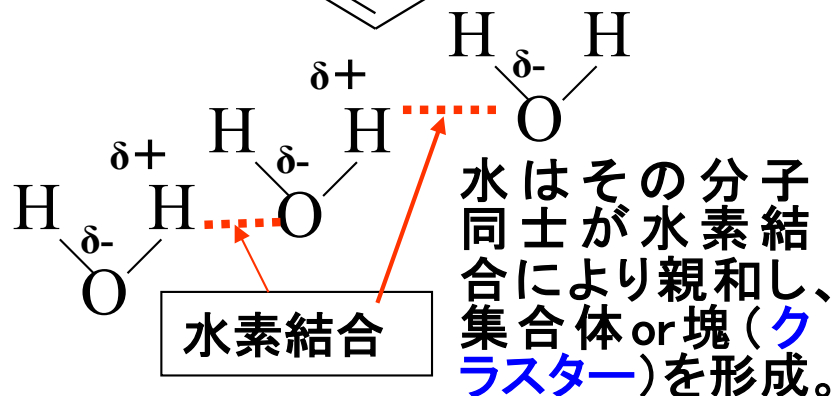
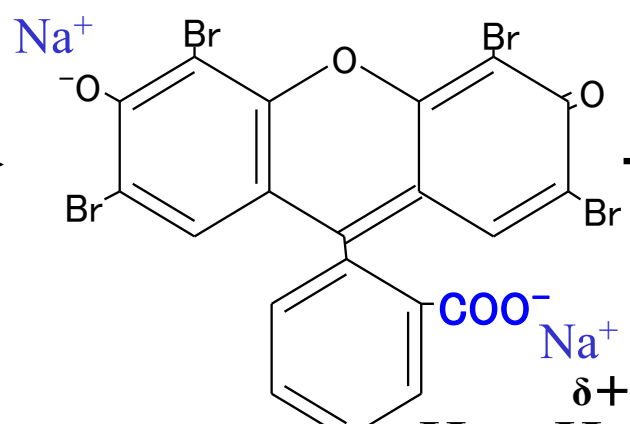
染色強度の因子	弱 (小)	← 染色強度 → ← 共染リスク →	強 (大)
①エオジンの濃度	低	⇔	高
②酢酸添加量 (組織の好酸性)	少 小	⇔ ⇔	多 大
③溶媒	水	⇔	水・エタノール混合系

酸性色素エオジン/水や酸、アルコール類への溶解性

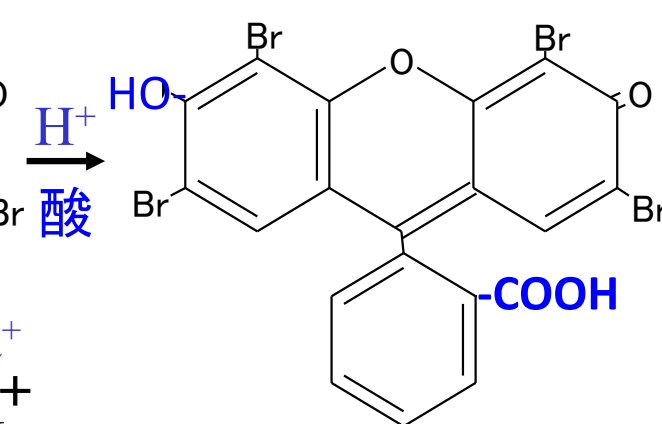
①エオジン(酸性色素)は水に易溶



エオジンのCOONa基がイオン化することにより、集合体を形成している水分子間に入り込み色素が分散・溶解。



②エオジン は酸に難溶・不溶



酸 H^+ の添加により COO^- が $COOH$ となり、 $COOH$ 基はイオン化しにくいので、水に難溶・不溶となり、沈殿し、エオシン酸(通称”塩酸エオシン”)が生じる。

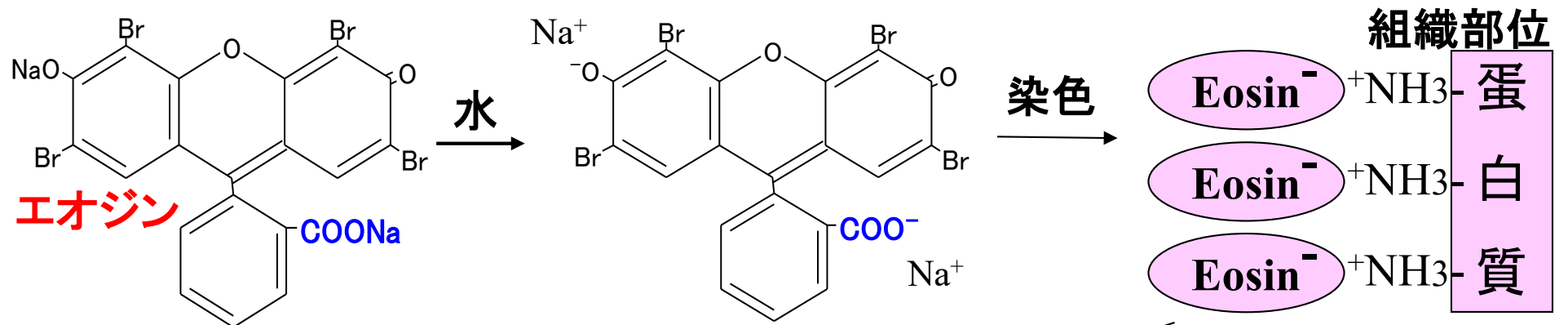
③エオジン(酸性色素)はアルコール類に難溶・不溶

色素分子同士の静電的親和が強いので、アルコール類には難溶・不溶となる。
炭素数が多い極性の低いアルコールほど溶けにくくなる。

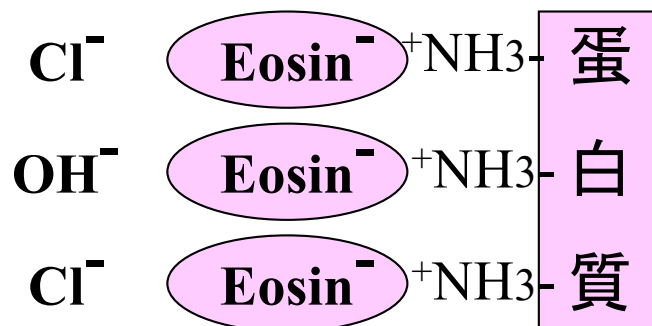
エオジンのアルコール類への溶解性

低 ← 極性 → 高
イソプロピルアルコール < エタノール < メタノール << 水
(CH₃)₂CHOH CH₃CH₂OH CH₃OH H₂O

エオジン染色と水洗による脱色のリスク(水道水の影響)

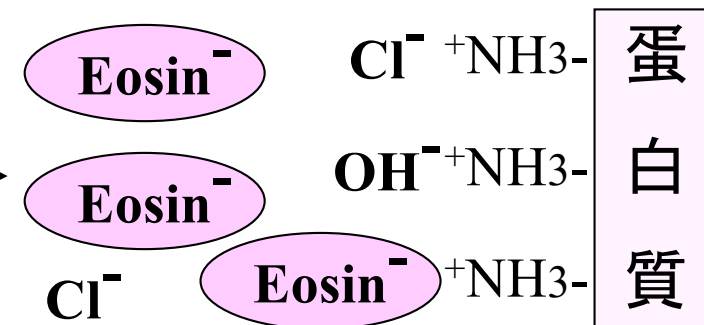


塩素イオンCl⁻
やpH値が高
く、OH⁻濃度
の高い水道
水で水洗



流水水洗

流水水洗



水道法上の水質基準(一部)

不純物の種類	水質基準値
Fe ^{2+,3+}	max. 0.3mg/L
Na ⁺	max. 200mg/L
Ca ²⁺ Mg ²⁺	max. 300mg/L
Cl ⁻	max. 200mg/L
有機物	max. 5mg/L
pH値	5.8~8.6

エオジン は 水 に 溶 解 し や す く、特 に 陰 イ オ ン を 多 く 含 む 水 道 水 で 水 洗 す る と、組 織 に 親 和 し た 負 (-) の エ オ ジ ン と 同 じ 負 (-) 荷 電 の 陰 イ オ ン が 交 換 し、脱 色 の リ ス ク 大。染 色 後、精 製 水 or 蒸 留 水 水 洗 が ベ タ ー。ギ ム ザ 染 色 な ど で も、水 洗 時 の 水 質 が 染 色 に 影 響 を 与 え る。

HE染色に影響を与える因子

①染色液の種類(処方)、調製・使用パターン(ヘマトキシリンの使用開始時期、液交換、他)、液の持込・持出しによる染色力の低下や染色性の変化

②染色時間と染色温度

通常染色時間が長く、また温度が高いほど染まりが濃くなる。

低	←	染色温度	→	高
遅	←	色素の拡散・染色速度	→	速

温度が10℃低くなると、一般的に染色速度は約1/2倍になる。また温度は染色に限らず、様々な処理操作に影響

③塩酸分別、色出し条件

④水洗、水のpH値、水質

⑤組織の種類、切片の厚さ(厚いほど濃染)、他

⑥固定 固定条件(固定液の種類、pH、時間)

固定により、組織成分ないし構造が化学的・物理的に変化。
固定条件により、その変化の程度が異なる。

⑦前処理(脱灰、他)

強酸性脱灰液による脱灰組織は、酸が残留し、組織蛋白が超好酸性化し、エオジンが過染し、好塩基性低下によりヘマトキシリンの染色は阻害される。

⑧その他

例、プロセッシング過程での脱水不十分→核が青白色調(blue hue)

