

# 標本の褪色の原因と防止法

渡辺明朗(2021.10)

病理組織染色標本は長期間の保存により、経時的に褪色が生じる場合がある。その褪色の原因を考察すると共に、褪色の防止法について記す。

## 1. 褪色の原因

褪色の原因として、光反応による色素の化学構造の変化、また細胞・組織に親和しないし浸透した色素が封入標本中心部に残留する溶剤中へ溶出する等が考えられる。

### 1) 光褪色(Photofading)<sup>2)</sup>

日光にあたるカーテンは、時と共に変色ないし色あせてくる。この現象は色素が光に対して不安定で、光の下で変色ないし褪色することを示唆している。

色素は、その分子の化学構造に応じて特定の波長の光を吸収し、その波長以外の光が反射ないし透過して我々の眼に入り、その色素固有の色として感知されることになる。色素分子は化学構造において種々の電子(n 電子、 $\pi$  電子など)を有する(図-1)。その色素が光を吸収、すなわち光のエネルギーを吸収するとし、図-2 中の①のごとく、色素分子中の電子はエネルギーレベルの低い通常の状態(基底状態A)からエネルギーレベルの高い状態(励起状態B)へ移行する。この励起状態の電子を有する色素分子は次の二つのいずれかの過程をへて、その吸収したエネルギーを失う。

- (イ) 吸収したエネルギーを熱エネルギー等の形で放出し、図-2 中②のごとく元のエネルギーレベルの低い基底状態(A)へ戻る。
- (ロ) 励起状態(B)の電子が、そのエネルギーを失う図-2 中③の過程で、色素分子が光の下で反応(酸化、還元など)し、元の色素とは異なる化学構造を有するようになり、変色ないし無色となる。また、励起状態(B)の電子がエネルギーを少し放出し、それよりエネルギーレベルが少し低い他の励起状態(C)を経由して、さらにエネルギーを失う④の過程で、同様に光の下で色素分子が反応(酸化、還元など)し、変色ないし褪色する場合がある。

(イ)において、エネルギーを放出し、電子のエネルギーレベルの低い元の基底状態への移行が、容易ないし速やかであるほど色素の褪色は起こりにくい。また、エネルギーレベルの移行の容易さは色素分子の化学構造や化学官能基の種類に依存する。そのため、色素の種類により褪色しやすい色素がある。例えば、パピニコロウ染色に使用される Light green SF yellowish や、ワンギンソン染色に使用される Fuchsin acid は、光に不安定で褪色しやすい性質があ



図-1 ライトグリーンイエローの化学構造と電子

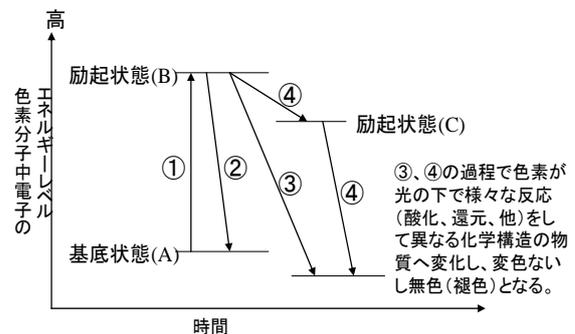


図-2 色素分子の光による変化

る。一方、それぞれ代用として使用される Fast green FCF(Fast“堅牢な”を意味する)や、Sirius red F3Bは光に対して堅牢性に優れ褪色しにくい性質がある。

(ロ)において、電子が励起状態の色素分子は反応性に富み、光の下で酸化、還元、分解等の反応により色素の化学構造が変化し、異なる色(変色)ないし無色の物質になる(褪色)。また、色素の種類により酸化反応、還元反応のどちらを受けやすいかが異なる。例えば、チアジン系色素(例、Methylene blue)は、光の下でより酸化されやすく、一方、インジゴイド染料(例、Indigocarmine)は還元されやすい性質があり、色素が酸化ないし還元されることにより変色または褪色する。そして特定の色素は特定の組織成分上でより褪色する傾向がある。例えば、アゾ色素(-N=Nを有する色素)が特定の組織成分(蛋白質のヒスチジン、トリプトファン、他)上で、光の下で光還元が起こりアミン(-NH<sub>2</sub>)になる。色素として発色に関与する発色団である二重結合のアゾ基に代わりアミンになるので変色ないし無色となる。このように蛋白質(例、ケラチン)上では還元反応が起こりやすく、他の成分(例、セルロース)の上では酸化反応が起こりやすい。これらの光が関与する様々な反応は酸素や水が共存すると助長され、また光の中で特にエネルギーの高い紫外線の下で色素は様々な光反応をし、その結果変色や褪色しやすい。

**参考: 染色強度と光褪色**

一般的に、淡い染まりの標本ほど褪色が顕著に見られる傾向がある。逆に、染まりの濃い標本は褪色が起こりにくい。色素が細胞・組織部位に親和し、多く色素が細胞や組織部位内へ浸透するほどその部位が濃く発色してくるが、色素が特定の部位へ多く親和しないし浸透した場合、色素同士が凝集する傾向がある。凝集した色素の微粒子の表面の色素分子だけが光にさらされ影響を受けやすいが、内部の色素分子は影響を受けずに存在するので、濃い染まりの標本は褪色しにくいことになる。2μm等の薄い切片は、厚い切片に比べ一般的に淡い染まりとなるが、淡い染まりの場合、分散した色素分子のそれぞれが直接光の影響を受け、そのため褪色しやすくなる(図-3)。

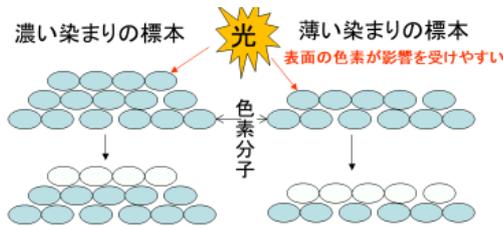


図-3 染色強度の違いと光褪色の程度の違い

また、同じ標本上でカバーガラスの縁に近い切片部位や細胞は外的要因(空気、湿気、他)に曝されやすいためか褪色がみられる場合がある(図-4)。

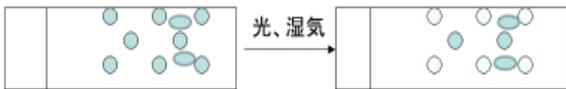


図-4 標本上の細胞の位置の違いと褪色のリスク

**2) 色素の封入剤中への溶出(Bleeding)**

① 不十分な脱水、透徹により持ち込まれる水やエタノールへの色素の溶出

封入後、カバーガラスの縁付近では、封入剤ないし透徹溶剤のキシレンが蒸発し、その部分の樹脂が早く硬化するが、切片や細胞塗抹が存在する標本の中心部分では封入剤の溶剤及び脱水、透徹過程から持ち込まれた溶剤が長期間蒸発せずに残存している。そのため不十分な脱水や透徹が原因となり、水分やエタノールが、封入標本中に残存する溶剤中に持ち込まれると、細胞ないし組織に染まった色素(特に Eosin Y 等の水溶性色素)がその水分やエタノールに溶解込み、残存する溶剤中へ経時的に溶出する(図-5)。また梅雨時に作製した標本に褪色がみられる場合があるが、吸湿しやすいエタノールへ水蒸気がとけ込み、そのため他の季節に比べ脱水が不十分になりやすいため褪色の一因と考えられる。

② 封入剤中成分ないし不純物による影響

昔使用されていた封入剤のカナダバルサム(カナダ)に広

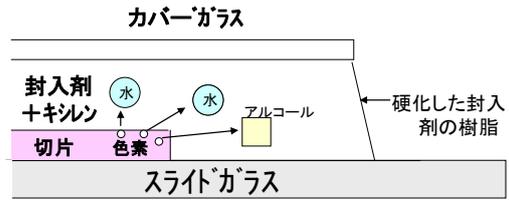


図-5 封入標本中色素のキシレン・封入剤への溶出による褪色

く産するバルサムモミなどから採取される天然樹脂で松脂に似た性質を有する淡黄色の粘調な液体は、アビエチン酸(CH<sub>19</sub>H<sub>29</sub>COOH)(図-6)等の有機酸を含み、その酸の濃度の指標となる酸価<sup>注</sup>が 84~87 になる。



図-6 バルサムモミの樹脂とアビエチン酸

注) 酸価(Acid value)

脂肪、ロウ、樹脂等の1g中に含まれる遊離脂肪酸を中和するのに要する水酸化カリウムの mg ミリグラム数を、その成分の酸価という。酸価が大きいほど、有機酸を多く含むことになる。通常検体をアルコール・エーテル混合液に溶解し、フェノールフタレインを指示薬として 0.5N 水酸化カリウムで滴定し、滴定に要した水酸化カリウムの mg 数から酸価を求める。

アビエチン酸等の酸性成分が褪色の原因となる。細胞ないし組織の酸性官能基(例、リン酸基 PO<sub>4</sub><sup>-</sup>)へ結合した正(+)の塩基性色素(例、Methyl green)とアビエチン酸の水素イオン(H<sup>+</sup>)が交換し(特に水分共存下)、その結果色素が封入剤中へ溶出、拡散し褪色すると考えられる(図-7)。また、カナダバルサムには還元作用のある不飽和二重結合を有する成分のアビエチン酸を含むため、カナダバルサムで封入した標本は色素が還元され褪色することがある。

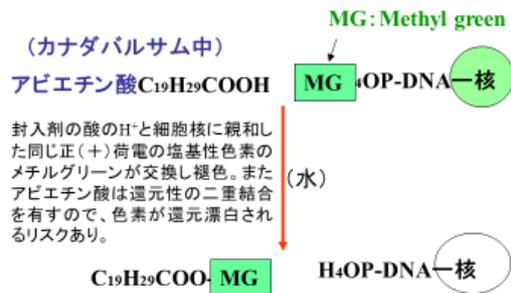


図-7 カナダバルサム中酸性成分による色素の溶出

参考: PAS染色標本の非褪色性

シッフ試薬は多糖類のグリコールへ共有結合により不可逆的に強く結合するので、シッフ試薬で反応させた後の水洗や脱水過程での脱色のリスクはなく、また染色ないし封入後の溶出による褪色のリスクもほぼない。一方、水に溶解しやすい多くの色素(Eosin Y などはイオン結合により細胞や組織を染めるが、イオン結合は可逆的な反応で弱い結合のため、封入後色素の封入剤中への溶出による褪色のリスクがある。

## 2. 褪色の防止

褪色防止のために、前述の褪色の原因と考えられる光褪色と色素の溶出のリスクを少なくすることが重要となる。

### 1) 標本は遮光保存を厳守

まず、光による褪色を防止するため、標本は暗所ないし遮光保存が重要となる。古橋ら<sup>3)</sup>は、種々蛍光灯下のHE染色標本の褪色を比較検討しているが、白色蛍光灯下で、エオシンは1日目から、ヘマトキシリンは2週間目から褪色が見られたことを報告している。従って、染色標本は暗所での保管が重要となる。また、染色標本を長時間鏡検すると、局所的に照明の光による褪色が起こるので注意を要する。

光による褪色を防止するのに有効な物質として、特に光の中でエネルギーが強く、色素に光化学反応の影響を与える紫外線を吸収する物質(紫外線吸収剤)があるが、一例として図-8に示す。

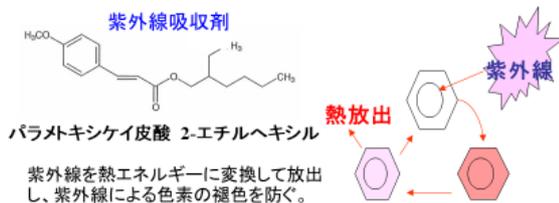


図-8 紫外線吸収剤の例とその原理

また酸化による褪色を防止するために、BHT (Butylated Hydroxytoluene; 正式名 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol)等の酸化防止剤を1%濃度で封入剤へ添加している文献例があり、このような酸化防止剤が添加された封入剤もある。

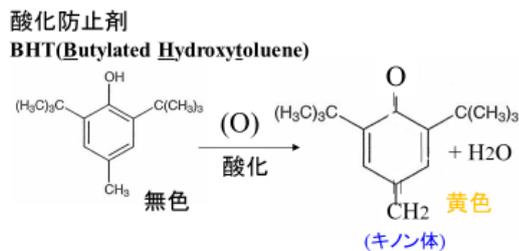


図-9 酸化防止剤BHTとそのキノン体

BHTのような酸化防止剤は、色素が酸化反応を受ける前に、自分自身が先に酸化されやすい特性がある。また酸

化されると、キノン体になる酸化防止剤が多く、そのキノン体は黄色を呈す(図-9)。そのため封入剤中の酸化防止剤が空気酸素や、ポリマー製造時に使用される重合開始剤が未反応のままポリマーに少し残留すると、その重合開始剤により酸化され、経時的に封入剤が淡黄色を呈することがある。BHTは酸化防止剤として食品、動物医薬品、石油製品、プラスチック等に広く添加されている。

### 2) 十分な脱水、透徹

封入標本中に水分やアルコールが存在すると、褪色の原因である光反応が助長され、また色素の溶出のリスクがある。従って、標本作製の最後の過程の脱水操作で水分を含まないアルコールで脱水し、水分やアルコールを含まないキシレンで十分に透徹することが重要となる。特に、湿度の高い時期や標本作製枚数が通常より多いときには、脱水が不十分になりやすく注意が必要で、通常より早めに溶剤を交換したり、モレキュラーシーブ等で乾燥した溶剤の使用が望まれる。

鈴木ら<sup>4)</sup>は脱水、透徹の最後のアルコール槽とキシレン槽をモレキュラーシーブ 3A(後述参照)で乾燥した溶剤と未乾燥の溶剤を比較検討し、後者の未乾燥溶剤による脱水・透徹 HE 標本は、前者の乾燥溶剤に比べ、HE 標本の褪色が明らかに早い結果を得て、完全な脱水・透徹が標本の褪色を防ぐのに重要であることを力説している。

また自動染色装置では機種により次槽への液の持ち出し・持ち込みが一般的に手染めより多く、脱水及び透徹に使用するエタノールやキシレンの薬液管理に注意する必要がある。

褪色の最も大きな原因となるのが脱水・透徹不十分であり、その原因と対策を表-1にまとめる。

表-1 不十分な脱水・透徹の原因と対策

不十分な脱水・透徹の原因	対策
①液の持ち込みによる水・エタノールの混入。水などが混入した薬液を長く使わず。	・薬液の早めの交換(季節や検体数に準じて)
②検体処理数・標本枚数が増加していても薬液を同じ交換条件で使用し、薬液へ水分やエタノールが多く混入。	・必要に応じてモレキュラーシーブで乾燥した溶剤を、特にエタノール、キシレン最終槽に使用。
③吸湿性のエタノールへ湿気(水分)の溶け込み(梅雨・夏期の湿度の高い時期作製した標本で褪色があることを経験しているユーザー多い)	・脱水・透徹条件の変更(液槽数と浸漬条件)
④脱水・透徹時の薬液への浸漬回数や時間が不十分	

### 3) 中性で還元性成分等含まない封入剤の使用

前述のごとく、封入剤に有機酸や還元性二重結合を有する成分が含まれると褪色の原因になるので、中性で還元

性二重結合がない封入剤の使用が望まれる。封入剤の主成分とその特徴及び染色標本の褪色のリスクを表-2 にまとめる。

表-2 封入剤の主成分と特徴及び標本褪色のリスク

封入剤の主成分 (ポリマー)	特徴と標本褪色のリスク	封入剤
アクリルポリマー 例: ポリメタクリル酸メチル	弱酸性を示す場合があるので、ポリスチレン系封入剤に比べると褪色のリスクあり。 酸価(Acid value): 樹脂等の1g中に含まれる遊離脂肪酸を中和するのに要する水酸化カリウムの mg ミリグラム数を酸価という。アクリルポリマー系封入剤で酸性を示すものがある。	マリノール オイキト エンテランニュー
ポリスチレン $\left[ \begin{array}{c} \text{CHCH}_2 \\   \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} \right]_n$	ほぼ中性で、還元性成分不含なので褪色のリスクは小	New M-X MGK-S DPX ピオライト(スチレン・アクリル共重合体)
カナダバルサム バルサムモミなどから採取される天然樹脂で、樹脂に類似	酸性及び還元性成分を含むので、褪色のリスクが大きい(大学医学部基礎で一部利用されているが、現在はほとんど使用されていない)。	和光純薬、メルク等で取扱い。但し、メーカーにより特性、精製度が異なる。

種々の封入剤(溶剤: キシレン)封入標本の褪色比較結果は多く報告されている。また低有害性の代用キシレンが使用されつつあるが、代用キシレン用封入剤の褪色比較も報告されており、榊原ら<sup>9)</sup>は種々な癌のパピニコロウ染色標本ではパラマウント封入標本はネオマウント封入標本に比べ早く褪色すると報告している。

### 3. 乾燥剤・モレキュラーシープ

キシレンやエタノールの乾燥に、多孔性ゼオライトであるモレキュラーシープ(Molecular sieve)が有用である。モレキュラーシープには無数の一定の大きさの細孔(小さな穴)(細孔の直径: 0.3nm, 0.4nm など)があり、その細孔により、分子(モレキュール Molecule)をふるいわけ(シープ sieve)ことができる。細孔より小さい分子で、かつ水分子のように極性の強い分子が細孔内へ取り込まれる。モレキュラーシープ 4Å をキシレンに使うと、水とエタノール両方除去可能となる。

#### 1) モレキュラーシープの特長

- ① 乾燥力が強い  
有機溶剤中の水分を約 0.001% にまで除去可能
- ② 使用法が簡便で安全  
溶剤(キシレンなど)へ所定の細孔径を有するモレキュラーシープを添加し、時折攪拌し放置(約1日)するだ

けで、溶剤を乾燥でき、取扱が安全。

- ③ 乾燥容量が大きい  
通常モレキュラーシープの重量の最大約 20%の水分を乾燥除去できる。
- ④ 再生が可能
- ⑤ 水だけでなく極性不純物の除去も可能  
例、透徹に使用中のキシレンにモレキュラーシープ 4Å (0.4nm) を入れると、キシレン中の水分だけでなく、キシレン槽へ持ち込まれたエタノールも除去できる(エタノール分子のサイズは小さいので、0.4nm の細孔に入り込むため)。

#### 2) モレキュラーシープの種類と溶剤

アルコール(メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール)中の水分の除去乾燥用としては、表-3 のごとく細孔の大きさが 3Å (オングストローム)(=0.3nm)のモレキュラーシープ 0.3nm(3Å)が適す。水の分子の直径は 2.6Å(0.26nm)で、水分子はモレキュラーシープの 3Åの穴の中に入り込み、その結果エタノールが乾燥されることになる(図-10)。一方、エタノールの分子の直径は 3Åより大きいのでモレキュラーシープ 0.3nm(3Å)の細孔の中に入り込めない。

表-3 モレキュラーシープの種類と有機溶剤の種類

モレキュラーシープの種類	有機溶剤
モレキュラーシープ 0.3nm (3Å)	メタノール エタノール
モレキュラーシープ 0.4nm (4Å)	キシレン

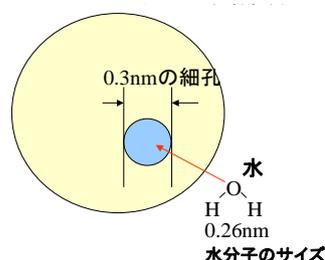


図-10 モレキュラーシープ 0.3nm による乾燥

#### 3) モレキュラーシープの使用量(必要量)

モレキュラーシープの乾燥能力は最大重量の約 20%であり、完全な乾燥のため、乾燥能力を 10%とみなすと、水分量 1%の有機溶剤 1 Lにつき、100g のモレキュラーシープが必要となる。

例えば、含水量 0.01%のキシレン 10 Lを乾燥するのに必要なモレキュラーシープ 0.4nm の必要量は、下式のとおりである。

$$10000 \times 0.0001 / 0.1 = 10g$$

また、含水量 0.1%の 99.9%エタノール 10 Lを乾燥するのに必要なモレキュラーシープ 0.3nm の必要量は、次式の

とおりである。

$$10000 \times 0.001 / 0.1 = 100g$$

#### 4) 再生法

モレキュラーシーブは容易に再生して、繰り返し使用することができる。使用したモレキュラーシーブを多量の水で洗浄するか、またはキシレン乾燥に使用した場合はエタノールでキシレンを洗い流した後、水で数回洗浄して付着した溶剤を除去する。次に 200~250°Cで乾燥する。この時点で約 3~5%の水がモレキュラーシーブの細孔内に残るが、多少含水していても通常の使用には問題なく使用できる。

#### 4. 褪色した標本の再染色

褪色した標本の再染色や染色標本を他の染色に供する場合、まず標本から次のごとくカバーガラスを除去し、次に脱色操作をするが、その方法について記す。

##### 1) 標本からカバーガラスの除去

封入して新しい標本の場合は、標本をキシレンに立てかけ、しばらく放置して、カバーガラスをずり落とす。封入して時間が経過した標本の場合、カバーガラスがスライドガラスに強く付着しているので、標本をキシレンに立てかけ、約 60°Cの恒温槽に入れ、カバーガラスをずり落とす(通常1晩~2 ないし3日要する。必要な時間は封入後の経過時間や封入剤の種類に依存する)。

次にキシレンで十分洗浄し、組織などに入り込んでいる封入剤成分(通常高分子化合物)を溶解除去し、さらにエタノールを通して洗浄に使用したキシレンを除去して、最後に水にばませる。

##### 2) H+E染色標本の脱色方法

(A)アンモニア・アルコール(50-95%エタノール 100mlへ数滴のアンモニアを添加)へ切片を浸すと、アルカリの負(-)荷電のOH<sup>-</sup>イオンと組織蛋白に親和した同じ負(-)荷電のエオシンが置換し容易に溶出・脱色する。

(B)0.5-1%塩酸50-95%アルコールへ切片を浸し、酸の正(+ )荷電のH<sup>+</sup>イオンと核に親和している同じ正(+ )荷電のヘマトキシリンを置換させ溶出させる。溶出除去に1時間以上要する場合もある。

(C)水洗く(min. 10分)。水洗により使用した塩酸を除去する。酸が切片中に残留すると、再染色で、ヘマトキシリンがのりにくくなる。

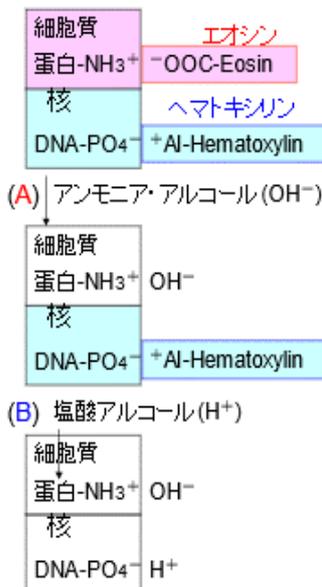


図-11 染色標本の脱色方法

#### 5. 蛍光色素の蛍光減衰(消失)

特定の化学物質ないし蛍光色素分子が特定波長の光を吸収して、その電子のエネルギーレベルが A(基底状態)からB(励起状態)へ移行し、元のエネルギーレベルに戻るさい(図-12-①)、色素の種類により蛍光を発生する。その蛍光の発する時間が長い場合(図-12-②)、りん光と呼ぶ。

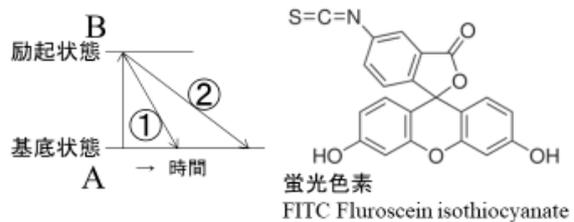


図-12 蛍光色素の例と光によるエネルギーレベルの違い

蛍光色素分子が吸収する励起光を当て続けると、蛍光は徐々に弱くなり消失する。したがって蛍光色素染色標本は通常は写真をとってデータとして保存する。蛍光褪色防止剤(例、p-Phenylenediamine)を添加した各種封入剤(高価)が市販されている。但し、褪色を遅延させる効果はあるが、永久標本にはならないと考えられる。

#### 参考文献

- 1) 近藤一夫監修: 染色の科学、建帛社1977
- 2) Hordoin RW: Histochemistry : An Explanatory Outline of Histochemistry and Biophysical Staining Gustav Fischer, 1982
- 3) 古橋由美、他: HE 染色標本の蛍光照射による退色についての検討、実験病理組織技術研究会誌、12 1-6, 2003
- 4) 鈴木由美恵、他: 検査と技術 Vol. 22, No.12, 977, 1994
- 5) 榎原栄一、他: 医学検査 Vol. 58, No.5 359, 2009