

好銀性線維鍍銀染色の原理とポイント

1) 黒白写真と好銀性線維鍍銀染色の操作と試薬の類似性

2) 鍍銀染色の原理と染色のポイント

酸化剤の種類とその特性の違い

アンモニア銀液調製のポイント


細網線維と膠原線維の成分の違い、他

第113回日本病理組織技術学会

2026年 3月 8日

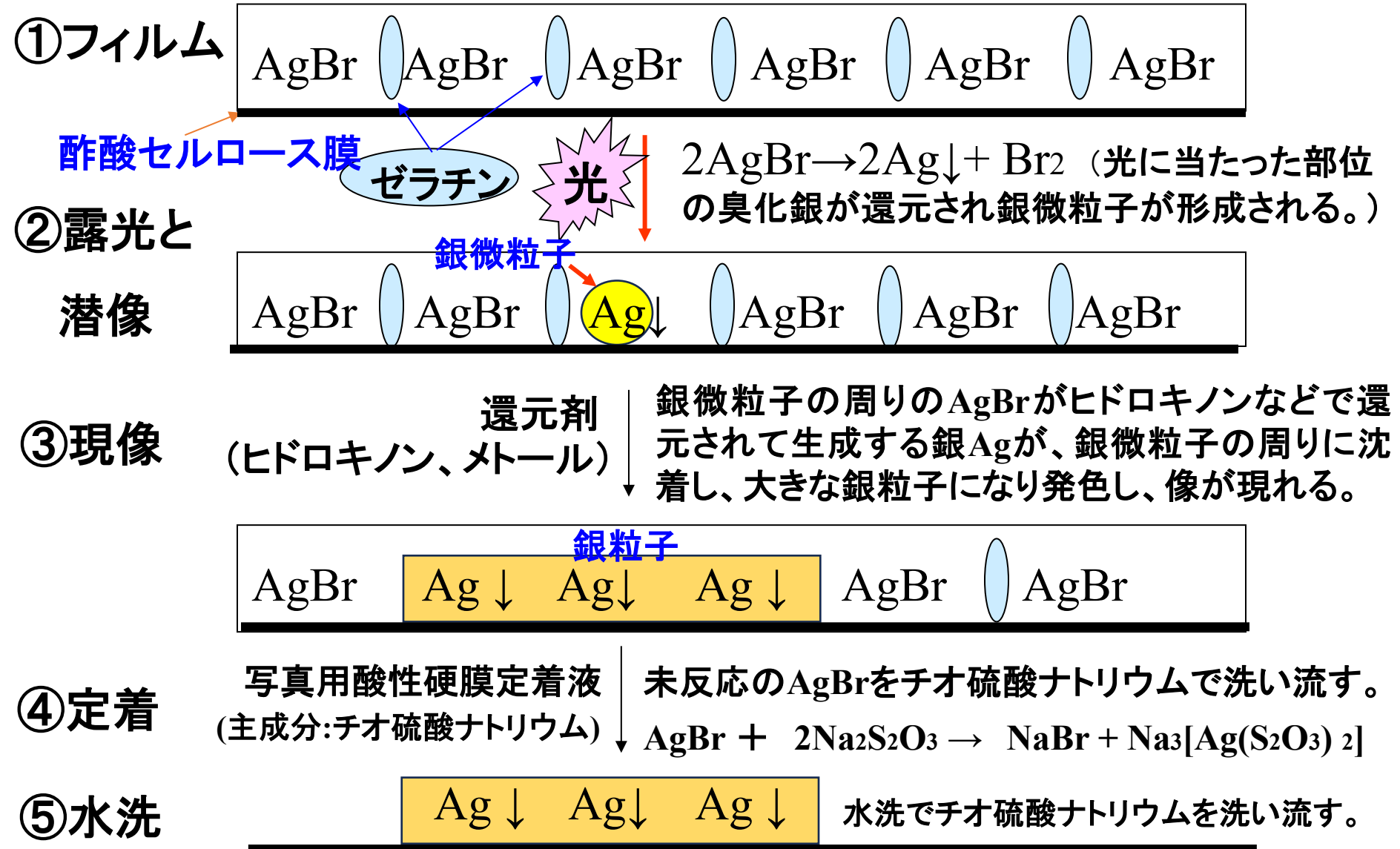
渡辺 明朗

黒白写真と好銀性線維鍍銀染色の操作と試薬の類似性

黒 白 写 真	好銀性線維鍍銀染色
<p data-bbox="59 272 423 408">臭化銀 AgBr (フィルム上)</p> 	<p data-bbox="890 272 1640 337">アンモニア銀 $\text{NH}_3\text{-Ag}^+\text{-NH}_3$</p>
<p data-bbox="59 458 365 522">露光と潜像</p> <p data-bbox="59 536 842 743">(光により臭化銀AgBrが還元され、銀微粒子からなる潜像ができる)</p>	<p data-bbox="890 458 1195 522">1)酸化処理</p> <p data-bbox="890 536 1856 672">(多糖類 α-グリコールの酸化により還元性アルデヒド基CHOが生成)</p> <p data-bbox="890 686 1818 822">2)鍍銀(銀イオンAg^+の生体部位への親和及びAg^+の部分的還元)</p>
<p data-bbox="59 872 832 1008">現 像(還元剤:ヒドロキノン、メトール、他)</p> <p data-bbox="59 1022 794 1158">(還元力の強いメトールなどが使用される)</p>	<p data-bbox="890 872 1644 936">還 元(還元剤:ホルマリン)</p> <p data-bbox="890 951 1875 1158">(アンモニア銀の銀イオンは還元されやすいので、還元力の穏やかなホルマリンが使用される)</p>
<p data-bbox="59 1200 832 1336">定 着(未還元 of AgBrを溶出除去) (写真用酸性硬膜定着液) 主要成分:チオ硫酸ナトリウム</p>	<p data-bbox="890 1200 1721 1336">定 着(未反応 of Ag^+を切片から除去) (同左 or チオ硫酸ナトリウム)</p>

黒白フィルム写真ができる過程と試薬(薬品)

黒白フィルムは、酢酸セルロース膜へ臭化銀AgBrとゼラチンの混合物が塗布されて製造される。ゼラチンは銀の連鎖反応によるカブリを抑制する。



好銀性線維鍍銀染色の原理とポイント

Bielshowskey(1904) 神経原線維の鍍銀染色

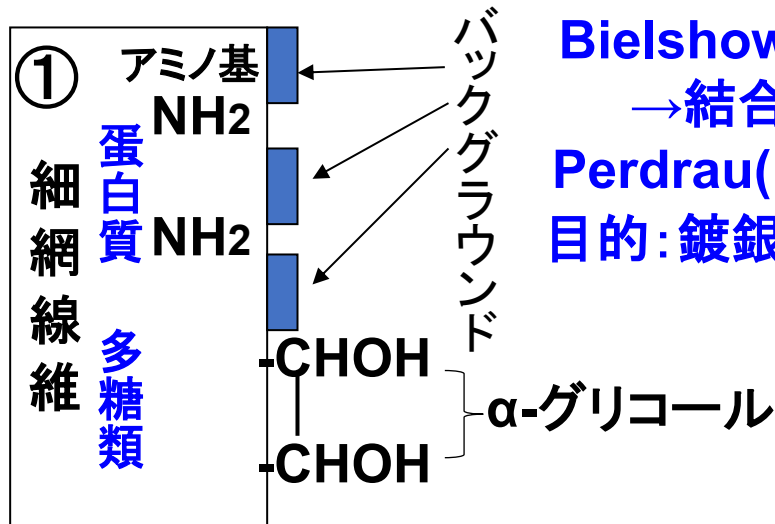
→ 結合組織の鍍銀染色に応用

Perdrau(1921) 過マンガン酸カリウム酸化処理の導入

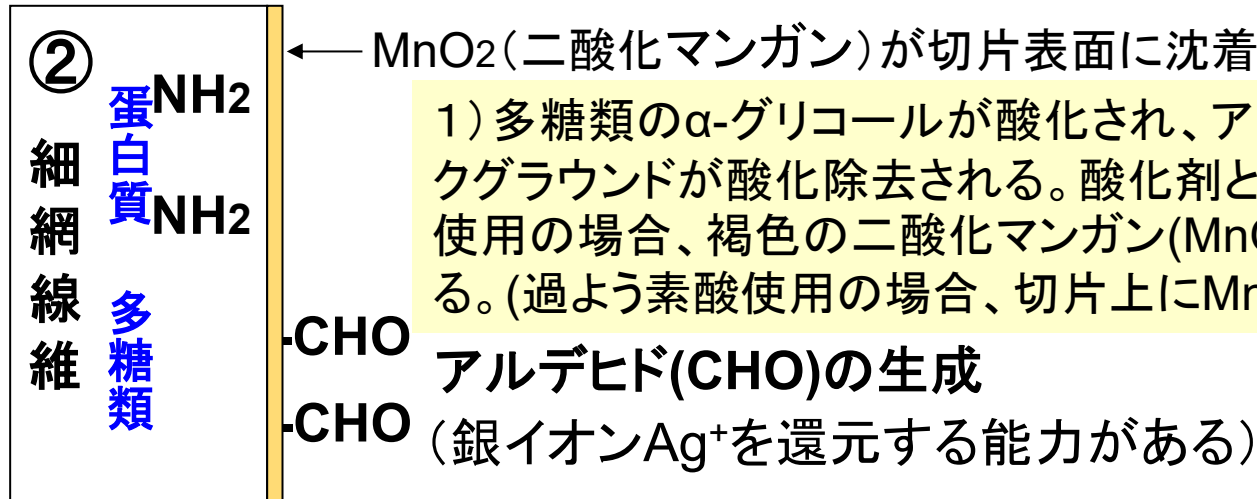
目的: 鍍銀染色の選択性の向上

6~8μm厚さの切片を使用。薄い切片では、細網線維が切れ切れになり、構築像の観察が不可能になる。

細網線維の主要成分はコラーゲン蛋白で、膠原線維より多糖類を多く有する特徴がある。



1) 精製水洗浄後(水道水は有機物や種々イオン含む)、酸化処理
(0.25-0.5%過マンガン酸カリウムで約3分、又は0.5%過よう素酸で2-3分)



1) 多糖類のα-グリコールが酸化され、アルデヒドが生成し、またバックグラウンドが酸化除去される。酸化剤として、過マンガン酸カリウム使用の場合、褐色の二酸化マンガン(MnO₂)が切片表面上に沈着する。(過よう素酸使用の場合、切片上にMnO₂の沈着はない。)

アルデヒド(CHO)の生成

(銀イオンAg⁺を還元する能力がある) $\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$

2) 軽く水洗、精製水洗浄後、2%シュウ酸処理し(1-2分)、MnO₂を溶出除去

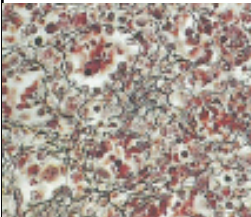
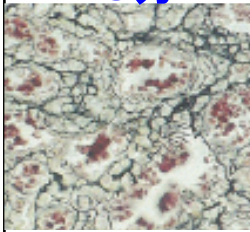
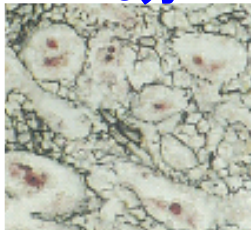
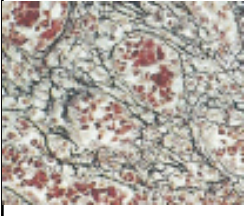
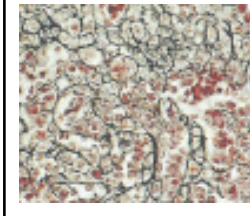
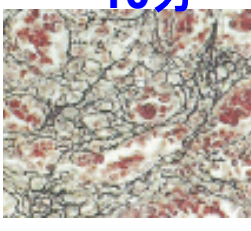
酸化条件及び酸化剤の種類(過マンガン酸カリウム & 過よう素酸)

1) 過マンガン酸カリウムの酸化条件(通常0.5%、約3分)と染色への影響

酸化不足	酸化過剰
細網線維は繊細に染色されるが、共染のリスクがある。	細網線維の断裂、繊細な線維の染色が喪失し、切片剥離のリスクがある。

注意: 濃度が低い0.25-0.5%過マンガン酸カリウムは、光や熱により分解し酸化力が早く低下するので、作り置きしない。5%過マンガン酸カリウム水溶液の場合は、使用時希釈して使用する。

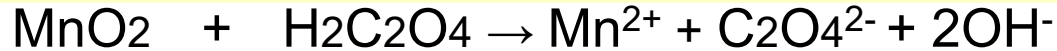
2) 酸化剤の種類(過マンガン酸カリウム & 過よう素酸)の違い

	酸化力	酸化の程度の制御	酸化時間と染色結果		
			1分	3分	10分
過マンガン酸カリウム KMnO ₄	強い	困難 $\begin{array}{c} \text{COH} \rightarrow \text{CHO} \rightarrow \text{COOH} \\ \text{COH} \end{array}$ アルデヒド カルボン酸 グリコール 還元力あり 還元力なし			
過よう素酸 H ₅ IO ₆	穏やか	容易 $\begin{array}{c} \text{COH} \rightarrow \text{CHO} \\ \text{COH} \end{array}$ 通常酸化条件では、酸化はアルデヒドで止まる。			

2) 軽く水洗、精製水洗浄後、2%シュウ酸処理(1-2分)してMnO₂を除去

③
細網線維
蛋白質 NH₂
多糖類

2) シュウ酸により、切片表面上の黄色～褐色の二酸化マンガンをMn²⁺として溶出・除去する。またシュウ酸水溶液は比較的長期安定(約1年)。



(二酸化マンガ) (シュウ酸)

(注: 過よう素酸使用時、切片上には褐色の二酸化マンガMnO₂が生成しないので、シュウ酸処理不要)

-CHO

-CHO

3) 水洗後、2%鉄ミヨウバンによる増感(40-50秒)注: 1分を超えると、共染

④
細網線維
蛋白質 NH₂ → Fe³⁺
多糖類

3) 鉄ミヨウバン[(硫酸第二鉄アンモニウムNH₄Fe(SO₄)₂)]により、銀に親和するアミノ基を組織内部から引き出す。

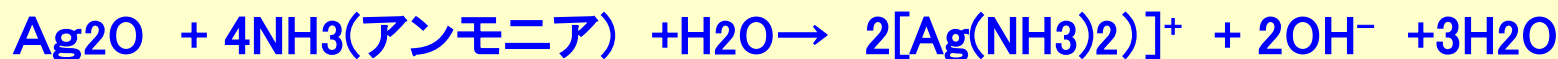
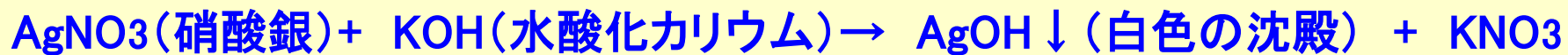
短 ← 鉄ミヨウバン処理時間(通常40-50秒) → 長

薄い染まり

共染(60秒以上)

4) 蒸留水 I、II、IIIで十分に水洗後、アンモニア銀液へ浸漬

アンモニア銀液の調製とポイント



銀アンモニア錯体

- ①硝酸銀を溶解する水は、再蒸留水が望ましい。水道水の使用は厳禁(水道水には Cl_2 ないし Cl^- 陰イオンが存在し、塩化銀 AgCl の沈殿が生じる。)
- ②強アルカリ(水酸化カリウム水溶液)は作り置きしない。経時的に空気中の二酸化炭素 CO_2 を吸収し、炭酸カリウム K_2CO_3 が生じる。
- ③アンモニア水の添加は、褐色の酸化銀 Ag_2O の沈殿が微量残る状態でストップ

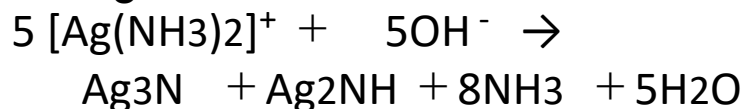
少	← アンモニア水添加量	→ 多
$\text{Ag}[(\text{NH}_3)_2]^+$ 濃度低い		NH_3 濃度、pHが高く、染色力低下
染色強度弱くなる。 Ag_2O 多く残ると、標本へ沈着リスク大		淡い染まり。膠原線維黒色化傾向

④アンモニア銀濃度高いと共染(アンモニア銀濃度高めの市販品→要希釈使用)

⑤非特異的銀粒子沈着抑制 → ゼラチン蛋白加アンモニア銀液の使用

警告！！ 爆発

アンモニア銀液は、経時的に(特に光のあたる条件下)爆発性の雷銀(窒化銀 Ag_3N と銀アミド Ag_2NH の混合物)が生じる。



(注意: ゼラチン濃度が高すぎると、薄い染まりとなる。)



調製したアンモニア銀液使いきれない場合、必ず冷蔵保存する。又は、 NaCl 水又は塩酸水を添加し、塩化銀 AgCl として沈殿処理する。

アンモニア銀液への浸漬時間(通常7~10分)と染色結果

短い ← アンモニア銀液浸漬時間 → 長い

染まりが薄い

共染のリスク大

但し、染色強度や共染の有無は、鍍銀後のエタノール分別と還元条件にも依存。

検体により、染色時間を増減する。(例、脾臓は長め15-20分、細網線維が多い場合も長めにする。)また、肝臓の場合、グリコーゲン(酸化によりアルデヒド生成)の保持程度によりバックの染まりの強さが変化すると考察される。(グリコーゲンは分子量により、水溶性の程度が異なる。)

渡辺鍍銀法とN・F(Naumenko & Feigin)法

成分	渡辺 鍍銀法	N・F法
Ag(銀)	1	1
NH ₃	2.8	3.2
NaOH	0.61	0.45
NaOH/NH ₃	0.22	0.14
銀液調製の再現性	やや劣	優

8%硝酸アンモニウム水溶液 7ml
蒸留水 35ml
4%水酸化ナトリウム水溶液 8ml
10%硝酸銀水溶液 3.8ml
上記を混和して、アンモニア銀液(N・F法)を調製

アンモニア水をピペットで滴下して調節するより、各試薬の所定濃度溶液の所定量を混合して調製するN・F法の方が、銀液調製の再現性に優れる。 1滴=50μl(薬局方)



↓ 4) 蒸留水 I、II、III で十分に水洗後、アンモニア銀液へ浸漬(10-30分)

(AとBが起こる)

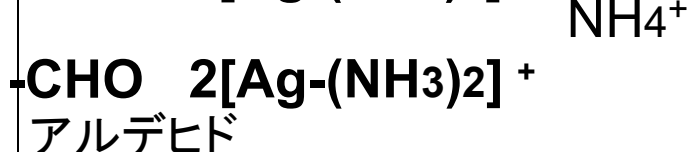
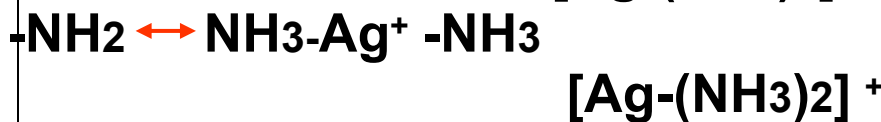
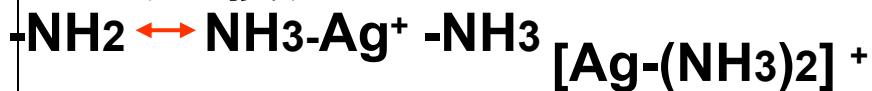
⑤

細網線維

蛋白質

多糖類

A) 交換反応



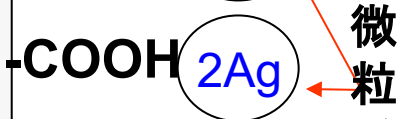
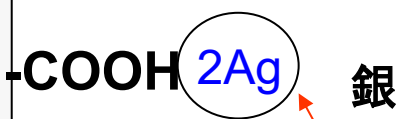
A) アンモニア銀と蛋白質アミノ基NH₂の間で交換反応が起こり、そのアミノ基に銀イオンが親和する。

⑥

細網線維

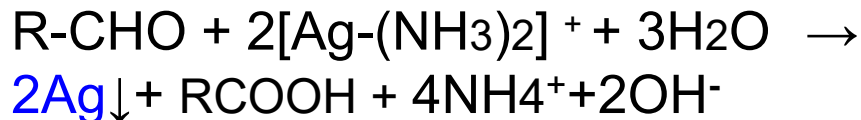
蛋白質

多糖類



銀微粒子

B) 糖グリコールが酸化されて生成したアルデヒドCHOにより銀イオンAg⁺が還元され、銀微粒子が生成。この段階では銀の発色はまだ淡い。







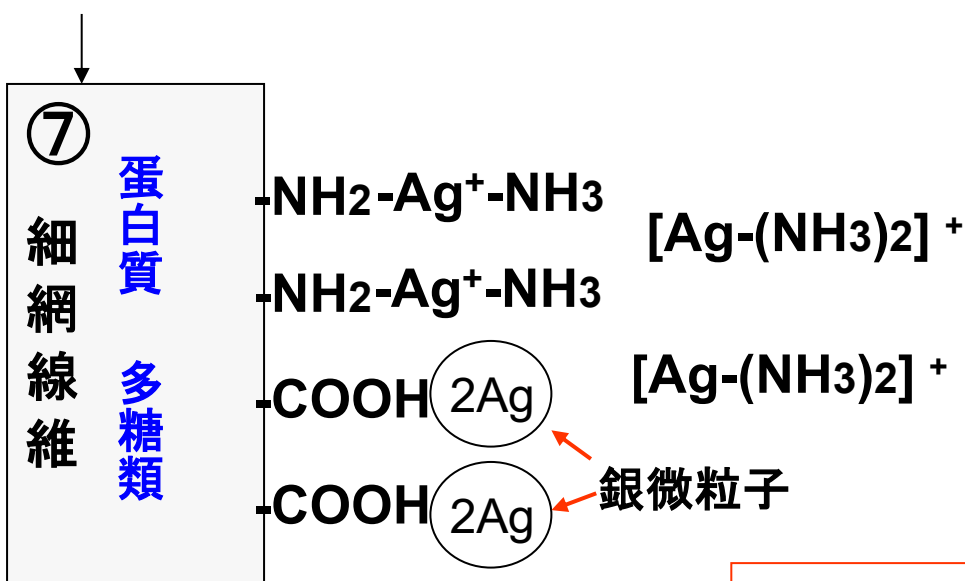
↓ 5) 95%エタノールで分別(約1秒) (注: 70%エタノールでも可)

(参考: Bielshowsky-Perdrau法→蒸留水 I、II 各5-10秒)

染色の特異性の低い鍍銀染色では、分別が重要なステップとなる。

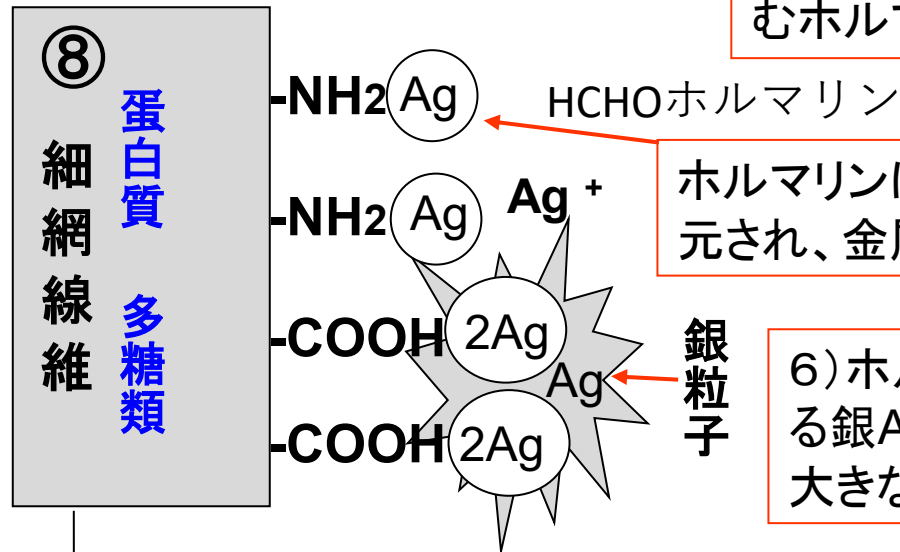
銀粒子の大きさとその色調

銀粒子ないし銀粒子の群れの大きさ			銀発色の色調
小	10-20nm		黄色
↑	> 30		赤色
↓			褐-紫色
大	> 100		黒色



6) ホルマリン還元(1-2分)
で銀粒子となり発色

6) **切片を動かさない**。動かすと還元されて新しく生じる金属銀が、銀微粒子の上へ付着しにくくなり銀粒子が大きくならないと考えられる。鉄ミョウバンを含むホルマリンは不安定なので、使用時調製がよい。



ホルマリンにより $\text{-NH}_2\text{-Ag}^+\text{-NH}_3$ の銀イオン Ag^+ が還元され、金属銀が生成し、その部位に沈着する。

6)ホルマリンにより銀イオン Ag^+ が還元されて生じる銀 Ag が、銀微粒子の上に沈着し、細網線維にて大きな銀粒子となり、細網線維が黒く発色する。

7) 蒸留水水洗後、0.2%塩化金酸で調色

染色の三要素/細網線維と膠原線維の違い

染色の三要素

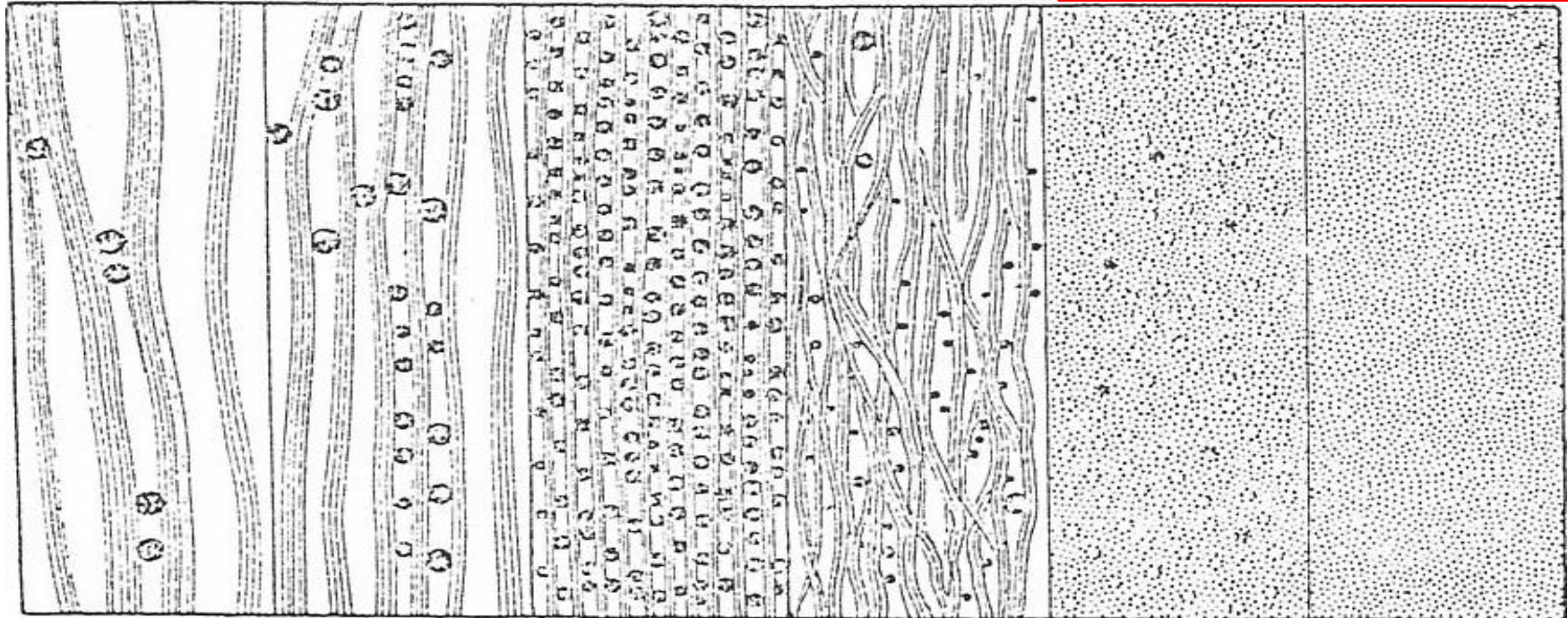
①化学的親和性
②濃 度
③組織の構築の粗密と銀錯体の入り込みやすさと銀粒子の成長しやすさ

	細網線維	膠原線維
主成分	コラーゲン蛋白	コラーゲン蛋白
糖成分の量 (PAS染色)	やや多い(酸化により銀還元性) (PAS陽性++)	少ない (PAS陽性+)
鍍銀染色	黒色	赤色

組織部位の構築の疎密と鍍銀染色の発色の強さ

疎 ← 構築 → 密

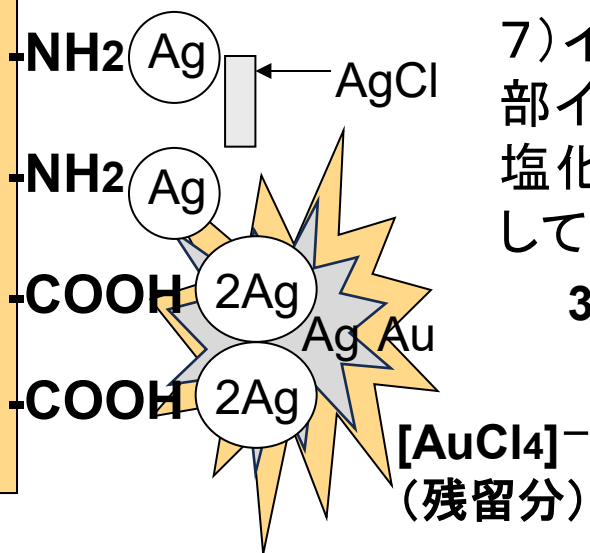
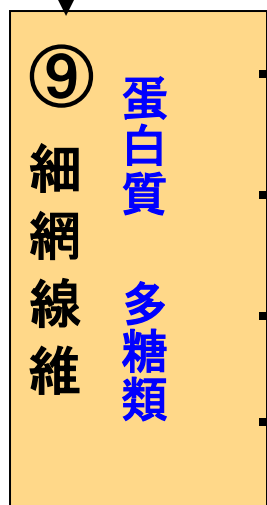
細網線維にアンモニア銀が多く入り込み、より多くの銀粒子が沈着すると考察される。膠原線維に生じる銀粒子は分別過程で一部溶出すると考察される。



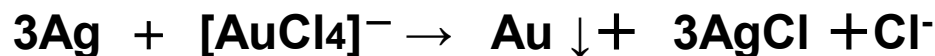
①膠原線維 ②細網線維 ③神経細線維 ④神経細胞 ⑤赤血球 ⑥髄鞘

図の引用文献: 関 正次: 鍍金属、組織検査法、杏林書院、1961

7) 蒸留水水洗後、0.2%塩化金酸で調色(10分～1晩)



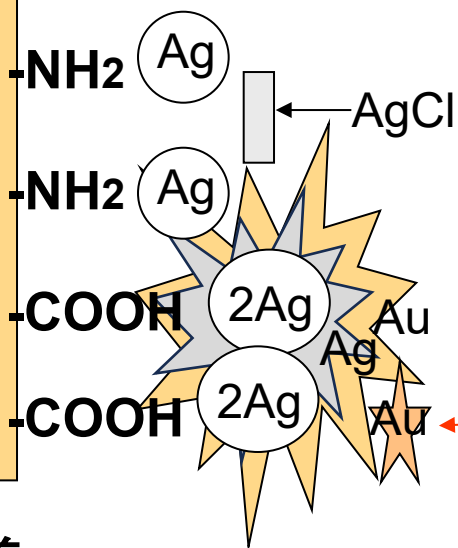
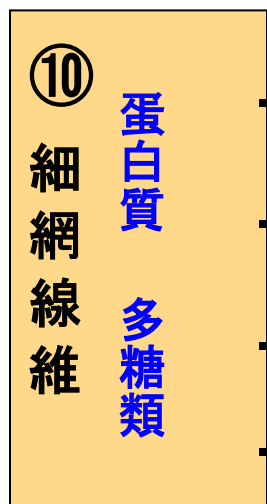
7) イオン化傾向は銀Ag > 金Auなので、銀が一部イオンAg⁺として溶出して塩化銀AgClとなり、塩化金酸 [AuCl₄]⁻の金イオンが金属金Auとして銀粒子の上へ沈着する。



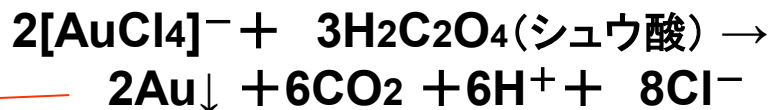
(調色には塩化金酸が適し、塩化金酸液は長期安定)

○ 塩化金酸 (テトラクロロ金酸)	✗ 塩化金
Tetrachloroauric(III) acid	Gold(I) chloride Gold(III) trichloride
H[AuCl ₄]	AuCl AuCl ₃

8) 2%シュウ酸処理(1分)、水洗3-5分



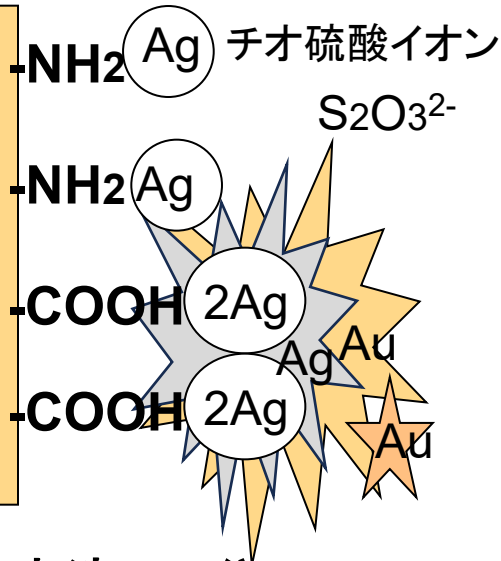
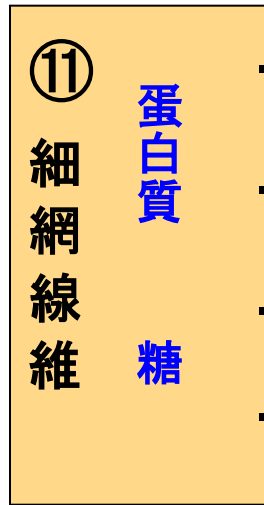
8) 残留する塩化金酸をシュウ酸で処理し、さらに金属金を発色部位に沈着させる。本シュウ酸処理の省略は可能。



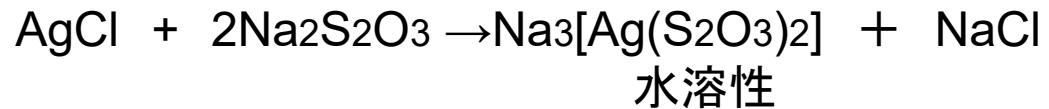
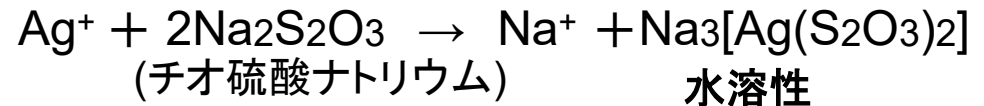
シュウ酸処理時間の長短は染色への影響ほぼなし。

9) 定着

↓ 9) 定着(2%チオ硫酸ナトリウム 3～5分)

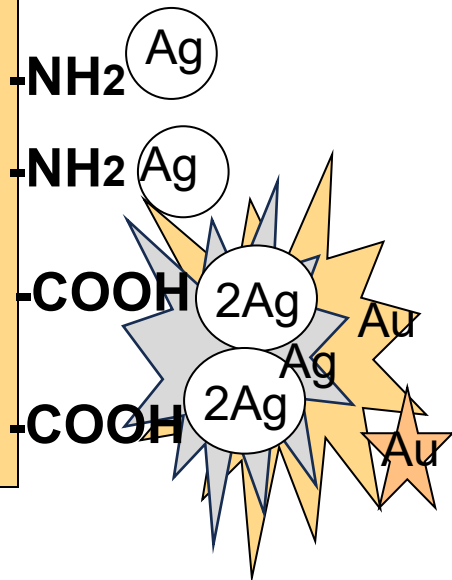
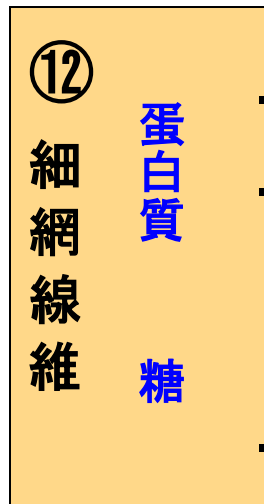


9) 未還元の前銀イオンや塩化銀を、チオ硫酸ナトリウムで処理し、溶出除去する。本操作をしないと、残留の前銀イオンが光により還元され、標本が変色する。



ハイポは弱アルカリのため、切片剥離のリスクあり。
写真用酸性硬膜定着液は剥離リスクほぼなし。

↓ 10) 流水水洗1～2分



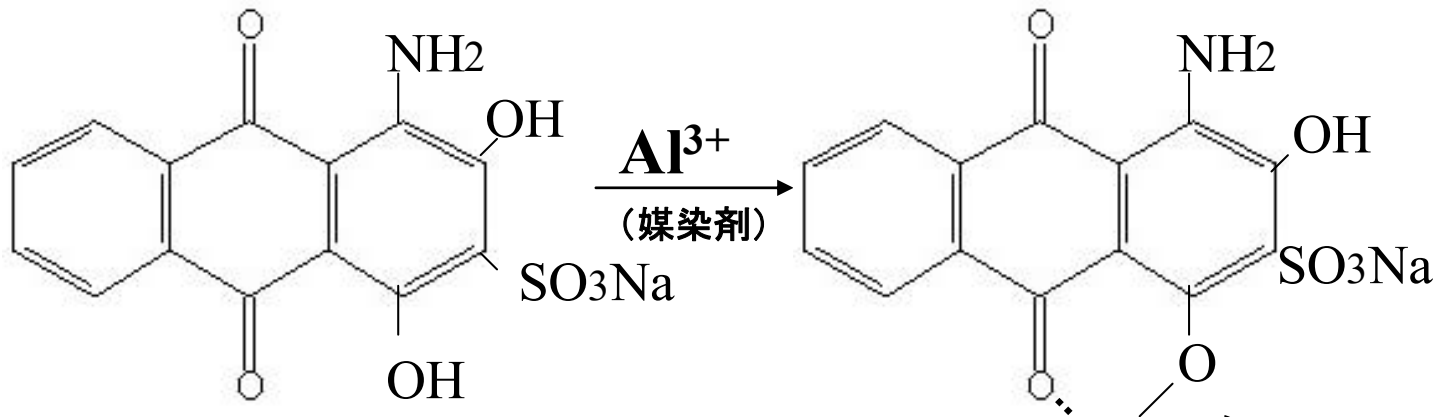
写真用酸性硬膜定着液		成分の作用
チオ硫酸ナトリウム	240 g	AgBr溶解・除去
亜硫酸ナトリウム・無水	15 g	保存・安定化剤
28%酢酸	48 ml	酸性化剤
カリウムミョウバン	15 g	銀塩剥離防止剤
ホウ酸	8 g	硬膜剤
温水(約50℃)	600 ml	
冷水を加えて全量を1000mlとする。 使用するさい、約5倍量の水で希釈		

10) 定着に使用したチオ硫酸ナトリウムを、十分な水洗で洗い流す。チオ硫酸ナトリウムが残留すると、経時的に硫化銀 Ag_2S が生じ、標本が変色する。

ケルンエヒトロートによる核染色の原理

ケルンエヒトロート 独語→Kern(核)echt(堅牢に)rot(赤色)

英語→Nuclear(核)fast(堅牢に)red(赤色)



C.I.No. 60760

C₁₄H₈NNaO₇S = 357

溶解性: 0.6% (水)

0.04% (エタノール)

核DNA -PO₄⁻

細胞核(Kern)を堅牢に(echt)、赤色に(rot)染めることから色素名が由来する独語名ケルンエヒトロート(Kernechtrot) は、ヘマトキシリン同様3価のアルミニウムイオンAl³⁺と錯体を形成し、色素本体は正(+)に荷電し、負(-)に荷電する細胞核DNAリン酸基(PO₄⁻)にイオン結合し、細胞核を赤色に染める。