

# 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

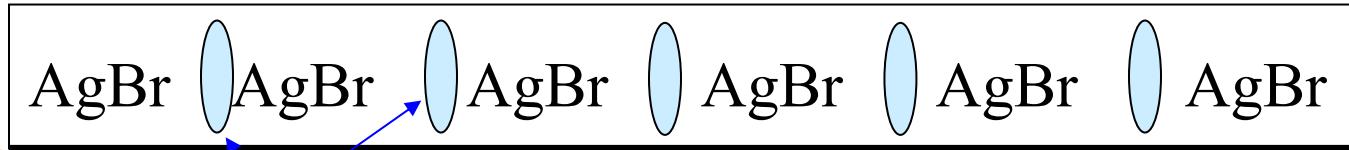
# 黑白写真と好銀性線維鍍銀染色の操作と試薬の類似性

黒白写真	好銀性線維鍍銀染色
臭化銀 AgBr (フィルム上) 	アンモニア銀 $\text{NH}_3\text{-Ag}^+\text{-NH}_3$
露光と潜像 (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)	1)酸化処理 (多糖類 $\alpha$ -グリコールの酸化により還元性アルデヒド基CHOが生成) 2)鍍銀(銀イオン $\text{Ag}^+$ の生体部位への親和及び $\text{Ag}^+$ の部分的還元)
現像(還元剤:ヒドロキノン、メトール、他) (還元力の強いメトールなどが使用される)	還元(還元剤:ホルマリン) (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)
定着(未還元の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	定着(未反応の $\text{Ag}^+$ を切片から除去) (同左 or チオ硫酸ナトリウム)

# 黑白フィルム写真ができる過程と試薬(薬品)

黑白フィルムは、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。

## ①フィルム

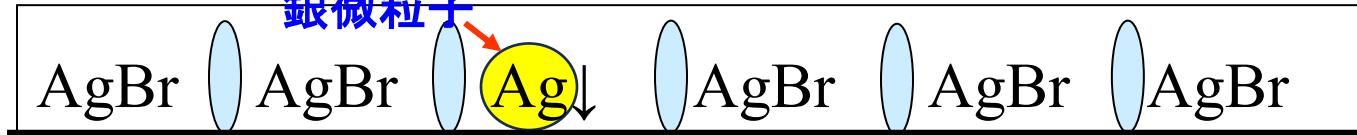


酢酸セルロース膜

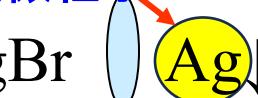
ゼラチン



## ②露光と潜像



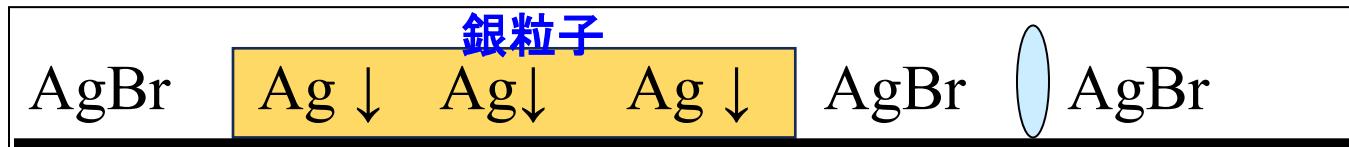
銀微粒子



## ③現像

還元剤  
(ヒドロキノン、メトール)

銀微粒子の周りのAgBrがヒドロキノンなどで還元されて生成する銀Agが、銀微粒子の周りに沈着し、大きな銀粒子になり発色し、像が現れる。



銀粒子



## ④定着

写真用酸性硬膜定着液  
(主成分:チオ硫酸ナトリウム)

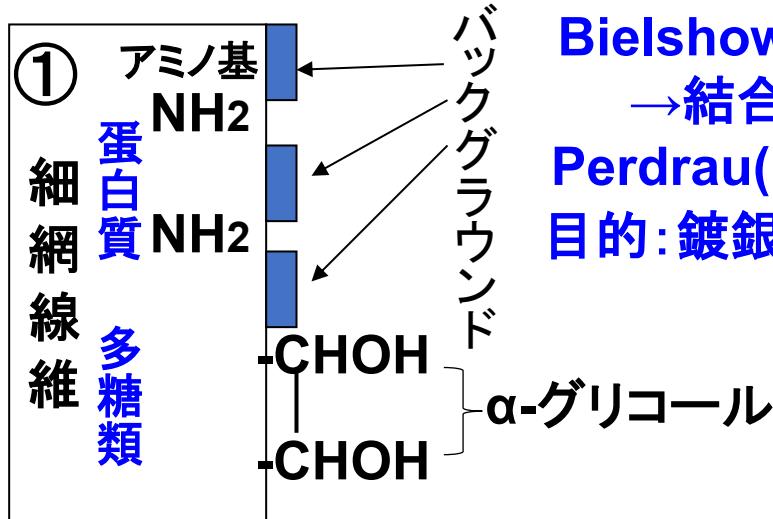
未反応のAgBrをチオ硫酸ナトリウムで洗い流す。  
$$\text{AgBr} + 2\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \rightarrow \text{NaBr} + \text{Na}_3[\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2]$$

## ⑤水洗

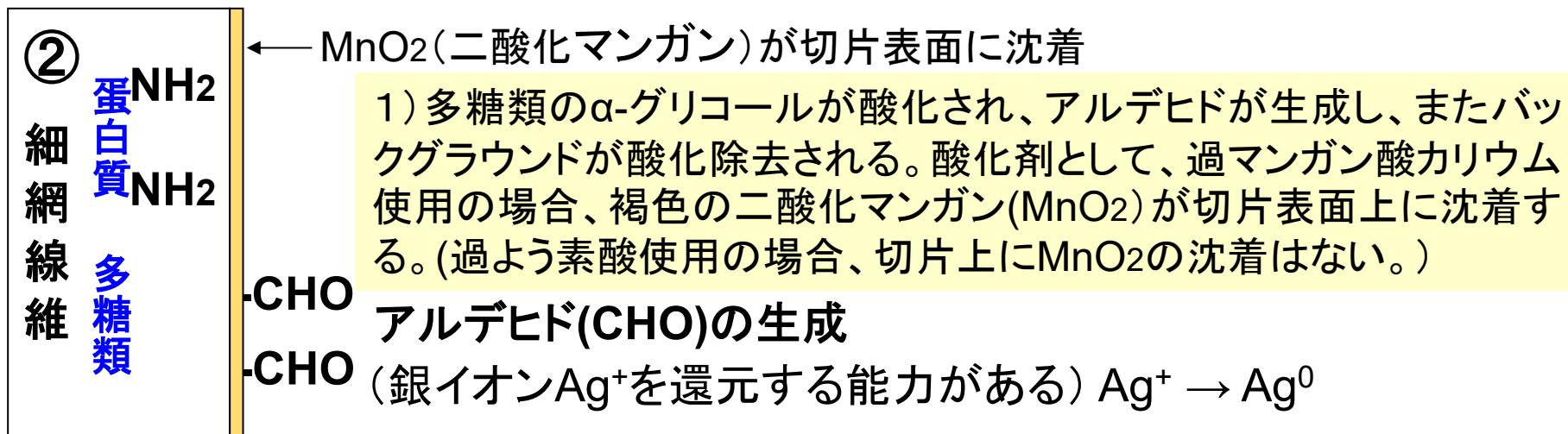


水洗でチオ硫酸ナトリウムを洗い流す。

# 好銀性線維鍍銀染色の原理とポイント



↓  
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%過硫酸酸で2-3分)



↓  
2) 軽く水洗、精製水洗浄後、2%シュウ酸処理し(1-2分)、MnO<sub>2</sub>を溶出除去

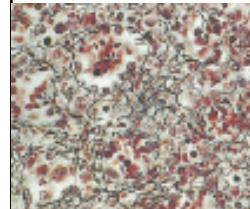
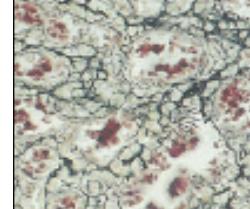
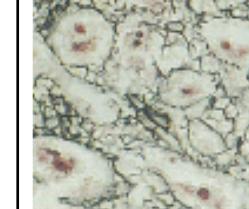
# 酸化条件及び酸化剤の種類(過マンガン酸カリウム & 過よう素酸)

## 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
細網線維は纖細に染色されるが、共染のリスクがある。	細網線維の断裂、纖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		
過マンガ ン酸カリウム $KMnO_4$	強い	困難 $COH \rightarrow CHO \rightarrow COOH$ $COH$ 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	1分	3分	10分
過よう素酸 $H_5IO_6$	穏やか	容易 $COH \rightarrow CHO$ $COH$ CHO 通常の酸化条件では、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MnO<sub>2</sub>を除去

③

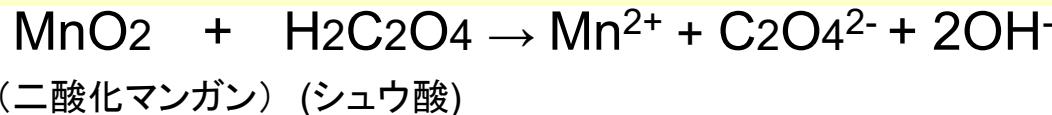
NH<sub>2</sub>

細  
綱  
線  
維

蛋白質  
多糖類

-CHO  
-CHO

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Mn<sup>2+</sup>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)。



(注: 過よう素酸使用時、切片上には褐色の二酸化マンガン MnO<sub>2</sub>が生成しないので、シュウ酸処理不要)

↓ 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

NH<sub>2</sub>

細  
綱  
線  
維

蛋白質  
多糖類

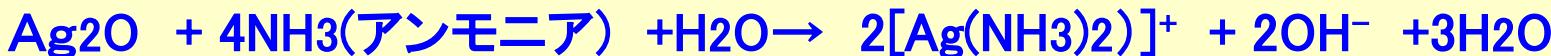
→ Fe<sup>3+</sup>  
-NH<sub>2</sub> Fe<sup>3+</sup>  
-CHO  
-CHO

3) 鉄ミヨウバン[(硫酸第二鉄アンモニウム NH<sub>4</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>]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

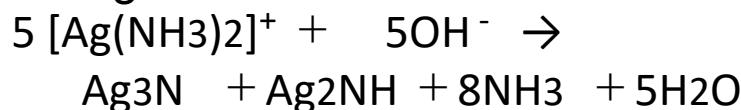
- ①硝酸銀を溶解する水は、再蒸留水が望ましい。水道水の使用は厳禁(水道水にはCl<sup>-</sup>ないしCl<sup>-</sup>陰イオンが存在し、塩化銀AgClの沈殿が生じる。)
- ②強アルカリ(水酸化カリウム水溶液)は作り置きしない。経時に空気中の二酸化炭素CO<sub>2</sub>を吸収し、炭酸カリウムK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>が生じる。
- ③アンモニア水の添加は、褐色の酸化銀Ag<sub>2</sub>Oの沈殿が微量残る状態でストップ

少	←	アンモニア水添加量	→	多
Ag[(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> 濃度低い 染色強度弱くなる。Ag <sub>2</sub> O多く残ると、標本へ沈着リスク大				NH <sub>3</sub> 濃度、pHが高く、染色力低下 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に染(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、経時に(特に光のある条件下)爆発性の雷銀(窒化銀Ag<sub>3</sub>Nと銀アミドAg<sub>2</sub>NH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 <sub>3</sub>	2.8	3.2
NaOH	0.61	0.45
NaOH/NH <sub>3</sub>	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)

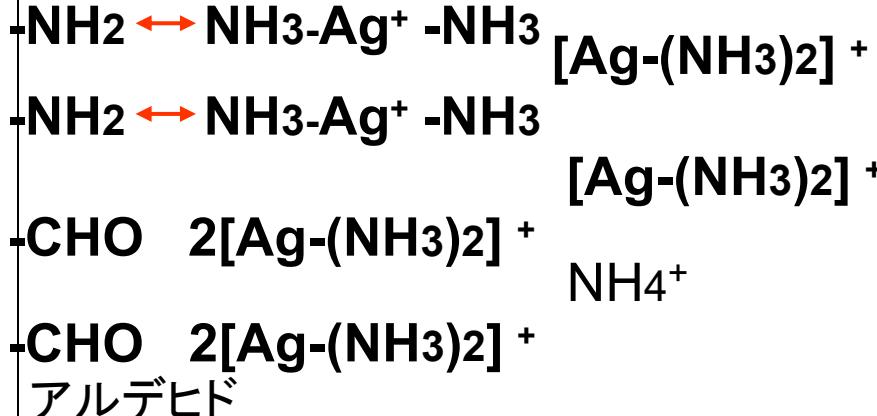
(AとBが起こる)

⑤ 細網線維

蛋白質

多糖類

A) 交換反応

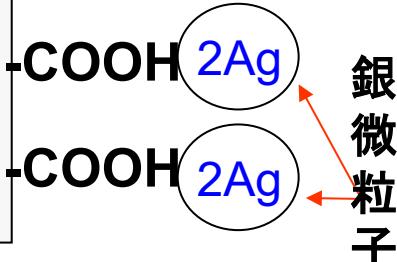


A) アンモニア銀と蛋白質アミノ基 NH<sub>2</sub> の間で交換反応が起こり、そのアミノ基に銀イオンが親和する。

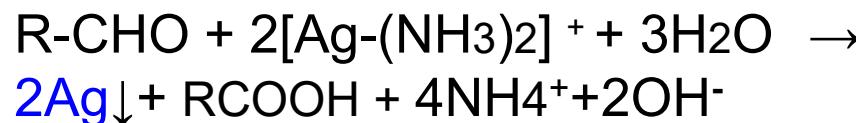
⑥ 細網線維

蛋白質

多糖類



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<sup>+</sup> 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)

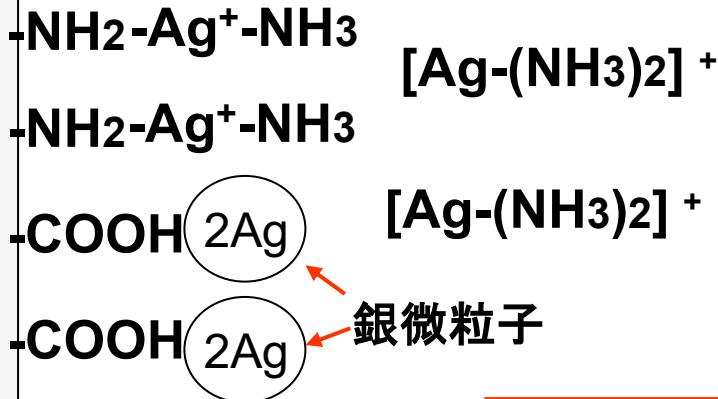
染色の特異性の低い鍍銀染色では、分別が重要なステップとなる。

## 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

⑦

蛋白質  
細網線維  
多糖類



## 銀粒子の大きさとその色調

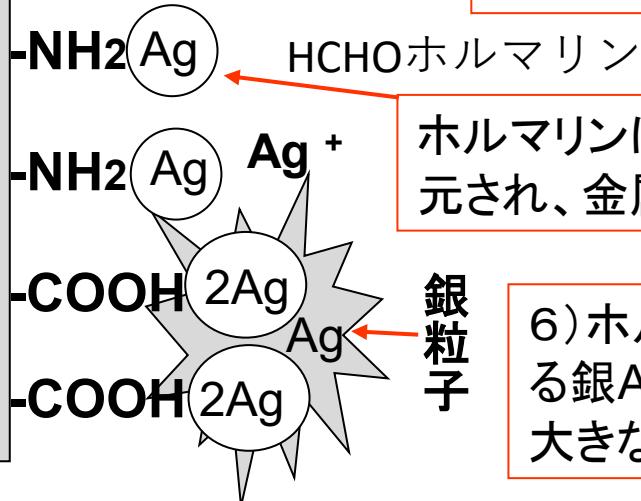
銀粒子ないし銀粒子の群れの大きさ	銀発色の色調
小 10–20nm	黄色
↑ > 30	赤色
↓	褐–紫色
大 >100	黒色

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。

⑧

蛋白質  
細網線維  
多糖類



ホルマリンにより-NH<sub>2</sub>-Ag<sup>+</sup>-NH<sub>3</sub>の銀イオンAg<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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

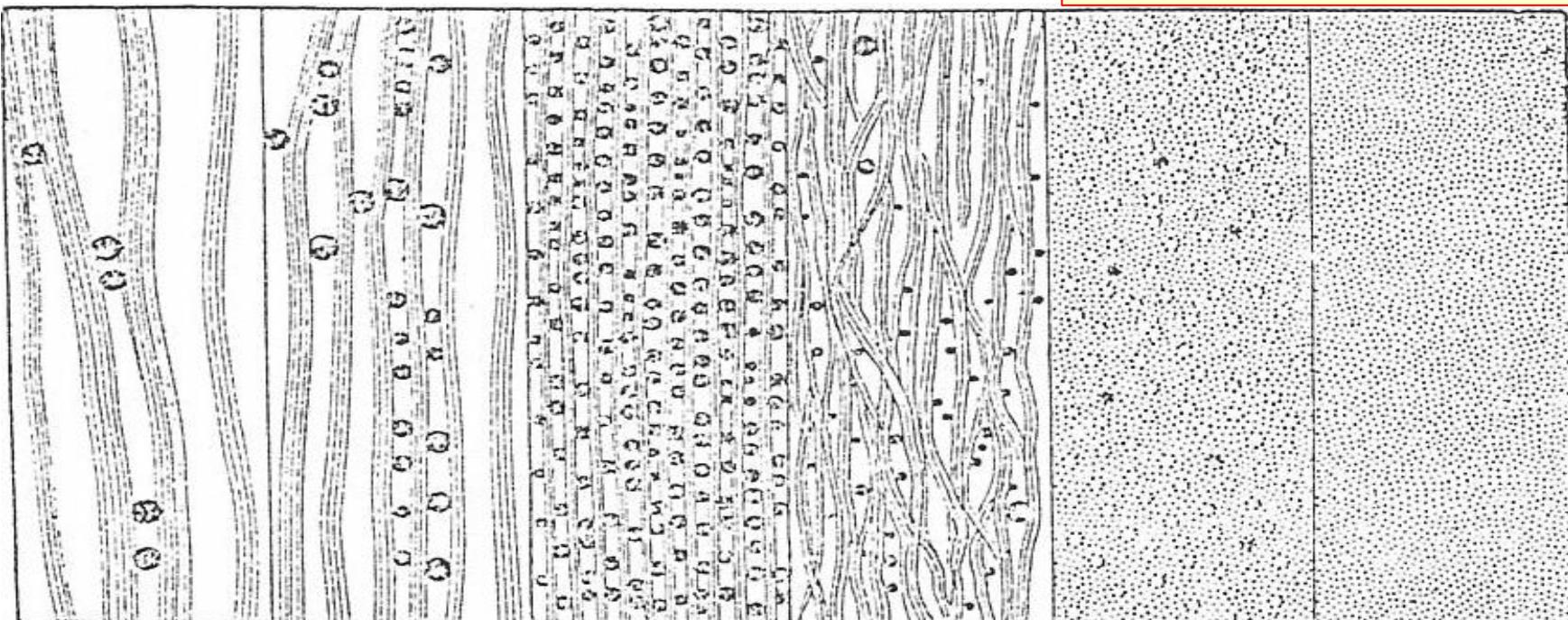
- ①化学的親和性
- ②濃度
- ③組織の構築の粗密と銀錯体の入り込みやすさと銀粒子の成長しやすさ

	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神膠細胞

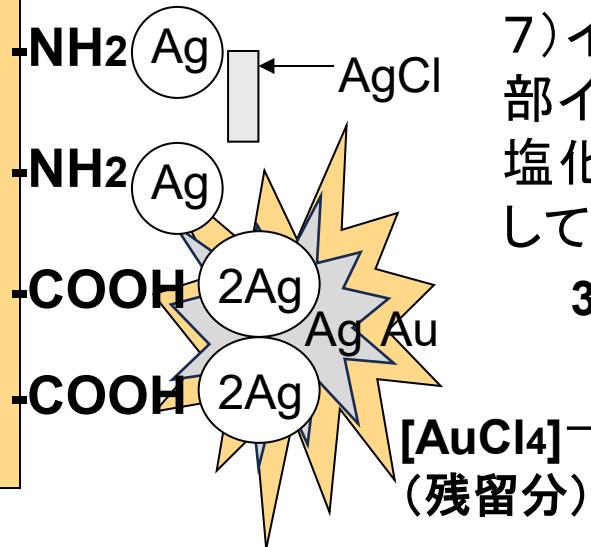
⑤赤血球

⑥髓鞘

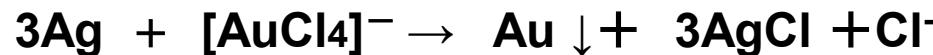
図の引用文献: 関 正次: 鍍金属、組織検査法、杏林書院、1961

## 7) 蒸留水水洗後、0.2%塩化金酸で調色(10分～1晩)

⑨ 細網線維  
蛋白質 多糖類



7) イオン化傾向は銀Ag > 金Auなので、銀が一部イオンAg<sup>+</sup>として溶出して塩化銀AgClとなり、塩化金酸 [AuCl<sub>4</sub>]<sup>-</sup>の金イオンが金属金Auとして銀粒子の上へ沈着する。

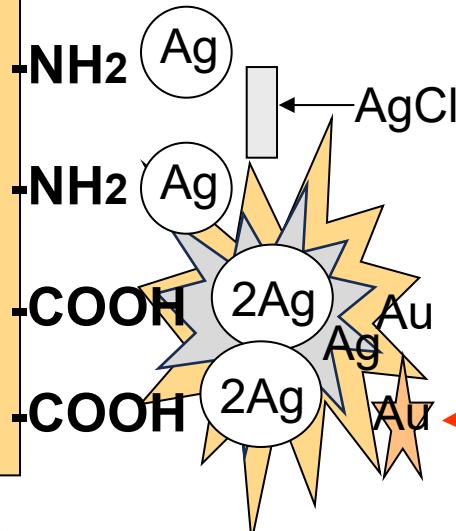


(調色には塩化金酸が適し、塩化金酸液は長期安定)

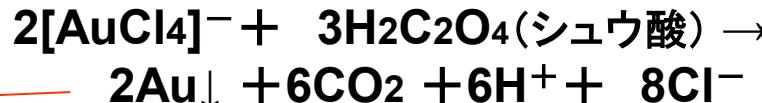
○ 塩化金酸 (テトラクロロ金酸)	✗ 塩化金
Tetrachloroauric(III) acid	Gold(I) chlrode Gold(III) trichloride
H[AuCl <sub>4</sub> ]	AuCl AuCl <sub>3</sub>

## 8) 2%シュウ酸処理(1分)、水洗3-5分

⑩ 細網線維  
蛋白質 多糖類



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

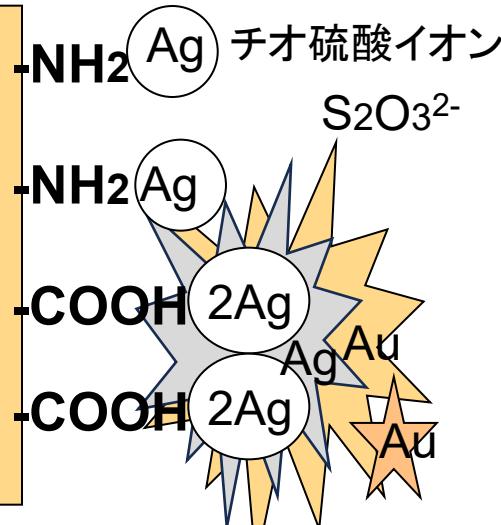
## ↓9) 定着(2%チオ硫酸ナトリウム 3~5分)

⑪

蛋白質

細網線維

糖



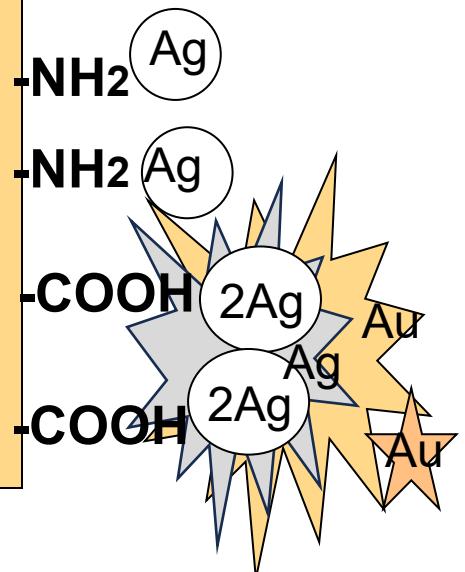
## 10) 流水水洗1~2分

⑫

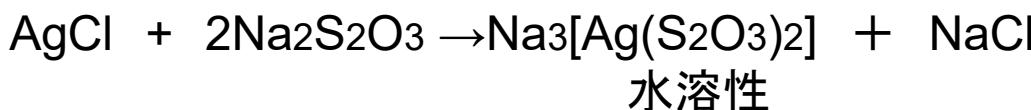
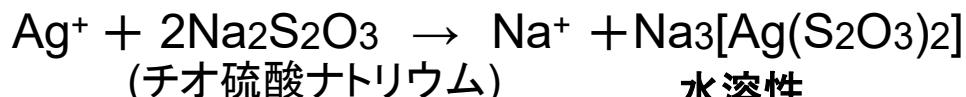
蛋白質

細網線維

糖



9) 未還元の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。



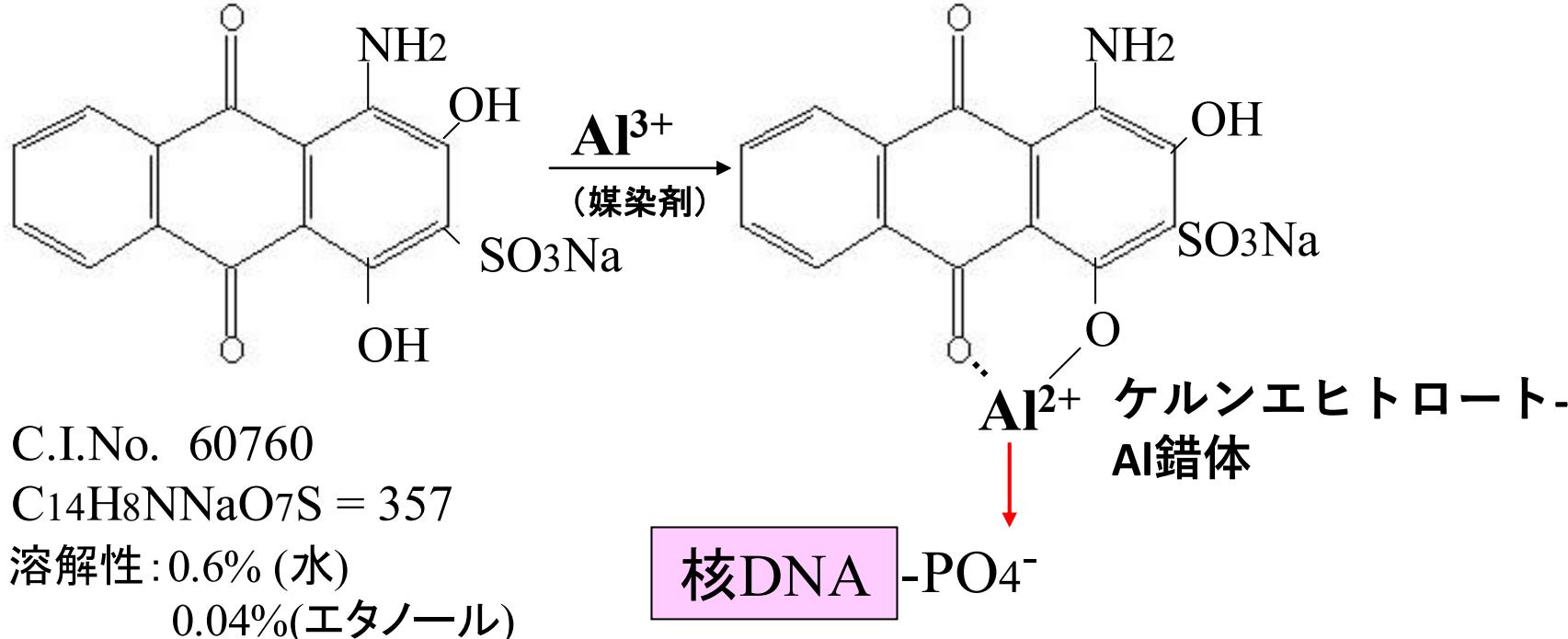
ハイポは弱アルカリのため、切片剥離のリスクあり。  
写真用酸性硬膜定着液は剥離リスクほぼなし。

写真用酸性硬膜定着液	成分の作用
チオ硫酸ナトリウム	$AgBr$ 溶解・除去
亜硫酸ナトリウム・無水	保存・安定化剤
28%酢酸	酸性化剤
カリウムミョウバン	銀塩剥離防止剤
木ウ酸	硬膜剤
温水(約50°C)	
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)



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、ヘマトキシリント同様3価のアルミニウムイオンAl<sup>3+</sup>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(PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)にイオン結合し、細胞核を赤色に染める。