

脂肪染色やってよ …と言われたら

株式会社LSIメディエンス 病理研究部
病理1G 標本作製チーム/鏡検チーム
黒滝 哲郎

脂肪染色やってよ…と言われたら

✓ どの染色方法を選択すればよいのか

ズダンIII

ズダンIV

オイルレッドO

ズダン黒B

ナイル青

…etc.

脂肪染色やってよ…と言われたら

- ✓ 各染色方法についてどういう点について気を付けるべきなのか

温度？

染色時間？

脂肪染色やってよ…と言われたら

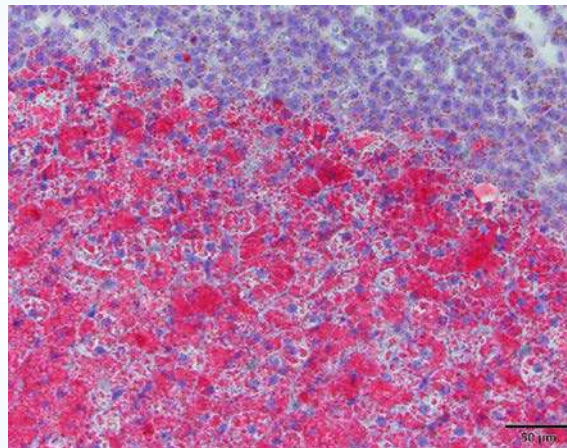
- ✓ 染色結果をどのように判断すればよいのか(鏡検者の目線からも)
- ✓ 動物別, 臓器別で染色態度に違いはあるのか

安全性試験では . . .

①変更書が出て、

「空胞化が認められたことから、以下の個体について常法に従いオイルレッドO染色標本を作製し、鏡検する。」

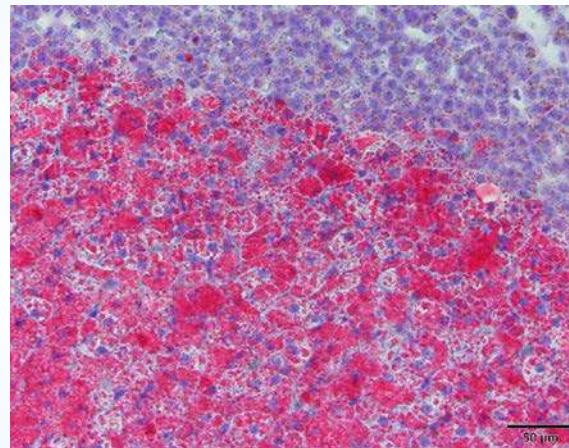
本当にオイルレッドO染色でいいの？



安全性試験では . . .

でもSD, 委託者が指定してきたのだから,
まあいいかな…

本当にオイルレッドO染色でいいの？



検討試験では . . .

おい、今西、肝細胞に空胞があるんだよ。この空胞が脂肪かどうか確認してくれない。

染色は何染色をやればいいですか？

染色方法？まあ、適当に調べて、お前ができるやつでいいや。来週月曜日には結果頂戴ね。

検討試験では・・・

(まじかよ！脂肪染色なんてやったことないし、今日は金曜日だぞ！土日出勤しなきゃならないよ。今週末は遠距離の彼女も来るのに！)

わかりました・・・

安全性試験にしても，検討試験にしても，
「脂肪染色の依頼がある時にはホルマリン固定されている場合が多い」．そのため，本講演ではホルマリン固定材料を用いることを前提とする．

未固定組織生材料も使用可能であるが、
安全性試験の場合、事前に

① 解剖時に脂肪染色用標本を作製する用意

② 脂肪染色の対象となる臓器を予測

③ どの群を何匹染色するか

をしておかないと、対応不可能。

よって、ホルマリン固定材料を対象とする。

脂肪染色にはホルマリン固定材料と未固定組織生材料とどちらがいいの？

染色性に違いが見られるという記述は見つけられませんでした

人医学では術中検査に用いられるため未固定組織生材料の検査が多いのかもしれない

ホルマリン固定について

脂質は非水溶性なのでホルマリンなどの水溶性固定液では固定されない。

10%ホルマリン液へ浸漬すると脂肪滴周囲の組織を固定し，脂肪の変異変質を防止する。

即ち，脂肪組織の固定の意義はその周囲組織をいかに良く固定するかということ。

ちなみに…，
脂肪組織を真に固定するためにはオスミウム酸や重クロム酸などを用いる。電顕検索など。

通常の脂肪染色にはホルマリン固定パラフィン包埋組織は使用できない。作製過程のキシレン，アルコール処理により脂質が組織から溶け出すため。もちろん，アルコール固定も避けるべき。

脂質とは・・・

- ① タンパク質，糖質と共に重要な生体構成成分
- ② 水に不溶性
- ③ 有機溶媒(アルコール，クロロホルム，エーテル等)に溶解する生体内有機物の総称
- ④ 定義は明確ではなく，化学的な構成成分は一定しない

病理組織標本作製の理論(実験病理組織技術研究会)

標準組織学総論(医学書院)

最新染色法のすべて(医歯薬出版株式会社)

病理組織標本の作り方(慶応大学病理学教室)

脂質とは・・・

脂質とは何か。生化学の教科書における伝統的定義は「水に溶けず有機溶媒に溶ける生体分子」である。しかし、水に溶けない脂肪以外の生体分子(タンパク質, 炭水化物)は存在するし、水溶性として取り扱うべき脂質分子も存在する。そもそも、有機溶媒の定義も曖昧である。(中略)つまり脂質とは漠然とは定義されるが厳密には定義できない。

脂質とは…

- ①単純脂質
- ②複合脂質
- ③誘導脂質

病理組織標本作製の理論(実験病理組織技術研究会)

標準組織学総論(医学書院)

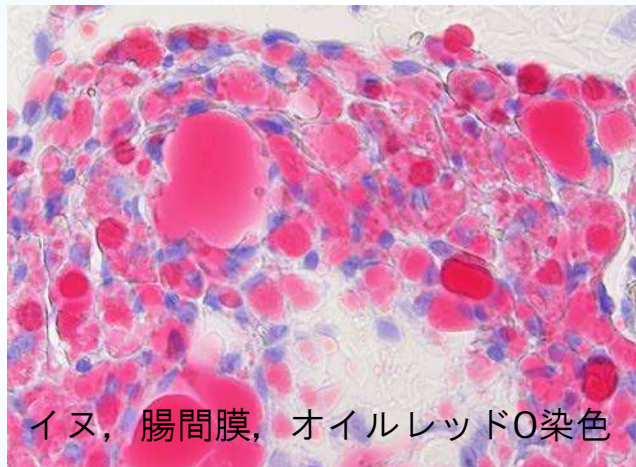
最新染色法のすべて(医歯薬出版株式会社)

病理組織標本の作り方(慶応大学病理学教室)

脂質とは…

①単純脂質

- ✓ 中性脂肪など
- ✓ 中性脂肪は人，動物に含まれる脂質のほとんどを占め，主としてエネルギー貯蔵の役割を担っており，皮下や腸間膜などに存在する

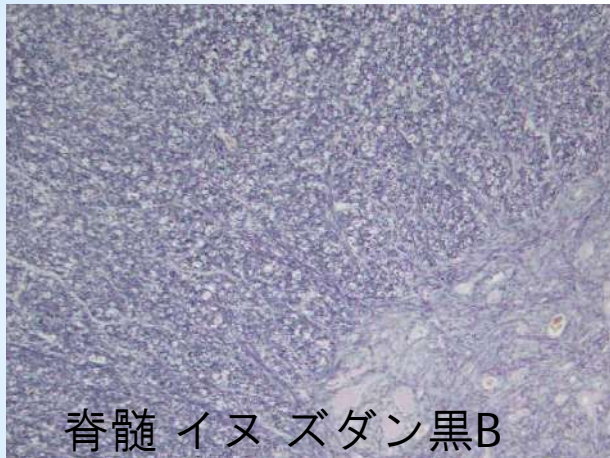


イヌ，腸間膜，オイルレッドO染色

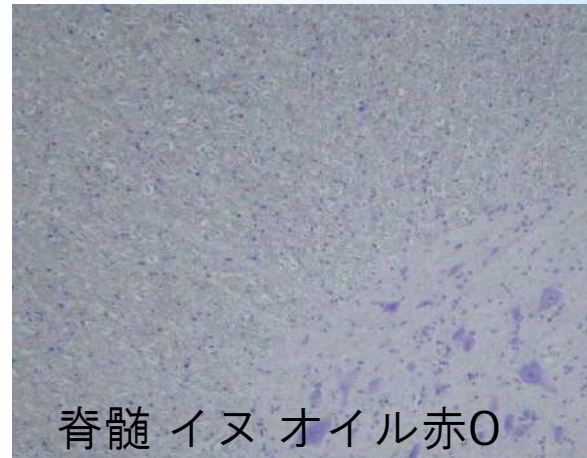
脂質とは・・・

②複合脂質

- ✓ リン脂質，糖脂質など
- ✓ リン脂質は脳，脊髄(特に髄鞘)，卵黄，肝臓，心臓に多い
- ✓ 糖脂質は脳，脊髄に多いが，特に髄鞘，灰白質に多い



脊髄 インズダン黒B



脊髄 オイル赤O

脂質とは…

③誘導脂質

- ✓ 単純脂質や複合脂質から加水分解により誘導された脂質。ステロイド，カルチノイドなど。
- ✓ ステロイドは胆汁酸，副腎皮質ホルモン，性ホルモン，ビタミンD,E,K等
- ✓ カルチノイドは非水溶性細胞内色素で，卵黄色素，ビタミンA等

染色方法

- ・ オイル赤O染色
- ・ ズダンⅢ，Ⅳ染色
- ・ ズダン黒B染色

染色原理：脂肪組織内への色素融解による物理的染色法。化学反応ではない。

オイルレッドO染色

- ✓ 脂肪染色はオイルレッドO染色を使用している施設が多い。ズダンⅢはコントラストが良くなく、メーカーやロットにより染色性が異なることが多いのであまり用いられない。調査施設の半分以上がオイルレッドO染色で、1/4がズダンⅢ染色である(岩手医科大学病理診断学講座HPより)。
- ✓ ズダンⅢ，ズダンⅣ染色の代替染色として広く推奨されてきた。両者に比べて赤色が濃く，染色方法が簡単である。
- ✓ ズダンⅢ，Ⅳと方法に大差はない。オイルレッドO染色はイソプロピルアルコールを使用する。
- ✓ イベントでの赤い煙や指紋の検出にも使用されているらしい。

オイルレッドO染色

臓器	染色液	核染	出展
諸臓器	オイルレッドO	マイヤーヘマト 2-5分	最新染色法のすべて 病理組織標本作製の理論
	10-15分, 37°C	(記載なし)	病理組織標本の作り方 組織学研究法
	10分, (記載なし)	ヘマト (記載なし)	岩手医科大学病理診断学講座
心臓, 肝臓	30分, 37°C※	マイヤーヘマト 15秒	Mehlem A, et al. 2013
骨格筋	5分, 室温	マイヤーヘマト 15秒	Mehlem A, et al. 2013

※: 生材料の凍結標本

ズダンⅢ染色

- ✓ 脂肪染色の元となった染色方法.
- ✓ **メーカー，ロット間で染色性が異なる**
ため，近年は殆ど推奨されない.

ズダンⅣ染色

- ✓ ズダンⅣはズダンⅢより脂溶性が強いためより強く濃く染色される(最新染色法のすべて).
- ✓ 実施してみたが、うまくいかなかった。

ズダン黒B染色

- ✓ リン脂質（中極性脂質）は染めやすいが、中性脂肪（無極性脂質）は染色性が弱い。
- ✓ 短所：pH4以下で不安定。70%エタノール溶液でも**4週間ほどしか安定ではないため、作り置き不可**である。

染色方法

ナイル青染色

- ✓ 染色原理：組織化学的染色法
- ✓ 塩基性色素（オキサジン）が化学的親和性によりリン脂質，遊離脂肪酸，塩基性物質を青く染色し，不純物として含まれるナイル赤（赤色オキサゾン）が中性脂肪を桃色に染色する。

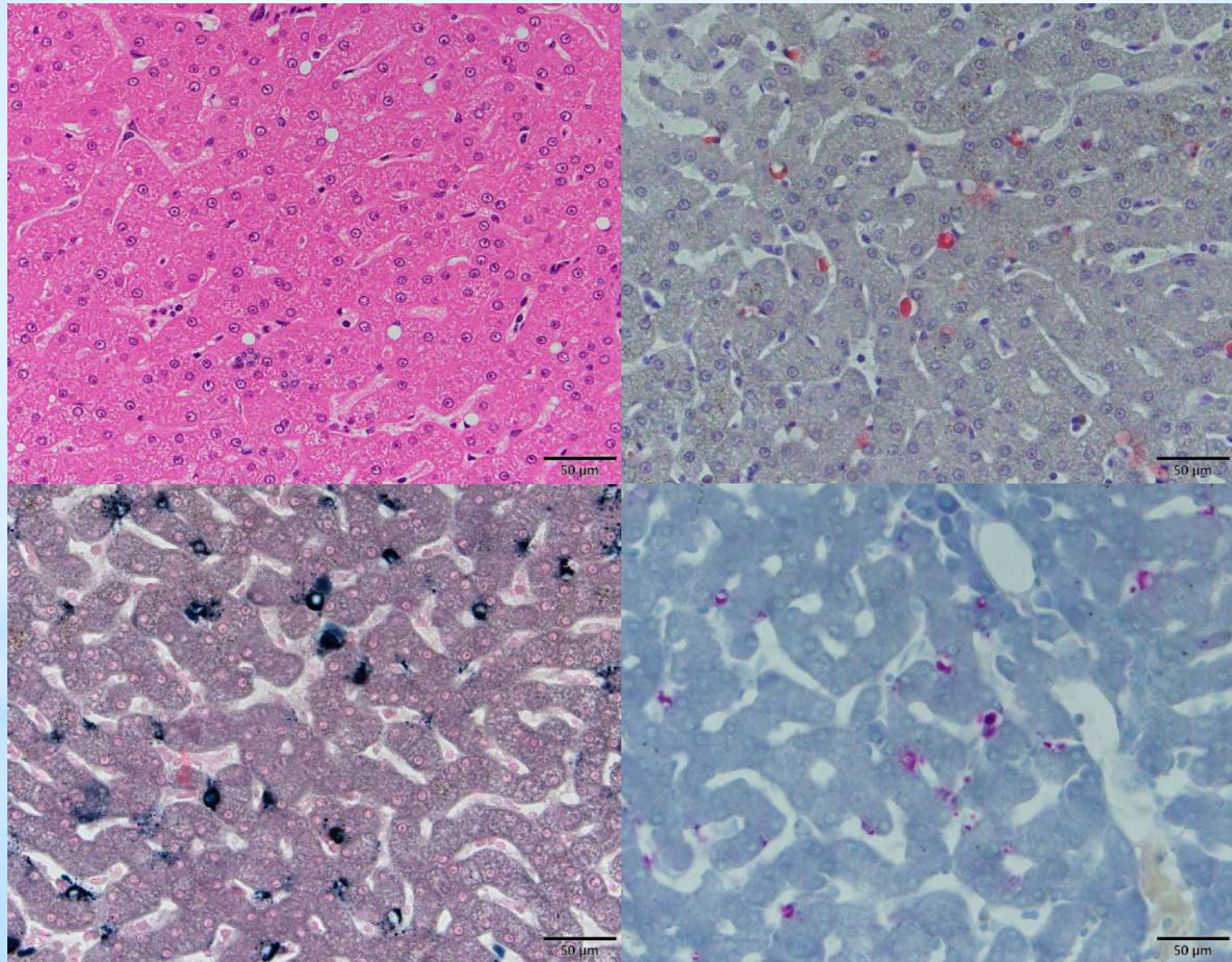
ナイル青染色

- ✓ ナイル青が酸化されてナイル赤が生じる。製造して新しいナイル青は溶解液を37°Cで1-2週間ほど放置するとナイル赤が生じる。

染色实例

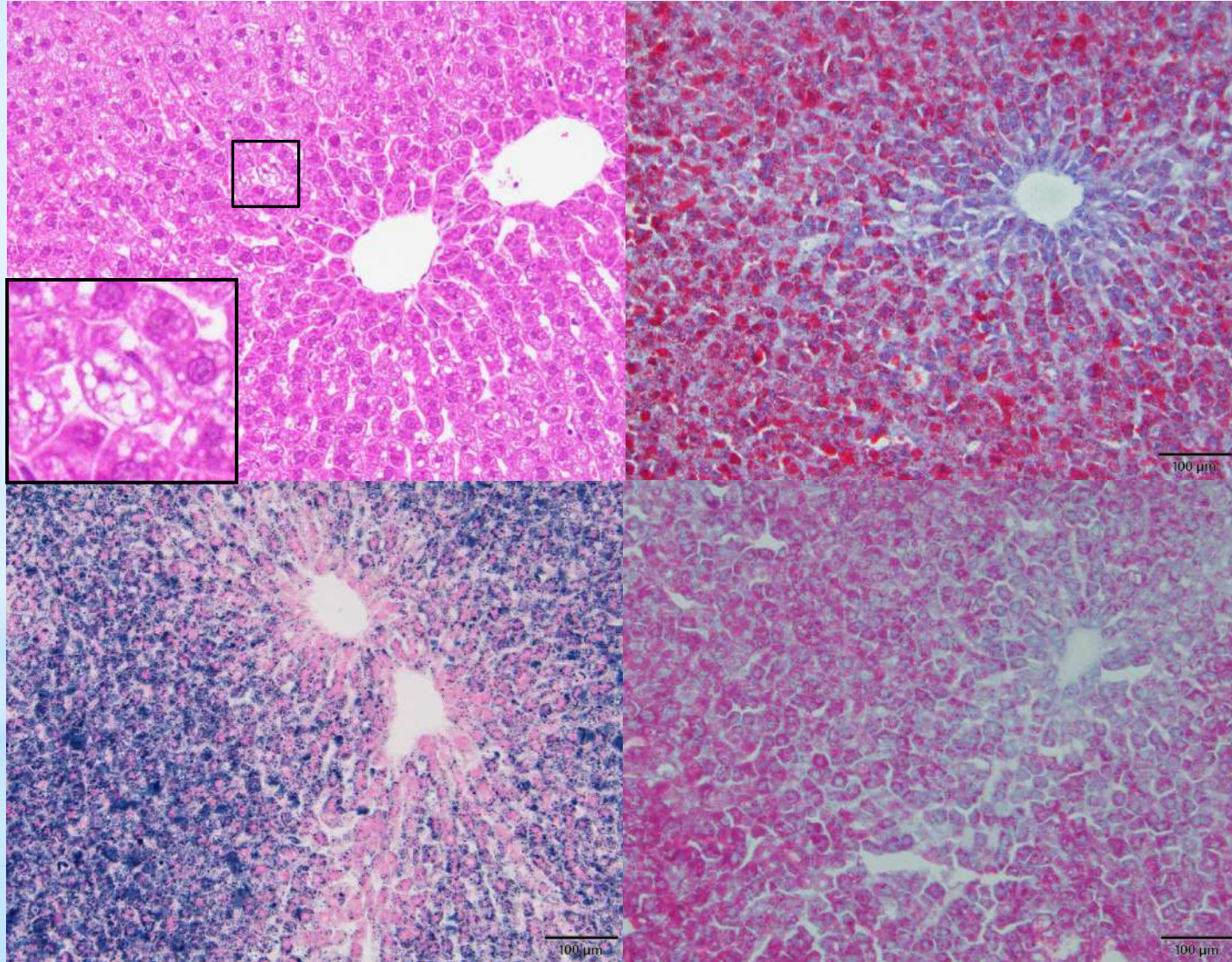
サルの肝臓

HE	オイル赤
スダソ黒	ナイル青



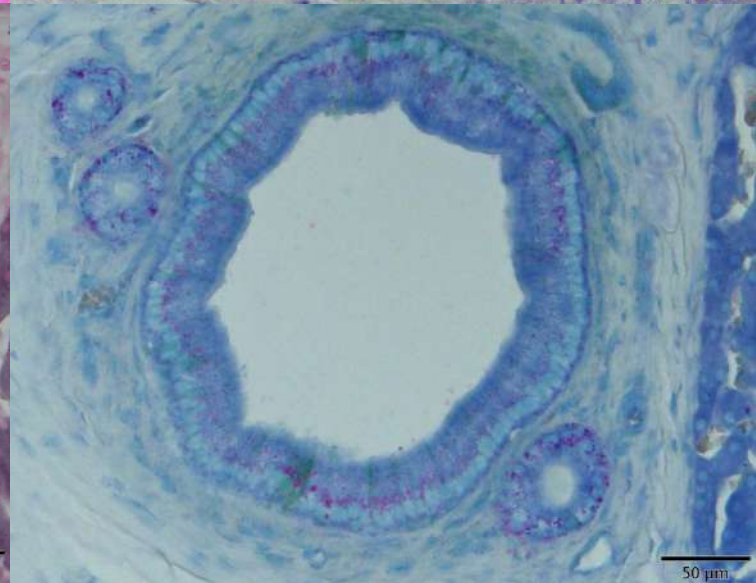
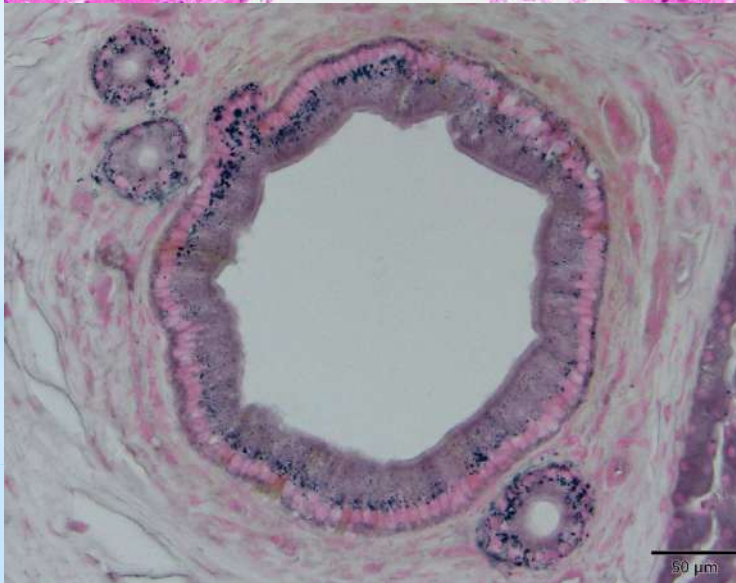
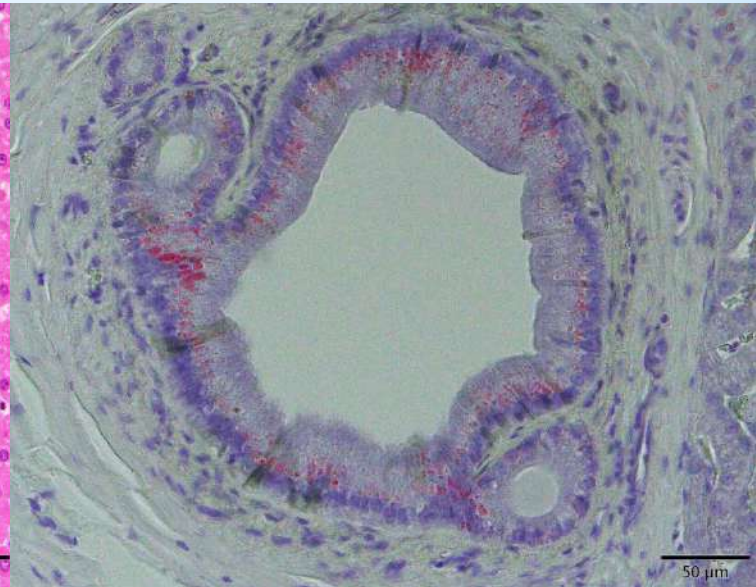
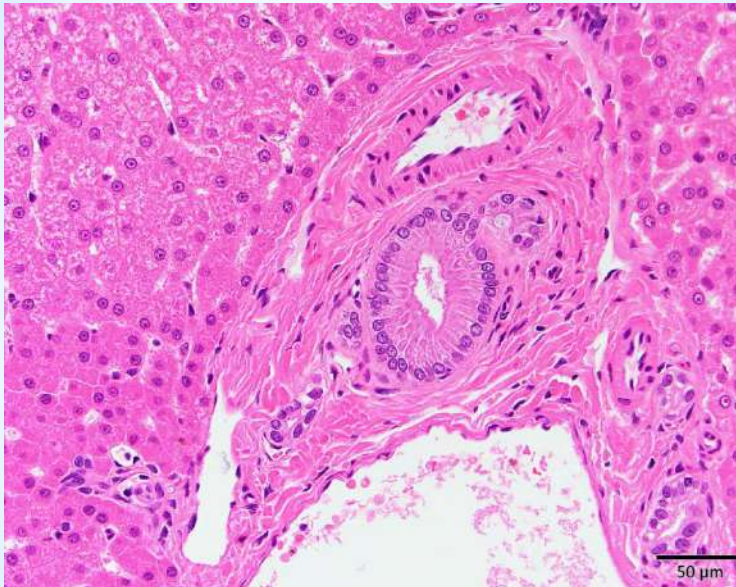
ラットの肝臓

HE	オイル赤
スダソ黒	ナイル青



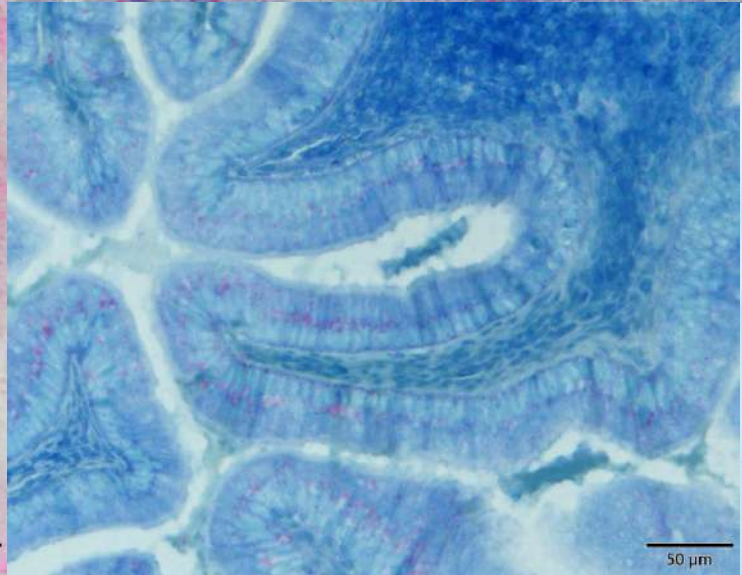
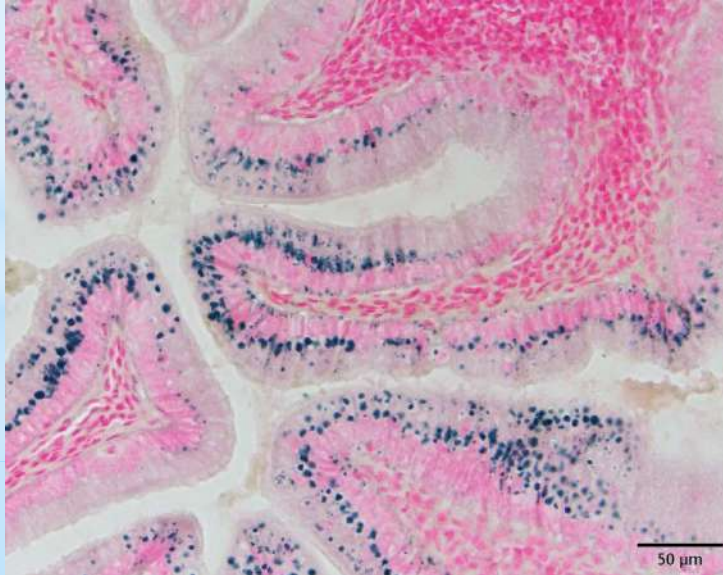
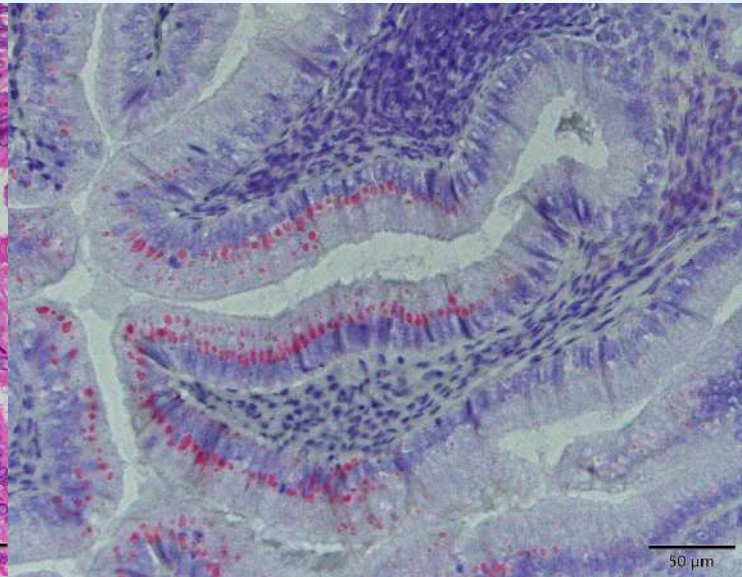
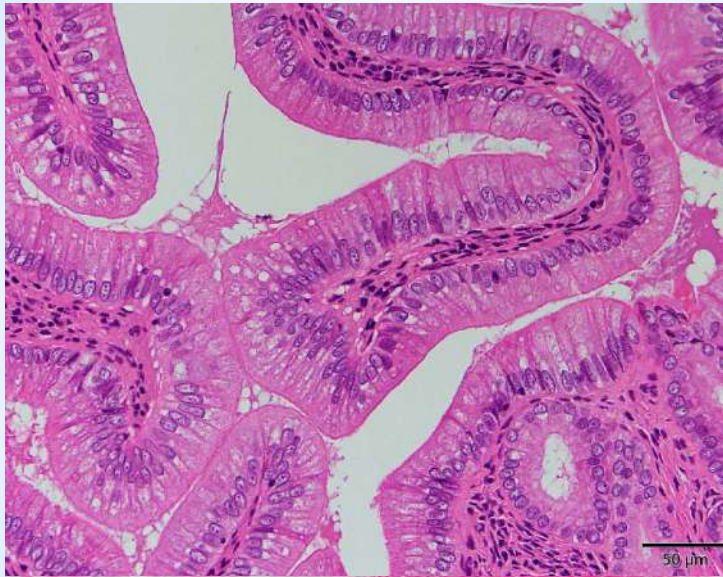
イヌの肝臓（小葉間胆管）

HE	オル赤
ズダン黒	ナイル青



イヌの十二指腸総胆管

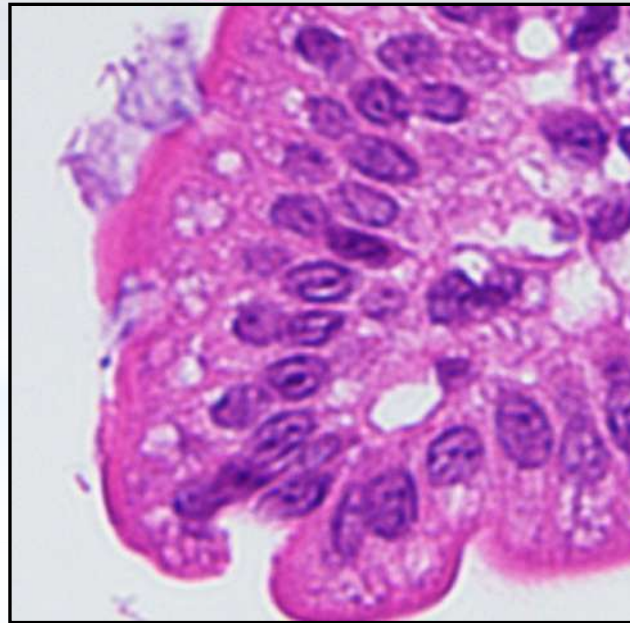
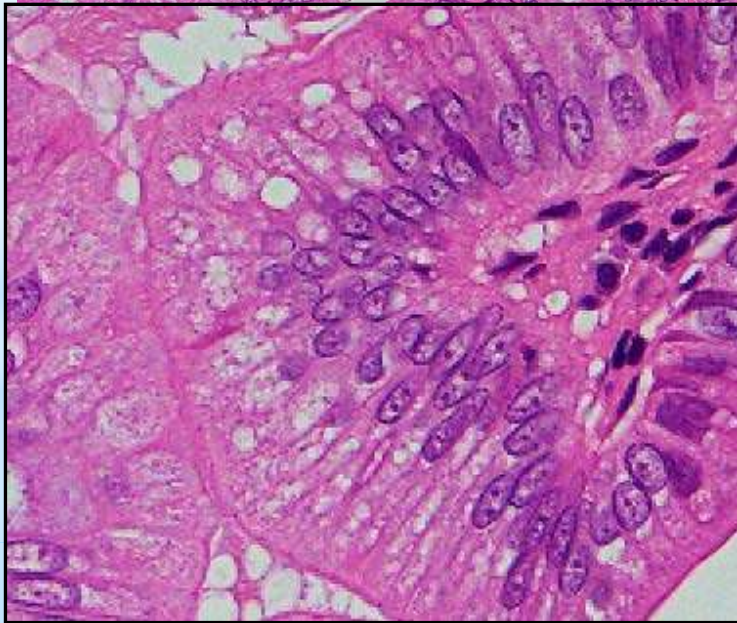
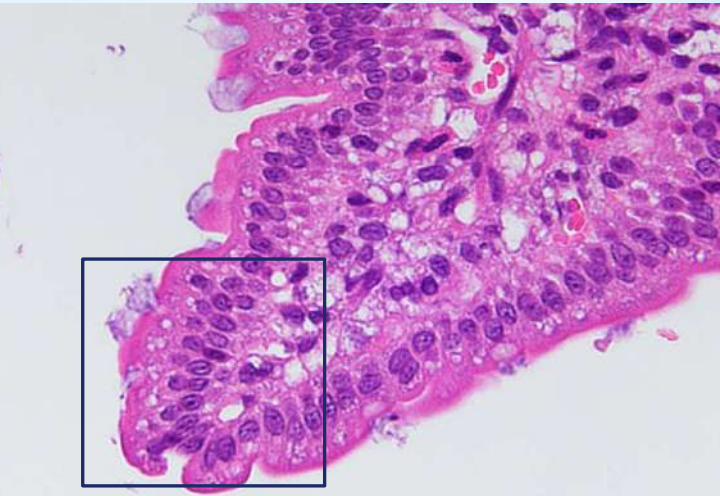
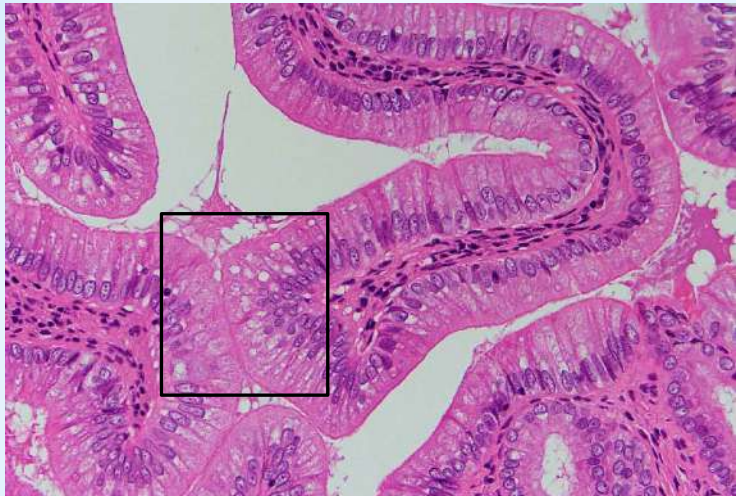
HE	オイル赤
スダン黒	ナイル青



十二指腸

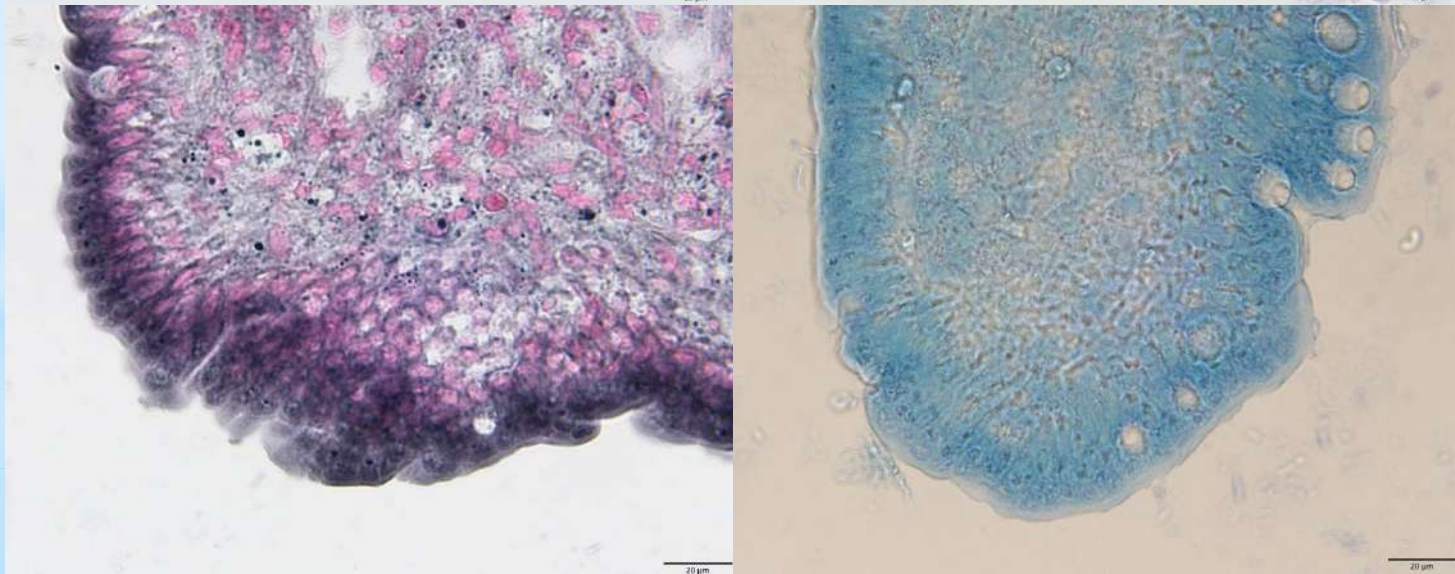
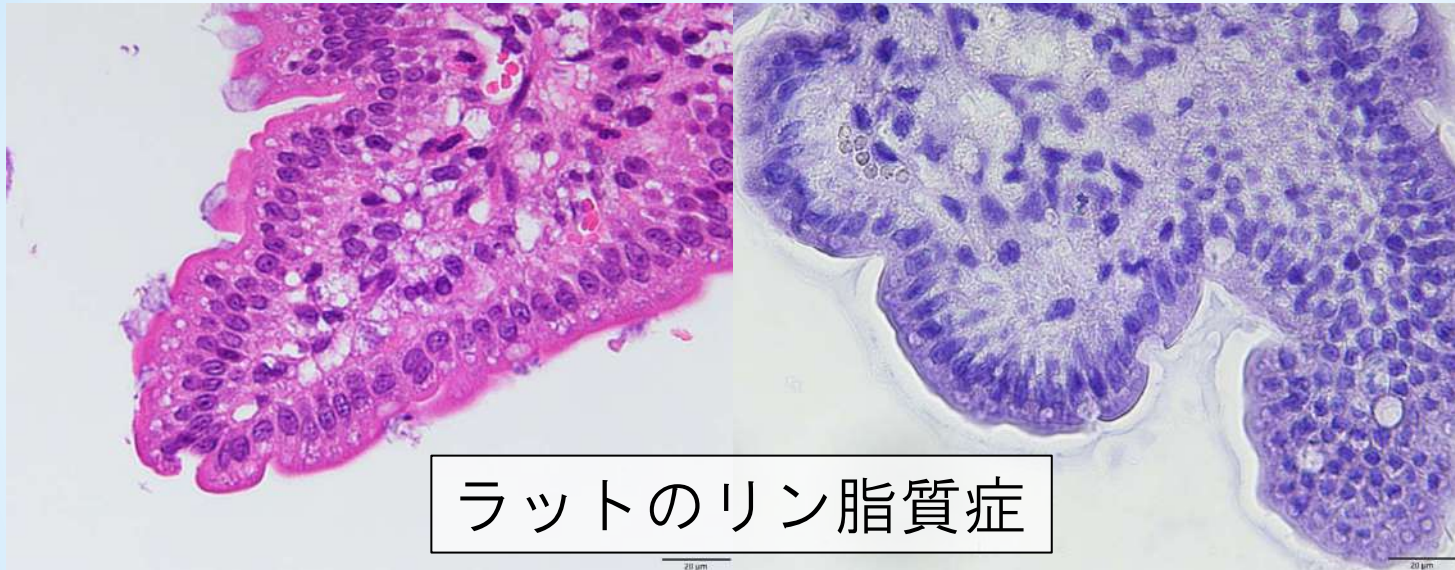
イヌHE

ラットHE

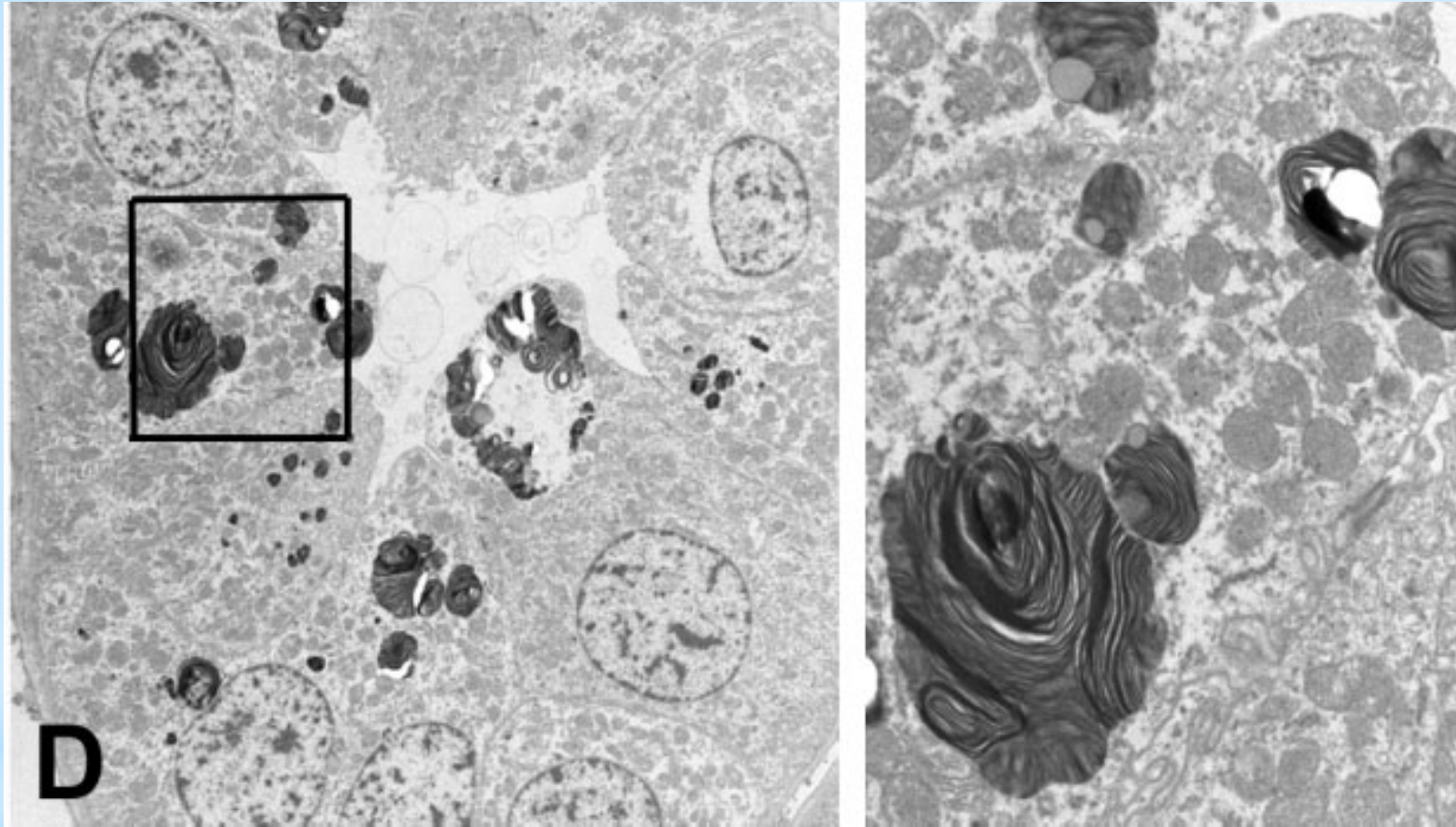


ラットの十二指腸

HE	オイル赤
ズダン黒	ナイル青



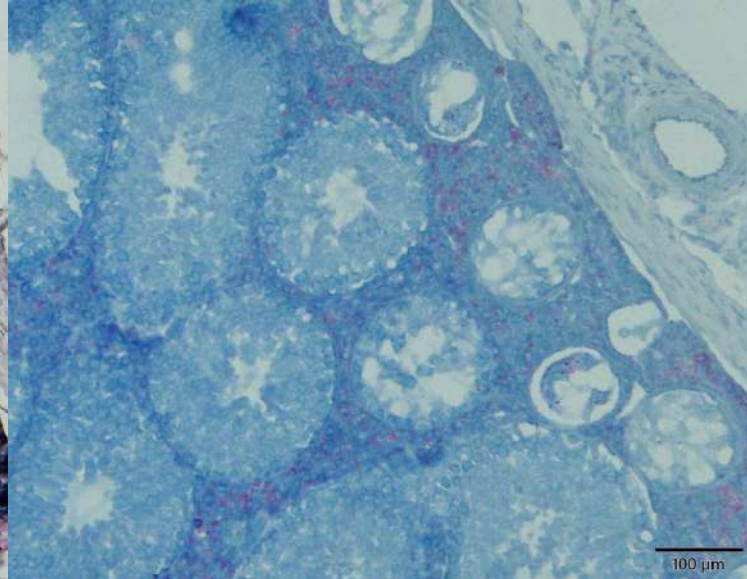
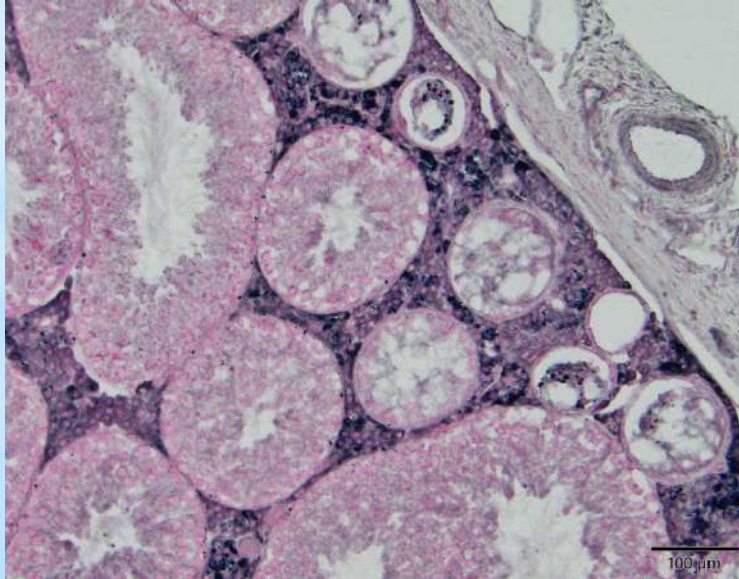
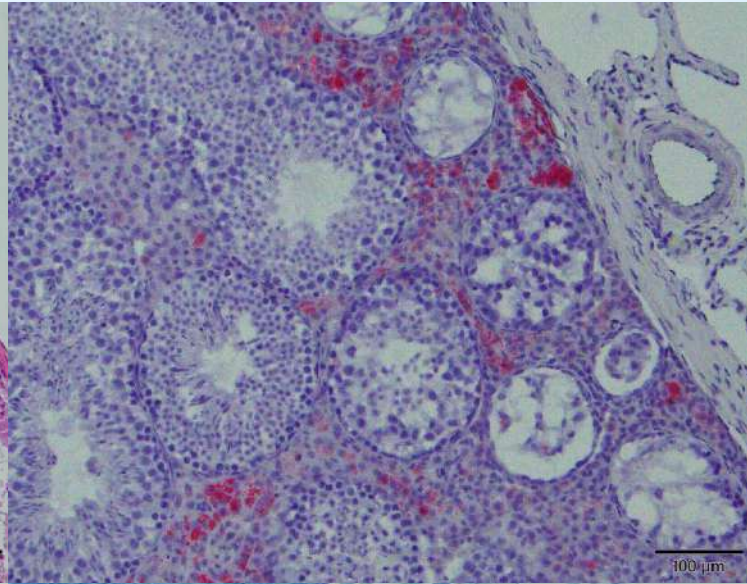
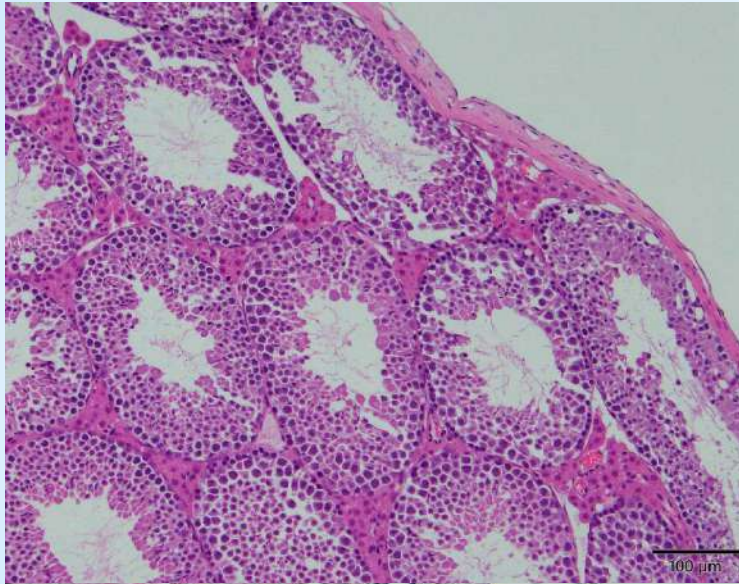
リン脂質症



リン脂質が細胞内に蓄積する。組織学的には空胞ないし泡沫状の細胞質を呈し、電顕ではミエリン様層状構造物が観察される。脂肪変性との鑑別が必要であるが、リン脂質症はオイルレッドO染色陰性で電顕的に写真のようなミエリン様層板構造物が観察される。薬剤起因性に生じるが先天性（リソソーム酵素の先天的欠損等）にも認められる。

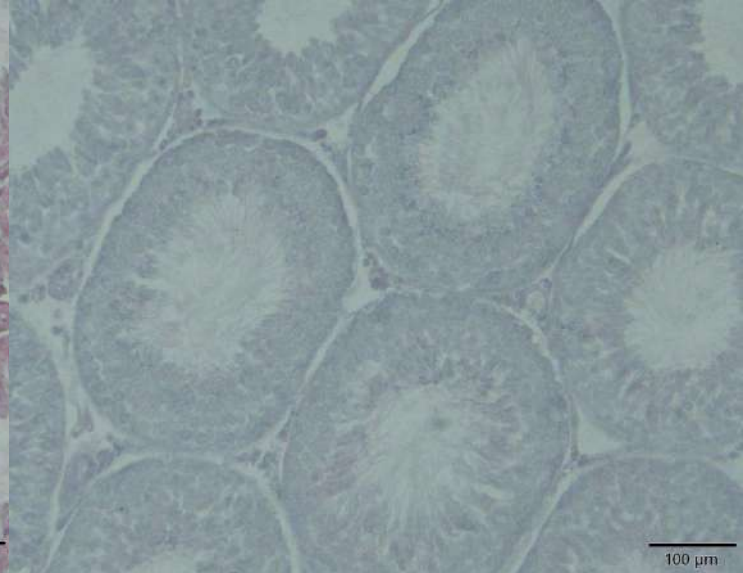
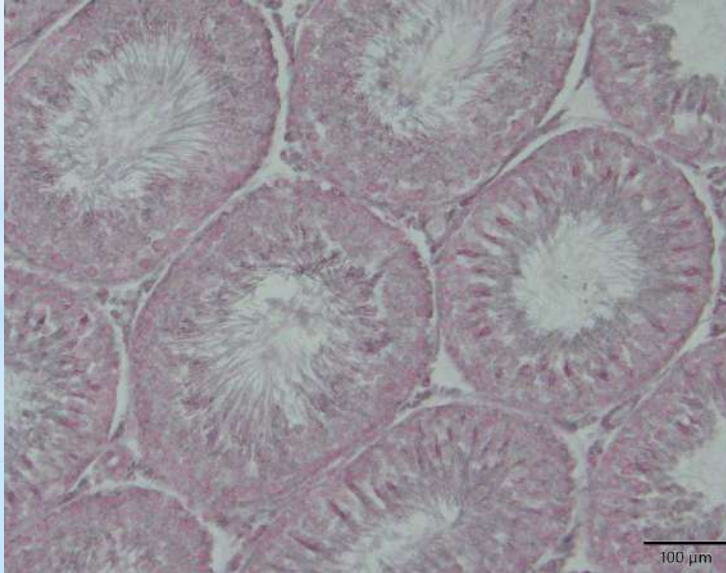
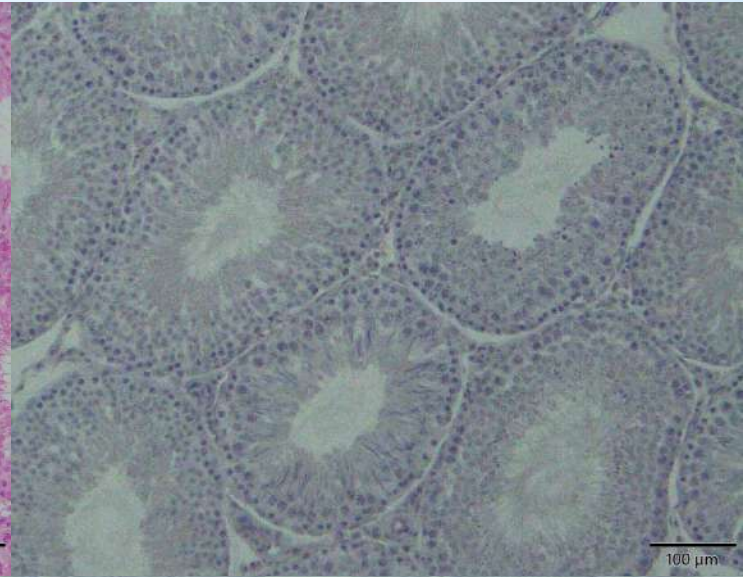
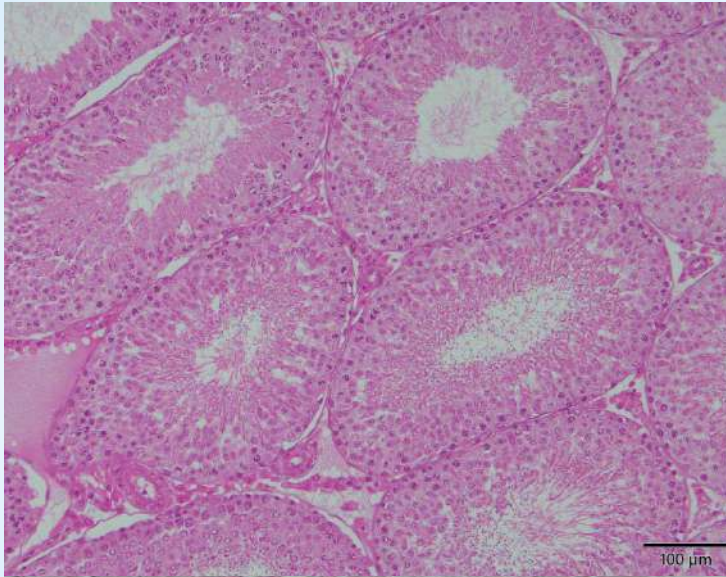
マウスの精巣

HE	オイル赤
スダソ黒	ナイル青



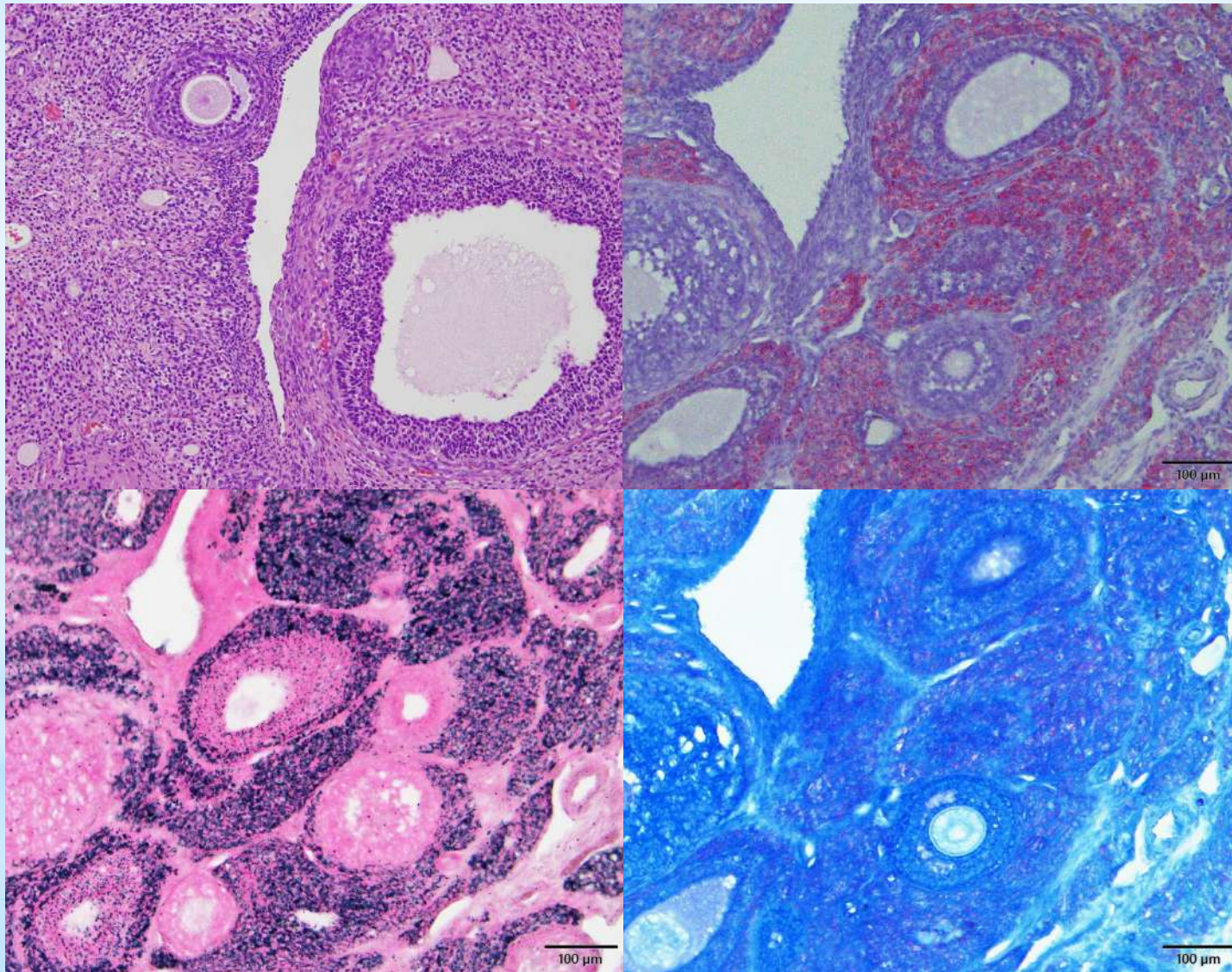
ラットの精巣

HE	オイル赤
スダソ黒	ナイル青



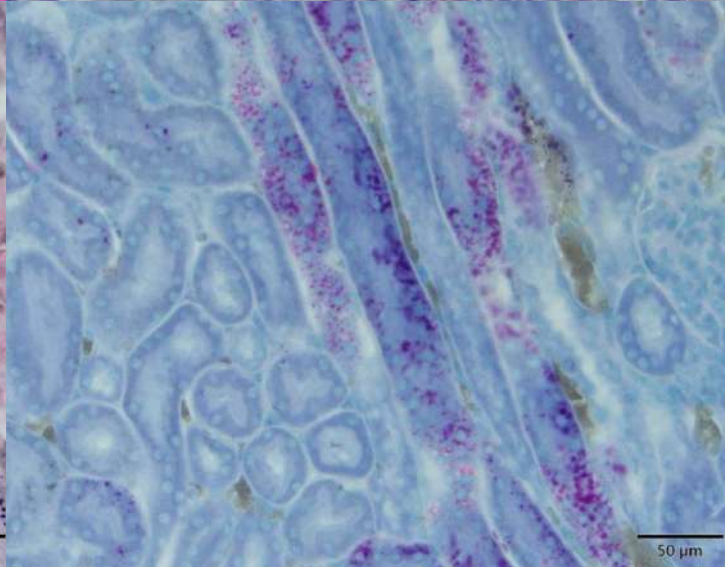
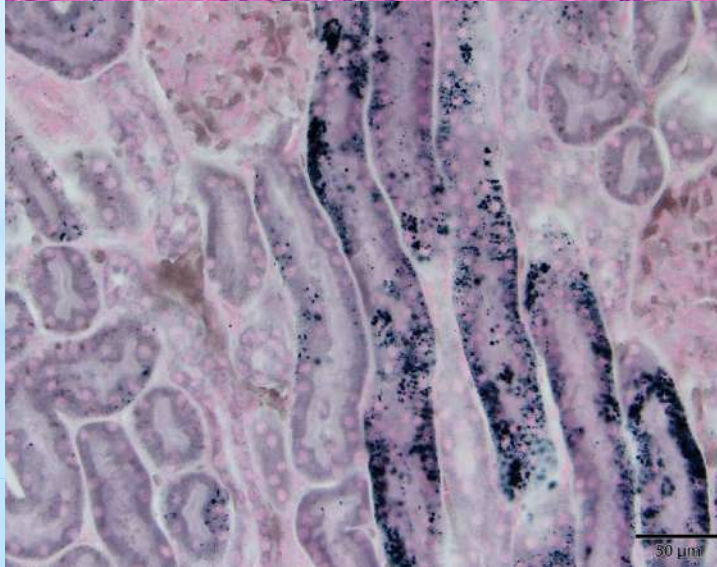
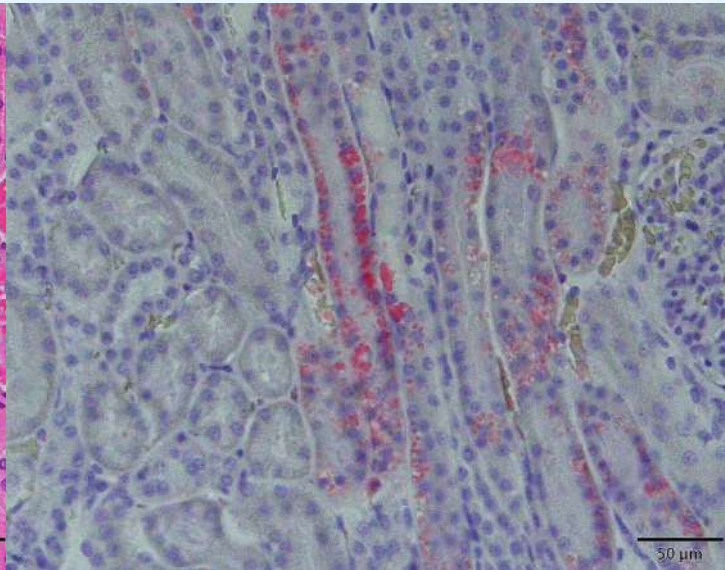
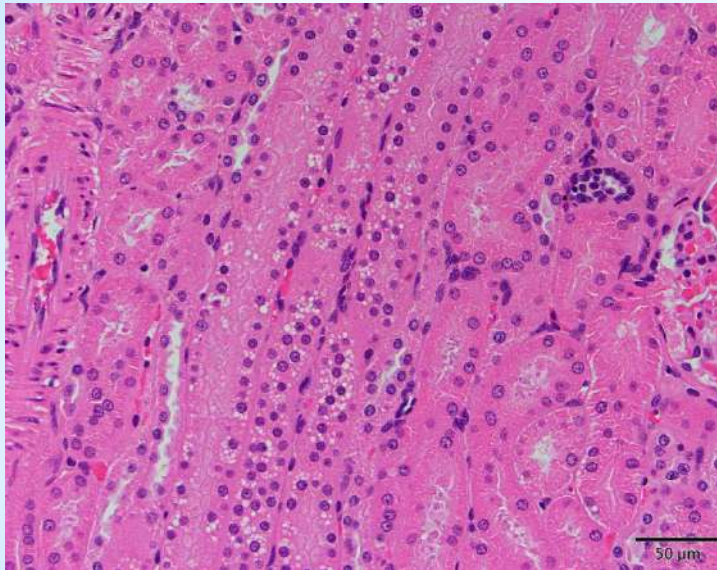
ラットの卵巢

HE	オイル赤
スダソ黒	ナイル青



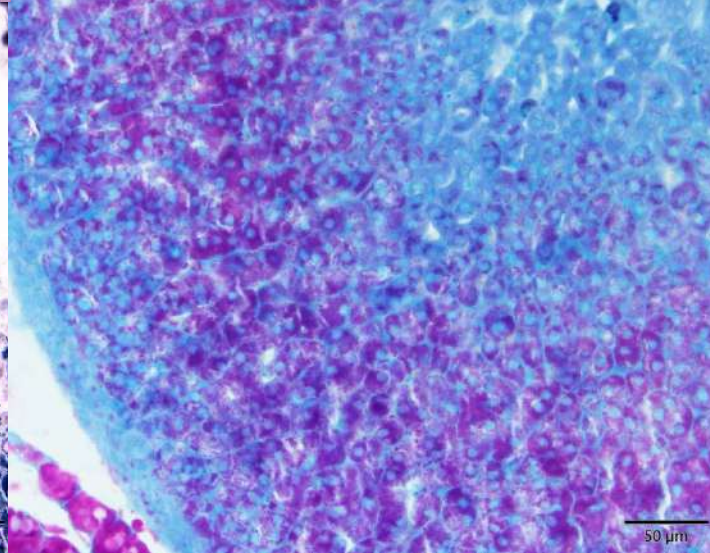
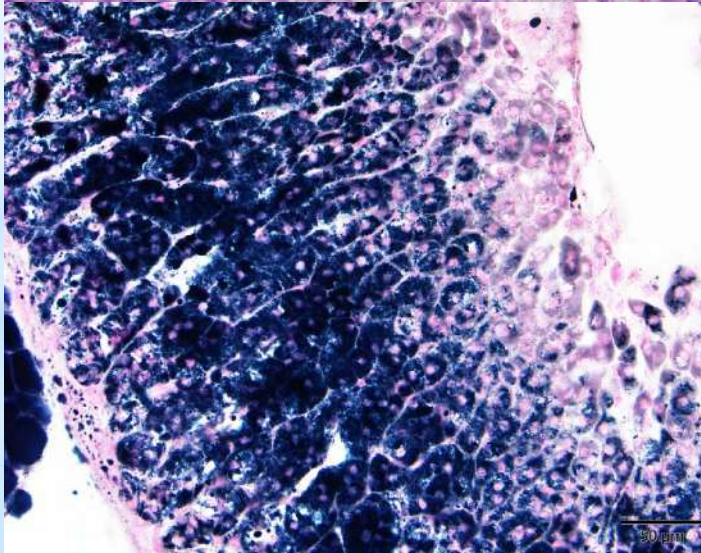
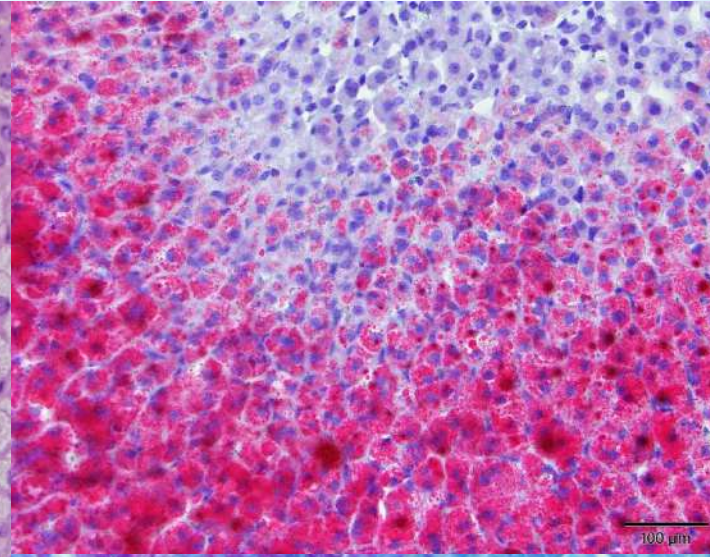
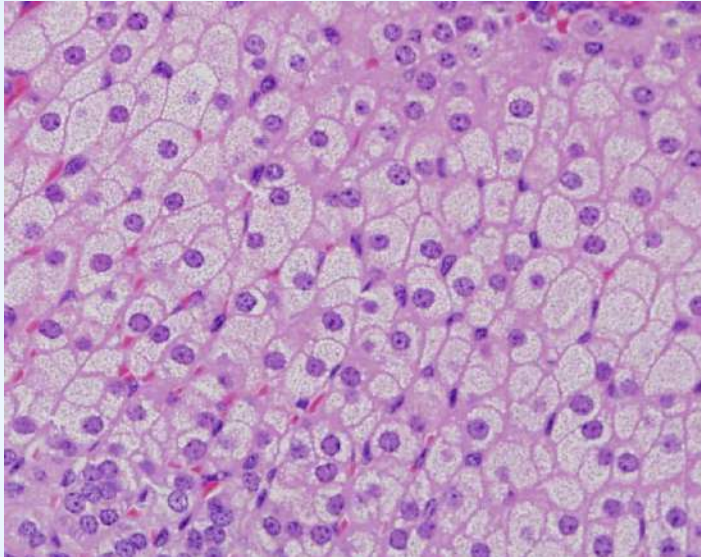
イヌの腎臓

HE	オイル赤
スダン黒	ナイル青



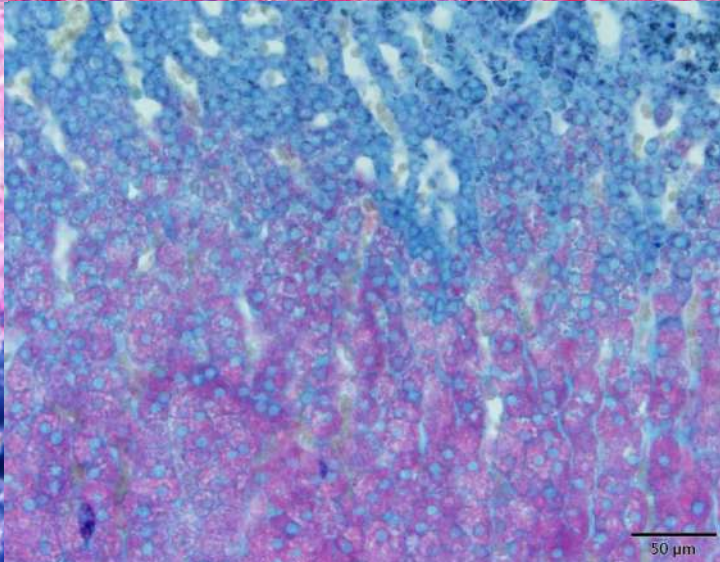
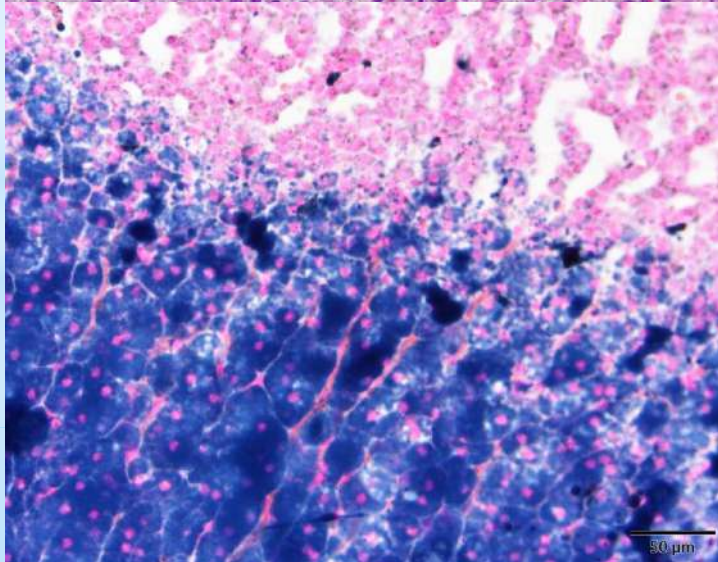
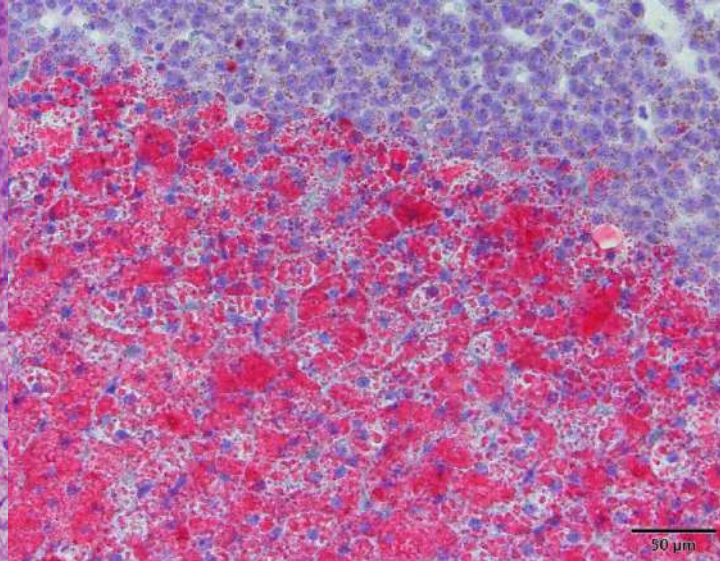
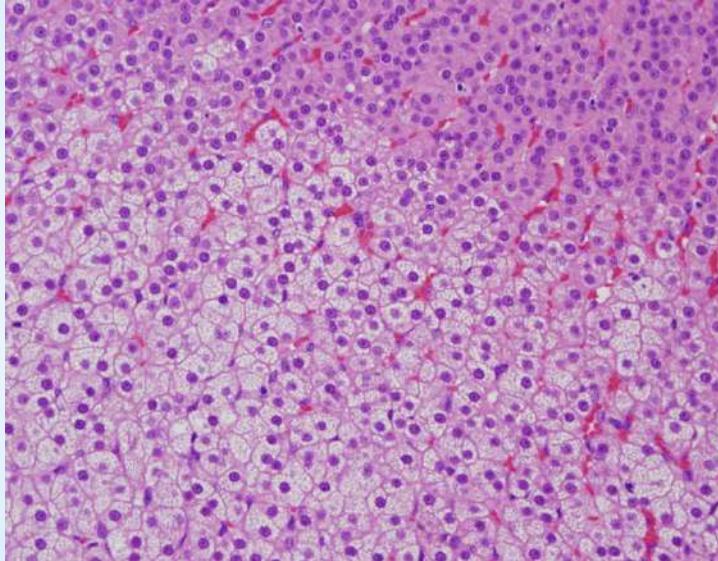
マウスの副腎

HE	オイル赤
スダン黒	ナイル青



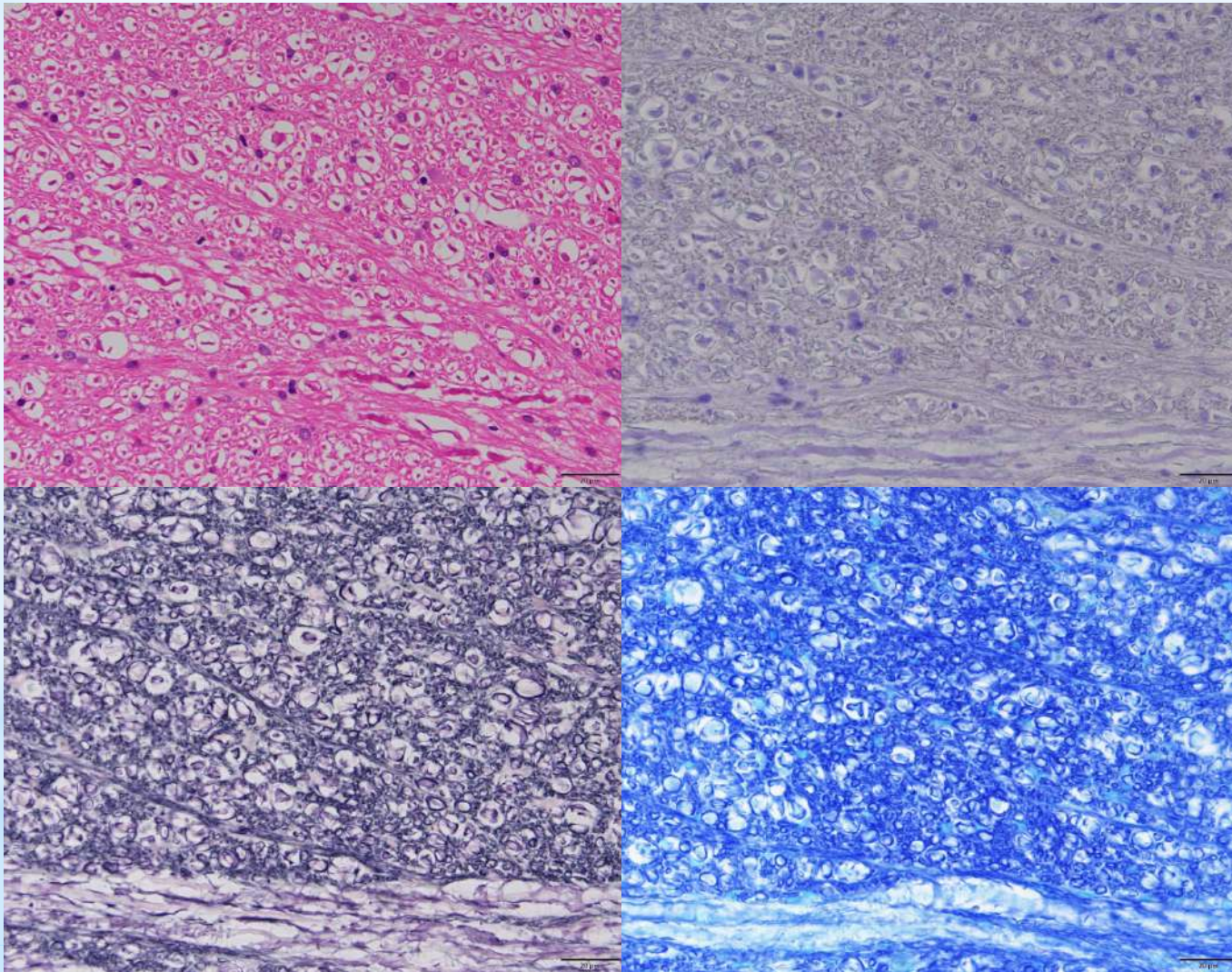
サルの副腎

HE	オイル赤
スダソ黒	ナイル青



イヌの脊髄

HE	オイル赤
スダン黒	ナイル青

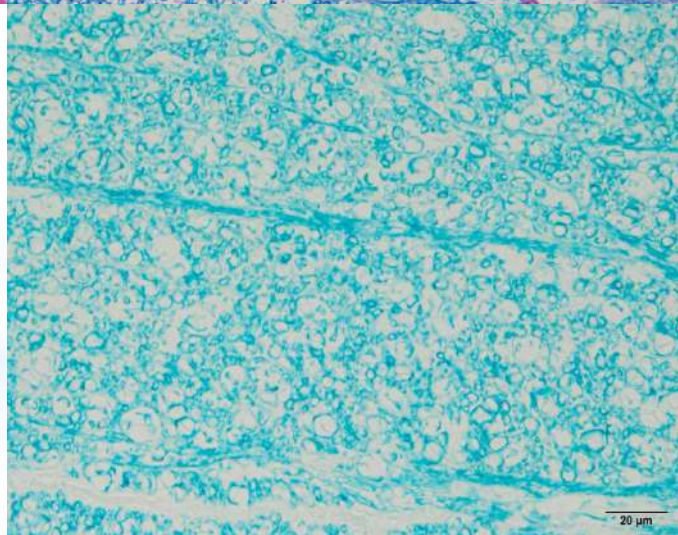
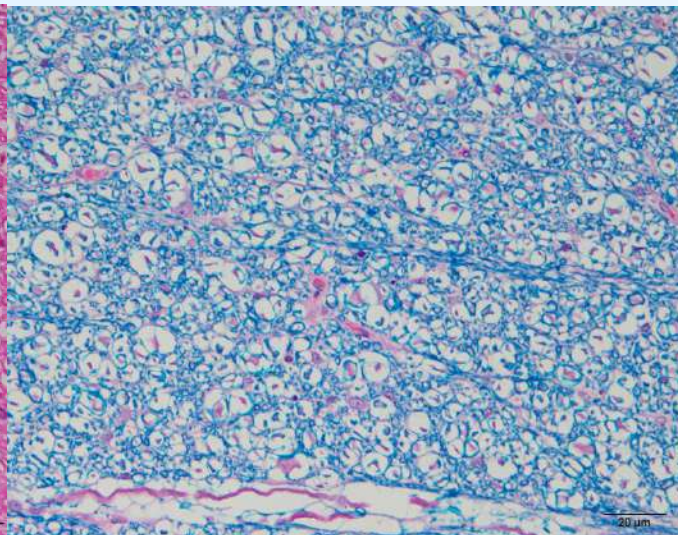
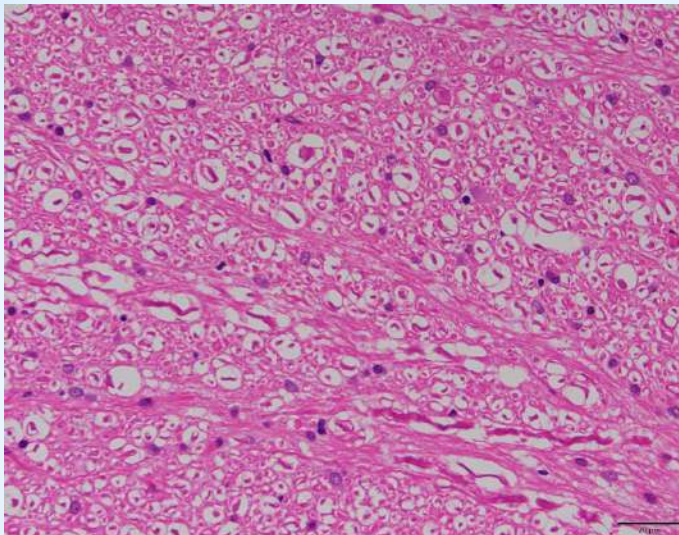


イヌの脊髄

HE

LFB-HE

LFB



脂肪染色を用いた研究

Case Report—

Glomerular Lipidosis Accompanied by Renal Tubular Oxalosis in Wild and Laboratory-Reared Japanese Rock Ptarmigans (*Lagopus mutus japonicus*)

Atsuko Murai,^A Mami Murakami,^A Hiroki Sakai,^A Hiroaki Shimizu,^B Koichi Murata,^C and Tokuma Yanai^{AD}

^ALaboratory of Veterinary Pathology, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan

^BOmachi Alpine Museum, Omachi-City, Nagano, Japan

^CLaboratory of Wildlife Management, Nihon University, Fujisawa, Japan

Received 12 April 2011; Accepted and published ahead of print 5 August 2011

野生および人工飼育の希少動物日本雷鳥における腎尿細管シュウ酸症を伴う糸球体リポドーシス

- ✓ 雷鳥は絶滅危惧種である
- ✓ 人工飼育を試みたがうまくいかない
- ✓ 死亡原因のほとんどはシュウ酸塩沈着を伴った糸球体腎症
- ✓ 本疾患の病理発生を調べるため死亡した野生動物と腎病変を比較検討した

人工飼育例

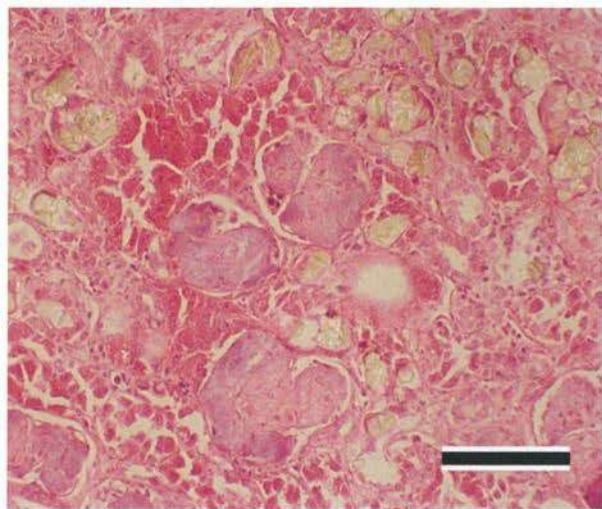


Fig. 1. Kidney section from laboratory-reared case, L2. Most of the glomeruli contained foamy vacuoles in the cytoplasm, and the tubules contained rosette-shaped crystals. H&E. Bar = 200 μ m.

糸球体を構成する細胞内には空胞が認められ、尿細管にはロゼット型の結晶が認められる。

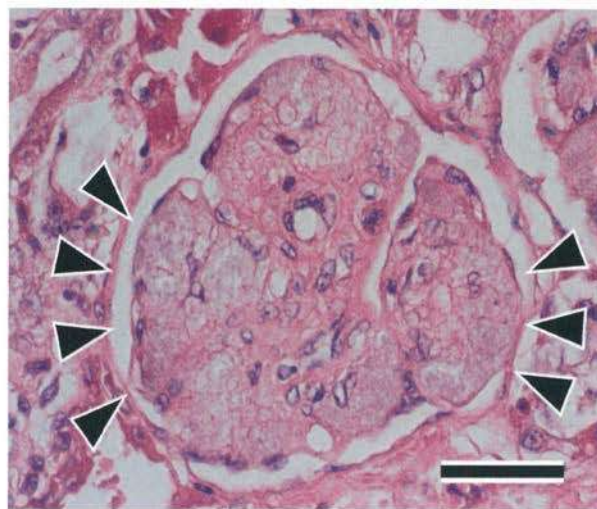


Fig. 3. Glomerulus section from laboratory-reared case, L2. This enlarged glomerulus was completely filled with lipid vacuoles and therefore classified as severe. It also exhibited calcification (arrows). H&E. Bar = 100 μ m.

左写真の高倍像。腫大した糸球体には脂肪滴が重度に充満していた。矢印は硬質沈着を示す。

野外例

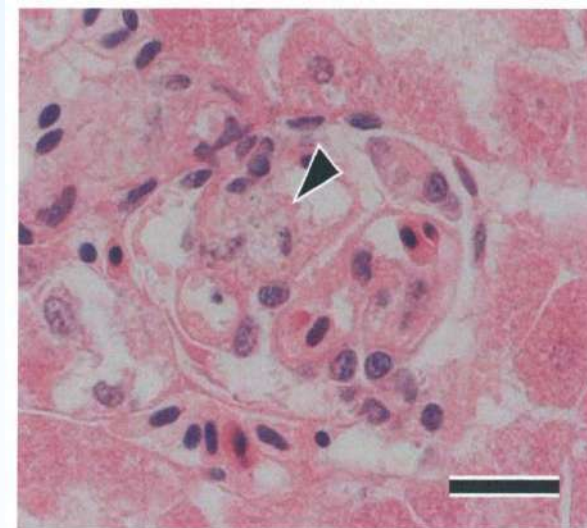
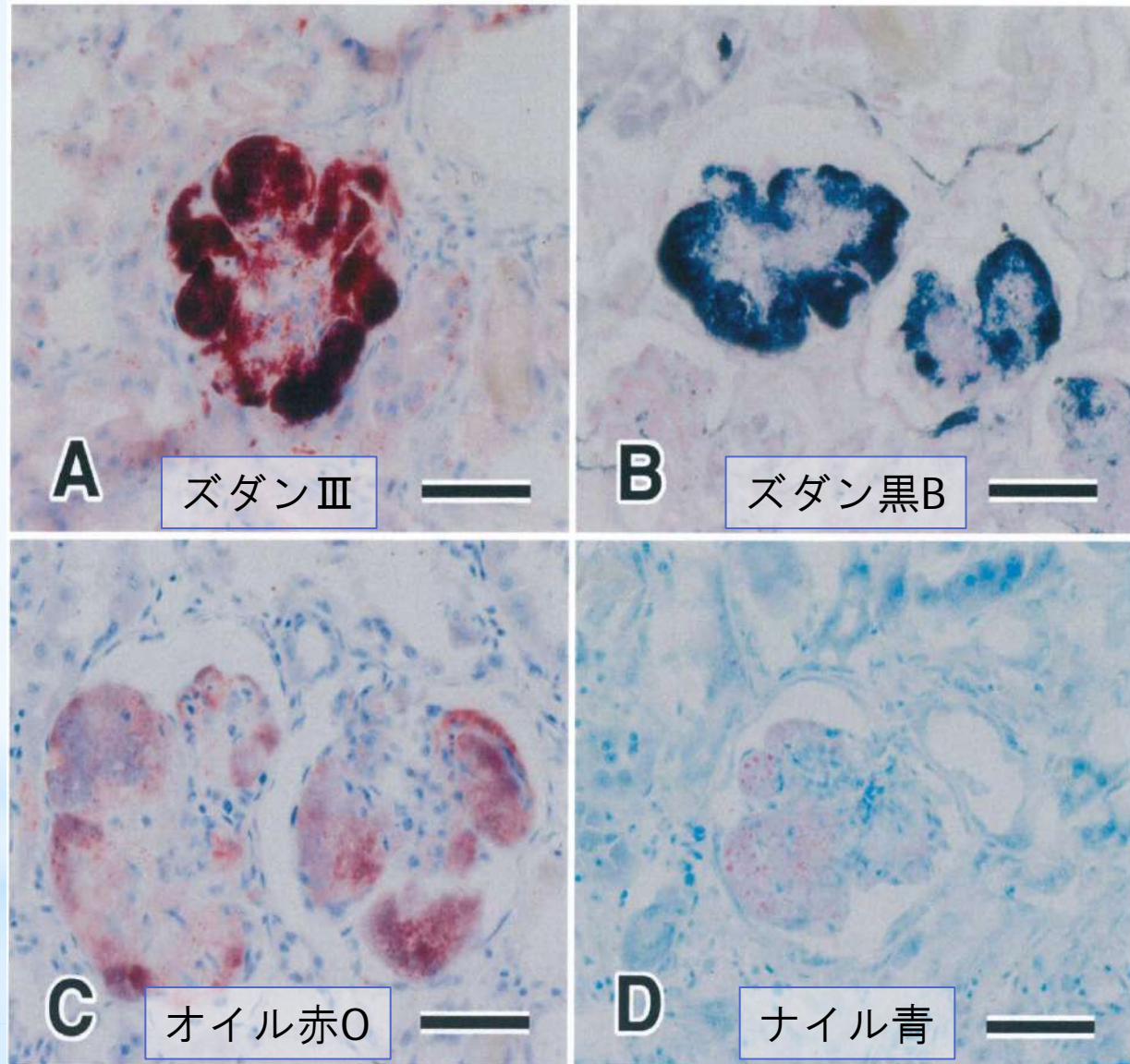


Fig. 2. Glomerulus section from wild case, W2. This glomerulus was classified as mild, and lipid vacuoles were concentrated in the mesangial area of the glomerulus (arrow). H&E. Bar = 30 μ m.

糸球体のメサンジウム細胞領域には脂肪滴が中等度に認められた（矢印）。

人工飼育例



糸球体の空胞はズダンⅢ，ズダン黒B，オイル赤O，ナイル青染色のいずれにも陽性を示し，中性脂肪であることが明らかとなった。

結 論

- ✓ 腎糸球体の空胞は中性脂肪が沈着する糸球体リピドーシスであった。
- ✓ 人工飼育例は糸球体リピドーシスが重度で，そのような症例は尿細管シュウ酸症の罹患率が高く，病変も重度であった。
- ✓ 人工飼育例の死因は腎病変が原因であると考えられた。
- ✓ 糸球体リピドーシスと腎尿細管シュウ酸症との関連性は不明である。

Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease

Annika Mehlem, Carolina E Hagberg, Lars Muhl, Ulf Eriksson & Annelie Falkevall

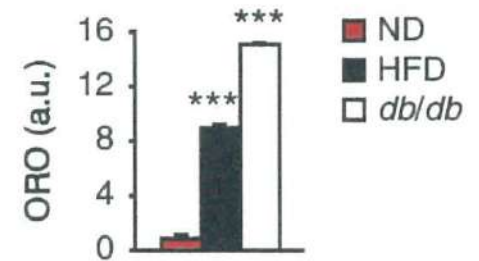
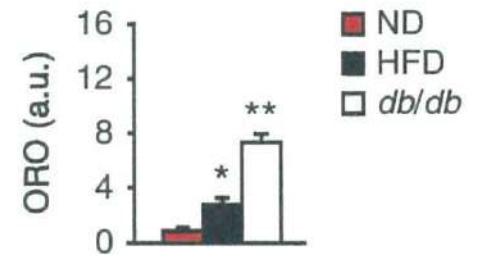
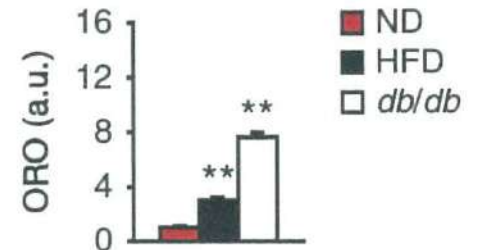
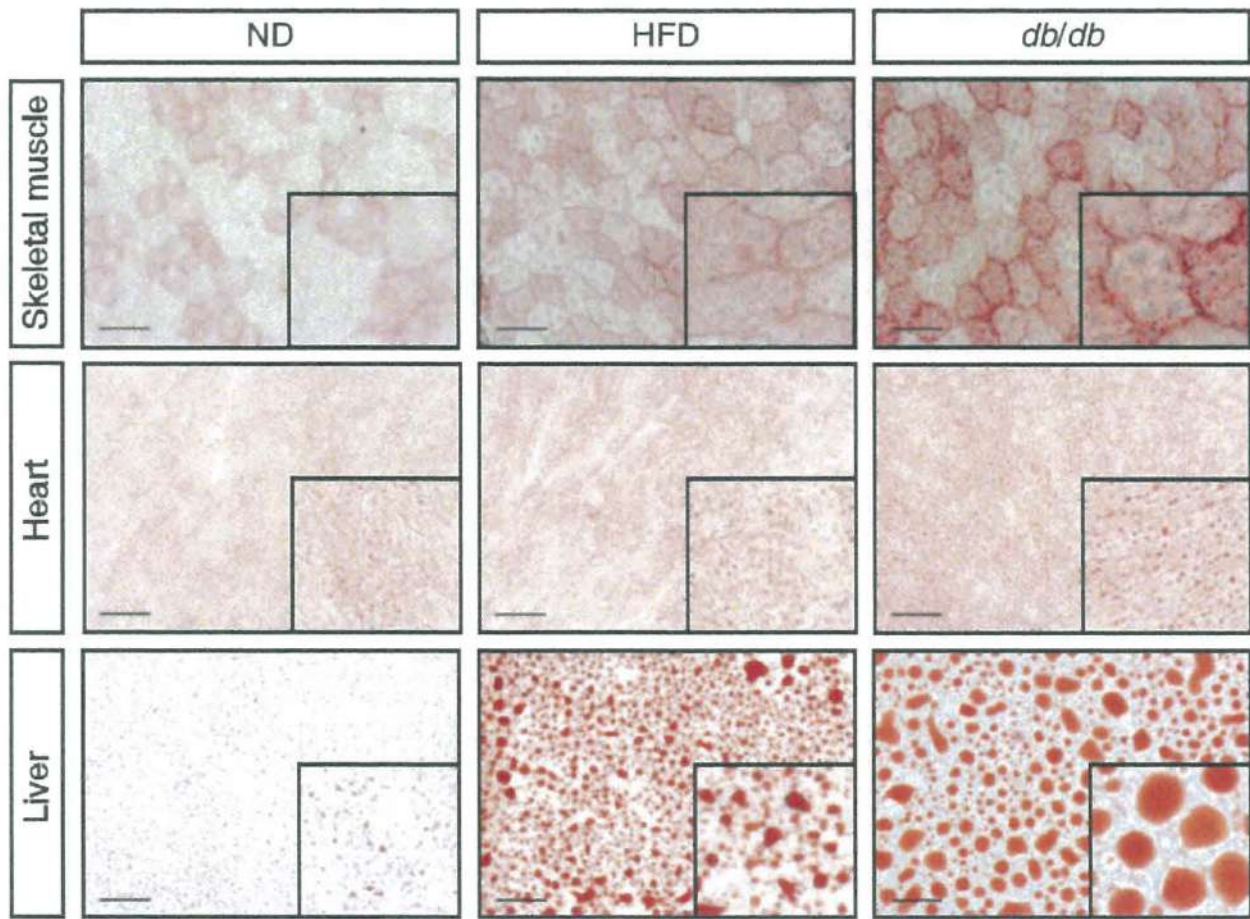
Tissue Biology Group, Division of Vascular Biology, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden. Correspondence should be addressed to A.F. (annelie.falkevall@ki.se).

Published online 23 May 2013; doi:10.1038/nprot.2013.055

NATURE PROTOCOLS | VOL.8 NO.6 | 2013 | 1149

健康時と疾患時における代謝状況を解析するためにオイル赤O染色により中性脂肪を画像化した

- ✓ 組織への脂肪の蓄積（肥満）は多くの代謝性疾患（高血圧，高脂血症，2型糖尿病）を解析するうえでカギとなる。
- ✓ よって，組織内外の脂肪組織を画像化し，解析することは，代謝性疾患を理解，評価するために重要である。
- ✓ 筆者らは凍結標本から作製したオイル赤O染色標本から中性脂肪と脂肪滴の形態像を比較，検討した。
- ✓ 食餌性に誘発されたマウスと遺伝的糖尿病マウスの骨格筋内，心筋内，肝臓内に蓄積された脂肪組織を評価した



ND: 正常給餌

HFD: 高脂肪食

db/db: 肥満と2型糖尿病の遺伝的モデルマウス

結 論

- ✓ オイル赤O染色を用いた画像解析の結果，高脂肪食給餌と遺伝的モデルマウスは肝臓，骨格筋内脂肪の蓄積が3～9倍も正常給餌例と比較して増加していた。
- ✓ 骨格筋内の脂肪の蓄積は全てのタイプの骨格筋において筋細胞膜周囲にみとめられた。
- ✓ 心筋，肝細胞では脂肪滴の大きさもサイズも増加していた。
- ✓ 以上より，オイル赤O染色は代謝性疾患の進展状況を知る上の可視化ツールとして有効であることが分った。

お世話になった方々

(株) LSIメディアエンス熊本研究所

渡辺秀幸

河上明美

涌生ゆみ

(株) LSIメディアエンス鹿島研究所

標本作製チームの皆さん

ご清聴ありがとうございました