

愛知県臨床検査標準化協議会推奨方法（1） グロコット染色改訂版

グロコット染色は多種の真菌の菌壁を黒色に染色し、放線菌やノカルジア、ムコール菌など染まりにくいとされる真菌にも適する染色であり、診断上重要な染色である。クロム酸で真菌の細胞壁に含まれる多糖類を酸化し、遊離したアルデヒド基にメセナミン銀を反応させ菌体を染色する。

コントラストをつけるため 4～6 ミクロンの少し厚めの切片での標本作製が推奨される。

推奨染色法

- | | | | | |
|-----|----------------|-----|--------|-----|
| 1. | 脱パラフィン・水洗 | | | |
| 2. | 5%クロム酸水溶液 | ・・・ | 60分 | 注1) |
| 3. | 水洗 | ・・・ | 3分 | |
| 4. | 1%重亜硫酸ナトリウム水溶液 | ・・・ | 1分 | |
| 5. | 精製水 | ・・・ | 10分 | |
| 6. | メセナミン銀染色液 60℃ | ・・・ | 60～70分 | 注2) |
| 7. | 精製水 | | | 注3) |
| 8. | 0.2%塩化金酸水溶液 | ・・・ | 5分 | |
| 9. | 精製水 | | | |
| 10. | 2%チオ硫酸ナトリウム水溶液 | ・・・ | 2分 | |
| 11. | 水洗 | | | |
| 12. | ライトグリーン染色液 | ・・・ | 1分 | |
| 13. | 水洗 | | | 注4) |
| 14. | 脱水・透徹・封入 | | | |

染色液および試薬の調製

【5%クロム酸水溶液】

- ・無水クロム酸 ・・・ 5 g
- ・精製水 ・・・ 100 mL

【0.2%塩化金酸水溶液】

- ・塩化金酸 ・・・ 0.2 g
- ・精製水 ・・・ 100 mL

【メセナミン銀染色液】（使用時調整）※1

- ・3%メセナミン水溶液 ・・・ 25 mL
- ・5%硝酸銀水溶液 ・・・ 1.25 mL
- ・精製水 ・・・ 25 mL
- ・5%ホウ砂水溶液 ・・・ 2 mL
- ・1%ゼラチン水溶液 ※2 ・・・ 0.5 mL 注5)

【1%重亜硫酸ナトリウム水溶液】

- ・重亜硫酸ナトリウム ・・・ 1 g
- ・精製水 ・・・ 100 mL

【2%チオ硫酸ナトリウム水溶液】

- ・チオ硫酸ナトリウム ・・・ 2 g
- ・精製水 ・・・ 100 mL

【ライトグリーン染色液】※3

- ・ライトグリーン S.F. ・・・ 0.5 g
- ・酢酸 ・・・ 0.2 mL
- ・精製水 ・・・ 100 mL

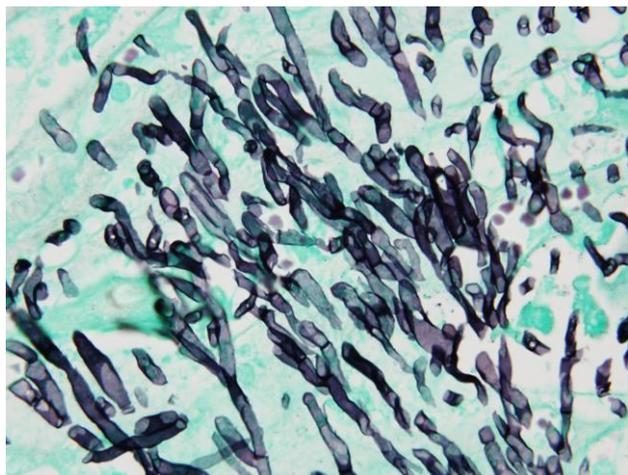
※1 3%メセナミン水溶液に5%硝酸銀水溶液を添加(添加直後の液は白濁するが、混合すると透明になる注6)。次に精製水と5%ホウ砂水溶液を加え混合する。最後に1%ゼラチン水溶液を加え使用液とする。調整された混合液は無色透明である。

※2 加温しないと溶けない。

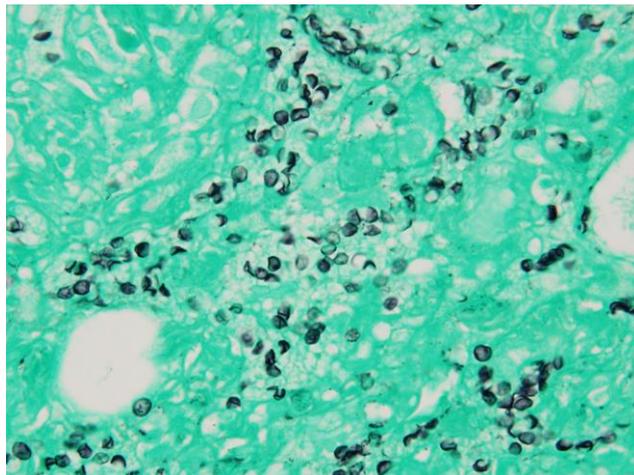
※3 精製水にライトグリーン S.F.を溶解し、酢酸を加える。

染色結果

真菌の菌壁、イロベチー：黒色
背景：淡い緑色



アスペルギルス 対物×100



イロベチー 対物×100

- 注1) 本処理による酸化が不十分であると背景の共染が強く、過酸化では生じたアルデヒド基がカルボン酸基まで酸化が進むため、菌体のメセナミン銀との反応が低下し真菌の染色性が落ちる。また、クロム酸は毒性が強いため廃液の処理が必要である。
- 注2) 切片を入れてからおよそ 20 分後に取り出し、切片に付着した気泡を取ることで染色ムラを防止する。途中、顕微鏡で十分に菌壁が黒色に染まっていることを確認する。チオ硫酸ナトリウムで定着するとかなり脱色されるため、真菌が十分に黒色に染まり結合織がわずかに染色された時点で反応停止するとよい。(右写真)
染色液を事前加温した場合は、反応時間が短縮できる。
染色液には銀を含むため、廃液の処理が必要である。
- 注3) 本処理により次工程の塩化金酸液は汚れず沈殿物もほとんど認められない。そのため繰り返し使用することが可能となる。
- 注4) 水洗は余分な色素が落ちる程度で良い。
- 注5) ゼラチンには、銀イオン同士の間でゼラチン蛋白が入り込むことにより、一度に多くの銀イオンが連鎖反的に還元されて起こる非特異的染色を抑制する効果、またスライドガラス上への銀粒子の沈着を抑制する効果がある。
アルブミンでも同様の効果が得られるが、反応に時間がかかる、高濃度では染まらなくなるなど注意が必要である。
- 注6) メセナミン銀原液(3%メセナミン水溶液と 5%硝酸銀水溶液の混合液)は、冷蔵庫で保存すれば数か月間使用する事も可能である。



参考文献

- 1) 三浦妙太、ほか：実践 病理組織細胞診染色法カラー図鑑 第三版。東京：近代出版；2008。123-127

【発行者】

愛知県臨床検査標準化協議会 (AicCLS)

病理検査部門

【問い合わせ先】 〒450-0002 名古屋市名東区名駅五丁目 16 番 17 号 花車ビル南館 1 階

公益社団法人 愛知県臨床検査技師会事務所内 愛知県臨床検査標準化協議会事務局

Tel 052-581-1013

Fax 052-586-5680

2016.10. Ver.1

Aichi Committee for Clinical Laboratory Standardization