

組織反応陽性荷電鉄コロイドのプロテイン銀と 塩化金による現像

岡山大学医学部解剖学第二講座 (主任: 村上宅郎教授)

村上 宅郎, 蘇 衛東, 洪 珞珈, 朴 大勲
大塚 愛二

健照会セオ病院 (院長: 瀬尾憲治博士)

瀬 尾 憲 治

(平成9年8月11日受理)

Key words : Cationic iron colloid, physical development, Prussian blue reaction, protein silver, gold chloride, Bodian's silver impregnation

緒 言

陽性荷電鉄コロイドで染色した試料は、一般にフェロシアン化カリウムと塩酸で処理し、組織と反応した鉄コロイドを Prussian blue 反応として検出している¹⁾。しかし、鉄コロイドと組織との反応が弱い場合には Prussian blue 反応も弱く、染色結果の判定に苦しむことがある²⁾。本稿はこれを補うためのプロテイン銀と塩化金による現像法を紹介する。

材 料 と 方 法

0.1Mカコジル酸緩衝4%パラホルムアルデヒド液 (pH 7.2) で灌流固定した ICR マウスの脳のパラフィン包埋標本³⁾から10~15 μ mの厚さの切片を作製し、塩化鉄をヒドラジンヒドレートとカコジル酸と共に煮沸することによって調製した微細陽性荷電鉄コロイド (pH 1.5) で処理した²⁾。

この切片を1%プロテイン銀 (Albumosesilber, Merck) 水溶液に3~4時間浸した後に蒸留水で1~2分間洗った。次に、同切片を1%塩化金水溶液に20~30分浸し、蒸留水で10~15分洗った後に1%ハイドロキノン・5%ホルマリン

混合水溶液で10分間還元し、蒸留水で充分洗った。後染色は省略した。

鉄コロイド処理した切片の一部は、プロテイン銀や塩化金による現像をおこなわず、従来の方法で Prussian blue 反応を行い nuclear fast red で後染色した^{1,2)}。

以上の切片はすべてバルサムで透徹して光顕観察した。

結 果

脳には神経細胞を囲む陰性荷電硫酸化プロテオグリカン (perineuronal sulfated proteoglycans) があり陽性荷電鉄コロイドによく反応する^{3~5)}。以下このプロテオグリカンの所見について述べる。

大脳皮質と小脳核のプロテオグリカンの鉄コロイド反応は従来の Prussian blue 反応で明瞭に観察できた (Fig. 1A)。プロテイン銀と塩化金処理による現像でこれらのプロテオグリカンは一層明瞭に観察でき、その網目構造も明らかに観察できた (Fig. 1B)。

小脳皮質 (小脳糸球) と海馬 (Fasciola cinerea) の鉄コロイド反応は Prussian blue 反応では非常に微弱であったが (Figs. 2A, 2A Inset),

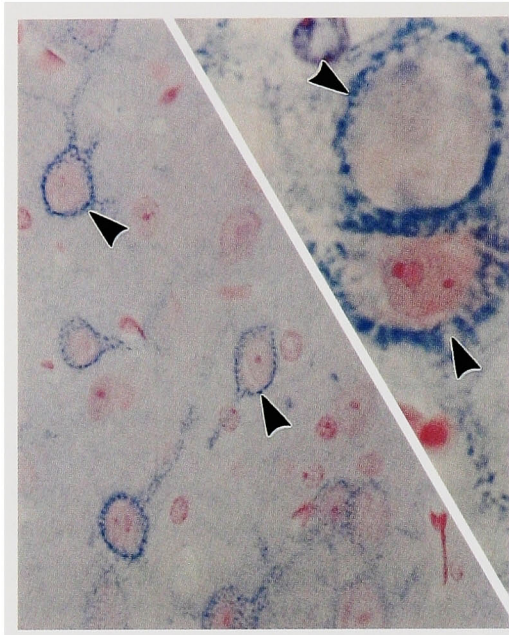


Fig. 1A

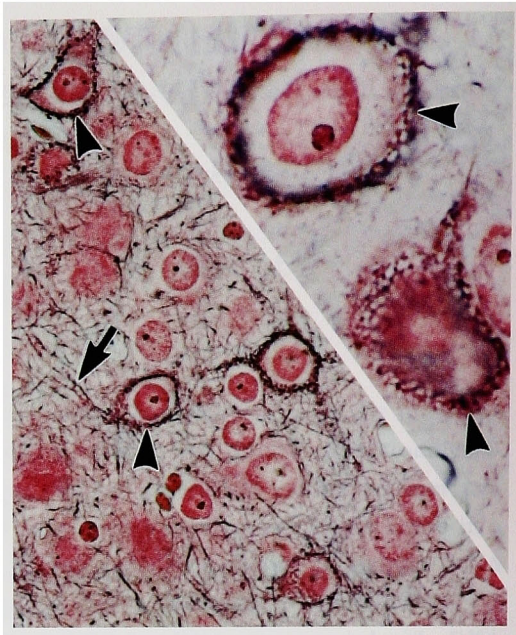


Fig. 1B

Fig. 1A and Inset. Sections from the rat cerebral cortex, which were stained with cationic iron colloid (pH 1.5), treated with potassium ferrocyanide and HCl for Prussian blue reaction and counter-stained with nuclear fast red. Some neurons possess marked perineuronal sulfated proteoglycans detectable with Prussian blue reaction after the cationic iron colloid staining (arrowheads). $\times 250$, Inset : $\times 800$.

Fig. 1B and Inset. Sections from the rat cerebral cortex, which were stained with cationic iron colloid (pH 1.5), and treated with protein silver and gold chloride for physical development. Perineuronal sulfated proteoglycans are clearly and sharply demonstrable by the physical development (arrowheads). $\times 250$, Inset : $\times 800$.

プロテイン銀と塩化金による現像で明瞭かつ高いコントラストで観察することができた (Figs. 2B, 2B Inset).

大脳皮質、小脳皮質、海馬台でプロテイン銀と塩化金による現像で神経線維とくに細い線維が明瞭に可視化された (Figs. 1B, 2B, 2B Inset). Prussian blue 反応では、このような神経線維の明瞭な観察はできなかった (Figs. 1A, 1A Inset, 2B, 2B Inset).

神経膠細胞、血管内皮や他の細胞は陽性荷電鉄コロイド (pH 1.5) とこれにつづく Prussian blue 処理あるいはプロテイン銀と塩化金現像処理に反応しなかった。

考 察

本研究は陽性荷電鉄コロイドで染色した標本をプロテイン銀と塩化金で現像すると、従来の Prussian blue 反応より一層強いコントラストで、組織と結合した鉄コロイドを明瞭に可視化できることを示した。この現像法はすでに知られており、山田とその共同研究者は、陽性荷電物質であるジアミンとチオカルボヒドラジドで処理した脾臓の標本をプロテイン銀と塩化金で現像して、血管内皮表面の陰性荷電基に結合したジアミンとチオカルボヒドラジドを現像可視化している⁶⁾。

本研究の鉄コロイド処理を省略した予備的実験では、プロテイン銀と塩化金による処理のみ

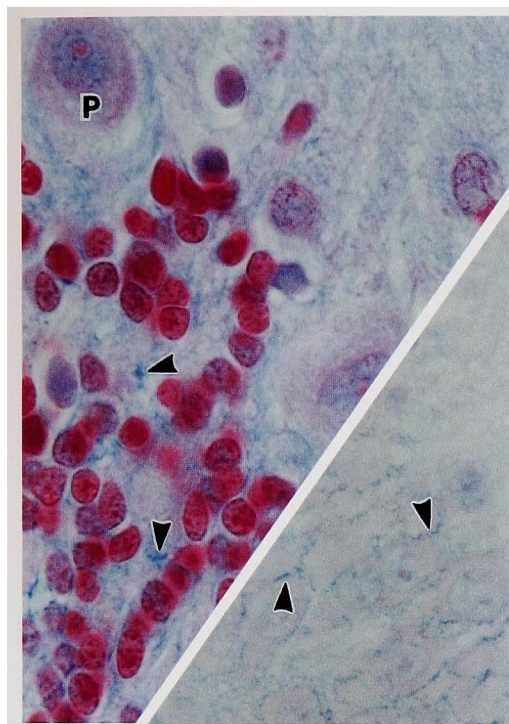


Fig. 2A

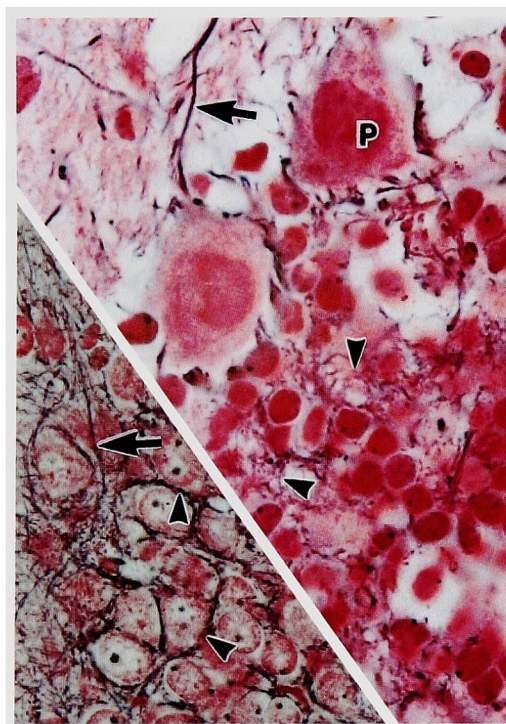


Fig. 2B

Fig. 2A and Inset. Sections from the rat cerebellar cortex (A) and hippocampal fasciola cinereum (Inset), stained with cationic iron colloid (pH 1.5), treated with potassium ferrocyanide and HCl for Prussian blue reaction and counter-stained with nuclear fast red. Perineuronal sulfated proteoglycans are so thin that they show a slight Prussian blue reaction (arrowheads). P Purkinje cell. $\times 800$, Inset: $\times 450$.

Fig. 2B and Inset. Sections from the rat cerebellar cortex (B) and hippocampal fasciola cinereum, stained with cationic iron colloid (pH 1.5) and treated with protein silver and gold chloride. Perineuronal sulfated proteoglycans are clearly demonstrated by the physical development with protein silver and gold chloride. Arrow indicates some nerve fibers concomitantly stained or developed with protein silver. P Purkinje cell. $\times 800$, Inset: $\times 450$.

では perineuronal sulfated proteoglycans はもちろんのこと小脳皮質海馬のプロテオグリカン様網目構造は決して染色されなかった（未発表所見）。従って、本研究で示した陽性荷電鉄コロイドで処理した後のプロテイン銀と塩化金に対する陽性反応は同鉄コロイドの組織との反応（結合）を反映していることは明らかである。Prussian blue 反応では通常観察できない神経終末線維がプロテイン銀と塩化金による現像法で明瞭に可視化されたことも、同現像法が有用であることを示していると思われる。坐骨神経を構成する神経線維⁷⁾や脊髄の白質と髄質の神経線

維⁸⁾は陽性荷電鉄コロイド処理後に Prussian blue 反応を示す。もちろん、これらの線維もプロテイン銀と塩化金による現像処理に強く反応した（未発表所見）。

しかし、一方で本研究で用いた現像法は神経とくにその終末を特異的に染めるとされる Bodian 氏渡銀法と原理的に同じであり^{9,10)}、本研究で現像された神経終末は Bodian の渡銀効果を反映している可能性がある。事実、本研究の鉄コロイド処理を省略した予備の実験では、プロテイン銀と塩化金による現像処理のみで神経終末が軽度であるが染色された（未発表所見）。従って、

鉄コロイド処理—プロテイン銀・塩化金現像に対する神経線維終末の強い反応はプロテイン銀の現像効果に同銀の神経親和性（媒染効果）が重なったものと思われる。なお、プロテイン銀と塩化金による現像処理では、細胞核と核小体も媒染されるので、特に後染色を必要としない。

われわれの先の研究では、陰性荷電鉄コロイドで処理した小腸の Paneth 細胞の果粒は Prussian blue 反応に陽性であった¹¹⁾。一方、本研究の予備実験では、陰性荷電鉄コロイドで処理した小腸の Paneth 細胞の果粒はプロテイン銀と塩化金による現像に反応しなかった。また、同予備実験で、陰性荷電鉄コロイド処理を省いて直接プロテイン銀と塩化金処理を行ったところ、Paneth 細胞の果粒は見事に染色された（未発表所見）。これらの所見はプロテイン銀は陰性荷電物質であることを示していると考えられる。つ

まり、本研究における現像では、プロテイン銀が組織と反応した陽性荷電鉄コロイドに結合し、次に銀をイオン化傾向に従って金に置換して色調を整えていることになる。

結 語

塩化第二鉄をヒドラジンヒドラートとカコジル酸と共に煮沸して陽性荷電鉄コロイドを調製した（Murakami et al, 1986）。このコロイドでマウスの脳切片を染色し、その後フェロシアン化カリウムと塩酸で Prussian blue 反応、あるいはプロテイン銀と塩化金で物理的現像処理を行った。その結果、現像法の方がより強く明瞭なコントラストを産むという利点があることがわかった。この現像法で神経周囲硫酸化プロテオグリカンや神経終末線維が光顕下に明瞭に可視化された。

文 献

- 1) Seno S, Akita T, Ono T and Tsuji T : Fine-granular cationic iron colloid. Its preparation, physiochemical characteristics and histochemical use for the detection of ionized anionic groups. *Histochemistry* (1985) **82**, 307—312.
- 2) Murakami T, Taguchi T, Ohtsuka A, Sano K, Kaneshige T, Owen RL and Jones AL : A modified method of fine-granular cationic iron colloid preparation : Its use in light and electron microscopic detection of anionic sites in the rat kidney glomerulus and certain other tissues. *Arch Histol Jpn* (1986) **49**, 13—23.
- 3) Murakami T, Taguchi T, Ohtsuka A and Kikuta A : Neurons with strongly negative-charged surface-coats in adult rat brain as detected by staining with cationic iron colloid. *Arch Histol Cytol* (1993) **56**, 13—21.
- 4) Murakami T, Ohtsuka A and Taguchi T : Neurons with intensely negatively charged extracellular matrix in the visual cortex. *Arch Histol Cytol* (1994) **57**, 509—522.
- 5) Murakami T, Ohtsuka A, Taguchi T and Piao DX : Perineuronal sulfated proteoglycans and dark neurons in the brain and spinal cord : A histochemical and electron microscopic study of newborn and adult mice. *Arch Histol Cytol* (1995) **58**, 557—565.
- 6) Ueda H, Fujimori O and Abe M : Histochemical analysis of acidic glycoconjugates in the endothelium lining the splenic blood vessels in the rat. *Arch Histol Cytol* (1996) **59**, 389—397.
- 7) Toda K, Nishida K, Inoue H, Ohtsuka A and Murakami T : Strongly anionic sites in peripheral axons of the rat sciatic nerve : Light and electron microscopic detection using cationic iron colloid. *Arch Histol Cytol* (1995) **58**, 485—492.
- 8) Murakami T, Ohtsuka A and Ono K : Neurons with perineuronal sulfated proteoglycans in the mouse brain and spinal cord : Their distribution and their reactions to lectin *Vicia villosa* agglutinin and Golgi's silver nitrate. *Arch Histol Cytol* (1996) **59**, 219—231.

- 9) Bodian D : A new method for staining nerve fibers and nerve endings in mounted paraffin sections. Anat Rec (1936) **65**, 89—97.
- 10) Bodian D : The staining of paraffin section of nervous tissues with activated protargol. The role of fixatives. Anat Rec (1937) **66**, 153—162.
- 11) Ohtsuka A and Murakami T : Fine anionic iron colloid and its use in light and electron microscopic detection of cationic sites in the rat kidney. Arch Histol Jpn (1986) **49**, 543—552.

**Physical development of tissue-reacted cationic iron colloid with
protein silver and gold chloride**

Takuro MURAKAMI¹⁾, Wei Dong SU¹⁾, Luo Jia HONG¹⁾,

Da Xun PIAO¹⁾, Aiji OHTSUKA¹⁾ and Kenji SEO²⁾

1) Section of Human Morphology,

Department of Anatomy,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. T. Murakami)

2) Kensho-Kai Seo Hospital,

Fukuyama, Japan

(President : Dr. K. Seo)

Rat brain sections were treated with fine granular cationic iron colloid, which was prepared by boiling ferric chloride with hydrazine hydrate and cacodylic acid (Murakami et al., 1986). The sections were then treated with ferrocyanide and HCl for Prussian blue reaction or with protein silver and gold chloride for physical development. Physical development had an advantage over Prussian blue reaction in that it produces clear and highly contrasted images under a light microscope. Thus, the perineuronal sulfated proteoglycans and the fine processes of the nerve cells were clearly demonstrated by physical development.