

〔研究ノート〕

クラウンエーテルを用いたAutometallography 現像液

藤 森 修¹

要 旨

Autometallographyは写真化学を応用した組織細胞化学の検出法で、免疫染色法のimmunogold-silver染色法や組織内金属検出の硫化銀法などで用いられる。Autometallographyの反応液として使用する現像液には保護コロイドとして粘稠性のあるアラビアガムの使用が必須であるが、様々な短所があるので、保護コロイドの代替物質として大環状化合物のクラウンエーテルの性質に着目して現像液の改良を試み良好な成果を得た。

キーワード：組織化学，銀増感法，現像液，重金属，クラウンエーテル

はじめに

Immunogold-silver法や重金属の組織化学的検出法で用いられるautometallographyの現像液は物理現像液とも呼ばれ、銀塩、還元剤、保護コロイド、pH調節剤で処方される。還元剤が主薬である化学現像液とは異なり、物理現像液は現像液中に銀塩と還元剤を含んでいることに特徴がある。銀塩としては硝酸銀 [3, 4]，酢酸銀 [4, 6]，乳酸銀 [1, 4] などが利用されているが、いずれの銀塩を用いる場合であっても、調合後の銀塩の急速で過剰な還元を防止するために現像液の成分に保護コロイドを加える必要があり、保護コロイドは現像液の安定性，autometallographyの信頼性などを左右する。従来使用されているアラビアゴムは優れた保護コロイドであるが様々な欠点もあり、これに代わる物質が長く求められていた [4, 9]。本研究では、溶液中から金属イオンを分離するのに利用されている大環状化合物のクラウンエーテルに着目し、数種のクラウンエーテルから18-Crown-6 (Fig. 1) を酢酸銀の現像液に導入して新たな現像液の作成を試みた。考案した改良現像液（クラウンエーテル現像液）を重金属の組織化学的検出法である硫化銀法に適用して，autometallography法の改良と亜鉛の組織化学的検出に良好な結果を得ることができた。

1 名古屋学院大学 リハビリテーション学部

Correspondence to Osamu Fujimori

E-mail: fujimori@ngu.ac.jp

Received 8 January, 2021

Accepted 10 January, 2021

材料と方法

組織材料

動物はSDラット（雄，15週令）3頭をそれぞれソムノペンチルの腹腔投与により安楽死させ，開胸後速やかに左心室より0.5%硫化ナトリウム・4% paraformaldehyde PBS（0.1M，pH7.4，4℃）溶液50mlで灌流固定した。脳および精巣上体を摘出し，さらに同固定液にて一晚4℃で浸漬固定したのち，PBSで24時間洗浄，定法にしたがってパラフィン包埋し，滑走式マイクロトームでパラフィン切片（4 μ ）を作成，スライドガラスに貼付してプレパラート標本としautometallographyに供した。

なお本研究は名古屋学院大学動物実験委員会の承認を得て行った（許可番号2010-012）。

Autometallography

クラウンエーテル酢酸銀現像液は18-Crown-6，酢酸銀，ハイドロキノン，クエン酸緩衝液で処方される。現像液はあらかじめ作成した以下のA液とB液を使用直前に混合して作成した。

A液： 蒸留水（2回蒸留）25 ml

18-Crown-6

酢酸銀

B液： 0.2 M クエン酸緩衝液（pH3.75） 25 ml

ハイドロキノン

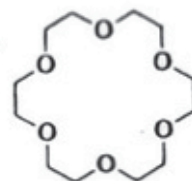


Fig. 1 Crown Ether（18-Crown-6）

0.2 M クエン酸緩衝液（pH3.75）

I 液 0.2M クエン酸水溶液 21 ml

II 液 0.2M クエン酸ナトリウム水溶液 9 ml

（I 液またはII 液でpHを3.75に調整する）

現像液50 ml中の18-Crown-6，酢酸銀，ハイドロキノンのそれぞれの量を表1のように設定し，64通りの試薬量の組み合わせで現像液を作成してautometallographyを行い，それぞれについて現像液としての適否を検討した。

表1

18-Crown-6	12.5 mg	25 mg	50 mg	100 mg
酢 酸 銀	25 mg	50 mg	100 mg	200 mg
ハイドロキノン	50 mg	100 mg	200 mg	400 mg

現像の判定は組織切片にautometallographyを行うとともに，金属銀の非特異的析出による現像液の劣化を肉眼的に観察して，それらの結果から適切な試薬の調合ならびに現像の適否を判定した。なお，autometallography施行後の組織切片はケルンエヒトロート（kernechtrot, Nuclear fast red）にて核染色を施しバルサム封入した。

現像液の調整は室内照明下で行い，調整後直ちに現像に供した。現像は染色瓶を研究室内の照明下

でクーラーボックス内に置いて遮光の下で行ったが、現像液の光に対する安定性を調べるために室内照明下でも現像を行った。

18-Crown-6ならびに酢酸銀はSigmaの製品を使用した。Hackerらが推奨するFLUKAの酢酸銀は60℃の湯煎で15分搅拌しないと溶解しないのに対し、Shigma製は常温で易水溶性であり使用しやすかった。ハイドロキノンは富士フィルム、クエン酸は和光純薬の製品を用いた。

またクラウンエーテル現像液による結果はアラビアゴムを使用するHackerらの酢酸銀現像液 [6] による autometallography の結果とも比較した。

結果

18-Crown-6は酢酸銀現像液において優れた保護コロイド様効果を発揮することが確かめられた。酢酸銀量が100 mg, 200 mgで18-Crown-6量が少量の場合、反応が早いために短時間で現像が完了するが最適現像強度を越えて過現像に陥りやすかった。また現像液の短時間での劣化が肉眼的にも明らかであり (Fig. 2-3), 非特異的な金属銀の組織, スライドガラスならびに染色瓶への沈着・汚染を起こしやすかった。これらの欠点は18-Crown-6を増量することにより改善された (Fig. 2-3) が、それに応じて現像にも時間を要するようになり、後述する最適処方 of 現像液とくらべ利点は乏しかった。

一方、酢酸銀が12.5 mgで18-Crown-6が最小量の場合、現像液の肉眼的劣化は長時間にわたって見られないものの1時間以上の現像でも十分な反応強度が得難く、銀塩の絶対量が不足しているものと考えられた。酢酸銀25 mgの場合は、これよりも改善されるものの適当量とは判断できなかった (Fig. 2-3)。

なお一般的に酢酸銀現像液では、硝酸銀現像液 [3, 4, 5] では見られることがなかった“銀鏡反応”による染色瓶の汚染を起こしやすい傾向があった。染色瓶の汚染は像液中への金属銀の非特異的沈着を誘発して現像液の劣化を早めるが、染色瓶の内面を5%牛血清アルブミン水溶液でコートし、水分を切った後、60℃で一晩乾燥させて使用するとこのような汚染を防止する効果があった。

試薬量を種々に変えて検討した結果、現像液の組成として最も適当であったのは以下の通りであった。この現像液を金属組織化学の autometallography に適用し、アラビアゴムを使用するHackerの酢酸銀現像液による結果と比較すると、60分ないしそれ以上を要した現像時間は15～20分に短縮され、現像液の作成、現像後の洗浄なども極めて容易であった。

A液	18-Crown-6	25 mg
	酢酸銀	50 mg
	蒸留水	25 ml
B液	ハイドロキノ	200 mg
	クエン酸緩衝液 (pH3.75)	25 ml

なお本現像液で遮光せず室内光の下で現像に供した場合、特異的な現像反応に要する時間は遮光下



Fig. 2 遮光下5分経過



Fig. 3 遮光下20分経過

いずれも18-crown-6 25 mg, ハイドロキノン200 mgで、左から酢酸銀12.5 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mgで処方した現像液。

Fig. 2 酢酸銀100 mgと同200 mgの現像液には非特異的な金属銀の析出による濁りが出ている。

Fig. 3 酢酸銀100 mgと同200 mgの現像液は非特異的な金属銀の析出で黒化し、染色瓶に銀鏡反応が見られた。酢酸銀50 mgの現像液でも15～20分までに緩徐に非特異的な金属銀の析出が起こり染色瓶への付着が見られるが、この段階では光顕レベルで組織の非特異的な金属銀の沈着はほとんど認めなかった。

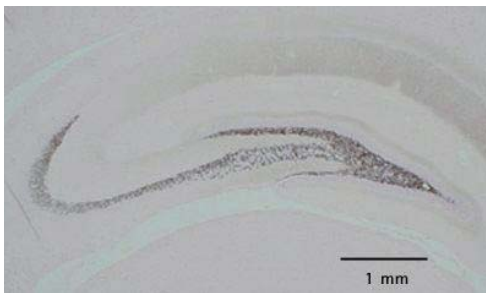


Fig. 4 ラット脳（海馬）

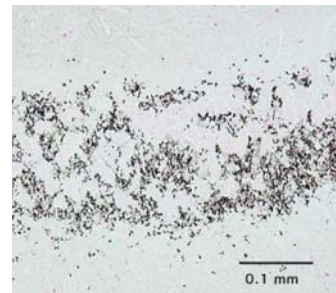


Fig. 5 Fig. 4 CA4領域の拡大

海馬から歯状回における亜鉛の局在が金属銀反応産物として黒色に認められる。

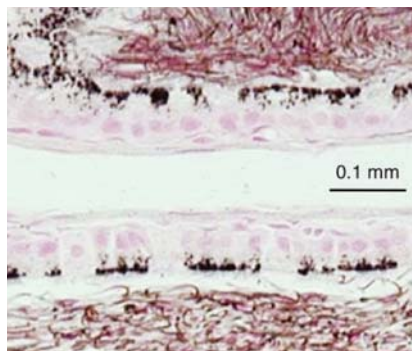


Fig. 6 ラット精巣上体

精巣上体管上皮の主細胞頂上部に亜鉛の局在を示す反応産物の集積が認められる。管腔内には線維状に多数の精子が見られる。

の場合と同様であるが、現像液の劣化が早急に進むため非特異反応などを引き起こしやすかった。

今回の検討の結果、クラウンエーテルを用いた現像液は作成が容易かつ染色操作も簡便であり、従来の方法よりも短時間で非特異的反応のほとんどない silver enhancement が可能となって、海馬および精巣上体の亜鉛の局在を従来の方法と同様に検出することができた (Fig. 4-6)。

まとめと考察

物理現像液は現像液中に銀塩と還元剤を含んでいるので、現像液の調合後は直ちに還元剤が銀塩を還元して現像液中で金属銀の形成が始まり、現像核となる重金属に金属銀が沈着する。しかし銀塩が急激かつ過剰に還元されるので、これが非特異的反応産物となり陽性反応との識別が困難になる。銀塩の急激な還元を防止するために物理現像液には保護コロイドが用いられており、Lüppo-Cramer (1914) [7] 以来、保護コロイドとしてアラビアゴムが使用されて来た。アラビアゴムは、その粘稠性により現像液中に含まれる銀イオンとハイドロキノンなどの還元剤との反応を緩徐に進める。この効果によって急激な銀イオンの還元を抑制して非特異的で粗大な金属銀の析出を防止し、特異的な陽性部位のみに微細で均質な金属銀が緩やかに形成される。

植物のアカシアの樹液を固めたアラビアゴムは天然素材であるため成分の組成が一定していない、実用濃度の水溶液に溶解しづらい、不溶性物質が含まれているのでこれらを除去する必要がある、粘稠であるため現像後の洗浄で除去しにくいなどの欠点があり、加えて保護コロイドとして有用なその粘稠性ゆえに反応後に現像液が洗浄しにくいという短所もある。成分が均質で処方しやすい代替試薬がこれまでもいくつか検討されてきたが、アラビアゴムに代わる保護コロイドは見い出されていなかった [5, 9]。今回、著者は従来のアラビアゴムに代えてクラウンエーテルを現像液に導入して改良を試み、クラウンエーテル現像液の autometallography における有用性を検討した。

クラウンエーテル [8] は分子内に空孔を有する大環状化合物で、空孔径に適合したイオン半径を持つ陽イオンを選択的に取り込んで安定な錯体を形成する物質であり、イオンの補足、分離、濃縮などに利用される。空孔径はクラウンエーテルの種類によって異なり、銀イオンの半径 (1.26 Å) と空孔半径の大きさから、本研究ではクラウンエーテルとして 18-Crown-6 (空孔半径 1.38 Å) を選択した。種々検討を重ねた結果、物理現像液に導入することによりクラウンエーテルはアラビアゴムと同様に金属銀の急速かつ過剰な析出を抑制することが確認され、かつ従来のアラビアゴム現像液の場合より現像時間を大幅に短縮する効果があった。また現像液に粘稠性はなく現像後のプレパラート標本の洗浄も極めて容易であった。

現像液中でクラウンエーテルは空孔内に銀イオンを取り込んで光や還元剤などとの急激な反応を抑制しているものと考えられ、機序は異なるものの保護コロイドと同様の効果をもたらし、適正な銀イオンとの混合比であれば、迅速かつ十分な還元が起こり、保護コロイドを用いた現像液よりも短時間で十分な検出強度を得ることができるものと思われる。本研究の結果はクラウンエーテルが現像液における保護コロイドに代わる物質としてアラビアゴムより優れた試薬であることを示しており、非特異的反応産物の出現がない autometallography を従来より短時間に実施できる有用な現像液として活

用できるものである。今後は著者が従来用いていた硝酸銀現像液について同様に検討と改良を加え、さらに immunogold を用いた光顕免疫染色法、電顕免疫染色法へと応用範囲を広げてゆく。

文 献

- [1] Danscher, G. Histochemical demonstration of heavy metals: a revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electron microscopy. (1981) *Histochemistry* 71, 1-16.
- [2] Danscher, G., Stoltenberg, M. & Juhl, S. How to detect gold, silver and mercury in human brain and other tissues by autometallographic silver amplification. (1994) *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 20, 454-67.
- [3] Fujimori, O., Tsukise, A. and Yamada, K. (1988) Histochemical demonstration of zinc in rat epididymis using a sulphide-silver method. *Histochemistry* 88, 469-473.
- [4] 藤森 修. (1992) 光顕免疫染色法. 横田貞記, 藤森 修編. イムノゴールド法. ソフトサイエンス社, 東京, pp 49-112.
- [5] Fujimori, O. (1999) Protein-A-gold/silver staining method: A review of a highly sensitive technique for light microscopic immunohistochemistry. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 7, 280-288.
- [6] Hacker, G. W., Grimelius, L., Danscher, G., Bernatzky, G., Muss, W., Adam, H. & Thurner, J. (1988) Silver acetate autometallography: An alternative enhancement technique for immunogold-silver staining (IGSS) and silver amplification of gold, silver, mercury and zinc in tissues. *J. Histotechnology* 11, 213-221.
- [7] Lüppo-Cramer, H. (1912) Neue Untersuchungen zur Theorie der photographischen Vorgängen. *Photographische Korrespond* 640, 28-34.
- [8] Pedersen, C. J. (1967) Cyclic polyethers and their complexes with metal salts. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 7017-7036.
- [9] Scopsi, L. (1989) Silver-enhanced colloidal gold method. (ed) Hayat, M. A. in *Colloidal gold-Principles, Methods and Applications*. Vol. 1, Academic Press, London, 251-295.

[Research Note]

Application of Crown Ether to Silver Enhancement Developer for Histochemical Autometallography

Osamu Fujimori¹

Abstract

Crown ethers are macrocyclic polyethers and these complex with cations and solubilize inorganic reagents into organic solvents. Using a kind of crown ethers, an attempt has been carried out to improve some drawbacks of developing solution including gum Arabic as protective colloid in histochemical silver enhancement techniques. In this study, Crown ether (18-crown-6) was introduced to silver acetate developer instead of protective colloid, and the developer improved was applied to sulphide-silver staining method for histochemical detection of zinc in brain and epididymis of rats. Eventually, the present crown ether developer permitted fast and effective development of reaction products and resulted efficient detection sensitivity in autometallography.

Keywords: histochemistry, silver enhancement, developer, heavy metal, crown ether

1 Faculty of Rehabilitation Sciences