

# プロテオグリカンの組織化学

## Histochemistry for The Proteoglycans

平林 義章

Yoshifumi HIRABAYASHI

Previously, it has been well known that the acidic glycoconjugates such as acidic glycoproteins, proteoglycans and acidic glycolipids, widely distributed in the tissues and organs. These molecules play the important functions such as tissue structure holding, tissue fluid filtration, water retention and cell membrane receptor in the living organs and tissues. Histochemistry is one of tissue preparation methods using the chemical and biochemical reactions and detecting some molecules and/or reacting groups on the tissue structures. However, it is difficult to visualize proteoglycan molecules on the tissue structures accurately. In this paper, the light-microscopic histochemical methods for the detection of proteoglycans on the tissue structures using dyestuff and selective methods are introduced.

キーワード：プロテオグリカン，組織化学，組織調製法，色素法，選択的方法  
proteoglycans, histochemistry, tissue preparation, staining methods with dyestuff, selective methods

### 1. 序論

酸性複合糖質は、酸性糖タンパク質、プロテオグリカン、酸性糖脂質などの総称で、生物の臓器・器官・組織に広く分布していることが知られている<sup>1,2)</sup>。この酸性複合糖質は、組織・臓器・器官において、組織細胞の構造維持、物質の濾過、線維化および石灰化、細胞分化および増殖調節、細胞接着阻害、細胞認識、トランスフォーミング成長因子 (TGF)- $\beta$  などの生理活性因子との結合、水和保水作用、保護コロイド作用、細胞膜受容体としての作用など多岐にわたる機能を有していて、生命現象に不可欠な物質である<sup>3-10)</sup>。

組織・臓器中に含まれている酸性複合糖質の分布様式や分子種の同定は、その組織・臓器の構造と機能を解明するのに有用な方法である。従来の生化学的手法を用いることにより、単位重量あたりに含まれている酸性複合糖質の量および種類を同定することはできる

が、酸性複合糖質が組織構造中にどのような割合でどのように分布しているのかなどを知ることはできない。組織化学は、既知の化学反応または生化学反応を用いて生体を構成する物質が形態学的な構造のどこにどんな形で存在するかを追求する学問であり、本法を用いることにより組織切片上のどこにどんな物質が存在するかを解明することが可能となる<sup>11-14)</sup>。

酸性複合糖質を検出するには、酸性複合糖質に多く含まれる酸性基を検出する方法、抗原抗体反応による酸性複合糖質の抗原性を検出する方法、レクチンやヒアルロンタンなどの糖鎖を認識するアフィニチンによって検出する方法などがあげられる<sup>12-14)</sup>。本論文では酸性複合糖質のうち、軟骨や結合組織などに広く分布するプロテオグリカンに焦点をあて、色素を用いた酸性基検出法と選択的方法の組合せによる同分子の組織化学的同定法について述べる。

組織化学法は基本的に組織・臓器の固定、包埋および薄切、検出法（染色法および選択的方法）の3つの行程に分けることができる。本論文では、3つの行程で著者が適切と考える代表的な方法について紹介する。

## 2. 固定法

組織標本を作製する最初の手順が固定である。固定の目的は組織構造の保持と目的物質の保存である。一般に固定剤としてはパラフォルムアルデヒドなどに代表されるアルデヒド剤、アセトンやエタノールなどの脱水剤、四酸化オスミウムや重クロム酸カリウムなどの酸化剤などが用いられている<sup>13-15)</sup>。どの固定法を用いるかは、組織化学により検出する物質の物性によって異なるので慎重に選択する必要がある。一般的に酸化剤やアルデヒド剤はタンパク質の一次構造を変化させるので、抗原性の保持などには不向きなことが多い。

プロテオグリカンに対する固定法としては、一般的に Carnoy 液や酢酸エタノールなどの水を含まない固定液、プロテオグリカンの沈殿剤である塩化セチルピリジニウムを含んだホルマリンや、4%パラフォルムアルデヒド緩衝液などが用いられている<sup>13-14)</sup>。酸性基検出法によるプロテオグリカン検出の場合、硬組織を含まない組織であれば水溶性物質の消失を考慮して Carnoy 液などを用いるのがよいが、骨組織等の硬組織を含み後で脱灰操作が必要な組織の場合は、組織構造の保存性などを考慮して4%パラフォルムアルデヒド緩衝液を用いるのがよい。

固定法には還流固定法や浸漬法などがあるが、できれば還流固定法を行った後、浸漬法により固定するのがよい。固定液の温度は低温（0～6℃）であれば組織融解を防ぐことができるが、胎生組織などに用いる場合は組織収縮を生じることがあるので注意が必要である。固定液の浸透圧も大切である。組織細胞の浸透圧は280～300mOsm/Lである。低張な固定液だと細胞への浸透が早いと細胞が膨化する可能性があり、逆に高張な固定液だと細胞の収縮を生じる可能性が高い。一般に等張な固定液でよい結果が得られると考えられるが、それよりもやや高張の固定液を用いる方がよい結果をえられることが多い<sup>14)</sup>。浸漬固定だけで固定する場合は、浸透速度が極めて早い Carnoy 液がよい。ホルムアルデヒドなどの場合は4時間で4～5mm浸透するので、固定剤の浸透性を考えて、組織片を5

mm以下の厚さにすることが望ましい<sup>13-14)</sup>。

### 2-1. 試薬調製法

#### 1) Carnoy 液<sup>16)</sup>

エタノール60ml, クロロホルム30ml, 酢酸10mlを混和する。

#### 2) 4%パラフォルムアルデヒド (PFA) 緩衝液<sup>13,14,17-19)</sup>

8% PFA 水溶液250ml, 0.25M リン酸緩衝液(pH7.4) 200ml, ショ糖37.5～40gを混和し、蒸留水を加えて全量を500mlとする。

8% PFA 水溶液：パラフォルムアルデヒド (TAAB社製) 40gを蒸留水400mlに加える。60℃に加温しながら攪拌器で攪拌しながら溶液が透明になるまで1N水酸化ナトリウム数滴を加える。パラフォルムアルデヒドが溶解後、蒸留水を加えて500mlとする。

0.25M リン酸緩衝液 (pH7.4)：リン酸水素2ナトリウム・12水塩89.5gを蒸留水に溶かして1,000mlとする (A液)。リン酸2水素カリウム10.2gを蒸留水に溶かして300mlとする。A液500mlにB液120mlを加える。

### 2-2. Carnoy 液による固定法<sup>16)</sup>

検体より切り出した組織片を冷 Carnoy 液（4～6℃）に浸漬する。この固定液に長時間放置すると組織の硬化が激しいので、厚さ1～2mmの組織片は1時間、3～5mmのものは3～5時間の浸漬を行う。浸漬後は、炭酸カルシウム飽和エタノールでクロロホルムと酢酸を洗浄し、パラフィン包埋を行う。

### 2-3. 4%パラフォルムアルデヒド緩衝液による固定法<sup>13,14,17-19)</sup>

ネブタール等の麻酔下に動物を開胸し、灌流ポンプなどを用いて、左心室より0.9%塩化ナトリウム水溶液（生理食塩水）またはリンゲル液で灌流して脱血した後、4%パラフォルムアルデヒド固定液で灌流する。灌流後、組織を切り出し同固定液に浸漬固定する。固定時間は24時間から1週間程度行う。特に骨組織や歯組織などの硬組織を含む材料は、後で脱灰操作を行うために十分な固定が必要である。浸漬固定が終了した組織片は0.9%塩化ナトリウム0.01M リン酸緩衝液 (PBS) (pH7.4)<sup>18,19)</sup> や生理食塩水で十分に洗浄した後、脱灰または脱水操作を行う。

### 3. 脱灰法

骨や石灰化組織などの硬組織を含む試料から組織標本を作製する場合は脱灰操作が必要となる。ギ酸やトリクロール酢酸などの酸による脱灰法やエチレンジアミン4酢酸 (EDTA) などのキレート剤による脱灰法が知られている<sup>14)</sup>。酸による脱灰法は短時間で処理が終わるが、組織構造の維持や抗原性の保存が悪いので、ここでは EDTA 脱灰法<sup>14,20)</sup>を示す。

#### 3-1. 試薬調製法

2.5% EDTA 液：エチレンジアミン 4 酢酸 2 ナトリウム 25g を蒸留水 500ml に溶解する。0.2N 水酸化ナトリウム水溶液を約 350ml 加えて pH7.4 に調整する。シヨ糖 70g を加え、蒸留水を加えて全量を 1,000ml とする。

#### 3-2. 脱灰法

固定・洗浄した組織片を十分量（組織片体積の 50 倍量ほど）の脱灰液に 4～6℃で浸漬する。2～3 日に 1 回脱灰液を交換して、1 週間から 1 カ月ほど脱灰を行う。脱灰時間は組織の種類と大きさ差によって異なる。カミソリの刃で抵抗なく切れるようになれば脱灰完了である。脱灰後の組織片は 2-3 で述べた PBS や生理食塩水で洗浄する。

### 4. 包埋および薄切法

固定・脱灰の終了した組織片を薄切するためにパラフィン等に包埋する。Carnoy 液などのアルコール性固定液を用いた場合はそのままパラフィン包埋を行うが、水溶性固定液を用いた場合は脱水操作を行う。

#### 4-1. 脱水<sup>13,14)</sup>

十分量のエタノール列を作製し、それぞれの溶液に 4～6℃で 30 分から 6 時間程度浸漬する。エタノール列は 50%, 70%, 80%, 90%, 100% (2 回) の順に行う。浸漬時に攪拌器等を用いると早く脱水を終えることができる。

#### 4-2. パラフィン包埋法<sup>13,14,21)</sup>

脱水の終わった組織片を室温でキシレンに 30 分ずつ 3 回浸漬して透徹する。組織がアメ色になったら透徹完了である。透徹した組織片を 60℃のパラフィンに 30 分から 2 時間程度 3 回浸漬する。組織の大きさや種類によって浸漬する時間が異なるが、なるべく短い時間

で終了する方がよい。糖鎖や酸性基に対して熱はあまり影響しないが抗原性は失活しやすい。

#### 4-3. 薄切法<sup>13,14,21)</sup>

ユングやシャンツェの滑走型マイクロトームを用いて 2～4μm の厚さの切片を作製し、シラン処理など粘着処理をしたスライドガラスに添付し、37℃のオーブンで一晩乾燥する。ミノーの回転型マイクロトームでは連続切片の作製が容易だが、組織の変形が大きいので滑走型マイクロトームを推奨する。組織切片に酵素消化や化学修飾などの選択的方法を行う場合は、組織片が剥離しやすいのでスライドガラスに粘着処理<sup>19)</sup>を施した方がよい。

### 5. 検出法

先に述べたように種々の原理に基づいたプロテオグリカン検出法があるが、ここでは比較的簡単に行うことのできる色素法による酸性基検出法とそれに組み合わせ分子種の同定を行うことのできる選択的方法について述べる。

#### 5-1. 試薬調製法

##### 1) アルシアンブルー法

##### ①アルシアンブルー pH1.0 染色液<sup>12-14, 22, 23)</sup>

0.1N 塩酸水溶液 100ml にアルシアンブルー 8 GX (ICI 社が最もよい) 1.0 g を溶解する。沈殿物が多いようであればろ過後使用する。

##### ②アルシアンブルー pH2.5 染色液<sup>12-14, 22-24)</sup>

3% 酢酸水溶液 100ml にアルシアンブルー 8 GX (ICI 社が最もよい) 1.0 g を溶解する。沈殿物が多いようであればろ過後使用する。

##### 2) ジアミン法

##### ①高鉄ジアミン染色液<sup>12-14, 24-26)</sup>

N, N'-ジメチル-m-フェニレンジアミン (2 塩酸塩) 120mg と N, N'-ジメチル-p-フェニレンジアミン (1 塩酸塩) 20mg を蒸留水 50ml に溶解したものに、染色直前に 40% (w/v) 塩化第二鉄塩酸溶液 (塩酸濃度は 4-6%) 1.4ml を加える。

##### ②低鉄ジアミン<sup>12-14, 24-26)</sup>

N, N'-ジメチル-m-フェニレンジアミン (2 塩酸塩) 30mg と N, N'-ジメチル-p-フェニレンジアミン (1 塩酸塩) 5mg を蒸留水 50ml に溶解したものに、染色直前に 40% (w/v) 塩化第二鉄塩酸溶液 (塩酸濃度は 4-6%) 0.5ml を加える。

### 3) 増感ジアミン法<sup>27)</sup>

#### ①高鉄ジアミン染色液

ジアミン染色の項〔5-1)2)①〕で述べた高鉄ジアミン染色液を用いる。

#### ②低鉄ジアミン染色液

ジアミン染色の項〔5-1)2)②〕で述べた低鉄ジアミン染色液を用いる。

#### ③0.5mM トリクロロ（エチレン）白金酸カリウム溶液（pH8.0）

0.1M ホウ酸0.1M 塩化カリウム溶液50mlに0.1M 水酸化ナトリウム溶液4mlを加えて蒸留水で100mlにした溶液に、トリクロロ（エチレン）白金酸カリウム（1水和物）18.4mgを溶解する。

#### ④0.1M ホウ酸0.1M 塩化カリウム液

ホウ酸6.18gと塩化カリウム7.45gを蒸留水に溶解して1,000mlとする。

#### ⑤水素化ホウ素ナトリウム溶液

リン酸水素2ナトリウム（12水塩）2.52gを蒸留水に溶解して100mlとする。この溶液に水素化ホウ素ナトリウムを0.1～0.5g溶解する。用事調製し、直ちに用いる。

#### ⑥物理現像液

A液（20%アラビアゴム水溶液45mlに10%硝酸銀水溶液1mlを加えた溶液）とB液（ヒドロキノン100mg、クエン酸300mgを蒸留水に加えて15mlとした溶液）を調製し、18～20℃に温度調節を行っておく。使用直前にA液とB液を混和し、暗所（写真用安全灯は可）で用いる。

## 5-2. 染色法

### 1) アルシアンブルー法

硫酸基検出法であるアルシアンブルー pH1.0法とカルボキシル基検出法であるアルシアンブルー pH2.5法がある。

#### ①アルシアンブルー pH1.0法<sup>12-14, 22, 23)</sup>

脱パラフィン・流水水洗した組織切片を、アルシアンブルー pH1.0 染色液に浸漬し30分染色する。切片についての染色液を濾紙等でふき取り、100%エタノール2～3回で洗浄・脱水し、キシレン3回で透徹した後、バルサム等の封入剤を用いてカバーガラスで封入する。

染色結果：硫酸基を含む硫酸酸性複合糖質は青色に染まる（図1左図）。

注：染色後に水や低濃度のエタノールに浸漬すると、

余分な色素により硫酸基以外の酸性基が着色する可能性があるので注意を要する。

#### ②アルシアンブルー pH2.5法<sup>12-14, 22-24)</sup>

染色法：脱パラフィン・流水水洗した組織切片を、アルシアンブルー pH2.5 染色液に浸漬し室温で30分染色する。蒸留水で5分水洗、エタノール列〔70%, 80%, 90%, 100%（2～3回）エタノール〕で脱水し、キシレン3回で透徹した後、バルサム等の封入剤を用いてカバーガラスで封入する。

染色結果：カルボキシル基などを含む弱酸性複合糖質は青色に染まる。硫酸酸性複合糖質は、淡青色に着色するか、または染まらない。

### 2) ジアミン法

硫酸基を検出する高鉄ジアミン法とカルボキシル基を検出する低鉄ジアミン法がある。

#### ①高鉄ジアミン法<sup>12-14, 24-26)</sup>

脱パラフィン・流水水洗した組織切片を、新たに調製した高鉄ジアミン染色液に速やかに浸漬し、室温で一晩（4～24時間）染色する。染色液調製後5分以内に用いることを推奨している。染色した切片は、95%および100%エタノール2～3回で洗浄・脱水し、キシレン2～3回で透徹した後、バルサム等の封入剤を用いてカバーガラスで封入する。

染色結果：硫酸基を含む硫酸酸性複合糖質は黒紫色に染まる（図1右図）。

#### ②低鉄ジアミン法<sup>12-14, 24-26)</sup>

脱パラフィン・流水水洗した組織切片を、低鉄ジアミン染色液に速やかに浸漬し、室温で一晩（4～24時間）染色する。染色液調製後5分以内に用いることを推奨している。染色した切片は、95%および100%エタノール2～3回で洗浄・脱水し、キシレン2～3回で透徹した後、バルサム等の封入剤を用いてカバーガラスで封入する。

染色結果：硫酸基ならびにカルボキシル基を含む硫酸酸性複合糖質やエラスチンは灰色ないし黒紫色に染まる。

### 3) 増感ジアミン法<sup>27)</sup>

本法は上述のジアミン法に銀増感法を組み合わせることにより、より僅量の酸性複合糖質を可視化することを可能にした方法である。

染色法：脱パラフィン・流水水洗した組織切片を蒸留水水洗する。上述の高鉄ジアミン液または低鉄ジアミン液で室温ないし37℃にて60～120分染色する。高鉄ジアミン液の場合は60分、低鉄ジアミンの場合は120



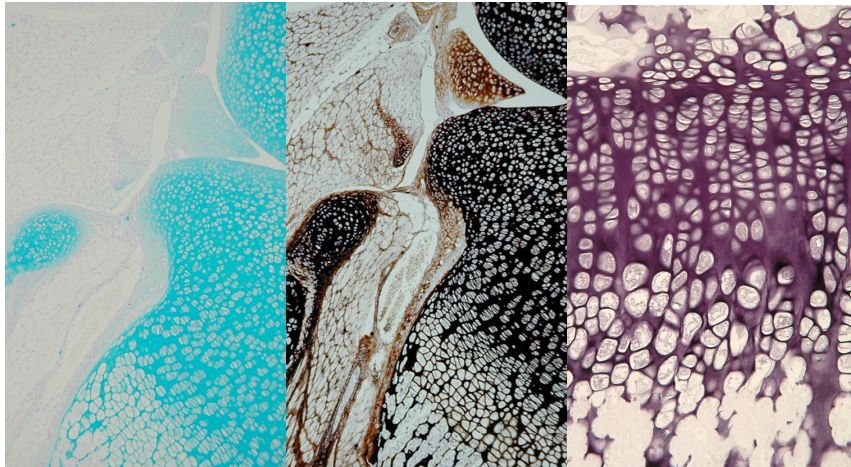


図1 マウス顎骨の成長軟骨：左図：アルシアンブルー（AB）pH1.0染色（撮影倍率25倍），中央図：増感高鉄ジアミン（S-HID）染色（撮影倍率25倍），右図：高鉄ジアミン（HID）ン染色（撮影倍率 50倍）。

（説明）

ABpH1.0染色では多量のグリコサミノグリカン分子を含む成長軟骨の軟骨基質が青色に染まるが同分子の含有量が少ない他の部位は染まらない（左図）。また HID 染色ではグリコサミノグリカン分子の分布によって軟骨基質が種々の程度の反応を示し、紫ないし黒紫色に染まる（右図）。軟骨基質の染色性はABpH1.0染色よりも HID 染色の方がよりコントラストがあり、グリコサミノグリカンの含有量の識別が容易である。HID 染色の可視化性を増強した S-HID 染色（中央図）では、軟骨基質だけでなく、僅量のグリコサミノグリカンを含む骨膜や骨格筋線維間の結合組織（筋周膜および筋上膜）も種々の程度の褐色の陽性反応を示すが、もともと多量のグリコサミノグリカンを含み HID 反応性の強かった軟骨基質では微妙な染色反応の違いは消えてなくなり均一の強い黒色を示している。



図2 ラット歯根部（撮影倍率 50倍），左図：増感高鉄ジアミン（S-HID）染色，中央図：コンドロイチナーゼ（Chase）B 消化 /S-HID 染色，右図：ChaseB/ 準丸ヒアルロニダーゼ（T-Hylase）二重消化 /S-HID 染色

（説明）

酵素消化法と S-HID 染色を組み合わせることによって、酵素基質のうち、硫酸基を含有するグリコサミノグリカン分子種の同定を行うことができる。S-HID 染色により象牙前質（A）、セメント質（B）、歯根膜の主線維（C）、歯槽骨の骨基質（D）が褐色から黒色の種々の程度の陽性反応を示している（左図）。コンドロイチン硫酸 B を基質としている ChaseB による消化により歯根膜主線維の中央部における S-HID 染色性が減弱しており、この部位にコンドロイチン硫酸 B が存在していたことがわかる（中央図）。またさらにコンドロイチン硫酸 A と C を基質としている T-Hylase による消化を行うと、さらに象牙前質、セメント質、歯槽骨と接する部の歯根膜の主線維（シャービー線維）および歯槽骨の骨基質の S-HID 染色性が減弱するので、この部位にコンドロイチン硫酸 A、C が存在していたことがわかる（右図）。

表1 グリコサミノグリカン分解酵素<sup>28)</sup>

| 酵素名 (由来)                                                     | 主要基質                        | 至適 pH 値              | 至適温度         | 阻害物質                                                                                            | 単一酵素消化法の反応条件                                                       |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| chondroitinase ABC<br>( <i>Proteus vulgaris</i> )            | CS-A, B, C, D,<br>E, CH, HA | 8.0 (CS)<br>6.2 (HA) | (37℃)        | Zn <sup>2+</sup> , HP                                                                           | 1-3 U/ml in 0.1M Tris-HCl buffer pH<br>8.0 at 37℃ for 3-24 hrs.    |
| chondroitinase AC<br>( <i>Flavobacterium heparinum</i> )     | CS-A, C, D, E,<br>CH, HA    | 7.3 (CS)<br>6.0 (HA) | 40℃<br>(37℃) | Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , KS, HP, HS,<br>CS-B                                       | 1-3 U/ml in 0.1M Tris-HCl buffer pH<br>7.4 at 37℃ for 3-24 hrs.    |
| chondroitinase ACII<br>( <i>Arthrobacter aureus</i> )        | CS-A, C, D, E,<br>CH, HA    | 6.0                  | 50℃          | Pb <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Sn <sup>2+</sup> ,<br>CS-B, HP         | 1-3 U/ml in 0.1M acetate buffer pH<br>6.0 at 37℃ for 3-24 hrs.     |
| chondroitinase B<br>( <i>Flavobacterium Heparinum</i> )      | CS-B                        | 8.0                  | 20℃          | Fe <sup>2+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>          | 0.1 U/ml in 0.1M Tris-HCl buffer pH<br>8.0 at 30℃ for 3-24 hrs     |
| keratanase<br>( <i>Pseudomonas</i> sp.)                      | KS-I                        | 7.2~7.4              | 37℃          | Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>                                          | 1-3 U/ml in 0.1M Tris-HCl buffer pH<br>7.4 at 37℃ for 3-24 hrs.    |
| keratanase II<br>( <i>Bacillus</i> sp.)                      | KS-I, KS-II                 | 6.0                  | 35℃          | p-chloromercuribenzoic<br>acid                                                                  | 0.1 U/ml in 0.1M acetate buffer pH<br>6.5 at 35℃ for 3-24 hrs.     |
| heparinase<br>( <i>Flavobacterium heparinum</i> )            | HP                          | 7.0                  | 35℃          | Zn <sup>2+</sup>                                                                                | 0.5 mg/ml in 0.1M acetate buffer pH<br>7.0 at 45℃ for 3-24 hrs.    |
| heparitinase I<br>( <i>Flavobacterium heparinum</i> )        | HS                          | 6.5~7.5              | 45℃          | Co <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , EDTA                      | 0.1 U/ml in 0.1M phosphate buffer pH<br>7.0 at 45℃ for 3-24 hrs.   |
| hyaluronidase<br>(bovine testes)                             | CS-A, C, CH,<br>HA          | 4~6<br>3.7 (HA)      | 37℃          |                                                                                                 | 1 mg/ml in 0.1M phosphate buffer pH<br>5.5 at 37℃ for 3-34 hrs.    |
| hyaluronidase<br>( <i>Streptomyces hyalurolyticus</i> )      | HA                          | 5.0<br>(6.0)         | 60℃          | Mg <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup>                                                             | 100 TRU/ml in 0.1M phosphate buffer<br>pH 5.0 at 40℃ for 3-24 hrs. |
| hyaluronidase SD<br>( <i>Streptococcus dysgalactiae</i> )    | HA, CH                      | 5.8~6.6              | 37℃          | Fe <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup> , Pb <sup>2+</sup> ,<br>Hg <sup>2+</sup> | 0.5 U/ml in 0.1M phosphate buffer pH<br>6.2 at 37℃ for 3-24 hrs.   |
| hyaluronidase<br>( <i>Hirudo medicinalis</i> )<br>(orgelase) | HA                          | 5.0                  | 37℃          | Hg <sup>2+</sup>                                                                                | 100-400 U/ml in 0.05M acetate buffer<br>pH 6.0 at 37℃ for 3-24 hrs |

CS: chondroitin sulfate, CH: chondroitin, HA: hyaluronic acid, HP: heparin, HS: heparan sulfate, KS: keratin sulfate

分浸漬するとよい。ジアミン染色した切片を流水水洗10~15分と蒸留水洗した後、0.5mM トリクロロ（エチレン）白金酸カリウム溶液（pH8.0）に室温で60分浸漬する。流水水洗10~15分と蒸留水洗した後、水素化ホウ素ナトリウム水溶液に室温で5~30秒浸漬する。流水水洗10~15分と蒸留水洗した後、物理現像液に20℃、暗所で3~10分浸漬する。物理現像後、蒸留水洗3回、5倍希釈写真用定着液（スーパーフジフィクス）2分浸漬の後、流水水洗する。必要に応じてヘマトキシリン液などで核染色を行い、エタノール列で脱水、キシレン3回で透徹した後、バルサム等の封入剤を用いてカバーガラスで封入する。

染色結果：

- ①増感高鉄ジアミン法：高鉄ジアミン法で陽性を示した組織部位は強い黒色を示す。高鉄ジアミン法で陰性または偽陽性を示した部位は、組織切片に含まれる僅量の硫酸酸性複合糖質の量によって種々の程度の褐色から黒褐色を示す（図1中央図）。
- ②増感低鉄ジアミン法：低鉄ジアミン法で陽性を示した組織部位は強い黒色を示す。低鉄ジアミン法で陰性または偽陽性を示した部位は、組織切片に含まれ

る僅量のカルボキシン酸性（弱酸性）複合糖質の量によって種々の程度の褐色から黒褐色を示す。

## 6. 選択的方法

選択的方法は検出法と併用してそこに含まれている物質の分子種や反応基の性質を判別する手法である。ここでは、プロテオグリカンに含まれる糖鎖（グリコサミノグリカン）の検出法について述べる。

### 6-1. 酵素消化法<sup>12, 13, 22, 28)</sup>

連続した組織切片を2枚用意し、脱パラフィン・流水水洗した後、蒸留水洗を行う。脱パラフィンした組織切片を1mg/dL（0.1%）牛血清アルブミン水溶液に浸漬した後、切片周囲の牛血清アルブミン溶液を濾紙またはキムワイプ等でふき取り、切片①には酵素を含まない緩衝液を、切片②には酵素溶液を切片上にのせる。酵素溶液の詳細については、表1に示す。緩衝液および酵素液をのせたスライドガラス①②を湿潤箱に入れ、オープンで酵素の至適温度を保ちながら3~16時間浸漬する。酵素反応終了後、組織切片を流水水洗し、上述の酸性基検出法を行う。染色した切片①と

②を比較すると、酵素消化法により切片②では、切片①と比較して酵素の基質の酸性基反応性が低下するので、組織中に含まれる酵素基質（グリコサミノグリカン）分子種の同定を行うことができる。

また、効率よく組織切片に含まれるグリコサミノグリカン分子種を同定するために、二重酵素消化法<sup>29)</sup>を用いる。この時は、連続した組織切片を3枚用意し、同様に脱パラフィン・流水水洗した後、蒸留水洗を行う。1回目の酵素消化では切片①には酵素1を含まない緩衝液、切片②と③に酵素1の溶液をのせ酵素消化する。消化後、流水水洗・蒸留水洗を行い2回目の酵素消化を行う。切片①と②に酵素2を含まない緩衝液を、切片③に酵素2の溶液をのせ、同様に酵素消化を行う。酵素消化後、上述の酸性基検出法を行う。切片①と②を比較することにより酵素1による基質の分布を観察し、切片②と③により酵素2による基質の分布を観察することができる（図2）。

## 6-2. 化学修飾法<sup>12, 13, 22, 28)</sup>

水酸基、アルデヒド基、硫酸基やカルボキシル基などの反応基に対する特異的な化学反応を切片上で行う方法を化学修飾法という。化学修飾法には水酸基の硫酸化、アセチル化、硫酸基の脱硫酸化（強メチル化）、アセチル基の脱アセチル化（けん化）、アルデヒド基の水素化ホウ素還元やヒドラジン反応、カルボキシル基のメチル化、メチル基の脱メチル化（けん化）などが知られている。ここでは、グリコサミノグリカンの一種のヘパリンやヘパラン硫酸を化学的に分解する亜硝酸処理について述べる。

### 1) 亜硝酸処理

#### 試薬調製法

##### ①亜硝酸液

亜硝酸ナトリウム3.3gを蒸留水150mlに溶解し、酢酸20.6mlを加えた後蒸留水で200mlとする。

##### ②1.8M 酢酸水溶液

酢酸20.6mlに蒸留水を加えて200mlとする。

#### 亜硝酸処理法

連続した組織切片2枚を用意し、脱パラフィン・水洗した後、蒸留水洗を行う。切片①を1.8M 酢酸溶液に浸漬し、切片②を亜硝酸液に浸漬する。切片①および②共に室温で80～120分処理した後、流水水洗しアルシアンブルー pH1.0法、高鉄ジアミン法、増感高鉄ジアミン法などの硫酸基検出法を行う。切片①において観察されたヘパリンまたはヘパラン硫酸の存在に

伴う硫酸基検出法の陽性反応は、切片②において消失する。

## 7. 総括

プロテオグリカンの分子種自体の同定には酵素抗体法を用いることが必要となるが、プロテオグリカンに含まれる糖鎖（グリコサミノグリカン）の種類は今回紹介した酸性基検出法と選択的方法により比較的簡単に同定することができる。染色結果は、染色後なるべく早くに顕微鏡写真や反応強度の表を作成して保存する必要がある<sup>13, 27)</sup>。また、ここで紹介した方法の1つ1つの行程は比較的単純なものが多いが、行程が多いので常に一定の結果を導き出すにはある程度の熟練を必要とする。特に組織中で同定したい分子種の量的比較をする場合は、物質の保存状態、組織切片の厚さの均一性、酵素反応や化学反応ならびに検出反応の再現性などを考慮して慎重に考察する必要がある<sup>13)</sup>。

## 引用文献

- 1) 梶川欣一郎, 結合組織, 金原出版, 1-588頁 (1984)
- 2) 小出輝, 林利彦, 細胞外マトリックス—基礎と臨床—, 愛智出版, 1-544頁 (2000)
- 3) Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD, Glycosaminoglycans: Molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev*, 71, 481-539 (1991)
- 4) Kjellen L, Lindahl U, Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem*, 60, 443-475 (1991)
- 5) Poole AR, Proteoglycans in health and disease: structures and functions. *Biochem J*, 236, 1-14 (1986)
- 6) 瀬野信子, 分布. ムコ多糖の構造と機能, 長谷川栄一, 鈴木旺, 瀬野信子 (編), 化学の領域増刊, 南江堂, 7-24頁, 1968
- 7) 木全弘治, プロテオグリカンの構造と機能, 藤本大三郎 (編), 細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー, アイピーシー, 89-111頁 (1990)
- 8) 木全弘治, 羽瀧脩躬, 羽瀧弘子, 細胞外マトリックス, 木幡陽, 箱守仙一郎 (編), 糖鎖の多様な世界, 講談社サイエンティフィック, 105-180頁 (1989)
- 9) 桂暢彦, 石灰化とプロテオグリカン, *Jpn J Oral Biol*, 26, 315-325 (1984)



- 10) Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins, 2nd edition, Krei T, Vle R (eds), Oxford Univ Press, 1-568 (1999)
- 11) 山田和順, 糖研究技術の発展, 小川和郎, 中根一穂 他 (編), 組織細胞化学の技術: 核酸と糖, 朝倉書店, 155-169頁 (1985)
- 12) 山田和順, II 糖組織化学の基本的技術, 小川和郎, 中根一穂 他 (編), 組織細胞化学の技術: 核酸と糖, 朝倉書店, 170-196頁 (1985)
- 13) 山田和順, 組織化学 初学者のための基礎と実際, 南江堂, 1-532頁 (1987)
- 14) 佐野豊, 組織学研究法, 第6版 (オンデマンド版), 南山堂, 1-961頁 (2003)
- 15) Stoward PJ, Fixation in Histochemistry, Chapman and Hall, 1-201 (1973)
- 16) Carnoy JB, La cytodierese de loeuf chez quelques nematodes. Cellue, 3, 5-62 (1886)
- 17) Lin W-L, Essner E, McCarthy KJ, Couchman JR, Ultrastructural immunocytochemical localization of chondroitin sulfate proteoglycans in Bruch's membrane of the rat. Invest Ophthalmol Vis Sci 33, 2072-2075 (1992)
- 18) IV 細胞組織の固定, 名倉宏, 長村義之, 堤寛 (編), 酵素抗体法, 第4版, 82-100頁 (2005)
- 19) VI 必要な器具と試薬の作製法, 名倉宏, 長村義之, 堤寛 (編), 酵素抗体法, 第4版, 109-122頁 (2005)
- 20) 永井教之, 赤木巧, 第二章 動物実験材料 (石灰化組織, 骨, 歯牙) の電顕標本作製法, 永井教之 (編), 骨・歯牙組織の病理検査法と研究技術の実際, 学際企画, 29-52頁 (1991)
- 21) V 切片の作製法, 名倉宏, 長村義之, 堤寛 (編), 酵素抗体法, 第4版, 101-108頁 (2005)
- 22) 山田和順, 藤田芳和, IV プロテオグリカン (ムコ多糖), 小川和郎, 中根一穂 他 (編), 組織細胞化学の技術: 核酸と糖, 朝倉書店, 223-246頁 (1985)
- 23) Lev R, Spicer SS, Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. J Histochem Cytochem 12, 309 (1964)
- 24) Spicer SS, Horn RG, Leppi TJ, Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides. In The Connective Tissue. Wagner BM, Smith ED (eds), Williams & Wilkins, 251-303 (1967)
- 25) Spicer SS, Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically. J Histochem Cytochem, 13, 211-234 (1965)
- 26) Lev R, Spicer SS, A histochemical comparsion of human epithelial mucins in normal and in hypersecretory states including pancreatic cystic fibrosis. Am J Pathol, 46, 23-47 (1965)
- 27) Hirabayashi Y, Light-microscopic detection of acidic glycoconjugetes with sensitized diamine procedures. Histochem J, 24, 409-418 (1992)
- 28) 平林義章, 酸性複合糖質の選択的方法, 日本組織細胞化学会 (編), 組織細胞化学1996, 91-95頁 (1996)
- 29) 平林義章, 磯貝文典, 山田和順, 結合組織酸性複合糖質の光顕組織化学における酵素消化法の活用方法. Connective Tissue, 24, 193-197 (1992)