

〈技術〉

中枢神経細胞質内の鍍銀陽性小体(核小体様封入体)の検索に 対するグルタルアルデヒド含有固定液の必要性

加藤 好光¹⁾、平山 将也²⁾、尾之内 高慶³⁾、
金子 千之²⁾、酒井 一由²⁾、安倍 雅人²⁾

Necessity of glutaraldehyde-containing fixative to search for silver-positive bodies (nucleolus-like inclusion bodies) in the central nervous system cytoplasm

Yoshimitsu Y Katoh¹⁾, Masaya Hirayama²⁾, Takanori Onouchi³⁾,
Chiayuki Kaneko²⁾, Kazuyoshi Sakai²⁾ and Masato Abe²⁾

Summary When paraffin sections of mouse brains fixed with an electron microscope fixative were stained by the modified Holmes method, silver-positive bodies were clearly stained in the nerve cytoplasm. The silver-positive bodies were identical to the nucleolus-like inclusion bodies observed by electron microscopy in the mouse and rat hypothalamic nerve cytoplasm. This study demonstrated that in order to observe the silver-positive bodies present in the neural cytoplasm of the central nervous system, a glutaraldehyde-containing fixative is required instead of a formalin-only fixative. Among the mixed fixatives, the mixed fixative of 2.5% glutaraldehyde and 5% formalin yielded the best results. However, for electron microscopic observation, we recommend a mixed fixative in which 5 % formalin is replaced with 2.5 % paraformaldehyde. In the future, it will be possible to search for silver-positive bodies in the central nervous system of laboratory animals and for silver-positive substances in the central nervous system in human brain tissues. In the hospital pathology laboratory, we hope that this information will aid in the search and diagnosis of silver-positive substances and neurodegenerative diseases.

¹⁾ 藤田医科大学サージカルトレーニングセンター
〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1番地98
²⁾ 藤田医科大学医療科学部
〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1番地98
³⁾ 藤田医科大学研究支援推進本部
〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1番地98

連絡先：加藤好光
藤田医科大学 サージカルトレーニングセンター
カダバーサージカルトレーニング施設
Tel: +81-562-93-9778
E-mail: ykatoh@fujita-hu.ac.jp

¹⁾ Surgical Training Center, Fujita Health University,
1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake, Aichi,
470-1192, Japan.

²⁾ Faculty of Medical Technology, School of Medical
Sciences, Fujita Health University, 1-98 Dengakugakubo,
Kutsukake-cho, Toyoake, Aichi, 470-1192, Japan.

³⁾ Research Promotion and Support Headquarters, Fujita
Health University, 1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-
cho, Toyoake, Aichi, 470-1192, Japan.

受付日：2021年3月18日

採択日：2021年5月17日

Key words: Glutaraldehyde-containing fixative, Silver-positive bodies, Nucleolus-like inclusion bodies, Modified Holmes method

I. 緒言

1982年に電子顕微鏡試料用に固定されたマウス青斑核領域のパラフィン切片に対してHolmes鍍銀染色法(原法)¹⁾で染色したところ、神経細胞質内に明瞭に観察される鍍銀陽性小体^{2,3)}に気づき、この鍍銀陽性小体が、1960年代よりラット^{4,7)}・マウス^{8,9)}の視床下部をはじめとする神経細胞質内に電顕観察された核小体様封入体と同一物である事を証明した²⁾。その後Holmes原法を改良したHolmes変法¹⁰⁾を発表し、この変法により、マウス中枢神経系で鍍銀陽性小体の観察される部位を検索し脳地図を作成している¹¹⁾。

しかし、核小体様封入体(鍍銀陽性小体)が正常神経細胞質内に存在することの機能的意義は解明されていない。その一つの理由として、核小体様封入体は一般的に使用されているホルマリン固定パラフィン切片の鍍銀染色では光学顕微鏡観察が出来なかった事による。

本研究の目的は、光学顕微鏡レベルで鍍銀陽性小体(核小体様封入体)を観察するためにグルタルアルデヒド含有固定が必須であるか否かを実証する事である。

II. 材料と方法

研究には正常ddY雄マウス(中部科学資材)の21匹(5週齢;体重約25g)を使用し、すべてのマウスはペントバルビタール深麻酔下にて、左心室より先ず0.9% NaClリン酸緩衝液を30ml流し、次いで各種の固定液で灌流している。固定液の違いにより、研究例1(n=5)は10%ホルマリン灌流固定後、同液に1日固定したもの(Fig. 1a)。研究例2(n=5)は10%ホルマリン灌流固定後、2.5%グルタルアルデヒドと5%ホルマリン混合液(最終濃度)で1日固定したもの、研究例3(n=11)は、ホルマリン濃度は5%で、グルタルアルデヒドのみ最終濃度を0.1%、0.5%、1.0%、2.5%(Fig. 1b)と変更した混合固定液でそれぞれ灌流固定後、同液に1日固定したもの。その後、すべての脳を

定法に従いパラフィン包埋し、青斑核領域の5μm連続切片を作製し、下記に示すHolmes変法^{10,11)}を施した。このHolmes変法は、2日間の行程で行うHolmes原法を約3時間に短縮した方法である。

Holmes変法

鍍銀液

- | | |
|--|----------|
| 1) 1.24%ホウ酸溶液(H ₃ BO ₃) | 55.0 ml |
| 2) 1.90%ホウ砂溶液(Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O) | 45.0 ml |
| 3) 蒸留水 | 394.0 ml |
| 4) 1%硝酸銀溶液(AgNO ₃) | 1.0 ml |
| 5) 10%ピリジン溶液 | 5.0 ml |

還元液

- | | |
|--|--------|
| 1) ハイドロキノン(C ₆ H ₆ (OH) ₂) | 1 g |
| 2) 亜硫酸ナトリウム(Na ₂ SO ₃) | 10 g |
| 3) 蒸留水 | 100 ml |

染色方法

- 1) 脱パラフィン、蒸留水で洗浄
- 2) 10%硝酸銀溶液 50°C 20分間
- 3) 蒸留水で3回洗浄
- 4) 鍍銀液 50°C 30分間(切片が肌色に変化)
- 5) 還元液 50°C 2分間(切片が黄色に変化)
- 6) 蒸留水で3回洗浄
- 7) 0.2%塩化金酸溶液 5分間(切片が灰白色に変化)
- 8) 蒸留水で3回洗浄
- 9) 2%シュウ酸溶液 5分間(切片が赤紫色に変化)
- 10) 蒸留水で洗浄
- 11) 5%チオ硫酸ナトリウム溶液 5分間(以降、金属籠等使用可)
- 12) 水洗
- 13) 脱水・封入

なお、この研究は藤田医科大学動物実験委員会からの承認(承認番号:AP16030)を得た研究である。

Ⅲ. 結果

研究例1の場合、10%ホルマリン固定液で固定された脳は肉眼的に白色で、柔らかであった (Fig. 1a)。ホルマリン固定のパラフィン切片をHolmes変法で染色すると、Holmes原法同様に神経突起は明瞭に染色されたが、脳組織間の保持が弱いため神経細胞の萎縮したものが多かった。また細胞質内の粗面小胞体 (ER) が濃く染色され封入体の存在は確認されなかった (Fig. 2)。

研究例2の10%ホルマリン灌流固定後、2.5%グルタルアルデヒドと5%ホルマリンの混合固定液で1日固定した標本では鍍銀陽性小体の存在が確認できた。この事は最初に10%ホルマリんで固定された脳組織でも、その後にグルタルアルデヒド含有固定液で再固定すれば、鍍銀陽性小体 (矢印) の検索が可能である事が確認された。その他の染色性は原法と同様に、核小体 (Nu) と神経線維 (Nf) および三叉神経中脳路核の神経細胞質内神経原線維 (Fi) が強陽性に染色され、細胞核 (N) と細胞質の辺縁部 (粗面小胞体; ER) は中等度に染色された (Fig. 3)。

研究例3では、グルタルアルデヒドの含有量を多くするに従ってアメ色が増加し、脳の硬さが増した (Fig. 1b)。それぞれの固定液で固

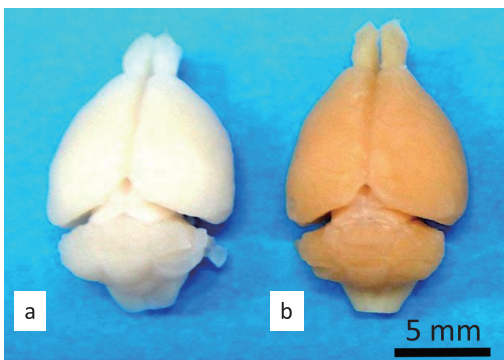


Fig. 1 a: Mouse brain fixed with 10% formalin fixative. The entire brain is white and soft.
b: Mouse brain fixed with a mixed fixative (final concentration) of 2.5% glutaraldehyde and 5% formalin. The entire brain is candy-colored and hardened by glutaraldehyde.

定されたパラフィン切片の青斑核領域をHolmes変法で染色し観察すると、0.1%と0.5%グルタルアルデヒド含有固定の場合神経細胞の萎縮はあったが、研究例2と同様に鍍銀陽性小体の存在が確認された (Fig. 4)。1.0%、2.5%とグルタルアルデヒドの含量が多くなると共に脳組織は硬く固定され、神経細胞の萎縮が少なくなり、細胞質の染色性も減少し核小体様封入体がより鮮明に鍍銀陽性小体 (矢印) として観察された (Fig. 5)。

Ⅳ. 考察

本研究により、パラフィン切片での鍍銀陽性小体である核小体様封入体の染色にはグルタル含有固定が必須である事が証明され、最適な固定液は2.5%グルタルアルデヒドと5%ホルマリンの混合液であった。またその固定試料は

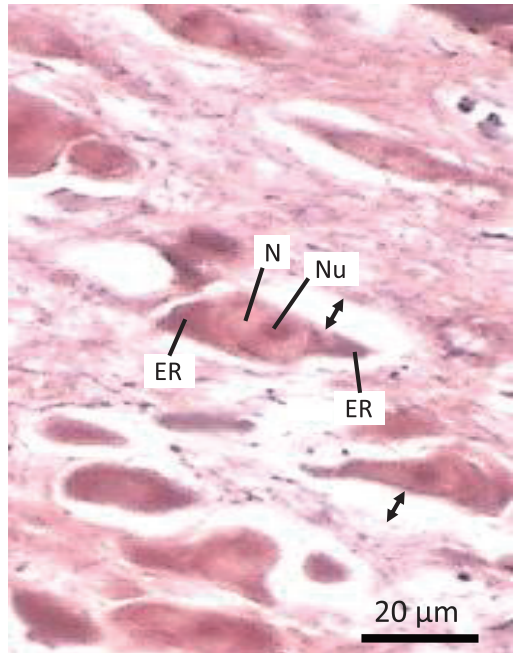


Fig. 2 Paraffin sections of the brain fixed with 10% formalin fixative. Specimen of the locus coeruleus in the brain stained by the modified Holmes method. Nerve cells are atrophied (↔) and the rough endoplasmic reticulum (ER) in the cytoplasm is deeply stained. N: nucleus, Nu: nucleolus

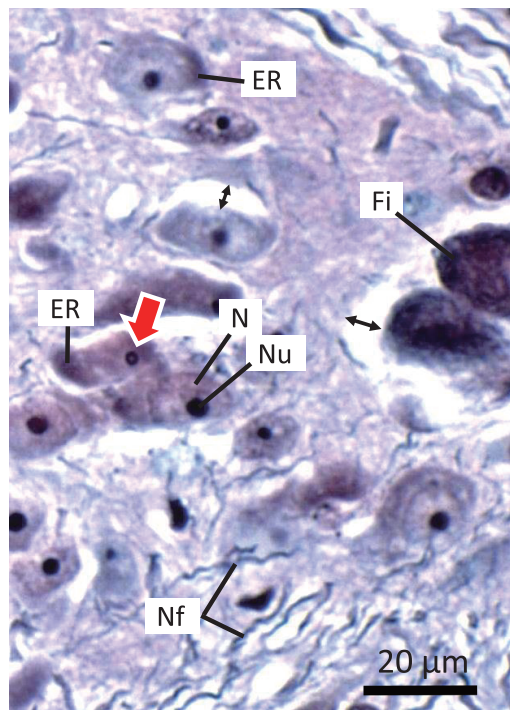


Fig. 3 Brain fixed with a mixed fixative of 2.5% glutaraldehyde and 5% formalin after 10% formalin fixation. A specimen of the locus coeruleus in the brain stained by the modified Holmes method. Nerve cells are atrophied (↔), but silver-positive bodies (arrow) are darkly stained. ER: rough endoplasmic reticulum, Fi: neurofibrils, N: nucleus, Nf: nerve fibers, Nu: nucleolus,

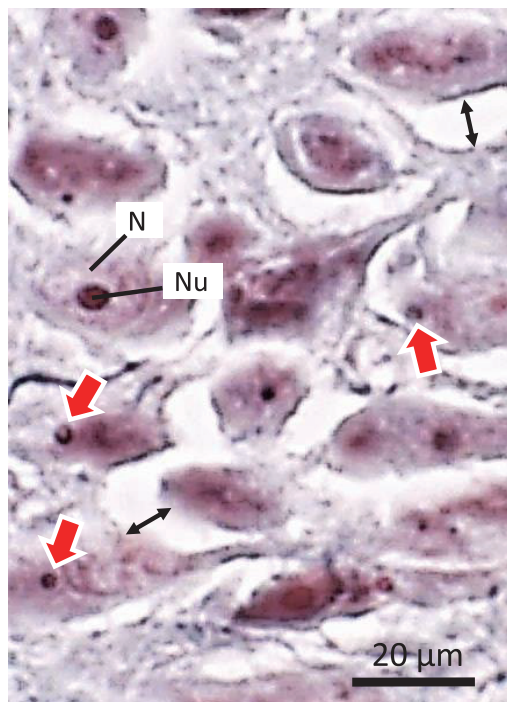


Fig. 4 Brain fixed with a mixed fixative of 0.1% glutaraldehyde and 5% formalin. A specimen of the locus coeruleus in the brain stained by the modified Holmes method. Nerve cells are atrophied (↔), but silver-positive bodies (arrow) are darkly stained. N: nucleus, Nu: nucleolus

電顕用試料としても活用できる。但し、筆者のこれまでの研究から電顕での観察を目的とする場合は5%ホルマリンを2%パラホルムアルデヒドに変更した混合液にする事を推奨する。またグルタルアルデヒド低濃度(0.1%)の混合固定液でも鍍銀陽性小体が確認された事は、今後鍍銀陽性物質の研究のために免疫染色の併用も可能となるかも知れない。

実験動物の中樞神経で鍍銀陽性小体(核小体様封入体)の詳細な検索・研究において、本法は簡便で有用な方法の一つであると思われる。従来、核小体様封入体の研究が電顕試料の超薄切片を電顕観察する事により報告^{4,9)}されたが、封入体の数量・量的変化を検索した報告は無い。今回のグルタルアルデヒド含有固定によるパラフィン切片で核小体様封入体が光顕観察でき

れば、その存在・数量・量的変化は容易に検索される¹¹⁻¹²⁾。本法使用によるマウスの研究において、鍍銀陽性小体が視床下部を初め自律神経系・モノアミン系・扁縁系に多く存在している事、マウスを脱水・絶食、レセルピン投与等の実験で鍍銀陽性小体が小さくなり数が減少する、そしてその後マウスを回復させると正常時の大きさと数量にもどる事などが分かっているが、その機能的意義については未だ不明である。今後、正常・病的状態の各種実験動物において鍍銀陽性小体(核小体様封入体)の存在有無を本法で確認し、生理学的実験・新規手法を取り入れ、鍍銀陽性小体の機能的意義、臨床的意義を解明したいと考えている。

また病理検査室では一般的にホルマリン固定が主流であるため、本来染色される鍍銀陽性物

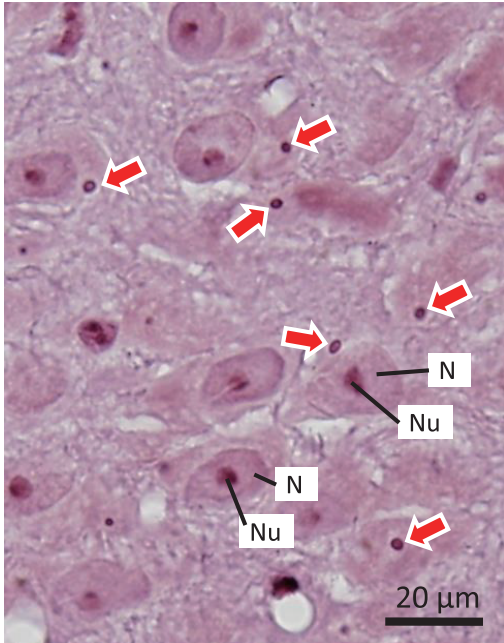


Fig. 5 Specimens of paraffin sections (5 μm) fixed with a mixed fixative of 2.5% glutaraldehyde and 5% formalin stained by the modified Holmes method. The brain tissue is firm and there is no nerve cell atrophy. Silver-positive bodies (arrow) are clearly stained. N: nucleus, Nu: nucleolus

質の存在を見逃していた可能性が考えられる。よって本法を活用し、試料の一部をグルタルアルデヒド含有固定液で固定しHolmes変法を施せば、これまで観察されていなかった鍍銀陽性物質が観察されるかも知れない。更に神経原線維変化など神経変性疾患¹³⁾の病理学的診断の一助になる事を期待している。

謝辞

稿を終えるにあたり、解剖学研究同好会の岡本優依君、水田朱音君、松本優南君らの標本作製に対する熱心な助力に感謝いたします。

また本研究の一部は藤田学園研究助成費の助成を受けて行ったものである。

本論文内容に関する著者らの利益相反：なし

文献

- 1) Holmes W: Silver staining of nerve axons in paraffin sections. *Anat Rec*, 86: 157-187. 1943.
- 2) 加藤好光: 青斑核領域に見られる核小体様封入体. *脳神経*, 34: 39-45. 1982.
- 3) Katoh Y and Shimizu N: The light and electron-microscopic localization of intracytoplasmic nucleolus-like bodies in the mouse brain stained by Holmes' silver method. *Arch histol Jpn*, 45: 325-333. 1982.
- 4) Kawabata I: Electron microscopy of the rat hypothalamic neurosecretory system. II. Nucleolus-like inclusion bodies in the cytoplasm of neurosecretory cells. *Arch Histol Jpn*, 26: 101-113. 1965.
- 5) Shimizu N and Imamoto K: Fine structure of the locus coeruleus in the rat. *Arch Histol Jpn*, 31: 229-246. 1970.
- 6) Grillo MA: Cytoplasmic inclusions resembling nucleoli in sympathetic neurons of adult rats. *J Cell Biol*, 45: 100-117. 1970.
- 7) Hindelang-Gertner C, Stoeckel ME, Porte A, Dellmann HD and Madarász B: Nematosomes or nucleolus-like bodies in hypothalamic neurons, the subfornical organ and adenohipophysial cells of the rat. *Cell Tiss Res*, 155: 211-219. 1974.
- 8) Anzil AP, Herrlinger H and Blinzinger K: Nucleolus inclusions in neuronal perikarya and processes: Phase and electron microscope observations on the hypothalamus of the mouse. *Z Zellforsch*, 146: 329-337. 1973.
- 9) Santolaya RC: Nucleolus-like bodies in the neuronal cytoplasm of the mouse arcuate nucleus. *Z Zellforsch*, 146: 319-328. 1973.
- 10) Katoh Y and Shimizu N: Identity of Holmes positive bodies with electron microscopically demonstrable nucleolus-like bodies in neuronal cytoplasm. *Stain Technol*, 57: 83-89. 1982.
- 11) 加藤好光、岸 千絵子、高野洋人、山田敬喜、磯村源蔵: マウス神経細胞質内に観察される核小体様封入体とその脳内分布：Holmes変法による研究. *形態・機能*, 1: 3-11. 2003.
- 12) Katoh Y and Shimizu N: Quantitative changes of Holmes positive nucleolus-like inclusion bodies in the mouse locus coeruleus under various experimental conditions. *Arch Histol Jpn*, 46: 491-500. 1983.
- 13) Pick A: Ueber die Beziehungen der senile Hirnatrophie zur Aphasie. *Prag Med Wochenschr*, 17: 165-167. 1892.