

組織固定剤としてのタンニン酸, 特にグルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒドとの混用

岡山大学医学部第二解剖学教室 (主任: 村上宅郎教授)

村上 宅郎, 朴 大勳, 大塚 愛二, 西田圭一郎

(平成8年6月27日受稿)

Key words : Tannic acid, paraformaldehyde, glutaraldehyde, tissue fixation

緒 言

タンニン酸は五倍子または没食子から単離されるガロイルグルコースで, その生薬はタンナルビンが登場するまで腸収斂薬として重用された。タンニン酸は皮のなめし剤, お歯黒の基材(附子)としても名高く, 農家では竹籠など張り子の上薬(柿のしぶ)としても使用された。

タンニン酸の組織学における利用は Schuberg (1909) の Azur-Eosin 染色¹⁾ からで, その後渡銀の還元剤等に多用された²⁾。そして水平らはタンニン酸とグルタルアルデヒドの混液は弾性線維を明瞭に固定する強力な組織固定剤であることを示した³⁾。ほぼ同時に, 私達はタンニン酸の組織固定作用と金属還元作用を利用してタンニン・オスミウム導電染色法を開発し⁴⁾、続いてアルギニン等のアミノ酸や糖質を用いてタンニン酸の組織内植え込みの増強を行った⁵⁾。

本研究では組織固定剤としてのタンニン酸を再検討し, タンニン酸単独でもペプトンを沈殿させ, グルタルアルデヒドやパラホルムアルデヒドと混用すると単味のアルギニンをも沈殿させる強力な固定剤であることを述べる。

材 料 と 方 法

1. 下記 a) - e) の固定液を調製した。

a) タンニン酸単独液 (タンニン酸, TAAB Laboratories, を0.5%の割合に含む0.1M カコジル酸緩衝液, pH7.2) - (T液)

b) グルタルアルデヒドまたはパラホルムアルデヒド単独液 (グルタルアルデヒド, 片山化学, を2.5%またはパラホルムアルデヒド, 片山化学, を4.0%の割合に含む0.1M カコジル酸緩衝液, pH7.2) - (G液またはP液)

c) グルタルアルデヒド・タンニン酸混液 (グルタルアルデヒドを2.5%, タンニン酸を0.5%の割合に含む0.1M カコジル酸緩衝液, pH7.2) - (GT液)

d) パラホルムアルデヒド・タンニン酸混液 (パラホルムアルデヒドを4.0%, タンニン酸を0.5%の割合に含む0.1M カコジル酸緩衝液, pH7.2) - (PT液)

e) グルタルアルデヒド・パラホルムアルデヒド・タンニン酸混液 (グルタルアルデヒドを2.5%, パラホルムアルデヒドを4.0%, タンニン酸を0.5%の割合に含む0.1M カコジル酸緩衝液, pH7.2) - (GPT液)

2. 下記 f) - l) のアミノ酸, ペプチドの単味被験液を調製した。

f) グリシン液 (グリシン, 片山化学, を10%の割合に含む蒸留水)

g) アルギニン液 (アルギニン, 片山化学, を10%の割合に含む蒸留水)

h) グルタミン酸液 (グルタミン酸飽和, またはグルタミン酸ソーダ, 片山化学, を10%の割合に含む蒸留水)

- i) グルタチオン液 (グルタチオン還元型, ナカライテスク, を10%の割合に含む蒸留水)
 - j) ペプトン液 (ペプトン, ミクニ化学, を10%の割合に含む蒸留水)
 - k) アルブミン液 (牛血清アルブミン, 片山化学, を10%の割合に含む蒸留水)
 - l) ゼラチン液 (ゼラチン, 片山化学, を10%の割合に含む蒸留水)
3. 上記1の固定液と2の被験液を4:1の割合で混合し, 沈殿の有無を調べた. また適宜に0.1NHClまたはNaOHを滴下してpH値を上下して反応の変化をみた.

結 果

- 1) グリシン液
pH7.2—1.0ではT, G, P, PT液に全く反応しなかった. しかし, GTとGPT液にはpH1.5で反応し白色沈殿が生じた.
- 2) アルギニン液
pH7.2—1.0ではT, G, P液に全く反応しなかった. しかし, GTとGPT液にはpH8.0—1.0で白色沈殿が生じた. PT液にはpH6.0—1.0で白色沈殿がみられた.
- 3) グルタミン酸液
pH7.2—1.0でT, G, P, GT, PT, GPT液に全く反応しなかった.
- 4) グルタチオン液
pH7.2—1.0でT, G, P, PT液に全く反応しなかった. しかし, GTとGPT液にはpH5.0—1.0で反応し白色沈殿が生じた.
- 5) ペプトン液, アルブミン液, ゼラチン液
これら3液はpH7.2—1.0でGとP液には全く反応しなかった. しかし, 3液はpH7.2のレベルで直ちにT液はもちろんのことGT, PT, GPT液と反応し白色沈殿を生じた.
- 6) アルギニンとグルタチオン液の分離処理
T, G, P液を加えたアルギニン各液にそれぞれG, T, T液を追加すると各液に沈殿が起こった. 同様の現象はグルタチオン液でも認められたが, グリシンとグルタミン酸液では認められなかった.

考 察

昨今の組織固定では構造の保全とともに, 酵素や生体物質の保存とその活性保持が要求される. そして, 従来のホルムアルデヒドに代わってグルタルアルデヒドやパラホルムアルデヒドが一般的に使用されている. タンニン酸は凝集反応が強く組織固定には適さないと考えられてきた. パラホルムアルデヒドは従来常用されたホルムアルデヒドの環状三量体トリオキシメチレンと考えられてきたが, $(\text{CH}_2\text{O})_n$ のnが3以上10~1000のものも含むとされる.

水平と協同研究者達はタンニン酸とグルタルアルデヒドとを混用することによって弾性線維などを透過電顕下に明瞭に観察した³⁾. そして, その後の検討によって, タンニン酸は組織との凝集反応を軽減できる0.5%の濃度でも十分な固定効果が期待できることが明らかとなってきている.

本研究は水平らの研究を補完するものである. すなわち, 本研究はタンニン酸とグルタルアルデヒドとの混液はアルギニンなどの塩基性アミノ酸をpH7.2の生理的レベルで沈殿させ, 中酸性域でグルタチオンを凝集し, 強酸性域でグリシンと反応する非常に強力な組織固定剤であることを証明した. さらに本研究はパラホルムアルデヒドとタンニン酸との混液もほぼ同様の効果が期待できることを明らかにした. 私達は, 特に脳の透過電顕観察においては, 2.5%グルタルアルデヒド・4.0%パラホルムアルデヒド・0.5%タンニン酸混液を常用している. このタンニン酸を含む固定液では粗面小胞体やゴルジ装置の腔内物質や神経細胞周囲のプロテオグリカン被膜が明瞭に可視化される.

タンニン酸の組織活性への影響については十分に検討されていない. しかし, 私達の最近の関節フィブロネクチン金コロイド免疫染色では, グルタルアルデヒド単独固定よりグルタルアルデヒド・タンニン酸混液固定で従来の所見をしのぐ良い結果を得ている⁶⁾. また別の実験で, ラットやマウスの脳を4%パラホルムアルデヒド・0.5%タンニン酸混液で固定して, レクチン標識・ヒアルロニダーゼ消化・コンドロイチナーゼABC消化を行ったところ, 得られた所見は

4%パラホルムアルデヒド単独固定による所見に劣ることはなかった⁷⁾。従って、タンニン酸は、低濃度で使用するかぎりでは、免疫反応・レクチン標識・酵素消化などの組織化学的検索に特に障害にならないと思われる。組織化学あるいは免疫組織化学的検索のためにホルムアルデヒドが単独で使用されることがある⁸⁾。この場合でもタンニン酸との混用が期待される。なお、タンニン酸を含む固定剤はpHによって固定力が異なるので実際の使用にあたってはpH値を十分に考慮する必要がある。また、目的によってタンニン酸の使用量を適宜に増量してもよいと思われる。

タンニン酸の活性基はガロイル基でありフェノール性OHである。グルタルアルデヒドやパラホルムアルデヒドの活性基はアルデヒド基でありアセタールOHである。これらの二種のOHを介してタンニン酸とアルデヒドが単味のアミノ酸の間に入って巨大分子を形成し、沈殿をおこすと考えられる。このことと関連して、ペプトン、アルブミン、ゼラチンがタンニン酸単独処理で沈殿し、グルタルアルデヒド単独では沈殿しないことは興味深い。グルタルアルデヒドあるいはパラホルムアルデヒドとタンニン酸によるアルギニンとグルタチオンの分離処理

でも沈殿が起ることも面白い。すなわち、これらの事実はタンニン酸とアルデヒドとは、アミノ酸、ペプチドあるいは蛋白のそれぞれ異なった部位に作用していることを示唆している。なお、アセタールOHはアミノ基に反応してメチレン架橋を形成することはよく知られている。

タンニン酸の糖質との反応は明らかでない。しかし、私達の先の実験ではタンニン酸で処理した澱粉はオスmium酸に染まり黒変した⁹⁾。この実験は、タンニン酸は糖質と静電的に結合することを示唆している。

結 論

タンニン酸とグルタルアルデヒドないしパラホルムアルデヒドとの混液は単味の塩基性アミノ酸であるアルギニン、オリゴペプチドであるグルタチオンを沈殿させる強力な組織固定剤である。このタンニン・アルデヒドで固定された組織は免疫反応、レクチン標識、酵素消化等の組織化学的検索によく反応する。

謝 辞

草野博通、榑崎正博、溝口久夫技官の協力に深謝します。

文 献

- 1) Schuberg A: Über die Färbung von Schnittpräparation mit der Giemsa'schen Azur-Eosin-Methode. Deutsche med Wochenschrift (1909), S 2106.
- 2) Romeis B: Tannin-Silber-Methoden; in Mikroskopische Technik, B. Romeis ed, R. Oldenbourg Verlag, München · Wien (1968) pp383—387.
- 3) Mizuhira V, Nakamura H and Fujioka T: New staining method for the elastic fibers using tannic acid-glutaraldehyde mixture. J Electron Microsc (1972) 21, 240.
- 4) Murakami T: A metal impregnation method of biological specimens for scanning electron microscopy. Arch Histol Jpn (1973) 35, 323—326.
- 5) Murakami T: A revised tannin-osmium method for non-coated scanning electron microscope specimens. Arch Histol Jpn (1974) 36, 189—193.
- 6) Nishida K, Inoue H and Murakami T: Immunohistochemical demonstration of fibronectin in the most superficial layer of normal rabbit cartilage. Ann Rheum Dis (1995) 54, 995—998.
- 7) 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 Jpn (1995) 58, 557—565.
- 8) Puchtler, H and Meloan SN: On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. Histochemistry (1985) 82, 201—204.

**Tannic acid as a tissue fixative, with special reference
to mixed use with glutaraldehyde and paraformaldehyde**

**Takuro MURAKAMI, Da Xun PIAO,
Aiji OHTSUKA and Keiichiro NISHIDA**

**Section of Human Morphology,
Department of Anatomy,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan
(Director: Prof. T. Murakami)**

Tannic acid mixed with glutaraldehyde or paraformaldehyde is a strong fixative, which can precipitate amino acids and oligopeptides such as arginine and glutathione. Tissue specimens fixed with this tannin-aldehyde mixture are useful for histochemical studies, including lectin labeling, immunological staining and tissue enzyme digestion.