

硬組織におけるアルカリ・フスフターゼの 組織化学的証明法

京都大学結核研究所病理学部主任 助教授

高 松 英 雄

京都大学医学部整形外科教室 講師 (主任 近藤鋭矢教授)

赤 星 義 彦

[原稿受付 昭和32年1月14日]

A NEW TECHNIQUE FOR THE HISTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF ALKALINE PHOSPHATASE IN HARD TISSUES. (BONE AND CARTILAGE)

by

HIDEO TAKAMATSU

(The Pathological Division, Tuberculosis Research Institute, Kyoto University.)

YOSHIHIKO AKAHOSHI

(The Orthopedic Division, Kyoto University Medical School)

(Director : Prof. Dr. EISHI KONDO)

Since the publications of the histochemical demonstration of alkaline phosphatase by TAKAMATSU (1938) and GOMORI (1939), numerous histochemical investigations of phosphatase activities in animal and also human tissues were reported, but the technical difficulties of the histochemical demonstration of hard tissues have still remained unsolved.

In regard to ossification, it seems that an old Robinson's theory has given an indelible impression for many investigators and some misunderstandings on this enzyme has been current. So the authors had been tried to improve the technique for the histochemical demonstration of this enzyme in calcified hard tissues, and revised the procedure of decalcification and also the staining course as a whole.

The authors revised method can be summeriezed as follows;

I] Decalcification and Reactivation.

After the fixation of the hard tissues in a cold mixture of absolute alcohol and acetone in equal parts for several days, the tissues were washed in short time, and then immersed in a following decalcifying solution at ordinary room temperature.

Decalcifying solution : 5% solution of Terasodium salt of EDTA (Ethylen Diamin Tetraacetic Acid) and 5% solution of Disodium salt of EDTA were prepared.

These two solutions were mixed in equal parts before use. This mixture indicates neutral nature (abuot pH 6.8~7.3). The completion of demineralization may be recognized by daily stab test with needle.

After the finish of demineralization, the slices were washed in a tap water about 30~60 minutes and dehydrated with alcohol, and then embedded in celloidin.

Before the histochemical use, sections were reactivated in a 1% solution of magnesium choride for several hours.

II] Histochemical Procedure for Alkaline Phosphatase.

The reactivated celloidin sections were tested for the demonstration of alkaline phosphatase by Takamatsu and Nishi's method.

1) Place in the following mixture of substrates at 37° C for 10-15 hours.

1% sodium β -glycerophosphate solution	20 cc.
1% calcium chloride solution	20 cc.
Palitzsch's buffer solution	10 cc.

This mixture was adjusted to a final pH 9.2 by addition of alkali.

2) Wash in distilled water.

3) Place in 5% silver nitrate solution about 5 to 10 minutes.

4) Wash in distilled water and place in neutral formol solution about 5 to 10 minutes.

5) Wash in distilled water twice about 20 to 30 minutes and then immerse in 0.1% gold chloride solution about 1 to 2 hours.

6) Wash in distilled water and place in 5% sodium thiosulfate solution about 1 minutes.

7) Rewashing in tap water, and counter-stain may follow by Kernechtrot solution.

8) Dehydrate through alcohol and mount in balsam as usual.

The sites of alkaline phosphatase activities were shown by deep blue or violet in various grades according to the activities, indicating a formation of metallic gold.

At higher magnifications, the sites were observed as fine granular precipitates in cytoplasm.

I い と ぐ ち

フォスファターゼの組織化学的研究は、細胞の機能と其形態学的変化の関連性を追求する意味に於て、もつとも重要な検索法の一つとして既に広く利用されている。

然るに骨軟骨組織に於ては、カルシウム、磷及び組織の基質となる蛋白の代謝にアルカリ、フォスファターゼ（以下 Al-P-ase と略す）が何らかの重要な役割りを演ずる事が認められているに拘らず、脱灰操作を伴う組織化学的証明法の困難さの故をもつて未だ充分に解明されるに到っていない。

即ち1938年著者の一人高松が Al-P-ase の組織化学的証明法について最初の発表を行つた際は、従来の強酸による脱灰法では酵素作用が著しく損われるため非脱灰のまつエロイジン切片とし、又は凍結切片を用いたが此の方法では研究材料の種類に制限を受けるのは当然である。その後 Kabat & Furth (1941) は弱酸性10% Diammonium citrate 溶液を使用して脱灰した硬組織における Al-P-ase の証明を試み、以来各種の弱酸性溶液を用いた報告が多く見られるに到つた。特に Lorch (1946) は Walpol の醋酸緩衝液の優秀性を発表し、Greep & Morse (1947) は各種弱酸性溶液による脱灰法を比較検討したが、此等の方法を

用いて生理的並に病的骨軟骨組織における Al-Pase についても多くの研究業績が相次いで発表された。

(Greep, Fisher, Monse, Lorch, BrucKner, Harris, Zorzori, Majno, Rouiller, Siffert, 高松, 岩, 蒲原)

我々も従来広く使用されている Lorch 及び Greep の弱酸性緩衝液による脱灰法を追試したが、酸性溶液を以てする脱灰法では如何にしても酵素作用の減弱が著しく、又種々の再賦活剤を一定の大きさを有する組織片に長時間作用せしめねばならないので非特異性反応或は染色の不均等が現われる場合が多いことを知った。更に又比較的大きな組織片に対する検索が殆んど不可能であるため、此等の欠点を可及的少くする目的で特殊な脱灰作用を有している EDTA (Ethylen Diamin Tetraacetic Acid) を用いて脱灰し、従来と全く別の方法に依る染色法を試みた。我々は EDTA が金属塩特に 2 価の金属イオンと結合して可溶性の非イオン性錯塩を作る性質を有し、従つて中性溶液での脱灰が可能であることに特に注目したのである。

我々のこの方法は既に昭和30年4月の第29回日本整形外科学会にその大要を発表したが詳細の問い合わせが多いので、改めて本誌上に紹介したいと思う。尚同様の研究が、海外に於ても、我々と別個に行われたが内容に於て異なるところがある。

本研究に際しては、健常海狸、結核罹患海狸、ラッテ、マウス、幼若家兎の膝関節全剔出標本、肋骨肋膜軟骨境界部及び人体材料について後述の如き種々の条件を組合せ、同時に動物の腎及び肝を全く同様の操作を加えて染色を行い従来の方と比較検討し、又松崎は歯芽組織について研究を行つた。此等の成果より按ずれば、本法は極めて優れた方法であることを確信するものである。

II 実施法について

I) 標本の採取固定

一般に酵素の組織化学的検索法の原理は、酵素自体の直接的証明ではなく、酵素作用の結果であるところの反応産物の証明、例えば基質の分解産物を沈澱捕捉し、更に呈色せしめ反応結果を検鏡するとき間接の証明法である。従つて酵素の活動性を保持すると同時に操作中における酵素及び反応産物の位置の移動を最少限にする事が必要である。

採取標本は直ちに固定液に投じ固定液は1日2~3回交換し、氷室内(約4°C)に保存する。

組織片の大きさは、勿論可及的小片である方がよいが検索の目的上比較的大きな標本を必要とする場合は、その不要断面のみを切除して薄片とする。例えば海狸膝関節全剔標本の如きものでは、その矢状断面に平行に両側からクーパー剪刀、グラインダー或いは歯科用モーター鋸で切除する。この場合周囲軟部組織に脂肪が多く存在すると正確に切断出来ないから先づ全標本を固定し、12~24時間を経てから脱脂と固定液浸透の程度に従つて少しづつ切除してゆくと2~3日の固定期間中に軟部組織も離開する事なく正確に鋸断、鈍磨し得て、3~5mmの薄い標本が出来る。更に2~3日充分に固定を行う。

固定液については、80%、90%、無水アルコール、無水アルコール及び純アセトン等量混合液について比較したが Al-P-ase の如き水解酵素では、80~90%アルコールよりも無水アルコールの方が良好と考えられ、実際的には無水アルコール、純アセトン等量混合液の場合もつとも美麗で鮮鋭な標本が得られた。尚骨軟骨組織では特に固定を充分行う必要があり、不十分であれば染色の不均等性があらわれ鮮鋭度が低下する。

2) 脱灰法

i) 0.2N 醋酸, 0.2N 醋酸ソーダ等量液 (Lorch),
ii) 10%スルフォサリチル酸, 20%クエン酸ソーダ混合液(Greep) iii) 5%アルカリ中和 EDTA液 (Disodium salt pH 5.2をNaOHで中和), IV) 5%酸中和 EDTA液(Tetrasodium salt pH 11.2をHClで中和),
v) 5%EDTA液 (Disodium salt と Tetrasodium saltの等量液) 及び3%, 10% EDTA液について比較検討した。脱灰速度はv) がもつとも速く、従来広く用いられていた Lorch液と比較して約4~5倍であり幼若動物では数時間の脱灰で充分目的が達せられ且つ脱灰液を毎日交換する必要はない。海狸膝関節では5~10日同一脱灰液中に浸漬して完了するが酵素作用の著しい減弱はみられなかつた。

この脱灰液のpHに関する実験では、EDTA液に於てはpH 5.5以下、pH 9.0以上では脱灰速度が急激に低下しpH 7~9の範囲に於てもつとも速かな脱灰作用がみられる。v)の作製に当つてはD.S.(Disodium salt)とT.S.(Tetrasodium salt)の等量混合によつて、略々pH 7.0となるが、時には多少の移動があるので使用に際しては電気pH測定器等を用いる。酸性なればT.S.を、アルカリ性なればD.S.を滴下して修正することが望ましい。iii) iv) ではpHの移動がおり

易く、i) ii) では後述の如き再賦活剤を長時間作用せしめない限り酵素作用が発現しない等の欠点がある。v) がもつとも良好な脱灰液である事は同様な操作を行つた腎、肝組織に依つても明瞭に認められた。

脱灰温度は27°C以内(冬は室温、夏は冷暗所)であれば特別な障害はないが、27°C以上では明らかに障害され37°C以上では殆んど証明されなくなる。又氷室内では幼若動物の脱灰は良好な結果が得られたが脱灰速度は遅延する故大体17°C前後が最も適当と考えられる。尚脱灰操作中組織片の表面に附着したCO₂ガスの除去促進のため、減圧脱灰或は振動法を試みたが実用的には必ずしもその必要はなく時々容器を手を持つて振る程度で充分である。

脱灰操作による酵素作用減弱の程度は動物の腎又は肝を同時に浸漬する事によつて比較し得るが従来弱酸性溶液では3~5日で障害が認められるに反し、中性EDTA溶液は5~7日でも認むべき障害はみられなかつた。但し10~14日に於ては酵素反応減弱の傾向があらわれ特に高温で脱灰すると著しい。

脱灰の程度は慣用の針で判定し、完了後は30分~1時間流水々洗を行い型の如くツエロイジンに包埋する。切片作製時一部脱灰不十分であればツエロイジンブロックのまま、EDTA液に切口を接して浸漬しておく事により10~24時間で10枚程度の切片は作製出来る。

3) 再活性化

Al-P-aseの賦活剤については多くのものが知られており従来文献によると脱灰操作中における硫酸亜鉛の添加、脱水アルコール中におけるグリシン、バルビタールソーダ等の添加及びpHのアルカリ性修正、或は基質液へのバルビタールソーダ、マグネシウムイオンの添加等が報告されてをり、殊に酸性溶液による脱灰を行つた場合は此等の操作を加えても酵素作用を充分に回復せしめることは困難である。

又此等賦活剤については、未だその作用機序も解明されているとは云い難く、而も組織片を一塊として長時間作用せしめて、果して正確な位置に酵素作用が発現するか否かについては甚だ疑問である。事実EDTA溶液脱灰の場合、組織片に対してバルビタール、グリシンを長時間作用せしめると染色の不均等性、非特異性反応、例えば核の濃染、拡散のあらわれる傾向が強くなり、むしろ此等の所謂賦活剤を作用せしめない方が理論的に正しい存在部位を示した。

従つて組織化学的検索に当つては此等薬剤による所

謂再活性化は出来る丈用いないか或は最小限にとどめるべきであろう。EDTA溶液による脱灰時にはCaイオンと同時にMgイオンも脱却せしめられるので、後にこれを補うために切片を1% MgCl₂水溶液に漬すことにより良好な結果を得た。Mgイオンの賦活作用についてKabat & FurthはM/100 Mg So₄を反応液に加える事をすゝめ、その後多くの生化学的研究もみられるが、Jenner & KeyはM/3000~M/1000の低濃度として用うべきだと述べている。又武内等は基質液にM/25~M/250のMgCl₂を添加した場合もつともよく反応が現われると報告している。然し高松等の研究に依ると組織中のAl-P-aseにはMgイオンの添加によつて始めて作用の現われるものと然らざるものと二型がある事が判明している。此等賦活剤の問題については更に検討すべき余地が多く残されているが、ともかく、EDTA液脱灰の際にはMgイオンの含まれる液に漬すことは必須の事柄である。

4) Al-P-aseの証明

Al-P-aseの証明法については、反応液中で生じた磷酸カルシウムを磷酸銀とし更にこれを還元して金属銀とする高松法、磷酸カルシウムを磷酸コバルトに変え次に硫化コバルトとするGomori法或はアゾ色素を用うる方法があり、上述の原則を用いた幾多の改良法も報告され、その優劣についても種々論議されているが染色標本におけるAl-P-aseの出現部位については高松法がもつとも微細な構造を示し非特異性反応も少いと考えられる。

然し高松法、Gomori法によると鏡検の際、リボクローム、ヘモジデリン、ヘモジリン等の褐色色素或は脱灰不十分な骨組織とAl-P-ase存在部位との判別が付き難い事が屢々あるので、此の欠点を補うために改良された高松・西法(1953)に従つて金置換法を行つた。

即ちツエロイジン切片(90%アルコール保存)を1% MgCl₂液中に数時間浸漬した後、次の如き基質液で37°C10~15時間反応せしめる。

{	1% β-グリセロ磷酸ソーダ	20cc
	1% 塩化カルシウム	20cc
	Palitz 硼酸緩衝液 (pH9.2)	10cc

pH9.1~9.3以内にある様毎回適宜修正を行う。又場合によつては更に2.5% MgCl₂10cc(混合液中濃度M/50)を加える。対照標本にはβ-グリセロ磷酸ソーダを省いた反応液を用うる。

反応後水洗して5% 硝酸銀液中に入れると酵素反応

によつて生じた磷酸カルシウムは、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + 6\text{AgNO}_3 \rightarrow 2\text{Ag}_3\text{PO}_4 + 3\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、稍褐色味を帯びた磷酸銀となる。充分水洗した後37%中性フォルマリン液 ($\text{MgCO}_3 + \text{Mg}(\text{OH})_2$ の過飽和溶液を濾過)に数分、液を捨て、蒸溜水を加え20~30分放置すると還元されて黒褐色の金属銀となる。更に充分水洗した後0.01%塩化金液中加入金属銀を金に置換せしめるとAl-P-aseの存在部位は美麗鮮やかな青紫色を呈して来る。水洗後5%チオ硫酸ソーダ液で定着して余分の金属塩を除去、流水水洗した後ケルンエヒトロート液

- a. Kernechtrot 0.5g
 焼明パン 5g
 蒸溜水 100cc
 b. 1%Ba(NO₃)₂

(a:b=9:1の割に混じたものを濾過)による後染色を行い型の如く脱水、封入を行う。

Ⅲ 総 括

本改良法の要点は、第一に脱灰操作をEDTA中性溶液(4曹達塩と2曹達塩の等量混合液を用いたことが特徴)で行い、第二に酵素反応証明法の後段階で生じた磷酸銀を中性フォルマリンで還元し、更にこの金属銀を金に置換して優れた標本を作製し得るに到つたのであるが、前述の方法を要約すると次の様である。

- 1) 固定:無水アルコール、純アセトン等量混合液(氷室内)1日2~3回交換し3~5日
- 2) 脱灰:5%EDTA液(Disodium saltとTetradsodium salt等量混合液 pH 7.0)
- 3) 約1時間水洗後、脱水、ツエロイジン包埋
- 4) 切片を水洗(以下すべて蒸溜水を用う)して1%MgCl₂液に数時間
- 5) 基質液反応:37°C10~15時間(pH9.1~9.3に修正)
- 6) 軽く水洗して5%硝酸銀 7分
- 7) 水洗して37%中性フォルマリン液 7分、液を捨て、静水中に20~30分
- 8) 再び水洗して0.01%塩化金液1.5~2時間
- 9) 水洗、5%チオ硫酸ソーダ液 1分
- 10) 流水水洗
- 11) 後染色:ケルンエヒトロート 約5分
- 12) 水洗、脱水、カルボールキシローール透徹

13) バルサム封入 検鏡

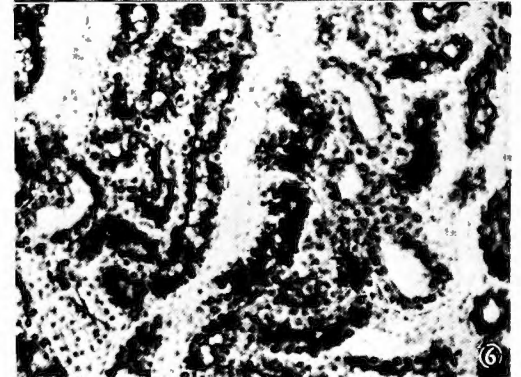
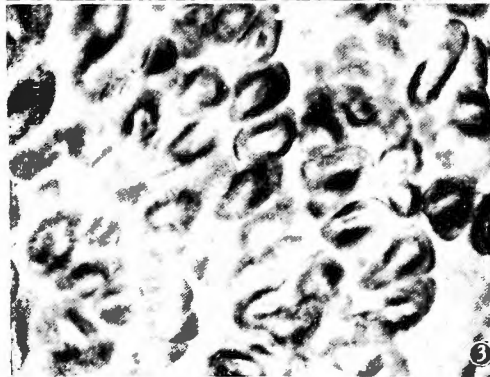
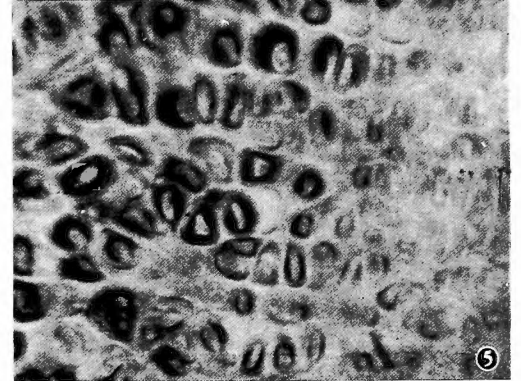
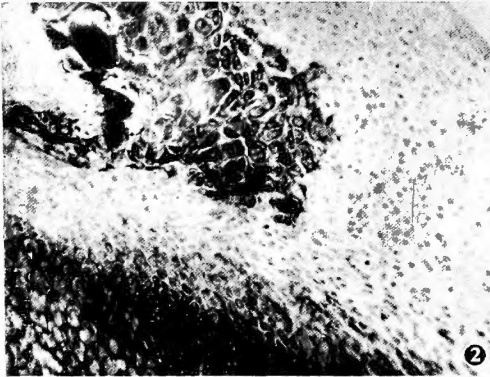
Al-P-ase存在部位は美麗な紫色を呈し、細胞核その他は後染色により淡赤色にに染色される。強拡大によると細胞原形質内に微細な顆粒として見られ、時には核の周囲に吸着されている事もあるが核内には認められない。

此の事はPhospho-mono-esteraseの理論的に正しい存在部位を示すものであり、且つ又種々の黒褐色色素との鑑別も容易である事、金属金は種々の化学薬品に対する安定性が高いために永久標本として保存し得る事等の利点を有している。

本研究に対し終始御鞭撻を戴き御校閲を賜つた京大整形外科近藤鋭矢教授に深甚の謝意を表する。

参 考 文 献

- 1) Birge, E. A. and C. E. Imhoff; Am. J. Clin. Path., 22; 192, 1952
- 2) Bourne, G.; Quart. J. Exp. Physiol., 32; 1, 1943
- 3) Dallemagne, M. J.; Anual. Rev. Path., 12; 101, 1950.
- 4) Dotti, L. B., Papero, G. P. and B. Clarke; Am. J. Clin. Path., 21; 475, 1951.
- 5) Gomori, G; Mic roscopic Histochemistry, Chicago, 1952
- 6) Greep, R. O., E. J. Fisher and A. Morse; Science, 105; 666, 1947.
- 7) idem.; J. Am. Dent. Assoc., 36; 467, 1948.
- 8) Hahn, F. L. and F. Reygadas; Science, 114; 462, 1951
- 9) Ham, A. W.; Histology p.204 1953.
- 10) Hillman, H. H. and C. H. Lee; Stain Tech., 28; 285, 1953.
- 11) Jacoby, F. and B. F. Martin; Nature, 163; 875, 1949.
- 12) Kabat, E. A. and J. Furth; Am. J. Poth., 17, 303, 1941.
- 13) Lillie, R. D: Histopathologic Technic, 1947.
- 14) Lillie, R. D. et al.; Am. J. Clin. Path., 21, 711, 1951.
- 15) Lorch, J.; Nature, 158; 269, 1946.
- 16) Moag, F.; Biol. Rev., 21; 41, 1946
- 17) Morse, A. and R. O. Greep; Anat. Rec., 97; 357, 1947.
- 18) Screebney, L. M., and G. Nikiferuk; Science, 113; 560, 1951.
- 19) Siffert, R. S.; J. Exp. Med., 93, 415, 1951.
- 20) Schajowicz, F., and R. L. Cabrini; J. Bone & Joint. Surg., 36; 474, 1954.
- 21) Takamatsu, H.; Tr. Soc. Path. Jap., 29; 492, 1939.
- 22) Takamatsu, H. and N. Ishi; Tr. Soc. Path. Jap., 43; 546, 1954.
- 23) 高松・赤星:日整会誌., 29; 3, 294, 1955
- 24) 高松・篠遠:日病会誌., 41; 昭27
- 25) 篠遠:横浜医学 3; 3・4, 昭27
- 26) 蒲原:整形外科 2; 4, 247 昭26
- 27) 岩:日整会誌 29; 1, 407, 昭30
- 28) Takamatsu, H and Y. Akahoshi; Acta Tubercul. Jap., 4; 2, 1956



附図説明 (Al-P-ase 存在部位は紫色に染色される.)

第1図: 健康海狸膝関節 (Al-P-ase 染色)

第2図: 同上標本の骨端軟骨及び関節軟骨部を拡大したもの (同上染色)

第3図: 同上標本の骨端軟骨における増殖軟骨層の強拡大 (同上染色)

第4図: 実験的膝関節結核 (海狸) 菌接種後2週間目, 十字靭帯附着部より骨端骨髓内え結核性肉芽

が侵入し周囲骨髓内細胞の Al-P-ase 反応は減弱している. (同上染色)

第5図: 幼若家兎の脛骨々端軟骨部の強拡大 (同上染色)

第6図: 健康家兎腎を EDTA 液に5日浸漬した後 Al-P-ase 染色を行ったもの, 反応の減弱が殆んど認められない.