

アミロイド染色の原理と染色のポイント

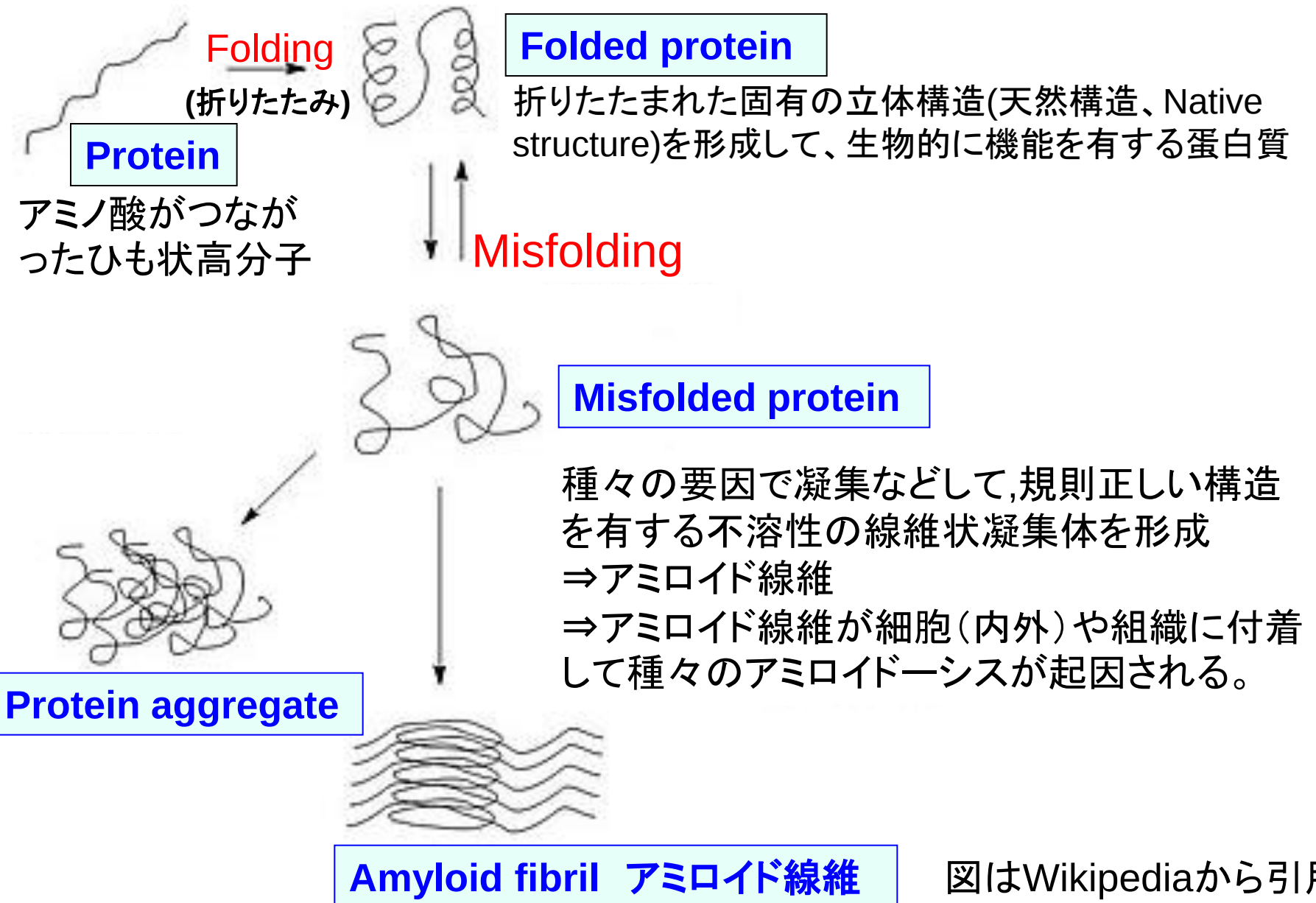
- ・アミロイドの物理的・化学的特性
- ・Congo red染色のメカニズムと3種類の染色法の違い
及び染色液成分の役割と染色のポイント
- ・DFS染色のメカニズムと特徴

第99回日本病理組織技術学会

2019年 3月 3日

元サクラファインテックジャパン株式会社 渡辺 明朗

蛋白質のフォールディングと ミスフォールディングによるアミロイド線維の形成

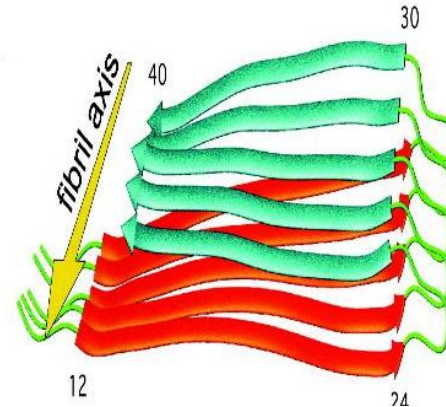
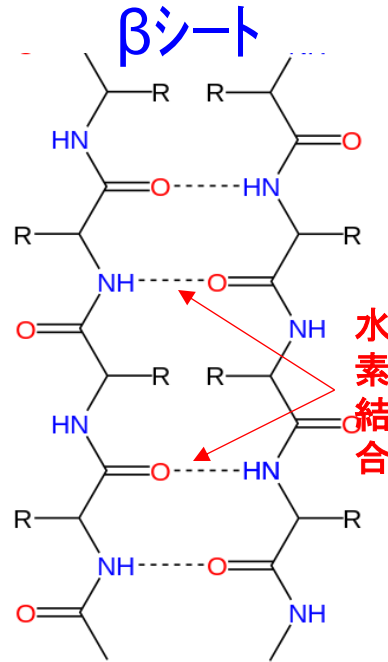


アミロイドの物理的・化学的特性

1) アミロイドの物理的特性

・主に蛋白質の β シートが積層した線維状構造

β シートは、隣り合ったペプチド鎖の間で、一方の主鎖の N-H のHが隣接する主鎖の C=O の Oと水素結合を形成し、全体として平面構造を形成している。

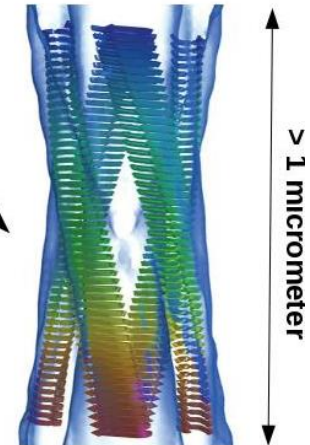


アミロイド線維の β -シート

図の引用

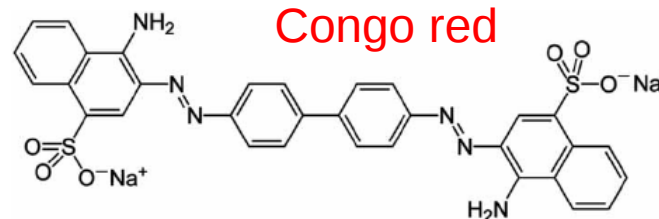
<https://people.sissa.it/~laio/Collaborators/Fahimeh.php>

50-150 Angstrom

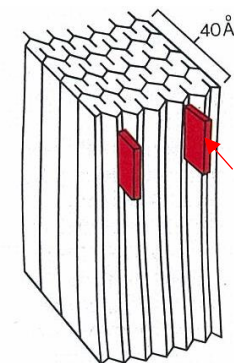


アミロイド沈着物
(不溶性、安定)

・線維状構造を有するアミロイドの染色には、平面的な分子構造を有する直接色素 (Congo red、DFS) が染色に適す。



Congo redの分子モデル



Congo red

図はNetから引用

アミロイドの物理的・化学的特性

2) アミロイドの化学的成分

・アミロイドの名称の由来

Virchow(1854) : Amyloidにヨウ素が付着→赤褐色に発色(澱粉と類似した反応)

→ Amylose(澱粉主成分)+oid (ギリシャ語で”類似体“の意)

・アミロイドの成分: **蛋白質**(アミロイドの種類により糖成分を少量含む)

種々アミロイドーシスにおけるアミロイド蛋白とその前駆体蛋白の1例

アミロイドーシスの病型	アミロイド蛋白	前駆体蛋白
I. 全身性アミロイドーシス 1)免疫細胞性アミロイドーシス ①ALアミロイドーシス 2)反応性AAアミロイドーシス 3)透析アミロイドーシス	AL AA Aβ2M	L鎖(κ、λ) アポSAA B2ミクログロブリン
II. 限局性アミロイドーシス 1)脳アミロイドーシス ①アルツハイマー型認知症	Aβ	アミロイド前駆体蛋白

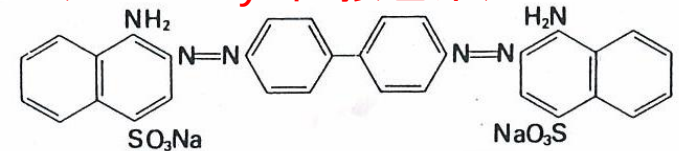
注:アミロイドーシスの分類の詳細は厚生労働省特定疾患調査研究班新分類をご参考下さい

・**20種類以上あるアミロイドーシスに関わるアミロイド蛋白ないしその前駆体蛋白には種々あり、アミロイド蛋白の種類や濃度によりアミロイド染色の発色の強度が異なると考察される。**

アミロイド染色用色素や染色法の種類

成分が蛋白質であり、線維状構造を有するアミロイド線維の染色には、その線維に入り込みやすい平面的な構造を有するCongo redのような直接色素が一般的に利用される。またその他の種類の色素も使用されることがある。

Congo red
(Direct dye直接色素)



Congo redの分子モデル

色素 or 染色法	色素の分類	特 記 事 項
Congo red	直接色素	アミロイド線維の染色に、世界的に最も広く利用されている。
Direct Fast Scarlet 4BS (DFS)	直接色素	日本では、Congo red同様DFSがアミロイド線維の染色に広く利用されている。
Sirius red F3B	直接色素	欧米では、Congo red同様アミロイド線維の染色に利用されている。
Thioflavine T	塩基性色素	アミロイド線維の蛍光染色に利用される。
Toluidine blue	塩基性色素	欧米ではアミロイド線維の染色に利用されることがある。
(PAS染色)		アミロイド線維の種類によっては糖成分を有し、その場合薄い赤色に染まる。

本講演では、Congo redとDFSについて述べます。

Congo redと直接色素(Direct dye)の特性

1) Congo redの特性

C.I.No. 22120



1883 Paul Boettiger(独)製造
セルロース繊維に強い親和性を有することからセルロース工業で用いられていたが、現在はBenzidine誘導体であるCongo redの有害性が強いことから工業的にはあまり使用されていない。

・直接色素に分類: Direct Red 28

・溶解性(水→3~5%、エタノール→0.1~0.7%)

・色素分子中に負(-)の酸性官能基の SO_3^- と正(+)の塩基性官能基($-\text{NH}_3^+$)を有するため水中で経時的に色素分子同士が親和しコロイド形成、また親油性のベンゼン環やナフタレン環同士の疎水性相互作用のため色素同士がコロイドを形成→沈殿物形成(作り置きしない)

2) 直接色素(Congo red, Direct Fast Scarlet 4BS、他)の特徴

媒染剤を用いなくても直接セルロースを染色可能な直接色素は下記特徴を有する。

①ベンゼン環やナフタレン環の芳香環が共面配置(同一平面性)で、

分子構造が平面的

②水素結合をする化学官能基(OH基、 NH_2 基など)を有する。

③分子量が比較的大きい(分子が比較的大きい)

Congo redのアミロイド染色のメカニズム(物理的要素)の考察

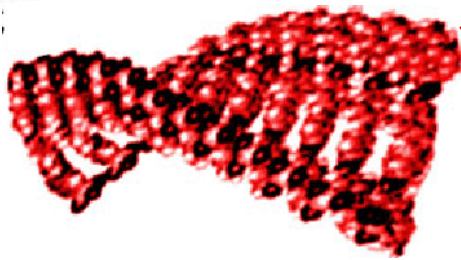
1) Congo redのSupramolecular form(超分子形)や単分子がアミロイド線維内に親和/Congo redの平面的構造がアミロイド線維の構造にフィット



A) Congo redの分子モデル



B) Congo redの分子が重なったリボン状Complex (Supramolecular form)



アミロイド線維のβ-シート

(図はNetから引用)

アミロイド沈着物 (不溶性、安定)

Congo redは水溶液中で、ベンゼン環やナフタレン環同士の疎水性相互作用や色素分子同士の SO_3^- と NH_3^+ のイオン性親和により、色素分子が重なったリボン状Complex (Supramolecular form)を形成する。そのComplexの大きさなどは塩濃度(min.0.3%)などに依存。(引用: M.Skowronek, et al: Peptide Science 46, 267, 1998)

Congo red分子が重なったリボン状Complexの形で、下記要因にて、β-シート蛋白のアミロイド線維内に親和し、安定。

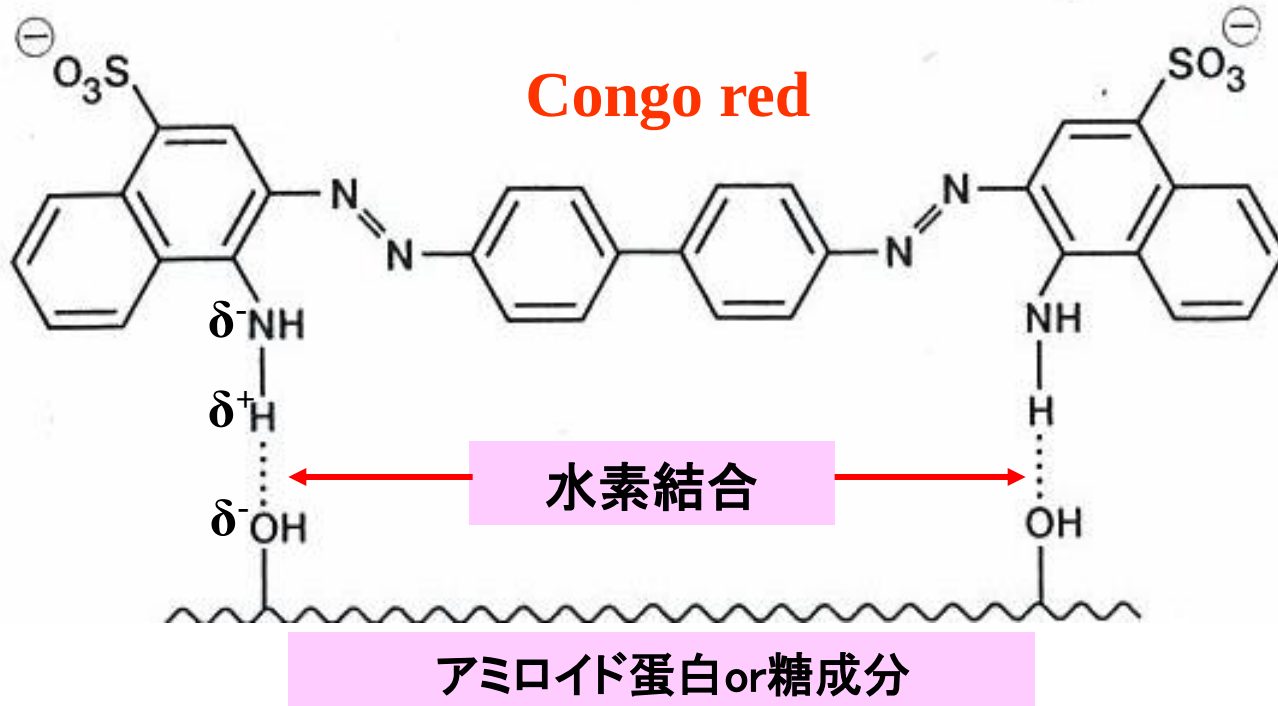
①Complexがアミロイド蛋白とリガンドとレセプターの組み合わせのごとく相互作用する。

②Complexはその形状に柔軟性があり、アミロイド蛋白の立体構造に合うよう多少変化できる。(引用: Stopa B. et al: Acta Biochimica Polonica Vol. 50, 1213. 2003)

またCongo redの色素単分子がアミロイド線維に親和する場合もあると考察される。

Congo redのアミロイド染色のメカニズム(化学的要素)の考察

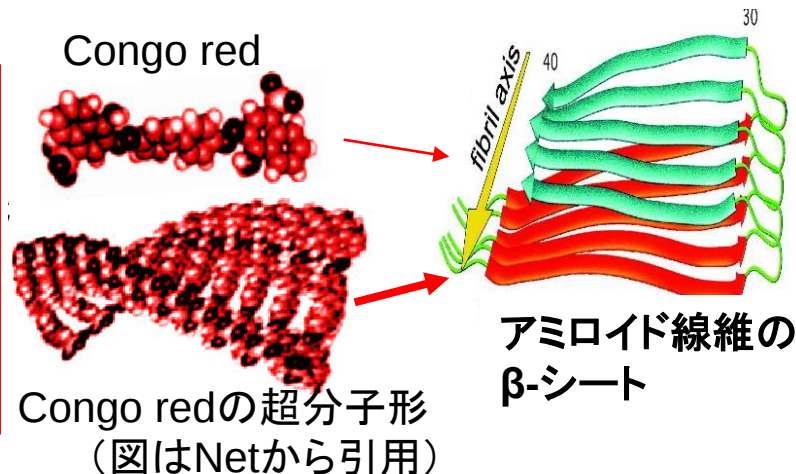
2) Congo redのアミロイド蛋白への水素結合による親和



水素結合

Congo red中アミノ基(NH₂)の窒素原子は、電気陰性度[隣接する他の原子から電子を引き寄せ、自分は負(-)になろうとする性質]が大きく、電子を吸引する力が強いので、その窒素原子に結合している水素原子は、電子密度が低くなり電子を吸引する性質を帯びるようになり、アミロイド蛋白中の電子を多く有する官能基(OH基の酸素OやNH₂基の窒素N)と結合

Congo red色素分子、特に色素分子が重なった超分子形がアミロイド線維内に入り込み、アミロイド蛋白と水素結合を形成すると考察される。



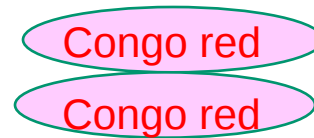
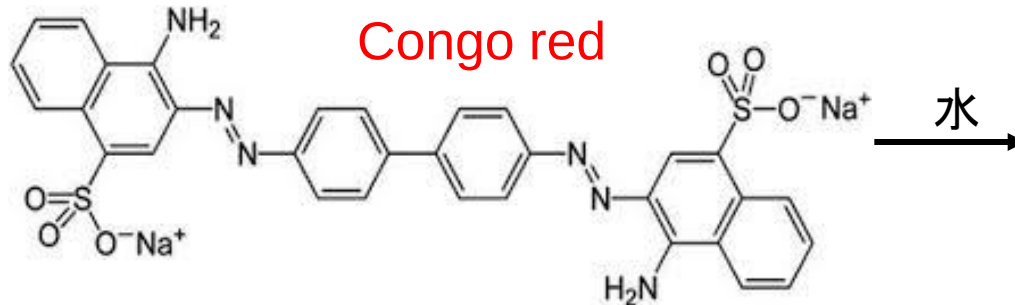
Congo red-アミロイド染色法の種類と特徴

染色法	年	色素濃度	染色液の組成	分 別 液
Bennhold法	1922	1%	水	KOH+エタノール
Highmann法	1946	約0.5%	水+エタノール	KOH+エタノール
Puchtler法	1962	約0.1-0.2%	水+エタノール+塩+NaOH	

1) Bennhold法の問題点

①色素同士が会合しコロイド形成し、染色強度が徐々に低下

塩が添加されていないので、正(+)と負(-)イオンを有する色素分子同士が会合しコロイドを形成、またアルコール類が添加されていないので、色素分子のベンゼン環同士間等の疎水性相互作用により色素が重なり、染色強度が低下する。



色素分子同士のイオン結合や疎水性相互作用によりコロイド形成

②共染のリスクが大

イオン化したスルホン酸基-SO₃⁻が好酸性部位(他の蛋白質)へ親和し共染⇒
弱アルカリ液で分別が必要



↓水



共染

蛋白質

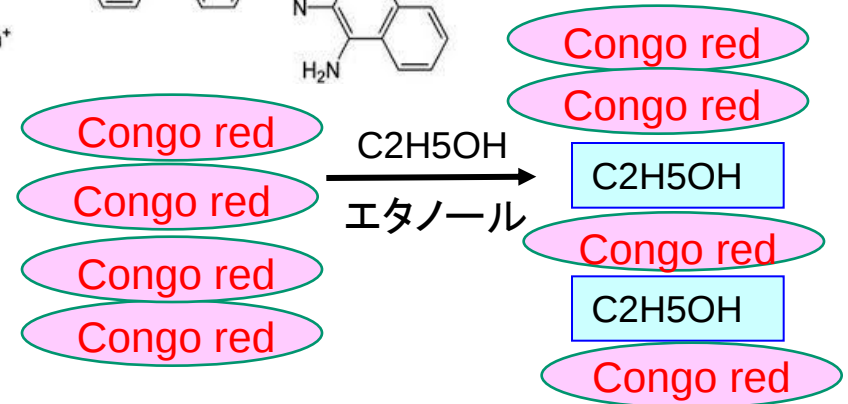
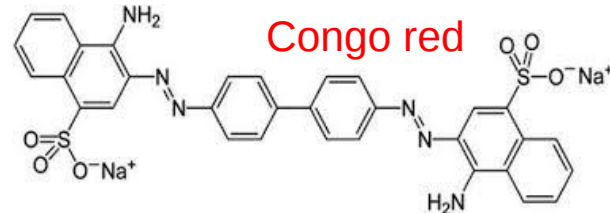
Congo red-アミロイド染色法の種類と特徴及び成分の役割

染色法	年	色素濃度	染色液の組成	分 別 液
Highmann法	1946	約0.5%	水+エタノール	KOH+エタノール
Puchtler法	1962	約0.1-0.2%	水+エタノール+塩+NaOH	

2)Highmann法の特徴

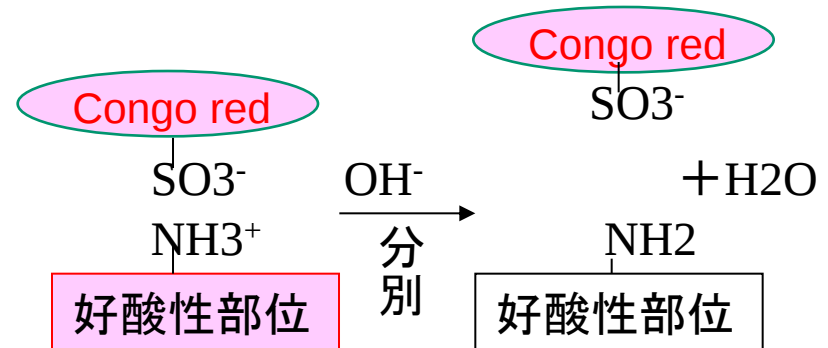
①染色液中エタノールの効果

- ・色素同士の疎水性相互作用を抑制し、色素を分散(右図参考)
- ・色素と親油性成分間の疎水結合の抑制
→親油性の弾性線維の共染抑制



②分別液中アルカリ性エタノールの効果

- ・アルカリ→好酸性の蛋白部位へ親和しているCongo redを分別・除去(右図参考)
- ・エタノール→親油性の性質のある弾性線維へ溶け込んだ色素の分別

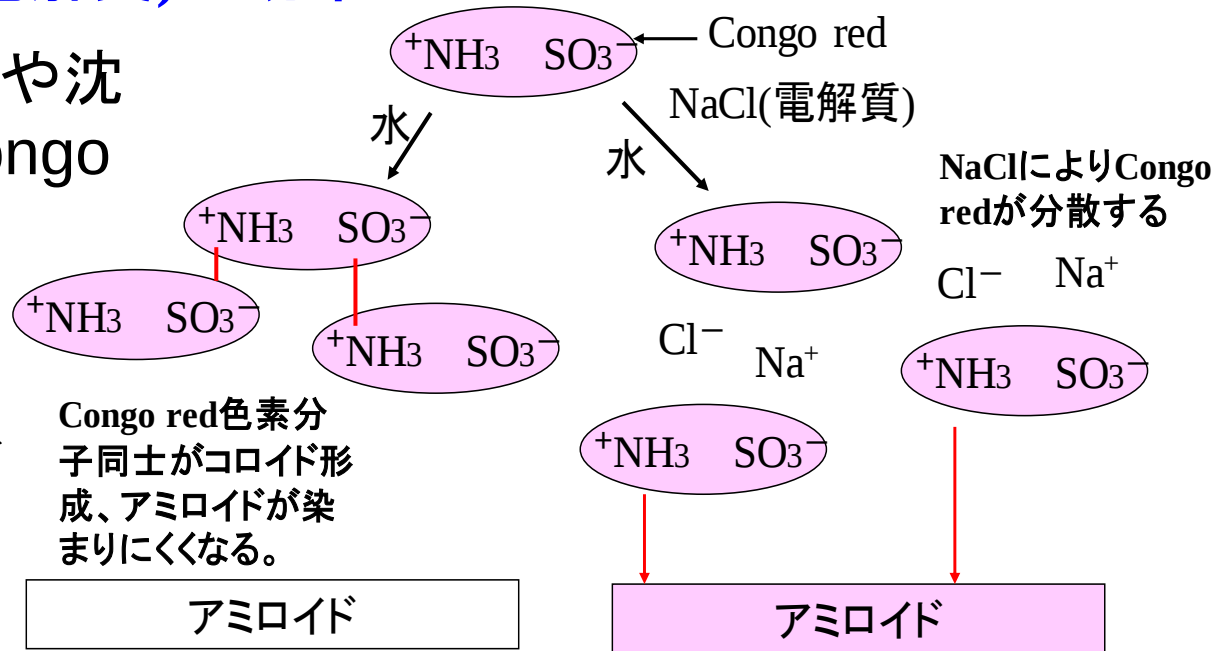


Puchtler法Congo red染色液中成分の効果

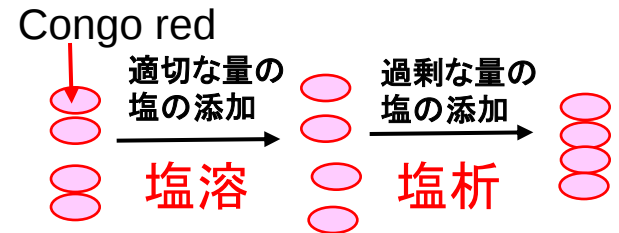
1) 塩化ナトリウムNaCl(電解質)の効果

① **塩溶**の効果: コロイドや沈殿物を形成しやすいCongo redを分散・溶解(**塩溶**)
⇒ **染色強度の増大**

② NaClのイオン化→
色素の組織部位へのイオン結合による親和の抑制⇒ **共染の減少**



注意: NaClを過剰に添加すると、**塩析**によりCongo redが沈殿。またCongo redは製造由来の塩を多く含み、色素の含有量や塩の量はメーカー、品番や製造ロットにより大きく異なり、適切な塩の添加量や染色強度が影響するリスクあり。



会社	品番	品名	品質管理上の含有量
Sigma-Aldrich	C6767	Congo red	≥ 35 %
Sigma-Aldrich	C6277	Congo red certified(BSC)	≥ 85 %
和光純薬	03-2319	Congo red 和光一級	吸光度(10mg/L,pH5.0) →0.27以上

塩化ナトリウムの濃度について

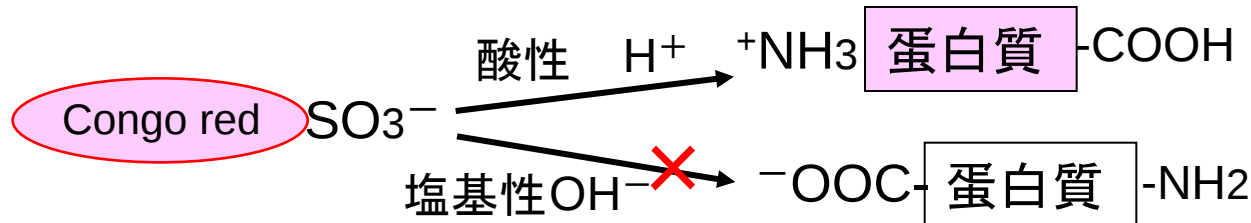
- ・右図のごとく、Congo redの単分子がアミロイド線維に入り込む染色原理も報告されているが、色素単分子にしろ超分子形にしろ、水-アルコール類混合溶媒中にてできるだけ色素濃度が高くなるよう、塩析による色素の沈殿が生じない範囲での塩の濃度が望ましいと考えられる。



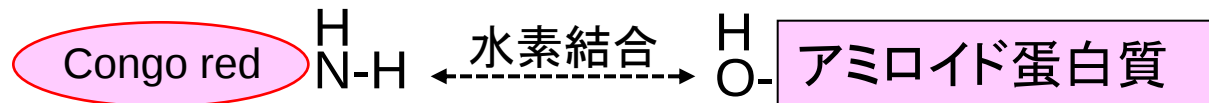
図はNetから引用

2) アルカリ(Puchtler法Congo red染色液中)の効果

- ・結合組織蛋白はアルカリ(OH⁻)下で負(-)となり、同じ負(-)荷電のSO₃⁻基を有するCongo redとは斥力が作用し共染しにくくなる。



- ・アルカリ条件下(OH⁻) Congo redのアミノ基NH₂のイオン化抑制
→Congo redのアミノ基(NH₂)とアミロイド中OH基等間の水素結合を増大



下記HPで、NaOH水溶液の添加量を変えてpH値の異なる染色液を比較検討されていますが、最適pHは9～11との報告あり。

<http://www.aichi-amt.or.jp/labo/patho/reco.html>

愛知県病理研究班活動記録平成21年度4月18日JR愛知豊田厚生病院黒木雅子氏発表

Congo redアミロイド染色(Puchtler法)のポイント

	染色操作	特記事項
①	脱パラフィン	・切片やや厚め(3-5 μm)の方が染色対象となる組織切片中のアミロイド濃度が高くなるので濃く発色。 ・本染色ではアルカリを使用するので、切片が剥がれやすい。⇒必要に応じて切片剥離防止コーティングスライドガラスを使用。 参考: アルカリは組織蛋白質アミド基を加水分解し、組織切片が徐々に損傷するリスクがある。 $ \begin{array}{ccc} \text{O H} & \text{H}_2\text{O} & \\ & \downarrow & \\ -\text{C}-\text{N}- & \rightarrow & \text{R}-\text{COOH} + \text{H}_2\text{N}-\text{R} \\ \text{蛋白アミド基} & \text{OH}^- & \end{array} $
②	流水水洗(約5分)、軽く蒸留水水洗	水道水には種々イオン等が含まれ、染色液に切片を浸す前に、蒸留水で切片を洗浄し、水道水由来のイオン等を洗い流す。
③	ヘマトキシリン染色液で核染色 約5分	染色時間はヘマトキシリン染色液の染色強度に依存。前処理液及びCongo red染色液の操作過程で、ヘマトキシリンが少し溶出するが、過染や共染しない程度で核染する。

	染 色 操 作	特 記 事 項
④	水洗(色出し) 約5分	前処理液がアルカリ性なので、色出しのための水洗は通常より短めでよい。
⑤	前処理液 約20分	・Congo redと同じ溶媒組成の前処理液(NaCl飽和80%エタノール100ml+0.1%NaOH 1ml)で切片をなじませる。 ・組織中のアミロイド蛋白中のOH基などが分子内・間で水素結合により親和しているのを切り、コンゴレッドが親和しやすくする効果があると考察される。 参考: 下記のHPでは、前処理液有無を比較検討し、両者で染色結果に大きな差はなかったとの報告あり。
⑥	Congo red染色液 約20分	Congo red染色液の調製(品質のよい色素、溶媒組成、適切な塩の濃度)がポイントとなる。染色時間は調製に使用した色素やその染色液の特性に依存すると考えられるが、下記のHPで30分、60分、180分の染色時間の比較で染色強度はほとんど同じであった旨の報告あり。
⑦	エタノールⅠ、Ⅱ、Ⅲで脱水(各約10回)後、キシレンで透徹	

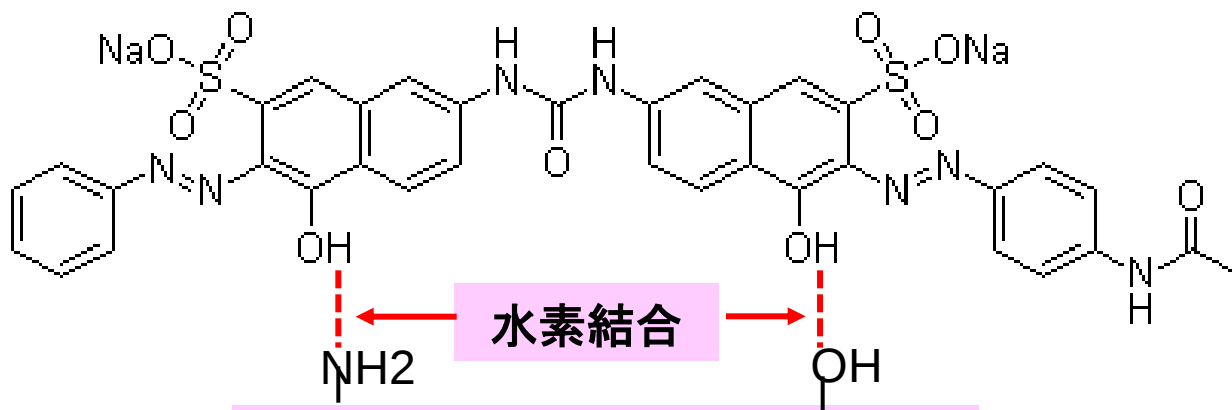
<http://www.aichi-amt.or.jp/labo/patho/reco.html>

愛知県病理研究班活動記録 平成21年度4月18日JR愛知豊田厚生病院黒木雅子氏発表

DFS(Direct Fast Scarlet 4BS)の染色メカニズムの考察

1977年: 森、柳原らが家庭用染料Pagoda red(英Dylon社製)をアミロイド染色に利用。その後本染料の主成分DFSが皮膚アミロイドなどの染色に利用され、現在日本ではDFSがアミロイド染色に広く利用されている。

DFS(Direct Fast Scarlet 4BS) Direct red 23



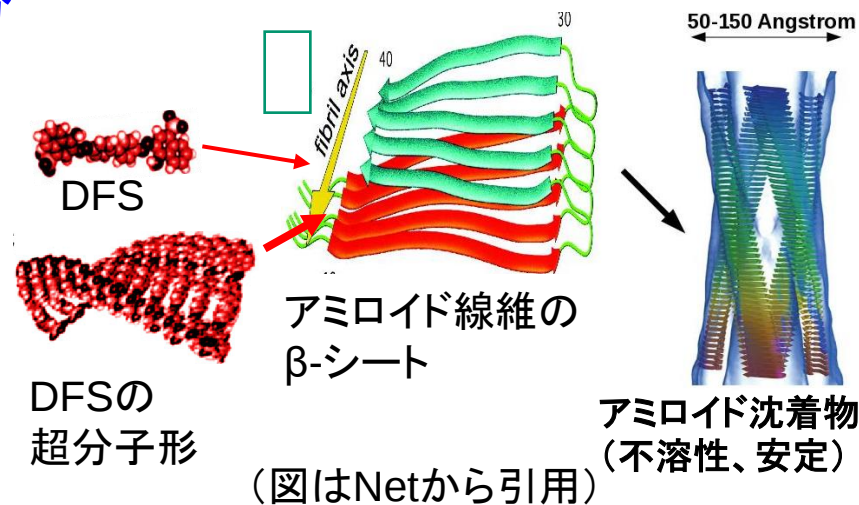
アミロイド蛋白or糖成分

1) DFSがアミロイド蛋白と水素結合

Congo red 同様、DFSがアミロイド蛋白と水素結合すると考えられる。

2) DFSのSupramolecular form(超分子形)がアミロイド線維内に親和(考察)

Congo redと同じ直接色素に分類されるDFSの色素分子の重なりである超分子形、また一部DFSの単分子がアミロイド線維内で立体的におさまりやすく配置し、アミロイド蛋白と水素結合などして親和すると考察される。



DFS染色液組成例と各成分の役割

DFS染色液組成成分	A	B
Direct Fast Scarlet 4BS	0.2g	0.8g
50%イソプロピルアルコール	100ml	
エタノール		20ml
精製水		80ml
硫酸ナトリウム(無水)	0.8g	
塩化ナトリウム		8g

1) アルコール類比率について

イソプロピルアルコール(IPA)などは、Congo red染色液におけるエタノールと同じ役割(色素同士の会合抑制及び色素と染色部位の疎水結合の抑制など)と同じ。DFSはアルコール類(特に、炭素数の多いIPA)に難溶、またNaClなどの塩は不溶となる。

低 ←アルコール類濃度→高
高い ←DFSの溶解性→低い
高い ←塩の溶解性 →低い

疎水結合抑制効果
エタノール<IPA $C_2H_5OH < (CH_3)_2CHOH$

2) 塩(電解質)の種類 [Na₂SO₄(分子量:142.0)、NaCl(分子量:58.4)、他]と濃度

①硫酸ナトリウムなどはDFSの分散化剤として機能すると考えられる。塩の種類が異なっても、グラム当量濃度(モル濃度/価数)が同じなら、効果に大きな差はないと考察されるが、工業的にジューツ麻の種々直接色素による染色に種々無機塩を比較した結果では次の順で、麻がより強く染まったとの報告あり:

NaCl<Na₂SO₄ (但し、Congo redやDFSのアミロイド染色の場合は不明)

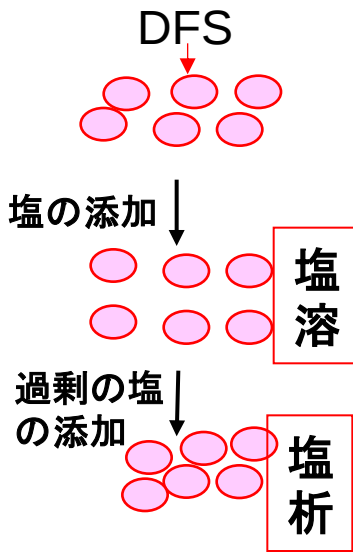
M.A.Salam:J. of Textile and Apparel Tech. & Manag.Vol6. 1. 2009

②塩の最適添加量は、DFS自身に含まれる塩の濃度や溶媒組成(アルコール類濃度)に依存すると考えられる。沈殿物が生じない範囲で塩を添加することが重要と考えられる(色素濃度が低下しないよう)。

③Na₂CO₃炭酸ナトリウム

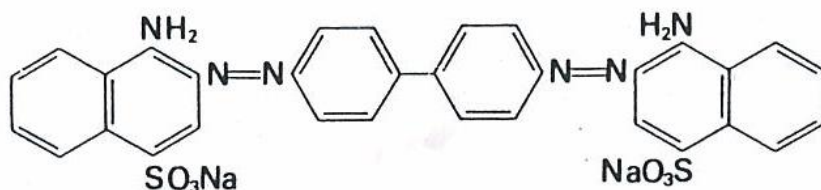
炭酸ナトリウムを添加する処方があるが、1%炭酸ナトリウムのpHは約11であり、アルカリのため切片剥離のリスクがある。

注:DFSはCongo red以上にメーカー、品番、ロットにより色素含有量に差があると推定される。[Sigma-Aldrich 212490 Direct red 23 (DFS) 色素含有量:約30%]

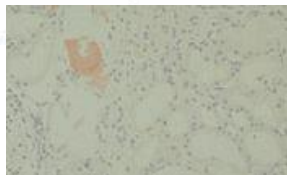


Congo red

Direct red 28

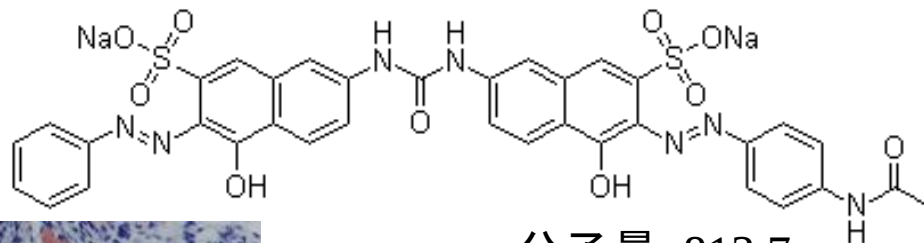


分子量: 696.7

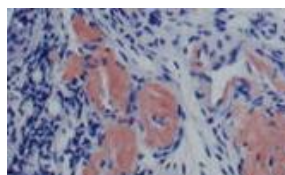


DFS (Direct Fast Scarlet 4BS)

Direct red 23



分子量: 813.7



標本写真はNetから引用

Congo redに対してDFSは下記利点がある。

- ①アミロイドが、一般的により強く発色
- ②共染が少ない
- ③分別が容易で、染色操作が簡便

DFSがより強くアミロイド線維を染色する理由(考察)

A)DFSは色素分子内に水素結合能を有する官能基(OH基、-NHCO-、他)が多い。

B)Congo redと異なり、正(+)に荷電するNH₂アミノ基がない。

C)DFSは分子がやや大きく、その分子の重なりである超分子形はアミロイド線維内で立体的によりフィットし、またアミロイド蛋白と水素結合でより強く親和すると考察される。

(DFS染色法は種々あるが、ヘマトキシリン核染の前にDFS染色が行われるのが一般的である。DFSが、その染色後水洗やヘマトキシリン染色過程でアミロイド線維から離脱・脱色しにくいのは、DFS色素分子が重なった超分子形がアミロイド線維に強く沈着しているためと考察される。一般的に大きい色素分子ないしその超分子形ほど先着部位から離脱・脱色しにくい。

D)モル吸光係数の違い? (Congo red=約40,000 L/mol.cm、 DFS ?)

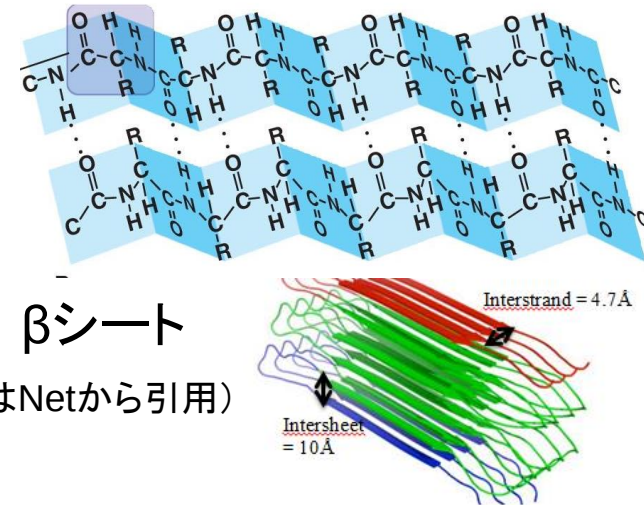
硫酸酸性過マンガン酸カリウム酸化処理によるAA蛋白と他の蛋白の識別

AA蛋白: 過マンガン酸カリウム処理感受性→Congo redで非染色

AA蛋白以外の蛋白: 過マンガン酸カリウム処理抵抗性
→Congo redで染色され、緑色複雑屈折を示す。

注: 硫酸酸性過マンガン酸カリウムは酸化力が強く、処理時間が長いと、AA蛋白以外にもCongo redの染まりが弱くなる。

AA蛋白が過マンガン酸カリウム処理後Congo redにより染色されない理由は不明であるが、AA蛋白のβ-シートの立体構造が変化するためと考察される。



酸化剤として酸化力の強い硫酸酸性過マンガン酸カリウムを使用

酸化力: 過マンガン酸カリウム < 硫酸酸性過マンガン酸カリウム



・硫酸酸性過マンガン酸カリウムは早い段階で酸素を放出するので使用时調製

単なる過マンガン酸カリウム水溶液



・シュウ酸により、褐色の二酸化マンガンをも Mn^{2+} として溶解除去

