

# トリパン青生体染色顆粒及びトリパン青— 中性赤重複生体染色顆粒の新固定法

金沢大学医学部病理学教室(主任 渡辺四郎教授)

小 田 幸 保

(昭和35年3月21日受付)

本論文の要旨は、十全医学会第5回集会(昭和25年11月)、及び日本医学会  
総会第6分科第40回日本病理学会において既に発表した。

酸性色素の内、ベンチジン系色素中、現今生体染色に用いられている色素は主としてトリパン青、コンゴ赤であるが、トリパン青を初めて生体染色に使用した Goldman<sup>14)</sup> がトリパン青生体染色顆粒の組織内固定をフォルマリン液をもつて行なつて以来、Gross<sup>17)</sup> はフォルマリン蒸気を、Schuleman<sup>39)40)</sup> は10%フォルマリン液を推賞し、一般には Schuleman の方法が用いられている。又 Bouffard<sup>7)</sup> は水酸加昇液を使用し、清野<sup>28)24)</sup> はアルコール、鳥瀧はフォルモール加エーテル及びアルコールを用い、その他ツェンゲル—フォルマリン、鉛糖醋酸昇液(三田村)<sup>30)</sup> 等が用いられ、又湯浅<sup>54)</sup> 等はスーザ液を推賞し、Möllendorff<sup>31)</sup> も亦1914年以來スーザ液を用いてトリパン青生体染色を利用した多数の業績を発表している。しかし、杉山<sup>43)</sup> がトリパン青の欠点を挙げておられるように、固定に際して脱色しやすいこと、従つて何れの固定液においてもトリパン青生体染色顆粒は瀰漫性染色、不鮮明像となることをまねがれ得ず、使用者によつてそれぞれ工夫がなされたにも拘らず、鮮明な顆粒像を現わす確実な固定法を見出すに至らないで現在に及んでいる。一方 Arnold<sup>6)</sup> 等によつて中性赤生体染色の研究がなされ、Golovine<sup>16)</sup> が該顆粒の固定法を考察して以来、多くの人により各種固定法が考案され、Golovine, Gurwitsch<sup>19)</sup>, Gross<sup>17)18)</sup>, Arnold<sup>6)</sup>, Vonwiller<sup>40)</sup>, Sabin<sup>38)</sup>, Kordes<sup>25)</sup>, Parat<sup>35)</sup>, Mc Junkin<sup>28)</sup>, Cash<sup>9)</sup>, Adams<sup>1)</sup>, Cappell<sup>8)</sup>, Ludford<sup>27)</sup>, Forkner<sup>10)</sup>, 塚本<sup>48)</sup>, 佐口<sup>37)</sup> 等の法がある。塚本はこれら諸種固定液の能力を系統的に研究比較して、Rabl 氏ピクリン酸昇液で固定し、飽和ピクリン酸アルコールで寒冷の下に脱水をすることが中性赤生体

染色顆粒の永久固定標本製作に適すると結論した。その他 Gardner<sup>11)</sup> 法、山崎法等も用いられたけれども、何れも顆粒の適確な固定を見るに至らなかつた。而して1943年に至り、佐口の研究により初めて中性赤生体染色顆粒の確実な固定法の出現を見るに至つたのである。次に二種の色素による重複生体染色は、従来多くは酸性色素において色調の異なるものを組合せて行ない、これに関する Ribbert<sup>36)</sup>, 清野及び菊地<sup>24)</sup>, Pappenheim 及び中野<sup>32)</sup>, Schuleman<sup>39)40)</sup>, Goldman<sup>14)</sup> 等の報告があるが、更に Herzfeld<sup>21)</sup>, Möllendorff<sup>31)</sup>, 橋<sup>46)</sup>, 山崎<sup>52)53)</sup> 等によつて異性色素による即ちリチオンカルミンとメチレン青及びトリパン青と中性赤の重複生体染色が行なわれ、山崎は中性赤顆粒の固定法を発表し、その行程中に硝酸銀を用いる所からこれを更にトリパン青—中性赤重複染色顆粒の固定に応用して、酸性、塩基性及び重染色顆粒の銀嗜好性に言及してはいるが、しかしこれら重複生体染色顆粒を固定して永久標本を作製することは未だなされておいない。

ここにおいて私は、先ずトリパン青生体染色顆粒の適確な固定法を案出し、更に一歩進めて化学的性質の反対であるトリパン青と中性赤との重複生体染色顆粒の固定法をも案出しようと試み研究に着手した結果、適確な新固定法を考案することに成功したので、ここに報告する次第である。

## 実 験

トリパン青(以下「ト青」と略す)とトリヂン青とは、永く別色素と考えられていたが、両者が同一色素であることを Goldmann<sup>14)15)</sup>, Schulemann<sup>39-41)</sup>,

New Fixing Methods of Dye Granules within Cells of Experimental Animals Vitrally Stained with Trypan Blue or both Trypan Blue and Neutral Red. Yukiyasu Oda, Department of Pathology (Director : Prof. S. Watanabe), School of Medicine, University of Kanazawa.

Möllendolff<sup>39)</sup>等により明らかにされ、本色素はベンチジン系ヂスアゾ色素でアルコールに溶け難いが、水に易容な有機塩で、その水溶液は膠質である。

中性赤はアチン色素に属するアミンの塩酸塩で、水に易溶である外「ト青」に比し分機溶媒に対する溶解性は遙かに著しい。即ち非電解質に近い性質を有し、分機溶剤は勿論、クロロホルム等の無極性溶剤にも溶けようとする性質を有するものである。

「ト青」及び中性赤生体染色顆粒の固定に従来多種多様の固定法が使用された。而して私は先人諸家の方法等を参考として生体染色顆粒の鮮明な固定像を得るために、組織固定と同時に色素顆粒を可及的速かに不溶性化してその変形を最少限にとどめること、更に永久標本製作行程中に経なければならぬ有極性、分機性及び無極性の各代表的溶媒の何れにも溶出ししない固定液調整を目標として研究を進めた。

#### I 「ト青」生体染色顆粒の固定法に関する実験

##### 1. 「ト青」生体染色顆粒固定液の比較及び探索実験

先ず従来「ト青」生体染色顆粒の固定に使用された各種の固定液を余の考えから試薬の処方を変えた固定液及び余の新調製固定液等を時計皿に採り、これに2%「ト青」溶液を滴下し、その凝固沈澱反応の有無や多寡を検し、凝固沈澱をするものにあつては、沈澱の分機溶媒に対する溶解性をも観察した上で、「ト青」生体染色顆粒の固定試験を実施した。

「ト青」生体染色の方法は、2%「ト青」リンゲル溶液、0.5ccを毎日一回、5日間、体重25gの健康成熟マウスの背部皮下に注入して、最後の注入から24時間を経て無麻酔のまま殺し、肝臓、肺臓、腎臓の3臓器を主とし、又必要に応じて他の臓器について、並列固定、及び標本製作を行なつた。臓器は2~3mm厚さの薄片となして固定液に浸漬するを可とする。

判定は、生体染色を施した一匹のマウスから得た同一臓器の組織片について並列固定実験をした標本を鏡検し、肝星芒細胞、肝細胞、肺胞中隔細胞、腎細尿管上皮細胞、その他諸細胞内の色素顆粒の出現の態度の比較に基づいて行なつた。

実験結果に基づく各種固定液の吟味

##### 1) 中性塩類固定液

中性塩の蛋白変性作用は、フォフマン順列から見れば、硫酸アンモン、硫酸ソーダ等多価のイオンのものが有効であり、又塩類溶液は組織固定作用と「ト青」溶液に対する塩析作用と相俟つて生体染色顆粒の固定に良好な結果を及ぼす理であるが、予想に反して組織収縮及び瀰漫性染色像を認めた。これは上記中性塩を

用いる場合相当濃厚な塩類濃度にする必要があることにより、滲透圧影響による組織収縮、そのための固定速度の緩徐と、滲透圧効果による顆粒色素の拡散によるものであると考える。

##### 2) 分機溶剤による固定液

清野は酸性色素生体染色顆粒の固定にアルコール固定を、又鳥瀧はフォルモール加エーテル等の固定を実施しているが、私の追試によると、これらの方法は、生体染色顆粒が色素を溶出して周囲にまで瀰漫性に汚染せられるのを見た。

Spiegel-Adolf<sup>40)</sup>はアルコールによる蛋白変性を蛋白質の無水物形成にあるとしている。即ちアルコール、アセトン等による蛋白質の凝固は、脱水作用及び溶媒の透電恒数が減ずるためコロイド粒子間の牽引力を増すことが大きな原因であつて、「ト青」はアルコールに溶け難い色素塩であるにも拘らず、その生体染色顆粒が色素を溶出して、瀰漫性染色をなすことは分機溶媒の水和時の騒乱作用が色素顆粒を拡散してしまふのであろうと解釈する。

##### 3) フォルマリン固定液

Goldmann<sup>14)</sup>が初めて「ト青」生体染色を行なつてフォルマリン固定をなし、Schulemann<sup>39)-41)</sup>が10%フォルマリン固定法を推奨して以来、現今でもフォルマリン固定を用いた実験を見受けるところであるが、鮮明な生体染色顆粒の固定像は得られない。

##### 4) 重クロム酸加里固定液

フォルマリンや重クロム酸カリ液では、「ト青」顆粒色素の固定を確実にすることが出来ず、その拡散を防止し得ない。

##### 5) 昇汞固定液

昇汞は組織蛋白と鞏固に結合し、不規則現象を生起しない良好蛋白沈澱剤として顆粒基質蛋白を変性し、「ト青」色素を収着せしめて色素の溶出を防止し得ているのであるが、色素を沈澱し、これを固定する能力に乏しい故に、瀰漫性染色はまぬがれ難い。

##### 6) アルカロイド試薬固定液

組織及び顆粒基質蛋白変性に対して強力な沈澱剤であるアルカロイド試薬を主薬とした固定液中、トリクロール醋酸、過塩素酸等酸性の強い固定液では、組織固定と同時に「ト青」を酸析することによつてやや鮮明な固定像を得る。スーザ液固定によつてやや良好な結果が得られるのは、昇汞の組織固定によるの他、同液に含まれる酸剤の故にもよる。スーザ液の昇汞を第1塩化コバルトで置換するが、又はスーザ液に更に第1塩化コバルトを加えたものは「ト青」溶液に対する沈澱作用があり、「ト青」生体染色顆粒の鮮明な固定

像が得られる。

#### 7) 明礬固定

明礬は水に解離して、組織収縮作用と呼ぶところの多価イオンの蛋白変性力により組織を固定する能力を有すると同時に更に Cr, Fe, Al 等金属の「ト青」金属附加物形成を生起するものと期待したが、実験の結果は予想に反し、かかる様子を見ない。更に同種陰イオンとしての硫酸、及び過塩素酸を加えて酸性となした結果、比較的鮮明な顆粒の固定像を得たのであるが、原形質部の明瞭を欠く結果を招来した。

#### 8) 鉛糖及びアルカリ土類固定液

「ト青」は4個の sulfon 酸基を有する故に、鉛塩又はアルカリ土類塩と反応して不溶性の sulfon 酸鉛、sulfon 酸バリウム、sulfon 酸ストロンチウムを生成し、溶出した形跡を見ないのに、顆粒像は鮮明を欠き、粗雑という感じをうける。

#### 9) 金属塩、金属錯塩及び金属塩——ピクリン酸混合液固定液

Werner の配位説は、金属錯塩のみならず有機錯化合物にまで発展し、有機沈澱反応及び呈色反応も、漸次多数の発見を数えるに至り、有機試薬として無機金属の検出定量法が行なわれつつある現状である。有機金属化合物の生起には、有機成分は分子内錯塩形成に又金属附加物形成に都合のよい官能基を有さねばならないが、単に原子団の種類のみによつて適否を定めるわけにはゆかないのであつて、分子化合物の生起、分子化合物の安定度及びこれに及ぼす置換基の位置、数、種類の影響等が関係を持つ故に、これらを考慮しながら、種々金属塩及び金属錯塩による「ト青」及び中性赤の沈澱性金属附加反応を探索中、第1塩化コバルトにピクリン酸を加えた混合液が、「ト青」の金属附加物形成のみならず「ト青」膠質液を特異的に瞬時に綿様に凝固することを発見し、更に又同混合液が中性赤膠質液に対しても瞬時凝固作用を有するのを認めた。

更に同様な作用を有する数種の金属塩について比較実験をし、組織及び生体染色顆粒の固定像、後染色態度を検討し、更に対照として第1塩化コバルト液固定、ピクリン酸液固定、昇汞——ピクリン酸液固定等の並列実験をした結果、第1塩化コバルト——ピクリン酸混合液を適確な「ト青」生体染色顆粒固定液として確認するに至つた。

#### 2. 「ト青」生体染色顆粒固定液の比較及び探索実験結果の総括

単に蛋白変性作用のみによる固定液では、「ト青」生体染色顆粒は瀰漫性染色像となり、アルコール、濃厚

塩類固定等の脱水の作用が主なる固定液では却つて「ト青」生体染色色素顆粒を拡散的に周囲を汚染させる結果を招来する。金属塩固定液の内、「ト青」色素と直接反応をして、不溶性の金属塩を生成するアルカリ土金属塩、鉛塩等が含まれた固定液では「ト青」顆粒の溶出の跡を見ないのに、標本鏡検上、顆粒がやや不鮮明をまぬがれない。しかるに金属塩を含有する酸性度の強い固定液では、「ト青」生体染色の比較的鮮明な固定像が得られることスーザ液固定標本に見る如くであり、更に私の変法であるコバルト——スーザ液固定によつて、微細な「ト青」顆粒をも比較的鮮明に固定されるのを見る。しかも金属塩の或る種のものに、ピクリン酸を加えた混合液は「ト青」膠質液に対して、金属附加の新らしい瞬時凝固沈澱現象の生成が認められ、「ト青」生体染色顆粒の固定像は生理的に最も近く、鮮明でしかも中性赤生体染色顆粒の固定にも応用し得るの特点を有し、金属塩中特に第1塩化コバルトとピクリン酸混合液は、「ト青」生体染色固定液として優れた性質のあることを認めた。

#### 3. 第一塩化コバルト——ピクリン酸混合液組成組合せ実験

第一塩化コバルトとピクリン酸混合液が、「ト青」生体染色固定液として、確実にしかも鮮明な固定像を与えることを認めたので、両者の混合割合を決定するために並列実験を行なつた。実験の結果は第一塩化コバルト 0.1g, ピクリン酸 0.01g, 蒸溜水 10.0cc の処方方が最も好結果を得た。

#### 4. 第一塩化コバルト——ピクリン酸混合液の固定力試験とフォルマリン添加試験

第一塩化コバルト——ピクリン酸混合液の固定力試験を行なつた結果、第一塩化コバルト及びピクリン酸の量が極めて少量な稀薄液でも、非常に微細な「ト青」顆粒をもよく固定し、鮮明な固定像が得られることを知つた。

なおフォルマリン添加実験を行ない、5~10%を加えて差支えないことを確かめ、従来のフォルマリン固定標本から隔たることのないように考慮した。次に第一塩化コバルト——ピクリン酸溶液濃度との増減組合せにより固定試験を行ない、その結果と先の2実験とを綜合して、非常に低濃度の第一塩化コバルト——ピクリン酸混合液でも、「ト青」生体染色の鮮明な固定像が得られ、その固定作用効力に大きな巾を有していて、操作技術的な誤りが少ない事実を確認した。この事実は低濃度固定液が用いられる「ト青」生体染色の皮下及び腸間膜等の伸展標本作製に當つて、組織の急激な収縮が避け得られ甚だ好都合である。

### 5. 組織固定剤としての酸の添加試験

前項において、第一塩化コバルト、ピクリン酸、フォルマリンの量的決定をなしたが、更に、細胞核の後染色像を良好ならしめる目的で酸の添加試験を行なった結果、酸として三塩化醋酸0.2g、或いは三塩化醋酸0.1gに昇汞0.2gを添加することにより、良好核固定像を与えるのを見た。

### 6. 「ト青」生体染色顆粒の新固定法

以上種々な実験の結果を基礎とし、従来多種多様な「ト青」生体染色顆粒固定法が考案されたにも拘らず、十分な効果を挙げる事が出来なかつた色々な欠点を補い、極めて微細な顆粒をも固定することの出来る適確の新しい固定法を確立し得た。その方法は次の如くである。

2%「ト青」リンゲル溶液、0.5ccを毎日1回、5日間、体重約25gの健康マウスの背部皮下に連続注射し、最後の注射から24時間以上を経て無麻酔のまま殺し、各種臓器を出来るだけ薄片として(厚さ2mm以下)下記固定液に浸漬する。

固定液：

第1塩化コバルト	0.1g
ピクリン酸	0.01g
フォルマリン	0.5~1.0cc
三塩化醋酸	0.2g
蒸溜水	10.0cc

固定時間 24時間

固定後は組織薄片を蒸留水中で軽く水洗、吸墨紙で水分を去り、

脱水操作：

90%アルコール	3時間	
無水アルコール	3時間	
キシロール	2時間	3回交換
パラフィン包埋	1.5時間	3回交換

切片とする。

後染色：

1%サフラン溶液

無水アルコールで分別及び脱水

キシロール置換透徹

バルサム封入

### II 「ト青」——中性赤重複生体染色顆粒の固定法に関する実験

#### 1. 「ト青」——中性赤重複生体染色顆粒の固定試験

「ト青」——中性赤重複染色固定液探索実験の結果から、重積錯塩溶液、又は陰イオン錯塩と陽イオン錯塩の混合液、その他重クロム酸カリと硝酸ストロンチウム混合液等を用いて、重複生体染色永久固定標本製作

の可能であることを知つたので、これが完成を目途に実験を継続し、コバルト中心原子にモリブデン酸、過塩素酸、クロム酸、ピクリン酸等を配位した錯塩を得ようとして実験を行なっているうちに、第一塩化コバルト——ピクリン酸混合液が「ト青」膠質液及び中性赤膠質液を共に同時に且つ同時に凝固沈澱する作用あることを認めたので、後記「ト青」——中性赤重複生体染色組織を、ピクリン酸——中性フォルマリン混合液で24時間浸漬固定したのち、更に佐口氏中性赤生体染色固定法を重加して満足な重複染色固定標本製作に成功を見た。よつて、第一塩化コバルト——ピクリン酸混合液を基礎に、その変法として、行程の短縮、簡易法の案出を試み、脱水操作は、デオキサン、脱水アセトンのみならず、アルコールによつても行ない得ることを目途として実験を進めた。実験には「トリパン青——中性赤重複生体染色を施した同一のマウス」(後述)から得た肺、肝、腎臓の組織薄片について各種固定剤及び並列固定実験をなした標本を鏡比較した。

この実験で第一塩化コバルト——ピクリン酸混合液固定液にモリブデン酸アンモン、重クロム酸カリ、その他の錯塩を添加する実験等を行なつたが、何れの固定液でも第一固定液だけでは、分機溶剤による脱水操作中における中性赤顆粒の溶出を防止し得ない。

前記「ト青」生体染色固定法用の第一塩化コバルト——ピクリン酸混合液のように酸剤を加えたものはアルコールの中で中性赤顆粒の溶出が甚だしいのを認める。従つてトリパン青——中性赤重複生体染色固定用には酸剤を加えることは不適當と考える。

5%モリブデン酸アンモン液、1%黄血塩液による第二固定液の重加固定操作によつて、分機溶剤による脱水操作中の中性赤顆粒の溶出は少なくなる。しかし第二固定に黄血塩溶液を用いる時には中性赤顆粒の色調を汚なくするので、従来の方法に従つて5%モリブデン酸アンモン液の重加固定をすることに決定した。更に中性フォルマリンの添加量並列固定実験で5~2.5%とするのを適當と認めた。

第一固定液の水素イオン濃度と分機溶剤中その中性赤溶出度と鏡標本の中性赤顆粒の色調の間に関連があり、固定液に酸を加えて酸性を強くすれば、中性赤顆粒は桃色となり、アルコール中への溶出度は大となる。よつて固定液水素イオン濃度を小さくすべく、補正剤として、醋酸ソーダ金属錯陰イオンアルカリ、クロム酸アルカリ、重クロム酸アルカリ等を附加した。これらの中酸素酸塩添加は中性赤顆粒の固定には好影響があるとしても、アゾ色素である「ト青」色素を漂白

脱色することがないであろうかの疑念から「ト青」色素液を加えて生じた沈澱を、顕微鏡下において分解漂白されるか否かを一週間に亘り観察した結果、一週間後においても、なお酸化漂白されない事実を確認した。

トリパン青——中性赤重複生体染色固定組織片の脱水操作法決定に関して、①コバルト——ピクリン酸——フォルマリン固定を経たもの（第一固定）。②第一固定を行なった上、更に5%モリブデン酸アンモンで第二固定をなしたものにそれぞれ半小豆大の肝小片を投入して、試験管底における溶出中性赤の着色度を観察し、なお2時間を経た後各一片を短時間脱水（無水アルコールで15分間浸漬）をして、キシロール、パラフィン包埋、切片として検鏡し、生体染色顆粒の出現の様子を観察し、分機溶媒への色素溶出試験を試みた。

エチルアルコール脱水試験の結果では、ピクリン酸アルコール脱水におけるよりも中性赤の溶出が多い。しかし極く低濃度のアルコール——ピクリン酸液では、ピクリン酸水溶液に見る如く、ピクリン酸イオンの作用によつてその溶出は見られない。

又比較的アルコール濃度の高いもの程溶出が多いが、無水アルコールでは脱水が急速に行なわれて中性赤の溶出は比較的少ない。

メチルアルコールでは、中性赤は非常に溶出度が大きく、組織片投入後10分でその溶出を始める。

脱水アセトン、デオキサン、メチルエーテルにおけるものは溶出を見ない。

以上の成績から、無水物を用いて、短時間に、急速に脱水操作を完了させることが必要であるが、脱水途中で組織固定中のピクリン酸が溶出してくるので新しいものに取換えを行なう必要がある。

以上の実験により、トリパン青——中性赤重複染色永久固定標本製作に成功したが、その良否判定は、先のトリパン青固定法及び佐口氏中性赤固定法によるそれぞれの顆粒の出現状況を、並列実験の固定法成績等を対照して比較検討したところ、大差ない結果を得ることが出来た。

## 2. トリパン青——中性赤重複生体染色顆粒固定試験の総括

中性赤生体染色顆粒を、水、分機溶剤、油類の何れにも全く溶解しないような形に導き得なかつたが、第一塩化コバルト——ピクリン酸混合液で、トリパン青——中性赤重複生体染色組織の酸性顆粒、塩基性顆粒及び重染色顆粒は共に確実に固定することが出来る。

更にこれにモリブデン酸アンモン液固定を重加する

ことにより、小臓器片で、短時間、急速に脱水を完了する限りにおいては、中性赤生体顆粒の溶出を見ないで永久固定標本の製作が出来る。

固定液の水素イオン濃度が強い時は、中性赤顆粒は桃色を呈し、脱水行程中溶出し易く、アルカリ側に傾く時は中性赤顆粒は橙色を呈し、脱水行程中の中性赤の溶出は少ないが、組織の膨化を見る。而して弱酸性の時に於いて、組織の固定像及び永久標本の生体染色顆粒の出現状況が良好である。而して中性フォルマリンの添加量は、2.5~5%が適当である。

## 3. トリパン青——中性赤重複生体染色顆粒の新固定法

以上諸種の実験の結果に基づき、トリパン青——中性赤重複生体染色顆粒の新固定法を確立した。その方法は次の如くである。

2%「ト青」リンゲル溶液 0.5cc を毎日1回、5日間、体重 25gr の健康マウスの背部皮下に連続注射し、最後の注射から24時間を経て、更に2%中性赤リンゲル溶液を1cc 同一マウス腹部腔内に注入、1~2時間を経て、無麻酔のまま殺し、各種臓器を出来るだけ薄片として、下記固定液に浸漬する。

### 第一固定液

第一塩化コバルト	0.2 g
ピクリン酸	0.02g
蒸溜水	10.0cc
中性フォルマリン	0.25
3%クロム酸カリ液	0.5cc 又は重

クロム酸カリ 0.3g を第1固定液の蒸溜水の一部で溶解して加える。

以上の液に、24時間浸漬固定後

### 第2固定液

5%モリブデン酸アンモン	20.0 cc
中性フォルマリン	0.25cc
(硝酸ストロンチウム	0.1g)

に24~48時間浸漬後、蒸溜水で臓器片を軽く水洗、吸墨紙で水を去り、脱水操作に移る。

### 脱水固定操作

無水アルコール 1.5 時間（3回交換）

（又は脱水アセトン、デオキサン、メチルエーテルを用いてもよい。）

キシロール浸漬 2 時間（3回交換）

パラフィン包埋 1.5時間（3回交換）

切片の後染色は 0.5%メチルグリーン又は1%トリパフラビンを用う。

無水アルコール分別脱水、キシロール、バルサム封入する。

## 考 按

私は先ず従来考案された先人諸家の「ト青」生体染色顆粒の固定法の追試を行ない、吟味した結果、1～2のものを除いては、何れの固定液も「ト青」と反応して不溶性化するものを見ないのみならず「ト青」色素膠質液に対して、それを瞬時に凝固するものがなかった。そのため固定操作の初期において既に顆粒色素の拡散を防止することが出来ず、瀰漫性染色乃至は不鮮明像を招来する。

杉山は生体染色における「ト青」色素使用の欠点は、固定に際して脱色し易いことにあるとし、細胞原形質の瀰漫性染色を指摘している。Gross<sup>17)18)</sup>は「ト青」生体染色顆粒の出現は、本色素が顆粒基質の蛋白凝固変性によつて水に不溶性になることによるとの見解を有しているが、私の実験によるとホルマリン、昇汞、重クロム酸カリ、アルコール等単に組織蛋白変性による固定操作のみでは、「ト青」生体染色顆粒像は不鮮明である。これは組織固定に際して色素コロイドイオンの共同沈澱及び顆粒基質蛋白凝固物の吸着、吸着性により吸着され、染色されるが、生体染色顆粒を生理的形態に保持し、原形質の瀰漫性染色を防止する迄には至らないことによるものと考える。

武田<sup>47)</sup>も亦ヘリー氏液によるベンチジン色素生体染色固定を行なつた所見を記載した際、その初めにおいて固定の不確実、不安定なることを述べている。しかし Heidenhain<sup>20)</sup>により初めて応用された細胞核研究用のスーザ固定液は、それに含まれる強酸の故に「ト青」は酸析され、更に強力な組織変性力と相俟つて比較的微細顆粒をもよく固定されている。近時過塩素酸は、蛋白変性力と変性蛋白と化学的諸性質とにより、三塩化醋酸に比較して、より優秀な除蛋白剤といわれているのであるが、私はその酸化作用の有無を懸念しながら応用したのであるが、これは「ト青」を褪色することは認めないけれども、蛋白沈澱力において三塩化醋酸に劣ると考える。

三村村<sup>29)30)</sup>は酸性色素の生体染色固定用として二種の鉛糖固定液を提唱した。鉛糖はアルカリ土金属塩溶液で固定したものと同じく「ト青」を有機スルホン酸金属として沈澱し、原形質の瀰漫性染色像は見ないけれども、バリウム塩、ストロンチウム塩で固定したもののより色素顆粒は粗雑な形態として認められる。コロイドイオンである点で、有機色素はその性質が蛋白質に類似し、更に助色団の種類によつては両性電解質となることは、早くから Kuster-Bredig<sup>31)</sup>によつて想像され、証明せられているところである。生体染色

顆粒の鮮明な固定像を得るには、組織固定と同時に色素顆粒を可及的速かに不溶性化し、その変形を最少限に止めることが必要で、色素コロイド顆粒の荷電中和による凝固化及び永久標本製作行程中に経なければならぬ有極性、分機性及び無極性の各代表的溶媒の何れにおいても溶出しないうような色素の不溶性化合物にならしめることであつて、第1塩化コバルト——ピクリン酸の共同作用はこれらの必要条件を満足させる。

膠質ゾルの放電は適当な電解質、精確に言えば反対に帯電したイオンを添加することにより起るものである。後者が吸着されることが強い程、小さい濃度でゾルの電荷を中和し析出させることが出来る。特に凝固作用の著しいものは、陰電荷に対しては吸着能の強い有機陽イオンであり、陰電荷に対しては吸着性の強い芳香族陰イオン、例えばサリチル酸、ピクリン酸等のイオンである。第一塩化コバルトとピクリン酸の混合液が、中性赤膠質液のゲル化は勿論、「ト青」膠質液に対しても特異的に作用して、瞬時に綿様の沈澱を起させるのであつて、これは恐らくは結晶析出に至るまでの無定形のゲル凝集状態であると考えるが、更にコバルト金属が附加し重塩塊の形となり各種溶媒に不溶となる結果、かく鮮明な「ト青」生体染色顆粒の固定像を得るものと信ずる。

第一塩化コバルト——ピクリン酸混合液の特異作用は、第一塩化コバルト液に少量のピクリン酸を加えた時に、既に有効であつて量的関係はないが、ピクリン酸を多く用いるときは、組織がピクリン酸により黄色に染まること、及び組織片の表面凝固によつて、内部への固定液侵入が遅くなる傾向があるので、第一塩化コバルトとピクリン酸の混合の割合を10対1としたが、その「ト青」生体染色顆粒に対する固定力は、非常に稀薄液でも有効で、組織が第一塩化コバルト及びピクリン酸に反応して化学変化を生起させる特殊な条件のない限り、他試薬を混入しても、その作用は減弱されることなく、固定力に大きな巾を有しているので実験操作中の誤謬はない。

私の実験中、常時において見ないが、或る「ト青」色素を用いて生体染色を行なつた際、「ト青」生体染色顆粒の形が金米糖様に又「ト青」色素の針状結晶が見られたことがある。この事実は Gross<sup>17)18)</sup>、Policard<sup>32)</sup>、Heidenhain<sup>20)</sup>、Höber<sup>22)</sup>、Königsberg<sup>22)</sup>、Möllendorff<sup>31)</sup>等多くの人の既に認めているところであるが、氏等はこの現象を死後変化、死後収縮に原因するとし、或いは又これを否定し、生前における顆粒の出方によるとなし、更に顆粒の出方によりて三種を区別し、空胞周辺に現われる「ト青」生体染色顆

粒は針状に見られるとして、Perivakuoläre granulaと呼んでいる。「ト青」溶液は、「ト青」色素がイオンミセル、イオン聚合状態に存し、膠質的性質を持っていること及びアルコール難溶性有機塩類として、大小の針状結晶を析出する晶質である性質も充分大であることは一般に周知のことである。色素分子中、助色団としての水酸基、アミノ基、スルホン基等は双極子基として作用し Körtum が暗示したように色素イオン聚合に対し London<sup>26)</sup> の分子引力が重要な役割を演じていることは、Werner<sup>26)</sup>、Pheiffer<sup>24)</sup> 等の業績がこれを有力に支持するものである。又 Pauli は染料分子のそれぞれの電離状態及びイオン荷電の位置に従つて色素分子或いはイオンは色々の立体的配位で聚合体を形成するといひ、安藤<sup>29)</sup> はトリパン青等ベンチジン色素膠質液の濃度と当量電導度の関係から、色素イオンの聚合に対し、側鎖の影響を吟味し、スルホン基、水酸基等親水性基を有するにも拘らず、色素イオンが水溶液中に存在することが不安定でイオンミセルを形成すると述べている。これらの見地から考察すると「ト青」金米糖様生体染色顆粒は、「ト青」の溶媒たる体液血中の塩類濃度、その他の性状変化によつてイオンミセルが形成され結晶核となり、それが成長しようとする傾向が強くなつた結果生じたものと考えられる。

次に、第一塩化コバルト—ピクリン酸混合液の特徴は、単に「ト青」膠質液をも凝固する能力を有し、トリパン青—中性赤重複染色の固定に用い得ることであつて、第一塩化コバルト—ピクリン酸混合液で固定後、佐口氏中性赤生体染色固定法をそのまま応用重加して、充分良好なトリパン青—中性赤重複生体染色組織の永久固定法を作製することが出来得る。しかし第一塩化コバルト—ピクリン酸混合液固定から直ちに脱水行程として、分機溶媒中に移す時は、なお多量の中性赤溶出を見るのである。先に塚本<sup>43)</sup> は、従来中性赤生体染色固定に用いられた諸種固定液の能力を系統的に研究しているが、私も亦種々の試薬を用いて中性赤の分機溶媒に難溶性金属附加物を得ようと欲して探索実験を行なつた。即ちアゼン系色素に属する中性赤色素と諸種有機金属錯化合物を生成させて見たが、この中には瞬時沈澱凝固反応を呈するものが多数に存し、又数種の金属塩により徐々ではあるが絮状沈澱をなすものも見受けられ、それら沈澱をアルコール等分機溶剤で溶解試験を試みたところ、溶出度に多少の差異はあるけれども、全く溶出しないうなものを見付けることは出来なかつた。従つてトリパン青—中性赤重複生体染色組織の永久固定標本作製の脱水行程において、中性赤生体染色顆粒の分機溶媒中に

多少なりの溶出はまぬがれ得ないのである。ところが第一塩化コバルト—ピクリン酸混合液に、黄血塩や、モリブデン酸アンモン液を混入し、固定操作を一回行程にして行なうよりも、先ず第一塩化コバルト—ピクリン酸混合液固定後、更に5%モリブデン酸アンモン液固定を重加する二回行程にして固定法を行なう方が、分機溶剤による脱水行程において中性赤顆粒の溶出は非常に防止されることを見たのである。しかしこの事実に対して妥当な解釈をなし得ない。但し実験によると酸性側固定液で固定をなした時は、中性赤生体染色顆粒は桃色をなして検出されるが、このような時は中性赤の分機溶剤中への溶出は多く、中性乃至アルカリ側で固定した時は中性赤生体染色顆粒は橙色を呈しているが、この時は脱水行程において中性赤の溶出は少ないのである。このような見地から固定液のpHの大小が関係を有するものと想像し、クロム酸カリ液、重クロム酸カリ液を加えてpHを高めるようにしたのである。第二固定液として用いた5%モリブデン酸アンモニウム液は、パラモリブデン酸アンモニウムなる多重モリブデン酸塩の作用及びそのpHが第一固定液のpHより高いことも中性赤の分機溶媒中への溶出を少なくしている理由の一つであると考えられる。

脱水行程に関する吟味については、塚本の推す飽和ピクリン酸アルコールは、中性赤を溶出させることが、無水アルコールだけで行なつたよりも甚だしいのである。ピクリン酸アルコール中に、中性赤水溶液を滴下する時は、これを凝固して溶解する所見が見られないし、更に長時間放置しても凝固中性赤の著しい溶出拡散を見ないのに、中性赤生体染色、トリパン青—中性赤重複生体染色を施して固定した組織を脱水しようとする時は、不思議に多量の中性赤色素の溶出を見るのである。この現象は、恐らくピクリン酸イオンは中性赤膠質液を凝固沈澱するけれども、無水アルコール中に溶解しているピクリン酸が電離することなく分子の形で存在し、中性赤に吸着し、アルコール中への溶出を助長することにあると解釈される。

無水アルコール、脱水アセトン、デオキサン、メチルエーテル等それぞれ中性赤沈澱に対する溶解度は異なるであろうが、短時間急速に脱水操作を行なう限りにおいては、何れとも限定する必要を認めない。

私の第一固定液及び5%モリブデン酸アンモン固定を重加した後、無水アルコール、脱水アセトン等で急速に脱水が完全に行なわれる最少限短時間では、美麗なトリパン青—中性赤重複生体染色永久固定標本を得ることが出来る。

以上先人諸家の諸種の方法を追試し、又これらに対

する私の変法等を研究、検討し考察を加えた結果、私の創製した第一塩化コバルト——ピクリン酸固定液が「ト青」生体染色顆粒の固定に最も適合したものであり、更にトリパン青——中性赤重複生体染色顆粒の固定をも確実に得る点で従来にその比を見ない優秀な固定液と信ずる。しかし本固定液の特徴を列挙すれば次の如くである。

1) 私の新固定液は色素膠質液から色素酸及び色素塩基を直ちに凝固沈澱せしめる性質を兼備しているが、その作用機転は荷電中和と考えられ、従つて生体染色顆粒の形態に及ぼす影響は極めて少なく生理的狀態に近いのである。

2) 第一塩化コバルト——ピクリン酸混合液は稀薄溶液においても色素顆粒の固定作用が確實で、重金属の蛋白変性に関して有する不規則現象を避け得るのみならず、組織固定作用も良好である。

3) 固定された「ト青」は、コバルトと有機錯化合物の重積塩の形となつて各種溶媒に溶け難い状態となり、又中性赤に対しては確実に固定しており、重ねて第二固定液に浸漬する程度の簡単な操作によつて、分機溶剤中で色素顆粒の溶出を見ない範囲で組織の完全脱水をなすことが出来る。

4) 本固定液に加えられたフォルマリンや三塩化醋酸等は、組織固定のために添加したのであつて、これによつて第一塩化コバルト——ピクリン酸の特異作用は減弱されることはない。

5) 固定液の調製は、極めて簡単で、且つ調製後長時間を経た液でも固定上に何ら支障を来さないから使用直前調製をする必要はない。

## 結 論

生体染色顆粒の鮮明な固定像を得るには、組織固定と同時に、色素顆粒を可及的速かに不溶性化して、その変形を最少限にとどめることが必須である。従来のトリパン青生体染色顆粒の固定法を検討し、更に独自の創案に基づいて、種々固定液の探索中、第一塩化コバルトにピクリン酸の少量を加えることによつて、トリパン青膠質液を瞬時に不溶性化することを見出した。更に本混合液が化学的性質の相反する中性赤に対しても、確実な沈澱作用を有することを知つた。以上の事実を基礎として、兩種薬液の組合せ実験、濃度決定実験、更に組織固定のための他種薬剤の附加実験等を経て、下記の如き新固定液の調製に成功した。

### 1. トリパン青生体染色顆粒の固定液

第一塩化コバルト	0.1g	三塩化醋酸	0.2g
ピクリン酸	0.01g	蒸溜水	10.0cc

フォルマリン 0.5cc 固定時間 24時間

### 2. トリパン青——中性赤重複生体染色固定液 第一固定液：

第一塩化コバルト	0.2g
ピクリン酸	0.02g
中性フォルマリン	0.25cc
3%クロム酸カリ	0.5cc
又は重クロム酸カリ	0.3g
蒸 溜 水	10.0cc

固定時間 24時間

### 第二固定液：

5%モリブデン酸アンモン	20cc
中性フォルマリン	0.25cc
硝酸ストロンチュウム	0.1g

固定時間 24時間～48時間

以上の固定液の特長は、色素酸のみならず、色素塩基をも直ちに沈澱固定せしめる特長を有すること、その作用機転は荷電的中和と考えるため、色素顆粒は変形を受けずほぼ生理的狀態を保持していること、固定されたトリパン青はコバルトと有機錯化合物の重積塩となり、脱水包埋操作中の各種溶媒に溶け難いこと、中性赤は第二固定液としてモリブデン酸アンモンの作用を加重することにより、より確実に固定されることを挙げる事が出来る。

本論文を採筆するに当り終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師渡辺四郎教授に対してここに衷心より感謝の意を表す。

同門一同の友情により本論文を登載し、故小田幸保博士の御冥福を祈る。

## 文 献

- 1) Adams, A. E. : Science. N. S. 68, 303 (19-28).
- 2) 安藤 暹 : 染料膠質学, 2版1, 裳華房, 東京, 1948.
- 3) 安藤 暹 : 日本化学会誌, 64, 1431 (1943).
- 4) Arnold, J. : Virchows Arch., 157, 424 (1899).
- 5) Arnold, J. : Virchows Arch., 159, 101 (18-99).
- 6) Arnold, J. : Ueber Plasmastrukturen und ihre funktionelle Bedeutung, I. Jena, 1914.
- 7) Bouffard, G. : Annal. d. l'Inst. Pasteur. 20, 539 (1906).
- 8) Cappell, D. F. : J. Path. Bact., 32, 595 (19-29).
- 9) Cash, J. R. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 24, 193 (1926).
- 10) Forkner, C. E. : J. Exp. Med. 52, 379 (1930).
- 11) Gardner, L. U. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 24, 646 (1927).
- 12) Gardner, L.



- U. & Smith, D. T. : Am. J. Path., 3, 445 (1927). 13) Glasunow, M. : Zeit. f. Zellforsch., 9, 697 (1929). 14) Goldman, E. E. : Beiträge f. Klin. Chirur., 64, 192 (1909). 15) Goldman, E. E. : Berlin, Klin. Wochenschr., Jg. 49. II, 1689 (1912). 16) Golovine, E. : Zeit. f. Wiss. Mikr., 19, 176 (1902). 17) Gross, W. : Ziegler's Beiträge, 51, 528 (1911). 18) Gross, W. : Verhandl. d. Deutsch. Path. Ges. 17, 123 (1914). 19) Gurwitsch, A. : Pflüger's Arch., 91, 71 (1902). 20) Heidenhain, M. : Plasma und Zelle. Abt. 1, 434, Jena. G. Fischer, 1907. 21) Herzfeld, E. : Anat. Hefte, 54, 447 (1917). 22) Höber, R. u. Königsberg, A. : Pflüger's Arch., 108, 323 (1905). 23) 清野謙次 : 生体染色の現況及び其の検査術式特に生体色素摂取及組織球形細胞説, 1, 南江堂, 東京並に第2版, 1929. 24) 清野謙次・菊地武熊 : 東京医会誌, 26, 1139 (1912). 25) Kordes, P. J. : Anat. Rec., 27, 23 (1924). 26) London, F. : Zeit. Physik. Chem., 11, 222 (1932). 27) Ludford, R. J. : Proc. Roy. Soc. London. Series, 107, 101 (1931). 28) Mc Junkin, F. A. : Am. J. Path., 1, 305 (1926). 29) Mitamura, T. : Centralbl. f. Allg. Path., 33, 580, 593 (1923). 30) 三田村篤志郎・仁藤隆作 : 日病理会誌, 19, 199 (1929). 31) Möllendorf, W. : Deutsch. Med. Woch., 40, 1839 (1914). 32) Pappenheim, A. & Nakano, J. : Folia Haemat., 14, 260 (1912). 33) Parat, M. et Painlevé, J. : Compt. rend. Soc. Biol., 93, 315 (1925). 34) Pfeiffer, P. : Berichte d. Deutsche Chem. Ges., 55, Jg. 1762 (1922). 35) Policard, A. : Compt. rend. Soc. Biol., 66, 100 (1909). 36) Ribbert, H. : Zeit. f. allg. Physiol., 4, 201 (1904). 37) 佐口 栄 : 医学と生物学, 4, 551 (1943). 38) Sabin, F. R. : Johns Hopkins Hosp. Bull., 34, 314 (1923). 39) Schulemann, W. : Arch. f. mikr. Anat., 79, 223 (1912). 40) Schulemann, W. : Arch. Pharm., 250, 252 (1912). 41) Schulemann, W. : Biochem. Zeit., 80, 1 (1917). 42) Spiegel-Adoff, M. : Handbuch d. Kolloidwissenschaft. 4, I, Lipzig. 1930. 43) 杉山繁輝 : 日本微生物学会雑誌, 17, 75, 662, 775, 1707 (1923). 44) 杉山繁輝 : 日本微生物学会雑誌, 18, 527, 705, 767, 1176, 1423, 1175, 1910 (1924). 45) 杉山繁輝 : 生体染色総説総論, 1, 南江堂, 東京, 1933). 46) 橘慶一郎 : 十全会誌, 38, 853 (1933). 47) 武田徳晴 : 実験医学会誌, 14, 631, 731, 734 (1930). 48) 塚本 茂 : 十全会誌, 37, 925 (1932). 49) Vonwiller, P. : Arch. f. Protistenk., 37, 279 (1918). 50) Werner, A. : Zeit. anorg. Chem., 3, 267 (1893). 51) 山崎一雄 : 化学の領域, 4, 4 (1950). 52) Yamasaki, M. : Arbeiten a. d. Anat. d. Kaiserlich Jap. Univ. zu Sendai, 15, 7, 19 (1932). 53) Yamasaki, M. : Arbeiten. a. d. Anat. d. Kaiserlich Jap. Univ. zu Sendai, 24, 163 (1941). 54) 湯浅 明 : 細胞学, P. 26, 同文館, 東京, 1942.

## Abstract

The new fixing solutions of the dye granules within the tissue cells of experimental animals vitally stained with trypan blue solution or neutral red solution following treatment with trypan blue solution were invented.

The components of the new fixing solutions are as follows:

1. The fixing solution of the dye granules of trypan blue in the tissue cells:

cobaltous chloride	0.1g
picric acid	0.01g
neutral formalin	0.5~1.0cc
trichloroacetic acid	0.2g
aq. dest.	10.0cc

Thin tissue sections from animals vitally stained with trypan blue are fixed with the fixing solution above mentioned for 24 hours, washed in distilled water dehydrate in alcohol, cleared

in xylol and embedded in paraffin.

2. The fixing solutions of the dye granules of both trypan blue and neutral red in the tissue cells:

Fixing solution A:

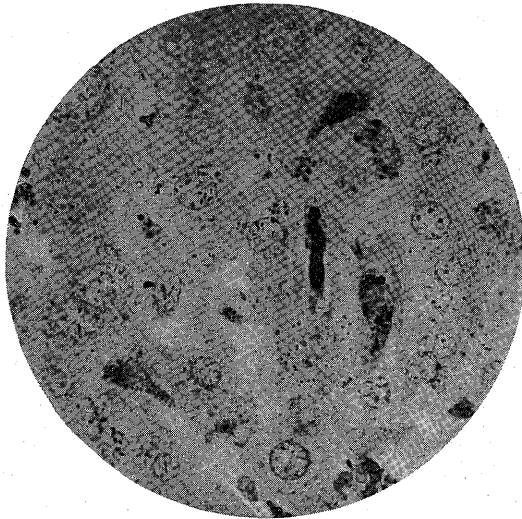
cobaltous chloride	0.2g
picric acid	0.02g
neutral formalin	0.25cc
3% chromic acid	0.5cc
(or potassium bichromate	0.3g)
aq. dest.	10.0cc

Fixing solution B:

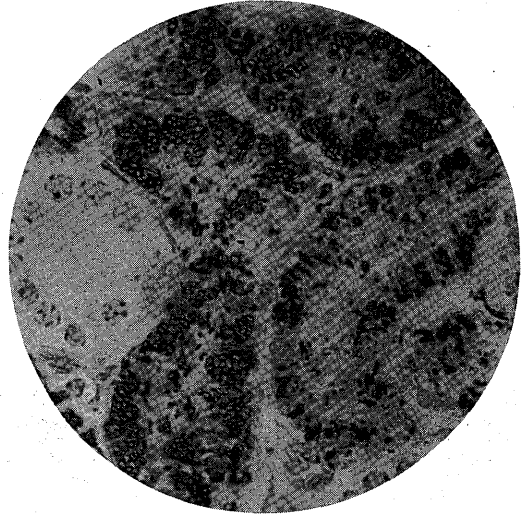
5% ammonium molybdate	20.0cc
neutral formalin	0.25cc
strontium nitrate	0.1g

Thin tissue sections from animals vitally stained with neutral red following treatment with trypan blue are fixed in fixing solution A for 24 hours, then fixed in fixing solution B for 24 to 48 hours, washed in distilled water for a short time, dehydrated in acetone or dioxan, cleared in xylol and embedded in paraffin.

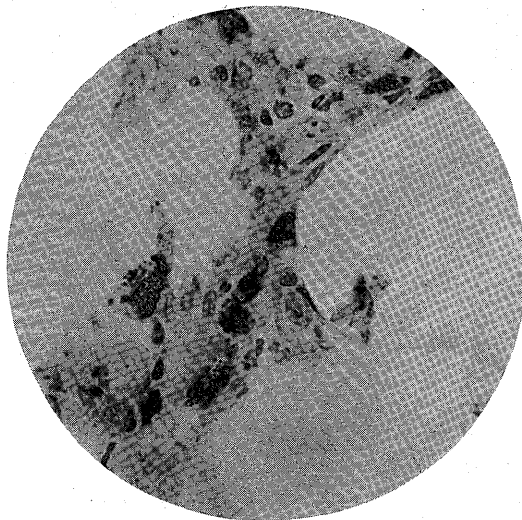
---



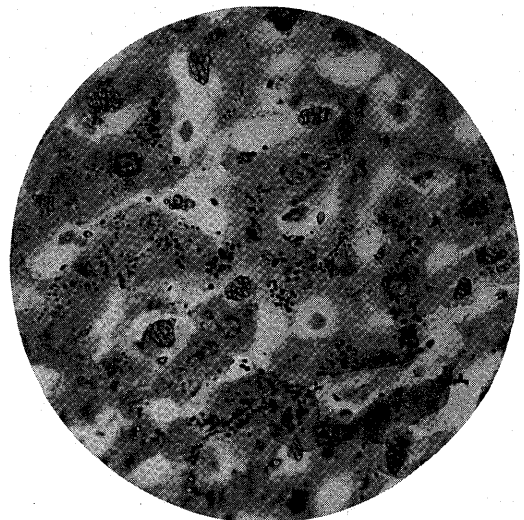
肝臓トリパン青生体染色



腎臓トリパン青生体染色



肺臓トリパン青生体染色



肝臓トリパン青—中性赤重複生体染色