

細胞質好塩基性物質の研究

第 2 編

顕微灰化法による細胞質無機物の検出特に
RNA含有体と無機物との関係

岡山大学医学部病理学教室 (指導: 妹尾左知丸教授)

神 田 三 郎

〔昭和 31 年10月20日受稿〕

1. 緒 言

前報に於て細胞質の好塩基性物質は固定操作, その他による蛋白の凝集効果, 超生染時諸種塩基性色素に依る核酸沈澱効果, 或はストレプトマイシンの核酸凝集作用により顆粒状乃至糸状に凝集することを報告した。この様な状態で細胞質内好塩基性オルガネラは少くともその蛋白成分と核酸とが分解することなく, エンキレーマと分離凝集し顕微鏡的に塩基好性の凝集部と, 嫌色素性のエンキレーマとに分れる。従つてこの様な操作によつて細胞のオルガネラ, 恐らくミクロゾームとその媒質の部分の成分が組織化学的に分析可能となるが, 私はこの編では好塩基性物質の灰分についての研究を報告する。Engström¹⁾は細胞質の灰化物が核酸を持つた部分に現われるということを報告しているが細胞質のミクロゾームが無機物を持つていることは極めて興味あることである。そこで私ははたして無機物が核酸の存在部位に現われるか, 又ミクロゾーム自身に無機物が存在するのか, 或はその周囲の媒質中に存在するかを知る目的で細胞質好塩基性物質を前編に記した方法に従つて凝集させ, その好塩基性凝集物の上に無機物が証明されるか, 或は凝集物の間の部分に現われるものかを追求した。

細胞の無機物は多くの学者によつて組織化学的な染色法を用いて研究せられている。しかしこれ等の方法を用いては殆んど満足な結果が与えられない。例えば Zinkant¹¹⁾は動脈

壁のカルシウムを組織化学的方法で検索したが, 顕微灰化法で得たカルシウムの全量の一部が検出されたのみであつた。又他の例では組織化学的には無機物が検出出来たのに灰化法によつては全く灰分のない場合がある¹⁰⁾。これ等の結果, 普通の組織化学的な方法で満足すべき結果が得られないのは, 無機物が有機物のためにマスクされて染色せられなかつたり, 又有機物と色素とが反応して, その結果を誤まらせたりするためである。之に反して灰化法は無機物検出の邪魔になる有機物を除去出来る点で確実にその存在部位を知ることの出来る利点を有している。

顕微灰化法はすでに1833年 Raspail²⁾によつて植物細胞の無機物の検出に用いられ, 後 Policard³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾, Scott⁷⁾⁸⁾⁹⁾等によつて改良発展せられた。しかし暗視野照明下に観察せられる灰分の中から, 各種無機物を区別することは従来の方法では極めて困難である。Horning¹²⁾は鉄は酸化鉄の形となつて暗赤色を呈し, カルシウムは白色無構造であり, Siliconはその結晶形成のため区別がつけられる様に記載しているが, 実際問題として鉄の赤色は極めて見にくく, 且赤色に見える顆粒は鉄染色によつて認められる実際の鉄量よりはるかに少い。従つてこの目的のために色々の努力がはらわれている。Policard⁴⁾はCaを検出するために灰の上に0.1Nの塩酸を滴下して灰を溶かし, これに0.1Nの硫酸を加え石膏の結晶を作らせて観察した。又 Hermann²¹⁾はMgを検するためテトラオキ

シアントラキノン等を、磷酸塩を検出するために硝酸ストリキニーネ及び硝酸モリブデンを用いた。しかし彼等の努力は目的物質の局在性を保つことが困難であつたためその目的を達していない。又 Policand⁵⁾ は灰分の spectrographic analysis をこころみている。

以上の点から考えて無機物の検出は灰化した後に染色する方法が最も理想的である。しかし灰化した組織は染色液によつて流れ去ってしまうので、普通の方法ではこの事は殆んど不可能に近い。幸い私は次に述べる様な方法で灰化組織を固定することに成功し、之によつて灰化組織の微細構造を破壊することなく染色し観察した。

2. 実験材料及び実験方法

a) 実験材料・健康なモルモット、家兎の延髄、橋、中脳、小脳、健康家兎、モルモット、ラットの肝臓、腸管、肺及びアコヤ貝卵を使用した。これ等の中、動物組織はクロロホルム・アルコール(1:2)、或は純アルコールに24時間乃至72時間固定し、型の如くパラフィンに包埋し6 μ の厚さの切片とした後、キシロールで脱パラしこれを灰化した。又一方この様なパラフィン切片と比較するために脳組織を短時間ホルマリン(10%)で固定し、凍結切片としたものを灰化し比較した。アコヤ貝卵は塗抹した後灰化したが、この一部はナイルブルー被膜の上で15乃至20分間超生染色し、一部は急速に乾燥したものの灰化像をそれぞれ比較した。

b) 灰化法：灰化には電気炉を使用した。これには1200°Cまで測定出来るパイロメーターと一次、二次共に何段かに切り換えられるスライダックが附属している。細胞の収縮を防ぐために電気炉の温度をあらかじめ400°Cに上げておいて、この中に脱パラ、乾燥した標本を挿入し、ルツボを標本の上に乗せて外部からの無機物の落下を防ぎつつ600°C~650°Cに於て5~10分間灰化した。この様な方法によつて細胞はその構成要素の融点を急激に通過して炭化し、更に灰化する

ので、灰化後もその微細構造をよく保っている。灰化後は電気炉内の温度が室温と等しくなるまで放置し炉から取出す。灰化時間は0.5cm平方6 μ 厚の切片なれば650°C 5~10分で足りる。

c) 観察方法：炉より取出した標本は一部は速かに清浄なデッキグラスをかぶせ、周囲をパラフィンで封じツァイス製の暗視野照明下で観察した。灰化組織は空気にさらすと灰分は空中の水分を吸収して容易に結晶を形成し元来の構造が乱れるため炉より取り出した後は可及的速かに封入観察しなければならない。一方又灰化標本の一部は卵白の薄膜を灰の上にかぶせ無水アルコールで固定した後染色して観察した。灰化組織に卵白の薄膜をかぶせるにはデッキグラスの一端に少量の卵白をつけ、一般の血液塗抹標本製作の要領でデッキグラスを僅かに標本面から離してオブジェクトの上を滑らす様に引くと卵白の薄膜はそのまま灰化組織の構造を乱すことなく灰分を固定する。この様にして処置した標本は速かに乾燥後、無水アルコールで固定する。染色にはアリザリン及びフェロシアンカリを用いた。アリザリン染色は純アルコールにアリザリンを飽和させたものを2~3分卵白の薄膜上より染色し、次いでアルコール及び水で洗つた後乾燥しバルサムで封じた。又鉄を検するため2%フェロシアンカリ水溶液に1%の割合に濃塩酸を加え10~15分間染色し、水洗乾燥の後バルサムで封じた。これ等暗視野照明下の観察も灰分の染色後の観察にも必ず同一切片のヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、比較しながら観察した。卵細胞の塗抹標本にはヘマトキシリン・エオジン染色のかわりにメチレンブルー単染色を用いた。

3. 観察結果

a) 暗視野装置による観察

i) 神経細胞 (Fig. 1, 2, 10, 11, 12) : 神経細胞は一般に細胞質及び核小体に大量の灰分が検出される。核のクロモネマの存在す

る部分には灰分は少い。小脳のプルキンエ氏細胞も核小体及び細胞質に多量の灰分が存在するが核小体を除く核の中には殆んど認められない (Fig. 12)。これに対して小脳の顆粒細胞には核に多量の灰分が存在する。これ等の所見から見て灰分の多寡は核酸の量に略々平行する様である。

脳をアルコール或はクロロホルム・アルコールで固定した場合は細胞質にニッスル氏小体が塩基性色素で染め出されるが、この様な固定切片標本を灰化すると、その灰像は丁度ニッスル氏小体と同じ様な形に分布する (Fig. 2)。これに対して短時間ホルマリン固定後凍結切片とした脳神経細胞では、細胞質好塩基性物質は瀰漫性に分布し無構造の像を呈するが、この様な切片の灰化標本に於ては細胞質の灰分も又好塩基性物質の分布と同じ様に細胞質内に一様に検出される (Fig. 1)。核の灰分は両者共極めて少いが、それでもニッスル氏小体の観察される様な細胞には細胞質の灰分が一様に分布している様な細胞に比し、核の灰分の像は粗大線維状乃至は顆粒状に分布している。核小体には常に大量の灰分が存在するが、いずれの場合に於ても全く無構造に見える。

ii) アコヤ貝卵細胞 (Fig. 5, 6) : アコヤ貝卵細胞に於ても神経細胞と同じ現象が観察せられた。即ち塗抹後急速に乾燥し、メタノール固定したものと、ナイルブルーフィルムの上で15~20分超生染した後乾燥、メタノール固定したものに就てそれぞれの灰化像と塩基性色素による染色像とを比較した。その結果急速に乾燥した卵細胞の細胞質は塩基性色素で比較的一様に染ると同時に灰像も又一様に分布し (Fig. 5)、ナイルブルーで超生染した細胞の細胞質は線維状の好塩基性物質と線維状の灰像とを与える (Fig. 6)。アコヤ貝卵細胞は又神経細胞と同じ様に細胞質及び核には多量の灰分が存在するが核様体にはほとんど認められず卵細胞に於ても灰分は核酸の分布と同じ態度をとることが明らかである。

iii) 肝細胞 (Fig. 3, 4) : 98%アルコール

で固定パラフィン切片とした肝細胞質の好塩基性物質は顆粒状を呈するが、同様処理をほどこした肝細胞の灰分も又顆粒状に分布する (Fig. 3)。核小体にも多くの灰分が存在するが神経細胞や卵細胞にくらべて比較的少量の灰分が顆粒状を呈して核の中に存在している。肝組織 (Fig. 4) に於て認められる灰分の大部分は肝細胞にあり、次で被膜にも多量の灰分を認める。又血管壁、赤血球に少量の灰分が存在しているのを観察し得る。

iv) 消化管 (Fig. 9) : 消化管では上皮細胞基礎膜、結合織線維、漿膜に灰分が存在する。上皮細胞の灰分は主として細胞質にあり核にはほとんど灰分を認めない。

e) 腎臓 (Fig. 8) : 腎臓の切片標本に於て認められる灰分は糸球体、ボーマン氏嚢、基礎膜、血管壁等の間葉組織であつて細尿管上皮細胞には、核にも細胞質にも灰分は認められない。

b) アリザリン染色による観察 (Fig. 10~12)

暗視野照明によつて観察せられる灰像から各無機物を検出するために灰化標本に上記の方法で卵白の薄膜をかぶせてアルコールで蛋白膜を固定し、灰分の流出を防ぎ、Ca 及び Mg を検出する目的でアリザリンで染色した。この場合には一般組織に於ける組織化学的検出法と異り有機物の存在による反応の妨害又は偽反応を防ぎ得るので試験管内に於ける無機化学呈色反応の様に急速に且確実に染色し得る。アリザリンで赤染せられる部は一般に暗視野装置で観察せられる灰像の量に比例している。即ち神経細胞、肝細胞、卵細胞等の細胞質、核小体には多量の灰分が存在するが、この部は又アリザリンによつて非常によく染色せられる。又同様に腎、消化管等の基礎膜、肝、腎の被膜、血管、神経線維等もよくアリザリンに染色せられる。

c) フェロシアンカリ染色 : 鉄は健康状態の細胞では一部の細胞及び組織を除いて非常に少く、且つ染色に際して水や塩酸を使用するため灰像が多少乱れるため比較的その観

察は困難である。フェロシアンカリによつて青く染色せられるのは赤血球、小脳の顆粒細胞核、肝、腎の基礎膜、血管壁等であつた。

4. 考 按

無機物質検出のための固定剤は、多くの学者によつて考按せられている³⁾⁴⁾⁶⁾¹³⁾。特に Scott の使用した中性フォルマリン 1 容にアルコール 9 容を加えた固定剤は一般に広く用いられている¹⁴⁾¹⁵⁾。しかし私の検索目的は灰分の分布をしらべる事で量的測定を厳密に行う必要がなかつた事と細胞質、好塩基性物質の凝集状態を変化させる種々の条件を必要としたため、アルコール・クロロホルム固定又はアルコール固定、超生染、凍結切片等を用いて灰化組織を得た。これ等の方法によつても細胞内無機物質は常に大量に細胞内に証明される。神経細胞に於てはその形が大きく好塩基性が強いので、私の用いた諸細胞の中では特に美しい灰化像を与えた。灰分は細胞質の好塩基性物質の形態に略々一致して現われる。即ちニッスル顆粒を示すものはその顆粒に一致し、彌漫性にあるものは灰分も又彌漫性に現われる。之等の所見は核小体の所見と共に RNA を含む細胞内オルガネラが多量に灰分を含む事を示すもので Alexander 等¹³⁾によつて示された所見と略々一致する。Nissl 小体を発現させる様な方法で処理した細胞に於ては、灰分は Nissl 小体に相当する部分のみ存在し、それ以外の細胞質の部分にはほとんど検出されない。同様の現象はアコヤ貝卵細胞、肝細胞に於ても認められる。又腎上皮細胞の様に RNA の少い細胞では灰分も極めて少い。これ等の事実は Engström¹⁾ や Scott⁹⁾ の灰分が核酸のある部分に存在すると云う報告を支持すると共に、更に細胞のオルガネラに就てこの事実を新しく証明したことになる。これ等の灰分は細胞を固定する際にその固定液に酸を加えると容易に細胞内から脱出するものであるが、酸の存在しない場合は常に核酸の存在部位と同様な部分に現われる。この事実は恐らくこの灰分は核酸或は蛋

白と電氣的に結合していることを示すものである。即ち細胞質内に灰分として検出される無機物の大部分はこの様に細胞質の構成要素として存在するものと考えられる。之等の灰分の主要成分は Ca 或は Mg であることは灰分の染色から肯定される。アリザリンで染色されるものは Lison¹⁶⁾ が指摘している様に Ca のみではない。実際試験管内での反応では Ca^{++} も Mg^{++} も共に赤色の沈澱物を作る。細胞質の Ca や Mg は Monné¹⁷⁾ によれば“cytoplasmic fibre”に於て核酸及びリピドの結合橋として存在しているのであろうと云う。又 Heilbrunn¹⁸⁾ は Ca^{++} が細胞質内で蛋白とリピドとの結合橋に使われていると考えている。

一方核に於ては大型の運動神経細胞等では核小体を除き一般に著しく灰分の含量が少い。しかしこれ等の細胞は核の好塩基性も弱く、好塩基性の強い核を有する小脳の顆粒細胞には大量の灰分があり、又 Alexander¹³⁾ 等の報告によれば胎生時の神経細胞核は好塩基性強く且つ灰分も多いと云うから核の中の無機物 (Ca^{++} , Mg^{++}) も核酸の含有量と平行して増減する様に思われる。Hunaoka¹⁹⁾ も又核の灰分は核のクロマチン量に比例すると報告している。之等の結果は何れも核に於ても又 Ca^{++} , Mg^{++} 等は核酸と結合しているのではないかとの想定を支持するものである。

核小体には常に大量の灰分が検出される。しかしその好塩基性物質の像及び灰化像は常に無構造略々円形に現われ細胞質好塩基性物質の凝集を起す様な操作によつてその形を変える様なことはない。

組織の灰像を観察すると、細胞の他に間質組織にも多量の灰が存在する。この灰は被膜、血管、漿膜、ボーマン氏嚢、基礎膜等結合織の存在部位に認められる。この灰分も大部分が Ca^{++} , Mg^{++} であつてすでに報告した様に²⁰⁾ P. A. S. 陽性物質と密接な関係がある様に見える。

一方鉄はその色で灰分の中から織別する方法は、私の観察からはそれ程信頼性がある様

に思えない。勿論白色の Ca^{++} の中に暗赤色の顆粒は認められるが、その量は少いため、もし顆粒が極めて小さいものであればこれを識別することが出来ない。実際マウスに連日クエン酸鉄を注射して強い鉄沈着を起させた肝臓フェロシアンカリ染色標本と同一灰化組織のフェロシアンカリ染色標本とを比較した結果、染色せられる鉄量は灰化標本の方がはるかに多かつた。しかしそれでもフェロシアンカリで染色するためには水や塩酸を用いなければならず、又健康な組織は一般に鉄が少いためこの方法も必ずしも満足な方法とは云い切れないうらみがある。尚鉄分の存在部位と細胞内構造との関係は、この実験では明らかにし得なかつた。

5. 結 語

- 1) 顕微灰化法を用いて神経細胞、卵細胞、肝細胞の細胞質、核の無機物の検出を行つた。
- 2) 好塩基性物質を有する細胞に就ては、大量の灰分が細胞質に存在する。その量は細胞質の核酸の量と略々比例する。蛋白凝集剤の作用及び核酸沈澱性に働く物質の作用から之等の灰分は核酸を含有するオルガネラの成

分をなすものと想定せられた。

3) 核小体には常に灰分が大量に検出されるが、これは常に一様に分布し蛋白凝集剤及び核酸沈澱性物質の作用による形態の変化は認められない。

4) 核の灰分はクロロマチンと密接な関係があり、クロロマチン量の多い小脳顆粒細胞核には灰分が多く、クロロマチン量の少い大型運動神経細胞では灰分も又少い。

5) 結合織のある部分にも灰分が多いが、これは核酸とは関係がない。

6) アリザリンで灰化組織を染色した結果細胞及び細胞間質共に灰分の大部分は Ca^{++} 或は Mg^{++} である。

7) 灰分をフェロシアンカリで染色すると、肝細胞、小脳顆粒細胞核、被膜、基礎膜、血管壁、赤血球等に鉄が認められる。

本研究の一部は第41回日本病理学会地方会に於て報告した。稿を終るにあたり、終始御指導と御校閲を賜つた恩師妹尾教授に深く感謝する。

本研究は文部省科学研究費の補助を受けた。ここに謝意を表す。

References

- 1) Engström, A. *Chromosoma*, **2**, 31, 1943.
- 2) Raspail, F. V. *Brailliere*, Paris, 1833.
- 3) Policard, A. *C. R. Acad. Sci.*, **186**, 1066, 1928.
- 4) —————: *Science*, **76**, 349, 1932.
- 5) ————— & Morel *Arteriosclerosis*, ed. E. V. Cowdry, 1933.
- 6) —————: *Compt. Rend. Acad. D. Sc.*, **176**, 1187, 1923.
- 7) Scott, G. H. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, **29**, 349, 1932.
- 8) ————— & Horning, E. S.: *Am. J. Path.*, **8**, 329, 1932.
- 9) —————: *Science*, **76**, 148, 1932.
- 10) —————: *Am. J. Anat.*, **53**, 243, 1933.
- 11) Zinkant, W. *Virch. Arch. Path. Anat.*, **281**, 911, 1931.
- 12) Horning, E. S.: *Cytology and cell physiology*, ed. G. H. Bourne, Oxford, 1952.
- 13) Alexander, L. and Myerson, A. *Am. J. Path.*, **13**, 405, 1937.
- 14) Scott, G. H. *C. R. Acad. Sci.*, **190**, 1930.
- 15) Covell, P. & Danks, W. B. C.: *Am. J. Path.*, **8**, 557, 1932.
- 16) Lison, L.: *Histochemie et cytochemie animales principes et méthodes*, 1953.
- 17) Monné, L. *Advances in Enzym.* **8**, 1948.
- 18) Heilbrunn, L. V.: *Scient. Amer.*, 1954.
- 19) Funaoaka, S. & Ogata, H.: *Fol. Anat. Japon.* **8**, 1930.
- 20) 神田三郎, 妹尾左知丸: *日病誌*, **42**, 昭28.
- 21) Hermann, F. Z.: *Wiss. M.*, **32**, 1932.

写 真 説 明

- Fig. 1. ホルマリン固定，凍結切片を灰化したモルモットの延髄の神経細胞，細胞質に一様に多量の灰分が存在するが核には殆んど灰分を認めない。核小体には大量の灰分が存在する。
- Fig. 2. アルコール・クロロホルム (1:1) 固定，パラフィン切片を灰化したモルモット延髄の神経細胞，細胞質の灰分は Nissl 氏顆粒の構造をとる。(第一編 Fig. 14 参照)
- Fig. 3. 健康ラット肝細胞の灰化像，絞殺後98%アルコール固定，パラフィン切片とした後灰化せるもの，細胞質及び核内に顆粒状の灰分を認める。
- Fig. 4. 健康ラット肝組織の灰化像，肝組織内に於ては肝細胞にもつとも灰分が多く，グリソン氏鞘の血管壁，赤血球，中心静脈内の赤血球にも灰分は認められる。
- Fig. 5. アコヤ貝卵細胞の灰化像，塗抹後急速に乾燥しメタノール固定をほどこした後灰化した。細胞質の灰分は一様に分布する。
- Fig. 6. 同上，アコヤ貝卵をニールブルー・フィルム上に塗抹10分間湿室内に入れ，乾燥，メタノール固定の後灰化した。細胞質の中に顆粒状に灰分が分布する。
- Fig. 7. 貧血家兎赤血球の灰像，未消血を塗抹，メタノール固定後灰化したもの。赤血球には多量の灰分が認められる。
- Fig. 8. ラット腎臓の灰化像，アルコール固定，パラフィン切片とした腎組織を灰化したもの。ボーマン氏嚢，糸球体，細尿管の基礎膜に多量の灰分を認める。
- Fig. 9. ラット小腸の灰像，98%エタノール固定，パラフィン切片を灰化したもの。基礎膜及び上皮細胞質に灰分が認められる。
- Fig. 10. 及11. Fig. 2. と同一灰化組織に卵白の薄膜をかけ，メタノール固定した後アリザリンで染色した神経細胞。
- Fig. 12. モルモット小脳の灰化組織をアリザリンで染色したもの。
- P = Purkinje 氏細胞 G = 顆粒層の細胞 M = 髄質 Mo = 分子層

Department of Pathology, Okayama University Medical School
(Director : Prof. S. Seno)

Studies on the Structure of Cytoplasmic Basophilia

II. Studies on Minerals in Cells with Special References
to Cytoplasmic Basophilia

By

Saburo Kanda

In the previous paper, the author reported that the cytoplasmic basophilia appears fibrous or granular by the dehydrating mechanism or by the action of RNA-precipitating agents. The purpose of this paper is to investigate the relation of minerals to cytoplasmic basophilia by means of microincineration, and also to distinguish clearly each minerals from others by alizallin or ferrocyan kalium stain after the coating with egg-white.

In the nerve cells and the egg cells of *pinctada maltensii* treated by agglutinating agents of basophilia, mineral ash appeared showing the similar picture like as Nissl-body or giving fibrous mesh work, while on the cytoplasm which basophilia was not agglutinated, careful fixation with formalin or freezing drying, mineral ash appeared homogenous on cytoplasm. The mass of mineral ash which appeared in cytoplasm seemed to be in proportion to the

quantity of nucleic acid, i. e. a quantity of mineral ash was recognized in the cytoplasm that showed strong basophilicity, and in the cytoplasm that showed weak basophilicity a small quantity of mineral ash was detected. From these observations, it was concluded that mineral ash detected in cytoplasm must be a component of basophilic organella but not of enkylema. Alizallin staining of the ash proved that mineral ash was mainly composed of calcium or magnesium. Treating with acid ferrocyan kalium, however, a small amount of iron was detected in ash too, i. g. liver cells, nucleus of granular cells in cerebellum, red cells, capsuls of liver or kidney, basement membrane and Bowman's capsule stained blue slightly by ferrocyan kalium.

神田論文附図

