

流行性脳炎包含体(濱崎)塗抹標本に 於ける所見に就て

岡山大学医学部病理学教室 (指導 浜崎幸雄)

近 藤 良 一

[昭和 27 年 6 月 10 日受稿]

流行性脳炎核包含体の研究は、これまで多数の者によつて行はれ、そのうち Wester, 高瀬, 池田等は罹患動物脳組織に於て夫々の小体を記載した。併し彼等はこれら小体の特殊性を確定し得ず、当時学者の意見は流行性脳炎には特殊包含体は現れないといふ意見が支配的であつた。(詳細は流行性脳炎核包含体研究の歴史参照)¹⁾

著者の一人浜崎は核病理学の立場から、この方面に研究を進め従来注意の払われなかつた神経膠細胞核、小脳ベルグマン氏細胞核、嗅腺細胞核に限定して出現し、神経細胞に絶体に現れない²⁾など従来報告されたビールス性核包含体には全く見られない特殊性を有する核包含体を発見した。更に全身の組織を検査し大網、脾臓、淋巴腺³⁾及び骨髄⁴⁾の網状織細胞に之を検出し、又 Virus の局所接種によつた網膜色素上皮⁵⁾、褐色脂肪細胞、胞隔細胞⁶⁾に同様の核包含体を発見してその特殊を確定した。この包含体は罹患マウス脳に殆んど 100%に証明せられ然も局所の組織変化に先き立つて出現する性質があるので、之を検出してマウスの感染如何を定めることは従来の組織変化に依存するより有利である。更に若しこの特殊包含体が脳の塗抹標本から検出することが出来れば一層便利であらうと云う考へからこの検査に着手した。

実験方法

材料は日本並に米国流行性脳炎 (St. Louis, Webster No. 3) の鼻内 (稀に脳内) 接種を受けた二十日鼠で定型的発病を見た例の新鮮な脳を用ひ、その一側脳半球より塗抹標本を

作製し、他の半球は組織切片として比較対照した。塗抹法は十分脱脂清拭した被蓋硝子に呼気を吹き掛けた後、主として脳幹部の小塊を「びんせつと」で挟み取り之を比較的厚く硝子面に塗抹した。注意すべきことは従来行はれた如き菲薄なる塗抹を行はないことである。即下記の如く菲薄な層に於ては染色剤の染色が速に且強く起り、包含体及びその附属物は染色され難いためである。尙脳幹切断面に硝子面を軽く押しつけて引き離すことによつて作られた塗抹標本も推称する価値がある。

対照実験としては、枯草菌、ブイヨン、健常二十日鼠脳乳剤等の脳内注射を施した二十日鼠の脳を用ひた。又他種 Virus 特殊包含体と比較するために親脳性へるべす病毒 (伝研、西脇株) をマウス脳内に接種して検索した。

染色法

染色液は Azur-Eosin-Lösung (Grübler) を用ひた。併し普通に行はれる Giemsa 染色法では包含体及びその附属物は弁別されないのを常とする。色々実験した結果次の如き方法で良成績を得た。

1. Eosin-Giemsa 法

1. 塗抹標本は塗抹後数時間乃至 24 時間を経過したものを用ふる。
2. 純アルコールをシャーレに盛りその底部に細末とした無水硫酸銅の薄層を作り、被蓋硝子の塗抹面を下にして硫酸銅層の上に載せる。かくて 5 分間固定。其後静かに被蓋硝子をピンセットにて挟み上げ、上層のアルコールにて銅の

粉末を洗ひ落し露を切り乾燥しない間に

3. 0.5% Eosin 液に浸し、20~30°C にて10分間染色。
 4. 瞬間水洗。
 5. Giemsa 稀薄液（蒸溜水 2c.c. に1滴の Giemsa 原液を滴下せるもの）を製し、之に被蓋硝子塗抹面を下にして浮かせて、染色を行ふこと15~20分。肉眼的に塗抹層の比較的厚い部は赤色を呈し、薄層の部のみ僅に紫色を帯び、鏡檢的には薄層に於ける核の染色素は多少紫藍色を呈するも、比較的厚い層の核の染色素は全く染色されず核基質は甚だ淡き綠色に輝くのを認める程度に止め、濃染を避ける様十分に注意する。
 6. 瞬間水洗。乾燥。鏡檢。
2. 谷口氏法⁷⁾
1. 固定 (Methylalkohol 100, フォルマリン原液 5, 氷醋酸 1.) 2分
 2. 水洗
 3. 1% Eosin 液を盛り、水蒸気の立つ程度迄加温 (30~60 秒)
 4. 水洗
 5. 谷口氏染色液 (Eosin-Methylenblau 0.3, Azur 0.08, Crystallviolett 0.005, Methylalkohol 25, Glycerin 25) 本液 1c.c. を 50c.c. の蒸溜水に稀めた液にて 20~30 分染色を行ふ。
 6. 水洗
3. 過マンガン酸加里 Giemsa 法 (三田村)
1. Methylalkohol 3~5 分固定
 2. 1% 過マンガン酸加里液に浸すこと 5~15 分
 3. 0.5% 稀酸 5~10 分間
 4. 水洗
 5. Giemsa 稀液 (蒸溜水 1c.c. に原液 1 滴)
 4. Viktoriablau-Färbung (Herzberg)⁸⁾
 5. Versilberung nach Fontana-Tribondeau-Morosow⁹⁾
 6. Mai-Grünwald 氏法

7. 三酸染色
8. Feulgen 氏反応
9. 石炭酸フクシン沃度 (浜崎)

検査成績

我々の改良せる Eosin-Giemsa 法を行ふに膠細胞核の包含体は橙黄乃至橙赤色を呈し光輝あり、Giemsa 液の過染色ある時は漸次に青色調加り、染色素が定型的に染色されるに及べば之と区別困難なる色調に変わる。前記の方法の如く注意して染色を行ひ塗抹の厚薄中庸を得たる部に於て検する時は一般に細胞核の染色素は染色されず核の基質は極く淡く綠色に輝くのを見る。染色素は此の内に在つて淡紅色の微細塊状顆粒として彌漫性に存し又稍々過染状態に在る際には紫色調を帯びる。

次に包含体を蔵する膠細胞核を仔細に検するに、殊に包含体の比較的小なるものに於てその周囲をとりまいて、面紗状の青紫色に染る物質の存するのを見る。本好塩基性物質は乾燥装置にて鏡檢すると平等に見えるが、油浸装置にて精檢する時は絮状乃至は線状物質塊であつて微細絲状物の集合せるかに見える。但好塩基物質中には微細顆粒を認めることあるも之等は紫赤色調強く染色素との間に形態並に分布上密接なる関係にある。

好塩基性物質は多少偏在するも大体核の中心部を占め、微動装置を上下して本物質の内部を検すれば多くの場合其の中央部に橙黄色に輝く小体を認める。本小体の小なる時は其の辺縁は好塩基物質との移行甚だ著明であるが小体の増大するに従つて橙赤色となり光輝を増し漸次好塩基性物質と鋭利に境されるに至る。之と同時に好塩基物質の減少を來し、菲薄面紗状と化し、又は全く之を失ひ僅少の紫赤色微細顆粒の小体周辺部に蜷集するを認める。

好塩基性物質は小体を中心に稍々鋭利な辺縁を有するが、通常辺縁は分離放散して稀薄となり、核膜に向つて分散する。乍然、適当に染色された場合は好塩基性物質は核膜との

間に狭き帯状の空隙を認める。注意すべきは此の空隙は Paraffin 切片に Haematoxylin Eosin 染色を施した際に現れる空隙と無関係であつて、後者は包含体と境する広き間隙であつて此の部は Eosin-Giemsa 染色に際して現はれる好塩基性物質の位置に相当することである。但 Giemsa の過染を起した場合に於ては染色素の濃染を起し、好塩基性物質の境界不明となり之が直接核膜と連るが如く見ゆるに至ることがある。尙好塩基性物質中に2ヶの小なる小体を認めることがある。然る時は各々の小体を中心に好塩基性物質集積を来すために、本物質は2極性となり繭形を呈する。勿論2ヶの小体が相接近して存する際にはかゝる所見はない。

脈絡膜上皮細胞は適當なる塗抹標本の作製困難なるため、並に核の染色性の膠細胞の夫れと趣きを異にするためか、Eosin-Giemsa 染色に際して好塩基性物質を明瞭に染色し得ない。即この細胞では本物質と染色素の好塩基度が相似しているものようである。勿論包含体自身は橙赤色光輝ある物質として出現し稀に淡青色面紗状物質にて包被されることがある。上記の包含体に特異なる核染色像と區別を要するのは白血球殊に単核球の核である。此の核は基質の綠色網が、膠細胞に比して遙に強く又前記包含体に附隨する好塩基性物質に類似する物質が可成多量に存する。本物質は包含体の夫れよりも濃染し面紗状又は線花状の感を与ふるもの少く、顆粒状の蛋白凝塊の感を呈する。その位置形態も雑多であつて、核内に稍平等に散布し、x 状 N 状等又火花状に分散すること多く邊緣鋭利なる塊を形成することが少い。尙単核球は明瞭に原形質の境界を認知し得ることが多い。

神経細胞の核は其の基質膠細胞核の夫れに類し極めて淡く綠色を呈し其の核には赤染するを以て包含体と鑑別するを要する。此の鑑別は概ね容易であつて、核仁は球形を呈し其の周縁に淡紫赤色の染色質小顆粒並列する。尙神経細胞の核内には淡紅色をなし星形を呈

する物質あり其の微細なる突起は互に連つて網状に配列するのを認めることがある。これは Heidenhain の好酸性染色質であつて核内に於て計劃的配列をなすに注意すれば弁別困難でない。

前記対照実験中枯草菌脳内注射例の塗抹標本に於ては白血球多数に存し、その一定数は前述の如き核染色を起し時々膠細胞核と紛らしきものに逢遇した。又膠細胞核も甚だ稀に前述の好塩基性物質に類似せるものが出現することがある。但其境界は鋭利でなくて核内に広く存在し核膜との間に明なる間隙を存せず且好塩基性物質は紫色調や、強く染色素と色調を同じくすることが多い。以上の如き所見は谷口氏法に於て著明であつて Eosin-Giemsa 法に於ては稀な所見である。

「へるべす」罹患二十日鼠脳の塗抹標本に Eosin-Giemsa 染色を行ふと多数の神経細胞核内に赤染する包含体を証明し得る。「へるべす」包含体は大きく其の周辺鋭利でなく屢々放線状の短い突起を生じ又基質は一般に粗であつて脳炎包含体の如く強い光輝を有しない。不規則網状又は綿花状の構造を示し往々中心部が空虚に現れ環状を呈する。染色素は核周辺部に輪状に存在し、包含体の周囲は淡明に現れ明瞭な好塩基性物質を認め得ないが稀に淡紫青色雲状の物質を包含体の附近に見ることがある。本物質は粗大雲片の集合せるが如く現れること多く染色素と密接なる關係に在つて Feulgen 陽性である。

尙稀な所見としては包含体以外に 0.5~1 μ 赤色の小球数個散在することがある。包含体内にも同様の微細なる顆粒存在し、核の周辺部に存するもの一般に粗大であつて核周辺部のものは核外に移行し得るものの如くである。

膠細胞核内の「へるべす」包含体は脳炎包含体と類似し境界鋭利なる赤色球として現れることもあるが包含体の周囲、即脳炎包含体の好塩基性物質の現れる位置に於て、多くは淡紫赤色粗雲状の物質が存し、此の物質は内方は包含体に移行し外方は広く拡散し鋭利な

る境界を認めしめない。

以上述べた所は Eosin-Giemsa 染色の定型的所見であつて、普通の Giemsa 染色に於ても認められるが如く染色成績は動搖可成強く、又同一標本に於ても塗抹層の厚薄により、又標本の辺縁部と中心部によつて成績を異にする。鏡検に際しては先づ弱拡大にて細胞核の紫色に着染されたる薄層部と脳物質赤染し核の全く認め得ない厚層部との中間帯の部を強拡大にて検索しなければ前記の所見は認知し得ない。

谷口氏法でも概ね Eosin-Giemsa 染色に類する染色所見を得るが膠細胞核並に単核球の基質は共にやゝ濃く青緑色を呈し、好塩基性物質も共に濃染するため包含体に附属する好塩基性物質と単核球並に核変性を起せる膠細胞の夫れとは完全な包含体の見出し得る場合以外に於ては鑑別困難なることがある。尙谷口氏法に於ては一般に核並に Oxychromatin の染色強く包含体の検出に障碍を与へる。

Feulgen 氏反応は既に報告した如く Paraffin 切片に於ては包含体には全然陰性であつて稀に之に附着する Chromatinknoten 存する場合、之に陽性となるのみである。

其他過マンガン酸加里 Giemsa 法, Viktoriablaue 染色, 鍍銀法, Mai-Grünwald 法は流行性脳炎包含体の染色に適しない。三酸染色法により核包含体は紅色を呈し Chromatin は綠色を呈すること Paraffin 切片に類するも後者に於けるが如く美麗でない。

總括並に考按

Virus 特殊性包含体と Elementarkörperchen¹⁰⁾ の関係に関しては、Guarnierie 氏小体と Paschen 氏小体の関係に就て花々しき研究並に論議が行はれ、今日に於ては両者は密接不離の關係にあり、唯前者を単なる Paschen 氏小体の集団となすべきや或は之に加ふるに

核物質の混在せるものなるや否やの点に於て意見の対立あるのみである。

一定の植物性 Virus では Virus Protein なるものがあり周知の如く結晶物として取り出すことができる。流脳病毒に就ては未だ之に Virus Protein を証明し得ないが、之が化学的物質に近似せる性質を有するものなることは疑ひを容れない。染色に於て包含体を密に圍繞する好塩基性物質は単なる核構成々分ではなく、核包含体の形成と密接な關係にあることに注意せなければならぬ。即本物質は H. E 染色にて包含体を繞る空隙として現れる部に出現し、又 Feulgen 反応陰性である。更に包含体の形成初期に多量にして且濃染し、包含体と明瞭なる境界なく移行し、包含体の増大成熟するに従つて好塩基性を減じ包含体との境界明瞭となり、終には好塩基性物質の消失を表すのを認める。この好塩基性物質が Virus 侵襲によつて惹き起された核の変性産物であるか或は Virus Protein 自身であるかは興味ある將來の課題である。

結 論

1. 我々は流行性脳炎罹患マウス脳塗抹標本に Eosin-Giemsa 法を行つて、組織切片に於て、浜崎の発見した特殊核包含体に相当する小体を検出することができた。
2. この包含体は Giemsa 液で淡青色に着染された神経膠細胞核内に紫色面紗状に現れた特異な物質中に橙赤色に輝く小体として出現する。この紫色面紗状の物質は包含体形成初期に多量に存し包含体を被覆しているが包含体の成熟するにつれて稀薄となり包含体が露出する。
3. 本法は流行性脳炎核包含体検出の簡便法として推奨に足るものであるが染色技術に熟練する必要がある。

文 献

1) 浜崎幸雄：日本医学及健康保健，3344号，(昭18)。

2) 全岡山医科大学紀要1。

3) 松本久：第1報，岡医雜，62：267，(昭25)。

- 第2報, 全, 63 : 96, (昭26).
 第3報, 全, 63 : 181, (昭26).
 4) 浜崎, 高見 : 岡医雑, 55 : 1029, (昭18).
 5) 浜崎, 奥田 : Jap. J. Med. Sci. V. Path. 3 : 1, (1943).
 6) 浜崎, 奥田, 山田 : Jap. J. Med. Sci. V Path. 7 : 219, (1943).
 7) 谷口 : Jap. J. exper. Med. 12 : 91-99, (1934).
 8) Herzberg, G. : Zbl Bact. usw. I. Orig. 131 : 358, (1934)
 9) Fontana-Tribondean-Morosow. Handb. d. Viruskr. (E. Gildmeister, E. Haagen, O. Waldwam) Jena (1939).
 10) Paschen. E. : Zbl. Bakter. usw. Abt. I. Orig. 130 : 190, (1933).

ビールス HST (Hamazaki) の酸・アルカリに 対する抵抗に就て

岡山大学医学部病理学教室 (指導 浜崎教授)

近 藤 良 一

[昭和27年6月10日受稿]

ビールス HST は吉田腫瘍腹水より, 1950年10月, 浜崎・佐藤等によりマウスの脳通過により分離されたものであつて¹⁾, 免疫血清学的実験等種々の研究の結果, 吉田腫瘍移植成立に欠くべからざる一因子であることは, もはや疑ふ余地はないのであつて, ビールス HST の性質について, 浜崎病理学教室に於て広範な実験が行はれている。今回私は浜崎教授の指示に従ひ, 本ビールスの酸・アルカリに対する抵抗について実験を行つた。

ビールス累代移植に関して最も注意すべきは乳剤を作るに用いる溶媒である。この溶媒の組成並に PH はビールスの異なるに従つて, 色や手加減が加えられなければならない。ビールス HST は分離当初は PH の修正を行はず生理食塩水そのままを用いていたが, 後には PH 7.4 のブイオンを用い, 爾来累代接種を行うこと一年半余に及んでいるが, ビールスの毒性は増強せず却つて幾分減弱の傾向が窺はれる。これは或は溶媒の不適當なためと考えられるので先づ本ビールスの PH に対する態度を検査した。

実験方法

従来ビールス HST の累代移植を行ふには, ビールス HST を接種され発症しているマウス脳を PH 7.4~7.6 のブイオンで10倍乳剤として, 3000回回転, 5分間遠沈してその上澄液 0.02c.c. をマウス脳内に接種する。今回行つた実験方法は操作は以上と変りなく, たゞ PH 7.4~7.6 のブイオンを用ふる代りに, PH 5.0, 5.5, 6.0, 8.5, 9.0, 9.5 のブイオンを用い, その発症の良否を比較した。即ちビールス HST を接種されて発症しているマウス2匹の脳を乳鉢にてすりつぶし, ごく少量の生理食塩水を加へて六等分し, それらを夫々 PH 5.0, 5.5, 6.0, 8.0, 8.5, 9.0 のブイオンで以て10倍乳剤として30分間室温に放置し, その各々を遠沈してその上澄液を2匹づつマウスの脳内に夫々 0.02c.c. 接種して19日後にそのマウスを犠牲として肺及び肝の病理組織学的検査を行つた。

実験成績

臨牀症状