

〔特別掲載〕

(東京女医大誌 第30巻 第12号)
(頁2701—2707昭和35年12月)固定液がアルカリ・ホスファターゼ
におよぼす影響

東京女子医科大学第二解剖学教室 (主任 飯沼守夫教授)

飯 沼 守 夫・保 倉 進・伊 藤 満・
イイ ノマ モリ オ ホ クラ ススム イ トウ ミツル池 田 稲 穂・浜 田 ナ ミ 子
イケ タ イナ オ ハマダ ミコ

(受 付 昭 和 35 年 10 月 21 日)

形態学的にホスファターゼの活性を検出する方法は高松⁹⁾、Gomori¹²⁾によりそれぞれ別個に考案されたが、以来本酵素の検出法の信頼性、特異性などについて枚挙にいとまないほど多くの発表がなされている。固定液と本酵素との関係については Danielli¹⁾がその著書中に簡単に述べているが著者らは日常組織学的研究に用いている固定液を使用し、それらと本酵素活性との間の詳細な関係を知らんとして本研究を行なつた。

研究材料および研究方法

エーテル麻酔をかけた成熟マウスより小腸、腎臓および肝臓の小片を切り取り、Gomori¹³⁾の固定法と室温24時間の10%ホルマリン固定、室温24時間の純エタノール固定を行ない、54°Cでパラフィンに包埋し、腎臓と小腸とからはそれぞれ20 μ 、10 μ 、5 μ 、2 μ の切片を、肝臓からは20 μ 、10 μ 、5 μ の切片を作製した。これらの切片を使用して、アルカリ・ホスファターゼの染色を行ない、その際ことなる厚さの切片でも同一種類の臓器の材料では同一条件で染色を行ない、さらに同一条件で顕微鏡写真を作製した。

自家所見

腎臓のアルカリ・ホスファターゼは基質液に15分、30分および60分入れて染色された。アセトン固定のもの(飯沼ら⁴⁾の第1—12図)にくらべて10%ホルマリン固定(第5—8図)およびエチルアルコール固定(第1—4図)のものは一般的に染色の程度が弱いが充分に実用になりうる。2 μ 厚の切片の染りはアルコール固定の場合もホルマリン固定の場合も、基質液に浸漬する時間に関

係なくアセトン固定の場合よりかなり染りが弱い。固定像はゆうまでもなく10%ホルマリン固定の切片が3者の中では最もすぐれているが、全般的な組織の収縮が見られる。アルコール固定の標本は全般的な収縮はホルマリン固定のものほど大ではないが、部分的な収縮強く、酵素活性の局在部位をあやまるおそれなしとしない。アセトン固定のものは固定像は決して良好とはいえないが、アルコール固定の場合のごとき部分的収縮はすくない。ホルマリン固定で2 μ の標本(第8図)ではかなりよく酵素の局在性を知ることができる。アルコール、ホルマリンおよびアセトンの3種類の固定液ともに基質液に入れる時間が1時間以内であるならば腎臓においては核が染色されることはほとんどない。

切片を熱湯で処理してから染色を行なつた場合切片が厚い方が濃く染るが、20 μ の切片でもその染りの強さは2 μ の切片のそれにははるかにおよばない。すなわちアルコールあるいはホルマリン固定でもアルカリホスファターゼの活性はかなりよく保存されているといえる。

肝臓のアルカリ・ホスファターゼの活性は基質液にそれぞれ2時間、4時間および24時間浸漬して染色した。2時間基質液に浸漬したものでは切片の厚さにかかわらず、アルコール固定およびホルマリン固定のもの(第9—14図)のほうがアセトン固定のもの(飯沼ら⁴⁾の第25—27図)よりもやや強い染色性を示し、アルコール固定では4時間および24時間基質液に入れたもの(第15図と第16図)はアセトン固定の場合と同程度であるが、ホルマリン固定の場合基質液にながく入れても染色性の増加

Morio IHNUMA, Susumu HOKURA, Mitsuru ITO, Inao IKEDA & Namiko HAMADA (Second Department of Anatomy, Tokyo Women's Medical College): The effect of fixatives upon the stainability of alkaline phosphatase.

はほとんど認められない(第17図と第18図), 24時間とゆうような長時間浸漬しなければアルコール固定(第16図)とアセトン固定(飯沼ら⁴⁾の第31図—第33図)では肝細胞核はほとんど染まらないが, ホルマリン固定では浸漬時間の長短によりいくぶん差は認められるが核が染る(第12—14, 17, 18図)。5 μ の切片で基質液に24時間つけた標本で核の染り方を見ると(第19—21図), その染りの強さはアセトン, アルコール, ホルマリン固定の順で核内のいわゆる染色質のごときものが染められているが, アセトンあるいはアルコール固定で得られる像は, 細胞学的に良い固定液たとえば Levi 液で固定してヘマトキシリン染色されたものからはほど遠い。ホルマリン固定のものでは比較的正しい像が保たれており, 核小体が明瞭に認められ, そこにいくぶん周囲より強い活性の存在することが分かる。また核形質は細胞形質よりも強く染つている。アセトンまたはアルコール固定では核形質が凝集して見掛け上濃く染つている。

小腸ではアルコール固定の場合(第22—25図)その活性はアセトン固定の場合(飯沼ら⁴⁾の第17—20図)と同程度に保存されているが, ホルマリン固定の場合(第26—29図)は活性がかなり弱くなつているが充分検出する。アルコール固定でもホルマリン固定でも切片が厚いと酵素活性があるかのごとく見えるのは同様である。しかしホルマリン固定の場合の方が酵素の拡散は少いように思われる。組織の収縮はホルマリンの場合が最も強く, アセトンの場合が最も少い。

考 按

酵素の活性を組織化学的に検出する場合, 気をつけなければならないことは第1に酵素の活性がよく保存されている切片を作ること, 第2に酵素の局在性をあやまらない切片を作ることである。酵素活性が最もよく保存された切片を作るには新鮮材料の凍結切片を作製するのが望ましく, 特に Cryostat の使用は極めて有利である。しかしかかる切片を染色するため基質液に入れると酵素のかなりの拡散現象が見られるようであつて, このことは組織が未固定であること, または充分に固定されていないためにおこる現象の一つとして考えられる。一般的にパラフィン切片を作るほうが検索時刻の制約を受けず研究がしやすいが, 固定, 包埋などでかなりの酵素活性の減少が見られるのはゆうまでもない。Danielli⁵⁾はいろいろの薬品の酵素に対する直接の作用を知るために, アルコール固定材料から切片を作り, それを薬品溶液中に2時間入れてから注意して水洗し, 更に基質液に入れて染色してみた。すると昇汞, 四酸化オスミウム, 三塩化醋酸, ヨウソ, 1%以上の濃度の醋酸では完全に非活性化され, 8%のホルマリン水溶液ではかなり非活性化されることが分つた。また種々な固定液で固定してから凍結切片を作つてその染色性を調べている。これは著者らの

パラフィン切片法と方法が異なるので同一に論ずることはできないが, アセトンおよびアルコール固定でも, 塩化カルシウムを加えたホルマリン固定と同程度の組織の収縮があることになつている。著者らの成績ではホルマリン固定が最も収縮強くアルコール固定これにつき, アセトン固定が最も少い。又固定像についてはいずれも良いとみでくわしい記述はない。この場合ホルマリン固定でも酵素活性を検出する可能性が示されている。

Seligman ら⁶⁾はラットの肝臓のホモジュネートを使用して酵素におよぼす10%ホルマリン固定液(pH 7の磷酸緩衝液を使用)の影響を調べ, 4°Cのこの液中に24時間おくとアルカリ・ホスファターゼの活性の74%が失われ, 1時間ならば27%が失われるとゆう。いずれにしてもホルマリンは非活性化作用をもつているが, 入れる時間が長い程非活性化が著しいことが分かる。しかし24時間入れても活性が残存していることは注目すべき事実である。Pearse⁷⁾はホルマリン固定はアセトン固定より鮮明な像が得られるから広く用いられる可能性があると述べ, その際は短時間の固定が望ましいといつている。そして酵素の固定による損失にふれ, 4°Cのホルマリンで2—4時間の固定で75%残り, 4°Cのアセトンで24時間の固定で70%残るとゆう数字を出している。著者らの成績から見てもホルマリン固定の優秀性は取上げられる価値があると思う。Lillie⁸⁾はホスファターゼ検出の際はホルマリン固定をするならば短時間するようにのべているが, 他の固定液について次の如き所見を述べている。すなわち約20°Cの70—80%のエタノール, またはイソプロピールアルコール固定はよくホスファターゼの活性を保存する。-20°Cのアセトン, またはアルコールは組織学的にはよい固定をしないことがあるが, -20°Cで10—14日間固定すると, 酵素活性は失われず, また組織学的所見もすぐれているとゆう。現在組織化学的所見を局所細胞化学的水準にもつてくることは不適當であるといわれているが, ホルマリン固定を用いるならば或程度それが可能になるであろう。ホルマリン固定像は細胞学的研究にむいた固定液で得られる像にかなり近く, それによつてアルカリ・ホスファターゼの局在性を論ずることができるとゆうならば, すぐれた研究成果が期待できる。しかしホルマリンはアルカリ・ホスファターゼに対して非活性的に作用するから, 極めて酵素活性の弱い組織の固定液としては不適當であろう。

Mowry⁹⁾はアルコール固定とアセトン固定との間には有意の差は認められないといつているが, 著者らの実験でもほぼ同様の結果といえる。その固定像は Danielli⁵⁾はどちらも良いとゆうが, 著者らの意見はどちらも悪いとゆうことになる。しかし比較的よい像はアセトン固定の場合のほうが得やすい。アセトンが組織学的に固定をするものであるか, いなかとゆう点について著者

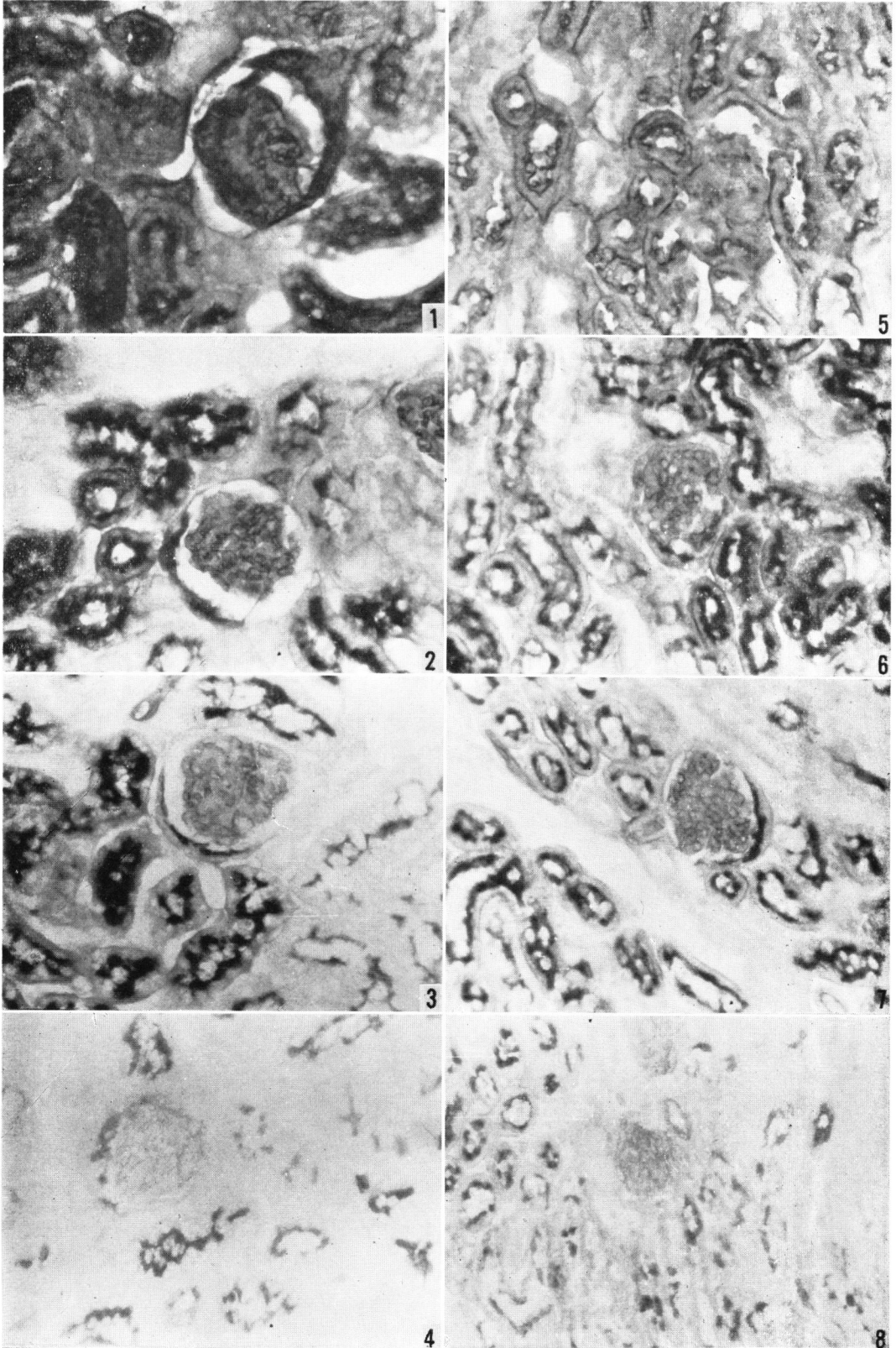
らは疑問をもっている。

結 論

手軽なホルマリン固定でもアルカリホスファターゼの活性はかなり保たれていて、パラフィン切片で染めることができる。アセトン、アルコール、ホルマリンの3種の固定液のうち、ホルマリンが組織学的に最もすぐれた固定像を示す。

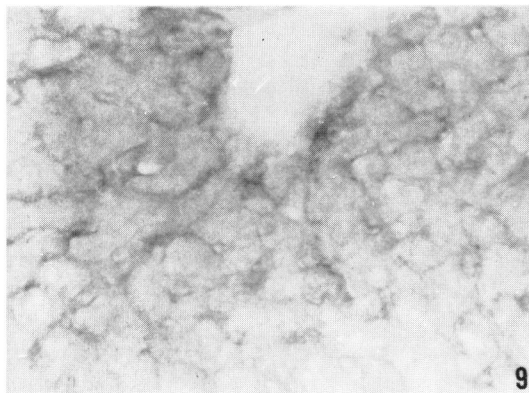
文 献

- 1) **Danielli, S.F.:** Cytochemistry, A critical approach, John Wiley & Sons, Inc., New York (1953)
- 2) **Gomori, G.:** Proc. Soc. exper. Biol. Med., **42** 23 (1939)
- 3) **Gomori, G.:** Microscopic Histochemistry, The Univ. of Chicago Press, Chicago (1952)
- 4) 飯沼守夫, 八十田敏男, 伊藤満, 浜田ナミ子: ホスファターゼの染色性に対する組織切片の厚さの影響。東女医大誌 **30** 2691 (1960)
- 5) **Lillie, R.D.:** Histopathologic Technic and practical histochemistry, The Blakiston Co. Inc., New York (1954)
- 6) **Mowry, R.W.:** Bull. int. Ass. med. Mus., **30** 95 (1949)
- 7) **Pearse, A.G. E.:** Histochemistry, Theoretical and applied, J. & A. Churchill, Ltd. London (1960)
- 8) **Seligman, A.M., Chauncey, H.H., Nachlass, M.M.:** Stain Techn. **26** 19 (1951)
- 9) 高松英雄: 満洲医誌 **29** 1351 (1938)

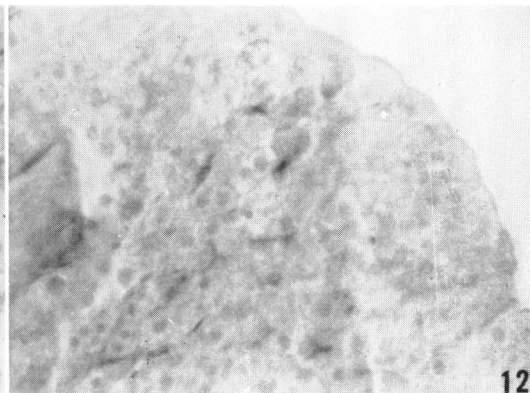


第1図 腎臓, アルコール固定, 基質液に30分浸漬,
20 μ 切片
第2図 第1図と同様材料, 10 μ 切片
第3図 第1図と同様材料, 5 μ 切片
第4図 第1図と同様材料, 2 μ 切片

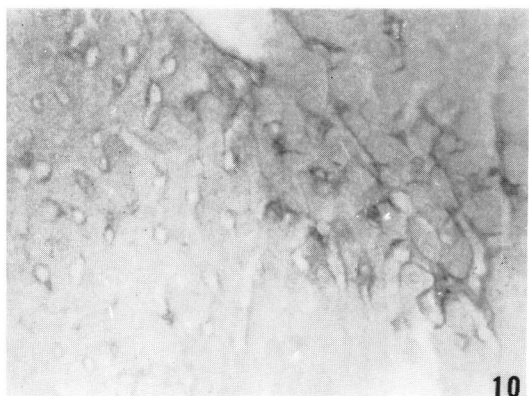
第5図 腎臓, ホルマリン固定, 基質液に30分浸漬,
20 μ 切片
第6図 第5図と同様材料, 10 μ 切片
第7図 第5図と同様材料, 5 μ 切片
第8図 第5図と同様材料, 2 μ 切片



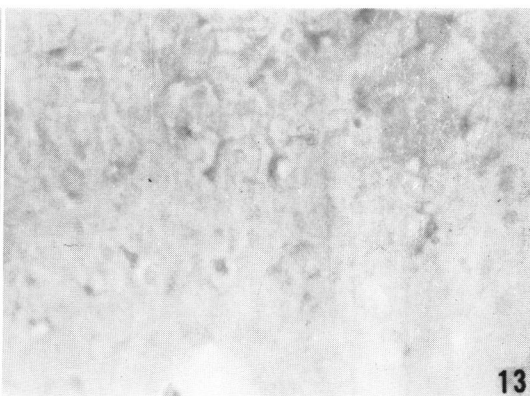
第9図 肝臓, アルコール固定, 基質液に2時間浸漬, 20 μ 切片



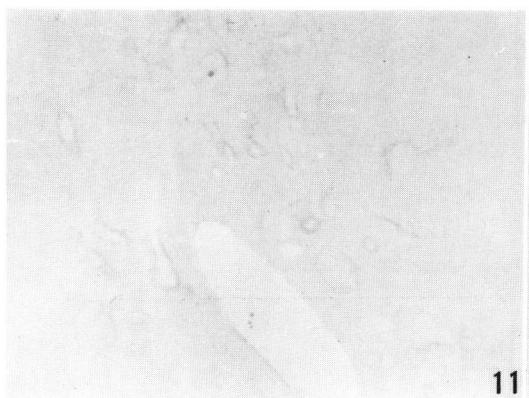
第12図 肝臓, ホルマリン固定, 基質液に2時間浸漬, 20 μ 切片



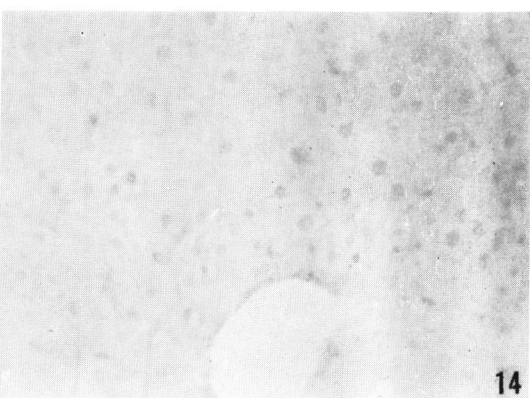
第10図 第9図と同様材料, 10 μ 切片



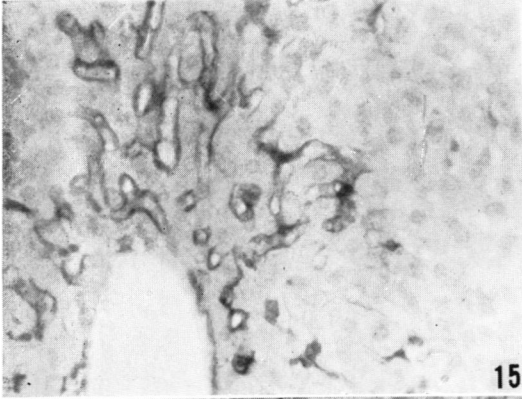
第13図 第12図と同様材料, 10 μ 切片



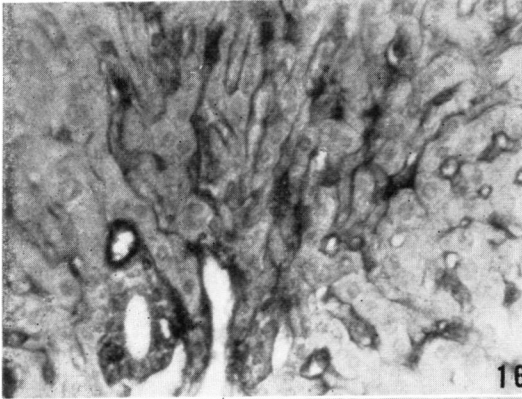
第11図 第9図と同様材料, 5 μ 切片



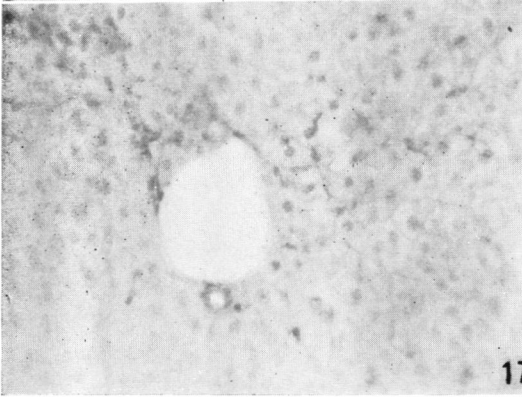
第14図 第12図と同様材料, 5 μ 切片



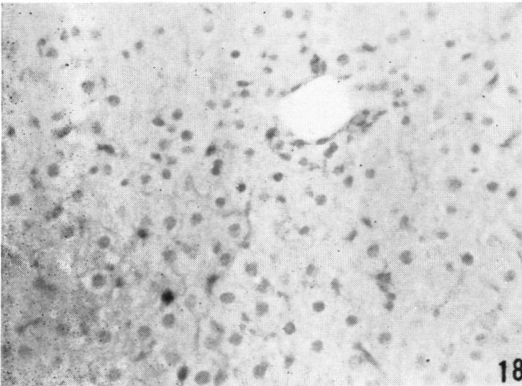
15



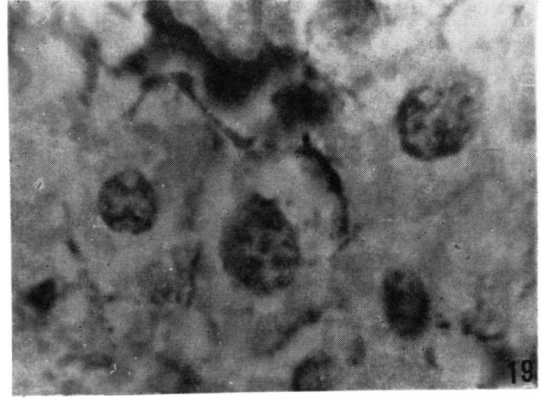
16



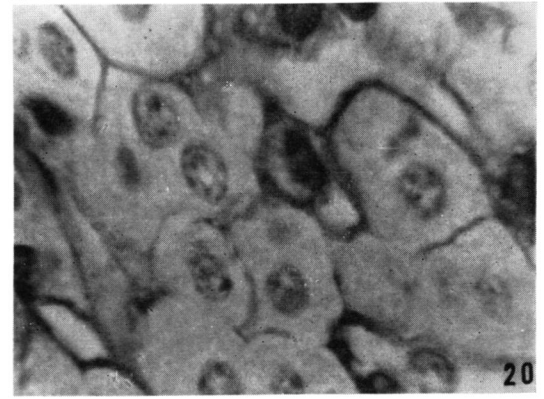
17



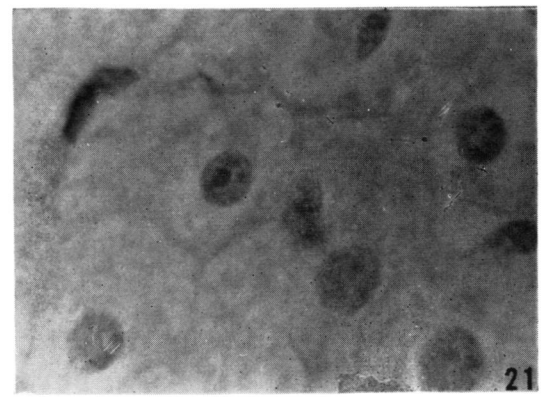
18



19



20



21

第15図 肝臓, アルコール固定, 基質液に4時間浸漬, 10 μ 切片

第16図 肝臓, アルコール固定, 基質液に24時間浸漬, 10 μ 切片

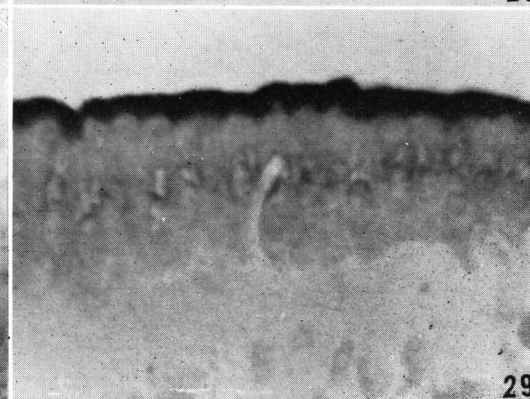
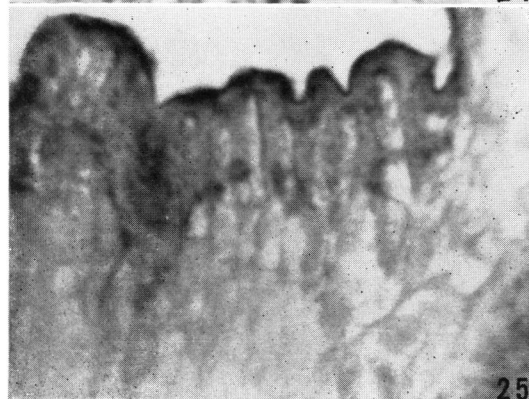
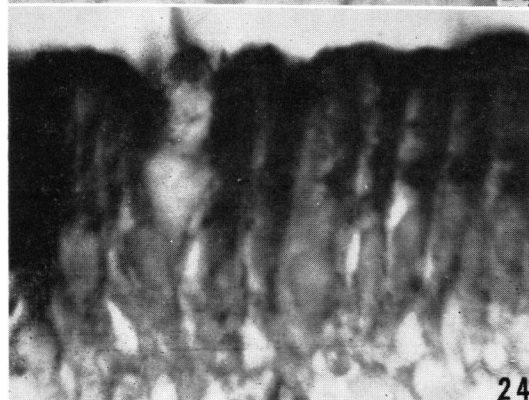
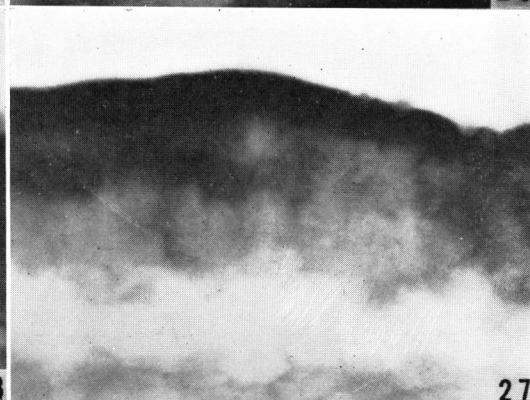
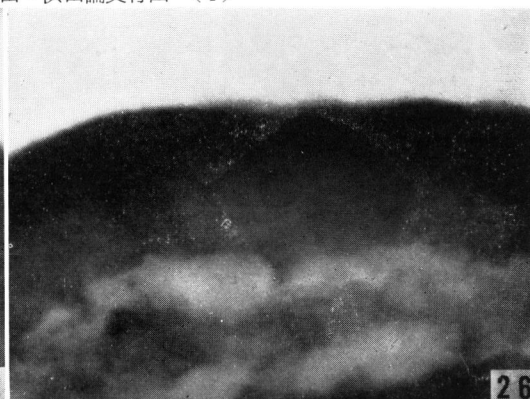
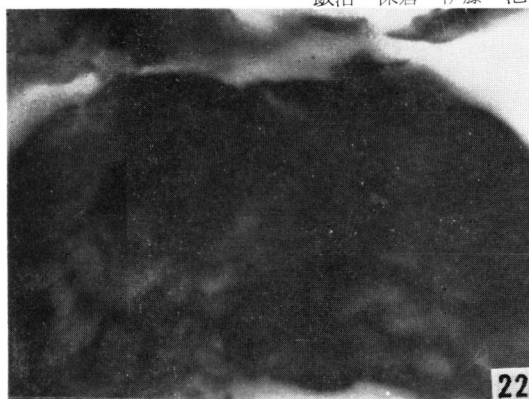
第17図 肝臓, ホルマリン固定, 基質液に4時間浸漬, 10 μ 切片

第18図 肝臓, ホルマリン固定, 基質液に24時間浸漬, 10 μ 切片

第19図 肝臓, アセトン固定, 基質液に24時間浸漬, 5 μ 切片

第20図 肝臓, アルコール固定, 基質液に24時間浸漬, 5 μ 切片

第21図 肝臓, ホルマリン固定, 基質液に24時間浸漬, 5 μ 切片



第22図 小腸, アルコール固定, 基質液に30分浸漬
20 μ 切片
第23図 第22図と同様材料, 10 μ 切片
第24図 第22図と同様材料, 5 μ 切片
第25図 第22図と同様材料, 2 μ 切片

第26図 小腸, ホルマリン固定, 基質液に30分浸漬
20 μ 切片
第27図 第26図と同様材料, 10 μ 切片
第28図 第26図と同様材料, 5 μ 切片
第29図 第26図と同様材料, 2 μ 切片