

〔特別掲載〕

(東京女医大誌 第30巻 第12号)
頁2691—2700昭和35年12月

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

東京女子医科大学第2解剖学教室 (主任 飯沼守夫教授)

飯沼守夫・八十田敏男
イヌマモリ オヤソダトシオ伊藤 満・浜田ナミ子
イトウ ミツル ハマダ ナミコ

(受付 昭和 35 年 10 月 21 日)

アルカリホスファターゼを組織化学的に染めだすことが考案^{1) 5)} されて以来正常あるいは実験的, 病的材料における本酵素に関する多くの研究が発表されている。又検出法の改良⁷⁾ とか, その信頼性などについても枚挙にいとまない程の論文がある。Danielli²⁾ はアルカリホスファターゼの検出にさいして, 切片の厚さの影響をのべているが, その考察は極めて不十分であるので, 種々の条件を設定して詳細なる研究を行ない, いささか所見を得たのでここに報告する。

研究材料及び研究方法

健康成熟マウスよりエーテル麻酔のもとに腎臓, 小腸および肝臓の小片を採取し, Gomori³⁾ の方法に従つてアセトン固定し, パラフィンに包埋し, 腎臓および小腸は, 20 μ , 10 μ , 5 μ , 2 μ の切片に, 肝臓は 20 μ , 10 μ , 5 μ の切片にした。これらの切片についてアルカリホスファターゼおよび酸ホスファターゼの検出を行った。異なる厚さの切片でも同一臓器の材料は同一の条件で染色を行ない, 更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分浸漬したものについて検討した。15分間基質液に入れた標本においては刷子縁の見掛上の幅は切片が厚くなる程ひろくなる(第1図)。これは刷子縁が厚く切れているとゆうことのみでなく多くはいくぶん斜に切れていることによると思われる。染りの強さは切片が薄くなる程弱くなるが, 特に細胞形質において著明である(第1~4図)。色々な部分の核はどの厚さの切片でも殆んど染つてない。切片が厚くなる程染り方の鮮鋭さが

うしなわれる。30分間基質液に入れた 20 μ の標本(第5図)では近位尿管のほとんど全体が濃染し, 刷子縁の部分をも他と区別することが困難である。10 μ (第6図), 5 μ (第7図), 2 μ (第8図)の各切片における所見は基質液に15分間浸漬した標本とくらべて大きな差異は認められないが, 各種尿管あるいは腎小体の基底膜の染りがやや強くなっている。60分間基質液に浸漬した 20 μ の標本(第9図)では尿管の染りは更になり, 刷子縁のみでなく全体が濃黒染している。10 μ 以下の切片の所見(第10, 11, 12図)は30分間基質液に入れた標本に比べていくぶん濃く染る。特に基底膜は明瞭に染め出されていて 2 μ 或は 5 μ の切片では印象的である。

熱湯にてホスファターゼを非活性化してから染色を行った標本においてはほとんど着染を認めなかつた。

小腸も腎臓と同様に基質液に各15分, 30分, 60分浸漬して酵素の活性を検出した。15分間基質液に入れた 20 μ の切片(第13図)では上皮細胞の核の部分はやや弱く染るが, 全体に濃染し, 小皮縁或は Golgi 野といった部分を区別することはできない。10 μ (第14図), 5 μ (第15図)の切片の所見はほとんど同じであつて小皮縁, Golgi 野に特に強い活性を認め, 上皮細胞核は着染されない。2 μ 切片(第16図)は上記の標本と染りは殆ど同様で, Golgi 野には強い活性が認められる。15分間基質液に浸漬した標本においては, 基底膜を構成する線維はほとんど染らない。30分間基質液に入れた切片では核膜および核網工の染りがかなり認められるようになる。勿論全般的に着染度は, 15分間基質液に入れたものと同くらべ

Morio IHNUMA, Toshio YASODA, Mitsuru ITO & Namiko HAMADA (Second Department of Anatomy, Tokyo Women's Medical College): The effect of thickness of the sections upon the stainability of phosphatases.

増加している。5 μ 切片 (第19図) と 2 μ 切片 (第20図) との間に着染度の差は認められず、小皮縁、Golgi 野は特に濃染し、又細胞形質中に活性を有する構造を認めうる。20 μ 切片 (第17図) では核上部の細胞形質は全く濃染し、小皮縁、Golgi 野を区別することは不可能である。10 μ 切片 (第18図) においてはその染りの強さは 5 μ 切片と 20 μ 切片との中間であつて、濃染する Golgi 野の上部がいくぶん明るく染つているが 5 μ あるいは 2 μ 切片の如き明瞭な像は認められない。基底膜は15分間基質液に入れた切片より強く染つている。60分間基質液に入れた標本においては 20 μ (第21図) および 10 μ 切片 (第22図) で上皮細胞は全く黒染し、その内部構造は殆んど知ることができない。ただ核の存在する部位がいくぶん弱染しているのみである。5 μ 切片 (第23図) もそれに近く、Golgi 野より上部の細胞形質は殆んど濃黒染している。2 μ 切片 (第24図) では Golgi 野は強く染色され明瞭に認めうる。又細胞形質内の微細構造はよく認めることができる。この場合の 2 μ の標本と基質液に15分間入れた 2 μ 切片とをくらべると、染りの強さには大きな差は認められないが細胞形質中の微細構造は前者の方がよく染つている。基底膜を構成する線維はかなり強く染つており、又その見掛け上の着染の強さは切片の厚さに正比例する。

熱湯にて非活性化した切片を同様に処理しても取り上げるべき染色は認められなかつた。

肝臓では 2 μ の切片を作ることが極めて困難であつたのでこれを除外した。基質液に入れる時間も15分から60分では着染が極めて弱いので、2時間、4時間および24時間基質液に入れて染めた。2時間基質液に入れた標本では3種の厚さの切片いずれもおなじような所見を呈し、わずかに中心静脈壁および星細胞に弱い活性を認めるのみである。肝細胞核には活性が認められない (第25、26、27 図)。4時間基質液に入れた切片で 10 μ のもの (第29図) と 5 μ のもの (第30図) とでは染りの上でほとんど差は認められないがよく見ると 5 μ の標本では核の染りがいくぶんはつきりしている。この両種の標本で強く染つているのは星細胞である。20 μ の切片 (第28 図) では細胞形質は前2者よりやや強く染るが、特に星細胞は強染している。又毛細胆管もかなり認められる。染色上より肝細胞核を細胞形質より区別することは困難である。24時間基質液に入れた切片では各厚さの標本とも染色の強さが増している。厚さの差はそのまま染色の差になつている。肝細胞核の染色性は切片の厚さには関係なく大体おなじ程度に染る。その染りは 10 μ (第32図) 5 μ (第33図) の切片では細胞形質より強く、20 μ (第31 図) では細胞形質とおなじ位である。毛細胆管および星細胞は切片が厚い程強く染つて見える。肝細胞間或は血管壁には線維状の活性を認めるが、これは基質液に浸漬

する時間が長く、又切片が厚くなる程明瞭になる。

非活性化した切片の染りは2時間基質液に入れた標本とおなじ位であるが、ただし後者に見られる星細胞或は血管壁の染りは認められない。

腎臓の酸ホスファターゼは基質液に24時間浸漬して検出した。20 μ (第34図) および 10 μ (第35図) の標本は同程度の染りを示すが、5 μ のもの (第36図) はかなり弱い。核の着染の程度は3種の切片ともほとんど同じ位である。細胞形質の染りは勿論部位によつて異なるが 5 μ の切片では 10 μ および 20 μ の切片にくらべて著明に弱い。しかし糸球体の染りは細胞核を含めて3種の切片で同程度である。酸ホスファターゼの場合も切片の厚くなる程基底膜が濃く染るが、アルカリホスファターゼの場合程著明ではない。

小腸の酸ホスファターゼも切片を24時間基質液に浸漬して検出した。切片の厚くなる程着染は強い。20 μ の切片 (第37図) では上皮層は極めて強く染り、核よりその上部にかけて微細構造を認め得ない。核も濃染している。10 μ の切片 (第38図) でもかなり染りは強いが、小皮縁が最も強く染りその活性が隣接する細胞形質ににじみ出たような感がある。5 μ の切片 (第39図) ではかなり明瞭な染色像が得られる。すなわち小皮縁よりにじみでることのない限局した活性、比較的強い核上部の活性および核の活性、中等度の基底膜の活性である。

肝臓の活性は基質液に24時間および84時間浸漬して検出した。84時間浸漬した標本では一般的に染りがきたない。格子線維のあるべき部位がやや濃染するほか、肝細胞核、細胞形質を区別することができない。24時間浸漬した標本では 10 μ の切片が最も濃染している (第41図)。核の染色性は 20 μ のもの (第40図) と 5 μ のもの (第42図) と同程度かあるいは 5 μ の切片の方がやや濃く染つた核が多いように思われる。核小体は明瞭に濃染する。細胞形質は 20 μ の切片の方がやや濃染している。10 μ の切片では核、細胞形質ともかなり濃染し、その区別をすることが困難である。肝細胞の境界が細胞形質より濃染する。

脱パラフィン後水までもつてきた切片を15分間熱湯につけて酵素を非活性化してから染色を行なつても、非活性化を行なわない切片の如き染色性はえられなかつた。

考 按

Danielli²⁾ はアルカリホスファターゼの検出に際し、基質液に入れて更にコバルト塩溶液に入れ、その次の水洗時間を切片の厚さにより変えなければならないと考えて 1 μ , 2 μ , 4 μ , 8 μ および 16 μ のパラフィン切片を作りその結果 1 μ の切片で1分、16 μ の切片で4分的水洗が最小限であるとゆうが、異なつた厚さの切片について同一時間水洗した場合の結果については述べていない。研究を行なう場合具体的な水洗方法、水洗時間を厳密に

規定し切片の厚さにより変えることは実技上不可能に近い。著者らの研究においては日常手軽に行う場合のことを考慮して水洗時間は切片の厚さにかかわらず原法通り一定にした。

アルカリホスファターゼの場合、一般的にいつて切片が厚くなるほど着染は強くなり、又基質液に入れる時間がながくなる程濃く染る。切片が厚ければ1枚の切片に含まれる酵素の絶対量は多くなり、又基質液には充分な量の基質を含んでいるので、浸漬時間がながくなればその分解産物が多くなるのは当然である。酵素活性の極めて強い部分すなわち曲尿細管の刷子縁とか、小腸の小皮縁といったところでは長時間基質液に入れた場合にはその染りがあまりにも強く、又まわりに拡散している。時に細胞全体が真黒になることさえある。短時間基質液に入れた場合でも切片が厚くなる程着染に局在性が認められない¹⁴⁾。これは酵素の拡散¹⁰⁾によるものと考えられるし、又切片が厚く強い活性を示す部分が斜に切れ見掛上幅がひろくなるとも考えうる。Lison¹⁰⁾によれば lyo-enzyme と desmo-enzyme とがあるとゆう。前者は染色の過程において拡散する可能性があるわけである。Ruyter と Neumann¹⁶⁾ はアルカリホスファターゼは30%エタノール中に20時間つけると全く溶出してしまうので、キシロールからアルコールを通して水までもつてくる間に酵素の正しい局在性が失われるとゆう。又 Pearse¹⁵⁾ は誤つた局在性を示すような原因として(1) 酵素のあつた場所から拡散し、酵素のない場所に吸着する。(2) 酵素の活性により生じた産物の他の部分の吸着の2つのものをあげている。著者らの所見より見ればこれらの因子を最小にとどめるためには切片を薄くすべきである。

Gomori の方法では濃く染る部分にある核は強く染る。例えば腎臓の近位曲尿細管の核は他の部分の核よりも短時間基質液に入れても濃染され、その染りの強さは刷子縁と同じ位であるから、このような核の染色は拡散によつて起るのであると Pearse¹⁵⁾ は述べている。著者らの実験においては腎臓の切片では核は殆んど染らず、染つた場合でも刷子縁の強染性とはくらべることでできない程の弱さであつて彼のゆうような結果は得られなかつた。核の染色性はのちに述べる如く基質液に入れる時間にかなり左右されると思われる。

Feigin⁹⁾ からも種々の実験を行なつた結果核の染色は拡散によるものであると結論している。Gomori⁶⁾ はアセトン固定をしたパラフィン切片でアゾ色素法で染めれば核の染色が見られないことを述べ、核の染色は全部が人工産物でないにしろ、その着染は基質液中の磷酸カルシウムの2次的吸着によると述べている。Novikoff¹⁴⁾ は核の着染はやはり磷酸カルシウムが核に吸着するためであつて核に活性があるとは考えられないと述べている。

Novikoff¹⁴⁾ は肝臓の切除実験を行ない、再生肝臓の核は正常の肝臓の核より活性が強い。又毛細胆管の活性も再生肝臓の方が強い。超遠心分離を行つてみると再生肝臓は正常肝臓よりも活性が全体で64%強く、核のフラクションのみでは500%強い。彼はこの事実を解釈するのに、核の活性が本当に強くなつたのではなくして、毛細胆管の活性によつて核のフラクションがよごされたための現象であるとする。そして核にはアルカリホスファターゼは極めて少くいかなる方法を用いても染め出しえないと結論している。Martin と Jacoby¹¹⁾ は酵素のみが、あるいは酵素と磷酸カルシウムとが強い活性部位から拡散して核に吸着されるとゆう。Yokoyama¹⁸⁾ からも核に活性を有するとは考えられないとゆう。一方 Dounce⁹⁾ は分離したラットの肝細胞核には高い活性を認め又 Brachet と Jenczer¹²⁾ は核のアルカリホスファターゼはDNAにおける磷酸の turnover を制御するといつてゐる。Danielli¹³⁾ は核小体は細胞においてホスファターゼ活性の最も強い場所の一つであるといつてゐる。以上の如く多くの学者はアルカリホスファターゼの活性は核にはないか、有つても極めて少く殆んど染色できないとゆう意見である。著者らの実験で短時間基質液に入れることにより強い染りのえられる腎臓と小腸とにおいては核は他の部分に比して極めて弱いか、或は殆んど染つてこない。ところが肝臓の如き活性の比較的弱い組織においては基質液に入れる時間がながくなり、その際核の染色が見られるようになる。核の着染の強さは切片の厚さに殆んど関係ないようである。この事実より、基質液中にとけ出した磷酸カルシウム、或は酵素が核に吸着されて染つてくるとのみ考えるのは適当でないようだ。もし吸着のみによるのであるならば、切片が厚くなる程強く染るべきである。

基質液に入れる時間が長くなる程線維の染りが強くなるが、この染りは吸着によるのであるか、或は本来弱い活性が存在するものであるかは不明だが、薄い切片でもかなり強く出ることを考えると、ここにも本来活性があるように思われる。

森¹²⁾ はラットの精巣の塗抹および切片標本のホスファターゼの活性を検出し、アルカリホスファターゼは切片、塗抹標本ともに細胞形質に強く核に弱く、酸ホスファターゼは切片では細胞形質に弱く核に特に強く、塗抹標本ではその逆であることを見ている。著者らの酸ホスファターゼの実験では切片の厚さに関係なく核の染りは大体同じ強さを示し、細胞形質は厚くなる程強い染色性が認められる。薄い切片では核の横断面がでる。つまり核膜を介さないで基質液に接する可能性が多分にあるわけであるが、その影響がいくぶんあるかもしれない。

ホスファターゼの検出をする場合切片の厚さの指定は Gomori⁷⁾ 3~8 μ , Lillie⁹⁾ 5~10 μ , Pearse¹⁵⁾ 5 μ ,

Gurr⁸⁾ はできるだけ薄くすることを要求している。著者らの所見から見ても切片は薄い方が間違つた局在性を示す可能性が少くなる。基質液に入れる時間が長時間にわたつても切片が薄ければ比較的正しい局在性を示すように思われる。

結 論

ホスファターゼの活性を見る場合切片はできるだけ薄くすべきである。5 μ 以下であることが望ましい。

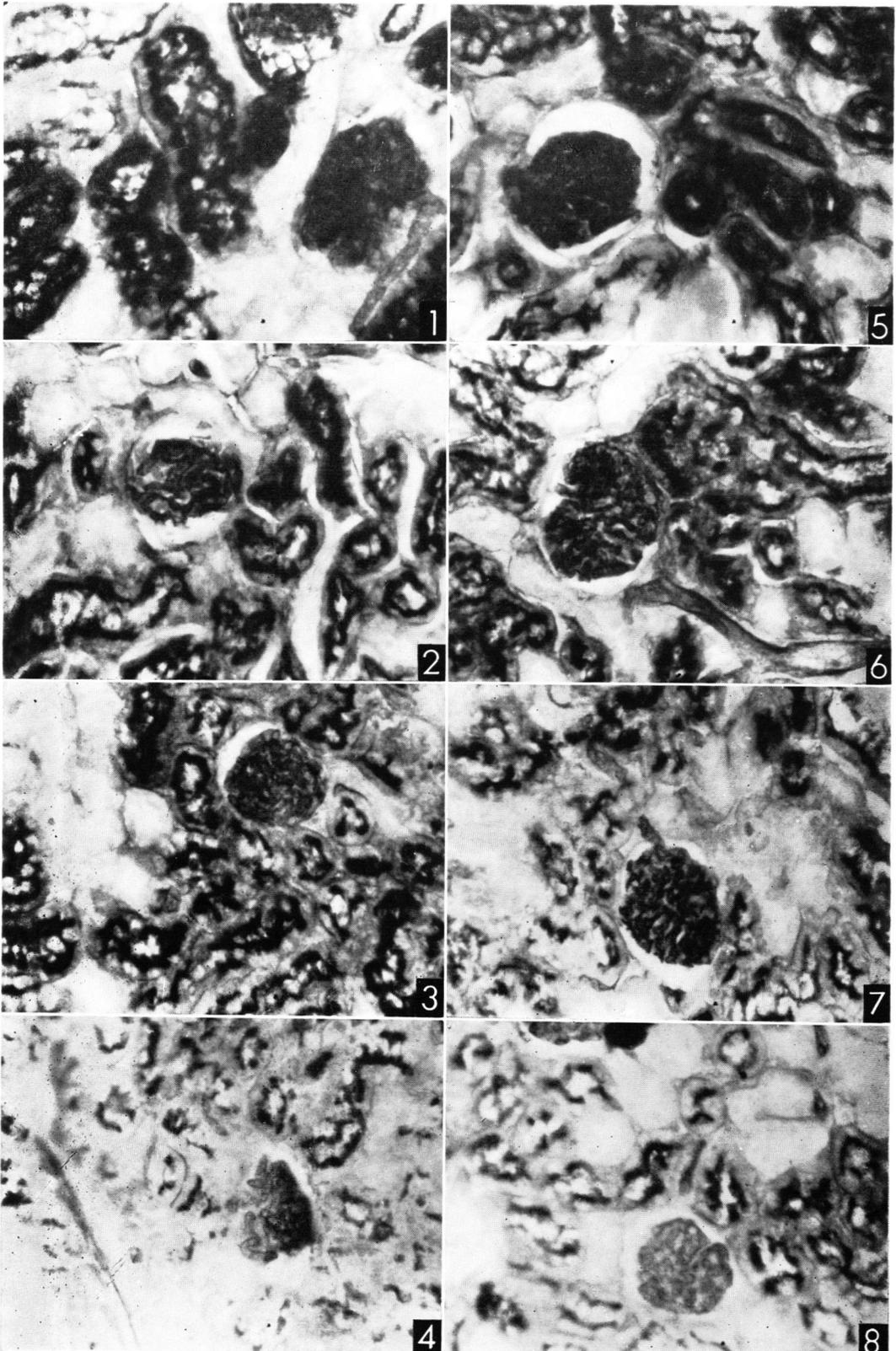
基質液に入れる時間はその材料に適當していなければならない。

核にもホスファターゼの活性は存在する。

文 献

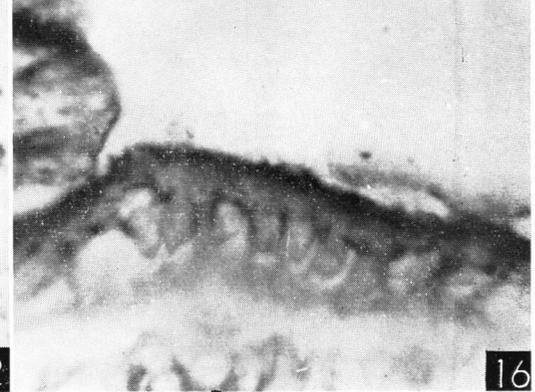
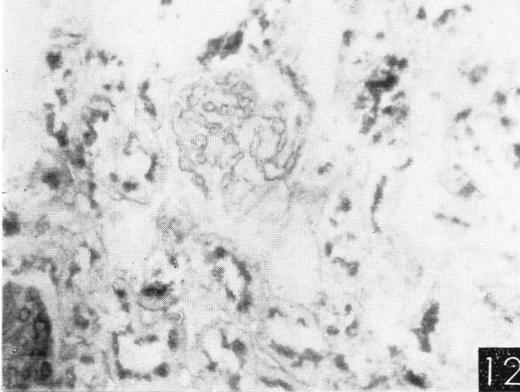
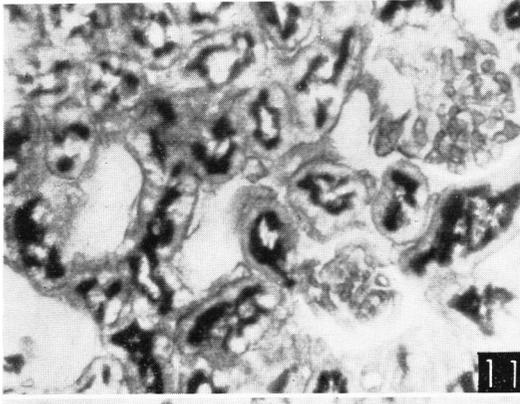
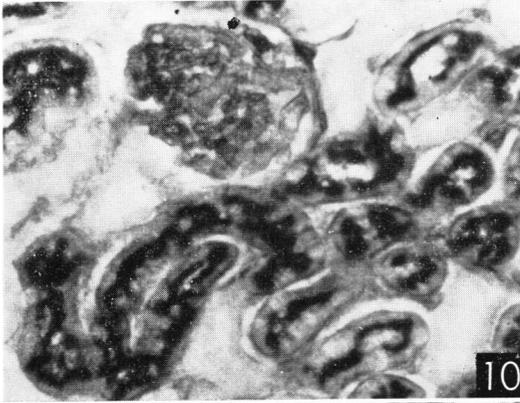
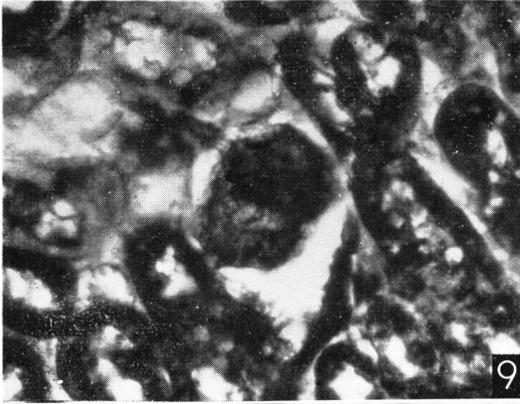
- 1) **Brachet, J. & Jeneer, R.:** Biochim. Biophys. Acta, **2** 423 (1958)
- 2) **Danielli, J.F.:** Cytochemistry, A critical approach, John Wiley & Sons, Inc., New York (1953)
- 3) **Dounce, A.L.:** J. Biol. Chem., **147** 685 (1943)
- 4) **Feigin, I., Wolf, A. & Kabat, E.A.:** Amer. J. Path., **26** 647 (1950)
- 5) **Gomori, G.:** Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **42** 23 (1939)
- 6) **Gomori, G.:** J. Lab. clin. Med., **37** 526 (1951)
- 7) **Gomori, G.:** Microscopic Histochemistry, The University of Chicago Press, Chicago (1952)
- 8) **Gurr, E.:** Method of Analytical Histology and Histo-Chemistry, Leonard Hill Ltd., London (1958)
- 9) **Lillie, R.D.:** Histopathologic Technic and Practical Histochemistry, The Blakiston Co. Inc., New York (1954)
- 10) **Lison, L.:** Bull. Histol. Tech. micr., **25** 23 (1948)
- 11) **Martin, B.F. & Jacoby, F.:** J. Anat., **83** 351 (1949)
- 12) 森宮: 解剖誌 **28** 43 (1953)
- 13) **Novikoff, A.B.:** Science, **113** 320 (1951)
- 14) **Novikoff, A.B.:** Exp. Cell Res., suppl. **2** 123 (1952)
- 15) **Pearse, A.G.E.:** Histochemistry, J. & A. Churchill Ltd., London (1954)
- 16) **Ruyter, J.H.C. & Neumann, H.:** Biochem. Biophys. Acta, **3** 125 (1949)
- 17) 高松英雄: 満洲医誌 **29** 1351 (1938)
- 18) **Yokoyama, H.O., Stowell, R.E. & Mathews, R.M.:** Anat. Rec., **109** 139 (1951)

飯沼・八十田・伊藤・浜田論文付図 (1)
 第 1~33 図 アルカリホスファターゼ



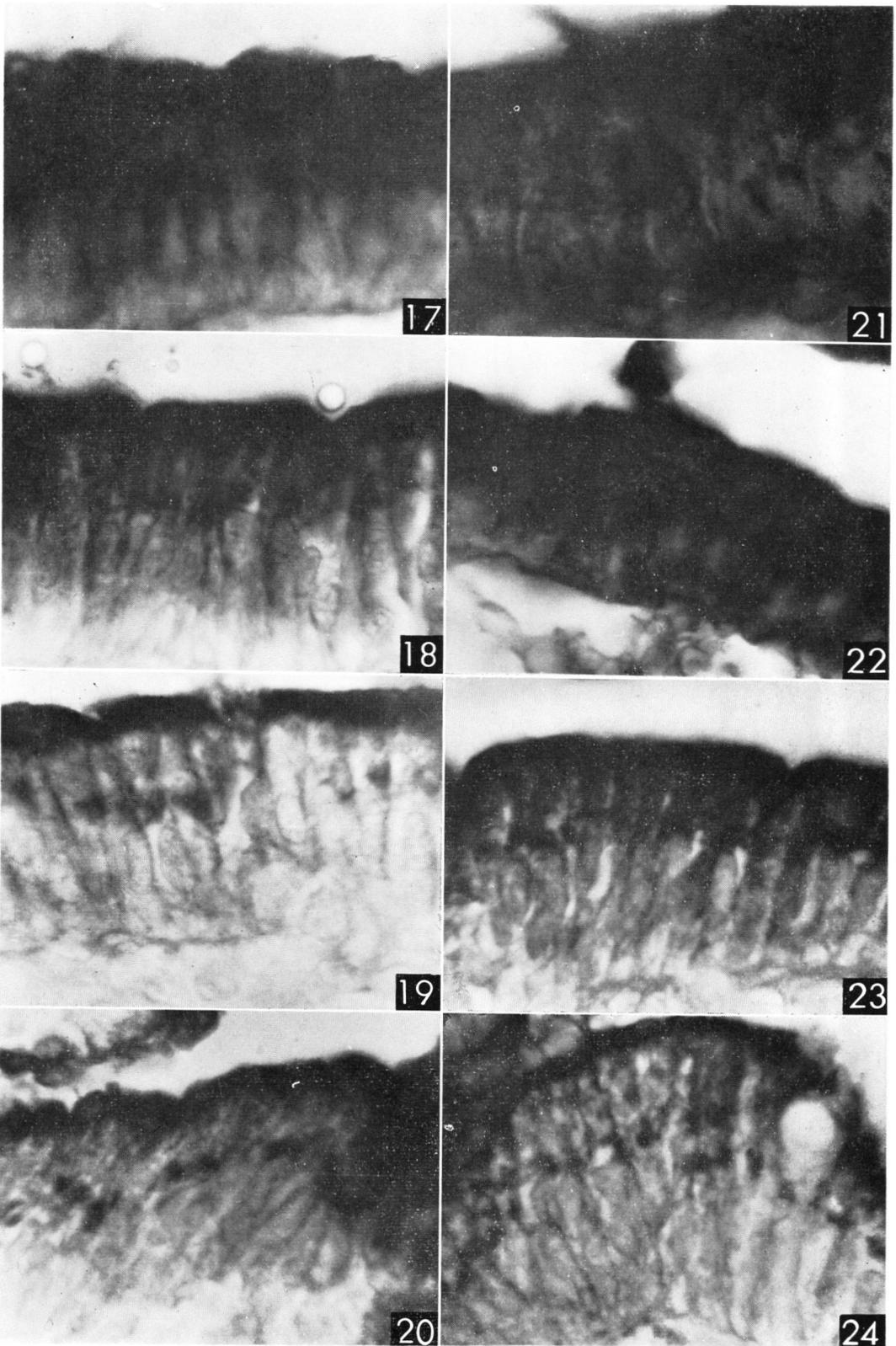
第 1 図 腎臓 15分間基質液に浸漬 20 μ
 第 2 図 同上 10 μ
 第 3 図 同上 5 μ
 第 4 図 同上 2 μ

第 5 図 腎臓 30分間基質液に浸漬 20 μ
 第 6 図 同上 10 μ
 第 7 図 同上 5 μ
 第 8 図 同上 2 μ



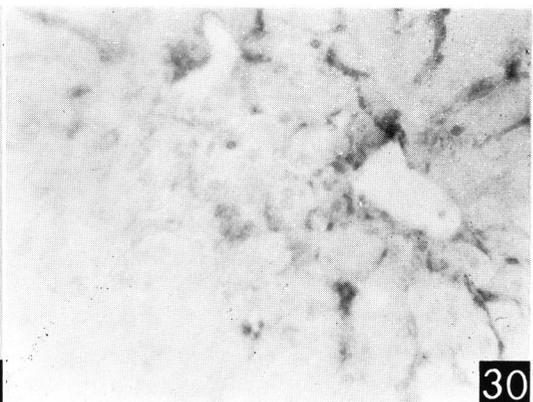
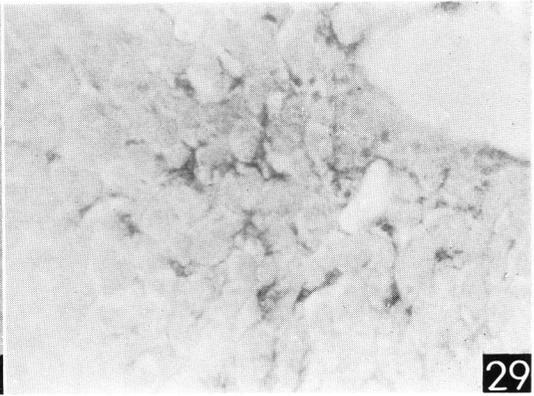
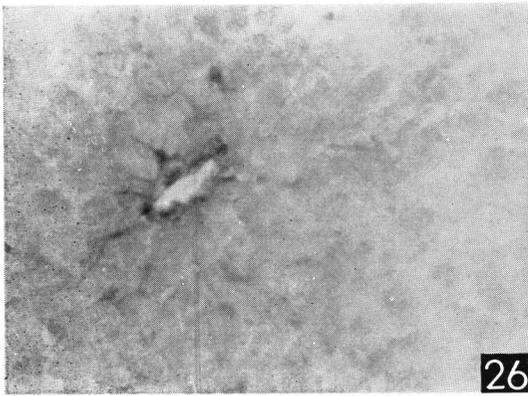
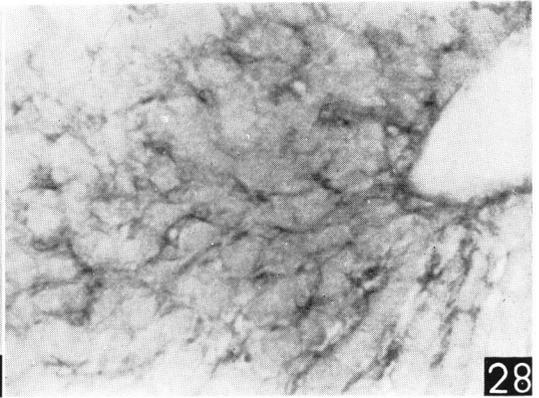
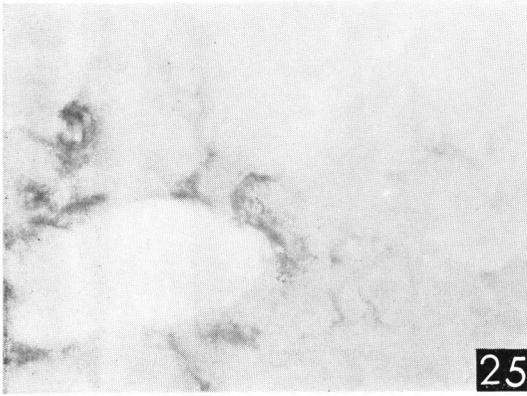
第9図 腎臓 1時間基質液に浸漬 20 μ
 第10図 同上 10 μ
 第11図 同上 5 μ
 第12図 同上 2 μ

第13図 小腸 15分間基質液に浸漬 20 μ
 第14図 同上 10 μ
 第15図 同上 5 μ
 第16図 同上 2 μ



第17図 小腸 30分間基質液に浸漬 20 μ
 第18図 同上 10 μ
 第19図 同上 5 μ
 第20図 同上 2 μ

第21図 小腸 1時間基質液に浸漬 20 μ
 第22図 同上 10 μ
 第23図 同上 5 μ
 第24図 同上 2 μ



第25図 肝臓 2時間基質液に浸漬 20 μ

第26図 同上 10 μ

第27図 同上 5 μ

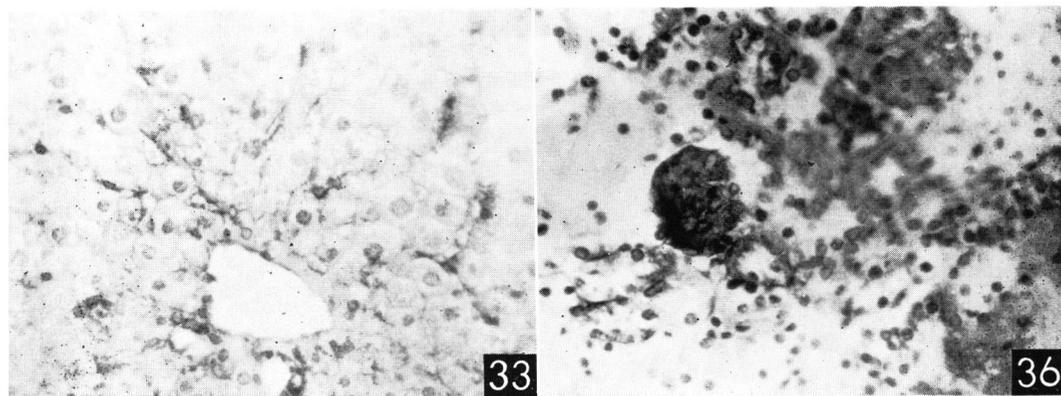
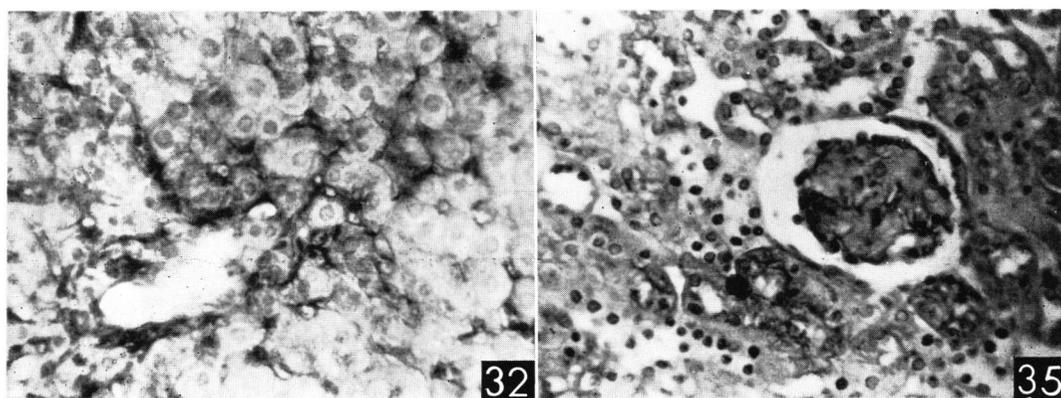
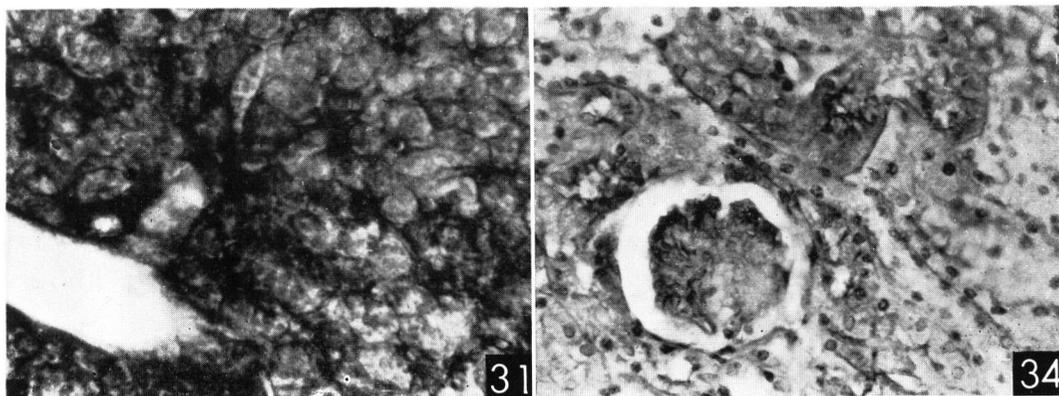
第28図 肝臓 4時間基質液に浸漬 20 μ

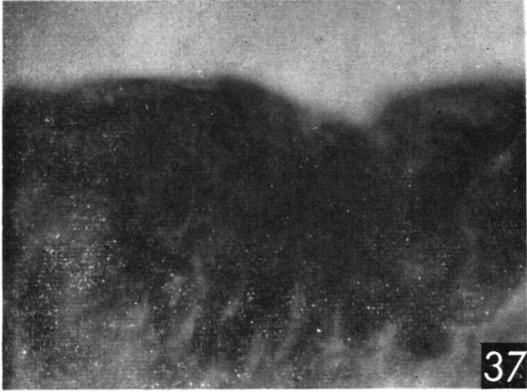
第29図 同上 10 μ

第30図 同上 5 μ

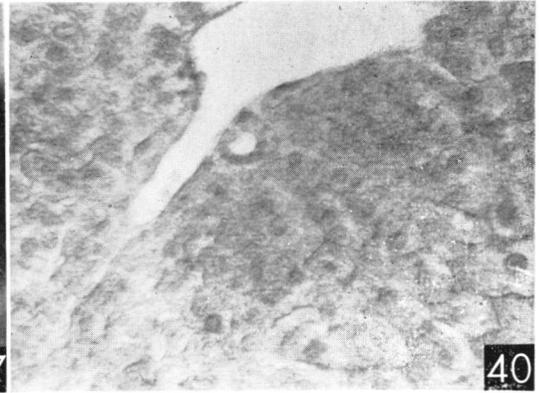
飯沼・八十田・伊藤・浜田論文付図 (5)

第 34~42 図 酸ホスファターゼ

第31図 肝臓 24時間基質液に浸漬 20 μ 第32図 同上 10 μ 第33図 同上 5 μ 第34図 腎臓 24時間基質液に浸漬 20 μ 第35図 同上 10 μ 第36図 同上 5 μ



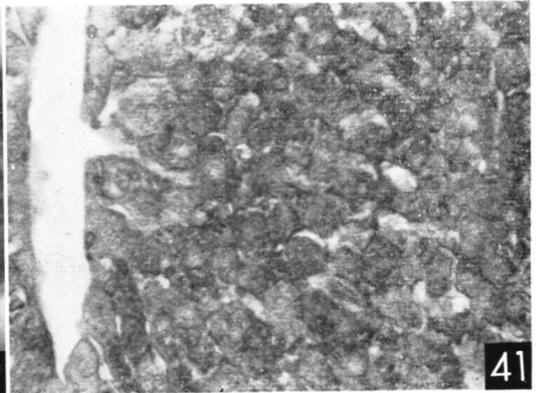
37



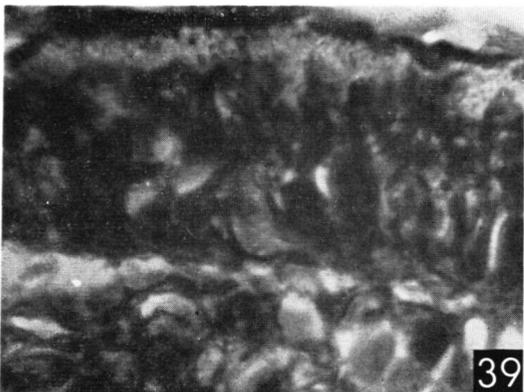
40



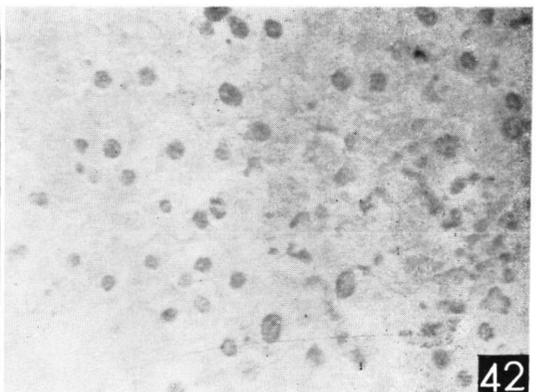
38



41



39



42

第37図 小腸 24時間基質液に浸漬 20 μ

第38図 同上 10 μ

第39図 同上 5 μ

第40図 肝臓 24時間基質液に浸漬 20 μ

第41図 同上 10 μ

第42図 同上 5 μ