

超生体染色顆粒の電子顕微鏡的研究

第 3 編

Nile blue 超生体染色によつて生ずる網赤血球 Substantia
Granulo-Filamentosa [SGF] に関する電子顕微鏡的研究

岡山大学医学部病理学教室 (指導: 妹尾左知丸教授)

中 本 孝

〔昭和33年11月13日受稿〕

緒 言

古くより幼弱赤血球として知られて来た網赤血球は造血現象や細胞分化の形態学的並びに生化学的研究の対象として、又貧血患者診療の指標として多くの研究が行なはれて来た。併しその内部構造は高濃度のhemoglobinのために之を観察することが容易でなく、溶血、超生染等の方法がとられて来たが、之等の方法は多くの artifact を生ずるために、Substantia Granulo-Filamentosa [SGF] が果して何であるかと云う事に就いては多くの見解を生んでいる。

即ち、Ehrlich (1881) が始めて網状物質を認めて以来、超生染による網赤血球の研究は、野手¹⁾、国枝²⁾、Caesalis³⁾、Herz⁴⁾、Pappenheim^{5, 6)}、Cunningham⁷⁾、Nittis⁸⁾ 等によりなされて来たが、SGFの本態に就いては、既存説 (Simmel^{9, 10)}、Seyfarth¹¹⁾、Lüdin¹²⁾、Brunner¹³⁾、Braunsteiner¹⁴⁾ 等)と人工産物説 (Schilling¹⁵⁾、Key¹⁶⁾、Kosenow^{17, 18)}、Bessis¹⁹⁾、Seno²⁰⁻²⁷⁾)をめぐつてその落付く所を知らなかつた。

然し最近電子顕微鏡の研究により網赤血球内にmitochondriaのある事が証明せられた (Braunner et al^{18, 28)}、Braunsteiner et al¹⁴⁾)。更に著者及び妹尾、吉沢等²²⁻²⁵⁾によつて、mitochondriaの他に小胞体の存在する事が明らかになつた。

著者は網赤血球の成熟過程を超薄切片によつて追求すると共に、SGFの本態を著者の考案した沃化水銀カリウム液による超生染色素固定法を利用して明らかにすることが出来たのでここに報告する。

材料並びに方法

1. 材料としては心穿刺により生常成熟家兎の血液を毎日20~30cc.宛、3~4回瀉血し、最後の瀉血から

2~3日後網赤血球の分離の著るしく起つた時期に於てその末稍血 (20~30%の網赤血球を含む) を使用した。

2. 色素は nile blue sulfate (Grüber 社製品) の 0.1% Hanks 氏溶液を用いた。

3. 網赤血球の内部構造の観察及びSGFの観察には別に塗抹標本についても行なつた。即ち、collodion膜を有するオブジェクトグラス上に血液を塗抹しそのまま或は乾燥後2.5%の割合に formalim を含む 0.8% 食塩水によつて溶血固定し、オスミウム染色或は chrom-shadowing を施し、又之を nile blue 染色を施した細胞に於ても同様に観察した。

4. その他の超生染法、固定、脱水、包埋等は第1編²⁰⁾に述べた方法に従つて行つた。

観 察 結 果

nile blue はその分子構造中に dimethylamino 基を有しており沃化水銀カリウム液により、又著者のオスミウム酸を加えた沃化水銀カリウムにより試験管内で不溶の沈澱物を形成するのが認められた。超生染後、細胞を塗抹し之を著者の固定液で固定し検鏡すると、網赤血球は美しい深青色のSGFを持つたまま固定されている事が光学顕微鏡的に証明せられた。

まづ、末稍血を第1編²⁰⁾で述べた方法で、nile blue で超生染することなく1%オスミウム酸で15~30分間固定し型の如く脱水包埋して超薄切片として観察した。又 nile blue Hanks 氏液で末稍血及び骨髓細胞を超生染し超薄切片として観察した所では、網赤血球内には明らかに棍棒状或は紐状の幅0.5~0.2 μ 、長さ不定の mitochondria を多数認める。之等の mitochondria は細胞の成熟に従つてその数を減じて来ると共に長さを減じ、最後には短棒状となり球状となつて消失して行く。この状態は塗抹溶血固定細胞に

於ても明瞭にその全貌を認めることができる。

若い網赤血球中に見られる長い mitochondria は普通の細胞に見られるような cristae が認められるが、直径の大きい球形のものでは、cristae 認められないか、或は壊れている cristae が認められる(写真1)。従つて網赤血球の mitochondria は成熟するに従つて尖端から切られて球状化し破壊消滅して行くという前報²³⁻²⁵⁾の溶血細胞に於ける観察結果がその内部構造の変化を伴っていることを示し得た(写真2)。

次に網赤血球内には mitochondria の他に直径0.06~0.1 μ 程度の小さい小泡状の円形腔胞が存在することが明らかに認められる(写真2)。之は mitochondria とは全く無関係の構造物であつて之が膨化した小胞体の切口であることは著者²³⁻²⁵⁾が先に妹尾、吉沢等と共に報告した所である。

次に nile blue 超生染によりこのような構造物がどのように変化するかを観察する為に、前記の方法で超生染した細胞を、著者が第1編²⁹⁾で述べた固定液で固定したものに就いて、同様な方法で(超生染して沃化水銀カリウム液で固定した)超薄切片で S G F の生ずる過程を観察すると、網赤球の断面は膨化した mitochondria がまつわりつくようにして、或は単独に糸状及び球状の小胞体が凝集して来るのが認められる。然しこの場合 mitochondria の電子密度は上昇していない。即ち色素はこの部分に侵入していない事が解る(写真3.4)。然し之等の mitochondria の周囲にまつわりつくようにして大小の不定形な電子密度の高い物質を認めることができる。このような物質は正常の網赤血球内には認める事ができない事からみて明らかに一種の人工産物であることは間違いない。之は著明な高い電子密度を持つているので、之が nile blue によつて超生染されたものか、或は色素そのものの何れかであることは確かである。即ち、之を強拡大してみると、(写真5.6) neutral red 顆粒の如く無構造なものではなく、小胞体の構造物が寄り集まつたものである事が解る。尙精細に観察すると ultramicrosome に似た顆粒の存在が認められる。網赤血球の小胞体は所謂 smooth surface の小胞体に属するものであるがこのような小胞体からも超遠心分離によつて palade の顆粒に最適する顆粒の存在が知られている⁸⁰⁾。尙之は S G F である事は明らかであるが妹尾、河合等によつてこの物質が RNA を含む事が証明せられている^{21, 22)}。

このような所見からこれが小胞体の凝集によつて生

じたものである事が解る。又、網赤血球、赤芽球等はオスミウム固定して切片とした細胞では小胞体に palade 顆粒の存在は一般に認められないものである。従つてこの小顆粒が人工産物か、或はもともとあるものが染められたのかは不明である。

以上の所見から S G F は小胞体が凝集して nile blue で染まつたもので、mitochondria ではない事を示している。

総括並びに考按

前述の如く網赤血球内に超生染によつて現われる S G F の本態が何であるかという事に就いては多くの論説があるが現在迄不明のまま残されて来た。著者は第1編²⁹⁾で述べた nile blue 超生染像から、明らかに之が小胞体の凝集と着色によつて生じた一つの人工産物であり、mitochondria は S G F の形成には無関係である事を始めて明らかにし得た。

従つてこの実験結果は従来長い間論争のまゝとなつて来た S G F の本態に関する問題に終止符を打つたものである。

Braunsteiner¹⁴⁾は網赤血球中に mitochondria をみつけながらそこに現われる小胞体の切断面についてもその存在を説明し得なかつた。又、Braunner and Vollejofreier^{13, 28)}等も溶血標本に於て小胞体の像を出しているに拘らず、之が一般の小胞体の像と異なる所から、之を mitochondria と見誤つて S G F 既存説に加担している。妹尾は先に河合等^{21, 22, 26)}と実験して網状物質が 2700 Å の線を吸収する事及び RNAase によつて消失することから、ここに RNA の存在を主張し、又之が網赤血球内の糸状の超顕微鏡的要素の凝集によつて生ずる人工産物であることを既に5年前に想定している。之は網赤血球内に小胞体の存在を示唆する最初の業績であつた。更に近年小胞体は多量の RNA を有していて、細胞質の好塩基性は主として之によることは Dustin⁸¹⁾、Thorell^{82, 83)}、Seno^{21, 22, 26)}、神田⁸⁴⁾等によつて明らかにされている。網赤血球内の RNA も小胞体及び之から生ずる小顆粒に属するものと考えられる。この場合切断された小顆粒状の小胞体は網赤血球内に彌蔓性に拡がっており、超生染を施す前の網赤血球の中では好塩基性が彌蔓性に広がっているという Kosenow^{17, 18)}、北島⁸⁵⁾、Thorell^{82, 83)}の観察結果と矛盾しない。

然し溶血によつて現われて来る糸状物質が果して小胞体であるか否かに就いては吉沢⁸⁶⁾による凍結乾燥切片の電子顕微鏡的観察によつて始めて決定された。

後、妹尾、吉沢、著者等^{23・24・25)}は超生染によつてこの糸状小胞体の存在が確立された。そしてここに述べた著者の観察結果によつて、SGFが小胞体の凝集物であり、人工産物であることが明らかにされた。既存説を出した観察者の多くは暗視野(Simmel^{9・10)})で、又は位相差顕微鏡(Lüdin¹²⁾)で、又は電子顕微鏡(Braun^{13・28)}・Braunsteiner¹⁴⁾)でmitochondriaの存在を認めた人々であり、人工産物説を支持した人々は超生染によつてのみSGFが現われる事実を忠実に表現した人々であつた。

又、hemoglobinの合成に関しては妹尾^{25・27・28)}の偉大なる業績があり、網赤血球のmitochondriaはhemを合成するために特殊な分化を遂げており、又小胞体もglobinを合成するために分化しているという事と関連して赤血球系細胞の成熟、好塩基性の減弱及び小胞体とmitochondriaの減少とhemoglobin合成との間には、或る程度の平行関係がある事を明らかにした。

文

- 1) 野手雅信：十全会雑誌，33，748，1928.
- 2) 国枝武直：日血会誌，3，367，1939.
- 3) Caesalis. D.: Folia haemat. 4, 1, 1907.
- 4) Herz. R.: ibid. 10, 419, 1910.
- 5) Pappenheim. A.: ibid. 12, 289, 1911.
- 6) Pappenheim. A.: ibid. 7, 19, 1909.
- 7) Cunningham. T. D.: Arch. Int. Med. 26, 405, 1920.
- 8) Nittis. S.: Folia Haemat. 41, 385, 1930.
- 9) Simmel. H.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 36, 144, 1924.
- 10) Simmel. H.: Folia Haemat. 32, 97, 1926.
- 11) Seyfarth. C.: ibid. 34, 7, 1927.
- 12) Lüdin. H.: Schweiz Med. Wschr. 78, 842, 1949.
- 13) Brunner. A. (Jr.). et al.: Experimentia. 12, 255, 1956.
- 14) Braunsteiner. H. et al.: Acta haemat. 16, 322, 1956.
- 15) Schilling. V.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 36, 144, 1926.
- 16) Key. J. A.: Arch. Int. Med. 28, 511, 1921.
- 17) Kosenow. W.: Acta Haemat. 7, 360, 1952.
- 18) Kosenow. W.: Lebende Blutzellen im Fluoreszenz und phasenmikroskop. Karger. Basel. 1956.

結 語

著者は瀉血貧血家兎の末梢血の超薄切片及びnile blueで超生染した血液に就いて電子顕微鏡的観察を行い、網赤血球のSubstantia Gramulo-Filamentosa〔SGF〕は色素によつて小胞体が凝集して生じた人工産物であり、mitochondriaは之に関係していない事を明らかにした。

本論文の要旨は第67回岡山医学会総会，第21回日本血液学会総会，第1回アジア血液学会総会並びに第47回日本病理学会総会に於て発表した。

擲筆するに臨み、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜りたる恩師妹尾教授に深甚の謝意を表します。併せて不断の御教示を忝うせし本病理学教室小田助教授並びに教室員各位に深謝し、又御厚意あふれる御援助を戴いた本学電子顕微鏡室深田、林技師に感謝の意を呈します。

献

- 19) Bessis. M.: Traité de Cytologie Sanguine. Masson et cie. paris. p. 219, 1954.
- 20) Seno. S.: T. Soc. path. Jap. 41 (E). 83, 1952.
- 21) Seno. S.: Mie Med. J. 4, Suppl. 1, 45, 1953.
- 22) Seno. S.: Die Retikulozyten. Handbuch d. gesamt. Haemat. I. P. 228~234, Urban. München. 1957.
- 23) 妹尾左知丸・中本孝他：日血会誌，20，311，1957.
- 24) Seno. S. & Nakamoto. T. et al.: Folia Haemat. Neue Folge. 2, 270. 1958.
- 25) Seno. S.: Acta Haemat. Japan. 21 (2) Suppl. 351, 1958.
- 26) 妹尾左知丸：細胞化学シムポジウム，1，55，1953.
- 27) Seno. S. & Nakamoto. T. et al.: Acta Haematol. Japan. 21, 2 (Suppl.), 332, 1958.
- 28) Brunner. A. (Jr.) and Vallejo-Freier. A.: Exp. cell. Res. 10, 55, 1956.
- 29) 中本孝：本論文，第1編，本誌.
- 30) 細胞化学会編：細胞，丸善，東京，1958.
- 31) Dustin. P. (Jr.): Symposia Soc. Exptl. Biol. 1, 114, 1947.
- 32) Thorell. B.: Acta Med. Scand. 200, 1947.
- 33) Thorell. B.: Studies on the formation of

- cellular substances during blood cell production. p. 70, Henry. Kimpton. London. 1947.
- 34) 神田三郎：岡山医学会雑誌，168，1989，1956.
- 35) 北島：天野重安著，血液学の基礎，上巻，P，221，丸善，東京，1948.
- 36) 吉沢浩洋：岡山医学会雑誌，印刷中.
- 37) 妹尾左知丸：第46回日本病理学会秋期総会特別講演，1957.
- 38) Seno. S.：未発表.

第3編 附 図 説 明

- 写 真 1：瀉血貧血家兔末梢血を染色しないで1%オスミニウム酸液で固定した網赤血球(Rc). この中にはmitochondria (M)と小胞体 (Er) の断面が明らかに認められる. 膨化した mitochondria 内にも cristae の変性したのが見られる.
- 写 真 2：写真1と同じ材料から得た網赤血球で中には写真1と同様に mitochondria と小胞体を認める. mitochondria は長い棍棒状でその全長にわたり，内部構造が見られるが中央部にあるその一端は破壊されている. 之から漸次分節細小化していく.
- 写 真 3：nile blue で染色し沃化水銀カリウム液で固定（本文参照）した網赤血球. S G F は膨化した mitochondria の周囲に集まった小胞体乃至 ultramicrosome によつて作られたものである事は明らかである. 即ち，nile blue 染色により mitochondriaは破壊されているが染色されていない.
- 写 真 4：同上の方法による網赤血球で泡状の小胞体のまわりに nile blue で強染した ultramicrosome を認める. この細胞の切片には mitochondria は現われていない.
- 写 真 5, 6：之を強拡大してみると S G F が小胞体及び ultramicrosome よりなる関係を明らかに示している.

Electronmicroscopic Studies on Supravital-Stained Granules
Part 3. An Electronmicroscopic Studies on Substantia Granulo-
Filamentosa (SGF) of Reticulocytes produced by Nile
Blue Supravital Staining.

Takashi NAKAMOTO

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

In this paper, the author reports the mechanism of the formation of the Substantia Granulo-Filamentosa (SGF) in reticulocytes produced by supravital staining.

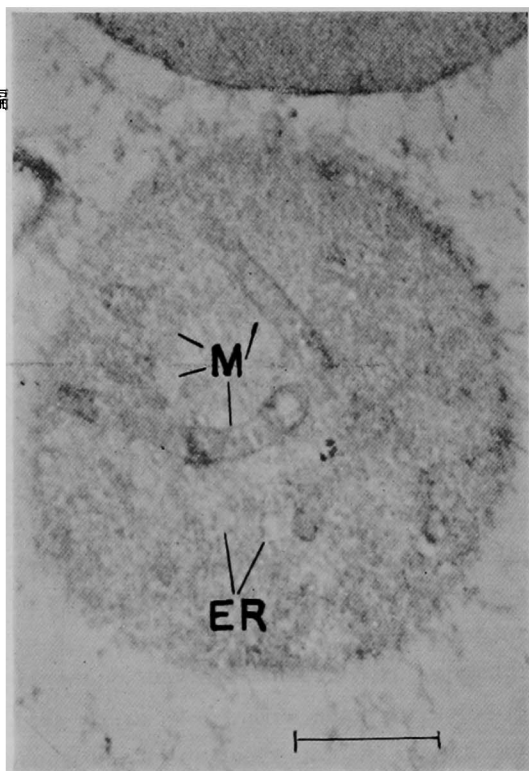
The reticulocytes have been obtained from the circulating blood of the blood depleted anaemic rabbits in the stage of the reticulocyte crisis. A droplet of blood taken was stained supravitaly mixing with Nile blue solution (Hanks' solution containing 0.1 % Nile blue.) and fixed with the method of author's own device as mentioned in Part 1, by which the dye can be fixed and appears electron dense under electron microscope.

By preparing ultrathin sections, these reticulocytes have been observed under electron microscope comparing with the section of the reticulocytes fixed with 1.0 % osmic acid. And it has been verified that the SGF of reticulocytes appear as the electron dense substances irregular in shape, mainly tangling around the mitochondria. The mitochondria are not stained, showing no increased electron density, though they are swollen and have deformed cristae.

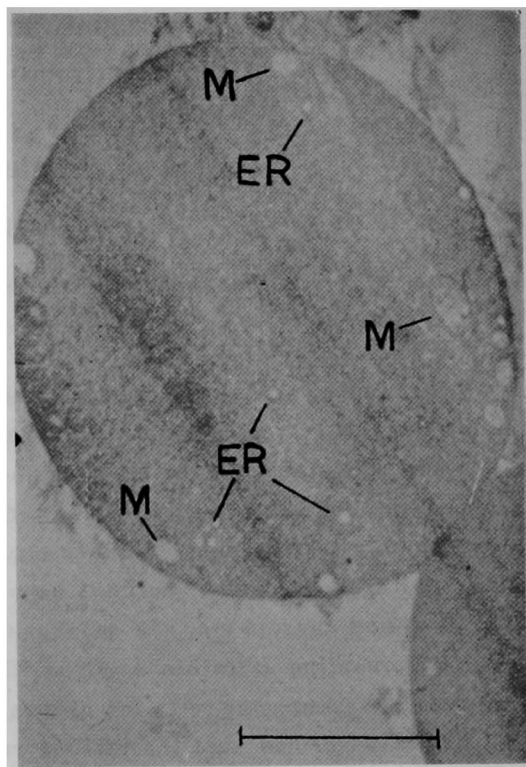
It has been verified that Substantia Granulo-Filamentosa (SGF) of reticulocytes are artificial product produced as the result of agglomeration of endoplasmic reticulum due to the presence of Nile blue, and that mitochondria are not involved in the stained picture of SGF.

第 3 編

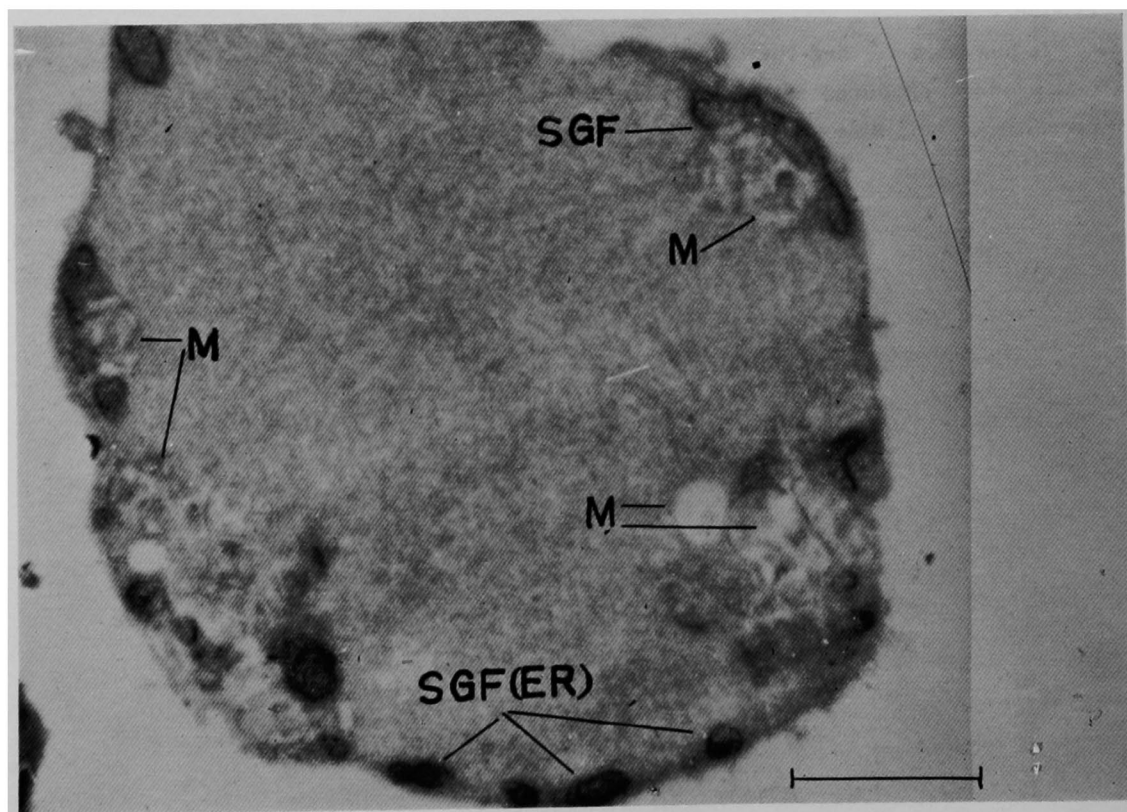
1



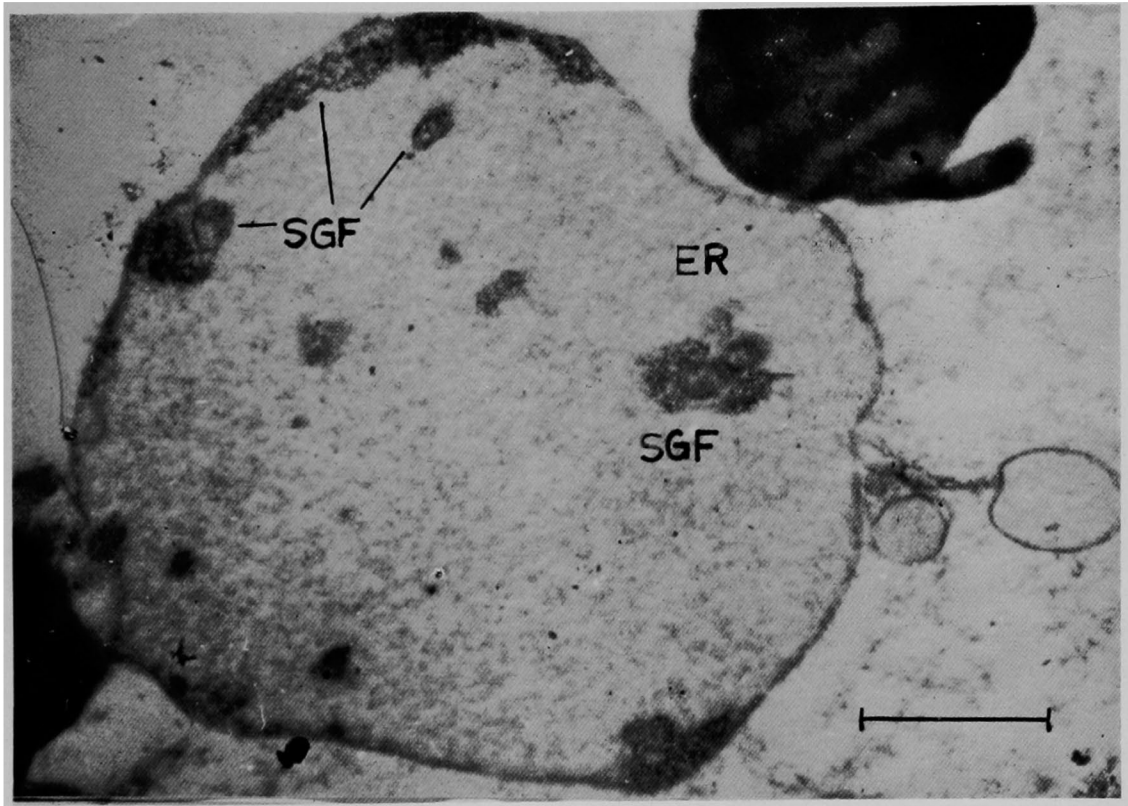
2



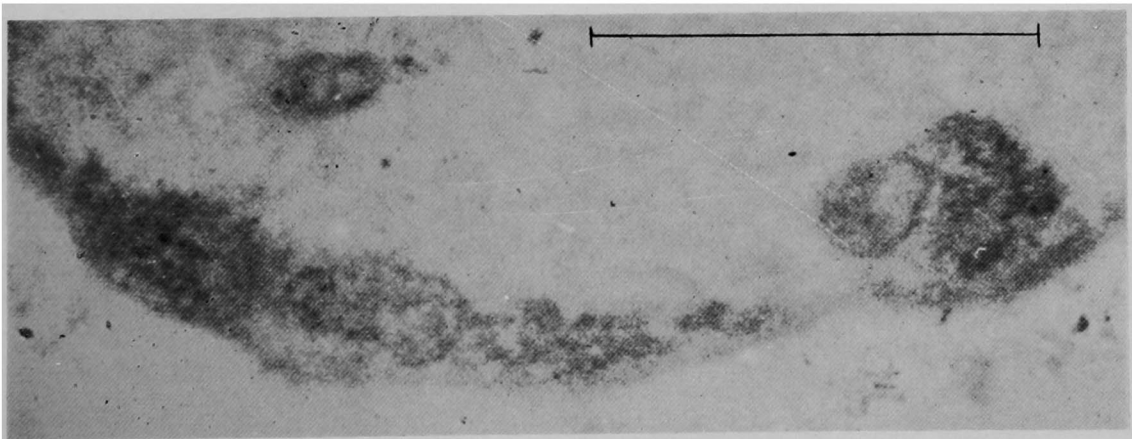
3



4



5



6

