

「グリコゲン」染色ニ就テ

(第2回報告)

動物性色素特ニ「カルミン」ヲ以テスル

「グリコゲン」染色ニ就テ

附 「グリコゲン」染色ト核染色トノ關係

岡山醫科大學解剖學教室(主任上坂教授)

助 手 結 緣 主 計

Best 氏「カルミン」染色法ハ「グリコゲン」染色ニ最良ナル方法ト認メラレ其ノ組織學的研究ニハ近時之ニ據ラザル者少ナシ。斯ノ如ク主要ナル染色方法タルニ拘ラズ「グリコゲン」ガ「カルミン」ニヨリ染色サルル機轉ニ關シ研究セシ者ナシ。唯ダ本法ノ案出者 Best 氏ハ「カルミン」ハ「グリコゲン」ニ化學的ニ結合セルニハアラザルベク單ニ物理的ニ吸着セルモノナルベシト云ヘリ。余ハ上坂教授指導ノ下ニ「グリコゲン」ノ染色機轉ニ關スル研究ニ着手シ染色學上ノ諸學說ニ照ラシツツ「カルミン」ヲ種々ノ試薬ニ溶カシテ染色シ且種々ノ試薬ニテ辨色シ遂ニ「カルミン」ノ「グリコゲン」染色ニ於ケル染色機轉ヲ探究シ併セテ「カルミン」ニ依ル核染色ノ原理ヲ追究シ茲ニ報告スルモノナリ。

「カルミン」ハ水及ビ酒精ニ不溶性ニシテ「アルカリ」液ニヨク溶ケ酸性溶液ニテモ永ク放置セバ多少溶解スルモノナリ。之ヲ使用スルニハ炭酸「リチウム」、明礬、硼砂等ノ水溶液ニ加ヘ又ハ鹽酸含有ノ酒精ニ入レ溶液ヲ作ル。「カルミン」ノ化學的構造式ニ就テハ不明ノ點多シト雖モ其ノ主成分ハ「カルミン」酸ニシテソノ他ニ「アルミニウム」、「カルク」及ビ蛋白體ヲモ含有セリ。

視テ Best 氏「カルミン」染色法ニ關シ今單簡ニ述ブル所アルベシ。即チ後陳ノ「カルミン」基液 20 cc 「メチルアルコール」 30 cc 「アンモニヤ」水 30 cc ノ混合液ニテ染色シ水ヲ避ケツツ直ニ「メチルアルコール」 40 cc 「エチルアルコール」 80 cc 蒸餾水 100 cc ナル辨色液中ニ入レ次デ「アルコール」ニテ脱水シ「キシロール」ニテ透明ニシ「バルサム」ニテ封鎖檢鏡スルモノナリ。

「カルミン」基液トハ「カルミン」 2 g 炭酸「カリウム」 1 g 「クロール」加里 5 g 蒸餾水 60 cc ヲ混ジ注意シテ煮沸シ冷却後「アンモニヤ」水 20 cc ヲ加ヘタルモノナリ。「カルミン」基液ハ冷暗所ニ貯藏シ使用前必ズ濾過シ前記處方ニヨリ使用スルモノナリ。但シ此基液ハ日ヲ經ルニ從ヒ使用シ能ハザルニ至ルモノニシテ上記處方ニヨリ製セシ染色液モ僅々 2-3 日ノ保存ニ堪ユルノミナリ。

上述ノ如ク Best 氏「カルミン」染色液中ニハ色素ノ他ニ炭酸「カリウム」、「クロール」加里、「アンモニヤ」水、「メチルアルコール」ノ 4 種ヲ含メリ、然ラバ之等ノ物質ハ常ニ存在セザレバ「グリコゲン」ハ染色シ能ハザルモノナリヤ、又之等ニ代フルニ他ノ物質ヲ以テスルコトヲ得

ルヤ否ヤ。辨色液ハ必ズ Best 氏ノ示スガ如キ處方ニヨラザルベカラザルヤ。次ニ染色後辨色液中ニ入ルル前後ニ於テ水洗セバ如何。余ハ之等ノ疑問ニ對シ試験ヲ續ケタリ。

實驗材料ハ冬眠期ノ蛙肝ヲ純「アルコール」ニテ固定シ「ツエロイジン」切片トシテ用ヒタリ。是レ冬眠期中ノ蛙肝ニハ多量ノ「グリコゲン」ノ存在スルガ爲ナリ。

Best 氏「カルミン」溶液ニ就テ

Best 氏ハ同氏ノ「カルミン」染色液中ニ含マルル「クロール」加里ノ代リニ「ブroom」,「ヨード」, 靑酸等ノ加里鹽ヲ置換スルモ又「グリコゲン」ヲ染色スルコトヲ得ト云ヘリ。加之炭酸「カリウム」ニモ之ニ類似ノ鹽類例セバ「リチウム」,「アルミニウム」,「ナトリウム」,「セジウム」,「ルビウム」等ノ鹽類ヲ代用スルコトヲ得ト。之等ノ理由ニヨリ同氏ハ「カルミン」ハ「グリコゲン」ニ單ニ理學的ニ結合セルモノナラント思考セリ。Loewenthal 氏ハ「カルミン」苛性曹達液ヲ作り之ニ「ピクリン」酸及ビ鹽酸「アルコール」ヲ作用セシメ「カルミン」ノ酒精溶液ヲ作り「グリコゲン」ヲ染色シ得タリト。

今余ハ Best 氏「カルミン」染色液中ニ含マルル 4 種ノ物質ヲ種々ニ組み合セテ次ノ如キ液ヲ作り順次之ヲ以テ染色シ Best 氏處方ニヨル辨色液中ニ入レ以下ノ操作ヲ Best 氏本法ト同一ニシテ標本ヲ作りタリ。

- | | |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| 1) 「カルミン, クロール」加里溶液 | 8) 「カルミン, アンモニヤ, クロール」加里溶液 |
| 2) 「カルミン, メチルアルコール」溶液 | 9) 「カルミン」炭酸加里「アンモニヤ」溶液 |
| 3) 「カルミン, クロール」加里「メチルアルコール」溶液 | 10) 「カルミン, アンモニヤ, クロール」加里「メチルアルコール」溶液 |
| 4) 「カルミン」炭酸加里溶液 | 11) 「カルミン」炭酸加里「メチルアルコール, アンモニヤ」溶液 |
| 5) 「カルミン, アンモニヤ」溶液 | 12) 「カルミン」炭酸加里「クロール」加里「メチルアルコール」溶液 |
| 6) 「カルミン, アンモニヤ, メチルアルコール」溶液 | 13) 「カルミン」炭酸加里「メチルアルコール」溶液 |
| 7) 「カルミン」炭酸加里「クロール」加里「アンモニヤ」溶液 | |

但シ炭酸「カリウム」及ビ「クロール」加里ハ 20% 水溶液トナシ「カルミン」ハ「メルク」會社製ノモノヲ用ヒ 1% 溶液タラシメタリ。「アンモニヤ」及ビ「メチルアルコール」ハ共ニ局方ノ純ナルモノヲ用ヒタリキ。2 種以上ノ溶液ニ「カルミン」ヲ溶解スル時ハ略ボ同量溶液ヲ混ジタリ。

「カルミン」ハ「クロール」加里ノ水溶液及ビ「メチルアルコール」ニ不溶性ナリ。從ツテ 1), 2), 3) ノ溶液ハ之ヲ作ルコト能ハズ。4) ニアリテハ炭酸加里ノ水溶液ハ「アルカリ」性ヲ呈スルガ故ニヨク「カルミン」ヲ溶解スルコトヲ得。此ノ「カルミン」炭酸加里溶液ニテ染色セバ「グリコゲン」ヲ染色シ得ルト同時ニ又他部ヲモ良染シソノ境界著明ナラズ而シテ核ハ染色セズ。5) ノ「カルミン, アンモニヤ」溶液ニテ染色スルモ亦同様ノ所見ヲ呈ス。6) ……以下ノ溶液ニテ

切片ヲ染色シ且 Best 氏本法ノ如ク操作セバ「グリコゲン」ノ境界著明ニシテ他組織及ビ核ノ染色ヲ見ルコトナシ。就中上列溶液ヨリ下列ノモノニ及ブニ從ヒ概シテ「グリコゲン」ノ染色力強ク Best 氏本法ニモ劣ラザルガ如キ美觀ヲ呈スルモノナリ。6)……11)ノ溶液ハ勿論,「グリコゲン」ヲ良染スルモノナルガ之等ハ皆「アンモニヤ」含有溶液ナリ。之等溶液ノミニ就イテ見レバ「グリコゲン」染色ニハ一見「アンモニヤ」が必要ナルカノ如ク見ユルモ 12) 及ビ 13)ノ溶液ニハ「アンモニヤ」ヲ含有セズ而モヨリヨク「グリコゲン」ヲ染色スルコトヲ得。由之「アンモニヤ」ハ「グリコゲン」染色ニ絶對的ニ必要ナラザルコトヲ知ルコトヲ得。

6) 9) 11) 13)ノ溶液中ニハ「クロール」加里ヲ含有セズ而モ「グリコゲン」ヲ充分ニ染色シ得ルノ事實ヨリ考ヘナバ「クロール」加里モ亦「グリコゲン」染色ニ絶對的ニ必要ナルモノニアラザルナリ。

次ニ 6) 8) 10)ノ溶液ヲ用ヒ「グリコゲン」ヲ良染シ得ルコトニヨリ炭酸加里モ亦絶對的必要ナラザルガ如シ。同様ニ 7) 8) 9)ノ溶液ニテモ同様染色シ得ルコトニヨリ「メチルアルコール」モ亦必要ナラザルガ如シ。

由是觀之「グリコゲン」染色ニ於ケル Best 氏「カルミン」溶液ニ關シ夫レニ含有サルル炭酸加里,「クロール」加里,「アンモニヤ」,「メチルアルコール」ノ内ニテ絶對的ニ必要ナルモノハ之ナキガ如シ。故ニ余ハ以下之等ノ關係ヲ根本的ニ探索センコトヲ企圖シ,先ヅ簡單ニシテ且「グリコゲン」ヲ良染シ得タル 18)ノ溶液即チ「カルミン」炭酸加里「メチルアルコール」溶液ニツキ更ニ深く研究ヲ行ヒタリ。

「カルミン」炭酸加里「メチルアルコール」溶液中ノ炭酸加里ノ代リニ 1—5%ノ割ニ鹽酸ヲ加ヘ「カルミン」鹽酸「メチルアルコール」溶液ヲ作りニテ染色シ以下 Best 氏本法ト同様ニ操作セバ「グリコゲン」ハ甚ダ美ナル赤色ヲ呈シ他組織トノ區劃判然ス。但此際「グリコゲン」染色ノ他ニ核染色(肝細胞,赤白血球,星芒細胞,内皮細胞等ノ核)ノ起ルヲ見ル。次ニ此「カルミン」鹽酸「メチルアルコール」溶液ノ「メチルアルコール」ノ代リニ稍々過剰ニ「アンモニヤ」水ヲ加ヘ「カルミン」鹽酸「アンモニヤ」溶液ヲ作り此溶液ニテ染色ヲ行フモ又良ク「グリコゲン」ヲ染色シ得ルモノナリ。ソノ所見ハ「カルミン」鹽酸「メチルアルコール」溶液ヲ用ヒシ時ト略ボ同様ナリ。

「カルミン」鹽酸「アンモニヤ」溶液ニツキ一考センニ鹽酸ハ「アンモニヤ」ト結合シテ過剰ニ加ヘラレタル「アンモニヤ」ノミ残り單ナル「カルミンアンモニヤ」溶液ト同様ナルガ如キ觀アリ。而シテ上述セシガ如ク單ナル「カルミン,アンモニヤ」溶液ハ「グリコゲン」染色ニ不適當ナルコトヲ述ベタリ。故ニ一見矛盾セルガ如キモ酸ト鹽基ト中和スル際ニハ酸中ノ水素ト鹽基中ノ水酸基トハ結合シテ水ヲ作ルベキモ鹽酸中ノ「クロール」ハ「アンモニヤ」基ト結合シ鹽化「アンモニウム」ヲ形成スルノミナラズ「カルミン」中ニ含マルル所ノ「カルシウム」トモ結合シテ「クロールカルシウム」モ生ズルモノナリ。之等ノ鹽類ハ染色上組織ト色素トノ親和力ヲ高ムルモ

ノナルガ故ニ上述セシ如ク「カルミン」鹽酸「アンモニヤ」溶液ヲ以テ良好ノ染色ヲ行フコトヲ得タルナリ。

「カルミン」鹽酸「メチルアルコール」溶液ニテ染色スル場合モ又同様ニ酸ハ「アルコール」ニ違フ場合ニハ「アルコール」ハ酸基ノ如キ作用ヲナシ酸中ノ水素ハ「アルコール」中ノ水酸基ト結合シテ水ヲ作り鹽酸中ノ「クロール」ノ一部ハ「カルミン」中ノ「カルシウム」ト結合シテ「クロールカルシウム」ヲ形成シ以テ染色力ヲ高ムルモノナリ。

1—5%内外ノ割合ニ鹽酸ヲ以テ作レル「カルミン」鹽酸「メチルアルコール」又ハ「カルミン」鹽酸「アンモニヤ」溶液ニ於テ鹽酸ニ代フルニ他ノ無機酸例セバ磷酸、硫酸、硝酸等ヲ以テスルヲ得ベク又5—10%内外ノ割ニ於テ有機酸例セバ枸橼酸、酒石酸、林檎酸、醋酸、蓆酸、蟻酸、三鹽化醋酸等ヲ代用スルコトヲ得ルモノナリ。而モ上記ノ如キ鹽酸含有ノ「カルミン」溶液ニテ染色セルモノ最モ「グリコゲン」染色ノ成績良好ニシテ他ノ無機有機ノ酸ヲ代用スル場合ノ成績ハ記載ノ順序ニ從ヒ良否アリ。即チ磷酸、枸橼酸ヲ以テ最良ナリトス。概シテ無機酸ヲ含有セル液ヲ使用セシ場合ニハ核染色著明ニ起ルト雖モ有機酸ヲ含有スル液ヲ以テスル場合ニハ核染色甚ダ微弱ナリ。例外トシテ三鹽化醋酸ハ無機ノ強酸同様ニ著明ナル核染色ヲ得セシムルヲ見ル。之等核染色ノ關係ニツイテハ更ニ詳述スル所アルベシ。

次ニ「カルミン」鹽酸「アンモニヤ」溶液中ノ鹽酸ノ代リニ食鹽ヲ以テス。之ヲ20%内外ノ割ニ加ヘ「カルミン」食鹽「アンモニヤ」溶液トスルモ良ク「グリコゲン」ヲ染色スルコトヲ得。更ニ「アンモニヤ」ノ代リニ苛性加里。又ハ苛性曹達ノ定規液ヲ以テスルモ尙ホ「グリコゲン」染色ヲ行フコトヲ得タリ。而モ「グリコゲン」ト他組織トハ其ノ境界判然區劃セラルルヲ見ル。加之之等ノ液ヲ用ヒシ場合ハ核染色ノ起ルコトナシ。

Best氏「カルミン」溶液ニ關シ上述ノ如ク之ヲ吟味シ來ル時ハ「カルミン」食鹽苛性加里溶液ヲ以テスルモ「グリコゲン」ヲ良染スルモノナルコトヲ知り得タリ。此「カルミン」食鹽苛性加里溶液ハBest氏「カルミン」溶液中ニ含マルル炭酸加里、「クロール」加里、「アンモニヤ」、「メチルアルコール」ノ孰レヲモ含有セズ。此點ヨリ考察スルニBest氏「カルミン」溶液中ニ含マルル上記4種ノ物質ハ「カルミン」ヲ以テスル「グリコゲン」染色ニ絶對的ニ必要ナルモノニアラザルコトヲ更ニ深く確かメ得タリ。

Best氏辨色液ニ就テ

Best氏「カルミン」溶液ニテハ「グリコゲン」ヲ染色スルニアタリ染色後、直チニ切片ヲ「メチルアルコール」40g「エチルアルコール」80g蒸餾水100gノ混合液ナル辨色液中ニ入ルルヲ法トス。然レドモ「カルミン」ヲ以テスル「グリコゲン」染色ニハ必ず此辨色液ヲ要セザルベカラザルヤ。

Best氏「カルミン」溶液及ビ前述セシ如キ「グリコゲン」ヲ良染スル他ノ「カルミン」諸溶液

ヲ用ヒテ染色シタル後之ヲ Best 氏辨色液中ニ入ルル代リニ唯ダ單ニ純「メチルアルコール」又ハ「エチルアルコール」ニ入レ辨色且同時ニ脱水スルモ良好ナル「グリコゲン」染色成績ヲ得ルモノナリ。

次ニ「グリコゲン」染色後ノ辨色液ハ常ニ斯クノ如キ「アルコール」性溶液タラザルベカラザルヤ。

Best 氏「カルミン」溶液ニテ染色シ「アルコール」性辨色液ヲ使用スル代リニ1—5%ノ無機酸水溶液或ハ10—20%ノ有機酸溶液ヲ應用スルモ良好ナル「グリコゲン」染色成績ヲ得ルモノナリ。尙ホ注意スベキハ Best 氏「カルミン」溶液ハ勿論、上述セシ「グリコゲン」染色ニ適スル他ノ「カルミン」諸溶液ニテ染色シタルモノハ20%内外ノ食鹽水ヲ以テ辨色スルモ可ナルコトナリ。元來 Best 氏「カルミン」染色液ハ製法稍々繁雜ナルモノニシテ注意シテ保存スルモ尙ホ且永ク使用ニ堪ヘザルモノナリ。且又此方法ニヨリテ作製セシ標本モ永ク保存ニ堪ヘザルノ缺點ヲ有スルモノナリ。「カルミン」鹽酸「アンモニヤ」溶液、「カルミン」炭酸加里「メチルアルコール」溶液、「カルミン」炭酸加里「アンモニヤ」溶液、「カルミン」食鹽苛性加里溶液等ニテ切片ヲ染色シ直チニ無機酸或ハ有機酸ノ水溶液又ハ食鹽水ニテ辨色セバソノ操作簡單ニシテ且染色液ノ製法モ亦容易ナル爲メニ使用前毎時之ヲ製スルモ困難ナラズ且永ク保存ニモ堪ヘ得ルモノナリ。殊ニ食鹽水ノ如キ安價ニシテ甚ダ便利ナリトス。尙ホ主要ナルコトハ染色液ニ酸ヲ含有スルカ又ハ辨色液中ニ酸ヲ使用セシ場合ニハ、ソノ標本ハ Best 氏本法ニヨル夫レヨリモ保存力甚ダ大ナルモノナリ。是レ「カルミン」ハ「アルカリ」液ニ可溶性ナルガ故ニ作製セシ標本モ不純ナル載物硝子ヨリ出ヅル「アルカリ」ノ爲メニ犯サレ日ヲ經ルニ從ヒ褪色スルニ反シ上記ノ如ク染色液ニ酸ヲ加フルカ又ハ辨色液ニ酸ヲ加ヘシ場合ニ於テハソノ酸ノ爲メニ載物硝子ヨリ出ヅル「アルカリ」ハ中印セラレ爲メニ標本ノ保存上 Best 氏本法ニヨリシモノニ比シヨリ大イナル效果ヲ顯スモノナリ。

Best 氏染色液中ニ含マルル物質ヲ酸ニテ置換シタル液又ハ酸其ノ他ヲ加ヘタル「カルミン」溶液ニテ染色セシ標本ニ於ケル「グリコゲン」竝ニ核染色ニツキテハ既ニ各自ノ場合ニ記述セシ所ナリ。次ニ上述ノ如ク辨色液ニ色々ノ試藥ヲ用ヒシ場合ニ於ケル「グリコゲン」染色所見ト核染色所見ト一層詳細ニ探索スベシ。

Best 氏「カルミン」溶液及ビ上記ノ「グリコゲン」染色ニ適スル他ノ「カルミン」諸溶液ニテ染色セシ後、種々ノ辨色液ヲ作用セシメタル場合ノ各所見ニツキ述ブルノ繁ヲ避ケ今之ヲ簡單ニ一括センガ爲メニ染色液ニハ Best 氏「カルミン」溶液ヲ用ヒ辨色液ノミ種々ノモノヲ使用セシ場合ニ於ケル「グリコゲン」竝ニ核染色所見ニツキ記述スベシ。

Best 氏本法ハ勿論、同氏ノ液ニテ染色シ單ニ「メチルアルコール」又ハ「エチルアルコール」ニテ辨色竝ニ脱水ヲ行ヒシ標本ニアリテハ「グリコゲン」ハ他組織ト著明ナル境界アルモノニシテ且核染色ヲ見ルコトナシ。同様ナル所見ハ辨色液トシテ食鹽水ヲ用ヒシ場合モ亦得ラルルモ

ノナリ。之ニ反シ辨色液トシテ鹽酸ヲ用ヒシ場合ニハ「グリコゲン」ノ著明ニ區劃セラルル他ニ核染色ノ顯著ニ現ルルヲ見ル。而シテ鹽酸ノ濃度ヲ上昇セシムルニ從ヒテ「グリコゲン」染色ハ次第ニ不良トナルニ反シ核ノ染色ハ益々著明トナルモノナリ。鹽酸ハ水溶液ヨリモ酒精溶液ヲ用ヒシ場合ニ核ノ染色力甚ダ大ナリ。辨色液トシテ磷酸及ビ硫酸ヲ使用セシ場合モ大體ニ於テ鹽酸ヲ用ヒシ場合ニ類似ノ現象ヲ呈スルモ核染色ハ同濃度ノ鹽酸液ト比較スレバ少シク微弱ナリ。硝酸ニ於テハ核ノ染色ハ鹽酸ト同様ナルモ「グリコゲン」ノ染色ハ低キ濃度ニ於テモ比較的の不良ナリ。此事實ハ興味アル事ナリト思惟ス。

次ニ有機酸ヲ辨色液トシテ使用セシ場合ヲ述ベンニ、多クノ有機酸ハ「グリコゲン」染色ヲ頗ル良好ニ保タシムルモノニシテ就中枸橼酸、酒石酸ヲ使用セシ場合ハ染色成績甚ダ佳良ナリ。此二者ハ有機酸中最良好ノ成績ヲ齎スモノニシテ無機酸中ノ硝酸ニ勝リ鹽酸、磷酸、硫酸ト略ボ伯仲セリ。而モ枸橼酸、酒石酸ヲ應用セシ場合ニハ核染色ノ現ルルト少ナシ。林檎酸ヲ用ヒシ場合「グリコゲン」ノ染色ノ狀ハ枸橼酸、酒石酸ノ成績ニ次グ。之ニ反シ醋酸、蓼酸、蟻酸、三鹽化醋酸等ヲ應用セシ場合ハ「グリコゲン」染色多少不良ニシテ殊ニ記載順序ノ後位ノモノヲ用フルニ從ヒ益々鮮明ノ度ヲ缺ギ無機酸ニ於ケル硝酸ヲ使用セシ場合ト同様若クハ夫レ以下ノ成績ヲ見ルモノナリ。

「グリコゲン」染色ニ於テ上述ノ如ク辨色液ニ酸ヲ使用セシ時染色成績佳良ナルモノヨリ列記セバ枸橼酸、酒石酸、林檎酸、醋酸、蓼酸、蟻酸、三鹽化醋酸ノ順序ニナルモ核染色ニ於テハ「グリコゲン」染色ニ殆ド不適當ナル三鹽化醋酸ハ有機諸酸中最モ強ク核ヲ染色セシメ此點ニ於テハ無機強酸ニ比シ唯ダ僅ニ劣レルノミ。今有機酸ニシテ核ノ染色ヲ最モ良ク保存セシムルモノヨリ順次ニ列舉スレバ三鹽化醋酸、蓼酸、酒石酸、枸橼酸、蟻酸、醋酸ナリトス。

「グリコゲン」染色ニアタリ辨色液トシテ適當ノ酸ノ水溶液ヲ作用セシメ後「アルコール」脱水ヲ行フモ又辨色ニ際シ之等酸ノ「アルコール」溶液ヲ以テスルモノノ成績殆ド同様ナリ。之ニ反シ核染色ニ於テハ酸ノ「アルコール」溶液ヲ辨色液トシテ用ヒシ場合ハ酸ノ水溶液ヲ用ヒシ場合ニ比シ核ノ染色成績遙ニ良好ナリトス。

然レドモ辨色液トシテ酸ヲ使用スル場合ニ「グリコゲン」染色ノ成績ト核染色ノ成績トハ酸ノ種類ニ從ヒ大差アルモノニシテ殊ニ有機酸ニ於テハ概シテ「グリコゲン」染色ニ良ナルモノハ却テ核染色ニ不良ニシテ、核染色ニ良ナルモノハ却テ「グリコゲン」染色ニ不良ナルハ興味アル事實ナリト信ズ。之ニ關シテハ更ニ頂ヲ設ケ記述セント欲ス。

「グリコゲン」染色後ニ於ケル水洗ニ就テ

「グリコゲン」ヲ良染セシムベキ「カルミン」ノ諸溶液ニテ切片ヲ染色セシ後 Best 氏辨色液又ハ余ノ經驗上良效アリシ無機及ビ有機酸ノ酒精液或ハ水溶液又ハ食鹽水ニテ辨色スルニ先チ切片ヲ水洗セバ色素ハ皆水中ニ溶ケ去リ「グリコゲン」竝ニ核ノ染色標本ヲ得ルコトヲ得ズ。

是レ Best 氏本法ニ於テモ染色後、水洗ヲ避ケツツ切片ヲ直チニ同氏ノ辨色液中ニ入ルル所以ナリ。次ニ染色後切片ヲ一度辨色液中ニ入レ後、之ヲ水洗セバ色素ノ水中ニ溶出スルコト比較的少ナクシテ「グリコゲン」染色ヲナサシムルヲ得。而シテ酸液特ニソノ酒精液ヲ辨色液トシテ用ヒ後、水洗セシモノニアリテハ「グリコゲン」ノ他ニ核モ染色サルルヲ見ルモノナリ。

「グリコゲン」染色ニ於テ辨色液使用前ニ水洗スルト其ノ後ニ水洗スルトニ從ヒ上記ノ如ク其ノ結果ニ大差ヲ來スノ事實ヨリ推考スレバ「カルミン」ハ「グリコゲン」存在部ニ單ニ物理的ニ吸着セルノミニシテ決シテ化學的ニ結合セルニハアラザルベシ。何トナレバ染色後、水洗スルコトナクシテ「カルミン」ヲ多少沈澱セシメントスル酒精溶液、酸液及ビ食鹽水等ノ辨色液中ニ入ルレバヨク「グリコゲン」染色標本ヲ得ルニ反シ、染色直後ニ水洗セバ色素ハ水中ニ忽チ溶出スレバナリ。

要之「カルミン」ヲ以テスル「グリコゲン」染色ハ「グリコゲン」存在部ニ理學的ニ附着セルモノヲ水洗スルコトナシニ直チニ「カルミン」ヲ沈澱セシメントスル辨色液ニ入レテ兩者ノ吸着ヲ強固ナラシムルニアリ。

「カルミン」ヲ以テスル「グリコゲン」染色ト 核染色トノ關係ニ就テ

Best 氏「カルミン」溶液ヲ以テ「グリコゲン」染色ヲ行フニ際シ同氏ノ方法ニヨル時ハ常ニ核染色ヲ見ルコトナキモ「カルミン」ノ酸含有酒精液ニテ染色シ以下ノ操作ヲ Best 氏本法ノ如クナスモ又 Best 氏「カルミン」溶液ニテ染色シ辨色ニ際シ酸含有ノ溶液、就中酸ノ酒精液ニテ處置スルモ每常核染色ノ出現スルモノナルコトハ既ニ前述セシ如シ。而シテ之等ノ場合ニ於テ「グリコゲン」竝ニ核ニ「カルミン」ハ唯ダ單ニ理學的ニ結合セルモノナランモソノ間ニ多少ノ差異アルモノナリ。即チ前者ノ染色ニハ水素「イオン」濃度が大關係ヲ有セザルモ後者ノ染色ニハ電離ノ強キ強酸ノ助ヲ要スルモノナリ。

元來有機酸ハ無機酸ニ比シ電離度弱キモノナリ、故ニ若シ「グリコゲン」染色ニ水素「イオン」ノ強濃度ヲ必要トスルナレバ辨色液ニ有機酸液ヲ使用スル場合ニ良好ナル染色標本ヲ得ル理ナシ。然ルニ枸橼酸、酒石酸ノ如キ電離度小ナル酸ニアリテモ電離度大ナル無機酸例セバ鹽酸、磷酸、硫酸ト略ボ同程度ニ良好ナル結果ヲ得タリ。而モ電離度大ナル硝酸ノ如キハ「グリコゲン」染色ニ却テ不良ノ成績ヲ示セリ。更ニ有機酸中電離度最モ大ニシテ鹽酸、硫酸ヨリ僅ニ小ナル三鹽化醋酸ヲ用フルトキハ染色成績甚ダ不良ナリキ。

由是觀之「グリコゲン」染色ニハ酸ノ電離度ノ強弱ハ無關係ナリト云フヲ得ベシ。今「グリコゲン」染色ノ目的ニ染色液又ハ辨色液ニ酸類ヲ應用スルニ當リ其ノ適否ヲ酸ノ種類ニ從ヒ列舉セバ鹽酸、磷酸、硫酸、枸橼酸、酒石酸、林檎酸、硝酸、醋酸、蓆酸、蟻酸、三鹽化醋酸ノ順序トナルモノナリ。

之ニ反シ「カルミン」ヲ以テスル核染色ニ於テハ強酸ノ助ヲ必要トスルモノニシテ即チ電離度大ナル鹽酸、硝酸ヲ使用セシ場合ニハ核ハ著明ニ染色シ磷酸、硫酸之ニ次グ、有機酸中ニアリテハ電離度強キ三鹽化醋酸ヲ最良トシ蓆酸、酒石酸、枸橼酸、蟻酸、醋酸等ノ順位ニ從ヒ益々不良ノ結果ヲ示スモノナリ。此成績ハ「グリコゲーン」染色ノ場合ト甚ダ趣キヲ異ニセル所ニシテ要スルニ「グリコゲーン」ノ密度ガ核ノモノヨリ小ナルニ原因スルモノナラント信ズ。

松浦輔彦氏ノ研究ニ據レバ「リチオンカルミン」ニテ染色セシ切片ヲ鹽酸「アルコール」ニ入ルトキハ「アルカリ」性ガ中和セラレテ「カルミン」ハ沈澱シ、此者更ニ鹽酸「アルコール」ニ溶解シテ核中ニ入り核染色ヲ起スト。

「グリコゲーン」ニアリテハ「カルミン」ガ沈澱スルノミニ由テ染色スルモノト見做スヲ得ベシ。何トナレバ核染色ニ不適當ナル食鹽水或ハ酸ノ水溶液ヲ以テ辨色スルモ良ク染色ノ目的ヲ達シ得レバナリ。是レ恐ラクハ固定サレタル「グリコゲーン」ハ核質ニ比シ緩疎ニシテ沈降セル「カルミン」粒子ヲ直チニ質中ニ受納シ得ルニヨル。從テ「グリコゲーン」中ニ存在セル「カルミン」ハ核中ニ保存サルルモノニ比スレバ脱出シ易ク爲ニ染色標本ハ辨色後水洗スレバ多少脱色スルモノナリ。且鹽酸「アルコール」ニ溶ケテ核中ニ入りタル「カルミン」ハ恐ラクハ分子ニ近キ小粒子ヨリナルニ反シ辨色後「グリコゲーン」中ニ殘レル「カルミン」ハ遙ニ粗大ノ粒子ヨリナルモノナラン。然レドモ「アルカリ」液ニ溶カシタル「カルミン」ノ純分子的溶液ハ「グリコゲーン」ノミナラズ核中ニ入ルモ保持サルルコトナクシテ水洗スレバ直チニ脱出ス。蓋シ「カルミン」分子ノ大サガ「グリコゲーン」或ハ核中ノ孔口ニ比シ餘リ小ナレバナリ。故ニ核染色ニ於テモ「グリコゲーン」染色ニ於テモ「カルミン」ハ眞ノ分子ヨリ多少大ナル粒子トナツテ存在スルヲ必要トスルモノニシテ殊ニ「グリコゲーン」中ニ保存サルル「カルミン」粒子ハ緻密ノ核中ニ保持サルルモノニ比スレバ一層大ナルヲ要スルモノナリ。

結 論

余ハ冬眠期中ノ蛙肝ヲ實驗材料トシ「カルミン」ヲ以テスル「グリコゲーン」竝ニ核染色ヲ行ヒ次ノ如キ結論ヲ得タリ。

A. 「グリコゲーン」ハ「カルミン」鹽酸「アンモニヤ」溶液ニテモ染色スルコトヲ得。更ニ「カルミン」食鹽加性加里液ニテモ染色シ得ルガ故ニ Best 氏「カルミン」溶液中ニ含マルル炭酸加里、「クロール」加里、「アンモニヤ」、「メチルアルコール」ハ「グリコゲーン」染色ニ當リ絶對的ニ必要ナラザルナリ。

B. 「グリコゲーン」染色ニ際シ辨色液ニハ必ズシモ Best 氏處方ニ據ル必要ナク唯ダ「カルミン」ヲ沈澱セシムベキ物質即チ單ニ「メチルアルコール」、「エチルアルコール」、有機酸又ハ無機酸ノ水溶液又ハ酒精液ヲ應用スルモ可ナリ。加之安價ニシテ且簡易ナル 20% 内外ノ食鹽水ヲ用フルモ充分染色ノ目的ヲ達シ得ルモノナリ。

C. 染色液ニ酸ヲ加ヘ又ハ辨色液ニ酸ヲ應用シ作製セル標本ハ保存ニ堪ユル力強シ。Best氏本法ニアリテハ「カルミン」液ハ「アルカリ」性ナルガ故ニ此方法ニテ作りタル標本ハ載物硝子ヨリ出ヅル僅ノ「アルカリ」ニ由テ著シク影響ヲ蒙ル即チ「カルミン」ハ溶出シ次第ニ褪色スルモノナリ。之ニ反シ酸ヲ使用セシ場合ニハ載物硝子ヨリ出ヅル「アルカリ」ハ残留セル酸ニ由リテ中和セラレ「カルミン」ハ溶出セズ標本ハ能ク保存ニ堪ユルモノナリ。

D. 「グリコゲン」染色後、直チニ切片ヲ水洗セバ「カルミン」ハ水中ニ溶出シ全ク脱色ス。然ルニ染色後一度辨色液中ニ入レ後、水洗セバ「グリコゲン」染色ハ多少褪色スト雖モ其ノ影響比較的少ナシ。

E. 「カルミン」ノ酸含有酒精液ニテ染色シ以下ノ操作ヲ Best氏本法ノ如クナスモ又 Best氏「カルミン」溶液ニテ染色シ辨色スルニ際シ酸含有ノ溶液就中酸ノ酒精液ニテ處置セバ毎常核染色ヲ見ルモノナリ。之ニ反シ染色後直チニ水洗セバ核染色ヲ起スコトナシ。然ルニ一度辨色液ニ入レ後、水洗スレバ核染色ハ影響ヲ蒙ルコト甚ダ少ナシ。

F. 染色液中ニ酸ヲ加フルカ又ハ辨色液ニ酸ヲ應用スル場合ニ「グリコゲン」染色ノ程度ハ酸ノ電離度ニ一致セズト雖モ核染色ニアリテハ酸ノ電離度ニ從ヒテ好成績ヲ示スヲ見ル。

G. 「カルミン」ハ「グリコゲン」及ビ核ニ理學的ニ結合スルモノノ間ニ多少差異アリ。「グリコゲン」ハ眞ノ分子ノ溶液ヨリ「カルミン」ガ沈澱スルノミニ由テ染色セラル即チ「グリコゲン」中ニ保存サルル「カルミン」粒子ハ核染色ニ於テ核中ニ存在セルモノニ比シ大ナラザルベカラズ。斯ル大ナル粒子ハ緻密ノ核質中ニ入ル能ハザルガ故ニ核染色ニ於テハ之ヲ更ニ鹽酸酒精ニテ小粒子ノ溶液トシ核質中ニ入ラシムルヲ要スルモノナリ。

本稿ヲ撰スルニ當リ終始御懇篤ナル御指導ヲ辱フシ尙ホ御校閲ノ勞ヲ惜マレザリシ恩師上坂教授ニ衷心謝意ヲ表ス。(2. 12. 7. 受稿)

文 獻

- 1) Best, Über Kurminfärbung des Glykogens und der Kerne, Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie. Bd. 23. 1906.
- 2) Derselbe, Über Glykogen, insbesondere seine Bedeutung bei Entzündung und Eiterung. Ziegler's Beiträge z. path. Anat. u. allg. Path. Bd. 33, S. 585.
- 3) Derselbe, Eine Methode Glykogen durch Lithionkarmin zu färben. Deutsch. med. Wochenschr. Nr. 5, 1902.
- 4) Best-Giessen, Über Glykogen. Verh. d. deutsch. path. Gesch. Bd. 4, S. 108.
- 5) Fränkel, Über Färbung mit Bestsbhem Karmin, speziell zum Nachweis von Fibrin. Virchows Archiv f. path. Anat. Bd. 204, 1911.
- 6) Derselbe, Über Fibrinfärbung mit Bestscher Karminlösung. Mun. med. Wochenschr. Nr. 50, 1906.
- 7) Kōsaka, Über die Färbungsmethode. Nissta-Igaku. Jahrg. 1926.
- 8) Loewenthal, Über eine neue alkoholische Karminlösung. Zeitschr. f. wiss. Mikr. Bd. 19, H. 1.
- 9) Matsuura, Über die Lithionkarminfärbung. Zentralorgan der Otsayama med. Gessellschaft. Nr. 456, 1928.
- 10) Schmidt, Pharmazeutische Chemie. 1919.

*Kurze Inhaltsangabe.***Über die Färbung des Glykogens im tierischen Gewebe.****(2. Mitteilung.)****Über die Karminfärbung des Glykogens, mit Berücksichtigung
des gegenseitigen Verhältnisses der Kernsubstanz und
des Glykogens bei der Färbung.**

Von

Kazue Yuien.

*Aus dem Anatomischen Institut der Universität Okayama.**(Vorstand: Prof. Dr. K. Kōsaka).*

Eingegangen am 7. Dezember 1927.

Zum Zweck der histologischen Glykogenfärbung im tierischen Gewebe wendet man heutzutage hauptsächlich die Bestsche Karminmethode an, da dieses Verfahren für diesen Zweck sehr günstig ist. In Bezug auf die theoretische Erörterung dieses Verfahrens finden sich jedoch kaum irgendwelche Angaben. Daher habe ich mich mit diesem Thema beschäftigt und bin zu den folgenden Ergebnissen gelangt:

A. Da man das Glykogen sowohl mit der Karmin-Salzsäure-Ammonialösung als auch mit der Karmin-Kochsalz-Kalilaugelösung gleich elegant tingieren kann, sind Kalicarbonat, Kalichlorat, Ammonia und Methylalkohol, welche alle bei der Bestschen Glykogenfärbung durchaus notwendig sind, für die Glykogenfärbung an und für sich keine unentbehrlichen Komponenten.

B. Als Differenzierungsmittel bei der Glykogenfärbung leisten auch Methylalkohol, Äthylalkohol, mehrere organische und anorganische Säuren, welche sämtlich Karmin mehr oder weniger aus seiner Lösung fällen, gute Dienste. Sogar die reine Kochsalzlösung (Ca. 20%) dient zu diesem Zweck in völlig guter Weise.

C. Wenn man bei der Glykogenfärbung zu der Farblösung bzw. zum Differenzierungsmittel eine Säure hinzufügt, so lassen sich auf diesem Wege besser dauerhafte Präparate anfertigen. Dies beruht m. E. höchstwahrscheinlich darauf, dass das sich aus dem Objektträger oder aus dem Deckglas befreiende Alkali durch die im Präparat übrig bleibende geringfügige Säuremenge neutralisiert wird und infolge dessen das adsorbierte Karmin sich nicht auflöst, was gerade die Entfärbung verhindert.

D. Legt man den Schnitt gleich nach der Karminfärbung in Wasser, so entweicht der Farbstoff ohne weiteres, sodass keine Glykogenfärbung erhalten wird. Dagegen kann man durch einmalige Differenzierung des Schnittes vor dem Auswaschen in Wasser die Entfärbung mehr oder weniger vermeiden.

E. Falls eine säurehaltige alkoholische Karminlösung statt der Bestschen Farblösung oder ein saures Differenzierungsmittel an Stelle des Bestschen gebraucht wird, so hat dieses Verfahren auch Kernfärbung zur Folge, welche ebenfalls durch Abspülen in Wasser gleich nach der Färbung vesnichtet wird. Selbst eine flüchtige Differenzierung macht jedoch die Karminfärbung der Kerne viel stabiler.

F. Bei der Anwendung einer säurehaltigen Farblösung oder eines sauren Differenzierungsmittels ist der Färbungsgrad des Glykogens der Dissoziationskonstante des Säures nicht proportional im Gegensatz zur Kernfärbung, welche beim Gebrauch einer stärkeren Säure besser ausfällt.

G. Sowohl bei der Glykogenfärbung als auch bei der Kernfärbung verbindet sich das Karmin mit dem Glykogen oder mit der Kernsubstanz nur physikalisch, aber es besteht ein gewisser Unterschied zwischen beiden Färbungsprozessen. Das Glykogen wird ohne weiteres gefärbt, wenn das Karmin aus seiner molekularen Lösung niederschlägt, da das fixierte Glykogen verhältnismässig locker ist und gröbere Karminteilchen in sich aufzunehmen vermag. Dagegen ist die fixierte Kernsubstanz zu dicht, als dass sie die genannten Teilchen in sich aufnehmen könnte. Um das Karmin in die Kernsubstanz eindringen zu lassen, muss man das niederschlagende Karmin wieder in Salzsäurealkohol auflösen, damit die Karminteilchen viel feiner werden.

