

は稀に米の脱穀後糠の中に発見されるのみであつて、上述の如く食用されることはないからこの際問題にはならない。

小麦及び小麦製品は終戦後は全国的に食用に供されているものであるから孰れの地域に於ても検便の際にこの物体が恐らく発見されるものと考えられそれだけに興味あるものと思われるので御報告する次第である。

文 献

- ①A. Kowarski: Klinische Mikroskopie, 1932.
 ②及能謙一: 糞便学, 昭和7年. ③J. Tillmanns und G. Ohnesorge: Praktikum der klinischen chemischen mikroskopischen und bakteriologischen Untersuchungsmethoden. (begründet von A. Kowarski und M. Klopstock) 昭19.

細胞の分離永久標本作製法

昭和30年3月5日受付

信州大学医学部第一解剖学教室

尾持昌次 小島徹 井上智弘

An Improved Method of Manufacturing the Permanent Preparation of Isolated cells.

Shoji OMOCHI, Toru OJIMA and Tomohiro INOUE

Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Shinshu University

We reported in the former issue of this paper a similar method of manufacturing the preparation of all kinds of epithelia. Now we have succeeded in an attempt to manufacture the preparations of various kinds of tissue, i. e. of epithelial (including glandular) tissue, of central nervous tissue, and also of muscular tissue of mammalia and of man.

The procedure of manufacturing the preparations of columnar and ciliated epithelia is similar to that recently reported.

In that procedure glandular tissue, central nervous tissue and muscular tissue are not isolated to each cells. They are put into the Ranvier's one third alcohol and left in it from 30 minutes to days. The time required varies with the sort of tissue (shorter in glandular and longer in muscular tissue). After throwing some glass balls (each 5 mm in diameter) into this fluid, it is shaken with severity. The cells thus isolated are centrifuged and treated in the same procedure that we recently reported. By this new method also the stratum cylindricum of stratified squamous epithelia of an adult frog is isolated in each cells. To take the isolated cells from the stratum corneum or from the stratum germinativum of the abdominal skin of an adult frog, it is immersed in 1% aqueous solution of pancreatin and is kept 1 hour in a thermostat (33°C in degree). After cooling it in a room temperature (ca. 15°C) it is shaken with some glass balls which are thrown in it and is treated in the same method above mentioned.

緒 言

我々は嘗て本誌上に上皮を分離して永久標本作製する方法についての創案を発表した。そしてその際にこの分離法が細胞の無糸核分裂を研究する上に好適のものであることを述べて置いた。その後研究を重ねるにつれてこの方法が細胞の無糸核分裂の研究上必須のものであることを確信するに至つたので、嘗て公表し

た円柱又は絨毛上皮の個々の細胞への分離及び重層扁平上皮の薄膜としての剝離の方法を更に前進せしめて、あらゆる上皮細胞の分離に成功し又中枢神経、筋、腺或は他の臓器の実質を個々の細胞にまで分離したいと努力してある程度の成果を収め得たのでここにその方法を紹介し又嘗て報告した上皮の分離法についての改良術式をも併せて述べ御参考に供したいと思う。

手 技

被検材料は温血、冷血動物いずれでもよく、人（成体及び胎児）、牛、馬、豚、犬、ラット、兎、蛙（成体及びオタマジャクシ）等多岐に亘っている。又組織としては上皮、筋、中枢神経の各組織に亘り、上皮組織では、円柱、線毛、重層又は単層扁平上皮、移行上皮等の各種の上皮、腸腺、肝臓、膵臓等の腺を検べた。筋組織では食道の骨格筋と平滑筋、神経組織では大脳皮質の諸細胞の分離に成功している。以上の各種の組織に対する細胞分離の方法は併し一様ではなく、組織により又器官により難易があるのはもちろんである。手技は大別して三つに分けることができる。即ち

1) 既発表の方法の如く被検材料を単に Ranvier 氏 $\frac{1}{2}$ アルコールの中に一定時間浸してから強く振盪する方法、2) これに更に硝子玉を加えて機械的に分離を促進する方法及び最後に 3) アルコールを使用しないでパンクレアチンによつて分離する方法とである。

最初に挙げた方法は円柱上皮、線毛上皮、移行上皮、単層扁平上皮に対して行つて有効なものであるが、次に最も標準的であるところの腸の円柱上皮の分離法を述べることにする。腸を適當の長さに取り冷血動物ならば0.65%の生理的食塩水、温血動物ならば0.9%のそれによつてよく洗つて腸内容を洗い流すようにする。腸内容はなるべく完全に除去するにつとめる必要がある。でないと分離標本に作つた際に上皮以外の異物が多く混ることゝなつて見苦しい。次に硝子瓶に Ranvier 氏 $\frac{1}{2}$ アルコール（90%エチルアルコール1に蒸留水2を混じたもの）を容れ、これにこの腸片を投入する。我々が用いた硝子瓶の大きさは50ccのもので共栓であるが、厳密にこの通りでなくても瓶の大きさはこれ以上大きくない方が便利である。と云うのは後述する如く、この瓶を手を持つて強く振盪する必要があるのと又その後で遠心沈澱を行うので余りに Ranvier 氏アルコールが多量であつてもこの際に不便であるからである。19~20°C で20分位放置した後、この瓶の栓が抜けないように注意しながら強く振盪する。すると Ranvier 氏アルコールは混濁してくるが、この混濁は始めの間は不均質である。しかししばらく振盪を続けていると均質に混濁するようになる。かよくなれば上皮が畧々個々の細胞にまで分離したのであるから、この混濁液を遠心沈澱器によつて遠心分離する。既発表の方法ではシャーレに盛つた Ranvier 氏アルコールの中で一旦上皮を塊状に分離し、後にこれをシュビツツグラスに移して振盪していたのであるが、この操作を始めから硝子瓶によつて一元化したのが改良点の一つである。

遠心分離には手働式又は電動式の遠心沈澱器を用いた。始めに1500回転位で約20秒間処理して後にその上

澄液だけを再び他のシュビツツグラスに移して1700回転位で1分間遠心分離する。このように遠心沈澱を2回に分つて行うのは上皮が畧々個々の細胞にまで分離はしても尙一部には塊状をなすものが混じるのは避けられないことなので、このような上皮塊をやゝ低速短時間の遠心分離によつて除き、次で上澄液に浮遊する残余の個々の細胞に分離した上皮を遠心沈澱させるのである。遠心沈澱器は電動式でも差支えないが唯回転数は余り多いものは細胞を破壊してうからよろしくない。15000回転で20分間もすると細胞は原形を留めなくなる。遠心分離ができたならば沈澱を残して上澄液を捨てるのであるが、上澄液は必ずしも透明ではなく多少の混濁を示しているのが常である。この際の上澄液は全部捨てないで、沈澱の3~4倍量を残して置いてシュビツツグラスをよく振つて沈澱と上澄液とを再びよく混和する。かくて分離した細胞による適當な濃度の乳濁液ができるからこれに固着液を乳濁液の $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ 量を滴下混和し、既発表の方法でオブゼクトグラスに塗抹する。固着液の製法もまた既発表の通りでよいが、念のため記すと次の通りである。10ccの蒸留水に0.7gのアラビヤゴム末を溶し、5ccのガーゼで濾過した卵白をこれに加えてよく振盪混合させると不透明な液になる。これを脱脂綿で濾すと透明な液となり、これで固着液はでき上る。夏期にはこれにチモールの小塊を加えて腐敗を防止している。

固着液の新鮮度は分離永久標本作製上非常に重要な意義があるから注意しなければならぬ。即ち固着液は製造当初には透明で淡黄色を呈している日が経つに従つて白い沈澱が生じ遂には全体として白濁する。この白い沈澱が多少生じても液が尙黄色で透明な間は用に堪えるが、白濁すれば駄目である。但し用に堪えても製造後は日と共に粘度が減じるから分離細胞をオブゼクトグラスに固着する能力はあつても、分離した細胞を一定の間隔に保つ力は減つてくる。即ち折角うまく細胞を分離してもこのように変性した固着液を加えると却つて分離した細胞が凝集する虞がある。又古くなつた固着液を用いるとヘマトキシリンで共染して汚れ易くなり、時としては水洗に際して剥れてしまう。之を要するに固着液はなるべく新鮮なもの（室温20°Cで1週間以内）を使用する必要がある。

塗抹し終つた標本はアルコール分を含んでいるので、すぐに乾燥する傾向がある。乾燥すれば予め用意した Zenker 氏液に10分間浸して再固定するか又は純メチルアルコールで一時間固定する。そしてその後は型の如く処理しヘマトキシリン単染色をするか、ヘマトキシリンとエオジンによる複染色を施し、アルコール列により順次脱水してキシロールを経てバルサムに封じて永久標本とする。

以上は腸の絨毛部の円柱上皮を分離永久標本とする方法であるが、腸陰窩の上皮を剝離して個々の細胞にまで分離するには Ranvier 氏アルコール中により長時間（1昼夜迄）放置する必要がある。同様に気管の線毛上皮では2～3時間、膀胱の移行上皮でも陥凹部（陰窩）まで完全に分離するには1昼夜（陰窩以外ならば1時間位）Ranvier 氏アルコールに浸して置く。このように Ranvier 氏アルコールに浸す時間は上皮の種類により又陰窩のような陥凹部迄も完全に剝離する必要があるか否かによつて相当の差があるが、その後の操作は上述したところと全く同様である。

第二の分離法は Ranvier 氏アルコールに浸して後に硝子玉をこれに加えて振盪するものであるが、この方法を必要とするのは重層扁平上皮、腺、筋及び脳である。この中では重層扁平上皮が分離には困難で従つてやゝ複雑な手技を必要とするが、腺とか筋或は脳は比較的簡単である。それで先ずこの簡単なものから述べる。肝臓、脾臓又は大唾液腺を3mm 立方位に切りとつて Ranvier 氏アルコールに浸す。約30分位してからこの瓶に直径約5mm の硝子玉5個位を入れて瓶（容量約50cc）の栓をして強く振盪し続ける。すると液は上述の円柱上皮の分離の場合と同様に均等に混濁するようになる。この際に腺の支質の結合組織は細糸状になつて沈澱するから、これを除いてからその後は円柱上皮の場合と同様に処理すればよい。重層扁平上皮を分離するには犬の食道の場合にはこれを縦に開いて粘膜下組織のところを剝離、Ranvier 氏アルコールに2日間浸す。次にメスを用いて上皮の表面をこそげる。と上皮は径1mm位の塊として剝げ落ちるから、これらの上皮塊を50ccの硝子瓶に用意した別の Ranvier 氏アルコール中に入れこれに硝子玉約25個を加えて強く振盪するのである。そしてこれを前述の円柱上皮の分離法と同様に予め低速回転の遠心沈澱によつて分離不完全な上皮塊を去り、その上澄液を2000回5分間位の遠心沈澱を行うのである。これより後の操作は上述したところと何等異らない。筋については人胎児の食道を材料としてよい結果を収め得たが、その方法は上述の腺細胞の分離と似ていて簡単である。唯 Ranvier 氏アルコールに浸す時間が長くて2日間位を要することゝ、硝子玉も25個位加える点が異つている。

蛙の腹皮に於ける重層扁平上皮はこの方法のみではその全層を分離することはできない。Ranvier 氏アルコールに2日間浸した腹皮を硝子玉25個と共に強く振盪することにより基底層にある圓柱形の細胞は分離するが、それより表層のものは依然として膜状のまま残つているから、このような膜状の上皮塊は茶漉のようなもので濾過して濾液だけを遠心沈澱するのである。表層の細胞は後述のパンクレアチン法によつて分離す

る。同じ重層扁平上皮でも蛙の角膜は食道と異りやゝ剝れたり分離したりし易いから、食道と同じように2日間 Ranvier 氏アルコールに浸して後に角膜上皮を上になるように角膜をオブジェクトグラスの上に置き針を用いて角膜上皮を宛も切り刻むようにすると上皮は小塊となつてポロポロと液の中に剝れ落ちてくる。この小塊を更に針で軽くたゞくようにすれば上皮は個々の細胞に分離する。但しオタマジャクシでは腹皮でも角膜でも Ranvier 氏アルコールに1時間浸して後に上述の要領で針でこそげれば上皮が個々の細胞に分離してしまう。その後の操作は上述したところと何等異らない。

第三の方法即ちパンクレアチンを使用する方法は上述の二つの方法ではどうしても分離し難い蛙の腹皮の重層扁平上皮の一部に応用したものである。即ち Ranvier 氏アルコールに浸して後硝子玉を入れて強く振盪しても尚膜状に残る部分の分離に用いたのである。これには新鮮な蛙の腹皮に予めつくつたパンクレアチンの1%水溶液を注ぎ33°Cの恒温器に1時間入れて置く。次にこれを容器のまま、即ちパンクレアチンに浸したまま15°Cの水により1時間冷却する。この頃には表層の上皮は膜状をなして剝れているから、その上皮だけをそつと別の容器に移し硝子玉25個と共に強く振盪すると表層の上皮が個々の細胞に分離するのである。これより後の操作は全く前述したところと同様である。

結 語

以上の如く我々は種々の方法を用いて色々の組織を個々の細胞にまで分離し、これを永久標本に作製して細胞増殖の研究に用いているのであるが、この方法は学生実習用の標本の作製にも役立つ。又この分離法乃至はその後の操作についてもまだまだ改良すべき点が残つているから今後この方面にも大いに力を致したいと思つている次第である。

文 献

尾持昌次、小島 徹、井上智弘：我等の分離上皮永久標本作製法、信州医学雑誌、1、1、1952。