

我等の分離上皮永久標本作製法

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

A Method of Manufacturing the Permanent Preparation of Isolated and Detached Epithelia

Shoji Omochi Toru Ojima Tomohiro Inoue

The 1st Anatomical Department, Medical Faculty, Shinshu Univ.

The present authors have succeeded in manufacturing permanent preparations from those of temporary separated columnar epithelia of the intestine, those of ciliated epithelia of the palate, and also from those of temporary thin membrane of stratified squamous epithelia of the abdominal skin, of an adult frog.

A piece of intestine is put into the Ranvier's one third alcohol and make it remain 30-50 minutes in this alcohol and columnar epithelia thus separated are mixed with Ranvier's alcohol and centrifuged. To the centrifuged a drop of adhesive fluid (0.7g Gummi arabicum are solved in 10cc distilled water, to this solution 5g filtered egg white is added and mixed) is added and mixed perfectly. This mixture is painted in thin layer on an object glass, as it occurs in the manufacture of blood-cell preparation, and after it has dried up, it is stained with hematoxylin and eosin. The procedure after the staining is the same as that of making some other usual preparations.

The ciliated epithelia also can be separated, but it needs a piece of palate to remain for a longer time in the Ranvier's alcohol.

The abdominal skin which has been left in the Ranvier's alcohol for 3-5 hours may allow its thin membrane of stratified squamous epithelia to be stripped off from it. Thus detached epithelial layer is treated as celloidin section and stained.

緒 言

組織或は細胞の構造について研究するには従来から、そして現在でも専らこれを甚だ薄い切片に作製し、染色している様である。切片につくるにはセロイデン又はパラフィンに包埋する方法と、炭酸ガスにより氷結してそのまま切る方法とがある。セロイデン又はパラフィンをを用いる方法では氷結法によるよりは薄く切れる利点はあるが、その操作中に標本をアルコール又はキシロールの中に浸さねばならないので脂肪の様なものは溶出して了つて検べることが出来ない欠点がある。氷結法はアルコール等の薬品を用いないから脂肪は組織内にそのまま残つて都合がよいが薄く切ることの出来ない欠点がある。パラフィン包埋とセロイデン包埋の両法を比較すると、パラフィン包埋法は熟練すれば2-3 μ の薄さに切ることができて細胞学的検索には便利であるが、ともすれば組織を収縮又は圧損させる欠点がある。セロイデン法はパラフィン法の様には薄くは切れないがこの様な欠点は少い。

以上の様にパラフィン法によれば相当薄い切片ができるので細胞学的の研究には専らこの方法が用

いられている。しかしこのパラフィン法によつても例えば円柱上皮の様な細長い細胞が密集している組織では相隣る細胞の核と核とが互に重り合つて細胞体とそれに所属する核とを判然と区別し得ないことが多い。いずれにしてもこの様な切片法で見られるものは細胞の断面像であるから、細胞そのものの全形を知るには好都合ではない。細胞の全形を知るのに便利なのは細胞の分離法である。この分離法にも色々あるが、アルコールを用いて簡単に行うことが出来る。しかし斯様にして分離した細胞はそのまゝ染色しないで、又はカルミン等で染色しても單に一時的の標本として観察するに止り、これをヘマトキシリン・エオジン重複染色による永久標本としてその後の研究の爲に保存する法が無かつた様である。私達は細胞の核分裂についての研究に際し、この分離法を応用して円柱上皮、絨毛上皮の完全な分離組織の永久標本化に成功し、尙又重層扁平上皮については細胞集団の剝離をすることができたので、こゝにその方法を紹介し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いが、こゝには主として實驗に用いた蛙についての手技を述べる。円柱上皮の分離標本をつくる爲には成熟トノサマガエルの腸を用いたが、これには長さ3~4cmに腸を切り取り0.65%の生理的食塩水でよく洗い、食塩水中で鉗を用いて縦に切り開く。この様にした腸の断片を食塩水中で静かに振り動かすことによつて腸内容をできるだけとり除く様にする。腸内容はなるべく完全に除去する様に努めるがよい。何となれば腸内容が残っていると分離標本に上皮以外の夾雑物が多く混じることとなるからである。次にシャーレにRanvier氏三分の一アルコール(80%エチルアルコール1に蒸溜水2を混じたもの)をとりこの中に腸片を投入する。室温(19~20°C)ならば30~50分もすると上皮は分離する。これを知るにはピンセットによつて腸片を液中で振り動かして見ると細粉状に上皮はこぼれ落ちて液は混濁する。上皮が完全に脱落したことは今までで白く見えた腸片が半透明になることによつて知ることができる。この様になれば腸片には上皮は残っていないから取り捨て、脱落した上皮によつて混濁した分離液をシユピツググラスに容れて強く振盪する。分離液には最初は大小種々の脱落した上皮集団が混じているから肉眼的にも不均質に見えるが、振盪を重ねることによつて均質に混濁する様になる。この操作によつて上皮が始めて單獨の細胞に分離するのであるから、これを入念に行はないと後に標本が出来上つてから分離不完全な上皮集団を混じて都合が悪いから特に注意を要する。この様に均質に見える液を遠心沈澱器によつて遠心分離するのであるが、私達は手動式の遠心沈澱器を普通の速さで20~30秒廻すことによつてよい結果を

得た。回轉速度が余りに速いと細胞が破壊して下う。既に1500回轉20分間で細胞は原形を留めない。

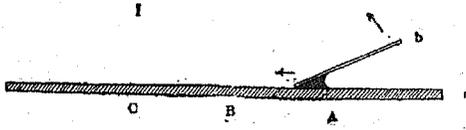
遠心分離が出来たならば、沈澱を残して上澄液を捨てるのであるが、上澄液は必ずしも透明ではない。多少の混濁はあつても差支えない。この際上澄液は全部捨てないで沈澱の3~4倍量を残して置く。そしてシユピツググラスをよく振つて沈澱と上澄液とを再びよく混和する。斯くて分離した細胞による適当な濃度の乳独液が出来る。次にこの液に細胞をオブゼクトグラスに固着させる爲の薬剤を混合するのであるが、これは著者の一人小島の創案になるもので次の處方によつてゐる。

処 方

10ccの蒸溜水に0.7gのアラビヤゴム末を溶し、5ccのガーゼで濾した卵白をこれに加えてよく振盪混合させるすると不透明な液になるから、これを更に脱脂綿で濾すと透明な液を得る。

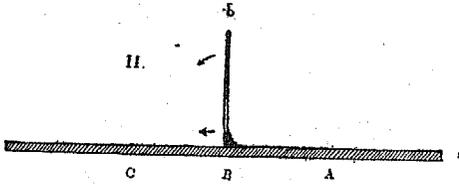
上記の固着液を時計ガラスに1/2滴入れてこれに前述の細胞乳独液を注ぎよく混和する。次にこれをオブゼクトグラスに塗抹するのであるがその方法は血液標本をつくる手法でもよい。しかしこの乳独液は血液よりも粘性が少ないので、血液塗抹の方法では標本の一端に細胞が密集して重なり合うのでこの部分の観察不可能になる反面、肝腎の標本には細胞がごく疎にしか塗れない缺点がある。そこで次の手法を案出して好成績を収めた。

即ち今第一図でオブゼクトグラスのA点からC点まで液を塗抹するとすればA点では通常の血液塗抹の場合と同じく液はカバーグラスの下面にあるが、カバーグラスの進行につれて第一図IIのB点では略直立しIIIのC点では逆に液面は上になる様にこれを廻轉させ



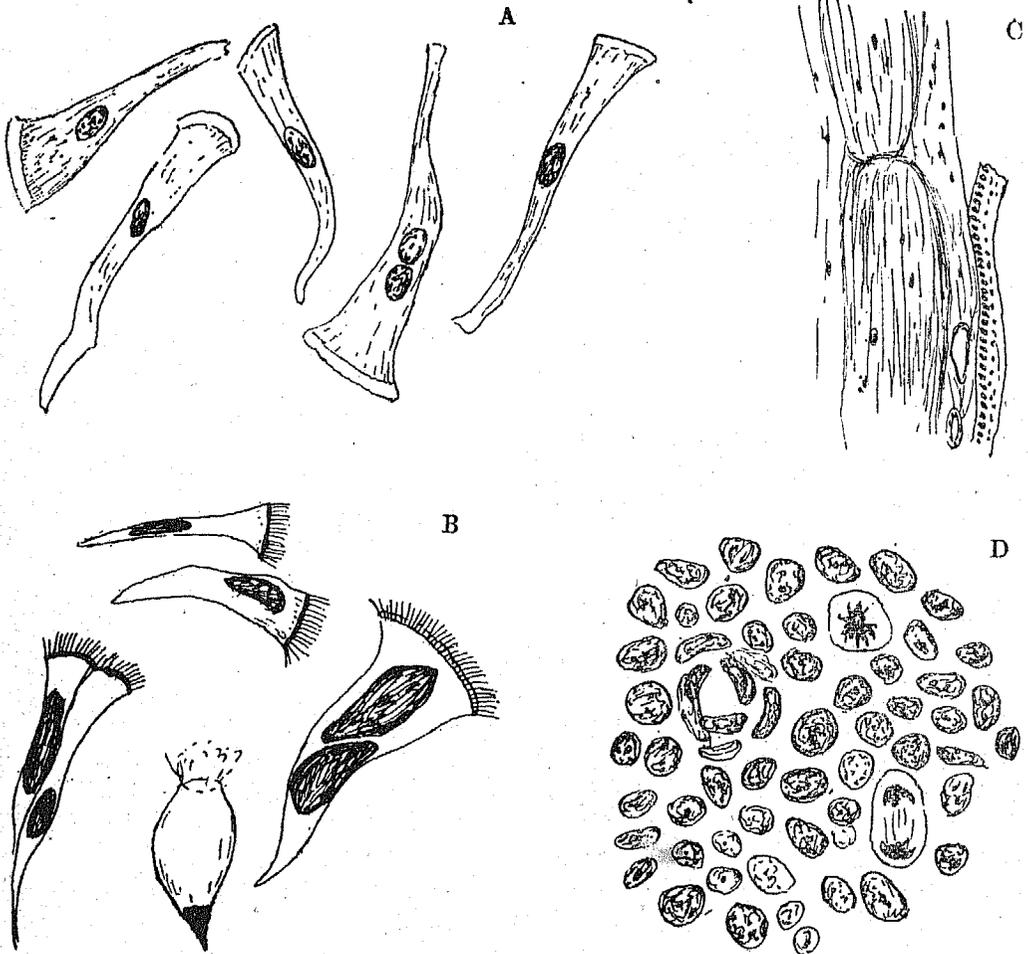
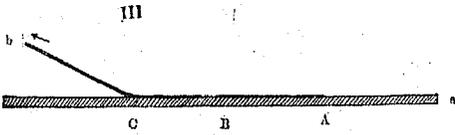
第1図 分離上皮の塗抹法

- a: オブゼクトグラス
- b: カバーグラス



第2図 分離又は剝離した上皮

- A: 円柱上皮
- B: 繊毛上皮 (杯細胞を含む)
- C: 重層扁平上皮が結合組織から剝離する有様を示す切片標本
- D: 剝離した重層扁平上皮の平面観; 有糸核分裂を認める



てC点でカバーガラスはオブゼクトガラスから離れる。C点ではもう液が殆ど残らない位に液量を加減するとよい。この様にすれば乳独液中に含まれた細胞が均等に且適當な密度でオブゼクトガラスに塗染される。尙オブゼクトガラスには脂肪がついていない程度の清浄なものが必要である。

塗染し終つた標本は液にアルコール分を含むので直ちに乾燥する傾向が強いが、一通り乾燥すれば直ぐに予め用意した Zenker 氏液に 10 分間浸して再固定し、これから後は型の如くに脱昇汞、脱ヨード、ヘマトキシリン染色（及びエオジン重複染色）を施して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。（第二図A, B）絨毛上皮の分離標本をつくるのも原則的には上述したのと異なる。唯 Ranvier 氏アルコール中に置くに要する時間が甚だ永く 24 時間もしないと完全分離に迄至らない。これは材料とする口蓋や食道の粘膜に余りに多くの粘液が附着している爲かも知れない。

重層扁平上皮についてはオタマジャクシの腹皮を 1 時間位（室温 19~20°C）Ranvier 氏三分の一アルコールに浸すことによりやゝ不完全ではあるが個々の細胞

に分離することに成功したが、成体では個々の細胞に分離する迄には至っていない。しかし成体の腹皮を室温で 3~5 時間 Ranvier 氏三分の一アルコールに浸すと重層扁平上皮の層が下層の結合組織から膜状に剝離する（第二図C）。但しこの剝離は自然に容易に行われるのではないから人為的に工夫をしなければならぬ。即ち上述の時間経つたならば、腹皮の表面に略上皮層と思われるだけの深さにメスで割を入れて、2 の割面にメスを差し込んで Ranvier 氏アルコール中に於て枇杷の果実の皮を剥ぐ様に上皮層を剥ぐのである。もちろんこの際静かに慎重にしないと上皮層が破れる虞がある。余りに剝離に困難を感じる様であれば Ranvier 氏アルコールへ浸す時間が未だ足りない証據であるから再びアルコール中に戻して 1~2 時間後に再び試みるとよい。剝離した上皮層は 10% Formol で固定し 1 日以上後 Zenker 氏液で再固定（約 2 時間）したが、Zenker 氏液による再固定は省略してもよい。これより後は氷結切片又はツエロイゲン切片と同様の取扱によつて脱昇汞、脱ヨード、染色、脱水操作を施せば上皮層の永久染色標本ができて上る。

結 語

個々に分離した円柱上皮、絨毛上皮については第二図 A, B, 層状に剝離した重層扁平上皮は第二図 C に示す様な永久標本につくられる。円柱上皮、絨毛上皮について細胞の全形を知るに便なることは言う迄もなこが、通常の切片標本では今こゝに一つの核が見えたとしても果していづれの細胞に所属する核であるかは何分切片は余程薄く上手に作られたとしても細胞体及び核断面像である爲に或は多少厚い切片では核と細胞体との関係が不明瞭な爲に判然としないことがあつた。故に例えば二個の核が近接して宛も一個の細胞が二個の核を有している様に見えても、この二個の核が眞に一個の細胞に属しているのか、或は重なつた他の細胞の核が見えて見かけ上この様に見えているのかさえ判然と区別し得ない場合が多々あつたのであるが、私達の分離標本によればこの虞は全くなく図の如く二核又は直接分裂の像さえも明瞭に個々の細胞の外形と共に認めることができる。

剝離した重層扁平上皮は層状になつていて、個々の細胞には分離していないから個々の細胞の形の研究には不向であるが、私達はこれを核分裂数の計測に利用して甚だ便益をえている。元來蛙の腹皮には皮下結合組織の中に結合組織性の色素細胞があるので、腹皮そのまゝではこの色素細胞が邪魔になつて上皮の核がよく見えないことが多い。著者の一人尾持が嘗てトノサマガエルやガマのオタマジャクシの角膜上皮について核分裂数に関する研究をしたのも、角膜には色素細胞がないからこの部位を選んだのに外ならない。然るにこの分離法によれば上皮層だけが剝離されて色素細胞は附着して来ないから角膜上皮に於けると同等又はそれ以上のよい条件で上皮細胞の核を研究することができの

る。尙核分裂数の研究は通常の切片標本に於ても行うこともできるが、切片標本では有糸核分裂像を断面として見るのであるから時としてはその分裂の時期の決定に多大の困難を感じることもある。然るに重層扁平上皮では有糸核分裂は主として最下層の胚芽層で行われるから、これを全体標本（即ち細胞を切断しない全体のまゝ）で観察することは核分裂の時期の決定に甚だ有利であるのみでなく、細胞総数との比を求める場合にも誤謬が少くて正確な数値を得ることができるのである。

以上の如く私達の分離上皮永久標本作製法は細胞の形若くは少くともそれらの細胞と核との関係、核及び細胞の分裂の状態を研究する上に非常に有意義であらうと思つている次第である。小島によつて確かめられたところでは分離された円柱上皮及び絨毛上皮細胞の核の大きさは本來の大きさ即ち0.65%の生理的食塩水中に於けるそれと分離永久標本に於けるそれと大差がないが、このことも附言する価値があると信じている。

出血性胃潰瘍に対する決定的療法

John D. Stewart, Irving Rudman, and Harry W. Hale
Ann. Surg. 132: 681~689, 1950.

著者等は過去四年間に、急激に、而も大量の出血を來した胃十二指腸潰瘍65例を基礎とし、持に手術的治療を加えた連続50例に就て、二、三の統計的觀察を試みると共に、出血直後の輸血と胃切除の価値に就て論じている。

即ち入院と共に直ちに大量（3000~4000cc）の輸血を行ひ、術中血圧の下降等も認めず、50例中40例に胃の80%を切除すると云ふ標準胃切除術を施行し、2例の死亡を経験している。この数字は以前著者等が非観血的に治療した症例（42例中死亡9例…21.4%）に比すれば遙かに良好であり、而も出血は勿論のこと、潰瘍に対しても根治的なものとなる手術的療法を推賞している。

本症患者の死因はAnoxiaであるから、大量の血液を補給すべきで、例へば、手術に關聯して3900cc位の血液を補給しても、赤血球数、循環赤血球数、或は血漿蛋白等は未だ健康体にまでは恢復してないので、實際はより多くの補血を必要とするものであらうと述べている。

（信大丸田外科 布施抄）