

魚類組織切片のヘマトキシリン・エオシン染色に対する ブアン液による固定条件の影響

¹ 小川智史 ² 佐藤 将 ² 兵藤則行 ³ 中村 将 ^{1, 4, 5} 平井俊朗

¹ 帝京科学大学生命環境学部生命科学科 ² 新潟県内水面水産試験場 ³ 沖縄美ら島財団総合研究センター
⁴ 岩手大学農学部食料生産環境学科 ⁵ 岩手大学三陸水産研究センター

Influence of fixation conditions with Bouin's solution on hematoxylin
and eosin staining of fish tissue sections.

¹ Satoshi OGAWA ² Shoh SATO ² Noriyuki HYODO
³ Masaru NAKAMURA ^{1, 4, 5} Toshiaki HIRAI

Keywords : Koi carp, ovary, Bouin's fixative, hematoxylin and eosin staining, over-fixation

1. はじめに

生物学におけるもっとも基本的な組織・細胞レベルの構造観察手技として組織切片法がある。この方法では組織を薄切した後にスライドガラス上で伸展し、観察に適した染色法を施すのが一般的である。生物試料の分析では保存条件の違いによって分析結果に大きな差異を生じることがあるため、導かれる結論に影響する危険性がある。したがって、試料採取から分析までの間に起こる自己消化や腐敗等の変性を最小限に留めることが重要であり、そのためにそれぞれの分析法に適した保存方法がとられている。組織切片法においては、(組織)固定と呼ばれる保存方法がとられることが一般的である。固定では、生体より採取した組織試料に固定液を浸透させ、細胞内の生化学反応を速やかに停止させることにより、生体内での状況に近い状態の保持を目指す。そのため固定液には、化学的架橋形成や析出によって、内在性の蛋白質分解酵素や組織に混在する腐敗菌の不活性化、組織構造の安定化をもたらす化合物が用いられる。また、これらの薬剤を可能な限り迅速に観察対象に到達させるため、血管を介して固定液を灌流したり、組織片を細切するといった方法もとられている¹⁾。さらに組織片から溶出される水分などによる固定液の成分組成変化を最低限に留め固定処理を安定的に進行させるために、固定操作中に穏やかに振とうしたり、通常組織片の体積に対して50～100倍といった十分量の固定液を使用することが望ましいとされている¹⁾。一方で、固定液が組織内に十分に浸透して変性が完全に停止された後に

は、固定液は直ちに除かれ、そのまま包埋処置を施すか、長期保存する場合はアルコールなどの保存液へ置換することが望ましいとされている¹⁻⁶⁾。これは変性停止のためにとられる化学処理が過剰となる「過固定 (over-fixation)」と呼ばれる状況に陥ることを防ぐためとされる。過固定になることにより、染色液による染色性や免疫組織化学における抗体の結合性などに影響が及ぶことが知られており、免疫組織化学においては反応性を回復させるための数多くの抗原賦活化処理法が提案されている⁶⁻⁸⁾。しかし、固定条件が組織切片の染色性に及ぼす影響について系統的に調査した例は極めて少ない。

19世紀中頃から約80種類の薬品が固定液の作製に用いられ、数100種類の液が案出された¹⁾。現在、一般的に使用されるものは約20種類ほどであり、ブアン液(飽和ピクリン酸:ホルマリン:酢酸=15:5:1の混合液)はその中でも多用されるものの1つである¹⁻⁵⁾。ブアン液は1897年、フランスの組織学者ポール・アンドレ・ブアン博士によって考案された固定液で^{9, 10)}、組織の収縮がほとんど起きず、脱灰を同時に行う目的で長時間この液の中で放置できるなどの優位性を持っていることから幅広い用途で使用されている¹⁻⁵⁾。古くからヒトをはじめとする哺乳類の組織試料の固定や保存にはホルマリン固定液やパラホルムアルデヒド固定液が多用されてきた^{1, 6)}。しかし、ホルマリンのみの固定液は魚介類など水生生物の組織に対しては不適であり、これは哺乳類組織よりも死後の自己消化速度が速いためであると考えられている^{5, 11)}。一方、ブアン固定

液はホルマリン固定液よりも組織浸透性や自己消化や腐敗などに対する化学的不活性化能が高く、水生生物の組織固定により適していることが経験的に知られているが、通常の浸漬時間（2～24時間）を超えた固定の長期化は過固定による悪影響を招く危険性があると考えられている¹⁵⁾。しかし、野生生物など実験室外での試料採取では固定液中に長時間浸漬せざるをえない状況が多く、試料数が膨大となる調査では固定液中でそのまま長期保存せざるをえない場合がある。

われわれは魚類生殖腺に関する組織学的解析を長年続けており¹²⁾、ヘマトキシリンとエオシンによる二重染色（HE染色）は最も多用する染色手技である。HE染色はヘマトキシリンから生じた塩基性色素（ヘマトキシリン自体はわずかに負に荷電した色素であるが、酸化してヘマトニンとなり、アルミニウム、鉄、水銀イオン等と強く結合すると陽性に荷電した「ヘマトニン-金属レーキ」となりこれが色素として利用される¹³⁻¹⁵⁾）で核などを染色し、酸性色素であるエオシンで対比染色を施すことにより細胞および組織構造の全体像を容易に把握することができるようになる。そのため、昔から病理診断等の最初の診断過程としても実施され、現在も一般染色の主流となっている。われわれはこれまでの研究において、ブアン固定液内で長期保存された組織試料の組織学的分析を多く行ってきた。その中で卵母細胞質などいくつかの組織学的所見が保存期間とともに変化することを経験している。これらの変化は細胞形、核内構造、組織構築などの観察にはあまり支障をきたさないが、染色性を根拠とした組織内に含まれる物質の組成評価には大きな影響を与えてしまうことがある。そこで本研究では、過固定の影響が明瞭に出る周辺仁期卵母細胞を多く含むコイ卵巣組織を用いて、ブアン固定液の固定条件（固定時間、対組織量比、pH）を系統的に変化させることで、過固定がHE染色に及ぼす影響について調査し、長期保存による組織像への影響が出にくい固定方法の検討を行なった。

2. 材料と方法

生命倫理についての配慮

実験動物の飼育ならびに屠殺に際しては、本学動物実験指針ならびに関係法令に準拠して、生命倫理に配慮した。

供試魚

新潟県内水面水産試験場にて生産されたニシキゴイ遺伝的全雌（XX）群を使用した。これらの魚を本学の水生生物育成室内（25℃恒温室）の水槽にて、12時間明期-12時間暗期の光周期条件下で2年間飼育した。

実験方法

2-フェノキシエタノールによる麻酔後、断頭放血処置によって安楽死させ、開腹した。開腹後、外部形態（色調と卵径）より卵黄形成期以前と判断された卵巣を使用した。消化器系を切除、鰓（うきぶくろ）を切開した後、卵巣を摘出し同程度の大きさになるように分割にして秤量（湿重量 0.3～0.4g）し、3、5、10、20、100倍量（v/w）のブアン固定液に浸漬、室温にて穏やかに振とうした。さらに、pH = 2.0、3.0、4.0、5.0になるように10N水酸化ナトリウム水溶液を添加したブアン固定液を同様に組織片（湿重量 0.2～0.3g）に対して250倍量（v/w）になるように加え、固定操作を行なった。浸漬後3日目、7日目、28日目に各試料の卵巣横断面より厚さが約2mm以内になるように組織片を切り出し（固定後重量 0.02～0.04g）、直ちに常法に従いパラフィン（シグマ社、パラプラスト・プラス）にて包埋した。残りの試料は、対組織量比を維持するように余分な固定液を抜き取り、室温にて次の細切まで保管した。上記、作製されたパラフィンブロック（30個）は2～3μm厚に薄切し、染色条件に差が生じないように全切片を1枚のスライドガラス上に伸展して染色した。染色にはマイヤー・ヘマトキシリン溶液（武藤化学社）と、1%エオシンY溶液（武藤化学社）に0.1%（v/v）になるように酢酸を加えたものを用いた。

3. 結果と考察

魚類卵巣の組織切片では、HE染色によって「周辺仁期」と呼ばれる発達段階の卵母細胞（PnOC）において特徴的に細胞質がヘマトキシリンで好染される。魚類の卵形成過程では、生殖細胞は増殖後ただちに減数分裂へと移行し、減数第一分裂前期で停止し、第一次成長期に入る¹²⁾。PnOCは第一次成長期の後半に相当し、この時期の生殖細胞には雌特有の顕著な形態的变化が生じるため、卵巣分化の重要な形態的指標とされる。この状態で維持された後、成熟へ向けた卵黄形成の開始によって生殖細胞は第二次成長期へと移行してゆく。これら一連の卵成長過程は、卵母細胞自身（内因性）および卵巣外（外因性）

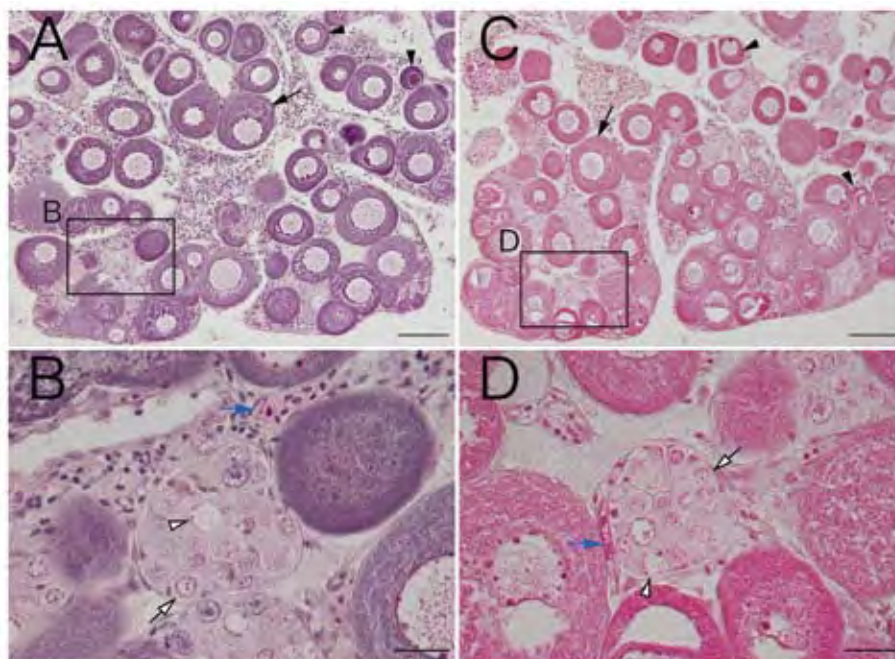


図 1：ブアン固定液の浸漬時間がコイ卵巣の HE 染色像に及ぼす影響

A, B：浸漬 3 日間、C, D：浸漬 28 日間

矢印：周辺二期卵母細胞（後期）、矢じり：周辺二期卵母細胞（前期）、青矢印：赤血球、スケールバー = 100 μ m (A, C)、50 μ m (B, D)

周辺二期卵母細胞は卵原細胞（白矢印）が増殖し細胞巣と呼ばれる細胞集団から分離した細胞である。減数分裂はこの細胞巣内で開始（白矢じり）される。

にて生産される物質の蓄積によって引き起こされてお
り、それに伴って生殖細胞には劇的な形態的变化が
もたらされる。HE 染色では、それらは卵径の増加に
加えて、色調の変化（大まかには青色から赤色の変化）
となって現れることから、使用される 2 種類の染料へ
の染色性は生殖細胞の発達状態をより正確に把握す
るための重要な手がかりとなる。われわれはこれまでの
研究から、卵径からほぼ同じ発達段階と推定され
る生殖細胞においても時として試料間で色調に大きな
差異（赤色化）を経験してきた。この原因として固定
やその後の保存状態が影響している可能性が示唆さ
れるが、これまでのところそれを実際に検証した例は
ない。そこで本研究では、同一個体から採取した試
料を使用することで個体差を排除し、固定および保
存条件による影響のみを抽出しようと考えた。

本研究ではこれまでの経験から、まずブアン固定
液への浸漬時間と固定液量の対組織量比が染色性に
及ぼす影響について検討した。浸漬時間についての
検討では、通常の浸漬時間（3 日間）で固定された
試料では、PnOC は赤紫色から青灰色で観察された
（図 1A, B）。細胞質内のヘマトキシリン染色性は不
均一で、特に卵径約 100 μ m 未満の前期 PnOC にお
いて顕著で、内容物による不均一な集塊形成が観察
された（図 1A）。また、核膜周辺部では、この時期

特有に観察される多数の仁がヘマトキシリンによって
濃染され、核質はエオシンによって薄く染色された。
一方、PnOC 以前の生殖細胞や体細胞では細胞質は
エオシンによって薄く染色され、赤血球では特徴的に
比較的高いエオシン好性が観察された（図 1B）。こ
れに対してブアン液に 28 日間浸漬した組織では、ヘ
マトキシリン染色性の顕著な低下により切片全体が赤
色化し、エオシンによる単染色のような様相を呈し、
過固定による影響と考えられた（図 1C, D）。3 日間浸
漬試料において PnOC に特徴的であった細胞質なら
びに仁でもヘマトキシリン好性は大きく低下してい
たが、残った染色性によってこれらの構造は確認す
ることはできた。しかし、細胞質における比較的高い
エオシン好性により他の細胞との区別が容易であった
赤血球は組織全体の赤色化によって周囲との見分け
がつけづらくなった（図 1B, D 青矢印）。

われわれはこれまでの研究において、ブアン液中
で長期間保存された試料について HE 染色像におけ
る色調の試料間差を経験している。試料採取時の都
合（容器容量と試料の大きさとの兼ね合いなど）に
より、組織量に対する固定液量が少なくなっていた
試料ほど色調の保存性が高いように感じられていた
ため、同一個体から採取した卵巣組織に対して異な
る対組織量比のブアン液を加え、この現象が再現さ

れるかを PnOC の染色性を指標として確認した (図 2)。その結果、組織量に対して 10 倍以上の固定液を添加した場合に時間経過とともにヘマトキシリンに対する染色性の低下 (切片全体が赤色化) が見受けられ、対組織量比が大きいほどその傾向が早い時点から出現した。一方で 5 倍以下の条件では色調の変化はほとんど見受けられなかった。一般に組織固定を実施する際には、固定液の組成変化を少なくするために、組織に対して十分量の固定液を添加することが推奨されている。今回の結果は、対組織量比を少なくすることで生じる固定液の組成変化が過固定を抑制し、むしろ適度な固定状態の維持に寄与している可能性を示唆している。

そこで組織成分によってもたらされる固定液の組成

変化の影響についてさらに検討を行なった。ブアン液の主要成分であるピクリン酸は比較的強い酸 ($pK_a = 0.38, 25^\circ\text{C}$) であり、飽和溶液中でもほぼ完全に電離している。ブアン液は強い酸性度ならびに電離によって生成するピクラーイオンによって蛋白質をはじめとする組織構成成分を凝固させ¹⁶⁾、さらには共存するホルムアルデヒドによって分子間に化学架橋を形成することにより、強い固定作用を発揮する。組織浸漬による酸性度への影響を知るため、まず未使用と対組織量比の小さい状態で組織を長期間浸漬保存 (約 2 年) したブアン液の pH を比較したところ、未使用では 1.6 付近の値であるのに対して、組織保存後では最高で 3.2 であった。次に本研究における対組織量比影響試験 (図 2) の試料について、各試料

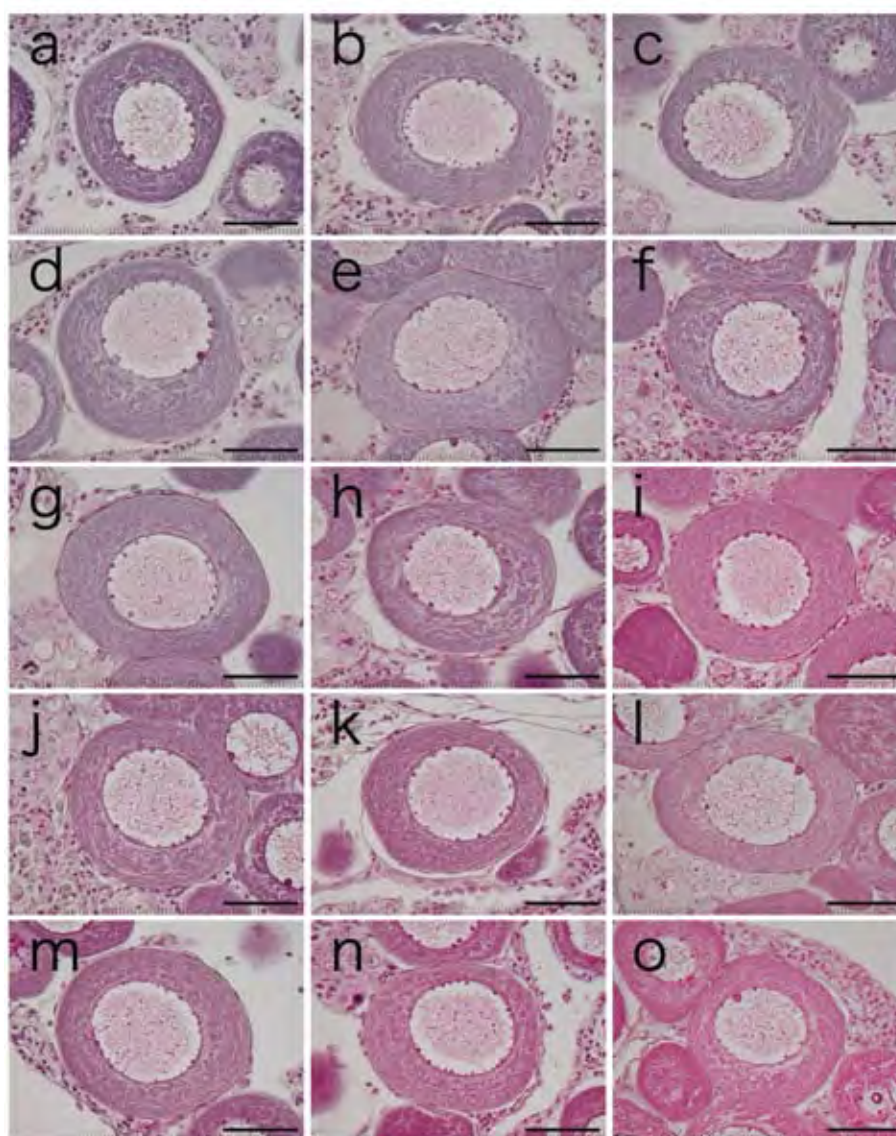


図2: ブアン固定液の対組織量比がコイ周辺仁期卵母細胞のHE染色像に及ぼす影響
 a-c: 3倍量 (v/w)、d-f: 5倍量 (v/w)、g-i: 10倍量 (v/w)、j-l: 20倍量 (v/w)、m-o: 100倍量 (v/w)、
 a, d, g, j, m: 3日間浸漬、b, e, h, k, n: 7日間浸漬、c, f, i, l, o: 28日間浸漬、スケールバー = 50 μm

表 1：組織片に対するブアン液量と pH の関係

ブアン液倍量 (v/w)	3	5	10	20	100
3 日間浸漬 (pH)	3.0	2.5	1.9	1.8	1.6
7 日間浸漬 (pH)	3.0	2.4	1.8	1.6	1.5
28 日間浸漬 (pH)	2.9	2.4	1.8	1.7	1.6

液温 23-25°C

の包埋(固定終了)時における pH を測定したところ、染色性の保持が良好な試料ほど高い傾向が見られ、浸漬 3 日目の時点ではほぼ安定状態になっていることが明らかとなった(表 1)。この中で最も染色性の保持が良好であった 3 倍量区では、予備調査で使用した染色性保持が比較的良好であった長期保存試料と同等の pH 値 (3.0) を示した。

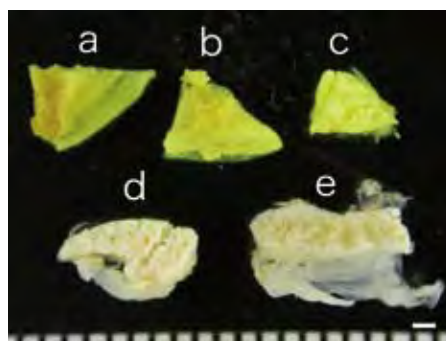


図 3：ブアン固定液の酸性度がピクリン酸の組織定着性及ばす影響

a:pH=1.6、b:pH=2.0、c:pH=3.0、d:pH=4.0、e:pH=5.0、スケールバー = 1mm

ブアン固定液 pH=4.0、pH=5.0 で固定された試料は固定液中では他の pH と差異は認められないが、脱水工程の 99% アルコール中でピクリン酸が完全に溶出し、試料が肌色になっている。

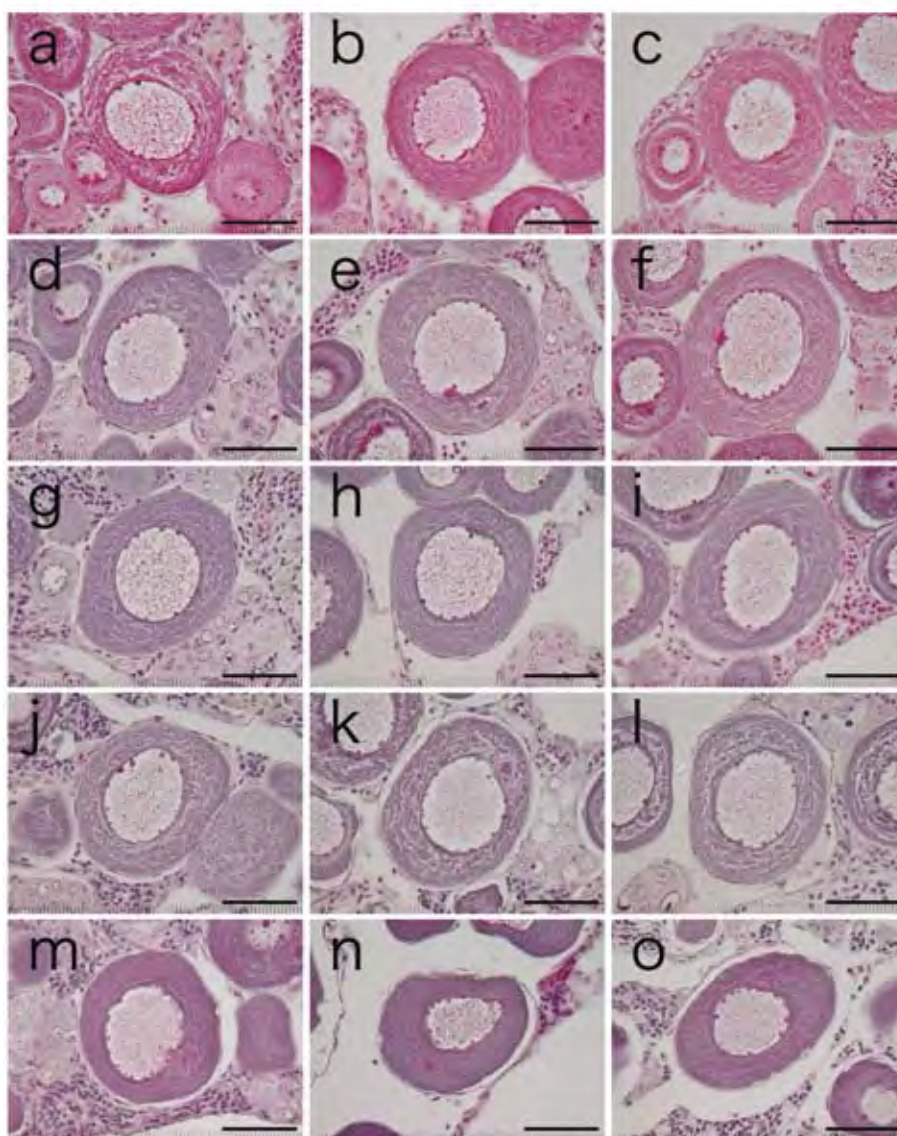


図 4：ブアン固定液の酸性度がコイ周辺仁期卵母細胞の HE 染色像に及ばす影響

a-c:pH=1.6、d-f:pH=2.0、g-i:pH=3.0、j-l:pH=4.0、m-o:pH=5.0、

a, d, g, j, m:3日間浸漬、b, e, h, k, n:7日間浸漬、c, f, i, l, o:28日間浸漬、スケールバー = 50µm

酸性度の低下が過固定の抑制に直接的に関与していることを確認するため、あらかじめ酸性度を段階的に低下させた固定液系列 (pH = 1.6、2.0、3.0、4.0、5.0) を作製し、組織成分による固定液組成変化の影響が出ないように対組織量比 250 倍にて浸漬した。ブアン原液 100mL に 10N 水酸化ナトリウム水溶液を添加して所定の pH に調整したところ、約 6mL 添加したところで pH = 5.0 となった。さらに中和を試みたところ、沈殿が発生して pH = 6.0 に調整することは出来なかった。これは水酸化ナトリウムによる中和によってピクリン酸がナトリウム塩を形成することで溶解

度が低下したことによるものと考えられる。これらの固定液によって得られた組織試料は包埋作業の過程でも明確な差異を生じた。すなわち pH が 4.0 以上では脱水の過程で組織片中からほとんどのピクリン酸が溶出した (図 3)。このことはナトリウム塩の生成により組織内での浸透力や保持力が低下したことによるものと推察される。HE 染色像でも pH 依存的な染色性の変化が明瞭となった (図 4)。原液 (pH = 1.6) では浸漬 3 日目で既に過固定による赤色化が見受けられ、pH = 2.0 でも 28 日目には同様の所見が出現した。これに対して、3.0 以上ではヘマトキシリンの染色性は良好に保持されていた。しかし、pH = 5.0 では細胞の収縮が著しく、固定不良により組織構造の安定化が不足していることがうかがわれた。さらに pH = 4.0 でも弱いながら同様の傾向が見受けられた。一方、ブアン液の純水による段階希釈系列 (原液 ~ 2 倍希釈; 対組織量比 30 ~ 35 倍) を用いて同様の実験を行ったところ、どの希釈率でも原液と同様に過固定の影響がみられたことから (紙面の都合で実験結果は提示せず)、水分による希釈がブアン液の固定作用に与える影響は少ないことが明らかとなった。

以上の結果から、固定作用 (形態の維持) と保存機能 (染色性の維持) を両立できる最適な pH は 3.0 付近と考えられ、先の長期保存試料による予備調査の結果と一致した。

過固定による組織切片 HE 染色像の赤色化の原因をさらに明らかにするために、対組織量比影響試験 (図 5A) ならびに酸性度影響試験 (図 5B) の試料について、ヘマトキシリンまたはエオシンの単独染色による比較を行なった。その結果、PnOC の染色性に対する過固定の影響が強まるに連れて、ヘマトキシリン染色性の低下とともに相反するようにエオシン染色性の上昇が起こっており、良好な染色像が保持された対組織量比 5 倍量以下と pH = 3 ~ 4 では両者のバランスが維持されていることが明らかとなった。このことは HE 染色における 2 つの色素への染色性が組織の固定状態の変化に伴って相互作用しながら変動していることを示唆している。

4. まとめ

組織固定法については実験者の経験的な伝承による部分が多く、本研究では組織学的解析に多用されるブアン固定・HE 染色における過固定の影響について初めて実験的に検証した。従来、組織固定法では強力な作用をもつ固定液によって短時間のうちに組織内の生化学的变化を停止させた後に、速やかに包埋

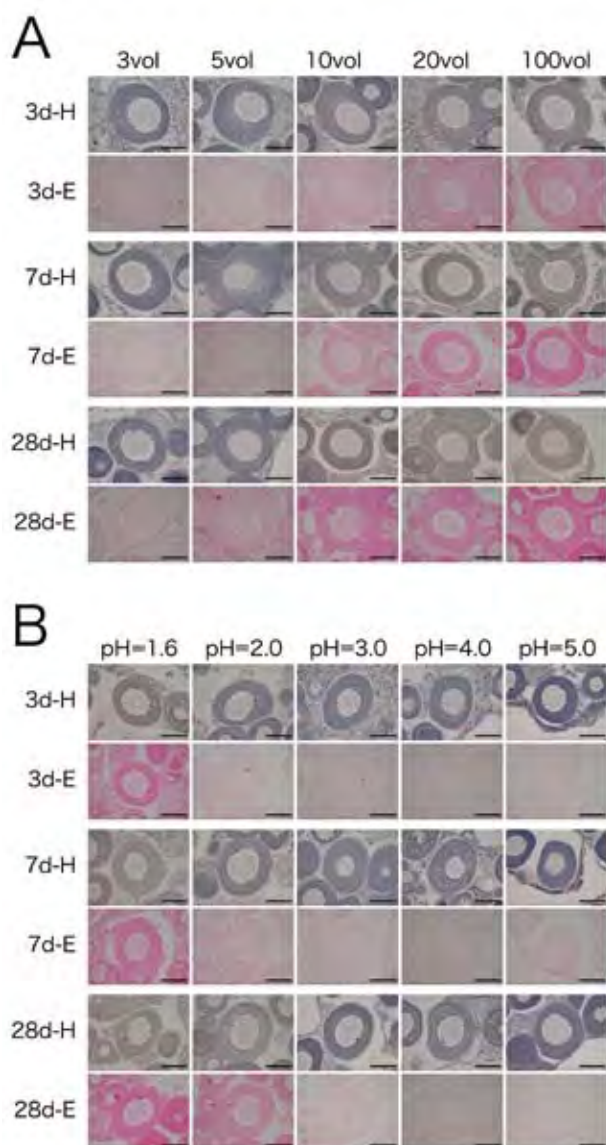


図5: ブアン固定液の対組織量比およびpHの異なる固定液がヘマトキシリンおよびエオシンに対する染色性及ぼす影響

A: 対組織量比、B: pHによる違い
3d-H, 7d-H, 28d-H: 3、7、28日間浸漬;ヘマトキシリン単染色、
3d-E, 7d-E, 28d-E: 3、7、28日間浸漬;エオシン単染色、vol: 倍量 (v/w)、スケールバー = 50µm

して安定化するか、次善策として保存液へ置換することで固定液自身による組織成分の過度の変性を防ぐことが推奨されてきた。しかし、保存液として使用されることの多いアルコールでは長期間の保存により組織収縮等の問題を引き起こす危険性があり⁵⁾、それに伴い蛋白質、脂肪、色素など組織成分の流出がおり、染色像への影響がでることも予想される。一方で、野外調査などでは採取した膨大な試料をすぐに包埋することは困難であり、貴重な試料を固定液中で長期間保存し続ける必要がある。本研究により、魚類組織の固定に対して有効であると考えられてきたブアン固定液がその強力な固定作用ゆえに過固定を起こしやすく、固定液の酸性度がこれらと密接に関係していることが明らかとなった。また、酸性度や対組織量比を適度に調節することにより、過固定による影響を抑えたまま試料状態を長期間良好に維持できることも示された。このことは、魚類組織固定法の最適化のための一助となるものと考えられる。しかし、臓器や生物種の違いによって組織構成成分の組成や特性には差異があり、今回の発見が魚類組織に普遍的に適用できるかについては今後さらなる情報の集積が必要である。さらにHE染色以外の染色法についても検証していく必要があると考える。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、供試魚のご提供ならびに飼育実験の一部にご協力いただいた新潟県内水面水産試験場の職員各位に深く感謝致します。また、ご指導ご助言をいただいた共同研究者の皆様に御礼申し上げます。さらに、供試魚飼育、試料採取等でご助力いただいた本学生命科学科、平井研究室の学生諸子に謝意を表します。

文献リスト

1. 佐野豊：固定．*組織学研究法（理論と術式）*，南山堂，東京，1981，pp. 55-77.
2. F. A. Putt：Tissue fixation. *Manual of histopathological staining methods*, John Wiley & Sons, New York, 1972, pp. 10-21.
3. M. Gabe：Topological fixation. *Histological techniques*, Masson, Paris, 1976, pp. 177-191.
4. 松本明：組織切片の作製法．*ホルモン実験ハンドブック II 各種溶液と顕微標本 日本比較内分必学会編*，学会出版センター，東京，1991，pp. 33-83.
5. D. R. Dietrich and H. O. Krieger：Fish preparation and microdissection of organs. *Histological analysis of endocrine disruptive effects in small laboratory fish*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2009, pp. 301-318.
6. 大谷明夫，鴨志田伸吾，堤寛，長谷川英章，吉村眞一：酵素抗体法の基本．名倉宏，長村義之，堤寛，*改訂四版 渡辺・中根 酵素抗体法*，学際企画，東京，2002，pp. 33-119.
7. 堤寛：抗原賦活法・増感法．*第23回組織細胞化学講習会 組織細胞化学1998 日本組織細胞化学会編*，学際企画，東京，1998，pp. 30-36.
8. 山下修二：抗原の賦活化．*第32回組織細胞化学講習会 組織細胞化学2007（組織細胞化学の基本から先端技術まで）日本組織細胞化学会編*，学際企画，東京，2007，pp. 45-53.
9. A. S. Parkes：Pol Bouin 1870-1962. a memoir. *J. Reprod. Fertil.*, 5, 301-307, 1963.
10. C. Ortiz-Hidalgo：Pol André Bouin, MD (1870-1962) . Bouin's fixative and other contributions to medicine. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 116 (8) , 882-884, 1992.
11. 三輪理：ホルマリンだけでは固定されない．*中央水研ニュース*，(25)，3-5, 2000.
12. 小川智史，佐藤将，兵藤則行，中村将，平井俊朗：ニシキゴイの生殖腺発達過程に関する組織学的観察．*帝京科学大学紀要*，11, 61-75, 2015.
13. 斉藤誠：ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色．*カラー版 染色法のすべて（月刊 Medical Technology 別冊）*，医歯薬出版，東京，1988，pp. 2-7.
14. 山本格士：ヘマトキシリン・エオジン重染色．*新染色法のすべて（月刊 Medical Technology 別冊）*，医歯薬出版，東京，1999，pp. 3-6.
15. 渡辺恒彦，成松一久：ヘマトキシリン・エオジン染色（HE染色）．*病理技術マニュアル3 病理組織標本作製技術 下巻 染色法 日本病理学会編*，医歯薬出版，東京，1985，pp. 35-44.
16. A. M. Bullock：Laboratory methods. R. J. Roberts, *Fish pathology 2nd edn.*, Baillière Tindall, London, 1989, pp. 374-405.