

# ニジマス各臓器のヘマトキシリン・エオシン染色像に対するブアン固定条件の影響

小川智史 飯島啓 柴田安司 中村將 平井俊朗

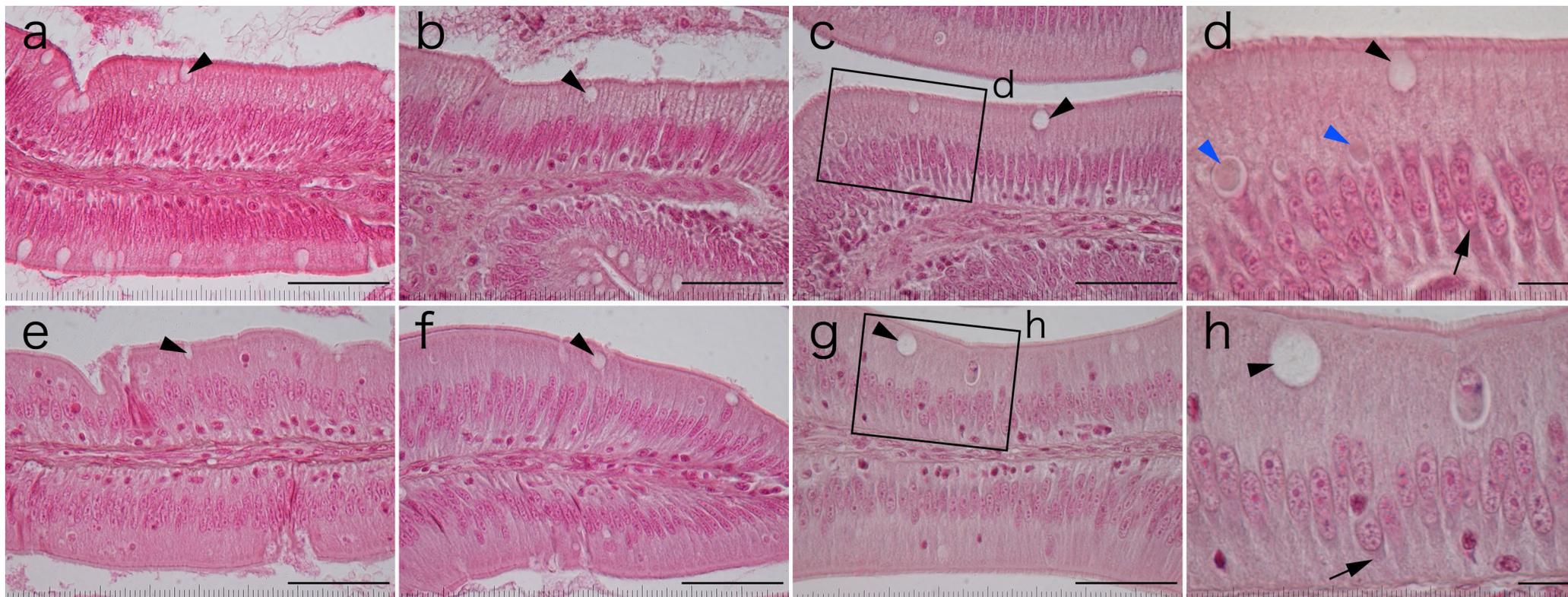
## 補足資料

- ・ 補足 1 : 腸、幽門垂
- ・ 補足 2 : 脾臓
- ・ 補足 3 : 肝臓
- ・ 補足 4 : 心臓
- ・ 補足 5 : 鰓 (えら)

## 補足1. 腸、幽門垂

腸粘膜上皮細胞の微絨毛が密集する頂端部については、元来、エオシン好性であり、構造が特徴的な事もあって、従来液でも光顕レベルの観察には支障がなかった（補足図 S1a-c）。粘膜上皮には粘液細胞が散在し、ところどころで粘液が観察された。粘液は嫌色素性であり、空洞のように観察された（補足図 S1d）。腸後部の上皮細胞の細胞質の核上部にはエオシン好性の構造（supranuclear body）が見られることが知られている<sup>22)</sup>。この構造はpH4液でのみ観察されたが、その染色性は微弱であった（補足図 S1d）。粘膜上皮の基底部には円柱上皮細胞の隙間を埋めるように小型の細胞が基底膜に接して位置していた。この細胞は腸と幽門垂で観察され、胃ではほとんど認められなかった。

幽門垂は胃幽門部から小腸起始部の境界部から指状に突出した盲嚢である。秋吉ら（2003）によると、サケ目の幽門垂は長く本数も多いとされ<sup>37)</sup>、本実験で使用したニジマスにおいても多数の盲嚢が密集した房状の臓器として認められた。組織学的な構造は腸とほぼ同様であった（補足図 S1e-h）。粘膜上皮細胞の核周辺部のヘマトキシン好性は pH4 液のみで認められ、腸よりもさらに薄かった（補足図 S1h）。



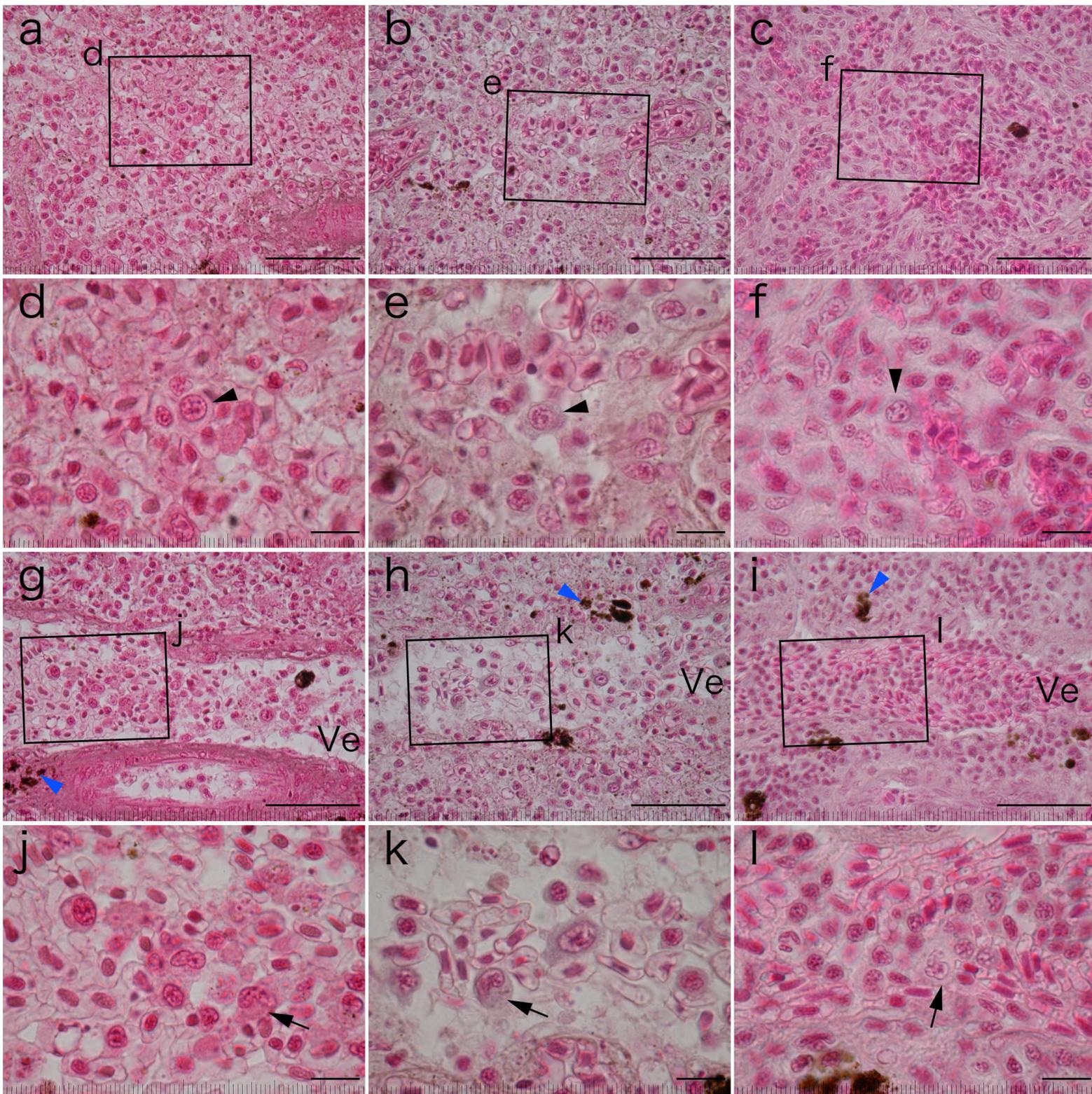
補足図 S1 腸、幽門垂の粘膜上皮

a,e : 従来液、b,f : pH3 液、c,d,g,h : pH4 液、a-d : 腸粘膜上皮、e-h : 幽門垂粘膜上皮、d,h : c,g の拡大像、矢印 : ヘマトキシリン好性の核周辺部、矢じり : 粘液、青矢じり : supranuclear body、スケールバー = 50 $\mu$ m(a-c,e-g)、10 $\mu$ m(d,h)

## 補足2. 脾臓

血球の形態学的分類は血液学、免疫学等の基本的な手法の一つである。その基準となる形態的特徴には、核の形状、細胞の大きさや細胞質に含まれる顆粒の大きさ等があり、それらの各種染色性もまた重要な情報源となる。血球の形態学的観察は、末梢血が対象となることが多く、塗抹法によって行われることが多い。一方で、病理研究などで造血器の組織観察が場合、組織切片法が利用されることもあるが、血球観察の場合は簡便な組織スタンプ法などが使用されることが多い。ブアン液を含め、汎用固定液による組織切片では、風乾など簡易固定法を使用する塗抹標本との間で染色像に大きな差異が生じるため比較が難しい。特に、ブアン液はこの傾向が強いため、形態的保持能が高いにもかかわらず、血球の観察にはあまり使用されず、組織切片における血球観察についてはあまり記述が多くないのが現状である。

本研究において、従来液では赤色単色化により、血球間の差異が確認できなかった（補足図S2a, d, g, j）が、pH3液とpH4液では、エオシン染色性の低下とヘマトキシリン染色性の増加によってエオシン嫌色素性の血球、ヘマトキシリン好性の血球も分別できるようになった（補足図S2b, c, e, f, h, i, k, l）。濃赤を示すのは赤血球であるが、一方で完全に脱色された無色の赤血球も多く観察された。ヘマトキシリン好性（青藍色）細胞はpH4液よりもpH3液で強く染色される傾向があった（補足図S2e, f, k, l）。脾臓切片内に黄褐色の顆粒がしばしば認められたが、これは老化した赤血球の崩壊過程で生じるヘモジデリン（血鉄素）と考えられ、固定液pHに関係なく同様に検出された<sup>28)</sup>。



補足図 S2 脾臓

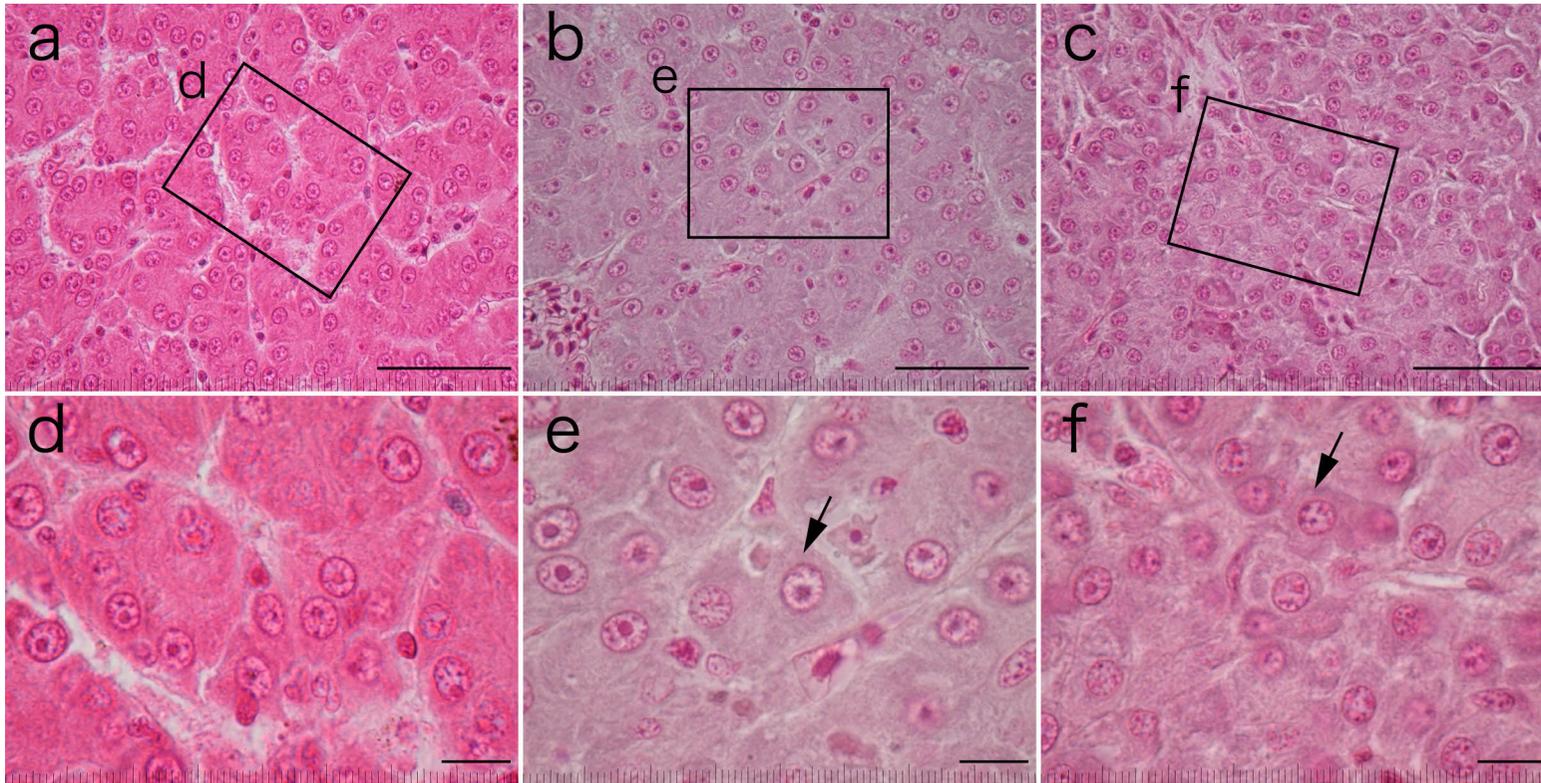
a,d,g,j : 従来液、 b,e,h,k : pH3 液、 c,f,i,l : pH4 液、 a-f : 脾臓実質内の血球、 g-l : 血管内の血球、 矢印 : 脾臓実質内のヘマトキシリン好性細胞、 矢印 : 血管内のヘマトキシリン好性細胞、 青矢じり : ヘモジデリン、 スケールバー = 50 $\mu$ m(a-c,g-i)、 10 $\mu$ m(d-f,j-l)

### 補足3. 肝臓

従来液では過固定による色調の赤色単色化が著しく（補足図 S3a, d）、pH3 液、pH4 液では組織構築の確認が容易になった（補足図 S3b, c, e, f）。

肝細胞は生体内物質代謝の中核（胆汁分泌、タンパク質や脂質、炭水化物の異化および同化、蓄積、解毒、造血、抗体産生など）を担っている。細胞質には脂肪やグリコーゲンを比較的多量に含んでいる場合があるため、通常のパラフィン切片を用いた概観標本には細胞質に空胞様構造として認められ、その割合は魚種や生理状態によっても大きく異なっている<sup>29,38)</sup>。そのため、肝細胞の組織像は、生体内物質代謝の状態を反映して変化することが知られており、例えば、卵形成に連動して核、仁の肥大化などが起こることが知られている<sup>39,40)</sup>。

本研究では、雄ニジマスの肝臓を観察に供したため、肝細胞の細胞質には空胞様構造は観察されず、ほとんどが実質で、肝細胞の大きさや形状に個体差は認められなかった。

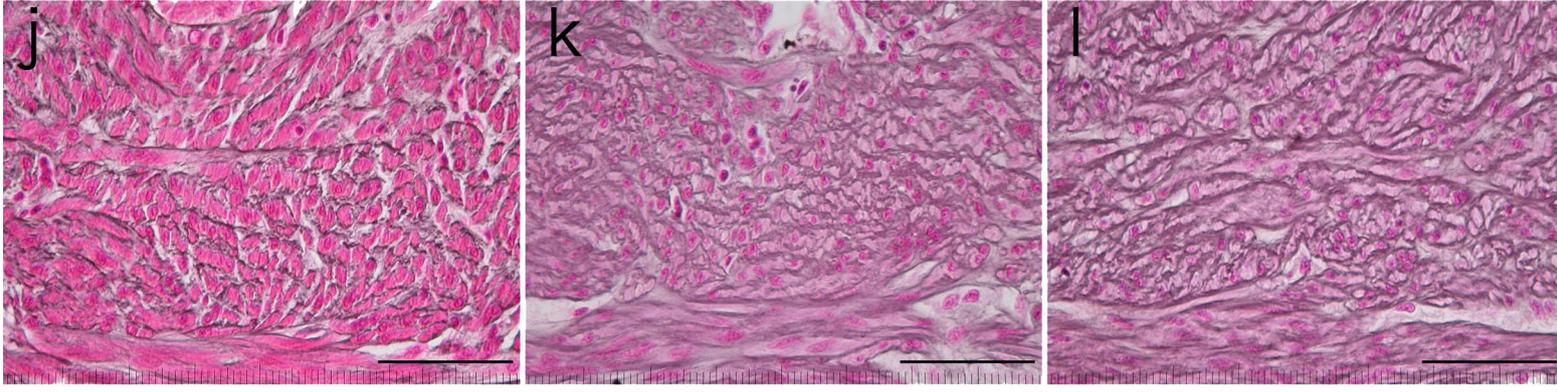
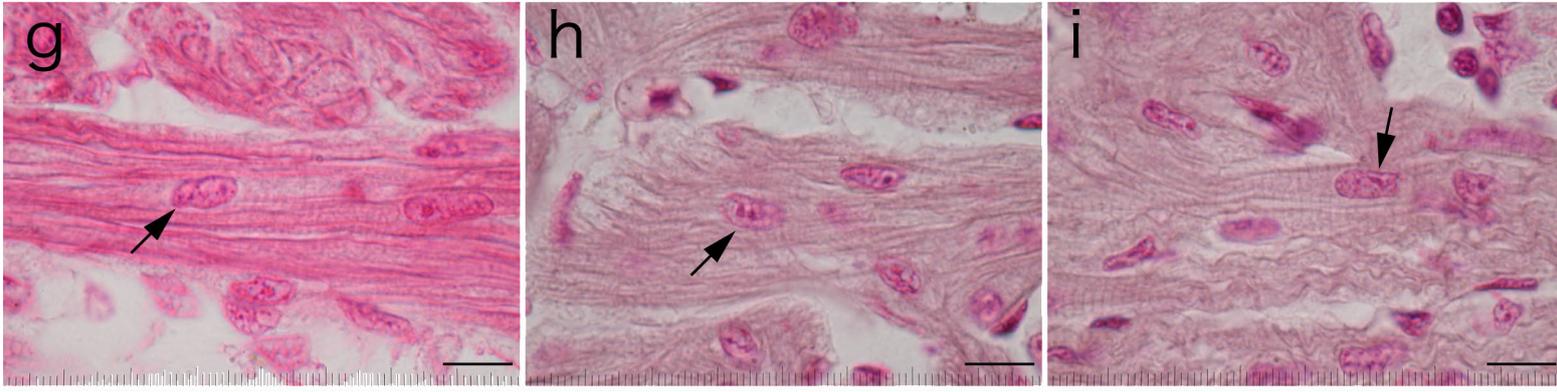
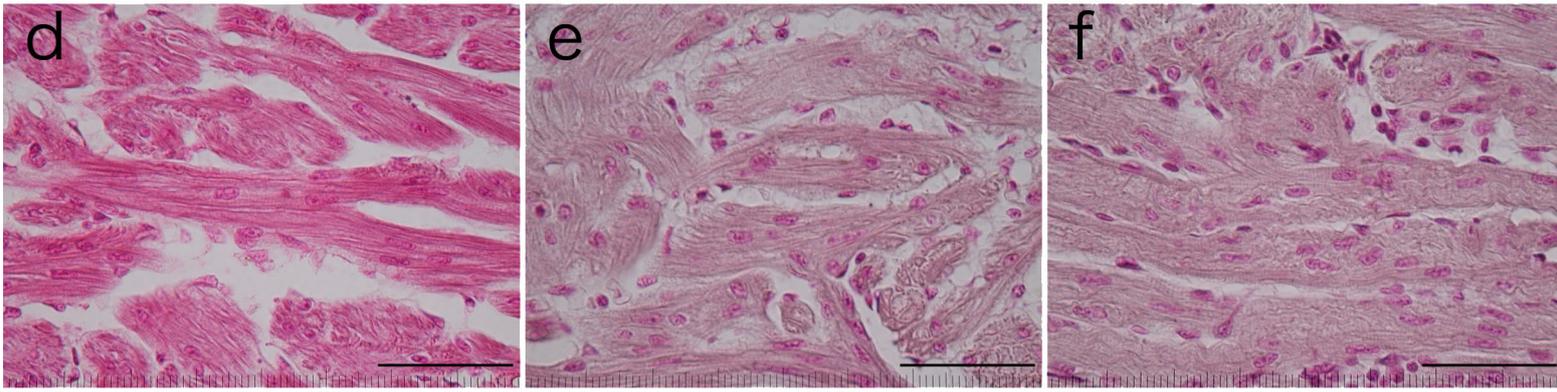
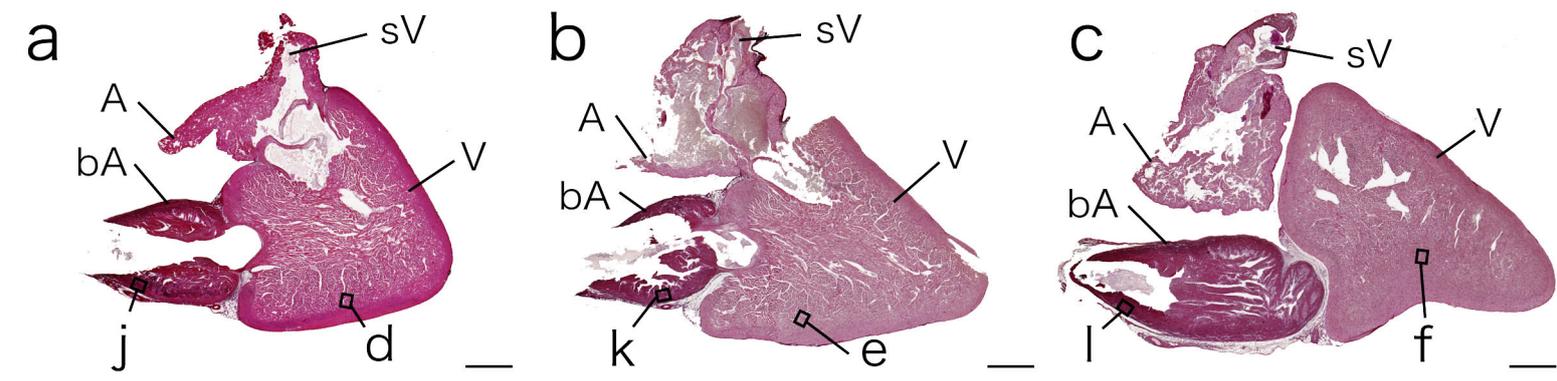


補足図 S3 肝臓

a : 従来液、 b : pH3 液、 c : pH4 液、 d-e : a-c の各拡大像、 矢印 : ヘマトキシリン好性細胞、 スケールバー = 50 $\mu$ m(a-c)、 10 $\mu$ m(d-f)

## 補足4. 心臓

心房壁は薄く、筋繊維が少ないのに対し、心室壁は厚く、心筋に富んでいるため、先行研究からも特に過剰にエオシン染色されやすいことが予想された。実際、従来液では過剰に強い赤色になり（補足図S4a, d）、pH3液、pH4液（特に前者）では、心筋の赤色調が適度に軽減されることで組織構築が明瞭に確認できた（補足図S4b, c, e, f）。心筋は、多核細胞で構成される横紋筋と異なり、単核の細胞体で構成されている。核はかなり細長い楕円形で、周囲に位置している線維芽細胞の核よりもはるかに大型のため、容易に識別できる。しかし、従来液では組織全体が過剰に赤色に染色されていたために心筋細胞を識別するのは困難であった（補足図S4g）。それに対し、pH3液、pH4液、では容易に、かつ、詳細に心筋細胞の構造を観察できた（補足図S4h, i）。動脈球は結合組織性の厚い壁をもち、弾性線維や膠原線維が豊富に含まれている<sup>31)</sup>。弾性線維はワイゲルトのレゾルシンフクシン染色法などで染色されるが、HE染色では染色されない<sup>32)</sup>。膠原線維もHE染色では染色されにくいことが知られており<sup>33)</sup>、結果的に動脈球の線維は茶褐色として観察された。線維層には上皮細胞や線維芽細胞が観察され、pH3液では核は赤色、細胞質はピンク色に染色されていたが、pH4液では細胞質が染色されないものが多く、細胞の形態は観察しづらい印象を受けた（補足図S4j-l）。

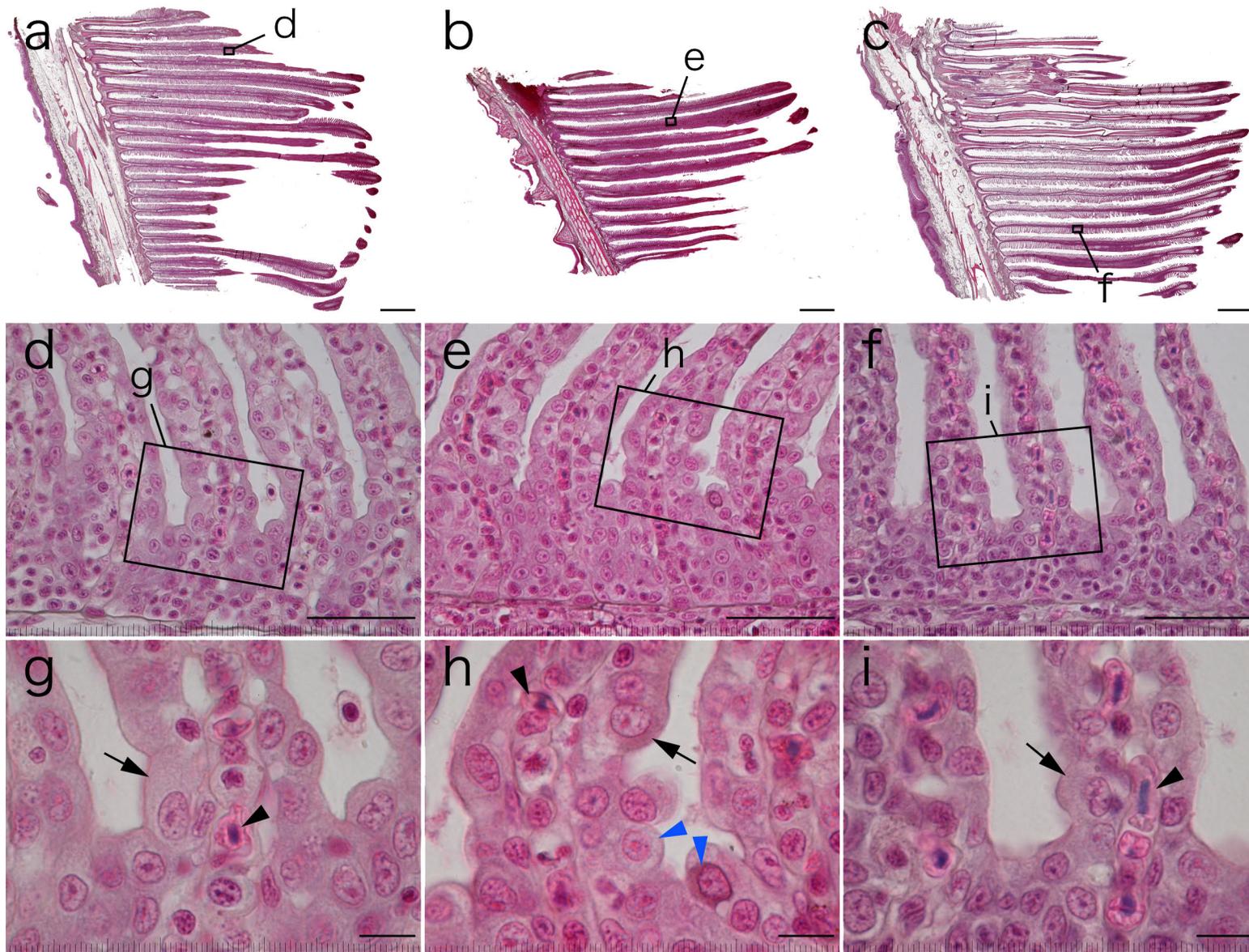


補足図 S4 心臓

a,d,g,j : 従来液、b,e,h,k : pH3 液、c,f,i,l : pH4 液、a-c : 切片の全体像、d-i : 心室のスポンジ層、g-i : d-f の各拡大像、j-l : 動脈球、A : 心房、bA : 動脈球、V : 心室、sV : 静脈洞、矢印 : 心筋細胞、スケールバー = 1mm(a-c)、50 $\mu$ m(d-f-j-l)、10 $\mu$ m(g-i) 注意 : 矢状断面として薄切された切片 (詳細は「材料と方法」に記載)。

## 補足5. 鰓（えら）

組織切片全体としては、pH3液で非常に濃いHE染色性が示されている（補足図S5a-c）。鰓弁のヘマトキシリン染色性はpH4液で最も鮮やかな青色を示し、最も強いエオシン染色性を示したpH3液では、pH4液の青色に赤色がさらに重ねられた色調になっていた（補足図S5d-f）。しかし、固定液のpHにより各細胞種の染色性に一定の違いが見られた。塩類細胞については、pH3液で両色素による染色のバランスが最良で、核質ならびに細胞質の染色性において他との分別が最も容易である印象を受けた（補足図S5d-i）。塩類細胞以外の上皮細胞についても、同様にpH3液でヘマトキシリン染色性の濃淡が最も明確になっている印象であった。一方、赤血球では、いずれの固定液でも細胞質のエオシン好性は保持されていたが、周囲の細胞との染色性が最も明確になったのはpH4液であり、pH3液は従来液よりも不明確であった。以上のように、従来液よりもpH4液で赤血球の識別は容易になるものの、pH3液が鰓弁の上皮系細胞の分別が容易で、総合的には最良の結果をもたらすと判定された。観察対象によって異なる評価の染色像となった原因については不明である。



補足図 S5 鰓

a,d,g : 従来液、 b,e,h : pH3 液、 c,f,i : pH4 液、 a-c : 切片の全体像、 d-f : 鰓弁、 g-i : d-f の二次鰓弁基部の各拡大像、 矢印 : 大型の塩類細胞、 矢じり : 赤血球、 青矢じり : 染色性の異なる上皮細胞、 スケールバー = 1mm(a-c)、 50 $\mu$ m(d-f)、 10 $\mu$ m(g-i) 注意 : 鰓弁の表面と平行な面で薄切された切片 (詳細は「材料と方法」に記載)。