

## 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

<sup>1</sup>小川智史 <sup>1</sup>飯島啓 <sup>1</sup>柴田安司 <sup>2</sup>中村將 <sup>1,3,4</sup>平井俊朗

<sup>1</sup>帝京科学大学大学院理工学研究科バイオサイエンス専攻

<sup>2</sup>沖縄美ら島財団総合研究センター

<sup>3</sup>岩手大学農学部食料生産環境学科

<sup>4</sup>岩手大学三陸水産研究センター

Influence of pH of Bouin's fixative on hematoxylin and eosin staining of tissue sections in rainbow trout

<sup>1</sup>Satoshi OGAWA <sup>1</sup>Kei IJIMA <sup>1</sup>Yasushi SHIBATA

<sup>2</sup>Masaru NAKAMURA <sup>1,3,4</sup>Toshiaki HIRAI

### Abstract

Bouin's solution is an effective fixative for fish histology. Despite its high potency to maintain the tissue structures, over-fixation (long time immersion in the fixative) is frequently associated with some artifacts in hematoxylin and eosin (HE) staining, a general method for tissue section staining. Previously, we have been reported that the over-fixation reduced affinity for hematoxylin coupled with over-staining by eosin in carp ovaries, resulting in heightened monochromaticity and lowered resolution in section image. In addition, it has been also demonstrated that Bouin's solutions adjusted to pH 3.0 or 4.0 suppress the artifacts in long-term storage. It is known that biochemical properties of tissue components show a wide variety among teleost fishes, mainly depending on their habitats. However, there is no systematic evaluation of species difference in over-fixation. In this study, we validated the storage capability of the modified Bouin's solutions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a cold water fish. Eleven organs of rainbow trout (pancreas, ovary, stomach, intestine, pyloric caeca, head kidney, body kidney, spleen, liver, heart, and gills) were fixed with original (pH 1.6) or modified Bouin's solutions for 2-3 months, and subjected to paraffin-embedded tissue section preparation followed by HE staining. All sections with the original solution gave typical images of over-fixed tissues. The modified solutions improved the imaging quality, and pH 4.0 solution gave superior images to pH 3.0 in all organs other than gill, heart, and spleen. Comparing the present observations with those for carp in which both pH 3.0 and 4.0 gave equally satisfactory results, trout tissues are more susceptible to acidity. Accordingly, acidity controlled Bouin's solution is an effective tool to preserve tissue samples without over-fixation, while optimal pH for long-term storage depends on species and/or organs.

Key words: rainbow trout, Bouin's fixative, pH, hematoxylin and eosin staining, over-fixation

### 1. はじめに

組織学的観察のためのパラフィン切片法は、19世紀末にはすでに基礎が確立された古典的な技術ではあるが、最先端の生命科学においても組織・細胞学的研究方法は欠かすことのできない重要な位置を占めている。当初、解剖学や病理学など医学領域の研究手法として、主として哺乳類組織を対象として発展してきた組織学は、現在では幅広い生物種で利用されている。その中で、試料採取から分析までの間に生じる組織構成成分の変性を物理・化学的原理によって抑制する手段として、(組織)固定法の重要性は大きい。しかし、組織を構成する生体化合物の生化学的特性は生物種や組織によって異なっており、変性の速度や様相もまちまちであることから、哺乳類を対象として考案された固定法そのままでは、十分な情報が得ることができない場合や、時として過

剰な固定により誤った判断に陥る危険性が生じる場合もある。

固定液は19世紀中頃から数百種類の液が考案されてきたが、現在では約20種に集約され、これらが多用されている<sup>1)</sup>。魚類組織では、10%中性緩衝ホルマリンの他、ブアン液、ダビットソン液、グルタルアルデヒド溶液などが主に使用されている<sup>2,4)</sup>。ホルマリン(ホルムアルデヒド水溶液)は基礎医学領域では最も広く使用される固定液の1つであるが、魚類組織では哺乳類よりも死後の自己消化速度がかなり速いため、ホルマリン単独による固定では十分な結果が得られず、ブアン液の有効性が提唱されている<sup>5)</sup>。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<sup>6,7)</sup>、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、組織・細胞の収縮や破壊

がほとんど起きないといった利点を有している。

組織切片法では、必要な情報を得るために染色が施される場合が多い。染色法も目的に応じて多くの手法が開発され、ある特定の組織成分のみを染め出す特殊染色と、概観的に組織の成り立ちを知る目的、細胞組織学の全体像を把握する目的で施される一般染色とに大別される。一般染色のうち、代表的な方法がヘマトキシリンとエオシンによる二重染色（HE染色）である<sup>8,9)</sup>。一般染色法で染められた標本は概観標本とも呼ばれ<sup>10)</sup>、HE染色では細胞核を青から青紫色に、他を淡赤から濃赤色に染め分ける<sup>8)</sup>。

我々は魚類を対象とした組織学的観察を長年続けており<sup>11-13)</sup>、概観標本作製用の固定液としてブアン液を常用している。しかし、研究上の理由から本液中で長期保管した試料を扱うことも多く、このような試料からHE染色を施した概観標本作製すると、固定条件（固定時間、対組織量比ほか）によって染色像の色調に差異が生じることを経験しており、過固定による影響が疑われた。そこで、コイ卵巣を用いてブアン液の酸性度と過固定が及ぼすHE染色像の色調変化について系統的な検討を行い、pH1.6の従来液<sup>14)</sup>よりもpH3.0~4.0に調整したブアン液で過固定の影響が軽減されることを見いだした<sup>12)</sup>。しかし、卵巣とは構成成分が異なる他臓器についても同様の効果が得られるかについては、問題点として残された。そこで、コイの他臓器についても同様の検討を行ったところ、概ね同様の傾向が確認され、中でも過固定による影響の程度は臓器によって異なることが明らかとなった（投稿準備中）。さらに予備的検討として、他魚種との比較を行ったところ、魚種間においても過固定による影響の度合いに違いが見られた。

魚類は脊椎動物中、約半数以上の種数（32,000種以上）を占め<sup>15)</sup>、多様な生殖環境への適応進化が知られている。その多様性は哺乳類など他の脊椎動物と比較してもはるかに大きく、それらは細胞や生体構成分子の生化学的特性における多様性に起因している。例えば、食品原料としての需要の高い魚肉について、その生化学的特性が広範な魚種で比較調査されており<sup>16-18)</sup>、その変性等が水温等の生息環境と関連性があることが示されている<sup>19)</sup>。このような生息環境（水温等）に適応した生体構成成分の生化学的多様性は、筋肉以外の臓器においても想定される<sup>17)</sup>ことから、固定という物理・化学的不活性化処理においてもその効果に種差が現れると予想される。従って、魚類における組織標本作製にあたっては、

対象種ならびに臓器の生化学的特性を視野に入れた固定方法の最適化が必要であると考えられるが、この点について系統的に議論した例はない。

本研究では、先に調査対象としたコイを温水性淡水魚の代表例と位置づけ、これと対比するため、代表的な冷水性淡水魚であり、重要な水産業対象種でもあるニジマス（*Oncorhynchus mykiss*）について、各臓器に対するpH調整ブアン固定液の効果を調査することで、冷水性淡水魚における組織切片作製・観察のための基礎資料とすることを目的とした。

## 2. 材料と方法

### 生命倫理に対する配慮

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

近隣の養魚場にて購入したニジマス未成熟魚（体重平均132g、体長平均23cm）の11尾を使用した。後の解剖で精巣・卵巣の確認により、オス6尾、メス5尾であったことが判明し、各臓器の観察用にはこのうちのオス3尾を使用した。さらに卵巣の観察用にはメス3尾を使用した。

### 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、脾臓、肝臓、幽門垂、胃、腸、心臓、生殖腺、腎臓（頭腎部と体腎部）、鰓を摘出し、直ちに固定液に浸漬した。

固定液はpHの異なる3種類のブアン液、すなわち、原法通りの処方<sup>1,3,14,20)</sup>によるブアン液（飽和ピクリン酸液、ホルマリン、酢酸を15:5:1に混合した液、pH1.6、以下、従来液）と、pH3.0、pH4.0に調整されたブアン液（以下、pH3液、pH4液）を用意した。pHはブアン液に10N水酸化ナトリウム水溶液を加えて調整した。

固定液量は組織液等によってpHが影響されない充分量（対組織量比20倍以上）を用いた。ただし、鰓は容器の都合上、約10倍以下になった。3尾のオスより摘出された各臓器を各1尾分ずつ、従来液、pH3液、pH4液に浸漬した。卵巣についても3尾のメスより摘出したものを、同様に各1尾分を3種類の固定液に浸漬した。浸漬期間は先行研究により過固定の影響が明確に生じることが予想される2、3ヶ月間とした。固定期間終了後（次の脱水作業直前）、

心臓は矢状断で観察できるように2分割、鰓弓は最長の一次鰓弁を中心に7-8mm幅に横断、他臓器は可能な限り横断面で観察できるように試料の端を切り揃えた後に細切した。整形した組織片は常法に従い、エタノール脱水、キシレン置換を経てパラフィン（ライカ社、パラプラスト・プラス）に包埋した。包埋試料を細切面が薄切面になるように固定し、横断面が十分に得られるように調整した後、2-3 $\mu$ m厚に薄切することで切片を作製した（組織表面から概ね1mm以内の位置を観察面とした）。各臓器について3種類の固定液（従来液、pH3液、pH4液）から作製された切片を同一スライドガラス上に伸展し、染色手技のバラツキによる影響を最小化した。

染色にはマイヤー・ヘマトキシリン溶液（武藤化学社）と、1%エオジンY溶液（武藤化学社）の液量に対し0.1%（v/v）の酢酸を加えたものを用いた。染色操作では、作業手順による染色性の差異を最小化するため、異なる固定条件で作製した切片を同時に処理し、染色像の比較は同時に処理したスライド間でのみ行った。スライドのヘマトキシリン染色液の浸漬時間は15分間とし、発色には温水（36~39 $^{\circ}$ C）を使用した。また、エオシン染色液の浸漬時間は3分間とし、続く水洗操作では切片からの色素溶出が目視できなくなるまで洗浄水を交換した。

### 3. 結果と考察

以下に各臓器の観察結果を記す。なお誌面の都合により、本文では、固定液のpH調整により観察像に顕著な向上が確認された臓器を中心に紹介する。その他の臓器については概略のみを述べることとし、それらの詳細については補足資料として提示する。

#### 3-1. 膵臓（幽門垂周辺）

ニジマスでは幽門垂の周囲に膵臓が散在しており、本研究でも幽門垂観察のために作製したプレパラートで同時に膵臓組織を観察できた（図1）。佐藤（1982）によると、膵臓外分泌部は膵臓の体積の大部分を占める腺細胞が房状に多数集合した組織（複合胞状腺）であり、外分泌部の腺細胞は強い好塩基性を示す細胞質で好酸性物質として球形の酵素原顆粒球を含み、核には1つ、もしくは2つの仁を有するとされている<sup>21)</sup>。一方、インスリン、グルカゴン等を分泌する内分泌部（ランゲルハンス島）は外分泌部中に散在する色素親和性の低い島状の組織として観察される。従って、HE染色による膵臓組織切片全体の色調は、その大部分を占める外分泌部腺細胞の細胞質がヘマトキシリン好性による青藍色に酵素原顆粒のエオシン好性の赤色が重なることで、濃紫色になることが予測された。しかし、従来液（pH1.6）

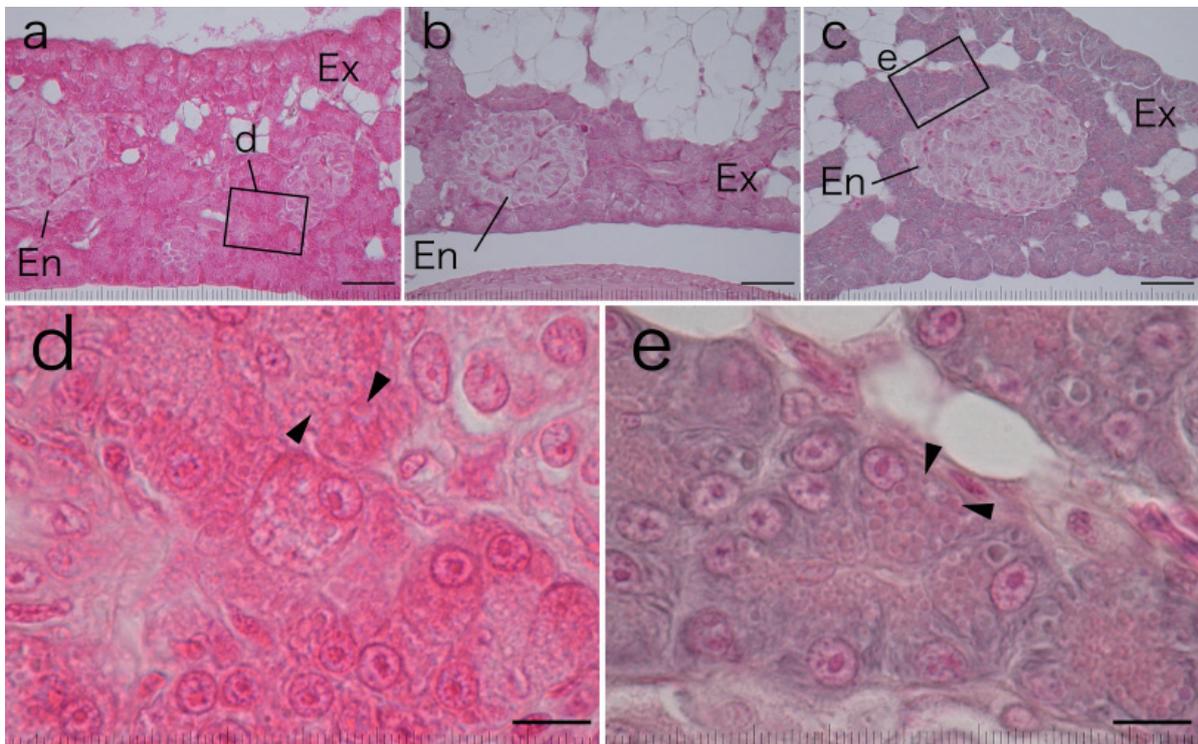


図1 膵臓（幽門垂付近）

a,d：従来液、b：pH3液、c,e：pH4液、d,e：a,cの拡大像、En：内分泌部、Ex：外分泌部、矢じり：酵素原顆粒、スケールバー = 50 $\mu$ m(a-c)、10 $\mu$ m(d,e)

では赤色の濃淡のみで示された染色像となった (図 1a,d)。pH3 液ではヘマトキシリン好性の向上により、外分泌部の腺細胞の細胞質が赤紫色を呈した (図 1b)。pH4 液ではさらに青藍色が強まり、全体的に青藍色で濃染される細胞も認識できるようになった一方で、エオシン染色性も向上し、腺細胞内に赤色の酵素原顆粒が明確に識別できるようになった (図 1c,e)。

以上の結果より、pH4 液が過固定による影響を最も軽減し、本来の HE 染色性を保つことができる固定液であると考えられた。

### 3-2. 生殖腺

先行研究により、過固定の影響が明瞭に現れることが予想された未成熟卵巣を中心に観察した。今回、組織観察に供した未成熟魚 3 個体では卵巣内に認められた生殖細胞の多くは周辺仁期卵母細胞であり、これらが組織の大部分を占めていることから、その染色性により組織切片全体の色調が支配されている印象を受けた (図 2a-c)。我々は、先にコイを用いてこの時期の卵母細胞の色調が過固定の影響によるヘマトキシリン好性の低下によって、赤色単色化の傾向が強まることを示した<sup>12)</sup>。また、周辺仁期卵母細胞は卵成長休止状態の前期と卵成長再開後の後期に大別され、後期への移行に伴って細胞は大型化し、色調も変化する。周辺仁期前期では細胞は小型で細

胞質が強い青藍色を示すのに対して、周辺仁期後期では細胞の大型化に伴って細胞質の色調の淡色化が観察される<sup>11)</sup>。この色調変化はヘマトキシリン好性の減少によるものであり、過固定の影響でヘマトキシリン好性が失われることは、細胞の発達段階を判定する上で重要な情報の一つを失うことを意味する。

今回、ニジマスにおいても同様の傾向が確認された (図 2d-f)。従来液では細胞質も核質もエオシン好性の赤色の濃淡だけになっている (図 2d)。これに対して pH3 液、pH4 液では、ほぼ同じ大きさの卵母細胞において、細胞質全体がヘマトキシリン好性の薄青色で示され、周縁部には強調されて濃染される構造が認められ、部分的に薄赤色で染色されて細胞内の部位差が明確になっていた (図 2e,f)。細胞質の青藍色は pH4 液で、より濃染される傾向があり、本来の HE 染色の色調に最も近いものと思われた。核質も、pH3 液、pH4 液では本来の HE 染色性に近いと思われる淡赤色で示され、特に pH4 液の核内では、微細構造 (相同染色体など) もコントラストの向上によって容易に認識できるようになっていた。

以上の結果より、pH4 液が過固定による影響を最も軽減し、本来の HE 染色性を保つことができる固定液であると考えられた。一方、精巣については先行研究と同様、固定液の pH による差異は認められなかった。

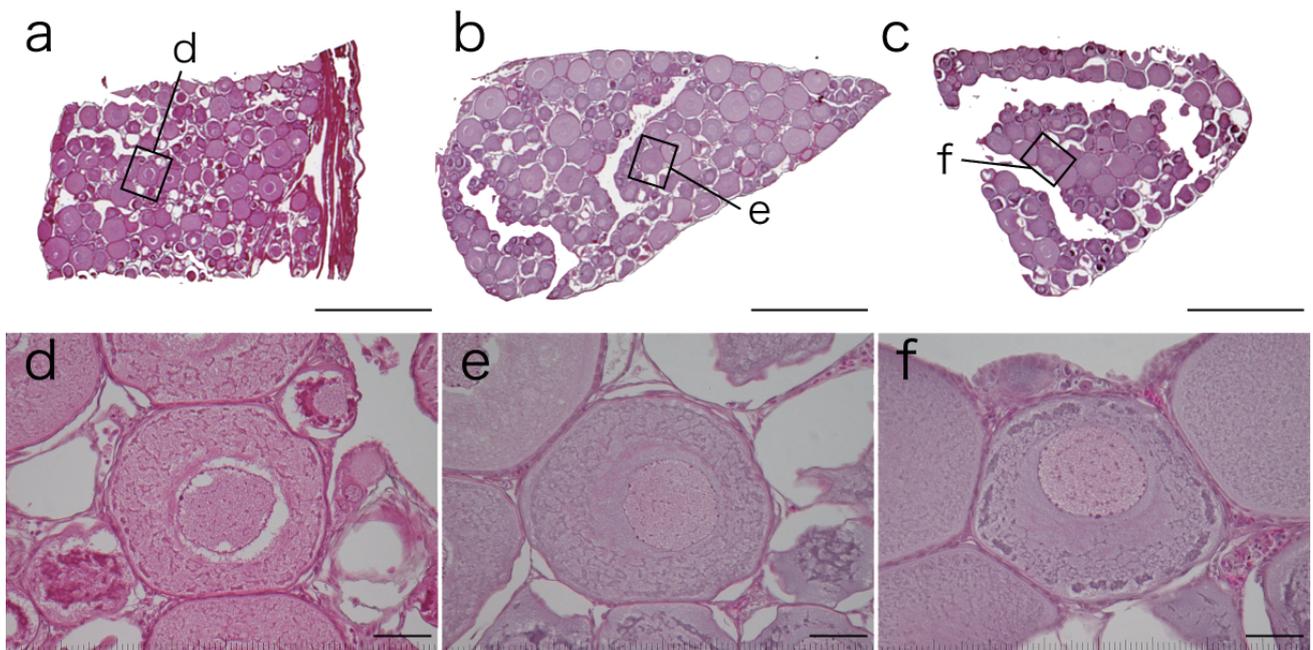


図 2 卵巣

a,d : 従来液、b,e : pH3 液、c,f : pH4 液、a-c : 切片の全体像、d-f : 周辺仁期卵母細胞、a-c は同じスライド上で伸展された切片で、拡大率も同一。スケールバー = 1mm(a-c)、50 $\mu$ m(d-f)

### 3-3. 消化管

消化管は咽頭から肛門へとつながる一連の管状器官であり、有胃魚では食道、胃、幽門垂、腸に区分される<sup>22)</sup>。いずれも内腔表面は主に単層の円柱上皮細胞による褶折り構造からなる粘膜を形成している。

今回のニジマスの消化管を胃、幽門垂、腸にわけて観察したところ、ブアン液の pH に依存して粘膜表層の上皮細胞の色調が大きく変化することが明らかとなり、特に胃で明瞭に観察された (図 3)。これら細胞の核は基底側に位置しているが、その核周辺部から基底側において pH3 液、特に pH4 液で強いヘマトキシリン好性を示した。以下に各部の所見の詳細を記す。

胃：

粘膜の表層 (胃腔側) から固有層に向かって上皮細胞層が陥入して胃腺を形成している様子が確認された (図 3a-c)。この表層粘膜上皮細胞の色調は、従

来液では赤色の濃淡のみである (図 3d,g) のに対し、pH3 液では細胞質でヘマトキシリン好性の増加が見られ (図 3e,h)、pH4 液では特に核周辺部で強いヘマトキシリン好性が確認できるようになった (図 3f,i)。さらに pH4 液では赤色化の軽減によってコントラストが強調されたことにより、細胞内の構造がより明確化され、核の頂端側は薄赤色を呈し、顆粒や小胞状の構造物も認められた (図 3i)。横手 (1982) は、胃腺を構成する細胞は、ヘマトキシリンやアゾカルミンで染色される丸みをおびた多角体の顆粒を含むとしている<sup>22)</sup>。従って、HE 染色においては胃腺の主細胞が青藍色として検出されると予想されたが、染色像が最も改善された pH4 液でも非常に薄い染色に留まった。

腸：

粘膜の上皮細胞は円柱状で背が高く、基底側近くに核を有する細胞で、その頂端部には発達した微絨

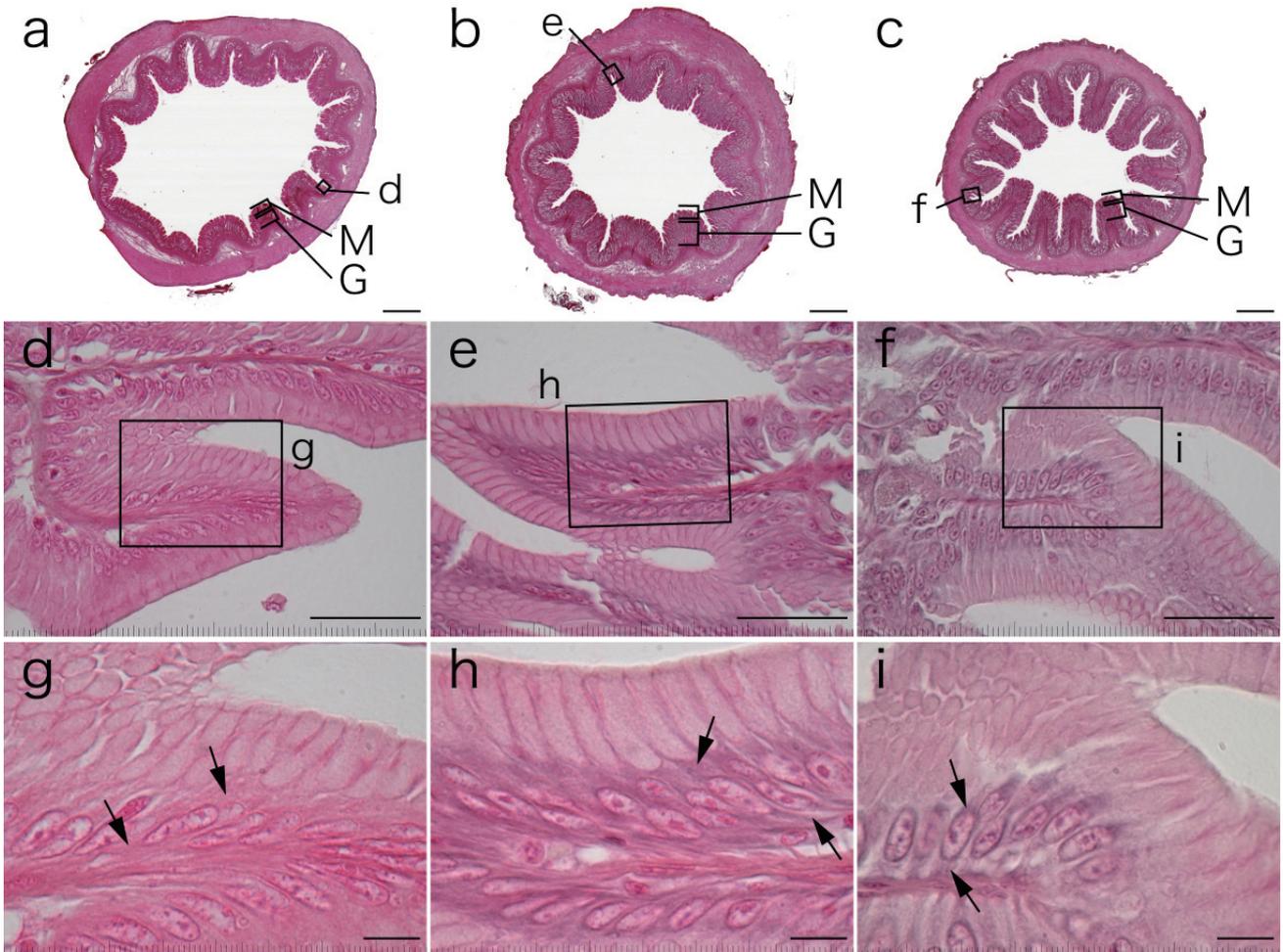


図 3 胃の表層粘膜上皮

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 : 表層粘膜上皮、g-i : d-f の拡大像、G : 胃腺、M : 表層粘膜上皮、矢印 : ヘマトキシリン好性の核周辺部、スケールバー = 1mm(a-c)、50 $\mu$ m(d-f)、10 $\mu$ m(g-i)

毛（刷子縁、さっしえん）が認められた（補足図 S1a-d）。胃と同様に核周辺部のヘマトキシリン好性は従来液、pH3 液では認識されないのに対し、pH4 液で初めて検出可能になった。

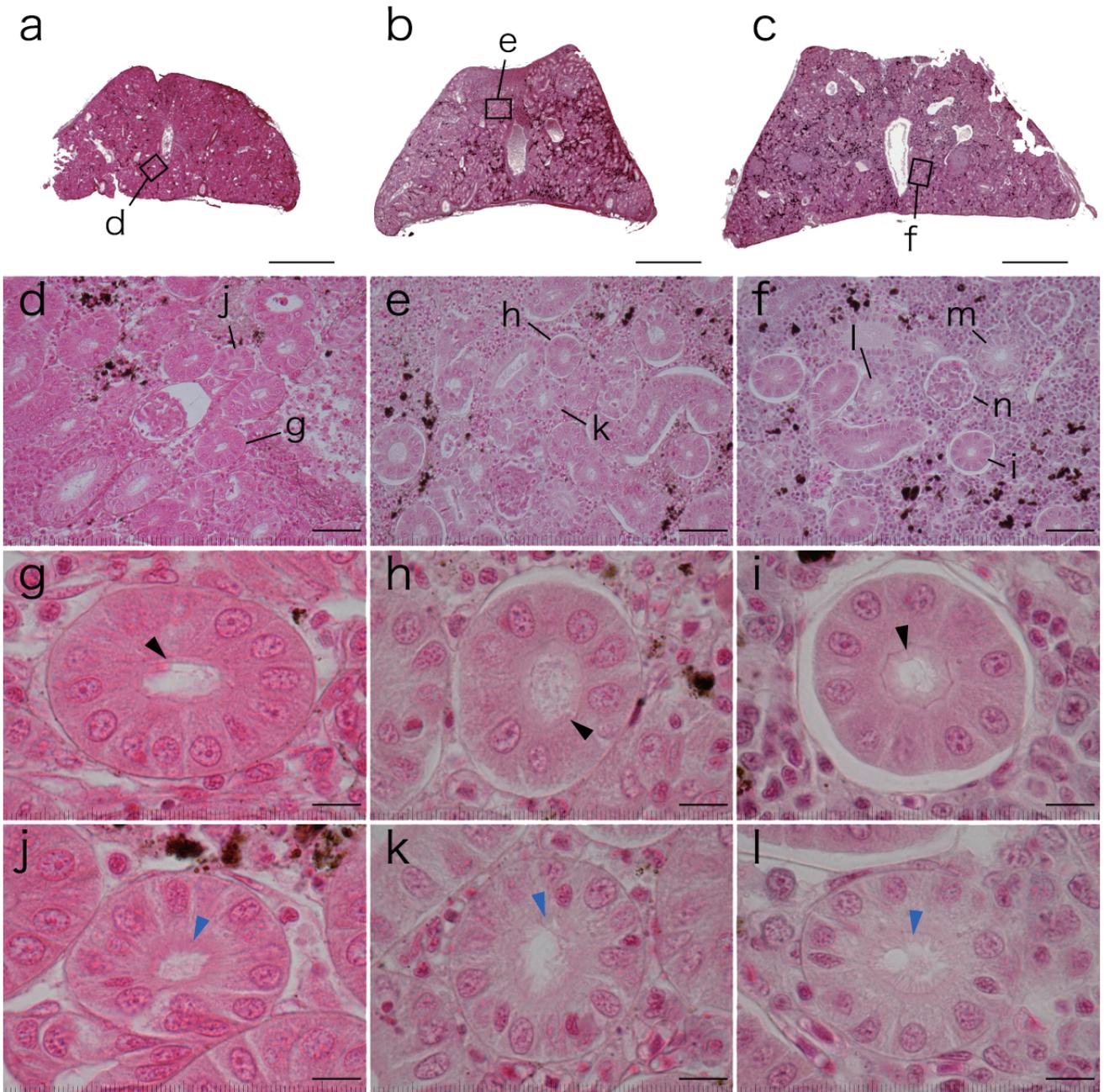
**幽門垂：**

胃、腸と同様、pH4 液だけに粘膜上皮細胞の核周辺部のヘマトキシリン好性が認められるが、腸よりもさらに薄い青色として検出された（補足図 S1e-h）。従って、胃、幽門垂、腸を1つの臓器として捉えた

場合、このヘマトキシリン好性は口腔に近いほど強まる傾向がうかがわれた。

**3-4. 腎臓**

硬骨魚の腎臓は、体腔背側に接して頭端から尾端まで伸長した左右一対の器官であり、頭腎と体腎に区別される。頭腎は腎臓の前端部で主としてリンパ様組織から成り、体腎は多数のネフロンを有する実質とリンパ様組織を含む間質から成る。頭腎および体腎に見られるリンパ様組織は硬骨魚の主要な造血



**図4 体腎**

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-f：腎小体と尿細管、g-i：近位細尿管、j-l：遠位細尿管、矢じり：刷子縁、青矢じり：線毛と微絨毛、スケールバー = 1mm(a-c)、50 $\mu$ m(d-f)、10 $\mu$ m(g-l)

器官である<sup>23-25)</sup>。ニジマスの場合、頭腎と体腎の境界は肉眼的に識別が困難とされている<sup>23)</sup>ことから、本研究では前端部を頭腎、中央部を体腎として観察に供した。

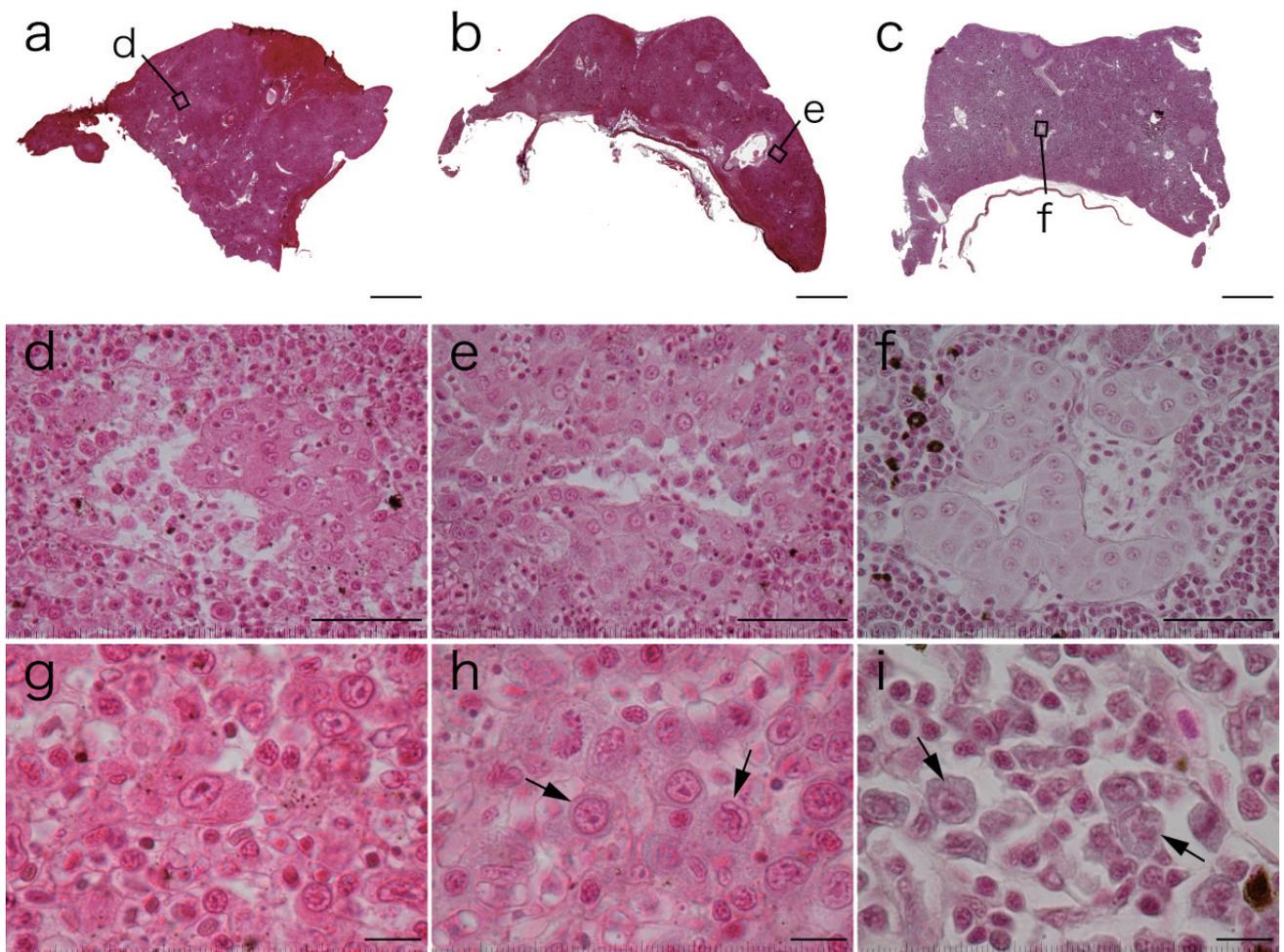
**体腎：**

体腎も、pH3液、pH4液で固定することでヘマトキシリン好性の維持などの染色性の変化により、組織学的所見から得られる情報量に大きな改善が見られた。組織切片では腎単位であるネフロンが様々な方向で切断された管状構造が観察された(図4a-f)。ネフロンは腎小体とそれに連なる尿細管から構成され、尿細管は頸部、近位、中間部、遠位尿細管に大別される。多くの場合、遠位尿細管節を構成する上皮細胞には粗大顆粒は認められず、近位尿細管と比べてエオシンなどの酸性色素による染色性が弱いとされている<sup>23)</sup>。このようにネフロンの部位判定において色素の染色性は重要な手がかりの一つとなって

いるが、従来液では遠位部と近位部の染色性における差異は認められず、構造を詳細に観察しなければ判定できない(図4d,g,j)。それに対し、pH3液ではHEの色調が全体的に薄くなり(図4e,h,k)、pH4液ではエオシンで濃染された近位尿細管と薄染の遠位尿細管が容易に区別できるようになった(図4f,i,l)。近位部の内腔を構成する上皮細胞の頂端部には刷子縁(微絨毛と線毛の層)が認められ(図4g-i)、遠位部の内腔では比して疎で長い線毛が含まれるものが多く観察された(図4j-l)。

**頭腎：**

頭腎ではpH4液でのみHE染色性が大きく改善された(図5a-c)。頭腎は大部分がリンパ様組織であり、その中に間腎腺(哺乳類の副腎皮質に相当)、クロム親和細胞群(哺乳類の副腎髄質に相当)が含まれている。ニジマスでは、クロム親和細胞は間腎腺と混在せず、間腎腺ともども主静脈やその分岐小静



**図5 頭腎**

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：クロム親和細胞群、g-i：リンパ様組織(d-fの各周辺部)、矢印：ヘマトキシリン好性細胞、スケールバー = 1mm(a-c)、50 $\mu$ m(d-f)、10 $\mu$ m(g-i)

脈の周囲に存在する<sup>26)</sup>。間腎腺は散在しているのに対し、クロム親和細胞はこれら静脈の壁面に集団を形成して存在している<sup>27)</sup>。また、間腎腺がエオシンで染色されるのに対して、クロム親和細胞は嫌色素性である。従って、他臓器と同様、過固定による影響（赤色単色化）が生じるとすれば、ニジマス頭腎では間腎腺の同定が困難となることが予想されたため、本研究ではクロム親和細胞に対する HE 染色性について着目した。その結果、予想通り、従来液では本来、嫌色素性であるところがエオシンによる染色性が増して赤色化したことで（図 5d）、周囲の細胞種との差異が不明確となった。そのため、発見には静脈に沿って存在する細胞集塊を丹念に検索する必要があった。pH3 液ではヘマトキシリンの染色性は向上したが、組織切片全体の赤色化は軽減されず、染色性によるクロム親和細胞の特徴付けは、わずかに改善されただけだった（図 5e）。これに対して、pH4 液では赤色化がかなり軽減され、クロム親和細胞も本来の嫌色素性として提示されていた（図 5f）。また、リンパ様組織においても、従来液では赤色の濃淡のみで表現されるため、血球の種類判別は難しかった（図 5g）のに対して、pH3 液ではヘマトキシリン染色性がわずかに向上したことによって好色素性の細胞が検出できるようになり（図 5h）、pH4 液では明確にヘマトキシリン好性の血球が検出できるようになった（図 5i）。

### 3-5. 脾臓

脾臓に含まれる血球には赤血球、リンパ球、単核球、マクロファージなどがある<sup>28)</sup>。従来液で固定された脾臓では、過固定による赤色単色化が顕著で、染色性の違いによる血球間の差異を確認することはできなかった（補足図 S2a,d,g,j）。一方、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過固定による影響は改善され、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）。

### 3-6. 肝臓

肝臓においても、従来液では過固定による色調の赤色単色化が顕著であった。肝細胞は肝臓の大半を占める細胞（実質細胞）であり、通常、丸みを帯びた多角体の細胞で、仁が1つの明るい球形の核を有するとされる<sup>4,29)</sup>が、従来液ではこの形態学的な特徴だけは、かろうじて確認できるだけに留まった（補足図 S3a, d）。これに対して、pH3 液、pH4 液では改

善され、肝小葉間を走行する血管内の赤血球との分別が向上し、組織構築の確認が容易になった（補足図 S3b,c,e,f）。肝細胞の状態変化によってはヘマトキシリン濃染傾向があることが知られている<sup>29)</sup>が、特に pH4 液では、肝細胞の一部に薄青色の細胞が認められ、核質の状態も最も明瞭に観察され、細胞間における生理状態の違いを反映しているものと推察された。

### 3-7. 心臓

大半の魚の心臓は1心房1心室で、血液は、静脈洞、心房、心室、動脈球の順に流れる<sup>30)</sup>。いずれも組織学的には内外両面を覆う膜層と中間層から成り、心房と心室は筋肉性で、動脈球と静脈洞は結合組織性である<sup>31)</sup>。通常でも筋繊維はエオシンに強く染色されるが、従来液では過剰なエオシンの染色性により、色調の単色化傾向が強まり、組織構築の観察が不明瞭になった（補足図 S4a-i）。それに対し、pH3 液、pH4 液（特に前者）では、心筋の赤色調が適度に軽減され、組織構築が明瞭に確認できた。動脈球の厚い結合組織性の壁は、HE に対して難染色で<sup>32,33)</sup>、結果的に茶褐色であった。線維層に含まれる上皮細胞は、従来液に対し、pH3 液、pH4 液で改善が認められた（補足図 S4j-l）が、pH4 液で嫌色素性の細胞が多く含まれたため、pH3 液の方が観察が容易になると思われた。

以上の結果より、心臓を全体的に良好な組織像が得られるのは pH3 液が有用であると考えられた。

### 3-8. 鰓

鰓弁（一次鰓弁）の両側面には二次鰓弁が多数並び、その表面は単層扁平上皮で覆われ、二次鰓弁基部には、粘液細胞や大型で好酸性細胞の塩類細胞が位置している<sup>24,34-36)</sup>。今回の観察でも、全ての固定液で基本的な組織構築については確認することができ、他臓器と比較して pH の影響が小さかった（補足図 S5）。各試料について使用済固定液の pH を測定したところ、従来液が 2.8（未使用では 1.6）に、pH3 液が 3.6（未使用では 3.0）に、pH4 液が 4.1（未使用では 4.0）であり、他臓器と比較して従来液、pH3 液で顕著な上昇が確認された。我々は、先に固定液と組織の量比が過固定の進行に関連することを示している<sup>12)</sup>。すなわち、固定液の量が少ないと組織成分による作用によって固定液の pH が上昇し、結果的に過固定が抑制される。本研究において、他臓器では固定開始時に固定液量を対組織量比 20 倍以上

にできたのに対して、鰓では作業場の都合で10倍以下となってしまった。このために、特に従来液において過固定による赤色単色化が抑制され、他臓器と比較してpHの影響が小さくなった可能性が考えられる。また、同様にpHの上昇が観察されたpH3液においてpH4液よりも良好な染色像が得られたことから、鰓におけるブアン固定液の至適酸性度はpH3とpH4の間にあることが示唆された。

#### 4. まとめ

組織切片法では、即時観察など特殊な状況を除いて、試料採取後ただちに組織構成成分の変性防止措置が取られる。切片標本作製までに時間を要するパラフィン包埋法では、通常、適切な固定処置が施されるが、固定法自体も物理・化学的に組織構成成分を安定な状態へと変化させることを原理としているため、固定処理条件の違いが観察結果に人工的な差異をもたらしてしまう危険性がある。そのため、固定は組織成分の変性を防止する最小限の条件で実施し、速やかに切片標本の作製に供するのが理想的である。しかしながら、野外調査などで膨大な試料数の検体が発生する研究では、そのような状況を作することは難しく、初期解析の概観標本にでさえ、悪影響が生じる危険性がある。概観標本の色調の情報は、核や細胞など形状とともに重要である。我々はコイ卵巣において、ブアン液の酸性度軽減が過固定（固定液内での長期保存）によるHE染色像への影響を改善することを示した<sup>12)</sup>。一方で、臓器や魚種の違いにより過固定の影響がさらに深刻で、細胞の形状や組織構築（組織を構成する細胞の配置）の観察にまで影響が出る場合があることも経験していた。そこで本研究では、過固定によるエオシンの過染が顕著であるサケ科魚類の代表として、ニジマスを用いてブアン液の酸性度とHE染色像への影響について系統的に調査することとした。

前報でコイ卵巣のHE染色像に改善をもたらしたpH調整ブアン液（pH3液、pH4液）内での長期保存について、ニジマス各臓器（膀胱、卵巣、胃、腸、幽門垂、体腎、頭腎、脾臓、肝臓、心臓、鰓）のHE染色像における色調との関係を調査した。その結果、コイの場合と同様に全ての臓器でブアン液の酸性度の軽減がHE染色像の赤色単色化を軽減させた。特にpH4液は、脾臓、心臓、鰓を除いた8種の臓器のHE染色像を大幅に改善させ、その効果は膀胱外分泌部、卵巣、胃、腸、幽門垂、体腎、頭腎で顕著であった。具体的には、膀胱外分泌部の腺細胞と酵素

原顆粒、卵巣の周辺二期卵母細胞、消化管の粘膜上皮の上皮細胞、体腎の尿細管、頭腎の間腎腺とクロム親和細胞において過固定による影響が最小化された染色像になっていると考えられた。

一方で、脾臓、心臓ではpH4液よりもpH3液で良好な組織像が得られる場合もあった。すなわち、脾臓では血球の一部、動脈球内の上皮細胞の識別においてpH3液の優位性がうかがわれた。従って、組織もしくは細胞によって、至適酸性度が異なる可能性があることが示唆された。

コイ卵巣ではpH3液により、過固定による染色性への影響に十分な改善が得られた。同様の傾向はコイの他の臓器でも確認されている（投稿準備中）。今回、ニジマスの複数の臓器についての検証では、一部の例外を除いて、さらに酸性度を軽減したpH4液でなければ十分な改善が得られないことが明らかとなった。これは温水魚と冷水魚の組織成分の生化学的特性の違いによるのかもしれない。おそらく、長期保存による過固定の影響を最小化するためのブアン液の至適酸性度は魚種によって異なっており、それを知ることで固定液をそのまま長期保存可能な保存液として使用することが期待される。一方で、固定法や染色法はあくまでも試料の組織学的特徴付けを明瞭化するための「人工的な加工操作」であることを忘れてはならない。従って、染色像から得られた情報が対象生物の生体組織内のどのような事象を意味するのかについての対応付けが重要不可欠である。例えば、組織切片上における物質レベルでの検出手技である組織化学、免疫組織化学などとの併用は重要であり、今後、pH調整ブアン液による長期保存がこれらの染色法に及ぼす影響についても検証する必要がある。

#### 謝辞

本研究は科学研究費補助金（基盤研究C 課題番号 15K07588；代表 平井）の助成のもと、実施された。また、ご指導ご助言をいただいた共同研究者の皆様へ御礼申し上げます。

#### 補足資料

本研究の実験結果詳解のための補足資料（補足図1～5）を帝京科学大学学術リポジトリに掲載する。  
< <http://id.nii.ac.jp/1409/00000496> >

#### 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. J. R. Latendresse, A. R. Warbritton, H. Jonassen and D. M. Creasy : Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.*, 30 (4) : 524-533, 2002.
  3. 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.
  4. L. Speilberg, Ø. Evensen, B. Bratberg and E. Skjerve : Evaluation of five different immersion fixatives for light microscopic studies of liver tissue in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.*, 17 : 47-55, 1993.
  5. 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.
  6. A. S. Parkes : Pol Bouin 1870-1962. a memoir. *J. Reprod. Fertil.*, 5 : 301-307, 1963.
  7. 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.
  8. 齊藤誠 : ヘマトキシリン・エオジン染色. *染色法のすべて (月刊 Medical Technology 編)*, 医歯薬出版, 東京, 1980, pp. 10-13.
  9. 齊藤誠 : 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.
  10. 佐野豊 : 染色の概要. *組織学研究法 (理論と術式)*, 南山堂, 東京, 1981, pp. 161-165.
  11. 小川智史, 佐藤将, 兵藤則行, 中村將, 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.
  12. 小川智史, 佐藤将, 兵藤則行, 中村將, 平井俊朗 : 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. *帝京科学大紀要*, 12 : 121-127, 2016.
  13. 平井俊朗, 小川智史, 柴田安司, 阪本憲司, 原将樹, 中嶋正道 : ギンブナに対する低線量放射性セシウム長期曝露の影響についての組織学的検証. *月刊海洋*, 50 (2) : 53-60, 2018.
  14. F. A. Putt : Tissue fixation. *Manual of histopathological staining methods*, John Wiley & Sons, New York, 1972, pp. 10-21.
  15. J. S. Nelson, T. C. Grande and M. V. H. Wilson : *Fishes of the world 5th edn.*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2016, pp. 1-12.
  16. 鈴木たね子 : 赤身の魚と白身の魚. *調理科学*, 9 (4) : 182-187, 1976.
  17. 宋興安, 平田孝, 坂口守彦 : 魚類筋肉および内臓組織の一般成分と含窒素エキス成分. *日水誌*, 66 (2) : 282-290, 2000.
  18. 文部科学省 : 日本食品標準成分表 (魚介類) . *日本食品標準成分表 2015 年版 (七訂)*, [http://www.mext.go.jp/a\\_menu/syokuhinseibun/1365419.htm](http://www.mext.go.jp/a_menu/syokuhinseibun/1365419.htm) [更新 2016.3.25]
  19. 新井健一 : *水産動物筋肉タンパク質の比較生化学*, 恒星社厚生閣, 東京, 2007.
  20. A. M. Bullock : Laboratory methods. R. J. Roberts (ed.) , *Fish pathology 2nd edn.*, Bailliére Tindall, London, 1989, pp. 374-405.
  21. 佐藤英雄 : 脾臓. 日比谷京 (編), *魚類組織図説 (正常組織と病理組織)*, 東京, 講談社, 1982, pp. 90-91.
  22. 横手元義, 隆島史夫 : 消化管. 日比谷京 (編), *魚類組織図説 (正常組織と病理組織)*, 東京, 講談社, 1982, pp. 75-83.
  23. 小栗幹郎, 横手元義 : 腎臓. 日比谷京 (編), *魚類組織図説 (正常組織と病理組織)*, 東京, 講談社, 1982, pp. 94-103.
  24. 金子豊二 : 浸透圧調節・回遊. 会田勝美 (編), *魚類生理学の基礎*, 恒星社厚生閣, 東京, 2002, pp. 215-232.
  25. 森友忠昭 : 魚類造血機構の解明. *魚病研究*, 49 (3) : 85-92, 2014.
  26. 小栗幹郎 : 間腎腺およびクロム親和細胞群. 日比谷京 (編), *魚類組織図説 (正常組織と病理組織)*, 東京, 講談社, 1982, pp. 126-129.
  27. 小林牧人, 金子豊二, 会田勝美 : 間腎腺とクロム親和細胞群. 会田勝美 (編), *魚類生理学の基礎*, 恒星社厚生閣, 東京, 2002, pp. 146-149.
  28. 隆島史夫 : 脾臓. 日比谷京 (編), *魚類組織図説 (正常組織と病理組織)*, 東京, 講談社, 1982, pp. 64-65.
  29. 隆島史夫 : 肝臓. 日比谷京 (編), *魚類組織図説 (正常組織と病理組織)*, 東京, 講談社, 1982, pp. 82-90.
  30. 難波憲二 : 呼吸・循環. 会田勝美 (編), *魚類生理学の基礎*, 恒星社厚生閣, 東京, 2002, pp. 45-

66.

31. 隆島史夫：心臓．日比谷京（編），*魚類組織図説（正常組織と病理組織）*，東京，講談社，1982, pp. 58-60.
32. 前田明：ワイゲルトのレゾルシンフクシン染色．*新染色法のすべて（月刊 Medical Technology 別冊）*，医歯薬出版，東京，1999, pp. 15-17.
33. 前田明：ワンギーソン染色．*新染色法のすべて（月刊 Medical Technology 別冊）*，医歯薬出版，東京，1999, pp. 13-15.
34. 小栗幹郎，佐藤英雄，隆島史夫：鰓．日比谷京（編），*魚類組織図説（正常組織と病理組織）*，東京，講談社，1982, pp. 54-57.
35. 金子豊二：魚類におけるイオン調節と塩類細胞．*化学と生物*，35（5）：376-382, 1997.
36. 金谷信宏，坪川達也：除草剤によるメダカ鰓細胞での小核誘発．*慶應義塾大学日吉紀要．自然科学*，41, 1-14, 2007.
37. 秋吉英雄，井上明日香，富室孝仁：硬骨魚類における幽門垂の比較組織学的研究；幽門垂の解剖学および組織学的構築と系統発生学的相関．*鳥根大学生物資源科学部研究報告*，8, 1-9, 2003.
38. 秋吉英雄，井上明日香，濱名昭弘：海水産魚類の行動と肝臓の組織生化学的相関に関する比較形態学的研究．*鳥根大学生物資源科学部研究報告*，6, 7-16, 2001.
39. K. Ishii and K. Yamamoto：Sexual differences of the liver cells in the goldfish, *Carassius auratus L.*, *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 21（3）：161-167, 1970.
40. 石井清士：性成熟に伴うヒメマス (*Oncorhynchus nerka*) の肝臓の形態変化．*北大水産研彙*，22（3），215-220, 1971.