Anat. Inst. d. Med. Fak., Univ. Okayama (Vorstand: Prof. M. SEKI).

Veränderungen der Struktur und Färbbarkeit des mit hochfrequentem Schall behandelten braunen Fettgewebes des Maus.

二十日鼠の褐色脂肪組織の構造と染色性の超音波作用による変化.

Kazuyuki HASHIMOTO 橋本 和幸.

(Eingegangen am 25. April 1958.)

In der vorletzten Arbeit hat der Verfasser (1957) festgestellt, daß die Markscheide der Nervenfasern des Frosches durch den hochfrequenten Schall mit lipoidfärbendem Viktoriablau und Irisolechtblau BL besser färbbar wird und zugleich die Markscheidensubstanz aus der Innenfläche der Markscheide in kugelige Form vorspringt, daß aber nach weiterer Beschallung die Färbbarkeit der Markscheide abnimmt und mit Osmiumsäure stärker schwärzbar wird. Im Anschluß hieran wurde eine Untersuchung am braunen Fettgewebe der Maus unternommen. Das Gewebe wurde nach der Wirkung mit hochfrequentem Schall mit lipoidfärbendem schwach basischem Viktoriablau und schwach saurem Irisolechtviolett BBN gefärbt. Zum Vergleich behandelte man das Gewebe mit Osmiumsäure.

I. Material und Methode.

Man entnahm der Maus gleich nach dem Tod ein Stück des braunen Fettgewebes aus dem Interscapularraum und schnitt es in kleinere Stückchen. Ein Stückchen wurde zur Kontrolle in physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt, die anderen wurden in ein Glasröhrchen von 1.8 cm Kaliber, 0.4 mm Wanddicke und 18.5 cm Länge mit 3 cc physiologischer Kochsalzlösung gebracht. Das Glasröhrchen wurde im Beschallungsgerät 1 und 2 Stunden lang beschallt. Um die Wärme des Öles des Gerätes während der Beschallung unter 15°C zu halten, benutzte man eine Wasserkühlröhre. Das Beschallungsgerät war der S—200 Typus von SHIMAZU. Die Wellenfrequenz betrug 710 kc, wobei 150 mA aus 1,500 V eingeführt wurden. Die beschallten Kontrollgewebestückchen wurden mit 10%iger Formalinlösung 6 Stunden lang fixiert und mit Gefriermikrotom in 15 μ dicke Schnitte zerlegt. Man klebte die Schnitte auf ein und denselben Objektglas auf und färbte sie im Inkubator bei 37°C mit einer Farblösung von Viktoriablau 10 Minuten, mit der von Irisolechtviolett BBN aber 40 Minuten lang. Dabei verdünnte man eine 1%ige alkoholische Lösung von Viktoriablau (von MERCK) kurz vor dem Gebrauch mit Wasser auf das 50fache, so daß die Lösung 0.02%igen Farbstoff enthielt. Man verdünnte aber zugleich auch eine 1%ige alkoholische Lösung von Irisolechtviolett BBN (von BAYER) auf das 20fache, so daß diese Lösung den Farbstoff 0.05%ig enthielt. Die Schnitte wurden andererseits mit 1%iger Osmiumsäure 30 Minuten lang behandelt. Die Schnitte wurden alle in Gummisirup von APÁTHY eingeschlossen und mikroskopiert.

1

2

3

Abb. 1. Braunes Fettgewebe ohne Ultraschallwirkung. Fixierung mit Formalin, einbetten in Paraffin und Färbung mit Hämatoxylin und Eosin. Wabige Struktur des Cytoplasmas. Das Fett ist ausgelöst. 420 $\times$.

Abb. 2. Nach 1stündiger Beschallung des Gewebes. Färbung des Paraffinschnittes mit Hämatoxylin und Eosin. Die Wabenträume erweitern sich beträchtlich. 420 $\times$.

Abb. 3. Nach 2stündiger Beschallung des Gewebes. Die Zellen runden sich ab. 420 $\times$.

Um das Gewebe auf der anderen Seite mit Hämatoxylin und Eosin zu färben, wurden die beschallten Gewebestückchen und die Kontrolle in Paraffin in einer Reihe eingebettet und 10 μ dick geschnitten. Man schloß die so mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitte in Xylolbalsam ein.

II. Ergebnisse der Untersuchung.

Bevor ich auf den speziellen Teil der Arbeit eingehe, seien die Befunde an den mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Paraffinschnitten des beschallten, formalinfixierten braunen Fettgewebes geschildert. Aus den Fettzellen ist das Fett ausgelöst, so daß nunmehr im Zelleib nur ein Netzwerk des Cytoplasmas mit feinen Maschenräumen übriggeblieben ist (Abb. 1). Nach 1stündiger Wirkung des hochfrequenten Schalls werden die Maschenräume des cytoplasmatischen Netzwerkes beträchtlich größer (Abb. 2). Nach weiterer 1stündiger Beschallung runden sich die Zellen mehr oder weniger ab (Abb. 3), so daß zwischen den Zellen vielerorts Spalträume entstehen.

A. Färbung der Gefrierschnitte des formalinfixierten braunen Fettgewebes mit schwach basischem, mittelstark polarem Viktoriablau.

1. Normales braunes Fettgewebe.

Die Zellen des braunen Fettgewebes drängen sich und sind also unregelmäßig polygonal gestaltet. Wie schon von MORITA (1955) beobachtet wurde, enthalten sie zahlreiche mit Viktoriablau kaum oder nicht färbbare Fetttröpfchen. Zwischen den Fetttröpfchen ziehen sich Scheidewände aus Cytoplasma, in welchen man mit Viktoriablau mehr oder weniger stark färbbare Lipoidkörnchen sehen kann (Abb. 4). Diese Körnchen finden sich mehr im Randteil der Zellen als in ihrem Centralteil.

2. Nach 1stündiger Beschallung.

Im Cytoplasma zwischen den Fetttröpfchen vermehren sich, wie in Abb. 5 dargestellt ist, gröbere, mit Viktoriablau stark gefärbbare Lipoidkörnchen. Im Centralteil der Zellen nehmen feinere Lipoidkörnchen beträchtlich zu.

3. Nach 2stündiger Beschallung.

Die Fettzellen runden sich ab (Abb. 6). Im Cytoplasma zwischen den Fetttröpfchen erscheinen zahllose feine und gröbere, stark färbbare Lipoidkörnchen, so daß das Cytoplasma sich dunkelblau färbt. Die mit Viktoriablau nicht färbbaren Fetttröpfchen nehmen an Zahl ab. Zwischen den Zellen entstehen weite Spalträume.

B. Färbung der Gefrierschnitte mit schwach saurem, mittelstark polarem Irisolechtviolett BBN.

1. Normales braunes Fettgewebe.

Die violett blau färbbaren Lipoidkörnchen zwischen den Fetttröpfchen befinden sich besonders reichlich im Randteil der Zelle und in der Nähe des Kerns (Abb. 7).

Die Fetttröpfchen bleiben gar nicht gefärbt.

2. Nach 1stündiger Beschallung.

4

5

6

Abb. 4. Braunes Fettgewebe ohne Ultraschallwirkung. Färbung des Gefrierschnittes mit Viktoriablau. Die Fetttropfchen werden kaum oder nicht gefärbt. In dem cytoplasmatischen Zügen zwischen den Fetttropfchen sind ziemlich zahlreiche Lipoidkörnchen sichtbar. 420 $\times$.

Abb. 5. Dasselbe nach 1stündiger Beschallung. Viktoriablau färbung. Die mit Viktoriablau färbbaren Lipoidkörnchen nehmen an Zahl und Größe zu. 420 $\times$.

Abb. 6. Dasselbe nach 2stündiger Beschallung. Viktoriablau färbung. Die cytoplasmatische Züge zwischen den Fetttropfchen bereichern sich stark mit Lipoid. Die Zellen werden etwas rundlich. 420 $\times$.

7

8

9

Abb. 7. Braunes Fettgewebe ohne Ultraschallwirkung, Färbung des Gefrierschnittes mit Isolechtviolet BBN. Zwischen den Fetttröpfchen sind die Lipoidkörnchen nicht sehr reich. 420 $\times$.

Abb. 8. Dasselbe nach 1stündiger Beschallung. Isolechtviolet BBN-färbung. Die Lipoidkörnchen vermehren sich. 420 $\times$.

Abb. 9. Dasselbe nach 2stündiger Beschallung. Isolechtviolet BBN-färbung. Das Lipoid vermehren sich in hohem Maße. 420 $\times$.

10

11

12

Abb. 10. Braunes Fettgewebe ohne Ultraschallwirkung. Behandlung des Gefrierschnittes mit Osmiumsäure. Die Fetttröpfchen sind verschwärzt. 420 $\times$.

Abb. 11. Dasselbe nach 1stündiger Beschallung. Behandlung mit Osmiumsäure. Die Fetttröpfchen werden größer und zugleich schwärzen sich stärker. 420 $\times$.

Abb. 12. Dasselbe nach 2stündiger Beschallung. Behandlung mit Osmiumsäure. Fetttröpfchen verändern sich noch stärker. 420 $\times$.

Wie bei Viktoriablauf kommen zahlreiche Lipoidkörnchen im Cytoplasma der Fettzellen vor (Abb. 8).

3. Nach 2stündiger Beschallung.

Im Cytoplasma kommen die mit Irisolechtviolett BBN färbbaren Lipoidkörnchen in großer Zahl zum Vorschein (Abb. 9).

C. Behandlung der Gefrierschnitte des beschallten, formalinfixierten braunen Fettgewebes mit Osmiumsäure.

1. Normales braunes Fettgewebe.

Die zahlreichen Fetttröpfchen, welche den Zelleib vollpfropfen, werden verschwärzt (Abb. 10), aber nicht so stark wie in den Zellen des beschallten Gewebes (s. unten). Zu vergleichen ist hierbei die Untersuchung von FAWCETT (1952). Er behandelte die Gefrierschnitte der formalinfixierten weißen und braunen Fettgewebe der Maus mit Osmiumsäure und stellte fest, daß in dem gleichen Zeitablauf die letzteren Schnitte noch goldbraun erschienen, während die ersteren sich schon schwärzten, und nahm an, daß das Fett im braunen Fettgewebe höher gesättigt ist als im weißen Fettgewebe.

2. Nach 1stündiger Beschallung.

Wie in Abb. 11 dargestellt ist, werden die Fetttröpfchen größer und bei weitem stärker zuschwärzen.

3. Nach 2stündiger Beschallung.

Die Verschmelzung der Fetttröpfchen in größerer Form und die Schwärzbarkeit derselben mit Osmiumsäure schreiten noch fort (Abb. 12).

III. Auswertung.

Die Zellen des braunen Fettgewebes sind bekanntlich an Lipoid reich, aber, weil dieses zum größeren Teil mit Eiweiß verbunden und maskiert ist, läßt es sich nicht ohne weiteres hinreichend nachweisen. Die zwischen den Fetttröpfchen in den Zellen ziemlich zahlreich vorhandenen feinen Körnchen lassen sich mit Viktoriablauf und Irisolechtviolett BBN distinkt färben. Sie müssen also freies Lipoid enthalten. Darunter gemengt müssen auch lipoidreiche Mitochondrien vorhanden sein. Der Befund der Färbung mit dem BAKERSchen Hämatein von FAWCETT (1952) und der der Untersuchung im Elektronenmikroskop von LEVER (1957) bestätigen diese Meinung.

Nach der Beschallung vermehren sich die mit obigen Farbstoffen färbbaren Körnchen im Cytoplasma zwischen den Fetttröpfchen beträchtlich. Diese Erscheinung erklärt sich daraus, daß das mit Eiweiß verbundene Lipoid, wie ich (1957) es bei der Untersuchung an markhaltigen Nervenfasern gesehen habe, durch die Beschallung weitgehend demaskiert und befreit wird.

Das Fett ist in den Zellen in vielen Tröpfchen geteilt multilobulär vorhanden. Durch die Beschallung konfluieren diese Tröpfchen, wie es schon YASUDA (1956) bei der Beschallung der Milchkügelchen beobachtet hat, miteinander und bilden größere Tropfen. Nach langer Beschallung schreitet die Konfluierung der Fetttröpfchen immer weiter fort, und die äußere Form der Zellen rundet sich mehr oder weni-

ger stark ab. Gleichzeitig wird das Fett mit Osmiumsäure stärker schwärzbar. Beim Verschmelzen des Fettes wurde vielleicht das in ihm gelöst vorhanden gewesene Lipoid befreit, worauf auch YASUDA (1956) bei den Milchkügelchen aufmerksam gemacht hat.

IV. Zusammenfassung.

Das braune Fettgewebe der Maus wurde beschallt und mit Formalin fixiert. Die Gefrierschnitte wurden mit lipoidfärbendem schwach basischem Viktoriablau und schwach saurem Irisolechtviolett BBN gefärbt, sowie mit Osmiumsäure behandelt.

Durch die Beschallung vermehren sich in den cytoplasmatischen Zügen zwischen den Fetttröpfchen der Zellen die mit Viktoriablau und Irisolechtviolett BBN gut färbbare Körnchen, bis diese schließlich zu einer zahllosen Menge zunehmen. Zugleich verschmelzen sich die Fetttröpfchen miteinander und werden mit Osmiumsäure stärker schwärzbar. Die äußere Gestalt der Fettzellen rundet sich mehr oder weniger ab.

内 容 自 抄.

超音波を作用させた二十日鼠の褐色脂肪組織をホルマリンで固定し、その凍結切片を類脂質を染める弱塩基性のビクトリア青と弱酸性のイリゾールエヒト重BBNで染め、またオスミウム酸で処理した。超音波により褐色脂肪細胞の脂肪小滴間の胞形質条列に類脂粒子が著しく数を増し、遂に無数になる。同時に脂肪小滴は互いに融合して大きい滴を作り、またオスミウム酸で黒化される性質が増す。

Literatur.

Fawcett, D. W.: A comparison of the histological organisation and cytochemical reactions of brown and white adipose tissues. *J. Morph.* 90 (1952). — **Hashimoto, K.**: Veränderungen der Struktur und Färbbarkeit der mit hochfrequentem Schall behandelten markhaltigen Nervenfasern des Frosches. *Arch. hist. jap.* 13 (1957). — **Lever, J. D.**: The fine structure of brown adipose tissue in the rat with observations on the cytological changes following starvation and adrenalectomy. *Anat. Rec.* 128 (1957). — **Morita, H.**: Färbung der Fettzellen der hungerunden Maus mit Viktoriablau. *Arch. hist. jap.* 9 (1956). — **Yasuda, H.**: Färbung der durch Ultraschallwirkung zersetzten Milchkügelchen mit lipoidfärbendem Viktoriablau. *Arch. hist. jap.* 9 (1956).