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

Anwendung von verschiedenen Lipidfärbungsmethoden bei den im Reagenzglas überlassenen neutrophilen Leukocyten des Menschen.

種々の脂質染色法を試験管内に放置せられた人の好中球に応用.

Kazuyuki HASHIMOTO 橋本和幸.

(Eingegangen am 11. Oktober 1959.)

Sudan III färbt nur Neutralfett, dagegen färbt Sudanschwarz B außer Neutralfett auch Lipide und stellt bei weitem mehr Gebilde in den Zellen dar. In der vorliegenden Untersuchung wurden sehr spezifisch Lipide färbendes Irisolechtviolett BBN und Viktoriablau sowie Sudan III und Sudanschwarz B angewandt. Als das Objekt der Färbung wählte man einfach überlassene neutrophile Leukocyten.

I. Material und Methode.

Das Blut von einem gesunden Menschen wurde 1/4 der Menge von 3.8%iger Natriumcitratlösung zugefügt, in einem Reagenzglas bei 37°C überlassen und nach 8 und 24 Stunden auf einem Objektglas ausgestrichen. Die Ausstriche wurden halb getrocknet und in einem geschlossenen Behälter mit Formalin 10 Minuten lang gedämpft. Einen größeren Teil der Ausstriche legte man für die CIACCIOsche Färbung und ihre Modifikationen 2 Stunden lang in der Lösung, bestehend aus 1 Teil von Formalin und 4 Teilen von 3%iger Kaliumbichromatlösung, und für weitere 6 Stunden in einfacher 3%iger Kaliumbichromatlösung ein, damit man die lipide Substanz unlöslich machte. Die so behandelten Ausstriche wurden nach dem Ausspülen in Wasser durch allmählich steigenden Alkohol entwässert und in warmes Xylol und Benzol bei 37°C gebracht, in welchen sie je 2 Stunden verweilten. Danach werden sie durch Alkoholreihe in Wasser zurückgebracht.

Die Färbung der Ausstriche vollzog sich in gesättigter Lösung von Sudan III oder Sudanschwarz B in 70%igem Alkohol 60 Minuten, in 0.1%iger Irisolechtviolett BBN-Lösung in 60%igem Alkohol 20 Minuten und in 0.05%iger Viktoriablaulösung in 40%igem Alkohol 10 Minuten, und zwar immer bei 37°C. Die mit Sudan III und Sudanschwarz B gefärbten Ausstriche wurden nach dem schnellen Eintauchen in 40%igem Alkohol gewässert, die anderweitig gefärbten aber unmittelbar in Wasser übertragen.

Ein anderer Teil der Ausstriche wurden um die Lipide nach der BAKERschen Methode aufzubewahren in Formalin-Calciumlösung fixiert, in Kaliumbichromatlösung nachfixiert und ohne Behandlung mit einer nichtwässrigen Flüssigkeit mit Hämatoxylin gefärbt.

Man färbte weitere Ausstriche zur Vergleichung nach der MAY-GIEMSAfärbung (der PAPPENHEIMschen panoptischen Färbung).

Die nach der CIACCIOschen Methode, nach einer Modifikation von ihr und

nach der BAKERSchen Methode gefärbten Präparate wurden in APATHYschem Gummisirup eingeschlossen und mikroskopiert.

II. Ergebnisse und Auswertung.

A. Färbung der neutrophilen Leukocyten nach der CIACCIOschen Methode.

Bei dieser Färbung ist das Nentralfett, das nicht in nichtwässrigen Lösungsmitteln unlöslich gemacht ist, größtenteils aus den Zellen ausgegangen. In dem gleich nach der Blutentnahme hergestellten Ausstrich wird die Grundsubstanz des Cytoplasmas der neutrophilen Leukocyten, wie in Abb. 1 gezeigt ist, diffus blaßorangerot gefärbt ($\pm$). Die meisten Granula in ihm färben sich auch sehr schwach ($\pm$). Vergleicht man diese Granula mit den nach der MAY-GIEMSAfärbung erscheinenden

Abb. 1—3. Färbung nach der CIACCIOschen originalen Methode. 1,100 $\times$

Abb. 1. Von einem kurz nach der Blutentnahme hergestellten Ausstrich. In der Nähe des Kerns sieht man größere Granula.

Abb. 2. Nach 8 Stunden langer Überlassung. Die Granula sind größer und besser färbbar geworden.

Abb. 3. Nach 24stündiger Überlassung. Die Färbung der Granula ist wieder schlechter. Hohlräumchen ohne Inhalt kommen vor.

hinsichtlich der Größe und Verteilung, so ergibt sich, daß sie offenbar die speziellen Granula der neutrophilen Leukocyten sind. Es ist aber zu bemerken, daß auch nicht wenige Zellen ohne nach der CIACCIOschen Methode färbbare Granula vorhanden sind. Es gelang zwar SEHRT (1927), NAKAYAMA (1948) u. a., in den mit Formalin oder Alkohol fixierten neutrophilen Leukocyten spezielle Granula mit Sudan III darzustellen. Nach der Angabe von LILLIE und BURTNER (1953) verlieren aber die speziellen Granula nach der Behandlung mit 0.3%iger Kaliumbichromatlösung mitsamt der Indophenolblau-Oxydase- und der Benzidin-Peroxidasereaktion auch ihre Färbbarkeit mit Sudan III.

Nach 8stündiger Überlassung des Blutes treten in den meisten neutrophilen Leukocyten stark orangerot färbbare größere Granula (+++) auf (Abb. 2), welche nach der MAY-GIEMSAfärbung dunkel violett zu färben sind.

In dem 24 Stunden lang überlassenen Blut bleibt die Cytoplasmagrundsubstanz

der meisten neutrophilen Leukocyten fast unfärbbar ($\pm$), wobei die Zahl der färbaren Teilchen abnimmt (Abb. 3). In diesem Stadium treten Vakuolen und Fetttropfchen in den Zellen auf. Das Fett ist im Präparat ausgelöst.

B. Verwendung von Sudanschwarz B statt Sudan III bei der CIACCIOschen Färbung.

Abb. 4 bietet einen nach dieser Methode gefärbten neutrophilen Leukocyten im kurz nach der Entnahme ausstrichenen Blut. Wie von McMANUS (1945) an den mit Sudanschwarz B gefärbten alkoholfixierten neutrophilen Leukocyten konstatiert wurde, färbt sich die Grundsubstanz des Cytoplasmas grau ($\pm$), zahlreiche Granula in ihm aber blau (+). Diese Granula entsprechen meistens den speziellen Granula nach der MAY-GIEMSAfärbung.

Nach 8 Stunden nimmt die Größe der Granula zum Teil beträchtlich zu, und sie färben sich dunkelblau (+ + +) (Abb. 5). Diese Granula stimmen zum Teil bezüglich Form und Verteilung im Cytoplasma mit den sogenannten toxischen Granula überein, welche nach der MAY-GIEMSAfärbung dunkelviolett auftreten. Es ist also anzunehmen, daß diese Granula an Lipiden reich sind.

Abb. 4—6. Färbung mit Sudanschwarz B statt Sudan III in der CIACCIOschen Färbung.
1,100 $\times$

Abb. 4. Von einem kurz nach der Blutentnahme hergestellten Ausstrich. Im Cytoplasma sind zahlreiche feine Granula vorhanden.

Abb. 5. Nach 6stündiger Überlassung. Vermehrung der Zahl und Größe der Granula.

Abb. 6. Nach 24stündiger Überlassung. Die Granula färben sich wieder schlecht.

Nach 24 Stunden zerfallen die Bestandteile der neutrophilen Leukocyten in weitem Maße, und die Zahl und Färbbarkeit der Granula vermindern sich mehr oder weniger stark (Färbung bis + + und +) (Abb. 6).

C. Verwendung von Irisolechtviolett BBN statt Sudan III bei der CIACCIOschen Methode.

Im kurz nach der Entnahme ausgestrichenen Blut werden im Cytoplasma der meisten Zellen nach diesem Färbungsverfahren zahlreiche violettblau gefärbte Granula gesehen (+) (Abb. 7). Es gibt aber auch solche Zellen, deren Cytoplasma sich

fast ohne Granulationen schwach coloriert.

Nach 8stündiger Überlassung treten in den Zellen grobe, in der Stärke ++ blauviolett färbbare Granulationen auf (Abb. 8).

Abb. 7—9. Färbung mit Irisolechtviolett BBN statt Sudan III in der CIACCIOschen Färbung. 1,100×

Abb. 7. Von einem kurz nach der Blutentnahme hergestellten Ausstrich. Im Cytoplasma befinden zahlreiche feine Granula.

Abb. 8. Nach der 8 Stunden langen Überlassung. Die Granula in den Zellen werden größer und stärker färbbar.

Abb. 9. Nach 24stündiger Überlassung. Die Färbbarkeit der Granula verringern sich ein wenig.

Nach 24 Stunden nimmt die Zahl und Färbbarkeit der Granula wie bei der Sudan-schwarz B-färbung ab (zumeist +) (Abb. 9).

D. Verwendung von Viktoriablau statt Sudan III bei der CIACCIO-scher Färbung.

In den gleich nach der Blutentnahme fixierten neutrophilen Leukocyten wird

Abb. 10—13. Die Färbung mit Viktoriablau statt Sudan III in der CIACCIOschen Färbung 1,100×

Abb. 10. Von einem kurz nach der Blutentnahme hergestellten Ausstrich. Im Cytoplasma sind zahlreiche Granula vorhanden.

Abb. 11. Nach der 8 Stunden langen Überlassung. Verstärkung der Färbbarkeit der Granula.

Abb. 12. Nach 24stündiger Überlassung. Die Teilchen sind immer noch stark zu färben.

die Grundsubstanz des Cytoplasmas sehr schwach blau ($\pm$) und Granula etwas stärker blau (+) gefärbt (Abb. 10). Der Kern färbt sich stärker blau ($++$).

Nach 8stündiger Überlassung des Blutes werden die Granula besser färbbar ($++$) (Abb. 11). Nach 24stündiger Überlassung reduzieren sich aber ihre Zahl und Färbbarkeit zumeist wie bei der Sudanswarz B und Irisolechtviolett BBN und zwar zumeist bis zur Stärke (+). (Abb. 12).

E. Färbung nach BAKER.

Nach dieser Methode werden Phosphatide in den Zellen gut erhalten und dank des beizenden Bichromates mit Hämatoxylin gut tingiert. Weil die Zellen nicht mit nichtwässrigen Flüssigkeiten behandelt werden, bleibt auch Neutralfett, wenn vorhanden, ungelöst.

Abb. 13—15. Färbung von Phosphatid nach der BAKERSchen Hämateinmethode. 1,100 $\times$
Abb. 13. Von einem kurz nach der Blutentnahme hergestellten Ausstrich. Im Cytoplasma
finden sich mäßig stark gefärbte Granula.

Abb. 14. Nach 8 Stunden langer Überlassung. Die Granula färben sich stärker.

Abb. 15. Nach 24stündiger Überlassung. Die Färbbarkeit der Granula vermindert sich.

Die Cytoplasmagrundsubstanz der neutrophilen Leukocyten ist anfänglich blaßblau zu färben ($\pm$). In ihm befinden sich zahlreiche Granula von der Färbestärke + (Abb. 13). Nach 8 Stunden werden die Granula größer und stärker färbbar ($+++$) (Abb. 14). Weil die Grundsubstanz schwach blau gefärbt ist (+), sind nicht gefärbte Fetttropfchen von verschiedener Größe klar zu sehen. Nach 24stündiger Überlassung des Blutes wird die Färbbarkeit der Granula und des Cytoplasmas mit dem Fortschritt des Zerfallens der Zellen etwas vermindert (Abb. 15).

III. Zusammenfassung.

Zur Färbung von Granula in den neutrophilen Leukocyten wurden anstelle von Sudan III auch Viktoriablau, Sudanswarz B und Irisolechtviolett BBN angewandt, und es wurden neben den speziellen Granulationen auch lipoide Granula gefärbt, und zwar in der genannten Reihenfolge der Farbstoffe ansteigend.

Nach der BAKERSchen Hämateinmethode für Phosphatidfärbung wurden die Granula ebensostark wie mit Viktoriablau zur Darstellung gebracht.

Früher hat NAMBA (1956) die im Reagenzglas überlassenen Blutzellen mit

Formalindampf fixiert und mit Viktoriablauf gefärbt. Durch die in dieser Richtung fortgesetzten Versuche wurde festgestellt, daß in den kurz nach der Blutentnahme fixierten neutrophilen Leukocyten mit Sudan III fast keine Granula darzustellen sind, wohl aber mit Viktoriablauf, Irisolechtviolett BBN und Sudanschwarz B, welche zahlreiche Granula anfärben können. Die Färbbarkeit der Granula verstärkt sich während der Überlassung des Blutes mehr oder weniger bedeutend, nimmt aber nach 24 Stunden wieder ab.

内 容 自 抄

クエン酸ソーダ溶液を加えて試験管内に放置せられた人の血液の塗布を、重クロム酸塩溶液で固定し、非水液で処置する Ciaccio 氏法にてズダン III で染める代りに、ビクトリア青で染めれば、好中球の類脂質粒子がよく現わされ、ズダン黒 B とイリゾールエヒト堇 BBN ではなおよく現わされる。放置の時とともに染色性が増加し、24 時間後には再び減ずる。非水液で処置しない Baker 氏法が類脂質粒子を現わすのは、ほぼ上記のビクトリア青の程度であった。

Literatur.

Lillie, R. D and **H. J. Burtner**: Stable sudanophilia of human neutrophil leucocytes in relation to peroxidase and oxidase. *J. Histochem. Cytochem.* 1 (1953). — **McManus, J. F. A.**: Granules of the human polymorphonuclear leucocyte. *Nature* 156 (1945). — **Nakayama, Y.**: Histochemical study about fatty substances of leucocyte. (*Jap.*) *Tr. Soc. Path. Jap.* 37 (1948). — **Namba, S.**: Veränderungen der Färbbarkeit mit Viktoriablauf der Erythrocyten und Leukocyten in dem in Reagenzglas überlassenen Blut des Menschen. *Arch. hist. jap.* 9 (1959). — **Sehrt, E.**: Histologie und Chemie der Lipide der weißen Blutzellen und ihre Beziehung zur Oxydase-reaktion, sowie über den Stand der modernen Histologie der Zellipide. Leipzig, 1927.