Aus dem Anatomischen Institut der Med. Fakultät, Univ. Okayama
(Vorstand: Prof. M. SEKI).

Über das Eintreten des lipoidlöslichen Farbstoffes, Viktoriablau, in die Nasen- und Rachenschleimhaut der Maus.

類脂溶性の染料ビクトリア青の二十日鼠の鼻と咽頭の粘膜
への進入に就いて.

Hideo TAKAHASI 高橋秀夫.

[Eingegangen am 31. Januar 1954.]

Der Verfasser (1954) hat in die Naris der Maus eine Lösung eines für vitale Färbung gebräuchlichen Säurefarbstoffes, Trypanblau, eingetröpfelt und die Art und Weise des Eindringens dieses lipoidunlöslichen, verhältnismäßig großmolekularen Farbstoffes in die Nasen- und Rachenschleimhaut beobachtet. Zur Ergänzung war noch ein Experiment mit einem lipoidlöslichen Farbstoff notwendig, da die Zellen und die interzellularen Substanzen lipoidreich sind. Unter den lipoidlöslichen Farbstoffen empfahl KOYAMA (1950) Viktoriablau 4R als der beste. Es wurde mit diesem Farbstoff folgende Untersuchung vorgenommen.

I. Material und Methode.

Eine 1%ige Lösung von Viktoriablau (der Firma MERCK) in 90%igem Alkohol wurde mit physiologischer NaCl-Lösung 5,000- und 10 000-fach verdünnt und in die Nasenöffnung der Maus eingetröpfelt. Die erstere Verdünnung diente für die Untersuchung des Rachens, die letztere aber für die der Nasenhöhle. Die Farblösung wurde dabei unter Benutzung einer Glaspipette mit einer gestumpften Spitze von Zeit zu Zeit eingetröpfelt, damit die Farbe durch die eigene Flimmerbewegung des Schleimhautepithels nach hinten befördert wurde.

Die Eintröpfelung der Farblösung dauerte, wie bei der früheren Arbeit mit Trypanblau, 2, 5, 10, 20 und 60 Minuten. Nach 3, 5, 10, 40 und 120 Minuten tötete man die Tiere. Die Versuchstiere betrugten 4 für jedes Experiment und 40 im ganzen. Gleich nach schneller Entfernung von Haut, Gehirnschädel und Zähnen wurde der Oberkiefer mit der Nasenhöhle für 1—2 Stunden in eine 10%ige Formalinlösung gebracht, darauf zerlegte man das Objekt ohne Wasserspülung in Gefrierschnitte von 15—20 μ Dicke. Die Hälfte der Schnitte wurde sofort, die andere Hälfte wurde aber nach einer schwachen Nachfärbung mit Kernechtrot,

auf einem Objektglas einige Minuten getrocknet. Die Präparate wurden nach Eintauchen in Xylol im Xylolbalsam eingeschlossen. Es ist rätlich dem Xylol eine 10%tige Menge von Benzol zuzusetzen, weil das reine Xylol dem Rest von Wasser im Schnitte zu feind ist. Um zu sehen, ob der Farbstoff zum Teil während der Fixierung in der Formalinlösung in tiefere Schichten des Gewebes diffundiert oder aber sich aus dem Gewebe auslöst, wusch man schnell das Gewebestück mit physiologischer NaCl-lösung und zerlegte es ohne Fixierung in Gefrierschnitte, und man verglich dies mit den obigen Schnitten. Es wurde ferner nach 40 Minuten nach 20minutigen Eintröpfeln ein Gewebestück sofort, ein anderes Gewebestück aber nach 2tägiger Fixierung in 10%iger Formalinlösung in Gefrierschnitte zerlegt, und diese beiden Schnitte wurden verglichen. Durch eine nähere Untersuchung wurde bestätigt, daß praktisch der wasserunlösliche Farbstoff Viktoriablauf sich während der Fixierung nicht verschieben.

II. Ergebnisse der Versuche.

A. Nasenhöhle.

1. Regio respiratoria.

3 Minuten nach einem 2minutigen Eintröpfeln. Der Farbstoff Viktoriablauf färbt die Oberfläche des Flimmerepithels und dringt zugleich in die interzellularen Räume der Epithelzellen ein, wobei er die Seitenfläche der Epithelzellen färbt. Die Farbe erreicht aber nicht das subepitheliale Gewebe. Die Farbe geht besonders schnell durch die Spalträume um die Becherzellen.

Unter dem Epithel der Regio respiratoria färbt sich dasjenige des unteren Abschnittes des Nasenseptums und der hinteren Nasenöffnung am frühesten.

5 Minuten nach einem 5minutigen Eintröpfeln. Der Farbstoff dringt durch die Zellen selbst und durch die interzellularen Räume in die Tiefe des Epithels ein und gelangt durch die Basalmembran hindurch zum subepithelialen Bindegewebe, das er schwach färbt (Abb. 1). Der Farbstoff färbt die Oberfläche der Becherzellen stark, geht aber nicht in ihr Inneres. Durch genauere Untersuchung wird festgestellt, daß die Basalmembran, selbst wenn der Kern der Flimmerzellen und der Leib der Basalzellen noch ungefärbt bleiben, schon ziemlich distinkt gefärbt wird.

10 Minuten nach einem 10minutigen Eintröpfeln. Das Flimmerepithel wird, wie in Abb. 2 gezeigt, diffus gefärbt, wobei aber die Flimmerhaare, die interzellularen Räume und die Basalmembran sich besonders stark färben. Das Innere der Becherzellen färbt sich hier auch nicht gut und sieht wie eine Höhle aus. Die unter das Epithel eingegangene Farbe färbt die Bindegewebsfasern und die Wand der Blutkapillaren.

Abb. 1. Mehrreihiges Epithel der hinteren Nesenöffnung. 5 Minuten nach 5minütigen Eintropfen der Viktoriablaulösung. Das Viktoriablau färbt die Zylinderepithelzellen. Die Basalmembran und das subepitheliale Gewebe sind auch gefärbt. Das Innere der Becherzellen bleibt ungefärbt. 1,000 $\times$. Erklärung der Abkürzungen in Abb. 1 bis 7: **Bj** Blutgefäß, **Bm** Basalmembran, **Bz** Becherzellen, **Dr** Drüse, **D** Drüsenausführungsgang, **Ep** Epithel, **Fbc** Fibrocyten, **Hsc** Histiocyten, **Fz** Zylinderepithel mit Fimbrilhaaren, **Kd** Kehldeckel, **Kf** kollagene Fasern, **Mz** Mastzellen, **nL** neutrophile Leucocyten, **R** Nasaltteil des Rachens, **R** Oralteil des Rachens.

Abb. 2. Aus dem Mittelteil des Nasenseptums. 10 Minuten nach 10minütigen Eintropfen. Die Gefäßwand ist auch schwach gefärbt. Das Innere der Becherzellen ist farbfrei. 400 $\times$.

40 Minuten nach einem 20minutigen Eintröpfeln. Die Flimmerzellen färben sich diffus so stark, daß man die einzelnen Zellen nicht mehr unterscheiden kann. Die Farbe geht viel mehr als in den früheren Zeiten in das subepitheliale Gewebe ein. Dabei färbt sich die Drüsenwand schwächer als die Gefäßwand. Man sieht stellenweise neutrophile, segmentkernige Zellen im Bindegewebe. Die Schleimhaut ist offenbar etwas entzündet. Gelegentlich werden Histioeyten mit aufgespeicherten, schwach blau gefärbten Granula und Mastzellen mit zahlreichen, viel stärker gefärbten spezifischen Körnchen getroffen.

Es wurden Schnitte aus zwei Gewebestücken, von denen das eine nicht fixiert und das andere in 10%iger Formalinlösung 2 Tage fixiert worden war, vergleichend untersucht. In den Schnitten aus dem lange in der Fixierungsflüssigkeit aufbewahrten Gewebestück ist das Epithel durchschnittlich etwas stärker blau gefärbt. Aber die Weise des Eindringens der Farbe in das Gewebe und ihre Verbreitung in ihm ist die gleiche. Eine bedeutende Diffusion der Farbe während und nach der Fixierung wird also nicht wahrgenommen.

In den meisten Fällen tritt Viktoriablauf in die Nebenhöhle der Nase ein. Nach 20minutigen Eintröpfeln erreicht die Farbe manchmal die Kapillarenwand unter dem Epithel, aber nur in geringem Grade. Das Epithel des Ductus nasolacimalis und des JACOBSONSchen Organs blieb immer ungefärbt.

2. Regio olfactoria.

Schon 3 Minuten nach 2minutigen Eintröpfeln färbt der Farbstoff den oberen Abschnitt der Riechzellen schwach, und 5 Minuten nach 5minutigen Eintröpfeln wird der Kern der Riechzellen gefärbt. Nach mehr als 10 Minuten dauerndem Eintröpfeln werden auch die Stützzellen des Epithels sowie verschiedene Gewebelemente unter dem Epithel schwach angefärbt. Der Kern der Riechzellen färbt sich dabei nur in geringem Grade besser als das Cytoplasma, dagegen wird der Kern bei Eintröpfeln, von Trypanblau, wie es SEKI (1940) gezeigt hat, tief blau tingiert.

B. Rachen.

Die durch die Flimmerbewegung nach hinten geflossene Farbe färbt, wie in Abb. 3 gezeigt, die laterale Wand des Nasalteils des Rachens, den Scheitelrand des Kehldeckels, den Zungenrücken und die Wände der auf den lateralen Seiten der Zunge liegenden Furchen besonders gut. An dem weichen Gaumen wird das Epithel schwach gefärbt.

1. Nasaler Teil des Rachens.

Erst 10 Minuten nach 10minutigem Eintröpfeln gelangt die Farbe zu der Rachenmündung der Ohrtrumpete und zu der dorsalen Gegend derselben. Die Farbe dringt in das Epithel ein, wie bei der respiratori-

Abb. 3. Übersicht über den Rachen. Frontalschnitt. 40 Minuten nach 20-minütigen Eintröpfeln. Der Farbstoff dringt leicht durch das Epithel an der lateralen Wand des Nasalteiles des Rachens und an der vorderen Fläche des Kehlkopfs hindurch in das subepitheliale Gewebe ein. 22×.

schen Regio der Nasenschleimhaut beobachtet wurde. Die Farbe tritt nur wenig in die Ohrtrumpete. 40 Minuten nach 20minütigem Eintröpfeln färbt die Farbe das Flimmerepithel diffus, erreicht über die Basalmembran hinaus das subepitheliale Gewebe und färbt die Bindegewebsfasern schwach (Abb. 4). Bei näherer Beobachtung findet man oft Mastzellen mit stark gefärbten Granula und Histiocyten mit schwächer gefärbten Speicherungen. Daneben werden auch neutrophile Leukozyten mit einem stark blau gefärbten Kern angetroffen, der offenbar nach dem Tod der Zellen gefärbt ist.

40 Minuten nach 20minütigen Eintröpfeln dringt der Farbstoff durch das ventral von der Mündung der Ohrtrumpete liegende, mehrreihige Epithel in das darunter gelegene Bindegewebe und färbt verschiedene Gewebselemente blaßblau.

2. Oraler Teil des Rachens.

Das in die Nasenhöhle eingetröpfelte Viktoriablau tritt nach 20 Minuten nirgends in das Epithel ein.

40 Minuten nach 20minütigen Eintröpfeln färbt sich aber das die ventrale Fläche des Kehlkopfs bedeckende Zylinderepithel stark, zudem kolorieren sich auch viele Gewebselemente unter dem Epithel (Abb. 3). Das geschichtete Plattenepithel an anderen Orten wird nur in seiner oberflächlichen Schicht gefärbt.

Abb. 4. Aus dem Nasalteil des Rachens gegenüber dem weichen Gaumen. 40 Minuten nach 20minütigen Eintröpfeln. Der in das subepitheliale Gewebe eingewanderte Farbstoff färbt leicht die Bindegewebsfasern. Man sieht Mastzellen, Histiocyten und gestorbene neutrophile Leukocyten. 400×.

2 Stunden nach 1stündigem Eintröpfeln färbt der Farbstoff nicht nur das geschichtete Plattenepithel auf der dorsalen Fläche des Kehldeckels und an der lateralen Wand des hinteren Teils des Rachens stark, sondern auch durch das Epithel hindurch viele Gewebelemente unter dem Epithel (Abb. 5 und 6). Aber am dicken geschichteten Plattenepithel des Zungenrückens und des weichen Gaumens tritt der Farbstoff nur bis zu den interzellularen Räumen seiner mittleren Schicht ein. Der Farbstoff geht nicht weit in die Ausführungsgänge der hier vorhandenen Drüsen und färbt, wie in Abb. 7 gezeigt, ihre Wand schwach. In dieser Zeit dringt der Farbstoff durch das geschichtete Plattenepithel am hinteren Teil des Bodens der Mundhöhle in das darunter gelegene Gewebe ein.

Nach einstündigem Eintröpfeln von Viktoriablau erscheinen neutrophile Leukocyten stellenweise im Bindegewebe. 2 Stunden nach dem

Abb. 5. Aus einem Ende des Kehlschneides. Frontalschnitt. 2 Stunden nach 1stündigem Eintröpfeln. Schwache Nachfärbung mit Kernechtrot. Der Farbstoff färbt das Epithel stark und geht in das subepitheliale Gewebe über. Die mit Viktoriablau gefärbten Gebilde im Bindegewebe sind dunkler und die mit Kernechtrot gefärbten sind schwächer dargestellt. 510 $\times$.

Abb. 6. Aus der dorsalen Wand des Oralteils des Rachens. 2 Stunden nach 1stündigem Eintröpfeln. Das subepitheliale Gewebe ist blaßblau mit Viktoriablau durchgetränkt. Der Kern von gestorbenen neutrophilen Leukoeyten tingiert sich dunkel. 400 $\times$.

Abb. 7. Mündung eines Ausführungsgangs der Drüse auf dem Zungenrücken. 40 Minuten nach 20minütigem Eintröpfeln. Aus der Färbung des Epithels des Ausführungsgangs ersieht man, daß die Farbe gegen den Sekretstrom nicht leicht in den Gang eingeht. 400×.

Istündigen Eintröpfeln sieht man, wie in Abb. 6 gezeigt, hier und da gestorbene neutrophile Zellen, deren Kern tief mit Viktoriablau gefärbt ist.

III. Zusammenfassung.

Ein in Wasser nicht löslicher, wohl aber lipoidlöslicher Farbstoff, Viktoriablau, wurde in Form einer wässriger Lösung in die Naris der Maus eingetröpfelt, und dabei wurde die Art und Weise des Eintretens des Farbstoffes in die Nasen- und Rachenschleimhaut untersucht.

1. Das Viktoriablau färbt schnell den oberen Rand des Zylinderepithels mit Flimmerhaaren, erreicht durch die interzellularen Räume das Basalmembran und tritt dieses durch. Nach längeren Eintröpfeln der Viktoriablaulösung werden die ganzen Flimmerzellen diffus gefärbt, dabei bleibt der Inhalt der Becherzellen gewöhnlich kaum gefärbt.

2. In der Regio olfactoria der Nasenschleimhaut wird das Viktoriablau von den Riechzellen aufgenommen, färbt sie aber nicht so stark wie ein Säurefarbstoff, Trypanblau. Später färbt das Viktoriablau die Stützzellen.

3. Das geschichtete Epithel ist schwerer durchlässig als das Zylinderepithel. Aber nach längerem Eintröpfeln der Viktoriablaulösung bietet

das Epithel an der dorsalen Fläche des Kehldeckels, der dorso-lateralen Wand des Oralteils des Rachens und dem Boden der Mundhöhle dem Farbstoff keinen Widerstand mehr. Das Epithel am Zungenrücken und weichen Gaumen läßt aber dabei die Farbe nicht durch.

4. Das lipoidlösliche Viktoriablau tritt im Vergleich zum lipoidunlöslichen Trypanblau mit einer etwa zweimal größeren Schnelligkeit durch das Zylinderepithel in das subepitheliale Gewebe ein. Es kann auch gegenüber dem Trypanblau leichter in das geschichtete Plattenepithel eingehen. Was bezüglich der relativen Leichtigkeit und Wege des Eintretens von Viktoriablau in die Naser- und Rachenschleimhaut beobachtet wurde, gilt wahrscheinlich auch von den ebenfalls lipoidlöslichen Alkaloiden, wie Cocain, und anderen verschiedenen lipoidlöslichen Arzneimitteln.

内 容 自 抄

類脂質によく溶ける中等極性染料なるビクトリア青の溶液を鼻腔に滴入すれば、先ず速かに二十日鼠の鼻腔の絨毛柱形上皮の頂縁を染め、類脂質に溶けない染料のトリパン青の約2倍の速さで上皮細胞の間隙に進入して、細胞の表面を染めながら基底膜に達し、それを染めたのち上皮下に入る。その間に染料は細胞体の内にも易く入り、絨毛柱形上皮を普遍に染める。これは類脂質に溶けない酸性染料のトリパン青が絨毛細胞の胞体を殆んど染めず、主に上皮細胞の間隙のみを通つて上皮下に進むのと違う。杯細胞の粘液はビクトリア青に染り難い。

嗅上皮では嗅細胞の上部の突起が早く染まり、次に核が染まり、次いで支柱細胞も淡染して上皮は普遍に染まるが、トリパン青の場合のように嗅細胞の上部と核が特に甚だ強く染まることはない。

咽頭口部の重層扁平上皮では他の柱形上皮の部に較べてやや染料の進入が遅れるが、そのうち喉頭蓋の背面、口腔底の上皮等は比較的染料を通し易く、舌背や軟口蓋の強い重層扁平上皮はそれを通さない。

ビクトリア青が鼻腔と咽頭の粘膜へ進入する難易と通路について見たことは、やはり類脂溶性であるコカイン等のアルカロイドや他の種々の類脂溶性の薬品にても同様であろう。

Literatur.

- Koyama, Y.** : Versuche der Färbung von Ölen und Fetten mit alkohollöslichen Farbstoffen. (Jap. m. dtsch. Zfass.) Arch. hist. jap. 1 (1950). —
Seki, M. : Vitalfärbung des Riechepithels der Maus mit Trypanblau. Z. Zell-

forsch. 31 (1940) od. Arch. hist. jap. 3 (1952). — **Takahasi, H.:** Durchlässigkeit der Schleimhaut der Nase und des Rachens für lipoidunlösliches Trypanblau. Arch. hist. jap. 6 (1954).