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

Veränderungen in der Färbbarkeit mit lipoidfärbendem Viktoriablau bei den von Pankreatin angegriffenen Leberzellen.

パンクレアチンが作用した肝細胞の類脂質染料なる
ビクトリア青での染色性の変化.

Yoshiki TAMURA 田村良喜.

[Eingegangen am 26. November 1954.]

In meinem vorigen Versuche (1954) habe ich beobachtet, daß in den Leberzellen der Mäuse mit speziell lipoidfärbendem Viktoriablau gut färbbare Granula reichlich vorhanden sind, und daß diese, wenn die Versuchstiere mit Lecithin intravenös injiziert werden, sich noch vermehren. Es wurde von MORI (1954) festgestellt, daß die mit dem Eiweißverdauungsferment Pankreatin versetzten Milchkügelchen in der Kuhmilch im Verlauf der Zeit mit Viktoriablau immer stärker und in größerer Zahl färbbar werden, daß ferner bei der Fütterung der Mäuse mit der Kuhmilch die in den Magen und Darm gelangten Milchkügelchen mit Viktoriablau sehr stark färbbar werden. In der vorliegenden Arbeit ließ ich das Pankreatin auf die Leberschnitte der Maus einwirken und beobachtete die Zellen nach der Färbung mit Viktoriablau.

I. Material und Methode.

Die Mäuseleber wurde herausgenommen, in eine physiologische Kochsalzlösung gebracht, und aus ihr wurden 40μ dicke Gefrierschnitte hergestellt. Man übertrug die Schnitte aus der physiologischen Kochsalzlösung in eine mit derselben Lösung bereitete auf 25°C gehaltene 0.01%ige Pankreatinlösung von pH7.5. Nach 5, 10 und 20 Minuten wurden die Schnitte für 3 Minuten in eine mit physiologischer Kochsalzlösung bereitete 1%ige Formalinlösung gebracht, um die Wirkung des Pankreatins umzusetzen. Nach etwa 3minütiger Ausspülung im Wasser wurden die Schnitte schließlich in eine 0.01%ige Viktoriablaulösung eingelegt, die ebenfalls mit physiologischer Kochsalzlösung bereitet wurde. Man bereitete diese Farbstofflösung, richtiger Farbstoffsuspension, indem man eine 1%ige alkoholische Viktoriablaulösung mit der Kochsalzlösung 300fach verdünnte. Die in ihr 10 Minuten gefärbten Schnitte wurden kurz abgespült, auf ein Objektglas gebracht, abgetropft, vor dem Ab-

trocknen im Gummisirup, bestehend aus Gummi arabicum 5, Rohrzucker 5 und Wasser 20, eingeschlossen und mikroskopiert. In diesem wässrigen Einschlußmedium werden die Zellen allerdings nicht hinreichend aufgeheilt. Die feinsten Gebilde in ihnen waren also nicht sehr deutlich zu sehen, aber das Ziel meiner Untersuchung konnte im Großen erreicht werden. Kontrollversuche an den nicht mit Pankreatin versetzten Gefrierschnitten liefen parallel.

II. Ergebnisse der Untersuchung.

a) *Färbung der unbehandelten Leberschnitte.*

Wie man aus Abb. 1 ersieht, finden sich blau färbbare Granula verschiedener Größe im ganzen Bereich des Zelleibes der Leberzellen.

Abb. 1. Viktoriablafärbung des nicht fixierten Gefrierschnittes der Mäuseleber. Die feinste Struktur ist infolge des den Schnitt umgebenden wässrigen Einschlußmittels nicht sehr deutlich, man sieht aber außer den vielen runden und polymorphen Körperchen von verschiedener Größe und Färbungsstärke noch zahlreiche als Mitochondrien anzusehende kleine stäbchenförmige, ovale und runde Gebilde. 960 $\times$.

Die Cytoplasmagrundsubstanz zwischen den gefärbten Körperchen wird schwach gefärbt. Das zeigt, daß in ihr Lipide, wenn auch gering, enthalten sind.

Ein gleiches Bild habe ich früher (1953) an zuvor mit Formalin fixierten Leberschnitten beobachtet. Unter den mit Viktoriablau gefärbten Granula gibt es fadenförmige, stäbchenförmige, rundliche und ovale. Die faden- und stäbchenförmigen sind wahrscheinlich Mitochondrien und finden sich in der Nähe der Kernes verhältnismäßig zahlreich. Die runden und ovalen sind ohne Zweifel zum Teil Mitochondrien und zum größten Teil aus Eiweiß bestehende Einschlüsse und fettige Körperchen. Außerdem sieht man zwischen solchen gefärbten Granula zahlreich unregelmäßig gestaltete, nicht gut färbbare Körperchen. Die kleinen lipoiden Einschlüsse in den mit OsO_4 fixierten Leberzellen, die von PALADE (1952) im Elektronenmikroskop beobachtet wurden, färben sich mit Viktoriablau ziemlich stark.

b) *Färbung nach 5 Minuten langer Wirkung des Pankreatins.*

Die mit Viktoriablau stark färbbaren Granula von verschiedener Größe nehmen an Zahl und an Färbstärke bedeutend zu (Abb. 2). Die besonders stark dunkel färbbaren Granula sind verhältnismäßig groß und verteilen sich im ganzen Bereich der Zellen. Auch die Färbbarkeit der kleinsten Granula und der Mitochondrien verstärkt sich, wenn auch nur in geringem Maße. BENSLEY (1937) trennte die Mitochondrien aus der Emulsion der Leberzellen durch Centrifugierung ab und untersuchte sie chemisch. Nach ihm sollen die Bestandteile der Mitochondrien folgende sein: Proteine und Unbekannte 64.67%, Glyceride 28.88%, Lecithin, Cephalin etc. 4.2% und Cholesterol 2.25%. Es ist leichtverständlich, daß infolge der Wirkung des Pankreatins die Eiweißsubstanz der Mitochondrien zersezt wird, so daß die demaskierten, frei gewordenen Lipoiden nun mit Viktoriablau färbbar werden.

Abb. 2. Viktoriablau färbung des Schnittes nach 5minütiger Wirkung des Pankreatins. Die Färbbarkeit der Körperchen in den Leberzellen, einschließlich der Mitochondrien, verstärkt sich. 960 $\times$.

Die Färbung der Cytoplasmagrundsubstanz steigert sich nach der Wirkung des Pankreatins nicht, weil die Grundsubstanz so zart und substanzarm ist, daß durch die Wirkung des Pankreatins die demaskierten Lipoiden mit den zersetzten Eiweißsubstanzen in kurzer Zeit fast restlos verloren gehen.

c) *Färbung nach 10 Minuten langer Wirkung des Pankreatins.*

Die Färbbarkeit der verschiedenen Granula in den Leberzellen mit Viktoriablau steigert sich noch mehr, und die Unterscheidung der Mitochondrien von den anderen Granula ist fast unmöglich (Abb. 3). Die Cytoplasmagrundsubstanz ist kaum zu bemerken.

d) *Färbung nach 20 Minuten langer Wirkung des Pankreatins.*

Die meisten Gebilde in den Leberzellen färben sich stark, und der Zelleib erscheint mit den so tingierten Gebilden vollpfropft (Abb. 4).

Abb. 3. Viktoriablaufärbung des Schnittes nach 10minütiger Wirkung des Pankreatins. Die Färbungstärke der Gebilde in den Leberzellen steigert sich noch mehr. Die Cytoplasmagrundsubstanz ist größtenteils ausgelöst. 960 $\times$.

Abb. 4. Viktoriablaufärbung des Schnittes nach 20minütiger Wirkung des Pankreatins. Alle Gebilde in den Leberzellen färben sich sehr stark. 960 $\times$.

III. Zusammenfassung.

Man ließ das Pankreatin auf die Gefrierschnitte der frischen Mäuseleber einwirken und stellte fest, daß die in den Leberzellen vorhandenen Mitochondrien und andere Körperchen (verschiedene Zelleinschlüsse, fettige Körperchen usw.) mit dem Viktoriablau stark färbbar werden. Dies beruht offenbar auf der Demaskierung der Lipide in diesen Gebilden.

内 容 自 抄.

二十日鼠の生の肝の凍結切片にパンクレアチンを作用させ、ビクトリア青で染め、肝細胞内の粒子の染色の状況を観察した。パンクレアチンによる蛋白分解が進むにつれて、肝細胞内の糸粒体と諸粒子（種々の細胞包含物、脂肪性の粒子等）がビクトリア青に強く染まるようになる。これはそれ等の物象の類脂質が脱仮面されるためと解せられる。

Literatur.

Bensley, R. R.: On the fat distribution in mitochondria of the guinea

pig liver. Anat. Rec. 69 (1937). — **Mori, Ch.**: Morphologische Studien über die Verdauung der Milchkügelchen. Arch. hist. jap. 6 (1954). — **Palade, G. E.**: A study of fixation for electron microscopy. J. exp. Med. 95 (1952). — **Tamura, Y.**: Viktoriablau-Färbung der Schnitte von Leber, Niere und Lymphknoten der mit Lecithin intravenös injizierten Mäuse. Arch. hist. jap. 6 (1954).