処理過程に於ける犢皮組織の変化に関する研究

V 石灰漬せる生皮組織の変化に関する組織化学的研究

木 塚 静 雄

(山口大学農学部)

Studies on the histological changes of calf skin during the process

V Histochemical studies on the reaction of tissue in the skin treated by lime solution

SHIZUO KIZUKA

(Faculty of Agriculture, Yamaguchi University)

I 緒 言

第2報において観察せる如く形態的に見れば石灰液は生皮内各組織に対して一様に作用するものではなく、或る組織には容易に作用し、他の組織には影響が少なかった。然るに飽和石灰液はかなり強いアルカリ性を有し各組織に対してそれぞれ化学的影響を与えと思われるが、複雑な機構になる生皮内の各組織を個別に摘出して分析することも困難であるので、これを組織化学的方法により定性的に追求して各組織に起る反応を検討し、形態的变化の研究を一步進めんと試みたので本報においてこれを取纏める。

II 研究材料及び方法

1. 研究材料 第2報において供試せるものと同じ原皮(a_1 及び b_2)を用い、その隣接部を $1.0 \times 1.5 \text{ cm}^2$ 程度に切截して材料となした。

2. 研究方法 石灰漬により $\text{Ca}(\text{OH})_2$ が生皮組織と結合し或は組織間に沈着せる状態を究明するには生体内に生理的に存在するCaの検出とは同一にすることは出来ない。即ち石灰漬の場合は $\text{Ca}(\text{OH})_2$ は解離して Ca^{++} 、 OH^- の状態が存在するとせられるので先づ沈澱剤を用いて Ca^{++} を沈澱せしめた後でその反応を観察したが沈澱剤には蓚酸 Ammonium (COONH_4)₂を用いた。また別に硝酸銀を用いその還元作用を利用して試料中のCaの状態を検せんと試みた。以上の外に硫酸銅及び硝酸 Cobalt も試用してみたがこれ等の結果は参考とするに足るものは得られなかつたのである。

III 実験及び観察

A 蓚酸 Ammonium による場合

本法は GRASSER の一般分析に於ける石灰定量法を応用したものである。

a 実験法 先づ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ の飽和溶液(pH 12.4)を作り、この中に供試材料を入れ 15°C に保持し72時間静置後取出し別の容器に新しく調製した $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 飽和溶液を以て洗滌しその儘直接に CH_3COOH の25%液に移し20分間処理し次いで蓚酸 Ammonium(COONH_4)₂の飽和溶液に移し48時間処理する。

此の材料を以て一般法に従い切片を作つた。

〔註〕脱水、包埋等の操作時には殆んど色彩の変化はない。即ち石灰の皮よりの滲出はないようであるが切片の Paraffin 溶解の時より漸次褪色し、水洗前後に至つて殆んど無色となる。

かくて得た切片は夫々次の染色を施した。

- (a) Purpurin(Merk, Purpurinの無水酒精飽和溶液)
- (b) Direct black E.G. Conc の1%酸性溶液(CH_3COOH 添加)
- (c) Purpurin+Rämon Cajal の Picro-indigo carmin
- (d) Orcein(Unna Taenzerの方法)
- (e) Resorcinfuchsin(Weigert氏)
- (f) Congored 1%溶液
- (g) Phenolphthalein 酒精飽和溶液
- (h) Scarlet 1%酸性溶液
- (i) Haematoxylin(Böhmer氏)

b 観 察

1 Purpurin に依る場合 1) 表皮層は全面に鮮赤色となり胚芽層、顆粒層等の区別が付き難い。元来材料は3日間の石灰漬によつたものであるから表皮層の細胞は崩壊したものが多いため各層の識別は困難になる。胚芽層の底部と真皮乳頭層との境界部は明かで表皮層は濃

赤色であるのに真皮層は無色に近い。但しこの境界部には部位により弾性繊維の如き黒線条が認められる。

2) 真皮層中膠原繊維は染色されず無色で弾性繊維は微細なものまで赤黒色に染まる。立毛筋、皮脂腺、毛等も同様に染まるが、仔細に観察すれば筋原繊維間の接合部は濃赤色であり、立毛筋全体は淡色である。皮脂腺では変形していないものにも濃淡の別があり、染色された部位では核も染色されるが亦全く染色されない部位もある。汗腺は大体崩壊されていると思われるが染別された場所はない。毛嚢の外根鞘、内根鞘、毛小皮各細胞間は濃赤色となり細胞個々の分離状態も見られる。細胞中に核の尙存在するものもあるが形状不定である。

3) 皮下組織中の弾性繊維は僅かに膨潤して鮮赤色に染まる。その他は染まらない。併し血管の内膜のみは赤染している。

2 Direct black (E. G. Cone) の場合 表皮及び毛は赤色染し、立毛筋は淡赤乃至淡赤紫色を呈するが明瞭でない。真皮中の他の組織即ち膠原繊維は無色に近い淡色であり、弾性繊維は明瞭でないが皮下組織中のものは明らかに赤染する。之等の呈色は時間の経過と共に褪色し又橙黄色に変わる。尙石灰処理せざる生皮切片を試料として同様処置をしたがその場合は胚芽細胞以外は全然呈色反応は見られなかつた。

3 Purpurin+Picro-indigo carmin の場合 Purpurin で染色したものに更に Picro-indigo carmin で重複染色したのであるが本法によれば呈色部位は概して Purpurin の場合と同一部位であり色調は淡褐色乃至緑褐色を呈する。対照として生皮切片を染色すれば表皮、毛嚢等の Keratin 質の部は Picrin 酸により黄色となり、立毛筋は緑黄色を呈するが他は一様に緑色となる。

4 Orcein の場合 本法では弾性繊維の部のみ僅かに染色され色調は淡紫色である。対照の生皮切片の場合も弾性繊維のみ紫染する。

5 Resorcin fuchsin の場合 真皮、皮下組織共に弾性繊維は鮮明な黒色を呈し表皮、毛嚢等は全く無色である。後染色として Orange fuchsin 法を試みたが表皮毛嚢、立毛筋は何れも赤→橙の移行色を呈し真皮と表皮との境界に細い黒線条を認める。随所に橙色の顆粒を認める。真皮中の膠原繊維は一応染色されるが直ちに褪色して無色となる。

6 Congored の場合 Congored は元来溶液の酸性反応に利用される色素であるが中性の場合赤色となり弱アルカリの場合褐色を呈する。今その1%溶液に切片を浸漬すれば一様に灰褐色を呈し多く繊維組織の部分に褐色と赤色とその移行色の部分が出て染むらを生ずる。対照として生皮切片を染色すれば一様に赤染し組織の染色

差別は認められない。従つてこれは判定資料にはなし難い。

7 Phenolphthalein の場合 一般に稀薄な $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 溶液に Phenolphthalein 液を滴下すれば直ちに赤紫色の反応を示すのでこれを応用して石灰漬皮の切片に適用しこの Phenolphthalein 液中に切片を浸漬したか何等の呈色をなさず、故に切片を $(\text{COONH}_4)_2$ で処理したもので試みれば僅かに皮下組織中の弾性繊維が淡赤色を呈するがこれも間もなく褪色してしまう。

以上の諸反応を表示すれば第1表の如くなる。

第1表 石灰漬せる贖皮内各組織の反応

試 薬		プル プリン	フレ ゾ ル シン	オル シ エン	カ ジ ク ル ミ ン	ビ ク ロ イ ン ゴン	ブ ダ イ レ ツ ク ト
試料組織	角 質	+	-	-	+	+	+
	淡 明	-	-	-	-	-	-
皮 粒 層	細胞	+	-	-	+	+	+
	顆粒	+	-	-	-	-	-
層 胚 芽 層	核	+	-	-	-	-	-
	細胞	++	-	-	+	+	+
真 立 毛 筋 織 維	細胞	+	-	-	+	+	+
	汗 腺	+	-	-	-	-	-
皮 皮 脂 腺	細胞	+	-	-	-	-	-
	弾 性 織 維	++	++	++	++	++	++
層 膠 原 織 維	細胞	-	-	-	-	-	-
	織 維	-	-	-	-	-	-
血 管	内 膜	++	++	+	+	+	+
	外 膜	-	-	-	-	-	-
毛 及 び 毛 嚢	内 髓 質	++	-	-	+	+	+
	内 根 鞘	+	-	-	+	+	+
	外 根 鞘	+	-	-	+	+	+
皮 組 弾 性 織 維	下 織 疎 性 結 合 組 織	++	++	++	++	++	++
	備 考	物 質 染 色 性	ア ル カ リ 色 性	染 エ ラ ス チ ン	染 エ ラ ス チ ン	一 般 染 色	異 染 色 調

B 硝酸銀による場合

本法の目的は石灰漬せる皮組織内の石灰の状態を観察する為に行つたが、これは直接的検索は困難である。何となれば組織が $\text{Ca}(\text{OH})_2$ で塩基性となる為に銀粒子が組織面において一様に還元せられ全面的に黒色乃至黄黒色となつて判別出来ないからである。故に次の如き実験法を行つた。

a 実験法 石灰液に浸漬せる皮片を先ず醋酸 Ammonium で処理し充分に醋酸石灰の沈澱の生ずるのを待ち(72時間処理した)これをよく水洗し、組織間内に残留する醋酸石灰を可及的に脱去せしめ、2% AgNO_3 液中に24時間浸漬し、脱水包埋して切片を作成、80%酒精に10時間浸漬し残留せる銀粒子を流せば比較的明瞭な標本を得ることができる。

b 観 察 銀粒子は表皮角質層の細胞の剝離せる状態の通りに並列し顆粒層より胚芽層までは粒子の存在は

なく一面に黒色となり、これと同様な状態が毛の外根鞘、内根鞘、皮質及び立毛筋、皮脂腺周辺等に見られる。皮脂腺に於いては同一腺内で多量に粒子の生ずるものと然らざるものとがあり、核の存在は不明である。真皮中の膠原繊維では銀粒子の状態は一応平均して褐赤は赤染しているが、濃淡の斑々な箇所もある。造繊維細胞の存在部位と思われる所は形状不定で黒色を呈している。亦膠原繊維の繊維束の随所に繊維束を横断する如き縞様の密なる黒色粒子の列が見られるがこれも濃淡の異なる所と不明瞭な所が見られる。乳頭層の弾性繊維は銀粒子の大きさに比し細微なためその判別はつきかねる。皮下組織の弾性繊維はその存在部位と思われる所にも粒子の形成は全然認められず、黄褐乃至淡黄色を呈している間に介在して結合組織繊維部には明瞭に粒子を生じているのが観察される。

第2表 硝酸銀による反応

項 目	角 質 層	顆 粒 層	胚 芽 核	立 毛 筋 細 胞	脂 腺 細 胞	汗 腺 細 胞	弾 性 細 胞	血 管 膜	膠 原 纖 維	毛 及 毛 囊	皮 下 層	疎 性 結 合 組 織
生皮	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
石灰処理皮	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

IV 考 察

1 反応検索について 本研究の目的は石灰漬によつて惹起された皮内組織の変化についてその形態的变化を観察すると共にその性状の変化を組織化学的方法によつて究明せんとしたものであるが前者は既に第2報において観察したので本報では主として後者について考察する。皮内組織中のアルカリ性物質に最も鋭敏な反応をなせる試薬は Purpurin で、これは生皮では何等の反応をなさないに不拘石灰漬皮には所期の反応をなした。Phenolphthalein は溶液に対しては敏感であるが組織には殆んど反応を起さない。Orcein 及び Resorcin fuchsin は弾性繊維にのみ敏感に作用した。一般染色及び Metachromat 染色はこれ等の反応を確かめるための参考に供したものである。而して硝酸銀はアルカリに対する銀反応の有無を目的として試用したものである。以上により実験観察の結果次の如く考察した。

2 膠原繊維の反応 膠原繊維は Purpurin その他の試薬によつてもアルカリの反応を呈しない。⁽¹⁾ Beck 及び Theis and Jacoby 等は石灰漬せる Collagen はその等電点を pH の低位に移行するといひ、これは構成アミノ酸のうちアミド態のものが脱アミノするためであるとせ

られる。本研究の結果もこれと符合して硝酸銀の反応あるに不拘全体としては酸性の反応を呈するのでこれによつて膠原繊維は石灰漬により変性することが判定される。硝酸銀によつて膠原繊維はその面が一応赤乃至褐色に染るが銀粒子の配列は濃淡不整である。元来銀粒子はその殆んど全部が組織表面に沈着し、移動性が容易であり、更に pH がアルカリ側にあるときのみ蛋白質と結合するとせられるものであるから、この赤乃至褐色の色素反応は膠原繊維の実質において反応せるものに非ずして単にその面に沈着せる Ca による反応像ではないかと考察せられる。併し膠原繊維の随所に特異の横断斑を生じたことは単なる銀粒子の配列とも思われず、或は膠原繊維が X 光線⁽³⁾に対して特異の斑像を形成すると報告せる Astbury の説と対照して膠原繊維中には銀粒子の特に強く作用する特定の物質があつて、この斑の位置にあら

われたのではないかと推察されるのである。次に表皮層と相接する真皮層最外部については、第一報において「末端の判別し難い微細なる膠原繊維が相纏絡して平板状の層を形成し他に比し染色度が薄い」と報告したのであるが、本実験において Purpurin 並に Resorcin fuchsin を試用する場合に弾性繊維の反応と酷似する反応を呈することを観察したのである。併し他の試薬による場合には弾性繊維の反応があらわれるにも不拘、此の部位には反応はなかつた。従つて今これを早計に断定することは出来ないが従来定説の無いこの部（所謂銀面と通称せられる）の研究に幾分の資料を提供し得るものと考察する。

3 弾性繊維の反応 弾性繊維は Purpurin その他により生皮の場合は染着しないにも拘らず、石灰漬によつて良く呈色するようになるので、石灰と結合して蛋白塩を形成せる如く見られるが単に以上の反応のみでは変性したという証明にはならない。然るに弾性繊維は銀反応をしなかつた。銀粒子は前記の如く物理的に組織の表面にのみ吸着するものとみなされ、膠原繊維にはその反応をみたが弾性繊維にはみないのであつて、このことは繊維が銀の吸着を排除したと見る外はないので結局弾性繊維の界面に起る特異な現象であると考察される。

4 皮組織中石灰に作用され易き部分 石灰漬せる皮では Keratin 質の組織が Purpurin によつて濃淡の差はあつても全てよく赤染されるがこのことは Keratin がアルカリ溶液により加水分解し、OH⁻が増加することにより塩基性根が増加しそのため酸性色素溶液においてそれ自身の酸性根を有する色素酸と結合して染色され易くなるものと考察する。また各組織を構成する細胞は互に接合質によつて結ばれるが、石灰溶液によつてこれ等は同時に溶解されるものではない。形態的にはその位

置による影響が多いが、またその各個の抵抗性は異なる。接合質は一種の膜 Albumin によつて成りアルカリ溶液には容易に溶解するものであるから各種細胞はそれ自身が溶解する前に先ず接合質の溶解によつて細胞間に間隙を生じ、然る後抵抗性の強弱により弱いものから次第に溶解するのであつて、上皮性の細胞や、立毛筋細胞は弱い。従つて本実験では3日間の石灰漬により既に多くの結合質や細胞が溶解消失しているために Purpurin その他の反応を起さなかつたものと思われる。汗腺の反応が無いのは斯の如き理由によるであろう。

5 石灰漬皮中の皮脂細胞 第2報でも観察した様に皮脂腺の一部皮脂細胞殊に脂肪顆粒中には長期石灰漬によつても著明な変化を起さないものがある。本実験においても石灰漬の切片に顆粒状の脂肪顆粒が殆んど変化せず残存するものが認められた。これは皮脂細胞中に石灰液によつて変化を蒙らぬものが存在することを意味する。元来皮脂細胞中の成分にもその細胞の発達過程によつて発育初期のもの、緩溶解をなし自然的崩壊の寸前にあるもの等があり、内容成分にも差異があつて本質的にはその内容は複雑である。脂肪球として成長したものには不飽和物たる cholesterol, phosphatid, 核蛋白質等を含み Glyceride は比較的少ないとせられる。従つて脂肪顆粒の鹼化は極めて小部分に限られるものであつて脂肪顆粒が脱落し或は消失するのは多くは脂肪顆粒を囲む他組織のアルカリによる溶解に起因すると考察せられる。なお残存する皮脂細胞は他と同じく Purpurin の反応は明かにあらわれる。

V 総 括

3日間石灰漬をなした犢生皮の組織を組織化学的に検索して次の結果を得た。

1 膠原繊維は石灰漬によつて明かに変性し酸性の反応を呈するに至つた。また硝酸銀で検した結果繊維面に縞状の紋が形成されることを認めた。

2 弾性繊維は石灰と結合して蛋白塩を形成するようで、そのため特定の色素で染色すれば生皮に比し染色度を増してくる。硝酸銀の吸着は起らない。

図 版 説 明

第3報附図

Fig. 1 犢皮乳頭層の変化(固定切片の石灰漬3日目)

Fig. 2 " " (" " 25日目)

Fig. 3 " " (" " 40日目)

第4報附図

Fig. 4 犢皮表皮層の状況(Trypsin 消化10時間目)

3 上皮性の各組織は3日間の石灰漬で溶出するものがあるが、色素反応よりすればアルカリ性となる。

4 皮脂腺中の脂肪顆粒は内容も複雑とせられるが石灰漬によつて作用不均一で変化せぬものが多い。石灰漬による脱脂の効果は鹼化よりも寧ろ支持組織の崩壊に主因があると考察される。

5 乳頭層上部真皮、表皮両層の境界に弾性繊維と類似の反応が少数例観察された。(1952, 11, 14受付)

文 献

- 1 BECK, J. TR. (1938): A. L. C. A., 33, 621
- 2 THEIS, E. R. and JACOBY, T. F. (1940): A. L. C. A., 35, 257
- 3 ASTODARY (1938): J. A. Biochem.

Résumé

1 The collagen fibre of the raw skin degenerated and presented a reaction of acidity by soaking in lime solution. The result of treating the collagen fibre with silver nitrate showed little dots in stripes on the surface of fibre.

2 The elastic fibre combined with lime formed the protein base. Therefore, it presented remarkable reactions to the special pigments and was stained better than raw skin. Silver grains were not recognized in the place where the elastic fibre existed.

3 The epidermistic tissue including epidermis also presented basic character by liming.

4 The contents of the sebum cutaneum in the sebaceous gland are much complicated, and the reaction by lime solution is not always equal. It is considered that the sebum cutaneum seldom saponifies. The effect of taking fat away by liming is considered to be produced chiefly by breaking the supporting tissue.

Fig. 5 犢皮網状層下部の状況(" " 20時間目)

第5報附図

Fig. 6 犢皮乳頭層斜断面(Purpurin 染色)

Fig. 7 犢皮網状層下部(Resorcinfuchsin 染色)

Fig. 8 " " (Picro indigo carmin 染色)