

セロイジン包埋・パールワイゲルト染色法による 魚類脳髓の連続切片標本作製の1改良法*

内 橋 潔**・島村 初太郎・本田 厚子

パール・ワイゲルト法による染色法は、従来神経組織の標本作製に多く用いられてきたが、実際に標本作製すると、わずかな操作の違いや、薬品の用い方によって、標本のでき具合が左右される場合が多く、標本の破損もあつて連続切片標本等を作る場合には支障をきたすのが常である。筆者らが魚類脳髓の標本作製するに際して行なっている方法は、割合これらの欠点が除かれているように思われる。とくに、セロイジン・フィルムを用いて、一定枚数の標本をまとめる方法は、法政大学、柘植博士がソ連から聞いて帰つた方法を、筆者らが改良したものでこれらの仕事にたずさわる人々にとつて、きわめて有益なものであると思われる。その方法を述べると下記の通りである。

1. フォルマリン固定

摘出した脳を10%中性フォルマリン液に7~10日間固定。

2. 水洗

流水で約1昼夜水洗する。

3. ミュウレル氏液固定

ミュウレル氏液に入れ37°Cに調節した恒温器内で2週間固定する。固定する期間が短かいと染まりが悪く、入れ過ぎると標本がもろくなる。

4. 水洗

流水中で約1晩。

5. アルコール脱水

各濃度アルコールに各々1日。

6. セロイジン包埋

7. 15~20 μ 切片作製

魚脳の場合この厚さが最適である。

8. フィルム作製

ガラス板にデキストリン・シロップ液を流し、少し乾かす。70%アルコールで浸した半透明タイプ用紙片に切片を裏返しに張りつけ、ガラス板にのせ静かに紙をはがすと切片はきれいにガラス板に張付く。水分を吸い取り、5%セロイジン液を均等の厚さになるように流し、しばらくして、適当の大きさにメスで条痕をつける。水中に入れると、ガラス板から離れるので墨で番号をつける。

9. ミュウレル氏液に入れる

上記のフィルムをミュウレル氏液につけて約5日間37°Cを保つ。

10. 水洗

ミュウレル氏液の色が出なくなるまで約20分。

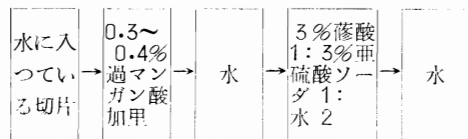
11. ワイゲルト・ヘマトキシリン染色

ワイゲルト・ヘマトキシリン染色液に入れ、37°C恒温器内で1晩おく（原液が調剤してから日が浅く充分熟成していない場合は過マンガン酸加里0.4%液を6滴位入れる）。

12. 水洗

充分さめてから染色液から水道水にだし、炭酸リチウム飽和溶液を少々滴下して鮮やかな色になつたら、水中に色が出なくなるまで水洗する。

13. 弁色



(上記の順序を誤ると標本は退色破損し、)
沈澱も生じて使用不可能になる。

0.4%過マンガン酸加里液に30~60秒入れ、水に

* Kiyoshi Uchihashi, Hatsutarō Shimamura & Atsuko Honda: A modified method of celloidin Pal-weigert staining for the continuous histological preparation of fish brain.

** 北海道区水産研究所。

移し、3% 蔞酸と3% 亜硫酸ソーダの等分液(使用直前にまぜ合す)に同量の水を加えた中に移すと髄鞘は青紫色に、他の部分は白色になる。過マンガン酸加里溶液中では標本がもろくなるので入れ過ぎないように注意する。

14. 水洗

水中に1晩おくと髄鞘は青黒味を帯びてくる。(蒸留水ではいけない)

15. カルミン染色

染色液をよく濾過し、フィルムを蒸留水でゆすぎ、軽く水分を吸い取り、pH約5.2に調整した染色液に入れ、さらにpH5.18~5.2に調整して37°C恒温器内で染色する。1晩でよく染まらない場合はさらにpHを調整しなおす(大体3日位で充分染まる)。あまり長くカルミン液に入れすぎると標本がもろくなる。過染した場合は炭酸リチウム飽和溶液の10%液か塩酸アルコール(70%アルコール100cc、塩酸1cc)で脱色する。沈澱が付着した場合は小筆(日本画面相書用の細筆)で表裏とも月念にとり除き組織を傷つけないように注意して蒸留水で充分すすぐ。

16. アルコール脱水、キシロール透徹

とくに注意することは濃度の高いアルコール中ではセロイデン・フィルムが溶解するので95%アルコールまでとし、これで充分に脱水しカルポール・キシロールに入れ、さらに、キシロールを通す。カルポールが標本に残ると色がさめやすい。

17. バルサム封入

バルサムは一度火にかけてテレピン油を蒸発させたものをキシロールで適當の固さにうすめて使用すると固まるのが早くて扱いやすい(とくにフィルム法では、大量のバルサムを使用するので、テレピン油を蒸発させないと3年以上経過した標

本でもよく固まらず、取扱いに困難をきたした経験がある)。

試薬

◎デキストリン・シロップ液	{ 白色デキストリン(飽和溶液) 1 単シロップ 3 96%アルコール 2
◎ワイゲルト・ヘマトキシリン原液	{ ヘマトキシリン粉末 1g 無水アルコール 10cc

メルク社製のヘマトキシリンを用い、褐色ピンに調剤後最低2週間放置して使用する。国産又は他社製品は魚脳の場合まったく染まらず不適当である。

◦ 使用液	{ へマトキシリン原液 10cc 炭酸リチウム飽和溶液 1cc 蒸留水 90cc
	{ カルミン 2g 強アンモニア 4cc 蒸留水 200cc
◎カルミン原液	{ カルミン 2g 強アンモニア 4cc 蒸留水 200cc

グリュウブレ社製のカルミン2gを強アンモニアを少しづつ滴下させながら乳鉢でよく混ぜ合せ、赤黒いアメ色になつてきたら、蒸留水200ccで広口ビンに洗い流して、口をガーゼでおおい熟させる。熟したものは黒赤色になる。

◦カルミン使用液	{ カルミン原液 10cc 蒸留水 120cc 0.4%塩酸水 2cc
----------	---

pH5.18~5.2位が一番良く染まる。染まりのよい液は振つてできた泡がなかなか消えない。酸性が強くなつてくると沈澱ができる。染色液は使用ごとにカルミン原液と0.4%塩酸で、pHを調整する。調剤後長時間を経たものほどよく、使用すればするほどよい(グリュウブレ社製以外の薬品を使用した場合はまったく染まらない)。