Methode zur sehr elektiven und sehr distinkten Darstellung der Mitochondrien durch Versilberung.

糸粒体を銀染により甚だ選択的に甚だ判然と現出する 1 法.

Shunsaku FUJII 藤井俊策.

(Eingegangen am 4. Oktober 1956.)

Es gibt schon über zehn ausgezeichnete Methoden zur Darstellung der Mitochondrien mit Farbstoffen, aber wir haben bisher kaum gute Versilberungsmethoden. Früher beobachtete KOLMER (1916) nach der CAJAL'schen Uran-Silbermethode häufig neben dem GOLGI-Apparat auch versilberte Mitochondrien. Es gelang TOMITA (1941) Mitochondrien nach seiner Gelatine-Silbermethode darzustellen. MATSUDA (1936) konnte nach einer modifizierten TOMITA'schen Methode Mitochondrien in den Pancreaszellen färben, und FUKUDA (1940) in den kultivierten Fibrocyten. Aber nach solcher Silbermethoden schwärzen sich neben den Mitochondrien sehr oft andere reduzierend wirkende Gebilde. Der Verfasser vorliegender Mitteilung konnte die Mitochondrien nach einer neuen Methode sehr elektiv und sehr distinkt darstellen. Danach behandelt man zuvor die Gewebsschnitte mit Goldchlorid und erst danach imprägniert man sie mit Silbernitrat.

I. Verfahren der Versilberung.

1. Ein frisches Gewebstückchen wird mit REGAUD'scher Bichromat-Formalinlösung für 2 Tage fixiert und dann für 5 Tage in 3%ige Bichromatlösung gelegt. Während dieser Zeit wird die Lösung täglich erneuert. Als Fixierungsmittel wurden außer der REGAUD'schen Flüssigkeit noch ORTH'sche Lösung, 10%iges neutrales Formalin, 10%iges Formalin und ZENKER-, HELLY- und BOUIN'sche Lösung durchprobiert. Die REGAUD'sche Flüssigkeit erwies sich aber als die beste, als nächstbeste folgten 10%iges Formalin und 10%iges neutrales Formalin, während andere Flüssigkeiten weniger gute Resultate gaben.

2. Gründliches Auswaschen in destilliertem Wasser für 1 Tag.

3. Entwässern und Einbetten in Paraffin wie gewöhnlich. Schneiden in Schnitte von 3—5 μ Dicke. Kleben der Schnitte auf dem Objektglas.

4. Ist das Bichromat aus den Schnitten nicht genügend ausgegangen, so wäscht man sie vor der Färbung mit 2—5%iger Bicarbonatlösung aus.

5. Nach kurzer Abspülung füllt man die Oberfläche des mit den

Schnitten aufgeklebten Objektglases 3—5 Minuten lang mit einer sehr verdünnten Goldchloridlösung. Die Goldchloridlösung wird bereitet, indem man 3 Tropfen einer 1%igen Goldchloridlösung in 5 cc destillierten Wassers löst.

6. Die Goldchloridlösung wird abgegoßen, und das Objektglas wird ohne Abspülung mit Wasser mit einer 1—2%igen Silbernitratlösung mit einem Zusatz von gleicher Menge 1%iger Gelatinelösung gefüllt und bei 37°C 3—4 Minuten lang liegen gelassen.

7. Nach Abgießen der Silbernitratlösung wird das Objektglas ohne Auswaschen mit Wasser mit einer Hydrochinonlösung, bestehend aus 0.5%-iger Hydrochinonlösung und 1%iger Gelatinelösung zu gleichen Teilen, gefüllt und bei 37°C für 1—2 Minuten lang liegen gelassen. Inzwischen beobachtet man die Schnitte unter dem Mikroskop. Zur Beobachtung überträgt man das Objektglas, sobald als im Cytoplasma schwarze Granula auftreten, ins Wasser.

8. Gründliches Auswaschen der Schnitte, dann Entwässern und Einschließen in Kanadabalsam.

In den gelungenen Präparaten tingieren sich die Mitochondrien sehr scharf schwarz mit violetterm Ton. Die Cytoplasmagrundsubstanz färbt sich entweder schwach gelblich oder blaßviolett. Der Kern färbt sich kaum, nur das Kernkörperchen tritt violettschwarz gefärbt auf. Zuweilen wird die Cytoplasmagrundsubstanz intensiv gelbbraun gefärbt. Dabei heben sich die ebenfalls gelbbraun gefärbten Mitochondrien nicht deutlich ab. Eine solche Folge tritt leicht ein, wenn eine nicht frische Silbernitrat- und Hydrochinonlösung angewandt wird. In einem solehem Falls ist eine Differenzung der Färbung mit einem Gemisch von 1%iger Ferricyankaliumlösung und einer 5%igen Natriumhyposulfitlösung im Verhältnis 1:10 zu empfehlen. Zur Nachfärbung des Kerns eignet sich Safranin oder Kern-echtrot.

II. Befunde der Mitochondrien in verschiedenen Zellen nach dieser Versilberungsmethode.

Im folgenden sollen die nach dieser Versilberungsmethode dargestellten Mitochondrien in verschiedenen Zellen der erwachsenen Maus besprochen werden.

1. *Submandibulardrüse.*

Über die Mitochondrien der Submandibulardrüse liegen viele Mitteilungen vor, wie z. B. von SCHLUTZE (1911), TAKAGI (1925) und SEKINE (1937). Nach meiner Versilberungsmethode erscheinen die meisten Mitochondrien in den Drüsenzellen des sezernierenden Teils, wie in Abb. 1 gezeigt ist, in Form von langen, dicken und oft an einem Ende verdickten Stäbchen mit einer leichten Krümmung. Körnige Formen sind wenig. Durch genauerer Beobachtung wird bestätigt, daß die stäbchenförmigen

Abb. 1. Submandibulardrüse. Ein Querschnitt des Streifenstückes in der Mitte der Abbildung. 900 $\times$.

Mitochondrien mehr im Basalteil und die granulären Formen mehr im apikalen Teil der Zellen vorhanden sind. Sie ordnen sich nicht sehr regelmäßig in den Zellen.

In den Zellen des Streifenstückes ordnen sich dagegen schlanke fadenförmige Mitochondrien von der Zellbasis senkrecht nach oben in longitudinaler Richtung und bilden sog. Basalstreifen. Die Mitochondrien sind auf der lateralen Seite des Kerns stäbchenförmig und verhältnismäßig weniger vorhanden, und über dem Kern körnig in Form und noch weniger an Zahl.

2. *Fundocorpusdrüsen des Magens.*

Über die Mitochondrien in den Zellen der Fundocorpusdrüsen gibt es eine Mitteilung von EKLÖF (1914), OKANISHI (1933), INOUE (1936) u. a. m. Die Mitochondrien der Hauptzellen werden nach meiner Methode wie in Abb. 2 dargestellt. Sie sind zum größten Teil fadenförmig und etwas dick oder schwach gekrümmt. Mitochondrien von Stäbchenform kommen wenig vor. Im Apikalteil der Zellen finden sich granuläre, ringförmige, perlenschnurartige Mitochondrien in geringer Zahl.

In den Belegzellen drängen sich verhältnismäßig grobe Granula. Diese Granula wurden von ZIMMERMANN (1898) als Sekretgranula und von SCHLUTZE (1911) und EKLÖF (1914) als Mitochondrien bezeichnet.

3. *Duodenum.*

Es gibt auch viele Untersuchungen über die Mitochondrien in den Epithelzellen des Duodenums. Danach sollen die Mitochondrien unter dem Kern körnig und über dem Kern stäbchenförmig sein. Auch in meinen versilberten Präparaten sind die Mitochondrien, wie es in Abb. 3 dargestellt

Abb. 2. Fundocorpusdrüsen des Magens. Haupt- und Belegzellen. 900 $\times$.

Abb. 3. Duodenum. Deckepithel. 900 $\times$.

ist, im supranuclearen Teil stäbchenförmig und longitudinal und parallel vorhanden, dagegen sind sie im infranuclearen Teil körnig und drängen sich dicht. Im Bereich des GOLGischen Apparates oberhalb des Kerns existieren fast keine Mitochondrien.

In den Epithelzellen des Endabschnittes des Dudenums vermehren sich die körnigen Mitochondrien im supranuclearen Teil der Zellen und die stäbchenförmigen im infranuclearen Teil derselben (Abb. 4).

In den Epithelzellen der Krypten (Abb. 5) sieht man eine Ansammlung von körnigen Mitochondrien nahe dem Scheitel der Zellen. Faden- und

Abb. 4. Endabschnitt des Duodenums. Deckepithel. 900 $\times$.

Abb. 5. Duodenum. Darmkrypten. 900 $\times$.

stäbchenförmige Mitochondrien sind hier selten.

Die Granula der PANETHschen Zellen treten mehr oder weniger geschwärzt auf.

Die Mitochondrien treten in den Zellen der BRUNNERSchen Duodenaldrüsen sehr distinkt zutage (Abb. 6). Die meisten von ihnen sind stäbchen- oder fadenförmig. Die länglichen Formen ordnen sich longitudinal und parallel.

4. *Blinddarm.*

Die Mitochondrien in den Epithelzellen sind, wie in Abb. 7 dargestellt

Abb. 6. BRUNNERSche Duodenaldrüse. 900 $\times$.

Abb. 7. Blinddarm. Deckepithel. 900 $\times$.

ist, zumeist stäbchen- oder fadenförmig und weniger an Zahl vorhanden als in den Zellen des Duodenums.

5. *Pancreas*.

Weil die Mitochondrien in den Pancreaszellen groß und leicht darstellbar sind, ist darüber eine große Literatur vorhanden. Wir finden z. B. die Arbeit von BENSLEY (1911), SCHLUTZE (1911), MISLAWSKY (1911, 1913), ARNOLD (1912) u. a. Die Abb. 8 zeigt die Mitochondrien in den Pancreaszellen nach meiner Methode. Sie sind von verschiedenen Formen:

Abb. 8. Pancreas. 900 $\times$.

faden- und stäbchenförmig, stäbchenförmig mit einer Verdickung am Ende oder an der Mitte und gerade und gekrümmt. In allgemein liegen lange Mitochondrien in dem Basalteil der Zellen und kurze mehr im Scheitelteil derselben. Die Mitochondrien richten sich nach dem Drüsenlumen hin und ordnen sich parallel. An einer anderen Stelle desselben Präparates sind aber die meisten Mitochondrien, wie man es in Abb. 9 sieht, stäbchen-

Abb. 9. Pancreas. 900 $\times$.

hanter-, komma-, und perlschnurförmig und körnig, dagegen sind lang-fadenförmige wenig zu finden. Man sieht also, daß je nach der Funktion der Zellen sich die Form und Zahl der Mitochondrien leicht und mannigfaltig verändern. Bei einer näheren Beobachtung in der Abb. 8 und 9 konstatiert man, daß das eine oder beide Enden der Mitochondrien oft schwächer geschwärzt, daß ferner schwächer geschwärzte ringförmige Gebilde von gleicher Größe vielerorts zwischen den Mitochondrien zu sehen sind. Es handelt sich vielleicht um Sekretionsgranula.

6. *Leber.*

Über die Mitochondrien in den Leberzellen der Maus gibt es eine genaue Arbeit von NOËL (1923). Danach sind die Mitochondrien in den Leberzellen in der Umgebung der Centralvene des Läppchens zum größten Teil im Ruhezustand und schlank von Gestalt, dagegen erscheinen sie in der Aktivitätsrandzone des Leberläppchens zumeist keulen- bis kugelförmig. In Abb. 10 ist ein Stück aus der Umgebung der Centralvene gezeigt. Stäbchenförmige Mitochondrien sind mehr vorhanden. Im Gegensatz dazu sind

Abb. 10. Leber. Aus dem Centralteil des Läppchens. 900 $\times$.

die Mitochondrien in Abb. 11 von dem peripheren Teil des Leberläppchens fast alle grob körnig. Die Mehrzahl von ihnen lagert sich in der Randzone des Zelleibes. Außer den Mitochondrien sieht man im Cytoplasma zahlreiche schwach gefärbte Körnchen, die wahrscheinlich lipoidhaltige Granula sind.

Abb. 11. Leber. Aus der Randzone des Läppchens. 900 $\times$.

7. Niere.

Aus der Literatur über die Mitochondrien des Harnkanälchens sind z. B. die Mitteilungen von BENDA (1903), KOLSTER (1911), MIYOSHI (1936) und SUNAGA (1955) zu nennen. Die sog. Nierenstäbchen in den Zellen des Hauptstückes des Harnkanälchens sind seit BENDA als Reihen der Mitochondrien angenommen. Dies ist ganz klar in unserer Abb. 12 veranschaulicht.

Abb. 12. Hauptstück der Niere. 900 $\times$.

8. Uterus.

Über die Mitochondrien der Epithelzellen des Uterus sind Berichte

von KATO (1929), OGAWA (1934) u. a. vorhanden. In Abb. 13 ist das Uterusepithel einer Maus in der Zeit 2 Tage nach der Geburt gezeigt. Die Mitochondrien sind meistens stäbchen- oder fadenförmig und verdicken sich häufig am Ende. Körnige Formen sind wenig. Die Verteilung der Mitochondrien oberhalb und unterhalb des Kerns ist nahezu die gleiche.

Abb. 13. Uterus, 2 tage nach Geburt. 900 $\times$.

9. Bläschendrüse.

Die Mitochondrien in den Zellen dieses Organs erscheinen meist ziemlich faden- und stäbchenförmig, zwischen diesen verteilen sich körnige Formen in geringer Zahl (Abb. 14).

Abb. 14. Bläschendrüse. 900 $\times$.

III. Auswertung der Ergebnisse.

Früher zog TANAKA (1927) etwas zwanzig Versilberungsmethoden zur Darstellung von Zellgranula in Betracht und wies auf die Möglichkeit der Versilberung verschiedener Gebilde in Cytoplasma hin. Nach meiner Methode, wonach man das Gewebe vor allem mit der REGAUDschen Flüssigkeit fixiert und dessen Schnitte nach der Vorbehandlung mit einer verdünnten Goldchloridlösung versilbert, werden solche Gebilde dargestellt, die aus ihrer Form, Zahl und Verteilung im Zelleib wenigstens zum größten Teil als Mitochondrien aufzufassen sind. Sie sind ganz anderes als die Granula, welche KON (1937) nach seiner Methode in Benutzung ammoniakalischer Silberlösung versilberte. Die Methoden von MATSUDA (1936) und TOMITA (1941), nach welchen das Gewebe in der osmiumsäurehaltigen CHAMPYschen oder FLEMMINGschen Lösung fixiert und mit einer Gelatine-Silberlösung behandelt wird, schwärzt nicht nur die Mitochondrien, sondern auch den GOLGI-Apparat oder die Lipoidgranula.

Der einzige Nachteil meiner Methode ist, daß die nach ihr geschwärmten Mitochondrien verglichen mit denen nach der HEIDENHAINschen Eisenhämatoxylinmethode u. a. bei Benutzung von Farbstoffen mehr oder weniger dick erscheinen. Je konzentrierter die Silbernitratlösung ist und je länger das Objekt damit behandelt wird, um so dicker erscheinen die Versilberungsbilder.

Weil das Silberbild nach dieser Methode nicht rein schwarz, sondern violettschwarz erscheint, muß das Gold sich im Silberbild hinzugesellt haben. Die Silberimpregnierung in den Mitochondrien nach meiner Methode vollzieht sich wahrscheinlich in der Weise, daß anfangs das Goldchlorid sich gleichmäßig sehr dünn in den Zellen des Schnittes verteilt, welches aber bei dem Einlegen des Schnittes in der Silbernitratlösung aus lockerer gebauten Strukturen rasch ausgeht, aber in den dichter gebauten Mitochondrien länger bleibt. Wenn die Silberionen in die Mitochondrien eindringen, verbinden sie sich mit den Chlorionen des Goldchlorides, und das entstandene unlösliche Silberchlorid setzt sich ab. Im Inneren der Mitochondrien koexistieren nun die gelösten Gold- und Silberionen. Durch Zusatz des Reduktionsmittels werden die Gold- und Silberionen reduziert und in metallisches Gold und Silber umgewandelt. Darauf, daß das naszierende metallische Silber sich besonders leicht und reichlich an der Oberfläche der Silberchloridniederschläge ablagert, hat schon SEKI (1940) hingewiesen. Mit der Zeit vermehrt sich die Ablagerung des Silbers, daher wird das Silberbild der Mitochondrien dicker. Ob und wie das Wechselspiel von Gold und Silber dabei vor sich geht, muss noch dahingestellt bleiben.

IV. Zusammenfassung.

Es wurden Paraffinschnitte von den mit der REGAUDschen Flüssig-

keit fixierten Gewebsstückchen nach der Vorbehandlung mit einer sehr verdünnten Goldchloridlösung mit einer Silbernitratlösung überdeckt und dann mit einem Gelatine-Hydrochinongemisch reduziert. Die Mitochondrien in den Zellen tingierten sich sehr elektiv violett-schwarz. Die Resultate der Versilberung nach dieser Methode an verschiedenen Organen sind mit Photographien gezeigt.

内 容 自 抄.

組織塊を Regaud 氏重クロム-ホルマリンで固定し、パラフィン切片とし、甚だ薄い塩化金溶液で前処理したのち、硝酸銀溶液を加え、ゲラチン-ヒドロキノンで還元すると、細胞の糸粒体が甚だ選択的に紫黒に染め出される。諸器官で行われたこの銀染法の結果を写真で示した。

Literatur.

- Arnold, G.**: The role of the chondriosomes in the cells of the guineapig's pancreas. Arch. Zellforsch. 8 (1912). — **Benda, C.**: Die Mitochondria des Nierenepithels. Verh. anat. Ges. 17 (1903). — **Bensley, R. R.**: Studies on the pancreas of the guineapig. Amer. J. Anat. 12 (1911). — **Eklöf, H.**: Chondriosomenstudien an den Epithel- und Drüsenzellen des Magen-Darmkanals und den Ösophagusdrüsenzellen bei Säugetieren. Anat. H. 51 (1914). — **Fukuda, E.**: Studien über die feinere innere Zellstruktur der Fibroblasten aus Gewebeskulturen in vitro. (Jap. m. dtsh. Zfass.) Kaibo Z. 16 (1940). — **Inoue, K.**: Zytologische Untersuchung der Belegzellen der Magen-Fundusdrüsen. IV. Beobachtung an der Ratte von der Geburt bis zur Reife. (Jap. m. dtsh. Zfass.) Kaibo Z. 9 (1936). — **Kato, K.**: Fein-histologische Veränderungen der Schleimepithel in der Pubertät, Schwangerschaft und dem Puerperiumstadium. (Jap.) Kaibo Z. 2 (1929). — **Kolmer, W.**: Über einige durch Ramon y Cajals Uran-Silbermethode darstellbare Strukturen und deren Bedeutung. Anat. Anz. 48 (1916). — **Kolster, R.**: Mitochondria und Sekretion in den Tubuli contorti der Niere. Beitr. path. Anat. 51 (1911). — **Kon, Y. u. K. Takeda**: Silberreaktion der endokrinen Drüsen und Histochemie. Tokyo, 1937. — **Matsuda, T.**: Eine Methode zur Darstellung der Plastosomen durch Silberimprägnationsmethode. (Jap.) Osaka Iji Shinshi. 7 (1936). — **Mislawsky, A. N.**: Beiträge zur Morphologie der Drüsenzelle. Über das Chondriom der Pancreaszelle einiger Nager. Anat. Anz. 39 (1911). — Über die Chondriom der Pancreaszellen. Arch. mikr. Anat. 81 (1913). — **Miyoshi, R.**: Zytologische Untersuchung der Nirenepithelzellen. (Jap. m. dtsh. Zfass.) Kaibo Z. 9 (1936). — **Noël, R.**: Sur quelques données relatives à l'histophysiologie du foi, et leur importance possible dans la pathologie hépatique. J. Med. Lyon. 1923. — **Okanishi, J.**: Studies on the mitochondria and metachondria of the gastric gland cells. I. The mitochondria and metachondria of the fundus gland cells. Jap. J. of exper. Med. 11 (1933). — **Ogawa, M.**: Zytologische Untersuchungen des Uterusepithels von Ratte. (Jap.) Kaibo Z. 7 (1934). — **Schlutze, O.**: Über die Genese der Granula in den Drüsenzellen. Anat. Anz. 38 (1911). — **Seki, M.**:

Zur Theorie der histologischen Silberschwarzung. I. Z. Zellforsch. 30 (1940). — **Sekine, M.**: Studien über die Mitochondrien und Metachondrien in den Speicherdrüsenzellen (Parotis und Submandibulardrüse). (Jap.) Jikken Igaku Z. 21 (1937). — **Sunaga, Y.**: Cytological studies on the renal corpuscle and the proximal convolution of the renal tubulus in the human kidney. I. Cytological observation of the epithelium of the proximal convolution. (Jap. m. eng. Zfass.) Arch. hist. jap. 8 (1955). — **Takagi, K.**: Untersuchungen über die Unterkieferdrüse der Katze mit besonderer Berücksichtigung des Chondrioms. Z. mikr. anat. Forsch. 2 (1925). — **Tanaka, R.**: Vergleichende Untersuchung über die Zellgranula nach verschiedenen Versilberungsmethoden. (Jap.) Trans. Soc. path. jap. 17 (1927). — **Tomita, T.**: Über eine in unserem Institut erfundene Versilberungsmethode und ihre Anwendung. Jap. J. of Med. Sci. I. Anat. 8 (1941). — **Zimmermann, K. W.**: Beiträge zur Kenntnis einiger Drüsen und Epithelien. Arch. mikr. Anat. 52 (1898).