京都府立医科大学, 第2解剖学教室 (主任: 山田 博教授).
Dept. of Anat., Kyoto Prefectural Med. College (Director: Prof. Dr. H. YAMADA).

光電管光度計による組織構成要素の量的測定法について.

On the Measurement Method for the Quantitative Analysis of Tissue Components by the Electric Photometer.

山田 博, 藤田尚男, 加納睦巳, 小室和信, 児玉昌彦
Hiroshi YAMADA, Hisao FUJITA, Mutsumi KANO,
Kazunobu KOMURO and Masahiko KODAMA.

(Received November 5, 1957.)

組織構成要素の量的関係や量的変化の状態を的確に把握しようとする場合, 普通に行われている疎密又は多寡によるあらし方や+記号の数によるあらし方では, 判定に一定の基準がないために観察者の主観に影響されてその成績は必ずしも一致せず, 又数的な表示によらないために観察結果の整理にも甚だ不便であることは言をまたない. そこでこれを出来るだけ客観的に且つ数的にあらしわそうとして planimeter による面積測定法, 切抜紙片の重量測定法, area sampling, line sampling, point sampling などの方法が考えられているが, これらの方法も各種の場合によく適用されるというのではなく, 又実施に大きな労力を要するものが多く, 殊に sampling の方法ではかなりの不正確さを免れることができない.

最近たまたま臓器組織の老化の研究において老化と密接な関係を有する弾性線維の量的変化の解明を試みようとしたところ, 従来の方法では到底満足な結果を期待することは困難であることが明瞭となり, これを機会にかねて考えていた光電管光度計による組織構成要素の量的測定法を成功させるべく工夫を重ねた結果, 本法が簡便で正確で利用効果の甚だ大きいことを確認することができたので, ここに報告することにした.

I. 測定法の考案に至るまで.

本研究の直接の動機をなした犬の大動脈の中膜の弾性線維の面積率即ち線維密度の測定にあたって, 最初に行った方法は Weigert の弾性線維染色を施した切片を光学顕微鏡にかけて下から強い光をあて, その透光度を光電管光度計で読む方法であった. これに使用した光電管光度計は東京光電研究所製の光電管式顕微鏡写真用露出計で, その校正用標準光源の安定保持のために定電圧装置を使用した. 又顕微鏡光源には 75W のリフレクターランプを使用し, フィルターとして磨硝子を用いた. まず顕微鏡の視野に切片の目的部分が全部入るように対物レンズを合せた後に, 接眼レンズを外して露出計の受感部を差込み, 露出計の指針の振れ

を読み取る。しかしこの方法では弾性線維染色の濃淡や、弾性線維以外の部分の着色や、バルサムなどの影響のために甚だ不正確な結果しか得られないことがわかった。

そこでこの切片法は中止して、切片の代りにフィルムを用いるフィルム法に切替えることにした。しかしこの場合も切片を撮影したそのままのフィルムでは上記の障害は少しも除かれないから、撮影したフィルムを常に一定の拡大率で印画紙に焼付け、この印画紙の上に一定の方眼紙を置き下から光をあてて透写を行い弾性線維の部分だけを製図用黒インクで黒く塗りつぶす方法をとることにした。この際黒さに濃淡のできないように注意する。このようにして出来上がった弾性線維の透写図をトレーシングペーパーと呼び、これを 35 mm フィルムに複写した。このフィルムを被検フィルムとして顕微鏡にかけて切片の場合と同様の方法で検査する。ただし対物レンズには倍率の小さい 4 倍程度のものを用いる。弾性線維の密度はその際の露出計の読みの逆数をもつてあらわしてもよいが、弾性線維の占める面積率をもってあらわした方が合理的で、すべての点において便利である。そこでこの面積率を求めるために、さきの場合と同質の方眼紙に平等間隔の黒線を同じ黒インクで色々の数に互に直交するように引いて黒色部の面積率を 10% から 10% おきに 100% まで 10 種類のものを作り、これを標準用紙と呼ぶことにした。この標準用紙を 35 mm フィルムに複写したものを標準用フィルムと呼ぶことにし、これを顕微鏡にかけてその各黒色部面積率に対する露出計の読みを最初に検べておき、被検フィルムの読みを標準用フィルムの読みに照合して弾性線維の面積率即ち線維密度を求める。この場合標準用フィルム又は被検フィルムにおける複写の際の拡大率はなんら考慮する必要はない。これは拡大しても黒色部と白色部と

の面積比には変化がないからである。又光源の距離や絞りなどはその都度適当に定めればよい。ただ標準用フィルムと被検フィルムの検査は同じ時に全く同一条件のもとに行わなければならない。

今 Weigert の弾性線維染色を

表 1. フィルム法による犬の大動脈中膜の弾性線維密度の測定例. I.

Table 1. An example of the measurement of the elastic fibers density in the aortic media of dog, obtained with the film method. I.

A. 標準用フィルム. Standard films.

Black area percentage (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Value on the photometer	5	12	17	23	28	37	46	56	65	84

B. 被検フィルム. Tracing films.

	Aorta ascendens	Aorta thoracica	Aorta abdominalis
Value on the photometer	67	38	12
Area percentage of elastic fibers (%)	90	60	20

施した犬の大動脈の各部分の中膜の顕微鏡写真における弾性線維を透写したトレーシングペーパーを複写した被検フィルムを、日を変えて2回同じものについて測定した例を示したものが表1と表2である。この表の標準用フィルム

表 2. フィルム法による犬の大動脈中膜の弾性線維密度の測定例. II.

Table 2. An example of the measurement of the elastic fibers density in the aortic media of dog, obtained with the film method. II.

A. 標準用フィルム. Standard films.

Black area percentage (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Value on the photometer	4	10	15	19	23	32	40	50	60	70

B. 被検フィルム. Tracing films.

	Aorta ascendens	Aorta thoracica	Aorta abdominalis
Value on the photometer	58	30	10
Area percentage of elastic fibers (%)	90	60	20

の場合の黒色部面積率の黒色部なる言葉の意味は元のトレーシングペーパーにおける黒色部をいい、フィルムでは黒白反対の関係にある。したがって黒色部面積率の大なるもの程フィルムにおける透光度は大きく、露出計の読みは大となる。標準用フィルムにおける読みの値が異なるのは光源の距離や絞りの状態が多少異なるからである。被検フィルムにおける読みを標準用フィルムのそれと照合して面積率を求めると第1回目の成績では上行大動脈90%, 胸大動脈60%, 腹大動脈20%の値を得、日を変えて行った第2回目の成績も第1回目と全く等しい値を示し、常に一定した測定値の得られることがわかった。この面積率はそのまま線維密度をあらわすもので、大動脈の各部分における弾性線維密度の関係をこれによって極めて正確に把握し得ることがわかる。

フィルム法に成功したわれわれは更に労力と費用の節約を計るためにトレーシングペーパーをそのまま使用して測定する方法即ちトレーシングペーパー法について吟味することにした。この方法は光学顕微鏡では行えないために万能引伸機を利用することにした。なお引伸用電球では明る過ぎるので電圧調整器を用いて30W程度に落して使用した。測定にあたっては引伸用レンズを取外し蛇腹はできるだけ短縮した。標準用紙又はトレーシングペーパーは2枚のキャビネ判硝子板の間に挟んで、これを引伸機のネガキャリア挿入部に挿入し、その下側の蛇腹の部分から露出計の受感部を挿入して透光度を測定した。なお受感部には長さ11cmの金属筒をはめて使用した。

まず図1に示すような黒色部面積率が10%宛異なる10種類の標準用紙についてその透光度を測定してみると、表3, Aに示す如き露出計の読みが得られる。それと同一条件のもとに図2に示す犬の上行大動脈、胸大動脈及び腹大動脈の中膜の

図 1. 標準用紙 (%は黒色部面積率を示す).

Fig. 1. Standard papers (% means $\frac{\text{Black sections}}{\text{Black and white sections}} \times 100$)

上行大動脈 Aorta ascendens.

胸大動脈 Aorta thoracica.

腹大動脈 Aorta abdominalis.

顕微鏡写真
Photomicrographs.

トレーシング-ペーパー
Tracing papers.

図 2. 犬の大動脈中膜の弾性線維の顕微鏡写真とトレーシング-ペーパー.
Fig. 2. Photomicrographs and tracing papers of the elastic fibers in the aortic media of dog.

表 3. トレーシング-ペーパー法による犬の大動脈中
膜の弾性線維密度の測定例.

Table 3. An example of the measurement of the elastic
fibers density in the aortic media of dog, obtained with
the 'tracing paper' method.

A. 標準用紙. Standard papers.

Black area percentage (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Value on the photometer	90	82	70	62	53	45	32	21	10	2

B. トレーシング-ペーパー Tracing papers.

	Aorta ascendens	Aorta thoracica	Aorta abdominalis
Value on the photometer	13	48	80
Area percentage of elastic fibers (%)	90	60	20

弾性線維のトレ
ーシング-ペー
パーを移動させ
ながら各部分の
透光度を測定し、
その平均値を求
めると、表 3, B
に示す如き露出
計の読みが得ら
れる。そこで後
者の読みを前者
の読みに照合し
て弾性線維の面
積率を求めると
上行大動脈では

90%, 胸大動脈では60%, 腹大動脈では20%なる値が得られ、これはそのまま線
維密度をあらわす。この成績はさきのフィルム法の場合と全く一致する。さきの
フィルム法ではフィルムの撮影及び現像条件を常に一定にしなければならず、又
現像濃などを生じないように注意しなければならないが、トレーシング-ペーパー
法ではこれらの煩雑さもなく、更に労力も費用も少なくて済むことから、遙かに
フィルム法に優るものといえる。

本測定法は又弾性線維のみならず膠原線維、格子線維、筋線維など各種線維の
密度測定にもよく利用し得るものである。この際夫々の線維に対して特殊染色を
施して行うことはいうまでもない。その他細胞の密度、実質と間質との量的比な
どの測定にも利用せられ、その利用範囲は甚だ大きい。

顕微鏡写真
Photomicrographs.

トレーシング-ペーパー
Tracing papers.

幼雛 (4 日, ♀) Chick (4 days old, ♀).

成鶏 (140日, ♀) Hen (140 days old, ♀).

図 3. 鶏の甲状腺の顕微鏡写真とトレーシング-ペーパー.
Fig. 3. Photomicrographs and tracing papers of the thyroid gland of domestic fowl.

今その1例として鶏の甲状腺の濾胞面積率の成長による変化を検べた例をかかげる. 図3に示す幼雛と成鶏のトレーシング-ペーパーについてその透光度を測定してみると, 表4に示す如く濾胞面積率は幼雛75%, 成鶏80%で両者の間に殆ど明瞭な

表 4. トレーシング-ペーパー法による鶏の甲状腺の濾胞面積率の測定例.

Table 4. An example of the measurement of the area percentage of the follicular tissue in the thyroid gland of domestic fowl, obtained with the 'tracing paper' method.

A. 標準用紙. Standard papers.

Black area percentage (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Value on the photometer	90	82	70	65	53	45	32	21	10	2

B. トレーシング-ペーパー. Tracing papers.

	Chick	Hen
Value on the photometer	75	80
Black area percentage (%)	25	20
Area percentage of follicular tissue (%)	75	80

差異は認められず, 濾胞面積率は成長によって殆ど変化しないことがこの方法によって簡単にわかる. なお本例において対象とする濾胞を黒く塗りつぶさず, その間の部分を黒く塗りつぶしたのは, 面積の少ない方を塗りつぶした方が労力的に少なくて済むからである.

II. 在来の方法との比較.

量的測定法として従来行われている方法のうち, planimeter による面積測定法や切抜紙片の重量測定法は今回の例の大動脈中膜の弾性線維密度や甲状腺の濾胞面積率の測定にはその適用が困難であり, 又 line sampling の方法は顕微鏡写真

の上に任意の方向に線を引き一定線分の長さに対してその線と交叉する線維の幅の総和の占める割合を求める方法であるが、今回の例の如き場合には甚だ不正確な成績しか得られない。したがって一応適用し得るものとしては area sampling と point sampling の方法の2つになる。そこでこの2つの方法をさきに行ったと同じものについて行って、これと新しく考案した方法との比較を行うことにした。

Area sampling の方法は顕微鏡写真の上に等間隔の縦横の線を描くか、又は方眼硝子板をその上にのせて、その一定数の区劃に対して被検組織成分が半分以上含まれる区劃の数の占める割合を求める方法である。幸いトレーシング-ペーパーは方眼紙を使用しているので、さきのトレーシング-ペーパーをそのまま利用して測定した。しかし全体にわたって測定するには非常な労力を要するので任意に3カ所を選んで夫々1カ所100目について測定した。その結果は表5に示す如く

表 5. Area sampling による犬の大動脈中膜の弾性線維密度の測定例。

Table 5. An example of the measurement of the elastic fibers density in the aortic media of dog, obtained with the area sampling method.

	Aorta ascendens	Aorta thoracica	Aorta abdominalis
Area percentage (%)	92	44	59
	94	55	15
	89	44	13
Mean	91	48	29

場所によって大きい差のあることがわかる。

殊にこれは線維密度の小なる場合に著明に認められる。即ち線維密度の大なる上行大動脈ではトレーシング-ペーパー法の場合とよく一致した成績を示すが、密度の小なる胸大動脈や腹大動脈ではもはや

さきの場合と一致した成績を示さない。かかる点から2—3カ所を選んで測定することは甚だ危険であることがわかるが、これを全体にわたって測定するには大きな労力を要し、又半分以上目標物の含まれる区劃のとり方についても絶対に正確なやり方とはいえず、これらの点においてトレーシング-ペーパー法に著しく劣るものといえる。

又 point sampling の方法は area sampling の場合の縦横両線の交点の一定数に対して線維と交叉する交点の数の占める割合を求める方法であるが、やはりさきのトレーシング-ペーパーについてこの

表 6. Point sampling による犬の大動脈中膜の弾性線維密度の測定例。

Table 6. An example of the measurement of the elastic fibers density in the aortic media of dog, obtained with the sampling method.

	Aorta ascendens	Aorta thoracica	Aorta abdominalis
Area percentage (%)	90	42	58
	95	57	14
	90	41	10
Mean	92	47	27

方法を行ってみると、表6に示す如く area sampling の場合と全く同様の成績が得られ、又これについても先に述べたと全く同様ながいえる。

又これらの方法でさきの鶏の甲状腺の濾胞面積率を求めてみると表7及び表8に示す如き成績が得られ、やはり場所によってかなりの差のあることから、広く全体にわたって測定する必要があることがわかる。しかしこれはさきの線維密度の場合程複雑ではないから、その成績もトレーシング-ペーパー法の場合にかなり近いことがわかる。

いずれにしてもsamplingの方法ではできるだけ正確な値を得ようとすれば大きな労力を必要とし、又その正確さの点においても絶対とはいえない。これに対してトレーシング-ペーパー法は甚だ簡単に全体を測定することができて正確な値を得ることができ、その簡便さと正確さにおいて従来の方法を遙かに凌駕するものといえることができる。

III. 結 語

組織構成要素の量的測定法としてわれわれが考案した光電管光度計によるトレーシング-ペーパー法が甚だ優秀な成績を収め得ることを知ったのでここに報告した。

Author's abstract.

To measure the tissue components quantitatively, a 'tracing paper' method is recommended. A section paper is placed on a photomicrograph of the section of the tissue, and the sections of the paper comprising the components of the tissue to be measured are smeared with drawing black ink. This tracing paper is then compared with a standard paper with 10 to 100% blackening in using the electric photometer. One put each paper, held between two glass plates, in the inserting space of the

表 7. Area sampling による鶏の甲状腺の濾胞面積率の測定例。

Table 7. An examples of the measurement of the area percentage of the follicular tissue in the thyroid gland of domestic fowl, obtained with the area sampling method.

	Chick	Hen
Area percentage (%)	67	90
	86	89
	71	80
Mean	75	86

表 8. Point sampling による鶏の甲状腺の濾胞面積率の測定例。

Table 8. An examples of the measurement of the area percentage of the follicular tissue in the thyroid gland of domestic fowl, obtained with the point sampling method.

	Chick	Hen
Area percentage (%)	65	88
	89	81
	77	92
Mean	77	87

nega-carrier of photoenlarger, remove the enlarger lens and set the light tube of photometer under the test paper. This 'tracing paper' method has been verified to be better than the all other methods regarding to simplicity and exactness.

文 献

Caspersson, T.: Anat. Anz. 101, Erg. (1954). S. 2. — **Eränkö, O.:** Quantitative methods in histology and microscopic histochemistry. 1955.