Anat. Inst. d. Mediz. Fak., Univ. Okayama (Vorstand: Prof. M. SEKI).

Elektronenbild der mit zwei Säurefarbstoffen von verschiedener Molekulargröße gefärbten kollagenen Mikrofibrillen.*

分子の大きさの異なる 2 種の酸性染料で染められた膠原微細線維の電子像.

Yutaka KOBAYASHI 小林 豊.

(Eingegangen am 15. Dezember 1957.)

HERRATH und DETTMER (1951) und DETTMER, NECKEL und RUSKA (1951) haben die Kollagenfasern nach der GÖMÖRIschen Methode versilbert und zum ersten Mal gefunden, daß zwar die D-Teile der quergestreiften Mikrofibrillen, aber nicht die H-Teile derselben mit den Silberteilen imprägniert werden. Neuerdings hat SUWA (1956) darauf aufmerksam gemacht, daß in den D-Teilen der Mikrofibrillen sich die unter dem Lichtmikroskop gelb bis gelbbraun erscheinenden Silberteilen deswegen entwickeln oder ablagern können, weil die molekularen Gefügelücken der D-Teile dazu genügend weit sind. Bei den nach einem Versilberungsverfahren unter dem Lichtmikroskop *gelb* erscheinenden Kollagenfasern sind die D-Teile der Mikrofibrillen mit kleinen Silberteilen von bis 20 $m\mu$ im Diameter abgelagert, und bei den *braun* bis *dunkelbraun* erscheinenden mit größeren Silberteilen von bis 30 $m\mu$. Das molekulare Gefüge der D-Teile ist also viel lockerer als das der H-Teile, seine Gefügelücken sind aber für die Ablagerung von noch größeren, *ganz schwarz* erscheinenden Silberteilen in ihnen nicht genügend weit. Ich färbte die Kollagenfasern mit zwei Säurefarbstoffen von verschiedener Farbe und Dispersität und konnte im Elektronoskop nachweisen, daß unter gewissem Mengenverhältnis von den Farbstoffen sich der gröber disperse Farbstoff fast lediglich in den D-Teilen abgelagert. Damit wollte ich zur Theorie der Färbungsverfahren nach VAN GIESON, nach HEIDENHAINs Azan u. dgl. beitragen.

I. Material und Methode.

Es wurden die mit 10%igem Formalin fixierten Schwanzsehnen einer erwachsenen Maus auf dem Gefriermikrotom 2mal 5 μ dick geschnitten. Die Schnitte wurden in einem Achatmörser sorgfältig mit 2 cc destillierten Wassers 20 Minuten lang verrieben. Auf der anderen Seite bereitete man mit der Pufferlösung von pH 3 nach Mc ILVAINE eine 0.5%ige Lösung von kleinmolekularer Pikrinsäure, 0.25%ige Lösung von größermolekularem Anilinblau und eine Mischung aus gleichen Raumteilen einer 1%iger Pikrinsäure- und einer 0.5%iger Anilinblaulösung. Zu 1 cc jeder Lösung setzte man einen Tropfen der Suspension der verriebenen Kollagenfasern. Nach 20minütiger Färbung wurde ein Tropfen des Gemisches zum Aus-

* Dédicé à mon ancien et vénéré maître, Monsieur le professeur A. POLICARD à Lyon, actuellement à Paris. Votre dévoué et reconnaissant élève, M. SEKI.

waschen der gefärbten Kollagenfasern in 2 cc destillierten Wassers hineingetan. Sogleich danach nahm man ein Tröpfchen der Suspension der gefärbten Kollagenfasern mit einer Platinöse auf eine befilmte Objektblende und trocknete es. Die Präparate wurden ohne Bedampfung mit Metall im Elektronoskop photographiert.

II. Ergebnisse und Auswertung.

Die Kollagenmikrofibrille, die weder gefärbt, noch mit Metall bedampft ist, zeigt im Elektronoskop die Querzonierung aus schattendichten D- und schattenschwachen H-Teilen nicht sehr deutlich, wie in Abb. 1 dargestellt ist. Die Abb. 2 stellt die Kollagenmikrofibrille dar, welche nur mit kleinemolekularer Pikrinsäure gefärbt ist. Die Moleküle von Pikrinsäure dringen sowohl in die D-Teile als auch in die H-Teile, so daß die Querzonierung eher undeutlicher geworden ist als bei der Fibrille ohne Färbung. Die Mikrofibrillen in Abb. 3 sind dagegen nur mit großmolekularem Anilinblau gefärbt. Man sieht, daß alle Querzonen der Mikrofibrillen in etwa gleichem Ausmaße schattendichter geworden sind, so daß die Querzonierung hier auch nicht deutlich ist. Wenn man aber die Kollagenfasern nach dem Färbeprinzip von VAN GIESON, Azan u. dgl. mit einer Mischung von kleinemolekularer saurer Pikrinsäure und von großmolekularem saurem Anilinblau in geeignetem Verhältnis färbt, so werden die D-Teile sehr dunkel, aber die H-Teile bleiben hell, daher heben sich die D-Teile stark ab, wie in Abb. 4 gezeigt ist.

Nach der Methode von VAN GIESON oder dem HEIDENHAINschen Azan-Verfahren färben sich unter dem Lichtmikroskop die ultrastrukturell weitporig gebauten Kollagenfasern mit großmolekularer Farbe (bei VAN GIESON mit rotem Säurefuchsin und beim Azan mit blauem Anilinblau), aber die engporige Muskulatur mit kleinemolekularer (bei VAN GIESON mit gelber Pikrinsäure und beim Azan mit rotem Azokarmin, in den extremen Fällen mit gelbem Goldorange G oder Orange G). Das Cytoplasma erscheint dabei in einer Mischfarbe. Diese differente Färbung der Gewebelemente ist hauptsächlich die Folge der differenten ultrastrukturellen Gefügedichte der letzteren und zugleich auch, worauf schon früher SEKI (1936, 1939) aufmerksam gemacht hat, die des Wettstreites der Farbanionen um Adsorption am Substrate. Das gleiche muß von den D- und H-Teilen der Querzonierung der Kollagenmikrofibrillen gelten. Nämlich, die großen schattendichten Anilinblauanionen, die wie leicht nachweislich an den meisten Substraten stark adsorbierbar sind, drängen die kleineren, weniger adsorbierbaren, ebenfalls elektrisch negativ geladenen Pikrinsäureanionen aus den D-Teilen, treten aber in die dichteren, engporigen H-Teile nur gering ein, zumal die kleinen schattenschwachen Pikrinsäureanionen sich in die H-Teile leicht diffundieren und die Anilinblauanionen daraus verdrängen, da die kleinen Pikrinsäureanionen dort an Zahl weit überlegen werden. Als Folge tritt der Kontrastunterschied zwischen den D- und H-Teilen sehr stark hervor.

Das obige Experiment bestätigt zugleich die von SEKI (1955) geäußerte Hypothese, daß die Gefügelücken des substanzreichen, aus parallel angeordneten Molekülen und Micellen bestehenden D-Teils viel weiträumiger sind als diejenigen des substanzarmen, aus ungeordneten Molekülen und Micellen zusammengesetzten H-Teils.

Die Kollagenmikrofibrillen sind anfänglich 10—20 m μ dick und verlängern sich dann, wie auch aus den Untersuchungen von POLICARD, COLLET und GILTAIRE-RALYTE (1954) und POLICARD und COLLET (1956) hervorgeht, nach und nach und binden sich zugleich in ein dickeres Bündel zusammen. Dabei koinzidieren die Strukturperiode der Mikrofibrillen, indem die D-Teile einer Mikrofibrille mit denen der anderen in einer Reihe stehen. Die Koinzidierung der Strukturperiode scheint hauptsächlich durch die Wechselwirkung zwischen den elektrischen Ladungen der aus regelmäßig angeordneten Ionen und Dipolen bestehenden, also elektrostatisch wirksamen D-Teile von benachbarten Mikrofibrillen bewirkt zu werden, eine Vermutung, die sich auch aus der Beobachtung über die periodische Querzonierung von SEKI (1955) ergibt.

III. Zusammenfassung.

Es wurden die Kollagenfibrillen der mit Formalin fixierten Schwanzsehne der Maus mit einer Mischung von kleinmolekularer *Pikrinsäure* und großmolekularem *Anilinblau* gefärbt, und die D-Teile der periodischen Querzonierung konnten stark schattendicht gemacht werden. Bei der Färbung mit reiner *Pikrinsäure*- oder *Anilinblaulösung* wird dagegen die Querzonierung eher etwas undeutlicher, da sowohl die D- als auch H-Teile ihre Schattendichte vermehren, und zwar bei *Pikrinsäure* gleichmäßig in schwachem und bei *Anilinblau* gleichmäßig in starkem Maße. Man nimmt an, daß bei der Färbung mit der Farbstoffmischung das großmolekulare, stark adsorbierbare, schattendichte *Anilinblau* sich in den weiten Gefügelücken der D-Teile der Querzonierung reichlich ablagert und daraus die kleinmolekulare, schwacher adsorbierbare, schattendichte, ebenfalls elektrisch negativ geladene *Pikrinsäure* verdrängt, welche letztere aber in die H-Teile von engeren Gefügelücken verhältnismäßig zahlreich eindringen und durch das Überwiegen ihrer Zahl das Eintreten von *Anilinblau*molekülen verhindern.

内 容 自 抄.

ホルマリンで固定されたマウスの尾腱の膠原微細線維では周期的横帯構造が不明瞭に認められ、ピクリン酸で染めると、その小分子が濃影横帯と淡影横帯に一樣に入るから、横帯がなお分かりにくくなり、又よく吸着せられる大分子のアニリン青で染めても、微細線維の全体が著しく暗くなるから、横帯がやはりなお分かりにくくなる。然るに、両者を適当に混合した溶液でそれを染めれば、アニリン青が主として濃影帯に沈着し、周期的横帯構造が甚だ明瞭に現わされ得る。その理由が説明された。

Literatur.

Dettmer, N., I. Neckel u. H. Ruska: Elektronenmikroskopische Befunde an versilberten kollagenen Fibrillen. Z. wiss. Mikrosk. 60 (1951). — **Herrath, E. v. u. N. Dettmer:** Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Gitterfasern. Z. wiss. Mikrosk. 60 (1951). — **Policard, A., A. Collet et L. Giltair-Ralyte:** Etude au microscope électro-

nique des premiers stades de la fibrose dans le granulome silicotique. C. r. Acad. Sci. 239 (1954). — **Policard, A.** et **A. Collet**: La genèse des fibrilles collagènes et les débuts de la fibrose envisagés au point de vue inframicroscopique. Biol. méd. 45 (1956). — **Seki, M.**: Zur physikalischen Chemie der histologischen Färbung. XI. Anwendung der Molybdän- und Wolframverbindungen. Z. Zellforsch. 24 (1936). — Untersuchungen mit nicht-wässrigen Flüssigkeiten. VIII. Darstellung der Neurogliafasern. Z. Zellforsch. 29 (1939). — Molekularhistologische Studien über die Elemental- und Mikrofibrillen des Kollagens. II. Nähere Beobachtung über die periodische Querzonierung der kollagenen Mikrofibrillen. Arch. hist. jap. 7 (1955). — **Suwa, K.**: Vergleichende Beobachtung der Elektronenbilder der nach GÖMÖRI und BIELSCHOWSKY versilberten Kollagenfasern und der nach GÖMÖRI und PAP versilberten Retikulumfasern. Arch. hist. jap. 10 (1956).

Tafelabbildungen.

Erläuterung zu den Tafelabbildungen.

Abb. 1. Elektronenbild von kollagenen Mikrofibrillen, weder gefärbt, noch mit Metall bedampft. Querstreifen sind, wenn auch nicht sehr deutlich, ersichtlich. 30,000 $\times$.

Abb. 2. Dasselbe einer mit 0.5%iger Pikrinsäurelösung gefärbten. Sowohl der D-Teil als auch der H-Teil erscheint ein wenig dunkler. Die Querzonierung ist etwas undeutlicher geworden. 30,000 $\times$.

Abb. 3. Dasselbe bei mit 0.25%iger Anilinblaulösung gefärbten. Die beiden Teile der Querzonierung sind in etwa gleichem Ausmaße schattendichter geworden, so daß die Querzonierung undeutlicher ist als bei den nicht gefärbten Mikrofibrillen. 30,000 $\times$.

Abb. 4. Elektronenbild einer mit der Mischung von 1% iger Pikrinsäure- und 0.5%iger Anilinblaulösung zu gleichen Teilen gefärbten kollagenen Mikrofibrille. Die D-Teile nehmen schattendichtes Anilinbau stark, die H-Teile aber nur schattenschwache Pikrinsäure. Die periodischen Querzonen sind somit ganz augenfällig gegenübergestellt.