京都府立医科大学, 野田解剖学教室 (指導: 野田秀俊教授).
Anat. Inst. d. Kyoto Präf. Med. Fak. (Vorstand: Prof. H. NODA).

格子線維鍍銀法への試み.*

Versuch, die Silberimprägnationsmethode von
Gitterfaser zu verbessern.

佐 野 豊 Yutaka SANO.

〔昭和26年12月18日原稿受附〕

1905年 Maresch が肝臓の研究を行うにあたって, 1904年神経原線維染色法として Bielschowsky が発表した鍍銀法を使用し, 極めて微細な格子線維を顕現する事に成功して以来, 此の方法は Bielschowsky-Maresch 氏法として, 結合組織鍍銀法の根本となつたのであるが, 彼と殆んど時を同じうして Max Wolff (1905), Studnicka (1906) も鍍銀法について発表している. 其後, 格子線維研究の進歩と共に, 格子線維は生理学的にも, 病理学的にも極めて重要なものである事が判明し, 其の顕現法にも幾多の変法が現れるに至つたのである.

今其の重要な改変と思われる事項を挙げるならば, 大略次の4点に要約される.

第1. Bielschowsky-Maresch 氏法の前処置として, 過マンガン酸加里と蓚酸を以てする操作が附加せられた事である. これは Perdrau (1921) の大きな業績で, 此によつて該鍍銀法は極めてその確實性を増し, 且つフォルマリン以外の多くの固定液を使用した切片にも鍍銀が可能となり, 又パラフィン切片以外に凍結切片にも比較的恒常的な結果が得られるようになったのである.

尙 Wilder (1935), Oliveira (1936) は過マンガン酸加里の代りに隣モリブデン酸を, Foot (1932) は Pyridin-Glycerin を用いており, 又蓚酸の代りに Wilder (1935) はブロム水素酸を, Gömöri (1937), Romeis (1948) は異性重亜硫酸加里を用いてゐる.

現今如何なる研究者も此の前処置の附加に就て, 其の良否を論議するものはない.

第2. 発生銀を適当な構造に沈着せしめる爲に, アンモニア銀液使用前

* 1951年5月27日, 和歌山医科大学で開催された日本解剖学会, 第九回近畿地方部会で報告した.

に、媒染剤として用うる薬剤に関するもの、即ち硝酸銀液の代りとなるものに就ての改良である。

此のために Achúcarro (1911), Rio Hortega (1916), Volterra (1923), Plenck (1927) 等はタンニンを用いて独特なタンニン銀法を作り出した。Wilder (1935), Oliveira (1933) は硝酸ウランを用い、Gsmöri (1937) は鉄明礬を推奨してゐる。

第3. アンモニア銀液に関する改良である。

作成法に関しては、今も尚 Bielschowsky 氏の原法が用いられているが、水酸化銀の沈澱を蒸留水で洗うことを主張する人々がある。Schlemmer (1910), Rio Hortega (1916), Deikun (1926), Heringa (1933), Jalowy (1938) 等は何れも沈澱を洗っている。又 Kubie, Davidson (1928) は Silberdiaminocarbonat として用い、Wilder (1935) は Silberdiaminohydroxyd として用いてゐる。

第4. 過剰銀沈着を来した場合の分別、乃至は除去に関するものである。此は鍍銀が失敗に終つた場合（特に過剰に銀が沈着した場合）の処置で、Berg (1921) は青酸加里や過マンガン酸加里を、Ostertag (1925) は次亜硫酸ソーダに赤血塩を加えたものを用いてゐる。Bielschowsky 自身も赤血塩と硝酸ウランを用いて分別液を作つてゐる。併し此等のものは鍍銀が成功する場合には殆んど顧る必要はない。

以上は従来試みられた Bielschowsky 法改良法のうちの重要な事項であるが、此等の他にも殆んど枚挙に遑のない程莫大な諸家の報告がある。そして其の大部分は僅かな濃度や時間の相違を主張するものであつて、其のうちでも第1の事項に関するものが大部分を占めてゐる。私は其等の諸法を一々通覽追試した結果、改良法の大部分は殆んど無意味なものであり、液の組成、濃度、時間等よりも、寧ろ各著者の用いた固定法、包埋法、材料の種類、切片の厚さ等に影響される事を知つた。それで私は之等の諸条件に応じ得て、然も鍍銀の各操作に出来るだけ Spielraum を持ち得る様な術式を探索すべく志し、結合組織媒染剤として嘗て用いられた種々の薬剤、即ち燐モリブデン酸、燐ウォルフラム酸、硝酸銀、タンニン、鉄明礬、加里明礬、臭化アンモニウム、ビリヂン-グリセリン等を単独に、或は複合し、種々の前処置との組合せを行いつつ研究してみた。次に挙げるのは其の結果最も優れてゐると思われる方法である。

1. 0.25-0.3%過マンガン液加里酸を約15分間作用させる。此の液は其の都度新調する。時間は大体の標準であつて、極めて新鮮な材料や、ツェロイデン包埋のものでは寧ろ20分位作用させる方が良く、パラフィン

切片では更に短かくてもよい。此の作用が不足した時には核が同時に鍍銀せられる。

次いで蒸溜水で 2-3 度洗い、過マンガン酸加里の色が蒸溜水に残らないようになる迄かえる。

2. 1% 蔞酸に約 5 分。此処では切片の色が全く無くなり、白くなる迄充分作用させればよい。切片の皺などがある時には、液の中で切片を動かさねばならない。

再び蒸溜水を 3-4 回交換して洗滌する。

以上の前処置を充分に行えば行う程、線維は特異的に現れて来る。過マンガン酸加里の代りに、燐モリブデン酸や燐ヴォルフラム酸を使用する事は余り良いように思われない。蔞酸は異性重亜硫酸加里と変えても結果に変化はない。

3. 25% 鉄明礬液に 15-30 分つける。鉄明礬は美しい紫色の結晶を示す良品を用い。液はその都度新調する。鉄明礬を本法に使用したのは Gömöri が始めてである。Romeis は此の方法を脳下垂体の研究 (1940) に用いて以来、鉄明礬の使用を推奨してゐる。彼等は 2% の液を 1 分間作用させており、Romeis は本液の濃度を高くしても、作用時間をこれ以上延長しても無意味であると Mikroskopische Technik (1948) の中に註釈を加えているが、私はこの事は Gömöri も Romeis も共にパラフィン切片ばかりを用い、ツェロイデン切片を使用しなかつた事から出た誤りであるように思う。又彼等は本媒染剤を用いた後の水洗は極めて速に行い、洗い落す程度であるが、私はパラフィン切片では其の通り行つても比較的良好的の切片を得たが、ツェロイデン切片では到底 2%, 1 分と云う使用法では満足な結果を得る事が出来なかつた。

次いで蒸溜水で 30-60 分、液を幾度もかえて完全に水洗する。

私は鉄明礬を充分高い濃度で長時間作用させ、再び完全に水洗する事こそ、あらゆる包埋法にも本鍍銀を可能ならしめる鍵であると思ふ。

4. アンモニア銀液は Rio Hortega が 1916 年タンニン銀法に使用した作成法を用いる。これでは水酸化銀の沈澱を充分水洗し、過剰の塩基を洗い落とすため、銀液を保存しておくことも出来るし、又切片に余分な銀沈着をみる事も少い。Bielschowsky 氏法のアンモニア銀液作成に沈澱を水洗する事を主張したのは Schlemmer (1910) が始めてのようである。最近 Romeis は格子線維の鍍銀に際しては、水酸化銀の水洗は何等の利益もないと主張しているが、私は Rio Hortega の銀液の方が確かに優れていると考える。

5. 以下水洗し1: 9中性フォルマリンで還元し、鍍金する迄は凡て原法に従う。

以上の方法により

1. 各種の固定法によつて固定した材料が鍍銀出来る。私は特に Carnoy, Formol, Formol-Alkohol による固定が好都合であると思う。但し長くクローム酸によつて chromieren せられたものはよくない。又ピクリン酸や三塩化醋酸を含む固定液を用うる時は結合組織が膨化するため成績がよくない。

2. 包埋法は凍結、パラフィン、カーボワックス、ツェロイデンの何れでもよい。従来の諸法ではパラフィン切片に対して優秀な方法は、ツェロイデン切片に対しては奏効しないとか、或はその逆の傾向があつたが、此の方法では包埋法に左右されない。

3. 恒常的に顕現されるから連続切片的観察も可能である。

4. 短時間に多数の切片を同時に鍍銀する事が出来る。

以上の点で本法は他の鍍銀法の如き気まぐれな欠点は充分にのぞかれたと云う事が出来る。

結 語.

従来試みられた数多くの Bielschowsky-Maresch 氏法改良法に就て、一々通覽、追試すると共に、鍍銀の各操作に出来る限り Spielraum を持ち得るような術式を作ろうと思ひ、結合組織媒染剤として嘗て用いられた種々の薬剤を、単独に或は複合し、且つ色々の組合せを行つて研究してみた。其の結果、鉄明礬を媒染的に用い、Rio Hortega 氏タンニン銀法に従つて作成せるアンモニア銀液を用いて、固定法や包埋法に左右される事なく、然も短時間に、且つ恒常的に格子線維を顕現する一方法を得る事が出来た。

稿を終るに當り、御指導を賜つた野田教授に感謝の意を表する次第である。

Autoreferat.

In der vorliegenden Untersuchung hat der Verfasser eine neue Verbesserung der BIELSCHOWSKY-MARESCH'schen Methode für die Silberimprägnation von Gitterfaser unternommen. Die Kernpunkte der Modifikation, die nach der Nachprüfung und durch mannigfaltige Kombinationen der bisher bekannten Methoden gewonnen wurden, sind der Gebrauch des Eisenalauns als Sensibilisator und die Herstellung der ammoniakalischen Silberlösung nach der Rio Hortegaschen Tanninsilbermethode. Die Vorzüge dieser Methode sind ihr konstanter Erfolg, die Verkürzung der erforderli-

chen Zeit, und vor allem, die Unabhängigkeit des Resultates von der Arten der Fixierungs- und Einbettungsmittel.

文 献.

- Berg, W.:** Über eine Modifikation der Silberimprägnation des Bindegewebes nach Bielschowsky-Maresch. *Z. wiss. Mikr.* 38 (1921). S. 340. — **Bielschowsky, M.:** Die Silberimprägnation der Neurofibrillen. *J. Psychol. u. Neurol.* 3 (1904). S. 253. — **Deikun, B. J.:** Über die Herstellung der ammoniakalischen Silberlösung bei Imprägnationsmethoden. *Z. wiss. Mikr.* 43 (1926). S. 382. — **Foot, N. Ch. a. E. B. Foot.:** A technique of silver impregnation for general laboratory purposes. *Am. J. Path.* 8 (1932). P. 245. — **Frederikse, A. M.:** Der Zusammenhang zwischen Mitochondrien und Bindegewebsfibrillen. *Anat. Anz.* 50 (1917). S. 393. — **Gömöri, G.:** Silver impregnation of reticulum in paraffin section. *Am. J. Path.* 13 (1937). P. 993. — **Heringa, G. C.:** Reticulum und Kollagen. *Z. mikr.-anat. Forsch.* 34 (1933). S. 459. — **Jalowiy, B.:** Kollagen, Elastin und Retikulin der Haut. *Z. Zellforsch.* 27 (1938). S. 667. — **木原卓三郎:** 脉管外通液路系. 血液学討議会報告. 3 (1950). — **Krauspe, C.:** Beiträge zur Kenntnis der Gitterfasern. *Virchows Arch.* 237 (1922). S. 475. — **Maresch, R.:** Über Gitterfasern der Leber und die Verwendbarkeit der Methode Bielschowskys zur Darstellung feinsten Bindegewebsfibrillen. *Zbl. Path.* 16 (1905). S. 641. — **増田芳次:** 格子繊維染色に就て. *日本病理会誌.* 21 (1931). 頁 114. — **森田秀一:** Gitterfaserに関する研究. *解剖誌.* 26 (1951). 号2, 頁 54. — **緒方知三郎:** 病理組織顕微鏡標本の作り方手ほどき. 1949. — **Oliveira, G. de:** Über ein neues Verfahren zur Darstellung des Stützgerüsts der Organe. *Virchows Arch.* 298 (1936). S. 523. — **Ostertag, B.:** Über Imprägnieren und Abschwächen zur Erzielung gleichmäßiger Präparate bei der Silberimprägnation am Gewebsblock. *Z. wiss. Mikr.* 42 (1925). S. 182. — **Pap, T.:** Eine neue Methode zur Imprägnation des Reticulums. *Zbl. Path.* 47 (1930). S. 116. — **Perdrau, J. R.:** The silver reduction method for the demonstration of connective tissue fibres. *J. Path. a. Bact.* 24 (1921). P. 117. — **Plenk, H.:** Über argyrophile Fasern (Gitterfasern) und ihre Bildungszellen. *Erg. Anat.* 27 (1927). S. 302. — **Romeis, B.:** Mikroskopische Technik. 15. Aufl. 1948. — **Schlemmer, A.:** Über die Herstellung der ammoniakalischen Silbersalzlösung bei der Imprägnationsmethode Bielschowskys. *Z. wiss. Mikr.* 27 (1910). S. 22. — **関正次:** 組織検査法と物化学. 1951. — **Studnicka, F. K.:** Über die Anwendung der Methode von Bielschowsky zur Imprägnation von Bindegewebsfibrillen besonders im Knochen, Dentin und Hyalinknorpel. *Z. wiss. Mikr.* 23 (1906). S. 414. — **Wilder, H. C.:** An improved technique for silver impregnation of reticulum fibres. *Am. J. Path.* 11 (1935). P. 817. — **Wolff, M.:** Über die fibrillären Strukturen in der Leber des Frosches. *Anat. Ang.* 26 (1905). S. 135.