

メチレン青の静脈内点滴注入による中枢神経系 生体染色法の批判

京都大学医学部外科学教室第1講座（指導：荒木千里教授）

大学院学生 安 藤 協 三

（受付日付 昭和31年9月15日）

EVALUATION OF THE METHYLENE BLUE VITAL STAINING OF THE BRAIN WITH INTRAVENOUS DRIP TECHNIQUE

by

KYozo ANDO

1st Surgical Division, Kyoto University Medical School
(Director: Prof. Dr. CHISATO ARAKI)

In 1948, FEINDEL, ALLISON and WEDDELL⁹⁾ reported the methylene blue vital staining of the central nervous system by way of the intravenous perfusion and suggested the usefulness of the technique. They stated that the degenerating nerve fiber tracts could easily be recognized macroscopically by their intense and metachromatic staining and that the finer morphological changes, such as blistering and fragmentation, of the degenerating axones were clearly demonstrated microscopically. In the present study the technique has been reexamined in detail.

Forty seven rabbits, young and adult, weighing 0.32 to 3.66 kg were used in experiments. While in four of them no operation was done, remaining forty three underwent the following operations: Enucleation of one eye, subcortical undercutting of the frontal area, cortical excision, hemisection of the spinal cord, puncture in the midbrain etc. Sometimes two sorts of operation were performed in one and the same animal. The solution of the dye of 2.5%, 2.0%, 1.0% or 0.5% respectively was newly prepared in physiological saline or in 5% glucose solution in each experiment. The dye used was Methylenblau B extra (MERCK), Methylenblau f. med. Zwecke (MERCK) or Methylenum caeruleum (HÖCHST). The dye solution was perfused into the marginal ear vein of rabbits at the rate of one to eight drops per minute for one to six hours and in various postoperative stages from two hours to seventy five days after operation. Animals usually fell dead during or soon after this procedure.

The brain was then removed and cut into slices less than 4 millimeters in thickness. The slices were immersed in 6% ammonium molybdate physiological saline, and kept in the refrigerator at 0°C to 2°C for a period from four to twenty four hours. After thorough washing in several changes of chilled physiological

saline, they were placed in 10% neutral formalin for three to five days. Serial sections, made from frozen or celloidin-paraffin embedded tissue blocks, were subjected to microscopic studies.

Gross appearances: Appearances of the normal brain were entirely in accord with FEINDEL's description. On removal of the calvarium the surface of the brain was usually pale blue but gradually darkened on exposure to air, until at last the entire brain became deep blue in colour. Adequate immersion in molybdate ammonium solution brought about a more even blueing of the dye throughout the entire block of tissue. Grey matter was stained more deeply than white matter, so that normal fiber tracts, such as the internal capsule, the corpus callosum and the crus cerebri, remained pale (Fig. 6). Contrary to the description of FEINDEL and others, the dense and metachromatic staining of the degenerating fiber tracts, permitting the macroscopic identification of the tract, could not at all be demonstrated. In only eight out of twenty two rabbits with unilateral eyes enucleated one to seventy five days previously, the intense staining of the optic tract—more intense on the side of the operation—could be recognized. But even the most striking difference in the staining intensity on both sides was no more than that shown in Fig. 7. No particularly intense or metachromatic staining could be found in the brains of rabbits which underwent operations other than the enucleation of the eye.

Histological features: Staining of normal neural elements was nearly in accord with findings of FEINDEL and others (only that nerve fibers, it seemed, were stained more clearly than in their illustrations). Features of degenerating nerve fibers were, however, much unlike their description. The most striking feature on microscopic examination was the staining of cell bodies and their processes, also normal nerve fibers being more or less stained in most regions. Nerve cells in the cerebral cortex could easily be stained together with their long dendrites (Fig. 17). Thick dendrites of PURKINJE cells in the cerebellar cortex were characteristically stained (Fig. 20). As nerve cells in regions other than the cerebral and the cerebellar cortex were also relatively well stained, various nuclei of the brain stem or cerebellar nuclei could be recognized. Normal nerve fibers were stained with some difficulty in most regions, but fairly well in some regions, such as the midbrain, the pons, the medulla oblongata etc. Metachromasia, fragmentation, vesiculation etc., which were considered as the characteristics of degenerating nerve fibers by FEINDEL and others, could be found in thirteen out of forty three brains. They were found more or less (i) in the lateral geniculate bodies on both sides and in the optic fascicle on the side of the eye enucleated, (ii) in the cerebral cortex following the subcortical undercutting and (iii) in the spinal cord near the wound of spinal hemisection (Fig. 8, 9, 26). But if a fairly large number of degenerating nerve fibers were to be found, they had to be carefully looked for in the areas where the degenerating nerve bundles were anatomically expected to be present, a fact widely differing from the description of FEINDEL and others that the course of degenerating nerve bundles could be recognized even under low-power magnification ($\times 25$) owing to its metachromatic staining. Furthermore as FEINDEL and others admitted, aber-

rant degenerating fibers were found in the regions entirely unrelated to the area of lesion, e. g. in the cerebral subcortex, the optic radiation, the ventral spinocerebellar tract, the cerebellar white matter and in the adjacent portion of the oculomotor nucleus in case of the enucleation of one eye (Fig. 28).

Table 1 indicates the number of the brains showing various grades of staining; i. e. from grade 0 to 4 according to the criteria given by HELLER and others¹¹⁾. Neural elements were usually stained in less number by this technique than by routine staining methods.

Table 1

Grades of staining	Nerve fibers	Nerve cells
0	unstained	hardly stained
1	hardly stained	faintly stained
2	faintly stained	well stained
3	well stained	well stained
4	completely stained	completely stained

Grades of staining	Number of animals
4	0
3	12
2	23
1	8
0	4

The body weight and the age of the animals had nothing to do with the stainability of the brain. The grade of staining became better with the increase in per kg dosage of the dye and the duration of perfusion. However, the staining of the central nervous system by this technique did not exceed beyond a certain limit, thus there being no instance of the grade 4. In addition it was difficult to obtain good results constantly in all cases. FEINDEL and others recommended the use of a small quantity of highly concentrated (2.5%) solution to avoid the development of cerebral edema. From my experiences, as the dye solution of lower concentration (0.5%) gave the better stain in most cases without accompanying marked evidences of cerebral edema, I preferred the use of 0.5% solution.

So-called aberrant degenerating nerve fibers of FEINDEL et al were found more extensively as compared with their description, and even in the normal intact brains of rabbits. FEINDEL and others ascribed the appearance of aberrant degenerating fibers to the toxic effect of methylene blue on neural elements. However, considering their frequent appearance in the superficial layer of the brain, laboratory procedures, such as the fixation of dye, the dehydration of specimen etc., must play some rôle. The difficulty of differentiating truly degenerating fibers from aberrant ones diminishes the value of this technique in the experimental studies of the central nervous system. Although nerve fibers with marked morphological changes tended to show the metachromatic staining, there were not infrequently metachromatic fibers without morphological changes. And sometimes it was seen that one and the same nerve fiber was stained blue in one part and purple in the other.

Deformed fibers lacking metachromasia could also be found. These facts may reveal the unreliability of the metachromatic staining as an evidence of degeneration. Deformations of fibers are more important in recognizing the degeneration.

Recently WEDDELL and PALLIE³⁹⁾ suggested the use of hyaluronidase to improve the stainability in the local injection method of methylene blue. However, the use of hyaluronidase in various ways (Table 2) in combination with the intravenous perfusion of methylene blue brought no improvement in the staining results.

Table 2 The use of hyaluronidase

- 1) Injection into the cerebellomedullar cistern
- 2) Injection into the carotid arteries on both sides
- 3) Injection into the cerebral substance
- 4) Application to the surface of the brain
- 5) Letting soak into the tissue blocks before the fixation of dye
- 6) Admixture with the dye fixative

Conclusion

Contrary to the suggestion of FEINDEL and others, it must be concluded that this technique is or will be by no means an excellent method of staining in experimental studies of the central nervous system.

目 次

第1章 緒 論

第2章 実験動物及び実験方法

第1節 実験動物及び手術

第2節 色素の注射

第3節 組織標本作製法

第3章 所 見

第1節 肉眼的所見

第1章 緒 論

1886年に Ehrlich⁴⁾がメチレン青を用いて、神経系の生体染色を行つて以来、多数の研究者が種々の方法で、生体染色的乃至超生体染色的にメチレン青を応用して、神経系に関する多くの業績を残している事は Dogiel³⁹⁾及び Kiyono et al.⁴⁰⁾が綜説している如くである。

以来今日に至るもメチレン青は引き続き神経系の研究に盛んに用いられているが、1947年に Feindel et al.⁴¹⁾が神経系の生体染色に新しい方法としてメチレン青静脈内点滴注入法(intravenous drip technique, continuous intravenous perfusion)を導入するまでは、実験動物に恒温動物を使用する機会が多い関係上色素投与法は次の数種の方法に限られていた。即ち

- 1) 摘出した組織片をメチレン青溶液に浸漬して、

第2節 組織学的所見

第4章 考 察

第1節 実験方法に対する考察

第2節 所見に対する考察

第3節 本法の利点及び欠点

第5章 結 論

謂わば超生体的に染色する方法 (田内³²⁾・Heller et al.⁴¹⁾・Nelemans et al.⁴⁰⁾).

2) i) 局所にメチレン青を注射して染色を行う方法 (福田⁴⁰⁾・Feindel et al.⁴¹⁾・Pallie et al.⁴¹⁾・Pirozynski et al.⁴²⁾・Weddell³⁴⁾・Weddell et al.³⁵⁾・Woollard et al.⁴³⁾).

ii) 局所、例えば結膜嚢にメチレン青を注入して角膜等の神経線維を染色する方法(Weddell et al.³⁵⁾).

3) 動脈系より色素を注入して、その配下領域の組織中の神経を染色する方法 (中島⁴³⁾・Pallie et al.⁴¹⁾・Schabadasch³⁰⁾・27)・28)・29)・田内³²⁾).

4) 静脈から色素を点滴でなく、一気に注入して、皮膚中の神経を染色する方法 (Clark et al.³⁷⁾).

等であつて、現在も屢々利用されている。

一方メチレン青の静脈内点滴注入法は、発表されて以後短期間に末梢神経並びに自律神経に関する多数の

第1表 静脈内点滴注入法を用いた家兎の手術及び所見

動物 番号	性別	体 重	手 術	色 素 注 入			肉 眼 的 所 見	組 織 学 的 所 見	
				術後注入 までの時間	体重当 kg 注入量	注入時間		染色度	変性神経線維
R. 1	合	1.20kg	左側眼球剔出	6日	0.05 g	5分	Feindelの変性所 見を認めず	0	(-)
R. 4	合	1.18 //	右側眼球剔出	11日	0.38 //	120 //	〃	2	(-)
R. 12	合	2.73 //	中脳中心灰白質昏 睡穿刺	30日	0.21 //	60 //	〃	1	(-)
R. 14	合	2.88 //	左側眼球剔出	16日	0.51 //	122 //	〃	2	ロボットミー施行部大脳 皮質下に少数
R. 15	合	2.34 //	左側ロボットミー	29日	0.13 //	22 //	〃	1	(-)
R. 18	早	3.08 //	左側皮質切除	24日	0.15 //	37 //	〃	2	(-)
R. 24	合	2.60 //	右側皮質切除	29日	0.19 //	55 //	〃	2	(-)
R. 25	合	2.98 //	右側皮質切除	69日	0.22 //	38 //	〃	2	(-)
R. 28	合	2.32 //	右側皮質切除	34日	0.54 //	85 //	〃	3	中脳中心灰白質中に少 数
R. 29	合	2.12 //	右側皮質切除	35日	0.26 //	43 //	〃	2	(-)
R. 30	合	2.32 //	右側皮質切除	32日	0.58 //	82 //	〃	2	(-)
R. 43	合	3.66 //	右側眼球剔出	20日	0.34 //	138 //	〃	2	左側視床に僅少
R. 44	合	2.92 //	左側大腿神経切断	21日	0.001 //	8 //	〃	0	(-)
R. 45	合	2.72 //	右側眼球剔出	21日	0.64 //	129 //	〃	2	左側前頭部皮質下に僅 少 両側上丘に多数
R. 46	合	2.48 //	右側皮質切除	33日	0.58 //	238 //	〃	2	(-)
R. 47	早	2.20 //	左側皮質切除	25日	0.57 //	195 //	〃	3	(-)
R. 48	早	2.72 //	左側眼球剔出	21日	0.28 //	157 //	左側視束稍々青紫 色	2	両側上丘に少数
R. 49	早	2.00 //	左側眼球剔出	25日	0.13 //	65 //	左側視束濃染	1	(-)
R. 50	合	2.24 //	左側眼球剔出	21日	0.05 //	10 //	Feindelの変性所 見を認めず	0	(-)
R. 52	合	1.98 //	左側眼球剔出	1日	0.14 //	39 //	〃	2	(-)
R. 53	合	1.98 //	左側眼球剔出	3日	0.23 //	45 //	〃	1	(-)
R. 54	合	2.02 //	左側眼球剔出	5日	0.60 //	103 //	左側視束稍々濃染	3	前脊髓小脳路中に多数
R. 55	合	2.32 //	左側眼球剔出	10日	0.22 //	67 //	左側視束太く稍々 濃染	2	
R. 56	合	2.40 //	左側眼球剔出	14日	0.45 //	125 //	左側視束濃染	3	大脳皮質下に僅少
R. 57	早	2.68 //	左側眼球剔出	19日	0.59 //	132 //	左側視束太く濃染	3	左側視束, 第4脳室底 前脊髓小脳路中に少数
R. 58	早	2.72 //	左側眼球剔出	75日	0.26 //	43 //	Feindelの変性所 見を認めず	1	(-)
R. 73	早	0.32 //	左側皮質下切離	2時間	0.31 //	3 //	〃	1	(-)
R. 75	合	0.54 //	右側皮質下切離	2時間	0.35 //	35 //	〃	2	大脳皮質に僅少
R. 77	早	0.54 //	右側皮質下切離	1日	0.77 //	60 //	〃	2	大脳皮質に多数
R. 78	合	0.68 //	右側皮質下切離	3日	0.23 //	18 //	〃	2	(-)
R. 90	合	0.58 //	胸髄左側半切	7日	0.38 //	57 //	〃	2	(-)
R. 92	早	0.72 //	胸髄左側半切	14日	0.51 //	143 //	〃	2	切断部上方左側に僅少 錐体交叉上方右側少数
R. 93	早	0.98 //	胸髄左側半切	21日	0.26 //	45 //	〃	2	切断部下方左側に僅少
R. 94	合	1.30 //	胸髄左側半切	73日	0.23 //	145 //	〃	3	(-)
R.101	合	0.62 //	胸髄右側半切	3日	0.01 //	8 //	〃	1	(-)
R.104	早	0.82 //	胸髄右側半切	1日	0.23 //	155 //	〃	3	(-)
R.112	合	0.45 //	右側眼球剔出	1日	0.60 //	97 //	〃	3	(-)
R.113	合	0.50 //	左側皮質下切離	5日	0.04 //	15 //	〃	0	(-)
R.114	早	0.56 //	右側眼球剔出	5日	0.36 //	91 //	右側視束濃染	2	視束交叉部に僅少
R.115	合	0.66 //	左側皮質下切離	14日	0.49 //	255 //	右側視束稍々濃染	3	左側外側膝状体中に多 数
R.116	早	2.40 //	右側眼球剔出	22日	0.21 //	396 //	Feindelの変性所 見を認めず	3	切離部に僅少, 両側外 側膝状体中に多数

R.117	合	1.60 //	腰髄左側半切	1日	0.12 //	77 //	Feindelの変性所 見を認めず	2	(-)
R.121	合	1.36 //	腰髄左側半切	7日	0.45 //	335 //		3	切離部の上方に僅少
R. 8	合	1.44 //	手術せず		0.48 //	28 //		2	(-)
R. 13	合	2.30 //	//		0.24 //	45 //		1	(-)
R. 61	合	1.92 //	//		0.29 //	43 //		3	前脊髄小脳路及び外側 絨帯中に僅少
R. 63	合	2.58 //	//		0.14 //	33 //		2	(-)

研究に応用されたが、Feindel et al.⁷⁾は更に1948年にその変法を発表*して正常家兎及び一側の眼球を剔出した家兎(或場合には嗅索の切断をも附加した)について中枢神経系の染色を行った。

其の際変性神経線維素がメタクロマジーを示すので肉眼的にもその走行分布を容易に知り得るだけでなく、顕微鏡的には諸種の正常神経要素が染色され、更に正常神経線維と違つて特異な染色(濃染及びメタクロマジー)及び形態的変化(空胞化、断裂等)を示す変性神経線維の存在を認めて、此の方法が中枢神経系の実験的研究に有力な方法であり、今後の改良によつて応用の範囲も拡張し得るであろう事を示唆した。そして Feindel⁷⁾はメチレン青を用いて中枢神経系内の変性神経線維を追究した研究は他に見当たらないと述べ

* 色素液の濃度を大にして、注入液量を少くした。

ている。

そこで著者は中枢神経系に種々の実験的手術侵襲を加えたものに Feindel et al.⁷⁾の方法を試みた。尚 Feindel et al.⁷⁾は組織標本作製の方法について具体的な記載をしていないので、此の点に関しても若干の検討を加えた。

第2章 実験動物及び実験方法

色素注入法としては主として静脈内点滴注入法を用い、別に腹腔内注入法をも試みた。

第1節 実験動物及び手術

実験動物には家兎、犬及びマウスを使用した。

家兎：体重 0.29~3.66kg の幼若又は成熟健康な雌雄の家兎63頭を使用した。47頭は静脈内点滴注入法により16頭は腹腔内注入法によつて色素を投与した。静脈内点滴注入法を行った47頭の中、4頭は比較の為前

第2表 腹腔内注入法を用いた家兎の手術及び所見

動物 番号	性 別	体 重	手 術	色 素 注 入			肉 眼 的 所 見	組 織 学 的 所 見	
				術後注入 までの時間	体重当kg 注入量	注入時間		染色度	変性神経線維
R.16	早	2.37kg	左側眼球剔出	48日	0.21 g	95分	Feindelの変性所 見を認めず	3	両側内側絨帯、外側膝 状体、上丘、小脳内に 多数、橋に少数
R.20	早	2.66 //	後頭部開頭	66日	0.37 //	70 //	//	3	(-)
R.36	早	0.63 //	左側眼球剔出 右側大腿神経切断	1日	0.25 //	68 //	//	2	右側外側膝状体中に僅 少 脊髄中に僅少
R.37	早	0.60 //	左側眼球剔出 右側大腿神経切断	3日	0.25 //	107 //	//	1	(-)
R.39	早	0.68 //	左側眼球剔出 右側大腿神経切断	10日	0.51 //	130 //	//	1	(-)
R.40	早	1.07 //	左側眼球剔出 右側大腿神経切断	20日	0.25 //	62 //	//	2	(-)
R.51	合	1.52 //	両側皮質切除	23日	0.65 //	130 //	//	2	(-)
R.59	早	3.02 //	左側眼球剔出	71日	0.49 //	130 //	//	1	(-)
R.76	合	0.38 //	右側皮質下切離	2時間	0.52 //	115 //	//	3	(-)
R.31	合	1.54 //	手術せず		0.32 //	95 //	//	2	(-)
R.32	早	1.38 //	//		0.36 //	88 //	//	1	(-)
R.60	合	2.16 //	//		0.46 //	95 //	//	2	小脳内多数、大脳皮質 下少数、視床内に僅少
R.62	合	2.12 //	//		0.94 //	273 //	//	2	(-)
R.68	合	2.24 //	//		0.22 //	65 //	//	3	(-)
R.74	早	0.29 //	//		1.47 //	210 //	//	3	(-)
R.84	早	1.94 //	//		0.17 //	64 //	//	1	(-)

処置としての手術を行わず、残り43頭に眼球剔出(22例)、皮質切除(8例)、前頭領域の皮質下切離(9例)、胸髄半側切断(6例)、腰髄半側切断(2例)、ロボトミー(2例)、大腿神経切断(1例)、中脳中心灰白質昏睡穿刺(1例)等の手術を単独に又は2種を組み合わせて施行した(第1表)。腹腔内注入法を行った16頭の中、7頭には手術をせず、残り9頭に眼球剔出(6例)、大腿神経切断(4例)、皮質切除(1例)、皮質下切離(1例)、開頭(1例)を単独に又は2種を組み合わせて行った(第2表)。

犬: 体重 2.0~8.6kg の幼若又は成熟雌雄の犬7頭を用い、何れも静脈内点滴注入法によつて色素を投与した。1頭には何も手術をせず、他の6頭には腰髄内ニコチン注射(0.01 ccの原液又は3倍液)(4例)、延髄錐体路切断(1例)、皮質下切離(1例)を行った(第3表)。

マウス: 体重 22.0~25.1g の成熟雌雄のマウス8頭を用い、何等の手術も行わず、腹腔内注入法によつて色素を投与した(第4表)。

第3表 犬の手術及び所見——すべて静脈内点滴注入法による

動物 番号	性 別	体 重	手 術	色 素 注 入			肉 眼 的 所 見	組 織 学 的 所 見	
				術後注入 までの時間	体重当kg 注入量	注入時間		染色度	変性神経線維
D. 1	♂	4.1 kg	手術せず		0.28 g	120分	Feindelの変性所 見を認めず	1	(-)
D. 3	♂	2.0 //	右側皮質下切離	20日	0.18 //	117//	//	1	(-)
D. 4	♂	2.4 //	左側延髄錐体路切断	21日	0.17 //	193//	//	2	左側視床及び切断 部に僅少
D. 6	♀	3.0 //	腰髄内ニコチン注射	34日	0.27 //	365//	//	1	(-)
D. 9	♂	5.5 //	腰髄内ニコチン注射	8日	0.25 //	225//	//	1	(-)
D.10	♀	6.2 //	腰髄内ニコチン注射	15日	0.20 //	265//	//	1	(-)
D.11	♂	8.6 //	腰髄内ニコチン注射	3日	0.34 //	480//	//	1	(-)

第4表 マウスの所見——すべて腹腔内注入法による

動物 番号	性 別	体 重	手 術	色 素 注 入			肉 眼 的 所 見	組 織 学 的 所 見	
				術後注入 までの時間	体重当kg 注入量	注入時間		染色度	変性神経線維
M. 2	♀	22.0 g	手術せず		0.56 g	120分	Feindelの変性所 見を認めず	1	(-)
M. 4	♂	25.1 //	//		0.25 //	128//	//	2	(-)
M. 5	♂	22.0 //	//		0.28 //	120//	//	1	(-)
M.11	♂	22.0 //	//		0.77 //	28//	//	1	(-)
M.12	♂	25.0 //	//		1.20 //	210//	//	1	(-)
M.13	♂	20.0 //	//		0.85 //	49//	//	1	(-)
M.14	♀	25.0 //	//		0.68 //	70//	//	1	(-)
M.15	♀	22.0 //	//		0.77 //	68//	//	1	(-)

第2節 色素の注射

色素液調製: 色素にはメチレン青B-extra(Merck)・メチレン青 f. med. Zwecke (Merck)・メチレン青(Höchst)の3種を使用した。

溶媒として生理的食塩水又は5%葡萄糖液を使用し、2.5%・2.0%・1.0%・0.5%液の何れかを実験の都度調製、完全に溶解せしめた後濾過煮沸滅菌して使用する。

静脈内点滴注入法: 各種手術後2時間~75日の間で種々の時期を選んで、イソミタルソーダ(体重当kg

0.035g)の腹腔内又は静脈内注射による麻酔下に又は無麻酔下に、家兎では耳介静脈、犬では下腿静脈から、毎分家兎では1~8滴、犬では4~20滴に調節し、家兎では1~6時間、犬では2~8時間継続して点滴注入を行った。大多数の動物は此の時期には自然に斃死するが、然らざるものは色素の過量急速注入、イソミタルソーダの過量投与或はモリブデン酸アンモンの注射によつて死亡せしめた。色素注入量は最高体重当kg770mgに達した(第1表)。

腹腔内注入法: 手術後2時間~71日の間で種々の時

期に色素を注入した。無麻酔下で体重当 kg0.2~0.3 g のメチレン青を、それぞれの濃度の液の一回の注射液量が家兎では体重当 kg 10cc を、マウスでは体重当 g 0.2cc を越えないようにして、一時間毎に注射を反復した。此の方法で動物は1時間半~3時間で多くは自然に斃死する。色素投与量最高は1.47g/kg (体重) に及んだ(第2表)。

第3節 組織標本作製法

動物死亡後速やかに剔出した脳・脊髓を厚さ 4mm 以下の組織片に薄切する。此の際組織の歪曲を避ける為注意して安全カミソリの刃を用いるか、又は著者試作のマクローム(Fig. 1)を使用する。組織片を実験の都度調製濾過した6%モリブデン酸アンモン生理的食塩水液に浸漬し、組織片の大きさに従つて4~24時間0~2°Cの温度に保持して組織内色素の固定を計る。

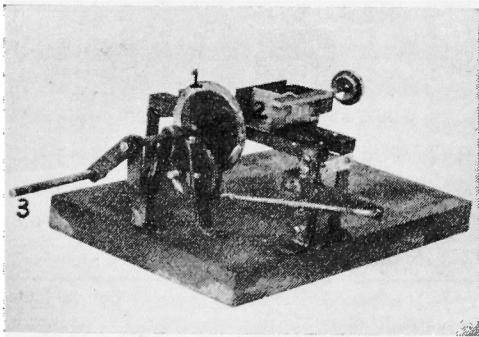


Fig. 1 著者試作のマクローム。1. 刃
2. 標本薄切台 3. 把手

色素の固定を終つた組織片は冷たい生理的食塩水を数回取り替えて15~20分間洗滌し、10%の中性フォルマリン生理的食塩水液に移して組織の固定を行う。フォルマリン固定期間は3~5日で、其の間フォルマリン液は数回交換する。

組織片の一部は 30 μ 前後の凍結切片を作製して検索した。或場合にはゲラチン包埋法(カルボールゲラチン浸漬期間は24~36時間)をも行つた。

大部分の組織片は Peterfi (Romeis²⁹) のツェロイザン・パラフィン包埋法によつて連続切片を作製して検索した。フォルマリン固定後組織片を8~12時間水洗し、必要があれば組織片を更に薄切し、大量のアルコールを使用して、組織片の大きさに従つて2~4時間で脱水を完了する。脱水完了後組織片を1%メチルベンツォアート・ツェロイザン液に移し、時々振盪して2~6時間で組織片が透明になるのを待つてキシロールに移し(キシロール: 1~1.5時間)ベンツォー

ルパラフィンを通して(30分間)、パラフィン(1時間以内)で包埋する。10~20 μ の連続切片を作製して検鏡する。

第3章 所 見

一般に肉眼的所見においても、組織学的所見においても、家兎に比較して犬及びマウスの染色性は劣る。

第1節 肉眼的所見

正常脳脊髓の着色状態: Feindel et al.³⁰の記載と一致した。即ち剔出直後の脳表面は淡青色を呈するが、空気と接触して次第に濃青色となる。部位によつて濃青色を呈する時間は不同であるが次第に脳表面全体が均等に青くなる(blueingと云う)。脳を薄切すると断面も青くなる。モリブデン酸アンモン液中に浸漬すると、組織全体が一層青味を増す。灰白質は白質より遙かに濃染し、正常の神経線維索例えば内包・脳梁・視索・大脳脚などは蒼白色に止るが、大脳核や視床などは濃青色を呈する(Fig. 6)。脊髓に於いても灰白質は濃青色を呈し、白質は蒼白色を呈する。

変性神経線維索の着色: Feindel et al.³⁰は著明なメタクロマジーによつて、変性神経線維索の走行・分布の輪廓を肉眼的にも容易に認め得るといつているが著者の実験ではこれを実証出来なかつた。

即ち著者は28頭の家兎に偏側の眼球剔出を行い、手術後1~75日の間に22頭は静脈内点滴注入法により、6頭は腹腔内注入法によつて、中枢神経系の染色を試みたが、眼球剔出側視束の濃染所見を認めたのは静脈内点滴注入法を用いた22例中8例に過ぎなかつた。一側の視束が濃染して左右差の最も著しかつた例でもFig. 7の程度であり、メタクロマジーについては更に著明でなく、Fig. 7の例も眼球剔出側視束は相当高度に紫の色調を帯びているが、反対側視束も多少紫色がかつている。奇妙な事に視束の染色に左右差を認めた8例では、視束交叉前後の関係は必ずFig. 2の如く、視束交叉より末梢部は眼球剔出側視束が濃染し、視束交叉より中枢側では反対側視索が濃染していた。

眼球剔出以外の手術を行つた家兎及び犬では、中枢神経系の何の部分にも濃染性及びメタクロマジーを認めず、正常組織との差異を見出し得なかつた。

第2節 組織学的所見

犬及びマウスは家兎に比較して染色性は劣り、神経細胞或は神経線維が僅かに染色される程度である。

組織切片は肉眼では通常のニッスル染色を施した標

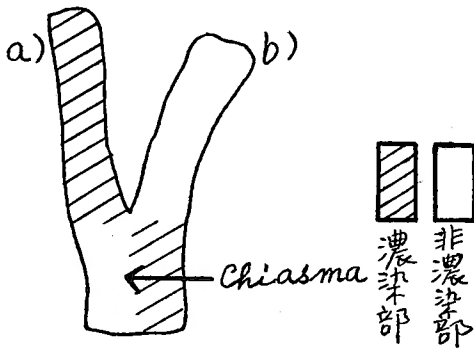


Fig. 2 視束交叉前後の関係

a) 眼球剔出側 b) 反対側

本と同じ着色外観を呈する。併し一般に此の方法で染色される神経要素（神経細胞・神経線維等）の数は鍍銀染色を施した標本と比較して明かに少い。又標本作製までのホルマリン固定・脱水等の操作中に表面から深さ約20 μ の範囲は脱色している事が多い。

検鏡上最も顕著な所見は神経細胞及び之に接続する突起が染色され（Fig. 14, 15）、正常神経線維も部位によつては相当染色される（Fig. 14）。

各実験によつて得た標本を検鏡して、正常神経要素の染色程度を Heller et al.¹¹⁾に従つて染色度0から4までの5段階に次の如く分類してその判定結果を第1～4表に示した。

染色度0：神経線維は全く染まらず、神経細胞はかすかに染色されるものもある程度。

染色度1：神経細胞は多少染色され、神経線維は殆んど染まらない。

染色度2：神経線維が多少染まり、神経細胞はよく染まる。

染色度3：神経線維も神経細胞もかなりよく染色される（Fig. 17, 18, 19の程度）。

染色度4：最も完全且つ良好な染色。

前述した如く本法では染色される神経要素の数が鍍銀染色標本と比較して明かに少いので、染色度4に該当するものはなく、染色度3を以てメチレン青による中枢神経系の典型的染色 typical staining と考える。

神経細胞：大脳皮質の神経細胞は染色され易い（Fig. 17）。通常のニッスル染色法によるよりも樹状突起が長く染まる。併し軸索突起の染色は不著明。小脳皮質の神経細胞ではプルキンエ細胞の染色が特異的で、大きな細胞体及び太い樹状突起は染色されるが、その細かい分枝及び軸索突起は通常染色されない

（Fig. 20）。大脳皮質及び小脳皮質以外の神経細胞も到る所で比較的良く染色され、脳幹諸核・小脳核・脊髓前柱核等を識別し得るが、尾状核及びレンズ核等の神経細胞の染色は困難である（Fig. 3, 21）。概して云えば神経細胞は軸索突起及び樹状突起の細かい分枝及び核が染色され、細胞原形質は通常均質性で淡青色に染まるが或場合には多数の青い小顆粒が細胞原形質内或は突起に沿つて撒布されているのを認める（Fig. 11, 15）。

正常神経線維：神経細胞に比較すると染色され難いが、部位によつては、即ち中脳・橋・延髄などではかなりよく染まる（Fig. 10, 19, 22）。前頭部及び脊髓白質中の神経線維の染色は困難である。正常神経線維も通常均質性に濃青色に染まるが、太い有髓神経線維では多数の青い小顆粒が線維の経過に沿つて撒布されていて、Ranvierの絞輪に一致して濃染所見を認める事がある（Fig. 23）。或部位例えば橋では波状の外観を呈する神経線維もあり（Fig. 24）、内包或は橋に卵円形膨隆のある線維を認める事もある（Fig. 25）。

変性神経線維：Feindel et al.⁹⁾が特異な染色（濃紫色）及び形態的变化を以て容易に正常神経線維と区別し得ると述べている変性神経線維と一致する所見が時に認められる（第1～4表）。即ち眼球剔出後1～48日に両側外側膝状体及び両側四丘体上丘に相当数又は少数、眼球剔出側視束中に少数、更にロボトミー乃至は皮質下切離施行後2時間～20日に切離部より中枢側に相当数の変性神経線維と思われる像を認める。即ち著明に又は軽度にメタクロマジーを示して紫の色調を帯び、且つ不規則の膨隆・空胞化・断裂等の形態的变化を示している（Fig. 8, 26, 27）。更に非連続的な遊離球の状態となつて、メタクロマジーを呈するものもある（Fig. 9）。之等の変性神経線維の形態的变化はCajal²³⁾・Spielmeyer³¹⁾・城田³⁰⁾等が鍍銀法で変性神経線維と認めている像と略々一致する。

上記の変性神経線維は相当数認め得る場合でも、Feindel et al.⁹⁾の云う如く弱拡大（約25倍）で変性神経線維索の主要経路を知り得る程度ではなく、解剖学的知識に従つて変性神経線維の存在を期待し得る部位を仔細に検鏡して、辛うじて認め得る程度である。更に上記変性神経線維に全く一致する所見が手術とは無関係と考えられる部位、即ち大脳皮質下・視放線・前脊髓小脳路・小脳・動眼神経核近傍に認められる事がある（Fig. 28, 29）。Feindel et al.⁹⁾も大脳皮質下

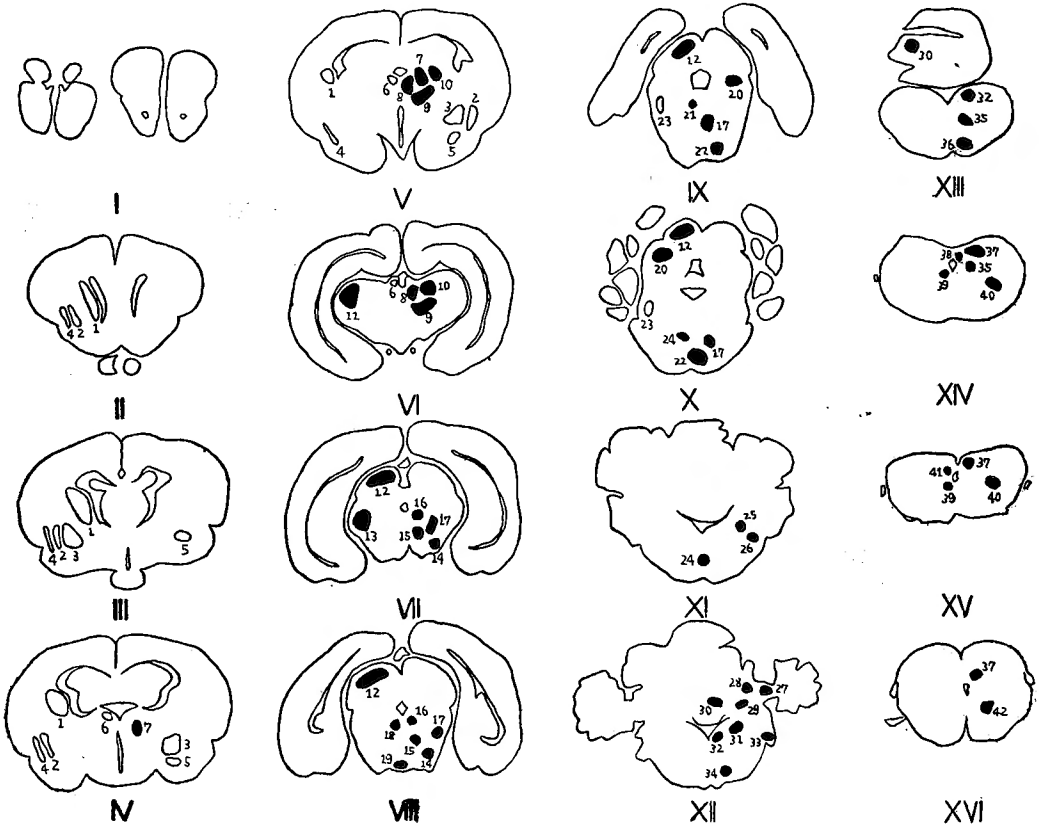


Fig. 3 神経核の染色の難易 ●染色容易の核 ○染色困難の核又は軽度に染色される核 (Winkler and Potter⁴¹⁾の図による.)

- | | | |
|------------|----------------------|-------------|
| 1. 尾状核 | 15. 赤核 | 29. 球状核 |
| 2. レンズ核被殻 | 16. エーザンゲル, ウェストフール核 | 30. 室頂核 |
| 3. レンズ核淡蒼部 | 17. 網様核 | 31. ダイテルス核 |
| 4. 前脚 | 18. 動眼神経核 | 32. 蝸牛神経背側核 |
| 5. 扁桃核 | 19. 脚間核 | 33. 蝸牛神経腹側核 |
| 6. 手綱核 | 20. 下丘核 | 34. 顔面神経核 |
| 7. 視床前核 | 21. 滑車神経核 | 35. 孤束核 |
| 8. 視床背内側核 | 22. 橋核 | 36. オリブ核 |
| 9. 視床腹内側核 | 23. 外側絨帯核 | 37. 背核 |
| 10. 視床外側核 | 24. 縫線腹側核 | 38. 迷走神経背側核 |
| 11. 外側膝状体核 | 25. 三叉神経起始核 | 39. 舌下神経核 |
| 12. 上丘核 | 26. 三叉神経終止核 | 40. 疑核 |
| 13. 内側膝状体核 | 27. 齒状核 | 41. 副神経核 |
| 14. 黒核 | 28. 栓状核 | 42. 前柱 |

に迷在性変性神経線維を認めている。又形態的变化を伴わないで、メタクロマジーのみを示す神経線維も存在するが、之は正常神経線維と考えられる (Fig. 30). 更にメタクロマジーを示さないが、明かに変性神経線維と思われる形態的变化を示す線維も認められる

(Fig. 31).

線維分岐及び結節形成：変性又は正常神経線維の側副枝及び分岐部を著明に認め得る事もあり、分岐部に相当して結節形成を認める事がある (Fig. 25, 32).

神経終末 明瞭な所見は得られなかつた。

非神経細胞性要素：中枢神経系中の血管は著明に認められる。血管に沿って網状構造を形成する線維を認め得る事があるが、神経線維とは断定出来ない (Fig. 13)。神経膠細胞要素は原則的には染色されない。脳室上衣細胞が選択的に染色され、脳実質中にのびる単極性の突起を場合によつてはその分枝状態まで認め得る (Fig. 33)。

他の臓器：少数例において他の臓器も略々同様操作を以て組織標本を作製した。硬膜に鮮明に染色された神経線維を認める (Fig. 12)。脈絡叢は上皮細胞のみ染色されるが、神経線維は染色されれない (Fig. 34)。肝、腎、脾等も観察したが神経線維は認められなかつた。

第4章 考 察

第1節 実験方法に対する考察

メチレン青による神経染色の改良法としては Heller et al.¹¹⁾ Nelemans et al.¹⁰⁾ の浸漬法があるが、静脈内点滴注入法については色素注入法の特長からか、従来あまり考慮されていない、Feidel et al.⁹⁾ は優秀な組織標本を得るには次の3点が重要であるとしている。即ち十分な色素量の注入、組織内色素の均等の酸化及び固定、組織の固定の3点をあげて尚検討中であるとしている。著者は其他にも若干の点について検討を加えた。

色素の注入について：

1) 色素の種類 本実験には3種類のメチレン青即ち Methyleneblau f. med. Zwecke (Merck), Methyleneblau B-extra (Merck), Methylenum caeruleum (Höchst) を使用したが、染色度に差は認められなかつた。色素の製品の差は実験成績にあまり影響を及ぼさないとされる。

2) 色素液濃度 Feindel et al.⁹⁾ は脳浮腫の招来を避ける為高濃度の液即ち2.5%液の比較的小量を使用している。著者も之に倣つて、先づ2.5%生理的食塩水液を使用した。色素注入に当つて注射針の閉塞等の支障が多いので、メチレン青の生理的食塩水に対する溶解度を測定したところ、生理的食塩水を溶媒として2.5%溶液を得るには25°C以上の温度を要し、従つて恒温槽の設備を要することが判明した。次に溶媒として5%葡萄糖液を使用したところ、5°Cで4%以上の濃度の液を調製する事が出来 (Fig. 4)、此の際葡萄糖の還元能は殆んど問題にならず、又 Heller et al.¹¹⁾ は浸漬法で葡萄糖の小量を色素液に添加する事は標

本の染色度を良好にするとしているので、本実験では好んで5%葡萄糖液をメチレン青の溶媒として使用した。

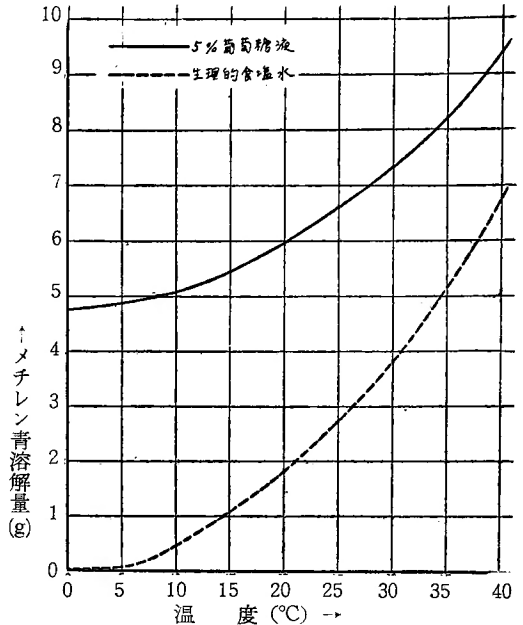


Fig. 4 メチレン青の溶解度

飽和溶液100 cc 中に含まれるメチレン青の量(g)

然し乍ら点滴注入液の色素濃度については実験を重ねるにつれて、色素液の濃度が大なる程注入中に事故が多く、更に低濃度で注入液量を増加させても、脳浮腫の所見はそれ著明でなく染色効果は劣らないことを知つたので、以後は0.5%液を使用した。此の程度の濃度ならば生理的食塩水を溶媒とし、室温で実験を行い得る。又 Schabadasch¹²⁾ が動脈より色素液を注入する染色法で、色素液の濃度が大であると却つて染色が悪くなるとしている原則にも副う。

3) 色素液注入速度の調節 色素液の1分間の滴下数を一定に保つ事は甚だ困難であり、滴下数は一般に次第に減少する傾向がみられ、色素液の濃度が大なる程此の傾向が大である。此の点からも色素液の濃度がそれ程大きくない方が望ましい。滴下数を調節するには、滴球の活栓、或は滴球内ガラス管の内径を調節するよりは、滴球の上部でゴム管の内腔を「ねぢ」で狭窄する方法、イルリガートルの高さを加減する方法による方が容易である。

4) 色素液の pH Schabadasch¹²⁾ (1939) は特定の組織中の神経を染色するには一定の至適 pH があると

している。Heller et al.¹¹⁾ Nelemans et al.¹⁰⁾ 等もメチレン青溶液の pH は染色反応に重要であるとしている。然し乍らそれ等の pH は色素液を動脈より注入し、又は超生体染色的に色素液に浸漬する方法で決定された至適 pH である。静脈内点滴注入法では、中枢神経系が或特定の pH で染色成績が良好であつたとの結論を導き得ても、中枢神経系を循環する「色素液を混じた血液」の pH をその値に一致させて、而も一定に保つ事は殆んど不可能である。常識的に血液の pH に近い値が適当と考える。5%葡萄糖液にメチレン青 f. med. Zwecke (Merck) を溶解すると pH は稍々酸性側に傾いたが、2.5%液を調製しても pH の変動は 0.3 前後に過ぎず、此の程度の液を血流中に混じても、血液の pH はその緩衝作用によつて、それ程変動しないと思われる。

5) 色素液の温度 Heller et al.¹¹⁾ は体温を推奨し、Nelemans et al.¹⁰⁾ は室温 (15~21°C) でもよいといつているが、静脈内点滴注入法では動物に与える障害を減らす意味で、体温に一致させる事が望ましい。Feindel et al.⁹⁾ は色素液を緩徐に注入する事で此の条件は充たされるとしている。

6) 色素液の組成 Schabadasch,²³⁾²⁷⁾²⁹⁾²⁹⁾ Heller et al.¹¹⁾ Nelemans et al.¹⁰⁾ は夫々独自の考えによる色素液の処方推奨しているが、此の点に関しては検討しなかつた。

7) 色素液調製の時期 Heller et al.¹¹⁾ は調製後 3~4 日を経た溶液はメチレン青がアズール A, B, C 等に変換して染色性が低下するから使用すべきでないとしているのに対し、Nelemans et al.¹⁰⁾ Kondratjew¹²⁾ は調製後一定期間放置して使用する事を勧めている。併し Heller et al.¹¹⁾ の主張が理論的に正しいと思われ、事実調製後数日を経過した色素液の使用は染色度を不良にする傾向が見られた。

8) 色素液の酸素附加 Heller et al.¹¹⁾ Nelemans et al.¹⁰⁾ がこれを行つているが、Feindel et al.⁹⁾ は色素液の緩徐な注入は酸素の附加と同じ効果があると考えている。著者も同意見である。

9) 腹腔内注入法 静脈内点滴注入法と同程度の染色度を収め得る事がある。注射回数、注射量が適当であれば、決して静脈内点滴注入法に劣らないと思われる。操作が簡単で、如何なる小動物にも応用し得て、色素注入中の事故も少く、滴下数を監視する必要もない。

10) 家兎の体重と染色度との関係 著者の実験では家兎に於ける染色度の差は動物の体重とは関係がない。之は Heller et al.¹¹⁾ がメチレン青浸漬法による超生体染色で幼若で栄養のよい動物の組織は老齢の動物の夫れより遙かに容易に染色されるとし、Kondratjew¹²⁾ も超生体染色的にメチレン青を用いて、肉眼的にも幼若で健康な動物程神経系の染色は容易且つ完全であるとしている意見と一致しない。栄養状態については著者の使用した動物の栄養状態がすべて良好であつた為、染色度との関係は決定出来なかつた。

但し変性像を追究する実験に際して幼若動物を用いる事は意味が別で、変性像が速やかに現われる利点があるとされ、Brodal¹³⁾ が細胞の逆行変性をみた実験でも、Cajal²⁸⁾ の広範囲の変性実験でも、幼若或は出生直後の動物を用いている。Feindel et al.⁹⁾ の原法も体重 1.0~1.5 kg の幼若家兎を使用しているが、著者も体重 0.54 kg、生後 1 ヶ月の幼若家兎に皮質下切離を行つて、術後 1 日で大脳皮質に変性神経線維を認めている。

11) 色素注入量と染色度との関係 家兎の中枢神経系の染色度は静脈内点滴注入法による時は体重当 kg の色素注入量が増大するに従つて良好となるが、腹腔内注入法によつては此の関係は認められない。著者の実験では体重当 kg 300~500 mg の色素を注入した動物は染色度 2~3 の結果を収め得た。之は Feindel et al.⁹⁾ が実験当初に使用している色素量と一致するが、同氏等が後にそれよりも少量が適当である事が判明したと附言している事実とは一致しない。

12) 色素注入時間と染色度との関係 色素注入時間が大となるに従つて、静脈内点滴注入法では染色度は良好となるが、腹腔内注入法では此の傾向はない。色素注入時間についても著者の実験例で 1~3 時間色素を静脈内に点滴注入し得た動物は概して良好な染色度を収め得て、Feindel et al.⁹⁾ の色素注入時間と一致する。

次に色素量を極端に大にした場合、色素注入時間は短くて良いか、或は色素量が少くても色素注入を長時間続ければ良好な染色度を収め得るかの問題がある。著者はかゝる実験を行つていないが、色素の注入量を非常に大とした場合動物は短時間内に、注入色素の全量が全身を循環しないうちに死亡する事が考えられ、非常に稀薄な溶液を長時間点滴注入を続ける場合、動物の腎機能が健常で色素注入量と色素排泄量とが動的

平衡又は之に近い状態を保つ時は全身組織は全く染色されないと考えられる。

腹腔内注入法で色素注入量及び色素注入時間の増大と染色度との間に平行関係が認められないのは、腹腔内に注入した色素の全量が直ちに吸収されて血行に入り全身を循環する事にはならないからであろうと思われる。腹腔内に注入して確実に吸収される色素量を決定して腹腔内注入を行えば、静脈内点滴注入法と同様の関係を認め得るであろう。

更に小宅²⁰⁾が最近リチオンカルミン・トリパン青・イサミン青等の酸性色素を用いて神経系の生体染色を行い、色素投与量を増加する時リチオンカルミンでは染色の強さが比較的早く飽和され、トリパン青やイサミン青では染色の強さが色素投与量に比例して増大する所見を認め、この両者の差違の説明として、リチオンカルミンでは色素の粗大顆粒状摂取が略々組織球に限定されるに反し、トリパン青やイサミン青は微細顆粒状摂取がシュワン細胞や神経節細胞にも起る為と考えている。此の理由からすればメチレン青は当然色素投与量が大きくなる程染色の強さが増大すると考えられ、事実此の傾向が認められるが、染色度4を認め難い点から染色の強さは或程度で飽和されると考えた。

色素固定法：

色素固定液は原法に従つて6%モリブデン酸アンモン生理的食塩水溶液を用いた。色素固定にモリブデン酸アンモンを用いるのは、Monnier¹⁷⁾によつて記されている反応*を応用したもので、Betheによつて始めて生体染色の固定に利用された。Feindel et al.⁸⁾も此の方法で組織内色素の酸化と固定が毎常可能であるとは限らないとして、此の点がメチレン青静脈内点滴注入法の最大欠陥としている。組織の腐敗・自家融解を防ぐ目的で0~2°Cで組織を浸漬するので、モリブデン酸アンモンの組織内浸透度は Feindel et al.⁸⁾が示

* メチレン青がモリブデン酸によつて濃青色の沈澱を生ずる反応。

すより遙かに不良である。モリブデン酸アンモンが完全に組織内に浸透する時は組織切片を作製した際、組織の中心部まで肉眼的に着色するが、浸透不良の場合は組織切片の中心部は着色しない (Fig. 35)。此の関係は組織ブロックにも認められるので、次の如き実験を行つた (Fig. 5, 第5表)。

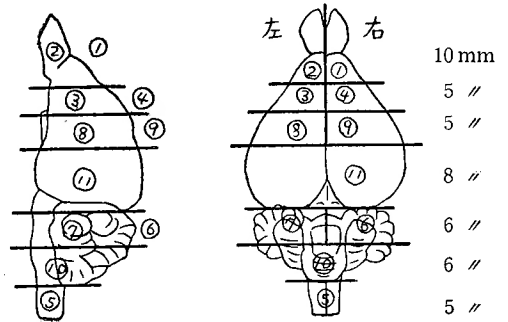


Fig. 5 モリブデン酸アンモン液の組織内浸透実験

体重2.24 kg の家兔の腹腔内に2.5%メチレン青葡萄糖液20ccを注入して70分後に死亡。脳剔出後、図の如く11ヶの組織片として、6%モリブデン酸アンモン生理的食塩水液に浸漬し、0~2°Cの温度に保持する。浸漬後1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50時間に組織ブロック1ヶ宛を取り出し、之に剖面を入れて検した。その結果色素固定液の組織内への浸透度は組織内部の脳室の状態にも関係するが、大体10~20時間では表面から2~3mm程度の深さまで、組織内へ浸透するに過ぎない。一方組織ブロックを24時間以上色素固定液中に浸漬すると、組織が膨化し標本が見にくくなる。それ故色素固定液浸漬時の組織ブロックの厚さは4mm以下で、浸漬時間24時間以内との規準を決定した。従つて組織片は出来るだけ薄切する必要がある、事情が許せば中枢神経系内の必要な部分のみを小さく切り出して(例えば正中線で半分にか切る等)、色素固定液中に浸漬する事が望ましい。厚さ4mm以下の薄い組織片を組織が歪曲しないように安全剃刀の刃で切るのは困難で

第5表 モリブデン酸アンモン液浸漬時間と組織内浸透度との関係

左	浸漬時間 (時間)	浸透部の厚さ (mm)	右	浸漬時間 (時間)	浸透部の厚さ (mm)	浸漬時間 (時間)	浸透部の厚さ (mm)	
②	2	完全	①	1	完全	⑤	5	完全
③	3	完全	④	4	完全	⑩	40	完全
⑦	10	2mm	⑥	7	2mm	⑪	50	完全
⑧	20	4mm	⑨	30	3mm			

表中完全とあるは組織内浸透が完全であつた事を示す

ある。組織を凍結した後安全剃刀の刃で薄切してみたが、操作が煩雑である。次に生の組織からその儘凍結切片を作つて色素固定液に浸漬する方法を試みたが、固定していない組織ブロックでは100 μ 前後の切片しか得られず、透徹、検鏡に不利である。従つて Fig. 1 の如きマクロトームを試作してみたところ、刃の回転と同時に組織を離断するので、組織の歪曲程度も軽く、厚さ4mm以下の組織ブロックを得るのも容易である。次に動物の生存中に色素固定液を注入して中枢神経系内を循環せしめ得ないかと、マウスを用いて第6表の如き実験を行つた。それによるとモリブデン酸アンモンは毒性強く動物の生存中に中枢神経系内の色素の固定に十分な量を全身循環系に導入する事は不可能である。Lewin¹⁰⁾によればモリブデン酸アンモンは通常家兎で経口的に1.6gを投与しても心臓衰弱と痙攣の為に死亡するとされているので、かゝる企ては全く無意味である。Feindel et al.⁹⁾が指摘する如く、モリブデン酸アンモンは組織中に透過しにくいのみならず、組織の固定力が殆んどなく、ホルマリン等組織固定薬と混ざると直ちに白色の沈澱を生ずる欠点があり、組織をホルマリンで固定した後、色素固定液に浸漬すれば発色が不十分である。之等の欠点を補つて組織内色素の固定を計る為に Hines et al.¹²⁾ はモリブデン酸アンモン液の血管内灌流を行つて、骨格筋の神

経支配を研究しているので、之に準じて家兎3頭を用いて色素固定液の灌流実験を行つた(第7表)。灌流後剔出した脳は肉眼的に脈絡叢等の血管系の方が著色顕著であり、更に顕微鏡的に所々に血管破綻像を認める(Fig. 36)。之は血管内でメチレン青がモリブデン酸アンモンで沈澱されている所へ更に加圧灌流するのが原因と思われ、此の所見を取除く為には血管内メチレン青を生理的食塩水等を使用して、予め剔出した後色素固定液を灌流せねばならず、かゝる操作を行えば染色成績は不確実になると思われるので、此の方法の応用にも難点がある。

更に Heller et al.¹¹⁾ はモリブデン酸アンモンが組織固定力が殆んどないので、色素固定を行う際に1%の割合で重クローム酸カリを加える事を推奨している。著者は家兎3頭に色素液の静脈内点滴注入を行つて、脳剔出後の次の組成を有する液に浸漬して色素固定を計つた。即ち生理的食塩水100cc、モリブデン酸アンモン6.0g・重クローム酸カリ1.0g。此の結果得た組織標本の染色度は、モリブデン酸アンモンのみを使用した場合と比較して決して良好とは考えられなかつた。

組織の固定：

Feindel et al.⁹⁾ が指示しているホルマリン固定期間3日以内と云うのは稍々短か過ぎると思われるの

第6表 モリブデン酸アンモン毒性試験

動物番号	体重(g)	8%モリブデン酸アンモン腹腔内注射量(cc)	注射後死亡までの時間(分)	モリブデン酸アンモン注射量(g)	体重1kg当モリブデン酸アンモン注射量(g)
M 6	21	0.5	4	0.040	1.90
M 7	21	1.0	6	0.080	3.81
M 8	28	1.0	5	0.080	2.86
M 9	20	0.1	生存*	0.008	0.40
M10	29	0.2	13	0.016	0.80

* 120分生存後0.2cc。(0.016g)追加注射して5分で死亡

第7表 色素固定液灌流実験

動物番号	性別	体重	色素液注入法	色素固定液	組織固定法
R.123	♂	1.72kg	静脈内点滴注入法	灌流法	ホルマリン灌流 ホルマリン浸漬
R.124	♂	2.40kg	静脈内点滴注入法	灌流法	ホルマリン灌流 ホルマリン浸漬
R.125	♀	2.60kg	灌流法	灌流法	ホルマリン浸漬

灌流法：開胸、左心室よりカニューレを大動脈中に挿入して大動脈球部で結紮固定、大動脈弓下部で下行大動脈を結紮、腹部で大静脈を開放、120mm水銀柱前後に加圧しつゝ液を灌流する。色素液、色素固定液、組織固定液の容器は別にする。

で、組織片の大きさに応じて、3～5日と固定期間に巾を持たせた。固定期間が3日から5日に延長されても染色度はあまり影響を受けない。

組織の脱水：

エチルアルコールによる脱水法を用いる。常温でメチレン青1gは水25ccに溶解し、60ccのエチルアルコールに溶解する事からも想像されるように、水に溶け易いのであるから濃度の低いアルコール内では濃度の高いアルコール内よりも組織ブロック中の色素の損失が大である。アルコールによる脱水法を種々検討して(第8表)、IXの方法即ち大量の95%及び無水アルコールに頻回浸す方法が最良と思われた。Weddell et al.¹¹⁾も最初に95%アルコールを使用して脱水を行っている。

更に固定期間と脱水法の組織に及ぼす影響を検討した(第9表)結果、短期間固定による迅速脱水、普通脱水、普通期間固定による迅速脱水、普通脱水の各場合の組織に及ぼす影響(細胞の収縮、線維間空隙)は段階的の差で、それ程高度でない事を認めた。

尚脱水に使用するアルコールは還元物質などを含まない再蒸溜アルコールが望ましいが、著者は好んで市販のアルコールを用いた。但しRosin¹²⁾に従ってアルコールの検定を行い、化学的に比較的純粋である事を確めて使用したので、脱水効果は再蒸溜アルコールと著差はないと考えられる。

アセトンを用いる迅速脱水を試みたが、メチレン青はアセトンに非常によく溶解するので、色素の損失は大であり、此の方法は実用的でない。

最近 Heller et al.¹³⁾ Nelemans et al.¹⁴⁾は共にブチルアルコールを使用して脱水しているが、此の方法は脱水に長時間を要するので応用しなかつた。

中枢神経系の部位によつて脱水に難易があり、通常小脳中部及び脊髄の脱水は困難であるから、之等は慎重に脱水すべきである。

組織ブロック包埋法：

種々の方法を検討した。

- 1) カーボワックス法 分子量の小さいカーボワ

第8表 アルコールによる脱水方法の検討

脱水法	使用した瓶の數	各瓶のアルコール量	70%アルコール	80%アルコール	85%アルコール	90%アルコール	95%アルコール	無水アルコール	脱水所要時間合計
I	6	90cc	I 1日	I 1日	I 1日	I 1日	I 1日	I 1日	6日
II	6	90cc	II 半日	II 半日	II 半日	II 半日	II 半日	II 半日	3日
III	36	60cc	III 15分	III 15分	III 15分	III 15分	III 15分	III 15分	9時間
IV	36	60cc	IV 10分	IV 10分	IV 10分	IV 10分	IV 10分	IV 10分	6時間
V	16	60cc	V 15分	V 15分	V 15分	V 15分	V 15分	V 15分	4時間
VI	8	350cc	VI 30分	VI 30分	VI 30分	VI 30分	VI 30分	VI 30分	4時間
VII	8	350cc	VII 10分	VII 10分	VII 10分	VII 10分	VII 10分	VII 10分	80分
VIII	8	350cc	VIII 15分	VIII 15分	VIII 15分	VIII 15分	VIII 15分	VIII 15分	2時間
IX	8	2000cc	IX 15分	IX 15分	IX 15分	IX 15分	IX 15分	IX 15分	2～4時間

クス液中に浸す操作の時に色素喪失が大であり、切片にした際相互に連絡のない組織は散乱するので不適當。

- 2) ツェロイチン包埋法 長期間エーテル及びアルコール等の溶媒中に浸漬するので、甚しく脱色する。

第9表 固定期間と脱水法の組織に及ぼす影響の検討

動物番号	性別	体重	組織	固定期間	脱水法	組織標本作製法
R. 88	♀	2.78kg	右半脳	3日	迅速脱水法 脱水時間4時間	パラフィン包埋 ヘマトキシリン・エオジン染色
			左半脳	7日	普通脱水法 脱水期間6日間	パラフィン包埋 ヘマトキシリン・エオジン染色
R. 89	♂	2.0kg	右半脳	3日	迅速脱水法 脱水時間4時間	パラフィン包埋 ヘマトキシリン・エオジン染色
			左半脳	7日	普通脱水法 脱水期間6日間	パラフィン包埋 ヘマトキシリン・エオジン染色

3) パラフィン包埋法及びツェロイヂン・パラフィン包埋法 Feindel et al.⁹⁾は後者を推奨している。その理由は組織の収縮が軽度である上にメチルベンツォアート・ツェロイヂンを通過させ、相当量の色素を失うが、色は却つて濃くなるからであろう。メチルベンツォアート・ツェロイヂン浸漬中は頻回に振盪して組織の透徹を早くすべきである。パラフィンに包埋した際ブロックが濃青色を呈する時は組織切片を作製しても肉眼的に明かに青色を帯び染色度は通常良好であるが、ブロックが淡緑色を呈する時は組織切片は殆んど無色となり染色度は非常に悪い。

4) 凍結切片作製法 切片作製までに脱水過程がなく、切片にしてからは速やかに脱水が出来、或は孵卵器内でその儘乾燥し得るので色素の損失は殆んどなく、凍結切片は試むべき方法である。たゞ固定期間が短いので、乾燥法による脱水には細心の注意を要する。切片にした際カーボワックス包埋法同様、相互に連絡のない組織は散乱するが、之はゲラチン包埋法によつて避け得る。但し、色素の損失はそれだけ大となり、表面に近い部分を検索するには適しない。

従つて標本の一半にはツェロイヂン・パラフィン包埋法を、又他の一半には凍結切片作製法を行うのが望ましい。

第2節 所見に対する考察

正常神経要素については Feindel et al.⁹⁾の所見と肉眼的にも組織学的にも略々一致する所見を得た。

然るに著者は比較的忠実に原法に準じて実験を行ったにも拘らず、変性神経線維については、Feindel et al.⁹⁾の収めた結果と比較して非常に不満足な所見を得たのみであつた。

Feindel et al.⁹⁾は家兎10頭に偏側の眼球剔出を行い、中2頭には経眼窩的に嗅索切断を加え、術後5～20日にメチレン青の静脈内点滴注入を行つて、変性神

経線維索は肉眼的にも必ず著明に濃染性及びメタクロマジーを示して、その走行、分布を追究し得るとしている。著者は眼球剔出を行つた28例中8例に剔出側に一致して視束の濃染性を認めたがメタクロマジーについては著明でなかつた。其際視束の濃染性は毎常Fig. 2の如き状態を呈していた。Feindel et al.⁹⁾の実験でも此の關係が見られる如くである。此の所見は家兎の視束が部分的交叉であるとすれば奇異に感じられるが、津崎²⁹⁾によれば家兎では視束の大部分の線維は交叉し、視索に入つてからは平等に分布するというから、此の所見は変性像として必ずしも矛盾しない。然し間脳側面を走る視索部分では濃染所見を認めた事がなく、又他の手術を施行した動物にメタクロマジー或は濃染性を肉眼的にどの部分にも認め得なかつたので、著者は此の視束の肉眼的所見を以て直ちに変性像とは決定し得なかつた。

次に組織学的検索によつて、毎常ではないが変性神経線維の存在を期待し得る部位に Feindel et al.⁹⁾の云う変性神経線維と一致する像即ち濃染性・メタクロマジー・形態の不規則性・空胞化等を見出し得る。然し Feindel et al. が皮質下に認めている迷在性神経線維を、著者も手術とは全く無関係と思われる中枢神経系内の多くの部位に、例えば前頭部皮質下、前脊髓小脳路、第4脳室底、小脳、橋等に認めている。此の所見は Feindel et al. もメチレン青静脈内点滴注入法の価値を減少するとして、メチレン青の神経要素に対する毒性によると考えている。著者は実験初期には此の迷在性の変性神経線維は一ヶ所に多数見出される事がないので本来の変性神経線維と区別し得ると考えていたが、後に手術を施行しない家兎(第2表, R.60)の小脳中に多数存在する所見を認めたので両者の区別はそれだけでは不可能と考えている。又之等の迷在性の変性神経線維は中枢神経系の割合表層に近い部位に見

出される事が多いので、メチレン青の毒性の影響以外に色素固定液に浸漬する等の組織標本作製上の操作の影響も見逃し得ないと思われる。

多くの場合、手術の結果として当然現われるべき部位に見出される変性神経線維も毎常見出されるとは限らず、認め得ても少数の事も多く、中枢神経の実験的研究における本法の価値は更に低下する。

Feindel et al. が強調している組織所見における変性神経線維のメタクロマジーについても、これを呈しているながら形態的变化を全く伴わず正常と考えられる神経線維の存在することや、1本の神経線維で一部正常に染まり、他の部分でメタクロマジーを呈するものあり、又形態的变化のみでメタクロマジーを認めぬ変性神経線維の存在する事から変性像としてのメタクロマジーは Weddell et al.²⁰⁾ が末梢神経の変性像にも認めている所見ではあるが尚疑問を持たざるを得ない。此の点から本法による組織標本においても Cajal

²¹⁾ Spielmeyer²²⁾ 城田²⁰⁾等の記載する形態的变化即ち断裂、軸索遊離球、肥厚、膨大、空胞化等を変性像として第一義的に考慮すべきであるとする。

本法による組織標本は鍍銀法による標本と比較して、染色される神経要素の数が少い。此の所見は Feindel et al.¹⁹⁾ は認めていないが、Feindel et al. は正常神経線維は原則的に染色されないとしての観察であり、著者は正常神経線維も原則的に染色可能とする見解の差によると思われる。Fig.37は Feindel et al.¹⁹⁾ の論文から転載したもので、視索中の変性線維を図示したものであるが、視索は神経線維が密集している部位であり、染色されていない線維が正常神経線維ばかりだとは考えにくく、やはり実際に染色される神経要素の数が少ないものと考えねばならぬ。此の理由には Heller et al.¹¹⁾ が超生体染色的に浸漬法で認めているように、メチレン青によつては先づ細い神経線維が染色され、次いで太い神経線維が染まり、やがて細い神経

第10表 ヒアルロニダーゼ使用実験 (ヒアルロニダーゼには塩野義製薬のストラクターを使用)

動物番号, 性別, 体重	ヒアルロニダーゼ使用法	ヒアルロニダーゼ使用後の処置	組織切片作製法
R.70 合 2.0kg	放血致死後脳を剔出, 5片に薄切ストラクター5000単位を溶解した20ccの生理的食塩水に氷室中で30分間浸漬	10%フォルマリンで固定 (1週間)	凍結切片 鍍銀法
R.71 合 2.06kg	後頭下穿刺を行い、髄液 1.0cc 排除後ストラクター5000単位を溶解した 1.0cc の生理的食塩水を大槽内に注入	ストラクター注入後10時間で放血致死, 脳を剔出し, 10%フォルマリンで固定 (1週間)	凍結切片 鍍銀法
R.72 合 2.12kg	ストラクター5000単位を溶解した0.5ccの生理的食塩水を前頭部の脳実質中に注射	20分後放血致死, 脳を剔出, 10%フォルマリンで固定 (1週間)	凍結切片 鍍銀法
R.85 合 2.34kg	両側の外頸動脈結紮後ストラクター2500単位を溶解した5ccの生理的食塩水を左頸動脈より注射, 20分後右頸動脈より同様処置を行う	両側頸動脈注射終了後20分で放血致死, 脳を剔出して10%フォルマリンで固定 (1週間)	凍結切片 鍍銀法
R.86 合 2.20kg	前頭部開頭, 硬膜を開きストラクター5000単位を溶解した 1.0cc の生理的食塩水に浸漬したガーゼの薄片を脳表面におき, 10分間に10回変更, 皮膚縫合	30分後放血致死, 脳剔出, 10%フォルマリン固定 (1週間)	凍結切片 鍍銀法
R.79 男 2.04kg	両側の外頸動脈結紮後ストラクター2500単位を溶解した5ccの生理的食塩水を左頸動脈より注射, 20分後右頸動脈より同様処置を行う	ストラクター注射終了後1時間でメチレン青静脈内点滴注入開始	ツェロイヂン・ パラフィン包埋 染色度3
R.80 男 1.98kg	後頭下穿刺を行い、髄液 1.0cc 排除後ストラクター5000単位を溶解した 1.0cc の生理的食塩水を大槽内に注入	ストラクター注入後10時間でメチレン青静脈内点滴注入開始	ツェロイヂン・ パラフィン包埋 染色度2
R.81 男 1.80kg	前頭部開頭, ストラクター5000単位を溶解した 1.0cc の生理的食塩水を脳実質中の3ヶ所に注射	ストラクター注射後40分でメチレン青静脈内点滴注入開始	ツェロイヂン・ パラフィン包埋 染色度1
R.82 合 1.92kg	前頭部開頭, 硬膜を開きストラクター5000単位を溶解した 1.0cc の生理的食塩水に浸漬したガーゼの薄片を脳表面におき10分間に5回変更, 皮膚縫合	25分後メチレン青静脈内点滴注入開始	ツェロイヂン・ パラフィン包埋 染色度2
R.83 合 2.0kg	メチレン青静脈内点滴注入後脳剔出, 4片に薄切ストラクター5000単位を溶解した20ccの生理的食塩水に氷室中で30分間浸漬	色素固定を通常方法で行う	ツェロイヂン・ パラフィン包埋 染色度3
R.84 男 1.94kg	メチレン青静脈内点滴注入後脳剔出, 薄切後ストラクター5000単位を溶解した60ccの6%モリブデン酸アンモン生理的食塩水に浸漬, 0~2℃で保持	10%フォルマリン生理的食塩水で固定 (生理的食塩水で洗滌後)	ツェロイヂン・ パラフィン包埋 染色度3

線維は褪色し始める傾向があり、太い神経線維と細い神経線維とが染色される時期が異なる事も一因と考えられる。事実本法を用いた時太い神経線維の方が染色が容易であると思われる。

最近 Weddell et al.³⁹⁾ Pallie et al.²¹⁾は予め組織中にヒアルロニダーゼを注射して置くと、メチレン青の生体染色でも鍍銀法でも、神経要素は微細な点まで生理的な状態で認められ人工産物も少いと述べている。著者は種々の方法でヒアルロニダーゼを用いて実験を行った(第10表)。その結果、メチレン青静脈内注入法によつても、対照として試みた鍍銀染色によつても染色性が向上したと思われる所見は認め得なかつた。

正常神経要素の染色に部位による難易が認められるのは、中枢神経系の構造が部位によつて異り、組織標本作製上の操作の影響が部位によつて異なる事も一因であろうが、本法が血管系から色素を導入する方法である以上、血管の分布状態の差異による影響も無視出来ないと思われる。

尚犬及びマウスが家兎よりも染色性が劣る事実は色素注入量の差、血管分布の差以外に、家兎の脳重の体重に対する割合が犬及びマウスの夫れと比して著しく小さい事も何等かの関係があるのではなからうか(第11表)。

第11表 脳重と体重との関係

		体 重	脳 重
家 兎	津崎 ³⁷⁾	173~194 (100)	1 (0.51~0.58)
	石黒 ¹⁷⁾	100	0.35~0.42
	安藤	100	0.45前後 *
犬	安藤	100	1.1前後 *
マウ ス	安藤	100	1.5前後 *

* 著者少数例測定による

第3節 本法の利点及び欠点

本法の利点としては正常神経要素を或程度まで染色し得て、中枢神経系の連続切片を作製するには、切片作製後染色する必要がなく他の如何なる方法よりも簡単である事が考えられる。

之に対して欠点が遙かに多いと思われる。染色される正常神経要素の数が少く、且つ不確実であり、従来多くの研究者がメチレン青による神経の染色で認めているように、本法による中枢神経系の染色も成績が不定であると言う印象を拭い得ない。又全身の各組織に

よつて神経の染色条件が異り、一度に全身組織の神経要素を染色する事も不可能である。脳組織を染色し得るメチレン青注入操作で、末梢神経や肝、腎、脾、睾丸等の内部神経を染色し得なかつたことから、著者は脳組織がこれらの臓器内神経よりも染色容易である、少くとも染色困難ではないという印象をうけた。

更に変性神経線維の染色も確実性に乏しく、変性神経線維に対するマルキー法及び鍍銀法並びに変性神経細胞に対するニッスル染色等と比較して決して優秀な方法とは思われぬ。従つて中枢神経系の実験的研究における本法の将来性は Feindel et al.⁹⁾の示唆に反して、染色条件を更によく吟味せねば全く期待し得ないのではないと思われる。

Feindel et al.⁹⁾も迷在性の変性神経線維の存在以外に具体的な事実を挙げていないが、染色成績は尚不満足であるとしており、原法の発表以後中枢神経系の実験的研究に静脈内点滴注入法を用いた業績が他に見当たらないのも此の間の事情を物語るものであろう。

第5章 結 論

1) 1948年 Feindel et al.⁷⁾はメチレン青静脈内点滴注入法によつて中枢神経系の染色を行い、その肉眼的並びに組織学的所見から、改良を加える事によつて此の方法が有力な中枢神経系の実験的研究方法となり得るであろうと示唆した。

2) 著者は Feindel et al.⁹⁾の示した原法の追試及び批判を試みた。

3) その結果、正常神経要素については略々 Feindel et al.⁹⁾の所見と一致したが、変性神経線維に関しては肉眼的にも組織学的にも Feindel et al.⁹⁾の所見と比較して遙かに不満足な結果を得たのみであつた。

4) 従つて中枢神経系の実験的研究における本法の将来性は全く期待し得ない。

5) 実験方法について検討を加え、比較的一定した染色成績を収める標準的な実験方法を示した。

6) 中枢神経系に種々の方法でヒアルロニダーゼを用いたが、メチレン青の静脈内点滴注入法及び鍍銀法で染色性の向上は認められなかつた。

7) メチレン青の静脈内点滴注入法において、動物の体重従つて年令と染色度とは無関係と考えられたが、色素の注入量と注入時間が増大する程染色度は向上する傾向が認められた。

8) 犬及びマウスは家兎と比較して、中枢神経系の染色性は明かに不良であつた。

参 考 文 献

- 1) Brodal, A.: Modification of Gudden Method for Study of Cerebral Localization. Arch. Neurol. Psychiat., **43**; 46, 1940.
- 2) Clark, E. R. & Clark, E. L.: Microscopic Studies on the Regeneration of Medullated Nerves in the Living Mammal. Am. J. Anat., **81**; 233, 1947.
- 3) Dogiel, A. S.: Methylenblau zur Nervenfärbung. In "Enzyklopädie der Mikroskopischen Technik", R. Krause. III Edit. Berlin. Urban und Schwarzenburg; 1390, 1926.
- 4) Ehrlich, P.: Über die Methylenblaureaktion der lebenden Nervensubstanz. Biol. Zbl., **6**; 214, 1886.
- 5) Feindel, W. H.: A Study of Neural Patterns by the Aid of Intravital Methylene Blue. D. Phil. Thesis. University of Oxford. 1948.
- 6) Feindel, W. H., Sinclair, D. C. & Weddell, G.: A New Method for Investigating the Nervous System. Brain, **70**; 495, 1947.
- 7) Feindel, W. H. & Allison, A. C.: Intravenous Methylene Blue for Studying Fiber Degeneration in the Central Nervous System. Science, **107**; 429, 1948.
- 8) Feindel, W. H., Allison, A. C. & Weddell, G.: Intravenous Methylene Blue for Experimental Studies on the Central Nervous System. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., **11**; 227, 1948.
- 9) Feindel, W. H., Hinshaw, J. R. & Weddell, G.: The Pattern of Motor Innervation in Mammalian Striated Muscle. J. Anat., **86**; 35, 1952.
- 10) Fukuda, T.: Demonstration of the Cutaneous Nerves with Methylene Blue Staining in Leprosy. Arch. Jap. Chir., **22**; 525, 1953.
- 11) Heller, R. E., Thomas, R. W. & Davenport, H. A.: Staining Nerve Fibers with Methylene Blue. An Evaluation of Variables Used in an Immersion Technic. Stain Technol., **22**; 111, 1947.
- 12) Hines, M. & Tower, S. S.: Studies on the Innervation of Skeletal Muscles. II. Of Muscle Spindles in Certain Muscles of the Kitten. Johns. Hopk. Hosp. Bull., **42**; 264, 1928.
- 13) Ishiguro, A.: Cerebral Blood Flow in Cerebral Edema. Experiments on Rabbits. Fol. Psychiat. Neurol. Jap., **9**; 89, 1955.
- 14) Kiyono, K., Sugiyama, S. & Amano, S.: Methylenblaufärbungsmethode von Nervensfaern. In "Die Lehre von der Vitalfärbung", Kyoto. 65, 1938.
- 15) Kondratjew, N. S.: Eine Neue Methode der elektiven makroskopischen Färbung des Nervensystems. Ztschr. f. Anat. Entwicklungsgesch., **78**; 669, 1926.
- 16) Lewin, L.: Gifte und Vergiftungen. In "Lehrbuch der Toxikologie". IV Aufl. Berlin, 1929.
- 17) Monnier, A.: Chem. Zbl. **II**; 132, 1917.
- 18) Nakajima, T. & Murata, M.: Experimental Studies on the Intramural Nerve Plexus of the Cat's Stomach. Read in part before XIV General Meeting of the Japan Neurosurgical Society, 1955.
- 19) Nelemans, F. A. & Dogteron, J.: Staining of Nerve Fibers with Methylene Blue. Factors Improving the Staining. Stain Technol., **28**; 81, 1953.
- 20) Oyake, Y.: Vital Staining of the Nervous System. Tr. Soc. Path. Jap., XLII Editio generalis; 459, 1953.
- 21) Pallie, W., Corner, G. W. & Weddell, G.: Nerve Terminations in the Myometerium of the Rabbit. Anat. Rec., **118**; 789, 1954.
- 22) Pirozynski, W. J. & Webster, D. R.: Experimental Investigation of Changes in Axis Cylinders of Peripheral Nerves Following Local Cold Injuries. Am. J. Path., **29**; 547, 1953.
- 23) Ramon Y Cajal, S.: "Degeneration and Regeneration of the Nervous System" London. Oxford University Press. Vol. II, 1948.
- 24) Romeis, B.: Mikroskopische Technik. XV Aufl. München. 1948.
- 25) Rosin, J.: Reagent Chemicals and Standards. New York. 1937.
- 26) Schabadasch, A.: Untersuchungen zur Methodik der Methylenblaufärbung des vegetativen Nervensystems. Ztschr. Zellfor. Mikro. Anat., **10**; 221, 1930.
- 27) Schabadasch, A.: Zur Theorie und Praxis des Fixierens der Methylenblaufärbung des Nervensystems. Ztschr. Zellfor. Mikro. Anat., **10**; 245, 1930.
- 28) Schabadasch, A.: Die Nerven des Magens der Katze. Ztschr. Zellfor. Mikro. Anat., **10**; 254, 1930.
- 29) Schabadasch, A.: Intramurale Nervenengeflechte des Darmrohrs. Ztschr. Zellfor. Mikro. Anat., **10**; 320, 1930.
- 30) Shirota, S.: Studies on the Nerve Fibers in the Gliomas of the Cerebrum and the Pons. (In the Press) Read in Part before XIV General Meeting of the Japan Neurosurgical Society, 1955.
- 31) Spielmeier, W.: Nervenfasern. In "Histopathologie des Nervensystems". I Band: 111, 1922.
- 32) 田内: メチレンブラウによる神経の超生体染色について. 日本整形外科学会誌, **7**; 483, 1932
- 33) 津崎: 実験用動物解剖学, 兎篇 1954.
- 34) Weddell, G.: The Pattern of Cutaneous Innervation in Relation to Cutaneous Sensibility. J. Anat., **75**; 346, 1940.
- 35) Weddell, G., Harpman, J. A., Lambley, D. G. & Young, L.: The Innervation of the Musculature of the Tongue. J. Anat., **75**; 255, 1940.
- 36) Weddell, G. & Glees, P.: The Early Stages in the Degeneration of Cutaneous Nerve Fibres. J. Anat., **76**; 65, 1941.
- 37) Weddell, G., Sinclair, D. C. & Feindel, W. H.: An Anatomical Basis for Alterations in Quality of Pain Sensibility. J. Neurophysiol., **11**; 99, 1948.

38) Weddell, G. & Zander, E.: A Critical Evaluation of Methods Used to Demonstrate Tissue Neural Elements, Illustrated by Reference to the Cornea. *J. Anat.*, **84**; 168, 1950.
 39) Weddell, G. & Pallie, W.: The Value of 'Spreading Factors' in the Demonstration of Tissue Neural Elements. *Quart. J. Microscop. Science*, **95**; 389, 1954. 40) Weddell, G., Pallie, W. & Palmer, E.: The Morphology of Periphe-

ral Nerve Terminations in the Skin. *Quart. J. Microscop. Science*, **95**; 483, 1954. 41) Winkler, C. & Potter, A.: An Anatomical Guide to Experimental Researches on the Rabbit's Brain. Amsterdam, 1911. 42) Woollard, H. H., Weddell, G. & Harpman, J. A.: Observations on the Neurohistological Basis of Cutaneous Pain. *J. Anat.*, **74**; 413, 1939.

附 図 説 明

Fig. 14: 蝸牛神経背側核中の神経細胞 (×400).

Fig. 15: 橋核中の神経細胞. 細胞原形質及び突起中に小顆粒が撒布されている (×900).

Fig. 16: 前脊髄小脳路中の神経線維 (×400).

Fig. 17: 前頭部大脳皮質. 樹状突起が著明に染色されている (×100).

Fig. 18: 動眼神経核附近 (×100).

Fig. 19: 中脳神経線維束 (×100).

Fig. 20: プルキンエ細胞 (×400).

Fig. 21: 脊髄前柱細胞 (×100).

Fig. 22: 橋の正常神経線維 (×100).

Fig. 23: 橋の正常神経線維. 小顆粒が撒布されている. Ranvierの絞輪(↑)が右方に認められる (×400).

Fig. 24: 橋内の波状の外観を呈する神経線維 (×400).

Fig. 25: 卵円形膨隆のある神経線維(橋). 中央に線維の分岐が認められ, 分岐部に結節形成がある (×400).

Fig. 26: 眼球剔出後48日目の反対側外側膝状体中の変性神経線維 (×900).

Fig. 27: 眼球剔出後14日目の反対側外側膝状体中の変性神経線維 (×400).

Fig. 28: 前頭部大脳皮質下の迷在性の変性神経線維 (×400).

Fig. 29: 小脳内変性神経線維. 軸索の遊離球の状態が認められる (×400).

Fig. 30: ダイテルス核中の神経線維. 斜めに走る線維は殆んど形態的变化を示さぬが, メタクロマジーを呈している (×100).

Fig. 31: 腰髄内の単一変性神経線維. メタクロマジーを示さず (×400).

Fig. 32: 視床内変性神経線維. 分岐部に結節形成あり (×400).

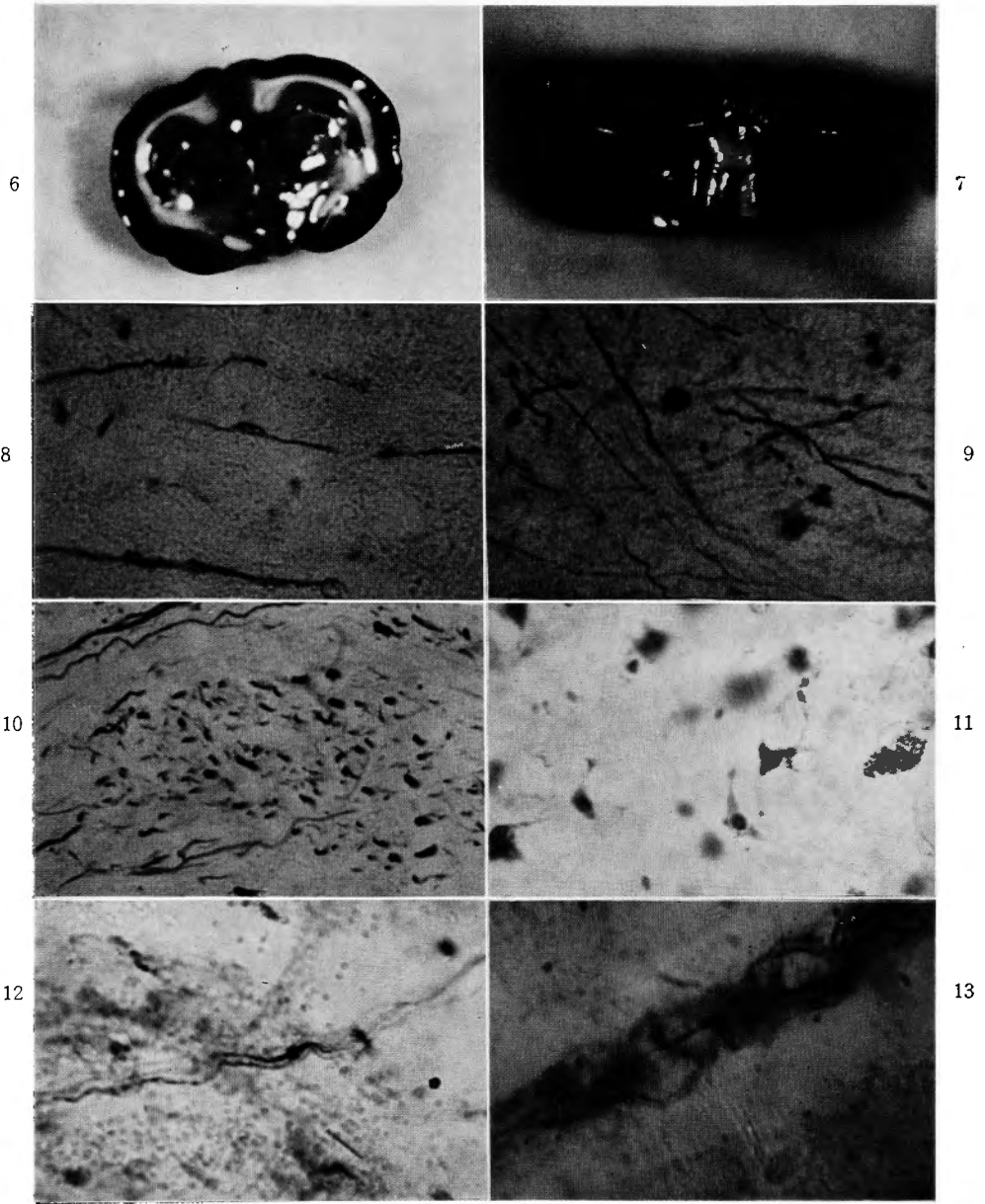
Fig. 33: 側脳室壁の脳室上衣細胞. 単極性の突起が脳実質中にのびて分枝している (×400).

Fig. 34: 第4脳室脈絡叢 (×200).

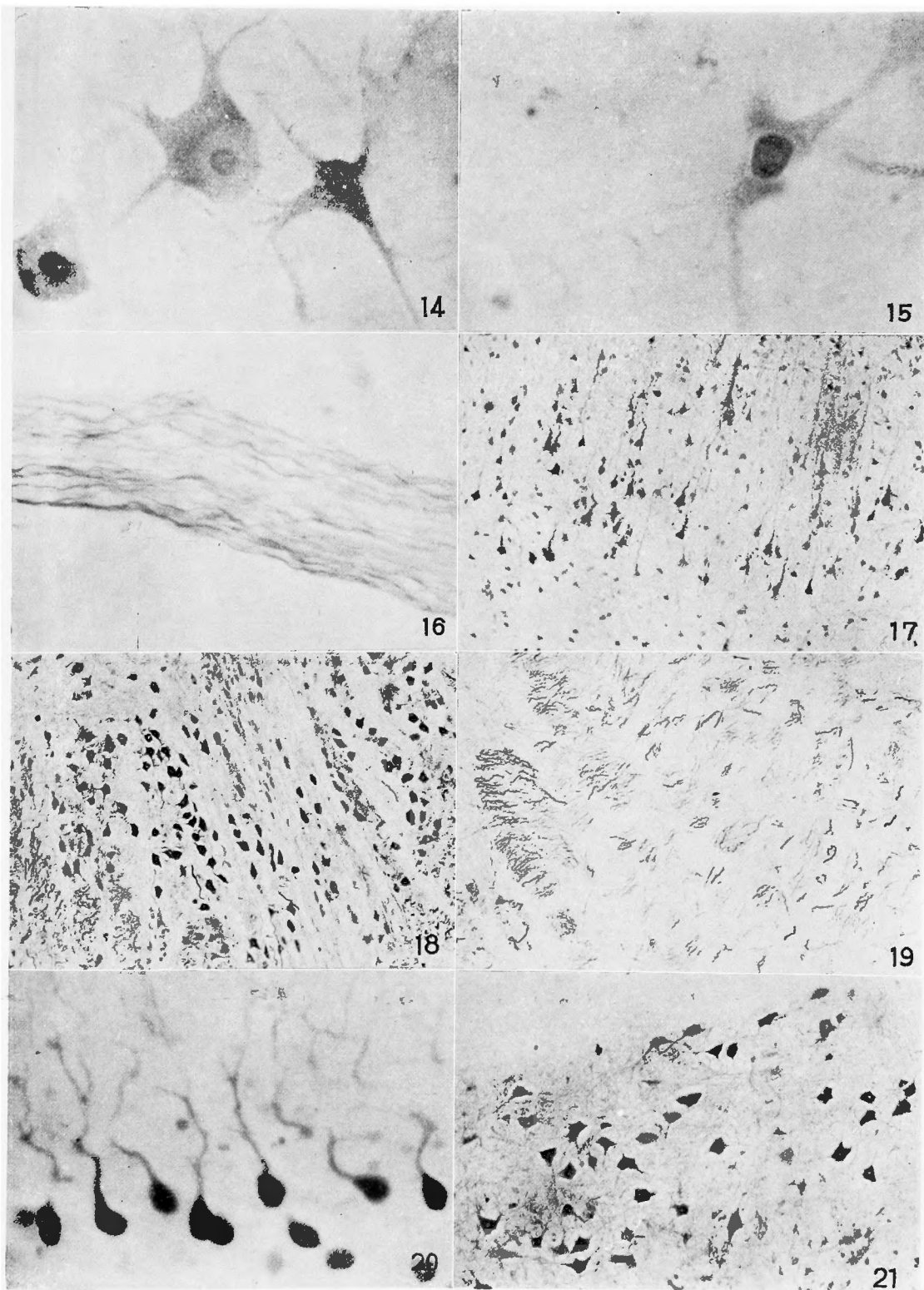
Fig. 35: モリブデン酸アンモンの組織ブロック内滲透不良例. 橋の中心部は著色していない. 凍結切片30 μ .

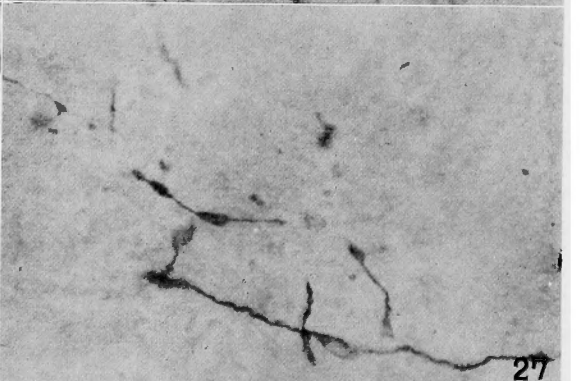
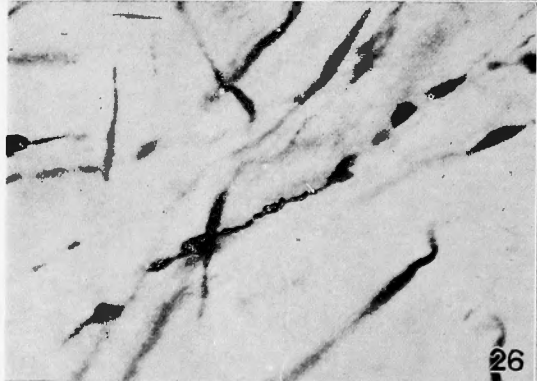
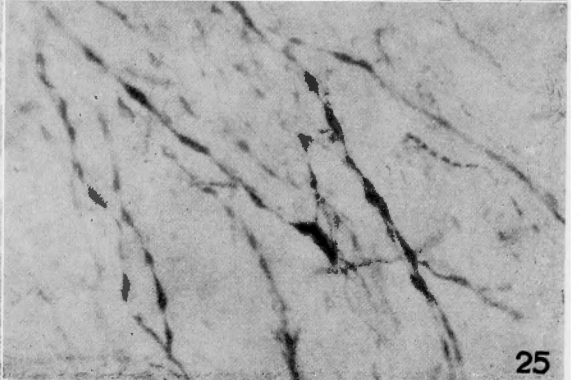
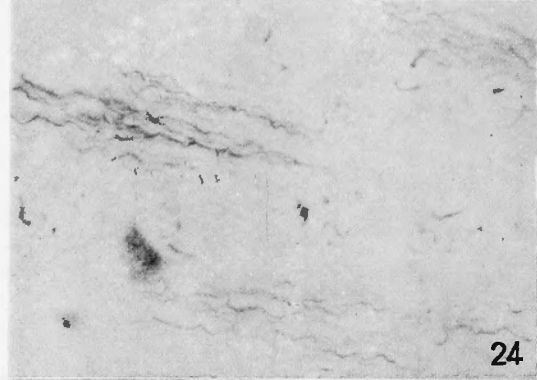
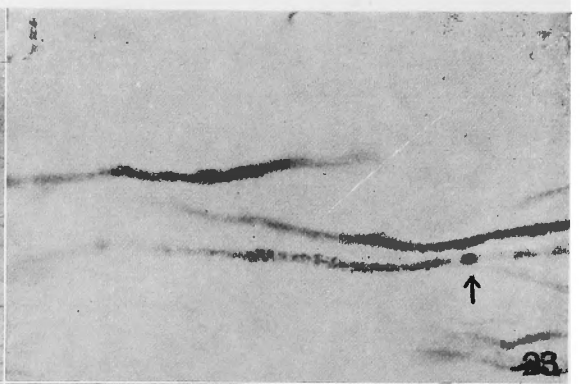
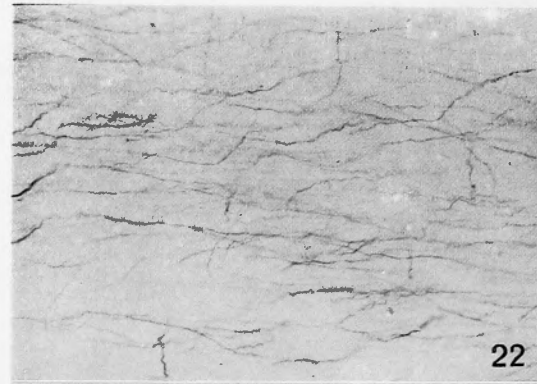
Fig. 36: 色素固定液灌流実験を行つた家兎の硬膜伸展標本. 所々に血管破綻像を認める (×100).

Fig. 37: Science 所載の Feindel et al. の論文の附図を転載したもので, 視索中の変性神経線維を示す.



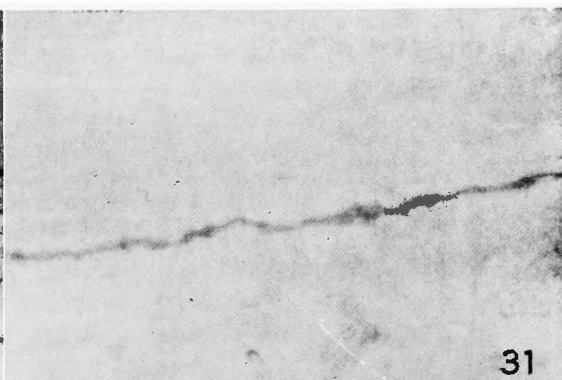
- Fig. 6 :** 灰白質は白質より遙かに濃く着色する。両側視索は蒼白色に止つている。
Fig. 7 : 左眼剔除後19日目。左側視索は濃染し稍々太い。両側ともメタクロマジーを呈している。
Fig. 8 : 眼球剔除後21日目の剔除側上丘中の変性神経線維、空胞化及びメタクロマジーを認める(×400)
Fig. 9 : 眼球剔除後48日目の反対側上丘近傍の変性神経線維。遊離球の状態になつてもメタクロマジーを認める(×400)。
Fig. 10 : 中脳正常神経線維束(×400)。
Fig. 11 : 橋の神経細胞。原形質内に青い小顆粒が撒布されている(×400)。
Fig. 12 : 硬膜の単一有髓神経線維。髓鞘は淡染し Ranvier の絞輪は濃染す(×400)。
Fig. 13 : 脳実質内血管。網状構造を形成する線維を認める(×900)。



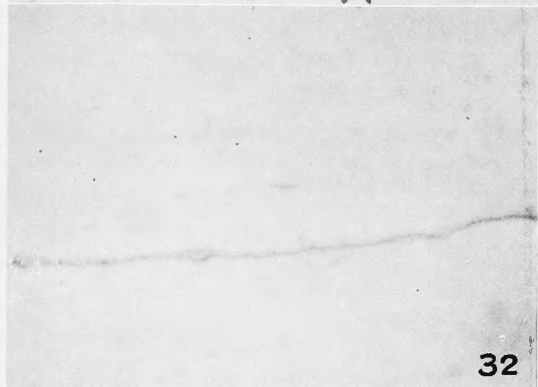




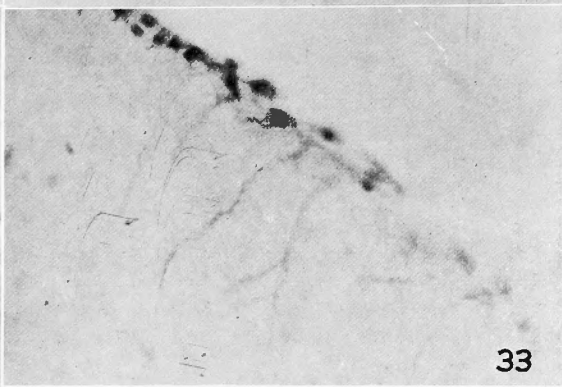
30



31



32



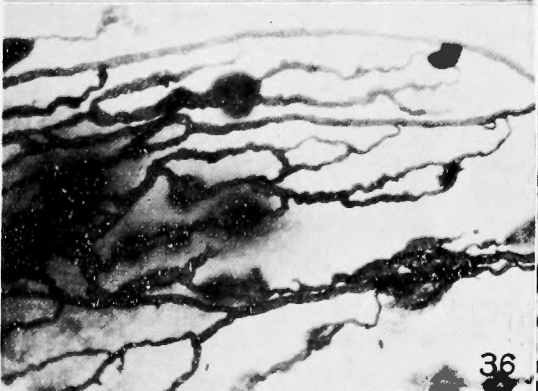
33



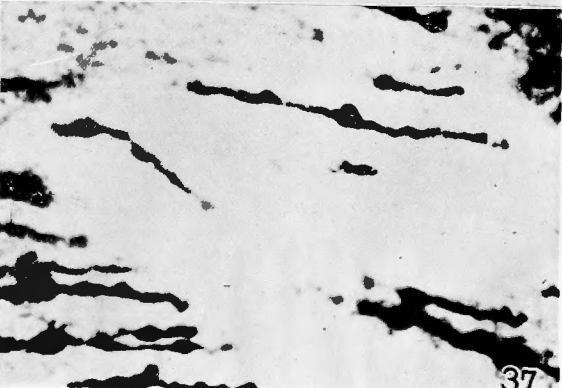
34



35



36



37