

国産プロタルゴールによる Bodian 氏軸索染色法 — 一変法

岐阜県立医科大学第二外科学教室（主任：竹友隆雄教授）

河 村 義 博

〔原稿受付 昭和40年1月10日〕

A Modified Bodian's Method for Staining nerve Fibers Using Protargol Manufactured in Japan

by

YOSHIHIRO KAWAMURA

From the 2nd Surgical Division, Gifu Prefectural Medical School

It is well known that Bodian's method for staining nerve fibers is very useful in histological examination of the nervous system. In his original paper Bodian described that the protargol manufactured by Winthrop Chemical Co. should be used in this method, and actually it has been difficult to stain nerve fibers successfully using protargol manufactured in Japan. However, it became difficult recently to obtain Winthrop's protargol and it is reported that the company stopped manufacturing the drug. Although it is said among investigators that BAYER's protargol is as good as Winthrop's one for the staining, even the former product is rather difficult to obtain in this country. Thus, without this drug the useful method of BODIAN would remain only as a historical method.

I tried to stain nerve fibers by this method with some modification, using protargol manufactured by various Japanese companies (IWAKI Co., EBISU Co., FUJISAWA Co., DAI-ICHI Co. and HOEI Co.) as BAYER's protargol. The modification of the method was made as follows. The original reducing solution, which consists of

- 1 gm. hydroquinone
- 5 gm. sodium sulfite
- 100 cc. aq. dest.

was changed to

- 2 gm. hydroquinone
- 4 gm. sodium sulfate
- 100 cc. aq. dest.

Otherwise original procedures were followed. The results of staining, using those various products of protargol, were compared with each other. It was found that the results of staining according to this modified method, using some of the Japanese products of protargol as well as BAYER's one, were as excellent as the result of staining according to the original method using BAYER's protargol. Apart from its theoretical consideration, this modified method of BODIAN's stain seems to have wider applicability to products of protargol delivered by various manufacturers as compared with the original method of BODIAN.

緒 言

従来神経組織の染色は、その組織学的、及び個々の細胞の化学的性質等の複雑性のため、古くからCajal, Golgi, Bielschowsky 等により、幾多の染色法及びその変法が、案出されてきているがそれ等の多くは操作が煩雑であり、且つ又、その操作の習熟に時間を要し、しかもその染色結果が、不均一であることが欠点とされる。又これ等の神経染色法の多くは凍結切片によるものであるが、Davenport (1930)¹⁾, Bodian (1936)²⁾³⁾, Romanes (1950)⁴⁾, 藤森 (1952)⁵⁾⁶⁾等は、パラフィン切片による染色法を考案し、操作の簡易化をはかった。これ等のうちでも Bodian 氏は、種々の点で長所を有するに拘らず、その主薬であるプロタルゴールを Winthrop 製と限定しており、事実日本製プロタルゴールでは、染色されないのである。此の Winthrop 製プロタルゴールが近年入手困難となり、著者の調べた所では、その製造中止との事であるから、種々の長所を具備した Bodian 氏染色法も、有名無実、単なる歴史的染色法の運命となりつつある現状である。ところが著者は、二、三の国産プロタルゴールを使用し、Bodian 氏原法に、聊か改変を加えたところ、殆んど同様の染色像を得る事が出来、一部に於いては、それに優る染色像を得る事が出来たので、その染色法及び、その染色像の一部を供覧する。

Bodian 氏軸索染色法について

1933年, Bartelmez⁷⁾ 及び Hoerr は, Roger の染色法に於いて、硝酸銀の代りに、初めてプロタルゴールを使用し、良好なる染色像を得ることに成功した。これとは別に Bodian は、パラフィン切片に於いてプロタルゴールによる画期的染色法を発表し、その染色操作が比較的簡単であり、染色像が均一的である事を強調した。即ち、1936年彼は実験動物に於いて、主に中枢神経の染色法につき、翌年には染色法に対する固定法の重要性につき詳述しているが、その内容を要約すると次の如くである。

Bodian 氏軸索染色法

固定液の種類

- ① ホルマリン 10cc
生理食塩水 90cc
- ② ホルマリン 5cc
氷醋酸 5cc
80%エチルアルコール 90cc
- ③ ホルマリン 5cc

- 三塩化醋酸 1～2g
- ④ ホルマリン 5cc
蟻酸 2～5cc
80%エチルアルコール 90cc
- ⑤ ホルマリン 5cc
強水酸化アンモニウム 1cc
80%エチルアルコール 90cc
- ⑥ 無水エチルアルコール 95cc
氷醋酸 5cc
- ⑦ 無水エチルアルコール 100cc
三塩化醋酸 1～2g
- ⑧ 無水メチルアルコール 95cc
氷醋酸 5cc
- ⑨ d'Ancona 液

{	95%メチルアルコール 40cc
	ピリヂン 20cc
	抱水クロラル 2.5g
	蒸留水 40cc
- ⑩ Huber 液

{	95%メチルアルコール 100cc
	三塩化醋酸 1.5g
	塩化水銀 3g
- ⑪ 5%重クロム酸カリ 80cc
ピリヂン 10cc
メチルアルコール 10cc
強水酸化アンモニウム 1cc
- ⑫ Carnoy 液
- ⑬ Bouin 液

固定法：

上記種々の固定液は、染色せんとする神経要素により適当に撰択するのであつて、末梢神経の染色は、その中①②③⑦⑩⑪等を適当として居り、固定時間については特別限定して居ない。

染色方法：

固定材料を脱水し、キシロール透徹後、パラフィン包埋し、薄切し、卵白グリセリン載物ガラスに貼付し、乾燥後、

① 脱パラフィン後アルコールで充分洗った切片を、蒸留水で水洗。

② 鍍銀：1%プロタルゴール（Winthrop 製）液中で 37℃、12～24 時間加温後、蒸留水で水洗（但し 1%プロタルゴール 100ccにつき銅粉 5g 投入せるものを用いる）。

③ 次の還元液中に 10 分間、その後丁寧に蒸留水で

水洗.

- ハイドロキノ 1g
- 亜硫酸ソーダ 5g
- 蒸留水 100cc

④ 鍍 金

- a) 1%塩化金 (100 ccにつき 氷醋 3 滴混和せるもの) 中で 5~10分, 次いで蒸留水で水洗.
- b) 2%硝酸液 5~10分で発色, 蒸留水で水洗.
- c) 5%ハイボ 5~10分, 蒸留水で水洗.

⑤ アルコール脱水, キシロール透徹

⑥ バルサム封入

著者の染色方法:

固定液及び固定法

- A {
 - ホルマリン 100cc
 - 蒸留水 900cc
 - 塩化ナトリウム 8.5 g
 - 炭酸マグネシウム 1.0 g

又は普通 10%ホルマリン固定液

B Bouin 液

等を使用し, 固定時間は前者を用いる時は, 直径約 0.5 cm 程度の末梢神経ならば 24 時間以上, 後者では更に短時間で良いが硬化し易く太い神経の場合は不適當の様である.

染 色 法

固定材料を通常の如く, パラフィン包埋し, 薄切し, 卵白グリセリン載物ガラスに貼付し, 乾燥後, 前記 Bodian 染色法の②に於いて, Winthrop 製プロタ

ルゴールの代りに, 岩城製薬の 1%プロタルゴール液を使用し, 37°C, 12~24 時間加温した. 尚, 原法同様 1%プロタルゴール 100cc につき銅粉 5g 投入した.

次いで前記 Bodian 氏染色法③に於ける還元剤

- ハイドロキノ 1g
- 亜硫酸ソーダ 5g
- 蒸留水 100cc

の代りに著者は,

- ハイドロキノ 2g
- 結晶硫酸ソーダ 4g (小宗化学)
- 蒸留水 100cc

を使用し同液中に 10 分間放置し, その他の操作は前記 Bodian 氏染色操作と全く同様に施行した.

著者の染色法による成績

この方法により家兎の末梢神経の正常像, 変性像, 再生像等につき染色し良好なる染色像を得, 殊に家兎角膜の神経繊維に於いては, 原法試薬によるもの以上と思われる染色像を得る事が出来た.

中枢神経及び神経終末部等に関しては, 染色は可能であるが, 未だ充分なる結論に達して居ない.

注 意 事 項

① 1%プロタルゴール液の作製に当り完全溶解のためには, プロテイン銀粉を浮遊せしめて自然溶解を待つ.

② ハイドロキノ硫酸ソーダ液の作製に当つては, 自然溶解を待つときは長時間を要するから, 約 10 分間の振盪により溶解を早める.

③ ハイドロキノ硫酸ソーダ液は室温 3~4 日で

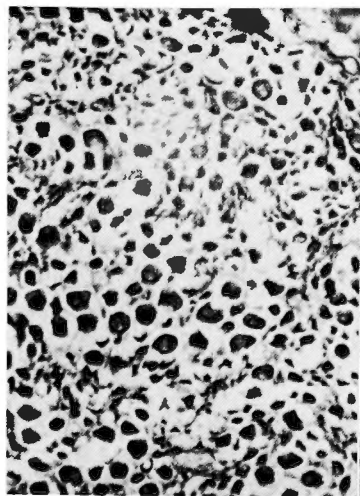


Fig. 1 兎正常神経横断 (900倍)

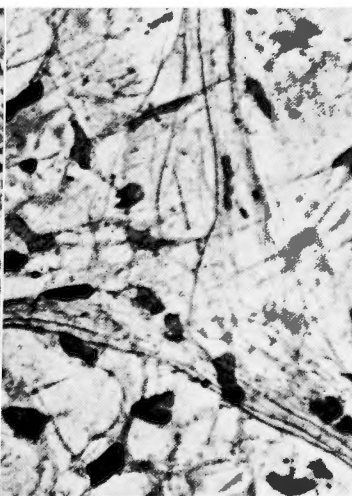


Fig. 2 兎角膜神経線維 (900倍)

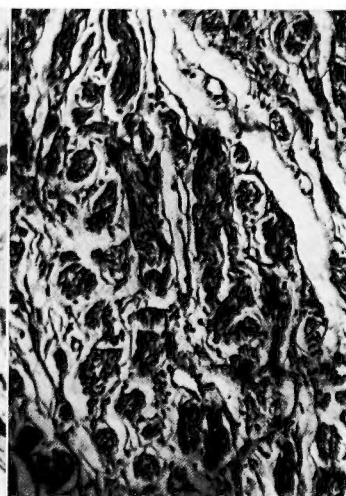


Fig. 3 人断端神経腫 (350倍)

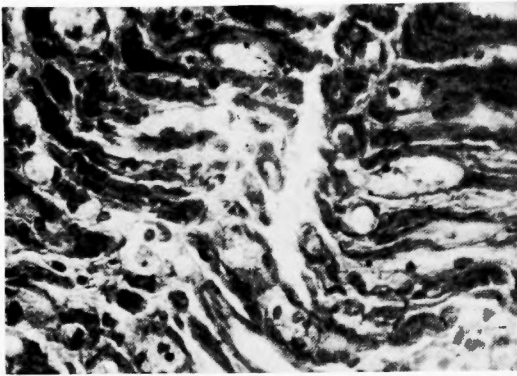


Fig. 4 兎アルコール注射変性縦断 (900倍)



Fig. 5 兎再生神経縦断 (900倍)

着色し始める。従つて染色効果を高める為にはその都度新調した方がよい。

考 按

組織標本の作製に当つて固定法の重要性は周知の事実であるが、殊に鍍銀染色の場合、これは微妙役割を演ずる。従つて染色対象たる神経要素の種類や病理変化に応じて、夫々異つた固定法及び染色法を選ばねばならない。更に鍍銀染色の場合には、普通染色では大して問題にならない様な条件、例えば気温、蒸留水の純度、試薬のpH等が重大な影響を持つ場合が多いのである。Holmes⁸⁾、Silver⁹⁾等は鍍銀法に於けるpHと染色像の関係につき詳述し、Bodian氏染色法に於けるプロタルゴール液中への銅粉投入が染色効果を良好にする事実をpHの変化に帰して説明して居る。Bodian氏染色法の場合、これ等条件は厳密な意味では問題となるが、他の鍍銀法に比べると比較的鈍感である。例えばBodian原法では水洗に蒸留水を使用すべきであるが、實際上水道水を使用しても左程染色に影響しない場合が多い。

固定法に関しては著者は前述の如く二種類を使用した。が、細い神経の場合はBouin液を使用した方が切片の収縮その他の点から幾らか良い様であるが太い神経の場合は固定に長時間を要し、その間にBouinの場合は材料の硬化を来し不適當である。

プロタルゴール液に関しては前述の如く、原法ではWinthrop製品と指定して居るがPolley (1956)¹⁰⁾はRouqueのプロタルゴールによりBodian氏軸索染色法に成功し、プロタルゴール液のpHが染色像を左右する重要因子である事を強調している。

著者は岩城製薬、エビス製薬、藤沢薬品、第一製

薬、保栄製薬及びバイエル製プロタルゴールにて前述の著者の染色法を試みたが、岩城製薬及びバイエル製品に於いて最も良好なる染色像を得、次いでエビス製薬、他の三社では劣つて居る。これより見れば理論的根拠はさておき、鍍銀に関するプロタルゴールの反応スペクトラムは、原法の還元剤、ハイドロキノン亜硫酸ソーダ液よりも著者のハイドロキノン硫酸ソーダ液の方が広い様に推定出来る。

本 法 の 特 徴

国産プロタルゴールによる軸索染色法の特徴は勿論Bodian氏法のそれに一致し、

- ① パラフィン切片で鮮明なる染色像が得られ、連続切片、大量染色等に便利である。
- ② 染色操作が簡単であり、染色像も均一的である。
- ③ 標本作製までの所要時間が比較的短い。
- ④ 単なる10%ホルマリン固定物件でも、末梢神経に関する限り鮮明なる染色像を得る事が出来る。
- ⑤ セロイザン切片でも染色可能である。

結 語

Bodian氏軸索染色法が試薬の入手困難なる現在、国産プロタルゴールによる染色法を考案し、末梢神経に於いて優秀なる染色像を得たのでその染色法を述べた。

稿を終るにあたり御校閲を賜つた竹友隆雄教授に深甚の謝意を表し、又実験その他で御援助を賜つた同教室の上田義夫先生に謝意を呈す。

尚、本文の要旨は第62回日本外科学会で発表した。

参 考 文 献

- 1) Davenport: Staining nerve fibers in mounted sections with Alcoholic silver nitrate solution. Arch. neur. and psychiat., **24**: 690, 1930.
- 2) Bodian: A new method for staining nerve fibers and nerve endings in mounted paraffinsections. Anatomical record, **65**: 89, 1936.
- 3) Bodian: The staining of paraffin sections of nerve tissue with activated protalgol, The role of fixations. Anatomical record, **69**: 153, 1937.
- 4) Romans: The staining of nerve fiber in paraffin sections with silver. Journal Anatmy, **84**: 104, 1950.
- 5) 藤森正雄他: フォルマリン固定, パラフィン包埋の同一切片による中枢神経系構成分の特別染色. 脳と神経, **4**: 208, 1952.
- 6) 藤森正雄他: フォルマリン固定, パラフィン包埋の同一切片による中枢神経系構成分の特別染色, 脳と神経, **5**: 183, 1953.
- 7) Bartelmez and Hoerr: The vestibular club endings in Ameiurus. J. comp. neur., **59**: 401, 1933.
- 8) Holmes: Silver staining of nerve axons in paraffin sections. Anatomical Record, **86**: 157, 1943.
- 9) Silver: Colloidal factors Controlling silver staining. Anatomical Record, **86**: 157, 1943.
- 10) Polly: Silver staining of nerve tissue with a new silver protainate. Anatomical Record, **125**: 509, 1956.
- 11) 山田平弥他: 新しい組織学研究法, 医歯薬出版株式会社, 162, 1955.