

人 脳 組 織 の 電 子 顕 微 鏡 学 的 研 究

第 3 篇

死 後 の 自 家 融 解 性 変 化 に つ い て

(本論文の要旨は第14回日本脳神経外科学会および第65回岡山医学会総会に発表した)

岡山大学医学部第1外科教室(指導:陣内教授)

医学士 小 野 正 員

〔昭和31年3月27日受稿〕

第1章 緒言ならびに文献

従来光学顕微鏡による病理組織学の研究には主として剖検によつてえられた材料が用いられてきた。このような組織では一般に死後固定までにかかなりな時間が経過しているのが普通で、その組織像も本来の病理学的変化のほか細胞構成々分の死後変化、すなわち一般に自家融解とよばれる変化の影響を免れるわけにはゆかない。いいかえれば、これらの変化が直接あるいは間接に細胞の構造にかなりな変化を生ずるであろうことを考慮にいれなくてはならない。しかし、光学顕微鏡の領域においてはその分解能が小さく、かつそれらの変化が早期には大部分が分解能の限界以下の order においておこるため、一部の細胞化学的研究の面を除いてはほとんど無視しても差支えなかつた。

最近、電子顕微鏡の発達によつて、研究の対象が単に細胞の形態のみならず、その超微細構造、すなわち巨大分子ないしはミセル構造にまでおよんできたためこの問題が大きな関心をもたれるようになったが、それはあくまで標本作製技術の問題として取り上げられたにとどまり、いかにしてこのような影響を最小限にとどめるかということが研究されてきたに過ぎなかつた。このため電子顕微鏡用組織としては専ら新鮮組織、とくに実験動物より採取した組織が多く用いられ、また固定にあつても Weiss¹⁾ らが行つたごとく切除後

極めて短時間内に固定することが原則とせられてきた。その他、灌流固定法²⁾、臓器内に固定液を注射する方法³⁾、冷却法⁴⁾、氷結法(Baker, 1953) 漿尿膜の特別な固定法⁵⁾⁶⁾などのいろいろな方法が同様な目的で試みられ、たしかにこの方面に大きな進歩をもたらした。

元来、自家融解性変化が切片採取後固定までの時間に比例し、また操作時の温度に影響せられる以上、このような考えかたは理論的にもまったく正しく、したがつて現在でも標本作製上の一般原則である点には間違いはない。しかし、その反面、死後変化を積極的に追求して、固定までに一定時間を経過せる組織に対してもまた、電子顕微鏡的検索を可能にする努力も忘れてはならない。すなわち、電子顕微鏡組織学が従来の細胞基本構造の研究より、さらに進んで病理学的変化の探究に新しい境地をひらきつゝある現在、鏡検材料の面においても新鮮組織ばかりでなく、材料入手のさらに容易な剖検組織を使用することについても真剣に考えることが必要となつてきたからである。

現在までこの方面における系統的研究は極めて少く、わずかに高木⁷⁾ らの報告がみられるにすぎない。すなわち高木およびその共同研究者たちはラットの肝、脾および腎の死後変化を時間的に追求し、核質、核膜、核小体、細胞質、ミトコンドリアおよび小胞体などの自家融解像を明らかにした。

私は第1篇および第2篇で述べたごとく、人脳組織を電子顕微鏡的に研究してその基本構造に関する若干の知見をえたが、これを病理組織学に応用する目的で自家融解性変化を追求することにした。すなわちこれは脳組織の研究においては他の組織にくらべて剖検材料を使用することが多く、また死後変化がより急速にあらわれるであろうとの考慮にもとづくものである。

第2章 実験方法および材料

使用材料は第1篇と同様、手術時に切除した人脳を用い、その一部は切除後速かに（10分以内）固定して対照とした。残りの組織は無固定のまま 20°C の生理的食塩水中にひたして室温（ 0°C ）に放置し、30分、1時間、2時間、3時間、5時間、10時間および24時間後にそれぞれ固定した。このときの室温の変化は $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 以内で、組織は十分量の液の中に入れ、直接空気と接触しないように注意した。また、固定のための小片はそのつど組織塊の中央部より切り出した。

固定、脱水、包埋、切断および鏡検などの操作はすべて第1篇に述べたところと同様である。

第3章 実験成績

組織の切除後固定までの時間によつてそれぞれ次のような成績をえた。

第1節 10分以内に固定せるもの

死後変化のもつとも少い像で、第1篇に述べた所見と一致するので省略する。

第2節 30分後に固定せるもの

a) 神経細胞：第1図に示すごとく、核は基質をなす微細粒子が軽度（軽度）に融解するため、幾分鬆疎化したような外観を呈するが、その変化はさほど顕著ではない。また、核内のところどころにみられる染色質粒子の凝塊もその分布がやゝ疎とはなるが、個々の凝塊はかえつて density が増大してみられる。これは粒子の融解とともに凝集があらわれるためと思われる。

細胞質もさほど変化が著明ではないが、やや目立つのは小胞の拡大および断裂であろう。これは自家融解性変化のなかでもつとも速かに、またもつとも明瞭にあらわれてくる変化である。すなわち第1篇で述べたごとく神経細胞内の小胞は元来扁平あるいは楕円形で、明らかな膜様組織でつまれているが、死後30分ではすでにその形は円形あるいは拡大した不規則形を呈し、膜様組織の断裂も一部には認められるようになる。これは細胞質の膨化に基因する変化である。その他にはあまり変化はみられないが、Nissl 物質の凝集したものがところどころにあらわれてくる。mitochondria にも一部膨化像が認められる。

b) グリヤ細胞：核および細胞質ともにいまだ著明な変化はあらわれていない。

第3節 1時間後固定せるもの

a) 神経細胞：第2図に示すごとく、微細粒子の融解がやゝ著明となり、また染色質粒子も融解および凝集像がかなり目立つてくる。したがつて核質はやゝ粗糙となるが、本来の微細網状構造はなお比較的よく保存せられている。また、細胞質に比してやゝ density の増大したものも認められる。これは核の収縮あるいは細胞質の膨化によるもので光顕的の Pyknose に相当する変化である。核膜はその彎入がやゝ増加し、核の収縮を思ふすが、あまり著明な変化ではなく、核膜自体の二重構造もよく保存せられている。なお、核膜内側に核質の沈着がやゝ多くなり、不規則に肥厚したようにみえるものもある。

細胞質では膨化が進み、小胞のみならず基質も鬆疎となる。また Nissl 物質は凝集する傾向が大となる。このようにして一部には微細構造を失つたものもみられるが、全般的にはなおよくその形態を保っているものが多い。mitochondria には一部に膨化および cristae mitochondriales の断裂あるいは消失などがみられるようになる。これに反し、細胞質内の微細線維構造は Nissl 物質の融解あるいは凝集によつてかえつて明瞭にあらわれてくることがある。

b) グリヤ細胞：核質が均質でなくなる。すなわち、dense な粒子が主として核周辺部にあつまり、この部の density が増強するが、中央部はかえって疎となり、明るくみえるようになる。

細胞質も膨化、基質粒子の融解などによって幾分疎となるものもあり、また同時に凝集もおこるため、やゝ粗大な粒子もあらわれるが、その変化はあまり著明ではない。mitochondria の変化は神経細胞と同様である。

第4節 2時間後に固定せるもの

a) 神経細胞：第3図に示すごとく、核の基質粒子の消失が著明となり、微細網状構造が認めがたくなる。また、これらの粒子および染色質粒子の凝集によつて核内には粗大な凝塊があらわれ、核の収縮と相まつてその density がかなり増大してくる。核膜は彎入がさらに増加するが、二重構造はよく保存されている。なお第1篇でも述べたごとく、核の収縮が著明なものでは核膜内葉は核とともに収縮するため、外葉との間に大なる間隙をつくり、大きな波状構造を示すようになるものもある。

細胞質の膨化は一層進行し、基質の消失、断裂あるいは凝集をとめない、electron density が一般に小となつてくる。微細構造は大部分よく保存されているが、反面破壊の高度なものも増加してくる。Nissl 物質は融解がさらに強くなり、また凝集によつて凝塊に生長するのがみられ、小胞も断裂したものが多くなる。

b) グリヤ細胞：第3図にみるごとく、核質がさらに粗糙となり、細胞質ではその周辺部に空胞状の間隙があらわれ、核、細胞質ともに収縮してかえつて density が増加するものもある。全般に粒子の融解あるいは凝集によつてその構造が明らかに粗大となる。

第5節 3時間後に固定せるもの

第4図に示すごとく、神経細胞、グリヤ細胞ともに2時間後の変化が増強する程度で、あまり著明な変化はみられない。ただ像を構成する個々の粒子の輪廓が不明瞭となる傾向

がある。

第6節 5時間後に固定せるもの

この時期より自家融解性変化は一段と顕著になる。

a) 神経細胞：第5図に示すごとく、核および細胞質基質においては正常細胞にみられる微細粒子の消失が著明となり、また同時におこる凝集と相まつてさらに粗大な粒子を構成し、組織像は一見して明らかな粗大網状を呈するようになる。これらの網状構造は本来に認められる核および細胞質の微細網状構造とはまったくことなつたもので、自家融解の結果二次的に生じた構造にすぎない。また、このような構造を構成する個々の粒子も正常のものとはことなり、粗大で輪廓も不明瞭なため全体として残渣状に認められる。したがつてこの時期には固有の微細構造はほとんど失われている。

核は著しく収縮し、著明な Pyknose を呈するものもあり、核膜ではその内側および内外両葉間の腔に核質の沈着が多くなるため、全体としてく厚く、また厚さが不定となり、density が増し、二重構造が認められない場合が多くなる。しかし、これは核膜そのものの変化よりもむしろ核質の沈着によるみかけ上の変化と考えられる。何となれば24時間後のものでこれら沈着物の融解してしまった例では二重構造がほとんど正常に近い状態で保存されているからである。mitochondriaは半数以上に著明な膨化および crista の断裂像があらわれるが、なお正常構造を保存しているものも少くない。細胞内小線維はほとんど認められず、小胞は単に空胞状の間隙としてみられる場合が多い。

b) グリヤ細胞：第6図に示すごとく、神経細胞の変化とほぼ同様であるが、神経細胞にくらべればその変化は幾分おそいように思われる。

第7節 10時間後に固定せるもの

第7図に示すごとく、神経細胞の変化は、以上の変化がさらに増強してくるが、本質的には5時間のものと大差は認めない。なお核

の収縮によつて核膜の変形が大となり、正常にみられるような円形の形態を保っているものが少くなる。

第8節 24時間後に固定せるもの

第8図および第9図に示すごとく、神経細胞およびグリア細胞ともにほぼ同程度の破壊像を示す。すなわち核、細胞質はともに濃淡の斑点状を呈し、微細粒子はまったく融解するか、または粗大に凝集しているが、いずれにしてもその個々の輪廓はまったく不明瞭となり、細胞固有構造のうちで電子顕微鏡的に追求を要する構造、すなわち 0.2μ の order 以下のものはほとんど認めがたくなつてくる。したがつて電子鏡検材料としてはもはや意味のないものになつてしまう。ただ核膜、mitochondria 限界膜などの膜様組織は比較的よく保存せられ、とくに核膜では先に述べたごとく、粒子の融解の結果5時間後の像よりもかえつて二重構造が明らかに認められる場合が多い。しかし、これらの構造もまったく正常ではなく、おのおの単一の膜についてみれば、いずれも膨化のため厚さを増加しているのが認められる。

Mitochondria では限界膜はよく保たれているが、いずれも膨化が著しく、crista の断裂を認めるものが多い。しかし、なかにはcrista、限界膜ともに明らかな二重構造を有し、ほぼ正常に近い内部構造を有しているものもみられる。

このように24時間経過せるものでは細胞の破壊が顕著ではあるが、その構成物質がまったく融解あるいは消失してしまうのではなく、主として光学顕微鏡の分解能以下における微細構造が失われているにすぎない。したがつて光学顕微鏡的にみれば、なお比較的よく染色性を保ち、幾分変形されてはいるが、細胞形態は明らかに認められるものが多い。

第4章 総括ならびに考按

以上の実験成績を総括すれば、まず神経細胞においては切除後30分ですでに軽度な変化がおこり、核基質の融解と小胞の拡大とがあ

らわれる。ついで、1時間後には核の粗粒化、核濃縮の傾向があらわれ、さらに2時間後には変化がかなり進んで、核および細胞質ともに基質粒子の融解あるいは凝集が著明となるが、微細構造はなお比較的よく保存せられている。しかし、5時間後になると以上の変化は一段と明らかになり、基質粒子の融解あるいは凝集によつて像を形成する個々の粒子はほとんどが本来のものとはことなつてくるのみならず、その配列による網状構造も多くは本来の像とことなつた二次的変化像となつてしまう。したがつてこの時期以後では微細な病理学的変化を追述することはまったく不可能となる。

グリア細胞では変化がやゝ遅れ、1時間後に軽度な変化があらわれ、2〜3時間で中等度、5時間以後にはやはり強度な変化があらわれてくる。

高木ら⁷⁾はラットの肝、腎および脾組織を用いた実験で死後の変化は1時間で軽度にあられ、5〜7時間でかなり進んだ変化がみられるようになる」と述べているが、私の以上の成績はグリア細胞においてはこれとほぼ一致するか、あるいは幾分変化の度が早く、神経細胞においてはかなり変化が早くおこるようである。これは脳組織とくに神経細胞の構成成分が物理、化学的条件の変化に極めて鋭敏に反応する結果と思われるが、その他に脳組織の含水量が多く、構密度の低い点も変化を助長する一因として挙げることができよう。

さて、このような自家融解性変化の本態はDeRobertis⁹⁾のいうごとく一般に細胞構成々分の凝集および分解によるものである。すなわち、死後まず細胞質に不可逆的な凝集がおこり、さらに加水分解酵素あるいは嫌気性発酵などにより高分子化合物が分解せられ、低分子化合物やイオンが増加してくる。その結果、浸透圧がたかまり、またpHが酸性側にかたむくため水分を吸収して細胞質の膨化があらわれる。このようにしてついには細胞はまったく液化してしまうが、核ではこれとはやゝことなり、まづ核質が収縮して染色性が

増加する。これがいわゆる Pyknose という変化で、核の容積が小さくなつたため染色性が増大したもので核酸の絶対量にはあまり変化がないことが知られている⁹⁾。ついで核酸の減少がはじまり染色性が低下し、ついにはまったく融解してしまうが、細胞質に比べればその変化は一般におそいといわれている。

私の実験によれば、まず細胞質に膨化があらわれてくるが、これに少しおくれ、あるいはほとんど同時に核の変化もあらわれてくる。したがって相互の間にはあまり時間的なへだたりは認められない。細胞質の膨化はまず小胞の拡大、分裂、ついで基質の鬆疎化としてあらわれ、また凝集および分解の過程はおのおの時間を追つてあらわれる粒子の変化によつて示されている。核質の変化はまず微細な基質粒子（おそらく蛋白質と思われる）の融解あるいは凝集にはじまり、ついで染色質粒子（DNA を含む粒子）の凝集および融解がおこり粗大な凝塊をつくるようになるが、一方では核の収縮によつて Pyknoes があらわれ、時間の経過とともに次第に著明となり、10時間後には核の形態に明らかな収縮像がみられるようになる。なお、electron density からみれば24時間後でも核内物質の消失はさほど顕著ではなく、光学顕微鏡的にはなおよく染色性を保持していることが推察できる。この点では細胞質についてもほぼ同様なことがいえるが、膨化と物質の分解とがやゝ高度なため幾分染色性の低下はまぬがれないようである。

なお Bourne⁸⁾によれば mitochondria は細胞中でもつと敏感なところで、細胞の受けたいろいろな障害に鋭敏に反応するといひ、DeRobertis³⁾も mitochondria は死後速かに膨化してばらばらな顆粒になると述べている。私の観察では形態的には死後30分～1時間で膨化したものもあらわれるが、全般的にはよくその構造を保存しており、5時間後にはじめてその大半が破壊せられる。しかし、24時間後でもなおよくその構造を保存しているも

のも認められる。したがって形態的にみれば従来いわれていたごとくさほど急速に破壊されるものではないようである。

以上、死後24時間以内の自家融解性変化について述べたが、これを要約すれば、微細粒子の融解あるいは凝集と細胞の膨化および収縮とになる。なお、しばしば述べたごとく膜様の組織は比較的よく保存せられているため、細胞形態そのものにはあまり大きな変化は認められない。これは膜様組織の分子配置が相互に安定しているためと思われるが、いずれにしても24時間以内の組織変化は超顕微鏡的 order のものが大部分であるため、光学顕微鏡的には一部形態や染色性の変化のほかにはその実態をつかむことは困難である。とくに従来の光学顕微鏡的 coarse fixative を使用するとき、すでに第2篇で示したごとく固定による artifact がはるかに大で、自家融解性変化はこれに掩われてますます認めがたくなつてくる。したがって光学顕微鏡的病理組織学の領域では剖検材料を使用してもあまり不自由はきたさなかつた。電子顕微鏡的研究においてはこの実験が示すごとく、死後なるべく速かに固定することが理想であるが、ある程度時間が経過したものでも2時間以内であれば十分有用性が認められる。さらにやむをえない場合には5時間までのものでも使用に堪えないことはないが、この場合には極めて微細な病理学的変化の追求は困難となる。5時間以上を経過した組織ではたとえ電子顕微鏡の高分解能をもつてしても、もはや光学顕微鏡的に認められる以上の成果を期待することはできない。

最後にこのような in vitro ともいえる切除組織の変化が実際の屍体内の自家融解性変化に一致するかどうかについて考えてみたい。まず、以上のような実験方法でもつとも問題となる点は、1) 切除時組織がある程度の損傷を受けること。これは手術時の摩擦、圧迫、出血、浮腫、電気凝固、食塩水洗滌あるいは麻酔などによる物理、化学的損傷である。2) 切除時および切除後を通じて直接空気に

触れる機会が多いこと。3) 屍体内組織とことなり、生理的食塩水にひたしてあるため反応条件がことなつてくること。4) 他部分の変化による影響を受けない反面、環境とくに温度による影響が大であることなどである。このような諸点はいずれも組織変化に大きな影響をあたえる要素であるが、材料として人脳を用いる以上、ある程度不可避的のものでもある。私はこれらの影響をなるべく少なくする意味でつぎの点に注意した。1) 組織切除は開頭後なるべく速に行い、また切除前の電気凝固、圧迫、摩擦などの操作は極力避けた。2) 切除組織は十分量の生理的食塩水中にひたし、直接空気と触れないようにした。3) なるべく温度が一定で20°Cに近い気象条件を選定した。4) 固定用小片はその都度組織塊の中央より採取した。

このような注意によつて以上の問題点は一応解決せられたものと考えてよい。したがつてここに述べた私の実験成績はそのまゝ屍体内の組織変化に適用して大なる誤はないもの

と信じる。

第5章 結 論

1) 死後の自家融解性変化の主体は微細粒子の融解あるいは凝集と、細胞の膨化および収縮とである。

2) 電子顕微鏡用の標本は死後(切除後)なるべく速かに固定することが必要である。

3) 死後2時間以内であれば微細構造は比較的よく保存せられており、電子顕微鏡標本としても利用できる。

4) やむをえない場合には5時間までのものであれば使用できないことはないが、微細変化の探究は困難である。

5) 5時間以上経過せるものでは電子顕微鏡的研究には供しえない。

拙筆にあたり御指導、御校閲を賜つた恩師陣内教授、組織学的ならびに技術的御指導を賜つた本学解剖学関教授、病理学妹尾教授および京都大学東教授に深甚なる謝意を捧げる。

主 要 文 献

- 1) Weiss, J. M.: J. Exptl. Med., 98, 607, 1953.
- 2) Dalton, A. J., Kahler, H., Striebich, M. J., and Lloyd, B.: J. Nat. Cancer Inst., 11, 439, 1950.
- 3) Pease, D. C.: Anat. Rec., 121, 701, 1955.
- 4) Sjöstrand, F. S., and Hangan, V.: Exp. Cell Res., 7, 393, 1954.
- 5) Borysko, E., and Bang, F. B.: Bull. Johns Hopkins Hosp., 92, 257, 1953.
- 6) Evans, G., and Flewett, T. H.: Exp. Cell Res., 6, 155, 1954.
- 7) 高木文一, 外: 第11回電子顕微鏡学会講演予稿, 1955.
- 8) Bourne, G. H.: J. Roy. Micro. Soc., 70, 367, 1950.
- 9) De Robertis, E., Nowinski, W. W., and Saez, F. A.: General Cytology, 鶴上三郎訳, 東京, 昭30.
- 10) 東昇, 外: 電子顕微鏡標本作製技術講習会テキスト, 昭31.

First Dept. of Surgery, Okayama University Medical School
(Director : Prof. Dr. D. Jinnai)

Electronmicroscopy of the human brain tissue.

Part III.

By

Masakazu Ono

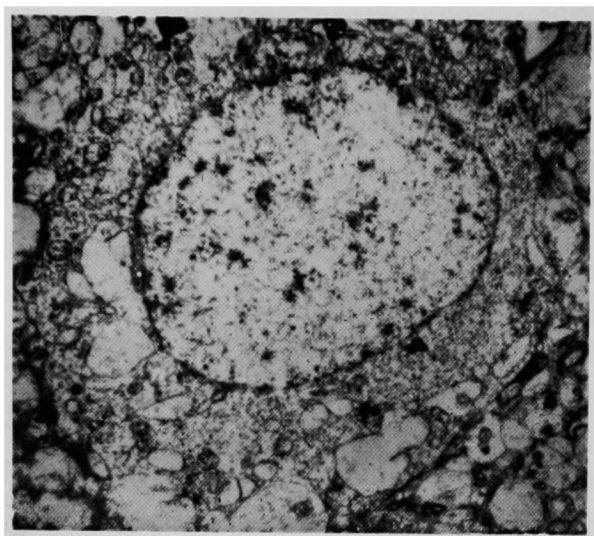
1) The main postmortal autolytic changes were melting or agglutination of the fine granules, swelling and contraction of the cells.

2) The specimen for electron microscope should be fixed early as possible.

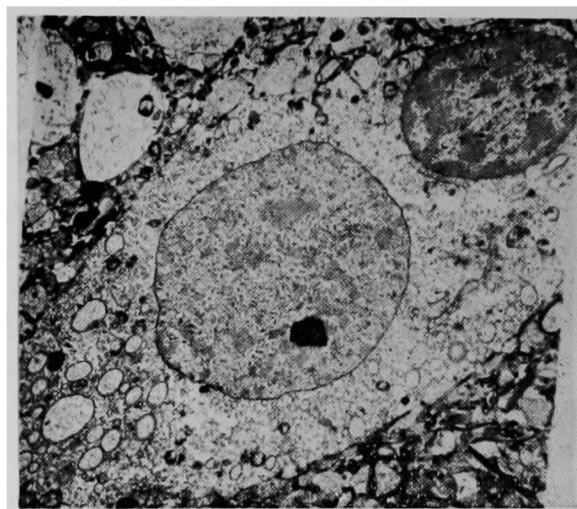
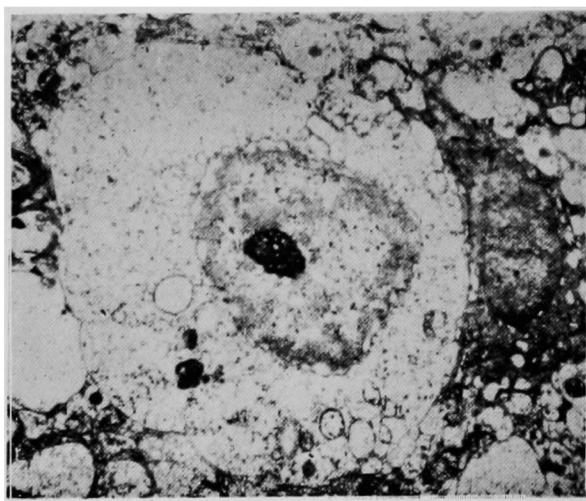
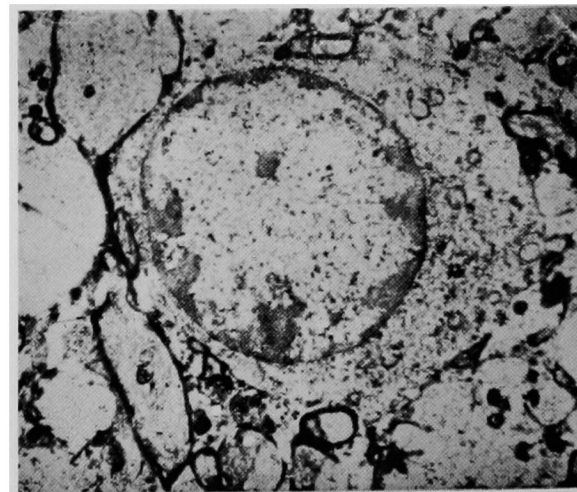
3) The fine structures were preserved relatively well within 2 hours after death. Therefore the specimens obtained within 2 postmortal hours could be used satisfactorily for the electron microscope. If unavoidable, the specimens obtained until 5 postmortal hours could be used, but the investigation of the fine changes might be difficult.

5) The specimens over 5 hours could not be used for electron microscope.

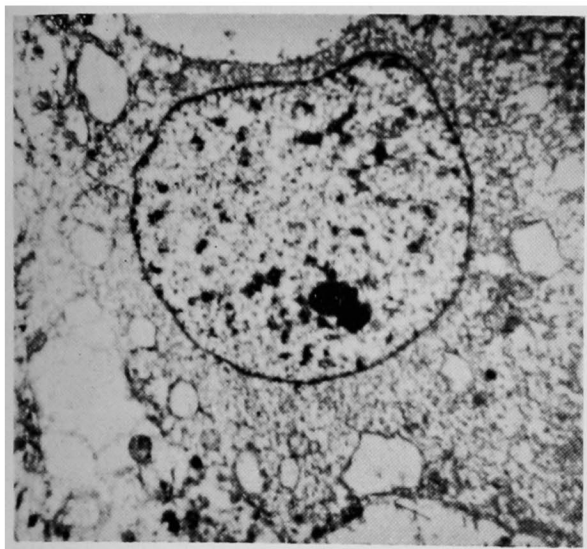
小野論文附図

 $\overline{1\mu}$

第1図 30分後固定（神経細胞）

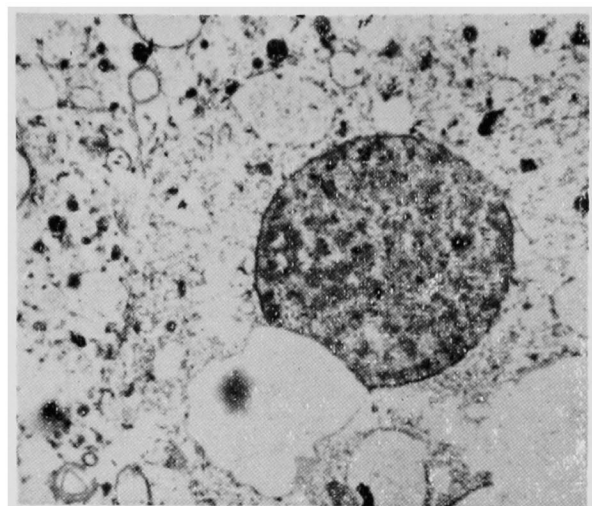
 $\overline{1\mu}$ 第2図 1時間後固定
（神経細胞および Glia 細胞） $\overline{1\mu}$ 第3図 2時間後固定
（神経細胞および Glia 細胞） $\overline{1\mu}$

第4図 3時間後固定（Glia 細胞）



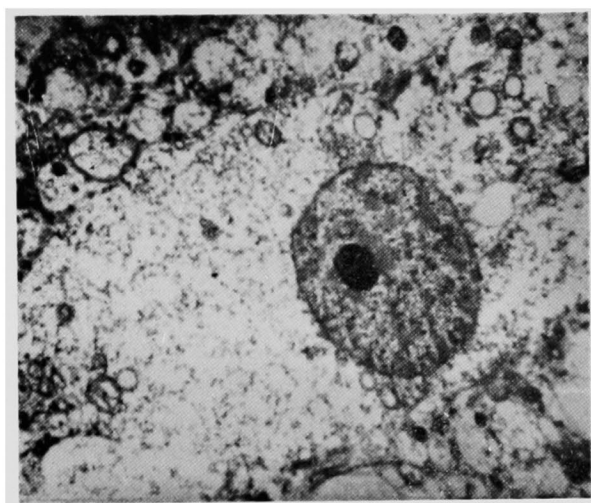
1μ

第5図 5時間後固定（神経細胞）



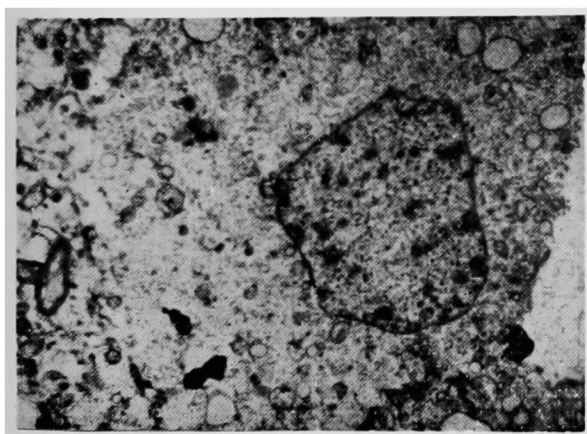
1μ

第6図 5時間後固定（Glia 細胞）



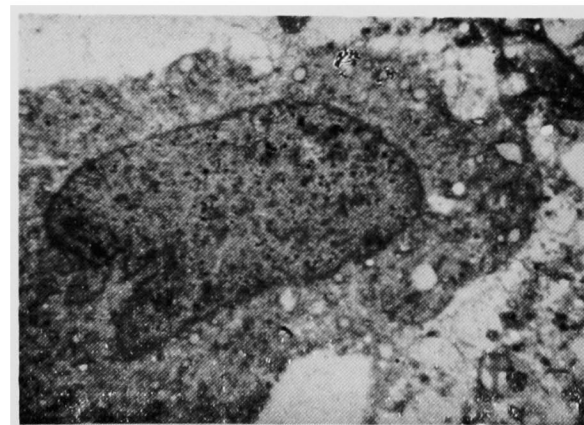
1μ

第7図 10時間後固定（神経細胞）



1μ

第8図 24時間後固定（神経細胞）



1μ

第9図 24時間後固定（Glia 細胞）