

結合織細胞間物質の電子顕微鏡的研究

金沢大学医学部第一病理学教室(指導：故 宮田栄教授)

梶川 欽一郎

(昭和32年2月11日受付)

Electron Microscope Studies on the Intercellular Substance of Connective Tissue

Kinichiro Kajikawa

The first Department of Pathology, School of Medicine, Kanazawa University

(Director : Prof. Dr. S. Miyata)

序 言

結合織の特徴の一つは多量の細胞間物質が存在することである。細胞間物質は結合織の種類によつて差異はあるが、一般に線維成分とそれを包埋する基質(ground substance)に分けられる。この中線維成分一特に膠原線維は試料の作成が比較的容易であるため、その電顕的研究は殆んど電子顕微鏡の歴史と共に始まつており、近年はX-線廻折、化学的分析の知見と相俟つてある程度の総合的な業績が既に発表されている。^{2) 4) 12) 15) 44) 62)}しかし、膠原線維の電顕的形態学で取扱い得る面だけについてみても、線維の構造単位、横紋形成の機序、線維と基質の関係、更に最近一部の学者^{34) 62)}によつて主張されている線維の管状構造の問題等、重要な根本問題が未解決のまま残されている。結合織の線維成分の中、細網線維、弾力線維の電顕的研究は膠原線維のそれより遙かにおくれており、その知見は断片的である。その原因の一つはこれらの線維は膠原線維に比して純粋な電顕的試料をつくるのが容易でない点にある。電顕的研究の多くの場合に遭遇するこの種の困難性をこれら線維についてもいかに解決するかということ自体が既に一つの問題となる。元來結合織線維は主として組織学的な染色性によつて定義されているので、その電顕像から線維に特有な染色性の説明も亦要求されねばならぬ。又、弾力線維が示す弾性という機能上の特性の解明も問題となるであろう。更に、膠原線維、細網線維、弾力線維は本質的に差異があるかどうか、若しあるとすればどのような構造上の特性に基くか。こうした問題も亦われ

われの前に提出される。

結合織細胞間物質の他の重要な成分は基質である。化学的には周知の如く粘多糖類と蛋白質の複合体として線維間に存在する不定形の物質である。基質の電顕的観察は、その性質上線維成分のそれより一層困難が伴つており、従來基質に関する電顕的研究は甚だ少ない。線維成分の研究に好んで用いられる結合織の磨潰、細離の方法ではこの物質は殆んど対象とすることはできない。このような方法では、線維間に存在する基質は操作中に殆んど失われてしまうからである。この欠点を補うため結合織の伸展法が賞用される。^{6) 28)}

⁵⁰⁾この方法では線維と基質の空間的位置の関係が比較的良好に保たれて観察されるが、やはり試料の固定、乾燥による基質の脱出、変形はある程度免れない。しかし、生物試料の電顕的観察の際、少なくとも当分はさけることのできないこれらの障害を我慢すれば、線維間の基質の形態を観察するには、この伸展法はすぐれた研究方法の一つであると思われる。基質の今一つの研究方法はいわゆる“電子染色 electron staining”による方法である。基質の光顕的研究が組織化学的染色によるところが多いと同様に、電子顕微鏡の世界においても、この一見不定形な物質は単に形としてよりも、“染色性”によつて捉えるのが有効でないかと思われる。例えば、線維が構築される場合、基質は単に“接合物質”として線維の表面を包んでいるのか、或いは最近一部の^{5) 24) 27)}によつて暗示される如く、基質成分は線維の内部構造にまで関与するかという問

題は結合織の生理及び病理を理解する上に極めて重要な鍵となるが、この問題を電顕的に解析する場合には恐らく基質の電子染色法が有力な武器となるのではないかと思われる。従来結合織線維の“電子染色”に関する系統的な研究は甚だ少なく、Schwarz 一派の鍍銀法による業績^{7) 8) 9) 28) 40) 52) 53)}があるにすぎない。われわれは線維の鍍銀法から出発して、この方面の知見を加えつつある。^{28) 30) 31) 55)}本論文においても“電子染色”の知見に基いて線維と基質の関係に論及したい。

結合織の病理は近年多くの学者の注目をひいている。それらの問題の中には電顕的オーダーにまで掘下

げた世界で論ぜられねばならぬ事柄が次第に多くなりつつある現状である。そのためにはわれわれは先ず光学顕微鏡から一応離れて、正常の結合織の構造に関する電顕的知見を得る必要に迫られる。本論文ではこの中細胞間物質を中心として、正常の結合織の構造に関するわれわれの得た知見を述べるが、勿論上述の諸問題のすべてに対して結論を与えるものではない。むしろ、今後これらの問題を更に追求していく上に必要な基礎的知見の記載である。それは電子顕微鏡の出現によつて新しい出発点に直面したものに課せられる当然の課題でもある。

研究材料及び研究方法

疎性結合織の伸展法による試料作成： ヒト及び各種脊椎動物の皮下、筋間の疎性結合織を材料とした。錠で切取られた疎性結合織を10%中性ホルマリンで2時間固定、十分水洗後、その小片をコロジオン又はホルムバールの薄膜を張つたメッシュ上にできるだけ薄く伸展、空気乾燥する。この際組織片の大きさを、極端に伸展しなくても十分薄い膜が作成できるように適当に加減することが必要である（このためにはウサギ、モルモットの疎性結合織が比較的良好な薄膜をつくりやすいので、特別な目的がない限り、この動物が最も多く利用された）。この方法は一般に伸展が可能な疎性結合織にしか利用できないが、未固定の腱は針で長軸に沿つて静かにほぐすと、細線維の網状の薄膜を得ることができるので、この種の材料は疎性結合織伸展法に準じて試料をつくつた。

線維の磨潰、細離法による試料作成： 上記の伸展法が利用できない材料一腱の一部、皮膚真皮等は10%中性ホルマリンで固定、homogenizer、超音波で磨潰又は針で細離し、遠沈分離、数回水洗後懸濁液をつくり、その1滴をコロジオン又はホルムバール膜を張つたメッシュに載せ空気乾燥する。

線維を被うている基質を除去する目的で、0.1-1.0%トリプシン(Merck)(リン酸緩衝液でpH 7.4-8.0に調整)溶液又はヒyaluronidase(スプラクター、5000単位/cc)を用いた。未固定材料にこれら酵素を37°C、2~48時間作用せしめ生理的食塩水で十分水洗後ホルマリン固定、又は未固定のまま上記の諸方法により試料を作成した。疎性結合織の場合は一部ホルマ

リン固定後メッシュ上につくつた組織の薄膜に酵素処理を施し十分水洗、空気乾燥した。しかし、固定材料に対する酵素の効果は不確実であるので、酵素処理は原則として未固定材料に施した。

線維の鍍銀法： 線維の鍍銀にはGOMORI法を用いた(但し、多くの場合塩化金処理は省略した)。疎性結合織を10%中性ホルマリンで固定、蓋ガラス上に小皮標本をつくり(この際標本を乾燥せしめないことが必要!)、鍍銀する。腱では上記の如く、未固定のまま一旦薄膜状に広げ、それを10%中性ホルマリンで固定、遊離のまま鍍銀する。細挫、磨潰した線維では、遠沈をくりかえしつつ、遠沈管内で各試薬を作用せしめて鍍銀する(DETTMERの方法*)。しかしこの方法は、良好な鍍銀成績を毎常得るにはかなり困難が伴っている。基質鍍銀の目的で、過ヨード酸銀法を用いた。未固定材料を0.5%過ヨード酸溶液に30分浸漬、十分水洗後GOMORIのアンモニア銀液又はmethenamine銀液で30~60分処理、水洗、5%チオ硫酸ソーダを経て十分水洗した後、上記同様な方法で試料を作成する。未固定材料は操作中多少膨潤する欠点がある。しかし、ホルマリン固定材料では、銀塩を作用せしめる前に十分水洗しても、ホルマリンを完全に除去できないおそれがあり、若し、ホルマリンが少しでも残っているとこの鍍銀目的にそわないので、ホルマリン固定は行わなかつた。以上の鍍銀された材料はすべて先ず光顕的に観察し、良好な鍍銀が行われたもののみを試料として用いた。

* 私信

その他の電子染色：現在までわれわれは20数種の化学物質について、線維の染色効果を検討しているが、いずれも未固定材料に可検試薬を1～2時間作用せしめ水洗後空気乾燥して試料とする。

細網線維の観察方法：成熟ネコの脾を未固定のまま約10 μ の凍結切片となし、1%トリプシン溶液で37°C、2時間処理、光顕下で脾材、血管をできるだけ除去し、残余の組織を静かに針でほぐしその小片をメッシュ上に広げて試料とする。細網線維の鍍銀は10%中性ホルマリンで固定された材料の凍結切片をGOMORI法に従って行つた。

弾力線維の観察方法：ウシの項鞅帯を約1cmの長さに切り、針でできるだけほぐして水洗、1%トリプシン溶液で室温3時間処理、十分水洗をくりかえす。この材料を更に針で細離し、その中弾性を示す線維片のみを注意して集め、水洗、針でほぐしつつメッシュ上に載せる。一部の材料はトリプシン処理を省いたが、この場合は多量の基質の存在のため、良好な標本を得ることは一般に困難であつた。

コラーゲン溶液の作成法と観察法：体重約200gのラット尾腱を長さ約0.5cmに切り、生理的食塩水で十分水洗、その約0.7gを0.01%の酢酸溶液(pH 3.8) 50mlに浸漬、4°C 24時間放置する。線維の膨潤過程を観察する場合には、酢酸溶液に浸漬後適当な時間をおいて線維を取り出し、伸展法に準じて試料をつくる。浸漬24時間後には半透明な外見を呈する膨潤線維がかなり残存する。これを清潔なガーゼ2枚で濾過すると、極めて僅か粘性をもつた透明な液(pH 3.8)—いわゆるコラーゲン溶液—が得られる。コラーゲン溶液の観察には、この原液を十分注意して作成された再蒸留水(電顕的に挟雑物が全く存在しないことを確認しておく)、又は0.01%酢酸溶液で100～20、

000倍に稀釈して、その1白金耳をコロジオン膜を張つたメッシュに載せ空気乾燥、一部のものは1%オスミウム酸蒸気で20分乃至2時間固定、軽く水洗、乾燥して試料とす。

in vitroの線維の再成法：十分清潔な載せガラスの上で、上記コラーゲン溶液5容、0.17M NaCl 1容の割合に混合し、5分乃至5時間に至る様々な間隔で、混合液の1白金耳をコロジオン膜を張つたメッシュに載せる。線維再成の進行を中断する目的で1%オスミウム酸蒸気で固定、水洗、空気乾燥する。NaClの他種々の物質を加えて線維再成効果を檢した(第2表)。pHの影響を檢するためには、載せガラス上のコラーゲン溶液に粉末状の酢酸ナトリウムを加え、pH 4.8, 5.8, 6.8, に調整しその1白金耳をメッシュに載せ空気乾燥して試料とした。再成線維の鍍銀には次の方法を用いた。上述のコラーゲン溶液とNaCl又はその他の可検物質との混合液を室温に放置すると、線維の析出と共に液が次第に混濁してくる、この混合液が乾燥する直前に10%中性ホルマリンで固定、水洗後、GOMORI法で鍍銀する。鍍銀された材料は十分水洗後光顕下で檢し、鍍銀の良好な部位を針で細離して試料とする。

以上の各種試料は“電子染色”標本を除いて殆んどすべて、Cr-shadowingを施して観察した。使用電子顕微鏡は日立HS-2型、HU-9型(50KV)、直接倍率は試料によつて、2,000～20,000倍とし、必要に応じて18,000～200,000倍に拡大して観察した。数値の測定はこの印画紙に拡大された写真について行つた。電子廻折には日立HU-9型の制限視野電子廻折装置を用いた。(電子廻折の撮影、廻折像の解析に関しては日立中央研究所只野文哉博士の御援助によつた。ここに感謝の意を表す)。

電子顕微鏡の所見

1. 疎性結合組織細胞間物質の一般の構造

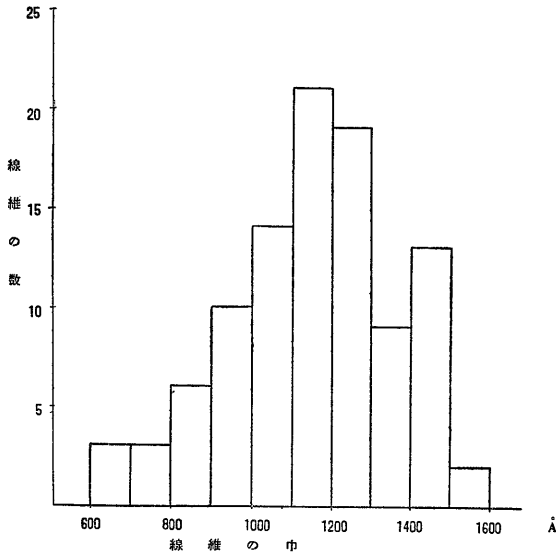
疎性結合組織の伸展標本を電顕的に観察すると、光顕的に認め得る最小の線維は更に数本の微小な細線維* (fibril)の集合からなつている。この細線維には後述する如く一定の周期をもつた横紋が認められる。疎性結合組織ではこの細線維が縦横に交錯している間に更に微細な線維が認められる。この種の線維は良好な標本

では基質の内に深く包埋され、細かい網状の排列をとる(Fig. 1)。基質の存在によつて一般に横紋の形態は明らかではないが、比較的幅の大きいものには横紋がうかがわれる。

細線維の幅は従来の報告では多少の変動はあるが、大体1000Å前後とされている。われわれの測定では、例えば成熟モルモット皮下疎性結合組織の細線維の

*この細線維を特に微線維(microfibril)と称して光顕的な最小線維—細線維と区別することがあるが、本論文では光顕的オーダーの線維は取扱わないので、微線維という名称は用いないでおく。

第 I 図



成熟モルモット皮下疎性結合織における細線維の幅の分布

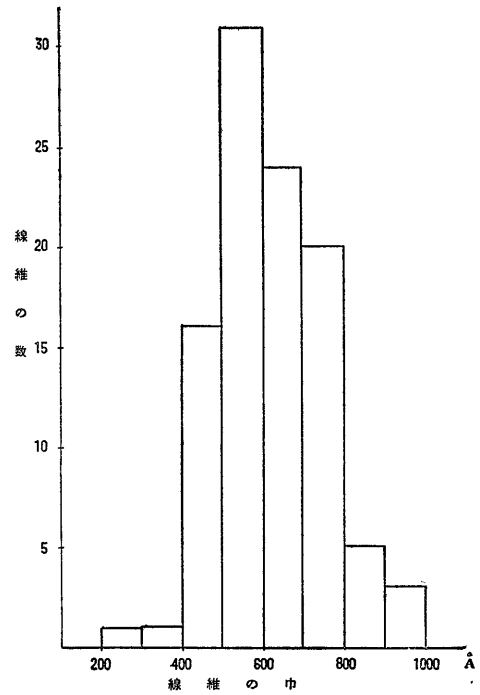
第 1 表 各種脊椎動物疎性結合織の細線維の中と横紋周期の長さ

材 料	細線維の中 (平均Å)	周期の長さÅ
ヒ ト	500~ 820 (720)	710
イ ヌ	500~1300 (960)	800
ネ コ	500~1300 (980)	810
ウ サ ギ	550~1200 (920)	660
モルモット	550~1400 (1000)	820
ラ ッ ト	630~ 800 (750)	760
マ ウ ス	550~1100 (860)	680
ク ジ ラ	490~ 980 (790)	650
ニワトリ	530~ 950 (760)	660
ヘ ビ	730~1600 (1200)	860
マ グ ロ	830~1670 (1290)	660

幅は 550~1500 Å (平均 1000 Å) の間に分布する (第 I 図)。この値は第 1 表に示す如く検査された各種脊椎動物を通じて大差がないことは興味がある。細線維間の基質に包埋された微細な線維は一般に shadow した標本でなければ明瞭に認め難い。shadow した標本でも後述する如き基質の構造との限界が定めにくいのでその幅を正確に測定することはかなり困難である。又基質が豊富に残存している標本でなければこれらの微細な線維は認められないので、十分多数の線維の幅

を測定することも容易でない。成熟モルモットでは細いものは幅 200 Å 又はそれ以下で、太いものは 900 Å, 平均 560 Å であった (第 II 図)。

第 II 図



成熟モルモット皮下疎性結合織における細線維間の微細線維の幅の分布

線維の間には基質が存在する。しかし、標本作成時の固定、乾燥等の影響によつて、このゲル状の物質は電顕下では非常に変形して認められるものと考えねばならない。Shadowing を施した伸展標本では、線維間物質は顆粒状乃至フェルト状の不定形な物質として認められる。その中には上述の網状の配列をとる微細な線維の他に、球数状に連つた球状物質や紡錘形の短い線維様物質が含まれている (Fig. 2)。球状のものは直径が約 180 Å 又はそれ以下で、紡錘形のものには中央の幅が約 850 Å, 時に 460 Å の周期をもつ横紋が認められる。このような構造物と上述の微細な線維との限界は定め難い。疎性結合織においては、時々微小なフィラメント状の物質が線維軸に直角に細線維の横紋凸部に附着し、又は細線維の横紋の間に橋渡しをしている像に遭遇する (Fig. 4)。このような線維の横紋に附着するフィラメントは後述の再成線維においても認め

られることがある。

トリプシン、ヒヤルロニダーゼ処理によつて基質は消失し、細線維の横紋は明瞭になる。細線維間の微小な線維は認められなくなるが、これは微小な線維が酵素によつて消化されたのか、線維を支持している基質が消化されるため操作中に脱出するのかは明らかでない。

2. 膠原線維の微細構造

(1) 横紋構造

膠原線維は周知の如く平均 640 Å の周期性横紋構造を有する。Shadow しない標本では電子密度の大きい暗い部分（暗帯）と、電子密度の小さい明い部分（明帯）が区別される。Shadow した標本では前者は凸隆し（凸部）、後者は陥凹してみえる（凹部）。両者は合していわゆる周期（period）（又は巨大周期 macro-period）を形成する。われわれが実験に供した諸動物の疎性結合組織膠原線維の周期の平均の長さは第 1 表に示されている。shadow した標本では凸部の中央に通常更に微細な陥凹部がみられるのでこの部は線維に二重の環をはめたようにみえる（Fig. 7）。又凹部の間にも更に微細な凸部が認められることがある。その際この小凸部は凹部の中央でなく、二重環の如くみえる大きな凸部の一側に片寄っている。このような場合には三重の環となるが、線維の一周期間の横紋の配列は非対象性となり、線維が軸方向に対して方向性を示すことになる（Fig. 3）。認め得る横紋の数は標本によつてかなり変動があるが、われわれの経験ではウサギ皮下疎性結合組織の shadow した伸展標本で、一周期あたり最高 4 本の凸部が認められた（Fig. 3）。細線維が数本結合した場合は隣接する細線維の横紋の凹凸部は整然と配列する。しかし、時々、特に細線維が分散しかけた部分では、隣接する細線維の横紋の凹凸部が一つずつ、ずれているのを見ることがある。細線維の横紋が整然と並んだ場合は横紋が横に並んだ 1 本の紐の如く相隣れる細線維の上を走つて、個々の細線維の境界が不明瞭なものがある。疎性結合組織では、しかし、多くの場合線維を構成する細線維の境界は明らかである。これに反して、腱の膠原線維では 2000~3000 Å の幅をもつた太い線維でも、その個々の構成細線維の境界は不明瞭である。このような差異は単に細線維の結合状態の差によるものか、或いは線維の構成自体に何か本質的な差が存するかは不明である。

膠原線維は一般に軸方向に対する伸展性に乏しい。

しかし、偶然メッシュの支持膜が破れた部分で、線維が軸方向に伸展された像に接することがある。この場合は横紋の凸部は伸びないで凹部が伸びる（Fig. 5）。又線維が観察中に何らかの原因でちぎれることがある。この場合も横紋の凹部で断裂するのが常である（Fig. 6）。（第 1 表の伸展標本から得た線維の横紋周期の平均値が従来報告されている値より多少大きいものがあるのは、標本作成時に線維が伸展される可能性を考慮する必要がある）。

(2) 細線維の軸方向の構造

線維を包被している基質をトリプシン処理によつて除去したウサギの疎性結合組織を観察すると、線維の軸方向に並ぶ数本のフィラメント状の構造が認められることがある（Fig. 7）。この構造物は二三の横紋を貫き横紋凸部の交点是小結節状にみえる。同様なフィラメントは後述の再成線維についても認められる（Fig. 8）。又実験的壞血病に罹患せしめたモルモットの皮下疎性結合組織において、細線維が数本のフィラメントに分散している像に接したことがある²⁰⁾。ラット尾腱を超音波で処理すると、先端の尖つた線維が認められることがある。後述する如く、*in vitro* の線維再成の過程では、先端の尖つた短い線維が側面的結合によつて太さを増すと考えられるので、逆に生体線維を破壊した場合このような先端の尖つた線維が現われることは、線維の構築を考える上に興味ある所見である。更にラット尾腱を homogenizer で細挫すると、線維は大小のフィラメントに分断される（Fig. 9）。その幅や長さはかなり変動が大きい、幅の平均は約 270 Å、長さの平均は約 2600 Å であった。

ラット尾腱を 0.01% 酢酸で処理すると、線維は次第に膨潤し、固有の横紋は消失する。ラット尾腱の膠原線維は幅約 2500~3400 Å（平均 2700 Å）であるが、膨潤によつて幅は 320% も増大する。この過程はかなり速やかに行われる。酢酸処理 10~15 分後には、軸方向に幅約 380 Å のフィラメントが現われる（Fig. 10, 11）。時間の経過と共に線維はその外縁から次第に顆粒状乃至不定形物質に変つていく。線維の中央には比較的後まで横紋を認め得る細線維が残っている。時々、膨潤線維の中に螺旋状構造が認められるものがある。又、横紋を失つた線維の一部に電子密度の高いくびれを認めることも稀れではない（Fig. 10）。膨潤が進むと線維は円柱状の形態を失い扁平となり、横紋その他上述の構造物は消失して次第に不定形物質へと崩

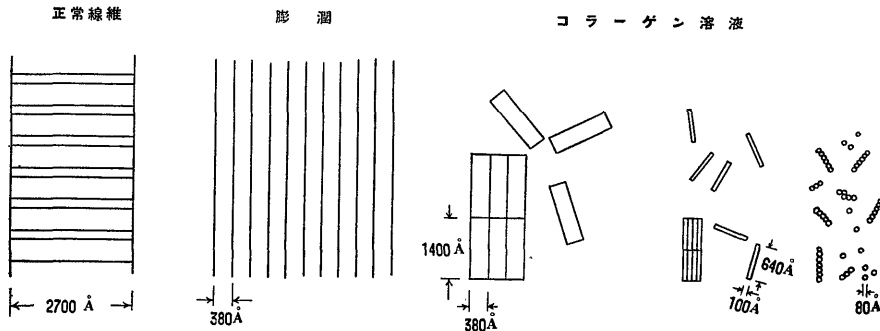
壊していく。

(3) コラーゲン溶液の観察

コラーゲン溶液の1滴をそのままメッシュ上にとり shadowing を施して観察すると、外見上無構造な物質として認められ、特定の構造物は見出されない。これはコラーゲンの構成成分があまりに密集して存在するためと考えられる。このコラーゲン溶液を 100~1000 倍に稀釈した場合には短桿状のフィラメントが互に凝縮して認められる (Fig. 12)。しばしば松葉状に配列する。その中遊離したものを測定すると、幅約 380 Å, 長さ約 1400 Å であった。横紋は認められない。10,000 倍の稀釈では幅約 100 Å の細いフィラメントが網状に配列して存在する (Fig. 13)。20,000 倍稀釈ではこれらのフィラメントが遊離して認められる (Fig. 14)。フィラメントの中は略々一定で約 100 Å 又はそれ以下、長さは 220 乃至 1900 Å (平均 640 Å) で変動が大

きい。フィラメントには横紋は認められないが、或るものは微粒子の連鎖からなる如くみえる。フィラメントの長さに変動が著しいのは、溶液が乾燥する場合、特に乾燥し始める溶液の辺縁でフィラメントが再結合 (reassociation) するためと思われる。実際、溶液がやや濃厚な部の辺縁に沿って恰も浪打際のように長いフィラメントが現われる傾向がある。この乾燥時の再結合を阻止する目的で、メッシュに載せた 10,000 倍稀釈溶液を 1% オスミウム酸蒸気で固定した標本を観察した。(この際ホルマリン蒸気で固定すると溶液の成分は凝集して観察に堪えない)。この場合には、直径 60~100 Å (平均 80 Å) の微粒子が密集し、処々数個の微粒子が珠数状に連つて短いフィラメントが形成されている像に接した (Fig. 15)。第Ⅲ図に尾腱の膨潤からコラーゲン溶液に至る膠原線維の分解過程が示されている。

第Ⅲ図 ラット尾腱膠原線維の溶解過程



3. in vitro の線維の再成 (reconstitution).

in vitro でコラーゲン溶液から再成される線維の観察には二つの問題が含まれている。第一はコラーゲン溶液に 0.17 M NaCl を加えて経時的に観察し、線維の形態発生の過程を追求することである。第二は、線維の再成効果に影響を及ぼす因子の解析である。

(1) 線維再成の過程の観察

線維再成の過程を追求するには、コラーゲン溶液と NaCl の混合液内で進行する線維再成の反応を随時停止することが必要である。この目的のため Vanamee 等⁵⁰⁾の方法に従つてオスミウム蒸気固定を用いたが、この方法によつても反応の進行を瞬間的に停止することはかなり困難で、一定時間後検査された多数の標本は毎常同一の像を呈するとは限らない。コラーゲン溶液と NaCl を混じて短時間に取出した試料でもかなり

線維の形成が進んでいることがある。

コラーゲン溶液に NaCl を加えて約 5 分後には多数のフィラメントが認められる (Fig. 16)。フィラメントは幅約 70 Å, 長さ平均約 640 Å で大きさは略々一定である。フィラメントの中には微粒子の連鎖からなる如くみえるものがある。フィラメントは不定形の物質に包まれて、その中から析出した如くみえる。注意して観察すると、微粒子が接着しないで、約 70 Å の間隔で周期的に配列している部分がある。恰もフィラメントが一定の間隔で分節したような印象を与える。更にある試料では不定形物質に深く包埋されて多数の微細な線維が認められた。このような線維は上述のフィラメントが 2~3 本側面的に結合して形成されており、その巾は約 200 Å である。フィラメントの微粒子状の濃縮部は互に横につながつて、周期的な等間隔の

初期横紋をつくる（一次短周期線維）(Fig. 18). この周期の長さは 120乃至140Å であつた。

NaCl を加えて30分後には種々の長さの細線維とその間に多数の短紡錘形の構造物 (tactoid) が認められる (Fig. 17). tactoid の長さは平均約 1540Å, 中央の幅は平均約 230Å でその大きさは略々一定である. tactoid は互に尖つた先端で側面的に結合して次第に長さ増幅を増す. そして先端の尖つた短い線維が形成される (tapered fibril). 線維の幅が約 400Å に達したものでは約 200Å の等間隔性の周期をもつた横紋が認められる (二次短周期線維) (Fig. 19). 横紋凸部は微粒子が珠数状に並んだ如くみえる. この短周期性線維には, 所々 3 本目の横紋凸部が特に電子密度が高く, 際立つてみえる部分がある. このような凸部は相隣れる凸部と結合して二重環の大きな凸部をつくる. かくして, 等間隔性の短周期は長さ約 340Å の凸部 (二重環) と長さ約 300Å の凹部からなる新しい 640Å の周期をつくる (一次正周期線維) (Fig. 19). 先端の尖つた短い細線維の先端に近い部分は二次短周期性横紋を示し, 線維の幅が大きくなつた部分では次第に一次正周期性横紋が認められる。

コラーゲン溶液に NaCl を加えて 1 時間以上経過すると, tactoid は殆んど認められなくなり, 種々の大きさの線維が形成される. 線維の幅が 800Å 以上のものには 640Å の正周期性横紋が認められる. 上述の正周期性横紋の成り立ちから明らかな如く, 二重環をなす凸部の間には短周期性横紋をつくつていた 1 本の細かい凸部が残っている. NaCl 添加後 5 時間になると 1000Å 以上の線維が認められる. 線維の先端は最早

や電顕視野にはあらわれない. このような線維では上記正周期横紋の二重環の間に残つた細い 1 本の凸部は更にこの二重環と結合して横紋の形成は完成する (二次正周期線維) (Fig. 20, Fig. 21). この場合は周期は 640Å であるが, 三重環からなる大きな凹部は 510Å, 凹部は 130Å の長さを持つことになる. このような横紋の形態は成熟動物の生体における膠原線維のそれとよく一致する。

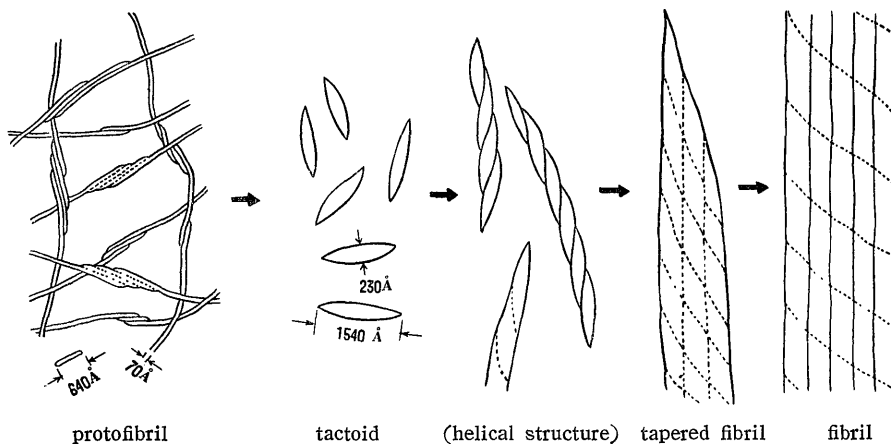
以上の線維再成過程を模型的に示すと, 第IV図, 第V図の如くなる。

完成した線維は側面的な結合が密で一般に線維を構成するフィラメントの走行は認められないのが普通であるが, 時には線維軸に平行に走る数本のフィラメントを認めることがある (Fig. 8). フィラメントは数個の横紋を貫いている. 線維が再生の途中で屈曲すると, 屈曲部には横紋が欠失している. 稀れに, 螺旋状の線維が形成されることがある (Fig. 22, Fig. 23). 螺旋のピッチの長さは様々でコヨリ状のものや, ゆるく数本の線維がよじれ合つたものがある. いずれの場合にも線維の横紋が認められないのが常である. このような螺旋構造は既述の種々の長さの紡錘形の線維がゆるく結合した像の如くみえる. 螺旋のピッチの長さはつまりこの構成する紡錘形の線維の長さに左右されるわけである。

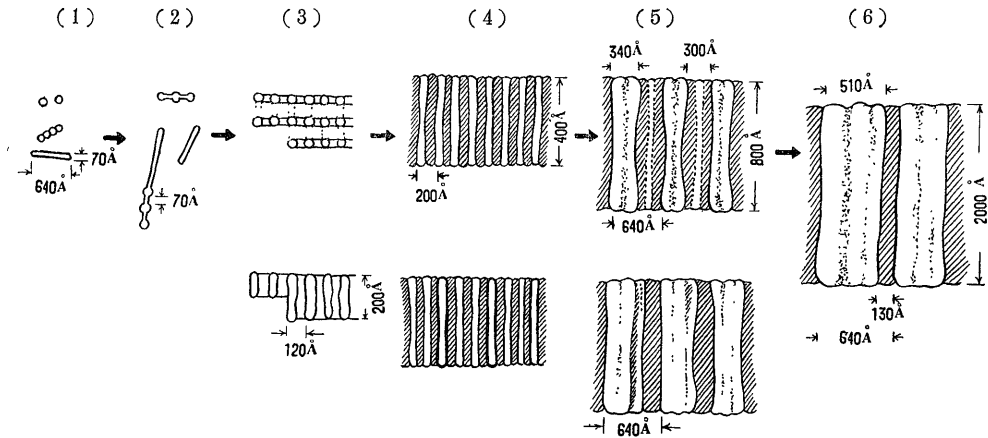
(2) 線維の再成効果に影響を及ぼす因子

(a) pH: コラーゲン溶液 (pH 3.8) に酢酸ナトリウムを加えて pH を調整した. pH 4.8 の場合には線維の再成は認められない. pH 5.8 の場合には横紋のない柔軟な細線維が再成された. PH 6.8 に調整する

第 IV 図 in vitro における線維の再成過程



第 V 図 再成線維の横紋形成過程



(1) 微細フィラメント。(2) フィラメントの分節。(3) 分節間の結合(上), と一次短周期線維の形成(下)。(4) 二次短周期線維(上), 横紋凸部が3本毎により明瞭になる(下)。(5) 一次正周期線維, 横紋凸部は二重環からなる(上), 横紋凸部は三重環をつくる(下)。(6) 二次正周期線維。

と, 640 Å の周期性横紋をもつ線維が再成された (Fig. 24).

コラーゲン溶液に添加された物質とその反応は第 2 表に総括して示されている。

(b) 塩類 : 塩類の濃度は 0.17M とし, コラーゲ

ン溶液 5 容に対して塩類溶液 1 溶の割合に添加した。

Hg-, Mg-, Ca-塩では線維の再成はみられなかつた。

種々の Na-塩と K-塩とを比較すると, 一般に Na-塩の方が線維再成効果は良好であつた (Fig. 28)。これらの塩類を加えた場合 pH の影響も考慮されねばなら

第 2 表 各種物質の線維再成効果

再成線維の型	コラーゲン溶液への添加物質
線維の再成なし	MgCl ₂ , CaCl ₂ , HgCl ₂ 卵白アルブミン*, フィブリンノーゲン, ヘパリン***, トアスコルビン酸**-*
横紋のない線維	K ₂ HPO ₄ , K ₂ SO ₄ , リンゲル液, RNA**, Chs. *-***, 血清(ウサギ)皮下水腫液(ヒト), Chs. *+NaCl (0.02M), Chs. *+NaCl (0.08M)
短周期性線維	タイロード液, チオ硫酸ソーダ, KCl, Chs. *+NaCl (0.08M), Chs. ** +NaCl (0.17M)
正周期性線維	NaCl, Na ₂ SO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , 酢酸ソーダ, 酢酸カリウム, クエン酸ソーダ, DNA**, 関節液(ウサギ), 硝子体液(ウサギ), Chs. *-** +NaCl (0.17M)
長周期性線維	Chs. *+NaCl (0.17M)

塩類濃度は 0.17M, Chs. =コンドロイチン硫酸。

* : 1% ** : 0.1% *** : 0.01%

ぬが, 線維再成効果は pH の作用のみには帰せられないようである。例えば NaCl, KCl, CaCl₂ を加えた場合溶液の最終 pH はいずれも大体 4.4-4.8 であつたが, NaCl は正周期線維を, KCl では短周期線維, 時には横紋のない線維が再成され, CaCl₂ では線維の再成は全く認められなかつた。又, Na₂SO₄ を添加した

場合は pH は 4.6, Na₂HPO₄ を添加した場合は pH は 7.2 であるにも拘らず, 共に 640 Å の横紋を有する線維が再成された。コラーゲン溶液に 0.08M NaCl を加えた場合は, 横紋のない柔軟なうねりをもつ細い線維が再成された (Fig. 25)。Ringer-, Tyrode-液では, 塩類単独の場合に比し線維再成効果は劣る。

(c) 蛋白質：卵白アルブミン、fibrinogen を添加した場合には線維の再成は認められなかった。

(d) 核酸：0.1% DNA, RNA をコラーゲン溶液に添加した。最終 pH は共に 4.6 であった。RNA の場合は網状に配列した横紋のない細い線維が再成された (Fig. 26)。DNA の場合は太い線維が互に重り合つて再生され、640 Å の横紋が認められた (Fig. 27)。

(e) 多糖類：heparin (0.01%) をコラーゲン溶液に添加した場合には線維は再成されなかった。これに Ringer 液を同時に加えた場合は横紋のない不完全な線維が多数に再成された。

コンドロイチン硫酸 (1-0.1%) をコラーゲン溶液に加えて 5 分後 1% オスミウム酸蒸気で固定した標本を観察すると、様々な長さのフィラメントが認められる。フィラメントが集合している部分は、細い網状の配列をとり分岐しているように見える。60 分後には、多数の長い繊細な線維が不規則に集在する。横紋は認められない。2 時間以上経過すると、線維は太さを増すがその形態は平滑な輪廓を欠き、不定形の塊状物質が凝集した如くみえ、横紋は形成されない。しばしば、先端の尖つた線維が混在している。

この溶液に 0.02M NaCl を同時に加えても所見は略々同様である (Fig. 29A)。0.08M NaCl を加えると、横紋のない線維の他に短周期線維が再成される。0.17M NaCl の存在の下では、コンドロイチン硫酸の濃度が 0.1% の場合は短周期乃至正周期線維が再成され (Fig. 29B)。コンドロイチン硫酸の濃度が 1% の場合は、正周期線維の他に 2000~3000 Å の長周期の横紋をもつ線維が形成された (Fig. 29C)。長周期線維の幅は約 700 Å で一般に正周期線維より細い。横紋凸部は約 500~600 Å、凹部は約 1800~2500 Å で、時々 2 個の凸部が pair になつて相接しているものがある。長周期横紋の凸部は特に電子密度が高いが、凹部に 3~4 個の電子密度のやや低い凸部が介在していることがある。稀れに長周期横紋と正周期横紋が互に移行している部分が認められた。

(f) その他の物質：ウサギ血清、ヒト皮下水腫液をコラーゲン溶液に加えた場合には、不定形の物質の間に横紋のない線維が認められた。ウサギ硝子体、関節液を加えた場合には多数の正周期線維が認められた。0.1~0.01% アスコルビン酸には線維再成作用は全く認められなかった。コンドロイチン硫酸、NaCl、核酸の存在の下でも、アスコルビン酸を添加すること

によつて常に線維の再成効果は減少した。

4. 膠原線維の電子染色

(1) GOMORI 法による鍍銀所見

成熟ラット尾腱を GOMORI 法で鍍銀すると、微細な銀粒子が膠原線維の固有の横紋に一致して周期的に沈着する (Fig. 31)。これに反して、生後 1 乃至 10 日の幼若ラット尾腱では、銀粒子は粗大で膠原線維の上に不規則に沈着する (Fig. 30)。成熟ウサギ疎性結合組織では、大体この両者の中間的な所見を示し、かなり粗大な銀粒子が膠原線維の横紋に一致して周期的に沈着する。Shadow した標本では、成熟ラット尾腱膠原線維の銀粒子は微細なため、それが線維の表面に附着しているか否かを確認することは困難であるが、疎性結合組織膠原線維においては、銀粒子は明らかに線維の表面に附着していることが示される。

今、ウサギ疎性結合組織を材料として、GOMORI 鍍銀の過程を追求してみる。先ずアンモニア銀液処理の段階では、線維上に極めて微細な粒子が瀰漫性に沈着する。電子廻折によると金属銀の廻折像が得られた (Fig. 33)。次に 10% 中性ホルマリンで還元すると、粒子は上述の如く線維上に周期的に沈着し、この際は明瞭な金属銀の廻折像が得られる (Fig. 38)。この標本を塩化金で処理すると粒子は一般に大きさが不同になり、廻折像として金、塩化銀及び両者の混合した 3 種のものが得られた (Fig. 39)。この 3 種の廻折像があらわれる頻度と線維の太さとの間に有意義な関係は見出されない。次いでチオ硫酸ソーダで処理すると、粒子は概ね線維上に周期的に沈着し、電子廻折によると金属金のみ廻折像が得られた (Fig. 40)。

アンモニア銀液処理後、標本をホルマリンで還元する場合、使用するホルマリンの濃度、作用時間及び温度によつて銀粒子が線維に附着する状態に差異が認められる (第 3 表)。一般に還元反応の速度が緩徐なときは、銀粒子は微細となり、線維の表面に瀰漫性に沈着する (Fig. 34)。還元反応の速度が急激であると、銀粒子は粗大となつて、線維上に不規則に沈着する (Fig. 36)。適当な還元速度においてのみ銀粒子は線維の横紋に一致して周期的な沈着を示す (Fig. 35)。

疎性結合組織線維は既述の如く、多量の基質で包埋されているので、この基質を除く目的でトリプシン、ヒアルロニダーゼを作用せしめた後鍍銀すると、アンモニア銀液処理後の段階で既に附着する銀粒子は減少する。ホルマリン還元により銀粒子は粗大となつて線維

第3表 ホルマリンの還元条件と銀粒子の附着状態 (室温)

濃 度	2.5%	5 %	10%	30%
作用時間				
5 分	小 (一)	小 (一)	小, 大 (±)	小, 大(±)
10 分	小 (一)	小, 大(±)*	大 (十)	大 (十)**
15 分	小, 大 (±)	小, 粗大(一)	粗 大 (一)	粗 大(一)

- 〔註〕 (一) : 銀粒子が線維に瀰漫性に附着するもの。
 (±) : 銀粒子が一部の線維の横紋に附着するもの。
 (十) : 銀粒子が殆んど総ての線維の横紋に附着するもの。
 * : 氷室 (6°C) で処置した場合は粒子は大きく線維の横紋に一致して附着する。
 ** : 37°C で処置した場合は粒子はやや細くなりよく横紋に一致して附着する。50°C で処置した場合は粒子は更に細くなり、線維に瀰漫性に附着する。

の表面に不規則に沈着する (Fig. 37)。その状態はホルマリンの還元反応を急激に行つた場合に類似する。

成熟ラット尾腱の鍍銀所見は疎性結合織のそれとは多少異なっている。尾腱をアンモニア銀液処理の段階で観察すると、微細な銀粒子は既に膠原線維の横紋に一致して沈着している。ホルマリン処理でこの粒子は更に増加するが、還元条件を変えても鍍銀効果は殆んど同様で、毎常銀粒子は横紋に一致して周期的な沈着を示す。又、トリプシン、ヒヤルロンダーゼで処理した後に鍍銀しても、鍍銀効果には殆んど影響は認められなかった。

酢酸で膨潤せしめた尾腱を鍍銀すると、横紋構造の崩壊と共に銀粒子は粗大となつて線維上に不規則に沈着し、膨潤が高度になるに従つて銀粒子の沈着は次第に減少する。そして膨潤線維がくびれた部分には、特に銀粒子が密集して沈着している (Fig. 32)。

コラーゲン溶液に NaCl を加えて再成された線維は shadow した標本では生体の膠原線維と同一の形態を示すに拘らず、鍍銀標本では生体の場合に比して銀粒子はかなり粗大で、周期的沈着の傾向は少ない (Fig. 41)。しかし、NaCl とコンドロイチン硫酸を同時に加えて再成された線維では、銀粒子は微細となり、より明瞭に横紋に一致して周期的な沈着を示す (Fig. 42)。

(2) 過ヨード酸銀法による鍍銀所見

生後21日のラット疎性結合織を過ヨード酸銀法で鍍銀すると、線維の周辺に極めて微細な銀粒子が瀰漫性に沈着する。成熟ウサギ疎性結合織では、同様に線維の周辺が微細な銀粒子によつて淡く“染色”されるが、その中央部は線維に沿つてやや濃く“染色”され、所々かすかに横紋の存在がうかがわれる (Fig. 43)。然るに成熟ラット尾腱では、膠原線維の辺縁が淡く染色される他に、周期的に“濃染”する横紋があらわれる

(Fig. 44)。対照として、過ヨード酸を作用せしめない標本では線維は全体に“濃染”して横紋はあらわれない。

(3) その他の“電子染色”

未固定のウサギ疎性結合織を5%硼砂で2時間処理すると、線維の周辺のみがかなり明瞭に“染色”される (Fig. 45)。所々線維内に極めてかすかに横紋の形がうかがわれる。10%中性ホルマリン固定の材料に同様な処理を行うと、線維の表面及びその周辺に凝縮状の物質が“染色”される (Fig. 46)。予めトリプシンによつて基質を除去した標本では、硼砂の染色効果は全く消失する (Fig. 47)。これに反して、未固定の成熟ラット尾腱を同様に硼砂で処理すると、線維の辺縁が莢膜様に淡染する他、横紋に一致して周期性の“染色帯”があらわれる (Fig. 48)。

未固定成熟ラット尾腱を材料として、各種の塩類を作用せしめその染色効果を検した。われわれの現在までの経験では、良好な横紋のコントラストを与える物質として、第一リン酸ナトリウム (5%)、塩化カルシウム (10%)、塩化バリウム (1%)、過マンガン酸カリ (0.5%)、クローム明礬 (10%) 等を挙げることができる。この内過マンガン酸カリとリン酸ナトリウムの染色状態はかなり特異的であつた。過マンガン酸カリ処理の場合は、Pair になつて並んだ細かい染色帯からなる横紋構造が認められる (Fig. 49)。横紋周期の長さは約 600 Å であつた。リン酸ナトリウムで処理された線維は長さ約 300 Å の染色帯と、約 360 Å の非染色帯からなる周期性横紋が極めて明瞭にあらわれる。染色帯は微細な粒子の連鎖からなるように見える。線維の膨潤した部分では時々、長さ約 730 Å の特に電子密度の高い染色帯が 2700 Å 及び 8800 Å の間隔で周期的に配列する (Fig. 50)。

5. 細網線維

ネコの脾から既述の方法で作成された標本においては、細網線維間になおかなり多量の不定形の物質が残存している。線維はしばしば等質性の濃厚な物質で包まれる (Fig. 51)。又、恐らく細胞原形質の崩壊物と思われる物質が線維間に介在し、線維は所々この物質の辺縁に沿って走っている。細網線維の細線維は数本集つてやや太い線維束をつくり又は単独で錯走して網工をつくるが、細線維の分岐は認められない。細線維は長さ平均 460 Å の周期性の横紋構造を示す。細線維の幅は平均 750 Å で膠原線維のそれより細い。

細網線維を GOMORI 法で鍍銀するとかなり粗大な銀粒子が線維の表面に不規則に沈着する (Fig. 54)。ホルマリンの還元条件を変えてもこの鍍銀効果は殆んど影響されない。

6. 弾力線維

ウシの項韌帯を針で細離した標本では、多量の濃厚な基質で包まれた弾力線維と、その周囲に単独に走る

膠原線維が認められる。基質のやや少ない部分では、その内に横紋構造を示す細線維の走行をうかがうことができる。トリプシン処理を行った標本では、線維を包む基質はかなり除去され細線維があらわれてくる。基質に包まれた細線維は様々な方向に互にもつれ合つて認められ、膠原線維の如く平行に走るものは少ない (Fig. 52)。基質から脱離した細線維には膠原線維と同様な周期性の横紋 (周期の長さは平均 600 Å) が認められる (Fig. 53)。時々、短周期性の横紋を示すものがある。細線維の幅は 440~740 Å (平均 625 Å) で膠原線維のそれより細い。所々細線維が繩をなつた如くもつれている。又、尖つた先端が認められる線維が稀れならず認められた。細線維の分岐は認められない。

弾力線維を GOMORI 法で鍍銀すると、一般に銀粒子の沈着は不良で、粗大な銀粒子が全く不規則に線維の表面に沈着する (Fig. 55)。

考 按

1. 膠原線維の構造単位とその構築

周知の如く膠原線維を構成する主成分はコラーゲンと呼ばれる蛋白質で、そのアミノ酸組成はプロリン、オキシプロリン、グリシンが多く、チロジン、トリプトファン、ヒスチジン、シスチン等が少ないことが特色とされている。物理化学的分析から得られたコラーゲン分子の大きさは、用いられた材料や測定方法によつてかなりな差異があるが、大体直径10数Å、長さは数百乃至数千Åに及んでいる³⁹⁾。コラーゲンの構造単位をこのオーダーのフィラメント (Protofibril) とみなす人が多いが、粒子状の形態を構造単位と考える人もいる。幼若動物^{40) 54)}、新生線維¹³⁾の観察において 60~80 Å、或いは 100~150 Å 程度の微粒子の連鎖が認められている。われわれがコラーゲン液の観察から得た一つの構造単位は長さ平均約 640 Å、直径約 100 Å 又はそれ以下のフィラメント (Protofibril) であつた。そしてこのフィラメントは直径 60~100 Å の微粒子の連鎖からなるように見える。同様な所見は PORTER 等⁴¹⁾によつて線維細胞の組織培養の際にも観察されている。これらの所見は protofibril が更に小さな球状の構造単位の集合からなつている可能性を暗示する。微粒子の内にはポリペプチド鎖が一定の配位を

とつてまきこまれていると推定される。⁴⁰⁾ MERCER³⁹⁾によると、こうした微粒子がフィラメントを形成する場合、(1) 粒子内のポリペプチド鎖が一旦とけて、それが平行に並び新たに線維状に結晶するか、(2) 粒子がそのまま珠数状に並んで線維をつくるかの二つの方法が考えられる。われわれの所見は MERCER の仮説の第2の考え方に一致する。この際粒子を結合する力については不明であるが、双極子的結合による可能性は考え得るところである⁵⁴⁾。

in vitro の線維の再成過程の初期に tactoid が認められる。恐らく、上述の protofibril が数本平行して集合するとそれが球形になろうとする表面張力と、並列した状態を保とうとするエネルギーが平衡して、このような tactoid が生ずると想像される。tactoid は尖つた先端で側面的な結合をなして次第に線維を形成し、線維が完全に形成されると最早や tactoid は認められなくなる。tactoid の結合が不完全であれば線維は螺旋状の構造を示す。生体においても陳性結合織の基質内にこのような tactoid がみられる。又幼若線維の存在が期待される間葉性腫瘍において先端の尖つた線維が見出されることが報告されている³⁾。このような事実から考えると、tactoid は線維構築上、一つの

より高次の構造単位であつて、線維はその側面的結合によつて組立てられていると思われる。若しそうとすれば、線維を破壊した場合に先端の尖つた線維、又は *tactoid* を生ずる筈である。実際 KEECH³⁵⁾ は *collagenase* 処理によつて線維が *tactoid* に分れることを報告している。われわれの実験範囲では、線維に機械的又は化学的な処理を施しても容易にこのような形態を認めることはできなかつたが、只ラット尾腱を超音波で処理した場合に稀れに先端の尖つた線維が認められた。線維が *tactoid* の集合からなるとしても、線維が成熟すると共に *tactoid* 相互間の結合が緊密になつて、線維内部には *tactoid* を貫いて線維軸に平行する結合が強化されるのかも知れない(第IV図)。線維の構造のどの結合が切断されるかによつて、線維は *tactoid* に分れたり、フィラメントに分れたりするのであろう。例えば REED 等⁴⁷⁾ は変性した膠原線維がしばしば螺旋状構造をとることを観察し、線維は螺旋形に並ぶ *helical tactoid* からなることを推論している。われわれも酢酸で膨潤させた線維、或いは壊死に陥らしめたラット尾腱において線維の螺旋構造を認めた³²⁾。このような螺旋構造は、変性によつて、特に *tactoid* 間の結合が障害を蒙つたために生ずると考えれば理解しやすい。後述の如く、GROSS 等¹⁹⁾ は *in vitro* の FLS 線維再成の初期においてもわれわれと同様な *tactoid* を観察している。この結果からみれば、*tactoid* の大きさと横紋周期との間には直接の関係はないように思われる。

線維が組立てられる場合、理論的にはポリペプチド鎖から細線維に至るまで連続的な形と大きさの変化がある筈である。コラーゲン溶液からの再成線維では直径 100 Å 以下のフィラメントから 2000 Å 以上の線維まで大きさにおいて連続的な変動がみられる。しかし、生体においては、例えば各種脊椎動物の疎性結合織では約 1000 Å 前後で線維の大きさは一つの単位をつくつていくようにみえる。この程度の大きさの線維の間にはもつと細かい網工をつくつて、更に微細な線維のシートがある。即ち、ここでは 1000 Å の幅をもつ線維系とそれより細い(平均 560 Å)線維系との間に不連続な構成がみられる(第I図、第II図参照)。腱では針でほぐした場合は大体 2000~3000 Å の幅の略々一定した太さの線維に分れる。即ち、腱ではこのあたりの大きさに一つの単位があるようにみえる。従つて、生体内で形成される線維は、組織に応じて一定

の大きさ毎に一つの「まとまり」をもつように組立てられているものと思われる。

膠原線維の重要な形態学的特徴は 640 Å の周期性の横紋である。しかし、この値はすべての膠原線維について一定ではない。200~270 Å の短周期性横紋は線維細胞の組織培養^{25) 41) 42)}、病的材料²⁹⁾及び成熟正常動物⁶²⁾において観察されている。RANDALL⁴⁴⁾ は胎生ラットの臍帯及び尾腱で 170~250 Å の周期をもつ横紋を認め、われわれも疎性結合織内に 460 Å の周期を有する線維を認めた。*in vitro* の線維再成過程では線維の幅の増大と共に横紋周期が長くなることがつきりと示される。このような所見を総合すれば、一般に短周期性横紋は未熟な線維の構造的特徴とみなしてよいと思われる。

横紋の形成が線維のどのような内部構造と関係があるかは今日不明である。GROSS 等¹⁹⁾ の観察によれば湿潤した状態の線維のレプリカ標本では線維の表面は平滑であるので、*shadow* した標本にみられる横紋の凹凸は乾燥によつて生じた産物と考えられる。しかし、小角-X線廻折の所見から、又 *Shadow* しない標本及び切片標本においても周期的な密度の変化が認められる点から、線維内部の構造に周期的な変化が存在することは疑いが無い。BEAR⁴⁾ は膠原線維の小角-X線廻折の研究により、線維内部には構造の不規則な部分(*band*)と構造の規則的な部分(*interband*)があることを示し、前者が電顕的に横紋暗帯にあたると考えている。われわれの実験において、再成線維の初期に認められた原始的な粒子状の横紋が、コラーゲン分子内のどのような変化を意味するかについては明らかでない。コラーゲン溶液に認められたフィラメントの長さが平均 640 Å で横紋周期の長さとも略々一致する点から、コラーゲン分子がこの長さでポリペプチドの一定の配位をとつていとも推定される。しかし、一方、単にコラーゲン分子自体の構造上の変化の他に、コラーゲン分子を骨格として、一種の基質が添加されることによつても周期性の明暗が生ずる可能性がある。つまり、電子密度の低い明帯(凹部)は水和しているに対して暗帯(凸部)には蒸発し難い高密度の物質(例えば糖蛋白)が濃縮して存在するとすれば、試料を乾燥した場合、そこは電子密度の高い部分としてあらわれ、*shadowing* によつて凸部として認められることになる。

線維の横紋構造に関して興味のあるのは *in vitro* に

再成される長周期性の横紋(long-spacing, LS)をもつ線維である。この種の線維は HIGHBERGER 等²⁴⁾ によつて発見され、2000~3000 Å の周期をもつ。PORTER⁴¹⁾ は線維細胞の組織培養において1000~1100 Å の長周期線維が認められたと報告しているが、一般には長周期線維は未だ生体内で確認されていない。長周期線維はその形に従つて FLS (fibrous long-spacing) 線維と SLS (segment long-spacing) 線維⁵¹⁾ とに分けられ、前者は更に横紋の状態によつて I, II, III 型に分類される⁴⁵⁾。I, II 型は周期の長さが 2400 Å であるが、III 型では、1200 Å で、上記の PORTER 等が組織培養で観察した長周期線維の周期の長さに一致する点は注目される。われわれの得た FLS 線維は大体 II 型に近い形態である。長周期線維はいろいろな方法で再成されるが、いずれもコラーゲンの他に一定量の多糖類の存在が有効であることが示されている¹¹⁾, ¹⁸⁾, ¹⁹⁾, ²⁴⁾, ²⁹⁾, ⁴⁵⁾。われわれの実験結果からも FLS 線維の再成には、塩類濃度と多糖類濃度との間に一定の関係が必要であることが証明された。FLS 線維の化学的分析から糖蛋白質が多量に存在することが示さ

れているので¹⁹⁾、多糖類が少なくともこの種の線維の内部構造と結合していることは疑いない。恐らく一定量以上の多糖類の存在が、コラーゲン分子の配列に変化を与えるのであろう。最近 GROSS 及びその協同研究者は、正周期一、FLS-、SLS- 線維を相互に変換することに成功し、この 3 種の線維に共通した一つの構造単位 (tropocollagen) を仮定している¹⁹⁾。GROSS²⁰⁾ によれば、tropocollagen は構造上方向性をもつた長さ 2000~3000 Å、幅 50 Å 以下のフィラメントで、線維の横紋周期の長さは結局 tropocollagen の配列の仕方によつて定まるといふ。

以上の横紋周期の長さに関するデータを総括してみると第 4 表の如くなる。210 Å の周期から 640 Å の周期になる部分だけは 3 倍の増加を示しているが、他は大体 2 倍ずつ周期の長さが増加していることが注目される。210 Å の約 2 倍の長さの周期 (約 460 Å) は細網線維及び稀れに疎性結合線維に認められた。このように横紋周期の長さがある整数比をもつて増加することは、横紋を構成する上に一定の長さの構造単位が存在することを暗示している。

第 4 表 膠原線維の横紋周期の長さの変動

横紋周期の長さ	見出された材料
120~140 Å	再成線維 (初期)
200~270 Å (210 Å)	再成線維, 幼若動物 ⁴⁴⁾ , 組織培養等 ²⁹⁾ ⁴²⁾
500~800 Å (640 Å)	結合組織一般, 再成線維
1000~1200 Å	再成線維 ⁴⁵⁾ , ⁴⁶⁾ 組織培養 ⁴¹⁾ ,
2000~3000 Å	再成線維

コラーゲン溶液から線維が再成するに必要な条件はなお十分明らかではない。われわれの実験から塩類の濃度、種類、溶液の pH が重要な役割をなしていることは明らかである。2 価以上のイオンの場合は 1 価のイオンの場合より低濃度で線維の再成がおこることが知られているが、特定のイオンは必要でないらしい。又、線維を再成するに必要な塩類濃度は非常に低く、塩類以外の物質でも再成がおこるので、線維再成の機序が単なる塩析によるものとは考え難い。われわれの実験範囲ではアスコルビン酸がコラーゲン溶液から線維を再成するに有効な物質であると考えべき証拠は得られなかつた。ビタミン C は線維細胞から分泌される液状物質をゲル化して線維をつくるに必要な物質であるという WOLBACH⁶¹⁾ の古典的な見解を支持し

難い成績である。ROBERTSON 等⁵⁰⁾ の実験が暗示する如く、ビタミン C はコラーゲン分子そのものの生成に必要な物質かも知れない。

最後に、膠原線維の構造に関して、線維が管状の構造をもつという意見がある³⁴⁾ ⁴²⁾。われわれは homogenizer で細砕した線維の断片の中で、やや管状構造を思わせる像に接したことがあるが、まだ明瞭な線維の管状構造の存在を確認していない。線維が管状とすれば横紋構造は線維全経を貫いた円盤ではなく、線維の表層にのみ存在することになる。しかし、線維の縦断切片においても横紋構造が認められる点はこの考えと合致しない。最近 RHODIN⁴⁸⁾ は膠原線維の切片標本において 4 本の明瞭な横紋を認め、しかも線維は約 60 Å の限界膜を有していることを報告している。

線維の微細構造については今後切片標本を用いて研究するべき分野が残されている。

2. 膠原線維の電子染色，特に線維と基質の関係について

従来膠原線維の電子染色にはオスミウム酸，燐タングステン酸等が好んで用いられ，これらの物質によつて一周期あたりに6乃至11本の横紋が“染色”されている^{14) 15)}。われわれの実験からその他の物質によつても膠原線維の横紋が“染色”されることが判つたが，その“染色帯”の形態が物質によつて差異があることは注目される。膠原線維の横紋の化学的組成との関係が暗示される所見と思われるからである。

成熟動物の膠原線維をGOMORI法で鍍銀すると，銀粒子は線維の横紋に一致して附着することは1951年DETTMER⁷⁾等により，又1953年それとは独立にわれわれによつて見出された²⁵⁾。その後SCHWASZ一派及びその他の人達により，細網線維²³⁾，幼若動物の膠原線維^{40) 43)}では銀粒子は粗大で線維の表面に不規則に沈着することが示され，われわれも亦それを確認した。この所見は成熟動物の膠原線維では細かい銀粒子が横紋暗部に一致し周期的な沈着を示すと著しい対照をなす。SCHWARZ⁵²⁾は前者を外鍍銀(Aussenversilberung)，後者を内鍍銀(Innenversilberung)と呼び分けている。

われわれは電子廻折を利用することによつて鍍銀の各過程における従来考えられていた化学変化⁶⁴⁾を電顕的に証明することができた。この変化から考えると，鍍銀の運命を左右するのはアンモニア銀液を作用せしめた場合の銀粒子の附着のしかたであるように思われる。鍍銀の成績は周知の如く非常に“気まぐれ”であるが，銀粒子の成長にはその核となるべき銀の芽(Keime)の存在が必要であると考えられている^{57) 58)}。

^{63) 61)}。線維をアンモニア銀液で処理した場合に認められる微細な銀粒子がこの芽に相当するものと考えられる。この銀の芽を発生せしめる場所が厳密な意味での好銀部位である。勿論アンモニア銀液を作用せしめた場合は，銀の芽—即ち還元された金属銀—にならぬ多量の銀塩がその他の場所に残存するわけで，これがホルマリンの還元作用によつて金属銀となり，先にできた銀の芽を中心として次第に凝集するものと考えられる。従つて鍍銀の過程は第一に，好銀部位における銀の芽の発生と，第二に，それを中心として凝集した銀粒子の吸着の二つの段階からなつている。

然らばこの好銀部位の本態は何か。過ヨード酸銀法と礬砂染色の所見がこの解答の一つの手がかりを与えてくれる。過ヨード酸銀法は従来光顕的に基質の一染色として用いられているPAS染色の原理を電顕的に利用したものであるが，その所見はGOMORI鍍銀法のアンモニア銀液処理の段階の結果と一致する。元来GOMORI鍍銀法と過ヨード酸銀法とは原理的には類似しており，共に酸化剤で前処置される。過ヨード酸の場合は周知の如く多糖類の1,2-glycolをアルデヒドに酸化する。銀塩はこの還元基によつて金属銀に還元され前述の銀の芽となる。GOMORI法で用いられる過マンガン酸カリは，過ヨード酸カリの酸化作用に相当するわけである。つまり，過ヨード酸銀法で銀の芽を発生する部位，即ち好銀部位がGOMORI鍍銀のそれと一致することはむしろ当然の結果であり，過ヨード酸銀法は好銀部位が基質の存在部位と一致することをより明瞭に示しているものに他ならない。基質除去により銀の芽の発生が減少する所見も，基質の存在が好銀性を規定していることを物語つている。礬砂染色はわれわれが経験的に見出した方法で，その染色の原理は未だ不明である。しかし，疎性結合織を材料とした実験結果から，礬砂で“染色”される物質は恐らく基質であろうと思われる。鍍銀の場合の好銀部位が礬砂の可染部位と一致する所見は，好銀部位とは基質の濃縮している部位であることを裏付ける。要するに，鍍銀の際に認められる好銀部位とは基質が濃縮して存在する部位であるということができよう。そして鍍銀の第一段階，即ち銀の芽の発生には基質の多糖類から生ずる還元基が役割を演じていると思われる。又，疎性結合織の如く線維の表面に多量の基質が存在する場合は，これが銀粒子の成長に際して保護膠質的な作用をなし，粒子の急激な凝集をある程度阻止するであろう。疎性結合織の基質を酵素処理で除去すると，銀粒子は粗大，不規則に沈着し，しかもその沈着状態がホルマリンによる還元を急激に行つた場合の所見に類似するのはこのような理由によるものと思われる。換言すれば，鍍銀の第二段階である銀粒子の凝集と吸着には基質のコロイド性が役割を演じているわけである。臍の膠原線維では酵素処理によつて，鍍銀効果は殆んど影響をうけず，酢酸で膨潤せしめて横紋構造を破壊すると始めて外鍍銀の状態になる事実は，恐らく臍においては横紋暗部に濃縮する基質は線維の内部構造と結合し，酵素によつて容易に除去されない状態にあ

るのではないかと想像される。腱の鍍銀の際は第一段階が殆んど決定的な役割をなし、銀の芽は線維内で発生し、銀粒子の成長はこの限局された狭い空間で行われるので大きな粒子にまで発達しないわけである。内鍍銀を示す線維が光顕的に褐染してみえるのはこのような理由に基くものであろう。コラーゲン溶液の再成線維がコンドロイチン硫酸の添加によつて、より明瞭な内鍍銀を示すことも、この物質が線維の横紋暗部でその内部構造の形成に関与すると考えれば理解しやすい。

以上を要するに、鍍銀上外鍍銀を示す線維では基質は比較的少量に線維の表面に存在し、内鍍銀を示す線維では基質は線維の横紋暗部に濃縮して存し、恐らくはその内部構造と結合していると思われる。基質が線維の内部構造に関与するか否かは線維の構造や病理を理解する上に非常に重要な問題である。これを確定するには更に多くの実験が必要ではあるが、線維の安定性の保持や線維の形成には多糖類の存在が必要であることを暗示する研究報告^{5) 27) 60)}は上述の考え方に一つの支持を与える。

3. 細網線維と弾力線維；及び 膠原線維とこれら線維の相互関係

細網線維の電顕的研究の第一の問題は試料として細網線維を純粋に取出すことが容易ではない点にある。われわれが用いたネコの脾からの標本では、濃厚な基質の内に包埋された細網線維が、まだ完全に破壊されなかつた細胞のまわりに網状の配列をつくつており、これを細網線維とみなして差支えないと思われる。細網線維の細網線維の形態は従来の報告^{23) 35) 37) 49)}の所見と一致する。膠原線維のそれと異なる点は、幅が狭く、横紋周期が比較的短く、線維の周囲に基質が多く、且つ鍍銀上いわゆる外鍍銀の状態を示すことである。これらの点は幼若膠原線維の形態と一致する。電顕的形態及び X-線廻折、化学的分析の結果³⁵⁾を総合して、細網線維の細網線維は膠原線維と同一種類の線維と思われる。

弾力線維に関する従来の電顕的研究では、弾力線維は多量の等質性の基質とそれに包埋された細網線維からなることは一般に認められている^{2) 8) 21) 36) 53)}。しかし、弾力線維の細網線維の横紋構造の有無については意見が分れる。GROSS¹⁶⁾は以前弾力線維は直径 70 Å の螺旋状をなす細網線維からなっていることを報告したが、GROSS¹⁷⁾自身及び FRANCHI¹⁰⁾等によつてこ

れは弾力線維と関係のない挾雑物であることが確認された。しかし、現在の更に吟味された実験条件でもなお弾力線維の細網線維には横紋がないという意見が多い^{21) 22) 36)}。これに対して、DETTMER⁸⁾、SCHWARZ⁵³⁾等は弾力線維は膠原線維と同様な横紋構造をもつ細網線維からなると述べている。われわれの所見は彼等の所見に一致する。この際常に問題になるのは膠原線維を弾力線維と誤認しているのではないかという疑いである。しかし、われわれは既述の如く試料の作製に必要な注意を払い、又細網線維の配列や基質の状態は膠原線維におけるそれとは区別される像を得ているので、ここで観察された線維は弾力線維と見做してよいと思われる。弾力線維の細網線維は膠原線維に比し幅が狭く、稀れではあるが短周期性横紋を有するものがあり、しばしば尖つた先端が認められ、鍍銀上は外鍍銀の状態を示す点は、膠原線維の未熟形に一致する所見である。弾力線維が示す弾性がどのような構造上の特性に基くかは未だ断定されない。細網線維の分子がちじんだ状態にあるとも考えられるが、電顕像が膠原線維と類似の形態を示す点から、細網線維の分子構造が弾性の殆んどない膠原線維と異なっているとは考え難いのではなからうか。むしろ、上述の如き短い細網線維が互にもつれ合つて基質に包まれているという構造が弾性を与える一つの要因ではないかと想像される。

以上観察された膠原一、細網一、弾力線維はわれわれの実験範囲では、電顕的に細網線維と基質からなり、細網線維はいずれも共通の横紋構造を示すコラーゲン型であつた。元来これらの線維の形態学的概念は主として光顕的な染色性によつて定義されている。膠原線維と細網線維にみられる光顕的な鍍銀上の差異は、電顕的に前者は内鍍銀を、後者は外鍍銀を示すことによるものであろう。この電顕的鍍銀効果の差異は基質の在り方によるものであることは前項で述べた通りである。又、弾力線維のレゾルチンフクシンによる染色性も基質の存在に基くものであるといわれている⁵³⁾。KRAMER 等³⁵⁾の細網線維の化学的分析の結果によれば、細網線維の基質は分子状のコラーゲンと多糖類からなっていると思われる。弾力線維では、HALL 等²¹⁾によれば、線状に並んだ球状蛋白質 (proelastin) の分子が、多糖類と proelastin が結合した "elastomucin" ともいふべき基質で包まれていると推定される。即ち、細網線維、弾力線維の基質は多糖類と、細網線維を構成する蛋白質と同一種類の蛋白質との結合した物

質であると考えられる。一方、線維を包む基質の比較的少ない膠原線維では、既述の如く細線維の内部構造に多糖類が結合していることが暗示される。つまり、極言すれば、膠原線維は基質が極端に緻密になつた型であり、この緻密化が行われないうまに残つてゐるのが細網線維の型であるとも考えられる。HALL 等の proelastin の化学的性質がもつと明らかにならなければ、弾力線維を構成する蛋白質がコラーゲンと同一で

あるか否かを断定することは差控えねばならないが、少なくともわれわれが電顕的に観察した限りは、弾力線維の細線維は膠原線維のそれと構造上大差はないのではないかと思われる。以上の事柄を総合して考えてみると、結合織の3種の線維が示す光顕的な形態は結局細線維の構成成分そのものにあるのではなく、むしろ基質の量的、質的な差異、或いは細線維と基質との結合状態の差異によるものと考えられる。

総 括

(1) 光学顕微鏡で認め得る最小の膠原線維は電顕的には数本の細線維からなる。細線維は膠原線維の一つの構造単位をつくり、各種脊椎動物疎性結合織では、その幅は大体 1000 Å 前後で一定している。

(2) 細線維は tactoid の集合からなつてゐると考えられる。tactoid 間の結合が不完全な状態におかれると、それは線維の螺旋構造としてあらわれる。

(3) tactoid は更に低次の構造単位よりなる。膠原線維を酢酸で膨潤溶解せしめた場合には、直径約 100 Å、長さ平均約 640 Å のフィラメント (protonfibril) にまで分れる。更にこのフィラメントは直径 60~100 Å (平均の 80 Å) 微粒子の連鎖からなるようにみえる。

(4) 膠原線維の横紋周期の長さは線維の成熟と共に増大し、*in vitro* の再成線維では、その成熟の程度に従つて周期の長さは 120 Å から 640 Å まで変動する。一定量以上の多糖類の存在により *in vitro* で 2000~3000 Å の長周期性横紋が形成される。

(5) *in vitro* の線維の再成にはコラーゲン溶液に加える塩類の濃度、種類及び溶液の pH が重要な役割を

もつてゐるが、その作用機序はなお不明である。

(6) GOMORI 鍍銀法によると幼若動物の膠原線維、細網線維では銀粒子は線維の表面に不規則に沈着する(“外鍍銀”)に対して、成熟動物の膠原線維では銀粒子は線維の横紋暗部に一致して周期的に沈着する(“内鍍銀”)。このような差異は、前者では基質が比較的線維の表面に多量に存し、後者では基質が線維の横紋暗部に濃縮して一恐らくはその内部構造と結合して存在するためと推定される。

(7) 未熟な膠原線維の形態学的特徴は、(i) 線維の幅が狭く、(ii) 横紋周期が短く、(iii) 線維の尖つた先端が認められ、(v) 鍍銀上外鍍銀の状態を示すことである。

(8) 膠原線維、細網線維、弾力線維はいずれもコラーゲン型の横紋を示す細線維と基質からなる。これら結合織線維が示す光顕的性質は細線維自体よりむしろ、基質の量的、質的な差異或いは細線維と基質との結合状態の差異によるものと思われる。

文 献

- 1) Bahr, G. F. : Über die Feinstruktur elastischer Fasern. Z. Anat. 116, 134—138, 1951.
- 2) Bahr, G. F. : Ergebnisse elektronenmikroskopischer Untersuchungen des kollagenen und elastischen Gewebes. Arch. f. Dermat. u. Syphilis. 193, 518—526, 1951.
- 3) Banfield, W. G. : Occurrence of tapered collagen fibrils from human sources with observations on mesenchymal neoplasms. Proc. Soc. exp. Biol. & Med. 81, 658—660, 1952.
- 4) Bear, R. S. : The structure of collagen

- fibrils. Adv. protein chem. 7, 69—160, 1952.
- 5) Bowes, J. H., Elliott, R. G. & Moss, J. A. : Some difference in the composition of collagen and extracted collagens and their relation to fiber formation and dispersion. Nature and Structure of Collagen. Edited by J. T. Randall. 199—207, London, 1953.
- 6) Day, T. D. & Eaves, G. : Electron microscope observations of the ground substance of interstitial connective tissue. Biochem. et Biophys. Acta, 10, 203—209, 1953.

- 7) **Dettmer, N., Nekel, I. u. Ruska, H.** : Elektronenmikroskopische Befunde an versilberten Kollagenen Fibrillen. *Z. Mikrosk.*, 60, 290—297, 1951.
- 8) **Dettmer, N.** : Elektronenmikroskopische Untersuchung der elastischen Fasern in Flugelband der Taube und ihre Beziehung zum üblichen Bindegewebe. *Z. Zellforsch.* 37, 89—100, 1952.
- 9) **Dettmer, N.** : Entwicklung und Probleme elektronenmikroskopischer Bindegewebsforschung. *Ärztli. Wochenschr.* 10, 709—713, 1955.
- 10) **Franchi, C. M. & de Robertis, E.** : Electron microscopic observation on elastic fibers. *Proc. Soc. exp. Biol. & Med.*, 76, 515—518, 1951.
- 11) **Fujiwara, T. & Chiuma, E.** : Studies on the fibrils, reprecipitated and reconstituted from dissolved collagen, with electron microscope. *J. electron-microsc.* 1, 57—59, 1953.
- 12) **Gale, J. C.** : Electron microscope Studies of collagen from normal and diseased tissues. *Am. J. Path.*, 27, 455—466, 1951.
- 13) **Goto, S.** : Elektronenmikroskopische Untersuchung der regenerierende Achillessehne der Maus. *日組記録*, 6, 183—187, 1954.
- 14) **Grassmann, w., Hofmann, U. u. Nemetschek, Th.** : Die Querstreifung von Kollagenfibrillen. *Naturwiss.* 39, 215—216, 1952.
- 15) **Gross, J. & Schmitt, F. O.** : The structure of human skin collagen as studied with electron microscope. *J. exp. Med.*, 88, 555—567, 1948.
- 16) **Gross, J.** : The structure of elastic tissue as studied with the electron microscope. *J. exp. Med.*, 89, 699—708, 1949.
- 17) **Gross, J.** : Fiber formation in trypsinogen solutions : an electron optical study. *Proc. Soc. exp. Biol. & Med.*, 78, 241—244, 1951.
- 18) **Gross, J., Highberger, J. H. & Schmitt, F. O.** : Some factors involved in the fibrogenesis of collagen in vitro. *Proc. Soc. exp. Biol. & Med.*, 80, 462—464, 1952.
- 19) **Gross, J., Highberger, J. H., & Schmitt, F. O.** : Collagen structures considered as states of aggregation of a kinetic unit. The tropocollagen particle. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 40, 679—688, 1954.
- 20) **Gross, J.** : The behavior of collagen units as a model in morphogenesis. *J. biophys. & biochem. Cytol. Suppl.*, 2, 261—274, 1956.
- 21) **Hall, D. A., Reed, R. & Tunbridge, R. E.** : Structure of elastic tissue. *Nature*, 170, 264—266, 1952.
- 22) **Hall, D. A., Reed, R. & Tunbridge, R. E.** : Electron microscope studies of elastic tissue. *Exp. Cell Res.*, 8, 35—48, 1955.
- 23) **von Herrath, E. u. Dettmer, N.** : Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Gitterfasern. *Z. mikrosk.*, 60, 282—289, 1951.
- 24) **Highberger, J. H., Gross, J. & Schmitt, F. O.** : The interaction of mucoprotein with soluble collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 37, 286—291, 1951.
- 25) **Jackson, S. F.** : Fibrogenesis in vivo and in vitro. *Nature and Structure of Collagen*. Edited by J. T. Randall. 141—151, London, 1953.
- 26) **Jackson, S. F. & Randall, J. T.** : The reconstitution of Collagen fibrils from solution. *Nature and Structure of Collagen*. Edited by J. T. Randall, 181—191, London, 1953.
- 27) **Jackson, D. S.** : Chondroitin sulphate as a factor in the stability of tendon. *Nature and Structure of Collagen*. Edited by J. T. Randall, 177—180, London, 1953.
- 28) **Kajikawa, K. & Sumita, Y.** : Electron microscopic studies on the connective tissue. Report I. The structure of the normal loose connective tissue fiber and its formation. *Acta path. jap.*, 3, 66—74, 1953.
- 29) **Kajikawa, K. & Sumita, Y.** : Electron microscopic studies on the connective tissue. Report II. The connective tissue fiber under various pathological conditions. *Acta path. jap.*, 3, 75—83, 1953.
- 30) **梶川敏一郎・佐田行夫・武田正孝** : 結合組織の電子顕微鏡的研究, 第4報, 基質の鍍銀染色に及ぼす影響について. *日病会誌*, 43 (総会号), 205—206, 1954.

- 31) **Kajikawa, K.** : Electron microscopic observations on reconstituted fibers from dissolved Collagen. *Acta path. jap.* 6, 37-49, 1956.
- 32) 梶川欽一郎・瀬戸成一 : 未発表.
- 33) **Keech, M. K.** : The effect of Collagenase and trypsin on Collagen. An electron microscopic study. *Anat. Rec.*, 119, 139-151, 1954.
- 34) **Kennedy, J. T.** : Tubular structure of Collagen fibrils. *Science*, 121, 673-674, 1955.
- 35) **Kramer, H. & Little, K.** : Nature of reticulin. Nature and structure of Collagen. Edited by J. T. Randall, 33-43, London, 1953.
- 36) **Lansing, A. I., Rosenthal, T. B., Alex, M. & Dempsy, E. W.** : The structure and chemical characterization of elastic fibers as revealed by elastase and by electron microscopy. *Anat. Rec.*, 114, 555-575, 1952.
- 37) **Little, K. & Kramer, H.** : Nature of reticulin. *Nature*, 170, 499-500, 1952.
- 38) **Mercer, F. H.** : The biosynthesis of fibrils. *Sci. month.* LXXV. 280-287, 1952.
- 39) 野田春彦 : コラーゲン, 蛋白質化学, 4巻, 水島・赤堀編, 65-152, 東京, 1956.
- 40) **Pahlke, G.** : Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Interzellulärschicht des menschlichen Sehngewebes. *Z. Zellforsch.*, 39, 421-430, 1954.
- 41) **Porter, K. R. & Vanamee, P.** : Observations on the formation of connective tissue fibers. *Proc. Soc. exp. Biol. & Med.*, 71, 513-516, 1949.
- 42) **Porter, K. R.** : Repair processes in connective tissues. *Connective tissue II*nd Conf., 126-157, New York, 1951.
- 43) **Propst, A. u. Ratzenhofer, M.** : Zum Verhalten der Sehnenfibrillen während der Entwicklung, im höchsten Alter und unter pathologischen Bedingungen ; über die Fibrillen im mesenchymalen Hyalin. *Z. wiss. Mikrosk.*, 62, 183-190, 1955.
- 44) **Randall, J. T. et al.** : Aspects of collagen structure. *Nature*, 169, 1029-1033, 1952.
- 45) **Randall, J. T. et al.** : Some physical and chemical properties of extracted skin collagen. *Nature and Structure of Collagen*. Edited by J. T. Randall, 213-222, London, 1953.
- 46) **Randall, J. T.** : Physical and chemical problems of fiber formation and structure. *Nature and Structure of Collagen*. Edited by J. T. Randall, 232-239, London, 1953.
- 47) **Reed, R., Wood, M. J. & Keech, M. K.** : Helical nature of the collagen fibril. *Nature*, 177, 697-671, 1956.
- 48) **Rhodin, J. & Dalhamn, T.** : Electron microscopy of collagen and elastin in lamina propria of the tracheal mucosa of rat. *Exp. Cell Res.*, 9, 371-375, 1955.
- 49) **Robb-Smith, A. H. T.** : The nature of reticulin. *Connective tissue III*rd Conf. 92-116, New York, 1952.
- 50) **Robertson, W. van B. & Schwartz, B.** : Ascorbic acid and the formation of collagen. *J. Biol. Chem.*, 201, 689-696, 1953.
- 51) **Schmitt, F. O., Gross, J. & Highberger, J. H.** : A new particle type in certain connective tissue extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 39, 459-470, 1953.
- 52) **Schwarz, W.** : Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Differenzierung der Cornea- und Sklerafibrillen des Menschen. *Z. Zellforsch.*, 38, 78-86, 1953.
- 53) **Schwarz, W. u. Dettmer, N.** : Elektronenmikroskopische Untersuchung des elastischen Gewebes in der Media der menschlichen Aorta. *Virchow's Arch.*, 323, 243-268, 1953.
- 54) **Seki, M.** : Molekularhistologische Studien über die Elementar- und Mikrofibrillen des Kollagens. II. Nähere Beobachtung über die periodische Querzonierung der kollagenen Mikrofibrillen. *日組記録*, 7, 5-17, 1954.
- 55) 瀬戸成一・梶川欽一郎 : 結合織の電子顕微鏡的研究, 第7報, 膠原線維の“電子染色”について. *日病会誌*, 45巻, 3号, 414-415, 1956.
- 56) **Vanamee, P. & Porter, K. R.** : Observations with the electron microscope on the solution and reconstitution of collagen. *J. exp. Med.*, 94, 255-266, 1951.
- 57) **Voigt,**

G. E. : Gewebseigene Keime (Primärkeime) bei histologischen Versilberungen. Z. wiss. Mikrosk., 61, 1—8, 1952. 58) **Voigt,**

G. E. : Kolloid und histologische Versilberung. Zbl. allg. Path. u. path. Anat., 89, 457—465, 1952. 59) **Wassermann, F.** :

Electron microscopic study of the submicroscopic network of fibrils as a component of connective tissue. Anat. Rec., 111, 145—169, 1951. 60) **Wassermann, F. &**

Lindenbaum, A. : Experiments concerning the effect of enzymes on the reconstitution of collagenous fibrils in vitro. J. biophys. & biochem. Cytol. Suppl. 2, 299—303, 1956.

61) **Wolbach, S. B. & Howe, P. R.** : Intercellular substances in experimental scurbutus. Arch. Path., 1, 1—24, 1926.

62) **Wyckoff, R. W. G.** : The fine structure of connective tissues. Connective tissue IIIrd Conf. 38—91, New York, 1952. 63)

Zeiger, K. : Die Methoden der histologischen Technik von Standpunkt der Kolloidlehre. Medizinische Kolloidlehre. Lichtwitz-Liesegang-Spiro, 1002—1005, Dresden u. Leipzig. 1934.

64) **Zeiger, K.** : Metallimprägnationen. Physikochemische Grundlagen der Histologischen Methodik, 113—134, Dresden u. Leipzig, 1938.

附 図 説 明

Fig. 1. モルモット皮下疎性結合織. 細線維間に, 基質に包まれた微細な線維の網工が認められる. Cr-Shadowing. ($\times 21,000$).

Fig. 2. モルモット皮下疎性結合織. 基質内の微細な線維様物質, 横紋を有する tactoid (\uparrow) が認められる. 右上に細線維がみえる. Cr-Shadowing. ($\times 20,000$).

Fig. 3. ウサギ皮下疎性結合織. 細線維の横紋凸部は微細な 3~4 本の線条からなっている. Cr-Shadowing. ($\times 25,000$, 右下; $\times 50,000$).

Fig. 4. モルモット皮下疎性結合織. 細線維の横紋凸部に線維軸に直交するフィラメントが附着 (\uparrow), フィラメントのあるものは横紋凸部を橋渡している (Br). Cr-Shadowing. ($\times 24,000$).

Fig. 5, Fig. 6. ラット尾腱. 細線維が軸方向に伸展された場合横紋凸部が伸び (Fig. 5), 又, 線維はこの部で断裂する (Fig. 6). Cr-Shadowing. ($\times 21,000$).

Fig. 7, Fig. 8. Fig. 7 は 1% トリプシンで処理されたウサギ皮下疎性結合織. Fig. 8. はコラーゲン溶液に 0.17 MNaCl 添加 1 時間後に再成された線維 (オスミウム酸蒸気固定). いずれも線維の軸方向に走る数本のフィラメントが認められる (\uparrow). Cr-Shadowing. (Fig. 7; $\times 39,000$, Fig. 8; $\times 25,000$).

Fig. 9. Homogenizer で細挫されたラット尾腱. 様々な大きさのフィラメントが認められる. Cr-Shadowing. ($\times 20,400$).

Fig. 10. Fig. 11. 0.01% 酢酸浸漬 10 分後のラット尾腱. 膨潤した線維の横紋は次第に消失して, 線維軸方向に走るフィラメントがあらわれる. 膨潤線維にはくびれを生ずる (Fig. 10). Cr-Shadowing. (Fig. 10; $\times 15,000$, Fig. 11; $\times 27,000$).

Fig. 12. コラーゲン溶液の 1,000 倍稀釈液. 空気乾燥, 短いフィラメントが散在, フィラメントは互に凝集するものが多い. Cr-Shadowing. ($\times 60,000$).

Fig. 13. コゲラン溶液の 10,000 倍稀釈液. 空気乾燥, 微細なフィラメントが網状に連っている. Cr-Shadowing. ($\times 120,000$).

Fig. 14. コラーゲン溶液の 20,000 倍稀釈液. 空気乾燥, 様々な長さのフィラメントが散在性に認められる. Cr-Shadowing. ($\times 102,000$).

Fig. 15. コラーゲン溶液の 10,000 倍稀釈液. オスミウム酸蒸気固定, 多数の微粒子の間に短いフィラ

メント (F) が散在, 微粒子は所々珠数状に連る (B). Cr-Shadowing. ($\times 200,000$).

Fig. 16. コラーゲン溶液に 0.17 MNaCl 添加後 5 分, オスミウム酸蒸気固定. 多数のフィラメントが散在, 所々粒子状の分節が認められる (\uparrow). Cr-Shadowing. ($\times 75,000$).

Fig. 17. コラーゲン溶液に 0.17 MNaCl 添加後 30 分, オスミウム酸蒸気固定. tactoid が形成され, 側面的結合によつて長さを増加する. Cr-Shadowing. ($\times 52,000$).

Fig. 18. コラーゲン溶液に 0.17 MNaCl 添加後 5 分, オスミウム酸蒸気固定. フィラメントが 2~3 本側面的に結合して微細な線維となる. フィラメントの分節は横に結合して短周期横紋を形成する (\uparrow) (一次短周期線維) Cr-Shadowing. ($\times 105,000$).

Fig. 19. コラーゲン溶液に 0.17 MNaCl 添加後 30 分, オスミウム酸蒸気固定. 短周期横紋 (二次短周期線維) (Ss) の凸部が 2 本ずつ結合して正周期横紋 (一次正周期線維) (Ns) が形成される. Cr-Shadowing. ($\times 50,000$).

Fig. 20. Fig. 21. コラーゲン溶液に 0.17 MNaCl 添加後 5 時間, 空気乾燥. 一次正周期線維の凹部に残つた細い凸部は, 二重環をなす横紋凸部と更に結合して新しい三重環の横紋凸部を形成する (Fig. 20. \uparrow). 完成した再成線維の横紋凸部は三重環からなり (二次正周期線維), 各線条は微粒子の連鎖からなるようにみえる (Fig. 21.). Cr-Shadowing. ($\times 60,000$).

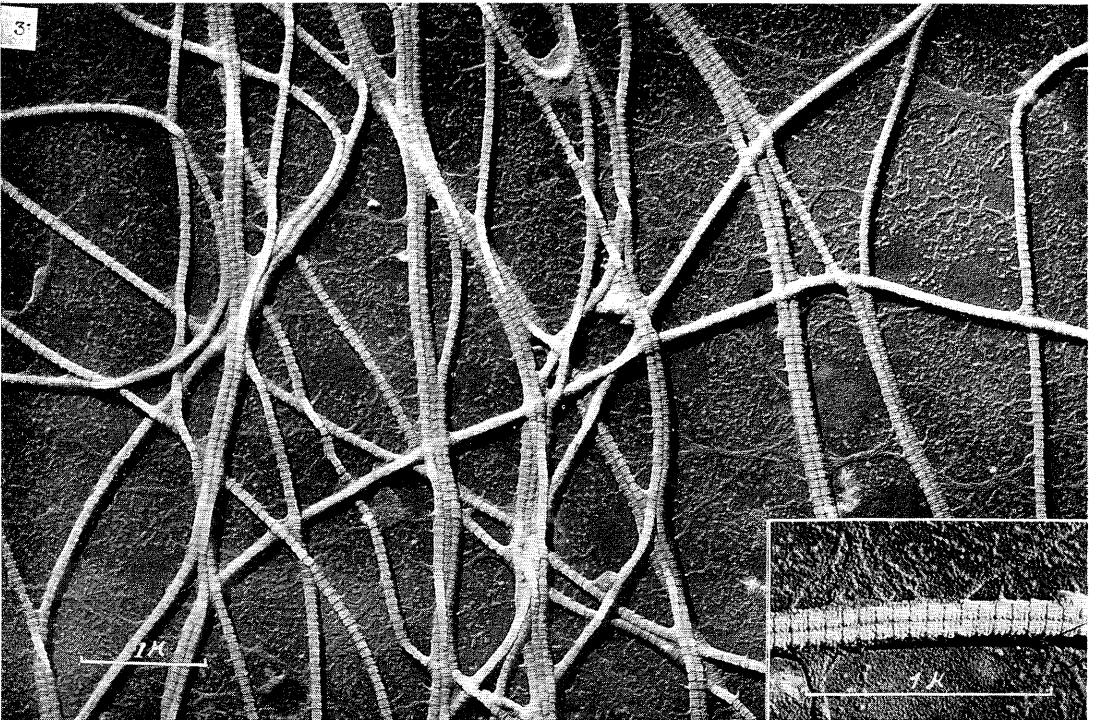
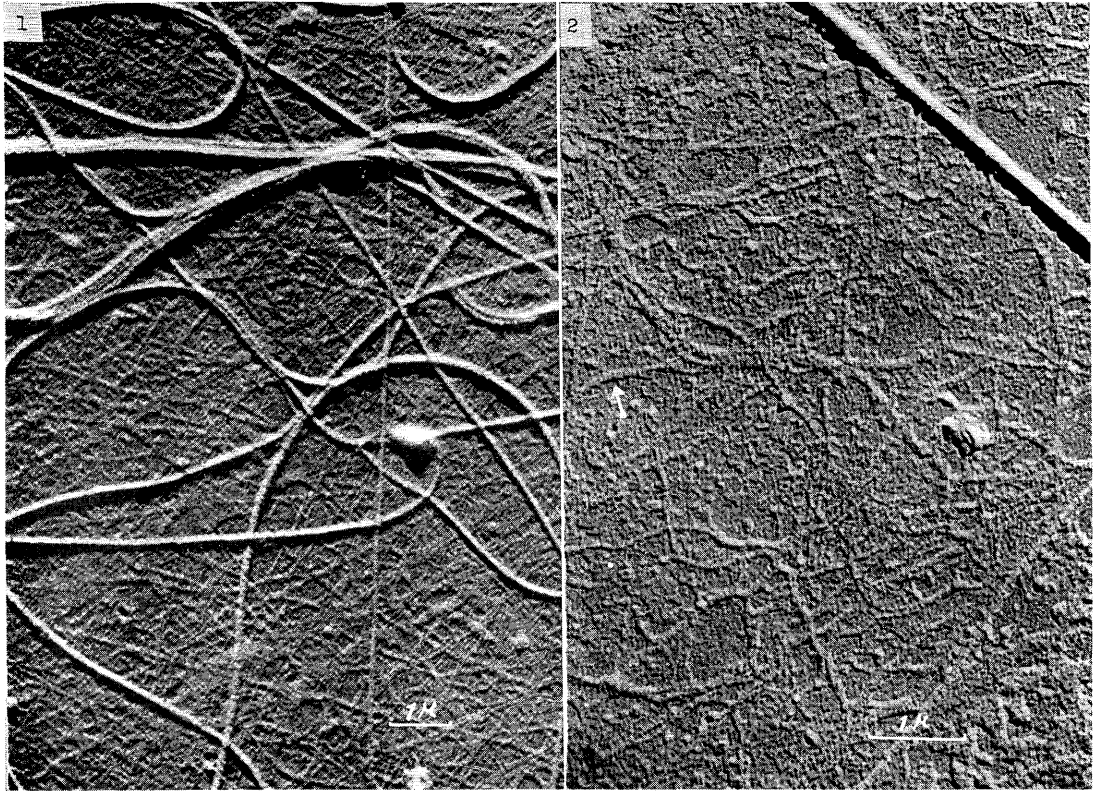
Fig. 22. コラーゲン溶液に 0.17 MNaCl 添加, 空気乾燥. 螺旋状構造を示す再成線維. Cr-Shadowing. ($\times 16,800$).

Fig. 23. コラーゲン溶液に 0.17 MNaCl 添加, 空気乾燥. 先端の尖つた数本の線維が結合, ゆるやかな螺旋構造を示す再成線維. このように線維間の結合が緊密でない場合には通常横紋は形成されない. Cr-Shadowing. ($\times 31,000$).

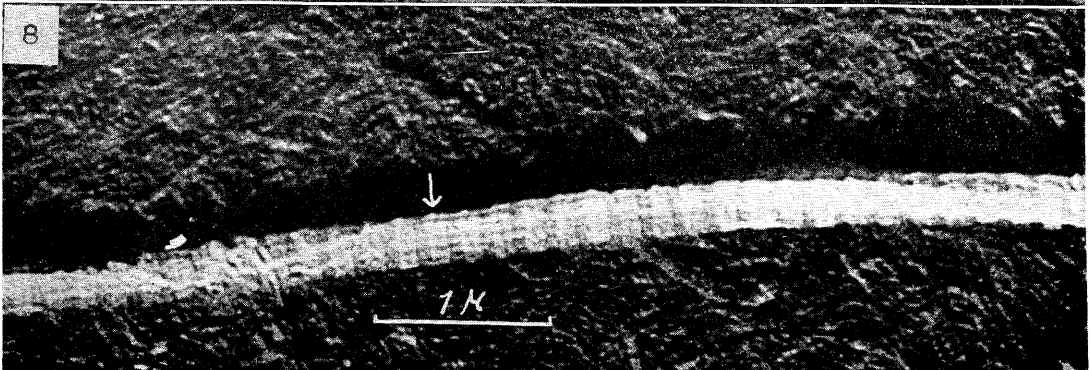
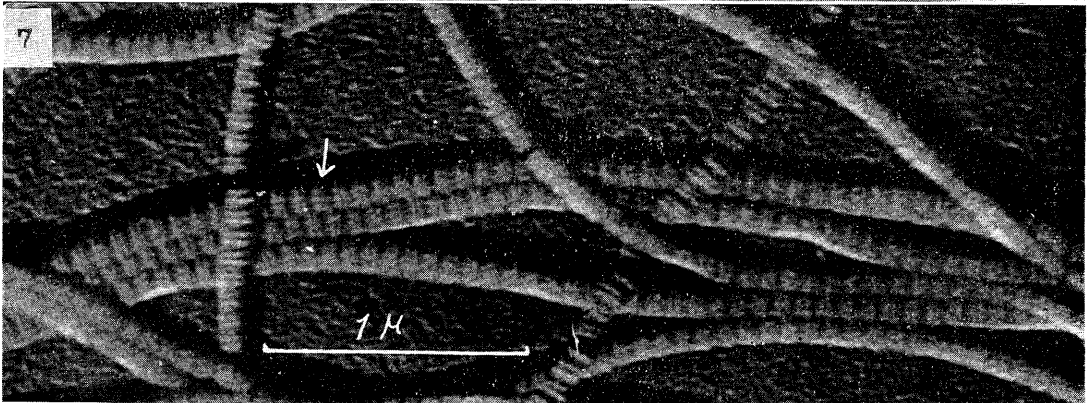
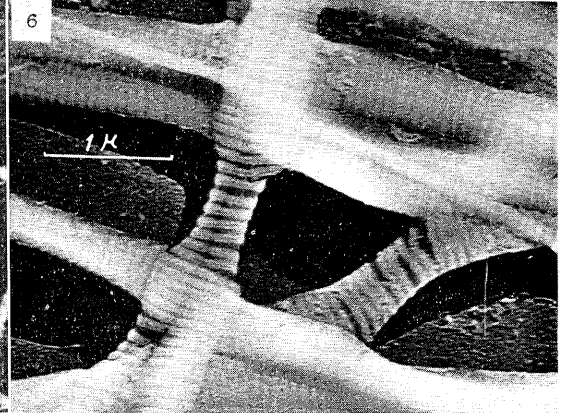
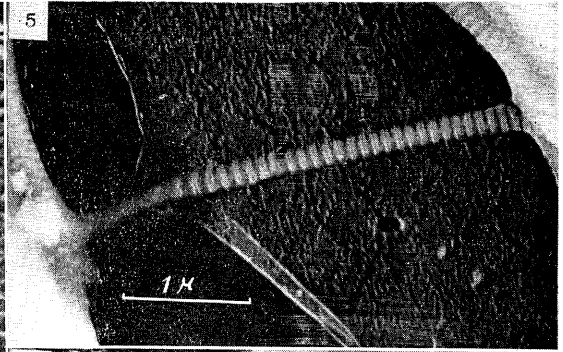
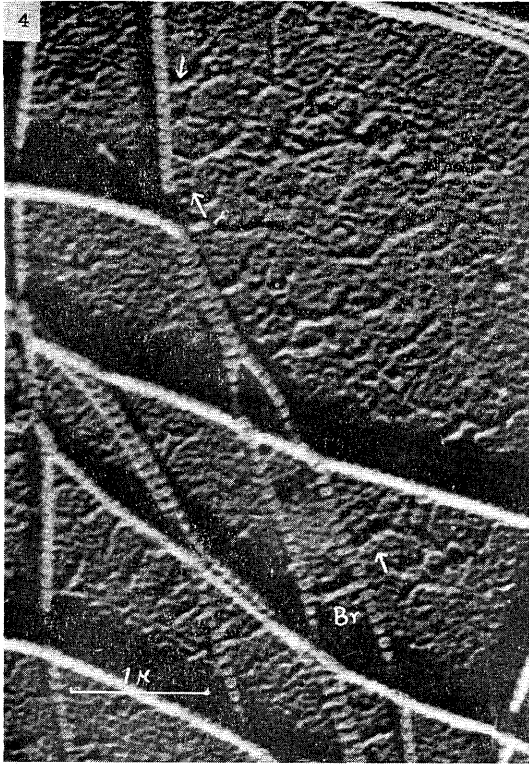
Fig. 24. コラーゲン溶液からの線維再成に及ぼす pH の影響. (A) pH 4.8, 線維の再成はない. (B) pH 5.8, 横紋のない細い線維が再成. (C) pH 6.8, 正周期線維が再成. Cr-Shadowing. ($\times 25,000$).

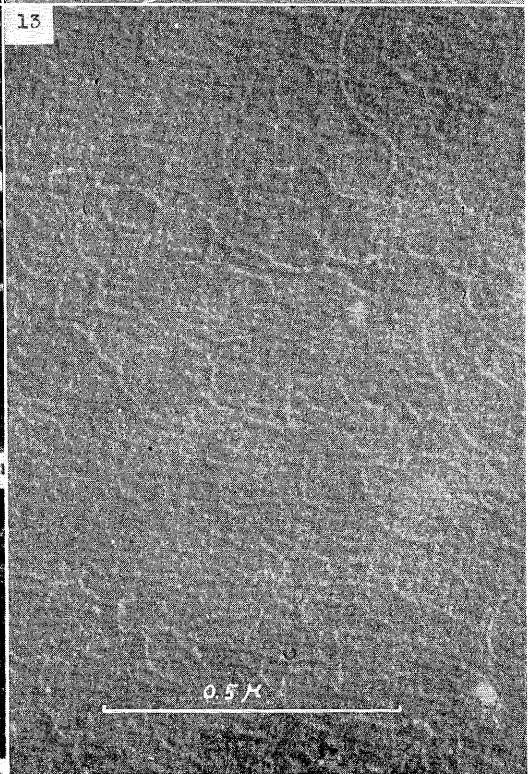
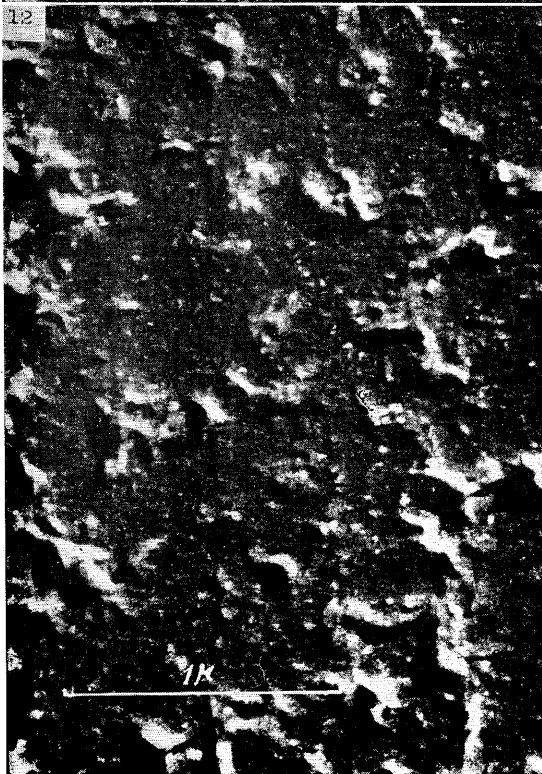
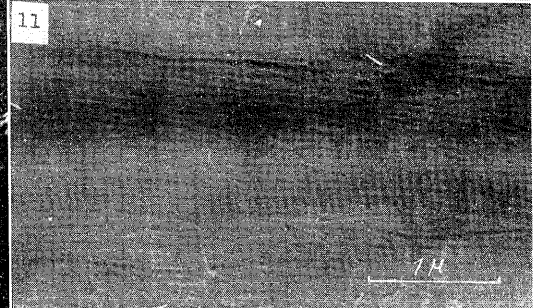
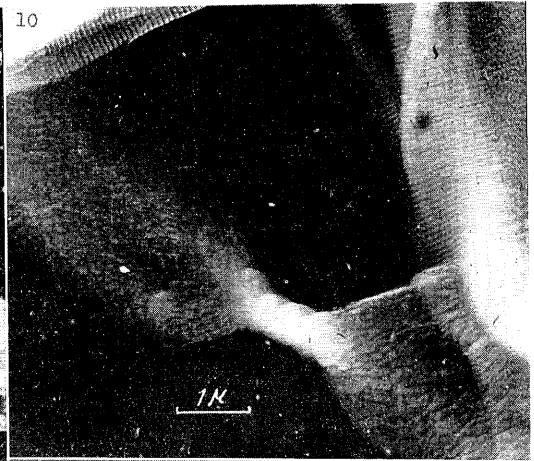
Fig. 25. コラーゲン溶液に 0.08 MNaCl 添加, 空気乾燥. 横紋のない線維が再成される. Cr-Shadowing. ($\times 18,000$).

梶川論文附図(1)

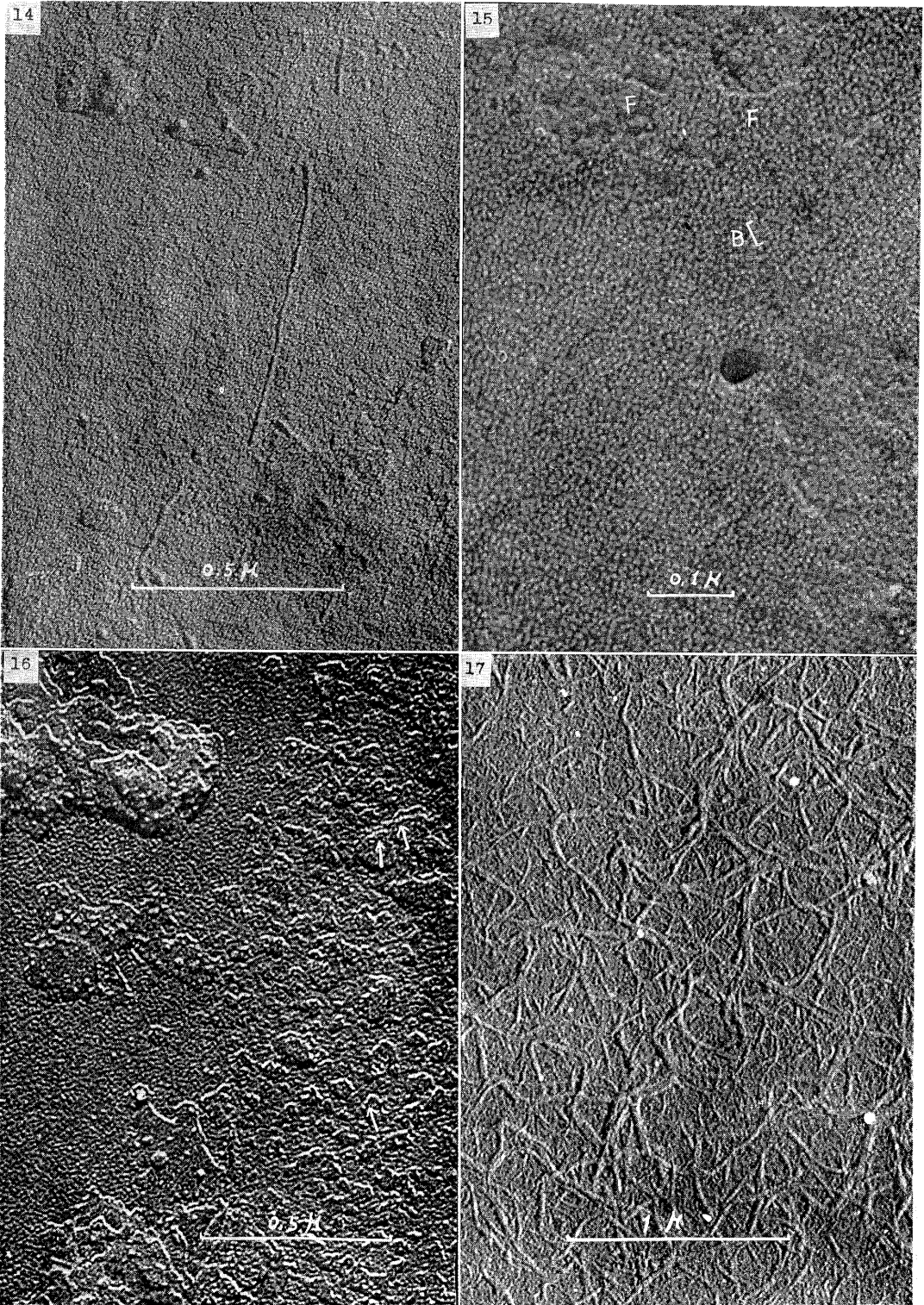


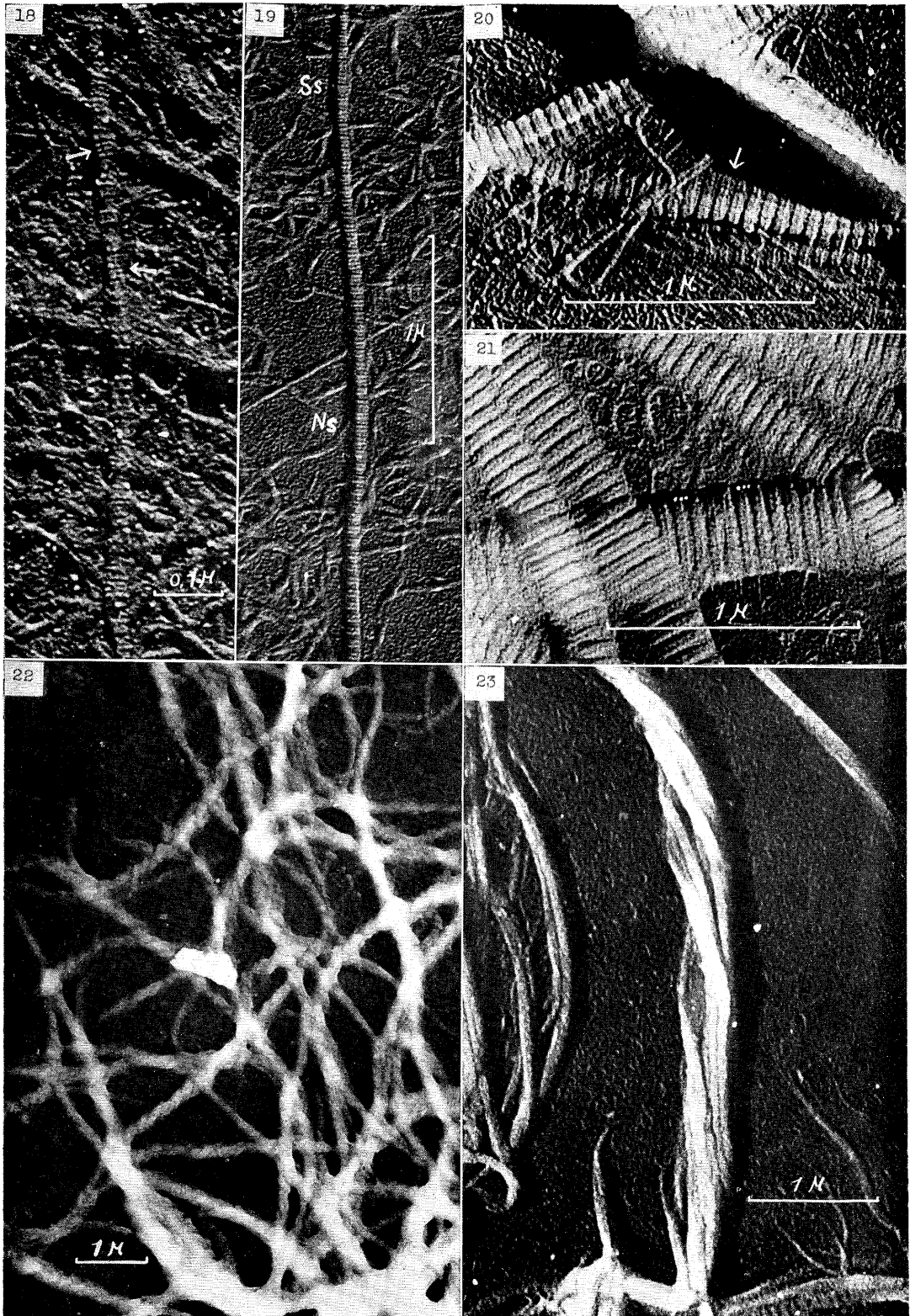
梶川論文附図(2)



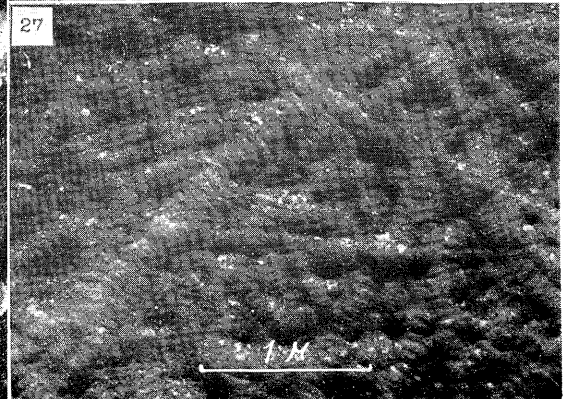
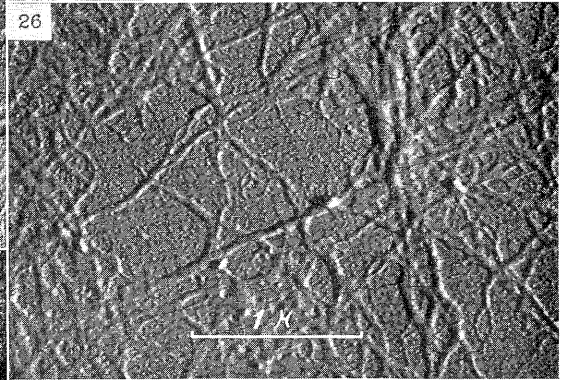
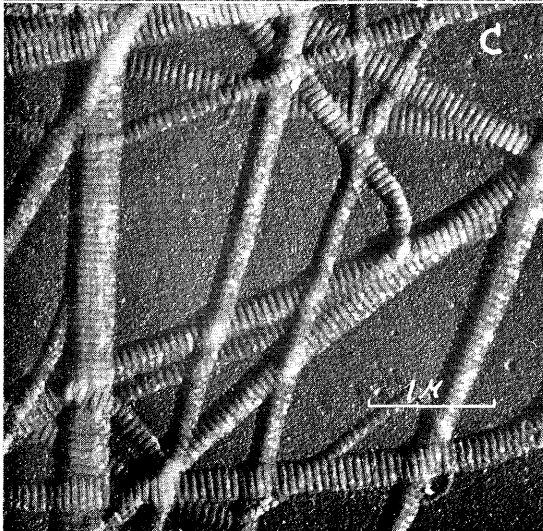
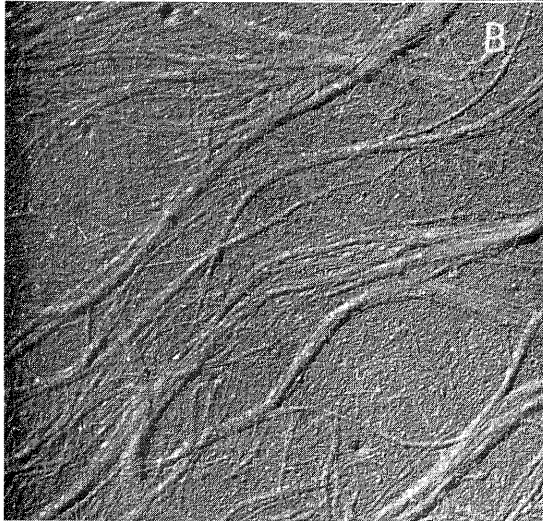
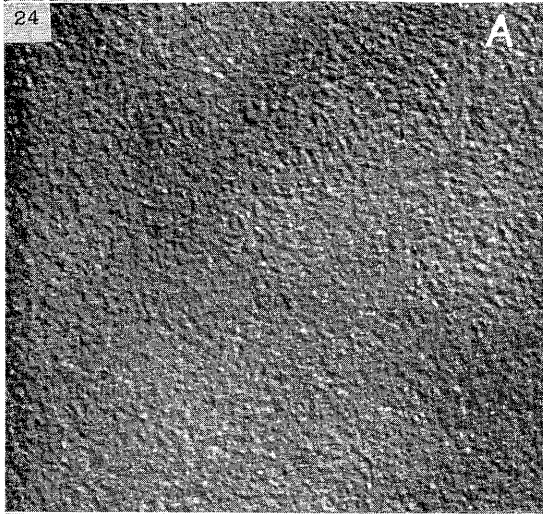


梶川論文附図(4)

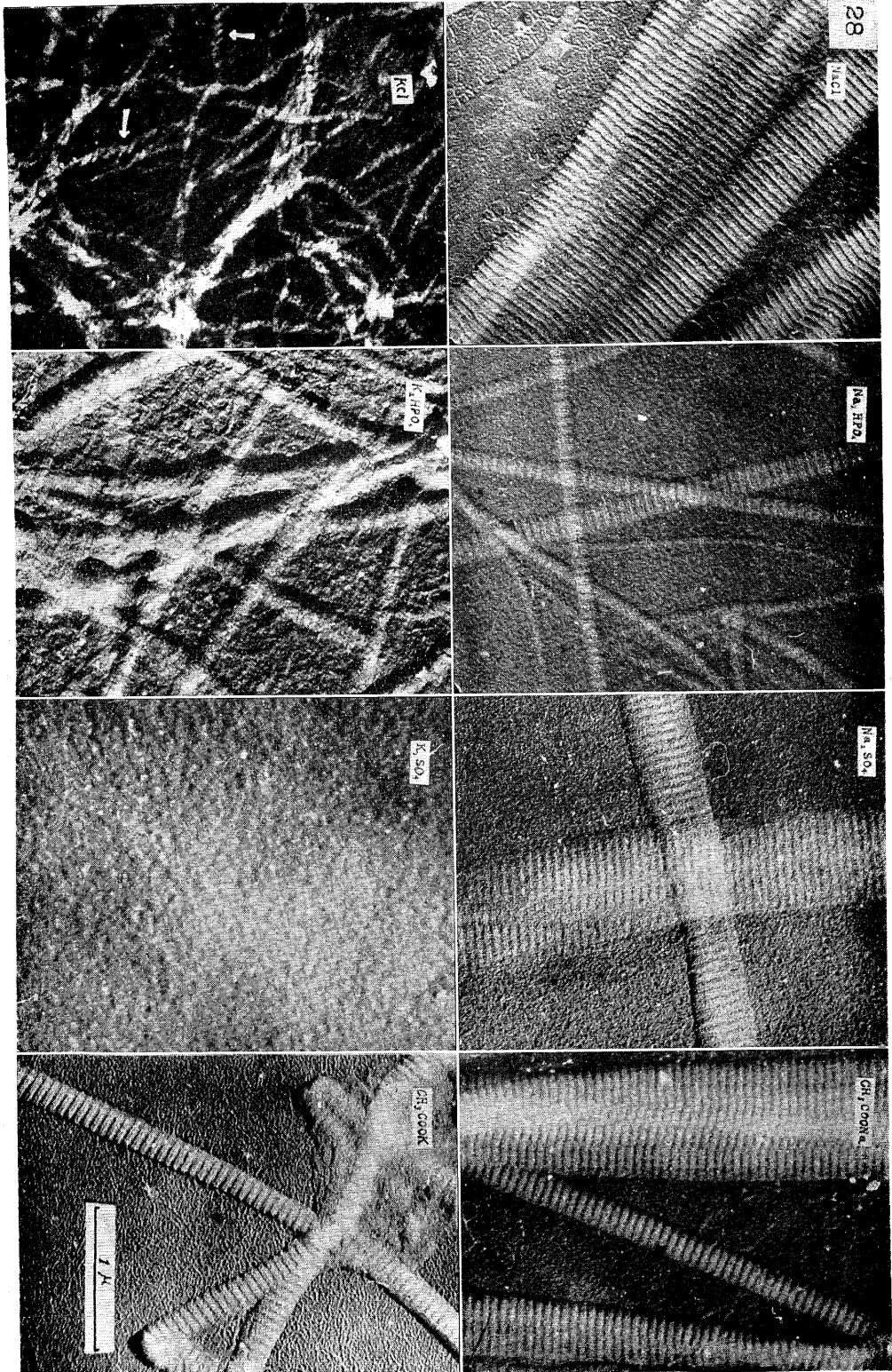


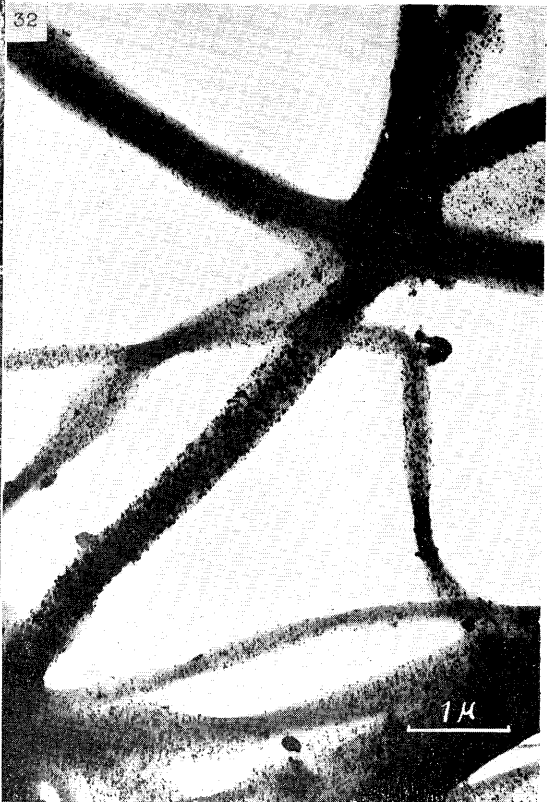
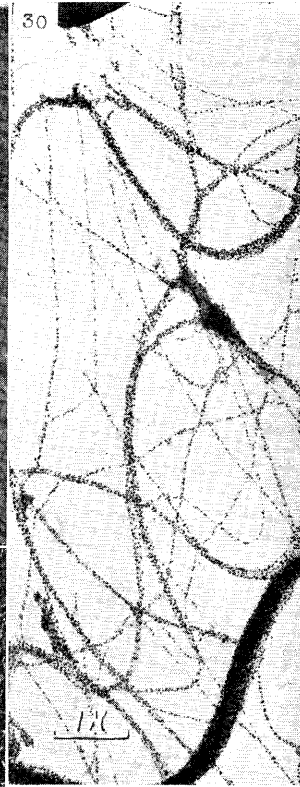
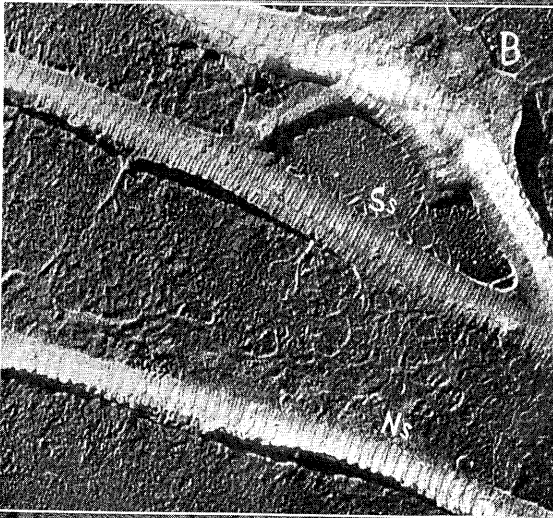
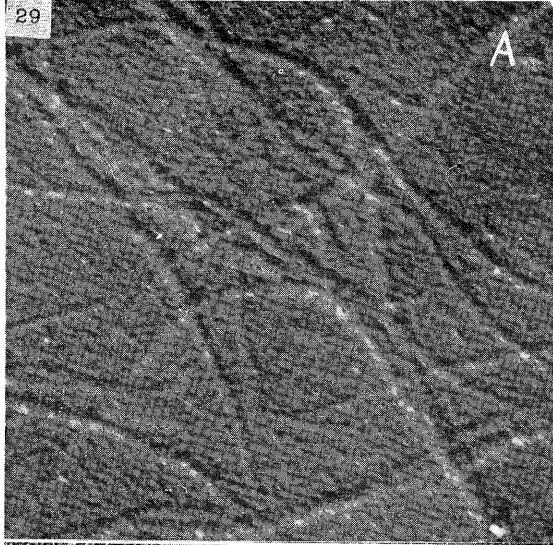


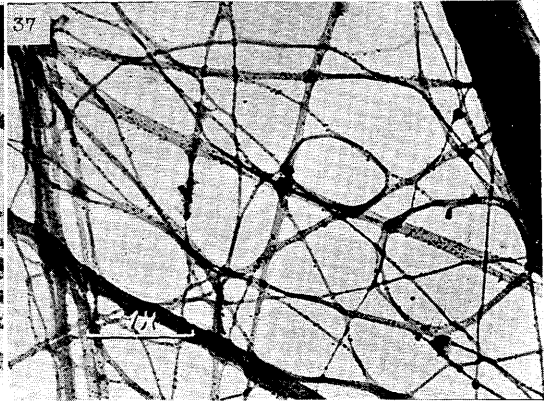
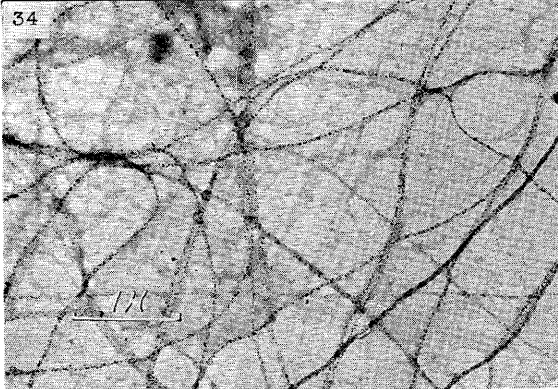
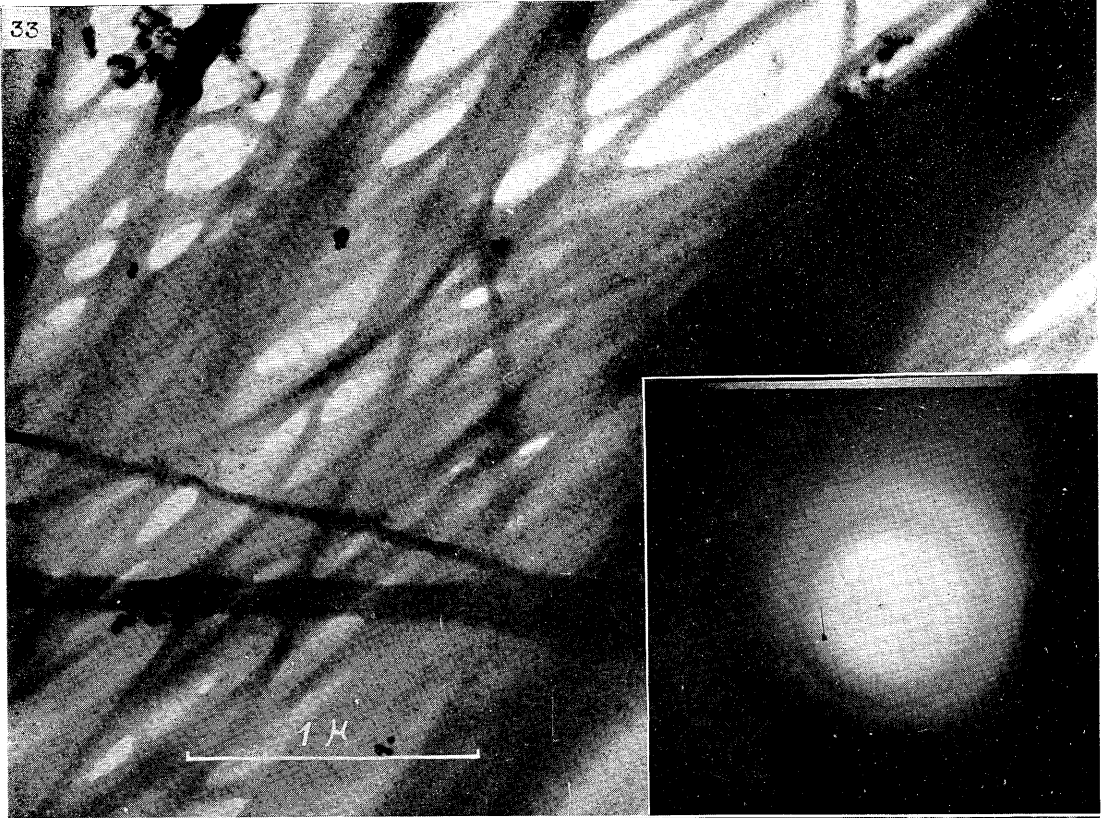
梶川論文附図(6)

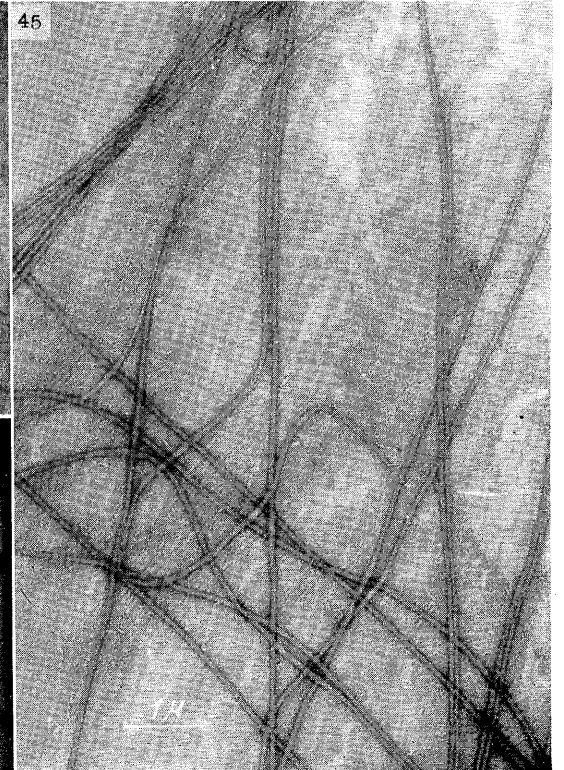
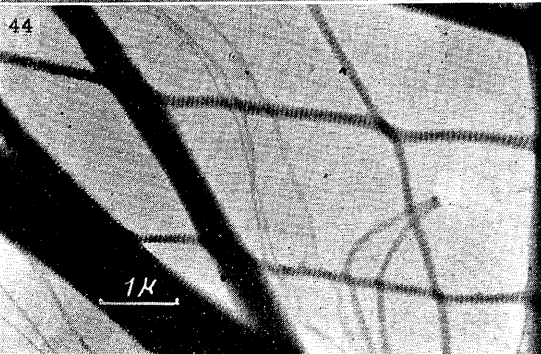
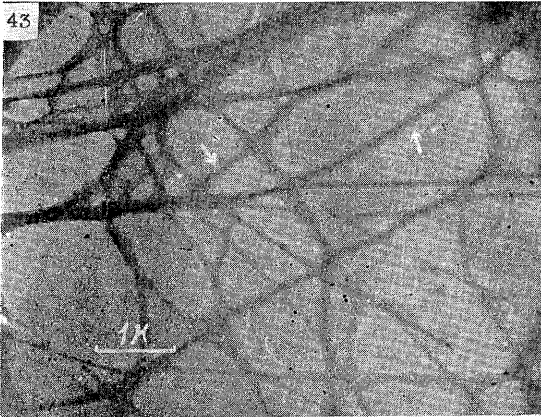
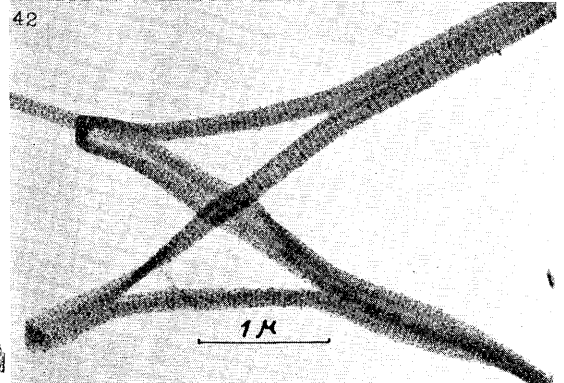
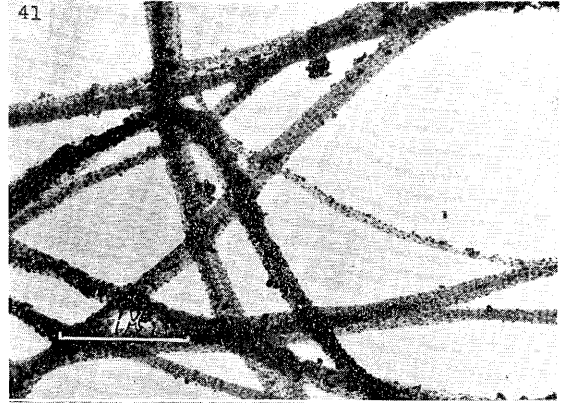
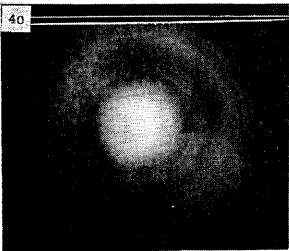
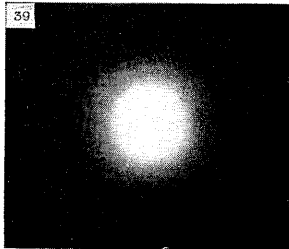
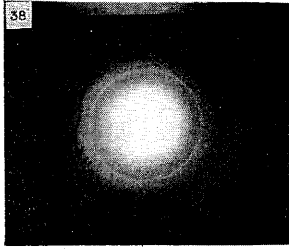


梶川論文附図(7)

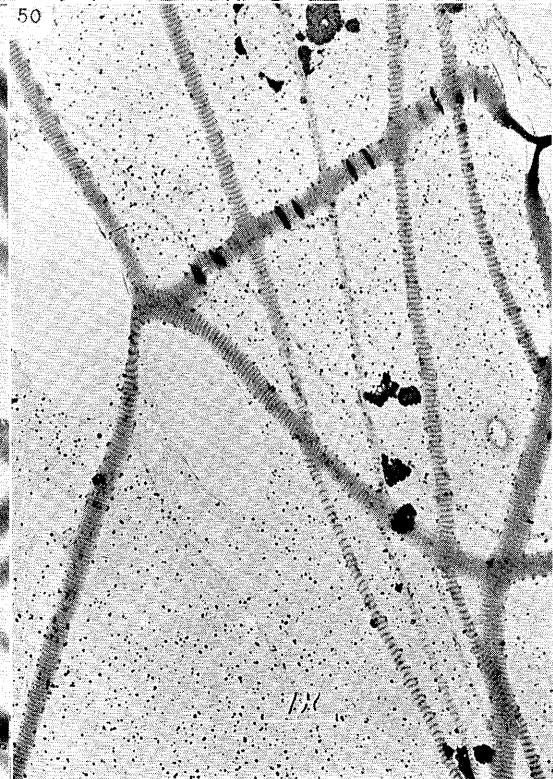
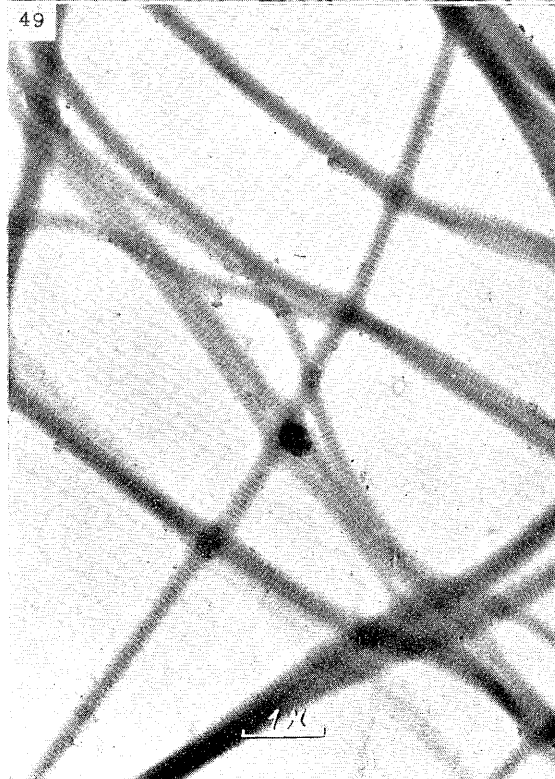
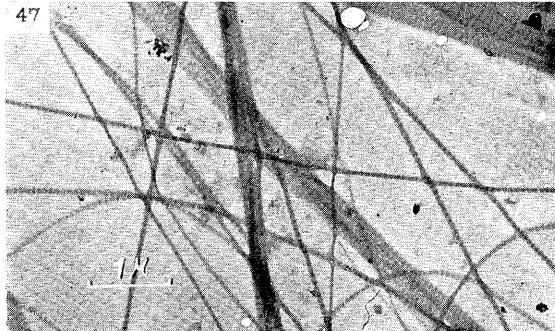
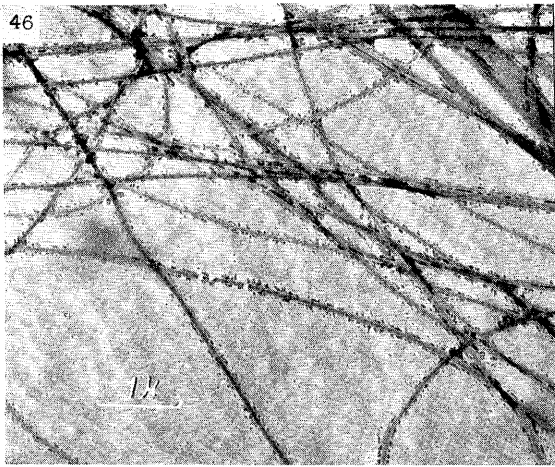








梶川論文附図(11)



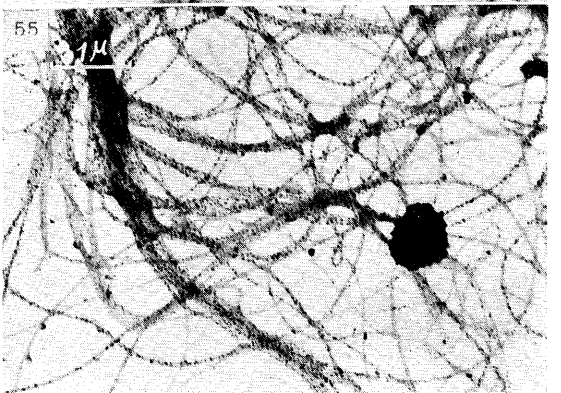
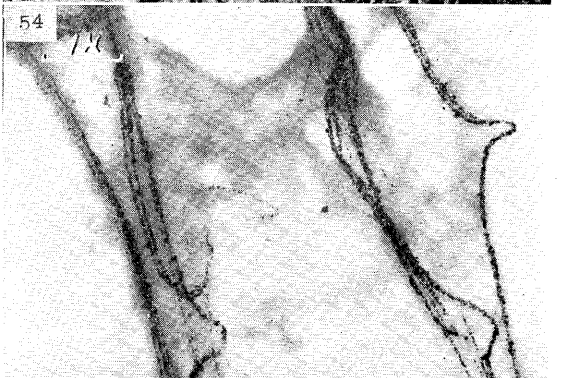
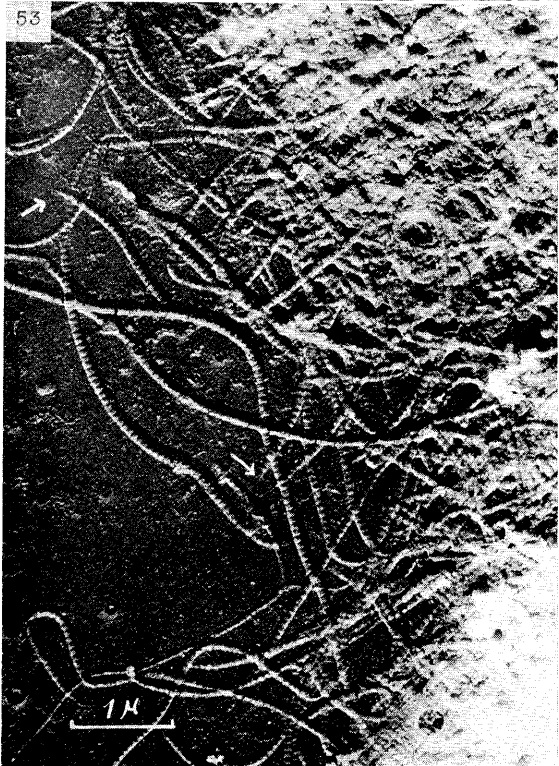
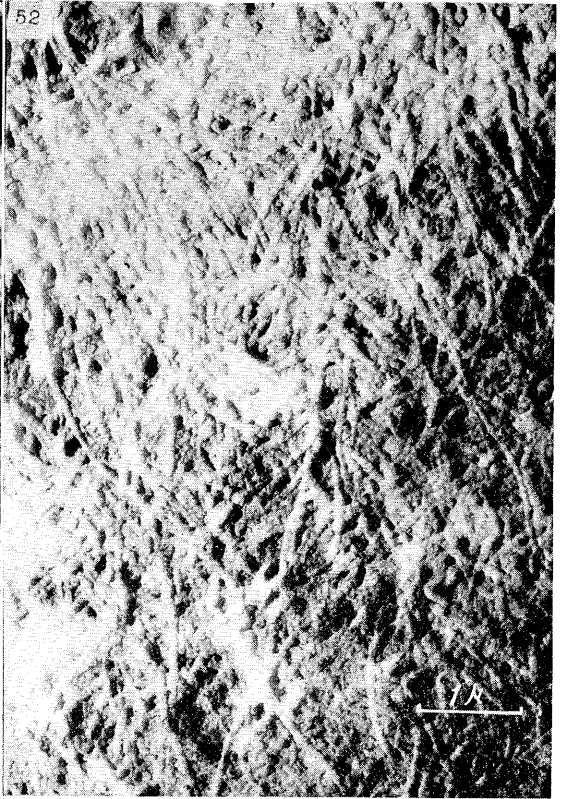


Fig. 26. Fig. 27. コラーゲン溶液に1% RNA を添加した場合 (Fig. 26.) は横紋のない線維が, 1% DNA を添加した場合 (Fig. 27.) は正周期線維が再成される. Cr-Shadowing. ($\times 33,000$).

Fig. 28. コラーゲン溶液からの線維再成に及ぼす塩類の影響. 上段は Na-塩. 下段は K-塩, 塩類濃度は 0.17M. 一般に Na-塩の方が線維再成効果は良好であることが示される. KCl を加えた場合螺旋構造をもつ線維が再成された(\uparrow). Cr-Shadowing. ($\times 45,000$).

Fig. 29. コラーゲン溶液からの線維再成に及ぼすコンドロイチン硫酸の影響. コラーゲン溶液に, (A) 0.02 MNaCl と 1% コンドロイチン硫酸を加えると横紋のない線維が, (B) 0.17 MNaCl と 0.1% コンドロイチン硫酸を加えると正周期線維 (Ns), 短周期線維 (Ss) が, (C) 0.17 MNaCl と 1% コンドロイチン硫酸を加えると, 長周期線維が形成される. Cr-Shadowing. ($\times 37,000$).

Fig. 30. 生後1日ラット尾腱の GOMORI 鍍銀. 微細な銀粒子が瀰漫性に沈着 (外鍍銀). ($\times 15,000$).

Fig. 31. 成熟ラット尾腱の GOMORI 鍍銀. 銀粒子は線維の横紋に一致して沈着 (内鍍銀). ($\times 25,000$).

Fig. 32. 稀酢酸で膨潤したラット尾腱の GOMORI 鍍銀. 粗大な銀粒子が線維の表面に不規則に沈着. ($\times 20,000$).

Fig. 33. ウサギ皮下疎性結合織, GOMORI 鍍銀においてアンモニア銀液処理の過程にて止めた標本. 線維上に極めて微細な銀粒子が瀰漫性に沈着, 右下は同標本より得られた金属銀の電子廻折像. ($\times 50,000$).

Fig. 34.—Fig. 36. ウサギ皮下疎性結合織の GOMORI 鍍銀, ホルマリンによる還元条件の鍍銀効果に及ぼす影響. Fig. 34: 2.5%ホルマリン5分間作用せしめた場合, 微細な銀粒子が線維上に瀰漫性に沈着. Fig. 35: 5%ホルマリン10分間(6°C)作用せしめた場合, 銀粒子は線維の横紋に一致して周期的に沈着. Fig. 36.: 10%ホルマリン15分間作用せしめた場合, 粗大な銀粒子が線維上に不規則に沈着. ($\times 21,000$).

Fig. 37. ウサギ疎性結合織. 1%トリプシン処理後 GOMORI 鍍銀, 粗大な銀粒子が線維上に不規則に沈着. ($\times 21,000$).

Fig. 38.—Fig. 40. 疎性結合織の GOMORI 鍍銀過程に得られた電子廻折像, Fig. 38: ホルマリン処理後得られた金属銀の廻折像, Fig. 39: 塩化金処理

後得られた塩化銀の廻折像, Fig. 40. チオ硫酸ソーダ処理後得られた金属金の廻折像.

Fig. 41. コラーゲン溶液に 0.17 MNaCl の添加によつて再成された線維の GOMORI 鍍銀. やや粗大な銀粒子がかなり不規則に沈着. ($\times 25,000$).

Fig. 42. コラーゲン溶液に 0.17 MNaCl, 1% コンドロイチン硫酸を添加し再成された線維の GOMORI 鍍銀. 微細な銀粒子が横紋に一致して周期的な沈着を示す. ($\times 25,000$).

Fig. 43. 過ヨード酸銀法を施したウサギ疎性結合織. 線維の周辺が“染色”され, 一部かすかに横紋の存在がうかがわれる(\uparrow). ($\times 16,500$).

Fig. 44. 過ヨード酸銀法を施したラット尾腱. 線維の横紋が明瞭に“染色”される.

Fig. 45. 未固定ウサギ皮下疎性結合織の硼砂処理. 線維の辺縁が“染色”される. ($\times 15,000$).

Fig. 46. ホルマリンで固定されたウサギ皮下疎性結合織の硼砂処理. 線維の辺縁に凝縮状の可染物質が認められる. ($\times 16,5000$).

Fig. 47. 1%トリプシン処理されたウサギ皮下疎性結合織の硼砂処理. 硼砂の染色効果は完全に消失する. ($\times 16,500$).

Fig. 48. 未固定ラット尾腱の硼砂処理. 線維の辺縁及び横紋が“染色”される. ($\times 15,000$).

Fig. 49. 未固定ラット尾腱の過マンガン酸カリ処理. Pair になつた細い横紋が染色される. ($\times 15,000$).

Fig. 50. 未固定ラット尾腱のリン酸ナトリウム処理. 明瞭な横紋構造が染色される. 膨潤部では2本ずつ並んだ太い染色帯が周期的にあらわれる. ($\times 15,000$).

Fig. 51. ネコ脾の細網線維. 多量の基質に包まれたコラーゲン型の細線維が認められる. Cr-Shadowing. ($\times 20,000$).

Fig. 52. ウシ項靱帯の弾力線維. 濃厚な基質の中に細線維がもつれ合つて包埋されている. Cr-Shadowing ($\times 21,000$).

Fig. 53. 上記同一標本. 細線維のほぐれた部分, 細線維はコラーゲン型の横紋を示し, しばしば先端の尖つた線維が認められる (\uparrow). Cr-Shadowing. ($\times 21,000$).

Fig. 54. ネコ脾の細網線維の GOMORI 鍍銀. 銀粒子は線維上に瀰漫性に沈着. ($\times 15,000$).

Fig. 55. ウシ項靱帯弾力線維の GOMORI 鍍銀. 粗大な銀粒子が不規則に沈着. ($\times 15,000$).