

技術ノート

解剖実習後の人体標本を用いた末梢神経の Sihler 染色

関谷 伸一¹, 鈴木 了², 宮脇 誠², 千葉 正司³, 熊木 克治²

¹新潟県立看護大学看護学部看護学科

²新潟大学大学院医歯学総合研究科機能再生医学講座内眼解剖学分野

³弘前大学医学部保健学科放射線技術科学専攻診療放射線技術科学講座

(2005年5月18日受付, 2005年7月25日受理)

要 約 : 解剖学実習終了後の遺体から, 支配神経をつけた状態の足底の筋を骨から剥離摘出し, Sihler 染色を施した。その結果, 神経線維が青紫色に濃染される一方, それ以外の筋, 腱, 筋膜, さらに神経を取り囲む神経外膜と神経周膜などの結合組織はほぼ透明化された。そのため神経周膜に包まれた神経線維の束である神経束のみが染め出され, それらの分岐様式が観察できた。外側足底神経と内側足底神経の間に確認された交通枝は, この染色によって数本の神経束から成ることが確認され, またループを形成するものと短母指屈筋に進入するものとが区別できた。交通枝の外側足底神経からの分岐部はT字状をなしていた。このように, 解剖学実習に用いられた人体の神経筋標本においても, 末梢神経解剖のために Sihler 染色が有効であった。

Key words : Sihler 染色, 解剖学実習, 神経束, 外側足底神経, 内側足底神経

序 文

肉眼解剖学における末梢神経系の観察は, 文字通り肉眼および実体顕微鏡を用いて行われているが, 末梢の細枝の観察にはおのずから限界がある。そのため古くから多くの染色法が試みられてきた。例えば, Sudan Black B¹²⁾ やメチレンブルー液^{4, 28)}, アリザリンレッド³³⁾ を用いる方法, 簡易渡銀法^{10, 30-32)} などがある。最近ではアセチルコリンエステラーゼ染色²⁹⁾, あるいは抗ニューロフィラメント抗体を用いた免疫組織化学染色法⁷⁾ も盛んに利用されてきている。

一方, 19世紀末に Sihler²⁷⁾ によって開発され, 筋肉内の神経終末を明らかにするために用いられた染色法は, Wharton^{35, 36)} によって紹介され, その後いくつかの改良が加えられながら, 両生類の下肢の末梢神経系³⁷⁾ や魚類の脳神経^{5, 6, 20, 21)} の研究などに用いられてきた。哺乳動物ではラットの口蓋^{15, 34)} および舌¹⁷⁾, イヌの喉頭³⁸⁾ の神経分布を明らかにするためにこの染色法が使われた。ヒト喉頭領域の神経支配に関しては, 本染色法を用いた一連の研究が, 最近 Sanders らによって精力的に行われている^{18, 19, 22-24, 39)}。

Liu ら¹⁶⁾ は Sihler 染色をウサギ上腕三頭筋長頭に適用することにより, その支配神経の詳細な筋内分布を明らかにし, この染色法が哺乳動物の骨格筋内の神経に応用できることを示した。その他の筋の支配神経については, ヒトの喉頭筋^{19, 23, 24, 38)}, ラット¹⁷⁾ とヒト³⁹⁾ の舌, ヒトの鼓膜張筋⁸⁾ と僧帽筋⁹⁾ について報告がある。いずれも剖検例からの新鮮材料を用いたり, 実験動物では還流固定を実施したりして, できるだけ早期固定を心がけ, 場合によっては緩衝剤を用いたバ

ラフォルムアルデヒド固定^{8, 9)} を行っている。

著者らは以前からヒラメ筋支配神経の筋内分布²⁵⁾, アキレス腱の前に時々見られる腓腹神経と脛骨神経間の交通枝²⁶⁾, 足底固有筋支配神経³⁾ の解析を進めてきたが, 肉眼解剖学的手技による限界を常々感じていた。Liu ら¹⁶⁾ によってなされた骨格筋内の神経線維染色は, 用いた筋が新鮮固定材料であることと, 筋が比較的小型であったことによって成功したといえる。しかし, ヒト解剖体における神経筋材料も, 同じくホルマリン固定であることと, 筋外での末梢神経の分岐様式を明らかにする目的であるならば, 剖出された標本を用いてもこの Sihler 染色が可能ではないかと考え, ヒト足底筋とその支配神経を対象にこの染色法を試みた。

材料と方法

新潟大学解剖学実習体の96才女性の足を解剖し, 足底の固有筋とそれらの支配神経である外側足底神経, 内側足底神経および深腓骨神経をつけて, 一括して足の骨からはずした。摘出にあたっては, 各筋枝・皮枝などを可能な限りカラー糸で識別した。

防腐処置

この実習体は, 新潟大学医学部において通常行われている以下の通りの防腐処置を施されたものである。すなわち, 左橈骨動脈から点滴用注射針を用いて, 高さ2.5 mに設置したイルリガートールから10%ホルマリン溶液10リットルを約12時間かけて点滴注入することにより固定処置を施した。その後, 50%変性アルコール溶液中に約1年間貯蔵し, 時間をかけてホルマリンをアルコールに自然置換し, 死後約1年から2年目で解剖学実習体として解剖された。実習終了後, 著者らにより足底の固有筋とそれらの支配神経のみが摘出され,

アルコールとフェノールを含む防腐液を噴霧し、乾燥しないようにしながら保管された。染色は、Liuら¹⁶⁾に従ったが、以下にその具体的な方法を述べる。

1. 浸軟と脱色

- ① 摘出された神経筋標本は、実習用防腐液（アルコール：グリセリン：フェノール：水＝18：4：1：37）を噴霧して乾燥を防ぎながら保管した。
- ② 水道水で30分水洗した。
- ③ 3% KOH 水溶液（100 ml 当たり 0.2 ml の 3% 過酸化水素水を加える）に毎日数回液を攪拌しながら20日間浸した。この間に液が汚れたので、3日後と10日後の2回交換した。

2. 脱灰

- ④ 水道水で約30分水洗した。
- ⑤ Sihler I 溶液（氷酢酸：グリセリン：1% 抱水クロラール＝1：2：12）に毎日数回液を攪拌しながら2週間浸した。液は1週間後に一度交換した。

3. 染色

- ⑥ 再び水道水で水洗した。
- ⑦ Sihler II 溶液（エールリッヒヘマトキシリン：グリセリン：1% 抱水クロラール＝1：2：12）に毎日数回液を攪拌しながら2週間浸した。染色液は1週間後に一度交換した。

4. 脱色

- ⑧ 再び Sihler I 溶液に浸した。2、3時間すると細かな神経が色あせ始めたので、この時点でこの処理を止めた。

5. 中和

- ⑨ 水道水で約30分水洗した。
- ⑩ その後0.05%炭酸リチウム液の中に入れた。この処理で神経が紫色から青色に変わった。この処理は2、3時間で止めた。

6. 透明化

- ⑪ 40%、60%、80%のグリセリンに順に3日、2日、1日と入れ、最後に100%グリセリンに入れた。
- ⑫ 100%グリセリンにはチモールの結晶をわずかに加え、冷暗所に保存した。

全行程で、約2ヶ月かかった。各段階で実体顕微鏡を用いて状態をチェックしながら進めた。

結 果

神経線維は濃い青紫色に染色され、筋と結合組織は淡いピンク色に染色されてはいるものの、ほぼ透明化され、きわめて鮮明に神経線維の走行が観察できた（図1）。筋と疎性結合組織はもとより神経周膜も透明化され、神経線維のみが染色されているため、神経周膜で包まれた神経束が明瞭に識別できた（図2）。また神経の識別用に結んだ糸は、染色過程で退色あるいは変色することがなく、マーカーとして最適であった（図1, 3a）。

短小指屈筋、小指対立筋、第3底側骨間筋、第4虫様筋の筋枝および第5中足指節関節への関節枝は、4本の神経束が癒合と分岐を繰り返しながら共同幹をなして外側足底神

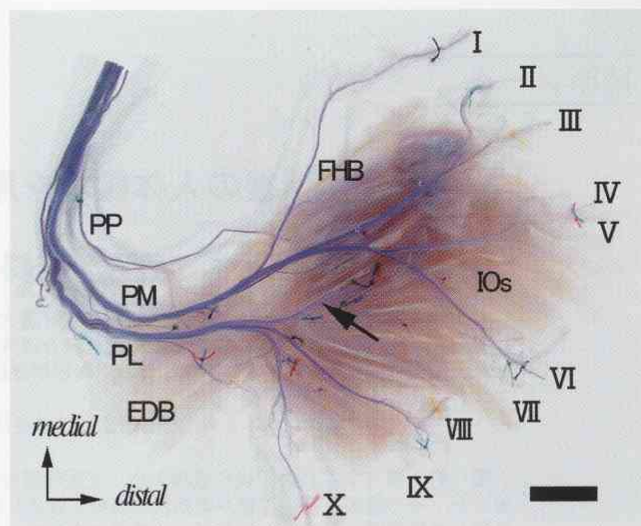


Fig. 1. Intrinsic muscles of the left foot and three main nerves demonstrated by the modified Sihler's stain. Bones of the foot were removed before the staining procedure. Muscles and connective tissues were made transparent in 100% glycerin. An arrow indicates a deep branch of the lateral plantar nerve (PL). Plantar aspect. EDB, extensor hallucis brevis and extensor digitorum brevis muscles; FHB, flexor hallucis brevis muscle; IOs, interosseous muscles; PM, medial plantar nerve; PP, deep peroneal nerve; I-X, proper plantar digital nerves. Bar=2 cm.



Fig. 2. Pieces of the tibial nerve processed with the modified Sihler's stain. Nerve fascicles are clearly visible since the epineurium and the perineurium were made transparent. Bar=1 mm.

経浅枝の一つとして分岐した（図3b）。この共同幹は最終的にそれぞれ各1本の神経束となって各筋と関節に達した。小指対立筋へ向かう神経束からは細い神経束が1本分岐し第3底側骨間筋に進入したため、第3底側骨間筋には2本の神経束が進入していた。外側足底神経の深枝から分岐する筋枝には、近位から順に、第4背側骨間筋、第2底側骨間筋、第3背側骨間筋への筋枝がそれぞれ一本の神経束として分岐し、次に第1底側骨間筋と第3虫様筋への共同幹、第2背側骨間筋と第1背側骨間筋への共同幹、母指内転筋横頭と第2虫様筋への共同幹が引き続き分岐した。いずれも遠位方向に向

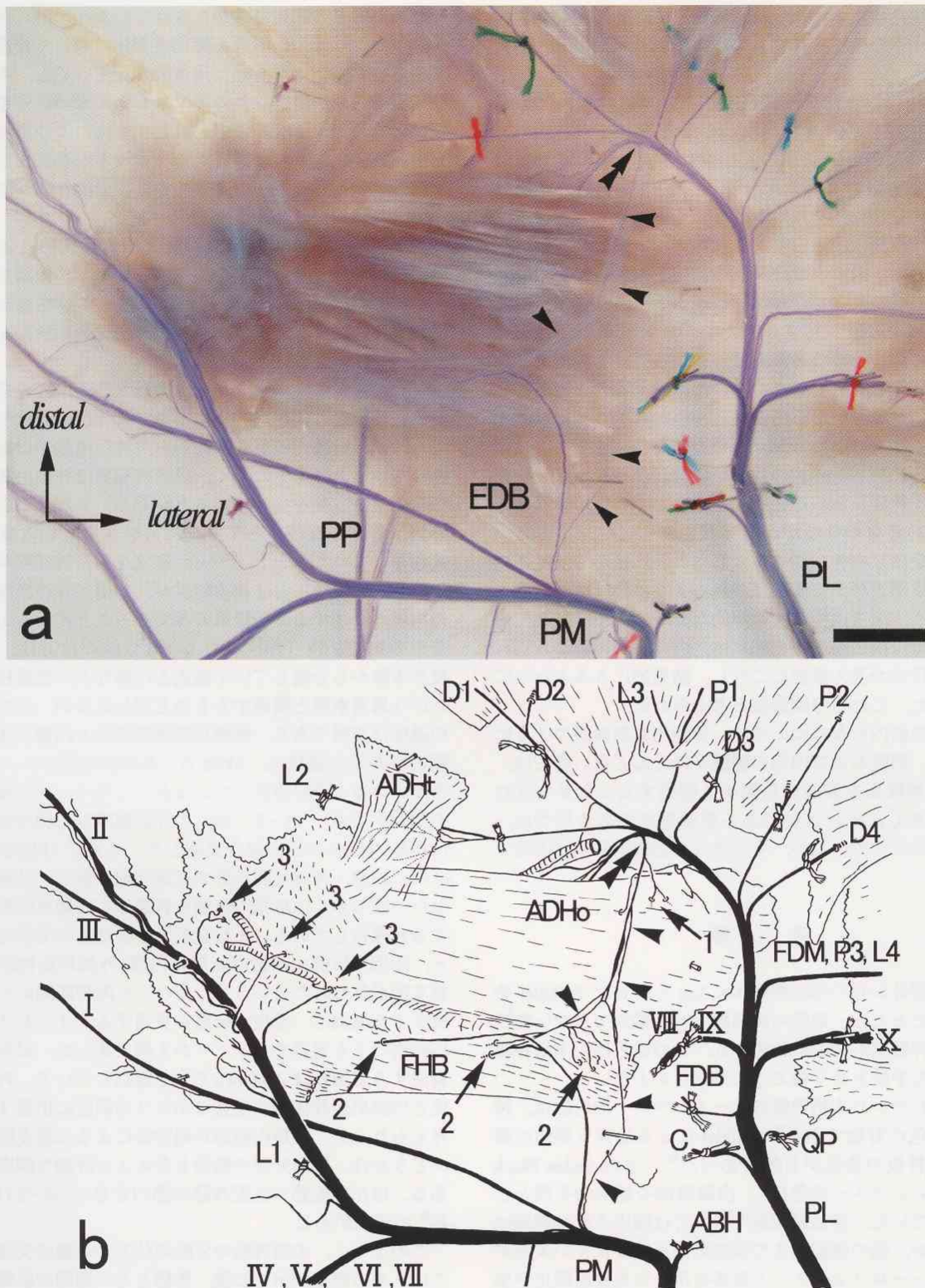


Fig. 3. a: Microdissected intrinsic muscles demonstrating an anastomosis (arrowheads) between the medial (PM) and lateral (PL) plantar nerves in the left foot. The branch point of the anastomotic branch from the PL is indicated by a double arrowhead. Each single nerve fascicle was stained deep blue-purple by the modified Sihler's technique. Plantar aspect. Bar=1 cm. b: Line drawing of Figure 3a. The extensor hallucis brevis muscle and the deep peroneal nerve are omitted. Note that an anastomosis between the medial and lateral plantar nerves is constituted of several nerve fascicles, and gives off three fascicles to the oblique head of the adductor hallucis muscle (ADHo) (arrow 1) and five fascicles to the flexor hallucis brevis muscle (FHB) (arrow 2). The branch point of the anastomotic branch from the PL was indicated by a double arrowhead. Note that intramuscular nerve branches in the transverse head of the adductor hallucis muscle (ADHt) are visible. Three fascicles from the PM supply the capsule of the first metatarsophalangeal joint (arrow 3). ABH, abductor hallucis muscle; C, cutaneous branch; D1-4, first to fourth dorsal interosseous muscles; FDB, flexor digitorum brevis muscle; FDM, flexor digitorum minimi brevis and opponens digiti minimi muscles; L1-4, first to fourth lumbrical muscles; P1-3, first to third plantar interosseous muscles; QP, quadratus plantae muscle. See Figure 1 for other abbreviations.

かって放射状に分岐した。最後に内側近位方向に向かう神経束が、3～4本の神経束に別れて母指内転筋斜頭に進入了(図3a, b)。

母指内転筋斜頭へ向かう神経束からほぼ直角に内側方向に分岐した神経束が、母指内転筋の下を通り3本の極めて細い筋枝を母指内転筋斜頭の起始部に与え、そのまま短母指屈筋の支配神経と交通した(図3a, b)。交通枝は4本ほどの神経束に分かれ、それらから少なくとも5本の神経束が別れて短母指屈筋に進入了。これらの神経束の叢状態は、単なる肉眼解剖学的剖出では決して判明しなかったものである。この交通枝の外側足底神経深枝からの分岐様式は、先に述べたようにほぼ直角であったため、分岐部がT字状をなしていた。また、一部の神経束は外側足底神経と内側足底神経間にループを形成していた。そのため内部に含まれる神経線維が、外側足底神経から内側足底神経に向かう神経線維なのか、あるいはその逆なのか、その方向を判断することは困難であった。しかしその他の外側足底神経深枝からの神経束は、内側足底神経からの神経束に合流してから短母指屈筋に進入了。神経束の分岐部がT字状をなしていたことは、短小指屈筋をはじめ骨間筋や虫様筋への各筋枝が外側足底神経深枝の遠位部表層から順次はがれるように分岐することと大いに異なり、両者は極めて対照的な分岐様式を示した。母指内転筋と短母指屈筋の停止部には、内側足底神経から別れた3本の神経束が進入了直前に二分し、結果的に5本となって進入了。これらは関節枝と考えられた。

支配神経の筋内分布については、母指内転筋横頭のように筋腹が薄く、筋膜および内部の腱膜がほとんどない筋では、筋内を走る神経束を表面から簡単に観察することができた(図3)。しかし、それ以外のある程度厚さのある筋では、神経線維は染まっているが、その走行の立体的解析は困難であった。

考 察

解剖学実習体からの神経筋標本にLiuら¹⁶⁾によるSihler染色を適用したところ、通常の内眼解剖では識別できない細枝に至るまで神経束が明瞭に染色され、この染色法が末梢神経解剖の有力な手段となり得ることが明らかとなった。

従来行われていた末梢神経のホールマウント染色法は、神経終末の染色に有効であり²⁸⁾、Sihlerによる研究も筋内の筋紡錘と運動終板の染色が目的であった²⁷⁾。またSudan Black B¹²⁾やメチレンブルー染色は⁴⁾、内眼解剖の補助的手段として用いられていた。簡易渡銀法^{10, 30-32)}では露出された神経は好染されるが、筋の深部にまで染色効果が及びにくい欠点がある。抗ニューロフィラメント抗体を用いた免疫組織化学染色法は、胚¹⁴⁾や小動物⁷⁾に対してよく用いられている。それらに対し、Taguchiら²⁹⁾はアセチルコリンエステラーゼ染色法を用いてヒト骨盤内臓における詳細な自律神経系の分布を明らかにした。これらの免疫組織化学的手法に比べると、今回用いたLiuら¹⁶⁾によるSihler染色は、時間がやや長めにかかる点を除けば、その操作は至って簡単であった。

この他にも、Sihler染色による筋の支配神経の研究報告はすでにいくつかあるが^{8, 9, 17, 19, 23, 24, 38, 39)}、いずれもこの染色法

のための独自の固定処理がなされている。しかし今回著者らが試みたように、医学部の解剖実習体に対して普通に行われている防腐固定処理を経た遺体標本を用いても、本染色が充分可能であり、足底以外の部位においても神経分布の詳細な検索に応用できるものと思われた。また、この染色法によると神経周膜に包まれた神経束の一本一本が識別でき、組織切片法とは異なりそれらの連続性や3次元的な広がりが見え観察できる利点がある。

今回観察された外側足底神経と内側足底神経間の交通枝は、肉眼ではただの1本の交通枝としてしか確認できなかったが、Sihler染色を施すことによって、この交通枝が明らかに数本の神経束から成り、複雑な神経束叢の様相を呈したことが明らかになった。

この交通枝の神経束の走向を考慮すると、短母指屈筋は内側足底神経と外側足底神経による二重支配を受けていると考えられた。逆に内側足底神経からの神経線維が母指内転筋に達していたとは考えにくく、母指内転筋は外側足底神経深枝のみによる支配を受けているといえる。しかしこの交通枝が外側足底神経深枝からT字型に分岐するという変わった様式をなしていたことと、ループ形成をした神経束があったため、この交通枝に含まれる線維が、外側足底神経深枝から短母指屈筋に達する神経線維のみであったと言えるかどうか、若干の疑問が残った。このような分岐の仕方は、通常の筋枝が本幹から分岐していく様式とは異なり、交通枝ができたという異常事態と関係するものと思われるが、その分岐発生の過程は不明である。外側足底神経深枝と内側足底神経との間にできる交通枝は、Akitaら¹⁾が両神経間にループが形成されている1例を報告しているが、このループは母指内転筋の背側を通過している。我々の今回観察した例では、交通枝は母指内転筋の足底側を通過した。小成¹¹⁾は短母指屈筋の62%に内側・外側足底神経の二重支配があり、外側足底神経からの枝の多くは母指内転筋を貫通して内側足底神経と交通すると報告している。また金沢大学医学部の実習記録によると、58例中17例に母指内転筋の内側・外側足底神経による二重支配が見られたという¹³⁾。そのうち両神経間にループを形成する交通例は、母指内転筋を貫通するタイプが2例、母指内転筋の下を通過するタイプが1例であった。母指内転筋を貫通する交通枝はArakawaら³⁾も観察している。外側足底神経と内側足底神経間の交通はかなり高頻度に出現するものと考えられるが、母指内転筋が両神経による二重支配を受けるかどうかは、筋内分布の検索も含めより詳細な調査が必要である。母指内転筋の支配神経の筋内分布についてはArakawaら²⁾の予報がある。

このように、末梢神経の分岐の仕方や各種の交通枝に関しては、ある程度剖出した後、神経とその周囲の組織を一括して摘出した標本をSihler染色することによって、細部にわたる検索が可能になることが明らかになった。一本一本の細い神経束が明らかになるため、今まで見落としていた新たな神経のネットワークが明らかになることが期待される。ただしいくつかの欠点もある。それは、この染色が完全に終了するまで2ヶ月以上もかかること、標本の大きさによって処理時間を調節しなければならないが、それらの条件の変化に対応した的確な調節が困難なこと、筋組織がほぼ完全に透明化さ

れるので、筋内分布を検索する時に筋線維と神経の位置関係がよくわからなくなってしまうこと、ホルマリン固定がしっかりなされていないとうまく染色されないこと、などが挙げられる。また遺体の防腐処置法の違いによる染色結果の違いについて、および染色後1年ほどで色素の退色が徐々に進行するが、再染色の可能性についても今後検討しなければならぬ。これらの欠点や問題点を踏まえた上で、目的に応じて

適用すれば良好な結果が得られることと思う。

本研究を進めるにあたり、ご協力いただいた新潟大学大学院歯学総合研究科機能再建医学講座肉眼解剖学分野技官の石本欣也氏、穂刈厚一氏に感謝いたします。なお、本研究の一部は平成14年度新潟県立看護大学学長特別研究費の補助を受けて行われた。

文 献

- 1) Akita K, Sakamoto H, Sato T (1999) Lateromedial and dorso-plantar borders among supplying areas of the nerves innervating the intrinsic muscles of the foot. *Anat Rec* 255: 465-470
- 2) Arakawa T, Sekiya S, Kumaki K, Terashima T (2004) Intramuscular nerve distribution of the oblique and transverse heads of the adductor hallucis muscle in the human foot. *Anat Sci Int* 79 Suppl: 445 (abstract)
- 3) Arakawa T, Sekiya S, Kumaki K, Terashima T (2005) Ramification pattern of the deep branch of the lateral plantar nerve in the human foot. *Ann Anat* 187: 287-296
- 4) Brown CA, Wassersug RJ, Naitoh T (1992) Metamorphic changes in the vagal innervation of the alimentary tract in the green frog, *Rana clamitans* (Ranidae). *Acta Anat* 145: 340-344
- 5) Fraser TH, Freihofer WC (1971) Trypsin modification for Sihler technique of staining nerves for systematic studies of fishes. *Copeia* 1971 (3): 574-576
- 6) Freihofer WC (1966) The Sihler technique of staining nerves for systematic study especially of fishes. *Copeia* 1966 (3): 470-475
- 7) Ishikawa Y, Hyodo-Taguchi Y (1994) Cranial nerves and brain fiber systems of the medaka fry as observed by a whole-mount staining method. *Neurosci Res* 71: 379-386
- 8) Kierner AC, Mayer R, Adunka O (2003) Is there a double innervation of the tensor tympani muscle in humans? *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112: 1056-1058
- 9) Kierner AC, Zelenka I, Burian M (2001) How do the cervical plexus and the spinal accessory nerve contribute to the innervation of the trapezius muscle? As seen from within using Sihler's stain. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127: 1230-1232
- 10) 木村邦彦, 高橋 裕 (1985) 簡易組織鍍銀法を末梢神経の走行分布の分析に用いる試み—カニクイザル (*Macaca fascicularis*) の外側腓腹皮神経の腓腹神経との交通枝—, 解剖誌 60: 8-10
- 11) 小成徳三郎 (1960) いわゆる二重神経支配の足筋に関する研究. 日大医誌 19: 1411-1430
- 12) 熊木克治 (1970) 頸神経と副神経, 線維解析に基づく形態学的考察. 解剖誌 45: 311-344
- 13) 熊木克治編 (1980) 解剖学実習資料集. 金沢大学医学部解剖学第二講座, 金沢, 245
- 14) Kuratani S, Tanaka S, Ishikawa Y, Zukeran C (1988) Early development of the hypoglossal nerve in the chick embryo as observed by the whole-mount nerve staining method. *Am J Anat* 182: 155-168
- 15) Liem RSB, Van Willigen JD (1988) *In toto* staining and preservation of peripheral nervous tissue. *Stain Technol* 63: 113-120
- 16) Liu J, Kumar VP, Shen Y, Lau H-K, Pereira BP, Pho RWH (1997) Modified Sihler's technique for studying the distribution of intramuscular nerve branches in mammalian skeletal muscle. *Anat Rec* 247: 137-144
- 17) McClung JR, Goldberg SJ (2000) Functional anatomy of the hypoglossal innervated muscles of the rat tongue: A model for elongation and protrusion of the mammalian tongue. *Anat Rec* 260: 378-386
- 18) Mu L, Sanders I (2000) Sensory nerve supply of the human oro-and laryngopharynx: A preliminary study. *Anat Rec* 258: 406-420
- 19) Mu L, Sanders I, Wu B-L, Biller HF (1994) The intramuscular innervation of the human interarytenoid muscle. *Laryngoscope* 104: 33-39
- 20) Nakae M, Sasaki K (2004) Homologies of the adductor mandibulae muscles in Tetraodontiformes as indicated by nerve branching patterns. *Ichthyol Res* 51: 327-336
- 21) Puzdrowski RL (1987) The peripheral distribution and central projections of the sensory rami of the facial nerve in goldfish, *Carassius auratus*. *J Comp Neurol* 259: 382-392
- 22) Sanders I, Mu L (1998) Anatomy of the human internal superior laryngeal nerve. *Anat Rec* 252: 646-656
- 23) Sanders I, Mu L, Wu B-L, Biller HF (1993) The intramuscular nerve supply of the human lateral cricoarytenoid muscle. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 113: 679-682
- 24) Sanders I, Wu B-L, Mu L, Li Y, Biller HF (1993) The innervation of the human larynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 119: 934-939
- 25) Sekiya S (1991) Muscle architecture and intramuscular distribution of nerves in the human soleus muscle. *Acta Anat* 140: 213-223
- 26) Sekiya S, Kumaki K (2002) Sural-tibial nerve communications in humans. *Anat Sci Int* 77: 140-144
- 27) Sihler C (1895) Über Muskelspindeln und intramuskuläre Nervenendigungen bei Schlangen und Fröschen. *Arch Mikros Anat Entwickl* 46: 709-723
- 28) Stilwell DL (1957) The innervation of deep structures of the foot. *Am J Anat* 101: 59-73
- 29) Taguchi K, Tsukamoto T, Murakami G (1999) Anatomical studies of the autonomic nervous system in the human pelvis by the whole-mount staining method: Left-right communicating nerves between bilateral pelvic plexuses. *J Urol* 161: 320-325
- 30) 高橋 裕, 木村邦彦 (1990) 簡易鍍銀法による横隔神経

- 心膜枝の追跡. 解剖誌 65 : 88-91
- 31) Takahashi Y, Kimura K (1993) The internal branch of the superior laryngeal nerve in the dog distributes to the esophageal gland at the pharyngo-esophageal junction. *Okajimas Folia Anat Jpn* 70: 115-118
 - 32) Takahashi Y, Yorifuji H (1997) Subglottic branch of the superior laryngeal nerve in the dog penetrates the cricoid cartilage. *Ann Anat* 179: 75-81
 - 33) Tanaka S, Nakatani T, Mizukami S, Lee H-Y, Chung I-H (1997) A variant branch of the internal laryngeal nerve supplying filaments to the cricothyroid muscle: An autopsy case. *Acta Anat Nippon* 72: 135-139
 - 34) Van der Werf AAD, Liem RSB, Jansen HWB (1980) The innervation pattern of the hard palate of the wistar albino rat. *Acta Morphol Neerl-Scand* 18: 125-132
 - 35) Wharton LR (1937) A technique for studying the innervation of organs. *Anat Rec* 67 (suppl 3): 469-475
 - 36) Wharton LR (1937) Studies on the innervation of the reproductive organs of *Macacus rhesus*. *Anat Rec* 68: 43-61
 - 37) Williams TW (1943) A technique for the gross differential staining of peripheral nerves in cleared vertebrate tissue. *Anat Rec* 86: 189-195
 - 38) Wu B-L, Sanders I (1992) A technique for demonstrating the nerve supply of whole larynges. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 118: 822-827
 - 39) Zur KB, Mu L, Sanders I (2004) Distribution pattern of the human lingual nerve. *Clin Anat* 17: 88-92

Application of the Modified Sihler's Stain Technique to Cadaveric Peripheral Nerves after Medical Students' Dissection Course

Shin-ichi Sekiya¹, Ryo Suzuki², Makoto Miyawaki², Shoji Chiba³ and Katsuji Kumaki²

¹Niigata College of Nursing, 240 Shinnan-cho, Joetsu 943-0147, Japan

²Division of Gross Anatomy and Morphogenesis, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University, Ichiban-cho, Asahimachi-dori, Niigata 951-8510, Japan

³Medical Radiological Technology, School of Health Sciences, Hirosaki University, 16-1 Hon-cho, Hirosaki 036-8564, Japan

The exact ramification and distribution pattern of the peripheral nerves is one of the most important information for anatomists and clinicians. However, it is very difficult to pursue perfectly all of the fine twigs of nerve branches even if we use a stereoscopic microscope.

Recently, Liu et al. (*Anat. Rec.*, 247: 137, 1997) applied a modified Sihler's stain technique to study the distribution of intramuscular nerve branches in mammalian skeletal muscles. Then, we attempted to apply this technique to plantar nerves of human foot removed from cadavers which were used for ordinary dissection practices at the School of Medicine.

Intrinsic muscles of the foot with motor and sensory nerve branches were removed en bloc from bones of the foot. They were macerated and depigmented in 3% aqueous potassium hydroxide, decalcified in Sihler's solution I. Then, after staining in Sihler's

solution II, they were destained in Sihler's solution I, neutralized in 0.05% lithium carbonate, and cleared in increasing concentrations of glycerin.

As a result, each nerve fascicle, which are bundles of nerve fibers invested by the perineurium, was very clearly visualized, since only nerve fibers were stained deep blue-purple, while muscles, the epineurium and the perineurium were made transparent in glycerin. We found an anastomosis between a deep branch of the lateral plantar nerve and the medial plantar nerve, composed of several nerve fascicles. Therefore, the modified Sihler's stain technique can be applied to cadaveric peripheral nerves after medical students' dissection course.

Key words: Sihler's stain, cadaver dissection, nerve fascicle, lateral plantar nerve, medial plantar nerve