

メチルグリーンを含む固定液の灌流によるカテコールアミン蛍光と細胞核の同時検出法

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8847

メチルグリーンを含む固定液の灌流による カテコールアミン蛍光と 細胞核の同時検出法

金沢大学医学部神経情報研究施設 (神経物性研究部門)

中 村 俊 雄

鳥 越 甲 順

金沢大学医学部解剖学第三講座

高 橋 暁

金沢大学医学部解剖学第一講座

山 下 利 夫

(昭和55年7月18日受付)

本論文の要旨の一部は、第85回日本解剖学会総会において発表した。

1962年 Falck ら¹⁾によって、ホルマリン蒸気処理によるカテコールアミン(以下CAと略記)の蛍光組織化学的検出法が発表されて以来、グリオキシル酸を用いる方法^{2)~4)}など多くの変法が報告されている。これらの方法は、CA蛍光を検出する操作中、100℃近い加熱処理を必要としているので、同一切片について、酵素組織化学的検索を行なうことが、極めて困難な欠点があった。ところが、近年、Furness ら⁵⁾⁶⁾によって、加熱処理を必要とせず、単に、ホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドの混合液による固定のみでCA蛍光を検出する鋭敏かつ簡単な方法が発表された。著者は、このFurness らのFaglu⁵⁾⁶⁾法の固定液に、ショ糖を20%の割に加えることにより、クライオスタット切片作製に伴うCA蛍光の減弱・凍結時の水晶形成による組織障害・乾燥時における組織収縮を防止することを可能にし、FGS法と名づけて報告した⁷⁾。さらに、このFGS法とKarnovsky ら⁸⁾のアセチルコリンエステラーゼ(以下AchEと略記)活性検出法を組み合わせ、CA蛍光とAchE活性の同時観察法も開発した⁹⁾。我々の開発したFGS法は、浸漬固定を用いるため、手術材

料などの別出臓器のCA蛍光を検出するのに、極めて好都合である半面、網膜など、薄い材料には問題はないが^{10)~12)}、厚い臓器では、固定液の浸入が遅いため、深部におけるCA蛍光を鋭敏に検出することがむづかしいという難点があった。この難点は、ある臓器内におけるCA蛍光含有神経線維(以下CA-Fと略記)の分布を連続切片で追究する際に、少なからぬ支障を来していた。

他方、FGS法のみでは、ある臓器内の各種構成分(例えば、唾液腺における終末部・介在部・線条部・導管・動脈・静脈など)とCA-Fとの分布相関を検索する際、後染色を施さないと、CA-Fの分布部位を正確に同定することが困難であった。たとえ通常の方法で後染色を施しても、CA蛍光物質は、水溶液中で容易に拡散してしまうので、CA蛍光の減弱は免れず、低温での短時間の後染色によって辛うじてCA蛍光を保存できるに過ぎない¹³⁾。

著者は、先にマウス唾液腺の神経支配をCajal-本陣氏写真銀法¹⁴⁾など種々の神経染色法によって検索して報告した¹⁵⁾、腺内各神経叢中のアドレナリン作動

Simultaneous demonstration of the catecholamine fluorescence and the cell nucleus by perfusion with a fixative containing methyl green. Toshio Nakamura & Kojun Torigoe, Department of Biophysics, Neuro-Information Research Institute, School of Medicine, Akira Takahashi & Toshio Yamashita, Department of Anatomy, School of Medicine, Kanazawa University.

性およびコリン作動性神経の分布についてなお不明確な点が残っていた。それで、その点を近年開発されたCA 蛍光とAChE 活性の組織化学的方法で解明することを企てた。しかし、CA-F 検出に際して、上記のように、臓器深部でのCA-F の検出不良と、後染色の困難性のため、研究の進展が阻まれていた。そこで、臓器深部まで良好な固定を行なうために、マウス用灌流固定装置を考案し、色素を加えた固定液の灌流固定を行ない、上記の2つの難点を同時に解決したので、その方法を報告する。

材料と方法

材料として、ddN 系成熟雄マウス(体重30g前後)の顎下腺を使用した。

1. 血管灌流固定装置の製作とその操作法

血管灌流固定装置については、従来から数多く発表されているが¹⁶⁾、いずれの方法を用いるにしても、目的とする臓器の隅々まで、均等に固定液を到達させることが最も肝要なことであることは論を俟たない。そのための要点の一つは、使用する動物の動脈圧に近い圧で、灌流操作を行なうことが、多くの研究者によって指摘されている^{16) 17)}。そこで著者は、注入圧を一定に保つため血圧計を組み込んだFurnessら⁹⁾の装置を雛形として選び、操作を簡便にするために若干の改良を加え、写真1、図1で示したような血管灌流固定装置を製作した。灌流装置は図1のように、2個の下口付広口瓶(A, B各120ml)、血圧計(1, 2)、溶液注入用漏斗

(3)、コック(4, 5)、翼付針(6)、リークパイプ(8)および連結用シリコンチューブよりなっている。注射針の尖部近くに、製本用ホットメルト(内田洋行)で小球(7)を作り、左心室に注射針を注入した際の血液の漏出防止と穿刺の深さを決めるストッパーに役立てた。通常Aの瓶のみ用いたが、洗浄液を使用したり、灌流途中で固定液を変えたりする時はBの瓶も使い、その際4,5のコックで液の灌流を切りかえた。

灌流固定法はまず、血管内での血液凝固防止のためヘパリンナトリウム(1000単位/ml, 武田薬品)を0.5ml、腹腔内に注射し、30分後、0.5%ネブタール(ペンタバルビタールナトリウム, 大日本製薬)を0.3ml、腹腔内に注射して麻酔し、マウスを固定台上に仰臥位に固定し、血管拡張剤として、1%亜硝酸ナトリウム0.2ml、腹腔内に注射し、直ちに固定液の灌流を行なった。灌流液の注入は、左心室または総頸動脈より行なった。左心室より注入の際は、胸腔を開き、左心室より、図1の小球をつけた翼付針(21G, 直径0.8mm)を用いて、左心室に針を入れた。総頸動脈より注入の際は図2のように、前頸部の皮膚を切開して、総頸動脈を露出し、直角に曲げた翼付針(30G, 直径0.3mm, 販売元: 八光商事)を用いて、針を総頸動脈に注入した。総頸動脈より灌流固定した方が、左心室より灌流固定した場合よりも、幾分良好な固定結果を示したが、操作にかなり習熟を要した。

灌流固定には、まず、図1の8のリークパイプを開き、3より固定液をAの瓶に注入して、8のリークパイプを閉じ、2のゴム球で圧を、使用動物の最高血圧近く

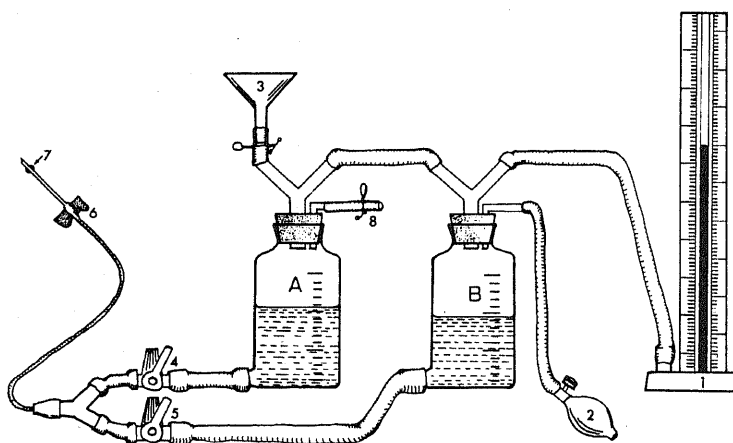


図1 血圧計を組み込んだ小動物用灌流固定装置の模式図

AとB: 下口付広口瓶(120ml入), 1: 水銀血圧計, 2: ゴム球, 3: 固定液注入用漏斗, 4と5: コック, 6: 翼付針, 7: ホットメルトを付けた小球, 8: リークパイプ, (操作法は本文参照のこと)

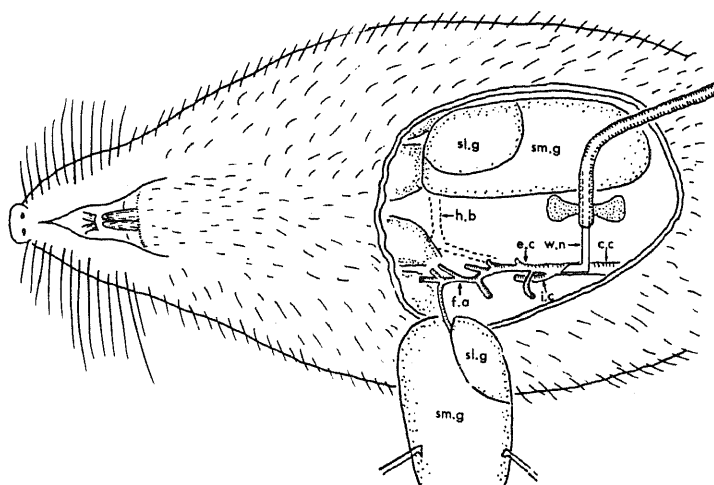


図2 マウス総頸動脈よりの灌流固定法の模式図

c. c.: 総頸動脈, e. c.: 外頸動脈, f. a.: 顔面動脈, h. b.: 舌骨, i. c.: 内頸動脈, sl. g.: 舌下腺, sm. g.: 顎下腺, w. n.: 翼付針, 先端部を直角に曲げてある

にあげ (マウスで約 110 mm Hg, ラットで 130 mm Hg)¹⁰⁾, 4 のコックを開いて, 針の先端まで液を満たして (管の途中の空泡は除いておく), 一旦コックを閉じ, 左心室または総頸動脈に翼付針を注入し, 注入圧を一定に保ちながら, 灌流固定を行なった. 注入液量はマウスで約 20 ml, ラットで約 100 ml とした.

2. CA 蛍光と細胞核の同時検出法

CA 蛍光と細胞核または CA 蛍光と細胞質の同時検出のために, 固定液に種々の色素を, 種々の濃度で加えてテストした結果, CA の黄緑色蛍光に対して, 核が赤色蛍光を呈する下記の処方が最良の結果を示した.

上述した装置と操作法により, マウスに下記の固定液 (室温) を, 約 113 mm Hg の圧で, 20 ml 注入した.

固定液の組成: 8% paraformaldehyde 水溶液¹⁰⁾ 50 ml, 0.2M phosphate buffer (pH 7.4) 48 ml, 20% glutaraldehyde 2.5 ml, sucrose 20g, 1% methyl green 水溶液 1 ml.

灌流が成功すると顎下腺は淡緑色を帯びて均等に染った. 灌流終了後, 直ちに上記固定液から, methyl green を除いた液に 4℃ で 3 時間再固定し, 18μ クライオスタット切片を作製し, 組織の乾燥による収縮防止のため, 切片を 50% ショ糖液に約 5 秒間浸し, 合成ゼオライト (和光純薬) を入れたデシケーター中に -20℃ で 6 時間入れて乾燥し, キシロールで透徹後, Entellan (Merck) に封じた.

CA 蛍光と細胞核の同時観察は, 落射蛍光装置

(Olympus BH-RF1-A 型) で行なった. ダイクロイックミラーを V 励起とし, 励起フィルターに BG 3, 1F 405 を各 1 枚入れ, 吸収フィルターに Y475 を用いた.

対照として, FGS 法⁷⁾に準じ, 顎下腺を浸漬固定後, 18μ クライオスタット切片を作製し, 上記と同様に, 落射蛍光装置で観察した:

成 績

FGS 法で CA 蛍光を単独に検出した標本では, CA による黄緑色の特異蛍光を有する神経線維 (CA-F) が, 顎下腺小葉内に緻密な網を形成して認められた (写真 2). CA-F はその走路中またはその末端に小腫大を形成している. これらの小腫大は synapse en passant と一般に呼ばれている, 静脈瘤様腫大を呈するシナプスに相当すると考えられる. このような CA による黄緑色蛍光のほかに, 黄色の顆粒が, 細胞内に散在性に認められた (写真 2). これは, その形態から lysosome に相当するのではないかと考えられる. マウス顎下腺の小葉は, 腺終末部・介入部・顆粒管 (ヒトには見られず, 特に雄マウスでよく発達している)・線条部・導管および脈管などから構成されているが, CA 単独検出法では, 写真 2 のように, CA-F と上記各部との相関を明らかにするのがきわめて困難であった.

今回, 著者が開発した方法, すなわち 0.01% の割合に methyl green を含む FGS 液で灌流固定した材料の

クライオスタット切片の蛍光顕微鏡像は、CA 蛍光の強さ、色調ともに、CA 蛍光単独検出の対照標本と差違はなかった（写真3）。methyl green 自体は、蛍光を示さなかった。methyl green では、選択的に染められた細胞核は、蛍光顕微鏡下で紫外線を照射した当初は、青緑色を呈しているが、間もなく赤色蛍光を発生し、ほぼ3分後に赤色蛍光はピークに達し、核はそのまま長時間赤色蛍光を持続する（写真3）。この論文に載せた写真は、モノクロームなので、CA-F と細胞核のコントラストは、不著明であるが、蛍光顕微鏡下では、黄緑色を呈する CA-F と赤色を呈する細胞核は、際立った色調の対比を示した。高橋らの方法²⁰⁾で H-E 染色を施したクライオスタット切片を参照にすると、核の形・分布・配列状態から、顎下腺内の上記の各部が容易に判定できた。そのようにして、写真3は、顆粒管と確実に同定できた。顆粒管の周囲には、シナプス部と考えられる小腫大が、少数ではあるが認められた（写真3）。顆粒管部における CA-F の終末の存否については、なお不明確であったが²¹⁾²²⁾、今回の方法で、その存在の可能性を明らかにすることができた。

写真4は、腺門部静脈壁の油浸系対物レンズを用いた強拡大像であるが、この標本でも、写真3の場合と同様に、連続切片の追究により、静脈であることが容易に判定できた。静脈壁には粗な CA-F 神経網および、シナプス部と考えられる静脈瘤様小腫大が認められた（写真4）。従来マウス顎下腺内の静脈壁に、CA-F の終末が存在しているか否かは不明確であったが、この場合も、CA 蛍光と細胞核の同時染色法によって、その存在が明瞭になったと考えられる。

CA 蛍光は、紫外線の照射により、一般には、短時間のうち褪色するとされているが、今回作製した標本は、少なくとも30分間の紫外線照射でも充分、CA 蛍光と細胞核の観察は可能であった。また、Entellan に未封入の切片では、デシケーター中に保存すれば、1年後でも、CA 蛍光と細胞核の観察が充分可能であった。Entellan に封じた標本では、日が経つにつれて、バックグランド蛍光が増大して、CA 蛍光の観察が、困難になってきたが、少くとも、一週間の間は、観察に特に支障はなかった。細胞核の赤色蛍光の方は、封入後1年経過してもほとんど変化なしに認められた。

考 察

先に著者が開発した FGS 法⁷⁾は、浸漬固定を用いるため、臓器深部の固定が不十分で、その部の CA 蛍光が弱い欠点があった。この点の改良に、もっとも有効な手段の一つは、灌流固定を行なうことであるが、マウ

スのような小動物で、目的とする臓器の隅々まで均等に灌流固定を施すことは、實際上、かなり困難である。灌流固定で良好な結果を得るためには、灌流時における末梢血管の閉塞を防止することと、注入圧を使用動物の血圧にほぼ等しくすることが重要であると多くの研究者によって指摘されている¹⁶⁾²³⁾²⁴⁾。そこで著者は、血管閉塞に対する処置として、血液凝固剤のヘパリン、および血管拡張剤の亜硝酸ナトリウムを使用した。このいずれの処理によっても、CA 蛍光は、浸漬固定による対照標本に比して、減弱は認められなかった。固定液の注入を良くするため、一般にリンゲル液などで血管内の駆血の前操作が行なわれているが、この操作で酸素欠乏による組織構造の保存を悪くすることが指摘されており²⁴⁾、また、アルデヒド系固定液では、駆血操作は必ずしも必要としないとされているので²⁴⁾、著者は、駆血操作を省いて、最初から固定液を注入した。今回用いた、メチルグリーンを含む固定液は、灌流時に目的とする臓器を着色させるので、灌流液の組織への浸透状況を知るのに好都合であった。予備実験として Tyrode 液で、駆血操作した場合と、最初から固定液を灌流した場合を比較してみたが、顎下腺の着色状態から見た限りでは、両者に差異は認められなかった。

次に、灌流圧を動物の血圧に等しくするため、血圧計を組み込んだ Furness ら⁶⁾の装置をモデルにして、写真1、図1で示したような血管灌流装置を作製した。この装置はごく簡単に手作りでき、小型であるので、移動に便利であるほか、少し習熟すれば、助手を必要とせず、一人で操作できる利点がある。左心室から灌流する場合、翼付針の先端近くに、逆流防止ストッパーとしてホットメルトで小球を取付けた。心臓からの灌流の場合、固定液の逆流防止のため、挿入したカニューレを上行大動脈とともに結紮することが一般に行なわれているが、小球状ストッパーの使用により、針を左心室に注射すると同時に、灌流が行なえ、灌流開始までの時間を大巾に短縮することができた。また、小球は、注射針の穿刺の深さを決めるストッパーとしても役立つ、針が心臓の対壁を貫通する支障が防止できた。左心室から注入した場合に比して、総頸動脈より注入した方が、顎下腺の CA-F が若干鮮鋭であった。ただし、マウス総頸動脈からの注射針の挿入には、かなり熟練を要した。最初は真直ぐな針を用いていたが、Webster ら²⁵⁾が用いた屈曲した注射針の方が、針の挿入が容易であった。この装置は、そのままラットの灌流固定にも応用できた²⁶⁾。

今回材料として用いた顎下腺のように、複雑な組織構成を示す臓器の CA 蛍光単独検出標本では、CA-F と

臓器内構成成分との相関を正確につけることは、必ずしも容易でない。CA 蛍光検出標本に一般に用いられる後染色を施すと、後染色中での CA 蛍光物質の消失や、バックグラウンド蛍光の増強によって、CA-F の観察が困難になってくる。そこで、従来、隣接連続切片に後染色を施して間接的に位置相関を知る方法や、CA 蛍光を観察した後、同一切片を位相差で観察したり²⁷⁾、あるいは、一旦 CA 蛍光の写真を撮影後、さらに切片を後染色して、再び写真撮影し、2枚の写真の同一視野を比較して、CA-F の分布部位を調べる方法²⁸⁾などが採られてきた。このような方法で、CA-F の分布をその末梢まで連続切片で検索しようとするのは、きわめて非効率で、しかも正確を期し難いので、同一切片について、CA 蛍光と構成組織の同時観察法の開発を試みた。

水溶液中では、CA 蛍光物質が容易に流出することから、FGS 液で灌流固定中に、同時に後染色をすることを考え、種々の色素を、種々の濃度で FGS 液に添加してみた。テストした色素は、eosin, acridine orange, rhodamine B, picrocarmine, safranin, Mayer の alum-carmin, toluidin blue, Meyer の haemalaun, gentian violet, acid fuchsin, nuclear fast red, evans blue, methyl green の 13 種であるが、バックグラウンド蛍光の増強、膠原線維などの同時染色、あるいは、CA 蛍光と後染色蛍光の類似性などのため、実際に使用可能であったものは、methyl green だけであった。E1-Badawi ら²⁹⁾は、0.05% eosin 水溶液を後染色に用いているが、今回のテストの結果、CA-F の蛍光は検出可能ではあるが、バックグラウンド蛍光がかなり強く、CA 蛍光の鮮鋭度の点で、実用には不向きであった。

methyl green は、Pappenheim³⁰⁾-Unna³¹⁾ の DNA 染色に広く用いられている色素であるが、この色素自体は、蛍光を示さず、核に結合し、かつ紫外線照射により、はじめて赤色蛍光を呈した。赤色蛍光は CA の黄緑色蛍光と際立った対比を示すため、CA-F と細胞核の蛍光顕微鏡下での同一観察に、きわめて好都合であった。methyl green の濃度は、種々検討した結果、0.01% の場合が、もっとも良好な結果を示した。今回開発した、CA 蛍光と細胞核の同時検出法をマウス顎下腺の神経支配の検索に利用し、腺内各部における CA-F の分布を明らかにすることが出来た³²⁾。この方法は、マウス顎下腺のみならず、膀胱などの他の臓器にも利用できた(中村、未発表)。高橋ら²⁶⁾は、この方法をラット内頸動脈の神経支配の研究に利用している。このように CA 蛍光と細胞核の同時検出法は、連続切片作

製が容易な点から CA-F の臓器内分布の検索に広く応用できる有用な方法であろうと考えられる。

結 論

血圧計を組み込んだ、灌流固定装置を作製し、その装置を用いて、メチルグリーンを含む固定液を灌流し、組織切片でカテコールアミン蛍光と細胞核を蛍光顕微鏡下で同時に検出する方法を考案した。

テスト材料として、成熟雄マウス顎下腺を用い、ヘパリン、亜硝酸ナトリウムを投与した麻酔マウスの左心室あるいは総頸動脈より、約 110 mm Hg の圧で、メチルグリーンを含む FGS 固定液 (8% paraformaldehyde 50 ml, 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) 48 ml, 20% glutaraldehyde 2.5 ml, sucrose 20g, 1% methyl green 1 ml) を注入してから顎下腺を剔出し、FGS 固定液 (メチルグリーンを除く) に 4℃ 3 時間に再固定し、18μ クライオスタット連続切片を作製し、50% Sucrose 液に 5 秒間浸漬後、合成ゼオライトを入れたデシケータで、-20℃ 6 時間乾燥し、キシロールで透徹後、Entellan に封入した。蛍光顕微鏡下で、カテコールアミン含有神経線維は、黄緑色の蛍光を呈し、細胞核は赤色の蛍光を示した。この方法は連続切片作製が容易なことから、カテコールアミン含有神経線維の臓器内分布の検索特に、臓器内の構成成分との相関の解明に広く応用できる有用な方法であろうと考えられる。

稿を終るに臨み、本研究に有益な御助言を賜った、本学解剖学教室主任兼神経情報研究施設長 本陣良平教授に深甚なる謝意を表します。また、灌流固定装置の作製について御助言頂いた金沢大学医療技術短期大学部 水上 稔教授および、原稿のタイプに協力頂いた当教室の山下恵子氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Falck, B., Hillarp, N. Å., Thieme, G. & Torp, A. : Fluorescence of catechol amines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.*, **10** : 348 - 354 (1962).
- 2) Axelsson, S., Björklund, A. & Lindvall, O. : Fluorescence histochemistry of biogenic monoamines. Study of the capacity of various carbonyl compounds to form fluorophores with biogenic monoamines in gas phase reactions. *J. Histochem. Cytochem.*, **20** : 435 - 444 (1972).
- 3) Axelsson, S., Björklund, A., Falck, B.,

- Lindvall, O. & Svensson, L.-Å. : Glyoxylic acid condensation: A new fluorescence method for the histochemical demonstration of biogenic monoamines. *Acta Physiol. Scand.*, **87** : 57 - 62 (1973).
- 4) de la Torre, J. C. & Surgeon, J. W. : A methodological approach to rapid and sensitive monoamine histofluorescence using a modified glyoxylic acid technique: The SPG method. *Histochemistry*, **49** : 81 - 93 (1976).
- 5) Furness, J. B., Costa, M. & Wilson, A. J. : Water-stable fluorophores, produced by reaction with aldehyde solutions, for the histochemical localization of catechol- and indolethylamines. *Histochemistry*, **52** : 159 - 170 (1977).
- 6) Furness, J. B., Heath, J. W. & Costa, M. : Aqueous aldehyde (Faglu) methods for the fluorescence histochemical localization of catecholamines and for ultrastructural studies of central nervous tissue. *Histochemistry*, **57** : 285 - 295 (1978).
- 7) Nakamura, T. : Application of the Faglu method (Furness et al.) for the histochemical demonstration of catecholamine to the cryostat section method. *Acta Histochem. Cytochem.*, **12** : 182 (1979).
- 8) Karnovsky, M. J. & Roots, L. : A 'direct coloring' thiocholine technique for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.*, **12** : 219 - 221 (1964).
- 9) Nakamura, T. & Torigoe, K. : Simultaneous visualization of catecholamine fluorescence and cholinesterase activity in the peripheral autonomic nerve: *Acta Histochem. Cytochem.*, **12** : 569 (1979).
- 10) Negishi, K., Hayashi, T., Nakamura, T. & Drujam, B. D. : Histochemical studies on catecholaminergic cells in the carp retina. *Neurochem. Res.*, **4** : 423 - 432 (1979).
- 11) Kato, S., Nakamura, T. & Negishi, K. : Postnatal development of dopaminergic cells in the rat retina. *J. Comp. Neurol.*, **191**: 227 - 236 (1980).
- 12) Negishi, K., Nakamura, T. & Hayashi, T. : Spatial density of catecholaminergic cells. *Exp. Eye. Res.*, **31** (in press) (1980).
- 13) 中村俊雄 : ホルムアルデヒド・グルタルアルデヒド・シヨ糖混合液固定法によるカテコラミンの組織化学的検出法. *解剖誌*, **54** : 88 - 89 (1979).
- 14) Honjin, R. : Studies on the nerve endings in the small intestine. *Cytol. Neurol. Stud.*, Kanazawa, **9** : 1 - 14 (1951).
- 15) 中村俊雄 : 顎下腺および舌下腺の神経支配について. *解剖誌*, **35** : 162 - 209 (1960).
- 16) 鈴木昭男 : 血管灌流による臓器・組織固定法・生体の科学, **31** : 256 - 263 (1980).
- 17) Griffen, L. D., Bulger, R. E. & Trump, B. F. : The ultrastructure of the functioning kidney. *Lab. Invest.*, **16** : 220 - 246 (1967).
- 18) Altman, P. L. & Dittmer, D. S. : *Biology data book*. p. 240. Federation of American Societies for Experimental Biology, Washington, D. C., 1964.
- 19) Karnovsky, M. J. : A formaldehyde-glutaraldehyde fixation of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biology.*, **27** : 137_A - 138_A (1965).
- 20) 高橋 暁・鳥越甲順・中村俊雄 : 新鮮骨格筋の凍結縦断切片作製の一改良法. 骨格筋線維の人工的収縮抑制法. *十全医会誌*, **88** : 617 - 622 (1979).
- 21) Norberg, K. -A. & Olson, L. : Adrenergic innervation of the salivary glands in the rat. *Z. Zellforsch.*, **68** : 183 - 189 (1965).
- 22) Fujiwara, M., Tanaka, C., Honjo, T. & Okegawa, T. : Histochemical demonstration of noradrenaline in rat salivary glands. *Jpn. J. Pharmacol.*, **15** : 369 - 377 (1965).
- 23) 坂井 義 : 実験動物の病理組織, その検査法と観察の要点 (榎本・林・田中編), 589 - 596 頁, 東京, ソフトサイエンス社, 1980.
- 24) 森 富 : 新組織化学 (小川・武内・森編), 143 - 158 頁, 東京, 朝倉書店, 1975.
- 25) Webster, E. DE F. & Collins, G. H. : Comparison of osmium tetroxide and glutaraldehyde perfusion fixation for the electron microscopic study of the normal rat peripheral nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **23** : 109 - 126 (1964).
- 26) 高橋 暁・山下利夫・鳥越甲順 : ラット内頸動脈の神経支配に関する組織化学的研究. *十全医会誌*, **89** : (印刷中) (1980).
- 27) El-Badawi, A. & Schenk, E. A. : Histochemical methods for separate, consecutive

and simultaneous demonstration of acetylcholinesterase and norepinephrine in cryostat sections. *J. Histochem. Cytochem.*, **15** : 580-588 (1967).

28) **Blessing, W. W., Chalmers, J. P. & Howe, P. R. C.** : Distribution of catecholamine-containing cell bodies in the rabbit central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, **179** : 407-424 (1978).

29) **El-Badawi, A. & Schenk, E. A.** : Dual innervation of the mammalian urinary bladder. A histochemical study of the distribution of cholinergic and adrenergic nerves. *Amer. J. Anat.*, **119** : 405-428 (1966).

30) **Pappenheim, A.** : Vergleichende Untersuchungen über die elementare Zusammensetzung des rothen Knochenmarkes einiger Säugetiere. *Virchows Arch.*, **157** : 19-76 (1899).

31) **Unna, P. G.** : Die Herkunft der Plasmazellen. *Virchows Arch.*, **214** : 320-339 (1913).

32) 中村俊雄・鳥越甲順・高橋 暁 : マウス顎下腺の神経支配に関する組織化学的研究。(抄録). *解剖誌*, **55** : 436-437 (1980).

写 真 説 明

写真1. 血圧計を組み込んだ小動物用灌流固定装置、説明は図1および本文参照のこと。

写真2. マウス顎下腺内のカテコールアミン含有神経線維 (CA-F). FGS 法による CA 蛍光単独検出標本. 左向きの矢印は、黄緑色蛍光を呈する CA-F を、上向きの矢印は、シナプス部に相当すると考えられる静脈瘤小腫大を示す。下向きの矢印は、lysosomeに由来すると考えられる黄色蛍光を発する小顆粒を示す。この標本では、CA-F と顎下腺構成成分との相関が不明確である。落射蛍光写真。×500。

写真3. マウス顎下腺の顆粒管周囲の CA-F. CA と細胞核の同時検出標本. gd : 顆粒管, 左向き矢印 : 黄緑色蛍光を呈する CA-F, 上向き矢印 : シナプス部と考えられる小腫大部, 下向き矢印 : 赤色蛍光を示す細胞核。落射蛍光写真。×500。

写真4. マウス顎下腺腺門部静脈壁の CA-F (強拡像). n : 赤色蛍光を示す細胞核, v : 腺門部静脈, 左向き矢印 : 黄緑色蛍光を呈する CA-F, 上向き矢印 : シナプス部と考えられる静脈瘤様小腫大。落射蛍光写真。×1200。

Simultaneous Demonstration of the Catecholamine Fluorescence and the Cell Nucleus by Perfusion with a Fixative Containing Methyl Green Toshio Nakamura*, Kojun Torigoe*, Akira Takahashi** & Toshio Yamashita, Department of Biophysics*, Neuro-Information Research Institute & Department of Anatomy**, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa Japan. 920, J. Juzen Med. Soc., 89, 499–507 (1980).

Abstract A histochemical method for the simultaneous demonstration of the catecholamine fluorescence and the cell nucleus under a fluorescence microscope by perfusion with a fixative containing methyl green, was described. Mouse submandibular glands were used as test materials. The best result was obtained by the following procedure.

Anesthetized mice were injected with heparin and sodium nitrite, and then they were perfused with the following fixative via the left ventricle or the common carotid artery. Special attention was paid to maintaining the fluid pressure at 110 mmHg by sphygomanometer during the whole perfusion procedure. The used fixative had the following composition: 50 ml of 8% paraformaldehyde, 48 ml of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4), 2.5 ml of 20% glutaraldehyde, 20 g of sucrose, and 1 ml of 1% methyl green.

After perfusion of the fixative, the submandibular gland was excised and immersed in the same fixative without methyl green at 4°C for 3 hours. After fixation, the serial sections were made at 18 μ with a cryostat and mounted on coverslips. The sections were dipped in 50% sucrose solution for 5 seconds, and dried in a desiccator containing synthetic Zeolite at -20°C for 6 hours. Then the sections were cleared in xylene and mounted in Entellan.

Under a fluorescence microscope, the catecholamine-containing nerve fibers showed a yellowish green fluorescence, while the cell nuclei showed a red fluorescence. The method described in this paper might provide a convenient way of studying the relationship between the catecholamine-containing nerve fibers and the tissue components in the submandibular gland as well as the other organs innervated by catecholamine-containing nerve fibers.

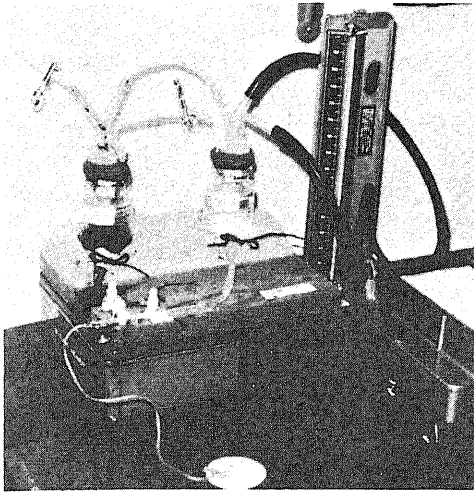


写真 1

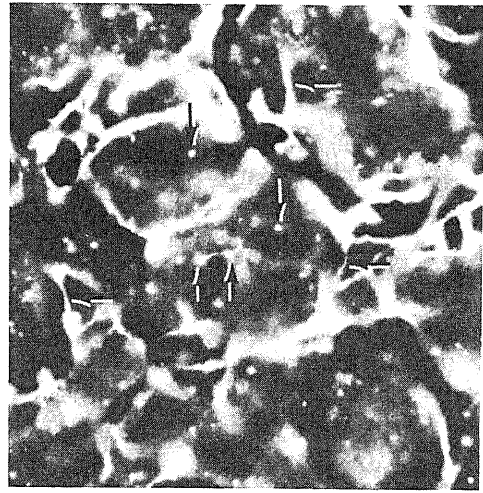


写真 2

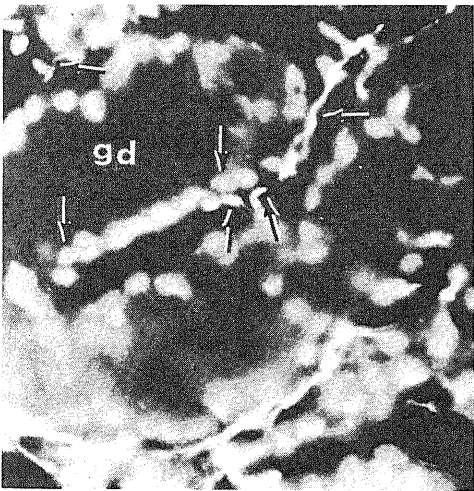


写真 3

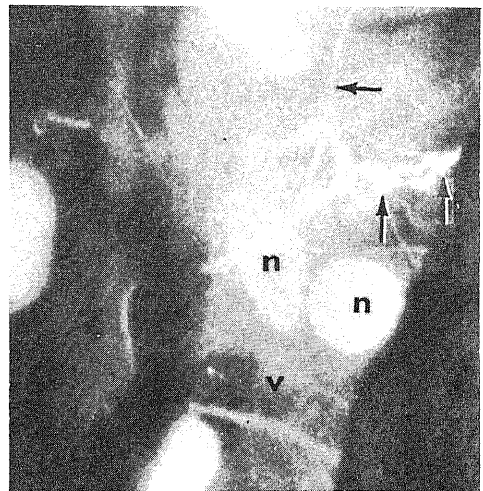


写真 4