

ラット内頸動脈の神経支配に関する組織化学的研究

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/2297/8850

ラット内頸動脈の神経支配に関する組織化学的研究

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

金沢大学医学部神経情報研究施設 (神経物性研究部門)

鳥 越 甲 順

(昭和55年7月25日受付)

本論文の要旨は、第85回日本解剖学会総会において発表した。

頭蓋内の動脈の壁に、神経線維が分布していることは、1664年に、すでに Willis¹⁾によって指摘された。その後、神経染色法を用いた Hassin²⁾, Clark³⁾ はじめ、多くの研究者によって、内頸動脈および椎骨動脈由来の頭蓋内動脈壁に、神経線維が豊富に分布することが確実に示された。近年、カテコールアミン(以下 CA と略記)の、蛍光組織化学的検査法が、Falck ら⁴⁾によって開発された、その方法によって、頭蓋内の動脈壁に、CAを含む神経線維(以下 CA-F と略記)が、豊富に存在することが、Falck ら⁴⁾はじめ、多くの研究者によって確かめられた^{7,8)}。一方、アセチルコリンエステラーゼ(以下 AchE と略記)活性の、組織化学的検出法によって、AchE 活性陽性線維(以下 AchE-F と略記)も、動脈壁に豊富に分布することが示された^{7,9)}。

上述のように、頭蓋内の動脈の壁には、CAを含む、アドレナリン作動性と考えられる神経線維と、強い AchE 活性を有する、コリン作動性と考えられる神経線維の両者が、豊富に分布していることが、組織化学的に明らかにされてきた。しかし、内頸動脈の起始から、大脳動脈輪に到達するまでの経路の、動脈壁の神経支配について、系統的な組織化学的検索は見当らず、僅かに、断片的な検索報告がみられるにすぎない^{7,10)}。この部の内頸動脈の神経支配の検索が乏しい最大の理由は、この区間で、内頸動脈が、頸動脈管、ついで頸動脈溝を通過するため、内頸動脈を、無傷のまま、全長にわたってとりだすことが、きわめて困難なことに

よると考えられる。

そこで著者は、連続切片作製可能な小動物として、成熟ラットを材料に選び、まず、合成樹脂の注入により、内頸動脈の走行を確かめ、次いで、CA 蛍光と AchE 活性の、両者の検出がともに可能な固定液¹¹⁾で、内頸動脈を一旦灌流固定後、実顕微鏡下で、内頸動脈をその起始から、大脳動脈輪に至るまでの、全長にわたってとりだすことを試みた。そして種々の方法を試みた結果、内頸動脈をその全長にわたって、ほぼ無傷のままとりだすことが可能な方法を見出した。その摘出材料について、伸展標本および連続切片を作製し、CA 蛍光と AchE 活性を検出し、内頸動脈壁の CA-F と AchE-F を検索したので、その結果を報告する。

材 料 と 方 法

材料として、成熟雄 Wister 系ラット(体重約 200g)の内頸動脈を用いた。以下に述べる方法で内頸動脈を採取し、CA 蛍光検出法と AchE 活性検出法を施した。

1. 内頸動脈採取法

内頸動脈をその全長にわたって採取するため、まず次の2つの方法によって、内頸動脈の分布を調べた。

1) 合成樹脂注入内頸動脈鋳型標本作製法

動物に血液凝固阻止のため、ヘパリンナトリウム液(1000 単位/1 ml, 武田薬品)を 5 ml 腹腔内に注射し、30 分後に、5%ネンブータル(ペントバルビタールナトリウム, 大日本製薬)を 0.5 ml 腹腔内に注射して麻

Histochemical studies on the innervation of the internal carotid artery of the rat. **Akira Takahashi & Toshio Yamashita**, Department of Anatomy, School of Medicine, **Kojun Torigoe**, Department of Biophysics, Neuro-Information Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University.

酔し、10分後さらに血管拡張剤として、1%亜硝酸ナトリウム生理的食塩水溶液を、0.5 ml腹腔内に注射後、直ちに開胸し、左心室より、血圧計を組み込んだ灌流装置¹¹⁾で、0.9%食塩水 100 mlを 100 mm Hgの圧で注入して洗滌し、次いで10%ホルマリン生理的食塩水溶液 100 mlを注入して、灌流固定をおこなった。灌流固定後、直ちに、合成樹脂 [Mercocox-CL-2R (主剤) 20g と MA (硬化剤) 0.2g の混合液 (販売先: 応研商事)] 20 mlを左心室より 20 ml注射器で注入し、15分間室温に静置後、さらに15分間 60℃に放置して合成樹脂を硬化させた。次に、頸部と頭部をまとめてとりだし、外皮を剥離してから、20% NaOHに室温 2日間浸漬し、軟部組織を腐蝕させ、約半日流水で洗滌後、乾燥した。作製した標本は実体顕微鏡下で観察し、内頸動脈の走行と頭蓋との相関を調べた。なお、脳表面の動脈の観察のため一部の材料は、合成樹脂注入後、直ちに頭蓋を開き、脳をとりだし、実体顕微鏡で観察した。

一部の材料は、奥村の方法¹²⁾に準じて、上記の方法で、ホルマリンの灌流固定後、3%ベルリンブルー液 [ベルリンブルー 3g, 蒸留水 (60℃) 45 ml, グリセリン 5 ml, 2.5%ゼラチン水溶液 50 ml] を灌流して、動脈を着色し、そのまま、実体顕微鏡下で内頸動脈の走行を観察した。

2) 頭蓋の脱灰・JB-4包埋・H-E標本作製

頸動脈管内での内頸動脈と骨壁の結合状態を知るために、前記1)の方法に従って灌流固定した頭蓋を、Plank & Rychlo法¹³⁾によって 20℃ 2日間脱灰し、エタノールで脱水後、水溶性合成樹脂 JB-4 (販売先: ケミサイエンス) に包埋し、10μ矢状連続切片を作製し、H-E染色を施した。

以上の方法で、内頸動脈の走行が明らかになったので、内頸動脈を実体顕微鏡下で、全長にわたってとりだすことを試みたが、未固定材料では、頸動脈管内および動脈溝部で、内頸動脈を剥離摘出することは、きわめて困難であることがわかった。そこで、CA蛍光検出ならびに AchE 活性検出の両者の検出可能な固定液として Nakamura & Torigoe¹⁴⁾ の FGS 固定液の著者の変法 [8% paraformaldehyde 水溶液¹⁵⁾ 50 ml, 0.2M phosphate buffer (pH 7.4) 48 ml, 20% glutaraldehyde 2.5 ml, 2% methyl green 1 ml, sucrose 10g] を用い、上記1)の操作のうち、0.9%食塩水での洗滌を除いたほかは、全く同じ操作で灌流固定後、実体顕微鏡下で内頸動脈を丹念に周囲組織から剥離し、全長にわたって1本の管として取り出した。特に剥離困難な部は、内頸動脈が頭蓋腔に入る頸動脈管の外口付近で、この部での剥離は特に慎重におこな

った。

2. CA 蛍光検出法

CA 蛍光検出法は、Nakamura の FGS 法¹⁶⁾に準じ、前記1)の方法でとりだした内頸動脈を、さらに、固定液 [8% paraformaldehyde 水溶液 50 ml, 0.2M phosphate buffer (pH 7.4) 48 ml, 20% glutaraldehyde 2.5 ml, sucrose 30g] に 4℃で 24時間浸漬し、スライドガラス上に伸展し、合成ゼオライト (和光純薬) を入れたデシケーター中で 24時間乾燥後、xylene で透徹し Entellan (Merck) に封じた。

内頸動脈各部の 18μクライオスタット横断連続切片について、CA 蛍光と細胞核の同時検出を、中村らの方法¹¹⁾に従っておこなった。

CA 蛍光の観察は、落射蛍光装置 (Olympus BH-RF1-A 型) に、ダイクロイックミラー、励起フィルター BG3 と IF405 を各 1 枚、吸収フィルター Y475 を装着しておこなった。

3. AchE 活性検出法

前記1)の方法でとりだした内頸動脈を、スライドガラス上に伸展し、合成ゼオライトで1晩乾燥後、中村と鳥越¹⁷⁾のルベア酸増強法による AchE 活性検出法に準じ、基質液 [0.2M phosphate buffer (pH 5.8) 53.0 ml, 2.94% sodium citrate 7.0 ml, 0.75% CuSO₄ · 5H₂O 10.0 ml, 2 × 10⁻⁴ M iso-OMPA (K & K 社) 10.0 ml, 0.169% 赤血塩 10.0 ml, 0.1% agar 10.0 ml, acetylthiocholine iodide 50.0 mg] に 37℃ 1時間浸漬し、次いで、ルベア酸増強液 (10% sodium acetate 80.0 ml, 0.1% rubeanic acid ethanol solution 20.0 ml) で室温 15分間処理し、脱水・透徹後、Entellan に封じた。

内頸動脈の横断切片についての AchE 活性検出は、前記1)の方法で内頸動脈をとりだし、その各部について、18μクライオスタット切片を作製し、その切片を上記基質液に 37℃ 30分間浸漬し、次いで、ルベア酸増強液に室温 15分間浸漬、脱水・透徹後、Entellan に封じた。

成 績

1. 内頸動脈の走行

内頸動脈に Mercocox を注入した血管鋳型標本ならびに、ベルリンブルー注入標本の実体顕微鏡観察により、内頸動脈の走行を調べた。気管に平行して走る総頸動脈は、甲状腺の下縁の高さで、外頸動脈と内頸動脈に分岐する (写真 1, 図 1)。総頸動脈から分かれた内頸動脈は、頸 2 腹筋後腹を奥の方へ曲り込み、鼓室胞 (tympanic bulla) の内側縁へ向い、そこで翼口蓋

動脈 (pterygopalatine artery, ヒトの外頸動脈由来の頸動脈に相当)¹⁸⁾を分岐し、さらに、鼓室胞の内側縁に沿って上行し、頸動脈管の内口に達する(写真2, 図1)。頸動脈管に入った内頸動脈は、ヒトのそのような強い彎曲走行を示さず、ほぼ直線状に前上方へ進んで頭蓋底の内面に達し、頸動脈管の外口から、頭蓋腔に入る(写真2, 図1)。頸動脈管の外口は、三叉神経根の腹側に位置し、この外口を出た内頸動脈は、三叉神経根の腹側を、頭蓋の内面にある頸動脈溝に沿って約3mm前進し、下垂体の側方に近づくと斜め前背側へ向きをかえ、下垂体茎の外側で鞍隔膜を貫通する(写真2)。鞍隔膜を貫通した内頸動脈は、まもなく、後大脳動脈を分岐して、大脳動脈輪に入る(写真2, 3, 図1)。後大脳動脈は、ヒトの場合、一般に脳底動脈の終枝となっているが、今回観察したラットの場合、Greene¹⁸⁾の記載にもあるがすべて内頸動脈より分岐していた。従ってヒトの場合の内頸動脈系と椎骨動脈系の連絡路である後交通動脈は、ラットの場合、後大脳動脈と脳底動脈間に認められた(写真3)。

以上の内頸動脈の経路のうち、最も剥離の困難な場所は、頸動脈管の外口附近であった。脱灰後 JB-4 包埋したラット頭蓋の連続矢状断切片の H-E 染色標本を観察すると、頸動脈管の外口附近では、写真4で示したように、内頸動脈壁が、頸動脈管壁の片側に、結合組織で、密に結合されていることが判明した。このこ

とから、頸動脈管の外口附近で、内頸動脈を剥離するときには、特に慎重を期し、内頸動脈をとりだすというより、むしろ、この部では内頸動脈を周囲の骨組織と共にとりだし、実体顕微鏡下で、内頸動脈に付着している骨片を外す方法を行った。内頸動脈壁の構造の局所的差異については、今後、電顕検索も加味してその詳細を明らかにしてゆきたいと考えているが、今回の検索の範囲では、中膜の厚さが、大脳動脈輪近傍の内頸動脈の部に比して、頸動脈溝および頸動脈管部でかなり薄くなっていることに気付いた。

2. 内頸動脈壁の AchE 陽性神経線維の分布

1) 伸展標本

内頸動脈の全長にわたる伸展標本について、AchE 活性陽性神経線維 (AchE-F) を、その起始部から順次観察すると、頸動脈管の外口を出て頭蓋腔に入るまでの内頸動脈壁には、AchE-F は認められなかった(写真5)。頸動脈管を出て、頸動脈溝の途中に達した内頸動脈壁においてはじめて、網目を呈する AchE-F が黒色を呈して認められた(写真6)。しかし、写真6で見られるようにこの部の内頸動脈壁では、AchE-F による神経網の分布密度は極めて小であった(写真6, 9)。内頸動脈が頸動脈溝部から、先へ進むにつれて、AchE-F による神経網の分布密度は徐々に大となり、鞍隔膜を貫通する部から急激に、その分布密度が増大し、後大脳動脈を分岐して、大脳動脈輪に達する部位で、その

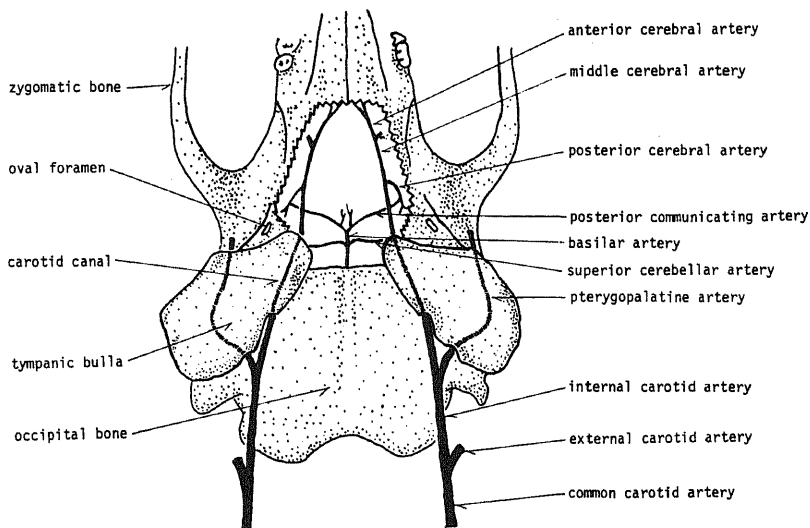


図1 ラット内頸動脈の走行を示す模式図 (メルコックス注入の血管鋳型標本に基づいて作製した頭蓋下面の図, basisphenoid bone, presphenoid bone と palatine bone¹⁸⁾ を取除いてある)

分布密度は最大になっていた(写真7, 8)。

写真9と10は、同一倍率で、それぞれ、頸動脈溝部と、大脳動脈輪に到達する直前の部を拡大して示したもので、それぞれAchE-Fがはじめて出現する部位と、その分布密度が最大になる部位に該当している。両者を比較すると、AchE-Fの分布に著しい差異があることが一目で判明できる。内頸動脈壁に分布するAchE-F神経網中には、神経線維の走行途中に、シナプス部と考えられる静脈瘤様腫大(varicosity)¹⁹⁾²²⁾が、かなり高頻度に認められた(写真10, 11)。また、神経線維の末端が腫大している像にも、しばしば接した(写真11)。この部もその形態から、シナプス部と考えられる。

2) 切片標本

内頸動脈を全長にわたってとりだし、それを起始から頸動脈管の内口までの区間、頸動脈管内の部、頸動脈管の外口から鞍隔膜を貫通するまでの区間、鞍隔膜から大脳動脈輪に達するまでの区間の4部に分け、そのそれぞれについて、10枚おきの連続横断切片を作製し、AchE活性を検出した。連続横断切片の観察によっても、動脈壁におけるAchE-Fの分布は、伸展標本での観察結果と同一であった。AchE-Fは、写真12, 13に見られるように、すべて外膜に分布し、中膜および、内膜に分布する像には、接しなかった。AchE-Fは、外膜の中で、特に中膜に接する部に、極めて密に分布していた(写真12, 13)。またAchE-Fの太い束が外膜の表層に粗な神経叢を形成して分布していた(写真12)。写真12は、鞍隔膜を貫通した直後の内頸動脈で、写真13は、大脳動脈輪に入った部の内頸動脈であるが、中膜の厚さは、後者の方が、かなり厚くなっている。

3. 内頸動脈壁のCA含有神経線維の分布

1) 伸展標本

起始から大脳動脈輪に至る内頸動脈を全長にわたって伸展したCA蛍光検出標本を、起始から順に蛍光顕微鏡で観察した結果、頸動脈管に入るまでの部では、CA含有神経線維(CA-F)は動脈壁には認められず、頸動脈管のほぼ中央部に至って、はじめて黄緑色を呈するCA-Fによる神経網が出現した(写真14)。しかし、この部では、CA-Fの分布密度は、極めて小であった(写真14)。CA-Fは、このはじめて出現する部位から末梢へ進むにつれて、その分布密度は次第に増加し、AchE-Fの場合と同様に、大脳動脈輪に入る直前の部で最大の分布密度を示した(写真15)。写真15と16は、同一倍率の写真で、それぞれ、頸動脈管中央部と大脳動脈輪に入る直前の部位を示している。この両者を比較すると、CA-Fの分布密度に著しい差異があることが

わかる。内頸動脈壁に分布するCA-Fによる神経網中には、その存在部位に関係なく、シナプス部に相当すると考えられる静脈瘤様腫大が豊富に認められた(写真14~16)。

2) 切片標本

AchE活性検出標本の場合と同様に、内頸動脈を4部に分け、そのそれぞれについて10枚おきの連続横断切片を作製し、蛍光顕微鏡下でCA-Fの分布を検索した。CA-Fの内頸動脈壁における分布は、横断切片についても、伸展標本で観察したと同様の結果であった。今回、メチルグリーンを加えた固定液を用いて作製した標本は、蛍光顕微鏡下で観察すると、細胞核は赤色蛍光を発した。このことは、CA-Fの血管壁内の分布部位の同定にきわめて好都合であった。CA-Fは、内頸動脈のいずれの部位においても、外膜のみに認められ、中膜および内膜には認められなかった(写真17, 18)。CA-FもAchE-Fと同様、外膜のうち、主に中膜に接する部に高密度に認められた(写真17, 18)。外膜の外表層部にも、CA-Fの網が認められたが、その分布密度は、上記の部位より、かなり小で、かつCA蛍光も幾分弱かった(写真18)。伸展標本で見られたと同様に、横断切片においても、シナプス部と考えられる静脈瘤様腫大を豊富に認めた(写真17, 18)。

上述したラット内頸動脈壁のAchE-FとCA-Fの分布を、図2に模式図として示した。

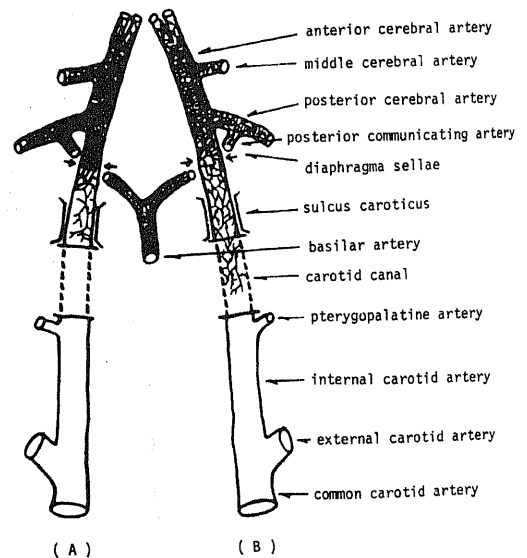


図2 ラット内頸動脈壁のAchE-F(A)とCA-F(B)の分布を示す模式図(説明は本文参照のこと)

考 察

脊椎動物の脳に分布する2系統の動脈、すなわち内頸動脈系と椎骨動脈系の、いずれにおいても、頭蓋腔内の大径動脈壁には、CA-FとAChE-Fの両者による密な神経網が存在していることが、多くの組織化学的研究報告で明らかになっている。このことは、Edvinssonら²⁾および和佐野⁸⁾の綜説に詳しく述べられている。しかし、内頸動脈・椎骨動脈のいずれについても、その起始から頭蓋腔に入るまでの経路の動脈壁の神経支配に関する組織化学的検査は、ほとんどなされていない。その理由は、緒言でも触れたように、その経路の動脈は、その解剖学的位置から、無傷のまま、全長にわたって採取することが困難なことに起因すると考えられる。事実、今回の内頸動脈についての研究の予備実験の経験から、内頸動脈の走行を確認し、動脈周囲骨組織との結合状態を充分把握し、動脈摘出手技に習熟した後でない、起始から大脳動脈輪までの内頸動脈の全経路の摘出は、ほとんど不可能に近いことがわかった。今回、著者らは、材料採取を容易にするための工夫として、最初に、左心室からの灌流固定法により、内頸動脈を固定する方法を用いた。固定液として種々検討した結果、CA蛍光検出にも、AChE活性検出にも用いられるNakamuraら¹⁴⁾のFGS固定液を採用し、それに0.02%の割合にmethyl greenを加えた¹¹⁾。methyl greenを固定液に加えたことによって、内頸動脈は、淡青色に染まり、動脈を周囲組織から識別することが容易になり、材料採取時間を著しく短縮することができた。methyl greenはDNAの染色に広く用いられている色素で、それ自体は蛍光を持たないが、核に結合すると赤色蛍光を呈することが知られている¹¹⁾。このことは、横断切片でCA-Fの分布を調べる際に、その分布位置の同定をするのに役立つ。

AChE-Fは、椎骨動脈系および内頸動脈系の頭蓋内大径動脈に豊富に存在し、後者の血管壁の方が前者より密にAChE-Fが存在していることが報告されている⁷⁾。今回のラットについての検索でも、内頸動脈が大脳動脈輪に到達する直前の部で、最も高密度のAChE-Fの分布が見られた。また今回は触れなかったが、大脳動脈輪、中大脳動脈と前大脳動脈の主幹動脈には、きわめて密なAChE-Fの分布が見られた。起始から大脳動脈輪に至る経路の内頸動脈壁のAChE-Fの分布についての系統的検索報告は見当らず、わずかにVasquezら²⁴⁾の断片的報告を見るにすぎなかった。Vasquezら²⁴⁾は、内頸動脈の頭蓋外の部分にはAChE-Fの分布は見られないと述べている。今回の伸展標本

ならびに横断連続切片の検索でも、AChE-Fは、頸動脈管を出るまでの内頸動脈壁では見られなかった。AChE-Fは、頸動脈管の外口を出て頸動脈溝部で、はじめて出現することが判明した。AChE-Fの最初の出現部位では、AChE-Fの分布密度は小で、末梢へ進むにつれて、その分布密度は次第に高まり、鞍隔膜を貫通する部で、急激に分布密度が高くなっていった。

AChE-Fは、内頸動脈の外膜にのみ認められ、中膜および内膜に分布する像には接しなかった。このことは、Motavkinら⁹⁾と、和佐野⁷⁾の所見に一致している。AChE-Fは、外膜中で、その外表層と、中膜に接する部の2か所で、神経叢を形成していることが、Motavkinら⁹⁾およびBorodulyaら²⁵⁾によって報ぜられている。このことは、著者の所見に一致する。ところで、このAChE-Fが、動脈壁でシナプスを形成しているか否かは、正確には、電顕検索にまたねばならないが、自律神経のシナプスは、電顕観察すると一般に、静脈瘤状に腫大して裸出した軸索がシナプス小胞を含み、シナプス後膜に接する形態をとっている^{19)~22)}。このような静脈瘤状腫大は、光顕でも観察できることが報ぜられている²²⁾。今回の伸展標本での検索で、内頸動脈壁のAChE-Fに静脈瘤様腫大および神経線維の末端部における小腫大が観察されたが、その構造は、大きさ、形態からシナプス部に相当すると考えられる。Motavkinら⁹⁾と、和佐野⁷⁾らは、AChE活性検出法で、頭蓋内動脈壁のAChE-Fを検出しているが、彼等の報告では、今回著者らが観察したような静脈瘤様腫大は示されていない。自律神経系のAChE活性は、かなり弱く、Koelleのアセチルチオコリン法²⁶⁾で検出しようとする、Motavkinら²³⁾がおこなったように8~15時間もの長時間にわたる基質液への浸漬が必要である。長時間の浸漬によってAChE活性反応産物は増強する反面、反応産物の拡散によって、AChE活性局在の鮮鋭度は低下してくる。この点を考慮して、著者らは、基質液に1時間浸漬後、ルベアン酸増強法¹⁷⁾を行った。その結果、AChE-Fは黒色で、かつ鮮鋭な像を示した。今回、AChE-Fで静脈瘤様腫大が検出されたことは、検出法の改良に起因するものと考えられる。

CA-Fも、椎骨動脈系、内頸動脈系の両者の、頭蓋内大径動脈に豊富に存在し、特に後者に高密度に分布していることが、蛍光組織化学的研究から明らかになっている^{6)~9)27)~31)}。今回の検索でも、大脳動脈輪、中および前大脳動脈に、CA-Fによる密な神経網が観察された。ところでCA-Fについても、起始部から、大脳動脈輪に至るまでの内頸動脈壁のCA-Fの分布に関する研究は乏しく、わずかに、和佐野⁷⁾とKnocheら¹⁰⁾の断片

的な報告を見るにすぎない。和佐野⁷⁾, Knocheら¹⁰⁾は内頸動脈壁に、CA-Fは、ほとんど認められないと記載しているが、その詳細については触れていない。伸展標本と横断連続切片についての著者の観察によって、CA-Fは、内頸動脈が頸動脈管に入るまでは見られず、頸動脈管のほぼ中央部で、はじめて出現することが判明した。AchE-Fの分布と同様に、CA-Fも最初の出現部位では、その分布密度は小で末梢へ行くに従って、分布密度は大となり、大脳動脈輪に入る直前で最大の分布密度を示した。

CA-Fも、AchE-Fと同じく、外膜のみ認められ、外膜の最表層部と中膜に接する部の2層性分布を示していた。このことは、和佐野⁷⁾の所見に一致する。シナプス部に相当すると考えられる静脈瘤様腫大は、CA-Fの出現しはじめる頸動脈管中央部から、CA-Fの高密度分布を示す大脳動脈輪近傍までの、すべての部位において豊富に認められた。動脈壁のCA-F中に静脈瘤様腫大が存在することは、Falckら⁹⁾ははじめ、多くの研究者の報告と同様であった。

Falckら⁹⁾によって開発されたCA蛍光検出法の原理は、凍結乾燥切片に formaldehyde ガスを作用させると、CAは formaldehyde によって閉環縮合反応をおこし、480~500m μ の波長をもって強い蛍光を発する isoquinoline 誘導体に変ることに基づいている。そしてこの方法は、CAに対してきわめて特異的な検出法であることは、一般に広く認められているところであり、今回用いた、FGS法¹⁶⁾も、反応の特異性を確かめられている Furnessらの方法³²⁾の変法である。従って、今回蛍光顕微鏡下で、黄緑色蛍光を呈した神経線維は、確実に、神経伝達物質であるCAを含んでいると推論できる。ところで、今回観察した内頸動脈壁のCA-Fの起源であるが、上頸神経節摘除後、頭蓋内内頸動脈系の大径動脈壁からCA-Fは完全に消失するとのNielsenら²⁷⁾, Kajikawa²⁸⁾の報告から類推すると、頸動脈管中央部から大脳動脈輪に至るまでの内頸動脈壁のCA-Fも、上頸神経節由来のものと考えられる。

一方、AchE-Fは、CA-Fの場合と異なり、神経伝達物質である acetylcholine を検出したものでなく、acetylcholine を分解する acetylcholinesterase の活性で検出したものである。cholinesteraseには、true-cholinesterase (acetylcholinesterase) と pseudo-cholinesterase があり、前者は acetylcholine に強い親和性を有することが知られている³³⁾、今回、著者らは、10⁻⁵M iso-OMPAで pseudo-cholinesterase を阻害^{33,34)}、true acetylcholinesterase 活性のみを検出した。伝達物質

である acetylcholine の組織化学的検出法が見いだされていない現在、コリン作動性神経の検出には、acetylcholinesterase 活性検出法が一般に広く用いられ、間接的に acetylcholine の存在を推定する方法がとられている。しかし、このような間接的方法では、コリン作動性神経の同定について二三の問題が生じている、すなわち、AchEがコリン作動性神経にのみ局在するのなら問題はないが、基質液に長時間(例えば24時間)切片を浸漬すると、コリン作動性でない知覚神経線維にも、AchE活性が検出されることが報告されている³⁵⁾。今回行ったAchE活性検出の際、基質液への浸漬は、1時間であるので、知覚神経線維が検出される可能性はないと考えられる。次に、AchE活性の電顕組織化学的検索から、ラット松果体³⁶⁾、マウス心房³⁷⁾、サルの腎臓³⁸⁾、マウス有郭乳頭³⁹⁾およびマウス耳下腺⁴⁰⁾で、AchE活性を有するCA-Fの存在が示唆されている。今回検索した内頸動脈壁に、AchE活性を有するCA-Fが存在するか否かについては、今後の電顕検索にまたねばならないが、少なくとも、頸動脈管内の内頸動脈壁には、そのような神経線維は存在しないと考えられる。その根拠は、頸動脈管内では、CA-Fは検出されないが、AchE-Fは検出されなかったことよっている。

内頸動脈壁のAchE-Fの起源については、ほとんど検索がなされておらず、わずかに Vasquezら²⁴⁾の一報を数えるに過ぎない。Vasquezら²⁴⁾は、ラットの大錐体神経切断後、内頸動脈壁のAchE-Fの減少を報告している。彼等²⁴⁾は、内頸動脈壁のAchE-Fの一部は、大錐体神経から由来することを示しているが、大錐体神経切断後に残存しているAchE-Fの由来については明らかにしていない。この点の解明は、将来に残された重要な課題の一つであろう。

結 論

ラットの内頸動脈の壁に分布する、アセチルコリンエステラーゼ活性陽性神経線維(AchE-F)と、カテコールアミン含有神経線維(CA-F)の分布を、その起始から脳底動脈輪に至るまでの全長にわたって、伸展標本と凍結横断連続切片について検索した。AchE活性はアセチルチオコリン法のルベアン酸増強法により、CA蛍光はFGS法によった。また内頸動脈の分布の検索に合成樹脂血管鋳型標本および脱灰H-E標本を製作した。得られた結果は次のとおりである。

1. ラット内頸動脈は、甲状腺の高さで総頸動脈から分枝して上行し、鼓室胞の内縁で頸動脈管に入り、

頸動脈管の外口から頭蓋腔内へ入り、頸動脈溝に沿って前進し、下垂体茎の側方で鞍膈膜を貫通し、まもなく大脳動脈輪に合流する。

2. AchE-F は、内頸動脈が頸動脈管の外口を出て直後、頸動脈溝に入って間もなく出現し動脈壁に網目状を呈して分布している。AchE-F の最初の出現部位では、その分布は疎であるが、末梢へ進むにしたがってその分布密度は高まり、大脳動脈輪に到達する直前の部で最高の分布密度を示す(図2)。

3. CA-F は頸動脈管の中央部の内頸動脈壁から出現しはじめ、動脈壁に網目状を呈して分布している。CA-F は出現部位では疎な神経網を示すが、末梢へ進むに従ってその分布密度は高まり、大脳動脈輪に到達する直前の部で最高の密度を示す(図2)。

4. 凍結横断切片の観察から、AchE-F および CA-F は、ともに動脈の外膜に限局して分布している。両種神経線維ともに外膜の表層および中膜との境界部に神経叢を形成している。

5. AchE-F ならびに CA-F は、内頸動脈壁で、シナプス部と考えられる静脈瘤様腫大を示した。

稿を終えるにあたり、本研究に有益な御助言を賜った、本学第一解剖学教室本陣良平教授に深甚なる謝意を表します。また、標本作製に、種々の便宜をはかっていただいた、本学神経情報研究施設中村俊雄教授に感謝します。

文 献

- 1) Willis, T. : Cerebri anatome. Martin & Allestry, London, 1664. (Edvinsson & Mackenzie 1977より引用).
- 2) Edvinsson, L. & Mackenzie, E. T. : Amine mechanismus in the cerebral circulation. *Pharmacol. Rev.*, **28**, 275-391 (1977).
- 3) Hassin, G. E. : The nerve supply of the cerebral blood vessels. A histologic study. *Arch. Neurol. Psychiat.*, **22**, 375-391 (1929).
- 4) Clark, S. L. : Innervation of the blood vessels of the medulla and spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, **48**, 247-258 (1929).
- 5) Falck, B., Hillarp, N. -A., Thieme, G. & Torp, A. : Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.*, **10**, 348-354 (1962).
- 6) Falck, B., Mchedishvili, G. I. & Owman, C. H. : Histochemical demonstration of adrenergic nerves in cortex-pia of rabbit. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **23**, 133-142 (1965).
- 7) 和佐野武雄 : 脳血管の神経支配. *脈管学*, **8**, 411-414 (1968).
- 8) 和佐野武雄 : 脊椎動物脳血管の神経支配, *解剖誌*, **54**, 65-84 (1979).
- 9) Motavkin, P. A. & Dovbish, T. V. : Histochemical characteristics of acetylcholinesterase of the nerves innervating the brain vessels. *Acta Morphologica Acad. Sci. Hung.*, **19**, 159-173 (1971).
- 10) Knoche, H. & Kienecker, E. -W. : Sympathetic innervation of the carotid bifurcation in the rabbit and cat : blood vessels, carotid body and carotid sinus. A fluorescence and electron microscopic study. *Cell Tiss Res.*, **184**, 103-112 (1977).
- 11) 中村俊雄・鳥越甲順・高橋 暁・山下利夫 : 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細胞核の同時検出法, *十全医会誌*, **89**, 印刷中 (1980).
- 12) 奥村隆彦 : 廿日鼠脳の血管構築に関する研究. *十全医会誌*, **64**, 512-539 (1960).
- 13) Plank, J. & Rychlo, A. : Eine Schnellenkalkungsmethode. *Zentralbl. Allg. Pathol.*, **89**, 252-254 (1952).
- 14) Nakamura, T. & Torigoe, K. : Simultaneous visualization of catecholamine fluorescence and cholinesterase activity in the peripheral autonomic nerve. *Acta Histochem. Cytochem.*, **12**, 569 (1979).
- 15) Karnovsky, M. J. : A formaldehyde-glutaraldehyde fixation of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **27**, 137A-138A (1965).
- 16) 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).
- 17) 中村俊雄・鳥越甲順 : コリンエステラーゼ活性検出におけるルベアン酸増強法. *解剖誌*, **55**, 263-264 (1980).
- 18) Greene, E. C. : Anatomy of the rat. p17, **183**, 185-186. Hafner Publishing Co., New York & London, 1963.
- 19) Honjin, R., Takahashi, A. & Tasaki, Y. : Electron microscopic studies of nerve endings

- in the mucous membrane of the human intestine. *Okajimas Folia Anat. Jap.*, **40**, 409-427 (1965).
- 20) **Honjin, R., Takahashi, A., Shimasaki, S. & Maruyama, H.** : Two types of synaptic nerve processes in the ganglia of Auerbach's plexus of mice, as revealed by electron microscopy. *J. Electron Microsc.*, **14**, 43-49 (1965).
- 21) **本陣良平・高橋 暁** : 消化管におけるシナプスの電子顕微鏡所見. *細胞化学シンボ*, **16**, 59-74 (1966).
- 22) **山下利夫** : マウス睪板筋の神経支配について. *十全医会誌*, **88**, 262-286 (1979).
- 23) **Motavkin, P. A. & Osipova, L. P.** : Cholinergic innervation of the human brain arteries. *Z. mikrosk. -anat. Forsch.*, **87**, 365-378 (1973).
- 24) **Vasquez, J. & Purves, M. J.** : The cholinergic pathway to cerebral blood vessels. I. Morphological studies. *Pflügers Arch.*, **379**, 157-163 (1979).
- 25) **Borodulya, A. V. & pletchkova, E. K.** : Cholinergic innervation of vessels of the base of the brain. *Acta Anat.*, **96**, 135-147 (1976).
- 26) **Koelle, G. B.** : The elimination of enzyme diffusion artefacts in the histochemical localization of cholinesterases and a survey of their cellular distributions. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **103**, 153-171 (1951).
- 27) **Nielsen, K. C. & Owman, C. H.** : Adrenergic innervation of pial arteries related to the circle of Willis in the cat. *Brain Res.*, **6**, 773-776 (1967).
- 28) **Kajikawa, H.** : Fluorescence histochemical studies on the distribution of adrenergic nerve fibers to intracranial blood vessels. *Arch. Jap. Chir.*, **37**, 473-482 (1968).
- 29) **Kajikawa, H.** : Mode of the sympathetic innervation of the cerebral vessels demonstrated by the fluorescent histochemical technique in rats and cats. *Arch. Jap. Chir.*, **38**, 227-235 (1969).
- 30) **Peerless, S. J. & Yasargil, M. G.** : Adrenergic innervation of the cerebral blood vessels in the rabbit. *J. Neurosurg.*, **35**, 148-154 (1971).
- 31) **Hernandez - Perez, M. J. & Stone, H. L.** : Sympathetic innervation of the circle of Willis in the macaque monkey. *Brain Res.*, **80**, 507-511 (1974).
- 32) **Furness, J. B., Costa, M. & Wilson, A. J.** : Waterstable fluorophores, produced by reaction with aldehyde solutions, for the histochemical localization of catechol and indolethylamines. *Histochemistry*, **52**, 159-170 (1977).
- 33) **Pearse, A. G.** : *Histochemistry, theoretical and applied*. 3rd ed., p766, 769. Churchill Livingstone, Edinburgh and London, 1972.
- 34) **Aldridge, W. N.** : The differentiation of true and pseudocholinesterase by organophosphorus compounds. *Biochem. J.*, **53**, 62-67 (1953).
- 35) **Amenta, F., Sancesario, G., Ferrante, F. & Cavallotti, C.** : Acetylcholinesterase-containing nerve fibers in the dura mater of guinea pig, mouse, and rat. *J. Neural Transm. (Suppl.)*, **47**, 237-242 (1980).
- 36) **Eränkő, O., Rehardt, L., Eränkő, L. & Cunningham, A.** : Light and electron microscopic histochemical observations on cholinesterase-containing sympathetic nerve fibres in the pineal body of the rat. *Histochem. J.*, **2**, 479-489 (1970).
- 37) **Chiba, T.** : Electron microscopic and histochemical studies on the synaptic vesicles in mouse vas deferens and atrium after 5-hydroxydopamine administration. *Anat. Rec.*, **176**, 35-48 (1973).
- 38) **Barajas, L., Wang, P. & Santes, S. D.** : Light and electron microscopic localization of acetylcholinesterase activity in the rat renal nerves. *Amer. J. Anat.*, **147**, 219-234 (1976).
- 39) **Takeda, M.** : An electron microscopic study on the innervation in the taste buds of the mouse circumvallate papillae. *Arch. Histol. Jap.*, **39**, 257-269 (1978).
- 40) **Takeda, M.** : Electron microscopy of the adrenergic and cholinergic nerve terminals in the mouse salivary glands. *Arch. Oral Biol.*, **23**, 857-864 (1978).

写真説明

写真1. ラット頭蓋下面, メルコックス血管鋳型標

本. 右 (写真では左) 総頸動脈 (cc) を末梢へ辿ると、内頸動脈 (ic) と外頸動脈 (ec) に分岐し、内頸動脈は鼓室胞 (tb) の手前で翼口蓋動脈 (pp) を分枝してから、鼓室胞の内縁を上行して、矢印の部 (内口) から頸動脈管に進入する。× 3

写真 2. 写真 1 の標本の頭蓋底内面。頸動脈管の外口 (矢印) から頭蓋腔へ出た内頸動脈 (ic) は、頸動脈溝 (sc) を通り、さらに進んで後大脳動脈 (pc) を分枝して大脳動脈輪に合流する。後交通動脈 (pc) は後大脳動脈 (pc) と脳底動脈 (ba) の間を連絡している。× 3

写真 3. ラット脳下面。メルコックス血管注入標本。内頸動脈 (ic) は鞍隔膜を貫通したところで切断されている。内頸動脈は後大脳動脈を分枝して大脳動脈輪に入り、さらに進んで中大脳動脈 (mc) と前大脳動脈 (ac) を分岐する。後交通動脈は後大脳動脈 (pc) と脳底動脈 (ba) の間を結んでいる。va: 椎骨動脈。× 3

写真 4. 頸動脈管の外口部の内頸動脈 (ホルマリン固定・脱灰・JB-4 包埋・矢状断切片・H-E 染色)。写真下方が内頸動脈の起始側で、矢印で頸動脈管の外口を示してある。頸動脈管の外口附近では、内頸動脈 (ic) は結合組織で頸動脈管壁の一侧に強く結合されている。× 40

写真 5. 翼口蓋動脈を分枝する手前の内頸動脈。伸展材料の AchE 活性検出標本。この部の内頸動脈壁には AchE 活性陽性線維はみられない。× 50

写真 6. 頸動脈溝部の内頸動脈。伸展材料の AchE 活性検出標本。写真左側が起始側で、下向きの矢印は頸動脈管の外口を、上向きの矢印は AchE-F を示す。AchE-F は内頸動脈が頸動脈口を出て頸動脈溝に達するとはじめて出現するが、この部では分布密度は小である。× 50

写真 7. 頸動脈溝を出て鞍隔膜を貫通する部分の内頸動脈。伸展材料の AchE 活性検出標本。写真左側が起始側で、1 の記号は鞍隔膜を貫通する部を示す。上向きの矢印は AchE-F を示す。鞍隔膜に近づくにつれて AchE-F の分布密度は大となっている。× 50

写真 8. 写真 7 の連続写真。1 の記号は鞍隔膜貫通部を、2 の記号は後大脳動脈分枝部を示す。上向きの矢印で AchE-F を示す。AchE-F の分布密度は末梢へ進むにつれて次第に大となり、大脳動脈輪に到達する直前の部で最大となっている。× 50

写真 9. 頸動脈溝部の内頸動脈。伸展材料の AchE 活性検出標本。矢印で AchE-F を示す。この部は AchE-F がはじめて出現しはじめた部で、その分布

密度は小である。× 250

写真 10. 鞍隔膜を貫通し、大脳動脈輪に到達する直前の部の内頸動脈。伸展材料の AchE 活性検出標本 (中拡大)。この部は AchE-F の神経網が最も密になっている部で、同倍率の写真 9 と比較すると、AchE-F の分布密度に大差のあることがわかる。矢印はシナプス部と考えられる静脈瘤様腫大を示す。× 250

写真 11. 大脳動脈輪に到達する直前の部の内頸動脈壁の強拡大像。伸展材料の AchE 活性検出標本。左向きの矢印はシナプス部と考えられる静脈瘤様小腫大を示す。上向きおよび下向き矢印は、AchE-F の末端にみられた腫大部を示す。× 500

写真 12. 鞍隔膜を貫通した直後の部の内頸動脈壁横断像。クライオスタット切片の AchE 活性検出標本。AchE-F は血管の外膜に局限して分布しているのがみられる。下向き矢印は外膜表層部を走る太い AchE 陽性神経束を示す。上向き矢印は外膜が中膜と接する部位を走る AchE-F を示す。× 500

写真 13. 大脳動脈輪に到達する直前の部の内頸動脈の横断像。クライオスタット切片の AchE 活性検出標本。矢印は外膜の中膜に接する部位に密に分布している AchE-F を示す。× 500

写真 14. 頸動脈管のほぼ中央部を走る内頸動脈。伸展材料の CA 蛍光検出標本。黄緑色の蛍光を呈する CA-F はこの部ではじめて出現しはじめる。矢印はシナプス部と考えられる静脈瘤様腫大を示す。細胞核は赤色蛍光を示している。× 600

写真 15. 大脳動脈輪に到達する直前の部の内頸動脈。伸展材料の CA 蛍光検出標本。同一倍率の写真 14 と比較すると、この部では CA-F の分布密度がはるかに高くなっていることがわかる。CA-F の神経網の分布密度はこの部で最大となっている。矢印はシナプス部と考えられる静脈瘤様腫大を示す。× 600

写真 16. 大脳動脈輪に入る直前の部の内頸動脈の強拡大像。伸展材料の CA 蛍光検出標本。矢印でシナプス部と考えられる静脈瘤様腫大を示す。× 1500

写真 17. 頸動脈溝部の内頸動脈の横断像。クライオスタット切片の CA 蛍光検出標本。黄緑色蛍光を呈する CA-F は外膜に局限して分布している。上向きの矢印は外膜が中膜と接する部を走る CA-F の静脈瘤様小腫大を示す。左向きの矢印は外膜の最外層を走る CA-F を、下向きの矢印は内弾性板の自家蛍光を示す。標本が少し斜めに切れているので、動脈壁は実際より厚くみえている。細胞核は赤色蛍光を発している。× 600

写真 18. 大脳動脈輪に入る直前の部の内頸動脈の横断像. クライオスタット切片の CA 蛍光検出標本. 上向きの矢印は外膜が中膜と接する部を走る CA-F の

静脈瘤様腫大を示す. 左向きの矢印は外膜最外層を走る CA-F を, 下向きの矢印は内弾性板の自家蛍光を示す. $\times 600$

Histochemical Studies on the Innervation of the Internal Carotid Artery of the Rat. Akira Takahashi & Toshio Yamashita, Department of Anatomy, Kojun Torigoe, Department of Biophysics, Neuro-Information Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920, Japan. *J. Juzen Med. Soc.*, **89**, 527–540 (1980).

Abstract The distribution of the acetylcholinesterase-positive nerve fibers (AChE-F) and the catecholamine-containing nerve fibers (CA-F) in the internal carotid artery of the rat was studied histochemically. For the demonstration of the acetylcholinesterase activity, the acetylthiocholine method combined with rubeanic acid intensification was used, and for the visualization of catecholamine fluorescence, the FGS method (Nakamura) was used. Both histochemical methods were applied to the whole stretch preparations as well as the serial cross-sections of the entire length of the internal carotid artery, respectively. The course of the internal carotid artery was studied by the stereoscopic microscopy of the vascular casts which had been injected with plastic resin as well as by the microscopic observation on the serial section of the decalcified skull. The results obtained were summarized as follows:

1. The internal carotid artery of the rat arising from the common carotid artery opposite to the lower end of the thyroid gland ascends toward the base of the skull, and enters the carotid canal at the medial margin of the tympanic bulla. After passing through the carotid canal into the cranium, the internal carotid artery runs further rostrally along the sulcus caroticus, and perforates the diaphragma sellae lateral to the stalk of the hypophysis. Afterward it perforates the diaphragma sellae, it runs for a short distance, and enters into the arterial circle of Willis.

2. Although there were found no AChE-F in the wall of the internal carotid artery between the carotid bifurcation and the exit of the carotid canal, AChE-F appeared in the wall of the internal carotid artery situated on the sulcus caroticus, and it was found that the loose network was formed by the AChE-F. The AChE-F around the vessels increased gradually in its innervation density along the intracranial course of the internal carotid artery and reached a maximal density at the entering portion of the artery into the circle of Willis (Text-Fig. 2).

3. CA-F appeared initially in the wall of the internal carotid artery situated on the middle portion of the carotid canal, and showed a loose network. The CA-F around the vessels increased its density gradually along the course of the internal carotid artery in a similar fashion to the AChE-F, and a maximal density of CA-F was seen at the entering portion of the artery into the circle of Willis (Text-Fig. 2).

4. AChE-F as well as CA-F was found to lie exclusively within the adventitia of the artery and form superficial and deep plexuses in the adventitia.

5. The varicosities of the nerve fibers which were assumed to be the synaptic areas, were very frequently recognized in the nerve plexus formed by the AChE-F or the CA-F around the internal carotid artery.

