新鮮骨格筋の凍結縦断切片のコハク酸脱水素酵素とコリンエステラーゼ活性の同時検出法

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: 中村, 俊雄, 鳥越, 甲順, 高橋, 暁, 山下, 利夫
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8792

新鮮骨格筋の凍結縦断切片のコハク酸脱水素酵素とコリンエステラーゼ活性の同時検出法

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54年8月20日受付）

本論文の一部は，第37回日本解剖学会中部地方会において発表した。

1952年Padykula[1]によって酵素組織化学的研究法が，骨格筋の検索に導入されるに及び，骨格筋は，組織化学的特徴を異にする数種の筋線維がモザイク状に入り混じった複雑な構築を有することが判明し[2]，さらに筋線維の酵素組織化学的特徴が，筋線維の生理学的特徴と密接に関連していることが明らかになってきた[3)~5)]．そして筋線維の分類として組織化学的分類が一般に広く用いられるようになり[6)~11)]，この分類は，正常骨格筋のみならず種々の骨格筋疾患の病理診断上にも，重要な地位を占めている．ところでこの筋線維は，成熟した骨格筋でも，不変のものでなく，支配神経によって強く影響を受け，異なる骨格筋間の支配神経交叉縫合実験で筋線維型の相互転換を起こせることも可能になっている[12)13)]．また筋線維型と神経筋接合部の形態間にも密接な相関があることが示唆されている[14)~16)]．ところで，筋線維型と神経筋接合部の相関を検索する手段として，Korneliussenらは[15)16)]筋線維型および神経筋接合部の型の分布をそれぞれ独立に調べ，相互の分布を対比する間接法を採っている．しかし，筋線維型と神経筋接合部を同時に検出する直接法の方が，このような検索については，はるかに優っていることは，論を俟たない．

現在，神経筋接合部を確実かつ容易に検出する方法は，コリンエステラーゼ（以下「chE」と略記）活性検出法である[17)]．このchE活性検出法と筋線維型の同定指標となる酵素活性の検出法を組み合わせれば，筋線維型と神経筋接合部の型との対応を直接に観察できる訳であるが，後述のように，標本作製上の困難性に阻まれて，そのような二重検出法の報告は少なく，著者の報告[18)]を含めて，わずか数報を見るに過ぎない[19)20)]．しかも，これらの報告で用いられた方法は，なお不備な点が多く，定量的な検索には応用しにくい．

筋線維型と神経筋接合部の同時検出標本作製上の難点は，神経筋接合部の全貌を観察するには，骨格筋の厚い縦断切片を必要とする点と，筋線維型の同定指標となる酵素の大部分は固定剤によって著しく活性が低下または消失する点にある．換言すれば，酵素活性を保存するため新鮮骨格筋の凍結切片，しかも30μ以上の厚い縦断切片を必要とすることである．このような切片を通常の方法で作製すれば，凍結切片の融解時に起こる筋線維の収縮のため，著しい変形が起き[21)22)]，同時に，神経筋接合部の形も変化する[22)]．今回，われわれは，このような収縮による人工的変化を，Ethylenediamine－tetraacetate（以下「EDTA」と略記）を塗布

Simultaneous Demonstration of Succinic Dehydrogenase and Cholinesterase Activities in the Frozen Longitudinal Section of the Fresh Skeletal muscle. **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.

したカバーグラスの使用によって抑え，コハク酸脱水素酵素（以下「SDH」と略記）とchE活性の両者を同時に検出する方法を案出したので報告する．

材料および方法

材料として，ddN系マウス前脛骨筋を用いた．頸椎脱臼によって屠殺したマウスから，直ちに前脛骨筋を，その起始から停止までの全長にわたって取り出し，前報[22]の方法に従って，クリオスタット（サクラ・コールドトームCM－41型）中で急速に凍結させ，15μまたは30μ凍結切片を作製した．

まず，先に報じた筋線維の人工的収縮抑制法[22]，すなわち冷却した寒天塗布カバーグラスで凍ったままの切片を採取し，4℃で1分間ホルマリン蒸気処理を行ってから，Nachlasらの方法[23]に準じてSDH活性検出法を行ってみた．その標本を観察すると，SDH活性は完全に消失していることが判明した．そこで，ホルマリン蒸気処理以外の方法で，人工的筋収縮を抑え，同時にSDHならびにchE活性を保存させる方法を探してみた．その結果，筋収縮連関に関与するカルシウムイオン[24][25]を，EDTA・寒天溶液塗布カバーグラスの使用によって除去すると，人工的筋収縮が抑制され，同時に，SDHとchE活性のいずれも保存されることが判明した．次にこの知見に基づいて，SDHとchE活性の同時検出法を開発したので，その操作法を記載する．SDH活性検出法はNachlasらの方法[23]，CHE活性検出法はKarnovskyらの方法[26]の著者の変法[22]によった．

1） EDTA塗布カバーグラスの作製

0.3％寒天水溶液（65℃）100 mlに，EDTA－2NAとEDTA－4NA（和光純薬）を各5g溶解し，このEDTA-寒天溶液に，カバーグラスを浸してから，37℃で1晩乾燥後，クリオスタット中で冷やしておく．

2） クリオスタット切片作製

新鮮骨格筋の30μ凍結切片を前述の方法に従ってクリオスタット（－20℃）で作製し，冷やしたEDTA塗布カバーグラスを，凍結切片の上から圧迫し，切片をカバーグラスに付着させる．次いで，カバーグラスに付着した切片を，クリオスタットから取出すと同時に，手早く，ヘア・ドライヤーで室温約10分間乾燥する．

3） Celloidin－coating

SDHおよびchE基質液に切片を浸漬中，酵素の拡散とカバーグラスからの切片の剥離がおこるが，その防止のため，Christieの方法[27]に準じて，0.5％celloidin溶液で切片をコーテングする．celloidinはethyl alcohol：ethyl ether：acetonの3者等量混合液に0.5％の割に溶かし，あらかじめクリオスタット中で冷やしておく．この溶液に切片を約2秒間浸し，余分の液を濾紙で吸い取った後，クリオスタット中で約5分間乾燥させ，次いで，室温でヘア・ドライヤーを用いて約10分間乾燥させる．

4） SDH活性検出法

基質液〔0.2M コハク酸ナトリウム水溶液 5 ml，0.2Mリン酸緩衝液（pH 7.4）5 ml，ショ糖1.5g，ニトロブルーテトラゾリウム 10 mg，蒸溜水 10 ml〕に37℃で15分間浸漬する．

5） chE活性検出法

切片を10％ホルマリンの0.9％食塩水溶液で，4℃，20分間固定後，0.9％食塩水で，約1分間洗滌し，基質液〔1/7 Mベロナール・酢酸緩衝液（pH 5.5）5.5 ml，0.1Mクエン酸ナトリウム水溶液0.5 ml，30mM硫酸銅水溶液1.0 ml，5mM赤血塩水溶液1.0 ml，10^{-5}M DFPの0.9％食塩水溶液1.0 ml，ホルマリン 1.0 ml，沃化アセチルチオコリン 5 mg〕に37℃，15分間浸漬し，蒸溜水で1分間洗滌後，エタノール脱水・キシロール透徹後，エンテラン（和光純薬）に封じた．

成　　績

通常の方法で作製した新鮮前脛骨筋の凍結横断切片にSDH活性検出を施した標本を写真1,2で示した．SDH活性反応産物であるformazanの青色沈澱の多寡により，SDH活性の強い筋線維と活性の弱い筋線維が判別できる．活性の強い筋線維は，Engelの分類[7]のⅠ型に，活性の弱い筋線維は，そのⅡ型に相当する．以下の筋線維型をこの分類に従って記述する．Ⅰ型の筋線維は，Ⅱ型の筋線維に比して，一般に細い．それぞれの型の筋線維は，数本集って群をなしている場合が多いが，1本だけ孤立して存在する場合も認められる．この両種の型の筋線維群がお互いに入り混じって，モザイク状の外観を呈している（写真1）．強拡大で観察するとSDH活性反応産物は，微細な顆粒として認められる（写真2）．SDH活性がミトコンドリヤに局在していることは，すでに生化学的[28]にも電子顕微鏡的細胞化学[29]によっても明らかにされていることから，SDH活性検出法によって見出された顆粒状構造物は，ミトコンドリヤに相当すると判断できる．Ⅰ型の筋線維に分布するSDH活性を示す青色顆粒は，Ⅱ型のそれに比して一般に大きい．このことは，可視光顕微鏡所見と電子顕微鏡所見の対比実験の結果[30]とも符合する．

横断切片では，通常のクリオスタット切片作製法によっても凍結切片融解時に起る筋線維収縮に基づく変形は，ほとんど見当らないが（写真1,2），縦断切片では，写真3のように，切片融解時に起こる収縮のため，筋線維に過伸展，過収縮の部位，さらには断裂部位が認められる．極度に引伸ばされた部位では，筋線維は著しく細くなり，「くびれ」を生じ，一方過収縮の部は太くなっている(写真3)．SDH活性は過収縮部では強く，過伸展部では弱くなり，場所によっては，交互に濃淡を示す縞模様を呈している（写真3,4）．このような濃淡縞模様は，筋節の短縮および伸展により，その中に含まれるミトコンドリヤの分布密度に変化が生じたためと解釈される．凍結切片融解時に起こる筋線維の著しい人工的変形は，筋線維上に存在する神経筋接合部の外形にもかなりの変形をもたらすことは，前報[22]で示した通りである．

今回，著者が開発したEDTA一塗布カバーグラスを使用する方法で，新鮮骨格筋の凍結縦断切片を作製すると，写真5～8で示したように，筋線維の過伸展・過収縮・断裂・くびれなどの人工的変形はほとんど見られなくなる．SDH活性単独検出標本では，SDH活性は，通常のクリオスタット切片作製法によるものより，若干低下するが，SDH活性の強いⅠ型と活性の弱いⅡ型との判別は充分可能である（写真5,6）．Ⅰ型の筋線維では，筋細胞膜下の細胞質内にも強いSDH活性が認められ，また毛細血管が筋線維の凹みに嵌り込んだ形で密接していると考えられる部位では，その両側の筋形質にも強い活性が認められる．このことは，マウス前脛骨筋の超薄切片の電顕写真（未発表）で，これらの部位にミトコンドリヤの集積が認められることと符合している．写真6で筋線維にSDH活性による横紋構造が認められる．これはマウス前脛骨筋の電顕像[31]でZ盤を挟んで小型のミトコンドリヤが密に分布していることに由来すると考えられる．SDHとCHE活性の二重検出標本でも，人工的な筋線維の変形は，ほとんど見られず，神経筋接合部は，強いchE活性による赤褐色の微細沈澱によって，その外形がほとんど変形なく鮮明に認められる．（写真7,8）．神経筋接合部の複雑な分岐状態も明瞭に観察できる．
同時に，各神経筋接合部の存在する筋線維の型も，SDH活性の強弱によって識別できる．（写真8）．

考　　察

近年，筋原性，神経原性を問わず，骨格筋疾患の病理診断や病因検索に，組織化学，特に酵素組織化学的検索が，きわめて重要になり，一般に広く用いられている[9)~11)]．このような検索には，通常，新鮮骨格筋の凍結横断切片が用いられているが，1本の筋線維，さらには1個の筋節内の局所的差異の検索，正常または重症筋無力症・幼児脊髄性筋萎縮症などの神経筋接合部の検索[10)11)17)32)]，筋線維型と神経筋接合部の相関の検索[14]などの際には，縦断切片が必要になる．ところが，新鮮骨格筋の凍結縦断切片を通常の方法で作製すると，緒言で触れたように，凍結切片融解時に起こる筋線維の収縮のため，筋線維に著しい人工的変形を生ずる．そのような人工的変形を防止するには，2－5μ程度の薄い切片を作製し，収縮が進行する前に迅速にヘヤ・ドライヤーで乾燥するなどの彌縫策が一般に採られている．しかし，神経筋接合部の全体像の観察が必要な時などは，30μ以上の厚い切片が必要となる．このような厚い切片について，人工的筋収縮を抑えてchE活性を検出する方法として，われわれは，凍結切片を凍らせたまま，寒天塗布カバーグラスに付着させ，ホルマリン蒸気中(4°C)で，切片の融解と同時に固定する方法を案出した[22]．しかしこの方法では，筋線維型の固定に用いられるSDHなど大部分の酵素は，ホルマリン蒸気固定によって，その活性が著しく低下するか消失するため，筋線維型同定法には使えない．そこで，酵素活性を保存したまま，かつ切片融解時の筋収縮を防止する方法が必要になってくる．ところで筋線維の収縮は，筋形質網に貯えられていたカルシウムイオンが，興奮によって遊離し，筋線維内のthin myofilamentのtroponinに結合することによって惹起されることが明らかになっている[33]．そこで，われわれはカルシウムイオンをキレート剤EDTAで除去することを考えた．そのような試みは，すでにPearsonら[21]によってなされているが，彼等の方法は3％EDTA水溶液にカバーグラスを浸してから乾燥し，そのカバーグラスで8μの厚さに切った凍結切片を付着させるものである．われわれは，30μ凍結切片について，彼等の方法を適用してみた結果，幾分人工的収縮は抑制できたが，なお，かなりに筋線維の変形が認められた．その原因は，カバーグラスをEDTA水溶液に浸したのみでは，EDTAはカバーグラス全面に一様ではなく斑点状にしか塗布されないことによると考えられる．われわれは，この欠点を，EDTAを寒天水溶液に溶かし，その液にカバーグラスを浸すことによって除いた．また，EDTAは，溶解しやすいナトリウム塩を用い，かつ，pHを中性に保つため，酸性の2ナトリウム塩と，アルカリ性の4ナトリウム塩の等量混合液を用いた．寒天溶液を用いた，もう一つの利点は，前報[22]で述べたように，凍結切片を凍ったままの状態で，比較的容易

にカバーグラスに付着できる点である．EDTA 塗布ガラスを用いると SDH，chE 活性とも若干低下するが，少くとも筋線維型の同定や，神経筋接合部の形態の観察には支障はなかった．

EDTA 塗布ガラスに付着させた切片に，SDH 続いて chE 活性検出法を施すと，基質液に浸漬中，切片がカバーグラスから容易に剥離し，切片を移動させる操作がきわめて困難になり，操作中しばしば組織の破損を伴ない，連続切片の作製も容易ではない．この点を改良するため，chriatie の方法[27]に準じて切片に celloidin－coating を行った．この celloidin－coating は，切片の剥離防止効果のほか，christie[27]の指摘のように検出操作中の SDH の拡散防止効果があり，像がかなり鮮鋭になった．

神経筋接合部の chE 活性検出に，Karnovsky らの方法[26]をそのまま適用すると，宇尾野[34]が指摘しているように神経筋接合部の人工的膨化と考えられる所見を示し，神経筋接合部の形態を正確に把握することは困難である．この点を改良するため Iwayama[35] の示唆したように，基質液中にホルマリンを添加したところ，写真 8 で示したように，神経筋接合部を鮮鋭に検出することができた．

今回，われわれが案出した EDTA・寒天塗布カバーグラスを用いる新鮮骨格筋の凍結縦断切片作製法は，その操作が至って簡単で，今回報告した SDH のみならず，ATPase[36]，phosphorylase[37] など，多くの酵素活性の検出法に応用できるであろう．また SDH と chE 活性の同時検出法は，正常骨格筋のみならず，発生・変性・再生時の骨格筋や種々の筋疾患で傷害を受けた骨格筋についての筋線維型と神経筋接合部の形態を同時に検索するのに有用であろう．

結　　論

コハク酸脱水素酵素ならびにコリンエステラーゼ活性を損なわずに，新鮮骨格筋の凍結縦断切片作製中に出現する筋線維の人工的収縮を抑制する方法を考案した．この方法の要点は，クリオスタット切片を，融解させずに，EDTA・寒天混合液塗布カバーグラスに付着させ，切片をヘア・ドライヤーで手早く乾燥させる点にある．

この方法によって，凍結切片融解時におこる，筋線維の収縮に基づく，断裂，くびれなどの変形や，随伴しておこる神経筋接合部の変形は，ほとんど抑制される．この切片に，コハク酸脱水素酵素活性検出法とコリンエステラーゼ活性検出法の両者を施した結果，いずれの活性も若干低下するが，筋線維型の同定と神経筋接合部の形態観察には支障はなかった．

骨格筋の縦断切片についての，コハク酸脱水素酵素活性とコリンエステラーゼ活性の同時検出法は，正常骨格筋のみならず，発生・変性・再生時の骨格筋や種々の筋疾患骨格筋についての筋線維型と神経筋接合部の形態の同時検索に有用であろう．

稿を終るに臨み，本研究に有益な御助言を賜わった，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．

文　　献

1) **Padykula, H. A.** : Localization of succinic dehydrogenase in tissue section of rat. Amer. J. Anat., **91**, 107－145 (1952).

2) **Stein, J. M. & Padykula, H. A.** : Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. Amer. J. Anat., **110**, 103－124 (1962).

3) **Guth, L. & Samaha, F. J.** : Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. Exp. Neurol., **25**, 138－152 (1969).

4) **Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Furukawa, T. & Peter, J. B.** : Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. Amer. J. Physiol., **220**, 410－414 (1971).

5) **Burke, R. E., Levine, D. N., Salcman, M. & Tsairis, P.** : Motor units in cat soleus muscle : Physiological, histochemical and morphrlogical characterististics. J. Physiol., **238**, 530－514 (1974).

6) **Engel, W. K.** : The essensity of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. Neurology, **12**, 778－794 (1962).

7) **Ogata, T. & Mori, M.** : Histochemical study of oxidative enzymes in vertebrate muscles. J. Histochem. Cytochem., **12**, 171－182 (1964).

8) **Romanul, F. C. A.** : Enzymes in muscle. I. Histochmical studies of enzymes in individual muscle fibers. Arch. Neurol., **11**, 355－368 (1964).

9) **Dubowitz, V.** : Histochemical aspects of muscle disease. p310－359. In J. N. Walton(ed.), Disorder of voluntary muscle. Churchill Living-

stone, Edinburgh & London, 1974.

10) 宇尾野公義・木下真男：筋病理アトラス，12－13頁，東京，医学書院，1972.

11) 宇尾野公義：筋肉病学（里吉・豊倉編），180－210頁，東京，南江堂．1973.

12) **Romanul, F. C. A. & Van der Meulen, J. P.** : Slow and fast muscles after cross innervation. Enzymatic and physiological changes Arch. Neurol., **17**, 387－402 (1967).

13) **Dubowitz, V.** : Cross-innervated mammalian skeletal muscle : Histochemical, Physiological and biochemical observations. J. Physiol., **193**, 481－496 (1967).

14) **Ogata, T.** : A histochemical study on the structural differences of motor endplate in the red, white and intermediate fibers of mouse limb muscle. Acta Med. Okayama, **19**, 149－153 (1965).

15) **Korneliussen, H. & Waerhaug, O.** : Three morphological types of motor nerve terminals in the rat diaphragm, and their possible innervation of different muscle fiber types. Z. Anat. Entwickl. Gesch., **140**, 73－84 (1973).

16) **Waerhaug, O. & Korneliussen, H.** : Morphological types of motor nerve terminals in rat hindlimb muscles, possibly innervating different muscle fiber types. Z. Anat. Etnwickl. - Gesch., **144**, 237－242 (1974).

17) 中村俊雄：神経筋接合部の構造．北陸麻酔誌，3，21－52 (1969).

18) 中村俊雄：マウス外眼筋の神経筋接合部と筋線維型の構造特性に関する組織化学的研究．十全医会誌，**85**，526－545 (1976).

19) **Cheng, K.** : Distribution of succinic dehydrogenase in extrocular muscles. Jap. J. Ophtalmol., **8**, 116－123 (1964).

20) **Ogata, T.** : A histochemical study on the structural differences of motor endplate in the red, white and intermediate muscle fibers of mouse limb muscle. Acta Med. Okayama., **19**, 149－153 (1965).

21) **Pearson, J. & Sabara, A.** : A method for obtaining longituginal cryostat sections of living muscle without contraction artefacts. Stain Technol., **49**, 143－146 (1974).

22) 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，（印刷中）(1979).

23) **Nachlas, M. M. Tsou, K. C., Souza, E. De, Cheng, L. S. & Seligman, A. M.** : Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new *p*-nitrophynyl substituted ditetrazole. J. Histochem. Cytochem., **5**, 420－436 (1957).

24) 名取礼二：筋肉病学（里吉・豊倉編），68－88頁，東京，南江堂，1973.

25) 遠藤実：筋収縮とカルシウム．生物物理，**15**，247－259 (1975).

26) **Karnovsky, M. J. & Roots, L.** : A "direct－coloring" thiocholine method for cholinesterases. J. Histochem. Cytochem., **12**, 219－221 (1964).

27) **Christie, K. N.** : Celloiden as a protective film for improving the histochemical localization of succinate dehydrogenase. Histochem. J., **5**, 473－477 (1973).

28) **Paul, M. H. & Sperling, E.** : Cyclophorase system XXIII. Correlation of cyclophorase activity and mitochondrial density in striated muscle. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **79**, 352－354 (1952).

29) **Barnett, R. J. &. Palade, G. E.** : Histochemical demonstration of the sites of activity of dehydrogenase systems with the electron microscope. J. Biophys. Biochem. Cytol., **3**, 577－588 (1957).

30) 中村俊雄・本陣良平：マウス外眼筋の筋線維型の構造特性に関する可視光ならびに電子顕微鏡的研究．解剖誌．**51**，285－286(1976)

31) 福島達夫：マウス外眼筋の神経接合部と筋線維型の構造特性に関する電子顕微鏡的研究．十全医会誌，**86**，434－465 (1977).

32) **Coërs, C. & Woolf, A. L.** : The innervation of muscle. A biopsy study. P66－70, 101－107, Beackwell Scientific Publications, Oxford, 1959.

33) 飯田荘象：トロポニンへのカルシウムイオンの結合．生物物理，**19**，147－152 (1979).

34) 宇尾野公義：酵素組織化学(武内・清水・小川編)．264－284頁，東京，朝倉書店，1967.

35) **Iwayama, T.** : Electron microscopic study on cholinesterase at the neuromuscular junction. Okajimas Folia Anat. Jap., **42**, 329－353

(1966).

36) **Wachstein, M. & Meisel, E.** : Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH. Amer. J. Clin. Path., **27**, 13－23 (1957).

37) **Takeuchi, T.** : Histochemical demonstration of phosyhorylase. J. Histochem. Cytochem., **4**, 841 (1956).

写 真 説 明

写直 1. 新鮮骨格筋の凍結横断切片のSDH活性検出標本. SDH活性の強いI型筋線維と活性の弱いII型筋線維が入り混じってモザイク状の外観を呈している. 15μ, × 100.

写真 2. 新鮮骨格筋の凍結縦断切片のSDH活性検出標本, SDH活性の強いI型筋線維(I)は細く, SDH活性の弱いII型筋線維(II)は細く, 矢印は, SDH活性を示す青色顆粒を示し, II型筋線維内の顆粒は, I型のそれに比して小さい. 15μ, × 400.

写真 3. 通常の方法で作製した, 新鮮骨格筋の凍結縦断切片にSDH法を施した標本, 凍結切片融解時に起こる人工的収縮のため, 筋線維に「くびれ」(上向き矢印). 過収縮(下向き矢印), 断裂(左向き矢印)などの著しい変形が見られる. 15μ, × 100.

写真 4. 写真3の拡大像. 過伸展部(矢印)は細くなりSDH活性が弱く, その両側の過収縮部は太くなりSDH活性が強い. 15, × 400.

写真 5. 著者の改良法によって作製した新鮮骨格筋の凍結縦断切片にSDH法を施した標本. 筋線維の人工的変形は, ほとんど見られず, I型筋線維(I)とII型筋線維(II)の判別も充分可能である. 15μ, × 100.

写真 6. 写真5の拡大像. SDH活性によってI型(I)とII型(II)筋線維が区別でき, I型筋線維においては, 筋細胞膜下の筋形質(上向き矢印), 毛細血管が筋線維に嵌り込んで分布していると考えられる部位の両側(下向き矢印)に強いSDH活性が認められる. 右向き矢印はZ盤を挟んで分布するミトコンドリアに由来すると考えられるSDH活性を示す. 15μ, × 400.

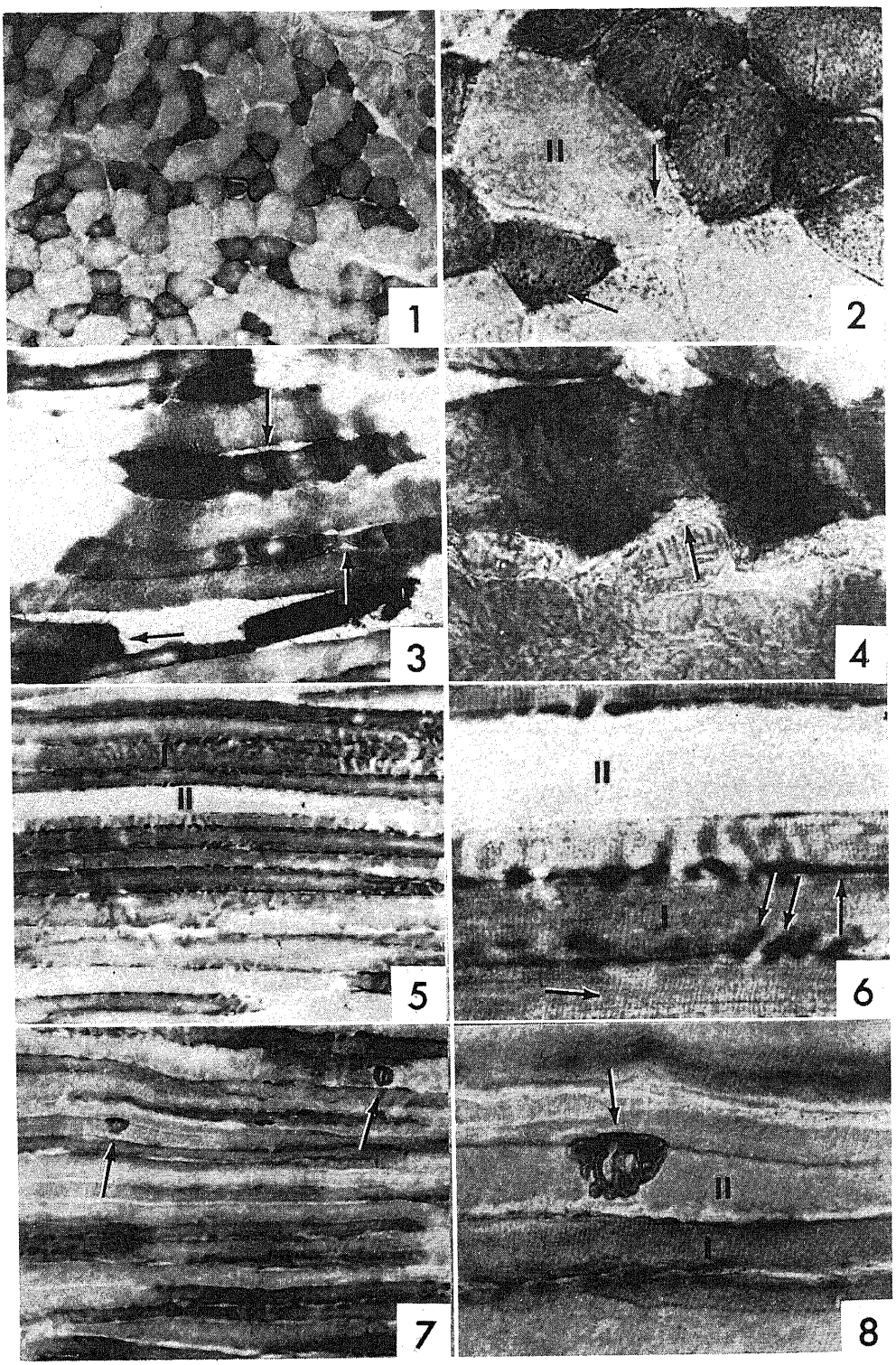
写真 7. 著者の改良法によって作製した新鮮骨格筋の凍結縦断切片にSDH－chE活性二重検出を施した標本, 矢印は強いSDH活性を有する神経筋接合部を示す. 30μ, × 100.

写真 8. 写真7の拡大像. I, IIはそれぞれ, I型およびII型筋線維を示す. 矢印はII型筋線維上の神経筋接合部を示す. 30μ, × 400.

Simultaneous Demonstration of Succinic Dehydrogenase and Cholinesterase Activities in the Frozen Longitudinal Section of the Fresh Skeletal Muscle. Toshio Nakamura & Kojun Torigoe, Department of Biophysics, Neuro-Information Research Institute, Akira Takahashi & Toshio Yamashita, Department of Anatomy, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920, Japan. J. Juzen Med. Soc., 88, 623–630 (1979)

Abstract A method for obtaining frozen longitudinal sections of the fresh skeletal muscle without contraction artefacts in addition to preserving the activities of both succinic dehydrogenase and cholinesterase, was described. The essential feature of the method involves mounting the frozen longitudinal sections on chilled coverslips previously coated with EDTA-agar solution.

By this method, the damages of muscle fibers such as tearing and constriction, and also the deformation of neuromusclar junctions were fully inhibited. The simultaneous investigation of the histochemical classification of muscle fiber types and the structure of neuromuscular junctions, was possible by the application of the double demonstration method of succinic dehydrogenase and cholinesterase activities to the frozen longitudinal sections of the fresh muscle fiber prepared by the present method. This method may be useful for the simultaneous investigation of the muscle fiber types and the structure of the neuromuscular junction in the developing or pathological muscle in addition to the normal subjects.


1
2
II
I
3
4
5
II
6
II
I
7
8
II
I