

原 著

## アミンおよびコリン作動性神経の連続重複観察法

小林 茂昭<sup>1)</sup> 塚原 重雄<sup>2)</sup> 松尾 宏一<sup>1)</sup>  
中川 福夫<sup>1)</sup> 横尾 昭<sup>1)</sup> 永田 哲士<sup>2)</sup>

1) 信州大学医学部脳神経外科学教室

2) 信州大学医学部第一解剖学教室

### CONSECUTIVE DEMONSTRATION OF AMINERGIC AND CHOLINERGIC NERVE FIBRES BY MEANS OF GLYOXYLIC ACID AND KARNOVSKY'S METHODS

Shigeaki KOBAYASHI<sup>1)</sup>, Shigeo TSUKAHARA<sup>2)</sup>, Koichi MATSUO<sup>1)</sup>,  
Fukuo NAKAGAWA<sup>1)</sup>, Akira YOKOO<sup>1)</sup> and Tetsuji NAGATA<sup>2)</sup>

1) Department of Neurosurgery, Shinshu University School of Medicine

2) Department of Anatomy, Shinshu University School of Medicine

KOBAYASHI, S., TSUKAHARA, S., MATSUO, K., NAKAGAWA, F., YOKOO, A. and NAGATA, T. *Consecutive demonstration of aminergic and cholinergic nerve fibres by means of glyoxylic acid and Karnovsky's methods.* Shinshu Med. J., 28: 361-366, 1980

A technique is described to demonstrate consecutively both aminergic and cholinergic nerve fibres in the same specimen using a whole mount preparation. The materials used in this study were the intracranial internal carotid arteries and irises of the rats. Under pentobarbital anesthesia, 250 ml of 2 % glyoxylic acid solution (0.1 M phosphate buffer, pH7.4) was perfused through the left ventricle of a rat for seven minutes at 4°C according to Axelsson et al. The internal carotid arteries and irises were taken out as whole mount preparations, mounted on the non-fluorescent glass-slides and dried with a hair dryer at 40°C. After they were observed and photographed with a Nikon fluorescence microscope, the same preparations were processed through Karnovsky's method to demonstrate the AChE activity. Thus, the distribution of both aminergic and cholinergic nerve fibres in the same specimens were observed consecutively. Specificity of catecholamine fluorescence was determined by reserpine treatment, superior cervical ganglionectomy and excitation spectra, and that of AChE activity by using butyrylthiocholine as a substrate in the incubation media and by iso-OMPA as an inhibitor. Technical improvements have been made in the process of the consecutive demonstration method on two points as follows: 1. Adequate time for drying whole mount preparations at 40°C was one hour. 2. Fluorescent photomicrography should be carried out without using xylene because it inhibits the successive demonstration of AChE activity. This method has been proved highly sensitive and reproducible in demonstrating both aminergic and cholinergic nerves in the same specimen.

(Received for publication; February 18, 1980)

Key words ; アミン作動性神経 (aminergic nerve)  
 コリン作動性神経 (cholinergic nerve)  
 グリオキシル酸法 (glyoxylic acid method)  
 カルノフスキー法 (Karnovsky's method)  
 連続重複観察法 (consecutive demonstration)

## 序 論

生体内のアミン作動性神経は1962年に Falck, Hillarp ら<sup>1)</sup> によってはじめてその観察法が発表されて以来、諸組織に証明されまた多くの変法が開発されてきた<sup>2)</sup>。一方、コリン作動性神経の染色法はコリンエステラーゼ活性の酵素組織化学的証明法として Koelle<sup>3)</sup> によって開発されたが、より簡便な方法として Karnovsky 法<sup>4)</sup> が現在一般的に広く使われている。多くの生体内諸器官は、生理・薬理学的方法<sup>5)6)</sup> によってアミンおよびコリン両作動性神経の支配を受けていることがわかっており、形態学的にも、同一組織での両作動性神経支配を観察する組織化学的方法がいくつか試みられてきたが<sup>7)10)</sup>、未だ改善すべき点が多く残っている。

本研究では、ラットの頭蓋内内頸動脈の全体標本 (whole mount preparation) を用いて同一標本上でアミンおよびコリン作動性神経を、それぞれ連続的にグリオキシル酸法<sup>11)</sup> と Karnovsky 法<sup>4)</sup> で光顕観察し、高感度かつ安定した成績をうることが出来たのでその方法を報告する。

## 材料および方法

成熟ラット (150~200g) 10匹にペントバルビタール 30mg/kg 腹腔内注射によって麻酔したのち、すばやく開胸し、あらかじめ用意した15%ショ糖を含む2%グリオキシル酸 (0.1Mリン酸緩衝液, pH 7.4) を2~4°C に保ちながらローラーポンプ (古江サイエンス, 東京, RP-N2) にて 35ml/min の速度で心臓より約7分間 (総量約 250ml) 灌流した。その際灌流は18G 針を左心室に穿孔し、右心房をハサミで破り放血した。又灌流液が頭部に有効に向かうよう下行大動脈を胸腔内でクランプした。灌流中ラットは低温に保つため氷の上に置いた。灌流終了と同時にすばやく脳を取り出し、約4°C に保った2%グリオキシル酸溶液 (上記参照) に浸しながら、頭蓋内内頸動脈および虹彩を手術用顕微鏡を用いて、血管を損傷あるいは過度の張力等を与えないように注意して剝離し取り出し、

無蛍光スライドガラス上に全体標本 (whole mount preparation) として伸展したのち、ヘアドライヤーを用い40°C に調節した温風処理を約1時間行ったうえ、封入せずにニコン落射蛍光顕微鏡 (EF EFA) にて観察し写真撮影を行った。用いたフィルターは励起フィルターとし、V (IF 395-425), 吸収フィルターとして470K, 撮影条件はニコン顕微鏡写真撮影装置 HFM を用いてコダックエクタクロム200昼光用フィルムで ASA 800あるいは1600にセットして自動露出を行った。アミン作動性神経の蛍光を観察撮影後同一組織標本をコリン作動性神経観察のため下記のごとく Karnovsky 法<sup>4)</sup> に従って染色を行った。まず浸漬液 (incubation medium) として A液: 0.1Mマレイン酸1ナトリウム塩緩衝液 (pH 6.0), B液: 100mM クエン酸ナトリウム, C液: 30mM 硫酸銅, D液: 5mM フェリシアンカリ, をあらかじめ各別個に4°C に保存したものをA液 6.5ml をとり、それにアセチルチオコリン (和光純薬) を5mg (2mM) 加え、以下順次B液 0.5ml, C液 1.0ml, D液 1.0ml, ショ糖 1.5g 更に蒸留水 1.0ml を加えて作製した。アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性の特異性確認のため、対照実験として基質としてアセチルチオコリンの代わりに2mMブチリルチオコリン (半井化学) を使用、又10<sup>-5</sup>M iso-OMPA を非特異性 ChE 抑制剤として浸漬液に添加した。反応は37°C の孵卵器中で約60分行ったのち脱水し、キシロールで透徹しエンテラン封入後ニコンタングステン顕微鏡 (OPTIPHOT) で同一標本の同一部位を観察、写真撮影を行った。なおアミン作動性神経の特異性確認のため片側あるいは両側の上頸神経節切除、およびレセルピン3mg/kg 実験前2日間投与実験を行うとともに、観察された蛍光の励起スペクトルを落射蛍光測光装置 (ニコン SMP-RFL) で記録した。また、上記重複観察法をラットの虹彩筋に応用して観察記録した一部の試料については、同一視野のアミン落射蛍光顕微鏡写真の35mm白黒のネガフィルムと、同一倍率のAChE活性カラー写真リバーサルフィルムとを同一マウントに重ね合わせて合成し、プロジェクターで映写して観察した。

## 結 果

ラットの頭蓋内内頸動脈にはアミンおよびコリン作動性神経ともに豊富に分布しており、分布密度の差は両者間に明確には認められなかった。各々の神経についてみると、アミン作動性神経は大多数が輪状走行をとっており縦走の神経はほとんど認められなかった (Photo 1)。一方、コリン作動性神経については輪状走行をとる神経はアミン作動性神経と同程度の分布を示しているが縦走の神経も多く認められた (Photo 2)。合成写真により両作動性神経の輪状走行をとる神経を比較すると明らかに同一走行をとる神経が多く認められた (Photo 3)。各々の神経は本法により明確に光顕レベルで観察でき、常に安定した結果が得られることが確認できた。また、虹彩筋でも同様な結果が得られた (Photo 4, 5)。上記で観察されたアミン作動性神経蛍光は上頸交感神経節切除およびレセルピン投与により消失した。また、得られた励起スペクトルは、Peak 415nm でノルアドレナリン蛍光に特異的なものであった (Fig. 1)。一方、コリン作動性神経に関しては、ブチルチオコリンを基質とした反応液での観察で縦走走行をとる一部の神経線維のみ反応を示したが大部分の輪走神経線維は陰性であった (Photo 6)。

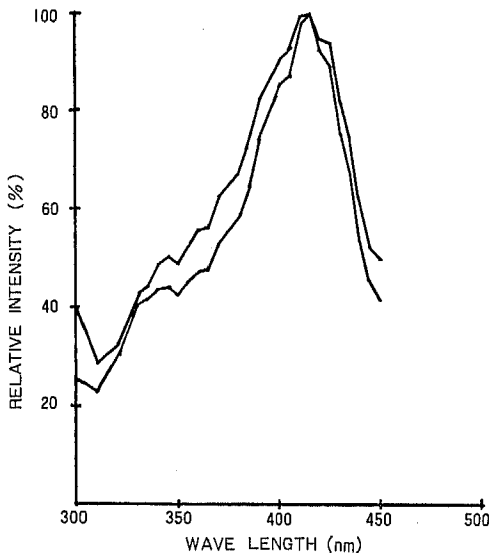


Fig. 1. Excitation spectra of the fluorescence observed in this method demonstrating that of catecholamine with the peak at 415 nm.

一方、iso-OMPA による抑制実験では縦走神経線維が消失し、輪走神経線維の大部分が陽性に現れた (Photo 7)。

## 考 察

同一組織でのアミン作動性神経とコリン作動性神経を形態学的に観察しようとする組織化学的試みは Eränkö と Harkonen<sup>7)</sup>, Jacobowitz と Koelle<sup>8)</sup>, Eranko<sup>12)</sup> 等による formaldehyde vapor 法, また El-Badawi と Schenk<sup>9)</sup> による formaldehyde solution 法などが行われてきたが、これらの方法では本来 80°C 高温下での反応が カテコラミン蛍光観察に最適であるとされているため<sup>1)</sup>, 低温下で AChE 活性を保存してしかも高感度の安定したカテコラミン蛍光を得ることは困難と考えられていた。一方、逆に AChE 活性を最初に観察することは AChE 染色の過程で カテコラミン蛍光陽性物質の拡散 (diffusion) を生じ、その後のカテコラミン蛍光の観察が不可能となる。したがって、AChE 活性が低下しない程度の温度でカテコラミン蛍光を観察できる方法が望まれていたが、Axelsson ら<sup>11)</sup> の グリオキシル酸法の開発によりそれが可能となり、近年 Tervio<sup>10)</sup> はラットの角膜でグリオキシル酸法<sup>11)</sup> と Karnovsky 法<sup>4)</sup> による連続重複観察法 (consecutive demonstration) を行っている。著者らは同様な方法でラットの頭蓋内内頸動脈の全体標本 (whole mount preparation) で観察した結果、Tervio<sup>10)</sup> の方法は有用であることを確認し、またいくつかの改良点をみいだした。まず、Tervio<sup>10)</sup> は 40°C で 2~3 時間の乾燥をカテコラミン蛍光の観察のために行っているが、著者らの方法では 1 時間で十分であった。また、彼はキシレンで封入してカテコラミン蛍光を観察しているが、著者らの基礎実験によるとキシレンで AChE 活性の低下が起こることが観察されたため無封入でカテコラミン蛍光を観察することが望ましいことを見出した。事実著者らの実験では無封入で十分良好なカテコラミン蛍光の観察が可能であった。最近、Imai ら<sup>13)</sup> がアミンおよびコリン作動性神経を同時に観察する方法を公表しているが、著者らの追試したところでは、この方法では常に安定した結果を得ることは困難であった。

本法の特異性に関しては、アミン作動性神経では上頸交感神経節切除あるいはレセルピン投与で蛍光が消失したこと、および励起スペクトルによってカテコラミン蛍光であることが確認できたこと、コリン作動性

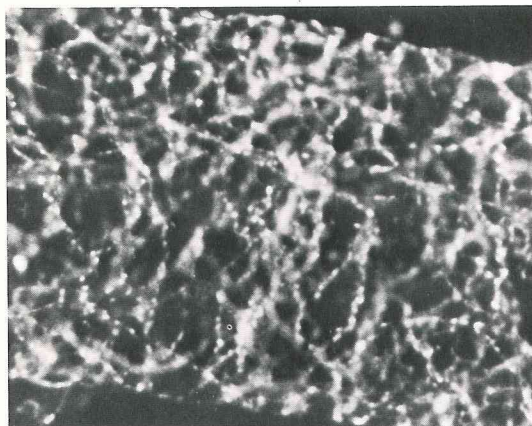


Photo 1

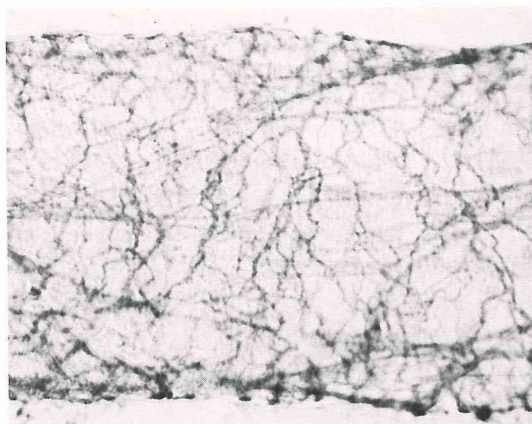


Photo 2

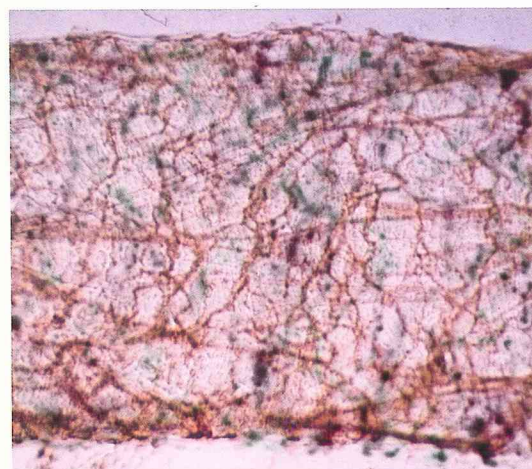


Photo 3

**Photo 1.** Fluorescent photomicrograph of aminergic nerves of an internal carotid artery as demonstrated by the consecutive method. Note circular fibres are prominently demonstrated.  $\times 200$

**Photo 2.** Tungsten light photomicrograph of cholinergic nerves of the same specimen as shown in Photo 1. Note many longitudinal fibres are seen in addition to circular fibres.  $\times 200$

**Photo 3.** Photographic duplication of Photo 1 and 2, showing many of aminergic (black) and cholinergic (brown) fibres taking the same courses.  $\times 200$

神経に関しては、ブチルチオコリン実験で縦走走行の神経の一部に活性が認められ、iso-OMPA 抑制実験で縦走神経が消失して大部分の輪状神経が残留したことから、輪状走行をとる神経は特異的な AChE 活性を示しているものであり、縦走走行をとる神経の一部は非特異的な AChE であることがわかった。この非特異性を示す縦走神経の一部は知覚神経由来の可能性が推定される<sup>14)</sup>。

本法によって同一走行を示した両作動性神経の存在が観察されたが、これが両作動性神経が伴行していることを示すのか、あるいは一本の神経が両作動性神経の性格を有することを示唆するの<sup>か</sup><sup>5)6)15)</sup>は電顕を含めた組織化学的観察によりさらに検討する必要がある。

以上の結果から、連続重複観察法として推賞される手技は次の通りである。

- 1 0.1Mリン酸緩衝 (pH 7.4) 2%グリオキシル酸で心臓より灌流して固定 (7分間) する。
- 2 無蛍光スライドガラスに全体伸展標本としてヘアドライヤーにより  $40^{\circ}\text{C}$  1時間乾燥する。
- 3 無封入のまま蛍光顕微鏡により観察し写真撮影する。
- 4 Karnovsky 法により AChE 活性の染色を行う。一部は対照実験として基質にブチルチオコリンを用い、あるいは抑制剤 iso-OMPA を加える。
- 5 脱水、エンテラン封入し、タングステン顕微鏡

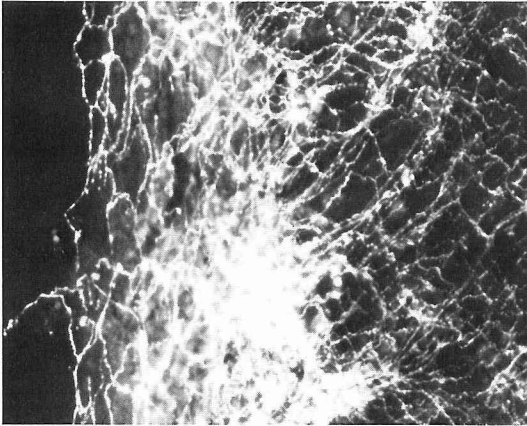


Photo 4

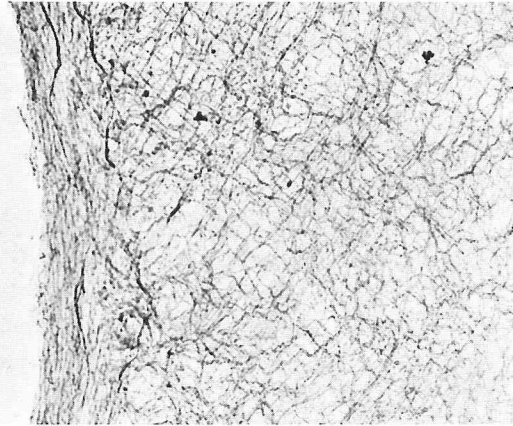


Photo 5

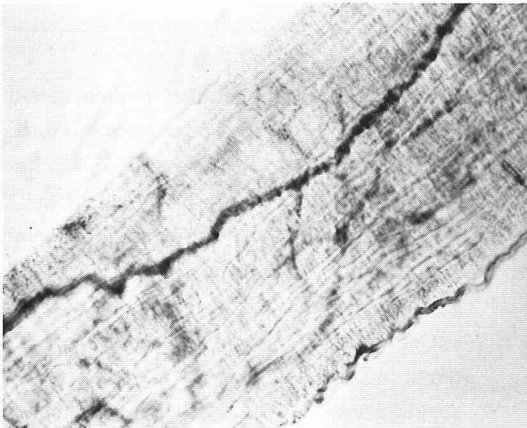


Photo 6

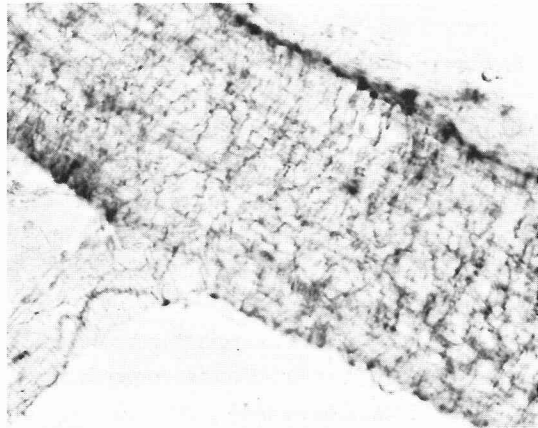


Photo 7

**Photo 4.** Aminergic nerves of the iris as demonstrated by the consecutive method,  $\times 200$

**Photo 6.** : Light photomicrograph of an internal carotid artery stained with Karnovsky's method where butyrylthiocholine was used in the incubation medium instead of acetylthiocholine, revealing pseudo-AChE activity in the longitudinal fibres,  $\times 200$

**Photo 5.** Cholinergic nerves of the same specimen as Photo 4,  $\times 200$

**Photo 7.** Light photomicrograph of an internal carotid artery treated with iso-OMPA. Note true AChE activity in circular fibres,  $\times 200$

により写真撮影する。

6 同一試料の2枚の写真と比較し、必要に応じ合成写真を作り観察する。

#### 結 語

アミンおよびコリン作動性神経を連続的に (consecutive) 重複観察する改良法を報告した。ラットの

頭蓋内内頸動脈およびラットの虹彩筋を全体伸展乾燥標本として、同一標本を最初にグリオキシル酸法によりアミン作動性神経を、次いでKarnovsky法によりコリン作動性神経を観察することができた。グリオキシル酸法の乾燥は $40^{\circ}\text{C}$ 、1時間が適当であり、また標本の封入にキシレンを使用すると、AChE活性の低下が起こることを見出し、標準的手技を確立した。

本方法は高感度かつ安定した結果を得ることが出来、両作動神経をそれぞれ同一標本で証明し得る有用な組織化学的な方法である。

稿を終わるに臨み、励起蛍光スペクトル分析をお願いした滋賀医科大学越智淳三教授に謝意を表します。

文 献

- 1) Falck, B., Hillarp, N. A., Thieme, G. and Torp, A.: Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J Histochem Cytochem*, 10 : 348-354, 1962
- 2) Moore, R. Y. and Loy, R. : In "Neuroanatomical Research Techniques", Robertson, R. T.(ed.), pp. 115-139, Academic Press, New York, 1978
- 3) Koelle, G.B.: The histochemical differentiation of types of cholinesterases and their localizations in tissues of the cat. *J Pharmacol Exp Ther*, 100 : 158-179, 1950
- 4) Karnovsky, M. J. and Roots, L.: A 'direct-coloring' thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem*, 12 : 219-221, 1964
- 5) Berry, C. B.: Cholinergic link hypothesis in adrenergic neuroeffector transmission. *Physiol Rev*, 46 : 420-456, 1966
- 6) Levy, M. N.: Sympathetic-parasympathetic interactions in the heart. *Circ Res*, 29 : 437-445, 1971
- 7) Eränkö, O. and Härkönen, M.: Noradrenalin and acetylcholinesterase in sympathetic ganglion cells of the rat. *Acta Physiol Scand*, 61 : 299-300, 1964
- 8) Jacobowitz, D. and Koelle, G. B.: Histochemical correlations of acetylcholinesterase and catecholamines in postganglionic autonomic nerves of the cat, rabbit and guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther*, 148 : 225-237, 1965
- 9) El-Badawi, A. and 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
- 10) Tervo, T.: Consecutive demonstration of nerves containing catecholamine and acetylcholinesterase in the rat cornea. *Histochemistry*, 50 : 291-299, 1977
- 11) Axelsson, S., Björklund, A., Falck, B., Lindvall, O. and Svensson, L. A.: Glyoxylic acid condensation: a new fluorescence method for the histochemical demonstration of biogenic monoamines. *Acta Physiol Scand*, 87 : 57-62, 1973
- 12) Eränkö, O.: Histochemical demonstration of catecholamines by fluorescence induced by formaldehyde vapour. *J Histochem Cytochem*, 12 : 487-489, 1964
- 13) Imai, H., Nakai, K., Itakura, T., Komai, N., Nagai, T., Kimura, H., Imamoto, K. and Maeda, T.: Simultaneous observation of aminergic and cholinergic nerve fibres in cerebral vessels: Electron microscopic study. *Acta Histochem Cytochem*, 12 : 182, 1979
- 14) de Sousa Pererira, J. M. M.: Histological, histochemical and microsurgical research on anatomophysiological basis of neurogenic control of cerebral blood flow. *Acta Neurol Scand [Suppl. 72]*, 60 : 94-95, 1979
- 15) Burn, J. H. and Rand, M.: Sympathetic postganglion mechanism. *Nature*, 184 : 163-165, 1959

(55. 2. 18受稿)