

# カテコールアミン蛍光組織化学法研究

## 第 1 編

### 抱水クロラールを加えたグリオキサール酸・ホルムアルデヒド法

岡山大学医学部第一解剖学教室（主任：大塚長康教授）

芳 原 達 也

（昭和52年11月29日受稿）

#### I 緒 論

Falck-Hillarp(1962年)等が<sup>1)</sup>生体モノアミン蛍光組織化学法を確立して以来、多くの研究者によって、各種動物の、ほとんどすべての臓器に存在する。モノアミン作動神経の分布が、細胞レベルで、直視下に観察され、報告されてきた<sup>2)~6)</sup>

Falck-Hillarp法が開発されて以来、この原法が長く使われてきたが、1974年、LindvallとBjörklund等<sup>7)8)</sup>によって発表されたグリオキサール酸法(以下GA法という)は、グリオキサール酸とカテコールアミン(以下CAという)との反応を利用したもので、従来のFalck-Hillarp法(以下FA法という)で発見できなかった大脳新皮質、大脳古皮質、小脳等に存在するCA、特にドーパミン(以下DAとする)神経細胞および、DA神経線維の発見に寄与した<sup>9)10)</sup>

著者は、このGA法と従来のFA法との長所を取り入れることにより、より鋭敏で、より適応範囲の広い、GA-FA法の変法を開発したので、報告する。

#### II 材料及び方法

実験は、♂、♀混合で、体重200~300gのラット、40匹を使い。

- ① FA法
- ② GA-FA法
- ③ 抱水クロラール FA法(以下CH-FA法という。)
- ④ 抱水クロラール GA-FA法(以下、CH-GA-

FA法という)

の4種類の方法によって行い、海馬、視床下部、青斑核を取り出し、組織のCA蛍光強度、組織像の乱れ、CA拡散を蛍光顕微鏡で比較観察した。GA-FA法、CH-FA法、CH-GA-FA法の3方法とも、脳灌流に用いた緩衝液の相違はあるが、灌流後の処置は、FA法に従って行った。

上記いずれの方法も、脳灌流の後、FA法に従って組織片を処理し、DahlströmとFuxe<sup>11)12)</sup>の方法に従って行った。その方法は次のごとくである。

脳灌流；ラットをエーテル麻酔し、胸廓を開いて、下大動脈を結紮する。氷冷灌流液(pH7.0)を左心室から注入し、右心耳を切開して脱血し、脳灌流を行う。

凍結乾燥；断頭した後、脳をすみやかに摘出し、5~7mmの厚さの組織片にして、金属容器中で、ドライアイス-イソペンタンを用いて、-80℃で瞬間凍結を行う。次にこれを凍結乾燥機に移し、-35℃で5日間、-20℃で24時間、+35℃で2時間、+50℃で1時間、と順次温度をあげつつ、真空乾燥する。

ホルマリンガス暴露；凍結乾燥終了後、ただちに、組織片を入れた金属容器ごと、80℃に加熱したパラホルムアルデヒドガスに、1時間さらす。

包埋；金属容器から取り出した組織片は、60℃のパラフィン(融点51~53℃)で1時間真空包埋する。

薄切封入；包埋組織片は、7~8μに薄切し、60℃に温めたスライドガラス上に置いて伸展し、キシレンでパラフィンを溶解し、流動パラフィンで封入

する。

検鏡；光源に Osram HBO<sub>200</sub> 高圧水銀燈を使って、Schott BG 12 filter (3~4 mm) の励起フィルターと Zeiss " 50" 2 mm の透過フィルターを通して、CA 蛍光をオリンパスの蛍光顕微鏡 FLM で検鏡した。

なお、GA-FA 法、CH-FA 法、CH-GA-FA 法の 3 方法における脳灌流液としては、それぞれ次のものを使用した。

① GA-FA 法

1~7% の GA 含有リン酸緩衝液 (pH 7.0) を水冷したもの。

② CH-FA 法

1~10% の CH 含有リン酸緩衝液 (pH 7.0) を水冷したもの。

③ CH-GA-FA 法

上記①と②の混合液を水冷したもの。

### Ⅲ 成 積

1) GA-FA 法

FA 法で処理した組織片を対照として、GA-FA 法で処理した組織の CA 蛍光強度、組織像の乱れ、CA 拡散などの鏡検所見を、表 I に示す。

水冷した、1%、3%、5%、7% の 4 種の GA-リン酸緩衝液 (pH 7.0)、200 ml を左心室から 5 分間かけて、脳灌流を行って、蛍光顕微鏡で鏡検して、FA 法と比較検討した。CA 蛍光強度は、GA 濃度が、3%、5% で一番強く、組織像の乱れは、GA 濃度が 1%、3% で最も少く、CA 拡散は、GA 濃度が 1% 以外では、認められなかった。従って、CA 蛍光強度、組織像の乱れ、CA 拡散の所見から、GA 濃度は、3% が最適濃度であると考えられた。

水冷 3% GA-リン酸緩衝液 (pH 7.0) を、100 ml、200 ml、300 ml、500 ml それぞれ 5 分間かけて、脳灌流を行った場合、CA 蛍光強度は、脳灌流量が 200 ml、300 ml 時に最も強く、組織片の乱れや CA 拡散は、300 ml 以上で認められた。従って、200 ml が最適灌流量であり、40 ml/分の灌流速度が最適であると考えられた。

脳灌流液に 3% GA-リン酸緩衝液 200 ml を用い、

表 I 種々の条件による GA-FA 法と、FA 法との蛍光組織像の比較。

	蛍光強度	組織像の乱れ	CA 拡散
1) GA 濃度			
1%	±	-	+
3%	#	-	-
5%	#	±	-
7%	+	+	-
2) 灌流流量 (5分)			
100 ml	±	-	-
200 ml	#	-	-
300 ml	#	±	±
500 ml	±	+	#
3) 灌流液温度			
0℃	#	-	-
3℃	+	-	-
5℃	±	-	±
10℃	-	-	+
20℃	-	-	+

注) 1 表 1, 2, 3, 5. の説明  
FA 法で処理した組織片を対照とする。

(1) 蛍光強度

- (-) 全然蛍光を発しないもの。
- (±) 対照よりやや弱い蛍光を発するもの。
- (+) 対照と同程度の蛍光を発するもの。
- (#) 対照より強い蛍光を発するもの。
- (##) 対照より非常に強い蛍光を発するもの。

液温度を、それぞれ0℃、3℃、5℃、10℃、20℃で、5分間で脳灌流を行った場合、CA 蛍光強度は、0℃で最も強く認められた。組織像の乱れは、灌流液の温度に関係がなかった。CA 拡散は、0℃、3℃でのみ認められなかった。従って灌流液温度として、0℃が最適と考えられる。

以上のことから、GA-FA 法による、神経組織の CA 蛍光は、0℃で3% GA-リン酸緩衝液、200ml を用いて、5分間で脳灌流を行った場合に、最も強く、組織像の乱れが少なく、CA 拡散もほとんど認められないことがわかった。

2) CH-FA 法

FA 法を対照として、CH-FA 法での CA 蛍光強度、組織像の乱れ、CA 拡散についての検鏡所見は、表2に示す通りである。

氷冷した1%、3%、5%、7%、10%の CH-リン酸緩衝液 (pH7.0)、200ml を5分間かけて、それぞれ脳灌流を行った場合、蛍光強度は5%と7%濃度で最も強く認められる。組織像の乱れは7%以上で認められ、5%以下では認められない。そして、5%以上では、CA 拡散は認められない。従って、CH 濃度は5%が最適であると考えられた。

氷冷した5% CH-リン酸緩衝液 (pH7.0)100ml、

200ml、300ml、500ml を、それぞれ5分間で、脳灌流を行う。CA 蛍光強度は灌流液量が200mlと300mlの場合、最も強く認められた。組織像の乱れと、CA 拡散は、500mlで認められ、それ以外の液量では認められない。従って、200~300mlの液量で5分間灌流するのが最適と考えられた。

5% CH-リン酸緩衝液 (pH7.0)200ml を0℃、3℃、5℃、10℃、20℃でそれぞれ40ml/分で5分間脳灌流した。20℃を除いた温度で、CA 蛍光強度は強く認められ、CA 拡散は出現しなかった。組織像の乱れは温度に関係なく認められなかった。

以上のことから、CH-FA 法による神経組織の CA 蛍光は、0℃~10℃で、5% CH-リン酸緩衝液 200~300ml を用いて、5分間で脳灌流を行った場合に最も強く、組織像の乱れが少なく、CA 拡散もほとんどないことが解った。

3) CH-GA-FA 法

FA 法で処理した組織片を対照として、CH と GA を併用した、CH-GA-FA 法の成績を表3に示す。

灌流液として、氷冷5% CH と3% GA 混合液を用いて、混合比1:2、1:1、2:1のものを、それぞれ200ml を5分間で脳灌流を行った。CA 蛍光強度は、混合比が1:1の場合が最も強く、次の

表2 種々の条件による CH-FA 法と、FA 法との蛍光組織像の比較。

	蛍光強度	組織像の乱れ	CA 拡散
1) CH 濃度			
1%	—	—	+
3%	±	—	+
5%	#	—	—
7%	#	±	—
10%	+	+	—
2) 灌流液量(5分)			
100ml	+	—	—
200ml	#	—	—
300ml	#	—	—
500ml	±	±	+
3) 灌流液温度			
0℃	#	—	—
3℃	#	—	—
5℃	#	—	—
10℃	#	—	—
20℃	—	—	+

(2) 組織像の乱れ

- (—) 対照と同程度の組織像の乱れ。
- (±) 対照より、やや強い組織像の乱れ。
- (+) 対照に比べ、強い組織像の乱れ。

表3 CH-GA-FA法の比較(200ml)

	蛍光強度	組織像の乱れ	CA 拡散
1) 3% GA 対 5% CH 混合 200ml			
1 : 2	+	±	-
1 : 1	##	-	-
2 : 1	#	-	-
2) 5% CH 100ml 灌流後に 3% GA 100ml 灌流したもの	##	-	-

## (3) CA 拡散

(一) 対照と同程度の CA 拡散

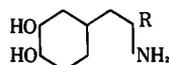
(±) 対照に比べ、やや強い CA 拡散 CA 細胞及び CA 線維と background との区別がはっきりつく

(+) 対照に比べ、強い CA 拡散 CA 細胞及び CA 線維と background との区別がややつきにくい。

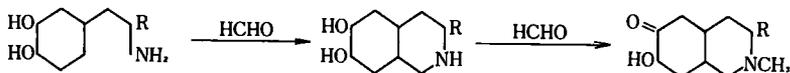
(##) 対照に比べ、非常に強い CA 拡散 CA 細胞及び CA 線維と background との区別が全然つかない。

表4 CA と GA, CH, FA との化学反応

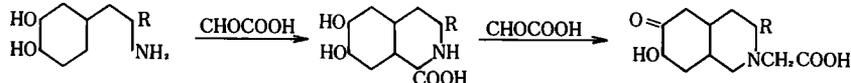
- ① FA 法
- ② GA 法
- ③ GA-FA 法
- ④ CH-FA 法



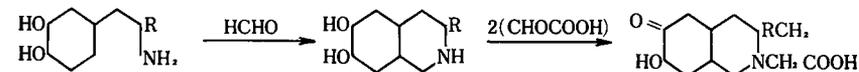
## 1) FA 法



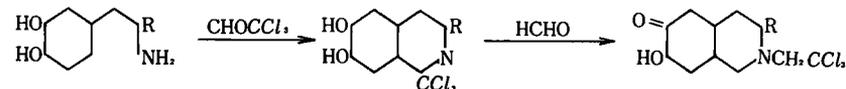
## 2) GA 法



## 3) GA-FA 法



## 4) CH-FA 法



で 2 : 1, 1 : 2 の順となった。組織像の乱れは、混合比が 1 : 1, 2 : 1 の場合に認められなかった。混合比に関係なく、CA 拡散は見られなかった。一般に色調は CH を用いた時には緑青色が強く、GA を用いた時には、緑黄色が強く出る傾向が認められた。

脳灌流するのに、水冷 5% CH 100 ml を 2 分 30 秒で灌流した後に、水冷 3% GA 100 ml を 2 分 30 秒で灌流した場合の組織片の CA 蛍光の鏡検所見は、水冷 5% CH 1 容 : 3% GA 1 容の混合溶液 200 ml を

用いた場合と全く同じ成績であった。

## IV 考 察

## 1) 蛍光物質の生成過程

FA 法, GA 法, GA-FA 法, CH-FA 法に於る CA 蛍光物質の生成化学反応式は、表 4 のごとくである。

FA 法による蛍光物質の生成は、Falck 等によると、primary catecholamine (たとえばドーパミンやノルアドレナリン) が、パラホルムアルデヒドと反応して、6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydrois-

oquinoline となり、強い触媒作用のもつ乾燥蛋白の存在によって、さらにパラホルムアルデヒドと反応して、強い蛍光を発する 6,7-dihydro 3,4-dihydro-isoquinoline となる。<sup>2)</sup>

Lindvall と Björklund 等によると、GA 法では、CA が GA と反応して、6,7-dihydro 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline 1-carboxylic acid となり、次に GA ガス暴露により、強い蛍光をもつた、2-carboxymethyl 6,7-dihydroxy 3,4-dihydroisoquinoline となる。又、GA-FA 法では、CA がパラホルムアルデヒドと反応して、6,7-dihydroxy 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline となり、これが組織中に存在する GA と反応して 2-carboxymethyl 6,7-dihydroxy 3,4-dihydroisoquinoline となる。<sup>7) 13) 14)</sup>

CH-FA 法では、CA と CH とで 6,7-dihydroxy 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline 1-trichlorocarbon となり、乾燥蛋白の触媒作用により、パラホルムアルデヒドと反応して、2-hydrochloral 6,7-dihydroxy 3,4-dihydroisoquinoline となり、強い蛍光を発するものと考えられる。<sup>15)</sup>

CH-GA-FA 法においては、FA-GA 法によって生ずる 2-carboxymethyl 6,7-dihydroxy 3,4-dihydroisoquinoline と、CH-FA 法の際に生ずる 2-hydrochloral 6,7-dihydroxy 3,4-dihydroisoquinoline の両蛍光物質が、同時に生成されるものと考えられる。

表5 GA-FA 法と CH-FA 法の蛍光組織像の比較

	GA-FA 法	CH-FA 法
1) 灌流液の最適濃度	3~5%	5~7%
2) 灌流液の最適量	200ml	200ml
3) 灌流液の最適温度	0℃	0~10℃
4) 蛍光強度	≡	≡
5) 蛍光色調	緑黄色	緑青色

## 2) GA-FA 法と CH-FA 法との比較

GA-FA 法と CH-FA 法における最適条件と、蛍光強度、蛍光色調の比較を表5に示す。CH-FA 法は、GA-FA 法に比べて、灌流液の最適温度が 0~10℃と広い範囲にあるが、蛍光強度は GA-FA 法の方がやや強い。CH-FA 法の最適温度の範囲が広いことは、Rat よりも大きい動物の脳灌流に有利であると考えられる。又、実際に脳灌流を行う際、CH-FA 法は GA-FA 法に比較して、灌流時の抵抗が著しく少ない。このことは大きな動物の脳灌流を行う場

合にも、CH-FA 法の方が有利であると考えられる。

## 3) CH-GA-FA 法

Rat よりも大きい動物に、GA-FA 法を用いた脳灌流実験が、失敗したのは、血液及び組織によって、目的臓器に達するまでに灌流液温度が最適温度より上昇したためと考えられる。蛍光強度が強く現われる GA-FA 法の利点を生かし、かつ最適温度の範囲の広い CH-FA 法の併用によって、最適温度条件の範囲の狭い GA-FA 法を補うことができる。即ち、CH-GA-FA 法では、温度条件の範囲が広く、蛍光強度も強く、組織像の乱れも少なく、CA 拡散もほとんどない鏡検所見が得られる。この方法は、大きな動物にも応用できるものと考えられる。

GA-FA 法では、組織の固定が早く進むために、赤血球のもつ蛍光物質や栓球のセロトニンの除去が不完全となって、鏡検に際して、組織中の CA 像が不鮮明となる。これに対して、CH-GA-FA 法では、固定は GA 法にやや劣るが、自家蛍光物質の除去が充分に行なわれて、組織の CA 像は GA-FA 法よりも鮮明となるので、CA 神経線維及び CA 神経細胞の細部の観察に有利になると考えられる。

## V 結 論

組織中の CA の証明には、FA 法、GA 法、GA-FA 法などが用いられてきたが、鮮明で強い CA 蛍光を得るのが容易でない。Rat を用いて、FA 法、GA-FA 法と新たに CH を加えた CH-FA 法、CH-GA-FA 法などを比較検討して、次の様な結論を得た。

1) CH-GA-FA 法では、2-carboxymethyl 6,7-dihydroxy 3,4-dihydroisoquinoline と 2-hydrochloral 6,7-dihydroxy 3,4-dihydroisoquinoline の 2 つの CA 蛍光物質が、同時に産生されると考えられ、そのため高感度の CA 蛍光を得ることができる。

2) CA 蛍光強度は、GA-FA 法の時に最も強い。CH-FA 法を用いると、灌流液温度の適温範囲が 0~10℃と広くなる。CH-GA-FA 法は、この両方法の長所をそなえている。

3) CH-GA-FA 法では、GA-FA 法に比べ、脳灌流時の抵抗が弱いために、血液中の自家蛍光物質除去が充分行われ、組織中の CA 像が鮮明で、CA 神経細胞及び CA 神経線維の細部観察が可能である。

4) CH-GA-FA 法は、灌流液の適温範囲が広く、脳灌流時の抵抗が少いため、大きな動物の脳灌流に適用できると考えられる。

稿を終えるにあたり、岡山大学第一解剖教室大塚長康教授、佐々木順造助手、東邦大学医学部森忠繁教授に深く感謝します。

本論文の要旨は、第17回日本組織細胞化学会（1976年11月東京）で発表した。

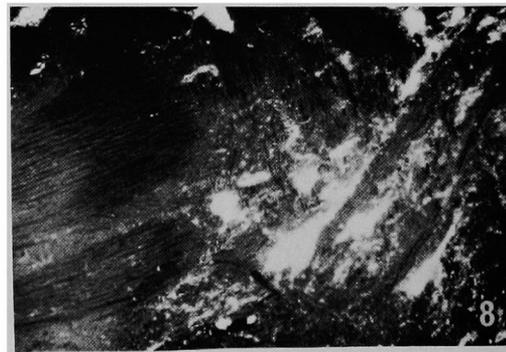
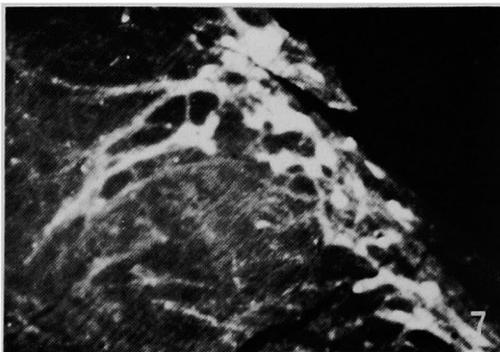
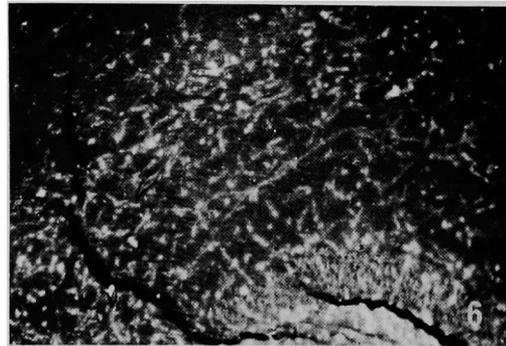
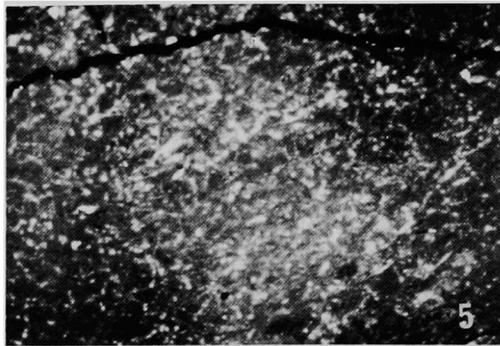
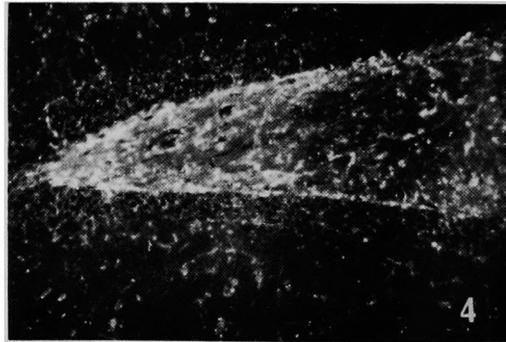
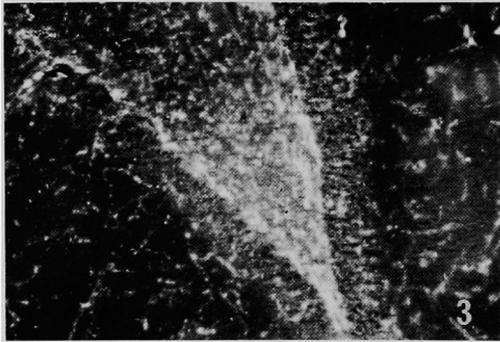
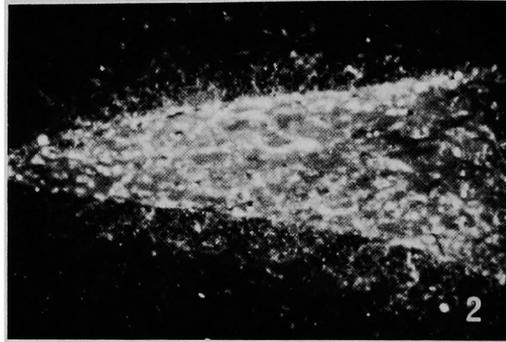
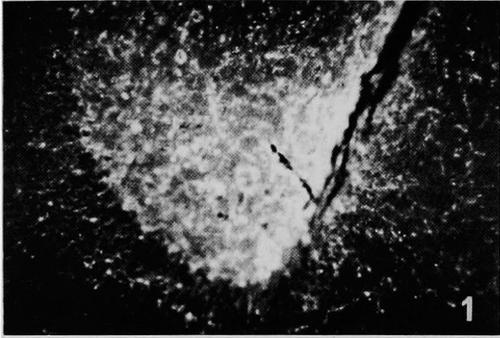
## 文 献

- 1) Corrodi, H. and Jonsson, G.: The formaldehyde fluorescence method for the histochemical demonstration of biogenic monoamines a review on the methodology. *J. Histochem. Cytochem.*, **15**: 65—78, 1967.
- 2) Falck, B. and Hillarp, N. A.: Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.*, **10**: 348—354, 1962.
- 3) Battista, A. and Fuxe, K.: Mapping of central monoamine neurons in the monkey. *Experientia*, Basel, **28**: 688—690, 1972.
- 4) Chu, N. and Bloom, F. E.: The catecholamine containing neurons in the cat dorsolateral pontine tegmentum; distribution of the cell bodies and some axonal projection. *Brain Research*, **66**: 1—21, 1974.
- 5) Ishikawa, M. and Shimada, S.: Histochemical mapping of catecholamine neurons and fibers pathways in the pontine tegmentum of the dog. *Brain Research*, **86**: 1—16, 1975.
- 6) Ikeda, H. and Gotoh, J.: Distribution of monoamine cells in the central nervous system of the chicken. *Jap. J. Pharmacol.*, **21**: 763—784, 1971.
- 7) Axelsson, S., Bjorklund, A., Falck, B., and Lindvall, O.: Glyoxylic acid condensation. A new fluorescence method for the histochemical demonstration of biogenic monoamines. *Acta. Physiol. Scand.*, **89**: 57—62, 1973.
- 8) Lindvall, O. and Bjorklund, A.: The glyoxylic acid fluorescence histochemical method. A detailed account of the methodology for the visualization of central catecholamine neurons. *Histochemistry*, **39**: 97—127, 1974.
- 9) Hokfelt, T., Fuxe, K., and Johansson, O.: Pharmacohistochemical evidence of the existence of dopamine nerve terminals in the limbic cortex. *Europ. J. Pharmacol.*, **25**: 108—112, 1974.
- 10) Lindvall, O., Bjorklund, A., and Moore, R. Y.: Mesencephalic dopamine neurons projecting to neocortex. *Brain Research*, **81**: 325—331, 1974.
- 11) Dahlstrom, A., and Fuxe, K.: A method for the demonstration of monoamine containing nerve fibers in the central nervous system. *Acta. Physiol. Scand.*, **60**: 293—294, 1964 b.
- 12) 磯部保, 心臓に分布するモノアミン作動神経に関する蛍光顕微鏡の研究, 岡山医学会雑誌, **85**, 541—554, 1973.
- 13) Lindvall, O. and Bjorklund, A.: Fluorophore formation from catecholamines and related compounds in the glyoxylic acid fluorescence histochemical method. *Histochemistry*, **39**: 197—227, 1974.
- 14) Lindvall, O. and Bjorklund, A.: Application of the glyoxylic acid method to Vibratome sections for the improved visualization of central catecholamine neurons. *Histochemie*, **35**: 31—38, 1973 b.
- 15) Solcic, E., Sampietro, R., and Capella, C.: Differential staining of catecholamines, 5-Hydroxytryptamine and related compounds in Aldehyde-fixed tissues. *Histochemie*, **17**: 273—283, 1969.

写 真 の 説 明

- 写真1 海馬の歯状回(CH-GA-FA法)×70
- 写真2 海馬の歯状回(GA-FA法)×70
- 写真3 海馬の歯状回(CH-FA法)×70
- 写真4 海馬の歯状回(FA法)×70
- 写真5 視床下部(CH-GA-FA法)×70
- 写真6 海馬のH<sub>3</sub>野(CH-GA-FA法)×70
- 写真7 青斑核(CH-GA-FA法)×70
- 写真8 青斑核(CH-GA-FA法)×140

芳原達也論文附圖



**The histochemical study of the catecholamine**  
**Part I. Glyoxylic acid-formaldehyde methods with chloral-hydrate**

by

**Tatsuya HOBARA**

Department of Anatomy, Okayama University

Medical School.

(Director : Prof.N.Otsuka)

The formaldehyde-induced fluorescence technique (Falck et al'62) allows for the microscopic visualization of intraneural monoamines.

The recently introduced glyoxylic acid technique (Lindvall and Bjorklund'74) appears to offer a most advantageous approach to monoamine tract tracing.

The technique allows the important finding that a marked degree of mixing of the various adrenergic components occurs in the central tract in the rat brain.

However, the technique in its present form is difficult to apply to large mammals.

Because, the catecholamine diffuse in the neural tissue during perfusion.

In this report, the author shows that it is able to prevent this defect by adding chloralhydrate to the glyoxylic acid-formaldehyde solution.

In this modified method, the fluorescence of catecholamine is enhanced and is easily classified in its color.

For this reason, chloralhydrate-glyoxylic acid-formaldehyde method can apply to large mammals.