



Title	神経構造解析法 I・II
Author(s)	井上, 芳郎; Inoue, Yoshiro
Citation	北海道大学大学院医学研究科 脳科学専攻 神経機能学講座・分子解剖学
Issue Date	2000
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/331
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	learning object
File Information	Taro12-neurohist-graduate.pdf



神經構造解析法

大学院医学研究科 脳科学専攻
神経機能学講座・分子解剖学

< 神経構造解析法の概説 >

生物の構造は視覚によって検索する。従って、肉眼から顕微鏡を使用するまで、構造を解析する細かさ（分解能）によって、解析法がことなる。

分解能：視覚による分解能は、現在では機械の精度があがり、もっと高くなっているが、理解しやすい数字としてあげる。

- 1) 肉眼で観察できる分解能 0.2 mm (1/1000m)
- 2) 光線顕微鏡で観察できる分解能 0.2 μ m (1/1000mm)
- 3) 電子顕微鏡で観察できる分解能 0.2 nm (1/1000 μ m)
- 4) 原子間力顕微鏡

本コースでは中枢神経系を対象とした、光線顕微鏡（一般的な光学顕微鏡）及び電子顕微鏡による解析法を学ぶが、一般の組織にも十分応用できる。

< 一般目標 >

- 1) 脳・脊髄の光学顕微鏡用の標本及び電子顕微鏡用の標本の作成法を修得する。
- 2) 神経回路の主要な構造である伝導路の証明法を理解する
- 3) 可視光線による光学顕微鏡の使用法を修得する。
- 3) 電子顕微鏡の使用法を修得する。
- 4) 共焦点レーザー蛍光走査顕微鏡の使用法を修得する。
- 5) 脳脊髄に対する特殊な染色法を理解する。

< 行動目標 >

- 1) 動物の脳脊髄を目的の応じて固定し、摘出し、包埋する事が出来る（無固定・凍結法を含む）。灌流固定と浸漬固定の差を説明できる。
 - 2) 光顕レベルでニューロン・グリア細胞の形態を染め出す方法を説明できる。
 - 3) 脳脊髄の伝導路を証明する方法を説明できる。
 - 4) 神経組織の光学顕微鏡用の染色を目的に応じて行うことが出来る。
 - 5) エポキシ樹脂を使用した電子顕微鏡切片を作成できるか、又は作成法を説明できる。
 - 6) 光学顕微鏡を正確に使用し、写真などによる資料を作ることができる。
 - 7) 電子顕微鏡を正確に使用し、写真などによる資料を作ることができる。
 - 8) 共焦点レーザー蛍光走査顕微鏡を正確に使用し、資料を作ることができる。
 - 9) 基本的なニューロン・グリア細胞の構造、細胞小器官の特徴の概略を説明できる。
- 6) 7) 8) 9) については研究に入った時点で説明する。

目次

- [1] 光学顕微鏡のための標本の作成法
- [2] 電子顕微鏡のための標本作成法
- [3] 神経回路を証明するための標識法
- [4] 神経組織を観察するための特殊な染色法

[1] 光学顕微鏡のための標本の作成法

光学顕微鏡で脳脊髄を観察するためには組織を薄切する事が不可欠である。そのために以下の方法がある。

- 1) 組織を凍結してミクロト - ムで薄切して観察する。
- 2) 組織を凍結しないでそのまま薄切して観察する。
- 3) 組織をパラフィンに包埋してミクロト - ムで薄切して観察する。
- 4) 組織をセロイジンに包埋して薄切して観察する。
- 5) 組織を樹脂に包埋して薄切して観察する。
(特殊な方法としては培養細胞を観察等がある。)

参考文献：佐野 豊著：「組織学研究法」南山堂 1965
(組織学の試料作成法の教科書として、代表的な名著)

1 組織を凍結してミクロト - ムで薄切する。

1) 組織の処理法

(1) 無処置で凍結させる。

mRNA の局在などを放射性同位元素で証明する in situ hybridization 法では必須の方法である。

(2) 固定した後、凍結させる。固定法は2)を参照。

凍結切片の最大の難点は凍結によって組織の中に氷の結晶が出来て、組織の構造を破壊することである。そのために結晶が出来ないように処置をすることが多い。

- ・氷結防止として固定した組織塊を 30% グルコ - ス液に底に沈むまで冷蔵庫内で浸漬する。
- ・脳は無酸素状況に置くと組織が直ぐ変性するから出来るだけ早く抜脳することが重要である。

2) 凍結法

急速に凍結する必要があるが、光顕レベルでは、以下の方法が用いられる。

(1) ドライアイスを手ハンマーで砕いて粉末状にしてその中に取り出した組織を入れて凍結する。

(2) ドライアイスのアセトンにいれて、-80度位の冷剤をつくり、その中に金属棒などを入れて冷やし、その上に組織を載せて凍結する。或いは、イソプロピルアルコールを入れた容器に入れて冷やし、冷えたらその中に組織を落とす。冷剤に直接入れることはない。気泡が組織の回りにつき、急速に凍結することを妨げる。

(3) ドライアイス・アセトン冷剤の代わりに液体窒素を使用しても良いが、光顕レベルではその必要は少ない。液体窒素を使った電顕用の急速凍結装置はある(写真参照)。

(4) 凍結用のスプレーを吹きかけて、急凍凍結する。

(5) 脳の鍍銀法などでは凍結切片用のミクロト - ムの凍結組織台の上に、組織を載せて、凍結させてたり、クリオスタットの凍結台の上で凍結させてから切る方法もある。

3) 切片作成法

(1) クリオスタットで薄切する。切片はミクロト - ムのある冷凍庫内でスライドガラスに張り付ける。免疫組織化学(方法は後述)には第1選択の切片作成法である。

クリオスタットは冷凍庫の中にミクロト - ムを入れて切る装置で、中央研究部超微形態部門、分子解剖学分野、生体構造解析学分野等にあり、使用を開放している。

(2) 凍結切片用ミクロト - ムで薄切する。

電気による冷却凍結装置をユング型のミクロト - ムに装着して室温で薄切する。この装置は分子解剖学分野で使用できる。切片は染色の目的に応じて蒸留水等に蓄える。

また、炭酸ガスボンベからのガスを噴射することで組織台を冷却して薄切する(ザルトリ

ウス型ミクロトーム)。古典的なニューロンやグリア細胞の鍍銀法や大型の脳の切片を作成するときに使用される。



クリオスタット(ブライト社)
分子解剖学分野 所蔵

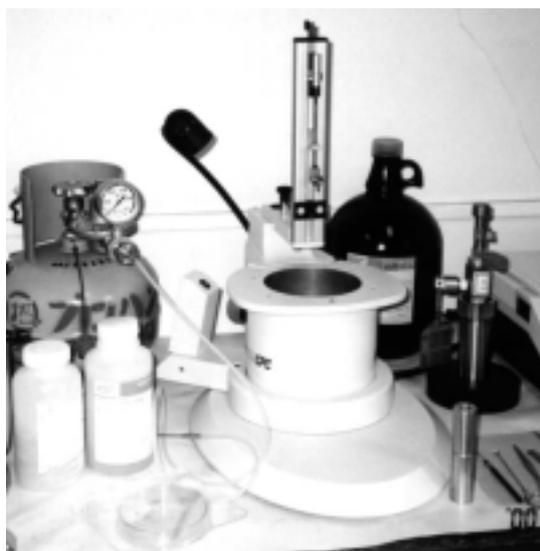
ライカ製クリオスタット
中央研究部、生体構造解析学分野 所蔵



急速組織凍結装置 分子解剖学分野 所蔵

分子解剖学分野所蔵

(electric freeze microtome)



急速凍結装置は液体窒素で冷却した純銅の棒に組織を圧着して瞬時に凍結する方法。接着面から $10\mu\text{m}$ くらいのところは氷の結晶が出来ず良好な電子顕微鏡像が得られる。免疫組織学などに使う。

電気凍結マイクロトームは滑走型のマイクロトームに取り付けた電気で冷却した台の上で、脳脊髄を凍結させ、薄切する。炭酸ガスボンベからの気化熱を使って冷却する方法に代わる。ニューロンやグリア細胞の鍍銀染色によく使われる。 $10\mu\text{m}$ 以上の切片しか切れない。

2 組織を凍結しないでそのまま薄切する方法

無固定もしくは固定してマイクロスライサー(Dosaka 日本製)、ビプラトーム(Oxford 英国製)、Leica VT1000S(ドイツ製)を使って切る。神経細胞を *in vivo* で標識したあとで観察する方法としてよく使用される。ナイフとしてはカミソリの刃を使用する。一般にはフェザーの鋼性両刃(青刃)を折って使用する。

固定すれば、 $10\mu\text{m}$ 厚の切片の作成も可能である。

<使用目的>

- ・免疫組織化学(光顕レベル、共焦点レーザー蛍光走査顕微鏡の観察)で使用される。
- ・免疫電顕の pre-embedding 法で使用される。
- ・脳脊髄の電子顕微鏡包埋の時に、 0.8mm 位の厚みの連続的に包埋する時に使われる。
- ・脳脊髄のスライス標本を用いた生理学・薬理学的な研究に使用される。
- ・逆行性、順行性に標識されたニューロンを観察するとき、その標本を電子顕微鏡資料に作製するとき使用される。

生体構造解析学 所蔵
LeicaVT2000S



Microslicer 2000(Dosaka 堂阪製)
分子解剖学分野 所蔵

3 組織をパラフィンに包埋してミクロトームで薄切する方法。

手順は以下の通りである。

- 1) 組織の固定 fixation
- 2) 組織の脱水 dehydration
- 3) 組織の透徹 cleaning
- 4) 組織のパラフィン浸透 infiltration
- 5) 組織のパラフィン包埋 embedding
- 6) パラフィン切片の作成法 sectioning

1) 組織の固定：灌流固定

マウスを深くエーテルで麻酔して、開胸し、右心房を切開して灌流液の排出口をつくる。左心室から固定液を注入する。針はツベルクリン針を用い、ペリスタポンプを使って灌流する。成熟マウスではポンプは最初血液が洗い流されるまで最高目盛、その後中間目盛で50cc位注入する。幼若のものはその大きさの程度に応じて適切にやる。抜脳後同じ固定液で浸漬固定する。通常は一晚(overnight と言う)。脳脊髄の良好な標本を得るためには可及的素早く深麻酔にして、素早く固定することである。生理食塩水等で血液を洗い出した後に固定する方法もあるが、直接固定液を入れた方が経験的に良いと考える。

「Tissue-Teck」のケースを使用すると包埋まで資料の流失を防げる。

人脳の矢状断、水平断、前額断などの大型切片を作る際は1 cm 位の厚さのブロックに切り分けて固定包埋する必要がある。

* 脱灰：骨を含むときにはEDTA 溶液（市販している）で脱灰を行う。

固定後、10%エチレンジアミン4酢酸塩(EDTA)に2週間浸漬して脱灰する。脱灰後充分に洗浄し、骨とともに切出した後に脱水を行う。

2) 組織の脱水(時間は組織の大きさによる。人脳などでは1ステップ2 - 3日かける。)

目的に応じて脳脊髄を切り出す。

良く振盪することが肝要である。「Tissue-Teck」のケースごとアルコールの容器に入れ、て組織の水分をアルコールに置換する。組織片が小さいときは時間を短くして良い。

70%エチルアルコール - - - 12時間位 (小指大くらいの大きさの時の目安)

80%エチルアルコール - - - 12時間位

90%エチルアルコール - - - 12時間位

95%エチルアルコール - - - 12時間位

100%エチルアルコール - - 24時間位(3回代える)

脱水の時、アルコールの温度を36

くらいに保つヒトもいる。

脱水用のアルコール壺と36℃恒温槽



3) 組織の透徹(時間は組織の大きさによる)

脱水用のアルコールを除去し、キシロールに置換する。透明感がでることが重要である。脱水が不十分であると(大型のブロックの時)透明感がない。

キシロール(xylol or xylene) - - 6時間位(3回代える。大きさによって1日以上のこともある)

*その他の透徹剤(benzol, テレピン油など)もあるから、キシロールで良い切片が出来ないときには方法の本を読んで検討する。

4) 組織のパラフィン浸透を使用する。

キシロールを除去して、パラフィンを組織に浸透する行程である。

下に挙げた時間は目安で、浸透の時間は組織の大きさによる。

(1)キシロール(1)+パラフィン(1)の混合液 - - 40°C、一晚

キシロール-パラフィン混合液用の専用オ-ブンを使用すること。

(2)パラフィン - - 3時間(組織が大きいとき真空オ-ブンを使用する事がある)

(3)パラフィン - - 3時間(組織が大きいとき真空オ-ブンを使用する事がある)

(4)パラフィン - - 3時間(組織が大きいとき真空オ-ブンを使用する事がある)

人の脳の水平断面のパラフィン切片も可能である。

*パラフィン:

パラフィンは融点が高いものを軟パラフィン、温度が上がるにつれて硬パラフィンと呼ぶ。好みに応じて適当な温度のパラフィンを使用してきたが、現在はパラフィンにプラスチックを混ぜた包埋剤(パラポラスト、ヒストセックなど)が一般に使用される。これを大きな容器に融かしておき、浸透用のパラフィン、パラフィン、パラフィンの系列と包埋用パラフィンを別容器に作る。パラフィン用の恒温器(60位)内で処理する。パラフィン恒温器は防爆のものが望ましい。

5) 組織のパラフィン包埋

包埋用パラフィンで包埋する。専用のステンレススチールの容器に包埋する。

60以上にしたステンレススチールの容器に包埋用のパラフィンを注ぎ、その中に方向性を考えて組織片を沈める。急速に冷たい水あるいは冷凍庫で冷やした金属板で冷却する。冷蔵庫に保存する。1晩、冷蔵庫で十分冷却すると容易に取り出せる。

包埋用のステンレススチール皿と
包埋用の組織かご(TissueTick)



<分子解剖学 所蔵のパラフィン包埋装置>
真空オープン（パラフィン包埋用 60 ）



（上段：キシロール・パラフィン浸透用オープン（約 40 ））下段はエポキシ樹脂硬化用オープン（60 ）



パラフィン包埋用オープン（60 ）
融かしたパラフィンを保存する。



6) パラフィン切片の作成法

<パラフィン切片を作成する手順>

(1) スライドガラスの用意 (2) 切片の薄切 (3) 切片の貼付

(1) スライドガラスの用意(クリオスタット切片を作成するときの準備と同じである)
一般には新しいスライドガラスは洗う必要はない。

一般的には切片を接着させるものを塗布する。

1) 卵白グリセリンを塗付する方法

2) ゼラチンを塗付する方法

3) 卵白アルブミンを塗付する方法

4) オルガノシランを塗布する方法

がある。目的に応じて使用する。

* 卵白グリセリンの作り方。

卵を割って卵白のみを取り出す。良くかき混ぜて泡を立て、10枚重ねのガゼでこす。等量のグリセリンを加えて良くかき混ぜて冷蔵庫に小分けして保存する。切る度毎に小指につけてスライドガラス上に薄く延ばす。

* ゼラチンスライドの作り方。

200ccの蒸留水に5gmのゼラチンを入れ、温浴50℃でスタ-ラで攪拌して溶かし、0.5gmのクロム明礬を加えて溶かし、蒸留水を加えて全量1000ccにします。室温に冷却した後濾過する。洗剤でよく洗ったスライドガラスを枠に入れ、蒸留水で更に洗浄して乾かないうちにゼラチン液に10分ほど入れ、40℃の孵卵器にて1昼夜乾燥させる。スライドケースに移して保存する。

* 卵白アルブミンスライドの作り方

卵1個を割って卵白のみを取り出す。蒸留水500ccに入れて攪拌器(スタ-ラ)で良く混ぜあわせながらアンモニア原液を1cc加える。濾紙で濾して卵白アルブミン液を作る。洗剤でよく洗ったスライドガラスを枠に入れ、蒸留水で更に洗浄して乾かないうちに卵白アルブミン液に10分ほど入れ、40℃の孵卵器にて1昼夜乾燥させる。スライドケースに移して保存する。

* オルガノシラン - スライドの作り方

in situ hybridization 法や剥がれやすい切片の時に利用

【準備】

1) スライドグラスを洗浄し、乾燥する。

2) オルガノシラン(3-Aminopropyl-triethoxysilane) 40mlをAcetonで1000mlに稀釈する(4%オルガノシラン)。

3) バットに蒸留水、Acetonを用意する。

【手順】

1) スライドグラスを ~ の順番に浸す。

4%オルガノシラン・・・1~2分間

蒸留水・・・・・・・・・・0.5~1分間

Aceton・・・・・・・・・・0.5~1分間

1クール×2回

とを繰り返す。

2) スライドグラスを室温乾燥する。

* 1)と2)の手順を1クールとし、2クール行う。

* 蒸留水は2~3ケース入れる毎に交換、Acetonは1クール毎に交換する。

* ケースごとにアルミ箔で覆い、cortingした日付と種別(シラン)を記入しておく。

* 常温で保存可能。

(2) 切片の薄切

1) スライドガラスに沢山張る連続切片を作る時は、回転型マイクロトームを使う。パラフィン切片が連続して、長いリボンの様になるように切る。厚さは 5-10 μm で必要に応じて決める。

2) スライドガラスに数枚の切片を張る時は、滑走型マイクロトームを使う。

厚さは 5-10 μm で必要に応じて決める。

3) マイクロトーム刀は現在は殆どが替え刃を使用する。国産ではフェザーから発売されている。従って、マイクロトーム刀を研磨する必要は無くなっている。

マイクロトーム刀の研磨は殆ど外注するが、自動研磨機は中央研究部にある。

これらのマイクロトームは解剖学教室に備えてある。



ライカ回転式マイクロトームとパラフィン伸展槽



ライカ滑走式マイクロトームと
パラフィン伸展槽



ユング型マイクロトーム

* 以上の機器は分子解剖学分野、生体構造解析学分野に常備している。

(3) 切片の貼付

1. 回転型マイクロトームの時は、接着剤を塗付したスライドガラスに水をのせ、その上で暖めてパラフィンのしわを伸ばして乾燥させる。十分乾燥させる事が肝要である。

2. 滑走型マイクロトーム(ユング型マイクロトームと呼ぶ)の時は、水に浮かべてしわをとり、さらに 40 位の温水に移して切片を伸ばし、スライドガラスにすくい上げて乾燥させる。十分乾燥させる事が肝要である。

空気が切片とスライドガラスの中に入らないように、ゆっくりと引き上げることが大切である。また、オルガノシランを塗布したスライドガラスは疎水性であるので、水を切片とス

ライドガラスの間に残さないようにすることが重要である。

3.脳の大型切片はテトランダー型マイクロトーム、ライツ滑走式大型マイクロトームを使用して切る。いずれも、分子解剖学分野に整備されている。

切片の広い方、添付の仕方には研究者、技師によって色々あり自分に合った方法を工夫することが大切である。

スライドに貼った切片は標本箱に保存し、埃が付かないよう保存する。

(1) パラフィン切片の染色法

手順

- 1) 脱パラフィン
- 2) 染色
- 3) 脱水・透徹・封入



< 脱パラフィン用のガラス壺・アルコール系列とキシロール >

1) 脱パラフィン

まず、パラフィンを取除く。

即ち、パラフィン包埋の逆の手順である。

時間は大まかな基準である。

キシロール	5分	キシロール	5分
100%エタノール	5分	100%エタノール	5分
95%エタノール	5分	90%エタノール	5分
80%エタノール	5分	70%エタノール	5分
蒸留水	5分		

2) 染色

詳細は染色法を参照。

神経組織における基本的な染色法

- 1.ヘマトキシリン・エオシン染色
- 2.ニッスル染色(トルイジン青染色)
- 3.クリュバ・バレラ染色(Kruver-Barrera 染色)
- 4.免疫組織化学染色

3) 脱水・透徹・封入

脱パラフィンの逆の手順である。

蒸留水	5分位
70%エタノール	5分位
80%エタノール	5分位
90%エタノール	5分位
95%エタノール	5分位
100%エタノール	5分位
100%エタノール	5分位
キシロール	5分位
キシロール	5分位

カバ - ガラスをかけてエンテラン・ニュー - で封入。
カバ - ガラスに封入剤がつかないようにする。

染色用のガラス壺と脱水用のアルコール系列が入ったガラス壺



(4)染色法

1.ヘマトキシリン・エオシン染色(H-E 染色) :

最も一般的な二重染色法。脳脊髄の切片標本にニッスル染色や免疫組織化学染色をやるうとも、基礎染色標本として重要である。

Mayer's hematoxylin 液(市販されている) - - 5分

水道の流水に 30分

蒸留水で洗淨

1% eosin 水溶液 - - 染色状態に応じて時間を変える(一般には 1-2分)。

(エオシンは必ず濾してから使用する。エオシンがよく染まらないときはエオシンに酢酸を 1滴加える。)

蒸留水で eosin を落として脱水、透徹、封入する。

70%-80%アルコールでエオシンは急速に脱色する。早めに濃度の高いアルコールへ移す。

2.ニッスル染色(トルイジン青染色) :

神経細胞の染色法としては最も基本的で必須の染色法である。

1% toluidine blue 水溶液 - - 5分

蒸留水で洗淨

脱水、透徹、封入する。

70%-80%アルコールで急速に脱色する。早めに濃度の高いアルコールへ移す。

3.クリュバ・バレラ染色(Kruver-Barrera 染色) :

神経細胞と髄鞘の二重染色法。パラフィン切片で脳脊髄の細胞構築を見るときには必須の染色法である。

脱パラフィン 95% アルコ - ルで止める。

luxol fast blue 液に浸漬して 56 で overnight する。

室温に戻して、95% アルコ - ルに入れる。

蒸留水中で軽く洗って 0.05% 炭酸リチウム水溶液に入れて脱色(『分別』とも言う)する。

10-20秒(時間はその時により、もっと長くなる事もある)。

さらに 70% アルコ - ルに入れて脱色する。 と の操作で髄鞘のみ青く染る。他は無色になる。落とし過ぎないように注意して、蒸留水に入れて脱色を止める。もし不十分であれば と を繰り返す。蒸留水で十分洗淨する。

0.1% クレシルエヒト紫液(トルイジン青染色や H-E 染色でもよい)でニッスル染色をする。37 で 5-6分。

95% アルコ - ルを数回通して脱色する。

100%アルコ - ルで完全に脱水し、透徹、封入する。

* ニッスル染色の代わりにヘマトキシリン・エオシン染色やPAS染色をしても良い。

* ルクソ - ルファスト青液の作り方：

luxol fast blue----- 1gm

95% ethyl alcohol-----1000cc

10%酢酸(acetic acid)--- 5cc

1年以上使用できる。

* クレシルエヒト紫液の作り方

cresylecht violet(Chroma 製が良い)---0.1%水溶液を作っておく。

使用時に 0.1%クレシルエヒト紫液 30cc に 10%酢酸水溶液を 5 滴加えて瀘過する。この液はあまり長持ちしない。

* 大型マイクローム（テトランダー型マイクロームとライツ型滑走マイクローム）

いずれも大きな脳（ヒトやサル、ネコなどの）の切片を作るときに使用される。

いずれも分子解剖学分野で所蔵している。

テトランダー型大型マイクローム（人脳のパラフィンブロックがのっている。）

大きなパラフィン切片を作ることは大変難しいが、現在、大きな刃渡りの替え刃のマイクローム刀があり、 $20\mu\text{m}$ くらいの厚さで人脳の水平断切片を作ることは可能である。切片を水に浮かせた後、パラフィン紙をかぶせてその上を筆を用いて掃くようにしてしわを伸ばすなどの工夫は当然もとめられます。



ライツ型大型滑走マイクローム



4.免疫組織化学（この方法については後述する）

4 セロイジンに包埋してミクロトームで薄切する。

大きい脳脊髄の連続切片を作成するときに使用されるが、薄い切片を作成することは難しく、30-50 μm 位の切片で資料を作成する。脳構築の全体像を把握する上でよく利用される。故兒玉作左衛門教授の脳切片のコレクションはセロイジン切片である。セロイジンはセルロース様の物質でエーテル・アルコールの等量溶液に溶かして使用する。市販名はセデュコール（メルク社製）である。火気は厳禁である。

手順

- 1)組織の固定 2)組織の脱水 3)組織の置換
- 4)組織のセロイジン浸透 5)組織のセロイジン包埋

(1) セロイジン包埋法

1)組織の固定

パラフィン包埋法と同じである。

2)組織の脱水(時間は組織の大きさによる)

良く振盪することが肝要である。網ケ - ス (Tissue-Teck のケ - ス) を使用すると包埋まで資料の流失を防げる。ケースごとアルコールの容器に入れる。

マウスの脳では：

70%エチルアルコール - - - 12 時間位

80%エチルアルコール - - - 12 時間位

90%エチルアルコール - - - 12 時間位

95%エチルアルコール - - - 12 時間位

100%エチルアルコール - - 24 時間位(3 回代える)

大きい脳 (人脳、サル、ネコなどの脳) では大きさに応じて3日、5日と長くする。

3)組織のセロイジン浸透

エーテル・アルコール (1 : 1) に浸漬1日くらい

2 %セロイジン 1 週間

4 %セロイジン 1 週間

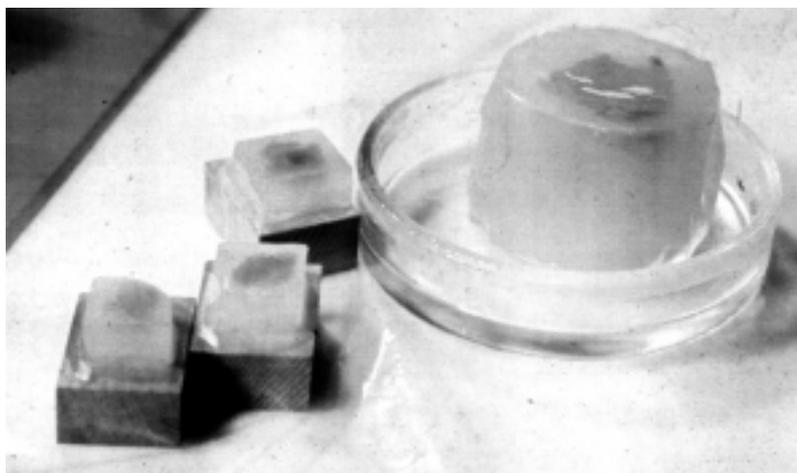
8 %セロイジン 1 週間

大きい脳 (人脳、サル、ネコなどの脳) では大きさに応じて3日、5日と長くする。

4)セロイジン硬化：

容器のなかに 8%セロイジンを入れ、その中に組織塊を沈め、デシケータ内で徐々に自然とエーテルアルコールを揮発させ、堅くなったなら、その後クロロフォルムガスで硬化する。時間は組織の大きさによる

ヒト脳幹のセロイジンブロック
(右)
とパラフィンブロック (左)



5)組織の保存

容器毎あるはセロイジンを容器から切り出して、70%アルコールの中に入れておく。

(2)セロイジン切片の薄切

手順

- 1)セロイジン包埋した組織をブロック台に固定する。
- 2)セロイジン切片の薄切とナンバーリング
- 3)セロイジン切片の保存

1)セロイジン包埋した組織をブロック台に固定

- a.包埋するときにブロック台に付けて包埋する。
- b.ブロック台(エポナイトが望ましい、木はだめ)にアロンアルファーで接着する。パラフィン包埋などで使用した Tissue-Tec のプラスチック籠を利用することもできる。

2)セロイジン切片の薄切とナンバーリング

- a.滑走型マイクロトームを使用する。大型のマイクロトームが望ましい。
- b.刷毛で常に70%アルコールでブロックを浸しながら、マイクロトームの上で切片を伸ばして切る。大体30μm位からもっと厚い切片を連続的に作る。
- c.切片の大きさより一回り大きい和紙片を作り、一定の方向に切片を1枚ずつ和紙片に張り付けて、70%アルコールに蓄える。
- d.切り終わったらそのまま蓄えてもいいし、和紙から1枚ずつ剥がして、墨で余白のセロイジンのところに番号をふる。セロイジンが乾きかけた時を見計らって細筆で番号をふる。

3)セロイジン切片の保存

番号をふった切片はそのまま70%アルコールの中に蓄えて必要の応じて染める。この時に染色法を考えて、奇数と偶数に分けて蓄える等工夫する必要がある。

(2)セロイジン切片の染色法

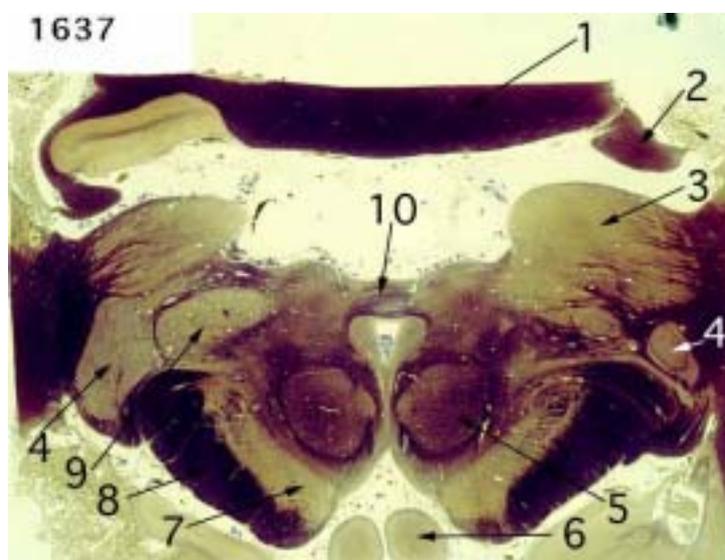
*ヘマトキシリン・エオシン染色

マイヤーのヘマトキシリンを10倍ほど(セロイジンに色が付かない濃度を経験的に決める)に希釈し、染めたい切片を浸漬しておく。パラフィン切片を染める時の濃度のヘマトキシリンを使用するとセロイジンが濃染して見苦しくなる。

自分の日程に合わせて切片を水洗、色出しをし、1%エオシン液に浸漬し(5分くらい)70%アルコールで脱色分別して95%アルコールへいれ以下の要領で脱水・封入する。

- 1.切片を70%アルコールに蓄える。
- 2.95%アルコールに移す。
- 3.100%アルコールにすばやく通す。もたもたしているとセロイジンが溶けてしまう。
- 4.キシロ-ル+アルコール1:1にさっと通す。
- 5.キシロ-ルに2回入れる。切片は白くなってはいけない。
- 6.キシロ-ルを出来るだけきってエンテラン-ニューに封入する。

セロイジン切片(連続切片1637枚目、ヒト中脳上丘・間脳境界部、髄鞘染色)



[2] 電子顕微鏡のための標本作成法

エポン樹脂 (epon 812 or quetol 812) に包埋してガラスナイフやダイヤモンドナイフで切ることで薄い切片を作成することが可能であり、電子顕微鏡用切片 (超薄切片) だけでなく、光学顕微鏡的にも解像度の高い資料 (準超薄切片) が得られる利点がある。

参考文献：

永野俊雄監訳：「透過電子顕微鏡生物試料作成ハンドブック」丸善、東京

原本：Hayat MA, "Basic techniques for transmission electron microscopy" Academic Press 1986

手順：

- 1) 組織の固定 fixation
- 2) 組織の脱水 dehydration
- 3) 組織の置換 replacement
- 4) 組織の樹脂の浸透 infiltration
- 5) 組織の樹脂包埋 embedding

(樹脂としてはエポン 812 が一般的であるが、生産の関係もあり、他の樹脂で代替することが多い)

1 組織の固定

1) 灌流固定

4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (またはさらに 0.5% glutaraldehyde を加える) で灌流固定する。抜脳後同じ固定液に浸漬する。時間は case by case であるが、overnight が一般的である。その後、osmic acid 後固定するために細説する。ブロックの大きさは小さい程良いが神経組織の様に部位が重要な意味をもつときは面積を広く、厚さを薄く (0.5mm から 0.8mm 位) する。マイクロスライサーを使用すると良い。あまり薄いと固定は良いがぼろぼろに壊れてしまい部位が分からなくなるし、又、厚いと次のオスミウム酸後固定では大きいと固定されない (せいぜい表面から 1mm 位までしか固定されない)。

目的に応じて、2.5% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer 液やその他の緩衝液を用いた固定液が使用される。灌流固定しないで、臓器を直ぐ取り出して固定液内で細切 (1mm 角以内) して固定することもあるが、神経系では出来ない。

固定液の作り方

8% paraformaldehyde 水溶液を作る。

重量比で 8% になるように paraformaldehyde を蒸留水に混ぜ (ここでは溶けない) 60-70 位のお湯で湯煎してスタ - ラを回転させて溶かす。30 分以上かけても溶けない時は、1 規定位の NaOH 水溶液をゆっくり 1 滴ずつ滴下して透明になるまで入れる (通常、1,2 滴で溶ける)。冷蔵庫内で長期間保存できる。

0.2M phosphate buffer を 2 リットル作成する。冷蔵庫内で比較的長期間保存できる。
約 1.5 リットルの蒸留水を容器に入れておく。

Na₂HPO₄ · 12H₂O-----116.0gm NaH₂PO₄ · 2H₂O-----11.84gm

を入れ、溶かした後 2 リットルにする。

pH の調整は必要に応じて 0.2M の Na₂HPO₄ · 12H₂O(酸性側の時)と NaH₂PO₄ · 2H₂O
(アルカリ側の時)を作っておき調整する。

この 2 つの液を 1 : 1 の割合で混じて 4%paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer を作る。

固定から以下の操作は「ペニシリン瓶」を容器にして、液量は 4cc を基準として使用する。

2) オスミウム酸後固定

上記の固定が終了したら、リン酸緩衝液でアルデヒドを洗い落としす。3 度ほど液をかえて 1 時間くらいで洗う。

1% osmic acid in 0.1M phosphate buffer にて後固定する(2 時間から 1 晩)。また、50 μ m 厚以下の薄い資料を包埋するときは 0.5% 以下の希釈した固定液を使う。切片が脆く壊れるのを防ぐことができる。オスミウム酸は猛烈な粘膜刺激性があるから吸込まないようにする事。気管支炎、角膜上皮の剥離を起こすので、操作は必ずドラフトの中で操作する。

オスミウム酸は高価であり、また、有毒性が高いので出来るだけ少量で固定する。一般にはペニシリンビンを使用して、1 ビン 4cc 以下が基準である。廃液は貯めて処理する。

固定液の作り方

2%osmic acid 水溶液を用意する。アンプルに入ったオスミウム酸をアンプルを割ってガラスごと、よく洗浄したビンにいれた蒸留水に溶かす。アンプルもきれいに洗浄する必要がある。指紋などつけないように注意する。乱暴に溶かすとガラス片が出て使用できなくなるので 1 週間くらい冷蔵庫内でゆっくり溶かす。

先の 0.2M phosphate buffer に 1 : 1 に溶かして 1% osmic acid in 0.1M phosphate buffer を作る。

2) 脱水(時間は組織の大きさによる)

洗浄することなくアルコール脱水に入る。

50%エタノール 5 分 - 70%エタノール 5 分 -

80%エタノール 5 分 - 90%エタノール 5 分 -

95%エタノール 5 分 -

100%エタノール (マイクロシュ - プで完全脱水したアルコール) 5 分 -

100%エタノール 5 分 -

100%エタノール 5 分 -

3) 置換(パラフィン包埋の時の透徹に相当する) - - 30 分が目安。

QY-1 で置換する。3 回液を替える。匂いの強い有機溶媒であるので必ずドラフトの中で

行う。

QY-1() 10分 - QY-1() 10分 -
QY-1() 10分 -

4) 包埋

エポン樹脂に包埋する。

樹脂の処方は次頁にある。

(1) QY-1 + エポン樹脂(1:1) 60分 - over night (一晩) してよい

(2) エポン樹脂() 60分 エポン樹脂() 60分

エポン樹脂を浸透させるために、37-40 に電球で暖める。

50 を越えると急速に硬化するから注意を要する。

(3) エポン樹脂に包埋(60 24-48 時間)

目的に応じて、シリコン平板包埋、ゼラチンカプセル、ポリカプセルを使用する。

専用の乾燥したオ - プンを使用する。特に、中枢神経系の研究は標本の方向性と観察する部位が重要になるので、平板包埋してから、方向性を見極めて切り出し、改めてエポン樹脂台に接着剤(包埋に残ったエポン樹脂を冷蔵庫で保存)で貼って標本作製することが多い。出来れば、標本の内容を紙片に鉛筆で書き込み一緒に包埋する。

重合中のオ - プンに水蒸気を発生するものを入れてはならない。

乾燥したところで保存する。

* 緩衝液の作り方

(1) 0.1mol 燐酸緩衝液 phosphate buffer(P B、pH7.4)の作り方

20リットル作成する。

約15リットルの蒸留水を容器に入れておく。

Na₂HPO₄·12H₂O-----580.0gm NaH₂PO₄·2H₂O-----59.2gm

を入れ、溶かした後20リットルにする。

pH の調整は必要に応じて 0.1M の Na₂HPO₄·12H₂O(酸性側の時)と NaH₂PO₄·2H₂O(アルカリ側の時)を作っておき調整する。

* P B S の時、NaCl を 170gm 入れる。

(2) Millonig's Buffer の作り方

A,B,C 液を作る。

A:NaH₂PO₄·2H₂O(2.26%)-----2000ml

B:NaOH(2.25%)----- 500ml

C:glucose(5.4%)----- 200ml

それを次の式に合せて D 液を作り

D=A(1660ml)+B(340ml)

最終的に緩衝液に調合する。

*Buffer(2000ml)=D(1800ml)+C(200ml)

* エポキシ樹脂の処方

注意 1 :

Laft(日本では串田)が初めて発表した時、Epon812、MNA、DDSA 3つの樹脂を処方して、A樹脂とB樹脂を作って、A Bの両樹脂の混合比で樹脂の硬度を決めた。それを重量成分に換算したのが次の表である。比重の重い順に静に充填して行くと層に別れる。硬化剤を入れてすばやくかつ十分にかき混ぜる。スタ - ラ - をつかっても良い。その時は気泡が発生するからこれを真空ポンプで除く。かき混ぜる事を怠ると重合むらができる。また、乾燥している日が実験日として望ましい。

最初の方法ではエポキシ樹脂(エポキシ樹脂)は Epon812 であるが、Quetol812 や Poly/Bed812 などの代替品がある。いずれも同じように使用できる包埋剤である。

(「日新 EM 株式会社」からカタログを取り寄せると便利である。

〒160-0007 東京都荒木町 23-9、tel 03(3355)3001、fax 03(3353)2888)

注意 2 :

また、こぼすと時間と共に重合してべたべたになるから必ず、汚した時は 100%アルコールで良く拭取る事。特に秤には計量用の大きいデスポの皿を乗せ、天秤台を汚さないようにする。また、間違えて汚した時は必ず 100%アルコールですぐ拭取る事。

注意 3 :

樹脂を作る時は容器として使い捨ての尿カップを使用する。樹脂は必要最小限の量を作るが誤差を考えて 50 グラムを最小とする。残った樹脂はエポキシのロケットを作るか、冷蔵庫に入れて後で接着剤代りに使う。

注意 4 :

作る量はペニシリン瓶 1 本につき、QY-1 + エポキシ樹脂(1:1)用に 2cc、エポキシ樹脂() と エポキシ樹脂() に各 4cc で包埋までに 10cc(約 10gm)必要になる。さらに包埋用にエポキシ樹脂が必要になる。カプセルに入れる時は、1 カプセル 0.8cc である。1 ピンに 10 個の組織片であれば $10cc + 0.8 \times 10 = \text{約 } 20cc$ 必要になる。

(1) A : B = 3 : 7 (硬)

MNA	35.5gm	MNA	17.75 gm
Quetol 812	50.5gm	Quetol 812	25.25gm
DDSA	13.9gm	DDSA	6.95gm
計	100.0gm	計	50.0 gm
DMP-30(硬化剤)	1.5gm	DMP-30	0.75 gm

(2) A : B = 4 : 6 (普通)

MNA	31.3gm	MNA	15.65gm
QUETOL 812	49.7gm	QUETOL 812	24.85gm
DDSA	19.0gm	DDSA	9.5 gm
計	100.0gm	計	50.0 gm
DMP-30	1.5gm	DMP-30	0.75 gm

* エポキシ樹脂を使用したガラス器具の洗浄法

- 1) 雑巾紙で出来るだけエポキシ樹脂を拭き取る。
- 2) 100%エチルアルコールの入った容器に3 - 4日つける。
- 3) 手がやっと入るくらい加温したハイアライS水溶液(濃度は2%位)を超音波洗浄器に入れてアルコール容器から出したガラス器具を洗浄する。1時間くらい。器具の中のアルコールは元の容器中に戻す。
- 4) 洗浄器からガラス器具を取り出して加温した新しいハイアライS水溶液に入れて1昼夜位おく。
- 5) 流水で水洗する。
- 6) 器具の中にほこりが入らないようにふせて乾燥させる。
乾燥器に入れても可、自然乾燥でも可。

(3) 樹脂切片の薄切

手順

- 1) ガラスナイフを作成する。
- 2) ブロックのトリミング
- 3) 厚切り切片の作成
- 4) 超薄切片の作成

1) ガラスナイフを作成する。

ガラスナイフの作成は市販されているガラス棒を利用し、LKB社製のナイフメーカーで作成する。幅6mm, 8mmの2種類はLKB社製でよいが、幅10mmのガラス棒は割ることが出来ないため三慶社製のナイフメーカーを使用する。

ガラスナイフには接着テープで水を入れるポートを作る。

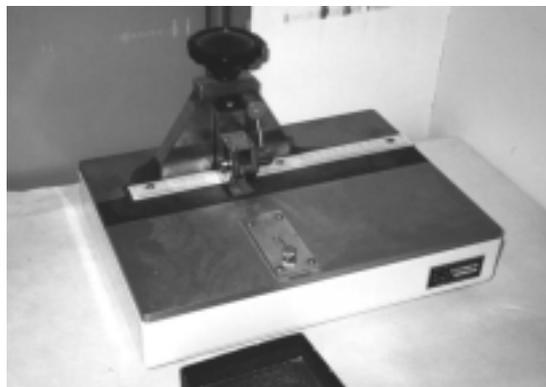
LKB社製のナイフメーカー

(中央研究部超微形態部門 所蔵)

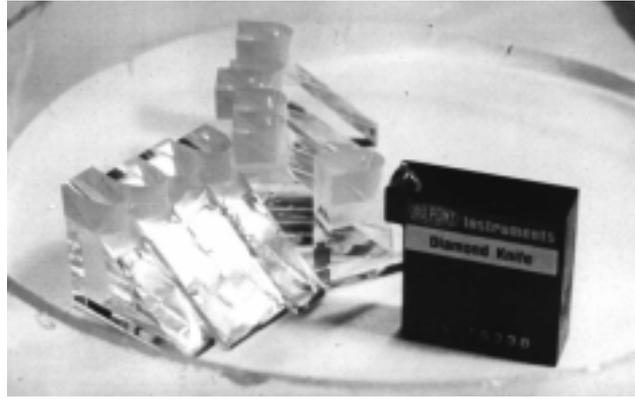


三慶社製のナイフメーカー

(分子解剖学分野 所蔵)



出来上がったガラスナイフと
ダイヤモンドナイフの例



2) ブロックのトリミング

ブロックのトリミングはカミソリを使用するがシック社製の片刃が最も良い。大まかにはグラインダーやヤスリを使用して円錐形に削り、実体顕微鏡下にカミソリを使用して削る。

3) 厚切り切片の作成

更にミクロトームにガラスナイフを取り付けてブロックの面出しを行いさらに希望する部位をカミソリでトリミングする。1 μ m から 2 μ m 厚の光顕用切片 (準超薄切片 semithin sections) をガラスナイフかダイヤモンドナイフで作成する。光顕用切片は常に 1% 位のトルイジン青 (1% 硼砂液に溶かしたもの。作り方参照) で加温染色しながら染色する。光顕下で超薄切片にする目的の部位を探す。

現在、金属製の面削り用のナイフがあり、それで面を出して後にダイヤモンドナイフで

* トルイジン青による加温染色

1 . 1% 硼砂 (sodium borate) 水溶液を作る (硼酸ではない!!)

2 . 1g のトルイジン青を 100cc の蒸留水に溶かす。濃いときには 1% トルイジン青 (硼砂水溶液) で適時希釈する。

* 樹脂が強アルカリ性であるためにアルカリ性の染色液の必要がある。一般の H-E 染色は使用できない。

3 . 染色液は時々濾過すること。

4 . スライドガラスに張り付けた切片上に染色液を滴下し、ホットプレート上で徐々に加温する。さわって熱く感じるくらい。沸騰させてはならない。30 秒くらい。切片の性質によるので切片毎に経験的に時間を決める。

5 . 蒸留水でよく洗い、乾燥させる。

6 . ニュウエンテランを使ってカバーガラスをかけ封入する。

(封入しないときは対物レンズに no-cover lens を使用して検鏡)。

4) 超薄切片の作成

超薄切片を作成する部位が決まったら、超薄切片用のダイヤモンドナイフに替えて切片を作成する。

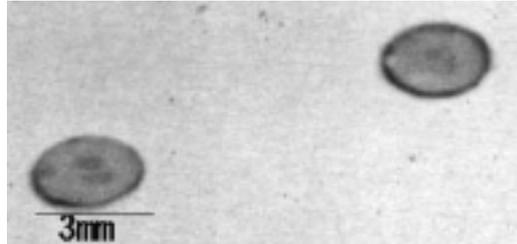
ダイヤモンドナイフのボートに水を張る。水の量は照明光が反射して白っぽく見える量にする。若干表面張力で窪んだ状態が良い。盛り上がった状態では切るとは不可能。

切片の厚さは切片の干渉光による。切片を集める道具として、自分の睫毛 (眉毛ではない) を抜いて、竹串の先に張り付ける。先端の細さが理想的である。

切片をメッシュに拾い上げる準備として：

- a.メッシュを脱脂する（エーテル+アルコール）。一般には150メッシュを使用する。
- b.必要に応じて膜を張る（基本顕微構造解析法 のレベル）。
- c.必要に応じて染色後、切片にカーボン蒸着を行う（基本顕微構造解析法 のレベル）。
- d.メッシュを挟むピンセットは専用のものを用意する。

銅メッシュ



5)超薄切片の染色

* ウラン液 - 水洗 - 鉛液 - 水洗 - 乾燥の順である。

水洗の水は精製水を使い、必ず新しい、ゴミなどが全くない水を使用する。

作成後は必ず一晩静置する。冷蔵庫で保管する。

a.酢酸ウラニル水溶液(1%)で染色。10分くらい。

ウランは国際規制物質であるので、水溶液を作るときには使用簿に必ず記入する。

* 脱水の過程でブロック染色する方法もある。0.5 - 2.0%水溶液に脱水前に1時間位浸漬するか、脱水の時に50%エタノールに酢酸ウランを溶かして染色する。

b.佐藤氏混合鉛液で後染色。2分くらい。

空気中の炭酸ガスを吸収して、炭酸鉛の沈殿物が付着して汚染することが多いので素早く染色することが肝要である。

鉛の染色液はその他に多くの方法がある。自分の好みと汚れが少ないものを選ぶ。

* 佐藤氏混合鉛液の作り方

原著：

Sato T:

"A modified method for lead staining of thin section." J Electron Microsc, 16: 193, 1967

- 1) 4%水酸化ナトリウム水溶液を作る。
- 2) 容器に精製水90ccを入れ、スターラーでゆっくり攪拌。
- 3) 硝酸鉛 1.5g、酢酸鉛 1.5g、クエン酸鉛 1.5gをいれる。
- 4) クエン酸ソーダ 3.0gを入れる。白く濁る。
- 5) 4%水酸化ナトリウム水溶液を24mlを入れる。透明になる。
- 6) 最後に精製水40mlを加えて、濾紙で濾過する。
- 7) 1晩放置してから、使用する。冷蔵庫内に保存する。
- 8) 空気中の炭酸ガスを吸って白濁すると使えなくなるので保存に十分注意する

[3] 標識物質を用いた神経細胞の染色法

神経細胞は軸索を遠位に伸ばしその部位に情報を伝達する投射という、他の細胞にはない特徴がみられる。そこで、神経細胞の染色には、軸索、細胞体のいずれかの部位に標識物質を注入することで、それぞれ細胞体、軸索を発色させる方法がある。

(補足) 標識には、興奮が伝達する方向に向かう軸索流を利用して軸索・終末を標識する順行性標識法と終末側から細胞体に向かう軸索流を利用して細胞体を標識する逆行性標識法がある。

(1) 逆行性標識法：軸索・終末のある部位に標識物質を入れ、細胞体を染色する。

(2) 順行性標識法：細胞体がある部位に標識物質を入れ、軸索を染色する。

- 1) 目的に合致したトレーサーを選択する。
- 2) 目的、トレーサーに合致した注入法を選択する。
- 3) 小手術をおこない注入する。
- 4) 対象動物を固定、薄切法する。
- 5) 発色、封入をおこない、顕微鏡あるいは電顕で観察する。

参考文献 Progress in neurobiology (2000) 62:327-351

(1) トレーサーの選択

(マウス大脳皮質脊髄路ニューロン(CS-neuron)を対象とした事例である)

略語	正式名称	製造元	発色の種類
	注入時の濃度と溶媒	我々が行なった方法	生存期間 (CS-neuron)
BDA	biotinylated dextran amine 10% in 0.01MPBS	Molecular probe 電気泳動および圧式注入	biotin 7 days
Biocytine	Biocytine 5% in 0.01M TRIS (Ph7.6)	Sigma 電気泳動 or 圧式注入	Biotin 2 days
CTB	cholera toxin subunit b 0.5-1.0% in DW	List Biological Lab 社 圧式注入法	抗原 - 抗体反応 3 days
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl- indocarbocyanine perchlorate 10% in DMSO (dimethylsulphoxide sigma 社)	Molecular Probe 圧式注入法	蛍光 3 days
DiO	3,3'-dioctadecyloxaacarbocyanine perchlorate 10% in DMSO (dimethylsulphoxide sigma 社)	Molecular Probe 圧式注入法	蛍光 3 days
DiA	4,4'-dihexadecylaminostyryl-N-methyl- pyridinium 10% in DMSO (dimethylsulphoxide sigma 社)	Molecular Probe 圧式注入法	蛍光 3 days
FB	Fast blue 5% in DW	Sigma 圧式注入法	蛍光 3 days
FG	Fluoro-Gold 2% in DW	Sigma 圧式注入法	蛍光 3 days

fluorescently tagged dextran amines	例 Dextran texas red 下線の蛍光物質は多種用意されている ----- 10% in DW	Molecular Probe ----- 圧式注入法	蛍光 ----- 3 days
HRP	Horseradish peroxidase ----- 10% in 0.05M Tris (ph 8)+ 0.1M KCl 30% in DW or 2% DMSO (sigma 社)	Sigma type VI (電気泳動法) ----- (圧式注入法)	HRP ----- 3 days
NY	Nuclear Yellow ----- 5% in DW	Sigma ----- 圧式注入法	蛍光 ----- 2 days
PHA-L	Phaseolus vulgaris leuco- agglutinin ----- 2.5% in 0.01M PBS	Sigma ----- 電気泳動法	抗原 - 抗体反応 ----- Over 3weeks
TB	True blue ----- 5% in DW	Sigma ----- 圧式注入法	蛍光 ----- 2 weeks
WGA	wheat-germ agglutinin ----- 1.0-5.0% in saline	東洋紡 ----- 圧式注入法 電気泳動法	HRP ----- 3 days

標識物質について、選ぶポイントとして

1) 順行性か逆行性かによって標識物質を選択することが重要である。

- ・ 順行性のみ：PHA-L
- ・ 逆行性のみ(ほぼ)：NY, FB, TB
- ・ 両方向性だが特に、順行性に優れるもの：DBA、WGA-HRP、biocytine (注入する際濃度を高くし、短距離の輸送であれば逆行性も優れる)
- ・ 両方向性だが特に、逆行性に優れるもの：HRP(しかし像はあまりよくない)、fluorescently tagged dextran amines, FGなど
- ・ 両者ともにすぐれるもの：CTB、DiI

2) 二重染色、電顕観察をおこなうかによって標識物質を選択する。

(a) 蛍光発色

蛍光発色すると、他の蛍光染色とあわせて二重染色が可。選択できるトレーサーとしては、

- ・ 物質そのものが蛍光(1に記してある)
- ・ 発色剤として蛍光標識してあるものをもちいることが出来るもの(DBA, Biocytine)。

(b) 電顕観察

電顕観察を行なうためには、発色剤としてDABなどを用いる必要がある。

- ・ DBA, HRP, Biocytin, WGA-HRP, CTB, PHA-Lなどでは容易に用いることができる。
- ・ DiIについては、Photoconversion をもちいることによりDABを沈着出来る。

3) 染色される細胞内の部位

- ・ NYは核のみが染色される。
- ・ HRPは細胞内の顆粒(小胞)が染色される。HRP-WGAは膜が染色される。
- ・ DBA, Biocytine, FG, FB, TB, fluorescently tagged dextran amineは細胞質が染色される。
- ・ DiIは生体では小胞が染色されるがHRPより感度はよい、死後脳では細胞膜が染色される。
- ・ CTは細胞膜が染色される。

4) 対象が末梢神経系か中枢神経系かで標識物質を選択する必要がある。

CTB、WGA-HRP、FBについては末梢で用いて標識できた。他のトレーサーについては不明。

中枢では、原則どれも使用可能であるが、CTBでは工夫がいる。

2) 注入法の選択。

注入法には、圧式注入法と電気泳動法がある。注入部位に限局性をもたせるためには、電気泳動法を用いたほうがよい。その際には荷電性を有する標識物質を選択する。DBA, HRP, WGA-HRP, Biocytine, などは荷電している。圧式注入法でもピコポンプなど微小圧を発生させる機器を用いると限局性が増す。

1) 圧式注入法

(ハミルトンシリンジを用いる)

ガラス電極の太端にハミルトンシリンジ(1 μ l ~ 10 μ l)の先端の金属筒を入れ、蠟(デントタルワックス 歯学部の売店で売っている)で隙間を埋める。その際、シリンジは中心部に置いておくことよい。シリンジを操作することで標識物質をガラス電極内に吸引し、脳固定機に装着させて脳へ標識物質を注出する。

(ピコポンプを用いる)

ハミルトンシリンジの代わりに、ピコポンプ(Pico splitter WPI社製)を用いると、圧の管理が容易となる。ピコポンプには、入力として陽圧、陰圧の口があり、前者は圧縮空気をつまんだポンペ(エアウォーター社より)と、後者は吸引器と、肉圧のシリコンチューブなどを通じて接続する(空気がもれないようにパッキングをするなどの工夫すること)。一方、陽圧の出力口をタイゴン社製のホースで接着し、そのホースの他端をガラス電極につなげる(接着剤を使用するなどして空気がもれないように工夫すること)。圧調整弁、開口時間、開口する周期などを操作することでガラス電極内に圧がかかり、液が抽出する。なお、ピコポンプは、Stimulator、PCなどにより弁の開閉を制御することができる。

両者共通して、注意することは、標識物質が注出されるまでの圧は、注出が開始してからの圧に比べ大きいことに注意する(静止摩擦力と動いているときの摩擦力が異なることを思い出ししてもらいたい)。それをうまく調整(たとえば、始めに弱い圧力を持続的にかけ、標識物質が注出するまでに待つ、などの手技)しないと一度に大量の物質がガラス電極より掃き出される。また、注出後しばらく(5分以上)は放置しておくこと、そうでないと針を抜く際に標識物質も同時に抜けることがある。

2) 電気泳動法

電気泳動を行なうにあたって電気生理学的な準備が必要となるが、その詳細は省き、手順のみを記載する。また、装置としては電流発生器と刺激装置のみの構成を想定している。シリンジなどを用いてガラス電極内に標識物質を10 μ lほど充填する。金属製シリンジからの金属成分の溶解が注入に悪影響を及ぼすことがたまにある、その場合はWPI社の細いポリマー製のカニューレなどを用いるとよい。次に、ガラス電極の抵抗値を測定する。抵抗値が範囲内であったならば、電流を流す端子と、一端をAgCl処理した0.2mm径の銀線の処理していない端とをコードで結び、処理してある端を標識物質と接するようにガラス電極内に入れする。アース端子はコードを用いて動物の耳と連結するようにする。硬膜、クモ膜を取り除いた脳表面より、ガラス電極をマニピュレーターなどを用いて刺入し、目的の位置まで進め、そこで、電流を流す。電流量、時間、電流の方向性については、注入先の領域の広さ、標識物質によりことなる。以下は、我々が行なった例です。

・DBA : + (陽) 電流(1~7 μ A) 700 msec(ON) 1300 msec (OFF)で900回

・Biocytine : - (陰) 電流(1~7 μ A) 700 msec(ON) 1300 msec (OFF)で900回

など。標識物質の荷電については説明書にかかれていますので参考にすること。なお、溶液中で+に荷電するには+電流を、-に荷電するものには-電流を加える。なお、微小電圧増幅器、オシロスコープがあると、標的でのニューロンの活動を測定できるため注入部位の同定に役立つ。

3) 死後脳への注入

注入後の生存させることが不可能である場合。個体の日時に正確性が要求される場合、抜脳しなければ注入が不可能である場合などで用いられる。灌流固定後に抜脳した死後脳に対して、Di

Iの結晶ないしは高濃度液を注入し、その後ホルマリン液に浸漬し約37度にて放置する。約1ヶ月以上すぎると(投射の距離により異なる)標識される。ただし、DiIは細胞膜への浸透性が高いため、この標識法はミエリンの発達していない時期(マウスではP9以前)時期であることが望まれる。また、クリスタル等が脳の表面に散らばると、その部位からも取り込まれてしまうので注意が必要である。

補1) 標識物質の準備

水溶性の標識物質については、トレーサーの選択の項目でかけられた溶媒に溶かす。おおむね一回10~20 μ l作製すればよい。底が尖って蓋のできる小さな容器に入れておく。電気泳動法を用いるときには、ゴミがガラス電極内に入らぬよう、溶媒をあらかじめフィルターにてこす、あるいは1000rpmの遠心かけるなどの工夫が必要。

補2) ガラス電極作製法

無芯の1.5mm~2.0mm径のガラス管(成茂社など)に、電気生理学実験で用いられるガラス電極作製機(成茂社、サッター社製などがある)を用いて、熱をかけ引き伸ばすことで電極を作る。電気泳動法では、先端が0.5~2Mになるとよい。圧式注入法では、10m μ 径以上にして針がつまらない程度がよい。太くすると、血液などが電極内に逆流し注入に悪影響を及ぼす。その後、アンブルカッター(注射薬投与で用いる)で、銀線と標識物質が接することのできるような適宜な長さになるようにガラス電極の他端を切り落とす。なお、切断面を火であぶるなどしてパッキングなどが傷つかないようにする。

補3) AgCl処理

0.1MのHCl溶液の中に、やすりでよく磨いた長さ3~4cmの銀線の約半分を2本平行に(接しないように)入れる。6Vの乾電池を用意し、ワニクリップのついたコードなどで、銀線の一本を+端子、残りを-端子と結ぶ。数分で、(+)極と結んだものが黒~白くなる。銀線を取り出しDWで洗浄する。

補4) ガラス電極の抵抗値測定法

AgCl処理した銀線をガラス電極内に入れ標識物質と接するようにする。ガラス電極を支持棒などで固定し0.1M KCl溶液に入れる。また、別の銀線の一端を溶液中に入れる。テスターの+をガラス電極からの銀線に、-を溶液からの銀線に接着させて抵抗値を測定する。電気泳動法では0.5M~2Mになることが望ましい。

(3) 注入時の小手術

マウス、ラットなどを想定する。手術前に麻酔をかける。麻酔法としては、エーテル、ネブタールなど、色々あるが、慣れているものを用いるとよい。我々は、生後12日以降で、3.5%抱水クロラル10 μ l/gを腹腔内注射により投与、それ以前ではエーテルを吸入により与えている。

注入の対象部位が脳など頭蓋骨で覆われている場合は歯科用ドリルにて頭蓋骨に穴を開け脳の表面を可視化し、延髄~頸髄の場合は後頭骨と第一頸椎の間の筋を切断することで延髄-脊髄移行部を可視化する。その後、硬膜、クモ膜をメスなどで剥がし、脳表面を露出させガラス電極を刺入する。その際血管を傷つけないように注意を払うこと。いずれにせよ、眼科用ハサミ、小外科用メス、なるべく細いピンセットを用い、侵襲を最低限に押える必要がある。

注入後、(1)で書かれた生存期間を参考にして生存期間を定める。

(4) 固定、薄切。

固定灌流については、4% paraformaldehyde溶液をもちいる。ただCTB, Biocytine, DBAなどでは、0.2% picric acidを付加したほうが光顕ではよりよい像をえられる。また、電顕に持っていく場合、0.5% Glutal aldehyde を付加する必要がある。ただし、発色がBiotineなどである場合、切片の深部にある標識物質を発色させるためGlutal aldehydeを0.1%にすることが望まし

い。

薄切は、一般に、50 μm厚で行なう。必要に応じて厚さを变化させること。

- ・CTBなど抗原抗体反応を用いて発色する場合は、免疫染色と同様。
 - ・Biotin, HRPが発色基質である場合は、凍結あるいはマイクロスライサーを用いる。
 - ・Dil等のような油性の色素の場合はマイクロスライサーが望ましい。
 - ・他の蛍光標識物質については、マイクロスライサーないしは凍結による薄切が一般的だが、F B、F Gなどではパラフィン包埋にても蛍光は残存する。
- ただし、電顕に持っていく場合は、マイクロスライサーを用いる。

(5) 発色、封入

a) Biotinを発色させる場合

免疫染色の2次抗体以降のステップとほぼ同等である。HRP-avidine複合体を浸漬し、DAB発色を行なう。なお、Twin Tritonなどの活性剤を1%ほど入れると切片の深部にある標識物質も染色される。また、蛍光発色させたい場合は、(蛍光物質) - avidine複合体を用いれば蛍光発色できる、それらの試薬については免疫染色製品を作製している製造元のカタログを参考のこと。電顕に持ち込みたい場合も同様であるが、活性剤はtwinを1%以下にするか、無添加にすること。そうでないと、膜が溶け、電顕像としてあまりに汚くなる。

b) HRP

薄切した切片をDABで発色させる。発色のさせ方は免疫染色の最後の発色法と同等である。それ以外にTMBにより発色させる方法がある。ただし、電顕に持ち込む場合はDAB発色に限られる。TMB法は、感度は高いもののゴミが多い、退色しやすいという欠点がある。

c) 蛍光

そのまま蛍光観察できる。

d) Dil

Dilは、蛍光観察以外に、Photoconversion法により電顕に持ち込むことができる。ただし、生体に注入した場合に限られる。死後脳へ注入した場合、電顕に持ち込むことはほとんど不可能である。

その後、封入、観察する。この手順は、電顕、光顕ともに通常の切片と同様の方法である。

[3] 標識物質を用いた神経細胞の染色法

神経細胞は軸索を遠位に伸ばしその部位に情報を伝達する投射という、他の細胞にはない特徴がみられる。そこで、神経細胞の染色には、軸索、細胞体のいずれかの部位に標識物質を注入することで、それぞれ細胞体、軸索を発色させる方法がある。

(補足) 標識には、興奮が伝達する方向に向かう軸索流を利用して軸索・終末を標識する順行性標識法と終末側から細胞体に向かう軸索流を利用して細胞体を標識する逆行性標識法がある。

(1) 逆行性標識法：軸索・終末のある部位に標識物質を入れ、細胞体を染色する。

(2) 順行性標識法：細胞体がある部位に標識物質を入れ、軸索を染色する。

- 1) 目的に合致したトレーサーを選択する。
- 2) 目的、トレーサーに合致した注入法を選択する。
- 3) 小手術をおこない注入する。
- 4) 対象動物を固定、薄切法する。
- 5) 発色、封入をおこない、顕微鏡あるいは電顕で観察する。

参考文献 Progress in neurobiology (2000) 62:327-351

(1) トレーサーの選択

(マウス大脳皮質脊髄路ニューロン(CS-neuron)を対象とした事例である)

略語	正式名称	製造元	発色の種類
	注入時の濃度と溶媒	我々が行なった方法	生存期間 (CS-neuron)
BDA	biotinylated dextran amine 10% in 0.01MPBS	Molecular probe 電気泳動および圧式注入	biotin 7 days
Biocytine	Biocytine 5% in 0.01M TRIS (Ph7.6)	Sigma 電気泳動 or 圧式注入	Biotin 2 days
CTB	cholera toxin subunit b 0.5-1.0% in DW	List Biological Lab 社 圧式注入法	抗原 - 抗体反応 3 days
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl- indocarbocyanine perchlorate 10% in DMSO (dimethylsulphoxide sigma 社)	Molecular Probe 圧式注入法	蛍光 3 days
DiO	3,3'-dioctadecyloxaacarbocyanine perchlorate 10% in DMSO (dimethylsulphoxide sigma 社)	Molecular Probe 圧式注入法	蛍光 3 days
DiA	4,4'-dihexadecylaminostyryl-N-methyl- pyridinium 10% in DMSO (dimethylsulphoxide sigma 社)	Molecular Probe 圧式注入法	蛍光 3 days
FB	Fast blue 5% in DW	Sigma 圧式注入法	蛍光 3 days
FG	Fluoro-Gold 2% in DW	Sigma 圧式注入法	蛍光 3 days

fluorescently tagged dextran amines	例 Dextran texas red 下線の蛍光物質は多種用意されている ----- 10% in DW	Molecular Probe ----- 圧式注入法	蛍光 ----- 3 days
HRP	Horseradish peroxidase ----- 10% in 0.05M Tris (ph 8)+ 0.1M KCl 30% in DW or 2% DMSO (sigma 社)	Sigma type VI (電気泳動法) ----- (圧式注入法)	HRP ----- 3 days
NY	Nuclear Yellow ----- 5% in DW	Sigma ----- 圧式注入法	蛍光 ----- 2 days
PHA-L	Phaseolus vulgaris leuco- agglutinin ----- 2.5% in 0.01M PBS	Sigma ----- 電気泳動法	抗原 - 抗体反応 ----- Over 3weeks
TB	True blue ----- 5% in DW	Sigma ----- 圧式注入法	蛍光 ----- 2 weeks
WGA	wheat-germ agglutinin ----- 1.0-5.0% in saline	東洋紡 ----- 圧式注入法 電気泳動法	HRP ----- 3 days

標識物質について、選ぶポイントとして

1) 順行性か逆行性かによって標識物質を選択することが重要である。

- ・ 順行性のみ：PHA-L
- ・ 逆行性のみ(ほぼ)：NY, FB, TB
- ・ 両方向性だが特に、順行性に優れるもの：DBA、WGA-HRP、biocytine (注入する際濃度を高くし、短距離の輸送であれば逆行性も優れる)
- ・ 両方向性だが特に、逆行性に優れるもの：HRP(しかし像はあまりよくない)、fluorescently tagged dextran amines, FGなど
- ・ 両者ともにすぐれるもの：CTB、DiI

2) 二重染色、電顕観察をおこなうかによって標識物質を選択する。

(a) 蛍光発色

蛍光発色すると、他の蛍光染色とあわせて二重染色が可。選択できるトレーサーとしては、

- ・ 物質そのものが蛍光(1に記してある)
- ・ 発色剤として蛍光標識してあるものをもちいることが出来るもの(DBA, Biocytine)。

(b) 電顕観察

電顕観察を行なうためには、発色剤としてDABなどを用いる必要がある。

- ・ DBA, HRP, Biocytin, WGA-HRP, CTB, PHA-Lなどでは容易に用いることができる。
- ・ DiIについては、Photoconversion をもちいることによりDABを沈着出来る。

3) 染色される細胞内の部位

- ・ NYは核のみが染色される。
- ・ HRPは細胞内の顆粒(小胞)が染色される。HRP-WGAは膜が染色される。
- ・ DBA, Biocytine, FG, FB, TB, fluorescently tagged dextran amineは細胞質が染色される。
- ・ DiIは生体では小胞が染色されるがHRPより感度はよい、死後脳では細胞膜が染色される。
- ・ CTは細胞膜が染色される。

4) 対象が末梢神経系か中枢神経系かで標識物質を選択する必要がある。

CTB、WGA-HRP、FBについては末梢で用いて標識できた。他のトレーサーについては不明。

中枢では、原則どれでも使用可能であるが、CTBでは工夫がいる。

2) 注入法の選択。

注入法には、圧式注入法と電気泳動法がある。注入部位に限局性をもたせるためには、電気泳動法を用いたほうがよい。その際には荷電性を有する標識物質を選択する。DBA, HRP, WGA-HRP, Biocytine, などは荷電している。圧式注入法でもピコポンプなど微小圧を発生させる機器を用いると限局性が増す。

1) 圧式注入法

(ハミルトンシリンジを用いる)

ガラス電極の太端にハミルトンシリンジ(1 μ l ~ 10 μ l)の先端の金属筒を入れ、蠟(デントタルワックス 歯学部の売店で売っている)で隙間を埋める。その際、シリンジは中心部に置いておくことよい。シリンジを操作することで標識物質をガラス電極内に吸引し、脳固定機に装着させて脳へ標識物質を注出する。

(ピコポンプを用いる)

ハミルトンシリンジの代わりに、ピコポンプ(Pico splitter WPI社製)を用いると、圧の管理が容易となる。ピコポンプには、入力として陽圧、陰圧の口があり、前者は圧縮空気をつまんだポンペ(エアウォーター社より)と、後者は吸引器と、肉圧のシリコンチューブなどを通じて接続する(空気がもれないようにパッキングをするなどの工夫すること)。一方、陽圧の出力口をタイゴン社製のホースで接着し、そのホースの他端をガラス電極につなげる(接着剤を使用するなどして空気がもれないように工夫すること)。圧調整弁、開口時間、開口する周期などを操作することでガラス電極内に圧がかかり、液が抽出する。なお、ピコポンプは、Stimulator、PCなどにより弁の開閉を制御することができる。

両者共通して、注意することは、標識物質が注出されるまでの圧は、注出が開始してからの圧に比べ大きいことに注意する(静止摩擦力と動いているときの摩擦力が異なることを思い出ししてもらいたい)。それをうまく調整(たとえば、始めに弱い圧力を持続的にかけ、標識物質が注出するまでに待つ、などの手技)しないと一度に大量の物質がガラス電極より掃き出される。また、注出後しばらく(5分以上)は放置しておくこと、そうでないと針を抜く際に標識物質も同時に抜けることがある。

2) 電気泳動法

電気泳動を行なうにあたって電気生理学的な準備が必要となるが、その詳細は省き、手順のみを記載する。また、装置としては電流発生器と刺激装置のみの構成を想定している。シリンジなどを用いてガラス電極内に標識物質を10 μ lほど充填する。金属製シリンジからの金属成分の溶解が注入に悪影響を及ぼすことがたまにある、その場合はWPI社の細いポリマー製のカニューレなどを用いることよい。次に、ガラス電極の抵抗値を測定する。抵抗値が範囲内であったならば、電流を流す端子と、一端をAgCl処理した0.2mm径の銀線の処理していない端とをコードで結び、処理してある端を標識物質と接するようにガラス電極内に入れする。アース端子はコードを用いて動物の耳と連結するようにする。硬膜、クモ膜を取り除いた脳表面より、ガラス電極をマニピュレーターなどを用いて刺入し、目的の位置まで進め、そこで、電流を流す。電流量、時間、電流の方向性については、注入先の領域の広さ、標識物質によりことなる。以下は、我々が行なった例です。

・DBA : + (陽) 電流(1~7 μ A) 700 msec(ON) 1300 msec (OFF)で900回

・Biocytine : - (陰) 電流(1~7 μ A) 700 msec(ON) 1300 msec (OFF)で900回

など。標識物質の荷電については説明書にかかっているので参考にすること。なお、溶液中で+に荷電するには+電流を、-に荷電するものには-電流を加える。なお、微小電圧増幅器、オシロスコープがあると、標的でのニューロンの活動を測定できるため注入部位の同定に役立つ。

3) 死後脳への注入

注入後の生存させることが不可能である場合。個体の日時に正確性が要求される場合、抜脳しなければ注入が不可能である場合などで用いられる。灌流固定後に抜脳した死後脳に対して、Di

Iの結晶ないしは高濃度液を注入し、その後ホルマリン液に浸漬し約37度にて放置する。約1ヶ月以上すぎると(投射の距離により異なる)標識される。ただし、DiIは細胞膜への浸透性が高いため、この標識法はミエリンの発達していない時期(マウスではP9以前)時期であることが望まれる。また、クリスタル等が脳の表面に散らばると、その部位からも取り込まれてしまうので注意が必要である。

補1) 標識物質の準備

水溶性の標識物質については、トレーサーの選択の項目でかけられた溶媒に溶かす。おおむね一回10~20 μ l作製すればよい。底が尖って蓋のできる小さな容器に入れておく。電気泳動法を用いるときには、ゴミがガラス電極内に入らぬよう、溶媒をあらかじめフィルターにてこす、あるいは1000rpmの遠心かけるなどの工夫が必要。

補2) ガラス電極作製法

無芯の1.5mm~2.0mm径のガラス管(成茂社など)に、電気生理学実験で用いられるガラス電極作製機(成茂社、サッター社製などがある)を用いて、熱をかけ引き伸ばすことで電極を作る。電気泳動法では、先端が0.5~2Mになるとよい。圧式注入法では、10m μ 径以上にして針がつまらない程度がよい。太くすると、血液などが電極内に逆流し注入に悪影響を及ぼす。その後、アンプルカッター(注射薬投与で用いる)で、銀線と標識物質が接することのできるような適宜な長さになるようにガラス電極の他端を切り落とす。なお、切断面を火であぶるなどしてパッキングなどが傷つかないようにする。

補3) AgCl処理

0.1MのHCl溶液の中に、やすりでよく磨いた長さ3~4cmの銀線の約半分を2本平行に(接しないように)入れる。6Vの乾電池を用意し、ワニクリップのついたコードなどで、銀線の一本を+端子、残りを-端子と結ぶ。数分で、(+)極と結んだものが黒~白くなる。銀線を取り出しDWで洗浄する。

補4) ガラス電極の抵抗値測定法

AgCl処理した銀線をガラス電極内に入れ標識物質と接するようにする。ガラス電極を支持棒などで固定し0.1M KCl溶液に入れる。また、別の銀線の一端を溶液中に入れる。テスターの+をガラス電極からの銀線に、-を溶液からの銀線に接着させて抵抗値を測定する。電気泳動法では0.5M~2Mになることが望ましい。

(3) 注入時の小手術

マウス、ラットなどを想定する。手術前に麻酔をかける。麻酔法としては、エーテル、ネブタールなど、色々あるが、慣れているものを用いるとよい。我々は、生後12日以降で、3.5%抱水クロラル10 μ l/gを腹腔内注射により投与、それ以前ではエーテルを吸入により与えている。

注入の対象部位が脳など頭蓋骨で覆われている場合は歯科用ドリルにて頭蓋骨に穴を開け脳の表面を可視化し、延髄~頸髄の場合は後頭骨と第一頸椎の間の筋を切断することで延髄-脊髄移行部を可視化する。その後、硬膜、クモ膜をメスなどで剥がし、脳表面を露出させガラス電極を刺入する。その際血管を傷つけないように注意を払うこと。いずれにせよ、眼科用ハサミ、小外科用メス、なるべく細いピンセットを用い、侵襲を最低限に押える必要がある。

注入後、(1)で書かれた生存期間を参考にして生存期間を定める。

(4) 固定、薄切。

固定灌流については、4% paraformaldehyde溶液をもちいる。ただCTB, Biocytine, DBAなどでは、0.2% picric acidを付加したほうが光顕ではよりよい像をえられる。また、電顕に持っていく場合、0.5% Glutal aldehyde を付加する必要がある。ただし、発色がBiotineなどである場合、切片の深部にある標識物質を発色させるためGlutal aldehydeを0.1%にすることが望まし

い。

薄切は、一般に、50 μm厚で行なう。必要に応じて厚さを变化させること。

- ・CTBなど抗原抗体反応を用いて発色する場合は、免疫染色と同様。
 - ・Biotin, HRPが発色基質である場合は、凍結あるいはマイクロスライサーを用いる。
 - ・Dil等のような油性の色素の場合はマイクロスライサーが望ましい。
 - ・他の蛍光標識物質については、マイクロスライサーないしは凍結による薄切が一般的だが、F B、F Gなどではパラフィン包埋にても蛍光は残存する。
- ただし、電顕に持っていく場合は、マイクロスライサーを用いる。

(5) 発色、封入

a) Biotinを発色させる場合

免疫染色の2次抗体以降のステップとほぼ同等である。HRP-avidine複合体を浸漬し、DAB発色を行なう。なお、Twin Tritonなどの活性剤を1%ほど入れると切片の深部にある標識物質も染色される。また、蛍光発色させたい場合は、(蛍光物質) - avidine複合体を用いれば蛍光発色できる、それらの試薬については免疫染色製品を作製している製造元のカタログを参考のこと。電顕に持ち込みたい場合も同様であるが、活性剤はtwinを1%以下にするか、無添加にすること。そうでないと、膜が溶け、電顕像としてあまりに汚くなる。

b) HRP

薄切した切片をDABで発色させる。発色のさせ方は免疫染色の最後の発色法と同等である。それ以外にTMBにより発色させる方法がある。ただし、電顕に持ち込む場合はDAB発色に限られる。TMB法は、感度は高いもののゴミが多い、退色しやすいという欠点がある。

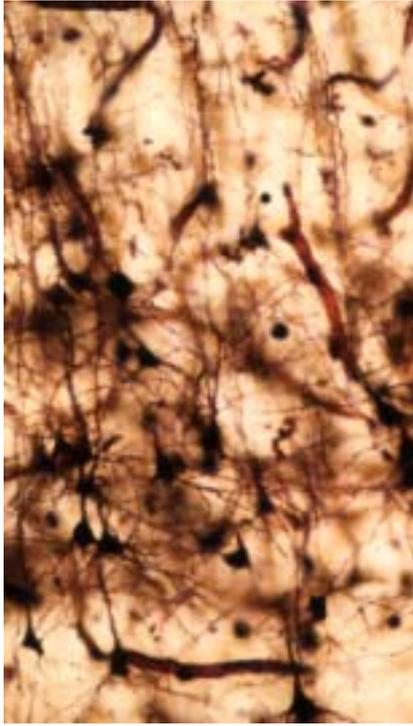
c) 蛍光

そのまま蛍光観察できる。

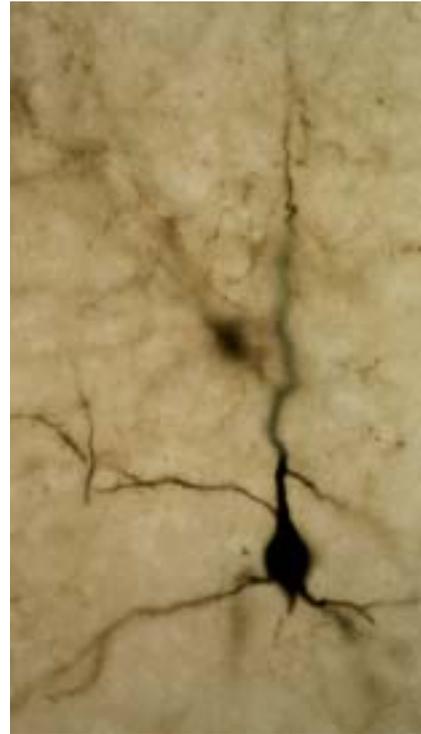
d) Dil

Dilは、蛍光観察以外に、Photoconversion法により電顕に持ち込むことができる。ただし、生体に注入した場合に限られる。死後脳へ注入した場合、電顕に持ち込むことはほとんど不可能である。

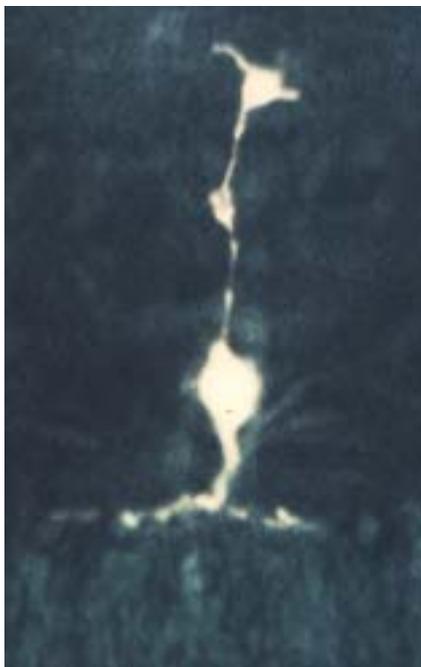
その後、封入、観察する。この手順は、電顕、光顕ともに通常の切片と同様の方法である。



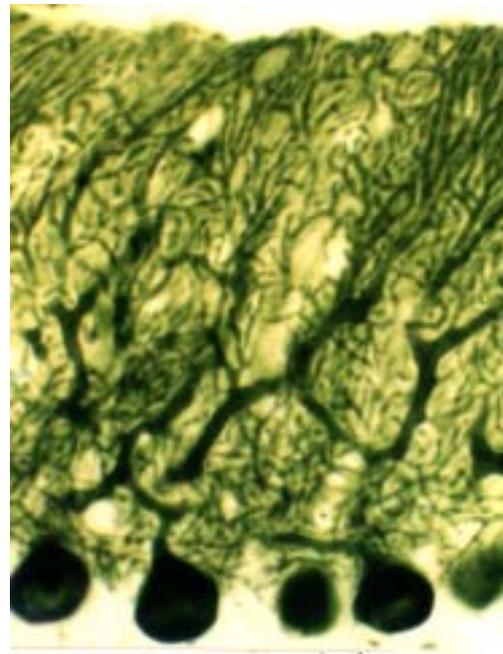
ヒト大脳皮質錐体細胞
ゴルジ鍍銀法



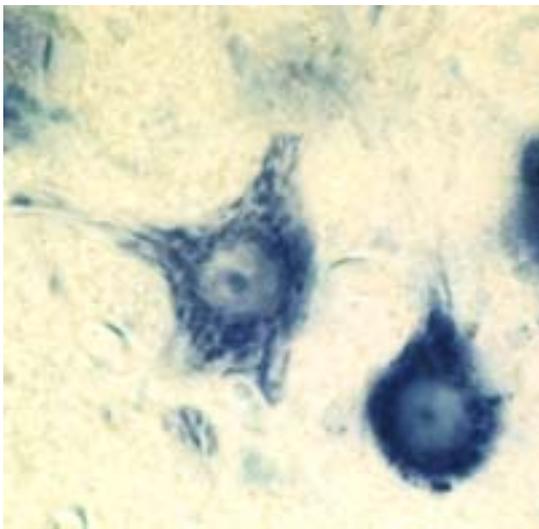
マウス大脳皮質錐体細胞
バイオサイチン逆行性標識法



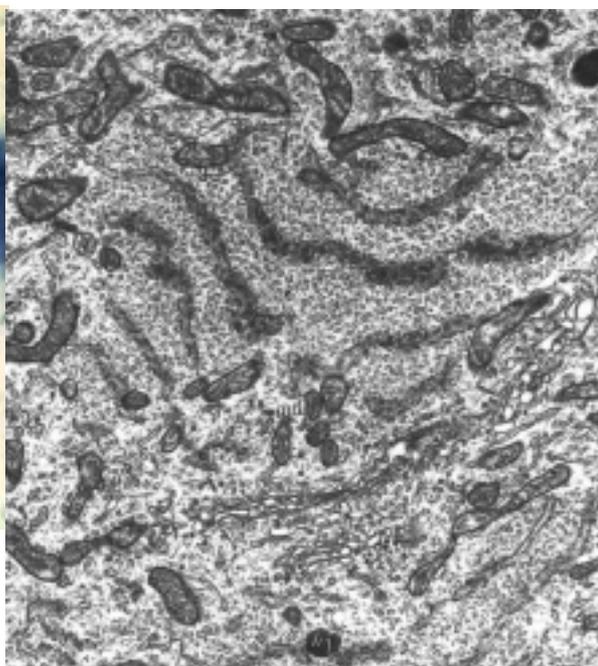
コイ網膜双極細胞
プロシアン黄細胞内注入法



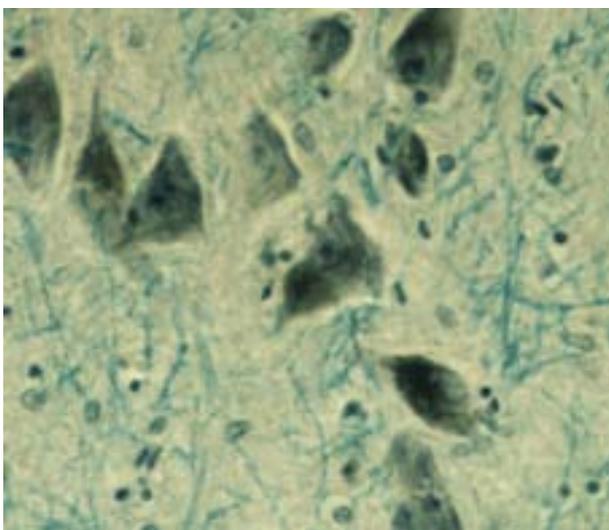
マウスプルキンエ細胞
IP3 受容体の免疫組織化学染色



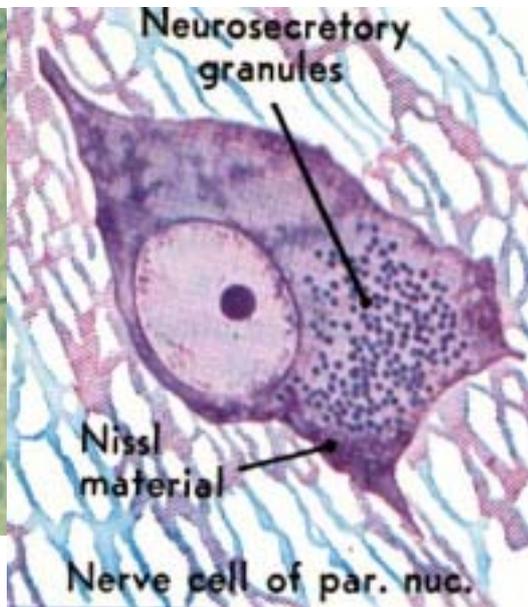
アカゲザル脊髄前角細胞のニッスル小体
セロイジン切片トルイジンプル - 染色



ラット・プルキンエ細胞のニッスル小体（電顕所見）

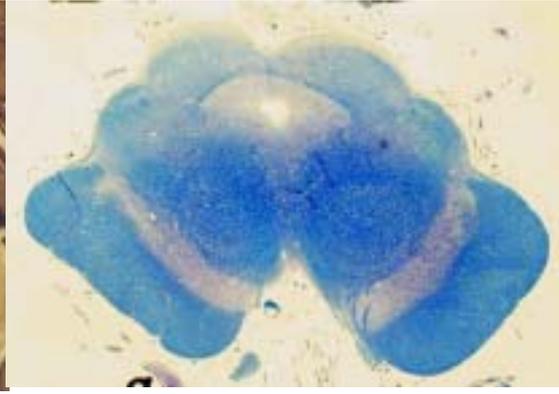


メラニン色素（細胞体が黒色）
ヒト黒質パラフィン切片
クリュバ - バレラ染色、
有髄線維が青くルクソール・ファスト青で染まっている。



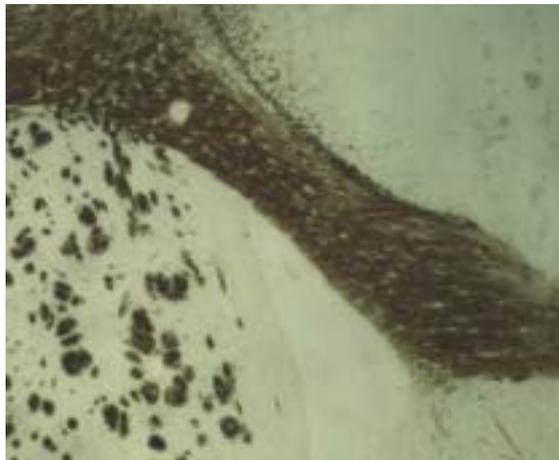
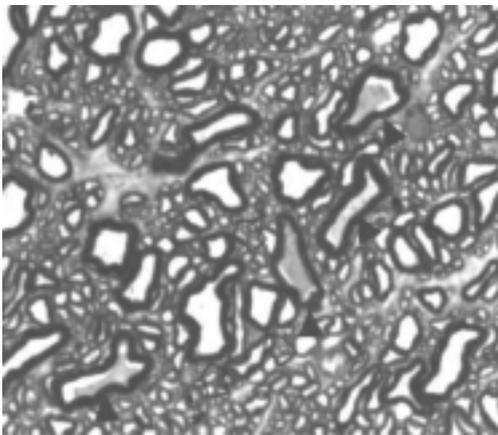
神経分泌顆粒（室傍核）

髄鞘を光学顕微鏡で観察する。



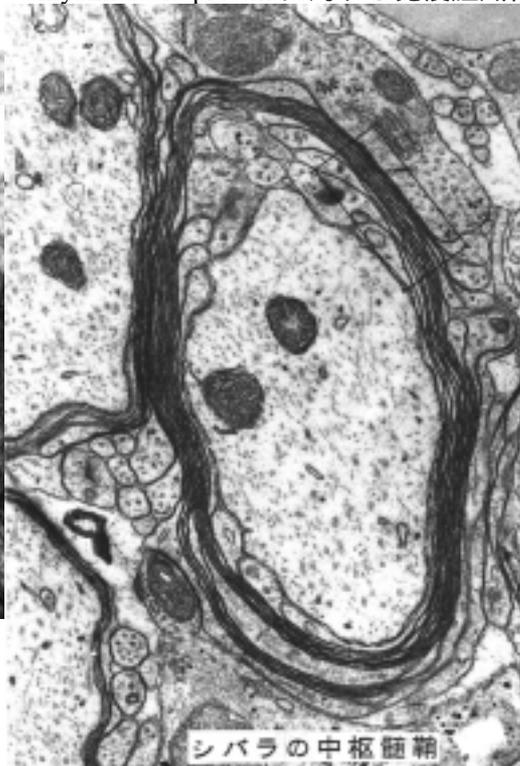
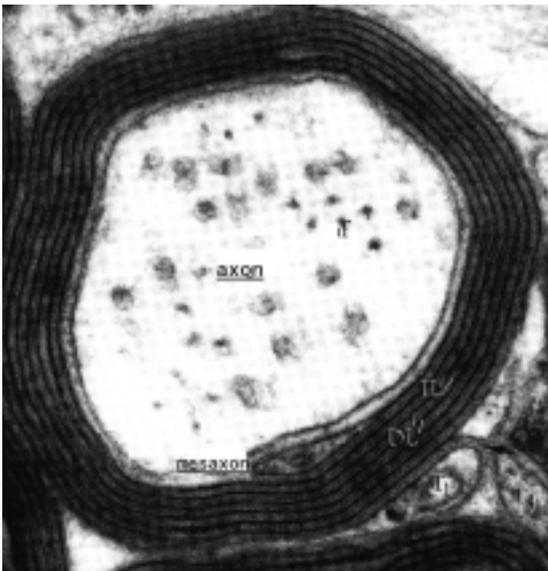
ヘマトキシリンを使用した八代法

Luxol Fast Blue-HE 染色



エポン包埋オスミウム酸染色

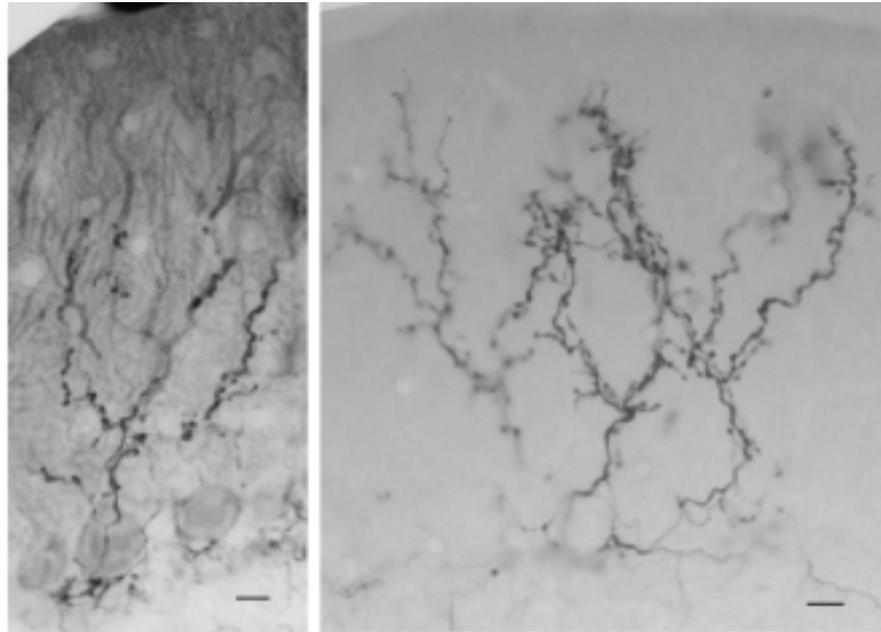
myelin basic protein に対する免疫組織化学



正常の髄鞘電顕像

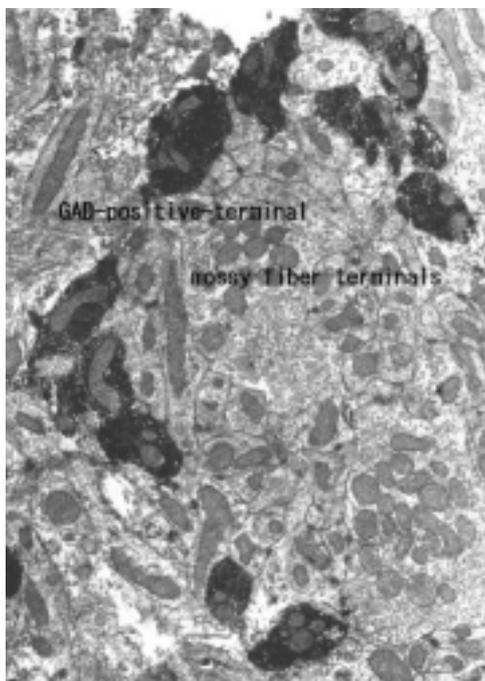
シバラの髄鞘には周期線がない

付図：マウスの下オリーブ核にバイオサイチンを電気泳動的に注入し、そこから順行性に
 登上線維内に運ばれたバイオサイチンを可視化した。



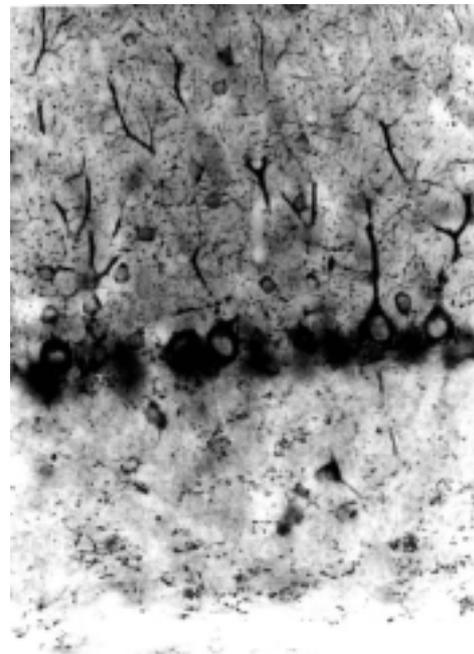
順行性にDBAで標識された
 小脳皮質の登上線維
 背景はCalbindinで染色された
 プルキンエ細胞
 (scale bar 10µm)

順行性にDBAで標識された
 小脳皮質の登上線維
 (scale bar 10µm)



GAD-positive terminal

mossy fiber terminals



付図：GABA ニュ - ロンが持つ (GAD グルタミン酸脱炭酸酵) を免疫組織化学染色
 右写真はマウス小脳のプルキンエ細胞、プルキンエ細胞樹状突起、分子層、顆粒細胞層の
 GABA 終末、ゴルジ細胞が陽性に染色されている。左写真は顆粒細胞層の GABA 陽性終
 末が苔状線維終末と顆粒細胞樹状突起を取り巻いている (小脳糸球体という)。