

## 血液脳関門について

### I. 中枢神経系における 6-aminonicotinamide 中毒下の蛍光色素 (Evans blue) の分布

佐々木 啓・Hartmut SCHNEIDER・Jorgo CERVÓS-NAVARRO

(ベルリン自由大学医学部神経病理学研究所)

鈴木 直 義

(帯広畜産大学家畜生理学教室)

1975年10月23日受理

## Studies on the Blood-Brain Barrier

### I. Distribution of the circulating fluorescent indicator (Evans blue) in the central nervous system after 6-aminonicotinamide (6-AN) poisoning

Satoshi SASAKI,\* Hartmut SCHNEIDER,\* Jorgo CERVÓS-NAVARRO\* and Naoyoshi SUZUKI\*\*

## 緒 言

血液脳関門の概念は EHRlich<sup>1)</sup>, GOLDMANN<sup>2)</sup> によって導かれ, トリパンプルー (TB) を使用した GOLDMANN の実験結果から, 硬膜 (dura mater), 下垂体 (hypophysis), 松果体 (pineal body), 脈絡叢 (plexus chcrioides), 最後野 (area postrema) などは生体染色されるが, その他の中枢神経系は上記の組織と異なる物質交換を示すことが明らかになった。

血液脳関門の所在については, 神経膠細胞 (glia cells), 特に中枢神経組織のほとんど総ての血管 (85%)<sup>3)</sup> を取り囲む星膠細胞 (astrocyte) の細胞膜の選択性に所在を置く考えがある。

13, 16, 22, 28, 37, 42, 46, 48, 49)

一方, 血液脳関門は内皮細胞 (endothelial cells) と基底膜 (basal membrane) との複合的機能<sup>1, 3, 7, 9, 11, 15, 18, 27, 32)</sup>, あるいはまた, 血管壁と神経膠細胞との全体的な機能を有し, 中枢神経組織の細胞間は神経細胞および神経膠細胞の突起で占められ細胞外隙は存在しないと言われている。

そこで, 今回著者らは蛍光色素 Evans blue (EB) を用いて, ニコチン酸アミドの代謝拮抗薬として知られる 6-aminonicotinamide (6-AN) の血液脳関門におよぼす影響, 特に関門とし

\* *Institute of Neuropathology, Klinikum Steglitz, Free University of Berlin, West Germany.*  
Dr. Sasaki's work was financed in part by a special grant of the West Berlin Senate and by Free University of Berlin.

\*\* *Department of Veterinary Physiology, Obihiro University, Obihiro, Hokkaido, Japan.*

ての血管壁，細胞外隙 (extracellular space) と神経膠細胞の意義について検討を加えた。

### 材料および方法

成熟雄 SPF, ウイスターラット 120 匹 (平均 270 g) を用いて, 6-AN の 0.1% (8 mg/kg, 10 mg/kg), 0.2% (20 mg/kg) および 0.5% 溶液 (50 mg/kg) を, それぞれのラット腹腔内に注入した。殺 2 時間前に尾静脈より 2% EB 溶液 1 ml, あるいはウシアルブミンとの混合液を注入した。

材料の固定は Bouin 液, あるいは 10% ホルマリン水溶液 (pH 6.7 および 7.4) を用いた。固定方法は灌流法および浸漬法で, 特に灌流固定液としては EB を 0.15% の割合で加えた溶液を使用した。ラット全血量を体重 100 g あて血液 5 ml として計算し, 2% EB 溶液注入後 0.15% に希釈されると推定した。

ラットに 6-AN の腹腔内注入後 4, 6, 12, 18, 22 および 24 時間後にネプタール深麻酔下で断頭後, 脳および脊髄を取り出し, あるいは開胸後心臓より 30~50 ml のリンゲル液で灌流し約 100 ml の固定液で灌流固定した。大脳および脊髄を取り出し Bouin 液, あるいは 10% ホルマリン水溶液で再固定後, 約 2 mm 間隔で額面断薄片を採取し, パラフィン包埋後 3~5  $\mu$  に薄切した組織切片を脱パラフィン後リン酸緩衝液 (pH 7.3) でよく洗滌し, 90% グリセリン・リン酸緩衝液にて封入して鏡検に供した。

Carl Zeiss 社製蛍光顕微鏡, exciting filter UG 1, heat filter 41 を使用した。室温 20°C 下で 20~30 秒で撮影した。また蛍光顕微鏡で検索した同一切片を Nissl あるいは Hematoxylin-Eosin 染色を施し, 同一視野を Agfapan 25 (ASA 25) にて撮影後, それぞれを比較検討した。

## 結 果

### 1 臨床所見

0.1% の 6-AN 溶液 8 mg/kg 注入例では, 注入 7~9 時間後に四肢の運動減退が認められた。10 mg/kg, 20 mg/kg および 50 mg/kg 注入例では運動減退の発現時期がそれぞれ投薬後 6, 4, 3 時間となり, 多量に与えた例ほど発現が早く現れた。8 mg/kg 注入例は全例生存したが, 10 mg/kg 例では 22 時間後まで不全麻痺が続いた。一方, 50 mg/kg 例は, 12 時間以内に全例強直性痙攣を起として斃死した。高濃度投薬例では出血性下痢と眼瞼および口唇の周囲に出血斑を認めた。

### 2 肉眼所見

#### a) 浸漬固定による所見

殺 2 時間前に 2% EB を 1 ml 静注したところ, 全身各臓器は青色に強く染色された。中枢神経系では EB により硬膜, 下垂体, 松果体, 脈絡叢, 最後野などが染色されたが, 大脳および

小脳表面は染色されなかった。

8 mg/kg 例：投薬後 6 時間以内では EB の組織内分布は対照例と比較して変化ないが、12 時間後には小脳、脳幹部の一定部位（小脳核、ダイテルス核、オリブ核）に EB による染色を認めた。18 時間以降では同部位に点状出血を認めた。

10 mg/kg 例：6-AN 投与による病的染色が最も強く、かつ広範囲におよぶのは投薬 12~18 時間後であった。その範囲は 8 mg/kg と略々同じで、主として小脳核、ダイテルス核、網様体、疑核、舌下神経核、オリブ核、薄束核、楔状束核、介在核 (Nc. intercalatus) 孤束、迷走神経背側核、蝸牛神経核、三叉神経脊髄路核、三叉神経根、外転神経核、橋核、赤核、視床、脚内核 (Nc. entopeduncularis)、被核などであった (Fig. 1)。特に、オリブ核における染色は著しく、外表面から容易に観察された。出血斑はオリブ核、ダイテルス核、小脳核、三叉神経核に認めた (Figs. 2, 3)。投薬後 22~24 時間では染色部位に著明な差は認めないが、染色度合は著しく低下した (Fig. 3)。

20 mg/kg 例：病的染色が最高に達するのは投薬 6 時間後で、その後は除々に低下した。染色部位は 10 mg/kg 例と差はないが、出血斑が 18 時間後に認められた。

#### b) 灌流固定による所見

病的染色部位は浸漬固定法と差はなく、Bouin 液による灌流後、淡緑色を呈し、EB を加えた Bouin 液を用いた場合は組織全体が淡黄緑色を呈した。EB を加えた 10% ホルマリン水溶液の灌流では、溶液の pH が 6.7 の場合、すべての組織が青染したが、pH 7.4 においては浸漬法の場合と差は認められなかった。

### 3 光学および蛍光顕微鏡所見

#### a) 浸漬固定による所見

10% ホルマリン水溶液固定後の切片では、赤色蛍光は弱いか、あるいは全く認めなかった。しかし、同一材料の Bouin 液による固定後の切片では強い赤色蛍光が観察された。

ノイロン (neuron)：10 mg/kg 例では、赤色蛍光は 6 時間後まで認めないが、12 時間後には細胞質、核、核仁、神経網 (neuropile) に強い赤色蛍光を観察した。これらの細胞は Nissl あるいは HE 染色後、濃染萎縮性を示した (Fig. 4)。Nissl 物質が比較的良好に保たれている神経細胞は自家蛍光のみで赤色蛍光を発しなかった。20 mg/kg 例では、6 時間後に 10 mg/kg 例と同様な結果を認めた。

星膠細胞 (astrocyte)、乏枝膠細胞 (oligodendroglia)：10 mg/kg 例では 12 時間後に、20 mg/kg 例では 6 時間後に、それぞれ細胞質に弱い赤色蛍光を認め、核には赤色蛍光を認めなかった。しかし、濃染色を示す細胞は特に強い赤色蛍光を発した。10 mg/kg 注入 18 時間後に、背髄灰白質の神経膠細胞に空胞変性を認めた。これらの変性した神経膠細胞は、ほとんど無蛍光であった。

血管小膠細胞 (microglia) : 血管壁, 血管周囲隙 (perivascular space) および血液成分などに, 強い赤色蛍光を認めたが, 小膠細胞では不鮮明であった。

#### b) 灌流固定による所見

蛍光色素の分布は浸漬固定法とは著しく異なり, 血管壁, 血管周囲隙および神経網に赤色蛍光を認めたが, 神経細胞は自家蛍光のみを発した。Nissl あるいは HE 染色後, 神経細胞は, その構造が明瞭で Nissl 物質も良好に保たれていた (Figs. 5, 6)。星膠細胞および乏枝膠細胞は 12 時間後に細胞質内に赤色蛍光を認めた (Fig. 5)。24 時間後では, 神経膠細胞は著しい空胞変性を示し核は濃染したが赤色蛍光はほとんど認められなかった (Fig. 6)。EB を加えない固定液のみの灌流では色素の流出が著しく, 血管壁と一部の神経網に赤色蛍光のみを認めた。10%ホルマリン水溶液 (pH 6.7) で灌流固定後の材料は, すべての細胞成分に赤色蛍光を認めた。

## 考 察

6-AN は Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADP) の類似物である 6-ANADP 合成により, ペントースサイクルを抑制する<sup>17)</sup>。6-AN 中毒の臨床症状として, その著しい特徴は四肢の不全麻痺で, 脊髄および脳幹部における変性, とくに神経膠細胞の著しい変性が明らかにされている。<sup>23, 25, 38, 39, 47)</sup>

著者らの結果では不全麻痺の出現と脊髄灰白質における循環障害とは時間的な相互関係を認めなかった。最初の機能障害は血液脳関門破壊の数時間前に出現し, 関門破壊は神経膠細胞の変性に先行した。このことは, 神経膠細胞の変性以前に EB の組織内浸入を認めることは関門破壊が神経膠細胞の壊死のみによるのではなく徐々に進行していくことを明らかにしているものと考えられる。

6-AN は星膠細胞および乏枝膠細胞に選択的に障害をおよぼし, 変性は両者に対してほぼ同時期 (10 mg/kg : 18 時間後) におこる。CERVOS-NAVARRO<sup>39)</sup> らの電顕観察では, 内皮性細胞に重度の変性を認めず腫脹するのみで, “tight junction” は完全に保たれ, 基底膜にも異常を認めていない。出血は基底膜より内側に限られるものが多く, 6-AN は血管壁に対して特に重大な変化をもたらさないと報告している。

EB は STEINWALL<sup>40)</sup> により tracer として用いられて以来, 一般にアルブミンと結合させて, 多くの実験に応用されている。著者ら<sup>19, 21, 24, 26, 29, 30, 32, 35)</sup> の結果では色素単独あるいはアルブミンとの結合, いずれの場合でも色素の組織内浸入に差を認めなかった。同様の所見は STEINWALL<sup>40)</sup>, RINDER<sup>35)</sup> によっても報告されている。アルブミンと結合させる理由としては, 分子量を大きくして色素の生理的膜透過を抑制し, かつまた, アルブミンとの結合により強い蛍光が得られることなどが考えられている。

CLASEN<sup>61</sup>らは水腫の実験研究において、EBは初期段階で水腫液中にアルブミンとの結合状態で存在するが、後にEBの大部分は水腫液中に留らず体外に排泄されると報じている。著者らは空胞変性を示す神経膠細胞にほとんど赤色蛍光を認めなかった。そしてまた、神経膠細胞の変性は空胞変性のみで水腫液は認めていない。<sup>39)</sup> EBとアルブミンとの化学的結合様式は明らかではないが、EBの静脈内注入後、比較的早急かつ選択的にアルブミンと結合することが認められている。

蛍光顕微鏡を使用した際には蛍光色素の組織内保有と人工的な変化について、とくに考慮すべきである。すなわち、生体染色実験の際に Bouin 液を使用することが知られているが、生体染色用色素はホルマリン水溶液中に流出し、<sup>12,29,33)</sup> さらにホルマリン固定後の組織中の色素も低濃度アルコール中に流出し、観察に至るまでの過程において、そのほとんどが消失することである。人工的变化としては、著者らの結果から神経細胞について特に留意する必要がある。浸漬固定下の神経細胞、なかでも存髄前角における運動神経細胞は、しばしば濃染萎縮性を示し、これらの細胞は特に強い赤色蛍光を発した。一方、灌流固定下での神経細胞は自蛍光のみで Nissl 物質も良好に保たれている。浸漬固定下の変化は、いわゆる“dark cells”と呼ばれるもので、これらは死後組織の取扱中における人工産物で核物質や原形質が脱水濃縮されるために起こるものであると、CAMMERMEYER<sup>4~5)</sup>は報告している。そして RINDER<sup>35)</sup>は正常状態下でもホルマリン浸漬固定でEBの神経膠細胞およびノイロンへの浸入を認めて、これらは材料採取の際の人工的变化であると報じている。著者らが観察した同様な所見は、血管内に充満するEBが材料採取の際に加えられる圧力により神経細胞に侵入したと考えられる。

一方、脳水腫あるいは脱水時に変化するのは、細胞外隙ではなく神経膠細胞の容積であることは既に知られている。VAN HARREVELD<sup>41)</sup>は急速凍結固定法を用いた電顕所見で150~200Å<sup>o</sup>の細胞外隙を認めている。電顕観察に応用されている一般的方法では灌流固定の際に血管周囲の星膠細胞の突起は腫脹し、より狭い細胞外隙か、あるいは場合によっては全くその存在を認めることが出来ない。同様に斃死後数時間を経た材料では星膠細胞の突起はすべて腫大し、細胞外隙は全く認めることが出来ない。

EBが変性した血管壁を通過後、神経網に達する過程に対して、VISS<sup>ら</sup><sup>42)</sup>EBが星膠細胞を通り神経細胞核にまで浸入することを報告している。著者らの結果では、空胞変性の強い神経膠細胞はEBを伝達する機能を持たず、EBは血管壁透過後に細胞外隙を通り神経網に達するものと考えられる。したがって、生活細胞が酸性生体染色色素の浸入を防止する機作については明らかではないが、少なくとも、内皮性細胞と基底膜の複合的機能を有する血液脳関門の所在を肯定しうると考えられる。

## 結 語

成熟雄ラットの大脳および脊髄を用いて、6-AN が血液脳関門に及ぼす影響を蛍光顕微鏡学的（蛍光色素エバンス・ブルー）に検討した。

その結果、6-AN 注入量の差により障害程度は異なるが、少なくとも、血液脳関門破壊は神経膠細胞の変性に先行した。6-AN は星膠細胞と乏枝膠細胞に選択的に障害を及ぼし、変性は両者に対してほぼ同時期に起こり、空胞変性を示す神経膠細胞にはほとんど赤色蛍光を認めなかった。これら空胞変性の神経膠細胞は蛍光色素、エバンス・ブルー、を伝達する機能を有しないと考えた。

## 文 献

- 1) BROMAN, T., RADNER, S., and SVANEERG, L. (1949): Acta Psychiat. et Neurol. scand., 24, 167
- 2) BROMAN, T. (1950): Acta Psychiat. et Neurol. scand., 25, 19-31.
- 3) BROMAN, T., RADNER, S., and SVANEERG, L. (1950): Acta Psychiat. et Neurol. scand., 25, 121-135.
- 4) CAMMERMEYER, J. (1960): Exp. Neurol., 2, 379-405.
- 5) CAMMERMEYER, J. (1961): Acta Neuropath., 1, 245-270.
- 6) CAMMERMEYER, J. (1962): Ergebn. Anat. Entwickl. Gesch., 36, 1-61.
- 7) CERVÓS-NAVARRO, J. (1963): Arch. Psychiat. Nervenkr., 204, 484-504.
- 8) CLASEN, R. A., PANDOIFI, S., and HASS, G.M. (1970): J. Neuropath. exp. Neurol., 29, 266-284.
- 9) DEMPSEY, E. W., and WISIOCKI, G.B. (1955): J. Biophysic. and Biochem. Cytol., 1, 245
- 10) EHRICH, P. (1885): Berlin: Hirschwald.
- 11) FERSZT, R., CERVÓS-NAVARRO, J., and SASAKI, S. (1974): *in* Pathology of Cerebral Microcirculation, editor, J. CERVÓS-NAVARRO, editor, Walter de Gruyter, Berlin-New York, 59-66.
- 12) FLEISCHHAUER, K. (1964): Z. Zellforsch., 62, 639-654.
- 13) GÄRTNER, W. (1927): Z. f. Biol., 86, 115.
- 14) GOLDMANN, E. E. (1913): Abh. preuß. Akad. Wiss. Physik.-math. Kl., 1, 1-60.
- 15) HAGER, H. (1961): Acta Neuropath., 1, 9-33.
- 16) HAUPTMANN, A., and GÄRTNER, W. (1932): Z. f. d. ges. Neurol. u. Psychiat., 140, 572.
- 17) HERKEN, H., LANGE, K., and KOLBE, H. (1969): Biochem. biophys. Res. Commun., 36, 93-100.
- 18) HIRANO, A., DEMBTZER, H. M., BECKER, N. H., and LEVINE, S. (1970): J. Neuropath. exp. Neurol., 29, 432-440.
- 19) HOSSMAN, K. A., and OLSSON, Y. (1971): Acta Neuropath., 18, 103-112.
- 20) HOSSMAN, K. A., and OLSSON, Y. (1971): Acta Neuropath., 18, 113-122.
- 21) JOHANSSON, B., LI, C. L., OLSSON, Y., and KLATZO, I. (1970): Acta Neuropath., 16, 117-124.
- 22) KAFKA, V. (1934): Arch. f. Psychiat., 101, 231
- 23) KIM, S. U., and WENGER, B. S. (1973): Acta Neuropath. 26, 259-264.
- 24) KLATZO, I., and STEINWALL, O. (1965): Acta Neuropath., 5, 161-175.
- 25) KÖNIG, E. M. (1973): Acta Neuropath., 26, 115-126.
- 26) KRISTENSSON, K., and OLSSON, Y. (1971): Acta Neuropath., 17, 127-138.
- 27) NIESSING, K., and VOGELL, W. (1957): Z. Naturforsch., 126, 641.

- 28) NIVEN, J. (1961) : *In* Poliomyelitis, Proc. Fifth Internat. Polimyelitis Conf. 1960 Philadelphia and Montreal, J. B. Lippincott.
- 29) OLSSON, Y., and HOSSMANN, K. A. (1970) : *Acta Neuropath.*, **16**, 103-116.
- 30) OLSSON, Y., CROWELL, R. M., and KLATZO, I. (1971) : *Acta Neuropath.*, **18**, 89-102.
- 31) OLSSON, Y., and KRISTENSSON, K. (1973) : *Acta Neuropath.*, **23**, 105-111.
- 32) OLSSON, J., KLATZO, I., and CARSTEN, A. (1975) : *Neuropathology and Applied Neurobiology*, **1**, 59-68.
- 33) PFUHL, W. (1930) : *Z. Zellforsch.*, **13**, 783-803.
- 34) RICHTER, OXON, and MUNICH. (1950) : *Recent Progress in Psychiatry*, Chapt. 6, Adlard & Son.
- 35) RINDER, L. and OLSSON, Y. (1968) : *Acta Neuropath.*, **11**, 183-200.
- 36) ROBERTIS, E. D. P. DE, GERSCHENFELD, H. M., and WALD, F. (1960) : *4. Internat. Kongr. f. Elektronenmikroskopie*, Bd. 2, 443.
- 37) ROBERTIS E. D. P. DE and GRSCHENFELD, H. M. (1961) : *Intern. Review of Neurobiol.*, **3**, 1
- 38) SCHNEIDER, H. (1971) : *Habilitationsschrift*, Freie Univ. Berlin.
- 39) SCHNEIDER, H., and CERVOS-NAVARRO, J. (1974) : *Acta Neuropath.*, **27**, 11-23.
- 40) STEINWALL, O., and KLATZO, I. (1966) : *J. Neuropat. exp. Neurol.*, **25**, 542-559.
- 41) SWENSON, M. J. (1970) : *Dukes' Physiology of Domestic Animals*, Cernstock Publishing Associates, A division of Cornell University Press, Ithaca and London.
- 42) TSCHIRGI, R. D. (1952) : *Blood-brain barrier. The biology of mental health and disease*, New York, Paul B. Hoeber, Inc.
- 43) VAN BREEMAN, V. L., and CLEMENTE, C. D. (1955) : *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, **1**, 161-165.
- 44) VAN HARREVELD, A., CROWELL, J., and MALTHOTRA, S. K. (1965) : *J. Cell Biol.*, **25**, 117-137.
- 45) VIESE, W. M., LISS L., and YASHON, D. (1975) : *J. Neuropath. exp. Neurol.*, **34**, 324-334.
- 46) WALTER, F.K. (1934) : *Arch. f. Psychiat.*, **101**, 135
- 47) WOLFF, I. R. (1969) : *Habilitationsschrift*, Freie Univ. Berlin.
- 48) WOLFF, J. (1965) : *Z. Zellforsch.*, **66**, 811-828.
- 49) WOLFF, J. (1968) : *Acta Neuropath. Suppl.* **IV**, 33-39.

### Summary

A study was made on the toxic effect of 6-AN on the vascular permeability in the rat brain and spinal cord. 120 rats were examined by light and fluorescence microscopies, 4-24 hours following intraperitoneal application of 6-AN (8, 10, 20, 50mg/kg).

Evans blue (1 ml, 2 %) was given intravenously as the tracer 2 hours before the sacrifice.

Brain stem and grey matter of the spinal cord revealed injury to the blood-brain barrier (BBB) according to the microscopic lesions.

Higher doses increased the intensity and shortened the latency of penetration of Evans blue into the involved structures, showing a characteristic peak for each dosage, and fading away 22-24 hours after application of 6-AN. Microcirculatory disturbances probably inhibited further penetration of Evans blue into the affected structures. The structures of the spinal cord and brains tem showing the red fluorescence of Evans blue varied depending

on the fixation method. After perfusion fixation (Bouin solution or formaldehyde : pH 7, 4), the blood vessel wall, the neuropil and nuclei of necrotic glial cells showed fluorescence. The cytoplasm of injured glial cells and neurons failed to demonstrate fluorescence. After immersion fixation (Bouin solution), Evans blue-tracing was seen mainly in shrunk and pycnotic nuclei. The comparison of Evans blue-fluorescence after perfusion and immersion fixation gives evidence that the staining pattern in tissue fixed by immersion reflects a supravital respective postmortal artefact.

The experiments suggest that Evans blue enters the brain tissue via the extracellular space, then staining mainly damaged structures of the neuropil, the glial cells and neuronal pericarya.



## Explanation of Plate

### Plate I

- Fig. 1 : 12 hours after i.p. administration of 10 mg/kg 6 aminonicotinamide. Perfusion fixation (Bouin). Intense penetration of Evans blue into the involved structures.
- Fig. 2 : 18 hours after 10 mg/kg 6-AN. Immersion fixation (Formalin). Pathological penetration of EB in *Nucleus (Nc.) entopeduncularis, Fasciculus retroflexus, Nc. nervi (n.) oculomotorii, Colliculus posterior, Lemniscus lateralis and medialis, Nc. raphes, Tractus (Tr.) corticospinalis, Nuclei cerebelli, Corpus trapezoideum, Nuclei vestibulares, Nuclei cochleares, Nervi VII., Nc. tr. spinalis n. trigemini, Oliva, Substantia grisea* of the spinal cord.
- Fig. 3 : 22 hours after 10 mg/kg 6-AN. Immersion fixation (Formalin). Severe hemorrhages in *Nuclei cerebelli*. Left controll.

### Plate II

- Fig. 4 : Lamina VII/VIII of the spinal grey matter.  
12 hours after i.p. administration of 10 mg/kg 6-AN. Immersion fixation (Bouin).  
a) Fluorescence micrograph of the unstained section ;  
b) Same section, Nissl. Fluorescence of the intravascular content, hyperchromatic neurons and some pycnotic neuroglial nuclei. (Magn. x160).
- Fig. 5 : 12 hours after 10 mg/kg 6-AN. Perfusion fixation (Bouin) with admixture of 0.15% EB. Fluorescence of the vessel wall, perivascular neuropile and cytoplasm of neuroglial cells with slight hydropic swelling. (Magn. x 160).
- Fig. 6 : 24 hours after 10 mg/kg 6-AN. Perfusion fixation (Bouin) with admixture of 0.15% EB.  
a) Fluorescence micrograph.  
b) Same section, HE. Spongy state with hydrophilic swelling of glial perikarya and piknotic nucleus. (Magn. x160).

Plate I

SASAKI, S. *et al.*

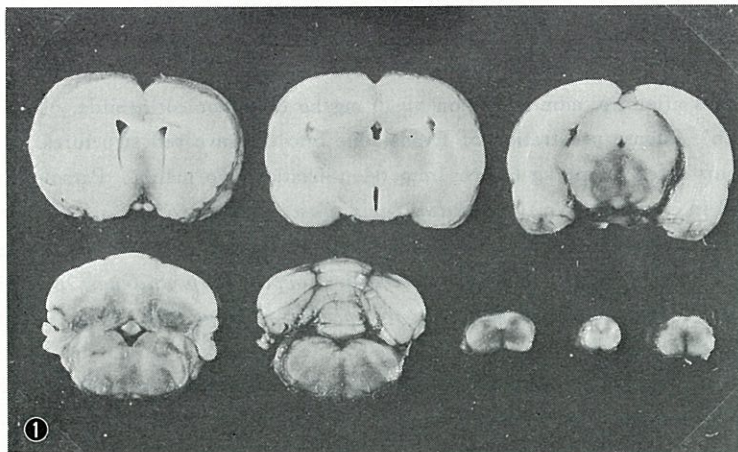


Fig. 1

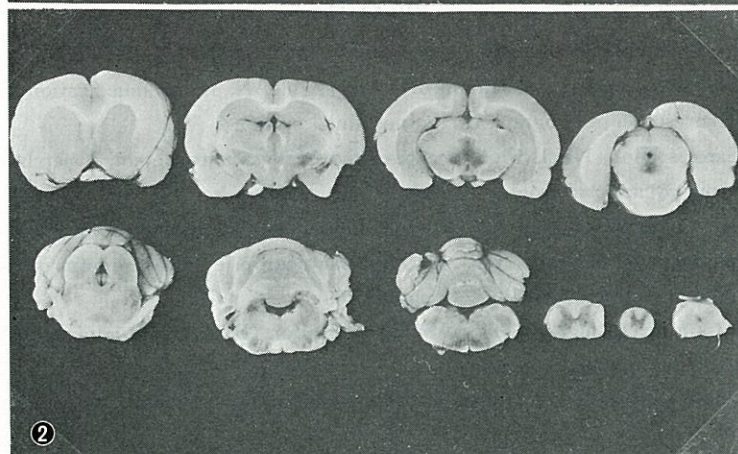


Fig. 2

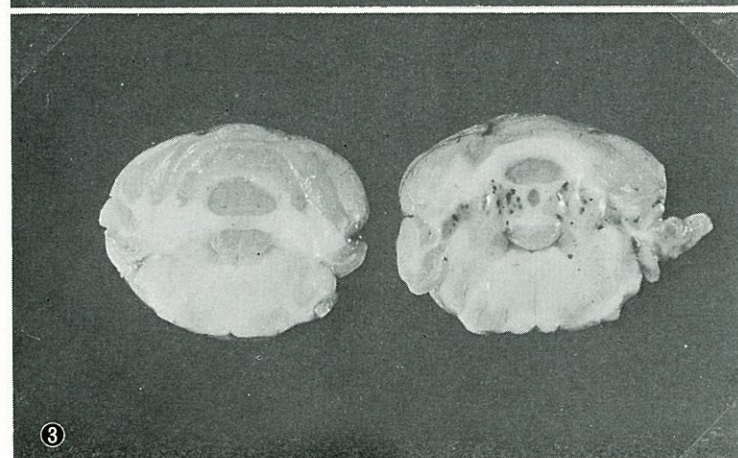


Fig. 3

SASAKI, S. *et al.*

Plate II

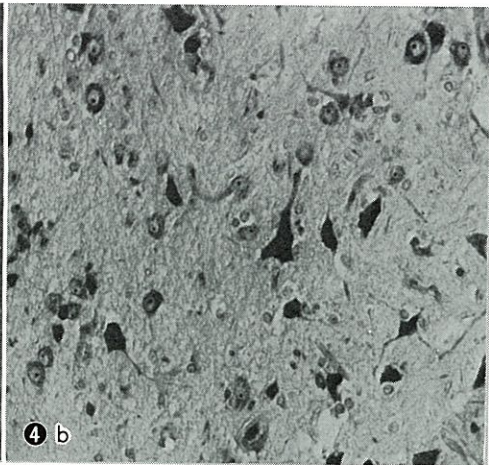
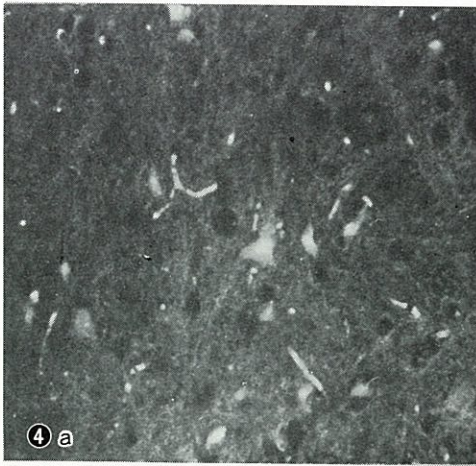


Fig. 4

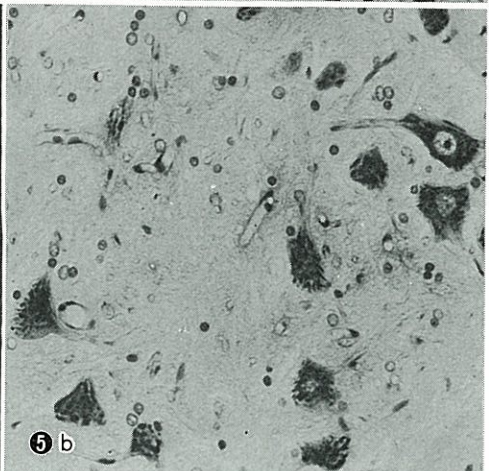
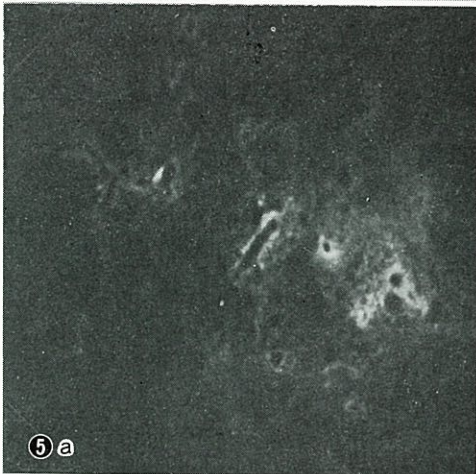


Fig. 5

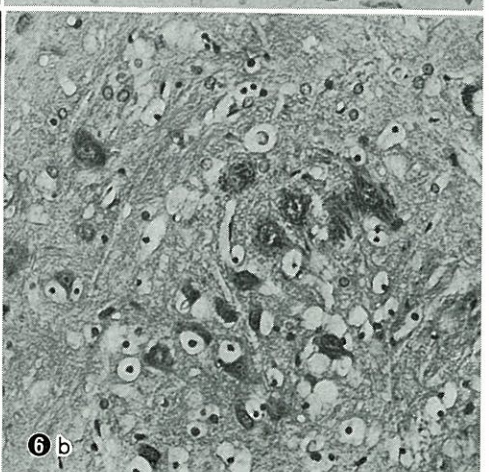
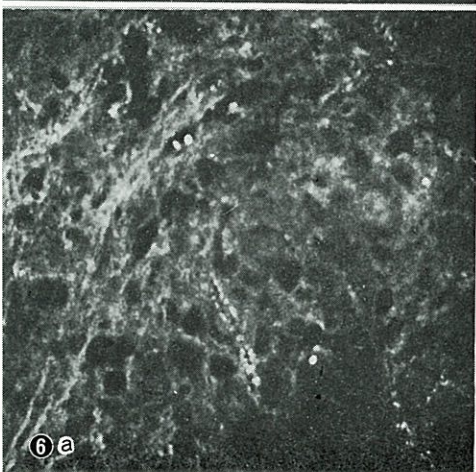


Fig. 6