

コロイド金免疫電子顕微鏡法の条件についての検討 ： マウス嗅球における樹脂包埋後免疫細胞化学法によるGABA免疫染色

野田, さやか
九州大学医学部保健学科放射線技術科学専攻

小坂, 克子
九州大学医学部保健学科放射線技術科学専攻

<https://doi.org/10.15017/3261>

出版情報：九州大学医学部保健学科紀要. 6, pp.17-26, 2005-10-05. 九州大学医学部保健学科
バージョン：
権利関係：



原 著

コロイド金免疫電子顕微鏡法の条件についての検討： マウス嗅球における樹脂包埋後免疫細胞化学法 によるGABA免疫染色

野田さやか¹⁾, 小坂克子¹⁾

Investigation on the Staining Condition of Post-embedding Immunogold Labeling at the Electron Microscopic Level; GABA Immunocytochemistry in the Mouse Olfactory Bulb.

Sayaka Noda, Katsuko Kosaka

Abstract

In order to obtain ultrastructural information about the localization of a particular structure or molecule, it is very important to apply immunocytochemistry at the electron microscopic (EM) level. We examined the staining condition of post-embedding immunogold labeling at the EM level, especially using anti-GABA immunocytochemistry on the mouse olfactory bulb. Post-embedding immunogold labeling consists of three steps; 1) etching of the EM sections by sodium metaperiodate, 2) incubation in primary antibody and 3) incubation in gold-labeled secondary antibody. Thus in the present study we focused our investigation on three factors; 1) the duration of etching, 2) the concentration (or dilution) of primary antibody and 3) the concentration of secondary antibody. We assessed the specificity of the immunostaining by counting the number of gold particles per area of the profiles of GABAergic granule cells and non-GABAergic mitral and/or tufted (MT) cells as a background labeling.

Firstly, one-way ANOVA indicates that the duration of etching of the EM sections by sodium metaperiodate causes difference in labeling under the same incubation conditions. Secondly, after the optimal etching, we investigated the effects of dilution condition of the primary and the secondary antibodies on the specific and nonspecific labeling. Two-way ANOVA indicates that the dilutions of both primary and secondary antibodies cause the difference in the labeling densities. Then Ryan's method was used to assess the differences in the number of particles on the granule cells and background MT cells.

By examining three factors we established the optimal conditions for post-embedding GABA immunocytochemistry which constantly gives a high specific labeling with a low background labeling.

Key Words: electron microscopy (EM), post-embedding immunogold labeling,
anti-GABA immunocytochemistry, olfactory bulb

1) 九州大学医学部保健学科放射線技術科学専攻

和文抄録

細胞の超微形態における構造や分子の局在，化学的性質を知るために免疫電子顕微鏡法は有用な方法である。主な免疫電子顕微鏡法の1つであるコロイド金粒子を標識物質とする樹脂包埋後法は，1) 電子顕微鏡切片のエッチング，2) 一次抗体反応，3) コロイド金粒子標識二次抗体反応から構成されている。本実験では重要なステップでありながら現在まで条件が未検討であった，1) エッチング時間，2) 一次抗体と二次抗体の濃度について検討した。対象組織として，マウスの嗅球を用い，抗体としてはアミノ酪酸（GABA）抗体を用いた。

染色性の効果を判定するために，まずGABA陽性の介在ニューロンである顆粒細胞とコントロールとしてGABA陰性の投射ニューロンである僧帽・房飾細胞を選び，それらの細胞上のコロイド金粒子数の密度を計測した。さらに一元配置法および二元配置法を用いて解析した。その結果，エッチング時間は金コロイド標識の数に影響を与えること，また最適なエッチング時間下で，一次抗体，二次抗体の濃度が免疫反応に影響を与えることが判明した。これらの検討の結果より，GABA抗体反応時の最適条件を確立することができた。

キーワード：電子顕微鏡，コロイド金標識免疫樹脂包埋後法，GABA免疫細胞化学法，嗅球

はじめに

細胞の化学的性質，超微形態での分子の局在の観察のために免疫電子顕微鏡法が用いられる。免疫電子顕微鏡法¹⁾は，電子顕微鏡レベルで抗原の局在を観察する免疫組織化学法であり，その要件として優れた超微形態が保存され，用いる抗体が細胞，組織内のあるべき場所に正確に固着されていることがあげられる。方法としては樹脂包埋前法と，樹脂包埋後法があり，樹脂包埋後法は全般的に包埋している樹脂をエッチングし，脱オスミウム処理することで抗原を露出し，抗原抗体反応するので，適用できる抗体が限られていること等の欠点があげられる。しかし，樹脂包埋後法は，樹脂包埋前法に比べて，超微細構造の保存に極めて優れており，細胞内抗原の検出や，二重染色も比較的容易であるという特徴がある。さらに，神経系における細胞体樹状突起，シナプス各部位別での詳細な観察が可能であり，そのような目的でよく用いられる方法である。今回は樹脂包埋後法の標識物質として最も一般的に使用されているコロイド金粒子を使う方法²⁾での免疫染色の条件について検討した。このコロイド金粒子を使う方法は定量的検討が可能であるという長所を持つが，樹脂包埋後法一般の問題点としてのエッチング時

間や一次抗体，二次抗体の濃度などの影響があり，それについて詳しくは検討されていない現状である。

この研究では，対象として，中枢神経系の嗅覚一次中枢である嗅球を用いた。嗅球は，外側から嗅神経層，糸球体層，外網状層，僧帽細胞層，顆粒細胞層からなる明確な層構造を示しており，近年共焦点レーザー顕微鏡，電子顕微鏡による詳細な解析も行われている^{3) 4)}。今回の実験では糸球体層と僧帽細胞層の間の外網状層を観察した。外網状層では興奮性である僧帽／房飾細胞の突起に抑制性である顆粒細胞のgemmuleがシナプス結合しており，両者は形態学的に明確に同定でき，僧帽／房飾細胞の神経伝達物質がグルタミン酸で，顆粒細胞の神経伝達物質が γ -アミノ酪酸GABAであることも確立しており，GABA抗体による免疫電顕で観察するのに適している。そこで，樹脂包埋後免疫細胞化学法において，金コロイド標識法を用いて，その1) エッチングの時間による影響，2) 一次抗体と二次抗体の濃度の関係，について比較検討した。

対象と方法

灌流固定

12週齢のマウス (C57BL/6) を2%パラホルムアルデヒド, 2.5%グルタルアルデヒド, 0.1Mリン酸緩衝液 (Milling's phosphate buffer PB), PH7.2~7.4の固定液 (H固定液) で心臓経由にて全身を灌流固定した。その後, 一時間から一晩浸透させた。

脳を取り出した後, 同様の固定液をいれたバイアルに入れ, 4℃で保存する。

後固定, 脱水, エポキシ樹脂包埋

1%四酸化オスミウムPB溶液に0.5mm程度の大きさのブロックをいれ, 0℃で30分程度後固定させる。反応後, 超純水で数回リンスし, 1.5%酢酸ウランUranyl acetate水溶液をいれ, 再び0℃で20~30分おく。

その後, アルコール系列で脱水する。まず, 50%アルコール, 70%アルコール, 90%アルコールの順にそれぞれ5分程度0℃で脱水する。その後室温にて, 100%アルコールで5~10分, 3回脱水し, プロピレンオキサイドで置き換える。Epon-Araldite混合樹脂に包埋するため, Epon-Araldite混合樹脂: プロピレンオキサイドを50:50にしたものに置き換えて2~3時間浸透させる。その後, Epon-Araldite混合樹脂に包埋し, 60℃のオーブンで数日間, 樹脂を重合させた。

超薄切片作製

ダイヤモンドナイフを用い, REICHERT-NISSEI URTRACUT S (Leica社製) を使用し70~80nmの厚さの超薄切片を作成した。包埋した切片は不必要な部分をカットし, 同じくエポキシ樹脂で作成したシリンダーにくっつけて使用した。

免疫樹脂包埋後超薄切片染色法⁵⁾

一次抗体, 二次抗体の濃度による影響を調べる目的で, エッチングの条件を検討し, 一次抗体, 二次抗体の濃度を変化させたが, 全体的な方法を簡単に記載すると以下ようになる。

Collodionで膜はりしたニッケル製メッシュグ

リッドに超薄切片を拾い, 免疫細胞化学を蓋つきのプラスチック製容器で作成したウエットチェンバー内にパラフィルム上で行った。すべての反応はパラフィルム上で20 μ lの溶液滴に切片の面に液に面するように載せて行った。一般的に使用されている濃度⁵⁾の1%メタ過ヨウ素酸ナトリウムで表面をエッチングした。超純水で数回洗浄し, 1%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin ;BSA) 燐酸緩衝生理食塩溶液 (PBS) で20~30分反応させ, 非特異的の反応をブロックした。その後, 一次抗体として抗GABA抗体rabbit polyclonal antibody GABA (Incstar) を1%BSA-PBSで希釈して一晩反応させた。PBSで3回洗浄した後, 二次抗体として1%BSA-PBSで希釈した金コロイド (サイズ10nm) 標識抗ウサギIgGで1~2時間浸透させた後, 超純水で数回洗浄し, 濾紙上で乾燥させた。

実験1. エッチングの検討

エッチングの時間による影響をみるため, エッチング時間は文献^{1) 2)}にみられる実際的な時間の範囲である3点, 0分 (エッチングなし), 20分⁵⁾, 60分, を選び, さらに長時間の影響を見るため240分も行った。これまで経験的に行っている条件である抗体濃度, 一次抗体は1000倍, 二次抗体は20倍で用いた。

実験2. 一次抗体と二次抗体の濃度の関係の検討

一次抗体の希釈濃度を1:500, 1000, 2000, 4000とし, そのそれぞれにおいて二次抗体の希釈濃度を1:10, 20, 40として計12の組み合わせについて検討した。またエッチング時間は実験1により決定した60分を行った。

電子染色

1%酢酸ウランUranyl acetate水溶液で5~10分染色し, 超純水のジェットでよく水洗した。その後, 同様に2.5%クエン酸鉛で5分染色し, 同様に水洗した。その後, 濾紙にとり, 乾かした。

電子顕微鏡観察, 及び撮影 (Hitachi-7100)

外網状層external plexiform layer EPLを, 10,000倍で撮影した。

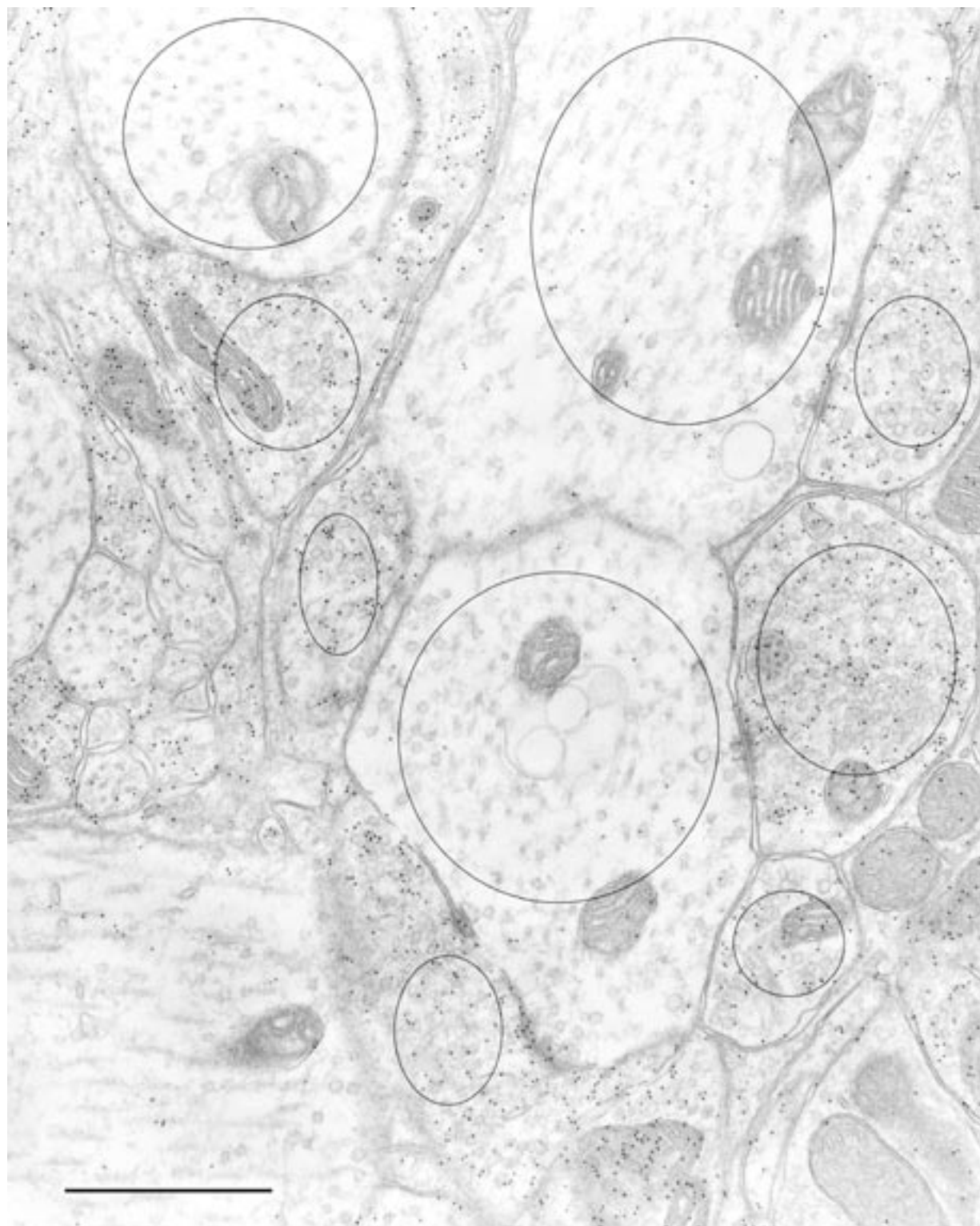


図1 金コロイド粒子数の計測方法を示す電子顕微鏡像。

僧帽/房飾細胞と顆粒細胞の突起内に入る楕円中の金コロイド粒子数を数え、楕円の面積はobject-imageで計測した。バックグラウンドとしたGABA陰性の僧帽/房飾細胞は、細胞質が大きくて明るく、微小管の見られるもの。GABA陽性の顆粒細胞は僧帽/房飾細胞との間にシナプス小胞をつくっているもの。スケールは $1\mu\text{m}$ 。

解析

撮影したネガ (75×90mm) をスキャナー (EPSON GT9600) で取り込み, 解析ソフトobject-imageを用いて解析した。実験1は撮影した早い番号のものから順に解析していき, 数えた細胞数が50に達したところで終了した。実験2はブラインドで解析するため第三者を介して乱数表を使用してランダムサンプリングし, 解析した。金コロイド粒子数の計測法は以下のごとくである。GABA陽性細胞の要素である顆粒細胞の特徴的な突起gemmule, 及びGABA陰性の要素である僧帽/房飾細胞樹状突起上の粒子数を計測した。モニター上で各突起上にそれに完全に含まれる適当な楕円を作り (図1), その楕円中にある粒子を数え, その面積を測定し, 各突起における金コロイド標識密度 (粒子数/μm²) を算出した。

結果

電顕像ではEPLにおいて容易に僧帽/房飾細胞樹状突起と顆粒細胞のgemmuleは同定でき, エッチングの時間や一次抗体, 二次抗体の濃度等の条件により多少, 数やばらつきかたに差はあるものの両者間の金コロイド標識の差異は容易に判別で

表1 エッチング時間についての多重比較

	平均 (分散)	t 値			
		0分	20分	60分	240分
0分	62.17 (1039.5)		4.386**	6.581**	3.961**
20分	126.38 (5820.2)			1.99*	0.484
60分	153.7 (1677.8)				2.525*
240分	119.5 (831.2)				

g

	平均 (分散)	t 値			
		0分	20分	60分	240分
0分	1.6 (2.56)		1.181	5.028**	5.336**
20分	2.9 (5.39)			3.789**	4.052**
60分	7 (32.89)				0.0002
240分	7.2 (12.17)				

**p<0.001, *p<0.05, #p<0.1
M/T : 僧帽/房飾細胞, g : 顆粒細胞

きた (図1)。

実験1

実験1の結果は図2と表1にまとめている。図2ではX軸にエッチング時間, Y軸に金コロイド粒子数/μm²をとりその平均を顆粒細胞の突起, 僧帽/房飾細胞の突起と各々別にプロットした。僧帽/房飾細胞の突起はGABA陰性であることが確立しているのでこれらの突起上の金コロイド粒子をバックグラウンドとしたが, GABA陽性であることが確立している顆粒細胞gemmule上の金コロイド粒子は定性的にも明らかに免疫反応陽性

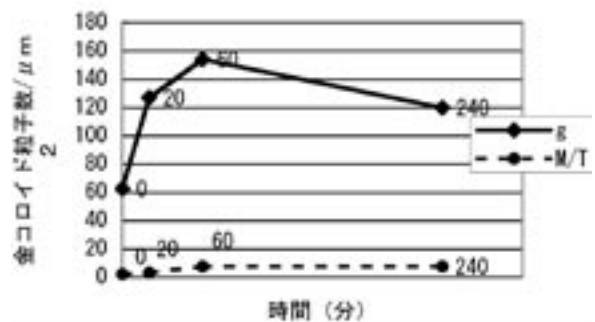


図2 エッチング時間の影響

X軸にエッチング時間の変化, Y軸に金コロイド粒子数/μm²をとった。

表2 一次抗体と二次抗体のそれぞれの濃度の時の平均と分散

	primary 2nd	g			
		500	1000	2000	4000
10	190.48 (51.24)	132.23 (50.47)	109.93 (40.40)	72.22 (32.00)	
20	134.85 (41.49)	128.87 (43.67)	120.8 (54.97)	73.28 (25.38)	
40	85.76 (37.07)	74.68 (33.72)	72.48 (33.60)	61.65 (27.07)	

M/T

	primary 2nd	M/T			
		500	1000	2000	4000
10	13.75 (6.29)	5.16 (2.09)	7.77 (3.57)	5.9 (7.98)	
20	5.47 (3.11)	7.74 (3.94)	7.18 (3.96)	2.93 (3.03)	
40	3.64 (1.48)	2.52 (1.67)	3.19 (3.19)	1.43 (1.74)	

**p<0.001, *p<0.05, #p<0.1
M/T : 僧帽/房飾細胞, g : 顆粒細胞

であった。エッチング時間0分すなわちエッチングをしない時にも金コロイド粒子は顆粒細胞gemmule上においており、計測することができた。GABA陰性である僧帽/房飾細胞の突起には平均 1.61 ± 1.60 個/ μm^2 （平均 \pm 標準偏差）の金コロイドがのっていた。またGABA陽性である顆粒細胞の突起には平均 62.2 ± 32.2 個/ μm^2 の金コロイドがのっていた。エッチングを20分した時、僧帽/房飾細胞の突起には平均 2.86 ± 2.32 個/ μm^2 、顆粒細胞の突起には平均 126.4 ± 76.3 個/ μm^2 の金コロイドがのっていた。エッチングを60分した時、僧帽/房飾細胞の突起には平均 6.98 ± 5.74 個/ μm^2 、顆粒細胞の突起には平均 153.7 ± 41.0 個/ μm^2 の金コロイドがのっていた。エッチングを240分した時、僧帽/房飾細胞の突起には平均 7.23 ± 3.49 個/ μm^2 、顆粒細胞の突起には平均 119.5 ± 28.8 個/ μm^2 の金コロイドがのっていた。

この結果についてエッチング時間によって金コロイドの粒子数に変化があるかどうかを調べる一元配置分散分析法にて比較、検討した。僧帽/房飾細胞の突起上の標識は $F=14.398$ ($df=85$, $p<0.0001$)、顆粒細胞の突起上の標識については $F=14.694$ ($df=89$, $p<0.0001$) であり、ともに有意差があった。この結果よりRyan法による多重比較検定を行った（表1）。その結果より、バックグラウンドの標識を示す僧帽/房飾細胞の突起上の標識については0分と20分が60分と240分に対しそれぞれ有意であった。0分と20分の間、60分と240分の間では有意差は見られなかった。一方、GABA免疫標識を示す顆粒細胞の突起上の標識では20分と240分との間で有意差が無かった以外はすべて有意差があった。

バックグラウンドの標識は60分と240分のエッチングでは0分と20分の場合より明らかに上昇し

表3 二元配置分散分析表

分散分析表（顆粒細胞）						a=0.05
変動要因	変動	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F 境界値
2nd	7146	3	2382	5.005	0.0451	4.757
primary	6090	2	3045	6.399	0.0325	5.143
誤差	2855	6	475.9			
合計	16090	11				

分散分析表（僧帽/房飾細胞）						a=0.05
変動要因	変動	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F 境界値
2nd	27.73	3	9.244	1.605	0.2842	4.757
primary	59.85	2	29.92	5.196	0.0490	5.143
誤差	34.55	6	5.759			
合計	122.1	11				

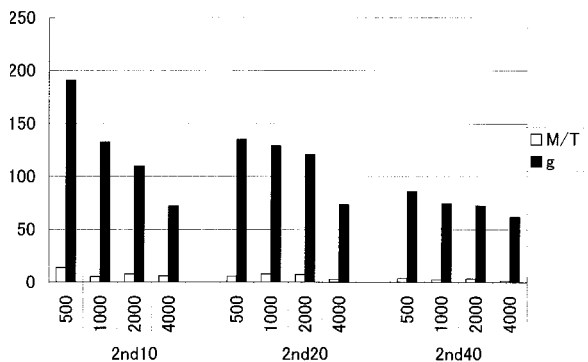


図3 二次抗体10倍、20倍、40倍希釈における一次抗体の濃度の変化による金コロイド粒子数/ μm^2 。
M/T：僧帽/房飾細胞，g：顆粒細胞

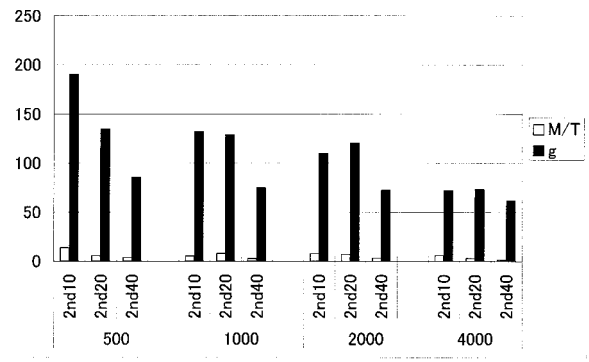


図4 一次抗体500倍、1000倍、2000倍、4000倍希釈における二次抗体の濃度の変化による金コロイド粒子数/ μm^2 。
M/T：僧帽/房飾細胞，g：顆粒細胞

ていた。一方、GABA免疫陽性であるべき突起の標識はエッチング時間によりやや複雑な変化を示していた。0分から60分まではエッチング時間とともに標識も上昇していたが240分ではむしろ60分と比べると有意に減少し、20分の標識と同等のレベルであった。実際の標識からバックグラウンド標識を差し引いても同じ傾向であった。しかし、標準偏差をみると20分のエッチングの場合が最も大きく、この条件ではばらつきが他の条件下よりも大きいことを示していた。従って、以下の実験ではバックグラウンドの標識はやや高くなるが、

表4 実験2についての多重比較

2nd10	平均 (分散)	t値		
		500	1000	2000
500	190.5 (51.24)		5.595**	1.408
1000	132.2 (50.47)			0.8
2000	109.9 (40.40)			

2nd20	平均 (分散)	t値		
		500	1000	2000
500	134.9 (41.49)		6.076**	8.403**
1000	128.8 (43.67)			2.339*
2000	120.8 (54.97)			

**p<0.001, *p<0.05, #p<0.1

2nd10	平均 (分散)	t値		
		500	1000	2000
500	13.1 (6.29)		3.373**	5.846**
1000	5.2 (2.09)			1.995*
2000	7.8 (3.57)			

2nd20	平均 (分散)	t値		
		500	1000	2000
500	5.5 (3.11)		2.390*	1.769#
1000	7.7 (3.94)			0.606
2000	7.2 (3.96)			

**p<0.001, *p<0.05, #p<0.1

M/T: 僧帽/房飾細胞, g: 顆粒細胞

特異的標識が最も高くばらつきも比較的少ないと考えられる60分のエッチング時間の下で実験2の1次抗体, 2次抗体の濃度についての検討を進めた。

実験2

実験2の結果は図3, 4, 表2-4にまとめている。それぞれの平均と標準偏差は以下のごとくであった(表2)。この結果を二元配置分散分析法にて検定した(表3)。要因が一次抗体である場合、顆粒細胞突起上の標識, 僧帽/房飾細胞突起上の標識どちらにおいても有意差があった。しかし、二次抗体が要因である場合は顆粒細胞突起上の標識では有意差があったが、僧帽/房飾細胞突起上の標識においては有意水準5%において有意差は見られなかった。すなわち、一次抗体の濃度はバックグラウンド標識, GABA免疫標識ともに関係するが、二次抗体の濃度はバックグラウンド標識には有意差を生じるとはいえないが、GABA免疫標識には有意差を生じるといえる。一次抗体の濃度が4000倍のときには二次抗体のどの濃度においてもあまり変化がなく、標識も他の場合より明らかにかかなり低かったため以下の検定では省略した。また二次抗体の濃度が40倍のときにも一次抗体のどの濃度においても金コロイド標識密度が他の場合より明らかにかかなり低いので同様に以下の検定では省略した。一次抗体の濃度500, 1000, 2000倍希釈, 二次抗体の濃度10, 20倍希釈についてRyan法による多重比較検定を行った(表4)。バックグラウンド標識については、二次抗体の濃度10倍では一次抗体の濃度の違いですべての間で有意差があった。しかし、二次抗体の濃度20倍では一次抗体の濃度500倍と1000倍では有意差があったが、500倍と2000倍との間, 1000倍と2000倍との間では有意差は無かった。一方、顆粒細胞突起上のGABA標識の場合、二次抗体の濃度10倍ではバックグラウンド標識同様一次抗体の濃度の違いですべての間で有意差があった。しかし、二次抗体の濃度20倍では一次抗体の濃度の違いの間で有意差は見られなかった。

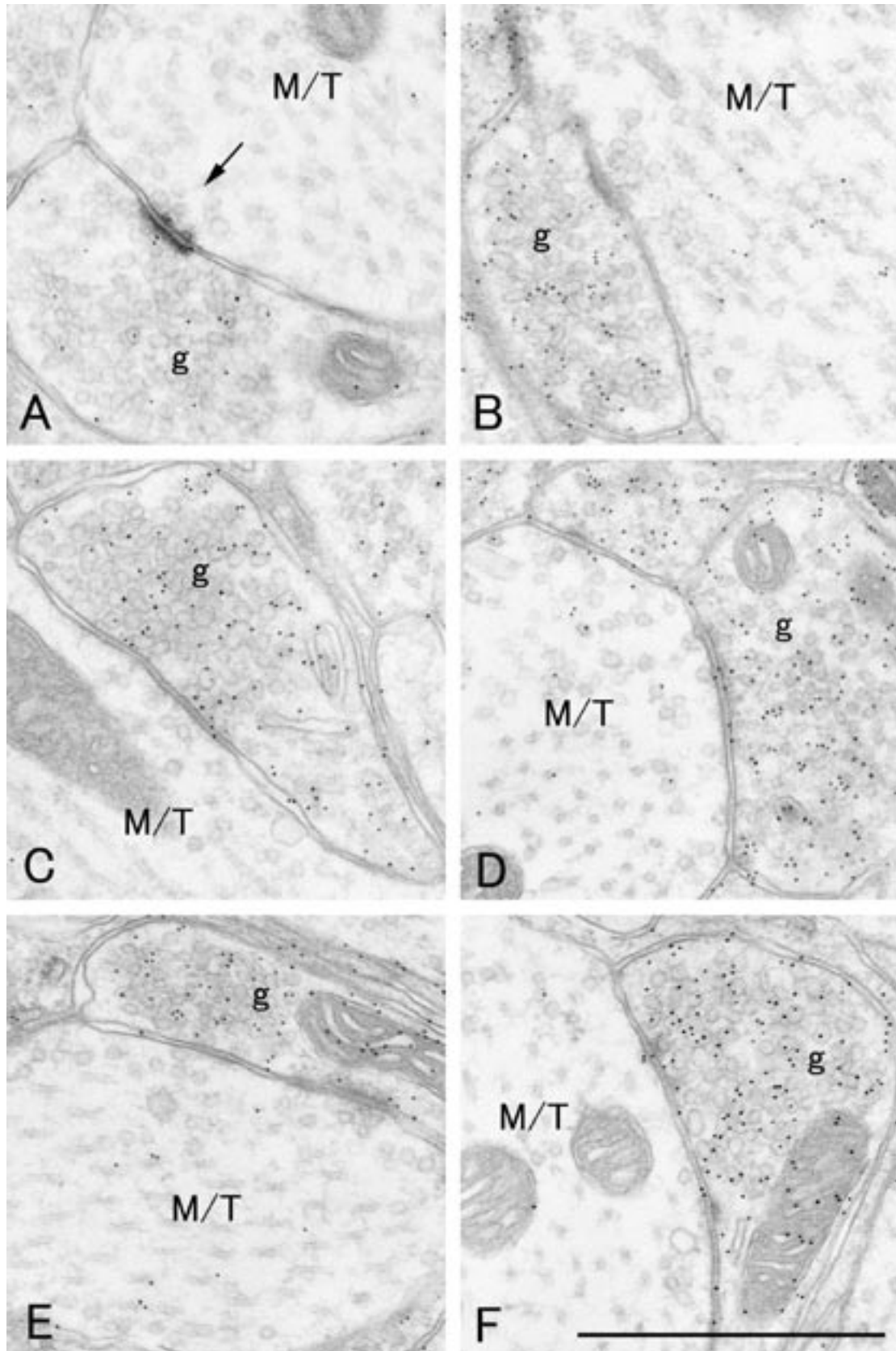


図5 エッチング、一次抗体、二次抗体の条件を変えた時のコロイド金免疫電子顕微鏡像。

A ; エッチング0分、一次抗体1000倍、二次抗体20倍
B ; エッチング60分、一次抗体1000倍、二次抗体20倍
C ; エッチング60分、一次抗体4000倍、二次抗体40倍
D ; エッチング60分、一次抗体500倍、二次抗体10倍
E ; エッチング60分、一次抗体1000倍、二次抗体20倍
F ; エッチング60分、一次抗体2000倍、二次抗体20倍
M/T : 僧帽/房飾細胞, g : 顆粒細胞, 矢印はM/Tからgへのシナプス。スケールは1 μ m。

考 察

樹脂包埋後免疫電顕においてはニューロン間のシナプス結合を直接観察でき、しかも免疫組織化学染色により化学的性質を明らかにできる。これによってシナプスでどのような興奮性、抑制性の伝達物質が働いているかわかる。今回、樹脂包埋後免疫細胞化学法（金コロイド標識法）において定量的にエッチングの時間、一次抗体、二次抗体の濃度等を検討することによって、より確実に染め分けることができるようになる。

実験1の結果では、バックグラウンド標識である僧帽／房飾細胞の突起では20分から60分の間に粒子数が増加している。一方GABA陽性の顆粒細胞の突起においては、エッチング60分までは時間に応じて金コロイドの標識が増加するがそれより長い240分ではむしろ標識が少なくなっている。一元配置分散分析法の結果、バックグラウンドもGABAの特異的と考えられる標識もそれぞれ有意であるので、エッチング時間が両者ともに影響を与えるといえる。すなわち、エッチング時間を60分にすると顆粒細胞突起上の金コロイドの粒子数は増加するが、バックグラウンドである僧帽／房飾細胞突起上の粒子数も増える。二つの値のかねあいから、20分か60分エッチングするのが適当であると考えた。

また顆粒細胞の突起上の標識についてはエッチング時間それぞれの比較についても60分が0分、20分、240分に比べ有意であった。つまり、エッチングをすることにより抗原が露出される。これは時間により、影響され60分程度で完了すると考えられる。20分ではバックグラウンドも少ないが、エッチングが完了していないため、ばらつきも増えその時その時によってエッチングの状態が変化するのではないだろうか。一方、240分では標識がむしろ低下していることは、おそらくエッチングという過程は単に抗原を露出するのみでなく同時に抗原性を破壊する過程も進んでいることを示している。この両者の兼ね合い、更に上述したエッチング時間が短い場合の大きなばらつきを考慮すると、エッチング時間は、60分が適当と考えられる。

実験2の結果より、一次抗体の濃度、二次抗体の濃度によって標識のレベルに差がでると考えられる。グラフでも一次抗体の濃度の変化によって金コロイドの数やばらつきが変動している。グラフや検定の結果から、一次抗体の濃度は1000倍か2000倍で使用するのが適していると考えられる。また二次抗体の濃度においては、濃度が上がるにつれて、バックグラウンドである顆粒細胞の金コロイドの数が増えてくる。しかも10倍と20倍の数が大差ないものもあった。検定の結果からも、二次抗体の濃度がバックグラウンドに影響することが確認された。よって、二次抗体の濃度は従来通り⁵⁾20倍で使用するのが適していると考えられる。

終わりに

包埋後免疫細胞化学法（金コロイド標識法）によって、確実に定量できるようになれば電子顕微鏡下においてシナプス結合をする神経要素を特定できる。さらに包埋前免疫染色と二重染色すれば、さらに多くのことが解析可能になる。今回は抗GABA抗体においてであるが、その他の抗体についても検討していきたい。

謝 辞

この稿をおえるにあたり、懇切丁寧なご指導、ご助言いただいた九州大学大学院医学研究院神経形態学分野・小坂俊夫教授、福田孝一講師、秋鹿祐輔講師、はじめとする教室の方々、保健学科平野裕子助教授に心から御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 中根一穂, 渡辺慶一(編): 酵素抗体法, 学際企画
- 2) Adalberto Merighi: Post-embedding electron microscopic immunocytochemistry in Julia M. Polak, John V. Priestley (eds): Electron Microscopic immunocytochemistry: Principles and practice. Oxford University Press, New York, 1992, pp51-87

- 3) 小坂克子：嗅球糸球体の定性的, 定量的形態解析 (財) ブレインサイエンス振興財団 伊藤正男, 川合述史 (編) : ブレインサイエンスレビュー2001 : 157-169 医学書院
- 4) 樋田一徳：嗅球神経回路の三次元構造解析 顕微鏡 第40巻・1号 : 20-2
- 5) Toshio.Kosaka, Katsuko.Kosaka, : Neuronal gap junctions in the rat main olfactory bulb, with special reference to intraglomerular gap junctions. Neurosci Res 45 (2003) 189-209