日本外科宝函 第34巻 第2号

神経細胞の形態的諸変化とその意義

— -in vitro の条件下における脳組織の電子顕微鏡的研究----

京都大学医学部脳神経外科教室(指導:荒木千里教授)

鈴木陽-

〔原稿受付 昭和40年1月11日〕

Electron Microscopic Study of Brain Tissue under in Vitro Condition

by

Yoichi Suzuki

From the 1st Surgical Division and Neurosurgery, Kyoto University Medical School (Director : Prof. Dr. Chisato Araki)

INTRODUCTION

By the incubating brain slice method morphological changes of nerve cells were studied with an electron microscope, and compared with histochemical changes.

MATERIAL AND METHOD

Adult rats were decapitated to obtain the brain and slices were prepared from the cerebral cortex. Incubation was done in modified Warburg's apparatus in 4 different ways;

Experiment 1 : O₂ was used as gas phase
Experiment 2 : N₂ was used as gas phase
Experiment 3 : 2, 4-dinitrophenol (DNP) 2×10⁻⁴M was used in addition to O₂
Experiment 4 : Acetylcholine (Ach) 10⁻²M and eserine 2×10⁻⁴M were used in addition to O₂

As for the incubation media, tissue culture medium (10 ml) was used in all instances except for the experiment 4 in which an additional experiment with Krebs-Ringer's solution (10ml) containing glucose 11×10^{-3} M was done. O₂ and N₂ were passed through containers for 15 minutes prior to incubation, then incubation was done for 15, 30, 45 and 60 minutes each in the quiescence state in 30°C with gas flow.

Obtained specimens were fixed for 2 hours in 1% osmium tetroxide containing 0.1M phosphate buffer (pH 7.2), dehydrated with ethyl alcohol, and then embedded into methacrylate. Leitz ultramicrotome for ultra-thin sectioning and Hitachi HS-6 model electron microscope were used.

Electron microscopic preparations were made at the similar depth from the surface of

slices as much as possible and several blocks were examined in each experiment.

RESULTS AND DISCUSSION

A. Normal picture of cortical nerve cells

Nucleus encircled with double nuclear membranes contained dispersed or occasionally conglomerated chromatin particles and one prominent dark nucleolus. NISSL body (endoplasmic reticulum) which was composed of ergastoplasmic-membranous sacs and associated finely granular components had a characteristic appearance in the cytoplasm. Mitochondria containing either transversely or longitudinally oriented cristae and dense bodies were scattered throughout the cytoplasm. GOLGI apparatus consisted of paired lamellar membranes, clusters of small vesicles and large vacuoles (Fig. 1).

B. Morphological changes of nerve cells in various incubations

Experiment 1

In aerobic incubation, the marked changes were first seen after 45 minutes, and by this time nerve cells maintained identical form as they are in vivo. Therefore, in other incubations, for the purpose of comparison, observations were mainly concentrated on the changes in preparations incubated for 45 minutes. Earlier developed changes were also compared to these changes (Fig. 2, 3, 4, 5 and 6).

Experiment 2

In anaerobic incubation, remarkable changes started to develop after 30 minutes. Characteristic changes were progressive increase of cytoplasmic osmiodensity, decreased osmiodensity of nucleoplasm and the disruptive process of mitochondria. There were also the pictures suggesting the rupture of the nuclear membrane and the sclerosis.

These findings indicate the same degenerative changes as observed in the light microscope, such as chromophilia, sclerosis, atrophy and cellular death. It may be thus considered that the changes were caused by the primary suppression of neuronal activity (Fig. 7, 8, 9, 10 and 11).

Experiment 3

When DNP was added, decrease of chromatin granules of nucleus, increased and gross cytoplasmic granules and severe changes of mitochondria were observed. These were similar to those seen in anaerobic incubation but lesser in degree.

DNP acts as uncoupler in the electron transport system and inhibit the formation of ATP, thus resulting in the deficiency of energy to maintain the proper form and function of cells which is considered to be the cause of these changes. The morphological difference in electron microscope between the experiments 2 and 3 may be explainable by the difference ence in metabolic disturbance (Fig. 12, 13 and 14).

Experiment 4

Remarkable changes of endoplasmic reticulum and mitochondria with diminution of cellular granules were recognized but the characteristic changes were in endoplasmic reticulum rupturing in some parts.

日本外科宝函 第34巻 第2号

These changes seem similar to chromatolysis observed in histochemical examination. Changes may be due to the metabolic change in endoplasmic reticulum by the stimulative action of acetylcholine probably resulting rapid exhaustion of labile-RNA granules, thus developing so-called chromatolysis.

On comparison of the uses of tissue culture media and Krebs-Ringer's solution containing glucose 11 mM, the latter caused the severer change (Fig. 15, 16, 17, 18 and 19).

SUMMARY

1) In aerobic incubation, nerve cells retained nearly normal picture until 45 minutes.

2) In anaerobic incubation with N_2 , nerve cells started to show changes in 30 minutes; i. e. changes in mitochondria, increased electron density of cell body, partial rupture of nuclear membrane and contraction of nerve cells a series of degenerative changes corresponding to light microscopic changes known as chromophilia, sclerosis and cellular death.

3) In case of the addition of DNP, the changes were similar to those seen in anaerobic incubation although they were lesser in degree.

4) When stimulation was given by acetylcholine, severe changes were noted on endoplasmic reticulum and mitochondria, a finding similar to chromatolysis in light microscope. On comparison of the use of tissue culture media with Krebs-Ringer's solution containing glucose 11 mM, the latter displayed severer changes.

5) It became clear that in two types of degenerative change of nerve cells, leading to the cellular death; i. e. the chromophilia and the chromatolysis, the former may be caused by the primary suppression and the latter by the hyperactive exhaustion.

緒言

神経組織,特に神経細胞が作内で最も複雑な機能を 持つ細胞のひとつであり,そこに示される形態学的変 化もまた 複雑で あるという 理由から人々の 注目を集 め,いろいろの角度から 各種の研究が 行なわれて来 た⁸⁾.

先ず初期には神経病理学,組織化学,細胞学の立場 からの研究で,特に Nissl および Einarson等⁵⁰⁸⁾は主 として neuron,特に Nissl substance に含まれている 核蛋白の動向と neuronal activity との関連を追い,染 色性の変化の面からこれを追求した。中でも Einarson は gallocyanin-chromalum method 等を用いて Nissl substance の実在を確かめ,更に chromophilia, chromophobia などの概念を確立した。

一方, 電子顕微鏡(以下電顕と省略)の生物分野へ の応用が進められ, Richards, Steinbach & Anderson 等¹⁵⁰が神経組織の電顕的観察を報告して以来, 正常神 経細胞に関する多くの人々の業績があり3)6091111522025) ²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾³²⁾,また最近神経細胞の病的変化を追求する努力もなされている^{4)7)10)17)21)28)33)37).}

更に近年組織学的変化と代謝異常 — 生化学的変化 とを結びつけて理解せんとする企ても数多くなされて いる。Allen¹⁾, Elliott & Pappius²⁶⁾²⁷⁾, Gerschenfeld et al⁴⁾⁷⁾等は incubating brain slice method を用い,生化 学的,生理学的な面で多くの優れた業績を報告した.

本実験においても、各種の糸件下におかれた神経細胞の形態学的変化を電顕的に把握せんと試みた。ただ neuronに表現される諸変化は、その成立因子が余りに も複雑で数多くの因子が関与し、しかもこれらの因子 の解析も容易でないことから、出来るかぎり単純化さ れ、再現性のある条件下で実験を行なうためにincubating brain slice method、すなわち in vitro study を行な った.

材料および実験方法

実験動物として成熟ラッテを用い、断頭により直ち に(約5分以内)脳を摘出し、氷冷 Krebs-Ringer 液 に
に
込しながら、
大脳皮質より約0.35~0.40mmの
にさで
約40mgの slice を
作成した.
次いでこの
実験のために
改良した
Warburgの
装置
(Fig. 20)を
用い、次に示す
ような
4種類の
条件で
incubation を
行なった

- 実験1:gas phase として O2 を使用したもの
- 実験2:gas phase として N₂を使用したもの.
- 実験4:O₂および acetylcholine (Ach)10⁻²M, eserine 2×10⁻¹M を使用したもの.
 - incubation medium として組織培養液 を用いたもの、
 - ブドー糖(11×10⁻³M)を含有せる Krebs-Ringer 液を用いたもの.

尚 incubation medium は4種類の実験のすべてに Table 1 の如き組成の組織培養液(10 ml)を用い, Ach 添加の場合(実験4)にのみブドー糖(11×10 ⁻³M)を含む Krebs-Ringer 液(10ml)(Table 2)によ る実験を追加した. 使用した添加物は前もつて medi-

Table 1 Tissue Culture Medium

human ascitic fluid	50%
chick embryo extract	5%
Gay's balanced saline solution	45%

Table 2 Krebs-Ringer's Solution

NaCl	127mM
KCI	5.1mM
CaCl ₂	2.73mM
KH ₂ PO ₄	1.27mM
$MgSO_1$	$1.27 \mathrm{mM}$
Tris	50mM
(PH	7.4)
Substrate	$11 \mathrm{mM}$

um に溶かしておき, また O_2 および N_2 はあらかじ め15分間攪拌しながら通気した後, 30°、静止状態で 通気しながら15分, 30分, 45分, 60分の incubation を 行ない, 適時 liceをとり出した. (Table 3 は上に述べ た実験条件をまとめたものである.)

以上により得られた incubated brain slice を0.1Mの phosphate buffer (μ 17.2) を含む $1 \% O_3 O_1$ で固定 (氷室 内2時間), アルコール系列にて脱水し, methacrylate (n-butyl: methylmethacrylate = 6:4) にて包埋し た.

これとは別に, incubation を行なうことなくとり出 した slice を直ちに同じ方法にて固定, 包埋して神経 細胞の正常像とした.

超薄切片作成には Leitz ultramicrotome を使用し, 電顕は Hitachi HS-6 型を用いた。

電顕的観察に際しては、sliceの表面からの距離を出 来るだけ一定にするように55か,ひとつの実験条件の ものを観察するのに数個のプロックを使用した。

実験結果

A. 大脳皮質神経細胞の正常像

核は胞体のほぼ中央に位置し, 円形または楕円形 で,時に凹凸の著明な輪廓を示すものもある. 核膜は 2 重膜構造をなしており,外側の膜の方が電子密度が 小で,時に胞体内に膨出することもある. 核質はchromatin の小顆粒が大体において瀰漫性に拡がつている が, ところどころに集合して存在することもある. 核 小体は電子密度大なる小顆粒の集合体で,限界膜を有 していない.

細胞質には rough surfaced endoplasmic reticulum が 網状をなして豊富に認められる。その構造は細管状, 或いは小胞状をなした限界膜によつて取り囲まれてお り,その内腔は電子密度が小である。またこの膜面の

Table	3
-------	---

	Gas phase	Addition (to concentration of)	Incubation Medium	Temperature (C)	Incubation Time (min)
• 1	O ₂	-	Tissue Culture Medium	30	15, 30 45, 60
2	N ₂		Tissue Culture Medium	30	15, 30 13, 60
3	O_2	2. 4 -Dinitrophenol (2×10 ⁻⁴ M)	Tissue Culture Medium	30	15, 30 45, 60
4	O ₂	Acetylcholme ($10^{-2}M$) Eserine ($2 \times 10^{-4}M$)	Tissue Culture Medium Glucose 11 × 10 ⁻³ M in Krebs-Ringer's solution	30	15, 30 45, 60

外側には直径およそ 100A の小顆粒が 附着している. この小顆粒はribosomes, Paladeの小顆粒, 或はRNA顆 粒などとよばれている.mitochondria は 2 重の薄膜に よつて囲まれており,内部には内側限界膜から作られ たcristae mitochondriales が通常長軸に直角に並んでい る. Golgi apparatusはGolgi membrane, Golgi vesicle, Golgi vacuoleの 3 つの形態を示す部分を有し,その膜 の表面には顆粒を有していない。dense bodyは細胞質 内に散在性に存在する電子密度大なる直径0.2~0.6µ程 度の小体で,一般に脂質顆粒などとよばれている organelle である。

また細空質には種々の大きさおよび電子密度を有す る顆粒が 潮浸性に散在している。細胞膜も同様に2重 膜構造を有している。これらの所見は,多くの人々に よつて報告されたものと一致している³³⁶¹¹¹¹⁵²⁰⁰²¹⁾²⁵⁾ ²⁹¹³⁰¹³¹⁾³²¹(Fig. 1).

B. 各種条件下における神経細胞の形態的諸変化 実 験 1

15分間のaerobic incubation (以下これを O_2 15'の如く 省略し、30分間、45分間、60分間 incubate したもの を、それぞれ O_2 30'、 O_2 45'、 O_2 60' と省略する.) では 非常に少数の mitcehondria に軽度の膨化が認められる 以外はほぼ正常像を示している (Fig. 2). O_2 30' では 軽度の膨化像を示す mitcehondria の数が増加するが、

他には全く変化を認めない (Fig. 3). $O_{2}15'$ では mitochondria の大きさおよびその常造に関してやはり軽度 の変化が認められ, また endoplasmic reticulumの内腔 の軽度開大などが認められたが,全体としてみるとほ ほ汇常像に近いものが得られた (Fig. 1,5). $O_{2}60'$ で は更に mitochondria および endoplasmic reticulum の 変化が強くなり,核質の chromatin 顆粒が一層集合す る傾向を示すようになり,核質全体としての電子密度 が低下する。また細胞質の顆粒も大きさおよび電子密

以上の御密結果から、()を用いた aerobic incubation では,著明な変化が生じ始めるのは45分以後であり、 それ迄はほぼ in vivo の神経細胞と identical な形態を 示すことがわかったので、以下の実験では45分 incubate した brain slice を中心として観察し、更により早期に 認められた変化も適宜 O_2 incubation のそれと比較検 討した.

実験 2

15分間の anaerobic incubation ()。の場合と同様に No15'と省略し, 30分, 15分, 60分をそれぞれ No30', N_245' , N_260' と略す。) では神経細胞はほぼ正常像を示 した (Fig. 7). N_230' では変化を起していない神経細 胞も未だ認められるが,多くはかなりはつきりした変 化を示しており, mitochondriaの膨化, cristaeの断裂, endoplasmic matrix の膨化が目立つ。特に注目すべき 所見は細胞質顆粒の 粗大化と数の 増加であり, cell matrix の電子密度はために全体として著明な増加を示 したことである(Fig. 8).

endoplasmic reticulum はおそらく変化していると思われるが,細胞質全体の電子密度の上昇のために不明 ③になる場合が多い.また一部に核膜の断裂を思わせ る所見が認められた(Fig. 9, 10).

 N_260' では、細胞質は電子密度大なる顆粒によつて 殆ど一様にうずめつくされており、細胞質内の organelles の弁別が困難な場合が多い. また一部において 神経細胞の縮小、すなわち sclerosis を思わせる像が得 られた(Fig. 11).

実験 3

DNP 添加 medium 中に15分間 incubate したもので は、(同様に DNP 15' の如く省略)核の chromatin 顆 粒は減少し、細胞質の顆粒は瀰漫性に規則正しく分布 しているが、個々の顆粒の大きさが正常に比し増加し ており、そのため細胞質の電子密度は全体として上昇 している. mitochondria は膨化し、cristae の構造にも 高度の乱れが生じている. endoplasmic reticulum は内 腔の開大が著しい(Fig. 12, 13).

DNP 45' になると、chromatin 顆粒は減少している が細胞質顆粒はその数を増し、細胞質の電子密度は更 に上昇している。しかし<u>この DNP 添加の実験では実</u> 験2の anaerobic incubation の場合にみられた程の高度 の変化は認められなかつた (Fig. 14). しかしやはり 両者は同じ方向への変化を示したものと思われる.

実験 4

Ach を加えて15分間 incubate したもの (以下 Ach 15'の如く省略)では, 神経細胞全体の電子密度が低下しており, 細胞質内の顆粒はやや大きさを増すが全

体としては数の減少が認められる。mitochondria は膨 化し始め, cristae の走行の乱れたもの, matrix の電子 密度の低下したものなどが現われて来る。endoplasmic reticulum の内腔はかなり高度に拡張し, その表面 に附着している Palade の小顆粒の数も減少してい る(Fig. 15).

Ach 45'では変化は更に進み,核質および細胞質の 顆粒は数個が集まつて小さな顆粒集合体を形成し,こ れらが胞体内にまばらに散在している。mitochondria はややその数を増し,その殆どが著しく膨化して形が ほぼ円形に近くなるものが多い.cristaeの構造が消失 し,mitochondria 自体が1つの大きな空胞となつてい る場合もある.endoplasmic reticulum には特に激しい 変化がみられる.すなわちその内腔は開大し,限界膜 の断裂を思わせる所見も認められ,膜に附着している Paladeの小顆粒も減少している.また dense body は その数を増し,内部に空胞を持つものも存在している (Fig. 16, 17, 18, 19).

以上の一連の変化を総合してみると,特徴のある所 見は endoplasmic reticulum の変化であって,限界膜の 断裂を思わせる程の激しい変化まで現われている。そ の他では mitochondria の高度の変化および細胞内類粒 の減少などが認められており,これらの所見は chromatolysis に際して認められた電顕像と一致している¹⁰⁰ ¹⁵⁾²¹⁾²⁵⁾²⁹⁾³³⁾³⁷⁾.また incubation medium として用いた 組織培養液とブドー糖11mMを含む Krebs-Ringer 液と を比較してみると,後者を用いた方が退行性変化が少 し強く現われ,細胞中の顆粒が更に減少し, endoplasmic reticulum の変化の度合もやや強く なつている (Fig. 16, 17, 18, 19).

察

耂

近年 incubating brain slice method を用いた研究が 盛んに行なわれているが^{11,47726)277}, この方法では何と いつても脳が in vitro にとり出されること,更に組織 が in vivo の環境とは異なつた medium に incubate さ れることなどから生理的状態とは異なつたいろいろな 変化を示す. in vitro の方法を用いた実験で,(多くの 場合組成の簡単な medium を用いたのであるが)Elliott 等²⁶⁹(tincubation を行なうだけで brain slice の容積が 40%もふえると報告しており, Gerschenfeld等⁴⁰⁷⁷は incubation により astrocytes の膨化および神経細胞の形 態変化を来すと述べている.

したがつて本実験では in vivoの状態に出来るだけ

近づけるために、条件さえ良ければ伸得細胞を長時間 survive せしめ得る組織培養液を medium として使用 し, ここに brain slice を incubate した。ただ実験4に おいて組成の更にはつきりした Krebs-Ringer 液を mediumとして用いた実験をも追加した。単純なKrebs-Ringer液のかわりに組織培養液を用いたことの効用は 明らかではないが, aerobic incubation において神経細 胞が45分迄ほぼ正常の形態を保持していること,およ びastrocytesの膨化の程度が共同研究者 系池18)の Krcha-Ringer液を用いた実験のそれよりかなり軽度であるこ と,また実験4において組織培養液とブドー糖11mM を含んだKrebs-Ringer 液を用いた場合との電顕所見を それぞれ比較してみると、後者の方が変化の程度が少 し強いことなどから判断し、少なくとも組織培養液は isolated brain sliceをより生理的条件に近い状態に保ち 得るものと想像される.

Nissl および Einarson⁵⁾⁸⁰は, 神紅和胞をその染色物 質の分布および排列の面から幾つかの型に分類し, そ れぞれの型が neuronal activity の1時期を表わしてい ると述べたが, in vivo の条件における神経細胞の微 察では関与する要因の余りに多いため必らずしも常に 一定の所見が得られない。即ち同一切片においてさえ 神経細胞の核の形,核小体の位置,細胞内顆粒の大き さおよび数などによつてかなり variation が認められ る. このことは in vitro の状態で種々の条件が与えら れた場合の神経細胞の所見に関してもいえることで, ここでもやはり若干のvariation が示されている. しか しその程度は in vivo のそれよりも表しく軽度で, か なり uniform な変化を毎察することが出来た.

<u>anaerobic incubricen において認められた神経細胞の</u> 電顕所見は,<u>光学顕微鏡にみられる所謂 chromophilia</u> の方向への^{3日にサーズ(レを三1)}たちのと思われる。即 ち,組織化学的に認められたchromophiliaと同じく細胞 内に含まれる物質の染色性が高められるような方向へ の変化が起つている事を表わしている。しかもaerobic incubation においては 60分以上経過して現われ始める 変化が anaerobic condition では 30分ですでに起つてい るという事である。chromophilia は動物実験では experimental inhibition; vitamin E deficiency; chronic. intermittent, sublethal hypoxia; experimental transneuronal degeneration 等の場合に認められ, また中毒,血 管性疾患,変性疾患等の慢性疾患の場合にも観察され ている⁵⁹. 結局これらの変化は neuronal activity を抑 制するような因子 (primary suppression) が神経組織に 働く場合に認められる変化だと考えられる. 我々の観察した神経細胞の胞体のopmiodensityの増加は, RNA 顆粒の積極的な増加を示すというよりおそらく細胞内 物質の利用能力の低下を意味するものであろう。何れ にせよ実験2における一連の所見は chromophilia から 細胞死に通ずる退行性変化を表わす電顕像と考えられ る.もつとも,稀には正常と思われる脳でも所謂 chromophiliaの像を示す神経細胞が認められており⁸⁰, この ことは電顕的にも観察されているが²¹⁰, このような神 経細胞が如何なる機能状態にあるかを正確に知ること は困難である.

Na 45'において核膜の断裂を思わせる像が認められ たことは、核質の電子密度の低下および細胞質の電子 密度の上昇と合わせて興味深い所見であるように思わ れる.即ち McIlwain²²⁾²³⁾によれは、核膜の断裂によ り histone のようなアルカリ性蛋白が胞体に migrateす ると脳組織はその electrical excitability を失なうに至る とされており、ここに認められた変化も神経細胞の機 能状態の一面を反映するものかも知れない.

またN₂ 60'では神経細胞の縮小と細胞質の電子密度 の上昇,即ち sclerosis を思わせる像が得られたが,こ れも注目すべき所見であると考えられる。 Einarson⁵⁾ は高度の chromophilia は細胞の sclerosis を結果し,更 に変化が進めば核蛋白などの 消失を伴なつた atrophy へと進み,やがて神経細胞の消失が起ると述べている. 一方 Gerschenfeld 等4)7) は脳浮腫の研究で神経細胞の 同じ変化を報告しており、このような変化は膨化した astrocytes によつて神経細胞が圧縮されたもので, astrocytes と neuron との滲透圧の差によつて起るので あろうと述べている。しかし石井等¹⁰の脳腫脹の電顕 的研究によると、astrocytesの高度の腫脹が認められる 際でも神経細胞は殆ど正常の形態を示す場合もあり、 sclerosis が単なる理学的要因によつて 惹き起されると は一寸考え難い. また同時に認められる高度の mitochondria の変化は、それに含まれている酵素、特に酸 化酵素に対する影響, ATP 産生の減少など種々の機 能障害を暗示するものと思われる。endoplasmic reticulum の変化を代謝の面から説明することはより一層難 かしいが,古くより endoplasmic reticulum が細胞の蛋 白合成の場と信じられている事実24)36),またMcIlwain ²²⁾³³⁾の示した事実,即ち neuronの endoplasmic reticulum に含まれる gangliesides が脳皮質の reactability に 関係しているという事,および教室社2)35)の最近の報 告における,脳圧迫により症状の悪化と一致して gangliosides が減少して いる などの 諸事実から 考えて, endoplasmic reticulum の形態学的な変化が細胞の機能 状態の一端をうかがわせる所見であることも間違いな いようである。

実験3でみられた電顕像における変化は,実験2に おける anaerobic incubation の場合ほど著しいもので はないが,同じ方向への退行性変化を示しているもの と考えられる.

これらを生化学的な面からみてみると、DNP の場 合には、ブドー糖および Krebs cycle の代謝に必要な substrate が存在しておれば、ブドー糖から始まる代謝 系路は常に回転しており、ただ DNP が electron transport system において uncoupler として働らくために ATP の形成を阻止している だけで、他は正常の場合 と変らない.

一方、N₂を用いた場合には、Krebs cycle に入つて から後の 代謝過程がスムーズに 行なわれな いことか ら、anaerobic glycolysis の結果生じた lactate が蓄積 し、ある程度たまるとこれが更に代謝系路の回転を阻 止するように働く¹⁹⁾といつた差が存在しており、この ような代謝様式の差によつて形態学的にも差が生じて 来たと考えられる.即ち<u>この実験3</u>で認められた変化 は、細胞の形状および機能を維持するためのエネルギ 一源とみられる ATP の形成が阻止されることによつ て生じたものと結論して良いであろう.(但しATP の 形成が全然行なわれないわけではなく、anaerobic glycolysis の過程でも僅かに ATP は生成される.)(Table 4)

実験 4 では, endoplasmic reticulum の変化が特徴的 である. 現在神経細胞における rough surfaced endoplasmic reticulum が Nissl body の構造と一致するとい



うことは多くの人々によつて報告されており34)36),高 度の endoplasmic reticulum の変化と Nissi body の染 色性の変化, 即ち chromatolysis とが同じ変化をさし ている事は先ず間違いないと信じられる。したがつ て、 実験4では chromatolysis の際にみられる神経細 胞の変化を観察したわけである。chromatolysisの概念 は多くの人々によつて説明されているように, neuronal activityが何らかの原因により異常に高められた結 果, Nissl body中のRNAが減少し, あるいは消失し, (RNA の exhaustion) それに伴なつて染色性の低下が 起るのであつて, neuronal degeneration の1つの型で ある⁵⁾. また chromatolysis は末梢神経切断後に逆行性 に認められる他⁸⁾¹⁵⁾³³⁾, 神経細胞自身に損傷が加わつ ても起り8), 電気ショック37), レ線照射28), 頭部外 傷²¹⁾,脳浮腫作成¹⁰⁾などの種々の実験において記ると いわれている。この場合の「電顕像はendoplasmic reticulum および mitochondria の変化として現われると報告 されている¹⁵⁾,一方,Hydén¹⁶⁾は神経組織が持続的に 刺激されると神経細胞の蛋白含量が低下し、この低下 は RNA 含量の減少にほぼ平行する事を生化学的な実 験から結論した。

本実験で使用された Ach は, 他の多くの実験にも みられるように stimulants として用いたものである. Hokin¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾は Ach が eserine の存在のもとに, microsomal fraction, 主として endoplasmic reticulum に作用 して, その中に含まれている phosphatidic acid の turn over を高めている事を示唆している. 何れにせよ Ach の刺激作用によつて endoplasmic reticulum において行 なわれる代謝過程に変化を来し, おそらく labile-RNA granules の急速な消費を結果し, その結果所謂 chromatolysis を惹き起したものと考えられる.

mitochondria の変化も著しい. Hokin¹²⁾は mitochondria に対するAchの刺激作用は,おそらく microsomal fraction に対する作用を通じて 行なわれ るのであろう と述べており,本実験で認められた mitochondria の変 化もあるいはこれで説明出来るかも知れない.

以上電顕によつて得られた神経細胞の形態学的な変 化と、従来よく調べられている組織化学的な変化とを 対比し、更にまたこれらを生化学の立場から説明せん と試みたが、現在の段階では、我々の得ている限られ た知見からその詳細について解析し、それぞれの間の ギャップを充分に埋めつくす事は不可能である。しか し神経細胞にみられる退行性変化の2つの表現、即ち chromophilia あるいは sclerosis と chromatolysis なる 現象は、1つは primary suppression から、他は hyperactivity あるいは exhaustion を通じて起る事をはつき りと確認したことは1つの収獲であつた。

現在特に脂質代謝と核蛋白代謝に関する研究が± な行なわれており、最近の生化学および生理学の著し い進歩からすれば、近い将来これら神経細胞の代謝の 全貌が明らかにされるであろう.

本実験は神経細胞の機能と形態の関連性に関して一 家にある解答を与えたものと思われ,特に external noxious agents の差によつて形態学的にそれに対応し た変性像が現われる事を示した.

結

語

ラッテを用い、断頭により得た脳から brain slice を 作成し、これを4種類の条件の medium 中に孵置した 後,各条件下に起つた大脳皮質神経細胞の変化を逐時 的に観察して次の結論を得た。

 aerobic incubation では神経細胞は45分迄は正常 像を示した。

N₂を用いた anaerobic incubation では、神経細胞は30分から変化を始め、mitochondria の変化、胞体の電子密度の上昇、核漠の断裂を思わせる所見、更には神経細胞の縮小を思わせる像などが得られ、chromophilia から sclerosis, 細胞死に至る退行性変化が証明された。

3) DNP を用いた場合の変化は, anaerobic incubation でみられた変化ほど強くはないが, やはりそれと 同じ方向への変化を示した.

4) Ach により刺激を行なうと, endoplasmic reticulum および mitochondria の高度の変化が認められ, また光学顕微鏡で示された chromatolysis と一致した電 顕所見が得られた. 組織培養液を用いた場合とプドー 糖11mMを含む Krebs-Ringer 液を用いた場合とを比較 してみると,後者においてやや変化が強いことが認め られた.

5) 同じく細胞死に通ずる神経細胞の2つの<u>退行性</u> 変化, 即ち chromophilia および chromatolysis は, 前 者が primary suppression により,後者が hyperactive exhaustion によつて起るであろう事が判明した.

稿を終るに臨み,終始懇切なる御指導および御校閲 を賜わつた石井昌三博士にあつく感謝致します.

参考文献

- Allen, J. N.: Extracellular space in the central nervous system. A. M. A. Arch. Neurol. Psychiat., 73: 241, 1955.
- 2) 荒木千里,石井昌三,近藤祐之,沼正作,小沢 和恵,辻宏:外傷脳および硬塞脳における脂質 代謝および核酸誘導物質の治療面への応用.神 経研究の進歩,8:82,1961.
- Barton, A. A., and Causey, G.: Electron microscopic study of the superior cervical ganglion. J. Anat. 92 : 399, 1958.
- 4) De Robertis, E. D., and Gerschenfeld, H. M.: Functional significance of astroglia; Submicroscopic morphology and function of glial cells. International review of neurobiology. Academic Press, New York & London, 1961.
- Einarson, L.: Nucleic acids as structural constituents of nerve cells; Modern scientific aspects of neurology. Edward Arnold Publishers, London, 1960.
- Fernández-Morán, H.: Electron microscopy of nervous tissue, in metabelism of the nervous system. Pergamon Press, London, 1957.
- 7) Gerschenfeld, H. M., WalJ, F., Zadunaisky, J. A. and De Robertis, E. D.: Function of astroglia in the water-ion motobolism of the central nervous system: An electron microscope study. Neurol., 9:6, 1959.
- Greenfield, J. G. : Nouropathology. Edward Arnold Publischere, London, 1958.
- Hartman, J. F.: Electron microscopy of mitochondria in the central nervous system. J. Biophysic. Biochem. Cytol., 2: 375, 1956.
- 10) 早石 修,小沢和恵,荒木千里,石井昌三,近 藤古之:脳外傷および超浮重の生化学,日新医 学,48:915,1961.
- 11) Hess, A.: The fine structure of nerve cells and fibere, neuroglia and sheaths of the ganglion chain in the cockroach. J. Biophysic. Biochem. Cytol., 4: 731, 1958.
- Hokin, L. E., and Hokin, M. R.: Acetylcholine and the exchange of phosphate in phosphatidic acid in brain microsomes. J. Biol. Chem., 233: 822, 1958.
- 13) Hokin, L. E., and Hokin, M. R.: The role of phosphatides in active transport with particular reference to sodium transport; Drugs and membranes, Proceedings of first international pharmacological meeting. Pergamon Press, London, 1963.
- 14) Hokin, L. E., and Hokin, M. R.: Effects of acetylcholine on phospholipides of brain cortex in vitro. Biochim. et Biophys. Acta, 16: 229,

1955.

- 15) 本陣良平:神経組織一般の電子顕微鏡像.脳と 神経,12:5,1960.
- Hydén, H.: Protein metabolism in the nerve cell during growth and function. Act. Physiol. Scandinav., 6: Suppl. 17, 1943.
- 17) Ishii, S., and Tani, E.: Electron microscopic study of the blood-brain-barrier in brain swelling. Act. Neuropath., 1: 474, 1962.
- (18) 菊池晴彦: in vitro における脳腫脹の電子顕微 鏡的研究.未発表.
- Lowry, O. H., Passonneau, J. V., Hasselberger, F. X., and Schniz, D. W.: Effect of ischaemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. J. Biol. Chem., 239: 18, 1964.
- Luse, S. A.: Electron microscopic observation of the central nervous system. J. Biophysic. Biochem. Cytol., 2: 531, 1956.
- 21) 牧田泰正:実験的頭部外傷による神経細胞の変 化の電子顕微鏡的研究. 日外宝, 31:822, 1962.
- 22) McIlwain, H.: Protein interactions and metabolic response to stimulating agents in isolated cerebral tissues : Histones as inhibitors. Biochem. J., 73 : 514, 1959.
- McIlwain, H.: Characterization of naturally occurring materials which restore excitability to isolated cerebral tissues. Biochem. J., 78:24, 1961.
- 24) 三浦謹一郎: 核酸の化学,現代化学シリーズ
 13. 東京化学同人,東京,1962.
- Palay, S. L., and Palade, G. E.: The fine structure of neurons. J. Biophysic. Biochem. Cytol., 1:68, 1955.
- 26) Pappius, H. M., and Elliott, K. A. C.: Water distribution in incubated brain slices of brain and other tissues. Canad. J. Biochem. Physiol., 34: 1007, 1956.
- Pappius, H. M., and Elliott, K. A. C. : Factors affecting the potassium content of incubated brain slices. Canad. J. Biochem. Physiol., 34 : 1053, 1956.
- Pitcock, J. A.: An electron microscopic study of acute radiation injury of the rat brain. Laborat. Investigat., 2: 32, 1962.
- 29) Roizin, L., and Dmochowski, L.: Comparative histologic and electron microscope investigations of the central nervous system. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 15: 12, 1956.
- 30) Rosenbluth, J., and Palay, S. L.: The fine structure of nerve cell bodies and their myelin sheaths in the eighth nerve ganglion of the goldfish. J. Biophysic. Biochem. Cytol., 9: 853, 1961.

- Rosenbluth, J.: The fine structure of acoustic ganglia in the rat. J. Cell Biol., 12: 329, 1962.
- 32) Schulz, R. L., Maynord, E. A., and Pease, D. C.: Electron microscopy of neurons and neuro-glia of cerebral cortex and corpus callosum. Am. J. Anat., 100: 369, 1957.
- 33) Smith, K. R.: The fine structure of neurons of dorsal root ganglion after stimulating or cutting the sciatic nerve. J. Comp. Neurol., 116:103, 1961.
- 34) Smith, S. W.: Fine structure of Nissl bodies

in sympathetic neurons of a lizard. Anat. Rec., 130: 373, 1958.

- 35) Tsuji, H.: Lipids metabolism in the cerebral edema. Glycolipids metabolism in the experimentally produced cerebral edema. Arch. Japan. Chirurg., 33: 995, 1964.
- Wilson, G. B., and Morrison, J. H.: Cytology. Chapman & Hall, London, 1961.
- 37) 吉田三彦:正常および実験的座望における小脳 皮質の電子顕微鏡学的研究、久留米医誌,24: 1117, 1961.



Fig. 2 Incubated for 15 min. under O_2 influx. \times 3,500

Fig. 3 Incubated for 30 min. under O_2 influx. \times 4,500



Fig. 5 Incubated for 45 min. under O_2 influx. \times 3,000

Fig. 6 Incubated for 60 min. under O_2 influx. \times 3,500



Fig. 7 Incubated for 15 min. under N_2 influx. × 6,000 Fig. 8 Incubated for 30 min. under N_2 influx. × 7,000



Fig. 9 Incubated for 45 min, under N_2 influx.





Fig. 11 Incubated for 60 min. under N_2 influx.



Fig. 12DNP added incubation for 15 min.Fig. 13DNP added incubation for 15 min.under O2 influx.× 4,000under O2 influx.× 3,000



Fig. 14 DNP added incubation for 45 min. under O₂ influx.



Fig. 15 Ach added incubation for 15 min. under O2 influx. × 7,000

Fig. 16 Ach added incubation for 45 min. under O2 influx. × 7,500



Fig. 17 Ach added incubation for 45 min. under O2 influx.



Fig. 18 Ach added incubation for 45 min. under O₂ influx. Krebs-Ringer's solution containing glucose 11 mM was used for the incubation medium. × 9,000



Fig. 19 Ach added incubation for 45 min. under O2 influx. Krebs-Ringer's solution containing glucose 11 mM was used for the incubation medium. × 18,000

Fig. 20 Modified Warburg's apparatus.

- N : nucleus
- N C : nucleolus
- NM: nuclear membrane
- M : mitochondria
- E R : endoplasmic reticulum
- DB: dense body
- G : Golgi apparatus
- CM: cell membrane
- A P : astrocytic process

(各写真のスケールは、1μを表す)