強陰性荷電被膜をもつ中枢神経細胞

岡山大学医学部第二解剖学教室(主任:村上宅郎教授)

村上 宅郎,田口 勇仁,大塚 愛二

(平成4年11月9日受稿)

Key words: Cationic iron colloid staining, central nervous system, neurons, sulfated proteoglycans

緒 言

塩化第二鉄をカコジル酸とハイドラジンハイドレートと共に熱すると pH 0.8—7.6の範囲で組織の陰性荷電基を光顕ならびに電顕的に検出できる超微細陽性荷電鉄コロイドが調製できる^{1,2)}. 一方,同鉄をチオシアン酸アンモニウム,アンモニアとカコジル酸と共に熱すると pH 3.5—9.5の範囲で組織の陽性荷電基を光顕ならびに電顕的に検出できる超微細陰性荷電鉄コロイドが調製できる^{2,3)}. 本論文では前者の陽性荷電鉄コロイド染色をラットの脳に適用し,ある種の神経細胞体とその突起根部の外表面が同鉄コロイド染色に強い陽性反応を呈することを示す.

材料と方法

雌、雄のウィスター系ラット(体重、約300g)をエーテル麻酔下に開胸し、上行大動脈より生理食塩水ついで0.1Mカコジル酸緩衝2.5%グルタールアルデヒド液を十分注入し、脳を潅流固定した。その後、脳を取り出して適当な大きさに切り、同上の緩衝グルタールアルデヒド液中に一晩浸し、通常の方法に従ってパラフィン包埋し、厚さ5-10μm の切片とした後脱パラフィンした。

以上のようにして作製したラット脳(特に海 馬領域、橋部、視床部、大脳皮質、小脳)の脱 パラフィン切片を我々の超微細陽性荷電鉄コロ イドで染色した後プルシアンブルー反応処理し^{1,2)}、 ついでカルボール・チオニンでニッスル染色あ るいはケルンエッヒトロートで後染色し、光学 顕微鏡で観察した.

結 果

調べた海馬、橋、視床、大脳皮質、小脳の各領域において強く陰性に荷電する(強いプルシアンブルー反応を呈する)被膜を有する神経細胞が観察された(図1~4)、すなわち、海馬領域では主として海馬台に(図1、2)、視床部では不確帯に(図3、4)、大脳皮質部では全野にわたって第V層に、小脳部では内側小脳核に、強いプルシアンブルー反応を呈する被膜をもつ神経細胞が多く認められた。このような被膜をもつ神経細胞は通常大型の細胞に属していた(図1~4)。

強いプルシアンブルー反応を呈する被膜は神経細胞の胞体を被うと同時に細胞突起の根部を連続的に被い、そして常に同被膜は非常に細かい網目構造として観察された(図2, 4)。網目構造の部位による差は特に認めなかった。また雌雄による差もなかった。

考 察

本論文はラット脳には pH 値1.0-2.0で我々の超微細陽性荷電鉄コロイドに強く反応する被膜をもつ相当数の神経細胞が存在することを示している。現在まで知られていなかったこれらの強い陰性荷電被膜をもつ細胞は、カルボール・チオニンによるニッスル染色に陽性反応を呈することから、神経細胞(ニューロン)であることは明らかである。

ラットの海馬台をグルタールアルデヒド固定

後超微細陽性荷電鉄コロイド (pH 値1.0-2.0) 処理して透過電子顕微鏡観察すると, 1.0-1.5 nm 径の微粒子 (鉄コロイド) が神経細胞体やその突起の根部の外表面に集合密着する像が著明に認められた (未発表). このことは我々の陽性荷電鉄コロイドは神経細胞膜と直接関連している物質すなわちプロテオグリカン (膜結合性糖タンパク質) と反応して上述の神経細胞体外表面での特有の強いプルシアンブルー反応を誘起したことを示している.

本研究で処方した pH 値1.0-2.0で解離しうる酸性基は主として硫酸基であると考えられ 1,2 ,そして我々の陽性荷電鉄コロイドはこの硫酸基

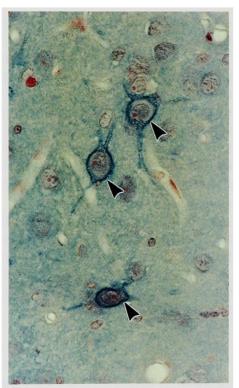


Fig. 1 Light micrograph of the rat hippocampal subiculum, which was incubated in a fine cationic iron colloid at pH value 1.5, treated for Prussian blue reaction and counter-stained with nuclear fast red. Note that the external surfaces of some nervous cells show a strong Prussian blue reaction (arrowheads). ×500.

と反応し、強いプルシアンブルー反応を呈したと考えられる。これらは前述のプロテオグリカンは硫酸基をもつことを示す。硫酸基をもつプロテオグリカンにはコンドロイチン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸等が知られており、コンドロイチナーゼやヘパリナーゼ等による酵素処理実験(未発表)によると、今回我々がラット中枢神経細胞外表面に染めだした物質は主としてコンドロイチン硫酸からなると考えられる。

中枢神経細胞のプロテオグリカンは現在のところ主として種々のレクチンとの特異反応を利用して調べられている⁴-6'. 海馬領域に限っていえば、強陰性荷電被膜をもつ神経細胞は、その分布状態から判断して、Drake 等"のGABA(ガンマアミノ酪酸) 性 Vicia villosa アグルチニン陽性の抑制系介在ニューロンにほぼ一致するよ

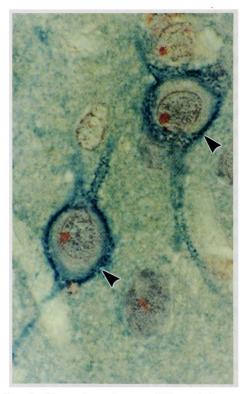


Fig. 2 Closer view of a part of Figure 1. Arrowheads indicate two nervous cells the external surfaces of which show a strong Prussian blue reaction. ×1300.

うに思われる。しかし一方で GABA 性神経細胞の代表格といわれる小脳のプルキンニエ細胞は我々の陽性荷電鉄コロイドには反応しない。 さらに他方で、非 GABA 性である前橋核の神経細胞群はそのほとんどが強い陰性荷電被膜をもっている。従って、我々が発見した強陰性荷電被膜をもつ細胞については、何か別の立場で論じられるべきかもしれない。

本研究でしめした強陰性荷電被膜をもつ神経 細胞はヒトやネコの脳にも存在し(未発表),こ の種の細胞は脊椎動物には広く存在すると思われる.

陽性荷電鉄コロイド染色を省くと、プルシア

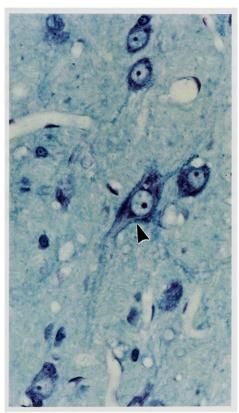


Fig. 3 Light micrograph of the rat zona incerta, which was incubated in the fine cationic iron colloid at pH value 1.5, treated for Prussian blue reaction, and counter-stained with carbol-thionin. Arrowhead indicates a large neuron the external surface of which shows a strong Prussian blue reaction. ×500.

ンブルー反応は起らない、従って、上述の神経 細胞を被う強いプルシアンブルー反応は陽性荷 電鉄コロイドとプロテオグリカンの結合に起因 することは明らかである.

結 語

ラットの脳をグルタールアルデヒド潅流固定 後切片とし,陽性荷電鉄コロイドとカルボール・ チオニンあるいはケルンエッヒトロートで染色 したところ,相当数の神経細胞が強い陰性荷電 をもつ被膜(プロテオグリカン)によって被わ れていた。これらの神経細胞は海馬台,前橋核, 不確帯,大脳皮質第V層,小脳内側核等に多く

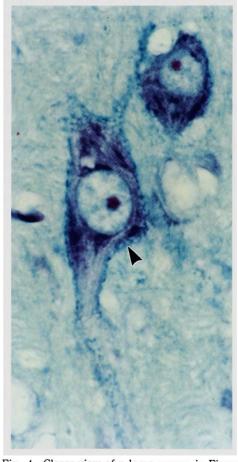


Fig. 4 Closer view of a large neuron in Figure 3. Note that the external surface of this neuron shows a strong Prussian blue reaction (arrowhead). ×1300.

認められた、海馬領域における分布状態からみると、強い陰性荷電被膜をもつ細胞は Vicia villosa アグルチニンに親和性をもつ GABA 性神経 抑制系神経と思われるが、同じ GABA 性神経 といわれる小脳のプルキンニエ細胞は強い陰性 荷電被膜をもたない。しかし一方で、非 GABA

性である前橋核の細胞群は強い陰性荷電被膜をもつ.これらのことは本研究で発見した強い陰 性荷電被膜をもつ神経細胞群は何か別の立場で 論じられなければならないことを示しているよ うに思える.

文 献

- Murakami T, Taguchi T, Ohtsuka A, Sano K, Kaneshige T, Owen RL and Jones AL: A modified method of fine-granular cationic iron colloid preparation: its use in light and electron microscopic detection of anionic sites in the rat kidney glomerulus and certain other tissues. Arch Histol Jpn (1986) 49, 13-23.
- 2) 大塚愛二, 宇野芳史, 田口勇仁, 村上宅郎:陽性および陰性荷電鉄コロイドによる組織・細胞荷電基の光顕ならびに電顕的検出. 岡山医誌 (1991) 103, 11-18.
- 3) Ohtsuka A and Murakami T: Fine anionic iron colloid and its use in light and electron microscopic detection of cationic sites in the rat kidney. Arch Histol Jpn (1986) 49, 543—552.
- 4) Fujita SC, Tada Y, Murakami F, Hayashi M and Matsumura M: Glycosaminoglycan-related epitopes surrounding different subsets of mammalian central neurons. Neurosci Res (1989) 7, 117—130.
- 5) 池田順一,川上速人,浅野 務,高田邦昭,平野 寛,平川公義:砂鼠海馬神経細胞の糖鎖構造について ーレクチン法による組織化学的解析 一. 脳神経(1991) 43,539-543.
- 6) Mulligan KA, Van Brederode JFM and Hendrickson AE: The lectin *Vicia villosa* labels a distinct subset of GABAergic cells in macaque visual cortex. Visual Neurosci (1989) 2, 63-72.
- 7) Drake CT, Mulligan KA, Wimpey TL, Henderickson A and Chavkin C: Characterization of *Vicia villosa* agglutinin-labeled GABAergic interneurons in the hippocampal formation and in acutely dissociated hippocampus. Brain Res (1991) 554, 176—185.

Central nervous cells with strongly negatively-charged surface-coats

Takuro Murakami, Takehito Taguchi and Aiji Ohtsuka Second Department of Anatomy,

> Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan

(Director: Prof. T. Murakami)

Light microscopy of tissue sections stained with cationic iron colloid (pH 1.0-2.0) and nuclear fast red or with this colloid and thionin revealed the presence of numerous neurons with a strong negative-charge or coated with sulfated proteoglycans such as chondroitin sulfates in the adult rat brain. These neurons were distributed mainly in the hippocampal subiculum, zona incerta, cerebral cortex (V lamina), medial cerebellar nuclei and certain other nuclei such as ventral pontine nuclei. In the hippocampal formation, the strongly negatively-charged cells seemed to be identical with the GABAergic inhibitory interneurons reactive to the lectin *Vicia villosa* agglutinin. The neurons, including the GABAergic Purkinje's cells, of the cerebellar cortex showed no reaction to the cationic iron colloid at pH 1.0-2.0. Many non-GABAergic large neurons of the ventral pontine nuclei were well reactive to the colloid at pH 1.0-2.0. These findings suggest that the cationic iron colloid at pH 1.0-2.0 mainly stains some subsets of GABA-ergic neurons, and additionally stains some non-GABAergic interneurons projecting long association or commissural fibers.