京都大学医学部, 解剖学教室, 第1講座 (指導: 岡本道雄教授と小川和朗博士).
Dept. of Anat., Kyoto Univ., Sch. of Med., Kyoto (Director: Prof. M. OKAMOTO,
Supervised by: Dr. K. OGAWA).

リゾゾームと色素顆粒.

1. ラッテ小脳 Purkinje 細胞.

Lysosomes and Pigment Granules.

I. In PURKINJE Cells of the Rat Cerebellum.

篠 永 安 幸 Yasuyuki SHINONAGA

(Received March 3, 1962.)

酸性ホスファターゼがリゾゾームとの関連において注目を浴びて以来, 齧歯類の小脳皮質内の Purkinje 細胞にもリゾゾームと推定される顆粒が存在するとの報告が2—3発表されている (Becker と Barron 1961, Barron 1961).

一方肝実質細胞内リゾゾームは肝実質細胞内リポフスチン形成と密接な関係があるとの Novikoff 一派の最近の報告がある (Essner と Novikoff 1960, 1961) ので, Purkinje 細胞内リゾゾームとセロイド乃至リポフスチン等の色素顆粒との関係を幼若ならびに老令 Wistar 系ラッテを用いて, 組織化学的に追求した.

I. 材 料 と 方 法

材料: 正常な Wistar 系幼若 (体重 80—100 g) ならびに老 (体重 360 g 前後) ラッテの小脳を用いた. 動物を無麻酔にて頸部挫折により屠殺したのち, 直ちに開頭して小脳を剔出し, 以下の如き諸種の染色を応用した.

酸性ホスファターゼ (ACP): Gomori の改良法を用いた. 詳細は既報してある (小川等 1960).

アルカリ性ホスファターゼ (ALP): Gomori のカルシウム-コバルト法 (小川等 1960) を用いた.

過ヨード酸-Schiff (PAS) 法: ホルモールカルシウム固定液で組織を1週間固定のち, クリオスタット切片, およびパラフィン切片を作り, 染色した.

過蟻酸-Schiff (PFAS) 法: Pearse (1960) 及び Lillie (1954) の各法をパラフィン切片に応用した.

プラズマール反応: 未固定クリオスタット切片で行なった.

Schmorl 反応: ホルモールカルシウム固定のクリオスタット切片ならびにパラフィン切片を用いた.

Ziehl-Neelsen 染色: パラフィン切片を用いた.

ズダン黒 B 染色: パラフィン切片を用いた.

ズダン IV 染色: ホルモールカルシウム固定のクリオスタット切片およびパラフィン切片を用いた.

ニール青 (硫酸塩) 染色: ホルモールカルシウム固定のクリオスタット切片およびパラフィン切片を用いた.

メチール緑染色: パラフィン切片を用いた.

トルイジン青染色: パラフィン切片を用いた.

中性紅染色: パラフィン切片を用いた.

アンモニア性硝酸銀還元能: ホルモールカルシウム固定のクリオスタット切片を用い, Bielshowsky 法に依り銀染色を行なった.

オスミウム酸還元能: パラフィン切片を用いた.

ヘマトキシリンエオジン染色: パラフィン切片を用いた.

以上用いた諸法の詳細は, 既出の論文 (小川等 1960) 乃至 Pearse (1960), あるいは Lillie (1954) を参照した.

位相差顕微鏡 (dark contrast) 観察: ホルモールカルシウム固定のクリオスタット切片を用いた.

螢光顕微鏡観察: パラフィン切片を用い, 一次螢光, 二次螢光および, 1% アクリジンオレンジでの染色後の標本を螢光顕微鏡により観察した.

消化試験: パラフィン切片を用い, 37°C にて次の消化液中に所定の時間浸漬後, PAS 染色を行なって効果を判定した.

1. 唾液による消化: 1—2 時間浸漬した.

2. ジアスターゼによる消化: 1% 局方ジアスターゼ水溶液 (PH 7.0) に切片を 1—24 時間浸漬した.

II. 成 績

酸性ホスファターゼ (ACP) 活性. 黒褐色の ACP 陽性顆粒 (リゾゾーム) が全ての Purkinje 細胞内に多数見られた (図 1, 2, 4, 5). 樹状突起の中にも陽性顆粒が認められた (図 2). 形は球状を呈し, 時に小輪状に陽性に出ることもあった. 陽性顆粒の大きさは直径 0.1—2.5 μ で, 種々である. 一般に 1 μ 以上の顆粒は細胞周辺部に偏在するものが多く, また axon hillock の部にも多数集積する傾向がある. 2.5 μ 前後の巨大顆粒は, 通常数箇の顆粒の集積より成っているのが認められ

Fig. 1. Note acid phosphatase (ACP) positive granules, lysosomes, in the cytoplasm of the PURKINJE cell of young rat cerebellum. No coarse granules are observed. $\times 900$.

Fig. 2. Lysosomes in the dendrites of the PURKINJE cell (an arrow) are noted. Young rat. $\times 900$.

Fig. 3. Lysosomes in a macrophage of rat cerebellum. $\times 900$.

Figs. 4 & 5. Lysosomes in the PURKINJE cell of old rat cerebellum. Fine as well as large and coarse granules are positive for ACP. Large and coarse granules have tendency of unilateral localization in the cytoplasm. $\times 900$.

た。1 μ 以上の顆粒の出現頻度は一般に老ラットに高く(図4, 5), 単位細胞内の顆粒総数も老ラットほど多い様である。また貪喰細胞にも著明な ACP 活性が認められた(図3)。

アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性. 本酵素陽性顆粒は認められなかった。

PAS 法. Purkinje 細胞内 PAS 陽性顆粒の形, 数, 大きさ, 分布状態等はリゾゾームのそれと同様であり(図6, 7), かつ, 固定クリオスタット切片とパラフィン切片では, PAS 陽性顆粒の形, 数, 大きさ, 分布状態, 等に余り著明な差は認められなかった。

PFAS 法. 本法陽性の顆粒については, 幼若ならびに老令ラットとも PAS 染色の所見と同様であった。

プラズマール反応. 顆粒は染色されなかった。

Schmorl 反応. 本法陽性顆粒は老令のラットの Purkinje 細胞に認められる事が多かったが(図8), 幼若ラットにも, 時に認められた。Schmorl 陽性顆粒数は一般に, PAS 陽性顆粒数より著しく少ない。かつ1 μ 以上の大きいもののみ陽性であった。

Ziehl-Neelsen 染色. 殆んど全ての Purkinje 細胞に鮮紅色の顆粒が認められた。形, 数, 大きさ, 分布状態等については, PAS 陽性顆粒と全く同様な所見が認められた。

ズダン黒 B 染色. 殆んど全ての Purkinje 細胞中に本法陽性顆粒を認めた。その形, 数, 大きさ, 分布状態等は PAS 染色の場合と同様であった。

ズダン IV 染色. 明瞭にズダン IV 好性の顆粒の存在を確認する事は困難であった。

ニール青(硫酸塩)染色. 深青色の陽性顆粒が認められた。分布状態等については, PAS 染色の所見と同様であった。

メチール緑染色. 濃青色(正染色)―薄紫色(異染色)に染まる顆粒が多数認められた。

トルイジン青染色. 青色に着染した顆粒の存在が認められた。形, 数, 大きさ, 分布状態等は PAS のそれと同様であった。

中性紅染色. 紅色に着色した顆粒が認められ, そのほかは PAS と同様な所見が得られた。

アンモニア性硝酸銀還元能. 直接アンモニア性硝酸銀を還元する能力は殆んど無いが, Bielschowsky 鍍銀法では嗜銀性が認められた。

Fig. 5. See page 378.

Fig. 6. Old rat cerebellum. Fine as well as coarse granules are positive for PAS reaction. $\times 720$.

Fig. 7. PAS stain. Old rat cerebellum. Large granules are in focus. $\times 900$.

Fig. 8. SCHMORL's reaction. Old rat cerebellum. Mainly large and coarse granules are positive for SCHMORL's reaction. $\times 900$.

オスミウム酸還元能. 1%オスミウム酸を軽度還元した.
ヘマトキシリンエオジン染色. ヘマトキシリンの色をとり, 好塩基性が認められた.

位相差顕微鏡 (dark contrast) 観察: 暗黒の細胞内顆粒を認めた.
螢光顕微鏡観察. 強い一次螢光は認められなかった. グリセリンと硫化アンモンを等量に混じた液を滴下して観察すると, 可成り強い二次螢光が認められた. 1%アクリジンオレンジで染色した場合, 黄褐色の螢光を認めた.

消化試験.
1. 唾液による消化. 顆粒の形態に何ら変化を認めなかった.
2. ジアスターゼによる消化. 顆粒の形態に何ら変化を認めなかった.

III. 考 察.

表 1 に総括してある染色所見は, Purkinje 細胞内顆粒のうち, 微細なものは従来セロイドと云われていた色素, および粗大なものはリポフスチンと云われていたものに相当する事を示している (Wolf と Pappenheimer 1945, Dixon と Herbertson 1950,

Table 1. Staining properties of intracellular granules of PURKINJE cells.

Staining methods	Results
Acid phosphatase	positive
Alkaline phosphatase	negative
PAS	positive
PFAS	positive
Plasmal reaction	negative
SCHMORL's reaction	only coarse granules positive
ZIEHL-NEELSEN	positive (acid fast)
Sudan black B	black
Sudan I V	unstained
Nile blue sulphate	blue
Methyl green	purplish blue (metachromatic)
Toluidine blue	purplish blue (metachromatic)
Neutral red	brick red
Silver reduction	argentophilic
Osmium reduction	osmiophilic
Hematoxyline and eosin	basophilic
Acridine orange	yellowish orange

Pearse 1960). 一方これらの色素顆粒はACP陽性であるので, de Duve の云うリゾゾームの概念に一致する. リポフスチンがリゾゾームという細胞内小器官 (organelle) に属するという事は Novikoff 一派が肝実質細胞を用いて証明している (Essner と Novikoff 1960, 1961). リポフスチンのみならず, その前段階的色素と解釈されるセロイド (Pearse 1960) もリゾゾームといわれる細胞内小器官に属するのである事が本研究の結果証明された訳である.

Essner と Novikoff (1961) は肝実質細胞で電顕的に, microbody と呼ばれる顆粒もリゾゾームに属するという事を報告しているが, Holt と Hicks (1961) は microbody には ACP は陰性であるとしており, この点, 所見に相異がある. 生化学的にも de Duve らはリゾゾームとは異り, Uricase, Catalase 等を主に含む小顆粒

の存在を推定しているが、これらの点に関してはなお詳細な生化学的、組織化学的、あるいは電顕的な研究が必要であると思われる (Novikoff 1961).

リポフスチンの起源に関しては、従来、糸粒体から出来るという説 (Hess 1955, Duncan 等 1960), 核から生ずるという説 (Dolley 1917), Golgi 装置により形成されるという説 (Gatenby と Moussa 1951, Bondareff 1957, Ogawa 等 1962) およびリゾゾームが変化をしたものであるという説 (Essner と Novikoff 1961, Ogawa 等 1962) 等の諸説があるが、現在の所は定説はない。我々はリゾゾームという細胞内小器官に属するセロイド、あるいはその前段階的なものが Golgi 装置により形成され、それが、より成熟して従来いわゆるリポフスチンと云われて来た色素顆粒になるものと推定している。色素として完全に成熟した顆粒には ACP あるいはエステラーゼ活性が低いか、あるいは、も早認められないという報告もある (Heidenreich と Siebert 1955, Essner と Novikoff 1961). 色素の Golgi 装置発生説を裏付けるものとして Caro (1961) の興味深い報告がある。Caro は脾臓の細胞を用いて電顕とラジオオートグラフィの組合わせによる方法に依り、Golgi 装置、特に Golgi 空胞に蛋白合成能がある事を報告している。

リポフスチンあるいはセロイドは古くより老化現象に関係があると云われている (Lillie 1954, Andrew 1952). 然し Levi (1946) は 81 才の人の中樞および末梢神経系の神経節で色素顆粒の認められない例を報告している。一方胎生 6—7 ヶ月の胎児あるいは 6 才の小児の脊髓神経節、8 才の学童の脊髓、20 才の青年の大腦皮質等の諸例にリポフスチンが認められている (Hild 1959, Reiser 1959) ので、リポフスチンの出現と老化現象はある程度の関連性はあるが、必ずしも老年に特徴的な現象であると云い切る事は出来ないようである。むしろ、一般的に、老化現象という漠然としたものに対応せしめるよりも、老化現象とは細胞の代謝の面からすれば如何なる現象であるかという事を追求する事が必要であろう。

蛙の植物神経系の神経節細胞では季節により、リポフスチンの出現度が異り、秋には少く、冬に多いという (Reiser 1959).

また、長期にわたってビタミン E が缺乏すると、肝、卵巣、子宮、精巣、大腦皮質、視床、延髄、脊髓前角細胞、小膠細胞、稀突起膠細胞、内皮細胞、貪喰細胞等にセロイドが形成されるという報告がある (Pappenheimer と Victor 1946, Bicknell と Prescott 1953, Einarson と Telford 1960). ビタミン E が構造上、最近問題になっている糸粒体内電子伝達系に関与している補酵素 Q (CoQ) と非常によく類似している (Green と Lester 1959) ので、この点、色素顆粒形成と細胞内呼吸との関連を示唆するものとして、興味深いものがある。Cytochrome b_3 に関連して色素が細胞内呼吸に何か一役買っているかも知れないという考えもある (Brachet 1957).

尚 Purkinje 細胞に神経分泌様の作用があり、リポフスチンが何らかの形で分泌物の carrier として働いているという報告もある (Shanklin 等 1957).

Sulkin (1953) はリポフスチンにアルカリ性ホスファターゼ (ALP) が陽性である事を報告しているが、我々の所見では陰性であった。培養細胞のリゾゾームでは ACP のみならず、ALP も陽性に出て来る事が報告されているが (Ogawa 等 1961), 切片標本に於けるこの所見の差が何によるものであるかは、現在の所わからない。

IV. 結 語.

Wistar 系の幼若ならびに老令ラットの小脳を用い、Purkinje 細胞内リゾゾームと色素顆粒 (リポフスチンとセロイド) との関係を組織化学的に検索した。その結果、Purkinje 細胞内色素顆粒は、所謂リゾゾームといわれる細胞内小器官に属する事がわかった。すなわち酸性ホスファターゼが色素顆粒形成に密接に関与している事を示すものである。これは肝実質細胞において、Novikoff (1961) が下した同様な結論を支持するものである。

擧筆に当り、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜った岡本道雄教授および小川和朗博士、さらに本研究途上種々援助を惜しまれなかった西藤泰子嬢に深甚な謝意を表します。

Author's Abstract.

Using the cerebellum of young (ca. 100 g of body weight) as well as old (ca. 360 g of body weight) rats of WISTAR strain, the relation of lysosomes in PURKINJE cells to pigment granules such as ceroids and lipofuscins was studied histochemically.

The present investigation revealed that the pigment granules in PURKINJE cells belong to the class of cellular organelles called lysosomes by DE DUVE (1955), indicating the close relationship of the acid phosphatase activity to the pigment formation in PURKINJE cells.

Results obtained in the present study are in good agreement with the report of ESSNER and NOVIKOFF (1961) who studied the relation of lysosomes to lipofuscins in the rodent liver.

文 献.

- Andrew, W.:** Cellular changes with age. Springfield, Ill., Thomas, 1952. — **Barron, K. D.:** Histochemical study of neuronal necrosis produced by intracerebral injection of diphtheria toxin. *Neurology* 11 (1961). P. 714-723. — **Becker, N. H. and K. D. Barron:** The cytochemistry of anoxic and anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Amer. J. Path.* 38 (1961). P. 161-175. — **Bicknell, F. and F. Prescott:** The vitamins in medicine. New York, Grune and Stratton, (1953). — **Bondareff, W.:** Genesis of intracellular pigment in the spinal ganglia of senile rats. An electron microscope study. *J. Gerontol.* 12 (1957). P. 364-369. — **Brachet, J.:** Biochemical cytology. New York, Academic Press, 1957. — **Caro, L. G.:** Electron microscopic radioautography of thin sections; The Golgi zone as a site of protein concentration in pancreatic acinar cells. *J. biophys. biochem. Cytol.* 10 (1961). P. 37-46. — **Dixon, K. C. and B. M. Herbertson:** Clusters of granules in human neurones. *J. Path. Bact.* 62 (1950). P. 335-339. —

Dolley, D. H.: The recovery from depression in the Purkinje cell and the decline to senility of depression; with the incidental histogenesis of abnormal pigmentation. *J. comp. Neur.* 28 (1917). P. 465-493. — **Duncan, D., D. Nall and R. Morales**: Observations on the fine structure of old age pigment. *J. Gerontol.* 15 (1960). P. 366—372. — **Einarson, L. and I. R. Telford**: Effect of vitamin-E deficiency on the central nervous system in various laboratory animals. *Biol. Skr. Dan. Vid. Selsk.* 11 (1960). P. 2-81. — **Essner, E. and A. B. Novikoff**: Human hepatocellular pigments and lysosomes. *J. Ultrast. Res.* 3 (1960). P. 374-391. — Localization of acid phosphatase activity in hepatic lysosomes by means of electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* 9 (1961). P. 773-784. — **Gatenby, J. B. and T. A. Moussa**: The neurone of the human autonomic system and the so-called 'senility pigment'. *J. Physiol.* 114 (1951). P. 252-254. — **Green, D. E. and R. L. Lester**: Role of lipids in the mitochondrial electron transport system. *Fed. Proc.* 18 (1959). P. 987-1000. — **Heidenreich, O. u. G. Siebert**: Untersuchungen an isoliertem, unverändertem Lipofuscin aus Herzmuskulatur. *Virchows. Arch.* 327 (1955). S. 112-126. — **Hess, A.**: The fine structure of young and old spinal ganglia. *Anat. Rec.* 123 (1955). 399-423. — **Hild, W.**: Das Neuron. In Möllendorffs u. Bargmanns Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Bd. 4. 1959. — **Holt, S. T. and R. M. Hicks**: The localization of acid phosphatase in rat liver cells as revealed by combined cytochemical staining and electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* 11. (1961). 47-66. — **Levi, G.**: Accrescimento e senescenza. Florence. La Nuova Italia, 1946. Cited in **Andrew, W.**: Structural alterations with aging in the nervous system. *Proc. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 35 (1956). P. 129-170. — **Lillie, R. D.**: *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. New York, Blakiston Co. Inc., 1954. — **Novikoff, A. B.**: Lysosomes and related particles. In 'The Cell' ed. by Brachet and Mirsky, Vol. 2. New York, Academic Press, 1961. — 小川和朗, 水野昇, 橋本健, 藤井園三, 岡本道雄: 培養神経組織の細胞化学. III. 染色法補遺—特に Lysosome に就いて, 京都大学医学部, 第一解剖論文集, 4 (1960) 頁 1-15— **Ogawa, K., N. Mizuno and M. Okamoto**: Lysosomes in cultured cells. *J. Histochem. Cytochem.* 9 (1961). P. 202. — **Ogawa, K., Y. Shinonaga and T. Suzuki**: Electron histochemical demonstration of acid phosphatase activity in the rat cerebellum. *J. Electronmicrosc.* (1962). In press. — **Pappenheimer, A. M. and J. Victor**: 'Ceroid' pigment in human tissues. *Amer. J. Path.* 22 (1946). P. 395-413. — **Pearse, A. G. E.**: *Histochemistry, Theoretical and Applied*. London, Churchill Ltd., 1960. — **Reiser, K. A.**: Die Nervenzelle. Möllendorffs u. Bargmanns Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Bd. 4. 1959. — **Shanklin, W. M., M. Issidorides and T. K. Nassar**: Neurosecretion in the human cerebellum. *J. comp. Neur.* 107 (1957). P. 315-337. — **Sulkin, N. M.**: Histochemical studies of the pigments in human autonomic ganglion cells. *J. Gerontol.* 8 (1953). P. 435-445— **Wolf, A. and A. M. Pappenheimer**: Occurrence and distribution of acid-fast pigment in the central nervous system. *J. Neuropath. exper. Neurol.* 4 (1945). P. 402-406.