濃染神経細胞に関する実験的、組織化学的研究*

Experimental and Histochemical Studies on the Hyperchromic Neurons

前田 敏博 (Toshihiro MAEDA)

Received June 2, 1966

濃染神経細胞に関する研究は前世紀以来のものであり、その報告は枚挙にいとまがない。しかしその意義に関しては実に多種多様の意見があり (TEWARI と BOURNE 1963, FRIEDE 1963 参照)、結局は生理的に意味のある細胞か、あるいは人工産物に過ぎないかが論争されて来た。最近 CAMMERMYER (1961), FRIEDE (1963) らは広汎な実験的研究により、これらは細胞の機械的萎縮による濃縮の結果であり、いわば人工産物であると結論した。すなわち死後材料採取時の手術的圧迫や、病的原因による細胞膜の傷害が細胞質の滲透圧を低下させ、組織液や固定液の滲透圧との関係で細胞の萎縮が起こることを示した。しかしこの実験はあくまでも萎縮を原因とする濃染細胞の発現機序を明らかにしたものであり、濃染細胞が生理的に存在する可能性を否定しているとは考えられない。ことに EINARSON (1957) はガロシアン染色による Nissl 像を 5 型に分け、これが細胞機能と関連することを述べ、濃染が極度の場合 不可逆の硬化、萎縮に至るとしている。

さて清水らは十数年来、脳のグリコゲン代謝の組織化学に従事しているが、とくに脳幹の橋網様体核、三叉神経中脳路核では、正常動物において、ある細胞はグリコゲンを含み、あるものはこれを含まず、動物を実験条件下 (インシュリンショック、飢餓) に置くとグリコゲン保有細胞が増加するが、条件が停止すると回復することを観察している。私は最近貧血動物脳を観察するうち、細胞内グリコゲン消長と Nissl 像との間に密接な関係が存在することを見出したので、正常動物脳におけるグリコゲン保有細胞をも含めて、広くグリコゲン代謝と塩基好性との間の関連を追及し、あわせて萎縮、濃染の問題にも検討を加えた。なお本論文における濃染細胞とは、上記 EINARSON の考え方に従い、正常より萎縮濃染に至る広範囲のものを包含している。

材料と方法

体重 2.2~3 kg の雄カイウサギ 39 羽を 2 群に分ち、1 群 (25 羽) は固定染色標本とし、他 (14 羽) は新鮮凍結切片とした。動物はすべてネンブータル麻酔 (30 mg/kg) をほどこし、実験動物は一侧の大腿動脈で血圧を描写しながら他側の動脈より採血、正常血圧 (90 mm~100 mmHg) の $\frac{2}{3}$, $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{5}$ に保ち、各々適当な時間生存させた。すなわち生存時間は $\frac{2}{3}$: 15 分, 45 分, 90 分; $\frac{1}{3}$: 20 分, 40 分, 45 分, 90 分, 180 分, 200 分; $\frac{1}{5}$: 40 分, 56 分である。固定標本のためには Orth の液 250 cc を左心室より生体注入の後 (約 30 分)、Rossman の液で固定 (24 時間) (SHIMIZU と KUMAMOTO 1952)、10 μ の連続パラフィン切片とし、各種染色をほどこした。新鮮凍結切片のためには断頭、摘出の後ただち

* 故関正次教授を追悼して。

にドライアイスにて凍結し、クリオスタットで 20μ の切片とした。正常(対照)動物例としては血圧測定後死亡させたものと、それをはぶいたものを用いた。

染色は核酸に対してガロシアンニン染色 (EINARSON 1957), G* に対しては PAS* 染色 (McMANUS 1948, PEARSE 1960 参照), 蛋白染色としてはテトラゾニウム結合反応 BURS-TONE 1955, PEARSE 1960 参照) 一般染色として H-E* 染色をほどこし, 消化実験として RNase*, α -および β -amylase 消化を行なった。

酵素活性としては, SD* (NACHLAS ら 1957, PEARSE 参照), LD* (NACHLAS ら 1958, PEARSE 1960 参照), Ald* (ABE と SHIMIZU 1964), G6PD* (NACHLAS ら 1958, PEARSE 参照) および Plase* を検索したが, Plase は竹内法 (1956) と堀法 (1964) を併用し, 前者ではアルコールを除去し α -, β -amylase 消化を行ない (TAKEUCHI 1958) branching enzyme を調べた。また UDPG* G transglucosylase (TAKEUCHI と GLENNER 1961) をも調べたが染色されにくかった。

パラフィン切片では相隣る切片に異なる染色をほどこし同一の細胞を鏡検した。

* 略語: G グリコゲン; PAS 過沃素酸 Schiff; H-E ヘマトキシリン-エオジン; RNase ribonuclease; SD, LD, G6PD こはく酸-, 乳酸-, グルコース 6 磷酸-脱水素酵素; Ald アルドラーゼ; Plase フォスフォリラーゼ; UDPG, uridine diphosphate-D-glucoside; Nvm 三叉神経中脳路核; Nrp 橋網様体核; Nxd 迷走神経背側核。

所 見

前述のように研究の目的を主として G 代謝と細胞の塩基好性に置いたので, 観察は主に a) 常に G が多くの細胞体中に証明される Nvm, b) 細胞により G 含有量に非常な差の見られる Nrp, c) 細胞体中にほとんど G が証明されない Nxd, および d) 大脳皮質に限定した。

I) 正常動物の脳の所見

a) 三叉神経中脳路核 (Nvm*)

この核の細胞は一般に大型卵円形細胞と考えられているが, 詳しく観察すると大型円形から小型長楕円形のものまで種々の大きさの細胞がある。一般に細胞体中には多量の G を保有しているが, その量も細胞によってかなりの差が見られる (図 5)。最も強く PAS に染まる細胞は最も小型のものであるが, α -amylase 消化に一部抵抗性を示し若干の糖蛋白を含有すると考えられる。大型の丸い細胞は淡染するか全く陰性であり, 中型楕円形細胞は中等度 PAS 陽性であり, そのすべては G よりなっている。ガロシアンニン染色で見ると PAS 強度陽性小型細胞は大, 中型細胞に比べ濃染している。大, 中型細胞体中にはこまかい点状の Nissl 小体が Axon hillock を除いて均一に散在し, 少量の大型 Nissl 小体が細胞膜に接近して存在するが, 小型濃染細胞では顆粒状 Nissl 小体が密につまり, 細胞周辺部に存在する Nissl 小体は極度に濃染し, かつ小体間の細胞質がやや濃く染まっている。また核もやや濃染し核小体も大きく見える。小型細胞で淡染するものが少数見られるが, それは少量の G を含有し, 少数の比較的大型の淡染する Nissl 小体が見られ, 核小体も淡染する。テトラゾニウム結合反応による蛋白染色では, 小型 PAS 強陽性細胞がやや強く

陽性に染まる。H-E でも同様の傾向に染められるが、小型細胞の細胞質は強いエオジン好性を示す。なお本核の細胞体および樹状突起中に存在する G は全く一樣な状態で、Nissl 小体とはなんら関係が見られない。

酵素反応で最も著しいちがいを見せるのは Plase 活性である(図 6)。円形大型細胞は全く陰性で中型細胞の活性が最も強く、小型には陽性のものと微弱ないし陰性のものがある。竹内法によると本核の強陽性細胞は紫色に、また弱陽性細胞は赤褐色に染まるが、 β -amylase で消化すると強陽性細胞にのみ弱い赤褐色が残る、若干の branching enzyme の存在がうかがえる。SD は大型より中型細胞がやや強い活性を示し小型細胞は弱い。同様の傾向を Ald, LD 活性は示すが、やや不著明である。これらに反し G6PD は大型細胞に弱く、中型、小型細胞と順次著明に活性を高める(図 7, 8)。

b) 橋網様体核(Nrp*)

本核の主要成分は紡錘形ないし星状の大型細胞であるが、PAS 染色に対する態度は個々の細胞によって非常に異り、ほぼ次の 4 型に分類できる(図 9, 10, 11)。I 型：もっとも大型の細胞で G の全く証明されないもの。II 型：細胞内はほぼ陰性であるが、細胞膜にそって周囲に G 顆粒が存在するもの。III 型：細胞内に中等度から多量の G が存在するが、ほとんど Nissl 小体に一致した像を呈するもの。IV 型：強度の PAS 陽性を示し小体を含めて一樣に染まり、一部は α amylase で消化されない糖蛋白様物質を含むもの。もちろんこれらの中間型と考えられる細胞もあり、また特に III, IV 型では同型といえども個々の細胞で程度の差が著しい。このほかに少数ではあるが、ほとんど α -amylase に消化されない糖蛋白様物質よりなる極端に小さな細胞があり、多枝状の樹状突起を PAS 染色で追求することができる。

これをガロシアンニン染色で観察すると次のようになる。I 型細胞は大型の淡染する Nissl 小体が細胞体中に典型的に排列し、その間に微細な Nissl 小体が散在する。核質は淡染し、かなり濃く染まる丸い核小体が通常 1 個ある。II 型細胞は細胞膜直下に存在するいくつかの大型 Nissl 小体が濃染している以外は I 型と変らない。III 型細胞になると大型 Nissl 小体のうち濃染するものが増加し、細胞質周辺部以外にも見られ、核小体は一層濃染する。多量の G が証明される細胞では、ほとんど全ての Nissl 小体が濃染し、細胞はやや小型となる。Nissl 小体と核小体の濃染は RNase で完全に消失する。IV 型細胞は一般に Nissl 小体が濃染すると同時に小体間の細胞質、核質、核小体いずれも幾分濃染し、細胞は一層小型となる。RNase で消化しても細胞質、核質、核小体の一樣な染色性は残る。H-E 染色によっても同様の所見を呈し、IV 型細胞は強いエオジン好性を示す(図 11)。蛋白染色によっても IV 型細胞は強度陽性に染まる(図 12)。まれに III, IV 型細胞では濃染する核小体が 2 個存在する。このほか少数存在する大量の糖蛋白を含有する極端な PAS 陽性細胞は、極度に濃染萎縮し、不規則な形態を示し、核も小さく、Nissl 小体や核が判別しがたいものもある(図 9)。

Plase 活性は III 型と思われる中型細胞に最も強く、大型細胞はその周囲に、細胞膜に接して—おそらく G 顆粒存在部位と一致して (II 型細胞)— 活性が見られるが、細胞は陰性

で、小型細胞もまた陰性である（図 13, 左）。ヨード反応で全ての細胞は赤褐色に染まるが、 β -amylase によりほとんど消化されるので、合成多糖体の大部分は小分子 amylose と思われる。SD, Ald, LD 活性は中型細胞が最も強く、大型、小型の順に弱い。逆に G6PD 活性は小型細胞ほど著しい（図 14）。

c) 迷走神経背側核 (Nxd*)

本核は楕円ないし紡錘形の中型細胞よりなり、ほとんどの細胞は中ないし小型のかなり濃染する Nissl 小体が幾分疎につまっている。H-E, 蛋白染色等すべての染色に対してほぼ均一の染色性を示し、特別に濃染細胞は見当らない（図 15）。G は細胞間に大量存在するのみで、細胞体内には見られないか、僅か存在する場合も細胞の一側に偏して見られる（図 16）。Plase は細胞間に強い活性があるのみで細胞内は全て陰性であり、また G6PD 活性は全てに強く、SD, Ald, LD は全てに弱い。

d) 大脳皮質

G は非常に微細な顆粒として細胞間に存在し、細胞内には見られない。錐体細胞には少量の Nissl 小体があるが樹状突起、細胞体ともに総じて明るい。細胞によって若干の染色性のちがいは認められるが、さほど明らかではない。所々に極度の萎縮濃染細胞が見られることがあるが、PAS 陽性は示さない。Plase 活性も細胞内は陰性で、細胞間にのみ見られる。

II 貧血動物の脳の所見

大腿動脈での血圧が $2/3$, $1/3$, $1/5$ という貧血条件下の脳の変化の大きさは、血圧値よりむしろ貧血時間の長さにより影響され、一般に時間経過とともに細胞間 G は除々に減少し、200 分でさらに著明となる。一方脳幹のいくつかの細胞群には時間とともに細胞内が PAS 陽性となった濃染細胞が増加し、除々に萎縮するが、軽度のものが多く、極端な小型細胞は増加しない。細胞間 Plase は貧血短時間で活性を上昇させ長時間持続する。

Fig. 1. Changes in enzymatic activities, glycogen content and chromophilia of the medium sized nerve cell in the nucleus of the mesencephalic tract of the fifth nerve during experimental anemia.

a) 三叉神経中脳路核 (Nvm) (図 1)

全体として大きな変化を示さないが、長時間 ($1/3$, 200 分) を経ると全ての細胞に G の増量が認められる。しかし染色性と細胞の形態は対照に比べてあまり変化がない。酵素活性では、はっきり差の認められるのは Plase のみで、短時間 ($1/3$, 45 分) ではやや不著明であるが、 $1/3$, 90 分でかなり活性が上昇し、 $1/3$, 200 分でも持続する。SD, Ald, LD はやや活性を低下しているが、G6PD の変化は著明でない。

橋網様体核 (Nrp) (図 2)

Nvm と異なり著明な変化をたどる。

短時間 ($1/3$, 20分, 40分; $1/5$, 40分) で最も多く見られるのは, G 顆粒が細胞周囲に集合し細胞内には少なく, また Nissl 小体は細胞周辺部の一二を除き淡染する II 型細胞である (図17). 時間の経過とともに ($1/5$, 60分; $1/3$, 180分, 200分) PAS 陽性の濃染神経細胞が著明となる (図18). その形状は正常時の III~IV 型細胞に匹敵するものが多く, 濃染性の大部分は Nissl 小体の濃染によっており萎縮も少ない. PAS 陽性物質は β -amylase に全く影響されず多くは真の G であるが, 若干の α amylase 抵抗物質を含んでいる. 長時間のものには典型的 I, II 型細胞はほとんど存在しない.

酵素活性の変化もまた著明で, 短時間 ($1/3$, 45分) で Plase, G6PD 活性の上昇, SD の低下が見られ, $1/3$, 90分になると Plase が活性をやや低下し, G6PD 活性は上昇を (図19), SD 活性は低下を続け (図20), 長時間 ($1/3$, 200分) になると SD の活性は著明に低下し, Ald, LD はこれに準じ, 逆に G6PD は強度陽性となる. Plase 反応では強陽性の細胞は見られなくなり, 中等度から微弱, 陰性の細胞がすべてとなる (図13, 右).

Fig. 2. Changes in enzymatic activities, glycogen content and chromophilia of the medium sized nerve cell in the pontine reticular nucleus during experimental anemia.

Fig. 3. Changes in enzymatic activities, glycogen content and chromophilia of the nerve cell in the dorsal nucleus of the vagus nerve during experimental anemia.

酵素活性の変化は著明でないが, G6PD は上昇の, SD, Ald, LD は減弱の傾向を示す. Plase 活性は細胞間では上昇を示すにもかかわらず, 細胞内はつねに陰性である.

d) 大脳皮質

c) 迷走神経背側核 (Nxd) (図3)

正常時細胞内に G をほとんど含まないこの細胞群が, 貧血時間進行につれ細胞内に G を保有するようになる. すなわち $1/3$, 20分ですでに出現し, 200分で著明に PAS 陽性となり (図16), 長時間のものでは一部 α -amylase 抵抗性の糖蛋白様物質を認める. ガロシアニン染色による濃染性は G 出現よりもかなりおくれ, 明確となるのは $1/3$, 180分, 200分であり (図15), 濃染は Nissl 小体間の細胞質が主体である. 同時に細胞, 核ともにやや萎縮し核も濃染するが, 最後まで全ての構造を識別することができる.

細胞の貧血による大きな変化をほとんど認めることができない。細胞間 G の減少は脳幹部より早く $1/3$, 200 分ではほぼ消失するが、細胞内に G の出現は見られない。染色性にも見るべき変化はない。細胞間 Plase の活性は長時間でもなお上昇したままである。

考 察

濃染神経細胞が人工産物であるか否かの議論が混乱している原因のひとつに、各々が対象とした濃染細胞の種類（あるいは程度）のちがいが無視されていることが挙げられる。例えば 暗調細胞, 濃縮細胞, 萎縮細胞 などの用語が、あたかも濃染細胞と同義語のようにしばしば用いられているが、これは極端な萎縮濃染細胞のみをとらえて全てを論じているからにはかならない。なるほど一般に濃染細胞は多かれ少なかれ萎縮像を示すので、単なる濃縮による濃染の機序が考えられるのももっともであり (FRIEDE 1963), 事実その範疇に入るものも多いと考えられる。しかしながら本来濃染細胞は細胞質の染色性によって分類されるべきものであり、萎縮のみに眼をうばわれるべきではなからう。

一方 EINARSON (1957) はガロシアンニン染色と紫外線吸光度を比較して、前者がほぼ定量的に核酸を染めることを示すとともに、その染色性は細胞の機能的あるいは病的状態に応じて変化するとして、神経細胞を 5 型に分類した。すなわち正常あるいは通常の染色性を示すものを Chromoneutral cells とし、それより濃染するものを hyperchromatic or moderately chromophilic cells, その上を extremely chromophilic cells と呼び、moderate chromophilia に hyperchromasia の語を与えている。彼に従えば、ひとつの核ないし亜核を形成する同種の細胞群でも、細胞によって機能状態を異にすれば、染色性にちがいが生じ、そのさい通常の染色性をこえるものは濃染神経細胞とされると考えられる。したがって本研究では、正常動物において Nvm, Nrp に色々の程度の濃染細胞を認めることができたが、これらの核は細胞個々の機能状態のちがいの振幅が、ほぼ一律の染色性を示す核の細胞群に比べてより大きいものと考えられることもできる。

さてその濃染細胞の形態を見ると、ほとんどは多少とも小さく、濃染と萎縮の間に密接な関係の存在することを想像させる。しかしながら軽度の濃染は見るときの萎縮を伴わないし、また最初に濃染性を示す構造物は明らかに Nissl 小体であることからしても、軽度の濃染細胞を例にとる限り、濃染が機械的濃縮の結果とは到底考えられない。また軽度の濃染は RNase で完全に消化されるので、濃染性の出現は核酸の蓄積によるものと思われる。萎縮が著しい細胞には Nissl 小体間に RNase で消化されない染色物質が存在し、蛋白染色も強まるので、この段階の濃染は核酸に加えて蛋白質の蓄積と、それに平行して起る細胞の萎縮による細胞質の濃縮とによるものと思われ、極端なものはいわゆる pyknotic nerve cell (MILLER 1949) と見なされるものと考えられる。以上の点は死後人工的に作られた暗調細胞の濃染の度合が、もともと細胞に存在した塩基好性物質の量に比例していること (CAMMERMYER 1960) とは根本的に異なっている。しかもその濃染が細胞膜に近い Nissl 小体にはじまることは、神経機能と核酸の関係 (HYDÉN 1960, BODIAN 1965) を暗示して興味深い。また核酸合成に役割を演ずると考えられている PPP (BEACONSFIELD 1964) の一員である G6PD の活性がまったく細胞の濃染と一致して変動することも、濃染

と核酸の関係を裏づけている。

さて神経細胞の濃染性と関係をもつ現象で最も注目に価するのは G と Plase 活性の消長である。脳内 Plase は組織化学的にみて G の分布と平行するのみならず、それより広く分布するとされるが (SHIMIZU と OKADA 1957), おそらくその大部分は肝 Plase と同じく G 顆粒と結合しているものと思われ (TATA 1964, SIE ら 1964), 組織化学的にもそれを想像させる所見が得られる。とくに Nrp II, III 型細胞, Nvm 中型細胞では両者の存在様式に完全な一致を認めることができる。かかる脳内 G がいかなる機能と関係するかは、まだ不明な点が多いが (清水 1964), Plase と結合しているものを活性 G と考えるのは妥当であろう。これらと細胞の濃染性との関係を見ると、Plase 活性の低下、活性 G の減少、不活性 G ないし糖蛋白の出現が濃染とよく平行している。すなわち Nxd は貧血によって初めから不活性 G が出現し、おくれで細胞質の濃染がほとんどは Nissl 小体間に始まり、同時に若干の細胞萎縮が起こる。Nrp では活性 G の存在する間に濃染性が Nissl 小体に始まり、次いで不活性 G ないし糖蛋白が Nissl 小体間に証明されると、細胞が濃染され細胞は萎縮してくる。また Nvm の細胞は貧血期間中 G の増加と Plase 活性の上昇が平行し、細胞の濃染は著明でない。

G が Nissl 小体と一致するか否かについて、相反する結果が報告されているが (TORYU 1937, SHIMIZU と KUMAMOTO 1952), 本質的には両者は無関係であっても、Nrp などではその親和性が大なのであろう。態本 (1953) は細胞により G の存在様式が異なり、Nissl 像と一致するものと、しからざる細胞のあることを記載している。

Plase 活性の変動が活性型 a と不活性型 b との変換であるのか、total Plase の変化であるのか問題であるが、反応液に AMP を添加しても全体に反応が強まるのみで、傾向はまったく等しかった。また竹内と平田 (1961), GUHA と WEGMANN (1961) に従い Plase b-kinase の活性化を試みたが、傾向はまったく同様であったので、本研究のそれは total Plase の変動を見ていて考えるべきであろう。断頭によって全ての Plase が活性化されたためとも思われる (BRECKENRIDGE 1962)。

肝 Plase は G の増加で結合型となり、減少消滅で可溶型となるだけで total Plase は変わらないとされているが (TATA 1964, SIE ら 1964), 脳も同様であるとすれば、Plase 活性の低下は酵素の可溶化のため組織化学的に証明が困難になったに過ぎないと考えられるかもしれない。しかし Nvm や Nrp の小型細胞はかなりの G を保有するにもかかわらず、Plase 活性が微弱であるため不活性 G と見なされざるをえなかったし、Nxd の細胞体には貧血によって Plase を伴わない G が出現する。また細胞間 G は貧血によって減少してゆくにもかかわらず、細胞間 Plase の活性は増加し長時間でも持続していることは、脳内 G と Plase の関係は簡単に割切れるものではなく、脳の複雑な構造と機能にからまっていることを暗示している。

脳内 G も肝、筋と同じく G synthetase によって合成され Plase によって分解されるものであり、両系は G6P、無機磷酸などによって拮抗的に調節される一つの cycle をなしているとされる (BRECKENRIDGE 1962, GREVILLE 1964), 竹内 (1958) は脳に branching enzyme

の存在を報告し、また Plase 反応を示すヨード染色が細胞によって青から赤の個有の色を呈することは清水、岡田 (1957) の指摘した通りである。しかし Nrp 細胞体の branching enzyme は正常時、貧血時ともに非常に微弱であり、Nxd は Plase さえも陰性である。また脳内の α -amylase で消化される PAS 陽性物質は β amylase 消化の影響を受けないことから考えれば、貧血時や濃染細胞といえども G-synthetase によって真の G が合成されるものと思われる。組織化学的に UDPG-G-transglucosylase を証明しにくかったのは (TAKEUCHI と GLENNER 1961, 本研究) 切片上で形成される G の即時的崩壊なども考えられるが (HESS と PEARSE 1961, GODLEWSKI 1964), 最も大きな理由は肝、筋に比してあまりに少量 (2—5%) である故であろう (Greville 1963)。最近基質の増量を主体とする反応液の改良によって Nvm や Nrp の細胞体中に本酸素の存在を証明したが、Plase とは筋その他の組織と同様 (HESS と PEARSE 1961, TAKEUCHI 1962, GODLEWSKI 1964) くいちがいを示しているようである (図 22)。

しかしながら、もちろん G が直接濃染しているわけではなく、前述のように濃染性の発現には核酸合成蓄積が第一義的役割を演じているのであり、G 蓄積はまったくの平行現象と思われる。しかし RNase で消化されない染色物質は、おそらく糖蛋白そのものであろう。

貧血実験についてであるが、本研究で用いられた貧血の条件は大腿動脈における血圧を指標としているので、脳中の正確な血圧や酸素供給量を知ることにはできないが、もっとも多く用いた末梢血圧 $1/3$ では脳内でも anemic hypoxia の状態にあると考えられる。従来の in vivo, in vitro における多くの anoxia, hypoxia, ischemia の実験では、神経細胞の変化を塩基性色素に対する染色性の低下、細胞の膨潤、細胞の消失と報告しているが (GRENNEL 1947, MILLER 1949, KRAINER 1958, COHEN 1962 ら)、細胞が残存した場合には萎縮濃染していたとする報告も多い (WEINBERGER 1940, LINDERBERG 1956 ら)。これらの中にあつて FRIEDE (1959) の報告は注目に価する。彼は in vitro において大量の GIP, ATP を含む液に脳組織片を投入したところ、膨潤、消失細胞に混在して濃染細胞が出現し Plase 陽性であったと報告し、“単に物理的に引起こされた傷害または変性と考えるより、むしろ adaptive metabolic stage を示しているもの”と考えた。もっともその後 (1963) 死後傷害を受けて生じた萎縮細胞に G 合成酵素が強い反応を示したもの”と解釈を改め、K イオンの流出が G 合成の増加を生むとして (KLEINZELLER 1957) 萎縮と G 出現を説明している。いずれにしても Plase ないし G が存在する神経細胞が濃染萎縮したことは in vivo の本実験とほぼ一致すると思われる。

貧血実験で濃染細胞が出現して来た網様体や自律系部位は anoxia に対して、大脳皮質、小脳 Purkinje 細胞などに較べてはるかに強い抵抗性を示すことが知られており (HEYMANS 1937, WEINBERGER 1940, GRENNEL 1947, KRAINER 1958 ら)、かかる濃染細胞が単なる変性像とは考えられない。事実追加実験として採血による貧血 (血圧 $1/3$) 2 時間経過後輸血で正常血圧にもどし、24 時間生存させた動物脳を観察したところ、大脳皮質の細胞は全面的にすでに細胞質の空胞化あるいは消失が見られるに対して、Nrp, Nvm はほぼ正常像に近く、Nxd は長時間貧血と同様の像を呈した。また貧血動物脳に見られる細胞間 G の減少に伴う細胞内 G ないし糖蛋白の出現、増加と同様な現象は、飢餓動物 (熊本 1953)、イ

ンシュリンショック動物 (SHIMIZU と INOUE 1952) にも観察されている。しかも飢餓実験で見られた所見は再給食で直ちに正常に復している。

最後に今まで述べた G, 核酸, 蛋白, 解糖, 呼吸などの代謝変動が細胞の染色性と形態の変化にいかに関結びつくのか推論してみたい。一般に神経細胞は hypoxia, anoxia を含めた種々の stress において結果的には ATP の減少によって, 細胞内 K イオンは流出し (DIXON 1949), 逆に Na イオン, 水の流入により細胞は膨潤する (VAN HARRVELD 1962). もし酸素不足が続けば, この状態は回復することなく細胞は嫌氣的解糖を続け, 乳酸が蓄積され acidosis の状態となり (FRIEDE 1963), 諸々の高分子の崩壊が細胞質を高滲透圧とし (CONWAY ら 1955) ますます強く膨潤が起り, 染色性の低下ついには消失となる。これが大脳皮質等に見られる一般的神経細胞の変化であるが, 脳幹にある濃染細胞を含むような細胞群では嫌氣的解糖が低いかおさえられるかしており, GIP, G6P の集積は UDP G G-transglucosylase の活性化, Plase の不活性化, ひいては G 合成蓄積を伴う (BRECKENRIDGE 1962). 一方かかる状態においては PPP が活性化され (GREVILLE 1963) 核酸合成が進み (BEACONSFIELD 1964) — おそらく蛋白合成も起こり — 濃染が始まり, 高分子の合成により細胞内滲透圧は低下し細胞は萎縮する。その結果ますます濃染性が強調され, 固定液によってはおなじ層強調される場合が生じる。このさい神経細胞の必要とする生化的エネルギーはグリア細胞が供給しているのであろう (HYDÉN 1960). ちなみに嫌氣的解糖の強さは尾状核, 大脳皮質に最も高く, 延髄, 脊髓に最も低いとされている (CHESLER と HIMWICH 1944).

阿部 (1965) は脳内 PPP は神経細胞の形態構造の維持に, EMP より TCA-cycle は神経機能の発揮に意味をもつと推論しているが, 濃染神経細胞出現の現象にもこれはあてはま

Fig. 4. Schematic representation of the relation of chromophilia of neuron and glycogen metabolism.

るものと思われる。すなわち濃染細胞は PPP の活性を上昇させているので、なんらかの stress 下であってその構造の維持に努めており、また一方 EMP-TCA-cycle がおさえられているので、神経機能は低下ないし休止している細胞と考えられる。

図 4 は濃染神経細胞発現のさいの変化を模式的に表わしたものである。

結 語

正常カイウサギの脳の三叉神経中脳路核、橋網様体核に存在する濃染神経細胞と、貧血カイウサギの脳の同核および迷走神経背側核に出現する濃染細胞を用いて、とくに塩基性色素に対する染色性とグリコゲン代謝の関係を研究した。

1) 細胞内にグリコゲンを有するものは一般に塩基好性が増し、濃染する Nissl 像を示す。グリコゲンがフォスフォリラーゼ活性を失うか、フォスフォリラーゼ活性をもたないグリコゲンないし糖蛋白が細胞内に出現すると、細胞はさらに濃染萎縮する。

2) 濃染性の出現は Nissl 小体の濃染に始まり、小体間細胞質の濃染に続き、一方細胞体の萎縮はこれより遅れて起こり、濃染性を強調する。

3) 濃染性の増加とグルコース-6-リン酸脱水素酵素活性の上昇はまったく平行し、逆にこれは酸脱水素酵素、アルドラーゼ、乳酸脱水素酵素の活性は低下する。

4) PAS 陽性濃染神経細胞は人工産物ではなく、細胞の機能状態を示すものと思われる。

終始ご懇篤なご指導とご校閲を賜った恩師清水信夫教授に深く感謝の意を捧げます。

Author's Abstract.

Various chromophilic neurons in the normal and experimental anemic rabbit brain were histochemically explored with special reference to glycogen metabolism. The present observations were restricted to the brain stem including the nucleus of the mesencephalic tract of the fifth nerve, pontine reticular nucleus and dorsal nucleus of the vagus nerve. In the normal brain, the nerve cells of the former two nuclei were heterogeneously stained by basic dye from chromoneutrally to hyperchromically with close correlation with PAS positivity, while those of the last nucleus showed the homogeneous chromoneutral staining and negative PAS reaction. Under anemic condition the PAS positive hyperchromic neurons were conspicuously recognized in the pontine reticular formation and the neurons of the dorsal nucleus of the vagus nerve increased their chromophilia and PAS positivity, but those of the mesencephalic tract of the fifth nerve slightly showed their neuronal change. In the cerebral cortex hyperchromic neurons were never observed under normal and experimental conditions.

The relation of chromophilia and glycogen metabolism is summarized as follows:

1) Moderate chromophilia (or hyperchromasia) of neuron is due to heavy staining of Nissl bodies, while PAS positive substance exclusively consists of glycogen accompanied by phosphorylase activity.

Further staining between Nissl bodies causes extreme chromophilia of neuron which is intensely stained by PAS reaction largely due to phosphorylase negative glycogen or glycoprotein, and then shrinkage of neuron further strengthens its hyperchromasia.

2) Intensity of chromophilia of the neuron fairly well corresponds to that of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity, while activities of succinic and lactic-dehydrogenase and aldolase show the opposite relation to the chromophilia,

3) From the present results it is suggested that PAS positive hyperchromic neurons occurring in the brain stem must not be artefact but reflect their physiological and metabolic conditions.

文 献

- Abe, T. and N. Shimizu**: Histochemical method for demonstrating aldolase. *Histochemie* 4: 209-212. (1964).
- 阿部富弥**: ラット脳に於ける糖代謝の組織化学的研究: アルドラーゼ, グルコース-6-リン酸およびコハク酸脱水素酵素. *日組録* 25: 333-369 (1965).
- Beaconsfield, P. and H. W. Reading**: Pathways of glucose metabolism and nucleic acid synthesis. *Nature* 202: 464-466 (1964).
- Bodian, D.**: A suggestive relationship of nerve cell RNA with specific synaptic sites. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 53: 418-425 (1965).
- Breckenridge, B. M. and J. H. Norman**: Glycogen phosphorylase in brain. *J. Neurochem.* 9: 383-392 (1962).
- Cammermyer, J.**: The postmortem origin and mechanism of neuronal hyperchromatosis and nuclear pyknosis, *Exp. Neurol.* 2: 379-405 (1963).
- Chesler, A. and H. E. Himwich**: Glycolysis in the parts of the central nervous system of cats and dogs during growth. *Am. J. Physiol.* 142: 544-549 (1944).
- Cohen, M. M.**: The effect of anoxia of the chemistry and morphology of cerebral cortex slices in vitro. *J. Neurochem.* 9: 337-344. (1962).
- Conway, E. J., H. Geoghegan and N. I. McCormack**: Autolytic changes at zero centigrade in ground mammalian tissues. *J. Physiol.* 130: 427-437 (1955).
- Dixon, K. C.**: Anaerobic leakage of potassium from brain. *Biochem. J.* 44: 187-190 (1949).
- Einarson, L.**: In: (ed. by) D. Richter: *Metabolism of the nervous system*. London, Pergamon Press, 1957. p. 403-421.
- Friede, R. L.**: Histochemical demonstration of phosphorylase in brain tissue: association of postmortem neuron changes with phosphorylase activity. *J. Histochem. Cytochem.* 7: 34-38 (1959).
- : Interpretation of hyperchromic nerve cells. *J. comp. Neur.* 121: 137-149 (1963).
- : Cerebellar edema. *Arch. Neurol.* 8: 67-81 (1963).
- Godlewski, H. G.**: Histochemistry of the glycogen synthetase and phosphorylases in normal and pathologic tissues. *Acta histochem., suppl.* 4: 30-51 (1964).
- Grennel, R. G. and H. Kabat**: Central nervous system resistance. II. Lack of correlation between vascularity and resistance to circulatory arrest in hypothalamic nuclei. *J. Neuropathol. exp. Neurol.* 6: 35-43 (1947).
- Greville, G. D.**: In: (ed. by) K. A. C. Elliott, I. H. Page and J. H. Quastel: *Neurochemistry*. Springfield, Charles C Thomas, 1963. p. 238-266.
- Guha, S. and R. Wegmann**: Phosphorylase in chick embryo liver. *J. Histochem. Cytochem.* 9: 454-455 (1961).
- Hess, R. and A. G. E. Pearse**: Dissociation of uridine diphosphate glucose-glycogen transglucosylase from phosphorylase activity individual muscle fibers. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107: 569-571 (1961).
- Heymans, C., J. J. Bouckaert, F. Jourdan, S. J. G. Nowak and S. Farber**: Survival and revival of nerve centers following acute anemia. *Arch. Neurol. Psychiat.* 38: 304-307 (1937).
- Hori, S. H.**: Cytological phosphorylase locations in rat liver and muscle as shown by a lead precipitation method. *Stain Technol.* 39: 275-278 (1964).
- Hydén, H. and A. Pigon**: A cytophysiological studies of the functional relationship between oligodendroglial cells and nerve cell of Deiters' nucleus. *J. Neurochem.* 6: 57-72 (1960).
- Kleinzeller, A. and R. Rybová**: Glycogen synthesis in brain cortex slices and some factors affecting it. *J. Neurochem.* 2: 45-57 (1957).

- Krainer, L.:** Pathological effects of cerebral anoxia. *Am. J. Med.* 25: 258-266 (1958).
- 熊本哲三:** 飢餓における脳グリコゲンの組織化学的研究. 阪大医誌. 5: 553-562 (1948).
- Linderberg, R.:** Morphotropic and morphostatic necrobiosis, investigations on nerve cells of the brain. *Amer. J. Pathol.* 32: 1147-1177 (1956).
- Miller, R. A.:** A morphological and experimental study of chormophilic neurons in the cerebral cortex. *Amer. J. Anat.* 84: 201-229 (1949).
- Pearse, A. G. E.:** Histochemstistry, theoritical and applied. 2nd ed. London, Churchill, 1960.
- Shimizu, N. and T. Kumamoto:** Histochemical studies on the glycogen of the mammalian brain. *Anat. Rec.* 114: 479-497 (1952).
- Shimizu, N and G. Inoue:** Histochemical studies on the brain glycogen of rabbits and its changes during insulin hypoglycemia. *Med. J. Osaka Univ.* 3: 337-345 (1952).
- Shimizu, N. and M. Okada:** Histochemical distribution of phosphorylase in rodent brain from new born to adults. *J. Histochem. Cytochem.* 5: 459-471 (1957).
- 清水信夫:** 脳の組織化学 (光顕および電顕的). 脳と神経. 16: 5-17 (1964).
- Sie, H-G., A. Hablanian and W. H. Fishman:** Solubilization of mouse liver glycogen synthetase and phosphorylase during starvation glycogenolysis and its reversal by cortisol. *Nature* 201: 393-394 (1964).
- Takeuchi, T.:** Histochemical demonstration of phosphorylase. *J. Histochem. Cytochem.* 4: 84 (1956).
- : Histochemical demonstration of branching enzyme (amylase-1, 4→1, 6-transglucosidase) in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 6: 208-216 (1958).
- Takeuchi, T. and G. G. Glenner:** Histochemical demonstration of uridine diphosphoglucose-glycogen transferase in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 6: 208-216 (1958).
- Takeuchi, T. and Y. Hirata:** A histochemical demonstration of dephosphorylase phosphokinase. *Kumamoto Med. J.* 14: 188 (1961)
- : On the histochemical reactions for uridine diphosphoglucose glycogen transferase and phosphophorylase in the normal skeletal muscles. *Proc. Jap. Histochem. Ass.* 3: 203-209 (1962).
- Tata, J. R.:** Subcellular redistribution of liver α -glucan phosphorylase during alterations in glycogen content. *Biochem. J.* 90: 284-292 (1964).
- Tewari, H. B. and G. H. Bourne:** Histochemical studies on the "dark" and "light" cells of the cerebellum of rat. *Acta neuropathol.* 3: 1-15 (1963)
- Toryu, Y.:** Distribution of glycogen in the central and sympathetic nervous system of the horse, with reference to histochemical analysis of the relation between glycogen and Nissl's bodies. *Sci. Rep. Tohoku Univ., Ser. IV.* 12: 1-18 (1937).
- Van Harreveld, A. and S. Tachibana:** Recovery of cerebral cortex asphyxiation. *Amer. J. Physiol.* 202: 59-65 (1962).
- Weinberger, L. M., H. H. Gibbons and J. H. Gibbon:** Temporary arrest of the circulation to the central nervous system. *Arch. Neurol. Psychiat.* 43: 961-986 (1940).

Figs. 5—8. The nucleus of the mesencephalic tract of the fifth nerve of the normal rabbit brain.

Fig. 5. PAS (left) and gallocyanin (right). Markedly PAS positive neurons are also intensely stained with gallocyanin. $\times 145$

Fig. 6. Phosphorylase reaction (Takeuchi mehod). Strong reaction is seen in the medium sized nerve cells and less intense staining in the small nerve cells. Note no activity in the large nerve cells (arrows). $\times 145$

Fig. 7. Glucose-6-phosphate dehydrogenase reaction. The moderate reaction is presented in the large nerve cells and the smaller cells exhibit the more prominent activity. $\times 145$

Fig. 8. Succinic dehydrogenase reation. The most intense staining is seen in the medium sized cells. The small nerve cells show somewhat weak activity. $\times 130$

Figs. 9—12. The pontine reticular nucleus of the normal rabbit brain. They are able to be classified into four types according to their PAS positivity.

Fig. 9. PAS (left) and galloeyanin (right). Three nerve cells belonging to type III are shown. Several dark stained Nissl bodies (arrows) are seen in the periphery of the perikaryon of neuron *a*, while inner Nissl bodies are also heavily stained partially in neuron *b* and almost entirely in neuron *c*. They are loaded with various amounts of glycogen which appear nearly coincident with the Nissl bodies. $\times 200$

Fig. 10. PAS (left) and galloyanin (right). Type I-neuron (*I*) is lightly stained with galloeyanin and is essentially devoid of glycogen. PAS positivity of exceptional or extreme type IV-neurons (*E*) is largely due to glycoprotein. $\times 165$

Fig. 11. PAS (left) and hematoxylin-eosin (right). Type IV-neuron (*4*) is also heavily stained with hematoxylin-eosin and is somewhat smaller than the other type neurons, where two dark stained nucleoli are seen. Type II-neurons (*2*) show an accumulation of fine glycogen granules on the outer surface of the cell body and are chromoneutrally stained. $\times 130$

Fig. 12. PAS (left) and tetrazonium coupling reaction (right). An upper nerve cell which is identified to be type IV-neuron shows intense protein reaction as compared with that of a lower neuron (type II). $\times 360$

Fig. 13. Phosphorylase reaction (Hori method) of the pontine reticular nucleus. In the normal brain (left) the enzyme activity is presented merely on the outer surface of the large nerve cell body (*L*), whereas the medium sized cells (*M*) are slightly to markedly stained. Faint staining is seen in the small nerve cell (*S*). The enzyme activity in the medium sized cell decreases under the anemic condition (right); blood pressure (B. P.) 1/3. 200 min. $\times 145$

Fig. 14. Glucose-6-phosphate dehydrogenase reaction of the pontine reticular nucleus in the normal brain. The smaller cells including medium sized cells (*M*) exhibit more prominent activity. *L*: large cell. $\times 100$

Fig. 15. Gallocyenin staining of the dorsal nucleus of the vagus nerve. Normal (above) and anemia (B. P. 1/3, 200 min.) (below). In the anemic brain dark staining of the cytoplasm and shrinkage of the nerve cell bodies are seen. $\times 250$

Fig. 16. PAS reaction of the dorsal nucleus of the vagus nerve. Normal (above) and anemia (B. P. 1/3, 200 min.) (below). Large amounts of minute granules of glycogen are present among the nerve cells which are devoid of glycogen in the normal brain, while in the anemic brain glycogen or glycoprotein occurs in the perikaryon and the glycogen granules disappear from the neuropil. $\times 250$

Fig. 17. and 18. The pontine reticular nucleus of the anemic brain.

Fig. 17. B. P. 1/5, 40 min. PAS (left) and gallocyanin (right). Some of subsurface Nissl bodies (arrows) are heavily stained with gallocyanin in the type II and III-neurons (2 and 3). Further heavy staining of inner Nissl bodies is seen partially in type III-neuron and wholly in type III-IV-neuron (3-4). PAS positivity of the nerve cell body fairly well corresponds to its chromophilia. Note somewhat shrunken perikaryon of the type III-IV-neuron. $\times 375$

Fig. 18. B. P. 1/5, 200 min. PAS (left) and gallocyanin (right). The type IV-neuron (hyperchromic neuron) increases in number. The cytoplasm including the Nissl bodies is hyperchromically stained and contains rather homogenous PAS positive material, which partly consists of glycoprotein. Two type I-neurons still remain.

- Fig. 19. Glucose-6-phosphate dehydrogenase of the nerve cells in the pontine reticular nucleus conspicuously increases in activity in the anemic brain (B. P. 1/3, 90 min.) (right). Left: control. $\times 140$
- Fig. 20. A decrease of succinic dehydrogenase activity is seen in the anemic pontine reticular nucleus (B. P. 1/3 90 min.) (below). Above: control. $\times 150$
- Fig. 21. Phosphorylase reaction (Takeuchi method) of the dorsal nucleus of the vagus nerve in the anemic brain (B. P. 1/3, 200 min.). Although the enzyme activity is prominent in the neuropil, it is never seen in the cell bodies. $\times 165$
- Fig. 22. Uridin diphosphoglucoside glycogen transglucosylase activity of the nucleus of the mesencephalic tract of the fifth nerve in the normal brain (modified Takeuchi-Glenner method). The small nerve cells reveal the most marked activity, that is somewhat different from the distribution of phosphorylase activity. $\times 135$