

脳神経細胞の機能とリボ核酸との関係に就いて

第 2 編

廿日ネズミの脳 RNA と脳運動機能の関連に就いて

岡山大学医学部病理学教室 (指導: 妹尾左知丸教授)

浜 田 日 佐 夫

〔昭和39年12月12日受稿〕

緒 言

第1編に於ける海猿脳の実験を通じ、RNaseの脳実質内、又は脳脊髄液導入は、脳神経細胞内へのRNaseの浸入と共に、細胞のRNAが消化される事が明らかにされた。海猿は静止状態を続け餌を取らなくなるので、RNAの消失は神経細胞の機能低下を起すものと思われた。然し、海猿は更に高次の神経細胞の機能を分析するには不適である。前実験に於いて、著者は脳脊髄液中へのRNase注入は、脳実質内注入と全く同様の細胞の変化と、症状を引起す事を知った。この事は同様の実験がマウスでも技術上可能である事を示している。本編に於いては、より精神活動の分析が容易であるマウスにRNaseを脳実質内に注入し、海猿の実験と比較検討した。即ちRNase注入後のマウスの状態の観察と共に、ニッスル染色に依る神経細胞の好塩基性の変化に就いての組織学的観察を行つた。病理学者は、普通ニッスル染色で細胞質のRNAの変化を重要な所見の一つとして観察して来た。

実験材料、及び方法

材料: マウスは20g前後の, ddn純系, 近親交配のもの60匹を使用した。

RNaseは第1編と同じ製品を同じく、無菌的Hanks's solutionの溶液として使用した。

方法: 神経細胞の活動性のテストとしてはSwinyard等の方法¹⁾、及び著者等の考案した握力テストを行なつた。

Test 1. 板乗りテスト、マウスを台の上に乗せて台の縁から両後足をはづした時、そのマウスが両足を台の上に乗せ得るかどうかを観察する。

Test 2. Righting Test マウスを仰臥位にした時、正常の位置に戻るかどうか、又その反応の遅速を観

察する。

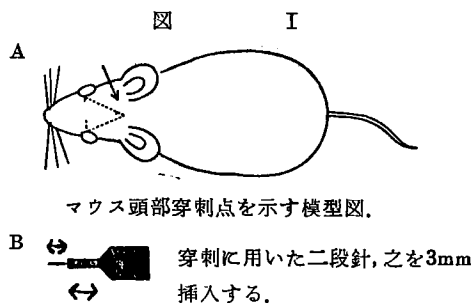
Test 3. 橋渡りテスト、あらかじめ空腹状態にしておいたマウスを、餌箱に橋渡した巾5mm、長さ30mmの縁の上を歩行させ、歩行状態を観察する。Swinyardに従いこのTestに最も重点を置いた。

Test 4. 握力テスト(妹尾、浜田の考案に依る) マウスを金網にとりつかせて、尾をバネのついたツマミで挟み、そのツマミをバネ秤に直結させて、バネ秤でマウスの尾を引張り、マウスが引張られる力に抗し切れなくなつて金網を離す時のバネ秤の目盛を読んで握力の強弱を判定した。マウスを太さ約1mmの金網にとりつかせて、尾を引張るとマウスは本能的に引張られる力に抗して、力一杯金網にとりつき、意識的に金網を放すことはない。

実際にこの方法でマウスが引張られる力に抗し切れなくなつて、金網を放す時のバネ秤の目盛は、同一マウスでは大体一定の数値を示す。これ等の事からこの方法がマウスの握力テストを判定するのに利用出来ると判断された。握力はバネ秤のグラム目盛に依つて表わされる。

RNaseの脳実質内注入法は、先端の部の太さ1/3mmの2段針(挿図B)を用いて、マウスの両目を結ぶ線を底辺とする正三角形の頂点で、正中線を少し右に寄つた点を針の刺入点として(挿図A)、マウスの脳実質内に、0.5%及び1% RNase Hanks's solutionを1匹当り0.05ccづつ注入した。RNase注入後6時間でTest 1. 2. 3. 4. を行い、RNase注入前の成績と比較すると共に、直後マウスの頸動脈を切断して殺し、速やかに脳を取り出してエタノール固定、パラフィン包埋、ニッスル染色にて組織を観察した。

対照としては、同様の方法にて、無菌的Hanks's solutionを0.05cc脳内に注入後前記と同様の観察を行なつた。



結 果

4つのテストを RNase 脳内注入以前の正常マウスに施行すると、Test 1. では、マウスを台の上に乗せて両方の後足を台からはずす様になると、マウスは直ぐ台の上へ飛び上る。Test 2では正常のマウスは仰臥位にする事自体が困難であり、仰臥位にし得ても直ちに正常体位に戻る。Test 3では、正常マウスを予じめ空腹にして置き、巾 5mm、高さ 10mm、長さ30mm の木の棒を、餌箱に渡し、その上を歩かすとマウスは木の上で止る事なく棒の上を歩行する。

Test 4では正常マウスの握力は 150~200g の範囲にあり、同一マウスでは略一定の値を示す。

1% RNase 0.05cc を脳実質内に注入したものの20匹に於いては、先づ第1に観察された症候は約半数の11匹に後足の麻痺を認めたが、対照動物にはこの様な事は認められなかつた。Test の結果は表 I に見る如く、Test 1では後脚を台に上げる事の不能なもの3匹、麻痺した後脚をひきつり乍ら前足の

表 I

	対 照	0.5% RNase	1% RNase
正 常	20	20	12
困 難	0	0	5
不 能	0	0	3
実験総数	20	20	20

表 I 0.5% 及び 1% RNase を右大脳実質内に注射したマウスの板乗りテスト (Test 1)

注射6時間後、0.5% RNase を注入したものと及び対照動物では全く変化はなかつたが1% RNase を注射したものは後肢を台の上に引上げるのに可成りの困難を示したものの5、後肢を台の上に引上るのが全く不能なもの3を認めた。

実験方法：本文参照

みで這い上る事の出来たもの一困難一、5匹、他のマウスでは余り障害を認めなかつた。Test 2では仰臥位からの体位の復元の不能のものが1匹あつたが、これは RNase そのものの作用であつたかどうかは疑問である。Test 3に於いては健全に棒を渡れるものは、僅かに3匹で、後足の麻痺が比較的軽度のもはよろけながら何んとか渡れる。この様な状態のものが7匹一困難一

後足の麻痺の為棒の上に立つている事が出来ず前足で棒にぶら下る様な恰好になり途中で落ちてしまうもの一不能一8匹、始めから全く棒に乗れないもの一完全不能一3匹、を認めた(表II) Test 4では表IIIに示す如く RNase 注入群では握力の減退が

表 II

	対 照	0.5% RNase	1% RNase
正 常	20	17	2
困 難	0	3	7
不 能	0	0	8
完全不能	0	0	3
実験総数	20	20	20

表 II 0.5%及び1% RNase を大脳右半球実質内に注入したマウスの橋渡しテスト (Test 3)

注入6時間後、対照の Hanks 氏液注入動物では1例も変化を示さない。0.5% RNase 注入群では、よろけるもの3匹を認めたのみであるが1% RNase 注入では完全に橋に乗る事の出来ないもの3匹、途中で落ちたもの8匹、よろけながら何とか渡れるもの7匹、残りの2匹は正常の行動をとつた。

表 III

	対 照	0.5% RNase	1% RNase
50g 以下	0	0	7
50-100g	0	0	10
100-150g	3	6	3
150-200g	17	14	0
実験総数	20	20	20

表 III 0.5%及び1% RNase 右大脳半球実質内に注入したマウスの握力試験 (Test 4)

注入6時間後0.5% RNase 注入では20匹中6匹に軽度の握力の低下を認めたが1% RNase 注入動物では全例に於いて、7匹には著しい握力低下を認めた。

実験方法：本文参照

顯著で、力の衰えを示さなかつたものは3匹で、他の17匹は程度の差はあるが力の減退が明らかに認められた。

次に0.5% RNase 0.05cc を脳実質内に注入したものの20匹に於いては、総じて対照例のものとならず Test 1. 2 に関しては、殆んど異常を認めず (表 I) Test 3 に於いては、5匹に棒を渡る際に少しよろめくのが認められた (表 II)。

Test 4 においても軽度力減退を見るものが対照に比して多かつた。(表 III)

対照として無菌的 Hanks 液 0.05cc を注入したものの20匹に於いては全く注入以前と変わらず Test 1, 2, 3, 4 共全マウスに異常を認めなかつた。

組織学的観察は RNase 注入6時間後の脳を、小脳～第IV脳室底を通る断面、及び乳頭体を通る前額断面で前記の方法に従つて、ニッスル染色を施し、諸神経細胞を観察した。

1% RNase Hanks's solution を注入したものは Test 1, 2, 3, 4 共異常を認めなかつた2匹を除いて、残りの18匹に於いて、小脳の Purkinje 細胞及び大脳の諸神経細胞を含む殆んど全ての脳細胞のニッスル小体の著明な減少を認めた。

0.5% RNase Hanks's solution を注入したものは、20匹中7匹に小脳の Purkinje 細胞その他の神経細胞にニッスル小体の減少及び消失を認めた。大脳及び脳幹の神経細胞も一部に著明なニッスル小体の減少を認める所もあつたが、総じて程度は軽かつた。

一方対照例の組織では、穿刺部位の軽度の反応を除き如何なる神経細胞のニッスル小体にも何ら異常を認めなかつた。

総括、並びに考案

脳神経組織に於ける RNA に就いては、最近特に注目を浴び、その研究²⁾⁻⁷⁾も数多くなされておられ、Hyden 等は活発に活動した時には、脊髄の前角細胞の細胞質の RNA 含量が減少し⁸⁾、又一方蝸牛神経核細胞の聴覚の刺激の後には、RNA の含量に同じ様な減少が見られると報告している⁹⁾。著者の実験より得た結果では、マウス脳神経細胞も海猿の場合と同様 RNase に依り、その RNA の低下を来し、脳神経細胞の RNA が減少、或は消失すれば、その

運動機能に著明な障害を来す事を示した。特に1% RNase を0.05cc 脳実質内に注入したものでは、組織学的に脳神経細胞の著しい RNA の減少、或は消失を認め、而も運動神経に関する機能の減退が著明に認められた。同じ様な実験で RNA の減少が少なく、而も運動テストにあまり変化の認められなかつたものもあつた事は、注入後の液の漏出、その他の実験方法の不手際に依るものと考えられる。4つのテストを通じていえる事は、RNA が少くなると全般的に運動機能が障害されるという事である。然し、動物が小さく、RNase を脳の限局した一部分に作用させる事が出来ないために各神経核の機能を、これ等の結果より分析する事は出来ない。第1編、及び第2編の実験を通じて RNA が神経細胞の機能の発現に重要な物質である事は、最早疑問の余地がない。現在知られている一般体細胞に於ける RNA の主作用は蛋白合成である¹⁰⁾⁻¹²⁾ 事から考えると脳に於ける RNA も蛋白合成に関係していると考えてよいであろう。若しそうであれば神経細胞は、蛋白合成という過程を通じて諸種の機能、即ち記憶、運動の調節等を果しているのかも知れない。然し、この事を明らかにするためには、神経細胞の蛋白合成に就いて、もつと詳しく知らなければならぬ。

結 語

- 1) マウス脳に RNase を注射すると各種神経細胞の RNA が減少、或は消失する。
- 2) 1% RNase 0.05cc をマウスの脳内に注入すれば、著明な運動障害を起す。運動障害の程度は脳神経細胞の RNA の減少像と平行関係にある。
- 3) 以上の事実よりマウスの運動機能に関係する神経細胞の働きは、それが保有する RNA 量と深い関係にあるものと結論された。

擧筆するに臨み、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜りました恩師妹尾教授並びに児玉教授に深甚なる謝意を表します。

併せて常に御厚意あふれる御教示を戴きました本病理学教室小田助教授並びに教室員各位に深謝し又色々御親切な御援助を下さつた本学精神神経科大月講師、並びに三井先生に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) E. A. Swinyard, W. C. Brown, L. S. Goodman; J. Pharmacol. and Exp. Therap. 106. 319 (1952)
- 2) H. von Foerster; Das Gedachtnis (Deuticke, Vienna, 1948)
- 3) H. Hyden; Biochemistry of the Central Nervous System, vol. 3 of Proc. 4th Intern. Congr. Biochem. (Pergamon, New York, 1960)
- 4) S. Brattgard; Acta Radiol. Scand. Suppl. 96 (1952)
- 5) R. Thompson and J. McConnell; J. Comp. and Physio. Psyc. 48,
- 6) J. McConnell, A. L. Jacobson, D. P. Kimble; ibid. 52, 1 (1955); E. Ernhart and C. Scherrick; Personal communication forward by J. McConnell.
- 7) J. B. Best; Federation Proc. 19, 24 (1960)
- 8) H. Hyden; Acta Physiol. Scand. Suppl. 6, (1943)
- 9) Hamberger, C. A. and H. Hyden; Acta otolaryngol. Suppl. L XI 61, (1945)
- 10) Caspersson, T.; Naturwiss 29, 33, (1942)
- 11) Brachet, J.; Chemical Embryology (New York: Interscience Publishers. Inc.) (1950)
- 12) Allfrey, V. G., Daly, M. M., and Mirsky, A. E.; J. Gen. Physiol. 37, 157 (1953)

On the Relationship Between Function and Ribonucleic Acid of
Cerebral Ganglion Cell

Part 2. Relationship of RNA to the motor function of mouse brain

By

Hisao Hamada

Department of pathology, Okayama University Medical School

(Director: Prof. Satimaru Seno)

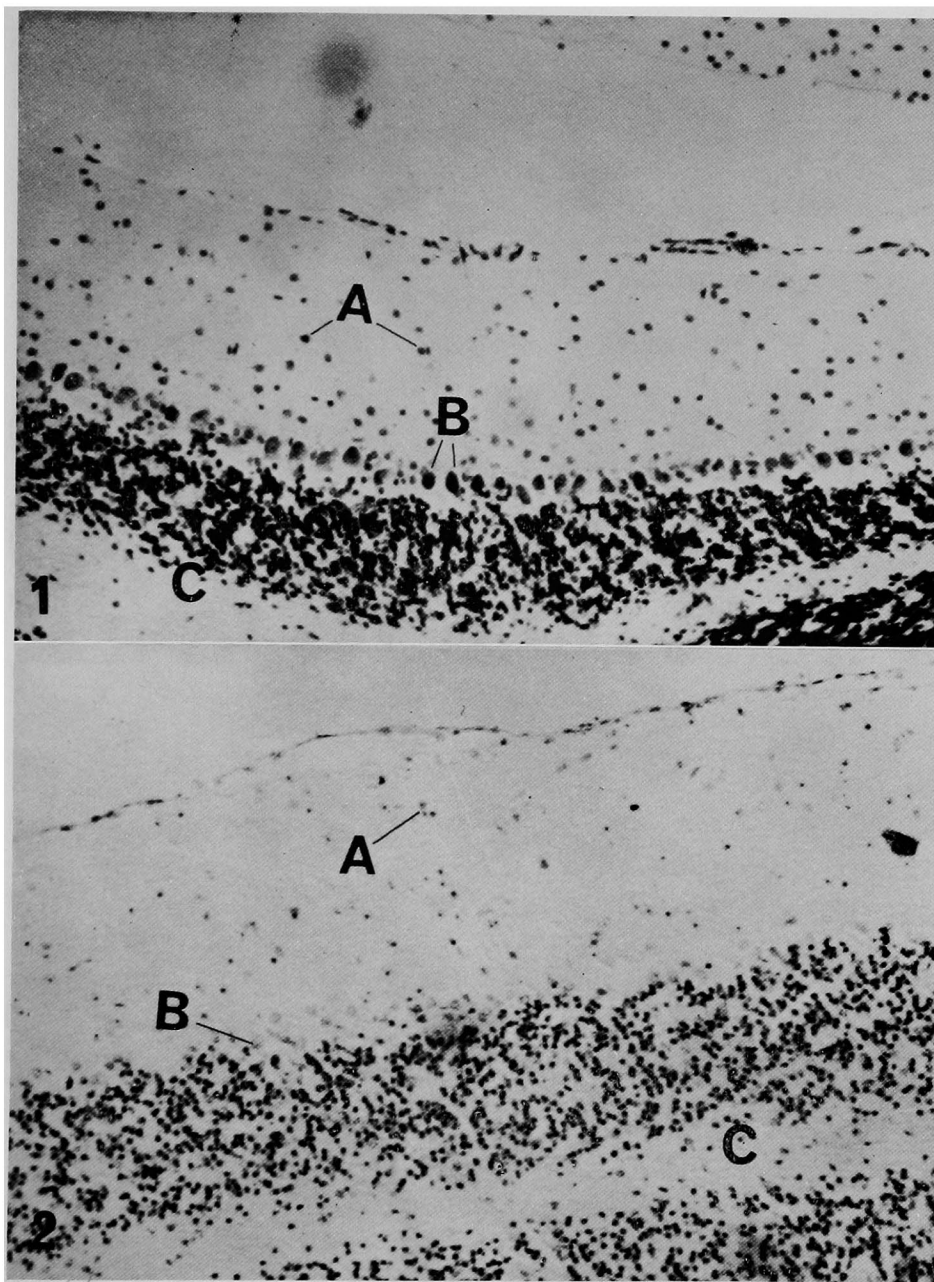
Author's Abstract

In a previous paper it was revealed that either the injection of RNase directly into the cerebral tissue or into liquor by cisternal puncture caused similar changes on the reduction of RNA level of the cerebral ganglion cells in the brain of guinea pigs, and the behavioral changes of the animals.

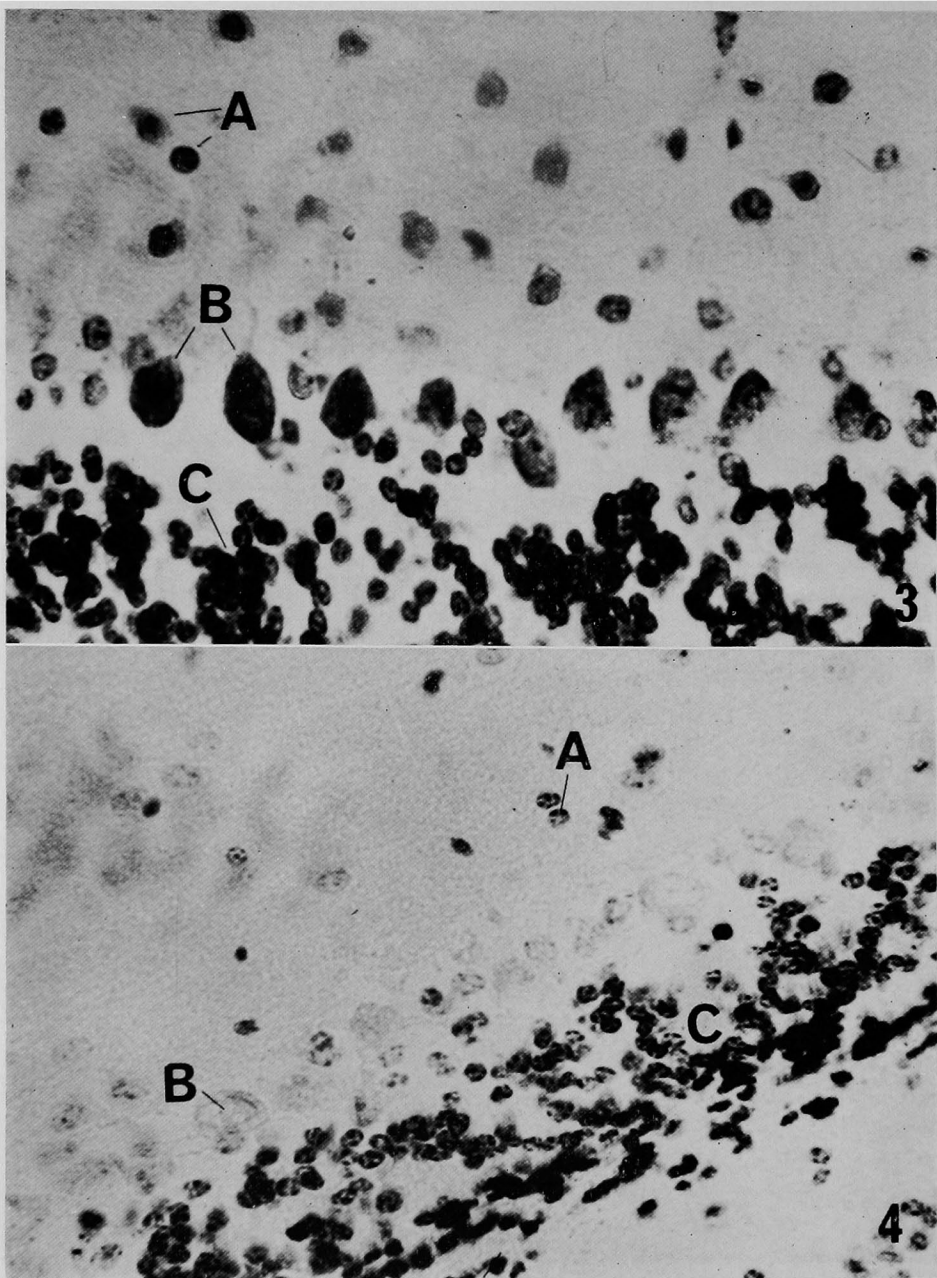
It was thought that the same method might also be applicable to the mouse in which further psychological and behavioral analysis are more readily accomplished.

In the present experiment RNase was injected directly into cerebral tissue of the mouse and the motor function of the mouse brain was analyzed. As the result it was found that on the injection of 0.05 ml of 1% RNase directly into the cerebral tissue of the mouse, severe motor disturbance was induced, and in addition, the degree of the functional disturbance paralleled with the decreased level of RNA on the cerebral ganglion cells.

浜田論文附图(2編)

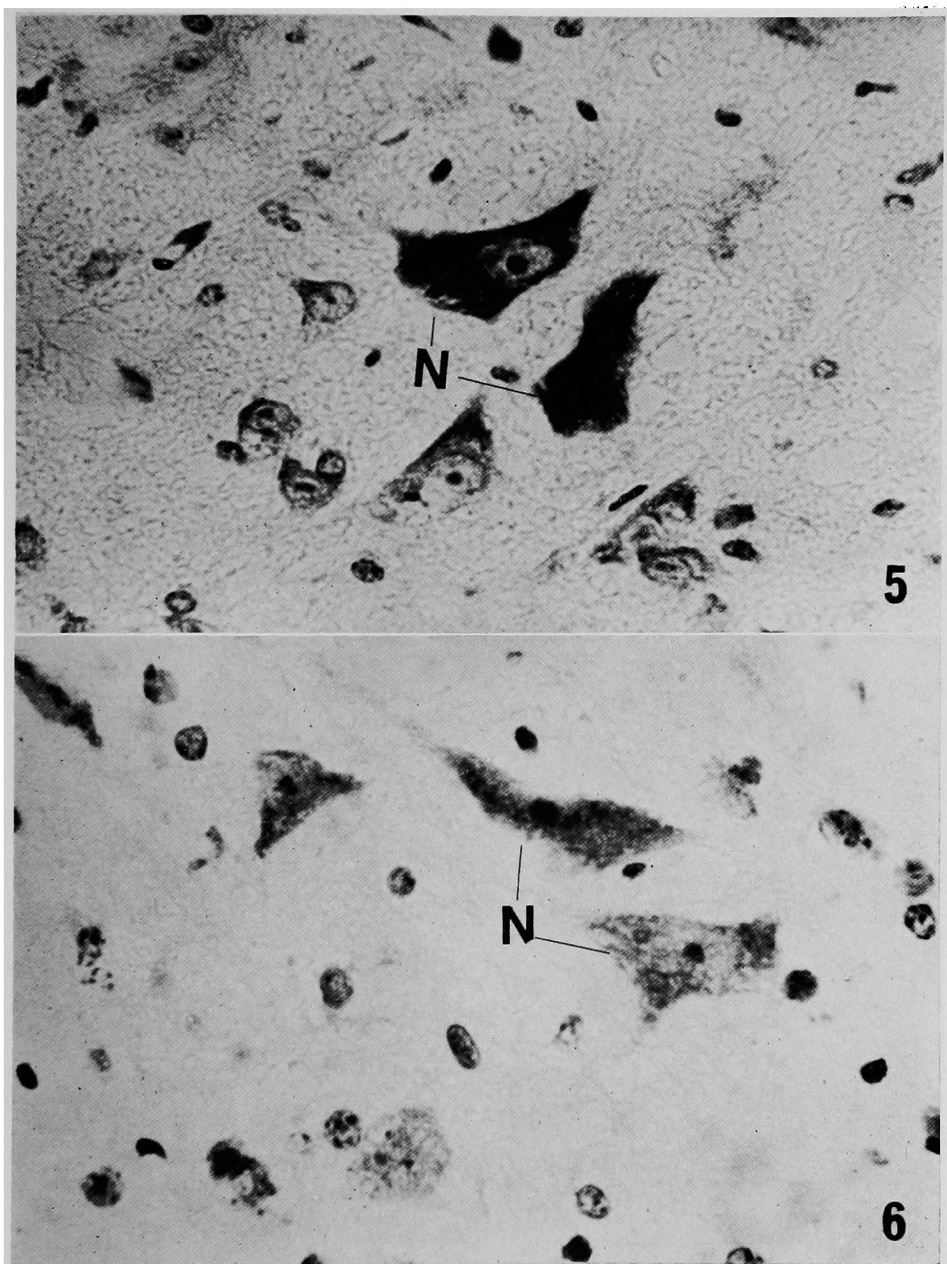


1. 对照動物の小脳, Hanks 液 0.05cc 脳内注入 6 時間後の切片各細胞層は健全なものと変わらない。
 A. 分子層の細胞 B. プルキンエ細胞 C. 顆粒層の細胞 エタノール固定
 ニッスル染色 ×100 方法: 本文参照
2. 1% RNase 0.05cc を脳内注入 6 時間後の小脳, 各細胞の染色が著るしく減少している。特にプルキンエ細胞は大きく, 1 の対照と比してその染色性の低下を認める事が出来る。
 A. B. C. は 1 に同じ 方法 本文参照 エタノール固定 ニッスル染色 ×100

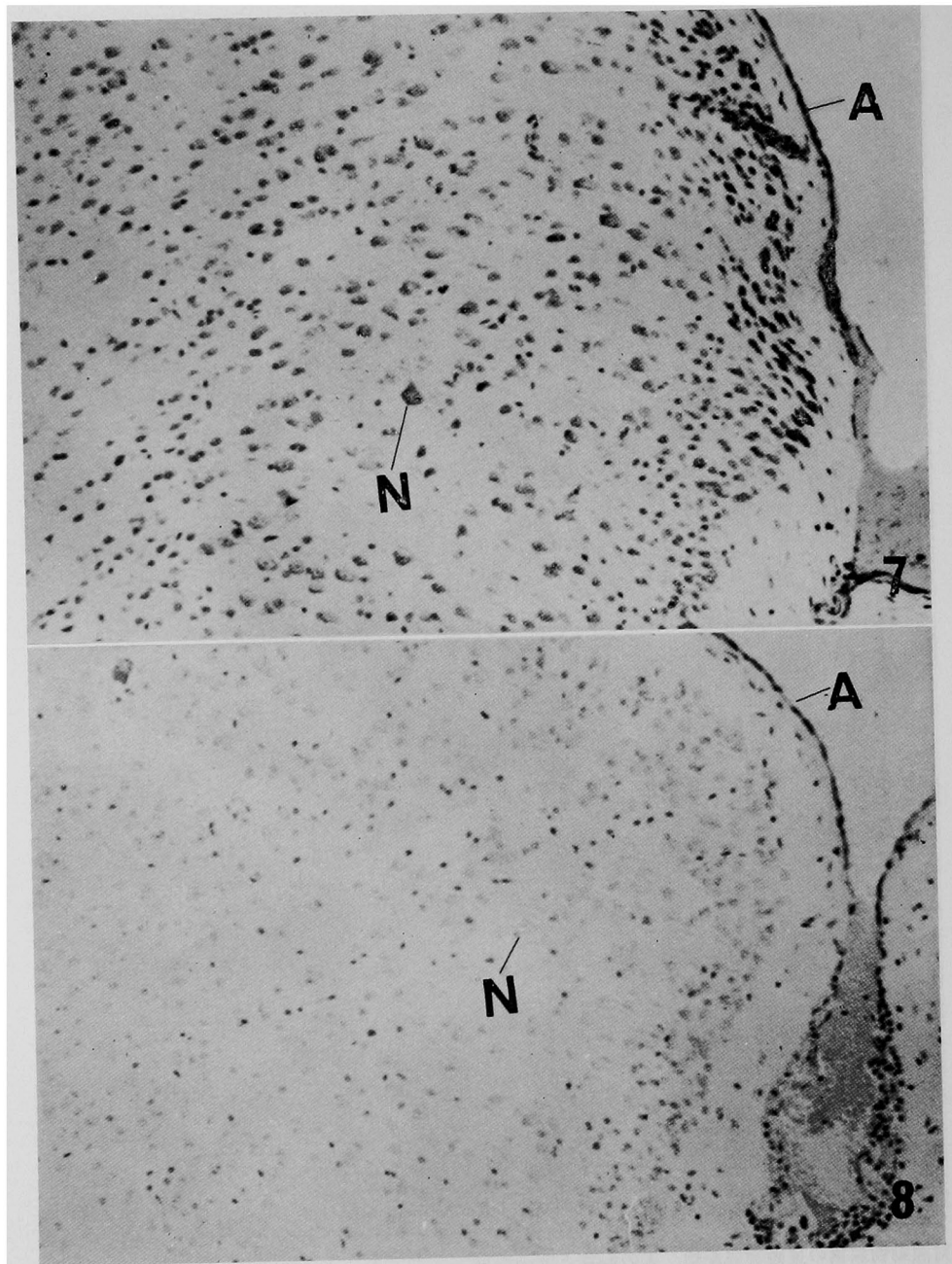


3. 対照動物の小脳の神経細胞，1の強拡大プルキンエ細胞，粒層及び分子層の細胞質 RNA 染色に注意
1と同一処理 A. 分子層の細胞 B. プルキンエ細胞 C. 顆粒層の細胞
エタノール固定 ニッスル染色 ×400
4. RNase 処理後の小脳強拡大写真2のものと同様な処理を行なったもの，プルキンエ細胞は殆んど染色性を失ひ，核小体も染色されなくなっている。顆粒層及び分子層の細胞は核のみ染色され，細胞質は殆んど染色されない。方法 本文参照 A. B. C. は3と同じ エタノール固定
ニッスル染色 ×400

浜田論文附図

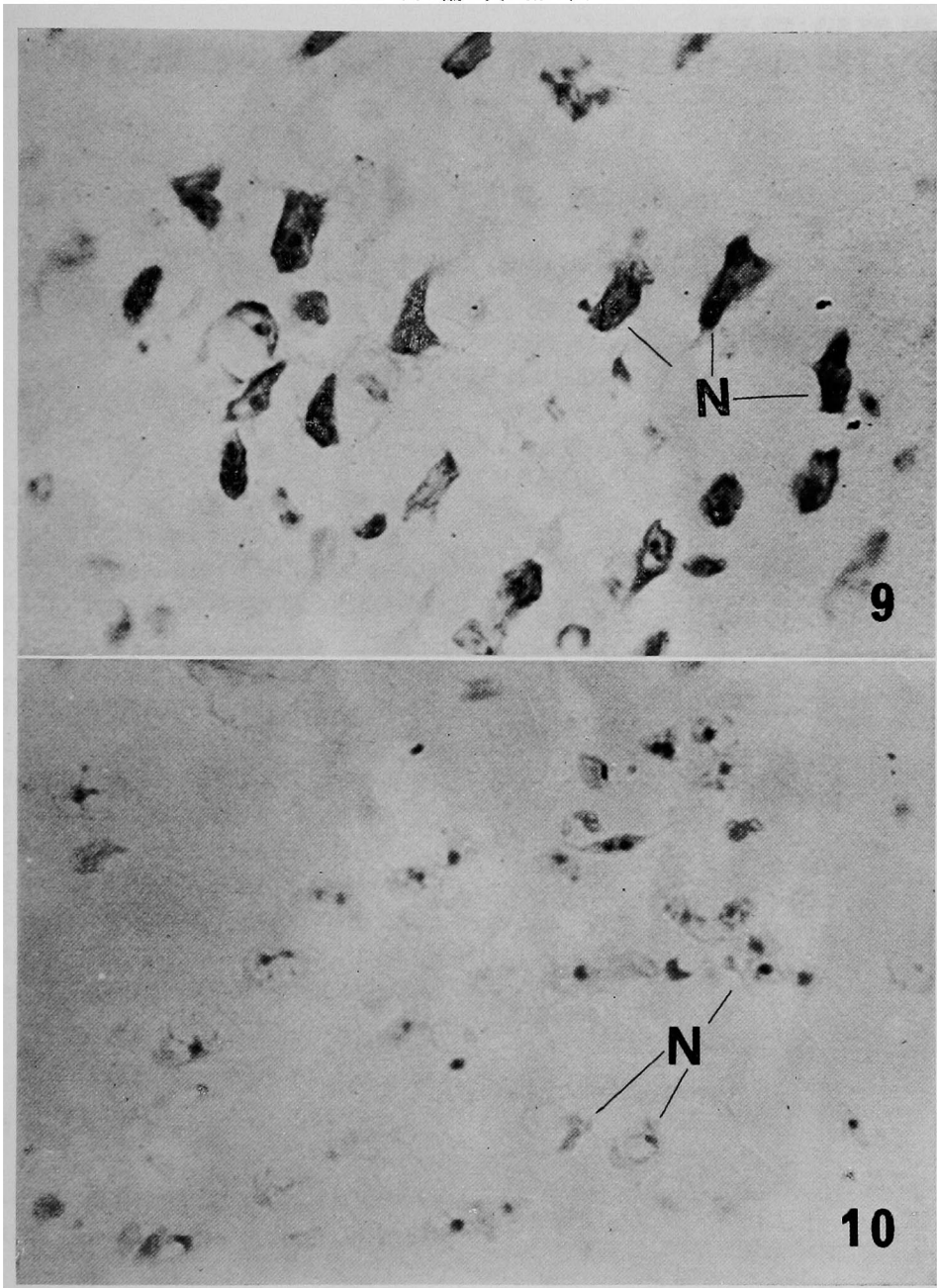


5. 対照動物脳橋の運動神経細胞, 1の動物と同一処理
 多量のニッスル小体をもち核小体明瞭
 N: 運動神経細胞 エタノール固定 ニッスル染色 ×400
6. RNase 処理動物の脳橋の運動神経細胞, ニッスル小体の染色性低下と, 核の染色不良状態を示す。
 2と同一処理を行なったもの
 N: 運動神経細胞 エタノール固定 ニッスル染色 ×400



7. 対照動物の大脳皮質，弱拡大写真全体の染色性がよくわかる。
 処理は1と同一 A：脳軟膜 N：神経細胞 エタノール固定 ニッスル染色 ×100
8. RNase 処理動物の大脳皮質弱拡大，全体として染色性の減少がよくわかる。処理は2と同一
 A：脳軟膜 N：神経細胞 エタノール固定 ニッスル染色 ×100

浜田論文附図



9. 対照動物の大脳皮質神経細胞 処理は1と同じ, 濃染された細胞質を認め正常動物のものと変りない。
N: 神経細胞 エタノール固定 ニッスル染色 ×400
10. RNase 処理動物の大脳皮質神経細胞, 処理は2と同じ, 細胞質の染色性低下と共に空胞変性が認められる。
N: 神経細胞 エタノール固定 ニッスル染色 ×400