

暗調と明調神経細胞 マウスの脳における光顕と電顕所見

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, 大塚 愛二

東広島記念病院(附)広島リウマチ・膠原病センター (院長: 山名征三博士)

山 名 征 三

(平成8年7月22日受稿)

Key words : Dark neurons, light neurons, central nervous system, mouse

緒 言

ヒト, マウス, ラットの脳の光顕や電顕切片を観察すると, 細胞質基質が明るく脹やかな明調神経細胞と細胞質基質が暗く収縮した暗調神経細胞とが区別できる¹⁻⁴⁾. これらの細胞のうち, 暗調細胞は固定などの試料作製不良による人工産物⁵⁻⁸⁾あるいは病的な細胞⁹⁻¹³⁾とされてきた.

一方, 暗調細胞は生理的な一つの表現形態とする見解があり, Ramón y Cajal (1909) は明調細胞を活動 (active) 細胞とし, 暗調細胞を休息 (resting) 細胞と見做した¹⁴⁾. これより早く, Hodge (1892) はカエルの脊髄神経節を電気刺激すると同神経節の神経細胞が暗調化することを発見し, 暗調細胞は疲れた (fatigued) 細胞であるとした¹⁴⁾. この電気刺激による神経細胞の暗調化は, 最近 Islam et al. (1994) によってラットの大脳皮質で再現され, 電気刺激を止めると明調細胞に復することも確認された¹⁵⁾.

Tewari and Bourne (1963) は酵素活性などの検討から, 暗調細胞は分泌期にある細胞と考えた¹⁶⁾. さらに, 私達はマウスやラットの脳で, 暗調細胞の数が動物の覚醒活動時に増加し安静睡眠時に減少することに気がつき²⁾, その出現は日内 (概日) リズムに依ることを示した⁴⁾. 私達はマウスの脳で, 暗調細胞は離乳期から現われはじめ²⁾細胞のアポトーシス (自爆死, 細胞自滅, 枯死, 自然死) に先立つ核染色体の断片化を検

定する nick end labeling 法に陰性反応を示すこと⁴⁾も明らかにした.

本研究では, マウスの脳の暗調神経細胞と明調神経細胞とくにゴルジ装置に注目して光顕と電顕的に再調査し, 両神経細胞の機能的側面を探る.

材 料 と 方 法

午前9時, 雄性成獣 ICR マウス数匹をエーテル麻酔下に, 上行大動脈よりリングル氏液 (5 cc) 続いてグルタルアルデヒドを2.5%, パラホルムアルデヒドを4.0%, タンニン酸を0.5%の割合に含む0.1Mカコジル酸緩衝液 (pH 7.2)¹⁷⁾ (5 cc) を注入して灌流固定した. この動物群から大脳皮質帯状回, 小脳皮質, 海馬から大 (2.0×2.0×1.5mm) と小 (1.0×1.0×1.0mm) のブロックを切り出し, 上記のカコジル酸緩衝アルデヒド・タンニン混液中で約6時間再固定した.

大きいブロックはパラフィン包埋切片とし, 脱パラフィン後陽性荷電鉄コロイド (pH 1.5) とケルネヒト赤 (nuclear fast red) で染色し, 光学顕微鏡で観察した¹⁸⁾. 小さいブロックはエボン包埋超薄切片とし, 鉛とウランで電子染色して透過電子顕微鏡で観察した.

結 果

午前9時の睡眠時間帯に屠殺したマウスの全

例において, その大脳皮質, 小脳皮質, 海馬に多くの暗調神経細胞が認められた (Figs. 1—3). これらの暗調神経細胞は明調神経細胞と混在していたが (Figs. 1—3), 出現頻度については検討しなかった. 神経膠細胞群の暗調化は全く認められなかった.

大脳皮質, 小脳皮質, 海馬を通して, 暗調神

経細胞と明調神経細胞の染色性および形態に, それぞれ共通する特徴があった. これらの所見について, 以下に述べる.

光顕所見

ケルネヒト赤は, 明調細胞では, 核小体を特異的に染め, 核と細胞質に対する染色性は低かった (Fig. 2 Inset). 暗調細胞では, 核小体は

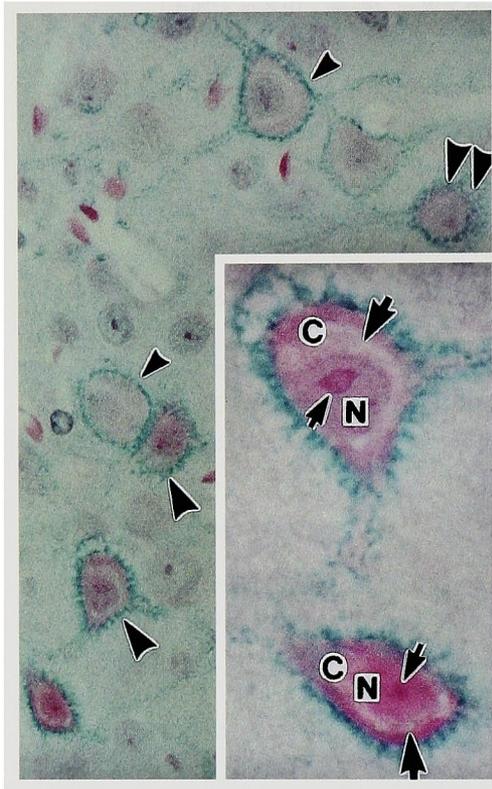


Fig. 1

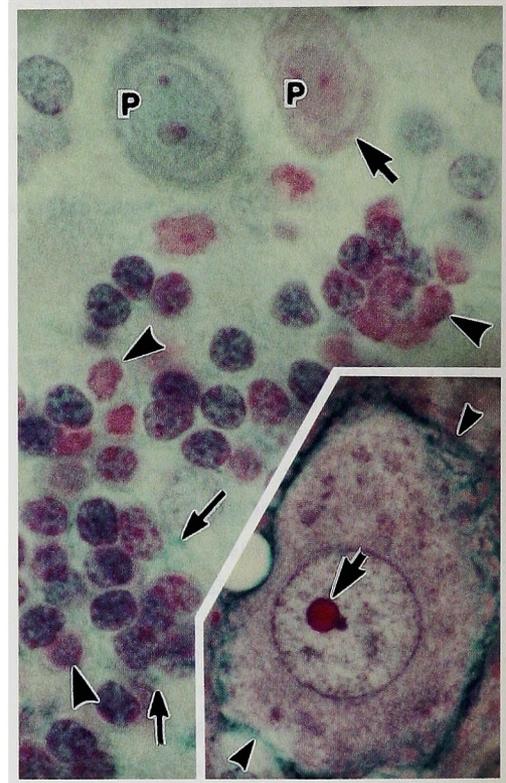


Fig. 2

Fig. 1 Transmission light micrograph of a section from the mouse hippocampal subiculum, stained with cationic iron colloid and nuclear fast red. Many neurons are coated with perineuronal sulfated proteoglycans reactive to cationic iron colloid. Some neurons are darkened, and intensely stained with nuclear fast red (*large arrowheads*). The light neurons with the surface coat are indicated by *small arrowheads*. The slightly darkened or intermediate neurons are indicated by *double large arrows*. Inset shows a closer view of the lower two dark neurons in the main figure. In the dark neurons, the nuclear fast red stains the nucleus (*N*) and cytoplasm (*C*) as well as the nucleolus (*small arrows*). *Large arrows* indicate the perinuclear zone, which is occupied by the Golgi's complexes. X 500, Inset: X 1,000.

Fig. 2 Mouse cerebellar cortex, stained with cationic iron colloid and nuclear fast red. Many granular cells are darkened, and stained with nuclear fast red (*large arrowheads*). The Purkinje cells (*P*) are also darkened (*large arrow*). The extracellular matrix in the cerebellar glomeruli is faintly reactive to cationic iron colloid (*small arrows*). Inset shows a light neuron in the hippocampal subiculum, stained with cationic iron colloid and nuclear fast red. This light neuron possesses a well developed surface coat (*small arrowheads*). In the light neurons, the nuclear fast red preferentially stains the nucleolus (*large arrow*). X 800, Inset: X 1,300.

もちろんのこと核と細胞質がケルネヒト赤によく染まった (Fig. 1 Inset). この染色性の違いによって、暗調細胞と明調細胞とは明瞭に区別できた。中間型の神経細胞も出現し (Fig. 1), これらは暗調細胞として観察した。

暗調細胞の核の周囲 (perinuclear zone) は、ゴルジ装置の発達のために、ケルネヒト赤に対する染色性が低かった (Fig. 1 Inset). 明調細

胞では、perinuclear zone は明瞭でなかった (Fig. 2 Inset).

明調、暗調を問わず神経細胞は陽性荷電鉄コロイド (pH 1.5) に染まらなかった。神経膠細胞群も同鉄コロイドに反応しなかった。しかし、大脳皮質と海馬には、鉄コロイドに染めだされる著明な硫酸化プロテオグリカン被膜を細胞外基質としてもつ神経細胞が多数認められた (Figs. 1, 1 Inset, 2 Inset). そして、小脳皮質果粒細胞間 (小脳系球) のプロテオグリカンが弱く鉄コロイドに反応した (Fig. 2).

明調細胞の被膜は網目状の構造として観察さ

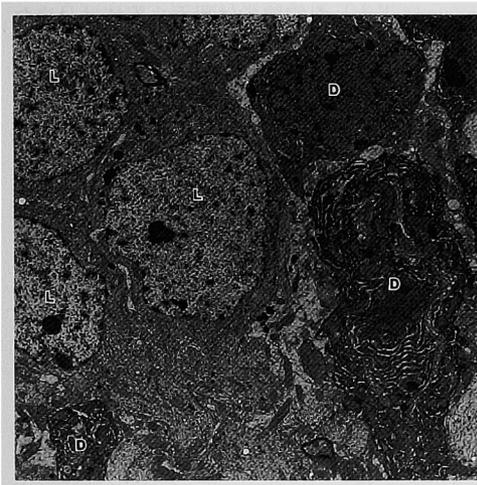


Fig. 3 Transmission electron micrograph of an ultrathin section from the mouse hippocampal C1 area. Some neurons are darkened (D). L light neurons. X 2,300.

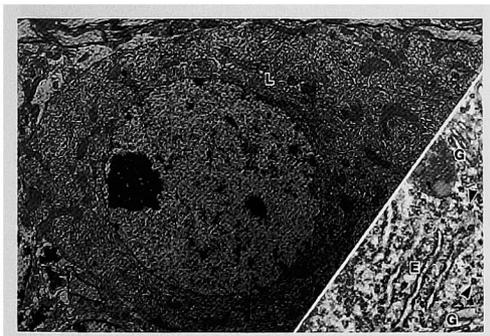


Fig. 4 A (resting) light neuron (L) in the cingulate cortex. Inset shows a closer view of a part of the main Figure. The ribosomes are sparsely distributed (small arrowheads). Endoplasmic reticulum (E) and Golgi's complexes (G) show no marked development. X 2,400, Inset: X 12,200.

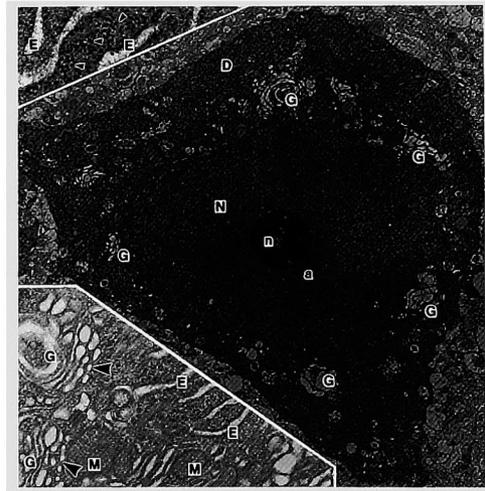


Fig. 5 A (active) dark neuron (D) in the cingulate cortex. The Golgi's complexes (G) are distributed in the perinuclear zone (see Fig. 1 Inset), and markedly dilated. The nucleus (N) is also darkened. The nucleolus (n) and nucleolus associated chromatin (a) are clearly visible. Upper inset shows a closer view of a part of the main figure. The cisternae of endoplasmic reticulum (E) contain a lot of amorphous substances. The cytoplasmic matrix is so dehydrated, that the ribosomes are densely distributed (small arrowheads). Lower inset shows a closer view of other area of the main Figure. The Golgi's complexes (G), including the transporting vesicles (large arrowheads), are well developed. M mitochondria. X 3,000, Upper inset: X 17,600, Lower inset: X 9,800.

れた (Fig. 2 Inset). 暗調細胞の被膜は, 細胞の収縮のために, 毛羽立ち「いがり」状を呈した (Fig. 1 Inset).

電顕所見

電顕でも, 暗調神経細胞が明調神経細胞と混在して出現することが確認できた (Fig. 3).

明調細胞の細胞質基質と核基質は共に電子密度が低く, 全体として脹よかで明るい細胞として観察された (Figs. 4, 4 Inset). 一方, 暗調細胞の細胞質基質と核基質は共に濃縮して電子密度が高く, 全体として収縮した暗い細胞として認められた (Figs. 5, 5 Inset, 6, 6 Inset). 多くの暗調細胞では, その収縮のために, 細胞膜が波うち, 核膜も波うっていた (Fig. 6). 電顕でも, 中間型の神経細胞が認められた. この中間型の細胞は, 光顕と同じく, 暗調細胞として観察した.



Fig. 6 Another example of dark neuron (D) in the cingulate cortex (most active form of dark neuron). The endoplasmic reticulum (E) and Golgi's complexes (G) are fully developed. The nucleus (N) is markedly condensed and shrunken by dehydration. Upper inset shows a closer view of a part of the main Figure, demonstrating the fully developed Golgi's saccules (G) and vesicles (large arrowheads). Lower inset shows a closer view of other area of the main Figure. The cytoplasmic matrix (C) is condensed by dehydration. X 3,600, Upper inset: X 11,700, Lower inset: X 25,800.

明調と暗調の両細胞において, 糸粒体などの細胞内小器官には特に異常なし相違は認められなかった. 両細胞で, 核小体付属染色質も明瞭に観察できた (Figs. 4, 5, 7). しかし, 暗調と明調の両細胞間に, 粗面小胞体とゴルジ装置とくに後者の形状において, 以下のような注目すべき所見が認められた.

すなわち, 暗調細胞はそのゴルジ装置の著明な発達によって特徴づけられた (Figs. 5, 6). 軽度に暗調化した細胞では粗面小胞体は目立たなかったが (Figs. 5, 5 Lower Inset), 典型的な暗調細胞では核の変形と共にゴルジ装置と粗面小胞体の拡大発達が認められた (Figs. 6, 6 Upper Inset). このような「活動あるいは分泌型の暗調細胞」のほかに「休 (安) 息ないし回復型の暗調細胞」が認められ, この種の暗調細胞では核はかなり脹よかでゴルジ装置の著明な拡大はなかった (Figs. 7, 7 Inset).

明調細胞でも, 輸送小胞を含めてゴルジ装置がかなり発達した「活動型の明調細胞」とゴルジ装置が目立たない「休息型の明調細胞」(Fig. 4) とが区別できた. しかし, 暗調細胞ほど明瞭ではなかった.

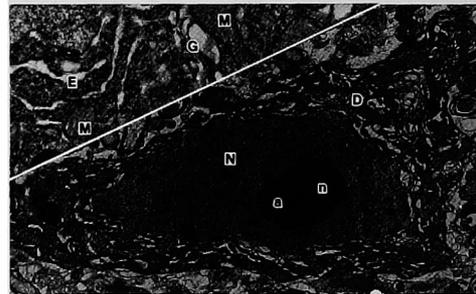


Fig. 7 A dark neuron (D) with markedly shrunken cell body (resting dark neuron or dark neuron in recovery to light neuron). The nucleus (N) shows no marked shrinkage. The nucleolus (n) and nucleolus associated chromatin (a) are noted as normal forms. Inset shows a closer view of a part of the main Figure. The cisternae of the endoplasmic reticulum (E) are irregularly arranged. The Golgi's complexes (G) shows marked shrinkages. M mitochondria. X 2,900, Inset: X 11,900.

考 察

本研究は暗調神経細胞は灌流固定によっても脳の随所で、その存在（出現）を明調細胞間に確認できる通常の細胞であることを光顕ならびに電顕的に示した。中間型細胞の出現は暗調細胞と明調細胞は一連の細胞であることを意味する。私達の先のマウスの大脳皮質の調査では、暗調細胞は午前3時と午後7時に最も多く出現し（60%弱）午前11時と午後11時に最も少なく出現した（15—20%）⁴⁾。

この暗調神経細胞については人工産物、病的な細胞等の多くの異なった見解が主として光顕的に述べられてきた⁵⁻¹³⁾。しかし、私達はマウスの大脳皮質を調査して、暗調細胞は動物の覚醒活動時に多く出現し睡眠によってその出現率が下る（概日リズムに従う）こと^{3,4)}や生後離乳期から現われはじめること¹⁾を知り、暗調細胞は活発な生産活動（神経伝達物質合成酵素の産生）期にある細胞とした^{3,19)}。

本研究は細胞の生産活動の主現場であるゴルジ装置と粗面小胞体の発達の程度から、A) 休

息型明調細胞、B) 活動型明調細胞、C) 活動型暗調細胞、D) 回復型暗調細胞が存在することを示した。私達はこの四型を「働き、休む(回復)」という細胞の生活環を表現していると理解し、Fig. 8に模式的に示した。上述したRamón y Cajal や Hodge の暗調細胞¹⁴⁾は私達の活動型暗調細胞を含まず、Tewari and Bourne の暗調細胞¹⁶⁾は私達の休息型の暗調細胞を含まない。

明調細胞で核小体を特異的に染めるケルネヒト赤が暗調細胞では核小体のほかに核と細胞質を染めることは面白い。このことは暗調細胞の核では盛んに RNA が産生され核小体の RNA と共に細胞質に動員されていることを示していると思われる^{3,19)}。活動型の暗調細胞では細胞質基質から粗面小胞体、ゴルジ装置への素材（酵素合成のための）供給の流れがあり、また合成された酵素が神経末端に向かう流れがあるはずである。このような細胞内の物質の動員や移動には多量の水が必要である²⁰⁾。しかし、ブドウ糖を主エネルギー源とする神経細胞では水の自家代謝による生産供給量は少ない。外来の水を貯える神経細胞間隙も狭い。すなわち、中枢神経系は、細胞の内外で、水事情の悪い組織ということができ、暗調細胞の本態は核質と細胞質基質の脱水であると思われる。

私達は、上述のように、睡眠ないし安静によって暗調細胞の数が著明に減少することをマウスやラットの脳でみている^{3,4,19)}。睡眠直後から前半に成長ホルモンの分泌が高まる^{21,22)}。私達はこの蛋白同化ホルモンが暗調細胞の明調細胞への回復に深く関わっていると考えている^{3,19)}。睡眠後半の高い副腎皮質刺激ホルモンの分泌²³⁾は中枢神経系よりむしろ下位器官の覚醒に対するものと思われる¹⁹⁾。さらに、私達は暗調細胞の出現（一定数以上）が内因性催眠物質（たとえばプロスタグランジン D₂²⁴⁾）分泌の引き金になりうると考えている。

細胞死について、最近アポトーシス（いわゆる計画的細胞死も含む）とネクローシス（壊死）とが区別されるようになった。本稿で論じた細胞の生理的活動サイクルで、休（安）息が無く激しい分泌活動が続けば、細胞は死に至る（未発表）。私達はこの死を「過労死」とよんでいる。

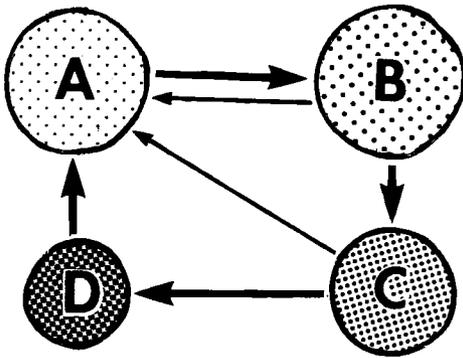


Fig. 8 Schematic diagram showing the light and dark cycle of neuron. A resting (light) stage with poorly developed Golgi's complexes, B active (light) stage with well developed Golgi's complexes, C active (dark) stage with fully developed Golgi's complexes, D resting (dark) stage with poorly developed Golgi's complexes. Sleep or relaxation may restore the B, C and D stages to A stage (thin and thick arrows).

結 論

マウスの大脳皮質, 小脳皮質と海馬を光顕と電顕的に調べた。暗調神経細胞はケルネヒト赤に好染し, 明調神経細胞から明瞭に区別できた。暗調細胞に活動型と回復型が認められた。活動型の暗調細胞はよく発達したゴルジ装置をもち, 回復型の暗調細胞のゴルジ装置はむしろ退行傾向を示した。活動型の暗調細胞は, この回復型

の暗調細胞を経て, 明調細胞に復すると考えられた。

謝 辞

本研究に使用した光顕標本は草野博道技官, 電顕標本は榎崎正博技官によって作製された。両技官に深謝します。本研究の一部は文部省科学研究費(08670016)によった。

文 献

- 1) Murakami T, Hitomi S, Ohtsuka A and Taguchi T : Neurons with perineuronal sulfated proteoglycans in the human visual cortex, with special reference to their reactions to lectins. Arch Histol Cytol (1995) **58**, 357—364.
- 2) Murakami T, Ohtsuka A, Taguchi T and Piao DX : Perineuronal sulfated proteoglycans and dark neurons in the brain and spinal cord : a histochemical and electron microscopic study of newborn and adult mice. Arch Histol Cytol (1995) **58**, 557—565.
- 3) 村上宅郎, 大塚愛二 : 睡眠は中枢神経の暗調細胞を明調細胞に復する。岡山医誌 (1996) **107**, 235—242.
- 4) Ohtsuka A and Murakami T : Dark neurons in the mouse brain : an investigation into the possible significance of their variable appearance within a day and their relation to negatively charged cell coats. Arch Histol Cytol (1996) **59**, 79—85.
- 5) Cammermeyer J : The importance of avoiding "dark" neurons in experimental neuropathology. Acta Neuropathol (1961) **1**, 245—270.
- 6) Stensaas SS, Edwards CQ and Stensaas LJ : An experimental study of hyperchromic nerve cells in the cerebral cortex. Exp Neurol (1972) **36**, 472—487.
- 7) Ebels EJ : Dark neurons. A significant artifact : the influence of the maturational state of neurons on the occurrence of the phenomenon. Acta Neuropathol (Berl) (1975) **33**, 271—273.
- 8) Løberg EM and Torvik A : Distribution between artefactually shrunken and truly denervated 'dark' neurons by *in situ* fixation with microwave irradiation. Neuropathol Appl Neurobiol (1993) **19**, 359—363.
- 9) Brown AW and Brierley JB : The nature, distribution and earliest stages of anoxic-ischemic nerve cell damage in the rat brain as defined by the optical microscope. Br J Exp Pathol (1968) **49**, 87—106.
- 10) Johnson JE Jr : The occurrence of dark neurons in the normal and deafferented lateral vestibular nucleus in the rat. Observations by light and electron microscopy. Acta Neuropathol (Berl) (1975) **31**, 117—127.
- 11) Agardh C-D, Kalimo H, Olsson Y and Siesjö BK : Hypoglycemic brain injury. I. Metabolic and light microscopic findings in rat cerebral cortex during profound insulin-induced hypoglycemia and in the recovery period following glucose administration. Acta Neuropathol (Berl) (1980) **50**, 31—41.
- 12) Sloviter RS : "Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. I. Acute electrophysiological and light microscopic studies. Brain Res Bull (1983)

- 10, 675—697.
- 13) Auer RN, Kamilo H, Olsson Y and Siesjö BK : The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. I. Light-and electron-microscopic findings in the rat cerebral cortex. *Acta Neuropathol (Berl)* (1985) **67**, 13—24.
 - 14) Ramón y Cajal S : Variations in the structure and shape of neurons under normal and pathological conditions, and the functional implications of such variations. in *Histology of the nervous system of man and vertebrates* by S. Ramón y Cajal. Vol. I., Swanson and Swanson eds, Oxford University Press, New York and Oxford (1995) pp174—190.
 - 15) Islam N, Moriwaki A, Hattori Y and Hori Y : Appearance of dark neurons following anodal polarization in the rat brain. *Acta Med Okayama* (1994) **48**, 123—130.
 - 16) Tewari HB and Bourne GH : Histochemical studies on the “dark” and “light” cells of the cerebellum of rat. *Acta Neuropathol (Berl)* (1963) **3**, 1—15.
 - 17) 村上宅郎, 朴 大勳, 大塚愛二, 西田圭一郎 : 組織固定剤としてのタンニン酸, 特にグルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒドとの混用. *岡山医誌* (1996) **108**, 293—296.
 - 18) Murakami T, Taguchi T, Ohtsuka A, Sano T, 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.
 - 19) 村上宅郎, 大塚愛二 : 睡眠で甦る脳の神経細胞. *ミクروسコピア* (1996) **13**, 164—170.
 - 20) 上平 恒, 逢坂 昭 : 生体高分子の水和, 細胞内の水の状態 : 生体系の水, 上平 恒, 逢坂 昭編, 講談社サイエンティフィク, 東京 (1995) pp105—166.
 - 21) Takahashi Y, Kipnis DM and Daughaday WH : Growth hormone secretion during sleep. *J Clin Invest* (1968) **47**, 2079—2090.
 - 22) Šassin JF, Parker DC, Mace JW, Gotlin RW, Johnson LC and Rossman LG : Human growth hormone release : relation to slowwave sleep and sleep-waving cycles. *Science* (1969) **165**, 313—315.
 - 23) 浜田真理子, 渥美義賢, 融 道男 : ホルモンと睡眠 : 睡眠とその障害をめぐって, 融 道男, 渥美義賢編, メディカルカルチャー, 東京 (1994) pp49—61.
 - 24) 松村人志 : 睡眠調節とプロスタグランディン (PG) D2, PGE2. *日本臨床* (1992) **50**, 195—201.

**Dark and light neurons in the central nervous system
Light and electron microscopic study of the mouse brain**

Takuro MURAKAMI¹⁾, Aiji OHTSUKA¹⁾ and Seizo YAMANA²⁾

¹⁾Section of Human Morphology, Department of Anatomy,

Okayama University Medical School,

Okayama, Japan

(Director: Prof. T. Murakami)

²⁾Centre of Rheumatic Diseases,

Higashi-Hiroshima Memorial Hospital,

Higashi-Hiroshima, Japan

(President: Dr. S. Yamana)

The cerebral cortex, cerebellar cortex and hippocampus of adult mice were studied by light and electron microscopy of tissue sections. Dark neurons were well stained with nuclear fast red, and clearly distinguishable from light neurons. The dark neurons were classified into active and resting types. Active types were characterized by their well developed Golgi's complexes. Resting types contained poorly developed Golgi's complexes. These findings indicate that active dark neurons are converted into the light neurons via resting dark neurons.