

神経分泌物の組成 II. 神経分泌系に及ぼす遠心分離作用*

熊 本 哲 三

和歌山医科大学第一解剖学教室

昭和 32 年 10 月 30 日 受領

緒 言

組織化学的見地より神経分泌物の組成について, Schiebler ('51, '52a, b), Hild 及び Zetler ('53), Sloper ('55, '57), 井本 ('55), Howe 及び Pearse ('56) 及び熊本 ('57a, b) 等の諸研究があり, その組成に関してやや違った見解をとる二説に分かれている。しかし細胞質の他の組成とは明らかに異なつた組成であることには疑いをもたないのである。

原形質の構成成分については, 組織学的, 組織化学的研究と並んで遠心分離によつて粘性や比重等の問題から究める方法がある。たとえばウニ卵や神経細胞に應用されている方法 (Ingvar, '23) であつて, 又最近ミトコンドリアやミクロソーム或は分泌物の研究において, 組織のホモジエネートを遠心分離機にかけて純粋に分離し, 試料として各方面に應用されている (Claude, '46a, b; Hogeboom, '51; Schneider 及び Hogeboom, '51)。下垂体後葉のホモジエネートを遠心分離して各々の分別について電子顕微鏡や酵素反応を行つて興味ある報告を Schiebler ('52) によつてなされている。

筆者はさきにカエルの神経分泌物に磷脂質が多量存在し, 他の細胞質とは明らかに区別し得られ, また血清によつてシロネズミの神経分泌物が分解されて chrome-alum hematoxylin phloxine の染色性が消失することを知つた ('57a, b)。このような神経分泌物が他の細胞成分と如何なる関係にあるかを知る目的で本研究を試みた。

実験材料及び方法

試供材料はすべてトノサマガエル (*Rana nigromaculata*) の脳を用いた。方法は断頭後直ちに摘出した脳を 0-4°C に保つた生理的食塩水に入れ, 各各一個ずつの脳を遠心管に入れて速かに遠心分離した。用いた装置は 40P 型日立分離用超遠心機 (ロータの半径: 81 mm) である。分別は 7,500r.p.m. より 40,000r.p.m. までの 8 の分別について各各 15 分及び 30 分間遠心分離を行つた。8 の分別については 7,500r.p.m., 10,000r.p.m., 15,000r.p.m., 20,000r.p.m., 25,000r.p.m., 30,000r.p.m., 35,000r.p.m. 及び 40,000r.p.m. の各分別である。遠心分離後は直ちに Zenker-フォルモル液に固定し, 水洗, アルコール脱水を経てパラフィンに包埋した。切片は前額断で 5 μ の連続切片を作製し, Gomori の chrome-alum hematoxylin phloxine 法及び 0.5% チオニン水溶液で染色を行つた。

実験結果

前額断によつて現われる Nucl. preopticus magnocellularis の細胞は第三脳室の左右に分布し, それらの神経細胞より出る神経分泌顆粒は, 大抵ななめ下外側に向つて分散している。神経細胞内では微細な分泌顆粒に伴つて種々の大きさの分泌顆粒がみられ, 分泌顆粒の密度はある細胞においてはほとんど充満しているものや, 比較的粗であるもの等あり, 軸索 (axon) に沿つて移動するものは微細な顆粒に伴つて中, 大型の球状の顆粒が存在する。ニューロパイル (neuropil) には巨大な顆粒や種々の大きさの顆粒が存在する。好塩基性物質, 主としてニッスル (Nissl) 小体であるが, これらの物質は細胞の周辺に比較的密に存在し, 細胞の中心部すなわち細胞核の周辺は疎である。細胞核及び仁はそれぞれ細胞及び核の中央部に位置し, 核質の分

* 本研究の要旨は第 6 回日本解剖学会 ('56) 及び第 26 回日本動物学会実験形態学会討論会 ('56) において講演した。

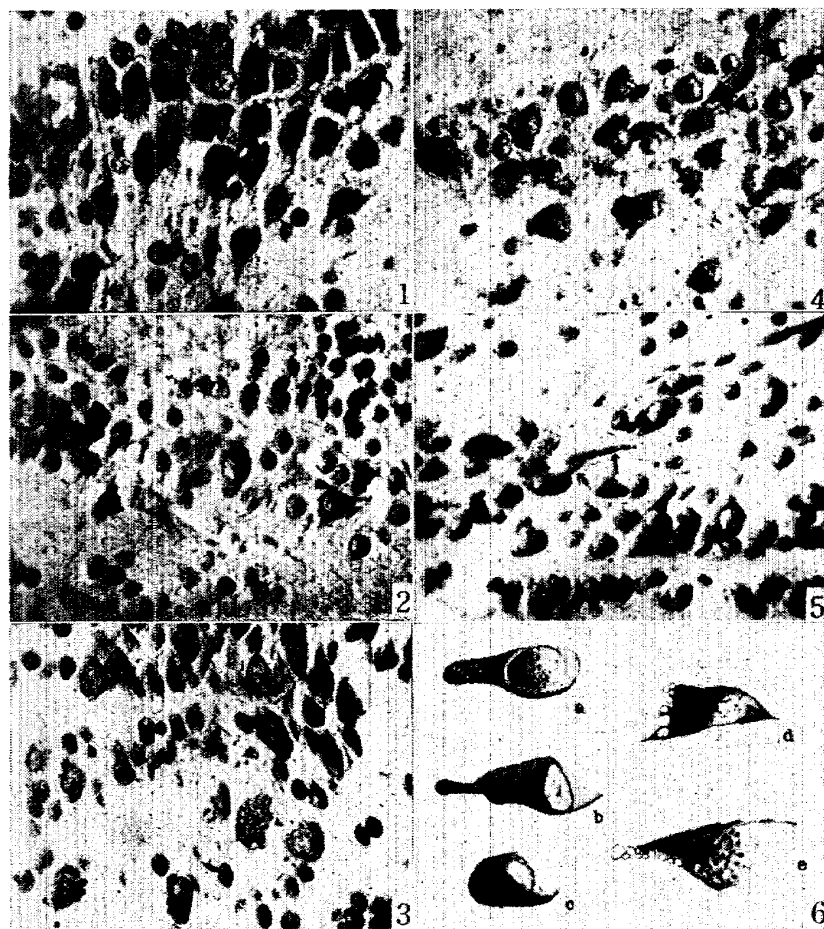


Fig. 1. Preoptic nucleus of the hypothalamus in control frogs stained with Gomori's chrome-alum hematoxylin phloxine method. Showing the distribution of large and small neurosecretory granules in the cytoplasm and neuropil. $\times 600$.

Fig. 2 and 3. Preoptic nucleus of the hypothalamus in frogs after centrifugation for 30 min. at 20,000 r.p.m. Showing the accumulation of large cytoplasmic neurosecretory granules and nuclear substance. Stained with CHP stain. $\times 600$.

Fig. 4. Preoptic nucleus of the hypothalamus in frogs after centrifugation for 30 min. at 25,000 r.p.m. Showing the remarkable accumulation of the cytoplasmic neurosecretory granules, and deformation of secretory cells. Stained with CHP stain. $\times 600$.

Fig. 5. Preoptic nucleus of the hypothalamus in frogs after centrifugation for 30 min. at 30,000 r.p.m. Showing the distribution of neurosecretory granules in a linear formation on the axon. Stained with CHP stain. $\times 600$.

Fig. 6. Preoptic nucleus of the hypothalamus in frogs after centrifugation for 30 min. at 40,000 r.p.m. Showing the agglutination of secretory granules stained with CHP stain (a, b and c) and distribution of neurosecretory granules and Nissl substance (d and e). Stained with 0.5% thionin. (The neurosecretory granules remain as brilliantly globular granules and Nissl substance is stained as dark blue or violet with thionin) $\times 1,400$ camera lucida drawing.

布もほぼ均等である。他の神経細胞及び神経膠細胞の核質の分布も神経分泌細胞の分布と同様である。(Fig. 1)。チオニン染色にさいして神経分泌物はニッスル小体と染色性が異り、淡青色に輝いて染り、両者の区別は明瞭である。しかしこのことは大型の球状顆粒についてであつて、微細なものについては染まっているか否かの識別は困難である。

神経細胞に及ぼす遠心力の影響は Nucl. preopticus magnocellularis の神経細胞と、他の神経細胞や神経膠細胞ではやや違っている。これらの点について詳細に記載すると、15,000 r.p.m. 15 分間の処置ではいずれの細胞においてもほとんど変化は認められないが、30 分間の遠心分離を行うと Nucl. preopticus の細胞以外においてわずかな変化がみられる。すなわち、核質及び仁の分布はやや乱れ、若干の核が細胞のかたがわによつている像をみる。20,000 r.p.m. の遠心分離において、特に 30 分間の作用では神経分泌細胞にも遠心力の影響があらわれる。まず神経分泌細胞の核質及び仁において、かたがわにかたよつた分布が観察せられ、神経分泌顆粒でも大きい顆粒は仁と同一がわにかたよつているが、好塩基性物質すなわちニッスル小体の分布はほとんど変らない (Fig. 2 及び 3)。この現象の特に著しいのは、更に高度の 25,000 r.p.m. 15 分の作用であつて、仁はほとんど核膜に接着する程度にかたよつている像もみられ、神経分泌物は Fig. 4 に示されどとく著しいかたよりと、それにとまら細胞の形態の

変化がみられる。これ以上の遠心力すなわち、30,000r.p.m. のものにおいても細胞の著しい変形がみられ、神経分泌顆粒の分布は淡青色に染まる細胞質にまぎって存在するも、中等度より大きいものは仁と同一がわに密集している。特に神経分泌顆粒の分布において興味ある所見として、軸索を移動する顆粒が遠心力のために軸索の一侧におしつけられて一列に配列していることである (Fig. 5)。このように神経分泌顆粒は遠心力のために細胞の一侧におしつけられて密集しているものもあるが、個々の顆粒はほとんど原形態をくずさず融合して塊状となることはない。更に高度の遠心力すなわち、35,000r.p.m. の作用によつて神経分泌顆粒と共にニッスル小体の分布が乱れ、不規則な塊状となつて細胞のかたがわに密に集つてい。ニューロピル (neuropil) に好塩基性物質の散在するものも観察された。40,000r.p.m. では細胞は細長く延びて、ほとんどの細胞含有物質がその方向にかたよつていて、神経分泌顆粒も塊状となつて密な集団を形成するものや、少量の微細な顆粒が皮殻状に原形質膜にそつて配列していたり、不定形の融合した塊状となつたりしている (Figs. 6a, b 及び c)。チオニン染色との比較において、ニッスル小体は神経分泌顆粒より移動が少くて核と神経分泌顆粒との間に位置している (Figs. 6d 及び e)。

Tractus preoptico-hypophyseus に沿つて移動する神経分泌顆粒は遠心力の影響はほとんど認められない。しかしながら phloxine によつて紅染する顆粒は、対照個体のものに比べて数多く認められる。

考 察

組織のホモジエネートから細胞内成分を遠心分離によつて分離することは、肝や脾のミトコンドリア、ミクロソーム、分泌物或は核質等について広く応用されている (Claude, '41; Hogeboom, '51; Schneider 及び Hogeboom, '51)。下垂体後葉のホモジエネートの各分別についても Schiebler ('52c) の報告がある。Schiebler によれば、シロネズミやハツカネズミの新鮮な下垂体後葉、肝、腎及び大脳皮質のホモジエネートを作り、これを遠心分離機にかけて各分別をとつてしらべた。その結果下垂体後葉より分離された顆粒は 2000×g においては 0.5-2.5 μ の直径を有し、12,000×g では 50-70m μ で、更に 20,000×g では 50m μ のものがわずかに存在するという。そしてこれらの分離された顆粒について位相差法や電子顕微鏡などによつて、或は酵素反応等の結果から、組織切片で見出される神経分泌顆粒に一致するという。

神経分泌物の化学的ないし組織化学的性状に關しての研究は Ortmann ('51), Schiebler ('51, 52a, b) Hild 及び Zetler ('53), Barnett ('54), 井本 ('55), Sloper ('55, '57) 及び Howe 及び Pearse ('56) 等の諸研究にみられる。Ortmann, Schiebler, Hild 及び Zetler, 井本等は神経分泌物は後葉ホルモンの担体であつて、糖脂質蛋白 (glyco-lipoprotein) 複合体であるという。Barnett ('54), Sloper ('55, '57) Howe 及び Pearse ('56) 等は蛋白質の証明を行つて、S 基を含むシスチン或はシステインが存在するという。du Vigneaud ('53a, b, '54) 等によつて後葉ホルモンの合成と構造の決定に成功し、後葉ホルモンは数種のアミノ酸から成り、オクタペプチド (Octapeptide) であるということがわかつた。筆者はさきにカエルにおいて磷脂質が神経分泌物の構成成分の一部をなしていることを認めた ('57a, b)。そこで Ingvar ('23) によつてなされた遠心分離の方法を、これらの神経分泌系に作用させてみた。Ingvar によれば、神経細胞で最も遠心分離の影響を受けやすいのは仁であつて、好塩基性物質は仁に次いで変化が現われるのであつて、これは恐らく高い粘性のためであろうという。筆者の観察結果は、遠心力の影響は先ず神経膠細胞や Nucl. preopticus を除く細胞の仁及び核質に現われ、次いで神経分泌細胞の核に現われる。神経分泌顆粒は大体 20,000r.p.m. 程度の遠心力によつて始めて正常の分布が乱され、細胞の一侧にかたよるようになる。ニッスル小体はそれよりはるかに移動し難く、35,000r.p.m. 程度の作用によつて乱れた分布を示すようになる。このことより考察して原形質の粘性や比重がそれぞれ異つた値を示すものであつて、細胞核の仁は特に大きい比重をもっているものと考えられる。この点に關して Ingvar の所見と同じようである。また核質——クロマチンを主体とする——も移動をおこしやすく、原形質中核質も比較的大きい比重をもっていることがうかがえる。更に種類の違つた細胞間における相違について考察すると、神経分泌を営む細胞は他の神経細胞 (神経膠細胞を含む) の核

とは粘性や比重が異つているものと考えられる。すなわち、神経分泌を営む細胞核よりは他の神経細胞に変化が起りやすく、このことは恐らく神経分泌細胞核の方が小さい比重によるものと解せられる。

神経分泌系の神経細胞内の遠心力による移動の程度や形態の変化から推察して、次のごとき結果を知ることが可能である。すなわち、細胞核自身は比較的大きい比重を有することであつて、それに次いで神経分泌顆粒が大きく、ニツスル小体は比較的小さいということである。また神経分泌顆粒は高度の遠心力によつても融合したり、変形することが少いことも知り、或る程度高い粘性を示す結果であろうと思われる。Fujita ('57) の電子顕微鏡の観察により散在する小顆粒は限界膜とその内部とで電子密度が異つているという構造や、筆者の実験によつても容易に融合や変形がおこらないということから考え合わせて、神経分泌顆粒の組成は必ずしも均等ではないことを意味しているものと思える。

神経分泌顆粒が神経細胞から下垂体後葉へ移動する過程で、軸索 (axon) の内部を通るか否かということとは、決定的な解決はついていないようであるが、大体軸索の内部であろうとされている (cf. 榎並, '56; 野田, '56)。軸索を移動する微細な分泌顆粒が強力な遠心力が働いたために軸索内の一側におしつけられて、一列に配列している像を観察し、更に分泌路にみられる神経分泌顆粒の形態や分布の位置がほとんど対照の個体と比べて変らない点から、軸索内部のせまい部分を通過して下垂体後葉へ向つて移動するものと思われ、Green 等 ('55) の電子顕微鏡によつて神経線維内に電子密度の高い 0.1μ 内外の小顆粒を観察していることより内部を移動するものと考えられる。やや興味ある所見として、神経分泌顆粒に混じて phloxine に好染する顆粒がやや多く認め得ることであつて、これらの問題については次の機会にゆずりたい。

要 約

1. 新鮮なトノサマガエルの脳を $0-4^{\circ}\text{C}$ に保つた生理的食塩水に入れ、40P 型日立分離用超遠心機を用いて 7,500r.p.m. より 40,000r.p.m. の 8 の分別に分けて遠心分離を行い、固定されたパラフィン切片を chrome-alum hematoxylin 法及びチオニン染色によつて、神経分泌細胞の形態と神経分泌顆粒を観察した。
2. 神経分泌細胞を除く神経細胞核 (神経膠細胞を含む) は 15,000r.p.m. 30 分の作用で変化がみられるが、神経分泌細胞核はややおくれ 20,000r.p.m. 頃より変化がみられる。
3. 遠心力の影響によつて神経分泌顆粒は細胞の一側にかたよることを観察した。これらの顆粒の移動は 25,000r.p.m. で著しいかたよりがみられ、細胞の変形をも伴う。
4. 神経分泌顆粒とニツスル小体とはそれぞれ異つた変化を示し、神経分泌顆粒の方がやや比重が大きくかつ粘性も高いようである。
5. 軸索を移動する微細な神経分泌顆粒は、遠心力の影響によつて一列に配列する像をみた。このことは軸索の内部を移動することを示すものと考えられる。

ご指導を賜つた本学半田順俊教授に深甚の謝意を表する。

Résumé

Studies of Physical and Chemical Properties of Neurosecretory Substance II. Effect of Ultra-Centrifugation on Neurosecretory System

Tetsuzo KUMAMOTO

Department of Anatomy, Wakayama Medical College

1. The purpose of this experiment is to observe the effect of the ultracentrifugation upon the hypothalamic neurosecretory system of the fresh frog brains. Excised brains were put into centrifuge tubes

together with the ice-cold physiological saline solution. The tubes were centrifuged for 15 or 30 minutes at the rate of 7,500 to 40,000 revolutions per min. (r.p.m.). After centrifugation, the brains were fixed in Zenker-formol fluid, dehydrated by alcohol, transferred to benzene, and embedded in paraffin. Serial sections were made at 5μ in thickness, and stained with Gomori's chrome-alum hematoxylin phloxine or 0.5% thionin solution.

2. At the rate of 15,000 r.p.m. for 30 min. the nucleus of the nerve cells (inclusive of the neuroglial cells but excluding the neurosecretory cells) showed a conspicuous change; namely the pressed chromatophil substances were accumulated at one side of the nuclear membrane. However, in the neurosecretory cells, this change began at first to be observed at the rate of 20,000 r.p.m.

3. By the effect of ultra-centrifugation, the neurosecretory granules were shifted and accumulated together at one side of the cytoplasm of the deformed nerve cell. The most marked changes were observed at the rate of 25,000 r.p.m.

4. Being compared with the distributions of the neurosecretory and Nissl substances after centrifugation, Nissl substance was found to distribute between the nucleus and the neurosecretory substance. This fact suggests that the neurosecretory substances has heavier specific gravity and higher viscosity than those of Nissl substance.

5. The fine neurosecretory granules along the axon of the hypothalamo-hypophyseal tract were observed to be stained in a linear formation on the axon. It will be naturally concluded from this fact that the neurosecretory granules are transported within the axon.

文 献

- Barnett, R. J. '54. *Endocrinology* **55**: 484. Claude, A. '46a. *J. Exptl. Med.* **84**: 51. ——— '46b. *J. Exptl. Med.* **84**: 61. du Vigneaud, V., C. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts. P. G. Katsoyannis & S. Gordon '53a. *J. Am. Chem. Soc.* **75**: 4879. du Vigneaud, V., H. C. Lawler and E. A. Popeno '53b. *J. Am. Chem. Soc.* **75**: 4880. du Vigneaud, V., D. T. Gish & P. G. Katsoyannis '54. *J. Am. Chem. Soc.* **76**: 4751. 榎並 仁 '56. *実験形態学誌* **10**: 65. Fujita, H. '57. *Arch. hist. Jap.* **2**: 165. Green, T. D. & V. L. van Breemen '55. *Am. J. Anat.* **97**: 177. Hild, W. & G. Zetler '53. *Z. ges. exp. Med.* **120**: 236. Hogeboom, G. H. '51. *Federation proceedings* **10**: 640. Howe, A. & A. G. E. Pearse '56. *J. Histochem. Cytochem.* **4**: 561. 井本昭雄 '55. *日組録* **8**: 361. Ingvar, S. '23. *Arch. neurol. psychiat.* **10**: 267. 熊本哲三 '57a. *実験形態学誌* **11**: 55. ——— '57b. *解剖学雑誌* (印刷中). 野田秀俊 '56. *基礎医学最近の進歩* pp. 171-184. Ortmann, R. '51. *Z. f. Zellforsch. u. mik. Anat.* **36**: 92. Schiebler, T. H. '51. *Acta Anat.* **13**: 233. ——— '52a. *Acta Anat.* **15**: 393. ——— '52b. *Exp. cell. Res.* **3**: 249. ——— '52c. *Z. f. Zellforsch. u. mik. Anat.* **36**: 563. Schneider, W. C. & G. H. Hogeboom '51. *Cancer Res.* **11**: 1.