

## マボヤ脳神経節の走査電子顕微鏡観察のための化学消化の試み

梶原昌五\*

(1993年6月30日受理)

### 1 序論

ホヤ類の神経系は、中枢神経系としての脳神経節と末梢神経系としての体壁および内臓に分布する神経からなる。これらに関する組織学的研究は、カタウレイボヤ *Ciona intestinalis* において、いくらかなされているが、脳神経節の細胞構成においても、まだ共通の認識が得られるまでにはいたっていない (Millar, 1953; Goodbody, 1974)。

神経系に関する組織学的研究は、一般に、組織を薄切して連続切片を作製し、その光学顕微鏡や電子顕微鏡による観察像から立体構成を構築することによって行われる。本研究で対象としたマボヤの属するホヤ類では、脳神経節を構成する細胞が比較的小さい (Millar, 1953) こと、さらに、脳神経節が円柱状なので、個別の神経節細胞の位置を特定するためのマーカーとなる形態的な特徴が把握しにくいことが従来の方法による研究の進展を妨げてきたと考えられている (小山, 1991)。

一方、組織の表面構造を観察する手段として、走査電子顕微鏡が用いられる。しかしながら、体内の多くの組織の場合は、基底膜や膠原繊維などの結合組織に包まれているために、組織を剖出しただけでは、対象となる細胞が観察されないことが多い。そのような組織の細胞を観察するために、結合組織の間質成分のみを除去する方法が有効となる。そのための化学消化の試みが1960年代後半から行われ始め、1976年、Evanらによって塩酸-コラゲナーゼ法が開発されてから、この分野の研究は一段と進み、さまざまな変法が開発された (宮澤と安達, 1992)。

本研究は、切片像からの立体像の構築ではなく、組織の化学消化法と走査電子顕微鏡法を用いることにより、マボヤの脳神経節の断面の立体構造を観察することが可能かどうかを調査する目的で行われた。

### 2 材料と方法

#### 1 材料

本研究では、生後3~4年のマボヤ *Halocynthia roretzi* を使用した。陸奥湾内で水産物として養殖されているマボヤを港で購入し、青森市浅虫の東北大学理学部附属臨海実験所内の水槽に一時保管した後、岩手大学に陸送し、研究室内に設置された海水循環式水槽中で、実験に使用するまで飼育した。

\* 岩手大学教育学部

## 2 方法

脳神経節の位置を確認するために、まず、マボヤを温海水(40℃)中で、水管を縮めなくなるまで麻酔し、その後10%海水ホルマリン溶液で固定し、後日、ホルマリン固定されたマボヤを水洗してホルマリンを除去した後、解剖した。

走査電子顕微鏡観察のために、組織の化学消化法として、Ueharaら(1980, 1981)の変法(Itoh and Tominaga, 1991)を、マボヤ脳神経節-神経腺複合体に適用した。

まず、生きているマボヤから、結合組織鞘に包まれた脳神経節-神経腺複合体をハサミで摘出し、シャーレ中の海水に浸した。次に、同複合体を包んでいる結合組織鞘を、ピンセットを用いてできるだけ取り除いた。その後、残存している結合組織を化学的に消化するため、37℃、0.25%海水トリプシン(Merck社)溶液に40分間浸した。処理終了後、トリプシンを除去するため、濾過海水で3回(37℃・室温・室温、各10分間)洗浄し、2.5%海水グルタルアルデヒド溶液(4℃)で脳神経節を2時間固定した。固定処理中、脳神経節内部の観察を容易にするために、脳神経節をカミソリで切断した。固定終了後、固定液を除去するため海水(室温)で脳神経節を洗浄(3回、各10分間)した後、8Nの塩酸(60℃)に25分間浸し、その後塩酸を除去するため、蒸留水で3回(60℃・室温・室温、各5分間)洗浄した。

試料の乾燥処理は、まず、上記蒸留水洗浄後の脳神経節を、70, 80, 90, 95, 99%(99%のみ3回)のエチルアルコール上昇系列により脱水(各15~30分間)し、最後にアルコールを酢酸イソアミルに置換して、日立HCP-1型臨界点乾燥装置により行った。

乾燥した試料を、走査電子顕微鏡専用の試料台の上に導電テープで保持し、エイコーIB-3型イオンコーターで金イオンを蒸着した。観察には、日立S-450型走査電子顕微鏡を使用した。

## 3 結果

### 1 脳神経節の存在部位と外部形態

マボヤの上面には入水管と出水管が突出している。両水管の基部に挟まれた部位は、周囲に比べて、被囊の色が大変薄い(図1-A)。この部分の被囊と、被囊直下の表皮、薄い筋肉組織を取り去ると、黄色の脳神経節が観察できた(図1-B)。さらに、脳神経節に沿って走行する山吹色の神経腺も観察できた。これらの器官は、脳神経節-神経腺複合体と呼ばれ、非細胞性の結合組織鞘に包まれている。



図1 マボヤの入水管と出水管基部周辺を背側から撮影した写真。入水管と出水管の基部を結ぶ線上の被囊を除去する前(A)と後(B)。Bでは、Aの被囊の色が薄い部分の下に脳神経節-神経腺複合体が存在することに注目。i:入水管, o:出水管, gc:脳神経節-神経腺複合体。スケールは2cm。

図2は図1-Bの拡大写真である。脳神経節はその両端で分岐している。入水管側（前端）では2本に、出水管側（後端）では2本に分れた直後に左の神経からさらに1本が分岐する（図2，矢印）。それぞれの神経は各水管の基部でさらに分岐するが，本研究では，それ以上の観察は行っていない。

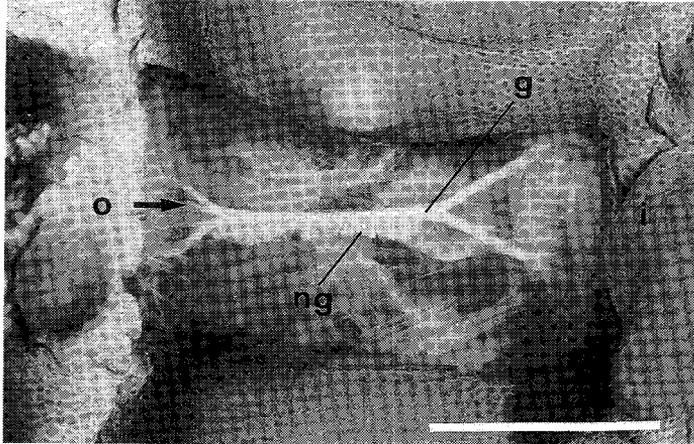


図2 図1-Bの拡大写真。i：入水管，o：出水管，g：脳神経節，ng：神経腺。矢印は，脳神経節後部左側の神経から分岐する神経。スケールは1cm。

## 2 脳神経節—神経腺複合体の走査電子顕微鏡観察

摘出した脳神経節—神経腺複合体は，厚い結合組織鞘に包まれている。この状態にすぐに化学消化法を適用しても，脳神経節細胞体を観察することは，結合組織鞘が厚いため不可能と考えられたので，まずピンセットを用いて，機械的に結合組織鞘を取り除いた。その後，前章に記載した方法で化学消化した。さらに本研究では脳神経節内部の細胞を観察することが主題であるので，グルタルアルデヒド固定中に，脳神経節を切断した。

図3に，化学消化された脳神経節—神経腺複合体の走査電子顕微鏡写真を示す。この写真から，ピンセットだけでは，結合組織鞘が完全に除去されていないこと，さらに，今回の消化法では，結合組織鞘が完全に消化されていないことが分かる。しかし，脳神経節の切断面に露出した細胞の観察は可能であった。

脳神経節を包む結合組織鞘の表面には，神経腺（図3，ng）と，背索（同，ds）が観察できた。また，これらの組織は，脳神経節に対して，斜めに走行していた。一方，脳神経節の断端（同，矢印）では，結合組織鞘がめくれており，脳神経節細胞が露出していた。この部分をさらに高倍率で観察したのが図4である。

細胞体は球形または楕円球を呈し，直径は7 $\mu$ mから10 $\mu$ mであった。また，直径約1 $\mu$ mの，軸索と考えられる突起が観察できた（図4，矢印）。これまでの観察では，他の種類の突起が細胞体から伸びている像は観察されなかった。細胞体は脳神経節を包む結合組織鞘の直下に存在して，層を形成していた。しかしながら，今回の実験では，脳神経節の髄質部に存在することが切片像の観察から明らかになっている細胞の線維は観察できなかった。

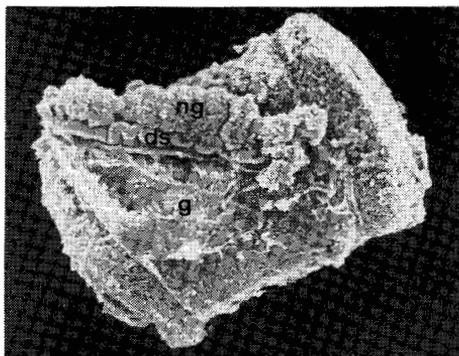


図3 化学消化された脳神経節—神経腺複合体の走査電子顕微鏡写真。g：脳神経節，ng：神経腺，ds：背索。スケールは50 $\mu$ m。

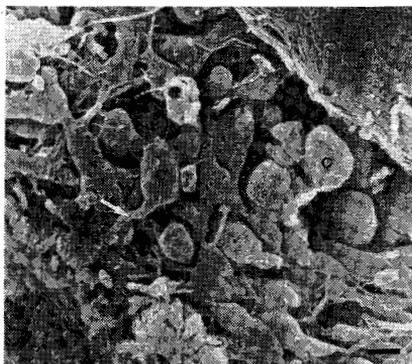


図4 脳神経節断端の高倍率走査電子顕微鏡写真。c：脳神経節細胞。矢印は軸索と考えられる突起。スケールは5 $\mu$ m。

今回得られた走査電子顕微鏡写真を注意深く観察すると、表面に小孔が観察できる細胞がいくつか見られた。また、チャージアップしている像も見られた。これらは、試料作製方法に問題があった事を示している。

#### 4 考 察

本研究は、マボヤ脳神経節の存在部位と外部形態を示すこと、さらに、脳神経節およびその細胞の表面構造を、化学消化法を適用して走査電子顕微鏡で観察することが可能かどうかを調査する目的で行われた。

ホヤ類では、脳神経節は入水管と出水管の基部を結ぶ線上の被囊直下の体壁中に、結合組織鞘に包まれて存在する (Goodbody, 1974)。図1では、マボヤでも同じ部位に脳神経節が存在することを示したが、マボヤにおいて特に顕著であるのは、脳神経節—神経腺複合体の上部にある被囊の色が周囲の色に比べて非常に薄いことである。Kajiwaraら (1990) は、マボヤの脳

神経節から視物質発色団を検出し、また、摘出した脳神経節に2種の単色光を照射することにより発色団の光異性化が可逆的に起こることから、脳神経節に光受容機能があることを示唆した。このことから、脳神経節の上部の被囊の色が周囲に比べて薄いことは、光の透過率を上げ、脳神経節に光情報を効率的に伝達するための、生物の環境適応の結果ではないかと考えられる。

本研究では、厚い結合組織鞘に包まれた脳神経節の細胞を、結合組織鞘を機械的、化学的に除去することによって、走査電子顕微鏡でも観察できるようになることが示された。特に、グルタルアルデヒド固定中に脳神経節を切断することにより、脳神経節内の細胞の存在部位および配列を、従来の、切片像からの構築に依らず直接観察することが可能になったことは、今後の研究の方向性を決定するうえで、重要な意味を持つ。さらに、この方法の確立によって、脳神経節から派出する、これまでに発見されていない神経束が見いだされる可能性がある。

今回得られた化学消化による走査電子顕微鏡観察での知見は、これまでに光学顕微鏡・透過型電子顕微鏡観察から明らかになっている、脳神経節の細胞体が脳神経節の皮質部分を形成している事実を裏付ける結果であるが、従来の方法では確認できなかった細胞から伸びる軸索と思われる像が得られたことは、今後、脳神経節の細胞の機能を研究するうえで、貴重な成果である。また、今回は得られなかったが、脳神経節髄質部に存在する神経線維の観察は、以下に述べる改良点と共に、今後の課題として追究すべき問題である。

また、得られた走査電子顕微鏡写真を注意深く観察した結果、消化酵素処理の不適を示すと考えられる結合組織鞘の未消化部分の存在、塩酸処理時間が長すぎたために生じたと思われる細胞表面の損傷、固定方法に問題点を残すと考えられる像のチャージアップ等、改良を要する点が見いだされた。今後は、この点を中心に、生体にできるだけ近い像が得られるよう方法の改善を進めて行きたい。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、適切な御助言をいただきました岩手大学教育学部生物学教室の星野善一郎教授に感謝いたします。また、技術的な御指導をいただいた、岩手大学電子顕微鏡室の上山あや子氏に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Goodbody, I., "The Physiology of Ascidians.", ed. Russell, F. S. and Yonge, M. *Advances in Marine Biology*, Academic Press Inc., London, (1974), pp. 1-149.
- 2) Itoh, T. and Y. Tominaga, "Scanning Electron Microscopy of the Antennal Lobe of the Honeybee, *Apis mellifera* L.", *J. Electron Microsc.*, 40, (1991), pp. 129-135.
- 3) Fujiwara, T. and Y. Uehara, "Scanning Electron Microscopy of Myenteric Plexus: A Preliminary Communication.", *J. Electron Microsc.*, 29(4), (1980), pp. 397-400.
- 4) Kajiwara, S., S. Tamotsu, Y. Morita and T. Numakunai, "Retinal isomers in the cerebral ganglion of the ascidian, *Halocynthia roretzi*.", *Invertebrate Reproduct. Develop.*, 17(2), (1990), pp. 155-158.

- 5) 小山洋道, 「ホヤ成体の神経系」, ホヤの生物学談話会編 『海鞘』第9号, 1991年, pp. 1-11.
- 6) Matsuda, S. and Y. Uehara., "Cytoarchitecture of the Rat Dorsal Root Ganglion as Revealed by Scanning Electron Microscopy.", *J. Electron Microsc.*, 30(2), (1981), pp. 136-140.
- 7) Millar, R. H., "Ciona". ed. Colman, J. S., *L. M. B. C. Memoirs on Typical British Plants and Animals*, The University Press of Liverpool, Liverpool. (1953), pp. 1-84.
- 8) 宮澤七郎, 安達公一監修, 『医学・生物学の走査電子顕微鏡(基礎・応用・アトラス)』, 医学・生物学電子顕微鏡技術研究会編 医学出版センター刊, 東京, 1992年.