

睡眠は中枢神経の暗調細胞を明調細胞に復する

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

(平成7年8月1日受稿)

Key words : Central nervous system, dark neurons, clear or light neurons, sleep, sulfated proteoglycans

緒 言

私達は超微細陽性荷電ならびに陰性荷電鉄コロイドを開発して, 各組織細胞を荷電の面から見直している¹⁻³⁾. その成果の一つとして, ヒトなど哺乳類をはじめ鳥類や魚類などの中枢神経内に神経細胞を囲んで強く負に帯電した膜(Golgi網)があり, この膜は硫酸化プロテオグリカンからなる細胞外基質であることを示した⁴⁻¹⁰⁾. また, この膜は小脳基底核, 橋核, 大脳皮質視覚領, 海馬台等の限られた部位の介在ノイロン群に主として出現することを示し, これらの介在ノイロンは中枢神経回路網の中で増幅器として働くと論じた^{9,10)}. 以上の研究の過程で, 脳や脊髄のいたる所に暗調細胞(dark cells or neurons)と呼ばれ細胞質が濃縮してチオニンやケルンエヒトロートに強く染まる細胞が夜間に多数出現することを認めた¹⁰⁾. 本論文はこれらの暗調細胞は活発に作動中の疲れた細胞であり睡眠によって通常の明調細胞に復することを述べ, 未発表所見を交えながら脳について考える.

材料と方法

過去に作製していたICR系成獣マウス(雄, 体重30~40グラム)の海馬台, 海馬, 小脳基底核, 小脳皮質, 大脳後頭葉皮質のパラフィン包埋試料を使用した. 同試料はエーテル麻酔下に0.1Mカコジル酸緩衝4%バラホルムアルデヒド・2.5%グルタルアルデヒド混液(pH7.2)で還流固定後に切り出し再固定されたものである. また, 試料は夕方(午後5~6時), 深夜(午後

11~12時), 翌朝(午前9~10時)に動物を屠殺固定されたものの中から選んだ. 試料の数は各時刻, 脳の各部位について, それぞれ2個である. そして, それぞれの試料から4枚の切片を作製した. 各切片は脱パラフィン後, 陽性荷電鉄コロイド(pH1.5)あるいはアルデヒドフクシンで染色し, ケルンエヒトロートないしカルボールチオニンで後染色して光学顕微鏡で観察した^{1,4,9,10)}.

結 果

強陰性荷電硫酸化プロテオグリカン細胞外基質は陽性荷電鉄コロイドとアルデヒドフクシンによって染色される⁴⁻¹⁰⁾. この細胞外基質をもつ神経細胞は海馬台で約20%(Fig 1), 海馬で2%, 大脳後頭葉皮質で約4%(Fig 2の右の挿図)の割合で認められた. 小脳基底核では小型のGolgi II型介在神経細胞をはじめほぼ全部の細胞がプロテオグリカン細胞外基質をもっていた. 小脳皮質ではプルキンエ細胞を含めて同細胞外基質をもつ細胞は認めなかった.

暗調細胞は細胞質が濃縮してケルンエヒトロートやチオニンに濃染すると共に細胞体も縮小していた. この縮小のために同細胞を被うプロテオグリカン細胞外基質はイガグリ状に毛羽立っていた(Fig 2の左の挿図). 暗調細胞の核と核小体は一般によく保たれ, 染色性も豊かであったが核小体が小さく, 核全体がケルンエヒトロートに強染していた(Fig 2の左の挿図). 暗調細胞には, 明調細胞と同様に, 核小体付髄染色質ないし核小体内染色質が著明に認められた.

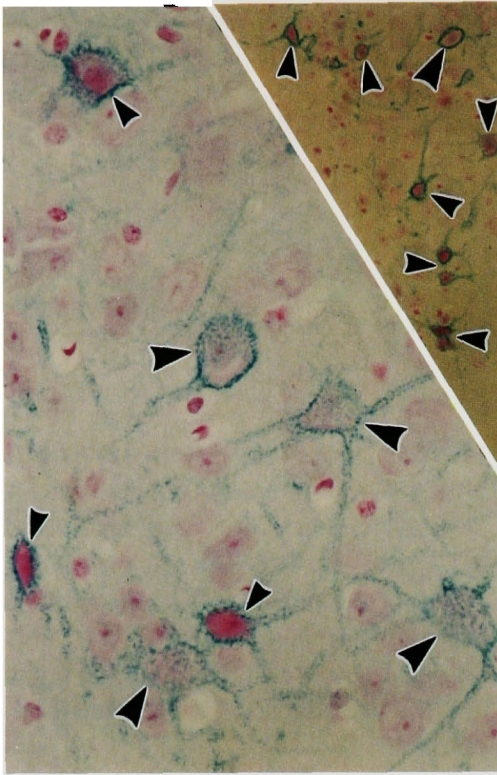


Fig. 1

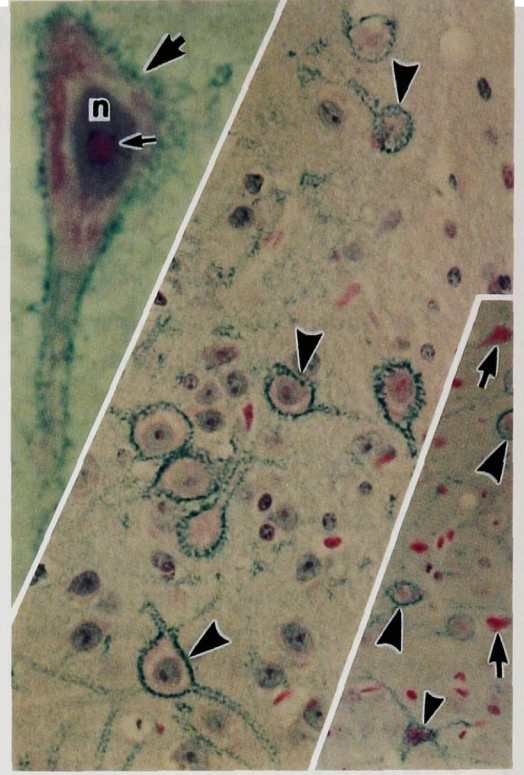


Fig. 2

Fig. 1 In the evening, some neurons with sulfated proteoglycans in the adult mouse hippocampal subiculum are changed into dark neurons (*thin arrowheads*). *Thick arrowheads* indicate normal or clear (light) neurons with sulfated proteoglycans. Cationic iron colloid (pH1.5) and nuclear fast red stainings. *Inset* shows that at midnight, almost all neurons with sulfated proteoglycans in the hippocampal subiculum are changed into dark neurons (*thin arrowheads*). *Thick arrowhead* indicates a clear neuron with sulfated proteoglycans. X 300, *Inset*: X 120.

Fig. 2 In the morning, almost all neurons with sulfated proteoglycans in the adult mouse hippocampal subiculum are observed as light neurons (*thick arrowheads*). **Left inset** shows that sulfated progeoglycans surrounding the dark neuron protrude hairy projections (*thick arrow*), which indicate the marked widening of the perineuronal tissue spaces. The nucleus (*n*) and nucleolus (*thin arrow*) of this dark neuron are clearly stained. **Right inset** shows that in the visual cortex, even the neurons without sulfated proteoglycans are changed into dark neurons (*arrows*). *Thick and thin arrowheads* (see Figure 1). X 270, *Left inset*: X 800, *Right inset*: X 150.

脳の各部位に暗調細胞と明調（正常）細胞の中間の染色性をしめす中間型の細胞が存在した。本稿では、この中間型細胞は暗調細胞とした。

ケルンエヒトロートは一般に核染色剤とされているが、正常な明調細胞では同剤はむしろ核小体を特異的に染めていた。しかし、前述のごとく暗調細胞では核全体がケルンエヒトロートに強く染っていた。

海馬台、海馬と小脳基底核では、暗調細胞は

強陰性荷電細胞外基質をもつ神経細胞にのみ出現していた (Fig 1, 同挿図)。大脳後頭葉皮質では、細胞外基質をもたない細胞も暗調となっていた (Fig 2 の右の挿図)。小脳皮質ではプルキンエ細胞が暗調となった。

試料作成（動物の屠殺）時刻を反映して、暗調細胞の出現に有為の差があった。以下部位別に述べる。

海馬台では、暗調細胞は夕方(午後5～6時)

屠殺群で細胞外基質をもつ細胞の約30% (Fig 1), 深夜(午後11~12時)屠殺群で同細胞の約70% (Fig 1の挿図)を占めていた。翌朝(午前9~10時)屠殺群では暗調細胞はほとんど認めなかった(全ての細胞外基質をもつ細胞は明るい明調細胞であった)(Fig 2)。

海馬では、暗調細胞は夕方屠殺群で細胞外基質をもつ細胞の約50%。深夜屠殺群で同細胞のほぼ全部が暗調細胞となっていた。翌朝屠殺群では暗調細胞は認められず、全ての細胞外基質をもつ細胞は明調細胞として認められた。

大脳後頭葉皮質では、夕方屠殺群で細胞外基質をもつ細胞の約30%と同基質をもたない細胞の1%が暗調となり(Fig 2の右の挿図)、深夜屠殺群では同基質をもつ細胞の約70%と同基質をもたない細胞の3%が暗調となっていた。翌朝屠殺群で、基質をもつ細胞はもちろんのこと基質をもたない細胞にも暗調化は認められなかった。

小脳基底核では、夕方屠殺群で細胞外基質をもつ細胞の約30%、深夜屠殺群で同細胞の約80%が暗調となっていた。翌朝屠殺群では暗調細胞はほとんど認められなかった。

小脳皮質では、夕方屠殺群でプルキンエ細胞の約20%が暗調となり、深夜屠殺群で同細胞の約60%が暗調となっていた。翌朝屠殺群では暗調なプルキンエ細胞はほとんど認めなかった。

考 察

試料を採取したマウスは4~5匹を小さいゲージ(床面積:38×25cm)の中で室温15~20℃下に自由に行動させ自由に水と餌をとらせていた。このマウスは夜行性であり、夕方から活動を開始して夜間最も活発となり、翌朝は睡眠中であった。海馬と海馬台は記憶と学習、小脳皮質と同基底核は運動、大脳後頭葉皮質は視覚に関わる。従って、本研究は、極めて貧しい生活環境ではあるが、日内(概日)リズムに沿って中枢神経の日常活動に関わる基本的な領域における暗調細胞の出現について追跡調査したことになる。

本研究は動物の活動が活発になる(あるいは疲労が蓄積する)に従って、脳の各部位で暗調

細胞の数が増し、睡眠によって暗調細胞の数が著明に減少することを示した。すなわち、本研究は暗調細胞は盛んに活動している言わば疲れたあるいは消耗した細胞であり、睡眠(休息)によって正常で健康な明調細胞に復することを明らかにした。中間型細胞の存在は暗調細胞と明調細胞は一連の細胞であることを示す。ラットの脳皮質視覚領では午前3時~6時に暗調細胞の数が最も多くなった(未発表)。

暗調細胞を被うプロテオグリカン細胞外基質が毛羽立っていることは同細胞の収縮によって周囲の組織間隙が著明に広がっていることを示す。暗調細胞の核と核小体の染色性が良いことは同核と核小体が健在であり暗調細胞自体が健康な細胞であることを示す。このことは、暗調細胞には明調細胞と同様に、核小体付髄染色質ないし核小体内染色質が明瞭に認められることによっても確認される。従来、暗調細胞は固定の悪い細胞あるいは変性した細胞等と記載されてきた¹¹⁻¹⁴⁾。Islam et al. (1994)は大脳皮質に電気刺激を与えて同所に暗調細胞の数の増加を認め、脳の可塑性との関連で論じた¹⁵⁾。アポトーシス(DNAの断片化)の検定法であるNick end labeling (TUNEL)法に暗調細胞は陰性反応を呈した(未発表)。

暗調細胞の出現とその明調細胞への回復は次のように説明できる。すなわち、神経細胞が活発に作動しているときは神経伝達物質(あるいはその生合成酵素)が細胞体から末梢に盛んに運び出されるために細胞体が枯渇萎縮して暗調となり、睡眠という神経の安息状態では神経伝達物質の分泌は押さえられて細胞体の粗面小胞体とゴルジ装置は十分に補給され脹よかて明るい明調細胞となる。この説明は神経伝達物質生合成酵素あるいはそのメッセンジャーRNAが短命であるという仮定に立っている(下記参照)。一方、神経膠細胞などから神経細胞への物資補給が間に合わぬ可能性もある。いずれにしても、暗調細胞では全操業にもかかわらず、生産が消費に追いつかない状態といえる。本研究で使用した色素とくにチオニン、メチレン青と共に、粗面小胞体の付着リボゾームや細胞質の遊離リボゾームを特異的に染める。従って、これらの

色素で強染する暗調細胞ではその細胞質基質が著名に濃縮していることになる。

暗調細胞の核がケルンエヒトロートに強染し、同細胞の胞形質の同赤に対する染色性が増し、また同細胞の核小体が小さくなっていることは注目に値する。前述のごとくケルンエヒトロートは RNA からなる核小体を特異的に染める。これらの所見は暗調細胞の核では mRNA の産生 (DNA から mRNA への情報転写) が増強され、同細胞の胞形質では核小体から動員された rRNA によって蛋白合成が盛んであると共に tRNA も総動員され粗面小胞体での生産活動が増強されていることを示している。

深夜に小脳基底核の細胞群のほとんどが暗調となっていたことも面白い。このような神経の枯渇状態では、動物は活動 (運動) を停止して休む (眠る) 以外にないと思える。さもないと、動物はやがて死に至るかあるいは神経細胞死による回復不能な器質的運動失調に陥ると思われる。ラットの断眠実験で3週間生存したという報告があるが、この断眠実験での動物死はいわゆる脳死か末梢の臓器障害 (死) によるものなのかは明らかにされていない。ハローセン麻酔下のヒトの脳 (視覚領) から得た試料には多くの暗調細胞がみとめられた¹⁰⁾。従って、麻酔時の神経系は安息状態にないといえる。催眠剤、睡眠薬、覚醒剤などの向精神薬やアルコールについては未だ検討していない。いずれにしても、神経系が適当に怠けてくれないとその支配を受ける末梢の組織器官は休むことができない。

硫酸化プロテオグリカン被膜を有する細胞は、小脳基底核の細胞を除いて、その多くはレクチン *Vicia villosa* や soybean アグルチニンで標識される糖蛋白被膜をもち GABA 陽性の抑制性神経細胞である^{9,10)}。小脳基底核の細胞は、プロテオグリカン被膜をもつが、上記のレクチンで標識されない^{6,9)}。しかし、小脳基底核の細胞はタウリン陽性といわれ抑制性ノイロンと考えられる。小脳皮質のプルキンエ細胞は硫酸化プロテオグリカンやレクチン標識糖蛋白被膜をもたないが GABA 陽性であるといわれている。

このように、暗調細胞が主として抑制性介在神経細胞群に認められたことも興味深い。抑制

性の介在細胞群が枯渇する (疲れる) と神経回路網の高揚が起り、これを押さえるために睡眠というフィードバックがかかると共に抑制性介在神経細胞群の賦活が行われると考えると都合がよい。私達の体が午後あるいは夕になるにつれてほぐれ、気持ちも大きくなって行動や判断が大胆になるのも抑制性介在神経細胞群の暗調化によって説明できるかもしれない。

最近知られた内因性睡眠促進物質 DSIP (デルタ睡眠誘発ペプチド)、ウリジン、プロスタグランジン D₂ の脳室内または睡眠中枢 (視束前野) 注入で暗調細胞の明調化は起こるのだろうか。睡眠抑制物質プロスタグランジン E₂ の覚醒中枢 (視床下部後部) 注入では? 視交叉上核 (日内リズムの中枢) を破壊した時に起る変調 (超日) リズムは介在神経細胞群の暗調、明調のサイクルによって決まるのであろうか。これらについては今後できれば培養細胞系などの実験を加味しながら検討してみたい。

睡眠時の高い成長ホルモン (蛋白合成を促進) 分泌はよく知られており、これはインスリンと共に直接暗調細胞の明調化に係わっていると思われる。

本研究では脳波 (脳波睡眠) を調べていない。マウスのレム睡眠は短く睡眠周期は約10分で、(総)睡眠時間は約13時間である。本研究の翌朝屠殺マウスは4~5時間の (行動) 睡眠をとっており、これは通常のはぼ1/3~1/2の睡眠量ということになる。この1/2以下の睡眠量で暗調細胞がほぼ完全に明調化することは、日常では必要な2倍以上の睡眠量を得て次の日の活動に備えていることになる。ただし、体重50gをこす老齢マウスの4~5時間睡眠後屠殺では多くの暗調細胞が認められ、加齢と共に暗調細胞の明調化は遅れる (未発表)。

ヒト成人の睡眠周期は約100分で、(総)睡眠時間は6~8時間である。従って、ヒトでは3~4時間の睡眠で神経系は十分回復すると思われる。ナポレオンの短眠 (3時間) は納得できる。いわゆる不眠者では神経細胞が交代で休んでいると思われる (下記参照)。各睡眠周期で、ノンレム睡眠がまず出現し、つづいてレム睡眠が現われる。私達は、この睡眠周期のうちレム睡眠

では主として旧脳の細胞群が、ノンレム睡眠では新脳の細胞群が賦活されると想像している。

ラットやマウスの調査では、暗調細胞は離乳期から現われはじめ、硫酸化プロテオグリカン細胞外基質も離乳期に形成される(Murakami et al., 投稿中)。つまり、働くから疲れるということであり、離乳はその脳が形態的機能的に完成したことを意味する。レクチンで標識される糖蛋白被膜も生後に形成されるが、プロテオグリカン細胞外基質より早い(Murakami et al., 投稿中)。

本論文で紹介した睡眠による暗調細胞の著明な減少ないし消失(明調細胞への回復)はラットや他の動物の脳でも確認しており、別に稿を改める(Ohtsuka and Murakami, 投稿中)。断眠実験で暗調細胞が明調化しないことも確認している(未発表)。なお、昼間搬入直後に屠殺したラットから得た標本の海馬では、プロテオグリカン細胞外基質やレクチン標識糖蛋白被膜をもつ神経細胞は健在で、これらの基質や被膜をもたない神経細胞が暗調化していた(未発表)。このことは環境の変化あるいは学習や教育の種類(動員される神経回路網のセクションの違い)によって暗調化する(疲れる)細胞群が異なることを示すと同時に昼間時(睡眠の時間帯)でも脳を働かせると(日内リズムにかかわらず)神経細胞が暗調化することを示している。

一方、睡眠時(昼)に暗調化し覚醒時(夜)に明調化する昼行化したと思われる細胞群(大脳皮質や脳幹のある細胞群)、暗調化と明調化が左と右の脳で交互に起り不眠(断眠)に耐えうる細胞群(大脳皮質の前頭葉、視床下部、脳幹のある細胞群)がある。さらに、視床下部や脳幹部には6~8時間交代で動員されると思われる(各細胞が超日リズムに従う或いは同リズムを保っていると思われる)細胞群からなる、すなわち昼夜にかかわらず常に1/4~1/3前後の細胞群が暗調化している核があった。このシステムは呼吸中枢など休むと致命的となる植物性核群に主として認められた(未発表)。これらについてはさらに詳しい経時的連続切片などを作製して今後詳しく検討したいと思う。

暗調細胞が疲れた細胞であるとすれば、その

出現部位と数を調べることによって一定の作業または学習や記憶について脳を検証することができる。いわゆる頭の良い悪いは動員される神経細胞の数なのであろうか、それとも神経細胞の質(細胞の可塑性)なのであろうか。動員する神経細胞とそのシナプスの数を増やすこと(神経回路網の拡大と高密度化…回路網の可塑性)が勉強であり訓練であらうか。私達は、動員される神経細胞の数が多くその質が高い人を教養豊かで独創性に富む人、数は多いがその質が並な場合は決まりきったことを無難にこなす学業優秀な人だと思っている。

現代人の脳には大脳皮質だけで100~140億(Economo, 1925)(Rockel et al., 1980)によると約300億(神経系全体では1,000億以上)の神経細胞があるといわれる。そのうち何割(%)を使って現代人は現在の高エネルギー消費型の機械文明を築いてきたのであろうか。現代人には将来新しい文明を創造する余剰の神経細胞があるのであろうか。来るべき厳しい地球環境を生き抜くためには、人類は雑種強勢あるいは突然変異などをへて変身し、脳と肉体を強化しておく必要があるのだろうか。マウスを厳しい生活環境におくと、大脳皮質のほとんど全ての神経細胞が暗調化する(未発表)。つまり、この動物は地球上で生活するためにすでに全脳を使っていると思われる。

我々は昼行の日周リズムとくに社会リズム(主として午前8時半から午後5時までの勤務体制)によっている。一方、ラットやマウスなどの実験動物は夜行性の日周リズムで行動している。すなわち、我々は一般的に寝ている(あるいは寝ばけた)動物について実験研究してきたことになる。時には動物のリズムに合わせて、夜中や動物が最も疲れる(盛んに活動している)と思われる午前3時~6時に実験を行ってみるのも生命を探る(考える)上で重要であると思う。

この種の神経系の実験では、動物を「死の恐怖をあたえることなく屠殺して」試料を作製することが肝要である。

結 論

夕方、深夜、翌朝の各時に屠殺した成獣雄マ

ウスから海馬台, 海馬, 小脳基底核, 小脳皮質と大脳皮質視覚領のブロックを切り出しパラフィン包埋後切片とし, 陽性荷電鉄コロイドとケルンエヒトロートないシカルボールチオンで染色して光顕観察した。夕方に採取した例では, 脳の各部位に少数の暗調細胞が認められるのみであった。深夜に採取した例には, 脳の各部位に多くの暗調細胞が認められた。すなわち, 深夜には小脳基底核の細胞の80%以上が, 小脳皮質ではプルキンエ細胞の50%以上が暗調化していた。プルキンエ細胞を除いて, 暗調細胞は一般に鉄コロイドで染まる硫酸化プロテオグリカ

ン細胞外基質をもっていた。翌朝(マウスは睡眠中)に採取した例では, 脳の各部位(小脳皮質も含めて)で暗調細胞の数は著明に減少していた。以上の所見は暗調細胞は睡眠(安息)によって正常な明調細胞に回復する「疲れた」細胞であることを示す。暗調細胞は固定の悪い細胞でもなく, 変性細胞でもない。

本研究に使用した光顕標本の大部分は草野博通, 榑崎正博両技官によって作製染色された。彼等の夜を徹する協力で感謝します。

文 献

- 1) Murakami T, Taguchi T, Ohtsuka A, Sano K, 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.
- 2) Ohtsuka A and Murakami T : Fine anionic iron colloid and its use in light and electron microscopic detection of cationic sites in the rat kidney. *Arch Histol Jpn* (1986) **49**, 543-552.
- 3) 大塚愛二, 宇野芳史, 田口勇仁, 村上宅郎 : 陽性および陰性荷電鉄コロイドによる組織・細胞荷電基の光顕ならびに電顕的検出。岡山医誌 (1991) **103**, 11-18.
- 4) Murakami T, Taguchi T, Ohtsuka A and Kikuta A : Neurons with strongly negative-charged surface coats in adult rat brain as detected by staining with cationic iron colloid. *Arch Histol Cytol* (1993) **56**, 13-21.
- 5) Murakami T, Taguchi T and Ohtsuka A : The occurrence in the human brain of neurons with strongly negative-charged proteoglycans. *Arch Histol Cytol* (1993) **56**, 23-26.
- 6) 村上宅郎, 田口勇仁, 大塚愛二 : 強陰性荷電被膜をもつ中枢神経細胞。岡山医誌 (1993) **105**, 49-53.
- 7) Murakami T, Tsubouchi Y, Tsubouchi M, Ohtsuka A, Taguchi T and Kikuta A : The occurrence of rat spinal cord neurons with strongly negative-charged surface coats. *Arch Histol Cytol* (1993) **56**, 501-504.
- 8) Murakami T, Tsubouchi M, Tsubouchi Y, Taguchi T and Ohtsuka A : The occurrence of neurons with strongly negatively charged surface coats in mammalian, avian, reptilian, amphibian and piscine brains. *Acta Med Okayama* (1994) **48**, 195-197.
- 9) Murakami T, Ohtsuka A and Taguchi T : Neurons with intensely negatively charged extracellular matrix in the human visual cortex. *Arch Histol Cytol* (1994) **57**, 509-522.
- 10) 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.
- 11) Cammermeyer J : The importance of avoiding dark neurons in experimental neuropathology. *Acta Neuropathol (Berl)* (1961) **1**, 245-270.
- 12) Stensaas SS, Edwards CQ and Stensaas LJ : An experimental study of hyperchromic nerve cells in

the cerebral cortex. *Exp Neurol* (1972) **36**, 472—487.

- 13) 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.
- 14) 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.
- 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.

**Sleep restores the ratio of dark neurons to light
neurons in the central nervous system**

Takuro MURAKAMI and Aiji OHTSUKA

Section of Human Morphology,

Department of Anatomy,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. T. Murakami)

Blocks of the hippocampal subiculum, hippocampus, intracerebellar nuclei, cerebellar cortex and visual cortex were isolated from adult mice in the evening, at midnight or in the next morning. They were embedded in paraffin, cut into sections, stained with cationic iron colloid or aldehyde fuchsin and counter-stained with nuclear fast red or carbol-thionin. Specimens prepared at midnight contained a markedly increased number of dark neurons. In the cerebellar cortex, 50% or more of Purkinje cells were dark at midnight. The dark neurons, except for Purkinje cells, were usually provided with extracellular sulfated proteoglycans reactive to cationic iron colloid or aldehyde fuchsin. The specimens, including those of intracerebellar nuclei and cerebellar cortex, prepared in the next morning (or when the animals were sleeping) contained few dark neurons. These findings suggest that the dark neurons are exhausted or tired cells, which are restored to normal or light cells with sleep (resting of neurons), and that they are neither poorly fixed nor degenerative cells.