

マウス中枢神経系の強陰性荷電細胞外基質

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

(平成6年6月10日受稿)

Key words: Central nervous system, neurons, strongly negatively charged extracellular matrix, sulfated proteoglycans

緒 言

私達はラットの脳や脊髄には強く負に帯電した被膜をもつ神経細胞があることを発見した¹⁻³⁾。同様の神経細胞はヒトの脳にあり⁴⁾、またウシ、ネコ、モルモット、マウスなど哺乳類、ウズラやインコなど鳥類、カメヤトカゲなど爬虫類、カエルやイモリなど両棲類、コイやアユなど魚類の脳にも認められる⁵⁾。本研究は、マウスの中枢神経系を組織化学的ならびに電顕的に調べ、この被膜は細胞外基質としてシナプスを特異的に囲む硫酸化プロテオグリカンであり、この被膜をもつ神経細胞は介在ニューロンに属することを明らかにする。

材 料 と 方 法

新生から成熟 ICR マウスの脳と脊髄をエーテル床酔下に切り出し、0.1Mカコジル酸緩衝4%パラホルムアルデヒド(pH7.2)で固定した。これらの組織をパラフィンに包埋して切片とし、脱パラフィンした。

脱パラフィンした切片標本を陽性荷電鉄コロイド(pH1.0-1.5)⁶⁾、アルデヒドフクシン⁷⁾あるいはアルシアンブルー⁸⁾で染色した。一部の切片標本はレクチン *Vicia villosa* アグルチニンで標識した⁹⁾。さらに他の一部の標本は、メチル化とケン化を行った¹⁰⁾。残された標本はヒアルロニダーゼ(100 TR Units/ml, 生化学工業)、コンドロイチナーゼABC(5 Units/ml, 生化学工業)、ヘパリチナーゼ(1 Unit/ml, 生化学工業)、ケラタナーゼ(2 Units/ml, 生化学工業)で処理

したのちに、上記鉄コロイド、アルデヒドフクシン、アルシアンブルー染色あるいはレクチン標識を行った。これらの切片標本は光学顕微鏡で観察した。

一部の成熟マウスについては、大脳の後膨大部皮質(retrosplenial cortex)と小脳基底部を細切して0.1Mカコジル酸緩衝0.1%オスミウム酸(pH7.2)で固定した。この試料は水溶性LR-White樹脂に包埋して超薄切片とし、さらに陽性荷電鉄コロイド(pH1.0-1.5)染色とオスミウム蒸気処理して、透過電子顕微鏡で観察した¹¹⁾。

結 果

陽性荷電鉄コロイドにpH1.0-1.5のレベルで反応する強陰性荷電被膜(Fig. 1)は生後3-4週目から出現した。この被膜はアルデヒドフクシンとアルシアンブルーで染色され、また鉄コロイドとアルデヒドフクシン(Fig. 2)あるいはアルシアンブルーとアルデヒドフクシンによって二重染色された。同被膜は網目状を呈し、神経細胞の胞体とその突起の根部を囲んでいた(Figs. 1, 2)。被膜の鉄コロイド反応はメチル化で消失し、ケン化でこの反応は回復しなかった。

このような被膜をもつ神経細胞は主として後膨大部皮質、海馬台、橋核、小脳基底核、脊髄後角に認められた。特に小脳基底核では小型の神経細胞を含めて大部分の神経細胞が同被膜をもっていた。視床や脊髄前核の神経細胞や小脳皮質のプルキンエ細胞には上記鉄コロイドに反

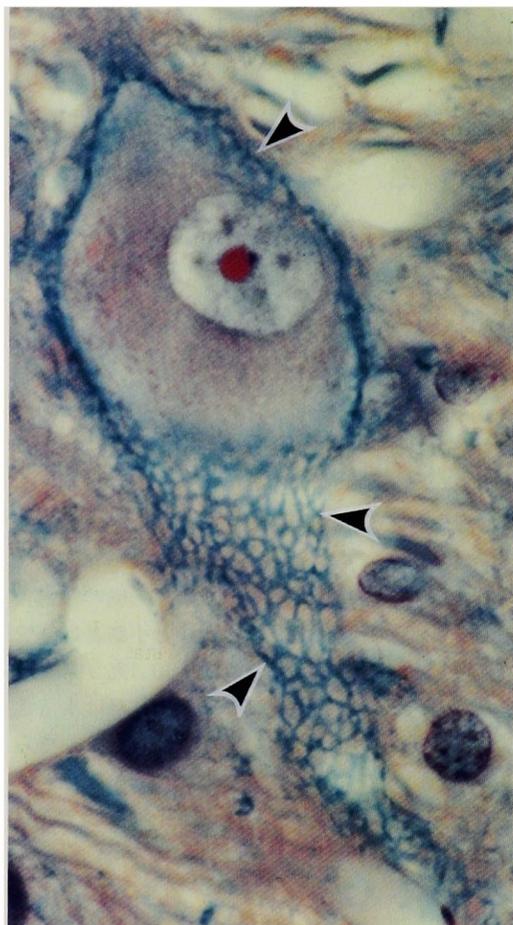


Fig. 1

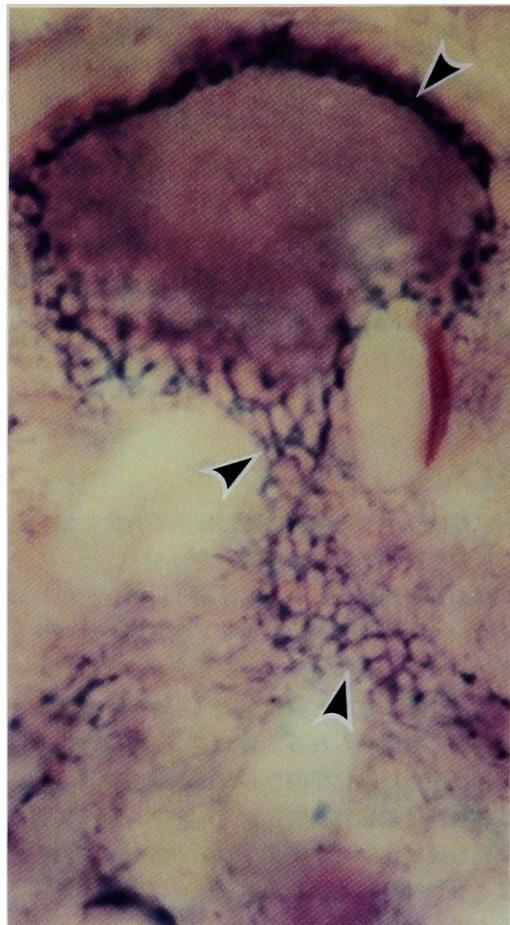


Fig. 2

Fig. 1 Light micrograph of a neuron in the retrosplenial cortex of the mouse brain. This neuron possesses the strongly negatively charged surface coat or meshwork which surrounds the cell body and processes, and is stained with cationic iron colloid with a pH value of 1.0 (arrowheads). $\times 1,500$.

Fig. 2 Strongly negatively charged surface coat or meshwork is doubly stained with cationic iron colloid and aldehyde fuchsin (arrowheads). $\times 1,700$.

応する被膜は認めなかった。

レクチン *Vicia villosa* アグルチニンに対する染色性も生後3-4週目から出現し、連続切片の観察からこのレクチンに反応する神経細胞は鉄コロイド、アルデヒドフクシンないしアルシアンブルーで染色される細胞と同一であった (Fig. 3)。しかし、同レクチンに対する染色性は各部分で異なり、後膨大部皮質と海馬台の神経細胞ではレクチン反応強陽性、脊髄後核の細胞ではレクチン反応弱陽性、橋核と小脳基底核とくに小脳内側核の細胞では小型のものを含めてレクチ

ン反応はほぼ陰性であった。

橋核や小脳基底核を含む各部分において、あらかじめヒアルロニダーゼで標本を処理すると、被膜の鉄コロイド反応、アルデヒドフクシン反応、アルシアンブルー反応は全て陰性となったが (Fig. 4)、レクチン *Vicia villosa* アグルチニン標識には全く変化は認められなかった。また、コンドロイチナーゼABC、ヘパリチナーゼ、ケラタナーゼ単独処理では被膜の鉄コロイド反応に著明な変化はなかったが、これら3酵素の連続処理で被膜の鉄コロイド反応とアルシアン

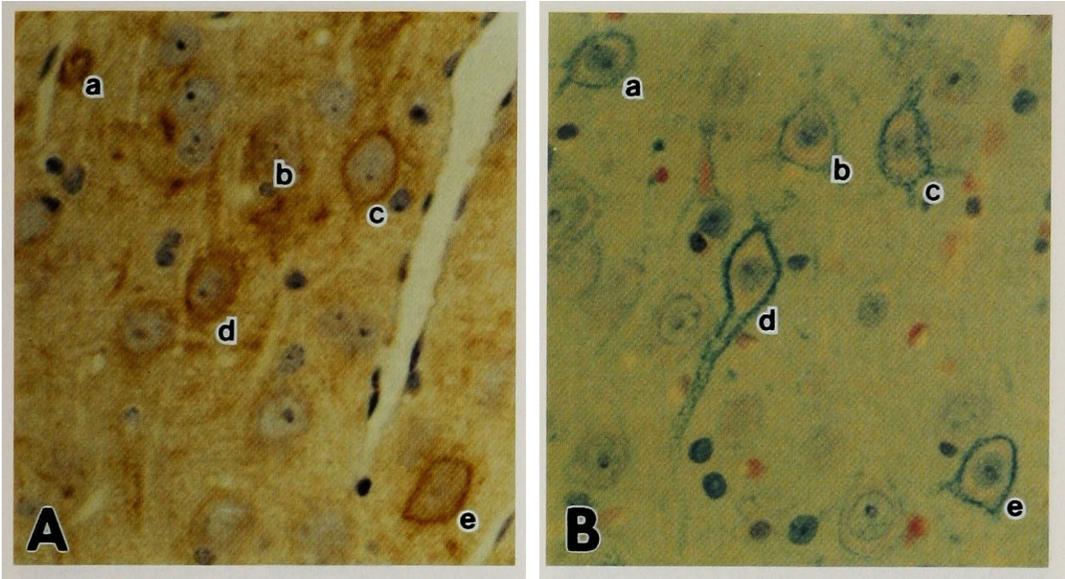


Fig. 3 Two adjacent sections from the mouse retrosplenial cortex. The section A was labeled with lectin *Vicia villosa* agglutinin. The section B was stained with cationic iron colloid. The a-d cells in the section A are identical with the a-d cells in the section B, respectively. Note that the neurons labeled with lectin *Vicia villosa* agglutinin are stained with cationic iron colloid. A and B, $\times 500$.

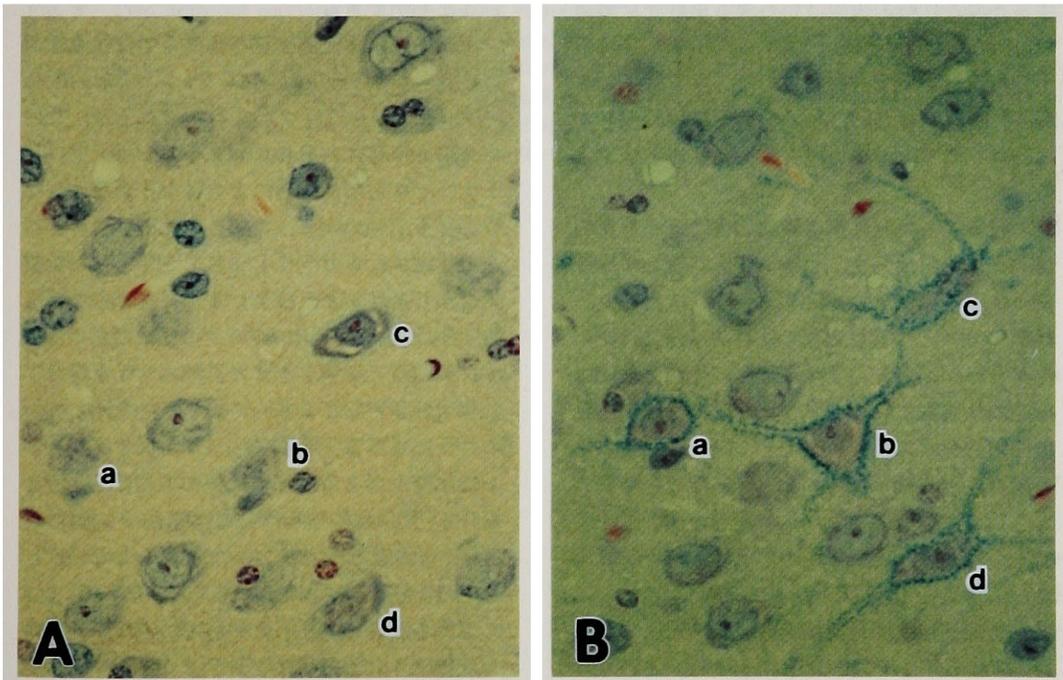


Fig. 4 Two adjacent sections from the mouse retrosplenial cortex. The section A was digested with hyaluronidase, and stained with cationic iron colloid. The section B was directly stained with cationic iron colloid without such preliminary hyaluronidase treatment. The a-d neurons in the section A are identical with the a-d neurons in the section B, respectively. Note that the neurons, when preliminarily treated with hyaluronidase, lose their reactivity to cationic iron colloid. A and B, $\times 500$.

ブルー反応は陰性となった (Fig. 5)。コンドロイチナーゼ等 3 酵素処理においては、被膜のアルデヒドフクシン染色性はよく保たれていた。同 3 酵素処理はレクチン標識に何ら影響を与えなかった。

電顕観察では、鉄コロイド粒子は神経周囲の組織間隙内に均一かつ瀰漫性に沈着し、シナプス部を残して、同組織間隙を埋めていた (Fig. 6)。なお、神経細胞のゴルジ野に少量ではあるが鉄コロイド沈着が認められた。

考 察

本研究は、ラットの所見と同じく¹⁻³⁾、マウスでも強陰性荷電被膜をもつ神経細胞は後膨大部皮質、海馬台、橋核、小脳基底核、脊髄後角などに主として存在することを示す。後膨大部皮質と海馬台の同細胞は明らかに局所介在神経細胞 (local interneurons) であり、小脳に主として投射する橋核の細胞と視床や赤核などに投射する小脳基底核の細胞はいわゆる中継介在細胞 (relay interneurons) に属する。小脳基底核の小型細胞は局所介在細胞であることもよく知られている。すなわち、強陰性荷電被膜は介在ニューロンに主として出現するということができる。

本研究で、強陰性荷電被膜の鉄コロイド反応はメチル化で消失するがケン化で回復せず、またコンドロイチナーゼ ABC、ヘパリチナーゼ、ケラタナーゼの単独処理では著明な消失は認められないが、これら 3 種の酵素の連続処理でほぼ完全に消失することが判った。これらの所見は強陰性荷電被膜は硫酸基とくにコンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸を含むことを示している。なお、本研究の予備実験でヘパリチナーゼやノイラミナーゼ等で消化を試みたが、特に変化は認められなかった。

本研究は強陰性荷電被膜はアルデヒドフクシンやアルシアンブルーでも染色され、ヒアルロニダーゼで消化され、鉄コロイドとアルデヒドフクシンとで二重染色され、アルシアンブルーとアルデヒドフクシンとで二重染色され、また被膜のアルデヒドフクシン染色性はコンドロイチナーゼ ABC、ヘパリチナーゼやケラタナーゼ

の前処理によって消失しないことを確認した。これらの所見は鉄コロイド、アルデヒドフクシン、アルシアンブルーは被膜の別々の基 (構成要素) を染めていることを示す。すなわち、鉄コロイドとアルシアンブルーは硫酸基を、アルデヒドフクシンは蛋白 (チスチン、チステインなどの—SS—あるいは—SH—基をもつ) 部分に反応していると考えられる。従って、本研究は強陰性荷電被膜は硫酸基のほかにヒアルロン酸と蛋白質を含むことを示している。なお、アルシアンブルーの染色性は非常に弱く、この種の染色には鉄コロイドがはるかに優れている。

ヒアルロニダーゼで前処理すると被膜が鉄コロイド、アルデヒドフクシン、アルシアンブルーに対する染色性を失うことは注目に値する。これらの事実は硫酸基 (コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸) と蛋白質はヒアルロン酸に結合していることを示しており、この複合体は明らかに硫酸化プロテオグリカンとすることができる。

本研究は後膨大部皮質と海馬台では強陰性荷電被膜をもつ細胞が同時にレクチン *Vicia villosa* アグルチニンによって強く標識されるが、このレクチン標識はヒアルロニダーゼやコンドロイチナーゼなどの前処理によって全く影響されないことを示している。このことは同アグルチニンで標識されるガラクトースアミンを含む物質すなわちセリンまたはスレオニン基をもつ糖蛋白¹²⁾は、被膜プロテオグリカンの構成要素ではなく、細胞膜と被膜プロテオグリカンを結合する接着分子として介在していることを示しているように思える。小脳基底核など同アグルチニンに陰性反応を示す部では他の接着分子が考えられる。魚や鳥の強陰性荷電被膜をもつ細胞⁹⁾は *Vicia villosa* アグルチニンで標識されないが、ヒトの視覚領の同細胞⁹⁾は同アグルチニンによって標識される (未発表)。一方で、同アグルチニンに標識される物質はプロテオグリカンとは全く独立している可能性も考えられるが、我々は現在のところ接着分子と考えて、今後の研究を進めたいと思っている。なお、大脳皮質や海馬台にレクチン *Vicia villosa* アグルチニンで標識される神経細胞が介在することはすでに知られ

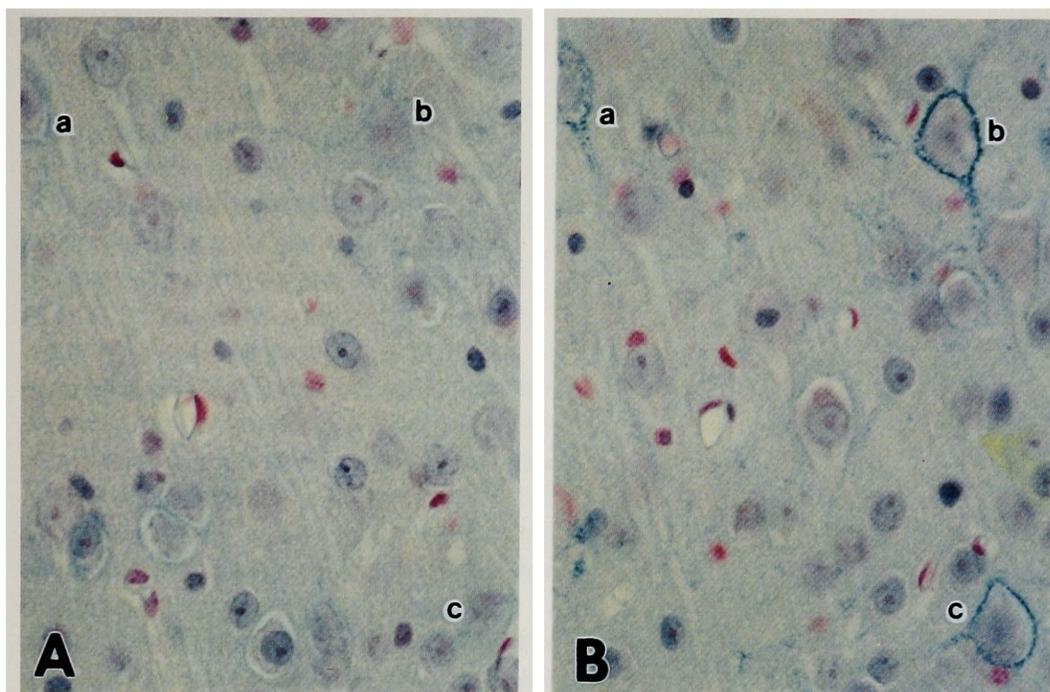


Fig. 5 Two adjacent sections from the mouse retrosplenial cortex. The section A was digested with chondroitinase ABC, heparitinase and keratanase, and stained with cationic iron colloid. The section B was directly stained with cationic iron colloid without such preliminary enzyme treatments. The a-c neurons in the section A are identical with the a-c neurons in the section B, respectively. Note that the neurons, when preliminarily treated with chondroitinase ABC, heparitinase and keratanase, lose their reactivity to cationic iron colloid. A and B, $\times 500$.

ており、主として GABA 性神経として論じられている¹³⁻¹⁵。

脳が硫酸化プロテオグリカンを含むことはよく知られている¹⁶。Oohira^{17,18}や他の研究者達^{19,20}は、生化学的に、出生前のラット脳ではヘパラン硫酸プロテオグリカンが主であり、出生後ではコンドロイチン硫酸プロテオグリカンが主であるとしている。そして、Rauch 達はラット脳から分離したコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの一つについてその化学構造を明らかにしている²⁰。さらに、多くの研究者達がコンドロイチン硫酸プロテオグリカン、特に同グリカンのコア蛋白に対する抗体を作製して免疫的にマウス、ラットや他の動物の小脳皮質のプルキンエ細胞、脊髄の前角運動細胞、海馬の神経細胞などを染色した²¹⁻²⁴。しかし、本論文で述べた我々の強陰性荷電被膜は出生後に形成され、コンドロイチナーゼABC単独では十分消化され

ず、また小脳皮質のプルキンエ細胞や脊髄の前角運動細胞は我々の鉄コロイド、アルデヒドフクシン、アルシアンブルー染色に反応しない。従って、我々の強陰性荷電被膜をもつ、あるいはアルデヒドフクシンに染まる細胞は Oohira 達^{17,18}や他の研究者¹⁹⁻²⁴が免疫学的に染めだした細胞とは異なると思われる。

本研究の電顕観察は、陽性荷電鉄コロイドが神経周囲の細胞間隙に特異的に沈着すること、すなわち被膜が細胞外基質として同間隙を埋めてシナプスを囲み同シナプスを周囲組織から隔離していることを示している。鉄コロイド沈着が神経細胞のゴルジ野に認められることは、この被膜は神経細胞によって作られることを示している。なお、光顕で認められた被膜の網目の各々は各シナプスによって占められていることは本電顕観察で明らかである。

本研究で調べた強陰性荷電被膜の機能につい

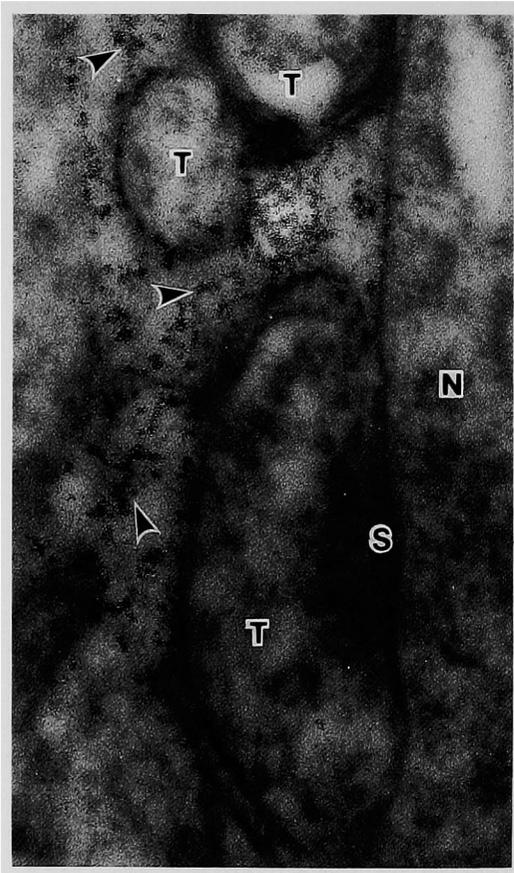


Fig. 6 Transmission electron micrograph of a ultrathin section stained with cationic iron colloid with a pH value of 1.0. Note that the colloidal iron particles are preferentially deposited in the perineuronal tissue spaces (arrowheads). N neuronal somata, S synapse, T nerve terminals. $\times 100,000$.

では全く知られていない。しかし、私達は「この被膜は緩衝あるいは荷電閾門, buffer or charge barrier, として働く」と考えている。すなわち、被膜の強い陰性荷(帯)電は神経周囲組織間隙に電気的安定性を醸成し、シナプスにおける一定的で安定的な(周囲の電気変動に影響を受けない忠実な)シグナル伝達を保障すると考えている。この観点からみて、上に述べたように介在ニューロンに主として強陰性荷電被膜が現われることは特に意義があるように思える。一般に神経細胞の胞体上にあるシナプスは抑制

性であることはよく知られており、従って本研究で報告した被膜はこのシナプスを特異的に囲んでいることになる。

未発表所見であるが、電顕試料を pH7.0 前後に調製した陽性荷電鉄コロイド⁶⁾で染色するとほとんど全ての神経細胞の周囲組織間隙にコロイド鉄の沈着が認められる。このレベルの pH 値ではカルボキシル基等全ての陰性基が解離して鉄コロイドに反応する事実からみて⁶⁾,ほとんどの神経細胞は何らかの被膜をもつものと考えられる。すなわち、私達は上記 Oohira 等の免疫的に染色される細胞はもちろんのことコンカナバリンAや他のレクチンで標識される細胞もそれぞれ個有の被膜あるいは細胞外基質をもっていると考えている。

同じく未発表所見であるが、大脳や小脳内の神経線維のほとんどは pH1.0—1.5 に調製した陽性鉄コロイド染色には反応しない。しかし、脊髄のレベルでは白質内の神経線維のほとんどが同鉄コロイドに強い陽性反応を示し、また運動性ならびに知覚性の末梢神経線維も強い陽性反応を示した。副腎髄質や消化管壁の細胞群も強い陽性反応を示した。一方、交感幹神経節の細胞はほとんど反応しない。これらの神経細胞内反応については稿を改める予定である。

結 論

マウス小脳基底核神経細胞は出生後に出現し陽性荷電鉄コロイド、アルデヒドフクシン、アルシアンブルーに染まる被膜をもつ。同様の被膜をもつ神経細胞は後膨大部皮質、海馬台、橋核、脊髄後角などに認められた。この被膜は鉄コロイドとアルデヒドフクシン、アルシアンブルーとアルデヒドフクシンによって二重染色され、また被膜の鉄コロイドに対する染色性はメチル化で消失しケン化で回復しない。ヒアルロニダーゼ前処理によって被膜の鉄コロイド、アルシアンブルー、アルデヒドフクシンに対する染色性は共に消失する。コンドロイチナーゼABC、ヘパリチナーゼ、ケラタナーゼの連続処理によって被膜の鉄コロイドとアルシアンブルー反応は消失するが、アルデヒドフクシンに対する染色性は消失しない。電顕観察で鉄コロイドは瀾

慢性に神経周囲組織間隙に沈着することが確認できた。以上の所見は陰性荷電被膜は介在ニューロンに主として出現する硫酸化プロテオグリカンで、細胞外基質として抑制性の軸索-胞体シナプスを特異的に囲み同シナプスの情報伝達を安定保護する緩衝荷電関門として作用していると考えられる。なお、後膨大部皮質と海馬台

の強陰性荷電被膜をもつ神経細胞はレクチン *Vicia villosa* アグルチニンで強く標識された。

本研究の鉄コロイドやアルデヒドフクシンなどの染色は草野博通技官、酵素処理は大塚愛二講師、電顕観察は田口勇仁助手の協力を得た。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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—503.
- 4) 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.
- 5) Murakami T, Tsubouchi M, Tsubouchi Y, Taguchi T, Ohtsuka A and Kikuta 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.
- 6) Murakami T, Taguchi A, 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.
- 7) Gomori G: Aldehyde-fuchsin: a new stain for elastic tissue. Am J Clin Pathol (1950) **20**, 665—666.
- 8) Steedman HF: Alcian blue 8GS: a new stain for mucin. Q J Microsc Sci (1950) **91**, 477—479.
- 9) Nakagawa F, Schulte BA and Spicer SS: Selective cytological demonstration of glycoconjugate-containing terminal N-acetylgalactosamine on some brain neurons. J Comp Neurol (1986) **243**, 280—290.
- 10) Spicer SS and Lillie RD: Saponification as a means of selectively reversing the methylation blockage of tissue basophilia. J Histochem Cytochem (1957) **7**, 123—125.
- 11) Ohtsuka A, Kikuta A, Taguchi T and Murakami T: A hydrophilic resin-embedding method for light and electron microscopic detection of tissue anionic sites with cationic colloidal iron: as applied to mouse Paneth cells. Arch Histol Cytol (1993) **56**, 423—430.
- 12) Tollefsen SE and Kornfeld R: The B4 lectin *Vicia villosa* seeds interacts with N-acetylgalactosamine residue α -linked to serine or threonine residues in cell surface glycoproteins. J Biol Chem (1983) **258**, 5172—5176.
- 13) Nakagawa F, Schulte BA, Wu J-Y and Spicer SS: GABAergic neurons of rodent brain corresponding partially with those staining for glycoconjugate with terminal N-acetylgalactosamine. J Neurocytol (1986) **15**, 389—396.
- 14) Kosaka T and Heizmann CW: Selective staining of a population of parvalbumin-containing

- GABAergic neurons in the rat cerebral cortex by lectins with specific affinity for terminal N-acetylgalactosamine. *Brain Res* (1989) **483**, 158–163.
- 15) Drake CT, Mulligan KA, Wimpey TL, Hendrickson A and Chavkin C : Characterization of *Vicia villosa* agglutinin-labeled GABAergic interneurons in the hippocampal formation and in acutely dissociated hippocampus. *Brain Res* (1991) **554**, 176–185.
 - 16) Maeda N, Matsui F and Oohira A : A chondroitin sulfate proteoglycan that is developmentally regulated in the cerebellar mossy fiber system. *Dev Biol* (1992) **151**, 564–574.
 - 17) Oohira A, Matsui F, Matsuda M and Shoji R : Developmental change in the glycosaminoglycan composition of the rat brain. *J Neurochem* (1986) **47**, 588–593.
 - 18) Oohira A, Matsui F, Matsuda M, Takida Y and Kuboki Y : Occurrence of three distinct molecular species of chondroitin sulfate proteoglycans in the developing rat brain. *J Biol Chem* (1988) **263**, 10240–10246.
 - 19) Herndon ME and Lander AD : A diverse set of developmentally regulated proteoglycans is expressed in the rat central nervous system. *Neuron* (1990) **4**, 949–961.
 - 20) Rauch U, Gao P, Janetzko A, Flaccus A, Hilgenberg L, Tekotte H, Margolis RK and Margolis RU : Isolation and characterization of developmentally regulated chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of brain identified with monoclonal antibodies. *J Biol Chem* (1991) **266**, 14785–14801.
 - 21) Zaremba S, Guimaraes A, Kalb RG and Hockfield S : Characterization of an activity-dependent, neuronal surface proteoglycan identified with monoclonal antibody Cat-301. *Neuron* (1989) **2**, 1207–1219.
 - 22) Fujita SC, Tada Y, Murakami F, Hayashi M and Matsumura M : Glycosaminoglycan-related epitopes surrounding different subsets of mammalian central neurons. *Neurosci Res* (1989) **7**, 117–130.
 - 23) Watanabe E, Fujita SC, Murakami F, Hayashi M and Matsumura M : A monoclonal antibody identifies a novel epitope surrounding a subpopulation of the mammalian central neurons. *Neuroscience* (1989) **28**, 645–651.
 - 24) Stephenson DT and Kushner PD : An atlas of a rare neuronal surface antigen in the rat central nervous system *J Neurosci* (1988) **8**, 3035–3056.

**Strongly negatively charged extracellular matrix
in the mouse central nervous system**

Takuro MURAKAMI

Section of Human Morphology,

Department of Anatomy,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. T. Murakami)

Neurons of the retrosplenial cortex, hippocampal subiculum, pontine nuclei, intracerebellar nuclei and some other nuclei in the mouse demonstrated a marked surface coat which was formed three or four weeks after birth. This coat was stained doubly with cationic iron colloid (pH 1.0-1.5) and aldehyde fuchsin or with alcian blue and aldehyde fuchsin. Digestion with hyaluronidase eliminated all the cationic iron colloid, aldehyde fuchsin and alcian blue stainings of the surface coat. Successive digestion with chondroitinase ABC, heparitinase and keratanase erased the cationic iron colloid and alcian blue stainings of the surface coat, but did not interfere with the aldehyde fuchsin staining of this coat. Electron microscopy of ultrathin sections revealed that the iron particles were preferentially deposited in the perineuronal tissue spaces. These findings indicate that the surface coat consists of sulfated proteoglycans, which form an extracellular matrix in the perineuronal tissue spaces and as a charge barrier assure stable signal transmission at the axosomatic synapses with inhibitory nature. It was further observed that the neurons with such surface coats in the retrosplenial cortex and hippocampal subiculum were labeled with lectin *Vicia villosa* agglutinin.