

ラット後根神経節細胞の偽単極化過程における新発見

— 分散培養細胞のビデオ録画による観察 —

二宮孝文

札幌医科大学解剖学第1講座 (主任 高橋杏三教授)

New Findings on the Pseudounipolarization of Neurites in Rat Dorsal Root Ganglion Cells

— Observations of Dissociated Cell Culture Using a VTR System —

Takafumi NINOMIYA

Department of Anatomy (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. K. TAKAHASHI)

ABSTRACT It is well known that dorsal root ganglion (DRG) cells at early stages of development are bipolar and later become pseudounipolar in the process of cell differentiation. This morphological change has also been reported in tissue cultures. The author, using a video recording system, cultured DRG cells on day 18 of gestation and observed the morphological change of the neurons from being bipolar to pseudounipolar. The original process of the DRG neurons first disappeared within 30 minutes in culture and then the neurons elongated forming one or two new neurites. Successive observations of the DRG cells revealed that they were spindle-shaped at 21 hours of culture, eccentric bulged at 23 hours, and bell-shaped at 30 hours, finally becoming short-stem unipolar cells at 34 hours of culture. The elongation of new processes by the unipolarized DRG cell after 48 hours of culture and the change of the DRG cells again into bipolar cells revealed a similarity to the usual unipolarization. The author presumes that DRG cells in the early developmental stages of culture repeat the morphological change from bipolar cells to unipolar cells and finally the DRG cells become mature pseudounipolar neurons after two weeks of culture.

(Received June 5, 1991 and accepted June 21, 1991)

Key words: Cell culture, Dorsal root ganglion, Rat, Unipolarization, VTR system

1 緒 言

後根神経節 (DRG) 細胞は胎生期において、そのほとんどが双極細胞から偽単極細胞へ形態変化をとげる¹⁻⁷⁾。その変化様式は細胞体から伸びた2本の突起が徐々に近づき、突起起始部の細胞質が伸長することにより偽単極細胞の単極部が形成される⁸⁻¹⁰⁾。この形態変化は生体内だけでなく、DRGの器官培養を行なった場合でも培養3~4週間でDRG細胞の約9割以上は単極細胞となる⁹⁻¹¹⁾。また、分散培養においても線維芽細胞などの増殖を盛んにした条件下で同様な形態変化をとることがわかっている⁸⁻¹¹⁾。

元来、培養細胞の観察には倒立型位相差顕微鏡が用

いられ、スチル写真撮影による記録が主として用いられている。しかし、中井は培養の16mm映画撮影を用い、伸びた神経突起の先端がガラス面や膠原線維などに粘着し、線維が短縮すると細胞体は先端の方に引き寄せられ、尺取虫式の運動で神経細胞が移動すること、また、神経突起は伸びるだけでなく、短縮も行い、無秩序に伸びる神経突起の修正も行なうことを報告している^{12,13)}。最近では、VTR録画装置を用い、神経細胞がグリア細胞の突起に沿って移動することや¹⁴⁾、中枢神経系の多極細胞の軸索と樹状突起形成の様式なども明らかにされ¹⁵⁻¹⁷⁾、断片的な写真撮影記録の情報に比べ、VTR録画による、連続的、かつ詳細な情報が得られる

ようになった。

著者はVTR録画装置を用い、はじめて培養初期におけるDRG細胞の形態変化を観察し、いくつかの新知見を得たので報告する。

2 実験方法

胎生18日目のSprague-Dawleyラット後根神経節(DRG)を無菌的に取り出し、0.25%トリプシン溶液中で37°C、30分間処理したのち、遠心機にかけ(1000rpm, 8分)、上澄み液を除去し、Hanksの平衡塩類溶液(HBSS)で3回洗浄した。次に、血清入り培養液を加え、パスツールピペットでDRG細胞を分離させた。次いで、培養皿(35mmディッシュ, ヌンク社)に0.1% poly-L-lysine をコーティングし、分離されたDRG細胞をまいた。神経細胞を連続観察する際に、過度の線維芽細胞の増殖は観察に支障をきたす。そこで、線維芽細胞の増殖を適度に保つ意味で、培養24時間後に培地を無血清培地に交換した。培養液には血清培地(Dulbecco's MEM, 10% fetal calf serum, 1% 200 mM L-Glutamine, 0.6 mg/ml glucose, 50 ng/ml nerve growth factor, 100 units/ml penicillin G)と無血清培地(alpha MEM, 5 ng/ml bovine insulin, 10 ng/ml human transferrin, 30 nM selenium, 20 nM progesterone, 100 μM putrescine, 1% 200 mM L-glutamine, 0.6 mg/ml glucose, 50 ng/ml nerve growth factor, 100 units/ml penicillin G)を用いた。

培養システムとしては培養倒立顕微鏡(Nikon TMD)に保温ケースを取り付け、ケース内温度を37°Cに保った。培養液をpH7.3前後にするため、培養液のフェノールレッドの色を指標に、炭酸ガスを保温ケース内に送り込んだ(流量: 0.3~0.5 l/min)。観察記録は顕微鏡に録画用カメラ(日立KP-C200)を取り付け、長時間録画用VTR(ビクター LR-9000)を用い、2秒間隔で録画を行なった。

3 成績

単離された後根神経節(DRG)細胞は、突起の消失が起こり、細胞は球形となる(Fig. 1A 矢印)。培養2時間後、DRG細胞の細胞体から無数の細かい突起が出現する(Fig. 1B)。その突起は出現しては消失し、その動作を繰り返す。培養6時間になると多数の突起のうち1本が伸長し始め(Fig. 1C 矢頭)、中井の報告^{12,13)}のように鞭振り動作をしながら伸びて行く。その突起の伸びる方向は線維芽細胞の方へ向けられている(Figs. 1C and 1D)。さらに、培養8時間では、2本目の突起が1

本目の突起と反対方向に細胞体から出現し、(Figs. 1E and 1F)、培養13時間では双極細胞の形を呈するようになる(Figs. 1G and 1H)。一方、単離されたDRG細胞の中には突起の消失が起こらず、元来の突起に伸長と成長円錐(growth cone)がみられ、単極細胞の形を維持しているのがみられた。そこで、著者は一旦突起の消失が起こったのち、新たな突起形成によって双極細胞となったDRG細胞に焦点を絞って観察した。

双極細胞となったFig. 2AのDRG細胞は、細胞体から新たな突起を出現させた(Fig. 2B 矢印)。しかし、その突起は2~3時間で消失し、再び細胞体の他の部位からの突起が出現する(Fig. 2C 矢頭)。その突起は途中から細い分枝を出し、双極細胞であった元の突起に連絡する(Fig. 2D)。やがて神経細胞の元の2本の突起は徐々に近づき始め、突起起始部の伸長がみられる(Figs. 2E and 2F)。さらに神経細胞は突起起始部の細胞質の伸長によって、完全に偽単極細胞の形態をとるようになる(Figs. 2G and 2H)。ところがDRG細胞は培養36時間後に、単極細胞となった突起の部分が収縮し、細胞は球形を呈するようになった(Fig. 3A)。さらに培養44時間後から、元の突起起始部の反対部位から新たな突起の出現がみられ、培養開始時にみられたような突起形成を行い、DRG細胞は再び双極細胞となり(Figs. 3B-3E)、spindle-shaped bipolar cellを呈するようになる。次に双極細胞の2本の突起は再び近づき始め、eccentric bulged bipolar cell (Fig. 3F)を経て、bell-shaped bipolar cellに変化する(Figs. 3G and 3H)。ここで、2本の突起の接近は一旦止まり、DRG細胞体から新たな突起の出現がみられる(Figs. 4A-4C 矢印)。さらにこの新たな突起は、元来の突起の1本に徐々に近づき、細胞質の伸長が起こり、再び双極細胞になる(Figs. 4D and 4E)。そして、元来の2本の突起が接近を再開して、単極化が始まり(Fig. 4F)、DRG細胞は培養70時間後に再び偽単極細胞となった。

以上の観察結果をまとめると、培養下でのDRG細胞は、まず突起の消失が起こり、次に新たな突起出現によって双極細胞になるが、偽単極化への形態変化を行なった後にも、再び新たな突起の出現が起って双極細胞となり、再び偽単極化を繰り返すもののあることがわかった(Fig. 5)。

4 考 察

後根神経節(DRG)細胞は生体内において、そのほとんどが出生前までに双極細胞から偽単極細胞への形

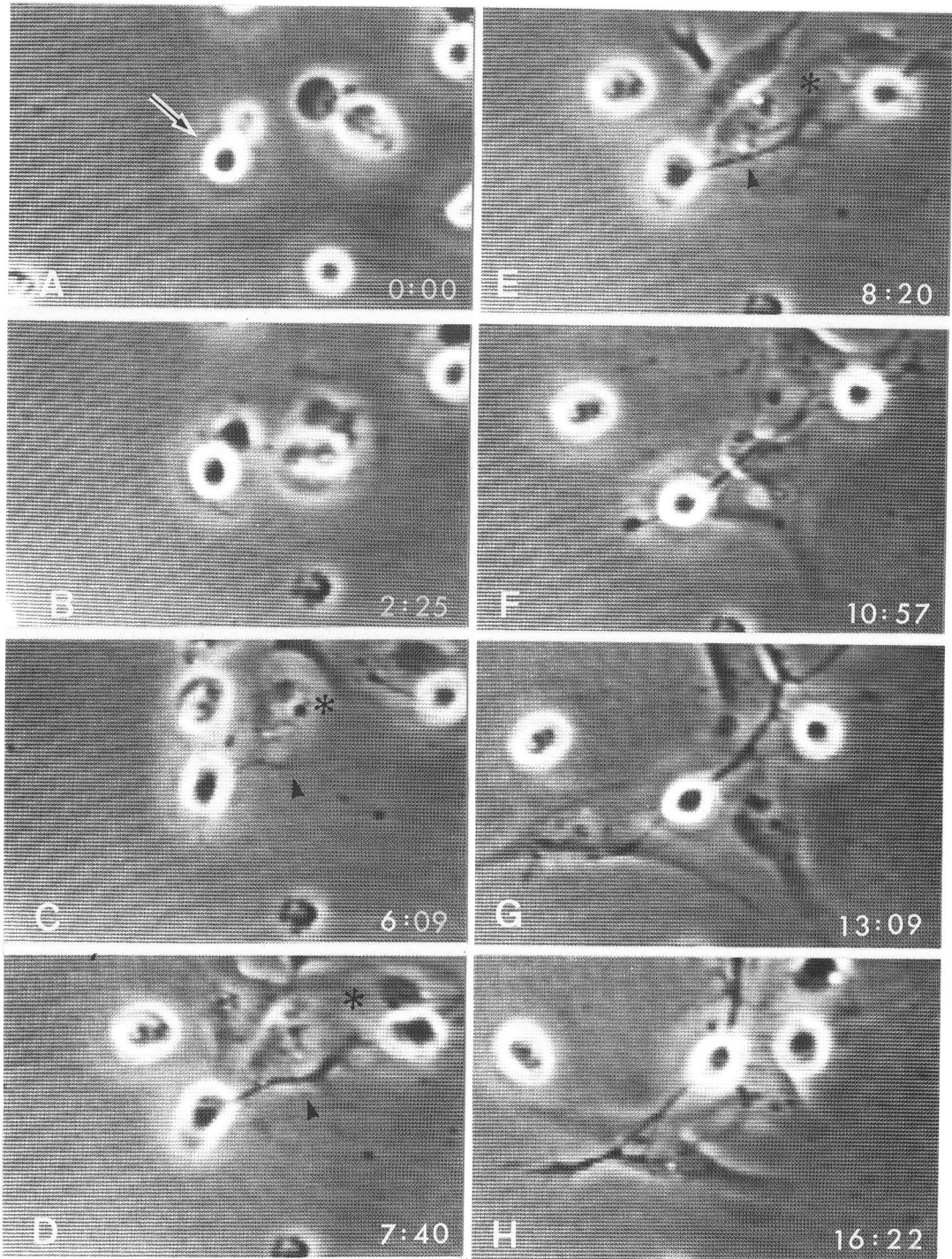


Fig. 1 DRG cell in culture from 0 hours to 16 hours (A-H). The arrowed cell in Fig.1A is the target of the observation. Several thin processes of the neuron repeatedly appeared and disappeared (B) and then the neuron elongated a neurite (arrowheads) (C-E). Another neurite appeared on the opposite side of the neuron from the first neurite (F) and the DRG cell changed into a bipolar cell (G and H). Asterisks are fibroblasts. Numerals shown in the lower right corner show the culture time (hours and minutes). x200.

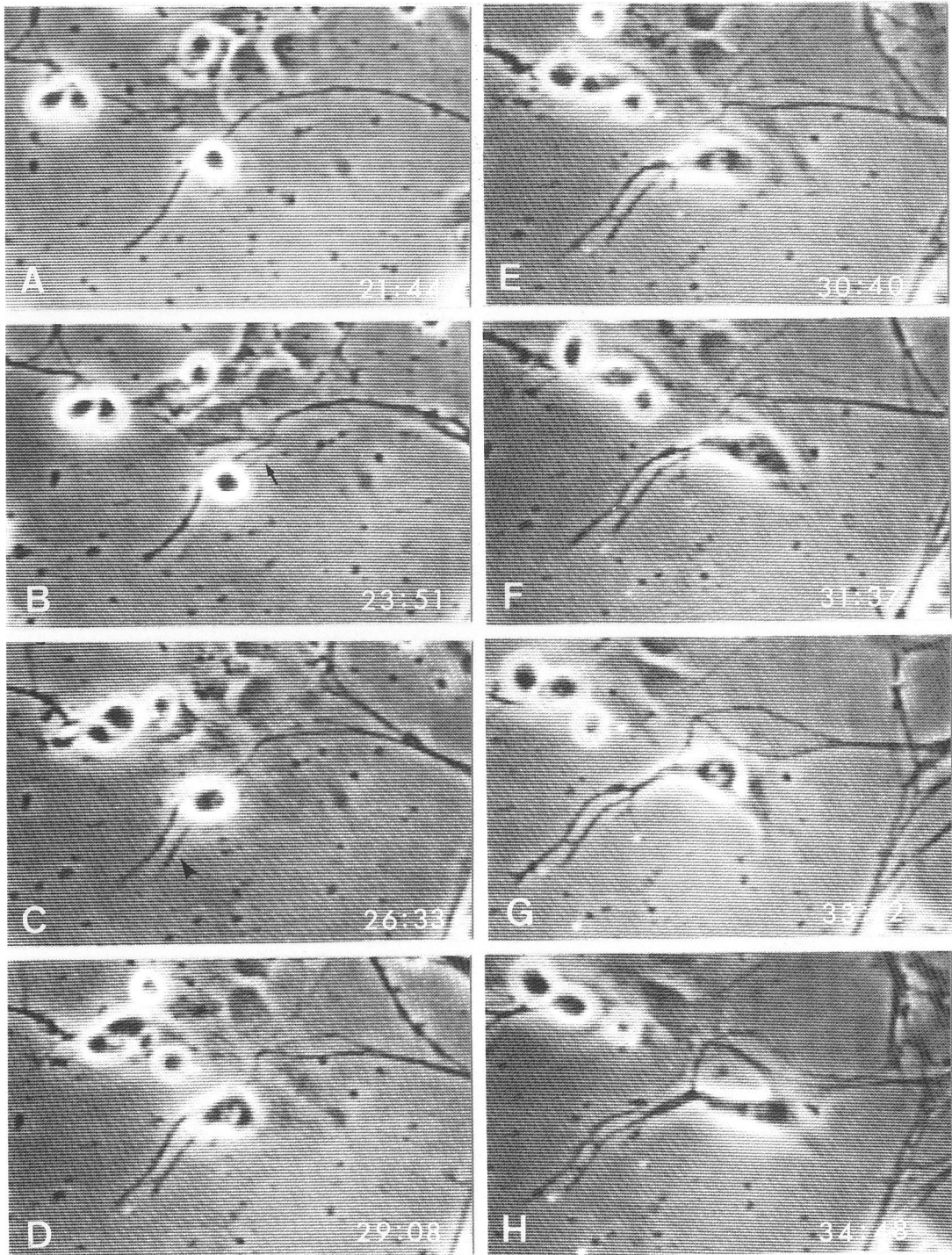


Fig. 2 The DRG cell in culture from 21 hours to 34 hours (A-H). The cell elongated two neurites in opposite directions (A). A new neurite (arrow) appeared from the DRG cell (B) and disappeared (C). And then another neurite appeared from the neuron (arrowhead) (C and D). The DRG cell was bell-shaped (E) and the cytoplasm of the cell elongated (F). Then the DRG cell changed into a pseudounipolar cell (G and H).

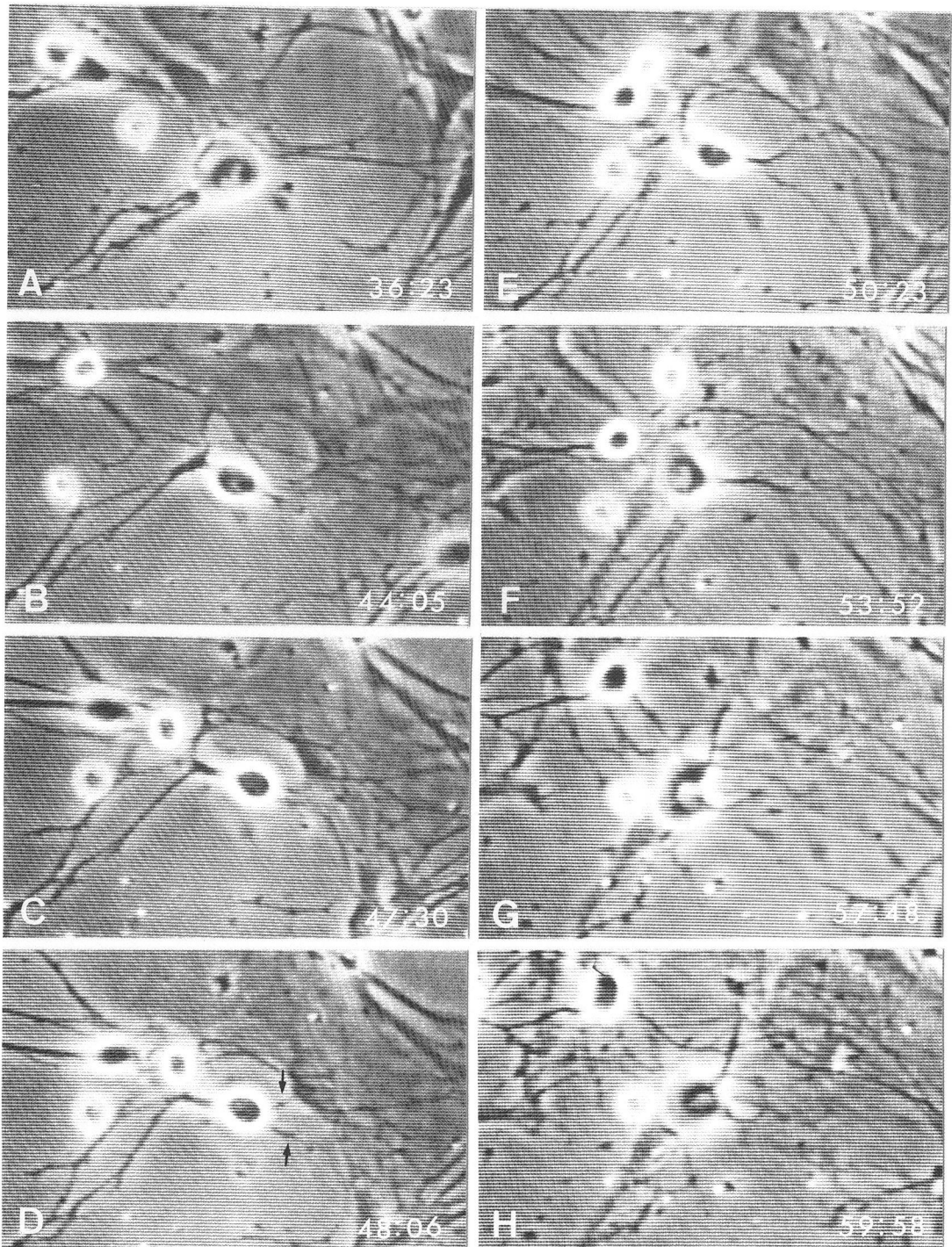


Fig. 3 The DRG cell in culture from 36 hours to 59 hours (A-H). Two new neurites (arrows) appeared from the unipolar DRG cell (A-D). These neurites became one neurite and the DRG cell changed into a spindle-shaped bipolar cell (E), then an eccentric bulged bipolar cell (F) and then a bell-shaped bipolar cell (G and H).

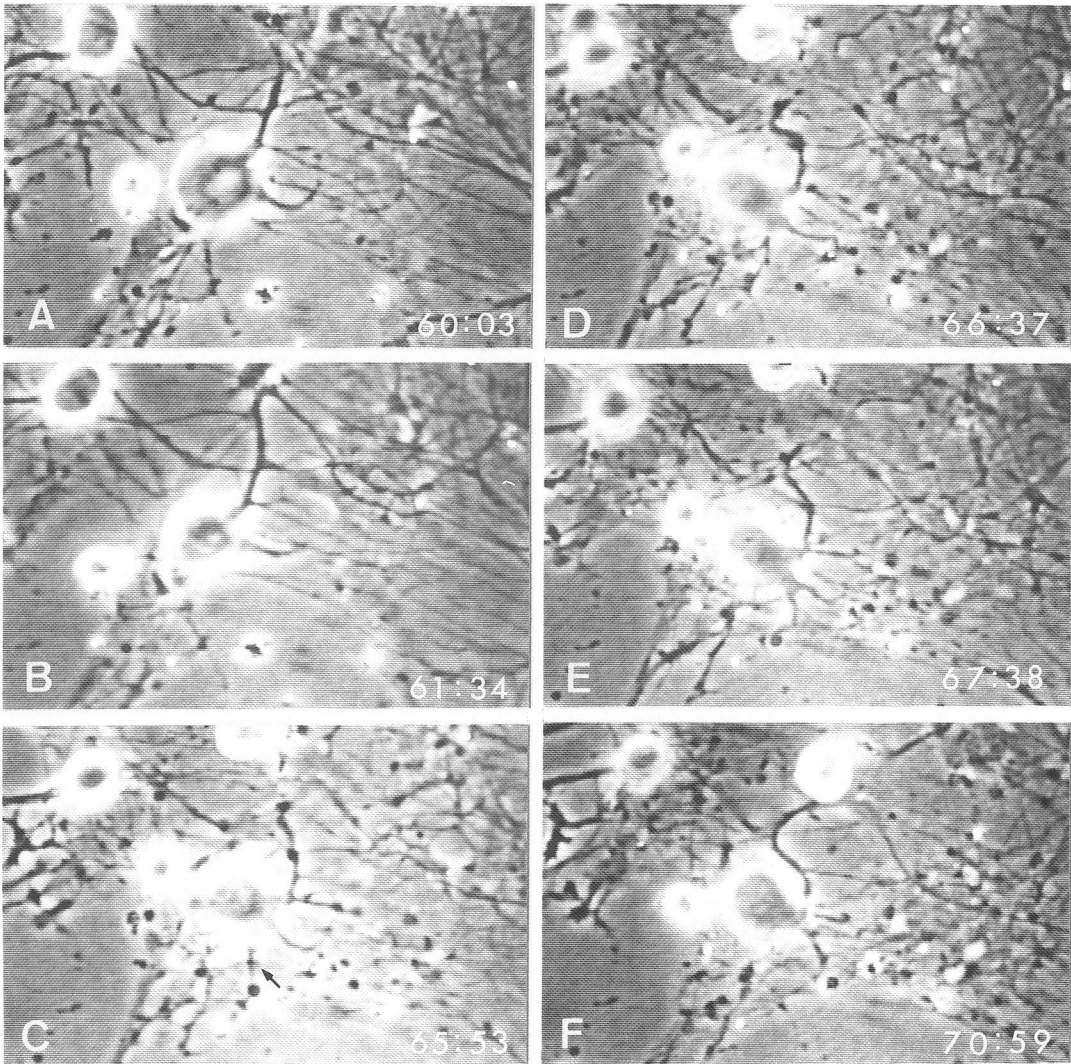


Fig. 4 The DRG cell in culture from 60 hours to 70 hours (A-F). The cell body of the bell-shaped cell (A) became spherical (B). A new neurite (arrow) appeared from the cell (C). The original neurites and a new neurite approached each other (D) and the DRG cell changed into a bell-shaped bipolar cell again (E). Finally, the DRG cell changed into a pseudounipolar cell (F).

態変化を終える^{7,8,10}。培養下においても、培養2週目以降で偽単極細胞への単極化をほぼ終わることがわかっている⁹⁻¹¹。そして、これまで培養下でのその形態変化様式については、双極細胞の2本の神経突起が徐々に近づき、突起起始部の細胞質の伸長によって偽単極細胞になると単純に考えられてきた。今回、VTR録画システムを用いて培養DRG細胞の突起形成を連続観察することにより、培養下でのDRG細胞は単純に双極細胞から偽単極細胞へ変化するのではなく、偽単極細胞になったものから、また新たに突起の出現がみられ双極

細胞になるものや、または細胞体から3本以上の突起を有する細胞になったものについても、その突起が徐々に近づき、細胞質の伸長によって、一旦、双極細胞となり、さらに偽単極細胞へと変化する事が観察された。培養DRG細胞は、そのような形態変化を何度も繰り返しながら成熟し、最終的に偽単極細胞になると思われる。この現象は培養初期において、DRG細胞の神経突起は最終的に終末をつくる標的が得られないために、細胞体から新たな神経突起の伸長をおこすものと思われる。そして、DRG細胞は伸ばした複数の突起を

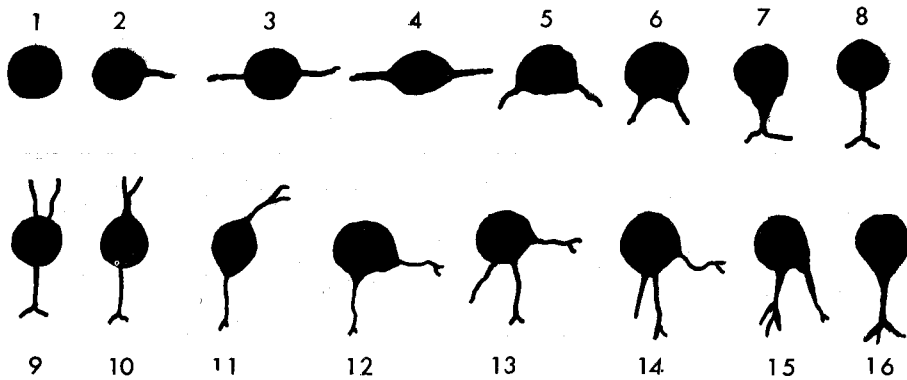


Fig. 5 Drawings summarizing the process-forming of DRG neurons in culture. DRG neurons in the early stages of culture repeated the morphological change from bipolar cells to unipolar cells.

1本の突起にする(単極化)性質を失うことなく、培養下でも単極化を繰り返しているものと思われる。その後、DRG細胞は培養2週間程で成熟し、偽単極細胞の形態を保つようになり、髄鞘を形成し始めるものと考えられる。

一方、生体内においては、DRG細胞は胎生早期に中枢側と末梢側に突起を伸ばし、終末をつくる標的を得て、単純に双極細胞から偽単極細胞への形態変化をとげ、ただちに成熟段階に入るものと考えられ、今回、培養細胞で観察されたような現象が起っているとは考えにくい。ただし、単極化の過程でDRG細胞の細胞体から細い突起状のものがでていのが観察されており⁷⁾、これは培養細胞で一旦出現した突起が消失するものに似ている現象であると推察される。

培養神経細胞での連続観察は中井による16mm映画撮影で多くの新しい知見が得られた^{12,13)}。最近では、VTR録画システムが観察に導入され、Goslin and Bankerによる中枢神経細胞の軸索と樹状突起形成^{15,16)}、神経細胞のグリア細胞上の移動などの詳細な報告¹⁴⁾もされるようになり、培養下での神経細胞の形態変化の詳細な観察には有用な手段となっている。

今回の観察結果は、培養初期におけるDRG細胞の一部を観察したものであるが、双極細胞から偽単極細胞への形態変化において、再度単極化を繰り返す報告はなされていない。今後、さらに詳細な観察と偽単極化におけるDRG細胞にたいするシュワン細胞や線維芽細胞との関連について追究してみたい。

5 要 約

後根神経節細胞が双極細胞から偽単極細胞へ変化することは、周知のことである。培養下においては、器官培養などある条件下で同様な形態変化をとる。著者は、胎生18日目のラット後根神経節細胞の分散培養を行い、VTR録画装置を用い、培養開始から神経細胞の神経突起の形成を追跡した。培養液は培養1日目のみ10%牛胎仔血清を含む血清培地を用い、それ以後は無血清培地(α MEM)とした。

単離された後根神経節細胞は培養開始から30分以内に元の突起が消失し、新たな突起の伸長が起こる。その突起の数は通常1~2本であるが、数本の突起を有する神経細胞もみられる。今回、とくに2本の突起を有する双極細胞に注目し、経時的に観察した。培養20時間で神経細胞は紡錘型から球形になり、2本の突起起始部が徐々に近づき始める。それと同時に、新たな突起の出現がみられ、それが元来の双極細胞の突起の一方に近づいて合一し、再び双極細胞となる。培養30時間では近づいた2本の突起起始部の細胞質の伸長がみられ、単極化が始まる。ところが、培養45時間では偽単極細胞となった神経細胞から新たな突起の伸長がみられ、再び双極細胞となり、前述と同様な単極化を繰り返す所見が得られた。したがって、培養下での培養初期における後根神経節細胞は、双極細胞から偽単極細胞への形態変化を何度も繰り返し、成熟過程へ向かうものがあると思われる。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲下さいました解剖学第1講座、高橋杏三教授に深く感謝致します。

文 献

- Hiss, N.: Zur Geschichte des menschlichen Rückenmarkes und der Nervenwurzeln. Abhandlungen der Sächsischen Akademie der Wissenschaften (Leipzig) **13**, 479-513 (1886).
- Cajal, S. Ramón y: Sur l'origine et le ramifications des fibres nerveuses de la moelle embryonnaire. *Anat. Anz.* **5**, 85-95 (1890).
- Lenhossék, M. VAN: Beobachtungen an den Spinalganlien und dem Rückenmark von Pristiurusembryonen. *Anat. Anz.* **7**, 519-539 (1891).
- Cajal, S. Ramón y: Die Structur der sensiblen Ganglien des Menschen und der Tiere. *Ergeb. Anat. Entwicklungsgesch.* **16**, 177-215 (1907).
- Tennyson, V. M.: Electron microscopic study of the developing neuroblast of the dorsal root ganglion of the rabbit embryo. *J. Comp. Neurol.* **124**, 267-318 (1965).
- Pannese, E.: Electron microscopical study on the development of the satellite cell sheath in spinal ganglia. *J. Comp. Neurol.* **135**, 381-422 (1969).
- Matsuda, S. and Uehara, Y.: Prenatal development of the rat dorsal root ganglia. A scanning electron-microscopic study. *Cell Tissue Res.* **235**, 13-18 (1984).
- 二宮孝文: ラット後根神経節細胞の突起形成期における形態変化 1. 発生初期における In Vivo 及び In Vitro での観察. *札幌医誌* **54**, 381-391 (1985).
- 二宮孝文: ラット後根神経節細胞の突起形成期における形態変化 2. 培養後根神経節細胞の経時的観察. *札幌医誌* **55**, 1-10 (1986).
- Takahashi, K. and Ninomiya, T.: Morphological changes of dorsal root ganglion cells in the process-forming period. *Prog. Neurobiol.* **29**, 393-410 (1987).
- 二宮孝文, 高橋杏三: 培養後根神経節細胞の経時的形態変化. *解剖誌* **64**, 465 (1989).
- Nakai, J. and Kawasaki, Y.: Studies on the mechanism determining the course of nerve fibers in tissue culture I. The reaction of the growth cone to various obstructions. *Z. Zellforsch.* **51**, 108-122 (1959).
- Nakai, J.: Studies on the mechanism determining the course of nerve fibers in tissue culture II. The mechanism of fasciculation. *Z. Zellforsch.* **52**, 427-449 (1960).
- Hatten, M. E.: Riding the glial monorail: a common mechanism for glial guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. *TINS* **13**, 179-184 (1990).
- Goslin, K. and Banker, G.: Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Cell Biol.* **108**, 1507-1516 (1989).
- Goslin, K. and Banker, G.: Rapid changes in the distribution of GAP-43 correlate with the expression of neuronal polarity during normal development and under experimental conditions. *J. Cell Biol.* **110**, 1319-1331 (1990).
- Sargent, P. B.: What distinguished axons from dendrites? Neurons know more than we do. *TINS* **12**, 203-205 (1989).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学解剖学第1講座 二宮孝文