

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

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)

Morphological Changes of Rat Dorsal Root Ganglion Cells in the Process-forming Period

II. Time-sequential Observation of Dorsal Root Ganglion Cells in Culture

Takafumi NINOMIYA

Department of Anatomy (Section I), Sapporo Medical College

(Chief: Prof. K. Takahashi)

Rat dorsal root ganglion cells on day 14 of gestation were cultured under the condition that led to a good cell differentiation. The incidence of appearance of pseudounipolar cells was then estimated time-sequentially by silver impregnated preparations. Further, fine structures of dorsal root ganglion cells, especially their proximal portions of processes, were observed with a transmission electron microscope.

1. In silver impregnated preparations, bipolar cells occupy 76% of all ganglion cells at the 6th day of culture, while unipolar cells increase to about 50% at the 8th to 16th day of culture. Unipolar cells increase to about 80% at the 22nd day of culture.

2. Cultured dorsal root ganglion cells at successive developmental stages were observed with a transmission electron microscope. By observing the morphological transformation from bipolar cells to pseudounipolar cells, it is confirmed that the unipolar stem process derives from the elongated cytoplasm of the cell body. No evidence is obtained that the two processes of bipolar cells fuse together to make a stem process. (Received October 17, 1985 and accepted December 2, 1985)

Key words: Cell culture, Cell transformation, Dorsal root ganglion, Rat, Unipolarization

1 緒 言

脊椎動物の後根神経節 (DRG) 細胞は、発生初期において双極細胞から偽単極細胞へ分化する。従来、突起の単極化については、突起癒合説¹⁻⁴⁾と細胞体伸長説⁵⁻⁷⁾との2つの説があるが、その単極化様式についての明確な報告はない。著者は第一報⁸⁾において、DRG 発生初期における偽単極細胞の出現頻度と、その突起形態を光線顕微鏡 (以下光顕) 及び走査型電子顕微鏡 (以下走査型電顕) を用い、*in vivo* 及び *in vitro* で観察した。その結果、DRG 細胞は、胎生 13~16 日までには双極細胞が多く存在するが、胎生 18 日以降からは、偽単極細胞が約 90% 以上を占めていた。また、走査型電顕で双極細胞から偽単極細胞へ移行する像をとらえ

ることができ、さらに渡銀標本による観察を加えた結果から、DRG 細胞の単極化は細胞体の伸長によって起こることを示唆した。今回、その単極化様式をより詳細に追求するため、胎生期の DRG 細胞を分化しやすい条件下で培養し、経時的に偽単極細胞の出現頻度を求め、さらに透過型電子顕微鏡 (以下透過型電顕) を用いて、DRG 細胞の微細構造、とくに突起の起始部について観察した。

2 実験方法

2.1 DRG 細胞の培養方法

実験動物には胎生 14 日の Sprague-Dawley ラット 13 匹を用いた。無菌的に採取した胸部 DRG を、前報と同じく Bunge and Wood⁹⁾ によるプラスチック製フィ

ルム (Allied Chemical 社, 米国) を用いた Hat 型ディッシュに植えた。

培養液には B600 medium¹⁰⁾ (Eagle's MEM 60 ml, 9-day chick embryo extract 10 ml, human placental serum 20 ml, 20% glucose 3 ml, 200 mM L-glutamine 0.7 ml, nerve growth factor 50 ng/ml) を用い, 最長 28 日間培養し, 経時的に観察した。

2.2 渡銀染色による DRG 細胞の観察

渡銀染色は, Bodian 法の大塚変法¹¹⁾ を用いた。まず, 培養 DRG を Hat 型ディッシュのまま緩衝液 (アール液) で 3 回洗い, 固定液 (ホルマリン 2 ml, 氷酢酸 2 ml, 80% アルコール 36 ml) で 2~7 日間固定する。次に流水で水洗し, 蒸留水で洗ったのち 20% 硝酸銀水溶液 (37°C) に浸銀し, 再び蒸留水で水洗後, 硝酸銀・緩衝液溶液 (37°C) で渡銀した。次に, ヒドロキノン・亜硫酸ナトリウム液で還元し, 流水で水洗後, 蒸留水を通し, 1% 塩化金で渡金した。さらに, 蒸留水で洗い 2% 酢酸水溶液に入れ, 流水で水洗後, 5% チオ硫酸ナトリウムで定着し, 水洗したのち, 脱水, 透徹, 封入の操作を行なった。完成した標本を顕微鏡で観察し, 単極細胞及び双極細胞の出現頻度を求めた。

2.3 透過型電顕による DRG 細胞の観察

培養 DRG 細胞をアール液で 3 回洗い, 2.5% グルタルアルデヒドで固定した。さらに, 1% オスミウム酸水溶液で後固定し, エタノール脱水後, エポキシ包埋した。Porter-Blum MT-1 型ウルトラミクロトームで 1 μm 切片を作製し, トルイジン青染色で顕微鏡による観察を行った。また超薄切片は, 酢酸ウラン・鉛二重染色を行ない, 透過型電顕 (日立 HS-7) で観察した。

3 実験結果

3.1 渡銀染色による DRG 細胞の観察





渡銀染色した培養 DRG 細胞を Matsuda and Uehara¹²⁾ の分類を参考にして, この標本で認識可能な四つの型に分類した。すなわち, Table 1 に示すごとく, 第 1 に紡錘形及び長楕円形の双極細胞 (spindle-shaped and eccentric bulged bipolar cell), 第 2 にベル状の双極細胞 (bell-shaped bipolar cell), 第 3 に単極部位の短い単極細胞 (short-stem unipolar cell), 第 4 に単極部位の長い単極細胞 (long-stem unipolar cell) である。

培養 6 日の DRG 細胞では, 第 1 型の双極細胞が 44%, 第 2 型のベル状の双極細胞が 32% で双極細胞は全体の 76% を占め, この時期では単極細胞は少ない。培養 8 日になると単極細胞が増加し, 47% を占める。この時期には双極細胞は第 1 型より第 2 型のベル状の双極細胞が多くなる。培養 8 日から 16 日までは, 双極細胞と単極細胞の比率にあまり変化はない。しかし, 培養 22 日以降では単極細胞の急激な増加がみられ, 80% 前後を占めるようになった (Table 1)。また, この時期において髄鞘形成も認められた (Figs. 1a and b)。

3.2 透過型電顕による DRG 細胞の観察

渡銀染色による四つの型の細胞の出現頻度の結果をもとに, 透過型電顕で培養 DRG 細胞を観察した。第 1 型の細胞 (spindle-shaped and eccentric bulged bipolar cell) では (Fig. 2a), 核は円形または楕円形で細胞体のほぼ中央に位置する。細胞質には多量の free ribosomes が散在する。細胞体から出る 2 本の突起には (Figs. 2b and c), microtubules 及び neurofilaments がその走行に沿って平行に走っている。2 本の突起のう

Table 1 Percentages of cell types with time in DRG culture.

Cell type	Days in culture	6	8	10	12	16	22	24	28
1. Spindle-shaped and Eccentric bulged bipolar cell		44	13	4	6	12	—	—	—
2. Bell-shaped bipolar cell		32	40	29	45	34	17	23	14
3. Short-stem unipolar cell		4	11	13	15	12	11	10	4
4. Long-stem unipolar cell		20	36	54	34	42	71	67	82
Counted number		125	150	124	127	237	63	99	334

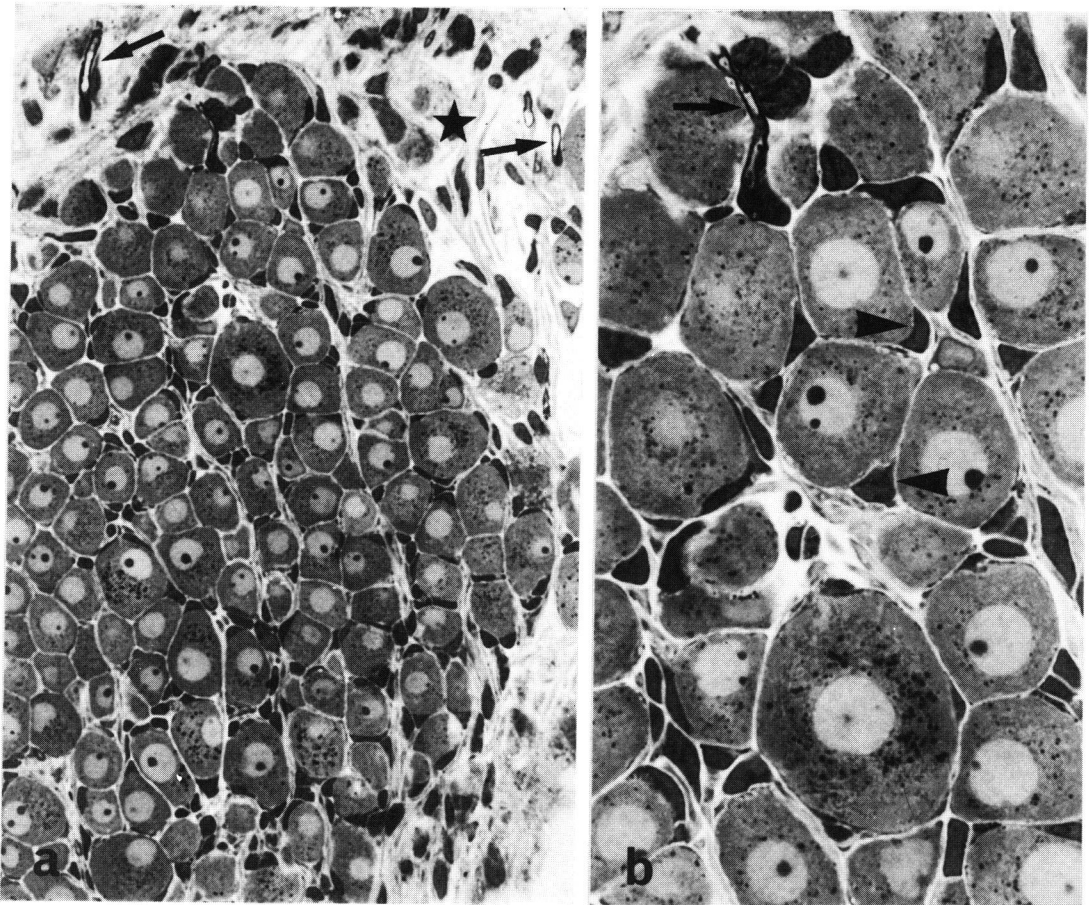


Fig. 1 Light micrographs of semi-thin sections showing dorsal root ganglia (DRG) at the 28th day of culture.
 a: Although the size of neurons are variable, cell bodies are uniformly stained. Arrows show myelinated fibers. ★, connective tissue surrounding the ganglion cells. Epon embedded, toluidine blue stain. $\times 360$.
 b: An enlarged view of Fig. 1a. Numerous lipofuscin granules are observable in some of the neuronal perikarya. Satellite cells are shown by arrowheads. Arrows show myelinated fibers. $\times 910$.

ち、末梢側ものは中枢側に比べて直径が太く、またその基部には free ribosomes を主体とする細胞体 organella がみられる。さらに、この時期には中枢側突起に近く、しばしば電子密度の高い外套細胞がみられた (Fig. 2b)。Fig. 3 は第 1 型の細胞と第 2 型の細胞 (bell-shaped bipolar cell) との中間型である。核は円形で細胞体のほぼ中央にある。中枢側突起の近くには外套細胞がみられた。さらに、この 2 本の突起が近づき、第 2 型の細胞となったものでは (Fig. 4a)、細胞質内にまだ free ribosomes が多い。突起の起始部には、microtubules 及び neurofilaments の集合がみられた (Fig. 4b)。単極化した DRG 細胞において、その単極部位は、細胞体の organella を含む部分が伸長した構造を示し (Figs. 5a and b)、2 本の突起が癒合することを

示唆するような電顕像は得られなかった。完全に単極細胞となったものでは (Fig. 6a)、その単極部位は細胞体部の特徴を失うが、microtubules や neurofilaments の走行がはっきりと認められ、いわゆる神経突起の構造を示す。また、突起の分岐部においては、そのほとんどの例において free ribosomes の集合がみられた (Figs. 6b and c)。

今回の培養 DRG 細胞の 24 日以降のものについて、とくに細胞質内に多数の顆粒が認められるものがあり (Fig. 1b)、透過型電顕による観察でリポフスチン顆粒であることが確かめられた。また、各々の DRG 細胞の大きさに差がみられたが (Fig. 1a)、その細胞質の染色性はほとんど同一で、明細胞と暗細胞の識別はできず、全体的に均一な細胞質をもった細胞であった。

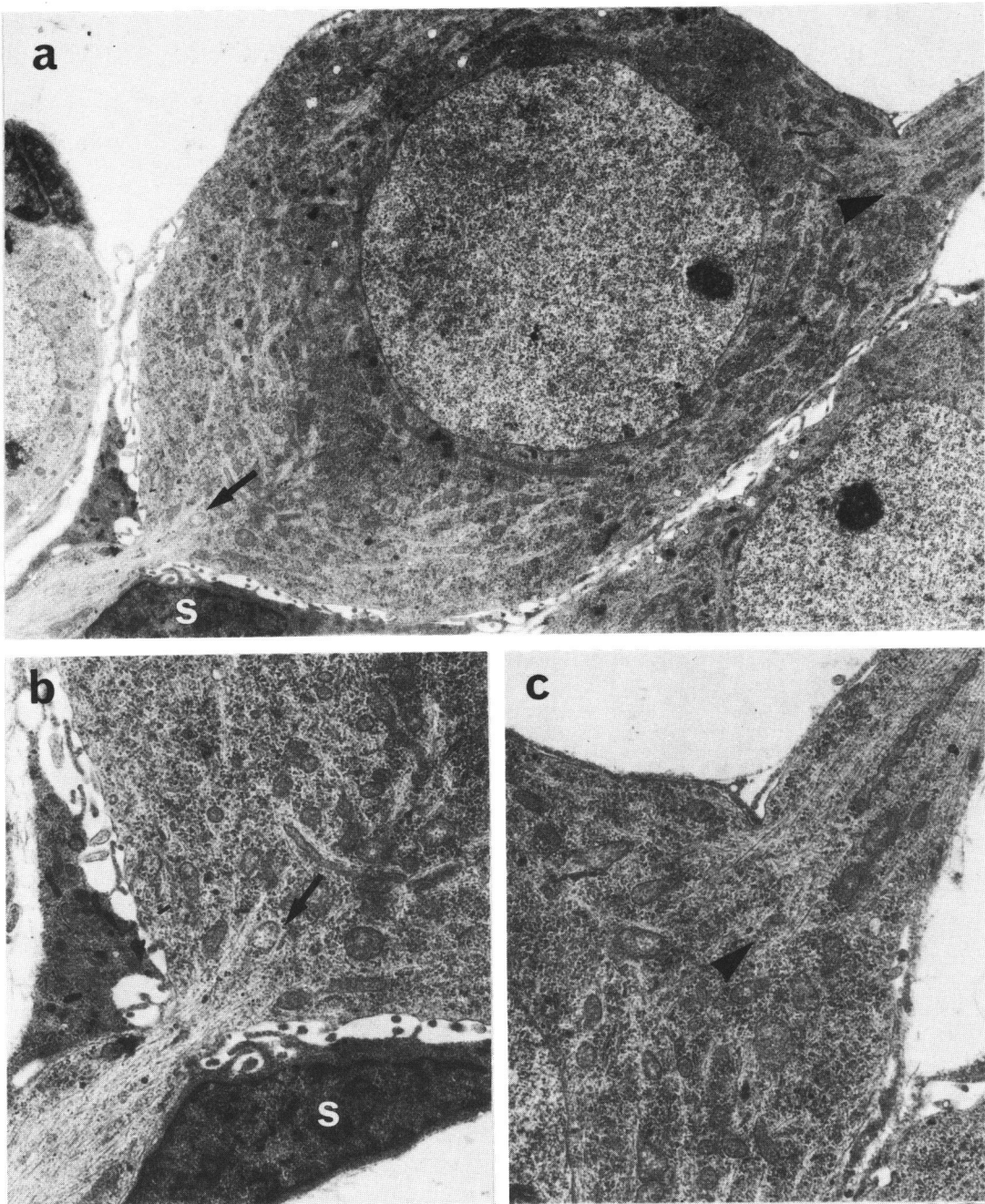


Fig. 2 Electron micrographs of a spindle-shaped bipolar cell in the early stage of DRG culture.
 a: Two opposite processes, the central (arrow) and the peripheral (arrowhead), are observable. S, satellite cell. $\times 4500$.
 b and c: Enlarged views of the two processes of Fig. 2a. The characteristics of each process are evident. Central process is covered by a satellite cell (S). b, $\times 8900$. c, $\times 9000$.

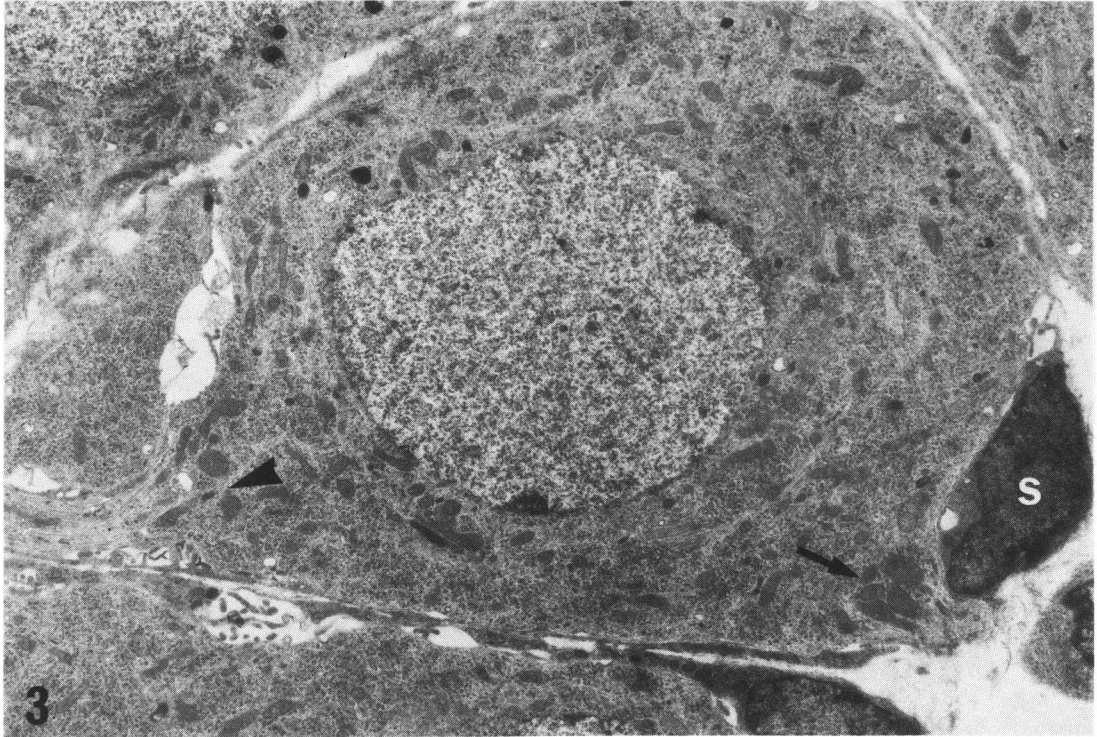


Fig. 3 An electron micrograph showing the transitional stage between eccentric bulged bipolar and bell-shaped bipolar cell. Two processes of the spindle-shaped bipolar cell approach each other (arrow and arrowhead) on one side of the cell body. The satellite cell (S) is seen near one of the processes, probably the central one (arrow). $\times 6400$.

4 考 察

DRG 細胞の *in vivo* における形態的变化については、その双極細胞から偽単極細胞への変化について早くから報告されている¹³⁻¹⁷。しかし、その2本の突起の単極化様式についての明確な報告はなかった。著者は第1報で、*in vivo* における各発生段階の DRG 細胞を分離細胞としたのち走査型電顕で観察し、細胞体伸長説を示唆する結果を報告した。また、培養下で、その初期に DRG 細胞が2本又はそれ以上の突起を出し、長期培養することにより線維芽細胞の存在下で単極細胞まで分化することを確かめた。このことから、DRG 細胞の分化には、線維芽細胞などの補助的細胞が必要と考えられた⁸。そこで今回は、細胞分化の条件を満たすため DRG 細胞を分離細胞とせず、摘出した神経節を器官培養し、渡銀染色による細胞分化の経過と、透過型電顕による細胞構造の観察を行なった。

4.1 渡銀染色による DRG 細胞の観察

DRG 細胞は培養初期、とくに培養6日では双極細胞

が76%を占めるが、単極細胞も24%認められる。このことから、さらに早い時期に単極化が始まっているものと思われる。培養8~16日では、単極細胞が50%前後に増え、双極細胞は、第1型の細胞(spindle-shaped and eccentric bulged bipolar cell)より第2型の細胞(bell-shaped bipolar cell)が増加している。さらに培養22日で、単極細胞の急激な増加がみられ、約80%に達する。したがって、胎生14日の DRG 細胞は、培養下において一定の速度で分化が進むのではなく、その分化は培養1週目までは、急速に進む。培養2週目では、その速度は緩徐となり、3週目から再び分化が急速に進むものと考えられる。

なお、培養22日で単極細胞の急激な増加がみられる時期に相当して、DRG 細胞に髄鞘が形成され、このことは、細胞の機能的成熟過程と関係をもつものと思われる。

4.2 透過型電顕による DRG 細胞の観察

観察した培養 DRG 細胞をその形態及び細胞内 organella を指標に Tennyson^{5,18} 及び Pannese^{7,19} の

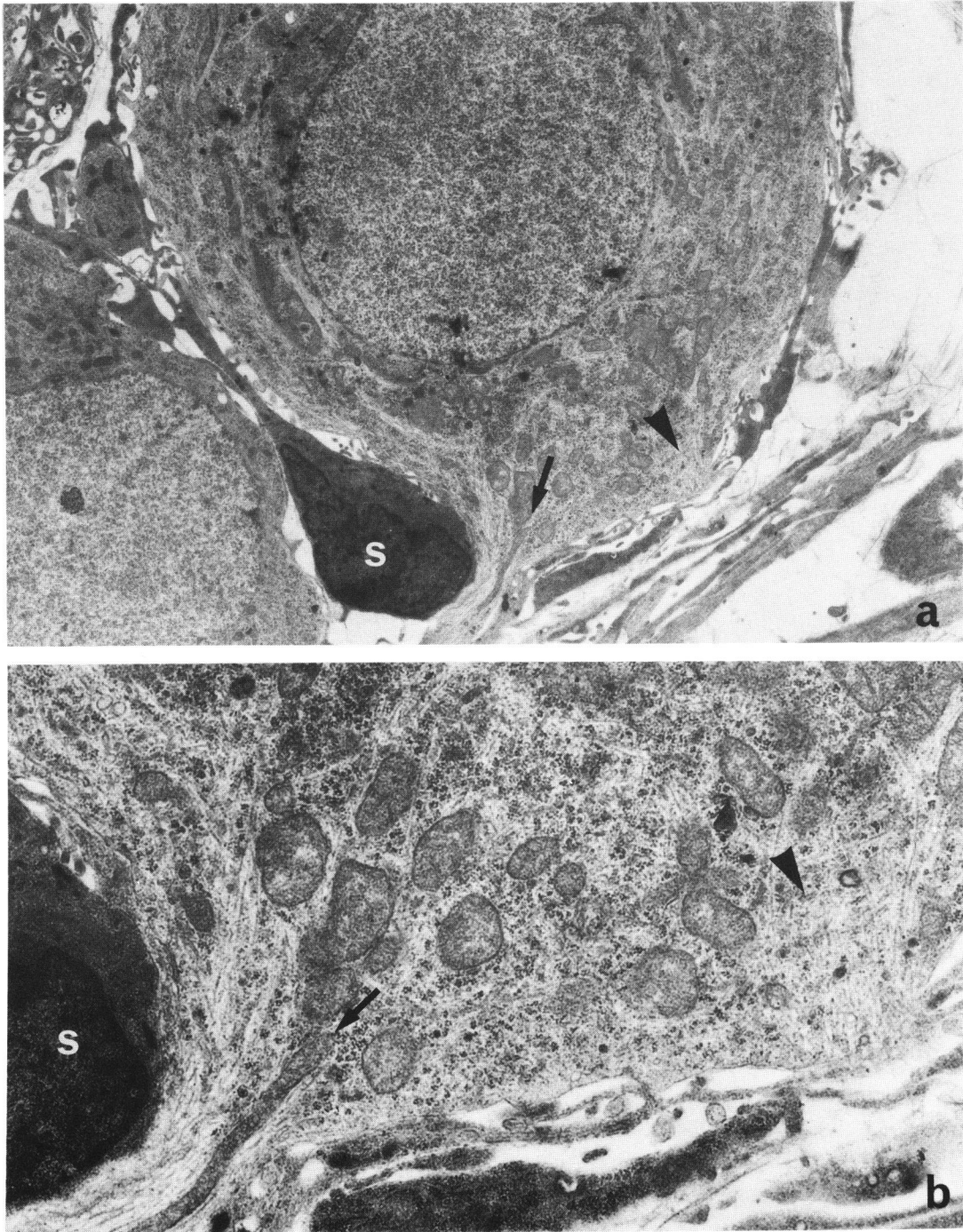


Fig. 4 Electron micrographs of a bell-shaped bipolar cell.

- a : One process, probably the central side, is shown by an arrow. An arrowhead shows the proximal portion of the peripheral process. S, satellite cell. $\times 5000$.
- b : An enlarged photograph of the proximal portion of the two processes. Note the aggregated neurofilaments at the original portion of the peripheral process (arrowhead). $\times 14200$.

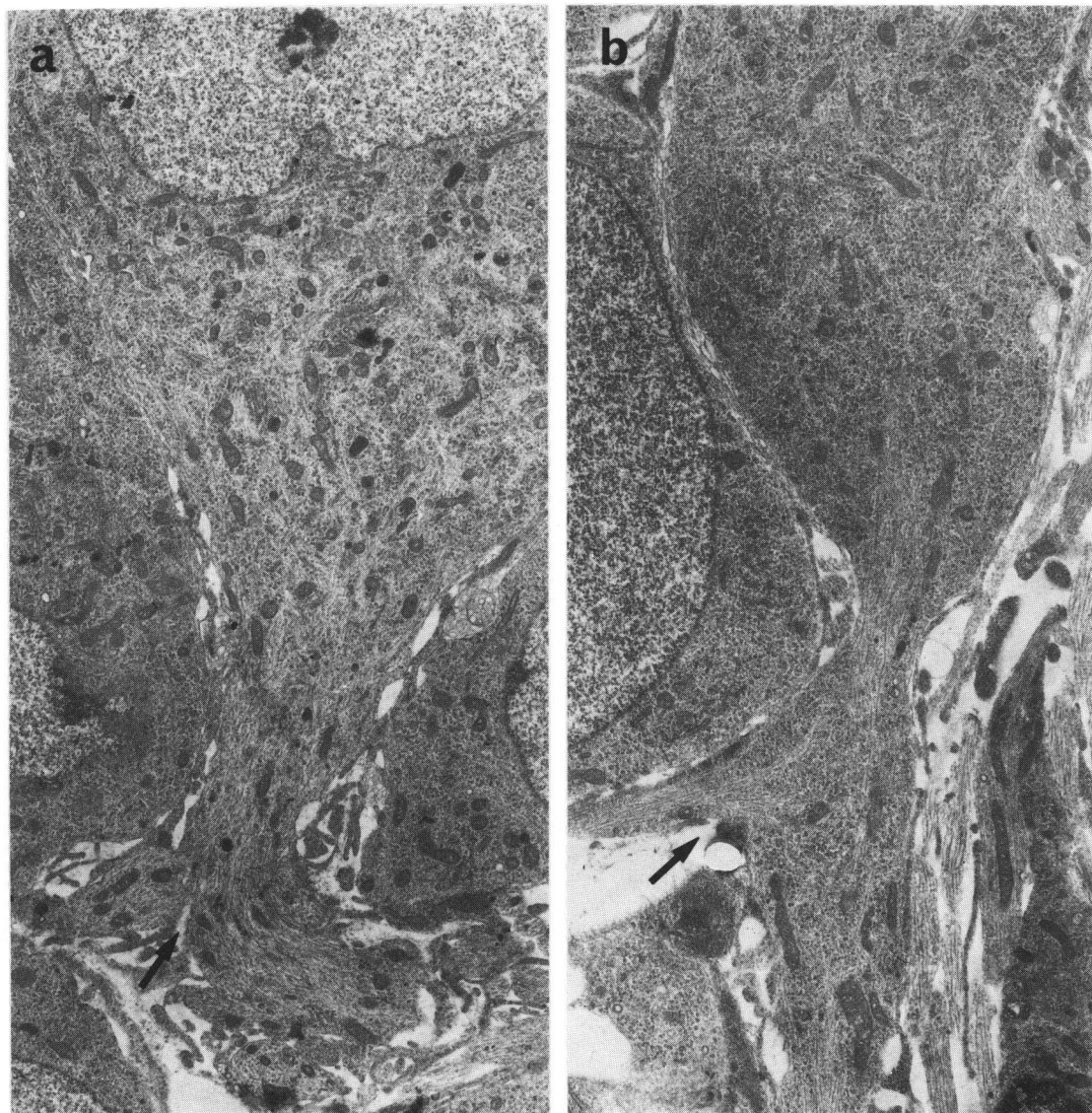


Fig. 5 Electron micrographs showing the stem processes of the initial stage of unipolar cells. Note that the stem process portions show the structures of perikaryal cytoplasm, and not the structure of cell processes. In both Figs. 5a and b, the two bifurcated processes are observable. Arrows show the bifurcated portions. a, $\times 7000$. b, $\times 9300$.

in vivo における DRG 細胞の報告と比較してみると、第1型の細胞 (spindle-shaped and eccentric bulged bipolar cell) は彼らの言う primitive neuroblast に相当し、第2型の細胞 (bell-shaped bipolar cell) は、intermediate neuroblast、また第3型 (short-stem unipolar cell) 及び第4型 (long-stem unipolar cell) の細胞は immature unipolar cell に相当するものとされる。

DRG におけるいわゆる明細胞、暗細胞²⁰⁻²⁶⁾の有無に関して、Bunge *et al.*²⁷⁾は、培養下でその出現を報告している。今回、著者の観察した培養 DRG 細胞においては、この二つの型の細胞を区別し得ず、細胞質はほぼ均一に染まっていた。前述のごとく髄鞘形成はみられたが、この時期の DRG 細胞が、完全に成熟しているか否かは明らかでない。さらに長期培養を行なうことにより、Bunge *et al.*²⁷⁾が胎生 16.5~19 日の材料を用

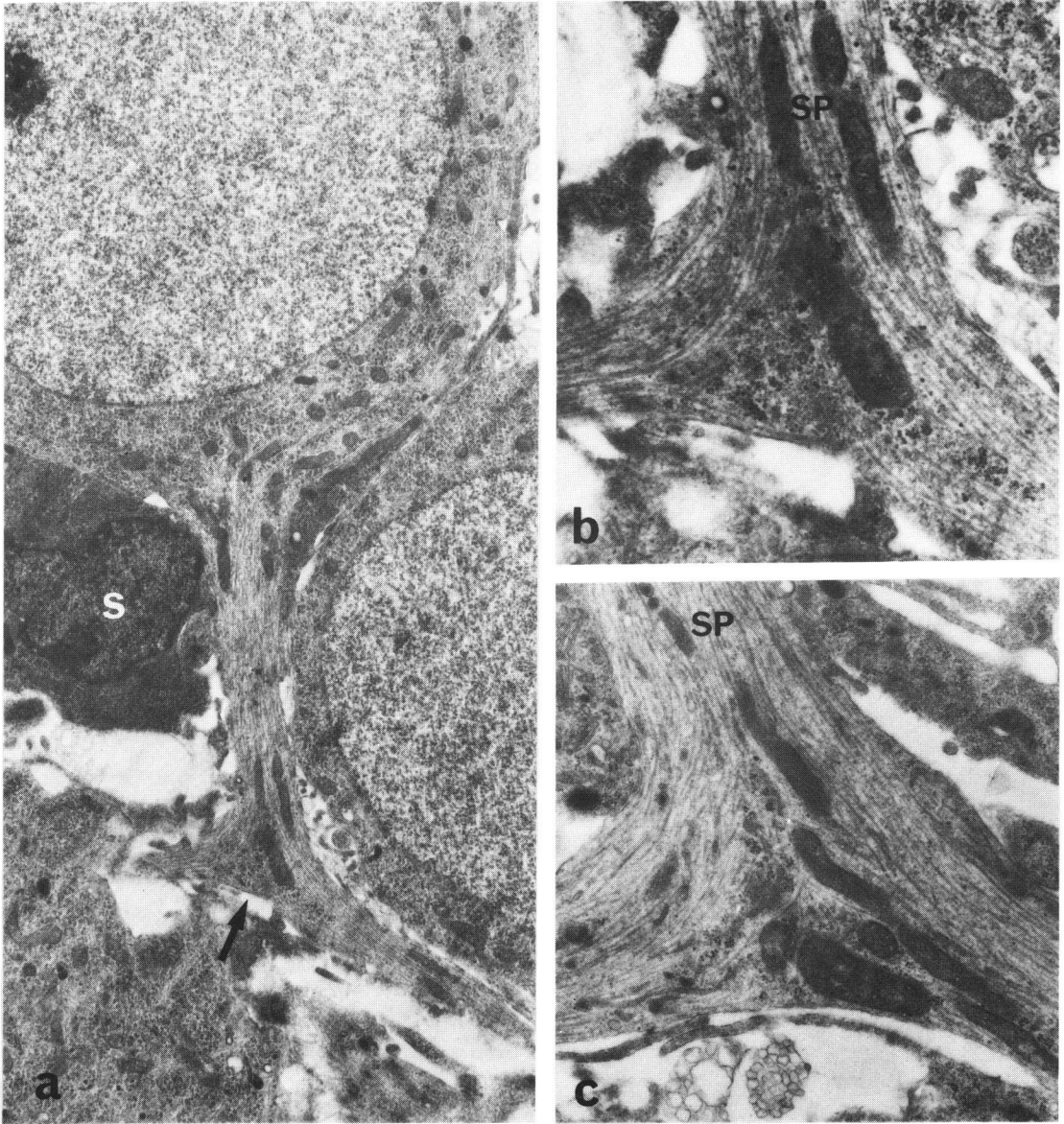


Fig. 6 Electron micrographs of the short-stem unipolar cells.

- a: Note the parallel-oriented microtubules and neurofilaments in the stem process and the two bifurcated processes (arrow). $\times 7700$.
- b: An enlarged view of Fig. 6a, showing the bifurcated portion from the stem process (SP). Clusters of free ribosomes are observable at the bifurcated portion. $\times 23000$.
- c: A photograph taken from another section, showing a similar structure as Fig. 6b. SP, stem process. $\times 16000$.

い、培養 24~79 日で認めたような明細胞、暗細胞が出現する可能性がある。

DRG 細胞の突起起始部において、双極細胞の 2 本の突起は、その形態的特徴から中枢側と末梢側の識別ができ、培養系においても *in vivo* と同様な突起の構造を

もつように分化することは注目すべき点である。また、単極細胞となったものでは、その単極部位は細胞体の構造を残しており、細胞体が伸長した部分であることを示唆する。さらに、その単極部位が伸びるに伴い microtubules 及び neurofilaments などがこれに伴行

し、神経突起の特徴的な構造を示すようになる。また、突起の分岐部に free ribosomes の集合がみられたことは興味ある所見であり、このことは、突起の単極部分が細胞体の伸長により生ずることの傍証であると思われる。

4.3 突起形成への形態変化のまとめ

第1報の *in vivo* における DRG 細胞の光顕及び走査型電顕を用いての観察によると、DRG 細胞の単極化は、細胞体の伸長によるもので、2本の突起の癒合によるものではないという結果が得られた⁸⁾。今回、培養 DRG 細胞の透過型電顕を用いての観察でも、単極化した部分が細胞体の構造を示し、さらに突起の癒合を示す所見が得られなかったことから、第1報の細胞体伸長説が裏付けられる結果となった。

5 結 論

胎生14日におけるラット後根神経節細胞を分化しやすい条件下で培養を行ない、渡銀染色による偽単極細胞の出現頻度を経時的に求めた。さらに透過型電顕を用い、神経節細胞の微細構造、とくに突起の起始部を観察した。

1. 渡銀標本において、培養6日では双極細胞が多く、76%を占めるが、培養8~16日では単極細胞の増加がみられ約50%に達した。培養22日では、さらに単極細胞の急激な増加がみられ80%前後を占めた。

2. 透過型電顕を用いて、各分化段階の後根神経節細胞を観察できた。とくに、双極細胞から偽単極細胞へ移行する電顕像をとらえることができ、この単極部分が、細胞体の一部の伸長した部分であることを確かめた。双極細胞の2本の突起が癒合して単極になることを示す像は得られなかった。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲下さいました解剖学第1講座、高橋杏三教授に深謝致します。また、ヒト胎盤血清を御提供下さった小六産婦人科病院長、小六義久博士に深く感謝致します。

本研究は、昭和59年度文部省科学研究費(奨励研究 A, No. 59770052)の補助によって行なわれた。

文 献

1. Gehuchten, G. van: Anatomie du système nerveux de l'homme. Louvain, A. Uystpruyt-Diludonne (1906).
2. Lenhossék, M. van: Zur Kenntnis der Spinalganglienzellen. Arch. f. mikrosk. Anat. **69**, 245-

263 (1907).

3. Copenhaver, W. M. and Johnson, D. D.: Bailey's Textbook of Histology. 14th ed., 167, Williams and Wilkins, Baltimore (1958).
4. Bloom, W. and Fawcett, D. W.: A Textbook of Histology. 10th ed., 348, Saunders, Philadelphia-London-Toronto (1975).
5. Cajal, S. Ramón y: Die Struktur der sensiblen Ganglien des Menschen und der Tiere. Ergeb. Anat. Entwicklungsgesch. **16**, 177-215 (1907).
6. 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).
7. Pannese, E.: The histogenesis of spinal ganglia. Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. **47**, 1-97 (1974).
8. 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).
9. Bunge, R. P. and Wood, P.: Studies on the transplantation of the spinal cord tissue in rat. 1. The development of a culture system for hemisection of embryonic spinal cord. Brain Res. **57**, 261-276 (1973).
10. Bunge, R. P., Bunge, M. B. and Cochran, M.: Some factors influencing the proliferation and differentiation of myelin forming cells. Neurology (Minneapolis) **28**, 59-67 (1978).
11. Otsuka, N.: Histological and ontogenetic studies on Mauthner's cells in fish. Z. Zellforsch. **58**, 33-50 (1962).
12. Matsuda, S. and Uehara, Y.: Prenatal development of the dorsal root ganglia. A scanning electron-microscopic study. Cell Tissue Res. **235**, 13-18 (1984).
13. Hiss, N.: Zur Geschichte des menschlichen Rückenmarkes und der Nervenwurzeln. Abhandlungen der Sachsischen Akademie der Wissenschaften (Leipzig) **13**, 479-513 (1886).
14. Cajal, S. Ramón y: Sur l'origine et les ramifications des fibres nerveuses de la moelle embryonnaire. Anat. Anz. **5**, 85-95 (1890).
15. Rétzius, G.: Zur Kenntnis des centralen Nervensystems; quoted by Scharf, J. H. In: v. Möllendorffs Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. IV, 1, Sensible Ganglien, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1891).
16. Lenhossék, M. van: Beobachtungen an dem Rückenmark von Pristiurus embryonen. Anat. Anz. **7**, 519-539 (1892).
17. Cajal, S. Ramón y: Asociación del método del

- nitrate de plata con el embrionario. Para el estudio de los focos motores y sensitivos. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid* **3**, 65-96 (1904).
18. Tennyson, V. M.: The fine structure of the axon and the growth cone of the dorsal root neuroblast of the rabbit embryo. *J. Cell Biol.* **44**, 62-79 (1970).
 19. Pannese, E.: Electron microscopical study on the development of the satellite cell sheath in spinal ganglia. *J. Comp. Neurol.* **135**, 381-422 (1969).
 20. Hatai, S.: Number and size of the spinal ganglion cells and dorsal root fibres in the white rat at different ages. *J. Comp. Neurol.* **12**, 107-124 (1902).
 21. Dogiel, A. S.: *Der Bau der Spinalganglien des Menschen und der Säugetiere.* 157, Gustav Fisher, Jena (1908).
 22. Hess, A.: The fine structure of young and old dorsal root ganglia. *Anat. Rec.* **123**, 399-424 (1955).
 23. Yamadori, T.: A light and electron microscopic study on the postnatal development of spinal ganglia. *Acta Anat. Nippon.* (Kaibogaku Zasshi: Tokyo) **45**, 191-205 (1970).
 24. Jacobs, J. M., Carmichael, N. and Cavanagh, J. B.: Ultrastructural changes in the dorsal root and trigeminal ganglia of rats poisoned with methyl mercury. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **1**, 1-19 (1975).
 25. Duce, I. R. and Keen, P.: An ultrastructural classification of the neuronal cell bodies of the rat dorsal root ganglion using zinc iodide-osmium impregnation. *Cell Tissue Res.* **185**, 263-277 (1977).
 26. Lawson, S. N.: The postnatal development of large light and small dark neurons in mouse dorsal root ganglia: a statistical analysis of cell numbers and size. *J. Neurocytol.* **8**, 275-294 (1979).
 27. Bunge, M. B., Bunge, R. P., Peterson, E. R. and Murray, M. R.: A light and electron microscopic study of long-term organized cultures of rat dorsal root ganglia. *J. Cell Biol.* **32**, 439-466 (1967).

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