



Acetylcholinesterase activity in the neural tube of the early chick embryo

三木, 明徳

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1981-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0333

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000333>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍) 三木 明徳 (香川県)
 学位の種類 医学博士
 学位記番号 医博い第324号
 学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当
 学位授与の日付 昭和56年3月31日
 学位論文題目 ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN THE NEURAL TUBE OF THE EARLY CHICK EMBRYO
 発生早期のニワトリ胚の神経管におけるアセチルコリンエステラーゼ活性について

審査委員 主査 教授 溝口史郎
 教授 馬場茂明 教授 藤原美定

論文内容の要旨

緒言

アセチルコリンエステラーゼ(以下AChE)は発生の極めて早い時期から神経系の組織に出現し、発生が進むにつれてその分布は拡がり、又活性も増強する。このようなことから、AChEと神経分化との関係が古くから注目され、これまでにいくつかの説が提示してきた。すなわち、1) 神経管を構成する細胞におけるAChE活性の出現は、未分化型の神経上皮細胞が神経芽細胞に分化したことを示す1つの重要な徴候であるという説。2) AChE活性の増強は神経細胞の分化及び成熟を示す徴候であるという説。3) AChE活性の出現及び増強はシナップス形成と密接な関係を持っているという説などである。しかしこれらの説の間には、AChE活性の出現と神経分化との関係の解釈に本質的な違いがあり、またいづれも十分な説得力のある説とは言い難い。

本研究は、特にAChE活性の出現が神経芽細胞の分化を示す指標になりうるかという点に注目して、発生早期のニワトリ胚を用いて、主として神経管におけるAChE活性の出現の時期と部位、及びAChE陽性細胞の形態的特徴を光顕及び電顕で調べた。

材料及び方法

白色レグホンの有精卵を37°Cで所定の時間孵化し、採取されたニワトリ胚のstageはHamburger and Hamilton法(1951)に従って判定した。光顕用にはMillonigのリン酸緩衝液(pH 7.2)に溶した4%Paraformaldehydeで12時間、4°Cで固定した後、同緩衝液で12時間水洗した。クリオスタッフで厚さ約10μmの凍結切片を作り、Karnovsky and Roots法(1964)に従って、反応液中に37°Cで40分間浸漬してAChE活性を検出した。電顕用には0.1Mのカコジル酸緩衝液で稀釀した

2% glutalaldehyde で 2 時間, 4°C で固定した後, 同緩衝液で 4 時間水洗した。ビプラトームで厚さ約 60 μm の未凍結切片を作製し, 同じく Karnovsky and Roots 法に従って, 反応液中に 4°C で 1 時間浸漬した。水洗の後, 1% のオスミウム酸で 1 時間後固定し, 脱水の後, 型の如くエポキシ系樹脂に包埋した。

光顕用, 電顕用とともに, 反応液の基質としてヨー化アセチルチオコリンを用いた。また 10^{-5} M の iso-OMP A で非特異性のコリンエステラーゼを抑制した。

なお, 対照実験としては, 基質を含まない反応液, 10^{-5} M エゼリンあるいは 10^{-4} M DFP を含む反応液を用いた。

所 見

光顕による観察では, AChE 活性を示す反応産物は褐色の微細顆粒として認められる。AChE 陽性細胞は孵卵 2 日 (20 体節, stage 13) のニワトリ胚の頸部神経管の基板に初めて認められた。発生の初期においては, 神経管を構成する細胞の殆んどが細長い紡錐形をしているのに対し, AChE 陽性細胞はそれよりもやや大型で類円形をしており, 基底膜の近くに位置していた。孵卵 3 日 (27~30 体節, stage 17) になると, このような AChE 陽性細胞が基板と翼板に認められた。また体節の筋板においても強い AChE 活性が認められた。孵卵 4 日 (stage 23) では多数の AChE 陽性細胞が基板と翼板で外套層を形成していた。筋板にも強い AChE 活性が認められ, またこの時初めて脊髄神経節の中に AChE 陽性細胞が確認された。今回観察した全期間を通して, 神経管の胚芽層を構成する細胞が淡い褐色を呈したが, 光顕レベルでは, これが AChE 活性によるものであると判定することはできなかった。

なお, 対照実験ではすべて, AChE による反応産物は認められなかった。

光顕で確認された AChE 活性の出現の時期よりもさらに早い時期については, 電顕で AChE 活性の有無を調べた。電顕による観察では, AChE 活性を示す反応産物は電子密度の高い, 微小な沈着物として認められる。このような反応産物を有する細胞は孵卵 30~35 時間 (10 体節, stage 10) のニワトリ胚の頸部神経管の基板及び翼板に認められた。これらの細胞では, 反応産物は一般に核膜の槽にのみ認められたが, ごく稀に短い粗面小胞体の槽にも認められた。この時期の AChE 陽性細胞は細長い紡錐形をしており, 大きい核が細胞体の大部分を占めていた。狭い細胞質は free ribosome で満されており, それらの間に少数の糸粒体, 短い粗面小胞体, 未発達な Golgi 装置が散在していた。このような形態的特徴は, この時期の神経管を構成している AChE 陰性細胞のそれと何ら変る所がなく, 従って, AChE 活性の有無を別にすれば, 両者を区別することはできなかった。

発生がやや進むと (13~17 体節, stage 11~12), 神経管を構成する細胞の中に, やや多くの粗面小胞体を持った AChE 陽性細胞が認められるようになった。このような細胞では粗面小胞体の槽にも反応産物がしばしば認められた。

また, 発生早期のニワトリ胚では, 神経管を構成する細胞だけでなく, 神經堤, 体節, 皮膚外胚葉上皮, 脊索などの細胞にも AChE 活性が認められた。

考 擻

(1) AChE 活性の出現の時期

光顕による観察では、孵卵2日（stage 13）のニワトリ胚の頸部神経管に初めてAChE陽性細胞が確認された。形態学的研究や³H-チミジンを使ったオートラジオグラフィーによれば、孵卵2日のニワトリ胚の頸部神経管に初めて神経芽細胞が出現すると言われている。今回の実験において、光顕的に確認できるAChE陽性細胞の出現の時期が、他の方法で調べられた神経芽細胞の出現の時期とはほぼ一致することが明らかになった。

しかし、電顕による観察ではこれよりもさらに早く、孵卵30～35時間（10体節、stage 10）のニワトリ胚の神経管において、AChE陽性細胞が認められた。すなわち、AChE活性は、従来他の方法によって調べられた神経芽細胞の出現の時期よりも約1/2日早く出現する。

(2) AChE陽性細胞の形態学的特徴

光顕による観察では、AChE陽性細胞はやや大型の類円形の細胞で、基底膜の近くあるいは外套層に位置していた。これらの細胞は、形態的特徴や存在する位置から判断して、従来神経芽細胞と呼ばれてきた細胞と一致する。

しかし電顕による観察では、AChE陽性細胞はstage 10のニワトリ胚の神経管に認められ、これらの細胞の形態的特徴は、同じ時期の神経管を構成するAChE陰性細胞のそれと区別することが殆んど不可能であった。さらにこれらのAChE陽性細胞には、神経細胞への分化に伴なう形態的変化、すなわち粗面小胞体の発達や深い核の切れ込みなどが全く認められなかった。このことは、この時期のAChE陽性細胞が未分化な神経上皮細胞であることを強く示唆している。

(3) AChE活性の細胞内分布

初めてAChE活性が確認された時期のAChE陽性細胞では、活性は主として核膜槽のみに分布していた。しかし発生が進むにつれて、胞体内にやや多くの粗面小胞体を持ったAChE陽性細胞が認められるようになり、このような細胞においては、活性は核膜槽だけでなく、粗面小胞体の槽にもしばしば認められた。これは、AChEはまず核膜で合成され、やがて粗面小胞体でも合成されるようになることを示唆している。

(4) AChE活性の出現と神経細胞の分化との関係

光顕による観察では、AChE陽性細胞は従来神経芽細胞と呼ばれてきた細胞に一致していた。

しかし、電顕による観察では、これまでに形態学的研究やオートラジオグラフィーによって調べられた神経芽細胞の出現の時期よりも約半日早くAChE陽性細胞が認められたこと、さらには、これらの細胞が形態的にみて未分化な細胞であることなどから、AChE活性の出現をもって神経上皮細胞が神経芽細胞へと分化したことを示す徵候であることは適当でなく、神経芽細胞の分化の判定には、さらに種々の検討を必要とすることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

神経伝達物質の一つと考えられているアセチルコリンの分解酵素であるアセチルコリンエステラーゼ（以下AChEという）は、発生の極めて早い時期から神経組織に出現し、発生の進行につれてその分布

が拡がり、その活性も増強する。このようなことから AChEと神経分化の関係は古くから注目されており、いくつかの説が提示されてきた。すなわち、1) 神経管を構成する細胞におけるAChE活性の出現は、神経上皮細胞が神経芽細胞へ分化したことを示す1つの重要な徴候である。2) AChE活性の増強は神経細胞の分化及び成熟を示す徴候である。3) AChE活性の出現とその増強は、シナップス形成と密接な関係を持つという説などである。しかしこれらの説の間には、AChE活性の出現と神経分化との関係の解釈に本質的なちがいがあり、またいずれも十分な説得力を持つとは言い難い。

本研究は、AChE活性の出現が神経芽細胞の分化を示す指標になり得るかという点に特に注目して、発生早期のニワトリの胚を用いて、神経管におけるAChE活性の出現の時期と部位並びにAChE陽性細胞の形態学的特徴を光顕と電顕でしらべたものである。

材料としては白色レグホンの有精卵を37°Cで所定の時間孵卵し、採取した胚の時期は Hamburger and Hamilton法(1951)に従って判定した。光顕用には Millonigのリン酸緩衝液(pH=7.2)に溶した4%パラフォルムアルデヒドで12時間4°Cで固定、同緩衝液で12時間洗った後クリオスタットで10μmの凍結切片を作り、Karnovsky and Roots法(1964)に従って反応させた。電顕用には、0.1Mカコジル酸緩衝液で薄めた2%グルタールアルデヒドで2時間固定、同緩衝液で4時間水洗した後、ビブロームで厚さ約60μmの非凍結切片を作り、同じく Karnovsky and Roots法で反応させた。ついで水洗の後1%オスミウム酸で後固定し、型の如く脱水、エポキシ系樹脂に包埋し、超薄切片とした。光顕用・電顕用ともに基質としてはヨー化アセチルチオコリンを用い、また、 10^{-5} M iso-OMPAで非特異性のコリンエステラーゼを抑制した。対照実験としては、基質を含まない反応液、 10^{-5} Mエゼリンまたは 10^{-4} M DFPを含む反応液を用いた。

実験結果

AChE活性を示す褐色微細顆粒状の反応産物を含む陽性細胞は、孵卵2日(20体節, stage 13)のニワトリ胚の頸部神経管の基板にはじめて認められた。発生の早期においては神経管を構成する細胞の殆んどが細長い紡錐形をした所謂神経上皮細胞であるのに対し、AChE陽性細胞はこれよりやや大きく、類円形を呈し、基底膜の近くに位置していた。孵卵3日(27~30体節, stage 17)になると、AChE陽性細胞が基板と翼板に認められ、また体節の筋板にも強いAChE活性が認められた。孵卵4日(stage 23)では多数のAChE陽性細胞が基板と翼板で外套層を形成していた。体節の筋板にも強いAChE活性が認められ、また脊髄神経節の中にもAChE陽性細胞が出現した。今回の観察の全期間を通じて神経管の胚芽層を構成する神経上皮細胞が淡い褐色を呈したが、光顕レベルではこれがAChE活性によるものであると判定することはできなかった。なお、対照実験では全て、AChEによる反応産物は認められなかった。

電顕による観察では AChE活性を示す反応産物は、電子密度の高い微小沈着物として認められるが、このような反応産物を有する細胞は孵卵30~35時間(10体節, stage 10)の胚の頸部神経管の基板と翼板において認められた。これらの細胞では反応産物は核膜槽にのみ認められたが、ごく稀に短小な粗面小胞体の槽にも認められた。この時期のAChE陽性細胞は細長い紡錐形を呈し、大きい核が細胞体の大部分を占め、狭い細胞質は free ribosomes で満たされ、その間に少数のミトコンドリア、短

小さな粗面小胞体及び発達未熟なゴルジー体が散在していた。このような形態的特徴は、相ならんで存在している AChE 陰性細胞のそれと何ら変るところがなく、従って AChE 活性の有無以外では両者を区別することは不可能であった。発生がやや進み 13~17 体節 (stage 11~12) になると、神経管を構成する細胞に、やや多くの粗面小胞体を持った AChE 陽性細胞が認められるようになり、これらでは粗面小胞体の槽にも反応産物が認められた。

考 察

1. AChE 活性の出現の時期については、光顕では 肢卵 2 日 (stage 13) の、電顕では 肢卵 30~35 時間 (stage 10) のニワトリ胚の頸部神経管で AChE 陽性細胞が認められた。光顕所見は従来³H-チミジンによるオートラジオグラフィーで言わわれている神経芽細胞の出現時期とほぼ一致するが、電顕所見はこれより 1/2 日早い。
2. AChE 陽性細胞の形態的特徴は、光顕所見では従来神経芽細胞と呼ばれてきたもののそれにほぼ一致するが、電顕所見によると、この時期の神経管を構成する細胞で AChE 陽性のものと陰性のものの間に特別の差異は認められず、陽性細胞がなお未分化な神経上皮細胞の状態にあること、従って AChE 活性の出現を以て直ちに神経芽細胞への分化の開始を示す指標となし得ないことが明らかにされた。
3. AChE 活性ははじめは核膜の槽のみに認められ、発生が進むにつれて粗面小胞体の槽にも認められるようになった。このことは AChE はまず核膜で合成され、やがて粗面小胞体でも合成されるようになることを示すものであり、細胞内の機能分化がまず核膜で始まることを示している。
以上の如く本論文は従来甚だ議論の多かった神経管の形態分化と機能分化、特に神経芽細胞の出現ないし分化と AChE 活性の関係について研究し、重要な新知見を得たものであり、高い学術的価値を有するものと認める。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。