

# 西洋ワサビのペルオキシダーゼ法に 関する基礎的研究

## I. 光学顕微鏡による検討

岡山大学医学部第一解剖学教室（指導：大塚長康教授）

奥 野 計 典

（昭和58年5月27日受稿）

**Key words :** HRP 法, 坐骨神経,  
脊髓前角細胞, 脊髓神経節

### 緒 言

外因性の酵素である西洋ワサビのペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) が軸索末端からエンドサイトーシスによって取り込まれ、軸索内を逆行性にさかのぼって起始ニューロンの細胞体に進み、この細胞体に集積するという性格を利用して、ニューロン間の線維連絡を証明する方法が Kristensson と Olsson (1971)<sup>2)</sup> や La Vail (1972)<sup>10)</sup> により開発された。また、この方法では神経終末部のみならず、軸索の損傷部からも HRP はニューロン内に入り、その起始細胞体に集まる。従って、この方法は中枢並びに末梢神経系における神経線維連絡を検索する方法として、これまで用いられてきた Nauta 法よりも優れているためこの方法を用いた研究成果が今日まで多数報告がなされてきた。

一方、この HRP 法に関する基礎的研究は少なく、Kristensson と Olsson (1973<sup>5)</sup>, 1974<sup>6)</sup>, 1975<sup>7)</sup>, 1976<sup>8)</sup>), La Vail と La Vail (1974<sup>11)</sup>) や Mizukawa ら (1978)<sup>12)</sup>, 石村 (1983<sup>13)</sup>) らの報告があるにすぎない。そこで本研究では、ラットの坐骨神経を用いて、その起始細胞である脊髓前角細胞や脊髓神経節細胞にみられる HRP の反応状態などを観察した結果を報告する。

### 材 料 と 方 法

実験動物としてはウィスター系ラット (300～350g) を用いた。まず、HRP (Sigma VI) 粉末

を生食水で30%～50%の濃度になる様に溶解した液を作る。一方、ラットの坐骨神経を梨状筋の下縁のところ露出し、上記の HRP 溶液を注射器に入れ、注射針で、坐骨神経を2～3mm 巾にわたって何回も突いたり、抜いたりして神経に損傷を与えながら HRP 溶液を5 $\mu$ l 注入した。また、あるものは注入前に注入部の上部あるいは下部で神経を結紮した。この様にして、HRP を注入したラットを注入後、1, 2, 3, 5, 7, 10, 12, 20, 24時間、2, 3, 4, 5, 7, 10日、2, 3, 4, 5, 週間目に動物をネンブタール注射液にて麻酔後大動脈より、まず Hanks 氏液200ml にて灌流し、全血を流出させたのち続いて0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.2～7.4) で作成した1%パラホルムアルデヒドと1.25%グルタルアルデヒドの混合液150ml を流量12～13ml/min の速度で灌流固定を行った。その後、坐骨神経とその起始部である脊髓を一体として取り出した。そしてこれを坐骨神経と脊髓に分け0.1Mリン酸緩衝液で作った30%ショ糖溶液 (pH 7.5) 中に入れ、低温 (4～6℃) で保存した。次いで厚さ50～60 $\mu$  の凍結切片を作った。更に切片を無ショ糖の緩衝液で良く洗った後、0.05M trisHCl 緩衝液 (pH 7.6) 100ml に 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride を 50 mg 溶解した液中に室温で30分入れる。次いで同液中に30%過酸化水素水30 $\mu$ l を滴加し、更に30分間入れて置く。その後、蒸留水で切片をよく洗い、ゼラチンアルコール中にてスライドグラ

スにはりつけ乾燥後クロロホルムで脱脂し封入した。

## 所 見

### I. 坐骨神経

梨状筋下縁部で坐骨神経を2 cmほど露出し、その中央部にHRPを注射針で神経をつつきながら注入した。注入後1時間目の坐骨神経では、注入部が褐色を呈するのみであった。3～6時間後になると、注入部は1時間目よりはやや強く褐色になるが、その部位はあまり拡大せず1～1.5 cm位脊髄寄りに拡大しているくらいであった。このやや褐色調の強い部位以外のところは薄い褐色を呈するに過ぎなかった。ただ上記のいずれの場合も、坐骨神経を取り巻く神経上膜(epineurium)と一部の神経間膜(perineurium)は濃褐色に反応していた。しかし、神経線維の一本ずつが反応を呈しているかどうかは光学顕微鏡的には判定できなかった。また、HRP注入部位より末梢側は全体として淡褐色を呈していた。この様な状態は、われわれが実験を行なったHRP投与後24時間以内ではほとんど変らなかった。更に、この様な状態はHRP注入後10日目頃まで認められた。しかし、HRP注入後2週間目以後ではHRP注入部がやや他の部位と比較して褐色調が強い程度で、その他の部位では神経上膜が褐色を呈していたが、神経周膜や神経線維は反応がほとんど認められなかった。また、注入部よりは末梢側も反応を観察できなかった。

また、HRP注入部より1～2 cm脊髄寄りの坐骨神経の全体を結紮した後、HRPを注入すると注入後3時間目で結紮部の末梢側端が褐色となり6時間でHRP注入部から末梢側端にかけてやや強い褐色を呈した。更に、24時間目には上記の部位が濃褐色となり、神経上膜、神経周膜、神経線維も濃褐色を呈していた。この様な状態はHRP注入後4日目頃まで見られた。この濃褐色部を強拡大で見るとかなり強い褐色を呈する神経線維が認められた。HRP注入後5日目になると神経上膜を除いた他のものはその褐色度はやや低下するが、強拡大で観察すると神経線維の走行はかなり良く見ることができた。

注入後6日目以後はしだいに注入部より褐色を呈する部位が少なくなり、3週間後には全く褐色部位を観察できなくなった。一方、結紮の中枢側端は結紮を行ないHRPを注入して以後3週間までの間、全く褐色を呈しなかった。

### II. 脊髄前角細胞

坐骨神経に運動性ニューロンを送る脊髄前角細胞は大型の神経細胞であり、腰髄前角部に存在していた。

そこで、われわれは上記した様な坐骨神経の損傷部よりニューロン内に取り込まれた、HRPが前角細胞体までに何時間であるいは何日で到着するかを検索した。そのため、どの動物も損傷部から坐骨神経が脊髄に入るまでの距離を7～8 cmとなる様に坐骨神経損傷部位を決めた。この様な条件下でHRPを注入後1, 3, 5, 7, 10, 12, 20, 24時間, 2, 3, 4, 5, 7, 10日, 2, 3, 4, 5週目のものについてHRP法を行なった。その結果、HRP注入後20時間目までは前角細胞は反応を呈しなかった。HRP注入後25時間目のものも20時間目のものとほぼ同様の状態であった。30時間目頃では、前角細胞の細胞質はまだ極めて薄いが褐色の反応をしている細胞が数個見当たる程度であった。しかし、注入後30～40時間目にかけては前角細胞のほとんどすべての細胞体が淡褐色を呈していた。次いで2日目になると前角細胞の大部分のものが、やや強い褐色を呈していた。注入後3日目になるとすべての前角細胞の細胞質が濃褐色、または褐色に反応していた。注入後5日目, 7日目さらに10日目にかけてすべての前角細胞の細胞質が強陽性を呈していた。HRP注入後2週間目になると10日目のものと比較して前角細胞の細胞質はやや反応が弱くなってきた。そうして3週間以後, 4週間, 5週間目になると前角細胞の細胞質はすべて反応がなくなり、HRP法でな陽性細胞を見出すことができなくなった。

上記の実験は左右両側の坐骨神経に同時に損傷を与えた後、観察したものである。そこでわれわれは、一側の坐骨神経を結紮し、その後、両側の坐骨神経にHRPを注入した。その結果、結紮をしてない側の坐骨神経や前角細胞は上記の様な褐色を呈していたが、結紮側では結紮後、

3, 8, 10日目のいずれの動物においても、前角細胞には全く反応が認められなかった。

一方、脊髄神経節においては、HRP 注入後20時間目頃から神経節細胞の細胞質が淡褐色を呈してきた。更に、24時間目のものでは神経節細胞の細胞質はやや強い褐色に反応してきた。その後、注入後2週間目になると神経節細胞の細胞質は淡褐色となり、3週間目には神経節細胞の細胞質は HRP 法では全く反応しなくなった。

### 考 察

軸索流とは神経細胞の軸索の中をある物質が流れによって輸送されていく現象をいう。細胞体内で生合成された物質が、軸索内を神経終末の方へ流れていく現象が種々の物質について観察されたが、一方、神経終末から細胞体の方へ逆に物質が流れる現象を逆行性軸索流という。

この軸索流の生理学的意義はまだ明らかにされていないが、1). 神経細胞における代謝活動が、細胞体から軸索末端までの長い距離の間で連続的に維持されるように働いている。2). 神経化学伝達物質の生合成や代謝酵素の神経細胞体より軸索末端への輸送に働くなどの活動があると考えられている。しかし、逆行性軸索流の働きについてはまだ不明な点が多い<sup>1,9)</sup>。

一方、Kristensson ら(1971<sup>2-4)</sup>) や La Vail ら(1972<sup>10)</sup>) らは HRP を神経終末部に注入すると、HRP は逆行性軸索流によってその終末部の起始細胞体に運ばれて、その線維連絡を明らかにすることができるという、いわゆる HRP 法を報告した。それ以後、これまで線維連絡の研究に好んで使われていた Nauta 法に変わって使用され、HRP による研究は多数ある。しかし、この HRP に関する基礎的研究はあまり行なわれていない (Kristensson ら1973<sup>5)</sup>, 1974<sup>6)</sup>, 1975<sup>7)</sup>, 1976<sup>8)</sup>, La Vail ら1974<sup>11)</sup>, Mizukawa<sup>12)</sup> ら1978).

われわれは本研究では坐骨神経を HRP 法で観察した。その結果、坐骨神経における HRP の注入部において HRP 法でやや強い褐色を呈するほかは淡褐色であった。この所見は、Kristensson ら(1976<sup>8)</sup>) の観察結果とほぼ同じであった。従って HRP 注入部から坐骨神経が脊髄

に入るまでの間の HRP の経過を光顕ではおえなかった。

一方、坐骨神経を結紮したのち HRP を注入したところ、注入部より脊髄に近い方で結紮すると、その結紮部の末梢端が HRP による褐色が強くなり、注入後24時間で最高となった。しかし、その中枢側端はまったく褐色を呈しなかった。このことは坐骨神経を結紮すると HRP が結紮部の末梢端までは上行性に運ばれるが、それより上部へは結紮のため HRP が運ばれなくなり末梢端で留まるためにおこる所見であると思われた。更に、坐骨神経の一侧のみを結紮し、他側の坐骨神経は何も処置を行わず両側の坐骨神経に HRP を注入すると、正常例では HRP 注入後一定の時間を経過すると前角細胞まで運ばれた HRP のため前角細胞は褐色を呈したが、投与後3, 8, 10日目のいずれの動物においてもまったく反応が認められなかった。このことは HRP は神経線維内では逆行性軸索流により運ばれていることを示唆しているものと思われた。

これまで坐骨神経を用いて HRP 法で研究した報告はかなりあるが、(Kristensson ら<sup>2-4)</sup> 1971, Mizukawa ら1978<sup>12)</sup>) そのほとんどのものは、坐骨神経とこれに属する脊髄神経節について観察したものが多く、そうして脊髄の前角細胞について観察したものはほとんどない。そこで、われわれは坐骨神経に注入した HRP が前角細胞に達するまでの時間を調べた。その結果、前角細胞が褐色を呈してくるのは HRP 注入後24時間目頃からで、30時間目になって褐色に反応した。また所見のところで述べたようにどの動物も坐骨神経の注入部から坐骨神経が脊髄に入るまでの距離を7~8 cmになるよう坐骨神経の注入部位を決めているので、坐骨神経の逆行性軸索流の輸送速度がわかった。

すなわち、HRP 注入部より脊髄の前角細胞までの距離を8 cmとすると、坐骨神経の注入部から前角細胞が、褐色を呈するまでの時間を30時間とすると、2.6mm/h, (62.4mm/day) となる。これが、われわれの研究の結果わかったラットの坐骨神経における HRP の逆行性軸索流の輸送速度である。又、Mizukawa ら(1978<sup>12)</sup>)

はラットの坐骨神経の逆行性軸索流の輸送速度は0.2~0.5cm/hとしているが、この速度はわれわれの観察したものとはほとんど同じであった。

ついで、前角細胞がHRP法で陽性反応になるまでのHRP注入後の時間は24時間目ではまだ反応が弱く、30時間目で初めて、褐色の陽性反応を呈した。その後、注入後7~10日目までその強い反応が認められた。

一方、脊髄神経節を構成する神経節細胞はHRP注入後20時間目で弱陽性反応がおり、24時間目のラットでは陽性反応を呈していた。

この様に脊髄前角細胞と脊髄神経節細胞とのHRP法による陽性反応を呈するまでの時間の違いは、HRP注入部から前角細胞と神経節細胞までの距離の差によるのか、あるいは、それぞれの神経細胞のHRPに対する反応態度の違いによるのか、それとも、もっと違った条件によるのかは明らかでない。

また、この研究ではHRPが軸索末端から取り込まれたのではなく、坐骨神経の途中で神経線維に損傷を与えたものを観察したので、軸索末端からHRPを取り込んだものとは少し異なってくる。また黒川<sup>9)</sup>が報告している様に、神経成長因子(NGF)、破傷風毒素や単純ヘルペスウイルスなどもこの逆行性軸索流により運ばれて行くと考えられている。この様に逆行性軸索流についてはまだ多くの問題があり、より多くの観察が必要であると思われる。したがって今後は光学顕微鏡のみならず電子顕微鏡による逆行性軸索流の検索が行なわれることが望ましい

と思われる。

## 結 語

ラットの坐骨神経を用いてHRP法の基礎的研究を行って次のごとき結果を得た。

脊髄までの長さが7~8cmになる様な坐骨神経の部位を注射針でつつきながらHRPを注入した。この注入部は注入後3時間から48時間で褐色の強陽性反応を呈した。また注入部より脊髄よりで坐骨神経を結紮するとHRP注入後24時間目にはその末梢端が強陽性反応を呈した。一方結紮部の中枢端はいずれの時間においても反応は陰性であった。

また、坐骨神経の一侧のみを結紮し、HRPを注入すると結紮側の前角細胞には陽性反応が認められなかった。このことはHRPが神経線維内では逆行性軸索流により輸送されていることを示唆するものである。

坐骨神経にHRPを注入後脊髄前角細胞に強陽性反応が認められたのは注入後30時間目から2週間目までであった。したがって、坐骨神経におけるHRP注入部から脊髄前角細胞までの距離と前角細胞が強陽性反応を呈してくるまでの時間とからラットの坐骨神経のHRPの逆行性軸索流の輸送速度を計算すると2.6mm/h(62.4mm/day)となった。一方、HRP法で脊髄神経節細胞に強陽性反応がみられるのはHRP注入後24時間目であって、前角細胞より神経節細胞の方がHRPの輸送速度が早かった。

## 文 献

1. Krishnan, N. and Singer, M.: Penetration of peroxidase into peripheral nerve fibers. *Am. J. Anat.* 136, 1-14, 1973.
2. Kristensson, K. and Olsson, T.: Retrograde axonal transport of protein. *Brain Res.* 29, 363-365, 1971.
3. Kristensson, K. and Olsson, T.: Uptake and retrograde axonal transport of peroxidase in hypoglossal neurones. Electron microscopical localization in the neuronal perikaryon. *Acta neuropathol.* 19, 1-9, 1971.
4. Kristensson, K. and Olsson, T.: Uptake and retrograde axonal transport of protein in hypoglossal neurons. Fate of the tracer and reaction of the nerve cell bodies. *Acta neuropathol.* 23, 43-47, 1973.

5. Kristensson, K. and Olsson, T.: Retrograde transport of horseradish peroxidase in transected axons.  
1. Time relationships between transport and induction of chromatolysis. *Brain Res.* **79**, 101—109, 1974.
6. Kristensson, K. and Olsson, T.: Retrograde transport of horseradish peroxidase in transected axons.  
2. Relation between rate of transfer from the site of injury to the perikaryon and onset of chromatolysis. *J. Neurocytol.* **4**, 653—661, 1975.
7. Kristensson, K. and Olsson, T.: Retrograde transport of horseradish peroxidase in transected axon.  
3. Entry into injured axon and subsequent localization in perikaryon. *Brain Res.* **115**, 201—213, 1976.
8. 黒川正則：ニューロン内の交通。日医新, **2742**, 134—135, 1975.
9. La Vail, J.H. and La Vail, M.M.: Retrograde axonal transport in the central nervous system. *Science* **176**, 1416—1417, 1972.
10. La Vail, J.H. and La Vail, M.M.: The retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase in the chick visual system: A light and electron microscopic study. *J. Comp. Neur.* **157**, 303—358, 1974.
11. Mizukawa, K., Matsuura, T., Nojyo, Y., Ibata, Y. and Sano, Y.: Retrograde transport and intra-neuronal fate of exogenous horseradish peroxidase in the nervous system nigrostriatal system and sciatic nerve of adult rat light and electron microscopic investigation. *Acta histochem. cytochem.* **11**, 160—170, 1978.
12. 石村 均：西洋ワサビのペルオキシダーゼ法に関する基礎的研究。II. 電子顕微鏡による検討。(岡山医学会雑誌に投稿中, 1983.

### 写 真 説 明

写真1. 前より見たラットの坐骨神経とその腰椎起始部の解剖像。

腰椎より出た腰仙骨神経幹とそれに続く坐骨神経が観察される。0.7倍

写真2. 後より見たラットの脊髓と坐骨神経起始部の解剖像。

脊髓中央部のふくらみは腰膨大部。1.1倍

写真3. ラットの坐骨神経, HRP法。

HRP注入後4時間, 注入部位(矢印)下方と, それより上方部に神経線維が強陽性に反応している。

6.5倍

写真4. 同上。

HRP注入後6時間, 陽性部位は上方に向って広がっている。(矢印は注入部位) 4倍

写真5. 同上。

HRP注入後30時間, 注入部位(矢印)とその上方部(左)の拡大像。110倍

写真6. 同上。

HRP注入後2日, 注入部位(矢印)を除きその上方部は弱陽性反応を呈している。5倍

写真7. ラットの脊髓横断像(腰膨大部) HRP法

坐骨神経に HRP 注入後24時間, 脊髓前角細胞には陽性反応は認められない。30倍

写真8. 同上。

同じラットの右側の坐骨神経に HRP 注入後24時間では前角細胞反応は陰性であった。左側の坐骨神経に HRP 注入後30時間では前角細胞の反応は陽性であった。40倍

写真9. 同上.

HRP 注入後 2 日.

30時間のものより陽性反応の前角細胞の増加と淡褐色化が進む. 55倍

写真10. 同上.

写真9の拡大像, 強陽性反応を呈する前角細胞がみられる. 濃染された細胞質が観察できる. 200倍

写真11. 同上.

注入後 4 日.

灌流しなかった標本で血管が網状に走るのが観察される. 35倍

写真12. 同上.

注入後 7 日.

両側の前角細胞が黒褐色に強陽性反応を呈する. 35倍

写真13. 同上.

右側の坐骨神経を注入部より上部で結紮したのち左, 右側から同時に注入後 8 日目.

結紮側は反応が陰性. 40倍

写真14. 同上.

注入後10日. 40倍

写真15. 同上.

注入後12日, 注入後10日目のものより反応がやや弱くなる. 灌流しなかった標本で血管が網状に観察される. 50倍

写真16. 同上.

注入後14日.

この頃から前角細胞の反応は極度に弱くなる. 60倍

写真17. 同上.

注入後18日.

すべての前角細胞で反応が陰性となった. 30倍

写真18. ラット脊髄神経節

HRP 法

坐骨神経に HRP 注入後24時間, 神経細胞は弱陽性に反応した. 200倍

写真19. 同上.

HRP 法.

注入後30時間.

神経細胞は24時間のものより強陽性反応を呈する細胞が増加した. 200倍

写真20. 同上.

注入後 2 日. 80倍

写真21. 同上.

HRP 法.

注入後 5 日.

強陽性反応を呈する神経細胞が増加した. 80倍

写真22. 同上.

HRP 法. 注入後 8 日.

黒褐色に強陽性に反応を呈する神経細胞が多くみられる. 80倍

奥野計典論文附図

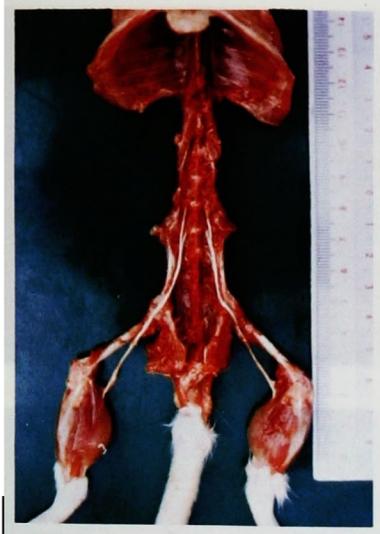


写真 1



写真 2

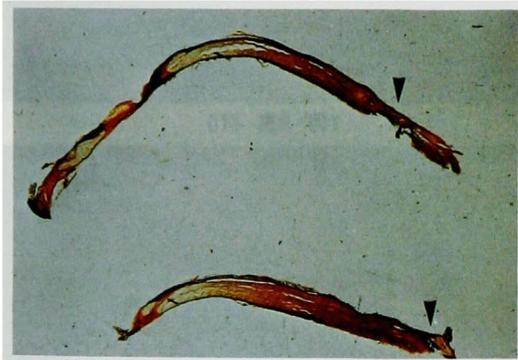


写真 3



写真 4

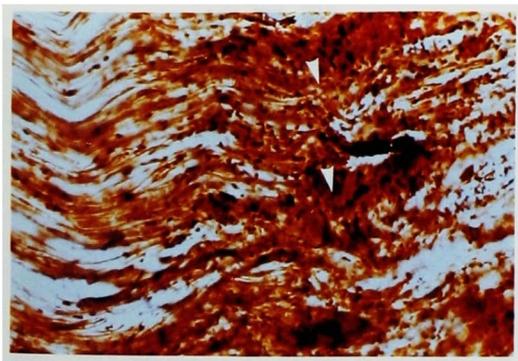


写真 5

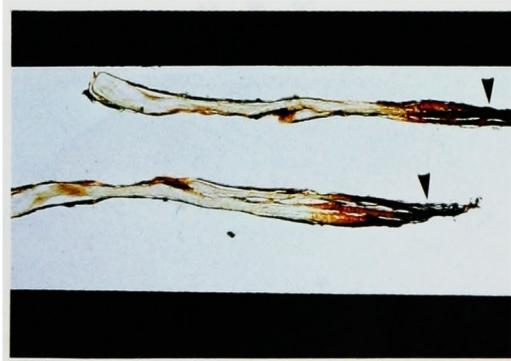


写真 6

奥野計典論文附図



写真 7



写真 8



写真 9



写真 10

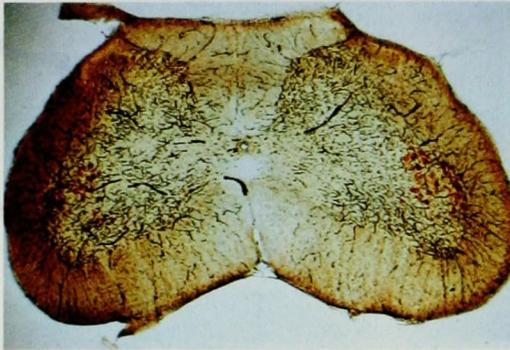


写真 11



写真 12

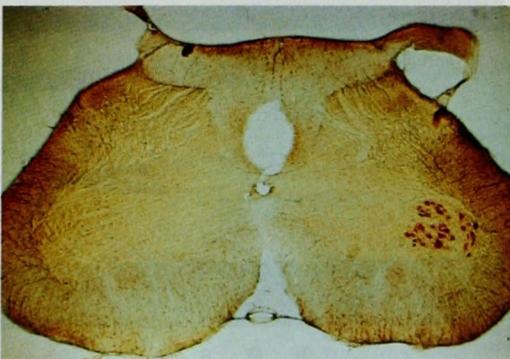


写真 13



写真 14

奥野計典論文附图

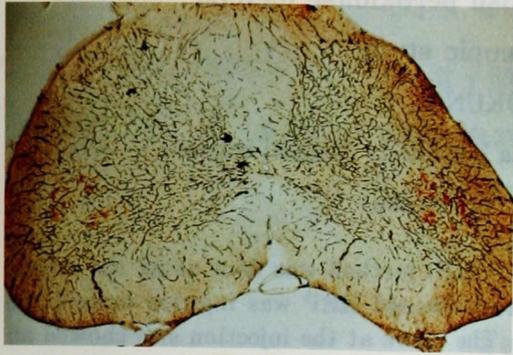


写真 15

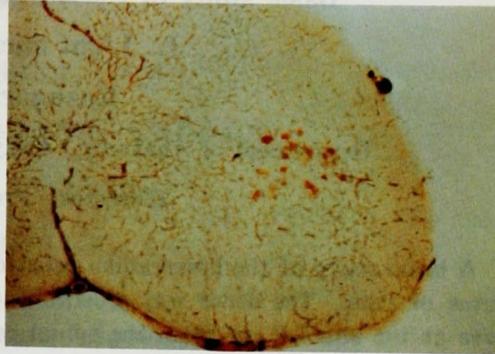


写真 16

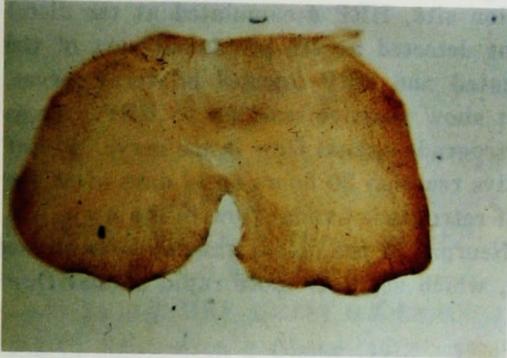


写真 17

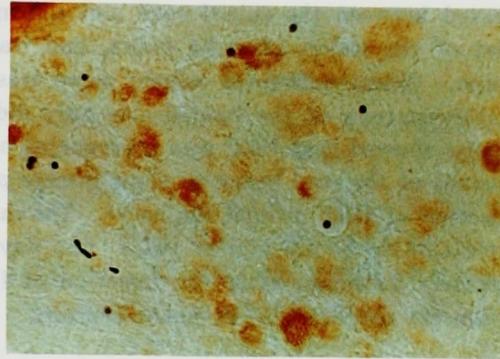


写真 18

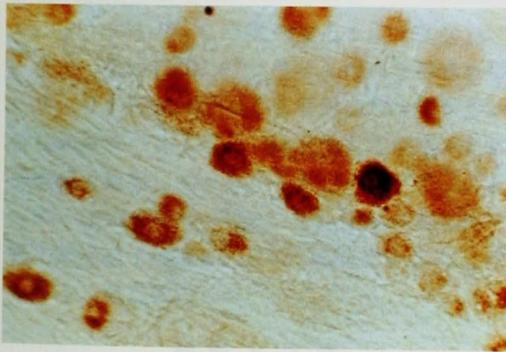


写真 19

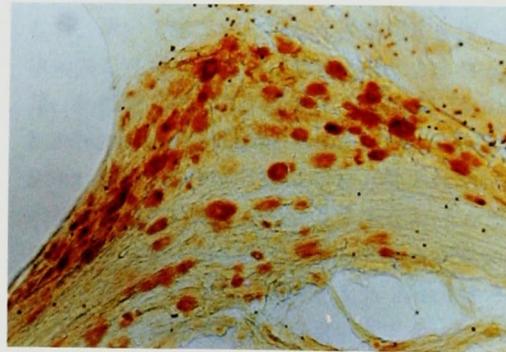


写真 20

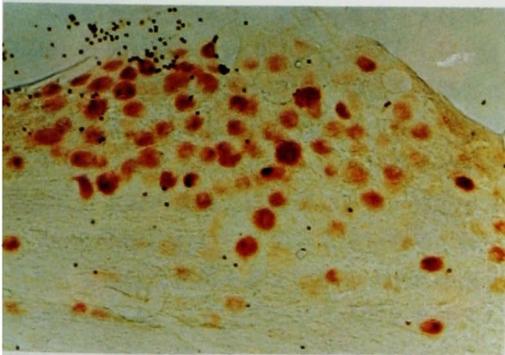


写真 21

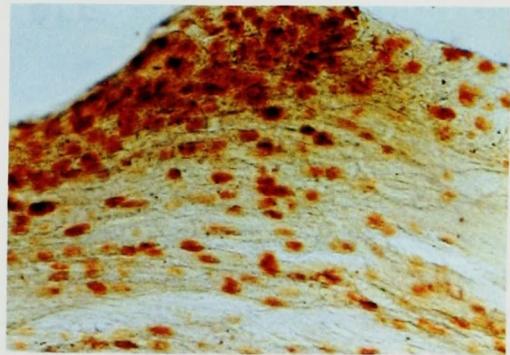


写真 22

## Basic study of the horseradish peroxidase method

### I. Light microscopic study

Kazunori OKUNO

Department of Anatomy, Okayama University Medical School

(Director: Prof. N. Otsuka)

A basic study of the horseradish peroxidase (HRP) method was done using the sciatic nerves of rats. The nerve was crushed with a needle and HRP was injected around the nerve at the site 7-8 cm from the spinal cord. The nerve at the injection site showed an intense positive reaction to HRP 3 to 48 hours after the injection. When the nerve was ligated between the spinal cord and the injection site, HRP accumulated at the distal part of the lesion after 24 hours, and was not detected at the proximal part of the lesion. When unilateral sciatic nerve was ligated and HRP injected bilateral nerves, motor neurons of the ligated side only did not show positive reaction to HRP. These results showed that HRP was transported by retrograde axonal flow in the nerve. Motor neurons of the cord began to show intense positive reaction 30 hours to 14 days after the injection of HRP around the nerve. The rate of retrograde axonal flow in the nerve was calculated to be 2.6 mm/hr (62.4 mm/day). Neurons in the spinal ganglia were stained intensely 24 hours after the injection of HRP, which suggests more rapid axonal flow in sensory neurons than in motor neurons.