

マウス培養後根神経節を用いた鉛中毒の実験的研究

伏見 滋子, 調 輝 男

酢酸鉛の末梢神経に及ぼす影響を調べる目的で、マウス脊髄後根神経節の組織培養を行い、 10^{-4}M 、 10^{-5}M 濃度の酢酸鉛が髓鞘形成が完成した成熟培養組織に及ぼす影響と培養末梢神経の発達に及ぼす影響を検討した。

髓鞘形成が完成した成熟培養組織では、 10^{-4}M 酢酸鉛投与後1か月に至るまで変化は認められなかった。

培養末梢神経の発達に及ぼす影響において、髓鞘の発達に関しては、 10^{-4}M 酢酸鉛投与下で髓鞘形成開始の遅延と髓鞘形成率の抑制が認められた。酢酸鉛投与下で形成された有髓神経では対照群と比べてその数は少ないが、形態的に差はなかった。髓鞘層板数は統計学的に対照群との有意差は認められなかった。位相差顕微鏡下で培養約1週間後から、Schwann細胞または線維芽細胞が変性したと考えられる空胞変性細胞が観察された。また、組織片周辺部のSchwann細胞は少なく、20日以後もSchwann細胞に囲まれていない軸索が存在した。 10^{-5}M 酢酸鉛投与群では、髓鞘形成率と形態観察で対照群と差は認められなかった。

神経細胞と軸索の発達に関しては、 10^{-4}M 、 10^{-5}M 酢酸鉛投与群で形態的な変化は観察されず、形態計測的にも軸索の面積、長径、短径では対照群と差は認められなかった。

以上より、組織培養実験において成熟組織では酢酸鉛の影響がないこと、成長段階の組織では髓鞘の発達抑制はあるが、神経細胞と軸索の発達抑制はないことが示唆された。

(昭和63年8月24日採用)

Effects of Lead Acetate on Matured and Developing Cultures of Mouse Dorsal Root Ganglia

Shigeko Fushimi and Teruo Shirabe

We examined the effects of 10^{-4}M and 10^{-5}M lead acetate on mature well-myelinated cultures and developing cultures of the mouse dorsal root ganglia.

When mature well-myelinated cultures were incubated with 10^{-4}M lead acetate for a month, pathological changes did not occur.

10^{-4}M lead acetate delayed the beginning of myelination and inhibited myelin formation in the developing cultures, while 10^{-5}M lead acetate had no effect. The number of myelin lamellae were the same as that of the controls. After 1 week of lead acetate treatment, some non-neuronal cells showed vacuolar degeneration. Few Schwann cells were seen in the peripheral zone of the cultured tissue. After

20 days of lead acetate treatment, some bare axons were present.

The neuronal survival and outgrowth in the presence of lead acetate were equal morphologically and morphometrically to those of the controls.

Based on these results, it was suggested that inorganic lead did not inhibit mature well-myelinated cultures, neuronal survival and outgrowth, but that it did inhibit myelinogenesis in developing cultures. (Accepted on August 24, 1988) *Kawasaki Igakkaishi 14(4) : 594-601, 1988*

Key Words ① Lead neuropathy ② Peripheral nerve ③ Tissue culture

はじめに

鉛中毒の末梢神経組織病変については、節性脱髄が主であると報告するものと軸索変性が中心であると報告するものがある。そのメカニズムは、後者の軸索変性が中心であるということについては明らかでないが、前者の節性脱髄が主であるとするものについては2説が考えられている。すなわち、血管内皮細胞の障害の結果として神経内鞘に浮腫が起こるとする説¹⁾と、鉛が Schwann 細胞に直接作用するために節性脱髄が起こるとする説^{2),3)}があり、後者が主流となっている。その作用機序について Whetsell ら⁴⁾は、鉛が Schwann 細胞の heme biosynthetic pathway に作用するために節性脱髄が生じると述べている。最近、発達初期における鉛の影響が注目されており、DesJardins ら⁵⁾は培養神経組織で鉛が髄鞘形成を抑制すると報告している。Ohnishi ら⁶⁾はラットの再生神経で鉛投与により Schwann 細胞の増殖が抑制されたことを、また、Sobue ら⁷⁾は培養 Schwann 細胞で鉛は Schwann 細胞の増殖を抑制するが、髄鞘構成成分の一つである galactocerebroside 発現で分化の状態をみると分化の抑制はなかったと報告している。

今回われわれは、酢酸鉛が末梢神経に及ぼす影響を調べるために、マウス後根神経節の組織培養を行い、酢酸鉛が髄鞘形成が完成した成熟培養組織に及ぼす影響と培養末梢神経の発達に及ぼす影響を検討した。その結果を報告し、特に酢酸鉛が Schwann 細胞の増殖、分化に及ぼす影響について考察する。

材料と方法

1) 材料

胎生17日の DS マウスから脊髄後根神経節を摘出し、できるだけ被膜を除去した。この後根神経節をコラーゲン処理した 35 mm の Falcon tissue culture dish に、2~3 個置き、95% air, 5% CO₂, 37°C で培養を行った。培養液は、Eagle's MEM にヒト臍帯血清 (25%), 50% 鶏胚抽出液 (10%), グルコース (6 mg/l), 7S-Nerve Growth Factor (Collaborative Research, Lexington, Mass.) (15 U/ml) を加えたものを用い、1 週間に 2 回交換を行った。

2) 実験方法

I. 成熟培養組織に及ぼす影響

培養開始 3, 4 週後の髄鞘形成が完了したと思われる組織を選び、酢酸鉛を 10⁻⁴M, 10⁻⁵M 含む前述の培養液に交換し、1 か月間経時的に観察を行った。対照群には、投与した酢酸鉛と同量の蒸留水を培養液に添加した。

II. 培養末梢神経の発達に及ぼす影響

培養開始 48 時間後に、対照群では蒸留水を実験群では酢酸鉛 10⁻⁴M, 10⁻⁵M を含む培養液に交換した。

髄鞘の発達への影響をみるためには、髄鞘形成率を調べ、それに伴う形態変化を観察した。髄鞘を形成していく能力が酢酸鉛の影響をうけるかどうかを調べるために、培養22日目の有髄神経の髄鞘層板の数について形態計測を行った。

神経細胞、軸索の発達への影響をみるためには形態観察を行い、軸索の成長が酢酸鉛の影響

をうけるかどうかを調べるために培養22日目の有髄神経の軸索の面積、長径、短径について形態計測を行った。

髄鞘形成率：長池らの方法⁹⁾に従い、位相差顕微鏡(×40)で確認し、髄鞘形成率を次の式で求めた。

$$\frac{\text{髄鞘形成のある組織片の数}}{\text{植えつけた組織片の数}} \times 100 (\%)$$

実験では、各濃度に22~32個の組織片を使用した。3回実験を繰り返して、平均と標準偏差を求めた。

形態観察法：通常の観察では、位相差顕微鏡を用いて光顕的観察を行い、必要に応じて透過型電子顕微鏡にて観察した。後者のためには、培養組織を2%グルタルアルデヒド(0.1M Sorensen's phosphate buffer, pH 7.4)で60分前固定を、2%四酸化オスミウムで90分後固定を行った後、型通りの方法にてエポン包埋標本を作製した。超薄切片作製後、酢酸ウラニール、クエン酸鉛の電子染色を行い、日立HU-12A型電子顕微鏡にて観察した。

形態計測法： 10^{-4} M 酢酸鉛投与群10ブロック、対照群12ブロックの電子顕微鏡試料を用い、組織周辺部の髄鞘を最も多く含むと思われる部位をシャーレに垂直に薄切した。有髄神経を10,000~20,000倍で撮影し、すべて計測に使用した。髄鞘層板の数は、Profile projector (Nikon) を使用し、電顕ネガフィルムを投影して major dense line (myelin lamellae) 数を計測した。軸索の面積、長径、短径は、Cosmozone 1S (Nikon) を用いてコンピューター計測し、得られた値の平均値と標準偏差を求めた。対照群、実験群において、測定値のヒストグラムでは正規分布が示唆されたため、t検定を用いて比較を行った。軸索の面積は対数正規分布するため、対数変換値で検討した。

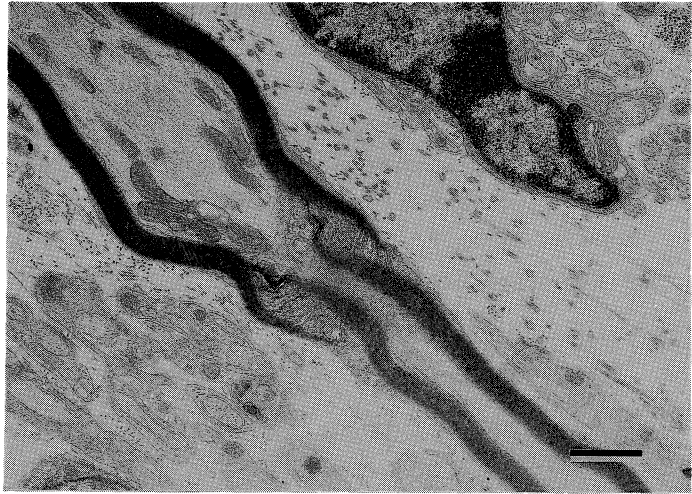


Fig. 1. Electron micrograph of a normal mature myelinated nerve fiber 1 month after 10^{-4} M lead acetate administration (×9,000).

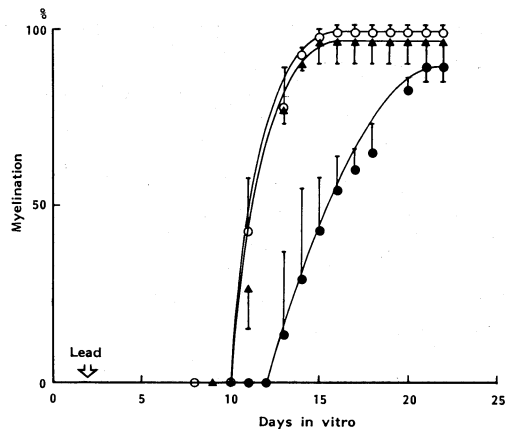


Fig. 2. Graph of the effects of lead acetate on the myelin formation. The tissues were cultured for 20 days in the presence of 10^{-4} M (●), 10^{-5} M (▲) lead acetate and under control conditions (○).

結 果

I. 成熟培養組織に及ぼす影響
酢酸鉛投与後1か月に至るまで、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} M 投与群において光顕的、電顕的(Fig. 1)に顕著な変化は認められなかった。

II. 培養末梢神経の発達に及ぼす影響
髄鞘形成率を Figure 2 に示した。対照群で

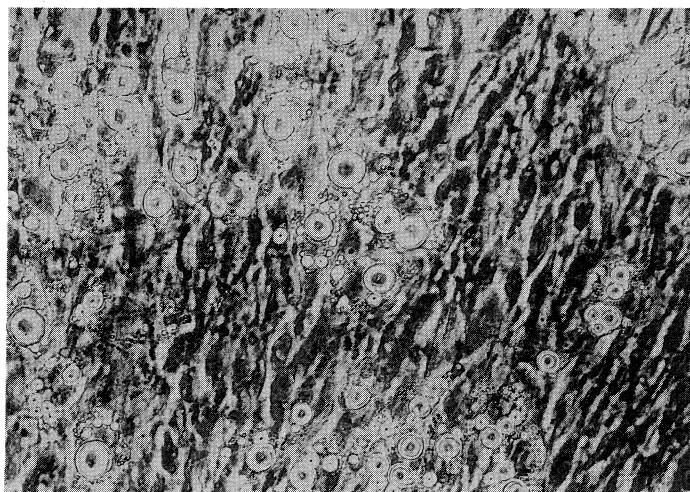


Fig. 3. Phase-contrast micrograph of dorsal root ganglia cultured in the presence of $10^{-4}M$ lead acetate showing vacuolar degeneration. 8 days in vitro ($\times 320$).



Fig. 4. Phase-contrast micrograph of the peripheral zone of dorsal root ganglia cultured in the presence of $10^{-4}M$ lead acetate showing some bare axons not surrounded by Schwann cells. 20 days in vitro ($\times 160$).

は、培養開始11日後から組織片に髄鞘形成が認められ、16日目まで急増して99%に達した。 $10^{-4}M$ 投与群では、髄鞘形成は培養13日後から認められ、21日目に89%に達した。この $10^{-4}M$ 、21日目では対照群に比べて有意に($p < 0.05$)減少が認められた。 $10^{-5}M$ では、培養11日後から髄鞘形成を開始し、15日目に95%に至り、対照群と同様な増加曲線を示した。

髄鞘形成に伴う形態変化を観察すると、 $10^{-4}M$ 投与群では培養7~10日目から高度な空胞変性を示す細胞が組織の中間部から周辺部にかけて観察された(Fig. 3)。また、組織周辺部に存在する non-neuronal cell の数は少なく、20日を経ても Schwann 細胞に囲まれていない軸索が認められた(Fig. 4)。位相差顕微鏡下でみられる有髄神経の数は、 $10^{-4}M$ 投与群では対照群と比べて少なかった。 $10^{-4}M$ 投与下で形成された髄鞘は、超微形態的に対照群と同様な形態を有していた(Fig. 5)。

神経細胞では形態的に変化は観察されず、神経突起の伸長も位相差顕微鏡下で対照群との差は認められなかった。

酢酸鉛投与下で成長した髄鞘と軸索が酢酸鉛の影響をうけるかどうかを調べるために、培養22日目の有髄神経で形態計測を行った結果を Table 1 に示す。髄鞘層板の数については、統計学的に有意差は認められなかった。軸索の面積、長径、短径についても対照群と有意差は認められなかった。

考 察

I. 成熟培養組織に及ぼす影響

鉛中毒は、動物実験で多数研究されており、Schwann 細胞が選択的に損傷をうけて、Schwann 細胞の核内に核内封入体が生じ、節性脱髄が起こると一般的に考えられている。

組織培養法を用いた実験報告は少なく、宇尾野ら⁹⁾は分離培養で検討しているが鉛による障

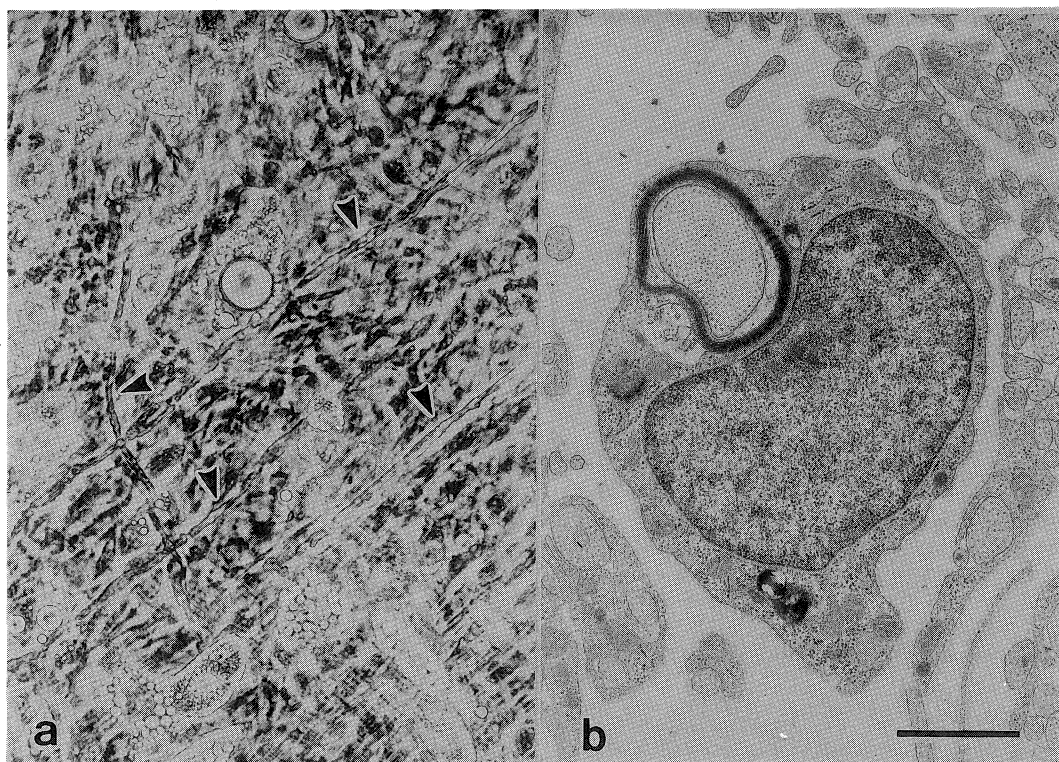


Fig. 5. Normal myelinated nerve fibers cultured in the presence of 10^{-4} M lead acetate, 22 days in vitro. (a) Phase-contrast micrograph. Arrowheads indicate myelinated nerve fibers ($\times 320$). (b) Electron micrograph of a cross-section of a myelinated nerve fiber ($\times 15,600$).

Table 1. Morphometric measurement of myelinated nerve fibers on electron microscopic sections.

	Control	Lead acetate 10^{-4} M
No. of EM blocks	12	10
No. of myelinated fibers	142	56
No. of myelin lamellae	13.5 ± 5.3	13.4 ± 4.5
Area of axis cylinder (μm^2)	1.92 ± 1.46	2.25 ± 1.54
Log _e Area	0.38 ± 0.79	0.58 ± 0.70
Long diameter (μm)	2.29 ± 1.04	2.47 ± 1.07
Short diameter (μm)	0.94 ± 0.39	1.08 ± 0.38

害を認めていない。Whetsellら⁴⁾は節性脱髄を報告しているが、核内封入体については記載がない。今回の実験では、髄鞘が存在する成熟培養組織で変化は認められなかった。直接に薬剤作用を受けやすい、単純化したモデルである組織培養法で脱髄が起こりにくい理由は明らかでないが、動物差、培養条件、媒介物を経

る必要性などが原因として考えられた。

II. 培養末梢神経の発達に及ぼす影響

今回われわれは、酢酸鉛が髄鞘の発達に及ぼす影響を検討するために、髄鞘形成率を調べた。その結果、 10^{-4} M酢酸鉛投与群では対照群に比べて約2日遅れて髄鞘形成を開始し、対照群と同様な増加曲線を示

し、21日目に約90%の組織片で髄鞘形成が認められプラトーに達した。すなわち、 10^{-4} M投与群では、対照群に比べて髄鞘形成開始の遅延と約10%の髄鞘形成率の抑制を認めた。 10^{-5} M投与群では、対照群との差を認めなかった。 10^{-8} M濃度では白色沈澱が生じるため、検索を行わなかった。DesJardinsら⁵⁾は培養神経組

織の髄鞘形成について、 $0.1 \mu\text{M}$ 酢酸鉛で50%抑制、 $100 \mu\text{M}$ で100%抑制がみられたことを報告している。今回の結果は数値的に DesJardinsら⁵⁾と相違があるが、髄鞘形成抑制を同様に示した。また、組織片に形成された有髄神経の数は、位相差顕微鏡で観察すると明らかに対照群より 10^{-4}M 投与群で少なかった。

以上の髄鞘形成率の遅延、抑制、有髄神経数の減少から、Schwann細胞の増殖抑制及びSchwann細胞の分化抑制の可能性が考えられた。

まず、Schwann細胞の増殖に及ぼす影響について考察する。

Ohnishiら⁶⁾は、ラットの再生神経で鉛によるSchwann細胞の増殖抑制を報告している。Sobueら⁷⁾は、培養Schwann細胞で鉛のSchwann細胞の増殖抑制効果を報告し、無機鉛はSchwann細胞の有糸分裂に直接に有害な作用を及ぼすと述べている。

今回、髄鞘形成に伴う形態的变化を観察すると、 10^{-4}M 酢酸鉛投与群では実験期間を通して神経細胞に変化は観察されなかったが、約1週間目から空胞変性細胞が組織片にみられた。この空胞変性細胞は組織片の中心部にはなく、中間部から周辺部に存在することから、non-neuronal cellであるSchwann細胞または線維芽細胞が変性した細胞であると考えられた。また、軸索がSchwann細胞に囲まれていなかったり、組織片周辺部にある形態的にSchwann細胞と考えられる細胞の数が対照群と比べて少ないことから、酢酸鉛により一部のnon-neuronal cellは変性、壊死し、Schwann細胞の増殖は抑制されていると考えられた。

Schwann細胞の増殖は、軸索との接触により刺激されるということが述べられており、¹⁰⁾最近、Schwann細胞の増殖は脊髄後根神経節の神経細胞の表面にある heparan sulfate proteo glycan と関係があること¹²⁾と神経細胞が分泌する urokinase がSchwann細胞の増殖を刺激すること¹³⁾が報告されている。このように、Schwann細胞の増殖は複雑な neuronal control により統制されており、今回の実

験のみでは鉛がSchwann細胞増殖メカニズムのどこの箇所かで抑制作用しているか明らかでない。Sobueら⁷⁾が酢酸鉛はSchwann細胞に直接影響を及ぼすと考察すると同様に、今回の結果では神経細胞に変化がなかったことから考えると、鉛が神経細胞に作用するのではなく鉛が直接Schwann細胞に作用して増殖を抑制すると考えるのが適切であると思われる。

次に、Schwann細胞の分化に及ぼす影響について考察する。

Schwann細胞の分裂、増殖後の分化能力を考えると、(1)軸索と接触、伸長し、神経線維に沿って広がり wrap をする能力 (ensheathment)、(2)髄鞘層板を形成していく能力 (myelination) が考えられる。そのどちらにも影響を及ぼすかを調べるために髄鞘層板の数を測定した。その結果、 10^{-4}M 酢酸鉛投与群における有髄神経の髄鞘層板数は、対照群と有意差は認められなかった。ゆえに、(2)の髄鞘層板を形成していく能力を抑制しているとはいえず、(1)の ensheathment に、鉛の影響がある可能性が示唆された。

Sobueら⁷⁾は、培養Schwann細胞において髄鞘のマーカーである galactocerebroside (GC) を cAMP analogue で誘導し、そのGC発現に関して酢酸鉛の影響がみられなかったことから、酢酸鉛の分化に及ぼす影響はないと報告している。しかしながら、今回の実験では 10^{-4}M 投与群でSchwann細胞に囲まれていない軸索が観察され、この形態的観察からも分化 (ensheathment) に鉛が作用している可能性があると考えられた。

Schwann細胞の分化については、Schwann細胞自体の細胞外基質 (基底膜、膠原線維) の生産が ensheathment と myelination に必要であると報告されており、細胞外基質が欠如した場合、神経細胞の維持、神経突起の生産、Schwann細胞の増殖は正常に起こるが、ensheathment と myelination の分化が起こらないと報告されている。^{14), 15)} 今回の実験では、Schwann細胞の増殖抑制があり髄鞘形成がみられたことから、Schwann細胞の細胞外

基質形成に強い影響を及ぼしているとは考えがたく、他の要因により ensheathment 抑制があると考えた方が妥当であると思われた。

Schwann 細胞の分化抑制について考察してきたが、もし Schwann 細胞の分化開始のためにはある程度の Schwann 細胞の数が必要ならば、鉛による Schwann 細胞の増殖抑制のために細胞数が不足して、そのために Schwann 細胞の分化抑制が生じたとも考えられる。したがって、鉛が Schwann 細胞の増殖段階のみに作用するのか、または、鉛が Schwann 細胞の増殖段階と分化の ensheathment 段階の両方に作用するのか、今回の結果からは明らかでない。

有髄神経軸索の発達が酢酸鉛により抑制され

るかどうかを調べるために、軸索の面積、長径、短径について形態計測を行った。Ohnishi⁶⁾は、ラットの再生神経で軸索径の減少を報告しているが、今回の結果では酢酸鉛投与群と対照群の間に有意差はなく、有髄軸索の発達は酢酸鉛の影響を受けているとはいえなかった。

以上、今回の実験結果から、酢酸鉛により髄鞘の発達は抑制され、Schwann 細胞の増殖抑制があることと分化抑制 (ensheathment) の可能性が示唆された。また、酢酸鉛により神経細胞と軸索の発達は抑制を受けていないと考えられた。

稿を終えるにあたり、ヒト臍帯血清の採取において御協力いただいた、総社市国富産婦人科・内科病院 國富慎一郎先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Myers, R. R., Powell, H. C., Shapiro, H. M., Costello, M. L. and Lampert, P. W.: Changes in endoneurial fluid pressure, permeability, and peripheral nerve ultrastructure in experimental lead neuropathy. *Ann. Neurol.* 8: 392-401, 1980
- 2) Windebank, A. J., McCall, J. T., Hunder, H. G. and Dyck, P. J.: The endoneurial content of lead related to the onset and severity of segmental demyelination. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 39: 692-699, 1980
- 3) Powell, H. C., Myers, R. R. and Lampert, P. W.: Changes in Schwann cells and vessels in lead neuropathy. *Am. J. Pathol.* 109: 193-205, 1982
- 4) Whetsell, W. O., Jr., Sassa, S. and Kappas, A.: Porphyrin-heme biosynthesis in organotypic cultures of mouse dorsal root ganglia. *J. clin. Invest.* 74: 600-607, 1984
- 5) DesJardins, K. C. and McCarthy, K. D.: The effect of inorganic lead on myelin formation in culture. *Trans. Am. Soc. Neurochem.* 15: 226, 1984
- 6) Ohnishi, A. and Dyck, P. J.: Retardation of Schwann cell division and axonal regrowth following nerve crush in experimental lead neuropathy. *Ann. Neurol.* 10: 469-477, 1981
- 7) Sobue, G. and Pleasure, D.: Experimental lead neuropathy: inorganic lead inhibits proliferation but not differentiation of Schwann cells. *Ann. Neurol.* 17: 462-468, 1985
- 8) 長池一博: 培養小脳組織によるミエリン形成機構の生化学的研究. *慶応医* 58: 85-106, 1981
- 9) 宇尾野公義, 別府宏園: 鶏胚脊髄前角細胞および後根神経節細胞に対する各種薬剤の選択毒性について一分離培養法による検討一. 厚生省特定疾患・筋萎縮性側索硬化症調査班 昭和50年度研究報告書. 1973, pp. 72-77
- 10) Wood, P. M. and Bunge, R. P.: Evidence that sensory axons are mitogenic for Schwann cells. *Nature* 256: 662-664, 1975
- 11) Salzer, J. L., Bunge, R. P. and Glaser, L.: Studies of Schwann cell proliferation. III. Evidence for the surface localization of the neurite mitogen. *J. Cell Biol.* 84: 767-778, 1980
- 12) Ratner, N., Bunge, R. P. and Glaser, L.: A neuronal cell surface heparan sulfate proteoglycan

is required for dorsal root ganglion neuron stimulation of Schwann cell proliferation. *J. Cell Biol.* 101 : 744—754, 1985

- 13) Baron-Van Evercooren, A., Leprince, P., Rogister, B., Lefebvre, P. P., Delree, P., Selak, I. and Moonen, G.: Plasminogen activators in developing peripheral nervous system, cellular origin and mitogenic effect. *Develop. Brain Res.* 36 : 101—108, 1987
- 14) Carey, D. J., Todd, M. S. and Rafferty, C. M.: Schwann cell myelination: Induction by exogenous basement membrane-like extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 102 : 2254—2263, 1986
- 15) Carey, D. J. and Todd, M. S.: Schwann cell myelination in a chemically defined medium: demonstration of a requirement for additives that promote Schwann cell extracellular matrix formation. *Develop. Brain Res.* 32 : 95—102, 1987