

## ラット松果体細胞のシナプスリボン

—— 生理的及び眼球摘出条件における数の変動 ——

長谷川 章 雄, 輦 止 勝 磨, 森 亘

東京大学医学部病理学教室

### 緒 言

シナプスリボン (synaptic ribbon; SR) は、長さ約  $0.4 \mu\text{m}$  で杆状の形態をした細胞質内微細構造物であり、多くの脊椎動物の松果体細胞<sup>8,21,22</sup> 及び各種感覚受容細胞<sup>6,19,20,24</sup> において観察される。

松果体細胞のいわゆるシナプスリボンの機能は神経伝達に關与するものと想像できるが、その点についての形態学的研究の報告はいまだに少数である。注目すべきものとして、VOLLRATH (1973) は、モルモットの松果体細胞中のシナプスリボンの数が昼間に減少し夜間に増加する約 25 倍の日周変動を示すことを報告し<sup>21</sup>、この構造物の機能を解明する手がかりとしている。

私共はこの事実をラットを用いて追試確認し<sup>11</sup>、さらに光刺激との関係を検討する目的で両側の眼球を摘出し、その後のシナプスリボンの数の変化を追跡した。その成績を報告するとともに、松果体細胞のシナプスリボンの機能についても考察を加えたい。

### 材料および方法

#### I. 全般的手法

実験動物；成熟した、妊娠していない雌 Sprague-Dawley ラット (210-240 g) を使用した。実験は 12 時間 (6:00 から 18:00) は蛍光灯照明、12 時間 (18:00 から 6:00) は暗黒の条件においた。実験室内では他種のラットや雄のラットも飼育され、餌の供給は昼間 *ad libitum* になされた。

電子顕微鏡試料作製；後述する各実験の後にラットを断頭屠殺し、松果体を取り出した。2.5% glutaraldehyde (0.2 M phosphate buffer, pH 7.4) に浸して 2 時間前固定した後、長軸方向に 3 分割して、近位、中間位、遠位とした。1% オスミウム酸による後固定、さ

らに脱水の後、Araldite-Epon に包埋した。Sorvall-Porter-Blum ultramicrotome で  $0.08 \mu\text{m}$  に薄切した切片は、200 番の銅グリッドにのせ、酢酸ウラニウム単独染色を施した後、電子顕微鏡 (JEM-7A) で観察した。

シナプスリボンの計数；Vollrath と Huss の手法<sup>21,22</sup> を踏襲し、グリッドの aperture 5 ケに相当するものを便宜的に 1 つの単位面積 (unit area; UA) として利用した。したがって 1 ケの unit area は  $85 \times 85 \times 5 \mu\text{m}^2$  にあたる。もし 1 枚の切片で 5 ケの aperture を観察できない場合には、同一ブロックの相当深い部分から切片を追加した。

一方、SR は 1 ケで孤立して存在する場合と、2 ケ以上が集簇して存在する場合があるため、SR の総数とは別に、1 ケ、2 ケあるいはそれ以上の数の SR の集簇部位をリボンフィールド (ribbon field; RF)、としてその数をかぞえた<sup>21,22</sup>

成績の処理；各松果体の近位、中間位、遠位から得られたデータを算術平均して各ラットを代表する SR と RF の数値とし、さらにこれをもとに各グループの平均と標準誤差を算出した。一方、近位、中間位、遠位について、一日を通した SR と RF の数の平均と標本標準偏差を算出し、その差を検討した。統計処理は、順位和検定 (rank-sum test)<sup>7</sup> を使用した。

#### II. 実験材料

##### 1. 正常ラットの松果体

ラット 24 匹を生理的条件下に約 3 週おいた後、エーテル麻酔下に 1 日の間 2:00 (午前 2 時)、6:00、10:00、12:00、14:00、16:00、18:00、22:00 に経時的に断頭屠殺し、3 匹ずつからなる 8 グループを得た。

##### 2. 盲目ラットの松果体

予備実験により盲目化の後 6 カ月間の経時観察を行ない、さらに本実験により盲目化の後 1 カ月目と 6 カ

月目の時点でのSRの数の日周変動を調べた。

予備実験：ラット22匹を使用し、そのうち16匹は両側眼球を摘出して実験群、残り6匹は両側眼球結膜に鋭的に傷をつけ（偽手術）対照群とした。その後15日から6カ月間飼育し、手術後15日、1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、6カ月の各時点で14:00（午後2時）に断頭し、松果体をとりだした。

本実験：ラット69匹を使用した。36匹は両側眼球を摘出して実験群、33匹は偽手術をして対照群とした。その後1カ月と6カ月の時点で、1日の間2:00, 6:00, 10:00, 14:00, 18:00, 22:00に経時的に断頭屠殺し、実験群3匹ないし4匹、対照群2匹ないし3匹ずつからなる6グループを得た。



図1. ラット松果体細胞のシナプスリボン(←)。細胞膜に近接して観察された例である。Bはその拡大を示す。  
PC: 松果体細胞, M: ミトコンドリア。午後2時屠殺, グルタル, オスミウム二重固定, ウラニウム, 鉛二重染色標本。38,000倍。

結 果

ラットの松果体細胞中のシナプスリボンは、電子顕微鏡で観察すると図1に示すとおりである。

シナプスリボンは、電子密な3層とその間に介在する電子粗な2層が識別でき、その周囲を直径約50nmのシナプス小胞が一行にとりかこんでいる。

細胞内での分布のしかたには、細胞膜に近接して膜と垂直方向をなして存在する場合、細胞膜から離れた核膜近くの細胞質中に存在する場合等がある。

I. 正常ラット松果体のシナプスリボンの数の日周変動

明12時間、暗12時間の生理的照明下においたラットの松果体のSRの数は、1日を通してみると近位で

22.38±5.86 SR/UA (synaptic ribbon/unit area), 中間位で16.67±5.17 SR/UA, 遠位で19.88±3.05 SR/UAであり、各値の間に有意の差は認められない。RFの数は近位で17.21±6.34 RF/UA, 中間位で13.08±3.80 RF/UA, 遠位で15.17±2.80 RF/UAであり、同様に有意の差はない。これらの結果から標本採取部位による数値の違いは小さく、SRは松果体内に均等に分布していると判断できる。

図2と図3は、SRとRFの数の日周変動を示している。両者はほぼ平行して変動し、夜間の2:00に最高値、昼間の12:00から14:00の間に最低値を示しており、その間16:00から18:00, 22:00, 及び2:00にかけての増加と、2:00から10:00, 12:00, 及び14:00

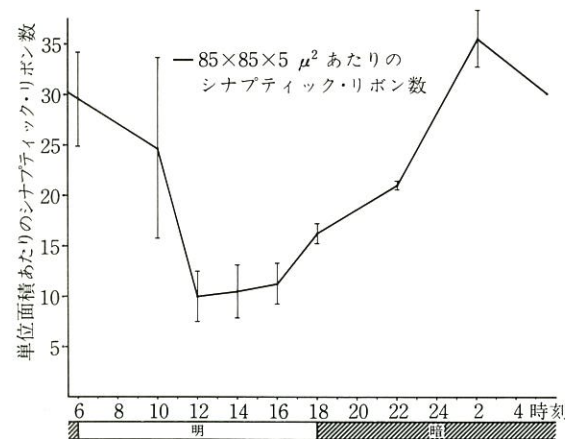


図2. 正常ラット松果体のシナプスリボン数 (mean±SE) の日周変動を示す。

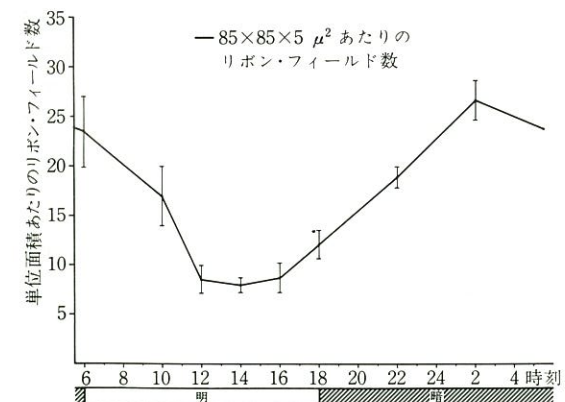


図3. 正常ラット松果体のリボンフィールド数 (mean±SE) の日周変動を示す。

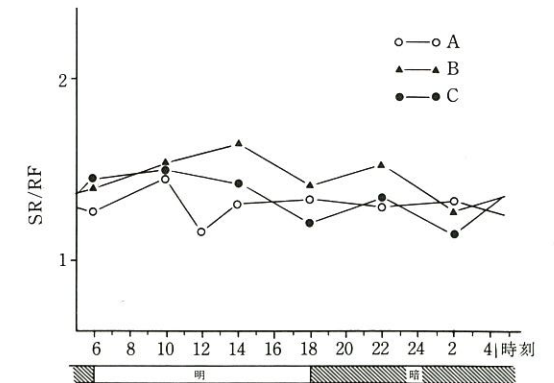


図4. シナプスリボンの集簇の日周変化を示す。Aは正常ラット, Bは盲目実験に使った1カ月目の対照ラット, Cは同じく6カ月目の対照ラットでの成績をあらわす。

にかけての減少が有意である (P<0.05)。又、12:00から16:00までの間では、SRとRFの数は変動が小さく、有意の差はみられない。

図4のAはSRの集簇様式の日周変化を示している。6:00から14:00の間に変動がめだち、SRの総数が減少する時間帯にRFを構成するSRの数が1に近づく。RFを構成するSRの数の平均は、1日を通してみると1.32 SR/RFであった。

II. 盲目ラット松果体のシナプスリボンの数の変化

予備実験：眼からの光刺激の除去によりSRとRFの数におこる変化を14:00の時刻を選び6カ月間追跡した。

図5と図6は、盲目化の後SRとRFの数が一時的に減少するが、6カ月後にはふたたび回復してくることを示している。眼球摘出の影響は、1カ月後の時点で最も強くあらわれている。1カ月、2カ月、3カ月のSRとRFの数値は、対照に比して有意に低く (P<0.05), 6カ月目の値と対照の間に有意の差は認められない。

本実験：盲目化の後1カ月目と6カ月目の時点で、SRとRFの数の日周変動についての知見を得た。

眼球を摘出して1カ月目の時点では、1日を通したSRの数は平均は9.24±3.39 SR/UA (対照 20.37±4.56 SR/UA), RFの数の平均は6.47±2.43 RF/UA (対照 14.02±3.96 RF/UA) であり、SRとRFの数の減少は対照に比して有意である (P<0.021)。各時刻別にみても、SRとRFの数は対照に比して減少している (14:00; P<0.028, 18:00, 22:00, 6:00; P<0.05)。

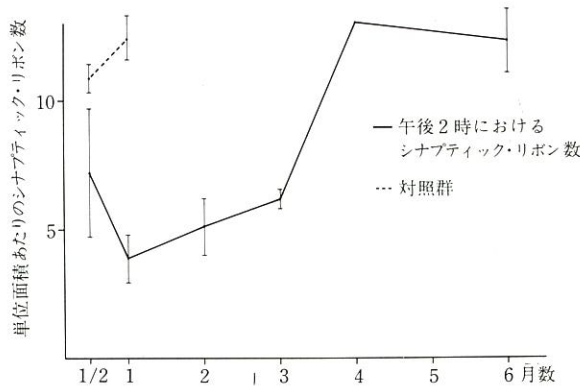


図5. 両側眼球摘出後のシナプスリボン数 (mean±SE, 実線) の経時的変化を示す。

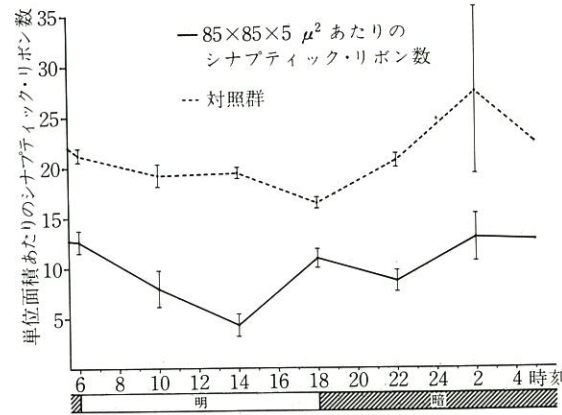


図7. 両側眼球摘出1カ月後におけるシナプスリボン数 (mean±SE, 実線) の日周変動を示す。

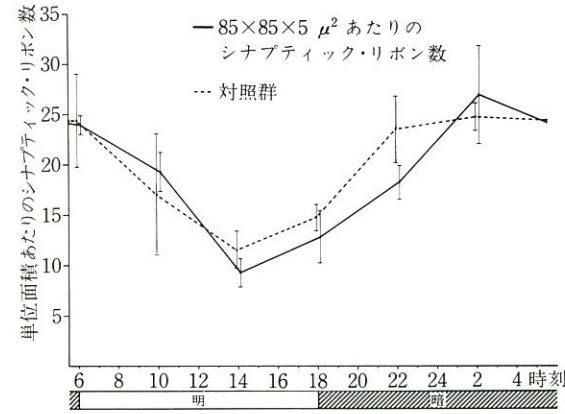


図9. 両側眼球摘出6カ月後におけるシナプスリボン数 (mean±SE, 実線) の日周変動を示す。

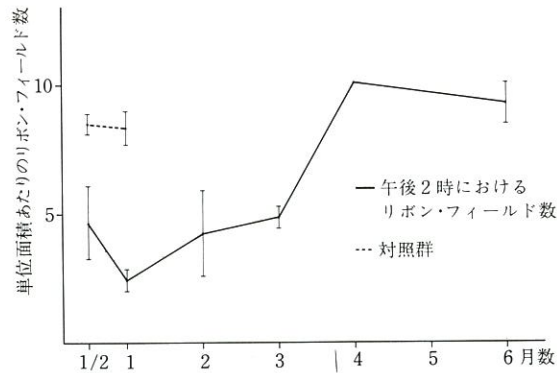


図6. 両側眼球摘出後のリボンフィールド数 (mean±SE, 実線) の経時的変化を示す。

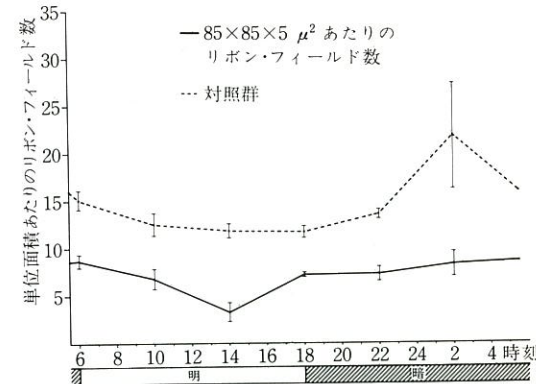


図8. 両側眼球摘出1カ月後におけるリボンフィールド数 (mean±SE, 実線) の日周変動を示す。

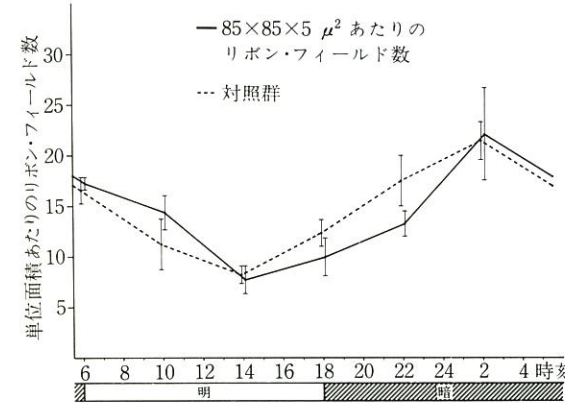


図10. 両側眼球摘出6カ月後におけるリボンフィールド数 (mean±SE, 実線) の日周変動を示す。

図7と図8は、盲目化して1カ月後の時点で、実験群のSRとRFの数が、滑らかではないが、日周変動の傾向を保っていることを示している。そして、14:00から18:00, 22:00, 2:00, 及び6:00にかけての増加と、2:00及び6:00から14:00にかけての減少が有意である (P<0.028)。

問題点として、対照の14:00のSRとRFの値が予想されるよりも高く出ており、動物管理に何らかの欠陥があったと想像される。

両側眼球摘出後6カ月を経過した時点では、SRの数を平均すると17.80±6.73 SR/UA (対照 19.37±6.98 SR/UA), RFの数の平均は13.61±5.16 RF/UA (対照 14.71±7.30 RF/UA)であり、対照に比して有意の差はみられない。

図9と図10は、この時点で実験群のSRとRFの数の日周変動がきわめて滑らかなことを示しており、盲

目化の影響は認められない。

図4のBとCは盲目実験の1カ月目と6カ月目の時点で使用した非盲目ラットのSRの集簇様式の日周変化を示している。単独のSRからなるRFは18:00と2:00の時点でめだち、すなわちSR/RFが1に近すぎ、複数のSRからなるRFは10:00から14:00の間にめだちという結果になる。RFを構成するSRの数の平均は、1日を通してみると1カ月目の対照ラットで1.46 SR/RF, 6ヶ月目の対照ラットで1.33 SR/RFであった。

### 考 察

私共の成績では、生理的状態におけるSRの数の日周変動は約3.5倍の上下幅を示したが、これは

一率でないとしている<sup>22</sup>。LUES (1971) はモルモットの松果体の明細胞 ("light" cell) のSRの数が、持続照明、暗黒の時にともに増加し、形態もかわると記載しており、定量的な仕事ではないが、VOLLRATHらの仕事のさきがけとなった<sup>13</sup>。ROMIJN (1975) は兎を用い、20日間の持続照明においた後の松果体を観察したところ、松果体明細胞の突起終末部のSRの数が増し、他方20日間の持続暗黒の後には形態学的な変化は観察されなかったことを報告している<sup>18</sup>。

SRの集簇様式の日内変化が明らかになれば、この構造物の発生と消滅の過程が見つけられると私共は考えた。今回の実験では正常ラットの成績 (図4-A) と盲目実験の際に使った対照ラットの成績 (図4-B, C) の間に開きがあり、解釈はむづかしい。おそらく、夜間にSRの総数が増加していく際には1ヶのSRで構成される新しいRFが形成され、夜間から昼間にかけてSRの総数が減少する際には複数のSRで構成されるRFのなかのSRが消えていくのではないかと想像している。

哺乳類の松果体中のメラトニンとその前駆体の含有量、あるいはメラトニンの合成酵素の活性に日周変動があるとする生化学的知見を考慮すると、シナプスリボンを松果体の内分泌活性と関係づけて考えたい。QUAY (1966) は、霊長類 *Macaca mulatta* の松果体の5-hydroxytryptamine (5-HT, Serotonin) 濃度に昼高く夜低い日周変動が存在し、N-acetylserotoninをメラトニンにかえるhydroxyindole-o-methyltransferase (HIOMT) 活性には逆に昼低く夜高い日周変動を認められたと報告しており<sup>16</sup>、明らかにされたデータから判断するとその日周差はともに約3ないし4倍とおもわれる。LYNCH (1971) は生物検定法 (dermal melanophore response) を利用して、ラットの松果体のメラトニン含有量に昼低く夜高い日周変動があることを示している<sup>14</sup>。その報告によれば松果体のメラトニン含有量は暗期にはいるとともに速やかに上昇しはじめ、暗期を通して上昇しつづける。そして、明期の直前からきわめて急激に減少するという。この変動の曲線は、今回のSRを指標にした実験の成績によく類似しており、SRは機能の上でメラトニンの産生に何らかの形で関与しているとも考えられる。今後、リボン周囲に存在するシナプス小胞の内容の解明がその点からも待たれる。

哺乳類の松果体においてシナプスリボンはどのような機能を担っているのであろうか。松果体は系統発生

VOLLRATH<sup>21</sup>の成績に較べると小さい。おそらく、実験動物の種差、実験室の条件のちがいが影響したと考えられる。又、盲目実験の結果はVOLLRATH<sup>22</sup>やROMIJN<sup>18</sup>の持続暗黒実験の成績と一致しないが、使用した実験動物の数などから判断して、盲目状態でSRの数の減少を認めた今回の結果は確度が高いと考える。

VOLLRATH (1973) はモルモット松果体のシナプスリボンの数が、生理的な照明条件下に著明な日周変動を示すことを最初に見いだした<sup>21</sup>。そしてその間の変動幅は約25倍に達するとしている。VOLLRATHとHUSS (1973) はモルモットを64日間の持続照明においた際には、SRの数は雄で20倍、雌で9倍増加し、一方26日から70日の持続暗黒においた際には結果は

の過程で形態、神経支配、そしておそらくは機能の上でも興味深い変化をとげている<sup>10</sup>。下等脊椎動物の松果体は光刺激を直接に感知して脳に向かう求心性神経のインパルスに転換する photoreceptor (第3の眼)であるといわれ、これに対し高等哺乳類の松果体は眼からいったん上頸神経節を経てとどく交感神経刺激を松果体のホルモンであるとするメラトニンの分泌へと転換する内分泌器 (neuroendocrine transducer) としての様相が強い。鳥類の松果体はこれら2者の中間の性格を持ち、光に直接反応してホルモンを分泌する (photoendocrine transducer) と考えられている<sup>2</sup>。以上のような系統発生の流れをふまえると、哺乳類の松果体のシナプスリボンは下等脊椎動物の光受容細胞から受け継がれた遺残要素にすぎず、特別の機能をもつものではないとする見方が生まれたのも不自然ではない。しかし1970年以降の電子顕微鏡を利用した定量的観察の蓄積は、哺乳類の松果体のSRがむしろ積極的な機能を担っていることを示唆する。SRの機能について HOPUS (1965) は、この構造物の存在する細胞膜に於て松果体細胞相互間にシナプス伝達が起こっている可能性があると考えており<sup>8</sup>、VOLLRATH と HUSS もSRは細胞間の情報伝達に関与し、その機能は松果

体の内分泌活性を促進させるか、あるいは松果体内に神経系に類似した回路を確立することにあるとの仮説を採用している<sup>21,22</sup>。他方 ROMIJN (1975) は、SRは交感神経系の伝達物質であるノルアドレナリンの松果体におけるレセプターではないかと考察し、上頸神経節除去後にSRの数が増すのは代償性の性格をもつのであろうと推察している<sup>18</sup>。

今回の実験の成績は、眼からはいる光刺激の周期的変化が松果体の機能に影響する因子であることを確認するとともに、盲目実験の成績が示すように光感覚以外にも松果体に代償的に作用し、その日周変動を維持させる因子が存在することを示唆した。図11は、松果体機能に影響を与えると考えられる各種の因子を示している。LAUBERら (1968) はニワトリひなの松果体 HIOMT 活性の光に対する反応が上頸神経節の摘出や眼球の摘出により阻害されないことを報告し、鳥類には網膜以外の光受容器 (extraretinal photoreceptor) が存在すると推察している<sup>12</sup>。WETTERBERGら (1970) は盲目化ラットの松果体中のセロトニン含有量にはあいかかわらず日周変動が見い出せる一方、盲目化した幼若ラットで、もし同時に HARDER 氏腺も除去するとセロトニンの日周変動が消失するとして、幼若

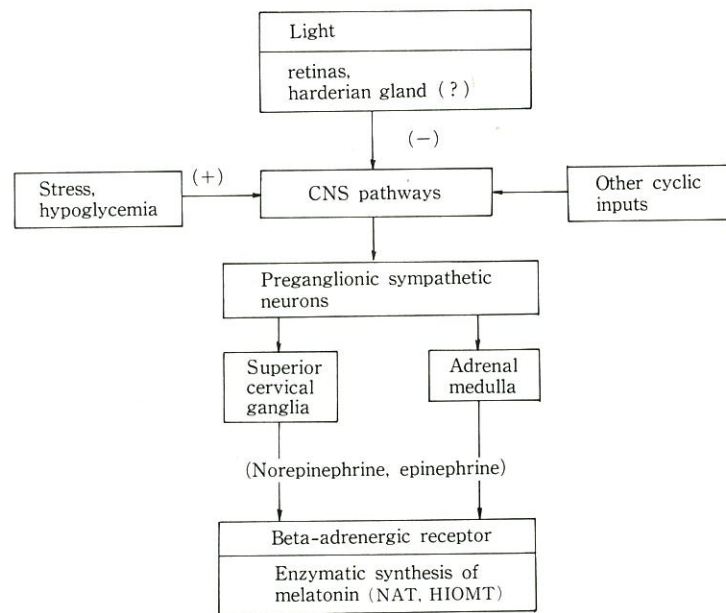


図11. 哺乳類松果体におけるメラトニン産生を制御する諸因子。(+)は促進的に作用することを示し、(-)は抑制的に作用することを示す。WURTMANらによる模式図<sup>9</sup>をもとにして、一部に加筆した。

ラットでは HARDER 氏腺が光受容器として機能すると考えている<sup>23</sup>。REITERら (1970) は、嗅覚喪失 (anosmia) が松果体に対し促進的に作用する可能性を追求している。彼らによれば、成育雌ラットの眼球と嗅球を同時に摘出すると8週の後には生殖器の萎縮が認められるが、一方のみの摘出では同様の効果は得られず、又松果体を同時に摘出すると上記の視覚嗅覚喪失の効果は発現しないという<sup>17</sup>。これらの結果から REITERら (1975) は嗅球から habenula を通って松果体へ神経が伸びている可能性が残されているとしている<sup>3</sup>。さらに交感神経系の緊張状態が松果体に与える影響についても目が向けられつつある。KAPPERS (1960) は、ラットの松果体が上頸交感神経節からの節後線維の支配下にあることを解剖学的に明らかにしており<sup>9</sup>、眼からの光刺激もこの経路を経て松果体に達すると一般に考えられている。LYNCHら (1973) は、ラットをインシュリン投与による低血糖状態、あるいは粘着テープを使用した immobilization の状態におくと、松果体のメラトニン含有量と N-acetyltransferase (NAT) 活性に対照に比し3-6倍、100-300倍の増加が認められ、 $\beta$ 型遮断薬である propranolol 前投与はこの反応を抑制するという結果をもとに、環境の照明以外にも交感神経系の緊張状態を変える因子 (ストレス) は松果体機能に影響を与えると考察している<sup>15</sup>。

今回の盲目実験では、除去されずに残された聴覚嗅覚あるいは摂食行動等がだいに盲目ラットの交感神経系の緊張の日周変動を形成し、松果体のSRの数の日周変動を回復させた可能性がある。交感神経系の緊張状態が松果体の機能に与える影響は、メラトニンの生理的意義の解明につながる重要なテーマの一つとして今後注目に値する。

## 要 約

ラットの松果体のシナプスリボン (SR) とリボンフィールド (RF) が電子顕微鏡像に出現する頻度の日周変動を、以下の条件下で測定した。

1) 明12時間、暗12時間の生理的照明下では、SRとRFの数は2:00 (午前2時) に最高、12:00 から14:00の間に最低を示し、その間の差は統計学的に有意であった (図2, 3)。

2) 両側の眼球を摘出し、1)と同じ照明条件に置くと、SRとRFの数は一過性に有意の減少を示すが、6ヵ月後にはほぼ完全に回復し対照との間に差がなくな

る (図5-10)。

3) SRとRFを指標にすると、眼球摘出による日周変動の位相のずれは確認できず、1ヵ月後と6ヵ月後の時点でもともに2:00から6:00の間に最高、14:00に最低を示した (図7-10)。

4) 眼からの光刺激以外にも松果体機能に影響を与え、その日周変動を持続させる因子の存在が示唆された。

## 謝 辞

本研究に際し、電子顕微鏡学全般について助言と協力を与えられた岩坂茂技術員に感謝し、また図表の転載を許可された Dr. RICHARD J. WURTMAN に感謝の意を表したい。

最後に、報告の機会を与えて頂いた日本病理学会の担当委員の方々へ厚く御礼申し上げます。

本研究は一部、文部省特定研究「脳の統御機能」研究費の補助により行われた。

## 文 献

### 総説的なもの

1. ALTSHULE, M.D., editor: *Frontiers of pineal physiology*. The MIT Press, Cambridge & London, 1975.
2. CARDINALI, D.P. and WURTMAN, R.J.: Control of melatonin synthesis in the pineal organ. 3rd chapter in 1), p. 12-41.
3. REITER, R.J., VAUGHAN, M.K., VAUGHAN, G.M., SORRENTINO, S.Jr., and DONOFRIO, R.J.: The pineal gland as an organ of internal secretion. 5th chapter in 1), p. 54-174.
4. WURTMAN, R.J. and AXELROD, J.: The pineal gland. *Sci. Am.*, **213** (1): 50-60, 1965.
5. WURTMAN, R.J. and MOSKOWITS, M.A.: The pineal organ. *New Engl. J. Med.*, **296**: 1326-1333, 1383-1386, 1977.

### 原著論文

6. FINE, B.S.: Synaptic lamellas in the human retina: An electron microscopic study. *J. Neuropathol. exp. Neurol.*, **22**: 255-262, 1962.
7. HOEL, P.G.: *Elementary statistics*. 2nd edition. John Wiley & Sons, New York, 1966. (*Japanese translation*).
8. HOPUS, V.K. and ARSTILA, A.U.: An apparent somato-somatic synaptic structure in the pineal gland of the rat. *Exp. Cell Res.*, **37**: 484-487, 1965.
9. KAPPERS, J.A.: The development, topographi-

- cal relations and innervations of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z. Zellforsch.*, **52**: 163-215, 1960.
10. KURUMADO, K. and MORI, W.: A phylogenetic study on the pineal gland. *Igaku-no-ayumi*, **64**: 227-239, 1975. (*in Japanese*).
  11. KURUMADO, K. and MORI, W.: A morphological study of the circadian cycle of the pineal gland of the rat. *Cell Tiss. Res.*, **182**: 565-568, 1977. (*Short communication*).
  12. LAUBER, J.K., BOYD, J.E., and AXELROD, J.: Enzymatic synthesis of melatonin in avian pineal body: Extraretinal response to light. *Science*, **161**: 489-490, 1968.
  13. LUES, G.: Die Feinstruktur der Zirbeldrüse normaler, trachtiger und experimentell beeinflusster Meerschweichen. *Z. Zellforsch.*, **114**: 38-60, 1971.
  14. LYNCH, H.J.: Diurnal oscillations in pineal melatonin content. *Life Sci.*, **10**: 791-795, 1971.
  15. LYNCH, H.J., ENG, J.P., and WURTMAN, R.J.: Control of pineal indole biosynthesis by changes in sympathetic tone caused by factors other than environmental lightening. *Proc. Natl Acad Sci. USA*, **70**: 1704-1707, 1973.
  16. QUAY, W.B.: 24-hour rhythms in pineal 5-hydroxytryptamine and hydroxyindole-O-methyl transferase activity in the Macaque. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, **121**: 946-949, 1966.
  17. REITER, R.J., SORRENTINO, S. Jr. and Ellison, N.M.: Interaction of photic and olfactory stimuli in mediating pineal induced gonadal regression in adult female rats. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **15**: 326-333, 1970.
  18. ROMIJN, H.J.: The ultrastructure of the rabbit pineal gland after sympathectomy, parasympathectomy, continuous illumination, and continuous darkness. *J. Neural Trans.*, **36**: 183-194, 1975.
  19. SMITH, C.A. and SJOSTRAND, F.S.: A synaptic structure in the hair cells of the guinea pig cochlea. *J. Ultrastruct. Res.*, **5**: 184-192, 1961.
  20. SZABO, T., WERSALL, J.: Ultrastructure of an electroreceptor (Mormyromast) in a mormyroid fish, *Gnathonemus petersii* II. *J. Ultrastruct. Res.*, **30**: 473-490, 1970.
  21. VOLLRATH, L.: Synaptic ribbons of a mammalian pineal gland; Circadian changes. *Z. Zellforsch.*, **145**: 171-183, 1973.
  22. VOLLRATH, L. and HUSS, H.: The synaptic ribbons of the guinea-pig pineal gland under normal and experimental conditions. *Z. Zellforsch.*, **139**: 417-429, 1973.
  23. WETTERBERG, L., GELLER, E., and YUWILER, A.: Harderian gland: An extraretinal photoreceptor influencing the pineal gland in neonatal rats? *Science*, **167**: 884-885, 1970.
  24. YAMADA, E., TOKUYASU, K., and IWAKI, S.: The fine structure of retina studied with electron microscope. III. Human retina. *J. Kurume Med. Ass.*, **21**: 1979-2027, 1958.