

## クルマエビの神経顆粒に関する研究—II

*in vitro* 条件による食道神経節の呼吸代謝量の測定

中 村 薫\*

### Studies on the Granular Inclusion in the Nerve Cells of the Prawn, *Penaeus japonicus* BATE-II

#### *In Vitro* Experiments of the Respiratory Activity on the Supraoesophageal Ganglion

Kaworu NAKAMURA\*

#### Abstract

Experiments were carried out to investigate the physiological influences of the respiratory metabolisms and the cell-membrane activities of the supraoesophageal ganglions on the PAS-positive granules of the peculiar cells (PAS-cells) in the prawn, *Penaeus japonicus* B.. For the respiratory measurements the cultivations of the ganglions were performed during 4 hours under the different compositions of the physiological salines and then the medium-effects upon the granules were investigated, too, after the above tissues were prepared histologically.

Effects of the different concentrations of the D-glucose (3 mg/dl and 0.03 mg/dl) and the difference between the D-glucose and the D-galactose (3 mg/dl) were no observed on the O<sub>2</sub> consumptions of the tissues and the quantities of the granules. For the physiological salines of the 107 mM K and the 3 mM K the former showed only the suppressed effects on the granules. Similarly for the 20 mM Ca and the 8 mM Ca the latter showed only, too, the suppressed effects on the granules and in addition the accelerative effects on the O<sub>2</sub> consumptions. Both of the recuperative cultivations during 3.5 hours after the treatments during 30 minutes with the physiological salines of the 107 mM K and the 8 mM Ca showed the accelerative effects on the granules respectively. Between the O<sub>2</sub> consumptions and the quantities of the granules there were no correlations.

In conclusion it seems that the granules may have a physiological role on the maintenance of the membrane activities of the PAS-cells.

---

\* 鹿児島大学水産学部増殖生理学研究室 (Lab. of Propagation Physiology, Fac. of Fisheries, Kagoshima Univ., Kagoshima, Japan)

クルマエビの食道神経節の表層に分布する神経節細胞集団の中で、特定部位（腹面後部神経節細胞集団）に位置し過沃素酸・SCHIFF (Periodic Acid-SCHIFF, PAS) 反応に陽性を呈する顆粒状物質を含有した特殊細胞 (PAS 細胞) に関して、当該顆粒の生理的意義をその出現状況に準拠して、該当神経節の呼吸代謝および膜活動等の神経生理的機能の側面より検討した。

### 実験方法

材料には体重 7~17 g の養殖されたクルマエビ *P. japonicus* BATE を用いた。食道神経節の摘出に当たっては、眼、第 1 および第 2 触角は各神経索の派出部位付近、囓食道神経連絡については食道通過の部位において切断処理を行なった。当該神経節は冷却した KUSANO 液 (甲殻類の生理的溶液)<sup>1)</sup> に移し、双眼実体顕微鏡下で、摘出の際神経節に付いたままでその周囲に備わった付属組織を除去後、神経節膜の腹面正中線域に眼科手術用ハサミを以て切れ込み手術を施し、後の培養の際における溶液および通気等の交替を容易ならしめた。次いで当該神経節の秤量を行なった。幾分、生理的溶液が神経節周囲を覆う状態のまま湿重を求め、摘出手術に先んじて得ていた体重値との関係を調べ、後者を基準とした神経節の最確値を Fig. 1 に示したグラフの上から求めた。以上の処理をふまえた各神経節は下記培養実験に供し、その後、飽和ピクリン酸・飽和昇汞等量溶液に  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  を 3.8% の割合で溶かした固定液に 2~3 時間放置の後、Bt-OH 脱水、パラフィン包埋を経て  $5\mu$  の組織切片とした。切片は過沃素酸 SCHIFF-MAYER ヘマトキシリン重染色を施し、神経節の後部腹面正中線域に位置する PAS 細胞<sup>2)</sup> に関して PAS 陽性顆粒の相対的出現量を複写計量法<sup>3)</sup> にもとづいて算出した。

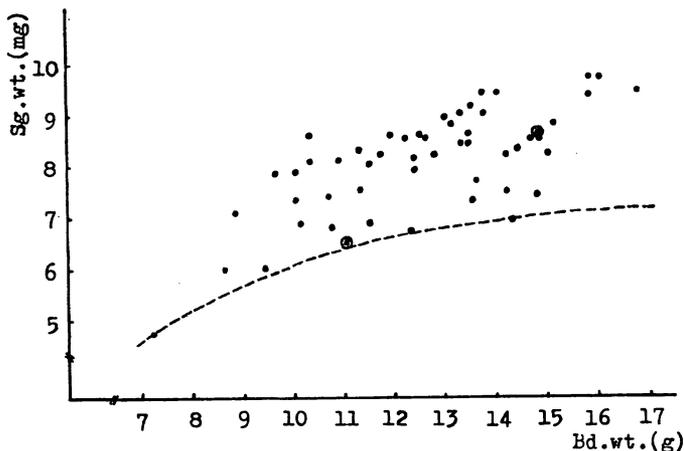


Fig. 1 Revised curve of the weight value of the supraoesophageal ganglion relating to the body growth. Actual values and the substantial curve that is introduced by connecting the minimal values of each stage are plotted.

培養実験は生理的溶液のイオン組成の人為的変動, 特に  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  が膜の機能に与える効果とグルコース或いはガラクトース等, 栄養分の相違および前者については濃度差も加えた効果等を当該神経節の呼吸量の面から調べ, 併せて PAS 顆粒量の変動から該当細胞への影響を検討することとした.

① KUSANO 液 (I 中)\*:  $NaCl$  ( $23.2\text{ g} = 400\text{ mM}$ ) +  $KCl$  ( $0.6\text{ g} = 8\text{ mM}$ ) +  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  ( $1.9\text{ g} = 13\text{ mM}$ ) +  $MgCl_2 \cdot 6H_2O = 13\text{ mM}$  (18 ml)

② 0.05 M  $KH_2PO_4$  (7 drops)

③ 0.5 M  $NaHCO_3$  (6 drops)

\* ① の pH は約 6.5 であるが ②③ の添加により pH = 7.2 ~ 7.4 に調整される.

- 1) グルコース実験: ①②③ に D-グルコースを添加して濃度 3 mg/dl と 0.03 mg/dl の 2 区を設定した.
- 2) ガラクトース実験: ①②③ に D-ガラクトースを添加して濃度 3 mg/dl の区を設定した.
- 3) K 実験: ① の  $KCl$  組成のみを 107 mM と 3 mM に切替え, 各々に関して ② と ③ および D-グルコースを 3 mg/dl となる様に添加した 2 区を設定した.
- 4) Ca 実験: ① の  $CaCl_2$  組成のみを 20 mM と 8 mM に切替え, 各々に関して ② と ③ および D-グルコースを 3 mg/dl となる様に添加した 2 区を設定した.
- 5) 補足実験: いわゆるカリウム効果の補足実験として実験 3) の  $K = 107\text{ mM}$  と実験 4) の  $Ca = 8\text{ mM}$  の各区に関して 30 分間の短期的培養を行なった後, 両区とも実験 1) の 3 mg/dl グルコース培養液で 3.5 時間の継続培養を行なった.

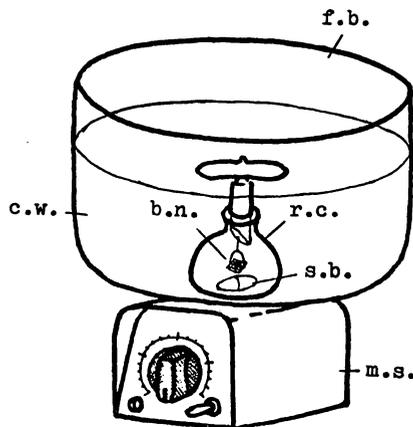


Fig. 2 Culturing apparatus for the measurement of oxygen consumption of the supraoesophageal ganglion. After the cultivation the dissolved oxygen in the medium was measured by the WINKLER'S method. Abbrev., b.n.: basket net for supporting the tissue, c.w.: cooled water, f.b.: finger bowl, m.s.: magnetic stirrer, r.c.: respiratory chamber, s.b.: stirring bar.

以上の各実験において①②③等は Fig. 2 に示した呼吸量測定用の呼吸室 (18.07 ml 容量, ガラス製) に順次注入し, 攪拌子を入れて軽く攪拌を行なった後, 神経節を網に乗せた (盲検では除いた) 栓を挿入して過剰の培養液を over flow させ, 実験 5) を除き, 4 時間の培養実験を開始した. なお培養温度を 18~20°C の範囲に維持するために呼吸室の周囲は氷を含んだ冷却水で適宜調節した. 培養終了の後, 各神経節は取出して固定液に移し, 培養液はそのまま微量 WINKLER 法にもとづく溶存酸素量の測定に供した. ところで神経節の酸素消費量は盲検値との差違から算出し, 測定誤差等を考慮し且つ先に求めた神経節湿重の最確値をもとに有効数字 2 桁まで  $\text{mlO}_2/\text{g}/4 \text{ hr}$  の単位で表示した. 上記各実験は 1978 年 5 月より 7 月の期間に実施した.

### 結 果

実験 1) の結果を Table 1 に示した. グルコースの 3 mg/dl 区と 0.03 mg/dl 区における PAS 顆粒量は後者に属す No. 11 で非常に高い値を示す他はむしろ前者に多く出現する傾向があるが, 平均値の比較では著しい差異は認められず, 各々 0.87 と 0.79 であった. 一方, 呼

Table 1. Quantities of the PAS-positive granules in the PAS-cells and the oxygen consumptions of the supraoesophageal ganglions under *in vitro* conditions of the two different concentrations of glucose. No. 1-10=3 mg/dl, No. 11-17=0.03 mg/dl.

No.	PAS-positives*	Oxygen consumption (unit=ml/g/4hr)
1	0.0	1.9
2	0.0	0.9
3	1.0	1.0
4	0.0	trace
5	2.8	0.2
6	0.0	1.2
7	0.8	0.3
8	2.4	0.1
9	1.7	0.3
10	0.0	trace
11	5.1	0.8
12	0.0	0.5
13	0.1	0.6
14	0.1	trace
15	0.2	0.8
16	0.0	1.0
17	0.0	1.0

\*: Relative values of the weights converted from the magnified volumes of the histological specimens by transcription method (unit=g).

吸量においても両者には近似的な値が示され、各々の平均値 (ml/g/4 hr) は 0.50 と 0.67 であった。実験 2) の結果を Table 2 に示した。ガラクトース区の PAS 顆粒量は平均値が 0.54 で、実験 1) のグルコース同濃度区の平均値 0.87 と比較すると低い値であり、出現状況

Table 2. Quantities of the PAS-positive granules in the PAS-cells and the oxygen consumptions of the supraoesophageal ganglions under *in vitro* condition in which the glucose was replaced with galactose (3 mg/dl).

No.	PAS-positives*	Oxygen consumption (unit=ml/g/4hr)
1	2.6	0.1
2	0.0	0.4
3	0.0	trace
4	1.2	0.7
5	0.0	0.6
6	0.0	0.8
7	1.6	1.0
8	0.0	0.5
9	0.0	0.4
10	0.0	trace

\*: The same as in Table 1.

Table 3. Quantities of the PAS-positive granules in the PAS-cells and the oxygen consumptions of the supraoesophageal ganglions under *in vitro* conditions of the two different concentrations of potassium. No.1-7=107 mM, No. 8-14=3 mM.

No.	PAS-positives*	Oxygen consumption (unit=ml/g/4hr)
1	0.1	0.5
2	0.0	0.5
3	0.0	0.2
4	0.0	0.5
5	0.0	0.5
6	0.0	0.8
7	0.0	0.8
8	0.0	0.4
9	1.8	0.6
10	0.0	0.7
11	0.0	0.8
12	0.6	0.6
13	0.0	1.1
14	0.0	0.2

\*: The same as in Table 1.

からみてもやや低い頻度であることが窺われる。一方、呼吸量は平均値で 0.45 を示し先のグルコース区と比較して差異はないことがわかった。ところで両実験区とも PAS 顆粒量と呼吸量との間には特定の相関性は認められない。

実験3)の結果を Table 3 に示した。Kの107 mM 区における PAS 顆粒量は3 mM 区と比較すると量的に少ない傾向が示され、平均値では各々 0.00 と 0.34 となり、特に前者は先のグルコース 3 mg/dl 区の平均値 0.87 と比べると著しく低い値であることが明瞭である。一方、呼吸量の平均値では 0.54 と 0.63 となり両者の間には著しい差異はなく且つ先のグルコース区の値 0.50 と比較してもその差異は少ないことが示される。なお PAS 顆粒量と呼吸量との間には特定の相関性は認められない。

実験4)の結果を Table 4 に示した。Ca の 20 mM における PAS 顆粒量は 8 mM 区と比較すると量的に多い傾向が窺われ、各々の平均値は 0.47 と 0.00 となるが、先のグルコース 3 mg/dl 区の値 0.87 と比較するといずれも絶対量的に少ないことが示され、特に後者の 8 mM 区は著しく低い値であることが明瞭である。呼吸量に関しては 8 mM 区では逆に 20 mM 区より高い傾向が窺われ、平均値の比較では各々 0.99 と 0.44 となり、さらに両者を先のグルコース区の値 0.50 と比べると特に前者の値は約 2 倍もの高い呼吸量を示すことは著明である。なお PAS 顆粒量と呼吸量との間には特定の相関性は認め難い。

実験5)の結果を Table 5 に示した。K, Ca 両区の PAS 顆粒量は各々平均値として 1.68 と 1.28 であり両者の値はいずれも実験1)のグルコース 3 mg/dl 区、実験3)の K=107 mM

Table 4. Quantities of the PAS-positive granules in the PAS-cells and the oxygen consumptions of the supraoesophageal ganglions under *in vitro* conditions of the two different concentrations of calcium. No. 1-7=20 mM, No. 8-14=8 mM.

No.	PAS-positives*	Oxygen consumption (unit=ml/g/4hr)
1	0.0	0.4
2	1.8	0.1
3	0.8	0.4
4	0.7	0.5
5	0.0	0.9
6	0.0	0.4
7	0.0	0.4
8	0.0	0.8
9	0.0	1.3
10	0.0	1.9
11	0.0	0.7
12	0.0	1.3
13	0.0	0.2
14	0.0	0.7

\*: The same as in Table 1.

Table 5. Quantities of the PAS-positive granules in the PAS-cells after the "potassium-effect" under *in vitro* condition. No. 1-4 and No. 5-10 were treated respectively with 107 mM potassium and 8 mM calcium during 30 minutes, then, were cultured in the physiological medium during 3.5 hours.

No.	PAS-positives*
1	1.7
2	3.6
3	1.0
4	0.4
5	2.2
6	0.3
7	0.5
8	1.0
9	0.2
10	3.5

\*: The same as in Table 1.

区および実験4)のCa=8mM区の各々において平均値である0.87, 0.00および0.00と比較して著しく高い値であることが示される。

## 考 察

クルマエビの血糖値は還元糖として5~20mg/dlの測定例<sup>4)</sup>があるが、本実験で与えた条件(3mg/dl)はその平常の生理的範囲を著しくはずれた値ではないと判断される。ところでグルコースは特に脳組織においては重要なエネルギー源であることは周知のことであり、クルマエビ等の甲殻類においても電気生理学的方面では神経系の機能維持に不可欠な栄養分として用いられている<sup>1)5)</sup>。さて実験1)においてグルコースの100倍の濃度差により両区のPAS顆粒量と呼吸量とに著明な差異を生ぜず、且つ両値に特定の相関性が示されないことは当該顆粒が神経節の呼吸代謝と直接的には生理的関連を有さないことを意味し、さらに呼吸代謝は一定範囲におけるグルコースの変動には影響を受け難いものであらうと判断される。

実験2)においてガラクトース区のPAS顆粒量は実験1)グルコース区より多少とも低い値であることから両者の違いによる効果が示唆されるが、呼吸量としては相違が明瞭ではないことを考慮すると、ガラクトースもグルコースと同様に当該組織に利用され易い単糖であらうと考えられる。

実験3), 4)および5)は生体のイオン組成の中でも神経系の代謝・活動に重要な役割を果たすKとCaを対象として、その変動が呼吸代謝に与える影響を調べると同時に、神経系の膜活動の維持の上で何らかの生理的関連がPAS顆粒にないものかと云う可能性を検討したものである。さて、K<sup>+</sup>はNa<sup>+</sup>と共軛して生体内では一定の濃度で神経系の機能を維持してい

るが、その濃度が例えば 100 mM 程まで著しく高まると呼吸量とグルコース消費量の増加を伴った、いわゆる‘カリウム効果’が発現する。それは  $\text{Ca}^{2+}$  の減少によっても惹起され、いずれの場合にもその発現には無傷の細胞膜の存在が必須の条件で、膜における刺戟代謝の調節機構が関与しているとされる<sup>6)7)</sup>。ところで実験 3) において平常値 (8 mM) の約 13 倍の濃度を与えた  $\text{K}=107$  mM 区における呼吸量は 0.54 の平均値 (ml/g/4 hr) で実験 1) のグルコース 3 mg/dl 区の平均値である 0.50 と比較すると呼吸代謝への亢進効果は著明ではなく、カリウム効果は確認できない。他方、PAS 顆粒量は平均値が 0.00 でグルコース同上区の値 0.87 と比較するとその出現は  $\text{K}$  の増加により抑えられていることを推察させる。実験 4) における  $\text{Ca}=8$  mM 区の呼吸量は平均値で 0.99 を示し、これは実験 1) のグルコース 3 mg/dl 区の平均値である 0.50 と比較すると非常に高い値であり、 $\text{Ca}=20$  mM 区の同上値は 0.44 であることを考慮すると、当該神経節の呼吸代謝は  $\text{Ca}$  の減少により機能を亢進化されたものと解される。一方、PAS 顆粒量については  $\text{Ca}=8$  mM 区の平均値が 0.00 であり、 $\text{Ca}=20$  mM 区および実験 1) のグルコース同上区の各値が 0.47 と 0.87 であることから、その出現は  $\text{Ca}$  の減少により抑えられていることを推察させる。ところで実験 5) における PAS 顆粒量は  $\text{K}$ 、 $\text{Ca}$  両区とも実験 1) のグルコース 3 mg/dl 区の平均値である 0.87 に比較して非常に高く、各々 1.68 と 1.28 の平均値を示し、いずれも先の実験 3)、4) における  $\text{K}=107$  mM と  $\text{Ca}=8$  mM 各区の場合と全く逆の結果となるが、これは一つにいわゆるカリウム効果を導くことを目的として設定した培養時間の相違にもとづくものと解釈される。即ち実験 3) と 4) においては両区とも培養期間中、神経節細胞は持続して刺戟を受けた状態にあるが、実験 5) においては 30 分間の被刺戟状態の後、平常状態における (回復) 期間を用意されており、この期間に当該顆粒は量的増加を行なうことが考えられる。さらに先の実験 3) の  $\text{K}=107$  mM 区において期待されて然るべきカリウム効果が呼吸量の上に認められなかった点は、他方において実験 4) の  $\text{Ca}=8$  mM 区が生理的濃度範囲を著しくは逸脱していない (著者は先に平常値として 10~20 mM の値を得ている<sup>4)</sup>) のに反して、 $\text{K}=107$  mM 区ではその設定濃度が異常に高い点に加えて、培養時間の長さが負に作用したためとも解される。

以上の諸結果から考察すると当該顆粒は食道上神経節の呼吸代謝とは直接的には関連せず、むしろ PAS 細胞の膜における刺戟代謝の調節機構に何らかの機序で関与する物質であろうことが推察される。

## 要 約

1. クルマエビにおける食道上神経節の後部腹面正中線上の細胞集団に所在する PAS 細胞に関して、当該細胞の含有顆粒の生理的意義を該当神経節の呼吸代謝および膜活動等、神経生理的機能の一側面より検討した。

2. 食道上神経節は気密容器内で 4 時間、18—20°C 条件のもとに組織培養を行ない、培養終了の後、組織標本として該当部位に出現した顆粒像を複写計量法により計量した。他方、培養液は微量 WINKLER 法により溶存酸素の減少量を求めて呼吸量を算出した。

3. 培養液は KUSANO 液を基本とし、栄養分の効果実験としてはグルコースの 3 mg/dl と 0.03 mg/dl の 2 区さらにガラクトースの 3 mg/dl 区を設定した。グルコースに関しては両区

の間で PAS 顆粒量と呼吸量との各々に著しい差異は認められず、ガラクトースについてもグルコースにおける両値との相違は各々明瞭ではなかった。

4. イオン組成の変動効果実験としては parameter に K と Ca を選び KUSANO 液の両成分に関して、前者は 107 mM と 3 mM, 後者は 20 mM と 8 mM の各 2 区を設定し、各々グルコースを添加して 3 mg/dl の条件で培養した。K=107 mM と Ca=8 mM の両区において PAS 顆粒は出現を抑えられた結果を示し、他方、呼吸量は後者にも著しい活性が示されその平均値は 0.99 ml/g/4 hr. で平常値 (0.50 ml/g/4 hr) の約 2 倍であった。

なお補足実験として K=107 mM と Ca = 8 mM の両区に関して 30 分間の短期培養の後、イオン組成が平常の培養条件に戻して 3.5 時間の継続培養を行ない、PAS 顆粒量を調べた。両者とも当該顆粒には著しい量的増加が確認された。

5. 上記実験の諸結果において PAS 顆粒量と呼吸量との間には特定の相関性は認められず、よって当該顆粒は神経節の呼吸代謝とは直接的には生理的関連を有さないものと考えられる。

6. PAS 顆粒は該当細胞の膜における刺戟代謝の調節機構に関与する物質であろうことを推察した。

#### 文 献

- 1) KUSANO, K. (1966): Electrical activity and structural correlates of giant nerve fibers in Kuruma-shrimp (*Penaeus japonicus*). *J. Cell. Physiol.*, **68**, 361-384.
- 2) 中村 薫 (1974): クルマエビの神経分泌に関する研究-II PAS 陽性物質の組織化学的検討および VP 神経節細胞集団のトポグラフィ。鹿大水紀要, **23**, 185-193.
- 3) 中村 薫 (1974): クルマエビの神経分泌に関する研究-III 環境条件と PAS 陽性物質量との相関性の検討。同上, **23**, 195-200.
- 4) 中村 薫 (1975): クルマエビの神経分泌に関する研究-VIII 血リンパ性状と PAS 陽性物質量との相関性の検討。同上, **24**, 33-42.
- 5) OTSUKA, K., E. A. KRAVITZ and D. D. POTTER (1967): Physiological and chemical architecture of a lobster ganglion with particular reference to gamma-aminobutyrate and glutamate. *J. Neurol.*, **30**, 725-752.
- 6) ASHFORD, C. A., and K. C. DIXON. (1935): The effect of potassium on the glucolysis of brain tissue with reference to the Pasteur effect. *Biochem. J.*, **29**, 157-168.
- 7) 黒川正則 (1973): “脳の機能と物質”, 岩波書店, 東京, 84-90.