

クルマエビの神経顆粒に関する研究—I
食道上神経節における VP 細胞集団の軸索連絡

中 村 薫*

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

Axonal Connections of the VP-Ganglion Cell Group
in the Supraoesophageal Ganglion

Kaworu NAKAMURA*

Abstract

Among the nerve cells of the supraoesophageal ganglion of the prawn *Penaeus japonicus* B. some peculiar cells that contain the PAS-positive granules like grains of rice are observed in the anterior part of the ventroposterior ganglion cell group (VP-group). Until now there is no explanation of its physiological role or meaning about the substance. Therefore the anatomical investigations of the axonal connections of these cells were performed by the intracellular staining. After fixation the microelectrode filled with 4% procion yellow solution was inserted in the cell body and the dye was electrophoretically injected during 2-7 hrs. under cooled condition. Specimens were then dehydrated and buried in paraffin for the histological preparation. The wave length of 450 nm of the fluorescent microscopy was used for the observations of the innervations of the dye-injected cells.

The innervations of the cells are as follows: The cell bodies which situate in the anterior of the VP-group send their axons to the dorsal area of the protocerebral neuropile passing by adjacently both outsides of the paired beginning parts of the (inner) giant axons that sink deeply in the dorsal neuropile of the deuto- or the tritocerebrum. As a result it may be concluded that the cells including the PAS-cells are intercalary neurones of which axon terminals end within the supraoesophageal ganglion.

従来、甲殻類の中樞神経系を対象とした神経分泌現象の研究分野では、特に十脚目における眼柄内のサイナス腺-X器官複合体の生理的役割が比較的よく検討されており、その他食道上

* 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)

神経節を始めとする腹髄神経索或いは末梢神経部位等においては、交連器官や囲心器官等の神経液性器官を除いて詳細な報告例は無い様である。ところでクルマエビにおいては過沃素酸 SCHIFF (Periodic Acid-SCHIFF, PAS と略称) 反応に陽性を呈する米粒状の顆粒物質をその細胞質周縁および軸索起始部に特異的に含有する少数の細胞 (PAS 細胞と略称) が食道と神経節上の特定部位に存在する¹⁾²⁾。当該物質はいわゆる神経分泌的機能にもとづく由来を有せず³⁾、その化学的性状は広義の中性粘液多糖類に属するものと解された²⁾³⁾。そしてその生理的作用或いは意義に関しては未だ不明な点が多く、現時点においては確定的な結論を述べ得ない。さて当該物質の生理的意義を解明するに当たっては PAS 細胞の神経機能を把握する必要もあり、ここに神経節後部腹面の細胞集団 (Ventre Posterior 細胞集団, VP 細胞集団と略称) にその細胞体を位置させる当該細胞の軸索走向を解剖学的に先づ追跡することとし、その機能面についての理解の一端とした。

実験方法

材料には体重 15~20 g の養殖されたクルマエビ *Penaeus japonicus* B. を用いた。食道と神経節を摘出し 15% の割合にホルマリンを溶かした SÖRENSEN 緩衝液 (pH 7.4) で 1 晩冷蔵庫内にて固定の後、同緩衝液にメチレン青を微量添加した染色液中にて神経節膜の腹面正中線域を眼科手術用のハサミで方形に切除した。そして膜内面と神経節組織の間に網状によく発達した結合組織を可能な限り除去し、該当細胞集団の細胞体表面を露呈させた。次いで上記固定液による再固定を冷蔵庫内にて 1 晩行ない、その後、プロシオン黄 (Procion Yellow MX-4R) の細胞内注入による軸索走向の同定実験を実施した。先づパラフィンを敷いた小型シャーレに腹面を上方に向けた神経節を支持固定し、氷冷条件で上記緩衝液を充たした後、色素の 4% 水溶液をつめたガラス微小電極 (先端外径は約 3 μ) を対象の細胞内に挿入し電極から負の通電を 2~7 時間行ない電気泳動的に注入した。電源は 1.5 V の乾電池を用い回路にはトランジスタ検流計 (横河電機, TYPE 2707) を置き電極の細胞挿入時点と通電時のチェックに当たった。長時間注入の際に通電とともに電気抵抗が増大し電流が流れなくなる場合にはあらたに電極を用意して挿入を繰返した。装置の概要は Fig. 1 に示した。通電終了の後、神経節はあらたに用意した緩衝液に移して 1 晩冷蔵庫内に放置の後、脱水・包埋の処理をしてパラフィンによる連続切片とした。切片の厚さは 25 μ に設定し横断、縦断および水平の 3 切面の各標本を用意した。染色は少数に関して PAS 法を適宜行ない、大半は非染色のまま脱パラフィンの後、ビオライトにより封入した。軸索の走向分布の観察には螢光顕微鏡による 450 nm 波長帯の励起螢光を目標とした。なおプロシオン黄の微小電極注入法に関しては STRETTON and KRAVITZ⁴⁾、ILES and MULLONEY⁵⁾、金子⁶⁾ 等の報告例を参考とした。

結 果

プロシオン黄の細胞内注入法により明らかにされた VP 細胞集団の中形細胞の軸索分布を Fig. 2 に示した。PAS 細胞が中形細胞に属すること¹⁾ を鑑み本実験において得られた幾例かの結果をもとに判断すると、当該細胞の軸索は Fig. 2 に示される様に (Fig. 中には 2 個の

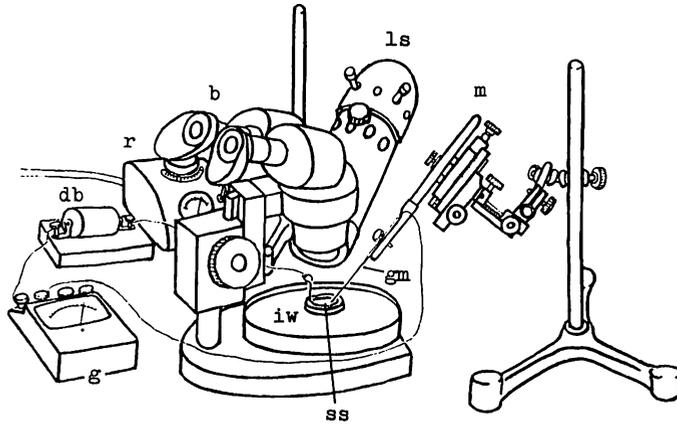


Fig. 1 Intracellular dye-injectioning apparatus provided with the microelectrode and the electrical current components.

A specimen is immersed in a physiological saline solution(ss) cooled with iced water (iw). The glass microelectrode (gm) is operated by 3 dimensional manipulator (m) and performs as a cathode opposed to the solution which is an anode. The electrical circuit is prepared with a dry battery (db) of 1.5V and a galvanometer (g).

The apparatus possesses further a binocular (b), a light source (ls) and a regulator (r) of the light intensity.

The dye-injection to the cell body is performed electrophoretically.

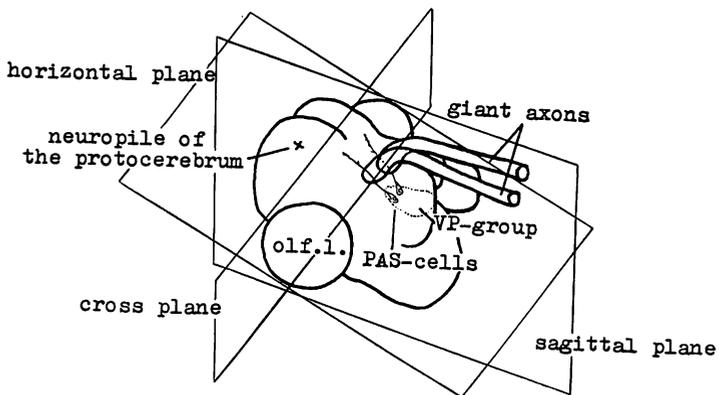


Fig. 2 Diagrammatic representation of the neuropile mass of the supraoesophageal ganglion (left dorsal view). The axons of the PAS-cells of which cell bodies locate in the anterior part of the ventro-posterior ganglion cell group (VP-group) pass by adjacently the outside of the paired beginning parts of the giant axons and reach to the dorsal area of the neuropile of protocerebrum.

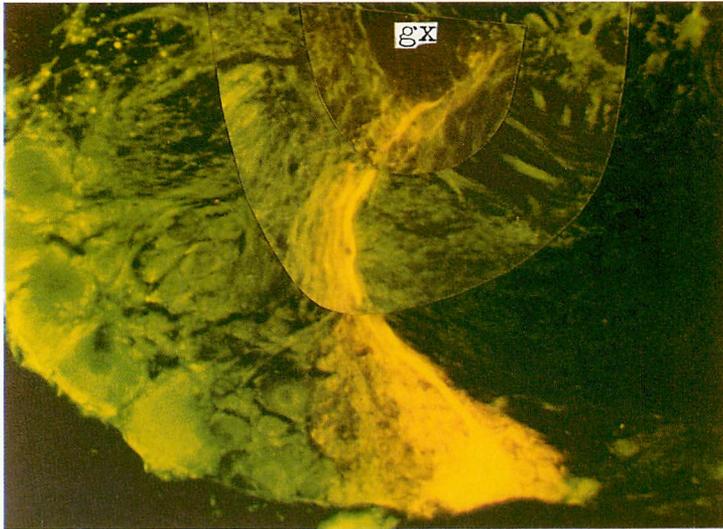
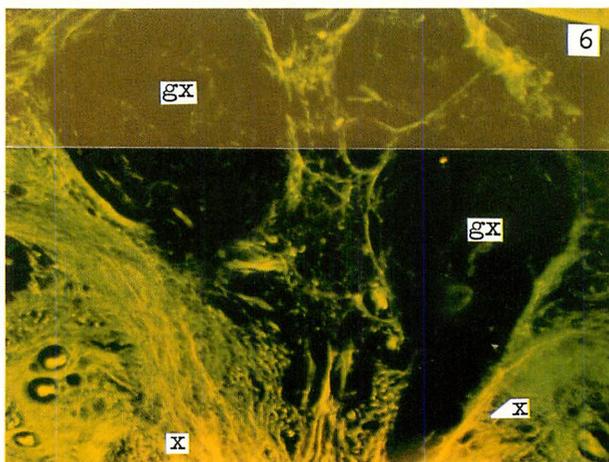
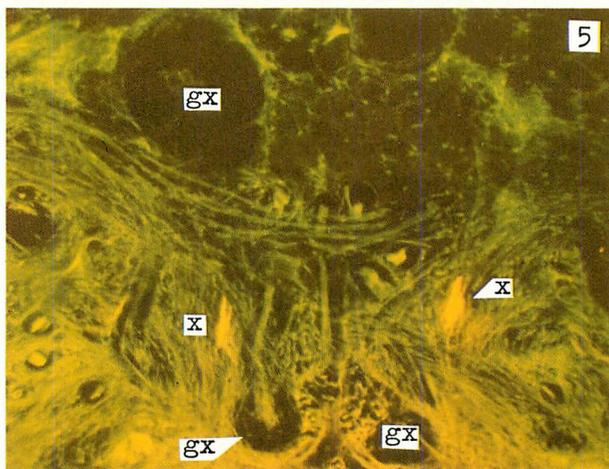
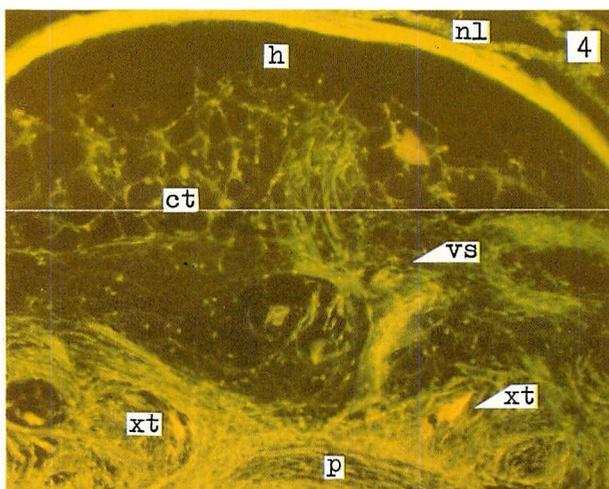


Fig. 3 Sagittal section of the ventroposterior area of the supraoesophageal ganglion. This photograph is composed by piling up 3 successional sections. The dye-injected cell of middle size of which cell body situates in the anterior neuropile passes by the beginning part of the giant axon(gx).

中形細胞のみ PAS 細胞として簡略的に表わした), 先づ神経節後部腹面の正中線付近に位置する細胞体より背前方へ向けて派出し, 神経嚢 neuropile 後部背面の正中線寄りに左右背方から埋没する1対の(内側)巨大軸索の起始部外側を近接的に通過した後, 神経嚢背部の表層近くを前方へ進み, その末端は前脳 protocerebrum に相応する神経嚢前部の背面寄りに終ることが判明した. Fig. 2 に示された縦断, 横断および水平の各切面の, 写真による標本像を各々, Fig. 3~12 に呈示した. Fig. 3 は神経節後部腹方域の正中線縦断像で3枚の連続切片を重ね合わせたものである. VP 細胞集団に位置する細胞体より派出した軸索は背前方の巨大軸索起始部付近を通過して上方へ向うことが窺われる. Fig. 4, 5 および 6 は各々, 神経嚢の前部, 中央部それに中央部よりやや後方寄りの, いずれも背方域の横断像である. Fig. 4 では神経嚢の背面寄りに終る該当軸索束の末端部位が認められ, Fig. 5 と 6 では背方より神経嚢に埋没した巨大軸索起始部の外側に近接して走向する該当軸索束の状態が確認される. Fig. 7~12 は(内側)巨大軸索の起始部より前方域で, 神経嚢内を走向する該当軸索束を背方よ

Fig. 4-6 Intermittent cross sections from anterior to posterior of the dorsal area of the supraoesophageal ganglion. In Fig. 4, the neighborhoods of the terminals of axon bundles (xt) are observed in the protocerebral area (p). Under the neural lamella (nl) a haemocoel (h) develops exceedingly with the loose connective tissue (ct) and the vascular system (vs) in the dorsal space of the neuropile. In Fig. 5 and Fig. 6, the axon bundles (x) run down passing by adjacently both outsides of the paired beginning parts of the giant axons (gx) which are buried in the dorsal area of the deuto- or the tritocerebral neuropile.

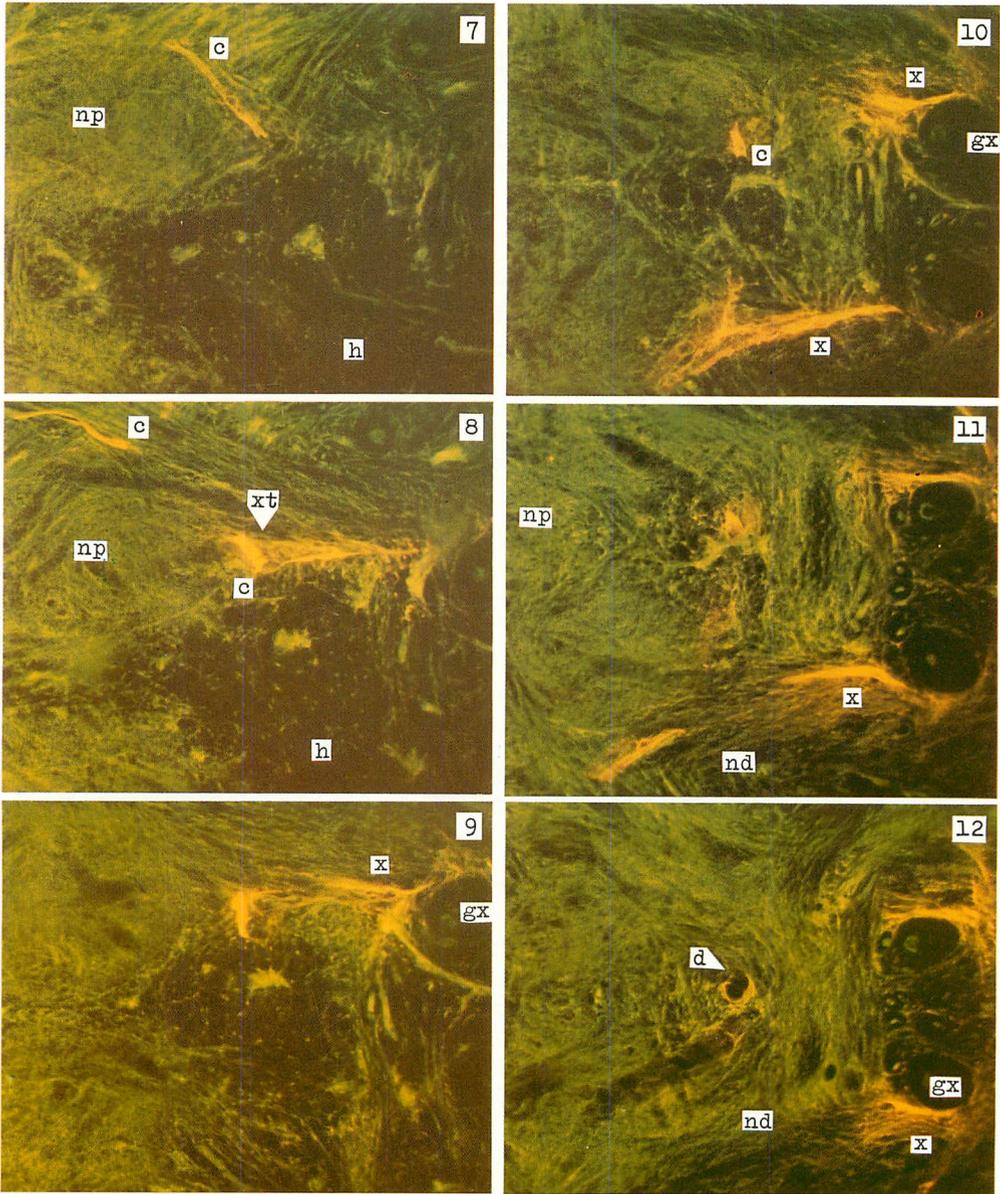


り順次水平切面で追跡した連続像である。該当軸索束は Fig. 8 においてその末端部位が確認され、Fig. 7 に認められる像 (C) は他の由来にもとづく神経軸索か、或いは脈管系の一部であろうと解される。Fig. 10, 11 および 12 では該当軸索束が左右の対をなす巨大軸索起始部の外側に各々、近接して通過する様子が示される。なお Fig. 12 において中央付近に認められる、正中線上の小孔 (d) は当該神経節の膜内腔および神経嚢内部にまで入り組んだ発達を示す脈管系の一部の断面像である。

考 察

甲殻類十脚目での中枢神経系における神経繊維連絡は従来、BETHE⁷⁾、HELM⁸⁾ 等により *Carcinus*, *Astacus*, *Palaemon* その他の食道上神経節を始めとして、渡銀法或いは主としてメチレン青法を用いた報告がなされ、一方近年 STRETTON and KRAVITZ⁹⁾、KENNEDY et al.⁹⁾、SANDEMAN and OKAJIMA¹⁰⁾ 等により *Procambarus*, *Scylla* その他の食道上神経節或いは腹髄神経索における特定細胞への色素注入による選択的な染色法が、プロシオン黄もしくは塩化コバルトと微小電極の応用により実施され、いづれの場合にもいくつかの神経節細胞に関してはその軸索走向が明らかにされた。ところでクルマエビの神経節内の軸索連絡に関しては同種での知見に乏しく、よってその検討に当たっては他種における結果と比較することに依った。即ち KRIEGER¹¹⁾ の *Astacus* では gz 5, BETHE⁷⁾ の *Carcinus* では *Cellulae inferiores mediales* そして TURNER¹²⁾ の *Cambarus* では *Ventral nidus* 等の各細胞集団が分布位置的にクルマエビの VP 細胞集団に相応するもので、BETHE は該当細胞集団における構成細胞のいくつかに関して軸索追跡を行ない、軸索に第1触角と腹髄へ向う両者を同定し、さらにその樹状突起が第1および第2触角に関わる神経嚢と連絡することを示している。又、HELM⁸⁾ も *Scyllarus* において第1および第2触角に関わる神経嚢への連絡を認めている。さてクルマエビにおいて PAS 細胞は VP 細胞集団の前方寄りに位置する中形細胞であるが、該当部位の細胞群はその軸索束の大半を前脳神経嚢 *protocerebral neuropile* の背域に送ることから、PAS 細胞は一つに前脳の機能、即ち視神経節と連絡した視覚ニューロンおよび嗅葉と連絡した嗅覚ニューロン等の情報処理機能さらにはより高次な連合統合機能¹³⁾¹⁴⁾ と関連することが考えられる。他方、十脚目の神経嚢には豊富な脈管系の存在が MATSUMOTO¹⁵⁾、SANDEMAN¹⁶⁾、ABBOTT¹⁷⁾ 等により *Eriocheir*, *Carcinus* において確認されており、此に Fig. 7, 8 その他 12 までにおいて示される (c) 要素を脈管系の一部と解釈すると、当該軸索束の末端部は前脳背域における脈管と連絡することも考えられ、PAS 細胞が

Fig. 7—12 Successional horizontal sections of the dorsomidline area of the neuropile of supraoesophageal ganglion. In Fig. 8, the axon terminals (xt) are observed to connect with another component (c) which may be a large axon or a vascular duct. In later figures, the axon bundles pass by adjacently both outsides of the paired beginning parts of the giant axons (gx) which fall in the neuropile deeply. Abbrev., c: another axon or a vascular duct, d: duct of the vascular system in the neuropile, gx: beginning part of the giant axon, h: haemocoel, nd: neuropile of the deutocerebrum, np: neuropile of the protocerebrum, x: axon bundles, xt: axon terminals.



神経液性的機能を果たすか、脈管系の機能に關与する可能性も皆無ではない。いづれの場合にしても当該細胞は同神経節内に終る介在性ニューロンの範疇に入るものと判断される。さて注入実験の技術面に関しては、設定条件が充分には整わず、回路の電気抵抗が低いことを主な原因と考えられる、充填色素の微小電極内での沈着が通電中、度々生じた。その際はあらたな電極を以て再挿入の操作によったが、特に長時間(4~7 hrs.)標本では電極挿入細胞以外の近隣細胞およびその軸索にも遺漏色素の拡散にもとづく可染像が示されたので、結果的には少数の例外を除いては単一軸索ではなく軸索束の走向を觀察することとなった。

要 約

1. クルマエビの食道神経節の後部腹面正中線上に位置する VP 細胞集団の PAS 細胞に關して軸索追跡を試みた。軸索染色は微小電極によるプロシオン黄の細胞内注入法を適用し、通電終了の後、パラフィンの組織標本を作成した。なお觀察は 450 nm 波長帯の励起螢光像によった。

2. VP 細胞集団にあつて、その前方寄りに位置し、PAS 細胞を含む中形細胞群はその軸索束を背前方の(内側)巨大軸索の起始部外側を近接通過させた後、前脳部位の神経氈背域へ送ることが確認された。

3. PAS 細胞は一つに前脳部位の中枢機能に關与することが推察され、他方脈管系の機能に關連する可能性も否定出来ないが、いづれにせよ当該細胞は神経節内に終る介在性ニューロンに屬することが判明した。

文 献

- 1) 中村 薫(1974): クルマエビの神経分泌に關する研究-I 食道および眼柄内神経節に分布する神経節細胞集団の位置的關係。鹿大水紀要, **23**, 173-184.
- 2) 中村 薫(1974): クルマエビの神経分泌に關する研究-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。同上, **23**, 185-193.
- 3) 中村 薫(1978): クルマエビの神経分泌に關する研究-XII PAS 細胞の微細構造。同上, **27**, 1-7.
- 4) STRETTON, A. O. W., and E. A. KRAVITZ (1968): Neuronal geometry: Determination with a technique of intracellular dye injection. *Science*, **162**, 132-134.
- 5) ILES, J. F., and B. MULLONEY (1971): Procion yellow staining of cockroach motor neurones without the use of microelectrodes. *Brain Research*, **30**, 397-400.
- 6) 金子章道(1974): プロシオンイエローを用いた細胞内染色法。生体の科学, **25**, 244-250.
- 7) BETHE, A. (1897): Das Centralnervensystem von *Carcinus maenas*. Ein anatomisch-physiologischer Versuch. I. Theil, I. Mittheil. *Arch. mikr. Anat.*, **50**, 460-546.
- 8) HELM, F. (1928): Vergleichend-anatomische Untersuchungen über das Gehirn, insbesondere das Antennalganglion der Dekapoden. *Z. Morph. Ökol. Tiere*, **12**, 70-134.
- 9) KENNEDY, D., A. I. SELVERSTON and M. P. REMLER (1969): Analysis of restricted neural networks. *Science*, **164**, 1488-1496.
- 10) SANDEMAN, D. C., and A. OKAJIMA (1973): Statocyst-induced eye movements in the crab *Scylla serrata*. III. The anatomical projections of sensory and motor neurones and the responses of the motor neurones. *J. Exp. Biol.*, **59**, 17-38.
- 11) KRIEGER, K. R. (1880): Ueber das Centralnervensystem des Flusskrebsses. *Z. Wiss. Zool.*, **33**, 527-594.
- 12) TURNER, C. H. (1901): The mushroom bodies of the crayfish and their histological en-

- vironment. *J. Comp. Neurol.*, **11**, 321-368.
- 13) BULLOCK, T. H., and G. A. HORRIDGE (1965): "Structure and Function in the Nervous Systems of Invertebrates", vol. 2, W. H. FREEMAN and Company, San Francisco and London, 1009-1030.
 - 14) 久田光彦・山口恒夫 (1975): 無脊椎動物の生物電気. in "生物電気"(岩瀬善彦・玉置三男・古河太郎編), 南江堂, 東京, 375-409.
 - 15) MATSUMOTO, K. (1954): Neurosecretion in the thoracic ganglion of the crab, *Eriocheir japonicus*. *Biol. Bull.*, **106**, 60-68.
 - 16) SANDEMAN, D. C. (1967): The vascular circulation in the brain, optic lobes and thoracic ganglia of the crab *Carcinus*. *Proc. R. Soc. Lond.*, **B 168**, 82-90.
 - 17) ABBOTT, N. J. (1971): The organization of the cerebral ganglion in the shore crab, *Carcinus maenas*. II. The relation of intracerebral blood vessels to other brain elements. *Z. Zellforsch.*, **120**, 401-419.