

培養後根神経節を用いた急性砒素中毒の 病理組織学的研究

川崎医科大学 人体病理学教室 (I)

中野 滋子, 調 輝 男

(昭和60年7月15日受付)

Histopathological Studies of Cultured Dorsal Root Ganglia in Acute Arsenical Neuropathy

Shigeko Nakano and Teruo Shirabe

Department of Human Pathology
Kawasaki Medical School

(Accepted on July 15, 1985)

マウス後根神経節の培養を行い、三酸化砒素 (As_2O_3) の影響を位相差顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いて、病理組織学的に検討した。

成熟培養組織に 10^{-7} M から 10^{-8} M 濃度の三酸化砒素を投与し、3日間継時的に観察を行った。

10^{-6} M 以上の濃度で、形態学的な変化を認めた。

神経細胞では、初期変化として Golgi 装置の膨化と小空胞の出現が顕著であった。その後、小胞体の配列の乱れと膨化がおこり、大空胞が形成された。神経細胞と比較して、衛星細胞は侵襲をうけにくかった。

軸索と髄鞘では、最初に神経細線維の走行の乱れと神経微小管の消失が認められ、続いて、髄鞘の解離が生じた。変性が進行すると、myelin ovoid, myelin debris が Schwann 細胞の細胞質内に観察された。

以上より、三酸化砒素による急性中毒の末梢神経障害は、軸索変性が主体であることが示唆された。

The effects of arsenic acid (As_2O_3) on cultured mice dorsal root ganglia were examined histopathologically with phase-contrast and transmission electron microscopes.

Mature organotypic cultures of mice dorsal root ganglia were incubated in media containing arsenic acid at concentrations of 10^{-7} M to 10^{-8} M for 3 days.

When ganglia were treated with arsenic acid concentrations above 10^{-6} M, pathological changes were recognized.

Prominent swelling of the Golgi apparatus and the appearance of small vesicles were the earliest ultrastructural changes. Next neuronal soma showed

disarrangement and dilation of the endoplasmic reticulum. Finally, large vesicles were observed. Satellite cells were the last part of the ganglia to break down.

Early changes in myelinated fibers were formation of densely packed neurofilaments and loss of microtubules. These were followed by splitting of myelin lamellae. Finally, many myelin ovoids and myelin debris were observed in Schwann cell cytoplasm.

These results indicate that peripheral nerve degeneration in acute arsenic neuropathy is compatible with axonal degeneration.

Key Words ① Arsenical neuropathy ② Dorsal root ganglia ③ Tissue culture ④ Axonal degeneration

はじめに

砒素は、自然界の至る所に存在している元素であり、用い方により、医薬としての性質または毒物としての性質をとることが昔から知られている。毒物としての性質としては、殺虫剤、農薬、含有食品などによって、砒素中毒が生じる。

ヒトの砒素中毒の末梢神経障害の病理学的研究では、軸索と髄鞘の両方に等しく変性変化を認めたもの^{1),2)} teasing 法あるいは電顕的観察により軸索変性の存在を報告するもの³⁾⁻⁵⁾ 軸索変性が主で一部節性脱髄があると報告するもの⁶⁾ がある。実験的には、組織培養法で、吉岡⁷⁾ が、亜砒酸ナトリウム (NaAsO_2) を用いて、 5×10^{-6} M 投与の場合は Waller 型、 3×10^{-6} M 投与の場合は軸索変性と一部の節性脱髄よりなるとする報告があるにすぎない。変性過程、また、それに伴う微細構造の変化についての研究は、現在までのところあまりなされていない。

今回、我々は、三酸化砒素 (As_2O_3) を使用して、とくに、環境要因を制限し、直接神経組織に及ぼす影響を調べるために、神経組織培養法を用いて、急性砒素中毒における末梢神経組織の病理学的検索を行ったので報告する。

材料と方法

1) 神経組織培養法

無菌的に胎生17日の DS マウスから後根神経節を摘出し、できるだけ被膜を除去した。前

もってコラーゲン (和光) 処理した 35 mm の Falcon tissue culture dish に後根神経節を 2 個ずつ置き、95% air, 5% CO_2 , 37°C 下で培養を行った。

培養液は、Eagle's MEM, 牛胎児血清 (30%), 50% 鶏胚抽出液 (10%), グルコース (6 mg/ml), 7S-Nerve Growth Factor (Collaborative Research, Lexington, Mass.) (15U/ml) となるように混合したのを用い、週に 2 回交換を行った。

2) 砒素中毒実験法

約 4 週後、髄鞘が完成した時点で、状態良好と思われる組織を選択し、砒素剤を投与した。各投与群に対して、シャーレを 3 枚ずつ用意し、3 回実験を繰り返した。砒素剤は、三酸化砒素をリン酸緩衝液 (PBS) で溶解して、最終濃度が 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M となるように、また、対照群では PBS を培養液に添加して 3 日間継続的に観察を行った。なお、この間培養液の交換は行わなかった。

3) 形態観察法

培養組織は、倒立位相差顕微鏡を用いて光顕的に観察を行い、必要に応じて固定後、透過型電子顕微鏡で観察した。後者のために、培養組織は 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後固定を 60 分、4°C 下で行った。25%~100% エタノール系列にて脱水後、Epon 812 で包埋した。Porter Blum MT 2B 超ミクロトームで超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛の電子染色を

行った。観察には、日立 HU12A 電子顕微鏡を 75 kV で使用した。

結 果

I. 対 照 培 養

成熟培養神経組織を電顕的に観察を行うと、後根神経節神経細胞には、神経細線維の少ない小型の神経細胞と、神経細線維の多い大型の神経細胞が認められた。小型神経細胞の小胞体 (ER) の槽がほぼ平行に配列しているのに比べて、大型神経細胞では不規則に配列していた。細胞質ではその他に、Golgi 装置、ミトコンドリア、ライソゾーム、神経微小管、heterogeneous body が見られた。核は、普通円形であるが、しばしば陥入を認めた。衛星細胞は、神経細胞を完全に取り囲み、基底膜によって覆われていた。

髄鞘では、lamellar structure, mesoaxon, Schmidt-Lanterman 切痕, Ranvier 絞輪などが認められ、これらは、in vivo での形態によく類似していた。しかし in vitro での神経細胞の大きさ、髄鞘の直径、internode の長さなどは、in vivo でのものより小さかった。

II. 実 験 培 養

1) 10^{-3} M 投与群

急激な変化を示し、24時間後には、すべての細胞に高度の変性がみられた。

2) 10^{-4} M 投与群

光顕的観察では、投与1時間後、組織周辺部の non-neuronal cell (線維芽細胞, Schwann 細胞) で顆粒状化がみられた。3時間後、神経細胞も軽度顆粒状化を示した。9時間後、non-neuronal cell は、顆粒状化の進行とともに、扁平から球状へと形態の変化がみられ、浮遊壊死細胞も出現した。神経細胞では顆粒状化の進行、空胞化、核の濃縮を認めた。一部の髄鞘に限局性膨化がみられた。24時間後、髄鞘は、断裂、崩壊像を示した。

3) 10^{-5} M 投与群

光顕的観察では、投与6時間後、一部の神経細胞に、ごく軽度な顆粒状化がみられた。9時間後、non-neuronal cell で顆粒状化を、また、一部の髄鞘でごく軽度な限局性膨化を示した。24時間後、神経細胞で軽度顆粒状化、空胞化、核の濃縮を認めた。48時間後、軽度から高度までの異なる変性段階を示す神経細胞が混在していた (Fig. 1A)。髄鞘も様々で、限局性膨化、一部断裂、崩壊像がみられた (Fig. 1B)。72時間後高度変性を示す細胞が増加した。

この 10^{-5} M 投与群で、とくに詳細に電顕的観察を行った。

神経細胞の初期変化として、Golgi 装置の軽度膨化と小空胞の出現がみられた (Fig. 2)。その後、核の偏位、核小体の凝集がみられ、Golgi

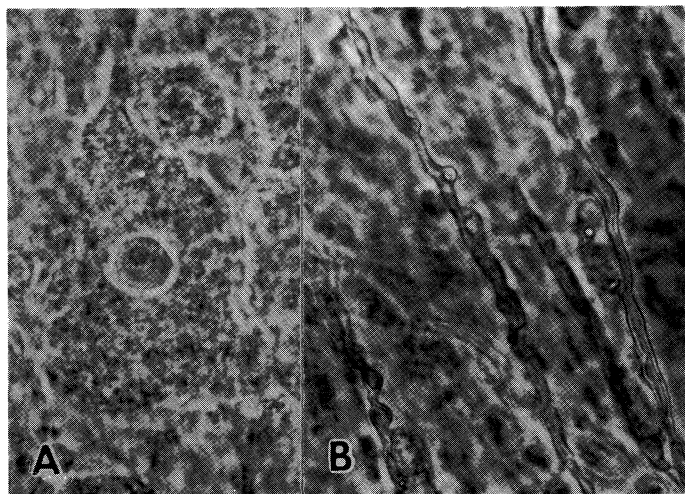


Fig. 1. Phase-contrast micrographs of DRG cultured for 48h with 10^{-5} M As_2O_3 showing marked degeneration.

(A) Neuronal soma contains a pyknotic nucleolus and granular cytoplasm.

×680.

(B) Myelin ovoids of various size and myelin debris are observed in myelinated fibers. ×680.

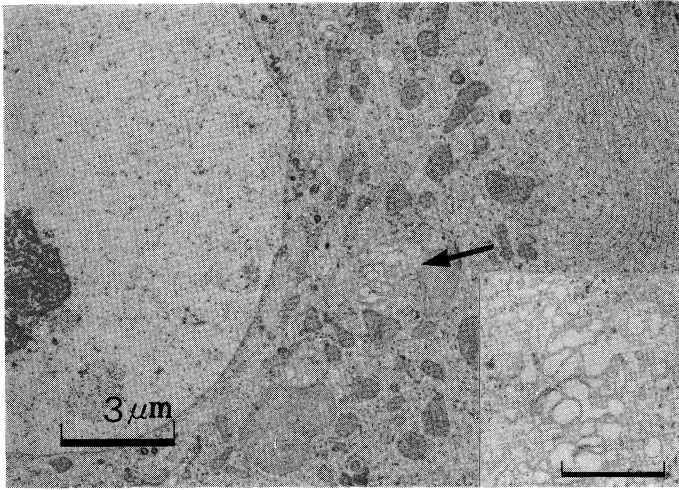


Fig. 2. Electron micrograph of neuronal soma 24h after 10^{-5} M As_2O_3 administration showing mild swelling of the Golgi apparatus and small vesicles. $\times 4,800$.

Inset shows the swollen Golgi apparatus from arrow with higher magnification. $\times 12,800$.

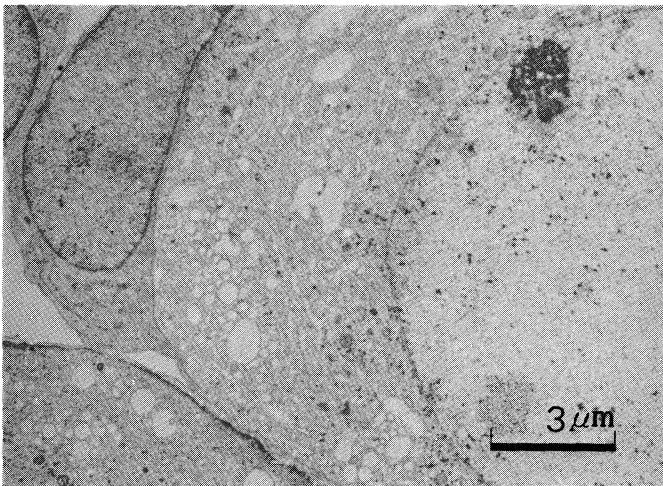


Fig. 3. Electron micrograph of neuronal soma 48h after 10^{-5} M As_2O_3 administration showing swelling of the Golgi apparatus, dilated ER and condensed nucleolus. No remarkable changes are observed in Satellite cell. $\times 5,280$.

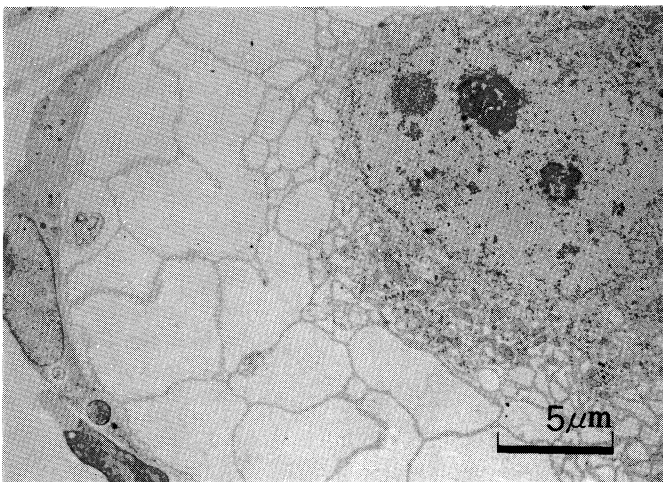


Fig. 4. Electron micrograph of neuronal soma 48h after 10^{-5} M As_2O_3 administration showing larger vesicles. Mitochondria are well preserved. $\times 3,300$.

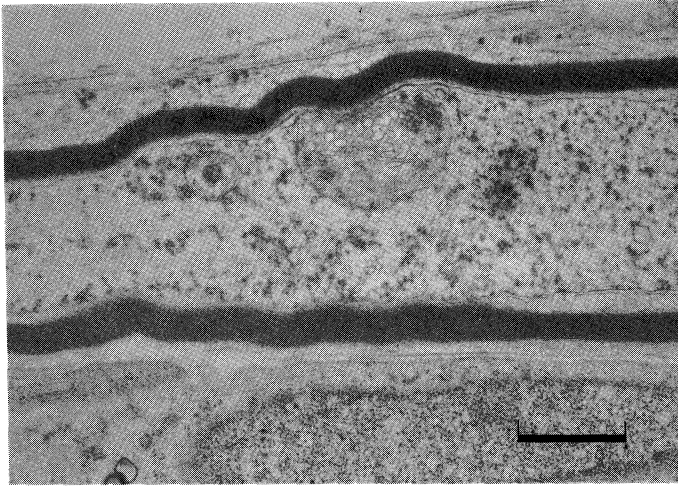


Fig. 5. Electron micrograph of a longitudinal section of myelinated fiber 48h after 10^{-5} M As_2O_3 administration showing masses of densely packed neurofilaments and loss of microtubules. $\times 14,400$.

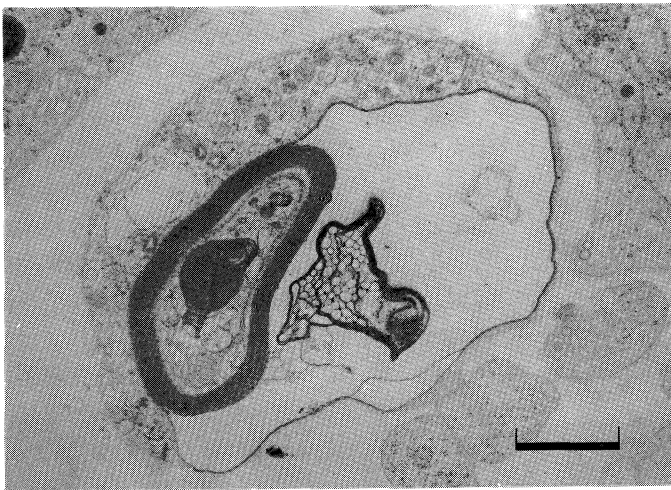


Fig. 6. Electron micrograph of across section through a myelinated fiber 48h after 10^{-5} M As_2O_3 administration showing splitting of myelin lamellae. $\times 13,200$.

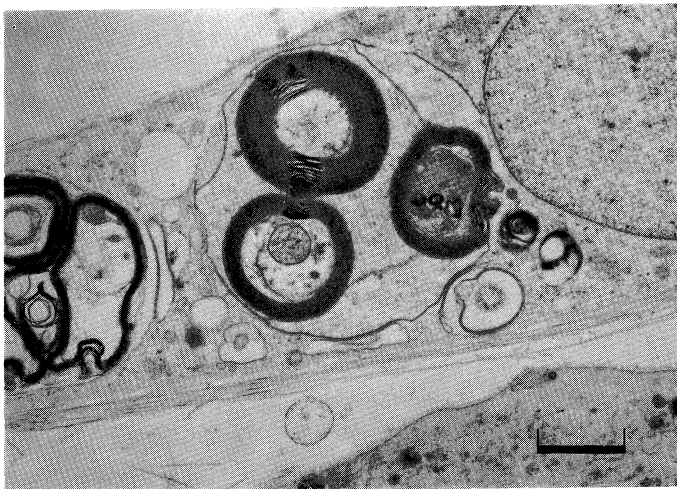


Fig. 7. Electron micrograph of a longitudinal section of myelinated fiber 48h after 10^{-5} M As_2O_3 administration showing myelin ovoids in Schwann cell cytoplasm. $\times 10,560$.

装置の膨化と ER の膨化が顕著になった (Fig. 3). ごく少数の神経細胞では、空胞形成を伴わずに、ミトコンドリア内膜の破壊をみた。この時期、衛星細胞では、変化は観察されなかった。変性が進行すると、Golgi 装置と ER の配列の乱れ、膨化による空胞が増加して、しばしば細胞質周辺部に大空胞が認められた (Fig. 4). 神経微小管、神経細線維、リボゾームは減少するが、ミトコンドリアは比較的保持されていた。衛星細胞は神経細胞に比べて損傷が少なく、神経細胞が死滅しても残存していた。

軸索の初期変化では、神経微小管の消失と神経細線維の乱れ、凝集がみられた (Fig. 5). さらに変性が進行すると、軸索中にミトコンドリア、dense body の集積がみられた。軸索の膨化、また、軸索に顕著な変化がある髄鞘で、髄鞘層板間、髄鞘軸索間の解離が観察された (Fig. 6). 高度変性像として、Schwann 細胞の細胞質中に、myelin ovoid, myelin debris の形成が認められた (Fig. 7).

4) 10^{-6} M 投与群

光顕的観察では、投与24時間後、一部の神経細胞で顆粒状化、核の濃縮がみられ、一部の髄鞘で軽度限局性膨化がみられた。また、non-neuronal cell で顆粒状化を認めた。72時間後、高度変性を示す神経細胞、また、髄鞘の断裂、崩壊が観察されるが、変化のない神経細胞、髄鞘も存在した。

5) 10^{-7} M 投与群

検索期間中、光顕的にも電顕的にも変化は観察されなかった。

考 察

今回の実験では、 10^{-3} M, 10^{-4} M 三酸化砒素投与の際は、24時間以内にすべての細胞に壊死をおこした。 10^{-5} M 投与群は、72時間では、軽度から高度までの様々な段階の変性変化が混在していた。また、 10^{-6} M 投与群では、大多数の神経細胞と髄鞘に変化を認めたが、一部変化のないものも存在した。 10^{-7} M 投与群では、検索期間後も1週間まで継続して観察を行った

が、変化はみられなかった。以上より、in vitro では、三酸化砒素濃度が 10^{-6} M 以上のとき急性中毒を示すと考えられた。

10^{-5} M 投与群は、変性の進行速度が中程度であり、急性中毒の変性過程をとらえる上で最も適当であると考えられた。まず、神経細胞に顆粒状化がみられ、続いて核の濃縮、軸索の変化がおこり、髄鞘の限局性膨化が生じた。軸索、髄鞘の変化は神経細胞に比しやや変性の出現期が遅いものの、一旦変性が始まると進行は急速であり、髄鞘の断裂、崩壊が生じた。その後、神経細胞の崩壊がおこった。

電顕的観察を行うと、神経細胞では、まず、Golgi 装置の膨化と小空胞の出現がみられ、その後、核の偏位、核小体の凝集がおこった。Golgi 装置と ER での配列の乱れ、膨化が進行し、大空胞となった。

軸索と髄鞘の微細構造変化は、神経微小管の消失と神経細線維の走行の乱れが最初に観察された。次に、ミトコンドリア、dense body の集積といった変化が生じて、軸索自体も膨化をおこし、変性が進行した。それに伴い、髄鞘層板間で、または、髄鞘と軸索間で解離が生じた。髄鞘の解離と破壊は広まり、こわれた断片は、myelin ovoid, myelin debris として集まった。この myelin ovoid, myelin debris は、Schwann 細胞の細胞質内に存在した。つまり、髄鞘の構造変化は、軸索の変化より遅く生じた。

神経組織培養法を用いた本実験から、三酸化砒素による急性中毒は、原発性に神経細胞と軸索を障害し、それに付随して髄鞘に障害をおこしたと考えられた。以上より、軸索変性であることが示唆された。

末梢神経における砒素中毒では、動物実験は非常に発症し難いためか報告がなく、組織培養法で、吉岡⁷⁾ が軸索変性と節性脱髄の混在を報告しているにすぎない。一方砒素中毒の臨床例における末梢神経病理組織像では、Heyman¹⁾ は、髄鞘の断裂、消失と軸索の崩壊を、Chhuttani²⁾ は、有髄神経線維の減少と軸索の断裂といったように、軸索と髄鞘の両方で

変性変化を報告している。また、teasing 法により、Dyck ら³⁾と Lequense ら⁴⁾は、軸索変性を報告している。Ohta⁵⁾は、電顕的に有髄神経線維の減少を認め、軸索変性が主体であると考えており、onion-bulb structure も認めている。田淵ら⁶⁾は、有髄神経線維の減少、髄鞘の変性および軸索の断裂、消失がみられ、軸索変性が主であったが、一部で節性脱髄を認めたと報告している。節性脱髄のみの報告はない。

過去において、以上のように報告がなされており、砒素中毒に関する病理学的統一見解は出されていない。臨床例における teasing 法では、末梢部のごく一面をみているにすぎないという問題がある。試料作製法の問題に加えて、砒素以外の環境要因や、急性中毒と慢性中毒の違いなども統一見解が得られない原因であると思われる。その点、今回用いた神経組織培養法は、外的要因を制限した非常に単純化したモデルである。本実験から、三酸化砒素によっておこる急性中毒は、軸索変性が主体であり、臨床例では、前述の他の要因が加わることによって節性脱髄が生じたものと推測された。

衛星細胞は、神経細胞の変性がかなり進行しても変化が認められず、最も侵襲をうけにくい細胞であった。これに対し、吉岡⁷⁾は、最も侵襲をうけやすい細胞であると報告している。本実験では、三酸化砒素を使用したのが、吉岡の実験では、亜砒酸ナトリウムを用いたという違いはある。砒素剤の相異だけでこのように衛星細胞の感受性に差が生じたとは考え難く、疑問が残った。

生化学的な立場から砒素中毒をみても、砒素は SH 基と反応して pyruvate dehydrogenase activity⁸⁾と heme biosynthetic pathway⁹⁾を抑制する。つまり、ATP 生産を抑制し、細胞呼吸を阻害するといわれている。in vitro の実験で、ミトコンドリアが砒素による損傷に非常に感受性が高いことが報告されている。^{10)~16)} Fowler ら¹⁷⁾は、超微形態学的手法と生化学的手法を組み合わせて、ラット肝臓のミトコンドリアへの影響を調べている。その結果、ミトコンドリアの膨化を観察し、この変化は mitochondrial marker enzyme である monoamine oxidase (MAO) と cytochrome oxidase (CO) の感受性があると報告している。Mohelská ら¹⁸⁾は、マウスの肝細胞で、急性中毒ではミトコンドリアの軽度なうねりと核膜の陥入がみられ、ER の変化はわずかであったと報告している。神経組織では、吉岡⁷⁾が、神経細胞の胞体内にライソゾーム由来と思われる dense body や ER の拡張と思われる小空胞が出現したが、ミトコンドリアは比較的良く保たれていたと報告している。先に呈示したごとく、我々の実験においても初期変性の際は、大多数の神経細胞ではミトコンドリアの変化は少なく、ごく少数で観察されるのみであった。これに比し、超微形態的に明らかであったのは、Golgi 装置と ER の膨化であり、吉岡の報告と一致している。当初の予想と異なり、ミトコンドリアに優位な変化がみられなかった理由は明らかでないが、エネルギー代謝障害における神経細胞の脆弱性とも関連するのかもしれない。

文 献

- 1) Heyman, A., Pfeiffer, J. B., Willett, R. W. and Taylor, H. M.: Peripheral neuropathy caused by arsenical intoxication. A study of 41 cases with observations on the effects of BAL (2, 3, dimercapto-propanol). N. Engl. J. Med. 254: 401-409, 1956
- 2) Chhuttani, P. N., Chawla, L. S. and Sharma, T. D.: Arsenical neuropathy. Neurology 17: 269-274, 1967
- 3) Dyck, P. J., Gutrecht, J. A., Bastron, J. A., Karnes, W. E. and Dale, A. J. D.: Histologic and teased-fiber measurements of sural nerve in disorders of lower motor and primary sensory neurons. Mayo Clin. Proc. 43: 81-123, 1968

- 4) Lequense, P. M. and Mcleod, J. G.: Peripheral neuropathy following a single exposure to arsenic. *J. neurol. Sci.* 32: 437—451, 1977
- 5) Ohta, M.: Ultrastructure of sural nerve in case of arsenical neuropathy. *Acta Neuropathol.* 16: 233—242, 1970
- 6) 田淵保則, 荻野純子, 高橋和郎, 矢島一枝, 田辺 等: Arsenical polyneuropathy の2症例. *臨床神経* 21: 165—171, 1981
- 7) 吉岡 亮: 神経組織培養法の神経毒性研究への応用. 砒素中毒と Neurolathyrism の解析. *神経進歩* 26: 1113—1122, 1982
- 8) Siller, C. M., Fowler, B. A. and Woods, J. S.: Effects of arsenic on pyruvate dehydrogenase activation. *Environ. Health Perspect.* 19: 205—207, 1977
- 9) Woods, J. S. and Fowler, B. A.: Effects of chronic arsenic exposure on hematopoietic function in adult mammalian liver. *Environ. Health Perspect.* 19: 209—213, 1977
- 10) Azzone, G. F. and Ernster, L.: Compartmentation of mitochondrial phosphorylations as disclosed by studies with arsenate. *J. biol. Chem.* 236: 1510—1517, 1961
- 11) Chan, T. L., Thomas, B. R. and Wadkins, C. L.: The formation and isolation of an arsenylated component of rat liver mitochondria. *J. biol. Chem.* 244: 2883—2890, 1969
- 12) Crane, R. K. and Lipmann, F.: The effect of arsenate on aerobic phosphorylation. *J. biol. Chem.* 201: 235—243, 1953
- 13) Estabrook, R. W.: Effects of oligomycin on the arsenate and DNP stimulation of mitochondrial oxidations. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 4: 89—91, 1961
- 14) Kagawa, Y. and Kagawa, A.: Accumulation of arsenate-76 by mitochondria. *J. Biochem. (Tokyo)* 65: 105—112, 1969
- 15) Ter Welle, H. F. and Slater, E. C.: Uncoupling of respiratory-chain phosphorylation by arsenate. *Biochim. Biophys. Acta* 143: 1—17, 1967
- 16) Wadkins, C. L.: Stimulation of adenosine triphosphatase activity of mitochondria and sub-mitochondrial particles by arsenate. *J. biol. Chem.* 235: 3300—3303, 1960
- 17) Fowler, B. A., Woods, J. S. and Shiller, C. M.: Ultrastructural and biochemical effects of prolonged oral arsenic exposure on liver mitochondria of rats. *Environ. Health Perspect.* 19: 197—204, 1977
- 18) Mohelská, H., Bencko, V., Smetana, K. and Hynčica, V.: Ultrastructural changes in hepatocytes of mice exposed to arsenic in drinking water. *Exp. Pathol.* 18: 275—281, 1980