

原 著

末梢自律神経の終末装置の組織学的構造

1. モルモット瞳孔括約筋

笹 本 真理子

山梨医科大学眼科学教室

抄 録：モルモットの瞳孔括約筋およびその周辺組織を、グルタルアルデヒドで灌流固定した後、60℃に加温した濃苛性ソーダ (7.2gmNaOH を30ml の蒸留水に溶かす) で、16分間処理して、結合組織、特にその線維成分を除去した。標本作製過程にこの操作を加えることによって、神経突起と膠細胞 (Schwann 細胞) が形成する網目構造の立体微細構造を走査型電子顕微鏡の下に可視化できた。

- 1) 瞳孔括約筋では末梢自律神経の終末部は網状をなしていた。この部の神経は、Schwann 細胞とニューロンの神経突起からできていた。
- 2) 末梢自律神経の終末部では、Schwann 細胞は髄鞘を形成しない。Schwann 細胞は個々に独立しているが、細胞質の突起は隣接するもの同士、互いに接して全体としては「Schwann 細胞の網目」を形成していた。
- 3) ニューロンの神経突起は、集合して束をなし、Schwann 細胞におおわれるが、ところどころ剥き出しになっていた。単一の神経突起が裸のまままで走行することがあった。

本研究において走査型電子顕微鏡写真で示された、瞳孔括約筋およびその周囲の自律神経の終末装置の構造は、Hillarp が自律神経基礎網 (autonomic groundplexus) と名づけて提唱したものにほぼ一致する。

キーワード 自律神経基礎網, 瞳孔括約筋, 走査型電子顕微鏡

I. 緒 言

眼科領域において走査型電子顕微鏡を用いた研究は、多数発表されているが、末梢自律神経の終末装置については、従来の方法では観察が極めて困難であったために、詳しい報告はいまだにみあたらない。著者らは、末梢自律神経の終末装置の微細構造を解明する目的で、モルモットの瞳孔括約筋およびその周囲の神経網を走査型電子顕微鏡で観察した。そのために結合

組織・基質除去法を若干、工夫した。また他に、Champy-Maillet (ZIO) 法、透過型電子顕微鏡法も行ない、走査型電子顕微鏡による所見を検証した。瞳孔括約筋は主として副交感神経の節後ニューロンを含むという¹⁾。Olson ら¹⁾は、最近、虹彩の神経の形態について、網羅的な総説を発表した。しかし、走査型電子顕微鏡による知見が欠如しており、また「Cajal の間質細胞」についての理解が不十分である。

著者らは、瞳孔括約筋を研究する一方で、比較のために腸管神経系に属するモルモットの十二指腸の深筋層神経叢、および交感神経に属する副腎髄質の節前ニューロン (preganglionic fibers) をはじめとして、いくつかの器官の自

律神経を同様の方法で観察している。これらについては続編として改めて報告し、あわせて、「Cajalの間質細胞」について医学史的な考察を発表する²⁾。

II. 材料と方法

(1) 実験動物

本実験には Hartley 系の雄モルモット (体重 200~400gm) を使用した。実験動物業者から購入したモルモットを、山梨医科大学実験動物センターの通常条件 (室温: 20°C ± 3°C, 湿度: 50% ± 10%, 12時間照明, 換気回数: 12~15回/h, all fresh and all out, 日本農産Gスタンダード飼料) で飼育して実験に供した。実験は、朝10時前後に開始した。

(2) 走査型電子顕微鏡法

エーテル麻酔下のモルモットにヘパリン (日本薬局方 ヘパリンナトリウム注射液) を体重 1 kg あたり1000単位静脈内注射した。開胸後、胸部大動脈を切断していったん瀉血した。上行大動脈を心膜横洞の高さで結紮。一方では胸部大動脈の近位切断端にポリエチレンチューブを挿入し、このポリエチレンチューブを通じて Ringer 液、次いで 2.5% グルタルアルデヒド液 (1/15M リン酸緩衝液) を灌流して、モルモットの頭、頸部の諸組織と一緒に虹彩を固定した。通常の手術器具を用いて眼球を摘出し、実体顕微鏡下に虹彩を剖出した。固定後の虹彩は、2.5% グルタルアルデヒド液の中に1週間以上、貯蔵してから濃い苛性ソーダ液 (7.2gm NaOH を 30ml 蒸留水を加える) に、60°C, 16分間漬けた。以下、Murakami の方法³⁾に従い、タンニン酸、オスミウム酸などで導電染色を施した後、脱水、臨界点乾燥、イオンコーティング等の通常の過程を踏んで、走査型電子顕微鏡 (JSM-T220, 日本電子社) で観察した。

(3) 透過型電子顕微鏡法

走査型電子顕微鏡法の場合と同様に 2.5% グルタルアルデヒド液で虹彩を固定した。1% オスミウム酸での後固定、0.5% 酢酸ウラニウ

ムでのブロック染色の後、エタノール系列で脱水し、プロピレンオキシドで処理の後に Spurr 樹脂に包埋した。超薄切片を 1% 酢酸ウラニウムと Millonig 鉛液で 2重染色して、日立 H-700型電子顕微鏡で観察した。

透過型電子顕微鏡による観察に先だち、透過型電子顕微鏡用に固定、包埋した標本を約 1 μm 厚のいわゆる semi-thin section とし、トルイジン青で染色して、光学顕微鏡で観察した。

(4) Champy-Maillet 法

Taxi⁴⁾ の Champy-Maillet 法を用いた。通常 ZI 液 4 ml に対し、O 液 1 ml を混合した染色液で良好な結果を得た。新鮮な組織片を ZIO 液の中で約 1 日間ブロック染色し、鋭利なピンセットで解きほぐし whole-mount preparation として光学顕微鏡で観察した。

III. 結 果

1. Semi-thin Section の観察結果

第 1 a 図は眼球を縦断した際の虹彩の光学顕微鏡の写真であり、透過性電子顕微鏡用の超薄切片を切るのに先だって作製したいわゆる semi-thin section を、トルイジン青で染色したプレパラートから撮影した。瞳孔括約筋の筋線維束の間隙には、毛細血管や有髄神経線維を認めた。虹彩支質の間質の膠原線維と線維芽細胞の同定は通常容易であった。

2. Champy-Maillet 法による観察結果

第 1 b, c 図は Champy-Maillet 法で染めた虹彩に含まれていた瞳孔括約筋およびその周辺組織の光学顕微鏡写真である。Champy-Maillet 法は末梢自律神経系の染色法として広く使用されている方法であり、瞳孔括約筋についてもその神経要素の染め出しは容易であった。しかし実験室の温度 (20°C が標準)、ZI 液と O 液の比 (著者らは通常 4 : 1 の比率で混合した)、pH (少量のトリスバッファーを添加する) 等の条件を変えることによって、可視化される組織・細胞要素の種類を変化させることができた。第 1 b, c 図に示すプレパラートでは、

Schwann 細胞の核，細胞質および髓鞘，神経突起（樹状突起と軸索が必ずしも明瞭に区別できないため，神経細胞の突起を神経突起という言葉で表現することにする。）およびその終末の数珠状に並ぶ膨大部がほぼ特異的に染まって

いた。線維芽細胞の核も見えるが，プレパラートの厚みのために，その細胞質の輪郭の識別は不可能であった。神経要素については良く染まっているものと，染まっていないものがあることが分かった。Champy-Maillet 法は，こ

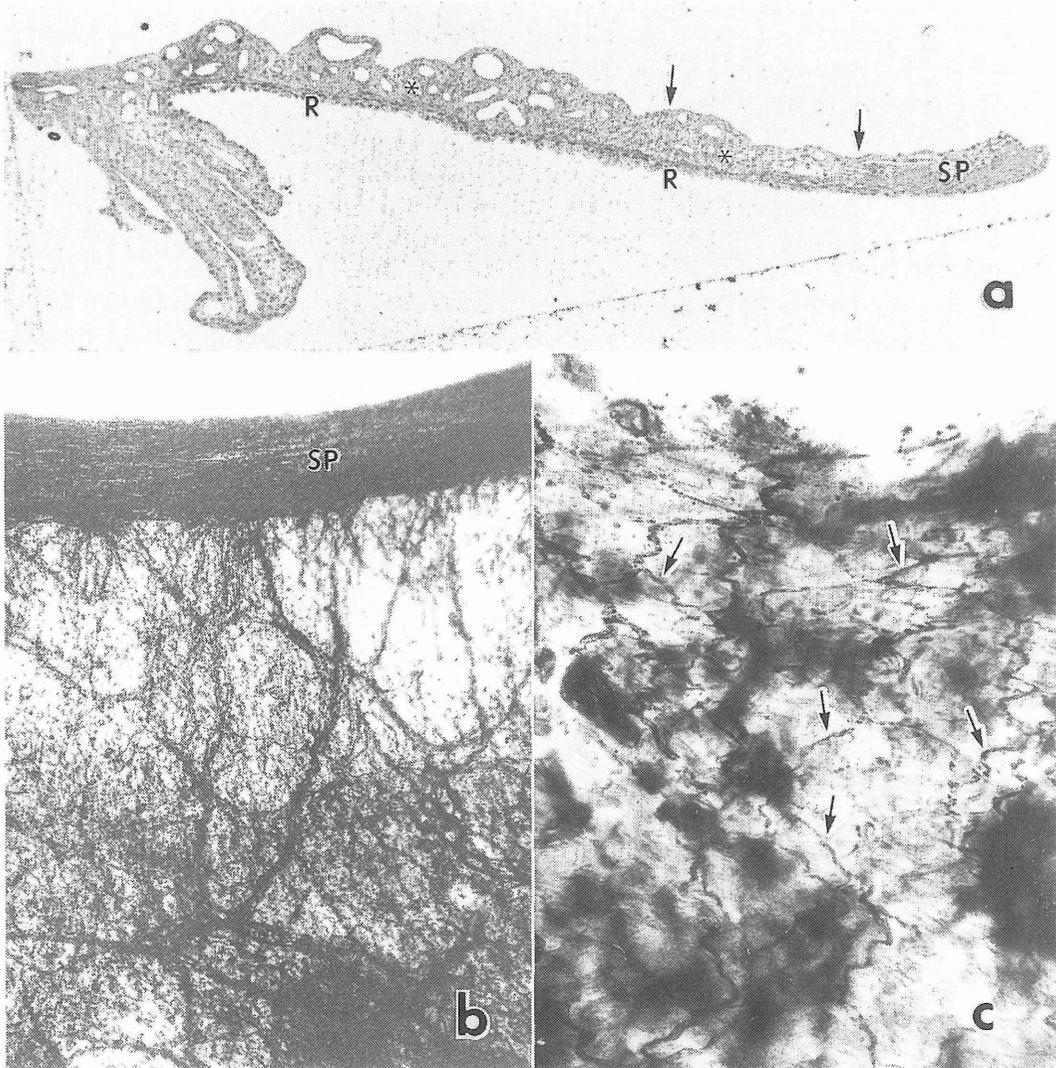


図 1. モルモットの虹彩の概観.

- a. 虹彩の断面。前房内皮(矢印)，虹彩支質(星印)，瞳孔括約筋(SP)，色素上皮層(R)の位置関係がわかる。毛様体の一部が左下に見える。灌流固定法を行なったので，血液は洗い出され血管は拡張している。トルイジン青染色。 X70.
- b. Champy-Maillet 法で神経を染色した虹彩の whole-mount preparation. 神経の網状構造を示す。瞳孔括約筋の領域(SP)は瞳孔を取り囲む黒い帯のようにみえる。 X70.
- c. 瞳孔括約筋をピンセットでほぐして神経網を剖出した。神経突起の束(矢印)が網目を作っている。黒い塊は取り残した色素上皮層の組織。 X300.

の種の染色むらを呈する性質をもっていることが、経験的に知られた染色法であるから、染色された神経要素の形態の解釈にあたっては、この点に特に留意するように心がけた。Champy-Maillet 染色を行なった虹彩の観察から、虹彩支質には直径 $1\mu\text{m}$ 以下のものから、 $10\text{--}20\mu\text{m}$ に及ぶ様々の太さの神経束が、網目を作っているのを見ることができた。瞳孔散大筋のある虹彩辺縁部では、直径 $10\mu\text{m}$ 前後の太い神経束が数 μm 間隔の網目を作り、さらに直径 $2\text{--}3\mu\text{m}$ または直径 $1\mu\text{m}$ 以下の神経線維または、神経束が $10\mu\text{m}$ 以下の間隔の細かな網をなしていた。直径 $10\text{--}20\mu\text{m}$ の太い神経束には有髄神経線維と共に無髄神経線維が混ざっていた。直径 $2\text{--}3\mu\text{m}$ または $1\mu\text{m}$ 以下の細い神経束は、主に無髄線維から成っていた (図 1 b, c)。虹彩の中心部の瞳孔括約筋の領域には、多数の神経線維が分布するため、Champy-Maillet 染色を行なった標本で、瞳孔括約筋の分布域を限定することができた (図 1 b)。虹彩辺縁部の太い神経束は、中心部に向かって伸びて瞳孔括約筋の神経に移行していた。瞳孔括約筋の中および周囲には、あまりにも多くの神経が密集しており、whole-mount preparation では、個々の神経の網目構造の観察が困難であった。しかし、色素上皮層をピンセットで除去し、また、細い針で瞳孔括約筋を解きほぐすことによって、瞳孔括約筋の内部の神経の網目構造を剖出することができた (図 1 c)。瞳孔括約筋に分布する神経突起のなかには、束をなさずに、単独で走行するものが多数認められた。

3. 走査型電子顕微鏡法による観察結果

第 2 a, b, c ; 3 a, b 図は、瞳孔括約筋 第 2 a, b, c ; 3 a, b 図は、瞳孔括約筋の中およびその周囲の神経の立体微細構造を示す走査型電子顕微鏡の写真である。本研究では、約 60°C に温めた濃苛性ソーダ液で虹彩組織中の結合組織線維、膠原線維および基底膜を除去することによって、細胞成分を可視化できた。走査型電子顕微鏡では、有髄神経線維と無髄神経線維の同定は、その太さから容易であった。有

髄神経線維では、Ushiki and Ide⁵⁾が報告しているような Schwann 細胞表面の格子模様が観察できた。Ushiki and Ide⁵⁾によればこの模様は Schwann 細胞の細胞質が一部に集まって髄鞘の外側に縦横の縞模様を形成したものである。無髄神経では、Schwann 細胞が神経突起を保護するように外側から被っている様子が観察できた。無髄神経はしばしば三叉または四叉に分枝・吻合していた。瞳孔括約筋およびその周辺では、Schwann 細胞の突起が互いに吻合して、神経網の骨格 (枠組みまたは支柱) を形成しているようにみえた。数珠状の膨大部をもつ神経突起の末端部は、Schwann 細胞が作る骨格に絡まっていた。その際、多くの神経突起は通常は束になり、ひとつの Schwann 細胞に被われていたが、なかには Schwann 細胞から離れた「裸の神経突起」もあった。このような独立の神経突起は、平滑筋線維の間質にもみられた。毛細血管の外壁には周皮細胞 (pericyte) が認められた。平滑筋細胞と線維芽細胞の区別は容易であった。

4. 透過型電子顕微鏡法による観察結果

第 4 a, b, c, d 図には透過型電子顕微鏡でみた神経要素を示す。透過型電子顕微鏡では、有髄神経線維、無髄神経線維、平滑筋細胞、線維芽細胞等の細胞成分と膠原線維、弾性線維、基底膜等の非細胞成分の断面の微細構造を観察できた。瞳孔括約筋の中では、神経突起はしばしば単一となり、しかも Schwann 細胞の鞘を失って、平滑筋細胞と直接、接していた。平滑筋細胞と神経突起の細胞膜同士が、わずかに 20nm 程度の間隙を、残しているだけのことがあった。この場合、神経突起と平滑筋線維との間に基底膜が介在していなかった (図 4 c, d)。平滑筋細胞の間の「裸の神経突起」の微細構造は変化に富んでいた。そして第 4c 図には多数のミトコンドリアを含む神経突起の断面を、また第 4 d 図には小型芯なし小胞を多数含む神経突起の断面を示す。

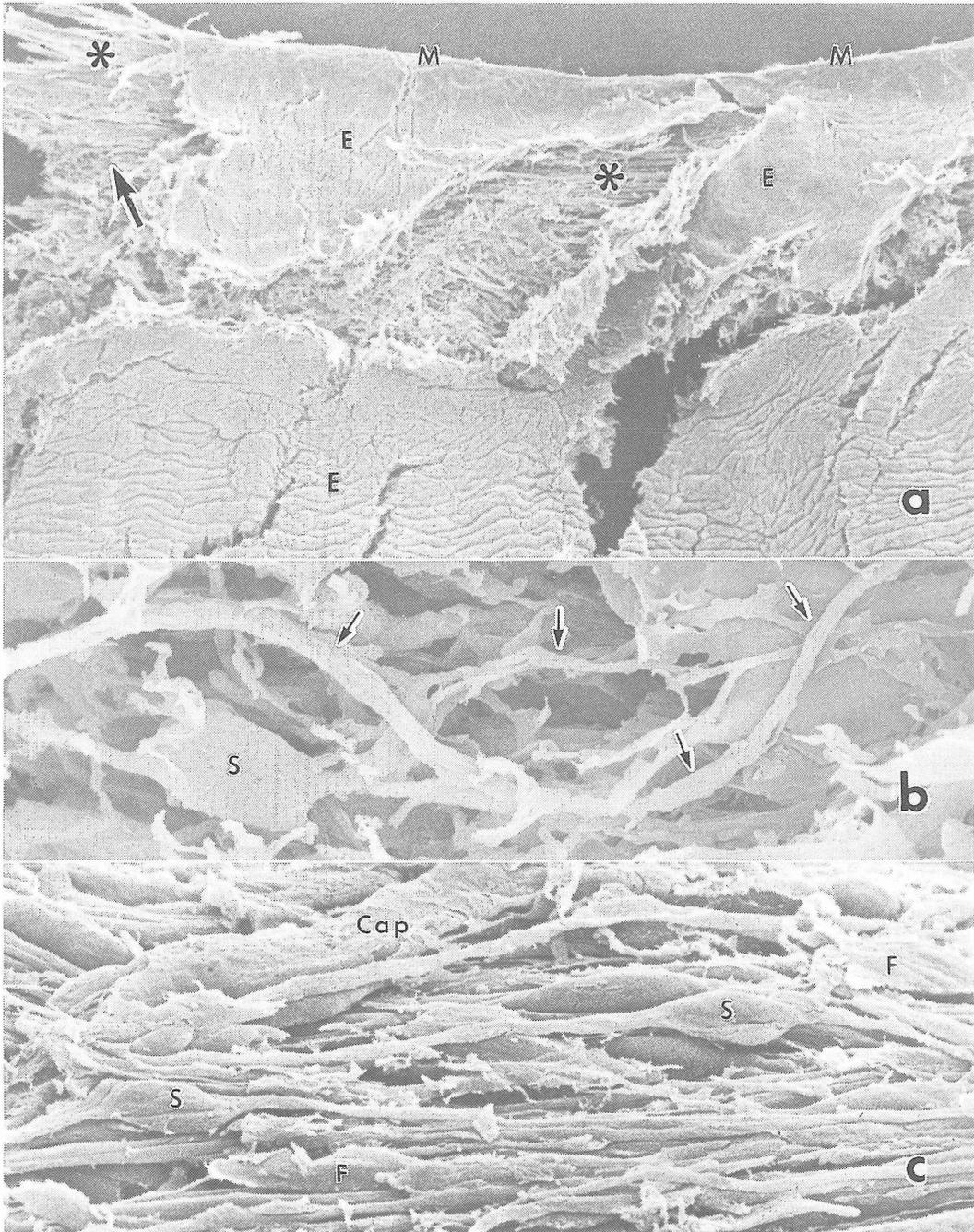


図2. 虹彩の走査型電子顕微鏡写真.

- a. 後房側から見たモルモットの虹彩の瞳孔縁(M)近傍. 色素上皮層(E)を剥離できたところでは, 間質中の瞳孔括約筋(矢印)が認められる. 矢印の部分をも b 図にて拡大する. X150.
- b. 瞳孔括約筋内に分布する無髄神経の網目. a 図の矢印で指す部位の拡大写真. Schwann 細胞(S)に支えられた神経突起の束(矢印)がみえる. X2500.
- c. 瞳孔括約筋. 毛細血管(Cap)と Schwann 細胞(S)がみえる. 線維芽細胞をFで標識する. X2000.

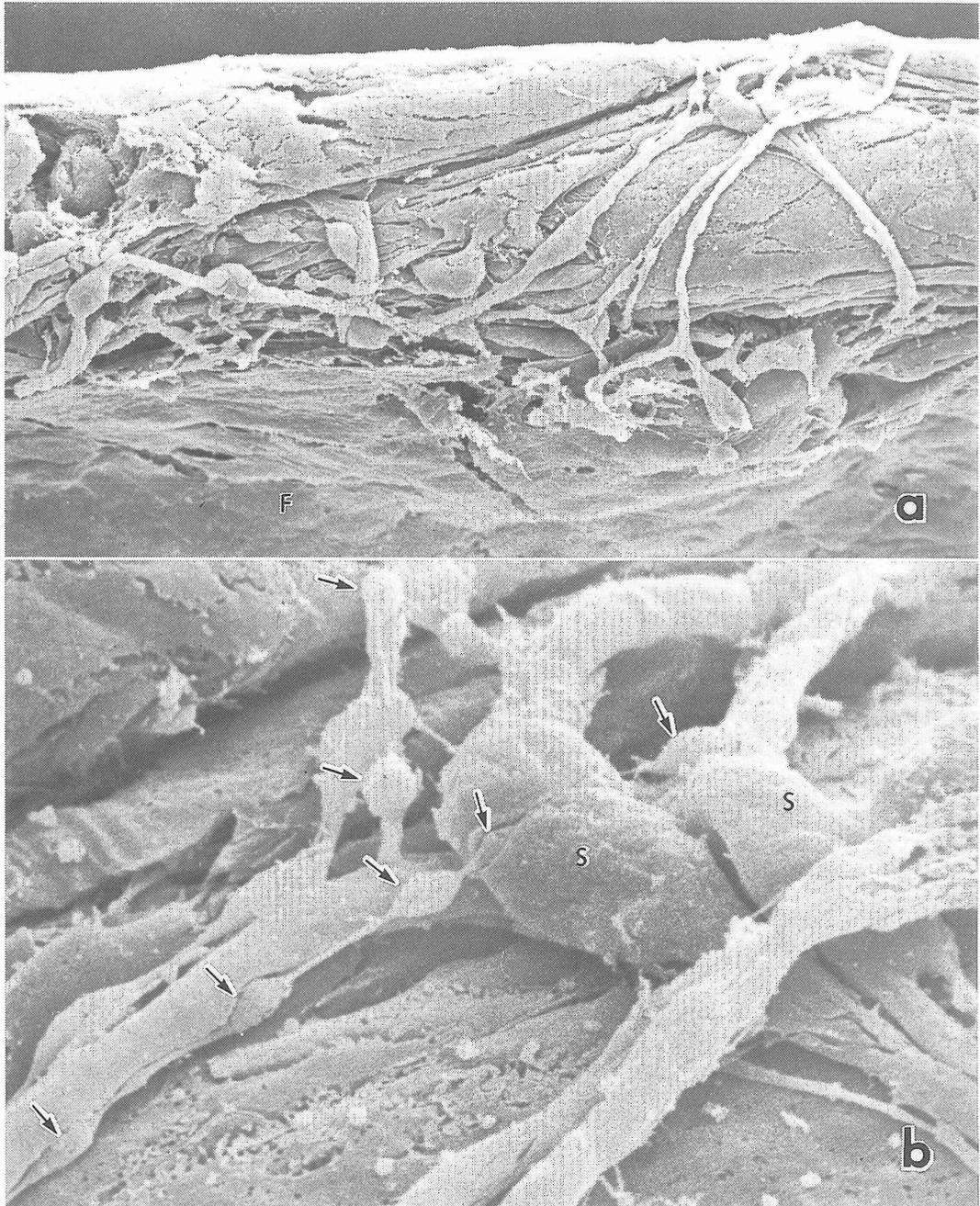


図3. 瞳孔括約筋を取り囲む無髄神経の網目。

a. 無髄神経の Schwann 細胞とニューロンの神経突起。ここではモルモットの虹彩を前房側から見ている。前房を形成する虹彩支質の線維芽細胞(F)が脱落した部位で無髄神経の網目が見える。X1200。

b. 瞳孔括約筋の周囲の無髄神経。aの一部を強拡大した数珠状の膨大部をもった神経終末が Schwann 細胞(S)に支持されている様子が見える場所がある。

Schwann 細胞から離れた裸の神経突起(矢印)が認められる。

X5500。

IV. 考 察

瞳孔括約筋および瞳孔散大筋を含む虹彩は、末梢自律神経の終末装置の研究モデルとして頻繁に使用されてきた¹⁾。本研究で著者らは、モルモットの瞳孔括約筋およびその周辺組織を、グルタルアルデヒドで灌流固定した後、濃苛性ソーダで処理して、結合組織特にその線維成分を除去した。この標本作製法によって、神経突起と膠細胞が形成する網目構造の立体微細構造が、走査型電子顕微鏡の下に可視化されてきた。著者らが知る限り、過去に虹彩の神経網の微細構造を、走査型電子顕微鏡で詳しく観察した報告はみあたらない。本研究で用いられた苛性ソーダによる組織消化法は、簡便であり複雑な器具を必要としないところから応用範囲は広いと思われる。

第5図は、瞳孔括約筋、毛細血管およびその周皮細胞と自律神経の終末装置との関係を示す半膜式図である。瞳孔括約筋およびその周囲の末梢自律神経の立体微細構造は、以下のように要約される。

1. 末梢自律神経の終末部では神経は網状をなす。この部の神経は、Schwann細胞とニューロンの神経突起からなる。
2. 末梢自律神経の終末部で、Schwann細胞は髄鞘を形成しない（無髄）。Schwann細胞は個々に独立しているが、細胞質の突起は隣接するもの同士、互いに接して全体としては「Schwann細胞の網目」を形成する。
3. ニューロンの神経突起は、集合して束をなしSchwann細胞におおわれるが、ところどころ剥き出しになっている。単一の神経突起が裸のみまで走行することがある。

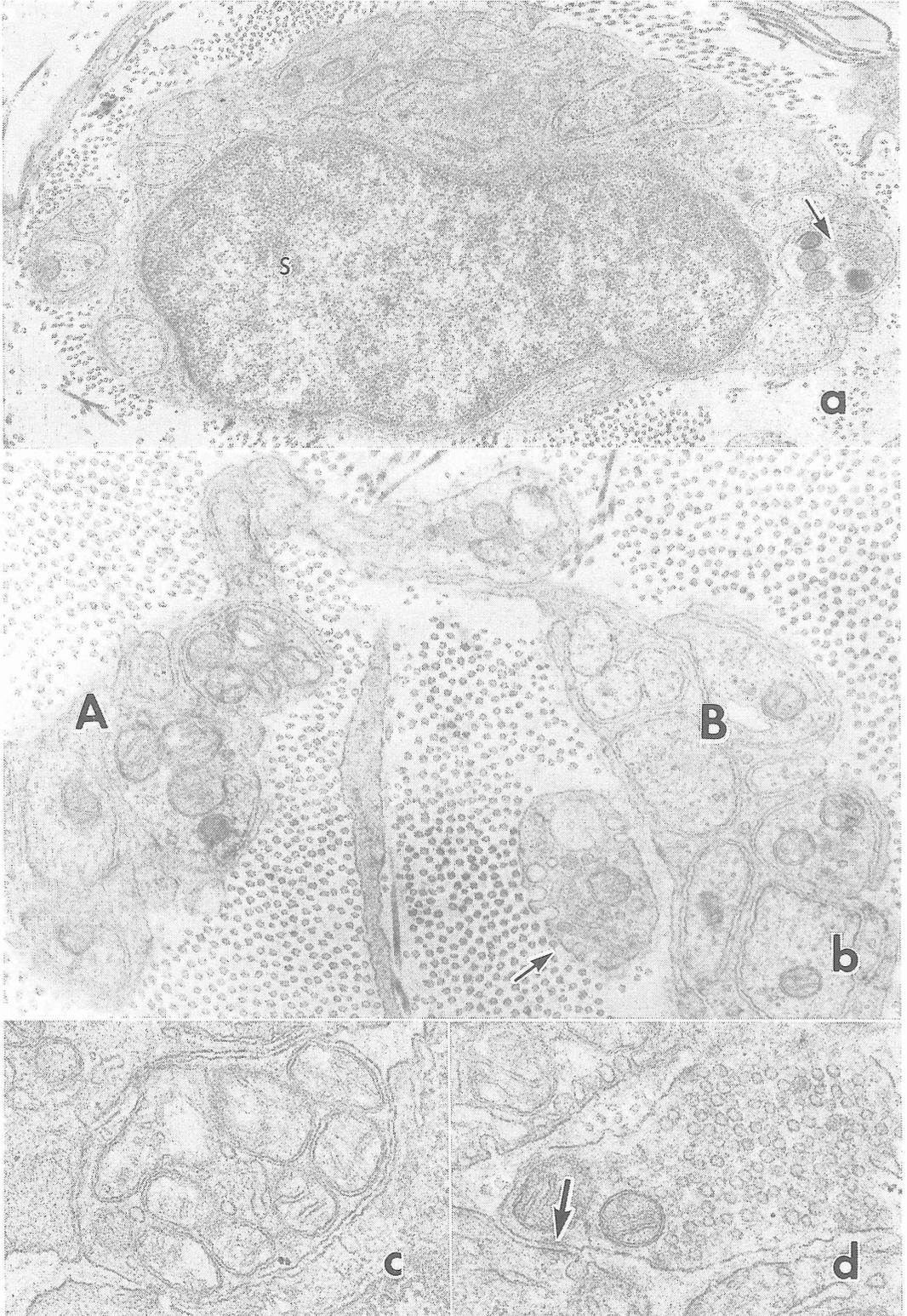
以上述べた瞳孔括約筋およびその周囲の自律神経の終末装置の構造は、Hillarp^{6,7)}が自律神

経基礎網（autonomic groundplexus）と名づけて報告したものに近い。Hillarp^{6,7)}によれば自律神経基礎網では、異なる多数のニューロンの突起が、Schwann細胞によって束ねられており、この神経束が、枝分かれと吻合をくり返して網目を作っている。効果器である平滑筋細胞などは、この神経網の網目の中に、はまり込んでいる。Hillarp^{6,7)}は個々の神経細胞の独立性を認めた。しかも、終末装置の網目構造の中においては、多数のニューロンが長い距離にわたって、接触して平行に走る現象を説明した。しかし、Hillarp^{6,7)}は、Schwann細胞が互いに癒合して形質胞体（plasmodium）をなしていると述べていること、およびCajal⁸⁻¹⁰⁾の間質細胞をSchwann細胞と考えた点で誤っている（続編²⁾を参照）。

眼科領域において、特に瞳孔括約筋に限っても、診療に使用される向自律神経剤は多い。それらの作用機序を考える際に、末梢自律神経の終末装置が、特有の網目構造をなす事実を念頭におくことは有用であろう。ただし、神経突起は終末部においても独立しており、異なるもの同士が、癒合することはないと思われる²⁾。

本実験は山梨医科大学動物実験指針に沿って行われた。

謝辞：御指導いただいた塚原重雄教授（本学眼科学教室主任）に深謝する。小林 繁教授（本学解剖学教室主任）の校閲を受けた。走査型電子顕微鏡の操作にあたっては木村久美子技官（本学電子顕微鏡室）の協力を得た。ここに記して感謝の意を表す。尚、本論文の要旨は、平成元年10月21日、第42回日本自律神経学会総会（東京）で発表した。



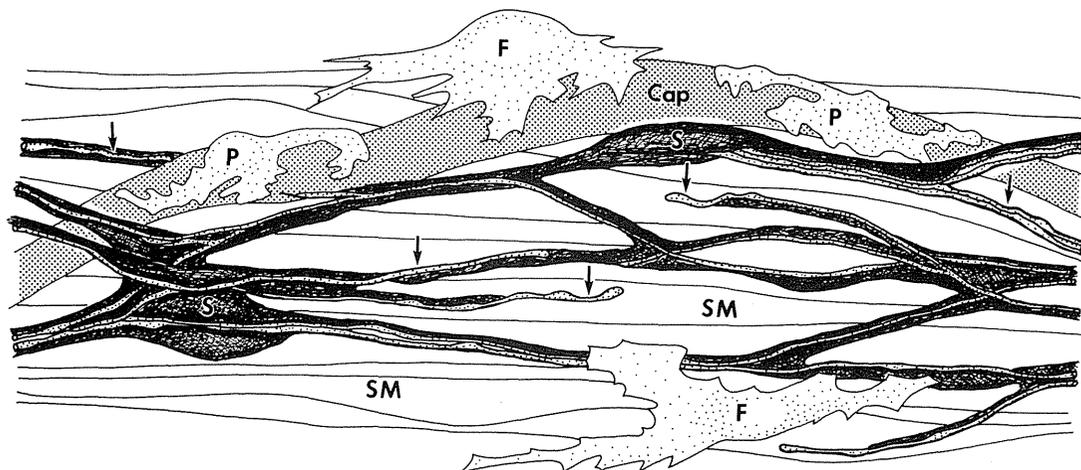


図5. 瞳孔括約筋内の自律神経の終末装置の組織学的構造を示す半模式図。本図は走査型電子顕微鏡による多数の写真の観察所見を統合して作った。Schwann細胞の核周囲部(S)、神経突起(矢印)、線維芽(様)細胞(F)、毛細血管(Cap)およびその周皮細胞(P)と共に瞳孔括約筋の平滑筋線維(SM)を示した。



図4. 瞳孔括約筋に分布する無髄神経の透過型電子顕微鏡写真。

- a. ニューロンの神経突起をおおう Schwann 細胞(S)。矢印で示す神経突起の断面では多数のシナプス小胞が詰まっている。 X15000.
- b. 瞳孔括約筋傍の無髄神経。無髄神経束が2本の枝(A, B)に分かれる分岐点の断面。矢印で指し示す構造は平滑筋細胞または線維芽細胞であろう。 X25000.
- c. 瞳孔括約筋の間質に出現した神経終末。多数のミトコンドリアを含む。神経終末と平滑筋細胞の間に基板が認められないことに注意。 X40000.
- d. 瞳孔括約筋の間質に出現した単独の神経線維。数珠状の神経膨大部に相当する構造。2個のミトコンドリアと共に多数の小型芯なし小胞を含んでいる。この神経終末と平滑筋細胞との間に一種の接装置が形成されている(矢印)。 X40000.

文 献

- 1) Olsom L. Ayrer-Le Lièvre C. Björklund H. Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol 6: The Peripheral Nervous System. Elsevier Science Publishers B. V., 1988; 545-597.
- 2) 笹本真理子, 木村久美子, 小林 繁, 塚原重雄. 末梢自律神経の終末処置の組織学的構造 2. 最近の形態学研究に基づく「Cajalの間質細胞」の本体についての医学史的考察. (投稿中)
- 3) Murakami T. A revised tannin-osmium method for non-coated scanning electron microscope specimens. Arch Histol Jap 1974; **36**: 189-193.
- 4) Taxi J. Contribution à l'étude des connexions des neurones moteurs du système nerveux autonome. Ann Sci Nat Zool 1965; **7**: 413-674.
- 5) Ushiki T. Ide C. Scanning electron microscopic studies of the myelinated nerve fibers of the mouse sciatic nerve with special reference to the Schwann cell cytoplasmic network external to the myelin sheath. J Neurocytol 1987; **16**: 737-747.
- 6) Hillarp N-Å. Structure of the synapse and the peripheral innervation apparatus of the autonomic nervous system. Acta Anat (Basel) [Suppl] 1946; **4**: 1-153.
- 7) Hillarp N-Å. The construction and functional organization of the autonomic innervation apparatus. Acta Physiol Scand [Suppl] 1959: 138-157.
- 8) Cajal SR. Nuevas aplicaciones del metodo de coloracion de Golgi. Sobre la red nerviosa ganglionar de las vellosidades intestinales. Gac Med Cat 1889; **12**: 614-616.
- 9) Cajal SR. Sur les ganglions et plexus nerveux de l'intestin. CR Soc Biol (Paris) 1893; **45**: 217-223.
- 10) Cajal SR. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertebres. Maloine. Paris. 1911.

Histological Structures of the Peripheral Autonomic Innervation Apparatus.

1. A Scanning Electron Microscopic Study of the Musculus Sphincter Pupillae in the Guinea-pig.

Mariko Sasamoto

Department of Ophthalmology, Yamanashi Medical College, Tamaho, Yamanashi, Japan.

Structures of the peripheral autonomic innervation apparatus in and around the musculus (m.) sphincter pupillae were investigated by light and transmission/scanning electron microscopy. Light microscopy of the Champy-Maillet (zinc iodide-osmium tetroxide: ZIO)-stained tissue preparations, showed dense nerve-fiber networks, consisting of a Schwann cell framework and neuronal projections. A few myelinated nerve fibers were present. Scanning electron microscopy revealed the three-dimensional architecture of the nerve networks. For better visualization of the cellular elements, a digestion method, using concentrated sodium hydroxide at 60°C, was employed to remove the collagenous and elastic fibers and basement membranes in the tissues. Schwann cells projected several cytoplasmic processes that were attached to each other and made a framework supporting the varicose and non-varicose neuronal processes. A Schwann cell frequently ensheathed more than ten neuronal processes. Varicose neuronal processes occasionally ran without a Schwann cell sheath in the connective tissue space between the smooth muscle fibers. Transmission electron microscopy of the ultrathin sections of the glutaraldehyde/osmium tetroxide fixed iris revealed ultrastructures of the nerve fibers and smooth muscle cells. Direct contacts between naked neuronal varicosities and smooth muscle fibers were frequently seen.

Concerning the fundamental histology of the peripheral autonomic innervation, the "autonomic groundplexus theory" proposed by Hillarp (1946, 1959) appears valid. Thus, in the groundplexus, nerve fibers apparently ran parallel in the smallest nerve bundles and remained independent in the terminal portion.

Key words: autonomic groundplexus, musculus sphincter pupillae, scanning electron microscopy