

神経髄鞘のX線回折的研究

金沢大学大学院医学研究科解剖学講座(指導 本陣良平教授)

平 松 京 一

(昭和38年12月16日受付)

神経線維の髄鞘が同心状に軸索を取り囲む多層構造よりなり、この層構造が交互に配列した protein 層と lipid 層とからなるとの推定が、偏光顕微鏡およびX線回折法による検索に基づいてすでに1930年代に述べられた (Schmidt, 1935, 1936, a, b, 1937 a, b; Schmitt, Bear & Clark, 1935; Schmitt, Bear & Palmer, 1941). 1950年代に入り、電子顕微鏡(以下電顕と略記)が髄鞘の微細構造検索に導入され、髄鞘は電子密度大な暗層(周期線)と、その間に挟まれた明層が交互に並んだ板層構造として観察され、明層の中央に電子密度やや大ないま一つ別な薄い暗層(周期間線)が存在することが明らかにされた(本陣, 1961; 本陣 & 中村, 1963参照).

周知のように、現段階においては、新鮮髄鞘をそのまま電顕下に観察することは極めて困難である。生物試料の超薄切片による電顕検索には、試料の固定・脱水・包埋・薄切などの操作が必要であり、電顕下では上記の操作により高度に変形した状態を観察していることは想像に難くない。事実髄鞘の板層構造の単位周期に例をとると、Finean et al. (1953), 本陣 (1959)らによつて指摘されたように、新鮮材料のX線回折法による場合と、固定包埋材料の電顕検索による場合とで、その値に著しい差異が見られる。

最近の電顕による神経線維微細構造の検索は、その髄鞘の板層構造が、末梢神経では Schwann 氏細胞、中枢神経では稀突起膠細胞の細胞膜が螺旋状に軸索を取り巻いて形成されることを明らかにした(本陣, 1961; 本陣 & 中村, 1963参照)。近年細胞膜の分子構造が生物学の重要課題として注目されているが、髄鞘が鞘細胞の細胞膜に連続し、これの重積したものである以上、髄鞘の分子配列を知ることは、生体機能に重要な役割を演じている細胞膜構造理解の有力な手掛りを与えるものといわねばならない。しかし、髄鞘の分子構成や分子配列については、なお不明の点が多く、研究はようやく最近緒についたばかりの感が深い。髄鞘

の分子構造、特に新鮮状態におけるこの超微構造の検索には、X線回折法はきわめて有力で、特にX線小角散乱法(以下単にX線回折と記載した場合、X線小角散乱を示すものとする)が、格子間隔の関係上、これに適し、電顕検索による結果との対比は、正常髄鞘構造解析の、最も有力な手段と考えられる。著者は従来の写真法によるX線回折実験に加うるに、近年開発された counter 法を用いて、回折波の示す回折角の正確な測定を行なうことにより、正常髄鞘の超微構造、ならびに電顕試料作製過程の構造変化を検し、回折実験の示す所見にX線結晶学的解析を試み、髄鞘の分子構成を明らかならしめんとしてこの研究を行なった。

材料及び方法

実験材料として、成熟ハツカネズミ(純系 KH-3種)の坐骨神経を使用した。新鮮材料検索の場合には坐骨神経4本をとり出し、ただちに Ringer 氏液に浸して、 $1 \times 1 \times 10$ mm の試料台に平行に挿入し、その外気に接する面を合成樹脂の薄膜(マイラー)およびゴムパッキングをもつて密封した。電顕対照実験においては、上記の試料に、次のような処理を順次加えた。(a) 中性 OsO_4 固定: Palade (1959) による, veronal-acetate 緩衝, 1% OsO_4 液 (pH 7.25) を用い、氷室内で4時間固定、後蒸留水で1時間水洗。(b) 脱水: 順次高濃度の ethanol 系列を通して脱水。(c) 包埋: methacrylate 樹脂 monomer に、重合促進剤として benzoyl peroxide を 2.5% 加えたものに試料を浸してガラス管に封入し、 50°C の孵卵器中に24時間放置して重合包埋した。検索は固定・脱水・包埋の各段階において行なつたが、固定後水洗した試料は蒸留水に浸したまま、上記のように試料台に密封し、脱水した試料は 100% ethanol に浸して密封した。また脱水後包埋した試料はそのまま試料台に挿入した。これら一連の処理を施した試料のほかに、Luft (1956) による veronal-acetate 緩衝 0.6% KMnO_4 液

X-ray Diffraction Studies of the Structure of Nerve Myelin Sheath. Kyoichi Hiramatsu, Department of Anatomy (Director: Prof. R. Honjin), School of Medicine, Kanazawa University.

(pH 7.25) で 4 時間固定 (氷室内) した試料を, 1 時間蒸留水で洗った後, 蒸留水に浸して上記同様試料台に密封した. 以上のように試料を挿入した試料台は, 試料が垂直になるような方向に回折装置に固定した.

X 線回折装置としては, 理学電機社製, 強力 X 線回折装置 (D-2F 型) の小角散乱装置を用い, X 線源としては Cu 対陰極の Phillips 社製密閉式管球を用い, 使用にあたって 0.02 mm の Ni フィルターで $K\beta$ 波ならびに連続 X 線を除去した. すべての実験を通じて管球電圧は 40 KV, 管球電流は 20 mA の条件で行なつた. pinhole collimating system による実験の場合には, 第 1 collimator に 5 ϕ , 第 2 collimator に 3 ϕ , slit collimating system による場合には, 第 1 collimator に 0.2 \times 12mm の slit, 第 2 collimator に 0.1 \times 12 mm の slit を使用し, また両 collimating system を通じて scatter slit は 0.5 \times 12 mm, receiving slit は 0.3 \times 12 mm の slit を用いた. slit collimating system による写真法の場合のみ, 第 1 collimator は 0.1 \times 12 mm, 第 2 collimator は 0.05 \times 12 mm の slit を装着した. 本実験においては原則として第 3 collimator は使用しなかつた. 第 1 collimator と第 2 collimator の間隔は 200 mm, 第 1 collimator と試料の間隔は 280 mm, 試料と scatter slit の間隔は 260 mm, 試料と receiving slit の間隔は 300 mm とした.

測定は Geiger-Müller counter (以下 G-M counter と略記) を goniometer にとりつけ, これを走査して count 数を自動的に記録計に連動して記録する理学電機社製 Geigerflex を用い, 同時に X 線フィルムによつて回折像を記録する. 古くから用いられているいわゆる写真法を併用した. 後者の場合, 試料とフィルム間の距離は 200 mm とした.

以上のような回折測定の結果から, 格子常数すなわち髄鞘における単位周期を求めるには次の Bragg 反射の公式 (1) によつた.

$$2d \sin \theta = n\lambda \dots\dots\dots(1)$$

ここに, n は正の整数 (次数を示す), λ は X 線の波長, θ は入射角および反射角, d は単位周期を示す.

測定は, counter 法では G-M counter を走査し, 回折波の示す 2θ の値を測定, 写真法では試料とフィルム面の距離 L , 中心点から回折スポットまでの距離 l から次の式 (2) より 2θ を求め, これらの値から式 (1) によつて d の値を求めた.

$$\tan 2\theta = \frac{l}{L} \dots\dots\dots(2)$$

その後の髄鞘超微構造解析の取扱いについては, 所見

の項に述べる.

神経の比重測定は, 種々の比重を持つ CuSO_4 液を作り, これに浸した際, 試料が静止する際の液の比重をもつて神経の比重とした.

所 見

I. 新鮮坐骨神経の X 線小角散乱像

pinhole collimating system による, ハツカネズミ新鮮坐骨神経の X 線小角散乱像では, 写真 1 のように, 赤道面に 5 つの回折波がみられる. このことは神経線維の縦軸に直角の方向にのみ回折波が存在し, 髄鞘中の X 線回折を起し得る単位周期が, 神経線維の縦軸から放射方向に配列していることを示している. さらにこのことは, 髄鞘の X 線回折実験においては, collimating 系に slit 系を使用し, これを神経束の縦軸に平行に装着した slit collimating system を使用して実験をすすめることを示している. slit collimating system を使用する場合, その回折波が pinhole collimating system のそれに比して遙かに強度であり, 写真法による回折像を得る際に露出時間の短縮が可能で, diffractometer による自動記録の際にも鮮明なピークが得られる利点をもっている.

slit collimating system を用いた写真法のフィルムは写真 2, 同じ slit collimating system で G-M counter から diffractometer で記録した counter 法によるチャートを写真 7 に示す.

上記の pinhole および slit collimating system の写真法フィルム, ならびに後者の counter 法チャートより, 単位周期の指数配当を行なつた. 各回折波は前述の Bragg 式 (1) を満足するわけであるが, n はなお未定である. それで,

$$\lambda = 2d (hOO) \sin \theta \dots\dots\dots(3)$$

$$d (hOO) = \frac{\lambda}{2 \sin \theta} \dots\dots\dots(4)$$

から, $d (hOO)$ を順次求めると, 182 Å, 91 Å, 60 Å, 44.5 Å, 35.5 Å の値を得る. この最小公倍数を求めると, 約 182 Å となり, 各回折波はそれぞれ, 1 次 (100), 2 次 (200), 3 次 (300), 4 次 (400), 5 次 (500) に相当することが明らかになつた.

写真 1, 写真 2, 写真 7 に示されるように, 1 次の回折波は非常に弱く, 写真法とくに slit collimating system を用いた写真法フィルムでは, 明瞭に認めることが出来るが (写真 2), 他においてはわずかに認められる程度であつた. 回折波強度の順位は, 2 次, 4 次, 3 次, 5 次, 1 次の順である.

以上の方法で各回折波の指数配当がきまつたので,

次に正確な単位周期を求めするため、各例の単位周期を、counter 法のチャートから計算し、実験例20例について平均値を求めた。この際 $d(100)$, $d(200) \times 2$, $d(300) \times 3$, $d(400) \times 4$, $d(500) \times 5$ の値のうち、ピークの著明な $d(200) \times 2$ の値を単位周期として用いた。そして20例の平均値として 182 \AA の値を得た。

さて、slit collimating system を用いるにあたり、今一つの吟味すべき問題がある。それは、この system を用いた場合に、slit 誤差を生じはしないかということである。そこで著者は、理想的回折像に近づけるための補正、すなわち slit 補正を試みた。

実測曲線 $\bar{I}(\epsilon)$ から理想的曲線 $I(\epsilon)$ へ補正する場合には、式(5)のごとき関係が成り立つ (ϵ は回折角)。

$$I(\epsilon) = - \int_0^{\infty} \frac{\bar{I}'(\sqrt{x^2+S^2})}{\sqrt{x^2+S^2}} ds \dots\dots(5)$$

ここに、 x は任意の点に P おける radian, S は任意のパラメーター、 \bar{I}' は実測値の微分であつて実測曲線の勾配をあらわす。つまり実測の散乱曲線をその図形に応じて適当に区切り、その各 x ごとに S を任意にきめて、順次実測曲線の勾配 \bar{I}' を測定し、それぞれの値から式(5)の積分項の内部を計算すれば、図積分によつて $I(\epsilon)$ を求めることが出来る(角戸正夫, 1956 参照)。この計算法により求めた補正曲線を、図1に示す。図において実線が実測曲線、点線が補正曲線を

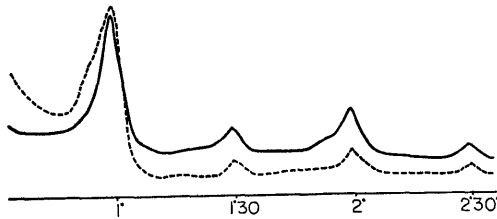


図1 ハツカネズミ新鮮坐骨神経 X 線小角散乱曲線 (slit collimating system の counter 法 chart) の slit 補正。実線は実測曲線、点線は補正曲線を示す。

あらわしている。図にみられるように実測曲線と補正曲線との間に、それらの回折波の位置にほとんど変化が認められない。したがつて、著者の行なつた slit collimating system 装置による本実験より得られた回折波曲線に対しては、slit 補正の必要のないことが判明した。これは scatter slit と receiving slit の間に設置されている soller slit によつて、水平面に対して傾いている X 線の大部分が除去されたためと考えられる。

以上の理由より、以後の実験はすべて slit collimating system を用い、主として counter 法を用い、これに写真法を併用して実験をすすめた。この counter 法は、回折角の測定精度の上で写真法にはるかに優り、その上測定時間が短かくてすむという利点があるが、一般に、counter 法による場合、散乱像の全貌を測定することは困難であつて、特に異方性の散乱像を示すものにおいては不備な点があるが、著者の神経髄鞘の実験においては、前述のように、pinhole collimating system による写真法により、回折波が赤道面にのみあらわれることを確認しているため、counter 法を用いてもさしつかえないと結論し得る。

II. 電顕対照実験

電顕によつて髄鞘を観察する際に、固定しない状態、すなわち新鮮状態では超微構造を検し得ないことはすでに述べたが、この電顕試料が固定、脱水、包埋等の処理によつて、髄鞘がどのような変化を受けるであろうか？ 著者は新鮮試料を OsO₄ 固定、ethanol 脱水、methacrylate 樹脂包埋と順次操作を施し、その各段階20例について X 線小角散乱実験を行なつた。

1. OsO₄ 固定

OsO₄ 固定によつて、単位周期は 182 \AA から 176 \AA へと変化し約 6 \AA の収縮をみる。回折像には、1次波が著明な増強を示し、強度の順序は、1次、3次、2次となる(写真3, 8)。

2. 脱水

ethanol 脱水によつて、単位周期はさらに収縮し、 156 \AA となり、前記固定試料より約 20 \AA の収縮をみる。電顕試料作成操作の中で、この脱水による周期の収縮が最も大である。回折像では、1次回折波はさらに著明となる(写真4, 9)。

3. 合成樹脂包埋

合成樹脂 (methacrylate 樹脂) に包埋した試料の単位周期は 143 \AA となり、さらに約 13 \AA 収縮する。一般に回折波は不著明となり、わずかに1次波、2次波のみが認められるにすぎない(写真5, 10)。新鮮試料が、この最終段階に至るまでに、その単位周期は約 40 \AA の収縮を来たす。

以上の一連の実際のほかに、次に述べる KMnO₄ 固定を施した試料についても検索を行なつた。

4. KMnO₄ 固定

KMnO₄ によつて固定された試料からは、1次および2次の回折波が得られたが、この場合、特異な点は1次波が弱く、2次波が著明なことである(写真6, 11)。周期は 172 \AA と変化し新鮮試料より約 10 \AA の収縮をみる。

III. データの解析的処理

X線の散乱は、原子の核外電子により生ずるものであり、X線小角散乱像の強度分布は、単位周期内の電子密度分布を反映しているものである。そこで著者は小角散乱像から逆に単位同期内の電子密度分布を知ろうとして、Patterson の vector 解析 および Fourier 合成、さらにモデルによる試謬法の検索を試みた。

1. Patterson 解析

Patterson の vector 解析は、回折波の強度から単位周期内における電子密度大なる位置間の vector を求めるものであるが、解析に先だち、回折波の強度を実測チャートより面積計で求め、その相対回折波強度(相対積分反射強度, relative integrated intensity)について Lorenz 因子と偏光因子の補正を施した。補正に用いた式は、

$$I = \frac{1 + \cos^2 2\theta}{\sin 2\theta} I'$$

書きかえると、

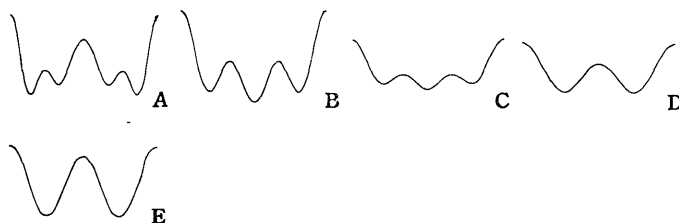


図2 X線小角散乱像の強度分布の Patterson 解析曲線。A, 新鮮試料; B, OsO₄ 固定試料; C, OsO₄ 固定後脱水試料; D, 脱水後 methacrylate 樹脂に包埋した試料; E, KMnO₄ 固定試料。

$$I' = \frac{I \sin 2\theta}{1 + \cos^2 2\theta} \dots\dots\dots (6)$$

ここに I は相対積分反射強度、I' は相対補正反射強度、 $\frac{1}{\sin 2\theta}$ は Lorenz 因子、 $1 + \cos^2 2\theta$ は偏光因子であるが、著者の実験では $\cos^2 2\theta$ は非常に小さい値であり、これは無視することが出来る。故に上記の式(6)は次の式(7)のように省略出来る。

$$I' = I \sin 2\theta \dots\dots\dots (7)$$

つまり相対補正反射強度は、相対実測積分反射強度 I に $\sin 2\theta$ を乗じたものとなる。

さて、この I' の値を用いて Patterson 解析を行なったが、計算は次式によった。

$$P(u) = \sum_h I' \cos 2\pi hu \dots\dots\dots (8)$$

ここに p(u) は Patterson function, h は回折波の指数(次数), u は単位周期内の座標をあらわす。

新鮮髓鞘の Patterson 解析曲線を図2のAに示すが、これによれば、 $\frac{1}{2}$ 周期の長さを持つた vector の存在が明らかである。この所見は、新鮮髓鞘のX線回

折像において、偶数次の回折波強度が強く、奇数次が弱いという所見とよく一致し、新鮮状態では、髓鞘のいわゆる周期線と周期間線の電子密度の間に大きな差が存在しないことを示すものと考えられる。またこの Patterson 解析曲線には、上に述べた $\frac{1}{2}$ 周期の vector のほかに、単位周期の $\frac{1}{4}$ および $\frac{3}{4}$ の長さに相当する弱い vector がみられるが、この問題については後に検討する。

OsO₄ 固定髓鞘では、 $\frac{1}{2}$ 周期の vector はみられない(図2のB)。この所見はX線回折像における1次波の著明な増強と、電顕所見とを合せて考えると、オスミウムは周期線にのみ強く沈着して、周期間線にはほとんど沈着しないことをよく示している。ここにみられる $\frac{1}{4}$ 周期および $\frac{3}{4}$ 周期の長さに相当する弱い vector については後に検討する。

OsO₄ 固定後脱水した試料について行なった Patterson 解析の結果は、脱水前と著明な変化を示さない

(図2のC)。

脱水後合成樹脂に包埋した試料の Patterson 解析では、図2のDに示すような曲線が得られた。これには、弱い $\frac{1}{2}$ 周期の vector がわずかにあらわれている。これは非常に興味深い変化と考えられるが、その意義については後述する。

KMnO₄ 固定髓鞘の Patterson 解析では図2のEに示すような結果が得られたが、これは $\frac{1}{2}$ 周期の強い vector の存在を示している。

さて以上の Patterson 解析で、OsO₄ 固定試料と KMnO₄ 固定試料における $\frac{1}{2}$ 周期の vector を比較してみると、前者では弱く後者では強い。このことは、電顕像所見の周期間線が OsO₄ 固定の場合と KMnO₄ 固定の場合とでは著明な差異を示し、周期間線は前者においては不明瞭で、後者では明瞭に観察されること、また周期線は両者の間に特別な差がみられぬこと等は、 $\frac{1}{2}$ 周期の vector が周期線と周期間線の間の長さの vector をあらわすことを強く暗示している。

2. Fourier 合成およびモデルによる試謬法

X 線回折において、構造因子 (単位周期内の各部分からの散乱波を合成した振幅であつて、h 次の構造因子を F(hOO) と略記) から単位周期内の電子密度分布を算出することが出来る。この解析法は一般に Fourier 合成法と呼ばれている。この際単位周期内の電子密度 ρ(x) は、構造因子 F(hOO) を係数とする次のような Fourier 級数であらわすことが出来る (x は単位周期内の座標)。

ρ(x) ∝ ∑_h |F(hOO)| cos{2πhx - α(h)}.....(9)

この式で α(h) は位相角であり、原点を対称心に一致させた場合、位相角をきめることは単に構造因子の符号をきめることとなるが、この場合補正強度から絶対スケールにした構造因子は、単位周期内の神経髄鞘の原子の正確な量がきまつていないので、その符号をきめることが困難なので、式 (9) において、α(h) 位

A. 新鮮髄鞘の Fourier 合成

組合せの方法によつて、新鮮髄鞘の Fourier 合成を行うために、2 次~5 次の構造因子に、それぞれ正または負の符号を与えることによつて、15組の電子密度曲線を得たが (図 3)、このうち Patterson 解析にあらわれる著明な 1/2 周期の vector を参照して、A・B・D・H の 4 つの曲線を並び出し、他を除外し得た。さらに A と H、B と D はそれぞれ周期を 1/2 だけずらしたものであつて、根本的には等しいものであるから、結局 A と B の 2 つにしぼることが出来る。しかしこの 2 者のうちいずれが正しい電子密度分布を示すかについては、この方法のみによつては決定し得ないので、著者は次に述べる試謬法を行なつて、別の面からさらに検討を加えた。

B. 試謬法による新鮮髄鞘 Fourier 合成の吟味

一般に単位周期の大きさおよびその中に含まれる化学単位の数決定された場合、各原子の座標を種々仮

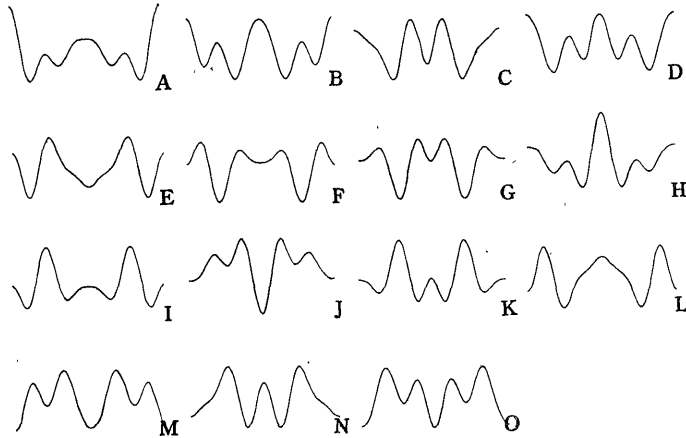


図 3 新鮮髄鞘の X 線小角散乱像の強度分布の Fourier 合成曲線。組合せの方法によつて得た 15 組の電子密度分布曲線を示す。

相角は省略した。そして F(hOO) にそれぞれ正または負の符号を与えて、そのすべての組合せについて Fourier 級数を計算した。その結果得た ρ(x) の中のどれかが正しい値を示しているはずである。正しい値を決定する方法として著者は組合せの方法 (permutation method) に基づいて、得た ρ(x) 値から正しい値を撰出しようと試みた。

さて構造因子の 2 乗は前述の相対補正反射強度に比例するので、

F^2(hOO) ∝ I'.....(10)

となる。したがつて構造因子 F(hOO) は √I' として計算した。

定し、モデルを作つて、これから構造因子を計算し、モデルの原子座標と、原子の種類に対応した原子構造因子 (各原子の核外電子数) を変えながら、逐次近似法によつて実測構造因子に合致させるようにする方法を試謬法と呼び、しばしば X 線結晶学に利用されているが、著者はこのモデルによる試謬法を、著者の実験結果に適用して検索をすすめた。ところで神経髄鞘に関しては正確な元素分析データがないため、原子座標は原子の存在位置と無関係に 182 等分して 1 Å 間隔とし、原子構造因子の代りに比重を用い、電頭や化学分析の知見に著者の Patterson 解析のデータを参照して、下記のように検討を加えながら、試謬法の出発点となるモデルを作つた。

新鮮髓鞘の Patterson 解析の所見では、 $\frac{1}{2}$ 周期の長さの比較的著明な vector の存在が認められ、この vector はすでに述べたように周期線と周期間線の間の vector を示す可能性が強い。また Folch-Pi & Le-Baron (1957) の化学分析データを参照し、lipid と protein の量的関係を約 2:1 とすれば、新鮮髓鞘の単位周期 182 Å のうち lipid が約 120 Å, protein が約 60 Å を占めると考えられる。そして protein が lipid より比重大であることから、電顕像で電子密度大な周期線と周期間線を一応 protein の存する部と仮定して図 4 の A に示すようなモデルを、試謬法の出発点とした。図において P(1) は周期線部の protein 層、P(2) は周期間線部の protein 層、L は lipid 層を示してい

$x_1, x_2 \dots x_{182}$ として対称心を原点に並び、実際の計算は $\frac{1}{2}$ 周期について行なった。なおここで吟味すべき問題がある。すなわち原子構造因子 (実際には比重を用いた) は回折角と波長によつて変化するものであり、回折角が大きくなるにしたがつて、原子構造因子は小さくなる (Cullity, 1962 参照)。この補正の必要性を検討するため、新鮮髓鞘における最大の回折角 (5 次, $2\theta = 2^\circ 27'$) について計算してみたが、誤差は 1% 以内であることが判明したので、この変化は無視した。

式 (11) によつて図 4 の A のモデルから計算された構造因子 (F cal.) と実測構造因子 (F obs.) との比較を図 5 の A に示すが、これは両者の間に大きなひらき

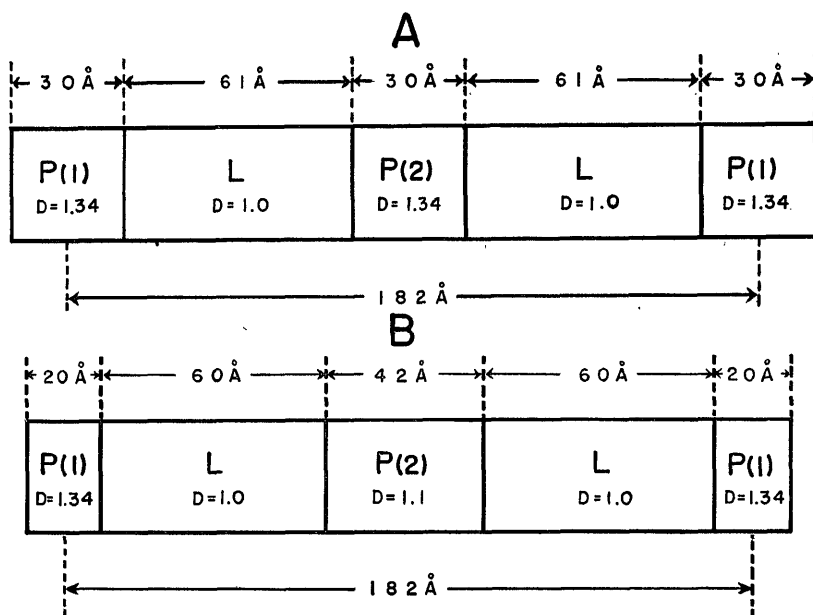


図 4 試謬法における髓鞘単位周期内のモデル。A は最初のモデルで B は試謬法による解析の結果最後に得たモデルである。P(1), 周期線部の protein 層; P(2), 周期間線部の protein 層; L, lipid 層。D は比重をあらわす。

る。電顕の知見からは P(1) と P(2) の比重を同じとすることには疑問があるが、一応両者を等しいと仮定して、共に比重を 1.34 (Haurowitz, 1950 参照) とし、lipid の比重を一般にいわれているように 1.0 とし、検討を始めた。

さてモデルから構造因子を計算するにあたっては、次の計算式を用いた。すなわち構造因子 $F(hOO)$ と原子構造因子 f_n との間には次の式 (11) に示すような関係式が成り立つ。

$$F(hOO) = \sum f_n \cos 2\pi h x \dots \dots \dots (11)$$

ここに n は単位周期内に含まれる原子の数、 x は原子座標をあらわす。単位周期を 182 等分し、その座標を

が存在することをあらわしている。試みにこの信頼度因子 (reliability factor) R を次の式 (12) で計算してみると、約 67% という大きな値となつた。

$$R = \frac{\sum |F_{obs.}(hOO)| - |F_{cal.}(hOO)|}{\sum |F_{obs.}(hOO)|} \dots (12)$$

一般にこの信頼度因子 (R) が 20% 以下にならないと、そのモデルは正しいものとはみなされないから、このモデルは実際のものから非常にかけ離れたものであるということになる。このことは、電顕像からの知見や、考按の項で述べるように、回折像からみても、P(1) と P(2) の比重を等しいと仮定したことが誤つていることを、さらに裏づけるものである。

そこでモデルの P(1) と P(2) との比重差を種々検討し、比重と各成分の量的関係の両パラメータを種々変化させながら、モデルから計算された構造因子 (F cal.) が、実測構造因子 (F obs.) に近づくように試謬法をすすめてみた。その結果、図 4 の B に示すような、P(1) の比重が 1.34 で 20 Å の幅を持ち、P(2) の比重が 1.1 で 42 Å の幅を持つ時、F cal. と F obs. が

に示す Fourier 合成曲線のうち A が新鮮坐骨神経髄鞘における単位周期内の電子密度分布をあらわしていると考えてさしつかえなからう。

ところで、この図 3 の A に示される Fourier 合成曲線上に、前述の Patterson 解析の際に存在した $\frac{1}{4}$ および $\frac{3}{4}$ 周期の vector に対応した小さな高まりがみられるが、ここでこの問題についてさらに検討すると、こ

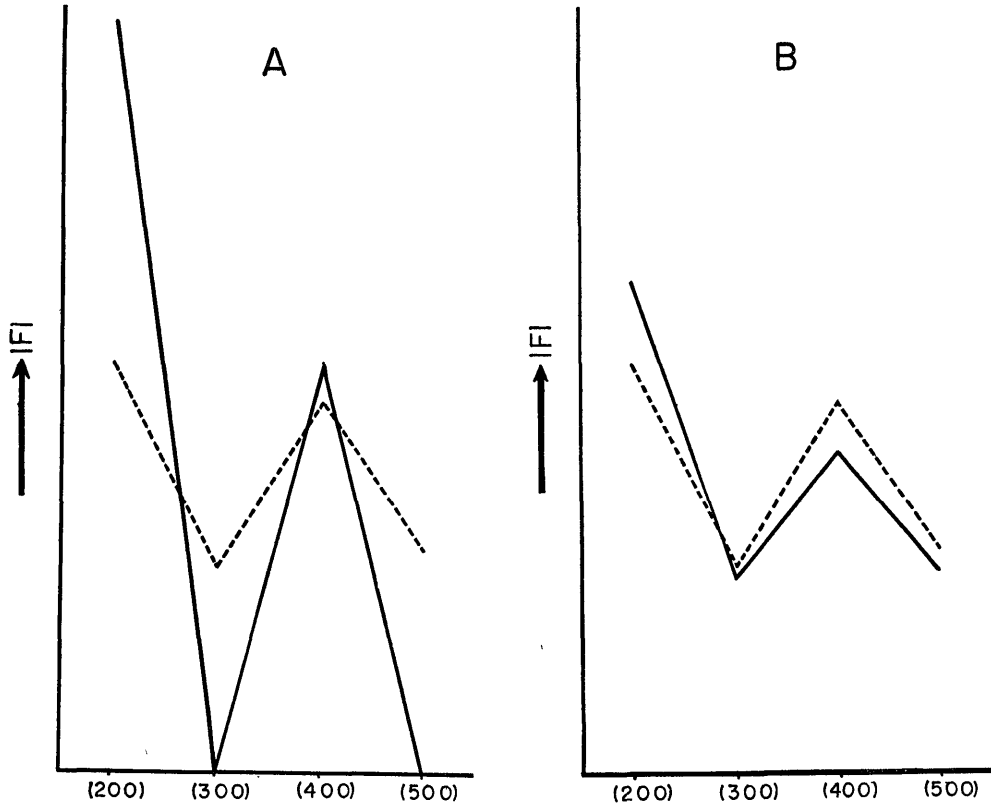


図 5 試謬法における計算構造因子 $|F \text{ cal.}|$ と実測構造因子 $|F \text{ obs.}|$ の比較。実線は $|F \text{ cal.}|$ 、点線は $|F \text{ obs.}|$ を示す。A は最初のモデルで、B は最終モデルで、両者の比較を示す。A においては $|F \text{ obs.}|$ と $|F \text{ cal.}|$ の間に大きな差があるが、B においては差はきわめて僅小となっている点に注意。

図 5 の B にみられるような非常に良い一致をみた。信頼度因子 (R) を計算してみると 13% であり、一応信頼すべき値に入っている。この計算された構造因子 (F cal.) の 2 次から 5 次について Fourier 合成を行なうと、図 6 の A のような曲線となり、これは実測構造因子 (F obs.) からの Fourier 合成曲線 (図 3) のうち、A に示す曲線とほとんど同一のパターンを示している。また F cal. は位相を含み、正負の符号を有するものであるが、この最終モデルから計算した F cal. の符号は、図 3 の A における符号と全く同一であり、すべて正の符号を示している。したがって、図 3



図 6 試謬法によつて得た最終モデルから計算した構造因子に基づく Fourier 合成曲線。A は 2 ~ 5 次の構造因子に基づく計算より得た曲線であり、B は計算によつて得た 1 ~ 7 次の構造因子を用いて得た曲線である。図 A の中央の大きなピークの左右にある高まりは、図 B においては小さくなっている。両者の比較からこの高まりが級数打ち切りの効果であることが判明した。

の小さな高まりは F cal. (2次~5次) を用いて行なった Fourier 合成の結果 (図6のA) においても同様に認められるが, モデル (図4のB) の, これに対応した部分に電子密度の高まりは存在しない. 次に F cal. の1次から7次までを使って Fourier 合成を試みた結果, 図6のBに示すような曲線が得られたが, この曲線では問題の小さな高まりは2つに分離して非常に小さくなっている.

一般に実測強度は, 高次まで測定が不可能なことが多く, ある次数で打切つて Patterson 解析や Fourier 合成を行なっているが, 得られた結果はあくまで近似値であつて, 種々の小起臥が曲線上にあらわれることがあり, これを級数打ち切りの効果 (termination effect) と呼んでいるが, 著者の新鮮坐骨神経髄鞘の電

厳密に計測することはきわめて困難である. 坐骨神経全体の比重を測定した結果は, 約1.045であつた. 神経には, 電顕所見からも明らかなように, 軸索および各線維間にかなりの組織間隙が存し, 髄鞘の比重は神経線維のそれより高いと考えられ, 著者のモデルから算出した髄鞘比重値1.06はほぼ妥当な値と考えられる.

C. OsO₄ 固定髄鞘の Fourier 合成

当然のことながら, OsO₄ で処理された髄鞘の Fourier 合成の結果は Patterson 解析の場合と同様に, 新鮮髄鞘のそれと比較すると, 著しい変化がみられる. まず組合せの方法によつて, 7組の Fourier 合成曲線を求めた (図7のA~G). Patterson 解析の vector や, 電顕の知見および後述の包埋試料の Four

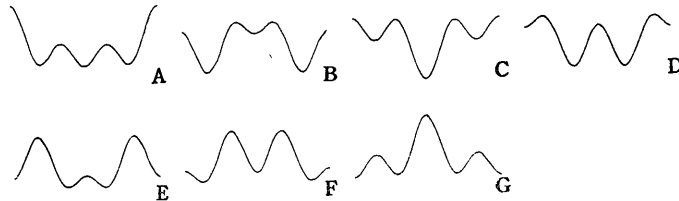


図7 OsO₄ 固定髄鞘の X線小角散乱像の強度分布の Fourier 合成曲線. 組合せの方法における7組の電子密度分布曲線を示す.

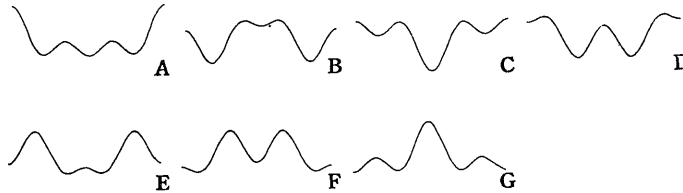


図8 OsO₄ 固定の後, 脱水を施した髄鞘の X線小角散乱像の強度分布の Fourier 合成曲線. 組合せの方法における7組の電子密度分布曲線を示す.

子密度分布曲線上にあらわれた小さな高まりも, 吟味の結果, これが級数打ち切りの効果であることが判明した.

著者の行なつたモデルによる試謬法は, 反射次数 (回折波次数) が少ない点, 周期線部と周期間線部の protein 層や lipid 層各部分を, 一樣の比重と仮定して検討した点において, 一般の広角 X線回折法の試謬法に比べて, きわめて大まかな方法ではあるが, 髄鞘の電子密度分布について, 大略の様相を示すものと考えられる.

さらに, 著者のモデルの妥当性を別の面から検討するために, 比重の関係を調べた. まず, モデル各部の割合とその比重から, モデル全体の比重を算出してみると, 約1.06である. この値と髄鞘の比重の実測値を比較することが必要なのであるが, 髄鞘のみの比重を

ier 合成の所見を参考にして考察すると, これらの可能性のうち, Aが妥当性があり, B~Gはこれを否定することが出来る. OsO₄ 固定試料に関しては, オスミウムの沈着量に関するデータがなく, 試謬法による検索が出来なかつた.

図7のAに示される電子密度分布曲線から, オスミウムが主として周期線の部分に沈着しているとい得る. 周期間線部には全然ピークが存在せず, その両側に小さな高まりがみられる. この高まりが先に述べた級数打ち切りの効果であるか否かについては, 試謬法が不可能であつたため, 検することが出来なかつたが, 級数打ち切りの効果における小起臥は, 一般に電子密度大な部分の両側に対称性にあらわれるのが常であるから, この場合の小さな高まりは級数打ち切りの効果とは考えられないので, この考察からは除外した. おそら

く周期間線部におけるオスミウムの沈着部位の二重化した状態を示すものと考えられる。

D. OsO₄ 固定後脱水した髄鞘の Fourier 合成

上記の試料を脱水した場合、組合せの方法から、図 8 に示すような 7 組の電子密度分布曲線が得られたが、Patterson 解析および電頭の知見を合せ考えると、このうち A が妥当な電子密度分布曲線であると推論される。曲線の形は上記の OsO₄ 固定髄鞘のそれと比較して著変はない。

E. 合成樹脂包埋した髄鞘の Fourier 合成

OsO₄ 固定、脱水後、methacrylate 樹脂に包埋した試料について行なつた Fourier 合成から、図 9 に示す 3 組の電子密度分布曲線を得た。Patterson 解析所見および電頭の知見とを合せ考えると A が妥当な電子密度分布をあらわしていることは明確である。興味ある点は、前記の OsO₄ 固定試料および脱水試料の Four-



図 9 脱水後 methacrylate 樹脂に包埋した髄鞘の X 線小角散乱像の強度分布の Fourier 合成曲線。組合せの方法によつて得た 3 つの電子密度分布曲線を示す。

ier 合成所見で二重化を示していた周期間線部が、合成樹脂に包埋した材料では合して単一のピークを示すことである。しかも周期線部の電子密度は周期間線のそれよりはるかに大であり、このことは電頭像で観察される所見とよく一致する。

F. KMnO₄ 固定髄鞘の Fourier 合成

KMnO₄ 固定試料について行なつた Fourier 合成の結果、組合せの方法によつて図 10 に示したような 3 つの電子密度分布曲線を得たが、このうち Patterson 解析による vector や電頭による知見を考慮に入れると、A が妥当な電子密度分布を示していることは明らかである。このことは Mn が周期線および周期間線部に沈着し、しかも両者の沈着度に著しい差がないことを示すものである。



図 10 KMnO₄ 固定髄鞘の X 線小角散乱像の強度分布の Fourier 合成曲線。組合せの方法によつて求めた 3 つの電子密度分布曲線を示す。

考 按

I. 新鮮坐骨神経髄鞘の X 線解析

X 線回折法による神経組織の超微構造に関する検索は、広瀬 (1924), Handovsky (1933), Boehm (1933) らによつてなされたが、これら初期の実験では、広角 X 線回折法を用いたがため、髄鞘を構成する分子のごく小さい単位周期の測定に止まり、髄鞘の層状構造の単位周期の測定には至らなかつた。髄鞘板層構造の検索、特にその周期測定には X 線小角散乱法を必要とした。

Schmitt, Bear, & Clark (1935) は小角散乱法を応用して、カエルの新鮮末梢有髄神経について 171 Å の単位周期測定に成功した。これと前後して Schmidt (1935, 1936 a, b, 1937 a, b) は、偏光顕微鏡によつて正常髄鞘の重屈折性を調べると共に、lipid 溶剤を作用させた後の変化を検し、髄鞘は放射方向に長軸を向けて同心円状に並んだ lipid 分子の多数の薄層と、これらの層の間に、分子の長軸を切線方向に向けて存在する protein の薄層よりなる分子モデルを想定し、Chinn & Schmitt (1937) は、適当な屈折率の媒質に入れると、この重屈折性が消失することから、この重屈折性がミセルの配列によるいわゆる形態重屈折性であることを明らかにした。さらに Bear, Palmer & Schmitt (1941); Palmer & Schmitt (1941) は、髄鞘から抽出した各種 lipid (cephalin, lecithin, sphingomyelin, kersin, phrenosin, cholesterol) の乾燥および湿材料を X 線回折法によつて検し、各 lipid は 2 分子層からなつていていることを明らかにした。Schmitt, Bear & Palmer (1941) は、以上の知見をもとにして、髄鞘の板層の単位周期が、lipid の 2 分子層を 2 層有し、その両側またはその中間に protein の単分子膜がこれと結合している数種の分子モデルを仮定し、Palmer, Schmitt & Chargaff (1941) は、lipid-protein complex (cephalin-histone および cephalin-globin complex) を実験的に作り、X 線回折で検して、この仮定を支持した。

電頭がこの研究分野に導入されると共に、髄鞘超微構造の検索は一段と進歩を示した。電頭所見によつて、髄鞘は軸索を囲む同心円状の明層、暗層、交互に重なり合つた多数の板層構造よりなることが発見され、偏光顕微鏡所見および X 線回折所見より得られた仮説は明確に実証された (Fernández-Morán, 1950 a, b; Sjöstrand, 1954; Hess & Lansing, 1953; Honjin, 1955, 1957a, b, c; Robertson, 1955, 1957; Fernández & Finean, 1957)。

以上のように、偏光顕微鏡、X 線回折、電頭のいずれによつても、髄鞘における板層構造の存在が明らか

にされ、その分子構成とその配列についてかなりの知見が得られたが、新鮮髄鞘の分子構成の詳細、特に電顕下で証明される明暗の各層部分と、X線回折波の示すデータとの関係についてはなお明確ではない。

ところで、電顕検索による場合、試料の固定・脱水・合成樹脂包埋・薄切、さらに電子染色等の操作が必要であり、実際に電顕下に観察される像は、新鮮状態よりかなり変化したものであることは否み得ない。著者は新鮮髄鞘の構造を明らかにし、且つ電顕所見との関係を検索するため、X線回折法を用いた。

髄鞘をX線回折法によつて検する際に留意すべきことは、末梢神経線維間に神経内膜鞘の結合組織細線維 (collagen fibril) が存在する事実で、結合組織細線維の示す縦軸方向の約 640 \AA の周期横紋からの回折波が、髄鞘の示す回折像に共に示され、これに変形を与えはしないかということである。しかしこの問題は Honjin (1957 a), 本陣, 平井 & 井村 (1957) によつて、この collagen fibrils が神経線維の縦軸に沿つて走っていることが確認されており、slit collimating system を神経線維の方向と平行に装置した場合には、この回折波を除去し得ることが明らかにされている (本陣 & 中村, 1963参照)。

著者は、新鮮ハツカネズミ坐骨神経髄鞘の単位周期を counter 法によつて計測し、20例の値として 182 \AA の値を得た。哺乳類末梢神経について、Schmitt, Bear & Palmer (1941) は 184 \AA , Fernández-Morán & Finean (1957), Finean (1958) は 178 \AA , 本陣 (1960 a), 本陣 & 平松 (1961) は 182 \AA , Höglund & Ringertz (1961) は 185 \AA の値を報告している。各研究者によつて値に若干の差があるが、これは動物差によるのか、実験誤差によるのかはさらに検討を要するが、本陣 (1960 a), 本陣 & 平松 (1961) は counter 法を用い、他は主に写真法によつたものであり、写真法による場合、フィルムの読みの誤差およびフィルムの現像処理による誤差がかなり入る事実を指摘したい。著者の実験によると、counter 法による値は写真法に比して精度は高い。

一方、末梢神経髄鞘の単位周期には、動物の綱による差が認められている。すなわち、両棲類については、Schmitt, Bear & Clark (1935) は 171 \AA , Elkes & Finean (1949) は $169.5 \pm 0.8 \text{ \AA}$, 本陣 (1959, 1960 a, b) は 171 \AA , Höglund & Ringertz (1961) は 171 \AA の値を報告し、また Höglund & Ringertz (1961) は鳥類で 182 \AA , 魚類で 161 \AA の値を示している。また中枢神経髄鞘の単位周期は、各動物について末梢神経よりそれぞれ約 20 \AA 短かい (Finean, 1960 b; 本

陣 & 平松, 1961; 本陣 & 中村, 1963)。これら、網間または中枢末梢間における周期の差は、髄鞘の分子の種類と構造の差を暗示するものであろう。

さて方法の項で述べたように、入射X線が原子の核外電子によつて散乱され、同じ電子密度分布を持つ繰返しがある場合、それが Bragg 角で干渉しあつて回折波を生ずる。したがつて回折波は、電顕でみられる電子密度大な周期線および周期間線のみから散乱されたものでなく、単位周期内にある、すべての原子の核外電子によつて散乱されたX線の合成としてあらわれるものであることに、留意せねばならない。また単位周期は同じ繰返しであれば、どの部分を起点にしてもかまわないわけであるから、周期の測定のみから、電顕にいう周期線周期間線を云々することは出来ない。しかし散乱X線の強度は、上述のように核外電子の量を反映するものであり、原子番号の大きい原子のあるところ、または原子の密度の大きなところからの散乱X線が、回折波の強度に主要な役割を有することは当然である。

この点を考慮して、今回の一連の実験結果について、1次波と2次波の強度を比較してみると、すでに本陣 (1960 a), 本陣 & 平松 (1961) が指摘しているようにきわめて興味深い結果が示された。すなわち新鮮試料と KMnO_4 固定試料では、2次波が著明で1次波は弱く、 OsO_4 固定試料では逆に1次波が著明で2次波が弱い。この事実は、前2者では $\frac{1}{2}$ 周期ごとにかかなり電子密度大な部分が存在し、後者では $\frac{1}{2}$ 周期の部分の電子密度が著しく小であることを示唆する。一方電顕所見では OsO_4 固定の場合は周期間線が不著明で、 KMnO_4 固定の場合はこれが著明になる。

以上のことから、詳しい解析を行なうまでもなく、電顕像の周期間線に相当する層が、X線回折での $\frac{1}{2}$ 周期を示す要素に相当するだろうとの推測がなりたち、髄鞘構造の電顕所見とX線回折所見との間の関連理解のいとぐちをつかんだ。著者はさらにこの関連を Fourier 合成による解析で、確実ならしめ得た。

さて神経を種々の異常条件下に置き、髄鞘の周期の変化を、X線回折および電顕によつて追求した2, 3の実験がある。Finean (1957) は、乾燥、温度、有機溶剤等による髄鞘の変化に関する実験のデータをもとにして、髄鞘単位周期内の分子モデルを提出している。それによると、lipid の2分子層の厚さを約 55 \AA とこの2分子層をはさむ protein の単分子膜を 15 \AA と考え、この lipid-protein 膜が2層並ぶと、両棲類の新鮮末梢神経髄鞘の単位周期の長さ 171 \AA にはほぼ一致するとした。この場合、lipid の2分子層をはさむ2

つの protein 層がまったく同一のものとする、X線回折によつて得られる単位周期は 171 \AA の $\frac{1}{2}$ つまり約 85 \AA を示すはずであり、電顕像にみられる周期線と周期間線の差は存在し得ないはずである。したがつて Finean はここに difference factor という概念をとり入れて、周期間線部には周期線部に比べて、何かしら異なつた要素が存在するとの仮説を提案している。末梢神経髄鞘は Schwann 氏細胞の細胞膜より由来し、周期間線部は Schwann 氏細胞細胞膜の外側の電子密度大な層が、また周期線部は内側の電子密度大な層が、それぞれ2層合して出来ることは、Geren (1954)、Robertson (1955)、Honjin (1957 a) によつて指摘されているが、Finean の difference factor がこの Schwann 氏細胞細胞膜の内側と外側の電子密度大な層の差によることは容易に推定し得る。このような差異の本態に関しては、Robertson (1958)、Finean (1960 a) らは周期間線部に polysaccharide が存在すると考えているが、Wolman & Hestrin-Lerner (1960) は、これとは逆に、polysaccharide が周期線に存在するとして、これを myelosaccharide と呼び、Finean (1957) のモデルを改変した分子モデルを提出している。

著者が行なつた新鮮髄鞘のX線小角散乱回折波の解析は、単位周期の間隔で並ぶ電子密度大な部のほかに、密度においてこれより小であるが電子密度大な構造があり、これは基本周期を示す個々の周期性の電子密度大な部の中間で、その中央に位置することを示している。このことは電顕所見でみられる周期線、周期間線の差が、新鮮時においても明確に存在することを示唆するものである。

すなわち、各回折波の強度は写真2および写真7に示したように、2次が一番著明であり、4次、3次、5次、1次の順でこれに次ぎ、このことは単位周期の $\frac{1}{2}$ に相当する vector が単位周期内に存在することを示す。もしこの2種の電子密度大な部分の間に差が存在しないならば、すでに述べたようにこの回折波のうち、偶数次に相当する回折波を残して、他はまったく打消されるはずである。

著者はさらに回折波の相対強度(相対積分反射強度)より、Patterson の vector 解析および Fourier 合成による、単位周期内の電子密度分布の検索によつてこの問題を追求した。Patterson 解析の結果から、単位周期内には、上記のように $\frac{1}{2}$ 周期に相当する比較的著明な vector が存在し、この vector は電顕にみられる周期線と周期間線の間の vector に一致するが(図2のA)、このほかに $\frac{1}{4}$ 、 $\frac{3}{4}$ 周期の vector の存在

が示され、これがいわゆる級数打ち切りの効果によるものであることは、著者のモデルによる試謬法に基づく解析によつて明らかとなつた。Finean (1954 a, 1962) もこれと同様な曲線を報告し、 $\frac{3}{4}$ および $\frac{1}{4}$ 周期の vector は、phospholipid の phosphate group 間の vector であるとの推定を述べているが、彼の報告においては試謬法による吟味が欠けているので、著者の解析結果からみると、彼の考えには同感しかねる。

今日、結晶構造の解析において、試謬法は常用の手段であるが、神経髄鞘においては未だ試みられなかつた。すでに述べたように今回著者は、はじめて髄鞘の研究に試謬法を試みた。このため化学分析、電顕、Patterson 解析のデータを参照してモデルを作り、その原子構造因子の代りに比重を用いてその構造因子を計算し、これと実測構造因子とを比較し逐次近似法によつて、信頼度因子が13%という満足すべき値を得るモデル(図4のB)に到達した。その際の計算構造因子(2次~5次)による Fourier 合成曲線(図6のA)は、図3のAときわめてよく一致し、しかもこの際計算構造因子の符号と実測構造因子の符号が、すべて正であることから、回折波相対強度の符合の組合せ法により求めた15組の Fourier 合成曲線(電子密度分布曲線)のうち、図3のAが妥当な電子密度分布を示すものであることを確かめた。

髄鞘について今まで試謬法が試みられなかつた大きな理由は、髄鞘の正確な元素分析がきわめて困難であり、したがつて原子構造因子ならびに原子座標を入れたモデルを作ることが現段階では不可能であることによると思われる。そこで著者は便宜的に原子構造因子の代りに比重を用い、原子の存在位置と無関係に単位周期を182等分して原子座標をきめた。電子密度分布が大略比重に比例することは一般にいわれているところであり、また182等分すれば原子座標は 1 \AA 間隔であつて、これはほぼ原子間隔のオーダーであるから、この仮定を入れても、15組の Fourier 合成曲線から妥当なものを撰出する手段としては、充分有効であると考えられる。このようにして得たモデルによる構造因子の符号、計算値、さらにそれによる Fourier 合成曲線等が、実測のものにきわめてよい一致を示し、且つ比重の計算値と測定値とが妥当な値を得ていることから、逆にモデル自体の妥当性を結論し得る。かくて撰出された Fourier 合成曲線図3のAは、周期線と周期間線とに電子密度差が存在することを明らかに示しているが、これは Finean (1957) のいう difference factor を電子密度分布の観点より表示したものであろう。 $\frac{1}{4}$ および $\frac{3}{4}$ 周期の部に存する小さな高まりを、級数打

切りの効果として無視することについてはすでに述べた(図6のA, B参照). Millington & Finean (1961)は, やはり組合せの方法によつて Fourier 合成を行ない, 著者の求めた曲線のうち, 図3のA・C・Gに相当すると思われる3つの曲線が, 新鮮髄鞘単位周期内の正しい電子密度分布を示す可能性を持つものとして報告し, Finean (1962)はこのうちのGを改変したものを妥当な Fourier 曲線として示したが, 彼の解析は試謬法による検討を欠いたがために誤つた結論に導かれたものと思う. 著者の所見からは彼の見解には同意出来ない.

さて, 著者の得たモデル(図4のB)を電子密度図形として示すと, 図11のごときものとなる. この電子密度分布と, 電顕でいう周期線・周期間線との相関については, OsO₄ 固定および KMnO₄ 固定の電顕所見において両者間の差が特に周期間線部に著明であり,

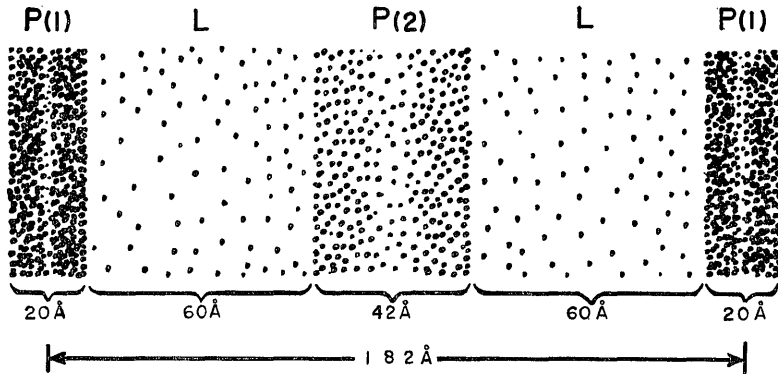


図11 試謬法によつて得たモデル(図4のB)を, 電子密度図形として示したもので, 髄鞘単位周期内の電子密度分布を示す. P(1), 周期線部; P(2), 周期間線部; L, lipid 層.

著者の行なつた Fourier 合成による電子密度分布曲線のパターンの上記のような解析から, モデルにおける電子密度大な部分 P(1) が電顕でいう周期線に相当するものと推測される. また周期線は電子密度大で幅はせまく, 周期間線は電子密度がこれよりやや小で幅がひろい. このことは Fourier 合成の所見(図3のA)ともよく一致する. 周期間線部が周期線部に比較して, 電子密度やや小で幅がひろいということは, 周期間線部には水が多く含まれ, 特にその中央部に多いということを推定せしめる. このモデル設定に当り, 周期線および周期間線をともに protein と仮定したが, X線回折実験の結果のみによつて, それがともに protein であるか, あるいは上記の polysaccharide がこれに関与するかは, にわかに確定し難い.

神経組織に mucopolysaccharide が存在すること

は, 生化学的にも (Abood & Abul-Haj, 1956; Brante, 1957; Bogoch, 1961; 山科, 1963), 組織化学的にも (Hess, 1953; Freedman, 1953; Abood & Abul-Haj, 1956; Wolman, 1957) 証明されている. またこの物質が protein ときわめて強く結合し, glycoprotein の形で存在していることが確かめられている (Brante, 1957; Bogoch, 1961). 一方この glycoprotein の量は神経組織に特に多いものではなく, 末梢神経の化学的構成成分は水・lipid・protein がほとんど大部分を占めている (Folch-Pi & LeBaron, 1957). これらの生化学的ならびに組織化学的な報告を参照して考按すると, 周期間線部に polysaccharide が存在することは疑いないとしても, 周期間線部にはこのほか多量の protein が存在すると推定される. Robertson (1958), Finean (1960a) は単に polysaccharide が存在するというのが, 著者はむしろ glycoprotein の形で存在しているので

はないかと考える. もし glycoprotein とすると, その糖は OH 基を多く持つため, 水との結合がきわめて容易であると考えられ, もし polysaccharide が周期間線部に glycoprotein の形で存在しているとすれば, この部が水を多く含む膨脹し, その電子密度が周期間線部より小となる可能性が強くなる. このことは著者の推定を裏づけるものである.

Fernández-Morán & Finean (1957)によると, 髄鞘は, OsO₄ 固定前に acetone で処理すると, 電顕像において lipid の抽出によると思われる明層の厚さの減少と共に, 周期間線の二重化があらわれる. Finean (1960a) はさらに神経を完全に乾燥した際に同様な周期間線が二重化することを報告している. また OsO₄ 固定前に HgCl₂ で処理すると, 電顕像で周期の拡張と共に周期間線が二重化することが Millington &

Finean (1958, 1961) によつて示されている。周期間線部の抵抗性が周期線部のそれに比して弱いことは、神経を低張液に浸した場合、髄鞘はただちに周期間線部の部から剥離すること (Robertson, 1958), さらに神経切断による2次変性の際に、周期間線部の部から剥離が起ること (高橋, 1961; Honjin & Takahashi, 1962) などから容易に推測し得るところで、これらの実験事実は、著者のモデルにおける周期間線部の電子密度が小で、構造が粗であるとの推定を支持するものであろう。著者は Finean (1957) のいう difference factor は両 protein 層の水分含有量の差に負うところ大であり、しかもこのことは、前にも触れたように、polysaccharide が周期間線部で glycoprotein として存在していることに由来すると推定する。Schwann 氏細胞細胞膜の外側の電子密度大なる層が、髄鞘形成に際して体液より水を多量にとり入れ得ることは大いに可能性のあることであり、上記の各種の実験における髄鞘の脱水がまず周期間線部の部に起ると考えられる。

II. 電顕試料のX線回折

超薄切片の電顕像における、哺乳動物末梢神経髄鞘の単位周期の長さは約 120 \AA の値が得られている (本陣, 1961)。また細解分離標本に、shadowing を施した電顕像からの髄鞘単位膜の厚さは $140 \sim 170 \text{ \AA}$ の値を示す (Honjin, 1955)。これらの値と、著者がX線回折実験によつて求めた新鮮髄鞘についての計測値 182 \AA との間に、大きな差がある。電顕写真撮影に至るまでに、髄鞘は固定・脱水・包埋・薄切といった種々の操作を受けるので、新鮮試料との間にかかなりの差がみられることは当然予想される。この髄鞘の単位周期の電顕による計測値とX線回折による計測値の差について、Finean (1954 b, 1958, 1960 a, 1961 a, b), 本陣 (1960 a, b), 本陣 & 平松 (1961), 本陣 & 中村 (1963) が、各電顕試料作製段階におけるX線回折測定を行なつて検討している。

ハツカネズミについての著者の所見では、新鮮状態における髄鞘の 182 \AA の単位周期は、 OsO_4 固定によつて 176 \AA となり、ethanol 系列による脱水で 156 \AA 、さらに methacrylate 樹脂包埋によつて 143 \AA となる。すなわち OsO_4 固定によつて 6 \AA 、脱水によつて 20 \AA 、包埋によつて 13 \AA それぞれ収縮し、特に脱水による収縮が著明であることが判明した。この結果は、すでに本陣 & 平松 (1961) によつて報告せられたところであるが、Finean, Sjöstrand & Steinmann (1953) の、ハツカネズミ坐骨神経髄鞘についてのX線回折実験では、 OsO_4 固定材料において 162 \AA の値が示され、この収縮の大きさは著者の測定値との間に

14 \AA の差を示している。また Finean (1961 a, b) は、 OsO_4 固定によつて約 20 \AA の収縮をみることを述べ、Finean (1954 b, 1960 a) はカエル坐骨神経髄鞘について 171 \AA の単位周期を示す新鮮試料が、 OsO_4 固定によつて 148 \AA となり、 23 \AA 収縮することを報告し、本陣 (1959) はカエル坐骨神経で、 OsO_4 固定によつて約 10 \AA 収縮すると報告している。このような固定による収縮の差はおそらく実験条件の差に由来するもので、固定液の濃度、pH、固定時間などによるものと推定される。一般に電顕試料に用いられる固定液は、収縮が少ないものほど良い固定といひ得るので、この点は固定液撰択の指標として利用し得ると考えられる。

著者の実験によると固定後 ethanol 系列によつて脱水された試料における単位周期は、さらに 20 \AA 収縮して 156 \AA となり、新鮮状態の単位周期から通算して 26 \AA の収縮を示している。これは本陣 (1960 a), 本陣 & 平松 (1961) の報告に一致する。Finean (1961 a, b) はラットにおいて、脱水の際 30 \AA の収縮を記載しているが、これも著者の所見との間に 10 \AA の差異が存在する。これも実験条件の差によるものであろう。

脱水後 methacrylate 樹脂に包埋した場合、単位周期はさらに 13 \AA 収縮して 143 \AA となる。これは新鮮状態のものから通算して約 40 \AA の収縮となる。これは本陣 & 平松 (1961) の所見と同様である。これに反し Finean (1961 a, b) は、ラットの坐骨神経における Araldite 包埋により、逆に 10 \AA 拡張すると報告している。この両者の差はおそらく包埋剤の差異によるものと考えられるが、この点についてはさらに今後検討したい。

このように、包埋後の単位周期はX線回折による測定から 143 \AA を示すことが判明したが、実際の電顕像には、これにさらに切断による歪みがかこれに加わり、電顕による像の拡大の誤差が加わる。電顕写真による計測値 $90 \sim 130 \text{ \AA}$ (本陣, 1961) はこのような経過によつて生み出されたもので、著者の実験は、新鮮試料における 182 \AA の単位周期が、電顕像で観察される単位周期約 120 \AA に変化する過程を明示したものと考えられる。

以上のように、新鮮試料から包埋試料への収縮は、全体の長さの約 $1/4$ に相当するが、この収縮は、髄鞘の分子構成と如何なる関連をもっているかについて、X線回折像の解析結果から考察してみたい。

まず OsO_4 固定試料のX線回折パターンにおける著明な変化は、1次回折波強度の著しい増大である。オスミウムは重原子であり、したがつてX線の散乱強度

が大であるから、単位周期ごとの電子密度大な部分からの回折波が強くなることは推測に難くない。電頭の見解は、オスミウムが周期線に強く沈着し、周期間線には微量しか沈着しないことを示している。OsO₄ 固定試料のデータに Patterson 解析を行なつてみると、新鮮試料の際に著明であつた $\frac{1}{2}$ 周期の vector が小さくなり、1次波のピークが著明となつている。この所見は電頭像の所見を明確に裏づけている。Fourier 合成による電子密度分布曲線を、組合せの方法から撰び出すには、Patterson 解析データおよび電頭の見解を念頭におけば容易である。ここで興味深いことは、Fourier 合成の所見において、周期間線部の電子密度のピークが両側に2分したごとき様相を呈することである(図7のA)。これは、Patterson 解析における $\frac{1}{4}$ および $\frac{3}{4}$ 周期の弱い vector に相当するものであるが、その意義についてしばらく考えてみたい。上述したように、著者は新鮮髓鞘では周期間線の幅がひろく、この部に水を多く含み、特にその中央部に水が多いと推定したが、OsO₄ 固定直後ではオスミウムが周期間線の中央部にはほとんど沈着せず、その両側にわずかな沈着が起り、これに反して周期線部にはオスミウムが強く沈着していると考えられる。このような電子密度構成を考えたとき、Fourier 合成の所見は充分理解し得る。しかしこの際吟味しなければならぬ問題は、新鮮髓鞘に関する試謬法の際に検討したと同様な級数打ちりの効果でなかろうかという問題である。しかし一般に級数打ちりの効果の際あらわれる小起伏(ripple)は原子重心附近に同心状にあらわれるものであるが、OsO₄ 固定髓鞘の際にみられる、周期間線部両側の2つの高まりには、その附近に原子重心と思われる高まりを欠くので、この効果から除外視してさしつかえないものと考えられる。しかし OsO₄ 固定髓鞘の場合試謬法を適用することが不可能なため、これを確認することは出来なかつた。しかし周期間線の二重化の可能性は、すでに述べた各種の変性処理の際の電頭所見における二重化のデータによつて支持されるであろう。Millington & Finean (1958, 1961) は固定前に HgCl₂ 液で処理した髓鞘の周期が拡張し周期間線が二重化している所見を報告していることはすでに述べたが、その際 Fourier 合成を同時に行なつて電子密度分布曲線上に、周期間線の二重化を証明している。この電子密度分布曲線は、著者の OsO₄ 固定髓鞘のそれと類似した図形を示している、しかし Millington らの OsO₄ 固定段階の材料の Fourier 合成は著者の所見とやや異なり、周期間線部の二重化を示していない。しかし Finean (1962) は、1年後に前報告

を譲り、前報と異なる Fourier 合成曲線(著者の図7のDに相当すると思われる)をあげて、これを妥当としている。しかしこれによると、周期線が二重化していることになる。Finean らのこれら2種の曲線は、いずれも著者の得たものと異なつている。電頭の見解ならびに新鮮状態および包埋状態のX線回折所見から推測すると、Finean らの見解にはかなりの無理があるように思われる。

髓鞘に対する OsO₄ 固定作用の機序については、今日なお明確でない点が多い。OsO₄ 固定髓鞘のX線回折像からみると、1次・2次・3次ともに176 Åの単位周期に相当するものであつて、乾燥、脱水、アセトン処理その他の変性の際にあらわれる60 Å附近の異常回折波(Finean, 1953, 1960a; Finean & Millington, 1957; 本陣 & 平松 1961)はこの際みいだされない。この所見は、OsO₄ 固定に際して、髓鞘の分子配列に基本的な著しい変化が起らないことを示している。

OsO₄ 固定後、ethanol 系列による脱水を行なつても、回折像は固定直後のものと比較して、その単位周期に収縮をみる以多には、著明な変化を示さない。また Patterson 解析による vector と、Fourier 合成による電子密度分布は、OsO₄ 固定直後の場合におけるデータに比して、その周期内の様相にほとんど変形を示さない。これらの所見は、固定後脱水操作を加えても単位周期の短縮以多に著しい変化が起らぬことを意味するものであろう。

前記の試料をさらに methacrylate 樹脂に包埋した場合、回折波は非常に弱く、わずかに1次・2次のみが認められた。このような回折波強度の減弱は、Finean (1960 a, 1961 a, b), Millington & Finean (1961) の所見にも示されている。これはおそらく合成樹脂の浸透により、微細な構造相互間の電子散乱の差が不著明となつたことによるものであろう。Patterson 解析および Fourier 合成の結果、包埋前に周期間線の存在に起因すると思われるピークの両側に存在した2つの小さな高まりが合して、単一のピークとなることが認められたが、この事實は、髓鞘が包埋に際して収縮し、特に周期間線の部分が著明に収縮して、二重化していた周期間線が合して単一のものとなると考えると、容易に説明することが出来る。いずれにしても、著者の得た包埋試料における髓鞘の電子密度分布曲線は、電頭下で観察される髓鞘の像から推測される電子密度分布とまったく一致した所見を示している。

KMnO₄ 固定髓鞘の板層構造の電頭像が、OsO₄ 固定の場合のそれと著しく異なることは、以前より知られている(Fernández-Morán & Finean, 1957; Robert-

son, 1958; 高橋, 1961). すなわち KMnO_4 固定では, 髄鞘の周期間線が明瞭にあらわれ, その電子密度と周期線のそれとの差が少ないことが観察されている. Finean (1960 a) は, この問題を X 線回折法によつて追求し, カエル坐骨神経の場合, KMnO_4 固定によつて 1 次・2 次の回折波のうち 2 次が 1 次にくらべて著明であることを観察し, 電顕所見を裏づけているが, この所見は著者の得た結果とよく一致する. さらに著者の Patterson 解析および Fourier 合成所見は, 周期線および周期間線に電子密度の差が少ないことを明示している.

結 論

ハツカネズミ坐骨神経髄鞘の新鮮状態における超微構造, OsO_4 固定, 脱水, 包埋等の一連の処理によるその変化および KMnO_4 固定による変化等を, X 線小角散乱法を用いて追求し, さらにその結果を Patterson 解析法ならびに Fourier 合成法によつて解析し, 次の結論を得た.

(1) ハツカネズミ新鮮髄鞘からの小角散乱像は, 182\AA の単位周期に相当する 1 次, 2 次, 3 次, 4 次, 5 次の回折波を示し, 周期線および周期間線の電子密度差が比較的少ないことが明らかとなつた. このことは Patterson 解析ならびに Fourier 合成によつて, さらに確定的に裏づけることが出来た.

(2) 試謬法によつて図 11 に示すごとき髄鞘単位周期内の電子密度分布モデルを作製した. 周期線は電子密度大で, 周期間線はその電子密度が周期線よりやや小で, 幅はこれよりやや広い. このことは, 周期間線の部分には水分が多く含まれることを推測せしめる.

(3) OsO_4 固定によつて, 髄鞘の単位周期は収縮して 176\AA を示す. 回折像および, Patterson 解析や Fourier 合成から, 周期線および周期間線の電子密度に大きな差が生じたことが判明した. このことはオスミウムが周期線に多く沈着し, 周期間線にはごく少量しか沈着しないことを示すものである. また Fourier 合成の所見は周期間線が二重化する可能性を示した.

(4) OsO_4 固定後, 脱水しても, 回折像や Patterson 解析曲線さらに Fourier 合成曲線の形には, 著明な変化はみられないが, 単位周期は著しく減少して 156\AA を示した. 脱水操作は電顕試料作製中, 最も強く収縮する過程である.

(5) 脱水後 methacrylate 樹脂に包埋した場合, 回折波は不著明となり, 1 次および 2 次波がわずかに認められる程度に止まり, 単位周期は 143\AA を示す. Patterson 解析および Fourier 合成から, 前記 OsO_4

固定髄鞘ならびにこれに続く脱水処理を行なつた髄鞘において二重化した周期間線が, この段階で合して単一のものになることが推定される. また OsO_4 固定の場合, 固定以後周期間線の電子密度は周期線のそれに比して, 著しく小であることが X 線回折実験の結果からも示された.

(6) KMnO_4 固定の場合, 回折像は, 周期線の電子密度と周期間線のそれとの差がほとんど存在しないことを示し, Patterson 解析, Fourier 合成の結果はさらにこのことを確認するものである.

稿を終るに臨み, 御懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師本陣良平教授に謝意を表し, 実験に当つて種々御援助下さつた中村俊雄助教に感謝します. また X 線回折装置使用に当つて, 種々御援助いただいた金沢大学理学部竹村松男教授, ならびに解析法について有益な御助言をいただいた大阪大学蛋白質研究所角戸正夫教授に謝意を表します.

文 献

- 1) Atwood, L. G. & Abul-Haj, S. K. : J. Neurochem., 1, 119 (1956).
- 2) Bear, R. S., Palmer, K. J. & Schmitt, F. O. : J. Cell. and Comp. Physiol., 17, 355 (1941).
- 3) Boehm, G. : Koll. Ztschr., 62, 22 (1933).
- 4) Bogoch, S. : Nature, 190, 150 (1961).
- 5) Brante, G. : Metabolism of the Nervous System, edited by D. Richter, Pergamon Press, London, p. 112 (1957).
- 6) Chinn, P. & Schmitt, F. O. : J. Cell. and Comp. Physiol., 9, 289 (1937).
- 7) Cullity, B. D. : X 線回折要論 (松村源太郎訳), アグネ, 東京, p. 479 (1962).
- 8) Elkes, J. & Finean, J. B. : Surface Chemistry, Butterworths Scientific Publication, London, p. 289 (1949).
- 9) Fernández-Morán, H. : Exp. Cell Res., 1, 143 (1950a).
- 10) Fernández-Morán, H. : ibid, 1, 309 (1950 b).
- 11) Fernández-Morán, H. & Finean, J. B. : J. Biophysic. and Biochem. Cytol., 3, 725 (1957).
- 12) Finean, J. B. : Exp. Cell Res., 5, 202 (1953).
- 13) Finean, J. B. : Nature, 173, 549 (1954 a).
- 14) Finean, J. B. : Exp. Cell Res., 6, 283 (1954 b).
- 15) Finean, J. B. : Metabolism of the Nervous System, edited by D. Richter, Pergamon Press, London, p. 52 (1957).
- 16) Finean, J. B. : Exp. Cell Res., Suppl., 5, 18 (1958).
- 17) Finean, J. B. : Biophysic and Biochem. Cytol., 8, 13 (1960 a).
- 18) Finean, J. B. : ibid,

- 8, 31 (1960b). 19) Finean, J. B. : World Neurology, 2, 466 (1961a). 20) Finean, J. B. : International Review of Cytol, edited by G. H. Bourne & J. F. Danielli, Academic Press, New York and London, XII, p. 303 (1961b).
- 21) Finean, J. B. : Interpretation of Ultrastructure, edited by R. J. C. Harris, Academic Press, New York and London, p. 88 (1962).
- 22) Finean, J. B. & Millington, P. F. : J. Biophysic. and Biochem. Cytol., 3, 89 (1957).
- 23) Finean, J. B., Sjöstrand, F. S. & Steinmann, E. : Exp. Cell Res., 5, 557 (1953).
- 24) Folch-Pi, J. & LeBaron, F. N. : Metabolism of the Nervous System, edited by D. Richter, Pergamon Press, London, p. 67 (1957).
- 25) Freedman, B. : Anat. Rec., 115, 265 (1953).
- 26) Geren, B. B. : Exp. Cell Res., 7, 558 (1954). 27) Handovsky, H. : Koll. Ztschr., 62, 21 (1933). 28) Haurowitz, F. : Chemistry and Biology of proteins, Academic Press, New York, p. 95 (1950). 29) Hess, A. : J. Comp. Neurol., 98, 69 (1953). 30) Hess, A. & Lansing, A. I. : Anat. Rec., 117, 175 (1953). 31) 広瀬 興 : 北海道医学雑誌, 第2年特別号, p. 1 (1924). 32) Honjin, R. : Okajima. Folia Anat. Jap., 27, 179 (1955).
- 33) Honjin, R. : ibid, 30, 257 (1957 a).
- 34) 本陣良平 : 細胞化学シンポジウム, 5, 109 (1957b). 35) 本陣良平 : 総合医学, 14, 673 (1957 c). 36) 本陣良平 : 解剖誌, 34, 附20 (1959). 37) 本陣良平 : 解剖誌, 35, 429 (1960a). 38) 本陣良平 : 脳と神経, 12, 5 (1960b). 39) 本陣良平 : 最新医学, 16, 857 (1961). 40) 本陣良平, 平井善昭 & 井村正人 : 十全医誌, 59, 1048 (1957).
- 41) 本陣良平 & 平松京一 : 解剖誌, 36, 375 (1961). 42) 本陣良平 & 中村俊雄 : 化学, 18, 688 (1963). 43) Honjin, R. & Takahashi, A. : Electronmicroscopy, 11, 139 (1962). 44) Höglund, G. & Ringertz, H. : Acta Physiol. Scand., 51, 290 (1961). 45) 角戸正夫 : 実験化学講座 (日本化学会編), 丸善, 東京, 4巻, p. 269 (1956). 46) Luft, J. H. : J. Biophysic. and Biochem. Cytol., 2, 799 (1956). 47) Millington, P. F. & Finean, J. B. : J. Ultrast. Res., 2, 215 (1958).
- 48) Millington, P. F. & Finean, J. B. : ibid 5, 470 (1961). 49) Palade, G. E. : J. Exper. Med., 95, 285 (1952). 50) Palmer, K. J., Schmitt, F. O. : J. Cell. and Comp. Physiol., 17, 385 (1941). 51) Palmer, K. J., Schmitt, F. O. & Chargaff, E. : ibid, 18, 43 (1941). 52) Robertson, J. D. : J. Biophysic. and Biochem. Cytol., 1, 271 (1955).
- 53) Robertson, J. D. : ibid, 3, 1043 (1957). 54) Robertson, J. D. : ibid, 4, 349 (1958). 55) Schmidt, W. J. : Z. Wissen. Mikr., 52, 158 (1935). 56) Schmidt, W. J. : Zeit. Zellforsch., 23, 261 (1936 a). 57) Schmidt, W. J. : ibid, 23, 657 (1936b). 58) Schmidt, W. J. : Z. Wissen. Mikr., 54, 159 (1937 a). 59) Schmidt, W. J. : ibid, 54, 390 (1937b). 60) Schmitt, F. O., Bear, R. S. & Clark, G. L. : Radiology, 25, 131 (1935). 61) Schmitt, F. O., Bear, R. S. & Palmer, K. J. : J. Cell. and Comp. Physiol., 18, 31 (1941). 62) Sjöstrand, F. S. : Z. Wissen. Mikr., 62, 65 (1954). 63) 高橋 暁 : 十全医誌, 67, 433 (1961). 64) Wolman, M. : J. Neurochem. 1, 370 (1957).
- 65) Wolman, M. & Hestrin-Lerner, S. : ibid, 5, 114 (1960). 66) 山科郁男 : 私信, (1963).

Abstract

The ultrastructure of the fresh sciatic nerves of the mouse and its changes at various stages of preparations for electron microscopy were studied by low-angle X-ray diffraction, and the data obtained were discussed by Patterson analysis and Fourier summation. The results obtained were summarized as follows:

1) The diffraction pattern of the fresh sciatic nerve showed the first, second, third, fourth and fifth diffraction bands corresponding to 182 Å repeating unit. This pattern revealed that the difference between electron density of period line and that of interperiod line in myelin layers was relatively small. This fact was certified by Patterson analysis and Fourier

summation.

2) A model of electron density distribution within the repeating unit of myelin layers was obtained by the method of trial and error. In this model (Fig. 11), the electron density of interperiod line is less dense than that of period line, and the thickness of interperiod line is greater than that of period line. It was presumed by this fact that interperiod line contained a larger amount of water.

3) The OsO_4 fixed specimen showed that there occurred a shrinkage in repeating unit of about 6 Å. The diffraction pattern, Patterson analysis and Fourier summation suggested that the difference between electron density of period line and that of interperiod line became larger by OsO_4 fixation. With reference to the results of electron microscopy, this indicated that the Os deposition in period line was greater than that in interperiod line. The result of Fourier summation suggested "doubling" of interperiod line.

4) The diffraction pattern, Patterson curve and Fourier curve of the OsO_4 -fixed and dehydrated specimen showed no striking change except a remarkable shrinkage in repeating unit of about 20 Å. The shrinkage in this procedure is the most intense during the treatment of specimens for electron microscopy.

5) The methacrylate-embedded specimen gave a more diffuse pattern which showed only the first and second diffraction bands corresponding to 143 Å repeating unit. Patterson analysis and Fourier summation suggested that the interperiod line which showed "doubling" at the OsO_4 -fixed or dehydrated stage lost its doubling profile and assumed a single layer by embedding. The electron density of interperiod line became extremely small after OsO_4 -fixation, as compared with that of period line.

6) The diffraction pattern of KMnO_4 fixed specimen showed that the difference between electron density of period line and that of interperiod line was very slight, and this fact was certified by Patterson analysis and Fourier summation.

写真説明

Plate I

写真1 ハツカネズミ新鮮坐骨神経のX線小角散乱像 (pinhole collimating system).

写真2 ハツカネズミ新鮮坐骨神経のX線小角散乱像 (slit collimating system).

写真3 写真2の試料を OsO_4 固定した場合のX線小角散乱像 (slit collimating system).

写真4 写真3の試料を脱水した場合のX線小角散乱像 (slit collimating system).

写真5 写真4の試料を合成樹脂包埋した場合のX線小角散乱像 (slit collimating system).

写真6 KMnO_4 固定を施したハツカネズミ坐骨神

経のX線小角散乱像 (slit collimating system).

Plate II

写真7 ハツカネズミ新鮮坐骨神経 (写真2と同一材料) の diffractometer によるX線小角散乱の chart.

写真8 OsO_4 で固定した試料 (写真3と同一試料) の diffractometer によるX線小角散乱の chart.

写真9 OsO_4 固定後脱水した試料 (写真4と同一試料) の diffractometer によるX線小角散乱の chart.

写真10 脱水後合成樹脂に包埋した試料 (写真5と同一試料) の diffractometer によるX線小角散乱の chart.

写真11 KMnO_4 で固定したハツカネズミ坐骨神経 (写真6と同一試料) の diffractometer によるX線小角散乱の chart.

Plate 1.

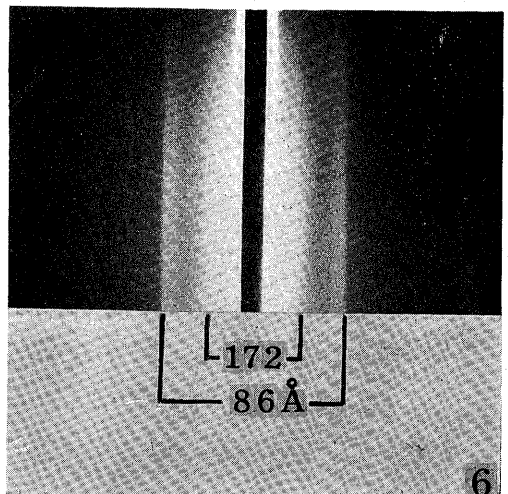
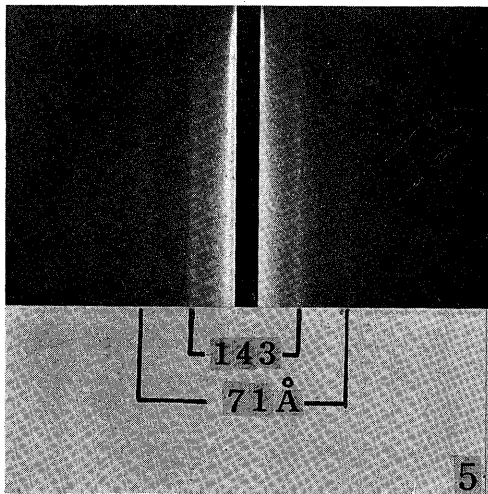
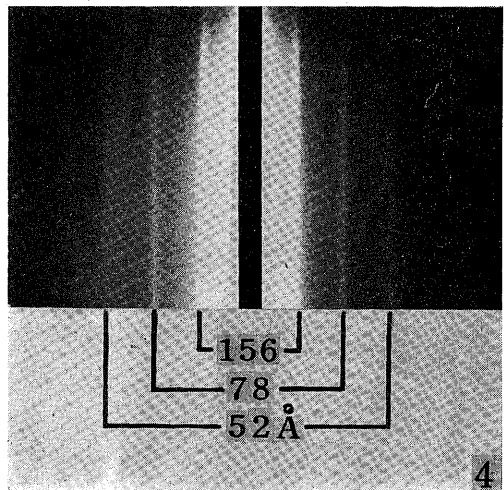
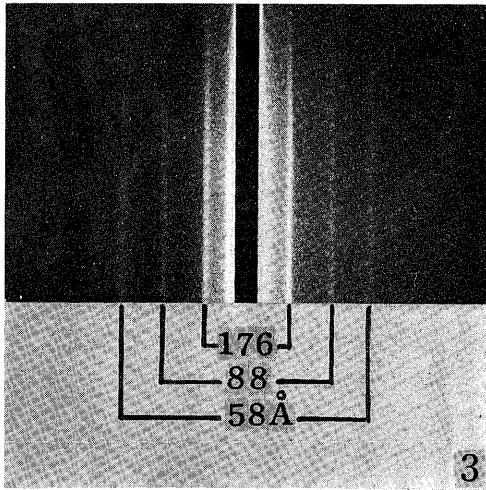
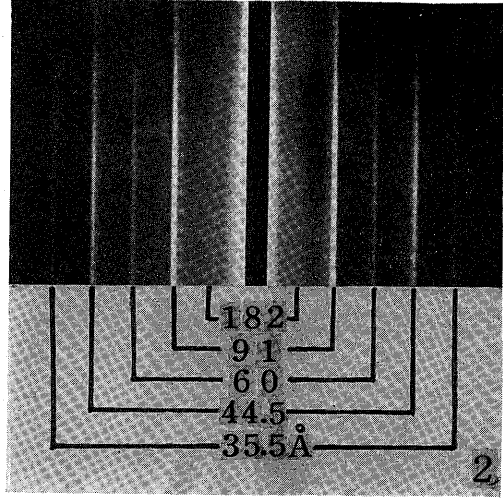
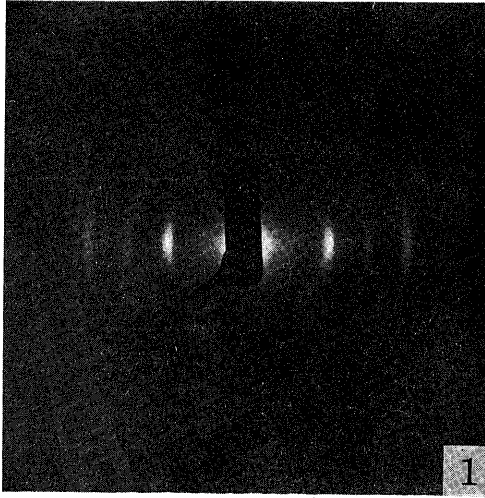


Plate 2.

