

学位論文題名

Postnatal development of the rat corticospinal tract, with special reference to confocal laser scanning microscopy of growing axons.

(ラット皮質脊髄路の生後発達

—共焦点レーザー走査顕微鏡による成長軸索の形態学的検討—)

学位論文内容の要旨

【緒言】

中枢神経系の発生過程では、伝導路を構成する軸索が、その標的ニューロンを認識しシナプスを形成することにより、機能的な結合関係が成立する。成長しつつある軸索には、成長円錐や側枝分岐などの特徴的な構造が観察される。本研究は、これらの表現形態を検討し成長軸索の行動を分析することにより、伝導路の形成機構に関する基礎的情報を得ることを目的とした。

皮質脊髄路は、構成する軸索を特異的かつ容易に標識することができ、齧歯類では出生直後の2週間に投射が形成されるので、成長軸索を観察するために胎仔の材料を必要としない。また、同一個体の脊髄の中で、髄節高位に応じて異なる形成段階を観察でき、発生現象の時間的解析に適している。これらの利点により、ラット新生仔の皮質脊髄路を研究対象とした。

脂溶性蛍光色素DiIは、発生過程のニューロンの観察に有用な標識物質であるが、従来の落射蛍光顕微鏡では、分解能の制約から少数の軸索のみを標識し、低倍率での観察が主体であった。本研究では、分解能の高い共焦点レーザー走査顕微鏡を応用して、多量のDiIにより多数の軸索を順行性に標識した上で、線維束の全体像から個々の軸索の微細な構造に至るまで、段階的に観察することができた。

【材料と方法】

42匹のWistar系ラット新生仔を材料とした。色素の注入と固定に際して、生後0日(P0)からP7までの動物には碎水中で低体温麻酔を施し、P8以上では抱水クロラルの腹腔内投与により麻酔した。総量0.6—1.0 μ lの25%DiIを右終脳半球の知覚運動野に注入した。DiIの注入から灌流までは母獣に戻して哺育させ、その期間は、P1に固定した2例のみ24時間、P2からP11までに固定した40例では48時間に定めた。以下の日齢は灌流の時点を表す。4%の燐酸緩衝パラフォルムアルデヒドを経心的に灌流固定した後、同じ固定液に24時間以上浸漬した。脊髄を摘出し、マイクロスライサーを用いて100 μ m厚の矢状断または横断切片を作

製した。Bio-Rad社製MRC-500を用いて標識軸索を観察、写真撮影した。

【結果】

① 走行経路：標識された皮質脊髓路軸索は、まとまった線維束を形成し、常に左(色素注入半球の反対側)の後索最腹側部に位置した。腰膨大までは中心管の近傍を下行し、仙髄以下では脊髓背面に接近した。白質における線維束全体の走行経路に個体差はなかったが、個々の軸索は線維束内で著しく蛇行し、互いに平行な走行を示さず、軸索の配列に部位局在性は認めなかった。

② 成長円錐：白質の標識線維束は、先行する少数の軸索と、これに遅れる多数の軸索によって構成され、それぞれを先導軸索、追隨軸索と区別した。両群とも軸索の最先端部に成長円錐を有し、その大きさは、より近位側にみられる軸索腫大と同程度の小さなものから、数倍に及ぶものまで様々であり、その形状は、紡錘状、楕円状、数珠状、扁平状、明瞭なlamellipodiumを伴うものなど多彩だった。しかし先導軸索と追隨軸索の間には、成長円錐の大きさや形態に差はみられなかった。各日齢で、追隨軸索の成長円錐は極めて広い髄節に観察されたため、軸索伸展の開始時期か成長速度に、かなりのばらつきがあると解釈された。

③ 先導軸索の成長経過：先導軸索の成長円錐は、日齢に応じて比較的定まった髄節に観察され、P1で頸膨大に、P2からP4にかけて胸髄に、P5からP7にかけて腰膨大に、P8以上で仙髄に存在しており、成長速度は平均約4mm/日と計算された。即ち、追隨軸索とは対照的に、先導軸索は一定の時間経過に従って成長していた。

④ 白質における投射側枝：線維束を離れ灰白質に投射するものは、常に軸索本体から分岐する側枝であり、軸索本体の成長円錐が進行方向を変更して灰白質に向かうことはなかった。成長円錐の近位側に、側枝発芽の初期像と思われる短い分枝が観察された。白質における側枝の分岐形態は、軸索本体から腹側に向かって側枝がほぼ垂直に分れる頻度が最も高いが、2次分岐により異なる領域に2本の投射側枝を与える例や、共通した軸索本体の近接する部位から2本の側枝が出る例がみられ、稀には背側への側枝もあり、分岐の形態は総じて多様であった。側枝が灰白質に侵入する方向は、線維束に対して垂直に離れる頻度が最も高いが、尾側方向や吻側方向に斜走する場合や、起源の異なる側枝が密集した後に、異なる標的領域に拡がる像もみられた。

⑤ 灰白質における投射側枝：矢状断切片で、投射側枝は灰白質内でさらに分岐を繰り返し、広範囲の標的領域に分布した。横断切片では、P3以上の頸膨大で灰白質に投射側枝が観察され、常に標識線維束と同側で分岐を繰り返した。分枝が到達する領域は、後角、中間質、前角と様々であるが、起源を共通にする複数の分枝は灰白質の限られた範囲に集まることから、特定の標的ニューロンに投射する傾向が予想された。

⑥ 側副線維束：P4の頸胸髄と、P8以上の腰仙髄で、後索内の主要な線維束の腹側に側副的な線維束を認めた。腰仙髄では、規則的な間隔で主要線維束との分離と合流を繰り返したが、側副線維束から灰白質に投射する線維はみられなかった。

【考察】

① 皮質脊髄路の成長過程：DiIによる標識法は、軸索の微細構造を鮮明に観察できる点では、ワサビ過酸化酵素(HRP)を用いた軸索標識法を凌駕する。共焦点レーザー走査顕微鏡の応用により、厚い切片に含まれる多数の軸索が観察の対象となり、高倍率での検討が可能となった結果、線維束内で軸索が不定の走行経路をとり、投射側枝の分岐が多様な形態を示すことが新たに明かとなり、皮質脊髄路の側副線維束が本研究で初めて記載された。投射側枝は軸索本体から直角に分岐する頻度が高く、この場合は標的から最短距離の位置で分岐したと解釈できるが、長い距離を斜走する投射側枝の存在からは、投射側枝自体が標的を探索する機能を備えていると考えられる。共通の軸索本体から複数の側枝が分岐し異なる髄節領域に投射する所見からは、1対多の結合関係を反映している可能性と、発生初期における側枝の過剰産生を示している可能性が考えられる。

② 標的誘導機構と特異的結合の成立：化学的親和性仮説によれば、標的からの拡散性の信号が軸索投射を誘導するとされるが、共通の空間を通過しながら異なる標的領域に投射する側枝の存在から、細胞レベルの厳密な対応関係を説明するには不十分と言える。

分子道標仮説によれば、軸索の通過地点に敷かれた誘導分子を認識しながら成長するとされ、グリア細胞の分化の経過が先導軸索の時間経過に一致するとの報告と考え合わせると、先導軸索の成長過程を説明し得るが、成長の時間経過が際立って異なる追隨軸索では、別の機構が予想される。

選択的安定化仮説によれば、過剰に産生されたシナプスの間で競合と選択が作用する結果、機能的結合関係が成立するとされ、発生過程にみられる側枝消退現象はこの仮説を支持する。本研究で観察された軸索本体と側枝の一部が、その後の経過で消退し、神経回路が再編成される可能性は十分に考えられる。

【結語】

① ラット新生仔の皮質脊髄路を、DiIにより順行性に標識し、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて観察した。

② 個々の軸索が線維束において不定の走行経路をとる点、投射側枝の分岐形態が多彩である点、主要線維束と側副線維束が存在する点など、伝導路の形態形成過程にみられる多様性が、新たに明かとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 上 芳 郎

副 査 教 授 加 藤 正 道

副 査 教 授 阿 部 和 厚

学位論文題名

Postnatal development of the rat corticospinal tract, with special reference to confocal laser scanning microscopy of growing axons.

(ラット皮質脊髄路の生後発達

—共焦点レーザー走査顕微鏡による成長軸索の形態学的検討—)

中枢神経系の発生では、伝導路を構成する軸索が、その標的ニューロンを認識しシナプスを形成する結果、機能的な結合関係が成立する。本研究では、発生過程の軸索に観察される成長円錐や側枝分岐などの特徴的な構造を検討し成長軸索の行動を分析することにより、伝導路の形成機構に関する基礎的情報が得られた。

皮質脊髄路は、構成する軸索を特異的かつ容易に標識することができ、齧歯類では出生直後の2週間に投射が形成されるので、成長軸索を観察するために胎仔の材料を必要としない。また、同一個体の脊髄の中で、髄節高位に応じて異なる形成段階を観察でき、発生現象の時間的解析に適している。これらの利点により、ラット新生仔の皮質脊髄路を研究対象とした。

脂溶性蛍光色素DiIは、発生過程のニューロンの観察に有用な標識物質であるが、従来の落射蛍光顕微鏡では、分解能の制約から少数の軸索のみを標識し、低倍率での観察が主体であった。本研究では、分解能の高い共焦点レーザー走査顕微鏡を応用して、多量のDiIにより多数の軸索を順行性に標識した上で、線維束の全体像から個々の軸索の微細な構造に至るまで、段階的に観察することができた。

生後1日から11日のWistar系ラット新生仔総計42匹を材料とした。25%DiIを右終脳半球の知覚運動野に注入した後、動物を母獣に戻して哺育させ、その期間は生後1日に固定した2例のみ24時間、その他の40例では48時間に定めた。4%の磷酸緩衝パラフォルムアルデヒドを経心的に灌流した後、浸漬固定を追加した。脊髄を摘出し、マイクロスライサーを用いて100 μ m厚の矢状断または横断切片を作製し、Bio-Rad社製MRC-500を用いて標識軸索を観察した。標識された皮質脊髄路軸索は、まとまった線維束を形成し、常に色素注入半球反対側の後索最腹側部に位置した。腰膨大までは中心管の近傍を下行し仙髄以下では脊髄背面に接近した。白質における線維束全体の走行経路に個体差はなかったが、個々の軸索は線維束内で著しく蛇行し、互いに平行な走行を示さず、軸索の配列に、大脳皮質の起始ニューロンの位置に対応するような、部位局在性は認めなかった。白質の標識線

維束は、先行する少数の先導軸索と、これに遅れる多数の追隨軸索によって構成され、両群とも軸索の最先端部に成長円錐を有したが、先導軸索と追隨軸索の間に、成長円錐の形態に差はみられなかった。成長円錐の形状は紡錘状、楕円状、数珠状、扁平状、明瞭な lamellipodium を伴うものなど多彩だった。各日齢で、追隨軸索の成長円錐は極めて広い髓節に観察されたため、軸索伸展の開始時期か成長速度に、かなりのばらつきがあると解釈された。一方、先導軸索の成長円錐は、日齢に応じて比較的定まった髓節に観察され生後1日で頸膨大に、2日から4日にかけて胸髓に、5日から7日にかけて腰膨大に、8日以上で仙髓に存在しており、成長速度は平均約4mm/日と計算された。即ち、追隨軸索とは対照的に、先導軸索は一定の時間経過に従って成長していた。線維束を離れ灰白質に投射する線維は、常に軸索本体から分岐する側枝であり軸索本体の成長円錐が進行方向を変更して灰白質に向かうことはなかった。側枝の分岐形態は、軸索本体から腹側に向かって側枝がほぼ垂直に分れる頻度が最も高いが、共通した軸索本体から異なる領域に投射する複数の側枝が出る例や、稀には背側への側枝もあり、分岐の形態は総じて多様であった。側枝が灰白質に侵入する方向は、線維束に対して垂直に離れる頻度が最も高いが、尾側や吻側方向に斜走する場合や、起源の異なる側枝が密集した後に、異なる標的領域に拡がる像もみられた。投射側枝は灰白質内でさらに分岐を繰り返す、広範囲の標的領域に分布した。頸膨大での投射側枝は、常に標識線維束と同側の灰白質で分岐を繰り返す、その分岐が到達する領域は、後角、中間質、前角と様々であるが、起源を共通にする複数の分岐は灰白質の限られた範囲に集まることから、特定の標的ニューロンに投射する傾向が予想された。生後4日の頸胸髓と、8日以上での腰仙髓で、後索内の主要な線維束の腹側に側副的な線維束を認めた。腰仙髓では、規則的な間隔で主要線維束との分離と合流を繰り返したが、側副線維束から灰白質に投射する線維はみられなかった。

本研究では、厚い切片に含まれる多数のDII標識軸索を、共焦点レーザー走査顕微鏡の応用により広範囲かつ観察した結果、線維束内で軸索が不定の走行経路をとり、投射側枝の分岐が多様な形態を示すことが新たに明かとなり、皮質脊髄路の側副線維束が本研究で初めて記載された。投射側枝は軸索本体から直角に分岐する頻度が高く、この場合は標的から最短距離の位置で分岐したと解釈できるが、長い距離を斜走する投射側枝の存在からは、投射側枝自体が標的を探索する機能を備えていると考えられる。共通の軸索本体から複数の側枝が分岐し異なる髓節領域に投射する所見からは、1対多の結合関係を反映している可能性と、発生初期における側枝の過剰産生を示している可能性が考えられる。

以上、本研究は、ラット新生仔の皮質脊髄路をDIIにより順行性に標識し、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて観察することにより、伝導路の形態形成過程にみられる多様性を新たに明かとした点に、研究の創意が見られ、神経発生学の分野に寄与した論文として、医学博士の学位に相応すると判定した。