

大脳皮質の発達とセロトニンニューロン

II. 未熟脳のセロトニン終末

前田 敏博* 藤宮 峯子** 木村 宏*

脳の発達にとってアミンニューロンが重要な意義をもつてであろうことは永く考えられてきた。この線に沿った多くの実験的研究がなされているにもかかわらず、基本的な両者の関係を知るにはまだほど遠いものがある。この原因の1つに、正常な神経発生の過程でアミン線維がどのようにして終末を形成していくのか、とくに受容側細胞の種類とその発達段階とを考慮した終末形成(synaptogenesis)に関する知識を全く欠いていることがあげられる。アミンニューロンを特異的に染色し、かつ満足する形態学的研究の行える方法をもち合わさなかったからである。

近年私どもはアミン特異抗体を用いる免疫組織化学やモノアミン酸化酵素各アイソタイプを用いる酵素組織化学などによって、アミン線維終末の形態学的研究法の改良を検討してきた結果、ようやく両者とも電子顕微鏡による微細構造の研究が可能となった。本研究はその1つであるセロトニンの免疫組織化学を用いて、ラット大脳皮質における神経細胞の分化過程とセロトニン入力との関係を形態学的に調べたものである。先に私どもはマウスの大脳皮質におけるセロトニン線維の生後発達を調べ、体性知覚野が分化する段階で一過性に集中的セロトニン入力が起こる現象を見出した。本研究では同様の現象がラット脳においても出現することを確かめ、つづいて、もっとも早期に本現象のみられる体性知覚野 Sm I の前背側部に位置する知覚運動野でのセロトニンニューロンの終末形成と皮質細胞の形態分化とを、電子顕微鏡下に詳しく観察した。本報告ではとくに生後3日について詳しく記載する。

材料および方法

生直後、2日、3日、6日のウイスター系ラットを用いた。4%パラホルムアルデヒド(FA)、0.5%グルタルアルデヒド(GLU)、0.2%ピクリン酸(PA)を含む溶液で左心室より灌流固定し、取り出した脳を、4%FA、0.2%PA溶液に2日間浸漬固定した。ビブラトームにて50 μ mの切片作成後、15%しょ糖溶液にて洗浄、その後、セロトニン免疫組織化学を行った。光顕用には0.1% Triton XPBS溶液を用い、電顕用には、Triton Xを含有しないPBS溶液中で、第1抗体以下の反応を行った。ニッケルDAB反応にて染色した後、オスミウム固定し、電子顕微鏡用包埋を行った。

結果

1) セロトニン入力生後発達の全体像

大脳皮質へのセロトニン線維の進入は、帯状野を経るものと内包を経るものがある。新皮質投射の多くは主に後者によっており、皮質内では脳梁に沿うものと最表層をまわって進入するものがある。新皮質への進入は前頭葉から後頭葉へ、頭頂葉から側頭葉への方向に進

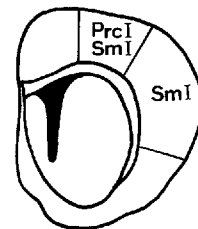


図1 ラット生後3日の大脳皮質区分を示す模式図。観察は運動領野(Prc I)と体性知覚領野(Sm I)が混在する前背側部(知覚運動野Prc I, Sm I)で行った。

* 滋賀医科大学解剖学教室(T. Maeda, Department of Anatomy, Shiga Medical School)

** 滋賀医科大学第2内科学教室

む。

体性知覚野 (Sm I) でみると、生直後から2日にかけて皮質下板で太い線維が多くは接線方向に走り、少数のものが垂直に皮質板に粗に進入する。また最表層にも水平に走る線維がみられる。生後3日になると皮質下板に多数の線維が集団となって叢を作り、そこから皮質板へ数を減じながら上昇している。皮質下板の線維塊は分離したバレル様構造をとり、背側から腹側へと順次明瞭となり、生後6日で Sm I 全野にわたって観察される。

2) 体性知覚野前背側部のセロトニン入力

この領域はもっとも早期にセロトニン線維集団 (塊) のみられる場所である (図1)。生後3日でみると、皮質下板の中から上層にかけてバリコシティーが密に集合してバレル様構造をなしている。点状のバリコシティーの多くは細胞体のまわりを取り囲むように位置しており、細胞体の粗ないわゆる細胞間にも同様な構造がみられる。

その終末様線維集団から延びる線維が皮質板に入り、その中から上層附近まで進入している。バリコシティーは皮質下板のものに比べてやや小さい。

6日になるとセロトニン線維集団はやや上層に限局してみられるようになる。バリコシティーの大きさは3日に比べるとかなり小さくなる。おそらく第四層の形成域と思われる。

3) 体性知覚野前背側部におけるセロトニンニューロン終末形成

生後3日における本領域を電子顕微鏡で観察すると、皮質板には未分化な神経細胞が集合しているのに対し、皮質下板には多くの突起を出して分化しつつある細胞が、突起の集団に隔てられてより散在性にみられる。

皮質板におけるセロトニン線維は、密接する未分化細胞の間隙に進入して、しばしば板状となって細胞体を囲むように細胞間隙を埋めている (図2)。その一部が膨らんで、中にミトコンドリアを入れる構造があり、おそらく光学顕微鏡でみられる小さなバリコシティーにあたるものと思われる。この膨らみと細胞体との間には特別な接着構造はみられない。やや細胞の集合が粗になり、細胞体の周囲が凹凸をボス場所には、かなり大きな膨らみが細胞質の凸部に接着してしばしばみられる。このセロトニン免疫陽性のバリコシティー様構造物の中にはミトコンドリアの他にシナプス小胞が存在し、接着部の膜間隙はやや拡大している場合が多い。さらに細胞間に位置し細胞突起と接着する膨らみは、より終末様構造を示している (図3)。

皮質下板にあるセロトニン免疫陽性構造物の多くは、樹状突起様構造と接着する終末様膨らみである。中にミトコンドリアとシナプス小胞を入れ、接着部の膜隙はやや拡大し、後膜下に少量の細胞質沈着のみられるものも

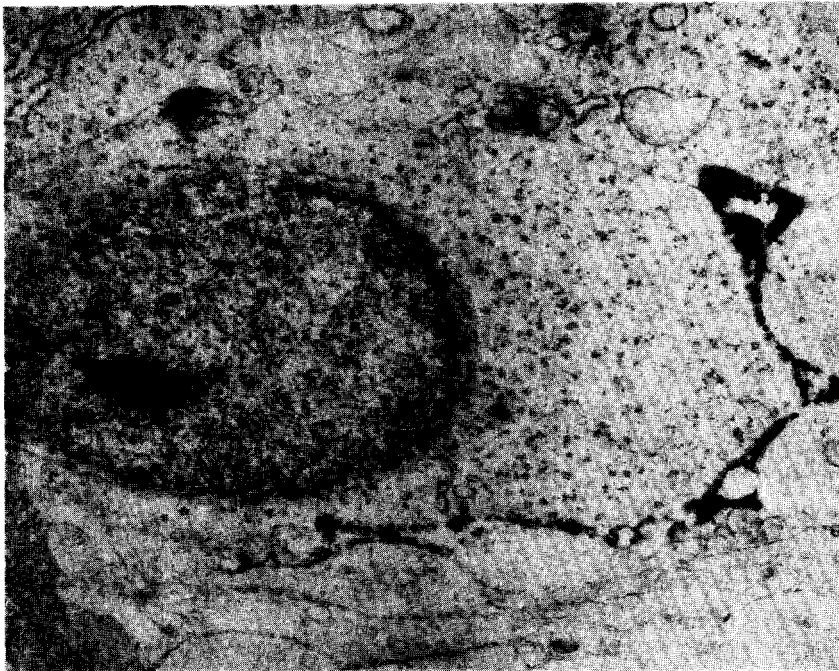


図2 ラット生後3日の皮質板内におけるセロトニン線維。未分化な神経細胞の間隙にセロトニン線維が板状になって進入している。(×18,000)

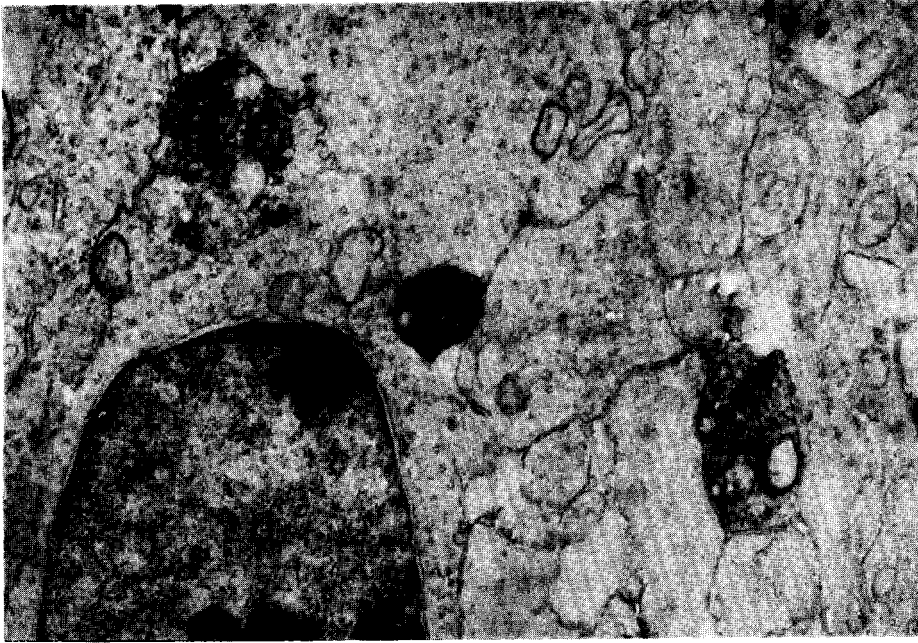


図 3 図 2 よりやや下層の皮質板内セロトニン線維。セロトニン線維が接着した部分が突出している。細胞間にはすでに軸索-樹状突起シナプス様の構造を示す線維がみられる。(×21,000)

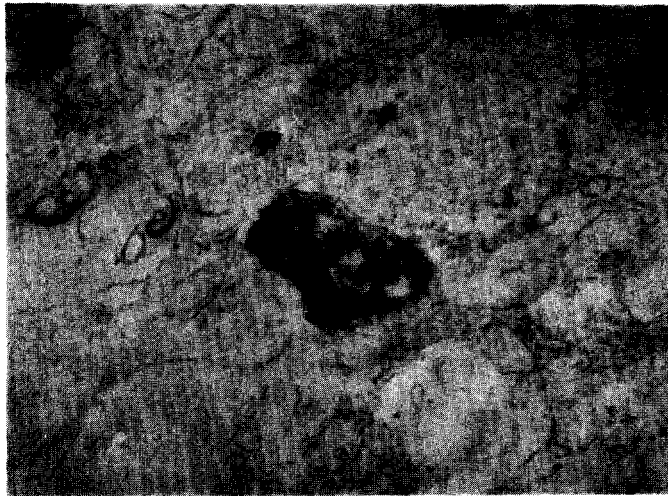


図 4 皮質下板内にみられるセロトニン線維。多くの軸索-樹状突起シナプスを作る終末がみられる。(×24,000)

ある。光学顕微鏡でみられた細胞体を取り囲むバリコンティーム、電子顕微鏡でみるとその多くは軸索-樹状突起シナプスを形成する終末とみなされる。細胞体に接するものも若干みられるが、そのさいの多くは皮質板同様特別な接合構造は認められない。

考 察

先に私どもはマウスにおける観察で、大脳皮質体性知覚野 (Sm I) の発達過程の、とくに第四層形成に一致して、一過性のセロトニンニューロンの集中的投射が起こることを見出し報告した。この現象は今まで長年の課

題であった“アミンニューロンと脳の発達”に対して、手掛りを与えてくれるものとして期待される。この問題を発展させるためには今後多くの実験的研究が必要と思われるので、他領域の研究結果との比較も含めて、実験動物としてもっとも多く用いられているラットの方が本研究には適していると考えられる。そこで今回ラットの生後発達を調べたところ、マウスで得られた結果と本質的には全く等しい現象が観察された。これは今後ラットでの研究を可能にするのみならず、普遍的現象としておそらくヒトを含めて大脳皮質の発達と関連したものであることをも示唆している。

今回とくに詳しく観察した体性知覚野 (Sm I) 前背側部は濃密に知覚性と運動性機能が混在するところで、細胞構築的にもそれを反映して第五層と第四層とがともに発達している特異な領域である。この場所にもっとも早期にセロトニン入力集中化が起こる理由是不明であるが、この現象がロヒゲ領域にもっとも顕著に現われるものではあるが、他の知覚野にかなり一般的にみられることを考えると、この領域の知覚性細胞の分化がより早期に起こることを反映しているであろう。

皮質板内の未分化細胞を囲むようにして細胞間隙に入り込むセロトニン線維が、おそらく最初の皮質細胞とのもっとも原始的な接触でありかつ終末形成の始まりと考えられる。同領域内の皮質板、皮質下板に観察された種々の免疫陽性構造物の形態から、その後につづくセロトニン終末形成はおそらく次のようであろうと思われる。細胞体に接触した板状線維の一部が脹らみミトコンドリアが集まる。その部でのセロトニン合成能を高めながら膨脹を進める。一方皮質細胞は接触部分を突出させて樹状突起を形成させ始める。接触部の膜間隙に多糖類の沈着が起こるために間隙幅がやや拡大し、後膜下にも細胞質が沈着を始めシナプスとしての接着構造ができ上がるころには、樹状突起は成長して終末は細胞間に位置する。

皮質の発育に伴い相対的に深層に移動していく分化した神経細胞は、完成したセロトニン終末を周囲に拡げた樹状突起に接着しているため終末は散在性にみえるようになる。

この終末形成の像は今まで想像されなかった新しい神経生物学上の問題を提起している。第一に樹状突起を形成する以前の密着し合った未分化神経細胞にセロトニン線維が積極的に接触を開始することである。さらにシナプス構造の完成以前にセロトニンを合成しおそらく放出しているであろうことである。このセロトニンはおそらく興奮の伝達を行うのではなく、液性物質として受容側細胞の初期分化に影響を与えていると思われる。

第二に接触部分が樹状突起となって成長していくこと、換言すれば形態的分化を示す以前の細胞膜がすでに受容性分化をとげていると思えることである。ニューロンの結合は決して偶然起こることではなく、入力線維は受容側を認識しているはずであるからである。

アミン入力を生後または胎生時に消去する実験が多く行われたが、その結果のうちで、もっとも確かと思えるものに一般シナプスの形成の促進がある。つまりアミン入力は他の入力の影響を遅らせていると考えることができる。一般にニューロンの分化・発達はさまざまな入力の影響下にあり、視覚領野ニューロンが視覚入力によって機能分化をとげる事実は有名である。多くの場合その入力は有利な影響を与えているものであろうが、時期的に早すぎると逆に不利に働くであろうことも容易に想像できる。セロトニンニューロンがこれほど早い時期に、とくに知覚性細胞と濃密に関係をもち、かつセロトニン放出下に受容性樹状突起を成長させることは、皮質ニューロンの発達段階における入力の調節機構として重要な意義をもつことを示唆している。大脳皮質の機能発達とアミンニューロンの課題に重要な手掛りを提供したといえよう。

abstract

Development of Cerebral Cortex and Serotonin Neuron

II. Morphogenesis of serotonergic terminal

Toshihiro Maeda, Mineko Fujimiya and Hiroshi Kimura

It is widely assumed that the aminergic neuron may participate in development of the brain. Despite many experimental studies in this line

of thinking, anything is hardly known about the fundamental relationship between the two. One reason for this may lie in little information con-

cerning terminal formation of the aminergic neuron referring to neuronal differentiation in developing nervous tissue. The present study aimed to clarify morphogenesis of serotonergic terminal in developmental process of postnatal cerebral cortex of the rat.

Rats from 0 to 6 postnatal days were subjected to immunohistochemistry of serotonin. The anterodorsal part of somatosensory cortex (Sm I) was observed at light and electron microscopic levels.

The anterodorsal part of somatosensory area studied in the present study shows characteristics of both the motor and the sensory cortex in terms of the function and also morphology. It is composed of dense laminae of IV and V with numerous glanular and pyramidal cells respectively in mature cortex.

Thick varicose fibers showing immunoreactivity of serotonin innervate the subcortical plate and also, but less densely, the superficial layer of cortex during early period up to 2 days. From these, several scattering fibers diverge toward the cortical plate.

At 3 days the serotonergic terminal fibers are closely packed to form a columnar mass in the subplate where the cell bodies are seen to be surrounded by numerous immunoreactive varicosities. A number of varicose fibers leaving from this plexus innervate up to middle layer of the cortical plate situated just dorsally.

Enzyme antibody method used in the present study well preserved fine structure of immature nervous tissue and allowed us to analyze the process of morphogenesis of serotonergic terminal.

In the upper cortical plate where immature nerve cells are very closely packed, serotonin containing plate-like fibers enter intercellular space as surrounding cell body. They show small bulges at places which contain mitochondria and synaptic vesicles but show no special contact structure with cell membrane. In the lower cortical plate where nerve cells are somewhat loosely arranged, the immunoreactive bulgings become large in size and comprise a large number of synaptic vesicles. The cleft of apposed membranes has tendency to be wide. The cytoplasm contacted with the varicosity usually protrudes into neuropil. Serotonin containing varicosities located in the narrow neuropil surrounding the cell body show a synaptic structure of axodendritic type.

In the subplate there are numerous immunoreactive bulgings, most of which contact with dendritic process with synaptic structure. Aoxosomatic terminals are also seen but always show no

special synaptic profile.

The synthesis of various pictures of the serotonin containing structure described above leads us to suppose the morphogenesis of serotonergic terminal as follows. Plate-like ending first associates with immature cell and swells at places. The swelling grows rapidly while synthesizing and presumably liberating serotonin in situ. The cytoplasm contacted with serotonin containing bulging protrudes gradually into the neuropil to form the dendritic process. The nerve cell migrates ventrally in relative position as extending the dendritic process loaded by serotonergic terminals which are sequentially added. This results in apparent dispersion of serotonergic terminals which show a transitory concentration in the vicinity of immature cell during early development.

Morphogenetical process of serotonergic terminal newly revealed in this study presents some important problems in terms of neurobiology. First, serotonergic nerve terminal actively contacts with very immature nerve cells which are still closely packed with each other. Serotonin is synthesized in situ and probably is liberated from terminal before synapse formation. It is easily supposed that this serotonin does not play a role in the transmission of nerve impulse but affects early differentiation of target cells as a humoral substance. Secondly, the parts of cytoplasm contacted with terminals grow up into dendritic process. That is, the cell membrane already differentiates with respect to receptive capacity before morphological differentiation, since terminal input should discern the definite receptor.

Among the results obtained from experimental studies dealing with deprivation of aminergic innervation during development, of great interest is an acceleration of synaptogenesis of other neurons resulted from absence of aminergic terminal. It is suggested that aminergic innervation postpones effect of other neuronal input. Development and differentiation of neuron progress in general depending on effect of input. However it is likely that the effect of input is not always favorable for differentiation of neuron in the case that innervation is done during too premature stage in particular. In this context it is very important fact that transitory dense innervation of serotonergic neuron takes place generally in the sensory cortex including the anterodorsal area of the Sm I and is associated closely with lamina IV. Therefore it is highly probable that control mechanism of input on premature neuron is one of the functional significances of serotonin neuron during neurogenesis.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



脳の発達にとってアミンニューロンが重要な意義をもつであろうことは永く考えられてきた。この線に沿った多くの実験的研究がなされているにもかかわらず、基本的な両者の関係を知るにはまだほど遠いものがある。この原因の1つに、正常な神経発生の過程でアミン線維がどのようにして終末を形成していくのか、とくに受容側細胞の種類とその発達段階とを考慮した終末形成(synaptogenesis)に関する知識を全く欠いていることがあげられる。アミンニューロンを特異的に染色し、かつ満足する形態学的研究の行える方法をもち合わせなかったからである。

近年私どもはアミン特異抗体を用いる免疫組織化学やモノアミン酸化酵素各アイソタイプを用いる酵素組織化学などによって、アミン線維終末の形態学的研究法の改良を検討してきた結果、ようやく両者とも電子顕微鏡による微細構造の研究が可能となった。本研究はその1つであるセロトニンの免疫組織化学を用いて、ラット大脳皮質における神経細胞の分化過程とセロトニン入力との関係を形態学的に調べたものである。先に私どもはマウスの大脳皮質におけるセロトニン線維の生後発達を調べ、体性知覚野が分化する段階で一過性に集中的セロトニン入力が起こる現象を見出した。本研究では同様の現象がラット脳においても出現することを確認し、つづいて、もっとも早期に本現象のみられる体性知覚野 Sml の前背側部に位置する知覚運動野でのセロトニンニューロンの終末形成と皮質細胞の形態分化とを、電子顕微鏡下に詳しく観察した。本報告ではとくに生後3日について詳しく記載する。