

Plastic Changes in Projection from Locus Coeruleus to Lateral Geniculate Nucleus Following Neonatal 6-Hydroxydopamine Treatment

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8128

ラット新生仔期 6-hydroxydopamine 投与による青斑核 —外側膝状核投射の可塑的变化

金沢大学医学部生理学第二講座 (主任: 山本長三郎教授)

青 木 扶 実

(平成1年5月31日受付)

新生仔期ラットにカテコールアミンニューロンの神経毒物質である 6-hydroxydopamine (6-OHDA) を投与すると、大脳皮質のノルアドレナリン (noradrenaline, NA) 作動性線維終末は除去され、脳幹部では NA 作動性線維による過剰投射がおこなることが、生化学的方法や形態学的方法を用いて明らかにされている。このことは、新生仔期 6-OHDA 処置によって、脳幹にある青斑核 (locus coeruleus, LC) 由来の NA 作動性線維が LC から遠位の投射部位で変性し、代償的に近位の投射部位へ線維が発芽することを示している。従来の研究において、外側膝状核背側部 (dorsal part of lateral geniculate nucleus, dLGN) における NA 作動性ニューロン投射への 6-OHDA 投与の影響に関する結果は一定していない。したがって、今回の研究では、dLGN における NA 作動性線維の再生、発芽を明らかにすることを目的とした。生後 6 時間以内のラットに 6-OHDA を皮下注射し、生後 6 週から 26 週に組織蛍光法と電気生理学的方法による実験をおこなった。組織蛍光法により、6-OHDA 処置動物では、大脳皮質のカテコールアミン線維はほとんど消失し、dLGN ではカテコールアミン線維の密度が増加していることを確認した。ウレタン麻酔下で LC ニューロンの単一活動電位を細胞外記録し、前頭皮質 (frontal cortex, FC)、視覚皮質 (visual cortex, VC) および dLGN を電気刺激して逆行性放電の有無を観察した。LC から各脳部位への投射量を定量化するために、各部位の刺激により逆行性放電が誘発される LC ニューロンの数の割合 (投射指数) を求めた。6-OHDA 処置動物では、FC と VC の投射指数は著明に減少し、dLGN の投射指数は明らかに増加した。対照群動物の約 50% の LC ニューロンでは、dLGN 刺激による逆行性放電の潜時が 50 msec 以上であった。それに対して、6-OHDA 処置動物のニューロンではすべて 50 msec 以下であった。LC ニューロン軸索の伝導速度は 6-OHDA 処置群で対照群と比較して遅くなっていた。逆行性放電の閾値を測定した結果、6-OHDA 処置動物の dLGN における LC ニューロン線維終末の電氣的興奮性が上昇していることが示された。これらの結果から、生直後に 6-OHDA を投与された動物では、LC から dLGN に投射する線維は、次の二通りの様式で再生、発芽することが考えられる。1) 大脳皮質へ投射する LC ニューロンでは、遠位の投射部位である大脳皮質における終末線維は変性し、近位の dLGN へは軸索線維が再生する。2) dLGN へ投射している LC ニューロンでも、長い投射経路をとる終末線維は変性し、それに変わって細胞体近位から終末線維が再生する。

Key words locus coeruleus, 6-hydroxydopamine, plasticity, sprouting, lateral geniculate nucleus

Abbreviations: DBH, dopamine- β -hydroxylase; dLGN, dorsal part of lateral geniculate nucleus; DMSO, dimethyl sulfoxide; DNB, dorsal noradrenergic bundle; FC, frontal cortex; GA, glyoxylic acid; HIP, hippocampus; LC, locus coeruleus; ME5, mesencepha-

ノルアドレナリン (noradrenaline, NA) 作動性ニューロンでは、中枢神経系の中でも傷害に反応して可塑的に変化する能力が高い¹⁾。とくに発達期の脳ではこの能力が著しい。Jonsson ら²⁾と Sachs ら³⁾は、新生仔期にカテコールアミンニューロンの神経毒物質である 6-hydroxydopamine (6-OHDA) を投与すると、成熟動物において大脳皮質の内在性 NA 濃度と [³H] NA の取り込みが減少し、脳幹部では逆に増加することを明らかにした。この現象は剪定効果と呼ばれており、NA 作動性ニューロンの細胞体から遠位の投射部位で NA 作動性線維終末が変性した場合、その部位では終末線維が再生せず除神経の状態が持続するが、細胞体近位の投射部位では代償的に過剰投射がおこることを示している。

NA 作動性ニューロン投射の中間部位にあたる視床での 6-OHDA 投与による NA 作動性ニューロン投射への影響は、生化学的方法で調べられているが、結果は一定していない⁴⁻⁶⁾。Gustafson と Moore⁷⁾はドーパミン-β-水酸化酵素 (dopamine-β-hydroxylase, DBH) に対する抗体を用いた免疫化学法によって、新生仔期ラットに 6-OHDA を投与した場合の視床における NA 作動性線維終末の発達的变化を検討した。その結果、視床の NA 作動性線維終末は、成熟ラットで明らかに増加していた。また、視床外側核群の中でも、正常動物においてとくに NA 作動性線維終末の多い外側膝状核背側部 (dorsal part of lateral geniculate nucleus, dLGN) では、過剰投射の程度がより明瞭であった。

大脳皮質や dLGN の NA 作動性線維終末は、脳幹にある青斑核 (locus coeruleus, LC) に由来していることがわかっている^{8,9)}。今回の研究では、新生仔期 6-OHDA 投与による LC ニューロンの大脳皮質と dLGN への投射の変化を検討することを目的とした。そのためまず第一に、組織蛍光法でこれらの部位における NA 作動性線維の投射の変化を確認した。次に電気生理学的方法によって、LC ニューロンの各部位への投射量の変化を定量的に検討した。同時に、新たに発芽した LC ニューロンの軸索や終末の電気生理学的特性を明らかにした。

対象および方法

1. 6-OHDA 投与

Sprague-Dawley ラットの雌雄を交配させ、膣スメ

アによって妊娠を確認した。膣スメアで精子が認められた日を E (embryonic day) 1 とした。出産日は E22 または E23 であった。生後 6 時間以内の新生仔ラットに、6-OHDA (SIGMA, St. Louis, U.S.A.) 100mg/kg (0.9% NaCl, 0.1% アスコルビン酸溶液 0.1ml 中に溶解) を 1 回皮下注射した (6-OHDA 処置群)。対照群の新生仔ラットには、皮下注射をおこなわなかった。ラットを生後満 4 週で離乳し、以後 1 ケージにつき 2~3 匹ずつを入れ、12 時間ごと明暗の部屋で飼育した。食物と水は自由に摂取できるようにした。生後満 6 週から満 26 週の週齢のラットを、以下の実験に用いた。NA 作動性ニューロンに対する 6-OHDA の効果には雌雄で差異がないことが知られているので¹⁰⁾、以下の実験では雌雄の区別なく用いた。

II. 組織蛍光法

6-OHDA 処置群 5 匹、対照群 5 匹について、グリオキサル酸 (glyoxilic acid, GA)-ジメチルスルフォキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) 法を用いて、形態学的に NA 作動性線維終末の投射の変化を検討した。ネンブタール 100mg/kg 腹腔内注射にて深麻酔を施し、ラットの上行大動脈から冷却 (2~4 °C) した GA-DMSO 溶液 (0.5% GA, 2% DMSO, 10% ショ糖, 0.1M リン酸緩衝液, pH 7.0) 400ml を 25~30 分かけて灌流した。灌流後、脳をとりだし、前頭皮質 (frontal cortex, FC), dLGN を含む各部分を前額面で切断し、ドライアイスで凍結した。それぞれの標本からクリオスタットを用いて厚さ 16 μm の前額面切片を作った。冷やしたスライドガラスの上に切片をすばやくのせて密着させ、灌流液と同じ GA-DMSO 溶液に 1 分間浸した。その後、温風で約 3 分間乾燥させ、次に乾熱器中に 100 °C で 5 分間おいた。カナダバルサムで密封してカバーガラスをかけ、蛍光顕微鏡 (BH-2, オリパス光学工業, 東京) による観察をおこなった。

III. 電気生理学的方法

6-OHDA 処置群 8 匹、対照群 8 匹を用いた。ウレタン 1.3g/kg 腹腔内注射にてラットに麻酔を施し、定位脳固定台 (SR-5, 成茂科学器械, 東京) に固定した。実験中、心電図と直腸温のモニターをおこない、ヒーターにより直腸温が 37 ± 1 °C になるように調節した。

1. 刺激

刺激電極には、絶縁したステンレススチール電線 (直径 0.2mm) 2 本を接着し、先端を 0.5mm 露出した

lic trigeminal nucleus; MFB, medial forebrain bundle; NA, noradrenaline; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; PSB, pontamine sky blue; VC, visual cortex

ものを用いた。刺激電極を背側 NA 性線維束 (dorsal noradrenergic bundle, DNB), FC, 視覚皮質 (visual cortex, VC) および dLGN に植え込んだ。各部位の定位脳座標は以下の通りである。DNB は小泉門から前へ 0.2mm, 外側へ 0.8mm, 脳表面からの深さ 5.7~5.8mm, FC は大泉門から前へ 3.0mm, 外側へ 1.5mm, 深さ 1.2mm, VC は小泉門から外側へ 3.0mm, 深さ 0.8mm, dLGN は大泉門から後ろへ 3.8mm, 外側へ 3.5mm, 深さ 4.2~4.3mm とした。刺激は, DNB に対しておこなう場合以外にはすべて持続時間 0.5msec, 強度 0.1~5.0mA の矩形波とした。DNB の刺激としては, 持続 1msec, 5.0mA の矩形波を用いた。刺激頻度はすべて 1Hz とした。

2. 記録

電極には, 先端が 1~2 μ m になるように折ったガラス管微小ピペットに, 2%ポンタミンスカイブルー (pontamine sky blue, PSB) 溶液 (0.5M 酢酸ナトリウム溶液に溶解) を充填したものを用いた。LC の定位脳座標は小泉門から後ろへ 3.5mm, 外側へ 1.2mm とした。記録電極を前方へ 15~20°傾けて刺入した。

1) LC の記録部位の同定

従来 LC の記録部位の同定は, 同側 DNB 刺激による誘発集合電位によっておこなわれた¹¹。しかし, 同側 DNB へ刺激電極を刺入することによって, 一部の上行性線維が切断される可能性があり, DNB よりさらに上位の脳部位への LC ニューロンの投射を定量化する場合, この方法では投射量の測定が不正確になる。したがって今回の LC 記録部位の同定は, 対側 DNB を刺激することによって誘発される低振幅の多発スパイクによっておこなった。正常ラットにおいて FC 刺激による多発スパイクは, 胎仔ラットから成熟ラットまでどの発達時期にも認められているので, LC の同定に有用であり¹²⁻¹⁴, 今回の実験でも対照群ラットの LC 記録部位の同定に用いた。また FC, dLGN, VC 刺激によって誘発される多発スパイクを対照群と 6-OHDA 処置群で観察し比較した。

LC ニューロンの単一活動電位は, DNB 刺激による多発スパイクに重なって逆行性または経シナプス性に誘発された。また, これまで報告されているように, LC ニューロンの自発放電頻度は尾を強く圧迫することによって一過性に上昇しその後減少した¹²。各個体において一回の記録電極の刺入によって, 何個の LC ニューロンが同定できたかを記録した。DNB の刺激のみ右側脳とし, 他の脳部位の刺激および LC からの記録はすべて左側脳で実験した。

実験終了後, 不関電極に対して記録電極側を負とし

て電気泳動的 (10 μ A の直流電流を 3 分間流出) に PSB を記録部位に流出させた (図1A)。dLGN の刺激電極に 0.4mA の直流電流を 1~3 秒間流し, dLGN の刺激部位を損傷し, 後に組織学的にその部位を同定した (図1B)。ラットの上行大動脈から, パラホルムアルデヒド-グルタルアルデヒド溶液 (4%パラホルムアルデヒド, 2.5%グルタルアルデヒド, 0.1Mリン酸緩衝液) で灌流し, 脳を取り出した。厚さ 50 μ m の凍結脳切片を作り, クレジルバイオレットで染色した。組織学的に LC の記録部位と dLGN の刺激部位を同定できたラットで, 実験結果を分析した。

2) LC から FC, VC, dLGN への投射指数

LC ニューロンの単一活動電位を記録できたならば, FC, VC, dLGN の各部位を電気刺激し, ニューロンが逆行性放電を示すかどうかを確認した。逆行性放電の判定基準は次の通りである。1) 潜時が一定であること, 2) 高頻度刺激 (≥ 200 Hz) に応答すること, 3) 自発性活動電位と衝突して消失する (collision test) こと^{15,16}。

1 個体 50~53 個の LC ニューロンにつき FC, VC, dLGN からの逆行性放電の有無を決定した。LC から各脳部位への投射を定量化するために投射指数を求めた¹⁵⁻¹⁷。ある刺激部位に対する投射指数は, 1 個体において記録された LC ニューロンの総数を 100 とした場合に, その中でその刺激部位から逆行性放電が誘発された LC ニューロンの数と定義した。

3) 逆行性放電の閾値と潜時

LC ニューロンに逆行性放電が確認された場合, 100%の逆行性放電を誘発する最小の刺激強度 (閾値) とその逆行性放電の潜時を, 各個体につき 8 個ずつ決定した。6-OHDA 処置群では, どの動物においても VC へ投射するニューロンを全く認めなかったのので, VC からの逆行性放電の閾値と潜時に関する分析はおこなわなかった。また, 6-OHDA 処置群では FC へ投射するニューロンは数が少なく, 4 個体 29 個のニューロンについてのみ閾値と潜時の測定が可能であったので, 総数 29 個のニューロンにおける測定値で分析をおこなった。

逆行性放電の閾値と潜時を測定したニューロンについて, 刺激強度を閾値より大きくしていった場合に, 潜時が数ミリ秒~数十ミリ秒の間隔で 1 度あるいは 2 度以上短縮する現象 (逆行性多発潜時) を認めることがある^{18,19}。この場合にも, 逆行性放電であることを確認し, 潜時を測定した。

4) 軸索伝導速度

6-OHDA 処置群 5 匹, 対照群 5 匹につき, 2) の実

験で使用したものとは異なるラットで測定をおこなった。この実験では、LC の記録側と同側の DNB, FC, dLGN に刺激電極を刺入固定した。LC の記録部位の同定は、同側 DNB 刺激による誘発集合電位と FC 刺

激によって誘発される多発スパイクを指標としておこなった。DNB 刺激による逆行性放電がみられるニューロンにつき、その潜時を測定した。同時に、そのニューロンが dLGN の刺激で逆行性放電を示すか

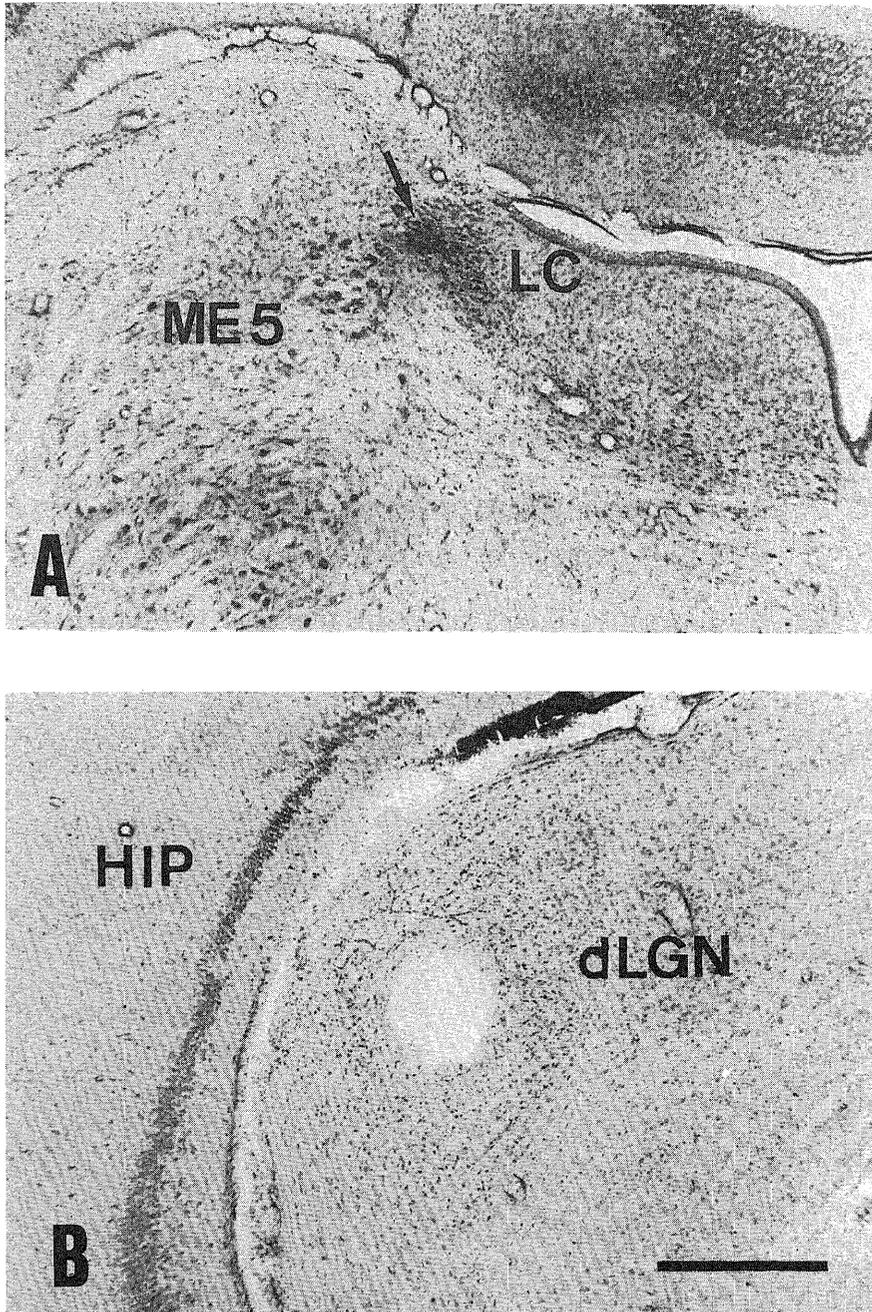


Fig.1. Photomicrographs of the recording site in LC marked by a spot of pontamine sky blue (arrow) (A) and the stimulating site in dLGN (B). These were obtained from a 6-OHDA treated animal. The bar in B indicates 0.5mm.

どうかも確認した。各個体4~6個のLCニューロンについて潜時を測定した後、最後に記録したLCニューロンの部位でPSBを電気泳動的に注入した。DNBの刺激部位を電氣的に凝固した。LCの記録部位の組織学的同定法と同様の方法で脳を固定したのち、 $100\mu\text{m}$ 毎に凍結切片を作成しながら、LCとDNB間距離を測定した。各ニューロンのDNBからの潜時とその個体のLC-DNB間距離から、個々のLCニューロンの伝導速度を算出した。

IV. 統計学的検定法

成績はすべて平均値±標準誤差で示した。対照群と6-OHDA処置群の平均値の差の検定にはStudent's t-testを用い、分布の差の検定にはWilcoxon's test for ranked categoriesを用いた。また二要因による影響の有意性検定には、二元配置分散分析後Schefféの多重比較を用いた。 $p < 0.05$ を有意とした。

成 績

I. 大脳皮質とdLGNでの蛍光陽性線維の分布の変化

これまでに報告されている¹⁰⁾ように、対照群ラットの大脳皮質では、細かいバリコシティーを伴う蛍光陽性線維が脳表面にむかって垂直方向に走り、脳表面近くでは脳表面に平行に走っていた(図2A)。6-OHDA処置群では、実験した5匹全部において皮質の蛍光陽性線維は全く見られないか、あるいはごく少量が認められるにすぎなかった(図2B)。

対照群のdLGNでは、大脳皮質で観察されたのと同様の細かいバリコシティーを持つ蛍光陽性線維がみられた(図2C)。6-OHDA処置群では、5匹のうち3匹のdLGNで明らかな蛍光陽性線維の密度の増加が認められた(図2D)。dLGNにおける蛍光陽性線維の螢

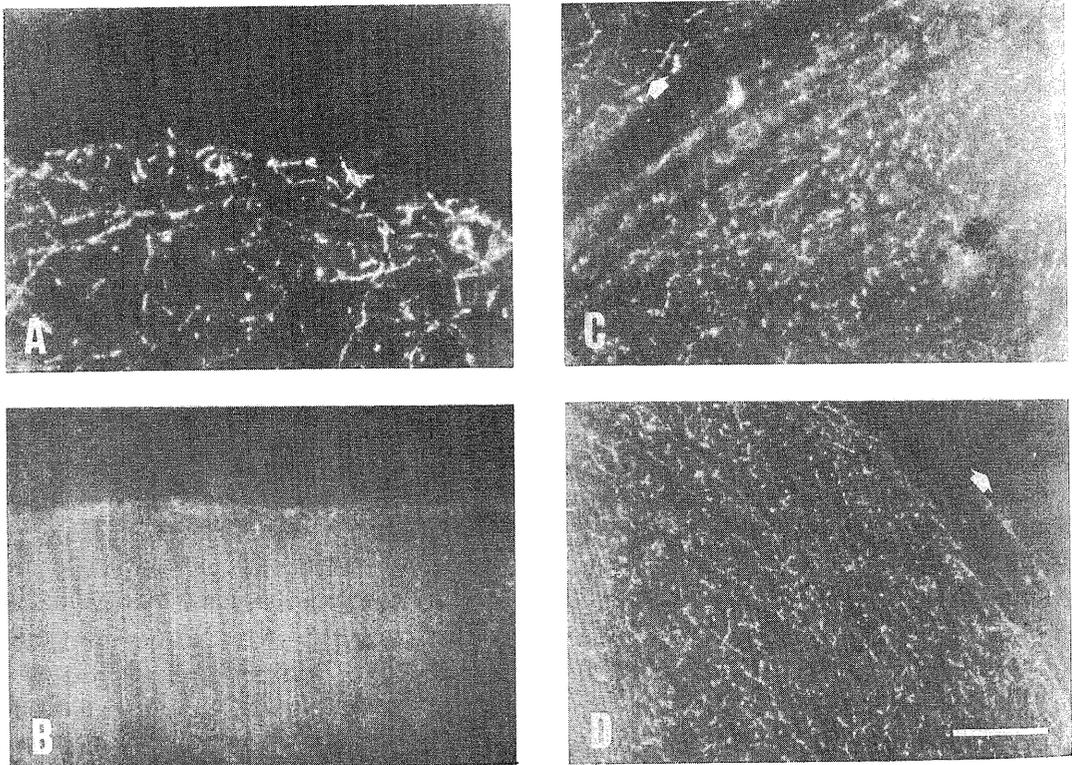


Fig. 2. Fluorescence photomicrographs of catecholamine fibers in FC (A, B) and dLGN (C, D). A, C: control. B, D: 6-OHDA treated. Note that despite the presence of fluorescence-positive fibers in the FC (A) and the hippocampus (C) of control animal, no fluorescent catecholamine fibers were observed in those brain sites of 6-OHDA treated animal (B, D). The density of fluorescence-positive fibers in dLGN was distinctly higher in 6-OHDA treated than in control animal. The fluorescent fibers in 6-OHDA treated animal had fine varicosities and were traceable for long distance as compared to those in control animal. The white arrows in C and D indicate the hippocampus. The white bar in D indicates $100\mu\text{m}$.

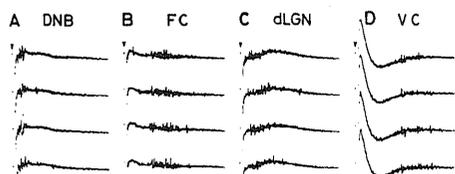
光の強度に関しては、6-OHDA 処置群と対照群で明確な差異は認められなかったが、パロコシティーの大きさは、6-OHDA 処置群でより小さく均一であるように見えた (図2D)。6-OHDA 処置群の他の2匹ではdLGNの蛍光陽性線維の密度は対照群に比べてそれほど差があるようには見えなかった。しかし、6-OHDA 処置群では、パロコシティーの大きさは小さく均一で線維が細くなっていた。

II. 電気生理学的方法でみた LC ニューロン投射の変化

1. LC ニューロンの電気生理学的同定

LC ニューロンの上行性投射の大部分は同側性であるが、一部は対側にも投射しており、LC に最も近い交叉部位は背側被蓋部である^{20,21}。したがって、対側 DNB を刺激すると LC ニューロンの交叉線維に活動電位を誘発するので、図3A, E にみられるような多発スパイクが LC で記録される。対照群ラットでは FC, VC, dLGN のいずれの部位の刺激でも DNB 刺激によるものと同様の多発スパイクが誘発された (図3B, C, D)。大脳皮質刺激による潜時は VC, FC の順に長かった。6-OHDA 処置群のラットでは FC や VC 刺激による多発スパイクはほとんど記録されず、dLGN 刺激による多発スパイクだけが観察された (図3F, G, H)。

CONTROL



6-OHDA

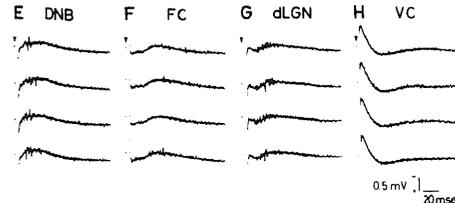


Fig. 3. The short trains of multiple units of small amplitude of LC neurons evoked by electrical stimulation of DNB (A, E), FC (B, F), dLGN (C, G) and VC (D, H). A, B, C, D: control. E, F, G, H: 6-OHDA treated. In 6-OHDA treated animals, the multiple unit responses to FC stimulation were greatly reduced, and those to VC stimulation almost completely disappeared. The arrowheads indicate the stimulation.

LC ニューロンの単一スパイクのほとんどは、これまで報告されているように二つの成分からなる陽性スパイクであり¹³、このスパイクの形状には対照群と6-OHDA 処置群とで差が認められなかった。自発放電頻度は数スパイク/秒を越えることはなく、両群とくに差がみられなかった。各個体で一回の記録電極の刺入によって同定できた LC ニューロンの数には、対照群 (5.0 ± 0.6 個, $n=8$) と6-OHDA 処置群 (6.2 ± 0.5 個, $n=8$) で差が認められなかった ($p>0.1$)。これらのことは、6-OHDA 処置によって LC ニューロン細胞体の電気的興奮性に変化がおこっていないことを示している。

2. 投射指数

6-OHDA 処置群と対照群で各刺激部位に対する投射指数を比較すると、両群の間に明確な差が認められた (図4)。FC の投射指数は、6-OHDA 処置群 (7.0 ± 3.6 , $n=8$) では、1個体のみ30で他の7個体はすべて10以下でうち3個体では0であった。それに対して対照群 (43.7 ± 3.1 , $n=8$) ではすべてが32以上の投射指数を示した ($p<0.001$)。dLGN 刺激では6-OHDA 処置群の投射指数の平均値 (58.6 ± 3.1 , $n=8$) は、対照群の投射指数の平均値 (29.5 ± 2.6 , $n=8$) の約2倍に増加していた ($p<0.001$)。対照群の VC に対する投射指数の平均値は $25.8 (\pm 4.2)$, $n=8$ であったのに対して、6-OHDA 処置群では、VC 刺激による逆行性放電は全く記録されなかった。

3. 逆行性放電潜時

逆行性放電の平均潜時は、FC 刺激の場合、対照群

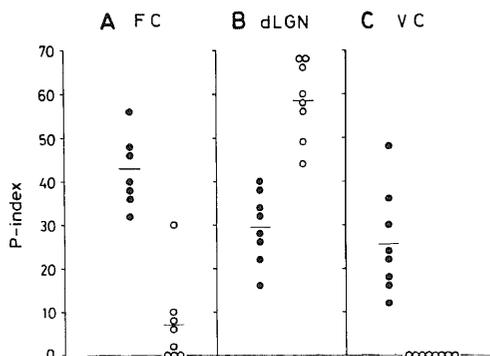


Fig. 4. P-indices of LC neurons for FC (A), dLGN (B) and VC (C). ●: control. ○: 6-OHDA treated. The short horizontal bars indicate the means of P-indices. The mean P-indices for these three brain sites were significantly different between control and 6-OHDA treated group ($p<0.001$, t-test).

(46.9 ± 1.3 msec, $n=64$) と 6-OHDA 処置群 (44.6 ± 1.9 msec, $n=29$) との間に有意な差がなかった ($p > 0.1$). dLGN 刺激の場合は、両群間に明確な差を認め、6-OHDA 処置群 (29.6 ± 0.8 msec, $n=64$) の平均潜時は、対照群 (50.7 ± 2.4 msec, $n=64$) と比較して短縮していた ($p < 0.001$). 潜時の分布をみると、両群間の差異はより明確になる (図5A, B) ($p < 0.01$). 対照群では潜時 50msec 以上のものが全体の約50%を占めるのに対して、6-OHDA 処置群では 50msec 以上のものは全く記録されなかった。

方法の項で述べたように、逆行性放電の潜時は刺激強度に依存しており、刺激強度を閾値から強くしていくと突然潜時が短くなるという逆行性多発潜時の現象が観察されることがある¹⁵⁾¹⁸⁾. 対照群と 6-OHDA 処置群での逆行性放電潜時の違いが、刺激強度に依存して

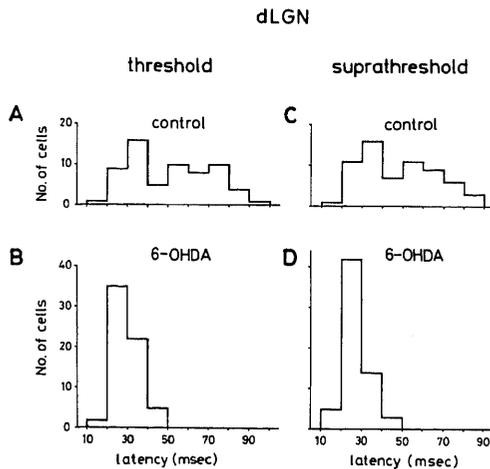


Fig. 5. Latencies of antidromic responses of LC neurons to dLGN stimulation at threshold (A, B) and suprathreshold intensities (C, D). A, C: control. B, D: 6-OHDA treated. The mean ($p < 0.001$, t-test) and the distribution ($p < 0.01$, Wilcoxon's test for ranked categories) of the latencies significantly differed between control and 6-OHDA treated animals. The latencies at threshold current intensity in control ranged from 19msec to 92msec, whereas all latencies obtained in 6-OHDA treated group were shorter than 50msec. Since it is known that some LC neurons reveal two or more discrete antidromic latencies as stimulus intensity is increased, latencies at suprathreshold current intensity were measured. The results were essentially the same as those obtained for threshold current intensity.

いるのかどうかをみるために、閾値以上の強い刺激によって誘発される逆行性放電の潜時 (閾値上潜時) を検討した。閾値上潜時の分布は、閾値刺激による逆行性放電の潜時の分布に比較して両群とも短潜時のものが小増加したのみで、対照群の閾値上潜時の分布が 6-OHDA 処置群の閾値上潜時あるいは閾値刺激による潜時の分布に似ることはなかった (図5C, D)。

対照群の VC 刺激による逆行性放電の平均潜時は 67.9msec (± 1.3 msec, $n=59$) であった。対照群ラットの大脳皮質刺激による逆行性放電の平均潜時は VC, FC の順に長く、この順番は多発スパイクの潜時の長さの順番と同じであった。このことは、LC ニューロンの大脳皮質への投射距離が VC, FC の順に長いことを示す。

4. 軸索の伝導速度

6-OHDA 処置群において dLGN 刺激による逆行性放電潜時の短いものが多くなっていたことが、軸索の伝導速度の変化に起因するのかどうかを検討した。

6-OHDA 処置群の LC ニューロンの平均軸索伝導

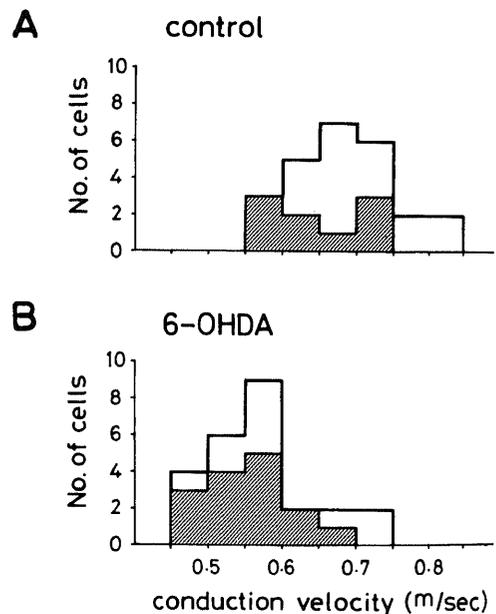


Fig. 6. Conduction velocities of LC axons. A: control. B: 6-OHDA treated. The conduction velocities of LC neurons in 6-OHDA treated animals were significantly slower than those in control animals ($p < 0.001$, t-test). Hatched columns are the data from dLGN-projecting neurons and white columns are those from neurons in which no antidromic responses from dLGN were evoked.

速度 ($0.59 \pm 0.01 \text{ m/sec}$, $n=25$) は、対照群 ($0.68 \pm 0.01 \text{ m/sec}$, $n=25$) より有意に遅くなっていた ($p < 0.001$) (図6). 6-OHDA 処置群において dLGN に投射するニューロンだけに軸索伝導速度の変化がおこったのかどうかを検討するため、6-OHDA 投与の有無と dLGN 投射の有無の二要因について二元配置分散分析をおこなった. その結果、6-OHDA 投与の有無による伝導速度の差のみ有意で ($p < 0.01$), dLGN 投射の有無による伝導速度の差はなかった ($p > 0.05$).

5. 逆行性放電閾値

これまでの結果から、6-OHDA 処置動物の dLGN では LC ニューロンの過剰投射がおこっており、この過剰投射は LC ニューロンの再生、発芽によることが示唆された. この再生した線維の電気的興奮性を調べるため、逆行性放電を誘発するのに必要な刺激閾値を検討した. FC 刺激による逆行性放電の平均閾値は、対照群 ($2.0 \pm 0.1 \text{ mA}$, $n=64$) と 6-OHDA 処置群 ($1.9 \pm 0.2 \text{ mA}$, $n=29$) の間では差はなかった (図7A, B). dLGN 刺激による逆行性放電の平均閾値は、6-OHDA 処置群 ($1.7 \pm 0.1 \text{ mA}$, $n=64$) で対照群 ($2.2 \pm 0.1 \text{ mA}$, $n=64$) と比較して低下していた ($p < 0.05$) (図7C, D).

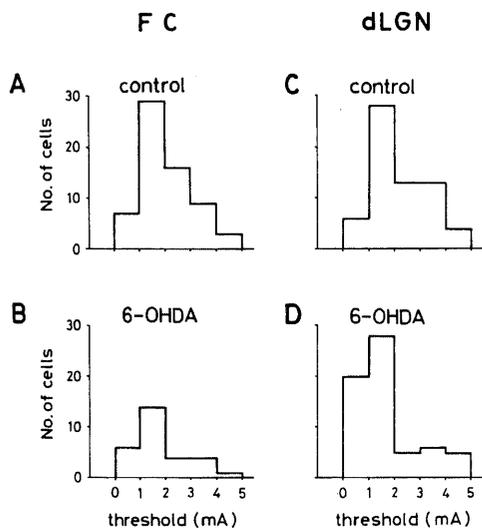


Fig. 7. Threshold current intensities for antidromic responses of LC neurons to FC (A, B) and dLGN stimulation (C, D). A, C: control. B, D: 6-OHDA treated. The threshold current intensities for FC stimulation were not different between control and 6-OHDA treated group, whereas those for dLGN stimulation significantly decreased in 6-OHDA treated group compared to control ($p < 0.05$, t-test).

考 察

本実験において、組織蛍光法と電気生理学的方法の結果から、6-OHDA 投与により、FC, VC への LC ニューロン投射が減少し、dLGN への過剰投射がおこることが確認された. これまで、新生仔期ラットへの 6-OHDA 投与による視床への影響は、生化学的方法や形態学的方法で調べられた⁴⁻⁷. 生化学的方法を用いた実験では、6-OHDA 投与によって視床の NA 濃度は変化しないという結果や⁴⁶、NA 濃度と [³H] NA の取り込みがわずかに増加するという結果があり⁹、一定した結果がでていない. Gustafson と Moore⁷ は DBH 免疫組織化学法を用いて、6-OHDA 処置動物の視床とくに dLGN で DBH 陽性線維が増加したことを明らかにした. 今回の実験では、組織蛍光法によって Gustafson と Moore⁷ の実験結果と同様の結果をえた. さらに電気生理学的方法を用いて、6-OHDA 投与による dLGN における LC ニューロン投射の増加を定量的に明らかにすることができた.

6-OHDA に対する LC ニューロンの感受性は終末線維で最も強く、軸索、細胞体の順に弱くなる²⁹. 終末や軸索線維の変性に引き続いておこる再生、発芽は細胞体から遠い投射部位ほどおこりにくく、細胞体に近い部位ほど盛んにおこることが明らかにされている¹¹⁻⁹. LC ニューロンの多くは大脳皮質を吻側内側から尾側外側へ投射することを、Morrison ら^{23,24} は形態学的方法を用いて、また Sakaguchi と Nakamura¹⁹ は電気生理学的方法を用いて、明らかにしている. 今回の実験でも、大脳皮質刺激による逆行性放電の潜時と多発スパイクの潜時 (図3B, D) の結果は、LC ニューロンの細胞体からの投射距離が FC, VC の順に長くなることを示している. 6-OHDA 処置群において、FC 刺激による逆行性放電は少数認められたにもかかわらず、VC からの逆行性放電は全く認められなかった. このことは、LC からの投射距離がより長い VC で軸索、終末線維の変性が強くおこり再生が全くおこらなかったことを示している.

dLGN 刺激による逆行性放電の潜時の結果では、6-OHDA 処置群で潜時の長いものが消失し、短いものが増加していた. 対照群の閾値上潜時の分布が、6-OHDA 処置群の閾値刺激あるいは閾値上刺激による潜時の分布に似ることがなかったことは、6-OHDA 処置による潜時の変化が刺激閾値の変化によるものではないことを示している. Nakamura ら¹⁹ は、FC 刺激による LC ニューロンの逆行性放電潜時は、新生仔ラットから成熟ラットまで変化しないこと

を明らかにした。dLGN に関する実験はなされていないが、dLGN 刺激による逆行性放電潜時の分布も発達に伴って変化しないと仮定すれば、今回の実験結果は、同じ dLGN 内の終末線維でも長潜時の逆行性放電を誘発する終末線維は変性し、短潜時の逆行性放電を誘発する終末線維が再生、発芽したことを示唆している。Gustafson と Moore⁷⁾による実験では、視床における NA 作動性線維終末の発達的变化を調べた。その結果、6-OHDA 処置動物の視床では、生後10日目には対照群動物と比較して DBH 陽性線維は減少し、成熟動物では明らかに増加していた。彼ら⁷⁾の結果は、視床へ投射している LC ニューロン終末の一部が 6-OHDA によって一旦変性したのち、新たに終末線維が再生、発芽したことを示している。このことは、6-OHDA 処置ラットの dLGN で LC ニューロンの軸索終末の変性と同時に再生がおこっていることを示唆する今回の電気生理学的実験の結果によく一致している。

LC から同側 dLGN への投射には少なくとも二つの経路がある⁸⁹⁾。すなわち DNB から直接側枝が出て投射する経路と、軸索が DNB からさらに吻側の内側前脳束 (medial forebrain bundle, MFB) に入ったのち反転して視索上交連、視索を通して dLGN に投射する経路である。後者の場合 dLGN の刺激による逆行性放電の潜時は長くなると考えられる。6-OHDA 処置群で逆行性放電潜時の長いニューロンが消失していたことから、6-OHDA 処置動物ではこの MFB を通過する dLGN の終末線維がとくに変性したと考えられる。

以上のことから、生直後に 6-OHDA で処置された動物では、LC から dLGN に投射する線維は、少なくとも次の二通りの様式で再生、発芽することが考えられる。一つは、LC ニューロンの投射部位の中で遠位の大脳皮質における終末線維が変性し、LC ニューロンの細胞体の近位から終末線維が再生、発芽する場合である (図8A)。Sakaguchi ら¹⁷⁾は、成熟ラットにおいて一側の VC を除去すると同側 LC から両側 dLGN への投射が増加すること (剪定効果) を、今回の実験と同じ投射指数を用いて明らかにした。本実験でも、同様の剪定効果がおこって LC から dLGN に過剰投射が生じた可能性がある。第二に考えられる LC ニューロン線維の dLGN への再生発芽様式は次のようなものである。同じ dLGN へ投射している LC ニューロン線維でも長い投射経路をとる (長潜時の逆行性放電に対応する) 終末線維は変性し、それに代わって細胞体に近い (短潜時の逆行性放電に対応する) 終末線維

が再生すると考えられる (図8B)。従来剪定効果と呼ばれる現象では、ある投射部位に LC ニューロン線維の再生、発芽がおこるかどうかは、LC からその投射部位への距離が遠いか近いかに影響されると考えられていた。今回の実験結果は、LC から投射部位への距離だけでなく、LC ニューロン線維の細胞体からの長さが、LC ニューロンの変性、再生のおこりかたを規定していることを示唆する。

6-OHDA 処置動物で、LC ニューロンの細胞体から DNB にいたる軸索の伝導速度が遅延していた (図6)。Gustafson と Moore⁷⁾は、6-OHDA 投与を受けたラットの DNB では、細かいバリコシティーを持つ線維が多く観察されると報告している。このことは、6-OHDA 処置動物の DNB では線維が細くなったことを示唆する。6-OHDA 処置動物の DNB 線維が細いことが、軸索の伝導速度が遅くなった要因になっていると考えられる。

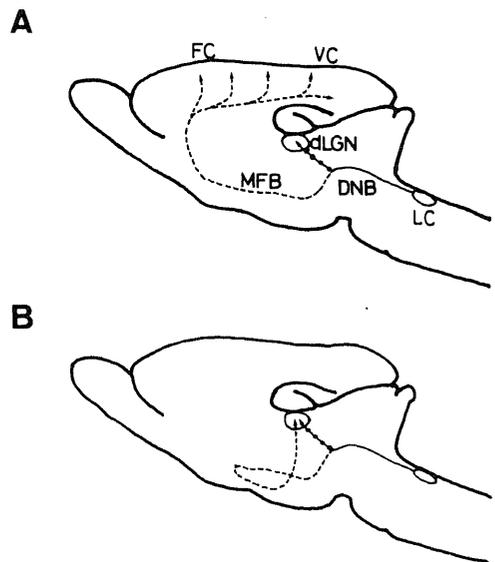


Fig. 8. Two possible modes of axonal regeneration of LC neurons in dLGN following neonatal 6-OHDA treatment. A: LC neurons projecting to FC and VC first lose their distal axons, and then axonal regeneration of LC neurons occurs in dLGN from proximal site of LC neuron. B: LC neurons projecting to dLGN with a long axonal trajectory once lose their terminal axons and instead axonal regeneration occurs from proximal site of LC neuron. The broken line indicates degenerate axon and the line with dots indicates regenerative axon.

6-OHDA 処置動物の dLGN 刺激による LC ニューロンの逆行性放電の閾値が低下していた (図 7)。逆行性放電の多発潜時の現象から、逆行性放電の誘発部位が終末線維に連続的にあるのではなく、間隔をもってある特別の終末部位 (例えば分枝点) に離れて存在することが示唆される。逆行性放電の閾値の低下は、この誘発部位の電気的興奮性の上昇を示すものであり、再生、発芽した終末線維の一つの電気生理学的特性を反映していると考えられる。

LC から中枢視覚系に対する NA 性支配の機能的役割はまだ確定していないので、LC から dLGN への過剰投射の機能的意義は明らかではない。LC ニューロンによる dLGN への投射の増加と、dLGN 刺激による逆行性放電の潜時が短縮しかつ潜時の分布の範囲が狭くなっていたことから、LC ニューロンの活動時、dLGN における NA 放出は多量にしかも短時間に集中しておこなうことが考えられる。したがって、6-OHDA 投与をうけたラットでは、dLGN への過剰投射が NA 性支配をほとんど消失した VC の機能的代償を果たしている可能性がある。

結 論

生後 6 時間の新生仔ラットに、6-OHDA 100mg/kg を皮下注射し、生後 6 週から 26 週の成熟ラットについて、組織蛍光法と電気生理学的方法を用いて、FC, VC, dLGN への LC ニューロン投射の変化を検討し、次の結果をえた。

1. 組織蛍光法では、6-OHDA 投与により大脳皮質で NA 作動性線維が減少し、dLGN では NA 作動性線維の密度が増加し、かつ終末線維が小さいバリコシティーを持つことを明らかにした。

2. 投射指数は、6-OHDA 処置群の FC, VC で減少、消失し、dLGN で増加した。6-OHDA 処置群の dLGN 刺激による逆行性放電の潜時の分布では、長い潜時のニューロンが消失し、短い潜時のニューロンが増加した。

3. 6-OHDA 処置群では対照群に比較して LC ニューロンの軸索伝導速度の遅延がみられた。これは 6-OHDA 処置動物において DNB の軸索の太さが細いことによると考えられる。

4. 6-OHDA 処置群で dLGN 刺激による逆行性放電の閾値が低下したことは、dLGN での LC ニューロン終末の電気的興奮性の上昇を示すものであり、6-OHDA 処置動物における LC ニューロンの電気生理学的特性であると考えられる。

5. 以上の結果から次のことを結論した。新生仔期

6-OHDA 投与後、大脳皮質への LC ニューロンの投射は減少し、dLGN へは過剰投射がおこる。dLGN への LC ニューロンの過剰投射は、FC, VC そして dLGN へ長い走行をとる終末が変性し、LC ニューロンの細胞体近位部から短い軸索や終末線維が再生、発芽することによりおこる。すなわち、LC から投射部位への距離だけでなく、LC からその投射部位へいたる軸索の長さが LC ニューロンの変性、再生のおこりかたを規定していると考えられる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり終始直接御指導していただいた中村彰治助教授に心から感謝の意を表す。組織蛍光法について御教示いただいた和歌山医科大学脳神経外科中井國雄博士ならびに統計学的処理について御指導していただいた金沢大学衛生学橋本和夫教授に深謝する。

文 献

- 1) Björklund, A. & Stenevi, U.: Regeneration of monoaminergic and cholinergic neurons in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.*, **59**, 62-100 (1979).
- 2) Jonsson, G., Pycock, C., Fuxe, K. & Sacks, C.: Changes in the development of central noradrenaline neurons following neonatal administration of 6-hydroxydopamine. *J. Neurochem.*, **22**, 419-426 (1974).
- 3) Sacks, C. & Jonsson, G.: Effects of 6-hydroxydopamine on central noradrenaline neurons during ontogeny. *Brain Res.*, **99**, 277-291 (1975).
- 4) Clark, D. W. J., Laverty, R. & Phelan, E. L.: Longlasting peripheral and central effects of 6-hydroxydopamine in rats. *Br. J. Pharmacol.*, **44**, 233-243 (1972).
- 5) Jonsson, G. & Sacks, C.: Regional changes in [³H]-noradrenaline uptake, catecholamines and catecholamine synthetic and catabolic enzymes in rat brain following neonatal 6-hydroxydopamine treatment. *Med. Biol.*, **54**, 286-297 (1976).
- 6) Oke, A., Keller, R. & Adams, R. N.: Dopamine and norepinephrine enhancement in discrete rat brain regions following neonatal 6-hydroxydopamine treatment. *Brain Res.*, **148**, 245-250 (1978).
- 7) Gustafson, E. L. & Moore, R. Y.: Noradrenaline neuron plasticity in developing rat brain:

- effects of neonatal 6-hydroxydopamine demonstrated by dopamine- β -hydroxylase immunocytochemistry. *Dev. Brain Res.*, **37**, 143-155 (1987).
- 8) **Lindvall, O., Björklund, A., Nobin, A. & Stenevi, U.**: The adrenergic innervation of the rat thalamus as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *J. Comp. Neurol.*, **154**, 317-348 (1974).
- 9) **Kromer, L. F. & Moore, R. Y.**: A study of the organization of the locus coeruleus projections to the lateral geniculate nuclei in the albino rat. *Neuroscience*, **5**, 255-271 (1980).
- 10) **Sachs, C., Pycock, C. & Jonsson, G.**: Altered development of central noradrenaline neurons during ontogeny by 6-hydroxydopamine. *Med. Biol.*, **52**, 55-65 (1974).
- 11) **Nakamura, S.**: Some electrophysiological properties of neurons in rat locus coeruleus. *J. Physiol.*, **267**, 641-658 (1977).
- 12) **Nakamura, S., Tsai, C. & Iwama, K.**: Recurrent facilitation of locus coeruleus neurons of the rat. *In* J. A. Hobson & M. A. B. Brazier (eds.), *The Reticular Formation Revisited*, p303-315, Raven Press, New York, 1980.
- 13) **Nakamura, S., Kimura, F. & Sakaguchi, T.**: Postnatal development of electrical activity in the locus coeruleus. *J. Neurophysiol.*, **58**, 510-524 (1987).
- 14) **Sakaguchi, T. & Nakamura, S.**: Some in vivo electrophysiological properties of locus coeruleus neurons in fetal rats. *Exp. Brain Res.*, **68**, 122-130 (1987).
- 15) **Sakaguchi, T. & Nakamura, S.**: The mode of projections of single locus coeruleus neurons to the cerebral cortex in rats. *Neuroscience*, **20**, 221-230 (1987).
- 16) **Nakamura, S., Shirokawa, T. & Sakaguchi, T.**: Increased projection from the locus coeruleus to the lateral geniculate nucleus and visual cortex in young adult rats following unilateral enucleation. *Neurosci. Lett.*, **49**, 77-80 (1984).
- 17) **Sakaguchi, T., Shirokawa, T. & Nakamura, S.**: Changes in projection from locus coeruleus to lateral geniculate nucleus following ablation of visual cortex in adult rats. *Brain Res.*, **321**, 319-322 (1984).
- 18) **Nakamura, S., Sakaguchi, T. & Aoki, F.**: Electrophysiological evidence for terminal sprouting of locus coeruleus neurons following repeated mild stress. *Neurosci. Lett.*, in press.
- 19) **Morrison, J. H., Grzanna, R., Molliver, M. E. & Coyle, J. T.**: The distribution and orientation of noradrenergic fibers in neocortex of the rat: an immunofluorescence study. *J. Comp. Neurol.*, **181**, 17-40 (1978).
- 20) **Shimizu, N., Ohnishi, S., Tohyama, M. & Maeda, T.**: Demonstration by degeneration silver method of the ascending projection from the locus coeruleus. *Exp. Brain Res.*, **21**, 181-192 (1974).
- 21) **Jones, B. E. & Moore, R. Y.**: Ascending projection of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Res.*, **127**, 23-53 (1977).
- 22) **Jonsson, G.**: Chemical neurotoxins as denervation tools in neurobiology. *Ann. Rev. Neurosci.*, **3**, 169-187 (1980).
- 23) **Morrison, J. H., Molliver, M. E. & Grzanna, R.**: Noradrenergic innervation of cerebral cortex: widespread effects of local cortical lesions. *Science*, **205**, 313-316 (1979).
- 24) **Morrison, J. H., Molliver, M. E., Grzanna, R. & Coyle, J. T.**: The intra-cortical trajectory of the coeruleo-cortical projection in the rat: a tangentially organized cortical afferent. *Neuroscience*, **6**, 139-158 (1981).

Plastic Changes in Projection from Locus Coeruleus to Lateral Geniculate Nucleus Following Neonatal 6-Hydroxydopamine Treatment Fumi Aoki,
Department of Physiology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J.
Juzen Med. Soc., 98, 704-715 (1989)

Key words locus coeruleus, 6-hydroxydopamine, plasticity, sprouting, lateral geniculate nucleus

Abstract

Biochemical and morphological studies have indicated that neonatal treatment with the catecholamine neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats results in a marked denervation of noradrenergic axon terminals in the telencephalon and hyperinnervation in the brainstem. This finding has led to the following view. Noradrenergic axons which arise in a brainstem nucleus, the locus coeruleus (LC), degenerate predominantly in the distal brain sites of LC at first following neonatal 6-OHDA treatment, and then the axonal sprouting of LC neurons takes place alternatively in the proximal sites. Regarding the effect of 6-OHDA on the projection of LC neuron to the dorsal part of lateral geniculate nucleus (dLGN), the previous results are not consistent. Therefore, I focused this study on the regeneration of noradrenergic axons in dLGN. Newborn rats within 6 hours after birth received a subcutaneous injection of 6-OHDA. Histofluorescent and electrophysiological experiments were performed at the age of 6 to 26 weeks. Using the histofluorescence method, I confirmed that in 6-OHDA treated rats catecholamine fibers almost completely disappeared in the cerebral cortex whereas the density of catecholamine fibers increased in dLGN. Under urethane anesthesia, single-unit activity was recorded extracellularly from LC, and electrical stimulation was given to frontal cortex (FC), visual cortex (VC) and dLGN to obtain antidromic response. The percentage of LC neurons activated antidromically from each brain site (projection index, P-index) was assessed to quantify the amount of LC projection to each brain site. In 6-OHDA treated animals compared with control animals, the P-indices for FC and VC were greatly reduced, whereas the P-index for dLGN markedly increased. In control animals, about 50% of LC neurons examined revealed the latencies of antidromic responses from dLGN of more than 50msec. In contrast, all latencies obtained in 6-OHDA treated animals were shorter than 50msec. The conduction velocities of LC axons were slower in 6-OHDA treated than control animals. From measurement of the threshold current intensities for antidromic activation, terminal excitability of LC axons in dLGN of 6-OHDA treated animals was found to increase. These results suggest two types of the axonal regeneration of LC neurons in dLGN following neonatal 6-OHDA treatment: 1) LC neurons projecting to cerebral cortex lose their cortical axon terminals at the distal site of LC, and axonal regeneration occurs in dLGN at the proximal site of LC. 2) LC neurons projecting to dLGN with a long axonal trajectory lose their axon terminals in dLGN, and axonal regeneration occurs from the proximal site.