

# Postnatal Development of the Auditory Pathway and Plasticity after Unilateral Ablation of the Inferior Colliculus in the Rat

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8520">http://hdl.handle.net/2297/8520</a>

## 聴覚中枢の生後発達と可塑性

### —ラット内側上オリブ核—下丘投射系の 正常発達と下丘剝離後の変化—

金沢大学医学部解剖学第三講座 (主任: 工藤 基教授)

尾小山 重 雄

脳幹聴覚伝導路の主要な投射路の1つである、内側上オリブ核—下丘投射の生後発達と可塑性について研究した。第1の実験系では内側上オリブ核—下丘投射の正常発達を検索するため生後各日齢の新生児ラットの下丘へ蛍光色素 (フルオロゴールド) を注入し、内側上オリブ核神経細胞を逆行標識し神経連絡網の生後発達を検討した。その結果、正常の成熟動物で観察される同側性投射は生後0日から観察されたが、交叉性の過剰投射は認められなかった。内側上オリブ核の標識細胞数は生後0日から発達に伴って次第に増加したが、核全体の神経細胞数は新生児から成熟動物でほぼ一定で変化しなかった。この事実は、生後この核で新たな神経発生や細胞移動が無いことを示すので、標識細胞と核全体の神経細胞との比から逆行性標識率を算出し生後の各時期で比較した。その結果、生後遅れて軸索を下丘に送る神経細胞が内側上オリブ核に存在し、内側上オリブ核—下丘投射そのものは生後7日前後で成熟動物に近い形に完成することが判明した。第2の実験系では成長期及び成熟ラットの一側下丘剝離後に引き起こされる脳幹聴覚中枢の可塑的变化を調べるため、各日齢の新生児 (生後1日、3日、7日) および成熟動物で一側の下丘を完全剝離し30日間生存させた後、同側の内側上オリブ核に起こる逆行変性後なおも生存する神経細胞についてその総数、およびその異所性投射の有無を調べた。下丘剝離後に内側上オリブ核に生存する神経細胞は生後1日から7日まで次第に減少し、成熟動物で再び増加した。下丘剝離による逆行変性は成熟動物よりも新生児で強く、ラット内側上オリブ核—下丘投射系においても、中枢神経で一般的に知られる現象 (Gudden 効果) が起こることを確認した。生後3日に下丘を剝離したラットの内側上オリブ核に反対側下丘に注入した蛍光色素 (フルオロルビー) で逆行標識される交叉性異常投射を観察した。この異常投射は生後7日および成熟ラットの下丘剝離では観察されないで、生後初期の下丘剝離により誘発された可塑的变化と考えられる。内側上オリブ核—下丘投射の生後発達の実験結果とあわせて考察すると、この可塑的变化は、生後一過性に見られる過剰投射の残存や軸索側枝の発芽現象によって形成された異常投射ではなく、生後遅れて下丘に投射する神経細胞によって形成される異所性投射であると考えられる。

**Key words** auditory pathway, inferior colliculus, medial superior olivary nucleus, postnatal development, plasticity

中枢神経系においては脳障害の時期により神経細胞の反応が異なる事は良く知られている事実である<sup>1)</sup>。例えば軸索切断による神経細胞の逆行性変性は幼若動物で強く、成熟動物では生後に発達する軸索側枝<sup>2)~5)</sup>や求心性神経終末の確立<sup>6)~9)</sup>などの神経細胞を取り巻く環境要因により逆行性変性の抵抗性が増すと考えられている。この現象は Gudden 効果として知られ、中枢神経系で広く認められている<sup>9)</sup>。しかしながら障害後、生存する中枢神経細胞の可塑性は成熟動物よりも幼若動物で高く、障害後の神経連絡網再編成や投射異常は幼若動物で容易に誘発される<sup>10)</sup>。現在までに、新生児動物の早期障害後に3種類の可塑的变化が中枢神経系で報告されている。1) 新生児に一過性に存在し、その後の正常発達に伴って消失する過剰な軸索が障害後、結果として残存し異常投射が形成される。この可塑的变化は新生児ラットの皮質脊髄路<sup>11)~15)</sup>、皮質赤核路<sup>16)</sup>やネコの皮質小脳路<sup>17)</sup>で神経路切断後に報告されている。2) 軸索切断後に逆行変性せずに生存した軸索の発芽現象即ち切断軸索の基幹部

や断端から発芽する軸索側枝により異常投射を形成することが報告されている<sup>18)~25)</sup>。このような可塑性は新生児のみならず成熟動物の中枢神経系でも認められている<sup>26)</sup>。3) 軸索が生後遅れて発達する中枢神経系では、生後早期の障害で直接傷害されない無傷の軸索が可塑的に変化し異常神経路やその投射部位が変化した異常投射を形成する。この種の可塑的变化はネコやラットの皮質脊髄路<sup>27)~29)</sup>、オポッサムの赤核脊髄路<sup>29)</sup>など種々の動物や神経系で報告されている。

聴覚機能の発達は多くの哺乳類で生後遅く起こり、新生児の聴覚伝導路は形態学および機能的に未発達である事は良く知られている<sup>30)~32)</sup>。脳幹聴覚中枢である上オリブ核群は延髄腹側に左右一対存在し、細胞構築学的に3大亜核、すなわち外側上オリブ核、内側上オリブ核、上傍オリブ核が同定されている<sup>33)</sup>。上オリブ核群は両耳からの情報を収斂し、更に上位中枢に伝達する聴覚伝導路の重要な中継核で、外側オリブ核は両側性に、内側上オリブ核は同側性 (非交叉性) に外側毛

平成5年12月7日受付, 平成6年1月5日受理

Abbreviations: FG, Fluoro-Gold; FR, Fluoro-Ruby

帯核や下丘へ投射し、上傍オリブ核も同側性に下丘へ投射する<sup>35)~38)</sup>。しかしながらその神経回路網の生後発達の詳細や生後早期の障害による可塑性を検討した研究はない。

本研究ではまず、内側上オリブ核一下丘投射の正常発達を調べた。次に、新生児から成熟ラットで一側下丘を剥離し、下丘へ同側性投射する内側上オリブ核神経細胞の下丘剥離の影響を検討した。下丘剥離後、内側上オリブ核に生存する神経細胞の可塑的变化を反対側の下丘に蛍光色素を注入し検討した。その結果、生後早期に一側下丘を剥離した動物で、可塑的に変化し反対側の下丘へ交叉性に異常投射する内側上オリブ核神経細胞を検出した。

## 材料および方法

### I. 実験動物および麻酔法

成熟(5週齢)および新生児 Sprague-Dawley 系ラットを実験動物として使用した。新生児は成熟ラットを室温25℃、湿度55%、11時間照明の飼育条件下で自家交配後、出産させ入手した。出産後12時間以内の新生児を生後0日ラット(P0)と定義し、P0, P1, P3, P7の新生児を使用した。成熟ラットの麻酔はペントバルビタール(50mg/kg)の腹腔内注射で、新生児は低体温麻酔法(-25℃, 30min)で行なった。

### II. 逆行性トレーサー(蛍光色素)の下丘への注入

励起波長が各々異なる2種類の蛍光色素を用いた。励起波長360nmのフルオロゴールド(Fluoro-Gold, FG) (Fluorochrome, INC., Colorado, USA)は生理食塩水で2%に溶解して使用した。励起波長545nmのフルオロルビー(Fluoro-Ruby Dextran-tetramethylrhodamine, FR) (Molecular Probes, INC., Eugene, USA)は生理食塩水で10%に溶解して使用した。

蛍光色素の注入は全身麻酔下で手術用顕微鏡を用い下丘を露出し、微量注入装置(General Valve, Fairfield, USA)に接続した先端径10-20μmの微小ガラス電極(Drummond Scientific Company, Broomal, USA)を用い注入した。新生児動物では下丘の異なる3部位に全注入量にして約0.5-1.0μl、成熟動物では後頭葉剥離後、下丘の異なる5部位に全注入量にして約1.0-1.5μlを各々注入し、蛍光色素が下丘全域に広がるように配慮した。

### III. 実験操作手順および日程

本研究は以下に示す2つの異なる実験系で構成される。

#### 1. 内側上オリブ核一下丘投射の正常発達(表1-A)

生後各日齢, P0, P3, P7の新生児各々5匹づつ、および成熟

動物(n=5)の右側下丘に蛍光色素(FG)注入し、下丘に投射している内側上オリブ核神経細胞を新生児の各時期および成熟動物で逆行性標識した。FG注入後24時間の生存期間を経て灌流固定し、脳幹部の顕微鏡標本を作製した。

#### 2. 内側上オリブ核神経細胞における一側下丘剥離の影響(表1-B)

下丘剥離に先立ち、出産後12時間以内の新生児(n=20)の右側下丘にFGを注入し、新生児期に下丘に投射している内側上オリブ核神経細胞をFGで逆行性に前標識した。同側下丘を手術顕微鏡下に実験操作手順(表1-B)に従って順次、吸引により完全剥離した。蛍光色素(FG)による神経細胞の長期標識(60日)を検討するための対照動物は、FG注入のみで下丘剥離操作を加えなかった。これらの実験動物は約30日の生存期間後、FGと励起波長の異なる蛍光色素FRを反対側下丘に注入した。FR注入後2日の生存期間を経て灌流固定し、脳幹部の顕微鏡標本を作製した。

#### IV. 灌流固定および顕微鏡標本の作製

灌流固定はペントバルビタール深麻酔下に開胸し、4%パラフォルムアルデヒド-0.1Mリン酸緩衝液で左心室より灌流固定を行なった。灌流固定後脳組織を摘出し、15%ショ糖-0.1Mリン酸緩衝液で浸透した。上オリブ核および下丘を含む脳幹部を凍結し、厚さ35μmの前額断連続切片を作製した。ゼラチン化スライドグラスに1枚毎に連続する切片を貼り、2組の顕微鏡標本を作製した。1組の標本は自然乾燥後、脱水、キシレン透徹し、封入後、内側上オリブ核の逆行性標識細胞数を評価するためニコン社製蛍光顕微鏡で観察した。他の1組の標本は1%クレシール紫(cresyl violet)で染色後、脱水、透徹、封入し、内側上オリブ核の全神経細胞数を評価するため光学顕微鏡で観察した。

#### V. 内側上オリブ核の観察

1枚毎に連続する切片で作製した2組の顕微鏡標本を各々、蛍光顕微鏡と光学顕微鏡で観察した。

##### 1. 内側上オリブ核一下丘投射の正常発達

内側上オリブ核全体を蛍光顕微鏡(励起波長360nm)で観察し、生後各日齢に逆行性標識されたFG陽性神経細胞を全ての標本について数え、その平均値を各日齢の陽性細胞数とした。さらに、ニッスル染色した標本を光学顕微鏡で観察し、内側上オリブ核の全神経細胞を数え各日齢における平均細胞数を算出した。生後各日齢における平均FG陽性神経細胞数を比較し、各日齢における逆行性標識細胞数の増減を検討した。同

Table 1-A. Experimental design for normal development of projection from medial superior olive (MSO) to inferior colliculus (IC)

Age <sup>a)</sup> of rat (day)	Number of rat used	Fluorescent dye injected	Injection site	Day of injection	Day of perfusion
P 0	5	Fluoro-Gold	Right IC	PND <sup>b)</sup> 0	PND 1
P 3	5	Fluoro-Gold	Right IC	PND 3	PND 4
P 7	5	Fluoro-Gold	Right IC	PND 7	PND 8
Adult	5	Fluoro-Gold	Right IC	PND 30	PND 31

The development of projection from MSO to IC was examined during postnatal days according to the experimental design.

<sup>a)</sup> P, postnatal; Adult, 30 days' rats after birth.

<sup>b)</sup> PND, postnatal day.

Table 1-B. Experimental design for plasticity of MSO neurons after unilateral ablation of IC

Age (day)	Number of rat used	Prelabeling of MSO			Ablation of IC		Postlabeling of MSO			Day of perfusion
		Fluorescent dye	Injection site	Day of injection	Site	Day of ablation	Fluorescent dye	Injection site	Day of injection	
Control	3	Fluoro-Gold	Right IC	PND 0	-	-	Fluoro-Ruby	Left IC	PND 60	PND 62
P 1	5	Fluoro-Gold	Right IC	PND 0	Right IC	PND 1	Fluoro-Ruby	Left IC	PND 31	PND 33
P 3	5	Fluoro-Gold	Right IC	PND 0	Right IC	PND 3	Fluoro-Ruby	Left IC	PND 33	PND 35
P 7	5	Fluoro-Gold	Right IC	PND 0	Right IC	PND 7	Fluoro-Ruby	Left IC	PND 40	PND 42
Adult	5	Fluoro-Gold	Right IC	PND 0	Right IC	PND 30	Fluoro-Ruby	Left IC	PND 60	PND 62

The plasticity of MSO neurons was examined according to the experimental design.

(-) means no operation of animals.

時に内側上オリブ核の全神経細胞数とこれらを比較し、各日齢の逆行性標識陽性率を算出した。

## 2. 一侧下丘剝離後の内側上オリブ核神経細胞の可塑性

ニッスル染色した標本を光学顕微鏡で観察し、下丘剝離後に生存する同側の内側上オリブ核神経細胞を数えた。各剝離日齢における生存細胞数は各々観察した全標本(各, n=5)を平均して算出した。下丘剝離以前に下丘に投射し下丘剝離後も生存する内側上オリブ核の神経細胞の存在を蛍光色素 (FG) による長期逆行性標識 (60日) によって検索するため全標本を蛍光顕微鏡 (励起波長 360nm) で観察した。その後、対側下丘に注入した FR で逆行性に標識される内側上オリブ核神経細胞の存在を検索するため、同一標本を蛍光顕微鏡 (励起波長 545nm) で観察し、下丘剝離後に起こり得る内側上オリブ核神経細胞の可塑性 (反対側下丘への異常投射) の有無を検討した。

## 成 績

### 1. 内側上オリブ核一下丘投射の正常発達

#### 1. 蛍光色素注入部位及び生存期間

FG 注入側下丘では蛍光色素が下丘全域に渡って広がったが、反対側下丘への色素漏出はなかった。蛍光色素注入後の生存期間は24時間で、一般的な蛍光色素による逆行性標識の生存期間と比較し短い、下丘に投射する他の聴覚脳幹 (蝸牛神経核や外側毛帯核) においても多数の逆行性標識が存在するので、この系の神経細胞を逆行標識するのに十分な生存期間と考えられる。

#### 2. 内側上オリブ核神経細胞の逆行性標識

成熟ラットでは内側上オリブ核一下丘投射は完全同側性で、交叉性投射がないことが知られており、本実験でもその事実を確認した。成熟動物で見られる同側投射は生後0日で既に存在していた (図 1A-C)。新生児ラットの皮質脊髓路で知られている<sup>12-15</sup>様な生後一過性に存在しその後正常発達に伴って消失する過剰な交叉性投射の存在を検索した結果、反対側の内側上オリブ核には生後のいずれの日齢にも標識細胞を認めず、内側上オリブ核一下丘投射系においては交叉性投射を認めなかった。

内側上オリブ核の標識細胞を核全域に渡って各日齢 (各々5例づつ) で数え、その平均値を平均逆行性標識細胞数とし、そのヒストグラムを図-2A に示した。逆行性標識細胞は生後0日でも129個認められ、生後発達に伴ってその数は次第に増加し、生後7日で290個とほぼ成熟動物の標識細胞数に近くなった。生後発達に伴う標識細胞数の増加は軸索が生後徐々に発達し、その投射が生後に完成する事を示唆する。

#### 3. 内側上オリブ核神経細胞数およびその逆行性標識陽性率

内側上オリブ核の神経細胞数は345-380個とほぼ一定で、新生児から成熟動物の間で Scheffé の多重比較法により検定した結果有意差を認めなかった。神経細胞数が生後変化せず一定である事実は生後上オリブ核で新たな神経細胞の発生や神経細胞の移動が起こらない事を示唆している。

生後各日齢における上オリブ核の標識細胞数と核全体の神経細胞数の比から、各日齢 (各5例づつ) における平均逆行性標識陽性率を算出した (図-2B)。内側上オリブ核の神経細胞標識率の増加は P0 から P7 の間で35%-80%と急激に高くなり、P7 から成熟動物の間で80%-90%と安定してくることか

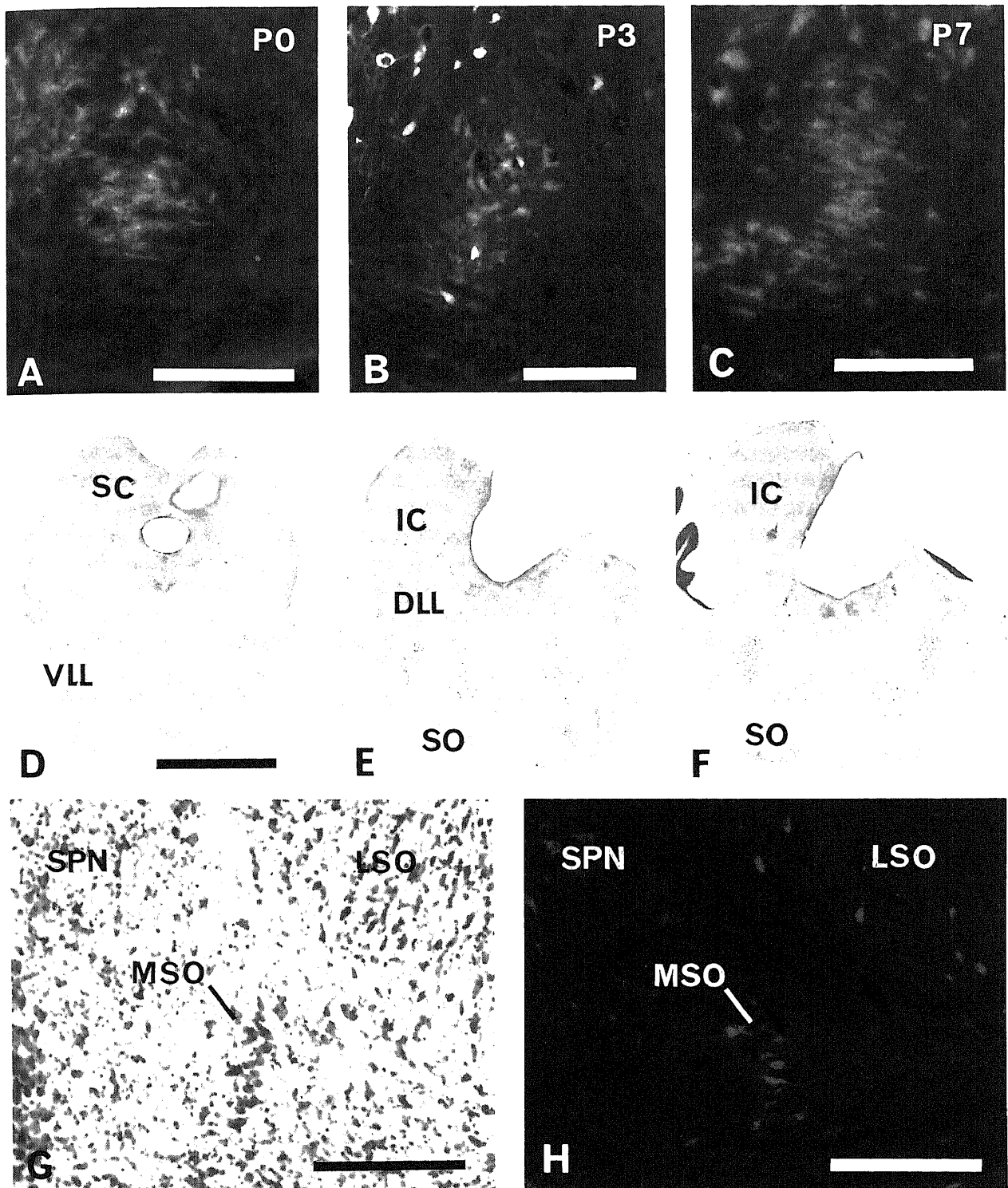


Fig. 1. (A-C) Fluorescent photomicrographs (ultra-violet filter) of frontal sections through brainstem showing Fluoro-Gold (FG) labeled neurons in medial superior olivary nucleus (MSO). FG was injected into ipsilateral inferior colliculus (IC) at postnatal days 0 (A, P0), 3 (B, P3) and 7 (C, P7). Bars=100  $\mu$ m.

Fig. 1. (D-F). Low power photomicrographs of frontal sections through brainstem arranged from rostral (D) to caudal (F) showing surgical lesions placed in right IC and adjacent structures such as superior colliculus (SC). Note that lesions removed the greater part of IC without any damage of contralesional IC, dorsal (DLL) and ventral (VLL) nuclei of lateral lemniscus and superior olive (SO). Bar in (D) indicates 2.5 mm for D, E and F.

Fig. 1. (G, H). Photomicrographs of two adjacent frontal sections through ipsilateral SO in IC ablation cases taken under brightfield (G) and fluorescent (H, green filter) illuminations showing cytoarchitecture of MSO in Nissl stained preparation (G) and Fluro-Ruby (FR) labeled neurons in unstained preparation (H). Note that aberrant crossed projection neurons appeared in the MSO (red cell-soma cluster in H) among normal crossed projection neurons in lateral superior olivary nucleus (LSO) and periolivary neurons in superior paraolivary nucleus (SPN) after FR injections into contralateral IC.

ら、ラットの内側上オリブ核-下丘注射は生後7日ではほぼ成熟動物に近い形に完成する事が示唆された。生後発達に伴う標識率の増加は、いずれの生後日齢においてもこの核の神経細胞総数が一定であることを考慮すると、生後軸索が遅れて発達し下丘に到達する内側上オリブ核神経細胞の存在を示唆する。

## II. 内側上オリブ核神経細胞における一側下丘剝離の影響

### 1. 一側下丘剝離および蛍光色素注入部位

内側上オリブ核を観察した剝離動物の下丘は図1 (D-F) に示すように剝離が完全で、且つ反対側下丘は無傷であった。生後0日のFG注入部位は図1 (D-F) に示すように完全剝離されているので剝離以前の注入部位の評価は不可能であるが、少なくとも反対側下丘へのFG漏出を認めない事を確認した。下丘を剝離後30日の生存期間を経て反対側下丘にFRを注入した。FRの注入部位は全例において蛍光色素の広がりを残存下丘全域に認めた。

### 2. 一側下丘剝離後に生存する内側上オリブ核神経細胞

一側下丘を生後の各日齢で完全剝離した後、内側上オリブ核の生存神経細胞は核内の一部に限局せず核全体に渡って散在し生存神経細胞の部位的局在を認めなかった。下丘剝離後内側

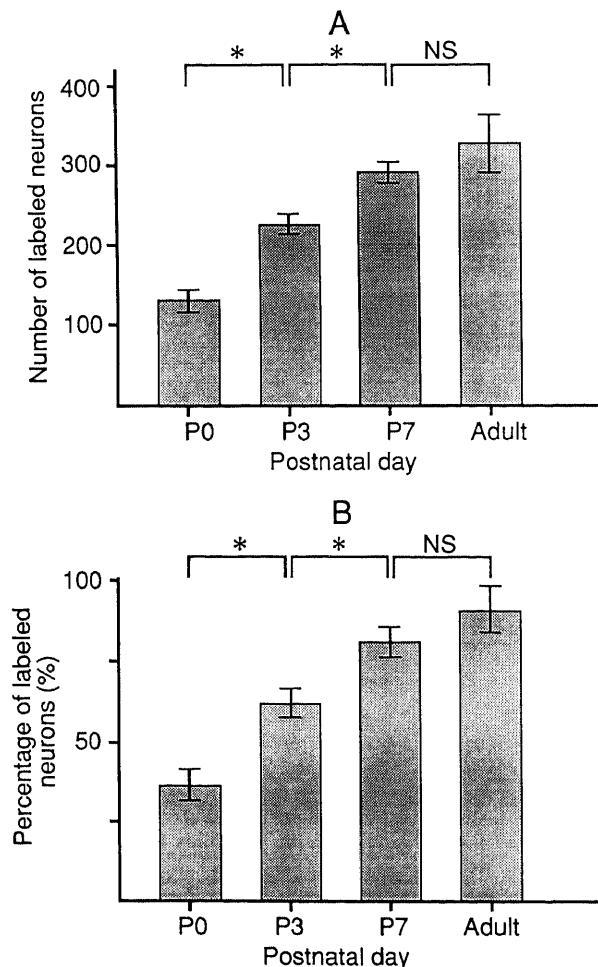


Fig. 2. Numbers (A) and percentages (B) of FG labeled neurons in ipsilateral MSO after FG injection into IC. Counts are made in 5 rats for each with different postnatal days (P0, P3, P7) and adult, and the values presented are means±standard deviations. \*,  $p < 0.05$  by Sheffé's multiple comparison tests. NS, no significant.

上オリブ核に生存する神経細胞を核全域に渡って数え、生後各日齢 (各5例づつ) における平均生存神経細胞数を算出し図3に示した。内側上オリブ核の生存神経細胞数は生後1日の下丘剝離で234個で生存率は正常内側上オリブ核の神経細胞数の約64%と最も高く、その後次第に生存神経細胞数は減少し生後7日の下丘剝離では最も低く127個で生存率は34%であった。成熟動物の下丘剝離後の内側上オリブ核の生存神経細胞数は182個 (50%) と生後3, 7日における下丘剝離動物よりも増加した。

### 3. FGによる内側上オリブ核神経細胞の逆行性標識

生後0日で一側下丘にFGを注入し下丘剝離せずに成長した対照動物では、同側の内側上オリブ核に逆行性標識細胞を認め交叉性投射は存在しなかった。同時に下丘に投射する事が知られる上オリブ核群に多数の逆行性標識細胞を認めた。対照動物での標識神経細胞の長期生存 (60日) はFGが他の蛍光色素ファーストブルー (Fast Blue) と同様<sup>2)</sup>に細胞毒性が低く、標識による細胞死を伴わず長期標識に適している事を示唆する。

生後0日に一側下丘へFGを注入した後、各日齢で下丘を完全剝離した動物の内側上オリブ核を蛍光顕微鏡で観察した。FGの逆行性標識は内側上オリブ核に生存する神経細胞のみならず、下丘投射が知られる脳幹聴覚中枢にも全く認めなかった。この事実は対照実験で長期生存する標識神経細胞を認める事を考慮すると、下丘剝離以前に下丘に投射する神経細胞が下丘剝離により逆行変性し死滅したことを示唆する。

### 4. 一側下丘剝離後に生存する内側上オリブ核神経細胞の可塑性

一側下丘剝離後30日の生存期間を経て反対側の下丘にFRを注入し、内側上オリブ核に剝離後生存する神経細胞を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、生後3日で下丘剝離した動物で下丘剝離と同側の内側上オリブ核で対側下丘に注入したFRによって逆行性に標識される交叉性の異常投射神経細胞を観察 (図1G, H) したが、それ以後で下丘剝離した動物ではこの様な

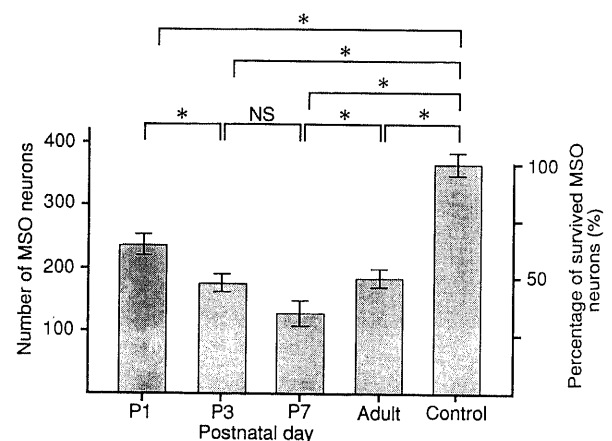


Fig. 3. Total number of MSO neurons counted in Nissl stained sections after ablation of IC at different postnatal days (P1, n=5; P3, n=5; P7, n=5) and in adult (n=5). The values presented are means±standard deviations. Right axis indicates percentage of survived neurons against normal in intact control cases (n=3). \*,  $p < 0.05$  by Sheffé's multiple comparison tests. NS, no significant.

異常投射を認めなかった。内側上オリブ核の異常投射神経細胞には FG の前標識を認めないので、この異常投射は下丘剝離後に軸索を発達させる無傷の内側上オリブ核神経細胞によって形成される事が示唆された。

考 察

聴覚機能の発現は多くの哺乳類で一般的に遅く、生後でも新生児の聴器や聴覚伝導路は形態学的及び機能的に未発達である事が知られている<sup>39</sup>。形態学的にラットの脳幹聴覚中枢の生後発達を Rogowski ら<sup>39</sup> はゴルジ法を用いて検索し、内側上オリブ核神経細胞の形態が生後7-14日以後になってやっと成熟動物に近い形態に発達する事を報告している。しかしながら聴覚中枢の生後発達を神経線維連絡の面から検索した研究はない。そこで本研究では生後の各日齢に一侧下丘へ FG を注入し、24時間の生存期間を経て逆行性に標識される内側上オリブ核の神経細胞を観察し、内側上オリブ核-下丘投射の生後発達を検討した。観察される内側上オリブ核の標識細胞はいずれの日齢においても成熟動物と同様にすべて同側性で、交叉性投射神経細胞は観察されなかった。それ故、ラットの内側上オリブ核-下丘投射は出生時から既に存在し、新生児ラットの皮質脊髄路で見られるような生後一過性の過剰な両側性投射<sup>11-15</sup> は認められない。内側上オリブ核の標識細胞数はその後発達に伴って増加し、生後7日でほぼ成熟動物に近い数になった。逆行性に標識される細胞数の増加が新生児初期(P0-P7)に特に著しく、その後(P7-成熟)は安定すること(図-2A)は、軸索そのものの伸長期とそれに続いて起こるシナプス結合の完成期を反映していることを示唆する。

内側上オリブ核神経細胞数は新生児から成熟動物の間ではほぼ一定で、発達による細胞数の増加を認めない。このことは内側上オリブ核においては生後新たな神経細胞の発生がなく、同時に神経細胞が他の部位からこの核へ移動しない事を示唆する。したがって、標識細胞数と核全体の神経細胞数との比によって逆行性標識陽性率を求めて、各日齢に下丘に軸索が到達している内側上オリブ核の神経細胞の比率を評価する際にも好都合である。以上、標識率の変化からみてもラットの内側上オリブ核-下丘投射は生後7日でほぼ成熟動物に近い形に完成することが本実験成績からも示唆される。

蛍光色素による長期標識には Tolbert ら<sup>27</sup> や Merline ら<sup>28</sup> は錐体路切断に先立ちファーストブルー (Fast Blue) や Rodamine fluorescent latex microspheres をネコやハムスターの皮質脊髄路で各々使用し20-40日に渡る長期標識を確認している。本実験においては下丘剝離に先立ち FG を内側上オリブ核神経細胞の前標識に用いた。下丘を剝離しない対照動物で60日に渡って多数の長期標識細胞が認められたので FG も他の蛍光色素と同様に長期標識に適している事を確認した。

生後0日に一侧下丘に FG を注入し、下丘剝離以前に下丘に投射する内側上オリブ核神経細胞を前標識した。その後、新生児から成熟動物の各日齢に同側下丘を完全剝離し30日の生存期間をおいた後、内側上オリブ核の生存神経細胞を数えた。神経細胞の生存率は生後1日から7日まで次第に減少し、成熟動物では再び増加した。すなわち、下丘剝離による逆行変性は成熟動物よりも新生児(P3, P7)で強いことが分かった。この結果は中枢神経で一般的に知られる現象 (Gudden 効果)<sup>9</sup> に一致する。軸索側枝が発達し主な標的部位以外に標的部を持つ神

経細胞や神経賦活因子を含む求心性神経終末が発達した後の神経細胞は、主な標的部位を除去しても逆行変性せず生存すること<sup>29-31</sup> が知られている。さらに逆行変性の強さを支配する要因として内側上オリブ核神経細胞が下丘以外にも投射標的として外側毛帯核を持ち<sup>30-32</sup>、ここへの側枝の生後発達を下丘剝離の影響を減少させた結果とも考えられる。又、本実験の下丘剝離による逆行変性は生後7日で最も強く現われたが、これが内側上オリブ核神経細胞の樹状突起の発育が最大となる時期<sup>39</sup> に一致することは興味深い。これは内側上オリブ核への求心性線維の分布によって軸索を切断された神経細胞の細胞死に対する抵抗性が影響を受けること<sup>9</sup> を示唆する。

下丘剝離後に内側上オリブ核に生存する神経細胞には FG の前標識が認められない。FG の長期標識による細胞死が対照実験で否定され、且つ下丘剝離による切断軸索から蛍光色素が逸脱し標識が消失する事は考え難い。それ故、生存神経細胞に FG の前標識を認めない事実は下丘剝離時に下丘に投射していた内側上オリブ核神経細胞は逆行変性し全て死滅したと考えられる。これと同時に、生存細胞数が生後1日から7日の間で次第に減少する本実験成績とラットの下丘中心核の細胞間隙が生後早期には広く正常発達に伴う求心性神経終末の増加により下丘中心核の細胞間隙が減少する Pysh<sup>40</sup> の電子顕微鏡による観察結果を共に考慮すると、生後遅れて下丘に投射する未発達の神経細胞の存在が示唆される。それ故、FG で前標識されない生存神経細胞は剝離時には下丘に投射がなく、剝離により直接障害を受けない無傷の神経細胞と考えられる。投射が完成していると考えられる成熟動物の下丘剝離実験では生存神経細胞に前標識を認めない。しかしながら、FG の前標識のない成熟動物の生存神経細胞は蛍光色素の有効な逆行輸送が注入後7日

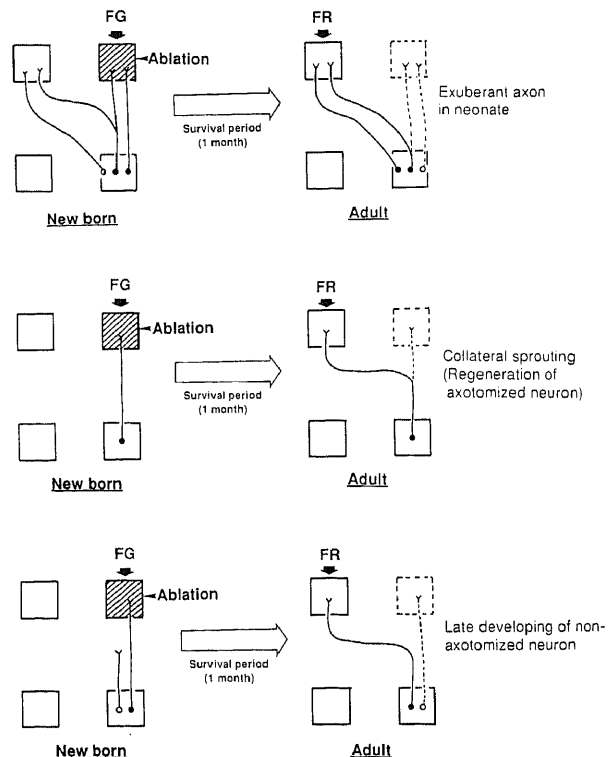


Fig. 4. Diagrams illustrating three hypothetical patterns of plasticity after off-target of ipsilateral projections seen in central nervous system.

前後であることを考慮すると、それ以後に発達した神経細胞が含まれていると考えられる。

生後3日に一側下丘を完全剥離した動物の内側上オリブ核に生存する神経細胞に、対側下丘へ注入したFRで標識される異常な神経細胞を観察した(図1H)。このような異常投射する内側上オリブ核神経細胞は生後7日以後の下丘剥離では認められず早期下丘剥離により可塑的に変化した神経細胞と考えられる。本実験で観察される交叉性の異常投射をする内側上オリブ核神経細胞の可塑性を現在までに中枢神経系で報告されている3種類の可塑的変化(図4)を基にして考察した。

ラットの皮質脊髄路では両側性過剰投射が新生児期に一過性に存在し、正常発達にもなって消失する事が知られている<sup>18)~19)</sup>。この過剰投射が皮質脊髄路切断により可塑的に変化し、そのまま残存して異常投射を形成することがLeongら<sup>11)</sup>やNahら<sup>12)</sup>によって報告されている(図4A)。そこで、生後の内側上オリブ核一下丘投射の正常発達を検索し本実験で観察される交叉性異常投射の形成を検討した。本実験ではラットの内側上オリブ核一下丘投射において生後いずれの時期にも交叉性の過剰投射を認めないので、観察された異常投射は生後一過性に存在する過剰投射の残存による可塑的変化ではない。

軸索の発芽現象として知られるこの可塑性(図4B)は新生児のみならず成熟動物でも認められている<sup>18)20)</sup>。この可塑性は障害後逆行変性せず生存した神経細胞で誘発されるので、可塑的に変化する神経細胞を前標識して障害後の生存を確認する事が重要である。本実験では励起波長が異なる2種類の蛍光色素(FG, FR)を使用し障害後生存する神経細胞と可塑的に変化する神経細胞を各々区別して標識した。その結果、対側下丘のFR注入により標識される異常投射神経細胞に下丘剥離以前に注入したFGの前標識による二重標識を認めなかった。それ故、本実験で観察された内側上オリブ核神経細胞の異常投射は下丘剥離により逆行変性せず生存した軸索から発芽する軸索側枝ではない。

ネコやラットの皮質脊髄路<sup>21)22)</sup>やオポッサムの赤核脊髄路<sup>23)</sup>で錐体路を切断した後、軸索が異常部位で再交叉する投射神経細胞が報告されている。これらの神経系では神経連絡網が新生児期に発達し生後遅れて完成することが知られているので、これらの投射異常は生後遅れて発達する無傷の軸索による可塑的変化と考えられている(図4C)。この可塑性では生後遅れて軸索が発達する神経細胞の存在が重要であるが、聴覚伝導路における生後発達の詳細は不明である。それ故、異常投射を観察した内側上オリブ核一下丘投射の生後発達を本実験で検索した。その結果、下丘に生後遅れて投射する神経細胞が内側上オリブ核に存在する事と下丘投射は生後7日後に完成する事が明らかになった。本実験で異常投射する内側上オリブ核神経細胞にはFGおよびFRによる二重標識が認められず、且つ生後遅れて下丘に投射する神経細胞が正常動物で認められることから内側上オリブ核の異常投射は下丘剥離時に下丘に投射していない神経細胞による可塑的変化と考えられる。

## 結 論

ラットの一側下丘を新生児及び成熟動物で完全剥離し、内側上オリブ核の神経細胞に与える影響を検索すると同時にその影響を内側上オリブ核一下丘投射の正常発達から考察し、以下の結論を得た。

1. 生後各日齢に下丘に蛍光色素(FG)を注入し逆行性に標識される神経細胞を観察した結果、内側上オリブ核には、他の中枢神経系で観察される生後一過性に存在し発達にもなって消失するような両側性過剰投射は観察されなかった。

2. 内側上オリブ核の標識細胞数は生後0日から発達に伴って増加し生後7日で成熟動物に近い数になったので、生後遅れて軸索を下丘に投射する神経細胞が内側上オリブ核に存在することが示唆された。

3. 内側上オリブ核の神経細胞数は新生児から成熟動物ではほぼ一定で変化しないことから、生後この核で新たな神経細胞の発生や移動が無いことが判明した。そこで、標識細胞と核全体の神経細胞との比から逆行性標識率を算出し生後の各日齢で比較した結果、内側上オリブ核一下丘投射そのものは生後7日で成熟動物に近い形に完成することが判明した。

4. 下丘完全剥離後に内側上オリブ核に生存する神経細胞は生後1日から7日まで次第に減少し、成熟動物で再び増加したので下丘剥離による逆行変性は成熟動物よりも新生児(P3, P7)で強く、ラット内側上オリブ核一下丘投射系においても中枢神経で一般的に知られる現象(Gudden効果)を確認した。

5. 下丘剥離後に内側上オリブ核に生存する神経細胞にはFGの前標識を認めないので下丘剥離時に下丘に投射していた内側上オリブ核神経細胞は全て死滅した事と同時に、剥離時には下丘に投射がなく、剥離により直接障害を受けない無傷の神経細胞の存在を示唆した。生後発達の実験結果もこの生後遅れて下丘に軸索が到達する未発達の内側上オリブ核神経細胞の存在を支持している。

6. 生後3日に下丘を完全剥離したラットで内側上オリブ核から反対側下丘に投射する交叉性異常投射を観察した。生後7日及び成熟ラットの下丘剥離ではこの異常投射は観察されなかったので、この異常投射は生後初期の下丘剥離により誘発された可塑的変化と考えられる。

7. 異常投射する神経細胞には、あらかじめ同側下丘に注入したFGの前標識との二重標識を認めないのでこの可塑的変化は生後一過性に見られる過剰投射の残存や軸索側枝の発芽現象によって形成された異常投射ではなく、生後遅れて下丘に投射する神経細胞によって形成される異所性投射であると考えられる。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師藤基教授に深甚なる謝意を表します。又、多大なる御協力を賜りました金沢大学医学部解剖学第三講座、中谷瀬治技官並びに松原亜紀子技術補佐員に感謝致します。本研究は文部省科学研究費、一般研究(C)課題番号(04670036)及び第4回老人医療基金研究助成を受けた。なお、本研究は第98回日本解剖学会総会(札幌, 1993)において発表した。

## 文 献

- 1) Goldberger, M. E. & Murray M.: Recovery of function and anatomical plasticity after damage to the adult and neonatal spinal cord. In C. W. Cotman (ed.), Synaptic Plasticity, 1st ed., p77-110, The Guilford Press, New York, London, 1985.
- 2) Barron, K. D., Dentinger, M. P., Nelson, L. R. & Scheibly, M. E.: Incorporation of tritiated leucine by axotomized rubral neurons. Brain Res., 116, 251-266 (1976).



- 3) Goshgarian, H. G., Koistinen, J. M. & Schmidt, E. R.: Cell death and changes in the retrograde transport of HRP in rubrospinal neurons following spinal and hemisection in the adult rat. *J. Comp. Neurol.*, **214**, 251-257 (1983).
- 4) Prendergast, J. & Stelzner, D.: Increases in collateral axonal growth rostral to a thoracic hemisection in neonatal and weanling rat. *J. Comp. Neurol.*, **166**, 145-162 (1976).
- 5) Froster, D. O., So, K. F. & Schneider, G. E.: Postnatal development of retinal projections in syrian hamsters: A study using autoradiographic and anterograde degeneration techniques. *Neuroscience.*, **4**, 1649-1677 (1979).
- 6) Cunningham, T. J., Huddelston, C. & Murray, M.: Modification of neuron numbers in the visual system of the rat. *J. Comp. Neurol.*, **184**, 423-434 (1979).
- 7) Cunningham, T. J.: Naturally occurring neuron death and its regulation by developing neural pathways. *Int. Rev. Cytol.*, **74**, 163-186 (1982).
- 8) Okado, N., Cheng, L., Tanatsugu, Y., Hamada, S. & Hamaguchi, K.: Synaptic loss following removal of serotonergic filbers in newly hatched and adult chickens. *J. Neurobiol.*, **24**, 687-698 (1993).
- 9) Cowan, W. M.: Anterograde and retrograde transneuronal degeneration in the central and peripheral neurons system. *In* W. J. H. Nauta & S. O. E. Ebberson (eds.), *Contemporary Research Methodes in Neuroanatomy*, 1st ed., p217-251, Spring-Verlag, Berlin & New York, 1970.
- 10) Lund, R. D.: *Development and Plasticity of the Brain*, 1st ed., p113-166, Oxford University Press, New York, 1978.
- 11) Leong, S. K. & Lund, R. D.: Anomalous bilateral corticofugal pathways in albino rats after neonatal lesions. *Brain Res.*, **62**, 218-221 (1973).
- 12) Nah, S. H. & Leong, S. K.: Bilateral corticofugal projection to the red nucleus after neonatal lesions in the albino rat. *Brain Res.*, **107**, 433-436 (1976).
- 13) Adams, C. E., Mihailoff, G. A. & Woodward, D. J.: A transient component of the developing corticospinal tract arises in visual cortex. *Neurosci. Lett.*, **36**, 243-248 (1983).
- 14) Stanfield, B. B. & O'leary, D. D. M.: The transient corticospinal projection from the occipital cortex during the postnatal development of the rat. *J. Comp. Neurol.*, **238**, 236-248 (1985).
- 15) Schreyer, D. J. & Jones, E. G.: Axon elimination in the developing corticospinal tract of the rat. *Dev. Brain Res.*, **38**, 103-119 (1988).
- 16) Nah, S. H. & Leong, S. K.: An ultrastructural study of the anomalous corticorubral projection following neonatal lesions in the albino rat. *Brain Res.*, **111**, 162-166 (1976).
- 17) Tolbert, D. L. & Panneton, W. M.: Transient cerebrotocerebellar projections in kittens: postnatal development and topography. *J. Comp. Neurol.*, **221**, 216-228 (1983).
- 18) Schneider, G. E.: Early lesions of superior colliculus: factors affecting the formation of abnormal retinal projections. *Brain Behav. Evol.*, **8**, 73-109 (1973).
- 19) Guth, L.: Axonal regeneration and functional plasticity in the central nervous system. *Exp. Neurol.*, **45**, 606-654 (1974).
- 20) Guth, L.: History of central nervous regeneration research. *Exp. Neurol.*, **48**, 3-15 (1975).
- 21) Devor, M.: Neuroplasticity in rearrangement of olfactory tract fibers after neonatal transection in hamsters. *J. Comp. Neurol.*, **166**, 49-72 (1976).
- 22) Gearhart, J., Oster-Granite, M. L. & Guth, L.: Histological changes after transection of the spinal cord of fetal and neonatal mice. *Exp. Neurol.*, **66**, 1-15 (1979).
- 23) Prendergast, J. & Misantone L. J.: Sprouting by tracts descending from the midbrain to the spinal cord: the result of thoracic funiculotomy in the newborn. 21 day old and adult rat. *Exp. Neurol.*, **69**, 458-480 (1980).
- 24) Veraa, R. P. & Grasfsteom, B.: Cellular mechanisms for recovery from nervous system injury: a conference report. *Exp. Neurol.*, **71**, 6-15 (1981).
- 25) Kalil, K. & Reh, T.: A light and electron microscopic study of regrowing pyramidal tract fibers. *J. Comp. Neurol.*, **211**, 265-275 (1982).
- 26) Foerster, A. P.: Spontaneous regeneration of cut axons in adult rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **210**, 335-356 (1982).
- 27) Tolbert, D. L. & Der, T.: Redirected growth of pyramidal tract axons following neonatal pyramidotomy in cat. *J. Comp. Neurol.*, **260**, 299-311 (1987).
- 28) Merline, M. & Kalil, K.: Cell death of corticospinal neurons is induced by axotomy before but not after innervation of spinal targets. *J. Comp. Neurol.*, **296**, 506-516 (1990).
- 29) Xu, X. M. & Martin, G. F.: Developmental plasticity of the rubrospinal tract in the North American opossum. *J. Comp. Neurol.*, **279**, 368-381 (1989).
- 30) Webster, D. B. & Webster, M.: Mouse brainstem auditory nuclei development. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, **89**, 254-256 (1980).
- 31) Dardennes, R., Jarreau, P. H. & Meiniger, V.: A quantitative Golgi analysis of the postnatal maturation of dendrites in the central nucleus of the inferior colliculus of the rat. *Brain Res.*, **318**, 159-169 (1984).
- 32) Blatchley, B. J., Cooper, W. A. & Coleman, J. R.: Development of auditory brainstem response to tone pip stimuli in the rat. *Brain Res.*, **429**, 75-84 (1987).
- 33) Coleman J. R.: Development of auditory system structures. *In* J. R. Coleman (ed.), *Development of Sensory Systems in Mammals*, 1st ed., p205-247, A Wiley-Interscience Publication, New York, 1990.
- 34) Schwartz I. R.: The superior olivary complex and lateral lemniscal nuclei. *In* D. B. Webster, A. N. Popper & R. R. Fay (eds.), *The Mammalian Auditory Pathway: Neuroanatomy*, 1st ed., p117-167, Springer-Verlag, New York, Berlin, 1991.

- 35) Glendenning, K. K. & Masterton, R. B.: Acoustic chiasm: efferent projections of the lateral superior olive. *J. Neurosci.*, **3**, 1521-1537 (1983).
- 36) Aitkin, L. M. & Schuck, D.: Low frequency neurons in the lateral central nucleus of the cat inferior colliculus receive their input predominantly from the medial superior olive. *Hear. Res.*, **17**, 87-93 (1985).
- 37) Henkel, C. K.: Axonal domains within the dorsal nucleus of the lateral lemniscus. *Soc. Neurosci. Absts.*, **15**, 746 (1989).
- 38) Kudo, M., Kitao, Y. & Nakamura, Y.: Differential organization of crossed and uncrossed projections from the superior olive to the inferior colliculus in the mole. *Neurosci. Lett.*, **117**, 26-30 (1990).
- 39) Rogowski, B. A. & Feng, A. S.: Normal postnatal development of medial superior olivary neurons in the albino rat. *J. Comp. Neurol.*, **196**, 85-97 (1981).
- 40) Pysh, J. J.: The development of the extracellular space in neonatal rat inferior colliculus. *Amer. J. Anat.*, **124**, 411-430 (1969).

**Postnatal Development of the Auditory Pathway and Plasticity after Unilateral Ablation of the Inferior Colliculus in the Rat** Shigeo Okoyama Department of Anatomy, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. *Juzen Med Soc.*, **103**, 154-162 (1994)

**Key words** auditory pathway, inferior colliculus, medial superior olivary nucleus, postnatal development, plasticity

#### Abstract

In one set of experiments, normal development of projections from the medial superior olive (MSO) to the inferior colliculus (IC) was examined by injecting Fluoro-Gold (FG) into the IC unilaterally at postnatal day 0 (P0), 3 (P3), 7 (P7) and adult. The rats were killed 1 day after the FG injections. In all cases, labeled neurons in the MSO appeared on the ipsilateral side only as they did in adult controls. The labeled frequency index of MSO neurons was increased stepwise (about from 35% to 90%) with increasing postnatal stages (from P0 to adult), suggesting differential growth of early- and late-developing axons. In another set of experiments, cell counts in the MSO were performed on rats, of which IC had been unilaterally ablated between P0 and maturity. All the rats were given injections of FG into the ipsilateral IC at P0 (before the ipsilateral IC was ablated in all cases) so that growth of early-developing axons to the ipsilateral IC could be examined for any labeled neurons in the ipsilateral MSO. Upon reaching adulthood, the rats again received injections of Fluoro-Ruby (FR) into the contralateral IC so that aberrant crossed projections to the intact IC could be examined for any labeled neurons in the ipsilateral MSO. These rats were sacrificed 2 days after the FR injections. The results indicate that : 1) The projection from the MSO to the IC is developed as an exclusively uncrossed one without making axon-collaterals to the contralateral IC at any postnatal stages. 2) When the IC is ablated unilaterally in certain postnatal periods, many neurons die in the ipsilateral MSO as a result of axotomy. 3) An aberrant crossed projection to the contralateral IC occurs in some of the survived neurons in the MSO, although such aberrant fibers still maintained in adults are very small in number. The present results further suggest that growth of late-developing axons is a major factor in the plasticity of this system.