

氏名(本籍)	しかもと きよみ 鹿本 希世美(茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第3214号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Basis of changes in left-right coordination of rhythmic motor activity during development in the rat spinal cord (発達期ラットにおけるリズム運動の左右協調を制御する脊髄内神経機構)
主査	筑波大学教授 博士(医学) 梶 正 幸
副査	筑波大学講師 博士(医学) 一 條 裕 之
副査	筑波大学講師 博士(医学) 金 岡 恒 治
副査	筑波大学講師 医学博士 吉 澤 利 弘

論文の内容の要旨

(目的)

哺乳類において基本的な歩行運動のリズムおよびパターンを形成する神経回路は脊髄の中に存在する。ラット新生仔から摘出した脊髄標本などを用いた実験により、胎生期に運動ニューロン群にリズム的な活動を起こさせる神経回路網が形成されており、左右の活動に協調関係が見られることが明らかにされている。しかしながら、リズム活動が現れ始める胎生初期には、胎生後期および新生仔期に見られる左右交代性のパターンとは異なる左右同期パターンが観察され、リズムパターンを形成する左右の神経結合に発達を伴った変化が起こっていることが考えられる。そこで、本研究では、運動リズムの発生初期に見られる左右同期したパターンの形成と、その発達に伴う変化に関与する神経機構を明らかにする事を目的とした。

(対象と方法)

胎生15.5日から20.5日のラット胎仔および生後0日のラット新生仔から脊髄摘出標本を作製し、電気生理学的手法、形態学的手法および光学側定法を用いて実験を行った。

- (1) 脊髄をKrebs液灌流下で生存させ、左右の腰髄前根から運動ニューロン群の複合活動電位を記録した。一部の実験においては、左右の脊髄に別々の灌流液を流した時の影響を観察した。
- (2) 摘出した脊髄をパラホルムアルデヒドで固定し、腰髄横断面の片側に脂溶性標識色素Dilの結晶を置き、反対側の交叉性ニューロンを逆行性に標識し、その脊髄横断面における局在を調べた。
- (3) Krebs液灌流下に置いた脊髄を用いて、交叉性ニューロンをカルシウム感受性色素Calcium Green-1 AMで逆行性に標識し、カルシウム・イメージングを行った。

(結果)

- (1) セロトニンの投与により左右前根で同期したパターンのリズムが出現する胎生15.5日から16.5日の脊髄標本で脊髄前交連を切断したところ、左右で独立したリズムが記録されるようになったことから、左右の脊髄それぞれにリズムを誘発する神経回路網が存在し、その間の結合は前交連を通ることが示唆された。

- (2) 前交連に軸索を送る交叉性ニューロンをDilで逆行性に標識して脊髄内における位置を調べた結果、交叉性軸索をもつニューロンの細胞体は脊髄腹内側部に多く分布することが示された。
- (3) 交叉性ニューロンをCalcium Green-1 AMで標識し、前根から運動ニューロン群の活動電位を記録するとともに、カルシウム・イメージング法で腰髄横断面の標識された細胞群の細胞内カルシウム濃度の変化を記録したところ、セロトニンによって誘発されたリズム発射活動に一致した周期的な細胞内カルシウム濃度の上昇が多く、腹内側に位置する交叉性ニューロンに認められた。
- (4) 交叉性ニューロンから脊髄反対側への入力を調べるために、摘出脊髄の灌流槽を左右で分離し、片側脊髄のみにセロトニンを投与した。この結果、反対側にもセロトニン投与側と同期した神経発射が見られ、脊髄半側のリズム形成回路から反対側へ交叉性ニューロンを介した興奮性の入力があることが示唆された。
- (5) このような反対側への興奮性入力があるのかを調べるために、片側脊髄へのセロトニン投与によって反対側に誘発されたリズムに対して様々な受容体の拮抗薬を灌流投与したときの影響を調べた。その結果、GABA_A受容体の拮抗薬であるビククリンおよびピクロトキシンを投与することによって、リズムの出現が抑えられたことから、この時期に見られる脊髄片側のリズム形成回路網から反対側への興奮性入力は、GABA_A受容体を介していることが示唆された。
- (6) セロトニン誘発リズムは胎生18.5日以降には左右交代性になるが、この時期に左右の灌流槽を分離して脊髄片側のみにセロトニンを投与しても反対側にはリズムは出現しなかった。左右の灌流槽を分離せずに、脊髄両側にセロトニンを投与することによって誘発された左右交代性リズムに対してビククリンもしくはグリシン受容体の拮抗薬であるストリキニーネを投与すると、胎生18.5日では左右のリズムが同期するようになった。さらに、胎生20.5日および生後0日の標本では、ビククリンの投与はリズムのパターンに変化を与えなくなり、ストリキニーネの投与によって左右のリズムが同期するようになった。このことから、発達に伴ってグリシン受容体を介する神経結合が左右の交代性のパターンを形成する中心的な役割を担うようになることが示唆された。

(考察・結論)

本研究では、胎生期のリズム形成回路網の左右間の結合は初めは主にGABA_A受容体を介しており、この作用が発達に伴って興奮性から抑制性に変化することでリズムのパターンが変化することが示された。哺乳類の脊髄において主な抑制性の神経伝達物質として知られているGABAやグリシンが、幼弱期には一過性に興奮性の活動を示すことが近年の研究で示されており、発達初期に見られるGABA_A受容体を介する興奮性の結合が、左右のリズム形成回路網を結合する抑制性経路の形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。本研究により、歩行運動時に見られるような左右の協調運動を司る神経機構が胎生期に発達してくるメカニズムを明らかにすることができた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

ラット新生仔から脊髄摘出標本を作成し、電気生理学的手法、形態学的手法および光学測定法を駆使して、歩行運動のリズムおよびパターンを形成する機構について調べ、発達過程の哺乳動物脊髄において見られる左右間のリズム発射活動の協調に関与するメカニズムを明らかにした優れた研究である。特に胎生16日における左右同期したリズムが脊髄前交連を介した交差性線維によって起こる事、これが胎生20日には左右交代性に変化する事、この神経伝達がいずれもGABA_A受容体を介して行われる事などを正確で緻密な実験によって証明しており、脊髄の運動制御とその発達に関する神経回路形成機構を理解する上で重要な貢献をした研究であると高く評価できる。よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。