

新たに発見された神経症状を呈するラットの解析

Investigation of a new neurological mutant rat

市原伸恒

麻布大学大学院獣医学研究科

Nobutsune Ichihara

Graduate School of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract. A new neurological rat has been found in the Wistar strain of rats. The mutation is inherited as an autosomal recessive trait and is manifest clinically by wobble gait and tremor after 9 weeks of age. In this study histopathological examinations were performed in order to investigate a change in the number of Purkinje cells and general histological change with H-E staining, distribution of astrocyte with immunohistochemical staining and the presence of the degeneration of Purkinje cell with Fluoro-Jade B reaction in the cerebellum and related nuclei at 5,7,9,13 and 48 weeks of age. The loss of Purkinje cells was recognized in lobules I-IX from 9 weeks of age. Thinnings of molecular layer and granular layer were found in mutant rat at 48 weeks of age. In mutant rat at 9, 13 and 17 weeks of age, reactive astrocytes with intense immunoreactivity against anti-GFAP antibody were distributed in molecular layer (Bergmann's glial cell) and cerebellar medulla. Fluoro-Jade B positive reactions were found in dendrites of Purkinje cells at 5 weeks of age. At 9, 13, 17 weeks of age, cell bodies, dendrites of Purkinje cells, Bergmann's glial cells and astrocytes of cerebellar medulla.

In present study, histopathological examination revealed degeneration in this mutant occurred first at dendrite of Purkinje cell, and then extended gradually from dendrite to the cell body of Purkinje cell. Though it is known lobules I-IX found degeneration and loss of Purkinje cells in mutant rat were associated with spinocerebellar tract and pontocerebellar tract, no histopathological change were recognized in these tracts. Unique features of this mutant rat are 1) degeneration is confined to cerebellum, 2) No histopathological change is found in lobule X, 3) Except for the cerebellum, There is no abnormality in blood examination and fertility. Further study, for instance electromicroscopic study in dendrites at early stage after birth or investigation of mutant rat after 48 weeks of age will reveal mechanism for degeneration and histopathological features in details.

1. 目的

実験に供したミュータントラットは、2001年に日本チャールズリバー株式会社において、Wistar系ラットの突然変異体として発見された。臨床徴候は生後8週齢頃から認められる振戦であり、その徴候は加齢に伴い、後躯から徐々に進行し、全身性に移行

する。遺伝的には、臨床徴候は常染色体劣性遺伝に従う。また、組織学的変化としては生後9週齢の個体において、小脳プルキンエ細胞が脱落していることが認められている。神経系以外の内臓諸臓器には組織形態学的異常は認められず、血液の一般生化学的性状にも異常は認められていない。このミュータントラットには正式な名称がないため、本報告にお

いて、本ミュータントラットを振戦ラットと表す。

本実験の目的は、小脳ならびに小脳関連神経核（小脳核、前庭神経核、下オリーブ核、橋核、赤核）に観察部位を絞り、生後5, 9, 13, 17, 48週齢の個体について小脳のプルキンエ細胞の脱落や層構造の変化などの組織学的変化を観察し、加齢により、どのような変化が生じているかを検討することである。また、一般染色による形態学的変化に加え、免疫組織化学的手法を用いた星状膠細胞の動態と、近年、神経変性細胞のマーカーとして用いられているFluoro-Jade Bを用いた神経細胞の変性の有無について検討を行い、戦振ラットの変性の特徴について明らかにする。

2. 材料と方法

1) 供試動物

生後5, 9, 13, 17, 48週齢の振戦ラットおよび正常対照ラット（Wistar系ラット）雄3個体を用いた。

2) 材料採取, 固定, 包埋, 染色

エーテル麻酔下のラットを、10%中性緩衝ホルマリンを用いて左心室より灌流固定し、脳を取り出した。採取した脳は、同固定液にて浸漬固定後、脳を傍正中断にて二分し、定法通りにパラフィン包埋した。得られた包埋ブロックから、厚さ6 μ mの切片を作製し、シランコートスライドガラスに貼り付けた。

染色は、一般染色としてHematoxylin-Eosin (HE)染色、星状膠細胞のマーカーであるGlial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)抗体を用いた抗GFAP免疫染色、神経変性のマーカー染色であるFluoro-Jade B染色を行った。

4) 計測

①. プルキンエ細胞数計測 (HE染色標本)

各葉ごとのプルキンエ細胞数を計測して、正常対照ラットと振戦ラットのプルキンエ細胞数を計測した。

②. 分子層ならびに顆粒層幅の計測 (HE染色標本)

正常対照ラットならびに振戦ラットにおける各葉ごとの分子層と顆粒層の幅について画像解析装置を用いて計測した。

③. 星状膠細胞の変化 (抗GFAP免疫染色標本)

正常対照ラットならびに振戦ラットにおける、抗GFAP免疫反応陽性を示す星状膠細胞の加齢による出現頻度の変化や、出現部位を検討した。

④. 神経変性細胞の検討 (Fluoro-Jade B染色標本)

小脳ならびに小脳関連神経核における神経変性細胞出現の有無や出現頻度を検討した。

3. 結果と考察

①. プルキンエ細胞数測定

生後5週齢ではいずれの葉についても正常ラットと戦振ラットの間に、プルキンエ細胞数の差は認められなかったが、生後9週齢以降、X葉を除く全ての葉で戦振ラットのプルキンエ細胞数に著しい減少を認めた (Fig. 1a, 1b)。X葉では生後17週齢以外の週齢で差は認めなかった。

②. 分子層ならびに顆粒層幅の計測

生後48週齢の振戦ラットにおいて、X葉を除く全ての葉の分子層と、I, II, III, VI, VIII, IX葉の顆粒層で菲薄化を認めた (Fig. 1a, 1b)。

③. 星状膠細胞の観察

生後5ならびに48週齢の振戦ラットにおける抗GFAP免疫反応の反応部位や反応性に正常対照ラットと差が見られなかった。生後9, 13, 17週齢においてはバグマングリアの突起に正常ラットよりも強い反応を認めた (Fig. 1c, 1d)。また小脳髄質と小脳皮質の顆粒層に認められる星状膠細胞の突起に正常ラットより強い反応を認めた。小脳関連神経核では反応陽性星状膠細胞数や、その反応性に正常対照ラットと戦振ラットの間に差は認めなかった。

④. 変性神経の観察

振戦ラットでは、生後5週齢でプルキンエ細胞の樹状突起のみに反応を認めた (Fig. 2a)。生後9, 13, 17, 48週齢ではプルキンエ細胞体ならびに樹状突起、バグマングリア、髄質に存在する星状膠細胞 (Fig. 2c) に反応を認めた (Fig. 2b, 2c)。これらのFluoro-Jade B陽性のプルキンエ細胞体の数は、生後9週齢で最も多く、生後17週齢ならびに生後48週齢では減少していた。正常対照ラットでは、いずれの週齢においてもFluoro-Jade B陽性細胞は認めなかった。また、正常対照ラットならびに戦振ラットの小脳関連神経核にもFluoro-Jade B陽性細胞は見られな

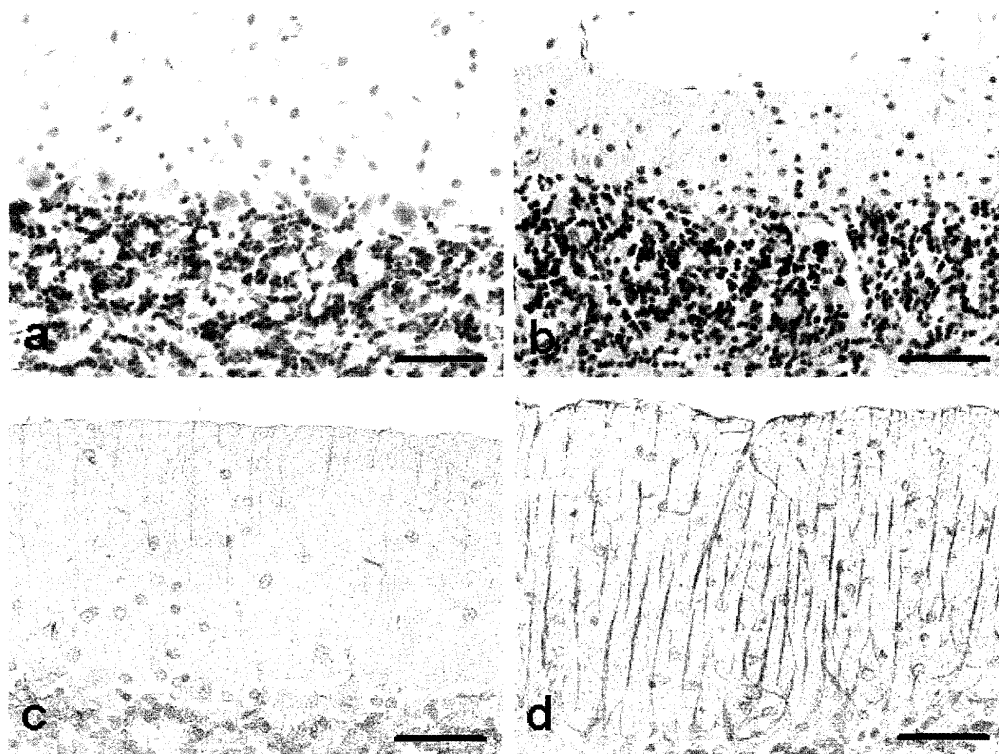


Fig.1 Light microscopic analysis of the cerebellar cortex at 48 weeks of age in normal rats (a,c) and mutant rats (c,d). Hematoxylin and eosin staining (a,b) and (c,d) immunohistochemical staining with anti-GFAP antibody. The scale bars represent 50 μ m.

かった。

今回得られた結果より、戦振ラットではプルキンエ細胞の脱落が生後9週齢以降、I葉からIX葉の広い領域で生じていることが判明した。プルキンエ細胞の脱落が見られたI～IX葉には、脊髄内の細胞群から起始する脊髄小脳路の神経線維や、橋核群から起始する橋小脳路の神経線維が伸びていることから、これらの神経路を含む錐体外路系が病態に関与している可能性があったが、本ラットでは小脳関連神経核には形態学的変化は認められなかった。小脳プルキンエ細胞の変性を伴う疾患では、変性部位が疾患の進行に伴い、継シナプ的に広がることが知られており、小脳関連神経核に関する変化については更に加齢の進んだ個体での検討が必要であろう。また、分子層ならびに顆粒層において菲薄化が認められたことは、プルキンエ細胞の脱落に伴う樹状突起ならびに軸索の消失に起因すると考えられる。抗GFAP免疫反応陽性を示す星状膠細胞の増加は、プルキンエ細胞の脱落に伴い、グリオシスが生じたためであると考えられる。

変性神経細胞の特異的な染色には、変性細胞の好銀性を利用した方法が古くから知られていたが、1997年に陰イオン蛍光色素の派生物である Fluoro-Jade が変性神経細胞のマーカーとして報告された¹⁾。その後、反応性や特異性などに関して改良が加えられ、1998年に Fluoro-Jade B が報告された²⁾。現在、Fluoro-Jade B は特異性の高さや、免疫組織化学染色との二重染色にも利用できるなどの利便性から、神経変性細胞のマーカーとして利用されている^{2),3)}。

HE 染色では生後5週齢の振戦ラットでは組織学的な変化は認められなかったが、Fluoro-Jade B 染色では生後5週齢の振戦ラットにおいて、分子層に広がるプルキンエ細胞の樹状突起に Fluoro-Jade B 陽性反応が認められ、既に生後5週齢でも変性が生じていることが判明した。また、生後9週齢以降の振戦ラットでは、樹状突起に加えてプルキンエ細胞体が Fluoro-Jade B 陽性を示した。これらのことから、プルキンエ細胞の変性は樹状突起から始まり、その後、変性が細胞体にまで至り、壊死・脱落が生じると考えられる。加齢に伴い Fluoro-Jade B 陽性のプルキンエ細胞数が減少するのは、変性したプルキンエ細胞

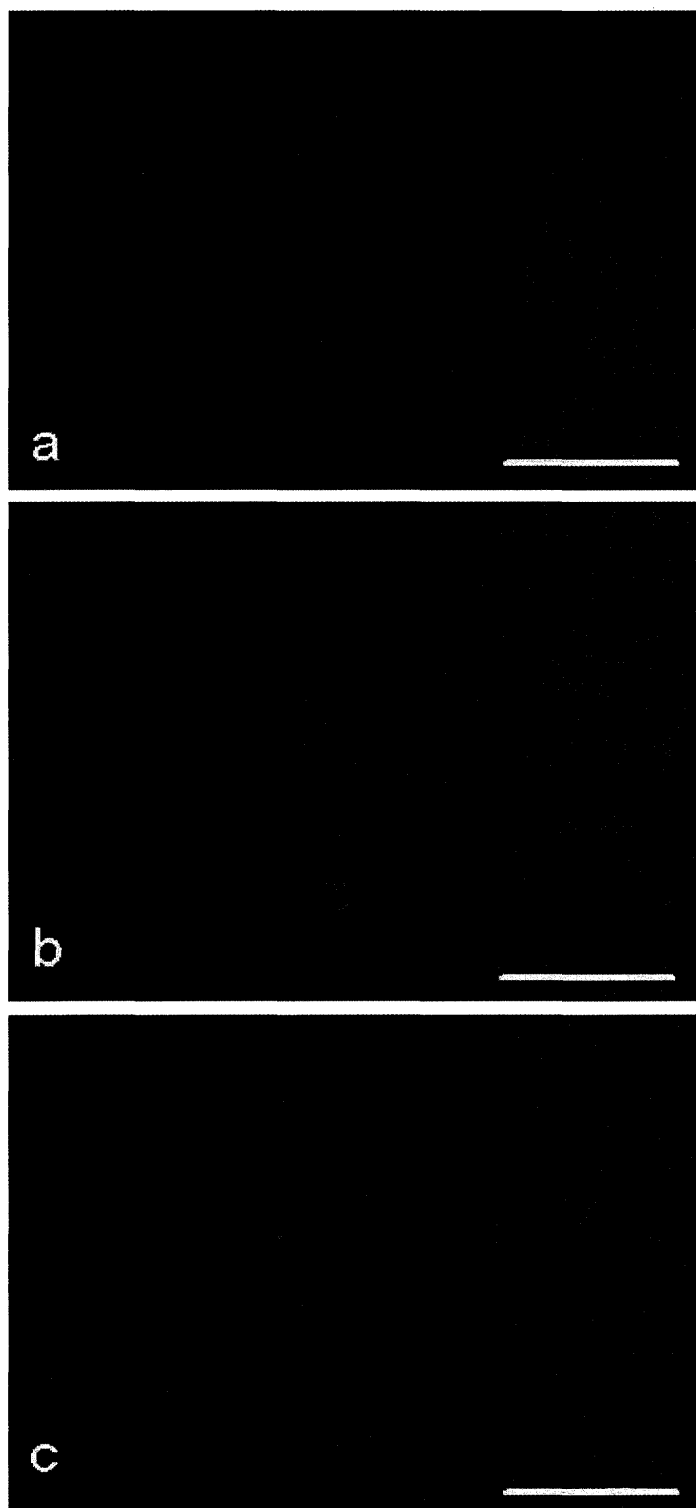


Fig.2 Fluoro-Jade B reactions of the cerebellar at 5 weeks of age (a), 7 weeks of age (b) and 17 weeks of age (c) in mutant rats. The scale bars represent 50 μm (a,b) and 100 μm (c).

が壊死・脱落し、プルキンエ細胞数自体が減少しているためであると考えられる。また、小脳髄質に存在する星状膠細胞と、小脳皮質の分子層に存在するパーグマングリアにも Fluoro-Jade B 陽性反応が見ら

れた。近年、正常または傷害を受けた中枢神経系において、星状膠細胞が Fluoro-Jade B に陽性反応を示すという報告がある⁴⁾。今回の実験でも変性に伴い反応性に増加した星状膠細胞に反応が見られたが、

今回得られた陽性反応の意義については不明である。しかし、今回の実験結果で、変性部位で増生した星状膠細胞に反応が見られたことは、Fluoro-Jade B 陽性の星状膠細胞が変性部位を知る上での指標になりうる可能性があると考えられる。

小脳変性がみられる実験動物としては、小脳組織が形成された後にプルキンエ細胞が脱落する Purkinje cell degeneration (pcd) マウス⁵⁾ や Nervous mouse⁶⁾, Komeda zucker creeping ラット⁷⁾。Cerebellar Calcification (CC) ラット⁸⁾ などが知られているが、戦振ラットは、1) 変性部位が小脳に局限している、2) X葉に変化がみられない、3) 小脳以外の部位や血液性状、繁殖力などに異常がない、4) これまで判明している限りでは、生後48週齢まで生存する、という点が特徴である。今後、これらの点に注目して解析を進めるとともに、生後早期の樹状突起の微細構造の観察や、さらに加齢が進んだ個体の小脳関連神経核の変化を解析することにより、本ラットの病態発生機序の解明や、詳しい病態解析に繋がるものと考えられる。

4. 要約

Wistar系ラットの突然変異体として発見された、振戦を示すミュータントラット(振戦ラット)の組織学的変化について検討した。本研究では生後5, 9, 13, 17, 48週齢の振戦ラットについて、HE染色標本観察によるプルキンエ細胞数の変化や形態学的変化を観察した。また、星状膠細胞の動態を調べるために抗Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) 免疫染色を、小脳や小脳関連神経核における神経細胞の変性の有無について調べるためにFluoro-Jade B染色を行い、観察を行った。

HE染色標本の観察の結果、生後5週齢の振戦ラットの小脳では著変は認められなかったが、生後9週齢以降の振戦ラットではI~IX葉においてプルキンエ細胞の脱落が認められた。生後48週齢の小脳皮質ではX葉を除く、全ての葉の分子層と、一部の葉で顆粒層の菲薄化が認められた。また、全ての週齢において、小脳関連神経核や錐体路では顕著な変化は認められなかった。生後9~17週齢の振戦ラットで

は小脳の分子層のバグマングリアや小脳髄質の星状膠細胞に、正常対照ラットと比べて強い抗GFAP免疫陽性反応が認められた。生後5週齢の振戦ラットでは分子層の樹状突起に、生後9~17週齢の振戦ラットではプルキンエ細胞体ならびに樹状突起、バグマングリア、髄質に存在する星状膠細胞にFluoro-Jade B陽性反応を認めた。

本ラットにおいて、生後5週齢でプルキンエ細胞の樹状突起から変性が生じ、変性が細胞体に及んで、プルキンエ細胞が脱落することが判明した。プルキンエ細胞の脱落が認められた小脳のI~IX葉には、脊髄小脳路や橋小脳路からの神経線維が伸びており、本ラットの病態変化にこれらの神経路が関与している可能性があるが、異常は認めなかった。小脳に変性が生じるラットはいくつか知られているが、本ラットは1) 変性部位が小脳に局限している、2) X葉に変化がみられない、3) 小脳以外の部位や血液性状、繁殖力などに異常がないこと等が特徴である。これらの点に注目して解析を進めるとともに、生後早期の樹状突起の微細構造の観察や、さらに加齢が進んだ個体の解析などを行うことにより、本ラットの詳しい病態解析に繋がるものと考えられる。

文献

- 1) Schmued, L.C., Albertson, C. and Slikker, W.Jr. *BRAIN RESEARCH* 751: 37-46, 1997.
- 2) Schmued, L.C., Slikker, W.Jr. and Wang, G.J. *Soc. neurosci. Ab.* 24: 1064, 1998.
- 3) Schmued, L.C. and Hopkins, K.J. *BRAIN RESEARCH* 874: 123-130, 2000.
- 4) Anderson, K.J., Fugaccia, I., and Scheff, S.W. *Journal of Neurotrauma* 20: 1223-1231, 2003.
- 5) Mullen, R.J., Eicher, E.M. and Sidman, R.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:208-212, 1976.
- 6) Dusart, I., Guenet, J.L. and Sotelo, C. *Cerebellum*. 5: 163-173, 2006.
- 7) Ishibashi, K., Komeda, K., Sekiguchi, F., and Kanazawa, Y. *Lab. Anim. Sci.* 39: 132-136, 1989.
- 8) Ando, Y., Ichihara, N., Takeshita, S., Nagata, M., Kimura, T., Tanase, H. and Kikuchi, T. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 221: 361-368, 1999.