

原著

## 赤核脊髓路の発生学的研究Ⅱ 生後2日目マウスの赤核の神経回路

栢原哲郎<sup>1)</sup> 小形晶子<sup>2)</sup>1) 神戸学院大学総合リハビリテーション学部  
医療リハビリテーション学科作業療法学専攻2) 神戸学院大学総合リハビリテーション学部  
医療リハビリテーション学科理学療法学専攻

**【要約】** 赤核脊髓路の発生について調べるために、標識物質としてビオチン化デキストランアミンを生後0日目のマウスの赤核に注入し、生存期間2日後（P2）、赤核からの順行性および逆行性投射について観察した。脊髓へ下行する標識線維群は、赤核を出てすぐに腹側被蓋交叉を通り、そのまま橋の外側部に向かい、さらに三叉神経主感覚核や延髄の三叉神経脊髓路核の内側部から腹内側部を脊髓まで下行していた。脊髓では、標識線維群は側索の最背側部を下行し、腰髄の下位のレベルにまで到達しているのが観察された。側索を下行する標識線維群から分枝した軸索側枝も、腰髄レベルの灰白質内で見られたが、その軸索側枝の分布の様子は頸髄と腰髄では明らかに異なっていた。頸髄では、側索から灰白質に侵入した軸索側枝は灰白質内でさらに分枝しながら赤核脊髓路の本来の投射領域である脊髓灰白質の中央部に大きく広がっていた。一方腰髄では、軸索側枝の分布領域は小さく、軸索側枝の分枝もほんの数本見られるだけであった。頸髄および腰髄で脊髓灰白質内へ侵入している標識線維の先端には成長円錐が観察されたが、神経終末はほとんど観察されなかった。赤核から視床に上行する標識線維群は、P2の発生段階でも、同側の中心被蓋路を通り視床内側腹側核、視床中心傍核、視床外側腹側核に到達しているのが観察された。加えて、これら標識線維群が観察された視床核群から、さらに他の視床領域に広がっていく標識線維群や反対側の視床に向かう標識線維群なども観察された。おそらくこれらは初期発生時に見られる一時的な投射線維群であると考えられる。また、このP2の赤核からの上行路および下行路で観察された標識線維は、ほとんどが大小様々な数珠玉状であり、その標識線維の表面には大小様々な突起も見られ、さらにそれらの標識線維の先端部には円形、楕円形、三角形など色々な形や大きさの成長円錐も見られた。また、赤核からの順行性投射だけでなく、小脳の中位核からの強い逆行性投射も観察された。

以上の結果から、P2の発生段階では、成体と同じような赤核、視床、脊髓、小脳間の大体の投射路や投射領域はすでに決まっているが、その投射領域内での精密なシナプス形成はまだ未成熟な状態であることが明らかになった。

キーワード：標識法、BDA、幼若動物、成長円錐、軸索側枝

## I まえがき

中脳の赤核は、大脳皮質運動野、4野、6野および小脳中位核からの入力を受け、上行性には視床運動系中継核へ、下行性には脊髄へ投射し、随意運動において特に四肢の運動の調整に重要な役割をはたしていると考えられてきた [1, 2]。それ故、赤核から脊髄への下行路である赤核脊髄路に関しては様々な実験動物 (成体) をもちいた数多くの報告がある [3-11]。それらの報告によると、多くの哺乳類では赤核脊髄路は赤核の尾側部にある大細胞部に起始し、腹側被蓋交叉を通過した後、三叉神経脊髄路の腹側部、上オリーブ核、顔面神経核の外側部、脊髄の側索の背側部を順次下行し、下位腰髄に到達すると報告されている。我々もピオチン化デキストランアミン (BDA) を用いた標識法で、成体マウスでは皮質脊髄路が側索ではなく後索を下行するために、赤核脊髄路は脊髄後角の直下、側索の最背側部を下行しながら、各脊髄レベルで脊髄灰白質中に軸索側枝を出し、主にそのV層 (Rex'd lamina) に終止する事を観察し報告した [12]。この様に成体での赤核脊髄路の研究は数多くなされてきたが、赤核脊髄路がどの様にして形成されるのか、発生学的な研究はあまり見られない。幼若動物を用いた標識法による研究は、逆行性標識物質を脊髄に注入した後、逆行性標識ニューロンを上位中枢 (中脳、橋、延髄、大脳皮質) で観察したもの [13-18] や、順行性標識物質を大脳皮質運動野に注入し、脊髄への下行路、皮質脊髄路を観察したもの [14-25] であり、順行性標識物質を用いた赤核脊髄路の発生学的な研究は我々の予備的な実験のみであった [26]。そこで今回、我々はできる限り初期の赤核脊髄路を観察する目的で、生後0日目のマウスの赤核にBDAを注入し、2日後の赤核脊髄路および赤核視床路についてさらに詳しい観察を行なったので報告する。

なお、今回の実験は神戸学院大学動物実験委員会の承認のもとに行った (承認番号A120507-50)。

## II 材料と方法

本実験には生後0日 (P0:生まれてから8~12時間以内) のICR系マウス8匹使用した。動物をジエチルエーテルで50秒間深く麻酔した後、手術用テープで四肢を固定し、頭皮を切開し、後頭骨の一部をピンセットで切り取る。その後、中脳の赤核に0.9%生理食塩水に溶解した10%ピオチン化デキストランアミン (BDA) の0.1~0.3 $\mu$ lをピコポンプで圧注入した。頭皮を縫合後、手術したP0マウスを母親のいる巣の中に戻した。なお、BDA注入時に注意すべき点はすでに他の論文 [26] で詳しく述べてあるのでここでは省略する。生存期間2日後、手術した動物を再びジエチルエーテルで1分以上深く麻酔し、3%パラフォルムアルデヒド溶液と0.05%~0.1%グルタルアルデヒド溶液の混合固定液で灌流固定を行った。脳を取り出した後、同じ固定液で3時間から一晩後固定し、30%スクロース溶液中で2~3日冷蔵庫 (4 $^{\circ}$ C) で保存した。その後、厚さ40~50 $\mu$ mの前頭断又は水平断切片を作製した。薄切した切片はBDAに対する組織化学的染色を行った。まず始めに切片を、0.9%食塩を含むリン酸緩衝液 (PBS) で5分ずつ3回洗浄し、5 $\mu$ lストレプトアビジン (400倍希釈) (Vector Lab.) と200 $\mu$ lの5%Triton-X100を含む2mlのPBS中で一晩反応させた。翌日、切片をPBSで5分ずつ5回よく洗い、1mgのdiaminobenzidine (DAB) (SIGMA社製)、200 $\mu$ lのnickel ammonium sulfate溶液を入れた5mlのPBS中で2分間浸透した後、0.3%過酸化水素水5 $\mu$ lを加えてさらに30分以上の発色処理を行った。DAB染色された切片を、ゼラチンを塗布したスライドガラスに貼り、脱水および

脱脂後、カバーガラスで封入し、光学顕微鏡で観察した。

なお、我々はできるだけ初期の赤核脊髓路を観察したかったが、生存期間1日ではBDA標識が弱く、赤核からの軸索の観察は困難であった。そこで今回は生存期間を2日間とした。本実験では、BDA注入実験以外にも、P2の脊髓灰白質中に侵入してくるBDA標識線維の分布域を確認するために、2種類の抗体 (anti-vGluT1、anti-Palvalbumin) で脊髓の免疫染色を行なった。そのために、P2マウスを3%パラフォルムアルデヒド溶液で灌流固定し、脳を取り出し、30%スクロース溶液に1日保存し、厚さ40 $\mu$ mの凍結切片を3シリーズ作製した。1シリーズはニッスル染色に、残りの2シリーズを免疫染色のために使用した。免疫染色にはABC Standard Kit, PK-4000 (VECTASTAIN製) を用いた。切片をまず2% Normal Goat Serum溶液でプロッキングした後、一次抗体溶液 (anti-vGluT2 : 100倍希釈, anti-Palvalbumin : 200倍希釈) に1日浸透させた。その後0.1M PBSでよく洗い、二次抗体に1時間、ABC Kitに50分間反応させた後、DABで発色させた。DAB発色後の切片を、ゼラチンを塗布したスライドガラスに貼り、脱水および脱脂後、カバーガラスで封入し光学顕微鏡で観察し、抗体陽性部位とBDA標識線維群の侵入部位とを比較検討した。

### III 結果と考察

今回の観察では、P0の赤核の吻側部から尾側部にかけて多量のBDAが注入され、大脳から頸髄下位レベルまでは前頭断切片、それ以下の脊髓レベルでは水平断切片を作製した4例 (m663、m665、m676、m738) と、赤核の尾側部に少量のBDAが注入され、大脳から脊髓まで全てのレベルを水平断切片にした3例 (m677、m1342、m1344) について報告する。先の多量のBDA注入例では、

主に前頭断切片で赤核からの下行性および上行性投射について観察し、後の少量のBDA注入例では、水平断切片で主に脊髓側索中を下行する軸索とそこから脊髓灰白質中に侵入する軸索側枝の形態を詳しく観察した。

まず先の4例について、赤核から橋、延髄、脊髓および視床への投射について述べる。これらの注入例ではBDAは赤核の中央部から尾側部にかけて広く、ほぼ全域に注入されていた (図1、図2-a, b, c)。この赤核注入例では、反対側優位で赤核から脊髓へ、両側性の下行性投射が観察された。はじめに反対側性の下行性投射について述べる。赤核のBDA注入部位から出た多くの標識線維群はすぐ同じレベルの腹側被蓋交叉を通過して反対側に移り、橋レベルの三叉神経主感覚核の腹内側部を下行していた。その一部の線維群からの軸索側枝が三叉神経主感覚核内に終止するのも見られた (図2-a, b, c, 図3-b)。また、成体の赤核脊髓路では観察されなかった多量の標識線維が橋網様体に広がっていた (図2-c, d)。こ

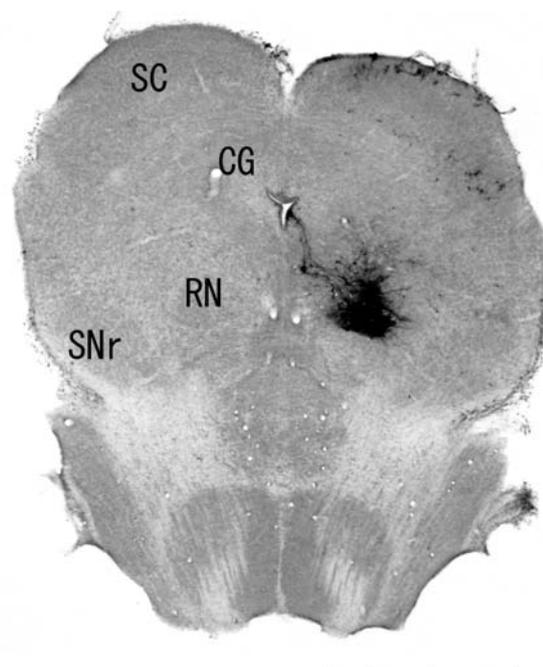


図1 P0マウスの赤核にBDAを注入したm676の注入部位を示す光学顕微鏡写真。sc : 上丘、CG : 中心灰白質、RN : 赤核、SN : 黒質、スケールバー : 1 mm

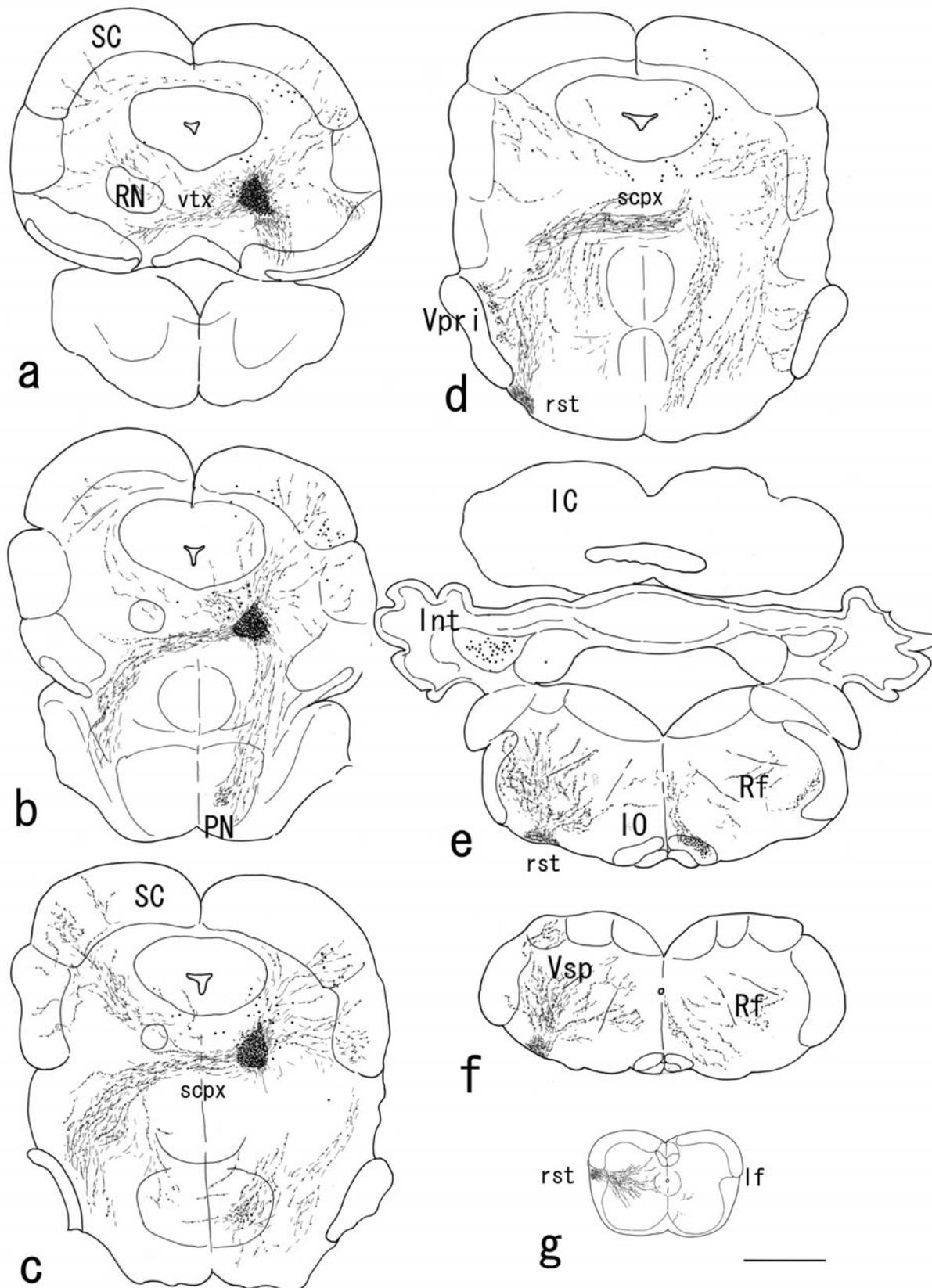


図2 P0マウスの赤核 (RN) へのBDA注入例 (m676) における、中脳から頸髄までの各レベルで観察された逆行性標識線維および標識終末の分布を示す模式図。

a→g: 吻側→尾側

SC: 上丘、IC: 下丘、PN: 橋核、Vpri: 三叉神経主感覚核、Vsp: 三叉神経脊髄路核、Int: 小脳中位核、Rf: 網様体、IO: 下オリーブ核、vtx: 腹側被蓋交叉、scpX: 上小脳脚交叉、rst: 赤核脊髄路、lf: 脊髄側索 スケールバー: 1 mm

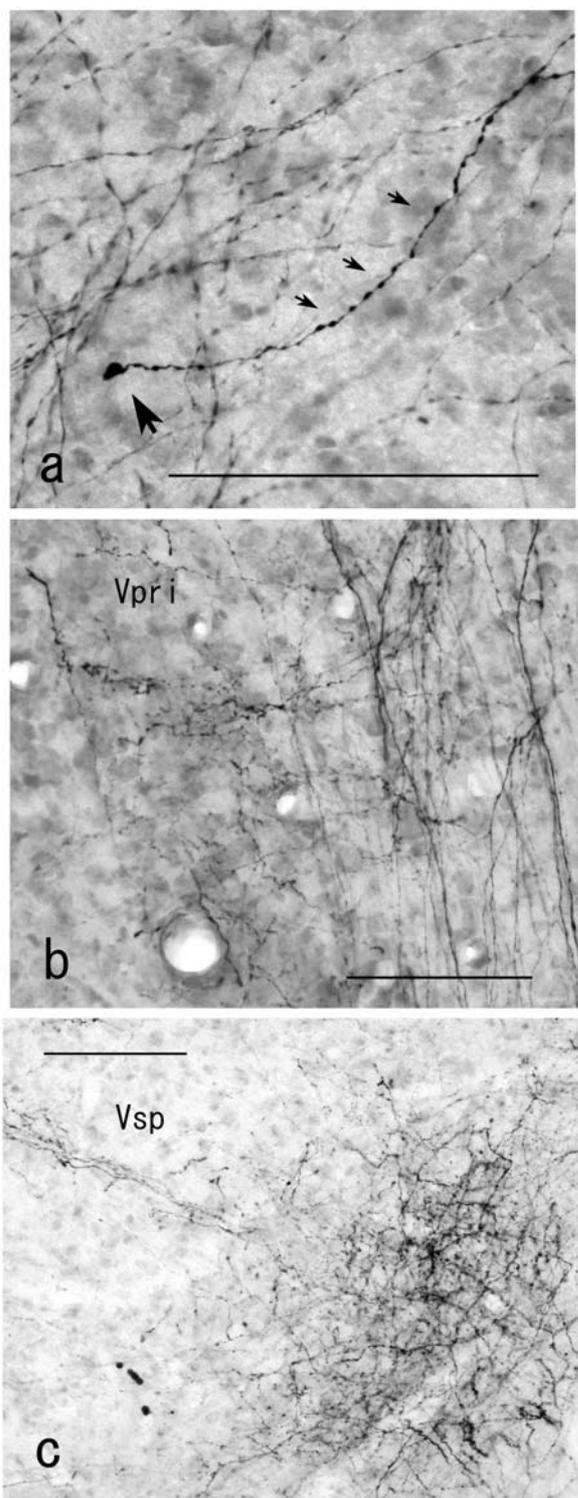


図3 P0マウスの赤核にBDAを注入したm676の橋レベル(a, b)および延髄レベル(c)で観察されたBDA標識線維を示す光学顕微鏡写真。  
 a: 数珠玉状(小さい矢印)の太い1本の標識線維群、先端部に大きな成長円錐(大きい矢印)が見える  
 b: 三叉神経主感覚核(Vpri)の内側を下行する標識線維群(赤核脊髓路:rst)と核内の標識神経終末  
 c: 三叉神経脊髄路核(Vsp)の内側部の網様体小細胞部の標識線維群と標識神経終末  
 スケールバー、a, b, c: 100 $\mu$ m

のP2の橋レベルで観察された標識線維の特徴は、成体とは大きく異なっていた。P2では2種類の太い線維と細い線維がみられ、しかもそれらは大小さまざまな顆粒を含んだ数珠玉状の線維がほとんどで、その先端には大きな成長円錐が観察された(図2-b, c, d, 図3-a)。このように、P2では軸索や軸索側枝を伸ばしている発生期であり、成体で観察されるような表面の滑らかな神経線維はまだ観察されず、赤核下行路の軸索の髄鞘化はまだ起こっていないと考えられる。マウスの皮質脊髓路では軸索側枝の分枝が終了する生後14日に、その髄鞘化が完成するとの報告がある[25]。また、このように赤核からの下行線維の先端がまだ橋レベルで観察される一方で、腰髄の下位レベルに到達している標識線維も観察された。このことより、赤核脊髓路は太さの異なる神経線維が全て一時期に下行するのではないことが示唆される。

延髄レベルでは、成体とほぼ同様に、三叉神経脊髓路の腹内側部を下行しながら延髄網様体の小細胞部に軸索側枝を伸ばしていた(図2-e, f)。この軸索側枝の広がりには成体に比べてより広い範囲に見られ、その標識線維の先端には成長円錐も見られた。しかし、そこでは神経終末はわずしか観察されなかった(図3-c)。つまり、P2の赤核脊髓路は、赤核から延髄レベルまでの下行路や投射領域などはすでに成体とほぼ同じではあるが、その領域内での神経終末の形成は橋核や三叉神経主感覚核でわずかに見られただけであり、まだまだ未成熟であると考えられる。

上位頸髄レベルでは、側索の最背側を下行する標識線維群から脊髓灰白質中に軸索側枝が侵入しているのが観察され(図2-g)、先端部に小型の成長円錐をもった軸索側枝が灰白質の中央部に向かって扇状に広がっていた(図4)。おそらくこの標識線維の分布する領域が成体の脊髓灰白質のV層に相当すると考えられるが、P2の脊髓のNissl

染色標本を観察してもこの灰白質の層構造はまだ明瞭ではない(図5-b)。我々はP2の脊髄で2種類の抗体染色(anti-vGluT1, anti-Palvalbumin)を試みた。vGluT1抗体による免疫染色では上位レベルでは内包、錐体交文など皮質脊髄路が陽性であった。脊髄レベルでは脊髄後索の腹側部(図5-c, dfv)、灰白質の内側部、前角の内側部および外側部にvGluT1陽性線維が観察された(図5-c)。またPalvalbumin抗体による免疫染色では脊髄神経節からの一次感覚性入力線維が陽性であった。脊髄内では、Palvalbumin抗体陽性線維は後索の背側部(図5-c, dfd)やvGluT1陽性線維の分布領域とほぼ同じ領域に観察された(図5-b, c)。この2種類の抗体染色の結果から、P2の赤核脊髄路からの軸索側枝は、皮質脊髄路と一次感覚性入力線維の共通の投射領域ではない領域である脊髄灰白質の中央部で外側部に分布しているよ

うである。つまりP2の発生期にすでに脊髄では、皮質脊髄路や一次感覚性入力線維の投射部位とは異なった領域に赤核が投射していることが明らかになった(図5-a, c, d)。この様に、脊髄でも赤核脊髄路の入力部位はすでに決まっているようであるが、そこで観察される神経終末は数も少なく、脊髄内へ広がっていく標識線維も多数観察されることから、脊髄内でのシナプス形成もまだ未成熟であると考えられる。赤核からの同側性の下行投射は、成体とほぼ同様に[27, 28, 29]、赤核から中心被蓋路、橋網様体を通り、一部の線維が橋核に終止しながら、延髄の下オリーブ核まで到達しているのが確かめられた。

赤核から視床への上行性投射については、特に視床腹内側核(図6-VPM)レベルで、先端部に成長円錐(図6-a, 矢印)を持った多量の標識線維が、正中部を超え反対側の視床内に侵入し

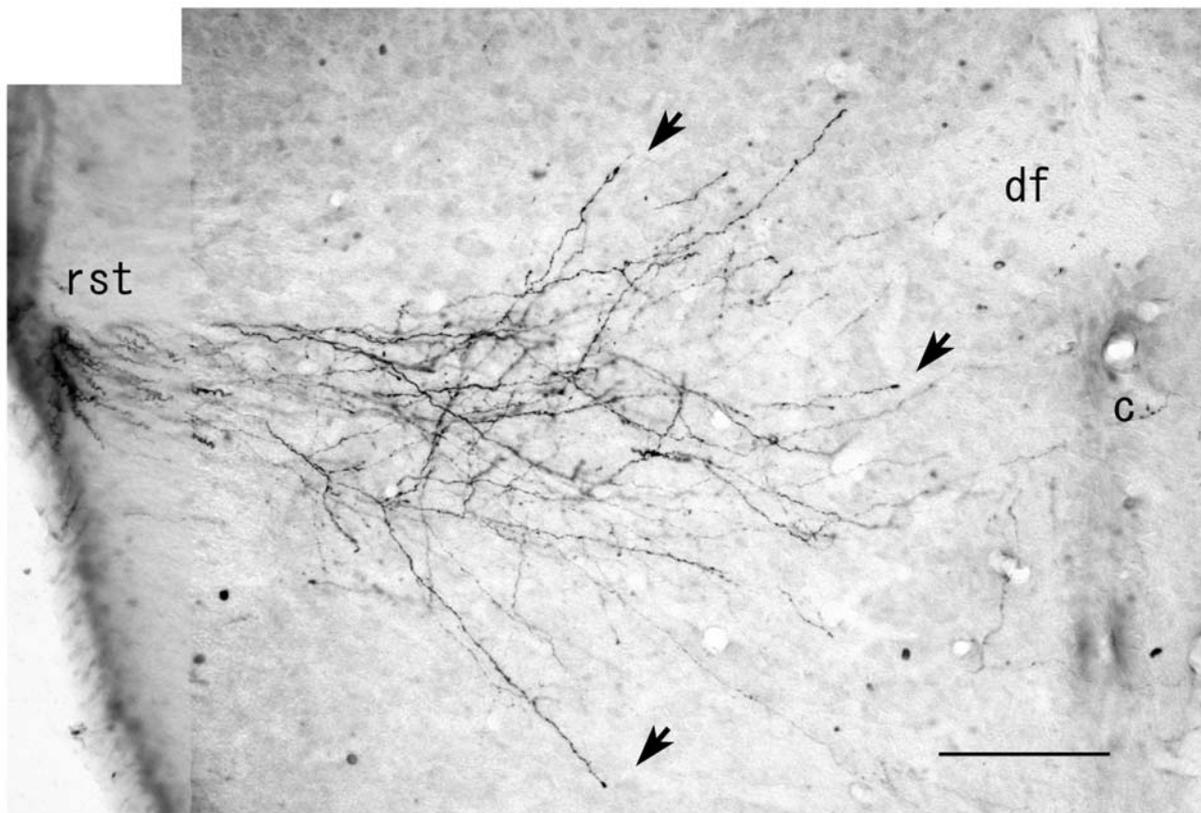


図4 P0マウスの赤核にBDAを注入したm676の頸髄で観察されたBDA標識線維の光学顕微鏡写真。脊髄側索(df)から灰白質中央部に侵入する標識線維群とその先端部に観察される成長円錐(矢印)、c: 中心管、スケールバー: 100 $\mu$ m

ているのが観察された(図6-a)。また、赤核の投射部位である視床外側腹側核内(図6-VL)にも、多量の標識線維とこの神経核から視床内に広がる標識線維およびその先端部の成長円錐が多数観察された(図6, 矢印)。これら成長円錐を持った標識線維の投射は、いずれも幼若動物の発生初期で見られる一時的な投射ではないかと考えられる。P2では、赤核からの視床への上行性の投射路や投射領域も、下行性のそれらと同様にほぼ決まっているようである。

次に、赤核脊髓路を水平断切片で観察した3例について述べる。これら3例では、BDAは視床水平断の視床腹外側核(VPL)と反屈束(fr)が第三脳室の外側に見られるレベルで、赤核の中央部(RN)に小さく注入されていた(図7-a)。この図7では、大脳脚(図7, cp)、中脳水道(図7, Aq)の後(背)方に未分化な小脳が観察され、しかもその小脳髄質内の中位核内(図7-a, Iat)に多数の逆行性標識細胞が見られた。P2の小脳は、プルキンエ細胞、登上線維、顆粒細胞、苔状線維など形態学的にはまだ未分化な状態にあるにもかかわらず、すでに小脳核から赤核への投射が見られ、中脳以下のレベルでの運動神経回路の形成はすでに始まっているようである。実際にP2のマウスの歩行運動を観察すると、四肢は動いてはいるが随意運動だとは思えないレベルではある。次に、図8に赤核への少量のBDA注入例(m1344)の脊髓水平断切片10枚のうち、BDA標識線維の観察された4枚の切片を示した(No. 3~6)。この図8で、上位頸髄から下位腰髄レベルまで、脊髓側索中を両側性で反対側優位に下行する多量のBDA標識下行線維群が観察された。この反対側性の標識線維群を追跡してみると、上位頸髄の切片3(図8 No. 3)のcf1から順番に、切片4(図8 No. 4)のcf2、切片5(図8 No. 5)のcf3、切片6(図8 No. 6)のcf4、最後に切片5のcf5に戻り、さらに腰髄の下

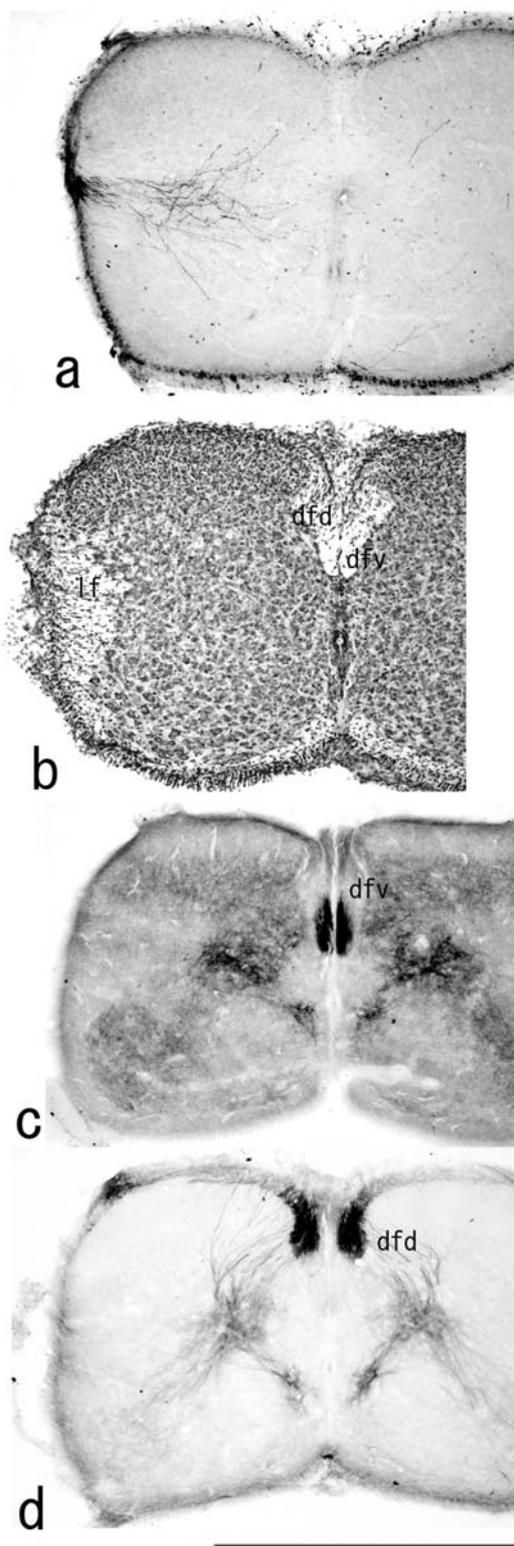


図5 P2マウスの頸髄の光学顕微鏡写真。  
 a: P0マウスの赤核にBDAを注入したm676の頸髄で観察されたBDA標識線維  
 b: Nissl染色、c: vGluT1抗体染色、  
 d: Palvalbumin抗体染色  
 dfd: 後索背側部、dfv: 後索腹側部、lf: 側索  
 BDA標識線維群が脊髓灰白質中にしめる領域はvGluT1抗体およびPalvalbumin抗体の陰性領域と一致する事に注目、スケールバー: 1mm

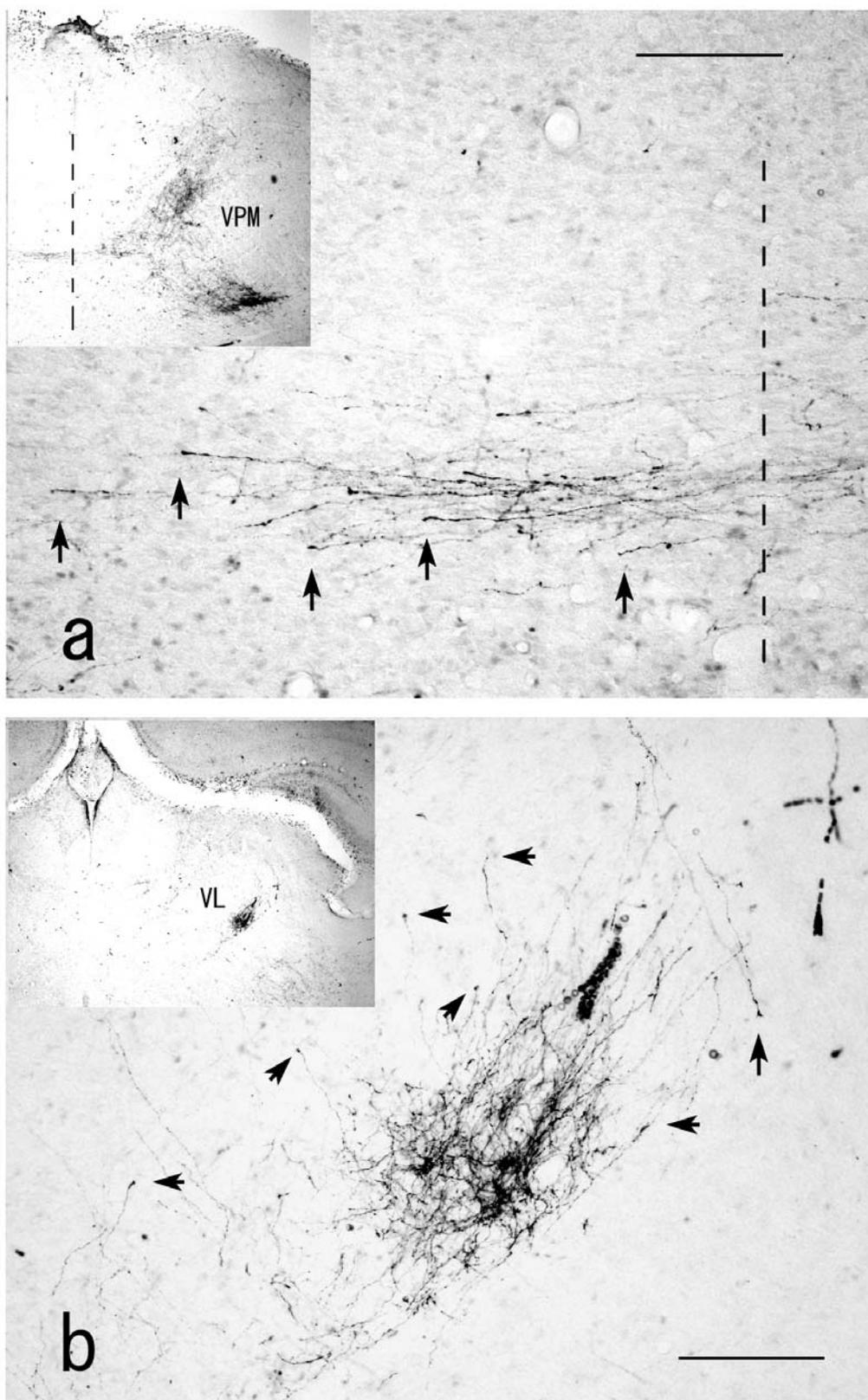


図6 P0マウスの赤核にBDAを注入したm665の視床レベルで観察された標識線維群の光学顕微鏡写真正中線を破線で示す。

a: 視床後内側腹側核 (VPM) レベルで観察された反対側に向かう標識線維群とその先端部に観察された成長円錐 (矢印)

b: 視床外側腹側核 (VL) で観察された標識線維群とその神経核から視床内に広がっていく標識線維とその先端部に観察された成長円錐 (矢印)

スケールバー、a, b: 100 $\mu$ m

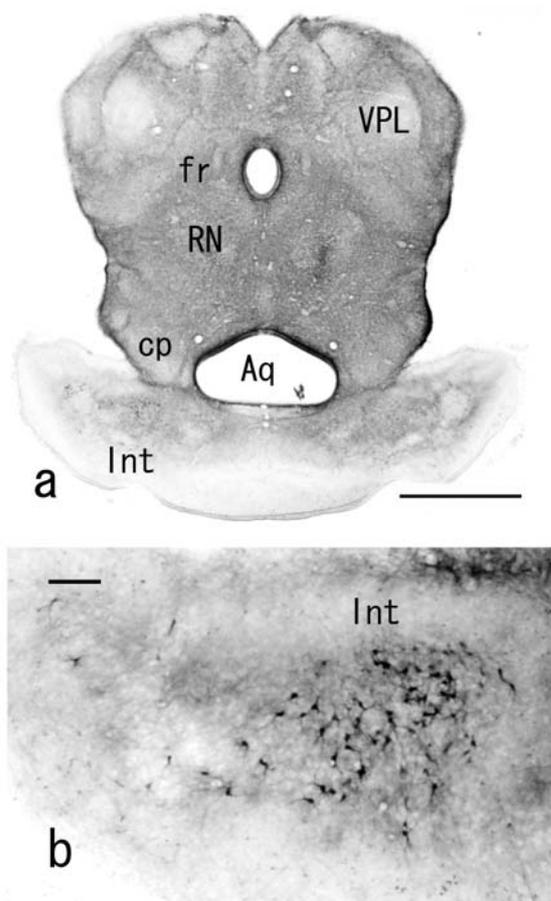


図7 P0マウスの赤核(RN)に少量のBDAを注入したm1344の注入部位(a)と小脳中位核(Int)で観察され逆行性標識細胞群(b)を示す光学顕微鏡写真。

VPL: 視床後外側腹側核、lat: 小脳外側核、Ⅲ: 第三脳室、aq: 中脳水道、cp: 大脳脚、fr: 反屈束、スケールバー、a: 1mm, b: 100 $\mu$ m

位レベルまで(図8-No.5 大きな矢印)たどることができた。さらに、この赤核脊髓路の脊髓各レベルにおける、脊髓灰白質中への軸索側枝の分布について、頸髄(図9a)、胸髄(図9b)、および腰髄(図9c)で比較してみた。すると、上位脊髓ほど側索中を下行する線維の数が多く、また灰白質中に侵入する軸索側枝の数、さらにその側枝からの二次、三次的な枝分かれの数が多いことが明らかになった。頸髄および胸髄では、腰髄に比べて軸索側枝の枝分かれは灰白質の中央部で多く見られた。また頸髄では、枝分かれした軸索側枝が吻尾方向へ広がる領域は、腰髄に比べて大きかった。P2では、何回か枝分かれをした多く

の軸索側枝でよく伸びているものは、胸髄レベルでは正中線を超えて反対側にまで伸び(図9b, 大きな矢印)、腰髄レベルでもほぼ正中線近くまで達しているものが多く観察された(図9-c, 小さな矢印)。

m1344では多量の反対側性の標識線維の他に、同側性の標識線維も少量ではあるが観察された。この図8の低倍率写真ではわかりにくいですが胸椎から腰椎の下位レベルまでNo.4とNo.5の切片を重ねて追跡し、同側の側索中を下行する1本の標識軸索を観察することができた(図8, No.4-if1, No.5-if2, if3)。この注入例では脊髓灰白質内へ侵入する1本の軸索側枝を脊髓の各レベルで観察することもできた(図10-a, b, c)。いずれのレベルの軸索側枝も軸索からほぼ直角に灰白質中に入り、枝分かれをし、曲がりくねりながら小さな突起を出し、特に長いものは灰白質の正中部にまで到達し、胸髄と腰髄では吻尾方向に100 $\mu$ m~200 $\mu$ mの範囲に広がっていた。この灰白質中の標識線維の先端部に見られた丸型~楕円形の成長円錐は、その大きさからみても、脊髓の他のレベルへ新たな行く先を探すものとは考えられず[21, 22, 33]、灰白質内で軸索側枝を広げる働きをしているのではないかと考えられる。P2では、成体と同様にそれぞれ1本の軸索側枝の分布する範囲はある程度決まっているようである[30, 31, 32]。

脊髓の灰白質内に広がる軸索側枝の分枝について、さらに詳しく観察した。すると、多くの軸索側枝は1本の側枝が同じような太さの2本の少枝に単純に枝分かれするのではないことが明らかになった。まず始めに、脊髓の側索から分枝した太い1本の軸索側枝が灰白質に達したところで、太さや長さの違う小枝を出して分枝し、灰白質中に広がっていくと思われる。しかも標識軸索側枝の先端には様々な大きさや形態の成長円錐が観察され、シナプスする相手を捜している様に見える(図

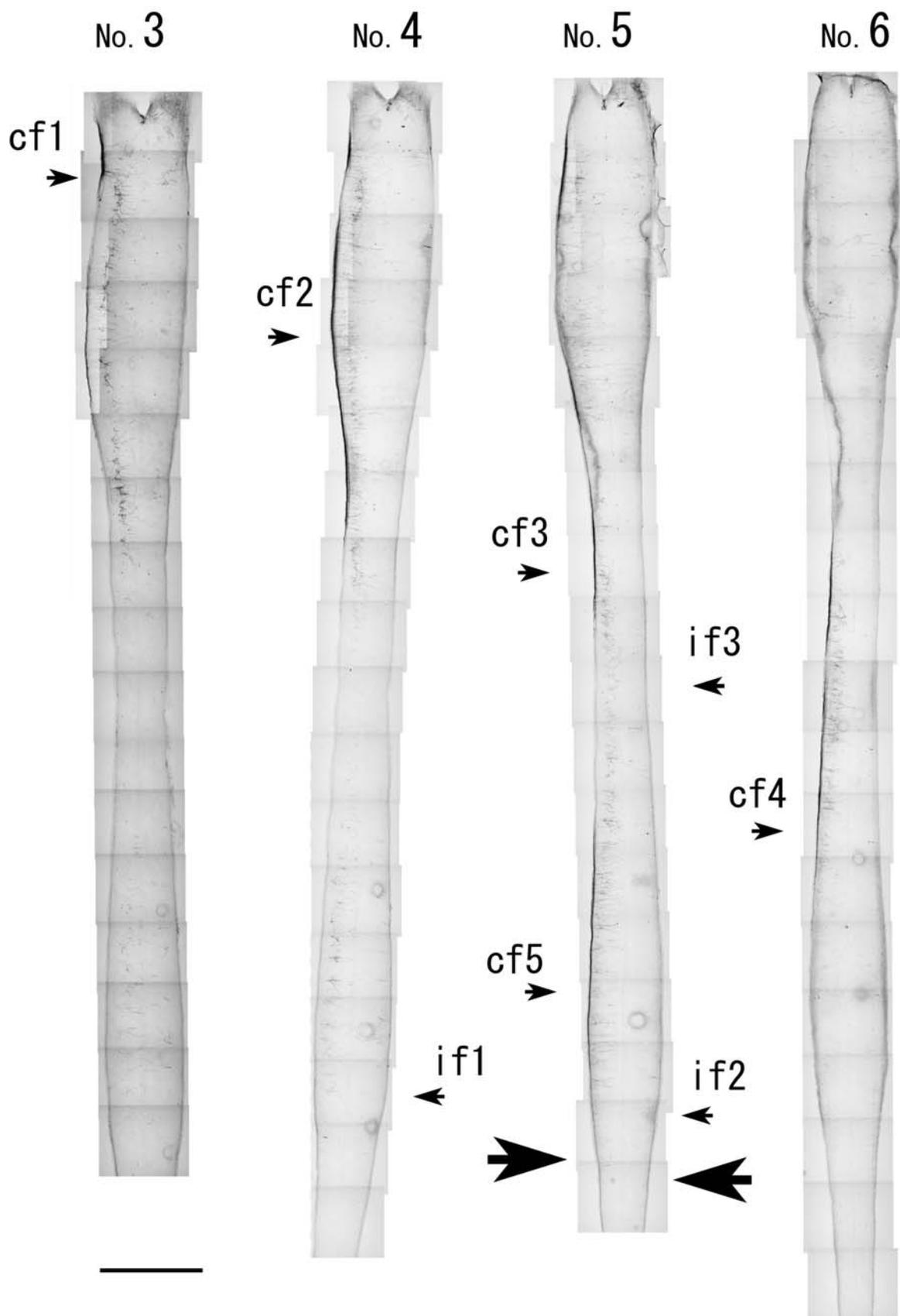


図8 P0マウスの赤核へのBDA注入例(m1344)、標識線維が観察されたP2の脊髓水平断切片(4枚、No. 4-6)の光学顕微鏡写真、脊髓側索中を反対側優位性で頸髄から腰髄レベルまで下行する標識線維(反対側性: cf1~cf5、同側性: if1~if3、本文参照)が観察できる、No. 3→No. 6: 背側→腹側、スケールバー: 2mm

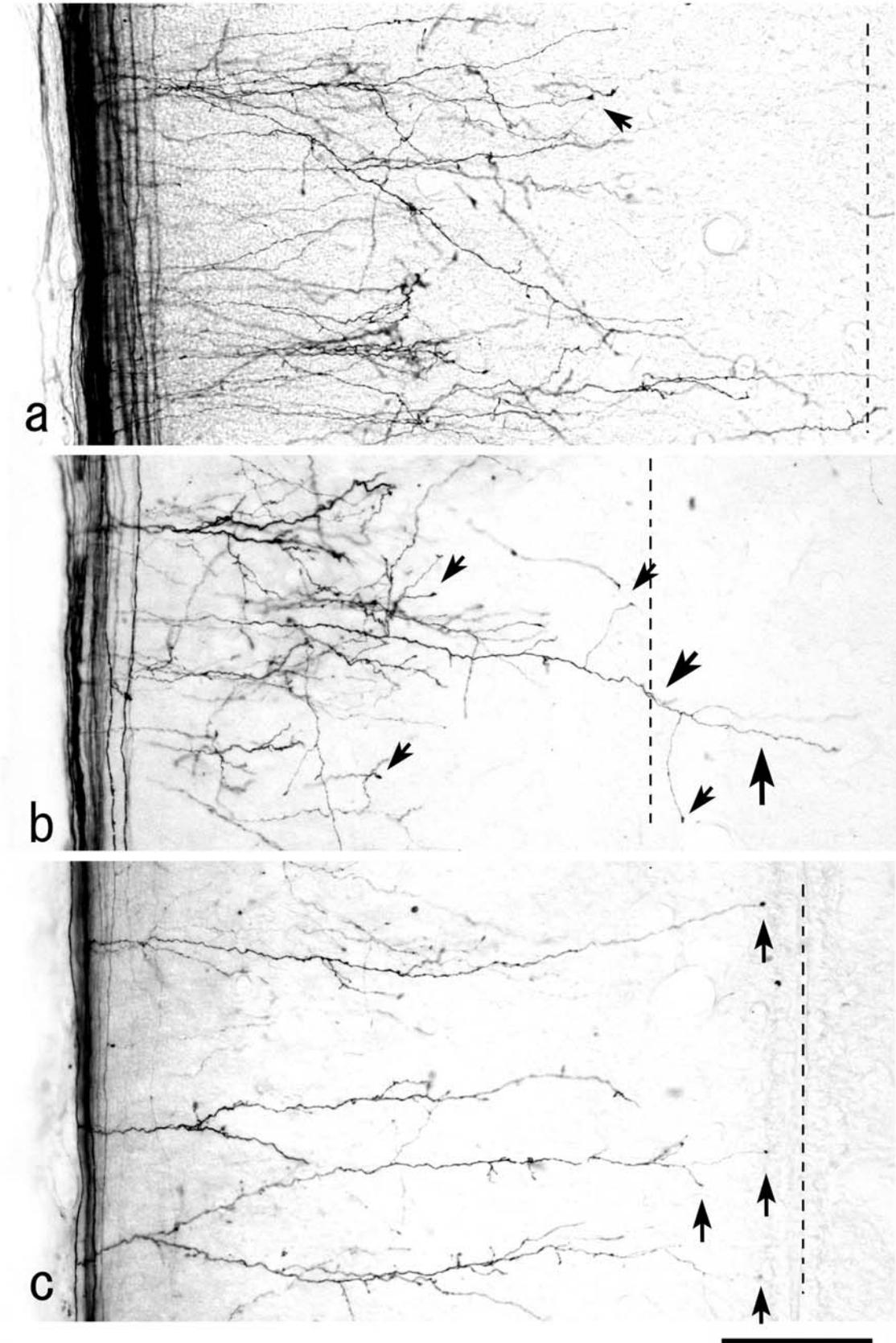


図9 P0マウスの赤核へのBDA注入例(m1344)、注入部位と反対側の脊髓各レベルで観察された標識軸索および標識軸索側枝の光学顕微鏡写真。反対側の脊髓側索中を下行する標識軸索からほぼ水平に脊髓灰白質に侵入し、さらに何回か枝分かれをくり返す軸索側枝とその先端部に観察された成長円錐(矢印)に注目、正中線を破線で示す  
a: 頸髄、b: 胸髄、c: 腰髄、スケールバー: 100 $\mu$ m

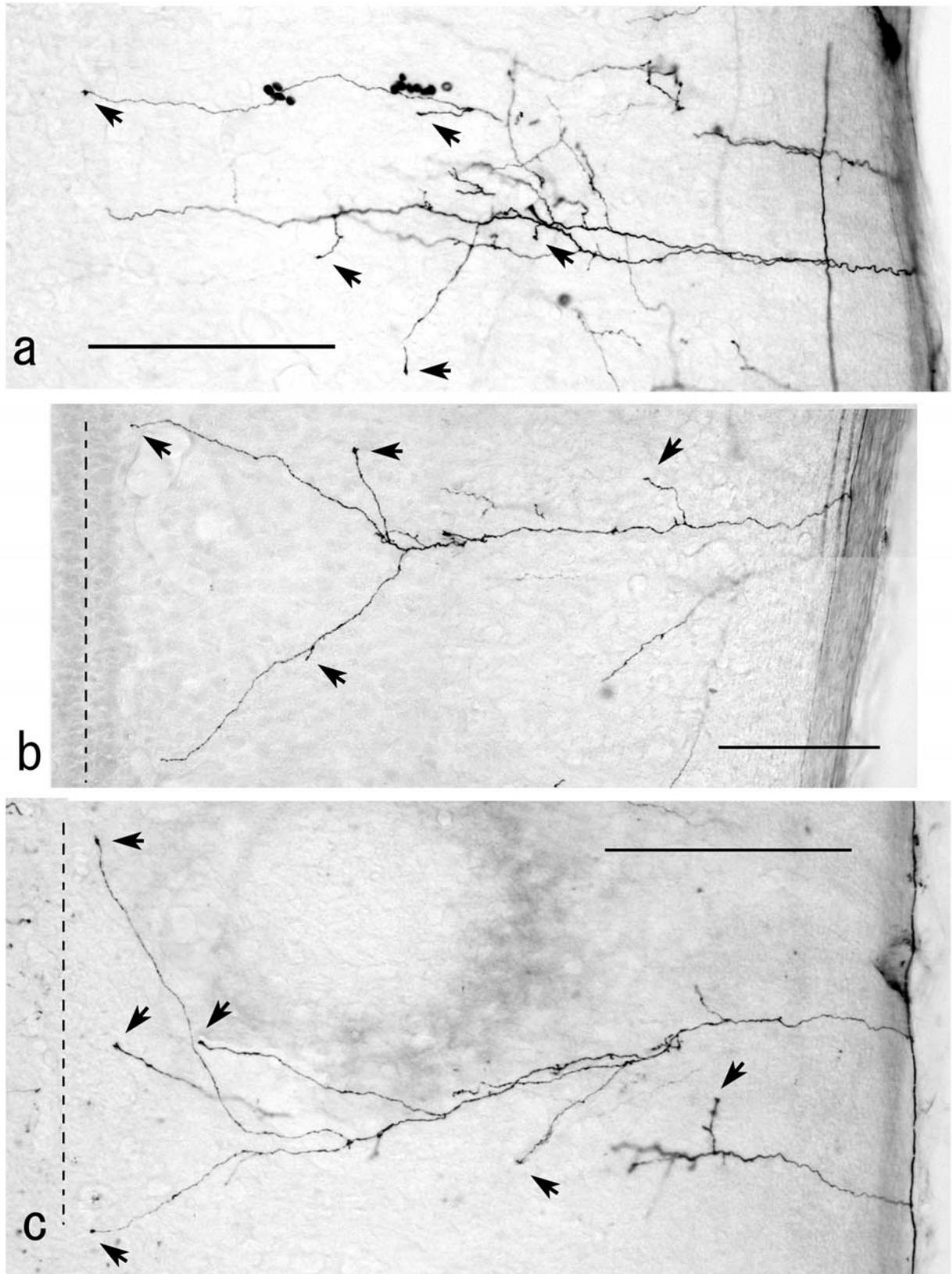


図10 P0マウスの赤核へのBDA注入例 (m1344)、注入部位と同側脊髄各レベルで観察された標識軸索側枝の光学顕微鏡写真。同側の脊髄側索中を下行する標識軸索から脊髄灰白質へ侵入する1本の標識軸索側枝の枝分かれ、およびその先端部に見られる成長円錐(矢印)に注目、正中線を破線で示す頸髄(a)、胸髄(b)、腰髄(c)、スケールバー、a, b, c: 100 $\mu$ m

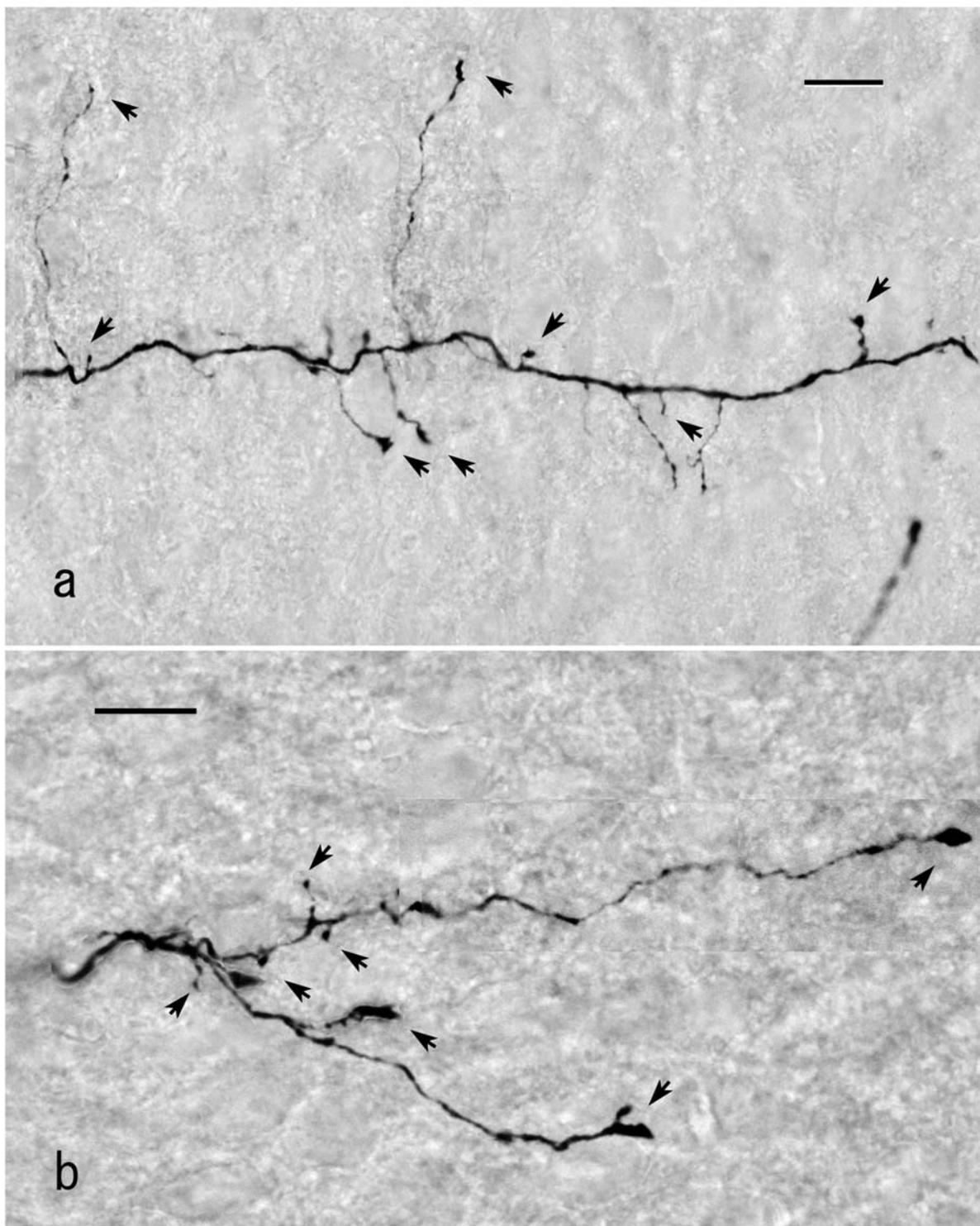


図11 P0 マウスの赤核へのBDA注入例 (m1342)、腰髄灰白質中で観察された太い標識軸索側枝 (a, b) からの大小様々な枝分かれを示す光学顕微鏡写真。

a: 太い1本の標識線維から上下方向に数本の分枝、大小様々な枝、その先端部に見られる成長円錐 (矢印) の形態の多様性に注目

b: 太い1本の標識線維の先端から分枝する4本の小枝と、その小枝からのさらなる枝分かれおよびそれらの先端部に見られる成長円錐 (矢印) に注目、スケールバー、a, b, : 10 $\mu$ m

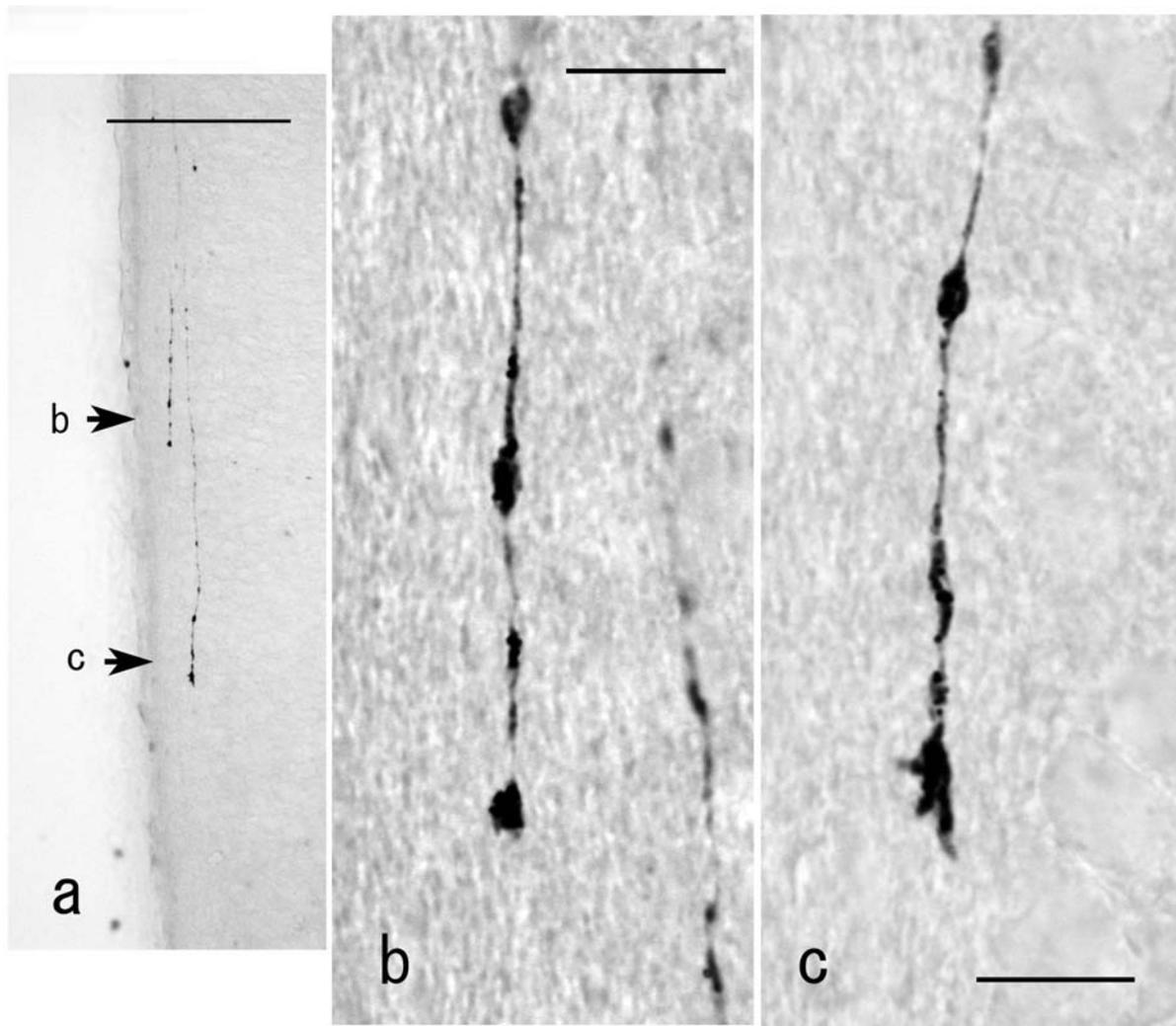


図12 POマウスの赤核へのBDA注入例 (m677)、下位腰髄の側索中で観察された数珠玉状の標識軸索およびその先端部に観察された成長円錐の弱拡大 (a) およびそれぞれの強拡大 (b, c) の光学顕微鏡写真。スケールバー、a : 100 $\mu$ m, b, c : 10 $\mu$ m

11-a, b)。脊髄灰白質内のどのような分子機構により、軸索側枝がそこで止まり、シナプスするのであろうか。神経活動依存的にシナプス形成されるのか、今のところまったくわかっていない。視床皮質投射では、視床からの軸索が脳基底核の原基を足場にして、皮質下の大脳髓質まで内包を上行し、そこからほぼ直角に皮質表層に向かって軸索側枝を出し大脳皮質のIV層で止まる [34]。一方、赤核脊髄路では、視床皮質投射とはその軸索の伸びる方向は異なるが、脊髄側索中を下行する軸索群から灰白質内にほぼ直角に軸索側枝を出し、分枝しながら灰白質の中央部で止まる。視床皮質投射ニューロンも赤核ニューロンも、細胞体

から出た軸索が束になって脳の中を移動し、本来の投射領域の近くまでくると軸索側枝を出し、成長円錐に引っ張られながら、その領域でシナプスする相手のニューロンを探しているようである。

今回、脊髄側索中を下行するBDA標識線維群の先端部は、腰髄レベルにまで到達していた。中脳や橋レベルで観察された標識線維は、数珠玉状であり、その先端部にはラットの皮質脊髄路 [21-24] の後索で見られたような長い大きな成長円錐ではなく、小さな成長円錐が観察された (図12-a, b, c)。神経路を最初に走る、いわゆる pioneer axon を追う後発の軸索や、一度方向が決まった軸索の先端部にある成長円錐は単純な形をとると報

告されている [35]。今回P2の赤核脊髓路でも、赤核から出た下行性の軸索群は中脳で交叉した後は、常に三叉神経系の上行路にそって脊髄まで下行していた。脊髄の発生過程では、下行路より上行路の方が先に形成されると考えられるので、赤核からの下行路は、延髄レベルまでは三叉神経系、脊髄レベルでは脊髄小脳路の上行路を手がかりにして脊髄を下行していくのだと考えられる。そのため、P2の側索中で観察された標識軸索の先端の成長円錐は、pioneer axonのそれではなく単純な形をしているのではないかと考えられる。

今回の実験では、ほとんどの注入例で、赤核からの下行標識線維群は脊髄側索を通り腰髄下位レベルまで到達していたが、その標識線維群から枝分かれして脊髄の灰白質中に侵入する軸索側枝が観察されるのは、腰髄の中位レベルまでであった。側索中を真っすぐに下行する軸索が到達するレベルと、下行する軸索から直角に脊髄灰白質へ侵入する軸索側枝のレベルに差があることは、ラットの皮質脊髓路でもすでに報告されており、その差は“waiting period”と言われている [19-24]。この“waiting period”は普通2~3日とされ、この間に標的領域内でシナプス形成が起こると考えられてきた。しかし今回のP2の脊髄では、この2つの軸索到達のレベルと軸索側枝の分枝のレベルにそれほど差は見られず、腰髄の下位レベルでもBDA標識の弱い軸索側枝を観察することができた。マウスではラットほど“waiting period”が明瞭ではないのかもしれない。また実験動物の違いだけではなく、実験に用いたBDA、HRP、PHA-Lなどの標識物質の違いにより、同じ発生期でも下行線維が到達する脊髄レベルが異なってくることが考えられる。もしくは“waiting period”そのものが本当に存在するのか、今後、更なる研究が必要であると考えられる。

## 【引用文献】

- [1] Ruigrok T.J., Precerebellar Nuclei and Red Nucleus, In : The Rat Nervous System, edited by Paxinos G, ELSEVIER ACADEMIC PRESS, p.167-204, (2009)
- [2] Tracy D., Ascending and descending pathways in the spinal cord. In : Paxinos, G. editor. “The Rat Nervous System” 3ed., Amsterdam, Elsevier, p.149-164, (2004)
- [3] Conde, F. and Conde, H., Demonstration of a rubrothalamic projection in the cat, with some comments on origin of the rubrospinal tract. Neurosci., vol.5, p.789-802, (1980)
- [4] Edward, S.B., The ascending and descending projections of the red nucleus in the cat: an experimental study using an autoradiographic tracing method. Brain Res., vol.48, p.45-63, (1972)
- [5] Holstege G. and Tan J., Projections from the red nucleus and surrounding areas to the brainstem and spinal cord in the cat. An HRP and autoradiographic tracing study. Behav. Brain Res., vol.28, p.33-57, (1988)
- [6] Liang, G., Paxinos, G. and Watson, C., Projections from the brain to the spinal cord in the mouse. Brain Struct. Func., vol.215, p.159-186, (2011)
- [7] Liang, G., Paxinos, G. and Watson, C., The red nucleus and the rubrospinal projection in the mouse. Brain Struct. Func., vol.217, p.221-232, (2012)
- [8] Pong, M., Horn, K.M. and Gibson, A.R., Spinal projections of the cat parvocellular red nucleus. J. Neurophysiol., vol.87, p.453-468, (2002)
- [9] Kuchler, M., Fouad, K., Weinmann, O., Schwab, M. E. and Raineteau, O. Red nucleus projections to distinct motor neuron pools in the rat spinal cord. J. Comp. Neurol., vol.448, p.349-359, (2002)
- [10] Waldran, H. A. and Gwyn, D. A. Descending nerve tracts in the spinal cord of the rat. I. Fibers from the midbrain. J. Comp. Neurol., vol. 137, p.143-153, (1969)

- [11] Yasui Y., Yokota S, Ono K. and Tsumori T., Projections from the red nucleus to the parvicellular reticular formation and the cervical spinal cord in the rat, with special reference to innervation by branching axons. *Brain Res.*, 923, p.187-192, (2001)
- [12] 栢原哲郎, 小形晶子. マウスの赤核の神経線維連絡. *神戸学院リハビリテーション研究* 7巻, p147-162, (2011)
- [13] Auclair,F., Belanger,M.-C. and Marchand.R., Ontogenetic study of early brain stem projections to the spinal cord in the rat. *Brain Research Bulletin*, vol. 30, p.281-289, (1993)
- [14] Lakke E.A.J.F., The Projections to the spinal cord of the rat during development : A time-table of descent. *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology*, vol.135, p.51-97, (1997)
- [15] Leong, S.K., Shieh, J.Y., and Wong, W.C. Localizing spinal cord projecting neurons in neonatal and immature albino rat. *J. Comp. Neurol.*, vol. 228, p.18-23, (1984)
- [16] Shieh, J. Y., Leong, S.K. and Wong, W.C., Origin of the rubrospinal tract in the neonatal, developing, and mature rats. *J. Comp. Neurol.*, vol.214, p.79-86, (1983)
- [17] Kudo, N., Furukawa, F. and Okado, N., Development of descending fibers to the rat embryonic spinal cord. *Neuroscience Research*, vol.16, p.131-141, (1993).
- [18] Stockx, E, M., Anderson C,R., Murphy, S.M., Cooke, I.R. and Berger,P,J., The development of descending projections from the brain stem to the spinal cord in the fetal sheep, *BMC Neuroscience*, 8 : 40, (2007)
- [19] Donatelle, J.M., Growth of the corticospinal tract and the development of placing reactions in the postnatal rat. *J. Comp. Neurol.*, vol.175, p.207-232, (1977)
- [20] Gorgels,T.G.M.F., Outgrowth of the pyramidal tract in the rat cervical spinal cord: Growth cone ultrastructure and guidance, *J. Comp. Neurol.*, vol. 306, p.95-116,(1991)
- [21] Joosten, E.A. and BaR, D.P., Axon guidance of outgrowing corticospinal fibers in the rat., *J. Anat.*, vol.194,p.15-32,(1999)
- [22] Schreyer, D.J. and Jones, E.G., Growth and target finding by axons of the corticospinal tract in prenatal and postnatal rats., *Neuroscience*, vol. 7, p.1837-1853, (1982)
- [23] Stanfield, B.B. The development of the corticospinal projection., *Progress in Neurobiology*, vol. 38, p169-202,(1992)
- [24] Gianino,S., Stein,S.A., Li,H., Lu,X., Biesiada, E., Ulas,J. and Xu,X-M., Postnatal growth of corticospinal axons in the spinal cord of developing mice, *Developmental Brain Res.*, vol.112, p.189-204, (1999)
- [25] Hsu,J-Y,C., Stein,S.A. and Xu,X-M., Development of the corticospinal tract in the mouse spinal cord: A quantitative ultrastructural analysis, *Brain Res.*, vol.1084, p16-27,(2006)
- [26] 栢原哲郎, 小形晶子. 幼若動物への順行性標識物質の注入法について. *神戸学院リハビリテーション研究* 6巻, p71-80, (2010)
- [27] Kennedy P.R., Light labeling of red nucleus neurons following an injection of peroxidase-conjugated wheat germ agglutinin into the inferior olivary nucleus of the rat. *Neurosci. Lett.*, vol.74, p.262-268, (1987)
- [28] Ruigrok T.J., On the existence of the cerebellar nucleo-rubro-olivary circuits : an anterograde and retrograde tracer study in the rat. *Eur. J. Neurosci. suppl.* vol.6, p.125, (1993)
- [29] Holstege,G., Anatomical evidence for an ipsilateral rubrospinal pathway and for direct rubrospinal projections to motoneurons in the cat. *Neurosci. Lett.*, vol.74, p.269-274, (1987)
- [30] Futami, T., Shinoda, Y. and Yokota, J., Spinal axon collaterals of corticospinal neurons identified by intracellular injection of horseradish peroxidase, *Brain Research*, vol.164, p.279-284, (1979)
- [31] Muto,N., Kakei,S. and Shinoda,Y., Morphology of single axons of tectospinal neurons in the upper cervical spinal cord. *J Comp. Neurol.*

- vol.372, P9–26, (1996)
- [32] Shinoda, Y., Yokota, J. and Futami, T., Morphology of physiologically identified rubrospinal axons in the spinal cord of the cat, *Brain Res.*, vol.242 p.321–325, (1982)
- [33] Tessier-Lavigne, M.T., Growth cones and axon pathfinding. In : Squire, L.R., Bloom, F.E., McConnell, S.K., Roberts, J.L. Spitzer, N.C. and Zigmond, M.J., edited. “Fundamental Neuroscience” 2ed., p.449–p467, Academic Press, Elsevier Science, (2003).
- [34] 山本亘彦, 視床皮質投射形成の分子機構, *Brain and Nerve*, vol. 60, p. 415–423, (2008)
- [35] 八木沼洋行, 発生における成長円錐, 「神経の再生と機能再建, 基礎と臨床」志水義房 他, 編集, 西村書店, (1997)

# Neural circuit of the red nucleus in mice 2 days after birth

**Tetsuro Kayahara and Akiko Ogata**

Department of Medical Rehabilitation

Faculty of Rehabilitation

Kobe Gakuin University

To investigate the early development of the rubrospinal tract, biotinylated dextran amine as a labeling substance was injected into the red nucleus in mice at day 0 after birth, and the anterograde and retrograde projections from the red nucleus were observed 2 days after birth (P2). Labeled fibers descending to the spinal cord passed through the ventral tegmental decussation immediately after exiting the red nucleus, headed toward the lateral region of the pons, and further descended to the principle sensory nucleus of the trigeminal nerve and medial and ventromedial regions of the spinal nucleus of the trigeminal nerve in the medulla oblongata. In the spinal cord, labeled fibers descended in the most dorsal region of the lateral funiculus and reached the lower level in the lumbar cord. Axon collaterals that branched from the labeled fibers in this lateral funiculus were also observed in the gray matter at the lumbar cord level, but the distribution pattern of the axon collaterals was different between the cervical and lumbar cord. In the cervical cord, the axon collaterals repeatedly branched in the gray matter and widely extended in the central region of the spinal gray matter, which is the original projection region of the rubrospinal tract. In the lumbar cord, the axon collateral distribution region was narrow, and only a few branches were noted. Growth cones were observed at the tips of labeled fibers entering the cervical and lumbar spinal gray matter, but no nerve ending was noted.

Labeled fibers ascending from the red nucleus to the thalamus had passed through the central tegmental tract on the ipsilateral side and reached the ventral medial and paracentral nuclei of the thalamus and ventral lateral thalamic nucleus at P2, but labeled fibers extending from these thalamic nuclei containing labeled fibers to other thalamic regions, those heading toward the thalamus on the collateral side, and projection fibers probably present only temporarily in early development were also observed. The labeled fibers observed in the ascending and descending pathways from the red nucleus at P2 were mostly beaded fibers of various sizes and processes with various sizes on the surface, and growth cones of diverse sizes and shapes, such as round, oval, and triangle shapes, were also observed. In addition to anterograde projection from the red nucleus, marked retrograde projection from the nucleus interpositus of the cerebellum was also observed.

It was clarified that projection tracts among the red nucleus, thalamus, spinal cord, and cerebellum similar to those in mature animals are already determined in the developmental step at P2, but precise synaptogenesis in the projected regions is still immature.

**Key Words :** Labeling method, BDA, juvenile animals, growth cone, axon collateral