

Biocytin によるラット皮質脊髓路の 順行性標識法

—WGA-HRP 法との比較—

今 井 富 裕

札幌医科大学生理学第2講座 (主任 青木 藩 教授)

An Anterograde Tracing Method of the Corticospinal Tract with Biocytin in the Rat

—Comparison with WGA-HRP Method—

Tomihiko IMAI

Department of Physiology (Section 2), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. M. AOKI)

ABSTRACT The aim of this study was to determine if biocytin, a low molecular weight analog of biotin, would reliably label details of corticospinal fibers at the lumbar level in the rat. All surgical procedures were performed aseptically under Nembutal anesthesia. Biocytin (5%) was injected extracellularly by pressure into the hindlimb motor cortex. Rats were perfused following survival periods of 1-7 days. After fixation, frozen sections (40 μ m thick) of the injection sites and the lumbar segments were incubated with avidin-horseradish peroxidase (HRP) containing 0.3% Triton-X 100. The reaction was enhanced with heavy metals. To elucidate the advantages of this technique with biocytin, wheat germ agglutinin (WGA)-HRP was compared with biocytin for its use in corticospinal fiber tracing.

The results are summarized as follows.

1) Biocytin was transported rapidly, at a speed of 20-40 mm/day outward from the injection site. Terminal labeling of corticospinal fibers at the lumbar segment was observed within 2 to 3 days of the injection.

2) With an injection volume of 300 nl, there was no apparent difference in labeling quality between animals with survival times of 24-72 h. The labeling was weaker with longer survival times (>5 days).

3) Although the reason for the decrease in labeling with survival time is unknown, possible explanations are that biocytin could be degraded by intracellular enzymes, such as biotinidase, or that it might have been expelled from the terminals into the extracellular space.

4) The number of axons labeled by biocytin was smaller than by WGA-HRP. However, biocytin stain provides a view of a higher level of detail than WGA-HRP.

These results indicate that anterograde tracing with biocytin can be applied to label axons in a long tract such as the corticospinal tract. Biocytin can be especially recommended as a useful anterograde neuronal tracer to reveal fine details in labeled axons.

(Received July 28, 1992 and accepted August 14, 1992)

Key words : Axonal transport, Biocytin, WGA-HRP, Corticospinal tract, Rat

1 緒 言

ニューロンはその形態が著しく特殊な細胞で、軸索の表面積や体積は細胞体に比較して数百倍にも及ぶ。しかし、軸索はリボゾームを欠くため軸索に必要な蛋白質はすべて細胞体で合成され、軸索内を終末側へ向かって順行性軸索輸送によって運ばれる¹⁾。近年、この軸索流に特定の物質を乗せ、マーカーとして標識することによってニューロンの形態や結合を明らかにする方法が発達し、中枢神経系の構造解明が進んできた。

最近では、従来の変性法^{2,3)}、放射性アミノ酸による標識法^{4,5)}に代わって、マーカーとしてレクチンあるいはレクチン化合物を利用した順行性標識法が用いられている。レクチンは、糖と相互作用する蛋白質あるいは糖蛋白質で、免疫学的産物でないものをいい⁶⁾、ニューロン内に取り込まれ、軸索輸送されたレクチンは種々の方法でニューロンとの結合状態を可視化することができる。中でも、小麦胚芽凝集素 (wheat germ agglutinin; WGA) を結合させた WGA-HRP (wheat germ-agglutinated horseradish peroxidase) は、特に順行性標識に優れ^{7,8)}、皮質脊髓路標識にも広く応用されている⁹⁻¹¹⁾。しかし、この方法では標識された線維が数珠状に標識されるため、微細な形態の描出には不利であった。微細な構造の把握にはインゲンマメ凝集素 (Phaseolus vulgaris leucoagglutinin; PHA-L) による標識¹²⁾が優れているが、取り込ませてからの生存期間や固定された組織への immunoreagent の浸透の問題¹³⁾、適応可能な動物種の制限¹⁴⁾の問題があり、皮質脊髓路のような長い経路のマーカーとして WGA-HRP 法ほど一般に定着していない。

PHA-L による標識と同等に微細なニューロンの形態を可視化する方法に biocytin 標識法がある。Biocytin (N-biotinyl lysine) はアミノ酸の一つである lysine に biotin が結合した物質であり、水溶性で、速い速度の順行性軸索輸送で運ばれ、avidin と非常に特異的で高い結合能を持っている。Horikawa and Armstrong (1988)¹⁵⁾ はラット神経組織の培養標本において biocytin をニューロンに細胞内注入し、蛍光色素や酵素の付いた avidin を結合させてニューロンを可視化することに成功した。続いて、King *et al.* (1988)¹⁶⁾ は biocytin をラット海馬に細胞外注入し、脳内への軸索投射を観察した。以後、動物種を問わず、biocytin はニューロントレーサーとして、中枢神経伝導路の形態学的解析に応用されている^{13,14,17-23)}。しかし、これらの報告は biocytin 標識法を脳内の神経結合の研究に用い

たものばかりで、大脳から脊髄への長い神経伝導路標識に応用した報告は見当たらない。

そこで本研究では、大脳からの下行性伝導路として、ラットの皮質脊髓路を選び、大脳皮質に biocytin を注入することによって腰髄レベルの皮質脊髓路線維を標識することができるか否か明らかにしようとした。そのために、まず、微小電気刺激により大脳皮質運動野後肢領域を機能的に同定し、その部位にナノリッターポンプで biocytin を微量圧注入した。その後、1-7 日の生存期間において大脳および脊髄の切片を作製し、皮質脊髓路線維の観察を試みた。その際、異なる生存期間で得られた結果から、皮質脊髓路を下降する biocytin の輸送速度を推定し、また、生存期間と標識線維の染色性の関係を明らかにしようとした。さらに、ラットの皮質脊髓路を腰髄レベルまで標識する場合の biocytin 標識法の長所、短所を比較検討する目的で、同じ大脳皮質運動野後肢領域に WGA-HRP を注入し、biocytin で標識された皮質脊髓路線維の光頭像を WGA-HRP 標識法で得られた光頭像と比較した。

2 実験方法

2.1 実験動物

実験動物として、Sprague-Dawley 系の無傷のラット 30 匹 (350-450 g) と胸髄下部 (T9-10) で両側の皮質脊髓路が切断された慢性ラット 3 匹 (350-450 g) を用いた。無傷のラット 30 匹のうち、7 匹を微小電気刺激による大脳皮質運動野後肢領域の同定に、18 匹を biocytin による標識に、5 匹を WGA-HRP による標識に用いた。慢性ラット 3 匹は皮質脊髓路切断後、飼育ケージに入れ、ラット飼育室 (動物実験施設内) にて 2 か月間生存させ、すべて biocytin による標識に用いた。

2.2 微小電気刺激による大脳皮質運動野後肢領域の同定

Biocytin を正確にラット大脳皮質運動野の後肢領域に注入するための予備実験として、ラット大脳皮質運動野の微小電気刺激²⁴⁾により後肢から誘発筋電図を記録できる部位を調べた^{25,26)}。ラットを pentobarbital sodium (60-80 mg/kg) 腹腔内投与により麻酔し、大腿静脈にカテーテルを挿入した。実験中の麻酔深度を維持するため、生理食塩水で 2 倍に希釈した pentobarbital sodium を 8-10 mg/kg/時で経静脈投与した。

上顎保定装置²⁷⁾でラット頭部を固定後、左頭頂部の頭蓋骨を取り除いて運動野を露出し、硬膜を切開反転した。露出された運動野は 35-38°C に温めた流動パラ

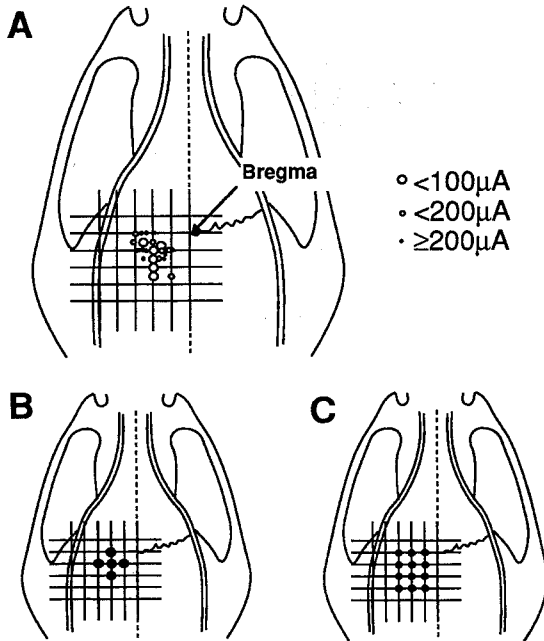


Fig. 1 Injection sites of neuroal tracers. Origin of grid is bregma; units are mm. A: the motor cortical thresholds for eliciting EMG responses of the contralateral hindlimb in 7 normal rats. B: five injection sites of biocytin. C: twelve injection sites of WGA-HRP.

フィンで覆って保温し、乾燥を防いだ。刺激電極には、タングステン線(直径 $125 \mu\text{m}$ 、長さ $40\text{--}50 \text{mm}$)の先端を電解研磨し、先端以外を絶縁塗料(ISONEL-31, 日触スケネクタディ)で被覆したもの(電極インピーダンス $2.5\text{--}5.0 \text{M}\Omega$)を用いた。記録電極には、双極ワイヤーフック電極(直径 $50 \mu\text{m}$ 、電極間距離 10mm)を用い、大腿静脈に麻酔用カテーテルを挿入するため、皮膚切開を施した際に両後肢の大腿四頭筋と大腿二頭筋に埋め込んだ²⁸⁾。電気刺激には、トレインパルス刺激(パルス幅 0.2msec 、 3msec 間隔の矩形波、 10mA)を用い、刺激部位および刺激強度を変えながら、対側の後肢から誘発筋電図が記録できる最小閾値を調べ、マップを作製した(Fig. 1A)。いずれの部位でも最小閾値を示す深さは皮質表面から $1.5\text{--}2.0 \text{mm}$ であった。

2.3 Biocytin による標識

2.3.1 注入法

2.2と同様の方法で麻酔を導入維持し、上顎固定装置でラット頭部を固定後、左頭頂部の頭蓋骨を取り除いて運動野を露出した。硬膜は切開反転せず、Fig. 1Bに示した5か所の注入部位には注入用ピペットを通す

ための小切開を加えた。

注入用ガラスピペット(先端径 $80\text{--}100 \mu\text{m}$)はポリエチレンチューブ、ガラス管を介してナノリッターポンプ(WPI, model A1400)に接続し、マニピュレータに固定した。Biocytin (Sigma)は 0.05M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.6)で5%に調整し、ナノリッターポンプの陰圧でピペット内に吸引充填した。錐体細胞層を破壊せずに biocytin 溶液を浸透させるため、ピペット先端を脳表面から 1mm (錐体細胞層直上)刺入した後、 0.5mm 戻して固定し、 300nl を $25 \text{nl}/\text{分}$ (12分間)で圧注入した。注入後10分間ピペットをその場に留置した。

2.3.2 生存期間

無傷のラット18匹の生存期間は注入後1日(3匹)、2日(3匹)、3日(6匹)5日(3匹)7日(3匹)とし、慢性ラット3匹の生存期間は3日とした。

2.3.3 灌流固定²⁹⁾

ラットは上記2.3.2に示した期間生存させた後、pentobarbital sodium 腹腔内投与により深麻酔下で開胸した。右心耳、心尖部を順に切開した後、心尖部から左室に16ゲージのカニューレを挿入し、メラホピキンス血管鉗子で左室を鉗んでカニューレを固定した。直ちに 0.9% NaCl 加磷酸緩衝液(pH 7.4, $33\text{--}37^\circ\text{C}$) $50\text{--}100 \text{ml}$ で、滴下初め $20\text{--}30$ 秒はゆっくり、残りを急速に灌流脱血し、次いで、 1% paraformaldehyde, 1.25% glutaraldehyde, 0.1M 磷酸緩衝液(pH 7.4, 4°C)の混合液で灌流固定した。

2.3.4 凍結切片の作製

灌流固定終了後、直ちに脳脊髄を取り出し、 10% 蔗糖加磷酸緩衝液(pH 7.4, 4°C)に保存した。1-2日後、ミクロトームで、大脳皮質(注入部位)および脊髄から厚さ $40 \mu\text{m}$ の凍結切片を作製し、 0.1M 磷酸緩衝液(pH 7.4, 4°C)に保存した。

注入部位からは、1匹につき、冠状断で $30\text{--}40$ 枚の連続切片が得られた。脊髄については無傷のラット18匹のうち、生存期間1日の3匹、2日の3匹から、それぞれ2匹ずつを、生存期間3日の6匹から3匹を、生存期間5日の3匹、7日の3匹から、それぞれ1匹ずつを胸腰髄の縦断切片作製に用い、残りの9匹からは腰髄の横断切片を作製した。1匹の脊髄標本から、縦断切片の場合は、長軸方向に皮質脊髄路を含む切片を $10\text{--}12$ 枚、横断切片の場合は、 $L_1\text{--}L_2$ 、 $L_3\text{--}L_4$ 、 $L_5\text{--}L_6$ からそれぞれ約 40 枚の凍結切片が得られた。慢性ラット3匹の脊髄からは皮質脊髄路の切断部位(T9-10)の横断切片(1匹につき約 40 枚)を作製した。

2・3・5 組織化学反応¹⁶⁾

初めに、切片を0.3% Triton X-100加磷酸緩衝液(pH 7.4) 50 mlに浸して10分間ずつ、溶液を変えて2回洗浄した。次に、0.3% Triton X-100加磷酸緩衝液(pH 7.4) 50 mlにavidin D-HRP (Vector) 100 μ lを加えた溶液に切片を移し、3時間室温(20-25°C)でincubateした。その後、0.1 M 磷酸緩衝液で10分間ずつ、溶液を変えて3回洗浄した。HRP反応はDAB (diaminobenzidine) 法で行なった。まず、切片を0.05% DAB, 1% nickel chloride, 1% cobalt acetate加磷酸緩衝液(pH 7.4) からなる反応溶液50 ml内で10分間preincubateした。次に、3% H₂O₂ 150 μ lを加えた反応溶液50 mlに移して5-20分間incubateした。反応終了後、切片を0.1 M 磷酸緩衝液(pH 7.4)で10分間ずつ、溶液を変えて3回洗浄した。反応切片をゼラチン被覆を施したスライドガラスに貼布し、後染色は、1% neutral redで行ない、切片標本を作製した。

2・4 WGA-HRPによる標識

2・4・1 注入法

Biocytin注入法と同様の方法で麻酔を導入維持し、上顎固定装置で頭部を固定後、左頭頂部の頭蓋骨を取り除いて運動野を露出した。硬膜は反転せず、注入は先端を鋭利に研磨した外径0.3 mm、内径0.1 mmのステンレス管によって行なった。ステンレス管はbiocytin注入の場合と同様にポリエチレンチューブ、ガラス管を介してナノリッターポンプ(WPI, model A1400)に接続し、マニピュレータに固定した。WGA-HRP(東洋紡)は0.1 M 磷酸緩衝液(pH 7.4)で2.5%に調整し、ナノリッターポンプの陰圧でステンレス管に充填した。注入はFig. 1Cに示した12か所で行なった。各部位で、ステンレス管を硬膜上から刺入し、脳表面から約1 mmの深さで固定した。1か所に100 nl/分で1分間かけて100 nl注入し、注入後1分間ステンレス管をその場に留置した。

2・4・2 灌流固定および凍結切片の作製

ラットはWGA-HRP注入後、3日間生存させ、biocytinの場合と同様の方法で灌流固定、凍結切片作製を行なった。ただし、脊髄標本についてはWGA-HRP注入の5匹のうち、2匹を縦断切片作製に、3匹を横断切片作製に用いた。

2・4・3 組織化学反応

HRP反応にはGibson *et al.*の変法³⁰⁾を用いた。Mesulamの原法³¹⁾と異なる点は、反応の途中で切片をリンスする操作(溶液1)を加えたことと、TMBを含

む溶液(溶液2)とnitroferricyanideを含む溶液(溶液3)を分けたことである。それぞれの溶液の組成は以下の通りである。

溶液1: 0.01 M 酢酸緩衝液, pH 3.3

溶液2: 溶液200 mlあたり, TMB 15 mg, エタノール 5 ml, 0.2 M 酢酸緩衝液 10 ml, 蒸留水 184 ml, 3%過酸化水素水 1 ml

溶液3: 溶液200 mlあたり, nitroferricyanide 200 mg, 0.2 M 酢酸緩衝液 10 ml, 蒸留水 189 ml, 3%過酸化水素水 1 ml

反応手順は、初めに切片を0.1 M 磷酸緩衝液(pH 7.4)から溶液1に移して15分間浸した(15分間に少なくとも3回溶液を変える)。次に溶液2に2分間、続いて溶液3に2分間浸し、溶液1に戻して切片を軽くリンスした。溶液2, 3に浸して、溶液1でリンスまでを1サイクルとし、10サイクル繰り返した。溶液1と3は2, 3サイクルに1回新しい溶液と交換した。10サイクル終了後、溶液1で15分間洗浄した。

2・5 標識細胞及び標識線維の観察

BiocytinおよびWGA-HRP標識の切片標本を明視野顕微鏡下に、40-400倍で観察し、必要に応じて、写真撮影およびcamera lucidaによるトレースを行なった。

3 成績

3・1 注入部位

Biocytin注入では、1か所の注入(300 nl)に対して、厚さ40 μ mの切片で20-30の錐体細胞が標識されており(Fig. 2A, B)、強拡大では標識された細胞の微細な形態が観察された(Fig. 2C)。1-3日の生存期間では、注入部位の標識の程度に差異は認められなかったが、5-7日の生存期間では、1か所の注入(300 nl)に対して、厚さ40 μ mの切片で標識される錐体細胞数が10以下に減少していた。

WGA-HRP注入では、1か所の注入量(100 nl)はbiocytin(300 nl)よりも少ないにもかかわらず、ガラスビペット刺入点から半径約0.5 mmに広く標識された(Fig. 3A)。したがって、1 mm間隔で注入した本実験では、隣り合った注入部位によって標識される領域は互いに接していた。厚さ40 μ mの切片では、第V層の100 \times 100 μ mの範囲に平均10-15の錐体細胞が標識されていた(Fig. 3B)。このように、WGA-HRPでは1か所100 nlの注入に対して、多くの錐体細胞が標識されたが、個々の細胞のdendrite, axonなどの微細構造はbiocytinによる標識に比べて不明瞭であった(Fig.

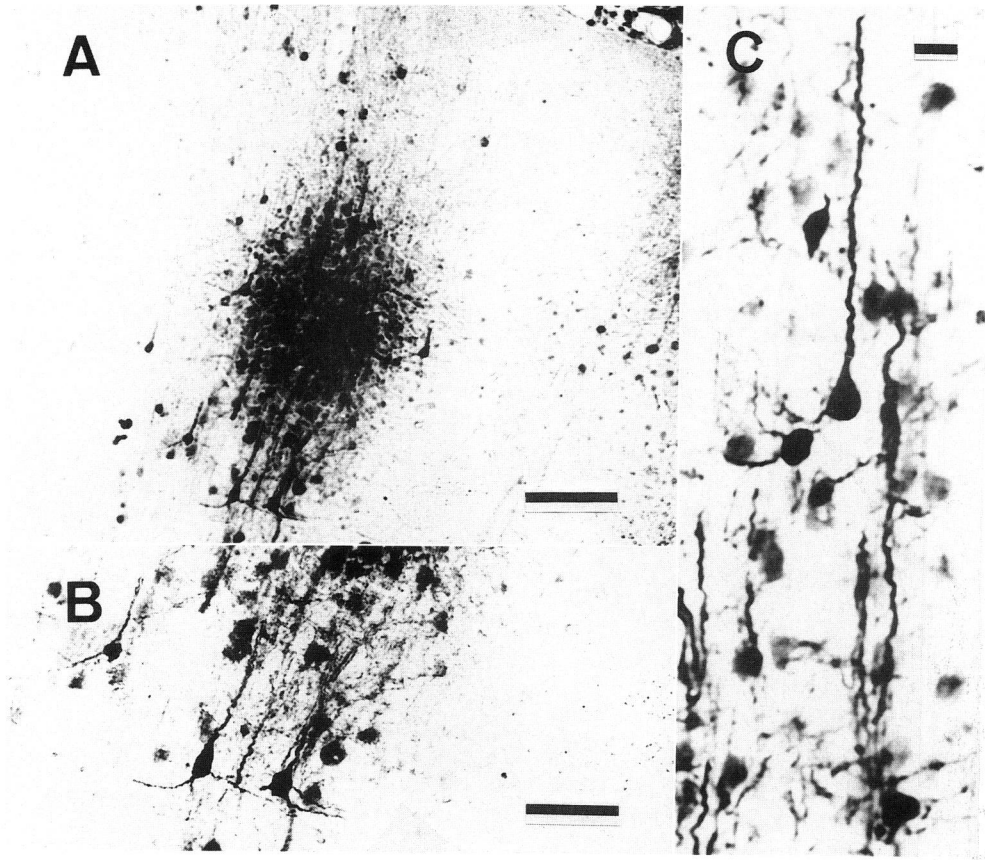


Fig. 2 A biocytin injection site. A: the injection site is restricted to the gray layer of the hindlimb motor cortex. B: the pyramidal cell layer in panel A is shown at higher magnification. C: pyramidal cells are photographed from an adjacent section. Scale bar for A=100 μm ; B=50 μm ; C=10 μm .

3B).

3・2 大脳白質内の線維の走行

生存期間 1-3 日の biocytin 標識では、1 か所 300 nl の注入に対して、大脳白質内に 10-20 本の皮質脊髄路線維が明瞭に標識された (Fig. 4)。Biocytin の場合、注入部位からのこれらの標識線維の連続的な追跡は容易であった。しかし、WGA-HRP の場合は biocytin に比べて、標識線維数は多いものの、標識線維が点状に描出されるため、着目する線維を連続的に追跡することは困難であり、単位面積あたりの標識線維数を計測することはできなかった。

生存期間 5-7 日では、注入部位の標識細胞と同様に大脳白質内を走行する標識線維もその染色性が減弱しており、1 か所の注入に対する標識線維数は 5 本以下に減少していた。

3・3 脊髄内走行及び分布

生存期間 1 日 (3 匹) では、縦断切片 (2 匹)、横断

切片 (1 匹) とも腰髄レベルで皮質脊髄路線維の標識は観察されなかった。生存期間 2 日 (3 匹) では、縦断切片 (2 匹) で、L₁-L₂ レベルの後索内に 2, 3 本の皮質脊髄路線維が標識された。しかし、横断切片 (1 匹) では、L₁-L₆ の後索内、灰白質内いずれにも標識された皮質脊髄路線維は観察されなかった。生存期間 3 日 (6 匹) では、縦断切片 (3 匹) において L₁-L₂、L₃-L₄ あるいは L₅-L₆ で、それぞれ 1-2 か所、局所的に 5-10 本の標識線維が後索内の皮質脊髄路から灰白質に進入している像が観察された (Fig. 5A)。横断切片 (3 匹) では、L₁-L₂、L₃-L₄ あるいは L₅-L₆ で、それぞれ 1-2 か所、連続切片 2-5 枚に局限して灰白質内に標識線維が観察された (Fig. 6A)。

5-7 日の生存期間では、脊髄の縦断切片、横断切片における標識線維の分布については、生存期間 3 日の成績と本質的な差異は認められなかった。しかし、生存期間 3 日の標本に比べて、標識線維の染色性が明ら

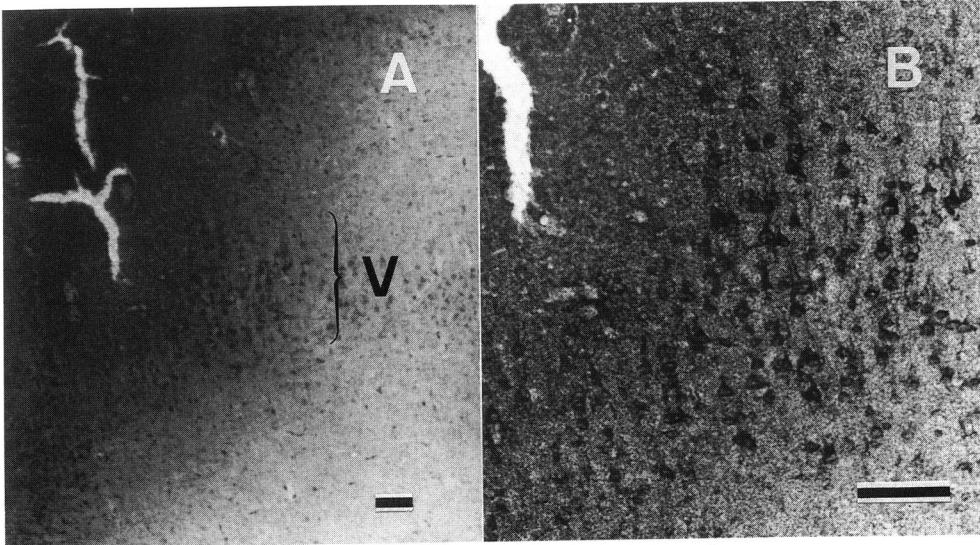
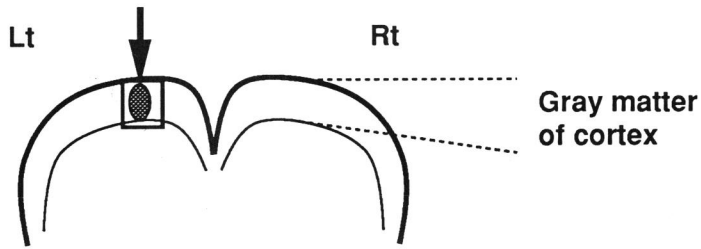


Fig. 3 A WGA-HRP injection site. Schematic presentation shows the photographed area of panel A. The arrow means a WGA-HRP injection. V in panel A shows the pyramidal cell layer. Panel B shows the pyramidal cell layer in panel A at higher magnification. Traces of a glass pipette are shown in the left upper parts of panel A and B. Scale bar=100 μ m.

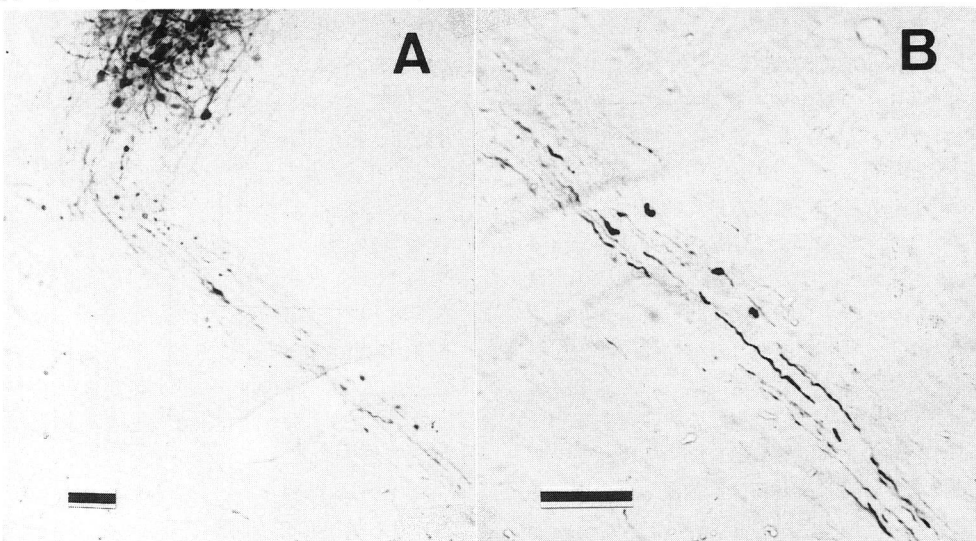


Fig. 4 Subcortical white matter just below an injection site. Panel A shows efferent axons labeled with biocytin. These labeled fibers are shown at higher magnification in panel B. Scale bar=50 μ m.

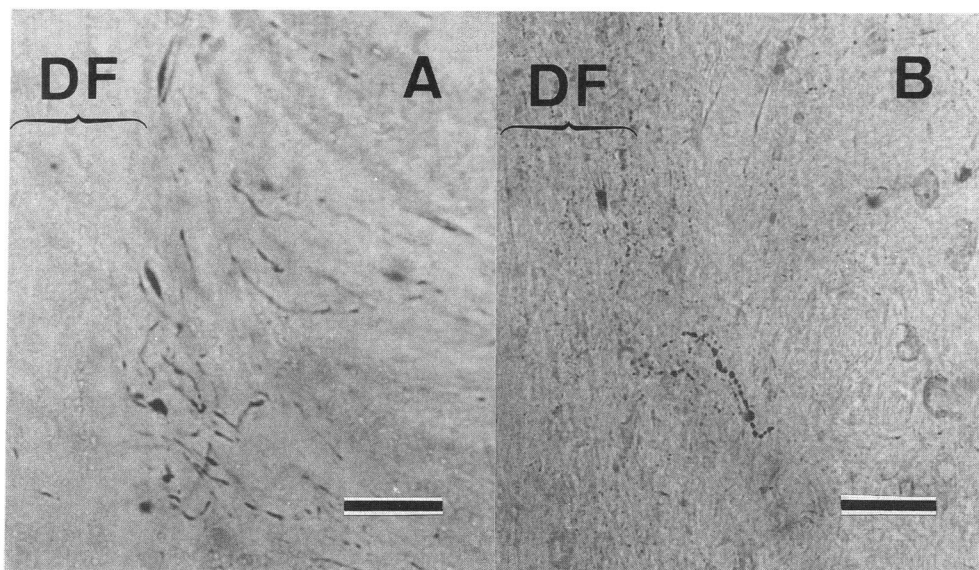


Fig. 5 Longitudinal sections of lumbar segments. Corticospinal fibers are labeled with biocytin (A) and WGA-HRP (B). DF means the dorsal funiculus. Scale bar=50 μ m.

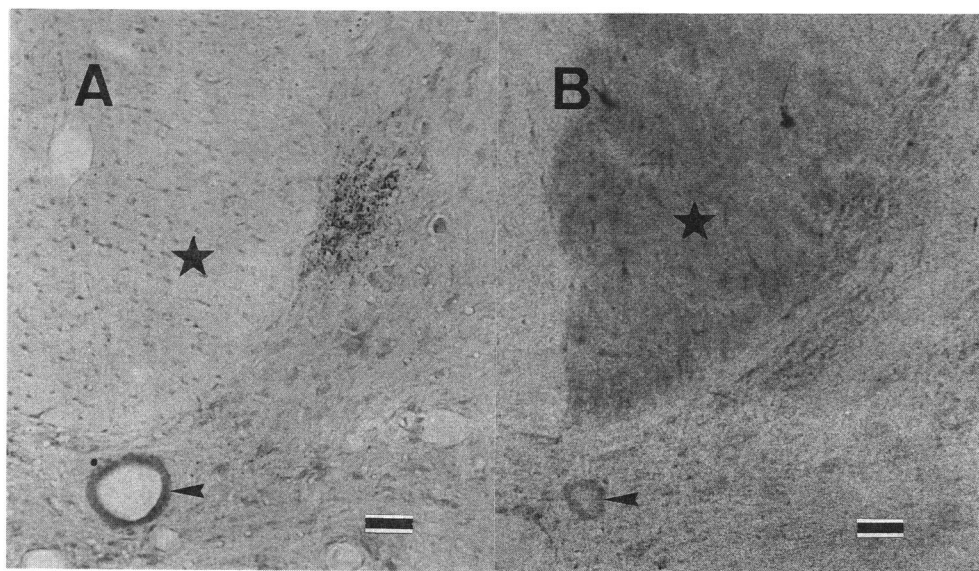


Fig. 6 Transverse sections of L1 segment. Corticospinal fibers are labeled with biocytin (A) and WGA-HRP (B). Corticospinal tract (*) is easily identified in a ventromedial area within the dorsal funiculus in B, but not shown in A. The arrowheads show central canals. Scale bar=50 μ m.

かに低下しており、縦断切片で観察される標識線維数は最も多い切片でも5本以下に減少していた。

標識の良好な生存期間3日の biocytin 標識像を同じく生存期間3日の WGA-HRP 標識像と比較すると、縦断切片では、白質内を走行する皮質脊髄路線維が、biocytin では線状に (Fig. 5A), WGA-HRP では点状に (Fig. 5B) 標識されているのが観察された。横断切

片では、biocytin の場合、標識が良好な場合でも標識される線維数が少ないため後索の皮質脊髄路全体の形態を可視化することはできなかった (Fig. 6A)。しかし、WGA-HRP の場合は、後索の最内側に位置する皮質脊髄路全体の形態が明瞭に描出された (Fig. 6B)。

3・4 傷害部位と再生線維

慢性ラット3匹では、注入後生存期間3日で傷害部

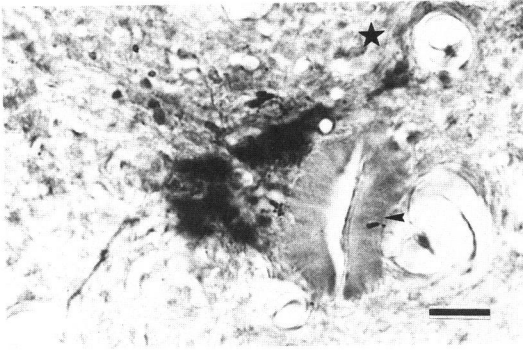


Fig. 7 Fine regenerating terminals rostral to the lesion (T9) in a chronically spinal-injured rat. Sprouting fibers from the corticospinal tract (*) are labeled with biocytin. The arrowhead shows a central canal. Scale bar=25 μ m. Note the cloudy background of the terminal fields.

位 (T9-10) の皮質脊髄路線維断端が全例明瞭に標識された。この際、標識線維の周囲に、再生線維末端から細胞外に放出されたとされる biocytin が雲状に標識されていた (Fig. 7)。

4 考 察

4.1 Biocytin の輸送速度

細胞外注入の場合の biocytin の正確な輸送速度については研究者によって若干の差が見られる。Izzo¹³⁾ は 4 時間で 12 mm 以上、King *et al.*¹⁶⁾ は 24 時間で 10 mm 以上としている。本実験では、大脳皮質運動野注入後 2-3 日で腰髄レベルの標識が可能であった。350-450 g のラットの皮質から腰髄までは直線距離で 70-80 mm であるから、皮質脊髄路を下降する biocytin の輸送速度は 20-40 mm/日と推定された。

4.2 Biocytin の代謝と細胞内動態

本実験でも明らかになったように、一般に biocytin による標識レベルは時間の経過とともに低下していくことはよく知られている。しかしながら、ニューロンに取り込まれた biocytin がどのようにして細胞内から消失していくのかについてはよくわかっていない。1つの可能性として、biotinidase のような biocytin 分解酵素の存在が挙げられる³²⁾。しかし、脳内の biotinidase 活性は血清の 10^{-3} - 10^{-4} に低下しており³³⁾、酵素による分解が唯一の機序であるとは考えにくい。Kita and Armstrong¹⁹⁾ は標識された軸索末端部の background に雲状に染色されている部分が存在することに注目し、軸索末端からの biocytin の放出を推定した。本実験でも、彼らが指摘したように、軸索終末部、特に皮質脊

髄路切断後の断端には再生線維に混じって雲状に染色される部位が観察された。したがって、少なくとも一部は、取り込まれた biocytin が漸次軸索輸送で末端に運ばれ、そこから放出されることが標識レベルの低下に関与していると思われる。

4.3 最適生存期間

一般に、*in vivo*^{15,17,20)} あるいは *in vitro*^{18,21)} の標本で biocytin を細胞内注入し、短い経路を標識する場合は、注入後直ちに組織固定に行なうため、注入後の最適生存時間を考慮する必要はなかった。しかし、細胞外注入で長い経路を標識する場合は、前項で述べたように、細胞内での分解や細胞外への放出によって biocytin の細胞内濃度は低下していくので、標識を試みる軸索の距離によって最適の生存期間を選択しなければならない。

Kita and Armstrong¹⁹⁾ は biocytin をイオントフォレーシスによってラット線条体に注入し、脳内の投射を観察しているが、生存期間 5 日で注入部位も投射線維も標識レベルが著しく減弱すると記載している。同様に、イオントフォレーシスによってサルの脳内に biocytin を注入し、淡蒼球外節から視床網様体核への投射²²⁾、視床下核および線条体から淡蒼球への投射²³⁾ を観察した報告でも生存期間を 2 日以内としている。また、Izzo¹³⁾ はラットの線条体、大脳皮質、孤束核にいか所 10-50 nl の biocytin を圧注入し、それぞれの部位からの投射を観察している。その中で、30 時間までは標識レベルの低下は認めないが、それ以上の生存期間にすると、標識が減弱し始め、96 時間で注入部位、投射線維とも全く標識されなくなったと報告している。

このように比較的短時間で標識の減弱を認めている報告に対して、biocytin を圧注入してサルの視覚野や体性感覚野から脳内の投射を観察した Lachica *et al.*¹⁴⁾ は生存期間 9 時間から 2 週間で標識レベルの低下を認めていない。また、ラット海馬の投射路を観察した King *et al.*¹⁶⁾ も、1-4 日間の生存期間で標識レベルの低下を認めていない。これらの報告では、いずれも注入部位一か所について 100 nl 以上の biocytin が注入されていた。

一か所に 300 nl 注入した本実験でも、生存期間 3 日で非常に良好な標識が得られており、5-7 日の生存期間では標識が減弱するものの、完全に消失してしまうことはなかった。つまり、一か所の注入量が多い場合は、長い生存期間でも標識レベルが保たれやすいことが推察された。その理由として、注入量が多い場合は注入部位で細胞外でブールされた biocytin が漸次取り込ま

れるためニューロン内の biocytin 濃度が長時間一定に保たれやすい点が挙げられる。

4.5 WGA-HRP 標識との比較

Biocytin は WGA-HRP のように注入部位で拡散しないため、細胞外注入でもピペット直下の限局した範囲のニューロンしか標識されなかった。このことは少数の注目する細胞だけが選択的に標識できるという利点もあるが、本実験のように一か所に WGA-HRP の 3 倍の量を注入しても少数の細胞しか標識されないことになる。つまり、運動野全体にもれなく biocytin を注入して皮質脊髄路全体を標識するような試みは実質的には不可能と考えられた。しかし、少数ながら、biocytin で標識されたニューロンは注入部位でも軸索末端でも PHA-L による標識¹²⁾ に似て、微細な突起の末端まで明瞭に描出された。したがって、個々のニューロンの微細構造を描出する場合や一つのニューロンを連続的に追跡する場合は、数珠状に描出される WGA-HRP に比べて biocytin による標識に優れていると思われた。

5 要 約

Biocytin の細胞外注入によってラット皮質脊髄路を標識し、標識線維の光顕像を WGA-HRP 標識による光顕像と比較した。Biocytin 順行性標識法の特徴と良好な結果を得るための条件として、以下の成績を得た。

1) Biocytin の軸索内輸送速度は一日 20-40 mm と速く、ラット大脳皮質運動野注入後、生存期間 2-3 日で腰髄レベルに達した。

2) 皮質の注入量が一か所 300 nl の場合、生存期間 3 日以内であれば、注入部位、投射路いずれの標識も減弱しなかった。しかし、5 日以上になると、標識は減弱した。

3) 生存期間が延びた場合、標識レベルが低下する機序として、biotinidase のような酵素による biocytin 分解の他に、軸索終末からの biocytin の放出が存在すると推測された。

4) WGA-HRP に比べて、標識されるニューロン数は限られていたが、biocytin 標識法の方が微細な形態を描出することに優れ、軸索の連続的な追跡も容易であった。

以上のように、biocytin による順行性標識法は皮質脊髄路のような長い投射路の標識にも応用可能であることが示された。特に、その特性から、限局した少数のニューロンの投射を詳細に標識することに優れていると思われた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導並びに御校閲を賜った本学生理学第 2 講座、青木藩教授に深謝致します。また、本論文の作成にあたり、貴重な御助言を頂いた本学解剖学第 1 講座、高橋杏三教授に深謝致します。

文 献

1. Schwartz JH. The cytology of neurons. In: Kandel ER, Schwartz JH, editors. Principles of neural science. 2nd ed. New York, Amsterdam, Oxford, Elsevier, 1985.
2. Nauta WLH, Gyax PA. Silver impregnation of degenerating axons in the central nervous system: a modified technic. Stain Technol. 1954, 29: 91-93.
3. Fink RP, Heimer L. Two methods for selective silver impregnation of degenerating axons and their synaptic endings in the central nervous system. Brain Res. 1967, 4: 369-374.
4. Cowan WM, Gottlieb DI, Hendrickson AE, Price JL, Woolsey TA. The autoradiographic demonstration of axonal connections in the central nervous system. Brain Res. 1972, 37: 21-51.
5. Edwards SB. The ascending and descending projections of the red nucleus in the cat: an experimental study using an autoradiographic tracing methods. Brain Res. 1972, 48: 45-63.
6. Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N. What should be called a lectin? Nature 1980, 285: 66.
7. Trojanowski JQ, Gonatas JO, Gonatas NK. Conjugates of horseradish peroxidase (HRP) with cholera toxin and wheat germ agglutinin are superior to free HRP as orthogradely transported markers. Brain Res. 1981, 223: 381-385.
8. Itaya SK, Van Hoesen GW. WGA-HRP as a transneuronal marker in the visual pathways of monkey and rat. Brain Res. 1982, 236: 199-204.
9. Aoki M, Fujito Y, Kosaka I, Satomi H. Does collateral sprouting from corticospinal fibers participate in motor recovery after spinal hemisection in monkeys? In: Flohr H, editor. Post-lesion neural plasticity. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 1988. 223-231.
10. Casale EJ, Light AR, Rustioni A. Direct projection of the corticospinal tract to the superficial laminae of the spinal cord in the rat. J. Comp. Neurol. 1988, 278: 275-286.
11. Schnell L, Schwab ME. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody

- against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* 1990, 343: 269-272.
12. Gerfen CR, Sawchenko PE. An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology on neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L). *Brain Res.* 1984, 290: 219-238.
 13. Izzo PN. A note on the use of biocytin in anterograde tracing studies in the central nervous system: application at both light and electron microscopic level. *J. Neurosci. Methods* 1991, 36: 155-166.
 14. Lachica EA, Mavity-Hudson JA, Casagrande VA. Morphological details of primate axons and dendrites revealed by extracellular injection of biocytin: an economic and reliable alternative to PHA-L. *Brain Res.* 1991, 564: 1-11.
 15. Horikawa K, Armstrong WE. A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J. Neurosci. Methods* 1988, 25: 1-11.
 16. King MA, Louis PM, Hunter BE, Walker DW. Biocytin: a versatile anterograde neuroanatomical tract-tracing alternative. *Brain Res.* 1989, 497: 361-367.
 17. Xu ZC, Wilson CJ, Emson PC. Synaptic potentials evoked in spiny neurons in rat neostriatal grafts by cortical and thalamic stimulation. *J. Neurophysiol.* 1991, 65: 477-493.
 18. Tseng GF, Parada I, Prince DA. Double-labeling with rhodamine beads and biocytin: a technique for studying corticospinal and other projection neurons in vitro. *J. Neurosci. Methods* 1991, 37: 121-131.
 19. Kita H, Armstrong W. A biotin-containing compound N-(2-aminoethyl) biotinamide for intracellular labeling and neuronal tracing studies: comparison with biocytin. *J. Neurosci. Methods* 1991, 37: 141-150.
 20. Vaney DI. Many diverse types of retinal neurons show tracer coupling when injected with biocytin or neurobiotin. *Neurosci. Lett.* 1991, 125: 187-190.
 21. Tasker JG, Hoffman NW, Dudek FE. Comparison of three intracellular markers for combined electrophysiological, morphological and immunohistochemical analyses. *J. Neurosci. Methods* 1991, 38: 129-143.
 22. Hazrati L-N, Parent A. Projection from the external pallidum to the reticular thalamic nucleus in the squirrel monkey. *Brain Res.* 1991, 550: 142-146.
 23. Hazrati L-N, Parent A. Convergence of subthalamic and striatal efferents at pallidal level in primates: an anterograde double-labeling study with biocytin and PHA-L. *Brain Res.* 1992, 569: 336-340.
 24. Asanuma H, Sakata H. Functional organization of a cortical efferent system examined with focal depth stimulation in cats. *J. Neurophysiol.* 1967, 30: 35-54.
 25. Hall RD, Lindholm EP. Organization of motor and somatosensory neocortex in the albino rat. *Brain Res.* 1974, 66: 23-38.
 26. Donoghue JP, Wise SP. The motor cortex of the rat: cytoarchitecture and microstimulation mapping. *J. Comp. Neurol.* 1982, 212: 76-88.
 27. Erickson RP. Nontraumatic headholders for mammals. *Physiol. Behav.* 1966, 1: 97-98.
 28. Greene EC. Anatomy of the rat. Transactions of the American Philosophical Society held at Philadelphia for promoting useful knowledge. New series-vol.27. New York, London, Hafner publishing company, 1963.
 29. Hart BL. Perfusion and removal of the rat brain. In: Hart BL, editor. *Experimental psychobiology. A laboratory manual.* San Francisco, W. H. Freeman and Company, 1976, 14-17.
 30. Gibson AR, Hansma DI, Houk JC, Robinson FR. A sensitive low artifact TMB procedure for the demonstration of WGA-HRP in the CNS. *Brain Res.* 1984, 298: 235-241.
 31. Mesulam MM. Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: A non-carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J. Histochem. Cytochem.* 1978, 26: 106-117.
 32. Thoma RW, Peterson WH. The enzymatic degradation of soluble bound biotin. *J. Biol. Chem.* 1954, 210: 569-579.
 33. Suchy SF, McVoy JS, Wolf B. Neurologic symptoms of biotinidase deficiency: possible explanation. *Neurology* 1985, 35: 1510-1511.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学生理学第2講座 今井富裕