

氏 名	きよ はら よし もと 清 原 義 幹
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2638 号
学位授与の日付	平成 15 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 生 理 系 専 攻
学位論文題目	A Novel Morphological Technique to Investigate a Single Climbing Fiber Synaptogenesis with a Purkinje Cell in the Developing Mouse Cerebellum: Dil Injection into the Inferior Cerebellar Peduncle (生後発達期マウス小脳において1本の登上線維が1個のプルキンエ細胞とど のようにシナプスを形成するのかを解析するための新たな形態学的手法：下 小脳脚へのDil注入)
論文調査委員	(主 査) 教 授 塩 田 浩 平 教 授 金 子 武 嗣 教 授 中 西 重 忠

論 文 内 容 の 要 旨

哺乳類高等動物の神経系では、一般に、その生後発達過程において、一端、過剰なシナプス結合が形成され、その後、神経活動依存性に、不用なシナプスは淘汰され、有用なもののみが固定化されて、しだいに成熟した機能的神経回路網が形成されることが知られている。この現象は、シナプス排除機構と呼ばれ、神経ネットワーク形成において、神経機能の成熟に伴い、シナプスの個数や位置を制限するという重要な過程として注目を集めてきた。中枢神経においては、小脳の登上線維－プルキンエ細胞間シナプスがそのよいモデルとされ、以下のようなプロセスを経て、成熟したシナプス結合が形成される。生後初期、まず数本の登上線維が、プルキンエ細胞1個を多重支配する。その後、生後15日頃になると、登上線維は、わずか1本のみを残してすべて消失し、いわゆる1対1の神経支配が完成すると考えられている。しかし、その形態学的基盤については現在まであまりわかっていなかった。そこで、我々は、このシナプス発達過程を形態学的に解析するために、新たな登上線維ラベル法の開発を試みた。

登上線維は、延髄下オリーブ核群を起始核として下小脳脚を経て小脳へ投射するオリーブ小脳路の小脳皮質内成分であるため、従来登上線維をラベルするためには、下オリーブ核群に *in vivo* で順行性トレーサーを注入する手法が用いられてきた。しかし、この方法は、幼若なマウスにおいては、解剖学的にアプローチしにくい下オリーブ核群にトレーサーを注入するという高度な技術が要求されるだけでなく、オリーブ小脳路全体がラベルされるのに必要なマウスの生存期間も問題となってきた。そこで、我々は、灌流固定後取り出したマウス小脳の下小脳側へDilを注入する方法を選択した。この方法では、上記の問題点が解決されただけでなく、結果としてごく一部の登上線維しかラベルされなかったため、一本の登上線維が求心性に上行し、プルキンエ細胞に投射していく画像を観察することに成功した。生後7日齢や9日齢のマウスにおいては、数本に分枝した登上線維側枝が、隣接する2, 3個のプルキンエ細胞の細胞体を取り囲むように収束するというこの時期特異的な所見が得られた。更にこのDilラベル法と光変換法を組み合わせることにより、プルキンエ細胞の細胞体を取り囲むように収束した登上線維側枝が本当にプルキンエ細胞とシナプスを形成しているかという問題に対して、電顕レベルで検討した。同生後発達期において、1本の登上線維から分岐した側枝がプルキンエ細胞の細胞体と樹状突起の両方にシナプスを形成するという所見が得られた。生後15日頃までには、登上線維のプルキンエ細胞の細胞体を取り囲むような投射パターンは消失し、また軸索－細胞体間シナプスも消失すると考えられている。このことを我々の結果と合わせて考えると生後2週目前半に認められる登上線維のプルキンエ細胞の細胞体を取り囲むような投射パターンは、登上線維がプルキンエ細胞の細胞体と樹状突起の両方を同時に効率よく支配するための形式であると推察される。以上のように、我々は、1本の登上線維が1個のプルキンエ細胞に対してどのように投射し、どのようなシナプスを形成するのかを光顕および電顕レベルにおいて解析する有用な形態学的手法を確立するに至った。

論文審査の結果の要旨

本論文はマウス下小脳脚へDilを注入することによりラベルされた小脳登上線維のプルキンエ細胞に対する投射パターンを光顕および電顕レベルにおいて解析したものである。本方法において、一部の登上線維のみをラベルする方法を確立し、1本の登上線維が求心性に上行し、プルキンエ細胞に投射していく画像を観察した。その結果、生後7日齢及び9日齢のマウスにおいては、数本に分枝した登上線維側枝が、隣接する数個のプルキンエ細胞の細胞体を取り囲むように収束するというこの時期特異的な所見を示した。更にこのDilラベル法と光変換法を組み合わせることにより、生後発達期において、1本の登上線維から分枝した側枝がプルキンエ細胞の細胞体と樹状突起の両方にシナプスを形成するという所見を示した。上記の結果より生後2週目前半に特異的な登上線維の投射パターンは、登上線維がプルキンエ細胞の細胞体と樹状突起の両方を同時に効率良く支配することを明らかにした。

以上の研究は、登上線維のプルキンエ細胞に対する神経支配を解析する有効な形態学的手法を確立したものであり、神経科学の研究に寄与するところが大いと考えられる。従って本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成15年5月19日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた者である。