

ウサギの小脳皮質アビオトロフィー
に関する病理学的研究

2015 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

佐藤 順子

【目次】

序論	3
第1章　ウサギの小脳皮質アビオトロフィーの 遺伝様式および病理組織学的変化に関する検討	5
緒言	6
材料と方法	7
結果	9
考察	13
小括	17
第2章　ウサギの小脳皮質アビオトロフィーの 病理発生に関する電子顕微鏡学的検討	18
緒言	19
材料と方法	21
結果	22
考察	24
小括	27
第3章　ウサギの小脳皮質アビオトロフィー病変の 形態計測法を用いた定量解析	28
緒言	29
材料と方法	30
結果	32
考察	34
小括	38
総括	39
謝辞	41
参考文献	42
要旨	47
Abstract	50
図表	54

序論

小脳皮質に形態異常や変性をきたす疾患には、感染などの外的要因もしくは虚血などの内的要因による変性疾患、先天性の低形成や異形成、遺伝性の変性疾患など様々なものがある。外因性もしくは内因性要因で胎子期に小脳の発生に異常をきたした場合、一般的に小脳は生まれながらに未成熟である。一方、胎子期の小脳発達は正常であるにもかかわらず、生後まもなく発症し、徐々に進行する遺伝性の変性疾患が存在し、本疾患のことを獣医領域ではアビオトロフィーと総称している【10, 11, 38】。小脳皮質アビオトロフィーもしくは類似の小脳変性症はイヌで最も報告が多く【9-12, 14, 16, 17, 25-27, 30, 32, 35, 38, 43】、その他、ネコ【10, 11, 17, 38, 42】、ウシ【6, 38】、ヒツジ、ウマ、ハクチョウ、サル【38】、アルパカ【28】などでも報告されている。また、いくつかのミュータントマウスの小脳変性症もこの範疇に入れられている【7, 13, 19-21, 29, 37, 39】。それらに共通する組織学的特徴は、プルキンエ細胞および顆粒細胞の変性および脱落であるが、その発症時期や神経変性の進行度合い、変性したプルキンエ細胞と顆粒細胞の割合、軸索や髄鞘に及ぼす二次的変化などは様々であり、ゆえに病理発生機序も様々であると考えられる。生後に神経細胞が変性に至る機序はミュータントマウスで報告されている。ミュータントマウスにおける小脳皮質変性の機序は様々で、移動中の顆粒細胞が壊死・脱落する Weaver マウス【37】、移動後に顆粒細胞の壊死が起こる Leaner マウス【13】、プルキンエ細胞の変性・壊死が先行する Nervous マウス【20】、Pcd マウス【21, 29】および Stumbler マウス【7】、顆粒細胞とプルキンエ細胞の両方で変性が始まる Lucher マウス【39】、プルキンエ細胞と顆粒細胞間のシナプス欠損による Staggerer マウス【19】などがある。しかし、ミュータントマウス以外で今まで報告されているアビオトロ

フイーの論文では、末期での症例報告が多く、一つの疾患に対して経時的な検討や発生機序を考察した論文は少ない。

本研究において、ある特定のウサギを交配すると、生後まもなく運動失調症状を発症する第 1 代目の子 (F1) ウサギが生まれることを見出した。それらの F1 ウサギは生後 10 日頃より起立不能がみられ、生後 25 日頃より運動失調症状や痙攣が激しくなり、哺乳や摂餌も困難となった。その罹患ウサギの遺伝様式を確認するために、親ウサギによる数回の交配および無発症 F1 ウサギとの戻し交配を行い、運動失調を示す F1 および戻し交配による第 2 代目の子 (N2) ウサギを作出した (第 1 章)。また、それらのうち生後 15 日、30 および 31 日、42 日の運動失調を発症した子ウサギの小脳について、HE 染色および免疫組織学的染色標本による光学顕微鏡学的検査を行い、この病変の特徴および進行について検索した (第 1 章)。また、生後 15 日および 25 日の F1 ウサギを用いた電子顕微鏡学的検査により、本疾患の発生機序を明らかにした (第 2 章)。さらに、光学顕微鏡で得られた病変の進行および電子顕微鏡観察で得られた病理発生機序を裏付けるために、生後 15 日と 42 日の疾患例を用いて画像解析装置による形態計測を行い、病変の定量的解析を実施した (第 3 章)。

第 1 章

ウサギの小脳皮質アビオトロフィーの
遺伝様式および病理組織学的変化に関する検討

緒言

ある特定のウサギ (Wbl:JW, SPF) を交配することによって、生後まもなく運動失調症状を引き起こす同腹子ウサギが生まれることを見出した。この運動失調症状は同腹子の複数例でみられたことから、本疾患が遺伝性であることを疑い、さらに数回の交配および戻し交配を行った結果、同様の症状を起こす第 1 代目の子 (F1) ウサギおよび戻し交配による第 2 代目の子 (N2) ウサギを作出することができた。獣医領域では、生後まもなく小脳性運動失調を発症する遺伝性の小脳皮質変性症は小脳皮質アビオトロフィーと総称している【10, 11】。この疾患の特徴は、生まれた時点では小脳構造や神経細胞に異常は認められないものの、生後まもなく、もしくは成熟してからプルキンエ細胞や顆粒細胞が変性、減数し、運動失調症状を発症することである【9, 11-13, 17, 26, 28, 30, 32, 35, 38, 43】。これまでに様々な動物でアビオトロフィーもしくは類似の小脳変性症が報告されているが、発症時期や病変の進行度合い、プルキンエ細胞と顆粒細胞の変性の割合、軸索や髄鞘に及ぼす二次的变化など、その臨床像および病理像は報告例によって様々である。また、報告の多くは症状末期での病理像の症例報告であり、一つの疾患について経時的な組織変化を観察したものは少ない。本章では、ウサギにみられたアビオトロフィーの遺伝様式を複数回の交配によって明らかにするとともに、それらの交配で得られた運動失調ウサギを用いて、生後 15 日、30 および 31 日 (30・31 日)、42 日のそれぞれの小脳を病理組織学的ならびに免疫組織学的に検索し、本疾患の経時的変化を検討した。

材料と方法

雌雄 2 匹の日本白色種ウサギ (Wbl:JW, SPF, 北山ラベス) を交配して F1 ウサギを作出した。12 匹の同腹子のうち死産もしくは生後すぐに死亡した動物を除いて 6 匹の同腹子 (雄 3 匹, 雌 3 匹) が発育したが, 生後 10 日ほどで雄 3 匹と雌 2 匹に運動失調の兆候が確認された。この疾患が遺伝性であることを確認するために, 同じ親ウサギを用いて再度 F1 ウサギを作出し, さらに無発症の雌 F1 ウサギと雄親ウサギによる戻し交配を行い, N2 ウサギを作出した。交配状況を図 1 に示す。また, 雌親は他の雄とも交配を行い, F1 ウサギを作出した。子ウサギは温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55 \pm 20\%$, 換気 6-20 回/時間, 照明時間 12 時間/日に維持された動物室において, 雌親ウサギと同一ケージにて飼育した。哺乳期間中は親ウサギからの自由哺乳とし, 生後 30 日前後より固形飼料の自由摂餌に切り替えた。運動失調症状を発症したウサギのうち, 病理学的検査に供した個体を表 1 に示す。発症直後の生後 15 日の疾患例として No.7 を, 生後 30・31 日の疾患例として Nos.2, 3 および 4 を, 生存可能限界の日齢である生後 42 日の疾患例として No.9 を用いた。それぞれの罹患ウサギとの比較対照のために日齢がほぼ同じ正常に発育するウサギも同様に各 1 例ずつ検査に用いた。生後 15 日の対照動物として発症のない同腹子である No.8, 生後 30・31 日の対照動物として他の親から生まれた生後 31 日のウサギ, 生後 42 日の対照動物として発症のない同腹子である No.10 を検索に用いた。

検査動物とその固定法および染色方法について表 1 に示す。

動物はペントバルビタール麻酔下で心臓内に生理食塩水を灌流しつつ放血し, 安楽死させた。Nos.2, 3, 4 および対照ウサギは安楽死後に 4%パラフォルムアルデヒド 500 ml による 30 分間の灌流固定を行い, 摘出した脳 (大脳, 小脳および

延髄)は10%リン酸緩衝ホルマリン液にて浸漬固定した。脳は前額断方向に複数箇所切り出した。すなわち、視床下部、海馬および扁桃体が確認できる位置、中脳水道および前丘が確認できる位置、中脳と延髄を確認できる位置、小脳を広く確認できる位置、および延髄を確認できる位置の5か所で切り出した。No.7, 9 およびそれぞれの対照ウサギは安楽死後に2.5%グルタルアルデヒド500 mlによる30分間の灌流固定を行い、摘出した脳(大脳、小脳および延髄)は2.5%グルタルアルデヒドにて浸漬固定した。固定された脳は矢状断方向に切り出した。切り出した組織はパラフィン包埋後、厚さ約4ミクロンで薄切し、光学顕微鏡検査に使用した。Nos. 2, 3, 4 およびその対照動物の切片には、ヘマトキシリンエオジン(HE)染色、Klüver-Barrera染色、Bodian染色、Holzer染色、さらに免疫組織学的染色として2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase), myelin basic protein (MBP), calbindin, synaptophysin抗体を用いた免疫染色を行った。免疫染色法の詳細を表2に示す。さらにTUNEL染色(ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, EMD Millipore Co., Billerica, MA, U.S.A.)についても実施した。Nos.7, 8に対してはHE染色、calbindin抗体を用いた免疫染色、およびTUNEL染色を施した。Nos.9, 10の切片にはHE染色を施した。

なお、この実験は「動物実験に関する指針(株式会社LSIメディエンス 創薬支援事業本部 試験研究センター)」に基づき、社内動物実験委員会の承認を得て実施した。

結果

遺伝様式

罹患ウサギの系統図を図1に示す。最初の人工授精による12匹のF1同腹子のうち6匹は死産もしくは生後すぐに死亡した。残りの6匹の兄弟のうち5匹が運動失調症状を呈し、1匹は性成熟に達しても運動失調症状は認められなかった。再度の人工授精で1匹のF1ウサギが生まれたが、生後まもなく死亡した。自然交配で生まれた11匹のF1同腹子のうち5匹が死産もしくは生後すぐに死亡し、残りの6匹のうち1匹が運動失調症状を呈した。この発症動物1匹と正常動物のうちの1匹は生後15日に安楽死させ、残りの4匹のウサギは性成熟に達するまで正常に生存した。無発症の雌F1ウサギと雄親ウサギとの人工授精では8匹のN2同腹子が生まれ4匹は死産であったが4匹は生存し、そのうち1匹に運動失調症状が見られた。雌の親ウサギを他の正常雄ウサギと人工交配させた結果、まず1匹のF1ウサギが生まれたが死産であった。二度目の交配では3匹のF1ウサギが生まれたが、すべてが正常に成長した。なお、雄の親ウサギは今回の交配以前に生殖試験に用いるために他の複数の雌ウサギと交配経験があるが、運動失調を示すF1ウサギは生れていない。

臨床症状

すべての罹患ウサギは生後10日頃より起立不能、歩行障害などの運動失調症状を示した。生後20日より横臥状態であったが麻痺はなく、時々頭を持ち上げ、四肢をばたつかせていた。生後25日からは、強直性発作、緊張亢進（体幹の弓なり緊張）、前足を振るわせて後ろ足を伸張させて、まれに眼球振盪を示す痙攣など、日齢が進むにつれて症状が悪化した。罹患ウサギは自力で哺乳すること

が困難であったため、生後 25 日から 31 日の体重は、正常ウサギ体重の 23% から 64%であった。この疾患の発現に性による偏りはみられなかった。

肉眼所見

生後 15 日, 30・31 日, 42 日: 肉眼的に, 対照ウサギと罹患ウサギの間で小脳の大きさに顕著な差は認められなかった (図 2a)。大脳, 延髄および脊髄においても罹患動物に肉眼的異常は認められなかった。中枢組織の矢状断面 (生後 15 日および 42 日) および前頭断面 (生後 30・31 日) において, 大きさ, 葉の構造, 白質と灰白質の配分に, 対照ウサギと罹患ウサギの間で肉眼的な差は認められなかった (図 2b)。

組織所見

生後 15 日: 切片上の罹患ウサギの大脳, 小脳, 延髄を含む脳の断面の大きさは, 対照ウサギのものと差はなかった。罹患ウサギの小脳は正常に分葉し, 分子層と顆粒層の幅および髄質の広さについても対照ウサギとの差は認められなかった。対照および罹患ウサギ両方の外顆粒層は, 表層では 2 層の卵円形から円形細胞からなり, それに続いて 1 層から 2 層の円形の細胞で構成されており, 両動物で差は認められなかった (図 2a,b)。外顆粒層では分裂像やアポトーシスが少数ながら認められた。対照および罹患ウサギともにプルキンエ細胞の細胞体は分子層と内顆粒層の間の定位置に配列しており, その数も両者の間で差は認められなかった。また, 内顆粒層内に移動遅延を起こしたプルキンエ細胞も認められなかった。Calbindin 染色標本では, 分子層におけるプルキンエ細胞の樹状突起の密度は対照ウサギと罹患ウサギで差はなかったが, 突起の幅は罹患ウサギで若干細かった (図 4a,b)。プルキンエ細胞に壊死や変性像は認められず,

プルキンエ細胞数にも差は認められなかった。

核濃縮を示す細胞が分子層と内顆粒層 (図 6b) に散見され、これらは TUNEL 染色陽性であり、アポトーシス細胞であると判断された (図 7a,b)。分子層内のアポトーシス細胞は、外顆粒層から最終定位置である内顆粒層へと移動中の顆粒細胞と推測された。内顆粒層では顆粒細胞のアポトーシスはみられるものの、顆粒細胞密度の減少は確認できなかった (図 6b)。

罹患ウサギの髄質に変化は認められなかった。また、大脳および延髄にも著変は認められなかった。

生後 30・31 日：罹患ウサギの分子層の厚さが対照ウサギより薄かった。外顆粒層の幅および髄質の広さに差は認められなかった。

外顆粒層は生後 15 日と比べてかなり薄くなり、対照および罹患ウサギとも 1 から 2 層の扁平細胞で構成されており、両者の間で差は認められなかった (図 3c,d)。

生後 30・31 日では小脳は横断面での観察であったため、縦断方向に走っているプルキンエ細胞樹状突起は連続的に観察されず突起の横断面として点状に観察される。Calbindin 染色標本では、プルキンエ細胞から伸びる樹状突起の幹は斑状に、枝はより小さな点状の陽性反応として観察された。罹患ウサギでは対照ウサギに比べその斑状および点状の樹状突起の密度の減少がみられた (図 4c,d)。Synaptophysin 染色では、シナプス小胞が微細顆粒状に陽性に染まった。罹患ウサギの分子層では対照ウサギに比べ synaptophysin 陽性顆粒密度の減少がみられた (図 4e,f)。罹患ウサギの中の 1 例 (No.2) にはプルキンエ細胞の胞体内に核と同じ大きさ、もしくはそれ以上の大きさの淡好酸性の球状体が認められた (図 5)。

罹患ウサギの内顆粒層では顆粒細胞密度の減少が認められた (図 6c,d)。核濃縮を示した細胞が顆粒層内に散在性に認められ (図 6d)、これらは生後 15 日の罹患

ウサギと同様に TUNEL 染色に陽性であり、アポトーシスに陥った顆粒細胞であった (図 7d)。生後 15 日の罹患ウサギでみられた分子層内のアポトーシスを示す移動中顆粒細胞は、生後 30・31 日では僅かであった (図 7c)。

内顆粒層に近接した髄質では、直径 5 から 50 μ m ほどの空胞が散在性に認められた (図 8a)。空胞内には時に好酸性球状体もしくは残渣様物質が認められた。これら空胞内物質は calbindin 陽性であったことから、変性あるいは膨化した軸索であり、空胞は拡張した髄鞘と判断された。CNPase 染色で、分子層および顆粒細胞層内の染色性の若干の低下がみられたが、Klüver-Barrera 染色および MBP 染色では脱髄を示す領域は観察されなかった。Holzer 染色ではグリオーシスと思われる変化は認められなかった。Bodian 染色では明らかな神経線維の減少は確認されなかった。周囲の小脳神経核には変性病変やグリア反応は認められなかった。また、大脳および延髄には HE 染色標本やその他の染色標本でも著変は認められなかった。

42 日齢: 対照および罹患ウサギの外顆粒層は生後 30・31 日と同様に扁平な 1, 2 層の細胞を残すのみであった (図 3e,f)。生後 30・31 日の HE 染色標本で認められた分子層の幅の減少や内顆粒層における顆粒細胞密度の減少が生後 42 日でもほぼ同程度に認められた (図 6e,f)。顆粒細胞の核濃縮像は、生後 30・31 日より減少していた (図 6d,f)。髄質には好酸性残渣物を入れた空胞が認められた (図 8c)。大脳および延髄には著変は認められなかった。

考察

特定のペアウサギを用いた三度の交配により、6匹の運動失調症状を示す F1 ウサギが得られ、さらに一度のもどし交配により、1匹の運動失調 N2 ウサギが得られた。発症した動物の性別に偏りはみられなかった。しかし、一方の親ウサギを親子関係のない他の動物との交配に切り替えた時には、運動失調 F1 ウサギを作出することはできなかった。この結果より、この疾患は常染色体劣性遺伝であることが疑われ、常染色体劣性遺伝が特徴とされているイヌのアビオトロフィーと同様の遺伝様式と推測される【10, 11, 16, 30】。

本疾患の特徴は、小脳全体の萎縮は顕著ではなく、発症直後の生後 15 日では顆粒細胞のアポトーシスが散見される以外に目立った変化は認められないが、生後 30・31 日および 42 日と成長すると、分子層の幅の減少、プルキンエ細胞の軸索の変性および樹状突起の減少、顆粒細胞の減少が認められる進行性病変を示すことである。

本疾患例の生後 15 日では、移動中および移動後の顆粒細胞の中にアポトーシスに陥っている細胞が分子層および内顆粒層で観察された。一般に、顆粒細胞は外顆粒層から移動を開始し、背後に T 字状の平行線維を残したまま内顆粒層に受かって軸索を伸ばして移動する【1, 3, 19】。本疾患例では各日齢における外顆粒層細胞の残存と減少は対照ウサギと同様であったことから、外顆粒層における顆粒細胞の分裂や移動には異常はないと判断できる。よって、外顆粒層から移動中および内顆粒層へ移動後の顆粒細胞に対する何らかの要因によって、アポトーシスが引き起こされているものと考えられる。

本疾患は、重篤な臨床症状に反して、HE 標本観察では神経細胞に顕著な消失や減少が確認できなかった。多くのアビオトロフィーの報告では、プルキンエ細

胞と顆粒細胞の顕著な変性, 壊死および減少が認められているが【9, 11-13, 17, 26, 28, 30, 32, 35, 38, 43】, いくつかの報告では本ウサギの罹患例の様に, 軽微な組織変化にとどまっている症例の報告もある【6, 16, 38, 42】。本症例では, HE 染色標本の観察では軽微な組織変化であったものの, 免疫組織化学染色を用いることにより, 神経細胞やシナプス部分に異常があることが判明した。すなわち, Calbindin 抗体を用いた免疫染色により, 罹患ウサギにおけるプルキンエ細胞の樹状突起の減少や幅の不整が確認できた。TUNEL 染色標本の観察により, 顆粒細胞はグリア反応などの激しい反応を伴うことなくアポトーシスによりゆっくりと減少していることが示された。Synaptophysin 抗体を用いた免疫染色標本の分子層における陽性反応が罹患ウサギで減少していたことより, 分子層におけるシナプスの減少が示唆された。

ウサギにおける遺伝性の運動失調症例が過去にも報告されている【33, 34, 36】。運動失調は2から3ヵ月齢で発症するが, 症状の進行は緩やかである。主に白質内にある前庭核および小脳核, 前庭小脳束において, 神経細胞やその周囲の神経網に空胞化が認められている。今回の症例は, 変化の発現する部位と変化の質が違ふこと, 発症時期が違ふことなどから, 先に報告された症例とは違いが認められる。

先天性の小脳性運動失調を起こす疾患には, アビオトロフィー以外にも小脳低形成, 神経軸索ジストロフィーなどがある。低形成は, 外因性(子宮内感染)もしくは遺伝性に胎児期の発達期に正常な分化を抑制する何らかの因子によって引き起こされる。小脳低形成では小脳の細胞構成成分の欠如や減少, もしくは小脳構成細胞の正常な細胞分布位置からの逸脱などが認められる。臨床症状は動物が歩き始める時期から現れるが, 進行性ではない。むしろ, 他の感覚による適応反応により臨床症状が改善されることもある【17】。今回のウサギの症例では, 臨床

症状は生後間もなく起立不能として発現したが、生後 25 日以降には症状は緊張亢進や強直性痙攣などが出現し、症状は悪化した。このような進行性の神経症状は過去に述べられている小脳低形成の症例と一致しない【17】。加えて、本罹患ウサギの小脳は、対照ウサギのものとは比べても肉眼像および組織構築に顕著な差は認められなかったことから、生前の小脳分化は正常に行われているものと考えられ、構成成分の欠如や位置異常が特徴とされる小脳低形成には一致しないと判断する。

神経軸索ジストロフィーはイヌでしばしば報告されており、早期に発現する進行性の変性疾患で、軸索変性像であるスフェロイドを多数形成することが特徴的であり、病変は小脳のみならず、脊髄や大脳の神経核でも認められる【30, 31, 41】。軸索変性（スフェロイド形成）はアビオトロフィーでも認められ【6, 35, 38, 42】、神経軸索ジストロフィーとアビオトロフィーは類似している点もある。本症例では好酸性球状物が顆粒細胞層と髄質の境界部に限局して散見された。この好酸性球状物は Calbindin 陽性であったことから、プルキンエ細胞の軸索由来のスフェロイド小体と考えられる。しかし、本罹患ウサギのスフェロイド小体の数は、神経軸索ジストロフィーで報告されているもの比べると少ないこと【30, 31, 41】、小脳に限局していること、発症初期には現れず病期が進むにつれて発現してくることなどから、プルキンエ細胞の変性に伴い二次的に軸索が変性したものであり、軸索変性を主病変とする神経軸索ジストロフィーとは異なるものと考えられる。

通常、ウサギは生後 10 日ほどで歩き始めるが、本罹患ウサギではそれが不可能であった。これは他の動物種で報告されているアビオトロフィー症例の発症時期の中でも早い発症である。最も早期の発現が報告されているのはアンガス牛の報告で、生後すぐに痙攣を発症している【6, 34】。この例では、最初は症状に関

連した形態学的変化は認められず、生後数日たって症状が進行してからプルキンエ細胞とその軸索に明らかな変化が認められている。本罹患ウサギは、正常な同腹子がいる中で、運動失調のために十分な哺乳ができないために徐々に削瘦し、なるべく長期生存させようと努力したものの、生後 42 日が限度であった。生後 42 日でも、多くのアビオトロフィー症例で報告されているような顕著なプルキンエ細胞と顆粒細胞の減少は観察されなかったが、生後 15 日から 30・31 日の間で明らかに病変は進行し、生後 30・31 日と 42 日の間ではその病態は維持されていた。一般に、小脳皮質アビオトロフィーは遺伝性疾患で、早期に発現し、進行性の小脳皮質変性を示し、神経機能が損傷される疾患の総称であることから、本疾患にはアビオトロフィーの診断が当てはまるものと考えられる。本疾患は、重篤な臨床症状にもかかわらず、組織病変は軽度で、その進行は緩徐であるように思われる。この重篤な臨床症状と組織学的病変との不一致も解明のために、本疾患の病理発生機序の検討が必要と考えられる。

小括

ウサギにおいて早発性の常染色体劣性遺伝による進行性の小脳皮質変性症、いわゆる小脳皮質アビオトロフィー症例が観察された。生後 15 日では顆粒細胞のアポトーシスとプルキンエ細胞樹状突起幹の太さの減少、生後 30・31 日では顆粒細胞密度の減少、プルキンエ細胞における樹状突起の密度の減少および髄質の軸索変性、生後 42 日では 30・31 日とほぼ同様な変化が認められた。本症例は重篤な臨床症状にも関わらず、組織病変は軽度で進行は比較的緩慢であった。

第 2 章

ウサギの小脳皮質アビオトロフィーの
病理発生に関する電子顕微鏡学的検討

緒言

第 1 章において、ある特定のペアウサギから生まれた同腹子にみられたウサギの遺伝性小脳皮質変性症、いわゆる小脳皮質アビオトロフィーの症例について、組織学的および免疫組織学的に検索した。このアビオトロフィー罹患ウサギでは、生後 15 日では小脳の大きさ、各層の幅、構成細胞の密度に異常は認められないが、日齢の経過に伴って分子層の幅の減少、プルキンエ細胞樹状突起および顆粒細胞の密度の減少、髄質における軸索変性などの病変が進行性に認められるようになった。一般的に小脳皮質アビオトロフィーを発症した動物は運動失調症状を示し、特徴的な組織像は、顕著なプルキンエ細胞と顆粒細胞の脱落ならびに減少である【9, 11-13, 17, 26, 28, 30, 32, 35, 38, 43】。本罹患ウサギは、一般的なアビオトロフィーに比べると軽度に見える小脳皮質変性病変と緩徐な病変の進行が特徴であるが、一方で、起立不能、強直性痙攣などの重篤な神経症状を示していた。この組織像と臨床像との不一致はこの疾患の病理発生機序に関連していると考えられる。病理発生機序について解明されている過去の報告として、ミュータントマウスにおける小脳皮質変性症がある。その機序は様々で、移動中の顆粒細胞が壊死・脱落する Weaver マウス【37】、移動後に顆粒細胞の壊死が起こる Leaner マウス【13】、プルキンエ細胞の変性・壊死が先行する Nervous マウス【20】、Pcd マウス【21, 29】および Stumbler マウス【7】、顆粒細胞とプルキンエ細胞の両方で変性が始まる Lucher マウス【39】、プルキンエ細胞と顆粒細胞間のシナプス欠損による Staggerer マウス【19】などがある。本章では、発症早期である生後 15 日と病変の進んだ生後 25 日のアビオトロフィー罹患ウサギの小脳皮質について電子顕微鏡学的検査を主体とした病理組織学的検索を行い、超微形態学的病変の初期変化と進行病変を観察することによ

り，病理発生機序を検討した。

材料と方法

表 1 に示した動物のうち、生後 15 日の罹患ウサギ (No.7) および対照ウサギ (No.8)、生後 25 日の罹患ウサギ (Nos.1, 5) および対照ウサギを電子顕微鏡学的検査に用いた。動物はペントバルビタール麻酔下で心臓内に生理食塩水を灌流しつつ放血し、安楽死させた。Nos.7, 8 の動物は 2.5%グルタルアルデヒド 500 ml による 30 分間の灌流固定を行い、摘出した脳 (大脳, 小脳および延髄) を 2.5%グルタルアルデヒドにて浸漬固定した。固定された小脳皮質は矢状断方向が包埋面になるよう複数片に切り出した。Nos.1, 5 および対照ウサギは安楽死後に 4%パラフォルムアルデヒド 500 ml による 30 分間の灌流固定を行い、摘出した脳 (大脳, 小脳および延髄) を 10%リン酸緩衝ホルマリン液にて浸漬固定した。小脳皮質は前額断面が包埋面になるよう複数片に切り出した。組織片は定法に従って、1%オスミウムにて後固定し、脱水後にエポン樹脂包埋を行い、ブロックを作製した。各組織片はそれぞれの切り出し面で検索できるように平板包埋した。厚切り切片にはトルイジンブルー染色を施した。超薄切片は、酢酸ウラン染色と鉛染色の二重染色を施し、80kv の透過型電子顕微鏡 (日立: H-7600) にて超微形態学的検査を行った。

なお、この実験は「動物実験に関する指針 (株式会社 LSI メディエンス創薬支援事業本部 試験研究センター)」に基づき、社内動物実験委員会の承認を得て実施した。

結果

生後 15 日：対照ウサギの分子層では、プルキンエ細胞の樹状突起幹は外顆粒層側に向かって真っ直ぐに伸びていた（図 9a）。一方、罹患ウサギではプルキンエ細胞の胞体の形が不整で高電子密度の細胞質と不整な樹状突起を持つものがいくつか観察された（図 9b）。すなわち、プルキンエ細胞樹状突起の一次樹状突起幹は真っ直ぐ上方へ伸びておらず、湾曲し方向を逸脱していた（図 10）。対照ウサギの分子層では、遠位領域に顆粒細胞の軸索である平行線維とプルキンエ細胞のスパインが多く存在し、平行線維とプルキンエ細胞スパイン間シナプス（平行線維シナプス）が散見された。シナプス前神経である平行線維末端ではミトコンドリアと多数のシナプス小胞が認められ、シナプス後神経であるスパインにはシナプス後膜肥厚部が電子密度の高いけば状構造として認められた（図 11a）。また、対照ウサギのシナプス接合面の形状は平坦もしくはゆるい弓状であることが一般的であった（図 12a）。一方、罹患ウサギでは対照ウサギと比べて、平行線維シナプスの数が明らかに減少していた（図 11b）。さらに、シナプス形態の異常も観察され、後シナプスのスパインが前シナプスの平行線維末端内に陥入している像が認められた（図 12b,c）。陥入したシナプスの接合面は正常とは異なる球状もしくは半球状のシナプス後膜肥厚を形成していた（図 12b,c）。電顕写真中に観察されるミトコンドリア数の減少から、平行線維末端の数は減少していると判断され（図 11a,b）、中には少数のシナプス小胞を含んで大きく膨化した平行線維末端も認められた（図 13）。内顆粒層の顆粒細胞の多くは正常な形態を示したが、時に核クロマチンの凝集、すなわち核濃縮に陥っている顆粒細胞が観察された（図 14a,b）。

その他、サテライト細胞、バスケット細胞およびゴルジ細胞には電顕的に著

変は認められなかった。また、軸索の膨化や髄鞘の空胞化は認められなかった。

生後 25 日：生後 25 日の動物では小脳の前額断面での観察を行ったため、前額断方向に沿って走行する平行線維が観察された。光学顕微鏡観察において幅の減少が認められた罹患ウサギの分子層では、平行線維の減少が認められた。平行線維が減少している部位では、シナプスを形成していない多くのスパインがその隙間を埋めていた。また、生後 15 日に認められた平行線維シナプスの減少は生後 25 日でも認められ (図 11d)、シナプス形態の変化も少数観察された。生後 15 日から 25 日の平行線維シナプス数の推移および対照ウサギと比べた際のシナプス減少率の推移については、矢状断と前額断とで観察面が違うことより詳細な比較はできないが、両日齢で顕著な差は観察されなかった。

プルキンエ細胞の中には細胞内小器官が凝集し、電子密度が高い胞体をもつダークニューロンとしての特徴を持つものが観察された。そのような細胞では核は不整で細く細胞辺縁に位置していた。中には粗面小胞体の消失、ゴルジ装置の拡張ならびにミトコンドリアの増加が部分的に観察される、いわゆる中心性色質融解像を呈するプルキンエ細胞もみられた (図 15b,c)。本変化は、第 1 章で述べたプルキンエ細胞内の好酸性球状体に一致した。プルキンエ細胞には壊死と判断される像は認められなかったが、顆粒細胞の中には、核濃縮を起こしている細胞が観察された。

罹患ウサギの髄質では軸索の膨化がしばしば観察され、多くの神経細線維、ミトコンドリアそして膜様物質を含んでいた (図 16a)。光学顕微鏡でみられた髄質の空胞内には、膜様物質、ミエリン様物質およびミトコンドリアなどの細胞質の残渣を含んでいた (図 16b)。

考察

生後 15 日と 25 日の罹患ウサギ小脳の電子顕微鏡学的検査の結果、アビオトロフィー発症早期の 15 日齢より平行線維末端の形態異常や平行線維とプルキンエ細胞スパイン間のシナプス結合の異常、プルキンエ細胞樹状突起幹の不整な走行などが認められることが判った。生後 25 日では平行線維の減少、プルキンエ細胞体や軸索の変性所見も加わり病変は進行した。

第 1 章で述べたように、本疾患では生後 15 日では移動中ならびに移動後の顆粒細胞の中にアポトーシスに陥っている細胞が認められている。一般に、外顆粒層から移動を始めた細胞は双極性に放射状方向に突起を伸ばす。そして背後に T 字状の突起を残したまま内顆粒層に向かって軸索を伸ばして移動し、その水平方向の部分が平行線維となる【1, 3, 19】。電顕検索において、生後 25 日に観察された罹患ウサギにおける平行線維の減少は、移動中ならびに移動後の顆粒細胞のアポトーシスによるものと考えられる。

平行線維シナプスの形成不全を原因とする小脳性運動失調は、いくつかのミュータントマウスやノックアウトマウスで報告されており、Stragger マウス【19】、グルタミンレセプター $\delta 2$ サブユニット欠損マウス【18】および Cblin 1 ノックアウトマウス【15】などが挙げられる。これらの動物では初期病変のシナプス異常が、前および後シナプス神経に影響を与えている。運動失調を起こす Weaver マウスや Leaner マウスでは、初期に顆粒細胞がほとんど死滅し、それに続いてプルキンエ細胞やゴルジ細胞が二次的に異常を起こし消失してゆく【13, 37】。このような論文が示すように、神経の正常な発達と生き残りのためには適切なシナプス結合が必要とされる【7, 13, 19, 37】。すなわち、本疾患においても、顆粒細胞のアポトーシス、プルキンエ細胞体の変化や軸索および髓

鞘の変化は、生後の発達に必要な神経相互の適切な接触不全によって引き起こされた二次的な変化であると推測される。シナプス接合ができなかった顆粒細胞はアポトーシスを起こして消失した。一方、同じシナプス結合ができないプルキンエ細胞で明らかな壊死や脱落が観察されないのは、顆粒細胞の神経末端は一つのプルキンエ細胞スパインとシナプスを形成するのに対して、一つのプルキンエ細胞には多数のスパインが存在し、多数の顆粒細胞とシナプスを形成していることが要因として考えられる。

小脳分子層矢状断面での検索により、プルキンエ細胞樹状突起幹の走行の不整が確認された。対照ウサギの小脳分子層矢状断面ではプルキンエ細胞樹状突起幹は外顆粒層の方向へ向かって真っ直ぐに伸び、平行線維はプルキンエ細胞樹状突起に向かって直交するように伸びている。プルキンエ細胞樹状突起の正常な走行のためには、平行線維との適切な相互作用が必要になる【2, 4, 5, 17, 18】。この樹状突起の走行異常所見からも、本罹患ウサギでは樹状突起異常の前にシナプス接合不全が存在する、すなわち、シナプス接合不全が病理発生原因であることが推測される。

現在までのところ、小脳皮質アビオトロフィーの明確な病理発生について言及している報告は少ない【16, 40】。神経異常は近接する相互の神経と周囲神経網との間の相互関係に依存しているので、組織形態学的検索だけで一次病変と二次病変を同定するのは非常に困難なことである。本章では、発症早期と進行期でのアビオトロフィー罹患ウサギの電顕検索を実施したことにより、この疾患の原因が、発症早期より顕著で、且つ病態が進行しても同様に認められるシナプス形成異常に起因していることを見出した。本症例ウサギでは組織学的病変は比較的軽度であるにもかかわらず、重篤な臨床症状を伴うことが特徴である。この組織像と臨床症状の不一致は、本疾患がシナプス形成不全に起因して

いることより十分理解できる事象である。本ウサギのように劇的な臨床症状にもかかわらず軽度の組織学的変化しか観察されない神経疾患では、シナプス形成不全がその病理発生機序の一因となっている可能性を考慮しなければならないと考える。

小括

生後 15 日および 25 日のアビオトロフィー罹患ウサギの小脳について電子顕微鏡学的検索を行った。発症早期の生後 15 日から平行線維末端の異常，平行線維とプルキンエ細胞間のシナプス数の減少およびシナプス接合形態の異常が認められた。生後 25 日では，平行線維シナプスの減少と平行線維の減少が観察され，さらに，生後 15 日にはみられなかったプルキンエ細胞体や軸索の変性所見も加わり病変は進行した。運動失調発症早期の生後 15 日での電顕観察結果より，本疾患の病理発生機序は平行線維シナプスの形成不全によるものと判断された。

第 3 章

ウサギの小脳皮質アビオトロフィー病変の
形態計測による定量解析

緒言

第 2 章において、アビオトロフィー罹患ウサギの病理発生は、平行線維とプルキンエ細胞とのシナプス形成不全であることが示された。このシナプス形成不全が、第 1 章で述べた顆粒細胞密度の減少やプルキンエ細胞体および軸索の変性を引き起こしているものと推測された。生後 15 日より組織学的に軽微な小脳皮質の変性像があるものの、小脳の大きさについては肉眼観察ではどのステージでも対照動物と顕著な差は認められていない。一般的に、成長してからの小脳皮質変性症では、小脳の大きさは萎縮に向かうものである【25, 32, 35, 41, 43】。今回の疾患例の様に、脳の発達段階にある生後まもない動物での発症の場合、急速な脳の発達と萎縮が同時に進行し、その病態をある特定のステージだけで掴むことは困難であることが多い。小脳皮質アビオトロフィーのような生後早期の発症で、進行性の病態を示す疾患では特に、生後の経時的な変化をとらえることが重要となる。さらに本疾患例では、組織変化が比較的軽度であること、かつ病変の進行が緩慢であることから、肉眼観察や光学および電子顕微鏡による形態学的観察で病変の進行を正確にとらえることが難しい。このような神経疾患に対して定量的解析を行うことによって、漠然と捉えられていた組織変化や病理発生機序に対してより正確な評価を行うことが出来る【5, 8】。第 3 章では、この遺伝性進行性のウサギの小脳皮質アビオトロフィーを発症初期の生後 15 日と生存可能限界の生後 42 日の動物の小脳矢状断面を用いて、画像解析装置を用いた形態計測により小脳面積、顆粒細胞数、アポトーシス細胞数およびシナプス数の定量的解析を行い、第 1 章および第 2 章でとらえた病理形態学的所見と発生機序の関連性について検討した。

材料と方法

本研究では形態計測を行うために同一の断面（矢状断）と同一の固定液で処理された動物を用いた。すなわち、表 1 に示した白色ウサギ（Wbl:JW, SPF）のうち、15 日齢の罹患ウサギ（No.7）および対照ウサギ（No.8）、42 日齢の罹患ウサギ（No.9）および対照ウサギ（No.10）を光学顕微鏡学および電子顕微鏡学的検査に用いた。動物はペントバルビタール麻酔下で心臓内に生理食塩水を灌流しつつ放血し、安楽死させた。Nos.7, 9 およびその対照ウサギは 2.5%グルタールアルデヒド 500 ml による 30 分間の灌流固定を行い、摘出した脳（大脳、小脳および延髄）を 2.5%グルタールアルデヒドにて浸漬固定した。固定された小脳皮質は、矢状断方向が包埋面になるよう複数片に切り出した。切り出された組織はパラフィン包埋後、厚さ約 4 ミクロンで薄切し、HE 染色を施して光学顕微鏡検査に使用した。残りの小脳皮質は縦断方向が包埋面になるよう複数片に切り出した。組織片は定法に従い、1%オスミウムにて後固定し、脱水後エポキシ樹脂包埋を行い、ブロックを作製した。包埋は縦断方向が検索できるように平板包埋した。厚切り切片にはトルイジンブルー染色を施した。超薄切片には、酢酸ウラン染色と鉛染色の二重染色を施し、80kv の透過型電子顕微鏡（日立：H-7600）にて超微形態学的検査を行った。

HE 染色標本では、生後 15 日および 42 日の罹患ウサギおよび対照ウサギの小脳縦断面における外顆粒層、分子層、内顆粒層および髄質の面積を画像解析装置（Image-Pro Plus; Media Cybernetics., Rockville, Md, USA）を用いて測定した。さらに内顆粒層では光学顕微鏡 200 倍での観察で無作為に選んだ 10 視野の顆粒細胞数とアポトーシス細胞数について画像解析装置を用いて計数した。アポトーシス細胞については第 1 章にて核濃縮を起こしている細胞が TUNEL

染色陽性であることを証明しているため、今回は HE 染色標本にて核濃縮を示す細胞をアポトーシス細胞として計数した。計数した顆粒細胞とアポトーシス細胞の密度に顆粒層の面積を乗じて、矢状断面における両細胞の総数を算出した。電子顕微鏡学的検索では、12000 倍観察で 25 視野を無作為に選んで観察した平行線維とプルキンエ細胞スパインとのシナプス数について計数した。シナプスについてはプルキンエ細胞のスパインにみられる電子密度の高いシナプス後膜肥厚を目安に認識した。計数したシナプス密度に分子層の面積を乗じて、矢状断面におけるシナプス総数を算出した。

なお、この実験は「動物実験に関する指針（株式会社 LSI メディエンス 創薬支援事業本部 試験研究センター）」に基づいて、社内動物実験委員会の承認を得て実施した。

結果

小脳面積の形態計測

図 17 に小脳矢状断面における各層面積の形態計測結果を示す。

生後 15 日では罹患ウサギと対照ウサギの小脳の大きさはほぼ同じであった。罹患ウサギ、対照ウサギ共に生後 15 日から 42 日の間に小脳は成長していた。ただし、その成長の割合が、罹患ウサギでは対照ウサギよりも低かった。正常ウサギでは小脳は 15 日から 42 日までの間に面積が 2 倍に増えていたが、罹患ウサギでは 1.2 倍にとどまっていた。生後 42 日では罹患ウサギの小脳面積は対照ウサギにくらべて 26%低いものであった。

生後 42 日における対照ウサギと罹患ウサギの小脳面積の差は分子層と内顆粒層の発達の違いによって生じていた。生後 15 日から 42 日の観察期間中では分子層で最も面積が増えており、対照ウサギでは 2.4 倍であり、内顆粒層では 1.9 倍、髄質では 1.7 倍の増加であった。一方、罹患ウサギでは分子層は 1.4 倍の増加にとどまり、対照ウサギとくらべて著しく低いものであった。髄質では 1.7 倍の増加であり、対照ウサギと同等な成長がみられた。また、内顆粒層では 0.9 倍の増加であり、生後 15 日とあまり変化がみられず、むしろ減少していた。

外顆粒層は生後 42 日では対照ウサギ、罹患ウサギともに菲薄化して定量化が不可能なレベルであった。

顆粒細胞数およびアポトーシス細胞数

小脳顆粒層矢状断面における顆粒細胞とアポトーシス細胞の密度および総数を図 18 に示す。

生後 15 日から 42 日の間で、顆粒細胞密度は対照ウサギ、罹患ウサギともに

減少した。これは同時に進行する神経網の発達によるものである。顆粒細胞数は生後 15 日では対照動物と罹患ウサギで差は認められなかった。しかし、生後 15 日から 42 日の間に顆粒細胞数は対照ウサギでは 160%に増加したのに対し、罹患ウサギでは 87%であり横這いもしくは減少傾向であった。アポトーシス細胞の密度と数は、対照ウサギでは生後 15 日、42 日ともに少数であったのに対し、罹患ウサギでは生後 15 日では顕著に高く対照ウサギのそれぞれ約 42 倍および 62 倍であった。また、42 日においても生後 15 日からは顕著に減少したものの対照ウサギの約 11 倍および 8 倍であった。

平行線維とプルキンエ細胞間シナプス（平行線維シナプス）の数

小脳分子層矢状断面における電子顕微鏡観察による平行線維シナプスの密度および総数を図 19 に示す。

生後 15 日から 42 日の間で対照ウサギ、罹患ウサギともにシナプス密度には大きな変動はなかった。これはシナプス形成と同時に進行する神経線維やグリア線維の発達によるものである。しかし、それぞれの日齢における対照ウサギと罹患ウサギのシナプスの密度の差は顕著なものであった。つまり、罹患ウサギでは対照ウサギと比べてシナプス密度は生後 15 日で 71%少なく、生後 42 日で 60%少なかった。矢状断面のシナプス総数では、罹患ウサギでは対照ウサギと比べて生後 15 日で既に 64%少なく、生後 42 日でも 71%少なかった。生後 15 日から 42 日にかけてのシナプス数の増加率にも差がみられ、対照ウサギではシナプス数は 2.1 倍に増加している一方で罹患ウサギでは 1.7 倍の増加にとどまっていた。

考察

本章では、アビオトロフィー罹患ウサギの小脳の形態計測によって、小脳の発達、病変の進行、そして病理発生機序が確認された。小脳矢状断面の全体および各層の面積を比べることにより、アビオトロフィー罹患ウサギでもその大きさは生後 15 日までは正常同様に発育していること、さらに生後 15 日から 42 日までの成長過程において、組織学的に異常が認められない部位（髄質）の大きさは、正常同様に発育してゆくことが明らかになった。生後 42 日では全体的には罹患動物の小脳の大きさは対照動物より 2 割程小さかったが、これは分子層および顆粒層の発育が抑制されていることが原因であった。加えて、本検索により、生後まもなく発症する脳の疾患の場合は、特定のステージだけで病変を評価すると、疾患の本質を見落とす可能性があることが判った。すなわち、本疾患を生後 42 日の時点だけで対照動物と比べた場合、小脳皮質の面積はすべての層で対照例にくらべて小さいため、内顆粒層以外の小脳の大きさは経時的には成長しているにもかかわらず、小脳皮質の萎縮と診断する可能性がある。加えて、第 1 章での肉眼的外表観察および剖面観察では生後 42 日の対照および罹患ウサギの小脳で大きさおよび面積の差を認識することが出来なかったことから、もともと小さな動物の小脳の 2 割程の差を肉眼観察で確信することは困難であり、形態計測の有用性が再認識された。

本罹患ウサギでは形態学的に顆粒細胞のアポトーシスが特徴であり、生後 15 日では顕著に多く、42 日ではその数は劇的に減少した。内顆粒層におけるアポトーシス細胞は、正常でも少数ではあるが認められ、生後 5 日から 10 日の間に増加傾向を示す【24】。分子層が形成されている期間中、内顆粒層へ移動後の顆粒細胞のうちシナプス形成に至らなかった細胞はアポトーシスに陥ることにな

る【22,24】。このことより、生後15日の罹患ウサギで多くみられたアポトーシスは、プルキンエ細胞とシナプスを形成できなかつた顆粒細胞であると考えられる。

第2章の電子顕微鏡学的検査において、平行線維とプルキンエ細胞スパインとのシナプスの減少を確認したが、本章ではそのことを形態計測により数値として実証した。罹患ウサギのシナプス数は、生後15日ですでに対照ウサギの半分以下で、その数は生後42日になっても大きく増えることはなかつた。このことより大部分のシナプス形成異常は生後15日前後にすでに発現していることが示唆される。

ラットにおける生後の小脳皮質の発達では、顆粒細胞の移動は生後8日前後で始まり、20日前後で終わる【1】。平行線維シナプスの形成は生後約12日から30日の間で行われる【1-4】。マウスでは小脳の発達はラットよりも早い。顆粒細胞の移動は生後3日前後で始まり、14日前後で終了し、平行線維シナプスの形成は生後7日前後で始まり20日前後で終了する【19】。つまり、いずれの動物種でも平行線維シナプスの形成は、顆粒細胞の移動から数日遅れで行われることが判る。第1章で、本罹患ウサギの外顆粒層の厚さが生後15日から30日の間に僅か1~2層に減少することを示したが、これは過去のウサギの報告に一致する【22】。生後15日では、既にある程度の密度のある内顆粒層が形成されていることから、移動のピークは生後15日以前と考えられる。また過去の報告では、ウサギでは生後20日から30日の間に分子層全体に synaptophysin 陽性反応が広くみられるようになり、その時期にはシナプス形成は完了していることが示されている【23】。すなわち、ウサギにおけるシナプス形成のピークは顆粒細胞移動後の生後15日前後であり、生後42日にはシナプス形成は終了しているものと考えられる。本疾患動物の顆粒細胞のアポトーシスはシナプス形成不

全によるものであるため、シナプス形成のピーク時である生後 15 日にアポトーシスの数が多く、形成期が終了している 42 日にはその数が激減するものと考えられる。

グルタミンレセプター $\delta 2$ サブユニット欠乏ミュータントマウスの場合、プルキンエ細胞スパインのシナプス形成率はワイルドタイプでは全スパイン数の 98% から 99% であるのに対して、ミュータントマウスでは 55% から 60% と低い。一方、残りのスパインはシナプス形成が最も盛んである生後 2 週目から 3 週目の間、いずれの神経末端ともシナプスを形成しない【18】。本罹患ウサギでは対照ウサギと比べてシナプス数は 64% から 71% 減少していた。つまり、わずか 36% から 29% の平行線維がプルキンエ細胞とシナプスを形成し、残りはシナプス形成に至っていないことを示している。このようなシナプス形成不全の発生率は、ミュータントマウスやノックアウトマウスの様に、その疾患によってある程度一定である場合が多い【15, 18】。今回の比較に用いた動物は各ステージ、各グループ 1 例ずつであることから断定はできないが、すべての罹患ウサギの症状の進行が同程度であることを考えると、ウサギのアビオトロフィーにおけるシナプス形成不全も一定の発現率（64% から 71%）で起こるのかもしれない。

生後早期に発症する進行性の遺伝性小脳疾患は、生後の小脳が発達しながら同時に変性が起こるために、その解析は容易ではない。今回、発症早期と生存可能限界期との 2 ポイントでの形態計測により、発達と変性の全体像を把握することができた。すなわち、本罹患ウサギの病理発生機序は以下のように考えられる。出生後すみやかに小脳が成長を始め、生後 15 日までは外観上は正常に成長し、外顆粒層から内顆粒層への顆粒細胞の移動にも異常はみられないが、生後 15 日前後のシナプス形成時期に対照ウサギに比べて約 60% から 70% の平行線維シナプスがシナプス接合不全をきたす。シナプス接合ができなかった顆

粒細胞はアポトーシスを起こして消失し、そのために生後 42 日までは内顆粒層と分子層の発達が抑制される。シナプス形成がすでに終了している生後 42 日には、接合がなかった顆粒細胞はすでに消失しているためアポトーシス数も減少する。平行線維シナプスに関与しない他の神経細胞は通常どおり成長し、小脳全体の大きさは増加する。

このように形態計測データは、組織学的所見やその解釈の妥当性を数的に裏付けし、病変の経時的な推移を明らかにしてくれる。定量解析を病理組織学検査に加えることは、特に生後まもなく発症する疾患には有用であると考えられる。

小括

生後 15 日と 42 日のアビオトロフィー罹患ウサギと対照ウサギの小脳矢状断面の形態計測によって、罹患ウサギでも生後 15 日までは全体および各層の大きさは正常同様に発育していること、さらに生後 15 日から 42 日までの成長過程において、分子層および内顆粒層の発育は抑制されるが、組織学的に異常のない髄質の大きさは、対照ウサギと同様に発育してゆくことが判った明らかになった。また、アポトーシスに陥った顆粒細胞数がシナプス形成時期の生後 15 日に多く、シナプス形成終了時期の生後 42 日に少ないことから、顆粒細胞のアポトーシスがシナプス形成不全に起因していることが裏付けられた。また、本疾患のシナプス形成不全率は生後 15 日で 64%、生後 42 日で 71%であった。このように発達と萎縮が混在する早発性の神経疾患に対する複数時期での形態計測は、組織学的所見に客観性を持たせるのみならず、病理発生機序を証明するための手法として有用であることが示された。

総括

本研究において、ある特定のペアウサギを交配すると、生後まもなく運動失調症状を発症する F1 動物が生まれることを発見した。第 1 章では、その遺伝様式を確認するために数回の交配および戻し交配を行い、運動失調 F1 および N2 ウサギを作出し、この疾患が常染色体劣性遺伝により発現することが示唆された。また、HE 染色および免疫組織学的染色標本による光学顕微鏡学的検査を行い、この病変の形態学的特徴および進行様式について検索した。生後 15 日では顆粒細胞のアポトーシスとプルキンエ細胞樹状突起幹の幅の減少、生後 30・31 日では顆粒細胞密度の減少、プルキンエ細胞における樹状突起の密度の減少および髄質の軸索変性、生後 42 日では 30・31 日とほぼ同様な変化が認められた。本疾患は、早発性の常染色体劣性遺伝による進行性の小脳皮質変性症、いわゆる小脳皮質アビオトロフィーに相当するものと考えられた。本症例は重篤な臨床症状にも関わらず、病変の程度および進行は比較的緩やかであった。また、第 2 章では、生後 15 日および 25 日の罹患ウサギの小脳皮質について電子顕微鏡学的検討を行った。発症早期の生後 15 日から平行線維末端の異常、平行線維とプルキンエ細胞間のシナプス数の減少およびシナプス接合形態の異常が認められたことから、この病態の病理発生機序は平行線維シナプスの形成不全によるものと判断された。第 3 章では、画像解析装置を用いて、生後 15 日と 42 日の罹患ウサギと対照ウサギの小脳矢状断面の形態計測を行った。光学顕微鏡観察における形態計測によって 罹患ウサギでも生後 15 日までは全体および各層の大きさは正常ウサギ同様に発育していること、さらに生後 15 日から 42 日までの成長過程において、分子層および顆粒層の発育は抑制されるが、髄質の大きさは正常に発育してゆくことが判った。また、アポトーシスに陥った顆粒

細胞数がシナプス形成時期の生後 15 日に多く，シナプス形成終了時期の生後 42 日に少ないことにより，アポトーシスがシナプス形成不全に起因していることが裏付けられた。本疾患のシナプス形成不全率は 64%から 71%であった。このように発達と萎縮が混在する早発性の神経疾患に対する複数時期での形態計測は，組織学的所見に客観性を持たせるのみならず，病理発生機序を証明するための手法として有用であることが示された。

本ウサギの様に劇的な臨床症状にもかかわらず軽度の組織学的変化しか観察されない神経疾患では，シナプス形成不全がその病理発生機序の一因となっている可能性を考慮しなければならないと考える。

謝辞

本稿を終えるにあたり，本研究の遂行に際して終始御指導賜りました株式会社 LSI メディエンス創薬支援事業本部試験研究センター病理研究部 土谷稔元部長，帯広畜産大学基礎獣医学研究部門病態予防学分野 古林与志安 教授に深謝します。

本稿作成に際し，有益な御助言と御校閲を頂いた帯広畜産大学基礎獣医学研究部門病態予防学分野 古岡秀文 教授，岩手大学農学部共同獣医学科 御領政信 教授，東京農工大学農学部獣医学科獣医病理学研究室 渋谷淳 教授，岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科獣医病理学研究室 柳井徳磨 教授に深甚なる謝意を表します。株式会社 LSI メディエンス創薬支援事業本部試験研究センター病理研究部の皆様には，きれいな標本作製していただきましたこと，ならびに有益な御助言・御鞭撻をいただきましたことを感謝いたします。

参考文献

- 【1】 Altman, J. (1972). Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. I. The external germinal layer and the transitional molecular layer. *J. Comp. Neurol.* 145, 353~398.
- 【2】 Altman, J. (1972). Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of purkinje cells and of the molecular layer. *J. Comp. Neurol.* 145, 399~464.
- 【3】 Altman, J. (1972). Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. III. Maturation of the components of the granular layer. *J. Comp. Neurol.* 145, 465~514.
- 【4】 Altman, J. (1973). Experimental reorganization of the cerebellar cortex. IV. Parallel fiber reorientation following regeneration of the external germinal layer. *J. Comp. Neurol.* 149, 181~192.
- 【5】 Anderson, W. A. and Flumerfelt, B. A. (1986). Long-term effects of parallel fiber loss in the cerebellar cortex of the adult and weanling rat. *Brain Res.* 383, 245~261.
- 【6】 Barlow, R.M. (1981). Morphogenesis of cerebellar lesion in bovine familial convulsions and ataxia. *Vet. Pathol.* 18, 151~162.
- 【7】 Caddy, K. W. and Sindman, R. L. (1981). Purkinje cells and granule cells in the cerebellum of the Stumbler mutant mouse. *Brain Res.* 227, 221~236.
- 【8】 Chen, S., Hillman D. E. (1989). Regulation of granule cell number by a predetermined number of Purkinje cells in development. *Dev. Brain Res.* 45, 137~147.

- 【9】 Cummings, J.F. and de Lafunta, A. (1988). A study of cerebellar and cerebral cortical degeneration in Miniature Poodle pups with emphasis on the ultrastructure of Purkinje cell changes. *Acta. Neuropathol.* 75, 261~271.
- 【10】 De Lahunta, A. (1980). Diseases of the cerebellum. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 10, 91~101.
- 【11】 De Lahunta, A. (1990). Abiotrophy in domestic animals: a review. *Can. J. Vet. Res.* 54, 65~76.
- 【12】 Gandini, G., Botteron, C., Brini, E., Fatzer, R., Diana, A. and Jaggy, A. (2005). Cerebellar cortical degeneration in three English bulldogs: clinical and neuropathological findings. *J. Small Anim. Pract.* 46, 292~294.
- 【13】 Herrup, K. and Wilczynski, S. L. (1982). Cerebellar cell degeneration in the Leiner mutant mouse. *Neuroscience.* 7, 2185~2196.
- 【14】 Higgins, R. J., Lecouteur, R. A., Kornegay, J. N. and Coates, T. R. (1998). Late-onset progressive spinocerebellar degeneration in Brittany Spaniel dogs. *Acta Neuropathol.* 96, 97~101.
- 【15】 Hirai, H., Pang, Z., Bao, D., Miyazaki, T., Li, L., Miura, E., Parris, J., Rong, Y., Watanabe, M., Yuzaki, M. and Morgan, J. I. (2005). *Cbln1* is essential for synaptic integrity and plasticity in the cerebellum. *Nature Neurosci.* 8, 1534~1541.
- 【16】 Jaggy, A. and Vandeveld, M. (1988). Multisystem neuronal degeneration in Cocker Spaniels. *J. Vet. Int. Med.* 2, 117~120.
- 【17】 Kornegay, J. N. (1990). Ataxia of the head and limbs: cerebellar diseases in dogs and cats. *Prog. Vet. Neurol.* 1, 255~274.
- 【18】 Kurihara, H., Hashimoto, K., Kano, M., Takayama, C., Sakimura, K., Mishima, M., Inoue, Y. and Watanabe, M. (1997). Impaired parallel fiber→Purkinje cell

- synapse stabilization during cerebellar development of mutant mice lacking the glutamate receptor $\delta 2$ subunit. *J. Neurosci.* 17, 9613~9624.
- 【19】 Landis, D.M.D. and Sidman, R. L. (1978). Electron microscopic analysis of postnatal histogenesis in the cerebellar cortex of Staggerer mutant mice. *J. Comp. Neurol.* 179, 831~863.
- 【20】 Landis, S. C. (1973). Ultrastructural changes in the mitochondria of cerebellar Purkinje cells of Nervous mutant mice. *J. Cell Biol.* 57, 782~797.
- 【21】 Landis, S. C. and Mullen, R. J. (1978). The development and degeneration of Purkinje cells in pcd mutant mice. *J. Comp. Neurol.* 177, 125~143.
- 【22】 Lossi, L., Coli, A., Giannesi, E., Rita, M. and Marroni, P. (2002). Cell proliferation and apoptosis during histogenesis of the guinea pig and rabbit cerebellar cortex. *J. Anat. Embryol.* 107, 117~125.
- 【23】 Lossi, L., Ghidella, S., Marroni, P. and Merighi, A. (1995). The neurochemical maturation of the rabbit cerebellum. *J. Anat.* 187, 709~722.
- 【24】 Lossi, L., Mioletti, S. and Merighi, A. (2002). Synapse-independent and synapse-dependent apoptosis of cerebellar granule cells in postnatal rabbits occur at two subsequent but partly overlapping developmental stages. *Neuroscience.* 112, 509~523.
- 【25】 Michael, J., Tiemeyer, B. A., Harvey, S., Cork, L. C., Coyle, J. T. and Price, D. L. (1984). Synaptic neurochemical alteration associated with neuronal degeneration in an inherited cerebellar ataxia of Gordon Setters. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 43, 580~591.
- 【26】 Montgomery, D. L. and Storts, R. W. (1983). Hereditary striatonigral and cerebello-oligary degeneration of the Kerry Blue Terrier. *Vet. Pathol.* 20, 143~159.

- 【27】 Montgomery, D. L. and Storts, R. W. (1984). Hereditary striatonigral and cerebello-olivary degeneration of the Kerry Blue Terrier. Ultrastructural lesions in the caudate nucleus and cerebellar cortex. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 43, 263~275.
- 【28】 Mouser, P., Levy, M., Sojka, J. E. and Ramos-Vara, J. A. (2009). Cerebellar abiotrophy in an alpaca (*Lama pacos*). *Vet. Pathol.* 46, 1133~1137.
- 【29】 Mullen, R. J., Eicher, E. M. and Sidman, R. L. (1976). Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73, 208~212.
- 【30】 Nibe, K., Kita, C., Morozumi, M., Awamura, Y., Tamura, S., Okuno, S., Kobayashi, T. and Uchida, K. (2007). Clinicopathological features of canine neuroaxonal dystrophy and cerebellar cortical abiotrophy in Papillon and Papillon-related Dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 69(10), 1047~1052.
- 【31】 Nibe, K., Nakayama, H. and Uchida, K. (2009). Immunohistochemical features of dystrophic axons in Papillon dogs with neuroaxonal dystrophy. *Vet. Pathol.* 46, 474~483.
- 【32】 Olby, N., Blot, S., Thibaud, J. L., Phillips, J., O'Brien, D. P., Burr, J., Brown, T. and Breen, M. (2004). Cerebellar cortical degeneration in adult American Staffordshire Terriers. *J. Vet. Med.* 18, 201~208.
- 【33】 O'leary, J. L., Harris, A. B., Fox, R. R., Smith, J. M. and Tidwell, M. (1965). Ultrastructural lesions in rabbit hereditary ataxia. *Arch. Nuerol.* 13, 238~262.
- 【34】 O'leary, J. L., Sawin, P. B., Luse, S., Harris, A. B. and Erickson, L. S. (1962). Hereditary ataxia of rabbits. *Arch. Nuerol.* 6, 123~137.
- 【35】 Sandy, J. R., Slocombe, R. F., Mitten, R. W. and Jedwab, D. (2002). Cerebellar

- abiotrophy in a family of Border Collie dogs. *Vet. Pathol.* 39, 736~738.
- 【36】 Sawin, P. B., Anders, M. V. and Johnson, R. B. (1942). "Ataxia," a hereditary nervous disorder of the rabbit. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 28, 123~127.
- 【37】 Sotelo, C. (1975). Anatomical, physiological and biochemical studies of the cerebellum form mutant mice. Morphological study of cerebellar cortical neurons and circuits in the Weaver mouse. *Brain Res.* 94, 19~44.
- 【38】 Summers, B. A. (1995). Degenerative diseases of the central nervous system. *In: Veterinary Neuropathology.* pp. 300~347. Mosby-year Book Inc. St Louis, Baltimore, Boston Carlsbad, Chicago, London, Madrid, Naples, New York, Philadelphia, Sydney, Tokyo, Toronto.
- 【39】 Swisher, D. A. and Wilson, D. B. (1977). Cerebellar histogenesis in the lurcher (Lc) mutant mouse. *J. Comp. Neurol.* 173, 205~218.
- 【40】 Tiemeyer, M. J., Singer H. S., Troncoso, J. C., Cork, L. C., Coyle, J. T. and Price, D. L. (1984). Synaptic neurochemical alteration associated with neuronal degeneration in an inherited cerebellar ataxia of Gordon Setters. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 43, 580~591.
- 【41】 Vandeveld, M., Higgins, R. J. and Oevermann, A. (2012). Axonopathies with prominent axonal swelling. *In: Veterinary Neuropathology Essentials of Theory and Practice.* pp. 171~173. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester.
- 【42】 Willoughby, K. and Kelly, D. F. (2002). Hereditary cerebellar degeneration in three full sibling kittens. *Vet. Rec.* 151, 295~298.
- 【43】 Yasuba, M., Okinoto, K., Iida, M. and Itakura, C. (1988). Cerebellar cortical degeneration in Beagle dogs. *Vet. Pathol.* 25, 315~317.

要旨

胎子期の小脳発達に正常であるにもかかわらず、生後まもなく発症し、徐々に進行する遺伝性の変性疾患のことを獣医領域ではアビオトロフィーと総称している。小脳皮質アビオトロフィーもしくは類似の小脳皮質変性症はイヌで最も報告が多く、ネコや家畜など様々な動物で報告されている。本研究において、ある特定のペアウサギ（Wbl:JW, SPF）を交配すると、生後まもなく運動失調症状を発症する F1 ウサギが生まれることを見出した。それらの F1 ウサギは生後 10 日頃より起立不能がみられ、生後 25 日頃より運動失調症状および痙攣が激しくなり、哺乳や摂餌が困難となるために生後 42 日が生存限界であった。

第 1 章では、その疾患の遺伝様式を確認するために数回の交配および戻し交配を行った結果、本疾患が常染色体劣性遺伝であることが示唆された。さらに、生後 15 日、30・31 日、42 日の罹患ウサギおよび対照ウサギの小脳について組織学的ならびに免疫組織学的に病変の特徴および進行について検索した。生後 15 日では移動中および移動後の顆粒細胞のアポトーシスが分子層および内顆粒層で観察された。分子層では、プルキンエ細胞樹状突起幹の幅の減少がみられた。生後 30・31 日では内顆粒層における散在性のアポトーシス細胞と顆粒細胞密度の減少、プルキンエ細胞樹状突起の密度の減少および髄質の空胞化や軸索変性がみられた。生後 42 日では内顆粒層のアポトーシス細胞数は減少していたが、顆粒細胞密度の減少や髄質の軸索変性は生後 30・31 日とほぼ同様であった。本疾患は臨床症状の重篤さに比べ、病変の程度および進行は比較的緩徐であった。本疾患には、早発性の常染色体劣性遺伝による進行性の小脳皮質変性症、いわゆる小脳皮質アビオトロフィーの診断が当てはまるものと判断された。

第 2 章では、本疾患の発生機序を調べるために生後 15 日および 25 日の罹患

ウサギおよび対照ウサギの電子顕微鏡学的検査を行った。発症早期の生後 15 日より平行線維とプルキンエ細胞スパイン間のシナプス（平行線維シナプス）の減少，後シナプス神経が前シナプス末端内に陥入する異常なシナプス接合形態および平行線維末端の膨化が認められた。生後 25 日では，平行線維の減少と平行線維シナプスの減少が観察された。加えて，シナプス形成不全による神経細胞への二次的影響，すなわちプルキンエ細胞の中心性色質融解，軸索変性も観察された。以上の結果から本疾患の病理発生機序は，発症早期より確認された平行線維シナプスの形成不全によるものと判断された。

第 3 章では，生後 15 日と 42 日の罹患ウサギと対照ウサギの小脳縦断面を使用して，画像解析装置を用いた小脳の全体および各層の面積，顆粒細胞数およびアポトーシス数，シナプス数の形態計測を行い，病変の推移を定量的に解析した。全体および各層の形態計測によって，罹患ウサギでも生後 15 日までは全体および各層の大きさは正常に発育していること，生後 15 日から 42 日の間も組織学的に異常が認められない髄質は対照ウサギ同様に発育していることが確認された。一方，罹患ウサギの生後 15 日から 42 日までの分子層および顆粒層の発育は抑制されていた。顆粒細胞の数は生後 15 日では対照ウサギと差はなかったが，対照ウサギでは 15 日から 42 日の間に顆粒細胞数は 160%に増加したのに対し，罹患ウサギでは 87%に減少していた。内顆粒層におけるアポトーシス細胞は，対照ウサギでは生後 15 日と 42 日とも少数であったのに対し，罹患ウサギのアポトーシス数はシナプス形成時期の生後 15 日で顕著に多く対照ウサギの 62 倍であり，シナプス形成終了時期の生後 42 日では 8 倍に激減した。罹患ウサギの平行線維シナプス数は，生後 15 日ですでに対照ウサギの 36%であり，生後 42 日でも 29%であった。この形態計測結果が表す罹患ウサギにおける分子層の低い成長率は，光顕および電顕観察でみられたプルキンエ細胞樹状

突起枝の減少や平行線維の減少を裏付けるものであり、アポトーシス数の生後15日から42日の推移も、顆粒細胞のアポトーシスの原因が、平行線維シナプスの形成不全に起因していることを裏付けるものであった。このように発達と萎縮が混在する早発性の神経疾患に対する複数時期での形態計測は、組織学的所見に客観性を持たせるのみならず、病理発生機序を明らかにするための手法として有用であることが示された。

今回検索した罹患ウサギの病理発生は、生後間もないシナプス形成時期における平行線維シナプスの形成不全であった。本罹患ウサギの様に重篤な臨床症状ににもかかわらず軽度の組織学的変化しか観察されない小脳変性疾患では、シナプス形成不全がその病理発生機序の一因である可能性を考慮すべきであると考えられる。

Abstract

Cerebellar cortical abiotrophy in veterinary medicine is defined as hereditary, early-onset, progressive cerebellar disease occurring postnatally and covers degenerative diseases of the cerebellar cortex, although fetal development is normal. Cerebellar cortical abiotrophy and other degenerative cortical diseases have been reported to occur most frequently in dogs, with additional reports in cats and some other domestic animals.

In this study, a specific pair of rabbits (Wbl:JW, SPF) gave birth to a set of littermates (F1) with symptoms of early-onset ataxia. The affected F1 rabbits showed dysstasia at postnatal day 10, and ataxia and opisthotonus from postnatal day 25. The maximum survival was postnatal day 42 due to an inability to suckle or eat.

In chapter 1, to confirm the hereditary form and reproducibility, the same parents of the offspring were mated a few times, and a subclinical F1 female was backcrossed with the male parent. These results suggest that this disease was an autosomal recessive inheritance. Furthermore, progressive changes of the affected and control rabbits were examined at postnatal day 15, 30-31 and day 42 by light microscopic and immunohistochemical examination. In the affected rabbit at postnatal day 15, apoptotic granular cells before and after migration completion were observed in the molecular layer and internal granular layer. The dendritic arbors of Purkinje cells in the affected rabbit were slightly thinner than those of the normal rabbit. At postnatal day 30-31, the affected rabbits showed apoptotic cells in the internal granular layer and a slight reduction in the number of Purkinje cell dendrites as well as granular cells with spheroid and vacuolation in the medulla. In the affected rabbits at postnatal day 42,

apoptotic cells in the internal granular layer almost disappeared; however, other lesions were equivalent at postnatal day 30-31. These lesions were relatively mild despite the clinical signs being severe. As cerebellar cortical abiotrophy is defined as a hereditary progressive disease causing abnormalities in cerebellar cortical nerve cells soon after birth, the present cases appears to represent a form of cerebellar cortical abiotrophy in rabbits.

In chapter 2, the cerebellum cortex of the affected and control rabbits were analyzed by electron microscopic examination at postnatal day 15 and 25 to determine the pathogenesis of this disease. At postnatal day 15 as the early stage of this disease, the reduced number of synaptic junction between parallel fibers and Purkinje cell spines were detected. Additionally, degeneration (swelling) of parallel fiber terminals, abnormal junction (invaginated junction) of the parallel fiber-Purkinje cell synapses and irregular orientation of the Purkinje dendritic arbor in the molecular layer were observed at postnatal day 15. The parallel fiber-Purkinje cell synapses were still reduced at postnatal day 25, and parallel fibers were also reduced. At postnatal day 25, secondary changes, such as central chromatolysis of Purkinje cells, and swollen axons, were observed. The electron microscopic findings at the early stage suggest that the pathogenesis of the present cerebellar lesion was caused by failed synaptogenesis during postnatal cerebellar development.

In chapter3, longitudinal changes in the development and atrophy of the cerebellum of rabbits with hereditary abiotrophy after birth were morphometrically analyzed at postnatal day 15 and 42 using image analysis. Sagittal section size of the cerebellum including each layer, number of granular and apoptotic cells, and number of parallel fiber-Purkinje cell junctions were compared between the affected and control rabbits. A

comparison of the size and each layer of the cerebellum revealed that the development in terms of size was normal during postnatal day 15, and the cerebellum developed in medulla without histopathological abnormality from postnatal day 15 to 42, even in the affected rabbits. The growth rate of the molecular and granular layers was repressed from postnatal day 15 to 42 in the affected rabbits. At postnatal day 15, the number of granular cells was almost equivalent between the affected and control rabbits; however, it was increased in the control rabbits (160%) and decreased in the affected rabbits (87%). The number of apoptotic cells was very low at postnatal day 15 and 42 in the control rabbits; however, it was remarkably high at postnatal day 15 (62-fold) and then decreased sharply at day 42 (8-fold) in the affected rabbits as compared to the control rabbits. The number of apoptotic cells in the affected rabbits was reduced remarkably from the peak of synaptogenesis at postnatal day 15 to the terminal synaptogenesis at postnatal day 42. In the affected rabbits, the number of junctions was 64% lower at postnatal day 15 and 71% lower at postnatal day 42 than those in the control rabbits. A decreased number of parallel fiber and Purkinje cell dendrites were supported by low growth rate of molecular layer in the morphometric analysis. The change in the number of apoptotic cells from postnatal day 15 to 42 supported that apoptosis of the granular cells was not due to the granular cell themselves, but to the failure of synaptogenesis between parallel fiber-Purkinje cell spines. Morphometric analysis revealed detailed changes in development and atrophy, and proved the validity of histological findings and their interpretation on postnatal nervous disease occurring soon after birth.

The pathogenesis of this disease was found to be failed synaptogenesis. This suggests that the pathogenesis of cases with mild changes in morphologically but with severe ataxia as those seen in the affected rabbit described here may also be associated with

failed synaptogenesis.

表1 固定方法および検査方法

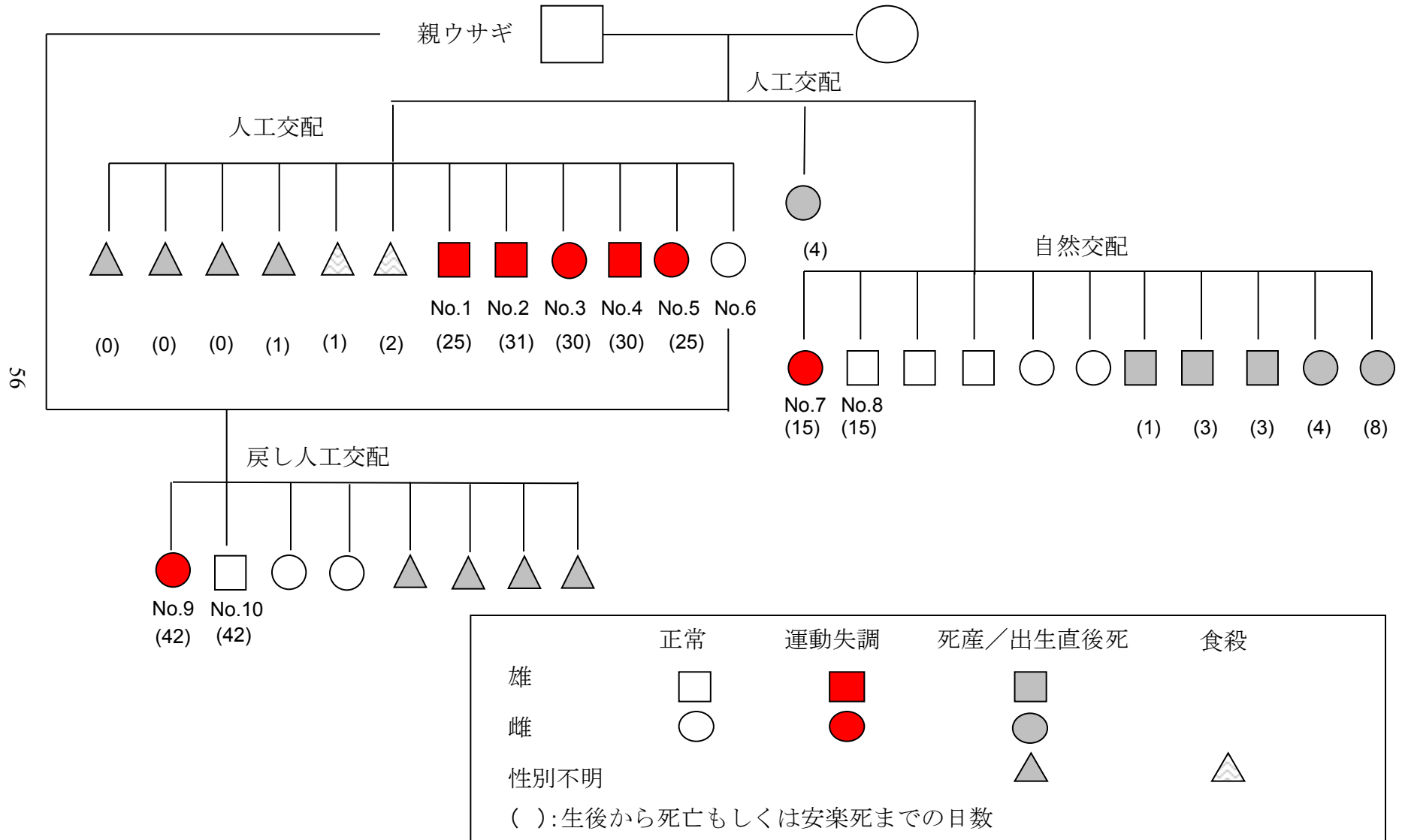
生後日齢	動物番号	体重	灌流固定	浸漬固定	染色方法	免疫染色抗体	電顕検査
15	7	NE	2.5%グルタルアルデヒド 500 ml 30分	2.5%グルタルアルデヒド	HE染色 TUNEL法	Calbindin	○
15	8 (対照ウサギ)	NE					○
25	1	267	4%パラホルムアルデヒド 500 ml 30分	10%リン酸緩衝ホルマリン液	NE	NE	○
25	5	126			NE	NE	○
30	3	220			HE染色 TUNEL法 Klüver-Barrera染色 Bodian染色 Holzer染色	Calbindin CNPase MBP Synaptophysin	NE
30	4	331					NE
31	2	354					NE
31	対照ウサギ	556					○
42	9	NE			2.5%グルタルアルデヒド 500 ml 30分	2.5%グルタルアルデヒド	HE染色
42	10 (対照ウサギ)	NE	NE	○			
生存	6	NE	NE	NE	NE	NE	NE

NE:検査せず

表2 免疫染色方法

抗体名		2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase)	Myelin basic protein (MBP)	Synaptophysin	Calbindin
		mouse	mouse	mouse	mouse
		Anti-Human brain CNPase	Anti-Human MBP	from bovine brain	from chicken gut
		mono	mono	mono	mono
		Chemicon International, Inc. MAB326	Abcom as24567	Progen Biotechnik GmbH No.61012	DBS Mob295
標本	パラフィン切片				
抗原賦活		Immunosaver, Nissin EM Corporation 95°C, 30分	Immunosaver, Nissin EM Corporation 95°C, 30分	Immunosaver, Nissin EM Corporation 95°C, 30分	Immunosaver, Nissin EM Corporation 95°C, 30分
内因性ペロキシダーゼ	3% H_2O_2 , 5分				
Protein Block	時間	5分			
一次抗体	希釈率	400倍	10倍	50倍	100倍
	温度	室温	室温	室温	4°C
	時間	1時間	1時間	1時間	一晚
二次抗体	抗体名	Dako Envison Kit Anti-mouse, Labelled polymer-HPR	Dako Envison Kit Anti-mouse, Labelled polymer-HPR	Dako Envison Kit Anti-mouse, Labelled polymer-HPR	Dako Envison Kit Anti-mouse, Labelled polymer-HPR
		Dako	Dako	Dako	Dako
		K4000	K4000	K4000	K4000
	希釈率	Ready-to-use	Ready-to-use	Ready-to-use	Ready-to-use
	温度	室温	室温	室温	室温
	時間	30分	30分	30分	30分
DAB発色	発色時間	4.5分	12分	10分	2分
ヘマトキシリン3G	時間	3秒	3秒	3秒	3秒

図1 運動失調発症動物の系統図



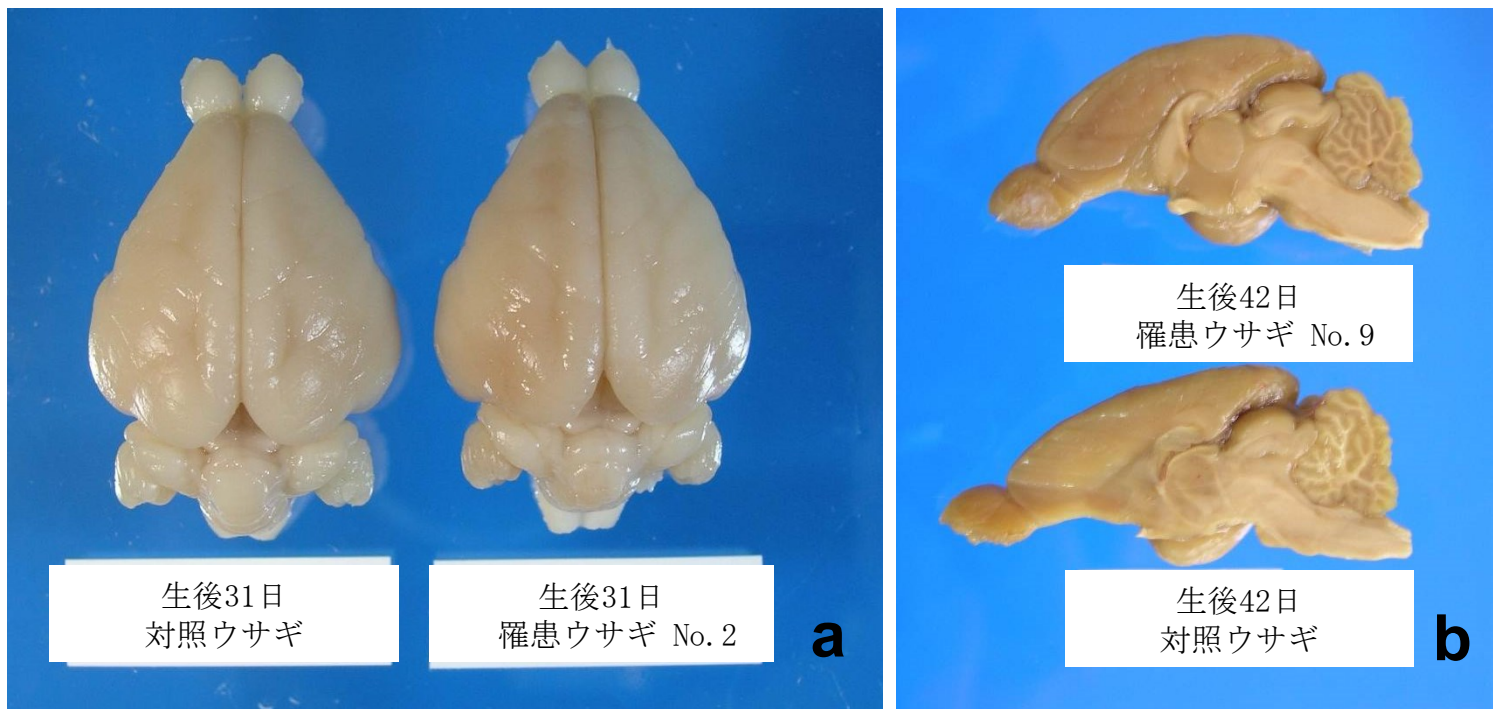


図2 脳，肉眼写真，(a) 生後31日 外観，(b) 生後42日 矢状断面。肉眼的観察では，小脳の大きさや構造に顕著な違いを確認することはできない。

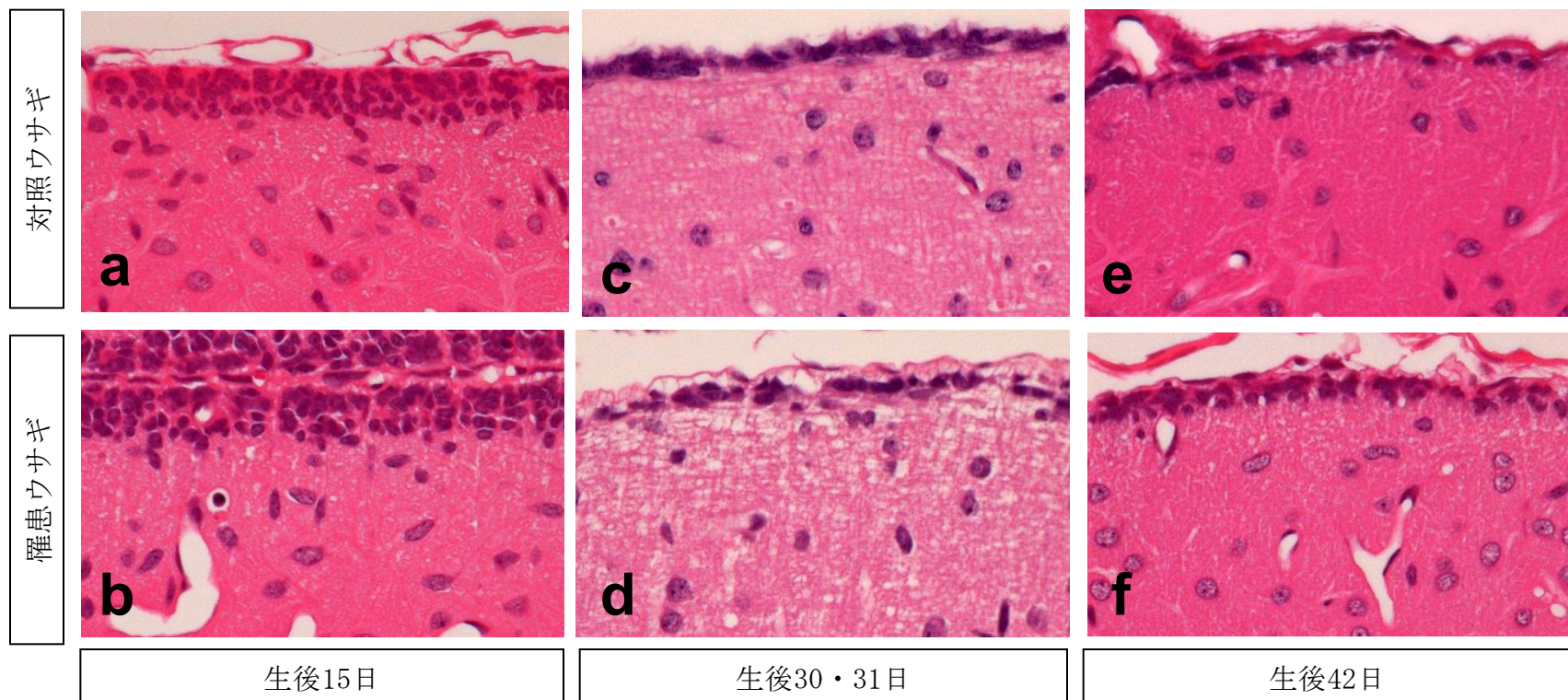


図3 小脳外顆粒層および分子層，HE染色，(a) 生後15日，対照ウサギ，矢状断面，(b) 生後15日，罹患ウサギ No.7，矢状断面，(c) 生後31日，対照ウサギ，前額断面，(d) 生後30日，罹患ウサギ No.3，前額断面，(e) 生後42日，対照ウサギ，矢状断面，(f) 生後42日，罹患ウサギ No.9，矢状断面。生後15日では，外顆粒層は上下2層ずつの4層ほどの円形から楕円形細胞から構成される。生後30日より外顆粒層は1層もしくは2層の扁平な細胞より構成される。罹患ウサギと対照ウサギで差は認められない。

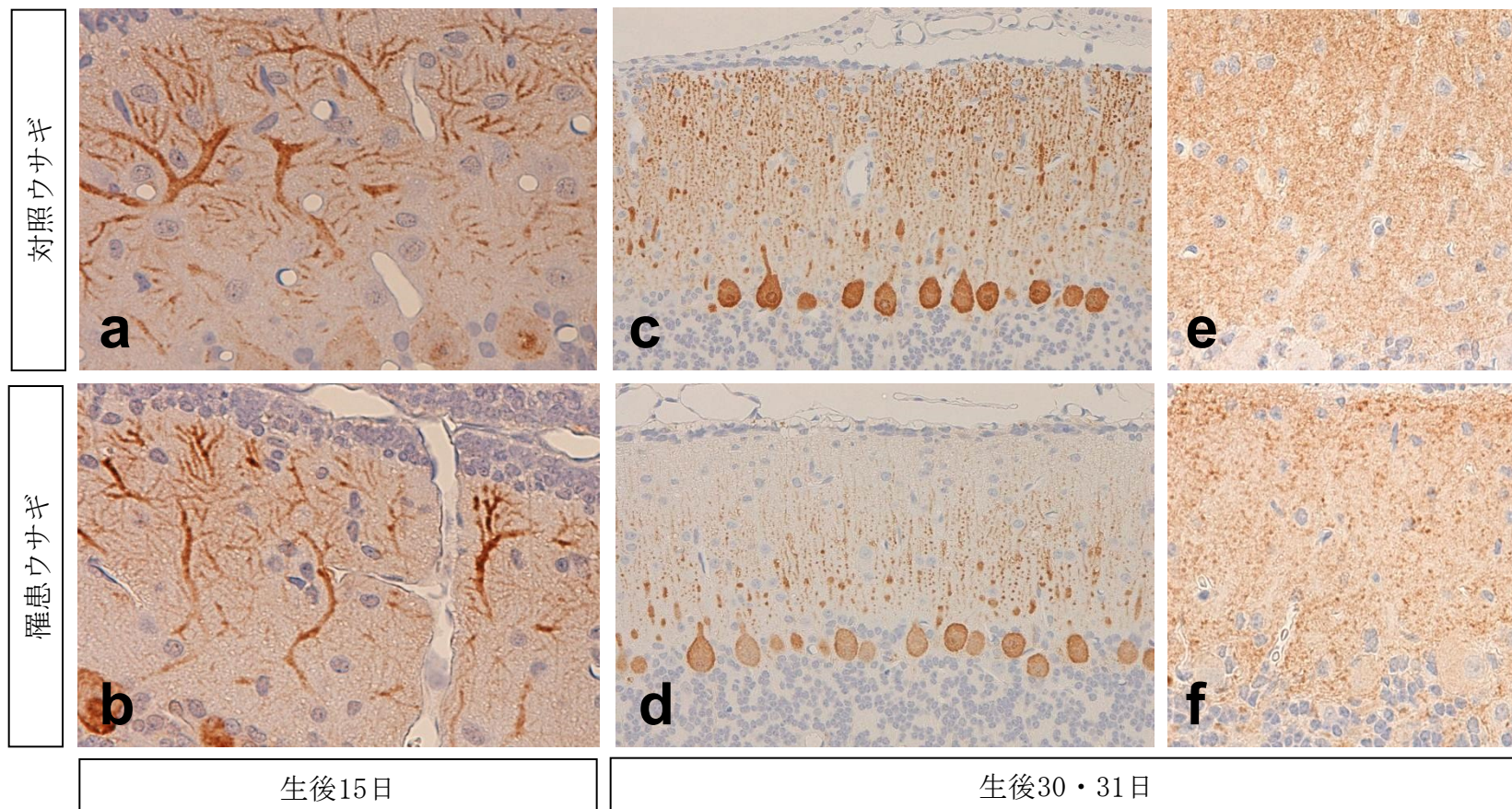


図4 小脳分子層, (a,b,c,d) calbindin染色, (e,f) synaptophysin染色, (a) 生後15日, 対照ウサギ, 矢状断面, (b) 生後15日, 罹患ウサギ No.7, 矢状断面, (c) 生後31日, 対照ウサギ, 前額断面, (d) 生後30日, 罹患ウサギ No.3, 前額断面, (e) 生後31日, 対照ウサギ, 前額断面, (f) 生後31日, 罹患ウサギ No.2, 前額断面。生後15日の罹患ウサギでは樹状突起幹の幅の減少が見られる。生後30・31日の罹患ウサギでは樹状突起のcalbindin陽性反応およびsynaptophysin陽性反応が少ない。

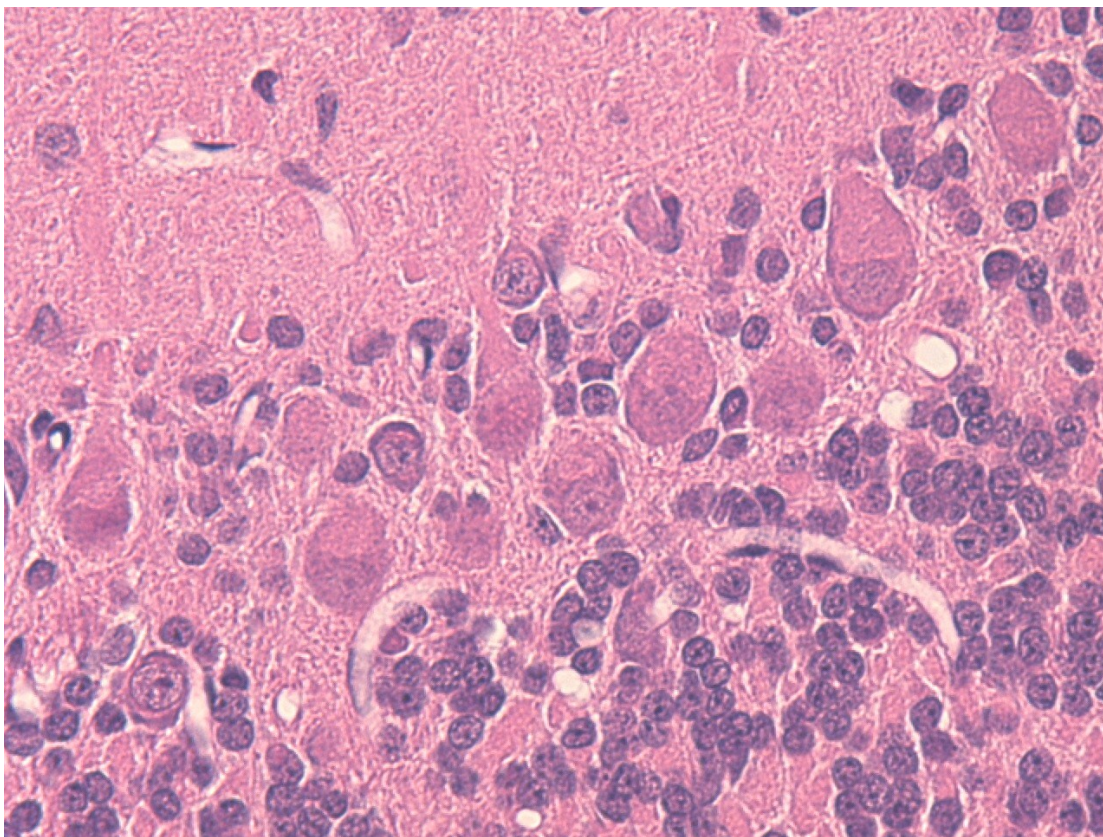


図5 小脳プルキンエ細胞層，生後31日，罹患ウサギ No.2，HE染色。プルキンエ細胞の胞体内に淡好酸性の球状領域が認められる。

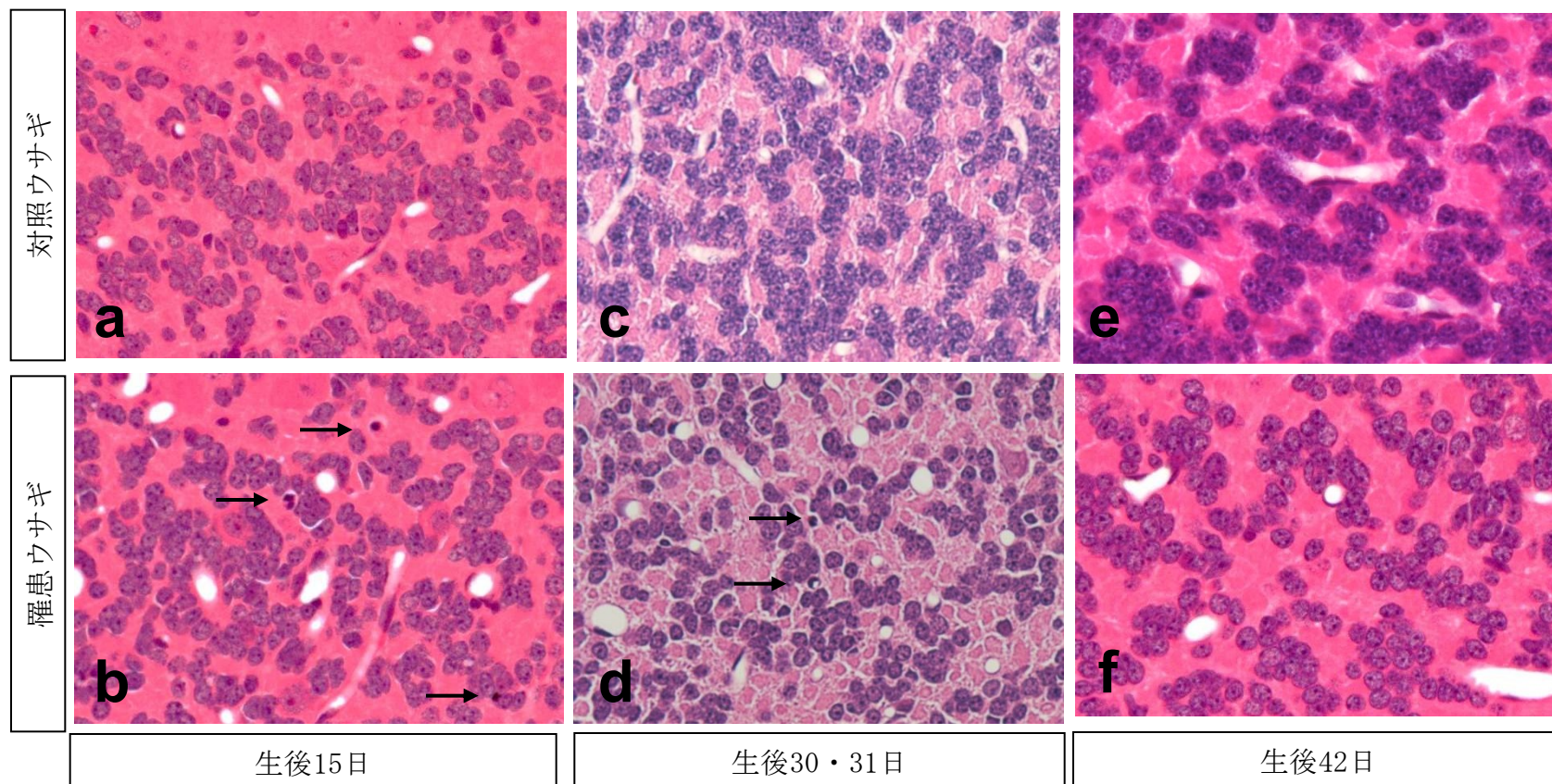


図6 小脳内顆粒層，HE染色，(a)生後15日，対照ウサギ，矢状断面，(b)生後15日，罹患ウサギ No.7，矢状断面，(c)生後31日，対照ウサギ，前額断面，(d)生後30日，罹患ウサギ No.4，前額断面，(e)生後42日，対照ウサギ，矢状断面，(f)生後42日，罹患ウサギ No.9，矢状断面。生後15日の罹患ウサギでは，核濃縮を起こした顆粒細胞（矢印）が見られる。生後30日でも核濃縮は見られ，さらに顆粒細胞密度のわずかな減少が観察される。生後42日の罹患ウサギは生後30日とほぼ同様に顆粒細胞密度の減少がみられるが，核濃縮像は少ない。

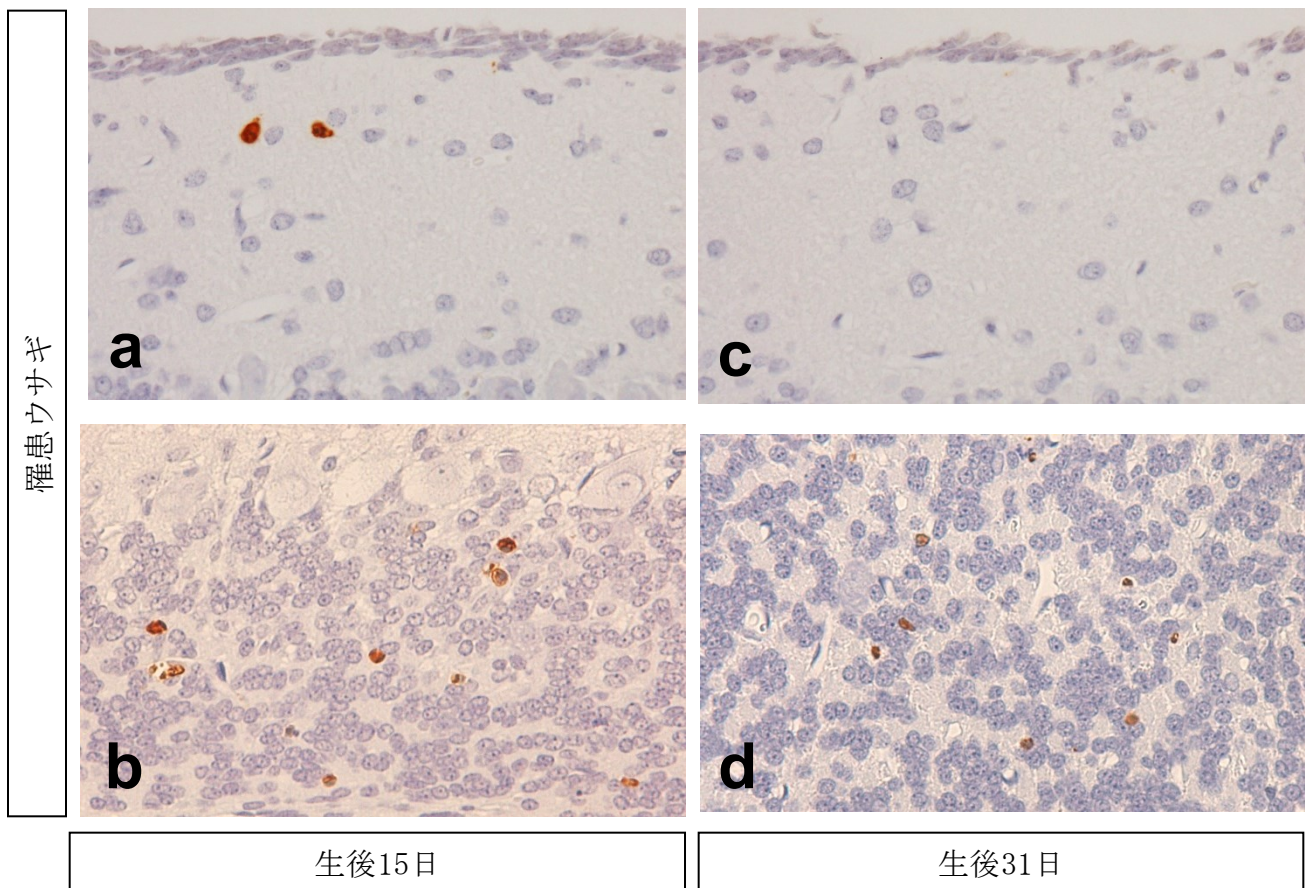
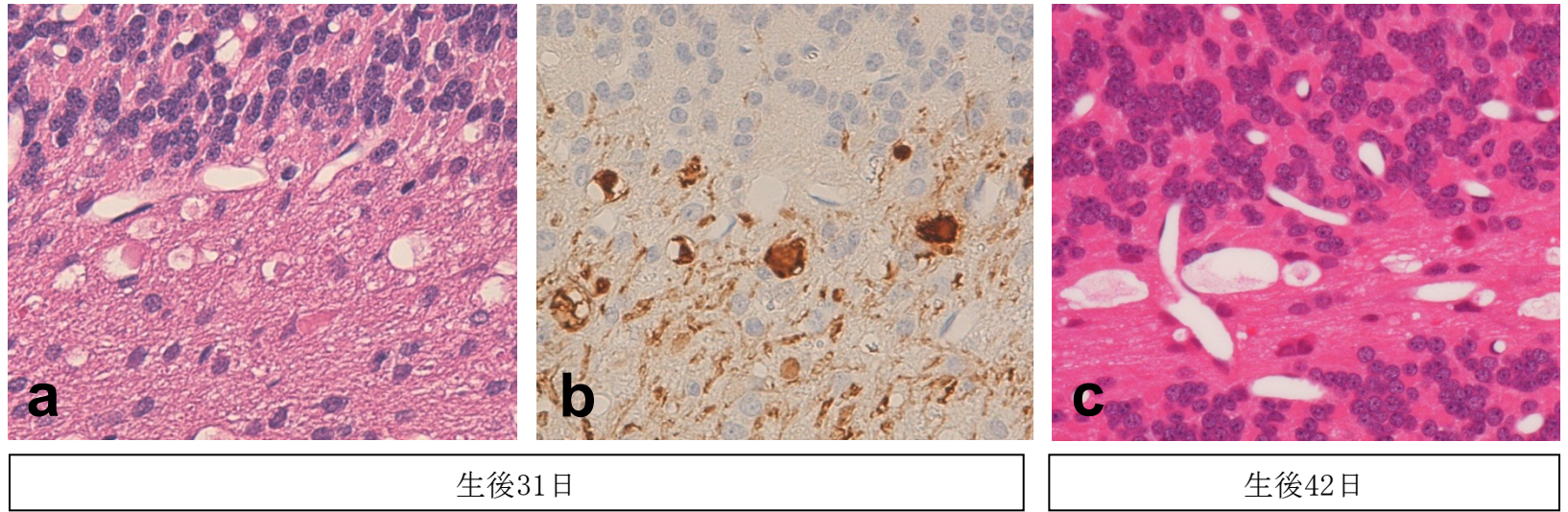


図7 小脳分子層および内顆粒層，TUNEL染色，(a,b) 生後15日，罹患ウサギ No.7，(c,d) 生後31日，罹患ウサギ No.2。生後15日では分子層を移動中の顆粒細胞にTUNEL陽性細胞が少数認められるが (a)，生後31日ではほとんどみられない (c)。内顆粒層では生後15日，31日ともにTUNEL陽性細胞が散見される (b,d)。



生後31日

生後42日

図8 小脳髄質，(a,c) HE染色，(b) Calbindin染色，(a,b) 生後31日，罹患ウサギ No.2，(c) 生後42日，罹患ウサギ No.9。顆粒層に近接する髄質において，好酸性物質を含む空胞が認められる (a,c)。好酸性物質はcalbindin染色陽性である (b)。

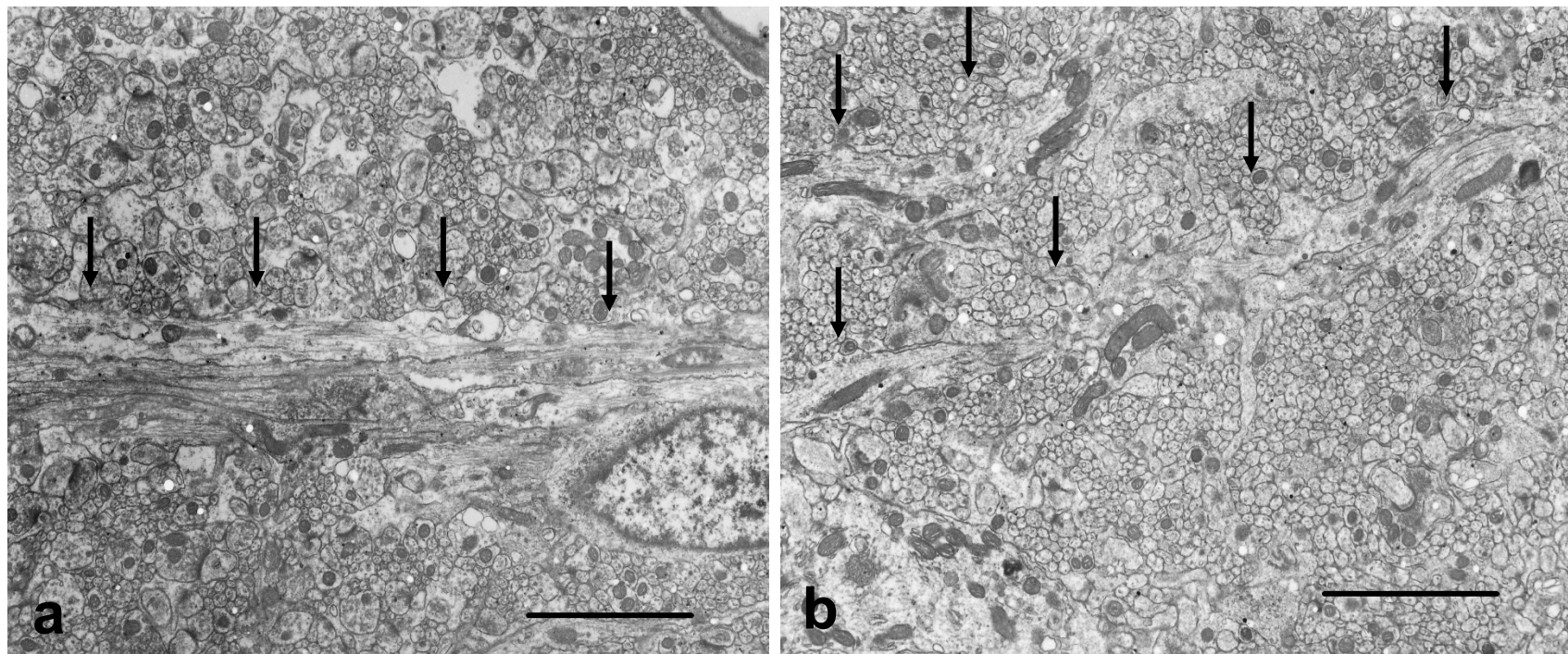


図9 プルキンエ細胞樹状突起，超微形態像，Bar = 4 μm ，(a) 生後15日，対照ウサギ，(b) 生後15日，罹患ウサギ No.7。罹患ウサギの樹状突起幹の幅が不均一で，蛇行している。矢印は樹状突起の走行を示す。

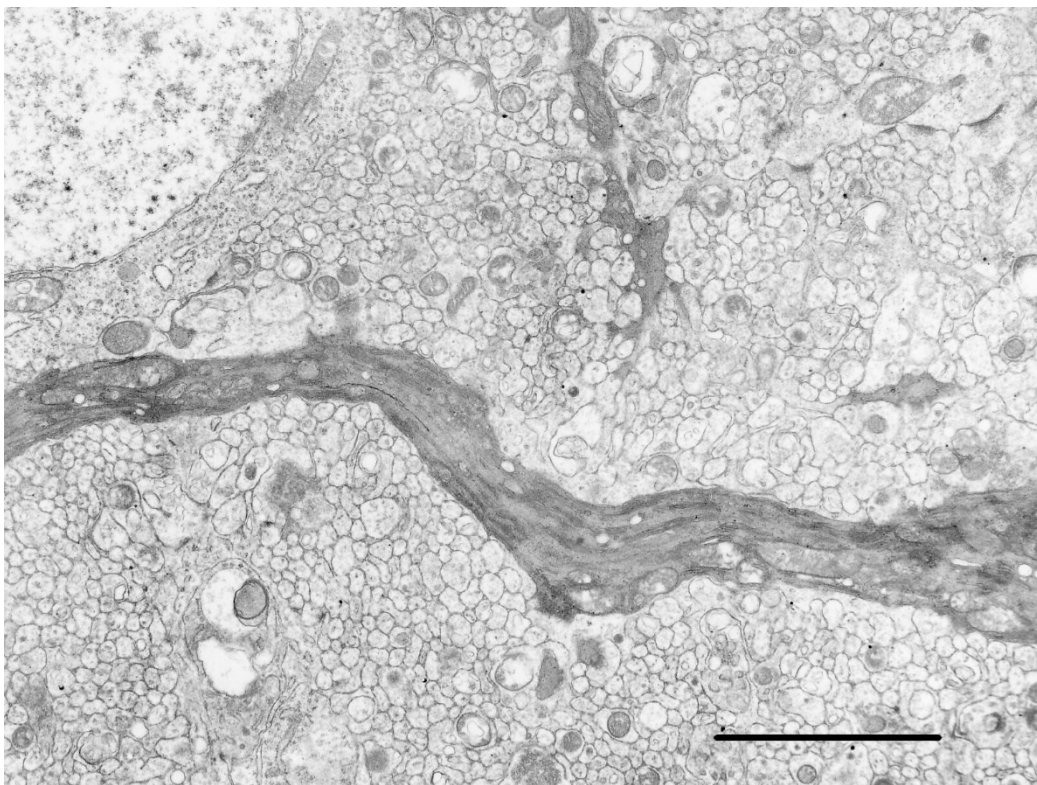


図 10 プルキンエ細胞樹状突起，超微形態像，Bar = 4 μm ，生後15日，罹患ウサギ No.7。走行が不整で湾曲している樹状突起が観察される。

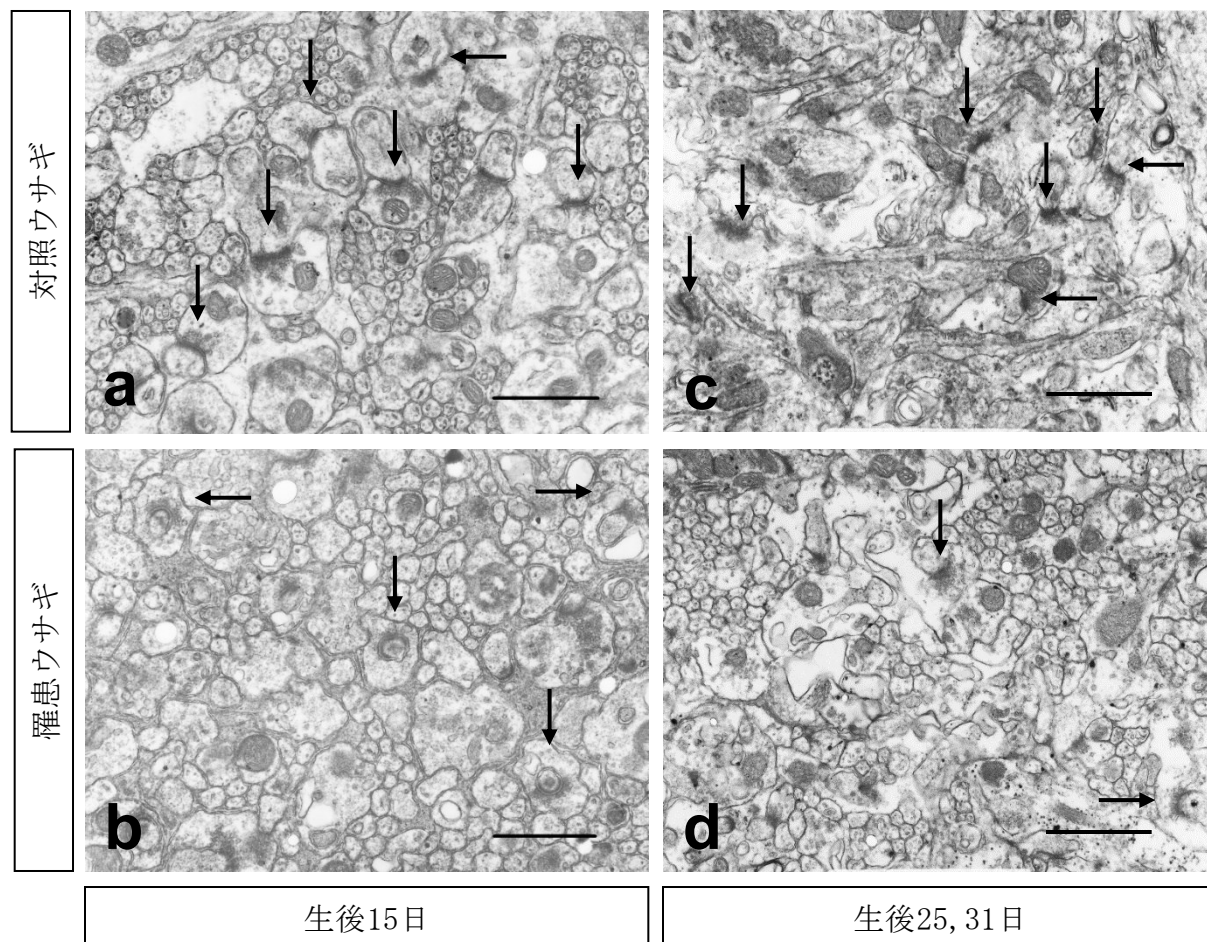


図 11 小脳分子層，超微形態像，Bar = 1 μ m，(a) 生後15日，対照ウサギ，(b) 生後15日，罹患ウサギ No.7，(c) 生後31日，対照ウサギ，(d) 生後25日，罹患ウサギ No.5。生後15日および生後25日の罹患ウサギで，平行線維末端とプルキンエ細胞スパイン間のシナプス（矢印）の減少が認められる。

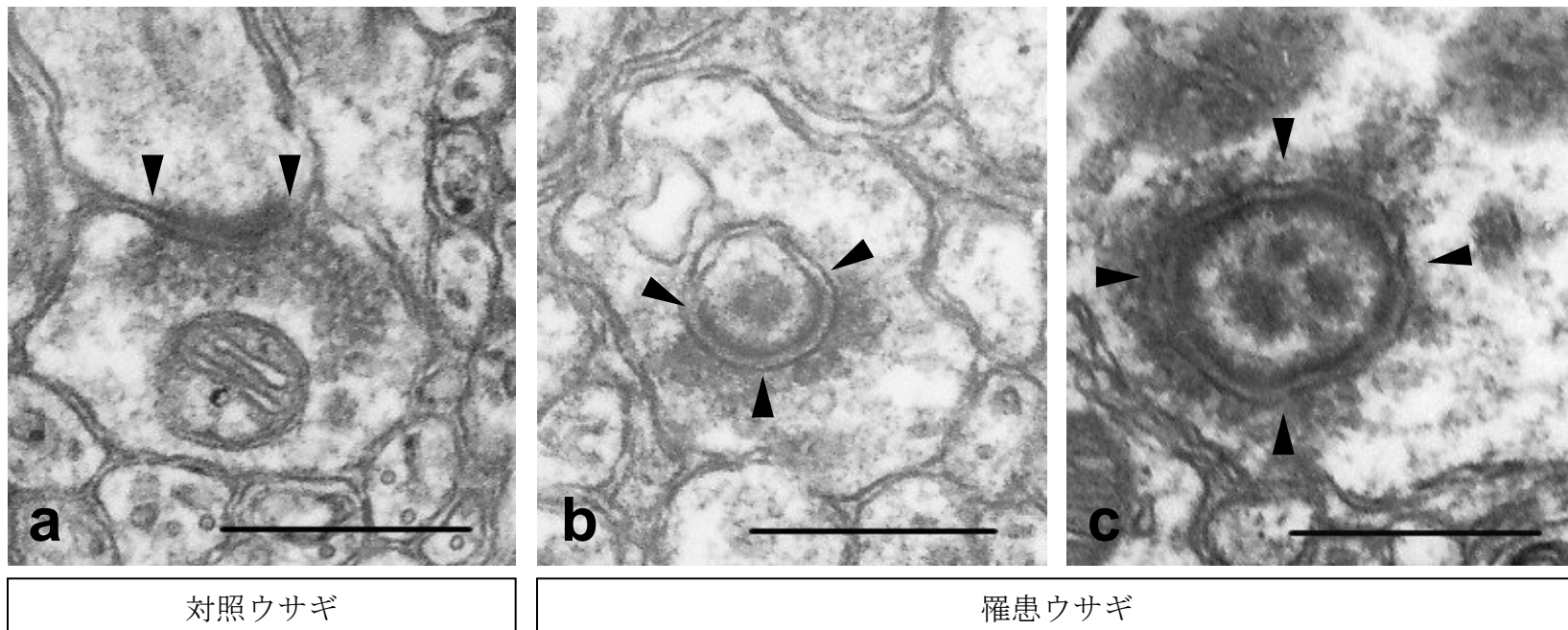


図12 プルキンエ細胞スパインと平行線維間シナプス，超微形態像，Bar = 0.5 μm ，(a) 生後15日，対照ウサギ，(b,c) 生後15日，罹患ウサギ No.7。罹患ウサギでは後シナプススパインが前シナプス平行線維末端内に陥入している(b,c)。シナプス接合面（矢頭）の形態は，対照ウサギでは平坦もしくはゆるやかな弓状の接合面であるが(a)，罹患ウサギでは半円状(b)もしくは円形(c)の接合面の形態を示す異常なシナプス結合が認められる。

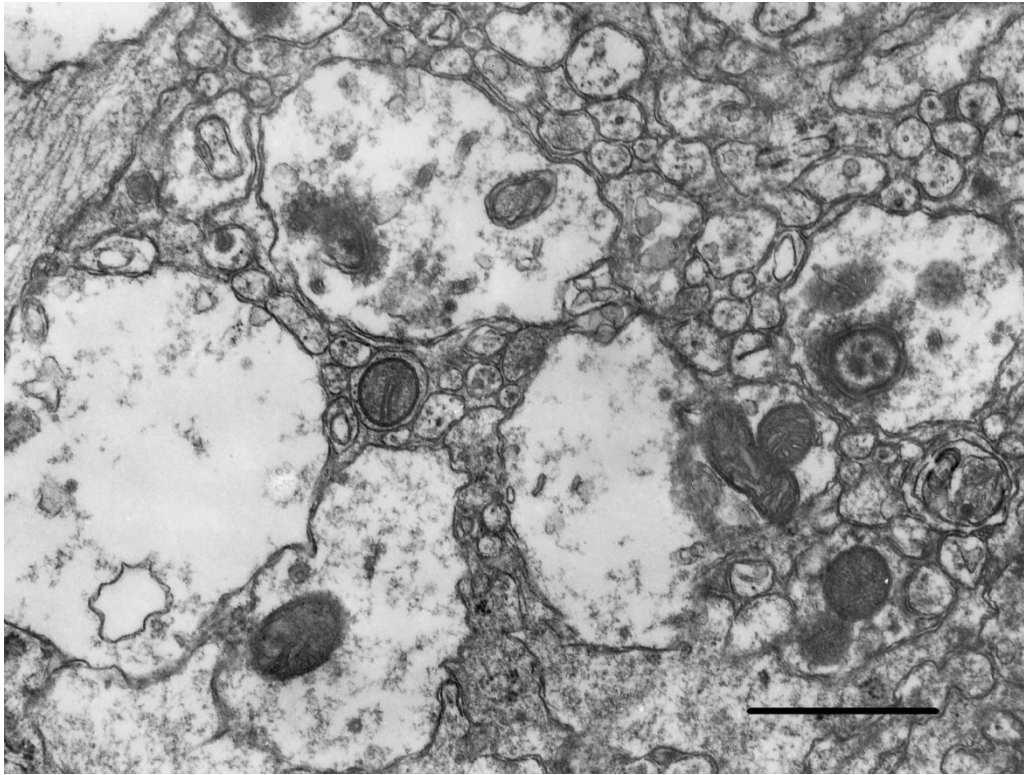


図 13 平行線維末端，超微形態像，Bar = 1 μ m，生後15日，罹患ウサギ No.7。平行線維シナプス末端に著しい膨化が見られる。

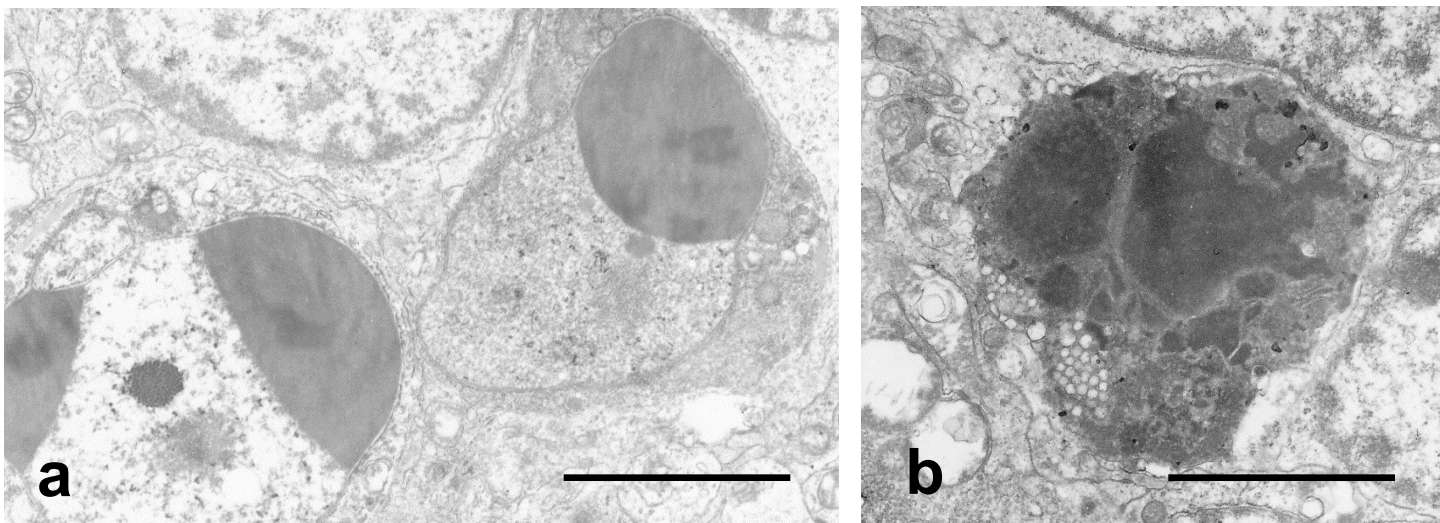


図 14 顆粒細胞，超微形態像，Bar = 6.4 μm ，(a,b) 生後15日，罹患ウサギ No.7。核クロマチンが凝集した細胞が認められる。

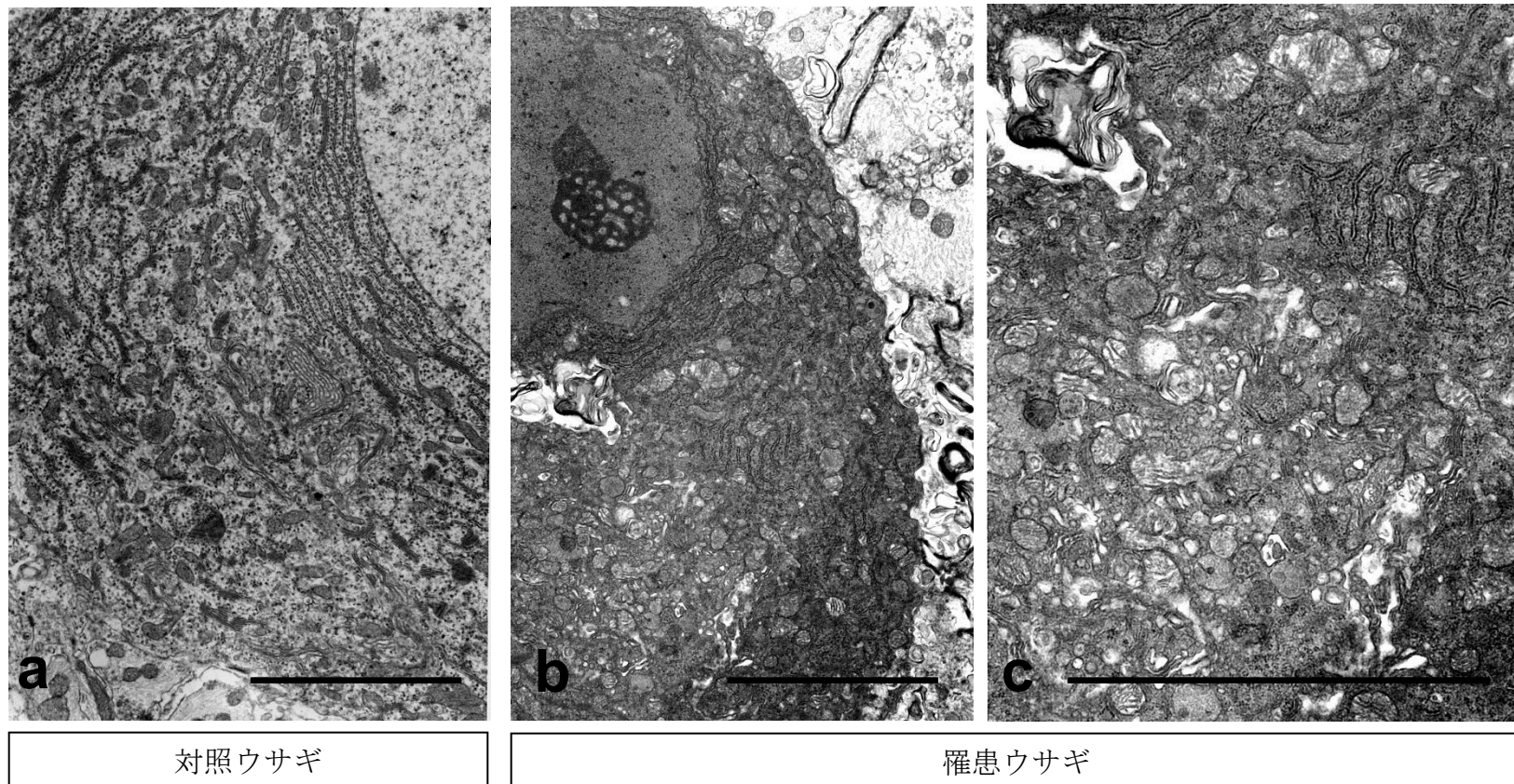


図15 プルキンエ細胞，超微形態像，Bar = 4 μ m，(a) 生後31日，対照ウサギ，(b,c) 生後25日，罹患ウサギ No.5。罹患ウサギのプルキンエ細胞胞体内に淡明な領域が認められる (b)。拡大像 (c) では，ミトコンドリアの増加，粗面小胞体の消失とゴルジ装置の拡張がみられる。

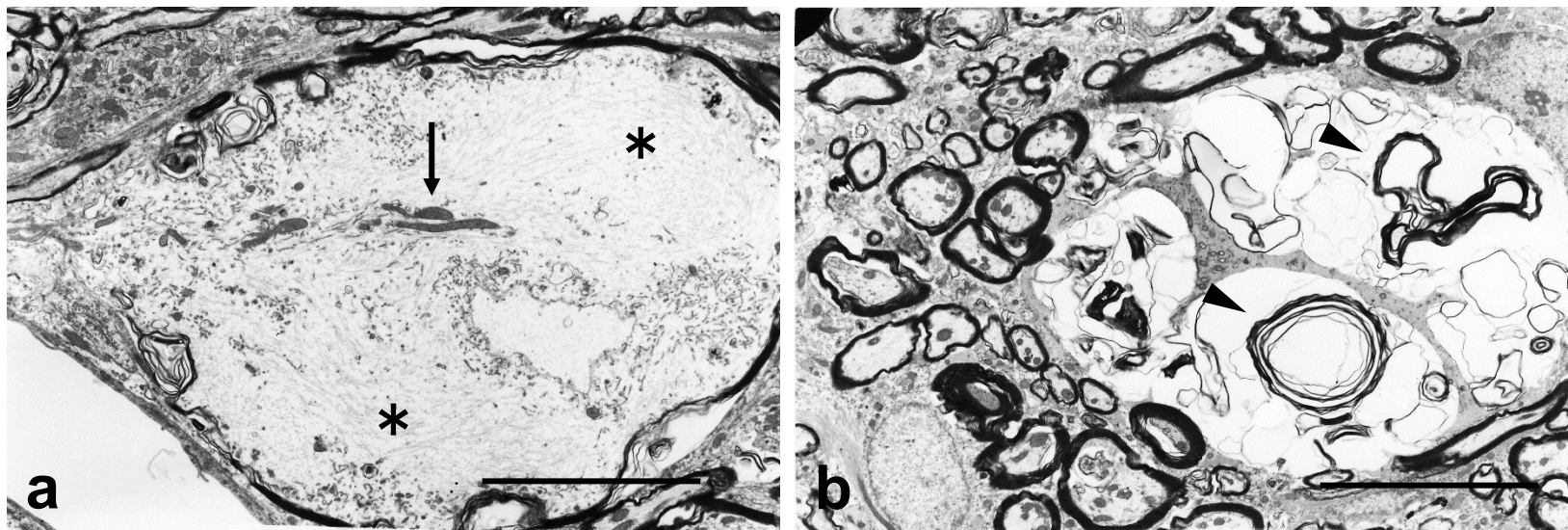
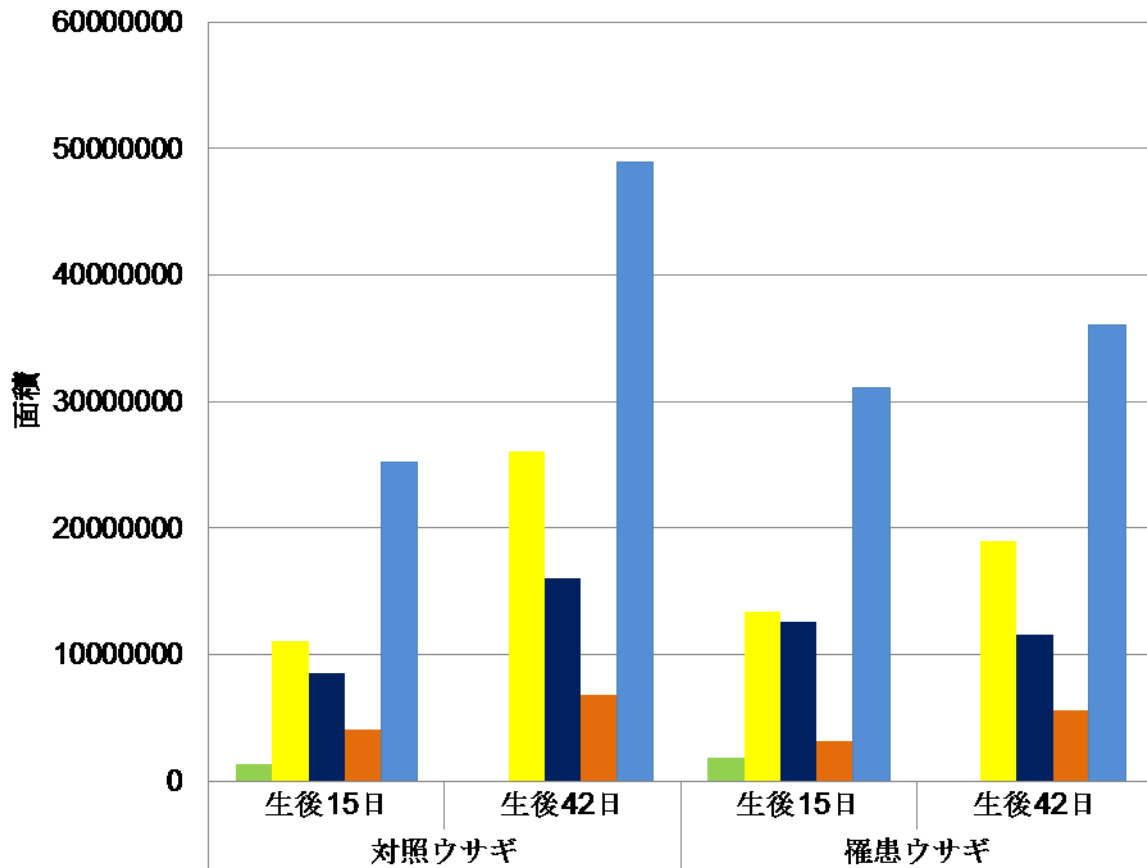


図 16 小脳髄質，超微形態像，Bar = 2.4 μm ，(a,b) 生後25日，罹患ウサギ No.5。(a) 神経細線維 (*) やミトコンドリア (矢印) を含む膨化した軸索が認められる。(b) 空胞内にミエリン様膜様物質 (矢頭) が認められる。



■外顆粒層	1403407.4	0	1877202.3	0
■分子層	11073871	26109910	13406956	18949280
■内顆粒層	8583346	16002265	12643062	11586709
■髄質	4111530.3	6815653	3169792	5565045.5
■総合面積	25172154.7	48927828	31097012.3	36101034.5

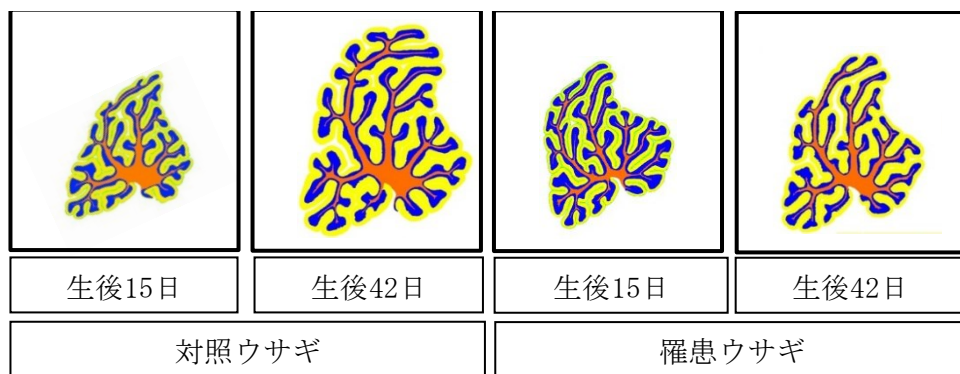


図17 小脳縦断面の面積 (μm^2)

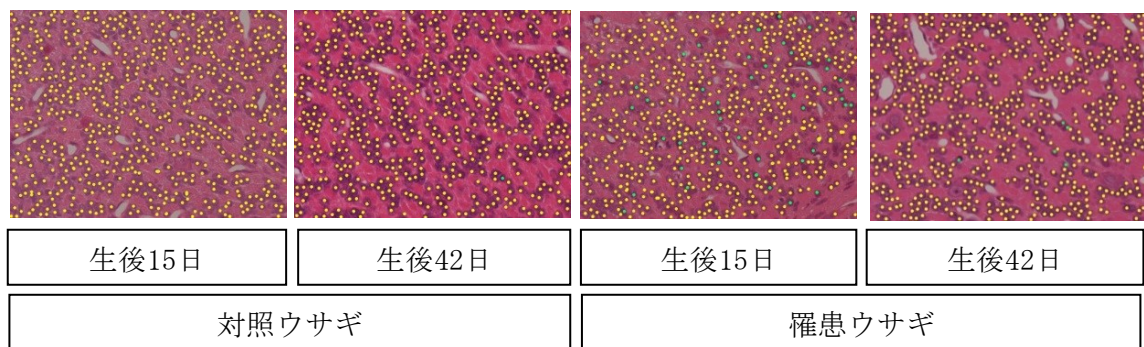
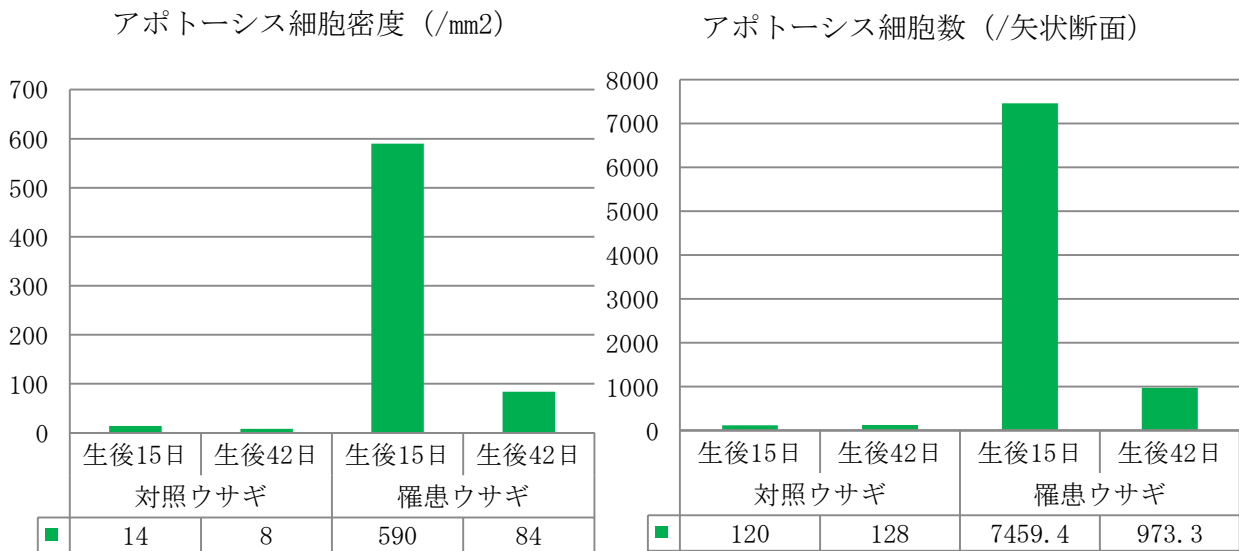
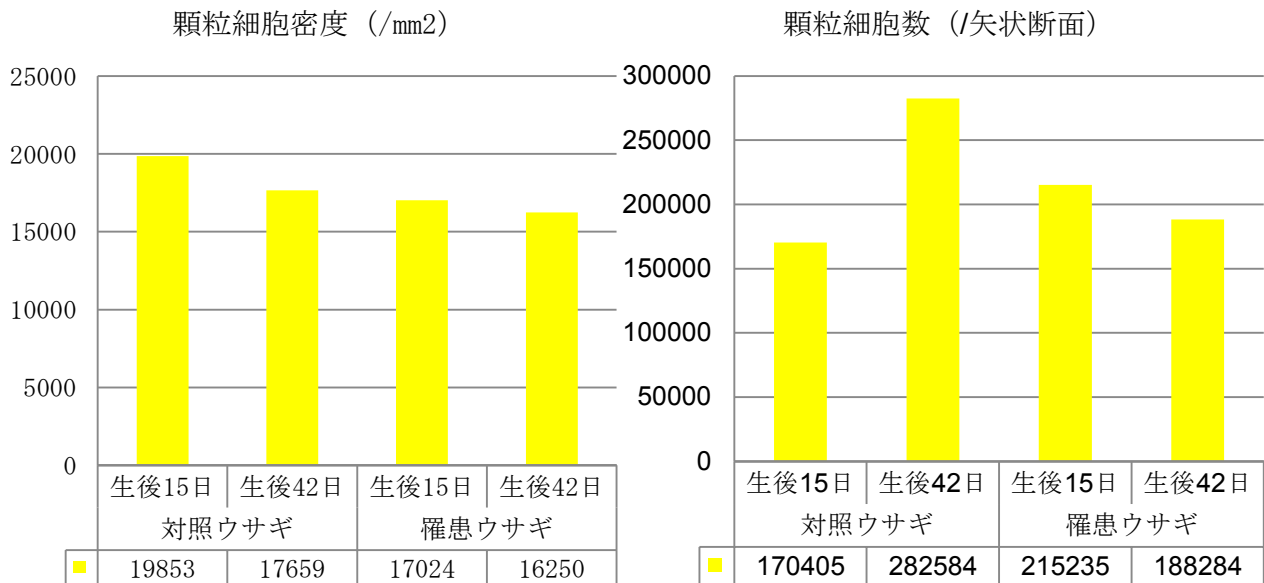


図18 顆粒細胞およびアポトーシス細胞の密度および数

写真の黄色の点は顆粒細胞，緑の点はアポトーシス細胞を表す。

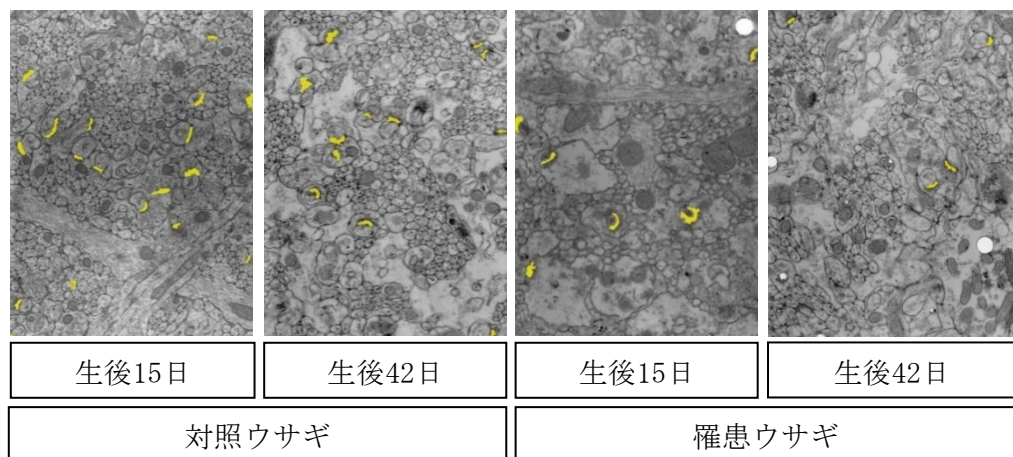
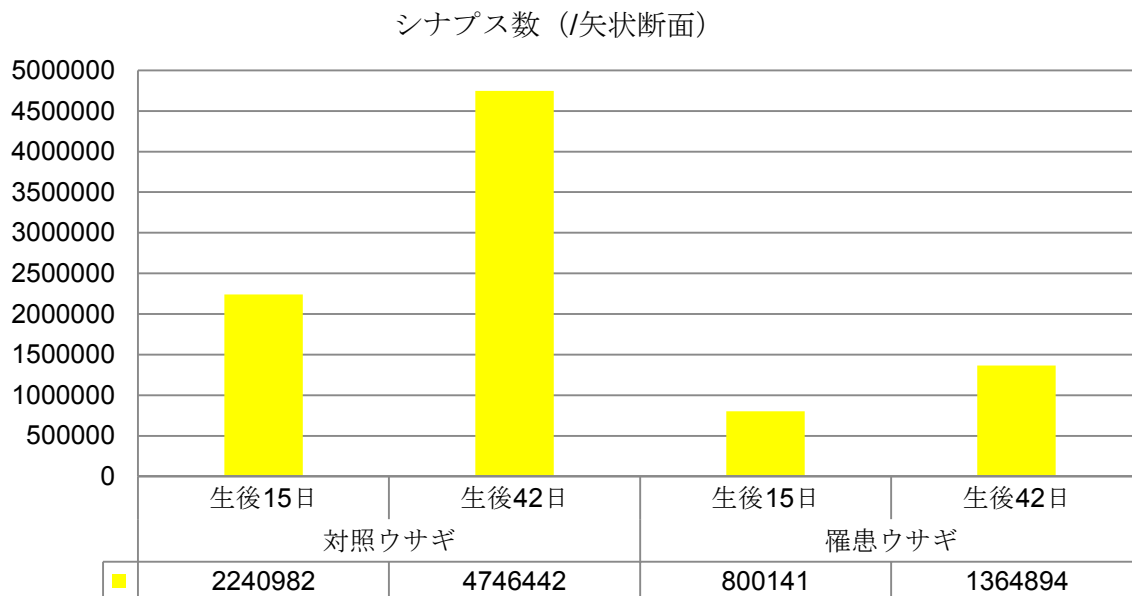
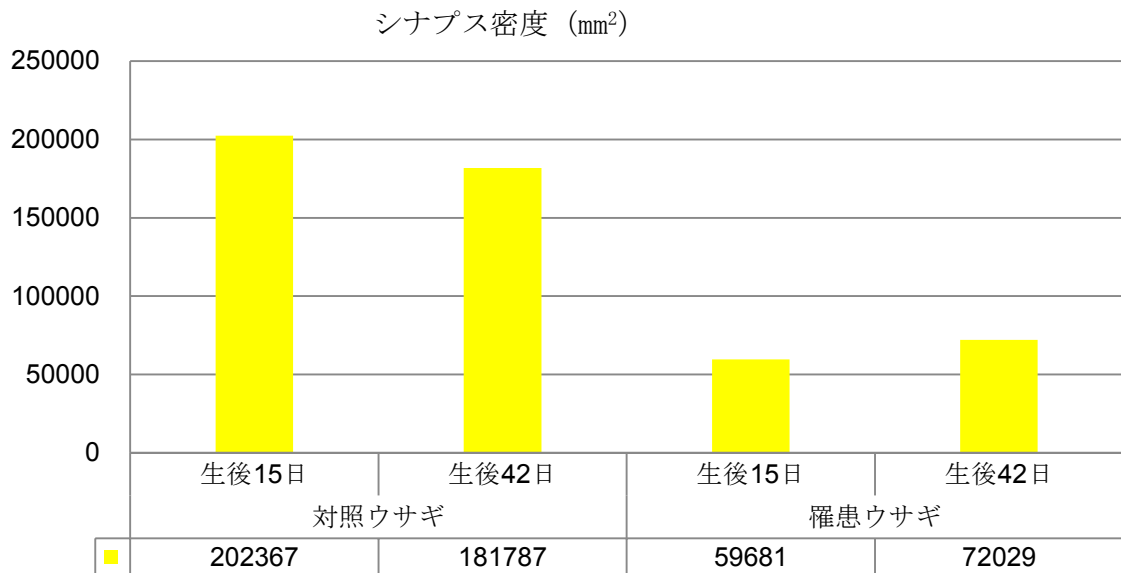


図 19 シナプスの密度および数
写真の黄色い部分はシナプス結合部を表す。