

マウス末梢神経発達における組織学的, 形態計測的研究

伏見 滋子, 東 靖人, 調 輝男, 有田 清三郎*

マウス脊髄後根神経の発達過程を, 組織学的観察と形態計量解析により検討した. 0, 20, 50, 90日齢の雄 DS マウスを使用し, 組織学的には, 電子顕微鏡にて観察した. 形態計量解析では, 有髄神経線維について, 1神経束における総有髄神経数, 軸索の面積, 周長, 長径, 短径と髄鞘層板の数を測定し統計学的に検討した.

組織学的観察の結果, 0日齢ですでに髄鞘形成は開始しており, 50日齢で無髄神経, 有髄神経両方とも成熟した形態を呈していた.

形態計量解析の結果, 総有髄神経線維数は0日から20日の間で急増した. 有髄軸索の面積は, 50日まで有意に増加を示した. 髄鞘層板の数は, 90日まで有意に増加を示した. 軸索の面積と髄鞘層板の数の相関関係は, 20, 50日齢では単調増加, 90日齢では成長曲線に類似したS字型の傾向を示した.

以上より, 90日齢では末梢神経の発育はほぼ成熟段階に達していることが示唆された. また, 軸索の面積と髄鞘層板の数の相関関係は末梢神経の発達過程を適切に評価する指標と思われる.

(昭和63年7月4日採用)

Morphologic and Morphometric Studies of the Development of Peripheral Nerves from Mice

Shigeko Fushimi, Yasuto Higashi, Teruo Shirabe and Seizaburo Arita*

The development of the dorsal root nerve fibers of 0-, 20-, 50-, 90-day-old mice were investigated morphologically and morphometrically.

Morphologic studies demonstrated that only a few myelinated nerve fibers were present at birth. In 50-day-old mice, mature myelinated nerve fibers and maturation of unmyelinated nerve fiber bundles were observed.

For quantitative analysis, the total number of myelinated nerve fibers was counted at each age. The area of the axis cylinder, its circumference, and the long and short diameters were measured, and the number of lamellae were counted on transverse electron microscopic sections.

Morphometric studies indicated that the area of the axis cylinder had a tendency to increase until the age of 50 days. The number of lamellae had a tendency to increase until the age of 90 days. The relationship between the number of myelin lamellae and the area of the axis cylinder indicated a tendency toward

川崎医科大学 人体病理 I
〒701-01 倉敷市松島577

Department of Human Pathology I, Kawasaki Medical
School: 577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-01
Japan

* 同 数学教室

Department of Mathematics

linearity in 20- and 50-day-old mice. At 90 days old, it gave a sigmoid curve which showed a tendency toward saturation.

From these results, it is suggested that maturation of the dorsal root nerve fibers occurred at 90 days old. The correlation between the area of the axis cylinder and the number of lamellae seemed to be better for evaluating the development of the peripheral nerves. (Accepted on July 4, 1988) *Kawasaki Igakkaishi 14(4): 530-538, 1988*

Key Words ① Peripheral nerve ② Development ③ Morphologic study
④ Morphometric study

はじめに

近年、画像解析装置の発達により形態を定量的に比較検討することが容易になってきた。末梢神経は、形態計量解析を行いやすいことから、軸索の直径、髄鞘の厚さ、全体の線維径、絞輪間距離、絞輪間隙幅、全体の線維径に対する軸索の比などを指標として統計学的に検討されてきた。特に、軸索の大きさと髄鞘の厚さの相関関係はよく研究されてきたが、比例関係があると報告するもの^{1)~5)}と、比例関係はないと報告するもの^{6)~10)}があり、その結論は得られていない。

臨床的にも形態計量解析は、末梢性知覚神経障害が認められる患者において応用されている。種々の神経疾患を研究する上で、使用する動物の末梢神経の発達過程を組織学的、定量的に知っておくことは、薬剤投与期などの関係からも重要である。しかしながら、末梢神経の発達を新生児から成熟段階まで経時的に、組織学的、定量的に報告したものはない。

今回、われわれはマウスの脊髄後根神経の発達を、通常成熟したとされている90日齢まで、組織学的観察と形態計量解析で検討した。形態計量解析から得られた計測値や分布が発達段階をどのように評するか組織像と比べあわせて、考察する。

材料と方法

0, 20, 50, 90日齢の雄DSマウスを、各3匹使用した。20, 50, 90日齢では、クロロフォルム麻酔下でマウスを開胸し、4%グルタルアル

ルデヒド(0.1M Soresen's phosphate buffer, pH 7.4)を左心室から注入して全身を灌流固定後、第10, 11, 12胸髄後根神経を採取した。0日齢では、脊髄を含んだブロックで摘出し、浸透固定を2%グルタルアルデヒドにて30分を行い、その後神経を採取した。採取神経は、2%グルタルアルデヒドで1時間、2%四酸化オスミウムで1時間30分二重固定後、型通りの方法にてエボン包埋標本を作製した。神経束に横断に超薄切片を作製し、単孔メッシュ上に載せ、酢酸ウラニール、クエン酸鉛の電子染色を行い、日立HU-12A型電子顕微鏡にて検鏡した。

形態計量解析のためには、0, 20, 50, 90日齢について各3試料を使用した。最初に、極低倍(700倍)で撮影を行い、3倍に拡大した全体写真を作成した。写真上の有髄神経すべてに通し番号をつけ、その番号をもとにして、20, 50, 90日齢では、1試料では有髄神経をすべて、残りの2試料では無作為に有髄神経を100本抽出し、10,000倍で撮影した。0日齢では、有髄神経が少ないため、すべて撮影を行い計測に使用した。

軸索の面積、周長、長径、短径は、自動画像解析システム(cosmozone 1 S (Nikon))を用いて、コンピュータ計測した。髄鞘層板の数は、profile projector (Nikon)を使用し、電顕ネガフィルムを投影してmajor dense line (myelin lamellae)数をカウントした。

有髄神経の発達を調べるためには、20, 50, 90日齢で各日齢につき3試料から100本ずつ合計300本の平均と標準偏差を求め、平均値の差

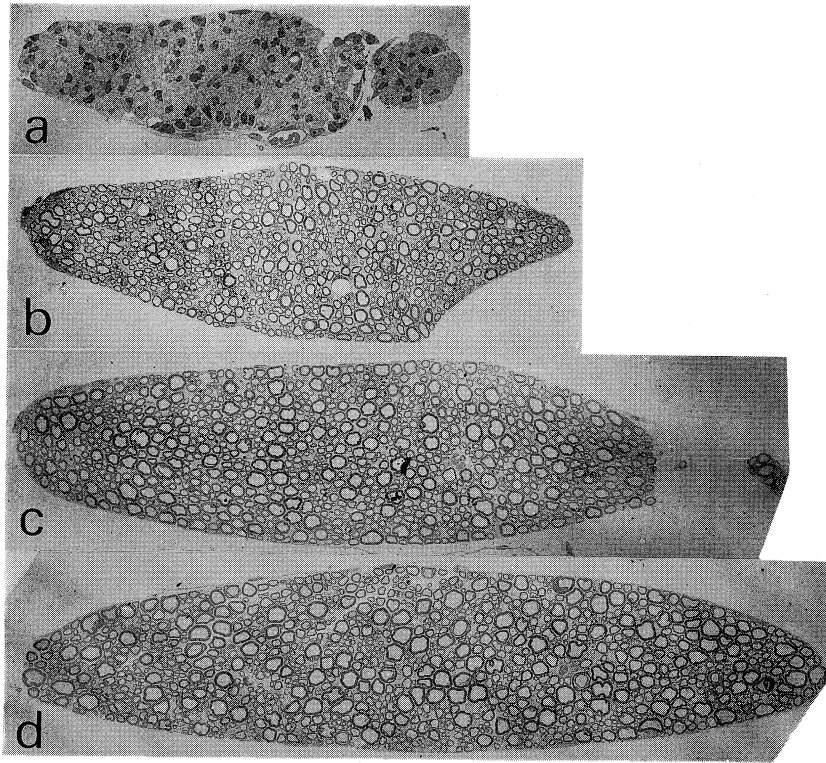


Fig. 1. Low magnification electron micrographs showing whole cross sections of the dorsal root nerve fibers of 0-(a), 20-(b), 50-(c), 90-day-old (d) mice, respectively ($\times 270$).

の検定(T検定)を行った。軸索の面積は対数正規分布するため、対数変換値で検討した。

軸索の面積、髄鞘層板数等の分布を調べるためには、20、50、90日齢について有髄神経をすべて測定した1試料を用いてそのヒストグラムを求めた。

結 果

1. 組織学的所見

0日齢では(Figs. 1a, 2a, 2b), 髄鞘形成がみられる軸索はきわめて少数であり、髄鞘形成

のない多くの軸索は単独または数本ないし数十本の群をなし、Schwann細胞の細胞質に囲まれていた。Schwann細胞に囲まれていない軸索も、一部存在した。基底膜を共有する複数のSchwann細胞が軸索群を囲む像や、Schwann細胞の分裂像もわずかに観察された。Schwann細胞の細胞質はelectron denseで、粗面小胞体、リボゾームが多く、まれに中心小体もみられた。

20日齢においては(Figs. 1b, 2c), 神経束全体がその大きさを増した。髄鞘形成のない

Fig. 2. Electron micrographs of the dorsal root nerve fibers. (a) A bundle of unmyelinated nerve fibers is surrounded by the cytoplasm of a single Schwann cell. A mitotic Schwann cell is observed (0-day-old, $\times 8,400$). (b) The cytoplasm of a Schwann cell is electron dense and contains highly active rough endoplasmic reticulum (ER), free ribosomes and mitochondria. Some free axons are also observed (0-day-old, $\times 12,000$). (c) The cytoplasm of a Schwann cell contains many rough ER, polysomes and mitochondria. Many unmyelinated nerve fibers surrounded by a Schwann cell are found (20-day-old, $\times 12,000$). (d) The axon of a heavily myelinated nerve fiber contains many neurofilaments and microtubules. The individual isolation of unmyelinated axons in the cytoplasm of a Schwann cell is seen (90-day-old, $\times 12,000$).

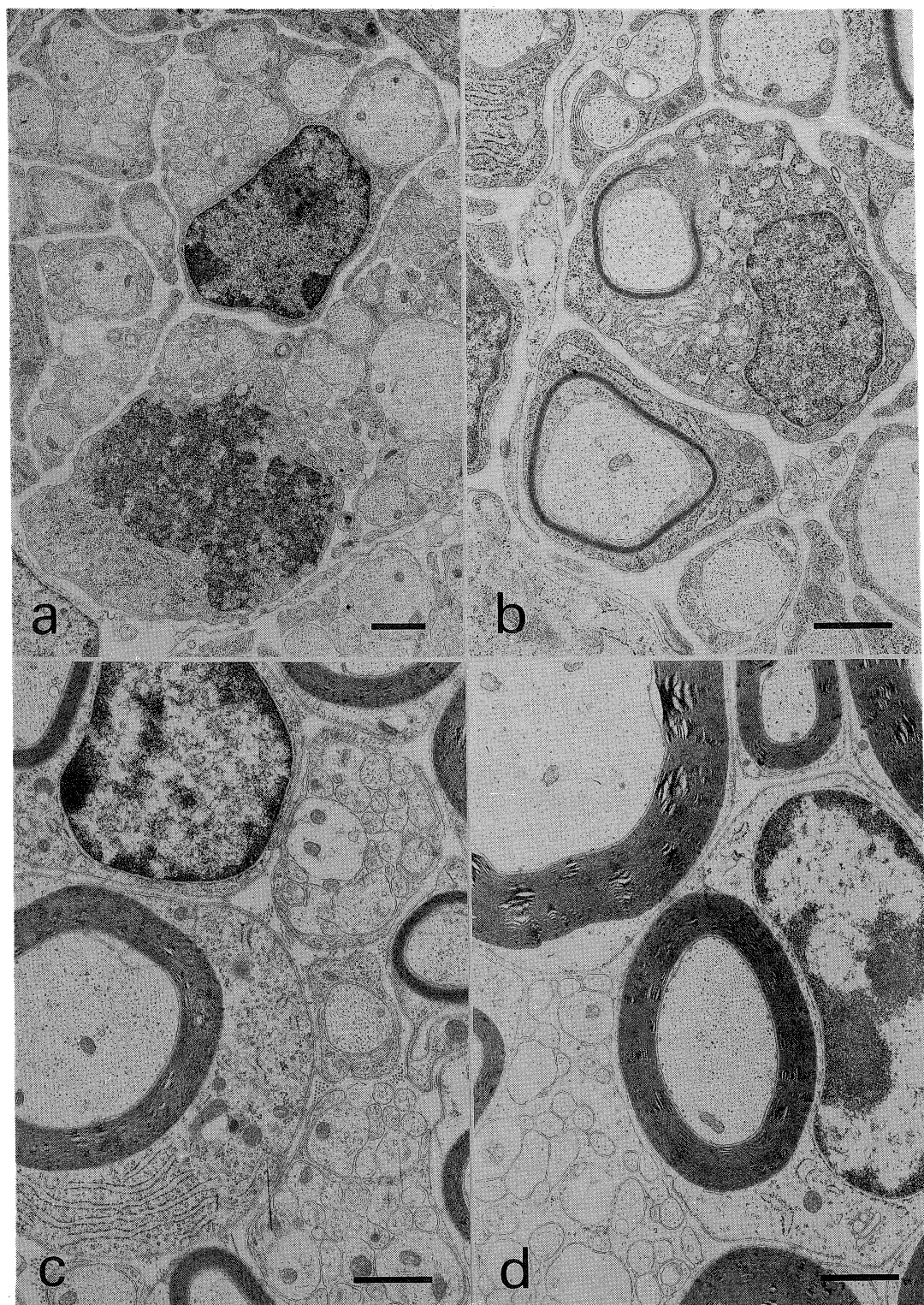


Fig. 2.

Table 1. Morphometric measurement of myelinated nerve fibers on electron microscopic sections.

Day	0	20	50	90
No. of total myelinated fibers	7.7±6.4	993.0±23.1	1011.3±184.9	1062.3±83.4
No. of myelin lamellae	5.35±3.16	26.22±12.83	34.26±16.30	39.50±18.85
Area of axis cylinder (μm^2)	2.79±2.31	3.39±3.28	4.94±5.36	5.83±6.45
Log _e Area	0.62±0.83	0.81±0.91	1.12±0.97	1.27±1.00
Circumference (μm)	5.61±2.48	6.64±3.25	7.83±3.96	8.60±4.56
Long diameter (μm)	1.93±0.87	2.52±1.25	2.91±1.41	3.22±1.68
Short diameter (μm)	1.72±0.81	1.46±0.78	1.80±1.11	1.86±1.09

Schwann 細胞の細胞質に囲まれている群は小群化し、群内の軸索間はより密になった。軸索内には、多くの neurofilament, microtubules, ミトコンドリアを含んでいた。髄鞘を形成している Schwann 細胞の細胞質は豊富で、粗面小胞体が発達し、リボゾーム、ミトコンドリアが多かった。

50, 90日齢においては(Figs. 1c, 1d, 2d), さらに神経束の増大がみられた。有髄神経では、軸索自体の大きさが増し、軸索群を取り囲んでいる Schwann 細胞の細胞質は小さくなった。Schwann 細胞の細胞質内の粗面小胞体及びミトコンドリアの減少がみられた。無髄神経では、軸索自体の大きさに変化はなく、各々の軸索は Schwann 細胞の細胞質で囲まれていた。

2. 形態計量解析

0, 20, 50, 90日齢での1神経束における有髄神経線維数、髄鞘層板の数、軸索の面積、周長、長径、短径の測定結果を Table 1 に示した。有髄神経線維数は、0日から20日にかけて急増し、20日以後増加は認められなかった。軸索の面積、短径は、20日と50日で明らかな増加($p < 0.01$)を示したが、50日と90日では有意差は認められなかった。周長と長径は、20日と50日で有意な増加($p < 0.01$)、50日と90日で有意な増加($p < 0.05$)がみられた。髄鞘層板の数は、20日と50日、50日と90日で有意に増加した($p < 0.01$)。

90日齢での軸索面積のヒストグラムを Figure 3 に示した。軸索面積の分布は20, 50日齢

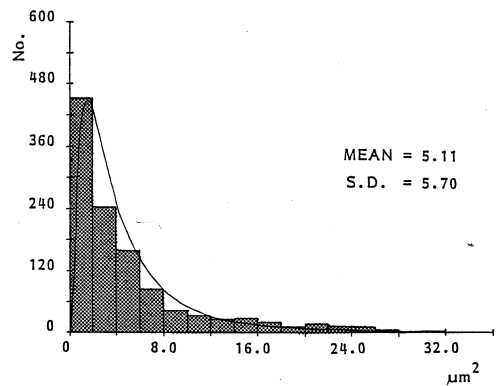


Fig. 3. Histogram of the area of the axis cylinder. The curve in the histogram shows a log curve (90-day-old).

でも、同様な対数正規分布を呈しており、適合度検定により検証された。

髄鞘層板の数のヒストグラムを Figure 4 に示した。一峰性の分布を呈し、日齢を経るにつれて髄鞘層板の分布は、多層方向に移行した。

軸索の面積と髄鞘層板の数の相関関係を Figure 5 に示した。その相関関係は、20, 50日齢では、やや直線性の傾向を、90日齢では、成長曲線型のS字曲線の様相を示した。

考 察

組織学的観察と形態計量解析の二つの観点で検討する。

まず最初に、組織学的に考察する。

末梢神経発達過程において、初期の Schwann 細胞と軸索の関係については多くの形態的観察の報告があり、^{2), 11)~15)} 一般的には次のように述べられている。

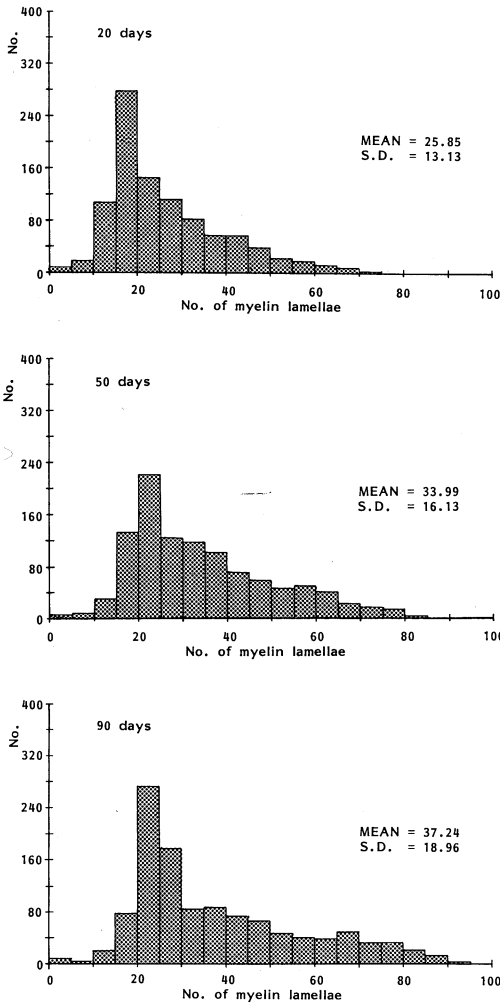


Fig. 4. Histograms of the number of myelin lamellae (20-, 50-, 90-day-old).

発達の初期に、数個の Schwann 細胞が軸索の束を囲んで大きな群をつくる。Schwann 細胞は増殖し、突起を伸ばしながら大きな群を再分する。群は小群化し、群の数が増える。群の周辺部に位置する大きな軸索は、Schwann 細胞と 1:1 の関係を確立し、Schwann 細胞は分裂を止め、髄鞘を形成し始める。その発達は群の周辺部から順次起こり、軸索に髄鞘を形成する Schwann 細胞が群を離れるまで続く。群の中央部の多くの軸索は、Schwann 細胞の表面に接触、湾入し続けて無髄神経となる。

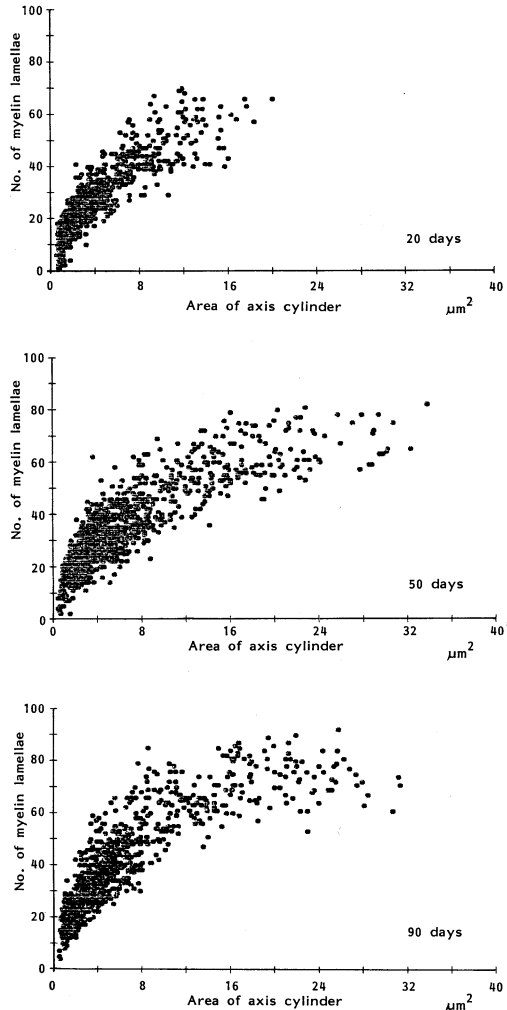


Fig. 5. Relationship between the number of lamellae and the area of the axis cylinder (20-, 50-, 90-day-old).

マウスを用いた今回の実験では、0日齢においては、大部分の軸索は群をなしているが、Schwann 細胞に囲まれていない軸索も存在した。この遊離している軸索が存在する原因は明らかでないが、可能性として、Schwann 細胞が分裂によって小群化する過程にあり、まだ軸索を囲んでいない、または、軸索が分岐して伸びてきていることが考えられる。

比較的径が大きい軸索では、1個の軸索が1個の Schwann 細胞に囲まれていた。そのような軸索では、髄鞘を形成する前段階の像が観察

された。髄鞘層板を10層以上有する有髄軸索も認められた。軸索群を囲んでいる Schwann 細胞では、有糸分裂像や複数の Schwann 細胞が群を囲む基底膜共有像も観察された。

このように0日齢では、非常に未熟な段階から髄鞘形成開始まで種々の様子を示していた。その末梢神経の発達過程については、Webster らがモデル化した上記の過程と同様のことが本実験でも観察された。

新生児期のラットは大きな群がみられる段階で、生後3日齢で1から3層の髄鞘層板の形成が観察されている。^{13), 15)}しかし Reier ら¹⁴⁾の実験でも示されるように、マウスの新生児では既に軸索群の小群化がみられ、Schwann 細胞との間に1:1の関係を確立した軸索が存在し、既に髄鞘形成が開始していることから、マウスはラットより出生時の発達段階は進んでいると考えられた。また、Reier ら¹⁴⁾はマウスの坐骨神経で1個の Schwann 細胞が軸索群を囲むと報告しており、われわれの観察より一段進んだ発達を示しているが、これは神経線維の種類によって発達段階に差があるためであろうと思われた。

有髄神経においては、20日齢の髄鞘を形成している Schwann 細胞の細胞質では粗面小胞体が発達し、リボゾーム、ミトコンドリアを豊富に含み、髄鞘形成のための蛋白合成がさかんであることがうかがわれた。50日齢になると、Schwann 細胞の細胞質は小さくなり、50日齢と90日齢では、形態的な変化はなかった。

無髄神経においては、20日齢では、軸索群を Schwann 細胞がひとまとめにして囲んでいた。50日齢では、個々の軸索が Schwann 細胞の細胞質で囲まれ、各々 mesaxon をもっていた。このことから、50日までに無髄神経は確立すると考えられた。Reier ら¹⁴⁾は、生後30日で Schwann 細胞の細胞質に囲まれている軸索が単離する(無髄化)と報告しており、われわれの実験も同様な結果を示した。

今回の形態学的観察から、マウスの脊髄後根神経では、生前に髄鞘形成を開始し、生後も軸索の成長や Schwann 細胞の有糸分裂が引き続

き起こり、50日までにはほぼ成熟段階に達すると考えられた。

次に、形態計量解析の観点から考察する。

形態計量解析の軸索の成長をみる指標には、面積、周長、径(長径 X, 短径 Y, 及び $(X+Y)/2$, \sqrt{XY} , $\text{Log } X$, $\text{Log } Y$, $\text{Log } (X+Y)/2$, $\text{Log } \sqrt{XY}$)などがあげられる。

宮本ら¹⁶⁾は、再生有髄軸索の径は、対数正規分布に近く、楕円に近い形態をしており、また、正常神経の径は正円型に近い形態をしているため正規分布、対数正規分布の一方に限定することはできないと報告している。われわれは、軸索成長の指標として、軸索径の大きさより面積の方が適切と考え、今回、軸索の面積に注目した。また、各日齢の軸索面積の分布は対数正規分布を示したため、面積の対数変換値の平均値で成長を比較した。

20, 50, 90日齢の有髄軸索面積を比較検討すると、50日まで増加($p < 0.01$)するが、50日と90日では有意差は認められなかった。Samorajski¹⁷⁾は、マウス脛骨神経で、軸索の直径は8か月まで増加があると報告している。今回計量解析した周長と長径では、50日と90日では有意差があり($p < 0.05$)、増加があったといえる。ゆえに、面積や径を基にすると、有髄軸索は50日まで急速な発育をとげ、その後90日までは緩やかな成長をすると考えられた。

髄鞘の発達の指標として髄鞘層板の数について検討した。0日齢で10層以上の髄鞘層板を形成しているものがあり、胎生期において既に髄鞘形成は、開始していると考えられた。0日以降その後少なくとも90日までは髄鞘層板の数は増加し、成長が続いていた。髄鞘層板の数の分布については、Friede ら¹⁾はマウスの坐骨神経と迷走神経で一峰性を、Sima⁶⁾はラットの後根神経で二峰性を報告しているが、今回のマウス後根神経では一峰性を認めた。

軸索の大きさと髄鞘層板の数を組にして考えると、今回の実験において有髄神経ではまず軸索の発育が起こり、遅れて髄鞘形成が始まった。軸索と髄鞘はともに発達し、軸索の径の拡大は50日ではほぼプラトーに達したが、髄鞘層

板は90日に至るまで厚さを増し続けた。50日齢は、組織学的にはほぼ成熟した段階と思われたが、軸索の面積、髄鞘層板の数のそれぞれを統計学的に検討したところまだ発達の途中であることが示唆された。

軸索の大きさと髄鞘の厚さとの相互関係については過去に多くの報告があり、髄鞘層板の数は神経線維の種類によってかなり違いがある³⁾ものの、一般に軸索の径が大きいものほど髄鞘層板の数は多い。その相関関係については、比例関係があると報告するもの^{1)~5)}と、比例関係はないとするもの^{6)~10)}がある。そこで今回われわれは、軸索の面積と髄鞘層板の数の相関関係を調べた。その結果、20、50日齢では幅をもった直線性の傾向を、90日齢では成長曲線に類似したS字型曲線を示した。20日齢では軸索の面積が小さく髄鞘層板の数も少ない未熟な段階を示したが、日齢とともに発育過程が徐々に移行していき90日齢ではプラトーに近く、ほぼ成熟段階に達していると思われた。しかし、今

回は90日以降を検討していないため、90日齢で完全に成熟したとは言いきれなく、その後も成長はわずかに続くと思われた。

Bertholdら¹⁰⁾は、末梢神経の発達について同様の相関関係をネコで報告しており、 $n=C_0+C_1d+C_2\text{Log}(d)$ (n : 髄鞘層板の数, d : 軸索の直径) という直線と対数関数を結合した型で表現している。Hildebrandら¹⁸⁾は種々の動物を用いて中枢神経で同様の相関関係を示しているが、マウスでは直線的であると報告している。Hildebrandら¹⁸⁾は軸索の直径と髄鞘層板の数で相関関係を調べており、われわれとの相違は中枢神経と末梢神経の差というよりは、使用した指標の面積と直径の違いによるものとも考えられた。

以上より、有髄神経の軸索の面積と髄鞘層板の数を組にした相関関係は総合的な発達を表現すると考えられるので、末梢神経の発達段階を評価する上で有効な指標ではないかと思われる。

文 献

- 1) Friede, R. L. and Samorajski, T.: Relation between the number of myelin lamellae and axon circumference in fibers of vagus and sciatic nerves of mice. *J. comp. Neurol.* 130: 223-232, 1967
- 2) Friede, R. L. and Samorajski, T.: Myelin formation in the sciatic nerve of the rat. A quantitative electron microscopic, histochemical and radioautographic study. *J. Neuropathol. exp. Neurol.* 27: 546-570, 1968
- 3) Williams, P. L. and Wendell-Smith, C. P.: Some additional parametric variations between peripheral nerve fibre populations. *J. Anat.* 109: 505-526, 1971
- 4) Friede, R. L.: Control of myelin formation by axon caliber. (With a model of the control mechanism.) *J. comp. Neurol.* 144: 233-252, 1972
- 5) Schröder, J. M.: Altered ratio between axon diameter and myelin sheath thickness in regenerated nerve fibers. *Brain Res.* 45: 49-65, 1972
- 6) Sima, A.: Relation between the number of myelin lamellae and axon circumference in fibres of ventral and dorsal roots and optic nerve in normal, undernourished, and rehabilitated rats. *Acta Physiol. Scand.* 410: 1-38, 1974
- 7) Berthold, C.-H. and Carlstedt, T.: Observations on the morphology at the transition between the peripheral and the central nervous system in the cat. *Acta Physiol. Scand.* 446: 43-60, 1977
- 8) Stanmore, A., Bradbury, S. and Weddell, A. G. M.: A quantitative study of peripheral nerve fibres in the mouse following the administration of drugs. 1. Age changes in untreated CBA mice from 3 to 21 months of age. *J. Anat.* 127: 101-115, 1978

- 9) Arbuthnott, E. R., Boyd, I. A. and Kalu, K. U.: Ultrastructural dimensions of myelinated peripheral nerve fibres in the cat and their relation to conduction velocity. *J. Physiol.* 308: 125—157, 1980
- 10) Berthold, C. -H., Nilsson, I. and Rydmark, M.: Axon diameter and myelin sheath thickness in nerve fibres of the ventral spinal root of the seventh lumbar nerve of the adult and developing cat. *J. Anat.* 136: 483—508, 1983
- 11) Peters, A. and Muir, A. R.: The relationship between axons and Schwann cells during development of peripheral nerves in the rat. *Q. J. exp. Physiol.* 44: 117—130, 1959
- 12) Allt, G.: Ultrastructural features of the immature peripheral nerve. *J. Anat.* 105: 283—293, 1969
- 13) Webster, H. deF.: The geometry of peripheral myelin sheaths during their formation and growth in rat sciatic nerves. *J. Cell Biol.* 48: 348—367, 1971
- 14) Reier, P. J. and Hughes, A. F.: An effect of neonatal radiothyroidectomy upon nonmyelinated axons and associated Schwann cells during maturation of the mouse sciatic nerve. *Brain Res.* 41: 263—282, 1972
- 15) Webster, H. deF., Martin, J. R. and O'Connell, M. F.: The relationships between interphase Schwann cells and axons before myelination: A quantitative electron microscopic study. *Dev. Biol.* 32: 401—416, 1973
- 16) 宮本博子, 宮本義洋, 津下健哉, 有田清三郎, 堀 義己: 有髓軸索の平均直径と平均個数により, 軸索充填密度を推定する方法. *川崎医学会誌* 10: 349—360, 1984
- 17) Samorajski, T.: Age differences in the morphology of posterior tibial nerves of mice. *J. comp. Neurol.* 157: 439—452, 1974
- 18) Hildebrand, C. and Hahn, R.: Relation between myelin sheath thickness and axon size in spinal cord white matter of some vertebrate species. *J. neurol. Sci.* 38: 421—434, 1978