ヒト胎児前庭神経核の形態計測学的検討方法について

藤井まゆみ¹⁾・後藤 昇¹⁾・木田 亮紀²⁾・菊池 恭三²⁾

Morphometric Evaluation of the Human Fetal Vestibular Nuclei

Mayumi Fujii¹⁾, Noboru Goto¹⁾, Akinori Kida²⁾, Kyouzou Kikuchi²⁾¹⁾ Department of Anatomy, Showa University School of Medicine²⁾ Department of Otolaryngology, Nihon University School of Medicine

Morphometric observation and evaluation consisting of celloidine serial sections, a microscope with a drawing tube, an image analyser and a computer are necessary for the precise understanding of the morphological development of the human nervous system with great objectivity. We introduced this method and particular anatomic parameters such as the circularity ratio (CR) and neuropil index (NI) with the preliminary data of the vestibular nuclei at 40 weeks of gestation (WG). For the analysis of the maturity of neurons, CR of neuronal somata, $4\pi A/L^2$ (A =area in μm^2 ; L =perimeter in μm), was calculated. The CR of a regular circle is 1.0. We evaluated the maturation of the neuropil defined as the tissue around each neuron including the axons, dendrites, myelin sheaths, glial cell bodies and their processes, vessels and connective tissue. The NI was calculated as follows: $NI = [(total\ columnar\ area\ in\ mm) - (total\ neuronal\ area\ in\ mm)] \times 10^3 / neuronal\ number$; We measured sections to obtain several morphometric parameters: the volume of the nuclear column, and number, packing density and cell body area of neurons, and calculated CR and NI, demonstrating the value at 40 WG. We are currently preparing to examine the development of the human lateral vestibular nucleus in 14 fetuses (6-40 WG), an infant (2 months old) and an adult (63 years old).

Key words: lateral vestibular nucleus, morphometry, development, human fetus, serial section

はじめに

日本平衡神経科学会第52回学術講演会のシンポジウム“平衡機能の発達とその障害”において、共著者が“前庭神経の発達”を講演した。そのなかで、ヒトの前庭神経系の形態学的発達について紹介し、発達を正しく評価するためには、組織学的な定性的検討のみならず、形態計測学的検討が必要であることをのべた¹⁾。今回私達は前庭神経

核群のひとつ外側核を選び、形態計測の方法と発達の評価法について述べ、40胎週齢の計測値を示す。

材料と方法

ヒト胎児の脳幹を、まず10%フォルマリンで一次固定を行った後にクロム酸二次固定を行い、水洗、脱水後、セロイジン包埋、連続切片(30 μm 厚)を作成した²⁾。連続切片は連続番号を切片毎に付し染色は10枚毎の切片を抜き出して、当研究のためには、Klüver-Barrera 染色 (K-B 染色)を行った。神経核とは神経細胞体の集まりであ

¹⁾ 昭和大学医学部第二解剖学教室²⁾ 日本大学医学部耳鼻咽喉科学教室

り、膜で被われているわけではないので、切片標本を1枚のみ観察して神経核の境界がわかるものではない。そこで、観察は実体顕微鏡を用い、切片標本を重ねて前庭神経外側核を核柱として観察しながら標本上の外側核の境界を確認した。計測には drawing tube 付き顕微鏡と画像解析装置を組み合わせたものを用い、核柱断面積は20倍で、神経細胞体は268倍で、光ファイバー付きカーソルでそれぞれの周囲をなぞって計測した。1個の神経細胞は1枚の切片に含まれることと、何枚かの切片に分割されることがあるので、計測の基準をはっきりさせておかなければならない。そこで、核小体（直径1 μm 位）を目標として核小体のある神経細胞のみの計測を行った。計測処理と統計解析には、当教室の開発による形態計測システムソフトと市販の統合型表計算ソフト LOTUS123を使用した。

統計解析のための指標として、真円率（CR）と neuropil index（NI）を用いた。真円率の計算は $CR = 4\pi A/L^2$ で求めることができる。Aは面積値、Lは周長である。neuropil index は $NI = \text{neuropilの面積}(\text{mm}^2) \times 10^3 / \text{神経細胞数}$ で計算される。そして、neuropilの面積 = (核柱の断面積の和) - (神経細胞体の面積の和) である³⁾。

観 察

40胎週齢の前庭神経外側核では、“材料と方法”の項で述べたように切片標本を重ねて実体顕微鏡下に核柱として観察することにより、二つの核柱として外側垂核と内側垂核に分かれていることを確認した。本核は下小脳脚・三叉神経脊髄路・前庭神経上核などに囲まれていること、また顕微鏡の倍率を高めて、濃染した Nissl 小体を含む大きい神経細胞体を見つけることにより他の神経核から区別した。外側垂核の神経細胞は比較的大きさのそろった多極性のものが多く、内側垂核の神経細胞は紡錘形・卵円形・多極性のものから成っていた。なお、内側垂核の神経細胞の一部に pyknosis の所見が観察できた。右内側垂核と外側垂核を図1に示す。

計測結果

左右それぞれの外側垂核・内側垂核の計測値（核柱断面積・核柱体積・切片当りの神経細胞数・核柱の神経細胞数・神経細胞面積・神経細胞周長・CR・NI）を参考のために表1に示す。なお、

図1 40胎週齢の右前庭神経外側核（K-B 染色）
M: 内側垂核；L: 外側垂核；スケールバーは100 μm 。

核柱体積 = 断面積の平均値 × 切片枚数 × 標本厚、
切片枚数 = 標本最大番号 - 最小番号 + 10 で計算した。

考 察

ヒトの脳の細胞成熟過程の定量的な観察は最近始まったばかりであるが、すでに、いくつかの脳神経核や小脳核で定量的な発達を検討した論文がある^{4)~12)}。しかしまだ脳の全貌が明らかにされるには程遠い。ヒト、とりわけ胎児に関する研究は、材料収集・研究手段の制約・胎齢の正確な把握・病理学的変化の可能性などの点で非常に困難である。定量的な研究ではデータの信頼性を高めるために十分な例数が必要であるが、現状では少ない材料で可能な限り情報量の多い研究手段が望ましく、連続切片法はその一つの有力な手法である¹³⁾。前庭神経核については、発達の形態計測学的報告は見つからなかった。平衡機能の発達を調べる手がかりとして、ヒト胎児脳の連続切片標本を用いて形態計測を行い計測結果の項に記したパラメータを算出し、胎週齢順の経時的検討を行うことにした。

形態計測を行うにあたり、まず標本の収縮率を最小にすることが大切である。クロム酸による二次固定を採用したセロイジン切片での標本の収縮率を計算すると、長さで約10%であり、パラフィン包埋や凍結法などの他の方法に比べて最も収縮率が小さい³⁾。計測に当たっては対象とする細胞数、面積、周長が一度の測定で全て行えるように

表1 40胎週齢の前庭神経外側核

	左		右	
	外側亜核	内側亜核	内側亜核	外側亜核
核柱断面積 (平均値, mm ²)	0.21	0.27	0.33	0.14
核柱体積 (mm ³)	0.25	0.41	0.39	0.21
神経細胞数/切片	39.3	39.4	50.5	18.8
核柱の神経細胞数	1570	1970	2020	940
細胞面積 (μm ²)	307±155	352±226	260±189	348±172
周長 (μm)	64.6±21.4	72.9±31.5	68.8±30.3	80.1±28.1
CR	0.9±0.1	0.8±0.2	0.7±0.2	0.7±0.2
NI	5.0	6.5	6.2	7.2

設計した画像解析装置と、オンラインで入力できるコンピュータプログラムが最も使いやすい³⁾。当教室の開発による形態計測システムソフトとLOTUS123を使用すると計測数を数千個まで増やすことも可能である。

神経細胞体の成熟度を調べ、比較するために、その面積値と周長から真円率 (CR) を求めた。幼若な細胞は円 (真円率1.0) に近く、成熟したものは突起が発達するので、円から遠く離れる (真円率0.8, 0.6などのように) ことになる³⁾。

neuropil とは中枢神経系の灰白質塊を作り、内部に神経細胞体が埋め込まれている軸索や樹状突起と神経膠の細胞体と突起のフェルト状の複雑な網で、その中には血管や結合組織も含まれる。脳の発達とともに neuropil が増加することは他のニューロンとの線維連絡が増加することを間接的ではあるが示している。よって神経細胞1個が持つ周囲の neuropil の量 (面積) を表す NI を、脳の発達を検討する上でとりあげることは重要である³⁾。

上記のように形態計測学的評価法には様々な特長があり、今までに行われた脳神経核の発達の形態計測学的研究結果^{4) 5) 7) 8) 9) 11)} と前庭神経核の発達を比較することも可能である。

Olszewski & Baxter¹⁴⁾ はヒト成人の前庭神経外側核を分類して Subnucleus lateralis (外側亜核) と Subnucleus medialis (内側亜核) としている。前者は neuropil が多く、細胞成分が疎で

あるが、後者は neuropil が少なく、細胞成分が密である。神経細胞については前者は大型の多極性や紡錘形などで、Nissl 小体が多くて濃染する。後者は大部分が中型で紡錘形、卵円形、多極性の中等度の濃さの染色性のものであるが、一部に卵円形の大型のものがわずかに含まれる。今回、ヒト40胎週齢の前庭神経外側核の観察では、外側亜核・内側亜核共に数カ所に大型の細胞や chromatolysis を疑わせるものや、pyknosis といった変性細胞が若干存在し、Olszewski & Baxter の細胞構築像とは、やや異なった所見であった。

タイトルに示したように、今報告は形態計測学的方法論が主体である。そして、参考のために計測データを1例紹介した。その計測データは、核柱の神経細胞数・細胞面積共に、左右の内側・外側亜核で差が認められるので、その原因は何かという指摘が有るかもしれない。しかし、その原因を考察する前に、数少ない貴重な標本で、まずデータを出し、集積してゆくことが必要であると考え、計測値を示した。よってデータについてのコメントは控える。今後、前庭神経外側核を胎週齢を追って計測・統計解析を行い、その発達過程を考察する予定である。

まとめ

1. 連続切片で前庭神経外側核の発達を評価しうることを示した。
2. 前庭神経外側核を亜核に分けて検討した。
3. 核柱・神経細胞の大きさを数量的に計測しう

ることを示した。

4. neuropil を数量的に評価する方法を示した。

謝 辞

コンピュータ解析に御協力を頂きました大阪市立大学生生活科学部生活環境学教室岡田 明助教授に深謝致します。

文 献

- 1) 後藤 昇: 前庭系の発達. *Equilibrium Res* 53: 103-109, 1994
- 2) Goto N: Discriminative staining methods for the nervous system: LPH triple stain and subsidiary staining methods. *Stain Technol* 62: 305-315, 1987
- 3) 後藤 昇, 山口勝之, 奈良隆寛, 他: 脳の発達の形態計測学的評価法について. *脳と発達* 20: 308-313, 1988
- 4) Hamano S, Goto N, Nara T: Development of the human motor trigeminal nucleus. *Pediatr Neurosci* 14: 230-235, 1988
- 5) Nara T, Goto N, Yamaguchi K: Development of the human hypoglossal nucleus: a morphometric study. *Dev Neurosci* 11: 212-220, 1989
- 6) Yamaguchi K, Goto N, Yamamoto T: Development of human cerebellar nuclei. *Acta Anat* 136: 61-68, 1989
- 7) 奈良隆寛, 後藤 昇, 野崎秀次, 他: ヒト胎児顔面神経核の発達. *脳と発達* 21: 453-459, 1989
- 8) Hamano S, Goto N, Nara T, et al: Develop-

ment of the human mesencephalic trigeminal nucleus: a morphometric study. *Dev Med Child Neurol* 32: 621-628, 1990

- 9) Nara T, Goto N, Hamano S: Development of the human dorsal nucleus of vagus nerve: a morphometric study. *J Auton Nerv Syst* 33: 267-276, 1991
- 10) Nozaki H, Goto N, Nara T: Development of the human pontine nuclei: a morphometric study. *Dev Brain Res* 65: 13-20, 1992
- 11) Nara T, Goto N, Nakae Y, et al: Morphometric development of the human auditory system: ventral cochlear nucleus. *Early Hum Dev* 32: 93-102, 1993
- 12) Milutinović B, Gudović R, Malešević J: Regressional changes of human cerebellar cortex and hypoglossal nucleus during development. *J Hirnforsch* 33: 357-360, 1992
- 13) 山口勝之, 後藤 昇, 奈良隆寛: ヒト胎生期小脳の発達: 構造別体積の検討. *脳と発達* 20: 3-9, 1988
- 14) Olszewski J, Baxter D: Nucleus vestibularis lateralis. In *Cytoarchitecture of the human brain stem*. pp 76-77, S. Karger, Basel, 2nd ed, 1982

原稿到着: 平成7年3月7日
別刷請求先: 藤井まゆみ
〒414 静岡県伊東市猪戸1-1-3
藤井耳鼻咽喉科医院