

マウス胚における 小胞性グルタミン酸輸送体2タンパク質の発現と分布

前島徹 久野節二

(Toru MAESHIMA Setsuji HISANO)

【要約】

ほ乳類の中枢神経系においてグルタミン酸は興奮性神経伝達の中心的役割を果たす。グルタミン酸作動性ニューロンのシナプスにはグルタミン酸をシナプス小胞に集積させるため小胞性グルタミン酸輸送体 (VGLUT) が存在しているが、脊髄におけるVGLUTが発生に伴っていつ、どこに発現するのかについては不明である。このことを明らかにするためにVGLUTの1つであるVGLUT2の胎生期発現について、胎生9日 (E9) からE18までのマウス胎仔を対象に免疫組織化学的解析を行った。VGLUT2の陽性線維はE10に初めて脊髄で確認され、脊髄神経侵入部位の脊髄表層および脊髄腹側部に少数の陽性線維が認められた。E11では前索、側索および交連ニューロンの線維に、E13では灰白質に入る少数の神経線維で陽性反応が観察された。E15では陽性線維は灰白質において広範囲に認められ、白質では線維のみならず白質全体が染色され、白質内でVGLUT2を持つ線維のシナプス形成が進んだと考えられる。E18では灰白質全体が陽性反応を示し、灰白質内にVGLUT2を持つシナプスの形成が進行したと思われる。以上の結果は、一次求心性神経の中枢枝の終末と脊髄起源のニューロンの軸索終末では、発生のかなり早い時期からタンパク質レベルでVGLUT2が発現すること、さらに脊髄では白質、灰白質に入る神経線維、灰白質の順にVGLUT2を持つグルタミン作動性シナプスが形成されることを示唆している。

キーワード：小胞性グルタミン酸輸送体2、VGLUT2、脊髄、神経発生、免疫組織化学

1. はじめに

ほ乳類の中枢神経系においてグルタミン酸は興奮性神経伝達の中心的役割を果たしている。しかし、グルタミン酸は、代謝産物あるいはγ-アミノ酪酸の前駆体としても脳内の至る所に存在しているために、興奮性神経伝達機能を担うグルタミン酸を特定することが困難で、近年、小胞性グルタミン酸輸送体 (vesicular glutamate transporter, VGLUT) が発見されるまでは、グルタミン酸作動性神経線維の組織化学的同一化は不可能であった¹⁻⁵⁾。VGLUTは神経終末のシナプス小胞の膜に存在し、細胞質基質からグルタミン酸を小胞に輸送し小胞内に蓄積させるために必須のタンパク質である。

細胞膜には無機リン酸を輸送するタンパク質が知られており、たとえば、腎臓では尿細管で無機リン酸を再吸収するシステムが知られている。このような研究の

中で、脳内で無機リン酸を再吸収する輸送体として、BNPI (brain specific sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter) とDNPI (differentiation-associated sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter) が同定されていた^{6,7)}。これらの輸送体が⁸⁾、VGLUTと同じ物であることが明らかにされ、前者はVGLUT1、後者はVGLUT2と呼ばれるようになった¹⁻⁵⁾。さらに、現在はVGLUT3も同定されている⁸⁻¹⁰⁾。

成熟ラットの脊髄においてVGLUT2は、灰白質と白質に広く存在している^{11,12)}。特にVGLUT1が脊髄後角のI層とII層の外側部にまばらに分布するのに対し、VGLUT2はこれらの領域に豊富に見られる¹¹⁾。また、VGLUT2は一次求心性神経のうちAδ侵害受容神経の終末、および脊髄後角にある脊髄由来のニューロンのうちP物質、ソマトスタチン、ニューロテンシンおよびエンケファリンなどのペプチドとグルタミン

酸が共存している神経の終末に存在することが明らかになっている¹²⁾。さらに一次求心性神経のうち無髄神経も弱いVGLUT2免疫陽性を示すことが示されている¹²⁾。

形成期中枢神経系において、グルタミン酸は神経伝達のほか、神経可塑性にも関与し、神経栄養因子としての重要な神経生物学的な働きをもつと考えられている¹³⁾。しかしながら、脊髄の発生においてグルタミン酸がいつどこでどのような働きをしているかはよくわかっていない¹⁴⁾。脊髄の形成過程で、グルタミン酸がどのような役割をしているかを解明するための基礎研究としてVGLUT2がマウスの発生に伴いつどのように見られるかについて、タンパク質のレベルで明らかにすることが本研究の目的である。

2. 材料と方法

材料

妊娠ICRマウスを日本エスエルシーから購入した。

方法

(1) 固定と包埋

妊娠9日、10日、11日、13日、15日、18日（それぞれE9、E10、E11、E13、E15、E18、膈プラグの形成日を0日とする）の母親ICRマウス各1匹をペントバルビタールで深麻酔し、開腹し、胎仔を取り出した。冷PBS（0.9%NaClを含む0.01Mリン酸緩衝液）中で羊膜、胎盤を取り除き、良く洗い、胎仔の冷麻酔を行った。E9、E10、E11、E13の胎仔は、酸アルコール液、4%パラホルムアルデヒド、ボーディアンII液でそれぞれ3~5匹ずつ浸漬固定した。E15、E18の胎仔は、冷麻酔下で断頭し脊柱を切り出しそれぞれの固定液で同様に浸漬固定した。E18の胎仔は固定液中で脊柱から脊髄を取り出した。

それぞれ4~5時間浸漬固定したのち、酸アルコール液とブアンII液固定の標本は80%アルコール液に、4%パラホルムアルデヒド固定標本はPBSに移し換えた後、脱水し、パラフィンに包埋した。

(2) 免疫組織化学

パラフィン包埋した試料は、それぞれマイクロトームで6~7 μ m厚に薄切し、脱パラフィンした。試料を0.1Mクエン酸緩衝液（pH6.0）中でマイクロウェーブ（500W）を5分間照射して抗原賦活化を行った後にPBSに保存した。

① 抗VGLUT2抗体

スキムミルク（雪印）を0.1%Triton X-100入りPBS（tPBS）に5%濃度で溶かした溶液を用いて、各切片を室温で1時間ブロッキングした。続いて、抗VGLUT2抗体（モルモット、10,000倍希釈）を用い4℃で一晩かけて一次抗体を反応させた。tPBSに続いてPBSで洗った後、室温で1時間ビオチン化抗モルモット抗体（ロバ、200倍希釈、Vector、Burlingame、CA）により二次抗体反応を行った。さらにtPBS、PBSで洗った後、ABC試薬（Vector Elite Kit）反応を4℃で1時間行った。その後0.02%ジアミノベンチジン、0.06%硫酸ニッケルアンモニウム、0.005%過酸化水素水を用いて免疫反応を発色させた。抗VGLUT2抗体は、免疫吸収試験をして特異性を確認した抗血清を用いた⁽¹⁵⁾。

② 抗シナプトフィジン抗体

シナプスを同定するためにシナプスに存在するシナプトフィジンの免疫染色を行った。5%スキムミルクでブロッキングを行った後、切片を抗シナプトフィジンモノクローナル抗体（Sigma、St. Louis、MO）で処理した。ビオチン化抗マウス抗体（ウマ、200倍希釈、Vector）で二次抗体反応を行った。ブロッキング、一次抗体、二次抗体の反応時間、温度は抗VGLUT2抗体の反応と同様とした。二次抗体反応以降はVGLUT2抗体の反応と同様の処理を行った。

3. 結果

(1) 固定液の決定

酸アルコール液、4%パラホルムアルデヒド、ボーディアンII液を用いて、標本の固定を行った。その中で最も固定液による試料の収縮が少なく、かつ良好な染色性を得たのはボーディアンII液であった（データは示さない）。そのため本研究ではボーディアンII液固定組織切片に関する免疫組織化学の結果のみを記述する。

(2) E9の結果

E9では抗VGLUT2抗体の免疫陽性は見られなかった（図1A、図3）。

(3) E10の結果

E10では抗VGLUT2抗体の免疫陽性が、脊髄神経の脊髄への侵入部位で脊髄の表層（図1B大矢印、C矢印、図3）、および腹側部にもわずかに認められた（図

1 B小矢印、図3)。後者は、白前交連（前交連ventral commissure）と前索に相当する部分と考えられる。

(4) E11の結果

E11の横断切片では脊髄神経の侵入部位のVGLUT2免疫陽性反応は非常に染色性を増し、分布域も明らかに拡張した（図1 D大矢印、図3）。脊髄底板で交叉する交連ニューロンの線維は、弱い明確な免疫陽性を示した（図1 D中矢印、図3）。白前交連（図1 D*印）、前索および側索部分（図1 D小矢印）にも免疫陽性の神経線維が確認できた（図3）。一方、抗シナプトフィジン抗体による免疫染色においては、陽性反応はVGLUT2陽性を示す脊髄神経の侵入部位に一致して脊髄表層で観察された（図1 E矢印）。E11の矢状断切片では、脊髄の長軸に沿って走るVGLUT2陽性線維が、背側部に認められた（図1 F大矢印）。横断切片で観察された脊髄背側の強い免疫陽性構造に相当するものと考えられる。また、脊髄底板の交連神経線維や同側白質への脊髄起源の神経線維も観察された（図1 F小矢印）。

(5) E13の結果

E13では、脊髄神経侵入部位においてVGLUT2免疫陽性はやや染色性が低下したものの、後索での分布域はさらに広がった（図2 A、図3）。前索・側索においても広い範囲で陽性反応が認められた（図2 A、図3）。灰白質にはほとんど陽性反応は確認できないが、後索から灰白質内に入る少数の弱い免疫反応を示す陽性線維が認められた（図2 B矢印、図3）。

(6) E15の結果

E15では、強いVGLUT2免疫陽性反応が、脊髄白質に広範囲に認められ、また灰白質においても頻繁に確認できた（図2 C）。白質では陽性線維のみならず白質全体が瀰漫性に淡く染まった（図2 C、D、図3）。後角内側部から外側部にかけて、後索から侵入する陽性線維（図2 D小矢印、図3）や、後角内側部から中間質内側部に至る陽性線維が観察された（図2 D大矢印、図3）。運動ニューロン領域でも陽性線維が観察された（図2 C大矢印、図3）ほか、運動ニューロン領域のやや背側部に局在する細胞に免疫陽性が認められた（図2 C小矢印）。

(7) E18の結果

E18では、VGLUT2免疫陽性反応は、白質と灰白質の両方で、広い範囲に認められた（図2 E、図3）。特に後角では灰白質全体が染まり、灰白質内にVGLUT2を持つ線維のシナプス形成が進行したことが伺われた（図2 F矢印）。その結果、後角内では陽性線維に囲まれた免疫陰性神経細胞が明瞭化した（図2 F*印）。

4. 考察

VGLUTには、現在VGLUT1、VGLUT2およびVGLUT3の3つのサブタイプが報告されている。そのうちVGLUT1とVGLUT2のアミノ酸配列は82%の相同性を持つが⁴⁾、ほ乳類の脳内分布は明確な違いがある^{3, 15, 16)}。VGLUT3は、コリン作動性ニューロンやモノアミン作動性ニューロンにも発現するが、その生理学的な意義はわかっていない⁸⁻¹⁰⁾。

脊髄では、VGLUT1は後角のI、II層ではあまり局在しない¹¹⁾のに対し、VGLUT2はI、II層を含めて広い層に分布している^{11, 12)}。そのため、痛みに関与したI、II層に終末を持つ無髄神経にVGLUT2が存在していると考えられている¹²⁾。ただ、発生のどの段階から脊髄のどこにVGLUT2が現れてくるのか、さらにVGLUT1との発生段階での共存性などに関するVGLUT2の研究報告はなされていない。

E10からE11で認められた脊髄背側部の免疫陽性部位はいわゆるthe oval bundle of Hisと呼ばれる一次求心性線維の中枢枝の長軸方向への束（後索の線維束）と一致していると考えられる¹⁷⁾。E11の矢状断切片による観察ではこの陽性線維が後索の線維束であることが確認された。脊髄に入った感覚神経の中枢枝は後索として頭尾両方向へ上行あるいは下行するが、E11のマウスでは2髄節を超えることはない¹⁷⁾。

本研究では、E10の脊髄腹側の白前交連と前索域に、少数の免疫陽性の線維を確認できた。この線維はE11の観察から考えると、白前交連で交叉・非交叉の脊髄起源のニューロン（脊髄固有・介在・上行路ニューロン）の神経線維が一部免疫陽性になったものと考えられる。E11の横断面では白前交連、前索および側索に免疫陽性線維が確認できる。さらに、白前交連で交叉する交連線維と思われる線維にも弱い免疫陽性を認め、矢状断切片観察においてもこれに相当する陽性線維が確認できた。ラットでは脳幹から脊髄への下行線維は胎生14.5日¹⁸⁾、皮質脊髄路はさらに遅く、頸髄に

達するのは生後1日、腰髄に達するのは生後5日¹⁹⁾であり、マウスも同様と考えられる。したがって、E11ではまだ脳からの下行線維は脊髄に到達しておらず、存在する前索、側索の神経線維はすべて脊髄起源のニューロンと考えられ、これらのニューロンが反対側へ向かう線維、または同側の白質を上行・下行する線維が免疫陽性を示したと思われる。

前索・側索・後索を上下行するこれらの神経線維のどの部分が免疫陽性を示すのだろうか。VGLUT2は成熟ラットではグルタミン作動性ニューロンのシナプス小胞に局限し、わずかながら細胞膜にも見られるという³⁾。ニワトリ胚ではシナプス形成は初めに白質から始まり、後に灰白質で見られるようになる²⁰⁾。本研究で示されたマウス脊髄におけるVGLUT2免疫陽性の出現が白質から始まり灰白質に広がるという免疫組織化学解析結果は、上記のシナプス形成パターンと一致している。また、E11脊髄におけるシナプトフィジン免疫染色においてもthe oval bundle of Hisが染まっていることから、白質でシナプスが形成され、そこにVGLUT2タンパク質が存在することが示唆される。しかし、E10～11では陽性反応は伸長中の軸索先端ばかりではなく、神経線維全体に認められた。電顕免疫組織化学による観察が必要ではあるが、次のようなことが考えられる。(1) 莫大な数の免疫陽性線維の終末部が重なって線維状に見える。(2) 細胞体から終末への輸送中のVGLUT2タンパク質が染色された。(3) 発生過程でVGLUT2は小胞性グルタミン酸輸送以外の役目を持っており、細胞膜などに一過性にタンパク質を発現している。もともと無機リン酸輸送体として見つかったものであり、発生期の軸索で、このような働きをしているのかもしれない。

E13の後角において灰白質に入る免疫陽性線維が観察された。マウスではE12に初めて感覚神経の線維がthe oval bundle of Hisの部分から灰白質に侵入し、E13では腹側に向かう神経は脳室層と分化中の後角との境目を腹側に向かう¹⁷⁾。これらの一次求心性線維はグルタミン酸作動性の神経であると考えられる¹²⁾が、免疫陽性の線維は少数であった。軸索終末部にまだVGLUT2タンパク質が見られないのか、含量が少ないため免疫組織化学的検出限界以下かもしれない。

E15の白質では陽性線維のみならず白質全体が瀰漫性に染まり、白質内でVGLUT2を持つシナプスが豊富に形成されてきたことが想定された。上述したように

ラットでは脳幹から脊髄への下行性線維はE14.5¹⁸⁾に確認されるので、今回の結果は、脊髄起源ニューロンのシナプス形成のみならず、脳幹から下行してきたグルタミン酸作動性神経によるシナプス形成も含まれている可能性がある。E18の陽性反応は脊髄全体、特に後角では各線維が染まっているというより全体的な瀰漫性染色を呈し、灰白質全域に渡ってグルタミン酸作動性シナプスの多くにVGLUT2タンパク質が存在することが示唆された。成熟ラットでは後角深層の内側部を除く広い領域でVGLUT2が存在している¹²⁾。E18では成熟動物におけるVGLUT2タンパク質の局在領域と近い分布パターンを示してきていると言える¹¹⁾。

以上の結果は、脊髄ではE10にthe oval bundle of His(将来の後索)と脊髄腹側部、E11で前索、側索、交連ニューロン線維、E13までに灰白質に入る神経線維、そしてE18までに灰白質でVGLUT2免疫陽性が出現することを示している。従って、(1) 一次求心性神経の中核枝終末と脊髄起源のニューロンの軸索終末では、発生早期からVGLUT2タンパク質が発現すること、および(2) 白質、灰白質に入る神経線維、そして灰白質の順にVGLUT2を持つシナプスが形成されることが考えられる。

【引用文献】

- 1) Bellocchio, E.E., Reimer, R.J., Fremneau, R.T. Jr. and Edwards, R.H.: Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter, *Science* 289, 957-960 (2000)
- 2) Takamori, S., Rhee, J.S., Rosenmund, C. and Jahn, R.: Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons, *Nature* 407, 189-194 (2000)
- 3) Fremneau, R.T. Jr., Troyer, M.D., Pahner, I., Nygaard, G.O., Tran, C.H., Reimer, R.J., Bellocchio, E.E., Fortin, D., Storm-Mathisen, J. and Edwards, R.H.: The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse, *Neuron* 31, 247-260 (2001)
- 4) Takamori, S., Rhee, J.S., Rosenmund, C. and Jahn, R.: Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2), *J. Neurosci.* 21, RC182: 1-6 (2001)
- 5) Varoqui, H., Schäfer, M.K., Zhu, H., Weihe, E. and Erickson, J.D.: Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses, *J. Neurosci.* 22, 142-155

- (2002)
- 6) Ni, B., Rosteck, P.R.Jr, Nadi, N.S. and Paul, S.M.: Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na⁽⁺⁾-dependent inorganic phosphate cotransporter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5607-5611 (1994)
 - 7) Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H., Hisano, S., Kasuya, H., Hori, T., Yamada, S., Tomura, H., Yamada, Y., Inoue, I., Kojima, I. and Takeda, J.: Molecular cloning of a novel brain-type Na⁽⁺⁾-dependent inorganic phosphate cotransporter, *J. Neurochem.* 74, 2622-2625 (2000)
 - 8) Fremeau, R.T. Jr, Burman, J., Qureshi, T., Tran, C.H., Proctor, J., Johnson, J., Zhang, H., Sulzer, D., Copenhagen, D.R., Storm-Mathisen, J., Reimer, R.J., Chaudhry, F.A. and Edwards, R.H.: The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 14488-14493 (2002)
 - 9) Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G.C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier, B., Giros, B. and El Mestikawy, S.: A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons, *J. Neurosci.* 22, 5442-5451 (2002)
 - 10) Takamori, S., Malherbe, P., Broger, C. and Jahn, R.: Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3, *EMBO Report* 3, 798-803 (2002)
 - 11) Li, J.L., Fujiyama, F., Kaneko, T. and Mizuno, N.: Expression of vesicular glutamate transporters, VGLUT1 and VGLUT2, in axon terminals of nociceptive primary afferent fibers in the superficial layers of the medullary and spinal dorsal horns of the rat, *J. Comp. Neurol.* 457, 236-249 (2003)
 - 12) Todd, A.J., Hughes, D.I., Polgar, E., Nagy, G.G., Mackie, M., Ottersen, O.P. and Maxwell, D.J.: The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn, *Eur. J. Neurosci.* 17, 13-27 (2003)
 - 13) Kandel, E.R.: The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses, *Science* 294, 1030-1038 (2001)
 - 14) Ina, A., Sugiyama, M., Konno, J., Yoshida, S., Ohmomo, H., Nogami, H., Shutoh, F. and Hisano, S.: Cajal-Retzius cells and subplate neurons differentially express vesicular glutamate transporters 1 and 2 during development of mouse cortex, *Eur. J. Neurosci.* 26, 615-623 (2007)
 - 15) Sakata-Haga, H., Kanemoto, M., Maruyama, D., Hoshi, K., Mogi, K., Narita, M., Okado, N., Ikeda, Y., Nogami, H., Fukui, Y., Kojima, I., Takeda, J. and Hisano, S.: Differential localization and colocalization of two neuron-types of sodium-dependent inorganic phosphate cotransporters in rat forebrain, *Brain Res.* 902, 143-155 (2001)
 - 16) Hisano, S., Hoshi, K., Ikeda, Y., Maruyama, D., Kanemoto, M., Ichijo, H., Kojima, I., Takeda, J. and Nogami, H.: Regional expression of a gene encoding a neuron-specific Na⁽⁺⁾-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) in the rat forebrain, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 83, 34-43 (2000)
 - 17) Ozaki, S. and Snider, W.D.: Initial trajectories of sensory axons toward laminar targets in the developing mouse spinal cord, *J. Comp. Neurol.* 380, 215-229 (1997)
 - 18) Kudo, N., Furukawa, F. and Okado, N.: Development of descending fibers to the rat embryonic spinal cord, *Neurosci. Res.* 16, 131-141 (1993)
 - 19) Donatelle, J.M.: Growth of the corticospinal tract and the development of placing reactions in the postnatal rat, *J. Comp. Neurol.* 175, 207-231 (1977)
 - 20) Kanemitsu, A. and Matsuda, S.: Synaptogenesis in the chick cervical cord and possible initial central pathways from dorsal root fibers to motor neurons - Golgi and electron microscopic studies, *Neurosci. Lett.* 48, 1-6 (1984)

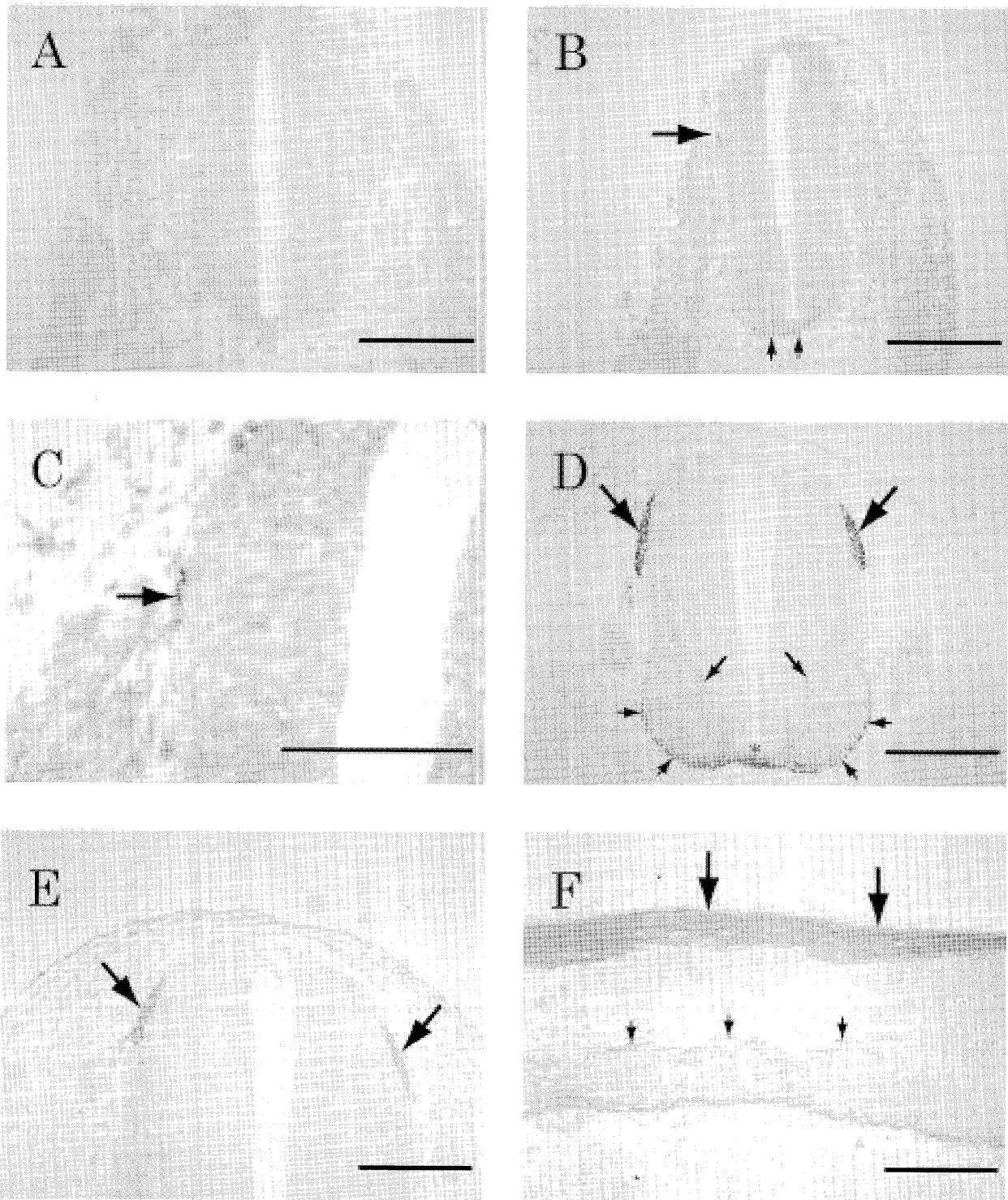


図1 E9～E11 マウス脊髄のVGLUT2およびシナプトフィジン免疫染色

A～D、F：VGLUT2染色、E：シナプトフィジン染色

A～E：脊髄横断面、F：脊髄矢状断面

A：E9。陽性線維は観察されない。B：E10。脊髄神経の脊髄への侵入部（大矢印）、脊髄腹側部（小矢印）において陽性線維が出現する。C：E10 脊髄背外側拡大図。脊髄神経の侵入部（矢印）が免疫陽性反応を示す。D：E11。脊髄神経の侵入部（大矢印）、脊髄交連ニューロンの神経線維（中矢印）、前索・側索（小矢印）および白前交連（*印）で陽性線維が存在する。E：E11。シナプトフィジン陽性線維は脊髄神経の脊髄への侵入部（矢印）に位置する。F：E11 脊髄。the oval bundle of His（大矢印）および脊髄起源ニューロンの神経線維（小矢印）に免疫陽性反応が認められる。バーの長さ：A-B、D-F：200 μ m、C：100 μ m

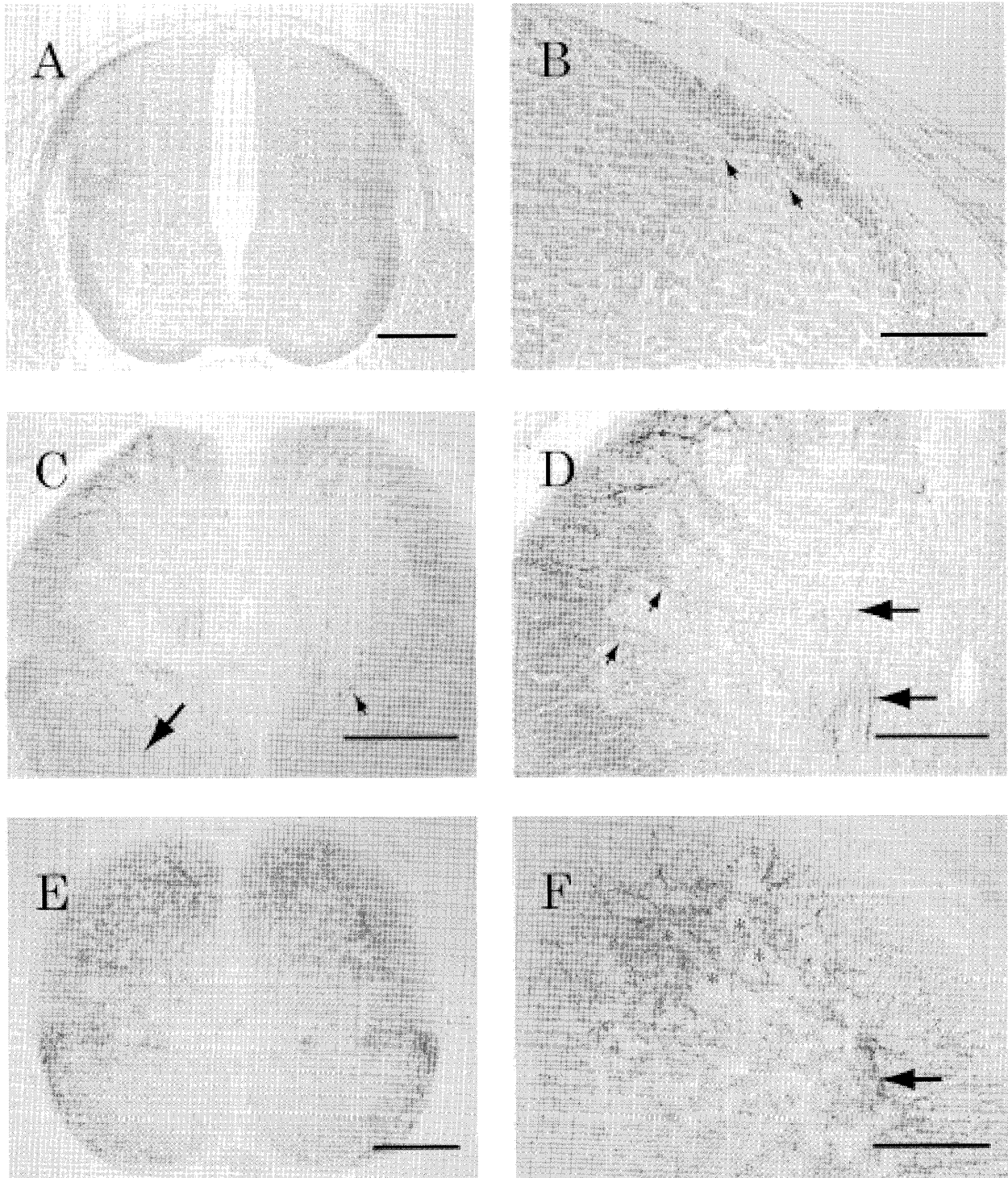


図2 E13～E18マウス脊髄のVGLUT2免疫染色

A : E13. 陽性線維は白質の広範囲で認められる。B : E13脊髄背外側拡大図。少数の陽性線維が後索から灰白質に入る (小矢印)。C : E15. 白質全体が弱免疫陽性反応を示す。運動ニューロン領域で陽性線維が認められる (大矢印)。免疫陽性神経細胞体が運動ニューロン群の背側部に局在する (小矢印)。D : E15脊髄背外側拡大図。後索から灰白質内に侵入する陽性線維 (小矢印) と脊髄腹側へ向かう陽性線維 (大矢印) が確認できる。E : E18. 白質に加え、灰白質も瀰漫性免疫陽性反応を示す。後角の強免疫陽性に注目。F : E18脊髄背外側拡大図。脊髄後角実質全体が免疫陽性を示し (大矢印)、免疫陰性神経細胞体 (*印) が明瞭に観察される。バーの長さ : A, C, E: 200 μ m、B: 50 μ m、D, F: 100 μ m

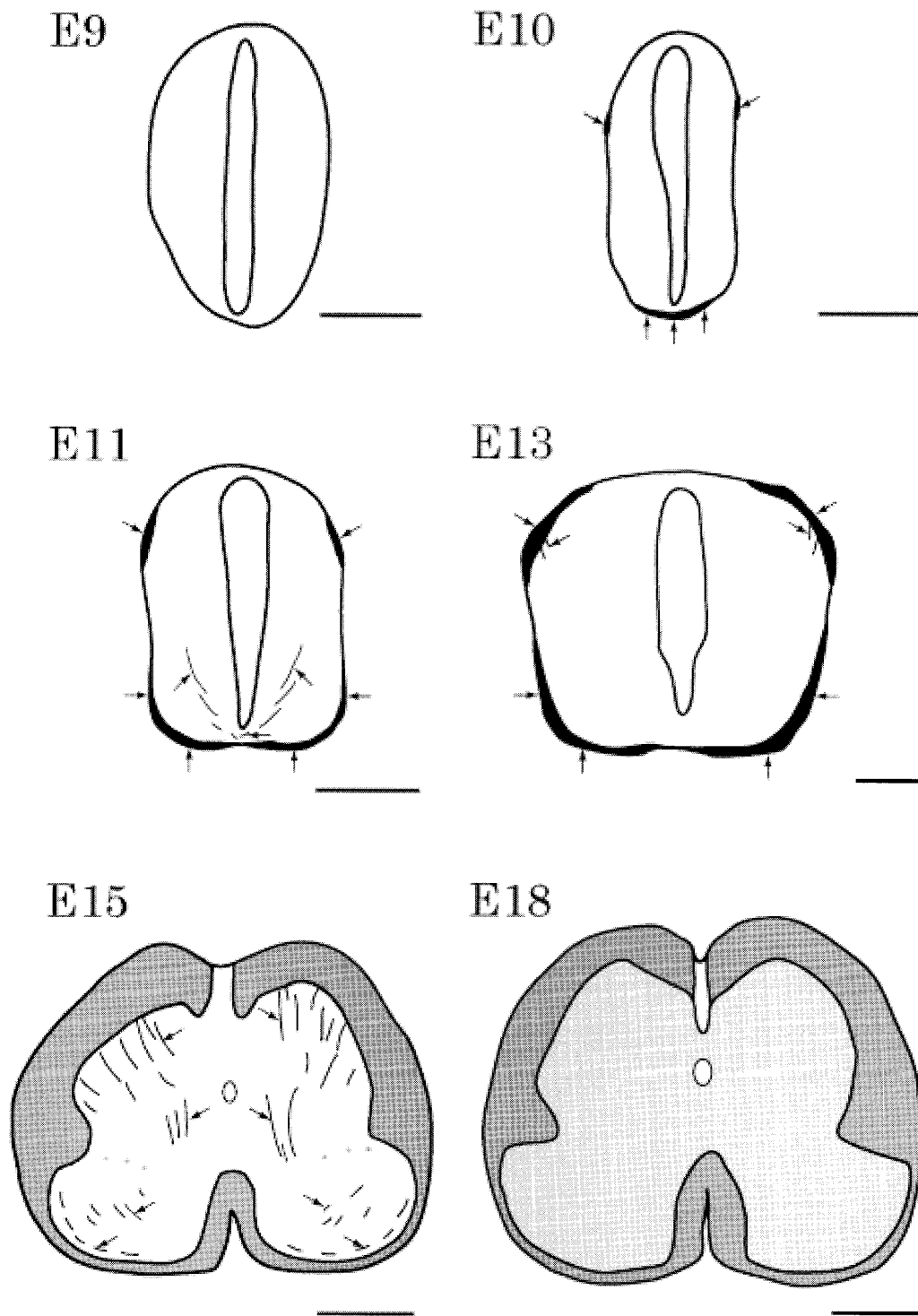


図3 E9～E18マウス脊髄のVGLUT2免疫染色（模式図）

E9～E18の結果を示す模式図。E9：陽性線維は観察されない。E10：脊髄神経の脊髄への侵入部と脊髄腹側部において陽性線維が出現する（矢印）。E11：脊髄神経の侵入部、脊髄交連ニューロンの神経線維、前索・側索および白前交連で陽性線維が存在する（矢印）。E13：陽性線維が白質の広範囲で認められ、また、少数の陽性線維が後索から灰白質に入る（矢印）。E15：白質全体が弱免疫陽性反応を示す（濃い網掛け部分）。後索から灰白質内に侵入する陽性線維，脊髄腹側へ向かう陽性線維，運動ニューロン領域で陽性線維が認められる（矢印）。E18：白質（濃い網掛け部分）に加え、灰白質も瀰漫性免疫陽性反応を示す（薄い網掛け部分）。バーの長さ：200 μ m