

第100回 日本眼科学会総会 宿題報告 I

網膜視神経移植

移植による視神経再生

福田 淳

大阪大学医学部第二生理学教室

共同研究者

渡部 眞三, 澤井 元, 三好 智満, 大出 尚郎

研究協力者

新島 旭, Rasminsky

要 約

成熟哺乳動物の視神経線維は、外傷などでいちど損傷されるとそのままでは再生しない。したがって、視覚機能の回復は望めなかった。しかし、最近の研究によって視神経線維のおかれている細胞外環境を神経移植によって末梢神経と同じものに変えてやると、軸索再生することがわかってきた。この末梢神経移植による視神経再生の研究は、これまで小動物での形態学的研究が中心であった。我々は将来の臨床応用の可能性をめざして、より高次の視覚機能を持ったネコにおいて視神経の再生を実現し、その起始細胞である神経節細胞の形態学的特徴のみならず、生理学的性質を明らかにしてきた。その結果、現在以下のことが明らかにされた。① 軸索再生する神経節細胞は約2～4%であり、特にアルファ細胞が軸索再生しやすい。また、アルファ細胞の軸索再生がしやすいのはそれが軸索切断に対して抵抗性を持っているからである。②

軸索再生した網膜神経節細胞は本来の樹状突起野を維持しているが、再生軸索は正常に比べ細く、無髄のことが多い。③ 再生視神経線維は正常動物での光情報伝達機能を維持しており、生理学的に Y, X, W 細胞に分類できる。④ 視神経切断後のパターン反転網膜電図(ERG)の振幅の低下は、坐骨神経移植によってより緩徐になる。以上の結果から、神経移植によってネコの網膜神経節細胞が逆行変性から免れ、かつ視神経線維を再生させ、それらが生理学的に機能することがわかってきた。さらに、それらを長期に生存させ、本来の脳内の標的である視覚中枢ニューロンにシナプス形成させることが今後の課題である。(日眼会誌 100: 956-971, 1996)

キーワード：網膜神経節細胞, 視神経線維, 機能再生, Y, X, W 細胞, ネコ

Optic Nerve Regeneration by Nerve Transplantation

Yutaka Fukuda

Department of Physiology, Osaka University Medical School

Abstract

The optic nerve fibers of adult mammals, once injured, can not regenerate spontaneously. However, from recent studies it has become clear that when their extracellular environment is replaced

with that of the peripheral nervous system, namely surrounded with Schwann cells, they can regenerate their axons through the grafted nerve. Previous studies on the optic nerve regeneration by periph-

別刷請求先：565 大阪府吹田市山田丘2-2 大阪大学医学部第二生理学教室 福田 淳
(平成8年10月17日受付, 平成8年10月17日改訂受理)

Reprint requests to: Yutaka Fukuda, M.D. PhD., Department of Physiology, Osaka University Medical School, 2-2, Yamadaoka, Suita-shi Osaka-fu 565, Japan

(Received October 17, 1996 and accepted in revised form October 17, 1996)

eral nerve transplantation have been done mostly in rats or hamsters. With an expectation of clinical application in future, we studied the optic nerve regeneration of adult cats because a great deal of knowledge on the optic nerve fibers and retinal ganglion cells had been accumulated. From recent series of studies we have obtained following results. ① Retinal ganglion cells that regenerated axons constitute 2~4% of the total population, and among several types of ganglion cells, α cells have the greatest capacity for axonal regeneration. The ability of α cells for axonal regeneration is related to their relative resistance to axotomy. ② Retinal ganglion cells with regenerated axons preserve their original dendritic fields, but their axons are thinner than normal, and mostly unmyelinated. ③

Single unit activities recorded from teased fibers of regenerated axons revealed that the units have mostly normal receptive field properties, enabling us to classify them into Y, X or W cells. ④ Amplitude reduction of pattern reversed electroretinogram (ERG) after the optic nerve section was slowed, to some extent, by the peripheral nerve transplantation. How we can reconnect these regenerated optic nerve fibers to the target neurons in the central visual system is a matter for future study. (J Jpn Ophthalmol Soc 100 : 956—971, 1996)

Key words: Retinal ganglion cell, Optic Nerve fiber, Functional regeneration, Y, X, W cell, Cat

I 緒 言

1. 歴史的背景

一般に成熟した哺乳動物の中枢神経系のニューロンは軸索を損傷されると順行性、逆行性に変性が進行し、中枢神経回路が修復されることはないと言われてきた。しかし、今世紀の初頭にすでに Ramon y Cajal とその弟子の Tello は、ウサギの脳皮質に坐骨神経組織片を移植し、中枢神経系のニューロンの軸索が移植片内部に長い距離にわたって再生することを観察し、末梢神経のシュワン細胞から何らかの神経栄養因子がでていることが再生にとって必要であると考えていた¹⁾²⁾。つまり、少なくともある種の中枢ニューロンは潜在的に軸索再生能力をもち、適当な細胞外環境を与えてやれば軸索再生するといえる。脳皮質組織の中への神経移植では、軸索再生させるニューロンの種類や再生軸索の投射する部位をコントロールするのは困難で、たとえ一部が再生したとしてもそれらの機能的な神経結合などについて研究することが出来なかった。

1980年代になって、末梢神経移植による中枢神経の再生が改めて注目されるようになってきた。それはカナダの Aguayo ら³⁾のグループが脳幹、脊髄、視床などの中枢神経組織の中に長い坐骨神経片の一端を差し込んで移植すると、各種の中枢ニューロンがそこを通過して長い距離にわたって軸索再生することを逆行性標識法を用いて証明したからである。神経回路の再建や機能回復の研究のやりやすさを考慮して、彼らは視覚神経系に着目し、網膜の一部に傷をつけ、その損傷部に坐骨神経片を吻合移植し、軸索切断された神経節細胞の軸索が長い距離にわたって再生することを逆行性標識法で証明した⁴⁾。それより少し以前に、McConnell ら⁵⁾は成熟マウスの網膜に損傷を加えてもしばらくすると神経節細胞の軸索が網膜内では再生していることを渡銀染色法で証明した⁵⁾。よ

く知られているように、多くの哺乳動物で網膜神経節細胞の軸索は視神経の中ではほとんどすべてが有髄線維であるが、網膜内では無髄である。そこで彼らは、哺乳動物の網膜神経節細胞は本来軸索再生能力を持つが、視神経内で切断されると髄鞘があるため、それによって再生が阻止されているのだろうと考えた。

次いで、Aguayo ら³⁾のグループはラットの眼窩内で視神経を完全に切断し、その断端に坐骨神経を移植し、それに沿って軸索再生した網膜神経節細胞の数を全伸展標本上で調べ、おおよそ3~5%が再生することを示した⁶⁾。さらに、坐骨神経移植片の中枢端を上丘の中に導くことによって、再生してきた視神経線維の終末が上丘ニューロンと新たにシナプス形成することを horseradish peroxidase (HRP) の順行性軸索標識法を使ってつきとめた⁶⁾⁷⁾。我々は末梢神経移植法によって再建されたハムスターの網膜—上丘路の視覚情報伝達機能が回復することを電気生理学的・行動学的に証明してきた^{8)~10)}。

2. 末梢神経移植のストラテジー

図1Aに示すように中枢神経ニューロンは軸索を切断されると順行性のみならず逆行性に變性し、やがて細胞体も壊死に陥ってしまう。そのメカニズムは現在次のように解釈されている。つまり、たとえ軸索切断端から局所的発芽が起こったとしても、中枢ニューロンの軸索をとりまいてオリゴデンドロサイト(稀突起膠細胞)とそれによって形成された髄鞘の膜成分が軸索再生を阻止する因子を出すため、やがて退縮し逆行性變性に陥る¹¹⁾¹²⁾。上にも述べたように網膜内にある神経節細胞の無髄の軸索は一度切断されても再生が容易に起こり、長い再生軸索を視神経乳頭に向けて伸ばす。ところが、視神経乳頭まで来ると視神経に侵入せず、再生軸索が逆戻りする像が Sawai ら¹³⁾によって報告されている。

一方、切断された網膜神経節細胞の軸索、つまり、視神経軸索を末梢神経系の環境下に置くと、シュワン細胞が

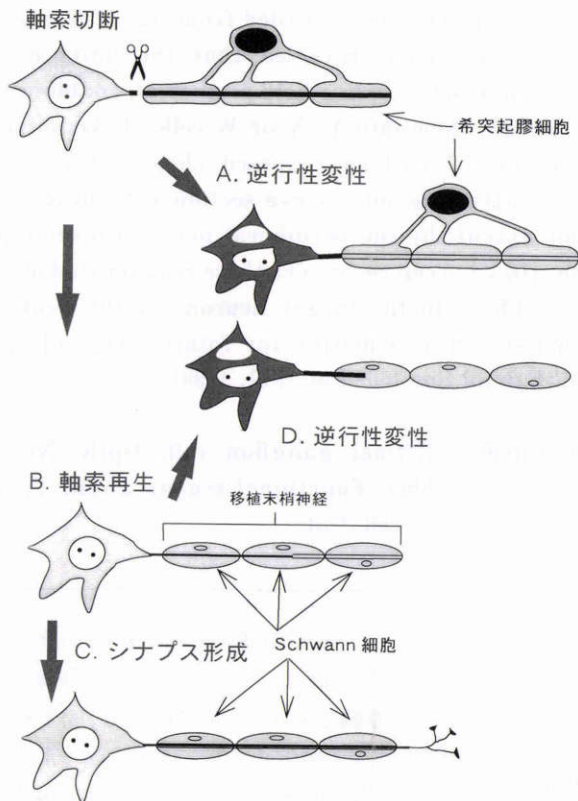


図1 軸索が切断された中枢神経細胞の変遷を示す概念図。

A: 切断された軸索は中枢神経系のオリゴデンドログリア(希突起膠細胞)が形成する髄鞘の表面では伸長できず、やがて逆行変性しその細胞体も死滅する。
 B: シュワン細胞を含んだ末梢神経を軸索の切断端に移植すると、軸索は髄鞘内へ伸長し細胞体も生存する。
 C: 標的細胞とシナプスを形成することができれば細胞体、再生軸索ともにさらに安定化する。
 D: 標的細胞がなくシナプス形成ができないと軸索は再び変性し、やがて細胞体も変性する。

出す栄養因子によって再生不能であった視神経線維も再生することができる(図1B)。これはシュワン細胞の表面に軸索再生を阻害する分子が存在しないだけでなく、シュワン細胞が再生を促進させる神経栄養因子を産生しているためと考えられる¹⁴⁾¹⁵⁾。次に、再生軸索の先端が適当な標的細胞を見つけ、シナプス形成することが出来れば、細胞は長期に生存し、標的細胞との間に作る神経回路も機能を再建することが可能である(図1C)。しかし、適当な標的細胞とシナプス形成できなければ、再び逆行性変性に陥り、細胞体も長期には死滅してしまう(図1D)。そこで、網膜神経節細胞を長期に生存させ、また、視覚情報を伝達し、視覚神経回路を再構築するためには、視神経切断端に末梢神経を移植するのみならず、その中枢端を視覚中枢に導く、いわゆる架橋移植をすることが必要である。

3. 本研究での目標

我々はこれまで主としてラットやハムスターを用いた研究において、切断された視神経の断端に末梢神経を移

植することによって視神経を再生させ、さらに、その再生視神経の先端を視覚中枢に導くことによって、中枢でシナプスを再形成させて視覚機能を回復させることに成功してきた^{8)~10)}。一方、単一ニューロンレベルでの数多くの視覚情報処理の研究はネコやサルを中心に行われてきた^{16)~18)}。これらの動物において、同様の移植によって視神経再生が可能になれば、視覚機能再生のより詳細な研究ができると同時に、ヒトへの臨床応用の可能性が広がってくる。以上の観点から、我々は末梢神経移植法によってネコの視神経線維が再生することをまず形態学的手法で証明し、さらに、再生したネコ視神経線維および網膜の視覚情報伝達機能を調べてきた^{19)~24)}。また、移植による効果をより明らかにするため、対照としての視神経切断ネコでも、主として形態学的に定量的解析を進めてきた²⁵⁾。さらに、最近では網膜機能全体を調べるため、パターン反転網膜電図(ERG)を記録し定量的に移植の効果を調べている。宿題報告では我々が最近行ってきた坐骨神経移植によるネコ視神経再生の研究を総括するとともに、現在進行している架橋移植実験の達成度についても報告した。

II 実験方法

1. 視神経切断および坐骨神経移植手術法²²⁾

笑気とハロセンの混合ガスで吸入麻酔した成ネコ(2~4 kg)の頭部を脳定位固定装置に固定し、自発呼吸で動物を維持した。前頭洞上面の前頭骨を除去し、さらに、前頭骨眼窩部を広く切開し、手術顕微鏡下で脂肪組織と上直筋を除去して視神経鞘を剖出した。鞘上面の長・短毛様体神経を切断しないようにして視神経鞘を縦に開き、左視神経を強膜から3~6 mmの所で眼科用剪刀で完全に切断した。視神経切断ネコの場合には、次に述べる逆行性標識用の色素注入以外はこのままで皮膚を縫合し、抗生剤を適用して手術を完了した。移植ネコの場合には視神経断端に同一個体の大腿から切り出した坐骨神経前枝(総腓骨神経、50~70 mm)の断面を、少なくとも3か所で微小手術用の縫合糸(Ethilon 10-0)で縫合した。移植神経の他端は、側頭筋を開いてその中に埋入し、筋と皮膚をそれぞれ縫合して閉じた。移植神経を筋内に留置することによって血管が浸潤し、シュワン細胞の生存と軸索の再生が促進されると考えた。

大脳皮質あるいは外側膝状体への坐骨神経の架橋移植の場合にはそれぞれの大脳領野の硬膜を切開し、移植片を露出させてその先端を直接あるいは特別のガイドを使って脳内に挿入し、10-0縫合糸で2か所で硬膜に縫合した。

2. 逆行性標識および細胞内注入法²²⁾

移植後約60日で移植ネコをペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®)で麻酔し、HRP(15%)あるいはtetramethyl rhodamine conjugated-dextran (TMRD,

分子量1万,10%)の溶液を移植神経に注入し,軸索再生した網膜神経節細胞を逆行性に標識した。標識物質を注入してから2日後に動物を固定液で灌流し,網膜伸展標本を作製した。HRPで標識された細胞はdiaminobenzidine(DAB)反応で可視化し,TMRDで標識された細胞は網膜を0.1Mリン酸緩衝液内に封入して落射蛍光顕微鏡下で観察し,それぞれ数えた。さらに,逆行性標識された細胞を蛍光顕微鏡下で観察しながら,細胞内にルシファーイエローあるいはHRPを注入し,それぞれ細胞の樹状突起の形態を観察した。

視神経切断ネコの場合には切断手術の際,その断端に1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI)を注入しておき,数か月後動物を深麻酔下で灌流固定した。全伸展標本を作製して色素を保持している細胞を生存細胞として同定した²⁵⁾。

一部の網膜ではHRPの細胞内注入のあとDAB反応を行った標本を垂直に切断し,樹状突起の広がっている内網状層での亜層(a層あるいはb層)を同定し,OFF-中心型,ON-中心型の区別を行った²⁶⁾。

3. 再生視神経線維の電子顕微鏡(電顕)解析²⁴⁾

末梢神経移植後約60日で動物を麻酔し,脳定位固定台に固定し,3%バイオサイチン溶液を充填したハミルトンシリンジを定位的に視神経乳頭に近づけ,10 μ lを注入した。20~24時間後に動物を深麻酔し,1%パラフォルム,1.25%グルタルアルデヒドで灌流の後,移植片を摘出しゼラチン包埋し,ピプラトームで50 μ mの切片にした。切片をさらに,HRP-ストレプトアビジンで反応させ,次にDABとH₂O₂で反応させ,2%オスミウムで固定,脱水の後,エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片はクエン酸鉛で染色し,JEM-100B電子顕微鏡で観察した。写真撮影には10,000倍,軸索直径の計測には26,000倍を用いた。

4. 再生視神経線維の電気生理学的記録法²³⁾

移植後60~90日に移植ネコを全身麻酔下で側頭部の皮膚,筋肉を切開し,移植神経を露出した。と同時に,周辺にミネラルオイルのプールを作り,移植片が乾燥しないように絶えず注意した。そのプールの中で手術用顕微鏡下で移植片を遠位端からマイクロピンセットで細い線維束に分け,フック型の銀線電極に乗せた。ユニットの自発活動を生体アンプで増幅し,ブラウン管上でスパイク波形を観察すると同時に,オーディオモニターで発火活動を聞いた。網膜神経節細胞の再生軸索のユニット活動であることは,光刺激に対する応答性で確認した。こうして記録されたスパイク発火活動をもとに,眼前57.3cmに置かれたスクリーン上にスポット光を投影し,それを点滅あるいは動かして,再生軸索をもつ神経節細胞の受容野の大きさやON-中心型,OFF-中心型などの光反応性および周辺抑制野の程度を調べた。性質が同定された光受容野中心のスポットの光の点滅に対する反応を

25~50回加算してヒストグラムを作成した。

5. パターン反転ERG記録法

成ネコにペントバルビタールナトリウム(ネンブタール[®]) (2mg/kg/hr)の持続点滴静注,またはハローセン(0.5%)で麻酔を施行した。ガラミン(2.5~5.0mg/kg/hr)の持続点滴静注によって眼球運動の抑制を行った。関電極としては直径3mmの人工瞳孔付きコンタクトレンズ電極を用い左眼に装着した。不関電極を右上眼瞼に置き,右耳介に塩化銀皿電極を置きアースとした。右眼はアイパッチで閉眼した。導出された電位は0.5~50Hzのバンドパスフィルターとハムフィルターを通して生体アンプで増幅し,パーソナルコンピューターで256~512回平均加算した。眼前57.3cmに垂直のスクリーンを置き,直像鏡で視神経乳頭を投影した後,網膜中心の位置を計算して決め,そこにパターン刺激呈示用のブラウン管(17インチ,32cm \times 24cm)の中心がくるように設置した。パーソナルコンピューターを用いて時間的・空間的にも正弦波変調を加えた縦縞模様のパターン反転刺激を提示し,空間周波数を0.1~10c/dの範囲で,時間周波数を1Hz,2Hz,4Hz,6Hz,8Hz(反転周期で,2Hz,4Hz,8Hz,12Hz,16Hz)の範囲で変化させた。位置x,時間t,最大輝度をLmax,最小輝度をLmin,縞の頂点間の距離を λ ,刺激周期をTとすると,管面の輝度L(x,t)は次式によって表される。 $L(x,t) = 1/2(L_{max} - L_{min}) \cos(2\pi x/\lambda) \cos(2\pi t/T) + 1/2(L_{max} + L_{min})$ 。背景輝度は0.4cd/m²,コントラストは約100%に設定した。加算された反応の波形をフーリエ解析し,基本周波数成分と2倍周波数成分に分け,各々の振幅を計測した。

III 結 果

1. 視神経切断後の生存細胞および軸索再生細胞の数と分布

視神経切断後約2か月生存した網膜神経節細胞数と,坐骨神経移植によって逆行性に標識された軸索再生細胞を表1にまとめた。坐骨神経移植ネコはTMRDを逆行性標識に使った2例のデータと,これより以前のHRPで標識した4例での結果が掲げられている。後者の場合には,ニッスル標本でHRPに標識されないが健全と思われる神経節細胞が,HRP標識細胞の約3~4倍存在したので,恐らく,HRPの取り込みが不十分であったと考えられる。成熟ネコの網膜神経節細胞数は網膜当り110,000~190,000といわれている^{27)~29)}ので,4,000~5,000細胞は全神経節細胞の2.5~4%に相当する。一方,4例の視神経切断動物での2か月後の生存神経節細胞数は平均3,200程度であった。注目すべきは軸索切断後2か月たってもかなりの神経節細胞が生存している点である。しかし,移植ネコの場合,逆行標識は移植片から行ったので,そこまで軸索再生していない細胞あるいは網膜内で生存しているが,軸索を移植片の中に伸

表1 坐骨神経移植ネコと視神経切断ネコでの逆行性標識された神経節細胞数の比較

	生存日数	逆行性標識物質	神経節細胞数
坐骨神経移植ネコ ²²⁾			
A	55	HRP	663
B	60	HRP	593
C	69	HRP	513
D	71	HRP	992
E	64	TMRD	5,040
F	65	TMRD	4,323
視神経切断ネコ ²⁵⁾			
A	58	DiI	2,472
B	61	DiI	5,585
C	57	DiI	1,660
D	58	DiI	3,287

HRP: horseradish peroxidase

TMRD: tetramethyl rhodamine-conjugated dextran.

DiI: 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate

²²⁾Watanabe et al., 1993. ²⁵⁾Watanabe et al., 1995.

ばしていない細胞は標識されていないはずである。したがって、それらを加えると、生存細胞数はさらに増加する。これらのことから、坐骨神経移植は軸索再生および生存維持にとっても有効であるといえる。事実、シュワン細胞や末梢神経片の眼球内移植によって軸索切断された神経節細胞の逆行性変性が阻止され、さらに軸索再生を促進させるという報告^{30)~32)}がある。

次に、全伸展標本上で標識細胞の網膜内分布を調べた。標識細胞の分布は、網膜の中心野と視神経乳頭付近に最も密であり、この分布パターンは以前正常の網膜で報告^{27)~29)}されている分布とよく似ている。周辺網膜でもかなりの標識細胞が存在するので恐らく、中心網膜、周辺網膜ともに均等に視神経線維を再生させるのだろう。

2. 軸索切断後の生存細胞と軸索再生細胞型の同定

初期の研究で、HRPで逆行性に標識された再生神経節細胞の細胞体の直径を計測したところ、ほとんどが20 μm 以上の大きい所に分布していることがわかった²⁰⁾。さらに、HRPの細胞内注入法で樹状突起の細部まで染めだしたところ、再生神経節細胞の樹状突起の先端部分が新たに伸びたり、一次突起の大部分が消失したと思われる樹状突起も認められた²²⁾。同様の変化はこれまで、ハムスター、ラットでも観察されている^{33)~35)}。この樹状突起の変化は正常網膜では見られないので、軸索を切断されたことによる反応として生じた樹状突起の可塑的伸展によるものと考えられる。とはいえ、次に述べるように大多数の細胞は、これまで正常網膜で報告されてきたアルファ、ベータ、ガンマ細胞³⁶⁾などの型に分類できた。

1) アルファ、ベータ、ガンマ細胞

アルファ(Y)、ベータ(X)、ガンマ(W)の3種類のタイプ^{36)~39)}が等しく軸索を再生しているか否かを、以下の方法で検討した。つまり、逆行性標識された神経節細胞の形

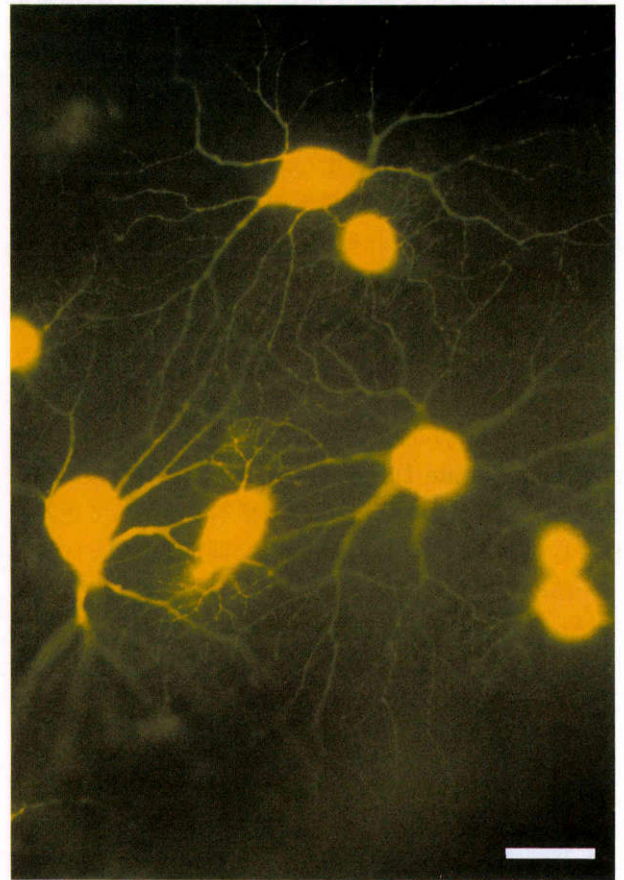


図2 伸展標本上での軸索再生網膜神経節細胞の写真。神経節細胞は移植片から逆行性に標識され、ルシファーイエローの細胞内注入によって樹状突起形態が観察された。その形態学的特徴から3つのアルファ細胞と、2つのベータ細胞が同定できる。バーは50 μm (渡部眞三撮影)

態を全伸展標本上で1つ1つ確かめていった。図2にはルシファーイエローの細胞内注入法で染めだされた3つのアルファ細胞、2つのベータ細胞の例が挙げられている。このように各網膜伸展標本において、数か所の領域にあるすべての再生神経節細胞の樹状突起を、ルシファーイエローの細胞内注入法で染めだし、樹状突起の形態からそのタイプを分類し、その領域をそれぞれのタイプの割合を求めた。図3上段にその結果を示した。正常網膜でのアルファ、ベータ、それ以外(NAB)の細胞の出現頻度(下段)と比べると、軸索再生群ではアルファ(Y)細胞の割合が特に高くなっており、ベータ(X)細胞の割合はあまり変わらず、それ以外の細胞が特に減っていた。軸索を切断された神経節細胞の生存率を同様の方法で求めたところ、アルファ細胞の割合は再生神経節細胞の場合と同様に高かったが、ベータ細胞の割合は極端に低かった²⁵⁾(図3中段)。このことから、アルファ細胞の高い再生率はその軸索切断後の比較的高い生存率と関係があると考えられる。軸索切断に対して最も弱いベータ細胞の場合、移植により生存自体も促進され、そのため軸索再生する細

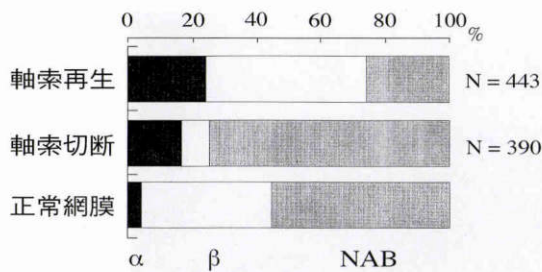


図3 軸索再生網膜神経節細胞の出現比率の比較。

正常網膜と、軸索切断、移植による軸索再生の場合での比較。アルファ(α), ベータ(β), その他(NAB)の細胞の割合を示す。いずれもルシファーイエローの細胞内注入により細胞型を同定した。

表2 アルファ(Y), ベータ(X), その他の細胞群での軸索再生率, 細胞生存率の比較

	細胞総数	細胞型の比率		
		アルファ	ベータ	その他
軸索再生神経節細胞 ²²⁾	443	23.9%	50.3%	25.7%
軸索切断生存した細胞 ²⁵⁾	390	16.4%	8.5%	75.1%
正常ネコでの神経節細胞 ²⁷⁾	150,000	4.2%	40.4%	55.6%
軸索再生率		19.0%	4.1%	1.6%
生存率		8.3%	0.5%	2.8%

²²⁾Watanabe et al., 1993. ²⁵⁾Watanabe et al., 1995. ²⁷⁾Hughes, 1981.

胞の割合も増えたものと考えられる。

次に、各細胞のタイプ毎の軸索再生率を算出した(表2)。表2の上半分はすでに図3で示したものと同一各細胞型での出現頻度である。正常ネコでの総細胞数を150,000として各細胞の出現頻度を4.2%, 40.4%, 55.6%として各細胞の正常網膜での総数がでてくる。その後に軸索再生細胞群での3型の比率, 23.9%, 50.3%, 25.7%を乗じることにより、各型の再生細胞の実数が算出できる。両者をもとに各細胞型での軸索再生率を算出した。その結果、Y細胞の19.0%, X細胞の4.1%, その他の1.6%が再生したことになる。つまり、Y細胞が他に比べ、軸索再生しやすいことが結論づけられた。なお生存率についても、同様に、Y細胞で高いことがわかる。しかし、一方、X細胞の場合、軸索切断による生存率が極端に低いのが、移植によってかなり救済され、軸索再生するのも事実である。

2) ON-中心型, OFF-中心型での軸索再生能の比較

神経節細胞がON-中心型かOFF-中心型かは、樹状突起を内網状層(inner plexiform layer, IPL)の内亜層(b層)あるいは外亜層(a層)のどちらに広げているかによって決定することができる^{40)~45)}。そこで軸索再生した神経節細胞で、細胞内注入によって細胞型を同定できた細胞の垂直標本を作製し、樹状突起の内網状層での分枝レベルを調べた²⁶⁾。HRP細胞内注入法で形態学的タイプ

が明らかになった81個の再生神経節細胞のうち33個がアルファ細胞で、そのうち29個(88%)がOFF-中心型であるのに対し、24個のベータ細胞のうち22個(92%)がON-中心型であった。しかしながら、アルファ細胞の一部の樹状突起が欠損したために同定が不可能であった細胞の多くはON-中心型であったので、アルファ細胞ではOFF-中心型が優位とは一概にはいえない。この問題については再生視神経線維の視覚情報伝達機能の項でもう一度ふれる。

3. 再生視神経線維の直径と髄鞘形成

以前の研究で、移植神経の断面の電顕的解析により、再生軸索がすべてシュワン細胞の細胞質か基底膜によって取り囲まれていることを報告⁴⁶⁾したが、再生軸索のすべてが再生視神経線維であるとはいえない。なぜなら、視神経切断端と坐骨神経の接合部から、周囲の末梢神経線維が迷入再生して、電顕の切片でその断面が再生視神経軸索のものと同定できないからである。そこで、今回の研究では、観察する軸索が真に再生した視神経線維であることを同定するため、眼球内の視神経乳頭から順行性に運ばれたバイオサイチンによって標識された線維についてのみ、その直径と髄鞘形成を調べた²⁴⁾。図4は電顕写真の1例である。中央にある有髄線維とその右上にある無髄線維の一部が順行性に黒く標識されている。いずれもシュワン細胞の細胞質によって囲まれている。左上側に見られるように無髄の再生軸索は多くの場合、複数の軸索が同時に一つのシュワン細胞によって囲まれているが、中央に見られるように有髄線維は常に一つのシュワン細胞に取り囲まれている。図4の電顕写真のように軸索断面での微小管が点の集合として現われる場合は、その軸索が垂直に切断されていると考えられる。511本の再生視神経線維のうち、434線維は垂直断面であるとされ解釈し、それらについて直径を測り、その分布を求めた(図5)。無髄線維の直径は0.5 μmにピークがあり、2.4 μmに至るなだらかな分布をする。一方、有髄線維の直径分布は0.7~1.6 μmと2.0 μm付近にピークのある二峰性の傾向がある。正常ネコでの視神経線維はすべて有髄であり、その直径分布は0.2 μmから5~6 μmに及ぶと報告⁴⁷⁾⁴⁸⁾されているので、再生軸索直径の分布は明らかに正常と異なる。ここで注目すべきは、直径が2.4 μmもある太い無髄線維があること、また、有髄線維は直径が0.7 μm以上のものしかないことである。今回の一連の研究は移植後の生存日数を約2か月と限っているが、再生軸索の有髄化がまだ不十分なのは術後日数が少ないためであるかも知れない。いい換えれば、生存期間をもっと長く保って電顕解析をすれば、より有髄化した線維が多くなるだろう。

4. 再生した視神経線維の視覚情報伝達機能

1) 軸索再生細胞の生理学的同定

正常ネコの網膜神経節細胞は、光刺激に対する反応性



図4 再生視神経線維の電子顕微鏡写真.

視神経乳頭に注入されたバイオサイチンによって順行性に標識された再生視神経線維が黒く標識されている。中央の軸索は有髄で右上側のは無髄である。いずれもシュワン細胞によって囲まれている。バーは $0.5 \mu\text{m}$ (渡部眞三撮影)

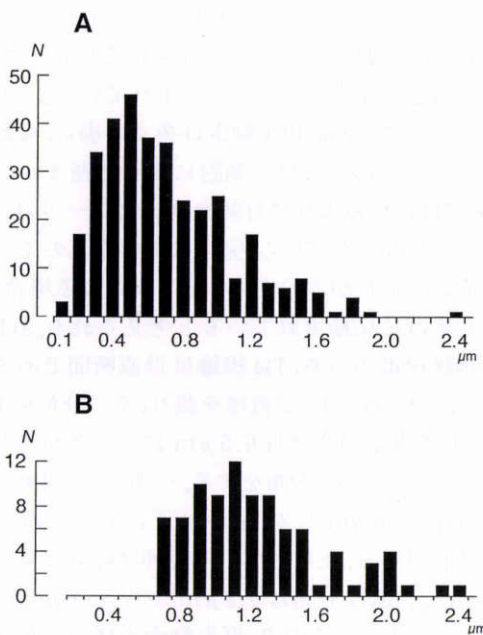


図5 再生視神経線維直径のヒストグラム.

A: 無髄線維の直径分布, $N=343$, $D=0.76 \pm 0.38 \mu\text{m}$.
 B: 有髄線維の直径分布, $N=91$, $D=1.28 \pm 0.39 \mu\text{m}$.
 サンプル線維数(N)と平均直径(D)±標準偏差.

の違いから, Y, X, W 型に分類され, さらに, それぞれ ON-中心型, OFF-中心型, ON-OFF-中心型などに区別される³⁷⁾³⁸⁾. 我々は軸索再生した網膜神経節細胞の光刺激に対する反応性を詳細に調べ, 正常な視覚情報伝達能が保たれているかどうかを検討した. 図6Aに示したユニットはON-中心型受容野を持っており, 速い動きの光刺激に対して反応し, スポット光のONに対してbrisk,

かつ transient (一過性)の反応をしており, ON-中心型 Y細胞と判定された. 図6Bに示したユニットもON-中心型受容野を持っているが, 速い動きの光刺激には反応せず, スポット光のONに対して, brisk, かつ tonic (持続性)の反応を示すのでON-中心型 X細胞と判定された. このようにして現在までに合計286個のユニットで光反応が確認され, その大部分がY, X, W細胞のいずれかに分類可能であった. 表3に示すように, その内訳はY型が142個(49.7%), X型が113個(39.5%), W型が19(6.6%)個で, 残り12個は分類不能であった. この実験から, 軸索再生した網膜神経節細胞の多くは正常に近い光反応性を保ち, Y型細胞の軸索再生能が最も高いことがわかった. この結果は, 上に述べた形態学的研究の結果とよく一致する.

2) 受容野直径と偏心度の関係

次に, 生理学的に同定されたY, X, W細胞について, それらの光受容野の直径が網膜中心から周辺に行くにつれてどのように変化するかを調べた. 以前報告した, 正常なネコ網膜での結果³⁷⁾と同じかどうか, どのように異なるかに興味を持たれた. 図7に今回の移植ネコでの結果を示す. 全体として周辺網膜に行くにつれて, やや受容野が大きくなる傾向があるが, 正常のネコのデータ³⁷⁾と比べると, 中心網膜で, つまり10度以内の偏心度での受容野が全体として大きい. その傾向はX細胞で著明である. 正常ネコでのX細胞の場合, 受容野中心直径は偏心度10度以内で, $0.5 \sim 0.1$ 度程度まで小さくなるのに対し, 移植ネコでは, 高々0.5度程度である. Y細胞の場合には, 10度以内の偏心度でも直径が正常と同じ0.7度程

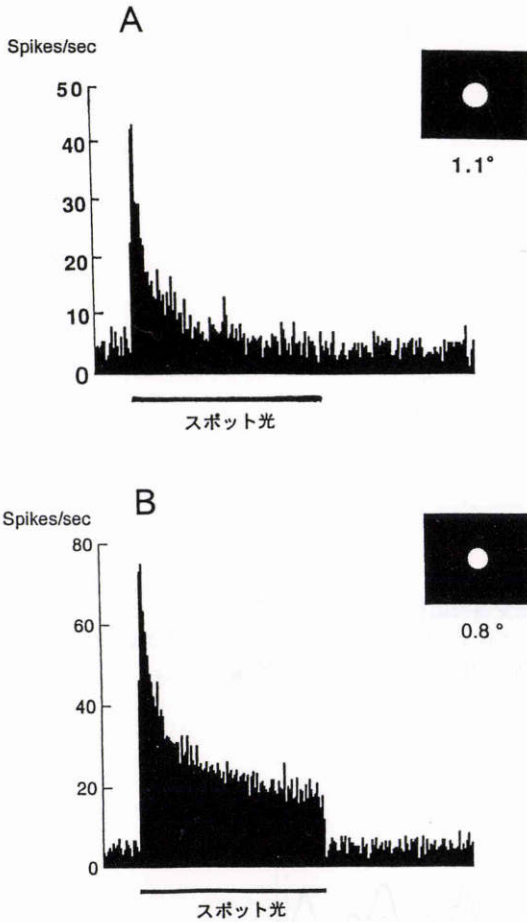


図6 再生視神経線維からの光反応記録の2例。

A: ON-中心型 Y 型再生線維の光反応。受容野中心の直径は 1.1°。受容野中心に一致したスポット光を 5 秒間持続的に呈示した時のスパイク頻度を表すヒストグラム。刺激と同時にスパイク頻度が急激に上昇するが、刺激後 2~3 秒で自発レベルまで低下しており、一過性の反応を示している。B: ON-中心型 X 型再生線維の光反応。受容野中心の直径は 0.8°。刺激の持続中ずっと自発レベルより高いスパイク頻度を保ち、持続性の反応を示している。

度のものがあり、それほど拡大しているとはいえない。特に X 細胞において、受容野が拡大しているのは、恐らく、視神経切断によって逆行性変性に陥った X 細胞が多く、それらへ興奮性入力を与えていた双極細胞からの興奮性入力が視神経再生した X 細胞に入力を収斂したためと考えられる。あるいは逆行性シナプスを介した、アマクリ

ン細胞の細胞死のため周辺野への抑制性入力解除されたためかも知れない。

3) ON-中心型, OFF-中心型での再生率の比較

電気生理学的研究では、Y 細胞, X 細胞とも ON-中心型が多かったことから、ON-中心型と OFF-中心型では軸索再生能に違いがあることが示唆される(表 3)。特に、OFF-中心型 X 細胞が全く記録されなかった事実は重要で、前項で述べられている形態学的観察の傾向ともよく一致する。ベータ(X)細胞での ON-中心型優位は形態学的研究と生理学的研究の間で一致していたが、アルファ(Y)細胞の OFF-中心型優位は両者の間で一致していなかった。恐らく、形態学的に分類不可能であった細胞はその多くがアルファ細胞で、生理学的には ON-中心型 Y 細胞と同定されたものと考えられる。また、W 細胞でも圧倒的に ON-中心型が多いので(表 3)、全体としてやはり ON-中心型神経節細胞が OFF-中心型より軸索再生しやすいものと考えられる。

5. 神経移植によるパターン反転 ERG への効果

Maffei ら⁴⁹⁾⁵⁰⁾の研究以来、パターン反転 ERG が網膜神経節細胞の機能を反映するといわれる。視神経切断あるいは移植後の神経節細胞の機能を全体として捉えるため、パターン反転 ERG を記録し、視神経切断後の変化および神経移植の効果を調べた。まず、予備実験として正常ネコにおけるパターン反転 ERG の記録を行い、時間・空間特性を検討したのち、本実験として視神経切断のみのネコと視神経切断後坐骨神経移植を行ったネコでパターン反転 ERG の振幅の経時変化を比較検討した。

1) 正常ネコでのパターン反転 ERG

図 8 はパターン反転 ERG の記録例で、A は時間周波数 2 Hz, 空間周波数 1 c/d での記録を、B は時間周波数 6 Hz, 空間周波数 1 c/d での記録を示す。我々が用いた時間的正弦波変調の刺激を加えた場合に得られる波形は、時間的矩形波変調の場合と異なり、2 Hz においても 6 Hz においても定常的(steady-state)で刺激周期に一致した連続的な波の繰り返しとなる。これにより、すべての刺激頻度において一過性(transient)と定常的(steady-state)とを区別せずにパターン反転 ERG の振幅を評価できる。また、高速フーリエ変換(FFT)を用いて波形成分の解析を行うと、刺激周期である基本周波数成分と反転周期である 2 倍周波数成分が主たる成分であることが

表 3 再生軸索より記録されたユニットの生理学的分類

	Y (α)	X (β)	W (γ)	その他 Unclassified	計
ON-center	107	113	14	0	234
OFF-center	35	0	3	0	38
ON-OFF-center	0	0	2	0	2
Others	0	0	0	12	12
計	142 (49.7%)	113 (39.5%)	19 (6.6%)	12 (4.2%)	286 (100%)

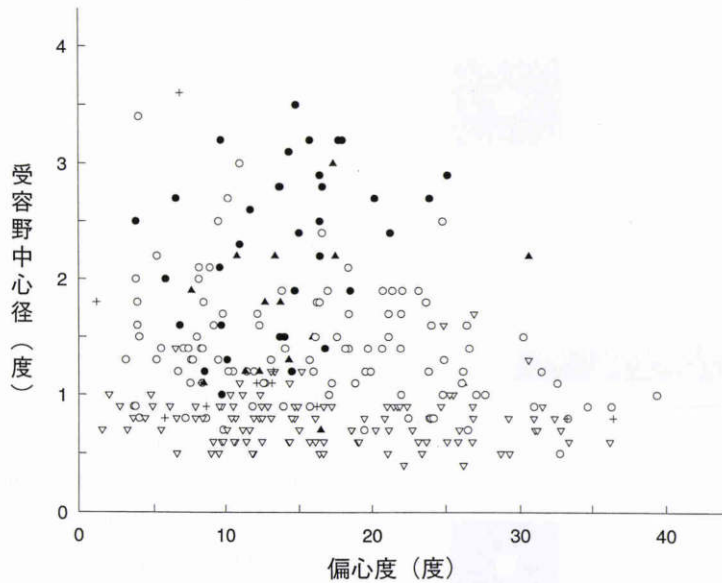


図7 再生視神経軸索をもつ網膜神経節細胞の光受容野直径と偏心度との関係。

偏心度はスクリーン上に視神経乳頭の投射部位から計算によって決め、網膜中心野の投射部位からの距離を視角に換算してプロットした。○:ON Y-cell ●:OFF Y-cell ▽:ON X-cell ▲:W-cell +:Unclassified cell

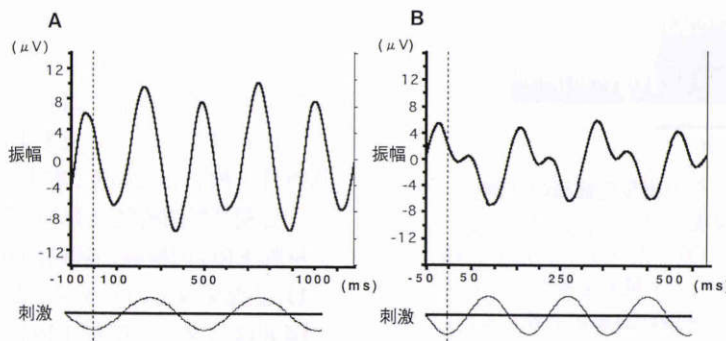


図8 パターン反転網膜電図(ERG)の1例。

A:時間周波数2 Hz,空間周波数1 c/dでの応答波形。B:時間周波数6 Hz,空間周波数1 c/dでの応答波形。いずれも下にパターン刺激の反転の時間経過を示してある。

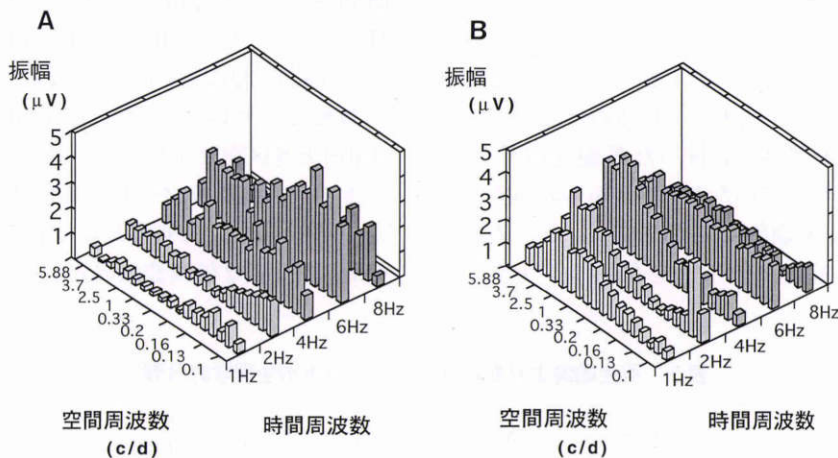


図9 正常ネコを用いたパターン反転ERGの時間的・空間的周波数特性。

パターン反転ERGをフーリエ解析した結果,基本周波数成分と2倍周波数成分の2つの成分に分けられる。A:基本周波数成分の振幅は時間周波数が大きくなるに従い大きくなる。B:2倍周波数成分の振幅は4 Hz前後にピークを持ち,心理物理学的に測定されたコントラスト感度曲線と良く一致している。2倍周波数成分が網膜神経節細胞の機能を反映していると考えられた。

明らかになった。

図 9 は種々の時間周波数および空間周波数におけるパターン反転 ERG をフーリエ解析して得られた基本周波数成分と 2 倍周波数成分の振幅を示す。図 9 A の基本周波数成分では時間周波数が高く、空間周波数が低い所にピークを認めるが、空間周波数特性において高い所も低い所も両端で小さくなるという、網膜神経節細胞の受容野特性に依存すると考えられるバンドパス型のチューニングカーブ⁵¹⁾⁵²⁾は認められない。一方、図 9 B の 2 倍周波数成分において、はじめてバンドパス型のチューニングカーブの空間周波数特性が認められた。さらに、時間周波数が低い所 (1~4 Hz) において 1~3.7 c/d 付近をピークとしたより顕著なバンドパス型であるのに対し、時間周波数が高くなる (6, 8 Hz) と空間周波数の低い方でも振幅が大きくなり、空間周波数にかかわらず振幅が一定になる傾向にある。

以上のことから、時間的正弦波変調の刺激を用いた場合には 2 倍周波数成分がパターンを要素を反映し、網膜神経節細胞の機能を最も良く反映すると考えられた。上に述べたように、ネコの網膜神経節細胞はその生理学的機能から Y, X, W の三つに分類され、Y 細胞は空間周波数特性は低いが、時間周波数特性は高い性質があり、逆に X 細胞は空間周波数特性は高いが、時間周波数特性は低い性質がある。W 細胞は一般に空間周波数、時間周波数特性ともに低く、多くの亜型を含む。これらの細胞の特性を考慮すれば、図 9 の三次元グラフ上の空間周波数が高く、時間周波数の低い領域の振幅成分は主として X 細胞の活動を反映し、空間周波数が低く、時間周波数の高い領域の成分は主として Y 細胞の活動を反映しているのではないかと予想される。

2) 視神経切断および神経移植ネコでのパターン反転 ERG

これまでの視神経切断後の末梢神経移植の研究から、アルファ、ベータ、ガンマ型のいずれの網膜神経節細胞も移植片遠位端からの逆行性標識法により軸索再生し得ることが証明され、さらに、再生軸索における単一ニューロンの光反応性の記録によって、個々の光反応がほぼ正常な Y, X, W 型細胞と同様の生理学的特性を保っていることを示してきた。しかし、これらの研究はいずれも視神経切断部位から 2~5 cm にわたって軸索再生した細胞だけを対象としている。短く軸索再生したものも含め、生存しているすべての網膜神経節細胞の機能を全体として評価するためにはパターン反転 ERG による評価が適切である。

正常ネコで行ったと同じ方法を用い、視神経切断後のネコと視神経切断後坐骨神経を自家移植したネコとでパターン反転 ERG の比較検討を行った。図 10 A に視神経切断後のネコのパターン反転 ERG の結果の 1 例を示す。手術前に正常のパターン反転 ERG をコントロール

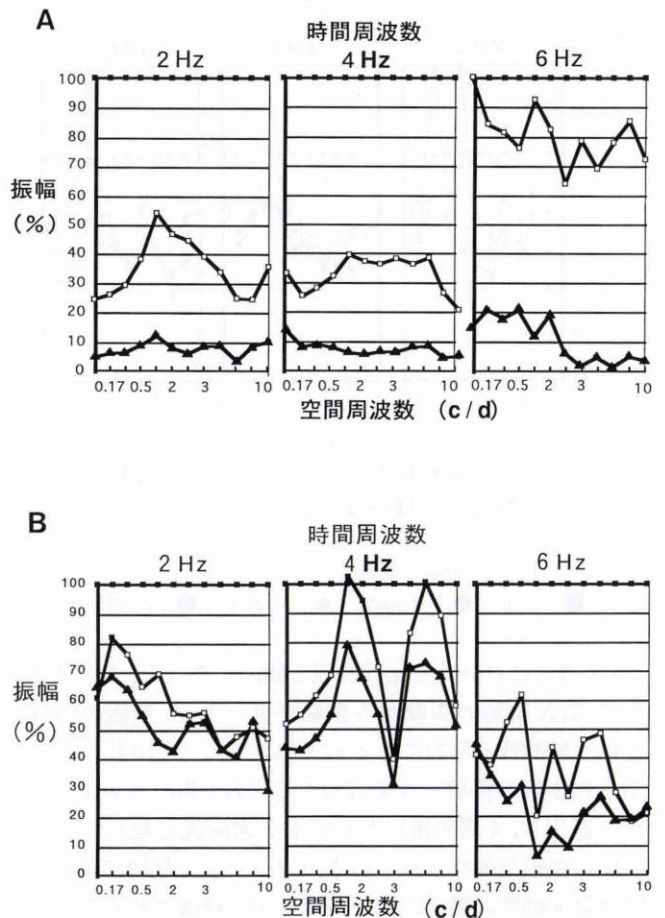


図 10 パターン反転 ERG (2 倍周波数成分) の経時変化の 1 例。

A: 視神経切断後、術後 1 週で 2 Hz と 4 Hz の反転刺激による電位の振幅が 6 Hz のものよりも先に減少し、3 週でどの空間周波数ともコントロールのほぼ 10% 前後となった。■: 術前, □: 1 週後, ▲: 3 週後。

B: 坐骨神経移植後、2 Hz 反転刺激による電位は術後 2 週でやはり 30~50% の減少を認めるが、4 週においても 50% 近く残っている。4 Hz 刺激の反応は変動が大きいが、同様の傾向がある。■: 術前, □: 2 週後, ▲: 4 週後。

として記録し、その後、約 4 週間において左眼の視神経を眼窩内で中心動脈を残して完全に切断した。術後、1 週間目と 3 週間目にパターン反転 ERG を記録した。空間周波数は 0.1~10 c/d、時間周波数は 2 Hz、4 Hz、6 Hz の範囲において得られたパターン反転 ERG の 2 倍周波数成分の振幅を縦軸に、術前コントロール記録の 2 倍周波数成分の振幅を 100% として示してある。いずれの時間周波数においても、3 週目にはコントロールに対して 20% 以下に振幅が小さくなるが、1 週目では 2 Hz で 25~55%、4 Hz で 20~40%、6 Hz で 65~100% 程度残っていた。時間周波数が低い 2 Hz、4 Hz 側で早くその振幅が小さくなり、時間周波数が高い 6 Hz の方が振幅の減少は比較的ゆっくりであった。特に時間周波数 6 Hz では空間周波数成分の低い 0.17~2 c/d の領域におい

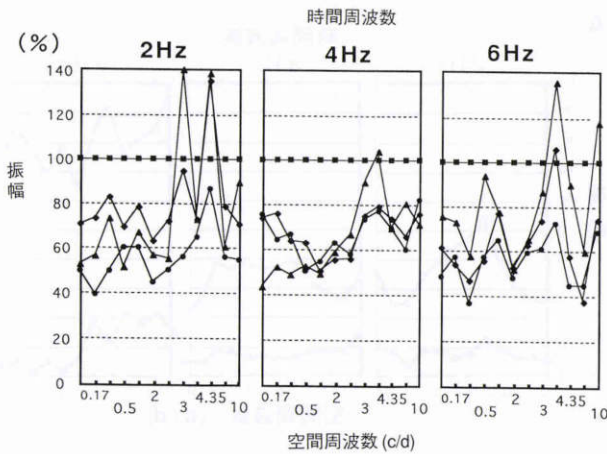


図11 坐骨神経移植ネコでのパターン反転 ERG (2倍周波数成分)の経時的变化。
5匹の移植ネコでの平均。2, 4, 6 Hz とも 8 週後でも 60% 前後の振幅が維持されている。
■: 術前 ◆: 2 週後 ▲: 4 週後 ●: 8 週後

て、3週目においても比較的残る傾向にあった。この結果からは、X細胞の領域から振幅が低下し、Y細胞の領域では比較的残る傾向にあると予想される。図10Bに示すように1例の移植ネコではむしろ2Hz側の方がゆっくりと減少し、4週間後においても2週間後と変わらない程度の振幅が維持されている。したがって、移植により網膜神経節細胞の機能の低下が明らかに軽減されることがわかった。このネコの場合、特に2Hz側で移植の効果が顕著なことから、X細胞の機能残存が強く示唆される。

正常ネコ網膜と坐骨神経移植ネコ網膜の各神経節細胞型の出現頻度を比較した図3の形態学的なデータにおいて、アルファ細胞の軸索再生能が他の細胞に比べ高いことが示されている。これは生理学的に単一線維記録を行った結果、Y細胞の出現率が高いこととよく一致する。図3の正常網膜と軸索切断網膜を比較すると、ベータ細胞の生存率が軸索切断によって極端に低下するが、移植によってその生存が著明に促進されたことを示している。このことはパターン反転 ERG の解析の結果である、低時間周波数成分の振幅の低下が移植ネコで比較的軽度である事実とよく一致していた。

我々は現在までに図10Bに示した1例を含めて移植群5例において、術後2週間目、4週間目、8週間目のパターン反転 ERG の記録を得ている。図11は5例の移植ネコでのパターン反転 ERG の相対振幅のデータを平均した結果をグラフにしたものである。平均すると図10Bの1例と異なり、2Hz側と6Hz側で振幅の残存率の違いは不明瞭になるが、いずれも8週目においても各空間周波数域において40~80%の範囲に残存しており、移植によりパターン反転 ERG の振幅の低下が緩徐になることは明らかである。しかし、ベータ(X)細胞の残存から期待される2Hz側と、アルファ(Y)細胞の生存から期待される6Hz側での振幅の低下の程度には差がなかった。

表4 網膜-大脳皮質間の架橋神経移植によって得られた長期にわたるパターン反転 ERG の残存と逆行性標識された神経節細胞数の関係

ネコ No	時間周波数 (Hz)	ERG の振幅 (μV) ¹		標識細胞数
		2 週	15 週	
# 37	2	6.30	0.77	18
	6	1.09	0.28	
# 38	2	7.19	4.84	630
	6	0.99	0.58	

1. 空間周波数 1 c/d のパターン反転で記録された ERG の 2 倍周波数成分

6. 再生視神経による視覚中枢の再支配

これまでの研究から、ネコの視神経が切断されても同一個体の坐骨神経の移植によって再生し、視覚情報を伝達することがわかった。しかし、再生軸索は、視覚情報を中枢神経系に伝達しなければ、移植動物の個体としての視覚機能の回復につながらない。また、再生視神経線維の末端が中枢神経細胞とシナプスを形成しない場合には、再生神経節細胞は最終的には逆行性に変性して死滅する(図1)。これまで我々を含めていくつかの研究グループが、ハムスターあるいはラットを用いた実験で、視神経切断端と視蓋前域や上丘を末梢神経で架橋し、シナプスを再形成させることに成功してきた。これらの研究で、縮瞳反射、明暗弁別といった正常動物で見られる機能が架橋移植を受けた動物で再現できることが証明されている¹⁰⁾⁵³⁾。

本研究において我々はネコにおいても、末梢神経の架橋によって軸索再生した神経節細胞の終末が、中枢ニューロンとシナプスを再形成させることを試みた。現在のところ、標的の視覚中枢としては外側膝状体、大脳視覚領を対象としている。この他に、直接前頭葉への結合も試みている。架橋移植による再生視神経線維と標的中枢神経細胞とのシナプス形成の証拠はまだ不十分であるが、1例で ERG の長期残存と神経節細胞の長期生存の証拠が得られた(表4)。視神経切断端と大脳灰白質との間を末梢神経で架橋した個体#38では、術後15週でもかなりの数の神経節細胞が生存し機能していることが、パターン反転 ERG の記録とその5週間後に行った逆行性標識法で示された。#37は架橋移植が不成功に終わった1例であり、ERG の振幅は低下しており、逆行性標識細胞も極めて少ない。

架橋移植を外側膝状体へ導くことによって長期間生存している神経節細胞には、中型のベータ(X)細胞も多く見られ(図12)、恐らく中枢神経細胞とシナプスを形成したことによって、軸索を切断された神経節細胞も長期間生存したものと考えられる。さらに、長期生存していた細胞の樹状突起の形態が、正常な網膜の神経節細胞のそれとあまり変わらないことも、ルシファーイエローの細胞内注入法でわかった(図13)。術後140日のベータ細胞の

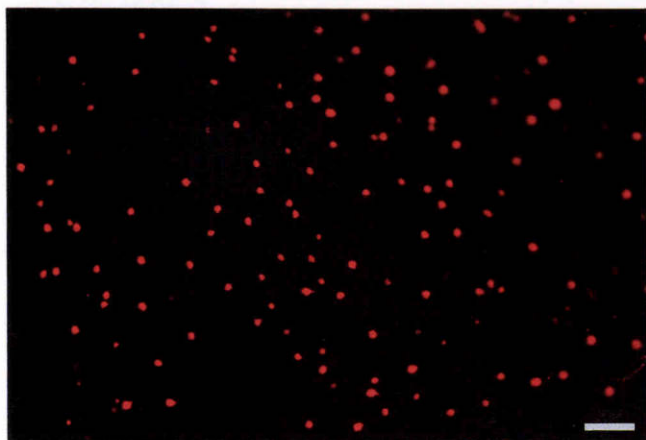


図12 視神経断端と外側膝状体の間を末梢神経で架橋し, 140 日後に移植神経に蛍光色素を注入して, 逆行性に標識した神経節細胞。

視神経乳頭(OD)の近傍の網膜伸展標本, バーは 100 μm (渡部眞三撮影)

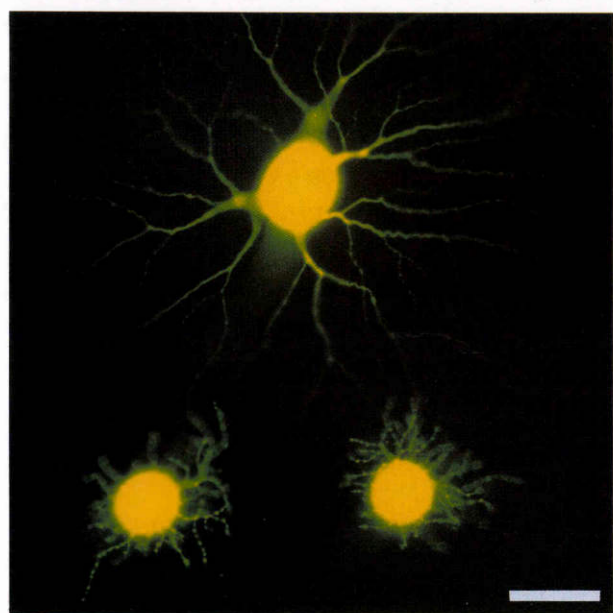


図13 視神経断端と外側膝状体の間を末梢神経で架橋し, 140 日間生存していた神経節細胞の, ルシファーイエロー細胞内注入によって得られた樹状突起の形態。

一つのアルファ細胞と二つのベータ細胞が明らかである。バーは 50 μm (渡部眞三撮影)

樹状突起はやや退縮しているが, アルファ細胞の樹状突起の形態は正常とあまり変わらなかった。このように, 軸索を切断された神経節細胞も, 中枢神経組織との間に末梢神経を架橋移植することによって再生軸索の終末が恐らく中枢でシナプスを形成し, そのため, さらに長期間生存できたものと考えられる。ネコにおいて再生軸索の中枢でのシナプス再形成は未だ電顕レベルでは証明できていないが, 神経節細胞が 4 か月以上生存していたことから, シナプスの再形成は間違いないだろう。

IV 考 按

最初に述べたように, Ramon y Cajal は哺乳動物で中枢神経系のニューロンが軸索再生しないのは, 末梢神経系のニューロンのように細胞外環境としてシュワン細胞がなく, それからの神経栄養因子が欠如しているためだと考えていた。確かに多くの末梢神経の移植実験で, 中枢神経ニューロンでもシュワン細胞の豊富な環境に置くと長い距離にわたって軸索再生することがわかってきた。我々の視神経に関する一連の研究から, ラット, ハムスターのみならずネコの視神経も坐骨神経の移植によって再生することが明らかになった。したがって, さらに高次の視覚系を持つ霊長類での視神経の再生も現実的課題になってきた。しかしながら, 現在の移植方法では軸索再生するのは全神経節細胞のうち, 数パーセントにすぎないのも事実である。この末梢神経移植法ではなぜ一部の神経節細胞だけが再生して, 残りの多くは再生しないだろう。さらに, 今回のネコでの軸索再生細胞の単一ニューロンレベルの解析から, 網膜神経節細胞の中でも細胞型によって軸索再生能力に違いがあることも明らかになってきた。この細胞型による再生能力の違いは何を意味しているのだろう。これらの点についてまず考察し, 次に現在知られている軸索再生を促進させる因子についてふれ, 最後に今後の課題について言及したい。

1. 神経節細胞細胞型による軸索再生能力の違い

坐骨神経移植によってなぜ数パーセントの視神経線維しか再生せず, 残りの 90% 以上の軸索が変性に陥るのだろう。まず初めに, 多くの軸索がその切断端の付近にある視神経内の髄鞘成分やオリゴデンドログリアにより突起伸展が阻止され, 成長円錐の崩壊が起こり, やがて逆行性に変性すると考えられる。あるいは末梢神経移植片内のシュワン細胞から放出される神経再生促進因子が量的に不十分なため, すべての細胞にいきわたらないため, 逆行性細胞死に陥るとも考えられる。次に, 移植する坐骨神経の中に含まれていたシュワン細胞の筒の数(つまり, もとあった末梢神経線維の数)がある一定数しかないため, それが制限条件になって, 高々数千の線維しか再生しないのかも知れない。

今回のネコでの実験から, 坐骨神経移植によって軸索を再生しやすいのは, 大型の細胞体と広い樹状突起野をもつアルファ細胞であることが明らかになった。さらに, 視神経切断のみを行った網膜でも, 大型の細胞体をもつアルファ細胞の中に長い期間にわたって生存するものが比較的多いことを見出した²⁵⁾。同様の大型細胞が軸索切断に対して抵抗性をもつことは他の研究者によっても確認されている。例えば, Cotte ら⁵⁴⁾はネコの視神経を挫滅した後 2 年以上にわたり, アルファ細胞の約半数が生存することを報告している。しかし, 何故アルファ細胞が軸索切断に対して抵抗性を示すのか, 今のところ不明であ

る。ラットの網膜でも、視神経切断後、大型の神経節細胞が小型の細胞より多く生存することが報告³³⁾⁵⁵⁾⁵⁶⁾されている。一方、ラットの視神経において、我々は視索を切断後、直径の太い視神経線維がより長期に生存することを電気生理学的に証明した⁵⁷⁾。したがって、哺乳動物において、一般に視神経切断に対して大型の神経節細胞、つまり太い視神経線維が抵抗性を示すといえる。他方、小型の細胞は軸索切断により逆行性変性に陥りやすい。我々の一連の実験では、移植手術を行ってから50~80日という長い期間を経てから軸索再生した細胞を調べているので、より早い時期に各細胞がどういう運命をたどっているかは伺い知ることが出来ない。しかしながら、ネコで見たX細胞の場合、グルタミン酸を伝達物質とする双極細胞からのシナプス入力が多いといわれるので、グルタミン酸毒性の機構がより強く働いて、そのため細胞死に至るものと考えられる⁵⁸⁾。しかし一方で、ラットの研究では大型の神経節細胞ほど、NMDA受容体を介したグルタミン酸毒性が強いという報告⁵⁹⁾もある。

2. 神経節細胞の生存維持・軸索再生を促進する因子

成熟ラットの網膜神経節細胞は、その軸索が眼窩内で切断されると15日で76%が変性し、それから3か月にかけて90%以上が変性するといわれる⁶⁰⁾。先に述べたように軸索再生させるためには、その前提としてまず細胞体の生存を維持しなければならない。そこで、視神経切断後に起こる網膜神経節細胞の逆行性細胞死を阻止する方法が最近盛んに研究されている。つまり視神経切断後、その断端あるいは眼球内に種々の神経栄養因子が注入され、その効果が調べられている。これまで生存維持に有効とされているのはbFGF⁶¹⁾、NGF⁶²⁾⁶³⁾、BDNF^{64)~68)}、CNTF⁶⁶⁾などである。それらの効果を受け取る側、つまり神経節細胞自体における受容体の発現の研究も進んできた。網膜神経節細胞におけるNGF受容体、BDNF受容体のtrkファミリーの存在についてはすでに幾つかの研究グループから報告^{69)~73)}がなされている。

一方、Thanosら⁵⁶⁾⁷⁴⁾は、視神経を切断し末梢神経を移植した側の眼球にマクロファージの抑制因子を投与すると、有意に神経節細胞の生存維持と軸索再生が促進されることを見出した。また、その傾向が網膜内のマイクログリアの増殖の抑制効果と並行していることを報告した。つまり、神経節細胞の軸索再生をマイクログリアが抑えているのを取り除くことによって再生が促進できたと考えた。このように、生存維持因子と軸索再生促進因子に関して様々な実験が行われているが、それらの作用機序に関してはまだ研究が行われていない。

3. 今後の課題

ネコのように視覚のよく発達した成熟哺乳動物においても、末梢神経の自家移植により切断された視神経が再生し、本来の視覚情報伝達が回復することがわかった。さらに、坐骨神経の大脳皮質や外側膝状体への架橋移植に

よって網膜—視覚中枢路が再形成される可能性がでてきた。とはいえ、ネコの場合もハムスターの場合も軸索再生した神経節細胞の数は全神経節細胞数の数パーセントに過ぎず、特に小型の神経節細胞は極めて軸索再生しにくい。したがって、再建した網膜—視覚中枢路での視覚情報伝達能も、全体としてみた場合、正常動物に比べると極めて劣っている。特に視覚にとって重要な空間視力や、上丘での網膜空間部位対応の再現が未だ不完全である。これらを改善してゆくには、まず何よりも軸索を再生する細胞の数を増やす必要がある。したがって、まず第一に、軸索切断による逆行性細胞死を阻止する因子を探し、軸索を再生する細胞の数を増やしてゆく研究が極めて重要である。第二に脳内でのシナプスの再形成をより促進させ、より多くの視覚中枢ニューロンが視覚情報を受け取るようにしなければならない。この二つが今後の大きな課題であり、それらがクリアーされれば、ネコにおいても神経移植によって再生した視神経線維が、外側膝状体を経由して大脳皮質視覚領に光情報を再び伝達し、より高度の視覚機能の回復が望まれるようになるだろう。

稿を終えるに当たり、宿題報告の機会をお与え下さいました。日本眼科学会評議員各位、第100回日本眼科学会総会長増田寛次郎先生、座長の労をお取りいただいた安達恵美子先生に心から感謝申し上げます。また、これまでの研究に対してご支援いただいた、三菱財団、三井生命科学財団、上原科学財団、内藤科学財団、日本失明予防協会、日本眼球銀行協会、日本医師会の各位および文部省に深く感謝いたします。

文 献

- 1) **Tello F**: La influencia del neurotropismo en la regeneracion de los centros nerviosos. *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid* 9: 123—159, 1911. *Univ Madrid* 11: 81—102, 1913.
- 2) **Ramon y Cajal**: El neurotropismo y la transplantacion de los nervios. *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid* 11: 81—102, 1913.
- 3) **Aguayo AJ**: Axonal regeneration from injured neurons in the adult mammalian central nervous system. In: *Synaptic Plasticity* (Ed): Cotman CW, Guilford, New York, 457—484, 1985.
- 4) **So K-F, Aguayo AJ**: Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. *Brain Res* 328: 349—354, 1985.
- 5) **McConnell P, Berry M**: Regeneration of axons in the mouse retina after injury. *Bibliothca Anat* 23: 26—37, 1982.
- 6) **Vidal-Sanz M, Bray CM, Villegas-Pérez MP, Thanos S, Aguayo AJ**: Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci* 7: 2894—2909, 1987.
- 7) **Carter DA, Bray GM, Aguayo AJ**: Regenerated retinal ganglion cell axons can form well-differentiated synapses in the superior colliculus of adult hamsters. *J Neurosci* 9: 4042—4050, 1989.

- 8) **Keirstead SA, Rasminsky M, Fukuda Y, Carter DA, Aguayo AJ, Vidal-Sanz M**: Electrophysiological responses in hamster superior colliculus evoked by regenerating retinal axons. *Science* 246: 255—257, 1989.
- 9) **Fukuda Y, Rasminsky M, Keirstead SA, Carter DA, Aguayo AJ, Vidal-Sanz M**: Reinnervation of adult hamster superior colliculus by regenerating retinal ganglion cell axons. *Biomed Res* 10, Suppl 2: 81—84, 1989.
- 10) **Sasaki H, Inoue T, Iso H, Fukuda Y, Hayashi Y**: Light-dark discrimination after sciatic nerve transplantation to the sectioned optic nerve in adult hamsters. *Vision Res* 33: 877—880, 1993.
- 11) **Caroni P, Schwab ME**: Two membrane fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol* 106: 1281—1288, 1988.
- 12) **Schwab ME, Caroni P**: Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading *in vitro*. *J Neurosci* 8: 2381—2393, 1988.
- 13) **Sawai H, Clark DB, Kittlerova P, Bray GM, Aguayo AJ**: Brain derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 stimulate growth of axon branches from regenerating retinal ganglion cells. *J. Neurosci* 16: 3887—3894, 1996.
- 14) **Heumann R, Korsching S, Bandtlow C, Thoenen H**: Changes in nerve growth factor synthesis in non-neuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol* 104: 1623—1631, 1987.
- 15) **Mayer M, Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, Thoenen H**: Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: Different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol* 119: 45—54, 1992.
- 16) **福田 淳**: 視覚中枢入力の多源性—ネコ網膜神経節細胞の三型分類—. *生体の科学* 26: 442—452, 1975.
- 17) **小川哲朗**: 外側膝状体視覚系および膝状体外視覚系の生理学. *神経進歩* 27: 718—733, 1983.
- 18) **斎藤秀昭**: 網膜における情報処理—神経節細胞の機能的形態的分類と軸索の中核投射—. *神経進歩* 30: 184—198, 1986.
- 19) **Fukuda Y, Watanabe M, Sawai H**: Axonal regeneration of cat retinal ganglion cells after peripheral nerve transplant. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1133, 1991.
- 20) **Watanabe M, Sawai H, Fukuda Y**: Axonal regeneration of retinal ganglion cells in the cat geniculocortical pathway. *Brain Res* 560: 330—333, 1991.
- 21) **Watanabe M, Sawai H, Fukuda Y**: Morphology of retinal ganglion cells that regenerated axons along peripheral nerve graft in cats. *Neurosci Res* 15: 157—S164, 1991.
- 22) **Watanabe M, Sawai H, Fukuda Y**: Number, distribution and morphology of retinal ganglion cells with axons regenerated into peripheral nerve graft in adult cats. *J Neurosci* 13: 2105—2117, 1993.
- 23) **Watanabe M, Sawai H, Sugioka M, Rasminsky M, Fukuda Y**: Physiological properties of retinal ganglion cells that regenerated their axons into peripheral nerve graft in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1155, 1993.
- 24) **Watanabe M, Sawai H, Fukuda Y**: Myelination of regenerated optic fibers in peripheral nerve graft of adult cats. *Exp Brain Res* 98: 39—43, 1994.
- 25) **Watanabe M, Sawai H, Fukuda Y**: Number and dendritic morphology of retinal ganglion cells that survived after axotomy in adult cats. *J Neurobiol* 27: 189—203, 1995.
- 26) **Watanabe M, Fukuda Y**: Asymmetric axonal regeneration in ON and OFF ganglion cells of adult cat retina. *Exp Neurol* (in press), 1996.
- 27) **Hughes A**: Population magnitudes and distribution of the major modal classes of cat retinal ganglion cell as estimated from HRP filling and a systematic survey of the soma diameter spectra for classical neurones. *J Comp Neurol* 197: 303—339, 1981.
- 28) **Stone J**: A quantitative analysis of the distribution of ganglion cells in the cat's retina. *J Comp Neurol* 124: 337—352, 1965.
- 29) **Stone J**: The number and distribution of ganglion cells in the cat's retina. *J Comp Neurol* 180: 753—772, 1978.
- 30) **Maffei L, Carmignoto G, Perry VH, Candeo P, Ferrare G**: Schwann cells promote the survival of rat retinal ganglion cells after optic nerve section. *Proc Natl Acad USA* 87: 1855—1859, 1990.
- 31) **Cho EYP, So K-F**: Characterization of the spouting response of axon-like processes from retinal ganglion cells after axotomy in adult hamsters: A model using intravitreal implantation of a peripheral nerve. *J Neurocytol* 21: 589—608, 1992.
- 32) **Berry M, Carlile J, Hunter A**: Peripheral nerve explants grafted into the vitreous body of the eye promote the regeneration of retinal ganglion cell axons severed in the optic nerve. *J Neurocytol* 25: 147—170, 1996.
- 33) **Thanos S**: Alterations in the morphology of ganglion cell dendrites in the adult rat retina after optic nerve transection and grafting of peripheral nerve segments. *Cell Tissue Res* 254: 599—609, 1988.
- 34) **Lau KC, So K-F, Cho EY**: Morphological changes of retinal ganglion cells regenerating axons along peripheral nerve grafts: A Lucifer Yellow and silver staining study. *Restorative Neurol Neurosci* 3: 235—246, 1991.
- 35) **Tabata T, Fukuda Y**: Dendritic regrowth of retinal ganglion cells in adult rats. *Neuroreport* 3:

- 709—712, 1992.
- 36) **Boycott BB, Wässle H**: The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *J Physiol* 240: 397—419, 1974.
 - 37) **Stone J, Fukuda Y**: Properties of cat retinal ganglion cells: A comparison of W-cells with X- and Y-cells. *J Neurophysiol* 37: 722—748, 1974.
 - 38) **Fukuda Y, Stone J**: Retinal distribution and central projections of Y-, X- and W-cells of the cat's retina. *J Neurophysiol* 39: 749—772, 1974.
 - 39) **Fukuda Y, Hsiao C-F, Watanabe M, Ito H**: Morphological correlates of physiologically identified Y-, X- and W-cells in the cat retina. *J Neurophysiol* 52: 999—1013, 1984.
 - 40) **Famigletti EV, Kolb H**: Structural basis for ON- and OFF-center responses in retinal ganglion cells. *Science* 194: 193—195, 1976.
 - 41) **Famigletti EV, Kaneko A, Tachibana M**: Neuronal architecture of on and off pathways to ganglion cells in carp retina. *Science* 198: 1267—1269, 1977.
 - 42) **Nelson R, Famigletti EV, Kolb H**: Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in the cat retina. *J Neurophysiol* 41: 472—483, 1977.
 - 43) **Peichl L, Wässle H**: Morphological identification of on- and off center brisk transient (Y) cells in the cat retina. *Proc R Soc Lond* 212: 139—156, 1981.
 - 44) **Wässle H, Peichl H, Boycott BB**: Morphology and topography of on- and off-alpha cells in the cat retina. *Proc R Soc Lond* 212: 157—175, 1981.
 - 45) **Wässle H, Boycott BB, Illing R-B**: Morphology and mosaic of on- and off-beta cells in the cat's retina and some functional considerations. *Proc R Soc Lond* 212: 177—195, 1981.
 - 46) **Fukuda Y, Sasaki H, Adachi E, Inoue T, Morigiwa K**: Optic nerve regeneration by peripheral nerve transplant. *Neurosci Res (Suppl)* 13: 24—S30, 1990.
 - 47) **Williams RW, Chalupa LM**: An analysis of axon caliber within the optic nerve of the cat: Evidence of size groupings and regional organization. *J Neurosci* 3: 1554—1564, 1983.
 - 48) **Hsiao C-F, Watanabe M, Fukuda Y**: The relation between axon diameter and axonal conduction velocity of Y, X and W cells in the cat retina. *Brain Res* 309: 357—361, 1984.
 - 49) **Maffei L, Fiorentini A**: Electoretinographic response to alternating gratings before and after section of the optic nerve. *Science* 211: 953—955, 1981.
 - 50) **Maffei L, Fiorentini A**: Electoretinographic responses to alternating gratings in the cat. *Exp Brain Res* 48: 327—334, 1982.
 - 51) **Baker CL Jr, Hess RF**: Linear and non-linear components of human electoretinogram. *J Neurophysiol* 51: 952—967, 1984.
 - 52) **Baker CL Jr, Hess RF, Olsen BT, Zrenner E**: Current source density analysis of linear and non-linear components of the primate electoretinogram. *J Physiol* 407: 155—176, 1988.
 - 53) **Thanos S**: Adult retinofugal axons regenerating through peripheral nerve grafts can restore the light-induced pupilloconstriction reflex. *Eur J Neurosci* 4: 691—699, 1992.
 - 54) **Cottee LJ, Fitzgibbon T, Westland K, Burk W**: Long survival of retinal ganglion cells in the cat after selective crush of the optic nerve. *Eur J Neurosci* 3: 1245—1254, 1991.
 - 55) **Tauchi M, Fukuda Y**: Retinal ganglion cells survived long after optic nerve section in adult rats. *Neurosci Res* 14(Suppl): S39, 1991.
 - 56) **Thanos S, Mey J**: Type-specific stabilization and target-dependent survival of regenerating ganglion cells in the retina of adult rats. *J Neurosci* 15: 1057—1079, 1995.
 - 57) **Sugioka M, Sawai H, Adachi E, Fukuda Y**: Changes of compound action potentials in retrograde axonal degeneration of rat optic nerve. *Exp Neurol* 132: 262—270, 1995.
 - 58) **Silveira LCL, Russelakis-Carniero M, Perry VH**: The ganglion cell response to optic nerve injury in the cat: Differential responses revealed by neurofibrillar staining. *J Neurocytol* 23: 75—86, 1994.
 - 59) **Benjamin E, Pan Z-H, Storm S, Lipton SA**: Greater sensitivity of large ganglion cells to NMDA-mediated cell death. *Neuroreport* 5: 629—631, 1994.
 - 60) **Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray GM, Aguayo AJ**: Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol* 24: 23—36, 1993.
 - 61) **Sievers J, Hausmann B, Unsicker K, Berry M**: Fibroblast growth factors promote the survival of adult retinal ganglion cells after transection of the optic nerve. *Neurosci Lett* 76: 157—162, 1987.
 - 62) **Carmignoto G, Maffei L, Candeo P, Canella R, Comelli MC**: Effect of NGF on the survival of rat retinal ganglion cells following optic nerve section. *J Neurosci* 9: 1263—1272, 1989.
 - 63) **Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G**: Nerve growth factor promotes functional recovery of retinal ganglion cells after ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 3232—3246, 1993.
 - 64) **Johnson JE, Brade YA, Schwab M, Thoenen H**: Brain derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 6: 3031—3038, 1986.
 - 65) **Thanos S, Bähr M, Brade YA, Vanselow J**: Survival and elongation of adult rat retinal ganglion cells: *In vitro* effects of lesioned sciatic nerve and brain derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci* 1: 9—26, 1989.

- 66) **Mey J, Thanos S**: Intravitreal injections of neuronal factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats *in vivo*. *Brain Res* 602: 304–317, 1993.
- 67) **Mansour RS, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ**: Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1632–1636, 1994.
- 68) **Peinado-Ramon P, Salvador M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M**: Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 37: 489–500, 1996.
- 69) **Cohen A, Bray GM, Aguayo AJ**: Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) increases adult rat retinal ganglion cell survival and neurite outgrowth *in vitro*. *J Neurobiol* 25: 953–959, 1994.
- 70) **Carmignoto G, Comelli MC, Candeo P, Cavicchioli L, Yan Q, Maffei L**: Expression of NGF receptor and NGF receptor mRNA in the developing and adult rat retina. *Exp Neurol* 111: 302–311, 1991.
- 71) **Takahashi JB, Hoshimaru M, Kikuchi H, Hatanaka M**: Developmental expression of trkB and low-affinity NGF receptor in the rat retina. *Neurosci Lett* 151: 174–177, 1993.
- 72) **Jelsma TN, Friedman HH, Berkelaar MJ, Bray GM, Aguayo AJ**: Different forms of the neurotrophin receptor trkB mRNA predominate in rat retina and optic nerve. *J Neurobiol* 24: 1207–1214, 1993.
- 73) **Perez MTR, Caminos E**: Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci Lett* 183: 96–99, 1995.
- 74) **Thanos S, Mey J, Wild M**: Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration *in vivo* and *in vitro*. *J Neurosci* 13: 455–466, 1993.
-