

# 脈絡膜におけるアセチルコリン・エステラーゼ 陽性神経の分布様式 (図4)

大島 浩一・渡辺 英臣・松尾 信彦 (岡山大学医学部眼科)

Acetylcholinesterase (AChE) positive nerves  
in the choroid of albino rabbit

Koh-ichi Ohshima, Hideomi Watanabe, Nobuhiko Matsuo

Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School

## 要 約

白色家兎脈絡膜を材料とし、フェロシアン化銅法を適用してAChE染色を行ない、形態学的観察を行なった。脈絡膜全体の伸展標本を観察することにより、AChE神経分布の全体像を容易に把握することができた。脈絡膜のAChE神経は以下の二種類に分類できた。(1)脈絡膜細動脈周囲に神経叢を形成するもの。(2)神経叢同士を互いに連絡するもの。AChE活性は、軸索膜とシュワン細胞膜との間隙、あるいは軸索膜と平滑筋細胞膜との間隙に認められた。しかし、軸索膜と脈絡膜間質の細胞膜との間隙に認めることはできなかった。以上より次のように結論した。(1)コリン作動脈神経が脈絡膜細動脈を支配している可能性がある。(2)間質に分布するAChE神経は、コリン作動性神経を供給する経路としての役割を果たしている。(日眼 91: 151—156, 1987)

キーワード: 脈絡膜, アセチルコリン・エステラーゼ, 伸展標本, 電子顕微鏡, 家兎

## Abstract

The distribution of acetylcholinesterase (AChE) positive nerves and the subcellular localization of AChE activity in the choroid of albino rabbit were studied applying the copper ferrocyanide method. In addition, by observing the wholemount preparation of the choroid, the entire picture of the choroidal nerve distribution could be easily understood. Two general types of AChE positive nerve were demonstrated. (1) Nerves forming periarterial nerve plexus. (2) Nerves running in the intervascular spaces of the choroid and connecting periarterial nerve plexuses each other. AChE activity was observed between the axolemma and the schwann cell membrane, and also demonstrated between the axolemma and the sarcolemma of the smooth muscle cell. But AChE activity between the axolemma and any stromal cell membrane was not found. These results indicate, (1) Choroidal arteriole may be innervated by cholinergic neurons. (2) AChE positive nerve connecting periarterial nerve plexuses seems to be the channel, through which cholinergic neurons pass. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 151—156, 1987)

Key words: choroid, acetylcholinesterase, wholemount preparation, electron microscopy, rabbit

## I 緒 言

脈絡膜は、網膜外層の物質交換にあずかる一方、網膜温度が過度に上昇しないよう制御しており、視機能

を良好に保つうえで重要な組織である<sup>1)</sup>。この脈絡膜には、神経線維が豊富に分布しており、一部はアセチルコリン・エステラーゼ活性を有する<sup>2)3)</sup>。脈絡膜のアセチルコリン・エステラーゼ陽性神経 (以後 AChE 神

別刷請求先: 700 岡山市鹿田界 2-5-1 岡山大学医学部眼科学教室 大島 浩一

Reprint requests to: Koh-ichi Ohshima, M.D. Dept. of Ophthalmol., Okayama Univ. Medical School  
2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700, Japan

(昭和61年9月1日受付) (Accepted September 1, 1986.)

経と略する)の分布様式は、脈絡膜血管構築と深く関連しており、これらの AChE 神経は、細動脈を介して循環調節に関与すると考えられる。一方、一部の AChE 神経は、血管と無関係に間質にも分布しており、後者に属する AChE 神経の役割は、現在までのところ不明である。

従来の報告者たちは、脈絡膜の一部のみを切片標本として観察するにとどまっていた。このため、脈絡膜における AChE 神経の全体像を、正しく把握できていなかった。そこで我々は、脈絡膜全体の伸展標本と切片標本の両方を作成し、それらに AChE 染色を適用した。その結果、神経の全体像を把握することが容易となり、間質に分布する AChE 神経の機能に関して、ひとつの解釈を加えることができた。

更に透過型電子顕微鏡を用いて、AChE 活性の微細局在を検討した。

## II 実験方法

材料として、成熟白色家兎 8羽11眼を用いた。

### 1. 光学顕微鏡標本の作成と観察

#### a. 伸展標本の作成

Sodium Pentobarbital (Somnopenyl<sup>®</sup>) を耳静脈より1分間以上の時間をかけて26mg/kg 注入し、動物を麻酔した。つづいて、開胸して左心室より上行大動脈にカニューレを挿入し、生理食塩水100ml つづいて4% Paraformaldehyde (0.1M 磷酸緩衝液, pH 7.4 に溶解)を約1mlの静水圧をかけて灌流した。その後ただちに眼球を摘出し、矢状断面で二等分し、あるいは毛様体の後端で前額断方向に割断して、水晶体、硝子体を取り除いた。この試料を4% Paraformaldehyde に浸漬し、氷室に一晩静置した。その後、網膜、強膜を取り除き、1cm<sup>2</sup>程度の観察しやすい大きさに細切した。0.1M 磷酸緩衝液で数時間洗浄したのち、酵素反応に供した。

#### b. 切片標本の作成

動物を麻酔後、眼球を摘出し、矢状断面で割断し、水晶体、硝子体を、取り除いた。つづいて組織を4% Paraformaldehyde に浸漬し、氷室に一晩静置した。10%~25%蔗糖加磷酸緩衝液で数時間洗浄し、後極部、赤道部、周辺部より適当な大きさの試料を切り出した。これを OCT コンパウンド<sup>®</sup>に包埋し、急速に凍結させた。クライオスタットをもちいて20~40 $\mu$ の厚さで眼球壁に垂直あるいは平行な方向に薄切し、酵素活性検出に供した。

### c. 酵素活性検出法

フェロシアン化銅法<sup>4)</sup>に準じて酵素反応を行なった。基質として Acetylthiocholine iodide を用いた。非特異的コリンエステラーゼを阻害するため、反応液中に10<sup>-4</sup>~10<sup>-5</sup>mol iso OMPA (Tetra isopropyl pyrophosphoramidate) を添加した。試料を反応液中に浮遊させたまま、室温で10~30分間反応させた。組織化学的対照として Karnovsky の浸漬液から基質、クエン酸ナトリウム、または硫酸銅を除いたものを反応液として用いた。

酵素反応終了後、試料を磷酸緩衝液で数分間洗浄し、アルブミン塗布スライドガラス上に伸展し、デシケーター中で一晩乾燥させた。エンテランで封入しオリンパス万能顕微鏡 Vanox model AHB-LB で観察し、自動露出装置 model PMA-10-A で写真撮影をおこなった。

### 2. 透過型電子顕微鏡標本の作成と観察

切片の作成法は光顕標本の作成法と同様である。組織を20 $\mu$ の厚さに薄切し、アルブミン塗布スライドガラス上に伸展した。スライドガラスをデシケーター内で数時間乾燥させ、10<sup>-4</sup>iso OMPA 水溶液中に約20分間浸漬した。つづいて、氷室内の Karnovsky の浸漬液中で10~15分間酵素反応を行なった。切片上に1% Osmic Acid (0.1M 磷酸緩衝液, pH 7.4 に溶解)を滴下し、室温で2時間反応させた。その後、型のごとくアルコール系列で脱水し、エポキシに包埋した。ウルトラミクロトーム Dupont MT2-B で超薄切片を作成し、酢酸ウラニル、クエン酸鉛の二重染色を施した。電子顕微鏡 HITACHI HS-9を用いて、観察、写真撮影をおこなった。

## III 結果

### 1. 光学顕微鏡を用いた観察

脈絡膜に分布する AChE 神経は、(1)細動脈周囲に神経叢を形成するものと、(2)細動脈周囲神経叢同士を連絡するもの、との2種類に分類できた。

#### (1) 細動脈周囲神経叢

AChE 神経は、脈絡膜細動脈周囲に豊富に分布し、神経叢を形成していた。また、ほとんどすべての細動脈が神経叢を伴っていた。細動脈周囲神経叢(以下神経叢と略する)の構造は、以下のごとくであった。

数本の太い AChE 神経が、一本の細動脈に沿って末梢まで伸びていた。この太い AChE 神経は、多数の神経線維の束であることが、電子顕微鏡を用いた観察に

より明らかとなった(後述)。この神経線維束から側枝が分岐し、これが細動脈を輪状あるいはラセン状に取り囲んでいた(Fig. 1a~d)。神経終末は、膨大部を細線維で連結した数珠状構造を呈していた。

AChE 神経の太さ、分布密度は部位により異なっていた。長および短後毛様動脈の分枝が脈絡膜に進入する領域では、AChE 神経は太く、密に分布していた。ところが細動脈の末梢に近づくにつれて(すなわち周辺部に近くなると)、AChE 神経は次第に細くなり数が減少してゆき、単一の神経線維として観察されるようになった(Fig. 1a~d)。一部の AChE 神経終末は神経叢から分岐して近傍の間質へ向かっていた。しかし、このような AChE 神経終末は極めて少数であった。

#### (2) 細動脈周囲神経叢同士を連絡する神経

神経叢同士を連絡する AChE 神経が多数認められた(これらを以下 Connecting Nerve=CN と略す)。CN は、後毛様動脈の分枝が脈絡膜に進入する領域では豊富に存在していた。しかしながら、周辺部付近では僅かに認められるのみであった(Fig. 1a~d)。隣接する細動脈周囲神経叢の間のみならず、遠隔の神経叢同士の間にも CN が認められた。また、長後毛様動脈流域の神経叢と、短後毛様動脈流域の神経叢との間にも CN が存在し、両者を連絡していた。

対照実験では、AChE 活性は検出されなかった。

#### 2. 透過型電子顕微鏡を用いた観察

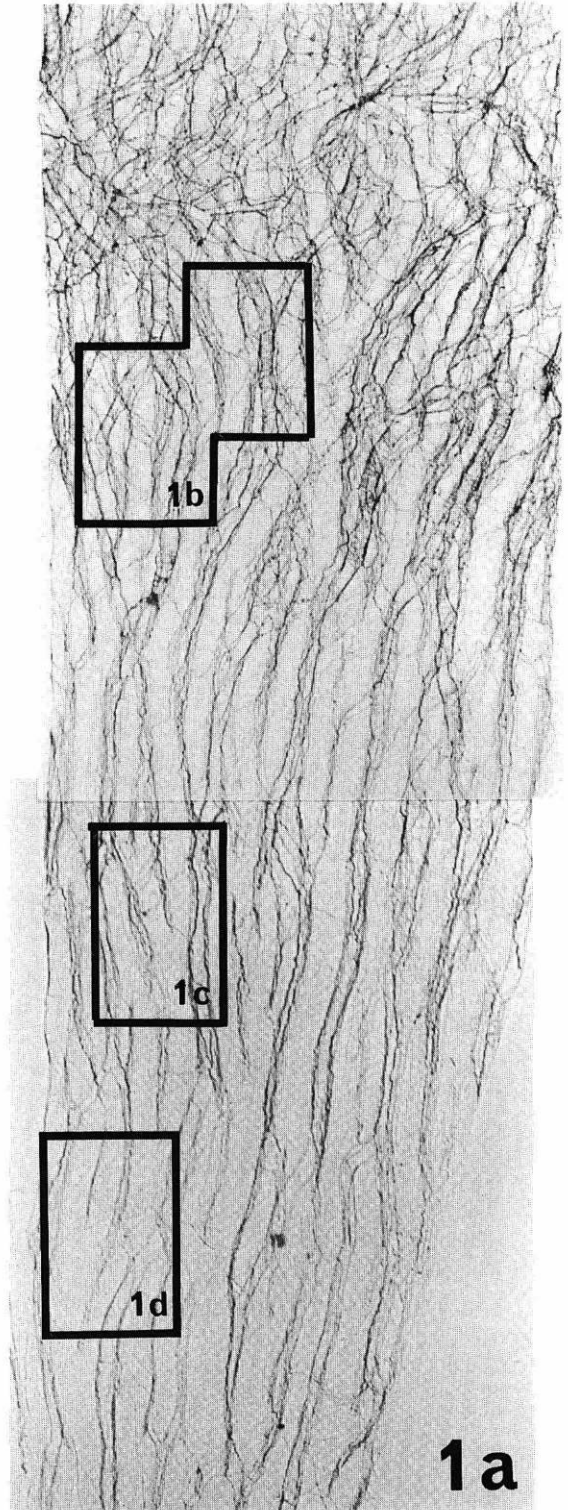
強い AChE 活性が、軸索膜とシュワン細胞膜との間隙、あるいは軸索間隙に認められた。これらの膜同士の間隙は約240 Åであった(Fig. 2,3)。また、AChE 活性は、神経終末の軸索膜と平滑筋細胞膜との間隙にも観察された。これらの膜は、約440 Åの距離を介して相対していた(Fig. 4)。

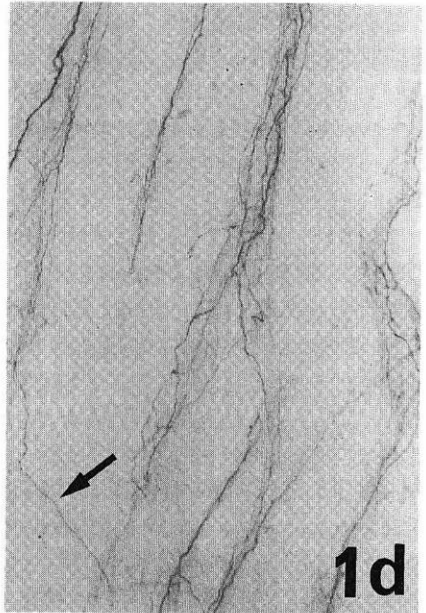
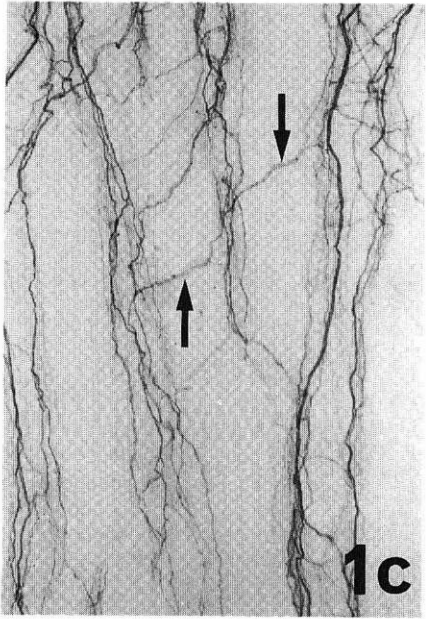
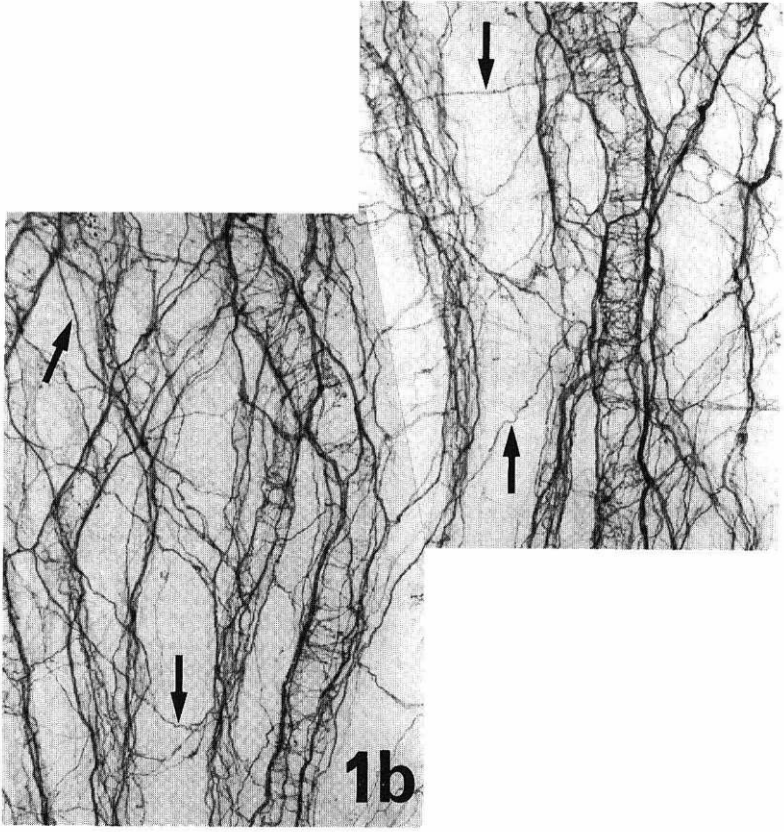
神経線維内には、ミトコンドリア、微小管が観察された。しかしながら、明瞭な synaptic vesicle を認めることはできなかった。部位によっては、反応産物(フェロシアン化銅)の拡散がわずかに認められた(Fig. 2,4)。

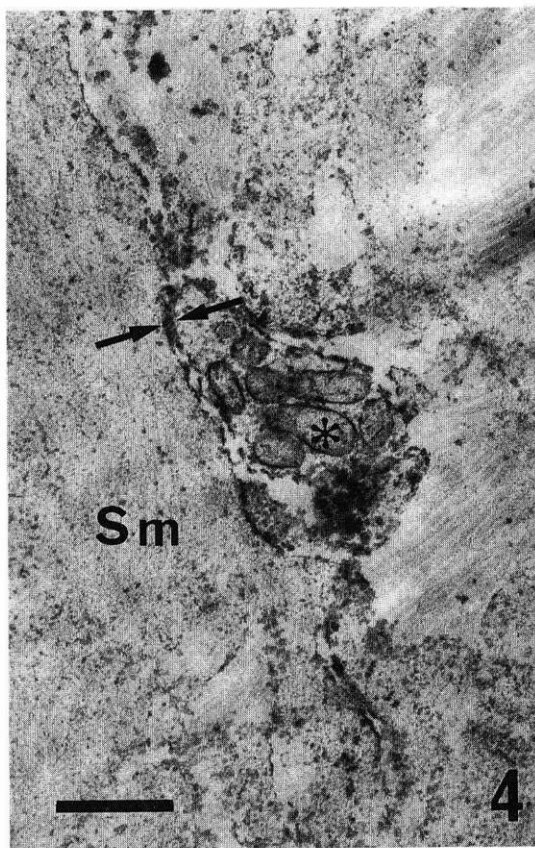
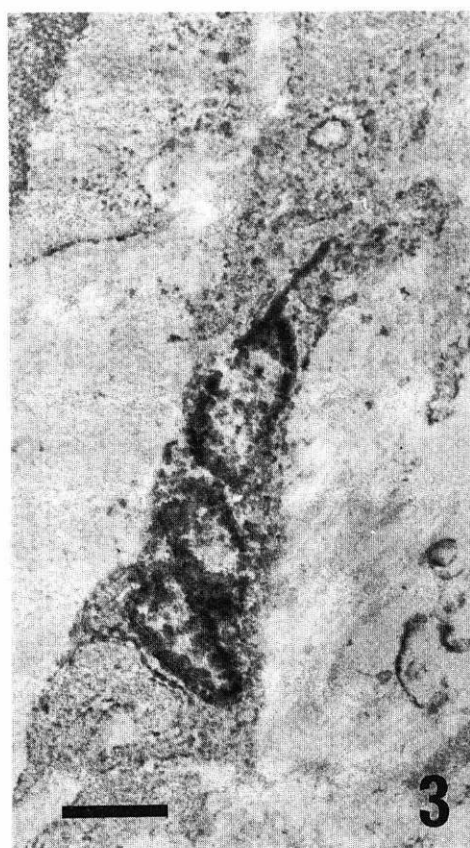
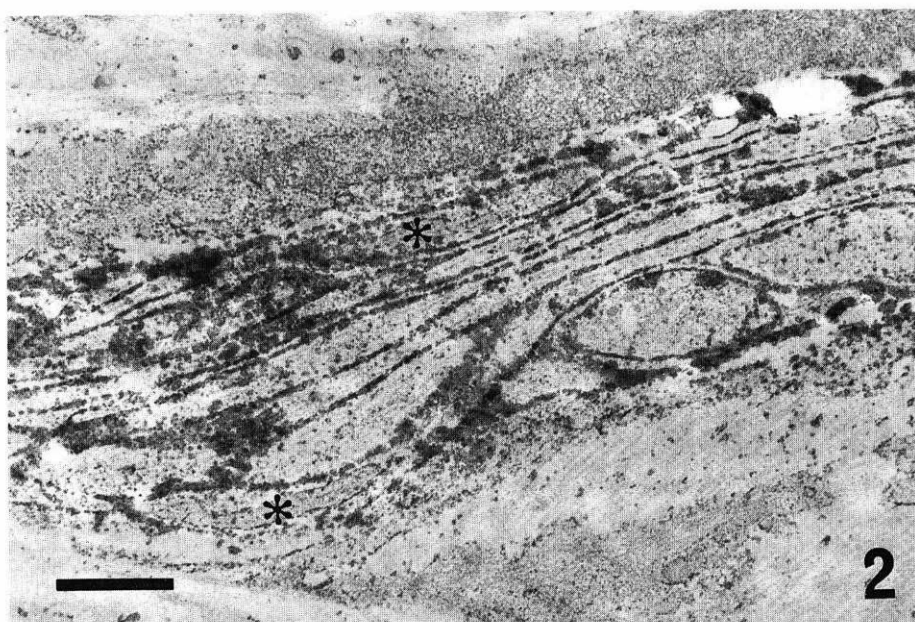
### IV 考 按

Wolter は、ヒト脈絡膜の切片に鍍銀染色を行ない、脈絡膜の神経を perivascular nerve fiber と intervascular space に分布する神経とに分類した<sup>5)</sup>。この Wolter の分類は、染色法、対象動物は異なるが、我々の分類と非常に似通っている。

以下、AChE 神経の機能的意義について考察する。







間質に分布するすべての AChE 神経は、神経叢と連結しており、これらが神経叢同士を結びつけていることが、伸展標本の観察によって一目瞭然となった。このことは、CN が AChE 神経を供給する経路としての役割を果たしていることを示唆する。一個の神経細胞に由来する神経線維が、CN を通じて広い範囲に供給され、複数の脈絡膜細動脈を支配しているのであろうと推測した。

次に間質の AChE 神経が、間質の細胞あるいは細静脈内皮細胞等に、影響を及ぼしうるか否かが問題となる。ちなみに、有色家兎あるいは猿では、ノルアドレナリン作動性神経が、メラニン含有細胞の代謝に影響を及ぼしうることを示されている<sup>67)</sup>。しかしながら本研究の範囲内では、AChE 神経が間質の細胞を支配する可能性を積極的に証明する所見を得ることはできなかった。

AChE 神経が、細動脈周囲に豊富な神経叢を形成すること、また AChE 活性が神経終末と血管平滑筋の間隙に存在することは、いずれもコリン作動性神経が脈絡膜細動脈を支配している可能性を示す。神経叢を形成する AChE 神経の分布密度は、部位によって異なっており、後毛様動脈の分枝細動脈が脈絡膜に進入する領域では、神経は密に分布していた。したがって、コリン作動性神経による支配は、上述の部位において特に強力に行なわれていると考えた。

コリン作動性神経が脈絡膜細動脈を支配することを、より確実に知るためには、神経終末におけるアセチルコリン合成酵素の証明、細動脈壁におけるアセチルコリン受容体の存在様式の検索等が必要であり、今後の課題として残されている。

原稿を終えるにあたり、技術的援助を賜りました細田彰、光岡健之の両氏に感謝致します。

#### Explanation of Figures

**Fig. 1a** A part of the wholemount preparation of the choroid (AChE staining,  $\times 10$ )

Two general types of AChE positive nerve are demonstrated.

- (1) Nerves forming periarterial nerve plexus.
- (2) Nerves running in the intervacular spaces of the choroid and connecting periarterial nerve plexuses each other.

AChE positive nerves are especially rich at the area, Short Posterior Ciliary Artery penetrated into the choroid.

**Fig. 1b** Posterior pole (AChE staining,  $\times 33$ )

Periarterial nerve plexus contains a great many of AChE positive nerves. Nerves, connecting periarterial nerve plexuses are also plentiful.

**Fig. 1c** Equatorial Area (AChE staining,  $\times 33$ )

**Fig. 1d** Peripheral Area (AChE staining,  $\times 33$ )

AChE positive nerves are thin and diminish in number.

The arrow shows AChE positive nerve, connecting periarterial nerve plexuses each other.

**Fig. 2** The longitudinal section of the AChE positive nerve. (The bar indicates  $1\mu\text{m}$ )

Intense AChE activity (deposits of copper ferrocyanide) presents between the axolemma and the Schwann cell membrane. The distance of these membranes is about  $240\text{\AA}$ . Mitochondria (asterisk) and microtubules are demonstrated in the axoplasm. Slight diffusion of reaction products is observed.

**Fig. 3** The transverse section of the AChE positive nerve (The bar indicates  $0.5\mu\text{m}$ )

**Fig. 4** AChE positive nerve terminal, facing the smooth muscle cell (Sm) of the choroidal arteriole (The bar indicates  $1\mu\text{m}$ ).

AChE activity is present between the axolemma and the sarcolemma of the smooth muscle cell. The distance of these membranes is about  $440\text{\AA}$  (arrows).

#### 文 献

- 1) **McMahon RT**: Uveal Tract. Anatomy, Congenital Anomalies and Tumors. In Peyman GA, Saunders DR, Goldberg MF, Ed: Principles and Practice of Ophthalmology, 1491—1553, WB Saunders Company, Philadelphia, 1980.
- 2) **Ehinger B**: Cholinesterases in ocular and orbital tissues of some mammals. Acta Univ Lund II, 1966, No. 2, 2—15, 1966
- 3) **Imai K**: Cholinergic innervation of the choroid. Ophthal Res 9: 194—200, 1977.
- 4) **Karnovsky MJ, Roots L**: A "direct coloring" thiocholine method for cholinesterases. J Histochem Cytochem 12: 219—221, 1964.
- 5) **Wolter JR**: Nerves of the normal human choroid. Arch Ophthalmol 64: 150—154, 1960.
- 6) 杉田 新, 吉岡久春, 猪口哲夫: 上頸神経節切除の脈絡膜メラノサイトにおよぼす影響について。日眼誌 88: 393—399, 1984.
- 7) 渡邊英臣: 猿眼脈絡膜メラニン細胞の上頸交感神経節切除による形態学的変化に関する研究。第3報。切除後長時間における変化について。日眼誌 89: 1171—1181, 1985.