

## ネコ動眼神経核の電子顕微鏡的観察

—特に下直筋支配核について—(図9)

近藤 佳夫・宇賀 茂三・石川 哲 (北里大学医学部眼科学教室)

Electron Microscopic Study of the Feline Oculomotor Nucleus  
Projecting the Inferior Rectus Muscle

Yoshio Kondo, Shigekazu Uga and Satoshi Ishikawa

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kitasato University

## 要 約

7匹の成猫の下直筋に HRP を注入し、脳幹の連続切片を作製後、光顕と電顕とで分析した。下直筋支配核は主に動眼神経核吻側部に分布し、反応陽性細胞は1861個観察され、細胞体平均直径は $46.8+1.66\mu\text{m}$ であった。反応陽性細胞におけるシナプス様式には3種類が認められた。それらは、Axo-somatic synapse, Axo-dendritic synapse, Axo-axonal synapse であり、Axo-somatic synapse には特に Knob 型と Plateau 型とが観察された。シナプス小胞の形態には、球状型と楕円型との2種類がみられた。反応陽性細胞におわるシナプス様式は比較的単純で、これらの構築が機能的な差を表わしているというよりは、むしろシナプス小胞の形状に機能上の違いがあると考えた。(日眼91:630-635, 1987)

キーワード：動眼神経核，下直筋，HRP 逆行性軸索輸送，電子顕微鏡，シナプス

## Abstract

To examine the fine structure of neurons in the oculomotor nucleus projecting the inferior rectus muscle, 50% horseradish peroxidase (HRP) solution was injected into the inferior rectus muscle of the adult cat with a Hamilton microsyringe, and serial sections of midbrain were studied with light and electron microscopes. Most HRP-positive cells were distributed in the rostral and caudal parts of the oculomotor nucleus. In total 1,861 cells were observed. The mean cell diameter was  $46.8+1.66\mu\text{m}$ . Supra-and/or infra-nuclear fibers terminating these motoneurons formed synapses at many parts of the cells e.g. at somas, axons, and dendrites. Two types of synaptic formations i.e. knob-shaped and plateau-shaped were observed. Moreover, the nerve terminals contained two types of synaptic vesicles; spherical and ellipsoidal-types. These results suggest that the function of motoneurons related to the inferior rectus muscle is not defined by the shape and distribution of nerve terminals of supra-and/or infra-nuclear fibers but depends on the properties of synaptic vesicles. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 630-635, 1987)

Key words: Oculomotor nucleus, Inferior rectus muscle, HRP retrograde axonal flow, Electron microscopy, Synapse

別刷請求先：228 神奈川県相模原市北里1-15-1 北里大学医学部眼科学教室 近藤 佳夫

Reprint requests to: Yoshio Kondo, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Kitasato Univ. 1-15-1 Kitasato, Sagamihara 228, Japan

(昭和62年1月26日受付) (Accepted January 26, 1987)

### I 緒 言

外眼筋を支配する神経細胞は脳幹内に局在すると考えられている<sup>1)</sup>。これらのひとつは動眼神経核であり、外眼筋の大部分を支配するもので、近年、Horseradish peroxidase(以下 HRP と略す)逆行性軸索輸送を応用してその構築が示された<sup>2)~10)</sup>。しかし、これらの知見は主に光学顕微鏡(以下光顕と略す)レベルであり、シナプス等の微細構造上の構築についてはまだ不明の点が極めて多い。今回我々は、未知の点が多い垂直運動筋の1つである下直筋に着目し、HRPを用いて支配運動神経細胞群を光顕と電子顕微鏡(以下電顕と略す)とで観察した。

### II 実験方法

実験動物として成猫7匹を用いた。麻酔は塩酸ケタミン(15mg)筋注により行ったが、前処置として硫酸アトロピン0.1ml筋注を施した。ネコを仰臥位にして気管内挿管をした後、開口器で口部を固定し顕微鏡下に口蓋粘膜を切開のち鈍的に下直筋に到達した。パラフィルムによって周囲の組織と隔離し、50% HRP水溶液約20 $\mu$ lをHamilton製microsyringeにて緩徐に注入した。この際、液の漏出を最小限にするため注入部周囲に極力注意し、ガーゼで頻回にふき取りながら注入を行った。注入約48時間後に、1%Paraformaldehyde・1.25% glutaraldehydeの混合液で灌流固定を行い、中脳を摘出した。光顕用標本については、中脳摘出前に10%蔗糖液で灌流を行った。これらの試料は30%蔗糖液に浸した後、厚さ50 $\mu$ mの切片を作製し、Mesulam<sup>11)</sup> TMB法及び過酸化水素で反応させた。対比染色は中性赤で行い、明視野下にて観察した。個々の細胞の大きさを計測するにあたっては各細胞の短軸径と長軸径との和を2で割ったものをその細胞の大きさとし、平均直径、標準誤差を算出した。電顕用と試料については、摘出した中脳を直ちに4% glutaraldehydeに浸した後、150 $\mu$ mの厚目の切片を作製し、Mesulam TMB法に従って酵素反応後、電顕用に処理し観察に供した。超薄切片はPorter-Blum MT-2型超ミクロトームで作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で染色後、日立製HU-12A電顕で観察した。

### III 結 果

ネコ左眼下直筋 HRP 注入で示された反応陽性細胞群は、同側の中脳動眼神経核に見出された。また、そ



図1a ネコ左眼下直筋 HRP 注入で示された動眼神経核の反応陽性細胞群。矢印：内側縦束にみられた HRP 反応陽性細胞。×100

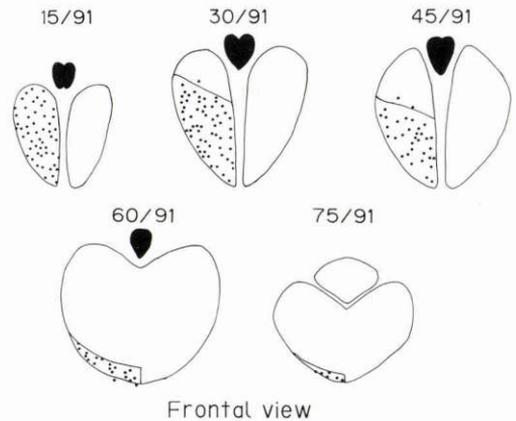


図1b 左眼下直筋 HRP 注入で示された反応陽性細胞群の分布を示す模式図。数字は91枚の連続切片中、吻側から数えた切片順位を示す。

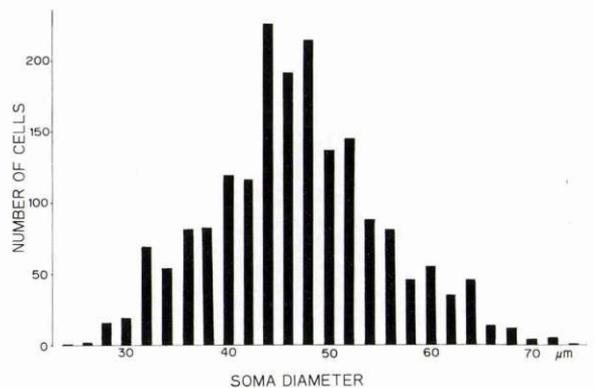


図1c 細胞の大きさと頻度との関係を示すヒストグラム。

れは内側縦束 (MLF) にも確認された (図 1a)。各反応陽性細胞群は、主に動眼神経核吻側部では、Edinger-Westphal 核に続いて出現し尾側の方まで比較的広い範囲に分布していたが、吻側では背側にもあった陽性細胞群も、尾側では腹側の方へ移行していた (図 1b)。これらの反応陽性細胞総数は1861個観察された。また、下直筋支配核の細胞体平均直径は $46.8 \pm 1.66 \mu\text{m}$ であったが、大きいものは $74 \mu\text{m}$ 、小さいものは $24 \mu\text{m}$ であって大きさの差異は比較的大きかった。ヒストグラムの形状は、ほぼ一峰性を示していた (図 1c)。

各細胞を電顕で観察すると、細胞体の形状は円形、楕円形その他、多形性のももみられた。反応陽性細胞軸索、樹状突起の起始部の直径はそれぞれ約 $15 \mu\text{m}$ 、約

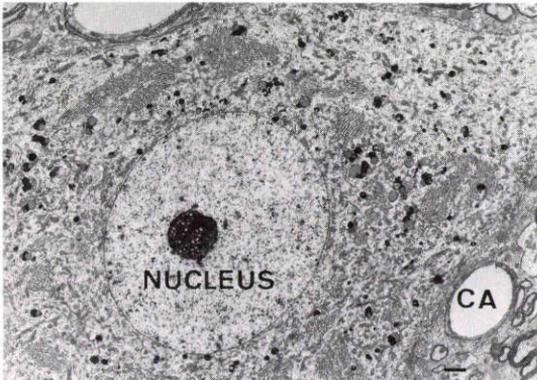


図2 比較的大型の反応陽性細胞の電顕写真。発達した粗面小胞体を含み、代謝活動が旺盛なことを示している。CA：毛細血管 $\times 2,800$  Bar= $0.5 \mu\text{m}$

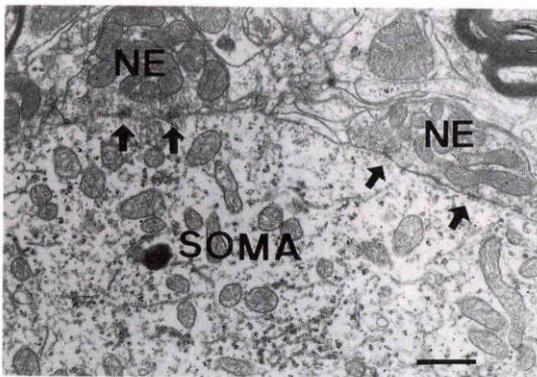


図3 反応陽性細胞細胞体におけるシナプス結合を示す電顕写真。2つのKnob型神経終末 (NE) がみられる。Axo-somatic synapse (矢印)。 $\times 11,400$  Bar= $1 \mu\text{m}$

$5 \mu\text{m}$ であった。反応陽性細胞体は中央に直径約 $20 \mu\text{m}$ の核を有し、その中に1個の核小体を含んでいた。細胞質には発達した粗面小胞体が観察され、代謝活動が旺盛なことを示していた。また、ライソゾームが多数存在し、それらの大部分のものにHRPが取り込まれている像もみられた。その他、ミトコンドリア、遊離リボゾーム等の細胞小器官が豊富に存在していた。反応陽性細胞の周囲において、有髄神経が直接細胞体に接するものはみられなかった。また、神経細胞周辺には毛細血管が豊富に分布していた (図2)。

反応陽性細胞の周囲において多数のシナプスが認められた。これには、神経終末が細胞体表面に大きく膨大して終わっているKnob型 (図3)と、広い範囲にわたって細胞体と接触しているPlateau型 (図4)との2型が認められた。これらは、1つの切片上に1細胞当たり10~12個みられ、Plateau型が多くてKnob型は少なかった。Knob型は細胞体に接した長さが $2.5 \sim 3.0 \mu\text{m}$ で、最大幅が約 $1.5 \mu\text{m}$ 、最小幅が約 $0.2 \mu\text{m}$ であった。一方、Plateau型はそれらが各々およそ $8 \mu\text{m}$ 以上、約 $2 \mu\text{m}$ 、約 $0.1 \mu\text{m}$ であった。その他、反応陽性細胞樹状突起におわるシナプスを形成したもの (図5)や、反応陽性細胞軸索におわるシナプスを形成したものの (図6)が観察された。このほか、ひとつの膨大終末部が細胞体と樹状突起との両方に同時にシナプスを形成している像もみられた (図7)。

神経終末内のシナプス小胞は、多くの場合直径約 $40 \text{nm}$ の球状であって、大きいものは $100 \text{nm}$ 前後、小さいものは $20 \text{nm}$ 前後であった (図8a)が、直径約 $50 \times 30 \text{nm}$ の扁平なシナプス小胞もかなりの頻度でみられた

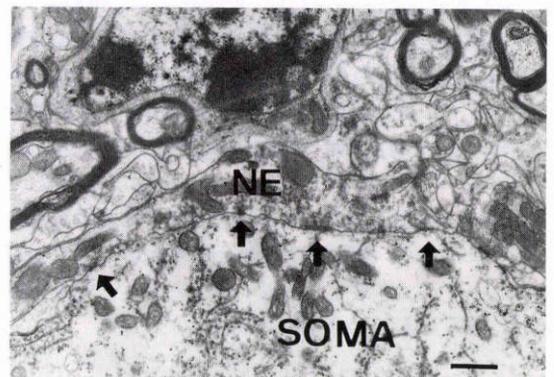


図4 反応陽性細胞細胞体に接触するPlateau型神経終末。Axo-somatic synapse (矢印)。NE：神経終末、 $\times 9,000$  Bar= $1 \mu\text{m}$

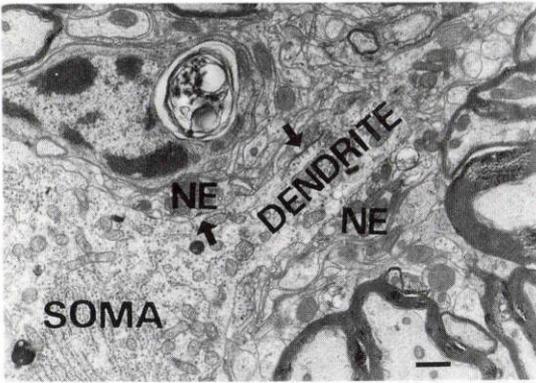


図5 反応陽性細胞樹状突起におけるシナプス結合。Axo-dendritic synapse (矢印)。NE: 神経終末,  $\times 6,100$  Bar= $1\mu\text{m}$

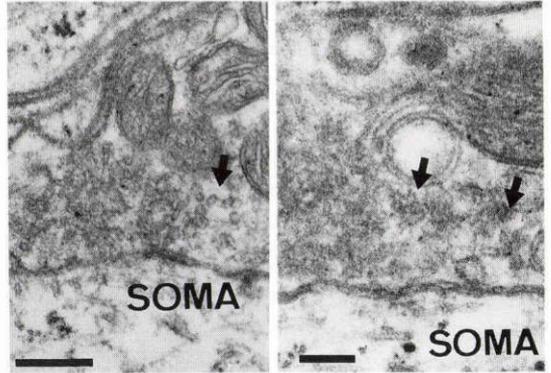


図8a この神経終末は球状なシナプス小胞(矢印)を含み,興奮型のものと思われる。 $\times 52,000$  Bar= $0.2\mu\text{m}$

図8b この神経終末は,平なシナプス小胞(矢印)を含み,抑制型のものと思われる。 $\times 70,000$  Bar= $0.2\mu\text{m}$

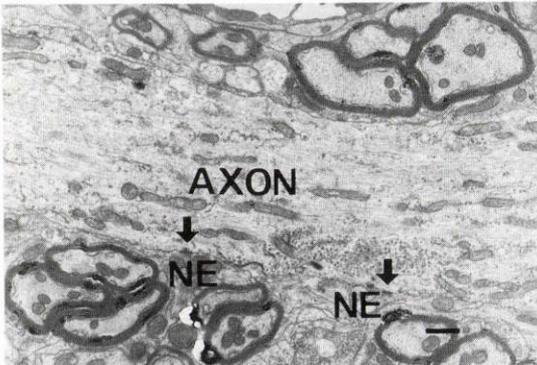


図6 反応陽性細胞軸索におけるシナプス結合。Axo-axonal synapse (矢印)。NE: 神経終末,  $\times 6,100$  Bar= $1\mu\text{m}$

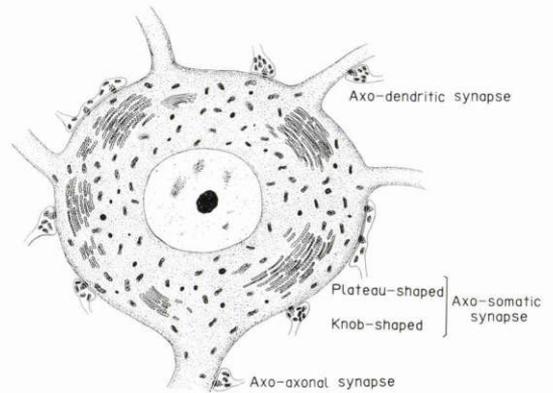


図9 大まかに3型のシナプス様式が認められる。

(図8b).

以上を模式的に示すと図9のようになる。

#### IV 考 按

今回我々は,垂直運動筋のうち,下直筋支配核が動眼神経核の高さにおいて中脳でどのように構築され,それが機能上どのように反映されるかを知るためHRPをトレーサーとして用い,神経細胞の数や大きさ,シナプス様式などについて検討した。

現在までに,HRPを用いて外眼筋支配運動神経細胞が標識される局在部位をみた報告がいくつかなされている。そのなかで,Büttner-Ennever<sup>6)</sup>はサル眼側内直筋にHRP-WGAを注入した際,動眼神経核に下

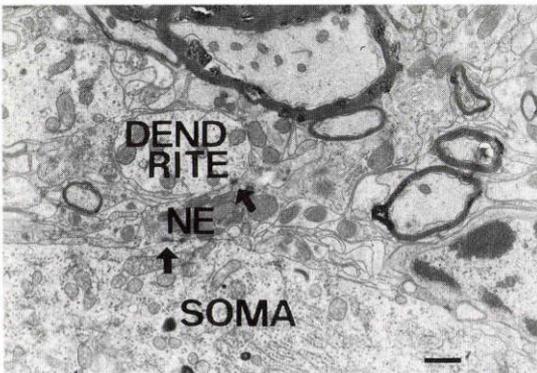


図7 細胞体と樹状突起との両方にシナプス結合をした例(矢印)。NE: 神経終末,  $\times 6,400$  Bar= $1\mu\text{m}$

直筋支配神経細胞の混入を報告した。また、Miyazaki<sup>10)</sup>はネコ外眼筋支配神経枝にHRPを注入し、大部分の吻側部の高さにおいて内直筋と下直筋とが混入したことを初めて示した。これは、動眼神経核が中心部において一束から成り、個々の線維の位置が決定していない<sup>12)</sup>こと、また、MLFにおいて内直筋の他、下斜筋、下直筋、対側の上直筋に標識細胞がみられたこと<sup>10)</sup>が背景にあると述べている。今回の実験でも同側のMLFに反応陽性細胞がみられたことから、内直筋支配領域にもそれが一部偏在しているものがあり、完全な区画にはなっていないと思われる。これは、動眼神経核の高さにおいて水平運動系に關与するMLFに、下直筋からの連絡がみられたことにより推測できる。以上のことから、MLFが運動中枢連絡路において垂直運動系に關係していることが示唆された。

ネコ中脳の連続切片から動眼神経核の立体構築を描き下直筋支配核の部位を示すと、動眼神経核の吻側では背側部から腹側部が、一方、尾側では腹側部が下直筋支配核になり、全体として紡錘状を呈していた。これらの所見はAkagi<sup>9)</sup>の報告とほぼ一致した。

今回の実験で示された下直筋支配核における反応陽性細胞体の平均直径は $46.8 \pm 1.66 \mu\text{m}$ であり、この値はSpencerら<sup>13)</sup>の示した外直筋 $37.96 \pm 8.75 \mu\text{m}$ 、内直筋 $34.60 \pm 7.82 \mu\text{m}$ 、牽引筋 $42.91 \pm 7.86 \mu\text{m}$ と比較してやや大きい。

一般に、核内神経細胞の細胞体は大別して2種類があり、一つは、粗面小胞体、ミトコンドリア、ニッセル小体等の細胞小器官が豊富なalpha運動細胞と、もう一つは、それらが粗で大きさが前者の半分ほどのgamma運動細胞である<sup>15)16)</sup>。Bakら<sup>15)</sup>は、gammaは筋紡錘支配であると報告した。今回の実験では、細胞体の平均直径は $24 \sim 74 \mu\text{m}$ の間に分布していたが直径 $40 \mu\text{m}$ 以上の運動細胞は主にalpha、直径 $40 \mu\text{m}$ 以下の運動細胞は恐らく筋紡錘支配のgammaであるかもしれない。知覚神経の分布に關する問題は今後の研究に待ちたい。

反応陽性細胞総数に關して、松本ら<sup>9)</sup>は上直筋で平均1413個、Miyazaki<sup>10)</sup>は内直筋で1658、1699個、下直筋で1518、1282個、下斜筋で1311、1125個、上直筋と上眼瞼挙筋で1355、1773個、Spencerら<sup>13)</sup>は外直筋で1179個であることを報告した。今回の実験で観察した下直筋支配核細胞総数は1861個であり、Miyazaki<sup>10)</sup>が報告したその値より幾分高い値を示した。これは、HRP注入の際の方法の違いに加えて、我々の実験で

はHRP筋肉注入後に生じる他筋への拡散ということがあったためかもしれない。しかし、我々の方法では、常にこれに近い値を示した。

過去に、動眼神経核神経終末をGolgi鍍銀法を用いて光顕的に検討したSzentagothai<sup>14)</sup>は、動眼神経核に終わるシナプス終末を2型に分類した。Type-Aは比較的太い線維で、動眼神経核のごく限られた範囲で終末分岐後、2、3の隣接した神経細胞体と無数のシナプスを形成するものである。Type-Bは細い線維で終末分岐が広い範囲に分布し、多数の神経細胞体とシナプス形成をするものである。一方、外眼筋支配核を電顕的に分析したBakら<sup>15)</sup>はネコ滑車神経核における神経終末の形状を幾つかに分類している。Type-1は細長い形状のものを指すのに対し、Type-2は長く、Type-1より幅広い形状で細胞小器官が粗なもの、Type-3は稀にしかみられないもので神経網に存在するもの、Type-4は大きい顆粒状小胞を含むものというように4型を示した。また、Axo-somatic synapseにはType-1, 2が、Axo-dendritic synapseにはType-1, 2, 3, 4がみられることを報告した。今回の実験結果と比較してみると、Plateau型シナプスがType-1に類似しており、Knob型シナプスはしいていえばType-2に類似していたが、凹凸がはっきりしているものが多くみられた。我々が分類したこれら2型の終末様式は、これまで中枢神経系の電顕的研究で指摘したものはほとんど見当たらない。しかし、この終末様式は、無数の神経線維が錯綜する中枢神経系において、特に機能的な違いを反映するものと考えられなかった。

その他、Waxmanら<sup>16)</sup>は下等な哺乳動物を用いて、動眼神経核のAxo-somatic synapseにはシナプス槽に差があることを指摘した。Spencerら<sup>13)</sup>はネコ外転神経副核におけるHRP陽性細胞や細胞小器官の種類を示した。Destombesら<sup>17)</sup>はネコ外転神経核の電顕像を示したが、これらの研究では神経終末の形状について触れた報告は見当たらない。

シナプス小胞の形態については、Uchizono<sup>18)</sup>がザリガニの神経系を用いて球状型の小胞を興奮型シナプス、楕円型の小胞を抑制型シナプスと位置づけした。この二つの形態をColonnier<sup>19)</sup>はネコ大脳皮質において、2型のシナプス小胞間の均一性、大きさ、形状、対称性、密度等の差を指摘した。また、Trediciら<sup>20)</sup>はネコ動眼神経核において、シナプス小胞の形状と細胞小器官の組成との間に一定の關係がみられることを報告した。Spencerら<sup>21)</sup>はネコ外転神経核において、

Tanishima<sup>22)</sup>はネコ Edinger-Westphal 核において、2型のシナプス小胞の存在を報告している。Spencer<sup>21)</sup>はこのなかで、同じ割合でシナプス小胞がみられることを示した。今回の実験でも、球状型のシナプス小胞の他に楕円形の小胞がかなりの頻度でみられ、興奮性のものや、抑制性のものの存在がシナプスの形状から伺われることから、下直筋反応陽性細胞周囲にみられたシナプスが上位中枢からの支配を受けていると思われた。また、外眼筋筋電図において眼球がある一方向に運動、注視する際、注視側の外眼筋、拮抗筋の両方に放電が起こることから、下直筋反応陽性細胞周囲において、核上性線維とのシナプスの他に拮抗筋群からの神経細胞間の連絡の存在が伺われた。これらのほかに、種々の神経終末がここでおわっていると考えられる。今後、他の垂直運動筋を比較検討していきたい。

#### 文 献

- 1) 下奥 仁：眼球運動に関する神経機構。動眼神経核を中心として。眼科 11：745—752, 1969.
- 2) Gacek RR： Localization of neurons supplying the extraocular muscles in the kitten using horseradish peroxidase. *Exp Neurol* 44: 381—403, 1974.
- 3) Akagi Y： The localization of the motor neurons innervating the extraocular muscles in the oculomotor nuclei of the cat and rabbit, using horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 181: 745—762, 1978.
- 4) Glicksman MA： Localization of motoneurons controlling the extraocular muscles of the rat. *Brain Res* 188: 53—62, 1980.
- 5) James RA, Edgar GD, James GF, JR： Functional organization of the oculomotor nucleus in the baboon. *Am J Anatomy* 161: 393—403, 1981.
- 6) Büttner-Ennever JA, Akert K： Medical restus subgroups of the oculomotor nucleus and their abducens internuclear input in the monkey. *J Comp Neurol* 197: 17—27, 1981.
- 7) Oda Y： The nerve center of the rat extrinsic ocular muscles as studied using horseradish peroxidase. *Okajimas Folia Anat Jpn* 58: 17—42, 1981.
- 8) 三村 浩：HRP 逆行性軸索輸送によるネコ外直筋支配神経の検討。日眼 85: 2008—2015, 1981.
- 9) 松本英樹, 宮崎茂雄, 白木かほる, 下奥 仁：HRP (Horseradish peroxidase) 法による外眼筋支配運動神経細胞の同定に関する基礎的研究。日眼 88: 1369—1374, 1984.
- 10) Miyazaki S： Location of Motoneurons in the oculomotor nucleus and the course of their axons in the oculomotor nerve. *Brain Res* 348: 57—63, 1985.
- 11) Mesulam M-M： Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: A non-carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J Histochem Cytochem* 26: 106—117, 1978.
- 12) Sunderland S, Hughes ESR： The pupilloconstrictor pathway and the nerves to the ocular muscles in man. *Brain* 69: 301—309, 1946.
- 13) Spencer RF, Baker R, McCrear RA： Localization and Morphology of cat retractor bulbi motoneurons. *J Neurophysiol* 43: 754—768, 1980.
- 14) Szentagothai J： The oculomotor system. NY, Harper Y Row, 215—217, 1964.
- 15) Bak IJ, Choi WB： Electron microscopic investigation of synaptic organization of the trochlear nucleus in cat. *Cell Tiss Res* 150: 409—423, 1974.
- 16) Waxman SG, Pappas GD： An electron microscopic study of synaptic morphology in the oculomotor nuclei of three inframammalian species. *J Comp Neurol* 143: 41—72, 1971.
- 17) Destombes J, Ripert JP： Ultrastructural observations of the abducens nucleus of the cat after injection of horseradish peroxydase into the lateral rectus muscle. *Exp Brain Res* 28: 63—71, 1977.
- 18) Uchizono K： Inhibitory synapses on the stretch receptor neurone of the Crayfish. *Nature* 214: 833—834, 1967.
- 19) Colonnier M： Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Res* 9: 268—287, 1968.
- 20) Tredici G, Pizzini G, Milanese S： The ultrastructure of the nucleus of the oculomotor nerve cat. *Anat Embryol* 149: 323—346, 1976.
- 21) Spencer RF, Sterling P： An electron microscope study of motoneurons and interneurons in the cat abducens nucleus identified by retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 176: 65—86, 1977.
- 22) Tanishima T： Fine structure of the Edinger-Westphal nucleus of the cat. *Jap J Ophthalmol* 17: 236—243, 1973.