

実験弱視における解剖学的研究

第1報 片眼遮蔽の行動, 眼軸長, 屈折および網膜神経節細胞に
与える影響について (図4, 表3)

三 輪 正 人 (滋賀医科大学眼科)

Effects of Experimental Amblyopia on the Visual Behavior,
Ocular Axial Length, Refraction and Morphological
Properties of Retinal Ganglion Cells

Masato Miwa

Department of Ophthalmology, Shiga University of Medical Science

要 約

生後2～4週の子猫に片眼遮蔽を施行し, 1～1.5年飼育し実験弱視猫を4匹作成した。この猫を用いて, 視性遮蔽の1) 視的行動, 2) 眼軸長, 屈折度に与える効果について検討した。また, 1匹の弱視猫においては, 遮蔽眼の視神経に蛍光色素を注入することにより, 3) 網膜中心野における神経節細胞の面積, 密度についても検討した。以下の結論を得た。1) 遮蔽開放, 僚眼閉眼時の行動は, あたかも盲のようであった。2) 眼軸長, 屈折度ともに, 遮蔽眼, 非遮蔽眼の平均値に有意差はなかった。3) 網膜中心野を構成する主要な神経節細胞の面積および細胞密度に変化はなかった。4) また, 蛍光色素 (Primuline) の取り込みと発色に差はなかった。5) しかし, 細胞面積の小型化が起こりつつある可能性も示唆された。(日眼 91: 890—895, 1987)

キーワード: 視性遮断, 視的行動, 眼軸長, 屈折度, 網膜神経節細胞

Abstract

4 kittens were reared from 2—4 weeks of age with the lid of one eye sutured shut for 12—18 months. After the period of deprivation the sutured lids were opened. All cats were observed for visual behavior, following which the axial length was measured with an ultrasonic ophthalmoscope, and refraction with a skiascope. The area and density of the foveal retinal ganglion cells constituting the area centralis (presumed to be X-cells) were calculated using a Primuline-stained hole mount preparation of the retina of one monocular-deprived cat. The data obtained were compared with those from non-deprived cats. The following results were obtained. 1) Behaviorally, all cats appeared blind when first exposed to visual stimuli in the deprived eye. 2) Both axial length and refraction were unaffected by visual deprivation. 3) There was no significant difference between the deprived cat and non-deprived cats in the area and density of the retinal ganglion cells. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 890—895, 1987)

Key words: visual deprivation, visual behavior, ocular axial length, refraction, retinal ganglion cell

別刷請求先: 520-21 大津市瀬田月輪町 滋賀医科大学眼科学教室 三輪 正人

Reprint requests to: Masato Miwa, M.D. Dept. of Ophthalmol., Shiga Univ. of Medical Science
Tsukinowa-cho, Seta, Ohtsu 520-21, Japan

(昭和62年5月25日受付) (Accepted May 25, 1987)

I 緒 言

一般的に、生後12週までの子猫を片眼遮蔽することで、その子猫に実験的弱視を起こすことが知られている¹⁾。また、その片眼遮蔽の外側膝状体、後頭葉視中枢におよぼす影響については、すでに生理学的にも解剖学的にも確立されつつある^{2)~4)}。しかしながら、網膜神経節細胞におよぼす組織解剖学的影響については電気生理学的なものに比して、まだあまり研究がなされていない。

今回、著者は、臨界期（生後4～12週）に片眼遮蔽した猫において、1) 遮蔽眼開放時の行動におよぼす影響について、2) 片眼遮蔽の眼軸長および屈折度におよぼす影響について、3) 遮蔽の網膜中心野における神経節細胞面積、密度に与える影響について検討したので報告する。

II 実験方法

1) 対象

生後2～6週の子猫の右眼瞼を縫合遮蔽して約1年間飼育したものおよび、その比較対象としての成猫を使用した。

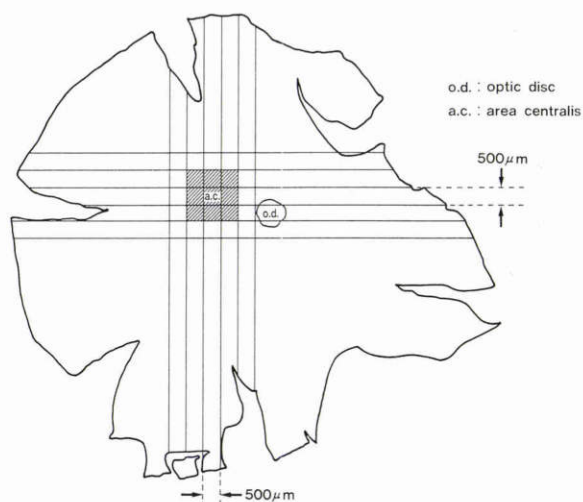


図1 網膜全貼付標本の模式図

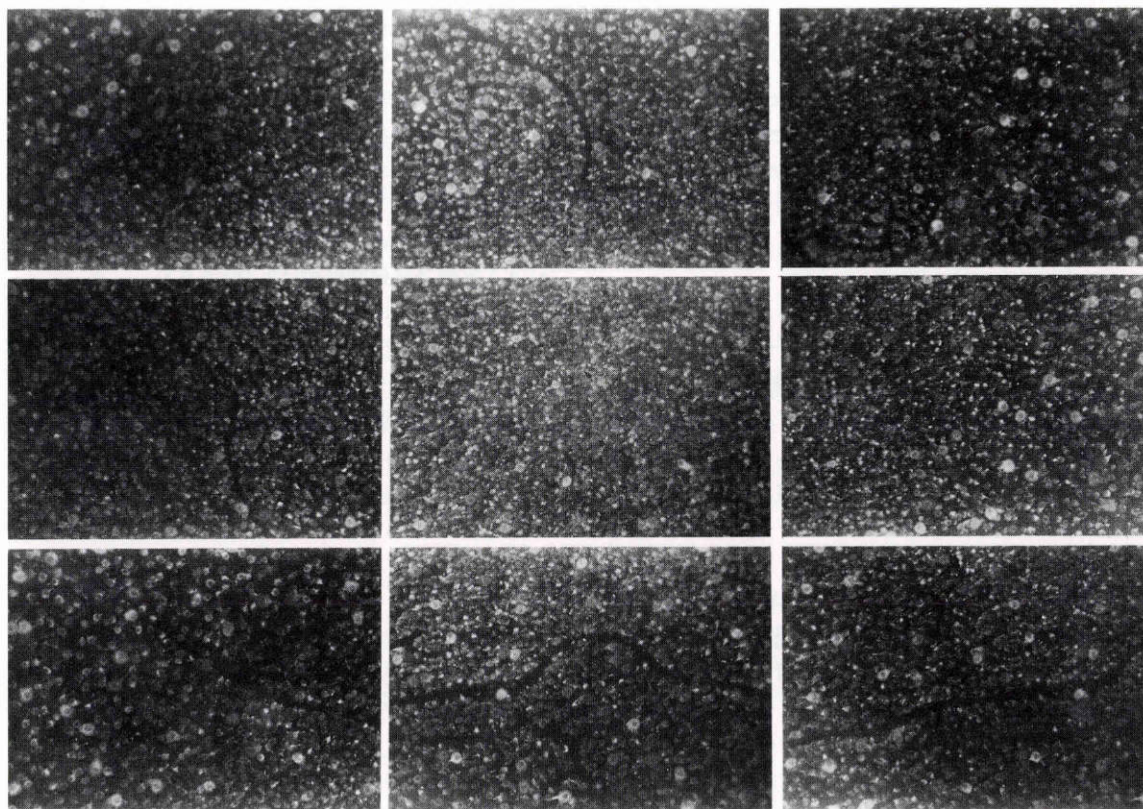


図2 網膜中心野の蛍光顕微鏡写真 (×400)

2) 行動観察および眼軸長測定

生後2～6週の子猫の右眼瞼を縫合遮蔽した後、約1年間その遮蔽が完全にできているか、観察しながら、飼育した。標本作成時、遮蔽眼を開瞼し他眼を遮蔽し、行動を観察した。そのうち、キシラジン塩酸塩（セラクター®）を筋注麻酔（0.15ml/kg）し、両眼に1% Atropin点眼し、30分後、検影法を行なった。また、超音波Aモードにて眼軸長を測定した。

3) 標本作成

蛍光色素（10% Primuline in saline）を右眼の視神経に注入。注入2～3日後、Krebs Ringer および4% Paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) にて灌流固定したのち眼球を摘出した。

摘出眼の角膜を輪部で切除したのち、水晶体および硝子体を摘出し、4% Paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)、30% Saccharose in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) にて2日間固定した。

そのうち、網膜を剝離し全貼付標本を作成した。

4) 蛍光顕微鏡写真撮影

蛍光顕微鏡にて、435nmで観察、写真撮影を行なった（図1、図2）。

5) 画像処理システムによる解析

網膜中心野（500×500 μm^2 の範囲）を515倍に拡大し、画像処理システムで細胞の輪郭をpen digitizer でなぞることにより、細胞数と細胞面積を解析した。

そして、コントロールとして生後1～2年の成猫と比較した。

III 実験結果

1) 開放時（他眼遮蔽時）の行動について

両眼を開瞼したのち、遮蔽眼を再遮蔽しても嫌がることはなかったが、他眼を遮蔽すると非常に嫌がった。また、遮蔽眼を開瞼し、他眼を遮蔽し机上におくと前後左右にフラフラ動き、机から落ちそうになり、またあつさりする等の行動の所見から、視力低下があることが示唆され、弱視が形成されていると考えられた。

2) 片眼遮蔽の眼軸長にあたる影響

表1のごとく、4匹の眼軸長は、著明な左右差は認められず、眼瞼縫合が眼軸におよぼす影響はなかった（ $p>0.05$, T-test）。

3) 片眼遮蔽の屈折にあたる影響

表2のごとく、4匹の猫の屈折度の平均値には有意差はなく、眼瞼縫合が屈折におよぼす影響はないものと考えられた（ $p>0.05$, T-test）。

表1 遮蔽眼と僚眼の眼軸長実測値とその平均値

	遮蔽眼（右眼）	左 眼
MDC 1	19.20 (mm)	19.38 (mm)
MDC 2	19.37 (mm)	19.67 (mm)
MDC 3	19.71 (mm)	19.66 (mm)
MDC 4	19.70 (mm)	19.82 (mm)
平 均	19.49 (mm)	19.63 (mm)

左右の眼軸長に有意差なし（ $P>0.05$, T-test）

表2 遮蔽眼と僚眼の屈折度の実測値とその平均値

	遮蔽眼（右眼）	左 眼
MDC 1	-2.25 (D)	-2.50 (D)
MDC 2	-3.00 (D)	-2.00 (D)
MDC 3	-1.50 (D)	-0.75 (D)
MDC 4	-2.50 (D)	-3.25 (D)
平 均	-2.31 (D)	-2.12 (D)

左右の屈折度に有意差なし（ $P>0.05$, T-test）

4) 蛍光色素（Primuline）取り込みと発色

Primuline の取り込みと発色について、片眼弱視猫（monocular deprived cat；以後 MDC と略す）とコントロールとの間に差はなかった。

5) 片眼遮蔽の網膜神経節細胞にあたる影響

図3は網膜中心野（500 $\mu\text{m}\times 500\mu\text{m}$ ）内の網膜神経節細胞の細胞数および細胞面積に関するヒストグラムであり、表3はこれをまとめたものである。

図3、表3のごとく MDC の遮蔽眼の網膜中心野における網膜神経節細胞数は2,102であり、一方、コントロールの細胞数は2,036と、両者に差はなかった。また、細胞密度も MDC が8,408/mm²、コントロールが8,144/mm²と両者に差がなかった。そして、網膜中心野を形成する主要構成細胞の面積は、両者とも40～100 μm^2 と同じであった。

平均細胞面積は MDC が84.86 μm^2 、コントロールが86.95 μm^2 であった。

IV 考 按

哺乳動物の Critical Period 内での片眼遮蔽が（特に猿および猫において）弱視を惹起することは既によく知られている。今回、4匹の猫において生後2～6週で片眼の眼瞼の上下の瞼板を縫合して、1年から1年半遮蔽を確認しつつ飼育し弱視猫を作成した。

この片眼遮蔽猫の、1) 遮蔽眼開放時の行動、2) 屈折および眼軸長、3) 網膜中心野の神経節細胞の形態に

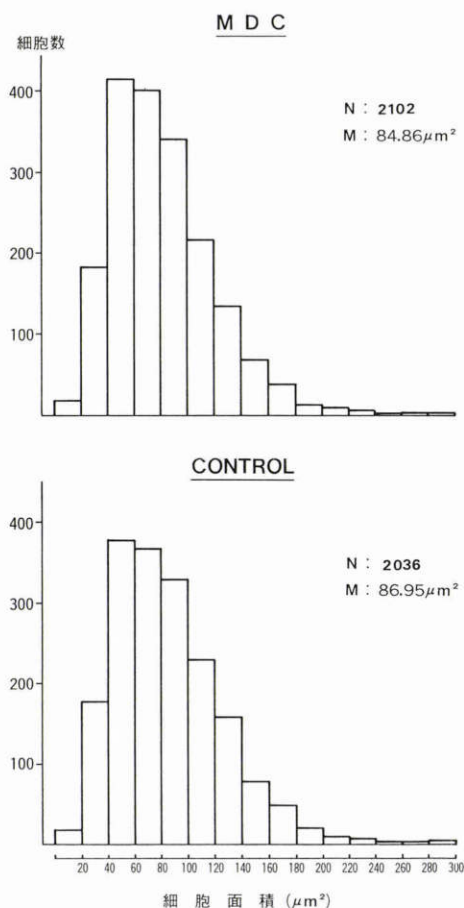


図3 MDC (片眼遮蔽猫) と対象の網膜神経節細胞の細胞面積別分布

表3 MDC (片眼遮蔽猫) と対象の網膜神経節細胞の面積、密度の比較

	MDC	CONTROL
神経節細胞数	2,102	2,036
主要構成細胞面積	40—100 μm^2	40—100 μm^2
細胞密度	8,408/mm ²	8,144/mm ²

あたえる影響について検討した。

1) 遮蔽眼開放、僚眼遮蔽時の行動について

生後早期より片眼を遮蔽した猫は全て、その遮蔽眼開放、僚眼遮蔽時には、あたかもまったく盲であるごとく行動した。これは、既に、Wiesel, Hubel.⁵⁾ Ganz, Fitch.⁶⁾ Dews, Wiesel.⁷⁾ Giffin, Mitchel.⁸⁾ らが報告した通りである。

Riesen ら⁹⁾は、生後すぐから暗室で育てた猫について、その猫の片眼を初めて開眼したときは、随分まご

つくが、徐々に行動的には正常となる、と報告している。また、ヒトにおいても梅津ら¹⁰⁾は次のように報告している。生後長く盲であったこどもが開眼手術をうけると、明暗、色調の弁別はすぐにも出来るが、視空間内での位置覚、形態覚が修得されるまでには、長期間が必要であった。

著者の実験でも猫は、明らかに盲のごとき行動を示した。これは、focal vision の低下 (網膜—LGB—主に17野の経路の障害) が原因ではなく、ambient vision (網膜—上丘—視床—主に18, 19野の経路) 即ち、視空間内の対象物あるいは自分の位置の認識、背景と違う形態の弁別などの学習の不足が原因であるためであると思われた。

今回は開眼後すぐの行動について観察したのみであったが、もっと長く観察してゆくと、この猫の行動は正常な猫と変わらなくなっただろう。それは、弱視が治癒したためでなく、ambient vision が学習により獲得されるからである。弱視により、高い解像力が必要とされる focal vision の低下があっても、これが、行動に直接関係しないことは、ヒトにおいては、臨床の場でよく遭遇する。

2) 屈折、眼軸長に与える効果

猿においては生下時より瞼縫合を受けると高度の近視化が起こるという事実は、既に、報告されている¹¹⁾¹²⁾。

猫での片眼遮蔽の、眼軸長、屈折度に与える影響については、2種類の報告があるのみである。Gollender ら¹³⁾は、1976年に、6匹の子猫に片眼遮蔽を施行し、左右眼の屈折に有意差はなかったと述べている。しかし、Albert ら¹⁴⁾は、1982年、20匹の片眼遮蔽で2年後に、眼軸長の延長と近視化が認められたと述べており、結論は出ていない。今回の結果では、少なくとも1年間の遮蔽による効果は認められなかった。

3) 網膜中心野における神経節細胞の形態におよぼす効果

生後2週目に瞼縫合を施行し1年間飼育した1匹の猫の、その被縫合眼の視神経に蛍光色素 (Primuline) を注入した。この蛍光色素はニューロンの終末から取り込まれ、軸索流により細胞体中に蓄積される¹⁵⁾ので、これを蛍光顕微鏡下で観察した。細胞密度、細胞面積については、蛍光顕微鏡写真を拡大し、画像解析することで検討した。この結果を、4匹の成猫の値をコントロールとして比較した。

網膜中心野における細胞は、そのほとんどが小型細

胞である。猫の場合、電気生理学的には、約90%がX-cell、残り10%がY-cellである¹⁶⁾と言われており、今回、著者のサンプリングを行なった中心野は、ほとんどがX-cellであると考えられる。遮蔽弱視による網膜神経節細胞におよぼす効果については、Sherman, Stone¹⁷⁾が、1973年に個々の神経節細胞の受容野および伝動速度について調べ、正常眼と比較して差がなかった、と述べている。また、Ganzら¹⁸⁾は、1968年に、ERGのa波のamplitudeが正常なの比して、b波のamplitudeが40%落ちていたと述べている。この実験は、視性遮断の網膜全体への影響を調べようとしたものである。彼らは、a波が正常なのは、視細胞が機能的に正常であるためであり、また、b波はbipolar cellのactivityを示しているの、このamplitudeが落ちているのは、視性遮断により、1) bipolar cell自体あるいは、2) bipolar cellと神経節細胞とのシナプス、あるいは、3) 神経節細胞自体の機能の低下を示している、と述べている。

今回の著者の実験結果では、1匹の弱視猫については、解剖学的に、少なくとも網膜中心野を構成する神経節細胞の大きさと細胞密度には差は認められなかった。

猿においては、von Noorden^{19)~21)}らが詳細に研究しており、臨界期における片眼遮蔽は、生後1年までは、組織学的に何の変化もおよぼさず、2~3年すると胞体の小型化が認められた、と述べている。著者の結果においても、平均細胞面積が、MDCでは84, 86 μm^2 でありコントロールで86, 95 μm^2 であり、MDCがやや小さく、一方、図4のごとく、細胞面積と細胞数のヒストグラムを重ね合わせると、100 μm^2 を境にして細胞面積

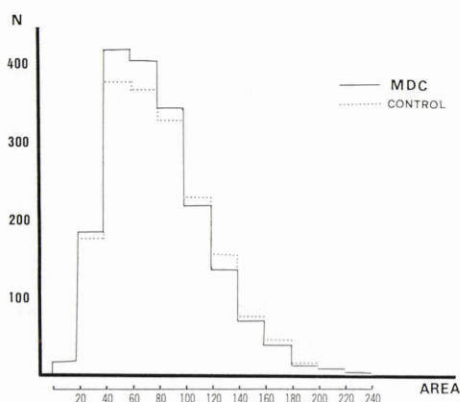


図4 網膜神経節細胞の面積別分布グラフの重ね合わせ

の小型化が起きている可能性も示唆された。しかしながら、これについては、まだ対象数も1匹と少ないため、更に対象数を増やして検討したい。

また、彼らはCresyl-Violet染色において、遮蔽眼の投射する外側膝状体の層の染色性が悪かったと述べているが、Primulineの取り込みと、その発色については、網膜神経節細胞についてはMDCとコントロールの間に差はなかった。これは外側膝状体のrelay cellにおいては、その細胞質は萎縮しているにもかかわらず、網膜神経節細胞ニューロンの軸索流は、弱視によりなんの影響も蒙っていないことを示していると思われる。

稿を終るに際して滋賀医大眼科講座稲富昭太教授の御校閲に深謝いたします。また、名古屋鉄道病院眼科野崎尚志博士の御助言に深謝いたします。なお、この論文の要旨は、第52回中部眼科学会にて発表した。

文 献

- 1) Wiesel TN, Hubel DH: Effect of visual deprivation on morphology and physiology of cell in the cat's lateral geniculate body. *J Neurophysiol* 26: 978-993, 1963.
- 2) Hickey TL, Spear PD, et al: Quantitative studies of cell size in the cat's dorsal lateral geniculate nucleus following visual deprivation. *J Comp Neurol* 172: 265-282, 1977.
- 3) Garey LJ, Blakemore C: The effect of monocular deprivation on different neuronal classes in the lateral geniculate nucleus of the cat. *Exp Brain Res* 28: 259-278, 1977.
- 4) Chow KL: Neuronal changes in the visual system following visual deprivation. *Handbook of Sensory Physiol.* Vol. 4/3A, edit. R Jung, Springer Verlag: Berlin-New York, 1973.
- 5) Wiesel TN, Hubel DH: Single cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *J Neurophysiol* 26: 1003, 1963.
- 6) Ganz I, Fitch M: The effect of visual deprivation on perceptual behaviour. *Exp Neurol* 22: 639, 1968.
- 7) Dews PB, Wiesel TN: Consequences of monocular deprivation on visual behaviour in kittens. *J Physiol* 206: 437, 1970.
- 8) Giffin F, Mitchell DE: The rate of recovery of vision after early monocular deprivation in kittens. *J Physiol* 274: 511, 1978.
- 9) Riesen, et al: Intraocular transfer of habits learned monocularly naive and visually experienced cats. *J Comp Phys Psy* 46: 166, 1955.
- 10) 梅津八三: 先天性盲人の開眼手術後における視覚

- 体験. 児童心理と精神衛生 2: 253, 1952.
- 11) **Wiesel TN, Raviola E**: Myopia and eye enlargement after neonatal lid fusion in monkeys. *Nature (Lond)* 266: 66—68, 1977.
- 12) **Sommers D, Kaiser-Kupfer MI, et al**: Increasing axial length of the eye following neonatal lid suture as measured with A-scan ultrasonography. *Assoc Res Vision and Ophthal* Sarasota, Florida, 1978.
- 13) **Gollender M, Thorn F, et al**: Development of axial ocular dimensions following eyelid suture in the cat. *Vis Res* 19: 221, 1979.
- 14) **Albert WK, Lilly S, et al**: Elongation of cat eyes following neonatal lid suture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22: 274—277, 1982.
- 15) **Kuypers HGJM, Catsman-Berrevoets, et al**: Retrograde axonal transport of fluorescent substances in the rat forebrain. *Neuroscience Letters* 6: 127—135, 1977.
- 16) **Enroth-Cugell C, Robson JG**: The contrast sensitivity of retinal ganglion cells of cat. *J Physiol* 187: 517—552, 1966.
- 17) **Sherman SM, Stone J**: Physiological normality of the retina in visually deprived cats. *Brain Res* 40: 224—230, 1973.
- 18) **Ganz L, Fitch, et al**: The selective effect of visual deprivation on receptive field shape determined electrophysiologically. *Exp Neurol* 22: 614—637, 1968.
- 19) **von Noorden, Gunter K**: Histological studies of the visual system in monkey with experimental amblyopia. *Invest Ophthalmol* 12: 727—738, 1973.
- 20) **von Noorden, Gunter K, Crawford MLJ**: Effect of lid suture on retinal ganglion cells in MACACA MULATTA. *Brain Res* 122: 437—444, 1977.
- 21) **von Noorden, Gunter K, Crawford MLJ**: Morphological and physiological changes in the monkey visual system after short-term lid suture. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 17: 762—768, 1978.
-