

ラット瞳孔反応中枢の発達

—アセチルコリンエステラーゼ活性の発達と

視覚遮断による影響の検討—(図4, 表1)

早 川 重 夫 (北里大学医学部眼科学教室)

The Development of Acetylcholinesterase Activity and the Effect
of Visual Deprivation in the Pretectal Nucleus
and the Edinger-Westphal Nucleus of Rats

Shigeo Hayakawa

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kitasato University

要 約

ラット104匹を用いて瞳孔反応中枢とされる視蓋前域核, Edinger-Westphal (EW) 核における神経伝達物質アセチルコリンの分解酵素であるアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の発達を生後0日から28日目, 一部は10週まで組織化学的に検討し, ラットの瞳孔反応とあわせて中枢の機能的発達を評価した. EW 核においては生後4日目より AChE 活性が出現し, 21日目までに完成した. EW 核より上位中枢と考えられる視蓋前域核は EW 核より遅れ, 生後10日目より AChE 活性が出現し, 28日目までに完成することがわかった. これは塚原らの報告にある虹彩の AChE 活性の発達とよく一致した. また出生直後に両眼球を摘出して視覚遮断をした群を作り, 正常発達群と同様に AChE 活性の発達を検討したところ, 視蓋前域核および EW 核の AChE 活性の発達には変化を認めなかった. このことから, 瞳孔反応中枢の機能的発達には視覚系からの入力の影響をおよぼさないことが判明した. (日眼 92; 2063—2070, 1988)

キーワード: 発達, アセチルコリンエステラーゼ, 視蓋前域核, Edinger-Westphal 核, 視覚遮断

Abstract

The pretectal nucleus and the Edinger-Westphal (EW) nucleus are considered to be at the center of the pupillary light reflex. The development of these two nuclei in rats was examined by acetylcholinesterase (AChE) histochemistry. AChE staining was analyzed qualitatively and quantitatively. Animals were sacrificed on postnatal days (PND) 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 21 and 28. In the EW nucleus, weak AChE activity was detected on PND 4 which thereafter gradually increased and matured by PND 21. In the pretectal nucleus, weak AChE activity was found first on PND 10, gradually increasing and maturing by PND 28. These results seem to indicate that the development of the pretectal nucleus is slower than that of the EW nucleus. Furthermore, the results of AChE activity of the pupillary reflex center paralleled the development of the light reaction of the pupil, expressed as the pupillary diameter in a light room. Further experiments were performed to elucidate the effect of visual deprivation on the development of AChE activity in the pupillary reflex center. Rats were enucleated binocularly at PND 0. The development of AChE activity in the pretectal nucleus and the

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 早川 重夫

(昭和63年7月25日受付, 昭和63年9月8日改訂受理)

Reprint requests to: Shigeo Hayakawa, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Kitasato Univ.

1-15-1 Kitasato, Sagamihara 228, Japan

(Received July 25, 1988 and accepted in revised form September 8, 1988)

EW nucleus were examined on PND 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 21, 28, 56 and 70. Histochemistry provided evidence that the AChE activity in the pupillary reflex center of the enucleated rats was identical to that of the normal controls without visual deprivation. The results suggest that visual stimulation is not an essential factor in the development of AChE activity in the pupillary reflex center. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 2063—2070, 1988)

Key words: Development, Acetylcholinesterase, Pretectal nucleus, Edinger-Westphal nucleus, Visual deprivation

I 緒 言

瞳孔の大きさは、例えば光の強さ、年齢によって変化することは一般に知られているが、新生児の瞳孔反応系の発達も興味がある問題である。瞳孔の大きさは、交感、副交感神経支配、またはその抑制系の完成により規定される。末梢因子に関しては、マウス虹彩筋へのコリン作動性、アミン作動性の発達による神経支配の研究が塚原ら¹⁾により組織化学的手法を利用し行なわれた。しかし、中枢における瞳孔反応と関係する脳神経諸核およびその経路の発達に関しては明らかではない。今回、ラットを用いて瞳孔反応、特に縮瞳に関係すると考えられる視蓋前域核、Edinger-Westphal (EW) 核に注目し、組織化学的に神経伝達物質アセチルコリン (ACh) の分解酵素であるアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の活性を検討し、瞳孔反応中枢の機能的発達を検討してみた。また発達早期の視覚遮断により弱視など視路の発達に異常が出現することは判明しているが、瞳孔反応をつかさどる系の発達に如何なる影響が現われるかも大切な問題である。そこで、今回はさらにラットで出生直後に視覚遮断を行なった群も加えて、瞳孔反応中枢の AChE 活性と発達との関係を研究した。

II 実験方法

有色系ラット (Long-Evans strains) を用い、正常発達群として生後 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 21, 28 日目について研究した。さらに出生後 6 時間以内に pentobarbital, Nembutal®, 腹腔内投与 (10~20mg/kg) 浅麻酔下にて、両眼球および両眼窩内容除去を行なった視覚遮断群も研究した。それらは生後 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 21, 28 日目, 8, 10 週目である。生後各日数のラットは 2~4 匹で、総数で 104 匹が用いられた。

1. ラット瞳孔の観察

発達にともなう瞳孔反応の変化は生後 0~28 日目について明室下, 150lux の照度でメディカルニコール (日本光学) を用いて撮影し、瞳孔径を写真判定で観察記録した。

2. AChE 組織化学

正常発達群、視覚遮断群のラットは、前述した生後各日について pentobarbital 腹腔内投与 (30~40mg/kg) 深麻酔後、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で作成した 2.5% glutaraldehyde と 0.5% paraformaldehyde の混合液で経心臓的に灌流固定し、その直後に脳を摘出して 30% 蔗糖—リン酸緩衝液に一晩保存した。翌日、ミクロトームにて厚さ 50 μ m の凍結前額断の連続切片を作成し、全切片について AChE 組織化学法を行なった。今回の実験に用いた AChE 組織化学法は、Koelle & Friedewald²⁾ と Karnovsky & Roots³⁾ 法とを合わせた Tsuji⁴⁾ 法を用い、一部 van Ooteghem & Shipley⁵⁾ の方法に従い簡略化した。以下その手順について述べる。先に作成した凍結切片は蒸留水で洗浄し、0.1M acetate 緩衝液中 (pH 5.2) に 15 分浸し、それから 0.1M acetate 緩衝液で作成した 4mM acetylthiocholine iodide, 2mM Cu⁺⁺, 10mM glycine, 20 μ M iso-OMPA (tetraisopropyl pyrophosphoramidate; pseudo cholinesterase 阻害剤) の反応液 (pH 5.2) 中で 23°C 下にて 2 時間反応させた。反応後、蒸留水で洗浄し、0.1M acetate 緩衝液で作成した 3% K₃Fe (CN)₆ 発色液 (pH 5.2) 中に 15 分浸し、その後再び蒸留水で洗浄した。対比染色は行なわなかった。染色した切片はゼラチン塗布したスライドガラスにのせ室温下にて 2~4 日間乾燥させた。乾燥後の標本は ethyl alcohol で脱水し、xylene で脱脂した後、封入剤にて包埋した。

3. AChE 活性の評価

作成した標本上で AChE 活性を AChE 染色性で評価した。まず注目した瞳孔反応中枢である視蓋前域核と EW 核、および他の脳神経運動核、外側膝状体、上丘、赤核、黒質、疑核、迷走神経背側核について光学

顕微鏡下で観察し、①神経細胞に AChE 活性を認める部位では、10～20細胞について顕微分光光度計⁶⁾(DMSP-II オリンパス光学)を用いてその吸光度を測定した。②神経線維集束に AChE 活性を認める部位に関しては、顕微分光光度計にて5～10箇所での一定面積の吸光度を測定し、正常対照値を100%として比活性で表わした。

以上の結果より、顕微測光法の酵素活性測定の精度と限界を考慮して AChE 活性を(－)；0～10%活性(+)；11～40%活性、(++)；41～80%活性、(+++)；81～100%活性(成熟活性)に分類し AChE 活性の発達を評価した。また神経細胞に活性を認める部位では、活性細胞数も計測したが、発達途上では cell death 現象があるとされているのでこの結果は判定の参考とした。

III 結 果

1. 瞳孔の発達

ラットは生後14日頃までは、ほとんど全例が眼を閉じている。そのため、その期間の瞳孔の研究は必要に応じて眼瞼を切除するか、もしくは強制的に眼瞼を開いて観察した。写真上で角膜径に対する瞳孔径の比を%で表わすと、生後0日～4日目 $76 \pm 8\%$ 、6日～10日目 $47 \pm 5\%$ 、12日～14日目 $24 \pm 3\%$ 、17日～28日目 $20 \pm 2\%$ とこの時期に成熟ラットとほぼ同様の比率となり、発達にともない瞳孔は明らかに縮小傾向を示した(図1)。

2. 正常発達群における瞳孔反応中枢の AChE 活性の発達

視蓋前域核：前視蓋前域核と視蓋前域オリブ核について顕微分光光度計を用いて吸光度を測定し AChE 活性を検討した。AChE 活性は生後8日目までは認めず、10日目ですでに活性が現われ始め、12日目での活性を認めた。そしてラットの眼が開いた14日目以降、17日目(++)、28日目には(+++)と成熟活性と同様にまで発達した(図2A)。

EW 核：AChE 活性を示す細胞を顕微分光光度計を用いて吸光度を測定し AChE 活性を検討した。AChE 活性は生後2日目までは認めず、4日目よりわずかに活性が現われ始め、8日目での活性を認めた。そしてラットの眼の開く前の12日目ですでに(++)の活性を認め、21日目には(+++)と成熟活性と同様にまで発達した(図2B)。

このように瞳孔反応中枢、特に EW 核では生後4日目より徐々に AChE 活性が出現してくるが、生後2日目の視蓋前域核と EW 核にはまだ活性の認めない時期に他の部位における AChE 活性について比較した(表1)。上丘は同様に活性を認めなかった。外側膝状

表1 生後2日目のラット脳幹における
脳神経諸核の AChE 活性。

上丘、視蓋前域核、EW 核	(－)
外側膝状体、動眼神経核、 滑車神経核、外転神経核	(±)
黒質、赤核、三叉神経運動核、 顔面神経核	(+)
迷走神経背側核、舌下神経核 前庭神経核、疑核	(++)

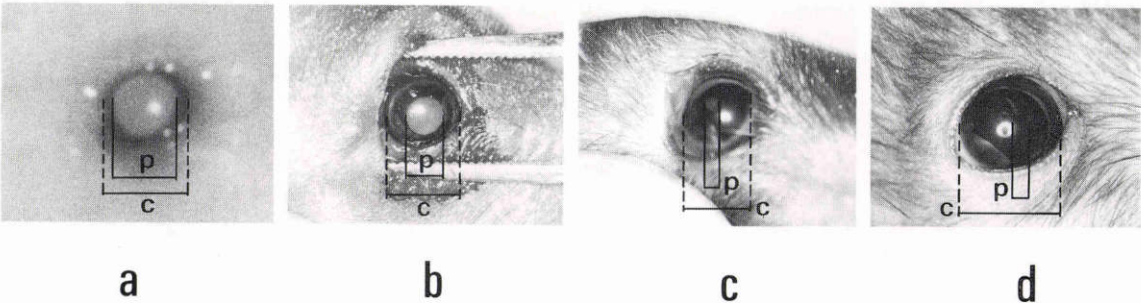


図1 明室下(150lux)で観察したラットの瞳孔。図中の線は角膜径(C)、瞳孔径(P)を示し、瞳孔の大きさは瞳孔径/角膜径の比を%で表わしたところ、次の如くであった。
a: 生後2日目、眼瞼を切除して観察した(76%)。b: 生後6日目、眼瞼を切除して観察した(52%)。c: 生後12日目、強制的に眼瞼を開けて観察した(27%)。d: 生後17日目、開眼後(22%)。



図 2A 正常発達群における視蓋前域核 AChE 活性の発達. $\times 30$

a: 生後2日目, AChE 活性 (-), b: 生後12日目, AChE 活性 (+), c: 生後28日目, AChE 活性 (++)
APT; 前視蓋前域核, OPT; 視蓋前域オリブ核, PC; 後交連, 3V; 第3脳室

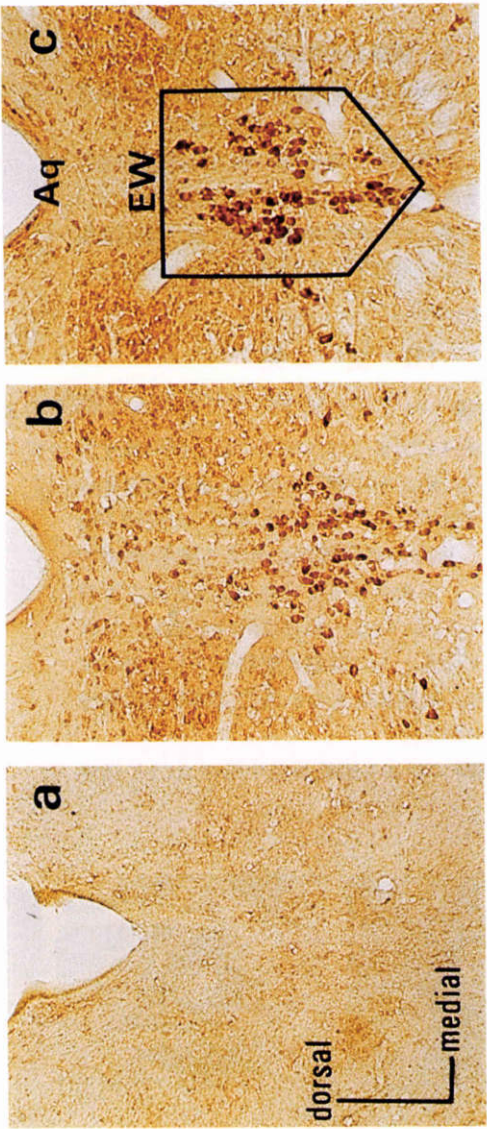


図 2B 正常発達群における EW 核 AChE 活性の発達. $\times 75$

a: 生後2日目, AChE 活性 (-), b: 生後12日目, AChE 活性 (+), c: 生後21日目, AChE 活性 (++)
EW; Edinger-Westphal 核, Aq; 中脳水道



図2C 視覚遮断群における視蓋前域核 AChE 活性の発達, ×30
a: 生後2日目, AChE 活性 (-), b: 生後12日目, AChE 活性 (+), c: 生後28日目, AChE 活性 (++)

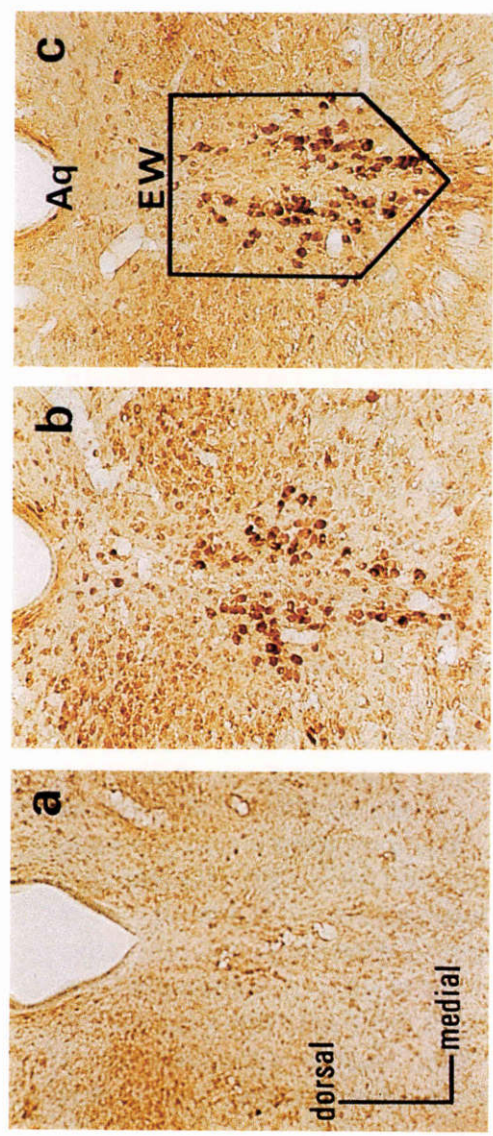


図2D 視覚遮断群におけるEW核 AChE 活性の発達, ×75
a: 生後2日目, AChE 活性 (-), b: 生後12日目, AChE 活性 (+), c: 生後21日目, AChE 活性 (++)

体、動眼神経核、滑車神経核、外転神経核でわずかに活性を認め始めた。黒質、赤核、三叉神経運動核、顔面神経核では(+)の活性を認めた。迷走神経背側核、舌下神経核、前庭神経核、疑核ではすでに(++)と成熟活性とまったく同様の活性を認めた。

3. 視覚遮断群における瞳孔反応中枢の AChE 活性の発達

視蓋前域核：AChE 活性は生後 8 日目までは認めず、10 日目よりわずかに活性が現われ始め、12 日目では(+)の活性を認めた。そして、17 日目では(++), 28 日目には(+++)と成熟活性と同様の活性を有するまでに発達した。また生後 8、10 週まで観察したところ、AChE 活性は成熟活性のままで変化は認めなかった(図 2C)。

EW 核：AChE 活性は生後 2 日目までは認めず、4 日目よりわずかに活性が現われ始め、8 日目では(+)の活性を認めた。そして、12 日目では(+++)の活性を認め、21 日目には(+++)と成熟活性と同様の活性まで発達した。その後、生後 8、10 週まで観察したところ、(+++)に至った AChE 活性は成熟後も活性はそのまま保たれ、以後変化は認められなかった(図 2D)。

IV 考 按

ACh は副交感神経の伝達物質で、そのほか自律神経の節前線維、運動神経筋接合部や中枢においても伝達物質として働いている。神経伝達物質としてはじめて証明された物質であるが、その存在は、アミン神経のための蛍光組織化学のように ACh そのものを可視化する手段はない。これまでの中枢コリン神経に対する組織化学法は、① ACh の分解酵素 AChE の存在を検出するもの、② ACh の合成酵素コリンアセチル基転移酵素の存在を証明するもの、③ 取り込み機構に基づくものの 3 種類の方法があり⁷⁾、本実験ではコリン作動性神経細胞の一番標準的な同定に使われている①の方法を用いた。図 2A~D に示した組織の写真上で茶褐色を呈している部位が AChE 陽性を示す部位である。本実験で用いた Tsuji⁴⁾法の変法は従来の方法では細胞が結晶状に染色されていた欠点がなくなり、顆粒状にはっきり染色され、なおかつ pH を低くすることによって artifact が少なくなり特異性が高まった方法である。本実験中に数多くの脳切片標本の染色を行ない、その染色性を評価した結果は非常に安定しており、今回の結果の信頼性が極めて高いと考えられた。また本実験では iso-OMPA を使用して pseudo cholinesterase の活性を除外した。

ラットの瞳孔は、光に対する反応の発達を検討する目的で 150lux の明室下にて観察した。対光反応には視覚系からの入力が必要であり、視覚系の発達との関係は無視することができない。ラットは生後 14 日目まで瞼を閉じており、視覚の入力に対する一種の遮断という状態が存在している。ラットの視覚系の発達に関しては、Karlsson⁸⁾は生後 12~13 日目頃に外側膝状体の微細構造が完成すると報告しており、また関谷⁹⁾は網膜—外側膝状体の神経投射は開瞼する生後 14 日目頃に、外側膝状体—上丘の神経投射は生後 1 日目に完成することを報告している。要するにラットの視覚系は開瞼という視覚入力の出現という起点を目指して発達していくと考えられている。今回の実験で瞳孔は、生後 6 日目から徐々に縮瞳傾向を示し、開瞼前の生後 12 日目には 27% と縮瞳し、そして開瞼後の生後 17 日目以降では、成熟ラットとほぼ同じ大きさの瞳孔径を示した。このことは、開瞼する 14 日目には光に対する反応が出現していると考えられ、前述した生後 14 日目までに完成する視覚系の発達との関連が考えられた。

組織化学的に瞳孔反応中枢を検討すると、EW 核は生後 4 日目より AChE 活性を認め始め、21 日目には成熟活性に達する。一方より上位中枢である視蓋前域核は生後 10 日目より活性を認め始め、28 日目に成熟活性に達し、活性の出現も完成も EW 核より遅れて発達していくことがわかった。ラットの視蓋前域核内では特に視蓋前域オリブ核が対光反応の縮瞳に関係するとされており¹⁰⁾、今回はオリブ核と同一切片上でみられる前視蓋前域核の両方について検討した。ラットの EW 核について対光反応との関係はいまだ明確にされていないが、筆者は対光反応の遠心路における中継点と考えた。EW 核の AChE 活性が視蓋前域核より早期に完成することは、1 つに EW 核の調節、輻湊に関与している細胞の存在が考えられる。しかし、その上位中枢についてはいまだ不明であるといつてよいと思われる。末梢については塚原¹¹⁾が虹彩の瞳孔括約筋の AChE 活性の発達を検討しており、生後 14 日目には 70% まで発達し、3~4 週で成熟活性まで発達すると報告している。これは今回の視蓋前域核、EW 核の中枢の AChE 活性の発達とよく一致していると思われる。以上、述べてきた瞳孔反応と中枢の AChE 活性の発達をまとめて比較すると、図 3 に示すように中枢の AChE 活性の出現とともに瞳孔も縮瞳傾向を示すという相関性が認められた。

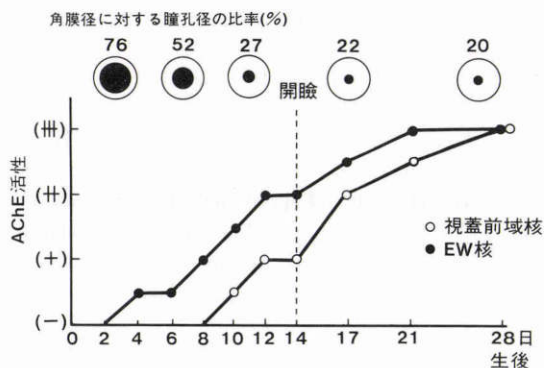


図3 正常発達群における瞳孔の変化と視蓋前域核、EW核のAChE活性の発達。視蓋前域核のAChE活性の発達はEW核より少し遅れて発達した。

ラットの生後2日目の脳幹部における脳神経諸核のAChE活性を表1に示した。上丘、外側膝状体、視蓋前域核、EW核の視覚系と関連のある部位の活性は遅れて出現してくることがわかった。またなかでも興味を惹くものは、迷走神経背側核、疑核は副交感神経系の核で、生後2日目に既に成熟活性にまで発達しているにもかかわらず、同じ副交感神経系の瞳孔反応系に属する視蓋前域核、EW核にはAChE活性は認めなかった。このことは、同じ副交感神経系でも部位や機能によって神経伝達物質の発達に差が生じることがわかった。

視覚系の発達と瞳孔反応中枢のAChE活性の発達を比較してみると、視覚入力が出現し、視覚系がほぼ完成する生後14日目でも瞳孔反応中枢のAChE活性は不十分であり、視覚入力の出現より1～2週間遅れて完成した。そこで、視覚入力瞳孔反応中枢の発達とどのような関係があるのかという疑問が生じた。そのため今回の実験ではさらに出生直後に両眼球および視神経を含んで眼窩内容を除去した完全な視覚遮断群を作り、その瞳孔反応中枢のAChE活性の発達を正常発達群と比較した。両眼球を摘出しての後頭葉視覚領野におけるtransient AChE活性の発達についてRobertsonら¹¹⁾は、正常発達において最も活性の高まる生後10日目頃のtransient AChE活性が消失し、視覚遮断が視覚系の中核におけるAChE活性の発達に影響をおよぼすことを報告している。今回、両眼球を摘出して瞳孔反応中枢のAChE活性の発達を検討したところ正常発達群と同様に発達していくことがわかった。さらに生後8、10週まで検討したが、その活性は低下することはない(図4)。このことは、視

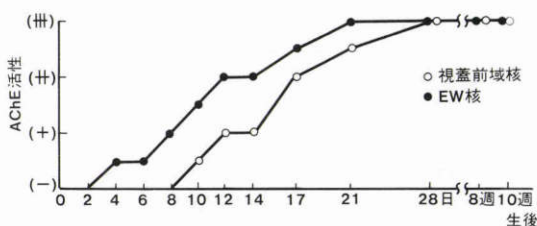


図4 視覚遮断群における視蓋前域核、EW核のAChE活性の発達。視蓋前域核、EW核のAChE活性の発達は図3の正常発達群と同じであった。

覚を遮断しても瞳孔反応中枢における神経伝達物質の発達には影響をおよぼさない、要するに機能的発達には関係ないということが判明し、瞳孔反応中枢は視覚入力とは無関係に発達していく系であることがわかった。その理由として、瞳孔反応中枢には視覚入力ばかりでなく他の刺激、抑制因子が存在し、その影響によって発達していくことが推察される。また副交感神経系の瞳孔反応中枢は、現時点では明らかではないが交感神経系の瞳孔反応に関する中枢の発達との均衡で発達していくのではないかということが推察され、今後さらに、交感神経系についての研究を重ねる必要があると思われる。

以上、瞳孔反応中枢とされる視蓋前域核、EW核の神経伝達物質の発達を検討し、機能的発達と視覚系との関係を明らかにした。

稿を終えるにあたり、御聖篤なる御指導、御校閲を賜りました石川 哲主任教授、宮田幹夫教授に深謝いたします。また多大な御協力をいただいた教室の関谷治久先生、平本大先生に御礼申し上げます。

本論文の要旨は第92回日本眼科学会総会にて発表した。

文 献

- 1) 塚原重雄, 清水幸夫, 佐々木隆弥他: マウス虹彩自律神経の生後発達に関する組織化学的観察. 眼臨 75: 1177—1179, 1981.
- 2) Koelle GB, Friedenwald JS: A histochemical method for localizing cholinesterase activity. Proc Soc Exp Biol (NY) 70: 617—622, 1949.
- 3) Karnovsky MJ, Roots L: A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterase. J Histochem 12: 219—221, 1969.
- 4) Tsuji S: On the chemical basis of thiocholine method of demonstration of acetylcholinesterase activities. Histochem 42: 99—110, 1974.
- 5) van Ooteghem SA, Shipley MT: Factors affecting the sensitivity and consistency of the Koelle-Friedenwald histochemical method for

- localizing of acetylcholinesterase. *Brain Res Bull* 12: 543—553, 1984.
- 6) 妹尾左知丸, 宮原正信, 内海耕造他: 顕微分光側光法とその生物学への応用, 蛋白質・核酸・酵素 10: 1181—1193, 1965.
- 7) 木村 宏: 神経伝達物質からみた神経解剖学(2) —コリンとベプチド神経の組織化学—, 医学のあゆみ 132: 637—644, 1985.
- 8) **Karlsson U**: Observations of the postnatal development of neuronal structures in the lateral geniculate nucleus of the rat by electron microscopy. *J Ultrastructure Res* 17: 158—175, 1967.
- 9) 関谷治久, **Stein BE**, 石川 哲: 上丘—外側膝状体核線維連絡の発達. 第91回日本眼科学会総会発表, 投稿中.
- 10) **Trejo LJ, Cicerone CM**: Cells in the pretectal olivary nucleus are in the pathway for the direct light reflex of the pupil in the rat. *Brain Res* 300: 49—62, 1984.
- 11) **Robertson RT, Fogolin RP, Tijerina AA, et al**: Effects of neonatal monocular and binocular enucleation on transient acetylcholinesterase activity in developing rat visual cortex. *Dev Brain Res* 33: 185—197, 1987.

(第92回日眼総会原著)