# 実験弱視における解剖学的研究

第2報 視性遮断の外側膝状体 relay-cell および網膜神経節細胞に

### およぼす影響について (図9,表3)

#### 三輪 正人(滋賀医科大学眼科)

Effects on the Relay-cells in the Lateral Geniculate Nucleus and the Retinal Ganglion Cells in Experimental Amblyopia

### Masato Miwa

Department of Ophthalmology, Shiga University of Medical Science

#### 要 約

生後2~3週の猫を片眼遮蔽して3匹の実験弱視猫を作成し、この猫の弱視眼の網膜神経節細胞(中心野および傍中心野における)の細胞面積、細胞密度について解析し、コントロールと比較した.また同時に、このうちの1匹の猫においては、外側膝状体(LGN)の層構造およびrelay cellの細胞面積についても解析した. そして次の結果を得た.1.弱視猫のLGNは、弱視眼の同側投射するA層に強い萎縮が認められた.細胞面積は同側、反対側投射に拘らず、大型細胞(Y-relay cell)が強く小型化していた.2.網膜神経節細胞では、LGNの変化に関係なく、X-cell、Y-cellともに、弱視によっては、どのような影響も蒙らないことが確証された. (日眼 92:69-76, 1988)

キーワード:猫,視性遮断,実験的弱視,網膜神経節細胞,外側膝状体

### Abstract

This paper reports an investigation of the morphological properties of retinal ganglion cells in visually deprived cats. Three Kittens with unilateral lid closure two to three weeks after birth were reared for  $12\sim24$  months. After a certain period of deprivation, the area and density of the retinal ganglion cells in the central area and nearby portions of the retina were measured using methods reported in a previous paper. The area of the relay-cells constituting the A and Al laminae of the LGN of one cat were calculated in brain sections stained by Cresyl-Violet. The large-sized relay-cells (Y relay-cells) in the A and Al laminae of the LGN projecting from the amblyopic eye showed apparent atrophy. The Al laminae projected ipsilaterally from the amblyopic eye was more atrophied than the A laminae which projected contralaterally from the atrophic eye. The retinal ganglion cells (both X-cells and Y-cells) were not affected by the experimental amblyopia. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 69-76, 1988)

Key words: Cat, Stimulus deprivation, Experimental amblyopia, Retinal ganglion cell, Lateral geniculate body

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 (昭和62年7月9日受付) Reprint requests to: Masato Miwa, M.D. Dept. of Ophthalmol., Shiga Univ. of Medical Science Tsukinowa-cho, Seta, Ohtsu 520-21, Japan (Accepted July 9, 1987) 70 - (70)

# I 緒 言

視的経験が視覚系の発育におよぼす効果についての 研究は,HubelとWiesel<sup>1)2)</sup>の解剖学的あるいは生理 学的な研究以来,飛躍的になされてきた.特に,彼ら の発表後,視性遮断により外側膝状体(以後 LGN と略 する)および視中枢(area 17, 18, 19)が蒙る影響に ついての検索は,生理学的にも解剖学的にも数多くな されてきた.しかしながら,視性遮断により実験的に 弱視を作成した動物において,その弱視のLGN に与 える影響と同時に,同じ実験動物で,網膜神経節細胞 に与える影響について検討した報告はない.

著者<sup>3</sup>は,先に,猫の臨界期に片眼を遮蔽することで 弱視猫を作成し,この弱視の眼軸長,屈折に与える影 響について報告する一方,そのうちの1匹の実験弱視 猫について,視神経に蛍光色素(primuline)を注入し て,網膜中心野における神経節細胞の構成を検討し, それが正常な成猫とほぼ同じであることを報告した.

今回,実験的弱視猫の対象を増やして,1)前回報告 した手法にて中心野における網膜神経節細胞の細胞面 積とその分布密度について,また,2)傍中心野の大型 細胞50個の平均細胞面積についてを解析し統計的に検 討した.併せて,3)一匹の同一弱視猫において,その 弱視がLGNのA層とA1層の層構造におよぼす影響 を観察し,また,4)それらの層の神経細胞の胞体面積 を計測し,この結果について検討したので報告する.

## II 実験方法及び材料

実験動物は表1に示してある. MDC 1, MDC 2, MDC 3の3匹の猫の生後早期に片眼(右眼)を遮蔽し, その遮蔽の状態を確認しつつ,1年から2年飼育した (図1). 遮蔽の方法は,すべての子猫の右眼の険縁の 皮膚を切除し,上下の険板を露出させて,これを6-0ナ イロン糸にて縫合することによった.実験時に,遮蔽 した眼瞼を開き,僚眼を眼帯遮蔽し,行動を観察した が,このとき,乗せた机の上から落ちそうになったり,

#### 日眼会誌 92巻 1号

あとずさりしたりしていた(図2). こういった行動的 所見から,明らかに弱視による視力低下のあることを 確認したのち,キシラジン塩酸塩(セラクタール® (0.15ml/kg)を筋注,全身麻酔下に,弱視眼(右眼) の視神経に直視下に蛍光色素(10% Primuline) 50~100 $\mu$ lを注入した.2~3日後,Krebs Ringer に て灌流し,4%paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) にて固定し,実験弱視眼(右眼)お



図1 右眼の瞼板縫合遮蔽1年後の猫



図2 遮蔽眼開放,非遮蔽眼の遮蔽時の視的行動の観察写真.この画面は,徐々に,あとずさりしているところである.

表1 実験対象の概略

No.	生まれた日	遮蔽した日	実験日	実 験 内 容
MDC 1 MDC 2 MDC 3	85/5/1 85/5/1 84/11/5	85/ 5/14 85/ 5/14 84/11/25	86/ 3/ 7 86/ 9/21 86/12/ 9	行動,網膜神経節細胞 行動,網膜神経節細胞,外側膝状体細胞 行動,網膜神経節細胞
	コントロール。	として,成猫4日	τ <u>τ</u>	網膜神経節細胞

(MDC: monocular deprived cat の略)

昭和63年1月10日



図3 実験弱視猫(MDCと示す)の網膜中心野(500×500µm<sup>2</sup>)を含む、その近傍の 蛍光顕微鏡写真.中心野の周り9枚の写真を傍中心野とした.中心野においては、 細胞密度と細胞面積について解析し、傍中心野では、大型細胞50個を抽出して、細 胞面積について解析した.

よび脳を摘出した.

摘出眼は、角膜を輪部で切除し水晶体と硝子体を除 去したのち、4%paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)、30% saccharose in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)に2日間浸漬,固定した. その後、網膜を全剝離し全貼付標本を作成し、蛍光顕 微鏡下(U励起,435nm)に網膜中心野( $500 \times 500 \mu$ m<sup>2</sup>) および傍中心野(その周りの9方向)( $500 \times 500 \mu$ m<sup>2</sup>) および傍中心野(その周りの9方向)( $500 \times 500 \mu$ m<sup>2</sup>) を写真撮影した(図3).この写真を515倍に拡大し、 細胞の輪郭をペンで描き、画像処理システム (NEXUS)を用いて、中心野については細胞数と細胞 面積を、傍中心野については写真上で大型である50個 の細胞の面積について解析した(図4).コントロール 4匹については、上記と同様の手順で網膜神経節細胞 の検討を行なった。

また MDC 2では, 摘出脳を 4 %paraformaldehyde にて固定した. そして interaural line の前方約8mm



図4 傍中心野の蛍光顕微鏡写真. 黒矢印が大型細胞 である.

の部位における $50\mu$ の厚さの両側のLGNを含む frontal sectionの凍結切片を作成し、Cresyl Violet に て染色した.そののち顕微鏡写真を撮影し、網膜神経

日眼会誌 92巻 1号

表2	網膜中心野	における	神経節細胞の面積,	密度について
----	-------	------	-----------	--------

細月	包 数	細胞密度	度 (/mm <sup>2</sup> )	平均細胞	面積 (µm <sup>2</sup> )
MDC	CONTROL	MDC	CONTROL	MDC	CONTROL
2,012	2,121	8,048	8,484	84.86	85.23
2,103	1,982	8,412	7,928	84.70	88.38
2,032	2,013	8,128	8,052	85.12	86.43
	2,028		8,112		87.76
平均 2,049	2,036	8,196	8,144	84.89	86.95

細胞数,細胞密度,平均細胞面積ともにMDCとCONTROLに有意差なし.(p>0.05, T-test)



## MDC



図5 MDC とコントロールの網膜中心野の蛍光顕微 鏡写真.

節細胞と同様に,両側の A 層および A1層の50個の細 胞輪郭の明瞭な神経節細胞を at random に抽出し,こ れについて,画像処理システム(NEXUS)を用いて細 胞面積について解析した.

### III 実験結果

蛍光色素によって,染色された網膜中心野の網膜神

表	3		網膜傍中心野における大型細胞の細胞面積に
	よ	ろ	解析結果

MDC (µm <sup>2</sup> )	CONTROL (µm <sup>2</sup> )
326.3	334.2
330.8	321.4
315.0	307.9
	317.5
平均 324.0	320.2

大型細胞の平均細胞面積についてMDCとCONTROLで 有意差なし.(p>0.05, T-test)

経節細胞の,弱視眼およびコントロールの写真は,図 5 に示されているように,蛍光顕微鏡下で,細胞質は 白黄色に発色されるが,この発色については弱視眼と コントロールに明かな差はなかった.

片眼遮蔽によって起こされた実験弱視猫の中心野 (500×500 $\mu$ m<sup>2</sup>)における網膜神経節細胞の細胞面積お よび密度, コントロール群の面積および密度について, 個々のデータを表 2 に示してある. この表に示すよう に両グループの平均値の間に, 統計学的な有意差はな かった (p<0.05, T-test).

また、中心野における神経節細胞の、細胞面積によ る分布状況は図6に示してある。左側の水平グラフが MDCの中心野での平均細胞面積別の分布グラフであ り、右側はコントロール群の分布グラフである。ほぼ 線対称であり、主に中心野を構成する細胞の面積は、 どちらも60~100平方ミクロンで、これについても両群 で差はなかった。

網膜傍中心野における大型細胞の細胞面積の解析結 果は、表3にある.この表に示すように、MDC および コントロールの間には有意差はなかった (p<0.05, T-test).

MDC 2については, LGN を Cresyl Violet にて染色 した. その両側の標本写真は図7に示した. LGN で



図6 網膜中心野における神経節細胞の細胞面積別の分布状況.実験弱視猫(MDC) とコントロールとは、ほぼ線対称となる.





I

非遮蔽側

図7 MDC2における両外側膝状体の Cresyl Violet 染色写真. 写真向かって左が遮 蔽側,右が非遮蔽側である. ほぼ矢印の部分にて50個の細胞を抽出し,細胞面積に ついて解析した.

は、それぞれの眼から A 層は反対側投射の成分を受け、A1層は同側投射の成分を受けている.図7に示すように、同側投射される A1層は遮蔽側が著しく萎縮しており、また反対側投射を受ける A 層は、非遮蔽側からの投射によって、十分発達した A1層に圧迫され

るかのように、遮蔽側のA層より厚さを減じていた. LGNのA層における50個の relay cell の細胞面積 による分布のデータは、図8に示し、A1層の分布デー タは図9に示した。A層に投射する網膜神経節細胞の

ノイロンは交叉するため,弱視眼についてのデータは,

74 - (74)









左側 LGN の A 層,正常眼(僚眼)についてのデータ は,右側 LGN の A 層から50個の細胞を取り出して解 析した. A1層については,同側性にデータを解析した. 図 8 のごとく,遮蔽側から投射を受ける A 層の relay cell の細胞面積別分布状況は,主に大型細胞に小型化 が起こっていた.また遮蔽側の relay cell の平均細胞 面積は287.6平方ミクロンであり,非遮蔽側の平均細胞 面積は306.2平方ミクロンであった.A1層でも同様に, 遮蔽側で大型細胞を中心に小型化が起こっており,そ れぞれ,遮蔽側の平均面積は350.4平方ミクロン,非遮 蔽側の平均面積は428.6平方ミクロンであった.

### IV 考 察

今回,著者は前報に引き続き,視性遮断が網膜中心 野の神経節細胞の形態におよぼす影響,および,その 同一猫における外側膝状体の relay cell の形態に与え る影響についても検討した.尚,網膜神経節細胞には, 形態学的な X, Y, W の分類法と,電気生理学的な α, β, γ の分類法が一般的であるが,中心野の中,小型細 胞 X-cell は  $\beta$ -cell に, 大型細胞 Y-cell は  $\alpha$ -cell に相 当していると考えられる<sup>4)</sup>.

Hubel, Wiesel<sup>10</sup>の, 猫の臨界期に片眼を縫合遮蔽し た研究は, 動物にとって, 視的環境からの遮断が視力 の生後発育に与える影響の大きさを実験的に証明する 可能性を与えた. それ以来, 弱視を実験的に惹起する 方法には, 1) 生下時より斜視をつくる方法<sup>506</sup>, 2) メ ガネ, コンタクトレンズにより不同視をつくる方法<sup>70</sup>, 3) Atropin による調節麻痺<sup>80</sup>, 4) 片眼を縫合遮蔽ある いはコンタクトレンズにより遮蔽する方法など多数の 報告がある. 著者は, そのうち最も弱視の深度の深く なると思われ, また他の方法よりも遮蔽が完全だと思 われる片眼の眼瞼縫合遮蔽を採用した.

猫の視覚発育にとっての臨界期は、Sherman、 Spear<sup>9)</sup>の1982年の報告によると、生後の4週から12週 にあると言われている。今回の実験では、生後2~3 週で片眼の瞼板を縫合し、約1~2年飼育することで 遮蔽眼に弱視を認めた。

Hubel, Wiese<sup>1)</sup>は1963年, 9匹の子猫と1匹の成猫 の片眼を1~4月間遮蔽したのち、この遮蔽によって 蒙った LGN 細胞の変化を次のように述べている。1) 34個の細胞の受容野の property をタングステン電極 を挿入して電気生理学的に調べると、すべてが正常な concentric receptive field を有していた. 2) 解剖学的 には, 遮蔽側より投射をうける層が萎縮し、その細胞 面積は小さくなっていた. また Sherman ら10)は、片眼 遮蔽猫の LGN の relay cell の受容野の特徴と求心性 の神経伝動速度を調べてみると、これが正常であった と述べている。同時に両眼の遮蔽猫と片眼の遮蔽猫に おいて, micro-electrode technique を用いて、Y-relav cell の遭遇頻度が減少していると報告した. その後, こ の事実についてはSherman, Stone<sup>11)</sup> (1973), Hoffmann, Cynader<sup>12)</sup> (1977) らにより確認されてい る. Shaplay, So<sup>13)</sup> (1980) らは、electrode のサイズ を大きくして、この遭遇頻度の減少は、Y-relav cellの サイズの減少が原因であるとした。しかしながら、こ れが、1) Y-relay cell の特性の変化によるものか、2) Y-relay cell の数の減少によるものか、3) Y-relay cell のサイズの減少によるものか、はまだ不明である、少 なくとも, Hubel, Wiesel が記したように、また今回 の著者の実験が示すように、LGN の遮蔽側の投射さ れる A, A1層では、おそらく Y-relay cell であるはず の大型細胞を中心に、細胞面積の小型化を認めた.

LGN の Y-relay cell が, なぜ選択的に小型化してい

るのか? について考察してみる時, 以下の報告があ る. 即ち, Leventhal, Hirsch<sup>14)15)</sup> (1977, 1978) は, 両眼を遮蔽して飼育した猫の LGN の Y-relay cell と X-relay cell から入力をうける cortical cell について 調べ, Y-relay cell から入力をうける細胞は binocular であり、X-relay cell から入力を受ける細胞は monocular であったと報告した. つまりLGNのX-relay cell は両眼の競合からもともと免れている可能性があ る. また, Sherman<sup>16)</sup> (1979) は17野4ab 層における LGN の Y-relay cell の終末の分岐は, 両眼からの入力 が相互に連関し合う場に高頻度に分布していると述べ ている. Daniels<sup>17)</sup> (1978) らは, LGN の X-relay cell と Y-relay cell の受容野の特性について調べ, X-relay cell は生後早期から成熟している一方, Y-relay cell は、その特性が未熟であったと述べた。以上のことか ら, 著者は, 1) X-relay cell と Y-relay cell との成熟 性の差, と2) binocularity, monocularity の違いが, 主に Y-relay cell の胞体が十分成長しない原因である と考える.

次に, LGN の層構造についてみると, 著者の結果で は、この層構造が、片眼遮蔽によって蒙った萎縮は、 同側投射を受けるA1層に強く現われていた。 Guillerv<sup>18)19)</sup> (1970, 1973) は、猫において同側性に投 射する axon は、反対側性に投射する axon より、より 速やかに順行性の変性を受け,更に,LGNの同側性投 射を受ける層は、片眼の摘出による transneuronal degeneration を、より速やかに受けると報告してい る. また, Sireteanu, Hoffmann<sup>20)</sup> (1979) は猫につ いて, Headon, Powell<sup>21)</sup> (1973), Hubel<sup>22)</sup> (1977) は猿について、片眼遮蔽による萎縮が、やはり同側性 の投射をうける LGN の層に強いことを報告してい る. 本来, 網膜には, visual streak と nasotemporal devision の2つの軸があり、この軸によって分割され た束が、それぞれ独立して中枢へ投射している、そし て、このうち特に naso-temporal devision によって分 割された、同側投射と反対側投射の成分で、その可塑 性に差が存在する結果になっていた.

ヒトの弱視における LGN の変化についての報告 は、僅かに von Noorden, Crawford  $6^{23}$  (1983)の 報告があるのであるのみである. ヒトとサルは、猫と 異なり、LGN は  $1 \sim 6$  層に分割されている. 彼らの報 告によると、ヒトにおいても、弱視眼の同側投射する 2、3、5 層では  $3 \sim 29\%$ の細胞面積の減少が認めら れ、反対側投射する 1、4、6 層では  $3 \sim 11\%$ の細胞 面積の減少が認められている.

LGN においては、主に Y-relay cell の発育障害が強 く現われ、X-relay cell の胞体は、僅かに小さくなって いた. この変化が、網膜の神経節細胞でも起こってい るのかを見るために、ほぼ90%が X-cell である網膜中 心野における細胞面積および細胞密度を調べると同時 に、傍中心野における大型細胞(これは Y-cell である) 50個の細胞面積を調べた.著者の実験結果にある通り、 X-、Y-cell ともに、変化はなかった.また Sherman、 Stone<sup>10</sup>(1973)は、片眼遮蔽した猫の網膜の W-、X-、 Y-cell の受容野の特性と伝導速度については、正常と 変わりなかったと報告し、Kratz ら<sup>24)25)</sup>(1979)もそれ を確証している.この電気生理学的事実と一致して、 網膜神経節細胞は、臨界期内の視性遮断によって、解 剖学的にも、なんの影響も蒙っていなかった.

今回著者は、子猫の臨界期に片眼の眼瞼を1~2年 間縫合遮蔽することで実験弱視を得て、この同一猫に おいて LGN と、網膜の神経節細胞の解剖学的変化を 観察して、明らかに LGN の細胞に発育障害が認める にも拘らず、網膜においては、X-、Y-cell ともに変化 のないことを確証した。

稿を終えるにあたり,この実験に多大な御助言を下さっ た名古屋鉄道病院眼科の野崎尚志博士に深謝いたします. また,御校閲下さった滋賀医大眼科教授稲富昭太先生に深 謝いたします.

#### 文 献

- Wiesel TN, Hubel DH: Effects of visual deprivation on morphology and physiology of cells in the cat's lateral geniculate body. J Neurophysiol 26: 978-993, 1963.
- Wiesel TN, Hube DH: Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. J Neurophysiol 26: 1003–1017, 1963.
- 3) 三輪正人: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.日眼 91:890 -895,1987.
- Stone J: Parallel processing in the visual system: The classification of retinal ganglion cells and its impact on the neurobiology of vision. New York, Plenum Press, 49-53, 1983.
- 5) Bennett MJ, Smith EL, Herwelth RS, et al: Ocular dominance, eye alignment and visual acuity in kittens reared with an optically induced squint. Brain Res 193: 33-45, 1980.
- Van Sluyters RC, Levitt FB: Experimental strabismus in the kitten. J Neurophysiol 43:686

76 - (76)

-689, 1980.

- Eggers HM, Blakemore C: Physiological basis of anisometropic amblyopia. Science 201: 264-267, 1978.
- Ikeda H, Tremain KE: Amblyopia resulting from penalisation: Neurophysiological studies of kittens reared with atropinisation of one or both eyes. Brit J Ophthalmol 62: 21-28, 1978.
- Sherman SM, Spear PD: Organization of visual pathways in normal and visually deprived cats. Physiol Rev 62: 738-855, 1982.
- 10) Sherman SM, Hoffmann KP, Stone J: Loss of a specific cell type from dorsal lateral geniculate nucleus in visually deprived cats. J Neurophysiol 35: 532-541, 1972.
- Sherman SM, Stone J: Physiological normality of the retina in visually deprived cats. Brain Res 60: 224-230, 1973.
- 12) Hoffmann KP, Cynader M: Functional aspects of plasticity in the visual system of adult cats after early monocular deprivation. Philos Trans R Soc Lond 278: 411-424, 1977.
- 13) Shapley R, So YT: Is there an effect of monocular deprivation on the proportion of X and Y cells in the cat lateral geniculate nucleus? Exp Brain Res 39: 41-48, 1980.
- 14) Leventhal AG, Hirsch HVB: Effects of early experience upon orientation sensitivity and binocularity of neurons in visual cortex of cats. Proc Natl Acad Sci USA 74: 1272–1276, 1977.
- 15) Leventhal AG, Hirsch HVB: Receptive-field properties of neurons in different laminae of visual cortex of the cat. J Neurophysiol 41:948 -962, 1978.
- 16) Sherman SM: The functional significance of X- and Y-cells in normal and visually deprived cats. Trend Neurosci 2: 192—195, 1979.
- 17) Daniels JD, Pettigrew JD, Norman JL:

Development of single-neuron responses in Kitten's lateral geniculate nucleus. J Neuro-physiol 41 : 1373—1393, 1978.

- 18) Guillery RW: The laminar distribution of retinal fibers in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat: A new interpretation. J Comp Neurol 138: 339-368, 1970.
- 19) Guillery RW: Quantative studies of transneuronal atrophy in the dorsal lateral geniculate nucleus of cats and kittens. J Comp Neurol 149: 423-438, 1973.
- 20) Sireteanu R, Hoffmann KP: Relative frequency and visual resolution of X- and Y-cells in the LGN of normal and monocularly deprived cats: Interlaminar differences. Exp Brain Res 34: 591-603, 1979.
- 21) Headon MP, Powell TPS: Cellular changes in the lateral geniculate nucleus of infant monkeys after suture of the eyelids. J Anat 116:135 -145, 1973.
- 22) Hubel DH, Wiesel TN, Levay S: Plasticity of ocular dominance columns in macaque monkey. Philo Trans R Soc Lond 278: 377–409, 1977.
- 23) von Noorden GK, Crawford MLJ, Levacy RA: The lateral geniculate nucleus in human anisometropic amblyopia. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 788-790, 1983.
- 24) Kratz KE, Sherman SM, Kalil R: Lateral geniculate nucleus in dark-reared cats: Loss of Y-cells without changes in cell size. Science 203: 1353—1355, 1979.
- 25) Kratz KE, Mangel SC, Lehmkuhle S, Sherman SM: Retinal X- and Y-cells in monocularly lid-sutured cats: Normality of spatial and temporal properties. Brain Res 172: 545-551, 1979.

(第91回日眼総会原著)