

成体ラット前房内へ移植した胎生網膜および 視蓋組織の形態変化 (図 5)

二宮 修也 (岩手医科大学医学部眼科学教室)

要 約

胎生13~20日のラット胎仔より網膜と視蓋の両者を摘出し、これらを成体ラット前房内に単独移植または混合移植し、その生着状況および形態変化を観察した。網膜単独移植は23眼、視蓋単独移植は34眼、網膜と視蓋の二者の混合移植は23眼、計80眼に施行し、それぞれ21.7, 41.2, 73.9%の生着率を得た。生着した移植片は虹彩上に癒着して成育し、組織内に血管網が発育したが、網膜は黄白色半透明で表面にひだを形成し、視蓋は黄白色で表面平滑な球形に形態変化を示した。光学顕微鏡では移植網膜は同類の細胞が集合し、管腔状構造を呈していた。視蓋は充実性で均一な構造を示し、大型の神経細胞が散在していた。また、網膜、視蓋の混合移植では短期生存例の網膜部にロゼット形成が認められ、長期生存例ではロゼットは消失し、網膜部は視蓋部を覆うように扁平化し、網膜組織は細胞層と線維層から成る重層構造として認められた。前房は移植実験における良好な培養槽になり得ると考えられた。(日眼会誌 93: 475-483, 1989)

キーワード：神経移植，網膜，視蓋，前房

Morphological changes of embryonic retina and tectum transplanted into the anterior eye chamber of adult rats

Shuya Ninomiya

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Iwate Medical University

Abstract

Primordia of the retina and the tectum of different ages (13 to 20 embryonic days) were transplanted as single or double grafts into the anterior chamber of the eye of normal syngeneic adult rats (Fischer 344). After 2-37 weeks (mostly 4-16 weeks), host rats were sacrificed and their eyeballs were dissected, frozen and sliced to 10 μ m thickness and examined histologically by using Nissl and acetylcholinesterase (AChE) stains. Survival of the retinal single grafts, the tectal single grafts and the double grafts of both tissues were 21.7% (5/23), 41.2% (14/34) and 73.9% (17/23), respectively.

The single grafts of the retina surviving on the iris of the host anterior chamber were observed through the transparent cornea as an irregular, translucent and whitish masses, inside of which small blood vessels were seen to enter. The grafted tissues contained many darkly stained cells and formed tubular structures of varying sizes and in part exhibited rosette-like structures. The surviving single grafts of the tectum grew forming round, developing tissue on the host iris. The surface of the graft was smooth and vascularized. In Nissl sections, grafts contained large cells densely distributed, in particular in the center of the solid tissues. Areas of strong AChE-positive reaction in the graft were

別刷請求先：020 盛岡市内丸19-1 岩手医科大学眼科学教室 二宮 修也

(平成元年 2 月 15 日受付，平成元年 3 月 13 日改訂受理)

Reprint requests to: Shuya Ninomiya, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Iwate Med. Univ. 19-1 Uchimaru, Morioka 020, Japan

(Received February 15, 1989 and accepted in revised form March 13, 1989)

located close to the host iris. Double grafts of the retina and the tectum were observed on the host iris to fuse about 2 weeks after transplantation. On Nissl sections, the retinal part of the grafts of about 2 weeks (short term) of survival demonstrated rosette formation of two (i.e., inner and outer) layers composed of light and dark cells, respectively. In grafts surviving 4-5 months (long term), the retinal part showed folded sheets over the tectal part. The retinal part was composed of two cell layers; densely packed and sparsely distributed cells were observed in their respective layers, and no rosette formation was observed. AChE stain was strongly positive in areas where small retinal cells were sparsely distributed. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 93: 475-483, 1989)

Key words: neural transplantation, retina, tectum, anterior chamber, rat

I 緒言

胎生期の組織はその未熟性により、細胞の相互作用や発育環境によって多様に変化する。その変化の発現様式を解析することによって組織の発生・分化、あるいは損傷に対する修復・再生の問題を明らかにすることが可能である。近年、中枢神経組織の移植による修復・再生の実験が試みられるようになり、神経発生生物学における研究の手段としてその有用性が確認されてきた。視覚系領域でも、網膜および視覚中枢神経組織は修復・再生の可能性があることが報告され、例えば McLoon ら^{1)~3)}は新生仔ラットの上丘に移植した胎仔の網膜、視蓋、大脳皮質が生着し、移植片と宿主組織である上丘との間に神経連絡が形成されることを示し、So と Aguayo⁴⁾は成体ラットの眼球表面より網膜に達するように一端を挿入した自己末梢神経の組織内を網膜神経節細胞の軸索が伸長することを示した。また、組織培養を応用したものでは、荻田と盛⁵⁾は胎仔ラットの網膜と外側膝状体を含む中枢組織を混合培養して、網膜由来の軸索が外側膝状体に向かって伸展することを観察し、大西ら⁶⁾や Fujisawa⁷⁾⁸⁾は6~10日目のニワトリ胚網膜をトリブシン処理で単一細胞に分散させた後、ニワトリ胚漿尿膜上に培養することによって、網膜構造が再構築されることを報告している。

今回、視覚系の組織として胎仔の網膜と視蓋の二つの組織を選び、これらを単独にまたは両者を前房内へ移植し、その生着状況や形態の変化を調べ、また実験系としての前房の有効性について検討する実験を行った。

II 実験方法

実験動物は Fischer 344 系 (inbred) ラットとし、供与者 donor と宿主 recipient を同種同系統に統一し、

donor は胎仔を、recipient は体重70~300gの成体を用いた。

妊娠13~20日のラット(以下、E13~E20と略す)を pentobarbital sodium (30mg/kg) 腹腔内注射によって麻酔し、開腹後、子宮壁を切開して胎仔を取り出した。全胎仔を取り出す間の母体の全身状態と胎仔の酸素供給を良好に保つため、麻酔量、切開創あるいは出血量を最小限とした。取り出した胎仔を培養液(Eagle's minimum essential medium)に入れ、クリーンベンチ内で実体顕微鏡下に眼球を摘出し、角膜を輪部で切除して強膜をピンセットにて経線方向に2分割し、網膜のほぼ全体を脈絡膜から剝離した。また胎仔の頭蓋骨を切除して脳組織を露出し、中脳前方の表層部の軟膜をはがし、視蓋の部位の脳組織を一辺が0.2~0.5mmの立方形状に切り出した。採取した網膜と視蓋の移植片は、直ちに移植または移植操作までの短い時間(通常5~10分)、37°Cの新鮮な培養液中に置いた。

recipient への移植方法は、ラットの両眼に約1時間前に1%の atropine を点眼して散瞳した。腹腔内に pentobarbital sodium (30mg/kg) を投与して麻酔した後、手術用脳定位固定装置にセットした。図1に移植操作を模式的に示した。すなわち、まず、鉤付きピンセットで外眼筋付着部を把持して眼球を亜脱臼させ、眼科手術用顕微鏡下で razor にて角膜に対し30度以下の角度で前房内に達する約2mmの角膜切開を入れた。その後ただちに、移植片として胎仔より採取した網膜あるいは視蓋組織を単独に、または両組織を、加熱によって先端の内径を約0.8mmに縮小した Pasteur ピペットで角膜創より前房内の虹彩の前面に静かに注入した。網膜は一眼分を、視蓋は採取した一側の組織片を前房内へ注入した。網膜は材料採取の段階で巻き縮むが、前房内注入の際には細化片しないように注意した。すべての動物にこのように両眼に移植し

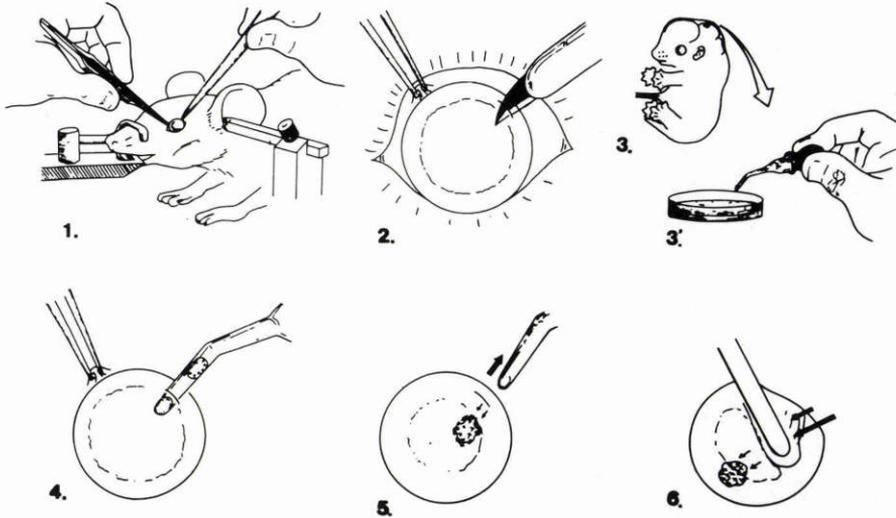


図1 ラット前房内への移植実験手順を示す図。

た。移植片の採取から移植までの操作は約10分以内に終わるようにした。

網膜と視蓋を混合移植する場合には、前房に同時に注入する方法と、視蓋を先に移植し、視蓋が虹彩に生着して血管侵入を認めた後(3日後, 1週後, 6週後)に、これに接触するように網膜を移植する方法との2種を採用した。

網膜単独移植は23眼(E13: 2眼, E16: 1眼, E17: 7眼, E18: 6眼, E19: 4眼, E20: 3眼), 視蓋単独移植は34眼(E13: 1眼, E14: 3眼, E15: 2眼, E16: 2眼, E17: 9眼, E18: 6眼, E19: 6眼, E20: 5眼), 網膜と視蓋の混合移植は23眼, 合計80眼に移植した。混合移植23眼のうち, 移植する網膜と視蓋の胎生時期が一致しているものは, E13が1眼, E16が7眼, E19が5眼, E20が3眼の計16眼であり, 網膜と視蓋の胎生時期が異なるものは, 網膜 E15 と視蓋 E14 のもの3眼, 網膜 E21 と視蓋 E18 のもの4眼の計7眼である。また, 網膜と視蓋を同時に移植したもの13眼, 視蓋の移植後3日目に網膜を移植したもの4眼, 1週後のもの3眼, 6週後のもの3眼である。

移植後, 24時間, 48時間, その後2カ月目までは1週毎に, その後は1カ月毎に軽麻酔下で, 眼科手術用顕微鏡にて経角膜的に移植片および前房の状態を観察した。

移植後, ラットを2~37週間生存させた後, 0.85% NaClを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)を左心室より灌流して脱血致死せしめ, 眼球を摘出した。ただし

に眼球のまま凍結し, クリオスタットにて $10\mu\text{m}$ の厚さで眼球の矢状断切片を作成し, Nissl染色あるいはacetylcholinesterase (AChE)染色を施し, 光学顕微鏡(以下, 光顕)にて観察した。

III 結果

1. 胎生網膜組織の単独移植

移植された網膜組織が虹彩の一定の場所に定着したことが眼科手術用顕微鏡にて観察され, 組織標本上でも定着した移植組織が虹彩上に存在し, 細胞分布が確認されたものを生着と判定した。網膜を移植した23眼中5眼(21.7%)に生着をみた。生着例を移植組織の胎生時期別にみるとE13が1眼(50%), E16が1眼(100%), E17が2眼(28.6%), E18が1眼(16.7%)で, 胎生時期が早いものほど生着率が高い傾向にあった。

生着した網膜組織片は手術用顕微鏡による観察では, 移植当初, 虹彩上にあって, 中心部が黄白色, 周辺部が半透明な円盤状を呈して軽度に収縮し, 表面は趣襞を形成して不整であった。明瞭な血管侵入は認められなかった。移植日数が経過すると(約4週以降), 表面が不整のまま白色化し, 全体として収縮し, 表面を微小血管が走行していた(図2A)。移植片が生着しなかった例では, 移植した網膜が前房内で細片化して散乱し, 1週後に前房内から消失するか, あるいは虹彩上に収縮した白色塊として認められた。

顕微鏡観察により, たとえば, E18, 移植後10週の例

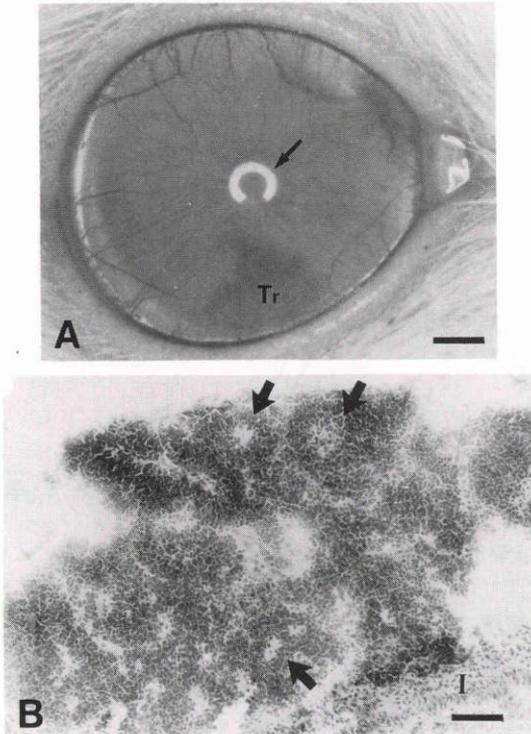


図2 A: 網膜単独移植例(E18, 移植10週後). 移植片は, ラット右眼前房内6時方向に半透明な円盤状組織塊として虹彩上に生着し発育している (bar=1mm) 中央部瞳孔に一致して光ってみえるリング(矢印)は写真撮影による反射光である(図3A, 図4Aも同様). B: AのNissl染色像. 生着した移植片は虹彩(I)上に濃染細胞の集合した組織として認められ, 一部は管腔様構造(矢印)を呈している (bar=100 μ m).

では, 移植網膜片は虹彩上に Nissl 染色に濃染される細胞の集合として認められた. 細胞は, 大小の管腔様構造を呈し, 一部ロゼットを形成していた(図2B). 移植組織の中に, 虹彩由来と思われる結合組織の増殖がみられた. 手術顕微鏡下による観察で生着例と判断された例においても, 組織学的には非生着と判定された例もあり, このような例では, 図2Bにみられるような組織像は観察されず, 細胞は粗で, 移植片の周辺部, とくに虹彩に面した領域に小細胞が散在し, 他の部分は主に結合組織で占められていた.

胎生早期(E13)組織の移植例においては, 移植片の網膜の切除, 摘出が難しく, 網膜以外の組織が混入しやすく, 移植組織内での結合組織の占める割合が多かった. なお, 生着例での移植網膜片の組織像に移植後の

生存期間の長短による明らかな構造上の差異は認められなかった.

2. 胎生視蓋組織の単独移植

視蓋のみを前房内に移植した例で, 手術顕微鏡下で移植片が虹彩の一定の場所に定着し, 組織片内に微小血管が新生し, 組織標本上でも生着が確認されたものは, 34眼中14眼(41.2%)であった. このうち, E13が1眼(100%), E14が1眼(33.3%), E16が1眼(50%), E17が7眼(77.8%), E18が2眼(33.3%), E19が2眼(33.3%)であった.

虹彩の表面に定着した視蓋の移植片は, 当初は中心部が血性色であったが, 48時間以内に虹彩より血管の侵入を受け, 組織内に微小血管網が密になった. しかし, 1週後には微小血管網が不明瞭となって血性色がうすれ, やや太い血管の走行が明瞭となった. また組織片全体の球形化と白色化がすすみ, 表面が平滑になりながら大きさが僅かずつ増大し(図3A), 大きいもので約2.5 \times 1.5mmの大きさ(E17, 移植後15週)になった. その後(最長期間のもので37週)は外見上に著変はなかった.

光顕による観察では, 移植した視蓋組織は, 図3B(E17, 移植後5週)に示したように, 神経細胞を含む組織が充実性に発達し, Nissl 標本上ほぼ均一に染色された. 組織片の中心部では, 細胞は大型の多角形で密に存在し, 周辺部は細胞が粗であり, また表層では小細胞が密に配列していた. 移植片は虹彩表面に密に接着し, 結合組織の増殖や虹彩の肥厚は認められなかった. A Ch E 染色では細胞は全体に軽い陽性反応を示したが, とくに虹彩付着面付近で反応が強かった(図3C).

胎生早期(E13-E14)と後期(E17以降)からの視蓋移植片において, その移植後の形態変化, 発育程度は早期に採取したもの程大きいように思われたが, 光顕組織所見に明らかな差違は認められなかった. また, 移植期間が約4週以上を経過するとそれ以降(最長37週)においては, 肉眼的にも組織学的にも移植組織に著しい変化は認められなかった.

3. 網膜と視蓋の混合移植

網膜と視蓋の混合移植23眼のうち生着を得たものは全体では17眼(73.9%)であったが, 二者の移植胎生時期が一致している例ではE13が1眼(100%), E16が7眼(100%), E19が3眼(60%), E20が1眼(33.3%)で, 胎生時期の早いものほど高い生着率を示した. 胎生時期が一致しないものでは7眼中5眼

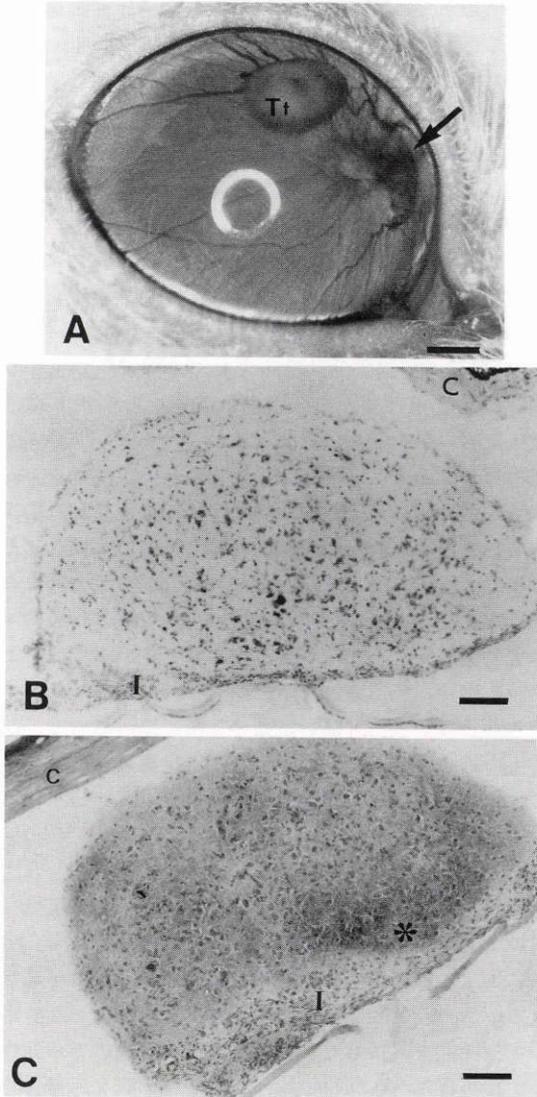


図3 A: 視蓋単独移植例 (E17, 移植5週後). 移植片は表面平滑, 黄白色の球体として虹彩上に附着している. 2時方向の刺入創 (矢印) に虹彩が癒着し, 瞳孔が偏位している (bar=1mm). B: A の Nissl 染色像. 生着した視蓋組織の表層部に主として小型円形細胞が, 深部に大型多角形の細胞が多数認められる (bar=100 μ m). I: 虹彩, C: 角膜. C: B の隣接切片の A Ch E 染色像. A Ch E 陽性反応の程度は一樣ではなく, 虹彩 (I) に近い右側部位 (*) に反応が強く表れている (bar=100 μ m). C: 角膜.

(71.4%) が生着した. また, 両者を同時に移植したものでは13眼中11眼(84.6%), 網膜の移植が3日後のもの4眼(100%), 1週後のもの1眼(33.3%), 6週

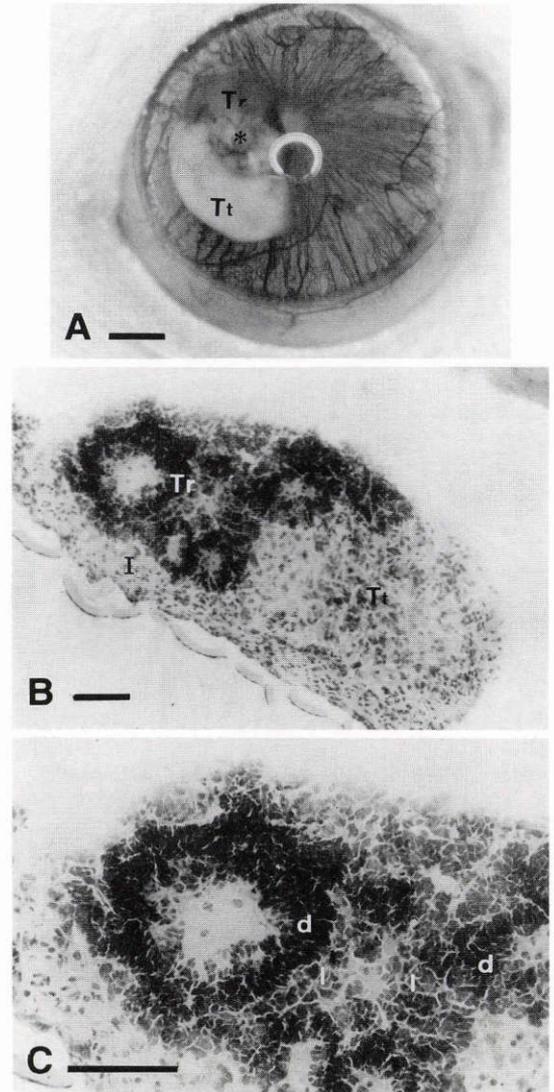


図4 A: 網膜 (E16) と視蓋 (E16) の混合移植例 (移植5週後). 網膜部 (Tr) と視蓋部 (Tt) が癒合して (*) 生着している. 視蓋部は白色化が著明で, 網膜部は一部が半透明である. 生着した移植片内に血管が侵入している像が認められる (bar=1mm). B: 網膜 (E16) と視蓋 (E16) の混合移植例の Nissl 染色像 (移植16日後). ロゼットを形成した網膜部 (Tr) と大小の細胞が分布する視蓋部 (Tt) が癒合して虹彩 (I) 上に生着, 発育している (bar=100 μ m). C: B の網膜部の拡大像. ロゼットが形成され, 濃染される細胞 (d) と淡染される細胞 (l) とが区別できる (bar=100 μ m).

後のもの1眼(33.3%) がそれぞれ生着した.

手術用顕微鏡により角膜を通して観察すると, 移植

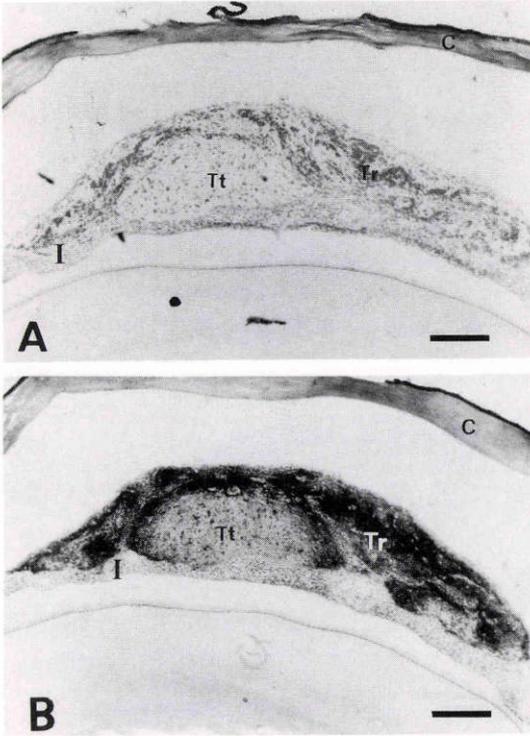


図5 A: 網膜 (E19) と視蓋 (E19) の混合移植例の Nissl 染色像 (移植19週後)。虹彩 (I) 上に網膜部 (Tr) が視蓋部 (Tt) を覆うように発育している (bar = 200 μ m)。C: 角膜。B: A の隣接切片の A Ch E 染色像。網膜部 (Tr) では A に示した細胞の粗な部位が陽性に染まる。視蓋部 (Tt) でも網膜部と接触している表層部が強陽性の反応を示している (bar = 200 μ m)。I: 虹彩, C: 角膜。

後約 2 ~ 3 週の間、網膜と視蓋の両組織片は一塊に癒合して発育し、白色、不整形の塊として虹彩上に認められた。視蓋部がより白色調を帯びていたのに対し、網膜部は単独移植例よりも表層への血管侵入が著明であった。このように、多くの例で二者の境界部が明瞭であった (図 4A)。

網膜および視蓋の各移植片が移植後癒合せずに一方が吸収されてしまった例は 4 眼あったが、分離して生着した例では、それぞれが虹彩上の別個の場所で単独移植と同様の形態変化を示しながら生着した。

光顕所見で移植後の生存期間が短い例 (E16, 期間 16日) では、移植片網膜部には濃染した小細胞からなるロゼット形成が観察され、これらがいくつか集合した形となっていた (図 4B)。一部のロゼットは均一無構造な中心部を囲むように内層の濃染細胞と外層の淡

染細胞の 2 層に区別された (図 4C)。移植片視蓋部の構造は慢性に細胞が散在し、中心部に細胞がやや密に存在していた (図 4B)。視蓋部におけるこれらの所見は単独移植例と比べて大きな差はなかった。なお、網膜部と視蓋部の癒合部は不規則であったが、相互の細胞が他方の組織に移行する所見あるいは境界膜の存在は確認されなかった。

移植後、長期間 (15 ~ 19 週) 生存させた例では、多くの場合、移植された組織は虹彩上に扁平状に発育しており、網膜部が視蓋部を覆うように接していた。Nissl 染色では網膜部は濃染された小型細胞が密集している層と粗な層とに区別され、それらが折り重なった層構造を示していた。しかし、ロゼット形成は認められなかった (図 5A)。A Ch E 染色では濃染細胞層間の細胞の粗な部位が強く陽性に染色され、層構造の形態がより明瞭に確認された。視蓋の移植片はその大きさが視蓋単独移植の場合ほど大きくは発育せず、直径 0.7mm 程度が限度であった。A Ch E 染色では視蓋部表層、とくに網膜部と接触している部位がより強く陽性に染色されていたが境界部に特徴的な所見はみられなかった。虹彩表面には密に接しており、虹彩上の結合織の増殖は認められず、視蓋単独移植のものと同様であった (図 5B)。

IV 考 按

近年、組織培養の技術が進歩し、中枢神経系組織においても培養によって組織を人為的に構築したり、移植によって損傷を受けた組織を修復させる試みがなされている。たとえば、破壊や薬物投与などにより特定の中枢機能を欠損あるいは低下させた疾患モデル動物の中枢神経系内へ動物の胎仔脳組織を移植し、神経内分泌機能の修復を計ったり、神経回路の解析を行ったりする研究^{9)~11)}がある。これら一連の実験に使用される移植組織としては、分化が完成した成体の組織よりも、分化の途中で未熟である胎仔の組織の方が生着・発育の程度が高いことから、胎仔組織が用いられている。

今回、移植実験によって組織の発生・分化あるいは修復・再生を調べるにあたり、宿主 (host, recipient) 側の移植される場所としては成体ラットの前房に、また移植組織としては胎仔ラットの視覚系の組織にそれぞれ限定した。ラットの前房は組織培養法の一方法としてすでに用いられており、脳実質、脳室などとともに免疫による拒絶反応が少ない移植部位 (im-

munologically privileged sites) としても知られている。たとえば、Olson ら¹²⁾は、前房がこの種の実験研究に優れている点として、移植手技が比較的容易で時間を要しないこと、数種類の移植片の同時移植が可能であること、侵襲を加えることなく経角膜的に観察できること、発育が良好であること、recipient の虹彩には sympathetic と parasympathetic の 2 つの神経支配があり、生着した移植組織にそれぞれの神経連絡が形成され、相互作用を受けること、などをあげている。5 日間の短期間の培養であれば、網膜は in vitro でも分化を続けるといわれている¹⁴⁾¹⁵⁾が、今回の網膜の移植実験から、網膜細胞の分化、および構築にとっての培養条件は in vitro よりも好ましいと考えられる。現在までに前房内に網膜を単独移植したもの¹⁶⁾¹⁷⁾や、歯状核、青班核、大脳皮質、海馬などの胎仔脳組織を二者混合移植¹²⁾¹³⁾、さらには三者混合移植¹⁸⁾して相互の神経連絡を観察している報告もみられる。

次に、移植組織 (donor) として網膜および視蓋を用いたが、その理由は、いずれも体表に近い所にあり摘出が容易であること、網膜は 10 層、視蓋は 7 層から成る特徴ある構造をもつこと、および正常に発達した成体ラットでは網膜からの神経線維が直接上丘に投射するなどの点に注目したためである。さらに網膜は、内網状層においてコリン作働性の神経伝達が行われているので A Ch E 染色によってコリン作働性の神経終末の局在と形態的特徴が得られる¹⁹⁾という移植片の確認に有利な手段があることなども、移植組織として選んだ理由である。

今回の実験では網膜単独移植 (図 2) の生着率は 21.7% (生存期間 2~10 週) であった。E13~E18 を用いた del Cerro ら¹⁶⁾¹⁷⁾が報告しているラット前房内網膜移植 (生存期間 0~91 日) における生着率は平均して 60~90% と高値を示したが、観察期間を長くし、1mm 以上に発育した場合の移植片の生着率をみるとかなり低くなっている。移植片採取の時期に関して言えば、本研究では網膜移植例の 87% が E17~E20 の組織を使用しているのに対し、彼らは移植網膜として E13~E18 のものを使用している。正常ラットの網膜の発生過程は、胎生 16 日以前の段階では、色素上皮細胞を除く神経網膜は完成されておらず、単一の厚い細胞層で網膜細胞の分化や配列構造は認められず、細胞は未熟で分裂の時期にある¹⁷⁾²⁰⁾。この移植網膜の胎生時期が移植後の生着、発育、分化に影響を与えていると思われる。また、網膜は機械的侵襲を受けると容易に破

損する組織であるので、生着率を高めるためには、移植組織としてさらに幼若な胎仔の組織を使用することに加えて、網膜の採取および移植の操作を慎重にし、また recipient 眼の組織損傷も少なくして炎症反応を最小限に抑えることが必要であると考えられる。

本実験において、視蓋のみを移植した例で 41.2% の生着を認めた。外見上は血管の侵入が網膜よりも著明で、移植片の大きさも増大し、生着の判定は比較的容易であった (図 3)。網膜に比して生着率が良好であった理由としては、網膜が採取の操作の際に分断して細片化しやすいのに対し、視蓋の場合は、それを少ない侵襲の下で一塊として切除し移植することが可能であったためと思われる。しかし、生着後の大きさが最大に発育するものでも直径 2.5mm を越えるものはなく、これはラットの前房が浅く容積が小さいため、前房水や侵入血管からの酸素、栄養の十分な供給があっても、移植片の発育には制約があるためと考えられる。

これら網膜あるいは視蓋の単独移植の場合に比し、網膜と視蓋の混合移植の場合には生着率が 73.9% と高く、混合移植することによって生着率が明らかに上昇した。これは第一に、虹彩上に早期に定着した生着率の高い視蓋組織片につづいて網膜が接触し癒合することによって、さらには、浮遊できる前房内の容積が制限されることによって混合移植片の前房内における浮遊時間が短縮されるので虹彩への接着が良好になると考えられる。

次に、移植片の生着、発育の良好な例では新生血管の増殖が認められるが、このことが生着の良否を決める重要な因子と考えられる。この新生血管は虹彩由来のもの¹⁷⁾で、移植片表層を走行した後に移植片内に侵入する (図 4A)。眼内組織に血管新生を発生させる因子としては、腫瘍、炎症、外傷、加齢、および低酸素状態があげられる²¹⁾。本研究で用いた donor 組織は未熟で細胞分裂活動の盛んな胎生組織であり、摘出、移植によって低酸素状態になり、加えて、recipient 側の移植手術による侵襲により、prostaglandin をはじめ各種の血管新生因子²²⁾が前房内に放出され、これが donor 組織内および recipient の虹彩の両者に血管の新生を誘発したと考えられる。

網膜と視蓋を混合移植する際に、採取したラットの胎生時期を一致させた場合に、単独組織の移植例と同様に胎生時期の早いものほど生着率が高かった。他方、移植する時期が一致しない場合、視蓋の移植から網膜

の移植までの期間が長いほど成績が悪かったのは、網膜を移植する時期にはすでに視蓋移植片の表面に被膜が形成されており、視蓋組織と密な接触が保てず、網膜は生着率の悪い単独の移植片としての過程をたどったためと考えられる。

萩田と盛⁵⁾は、胎生13日目の右眼の網膜組織と胎生15日目の左側の外側膝状体を含む脳組織を培養液中で co-culture することによって、網膜由来の神経軸索が外側膝状体に向かって伸展していく所見を得たことから、標的器官である外側膝状体に chemotactic factor の存在を示唆した。Sefton と Lund²⁹⁾は、胎仔マウスの網膜をマウスまたはラットの視蓋あるいは脳間の組織とともに新生仔ラット後頭葉皮質に移植した。この中で80%以上の例に分化と発育がみられ、二種の混合移植組織片が1.3mm まで離れていても相互の神経連絡が認められることをマウス特異抗体を用いて証明した。このことより、網膜の神経節細胞が生存するためには標的組織との神経連絡が重要で、標的組織は移植網膜の神経節細胞に影響を及ぼしうることを示唆した。本実験における混合移植の場合も、同じ視覚系の組織としての何らかの神経成長因子が存在し、網膜と視蓋の胎生移植組織が接触した場合に、視蓋側から網膜側への、あるいは、その逆方向への神経連絡の発育を促す因子が作用している可能性が考えられる。また、Ebendal ら²⁴⁾が虹彩に存在すると推測しているポリペプチド等の神経成長因子の作用も想定される。以上のことが、混合移植の生着率が良好であった理由として考察される。

幼若な網膜はロゼットを形成しやすい組織であることは以前から知られている特徴であり、病的な例としては網膜芽細胞腫がある²⁵⁾。今回、胎生網膜移植例で観察されたロゼット形成は、胎仔組織としての未熟性の他に、網膜自体が受けた外的侵襲²⁶⁾による影響もあろうが、これに加えて長期間の生着による組織自体の発育と、炎症に対する修復機転としての形態変化と考えることができる。しかし、本研究の混合移植例の網膜においては、移植後1カ月ではロゼットが形成されたが(図4B, C)、1カ月以上の長期生存例ではロゼットは認められなくなり、網膜は視蓋移植片を覆うように伸展し、小型の濃染細胞の密集している層と粗な層とが折り重なって層構造を呈するように発育した(図5A)。一方、Fujisawa⁷⁸⁾によれば、トリプシン処理で分散したニワトリ胚の網膜単一細胞を漿尿膜上で培養すると、単離した網膜細胞は初期には集合してロゼッ

ト構造をもった細胞集合体を形成し、その後ロゼット内で組織分化が進行した。この際、漿尿膜に接しないロゼットは崩壊、融合して平板状の網膜構造をとるようになり、神経節細胞は漿尿膜側に接近して神経節細胞層を形成した。今回の実験でもロゼット構造および平板状の層構造を呈した点で Fujisawa⁷⁸⁾の網膜培養細胞にみられる形態変化に類似している。本研究の網膜・視蓋混合移植例において、重層構造を示した組織の A Ch E 染色で、網膜部の濃染細胞の少ない層が陽性の所見を示した(図5B)。このことから、この層に A Ch E 活性があり、cholinergic な作用が働いていると推測された。視蓋部においても網膜部と接触する領域に A Ch E 染色での反応が強かったが(図5B)、網膜の神経節細胞が生存し、神経線維を視蓋組織に伸展して視蓋の神経細胞に何らかの関与をもつに至ったことが推察される。これらのことより、虹彩上に生着した網膜においても、その発育、分化する過程で、ロゼット構造から重層構造に形態的变化ないし再構築が行われたものと考えられる。

今回の実験と類似した所見を得たものとして、McLoon ら³¹⁻³²⁾のものがある。すなわち彼らは、ラット胎仔の網膜、視蓋あるいは脳組織を幼若ラット上丘表層へ単独に移植する実験を行ない、網膜は“folded sheets”およびロゼットの形態を示し、そのロゼットは中心部に視細胞が周辺部に神経節細胞が存在していたこと、視蓋は約1mm³の充実性の腫瘤として生着していたことなどを報告している。また、彼らは生着した移植片内に horseradish peroxidase (HRP) を注入することによって recipient と移植片との間に神経連絡が形成されることを示した。

今回の実験で、前房において、視覚系の組織である網膜および視蓋を混合移植したものが5カ月の長期にわたって生存、分化し得ることが明白となった(図5A, B)。Gerhardt ら²⁷⁾は前房内にラット胎仔の海馬と青斑核を含む脳幹組織とを混合移植して癒合発育させ、9~11カ月後に角膜のみを除去して移植片を組織培養液で満たし、海馬の移植片に微小電極を刺入して光または薬剤に対する脳幹由来の catecholaminergic なニューロンの反応を記録しているが、本研究で示したような視覚系の移植組織においてもこのような電気生理学的な研究を行ない、神経線維連結の証明をすることが可能である。移植された両組織間の相互作用あるいは、線維連絡を調べるためには、電気生理学的方法の他に、HRP やモノクローナル抗体を使った組織

化学的証明方法,あるいは電子顕微鏡的観察などが必要である。今回採用した実験手法は生体の神経系のモデルとして,純形態学的な研究とともに網膜の発達,可塑性,修復力などに関する研究に更に発展させることができると考えられる。

稿を終えるにあたり,御校閲を賜りました田澤 豊教授に深謝いたします。また,本研究の直接の御指導をいただき,御校閲を賜りました慶応大学医学部解剖学教室,川村光毅教授に深謝いたします。

文 献

- 1) **McLoon SC, Lund RD**: Specific projections of retina transplanted to rat brain. *Exp Brain Res* 40: 273—282, 1980.
- 2) **McLoon LK, McLoon SC, Lund RD**: Cultured embryonic retinae transplanted to rat brain: Differentiation and formation of projections to host superior colliculus. *Brain Research* 226: 15—31, 1981.
- 3) **McLoon SC, Lund RD**: Development of fetal retina, tectum and cortex transplanted to the superior colliculus of adult rats. *J Comp Neurol* 217: 376—389, 1983.
- 4) **So KF, Aguayo AJ**: Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. *Brain Research* 328: 349—354, 1985.
- 5) 荻田洋二, 盛 隆興: 中枢神経系の組織培養, 塚原勇 編: 眼科領域における最新の進歩, 東京, 医学教育出版社, 305—315, 1985.
- 6) 大西克尚, 藤沢 肇, 川上 泉: 網膜の培養, 第一報. トリブシン処理鶏胚網膜遊離細胞の各種培養法に関する研究. *日眼* 77: 562—570, 1973.
- 7) **Fujisawa H**: A complete reconstruction of the neural retina of chick embryo grafted onto the chorio-allantonic membrane. *Development, Growth and Differentiation* 13: 25—36, 1971.
- 8) 藤沢 肇: 網膜の再構築. *生体の科学* 35: 355—364, 1984.
- 9) **Björklund A, Stenevi U, Dunnet SB, et al**: Functional reactivation of the deafferented neostriatum by nigral transplants. *Nature* 289: 497—499, 1981.
- 10) **Freund TF, Bolam JP, Björklund A, et al**: Efferent synaptic connections of grafted dopaminergic neurons reinnervating the host neostriatum: A tyrosine hydroxylase immunocytochemical study. *J Neurosci* 5: 603—616, 1985.
- 11) **Gash D, Sladek JR Jr, Sladek CD**: Functional development of grafted vasopressin neurons. *Science* 210: 1367—1369, 1980.
- 12) **Olson L, Seiger A, Stromberg I**: Intraocular transplantation in rodents: A detailed account of the procedure and example of its use in neurobiology with special reference to brain tissue grafting. Ed by Federoff S and Hertz L, In *Advances in Cellular Neurobiology*, New York, Academic Press, 407—442, 1983.
- 13) **Olson L, Ebendal T, Seiger A**: Intraocular grafting of cultured brain tissue: growth, vascularization and neuron survival in locus coeruleus and cortex cerebri. *Neuroscience Letters* 47: 139—144, 1984.
- 14) 玉井 信, 野地 達: 網膜の器官培養. その 1. 正常幼若マウスでの試み. *日眼* 80: 260—266, 1976.
- 15) 玉井 信, 水野勝義: 網膜の器官培養. その 2. 幼若遺伝盲マウス網膜の場合. *日眼* 80: 667—674, 1976.
- 16) **del Cerro M, Gash DM, Rao GN, et al**: Intraocular retinal transplants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1182—1185, 1985.
- 17) **del Cerro M, Gash DM, Rao GN, et al**: Retinal transplants into the anterior chamber of the rat eye. *Neuroscience* 21: 707—723, 1987.
- 18) **Goldowitz D, Seiger A, Olson L**: Degree of hyperinnervation of area dentata by locus coeruleus in the presence of septum or entorhinal cortex as studied by sequential intraocular triple transplantation. *Exp Brain Res* 56: 351—360, 1984.
- 19) **Paxinos G, Watson C**: The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sidney, 1983.
- 20) **Kuwabara T, Weidman TA**: Development of the prenatal rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 13: 725—739, 1974.
- 21) Henkind P: Ocular neovascularization. *Am J Ophthalmol* 85: 287—301, 1978.
- 22) 佐藤 節: 網膜血管新生の発生病理. *眼科* 28: 425—432, 1986.
- 23) **Sefton AJ, Lund RD**: Cotransplantation of embryonic mouse retina with tectum, diencephalon, or cortex to neonatal rat cortex. *J Comp Neurol* 269: 548—564, 1988.
- 24) **Ebendal T, Olson L, Seiger A, et al**: Nerve growth factors in the rat iris. *Nature* 286: 25—28, 1980.
- 25) 大西克尚: 網膜芽細胞腫の発生起源と病理. *日眼* 26: 479—485, 1984.
- 26) 荒木敬二: 幼若網膜の体外培養時にみられる rosettes. *日眼* 65: 595—609, 1962.
- 27) **Gerhardt GA, Palmer MR, Seiger A, et al**: Adrenergic transmission in hippocampus-locus coeruleus double grafts in oculo: Demonstration by in vivo electrochemical detection. *Brain Research* 306: 319—325, 1984.