

二重標識法による外転神経核構成細胞の検討 (図 4)

皆 良 田 研 介 (佐賀医科大学眼科学講座)

要 約

外転神経核には **motor neuron** と **internuclear neuron** との少なくとも 2 種の神経細胞が存在することが知られている。これらは単一支配と思われるが、外直筋と対側動眼神経核との両者を支配する二重支配の神経細胞の存在も否定されない。本研究ではネコを対象とし、右外直筋に **Fluoro-Gold**、左内直筋に **WGA-HRP** を注入する二重標識法を行ないこの点について検討を加えた。その結果、右外転神経核に蛍光照明下にて **Fluoro-Gold** を取り込む神経細胞を認め、暗視野照明下では **HRP** 反応陽性細胞を認めた。しかし、外転神経核の吻側から尾側に至るまでの間には **Fluoro-Gold** と **HRP** 顆粒の両者を取り込んだ神経細胞は認められなかったことより、外転神経核の神経細胞には二重支配はなく、それぞれは外直筋と対側動眼神経核と連絡する単一支配神経細胞であることが確認された。(日眼会誌 93: 769-774, 1989)

キーワード：外転神経核，二重標識法，**Fluoro-Gold**，**WGA-HRP**，ネコ

Neuroanatomical Distribution of Motor and Internuclear
Neurons within the Cat Abducens Nucleus
Demonstrated by a Double Labeling Study

Kensuke Kairada

Department of Ophthalmology Saga Medical School

Abstract

The abducens nucleus contains two types of neurons which are motor and internuclear neurons. The neuroanatomical control system and the distributions of these two neurons were studied by simultaneous retrograde labeling with two different tracer substances in the cat. The tracers were **Fluoro-Gold (FG)** and wheat germ agglutinin conjugated with horseradish peroxidase (**WGA-HRP**). The types of cells were clearly identified by separate injections of **FG** or **WGA-HRP** into the right lateral rectus muscle and the left medial rectus muscle. The motor neurons labeled with **FG** were intermingled among the neurons which were labeled with **WGA-HRP**. No double-labeled neuron was detected within the abducens nucleus. These results indicate that motor and internuclear neurons in the abducens nucleus have their own projections and no neuron has dual projections. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 93: 769-774, 1989)

Key words: Abducens nucleus, Double labeling, **Fluoro-Gold**, **WGA-HRP**, Cat

別刷請求先：840-01 佐賀市鍋島町大字鍋島三本杉 佐賀医科大学眼科 皆良田研介

(平成元年 5 月 24 日受付，平成元年 6 月 21 日改訂受理)

Reprint requests to: Kensuke Kairada, M.D. Saga Medical School

Nabeshima Saga, 840-01 Japan

(Received May 24, 1989 and accepted in revised form June 21, 1989)

I 緒 言

外転神経核には同側外直筋を直接支配する motor neuron と対側内側縦束を上行し、動眼神経核内直筋支配域に連絡する internuclear neuron の少なくとも2種の神経細胞の存在が神経解剖学的研究^{1)~10)}や電気生理学的研究^{11)~13)}で明らかにされている。著者も逆行性軸索輸送される horseradish peroxidase (以下 HRP と略す) の外直筋への注入実験で同側外転神経核に HRP 反応陽性細胞を、すなわち motor neuron の存在を、また、動眼神経核への注入実験で対側外転神経核に HRP 反応陽性細胞、すなわち internuclear neuron の存在を追試確認している¹⁴⁾¹⁵⁾。さらに、順行性軸索輸送される wheat germ agglutinin (以下 WGA と略す) —HRP の外転神経核への注入実験から対側の動眼神経核および内側縦束に外転神経核 internuclear neuron の神経終末を確認した¹⁶⁾。これらのことから外転神経核には motor neuron と internuclear neuron の2種の神経細胞が存在し、これらが眼球の共同性水平向き運動に関与していることが察せられる。しかし、これら2種の神経細胞がはたして単一支配であって、多重支配はないのかなどについては研究の余地が残されている。両者を区別する方法として神経解剖学的見地からは motor neuron の方が internuclear neuron よりも大きい神経細胞であるとか²⁾、motor neuron は acetylcholinesterase を有している¹⁷⁾などの知見がある。一方、Steiger らは逆行性軸索輸送物質としては必ずしも安定してはいない蛍光色素剤の Evans blue と HRP の二重標識実験を応用して多重支配がないことをネコを対象とし報告している¹⁸⁾。近年、逆行性軸索輸送物質で樹状突起にまで良く取り込まれ、退蛍光が少ない新しい蛍光色素剤として Fluoro-Gold が紹介されている¹⁹⁾。Porter らは WGA-HRP が逆行性シナプス起え標識能を有することを報告し²⁰⁾、次いで岡村らは内直筋への WGA-HRP の注入実験で対側外転神経核に HRP 反応陽性細胞を確認している²¹⁾。そこで今回、蛍光色素剤である Fluoro-Gold を右外直筋に注入し、シナプス起え逆行性軸索輸送能をもつ WGA-HRP を左内直筋に注入する二重標識法を用い、外転神経核を構成する motor neuron と internuclear neuron について検討したので報告する。

II 実験材料および方法

対象実験および本実験とに成猫9匹を用いた。まず、

蛍光色素剤 Fluoro-Gold (Fluorochrome Inc.) および WGA-HRP (Toyobo, salt free) の単独注入実験を対象実験とした。次いで、Fluoro-Gold と WGA-HRP の二重標識を目的とした注入実験を行なった。

1. Fluoro-Gold 注入実験

Fluoro-Gold 注入実験に成猫2匹を用い、ケタラール麻酔下に結膜切開後、右外直筋を露出した。生理食塩水に溶解した4% Fluoro-Gold を10~20 μ l 注入した。5~7日間の生存期間の後、経心的に2000mlの生理食塩水にて灌流し、その後0.1Mリン酸緩衝液で作製した1.0% paraformaldehyde 1.25% glutaraldehyde の混合液2000mlで灌流固定し、脳を摘出した。ただちに30%ショ糖液に2~3日間浸した。その後、橋脳幹を厚さ50 μ mの水平凍結切片を作製し、ゼラチン貼布スライドガラスに貼布し、カナダバルサムを用いカバーガラスで封入した。顕微鏡検索には日本光学製落射蛍光装置を用い、蛍光励起には紫外線励起法、励起フィルター330~380nmを使用した。

2. WGA-HRP 注入実験

WGA-HRP 注入実験に成猫2匹を用い、ケタラール麻酔下に結膜切開、眼球虚脱後左内直筋を露出し、5% WGA-HRP を10~20 μ l 注入した。約48時間の生存期間の後、経心的に2000mlの生理食塩水にて灌流した後、1.0% paraformaldehyde・1.25% glutaraldehyde の混合液2000mlにて灌流固定し脳を摘出した。ただちに30%ショ糖液に2~3日間浸し、動眼神経核および外転神経核を含む中脳橋脳幹部の厚さ50 μ mの水平、凍結切片を作製した。切片をTMB法²²⁾²³⁾にて反応させた後、5% ammonium molybdate に浸し²⁴⁾、1% neutral red で対比染色を行なった。これら標本を明視野および暗視野照明下に観察した。

3. 二重標識実験

本実験には成猫5匹を用いた。まずはじめにケタラール麻酔下に4% Fluoro-Gold を右外直筋に注入した。次に、その約3~5日後に再びケタラール麻酔下に左内直筋に5% WGA-HRP を注入した。WGA-HRP 注入から約48時間後に、経心的に2000mlの生理食塩水にて灌流し、次いで1.0% paraformaldehyde・1.25% glutaraldehyde の混合液2000mlにて灌流固定し、脳を摘出した。ただちに、30%ショ糖液に2~3日間浸し、中脳橋脳幹部の厚さ50 μ mの水平凍結切片を作製した。切片をTMB法にて反応させた後、5% ammonium molybdate に浸した。標本作製にあたっては対比染色標本と無染色標本の2種を作製

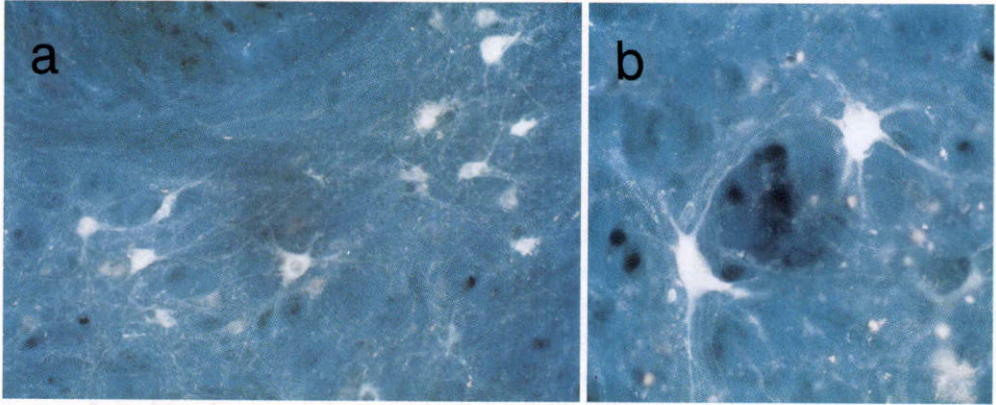


図1 右外直筋への Fluoro-Gold 注入で、同側外転神経核に観察された Fluoro-Gold を取り込む神経細胞を示す。(蛍光照明下, a : ×25, b : ×50)

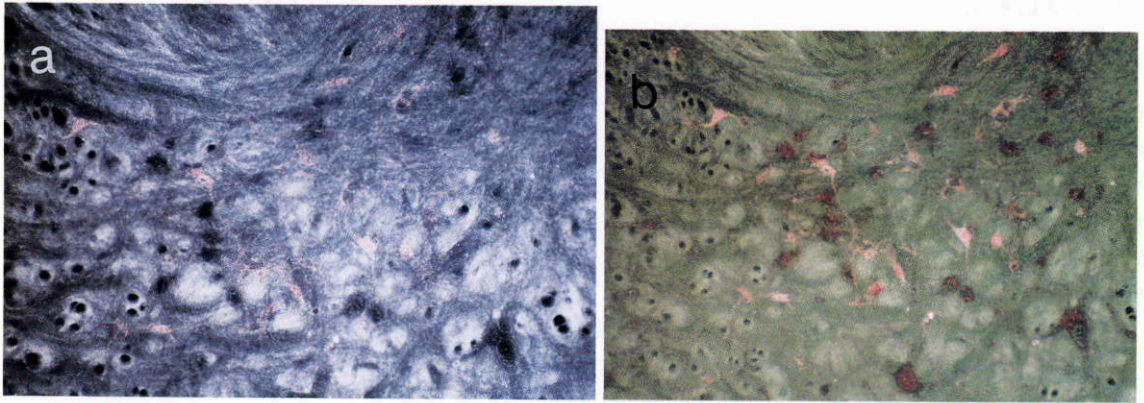


図2 左内直筋への WGA-HRP 注入で、対側外転神経核に観察された HRP 反応陽性細胞を示す。(暗視野照明下, a は無染色標本, b は撮影後対比染色を行なった標本であり, 共に同一部位標本である, ×25)

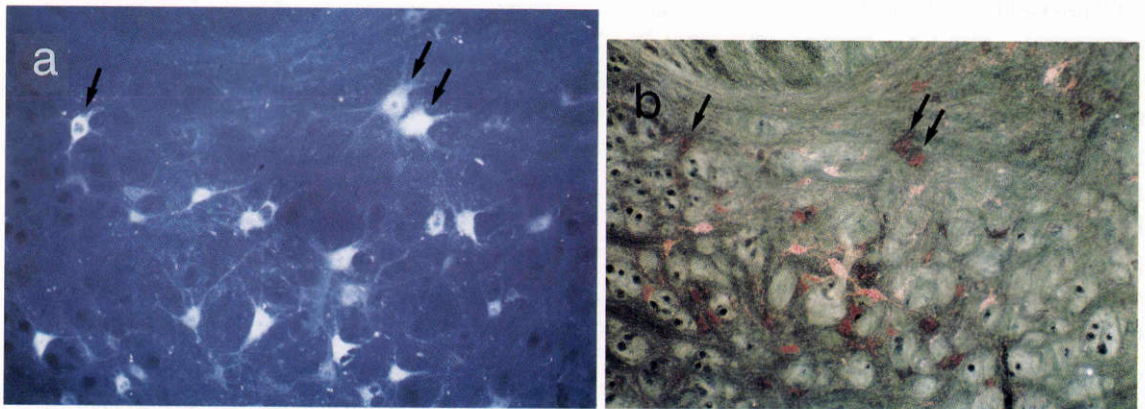


図3 右外直筋に Fluoro-Gold, 左内直筋に WGA-HRP を注入後の右外転神経核を示す。a は無染色標本で、蛍光照明下に Fluoro-Gold を取り込む神経細胞を認める。b は a と同一部位の対比染色標本で、暗視野照明下に HRP 反応陽性細胞を認める。HRP 反応を呈さない神経細胞群 (矢印) は蛍光照明下に認める Fluoro-Gold を取り込む神経細胞に一致する (×25)。

した。これら標本を明視野および暗視野照明下に観察し、また蛍光照明下にて同時に観察した。

III 結 果

1. Fluoro-Gold 注入実験

右外直筋への4% Fluoro-Goldの注入実験で、同側外転神経核に蛍光照明下にて Fluoro-Goldを取り込む神経細胞が観察された。これら神経細胞は外転神経核の物側から尾側に至るまで観察され(図1)、外転神経 motor neuronとみなされた。図1にみられるように Fluoro-Goldを取り込む神経細胞は明瞭なる蛍光像を呈し、標識細胞外への Fluoro-Goldの拡散はみられなかった。さらに樹状突起にまで良く取り込まれ、細部にわたり観察されるなど、神経細胞の形態を把握することが出来た。

2. WGA-HRP 注入実験

左内直筋への5% WGA-HRPの注入実験で、対側すなわち右外転神経核に HRP 反応陽性細胞が観察され(図2)、これらは外転神経 internuclear neuronとみなされた。右外転神経核に観察された HRP 反応陽性細胞は motor neuronと同じく、外転神経核の物側から尾側に至るまで観察され、やや尾側に多くみられる傾向にあった。

3. 二重標識実験

右外直筋への4% Fluoro-Goldおよび左内直筋への5% WGA-HRPの注入実験で、右外転神経核に先に行なった対象実験と同一結果を認めることが出来た。すなわち、蛍光照明下での観察では右外転神経核に Fluoro-Goldを取り込む神経細胞を認め(図3a)、暗視野照明下にて観察すると HRP 反応陽性細胞を認めた(図3b)。これら2種の神経細胞群は外転神経核の物側より尾側に両者分布していた。しかし、Fluoro-Goldを取り込む神経細胞、すなわち、motor neuronとみなされる神経細胞の方が核内に広く分布し、HRP 反応陽性細胞、すなわち、internuclear neuronとみなされる神経細胞も核内に分布はしていたが、顔面神経膝に近い背側に多く分布する傾向がみられた(図4)。なお、図3bで HRP 反応を呈さない神経細胞(矢印)は図3aで示す蛍光照明下にて認める Fluoro-Goldを取り込む神経細胞に一致し、外転神経核内の神経細胞には Fluoro-Goldと HRP 顆粒の両者を取り込む神経細胞は今回の研究からは認めることは出来なかった。

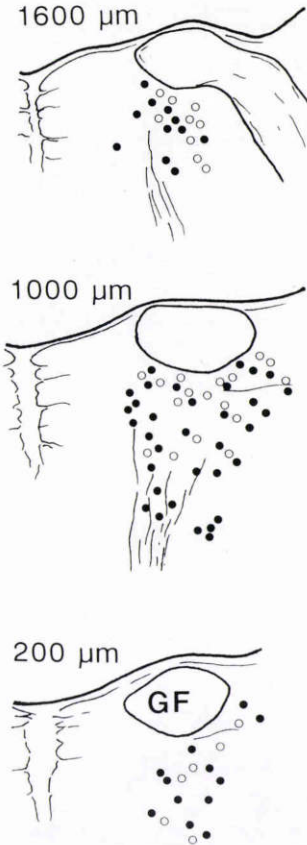


図4 Fluoro-GoldとWGA-HRPの同時注入例で、外転神経核尾側から200、1000および1600 μ mの高さでの局在を示す。●印がFluoro-Goldを取り込む神経細胞であり、○印がHRP反応陽性細胞を示す。GF：顔面神経膝。

IV 考 按

本研究で用いた Fluoro-Gold は1986年 Schmued らにより紹介された蛍光色素剤¹⁹⁾、330~400nmの波長の紫外線により蛍光を発する物質である。本実験に先だって行なった対象実験で Fluoro-Gold は逆行性軸索輸送され、軸索、神経細胞体に取り込まれ、蛍光照明下に黄白色の輝きとして認められた(図1)。とくに神経細胞体では樹状突起にまでそれを確認することが出来、形態を知る上においては有用な実験手段であることが確認された。一方、WGA-HRP は1985年 Porter らによりシナプスを起え、軸索輸送されることが証明されている²⁰⁾。本邦においても岡村・尾崎らが外眼筋への WGA-HRP の注入実験でこの事実を確認して

いる²¹⁾。

今回、外転神経核を構成する motor neuron と internuclear neuron の 2 種の神経細胞の支配形態について、Fluoro-Gold と WGA-HRP の両者を同時に用いる二重標識法を応用して検討を加えてみた。その結果、外転神経核に Fluoro-Gold を取り込む神経細胞と HRP 反応陽性細胞を認めることが出来た。ところで、WGA-HRP を内直筋注入後、対側外転神経核に HRP 反応陽性細胞が観察されたことは、外転神経核と対側内直筋との間に直接線維連絡がないことより、動眼神経核を介してシナプス起え逆行性軸索輸送され、外転神経核に取り込まれた結果だと推察される。しかし、Fluoro-Gold と HRP 顆粒の両者を取り込む神経細胞は確認することは出来なかった。このことは外転神経核内の個々の神経細胞は二重支配をせず、それぞれ同側の外直筋もしくは対側の動眼神経核と連絡するのみの単一支配神経細胞であるとみなされた。

ところで、外転神経核の motor neuron と internuclear neuron の 2 種の神経細胞に関しては、神経解剖学的面では細胞の大きさ²¹⁾⁴⁾や、含 acetylcholinesterase 細胞¹⁷⁾などでの違いから区別がされている。また、電気生理学的研究では神経細胞の刺激実験からも両者は区別されてはいるが^{11)~13)}、支配形態については、Steiger ら¹⁸⁾や Cabrera ら⁸⁾の報告をみるにすぎない。近年、種々の標識物質が知られ、異なった標識物質を同時に使用する二重標識も行なわれるようになっており、彼らもこの手法を用いたものである。すなわち、Steiger らはネコを用い、Evans blue を動眼神経核に、HRP を外直筋に同時に注入する実験を行なっているが、外転神経核に二重標識細胞を見出しはしていない¹⁸⁾。また、Cabrera らはラットを用い、Fluoro-Gold, true blue の蛍光色素剤を標識物質として、外直筋に true blue, 対側動眼神経核に Fluoro-Gold を注入する二重標識法から同様に外転神経核には二重支配細胞がないことを報告している⁸⁾。今回、動眼神経核への限局した注入手段をとらず、内直筋に WGA-HRP を注入し、シナプス起えで対側外転神経核 internuclear neuron を確認する方法を用いたネコでの研究でも二重に標識され神経細胞を認めることは出来なかった。なお、標本中には外転神経核群の全ての神経細胞が異なる 2 種の標識物質のうちのいずれかを有していたわけではなく、それらのいずれも認められない神経細胞も観察されたが、これは不完全な取り込みによるものと思われた。

以上述べてきたごとく神経解剖学的知見では外転神経核を構成する motor neuron と internuclear neuron には二重支配細胞はないが、今回の二重標識法によっても、それらの 2 種の神経細胞は独立の単一支配神経細胞であると結論するのが妥当と考えられた。

稿を終えるにあたり、御校閲いただきました大野新治教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Graybiel AM, Hartwig EA: Some afferent connections of the oculomotor complex in the cat: An experimental study with tracer techniques. *Brain Res* 81: 543-551, 1974.
- 2) Leigh RJ, Zee DS: Synthesis of the versional eye movement command: The Neurology of Eye Movements. Philadelphia, FA Davis Company, 93-95, 1985.
- 3) Büttner-Ennever JA, Akert K: Medial rectus subgroups of the oculomotor nucleus and their abducens internuclear input in the monkey. *J Comp Neurol* 197: 17-27, 1981.
- 4) Graybiel AM: Organization of oculomotor pathways in the cat and rhesus monkey, in Baker R, Berthoz A (eds): Control of Gaze by Brain Stem Neurons. New York, Elsevier, 79-88, 1977.
- 5) Maciewicz RJ, Spencer RF: Oculomotor and abducens internuclear pathways in the cat, in Baker R, Berthoz A (eds): Control of Gaze by Brain Stem Neurons. New York, Elsevier, 99-108, 1977.
- 6) Langer T, Kaneko CRS, Scudder CA, et al: Afferents to the abducens nucleus in the monkey and cat. *J Comp Neurol* 245: 379-400, 1986.
- 7) Labandeira-Garcia JL, Guerra-Seijas MJ, Segade LAG, et al: Identification of abducens motoneurons, accessory abducens motoneurons, and abducens internuclear neurons in the chick by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 259: 140-149, 1987.
- 8) Cabrera B, Portillo F, Pásaro R, et al: Location of motoneurons and internuclear neurons within the rat abducens nucleus by means of horseradish peroxidase and fluorescent double labeling. *Neurosci Lett* 87: 1-6, 1988.
- 9) Labandeira-Garcia JL, Segade GLA, Suarez Nuñez JM: Localization of motoneurons supplying the extraocular muscles of the rat using horseradish peroxidase and fluorescent double labelling. *J Anat* 137: 247-261, 1983.
- 10) McCrea RA, Strassman A, Highstein SM:

- Morphology and physiology of abducens motoneurons and internuclear neurons intracellularly injected with horseradish peroxidase in alert squirrel monkeys. *J Comp Neurol* 243: 291-308, 1986.
- 11) **Highstein SM, Maekawa K, Steinacker A**, et al: Synaptic input from the pontine nuclei to abducens motoneurons and internuclear neurons in the cat. *Brain Res* 112: 162-167, 1976.
 - 12) **Highstein SM, Baker R**: Physiological identification of interneurons and motoneurons in the abducens nucleus. *Brain Res* 91: 292-298, 1975.
 - 13) **Highstein SM, Baker R**: Excitatory termination of abducens internuclear neurons on medial rectus motoneurons: Relationship to syndrome of internuclear ophthalmoplegia. *J Neurophysiol* 41: 1647-1661, 1978.
 - 14) **皆良田研介**: 外転神経核と動眼神経核との線維連絡について. *神経眼科* 1: 41-46, 1984.
 - 15) **Kairada K**: Distribution of motor and internuclear neurons in abducens nucleus of the cat. *Jpn J Ophthalmol* 29: 453-459, 1985.
 - 16) **Kairada K**: Afferent and efferent connections of the cat abducens nucleus: A study by injection of wheat germ agglutinin conjugated with horseradish peroxidase. *Jpn J Ophthalmol* 30: 216-227, 1986.
 - 17) **Spencer RF**: Differential localization of acetylcholinesterase in cat abducens motoneurons and internuclear neurons. *Soc Neurosci Abstr* 6: 16, 1980.
 - 18) **Steiger HJ, Büttner-Ennever J**: Relationship between motoneurons and internuclear neurons in the abducens nucleus: A double retrograde tracer study in the cat. *Brain Res* 148: 181-188, 1978.
 - 19) **Schmued JS, Fallon JH**: Fluoro-Gold: A new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res* 377: 147-154, 1986.
 - 20) **Porter JD, Guthrie BL, Sparks DL**: Selective retrograde transneuronal transport of wheat germ agglutinin-conjugated horseradish peroxidase in the oculomotor system. *Exp Brain Res* 57: 411-416, 1985.
 - 21) **岡村良一, 尾崎峯生**: WGA-HRP の逆行性ニューロン起え標識による動眼神経核上機構の神経解剖学的研究. 昭和62年度環境庁公害防止等調査研究委託費による報告書, 78-79.
 - 22) **Mesulam MM**: Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurochemistry: A non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualising neural afferents and efferents. *J Histochem Cytochem* 26: 106-117, 1978.
 - 23) **Mesulam MM, Rosene DL**: Differential sensitivity between blue and brown procedures for HRP neurohistochemistry. *Neurosci Lett* 5: 7-14, 1977.
 - 24) **Fujii M, Kusama T**: Fixation of horseradish peroxidase reaction products with ammonium molybdate. *Neurosci Res* 1: 153-156, 1984.