

# 発育期のラット大脳皮質視覚野に投射する セロトニンニューロンの局在

—二重標識法による検討—

黄 亭然\*, 前田 敏博\*\*, 中澤みどり\*, 可児 一孝\*

\*滋賀医科大学眼科学教室, \*\*滋賀医科大学第一解剖学教室

## 要 約

ラット大脳皮質視覚野におけるセロトニン入力の後発育において、我々は、ラット視覚野皮質にセロトニン免疫陽性構造の集積が、生後7日より14日までみられ、以後消失することを見出した。この一過性セロトニン終末集積が視覚野の発達、形成にどのような意義を有するかを検討しているが、今回は、視覚野へ早期に投射するこのセロトニン線維の起始細胞の局在を、逆行性標識物質である WGA-apoHRP-Au と免疫組織化学法を用いた二重標識法によって検索した。視覚野皮質に注入した WGA-apoHRP-Au を逆行性に取込み、金コロイドで標識された細胞は、外側膝状体、縫線核、青斑核にみられた。セロトニン免疫陽性の細胞体は縫線核群およびその周辺に広く存在するが、そのうち、金コロイドで標識されたセロトニン細胞体は比較的少数であり、吻側では中脳の正中縫線核に存在し、尾側にいくにしたがって、背側縫線核の最腹部に主に存在した。(日眼会誌 95:249-253, 1991)

キーワード：セロトニン、視覚野皮質、縫線核、WGA-apoHRP-金コロイド、二重標識法

## A Double-labeling Study of Serotonin Neurons that Project to the Visual Cortex of Developing Rat Brain

Teizen Koh\*, Toshihiro Maeda\*\*, Midori Nakazawa\* and Kazutaka Kani\*

\*Department of Ophthalmology, Shiga University of Medical Science

\*\*Department of Anatomy, Shiga University of Medical Science

### Abstract

Immunohistochemical studies of developing rat brains revealed aggregation of serotonin terminal fibers in the visual cortex at from 7 to 14 postnatal days. This aggregation is transient, disappearing 2 weeks after birth. The cells of origin of these serotonin terminals were investigated using double-labeling with retrogradely transported WGA-apoHRP-Au and serotonin immunohistochemistry. WGA-apoHRP-Au was injected into the rat visual cortex on the 9th day after birth. The rats were allowed to survive for 2 days and sacrificed with perfusion. Cryostat sections of the brain were processed with silver-enhancement to develop the retrogradely transported WGA-apoHRP-Au, and then serotonin immunohistochemistry was performed. Double-labeled cells that were labeled with WGA-apoHRP-Au and serotonin-immunoreactive were found mostly in the raphe medianus and raphe

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 黄 亭然

(平成2年7月20日受付、平成2年8月16日改訂受理)

Reprint requests to: Teizen Koh, M.D. Department of Ophthalmology, Shiga University of Medical Science Tsukinowa-cho, Seta, Ohtsu 520-21, Japan

(Received July 20, 1990 and accepted in revised form August 16, 1990)

dorsalis in rostral and caudal sections of the mesencephalon, respectively. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 249-253, 1991)

**Key words:** Serotonin, Visual cortex, Raphe nuclei, WGA-apoHRP-Au, Double-labeling

## I 緒 言

神経機構の発達、形成に脳内モノアミンが密接に関与していることを示唆する数多くの報告があり<sup>1)</sup>、脳の発育にとってアミンニューロンが重要な意義をもつであろうことは永く考えられてきた。セロトニンニューロンもまた、脳の発育に密接な関係があるのではないかと考えられているが<sup>2)~6)</sup>、セロトニンニューロンと視覚の発達についての関係についてはいまだ知られていない。最近の免疫組織化学の発達によって、中枢神経系に分布するセロトニンニューロンの全貌を可視化できるようになった。我々は近年、ラット大脳皮質視覚野におけるセロトニン入力の生後発育を研究し、ラット視覚野皮質(将来の第IV層)に、セロトニン免疫陽性構造の集積が、生後7日より14日までみられ、以後消失することを見出した(図1a)<sup>7)</sup>。この一過性セロトニン終末集積が視覚野の発達、形成にどのような意義を有するかを検討しているが、今回は、視覚野へ早期に投射するこのセロトニン繊維の起始細胞の局在を、逆行性標識物質である wheat germ agglutinin(以下WGAと略す)-apoHRP-金コロイドと免疫組織化学法を用いた二重標識法によって検索したので報告する。

## II 実験方法および材料

Wistar系ラットを用い、視覚野皮質のセロトニン免疫陽性終末集積(図1a)が顕在化する生後9日の大脳皮質視覚野に、逆行性標識物質としてWGA-apoHRP-金コロイドを0.2~0.3 $\mu$ l注入した。この操作は、ネブタール麻酔下に、大脳皮質視覚野に対応する部分の頭蓋に骨窓をあけ大脳皮質視覚野を露出し、脳定位手術装置を用いて行った。WGA-apoHRP-金コロイドの注入部位は、ラット大脳皮質17野の中心部で第4層の深さとした(図1b)。また、WGA-apoHRP-金コロイドは皮質表層からも浸潤し、図2のようにその範囲は、大脳皮質視覚野内の直径2mmに及んだ。約48時間の生存期間の後、4%パラホルムアルデヒド(FA)、0.5%グルタルアルデヒド(GLU)、0.2%ピクリン酸(PA)を含むリン酸緩衝液(pH 7.4)で左心室より灌流固定

の後、取り出した脳を上記灌流液よりグルタルアルデヒドを除く溶液に2日間浸漬固定した。その後、15%ショ糖溶液に4~5日間浸し、外側膝状体、縫線核を含む間脳、中脳、橋の垂直、凍結切片(厚さ40 $\mu$ m)を作成した。切片を生理的現象液(1Mクエン酸緩衝液、50%アラビアゴム、5.6%ヒドロキノン、0.7%乳酸銀)を用いて現像し、25%チオ硫酸ナトリウムで定着することにより、視覚野から逆行性に金コロイドを取込んだ細胞体を銀で標識した(silver enhancement)。さらにその切片を0.3%トリトンXを含む0.1%リン酸緩衝液で洗浄し、ABC法(avidin-biotin-peroxidase complex method)にてセロトニン免疫染色を施した。これによって、視覚野に注入した金コロイドを逆行性に取込んだセロトニンニューロンの局在を検索した。

## III 結 果

視覚野皮質に注入したWGA-apoHRP-金コロイドを逆行性に取込み、金コロイドで標識された細胞は、外側膝状体(図3)、縫線核、青斑核にみられた。セロトニン免疫陽性の細胞体は縫線核群およびその周辺に広く存在するが(図4a)、そのうち、金コロイドで標識されたセロトニン細胞体(図4b)は吻側では中脳の正中縫線核に存在し、尾側にいくにしたがって、背側縫線核の最腹部に多く存在した。橋のセロトニン免疫陽性細胞群には金コロイドで標識されたものは認められなかった。生後11日における金コロイド標識セロトニン免疫陽性細胞体の存在部位を模式的に図5に示してある。

## IV 考 按

アミンニューロンが非常に未熟な大脳皮質に線維を送る事実は、皮質発達になんらかの影響をもつことを強く暗示している<sup>1)~6)</sup>。大脳皮質視覚野ニューロンの光反応性は、生後発達の時期における視覚体験によって可塑的に変化する事実はよく知られている。脳幹の青斑核に由来するノルアドレナリン性線維は、大脳皮質に広く分布するが、笠松ら<sup>8)</sup>は、このノルアドレナリン投射系が視覚野皮質の可塑性発現を調節していると主張してきた。一方、アセチルコリン投射系とノルア

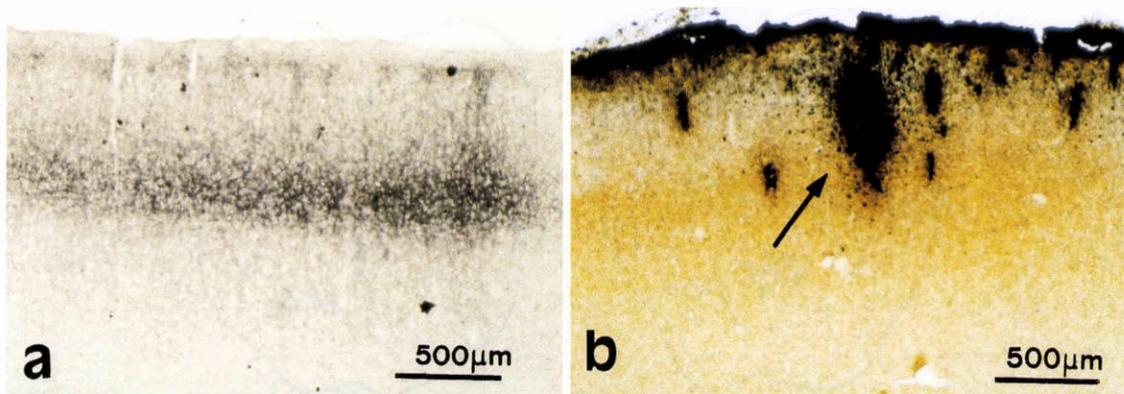


図1 ラット大脳皮質視覚野：セロトニン免疫陽性構造の集積が生後7日より14日までみられる(a)，その部にWGA-apoHRP-金コロイドを注入した(b)。(セロトニン免疫組織化学法(a)，およびsilver-enhancement(b)，×26倍)

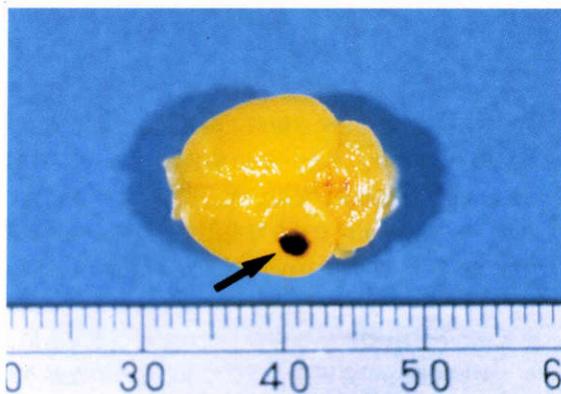


図2

大脳皮質視覚野にWGA-apoHRP-金コロイドを注入した(←)。

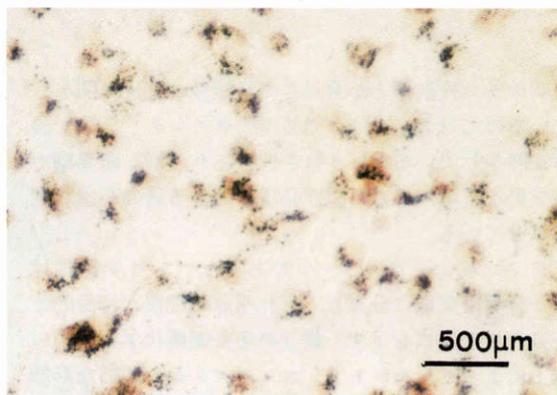
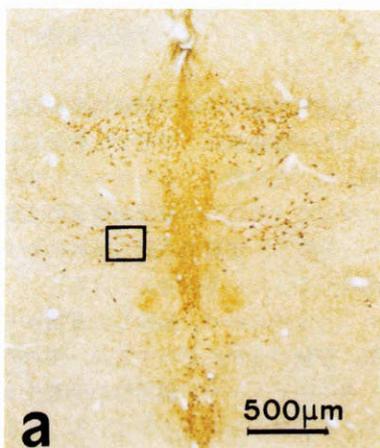
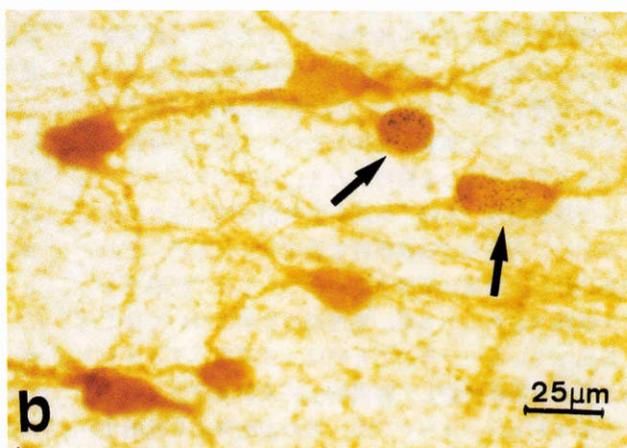


図3

外側膝状体，WGA-apoHRP-金コロイドを視覚野皮質から逆行性に取り込んだ細胞が多数みられる。(Neutral Red染色，×400倍)



a



b

図4 (a)セロトニン細胞体の存在する縫線核群。(DR：背側縫線核，MnR：正中縫線核)(b)□部分の強拡大，金コロイドを取込んだセロトニン細胞体(←)を示す。(silver-enhancement およびセロトニン免疫組織化学法，(a)×20倍，(b)×400倍)

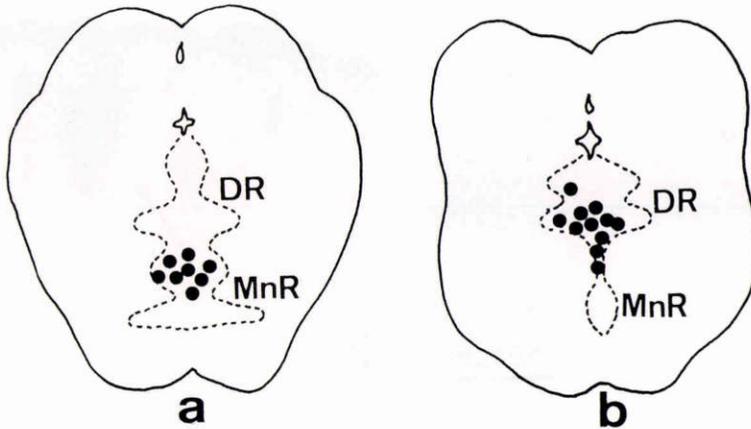


図5 金コロイドを取込んだセロトニン細胞体は吻側では MnR に存在し(a), 尾側では DR の最腹部に主に存在した (b).

ドレナリン投射系とが共同して可塑性の発現に参与しているのではないかとする報告<sup>9)</sup>やグルタミン酸受容体が関与しているという報告<sup>10)</sup>もあり, 最近, 臨界期の視覚野皮質における可塑性発現に関する研究が急展開をみせている。

アミンニューロンの一つであるセロトニン線維は脳, 脊髄の全域に分布し, それぞれの領域に特徴的な配列や終末様式を示す。最近の免疫組織化学の技術の向上によって, セロトニンニューロン系の詳細な形態学的研究ができるようになり, 先に我々は, 発達過程におけるラット大脳皮質視覚野の, とくに第四層形成に一致して, 一過性のセロトニンニューロンの集中的投射が起こることを見出した。成熟ラットではセロトニン線維の分布はびまん的であり, このような終末集積はみられず, また, 第四層は外側膝状体からの入力をうける層であることから, この集積現象は, “セロトニンニューロンと視覚の発達” について新しい手掛りを与えてくれるものと期待される。セロトニンニューロンの細胞体は, 中脳下半部から延髄下端の高さに広く存在し, それらは縫線核群を形成しているが, どの細胞体がどの領域に投射するかについては, 成熟ラットでは調べられているが, 発達期の投射についてはよくわかっていない。そこで今回は, 幼若期のラット大脳皮質視覚野に投射し, 特異的な終末集積をつくっているセロトニンニューロンが, どの細胞群より起始するのかを検討したものである。

ここで用いた WGA-apoHRP-金コロイドは, Basbaum ら<sup>11)</sup>が, 逆行性の標識物質として新しく紹介し

たものであり, 従来の蛍光色素や HRP に比べ, 注入範囲が広がらず目的とする領域に局限するという点で非常に優れており, また, その染色法において DAB (Diamino-benzidine) を用いず, 現像により逆行性に取り込まれた金コロイドを可視化するので, 免疫組織化学法など PAP 法 (peroxidase-antiperoxidase method) あるいは ABC 法を用いる染色法との二重標識も一つの切片で可能である。これを用いることにより, 中枢神経系の各領域について求心性のつながりがどのようにになっているのか, ニューロンの化学的性格とともに検索することができる。この実験において, 注入した WGA-apoHRP-金コロイドは, 視覚野皮質 (17野) に局限し (図2), 発達期のラット視覚野皮質に投射しているセロトニンニューロンの起始細胞の局在が明らかとなった。

視覚野に投射する起始細胞は中脳の縫線核群に存在し, しかも吻側では正中縫線核に, 尾側では背側縫線核の最腹部に存在した。その数は, 全セロトニン細胞数に比べ, 非常に少なく, これらの細胞が視覚野皮質まで軸索を伸ばし, 分岐し, 皮質発達期に特異的なセロトニン終末集積をつくっていると考えられる。

一般にセロトニンニューロンは, 起始した直後から激しく分岐し, 脳, 脊髄の全域に分布するが, その形態学的特徴から, 多くのニューロン鎖活動の調節をおこなう調節神経系として働くと考えられている。すなわち, ノルアドレナリンニューロン系などとともに, mass control system として幅広く神経活動に参加し, 調節をおこなっているものである。

視覚野へ投射し、幼若期に終末集積をつくるセロトニンニューロンもまた、視覚の発達、形成に関してなんらかの調節を行っていると考えられる。今回の実験において、二重標識法によって検索したセロトニン細胞体が、幼若期ラット視覚野皮質にセロトニン免疫陽性の終末集積を形成していることが明らかとなったが、はたしてこのニューロンが幼若期に特異的であり後に消失するものであるのか、あるいは、終末のみの変化であるのか、また、このセロトニンニューロンが、視覚の発達、形成にどのような意義をもつのか、今後の課題である。

本論文の要旨は、第94回日本眼科学会にて発表した。

#### 文 献

- 1) 前田敏博：アミンニューロンと神経発生。病理と臨床 3: 948—954, 1985.
- 2) Fujimiya M, Kimura H, Maeda T: Postnatal development of serotonin nerve fibers in the somatosensory cortex of mice studied by immunohistochemistry. J Comp Neur 246: 191—201, 1986.
- 3) Blue ME, Molliver ME: Postnatal development of the serotonergic innervation of cerebral neocortex in the rat. Soc Neurosci Abstr 11: 1128, 1985.
- 4) Moore RY, Haris AE, Jones BE: Serotonin neurons of the midbrain raphe: Ascending projections. J Comp Neurol 180: 417—438, 1978.
- 5) Lindov HGW, Molliver ME: An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: Ascending pathways and terminal fields. Brain Res Bull 8: 389—430, 1982.
- 6) Lindov HGW, Molliver ME: Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. Brain Res Bull 9: 559—604, 1982.
- 7) 中澤みどり：ラット大脳皮質視覚野におけるセロトニン神経線維の生後発達と視覚入力。日眼, 第93回講演抄録集, 151, 1989.
- 8) Kasamatu T: Prog Psychobiol Physiol Psychol 10: 1—112, 1983.
- 9) Singer W: In: The neuroscience: Fourth Study Program. Schmitt FO, Worden FG: The MIT Press, 1903—1110, 1979.
- 10) 津本忠治：大脳皮質視覚野の可塑性—グルタミン酸受容体の関与。神眼 5: 57—59, 1988.
- 11) Basbaum AI, Menetrey D: Wheat germ agglutinin-apoHRP-Gold: a new retrogradetracer for light-and electron-microscopic single-and double-label studies. J Comp Neurol 261: 306—318, 1987.