

チャイニーズハムスター網膜における神経節細胞の細胞体の 大きさ及び数に関する研究

土井 素明

三重大学医学部眼科学教室・第二解剖学教室

要 約

チャイニーズハムスター (*Cricetulus griseus*) の視神経に西洋ワサビペルオキシダーゼを注入して網膜の神経節細胞のみを染色し、視神経細胞層におけるそれらの細胞体の大きさ及び数を測定した。1眼あたりの細胞数は67,636~79,545個(平均73,575個, n=3)であった。細胞の密度は網膜後極部で周辺部におけるよりも高い傾向がみられ、とくに視神経乳頭のやや耳側で最も高かった。細胞体の大きさは直径6~28 μm (平均13.0 μm , n=500)であり、網膜後極部には周辺部におけるよりも小さい細胞が多い傾向にあった。(日眼会誌 95: 738-745, 1991)

キーワード: 網膜神経節細胞, 大きさ, 数, 西洋ワサビペルオキシダーゼ, チャイニーズハムスター

The Number and Soma Size of Retinal Ganglion Cells in Chinese Hamsters

Motoaki Doi

Departments of Ophthalmology and Second Anatomy, Mie University School of Medicine

Abstract

The number and somatic size of retinal ganglion cells in Chinese hamsters were examined by means of the horseradish peroxidase (HRP) staining method. The HRP staining is a method by which only the retinal ganglion cells can be stained. The number of ganglion cells per eye was 67,636~79,545 (mean: 73,575, n=3). There was a tendency for the density of retinal ganglion cells to be larger in the central than in the peripheral retina. The diameter of retinal ganglion cells was 6~28 μm (mean: 13.0 μm , n=500) and there was a tendency for the number of small cells to be larger in the central than in the peripheral retina. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 95: 738-745, 1991)

Key words: Retinal ganglion cells, Size, Number, Horseradish peroxidase (HRP), Chinese hamster

I 緒 言

ラット, マウス, ゴールデンハムスターなど齧歯類の網膜の神経節細胞(視神経細胞, 網膜の多極神経細胞)

の大きさや数に関する研究は、いくつか行われている^{1)~5)}。しかし、これらの種と同様に実験動物として繁用されている齧歯類であるチャイニーズハムスター(*Cricetulus griseus*)では、そのような研究は行われ

別刷請求先: 514 津市江戸橋2-174 三重大学医学部眼科学教室 土井 素明
(平成2年10月19日受付, 平成3年1月19日改訂受理)

Reprint requests to: Motoaki Doi, M.D. Department of Ophthalmology, Mie University School of Medicine, 2-174 Edobashi, Tsu 514, Japan

(Received October 19, 1990 and accepted in revised form January 19, 1991)

ていない。最近、さまざまな齧歯類網膜の神経細胞層に多くのアマクリン細胞が存在するといわれており⁴⁾⁶⁾、従来のメチレンブルー染色やニッスル染色による方法³⁾⁵⁾⁶⁾では神経節細胞のみを観察しているという確証がない。そのため近年、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を眼球外の視神経に注入し、その逆行性軸索輸送により選択的に神経節細胞の細胞体及び樹状突起を標識して調べる方法が用いられている¹⁾³⁾⁴⁾⁶⁾。そこで、著者もこの方法でチャイニーズハムスターの網膜神経節細胞の細胞体の大きさ及び数を調べた。また、本研究で得られた所見と報告されている他の齧歯類のそれとの比較を行った。

II 実験方法

外見上異常を認めない3～6カ月齢、体重30～40gのチャイニーズハムスター10匹20眼を使用した。麻酔薬として0.5%ペントバルビタールナトリウム注射液0.5mlを腹腔内に注射し、深部反射の消失を確認した後、実体顕微鏡下で上方の結膜を角膜輪部で約180度切開し、上直筋と上斜筋を切断して眼球を下方に押し下げ、直視下に視神経を捉えた。視神経周囲の結合組織を除去した後、マイクロシリンジ(HAMILTON社製)にガラスで作製したマイクロピペットを取りつけ、0.1M 磷酸緩衝液(pH 7.4)に溶解した50%HRP(SIGMA社製)と2%リソリンチンの混合液1 μ lを直接視神経に注入した。その後眼球をもとの位置に戻し、上下の眼瞼を絹糸で縫合した。予備実験としてHRPの注入後マウスを12, 24, 36, 48, 72, 96, 120または168時間生存させ検討したところ、細胞体及び樹状突起の染色には共に48時間が適当であり、それ以外の生存時間では細胞の変性消失が起こったり、HRP反応による染色が不十分であったりした。そこで、HRPを注入してから48時間後に再び動物を麻酔し、心臓より還流固定を行った。固定液として10%ホルマリン(0.9%塩化ナトリウム溶液で希釈)200mlを使用した。その後、標本の上方に切れ込みを入れて網膜神経層(以下網膜と記す)を丁寧に網膜色素上皮層から剥離した後、2.5%グルタルアルデヒド(0.1M 磷酸緩衝液に溶解、pH 7.4)に15分間浸した。0.1M 磷酸緩衝液(pH 7.4)で数回洗った後、切れ込みを入れたところを上にしてさらに数カ所切れ込みを加え、ゼラチンを塗布したスライドガラスの上におき、十分に硝子体を取り除いた後少し乾燥させて標本をスライドガラスに張りつけ、網膜の伸展標本を作製した。伸展標本はスライドガラス

ごと蒸留水で数回洗った後、網膜をHRP-TMB法⁷⁾にて染色した(図1)。HRP-DAB法⁸⁾(図2)も数眼試みたが、考按で述べるような理由により、本実験ではTMB法で染色された網膜を観察に供した。

細胞体が網膜の全体にわたり均一に、しかも数多く染まっている5眼(標本1～5)を選び、脱水前に乾燥を防ぎながら網膜及び細胞の計測を行った。網膜の面積の計測は、伸展標本の上に透明な方眼紙を置き、1mm²の升目の網膜上における数をかぞえることにより行った。細胞体の直径は、顕微鏡下でマイクロメーターを用いて計測し、縦と横の長さの違う細胞体では、両者の平均値をその細胞の大きさを表す数値とした。その後、HRP-TMB反応産物の脱色の防止、長期間の保存及び、汚染防止を目的として、標本を5%モリブデン酸アンモニウムに15分間浸した。ついで、アルコール、キシレン系列で脱水し、エンテランニュー®で封入した。細胞の数は、封入後顕微鏡下でかぞえた。

III 結果

伸展標本の弱拡大の写真を図3に示した。網膜の面積の計測値は $38 \pm 4 \text{mm}^2$ (n=5)であった。次に、その中から神経節細胞の染色(HRP反応陽性)細胞数の多い標本を3枚(標本1～3)を選び、神経節細胞の数をかぞえたところ、標本1では73,544個、標本2では79,545個、標本3では67,636個であり、平均73,575個であった。標本2及び標本3の網膜上に0.2mm²の面積を有する領域をそれぞれ図4a及び図4bのように無作為に11ないし23カ所を選び、それぞれの部域内におけるHRP反応陽性細胞の数を調べた。さらに標本1について、面積0.02mm²の部域内に存在する神経節細胞数を網膜全域にわたって多くの場所で調べた(図4c)。その結果、細胞の密度は、後極部で高く、周辺部で低い傾向があり、また視神経乳頭よりやや耳側の領域において最も高かった。

標本1におけるHRP反応陽性細胞73,544個の中から無作為に抽出された795個について細胞体の直径を計測し、その結果をヒストグラムで表した(図5a)。細胞体の直径は6～27 μm の範囲内に分布しており、その平均値は12.8 μm であった。さらに上記3枚の網膜伸展標本(標本1～3)に2枚の標本(標本4, 5)を加えた5枚の標本から、無作為に抽出された500個のHRP反応陽性細胞の細胞体の直径を計測したところ、直径の最小値(6 μm)、最大値(28 μm)、平均値(13.0 μm)及びヒストグラム(図5b)のいずれも標本1の場

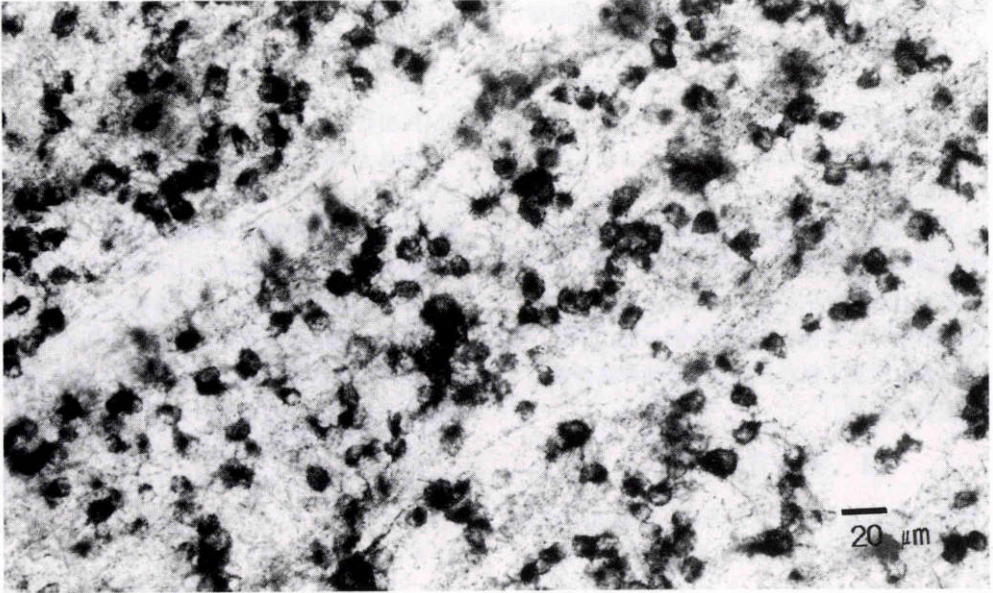


図1 HRP-TMB 染色によるチャイニーズハムスター網膜の伸展標本での神経節細胞写真 (×300).

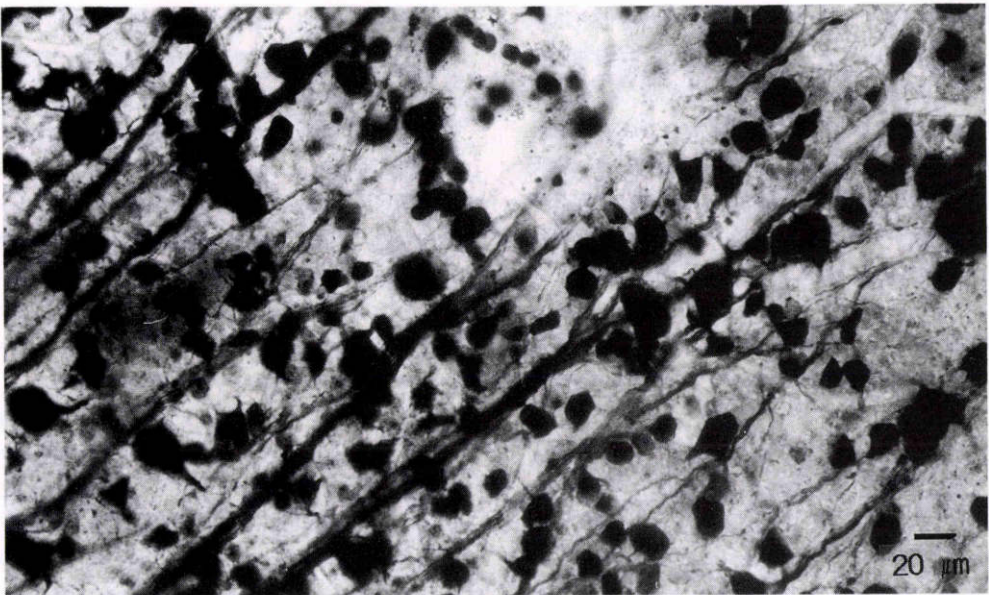


図2 HRP-DAB 染色によるチャイニーズハムスター網膜の伸展標本での神経節細胞写真, HRP-TMB 法に比べ, 細胞体の腫大が認められる (×300).

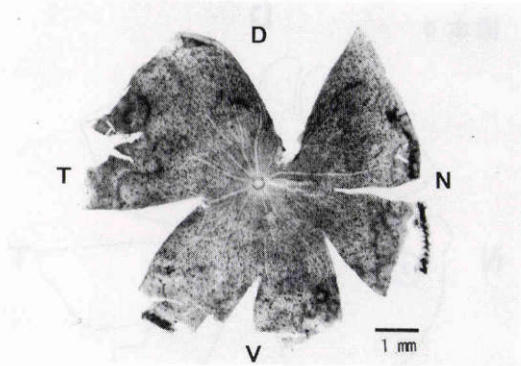
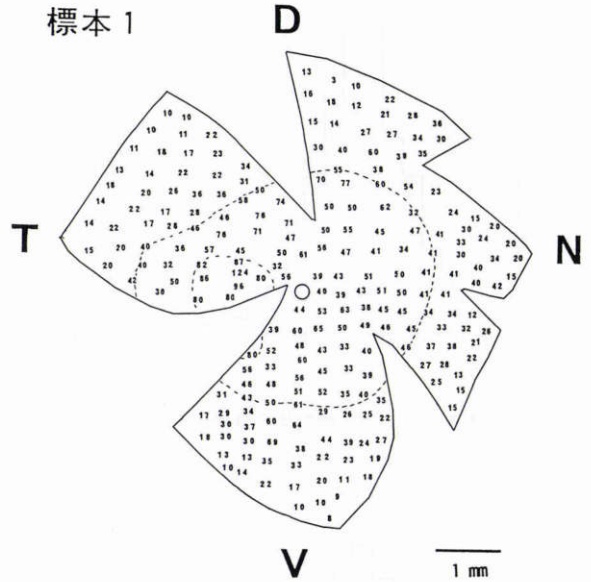
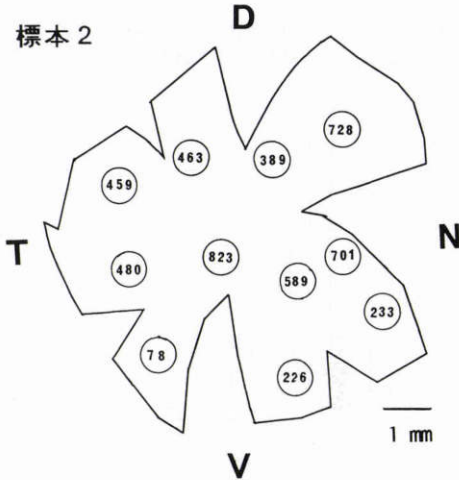


図3 チャイニーズハムスター網膜の伸展標本写真 (D: 背側, N: 鼻側, V: 腹側, T: 耳側, HRP-TMB染色, ×6).

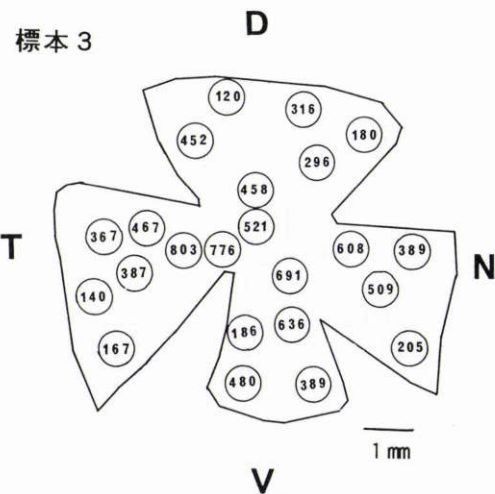


4c 標本1における0.02mm²あたりの細胞数。(外側の点線内: 2,000個/mm²以上, 内側の点線内: 4,000個/mm²以上)

図4 チャイニーズハムスター網膜での神経節細胞の単位面積あたりの細胞数, 細胞体の密度は視神経乳頭よりやや耳側の網膜上が最も高く周辺の網膜上は低い。



4a 標本2における0.2mm²あたりの細胞数。

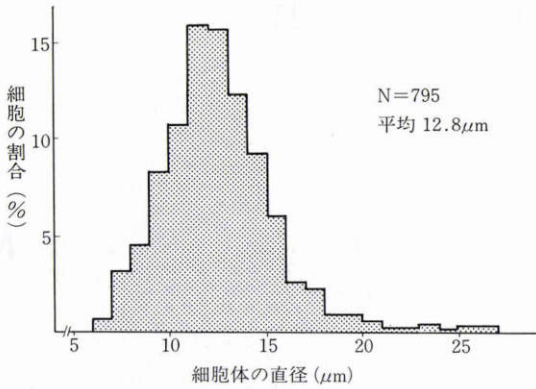


4b 標本3における0.2mm²あたりの細胞数。

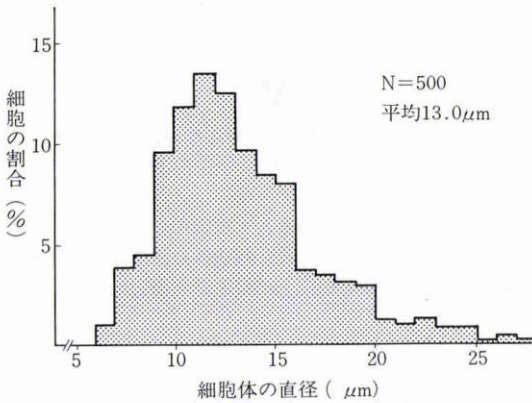
合ときわめて類似していた。標本4について、神経節細胞の細胞体の大きさを視神経乳頭周囲の網膜と周辺網膜との間で比較した(図6a)。視神経乳頭周囲の網膜①に存在する神経節細胞体は直径6~20 μ m, 平均10.8 μ mで、ヒストグラムで表すと図6bのようになった。一方周辺網膜②に存在する神経節細胞体は直径6~28 μ m, 平均14.0 μ mで、そのヒストグラムは図6cのようになった。網膜の周辺には視神経乳頭周囲に比べて、細胞体の大きい神経節細胞が多い傾向があった。

IV 考 按

齧歯類の網膜神経節細胞の大きさや分布の研究は、メチレンブルー染色⁵⁾やニッスル染色³⁾⁶⁾を用いる方法で行われていることも多いが、これらの方法では網膜の神経細胞層における神経節細胞とアマクリン細胞を完全に識別することは困難である。Drägerら⁴⁾はマウス網膜のニッスル染色を行い、神経細胞層に117,000個の細胞を認めているが、少なくとも47,000個(40%)は神経節細胞ではないとしている。同様に、Lindenら⁶⁾はゴールデンハムスターの神経細胞層に存在する



5a 標本1における細胞体の直径とその数の割合。



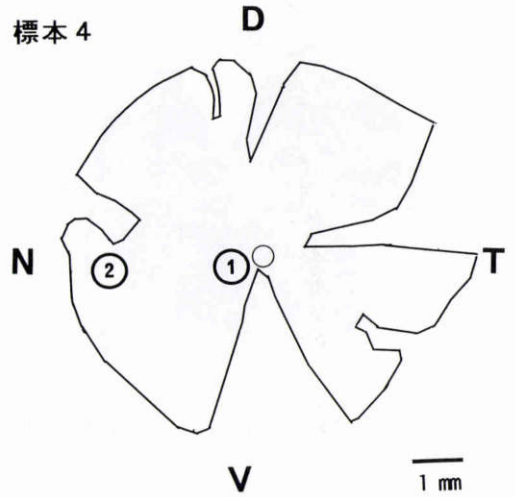
5b 標本1～5における細胞体の直径とその数の割合。標本1のみの結果(図5a)に類似している。

図5 チャイニーズハムスター網膜での神経節細胞の大きさ、各網膜ではほぼ同様な結果が得られた。

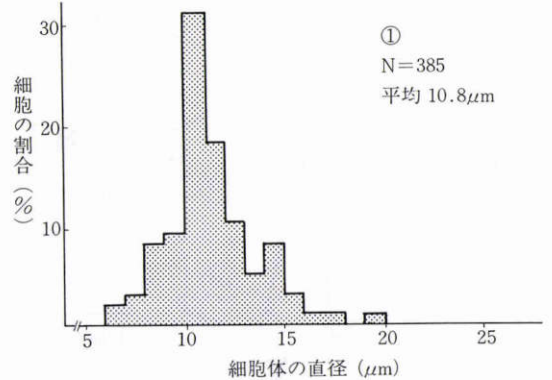
細胞のうち40%以上がアマクリン細胞であることを示している。HRPによる標識法は理論的に神経節細胞のみが観察の対象となりえる。

今回著者は、チャイニーズハムスターで、HRPの逆行性軸索輸送により網膜神経節細胞を標識し、その数、大きさ及び分布などを調べた。その際、神経節細胞の細胞体及び樹状突起がより多く、より鮮明に染まる(HRP反応が起こる)よう工夫したが、まずそれについて考察する。

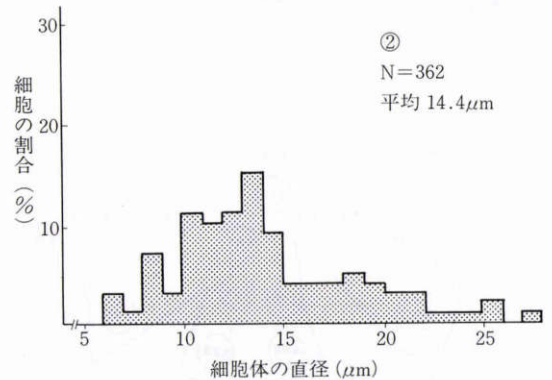
1. HRP法では、メチレンブルー法などに比べ標本作製に手間がかかり、染色ぐあいや標本により異なることが少なくない。きれいな標本を作製するためのポイントは、眼窩部の視神経へHRPを注入する際に血管をできるかぎり損傷しないように注意すること、網膜の固定を工夫すること、硝子体を十分に取り除くこ



6a 標本4における計測部位(①:視神経よりやや鼻側の網膜上, ②:鼻側周辺部網膜上)。



6b ①の部位における細胞体の直径とその数の割合。直径10～11μmの細胞が多く、大きい細胞は少ない。



6c ②の部位における細胞体の直径とその数の割合。①の部位よりも大きい細胞が多い。

図6 視神経の近くの網膜と周辺部網膜での細胞体の直径とその割合。

とであると思われた。一般に HRP 染色にはグルタールアルデヒド固定が適しているが、還流固定にこれを使用すると網膜と網膜色素上皮層を分離することが難しいので、本実験では10%ホルマリン溶液による還流固定後、眼球を2.5%グルタールアルデヒドで再固定した。また、還流固定を行うことにより赤血球などが洗い流され、HRP 反応による染色の際に神経節細胞以外の細胞が染まる危険性が少なくなる。標本作製過程で網膜及びその細胞の大きさに影響を及ぼすと考えられるものは、主に、固定、HRP 染色及び脱水である。網膜を固定後スライドガラスに固着させた場合、脱水による標本の長さの収縮率は5%以下と報告されている⁹⁾。しかし少しでも影響を少なくするために、網膜及び細胞の計測は脱水前に乾燥を防ぎながら行った。

2. この方法では、視神経に注入された HRP が視神経線維に取りこまれ、細胞体に達した細胞しか染まらないため、全ての神経節細胞が染まっているとはかぎらない。より多くの細胞を染めるためには、Arkin ら¹⁰⁾が行ったように、HRP 溶液にリソレンチンを加えて HRP の視神経線維への取り込みを増加させることが有益であると考えた。著者はまず Arkin らの方法¹⁰⁾をそのまま用いて、細胞体あるいは樹状突起を染めることを試みたがうまく行かず、とくに樹状突起に関しては不可能であった。その理由は、彼らを用いた変温動物(マッドバニー)と異なり、恒温動物であるマウスでは、Arkin ら¹⁰⁾のように HRP 注入後低体温で長期間生存させておくことができないからではないかと考えられた。チャイニーズハムスターにおける網膜神経節細胞の細胞体及び樹状突起の染色には48時間の生存期間が適当であったが、Mesulam¹¹⁾は、哺乳類での逆行性軸索輸送は84~113mm/日であること、および HRP 注入後の生存期間は24~72時間が適当かつ十分であって、5~7日を越えると HRP の活性が弱くなり十分に染まらないことを指摘している。HRP 法で哺乳類の神経節細胞の細胞体あるいは樹状突起の染色が行われている研究では、生存期間として48~72時間が多く¹³⁾⁴⁾⁶⁾¹²⁾¹⁶⁾、本研究における生存期間もこの範囲内にはいる。チャイニーズハムスターのような視神経の細い動物では、この神経への HRP の注入は容易でなく、注入時のマイクロピペットの先の位置の微妙な違いにより、多くの細胞体が染まっている標本や、染まっている細胞数は少なくとも樹状突起はよく染まっている標本が存在した。著者は、このような染まり方の違いは生存期間よりも HRP が視神経線維へ取り込

まれる量によると考えた。つまり、多くの視神経線維へ中等度に HRP が取り込まれれば、樹状突起までは染まらないが多くの細胞体が染まり、数や大きさを調べるのに適した標本が得られ、他方、特定の線維に多量の HRP が取り込まれれば少数の細胞で樹状突起がよく染まり、神経節細胞全体の形態の観察に適している。そこで、本研究では樹状突起は染まっていなくても細胞体が網膜の全域で均一に、しかも多く染まっている標本を5枚選んで観察した。いずれにしても、リソレンチンを用いた方が細胞体及び樹状突起の染まりがよく、この物質を使用しても、神経節細胞のみが標識され、血管を介してあるいは直接強膜を通しての HRP の網膜への浸潤は認められなかった。

3. HRP 反応により発色させる方法として HRP-DAB 法⁸⁾と HRP-TMB 法⁷⁾がよく使用されているが、どちらの方法も細胞体を腫大させるという報告がある³⁾¹⁰⁾。著者の経験でも DAB 法⁸⁾では細胞体のかなりの腫大が認められ、この方法は大きさを調べる研究には適さないと考えられた(図2)。さらに、TMB 法では細胞体の腫大が DAB 法によるよりも軽度であり、HRP に対する感受性が高いために染色される細胞の数が多かった。このような理由で、本実験では TMB 法を用いた。また、著者は本実験のまえに TMB 法での染色に用いる薬品の濃度や反応時間を変えて細胞体や樹状突起を染めてみたが、チャイニーズハムスターの場合は Mesulam⁷⁾の原法がよいようである。なお、HRP は細胞に取り込まれた後、細胞体及び樹状突起で顆粒として存在することが明らかにされており¹³⁾、TMB 法で染色した場合でも、細胞体及び樹状突起が点状あるいは斑状に染まりやすい傾向があるとも言われている¹³⁾。しかし、この研究で用いた方法は、細胞体の数及び大きさの観察以外にも標本を選べばチャイニーズハムスター網膜の神経節細胞の形態学的分類にも使用できると思われる。

今回行った研究の結果を、HRP 法ですで行われているラット¹²⁾、マウス³⁾⁴⁾及びゴールデンハムスター⁶⁾での研究結果と比較してみた。チャイニーズハムスター網膜の面積は、マウスのそれより広く、ゴールデンハムスターやラットと比べると小さい。神経節細胞の数はチャイニーズハムスターでは67,636~79,545個(今回の観察結果)、ラットでは113,000個²⁾、ゴールデンハムスターでは61,525~92,500個⁶⁾、マウスでは39,000~65,000個³⁾と網膜の広い動物ほど多い傾向がある。また、チャイニ

ズハムスターでは視神経乳頭に近い網膜において細胞の密度が高かった。とくに、視神経乳頭のやや耳側でもっとも高く、周辺に至るに従って低くなった。ラット¹⁾、マウス³⁾及びゴールデンハムスター⁶⁾でも同じ傾向が認められている。細胞体の大きさに関して、ラットでは直径が6~34 μm にわたってばらついており(平均12 μm)、9~13 μm の細胞が最も多い¹²⁾。マウスでは直径がほぼ7~28 μm の範囲内において平均12 μm 、その最頻値(最も多く存在した細胞の直径)は10 μm であり³⁾、ゴールデンハムスター⁶⁾では、直径が6~20 μm にわたってばらついており、10~11 μm の細胞が最も多いと報告されている。今回著者が調べたチャイニーズハムスターでは、直径は6~28 μm の範囲内において平均13 μm 、その最頻値は11~12 μm であった(図5)ことを考慮すると、ゴールデンハムスター⁶⁾を除き、広い網膜を有する動物では狭い網膜をもつ動物に比べて細胞体の大きい神経節細胞が存在する傾向があるものの、細胞体の直径の平均値は上記の齧歯類の全種を通じて類似しており、網膜の広さと神経節細胞の細胞体の大きさとの間には、はっきりした関係は認められないことがわかる。ただし、ラット¹⁾、ゴールデンハムスター⁶⁾では直径10 μm くらいの細胞体を有する細胞の割合が25~30%であるのに対し、マウス³⁾、チャイニーズハムスターでは、10~15%しかないという違いはある。今回の観察で、チャイニーズハムスターにおいては周辺部の網膜には中心部の網膜におけるよりも細胞体の大きい神経節細胞の存在する割合が高いことが判明した(図6)が、ラット¹⁾、マウス⁴⁾でも同様な傾向が認められている。

ラット、マウス、ゴールデンハムスター及びチャイニーズハムスターなどの齧歯類では、網膜の大きい動物ほど神経節細胞の数が多くはなるが、細胞体の大きさや、密度には顕著な差は認められない。このことは、少なくとも齧歯類では、同じ大きさの細胞は動物種にかかわらずよく似た形態をしており、類似の働きをしていることを示唆しているものと考えられる。網膜の神経節細胞の細胞体及び樹状突起の形態をもとにした神経節細胞の分類は、齧歯類においてはラット^{11,14)}、マウス^{15,16)}を除いてほとんどなされていないので、他の種でも行う必要があると思われる。著者は、この研究で得られた経験をもとに、樹状突起の形態観察に適した標本を用いてチャイニーズハムスターでのそれに関する研究¹⁷⁾も行ったので、次の論文で述べる予定である。

稿を終えるにあたり、宇治幸隆三重大学眼科学教授及び山村英樹三重大学第二解剖学教授(現名古屋大学環境医学研究所教授)に深謝いたします。

文 献

- 1) Dreher B, Sefton AJ, Ni SYK, et al: The morphology, number, distribution and central projection of class I retinal ganglion cells in albino and hooded rats. *Brain Behav EVOL* 26: 10-48, 1985.
- 2) Potts RA, Dreher B, Bennett MR: The loss of ganglion cells in the developing retina of the rat. *Dev Brain Res* 3: 481-486, 1982.
- 3) Dräger UC, Olsen JF: Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *J Comp Neurol* 191: 383-412, 1980.
- 4) Dräger UC, Olsen JF: Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20: 285-293, 1981.
- 5) Tiao YC, Blakemore C: Regional specialization in the golden hamster's retina. *J Comp Neurol* 168: 439-458, 1976.
- 6) Linden R, Esbérard CEL: Displaced amacrine cells in the ganglion cell layer of the hamster retina. *Vision Res* 27: 1071-1076, 1987.
- 7) Mesulam MM: Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: A non-carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J Histochem Cytochem* 26: 106-117, 1978.
- 8) Adams JC: Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product. *J Histochem Cytochem* 29: 775, 1981.
- 9) Fukuda Y: A three-groupe classification of rat retinal ganglion cells: Histological and physiological studies. *Brain Res* 119: 327-344, 1977.
- 10) Arkin MS, Miller RF: Muddpuppy retinal ganglion cell morphology revealed by an HRP impregnation technique which provides Golgi-like staining. *J Comp Neurol* 270: 185-208, 1988.
- 11) Mesulam MM: *Tracing Neural Connections*: New York, A Wiley-Interscience Publication, 1-151, 1982.
- 12) Perry VH, Cowey A: Retinal ganglion cells that project to the superior coliculus and pretectum in the macaque monkey. *Neuroscience* 12: 1125-1137, 1984.
- 13) Warr WB, Olmos JS, Heimer L: Horseradish Peroxidase. Heimer L, Robards MJ: Neuro-

- anatomical Tract-Tracing Methods. New York, Plenum Press, 207-262, 1981.
- 14) **Perry VH**: The ganglion cell layer of the retina of the rat: A Golgi study. Proc R Soc Lond [Biol] 204: 363-375, 1979.
- 15) **Doi M, Yamamura H, Uji Y**: Morphological classification of retinal ganglion cells in adult mice. 解剖誌 65: 310, 1990.
- 16) **土井素明, 宇治幸隆, 山村英樹**: マウス網膜における displaced ganglion cells の形態学的分類. 日眼会誌 94(抄録): 289, 1990.
- 17) **土井素明**: チャイニーズハムスター網膜における神経節細胞の形態学的分類. 日眼会誌 (印刷中).
-