

ラット視覚野における一過性セロトニン線維集積の 生後発達と眼球摘出による影響

中澤みどり¹⁾, 黄亭然¹⁾, 可児一孝¹⁾, 前田敏博²⁾

¹⁾滋賀医科大学眼科学教室, ²⁾滋賀医科大学第一解剖学教室

要 約

セロトニン神経線維は、生後発達の早期にラット一次知覚領野において、一過性集積を呈する。ラット視覚野でも、生後2日目から15日目までの一過性集積を呈するが、この集積は三段階に分けられることがわかった。最初のセロトニン線維集積(第一集積)は、第IV層の分化以前に、すでに視覚野相当の皮質下板に現れ、次第に皮質板の下層へ移動して第二集積を形成する。ここまでの現象は他の知覚野でも同様に認められている。視覚野では、さらに第二集積から上層へ伸びるセロトニン線維が柱状に集合して走り、第1層の下部で斑点状の集団を形成し、第三集積となる。この第三集積と合致する細胞集団は認められず、眼球摘出によっても大きな変化を認めなかった。この結果より、成熟サルで示されている一次視覚野の柱状構造に類似した機能形態的単位がラットにも存在し、その発達に初期セロトニン入力に密に関与する可能性が示唆された。(日眼会誌 96: 892-898, 1992)

キーワード: セロトニン, ラット視覚野, 生後発達

Transient Patterns of Serotonergic Innervation in the Rat Visual Cortex —Normal Development and Effects of Enucleation—

Midori Nakazawa¹⁾, Teizen Koh¹⁾, Kazutaka Kani¹⁾ and Toshihiro Maeda²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Shiga University of Medical Science

²⁾Department of Anatomy, Shiga University of Medical Science

Abstract

Serotonergic innervation formed transient dense aggregation in all rat primary sensory areas during early postnatal development. In the normal rat visual cortex, there were three stages in the transient aggregation of serotonin immunoreactive fibers from postnatal day (PND) 2 to 15. Primary aggregates appeared in the subplate prior to the differentiation of layer IV, and moved upward to the lower layer of cortical plate to form secondary aggregates. Secondary aggregation gave rise to ascending fibers on the cortical surface which were roughly grouped in columns (tertiary aggregation). The serotonin fibers of the tertiary aggregates were arranged in a lattice-like pattern in layer I, and were significantly altered either in size of distribution area or column number after monocular or binocular enucleation. These data indicate that the lattice-like pattern of serotonin innervation in neonatal rats may be an evolutionary precursor of the "blobs" seen in the higher primates. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 892-898, 1992)

Key words: Serotonin, Rat visual cortex, Postnatal development

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 中澤 みどり
(平成3年11月27日受付, 平成4年2月14日改訂受理)

Reprint requests to: Midori Nakazawa, M.D. Department of Ophthalmology, Shiga University of Medical Science, Tsukinowa-cho, Seto, Ohtsu 520-21, Japan

(Received November 27, 1991 and accepted in revised form February 14, 1992)

I 緒 言

さまざまな脳内生理活性物質が、神経機構の発達、形成に関与していることを示唆する報告が数多くあるが、中でも、細胞分化やシナプス形成に関するセロトニン神経線維の trophic action が、その発達段階において、とくに臨床的に注目されている。例えば、自閉症児は乳児期早期に睡眠・覚醒リズムの障害を示し、セロトニン神経系の障害が本症の基本病態とされる考えもある¹⁾。さらに近年、セロトニン合成の律速段階であるトリプトファン水酸化酵素の補酵素であるテトラヒドロピオプテリン (BH₄) の先天性欠乏症が知られ、カテコールアミンとならんでセロトニンの欠乏症が種々の脳発達障害の原因である可能性も示されている²⁾。

最近では、高感度のセロトニン免疫組織化学法を用いて、中枢神経系におけるセロトニン線維の発達を調べた報告がいくつかあり³⁾⁻⁹⁾、ラット体性知覚野において、発達期にバレル様の一過性集積を認めることが知られている⁴⁾⁵⁾⁷⁾⁻⁹⁾。視覚野についても、セロトニン線維が一過性集積を示すことは、我々を含めてすでに報告されている³⁾⁶⁾¹⁰⁾。セロトニン線維のみならず、アセチルコリンエステラーゼについても、一次視覚野の発達期に一過性集積を呈することが報告されている¹¹⁾⁻¹⁴⁾。我々は、ラット視覚野にみられるセロトニン線維の一過性集積の発達が、3段階に分けられることを発見した。このうち、第一集積と第二集積に関しては今までに報告があるが、皮質第1層に斑点状終末集団を作る第三集積については、現在のところ詳細な報告はされていない。そこで、セロトニン線維の第三集積とラット視覚野の生後発達について、詳細な観察を行い、さらに視覚野に機能的形態的变化を与えると考えられる生直後の眼球摘出操作を行い、第三集積がどのような影響を受けるのかを検討した。

II 実験方法および材料

Wistar系ラット(正常79匹、片眼摘出46匹、両眼摘出53匹)を用い、生後0、2、4、6、8、11、13、14、15日の脳を、ペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®)麻酔下に、4%パラホルムアルデヒド、0.5%グルタルアルデヒド、0.2%ピクリン酸を含むリン酸緩衝液による灌流固定⁴⁾¹⁵⁾で取り出した。取り出した脳を上記灌流固定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、前額断、脳表面に平

行な接線方向断の凍結切片(20 μm)を作成した。そして、DAB-ニッケル染色によるセロトニン免疫染色と、ガロシアン染色とを施した。免疫染色法は、藤宮⁴⁾に従い、用いたセロトニン抗体の特異性については、竹内¹⁶⁾がすでに報告した。眼球摘出は生後24時間以内に、低温麻酔下で片眼、または両眼施行し、生後2日から15日の脳に、上記正常動物と同様の処理、染色を施した。第I層の斑点状セロトニン線維終末集団の総数は、接線方向断切片を重ね描写して求めた。

III 結 果

1. 正常ラット視野におけるセロトニン線維の発達

最初のセロトニン線維の集積は、生後2日目に視覚野に相当する大脳皮質の皮質下板に現れ、接線方向断では“釣鐘型”を呈した(第一集積)。この終末群は皮質の発達とともに少しずつ上方へ移動して、皮質板に入りその下層に新しく集積を作った(第二集積)。第二集積が完了すると第一集積はみられなくなった。生後6日目になると、第二集積からセロトニン線維が集団をなして上方へ伸び皮質の表層(辺縁帯)に到達し、そこで一部のセロトニン線維が脳表面に平行に走っているのが認められた(第三集積)(図1A、図2A)。生後8日目になると、視覚野における細胞構築の第I層から第VI層まで明瞭に区別できるようになる。セロトニン線維の第二集積は第VI層に一致して認められ(図1B、図2B)、生後11日目では、第VI層顆粒細胞を取り囲んで最も密になった(図1C、図2C)。第VI層に位置する第二集積から上層へ伸びるセロトニン線維の第三集積は、生後8日目になるとその上部は第I層の下部で明らかな集団を形成し(図1B、図2B)、生後11日目では、第I層の終末集団ならびに第二集積から伸びる柱状線維集団はさらに明瞭となった(図1C、図2C)。接線方向断でみると、第二集積は、セロトニン線維がほぼ均一に視覚野全体に分布している形態を示していたが、第I層下部に見られる第三集積の終末集団は、斑点状の集積が間をつなぐ線維によって格子状に配列して認められた(図3)。ガロシアン染色ではセロトニン線維終末の第二集積は第IV層顆粒細胞層に一致して認められたが、第三集積の斑点状終末集団や第二集積とを結ぶ柱状線維集団に一致する特別な細胞構築は何も認められなかった。生後15日目になると、セロトニン線維の第三集積も第二集積と同時に消失した(図1D)。セロトニン線維終末の第二集積から第三集積が作られる過程(生後6日から11日迄)をカメラ

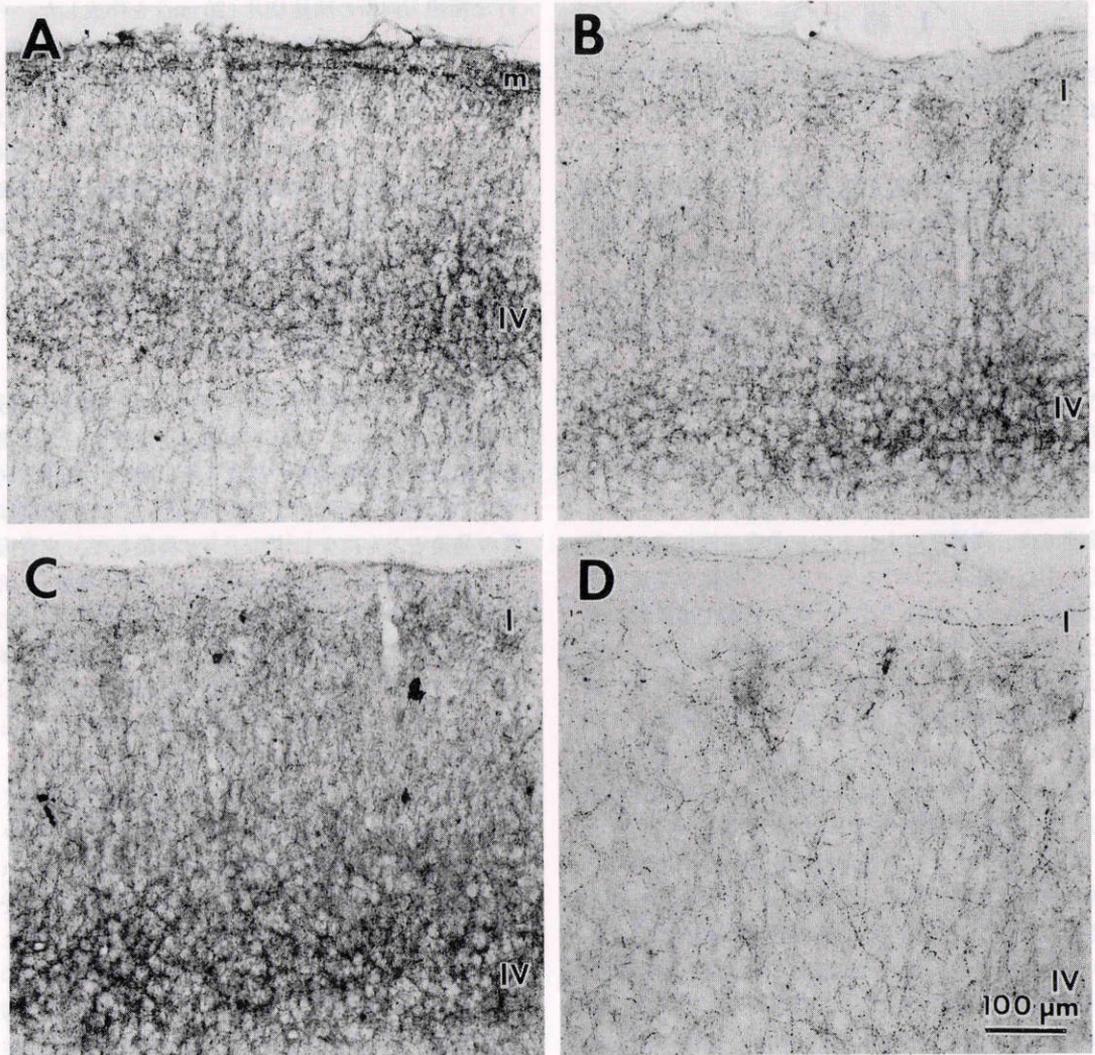


図1 ラット大脳皮質視覚野におけるセロトニン線維発達。

(A) 生後6日：まだ未分化な第IV層(IV)にセロトニン線維集積(第二集積)が現れる。(B) 生後8日。(C) 生後11日：第IV層(IV)に一致する第二集積から上層へ伸びるセロトニン線維が、第I層(I)で斑点状の第三集積を形成する。(D) 生後15日：セロトニン線維の集積は消失する。(m: marginal zone (辺縁帯), セロトニン免疫染色, $\times 107$)

シダで描いたものが第2図である。

2. 眼球摘出ラット視覚野でのセロトニン線維の発達

片眼, 両眼摘出ラットいずれにおいても, セロトニン線維終末集団の出現, 消失は正常ラットと同様の時間的経過を示した。セロトニン線維の第一集積は生後2日目にあらわれ, 上方へ移動して第二集積を形成した。第二集積から上方へ伸びる線維は第三集積を作り,

生後15日には全ての集積は見えなくなった。第1層に見られる第三集積の斑点状終末集団の数を接線方向断切片を用いて調べた結果では, 片眼摘出の同側, 反対側, 両眼摘出の両側すべて対照に比べて有意の差は認められなかった(表1)。また格子状配列の乱れも認められなかった(図4)。

一方, セロトニン線維の濃度を最も強く反映すると考えられる免疫染色濃度には変化が見られ, 第二, 第

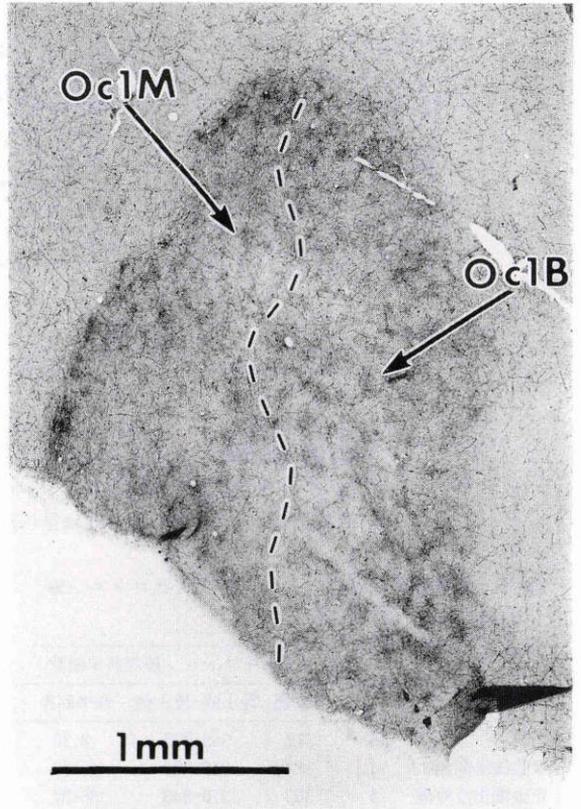
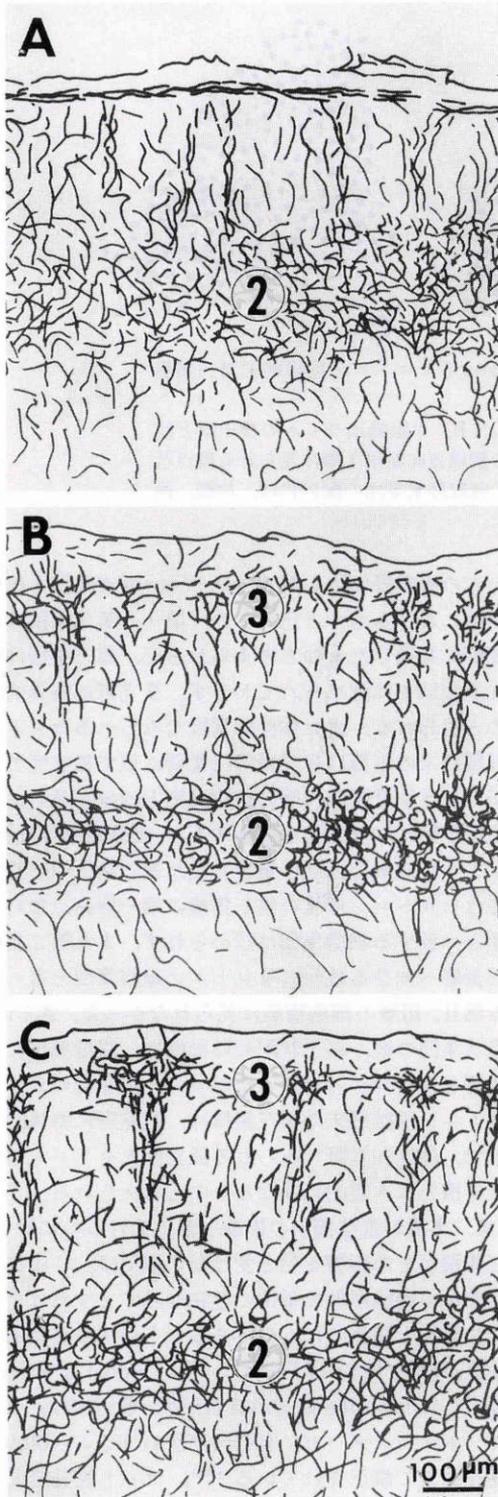


図3 正常ラット大脳皮質視覚野におけるセロトニン線維終末第三集積(生後11日目)。セロトニン線維の斑点状集積が、間をつなぐ線維によって格子状に配列している。(第I層接線方向断, Oc1M:単眼視領域, Oc1B:両眼視領域, セロトニン免疫染色, ×37)

図2 ラット大脳皮質視覚野におけるセロトニン線維終末第三集積の発達。(A)生後6日, (B)生後8日, (C)生後11日:生後8日目になると第二集積(2)からセロトニン線維が上層へ伸びて第三集積(3)を形成し始め, 生後11日目に最も著明となる。(カメラルシダ, ×88)

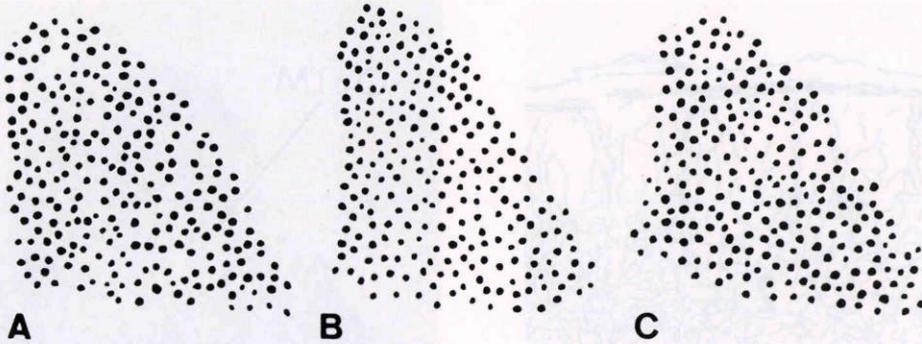


図4 生直後眼球摘出ラット大脳皮質視覚野におけるセロトニン線維終末第三集積(生後11日目)。

(A) 片眼摘出ラットの摘出眼と同側の視覚野, (B) 片眼摘出ラットの摘出眼と反対側の視覚野, (C) 両眼摘出ラットの視覚野の接線方向断第I層に見られる斑点状セロトニン線維終末集団をスケッチしたもの。線維終末集団の配列には、片眼、両眼摘出ラット視覚野とも変化は見られなかった。

表1 視覚野第一層にみられる斑点状セロトニン線維終末(第三集積)数

| 実験ラット群 | 実験数 | 斑点状セロトニン線維終末断数 | | |
|---------|-----|----------------|---------|-------|
| | | 平均値 | 最小値-最大値 | 標準偏差 |
| 正常 | 5 | 372 | 369-375 | 2.20 |
| 片眼摘出同側 | 4 | 367 | 346-383 | 15.80 |
| 片眼摘出反対側 | 4 | 365 | 310-385 | 36.37 |
| 両眼摘出 | 3 | 370 | 364-376 | 6.03 |

三集積ともセロトニン染色濃度は不均一となった。第二集積のセロトニン染色濃度が薄くなった部分に一致して第三集積もセロトニン染色濃度が薄くなっていた。

IV 考 按

発達期大脳皮質におけるセロトニン線維の一過性集積は、広く一次知覚野に認められる^{4)5)7)~9)17)}。視覚野では、生後2日目に皮質下板に現れ、第一集積を形成する。そして、上方へ移動し、皮質板下部で第二集積となり、結果的に第一集積は消失する。生後8日以降になると、セロトニン線維の第二集積は視覚野の第IV層によく一致し、さらに第二集積から上方へ伸びるセロトニン線維は集団を作り、その上端部に格子状に配列する斑点状第三集積を形成する。このセロトニン集積皮質が一次視覚野に限定されるかどうかは発達中の皮質であるがゆえに決定することは困難であるが、逆行性標識物質を用いた我々の研究によると、すべて濃密に外側膝状体から投射を受ける領野であった(未発

表)。この視覚野でみられるセロトニン終末集積と体性知覚野におけるものと比べると、第一、第二集積は両知覚野に共通したものと考えられるが、第三集積は他の知覚領域では認められておらず、視覚野に特異的なものと思われる。また体性知覚野でみられるセロトニン線維終末の集積は視覚野第三集積に似て孤立性であるが、体性知覚野第IV層の細胞構築とはほぼ一致し、また生後早期に知覚入力を遮断すると、細胞構築は乱れ、セロトニン線維の孤立性集積も乱れる^{7)~9)}。一方、視覚野ではセロトニン線維の第三集積の第一層斑点状終末集団と一致する細胞集団は認められず、また第二集積から表層へ伸びる柱状のセロトニン線維集団とも一致する第II、III層の細胞構築は見られなかった。さらに、斑点状集団の数、格子状配列の形態は、眼球摘出により影響を受けなかった。したがって、視覚野におけるセロトニン線維終末の第三集積は、視覚野に特異的なもので、体性知覚野でみられる孤立性セロトニン線維終末集積とは本質的に異なるものと考えられる。さらに、第二集積が眼球摘出の影響を強く受けるのに対し、第三集積がその影響を殆ど受けない事実は、この集積が何等かの機能形態の単位が存在を示すとすればより高度な機能と関係したものであることが示唆される。

従来、成熟サル¹⁷⁾の17野については、HubelとWieselが提唱したice-cube構造が有名だが、最近では、チトクロームオキシダーゼに富む円筒状のカラム(blob)構造を加えて修正されている¹⁸⁾¹⁹⁾。ラット視覚野でみられたセロトニン線維終末第三集積は第I層に格子状に配列する斑点状終末集団であるが、それと第IV層第二

集積との間を結ぶセロトニン線維集団を合わせてカラム状の構造とみることができる。体性知覚野を含めて早期セロトニン線維終末の集積は、皮質に存在する何等かの機能的単位の発達に先駆けて認められている。さらにサルの視覚野 blob 構造が細胞構築と一致しない機能的構造単位であることを考え合わせると、高等動物でみられる blob 構造に類似する機能形態の単位がラットにも存在する可能性が考えられる。

ラットの視覚野は、内側の単眼視領域 (Oc 1 M, 図 3) と、外側の両眼視領域 (Oc 1 B, 図 3) に分けられる²⁰⁾²¹⁾。発達期のセロトニン線維終末の第三集積は単眼視, 両眼視, 両領域にみられ, その配列の状態は両領域で殆ど差は認められなかった。一方, サルの視覚野は全て両眼視領域であり, ラットに想定される単位構造が, より高度な機能と関係するものとしても如何なる機能に関わるものであるかについては今後の検討が待たれる。

本論文の要旨は第 95 回日本眼科学会にて発表した。

文 献

- 1) 瀬川昌也: 自閉症児とサーカディアンリズム. 神経進歩 29: 140-153, 1985.
- 2) 成澤邦明: ビオプテリン代謝異常症. 小児内科 21: 138-142, 1989.
- 3) D'Amato RJ, Blue ME, Largent BL, et al: Ontogeny of the serotonergic projection to rat neocortex: Transient expression of a dense innervation to primary sensory areas. Proc Natl Acad Sci USA 84: 4322-4226, 1987.
- 4) Fujimiya M, Kimura H, Maeda T: Postnatal development of serotonin nerve fibers in the somatosensory cortex of mice studied by immunohistochemistry. J Comp Neurol 246: 191-201, 1986.
- 5) Fujimiya M, Kimura H, Maeda T: Development of cerebral cortex and serotonin innervation, in Segawa M (ed): Brainstem, Midbrain, Telencephalon and Behavior, Tokyo, Sanposha Printing Co, 147-160, 1988.
- 6) Nakazawa M, Fijimiya M, Kimura H, et al: Serotonin innervation in developing visual cortex of rat. An immunohistochemical study. Neurosci Res 9(Suppl): 49, 1989.
- 7) Rhoades RW, Bennett-Clarke CA, Chiaia NL, et al: Development and lesion induced reorganization of the cortical representation of the rat's body surface as revealed by immunocytochemistry for serotonin. J Comp Neurol 293: 190-207, 1990.
- 8) Suzuki F, Fujimiya M, Kimura H, et al: Serotonergic terminal aggregation in the somatosensory cortex of rat during early postnatal period. Acta Histochem 22: 737, 1990(Abstract).
- 9) Suzuki F, Handa J, Maeda T: Effects of congenital hydrocephalus on serotonergic input and barrel cytoarchitecture in the developing somatosensory cortex of rats. Child's Nerv Syst (in press).
- 10) Funahashi A, Fujimiya M, Kimura H, et al: Postnatal development of serotonin nerve fibers and terminals in rat visual cortex in microcephaly induced by methylazoxymethanol. Neurosci Res 9(Suppl): 143, 1989.
- 11) Kagayama GH, Gallivan ME, Gallardo KA, et al: Relationships between patterns of acetylcholinesterase activity and geniculocortical terminal fields in developing and mature rat visual cortex. Dev Brain Res 53: 139-144, 1990.
- 12) Prusky GT, Arbuckle JM, Cynader MS: Transient concordant distributions of nicotinic receptors and acetylcholinesterase activity in infant rat visual cortex. Dev Brain Res 39: 154-159, 1988.
- 13) Robertson RT, Fogolin RP, Tijerina AA, et al: Effects of neonatal monocular and binocular enucleation on transient acetylcholinesterase activity in developing rat visual cortex. Dev Brain Res 33: 185-197, 1987.
- 14) Robertson RT, Hanes MA, Yu J: Investigations of the origins of transient acetylcholinesterase activity in developing rat visual cortex. Dev Brain Res 41: 1-23, 1988.
- 15) Kimura H, McGeer PL, Peng LH, et al: The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. J Comp Neurol 200: 151-201, 1981.
- 16) Takeuchi Y, Kimura H, Matsuura T, et al: Distribution of serotonergic neurons in the central nervous system. J Histochem Cytochem 31: 181-185, 1983.
- 17) Nakazawa M, Koh T, Kani K, et al: Transient patterns of serotonergic innervation in the rat visual cortex: Normal development and effects of neonatal enucleation. Dev Brain Res 66: 77-90, 1992.
- 18) Livingstone MS, Hubel DH: Connections between layer 4B of area 17 and the thick cytochrome oxidase stripes of area 18 in the squirrel monkey. J Neurosci 7: 3371-3377, 1987.

