

視神経再生に及ぼす光照射の影響

江口英輔

(横浜市立大学理学部環境理学科)

出澤真理

(横浜市立大学医学部第一解剖)

Effects of light irradiation on regeneration of optic nerves.

Eisuke Eguchi and Mari Dezawa

はじめに

一般に、末梢神経系では損傷を受けても核を含む細胞体が生存していれば、神経線維は切断部位より再伸長が起こり(再生、regeneration)、やがて筋肉細胞などの元の標的器官と連結し正常な機能が回復する。中枢神経系でも下等脊椎動物(魚類、両性類、爬虫類など)では原則として神経線維は切断されても再生は起こる。これに対して、哺乳類のような高等脊椎動物においては中枢神経系の神経線維は切断等の損傷を受けると、まず損傷部位より末梢側がミエリンの髄鞘を含め退縮しはじめ、多くの場合、神経の細胞体側も逆行性的変性が起こり大多数の神経細胞は死んでしまう(細胞死)。末梢神経系と中枢神経系のこのような生死を分ける差は、一体何に由来しているのであろうか。最近の研究成果によるとこの違いは神経細胞自身の差によるのではなくて、神経線維を取り囲んでいる神経膠細胞(glial cells)の違いによるらしいことが明らかにされつつある。即ち、中枢神経系の神経線維のミエリンの髄鞘(myelin sheath)は稀突起神経膠細胞(oligodendrocyte)といわれる神経膠細胞によって形成されているが、この細胞の髄鞘の中には神経線維の再生を抑制する蛋白質が含まれているという研究結果がある。事実、oligodendrocyteのミエリンの髄鞘を抗体を用いて中和すると中枢神経でも再生は可能であるという報告もある(Caroni & Schwab, 1988; Keirstead et al, 1992)。他方、末梢神経系のミエリンの髄鞘はシュワン細胞(Schwann cell)という別の種類の細胞からできており、この細胞には神経線維の再生を抑制するような作用はないとされている(Bastmeyer et al, 1994)。

眼はもともと末梢の感覚器官であるので、網膜からの視神経線維は末梢神経系と思われがちであるが、実は中枢神経系に属している。事実、網膜は脳の一部から発生し分化してくる。したがって、哺乳動物の視神経線維を切断すると中枢神経系の神経細胞と同じく再生は起こらず、視神経線維を出している網膜神経節細胞も大部分が死滅してしまう(田内と日高、1994)。

1985年にSoとAguayoは興味ある論文を発表した(So & Aguayo, 1985)。即ち、ラットの視神経を切断し、末梢神経系である坐骨神経を切り出し、それを視神経の切断部位に移植すると、視神経線維の再生が移植された坐骨神経内に起こることを示したのであ

る。更に坐骨神経を用いて切断した視神経と上丘とを架橋手術にてバイパスすると、再生した神経線維が上丘まで到達し、上丘の神経細胞とシナプスを形成していることが電子顕微鏡で確認されている (Vidal-Sanz et al, 1987)。その後の研究によると、坐骨神経は視神経線維の再生 (伸長) の道案内 (誘導) をしただけで、伸びたのは、やはりラットの視神経軸索そのものであること、また移植された坐骨神経の神経線維はその後、消滅していることなどが明らかになった (Dezawa et al, 1997)。以上の話しはラットなどの哺乳動物での話しであり、それより下等な脊椎動物では様子は違ってくる。

魚類や両棲類のような哺乳類より下等な脊椎動物では網膜は中枢神経系であるにもかかわらず、視神経線維は切断等の損傷を受けても再生する能力を持っている。今回の実験で用いたコイなどの淡水魚は終生成長を続けるが、このことと何らかの関係があるのかも知れない。即ち、神経細胞といえども、いつも細胞分裂を行っているからである。動物界全体を見渡すと一般論として、神経細胞は進化的により高等なものほど再生能力は劣るということである。

視神経線維が切断されると、光の情報が脳には送られなくなるので盲目になるのは当然であるが、しばらくは眼そのものは正常に機能していると思われる。網膜には光受容細胞や双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞などの神経細胞があり、視覚の情報はこれらの感覚、神経細胞をへて、網膜神経節細胞に集められ、その神経突起である視神経線維によって脳まで送られる。たとえ視神経線維が切断されても、眼に光が照射されれば光受容細胞は興奮し、それに続く神経細胞に情報は伝達されていると思われる。すなわち、網膜神経節細胞は光刺激により、なんらかの神経情報 (神経伝達物質など) を双極細胞やアマクリン細胞などから受けていると思われる。その結果、網膜神経節細胞自身も後シナプス電位などを起こし細胞が活性化されるであろう。このように光刺激による間接的な網膜神経節細胞の活性化が神経線維の再生にどのような影響を与えるのかは興味ある問題である。また光刺激の有無が網膜神経節細胞の細胞死 (apoptosis) に、どのような影響を与えるのかも興味ある未知の問題である。これらのことを明らかにするために以下のような実験系を組み立てた。

材料と方法

実験材料として体長 10 ~ 13 cm のマゴイ (*Cyprinus carpio*) の若い魚を使用した。手術前 1 週間ほど、12 時間明 (2000 lux) 12 時間暗の状態 (LD) で飼育した。コイを 0.066 % の MS 222 (meta-aminobenzoic acid ethylester) 溶液に浸し麻酔をかける。手術中も常に MS 222 溶液を経口還流し続ける。すべて左眼の視神経を切断した。眼球のふちに切れ込みを入れ、眼球を反転させ、視神経を露出させて眼球から約 2 mm のところで視神経を外科用ハサミで切断する。眼球をもとに戻し、生体用アロンアルファ (東亜合成株式会社) で傷口をふさいだ。

手術後コイを次の 4 つのグループに分けて飼育した。

- ①明 (12 時間) + 暗 (12 時間) のサイクル・・・LD
- ②恒明・・・LL

③恒暗・・・DD

④フリッカー光 (3 時間, 3Hz) +暗 (21 時間)・・・FD

いずれも 20°C、餌はやらずに飼育した。光は白色蛍光灯 (三菱オスラム、15 W) を用い、魚の眼に当たる光の強さは凡そ 2000 lux である。LD は正常な光条件に近く、コントロールと位置づける。フリッカー光を用いたのは光が連続的についている場合は眼は容易に順応し、網膜からの反応は低下するが、光の on-off 刺激 (変化分) に対しては on-response, off-response がその都度、出るので刺激としての効果は連続光よりも、はるかに大きいと思われるので光条件の一つとして用いた。

それぞれ、手術後、3 日目、7 日目に網膜および視神経を摘出した (各条件で個体数 3 ~ 5)。視神経線維の再生の計測には切断部位より 2 mm 視蓋側の視神経線維束の cross section を電子顕微鏡で観察し、観察した cross section の面積とその中に含まれる再生しつつあるアクソンの数を計測し、各条件での比較のために 100 μm^2 あたりの面積で再生しつつあるアクソンの数の平均値を計算した。観察は透過型電子顕微鏡 (日本電子, JEM, 1200EX) を用い、加速電圧 80 kV で観察した。

また神経節細胞の細胞死 (apoptosis) の検索には TUNEL 法を用いた。paraformaldehyde で固定された網膜を cryostat で光の進行方向に平行な方向で凍結切片を作成した。このような切片では神経節細胞の核は一列に配列されて観察される。まず、この切片を DAPI 法で核を染色する (強い青色の蛍光に見える)。これは核と非特異的に結合するので、正常な核も apoptosis を起こして小さくなった核も全部染め出すことができる。この方法で染色された切片を観察し、切片内に見られる神経節細胞の核の総数を計測する。次に TUNEL 法で染色し apoptosis を起こした核だけを FITC で標識し (緑色の蛍光に見える)、同様に切片内に見られる apoptosis を起こした核の総数を計測する。そして観察された神経節細胞のうち、何%の細胞が apoptosis を起こしたかを計算した。

結果と考察

Grafstein の従来の研究によると (Grafstein, 1986)、魚の眼で視神経切断が行われると神経節細胞には以下のような特徴的なことが観察されている。まず最初に起こることは microtubule の崩壊である。再生しない神経ではこれが起こらないことから、microtubule の崩壊は再生開始に必要な反応であると思われる。その他の神経節細胞の細胞体内の微細構造の変化では、最初に見られるものは核小体の増大である。約 2 倍ほどになる。これは光顕でもはっきりと認められる。これは蛋白質合成のために ribosome を多量に作っているからである。このような変化は切断後 3 日では 20 - 40 % の細胞に見られるが、7 日後には 50 % を超える細胞に見られる。細胞質内の変化では Nissl 小体 (endoplasmic reticulum) の増大は切断後の数週間にわたり起こる。これは蛋白質合成のために ribosome を付けた、いわゆる粗面小胞体 (rough surfaced endoplasmic reticulum) の数が増大するからである。同時に Golgi も増大する。dense-cored vesicle の増大は 10 日あたりで顕著である。それに平行して細胞骨格系の輸送の増大のため、tubulin や actin の輸送が増大する。再生には周囲に存在する glia cell などの影響を受ける。

ここでは視神経線維の再生と神経節細胞の細胞死 (apoptosis) とに分けて我々の研究室と University of British Columbia が共同で行って来た過去数年にわたる研究結果と考察を以下に述べる。

1) 視神経線維の再生

神経は一般に切断されるとまず、切られた所から細胞体の方に向かって少し逆行性の退行が起こる (Traumatic degeneration, Ramon y Cajal, 1928)。これは $250\mu\text{m}$ より長くなることはない。そして24時間以内に terminal bulb が形成される。これは神経細線維 (neurofilament) の束の回りにその他の多くの細胞器官がとりまいている特徴的な構造を呈する。その後、48時間までに再生の始まりの兆候が現われる。再生してくる神経線維は直径が $1-2\mu\text{m}$ の小さな無髄神経が束状になったものであり、その構造的特徴は神経細線維が多く微小管 (microtubule) が少ないことである。これは正常な発生をしつつある視神経線維とは異なる点である。しかし、発生途上の視神経線維が伸長するときには微小管が多くなる (Grafstein 1986)。

図1はコイの正常な視神経線維の束の横断切片像である。コイの視神経線維は myelin sheath (M) で被われた直径約 $1\mu\text{m}$ の有髄神経である。普通の神経線維のように各線維の中には多くの微小管や神経細線維が見られる。視神経線維の他に各種のグリア細胞、基底膜やその他の細胞間質などが観察される。

図2は視神経切断後3日目の切断部位から約2mm脳側の場所で見られた再生 (伸長) しつつある視神経線維の束の横断切片像である。図1と比較してみると直ぐ気づくことであるが、まず第一に再生しつつある視神経線維には myelin sheath がないこと (無髄)、次に各神経線維の直径が小さいことである。切断された視神経線維は、その末梢側は退化、退縮していくが、それを取り巻いていた myelin sheath も残骸化し (図2)、いずれ消滅する。体制を立て直した神経節細胞は神経線維を再生、伸長させていくが、その先端はいくつもの小さな分枝となってグリア細胞や切断面より中枢側の神経線維が退化し残骸化したもの (degenerating debris) などが散在する組織のなかを伸びていく。したがって、図3のような無髄の小さな神経線維が塊りとなった横断切片像を呈する。普通のほ乳類などの神経再生で見られる再生先端部が膨大化した構造、成長円錐 (growth cone) は魚では見られない。

表1は、手術後、切断面より2mm中枢側の地点での3日目と7日目の視神経組織切片の $100\mu\text{m}^2$ 面積あたり再生しつつある神経線維の数を示し、それをグラフに表わしたものが図4である。3日目では再生神経線維の数は全体に少なく4つの光条件の間にも顕著な差はない。

しかし、7日目になると再生神経線維の数も増加し、光条件間でも有意な差が見られた。すなわち、最も再生が悪かったのはDDで1.7、次がLLで7.7、次がFDの45.9で最も再生神経線維の数が多かったのはLDの47.2であった。再生線維は 20°C では1日平均 $0.2-0.4\text{mm}$ 伸長するとされている (McQuarrie and Grafstein, 1981; Edwards et al, 1981)。このことは今回の実験の6日目でのLDやFDの結果とほぼ一致している。

表 1

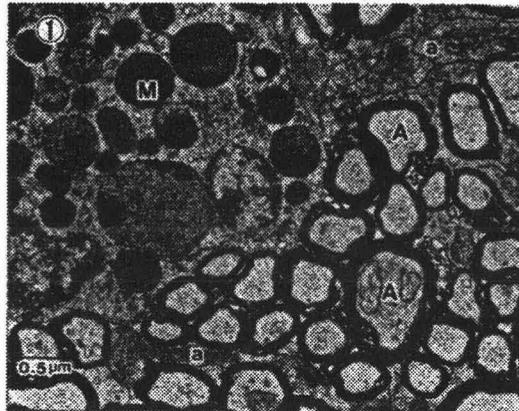
conditions	n	No. of reg. axons/100 μ m ²	Statistical difference							
			DD3	DD7	LL3	LL7	LD3	LD7	FD3	FD7
DD3	3	0	—							
DD7	3	1.7 \pm 0.9	no	—						
LL3	3	1.8 \pm 1.9	no	no	—					
LL7	3	7.7 \pm 2.9	*	no	no	—				
LD3	3	2.1 \pm 2.2	no	no	no	no	—			
LD7	4	47.2 \pm 13.7	**	*	*	*	*	—		
FD3	3	0.3 \pm 0.3	no	no	no	no	no	**	—	
FD7	5	45.9 \pm 18.4	**	**	**	**	**	no	**	—

各々の光条件下での再生神経線維数の平均値（左から3番目の欄）とその平均値間の統計的な有意性の検定（Bonferroni法によるANOVA）。DD3, 恒暗3日間；DD7, 恒暗7日間；LL3, 恒明3日間；LL7, 恒明7日間；LD3, 明暗3日間；LD7, 明暗7日間；FD3, フリッカーと暗3日間；FD7, フリッカーと暗7日間；no, 有意な差なし ($p > 0.05$)；* 有意な差あり ($0.05 > p > 0.01$)；** 顕著に有意な差あり ($p < 0.01$)。nの欄は個体数。

各光条件の間で統計的な有意性の有無を検定した（Bonferroni法によるANOVA）結果を表1に示した。LDとFDはそれぞれDDやLLとは有意な差があり、LDとFDの間、DDとLLの間にはそれぞれ有意な差はなかった。

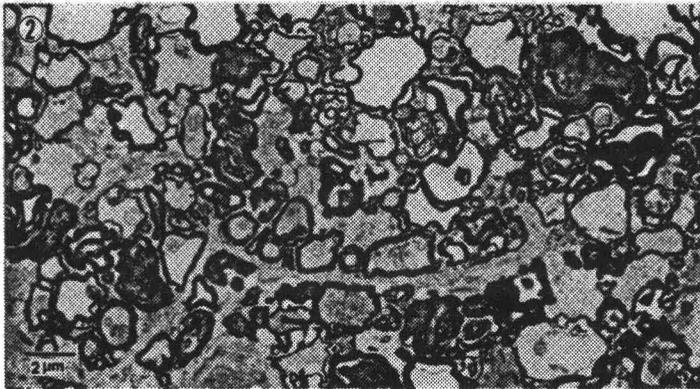
上で述べた7日目の結果は興味あるものである。恒暗（DD、1.7）の状態では再生は最低であったという事実から視神経線維の再生には光は必要であるとはいえるが、光は多ければ多いほど良いということではない。即ち、光がいつもある状態（LL、7.7）ではDD（1.7）よりは良いがLD（47.2）より明らかに悪いことから、光と同時に暗黒も必要であることが分かる。恒明の状態は、たとえ光が強烈でなくても正常な網膜でも、特に視細胞は損傷を受けやすいことが報告されている（Williams and Baker, 1980）。FD（45.9）は正常な条件のLD（47.2）とあまり変わらない結果が得られたのは意外であった。点滅光はそのつどにon-responseとoff-responseを惹き起こすので、順応が起こりやすい連続光のLDの場合とは生理状態は大きく異なるとおもわれるが、結果はLDとほぼ同じであった。その理由は今の所、不明である。他方、LDなどの他の条件で7日目の視神経組織ではまだかなりmyelin sheathの残骸がみられるのに対して、FDではmyelin sheathがほとんどなくなっていることが観察された。このことはmicrogliaやmacrophageの活動が盛んであることを示唆している。このことから、フリッカー光がなんらかの経路をへてmicrogliaやmacrophageの活動を高めていることが予想される。

図 1



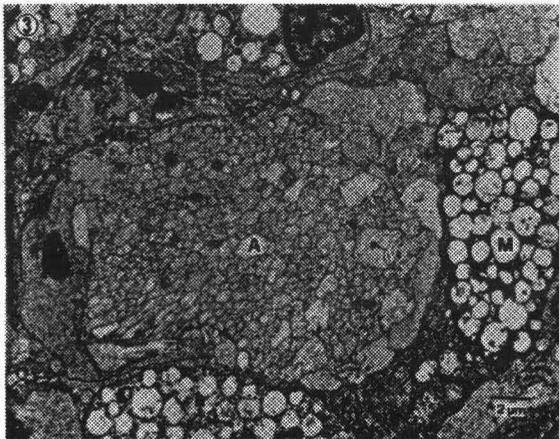
コイの正常な視神経線維束の横断切片像。視神経線維 (A) は有髄化している。グリア性線維 (a) がアストログリア細胞の中に見られる。ミクログリア細胞 (M) の中には多くのライソソーム小体がみられる。X 18,000

図 2



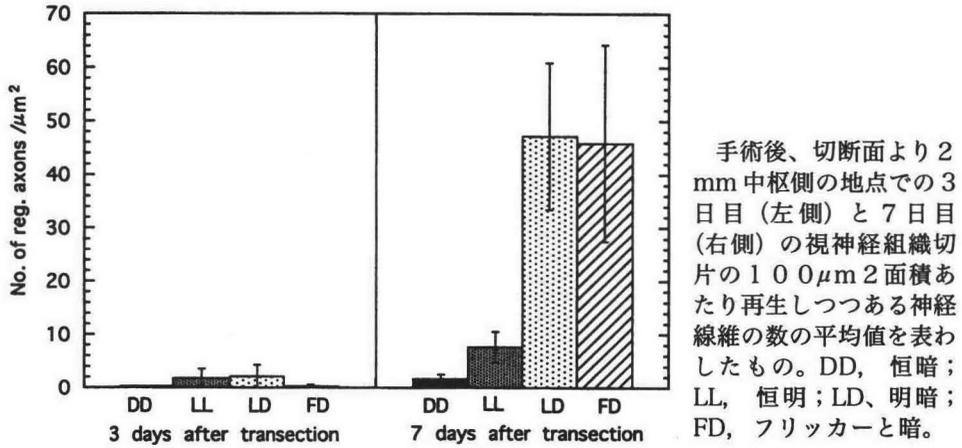
切断されてから7日後の視神経線維。視神経線維の末梢側は退化、退縮し、それを取り巻いていたミエリンの随鞘も残骸化している。X 6,000

図 3



視神経切断後7日目の切断部位から約2 mm 脳側の場所で見られた再生 (伸長) しつつある視神経線維 (A) の束の横断切片像。ミクログリア細胞 (M) の中には多くの食胞がみられる。X 5,000

図 4



2) 神経節細胞の細胞死 (apoptosis) の比較

一般に、細胞の死は apoptosis (積極的な自殺、またはプログラム化された死) と necrosis (壊死) に大別されている。細胞はもともと自爆 (自殺) 装置を持っており何らかの条件で、その細胞が死んだ方がその器官や個体全体の生存のために有利になる時に、この自爆装置が起動するものとされている。apoptosis は一般に核の DNA の破壊 (断片化) により細胞死が惹き起こされる。形態学的に見た場合、apoptosis は核が小さくなり、場合によっては断片化するのに対して necrosis では逆に核の膨大化が起こる。

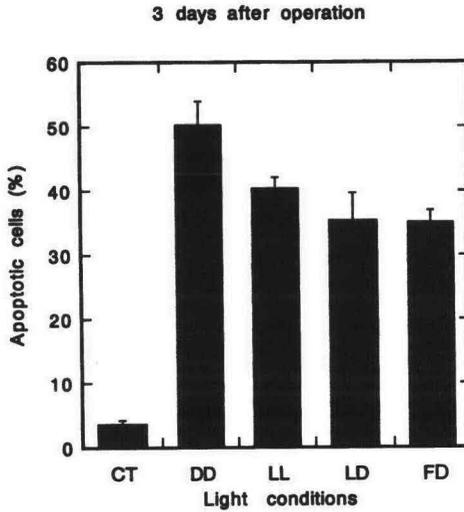
視神経線維が切断されると神経節細胞は逆行性的に変性が細胞体まで及び死に至ると思われる。たとえ神経節細胞が線維の切断という痛手から立ち直ったとしても線維の再生を待たずに apoptosis を起こして死んでしまうこともあるであろう。事実、ラットでは逆行性標識を用いて観察すると、視神経切断後 3 ヶ月ではわずか数%の神経節細胞しか生存していないという報告もある (田内と日高、1994)。

「材料と方法」の所で述べたように、観察された神経節細胞の核の数を計測し、次に apoptosis を起こした細胞の数を計測し、何%の細胞が apoptosis を起こしたかを計算した。ここでは 3 日目の結果について述べる (表 2 と図 5)。個体数は各光条件で各々 3 である。

まず最初に注目すべきことは、視神経を切断していない control の網膜の全神経節細胞のうち 3.6% に apoptosis が見られたことである。正常な網膜でも apoptosis が日常的に起こっていることである。古くなった神経節神経は常時、apoptosis を起こして死んでいく一方で、ほぼこれと同数、またはそれ以上の神経節細胞が新たに細胞分裂して作られていることを意味している。このことは、人などの哺乳動物とは際立って対照的なことである。即ち、哺乳動物では成長して成人になると中枢神経系の神経細胞はもはや分裂する能

力はなくなり、たとえ神経細胞が損傷等により死んでしまっても新たに分裂して、それを補充することはない。要するに減ることはあっても増えることはないのである。

図 5



切断されてから3日後の網膜で、観察された神経節細胞の核、apoptosis を起こした細胞の数を計測し、全体の何%の細胞が apoptosis を起こしたかを示したグラフ。

表 2

	Apoptotic cells (%)	CT	DD	LL	LD
CT	3.6 ± 0.6	-			
DD	50.3 ± 3.7	** < 0.001	-		
LL	40.4 ± 1.7	** < 0.001	* 0.014	-	
LD	35.4 ± 4.3	** < 0.001	* 0.018	no	-
FD	35.1 ± 1.9	** < 0.001	** 0.003	* 0.02	no

視神経切断後、3日目の各々の光条件下での ganglion cell layer で観察された総細胞数に対する apoptosis を起こした細胞数の割合 (%) とその統計的な有意性の検定 (Bonferroni 法による ANOVA)。CT, コントロール (視神経切断なし); DD, 恒暗 3 日間; LL, 恒明 3 日間; LD, 明暗 3 日間; FD, フリッカーと暗 3 日間。no, 有意な差なし ($p > 0.05$): * 有意な差あり ($0.05 > p > 0.01$): ** 顕著に有意な差あり ($p < 0.01$)。

apoptosis の割合が最も高かったのは恒暗 (DD) の 50.3% であった。次に多かったのは恒暗 (LL) の 40.4%, 以下明暗 (LD) の 35.4%, もっとも少なかったのはフリッカー光 (FD) の 35.1% であった (表 2)。ANOVA による有意性の検定の結果、DD は他の全ての光条件に対して有意の差があった ($P < 0.05$) (表 2)。その他の組み合わせでは LL と FD の間に有意の差があった。DD で最も高かったということは、眼に適当な光刺激がないと apoptosis を起こす神経節細胞が多くなるということであり、このことは 1) の「視神経線維の再生」の所で述べたように、DD が最も視神経線維の再生が少ないという結果と一致している。すなわち、DD で再生してくる視神経線維の数が少なかった (表 1) のは再生線維の伸びが遅かったこと他に、多くの神経節細胞が apoptosis を起して死ん

でいたからだといえる。

フリッカー光 (FD) の結果は実験前の予測を覆えすものであった。すなわち、ヒトの場合でいえば1秒間に3回程度のフリッカー光に数時間も曝されると眼と脳は極端に疲労し、心理状態までおかしくなるので、かつては拷問の道具として使われたこともある。フリッカー光は眼にとって有害な光であり、視神経の再生にも良い効果は与えないであろうと予測していた。コイをフリッカー光により拷問にかけるつもりで今回の実験を企画したわけではないが、不思議なことにコイにとっては拷問どころか、逆に最も好ましい (最も apoptosis の割合が低い) 刺激であったのは全く意外であった。

control でも神経節細胞に 3.6 % の apoptosis が見られたわけであるから、control と LD の apoptosis の値との差 (31.8%) は視神経切断のみによる apoptosis への影響と見ることができる。同様に、DD と LD との差 (14.9%) は恒暗の apoptosis に対する影響と考えることができる。

謝意

この研究の共同研究者である John D. Steeves 教授 (University of British Columbia, Vancouver, Canada) に感謝の意を表します。

引用文献

- Aguayo, A. J., David, S., Richardson, P. and Bray, G. M. (1982). Axonal elongation in peripheral and central nervous system transplants. In; *Advances in cellular neurobiology*. eds S. Fedoroff and L. Hertz, pp. 215-234, New York, Academic Press
- Bastmeyer, M., Jeserich, G. and Stuermer, C. A. (1994) Similarities and differences between fish oligodendrocytes and Schwann cells in vitro. *Glia*, 11, 300-314
- Cajal, S. Ramon Y (1928) *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. Vol. 1, 2. (edited and translated by R. M. May, 1959). Oxford Univ. Press, London.
- Caroni, P. and Schwab, M. (1988) Antibody against myelin associated inhibitor of neurite growth neutralizes non-permissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron*, 1, 85-96.
- Dezawa, M., Kawana, K., Adachi-Usami, E. (1997). The role of Schwann cells during retinal ganglion cell regeneration induced by peripheral nerve transplantation. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, 38, 1401-1410
- Edwards, D. L. Alpert, R. M. and Grafstein, B. (1981). Recovery of vision in regeneration of goldfish optic axons: enhancement of axonal outgrowth by a conditioning lesion. *Experimental Neurology*. 72 (3):672-86
- Grafstein, B. (1986). The retina as a regenerating organ. In; *The retina, A model*

- for cell biology studies. Part II, (eds. Adler, R. and Farber, D. B.), pp275-335, Academic Press, New York
- Keirstead, H. S., Hasan, S. J., Muir, G. D. and Steeves, J. D. (1992). Suppression of the onset of myelination extends the permissive period for the functional repair of embryonic spinal cord. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 11664-11668
- McQuarrie, I. G. and Grafstein, B. (1981) Effect of a conditioning lesion on optic nerve regeneration in goldfish. Brain Research. 216 (2):253-64
- So K. F. and Aguayo, A. J. (1985). Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. Brain Res., 328, 349-354
- 田内雅規、日高聡 (1994). 視神経切断による網膜神経節細胞の変性。神経眼科、11, 263-270
- Vidal-Sanz, M., Bray G., M., Villegas-Perez, M. P., Thanos, S. and Aguayo, A. J. (1987). Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. J. Neurosci., 7, 2894-2909
- Williams, T. P. and Baker, B. N. (1980). The effects of constant light on visual processes. Plenum, New York,