

学 位 論 文 要 旨

氏名 兵頭 宗厳

題 目：哺乳類新生仔における発達期網膜の形態学的変化：晩成性および早成性哺乳類の比較と離乳条件の差異が及ぼす影響

論文要旨：

視覚機能の獲得には網膜の形態学的構造の成熟が不可欠であるが、その発達過程は動物種により大きく異なる。本研究は、出生時の発達段階が大きく異なる晩成性動物（マウス）と早成性動物（ウシ）の新生仔網膜における生後成長過程を比較し、視覚機能獲得に必要な形態学的変化を明らかにすることを目的とした。

眼球の成長は両種において出生直後に急速で、その後は緩やかであったが、網膜層構造の形成や細胞の形態変化には差異が認められた。マウスでは、開眼時期である生後 14 日 (P14) 頃まで、網膜厚が増加する「肥厚期」を経て、P35 まで急速に薄くなる「薄化期」に移行する二相性変化を示した。肥厚期には外顆粒層 (ONL) および内顆粒層 (INL) の構築と、杆体双極細胞 (RBC) における軸索の伸長 (P10–14) が確認された。薄化期には細胞配列の変化が進行し、ONL, INL 中の細胞数減少や RBC の軸索短縮に加え、神経節細胞層では単層化傾向が生じた。これらの変化は、開眼に伴う視覚入力増加に起因する可能性が考えられる。一方ウシ網膜は、出生時点ですでに成熟した 10 層構造を有していた。マウスの肥厚期に相当する現象は観察されず、生後は主に ONL, OPL, INP, IPL にて薄化が生じた。しかし両種に共通して、細胞配列の再配列と RBC 軸索の短縮を伴う「薄化期」が存在し、離乳期頃には薄化が緩やかまたは完了して、成熟網膜へと変化した。これは晩成性・早成性動物によらない、視覚機能成熟に伴う共通の形態変化であることが示唆された。

そこで「離乳までの期間は、網膜の発達において生物学的に重要な意義をもつのではないか」という仮説を立て、マウスの離乳時期を変化させることで、その重要性の解明を試みた。早期離乳（幼少期ストレスモデル）、中期離乳（対照）、晚期離乳（良好な養育環境モデル）を設定して網膜の発達過程を評価した。さらに、早期離乳経験個体を親とする仔の視覚発達も評価し、母子関係の質が次世代の視覚成長に及ぼす影響の有無を調査した。離乳時期の変化はほぼ全ての個体で顕著な網膜の形態異常を引き起こさなかったが、一部では層構造欠損が認められた。網膜の各層厚は離乳時期・日齢・性別に依存して変化し、特にメスで顕著であった。オスでは変動が不規則であった一方、メスでは P35–56 において一貫した肥厚が生じた。この性差は、ストレス応答およびグリア細胞の活性化機序の差異を反映している可能性がある。また、MSEW 経験のある親では、産仔数や食殺率、仔の死亡率に統計学的有意差はなかったものの、一部で高い食殺・死亡率が観察され、母性行動の低下が示唆された。また、体温測定においても、低体温傾向を示し、授乳行動の減少が推測された。開眼時期は、MSEW 経験母由来の仔群では早期化傾向が見られ、眼

球成長は離乳から P35 までに軽度な矮小傾向を示した後、P42 以降は増大傾向に転じた。離乳までの期間は、母子間の関係性を重要な因子として、その後の母性行動の程度を左右するだけでなく、仔の視覚発達にも影響を及ぼしうることが明らかとなった。

また、眼球を用いた研究を進める過程で技術的課題が生じた。組織学・免疫組織学解析において、従来からの固定液では網膜・脈絡膜・水晶体・虹彩など、眼球微細構造の形態保存が不十分であり、形態学的変化に注目した本研究では高品質な眼球組織像が必要であった。そこで固定液の開発を行い、全眼球の形態保存・抗原保持・切片の作製性に優れた GBMT solution を確立した。マウス眼球を対象として、変性や剥離を伴わない明瞭な網膜 10 層構造の保持、眼球の円形外型の保存、水晶体破碎の改善、虹彩の変位抑制などに加え、特定の細胞質抗原に対する Immunofluorescence においても高強度のシグナルが得られた。本固定液は、浸漬固定のみで以上の効果を発揮するため、形態に着目した定量解析など、眼球全体を対象としたさまざまな組織学的解析における有用な技術的基盤となりうる。

以上、本研究では、① 晩成性・早成性動物間で発達様式は異なるものの、網膜の形態学的成熟は薄化過程を経て離乳期を境に収束すること、② 離乳時期までの期間は視覚の正常な発達に影響を及ぼし、特に幼少期ストレスは母性行動を減少させるだけでなく、仔の視覚へも世代を超えて影響を及ぼす可能性があること、③ GBMT solution は、浸漬固定のみで、眼球における高品質な組織標本の作成・抗原の良好な保持を可能にし、微細構造に関する解析に有用であること、が示された。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	兵頭 宗厳
審 査 委 員	主 査： 山口大学 教 授 日下部 健
	副 査： 山口大学 教 授 加納 聖
	副 査： 山口大学 教 授 森本 将弘
	副 査： 鹿児島大学 特任教授 安藤 貴朗
	副 査： 山口大学 准教授 櫻井 優
題 目	哺乳類新生仔における発達期網膜の形態学的変化：晩成性および早成性哺乳類の比較と離乳条件の差異が及ぼす影響

審査結果の要旨：

新生子が視覚機能を獲得するためには網膜の組織学的な完成が必要であるが、網膜の形成過程は動物種により異なる可能性がある。申請者は、出生時の発達状態が異なる晩成性および早成性動物を比較し、網膜の生後成長過程の違いと、視覚機能獲得に必要な形態学変化を明らかにすることを目的として研究を行った。

第一章において、晩成性動物と早成性動物のモデル動物としてそれぞれマウスとウシを用い、眼球および網膜の生後成長について検証した。マウスでは、開眼時期である生後 14 日頃まで、網膜の厚さが増加した。網膜は 14 日以降に薄化期に移行し、35 日まで続いた。肥厚期では成獣で見られる 10 層構造が完成し、内顆粒層では杆体双極細胞において軸索の伸長を確認した。薄化期になると外顆粒層では細胞が直線状に配列し、配列する細胞数が減少した。薄化期では杆体双極細胞は軸索が短縮し、神経節細胞は配列が多層から単層に減少した。一方、ウシの網膜は、出生時点ですでに 10 層構造を有していた。マウスの肥厚期に相当する過程は観察されず、出生後から 60 日まで網膜は薄化した。薄化期ではウシにおいても、網膜の細胞配列の変化と軸索の短縮が見られた。薄化期では、網膜への光の入射および感受に関わる組織構造が構築され、神経回路の収束に関連する網膜の成熟化が起きていると考えられた。

第二章では、網膜の成熟における出生から離乳期間の重要性に注目した。早期の離乳による母子分離（maternal separation with early weaning ; MSEW）は幼少期ストレスを誘導し、新生子の心理的・肉体的な負荷、不安の要因となる。実験動物では脳と網膜の組織異常を引き起こすことが知られている。申請者は MSEW および離乳遅延のモデルマウスを作出し、網膜の組織形成への影響を評価した。さらに、MSEW 個体の産子についても評価し、

幼少期ストレスが次世代の視覚成長に及ぼす影響を調査した。両モデルについて、成長過程の網膜の組織構造には顕著な異常を認めなかったが、両モデルのメスにおいて、網膜の肥厚化を確認した。また MSEW の一部個体では、産子において高い食殺・死亡率が観察された。授乳中の産子には低体温の傾向が見られ、MSEW 個体の授乳行動の低下が推測された。産子の眼球は離乳から 35 日までは矮小傾向を示し、開眼時期は 1～2 日早くなった。早期離乳によるストレス誘導はメス網膜の組織形成に影響し、幼少期のストレスおよび網膜の変化は、母性行動に影響を及ぼしうる可能性が示された。

申請者は、眼球を用いた研究を進める過程において、従来の固定液は網膜・脈絡膜・水晶体・虹彩における微細構造の形態、および眼球内の配置が十分に保存されていないことに気づいた。第三章では、眼球を保存するための高機能な固定液の開発を試みた。固定液に 1-ブタノールを添加することで、眼球内における組織の固定・脱水処理を均一化させた。ジスルフィド結合の強力な還元剤であるトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩と、メタノールを固定液へ添加することで水晶体を軟化させた。さらに、固定液成分のホルムアルデヒドをグリオキサールへ置換することで、タンパク質の架橋作用を軽減化させた。以上の試みから、眼球の全体標本の作製に適した GBMT solution を確立した。この固定液は網膜と角膜の形態および虹彩の配置の保持に優れた結果を示し、水晶体の薄切切片作製を容易にした。さらに細胞質抗原の保持性に優れ、免疫染色において陽性反応の増強と特異性を示した。

本論文は晩成性・早成性動物において共通する新生子網膜の薄化変化を明らかにし、細胞配列や軸索変化を伴う組織学的な成熟過程を提唱した。また、早期離乳モデルを作出し、幼少期ストレスが出生から離乳期までの網膜の成長に与える影響を示し、母性行動及び次世代の視覚形成への影響の可能性を示した。迅速かつ均一性のある固定液を開発し、眼球の高品質な組織標本の作成、抗原の良好な保持を可能にした。これらの成果は高い学術的価値を有し、組織学的解析における有用な技術的基盤の形成に寄与する。

以上により本論文は、博士（獣医学）の学位論文として、十分な価値があるものと認められた。