

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

山口大学大学院共同獣医学研究科

兵頭 宗厳

2026 年 3 月

目次

総合緒論	3
第一章 マウスとウシにおける出生後の網膜成長－組織学的変化の相違点と共通点－	
緒論.....	6
材料と方法.....	8
結果.....	13
考察.....	20
参考文献	25
付図・付表.....	28
第二章 授乳期間の変化が網膜の生後成長に及ぼす影響	
緒論.....	42
材料と方法.....	46
結果.....	50
考察.....	55
参考文献	61
付図.....	66
第三章 全眼球標本における組織保存性の向上を目的とした浸漬固定液の開発	

緒論.....	77
材料と方法.....	80
結果.....	83
考察.....	88
参考文献	95
付図・付表.....	99
総合考察	111
謝辞	114

総合緒論

出生時における哺乳類新生仔の成熟度は動物種により異なる。未熟な状態で出生し、自活能力の獲得まで親の庇護が必須であるものは晩成性動物に、ある程度成熟しており、生後すぐに一定の自活能力を示すものは早成性動物に大別される (Derrickson 1992; Kawamichi and Kawamichi 1993; Werneburg et al. 2016; Scheiber et al. 2017)。器官の発達程度もこれに準じ、特に視覚系では、前者は眼瞼が未解離のため開眼していないのに対し、後者は開眼しているという点で異なる。また、晩成性動物網膜は、出生時点の層構造が未完成であり、成熟網膜と同様の 10 層構造が完成するのは開眼時期頃である (Theiler 1989; Harman and Beazley 1987; Dufour et al. 2020; Kandoi et al. 2022)。一方、早成性動物網膜は出生時からすでに 10 層構造を示す (Abdo et al. 2014; Kuhrt et al. 2017; Tomar and Bansal 2019)。このことから、晩成性動物は視覚を出生後の成長過程の中で大きく成長させるのに対し、早成性動物では出生時から機能的な視覚をもつ、という顕著な差異が存在する。しかし、両者網膜の発達過程を比較形態学的観点から論じた報告はない。そこで第一章では、晩成性動物としてマウス、早成性動物としてウシに焦点を当て、発達期網膜の形態学的変化の差異および機序を解明することを目的として解析を行った。

離乳は哺乳動物にとって、親からの独立段階が大きく変化する生物学的イベントである。実験動物において離乳時期を変化させることは、幼少期のストレスモデルとして利用され、特に母子間の関係性に起因する精神障害の評価に用いられる (Murthy et al. 2019; Sun

et al. 2020; Vigdal and Brønnick 2022; Huang and Wan 2025) 。この分子生物学的な機序として、脳における神経細胞とアストロサイトの協調性の乱れが示唆されているが (Zeng et al. 2020) 、網膜における影響や機序については知見が少なく不明な点が多い。また幼少期のストレスに伴う精神障害は、親の行動変容を通して次世代以降にも伝達される (Kikusui et al. 2005; Saavedra-Rodríguez and Feig 2013; Assink et al. 2018) 。この「世代間伝達」が次世代の視覚発達に及ぼす影響は不明であるが、影響の程度によっては生物学的に深刻な問題となりうる。第二章では、視覚器の成熟に対する、離乳までの期間の生物学的意義を理解することを目的として、マウスを対象に解析を行った。

解析を進める中で、眼球特有の組織固定および薄切標本作成の困難さが課題となった。眼球は、固定液の浸透を阻む眼球壁の存在、網膜の迅速な死後変性、内部に位置する硬い水晶体、といった特徴を併せ持ち、従来の固定液の利用では、本来の形態を維持した全眼球標本を得ることが難しい (Margo and Lee 1995; Finnie et al. 2021) 。また、ホルムアルデヒドは強力なタンパク質架橋作用を示すため、抗原エпитープを過度にマスクし、免疫染色において問題となる場合がある (Konno et al. 2023, 2025) 。グリオキサールは迅速な固定作用を有し、かつ優れた抗原性保持性を持つ、注目すべき固定剤である (Richter et al. 2018; Konno et al. 2023, 2025) 。第三章では、マウス眼球を対象に、(1) 浸漬法における迅速な浸透と固定、(2) 抗原性の保持、(3) 適切な添加剤の混合による全眼球構造を維持した薄切標本の作成、の3点を可能にする新規固定液の開発を行った。

本論文の成果は、視覚発達過程に関して、晩成性-早成性動物間の差異に対する生物学的意義の理解、および幼少期の環境要因が担う役割の理解、に寄与するものである。さらに、眼球組織に関わる形態解析の有用性および信頼性の向上に貢献する。

第一章 マウスとウシにおける出生後の網膜成長－組織学的変化の相違点と共通点－

緒論

哺乳類新生仔には、出生時における各器官の発達程度に種差が存在する。消化管 (Thomson and Keelan 1986) や腎臓 (本研究室の未発表データ) は、多くの動物で出生時から十分機能的に発達している傾向にある。一方で皮膚や甲状腺は機能的に未熟であり、新生仔は体温調節能を欠いている場合がある (Cisneros and Goins 2009)。器官が未熟であることは新生仔が自活能力をもたないこと意味し、その機能は母親による庇護により補われる。これらの点に着目して、哺乳類は晩成性動物と早成性動物に分類される。この分類は、新生仔の特徴から判断されることが推奨されており、感覚器官の発達程度、体温調節能、自立的な運動能力、栄養学的独立（離乳など）までに必要な期間などを指標とする (Derrickson 1992)。一般に、晩成性動物にはマウスやラットが分類され、妊娠期間が短く、産仔数が多く、新生仔の体サイズが大きい傾向にある。新生仔は体毛が少なく、眼瞼が閉じており、わずかな歩行能力しかもたない (Derrickson 1992)。また新生仔は体温維持、授乳、捕食者からの逃避を独立行動が可能になるまで母親に依存する (Kawamichi and Kawamichi 1993; Werneburg et al. 2016; Scheiber et al. 2017)。これに対し、ウシやウマなどの早成性動物は妊娠期間が長く、産仔数が少なく、新生仔の体サイズが大きい傾向がある。新生仔はよく発達した体毛をもち、眼瞼は開裂し、自力歩行が可能である (Derrickson 1992)。視覚能力に関しては、マウス新生仔は出生時には開眼してお

らず、12 日齢（P12）頃に眼瞼が開裂して開眼するまでは視覚を利用することができない。新生仔の網膜では未熟な網膜神経芽細胞が顕著であり、細胞分化や組織構築が不十分である。10 層構造の構築はマウスでは P6 頃に始まり、P16 までに完成するとされる (Theiler 1989)。イヌ網膜も出生時には層構造が未完成であるが、P10–15 までに 10 層構造が完成し、この時期は新生仔の開眼時期と一致する (Dufour et al. 2020)。その他の晩成性動物（ジュウサンセンジリスやワラビー）においても、出生時網膜は組織学的に未熟であるが、開眼までには 10 層構造を完成させる (Harman and Beazley 1987; Kandai et al. 2022)。これに対し、早成性動物であるバフファローやヒトコブラクダ、アジアゾウ、アフリカゾウは出生時から完成した 10 層構造をもつ (Abdo et al. 2014; Kuhrt et al. 2017; Tomar and Bansal 2019)。以上の所見は、早成性動物の新生仔が出生時から機能的網膜をもつことを示唆する。晩成性動物と早成性動物において、網膜の組織学的成長過程を比較することは、視覚機能の獲得段階や成長機序を理解する上で有用であると考えられる。特に晩成性動物の、早成性動物よりも組織形成が遅れるという特徴は網膜の細胞分化や組織構築の違いを反映し、両者の視覚機能の獲得や成長に関わる重要な知見であると考えられる。本研究では、マウスとウシの出生後網膜を組織学的に解析し、両者の成長過程における特徴を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

1. 供試動物

ICR マウス（7 週齢）を日本 SLC（Hamamatsu, Japan）より購入し、飼育環境にて 1 週間順化させた後、雄雌を同居させ交配を行った。翌朝に膣栓が確認された雌を出産まで単独飼育した。娩出された仔は、P0, 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 90, 210, 240, 300（各日齢 3 個体）にて実験に用いた。P0-7 の新生仔はプラスチック製ペトリ皿に入れ、氷との直接接触を避けた上で氷冷麻酔を施し、不動化を確認後に断頭した。P8 以降のマウスに対しては、イソフルラン吸入による深麻酔下で不動化を施し、断頭または頸椎脱臼により安楽殺を実施した。その後マイクロピンセットを眼窩に挿入し、視神経を外眼筋と眼窩脂肪とともに切断して左右の眼球を慎重に採材した。本実験に関わる計画およびプロトコルは、山口大学動物使用委員会（承認番号：480 および 557）により審査・承認された。

ウシは、山口大学総合病性鑑定研究施設（iPaDL）にて死亡または安楽殺後に病理学的解剖を実施された黒毛和種ウシを対象とし、剪刀と鑷子を用いてマウスと同様の手法にて眼球を得た。日齢は P0, 1, 2, 3, 6, 8, 10, 15, 23, 35, 60, 120, 150, 300, 390, 420, 540（各日齢 1 個体）を用いた。使用したウシは、いずれも病理解剖時に眼球の異常および明らかな神経疾患の症状がないことを確認した。

2. 眼球の計測と固定

外眼筋および脂肪組織を除去し、マウスは実体顕微鏡 SMX800 (Nikon, Tokyo, Japan) とデジタル顕微鏡カメラ MC120 (Leica, Wetzlar, Germany) を用いて、ウシはデジタル一眼レフカメラ (D60, Nikon, Tokyo, Japan) を用いて正面および側面から撮影した (Fig. 1a, b)。

眼球の重量の測定に加え、写真と Image J2 (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて眼球の縦径、横径、前後径、ならびに角膜の縦径と横径を計測した。両動物の眼球は真球、角膜はマウスでは真円、ウシでは楕円と仮定して、体積と面積を算出した。マウス眼球は断面を入れず全体を、ウシ眼球は赤道面で切断し眼底側をそれぞれ対象として、24 時間の浸漬固定を行った。マウス眼球に対しては、Davidson's solution (10%中性緩衝ホルマリン液、99%エタノール、酢酸、蒸留水 (2: 3: 1: 3)、Presnell and Schreibman 1997) を、ウシ眼球に対しては 4% パラホルムアルデヒドを用いた。固定後はリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、マウス眼球は定法に従ってパラフィンプロックを作成した。ウシ眼球は visual streak 領域 (後述) を対象としてトリミングを行い、パラフィンプロックを作成した。

3. 網膜の厚さおよび、外顆粒層と内顆粒層の構成細胞数の計測

マウス眼球のパラフィン切片 (厚さ 6 μm) は、視神経乳頭を含む断面にて作成した (Fig. 1c)。マウス網膜では、視神経乳頭の背側に視覚情報の処理に優れる中心視覚野が局在している (Heukamp et al. 2020)。ウシ眼底における visual streak 領域 (Fig. 1d) も、中心

視覚野の役割を担っている (Hebel 1976; Kassab and Sugita 2000; Shinozaki et al. 2010) 。中心視覚野または visual streak 領域の網膜を含むパラフィン切片にヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡 (Nikon Eclipse CiE-E-31, Nikon, Tokyo, Japan) にて観察した。組織学写真を基に、画像解析・計測ソフトウェア WinROOF 2018 (Mitani Coop., Tokyo, Japan) を用いて、対象領域における網膜全体の厚さおよび各層の厚さを計測した。また外顆粒層 (outer nuclear layer: ONL) および内顆粒層 (inner nuclear layer: INL) の計測では、画像にて層構造に対して垂直な直線を引き、直線上に整列した細胞数 (層厚を構成する細胞数) を計数した。層厚と細胞数の計測は、各切片の任意の 20 箇所にて実施した。

4. 免疫組織化学

上記に準じて、マウス眼球 (P0, 2, 7, 14, 21, 28, 90) およびウシ網膜 (P1, 23, 60, 420) のパラフィン切片 (厚さ 6 μ m) を作成した。脱パラフィン処理後、100%, 90%, 70%エタノールおよび蒸留水に浸漬した。切片は抗原賦活化液 pH 9 (415211, Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan) と電気圧力鍋を用いて、20 分間加圧下にて煮沸した。10%スキムミルクで 30 分間ブロッッキングした後、一次抗体 [anti-Cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology, 5A1E, Danvers, MA, USA) または anti-PCNA (Proteintech, 10205-2-AP, Rosemont, IL, USA)] を 4°Cで一晩反応させた。ペルオキシダーゼ標識ポリマー結合二次抗体 (Histofine Simple Stain MAX-PO®, Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan) にて処理後、Peroxidase Stain DAB Kit

(Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を用いて特異的抗体結合を検出した。その後ヘマトキシリンによる対比染色を行い、切片を観察した。

5. 免疫蛍光

マウス眼球 (P6, 10, 14, 21, 28, 35, 56) およびウシ網膜 (P1, 6, 15, 23, 60, 420) のパラフィン切片 (厚さ 6 μm) を作成した。免疫組織化学と同様の方法にて脱パラフィン処理、抗原賦活化、ブロッッキングを行った後、Alexa Fluor 488 標識 anti-Protein kinase C alpha (PKC α) antibody (sc-8393 AF488, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を用いて 4°C にて一晩反応させた。Anti-PKC α antibody は双極細胞のサブタイプのうち、桿体双極細胞 (rod bipolar cell: RBC) を特異的に標識し、INL 中の細胞体および内網状層 (inner plexiform layer: IPL) 中の軸索を識別することができる (Haverkamp and Wässle 2000)。組織像は、共焦点顕微鏡 Mica と LasX ソフトウェア (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて取得した。RBC の形態解析は Image J2 (NIH) を用いて実施し、細胞体の長径と軸索長を計測した。また INL 外縁上に存在する PKC α 陽性細胞体数の計測に加え、細胞体密度 (単位長さあたりの細胞体数) を算出した。画像上で INL と IPL の境界線と並行に直線を引き、直線上の PKC α 陽性軸索数を計測し、細胞体密度と同様の手法にて軸索密度を算出した。同一軸索の重複計測を避けるため、IPL 領域のうち INL 側 1/2 の範囲内に存在し、単一かつ独立した軸索を計測対象とした。軸索長の計測には、切片作成過程で切断さ

れず、起始部から終末まで完全に連続する PKC α 陽性軸索を対象とした。一切片あたり 20 個の細胞体と 20 本の軸索について長さを計測し、平均値を算出した。

6. 各計測における選択バイアスの評価

ウシ網膜は利用可能なサンプルが各日齢 1 つのみであったため、統計ソフト EZR (Kanda 2013) を用いたブートストラップ法により、選択バイアスの有無を確認した。網膜の層厚、ONL および INL の層厚を構成する細胞数、RBC の細胞体長径と軸索長に関する測定データを対象とし、標準誤差に対するバイアスの比率 (Bias/Std. Error) が 0.1 未満の場合を選択バイアスなしと判断した。

結果

1. 眼球サイズの生後変化

マウス眼球は P0 直後から急速な成長を示した。重量は P28 までに 0.0047 g から 0.019 g に達し、4.04 倍となった (Fig. 2a, b)。体積は P42 までに 3.39 mm^3 から 19.64 mm^3 へ 5.79 倍に増加した (Fig. 2c, d)。角膜面積は P28 までに 1.09 mm^2 から 5.88 mm^2 へ 5.39 倍に増加した (Fig. 2e, f)。P35 以降は眼球重量・体積・角膜面積の増大が緩やかな変化へと移行した。ウシ眼球も出生後に急速な成長が確認されたが、その増大はマウスよりも僅かであった。出生後 6 日間で、重量は 10.65 g から 17.18 g へ約 1.61 倍に増加した (Fig. 3a, b)。眼球体積は $13.58 \times 10^3 \text{ mm}^3$ から $22.07 \times 10^3 \text{ mm}^3$ に達し、約 1.63 倍となった (Fig. 3c, d)。角膜面積は 281.58 mm^2 から 381.26 mm^2 へ 1.35 倍に増加した (Fig. 3e, f)。これらは P6 以降も直線的な増加を続けたが、変化はより緩やかであった。

2. 成長に伴う網膜の組織学的変化

2-1. マウス網膜

P0 および P2 のマウス網膜では、ONL、外網状層 (Outer plexiform layer: OPL)、INL は見られず、代わりに網膜神経芽細胞層 (Neuroblast layer: NBL) が観察された (Fig. 4a)。P5 にて NBL は ONL と INL に分かれ、ONL と INL の間が徐々に拡大することで OPL を形成し、P14 では明確な 10 層構造が認められた。網膜厚は出生後 14 日間で $192.04 \mu\text{m}$ (P0) か

ら 278.85 μm (P14) に肥厚し、その後は P35 までに 172.49 μm まで減少した (Fig. 4b 左)。P35 以降は網膜厚に大きな変化はなく、P240 から P300 にかけてわずかに減少した (Fig. 4b 左右)。ONL を構成する細胞は P14 でクロマチン凝集を示し、これらの細胞は P28 にて網膜層構造に対して垂直に直線状に配列するようになった (Fig. 4c)。神経節細胞層 (Ganglion cell layer: GCL) は P0 の時点で明瞭に認められ (Fig. 4d)、GCL を構成する網膜神経節細胞 (Retinal ganglion cell: RGC) の配列は P0-5 にかけて多層から二層へ変化し、P14 までに完全に単層へと変化した。

2-2. ウシ網膜

マウス網膜とは異なり、ウシ網膜は P0 時点で既に完成した 10 層構造を有していた (Fig. 5a)。P0 の網膜厚は 259.85 μm で、測定期間中最も厚く (Fig. 5b 左)、その後は 173.12 μm (P15) から 131.34 μm (P60) への急速な減少がみられた。P60 以降は大きな厚さ変化は認められなかった (Fig. 5b 右)。ONL における細胞配列を明確に同定することはできなかった。GCL では、P0 のマウスほど RGC 数が豊富ではなく、P6 では単列に整列していた (Fig. 5c)。一部のウシ網膜サンプルは死後変性を示し、重度の組織構造破綻が認められたものは解析から除外した。ブートストラップ解析より、計測データにおける Bias/Std. Error 比は全て 0.1 (10%) 未満で、ウシの計測データについて選択バイアスの影響は認められなかった (Table 1)。

3. 各網膜層の厚さ変化

3-1. マウス網膜

ONL は P6 で最も厚く ($75.13\ \mu\text{m}$) を示し、その後は P35 に $40.85\ \mu\text{m}$ となるまで急速な薄化を示した (Fig. 6a)。同様に INL は P5 で $87.00\ \mu\text{m}$ であり、P35 までに $37.49\ \mu\text{m}$ まで薄化した (Fig. 6b)。GCL も P0 で $22.32\ \mu\text{m}$ であり、P35 までに $8.82\ \mu\text{m}$ まで薄化した (Fig. 6c)。その後 ONL, INL, GCL は P56 にかけてわずかに薄化し、特に P49 以降はほぼ変化がみられなかった。一方で、OPL は P5 で最も薄く ($5.23\ \mu\text{m}$)、その後 P28 までに急激に肥厚して $16.06\ \mu\text{m}$ に達した (Fig. 6d)。P28 以降は急激に減少し、P35 で $9.52\ \mu\text{m}$ となった。同様の変化は IPL および視細胞層 (Photoreceptor cell layer: PL) でも観察された。IPL は P0 で最も薄く ($17.80\ \mu\text{m}$)、P14 で $53.19\ \mu\text{m}$ まで肥厚した後、P28 から P35 にかけて $51.31\ \mu\text{m}$ から $39.42\ \mu\text{m}$ へ急激に薄化した (Fig. 6e)。PRL は P0 で $6.08\ \mu\text{m}$ であり、P28 までに $31.52\ \mu\text{m}$ に肥厚した (Fig. 6f)。P28 以降は薄化が進行し、P35 では $21.05\ \mu\text{m}$ となった。神経線維層 (Neurofilament layer: NFL) は出生後、肥厚と薄化を示し、P2 で最も厚い $22.07\ \mu\text{m}$ を示した (Fig. 6g)。P10 以降は薄化が継続し、P35 で最も薄い $9.61\ \mu\text{m}$ に達した。

3-2. ウシ網膜

ONL, INL, OPL, IPL は P0 で最も厚く、P60 までに 40-60% 厚さが減少した。この期間の詳細な厚さ変化は、60.75 μm から 32.64 μm (ONL, Fig. 7a)、33.67 μm から 14.55 μm (INL, Fig. 7b)、14.78 μm から 6.84 μm (OPL, Fig. 7c)、91.33 μm から 33.55 μm (IPL, Fig. 7e) であった。GCL は P1 で最も厚い 18.55 μm を示し、その後は P60 までに 8.77 μm まで 52.7% 薄化した (Fig. 7c)。P60 以降、PL 以外の層では大きな厚さ変化は認められなかった。PL は肥厚期と薄化期の両方の変化を示し、最終的に P0 から P420 までの間に約 140% 肥厚した (Fig. 7f)。NFL も同様の過程を示し、P60 以降は約 13 μm で安定化した (Fig. 7g)。

4. ONL, INL を構成する細胞数の変化

ONL および INL の厚さはマウスおよびウシの網膜成長に伴い減少した。そこで層の薄化が細胞数の減少を伴うかを確認するため、ONL, INL で層構造に対して垂直に引いた直線上にある細胞数を計測した。マウス ONL では直線上の細胞数は P5 では 10.24 ± 1.15 個であったが、P28 では 11.97 ± 0.91 個へとわずかに増加した (Fig. 8a)。その後、細胞数は P300 までに 7.19 ± 0.45 個まで徐々に減少した。マウス INL の構成細胞数は P5 で最多の 11.48 ± 1.32 個を示し、その後 P21 で 7.31 ± 0.37 個まで減少した (Fig. 8b)。P49 (5.65 ± 0.26 個) 以降は一定に保たれた。ウシ ONL の細胞数は P15 で最多である 13.55 ± 2.06 個を示し、P23 で 9.05 ± 1.47 個まで減少した後、以降は P390 (7.50 ± 1.12 個) までほぼ一定となった (Fig.

8c)。INL の細胞数は P0 で 4.75 ± 0.89 個であり、P1 (6.40 ± 1.02 個) にピークに達した

(Fig. 8d)。その後は P60 で 2.90 ± 0.62 個まで減少し、以降は一定に保たれた。

5. 桿体双極細胞の細胞体サイズと軸索長の生後変化

INL および IPL の層厚変化に関し、両層に渡って位置する桿体双極細胞 (rod bipolar cell: RBC) について評価した。INL に対して垂直な直線上に存在する RBC 数を計測すると、マウス網膜では P10 において 2-3 個の RBC が整列していた (Fig. 9a)。その数は P14 で最大 5 個まで増加し、以降は P35 で 1-2 個に減少し、P56 まで維持された。この変化は Fig. 6b の結果と矛盾しないものであった。ウシ INL では、RBC は P1 で 2-3 個が存在し、P60 で 1-2 個に減少した (Fig. 10a)。

マウスにおいて RBC の細胞体は、日齢と共に楕円形から円形へと変化した (Fig. 9a)。RBC の細胞体の長径は P6 ($11.24 \pm 1.06 \mu\text{m}$) から P21 ($8.87 \pm 1.48 \mu\text{m}$) にかけて約 21% 短縮し、以降は一定となった (Fig. 9b)。また、層構造に対して平行方向における細胞体密度は、P6 で 0.14 ± 0.02 個/ μm であり、P14 で最大値 0.21 ± 0.03 個/ μm に達した (Fig. 9c)。その後は減少し、P35 以降は P6 と同程度 (約 0.14 個/ μm) で安定した。RBC の軸索は INL, IPL 内で垂直に伸長し、マウスでは P10 で、ウシでは P1 から IPL の内縁に到達していた。標本上で観察された RBC の軸索径は約 $1 \mu\text{m}$ であり、途切れることなく観察された軸索は $6 \mu\text{m}$ 厚の切片に対して平行に切断されたとみなされ、軸索の長さの測定には問題ないと考

えられた。RBC の軸索長は P10 ($92.15 \pm 18.89 \mu\text{m}$) から P14 ($113.29 \pm 7.913 \mu\text{m}$) にかけて増加し、P35 以降は約 $70 \mu\text{m}$ まで減少した (Fig. 9d)。層に対して平行方向における軸索密度は、IPL において P14 (0.15 ± 0.01 本/ μm) でピークに達し、P35 で 0.11 ± 0.01 本/ μm となるまで徐々に減少した (Fig. 9e)。

ウシ網膜では、RBC の細胞体長径は新生仔期に変動したが、成体では P420 ($8.78 \mu\text{m}$) で P1 ($8.17 \mu\text{m}$) と同水準に達した (Fig. 10b)。細胞体密度は新生仔期マウス (P0–14) でみられた増加は示さず、P1 (0.090 個/ μm) から P420 (0.07 個/ μm) まで継続的に減少した (Fig. 10c)。軸索もマウス P10–14 で観察されたほどの伸長は見られなかった。軸索長は P0 で最長 ($79.83 \mu\text{m}$) であり、P60 では約半分 ($41.89 \mu\text{m}$) となり、その後は P420 ($29.73 \mu\text{m}$) まで緩やかな減少を続けた (Fig. 10d)。軸索密度も P0 (0.099 本/ μm) から P420 (0.057 本/ μm) にかけて約 22% 減少した (Fig. 10e)。

6. アポトーシス細胞と増殖細胞の評価

マウスでは、GCL (P0) および INL 中央部 (P7) にて Cleaved caspase-3 陽性細胞がごく僅かに認められたが、それ以降は明らかな陽性細胞は検出されなかった (Fig. 11a 左)。ウシでは、GCL (P1–420) および INL (P23) に陽性細胞が確認された (Fig. 11a 右)。PCNA については、マウスでは GCL (P2) に多数の陽性細胞が確認されたが、P7 以降は減少した (Fig. 11b 左)。NBL (P2) および INL 中央部 (P7, 14, 21) では弱い陽性反応が認めら

れた。ウシでは、P1において ONL, INL, GCL にて陽性細胞が観察されたが、P60 および P420 では検出されなかった (Fig. 11b 右)。

考察

マウス眼球は出生直後から約 1 か月齢までは指数関数的にサイズと重量が増加し、その後 P35 以降で成長速度が緩やかになった (Fig. 2a-f)。同様にウシ眼球も出生後に急速な増大を示したが、P6 以降では成長速度が低下した (Fig. 3a-f)。ウシ眼球の急速な成長期は短く、これは早成性動物に特徴的な感覚器の早期成熟を反映している。一方で、両動物ともに眼球サイズの増大は、眼底および生後網膜に張力が生じていることを示唆する。

新生仔マウス網膜では三相性の変化が見られた。網膜は出生から P14 まで肥厚し、その後 P49 まで徐々に薄化が進行し、以降は厚さが安定した (Fig. 4b)。マウス網膜の肥厚期には、NBL から ONL, OPL, INL の形成が生じた。ONL, INL では PCNA 陽性細胞がほぼ見られなかったことから (Fig. 11b 左)、層の肥厚は細胞増殖によるものではないと考えられる。また、出生直後には OPL, IPL, PL, NFL が肥厚することが明らかになった (Fig. 6)。

P10-14 において、RBC は INL, IPL 中で細胞体長径と軸索長を伸長させた (Fig. 9b, d)。ラットでは網膜の細胞運命は胎生期に決定し、出生直後から網膜神経芽細胞の分化が進行することが知られている (Livesey and Cepko 2001)。マウス新生仔における出生から P14 までの網膜肥厚期は、開眼前の準備段階に相当すると考えられる。網膜の肥厚は細胞分化を反映した幼若期の現象であり、細胞体と軸索の伸長を通じて、網膜内で効率的な神経ネットワークを構築するための前段階となっていることが推察される。

一方で、ウシ新生仔網膜では、P60 までの薄化とそれに続く安定期という二相性の変化を示し、網膜の全層厚および OPL, IPL, PL, NFL では、マウス新生仔で見られたような肥厚期は認められなかった (Fig. 5b および Fig. 7d-g)。同じウシ亜科に属するバッファローでは、網膜の 10 層構造の形成および肥厚は胎仔期に起こることが報告されている (Tomar and Bansal 2019)。本研究で用いた黒毛和種ウシにおいても、出生時にはすでに NBL から ONL, OPL, INL への以降が完了していた (Fig. 5a)。このことから、ウシでも網膜の組織形成とそれに伴う肥厚過程が胎仔期に進行している可能性が示唆される。ブタ網膜では、P2 までに 10 層構造が完成し、P3 には RBC が INL の外側に整列することに加え、RBC は妊娠 9 週の段階ですでに網膜中に存在していることが確認されている (Ahn et al. 2009; Guduric-Fuchs et al. 2009; Kim et al. 2009)。また、ノウサギでは妊娠 30 日時点で 10 層構造がすでに完成しており、双極細胞を含む分化した網膜細胞が形成されている (El-Desoky et al. 2024)。モルモット新生仔の網膜では、出生時点で暗所視機能が成熟していることが ERG (網膜電図) により示されている (Racine et al. 2008)。このように早成性動物では、網膜細胞の分化や神経突起の伸長、神経ネットワークの形成が胎生期に進行し、出生時にはすでに視覚機能を迅速に発揮できる状態にあると考えられる。

生後網膜の薄化は本研究で観察されたマウスおよびウシに加え、イヌでも生じることが報告されている (Occelli et al. 2020)。マウスとウシでは新生仔期から性成熟期 (マウス：P56、ウシ：P390) にかけて、網膜の厚さは約 40% 減少した。マウスでは、ONL および

GCL が半減し、INL は 1/3 に減少した (Fig. 6)。ウシでは、Cleaved caspase-3 陽性細胞が検出され (Fig. 11a)、特に GCL におけるアポトーシスが薄化に関与することを示唆している。マウスおよびウシの網膜薄化期はいずれも開眼直後の時期に相当する。マウスでは P4 からの強制的な開眼により、網膜が早期に可視光に曝露されることで、RGC のアポトーシスが増加することが報告されている (Liu et al. 2012)。しかし本研究では、RGC 以外の細胞に対してアポトーシスが網膜の薄化にどの程度寄与しているかに関しては分からなかった。

また、マウスの RBC を計測したところ、細胞体サイズ (P10-21) および軸索長 (P10-35) は約 25% 縮小した (Fig. 9b, c)。Solovei ら (2009) は、マウス桿体細胞の核が P0 から P28 にかけて縮小し、特徴的なヘテロクロマチンの凝集核である“chromocenter”が P28 までに完成することを報告している (Solovei et al. 2009)。この chromocenter は、夜行性の動物種の網膜に共通して認められる。ウシの RBC で明確な縮小や形態変化が見られなかったのは、ウシが昼行性動物であり、夜行性環境に適応した細胞学的変化を必要としないためであると考えられる。一方で、軸索の短縮は両動物の網膜薄化期に共通して確認された (Fig. 9d, Fig. 10d)。開眼 (マウスでは P12-13、ウシでは P0) に伴い網膜へ照射される光量の増加がすることは、両種における RBC 軸索の短縮を誘発するトリガーとなる可能性が示唆される。軸索の短縮は、マウスでは P35、ウシでは P60 で安定し、これらの時期はいずれも離乳後二週程度 (マウス) および離乳初期 (ウシ) に相当する。ウシが早成性動

物であることを考慮すると、網膜細胞の形態的・機能的成熟はマウスと比較してより発達段階の早期に進行すると考えられる。

また、P14 から P28 の間に、ONL の構成細胞は層構造に対して垂直に整列し、細胞列は平行に並んでいた (Fig. 4c)。成熟した哺乳類の網膜では、ONL 内の視細胞は入射光に対し平行に整列しており、光が視細胞に到達する効率を高めている (Solovei et al. 2009)。マウスの視細胞におけるロドプシン量は P23 までに急速に増加し、同時期には外節でのディスク形成も活発に行われる (Caravaggio and Bonting 1963; LaVail 1973)。網膜構成細胞の配列化は、網膜への効率的な感光を促進するための重要な成長過程である。Kuhrt らは成熟した哺乳類網膜における「柱状細胞ユニット (columnar-cell unit)」の存在を提唱している (Kuhrt et al. 2012)。このユニットは、1 つの錐体細胞と複数の桿体細胞、そしてミュラー細胞の長い突起を中心に集まる複数の介在ニューロンから構成される。介在ニューロンは 2 個以上の双極細胞と 1 個以下の水平細胞から成り、桿体細胞の数は動物種によって異なる。この柱状細胞ユニットは、INL および ONL における細胞配列の主軸となるとともに、神経突起の伸長や IPL と OPL の層形成におけるガイドとしても機能する。さらに興味深いことに、Kuhrt らは眼球壁の伸展に伴う張力によって誘導される物理的な網膜構造変化の理論を提唱している (Kuhrt et al. 2012)。眼球壁の伸展過程では、柱状ユニット内の構成細胞がミュラー細胞突起の周囲を移動し、細胞配列を維持するためにユニットが平行方向に拡張し、垂直方向に短縮される。実際に本研究でも、網膜の薄化段階で ONL および INL

における配列細胞数の減少が確認された (Fig. 8)。ユニットの変化に関する詳細なメカニズムは明らかではないが、神経細胞の軸索短縮は、細胞配列の変化および網膜の薄化に対応した現象である可能性があり、視覚情報伝達の効率を高める神経ネットワークの発達に関与していると考えられる。

参考文献

- Abdo M, Hosaka YZ, Erasha A, et al (2014) Prenatal development of the eye tunics in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Anat Histol Embryol* 43:257–264
- Ahn M, Moon C, Jung C, et al (2009) Immunohistochemical localization of protein kinase C- α in the retina of pigs during postnatal development. *Neurosci Lett* 455:93–96
- Caravaggio LL, Bonting SL (1963) The rhodopsin cycle in the developing vertebrate retina. II. Correlative study in normal mice and in mice with hereditary retinal degeneration. *Exp Eye Res* 2:12–19
- Cisneros AB, Goins BL (eds) (2009) *Body Temperature Regulation*. Nova Science, Hauppauge, NY
- Derrickson EM (1992) Comparative Reproductive Strategies of Altricial and Precocial Eutherian Mammals. *Funct Ecol* 6:57–65
- Dufour VL, Yu Y, Pan W, et al (2020) In-vivo longitudinal changes in thickness of the postnatal canine retina. *Exp Eye Res* 192:107926
- El-Desoky SMM, Elhanbaly R, Hifny A, et al (2024) Temporospatial dynamics of the morphogenesis of the rabbit retina from prenatal to postnatal life: Light and electron microscopic study. *Microsc Res Tech* 87:774–789
- Guduric-Fuchs J, Ringland LJ, Gu P, et al (2009) Immunohistochemical study of pig retinal development. *Mol Vis* 15:1915–1928
- Harman AM, Beazley LD (1987) Patterns of cytogenesis in the developing retina of the wallaby *Setonix brachyurus*. *Anat Embryol (Berl)* 177:123–130
- Haverkamp S, Wässle H (2000) Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol* 424:1–23
- Hebel R (1976) Distribution of retinal ganglion cells in five mammalian species (pig, sheep, ox, horse, dog). *Anat Embryol (Berl)* 150:45–51
- Heukamp AS, Warwick RA, Rivlin-Etzion M (2020) Topographic variations in retinal encoding of visual space. *Annu Rev Vis Sci* 6:237–259
- Kanda Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48:452–458

- Kandoi S, Martinez C, Merriman DK, Lamba DA (2022) Characterization of retinal development in 13-lined ground squirrels. *Transl Vis Sci Technol* 11:17
- Kassab A, Sugita S (2000) Study of ganglion cell topography of the retina in buffaloes (*Bos bubalis*). *Nihon Chikusan Gakkaiho* 71:600–608
- Kawamichi T, Kawamichi M (1993) Gestation Period and Litter Size of Siberian Chipmunk *Eutamias sibiricus lineatus* in Hokkaido, Northern Japan. *J Mammal Soc Jpn* 18:105–109
- Kim J, Moon C, Ahn M, et al (2009) Immunohistochemical localization of galectin-3 in the pig retina during postnatal development. *Mol Vis* 15:1971–1976
- Kuhrt H, Bringmann A, Härtig W, et al (2017) The retina of Asian and African elephants: Comparison of newborn and adult. *Brain Behav Evol* 89:84–103
- Kuhrt H, Gryga M, Wolburg H, et al (2012) Postnatal mammalian retinal development: quantitative data and general rules. *Prog Retin Eye Res* 31:605–621
- LaVail MM (1973) Kinetics of rod outer segment renewal in the developing mouse retina. *J Cell Biol* 58:650–661
- Liu L, Wu J, Zhou X, et al (2012) The impact of visible light on the immature retina: a model of early light exposure in neonatal mice. *Brain Res Bull* 87:534–539
- Livesey FJ, Cepko CL (2001) Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci* 2:109–118
- Occelli LM, Pasmanter N, Ayoub EE, Petersen-Jones SM (2020) Changes in retinal layer thickness with maturation in the dog: an in vivo spectral domain - optical coherence tomography imaging study. *BMC Vet Res* 16:225
- Presnell JK, Schreibman MP (1997) *Humason's Animal Tissue Techniques*, 5th edn. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD
- Racine J, Behn D, Lachapelle P (2008) Structural and functional maturation of the retina of the albino Hartley guinea pig. *Doc Ophthalmol* 117:13–26
- Scheiber IBR, Weiß BM, Kingma SA, Komdeur J (2017) The importance of the altricial - precocial spectrum for social complexity in mammals and birds - a review. *Front Zool* 14:3
- Shinozaki A, Hosaka Y, Imagawa T, Uehara M (2010) Topography of ganglion cells and photoreceptors in the sheep retina. *J Comp Neurol* 518:2305–2315

- Solovei I, Kreysing M, Lanctôt C, et al (2009) Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell* 137:356–368
- Theiler K (1989) *The house mouse: Atlas of embryonic development*. Springer, New York
- Thomson AB, Keelan M (1986) The development of the small intestine. *Can J Physiol Pharmacol* 64:13–29
- Tomar MPS, Bansal N (2019) Prenatal development of retina in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anat Histol Embryol* 48:125–132
- Werneburg I, Laurin M, Koyabu D, Sánchez-Villagra MR (2016) Evolution of organogenesis and the origin of altriciality in mammals. *Evol Dev* 18:229–244

付図・付表

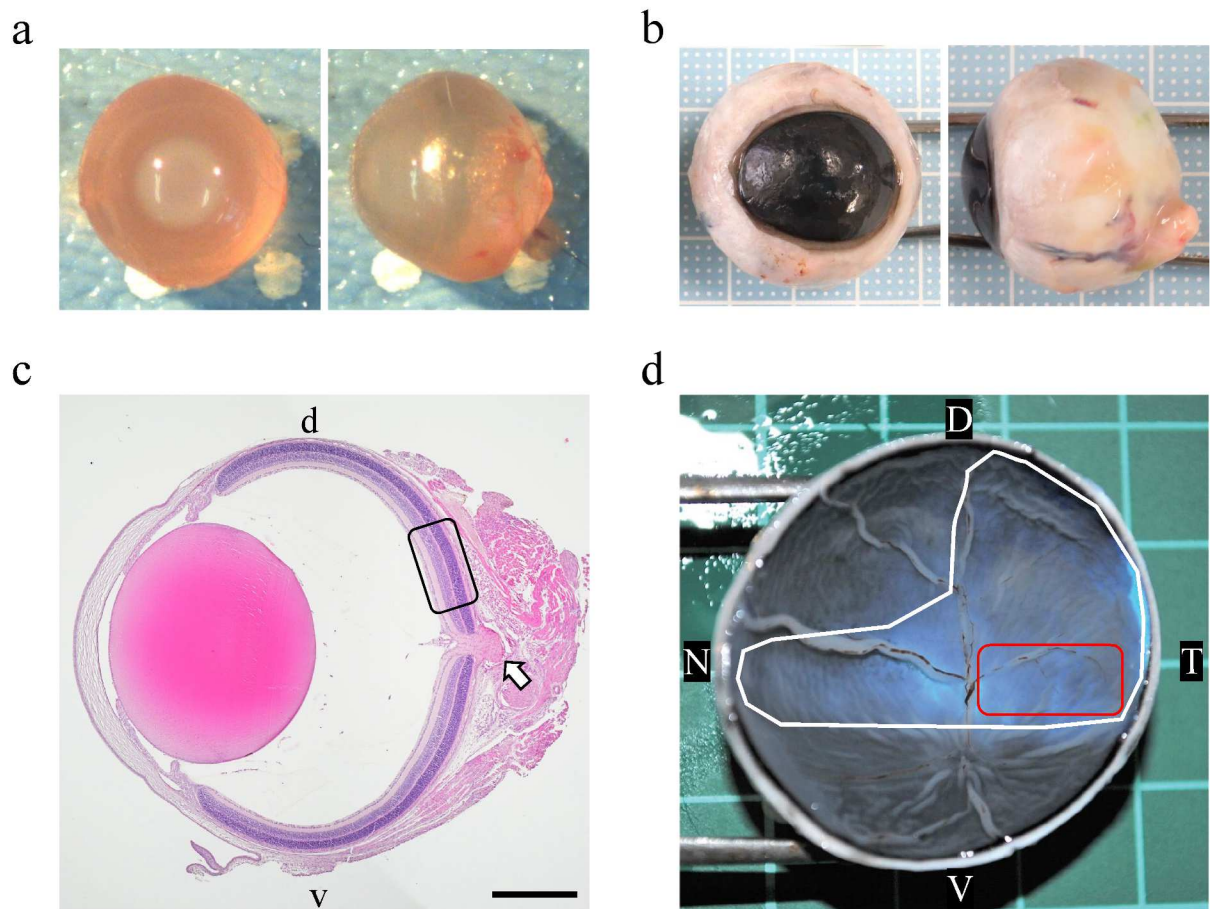


Fig. 1 マウスおよびウシの採材眼球と解析部位

a, b : マウス (a) およびウシ (b) の眼球の前面像 (左) および側面像 (右)

共に同じ水色のマットを使用しており、背景は1 cm四方の格子線を示す

c : 視神経乳頭 (矢印) を含む断面にて作成されたマウス眼球の薄切標本HE染色像

黒枠領域は、組織学的解析に用いた中心視覚野を示す。(スケールバー : 0.5 mm)

d : ウシ左眼球の眼底側半球

visual streak (白枠領域) を含むように赤枠領域をトリミングし、解析に用いた

背景は1 cm四方の格子線を示す

c および d では、眼球方向を背側 (D)、腹側 (V)、鼻側 (N)、側頭側 (T) で示した

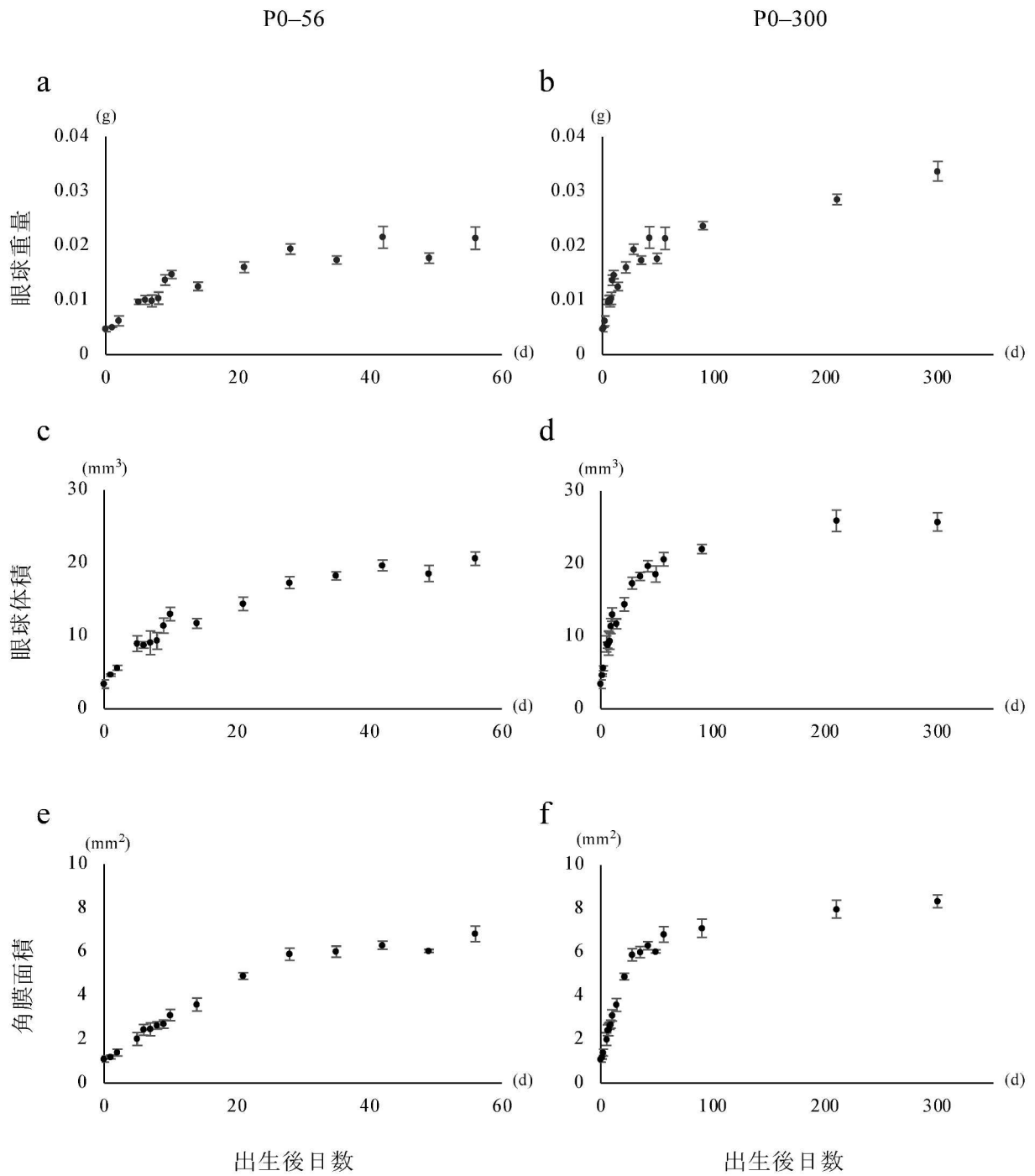


Fig. 2 出生後のマウス眼球のサイズ変化

a, b : 眼球重量 c, d : 眼球体積 e, f : 角膜面積

a, c, e はP0-56までを、b, d, f はP0-300までの値を示す

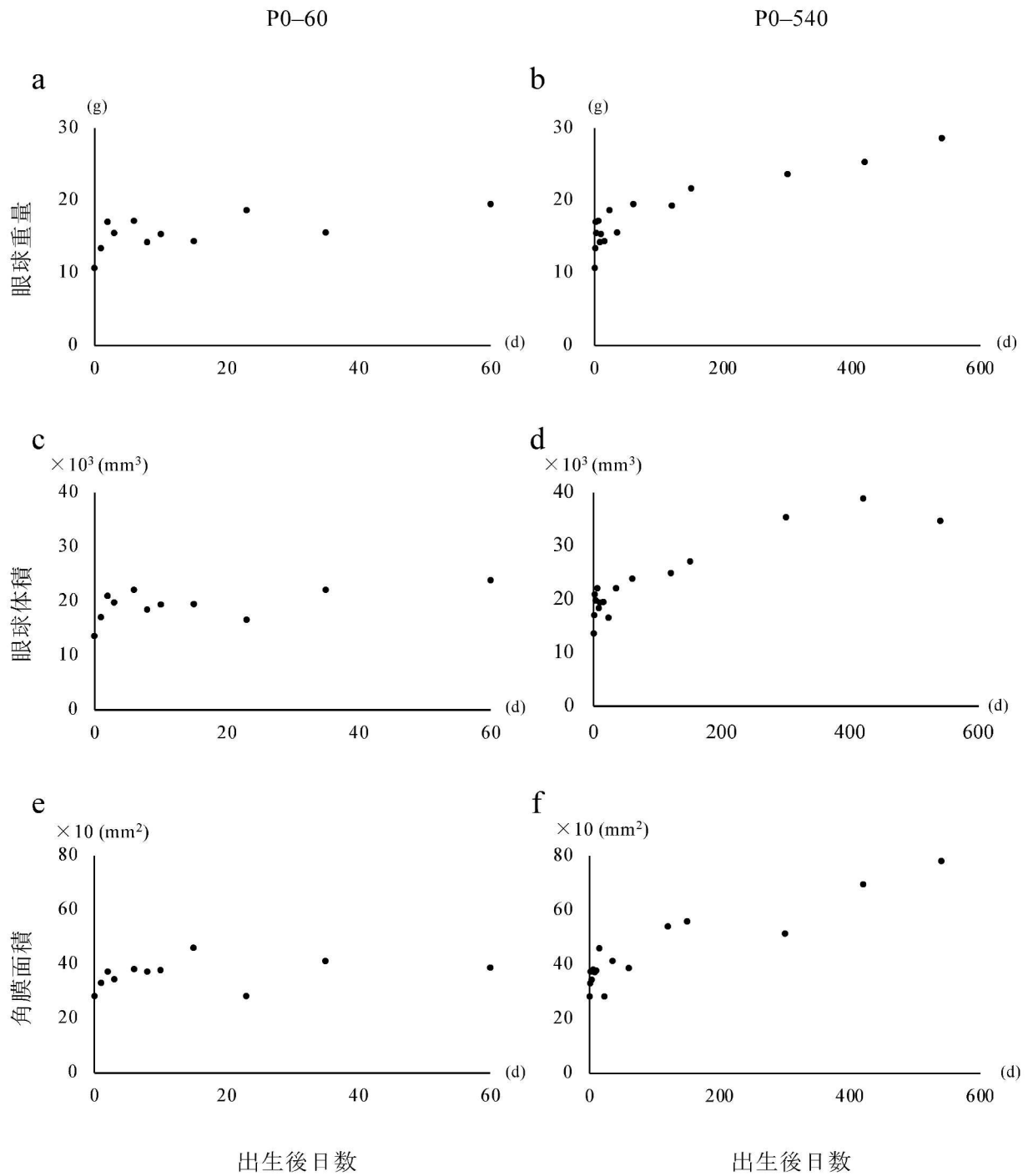


Fig. 3 出生後のウシ眼球のサイズ変化

a, b : 眼球重量 c, d : 眼球体積 e, f : 角膜面積

a, c, e はP0-60までを、b, d, f はP0-540までの値を示す

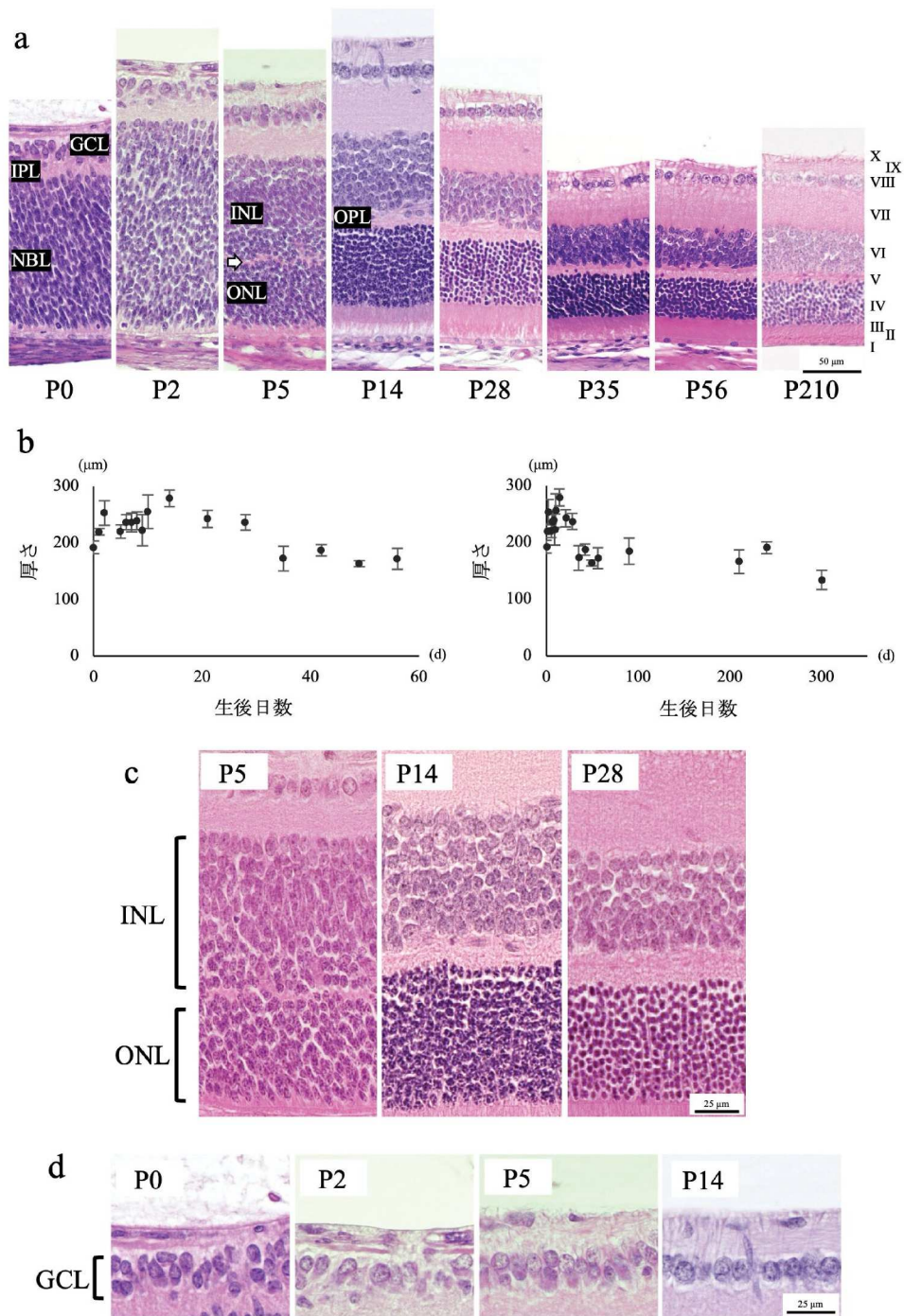


Fig. 4 発達期マウスにおける網膜の形態学的変化

a : 代表的な日齢における組織学的変化

矢印は出現した外網状層 (OPL) を示す

b : 日齢に伴う網膜総厚の経時的変化

左はP0-56までを、右はP0-300までを示す

c, d : INLおよびONL (c) , GCL (d) 構成細胞の形態変化

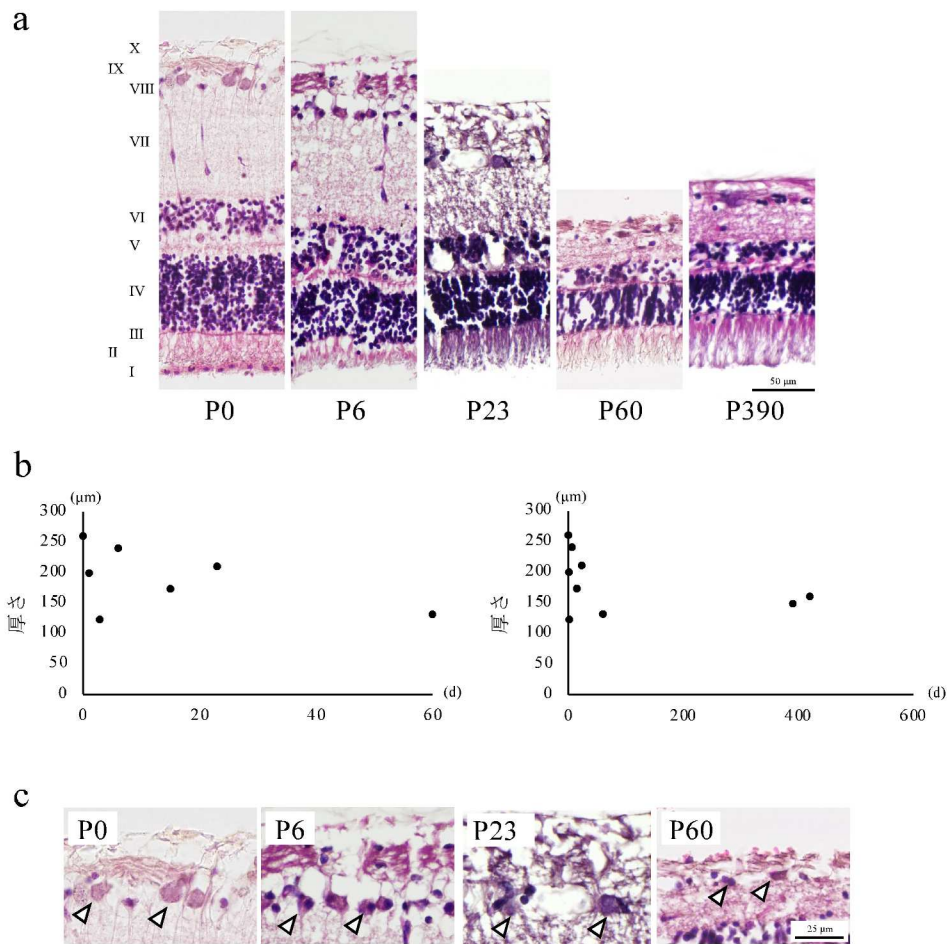


Fig. 5 発達期ウシにおける網膜の形態学的変化

a : 代表的な日齢における組織学的変化

b : 日齢に伴う網膜総厚の経時的変化

左はP0-60までを、右はP0-420までを示す

c, d : GCL構成細胞の形態変化

矢頭はRGCを示す

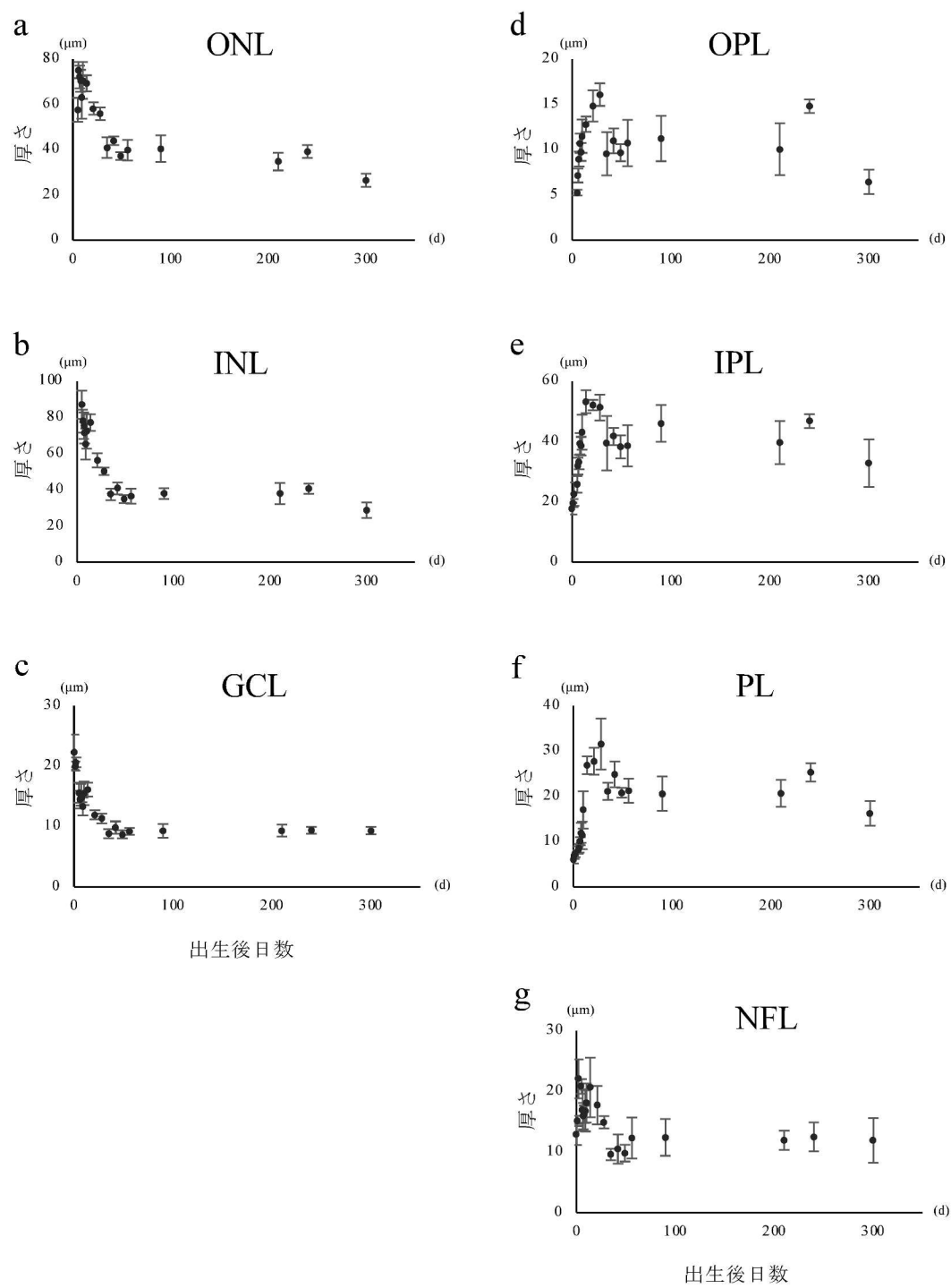


Fig. 6 マウス網膜各層の出生後厚さ変化

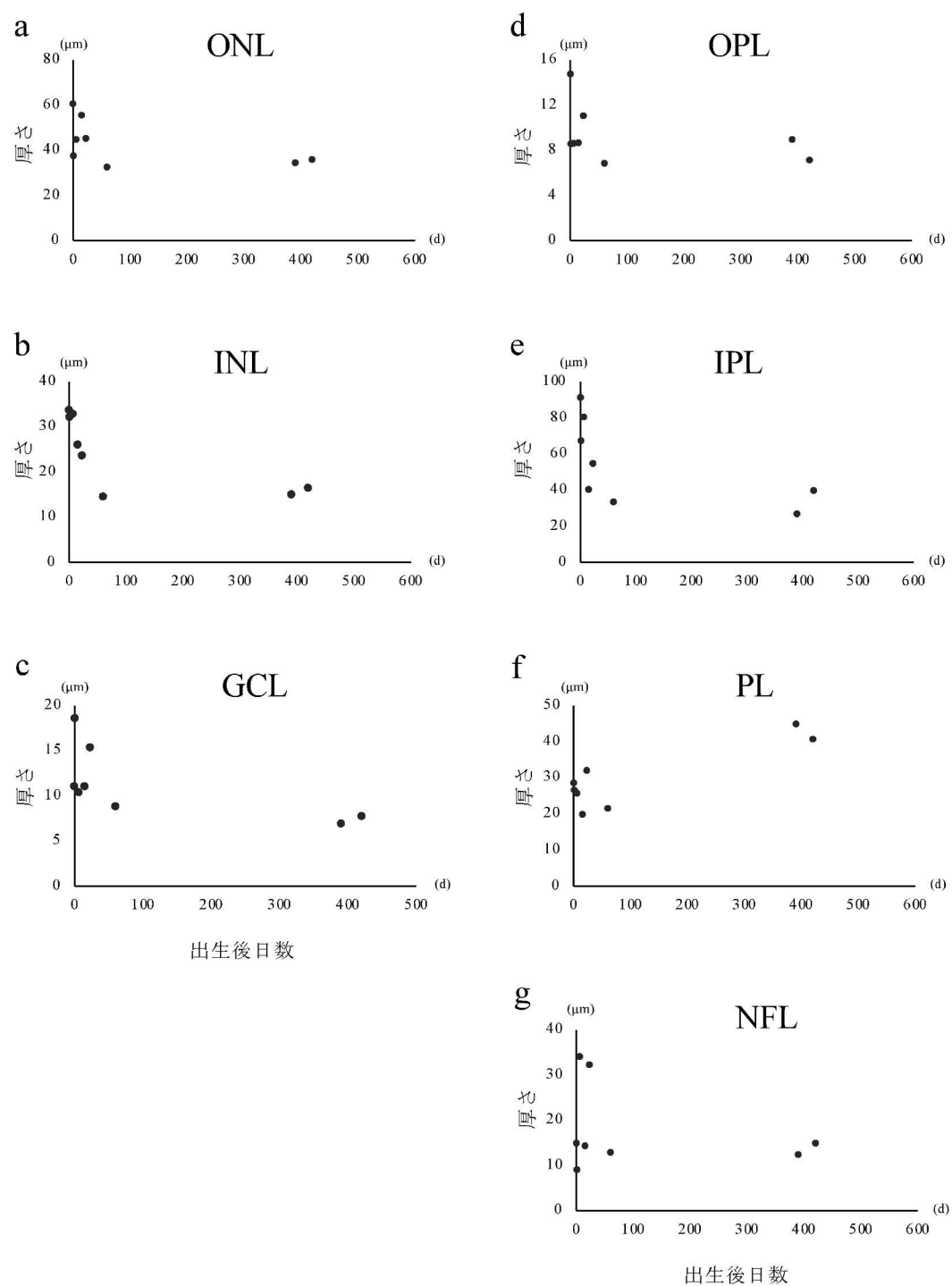


Fig. 7 ウシ網膜各層の出生後厚さ変化

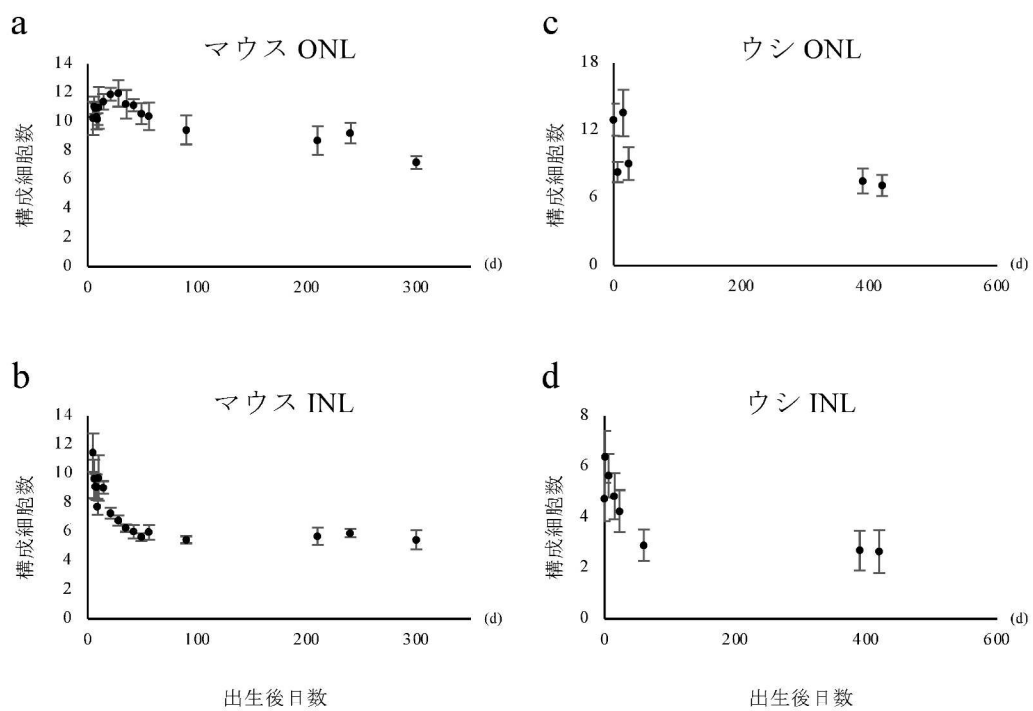


Fig. 8 ONLおよびINLにおける構成細胞数の変化

a, b : マウス c, d : ウシ

各層外縁から内縁に対し、垂直に引いた直線上の細胞数を計測した

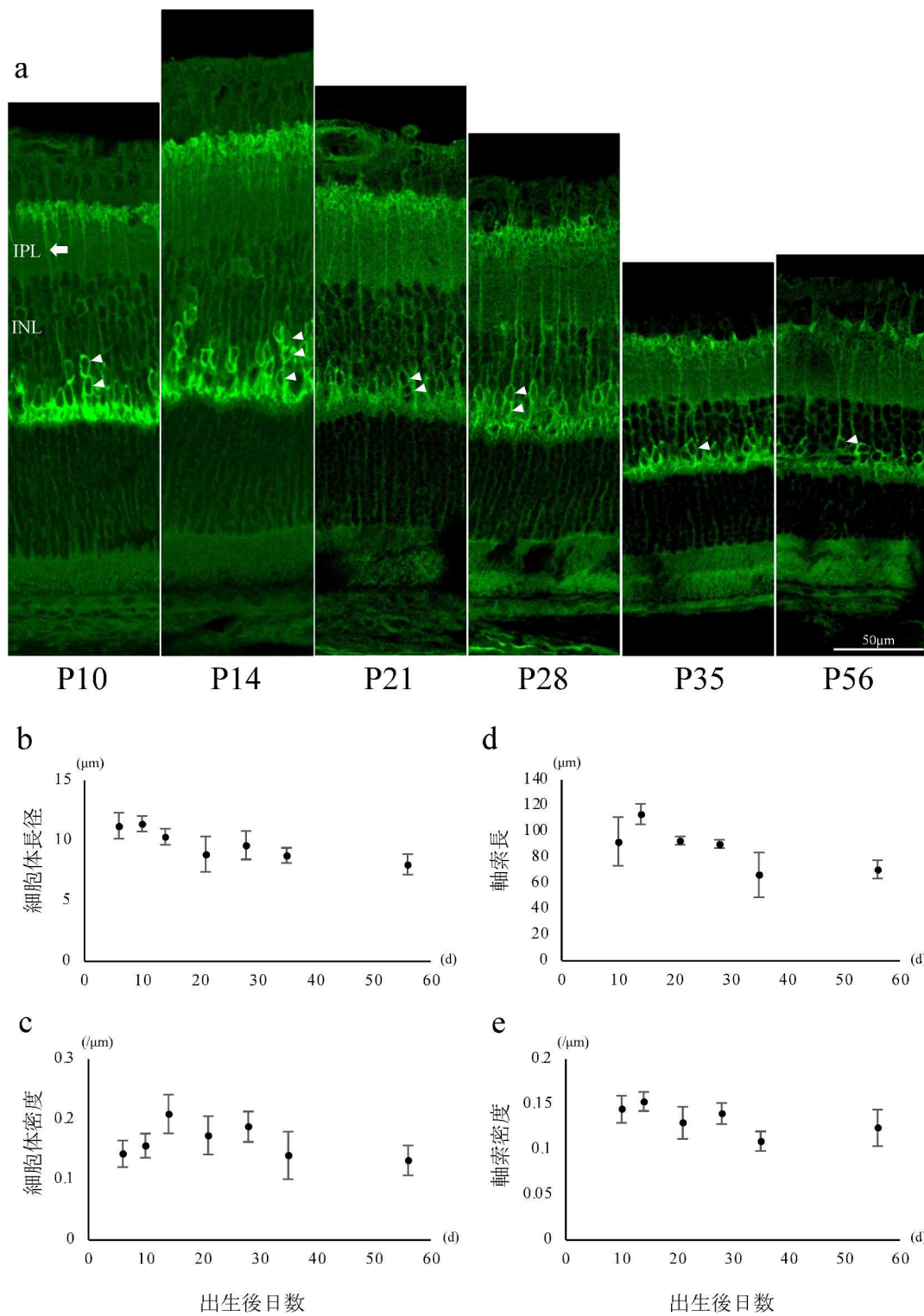


Fig. 9 マウス網膜における桿体双極細胞（RBC）の形態学的変化

a : 各日齢網膜の免疫蛍光染色像

矢頭は細胞体を、矢印は軸索を示す

b : RBC細胞体長径

c : INL内における水平方向1 μm当たりのRBC細胞体密度

d : 起始部から終末までのRBC軸索長

e : IPL内における水平方向1 μm当たりの軸索密度

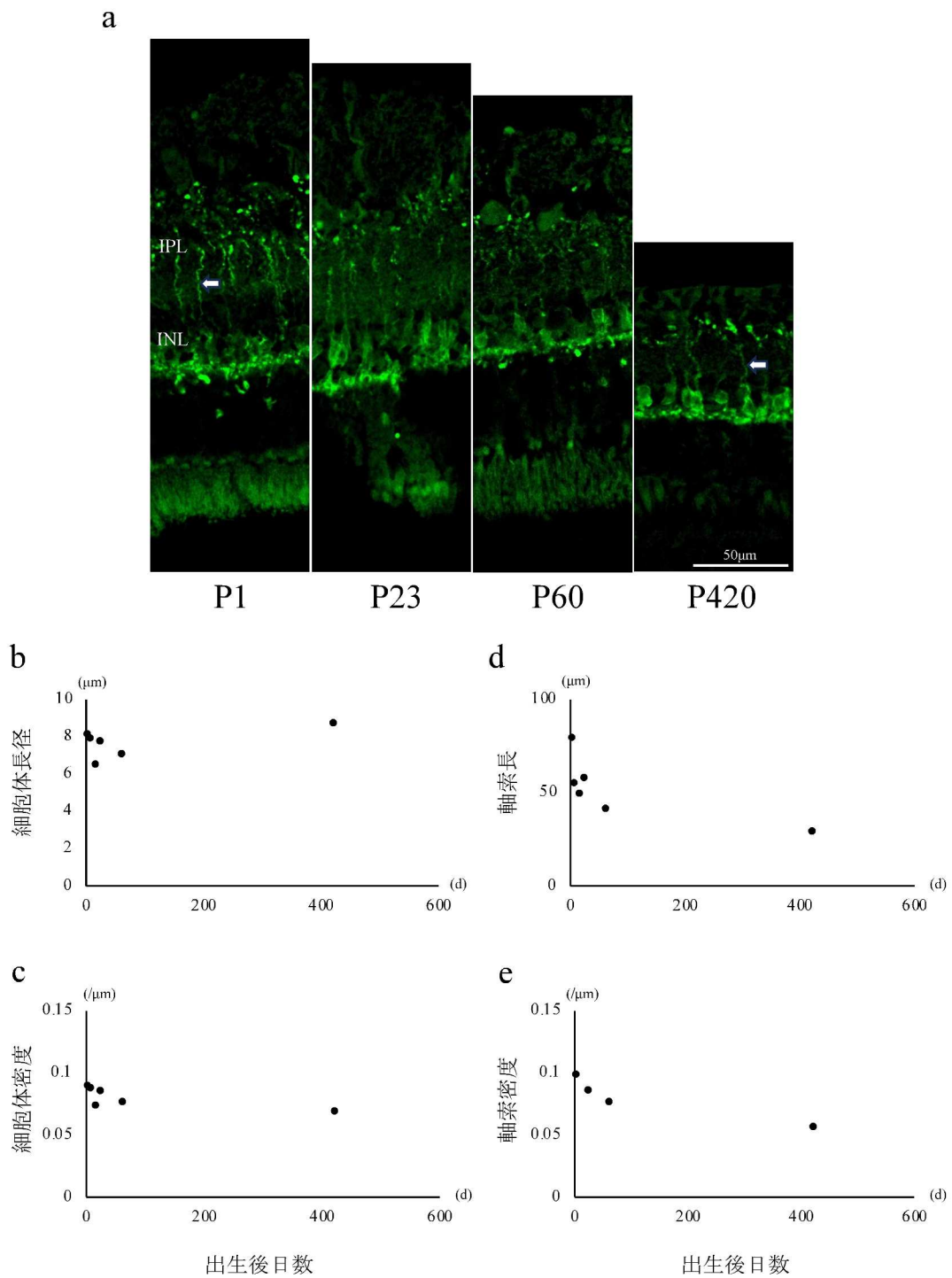


Fig. 10 ウシ網膜における桿体双極細胞（RBC）の形態学的変化

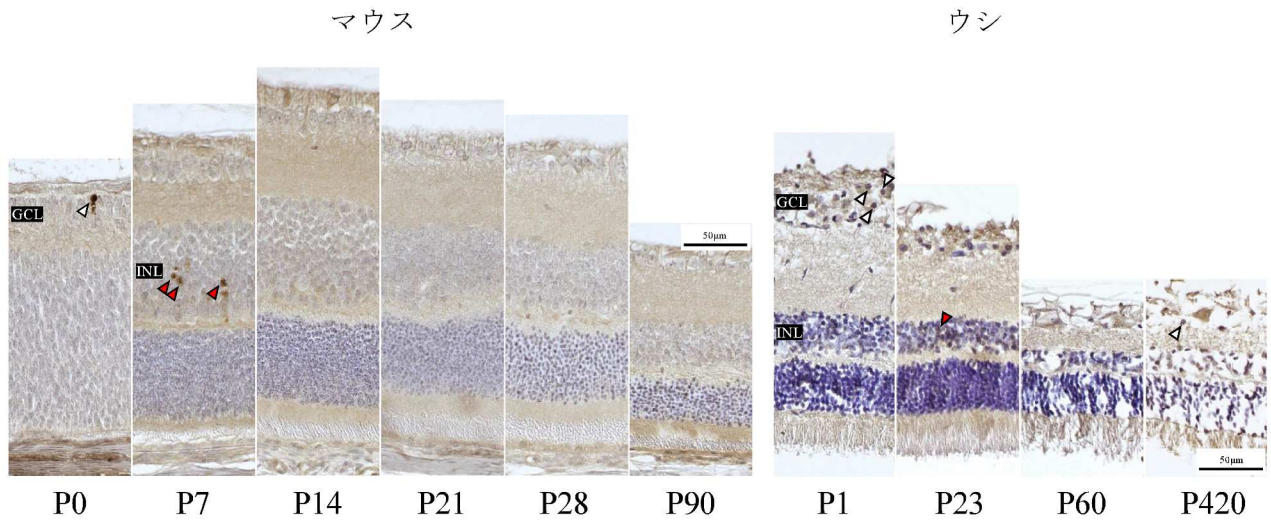
a : 各日齢網膜の免疫蛍光染色像

矢印は軸索を示す

b : RBC細胞体長径 c : INL内における水平方向1 μm当たりのRBC細胞体密度

d : 起始部から終末までのRBC軸索長 e : IPL内における水平方向1 μm当たりの軸索密度

a



b

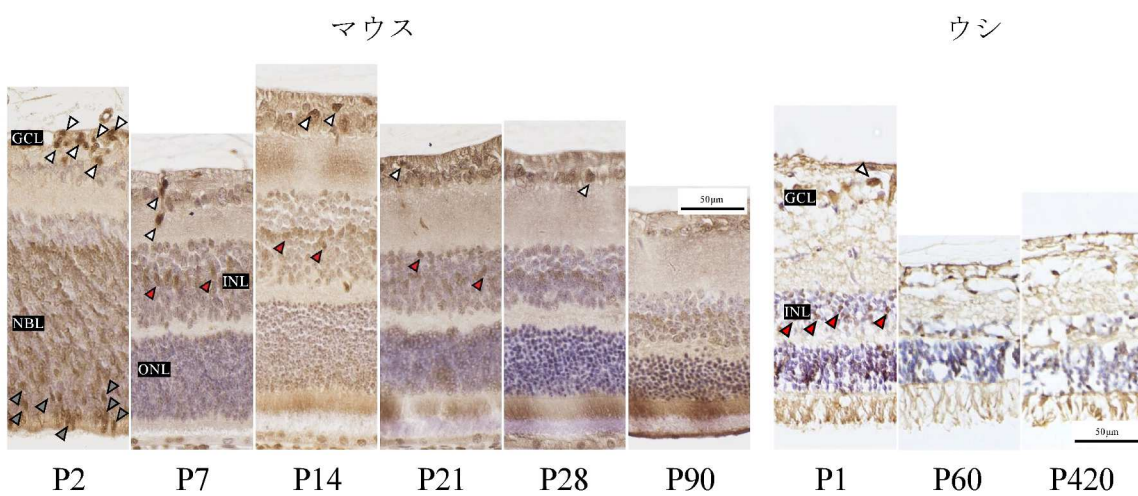


Fig. 11 マウス（左）およびウシ（右）網膜における

Cleaved caspase-3 (a) およびPCNA (b) のImmunohistochemistry

a : 白矢頭はGCL中の、赤矢頭はINL中の陽性細胞を示す

b : 白矢頭はGCL中の、灰矢頭はNBL中の、赤矢頭はINL中の陽性細胞を示す

Table 1. ブートストラップ法を用いたウシ網膜の各種解析における選択バイアスの評価

計測項目	日齢	平均値	Bias	Std. Error	Bias/Std. Error*
全層厚	0	259.850500	-0.004123	1.771195	0.002328
	1	199.339500	0.027629	2.077250	0.013301
	6	240.728500	0.021228	1.829764	0.011601
	15	173.123500	-0.108083	3.505990	0.030828
	23	210.400000	0.002420	1.083780	0.002233
	60	131.335000	0.006991	1.853695	0.003772
	390	148.506000	-0.015804	0.602658	0.026223
	420	160.408000	-0.007676	0.774026	0.009917
PL	0	28.559500	0.008722	0.652713	0.013363
	1	26.634000	-0.002522	0.355679	0.007091
	6	25.718500	-0.045742	1.064816	0.042958
	15	19.818000	0.006855	0.999730	0.006856
	23	31.938500	-0.007680	0.775645	0.009901
	60	21.471000	-0.055872	0.800187	0.069824
	390	44.884500	-0.051994	1.003572	0.051809
	420	40.680000	-0.000543	0.540198	0.001005
ONL	0	60.748500	-0.007138	0.334035	0.021371
	1	37.661000	0.010393	0.556456	0.018677
	6	44.827000	0.022011	0.839152	0.026229
	15	55.594500	-0.000157	1.099583	0.000142
	23	45.313000	0.002481	0.392168	0.006325
	60	32.638000	0.004022	0.413336	0.009731
	390	34.626500	0.024007	0.365828	0.065624
	420	35.902000	-0.018335	0.491947	0.037269
OPL	0	14.783000	-0.042670	0.762652	0.055949
	1	8.587000	0.009115	0.360536	0.025282
	6	8.613000	0.004725	0.532199	0.008878
	15	8.659500	0.000049	0.380172	0.000128
	23	11.053000	0.013405	0.405572	0.033052
	60	6.837000	0.005842	0.437050	0.013368
	390	8.969000	0.023948	0.514206	0.046573
	420	7.168500	0.002642	0.298635	0.008847
INL	0	33.671500	-0.012247	0.706044	0.017346
	1	32.107000	0.008768	0.470065	0.018653
	6	32.813000	-0.000059	0.829633	0.000071
	15	26.096000	0.001193	0.388691	0.003071
	23	23.611000	-0.007541	0.675527	0.011162
	60	14.551000	0.003750	0.377440	0.009935
	390	15.002500	0.002140	0.496682	0.004308
	420	16.488500	0.002515	0.481044	0.005229
IPL	0	91.329500	-0.054243	1.306811	0.041508
	1	67.376500	-0.028258	1.111195	0.025431
	6	80.538500	0.026212	1.009311	0.025971
	15	40.276000	-0.005263	0.987442	0.005330
	23	54.915000	-0.018045	0.845628	0.021340
	60	33.551500	-0.040505	0.977481	0.041438
	390	26.863000	0.033512	0.679852	0.049293
	420	39.906500	-0.044405	0.817798	0.054299

*Bias/Std. Error値が0.1未満の場合、選択バイアスなしとみなした

Table 1. ブートストラップ法を用いたウシ網膜の各種解析における選択バイアスの評価（続き）

計測項目	日 齢	平均値	Bias	Std. Error	Bias/Std. Error*
GCL	0	11.020000	-0.039308	1.259386	0.031212
	1	18.545000	-0.014546	1.100276	0.013221
	6	10.330000	-0.008318	0.557909	0.014910
	15	11.014000	0.015114	0.537013	0.028144
	23	15.334000	0.047918	1.243289	0.038542
	60	8.772500	-0.010601	0.650596	0.016294
	390	6.889500	0.007615	0.696890	0.010927
	420	7.723000	-0.007903	0.686445	0.011513
NFL	0	15.027500	-0.008645	1.263196	0.006844
	1	9.160500	0.016439	0.518338	0.031715
	6	34.155000	-0.071124	1.021541	0.069625
	15	14.381000	-0.062340	0.771488	0.080806
	23	32.394000	0.043399	1.576348	0.027532
	60	12.893500	-0.044998	0.457073	0.098448
	390	12.501500	0.002076	0.895070	0.002320
	420	14.938000	0.000057	0.792711	0.000072
層厚の構成細胞数 (ONL)	0	12.950000	0.001600	0.335813	0.004765
	6	8.300000	0.004100	0.191376	0.021424
	15	13.550000	-0.027850	0.463121	0.060135
	23	9.050000	-0.000700	0.314760	0.002224
	390	7.500000	0.008050	0.249890	0.032214
	420	7.100000	0.002050	0.216876	0.009452
層厚の構成細胞数 (INL)	0	4.750000	0.010700	0.199437	0.053651
	1	6.400000	0.002550	0.230465	0.011065
	6	5.650000	-0.000950	0.192064	0.004946
	15	4.850000	0.002050	0.206351	0.009935
	23	4.250000	0.007800	0.186920	0.041729
	60	2.900000	0.004050	0.139196	0.029096
	390	2.700000	0.001050	0.166491	0.006307
	420	2.650000	-0.007650	0.188745	0.040531
RBC細胞体長径	1	8.173650	-0.007872	0.276405	0.028480
	6	7.955900	0.016066	0.445894	0.036030
	15	6.563400	-0.003636	0.170819	0.021283
	23	7.802600	-0.002938	0.301562	0.009743
	60	7.111000	-0.006004	0.305265	0.019668
	420	8.596350	0.001018	0.331853	0.003067
RBC軸索長	1	79.827050	-0.042880	1.650505	0.025980
	6	55.741350	0.059088	1.579743	0.037403
	15	50.044250	0.006264	0.954276	0.006564
	23	58.481950	0.068041	1.052850	0.064625
	60	41.885250	0.035645	1.269641	0.028075
	420	29.625100	0.021952	1.058090	0.020746

*Bias/Std. Error値が0.1未満の場合、選択バイアスなしとみなした

第二章 授乳期間の変化が網膜の生後成長に及ぼす影響

緒論

第一章において、マウスの新生仔網膜は薄化現象を示し、薄化は網膜の組織学的な成熟に必要な過程であることが示唆された。網膜の薄化は、マウスでは離乳後2週程度、ウシでは離乳期初期に認められ、晩成性動物と早成性動物に共通した過程であると考えられた。本章では、「離乳までの期間が両動物新生仔の網膜成長に重要な意味を持つのではないか」という仮説を立て、「離乳時期を変化させることが新生仔の視覚発達へどのような影響を及ぼすのか」、に焦点を当てて研究を行った。

幼少期における中枢神経系の正常な発達を妨げる要因の一つとして、「幼少期ストレス (early life stress = ELS)」という現象が知られている。これは幼少期に経験する心理的または肉体的な負荷や緊張のことを指し、青年期以降の精神障害（不安様行動、抑うつ行動、攻撃性の増加など）の一因となる可能性がある。特にヒトでは、重度または慢性的なトラウマや虐待、ネグレクト、環境的・社会的剥奪などが ELS に該当し、その要因となる母子関係の希薄さは、子の精神的発達に負の影響を与えるとされている (Felitti et al. 1998; Alhusen et al. 2013; Silver et al. 2023; Kim et al. 2023)。

マウスやラット、ネコにおいては、「早期離乳を伴う母子分離 (Maternal separation with early weaning = MSEW)」が ELS と同等のストレスを仔に与えるとされており、特に実験動

物学分野ではこの手法を用いて ELS モデルの作出が行われている (Ahola et al. 2017; Sun et al. 2020) 。実験用マウスにおける離乳管理は3週齢にて行われることが一般的であるが、MSEW では新生仔期に一日あたり数時間の母子分離を連日経験させ、17-18 日齢 (P17-18) 頃に完全離乳を行う方法がある (Murthy et al. 2019; Sun et al. 2020; Calanni et al. 2025) 。また、連日の短期間の母子分離を経験させず、P14 頃において完全離乳を行う方法も存在する (Kikusui et al. 2009) 。これらの方法により、マウスではヒトと類似した精神障害が誘起される。一方で、MSEW の影響には性差が存在し、オスで特に不安様行動を増加させることが知られている (Murthy et al. 2019; Sun et al. 2020) 。これらの行動異常は、MSEW が前頭前皮質と海馬背側において神経細胞とグリア細胞 (アストロサイトおよびオリゴデンドロサイト) の協調性を乱すことに起因すると示唆されている (Zeng et al. 2020) 。

網膜に関しては、光干渉断層計 (Optical Coherence Tomography = OCT) を用いた生体網膜の観察により、ELS を受けたヒトにおいて NFL の薄化が生じることが知られているが (Barrett-Young et al. 2023; Yao et al. 2024)、詳細な細胞学的変化や機能変化、並びに視覚機能に及ぼす影響については不明である。一方でラットでは、ELS により視細胞の減少と ONL の薄化が生じ、これには網膜内におけるミクログリアおよびアストロサイトの増加と、両細胞の活性化を伴う炎症反応との因果関係が示唆されている (Grigoruta et al. 2020) 。

MSEW を受けたマウスでは、網膜層の肥厚もしくは薄化が生じないが、RGC の減少とミ

クログリアの増生と活性化、視覚の機能障害が誘導され、これはプロゲステロン阻害薬であるミフェプリストンの投与によって網膜内のミクログリアが減少することで改善される (Calanni et al. 2023) 。MSEW は新生仔期において網膜の成長を妨げ、視覚の発達に影響する可能性は高いが、研究は十分行われているとは言えない。特に離乳直後から青年期における、MSEW による網膜組織の変化やグリア細胞の活性化機序は不明である。

またヒトでは、幼少期に経験した虐待やネグレクトが原因となり、次世代に対しても同様の行動を示す、“ELS の世代間伝達” が成立することが知られる (Armfield et al. 2021; Ahmed and Shaban 2025; Sawyer et al. 2025) 。マウスでも同様の現象が観察され、特に MSEW を経験したメス個体が母親となると、母性行動が減少し、以後 3 世代に渡り自身の仔に ELS を与える (Kikusui et al. 2005; Saavedra-Rodríguez and Feig 2013; Assink et al. 2018) 。“ELS の世代間伝達” により、多世代にわたって網膜の成長が妨げられる可能性があり、これが事実である場合には、生物学的に重大な問題であるとともに、社会的にも深刻な課題となる。

幼少期および思春期における良好な親との関係性や養育環境は、子の精神的発達において重要な因子である (Ford et al. 2023; Fang et al. 2024) 。ただし一方で、行きすぎた過保護的な養育は、時に過干渉や支配的な行動を伴うことから、子に不安や抑うつを誘発するだけでなく、自立心と自律性の形成を阻害して基本的な社会性や自己解決能力の欠如を招く

(Vigdal and Brønnick 2022; Huang and Wan 2025) 。マウスでは、離乳が標準よりも遅い晩期離乳は仔の不安様行動を減少させ、探索行動および社交性を増加・向上させる (Curley et al. 2009)。晩期離乳を受けた仔が母親となった際には、自身の仔に対するマウンティング (授乳様行動) をより高頻度に行うことにより、「良好な養育環境」を形成する (Richter et al. 2016) 。ヒトでは、離乳時期の延長や親との良好な関係性の構築が、子の視覚の早期発達に関与し、自立運動性の獲得を促す可能性が示唆されている (Villar et al. 2020) 。しかしマウスでは、晩期離乳が視覚に及ぼす影響に言及した報告はなく、変化の有無やその程度は不明である。

以上より、本研究ではマウスの早期離乳モデルおよび晩期離乳モデルを作成し、① 早期および晩期離乳がマウスの網膜発達に与える影響と、② 次世代の仔の視覚発達 (開眼時期および眼球成長) に及ぼす影響、を解明することを目的とした。

材料と方法

1. 供試動物

導入 ICR マウス（7 週齢）は日本 SLC（Hamamatsu, Japan）より購入した。いずれのマウスも採餌および飲水は自由摂取が可能で、管理された室温（ $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ）および湿度（30-70%）かつ、12/12 時間の明暗サイクルの環境下で飼育された。後述する離乳を行なった仔らに対しては、低体温に伴うストレスや死亡を防ぐために実験動物用ヒーターマット（KN-475-3-35, Natsume Seisakusho Co.,Ltd., Tokyo）を用いてケージ下部から生後 14 日齢（P14）から P18 まで加温した（Richter et al. 2014; Grigoruta et al. 2020）。本実験に関わる計画およびプロトコルは、山口大学動物使用委員会（承認番号：480, 553, 557）により審査・承認された。

2. 早期および通常、晩期離乳モデルの作成

マウスを導入し、1 週間の順化後、雄雌を同居させ交配を行った。翌朝に膣栓が確認されたメスを出産まで単独飼育した。母親（ $n=10$ ）から娩出された仔（オス： $n=46$, メス： $n=48$ ）を用い、早期離乳群（P14 離乳群 = wP14）、通常離乳群（P21 離乳群 = wP21: Control 群）、晩期離乳群（P28, P35 離乳群 = wP28, 35）を作成した。離乳後はいずれのマ

ウスも同様の条件にて飼育し、P21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 にて安楽殺を施した。安楽殺は、イソフルラン吸入による深麻酔下での頸椎脱臼により行なった（グループ A とした）。

3. MSEW 経験個体を親とするモデルの作成

早期離乳（MSEW）を経験したメス（n=1）を親とする仔（オス：n=3, メス：n=5）を、購入した正常個体（メス：n=4, オス：n=3）とそれぞれ 9 週齢にて交配させ、MSEW 経験個体を父親または母親にもつ仔を作成した。それぞれ、MSEW 経験個体を父親とする群を“MSEW♂×♀群”、母親とする群を“♂×MSEW♀群”とした。これらと、通常離乳個体同士の交配による仔（“♂×♀群”とした）、計 152 匹（オス：n=75, メス：n=77）を得た。いずれも P21 にて離乳させ、P21, 28, 35, 42, 49, 56, 70, 84 にて安楽殺を施した（グループ B とした）。

4. MSEW 経験個体の産仔数と食殺数、総死亡数の測定、および仔の体温と開眼時期の記録

グループ B において、各母親における産仔数を記録した。さらに、毎日午前 10 時における仔の食殺数および総死亡数を記録し、出生日から全同腹仔が開眼するまでの期間の食

殺率と総死亡率を算出した。開眼時期は、少なくとも左右一方の眼瞼が開眼している個体を「開眼済み」と定義して、各同腹仔における観察日までの累積開眼率、ならびに観察日における各群内の新規開眼率を算出した。また、サーモグラフィカメラ (Pivot-IR, ICI, USA) を用いて、仔の体の任意の三箇所にて体温を計測し、平均値を求めた。

5. 眼球の採材とサイズ計測および網膜厚の計測

マウスを安楽殺後、マイクロピンセットを眼窩に挿入し、視神経を外眼筋と眼窩脂肪とともに切断して左右の眼球を慎重に採材した。グループ B においては、眼球重量の計測に加え、眼球体積と角膜面積を算出した (算出方法は第 1 章の材料と方法を参照)。両グループの眼球は採取後、Davidson's solution を用いて一晩固定し、定法に則りパラフィン包埋を施した。厚さ 6 μ m の薄切標本を HE 染色後、第一章と同様の手法にて各網膜層の層厚を計測した。各計測値は雌雄を区別して解析した。

6. 統計学的解析

グループ A における網膜厚計測では、まず各採材日齢において f 検定を実施した。離乳群を 2 群のみ含む場合では、いずれも計測値が非正規分布を示したため、続いて Mann-

Whitney U 検定を行った。3 群以上を含む場合では、非正規分布を示した群間には一元配置分散分析 one-way ANOVA (Dunnett の多重比較) を、正規分布を示した群間には Kruskal-Wallis 検定を行った。また、グループ B おける食殺率、死亡率、体温、開眼時期に関しては、各離乳群と“♂×♀群”との間で t 検定を実施した。

7. 免疫蛍光

一部の網膜パラフィン切片を対象に、第一章と同様の手法にて Immunofluorescence を実施した。一次抗体は、Alexa Fluor 488 標識 anti-PKC α antibody (sc-8393 AF488, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を 4°C で一晩反応させた。核染色には 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 340-07971, FUJIFILM WAKO, Osaka, Japan) を用いた。撮影は共焦点顕微鏡 Mica (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) および LasX ソフトウェア (Leica) を用いて行った。

結果

1. 早期離乳または晩期離乳が、仔の成長期網膜の組織学的変化に及ぼす影響

各日齢における代表的な網膜組織像を Fig. 1 に示す。早期離乳または晩期離乳は、ある 1 つの同腹仔群を除いた全ての個体において、いずれの解析日齢でも、層構造や網膜細胞列の不整、構成細胞の形態異常、クロマチン凝集の増強または減弱など、明らかな形態学的異常を生じさせなかった (Fig. 1a)。しかし、各群において、網膜の層構造の欠損を示す個体が観察された (Fig. 1b)。wP14 群では 3 匹中 1 匹、wP21 群では 2 匹中 2 匹、wP28 群では 4 匹中 4 匹において、採材日齢や性別にかかわらず左右眼球で生じた。HE 染色像では、網膜外層には大きく淡明な核をもつ細胞が存在していた。これは正常網膜 ONL 中の視細胞とは形態が異なっており、INL 中の細胞に類似していた (Fig. 1b)。また anti-PKC α antibody を用いて Immunofluorescence を実施したところ、陽性細胞（桿体双極細胞）は検出されなかった (Fig. 1c)。

各離乳群における網膜全層および各層の厚さ変化を Fig. 2, 3 に、各離乳群と wP21 群との有意差の有無を Fig. 4 に示す。オスでは、wP14 群および wP28 群では、wP21 群と比べて明確な違いや傾向は認められなかったが、wP35 群では、P35-56 で全層厚と OPL, INL において肥厚が認められた (Fig. 2, 4)。一方でメスでは、wP14 群、wP28 群、wP35 群において P21, 28, 63 では薄化傾向が、P35-56 では肥厚傾向がそれぞれ確認された (Fig. 3, 4)。特

に PL, ONL, OPL, INL, IPL については、各群に共通した肥厚変化が、P35-56 で認められた。

2. 父親または母親の MSEW 経験が、産子数と食殺数、総死亡数、および母性行動に及ぼす影響

幼少期の MSEW 経験が、性成熟後の出産および仔に対する母性行動に与える影響について評価した。産仔数は、Control 群である“♂×♀群”が 12.6 ± 1.85 匹と最も多く、“MSEW ♂×♀群”が最も少ない 10.5 ± 3.50 匹であった (Fig. 5a)。“MSEW ♂×♀群”では、一頭体でのみ 5 匹の出産であったが、他の個体はいずれも 10-15 匹を出産し、対照群と比べて統計学的な差は生じなかった (Fig. 5d)。また食殺は全群で発生し、群間での食殺率 (数) は、“MSEW ♂×♀群”が最も多く、一例では同腹仔 5 匹に対し、3 匹の食殺 (60.0%) を示した。一方で“♂×MSEW ♀群”は最も少なく、同腹仔内における食殺が 1-2 匹 (7.1-10.0%) であったが、“MSEW ♂×♀群”および“♂×♀群”との有意差は検出されなかった (Fig. 5b, d)。死亡新生仔を観察すると外傷が無く、食殺以外の死因と考えられる個体も確認され、総死亡率 (数) についても“MSEW ♂×♀群”の一例で 5 匹全ての死亡 (100.0%) が認められた。“♂×MSEW ♀群”および“♂×♀群”では死亡が 1-3 匹 (7.1-30.0%) であったが、“MSEW ♂×♀群”との間に有意差は検出されなかった (Fig. 5c, d)。通常、マウスの母親は

仔の上に覆い被さるように授乳を行う（マウンティング）。この授乳行動は新生仔の体温維持に寄与することが予想される。そこで仔群の体温を測定し、母性行動を評価するための間接的な指標として利用した（Fig. 6a）。いずれの群も P3 または P4 で仔群の体温は最高値（36.1–37.0°C）となり、以降は徐々に低下傾向を示した。“MSEW♂×♀群”と“♂×MSEW♀群”では共に、“♂×♀群”よりも仔マウスが低体温傾向を示すことが確認された（Fig. 6b）。特に、“MSEW♂×♀群”では P0, 6, 9, 15 で有意差が検出され、特に P0 では $32.7 \pm 1.80^\circ\text{C}$ と大きく低体温を示した（Fig. 6c）。“♂×MSEW♀群”では P0, 4, 6, 7 にて有意な低体温が確認されたが、P10 および P12 では逆に高体温であった（Fig. 6d）。さらに“MSEW♂×♀群”と“♂×MSEW♀群”との比較では、P1, 4, 7, 14 では後者が、P10, 12, 15 では前者が低体温を示した（Fig. 6e）。

3. 親の MSEW 経験が、仔の開眼時期と眼球成長に及ぼす影響

MSEW 経験個体を父または母とする仔について開眼時期を観察した結果を Fig. 7 に示す。親によりわずかな差がみられたが、いずれの群でも P12 から開眼し始め、P13–15 にはほぼ全頭が開眼した（Fig. 7a）。すべての日齢において、群間に統計学的な有意差はみられなかった。また最も多くの個体が開眼した日齢は、“MSEW♂×♀群”と“♂×♀群”では P14 であったのに対し、“♂×MSEW♀群”では P13 であった（Fig. 7b）。P14 までの開眼率

に着目すると、“MSEW♂×♀群”では全体の 94.5%が、“♂×MSEW♀群”では 94.8%が開眼したのに対し、“♂×♀群”では 76.4%であった (Fig. 7b)。

各群で眼球の重量と体積、角膜面積の変化を調べたところ、P21-84 において“♂×♀群”と同様の緩やかな増加を示した (Fig. 8, 9)。しかし、“MSEW♂×♀群”のオスの眼球重量と体積について詳細に見ると、P21-35 で“♂×♀群”より低値を、P42-56 では逆転して高値を示した (Fig. 8a, b)。P42 では“♂×♀群”と比べて有意差が検出された。角膜面積は P21, 35, 84 で有意に小さく、全日齢を通して矮小であった (Fig. 8c)。メスでは、眼球重量と体積は P21 で有意に増大し、その後前者は P28-35 で低値を、P42-84 では高値を示し、後者は P28 で低値を、P35-84 では高値を示した (Fig. 8d, e)。角膜面積は有意差な増減を示さなかったが、矮小傾向にあった (Fig. 8f)。“♂×MSEW♀群”のオスでは、眼球重量は P35 での減少傾向および P56 での増加傾向がみられた (Fig. 9a)。眼球体積は P49 と P84 にてそれぞれ有意な増加と減少が生じ、P21-35 までは減少傾向、P42-56 までは増加傾向、P70-84 では再度減少傾向が確認された (Fig. 9b)。角膜面積は、P21, 28, 49, 70, 84 で有意に小さく、全日齢を通して矮小であった (Fig. 9c)。メスでは、眼球重量は P49 での有意な増加に加え、P21-42 での減少傾向と、P49-84 での増加傾向を示した (Fig. 9d)。眼球体積は P42, 70 にて有意に増加し、P21-28 では減少傾向、P35-70 では増加傾向を示した (Fig. 9e)。角膜面積は P49 で有意な増加が見られたが、その他の日齢では一貫して矮小傾向が確認された (Fig. 9f)。また、“MSEW♂×♀群”と“♂×MSEW♀群”の比較においては、オスでは眼

球重量に有意差を認めなかったが、“MSEW♂×♀群”が P21-28, 56 にて増加傾向を、P42-49, P84 では減少傾向を示した (Fig. 10a)。眼球体積は、P21-35 では顕著な差は見られなかったが、P84 では“MSEW♂×♀群”が有意に高値であった (Fig. 10b)。角膜面積は日齢を通して大きな差は確認されなかったが、“♂×MSEW♀群”では矮小傾向がみられた (Fig. 10c)。メスでは、眼球重量が P84 で、眼球体積と角膜面積が P21 および P84 で、“♂×MSEW♀群”における有意な増大が確認された (Fig. 10d-f)。これら以外の日齢では大きな差は見受けられなかった。

考察

幼少期における母子間の関係性は、将来的な子の精神状態やその変化に伴う行動に大きく影響する。特に虐待やネグレクトなどによる精神的または身体的ストレスは ELS の代表的な因子であり、子の性質を変容させる要因として注目されている (Felitti et al. 1998; Alhusen et al. 2013; Silver et al. 2023; Kim et al. 2023)。一方で、過保護的な子への干渉もストレスを招き、不安や抑うつなどを引き起こすことが示唆されている (Vigdal and Brønnick 2022; Huang and Wan 2025)。そのため、子の健全な精神発達には、親からの適度な愛情と良好な関係性が必要である。

これらの現象を深く理解するために、哺乳動物を用いた動物実験では、ELS モデルとして早期離乳 (MSEW) が、「良好な養育環境」モデルとして晩期離乳が用いられている。本研究では、マウス仔の視覚系の発達に関して、① これら離乳時期の変化が及ぼす影響と、② MSEW 経験による影響が世代を超えて継承されるのか、に着目して解析を行った。

網膜において、早期離乳 (wP14)、通常離乳 (wP21)、晩期離乳 (wP28 および wP35) に伴う網膜の明らかな形態学的異常は、ほぼ全ての同腹仔群を除いて確認されなかった (Fig. 1a)。一方で、各群では正常網膜を持つ仔に混じり、層構造の欠損を伴う異常な網膜を持つ仔が確認された (Fig. 1b, c)。異常網膜は離乳時期、日齢および性別に関わらず見ら

れたことから、遺伝的要因による先天的な影響による可能性が大きいと推測される。残存した外側の顆粒層に位置する細胞は INL 中の細胞様形態を示したが、桿体双極細胞は網膜全域で消失していた (Fig. 1b, c)。これと類似した変化を示す例として、Pde6b 遺伝子の欠損 (網膜色素変性症モデルの一つ) や、Otx2 遺伝子の欠損による遺伝性疾患が挙げられる (Chang et al. 2007; Kaufman et al. 2021)。飼育過程において、明らかな異常行動等は確認されなかったが、これらの遺伝性疾患の可能性を考慮すると、羞明や弱視などが生じていた可能性が考えられる。

ラットでは、慢性的なストレスが ONL の薄化を誘導することが明らかとなっている (O' Steen et al. 1987; Grigoruta et al. 2020)。特に P2-14 での 1 日あたり 3 時間の MSEW とこれに続く P14 での完全離乳は、P75-80 および 3 ヶ月齢の時点において網膜を薄化させる。しかし一方で、マウスでは P4-17 での 1 日あたり数時間の MSEW とこれに続く P17 での離乳は、P70-75 の雌雄において PL, ONL, OPL, INL, IPL の層厚に変化を生じさせないと報告されている (Calanni et al. 2023)。本研究では、先行研究と異なり、マウスにおいてもラットと類似した MSEW による網膜の薄化変化が確認された (Fig. 2-4)。本実験では早期離乳群として P14 にて完全離乳を行なったため、先行研究と比較してより強い ELS が作用した可能性が考えられる。さらに層厚の変化には性差が確認された (Fig. 4)。オスでは wP14 および wP28 では網膜の肥厚と薄化が一貫性なく混在し、wP28 では肥厚傾向が確認された。一方でメスでは離乳時期によらず P35-56 における一貫した肥厚傾向が生じた。一般に、ス

ストレス耐性の強弱には性差が存在し、ストレスの種類や年齢、強度などに依存する (Hodes and Epperson 2019; Jiang et al. 2025)。またストレス応答に伴い活性化される脳部位および制御機構も雌雄間で異なる (Dion-Albert et al. 2022)。特に ELS による影響については、メスマウスにおいて抑うつ行動が増加するという報告の一方で、不安様行動が軽減したり、ストレス下での記憶力を向上させるといった ELS への適応効果をもたらすという報告も存在する (Harris et al. 2018; Goodwill et al. 2019; van Doeselaar et al. 2025)。この網膜厚の変化は、MSEW に対するストレス応答に性差が存在する可能性を示唆している。より詳細な理解には、行動学的実験と組み合わせ、不安様行動や抑うつ行動の有無による細分化した解析が必要である。また、脳においては、MSEW により誘発される不安様行動や抑うつ行動は、神経細胞とオリゴデンドロサイト、アストロサイトの協調性が乱れることが原因であるとされる (Zeng et al. 2020)。網膜ではミクログリアの活性化が誘導され、神経節細胞の減少とそれに伴う視覚障害が生じる (Calanni et al. 2025)。今回設定した実験条件におけるミクログリアの挙動や、血液網膜関門を構成するアストロサイトの反応性を評価することで、ELS による視覚障害の病態および機序の解明や治療への応用が期待される。

晩期離乳群では、メスにおいて早期離乳群と類似した肥厚が確認された (Fig. 2-4)。現時点で晩期離乳が網膜に及ぼす影響を明らかにした報告はない。また、晩期離乳は「良好な養育環境」モデルとして利用されているが、一方で親の過剰な保護によるストレスの有無に関しては議論がなされていない。そのためこの結果が、親と長期間生活することに伴

う正の影響によるのか、またはストレスに伴う負の影響によるのか、詳細は不明である。

行動学的解析や血中ストレスマーカーの評価を用いたストレス状態の理解が必要である。

新生仔期に MSEW 経験を受けた父親および母親は、産仔数、食殺率、仔の総死亡率について、統計学的な差を示さなかった (Fig. 5a-c)。ただし“MSEW ♂ × ♀ 群”の一例において、産子数が通常の 1/3–1/2 程度であった (Fig. 5d)。思春期に慢性的な社会的不安定性に伴うストレスを経験したオスでは、精子中の一部マイクロ RNA (miR) 量が変化し、特に miR-34 および miR-449 の低下は次世代オスに継承される (Rodgers et al. 2015; Champroux et al. 2024)。MSEW 経験は精子を介したエピジェネティックな制御機構に関与しているかもしれない。また“♂ × MSEW ♀ 群”では、特に P0–7 において、他の群よりも出生仔の低体温傾向が見られた (Fig. 6d, e)。間接的な評価ではあるが、これは MSEW を経験した母親による授乳行動の低下を意味し、母性行動が減少することを示唆している。ラットでは、ELS を経験した母親の脳では、オキシトシンやプロラクチン、アルギニンバソプレシンの発現が低下しており、これが母性行動の減少に関わると考えられている (Murgatroyd and Nephew 2013)。マウスは被毛のない状態で生まれ、低温環境への耐性が低い。出生から P10 頃までは、同腹仔と集まり群れになることや、褐色脂肪組織による非ふるえ熱産生が体温維持に重要である (Chabowska-Kita and Kozak 2016; Negron et al. 2020; Bienboire-Frosini et al. 2023)。その後、被毛の増加による熱の確保や、筋肉の発達によるふるえ熱産生により、離乳期である P18 頃から独立して体温を維持することが可能となる (Nagy 2013;

Chabowska-Kita and Kozak 2016)。また、授乳期から離乳までの低温下飼育は、褐色脂肪細胞マーカーの増加と、褐色脂肪様組織の増加を引き起こすことが知られている (Chabowska-Kita et al. 2015)。“♂×MSEW ♀群”の P7 以降の高体温傾向 (Fig. 6d, e) は、仔が体温維持機能を早期に獲得した現れかもしれない。

仔の開眼は、いずれの群においても P12 より生じ、P13-15 には完了した (Fig. 7a)。これはラットの母性行動のうち、舐めやグルーミング量の大小が仔の開眼時期に影響を与えないという報告と一致する (Qiu et al. 2020)。しかし新規開眼率に着目すると、P13 に開眼した個体数は、“♂×MSEW ♀群”が最多であった (Fig. 7b)。開眼には表皮成長因子 (EGF) が必要とされ、出生後間もない P0-3 における EGF の投与は、開眼を平均 1.5 日促進する (Hoath 1986)。開眼時期への影響評価には、EGF の定量評価が必要であり、ストレスが EGF 産生に与える影響も検討する必要がある。

眼球サイズは“MSEW ♂×♀群”、“♂×MSEW ♀群”の両群雌雄において、軽微ではあるものの P35 頃までの矮小傾向と、その後の増大傾向を示した (Fig. 8, 9)。MSEW または母性行動の減少が、仔の眼球成長に及ぼす影響に言及した報告はない。本研究の結果より、P35 頃までの新生仔期において、ストレスが眼球の成長に関与する可能性がある。また一般に仔は、母性行動の少ない母親では低体重が、多い母親では高体重となりやすい (Gammie et al. 2007; Enes-Marques and Giusti-Paiva 2018)。今回得られた P35 という日齢を

中心に、食餌量や体重を定量することで、MSEW または母性行動の減少と、眼球成長に影響を与える要因を明らかにできるかもしれない。

本研究では、視覚成長過程における「離乳」という生物学的イベントの重要性に焦点を当てた。離乳時期の早期化および晩期化は主にメスのマウス新生仔の網膜を肥厚させた。また親の MSEW 経験は、次世代に対して離乳後早期の眼球の矮小化を招き、さらに母親の MSEW 経験は、仔の早期開眼傾向も誘発した。これらは、幼少期の母子関係が新生仔の視覚の正常な発達に寄与することを示唆するものであり、「離乳に伴う生物の発達段階の変化」のさらなる理解に貢献すると考えられる。

参考文献

- Ahmed RS, Shaban M (2025) Breaking the cycle: A systematic review of intergenerational transmission of child maltreatment and preventive parenting interventions. *Child Abuse Negl* 169:107743
- Ahola MK, Vapalahti K, Lohi H (2017) Early weaning increases aggression and stereotypic behaviour in cats. *Sci Rep* 7:10412
- Alhusen JL, Hayat MJ, Gross D (2013) A longitudinal study of maternal attachment and infant developmental outcomes. *Arch Womens Ment Health* 16:521–529
- Armfield JM, Gnanamanickam ES, Johnston DW, et al (2021) Intergenerational transmission of child maltreatment in South Australia, 1986-2017: a retrospective cohort study. *Lancet Public Health* 6:e450–e461
- Assink M, Spruit A, Schuts M, et al (2018) The intergenerational transmission of child maltreatment: A three-level meta-analysis. *Child Abuse Negl* 84:131–145
- Barrett-Young A, Ambler A, Cheyne K, et al (2023) Childhood social isolation as a predictor of retinal neuronal thickness in middle age: A lifecourse birth cohort study. *Psychosom Med* 85:238–249
- Bienboire-Frosini C, Wang D, Marcet-Rius M, et al (2023) The role of brown adipose tissue and energy metabolism in mammalian thermoregulation during the perinatal period. *Animals (Basel)* 13:2173
- Calanni JS, Dieguez HH, González Fleitas MF, et al (2023) Early life stress induces visual dysfunction and retinal structural alterations in adult mice. *J Neurochem* 165:362–378
- Calanni JS, Pasquini LA, Dieguez HH, et al (2025) Microglial depletion prevents visual deficits and retinal ganglion cell loss induced by early life stress in adult animals. *Sci Rep* 15:17143
- Chabowska-Kita A, Kozak LP (2016) The critical period for brown adipocyte development: Genetic and environmental influences: *Brown Adipocyte Development*. *Obesity (Silver Spring)* 24:283–290
- Chabowska-Kita A, Trabczynska A, Korytko A, et al (2015) Low ambient temperature during early postnatal development fails to cause a permanent induction of brown adipocytes. *FASEB J* 29:3238–3252

- Champroux A, Tang Y, Dickson DA, et al (2024) Transmission of reduced levels of miR-34/449 from sperm to preimplantation embryos is a key step in the transgenerational epigenetic inheritance of the effects of paternal chronic social instability stress. *Epigenetics* 19:2346694
- Chang B, Hawes NL, Pardue MT, et al (2007) Two mouse retinal degenerations caused by missense mutations in the beta-subunit of rod cGMP phosphodiesterase gene. *Vision Res* 47:624–633
- Curley JP, Jordan ER, Swaney WT, et al (2009) The meaning of weaning: influence of the weaning period on behavioral development in mice. *Dev Neurosci* 31:318–331
- Dion-Albert L, Cadoret A, Doney E, et al (2022) Vascular and blood-brain barrier-related changes underlie stress responses and resilience in female mice and depression in human tissue. *Nat Commun* 13:164
- Enes-Marques S, Giusti-Paiva A (2018) Litter size reduction accentuates maternal care and alters behavioral and physiological phenotypes in rat adult offspring. *J Physiol Sci* 68:789–798
- Fang S, Fosco GM, Feinberg ME (2024) Parental warmth and young adult depression: A comparison of enduring effects and revisionist models. *Dev Psychopathol* 36:1849–1862
- Felitti VJ, Anda RF, Nordenberg D, et al (1998) Relationship of childhood abuse and household dysfunction to many of the leading causes of death in adults. The Adverse Childhood Experiences (ACE) Study. *Am J Prev Med* 14:245–258
- Ford CA, Pool AC, Kahn NF, et al (2023) Associations between mother-adolescent and father-adolescent relationships and young Adult Health. *JAMA Netw Open* 6:e233944
- Gammie SC, Bethea ED, Stevenson SA (2007) Altered maternal profiles in corticotropin-releasing factor receptor 1 deficient mice. *BMC Neurosci* 8:17
- Goodwill HL, Manzano-Nieves G, Gallo M, et al (2019) Early life stress leads to sex differences in development of depressive-like outcomes in a mouse model. *Neuropsychopharmacology* 44:711–720
- Grigoruta M, Chavez-Solano M, Varela-Ramirez A, et al (2020) Maternal separation induces retinal and peripheral blood mononuclear cell alterations across the lifespan of female rats. *Brain Res* 1749:147117
- Harris AZ, Atsak P, Bretton ZH, et al (2018) A novel method for chronic social defeat stress in female mice. *Neuropsychopharmacology* 43:1276–1283

- Hoath SB (1986) Treatment of the neonatal rat with epidermal growth factor: differences in time and organ response. *Pediatr Res* 20:468–472
- Hodes GE, Epperson CN (2019) Sex differences in vulnerability and resilience to stress across the life span. *Biol Psychiatry* 86:421–432
- Huang S, Wan Z (2025) Parenting styles and school bullying among Chinese adolescents: the mediating effects of social support and cognitive reappraisal. *BMC Psychol* 13:409
- Jiang T, Feng M, Hutsell A, Lüscher B (2025) Sex-specific GABAergic microcircuits that switch vulnerability into resilience to stress and reverse the effects of chronic stress exposure. *Mol Psychiatry* 30:2297–2308
- Kaufman ML, Goodson NB, Park KU, et al (2021) Initiation of *Otx2* expression in the developing mouse retina requires a unique enhancer and either *Ascl1* or *Neurog2* activity. *Development* 148:dev199399
- Kikusui T, Ichikawa S, Mori Y (2009) Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. *Psychoneuroendocrinology* 34:762–772
- Kikusui T, Isaka Y, Mori Y (2005) Early weaning deprives mouse pups of maternal care and decreases their maternal behavior in adulthood. *Behav Brain Res* 162:200–206
- Kim AW, Rieder AD, Cooper-Vince CE, et al (2023) Maternal adverse childhood experiences, child mental health, and the mediating effect of maternal depression: A cross-sectional, population-based study in rural, southwestern Uganda. *Am J Biol Anthropol* 182:19–31
- Murgatroyd CA, Nephew BC (2013) Effects of early life social stress on maternal behavior and neuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology* 38:219–228
- Murthy S, Kane GA, Katchur NJ, et al (2019) Perineuronal nets, inhibitory interneurons, and anxiety-related ventral hippocampal neuronal oscillations are altered by early life adversity. *Biol Psychiatry* 85:1011–1020
- Nagy ZM (2013) Development of homeothermy in infant C3H mice. *Bulletin of the Psychonomic Society* 31:221–224
- Negron SG, Ercan-Sencicek AG, Freed J, et al (2020) Both proliferation and lipogenesis of brown adipocytes contribute to postnatal brown adipose tissue growth in mice. *Sci Rep* 10:20335

- O'Steen WK, Sweatt AJ, Brodish A (1987) Effects of acute and chronic stress on the neural retina of young, mid-age, and aged Fischer-344 rats. *Brain Res* 426:37–46
- Qiu J, Singh P, Pan G, et al (2020) Defining the relationship between maternal care behavior and sensory development in Wistar rats: Auditory periphery development, eye opening and brain gene expression. *PLoS One* 15:e0237933
- Richter SH, Kästner N, Loddenkemper D-H, et al (2016) A time to wean? Impact of weaning age on anxiety-like behaviour and stability of behavioural traits in full adulthood. *PLoS One* 11:e0167652
- Richter SH, Wollmann E, Schmidt M, et al (2014) The effects of neonatal cryoanaesthesia-induced hypothermia on adult emotional behaviour and stress markers in C57BL/6 mice. *Behav Brain Res* 270:300–306
- Rodgers AB, Morgan CP, Leu NA, Bale TL (2015) Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:13699–13704
- Saavedra-Rodríguez L, Feig LA (2013) Chronic social instability induces anxiety and defective social interactions across generations. *Biol Psychiatry* 73:44–53
- Sawyer K, Barriault S, Williams MT, et al (2025) Intergenerational transmission of child maltreatment among Black families: A scoping review. *Child Abuse Negl* 170:107746
- Silver HC, Davis Schoch AE, Loomis AM, et al (2023) Updating the evidence: A systematic review of a decade of Infant and Early Childhood Mental Health Consultation (IECMHC) research. *Infant Ment Health J* 44:5–26
- Sun X, Zhang Y, Li X, et al (2020) Early-life neglect alters emotional and cognitive behavior in a sex-dependent manner and reduces glutamatergic neuronal excitability in the prefrontal cortex. *Front Psychiatry* 11:572224
- van Doeselaar L, Abromeit A, Stark T, et al (2025) FKBP51 in glutamatergic forebrain neurons promotes early life stress inoculation in female mice. *Nat Commun* 16:2529
- Vigdal JS, Brønnick KK (2022) A systematic review of “helicopter parenting” and its relationship with anxiety and depression. *Front Psychol* 13:872981

Villar J, Ochieng R, Staines-Urias E, et al (2020) Late weaning and maternal closeness, associated with advanced motor and visual maturation, reinforce autonomy in healthy, 2-year-old children. *Sci Rep* 10:5251

Yao A, Nishitani S, Yamada Y, et al (2024) Subclinical structural atypicality of retinal thickness and its association with gray matter volume in the visual cortex of maltreated children. *Sci Rep* 14:11465

Zeng H, Zhang X, Wang W, et al (2020) Maternal separation with early weaning impairs neuron-glia integrity: non-invasive evaluation and substructure demonstration. *Sci Rep* 10:19440

付図

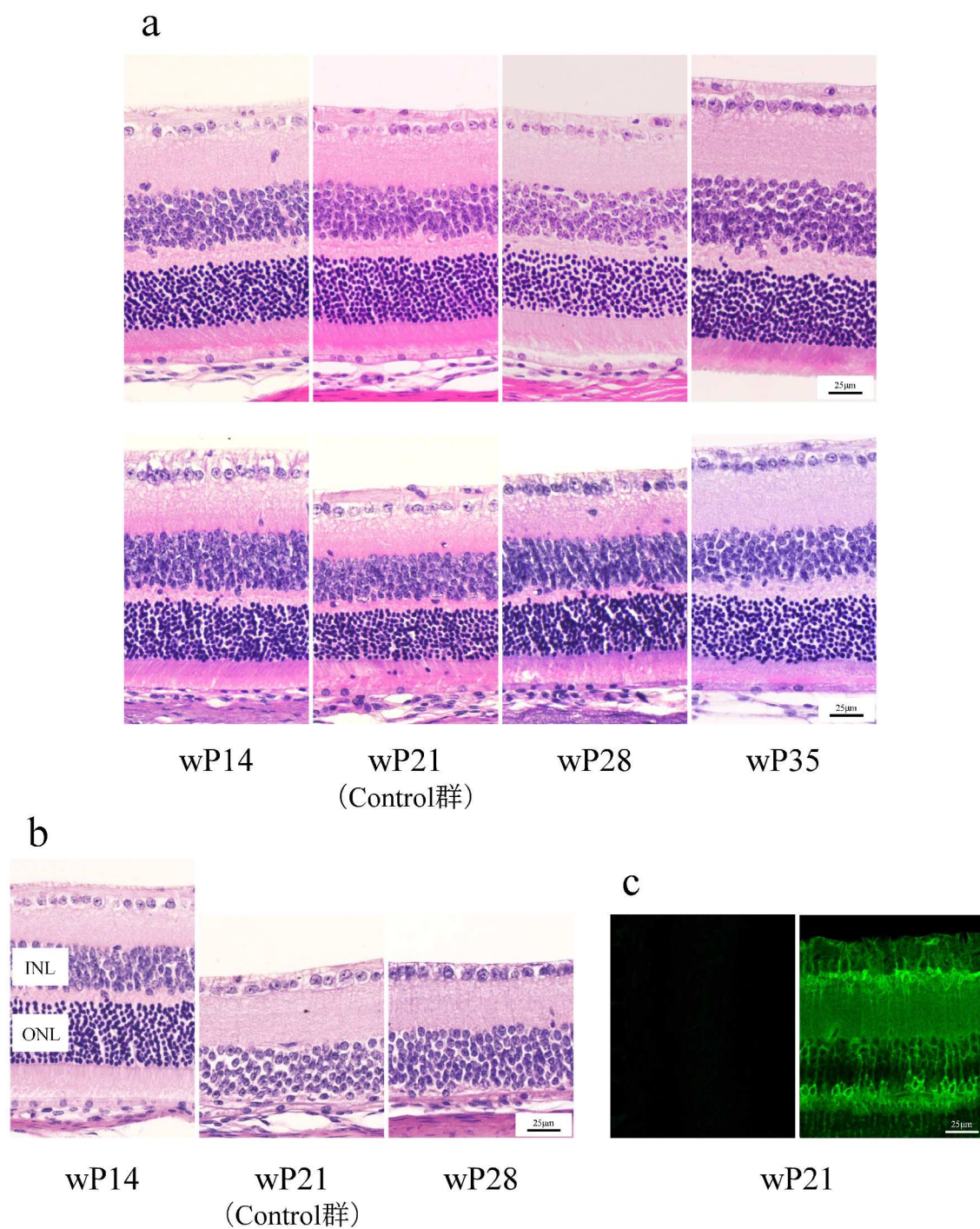


Fig. 1 早期・中期・晩期離乳群における網膜の組織像（代表例）

a : P56時点におけるオス網膜（上段）とP35時点におけるメス網膜（下段）

b : 各群で認められた網膜の異常

層構造の異常欠損を示す（いずれもP42・オス）

c : b 中のwP21個体網膜（左）と正常個体網膜（右）に対するPKC α を標的としたImmunofluorescence

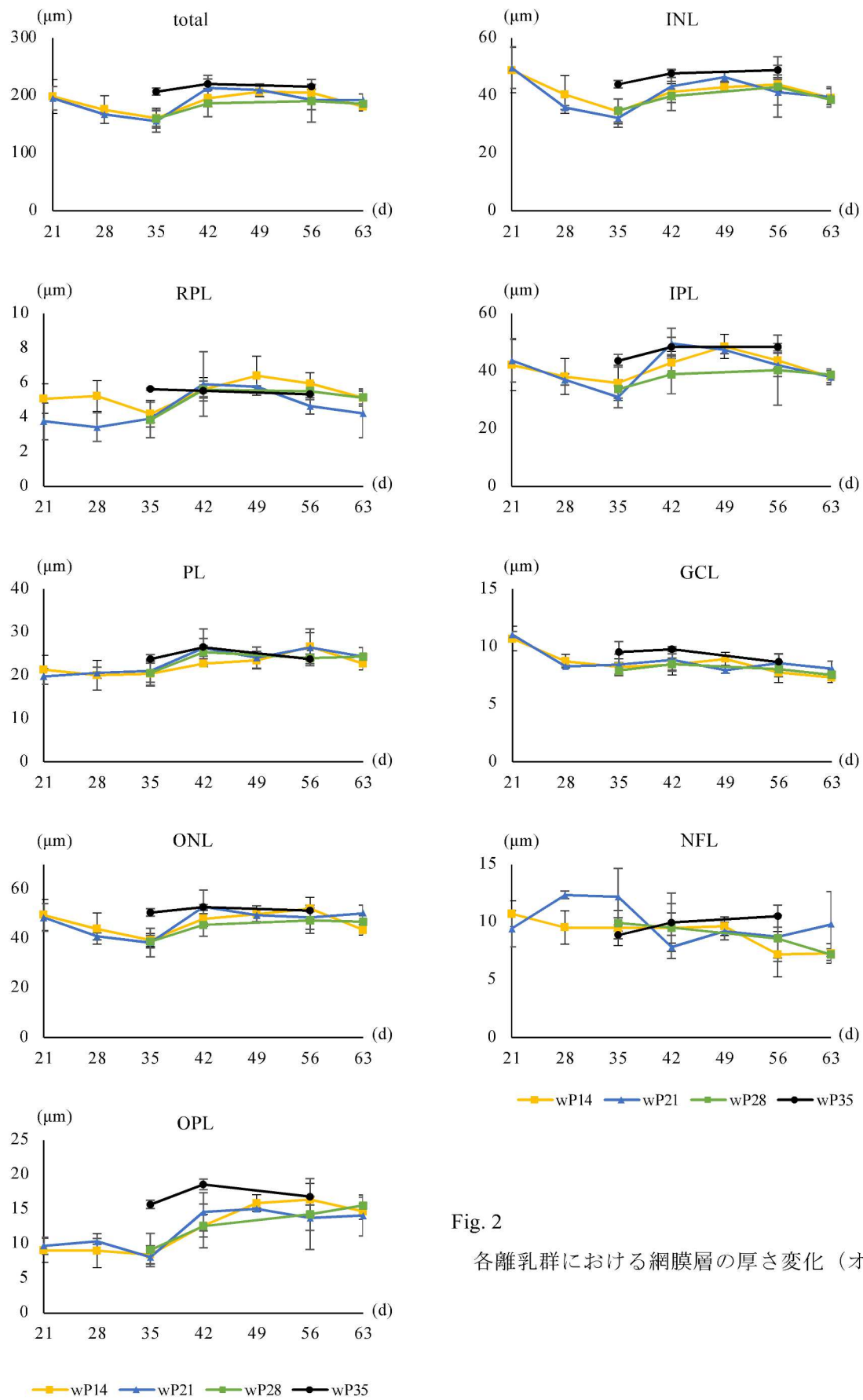


Fig. 2

各離乳群における網膜層の厚さ変化 (オス)

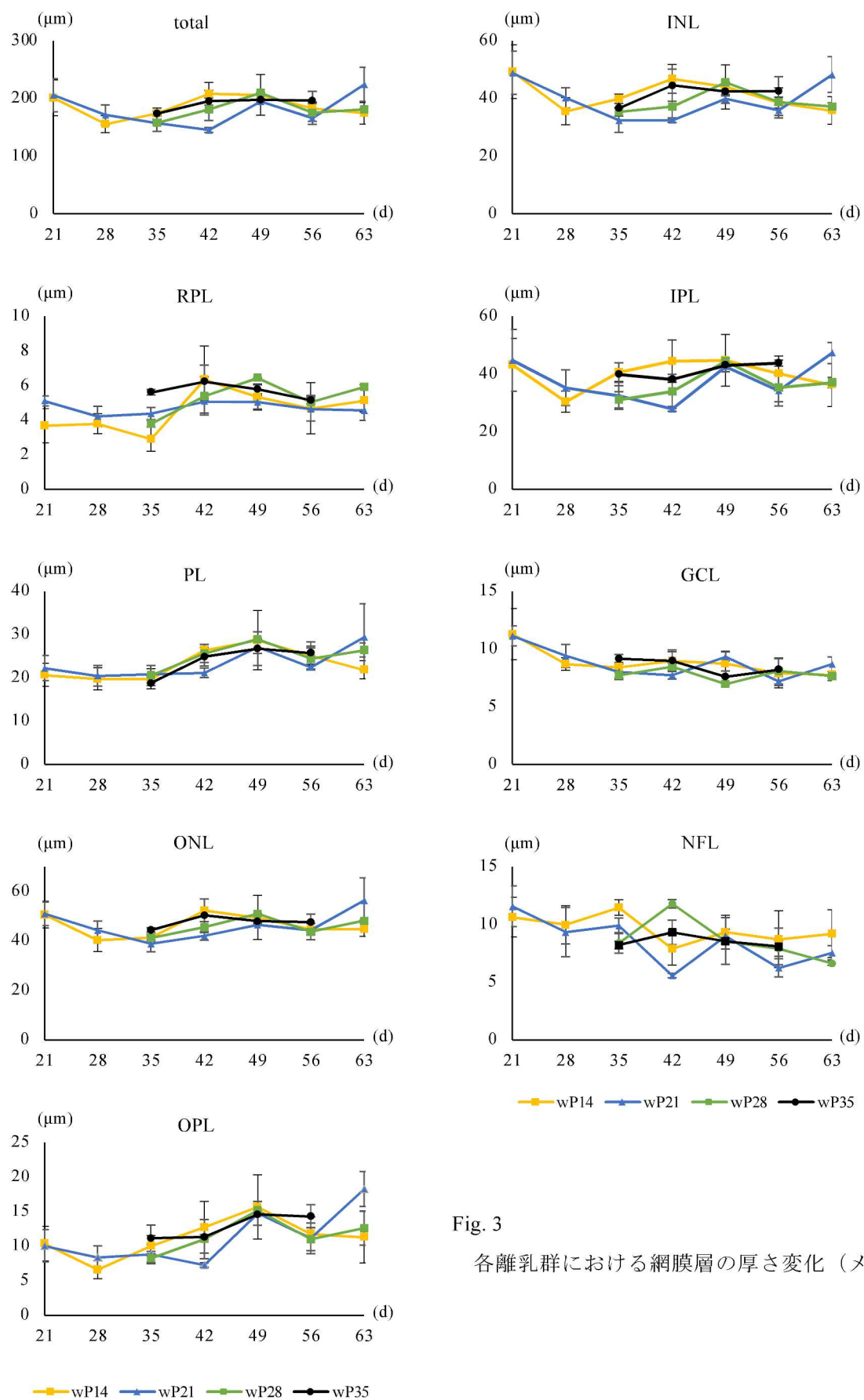


Fig. 3
各離乳群における網膜層の厚き変化 (メス)

オス

wP14 vs wP21

	total	RPL	PL	ONL	OPL	INL	IPL	GCL	NFL
P21									
P28									
P35									
P42									
P49									
P56									
P63									

wP28 vs wP21

	total	RPL	PL	ONL	OPL	INL	IPL	GCL	NFL
P35									
P42									
P56									
P63									

wP35 vs wP21

	total	RPL	PL	ONL	OPL	INL	IPL	GCL	NFL
P35									
P42									
P56									

メス

wP14 vs wP21

	total	RPL	PL	ONL	OPL	INL	IPL	GCL	NFL
P21									
P28									
P35									
P42									
P49									
P56									
P63									

wP28 vs wP21

	total	RPL	PL	ONL	OPL	INL	IPL	GCL	NFL
P35									
P42									
P49									
P56									
P63									

wP35 vs wP21

	total	RPL	PL	ONL	OPL	INL	IPL	GCL	NFL
P35									
P42									
P49									
P56									

Fig. 4 各離乳群における網膜層の厚さ変化のまとめ

wP21群（Control群）と比べ、赤は有意な肥厚を、青は有意な薄化を示す（ $p<0.05$ ）

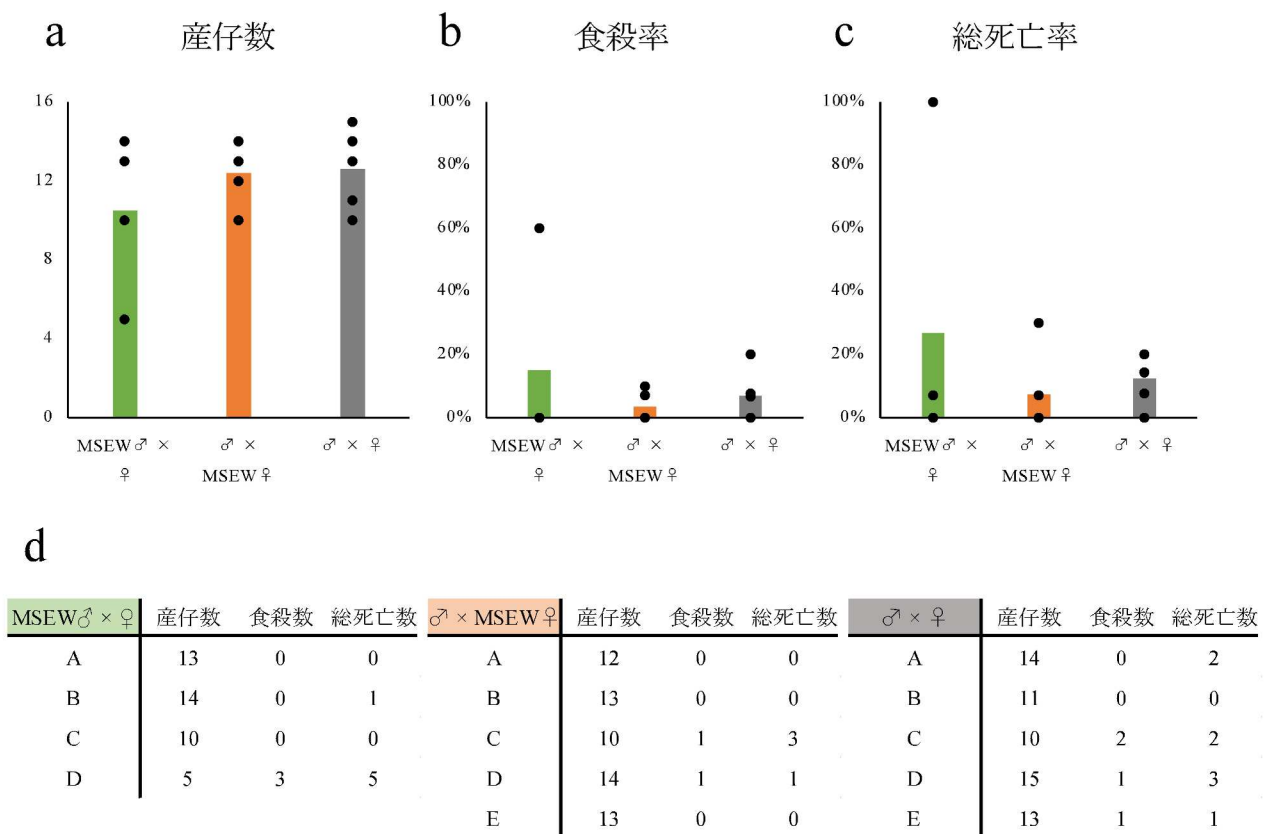


Fig. 5 各群・各親における産仔数・食殺率・死亡率

a: 各群の産仔数 b: 各群の食殺率 c: 総死亡率

a-c のプロットは各親における値を示す

d: 各親における産仔数、食殺数、総死亡数の実測値

A-Eは各親を表す

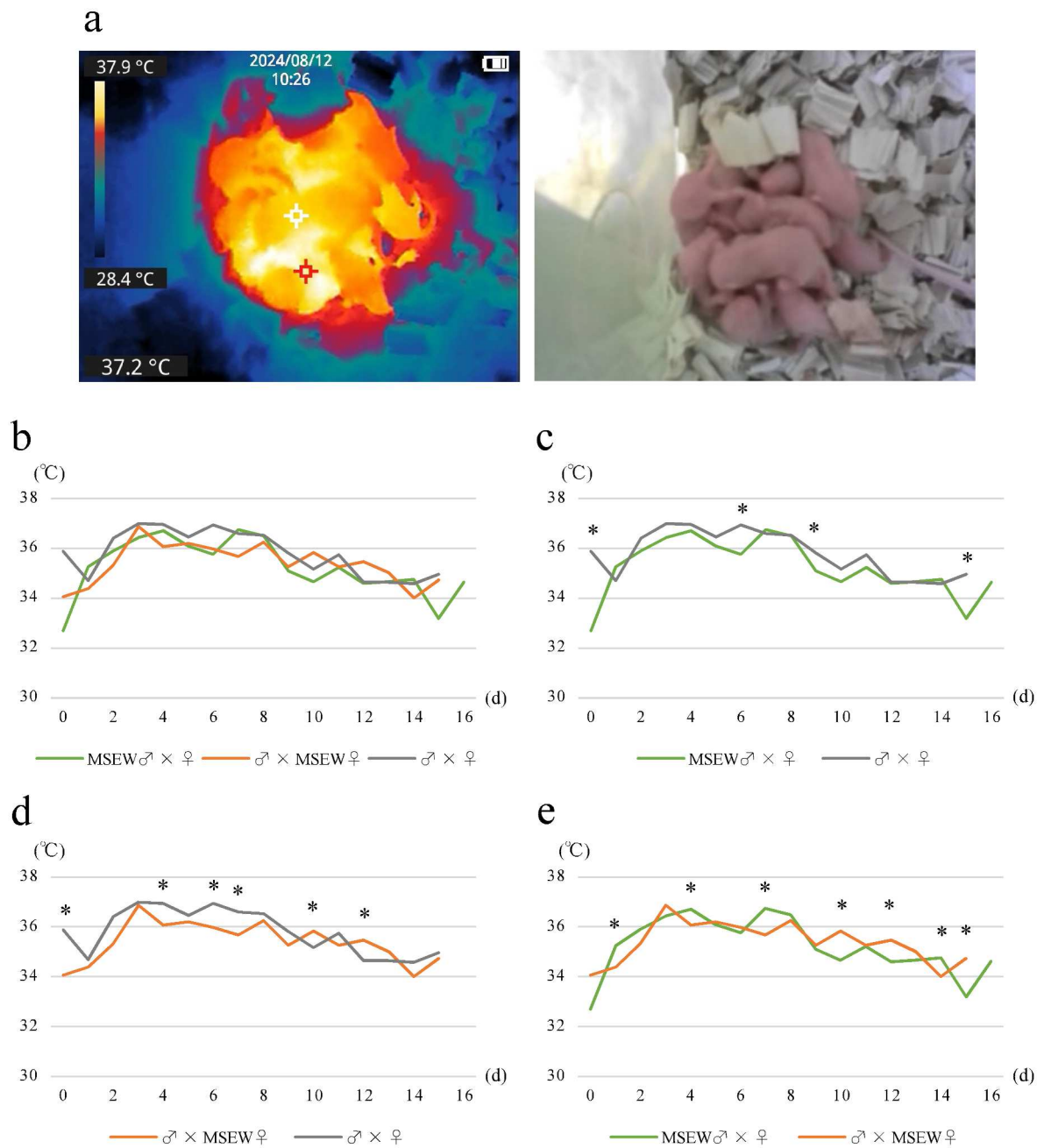


Fig. 6 サーモカメラを用いた仔群の体温計測

a : 代表的なサーモグラフィ (左) と、実際の仔群写真 (右)

b-e : 各群、全頭開眼までの体温の経日的変遷

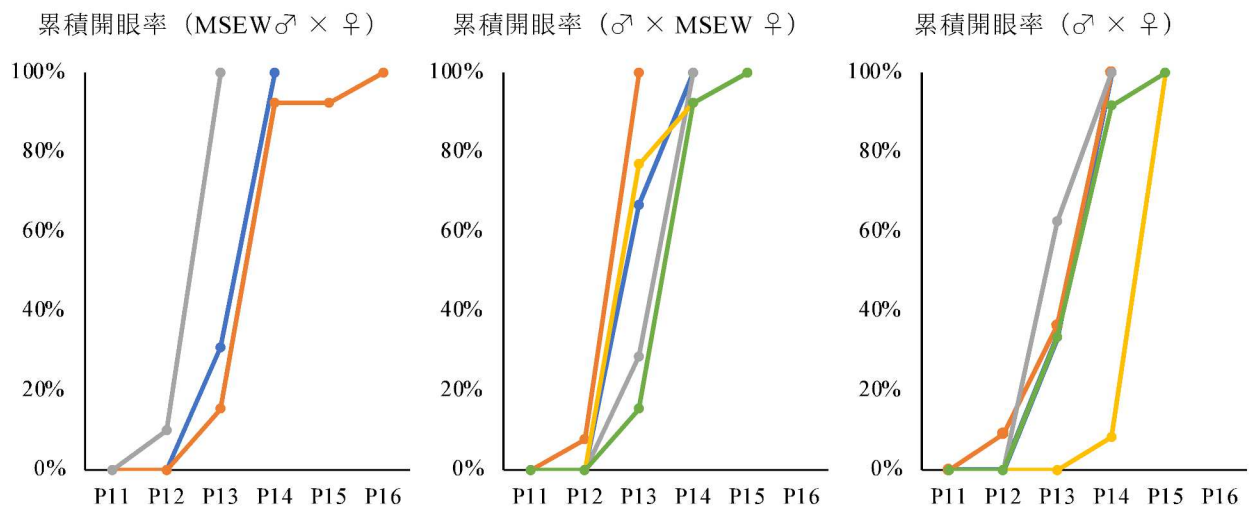
b : “MSEW♂×♀群”、“♂×MSEW♀群”および“♂×♀群”の変化

c : “MSEW♂×♀群”と“♂×♀群”の比較

d : “♂×MSEW♀群”と“♂×♀群”の比較

e : “MSEW♂×♀群”と“♂×MSEW♀群”の比較

a



b

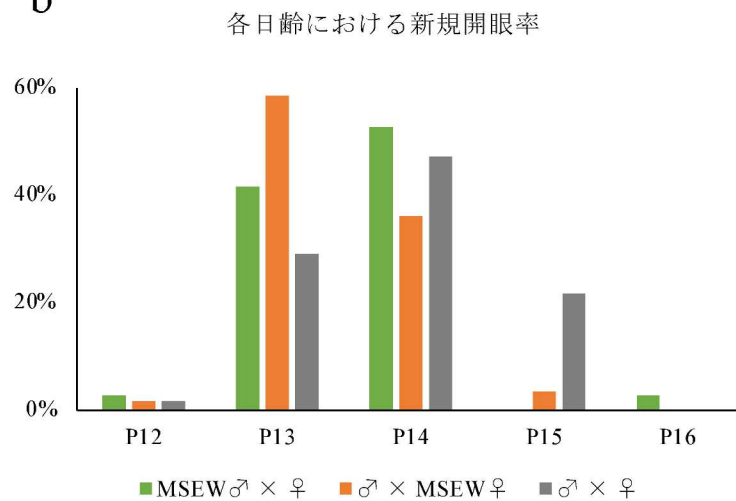


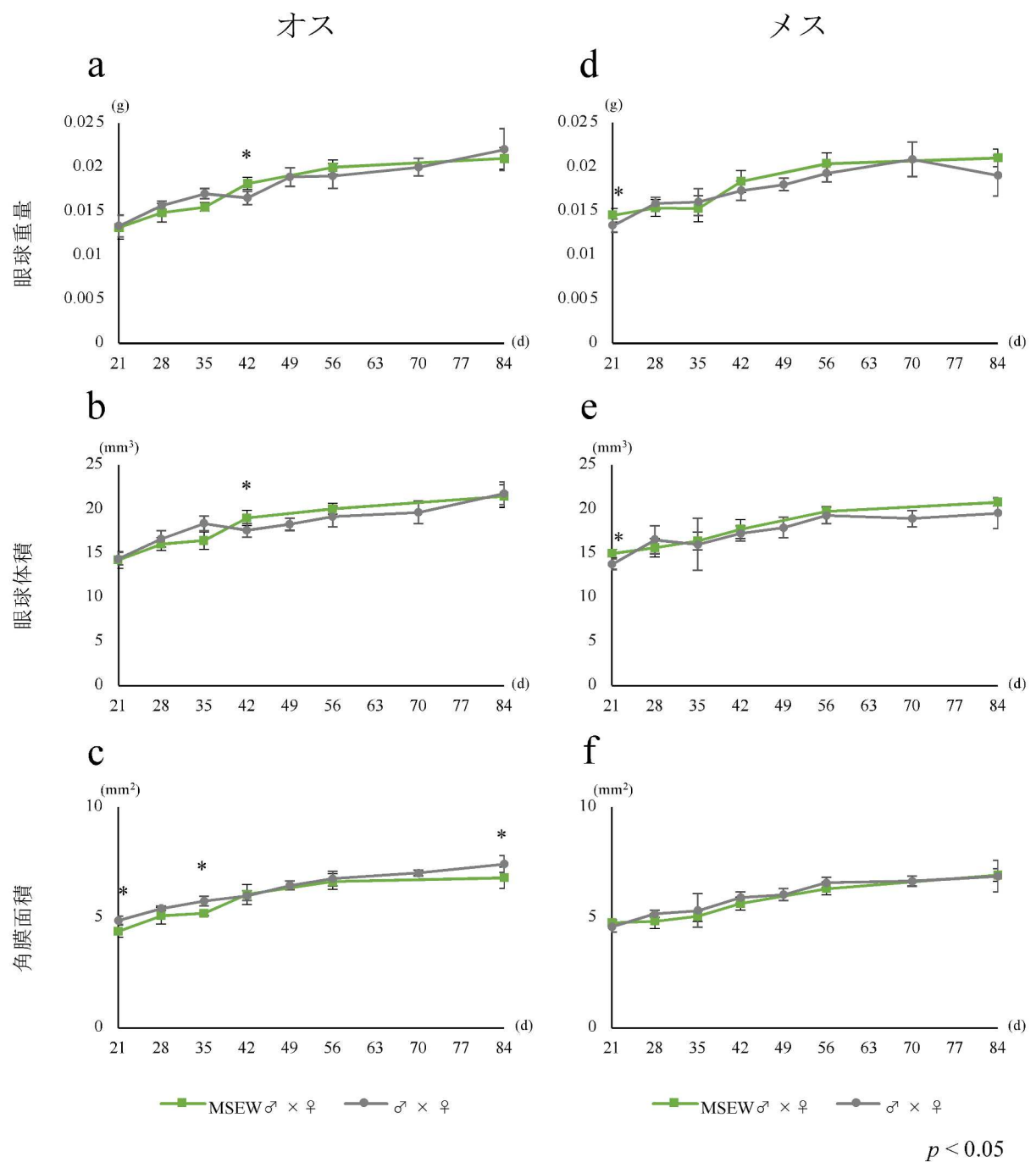
Fig. 7 各群・各親における開眼率の経日的変遷

a: 各群の累積開眼率

各色は異なる親から生まれた仔を表す

開眼率を日齢の進行に伴い積算し、全頭開眼が確認された場合を100%とした

b: 各日齢における新規開眼率の比較

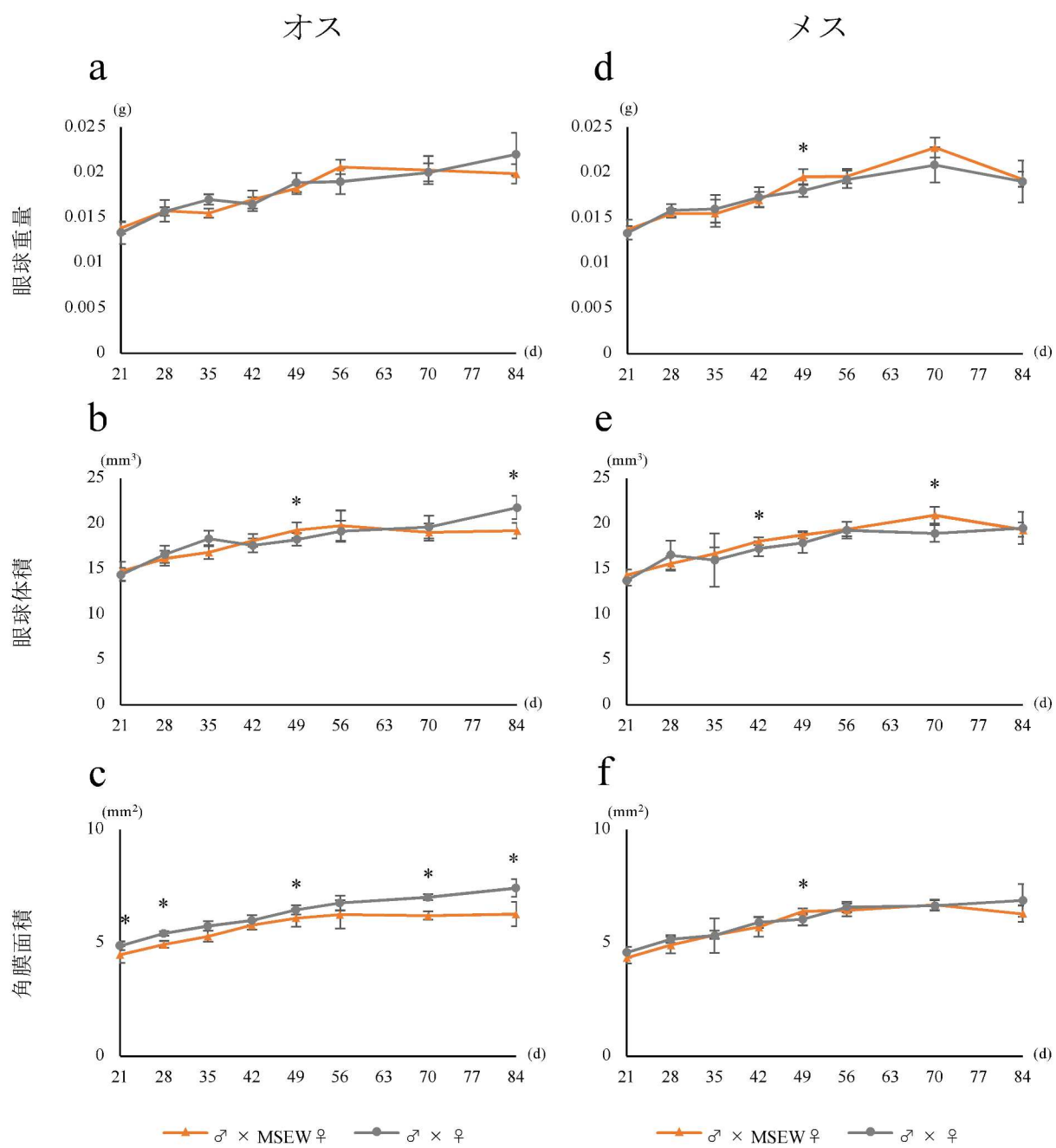


$p < 0.05$

Fig. 8 “MSEW ♂ × ♀ 群” と “♂ × ♀ 群” における眼球サイズの比較

a-c : オス d-f : メス

a, d : 眼球重量 b, e : 眼球体積 c, f : 角膜面積

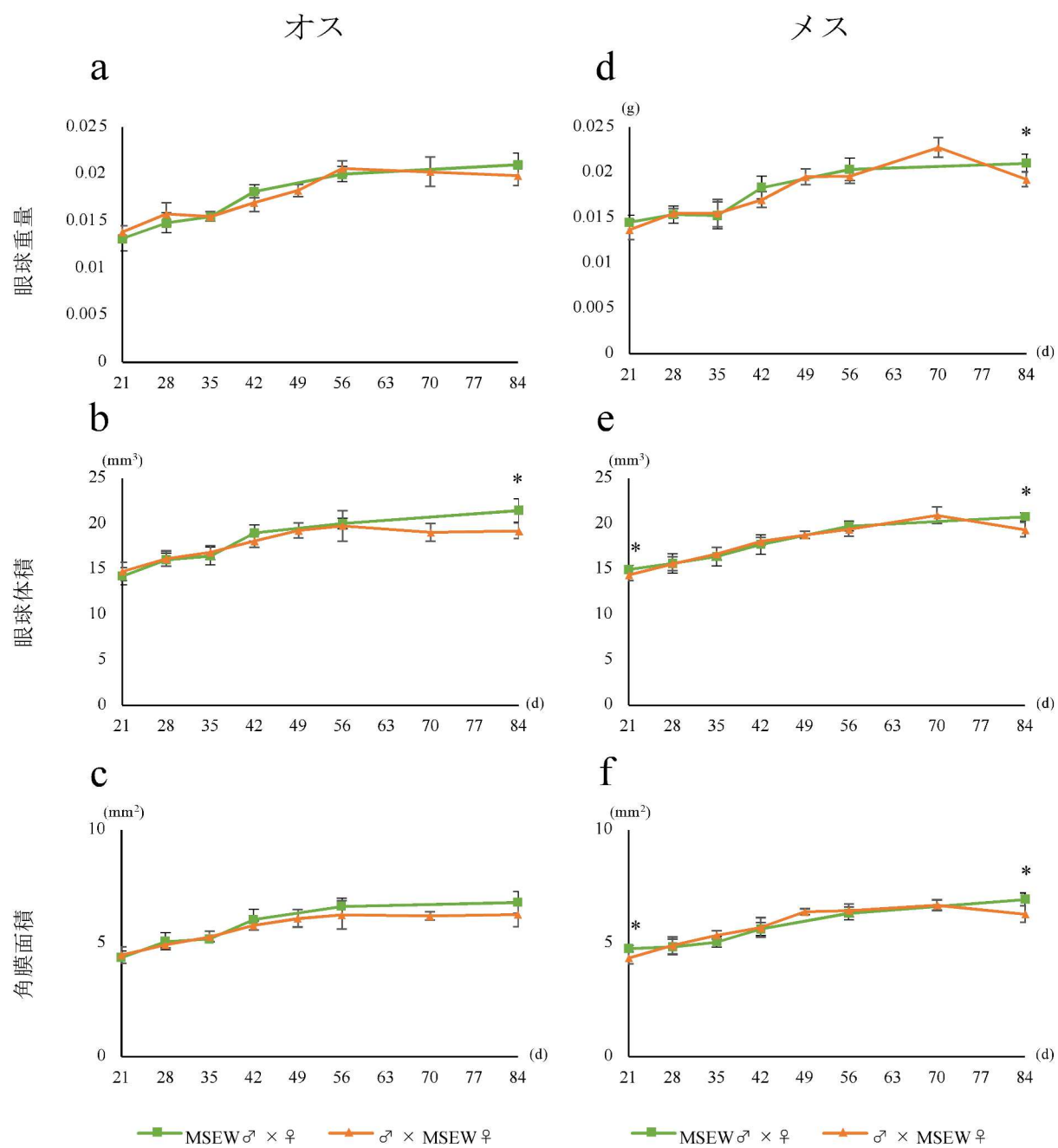


$p < 0.05$

Fig. 9 “♂×MSEW♀群”と“♂×♀群”における眼球サイズの比較

a-c: オス d-f: メス

a, d: 眼球重量 b, e: 眼球体積 c, f: 角膜面積



$p < 0.05$

Fig. 8 “MSEW ♂ × ♀ 群” と “♂ × MSEW ♀ 群” における眼球サイズの比較

a-c : オス d-f : メス

a, d : 眼球重量 b, e : 眼球体積 c, f : 角膜面積

第三章 全眼球標本における組織保存性の向上を目的とした浸漬固定液の開発

緒論

第一章および第二章ではマウス眼球とウシ眼球を用い、いずれも網膜形態に注目した組織学的解析を進めてきた。解析の中で眼球組織の固定方法については、網膜剥離などの人為的な構造破綻を避けることを目的に、浸漬固定による固定を採用した。しかし眼球壁は内部への迅速な固定液の浸透を妨げるため、一般的な固定液を用いた浸漬固定では眼球構造全体を均一に固定することが困難であった。Margo と Lee (1995) は、10%中性緩衝ホルマリン液 (neutral-buffered formalin: NBF) または 4%パラホルムアルデヒド水溶液 (paraformaldehyde: PFA) を迅速に使用した場合においても、眼球形状の変形や網膜の層構造の不整が頻繁に生じることを報告している (Margo and Lee 1995)。特に網膜は死後変性が生じやすく迅速な固定が必要とされている (Finnie et al. 2021)。そのため、網膜や虹彩など眼球内部構造の保存については、眼球壁および角膜をトリミングすることにより、固定液の内部への迅速な浸透を図ることが推奨されている (Pang et al. 2021; Souverein et al. 2023)。しかしマウス眼球は非常に小さく、適切なトリミングを行うには経験と技術を必要とする。不正確または時間を掛けたトリミング処置は、不十分な固定や死後変性を招く危険性がある。さらに最近の研究では、分子生物学的解析のために新鮮な未固定組織が必要とされるため、全身灌流固定を選択肢に入れることは難しい。また、教育用標本などの目的のため、眼球全体の標本作製が必要されるケースでは、眼球壁のトリミング自体が実

施不可能になる。以上の背景から、網膜の研究および眼球標本の用途に対しては、眼球壁を迅速に浸透する改良固定液の開発が求められている。

これまで、眼球の組織学的解析の困難さを改善するためにいくつかの取り組みが行われてきた。ブタノールは一般的に植物組織、例えばブドウ胚のパラフィン包埋に利用されている (Horiuchi et al. 1991) が、眼球ではキシレンの代わりに透徹処理に用いることで水晶体の薄切を容易にすることが報告されている (Kondo et al. 2014, 2016)。またメタノールも水晶体内部に均一に浸透する能力を持つ。しかし水晶体はブタノール・メタノールを利用してもパラフィン切片作成時に割れや破碎が頻発する。2-メルカプトエタノールはウェスタンブロットなどで用いられる還元剤で、タンパク質中のジスルフィド結合を特異的に切断する。トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩 (Tris(2-carboxyethyl)phosphine Hydrochloride: TCEP-HCl) はさらに強力な還元剤であり高い親水性をもつ。これらを組織学的標本の作製に用いた例は無いが、組織試料中においてもジスルフィド結合を切断して、水晶体を軟化させる効果が期待される。固定液に適切な添加剤を加えることで、水晶体や全眼球の薄切を容易にする固定液の開発が可能になると考えられる。

ホルムアルデヒドのタンパク質架橋作用は、抗原のエピトープ部位を組織表層から隠し、また抗原の立体構造を大きく変化させるため、抗体の結合親和性を阻害して免疫染色の遂行に問題となる場合がある。特に特定のシナプス関連タンパク質については、抗原賦

活化処理を施しても、ホルムアルデヒド固定標本の免疫蛍光染色では検出が困難であることが報告されている (Konno et al. 2023) 。グリオキサールは最も簡単な構造を示すジアルデヒドであり、揮発性が低くホルムアルデヒドよりも安全な架橋固定剤として注目されている (Dapson 2007) 。固定作用に優れており、ホルムアルデヒドよりも迅速に固定できるだけでなく、固定中に組織を過度に収縮させない特性ももつ (Dapson 2007; Wang et al. 2011) 。そのため、酢酸やエタノールと混合することで組織を適度に硬化させ、脳などの軟組織の形態を保ったまま容易な薄切が可能になる (Konno et al. 2023) 。さらにグリオキサール固定標本は、海馬や心筋、内耳の免疫染色において、PFA 固定標本と同等もしくはそれ以上の反応性を示す (Richter et al. 2018) 。さらに脳では、ホルムアルデヒド固定標本で検出されなかったシナプス関連タンパク質の検出を可能にする (Konno et al. 2023, 2025) 。

眼球は、固定液の浸透を阻む厚い強膜と、変性の進行が速い網膜などの内部組織の両方を有している。本研究では、ホルムアルデヒドの代替としてグリオキサールを用い、さらに適切な添加剤を加えることで、マウス眼球の組織学的構造を高く保持し、かつ免疫染色にも適用可能な効果的な固定液の開発を試みた。評価の指標として (1) 浸漬法にて従来の固定液よりも高い浸透性と固定効果を示すか、 (2) 水晶体およびマウス全眼球の高品質な薄切に有用か、 (3) 抗原性を損なわずに免疫染色への適用が可能か、に焦点を当て、新規固定液の開発と眼球の組織学的解析を行った。

材料と方法

1. 供試動物および眼球の採材

15 日齢から 15 ヶ月齢までのマウス [ICR (n = 92), B6C3F1 (n = 17), B6D2F1 (n = 19); Japan SLC, Hamamatsu, Japan]、計 128 匹を用いた。イソフルラン吸入麻酔後の頸椎脱臼、または二酸化炭素吸入にて安楽殺処置を行い、直ちに眼球の採材を実施した。眼窩内にマイクロピンセットを挿入し、視神経を眼筋および眼窩脂肪とともに切断することで、左右眼球を慎重に摘出した。動物実験は山口大学動物使用委員会の承認を受けて実施した（承認番号：557 および 667）。

2. 組織固定と薄切標本の作成

NBF と PFA、および標準 Davidson's solution (standard Davidson's solution: sDS) を調製した (Table 1)。1 匹のマウスから採取した左右眼球を、それぞれ 2 mL の各固定液中でシェーカーを用いて一晩浸漬固定した（一部の試料は 3 日間固定を行った）。リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline: PBS) で洗浄したのち、定法にてパラフィン包埋を施した。滑走式ミクロトーム (NS-31; Yamato Kohki Industrial, Saitama, Japan) および替刃 (A35; Feather Safety Razor, Osaka, Japan) を用いて、視神経乳頭部を含む 6 μ m 厚の薄切切片を作製した。

Table 1 に示す 3 種類の既存固定液を比較したところ、sDS 標本が眼球全体および各組織の固定に最も効果的であった。そこで免疫染色における効果の検証を目的として、sDS 中のホルムアルデヒドをグリオキサール (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) に置換した。予備実験によりグリオキサール濃度を 0.5–20% の範囲で検討し、2.22% で最小濃度かつ十分な固定効果が得られることを確認した。しかし、このグリオキサール置換 Davidson's solution (glyoxal-replaced Davidson's solution: grDS) は、浸漬法によるマウス眼球の組織保存には不十分であった (結果参照)。そこで、Table 2 に示す添加剤を用いて grDS の改良を試みた。各固定液の組成を Table 3 に示す。pH は LAQUAtwin II pH メーター (AS-pH-22, HORIBA Advanced Techno Co., Ltd., Kyoto, Japan) を用いて測定した。有機溶媒は水素イオンの解離や電極の動作に影響し、pH 測定を不安定にすることが知られているため (Mussini et al. 1985; Rondinini et al. 1987; Deleebeeck et al. 2021; Bastkowski et al. 2024)、各固定液の pH 評価は水性成分 (ホルムアルデヒド、グリオキサール、酢酸、TCEP-HCl、蒸留水の混和物) のみを対象に行った。各試料について 3 回の測定後、平均値 $\pm$ 標準偏差を算出した。

3. 組織学的解析・評価

HE 染色後、光学顕微鏡 (Eclipse CiE, Nikon, Tokyo, Japan) に観察し、画像解析ソフト WinROOF2018 (Mitani Coop., Tokyo, Japan) を用いて組織像を撮影した。得られた画像から、眼球外形、角膜、虹彩、水晶体および網膜の構造保持性を各固定液について評価した。

4. 免疫蛍光

一部の標本に対し、第一章と同様の手法にて Immunofluorescence を行った。Table 4 に示す一次抗体を用い、4°Cで一晩反応させた。非標識一次抗体については、二次抗体 goat anti-rabbit IgG H&L with Alexa Fluor® 594 (ab150080 ; abcam, Cambridge, MA, USA) を 1:250 で室温にて 1 時間反応させた。核染色には DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 340-07971, FUJIFILM WAKO, Osaka, Japan) を用いた。切片は Fluoromount/Plus™ (Diagnostic BioSystems, California, USA) で封入した。撮影は共焦点顕微鏡 Mica (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) および LasX ソフトウェア (Leica) を用いて行った。

結果

1. PFA および sDS による不完全なマウス眼球の構造維持

PFA にて固定した眼球では、眼球前壁（角膜）および後壁（強膜）が波状の不整像を示し、網膜の大部分が眼底から剥離していた（Fig. 1a）。水晶体では破碎と亀裂が生じ、水晶体核の一部は標本作成過程に剥離した（Fig. 1b）。虹彩は角膜側へ変位し、前眼房領域は狭小化していた（Fig. 1c）。角膜実質には膨化が確認され、コラーゲン線維間の間隙が拡張していた（Fig. 1d）。網膜は網膜色素上皮層（RPE）と PL の間だけでなく、視細胞の外節・内節間でも開裂が生じた（Fig. 1e）。さらに、PL と ONL の層間、および ONL と INL の層内においても開裂がみられた（Fig. 1f）。核におけるクロマチンの染色性は、後述の sDS 固定標本とは異なり、INL と ONL の核にて区別することが難しかった（Fig. 1g）。

sDS 固定標本では、眼球壁の環状構造は良好に保持されていたが、水晶体の核および皮質部は薄切時に破碎および亀裂を生じた（Fig. 1h）。前囊と水晶体上皮の間には異常な開裂が認められた（Fig. 1i）。虹彩は屈曲して変形し（Fig. 1j）、角膜では、実質の膨化とコラーゲン線維間隙の拡張、内皮の波状の変形が観察された（Fig. 1k）。一方で網膜では各細胞層間の剥離は認められず、平行な 10 層構造が良好に保持されていた（Fig. 1l）。ヘマトキシリン染色では、ONL の核においてクロマチンの濃密な凝集がみられ、INL および

GCL の核では淡染傾向を示した (Fig. 1m)。固定作用は、sDS を用いた場合の方が PFA を用いた場合よりも優れていた。

2. 1-ブタノールの添加による角膜変形および網膜不整の改善

grDS は、Davidson's solution 中の 0.82% ホルムアルデヒドを 2.22% グリオキサールに置換することで調製した (Table 3, Solution A)。grDS 固定では、眼球外形は良く保存されたが、内部構造は sDS と比較して保存性が低下していた (Fig. 2a)。水晶体では核の破碎と囊の剥離が生じた (Fig. 2b)、角膜では実質の膨化と上皮の剥離がみとめられた (Fig. 2c)。また網膜は、RPE と PL の間にて開裂が広範に渡って生じ、一部では網膜が波状に変形していた (Fig. 2d, e)。網膜を強拡大で観察したところ、クロマチンの染色性は sDS と大きな違いはなかった (Fig. 2f)。

grDS に 1-ブタノールを添加したところ (Table 3, Solution B)、全眼球標本の薄切性が向上した (Fig. 3a)。さらに、角膜では上皮および内皮の剥離が防がれた (Fig. 3d)。網膜では、波状の変形とともに RPE-PL 間の開裂が改善された (Fig. 3e)。ONL, INL, GCL では sDS と同様に、それぞれの細胞でクロマチンが濃染あるいは淡染して観察された (Fig. 3f)。網膜のクロマチン染色性は、これ以降に作製した Solution C-G の固定液においても良好な結果が得られた。しかし一方で、1-ブタノールは、水晶体囊および上皮細胞の剥離

や、水晶体核および皮質の広範な破碎を防ぐことができなかった (Figs. 3b, c)。虹彩は前方へ変位しており (Fig. 3c)、角膜実質の膨化も依然として認められた (Fig. 3d)。

3. メタノールの添加による水晶体破碎と角膜実質膨化の改善

メタノールの添加 (Table 3, Solution C) は、水晶体のほぼ全域における薄切を可能にした (Fig. 4a)。水晶体嚢の剥離は軽度になり、水晶体皮質の亀裂は小さくなった (Fig. 4b)。角膜実質の膨化は軽減され (Fig. 4d)、網膜は平行な 10 層構造を保持していた (Fig. 4e, f)。一方で虹彩は変位し角膜内皮に接しており、隅角は異常な狭小化を示した (Fig. 4c)。

4. 2-メルカプトエタノールまたは TCEP-HCl の添加による水晶体軟化と角膜実質膨化の改善

2-メルカプトエタノールの添加 (Table 3, Solution D) では、眼球全体の形態および網膜構造が良好に保持された (Fig. 5a, 5e)。しかし水晶体の破碎、角膜側への虹彩の変位、角膜実質の膨化は改善されなかった (Fig. 5b-d)。同様に、TCEP-HCl の添加 (Table 3, Solution E) も良好な眼球外形および網膜形態を保持した (Fig. 5f, 5j)。虹彩の変位および

角膜実質の膨化は改善されたものの (Fig. 5h, 5i)、水晶体嚢は上皮細胞から剥離し、核の周辺部には依然として亀裂が認められた (Fig. 5g)。

5. メタノールと TCEP-HCl の組み合わせ添加による全眼球の形態保持性の向上

メタノールと 2-メルカプトエタノールを組み合わせで添加した Solution F (Table 3) では、眼球の外形を十分に保持することができなかった (Fig. 6a)。水晶体嚢は上皮から剥離し、虹彩は角膜方向へ変位していた (Fig. 6c)。角膜実質には依然として膨化が認められた (Fig. 6d)。一方で、水晶体は亀裂を生じることなく滑らかに薄切することが可能になり (Fig. 6b)、網膜は層状構造を保持していた (Fig. 6e, f)。メタノールと TCEP-HCl を組み合わせで添加した Solution G (Table 3) は、眼球外形を良く保持した (Fig. 6g)。水晶体は滑らかに薄切することができたが、標本の乾燥過程において皮質および核に亀裂が生じ、後嚢において剥離が生じた (Fig. 6h)。虹彩の保存は良好で、異常な屈曲や角膜内皮への接着を示さなかった (Fig. 6i)。角膜実質の膨化は解析した固定液の中で最小限に低減され (Fig. 6j)、網膜は平行な 10 層構造を維持していた (Fig. 6k, 4l)。

Solution G を用いた標本は、眼球構造の保存性および標本の薄切性の両面で最も良好な結果を示したため、この固定液を、添加した構成成分の頭文字 (glyoxal, 1-butanol, methanol, TCEP-HCl) より「GBMT solution」と命名し、次の解析に用いた。

6. GBMT solution 標本を用いた Immunofluorescence における抗体反応性の増強

GBMT solution で浸漬固定を施した眼球について、特に網膜における抗原の保存性を Immunofluorescence にて検証した。細胞質または核に局在する抗原を対象とし、sDS 標本と比較した。Anti-Protein kinase C (PKC) α antibody は、両方の固定液標本とともに桿体双極細胞を良好に標識したが、GBMT solution 標本では IPL におけるバックグラウンドの蛍光強度が軽減され、特に軸索の標識がより明瞭で特異的であった (Fig. 7a, 7b)。Anti-synaptophysin antibody を用いたところ、sDS 標本では陽性像が検出されなかったが、GBMT solution 標本では OPL および IPL にて陽性反応が確認された (Fig. 7c, 7d)。一方で、anti-Chx10 antibody および anti-NeuN antibody は sDS 標本でより強い検出性を示したが、GBMT solution 標本では反応が減弱した (Fig. 7e-7h)。anti-calbindin D28-K antibody, anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody, anti-Tuj1 antibody については、両固定液間で染色性に明確な差は認められず、いずれも対象タンパク質が良好に標識された (Fig. 7i-7n)。

考察

眼球は、組織学的性質の異なる多様な構造を硬い強膜によって包み込んでおり、これによって固定液の迅速な内部浸透が妨げられ、均一な固定を行うことが困難である。また、眼球は固定および脱水に伴う収縮率に関して組織間で著しい差を示し、特に水分含有量が99%以上を占める硝子体と、網膜、脈絡膜、強膜の間で顕著である (Margo and Lee 1995; Ray C. Henrikson, Gordon I. Kaye, Joseph E. Mazurkiewicz. 1997; Slomianka 2006) 。Davidson's solution (DS) は、ホルムアルデヒドにエタノールおよび酢酸を添加することで、強い脱水作用とタンパク質凝固作用を示す。これにより迅速な固定が可能となり、DS は眼球、特に外形および網膜の保存に有用な固定液として知られている (Heywood and Gopinath 1990; Latendresse et al. 2002; Morawietz et al. 2004; Finnie et al. 2021) 。しかし DS は抗原タンパク質への影響が強く、免疫染色への適用に不向きと考える研究者も多い。したがってタンパク質の過度な架橋を抑制する目的で、DS に含まれるホルムアルデヒド濃度を低減して用いる場合がある (Presnell and Schreibman 1997; Latendresse et al. 2002) 。本研究で用いた sDS は低ホルムアルデヒド濃度で作製したが、眼球の外形を良好に維持した。しかし角膜、水晶体、虹彩の保存状態は不完全であった (Fig. 1h-k) 。

グリオキサールは、低濃度でも良好な固定能を示すことが知られている (Wicks and Sultzeff 1943) 。しかし本研究において、sDS 中のホルムアルデヒドをグリオキサールへ置換した grDS では、眼球組織、特に網膜の構造保持に対しては十分な効果を示さなかった

(Fig. 2)。通常、網膜は眼圧（眼房水や硝子体液、硝子体による）により適度に眼底に押し付けられている (Ghazi and Green 2002)。しかし固定過程において不均一な組織収縮や過度な膨張が生じると、眼圧の均衡が崩れ、特に発生学的および組織学的に接着が弱い RPE と PL の間で網膜剥離が頻発する可能性がある。したがって、ホルムアルデヒドを単純にグリオキサールに置換するのみでは、脆弱部位の形態保持は困難であったと考えられる。さらに、グリオキサールはホルムアルデヒドよりも柔軟性を保ったまま組織を固定する利点を持つが (Iwashita et al. 2020; Konno et al. 2023; Chidlow et al. 2025)、この効果は固定過程における眼球内の組織変形を助長する可能性もある。そのため、グリオキサールによる固定を補助する添加剤の使用が必須であると考えられた。

1-ブタノールの添加は、特に水晶体および網膜の構造保存を改善した (Fig. 3)。1-ブタノールはエタノールに比べて分子量が大きく極性が低いため、穏やかな脱水作用を示す (Spange et al. 2022)。特に硝子体の脱水が緩やかに進行することで、眼圧が徐々に低下し、眼球外形の維持に寄与したと推察される。同様に、穏やかな脱水は外側および内側網膜の組織収縮を均一にし、人工的な網膜剥離の防止にも寄与したと考えられる。また、1-ブタノールの添加により grDS 全体の極性および親水性が低下し、特に眼球壁における固定反応が緩慢になった可能性がある。これにより、強膜におけるタンパク質の凝固や膠原線維の網目状構造の収縮が遅延し、グリオキサールの眼球内部への浸透が促進されたと推測される。また、本研究で観察された虹彩の変位は、二つのタイプに分類された。一つ

は、水晶体嚢と上皮の剥離を伴うものである。これらの組織は水分含量が高いのに対し、水晶体皮質および核は水分が少なく、高密度なタンパク質から構成されている (Slomianka 2006)。そのため両者は脱水過程において異なる収縮率を示し、剥離したと考えられる。加えて、水晶体嚢の剥離は隣接する虹彩の変位を誘発した可能性がある。もう一つのタイプは水晶体の変位を伴うものである。不十分な脱水が硝子体の形態変化を引き起こし、水晶体と虹彩を前方へ押し出した可能性が考えられる。いずれの場合も、脱水過程の最適化が眼球内部構造の保存に有効であることが示唆された。

一方で、メタノールは分子量が小さく高い極性を示す (Spange et al. 2022)。一般的な化学的観点から、メタノールはエタノールや 1-ブタノールよりも組織への透過性が高く、より速い脱水およびタンパク質凝固を引き起こす可能性がある。メタノールの添加は grDS の浸透効果を向上させ、特に水晶体核のタンパク質凝固および構造維持に効果的であったことが推測される (Fig. 4)。一方で、膨化した角膜実質では、コラーゲン線維層間の剥離が見られた。角膜では、コラーゲン線維とプロテオグリカンが水素結合およびイオン結合を形成している。過剰なアルコール添加は水素結合に付随する bound water を脱水し、組織内の水素結合や分子間相互作用の弱화를招くと考えられる (Jayasuriya et al. 2003; Cheng et al. 2015)。また、角膜上皮は強い疎水性を有することが知られている (Holly and Lemp 1971; Holly 1978)。角膜表層の疎水性は固定液の浸透を妨げ、固定時間を遅延化することで実質の膨化の要因になっている可能性も考えられる。

水晶体の主要なタンパク質成分であるクリスタリンはチオール基（SH 基）を含み、酸化されるとジスルフィド結合を形成する。高齢マウスおよびラットで水晶体切片の作製が困難になるのは、クリスタリンのジスルフィド結合が増加して水晶体が硬化するためであると考えられている (Yu et al. 1985; Ozaki et al. 1987)。ジスルフィド結合の重要性を鑑み、2-メルカプトエタノールおよび TCEP-HCl を用いて還元を試みたが、各々を単独で添加した場合には顕著な効果は得られなかった (Fig. 5)。しかし各還元剤をメタノールと組み合わせて添加することで改善され、還元剤による水晶体の軟化には、メタノールの浸透効果との相乗効果が有効であると考えられた (Fig. 6)。さらに、TCEP-HCl は他組織にも効果的であり、虹彩および角膜実質の組織構造をより良好に保持した (Fig. 5, Fig. 6)。

マウス網膜の ONL は、ヘマトキシリン染色において特有の染色性を示し、ヘテロクロマチンが核の中央部に集中する“chromocenter”を形成する (Tanabe et al. 2021)。この核構造は網膜内の光の透過に有効であると考えられており (Solovei et al. 2009)、夜行性動物の網膜で顕著にみられる特徴である (Solovei et al. 2013)。一方で、マウス GCL 中の神経節細胞の核はヘマトキシリンで淡く染まる傾向があり、これは転写活性が高いユークロマチンを豊富にもつためと考えられる (Hedberg-Buenz et al. 2016)。ONL と GCL におけるヘマトキシリン染色性の特徴は、網膜の保存状態を評価する上で有用な指標と考えられる。一般に、酢酸やアルコールの添加剤は、組織において pH の低下とタンパク質の凝固促進を誘発するため (Stradleigh and Ishida 2015; Tokuda et al. 2018)、ヘマトキシリンの染色性に影

響を与える可能性がある。しかし本研究では、PFA 固定標本を除き、網膜の核染色性は維持されていた。グリオキサール (Wicks and Sultz 1943) および本研究で使用したすべての添加剤は、ヘマトキシリンの染色性に影響を及ぼすことは示唆されなかった。

ラット眼球はマウス眼球よりも大きい、GBMT solution による浸漬固定を行ったところ、網膜の 10 層構造は良好に保存され、水晶体核は滑らかに薄切することが可能であった。しかしながら、眼球の環状外形は変形し、水晶体核と水晶体皮質の間で開裂が生じた (兵頭、データ未掲載)。強膜は動物種によって膠原線維だけではなく、軟骨成分や弾性線維も含まれ、固定液の浸透性に影響を与えることが予想される。ラット強膜の浸透性はマウスとは異なる可能性があり、改めて固定液の処置条件を検証する必要がある。また、大型眼球の固定に関しては、角膜に細い針を刺入させ、硝子体腔内に固定液を注入する方法が報告されている (Morawietz et al. 2004; Boller et al. 2022)。この手法を適用することで、動物種に依存せずに固定液の眼球への浸透性が改善され、固定効果の向上と眼球形態の保持が可能となるかもしれない。

DS は NBF と比較して、いくつかの核内抗原 (cyclin D1) および細胞質内抗原 (Brn3a, γ -aminobutyric acid, glutamine synthetase, nestin, α B-crystallin, Iba1) に対する免疫染色への適用性が低いことが報告されている (Chidlow et al. 2011, 2025)。GBMT solution の開発において用いたグリオキサールは、ホルムアルデヒドよりも抗原性の保持に優れ、さらに対象

の抗原は核内・細胞質内の局在性に依存しないことが示されている (Richter et al. 2018)。

実際に、本研究で調整した GBMT solution にて固定した標本では、sDS 標本に比べて PKC α および synaptophysin を標的とした抗体反応性が向上し、より強いシグナルが得られた (Fig. 7a-d)。また、calbindin D-28K, GFAP, Tuj1 については、両固定液間で同等の結果が得られた (Fig. 7i-n)。これらの結果から、GBMT solution は細胞質内に局在する抗原の検出に極めて有効であることが示された。一方で、核内抗原である Chx10 および NeuN の検出性は sDS 標本よりも低下していた (Fig. 7e-h)。各固定液の水性成分の pH を比較すると、GBMT solution の pH (1.70 ± 0.01 , Table 3) は Davidson's solution (2.39 ± 0.02 , Table 1) よりもかなり低いことが示された。酸性条件である Bouin solution を用いた固定では、核内タンパク質の検出が減弱すること、あるいは非特異的反応が生じることが報告されている (Ananthanarayanan et al. 2005; Alkali et al. 2024)。GBMT solution 標本における核内タンパク質の検出性低下は、過度な酸性条件に起因する可能性がある。

本研究では、迅速かつ均一な組織浸透性を示し、高い固定能力を持つ GBMT solution を作製した。この GBMT solution は、浸漬法によりマウス眼球の組織構造を良好に保持し、水晶体核を含む眼球全体の高品質な薄切を可能にする。細胞質抗原に対する Immunofluorescence では高感度かつ高強度の陽性反応が得られたが、核内抗原に対する反応性には改善の余地が残されている。一方で、GBMT solution は眼球のトリミングや全身灌流固定を必要とせず、並行して反対側眼球のサイズ測定や凍結保存を容易かつ効率的に

行うことができる。内部の微細構造が適切に保持された全眼球薄切標本は、組織学的解析
および教育的用途における有効的な活用が期待される。

参考文献

- Alkali IM, Colombo M, Rodak O, et al (2024) Effect of fixatives and fixation period on morphology and immunohistochemistry of feline ovarian tissue. *Animals (Basel)* 14:825
- Ananthanarayanan V, Pins MR, Meyer RE, Gann PH (2005) Immunohistochemical assays in prostatic biopsies processed in Bouin's fixative. *J Clin Pathol* 58:322–324
- Bastkowski F, Heering A, Uysal E, et al (2024) Rigorous pH measurement in non-aqueous solution: measurement method and reference values in ethanol. *Anal Bioanal Chem* 416:461–465
- Booler HS, Lejeune T, Sorden S, et al (2022) Scientific and Regulatory Policy Committee points to consider: Fixation, trimming, and sectioning of nonrodent eyes and ocular tissues for examination in ocular and general toxicity studies. *Toxicol Pathol* 50:235–251
- Cheng X, Petsche SJ, Pinsky PM (2015) A structural model for the in vivo human cornea including collagen-swelling interaction. *J R Soc Interface* 12:20150241
- Chidlow G, Daymon M, Wood JPM, Casson RJ (2011) Localization of a wide-ranging panel of antigens in the rat retina by immunohistochemistry: comparison of Davidson's solution and formalin as fixatives: Comparison of Davidson's solution and formalin as fixatives. *J Histochem Cytochem* 59:884–898
- Chidlow G, Wood JPM, Chan WO, Casson RJ (2025) Evaluation of Glyoxal fixation for immunohistochemistry of the retina. *Sci Rep* 15:1–17
- Dapson RW (2007) Glyoxal fixation: how it works and why it only occasionally needs antigen retrieval. *Biotech Histochem* 82:161–166
- Deleebeeck L, Snedden A, Nagy D, et al (2021) Unified pH measurements of ethanol, methanol, and acetonitrile, and their mixtures with water. *Sensors (Basel)* 21:3935
- Finnie J, Manavis J, Chidlow G, et al (2021) Temporal sequence of post-mortem autolysis in the mouse retina. *J Comp Pathol* 187:17–26
- Ghazi NG, Green WR (2002) Pathology and pathogenesis of retinal detachment. *EYE* 16:411–421
- Hedberg-Buenz A, Christopher MA, Lewis CJ, et al (2016) Quantitative measurement of retinal ganglion cell populations via histology-based random forest classification. *Exp Eye Res* 146:370–385

- Heywood R, Gopinath C (1990) Morphological assessment of visual dysfunction. *Toxicol Pathol* 18:204–217
- Holly F (1978) Biophysical aspects of epithelial adhesion to stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17:552–557
- Holly FJ, Lemp MA (1971) Wettability and wetting of corneal epithelium. *Exp Eye Res* 11:239–250
- Horiuchi S, Kurooka H, Furuta T (1991) Studies on the embryo dormancy in grape. *Engei Gakkai Zasshi* 60:1–7
- Iwashita M, Nomura T, Suetsugu T, et al (2020) Comparative analysis of brain stiffness among amniotes using glyoxal fixation and atomic force microscopy. *Front Cell Dev Biol* 8:574619
- Jayasuriya AC, Scheinbeim JL, Lubkin V, et al (2003) Piezoelectric and mechanical properties in bovine cornea. *J Biomed Mater Res A* 66:260–265
- Kondo T, Ishiga-Hashimoto N, Nagai H, et al (2014) Expression of transforming growth factor β and fibroblast growth factor 2 in the lens epithelium of Morioka cataract mice: TGF β and FGF in the lens of MCT mice. *Congenit Anom (Kyoto)* 54:104–109
- Kondo T, Nakamori T, Nagai H, et al (2016) A novel spontaneous mutation of BCAR3 results in extrusion cataracts in CF#1 mouse strain. *Mamm Genome* 27:451–459
- Konno K, Yamasaki M, Miyazaki T, Watanabe M (2023) Glyoxal fixation: An approach to solve immunohistochemical problem in neuroscience research. *Sci Adv* 9:eadf7084
- Konno K, Yamasaki M, Watanabe M (2025) Advanced fixation techniques for high-sensitivity molecular imaging: effectiveness of glyoxal fixation for immunostaining. *Anat Sci Int* 1–6
- Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM (2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol Pathol* 30:524–533
- Margo CE, Lee A (1995) Fixation of whole eyes: the role of fixative osmolarity in the production of tissue artifact. *Arbeitsphysiologie* 233:366–370
- Morawietz G, Ruehl-Fehlert C, Kittel B, et al (2004) Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol* 55:433–449
- Mussini T, Covington AK, Longhi P, Rondinini S (1985) Criteria for standardization of pH

- measurements in organic solvents and water + organic solvent mixtures of moderate to high permittivities. *Pure Appl Chem* 57:865–876
- Ozaki Y, Mizuno A, Itoh K, Iriyama K (1987) Inter- and intramolecular disulfide bond formation and related structural changes in the lens proteins. A Raman spectroscopic study in vivo of lens aging. *J Biol Chem* 262:15545–15551
- Pang J, Thomas N, Tsuchiya D, et al (2021) Step-by-step preparation of mouse eye sections for routine histology, immunofluorescence, and RNA in situ hybridization multiplexing. *STAR Protoc* 2:100879
- Presnell JK, Schreibman MP (1997) *Humason's Animal Tissue Techniques*, 5th edn. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD
- Ray C, Henrikson, Gordon I, Kaye, Joseph E, Mazurkiewicz. (1997) *National Medical Series for independent studies—Histology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- Richter KN, Revelo NH, Seitz KJ, et al (2018) Glyoxal as an alternative fixative to formaldehyde in immunostaining and super-resolution microscopy. *EMBO J* 37:139–159
- Rondinini S, Mussini PR, Mussini T (1987) Reference value standards and primary standards for pH measurements in organic solvents and water + organic solvent mixtures of moderate to high permittivities. *Pure Appl Chem* 59:1549–1560
- Slomianka L (2006) *Blue Histology-The Eye*. OLYMPUS.
<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/eye/eye.htm>.
- Solovei I, Kreysing M, Lanctôt C, et al (2009) Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell* 137:356–368
- Solovei I, Wang AS, Thanisch K, et al (2013) LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. *Cell* 152:584–598
- Souverein EA, Nagiel A, Gnedeva K (2023) Obtaining high-quality cryosections of whole rabbit eye. *J Vis Exp* 10.3791/66115
- Spange S, Weiß N, Mayerhöfer TG (2022) The global polarity of alcoholic solvents and water - importance of the collectively acting factors density, refractive index and hydrogen bonding forces. *ChemistryOpen* 11:e202200140
- Stradleigh TW, Ishida AT (2015) Fixation strategies for retinal immunohistochemistry. *Prog Retin*

Eye Res 48:181–202

Tanabe H, Kusakabe KT, Imai H, et al (2021) The heterochromatin block that functions as a rod cell microlens in owl monkeys formed within a 15-Myr time span. *Genome Biol Evol* 13:evab021

Tokuda K, Baron B, Kuramitsu Y, et al (2018) Optimization of fixative solution for retinal morphology: a comparison with Davidson's fixative and other fixation solutions. *Jpn J Ophthalmol* 62:481–490

Wang YN, Lee K, Pai S, Ledoux WR (2011) Histomorphometric comparison after fixation with formaldehyde or glyoxal. *Biotech Histochem* 86:359–365

Wicks LF, Suntzeff V (1943) Glyoxal, a Non-Irritating Aldehyde Suggested as Substitute for Formalin in Histological Fixations. *Science* 98:204

Yu NT, DeNagel DC, Pruett PL, Kuck JF Jr (1985) Disulfide bond formation in the eye lens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:7965–7968

付図・付表

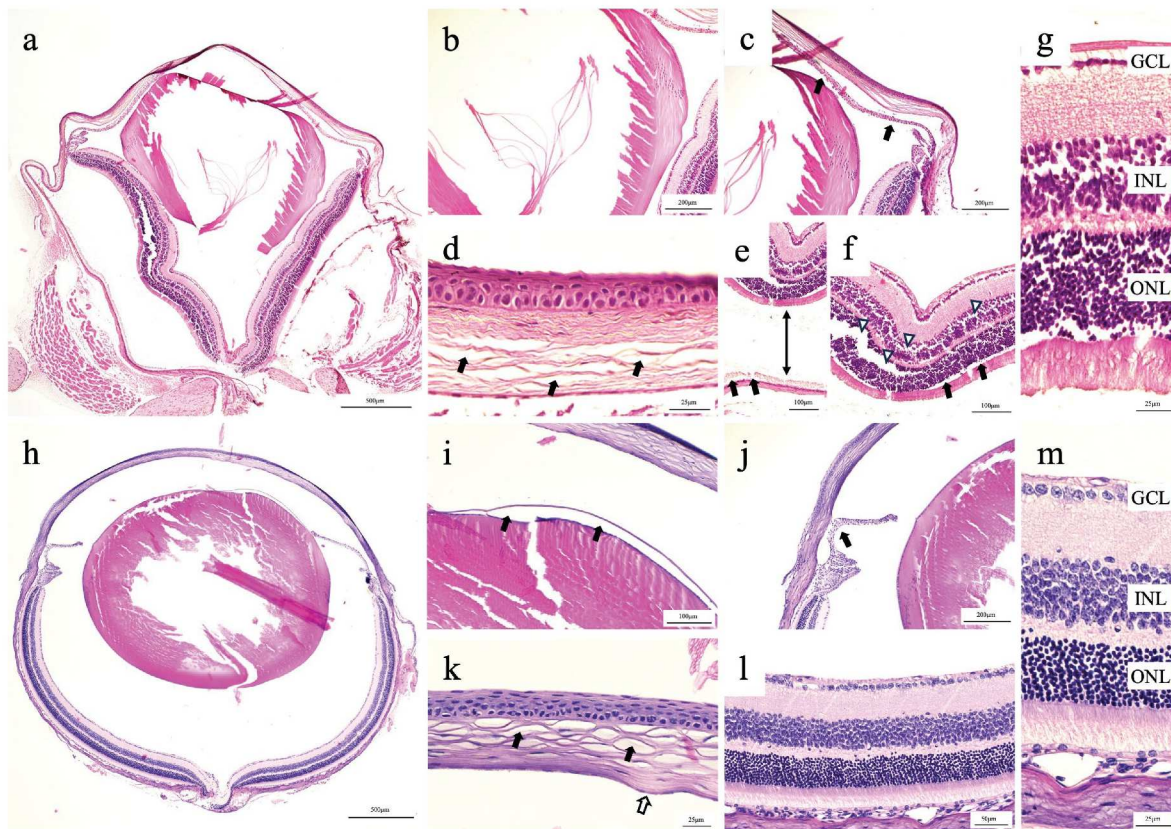


Fig. 1 PFA 固定 (a-g) および 標準Davidson's solution 固定 (h-m) による固定効果

a : 眼球外形の不整 b : 水晶体核の破砕 c : 虹彩の前方変位 (矢印)

d : 角膜実質におけるコラーゲン線維間隙の拡張 (矢印)

e : RPE-PL 間 (矢印) および視細胞の外節-内節間 (両矢印) における網膜の開裂

f : PL-ONL 間 (矢印) および ONL・INL (矢頭) における開裂

g : ONL, INL, GCL における核クロマチンの濃染

h : 良好な眼球円形構造の保持と、水晶体核の脱落 i : 水晶体嚢と上皮細胞列の剥離

j : 虹彩の変形 (矢印) k : 角膜実質の膨化 (黒矢印) および内皮の変形 (白矢印)

l : 並行な網膜層構造の維持

m : ONL における核クロマチンの濃染と、INL およびGCL における淡染

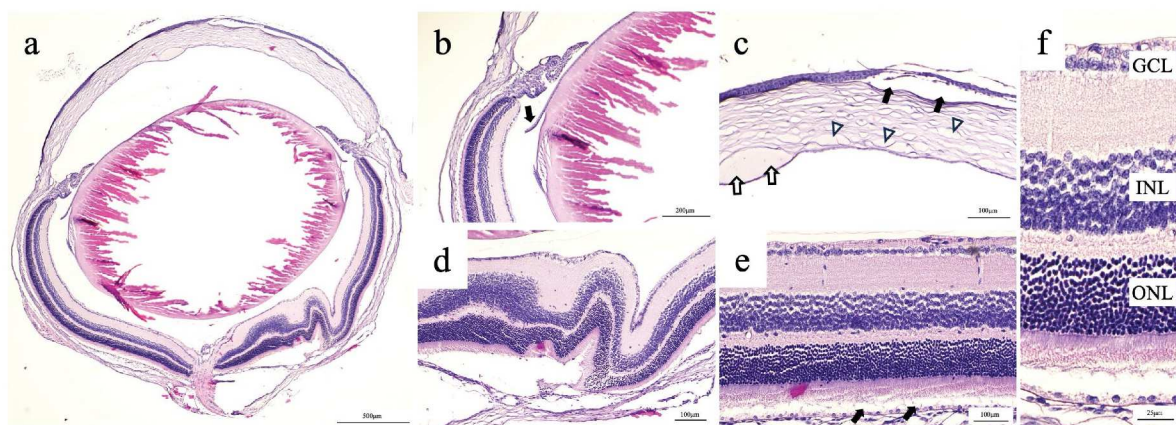


Fig. 2 grDS (Solution A) の固定効果

a : 円形構造が保持された眼球外形

b : 正常位置の虹彩、前眼房、隅角と、破碎した水晶体核および皮質、剥離した水晶体囊 (矢印)

c : 角膜上皮 (黒矢印) および Descemet 膜 (白矢印) における人工的な剥離と、実質の膨化 (矢頭)

d : 網膜の一部領域における波状の変形

e : RPE-PL 間での剥離 (矢印)

f : ONL での核クロマチンの濃染と、INL および GCL での淡染

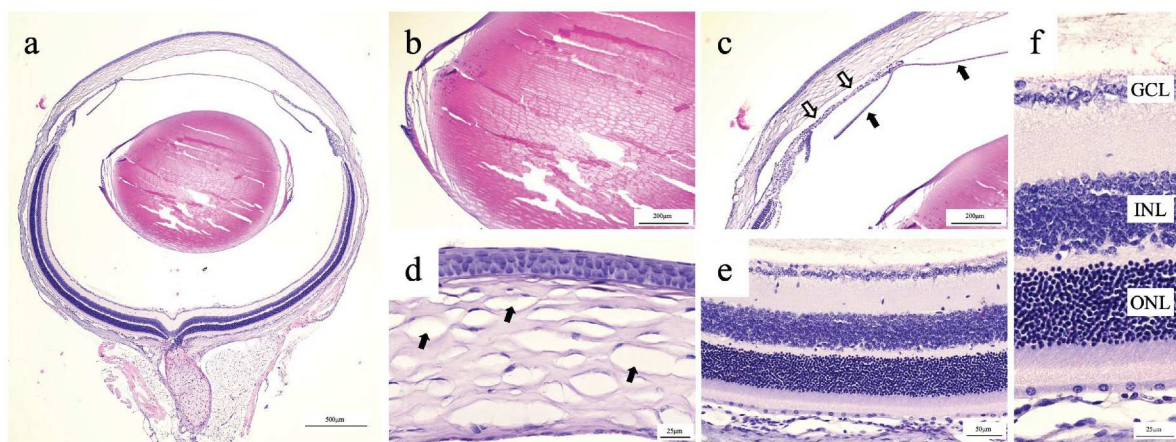


Fig. 3 Solution B (1-ブタノールの添加) による固定効果

- a : 眼球の環状外形の保持 b : 水晶体核および皮質の破碎
c : 水晶体嚢の剥離 (黒矢印) および虹彩の前方変位 (白矢印) d : 角膜実質の膨化 (矢印)
e : 正常な網膜層構造の保持
f : ONL での核クロマチンの濃染と、INLおよびGCLでの淡染

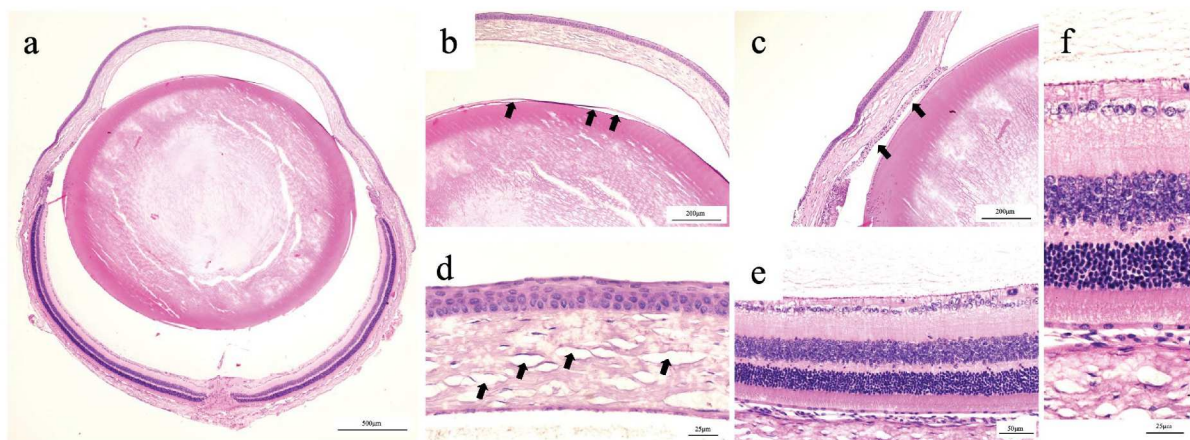


Fig. 4 Solution C（メタノールの添加）による固定効果

- a：眼球環状構造の保持
- b：水晶体皮質の軽度な亀裂および嚢の剥離（矢印）
- c：虹彩の角膜内皮への異常な接着（矢印）
- d：角膜実質の軽度な膨化（矢印）
- e, f：正常な網膜層構造の保持

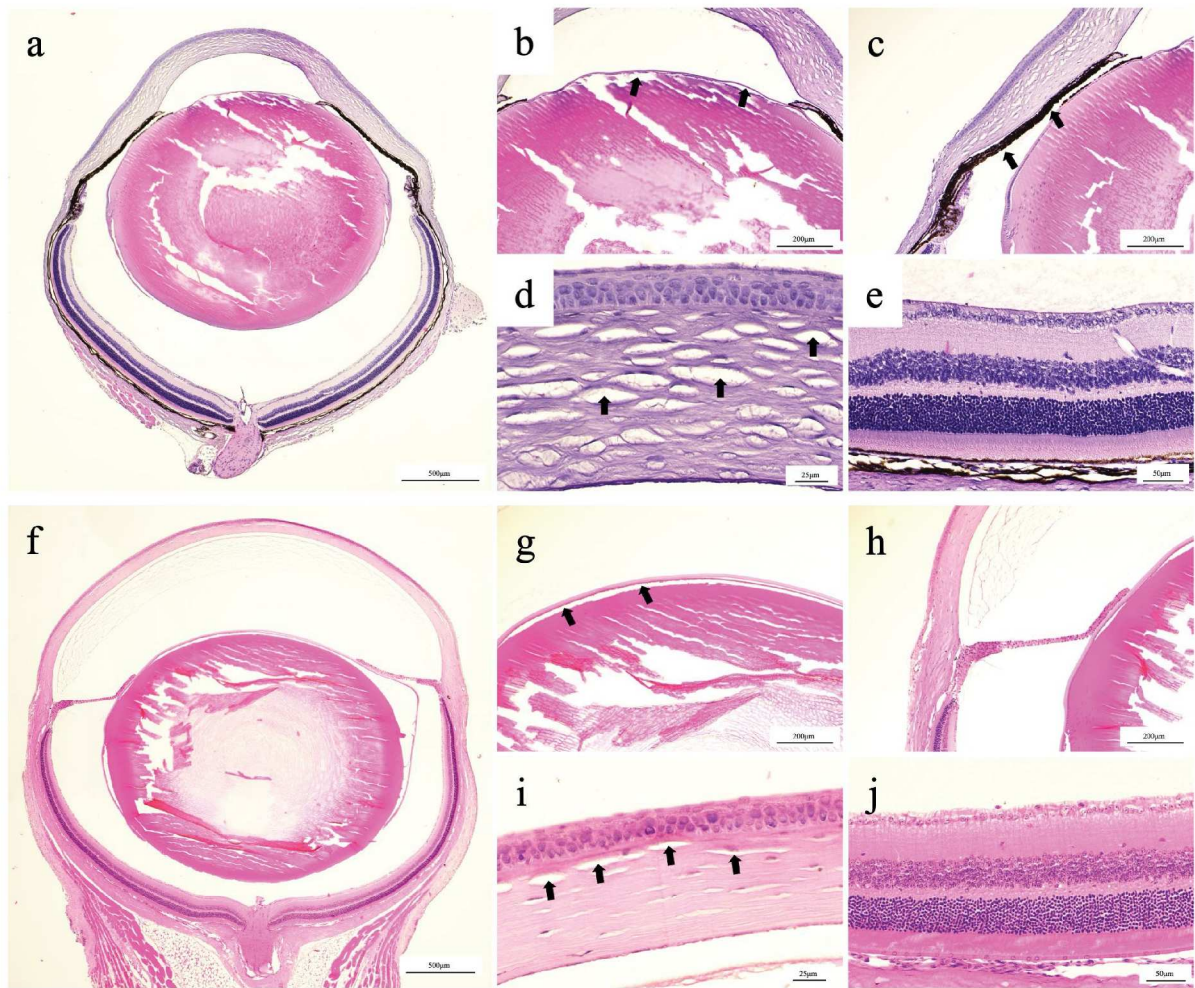


Fig. 5 Solution D (a-e, 2-メルカプトエタノールの添加)

および Solution E (f-j, TCEP-HCl の添加) による固定効果

a : 眼球環状構造の保持

b : 水晶体皮質および核の破碎と、囊の剥離 (矢印)

c : 虹彩の角膜内皮への異常な接着 (矢印)

d : 角膜実質の膨化 (矢印)

e : 正常な網膜層構造の保持

f : 眼球環状構造の保持

g : 水晶体皮質の破碎と、囊の剥離 (矢印)

h : 正常位置に保持された虹彩

i : 角膜実質の一部領域におけるわずかな膨化 (矢印)

j : 正常な網膜層構造の保持

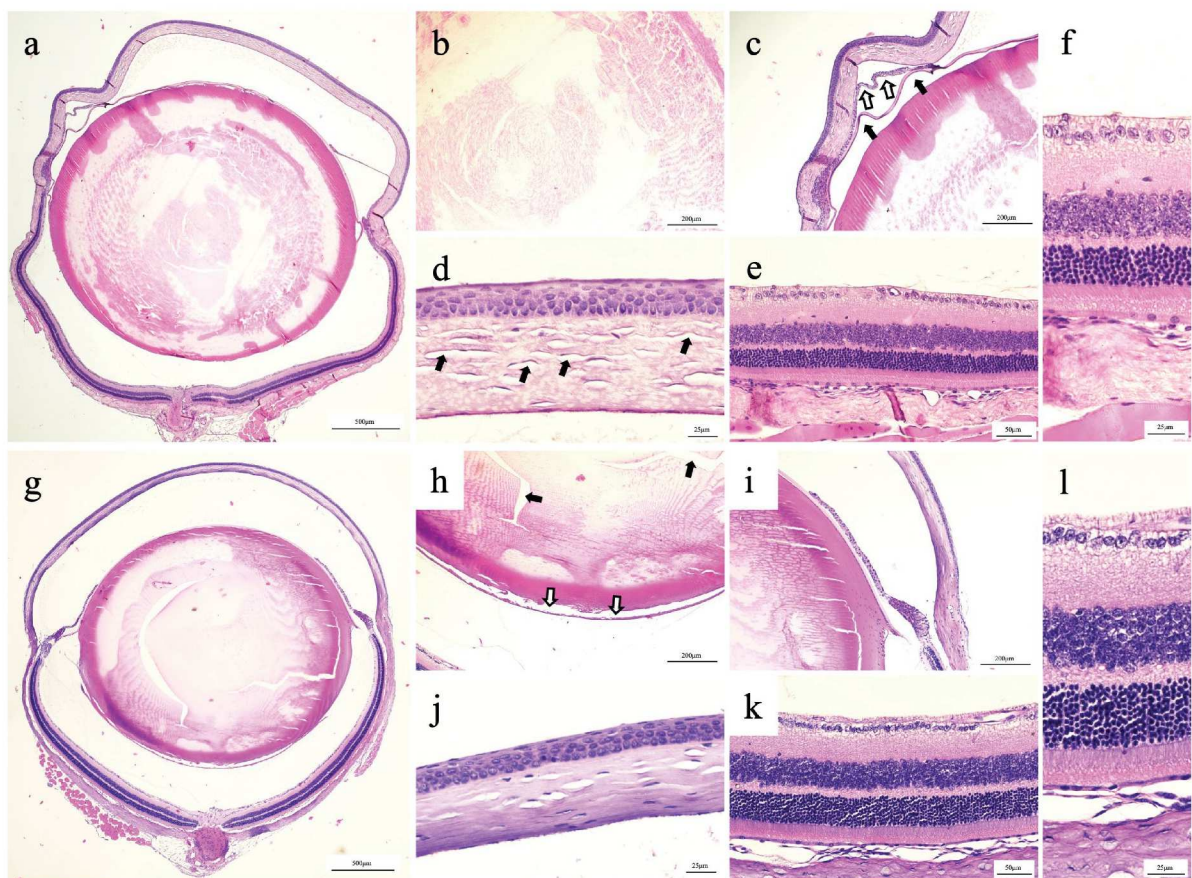


Fig. 6 Solution F (a-f, メタノールおよび 2-メルカプトエタノールの添加)

および Solution G (g-l, メタノールおよび TCEP-HCl の添加) による固定効果

a : 眼球環状構造の不整 b : 水晶体核および皮質の軽度な亀裂

c : 水晶体嚢の剥離 (黒矢印) および虹彩の前方変位 (白矢印)

d : 角膜実質の軽度な膨化 (矢印)

e, f : 正常な網膜層構造の保持

g : 眼球環状構造の保持

h : 切片乾燥過程に生じた水晶体皮質および核の亀裂 (黒矢印) と、水晶体上皮細胞の剥離 (白矢印)

i : 正常位置に保持された虹彩

j : 角膜実質のわずかな膨化

k, l : 正常な網膜層構造の保持

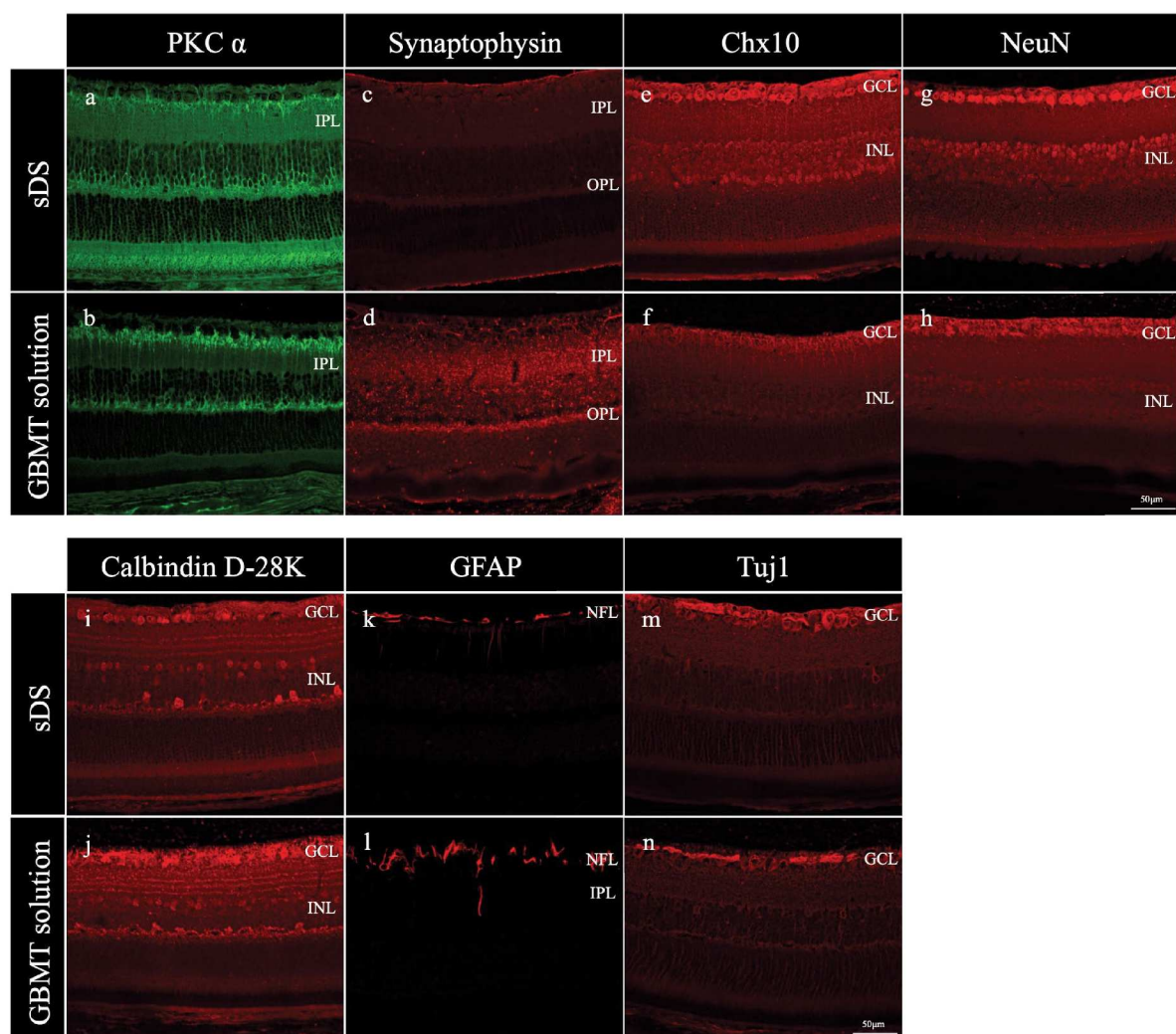


Fig. 7 sDS および GBMT solution 標本におけるImmunofluorescence

a, b : PKC α c, d : Synaptophysin e, f : Chx10 g, h : NeuN
i, j : Calbindin D-28K k, l : GFAP m, n : Tuj1

Table 1. 本実験で用いた固定液

基本固定液	組成
中性緩衝ホルマリン液 (NBF)	3.7% ホルムアルデヒド (10% ホルマリン, Fujifilm Wako, Tokyo, Japan), 0.0326M NaH_2PO_4 , and 0.0461M Na_2HPO_4 を蒸留水に溶解, pHは7.4に調整
パラホルムアルデヒド水溶液 (PFA)	4% パラホルムアルデヒド (FUJIFILM Wako) を蒸留水に溶解し、微量のNaOHとPBSを混合, pHは7.4に調整
標準 Davidson's solution (sDS)	22.2% NBF (0.82%のホルムアルデヒドを含む), 32% エタノール, 11.1% 酢酸 (FUJIFILM Wako) を蒸留水に溶解, 水性成分のpHは 2.39 ± 0.02
グリオキサール置換 Davidson's solution (grDS)	sDS中のホルムアルデヒドを2.22% グリオキサールに置換した。固定作用を評価した後、各種添加剤を添加した (Table 3参照)

PFAおよびsDSに対してはそれぞれ4つの眼球を適用した

Table 2. grDSに加えた添加剤

添加剤	製品情報
1-ブタノール	FUJIFILM WAKO (026-03321)
メタノール	FUJIFILM WAKO (134-01833)
2-メルカプトエタノール	Sigma-Aldrich (M3148)
TCEP-HCl	Sigma-Aldrich (C4706), 蒸留水にて希釈し100 mM solutionとして使用

Table 3. grDSとして作成した各種固定液の組成

構成成分	Solution A	Solution B	Solution C	Solution D	Solution E	Solution F	Solution G
ホルムアルデヒド	-	-	-	-	-	-	-
グリオキサール	2.22%	2.22%	2.22%	2.22%	2.22%	2.22%	2.22%
エタノール	32.00%	32.00%	32.00%	32.00%	32.00%	32.00%	32.00%
酢酸	11.10%	11.10%	11.10%	11.10%	11.10%	11.10%	11.10%
1-ブタノール		10.00%	10.00%	10.00%	10.00%	10.00%	10.00%
メタノール			3.00%			3.00%	3.00%
2-メルカプトエタノール				0.20%		0.20%	
100mM TCEP-HCl					20.00%		20.00%
蒸留水	54.68%	44.68%	41.68%	44.48%	24.68%	41.48%	21.68%
pH (水性成分のみ)	1.87 ± 0.02	1.80 ± 0.02	1.74 ± 0.02	1.73 ± 0.01	1.73 ± 0.02	1.74 ± 0.03	1.70 ± 0.01
解析眼球数	4	4	4	10	4	6	24

成分のパーセンテージは、各Solutionにおける最終濃度を示す

Fig. 4f-4jにてSolution GをGBMTと命名した (グリオキサール、ブタノール、メタノール、TCEP-HClの頭文字より)

Table 4. 本研究で用いた抗体

標的タンパク質	製品情報	標識	ホスト	濃度
	Santa Cruz			
PKC α	Biotechnology (sc-8393 AF488)	Alexa Fluor® 488	mouse	1:100
Synaptophysin	GeneTex (GTX100865)	未標識	Rabbit	1:250
Chx10	GeneTex (GTX114143)	未標識	Rabbit	1:250
NeuN	GeneTex (GTX132974)	未標識	Rabbit	1:250
Calbindin D-28K	MILLIPORE (AB1778)	未標識	Rabbit	1:250
	Santa Cruz			
GFAP	Biotechnology (sc-33673 AF647)	Alexa Fluor® 647	Mouse	1:100
beta Tubulin 3/ Tuj1	GeneTex (GTX130245)	未標識	Rabbit	1:250

総合考察

本研究では、哺乳類視覚器の発達過程を晩成性および早成性動物軸で捉え、形態学的観点から比較した。マウス（晩成性）とウシ（早成性）との比較により、特に網膜の成熟に関する相違点と共通点を明らかにした。まず組織学的解析により、両動物における網膜の生後変化を詳細に追った。出生時のマウス網膜は、網膜芽細胞からなる未熟な組織構成を示し、その後網膜芽細胞層の分化が進行して、開眼時期に成熟網膜と同様の 10 層構造を完成させた。網膜の厚さは成長期に変化し、開眼時期までに一時的な肥厚を示した後、離乳後二週程度までに急激に薄化した。一方でウシ網膜では、出生時から 10 層の網膜が認められた。網膜では、肥厚期が生じず、全ての層が離乳期初期までに薄化のみを示した。このように成熟網膜までの過程について両者の間には差が存在したが、成熟網膜は出生時網膜よりも大きく薄化するという点では共通性が見出された。マウスにおいては、この薄化期間に細胞配列の変化や軸索長の変化が起きていた。閉眼状態で出生する晩成性動物は、開眼まで細胞分化や細胞配列の編成を進行させるが、早成性動物はこれに相当する変化を胎仔期後期に完了させているのかもしれない。また、晩成性動物における開眼と、早成性動物における出生は、外界の光が網膜に直接照射されるという点では、同等の生物学的イベントであると考えられる。両種とも開眼時期から網膜の薄化が開始したことから、薄化は発達に伴う共通の組織変化であり、光の重要性が示唆される。さらに、薄化が離乳期頃に終了したことは、親からの独立段階が進行するという点で矛盾しない。

第1章の考察を踏まえ、離乳までの期間における網膜の正常発達に焦点を当てて実験を計画した。離乳時期を早期化または晩期化することにより、マウス網膜の各層には変化が現れた。この変化には性差が存在し、特にメスにおいて顕著な肥厚が認められた。この変化には、性ホルモンを介した機構が関与する可能性が考えられることに加え、先行研究からは性ホルモンを介したグリア細胞の関与も示唆されている。一方で、父親または母親の早期離乳経験が仔の視覚器発達に及ぼす影響に関しても評価した。早期離乳を経験した母親の仔では低体温傾向が確認され、授乳行動および母性行動の減少が示唆された。仔の眼球は離乳後しばらく矮小傾向を示し、また特に母親の早期離乳経験によって、開眼時期にはわずかな早期化が確認された。これらのことから、離乳までの期間は仔の網膜および視覚器発達に対して重要な役割を担う時期であり、特に母子間の良好な関係性が重要であると考えられる。

一連の研究を進める上で、網膜の微細構造を良好に保持した薄切標本が必要となり、そのための手段として、固定液の現状に問題があることが判明した。第3章では、優れた形態保持性を発揮する新規固定液の開発に取り組んだ。眼球壁は、固定液が内部まで迅速かつ均一に浸透・固定することを妨げ、固定過程における各組織の収縮率差は眼球組織標本において人工的な構造破綻を発生させる。またホルムアルデヒドはタンパク質の強力な架橋作用を持つことから、免疫組織学的解析への利用に制限がある。これらの課題を克服するため、従来のホルムアルデヒド系固定液に代わるグリオキサール系新規固定液の開発を

試みた。固定液に 1-ブタノールとメタノールを添加することで、固定・脱水の均一化を可能にした。さらにジスルフィド結合特異的還元剤である TCEP-HCl の添加は、水晶体を軟化させて薄切を容易にした。開発した GBMT solution は眼球外形および網膜を含む内部構造を維持し、眼球全体の高品質な標本の作製を可能にした。加えて、特に細胞質抗原に対する抗体反応性が向上し、免疫組織学的解析における有用性が示された。灌流固定を必要とせず浸漬固定のみで高品質な全眼球標本の作製を実現した点は、組織学的解析に関する基盤技術の発展に寄与したと言える。

本研究では、晩成性-早成性動物軸で哺乳類新生仔の視覚系発達過程を理解するための重要な知見が得られ、特に網膜の正常な発達には離乳までの期間が重要な意味をもつことが示された。離乳時期は、母子間の関係性に依存する幼少期ストレス（ELS）の発生期間でもある。ELS に起因する脳神経系の発達異常は評価が難しいが、網膜および視覚への影響の検出は ELS の病因性を理解するための重要なツールとなる可能性がある。特に、離乳期までの母子関係が、仔の網膜回路形成・視覚機能の発達にどのような意義を持つのかを検証する必要がある。全眼球構造の形態保持を可能にした GBMT solution は、組織学的解析にて微細な構造変化も高精度に検出することができる基盤技術としての利用が期待される。固定液の改良による核内抗原の検出性向上と大型動物の眼球への適用を図ることで、さらなる汎用性が担保されるだろう。

謝辞

本研究の遂行に当たり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました山口大学共同獣医学部獣医解剖学研究室の日下部健教授に心より感謝申し上げます。

お忙しい中、実験指導や貴重なご意見を下さいました獣医解剖学研究室の今井啓之准教授、獣医病理学研究室の櫻井優准教授、懇切なるご助言をいただきました発生学・実験動物学研究室の加納聖教授に深く感謝申し上げます。

多くの貴重なサンプルを提供していただきました、獣医病理学研究室の森本将弘教授をはじめとする皆様の温かいご協力に感謝の意を表します。