



Title	視覚伝導路における $\beta$ -アドレナリン受容体結合の調節とその生理的意義に関する研究
Author(s)	六車, 恵子
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3144268">https://doi.org/10.11501/3144268</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

視覚伝導路における  $\beta$ -アドレナリン受容体結合  
の調節とその生理的意義に関する研究

1997年

六車 恵子

## 目 次

緒 言	-----	1
本 論	-----	3
第一章	長期視覚入力剥奪がネコ大脳皮質視覚野における $\alpha_2$ -および $\beta$ -アドレナリン受容体結合活性に与 える影響	----- 3
実験方法	-----	3
実験結果	-----	5
考 察	-----	7
小 括	-----	9
第二章	片眼摘出がラットの中枢視覚系におけるノルアドレ ナリン受容体結合ならびにその神経支配様式に及ぼ す影響	----- 17
実験方法	-----	17
実験結果	-----	20
考 察	-----	23
小 括	-----	27
第三章	6R-エリスロ-5,6,7,8-テトラヒドロビオプテリン (R- THBP) による成ネコ視覚野における眼優位可塑性 の調節と神経伝達物質受容体結合活性の変化	----- 36
実験方法	-----	36
実験結果	-----	38
考 察	-----	40
小 括	-----	42
総 括	-----	47
結 論	-----	49
謝 辞	-----	50
引用文献	-----	51

## 緒　　言

哺乳類の大脳皮質一次視覚野には、網膜からの視覚情報が視床の外側膝状体 (Lateral Geniculate Nucleus, LGN) を経由して入力する (Fig. 1)。視覚野の多くの神経細胞には両眼からの入力が収束しており、いずれの眼に光刺激を与えても興奮性に反応する。生後発達初期の一定期間の視覚環境は、視覚情報処理を担う神経回路網の形成にとって非常に重要な役割を果たしている。例えば、仔ネコの一側眼瞼を短期間外科的に縫合して視覚入力を遮断することによって、視覚野から両眼性細胞が消失する [1]。すなわち、視覚野のほとんどのニューロンは正常に視体験をした方の眼に与えられた光刺激にのみ反応し、遮蔽されていた方の眼に与えられた光刺激はもはや視覚野のニューロンを駆動することができなくなる (Fig. 2)。この変化は個々の視覚野ニューロンの眼優位性という受容野特性について認められることから眼優位可塑性と呼ばれ、視性刺激遮断弱視の格好の動物モデルとして弱視の病態解明に寄与してきた。このような可塑的変化は感受性期と呼ばれる生後発達初期の限られた期間内に片眼遮蔽が施された場合にのみ認められ、成熟ネコでは生じない。また、感受性期内であっても両眼瞼を遮蔽した場合にはこのような可塑的変化は惹起されないことから、眼優位可塑性の機構として「両眼性入力の拮抗」という考えが提唱されている [2]。これは、「両眼網膜由来の視覚情報を中継する LGN ニューロンの軸索終末は同一シナプス後細胞上の限られたシナプス部位、あるいは、その細胞が遊離する栄養因子をそれぞれの神経活動に依存して互いに競合して占有しようとする」という考え方である。

眼優位可塑性の調節メカニズムは、概念上 (1) 中枢視覚系の神経活動に依存する機構と (2) 中枢視覚系路以外の神経化学的調節機構の 2 つに大別できる。後者の系については、ノルアドレナリン系 [3-5]、GABA 系 [6-8]、アセチルコリン系 [9-11]、セロトニン系 [12,13]、グルタミン酸系 [14,15] などの関与が報告されている。特に、中枢ノルアドレナリン系に関しては以下に示すように非常に詳細な研究成果が蓄積されている：(1) 仔ネコの視覚野へのカテコールアミンニューロン選択的毒薬である 6-hydroxydopamine (6-OHDA) の直接かつ持続的な注入によって眼優位可塑性が阻害される [3,16-18]、(2)  $\beta$ -アドレナリン受容体 ( $\beta$ -AR) のアンタゴニストにより濃度依存性に眼優位可塑性のレベルが低下する [19]、さらに (3) 感受性期を過ぎて可塑性レベルが極端に低下していると考えられる成ネコに対して、(i) 外来性にノルアドレナリン (NA) を直接視覚野に注入する、(ii) NA の前駆アミノ酸を経口投与する、(iii) NA- $\beta$ -AR 系の活性化に引き続く細胞内サイクリック AMP (cAMP) の産生増加を外来性に補うといった方法によって中枢性ノルアドレナリン系を賦活すると眼優位分布の変化を惹起することができる [20-23]。以上のこ

とより、大脳皮質視覚野に認められる眼優位可塑性の調節機構にNA- $\beta$ -AR-cAMP系が非常に重要な役割を果たしていることが推察されてきた。

ネコ視覚野内の内在性NA含量および $\beta$ -AR総数の生後発達より、眼優位可塑性の調節にはNA含量そのものではなく、むしろ $\beta$ -ARの活性化の程度が多大に寄与している可能性が考えられる。すなわち、生後発達に伴って内在性NA含量は直線的に増加するが、一方で、 $\beta$ -AR総数の発達曲線は感受性期に対応（5-13週）して一過性のピークを示す[24,25]。しかしながら $\beta$ -AR結合活性が片眼剥奪に伴うシナプス結合様式の変化によっていかに修飾されるかについてはこれまで調べられていなかつた。本研究では中枢性視覚障害と考えられる弱視の動物モデルを用いて、視覚入力の剥奪による $\beta$ -ARの結合様式の変化を中心に $\alpha_2$ -ARならびに視覚性入力の伝達物質であると考えられているグルタミン酸の受容体結合の変化もあわせて、生化学的ならびに免疫組織学的手法を用いて検討を行った。さらに弱視の薬物療法の可能性を模索する一環として、NAをはじめ脳内モノアミン系を賦活させると考えられている、芳香族アミノ酸水酸化酵素の補酵素である6R-エリスロ-5,6,7,8-テトラヒドロビオプテリン（R-THBP）[26,27]の末梢投与による受容体結合活性の変化についても併せて検討を行った。

# 本論

## 第一章 長期視覚入力剥奪がネコ大脳皮質視覚野における $\alpha_2$ -および $\beta$ -アドレナリン作動性受容体結合活性に与える影響

ネコ大脳皮質一次視覚野における  $\beta$ -AR結合部位数の生後発達曲線が、眼優位可塑性の感受性期におおよそ対応して一過性のピークをもつことがすでに示されている [24, 25]。しかしながら、視覚入力の剥奪により  $\beta$ -AR結合活性がいかに変化するかについての検討は未だなされていない。本章では、片眼遮蔽が  $\beta$ -AR結合活性に及ぼす影響を検討する目的で、まず正常ネコ脳における  $\beta$ -AR結合活性を粗シナプトソーム分画 (P<sub>2</sub>分画) について調べ、さらに大脳皮質においては *in vitro* オートラジオグラフィーの手法を用いて層特異的な結合様式の変化について調べた。また、感受性期を通して行った長期片眼遮蔽が  $\beta$ -AR結合活性に及ぼす影響について、P<sub>2</sub>分画ならびに *in vitro* オートラジオグラフィーで検討を行った。結合実験は  $\beta$ -ARのほかに、そのアンタゴニストが眼優位可塑性の調節にはほとんど影響を及ぼさないとされている  $\alpha_2$ -アドレナリン作動性受容体 ( $\alpha_2$ -AR) [28] に関する検討を行った。尚、以下の動物実験は「大阪バイオサイエンス研究所実験動物倫理規定に基づいて行われた。

### 実験方法

#### 1. 組織サンプルの調製

片眼剥奪群 (monocularly deprived cats, MD cats) のネコは生後4週目にハロセン麻酔下で一側眼瞼縫合した他は、対照群 (Control cats) と同様通常飼育下で育て、共に生後7ヶ月目に実験に供した。ネンブタール深麻酔下で経心的に0.1 M リン酸緩衝液 (PB, pH 7.4) を灌流した。脳定位固定装置に装着し、大脳皮質はFig. 3に示すように片半球あたり14部位に取り分け、その他の皮質下構造は定位固定装置から脱着した後、氷冷下で小脳、線条体、視床下部、橋-延髄、海馬、LGN、視床前核群にそれぞれ取り分け、速やかにドライアイスパウダーで凍結し-80°C下に保存した。

各組織は氷令した10-20倍量の0.32 M シュクロース/10 mM トリス塩酸緩衝液でホモジネートし、遠心操作により P<sub>2</sub>分画を得た。P<sub>2</sub>分画は50 mM トリス塩酸緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.4) で2 mg protein/ml の濃度に調製し、受容体結合実験に供した。

*in vitro* オートラジオグラフィーに用いる組織は、以下のように調製した。先に凍結しておいた組織をクリオスタッフで厚さ10  $\mu$ mの連続した矢状断に薄切り、予め

ゼラチンコーティングされたスライドグラスにマウントした。切片は-20°C下に保存し、薄切後2週間以内に使用した。

## 2. 受容体結合実験

$\beta$ -AR結合活性は $\beta$ -ARのアンタゴニストである [ $^3$ H] dihydroalprenolol ( [ $^3$ H] DHA, DuPont/NEN) を用い、Bylundらの方法 [29] に準じて行った。すなわち、P<sub>2</sub>分画を50 mM Tris-HClで調製した1.0 nM [ $^3$ H] DHAと25°C下で20分間インキュベーションした後、反応液をガラスフィルター (Whatman GF/B) を通して吸引濾過し、直ちに氷冷した50 mM Tris-HClで3回洗浄した。ガラスフィルター上にトラップした膜成分の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定しこれを全結合とした。全てのアッセイは3重に行った。非特異的結合は10  $\mu$ M (-) alprenolol 存在下で同様に行い、全結合と非特異的結合の差を特異的結合とした。

$\alpha$  <sub>2</sub>-AR結合活性は $\alpha$  <sub>2</sub>-ARのアンタゴニストである [ $^3$ H] rauwolscine (DuPont/NEN) を用い、P<sub>2</sub>分画とのインキュベーション時間を45分間とした以外は、 $\beta$ -AR結合実験と同様に行った。非特異的結合は10  $\mu$ M yohimbine存在下で測定した。

## 3. *in vitro* オートラジオグラフィー

*in vitro* オートラジオグラフィーはParkinsonらの方法 [30] を若干改良して行った。スライドグラスに貼り付けた切片を100 mM NaCl 含有 50 mM Tris-HCl (Buffer A)で4°C, 60分間プレインキュベーションした。 $\alpha$  <sub>2</sub>-ARは1.0nM [ $^3$ H] rauwolscineと25°C, 60分間インキュベーションすることによってトリチウム標識をし、非特異的結合はインキュベーション過程に10  $\mu$ M yohimbineを添加して求めた。 $\beta$ -ARはプレインキュベーション後、1.0 nM [ $^3$ H] DHAと25°C, 30分間のインキュベーションを行い、10  $\mu$ M (-) alprenolol の添加によって非特異的結合を求めた。

インキュベーション終了後4°C下 Buffer A液中で素早く洗浄し、手早く乾燥した後、さらに五酸化リンを敷いたデシケーター中に陰圧下で2晩置いた。乾燥後、スライドグラスをオートラジオグラフィー用カセットに並べ、定量解析のために既知の放射活性を持ったplastic standard scale ( [ $^3$ H] microscales, Amersham) を一緒に並べ、トリチウム感受性フィルム (Hyperfilm, Amersham) を載せて4°C, 5週間保管した。露光後、25°C下でKodak 19を用いて現像した。カセットより取り出した切片は、2-4%パラフォルムアルデヒド液で固定し、マイヤー・ヘマトキシリンまたはチオニンで対比染色を行った。

#### 4. オートラジオグラムの解析

オートラジオグラムの定量解析には、画像解析用ソフトウェア (NIH Image) を用い、charge-coupled device (CCD) カメラを備え付けたコンピュータで解析を行った。各々のフィルム上の  $[^3\text{H}]$  microscaleの画像を基に、脳内の受容体結合部位の黒化度を fmol/mg tissue に換算して表した。特異的結合は全結合から非特異的結合を差し引いて求めた。

#### 5. Scatchard plot 解析

$\beta$ -AR受容体飽和実験を  $\text{P}_2$  分画および組織切片を用いて行い Scatchard plot 解析を行った。すなわち、インキュベーション液中の  $[^3\text{H}]$  DHA濃度を 0.05 nM-12.5 nM まで変化させて濃度-結合曲線を求め、コンピュータによる非線形最小二乗法で解析しリガンドの結合親和性 ( $K_D$ ) および最大結合量 ( $B_{\max}$ ) を求めた。

### 実験結果

#### 1. $\text{P}_2$ 分画による受容体結合実験

成ネコの脳内  $\beta$ -ARに対する  $[^3\text{H}]$  DHA結合は、橋-延髄の 75% から 大脳皮質の 85% までほとんどの部位で高い特異的結合の割合を示した。Table 1 に 大脳皮質と各皮質下構造における  $[^3\text{H}]$  DHA結合活性を示した。対照群では小脳が最も高い結合活性を示し、視床下部ならびに橋-延髄は低い値を示した。大脳皮質は全体的に高値であったが、なかでも後頭葉は高い結合活性を示し (VC and VC-I, 60.1 fmol/mg protein) 、他の大脳皮質領域に比べて有意であった ( $35.1 \pm 1.7$  fmol/mg protein,  $P < 0.01$ )。後頭葉を除く大脳皮質の  $[^3\text{H}]$  DHA結合活性は比較的一様な値を示した (30.1-44.4 fmol/mg protein, Fig. 4)。

感受性期内にある生後4週目から6ヶ月間に渡る長期視覚入力の剥奪は、Fig. 4 に示すとおり、視覚野を含む大脳皮質後頭葉の  $[^3\text{H}]$  DHA結合活性を、遮蔽眼に対して同側および対側のいずれにおいても対照群に対して有意に減少させた (Control cats: 同側 =  $61.0 \pm 2.4$ , 対側 =  $59.3 \pm 2.8$  fmol/mg protein, MD cats: 同側 =  $35.4 \pm 2.6$ , 対側 =  $29.8 \pm 3.9$  fmol/mg protein,  $P < 0.01$ )。またに LGNにおいても、同側で対照群に対して 59.8% ( $P < 0.05$ )、対側で 60.8% ( $P < 0.01$ ) と有意な減少を認めた (Table 1)。

$\alpha_2$ -ARに対する  $[^3\text{H}]$  rauwolscineの特異的結合はいずれの脳内部位においても 85%以上と非常に高い割合を示した。Table 1 に  $[^3\text{H}]$  rauwolscine結合活性の脳内分布を示した。対照群においては線条体で最も高い結合活性が認められ、LGN, 橋-延

髓および視床前核群では低い値を示した。一方、大脳皮質内の  $\alpha_2$ -AR結合活性は後頭葉で比較的高値ではあるが、 [ $^3$ H] DHA 結合に比べ変化に富んだ分布様式を示した (Fig. 5)。

長期片眼遮蔽が  $\alpha_2$ -AR結合活性に及ぼす影響について検討したところ、  $\beta$ -AR結合とは異なり大脳皮質後頭葉ならびにLGNでの著明な変化は認められなかった (Table 1 and Fig. 5)。

## 2. [ $^3$ H] DHA 結合のScatchard plot 解析

長期片眼遮蔽により、後頭葉の P<sub>2</sub>分画の [ $^3$ H] DHA結合活性に有意な変化が認められたため、さらに  $\beta$ -AR受容体飽和実験を行いScatchard plot 解析により結合親和性および結合部位数に対する変化を検討した。対照群の成ネコでは  $K_D = 0.9 \pm 0.1$  nM,  $B_{max} = 149.0 \pm 10.5$  fmol/mg protein という結果を示したのに対し、MD catsでは  $K_D$  値に変化は認められなかったが、  $B_{max}$  は同側で対照群の 50.5%, 対側で 47.9% にまで有意に減少した (Fig. 6)。

## 3. *in vitro* オートラジオグラフィー

成ネコの大脳皮質視覚野における  $\beta$ -ARおよび  $\alpha_2$ -AR結合の層分布ならびに片眼遮蔽による変化を調べるため、 *in vitro* オートラジオグラフィーを行った。

正常成ネコの視覚野大脳皮質における [ $^3$ H] DHA結合活性は二本の明瞭なバンドを示した。一つは大脳皮質表層から III層に広がり、もう一つは深層部に認められた。IV層の [ $^3$ H] DHA 結合活性は非常に低かった (Fig. 7A)。長期片眼遮蔽は視覚野の全ての層において [ $^3$ H] DHA 結合活性の減少を引き起こした (Fig. 7A and 7B)。それに対して、大脳皮質前頭葉では長期片眼遮蔽による変化は認められなかった (Fig. 7C and 7D)。

成ネコの視覚野を用いた *in vitro* オートラジオグラフィーにおける [ $^3$ H] DHA 結合の飽和実験の結果を Table 2 に示した。正常成ネコにおける  $B_{max}$  は I-III層で最も高く ( $32.6 \pm 1.0$  fmol/mg tissue)、次いで V-VI層 ( $27.6 \pm 1.9$  fmol/mg tissue), IV層 ( $19.9 \pm 1.3$  fmol/mg tissue) の順であった。長期片眼遮蔽は同側ならびに対側の全ての層において  $B_{max}$  値の有意な減少を引き起こした。それに対して  $K_D$  値に対する変化は *in vitro* オートラジオグラフィーによっても認められなかった。

[ $^3$ H] Rauwolscine結合は [ $^3$ H] DHA とは異なった層分布を示した。I-III層では高い結合活性を示し、それに対して深層部では低い活性にとどまった。長期片眼遮蔽による変化はいずれの層においても認められなかった。

## 考 察

高等哺乳動物の大脳皮質視覚野に認められる眼優位可塑性の調節機構に中枢性ノルアドレナリン系が非常に重要な役割を果たしている可能性は、これまでに蓄積された詳細な報告により強く示唆される [3-5,16-23]。本章では、「眼優位カラムの可塑的変化を惹起しうる感受性期内からの長期片眼遮蔽によって、大脳皮質視覚野の  $\beta$ -AR結合活性にいかなる変化が生じるか」が、初めて明らかにされた。

これまでネコ脳内の  $\beta$ -AR結合分布様式についての報告が全くないことから、本研究では先ず、正常な環境下で育てられた成ネコにおける脳内  $\beta$ -AR結合活性について  $P_2$  分画ならびに *in vitro* オートラジオグラフィーによって検討を行った。大脳皮質の  $P_2$  分画を用いた結合実験により、 $\beta$ -AR結合活性が他の部位に比べ視覚野を含む後頭葉において著しく高いことが明らかとなった。ネコ [24] およびサル [31,32] では、大脳皮質の内在性ノルアドレナリン含量が前頭葉に比べ後頭葉で低いことが報告されている。ノルアドレナリン合成酵素であるdopamine- $\beta$ -hydroxylase抗体を用いた免疫組織学的検討によりサルのノルアドレナリン神経の支配様式は、一次体性感覚野ならびに運動野で高密度に認められ、一次視覚野では非常に疎であることが明らかになっている [33,34]。また内在性ノルアドレナリン量に応じてシナプス後部に存在する  $\beta$ -AR活性が変化する、たとえば、除神経により supersensitivityを生じるということはよく知られている [35]。以上のことから、 $\beta$ -ARが後頭葉において特に高く発現しているのは大脳皮質全体を通した中枢ノルアドレナリン系の恒常的な調節、すなわち、後頭葉におけるノルアドレナリン含量の少なさを  $\beta$ -ARの発現量の補償によってその機能の維持を図っているということを反映している可能性が考えられる。視覚野に高い  $\beta$ -AR結合活性を示す機能的な意義はまだ不明であるが、本章の結果は大脳皮質視覚野とその他の部位の間に、NA- $\beta$ -AR系の関与した機能発現の差異がある可能性を示唆している。

*in vitro* オートラジオグラフィーによる視覚野の  $\beta$ -AR結合活性が I-III層およびV-VI層に高く、IV層では低いという本章の結果は、先のParkinsonらの報告と一致している [30]。蛍光組織学的および免疫組織化学的検討によりノルアドレナリン神経の支配様式と  $\beta$ -AR結合活性が共に顆粒上層 (I-III層) と顆粒下層 (V-VI層) に高く、IV層では低いという報告がある [36-38]。しかしながら、この様な大脳皮質内の  $\beta$ -AR結合活性とノルアドレナリン神経の支配様式が層毎には一致するという結果は、先に論じた前頭葉から後頭葉にかけて認められる相補的な関係とは対照的なものである。 $\beta$ -ARとノルアドレナリン神経の大脳皮質の層分布および領野分布様式の違いから、それぞれは独立した機構によって調節を受けている可能性があることが考え

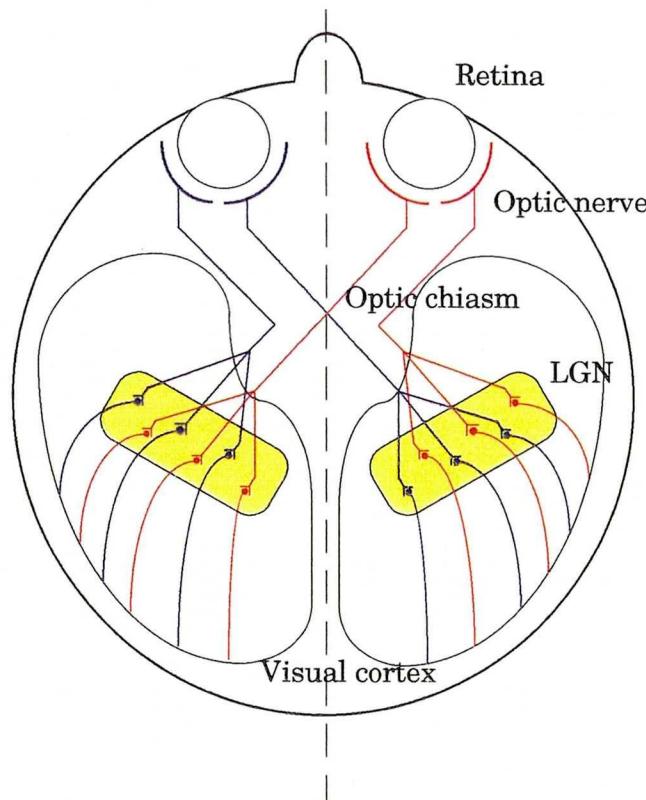
られる。

感受性期内にある幼若期から長期間に渡って片眼からの視覚入力を剥奪したときに誘導される視覚野の  $\beta$ -AR結合活性の変化について検討を行ったところ、遮蔽眼に対して同側および対側のどちら側の視覚野においても結合活性が有意に低下し、Scatchard plot解析によりその変化は結合親和性ではなく最大結合数の低下に由来するものであることが明らかとなった。Wilkinsonらは感受性期内にあるネコを14日間片眼遮蔽し、さらにこの間視皮質の半球にグルタミン酸を注入し続け、視覚野の  $\beta$ -AR結合活性の変化について検討を行った [39]。グルタミン酸が注入された視覚野では以前の報告 [40] 通り、可塑性が阻害されていたにもかかわらず、 $\beta$ -AR結合活性は両半球において全く差が認められなかつたと報告している [39]。 $\beta$ -ARの代謝回転は他の神経伝達物質の受容体に比べ時間を要する（10日以上）ので [41]、変化を誘導するためには比較的長期間の遮蔽操作を必要とするのかもしれない。また、Aokiらは幼若ネコに対して感受性期を通して15ヶ月間の長期に渡り暗闇飼育を行っても、 $\beta$ -AR結合に変化が認められなかつたと報告しているが [42]、一方で1年間以上暗闇飼育されたネコにおいても視覚野の眼優位可塑性に対するノルアドレナリン系の修飾機構が維持されていることが示されている [43]。さらに、生後10日目の幼若ネコの一側のLGNを破壊して視覚入力を阻害すると、視皮質深層部の  $\beta$ -AR密度が著しく減少することが示されている [38]。以上のことから、 $\beta$ -ARの結合活性の低下は視覚性神経活動の総活性量ではなく、その入力のパターン、すなわち活性量の不均衡が長期に渡って生じた場合に誘導されると推察される。

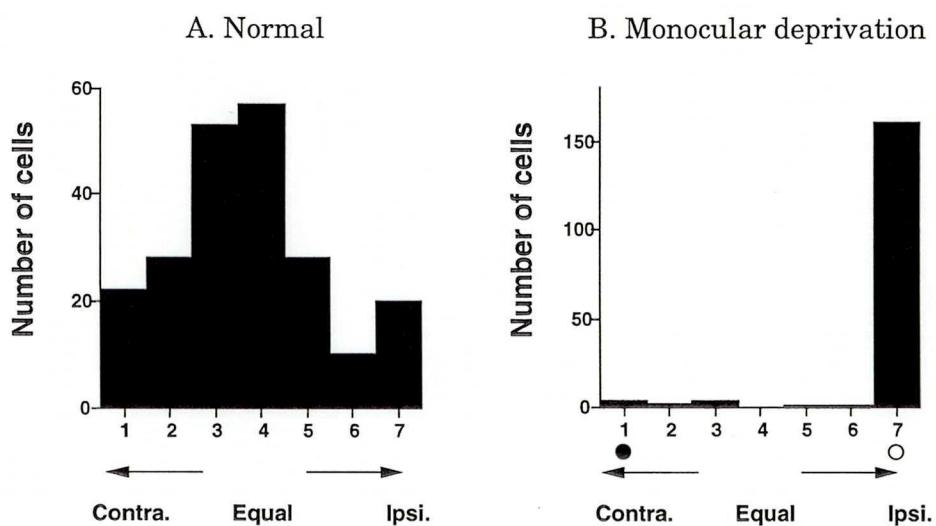
本章においては、長期片眼遮蔽が受容体の結合特性に及ぼす影響について  $\beta$ -ARだけではなく  $\alpha_2$ -ARについても検討を行った。長期に渡る視覚性入力の剥奪は視覚野の  $\alpha_2$ -AR結合活性を10%減じただけに留まり、その変化は有意なものではなかつた。1994年にJiaらが幼若期ネコのLGNを吸引除去すると視覚野の  $\alpha_2$ -ARの結合活性が約50%に低下すると報告している [44] が、本章で行った一側眼瞼縫合では視覚性入力が完全に取り除かれるわけではないので、 $\beta$ -ARの場合と同様に  $\alpha_2$ -AR結合の調節機構に対しても求心性入力の除去の程度が重要な役割を果たしている可能性があると考えられる。

## 小 括

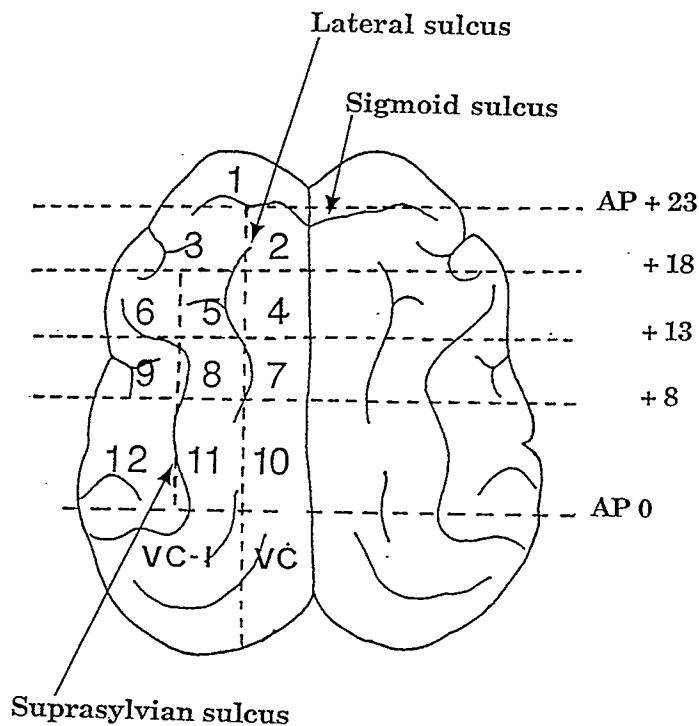
1. 正常成ネコの大脳皮質における $\beta$ -アドレナリン作動性受容体が、視覚野を含む後頭葉で非常に高い結合活性を有することを、P<sub>2</sub>分画ならびに大脳皮質切片を用いた*in vitro*オートラジオグラフィーによって示した。
2. 視覚野大脳皮質の $\beta$ -アドレナリン作動性受容体結合活性が感受性期内から始めた長期片眼遮蔽により有意に低下することを示した。
3. 視覚野大脳皮質の $\alpha_2$ -アドレナリン作動性受容体結合活性は、長期片眼遮蔽によって変化をしないことを示した。



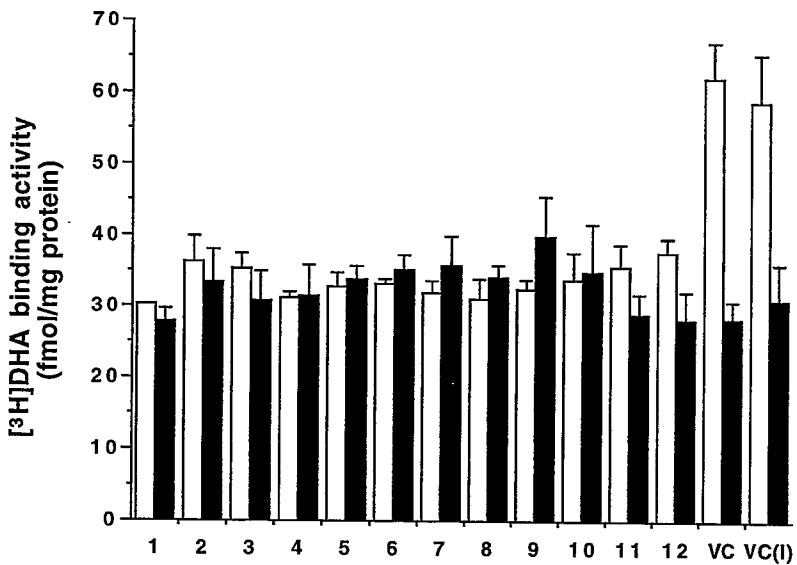
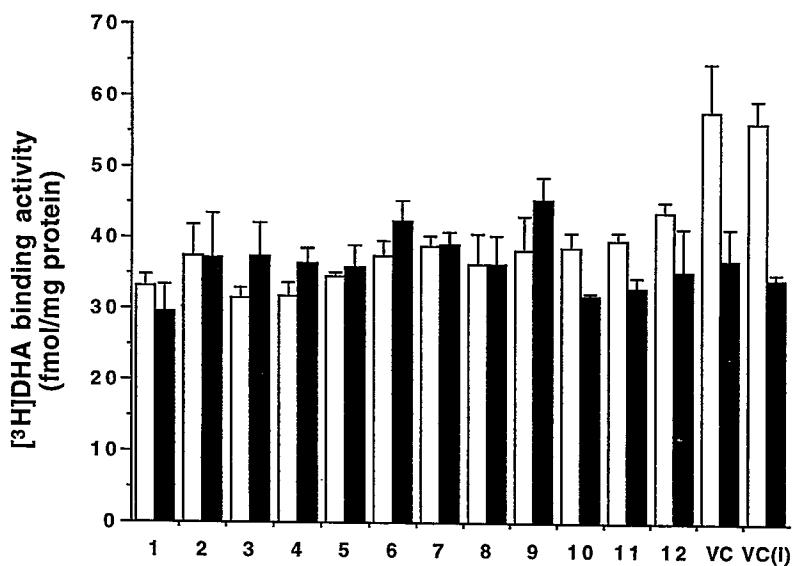
**Fig. 1.** Schematic diagram of the central visual pathway in the mammals. The ganglion cell axons run along the inner surface of the retina and gather together to form the optic nerve. The optic nerve projects primarily to the lateral geniculate nucleus (LGN) in the thalamus. The axons of LGN neuron project to the primary visual cortex.



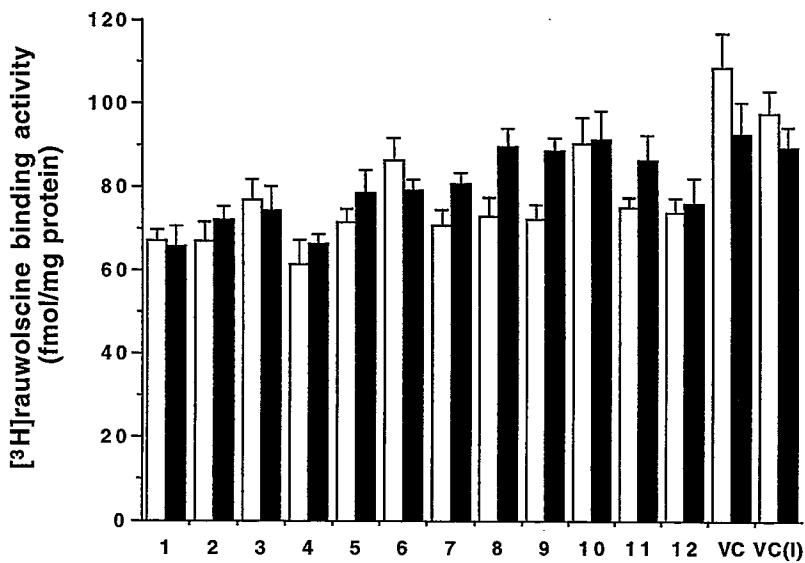
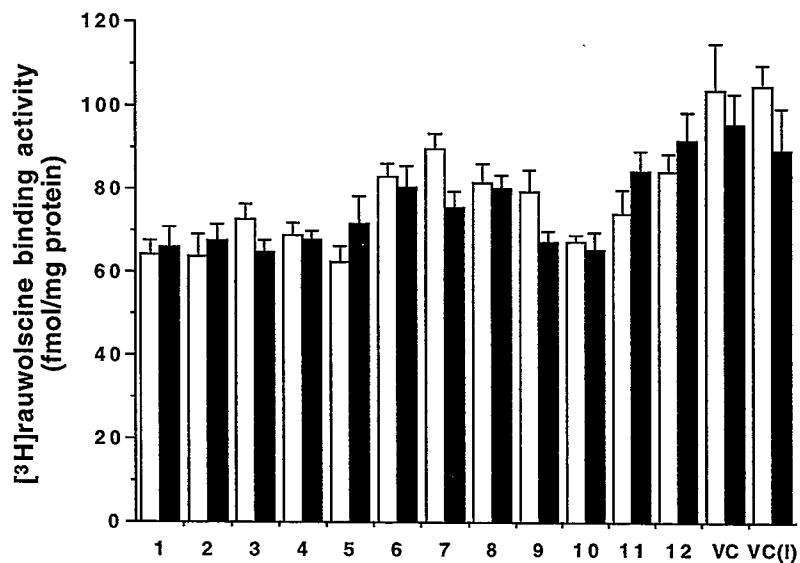
**Fig. 2.** Ocular dominance histograms from primary visual cortex of normal cats (A) and monocularly deprived cats (B). Group 1 and Group 7 refer to monocular cells that are exclusively activated by stimulation of the contra- and ipsilateral eye, respectively. Group 4 cells receive balanced excitatory input from both eyes. All other groups fall in between. Filled circles and open circles indicate the closed and exposed eye, respectively.



**Fig. 3.** The numbering of the tissue blocks in the cat cerebral cortex to examine the regional distribution of the receptor binding. After transcardial perfusion with a chilled buffer, the brain was quickly removed and the cerebral cortex was stereotactically dissected as follows. The coronal cutting was done at AP $\pm$ 0, +8, +13, +18, +23. The sagittal cutting was done along the lateral sulcus and suprasylvian sulcus. Tissue blocks of number 10-12, VC and VC-1 (the lateral portion of VC) were cut longer than number 1-9 to avoid destruction of subcortical visual structures, including the lateral geniculate nucleus and superior colliculi. The white matter in each tissue block was removed. All tissue blocks were immediately frozen and stored at -80°C until use.

**A****B**

**Fig. 4.** Effects of monocular deprivation on  $[^3\text{H}]$ DHA binding activity in contralateral (A) and ipsilateral (B) cat cerebral cortex. Cerebral hemispheres of normal cats were reconciled with those of deprived animals. Open columns indicate the data obtained from normal animals ( $N=4$ ) and filled columns from the animals one eye of which were monocularly sutured on postnatal 28th day ( $N=4$ ), respectively. The numbers indicate those of tissue blocks shown in Fig. 1. Each experiment was performed in triplicate. The data are presented in terms of fmol/mg protein and each value is mean  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p<0.01$  (Student's t-test)

**A****B**

**Fig. 5.** Effects of monocular deprivation on  $[^3\text{H}]$ rauwolscine binding activity in cat cerebral cortex. Conventions as in Fig. 4.

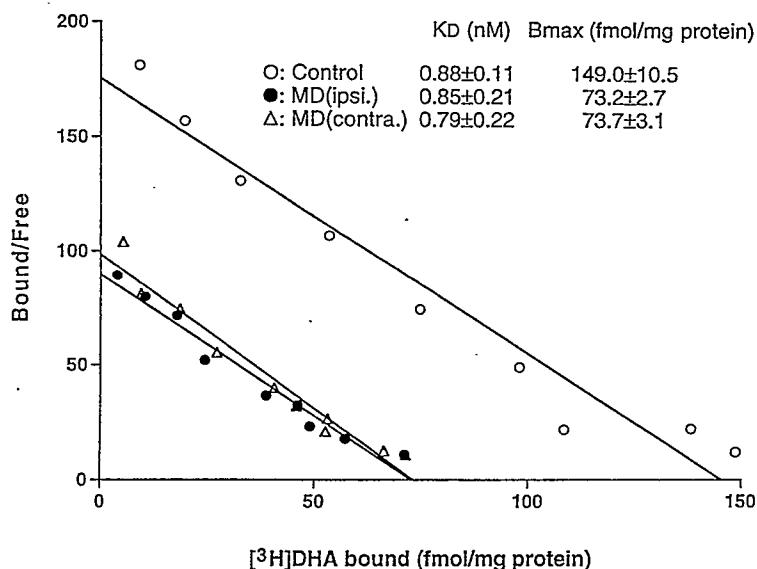
**Table 1.** Effects of monocular deprivation on [<sup>3</sup>H]DHA and [<sup>3</sup>H]Rauwolscine binding in cat brain

	[ <sup>3</sup> H]DHA (fmol/mg protein)		[ <sup>3</sup> H]Rauwolscine (fmol/mg protein)	
	Control	MD	Control	MD
<b>&lt; Cerebral cortex &gt;</b>				
occipital	60.1 ± 2.4	32.6 ± 2.1 **	103.5 ± 3.5	91.6 ± 5.3
other	35.1 ± 1.7	34.5 ± 1.6	74.0 ± 1.8	76.3 ± 1.9
<b>&lt; Subcortical regions &gt;</b>				
hippocampus	(i) 23.6 ± 1.1 (c) 26.4 ± 3.6	28.5 ± 2.6 28.7 ± 0.9	77.6 ± 5.4 91.9 ± 6.1	87.0 ± 4.9 77.0 ± 5.4 **
striatum	(i) 29.1 ± 4.0 (c) 30.5 ± 4.0	31.9 ± 3.3 30.5 ± 1.5	107.3 ± 3.8 117.1 ± 4.9	104.9 ± 6.8 109.1 ± 5.6
LGN	(i) 32.4 ± 1.6 (c) 30.8 ± 1.8	18.9 ± 1.3 * 19.2 ± 0.2 **	26.4 ± 1.9 23.8 ± 1.8	24.0 ± 1.4 23.1 ± 1.9
thalamus	22.3 ± 1.4	22.3 ± 0.9	44.5 ± 1.2	57.4 ± 4.0 **
hypothalamus	15.7 ± 1.8	16.9 ± 1.8	76.5 ± 6.1	67.9 ± 4.8
pons-medulla	13.8 ± 1.0	11.0 ± 1.5	36.7 ± 2.3	31.2 ± 1.8
cerebellum	117.1 ± 4.3	112.9 ± 5.0	98.0 ± 5.8	104.3 ± 2.9

(i), (c) represent the ipsilateral and contralateral hemisphere to the deprived eye.

\* P< 0.05, \*\* P< 0.01: significantly different from the control value.

The data of the cerebral cortex show the mean value of both hemispheres.

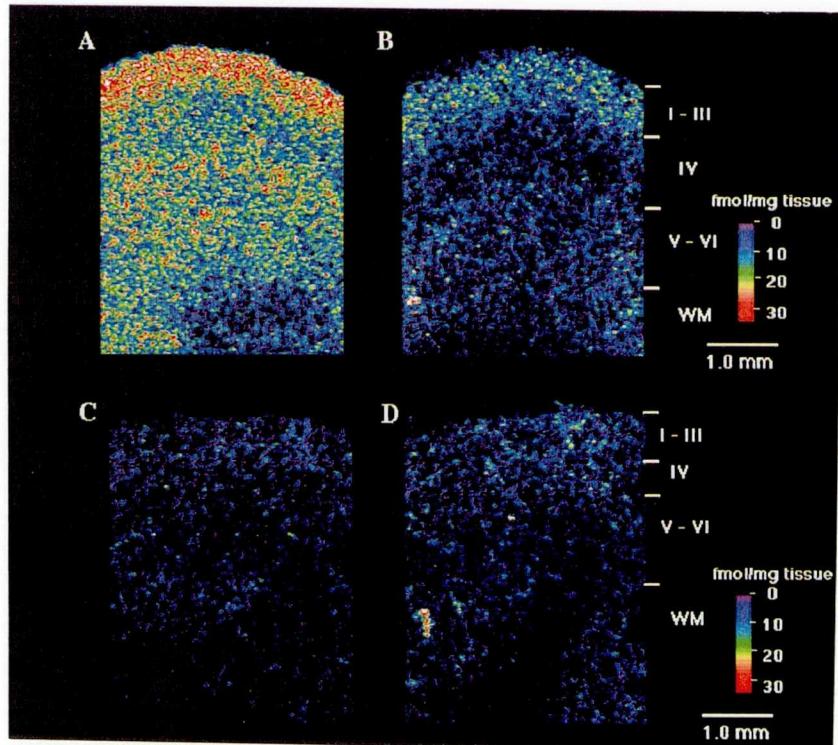


**Fig. 6.** Scatchard plots showing the effect of monocular deprivation on  $[^3\text{H}]$ DHA binding experiments. The Scatchard plot analyses were performed in the concentration range 0.05-12.5 nM  $[^3\text{H}]$ DHA to visual cortex of monocularly deprived and control animals. Points shown are the mean values from three experiments performed each in triplicate. Specific binding (expressed in fmol/mg protein) was obtained as the difference of the radioactivity of the filters in the presence and absence of 10  $\mu\text{M}$  (-)-alprenolol in the assay. O, samples from the occipital cortex of normal animals; ●, ipsilateral (ipsi.) occipital cortex to the deprived eye of the monocularly deprived (MD) cats;  $\Delta$ , contralateral (contra.) occipital cortex of MD cats. The values in the inlet indicated means  $\pm$  S.E.M.s

**Table 2.** Summary of Scatchard plot analysis of  $[^3\text{H}]$ DHA binding in the occipital cortex (*in vitro* autoradiography)

Layer	KD (nM)			Bmax (fmol/mg tissue)		
	Control		MD	Control		MD
	Ipsi.	Contra.	Ipsi.	Contra.	Ipsi.	Contra.
I-III	0.17 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.02	0.27 $\pm$ 0.05	32.6 $\pm$ 1.0	21.7 $\pm$ 0.8***	22.1 $\pm$ 0.8**
IV	0.25 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.05	19.9 $\pm$ 1.3	12.0 $\pm$ 0.9**	11.7 $\pm$ 0.2*
V-VI	0.30 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.08	0.34 $\pm$ 0.02	27.6 $\pm$ 1.9	15.8 $\pm$ 2.0*	15.5 $\pm$ 0.3*

\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001: significantly different from the control value.



**Fig. 7.** Pseudo-color coding of  $[^3\text{H}]$ DHA binding sites in the visual cortex (A, B) and frontal cortex (C, D) of the cat. The images of sagittal sections obtained from the normal cat (A, C) and those from the monocularly deprived cat (B, D) are shown. Scale bar=1.0 mm. Cortical layers are shown by Roman numbers.

## 第二章 片眼摘出がラットの中枢視覚系におけるノルアドレナリン作動性受容体結合ならびにその神経支配様式に及ぼす影響

哺乳動物の大脳皮質視覚野に認められる眼優位可塑性の調節に、中枢性ノルアドレナリン系が重要な役割を果たしていることが知られている [3-5]。第一章において、感受性期内にある仔ネコの一側眼瞼を縫合し片眼からの視覚入力を長期間遮断すると、視覚野における  $\beta$ -AR結合活性が著しく低下することを明らかにした。第一章では主として視覚野に焦点を絞り、視覚入力の剥奪と  $\beta$ -AR結合の関係についての検討を行ったが、本章ではさらに、 $\beta$ -ARおよびノルアドレナリン作動性神経の支配様式に対する視覚性活動依存的な調節機構についてより詳細に検討を行うことを目的とした。実験動物としては有色ラットを用い、中枢視覚系における  $\beta$ -AR結合活性を *in vitro* オートラジオグラフィーで、またノルアドレナリン作動性神経の支配様式はdopamine- $\beta$ -hydroxylase 抗体で免疫組織化学的に検討した。

電気生理学的実験によりラットの視覚野の細胞においてもネコやサルと同様に、眼優位性が認められることが既に報告されている [45,46]。さらにラット視覚野に認められている両眼性細胞がネコで観察されているように、生後発達初期の片眼遮蔽に対して感受性が高いことも明らかにされている [46-48]。従って、本章の実験動物としてはネコに代わってラットを用い、その結果をネコの場合と比較検討することにした。

本章では、視覚伝導路における代表的な視覚系構造である、視覚野、LGN、上丘における  $\beta$ -AR結合活性の活動依存的な変化を中心に、 $\alpha_2$ -ARならびに視覚性入力の伝達物質であると考えられているグルタミン酸の受容体結合についても併せて検討を行った。

### 実験方法

#### 1. 実験動物の手術方法

実験動物としてLong-Evans系ラットを用いた。視覚入力はハロセン麻酔下で片眼を摘出することによって剥奪し、片眼摘出 (monocular enucleation, ME) ラットは以下に示すようなグループに分類した。グループ1：（感受性期内の短期ME）生後12日目に片眼を摘出し13日後に実験に供した。グループ2：（感受性期を通した長期ME）生後12日目に片眼を摘出し78日後に実験に供した。グループ3：（感受性期外の長期ME）1年齢に片眼を摘出し30日後に実験に供した。グループ4：（新生児期からの短期ME）生後24時間以内に片眼を摘出し25日目に実験に供した。グループ5：（新生児期からの長期ME）生後24時間以内に片眼を摘出し90日目に実験に供した。

さらに、本章において視覚野とともに  $\beta$ -AR結合活性の変化を検討するLGNおよび上丘は同側性に大脳皮質視覚野からも興奮性の入力を受けているので、一側性に大脳皮質視覚野を除去することにより皮質由来の入力を遮断されたラットも合わせて作製した。グループ6：（感受性期内の短期視覚野除去）生後12日目に視覚野を吸引除去し13日後に実験に供した。グループ7：（感受性期を通した長期視覚野除去）生後12日目に視覚野を吸引除去し78日後に実験に供した。なお各々のグループの対照群としては、実験に供したときの日齢に合わせた無処置ラットを用いた。

## 2. *in vitro* オートラジオグラフィー

ネンブタール深麻酔下で経心的に氷冷した0.1 M PBを灌流し、速やかに脳を取り出しドライアイスパウダーで凍結した。厚さ10  $\mu$ mの冠状断凍結切片をPaxinosのアトラス [49] に従ってbregmaよりAP -3.6 mmから-8.8 mmにわたって作製した。

$\beta$ -ARに対する [ $^3$ H] DHA 結合、および  $\alpha_2$ -ARに対する [ $^3$ H] rauwolscine結合実験の方法は第一章に従った。

NMDA型グルタミン酸作動性受容体に対する結合実験は [ $^3$ H] MK-801 (DuPont/NEN) を用いて、Sakuraiらの方法 [50] を若干改変して行った。先ず、スライドグラスに貼り付けた切片は下記の異なる3種類の溶液内でそれぞれ10分間ずつプレインキュベーションを行った：

[溶液1] 50 mM Tris-acetate buffer, pH7.4, 4°C

[溶液2] 0.04% Triton X-100 含有 50 mM Tris-acetate buffer, pH7.4, 4°C

[溶液3] 50 mM Tris-acetate buffer, pH7.4, 25°C

プレインキュベーション終了後、10  $\mu$ Mグルタミン酸および10  $\mu$ Mグリシン含有 50 mM Tris-acetate buffer で調製した5.0 nM [ $^3$ H] MK-801 と25°C, 60分間インキュベーションすることによってトリチウム標識して全結合とし、非特異的結合はインキュベーション過程に5.0  $\mu$ M MK-801を添加して求めた。

non-NMDA型グルタミン酸作動性受容体に対する結合実験は [ $^3$ H] CNQX (DuPont/NEN) を用いてNielsenらの方法 [51] を若干改変して行った。すなわち、プレインキュベーションを50 mM Tris-acetate buffer, pH7.4, 4°C下で行った後、50 nM [ $^3$ H] CNQX と25°C, 60分間インキュベーションをした。非特異的結合は50  $\mu$ M CNQXとのインキュベーションにより求めた。

インキュベーション後の切片の乾燥から対比染色までの過程は、第一章に従って行った。

## 3. 免疫組織化学

グループ1, 2および3の片眼摘出群およびその対照ラットの脳内ノルアドレナリン

作動性神経線維を可視化するために、抗dopamine- $\beta$ -hydroxylase抗体を用いた免疫組織化学的検討を行った。

ラットはネンブタール深麻酔下で経心的に氷冷した0.1 M PBで脱血し、さらに4% パラフォルムアルデヒドを灌流して固定した。取り出した脳はさらに同固定液で後固定し、次いで10-30% シュクロースに浸漬した。シュクロースが組織に浸透した後、滑走式ミクロトームで厚さ50  $\mu$ mに薄切した切片を10 mM PBSに取り、以下浮遊式で免疫組織学的染色を行った。プレインキュベーションを0.3% Triton X-100含有10 mM PBS (PBS-T) 内で4°C下48時間行い、終了後切片は蒸留水で洗浄し、次に内在性の peroxidase活性を除去するために0.3% 過酸化水素／メタノール溶液に20分間浸した。蒸留水での洗浄後、非特異的結合を抑えるために10% Block Ace (雪印乳業) 含有PBSで12分間インキュベーションした。一次抗体としてPBS-Tで10,000倍希釈したウサギ抗 dopamine- $\beta$ -hydroxylase 抗体 (Eugene Tech International Inc.) を用い4°C下24時間インキュベーションした。洗浄後、ビオチン化抗ウサギIgG抗体、次いでhorseradish peroxidase conjugated streptavidine (DAKO A/S) でインキュベーションを行った。免疫活性は0.01% 3,3-diaminobenzidine (DAB) 反応によって可視化した。免疫組織化学に用いた切片の隣接切片は対比染色用とし、チオニンまたはマイヤー・ヘマトキシリンで染色した。

定量解析のためにdopamine- $\beta$ -hydroxylase抗体陽性線維の描画をし、任意の5,000  $\mu$ m<sup>2</sup> 四方に認められるvaricosityの数を調べ、結果を統計的に解析した。

#### 4. 網膜投射系の順向性標識

網膜由来の投射の順向性標識は西洋ワサビ過酸化酵素標識麦芽凝集素 [horseradish peroxidase-labeled lectin from Triticum vulgaris (WGA-HRP), Sigma] 用い、Itaya [52] , Tsengら [53] の方法に従って行った。ハロセン麻酔下で1.0% WGA-HRP溶液(3  $\mu$ l)をラットの硝子体に30 ゲージの注射針を1-2 mm 深さに刺入することによって注入した。標識を確実にするために一度目の注入から18-24時間後に再度同じ量を注入した。二度目の注入から7日目にネンブタール深麻酔下で、経心的に加温した3% 過酸化水素含有PBSを10分間流し、次いで固定液 (1% パラフォルムアルデヒド／1.25% グルタルアルデヒド) を30分間かけて流した。さらに0.1 M PBSで調製した10, 20, 30% シュクロース液をそれぞれ20分間かけて流した。

取り出した脳は4°C下で30% シュクロース液に保存し、24時間以内に凍結切片を作製した。Tetramethylbenzidine (TMB) 反応はMesulamらの方法 [54] を若干改良して行った。切片ははじめにincubation solution (0.1% sodium nitroprusside, 0.005% TMBおよび2.5% エタノール含有10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液, pH3.3) 内に4°C下で20分間浸漬し、さらにincubation solution 100 mlに対して0.3% 過酸化水素2.5 mlを加えること

によって酵素反応を開始した。酵素反応10分後、新たに作製した反応液に切片を移し替えさらに10分間インキュベーションした。10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液で10分間づつ3回の洗浄を行った後、ゼラチンコーティングされたスライドグラスにマウントした。対比染色はニュートラルレッドを用いて行った。

## 実験結果

### 1. 正常ラットにおける受容体結合

網膜から上丘、LGN、視覚野にまで至る視覚情報を司る神経伝達物質はグルタミン酸であると考えられており、とりわけNMDA型グルタミン酸受容体の関与が示されている。そこでまず、グルタミン酸受容体結合を *in vitro* オートラジオグラフィーによって検討した。 [<sup>3</sup>H] MK-801によるNMDA型グルタミン酸受容体結合実験での、上丘、LGN、視覚野の特異的結合は約90%であった。Fig. 8Aにオートラジオグラムの一例を示した。また正常ラットにおける上丘、LGNおよび視覚野の結合活性を Table 3に示した。生後25日目 (P25) のラットでは大脳皮質視覚野およびLGNは高い結合活性を示した。上丘では、網膜からの視覚情報が直接入力する浅層部に比較的高い結合活性が認められた ( $63.2 \pm 4.0$  fmol/mg tissue) のに対して、深層部は非常に低い活性 ( $9.8 \pm 2.1$  fmol/mg tissue) を示すに留まった。P25, P90ならびに一年齢 (P1Y) のラットの間で [<sup>3</sup>H] MK-801結合活性の変動はほとんど認められなかった (Table 3)。

一方、non-NMDA型グルタミン酸受容体に対する [<sup>3</sup>H] CNQX結合は Fig. 8Bに示すように、大脳皮質視覚野には高い結合活性が認められたが、上丘およびLGNは非常に活性が低かった。上丘では [<sup>3</sup>H] MK-801結合の場合と同様に浅層部の方が深層部に比べ高い値を示した ( $175.0 \pm 0.3$  vs.  $28.4 \pm 5.7$ )。P25, P90およびP1Yの結合活性の変動をみると、視覚野ならびにLGNではP90でP25に比べ有意な活性の増加が認められ、その後P1Yではほとんど変化がみられなかった。一方、上丘では有意な増減は全く認められなかった (Table 3)。

つぎに  $\alpha_2$ -および  $\beta$ -ノルアドレナリン作動性受容体についての検討を行った。

$\alpha_2$ -ARに対する [<sup>3</sup>H] rauwolscine結合は上丘、LGNおよび視覚野においては比較的低い結合活性しか示さなかった (Fig. 8C and Table 3)。またP25, P90およびP1Yの結合活性の変動も有意ではなかった (Table 3)。

それに対して、 $\beta$ -ARに対する [<sup>3</sup>H] DHAの結合活性は、視覚野および上丘で高く (Fig. 8D)、 [<sup>3</sup>H] MK-801ならびに [<sup>3</sup>H] CNQX結合様式と同様に上丘の浅層部は深層部に比べ約4倍高い活性を示した (Table 3)。P25, P90ならびにP1Yの間で有

意な変動は認められなかった。

## 2. 片眼摘出が受容体結合に及ぼす影響

### 2-1. 感受性期内の片眼摘出の影響

電気生理学的検討よりラットの感受性期は開眼直前から生後45日頃までと考えられている [48,65,66]。そこで先ず感受性期内の片眼摘出が受容体結合活性に及ぼす影響について検討を試みた。

[<sup>3</sup>H] MK-801 (Fig. 9) および [<sup>3</sup>H] rauwolscine結合のいずれも摘出期間の長短にかかわらず視覚野, 上丘およびLGNにおいて、対照ラットとの間に有意な変化は認められなかった。

片眼摘出は視覚野の [<sup>3</sup>H] CNQX結合に対してはほとんど変化を引き起さなかったが、摘出眼に対して対側のLGNでは対照ラットに対して有意な活性の減少を引き起した (グループ1: 77.0±1.1, P<0.05; グループ2: 137.5±4.5 fmol/mg tissue, P<0.01)。一方、上丘では結合活性の増加が認められた [グループ1: 対側, 185.8±3.6 (P<0.05), 同側, 198.1±8.0 (P<0.05) ; グループ2: 対側, 198.7±8.4 fmol/mg tissue (P<0.05) ]。しかしながら、グループ2の同側上丘では変化は認められなかった (Fig. 10)。

片眼摘出によって最も著明な変化が認められたのは、上丘およびLGNにおける [<sup>3</sup>H] DHA結合であった。P12から13日間の短期摘出により (グループ1) 対側の上丘およびLGNにおいて有意な活性の低下を認めた (上丘: 14.4±0.8, P<0.01 ; LGN: 11.2±0.4 fmol/mg tissue, P<0.01) (Fig. 11 and Fig. 12)。長期間に渡る摘出によっても (グループ2) 、対側上丘およびLGNにおいて有意な活性の減少が認められ (上丘: 16.3±0.3, P<0.05 ; LGN: 10.3±0.3 fmol/mg tissue, P<0.05) 、さらに同側上丘においては活性が増加することが判った (23.4±0.8 fmol/mg tissue, P<0.05) (Fig. 12)。それに対して視覚野では剥奪期間の長短に関わらず、眼球摘出が結合活性に及ぼす影響はほとんど認められなかった。しかしながら視覚野の [<sup>3</sup>H] DHA結合活性の発達に伴う変化に有意ではないが下向きの調節を引き起こす可能性のあることが判った。すなわち、正常な発達過程では [<sup>3</sup>H] DHA結合活性はP25とP90の間に変化が認められないのに対し、片眼摘出された動物では、P25に対してP90で活性が減少することが判った (それぞれ対照群に対して、同側視覚野で15%、対側視覚野で17%減少)。

### 2-2. 成ラットにおける片眼摘出が [<sup>3</sup>H] DHA結合に与える影響

[<sup>3</sup>H] DHA結合において認められた変化が感受性期と何らかの関係があるのかどうかを調べるために、感受性期を十分過ぎている1年齢の成ラットで片眼摘出を行い

[<sup>3</sup>H] DHA結合を調べた。1ヶ月に渡る摘出期間にも関わらず上丘, LGNおよび視覚野のいずれにおいても結合活性に有意な変化は認められず、Table 3に示した正常な1年齢の成ラットの値とほとんど差異はなかった（同側上丘, 15.7±0.5; 対側上丘, 15.8±0.5; 同側LGN, 13.9±0.8; 対側LGN, 14.2±0.7; 同側視覚野, 19.9±0.5; 対側視覚野, 20.2±0.5 fmol/mg tissue）。

### 2-3. 出生時の片眼摘出が上丘 [<sup>3</sup>H] DHA 結合に与える影響

ラットをはじめ多くの哺乳動物で出生直後に片眼を摘出すると、網膜由来の求心性入力に驚くほど大きな神経回路の再構築が生ずることが判っている。たとえば、生後24時間以内に片眼を摘出すると生後発達に伴って退化していく網膜神経節細胞から上丘への同側性投射が大部分保存され、成熟時に電気生理学的にも検出可能な機能的なシナプスが形成される [55-58]。本来、同側性投射は網膜神経節細胞の「プログラムされた細胞死」によって生後2週目の終わりまでに著しく退化していく。本節ではまず、この出生時の片眼摘出がもたらす上丘への求心性入力の再構築を順向性標識法によって確認し、このときに [<sup>3</sup>H] DHA結合活性に変化が観察されるかどうかについて検討した。

正常に発達した生後90日目のラットの結果をFig. 13Aに示した。一側眼球内に注入したWGA-HRPは順向性に上丘まで運ばれており、対側の上丘浅層部が強く標識された。同側の上丘浅層部にはこの様なシグナルは認められず、中間層にパッチ状の標識が確認できた (Fig. 13B)。これに対して、出生直後に片眼を摘出され90日間通常に飼育されたラットでは、対側浅層部の強いシグナルだけではなく、同側浅層部においても一様な標識が認められ (Fig. 13C and Fig. 13D)、同側投射が保存されることが確認できた。

この様な神経回路の再構築が生じているラットの [<sup>3</sup>H] DHA 結合を調べてみると、除神経による対側上丘の萎縮が生後12日目に片眼摘出した場合とほぼ同程度引き起こされているにもかかわらず、 [<sup>3</sup>H] DHA 結合活性に有意な減少は認められなかつた。(グループ4: 対側上丘, 14.3±1.2, 同側上丘, 18.2±0.9, グループ5: 対側上丘, 17.3±0.8, 同側上丘, 19.5±1.3 fmol/mg tissue) (Fig. 14)

### 3. 一側性大脳皮質視覚野除去が上丘の [<sup>3</sup>H] DHA 結合に及ぼす影響

ラット上丘は網膜からだけではなく、同側の大脳皮質視覚野ならびに対側の上丘から多くの興奮性入力を受けている [70,79,80]。そこで本節では、網膜-上丘投射系と同様にその神経伝達物質がグルタミン酸であると考えられている皮質-上丘間投射 [60-62] を阻害した場合に上丘の [<sup>3</sup>H] DHA結合が変化するか否かを調べた。

感受性期内の片眼摘出と同じくP12で一側性に視覚野の吸引除去手術を行い、P25およびP90で [<sup>3</sup>H] DHA の *in vitro* オートラジオグラフィーを行った。それぞれのオートラジオグラムの一例をFig. 13に示したが、グループ6 (Fig. 15A) およびグループ7 (Fig. 15B) のいずれにおいても上丘の [<sup>3</sup>H] DHA結合活性は変化しなかった。このとき [<sup>3</sup>H] MK-801, [<sup>3</sup>H] CNQX および [<sup>3</sup>H] rauwolscine結合の変化も調べたが、正常に発達した相当齢の対照ラットとの間に有意な差は認められなかった。

#### 4. Dopamine- $\beta$ -hydroxylaseの免疫組織化学的検討

生後12日目の片眼摘出によって最も著しく上丘における [<sup>3</sup>H] DHA結合活性に変化が認められたので、このときのノルアドレナリン作動性神経線維の投射様式の変化について抗dopamine- $\beta$ -hydroxylase抗体を用いた免疫組織化学的方法によって調べた。正常ラットでは、浅層部に高い密度の免疫陽性線維があり、深層部ではやや低めの免疫陽性を示すことが判った (Fig. 16A)。片眼摘出群ではP12からP25までの摘出では両側の上丘の間にまた対照ラットとの間にもほとんど変化が認められなかった。しかしながら、P90までの長期片眼剥奪によって両側の上丘間、ならびに対照ラットの上丘に比べ著しい変化が誘導されることを観察した (Fig. 16B)。対側上丘では免疫陽性線維のvaricosityの増大が生じ、反対に同側上丘ではその減少が引き起こされるような結果が得られた。定量的な解析を行うために免疫陽性を示すvaricosityを数えた結果、正常ラットでは上丘両半球の平均が4945±264/mm<sup>2</sup>であるのに対し、長期片眼摘出群では対側上丘で9719±457/mm<sup>2</sup>と有意な増加を示し (P<0.001)、同側上丘では3693±139/mm<sup>2</sup>と有意に減少する (P<0.001) ことが明らかになった (Fig. 17)。

#### 考 察

第一章で感受性期内の片眼剥奪が  $\beta$ -AR結合活性の著明な低下を引き起こすことを見出した。本章ではさらに、 $\beta$ -AR結合活性の視覚性神経活動依存的な調節機構についてより詳細に検討を行うことを目的に、ラットの主要な視覚構造である大脳皮質視覚野、LGN、上丘におけるノルアドレナリン作動性およびグルタミン酸作動性受容体結合活性について検討を行った。

## 1. ラット中枢視覚伝導路におけるグルタミン酸作動性神経伝達と受容体調節

網膜に始まり視床を経由して大脳皮質に至る視覚情報、ならびに大脳皮質視覚野からLGNまたは上丘への遠心性投射を担う興奮性の神経伝達物質はともにグルタミン酸であることが示唆されている [60-62]。グルタミン酸作動性受容体結合が生後10-20日頃に視覚野と上丘において一過性に上昇するという報告がある [63,64]。電気生理学的ならびに解剖学的な検討からは、ラット大脳皮質に認められる眼優位可塑性の感受性期が開眼直後（生後14日目）から生後45日頃までであるとする報告 [48,65,66] がある。これらの報告から、感受性期内の視覚入力の剥奪によって視覚野、LGNおよび上丘のグルタミン酸作動性受容体結合が仔ネコで見られるような修飾 [67] を受ける可能性が考えられる。そこで本章において、グルタミン酸作動性受容体結合を [<sup>3</sup>H] MK-801ならびに [<sup>3</sup>H] CNQX結合を用いて調べたところ、感受性期内の片眼剥奪により [<sup>3</sup>H] CNQX 結合活性は対側のLGNにおいてのみ有意な減少を認め視覚野および上丘での変化は観察されなかった。一方、 [<sup>3</sup>H] MK-801結合については視覚野、LGN、上丘のいずれにおいても有意な変化は認められなかつた。Schliebsらは片眼剥奪によって [<sup>3</sup>H] glutamate結合活性が同側LGNにおいては有意に増加するが、視覚野、上丘では変化が見られないと報告している [63]。この報告との結果の違いは、本章で用いた *in vitro* オートラジオグラフィーによる実験手技と  $P_2$  分画を使った彼らの方法との空間分解能の差異に起因するものと考えられる。実際、Kiyosawaらは *in vitro* オートラジオグラフィーによる検討で、生後10日目から30日目までの片眼摘出が対側の上丘と視覚野において [<sup>3</sup>H] kainate結合活性の有意な減少と [<sup>3</sup>H] AMPA結合活性の増加をもたらすことを報告している [68]。この [<sup>3</sup>H] kainateと [<sup>3</sup>H] AMPAの相反する変化が、両リガンドがともに結合するnon-NMDA型グルタミン酸受容体結合実験に本章では [<sup>3</sup>H] CNQXを用いたために検出できなかつた可能性が考えられる。

一方、NMDA型グルタミン酸受容体結合については、Kumarらが長期片眼遮蔽を行った場合のみ視覚野の [<sup>3</sup>H] MK-801結合活性が有意に減少すると報告している [64] が、本章では有意な変化は認められなかつた。この相違は主に結合実験の際のインキュベーション方法の違いによるものと考えられる。すなわち、本実験系では検出される結合活性を最大化するためにグルタミン酸とグリシンを加えている。NMDA受容体のイオンチャネル部位を認識する [<sup>3</sup>H] MK-801の結合は、組織標品の洗浄により著しく低下するが、グルタミン酸などのNMDA受容体アゴニストを添加すると結合は著明に増強される。ここにさらにallosteric modulatory siteであるグリシン認識部位の特異的アゴニストであるグリシンを添加すると結合がさらに増強されることが知られている [69]。Kumarらは本実験系で用いている濃度の10倍濃の [<sup>3</sup>H]

MK-801を用いていること以外にはその結合活性を増強させる修飾系には特に触れていないことから、本章の結合実験方法では片眼剥奪によって引き起こされるわずかな変化が検出できなかつたのではないかと考えられる。

## 2. 視覚性入力による $\beta$ -AR結合の調節

第一章において感受性期内の視覚性神経活動の様式によってノルアドレナリン作動性神経伝達系が修飾を受ける可能性を示唆した。しかしながら本実験では、視覚性入力の剥奪による  $\beta$ -AR結合活性の減少が上丘では認められたものの、大脳皮質視覚野においては認められなかつた。有色ラットを用いた電気生理学的な研究により、ラット視覚野においてもネコやサルに見られるような眼優位性をもつた受容野特性の明瞭な細胞が認められることが既に報告されている [45,46]。またラット視覚野の両眼性細胞も、ネコで知られているような生後発達初期の片眼遮蔽に対して感受性が高いことが明らかにされている [46-48]。しかしながら、網膜から第一次視覚野への視覚性入力の割合はネコやサルとは大きく異なり、ラットの場合、網膜神経節細胞の主たる投射先はLGNではなく (<20%)、上丘であるので (90%)、LGNを経由した一次視覚野への投射は少ない [70,71]。従って、大脳皮質視覚野において  $\beta$ -AR結合活性の減少が認められなかつたのは、おそらくネコとラットという種差によるものではなく中枢視覚伝導路の投射様式の量的な差によるものではないかと考えられる。さらに、ラット一次視覚野には解剖学的に認め得る両眼性競合の基盤となるような柱状構造（例えば眼優位カラム）が観察されない。その代わりに、Fig.13に示すように上丘の中間層に両眼性競合の存在を示唆するような同側性一次視覚入力のパッチ状の終止様式が認められる。以上のことから、 $\beta$ -AR結合調節にとって解剖学的な基盤を伴つた両眼競合が必要不可欠であり、感受性期内の生じる強度な両眼競合が  $\beta$ -AR結合活性の修飾をもたらすと考えられる。

## 3. $\beta$ -AR結合調節に対する感受性期

本章において、片眼摘出による  $\beta$ -AR結合活性の低下が対側上丘において認められたが、この変化は眼優位可塑性に対する感受性期内にある生後12日目に行った剥奪操作によってのみ引き起こされ、成ラットでの実験操作では有意な変化は認められなかつた。これまでに片眼剥奪操作の実施日と  $\beta$ -AR結合活性の変化については、生後12日目前後の片眼剥奪操作は効果的であるが、25,40,60,90日目に行った場合には変化を引き起こさないという報告がある [63,71]。

さらに本章においては、出生直後の片眼摘出が結合活性に変化を及ぼさないことを見出している。出生直後の片眼摘出は網膜由来の上丘への同側性投射を残存させるだけではなく、脳梁を介する皮質間投射や二丘傍野への投射の増加を誘導すること

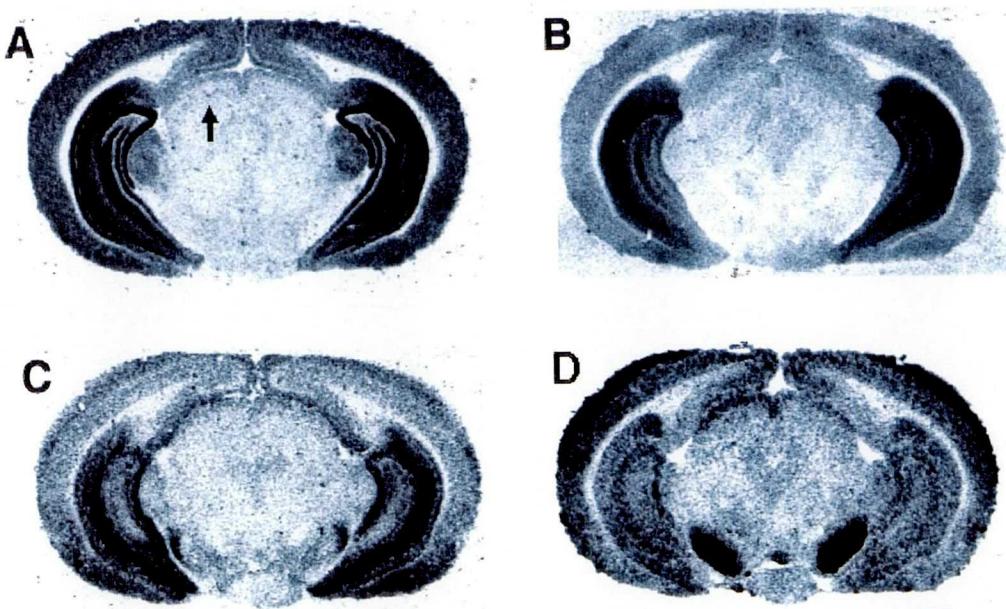
が知られている [73-75]。また、出生直後はまだ網膜-上丘間投射が未熟であることも知られていることから [76-78]、出生時に片眼摘出を行った場合は対側上丘への網膜投射が減少するため、それを補償する機構が誘導されて  $\beta$ -AR結合活性の低下が認められなかった可能性が考えられる。以上のことよりラット上丘における  $\beta$ -AR結合の調節は感受性期内の非常に限られた期間内においてのみ認められる可能性が示唆された。

#### 4. $\beta$ -AR結合調節に対する求心性入力特異性

一側性大脳皮質視覚野の除去は上丘の  $\beta$ -AR結合に対しては変化を引き起こさないことが本章において明らかとなった。上丘では網膜由来の入力が浅層部 (I-III) に、一方視覚野由来の入力が II層の深層部から III-IV層部にそれぞれ終止することが報告されている [70,79,80]。網膜-上丘間および皮質-上丘間投射の興奮性神経伝達物質はグルタミン酸であると考えられている [59,61,62]。Sakuraiは同側視覚野を吸引したときならびに対側片眼を摘出したときに上丘内のグルタミン酸濃度が共に減少することを報告している [81]。それにも拘わらず、 $\beta$ -AR結合の低下が片眼剥奪によってのみ生じたということに関しては以下の様な可能性が考えられる。第一に片眼摘出は網膜-上丘間の入力量を低下させただけではなく、皮質-上丘間投射の入力量をも低下させたために、結果として片眼摘出の方が視覚野除去に比べより機能的な活動のレベル低下の度合いが大きかった可能性がある。第二に、一側性に皮質を除去すると残っている視覚野から対側性に上丘への補償的な神経回路の再構築が誘導される [82] ことに基づく可能性がある。第三には、ノルアドレナリン系と網膜-上丘間投射の間に特異的な機能的相互作用があるという可能性である。上丘の細胞の受容野特性の機能構築に対しては、網膜からの入力と皮質からの入力がそれぞれ異なった立場から影響を及ぼす可能性があるということが報告されている。例えば、暗闇飼育は上丘の方向選択性をもつ細胞に対して反応性を著しく減ずるが、視覚野を除去しても方向選択性にはまったく変化が生じない [83, 84]。そして第四には、皮質-上丘間投射は上丘の浅層部内にあるGABA作動性介在ニューロンを活性化するとの報告 [85] を考慮すると、視覚野の除去が上丘浅層部における脱抑制を誘導した可能性もある。以上のようにいくつかの可能性が考えられるが、いずれにしても片眼剥奪の結果生じる  $\beta$ -AR結合の活性調節には上丘への入力間に、著しい不均衡の生じることが必要であると考えられる。

## 小 括

1. ラットにおいて感受性期内に行った片眼摘出は、対側の上丘およびLGNの  $\beta$ -AR 結合活性に有意な減少を引き起こすことを示した。
2. 長期片眼摘出が対側上丘において、  $\beta$ -AR結合活性だけではなく抗dopamine-  $\beta$ -hydroxylase抗体免疫陽性線維の補償的な変化をも誘導することを示した。
3. 残された眼からの同側投射が維持されるような神経回路の再構築を誘導する、出生直後の片眼摘出は対側上丘の  $\beta$ -AR結合活性に変化を及ぼさなかった。
4. 成ラットにおける片眼摘出は対側上丘の  $\beta$ -AR結合活性に変化を及ぼさなかった。
5. 大脳皮質視覚野の吸引除去によって  $\beta$ -AR結合活性に変化が認められなかったことから、上丘の  $\beta$ -AR結合調節に対して皮質由来よりも網膜由来の入力の方が重要であることを見出した。



**Fig. 8.** Autoradiographic images demonstrating the specific binding of  $[^3\text{H}]$ MK-801 (A),  $[^3\text{H}]$ CNQX (B),  $[^3\text{H}]$ rauwolscine (C), and  $[^3\text{H}]$ DHA (D). The images of adjacent coronal sections containing the superior colliculus (SC) and visual cortex obtained from a normal rat (postnatal day 25) are shown. The right hemisphere is left side. The arrow in "A" indicates the SC. Scale bar=1.5 mm.

**Table 3.** Binding activity of  $[^3\text{H}]$ MK-801,  $[^3\text{H}]$ CNQX,  $[^3\text{H}]$ rauwolscine, and  $[^3\text{H}]$ DHA in visual structures of normal rat

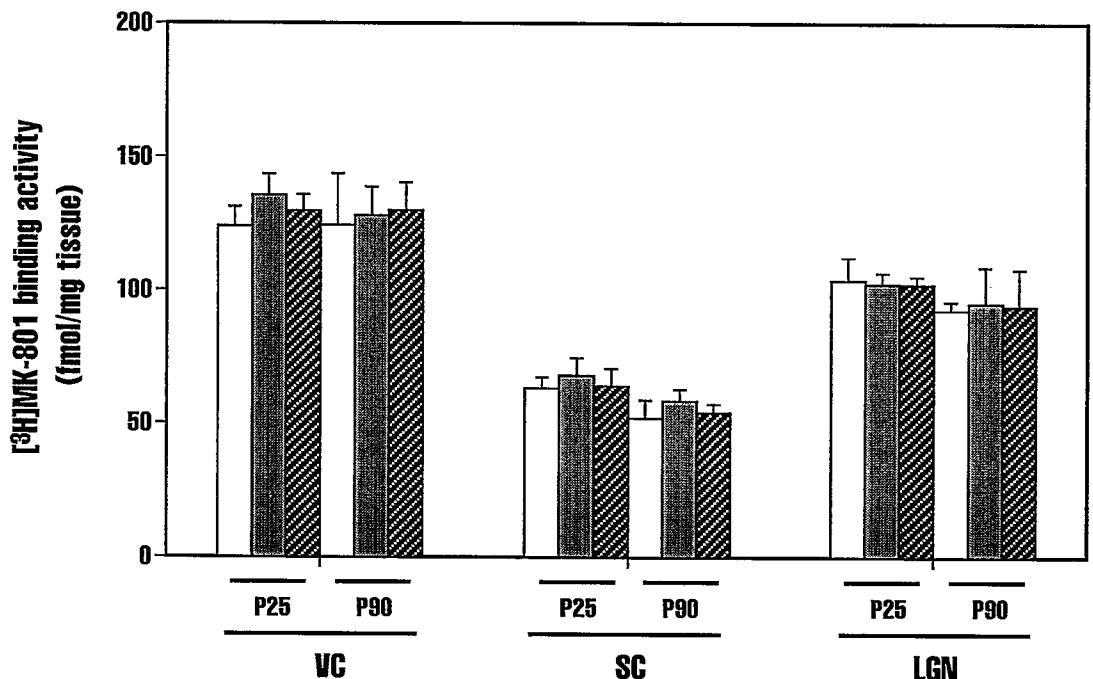
	$[^3\text{H}]$ MK-801	$[^3\text{H}]$ CNQX	$[^3\text{H}]$ rauwolscine	$[^3\text{H}]$ DHA
	(fmol/mg tissue)			
SC				
P25	$63.2 \pm 4.0$	$175.0 \pm 0.3$	$22.7 \pm 0.6$	$16.8 \pm 0.9$
P90	$52.0 \pm 6.8$	$167.1 \pm 4.1$	$17.6 \pm 0.5^{**}$	$18.4 \pm 0.4$
1 year	$59.7 \pm 4.8$	$181.5 \pm 10.4$	$19.1 \pm 1.4$	$16.8 \pm 0.2$
LGN				
P25	$103.8 \pm 8.5$	$106.6 \pm 3.0$	$12.4 \pm 0.04$	$14.8 \pm 0.5$
P90	$92.7 \pm 3.1$	$177.1 \pm 3.7^{***}$	$11.4 \pm 0.5$	$14.5 \pm 0.6$
1 year	$107.0 \pm 11.3$	$172.9 \pm 14.3^{***}$	$13.8 \pm 1.2$	$14.5 \pm 0.5$
VC				
P25	$124.0 \pm 7.2$	$261.7 \pm 7.9$	$16.4 \pm 1.1$	$23.5 \pm 0.4$
P90	$124.3 \pm 19.4$	$315.9 \pm 15.7^{**}$	$18.9 \pm 1.3$	$23.0 \pm 0.5$
1 year	$131.4 \pm 16.7$	$318.1 \pm 21.6^{**}$	$21.3 \pm 0.9^{*}$	$21.6 \pm 0.4^{*}$

Each value indicates mean  $\pm$  S.E.M.

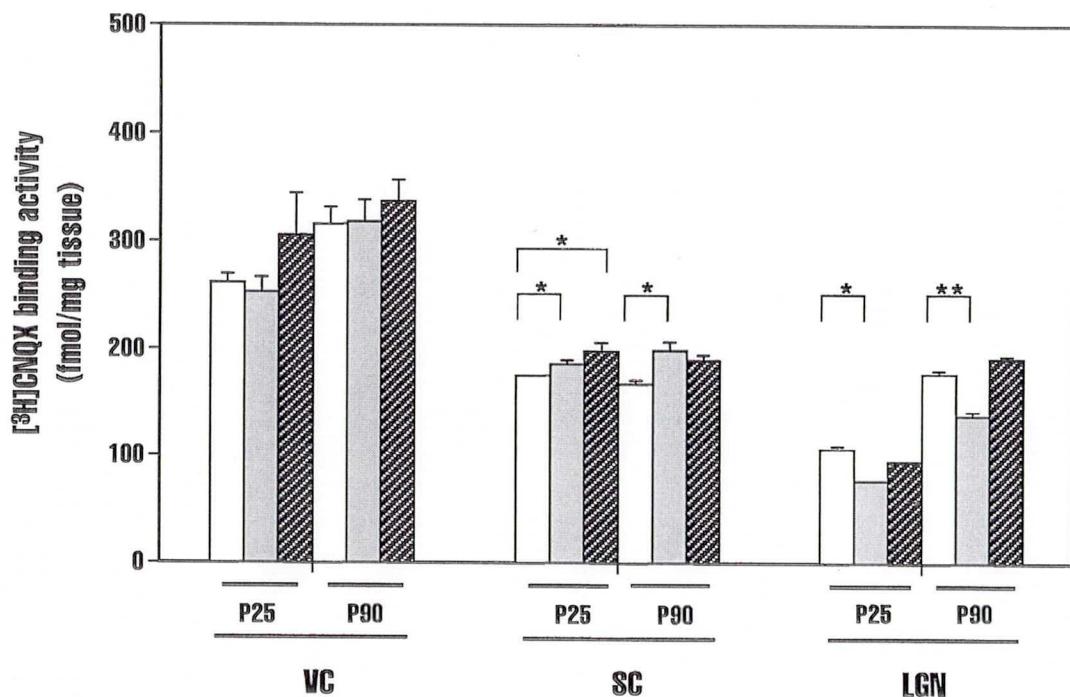
$^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ : significantly different from the value of postnatal day 25.

All values are the average of data obtained from two hemispheres.

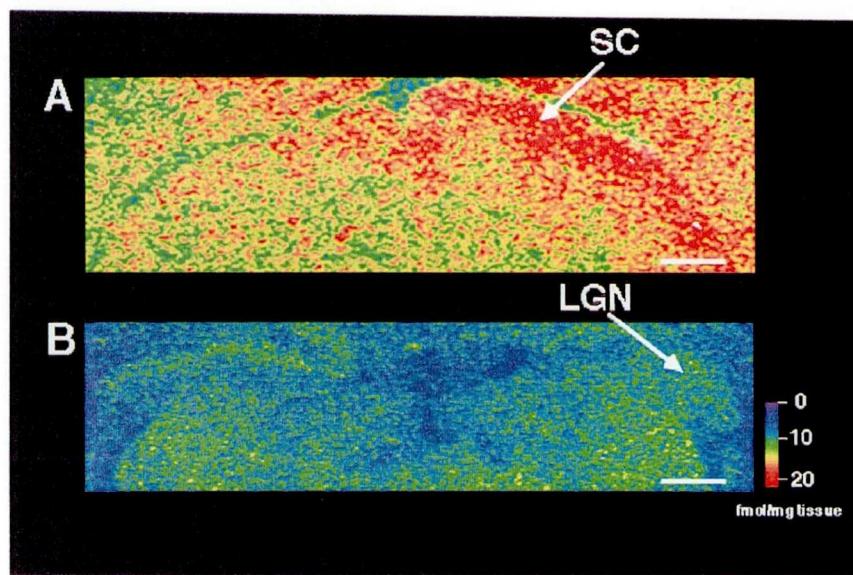
The data of SC represent the value of superficial layer.



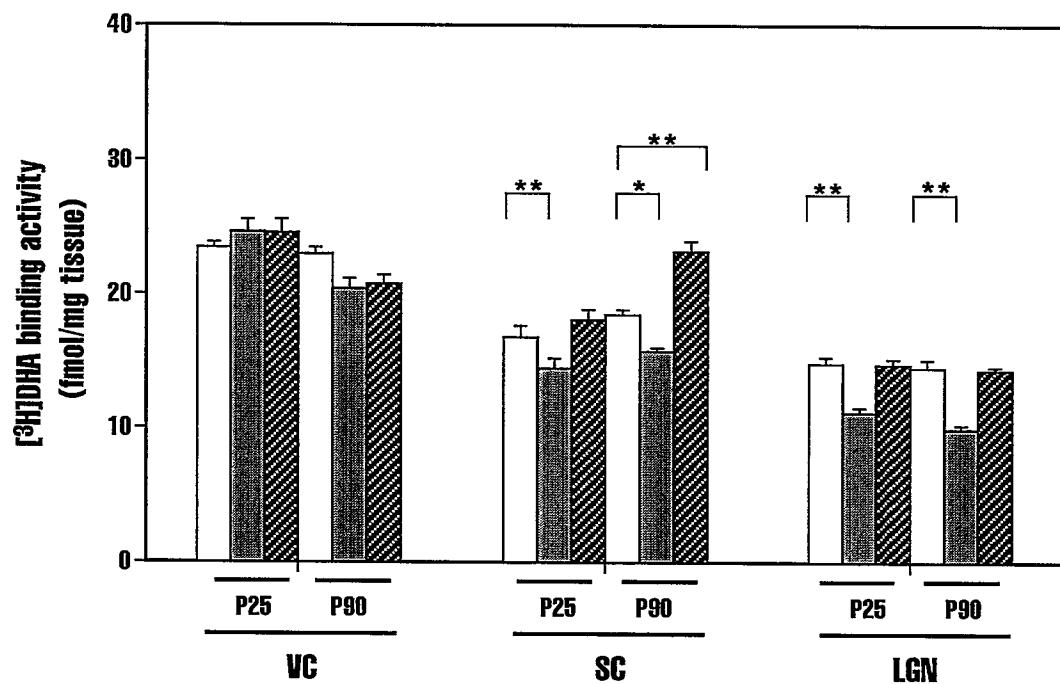
**Fig. 9.** Effects of monocular enucleation on  $[^3\text{H}]$ MK-801 binding activity in the contralateral (shaded columns) and ipsilateral (hatched columns) hemispheres of the visual cortex (VC), superior colliculus (SC), and lateral geniculate nucleus (LGN). Open columns indicate the data obtained from normal rats. Monocular enucleation was performed on postnatal day 12, and animals were perfused on day 25 (P25) or 90 (P90). The data are presented in terms of fmol/mg tissue, and each value is the mean  $\pm$  S.E.M.



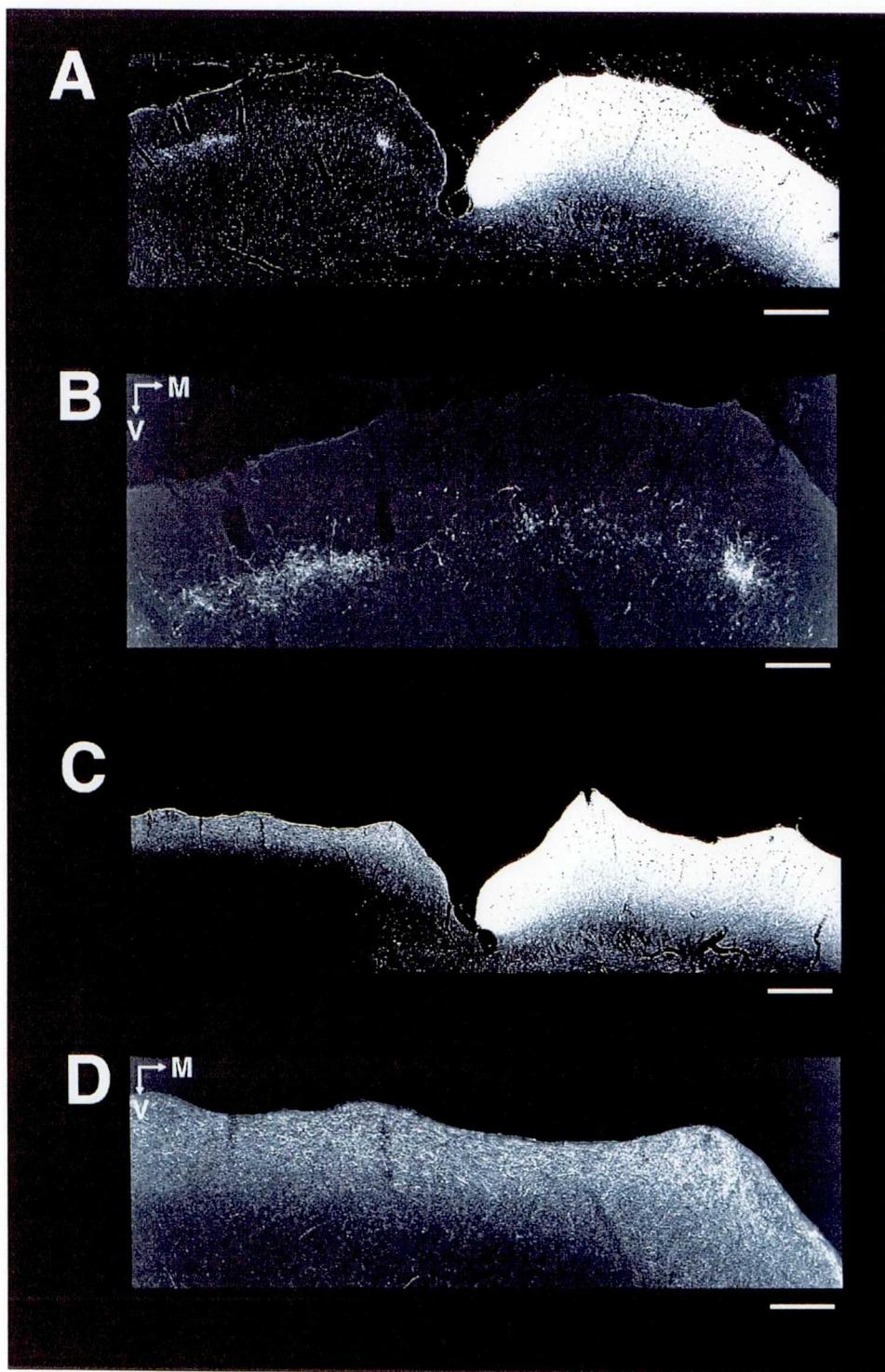
**Fig. 10.** Effects of monocular enucleation on  $[^3\text{H}]$ CNQX binding activity in the rat brain. Conventions are the same as those in Fig. 9. \*\*  $p<0.01$ , \*  $p<0.05$  (Student's t-test).



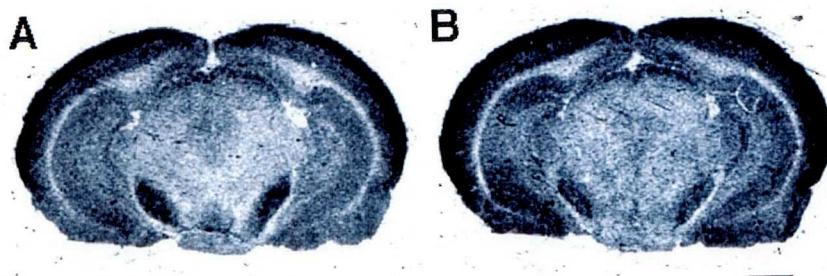
**Fig. 11.** Pseudo-color coding of  $[^3\text{H}]$ DHA binding activity in the (A) superior colliculus (SC) and (B) lateral geniculate nucleus (LGN) of the rat. The images of coronal sections obtained from a rat monocularly enucleated on postnatal day 12 and killed on day 25 are shown. The right hemisphere is at the left. Scale bar = 0.6 mm (A), 0.8 mm (B).



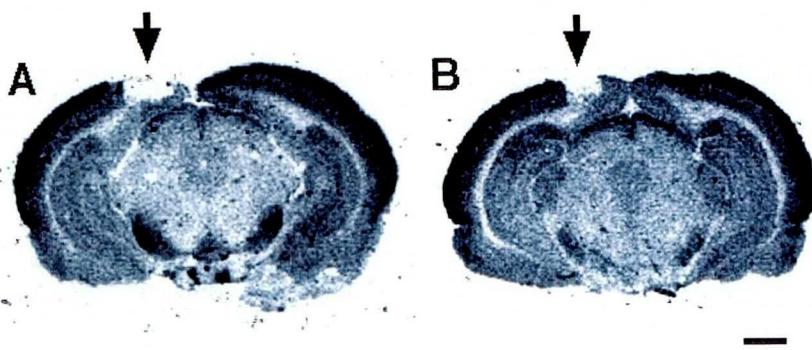
**Fig. 12.** Effects of monocular enucleation on [<sup>3</sup>H]DHA binding activity in the rat brain. Conventions are the same as those in Fig. 9. \*\* p<0.01, \* p<0.05 (Student's t-test).



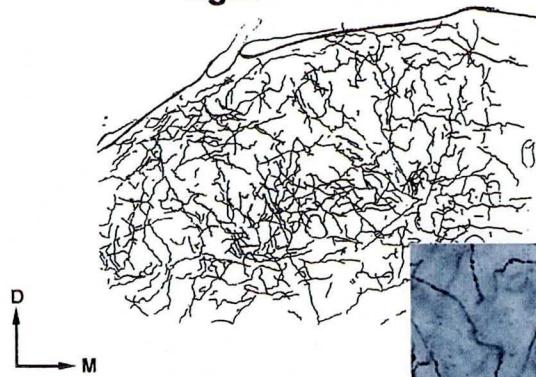
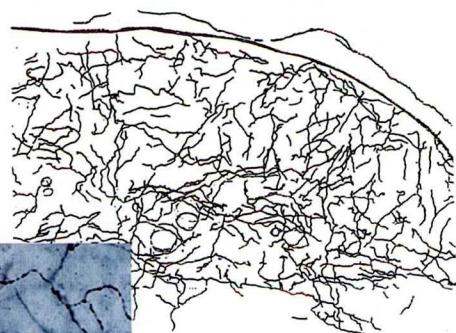
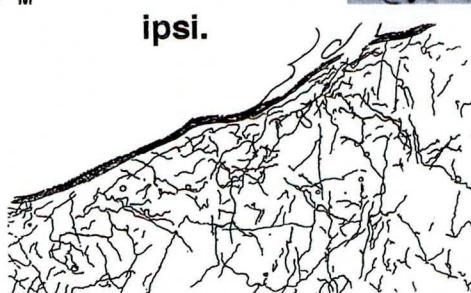
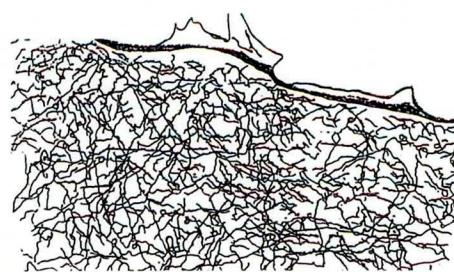
**Fig. 13.** Darkfield photomicrographs of coronal sections through the superior colliculus obtained from 12-week-old rats. WGA-HRP was injected into one eye to label the retinal projection to the SC. The images of a normal rat (A, B) and one monocularly enucleated on the day of birth (C, D) are shown. The images of the ipsilateral hemisphere of the superior colliculus illustrated in "A" and "C" are enlarged in "B" and "D", respectively. Scale bar = 300  $\mu$ m (A, C), 120  $\mu$ m (B, D). M: medial; V: ventral.



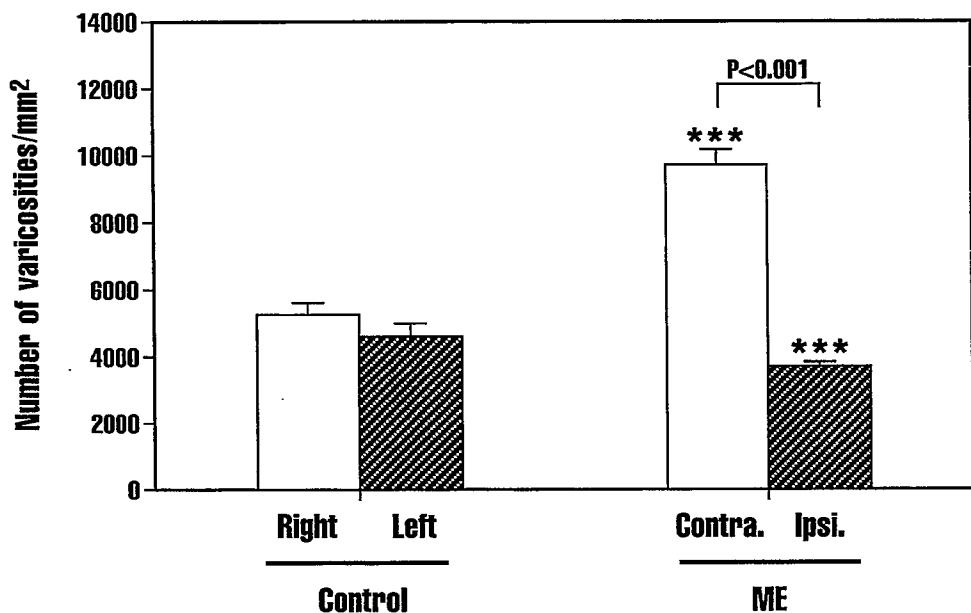
**Fig. 14.** Autoradiographic images demonstrating the specific binding of [<sup>3</sup>H]DHA in neonatal monocularly enucleated rat. Monocular enucleation was performed on the day of birth. The images of coronal sections obtained from postnatal day 25 (A) and 90 (B) are shown. The hemisphere contralateral to the enucleated eye is at the left.



**Fig. 15.** Autoradiographic images demonstrating the binding of [<sup>3</sup>H]DHA in unilaterally cortex-ablated rat. Unilateral cortical ablation was performed on postnatal day 12. The images of coronal sections obtained from postnatal day 25 (A) and 90 (B) are shown. Arrows indicate the site previously occupied by the visual cortex. Scale bar=2.0 mm.

**A****right****left****B****ipsi.****contra.**

**Fig. 16.** Camera lucida reconstruction of fibers in the SC immunopositive to anti-DBH antibody. The drawings of coronal sections obtained from a normal rat (A) and a monocularly enucleated rat (B) on postnatal day 90 are shown (Scale bar=50  $\mu$ m). Monocular enucleation was performed on postnatal day 12. ipsi., ipsilateral hemisphere; contra., contralateral hemisphere. The inset shows a photomicrograph of DBH positive fibers with higher magnification (Scale bar=25  $\mu$ m).



**Fig. 17.** Effects of monocular enucleation on the number of DBH-immunopositive varicosities in the superior colliculus. Open columns indicate the data obtained from the right hemisphere of normal rats (Control) or contralateral (Contra.) hemisphere of monocular enucleated rats (ME). Hatched columns indicate the data obtained from left hemisphere of normal rats or ipsilateral (Ipsi.) hemisphere of the enucleated rats. Monocular enucleation was performed on postnatal day 12 and the immunohistochemistry was initiated on day 90. The data are presented in terms of number of varicosities/mm<sup>2</sup>, and each value is mean  $\pm$  S.E.M. \*\*\*, significant difference from the control value ( $p < 0.001$ , Student's t-test).

### 第三章 6R-エリスロ-5,6,7,8-テトラヒドロビオプテリン (R-THBP) による成ネコ視覚野における眼優位可塑性の調節と神経伝達物質受容体結合活性の変化

一側眼瞼を外科的に縫合することによって引き起こされる眼優位カラムの可塑的変化は、視性刺激遮断弱視の格好の動物モデルとして導入され弱視の病態解明に寄与してきた。眼優位可塑性を調節する機構としてノルアドレナリン系の関与が強く示唆されており、第一、第二章を通じて網膜由来の視覚入力の遮断が  $\beta$ -AR結合活性に変化を及ぼすことを見出してきた。これらの動物モデルを用いた検討により、弱視発生時には  $\beta$ -AR結合活性が著しく減弱している可能性が考えられる。本章では、 $\beta$ -AR結合の活性化による弱視の薬物療法の可能性を調べるために、ノルアドレナリンをはじめ脳内モノアミン系を賦活すると考えられている、芳香族アミノ酸水酸化酵素の補酵素 6R-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (R-THBP) を用い、(1) R-THBPの末梢投与によって成ネコの視覚野で眼優位分布の変化を誘導できるかどうか、(2) R-THBPの末梢投与によって脳内モノアミンおよびグルタミン酸作動性受容体結合活性にいかなる変化が生じるか、について検討を行った。

#### 実験方法

##### 1. 成ネコの眼優位分布に対するR-THBPの効果

2~3才齢の成ネコを用い、生理食塩水に溶解したR-THBPを4 mg/kg、1日2回、1ヶ月間にわたり経口投与した。R-THBPの投与期間中一側眼瞼を外科的に縫合した。その後、視覚野から細胞外記録を行い、眼優位分布ヒストグラムを作成した。動物にフローセンと笑気の混合麻酔下で気管内挿管術と静脈カニューレ挿入術を施し、脳定位固定装置に装着した。記録中は呼吸を人工的に維持し、sodium pentobarbital (2 mg/kg/h) および gallamine triethiodide (10 mg/kg/h) を持続的に静脈から注入することによって適切な麻酔レベルを保持した。動物の眼前に半透明のスクリーンをおき、その上に刺激となるスリット光を投影した。ガラス微小電極を用いて第一次視覚野内の1つの記録トラック上で約100  $\mu$ mの間隔毎に単一細胞外記録を行い、呈示した刺激に対する反応性に基づき、Hubel and Wiesel の方法 [86] に従って記録細胞を7つのクラスのいずれかに分類しヒストグラムを作製した。

##### 2. ラット脳内モノアミンおよびグルタミン酸作動性受容体結合活性に対するR-THBPの効果

###### 2-1. R-THBPの投与ならびに組織サンプルの調製

動物は7週齢または3週齢の雄性Wistar系ラットを用いた。R-THBPは生理食塩水に溶解し、20 mg/kgを1日2回、1週間または2週間にわたり腹腔内投与を行った。対照

ラットには同量の生理食塩水を腹腔内投与した。ラットは最終投与の4時間後に断頭処置し実験に供した。直ちに脳を取り出し、氷冷下で線条体、大脳皮質前頭部、大脳皮質視覚野、海馬、上丘にそれぞれ取り分け、速やかにドライアイスパウダーで凍結し-80°C下に保存した。

各組織は氷令した10-20倍量の0.32 M シュクロース／10 mM Tris-HCl bufferでホモジネートし、遠心操作によりP<sub>2</sub>分画を得た。ノルアドレナリン作動性受容体結合実験に用いるP<sub>2</sub>分画は50 mM Tris-HCl, pH 7.4で2 mg protein/mlの濃度に調製した。グルタミン酸作動性受容体結合実験に用いるP<sub>2</sub>分画は50 mM Tris-acetate, pH 7.4で2 mg protein/mlの濃度に調製した。セロトニン作動性受容体結合実験に用いるP<sub>2</sub>分画はさらに50 mM Tris-HCl, pH 7.4に懸濁し、内因性のセロトニンを除去する目的で37°C, 10分間のインキュベーションを行い、遠心した。得られた沈渣は [<sup>3</sup>H] ketanserin結合に用いる場合は50 mM Tris-HCl, pH 7.7で2 mg protein/mlの濃度に調製した。

[<sup>3</sup>H] 8-OH-DPAT結合に用いる場合は0.1% アスコルビン酸, 10 μM pargylineおよび4 mM CaCl<sub>2</sub>含有50 mM Tris-HClで2 mg protein/mlの濃度に調製した。

## 2-2. 受容体結合実験

β-AR結合は第一章に準じて行った。

NMDA型グルタミン酸受容体結合はP<sub>2</sub>分画と10 μM グルタミン酸および10 μM グリシン含有50 mM Tris-acetate buffer, pH 7.4で調製した5.0 nM [<sup>3</sup>H] MK-801と25°C, 45分間インキュベーションすることによって標識し、非特異的結合はインキュベーション過程に5.0 μM MK-801を添加して求めた。non-NMDA型グルタミン酸受容体結合は50 mM Tris-acetate bufferで調製した50 nM [<sup>3</sup>H] CNQXと25°C, 45分間インキュベーションすることによって標識し、非特異的結合は50 μM CNQXとのインキュベーションにより求めた。

セロトニン作動性5-HT<sub>1A</sub>受容体に対する結合実験はPeroutkaの方法 [87] に準じて行った。P<sub>2</sub>分画を0.1% アスコルビン酸, 10 μM pargyline, 4 mM CaCl<sub>2</sub>含有50 mM Tris-HClで調製した1.0 nM [<sup>3</sup>H] 8-OH-DPATと25°C, 30分間インキュベーションすることによって標識し、非特異的結合は10 μM 5-HTを添加して求めた。5-HT<sub>2</sub>受容体結合はLeysenらの方法 [88] に準じて行った。すなわち、50 mM Tris-HCl, pH 7.7で調製した2.0 nM [<sup>3</sup>H] ketanserinと25°C, 30分間インキュベーションすることによって標識し、非特異的結合は10 μM ketanserinを添加して求めた。 [<sup>3</sup>H] 8-OH-DPATならびに [<sup>3</sup>H] ketanserinの飽和実験は各々の放射性リガンドを0.05 nM-12.5 nMに調製した条件下で同様に行った。

### 3. セロトニン免疫組織化学

細胞外記録終了後、ネコを経心的に0.1 M PBで脱血し、さらに4% パラフォルムアルデヒドを灌流して固定した。取り出した脳は同固定液で後固定し、次いで10-30% シュクロースに浸漬した。滑走式ミクロトームで厚さ50  $\mu$ mの薄切切片を作製し、浮遊式で免疫組織染色を行った。一次抗体としてラット抗セロトニン抗体 (Biogenesis Ltd.) を用い、Cy3<sup>TM</sup>-conjugated Streptavidin (Jackson Immuno Research Lab. Inc.) によって蛍光標識し共焦点顕微鏡下で観察した。

## 実験結果

### 1. 成ネコの眼優位分布に対するR-THBPの効果

1ヶ月間一側眼瞼縫合のみを行った成ネコの眼優位ヒストグラムをFig. 18Aに示した。以前の報告通り [89,90] 、感受性期を過ぎた成ネコに対して片眼遮蔽を施しても眼優位ヒストグラムの開眼側へのシフトは認められず、両眼性が保たれていることが確認された ( $B=0.72$ )。これに対して、片眼遮蔽期間中にR-THBPを繰り返し末梢投与すると両眼性は著明に低下した ( $B=0.42$ , Fig. 18B)。

### 2. グルタミン酸作動性受容体結合活性

正常ラットでは、 [<sup>3</sup>H] MK-801結合は海馬 ( $603.8 \pm 23.1$  fmol/mg protein) および視覚野 ( $589.0 \pm 31.0$  fmol/mg protein) で非常に高い活性を示し、一方 [<sup>3</sup>H] CNQX 結合も海馬 ( $2.0 \pm 0.2$  pmol/mg protein)、視覚野 ( $1.3 \pm 0.1$  pmol/mg protein) および上丘 ( $1.1 \pm 0.1$  pmol/mg protein) において高い結合活性を示した (Fig. 19A. and 19B)。これに対して1週間のR-THBPの投与は、いずれの部位においても [<sup>3</sup>H] MK-801, [<sup>3</sup>H] CNQXのどちらの結合活性にもほとんど変化を与えたなかった (Fig. 19)。

### 3. $\beta$ -AR結合活性

[<sup>3</sup>H] DHA結合は7週齢の正常ラットにおいては線条体、上丘および視覚野で高い活性を示した (Fig. 20)。R-THBPを1週間にわたり投与したが、いずれの部位においてもほとんど変化は認められなかった (Fig. 20B)。 $\beta$ -AR結合活性については、まだ感受性期内にある3週齢のラットに対するR-THBPの効果についても調べた。その結果、1週間の投与では海馬での有意な減少と上丘での有意な増加を認め、2週間の投与では上丘での有意な減少が認められた (Fig. 20A)。

### 4. セロトニン作動性受容体結合活性

5-HT<sub>1A</sub>受容体に対する [<sup>3</sup>H] 8-OH-DPAT特異的結合の割合は視覚野および海馬では高く、線条体では低かった。正常ラットでは海馬 ( $20.2 \pm 0.3$  fmol/mg protein) お

および視覚野 ( $14.9 \pm 1.8$  fmol/mg protein) で高い結合活性を認めた (Fig. 21A)。R-THBP投与は部位によって方向性の異なる変化を引き起こし、海馬では特異的結合の有意な増加 ( $39.5 \pm 1.0$  fmol/mg protein,  $p < 0.001$ )、一方視覚野では有意な減少 ( $9.2 \pm 0.5$  fmol/mg protein) を示すことが判った。 (Fig. 21A)。その他の部位では著明な変化は認められなかった。

5-HT<sub>2</sub>受容体に対する [<sup>3</sup>H] ketanserin結合の特異性は高い割合を示した。正常ラットでは大脳皮質前頭葉 ( $182.5 \pm 1.9$  fmol/mg protein) と線条体 ( $151.1 \pm 7.5$  fmol/mg protein) に高い結合活性を認め、視覚野と上丘 ( $96.9 \pm 2.3$ ,  $56.4 \pm 1.1$  fmol/mg protein) が次いで高かった。R-THBPの投与によって [<sup>3</sup>H] ketanserin結合は部位によって様々な変化が生じた (Fig. 21B)。線条体 (対照の117%,  $P < 0.05$ ) と海馬 (対照の149%,  $P < 0.01$ ) では有意な増加を示し、それに対して視覚野 (対照の66%,  $P < 0.01$ ) と大脳皮質前頭葉 (対照の93%,  $P < 0.01$ ) では有意な減少を示した。

R-THBPの投与によってセロトニン作動性受容体結合に最も著明な変化が引き起こされたので、さらにその結合特性を詳細に調べるため、海馬と視覚野のP<sub>2</sub>分画を用いて [<sup>3</sup>H] 8-OH-DPATと [<sup>3</sup>H] ketanserinの結合飽和実験を行った。本実験条件下ではScatchard plot解析の結果は両結合とも一相性を示した。正常ラットの [<sup>3</sup>H] 8-OH-DPAT結合のKD, B<sub>max</sub>はそれぞれ、視覚野: KD=0.56 nM, B<sub>max</sub>=59.1 fmol/mg protein; 海馬: KD=1.33 nM, B<sub>max</sub>=282.0 fmol/mg proteinであった。これに対してR-THBP投与群では 視覚野では最大結合数に有意な減少が認められ B<sub>max</sub>=47.9 fmol/mg protein,  $P < 0.01$ )、一方、海馬では結合親和定数が有意に減少した (KD=0.72 nM,  $P < 0.01$ )。 [<sup>3</sup>H] ketanserin結合は正常ラットの場合、視覚野: KD=1.08 nM, B<sub>max</sub>=114.8 fmol/mg protein; 海馬: KD=0.93 nM, B<sub>max</sub>=46.3 fmol/mg proteinであった。R-THBPの投与によって、視覚野ではB<sub>max</sub>値の有意な減少 (対照の14%,  $P < 0.05$ )、海馬では結合親和定数の有意な減少を認めた (対照の34%,  $P < 0.05$ ) (Fig. 22 and Table 4)。

## 5. 成ネコ視覚野におけるセロトニンの免疫組織化学的検討

受容体結合実験より、R-THBPの投与によって5-HT<sub>1A</sub>および5-HT<sub>2</sub>受容体結合活性に最も著しい変化が認められたため、つぎに「R-THBPの末梢投与がセロトニン作動性神経の支配様式にいかなる変化を及ぼすか」について、細胞外記録後のネコ視覚野の薄切切片で抗セロトニン抗体を用いた免疫組織化学的な検討を行った。

片眼遮蔽のみを施した成ネコの視覚野では、大脳皮質表層に免疫陽性線維が多く認められ、深層部では非常に少なかった (Fig. 23A)。これに対して、R-THBPの繰り返し投与は表層部における抗セロトニン抗体免疫陽性線維の密度の増加を誘導する結果が得られた (Fig. 23B)。

## 考 察

R-THBPは芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン）水酸化酵素の補酵素として知られ [91-93] 、生体組織に広範囲に分布し [94] 、生体アミンの生合成の調節に重要な役割を果たしている。また脳室内投与や微小脳透析法を用いた実験によりR-THBPの新たな作用として中枢神経系における神経伝達物質（ドーパミン、セロトニン、ノルアドレナリン、グルタミン酸）遊離の直接的な調節物質としての作用も報告されている [26,27,95] 。さらに、R-THBPの末梢投与によっても線条体においてドーパミン遊離促進作用が認められている [96] 。実際、末梢から投与されたR-THBPは非常に血液-脳関門を通過しにくいが、その約0.4%は通過することが既に報告されている [97,98] 。

本章では、中枢性視覚障害であると考えられる弱視の薬物療法の可能性を探る目的で、まず成ネコの眼優位可塑性に対するR-THBPの効果について電気生理学的に検討を行った。感受性期を過ぎた成ネコでは片眼遮蔽が第一次視覚野ニューロンの眼優位性に影響することはないことが既に報告されているので [89,90] 、遮蔽期間中に同時に薬理学的実験操作を加え眼優位分布を調べることによって可塑性への関与を調べることができる。片眼遮蔽を施しただけの対照ネコに比べ、R-THBP投与ネコの両眼性細胞の割合は著明に減少しており可塑性が増大していることを示す結果が得られた。そこで次に、眼優位可塑性に関与していると考えられるモノアミンならびにセロトニン受容体の結合活性がR-THBPで如何に修飾されるかについて検討を行った。なおR-THBPの末梢投与期間中に、行動学上異常な振る舞いは認められなかった。

ノルアドレナリンおよびグルタミン酸はR-THBPによる遊離促進作用が報告されているが、それぞれの受容体結合活性にはほとんど変化が認められなかった。しかしながら、感受性期内にある3週齢のラットに対しては上丘において $\beta$ -AR結合活性の変化が認められたことから第一、第二章を通じて明らかにしてきたように、 $\beta$ -AR結合活性の調節に感受性期内の中枢性の変化が必要である可能性が示唆される。

それに対して、セロトニン作動性受容体は、5-HT<sub>1A</sub>、5-HT<sub>2</sub>受容体ともに部位によって異なる方向性をもって変化する結果が得られた。P<sub>2</sub>分画とR-THBP (5 nM-500  $\mu$ M) を直接インキュベーションし [<sup>3</sup>H] 8-OH-DPATあるいは [<sup>3</sup>H] ketanserinとの結合活性を見たところ変化が認められないことから、この著明な変化がR-THBPのセロトニン受容体に対する直接作用ではないことは明らかである。

5-HT<sub>1A</sub>は他の神経伝達物質でも認められるようにセロトニン系の情報伝達系を恒常に維持するために、部位特異的なシナプス前部のセロトニン含量の変化に従つて代償的に結合部位が減少・増加することが知られている [99-101] 。本章におい

てR-THBP投与群の視覚野で  $[^3\text{H}]$  8-OH-DPAT結合がdown-regulationを生じる結果を得ているが、この変化は視覚野内のセロトニン含量を反映したものと考えられる。実際、ネコの視覚野で抗セロトニン抗体を用いた免疫組織学的検討によって、R-THBP投与が抗セロトニン抗体免疫陽性線維の増加を誘導する結果が得られている。しかしながら、海馬で特異的にセロトニン含量が減少しているかどうかは今のところ明らかではないので、海馬での  $[^3\text{H}]$  8-OH-DPAT結合の増加が代償作用かどうかは不明である。

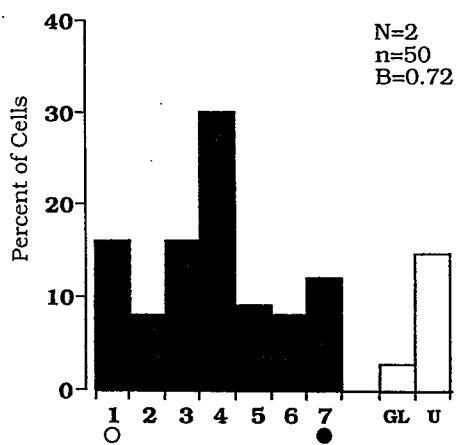
5-HT<sub>1A</sub>に対して5-HT<sub>2</sub>受容体の調節は必ずしもシナプス前部の活性を反映しているとは限らないということが報告されており [102,103] 、他の神経伝達物質系との相互作用が非常に重要であるという可能性が示唆されている [104-107] 。たとえば、6-OHDAによってドーパミンを枯渇させると線条体の5-HT<sub>2</sub>受容体の結合活性とmRNAの発現の増加が認められる [107] 。本章においてR-THBPが各々の部位の5-HT<sub>2</sub>受容体結合活性に対して多様な変化を引き起こすことを明らかにした。これはR-THBPによって様々な神経伝達物質の遊離が促され、5-HT<sub>2</sub>受容体が各々の部位でセロトニン系を含む他の神経伝達物質系との複雑な相互作用の中で調節を受けたために生じたものと考えられる。

R-THBPはモノアミン神経系の障害によって引き起こされると考えられている精神神経疾患に有効であることが報告されている [108-111] 。R-THBPによるこの改善効果はおそらく様々な神経伝達物質の生合成および遊離を活性化したことによるものと思われる。片眼剥奪による眼優位可塑性にノルアドレナリン系が関与していると考えられることから、R-THBPをはじめとした薬物による弱視の治療効果が期待される。本章では正常動物におけるR-THBPの影響を検討するに留まったが、疾患モデルとして開発された片眼剥奪動物に対するR-THBPの効果も検討する必要があると思われる。

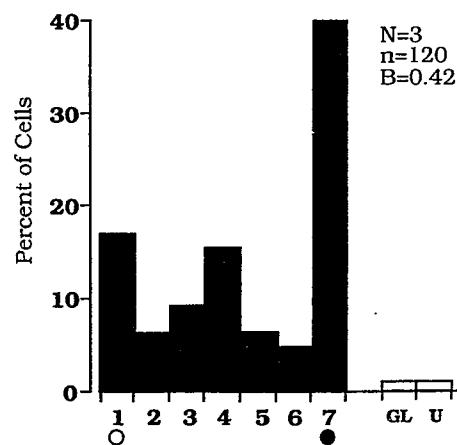
## 小 括

1. R-THBPの繰り返し末梢投与によって成ネコ第一次視覚野ニューロンの両眼性細胞の割合が著しく減少することを示した。
2. R-THBPの末梢投与による脳内モノアミン作動性およびグルタミン酸作動性受容体結合活性の変化について検討を行った。 $\beta$ -ARおよびNMDA型, non-NMDA型グルタミン酸作動性受容体結合活性に対して1週間のR-THBP投与は有意な変化を引き起こさないことを明らかにした。
3. R-THBPの末梢投与により、5-HT<sub>1A</sub>および5-HT<sub>2</sub>セロトニン作動性受容体結合活性に多様な変化が生じることが明らかになった。
4. 海馬と大脳皮質視覚野の [<sup>3</sup>H] 8-OH-DPATおよび [<sup>3</sup>H] ketanserin結合の Scatchard plot解析を行ったところ、R-THBPにより海馬では両リガンドのKD値が減少し、一方、視覚野ではB<sub>max</sub>が有意に減少することが明らかになった。
5. 成ネコ第一次視覚野におけるセロトニン抗体免疫陽性線維はR-THBPによって増加することが明らかになった。

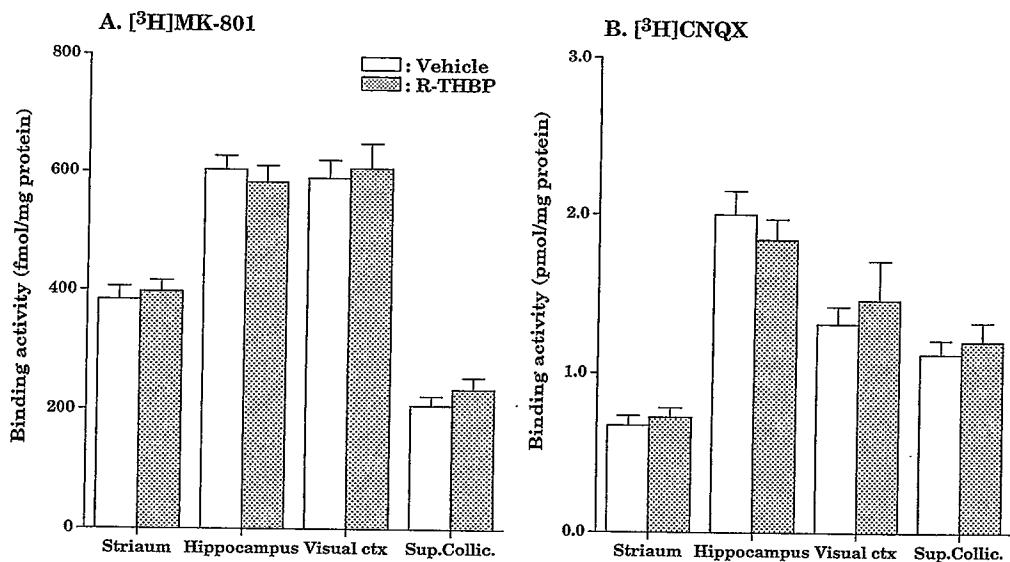
A. Control



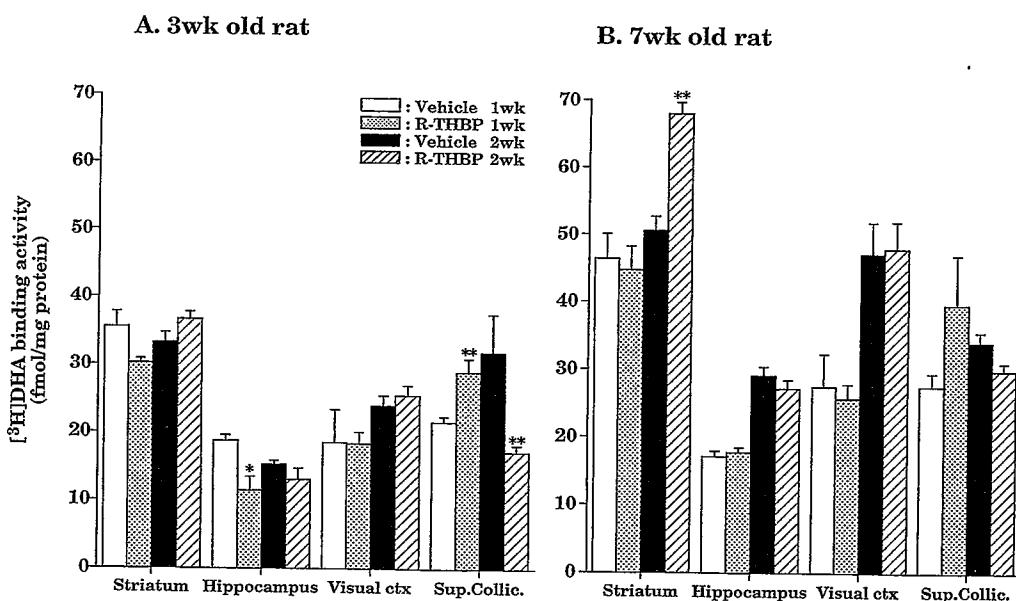
B. R-THBP



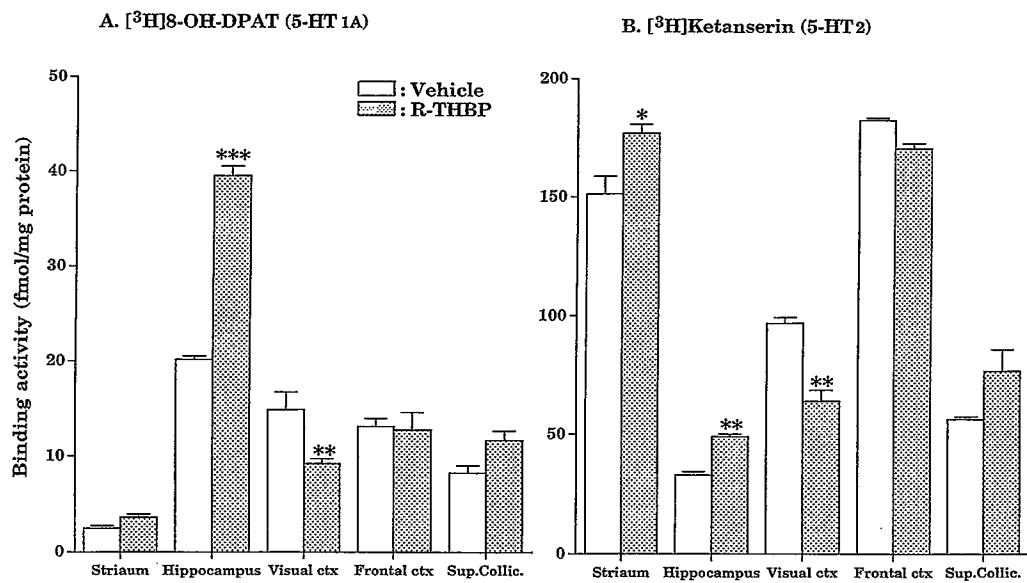
**Fig. 18.** R-THBP-induced changes in ocular dominance following 1 month of monocular deprivation in the cat. Ocular dominance of a given cell was determined according to the 7-group classification of Hubel and Wiesel [86]. GL and U indicate unit activity of LGN axons and visually unresponsive units, respectively. N, number of cats examined; n, number of visually active cells. Filled circles and open circles indicate the closed and exposed eye, respectively.



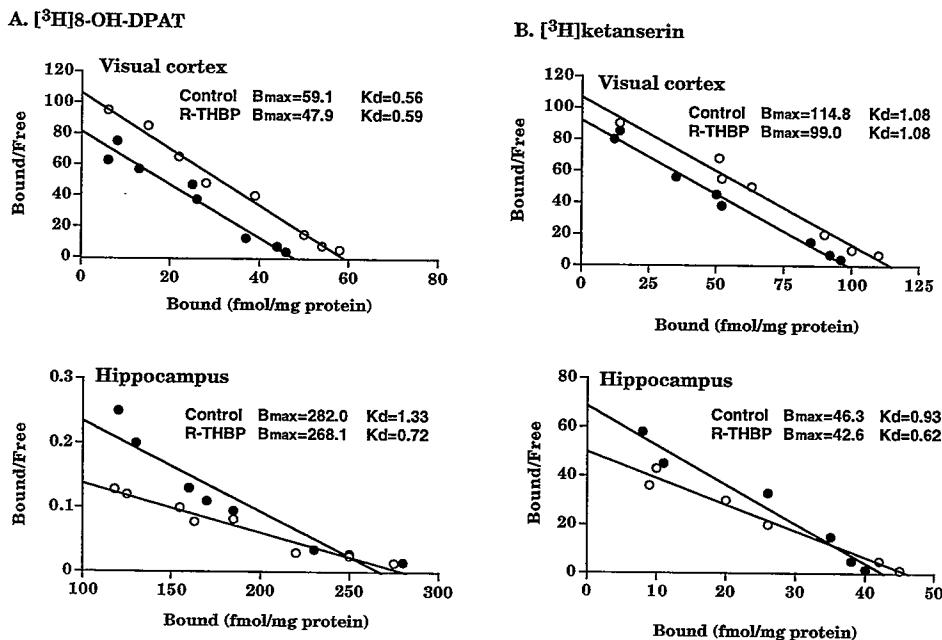
**Fig. 19.** Effect of peripherally administered R-THBP (1 week) on  $[^3\text{H}]$ MK-801 (A) and  $[^3\text{H}]$ CNQX binding in the rat brain. Open columns indicate the data obtained from control rats, and hatched columns from the rats administered R-THBP intraperitoneally (20 mg/kg, twice a day) for 1 week. Each assay was performed in triplicate. The data are presented in terms of fmol/mg protein and each value is the mean  $\pm$  S.E.M.



**Fig. 20.** Effect of peripherally administered R-THBP on  $[^3\text{H}]$ DHA binding in the rat brain. R-THBP was administered for 1 or 2 weeks from 3 weeks-old (A) and 7 weeks-old (B) rats. The data are presented in terms of fmol/mg protein and each value is the mean  $\pm$  S.E.M. \* p<0.05, \*\* p<0.01, (Student's t-test) vs. control.



**Fig. 21.** Effect of peripherally administered R-THBP (1 week) on  $[^3\text{H}]8\text{-OH-DPAT}$  (A) and  $[^3\text{H}]$ ketanserin (B) binding in the rat brain. Conventions are the same as those in Fig. 19. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$  (Student's t-test).

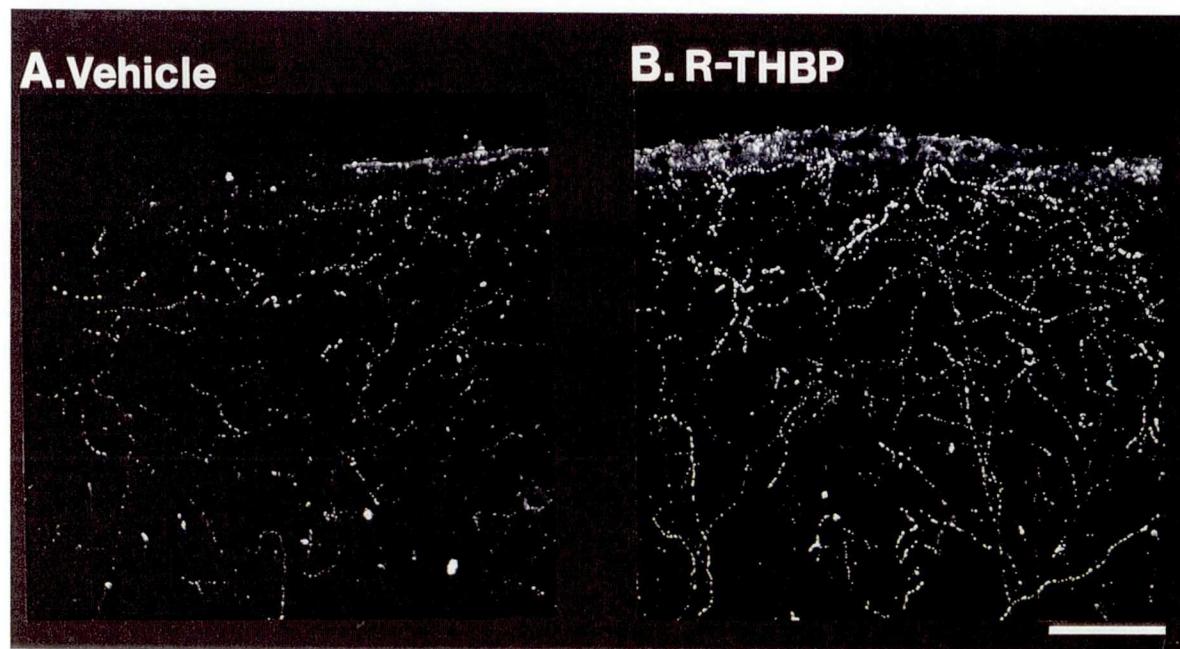


**Fig. 22.** Scatchard plots showing the effect of administration of R-THBP on  $[^3\text{H}]8\text{-OH-DPAT}$  (A) and  $[^3\text{H}]$ ketanserin (B) binding experiments. The Scatchard plot analyses were performed in the concentration range 0.05-12.5 nM  $[^3\text{H}]8\text{-OH-DPAT}$  and  $[^3\text{H}]$ ketanserin to visual cortex and hippocampus. ○, samples from the control rats; ●, samples from the rats administered R-THBP for 1 week. The values in the inlet indicate the mean value.

**Table 4.** Summary of Scatchard plot analysis of [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT and [<sup>3</sup>H]ketanserin binding in the visual cortex and hippocampus

	[ <sup>3</sup> H]8-OH-DPAT		[ <sup>3</sup> H]ketanserin	
	KD (nM)	B <sub>max</sub> (fmol/mg protein)	KD (nM)	B <sub>max</sub> (fmol/mg protein)
Control	Visual cortex	0.56 ± 0.04	59.1 ± 3.2	1.08 ± 0.09
	Hippocampus	1.33 ± 0.12	282.0 ± 21.4	0.93 ± 0.09
R-THBP	Visual cortex	0.59 ± 0.05	47.9 ± 4.3*	1.08 ± 0.11
	Hippocampus	0.72 ± 0.04**	268.1 ± 22.3	0.62 ± 0.05**

\* P<0.05, \*\* P< 0.01: significantly different from the control value.



**Fig. 23.** Photomicrographs of serotonin immunopositive fibers in the cat visual cortex. Samples were obtained from the control cat (A) and the cat administered R-THBP (B). Scale bar=100  $\mu$ m.

## 総 括

本研究は、中枢性視覚障害と考えられている弱視の薬物治療の可能性を探ることを目的として、片眼剥奪を主とする視覚系神経活動の変化に伴った脳内  $\beta$ -アドレナリン作動性受容体 ( $\beta$ -AR) 、ならびに視覚情報の伝達物質であるグルタミン酸の受容体結合活性の変化を検討したものである。

先ずはじめに、仔ネコの一側眼瞼縫合による脳内  $\beta$ -AR結合活性の変化について、P<sub>2</sub>分画および *in vitro* オートラジオグラフィーで検討した。正常成ネコの大脳皮質では  $\beta$ -ARが後頭葉で非常に高い結合活性を示すことを明らかにした。このことは、これまでに生化学的・免疫組織化学的検討によって前頭葉に比べて後頭葉で低いと報告されているノルアドレナリン作動性神経の投射様式 [24,31,32] を反映している可能性を示唆している。生後4週目から6ヶ月間に渡る長期片眼遮蔽は両側の大脳皮質視覚野および外側膝状体における  $\beta$ -AR結合活性を有意に減少させ、Scatchard plot解析の結果よりこの減少が結合親和性の低下ではなく最大結合数の減少に依るものであることも明らかにした。またこのとき別のタイプのアドレナリン作動性受容体である  $\alpha_2$ -ARでは変化が生じないことが明らかとなった。

さらに、遮蔽期間の長さおよび遮蔽開始の時期と  $\beta$ -AR結合活性の変化について、あるいは視覚野以外の視覚系構造 (LGN, 上丘) における変化についてより詳細に調べるために実験動物としてラットを用い、*in vitro* オートラジオグラフィーによる検討を行った。ノルアドレナリン作動性受容体として  $\beta$ -AR,  $\alpha_2$ -AR、およびグルタミン酸作動性受容体として NMDA, non-NMDA受容体についてそれぞれ結合活性を調べたが、片眼摘出によって最も著明な変化を示したのは  $\beta$ -AR結合であった。眼球摘出を受けた側に対して対側の上丘ならびに LGN で有意な結合活性の減少を認めたが、この変化は生後発達初期の感受性期内に行われた片眼摘出によってのみ引き起こされることが明らかとなった。感受性期内に行われた一側性視覚野除去や、網膜由来の神経回路網の再構築を促す生後間もない片眼摘出では変化を生じない。従って、視覚情報処理様式の違いから動物種によって異なる可能性はあるものの、感受性期内の網膜由来の視覚入力が中枢視覚伝導路における  $\beta$ -AR結合活性の調節に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

ネコ視覚野内の  $\beta$ -AR総数の発達曲線が感受性期に対応して一過性のピークを示すこと [24,25] 、NAの前駆アミノ酸の経口投与によって可塑性のレベルが極端に低下していると考えられる成ネコに対しても眼優位分布の変化を惹起することができる [23] ことからも、NA- $\beta$ -AR系の重要性は明らかである。本研究で見出した長期間の片眼遮蔽による  $\beta$ -AR結合活性のdown-regulationは、弱視の薬物療法を考える上では新たな問題を提起することも予想されるが、NA- $\beta$ -AR系の賦活を標的とし

た薬物療法は弱視はもとより、一度は失われた機能を再び取り戻すという可塑性の惹起に対しては大いなる可能性を秘めていると思われる。今後、R-THBPをはじめとしたNA- $\beta$ -AR系の賦活による、可塑性研究の発展が期待されるところである。

## 結 論

1. ネコ大脳皮質視覚野の  $\beta$ -AR結合活性が感受性期を通して行われた長期片眼遮蔽によって有意に減少することを示した。
2. ラットにおける片眼剥奪によって対側の上丘およびLGNの  $\beta$ -AR結合活性が有意に減少することを示した。また長期片眼剥奪により、  $\beta$ -AR結合活性だけではなくノルアドレナリン作動性神経線維の投射様式にも補償的な変化が生じることを示した。
3. R-THBPの末梢投与によって成ネコ視覚野に可塑的変化を誘導できることを示した。

## 謝　　辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました、大阪大学薬学部教授、馬場明道博士に心より厚く御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、多くの御指導、御助言を頂きました大阪バイオサイエンス研究所神経科学部門部長、渡辺恭良博士、同副部長、今村一之博士に深く感謝致します。

## 引用文献

- 1) Wiesel T.N. and Hubel D.H. (1963) Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *J Neurophysiol.* **26**, 1003-1017.
- 2) Wiesel T.N. and Hubel D.H. (1965) Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kitten. *J. Neurophysiol.* **28**, 1029-1040.
- 3) Kasamatsu T. and Pettigrew J.D. (1976) Depletion of brain catecholamines: Failure of ocular dominance shift after monocular occlusion in kittens. *Science* **194**, 206-209..
- 4) Kasamatsu T., Pettigrew J.D., and Ary M. (1979) Restoration of visual cortical plasticity by local microperfusion of norepinephrine. *J. Comp. Neurol.* **185**, 163-182.
- 5) Pettigrew J.D. and Kasamatsu T. (1978) Local perfusion of noradrenaline maintains visual cortical plasticity. *Nature* **271**, 761-763.
- 6) Duffy F.H., Snodgrass S.R., Burchfiel J.L., and Conway J.L. (1976) Bicuculline reversal of deprivation amblyopia in the cat. *Nature* **260**, 256-257.
- 7) Ramoa A.S., Paradiso M.A., and Freeman R.D. (1988) Blockade of intracortical inhibition in kitten striate cortex: Effects on receptive field properties and associated loss of ocular dominance plasticity. *Exp. Brain Res.* **73**, 285-296.
- 8) Shaw C. and Cynader M.S. (1988) Unilateral eyelid suture increases GABA<sub>A</sub> receptors in cat visual cortex. *Dev. Brain Res.* **40**, 148-153.
- 9) Bear M.F. and Singer W. (1986) Modulation of visual cortical plasticity by acetylcholine and noradrenaline. *Nature* **320**, 172-176.
- 10) Gu Q. and Singer W. (1993) Effects of intracortical infusion of anticholinergic drugs on neuronal plasticity in kitten striate cortex. *Eur. J. Neurosci.* **5**, 475-485.
- 11) Imamura K. and Kasamatsu T. (1989) Interaction of noradrenergic and cholinergic systems in regulation of ocular dominance plasticity. *Neurosci. Res.* **6**, 519-536.
- 12) Dyck R.H. and Cynader M.S. (1993) Autoradiographic localization of serotonin receptor subtypes in cat visual cortex: Transient regional, laminar, and columnar distributions during postnatal development. *J. Neurosci.* **13**, 4316-4338.
- 13) Gu Q. and Singer W. (1995) Involvement of serotonin in developmental plasticity in kitten visual cortex. *Eur. J. Neurosci.* **7**, 1146-1153.

- 14) Bear M.F., Kleinschmidt A., Gu Q., and Singer W. (1990) Disruption of experience-dependent synaptic modifications in striate cortex by infusion of NMDA receptor antagonist. *J. Neurosci.* **10**, 909-925.
- 15) Kleinschmidt A., Bear M.F., and Singer W. (1987) Blockade of 'NMDA' receptors disrupts experience-dependent plasticity in kitten striate cortex. *Science* **238**, 355-358.
- 16) Bear M.F., Paradiso M.A., Schwartz M., Nelson S.B., Carnes K.M., and Daniels J.D. (1983) Two methods of catecholamine depletion in kitten visual cortex yield different effects on plasticity. *Nature* **302**, 245-247.
- 17) Daw, N.W., Rader R.K., Robertson T.W., and Ariel M. (1983) Effects of 6-hydroxydopamine on visual deprivation in kitten striate cortex. *J. Neurosci.* **3**, 907-914.
- 18) Paradiso M.A., Bear M.F., Daniels J.D. (1983) Effects of intracortical infusion of 6-hydroxydopamine on the responses of kitten visual cortex to monocular deprivation. *Exp. Brain Res.* **51**, 413-422.
- 19) Shirokawa T. and Kasamatsu T. (1986) Concentration-dependent suppression by  $\beta$ -adrenergic antagonists of the shift in ocular dominance following monocular deprivation in kitten visual cortex. *Neuroscience* **18**, 1035-1046.
- 20) Heggelund P., Imamura K., and Kasamatsu T. (1987) Reduced binocularity in the noradrenaline-infused striate cortex of acutely anesthetized and paralyzed, otherwise normal cats. *Exp. Brain Res.* **68**, 593-605.
- 21) Mataga N., Imamura K., and Watanabe Y. (1992) L-threo-3,4-Dihydroxyphenylserine enhanced ocular dominance plasticity in adult cats. *Neurosci. Lett.* **142**, 115-118.
- 22) Kasamatsu T. (1980) A possible role for cyclic nucleotide in plasticity of visual cortex. *Soc. Neurosci. Abstr.* **6**, 494.
- 23) Kasamatsu T. (1982) A role of the central norepinephrine system in regulation of neuronal plasticity in cat visual cortex. in *Neurotransmitters in the Retina and the Visual Centers*. (Kaneko A., Tsukahara N., and Uchizono K. eds.) pp. 87-93. Biomed. Res. Foundation. Tokyo.
- 24) Jonsson G. and Kasamatsu T. (1983) Maturation of monoamine neurotransmitters and receptors in cat occipital cortex during postnatal critical period. *Exp Brain Res.* **50**, 449-458.
- 25) Shaw C., Needler M.C., Wilkinson M., Aoki C., and Cynader M. (1985) Modification of neurotransmitter receptor sensitivity in cat visual cortex during the critical period. *Dev. Brain Res.* **22**, 67-73.

- 26) Koshimura K., Miwa S., Lee K., Fujiwara M., and Watanabe Y. (1990) Enhancement of dopamine release in vivo from the rat striatum by dialytic perfusion of 6R-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin. *J. Neurochem.* **54**, 1391-1397.
- 27) Mataga N., Imamura K., and Watanabe Y. (1991) 6R-tetrahydrobiopterin perfusion enhances dopamine, serotonin, and glutamate outputs in dialysate from rat striatum and frontal cortex. *Brain Res.* **551**, 64-71.
- 28) Kasamatsu T. and Shirokawa T. (1985) Involvement of  $\beta$ -adrenoreceptors in the shift of ocular dominance after monocular deprivation. *Exp. Brain Res.* **59**, 507-514.
- 29) Bylund D.B. and Snyder S.H. (1976) Beta adrenergic receptor binding in membrane preparations from mammalian brain. *Mol. Pharmacol.* **12**, 568-580.
- 30) Parkinson D., Coscia E., and Daw N.W. (1988) Identification and localization of adrenergic receptors in cat visual cortex. *Brain Res.* **457**, 70-78.
- 31) Brown R.M., Crane A.M., and Goldman P.S. (1979) Regional distribution of monoamines in the cerebral cortex and subcortical structures of the rhesus monkey: concentrations and in vivo synthesis rates. *Brain Res.* **168**, 133-150.
- 32) Brown R.M. and Goldman P.S. (1977) Catecholamines in neocortex of rhesus monkeys: regional distribution and ontogenetic development. *Brain Res.* **124**, 576-580.
- 33) Morrison J.H. and Magistretti P.J. (1983) Monoamines and peptides in cerebral cortex: Contrasting principles of cortical organization. *Trends in Neurosci.* **6**, 146-151.
- 34) Foote S.L. and Morrison J.H. (1987) Development of the noradrenergic, serotonergic, and dopaminergic innervation of neocortex. *in Current Topics In Developmental Biology*. Vol. 21, (Moscona A.A. and Monroy A eds.) pp. 391-423. Academic Press, Inc. San Diego.
- 35) Jonsson G. and Hallman H. (1978) Changes in  $\beta$ -receptor binding sites in rat brain after neonatal 6-hydroxydopamine treatment. *Neurosci. Lett.* **9**, 27-32.
- 36) Itakura T., Kasamatsu T., and Pettigrew J.D. (1981) Norepinephrine-containing terminals in kitten visual cortex. *Neuroscience* **6**, 159-175.
- 37) Nakai K., Jonsson G., and Kasamatsu T. (1987) Norepinephrinergic reinnervation of cat occipital cortex following localized lesions with 6-hydroxydopamine. *Neurosci. Res.* **4**, 433-454.

- 38) Liu Y., Jia W., Strosberg A.D., and Cynader M. (1993) Development and regulation of  $\beta$ -adrenergic receptors in kitten visual cortex: an immunocytochemical and autoradiographic study. *Brain Res.* **632**, 274-286.
- 39) Wilkinson M., Shaw C., Khan I., and Cynader M.S. (1983) Ontogenesis of  $\beta$ -adrenergic binding sites in kitten visual cortex and the effects of visual deprivation. *Dev. Brain Res.* **7**, 349-352.
- 40) Shaw C. and Cynader M. (1984) Disruption of cortical activity prevents ocular dominance changes in monocularly deprived kittens. *Nature* **308**, 731-734.
- 41) Mahan L.C., Makernan R.M., and Insel P.A. (1987) Metabolism of alpha- and beta-adrenergic receptors in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **27**, 215-235.
- 42) Aoki C., Kaufman D., and Rainbow T.C. (1986) The ontogeny of the laminar distribution of  $\beta$ -adrenergic receptors in the visual cortex of cats, normally reared and dark-reared. *Dev. Brain Res.* **27**, 109-116.
- 43) Shirokawa T., Kasamatsu T., Kupperman B.D., and Ramachandran V.S. (1989) Noradrenergic control of ocular dominance plasticity in the visual cortex of dark-reared cats. *Dev. Brain Res.* **47**, 303-308.
- 44) Jia W.W.-G., Liu Y., Lepore F., Ptito M., and Cynader M.S. (1994) Development and regulation of alpha adrenoceptors in kitten visual cortex. *Neuroscience* **63**, 179-190.
- 45) Parnavas J.G., Burne R.A., and Lin C.-S. (1981) Receptive field properties of neurons in the visual cortex of the rat. *Neurosci. Lett.* **27**, 291-296.
- 46) Maffei L., Berardi N., Domenici L., Parisi V., and Pizzorusso T. (1992) Nerve growth factor (NGF) prevents the shift in ocular dominance distribution of visual cortical neurons in monocularly deprived rats. *J. Neurosci.* **12**, 4651-4662.
- 47) Berardi N., Domenici L., Parisi V., Pizzorusso T., Cellerino A., and Maffei L. (1993) Monocular deprivation effects in the rat visual cortex and lateral geniculate nucleus are prevented by nerve growth factor (NGF). I. visual cortex. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **251**, 17-23.
- 48) Fagiolini M., Pizzorusso T., Berardi N., Domenici L., and Maffei L. (1994) Functional postnatal development of the rat primary visual cortex and the role of visual experience: Dark rearing and monocular deprivation. *Vis. Res.* **34**, 709-720.
- 49) Paxinos G. and Watson C. (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego.

- 50) Sakurai S.Y., Cha J.H.-J., Penny J.B., and Young A.B. (1991) Regional distribution and properties of [<sup>3</sup>H]MK-801 binding sites determined by quantitative autoradiography in rat brain.. *Neuroscience* **40**, 533-543.
- 51) Nielsen E., Drejer J., Cha J.H.-J., Young A.B., and Honoré T. (1990) Autoradiographic characterization and localization of quisqualate binding sites in rat brain using the antagonist [<sup>3</sup>H]6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione: Comparison with (R,S)-[<sup>3</sup>H]-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoazasolepropionic acid binding sites. *J. Neurochem.* **54**, 686-695.
- 52) Itaya S.K. (1989) Enucleation-induced transsynaptic labeling with WGA-HRP in the developing rat visual system. *Dev. Brain Res.* **50**, 161-167.
- 53) Tseng Y.L., Tovar K., and Gordon B. (1995) Transneuronal WGA-HRP: can it demonstrate development of ocular dominance patches and effects of monocular deprivation? *J. Neurosci. Method.* **61**, 119-126.
- 54) Mesulam M.M. (1982) Principles of horseradish peroxidase neurochemistry and their applications for tracing neural pathways, axonal transport, enzyme histochemistry and light microscopic analysis. *in Tracing Neural Connections with Horseradish Peroxidase*. (Mesulam M.M ed.) pp. 123-131. Wiley, New York.
- 55) Laemle L.K. and Labriola A.R. (1982) Retinocollicular projections in the neonatal rat: an anatomical basis for plasticity. *Dev. Brain Res.* **3**, 317-322.
- 56) Takeuchi H., Fukuda Y., Hara Y., and Hisao C.-F. (1982) Physiological properties of expanded ipsilateral retinocollicular projection in neonatally enucleated albino rats. *Brain Res.* **231**, 191-196.
- 57) Jeffery G. (1984) Retinal ganglion cell death and terminal field retraction in the developing rodent visual system. *Dev. Brain Res.* **13**, 81-96.
- 58) Insausti R., Blakemore C., and Cowan W.M (1984) Ganglion cell death during development of ipsilateral retino-collicular projection in golden hamster. *Nature* **308**, 362-365.
- 59) Kvæle I. and Fonnum F. (1983) The effects of unilateral neonatal removal of visual cortex transmitter parameters in the superior colliculus and lateral geniculate body. *Dev. Brain Res.* **11**, 261-266.
- 60) Kvæle I., Fosse V.M., and Fonnum F. (1983) Development of neurotransmitter parameters in lateral geniculate body, superior colliculus and visual cortex of the albino rat. *Dev. Brain Res.* **7**, 137-145.
- 61) Lund Karlsen R. and Fonnum F. (1978) Evidence for glutamate as a neurotransmitter in the corticofugal fibres to the dorsal lateral geniculate body and the superior colliculus in rats. *Brain Res.* **151**, 457-467.

- 62) Sakurai T., Miyamoto T., and Okada Y. (1990) Reduction of glutamate content in rat superior colliculus after retino-tectal denervation. *Neurosci. Lett.* **109**, 299-303.
- 63) Schliebs R., Kullmann E., and Bigl V. (1986) Development of glutamate binding sites in the visual structures of the rat brain. Effect of visual pattern deprivation. *Biomed. Biochim. Acta* **45**, 495-506.
- 64) Kumar A., Schliebs R., and Bigl V. (1994) Postnatal development of NMDA, AMPA and Kainate receptors in individual layers of rat visual cortex and the effect of monocular deprivation. *Int. J. Dev. Neurosci.* **12**, 31-41.
- 65) Fifková E. (1970) The effect of unilateral deprivation on visual centers in rats. *J. Comp. Neurol.* **140**, 431-438.
- 66) Rothblat L.A. Schwartz M.L. (1979) The effect of monocular deprivation on dendritic spines in visual cortex of young and adult albino rats: evidence for a sensitive period. *Brain Res.* **161**, 156-161.
- 67) Czepita D. and Daw N. (1996) The contribution of NMDA receptors to the visual responses in animals that have been partially monocularly deprived. *Brain Res.* **728**, 7-12.
- 68) Kiyosawa M., Dauphin F., Kawasaki T., Rioux P., Tokoro T., MacKenzie E.T., and Baron J.C. (1996) Unilateral eyeball enucleation differentially alters AMPA-, NMDA- and kainate glutamate receptor binding in the newborn rat brain. *Neurosci. Res.* **26**, 215-224.
- 69) Reynolds I.J., Murphy S.N. and Miller R.J. (1987) <sup>3</sup>H-labeled MK-801 binding to the excitatory amino acid receptor complex from rat brain is enhanced by glycine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7744-7748.
- 70) Sefton A.J. and Dreher B. (1995) Visual system. in *The Rat Nervous System*. (Paxinos G. ed.) pp. 833-898. Academic Press. New York.
- 71) Toga A.W. and Collins R.C. (1981) Metabolic responses of optic centers to visual stimuli in the albino rat: anatomical and physiological considerations. *J. Comp. Neurol.* **199**, 443-464.
- 72) Aurich M. and Bigl V. (1988) A critical period of the development of  $\beta$ -adrenergic receptor binding in the visual system of rat during visual deprivation. *Int. J. Dev. Neurosci.* **6**, 351-357.
- 73) Stevenson J.A. and Lund R.D. (1982) Alteration of the crossed parabigeminotectal projection induced by neonatal eye removal in rats. *J. Comp. Neurol.* **207**, 191-202.
- 74) Wree A., Kulig G., Gutmann P., Zilles K. (1985) Modification of callosal afferents of the primary visual cortex ipsilateral to the remaining eye in rats monocularly enucleated at different stages of ontogeny. *Cell Tissue Res.* **242**, 433-436.

- 75) Wree A., Angenendt H.-W., Zilles K. (1986) The size of the zone of origine of callosal afferents projecting to the primary visual cortex contralateral to the remaining eye in rats monocularly enucleated at different postnatal ages. *Anat. Embryol.* **174**, 91-96.
- 76) Land P.W. and Lund R.D. (1979) Development of the rat's uncrossed retinotectal pathway and its relation to plasticity studies. *Science* **205**, 698-700.
- 77) Martin P.R., Sefton A.J., and Dreher B. (1983) The retinal location and fate of ganglion cells which project to the ipsilateral superior colliculus in neonatal albino and hooded rats. *Neurosci. Lett.* **41**, 219-226.
- 78) Thong I.G. and Dreher B. (1986) The development of the corticotectal pathway in the albino rat. *Dev. Brain Res.* **25**, 227-238.
- 79) Lund R.D. (1969) Synaptic patterns of the superficial layers of the superior colliculus of the rat. *J. Comp. Neurol.* **135**, 179-208.
- 80) Mize R.R. (1983) Patterns of convergence and divergence of retinal and cortical synaptic terminal in the cat superior colliculus. *Exp. Brain Res.* **51**, 88-96.
- 81) Sakurai T. and Okada Y. (1992) Selective reduction of glutamate in the rat superior colliculus and dorsal lateral geniculate nucleus after contralateral enucleation. *Brain Res.* **573**, 197-203.
- 82) Mustari M.J. and Lund R.D. (1976) An aberrant crossed visual corticotectal pathway in albino rats. *Brain Res.* **112**, 37-44.
- 83) Binns K.E. and Salt T.E. (1996) Corticofugal influences on visual responses in cat superior colliculus: The role of NMDA receptors. *Vis. Neurosci.* **13**, 683-694.
- 84) Thornton S.K., Withington D.J., McCrossan D., and Ingham N.J. (1996) The effect of dark-rearing, strobe-rearing and acute visual cortex removal on the visual responses in the superficial superior colliculus of the guinea-pig. *Neurosci. Lett.* **213**, 216-220.
- 85) Hirai H. and Okada Y. (1993) Ipsilateral corticotectal pathway inhibits the formation of long-term potentiation (LTP) in the rat superior colliculus through GABAergic mechanism. *Brain Res.* **629**, 23-30.
- 86) Hubel D.H. and Wiesel T.N. (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J. Physiol.* **160**, 106-154.
- 87) Peroutka S.J. (1986) Pharmacological differentiation and characterization of 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, and 5-HT<sub>1C</sub> binding sites in rat frontal cortex. *J. Neurochem.* **47**, 529-540.

- 88) Leysen J.E., Niemegeers C.J.E., Van Nueten J.M., and Laduron P.M. (1982) [<sup>3</sup>H]Ketanserin (R 41 468), a selective <sup>3</sup>H-ligand for serotonin<sub>2</sub> receptor binding sites. *Mol. Pharmacol.* **21**, 301-314.
- 89) Hubel D.H. and Wiesel T.N. (1970) The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J. Physiol.* **206**, 419-436.
- 90) Daw N.W., Fox K., Sato H., and Czepita D. (1992) Critical period for monocular deprivation in the cat visual cortex. *J. Neurophysiol.* **67**, 197-202.
- 91) Kaufman S. (1963) The structure of the phenylalanine-hydroxylation cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 1085-1093.
- 92) Nagatsu T., Levitt M., and Udenfriend S. (1964) Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **239**, 2910-2917.
- 93) Lovenberg W., Jequier E., and Sjoerdsma A. (1967) Tryptophane hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science* **155**, 217-219.
- 94) Fukushima T. and Nixon J.C. (1980) Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids. *Anal. Biochem.* **102**, 176-188
- 95) Miwa S., Watanabe Y., and Hayaishi O. (1985) 6R-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin as a regulator of dopamine and serotonin biosynthesis on the rat brain. *Arch. Biochem. Biophys.* **239**, 234-241.
- 96) Tani Y., Mataga N., Ishihara T., Kanai T., Watanabe Y., and Noguchi T. (1992) Intracellular content of 6R-tetrahydrobiopterin may regulate dopamine release from rat striatum. *in Neurobiology of Infantile Autism.* (Naruse H. and Ornitz E.M. eds.) pp. 335-336. Elsevier, Amsterdam.
- 97) Kapatos G. and Kaufman S. (1981) Peripherally administered reduced pterins do enter the brain. *Science* **212**, 955-956.
- 98) Levine R.A., Zoephel G.P., Niederwiser A., and Curtius H.-C. (1987) Entrance of tetrahydrobiopterin derivatives in brain after peripheral administration: effect on biogenic amine metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **242**, 514-522.
- 99) Nelson D.L., Herbet A., Bourgoin S., Glowinski J., and Hamon M. (1978) Characteristics of central 5-HT receptors and their adaptive changes following intracerebral 5,7-dihydroxytryptamine administration in the rat. *Mol. Pharmacol.* **14**, 983-995.
- 100) Savage D.D., Mendels J., and Frazer A. (1980) Monoamine oxidase inhibitors and serotonin uptake inhibitors: Differential effects on [<sup>3</sup>H]serotonin binding sites in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **212**, 259-263.

- 101) Hotta I. and Yamawaki S. (1988) Possible involvement of presynaptic 5-HT autoreceptors in effect of lithium on 5-HT release in hippocampus of rat. *Neuropharmacol.* **27**, 987-992.
- 102) Pandey S.C., Davis J.M., and Pandey G.N. (1995) Phosphoinositide system-linked serotonin receptor subtypes and their pharmacological properties and clinical correlates. *J. Psychiatry. Neurosci.* **20**, 215-225.
- 103) Leysen J.E., Van Gompel P., Gommeren W., Woestenborghs R., and Janssen P.A.J. (1986) Down regulation of serotonin-S2 receptor sites in rat brain by chronic treatment with the serotonin-S2 antagonists: ritanserin and setoperone. *Psychopharmacol.* **88**, 434-444.
- 104) Green A.R. (1987) Evolving concepts on the interactions between antidepressant treatments and monoamine neurotransmitters. *Neuropharmacol.* **26**, 815-822.
- 105) Grahame-Smith D.G. (1988) Neuropharmacological adaptive effects in the actions of antidepressant drugs, ECT and lithium. *in New Concepts in Depression.* (Briley M. and Fillion G. eds.) pp. 1-14. Macmillan Press, London.
- 106) Molliver M.A. (1987) Serotonergic neural systems: what their anatomic organization tells us about function. *J. Clin Psychopharmacol.* **7**, 3S-23S.
- 107) Laprade N., Radja F., Reader T.A., and Soghomonian J.-J. (1996) Dopamine receptor agonists regulate levels of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor and its mRNA in a subpopulation of rat striatal neurons. *J. Neurosci.* **16**, 3727-3736.
- 108) Narabayashi H., Kondo T., Nagatsu T., Sugimoto T., and Matsuura S. (1982) Tetrahydrobiopterin administration for Parkinsonian symptoms. *Proc. Japan Acad.* **58**, 283-287.
- 109) Curtius H.-Ch., Niederwiser A., Levin R.A., Lovenberg W., Woggon B., and Angest J. (1983) Successful treatment of depression with tetrahydrobiopterin. *Lancet* **i**, 657-658.
- 110) Curtius H.-Ch., Niederwiser A., Levin R.A., and Mulder H. (1984) Therapeutic efficacy of tetrahydrobiopterin in Parkinson's disease. *in Advances in Neurobiology.* (Hassler R.G. and Christ J.F. eds.) pp. 463-466. Raven Press, New York.
- 111) Naruse H., Hayashi T., Takesada M., Nakane A., Yamazaki K., Noguchi T., Watanabe Y., and Hayaishi O. (1987) Therapeutic effect of tetrahydrobiopterin in infantile autism. *Proc. Japan Acad.* **63**, 231-233.