

氏 名 (本籍)	や 八	ぎ 木	たか 孝	みち 陸
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	医	第	1581	号
学位授与年月日	昭和 59 年 2 月 22 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
最 終 学 歴	昭和 52 年 3 月 岩手医科大学医学部医学科卒業			
学位論文題目	網膜色素上皮貪食能における解糖系の関与			

(主 査)

論文審査委員 教授 水 野 勝 義 教授 岩 崎 祐 三
教授 立 木 蔚

論 文 内 容 要 旨

脊椎動物の網膜では、視細胞桿体外節（ROS）は環境の明暗変化に応じその先端部分を放出し（shedding：S）、網膜色素上皮（RPE）がそれを取り込み（phagocytosis：P）、消化分解する。これら一連の現象は視細胞の再生維持に深く関与しており、このメカニズムの欠如しているRCSラットでは、ROSが貯留しつつには網膜の変性が発生すると言われている。生体におけるPとSは、周囲の明暗変化に影響を受けること、概日性リズムを持つこと、持続的明状態では抑制されること等、様々な報告が成されている。

本実験では、ラット網膜器官培養においてみられるRPEの貪食現象と、生体で正常に認められる明暗変化により生じるPを利用し、iodoacetate（IA）、2-4 dinitrophenol（DNP）、sodium fluoride（NaF）の投与がPに与える影響を観察した。Pの変動は、従来の報告に基づき貪食されたROS先端部がトルイジンブルーに濃染することを利用し、光学顕微鏡にて形態学的に捕えた。更に、電子顕微鏡を用いてその微細構造を観察した。

網膜器官培養（in vitro）における実験は先に報告したごとく、眼球摘出後、pars plana付近より眼球を前後に2分割し、得られた眼球後部に、視神経を中心とした放射状の割を入れ、これを器官培養用 tantalum wire glid 上に置き培養した。培養条件も先に報告したごとく、air 50%、O₂ 45%、CO₂ 5%の gas 組成で、medium は FCS：CEE：MEM = 3：1：3 とした。MEM は Eagle を用いた。これらの培地に前記の薬剤を種々の濃度で溶かした。

ラット静脈内投与では（in vivo）、血液量を体重の1/13として計算し、血中濃度が10⁻⁵M及び10⁻⁹Mとなるように、尾静脈より投与した。

in vitro において、薬剤無添加群では、培養系へ移植直後はほとんど認められなかった large phagosomes は、2～3時間でピークに達し、その後5時間まで徐々に減少した。これをコントロールとし、薬剤添加によるP変動観察のための培養時間を、2時間と設定した。IA添加群ではdose responseが認められたが、NaFとDNPでは明確でなかった。すなわち、IAでは10⁻⁹Mの濃度以下でPの抑制は解除され、NaFとDNPでは、10⁻¹¹Mの低濃度でもPの抑制が認められた。形態学的には、RPEはよく保持されていた。

in vivo 実験では、3種の薬剤すべてで、10⁻⁹MにおいてもPの抑制がみられた。形態的には、in vivo に比較して変性が著明であった。薬剤の種類による形態の差は判然とはしなかった。IA・10⁻⁵Mでは10⁻⁹Mに比してミトコンドリアの空胞化が強いように思われた。in vitro と in vivo の結果の差は、in vivo では薬剤が、網膜並びに脈絡膜血流を介して豊富に組織に到達するのに対し、in vitro では周囲からの浸透の形で薬剤が組織に入ることが原因の1つと考

えられた。

RPEの貪食現象は、マクロファージ等をモデルとし、1) shedding, 2) recognition, 3) ingestion, 4) digestionの4段階にわけられるであろう。1)はRPEとROS間でのみ見られるものである。sheddingの発現にはRPEは関与せず、視細胞単独で生じ得るものであるとされ、光に強く影響され、細胞内microfilament systemは関与しないと報告されている。2)にはROS表面の糖蛋白の糖鎖部分、特にmannose, galactose, fucose等が重要な役割をになうとされているが不明な部分が多い。3)は2)と連動して生じるもので、細胞運動に伴ないactin filamentが作働するとされている。4)については、RPE内にライソゾーム酵素、特にacid lipase, cathepsin D等が高い活性をしめし、digestionに関係しているだろうということが報告されている。

今回の実験で使用したNaFはenolaseを、IAはtriose dehydrogenaseを阻害することで解糖系を抑制する薬剤であり、DNPは酸化的磷酸化の脱共役剤である。生体内における解糖系の主な役割はエネルギーの産生であり、その際に生じる酸化還元反応は酸化的磷酸化とむすびつきATPを産出する。これらの事と、先に述べたRPE貪食能のメカニズムを考え合わせれば、本実験でみられた貪食現象の抑制の原因の1つとして、ATP減少による細胞内microfilament systemの障害が考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

網膜色素上皮細胞（RPE）は、視細胞桿体外節先端部を貪食し、消化分解する。この現象は、視細胞の再生維持に重要であり、このメカニズムの欠如したRCSラットでは網膜の変性が生じ、網膜色素変性症のモデルの一型とされている。この論文は、Iodoacetate（IA）、Sodium-Fluoride（NaF）、2-4 dinitrophenol（DNP）の3種の薬剤を種々の濃度で *in vivo*, *in vitro* に投与し、RPEの貪食能の変化を形態学的に捕えたものである。

使用動物は午前6時照明点灯、午後6時消灯の明暗環境下で飼育したSDラットで、実験系としては2系を用いている。すなわち、生体において環境の明暗変化に応じて発生するRPEの貪食現象と、ラット網膜を器官培養系に移植後2時間で生じるRPE貪食現象の二者である。これらの系に、前述の3種の薬剤を加え、通常ではRPE貪食現象の最も著明となる時間、つまり前者では午前8時、器官培養では培地へ移植後約2時間目に標本を採取している。サンプルはEpon-812に包埋し、厚さ1ミクロンの切片を作り、長さ200ミクロン中のRPE内に含まれるトルイジンブルーに濃染した large phagosomes の数をカウントし、その数をRPE貪食活性の指標として捕えている。

網膜器官培養系においては、NaFとDNPでは 10^{-11} Mの濃度においてもRPE貪食能の抑制が認められており、IAでは 10^{-8} M以上の濃度では貪食現象は抑制されており、 10^{-9} M以下では抑制は解除されていた。生体における、尾静脈内投与ではいずれの薬剤も血中濃度が 10^{-9} Mの低濃度においても、RPE貪食現象の抑制が見られている。電子顕微鏡による観察では、器官培養系では、どのグループでも視細胞外節とRPEは良く保持されていた。経尾静脈投与群では、RPEは比較的良好に保たれていたが、視細胞外節の変化が顕著であった。

この実験で使用した薬剤は、IAがEnolaseを、NaFがTriose Dehydrogenaseを阻害することにより解糖系を抑制し、DNPが酸化的磷酸化を阻害する。マクロファージ等をRPE貪食現象のモデルとして考えると、これらの薬剤によるRPE貪食能の抑制は、ATPの産生低下による細胞内microfilament systemの障害に原因するのではないかと筆者は推定している。

RPEの示す貪食現象は、視細胞の再生機構への関与の深さからその重要性が認識されつつあり、circadian rhythmの性格を持つこと、receptor mediatedであろうこと等、近年様々な事実が明らかにされつつある。本論文はこの貪食現象を、RPEのエネルギー代謝という側面から解析することを試みたものであり、ひいては、これが網膜色素変性症の病因解明の一助と成り得る可能性を示した事において意義と価値を認める。よって、学位論文に値するものとする。