

氏 名（本籍） 西 川 眞 平
学位の種類 博 士（医 学）
学位記番号 医 第 2596 号
学位授与年月日 平成 6 年 2 月 23 日
学位授与の条件 学位規則第 4 条第 2 項該当
最 終 学 歴 昭 和 60 年 3 月 10 日
防衛医科大学校医学部医学科卒業

学位論文題目 Light-evoked changes of glycinelike immuno-
reactivity in the rat retina.
(ラット網膜におけるグリシン様免疫反応の光
による分布の変化について)

(主 査)
論文審査委員 教授 玉 井 信 教授 名 倉 宏
教授 近 藤 尚 武

論 文 内 容 要 旨

目 的

グリシンは抑制性の神経伝達物質であると考えられているが、その局在が光照射に伴ってどのように変化するのかはよくわかっていない。我々は、高い特異性をもつ、グリシンに対する抗体を作成し、金コロイドをマーカー粒子として、電子顕微鏡下にグリシンの網膜内における分布を調べた。

方 法

抗体の作成は Seguela らの方法を用いた。グリシンに対し 3 つの carrier protein (bovine serum albumin, bovine hemoglobin, hen egg albumin) を glutaraldehyde を架橋として結合させた。この immunogenic conjugates をサイクルでウサギに皮下注射した。血清を塩析後、DEAE-Sephadex chromatography, Sephacryl S-200 chromatography の後、affinity column chromatography を行った。抗体の特異性は dot blot 法と competitive ELISA 法の 2 通りで確かめた。

SD ラットを 24 時間暗順応後、光照射 (1, 10, 100, 1000lux) を 1 分間行い 5% グルタルアルデヒドにて灌流固定後、眼球摘出を行った。さらに 1000lux の照度で 2 秒、5 分、10 分と時間を変えて眼球摘出を行った。また、暗順応下のラットに対しても、同様に灌流固定後、眼球摘出を行った。網膜を細切し脱水後 LR White に包埋した。70nm の切片作成後 antiglycine antibody 1 時間、antirabbit IgG-gold 1 時間反応後、ウラン、鉛染色を施行した。電顕写真は無作為に角層 8 枚ずつとり、2 万倍に拡大しておのおのの網膜層の金コロイド数をカウントした。

結 果

定量的に金コロイドをカウントするためには抗体を飽和濃度下で使用しなければならないので、次に飽和濃度の決定を行った。anti-glycine antibody は $5 \mu\text{g/ml}$ で飽和し、 $10 \mu\text{g/ml}$ を 1 次抗体濃度と決定した。antirabbit IgG gold は $\text{OD}_{525}=0.3$ で飽和し、 $\text{OD}_{525}=0.6$ を 2 次抗体濃度と決定した。

暗順応下では、アマクリン細胞突起が双極細胞へのシナプス前膜を形成する部位をはじめ、シナプス膜に沿って金コロイドの集積が見られた。光照射後ではシナプス前膜には、ほとんど集積が見られず、主にアマクリン細胞の樹状突起に見られるのみであった。網膜角層における金コロイド数は視細胞層、外顆粒層で低く、内顆粒層の外層から内層にかけて徐々に増加しており、網

膜角層を薄切してアミノ酸の量を調べた Ross らの報告とほぼ一致していた。暗順応下のラットでは内網状層 ($27.8 \pm 5.7 \text{GCP}/\mu\text{m}^2$) とアマクリン細胞 ($33.3 \pm 5.5 \text{GCP}/\mu\text{m}^2$) でもっとも高かった。照射後には、このグリシン様免疫反応が内網状層においてのみ有意に減少していた。また、光の強さを 1, 10, 100, 1000lux と変えてみたが、どの光の強さにおいてもこの現象が観察された。また光の時間も変えてみたが同様な現象が観察された。

考 察

照射により内網状層のグリシン様免疫反応が低下することは、照射によりグリシンが放出され拡散するためと考えることができる。1973年 Cohen は明順応後と暗順応後の網膜におけるグリシンの量を調べたが、明では $16.9 \pm 0.5 \text{nmol}/\text{kg protein}$ 、暗では $17.4 \pm 0.8 \text{nmol}/\text{kg protein}$ と暗でやや多いものの有意な差は認められなかった。今回の方法は内網状層だけを比較することができるので差がはっきりでたものと思われた。1978年 Coull と Cutler は、照射によって網膜からグリシンが放出されることを報告した。ラットの硝子体中に液を灌流させ、照射を行うことにより、硝子体中に種々のアミノ酸のうちグリシンのみ放出されることを確かめ、このことはグリシンが網膜の神経伝達物質であることの強い証拠を与えるものだ、と結論づけている。今回の研究もこの機序により、内網状層から硝子体中へグリシンが放出されたものと考えることができた。

一方、網膜の内網状層において双極細胞は2つのアマクリン細胞にシナプスを作り dyad と呼ばれている。また逆に双極細胞がアマクリン細胞から入力シナプスを受けるともいわれている。今回の研究で暗順応下でグリシン陽性細胞のシナプス前膜に多くのグリシンの集積を認め、照射後に減少したことは、アマクリン細胞のグリシンによるコントロールを示したものと考えることができた。

結 論

照射によって、免疫組織化学的反応が変化することの減少は、照射に伴って放出されるグリシンの変化をみている可能性がある。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は網膜における各種の神経伝達物質のうち、抑制性神経伝達物質として知られるグリシンが光照射によってその局在が変化することを初めて明らかにし、免疫組織学的な手法を用いて光学顕微鏡のみでなく電子顕微鏡を用いた定量を行っている。著者は抗グリシン抗体を作成すると共に、それを用いて暗順応及び光照射後のグリシンの局在を明らかにした。その結果、介在ニューロンとして重要な位置を占めるアマクリン細胞の突起に暗順応では集積がみられるのに反し、光照射によってそれが消失し特異的な分布を示さないことを明らかにした。これらの結果は網膜を薄切してその各層に分布するアミノ酸組成を生化学的に調べ報告したものとほぼ一致していた。更に、光照射によってグリシン様免疫反応が内網状層、すなわちアマクリン細胞の神経突起の分布に一致していることを明らかにした。これらの研究は過去に光照射によってアミノ酸のうちグリシンのみが硝子体中に出現することが確認されていたが、網膜内において実際にグリシンが神経伝達物質として光に応答して分布が変化していることを明らかにしたものである。これらの結果は、光照射によって神経伝達物質がその挙動を変えていることを初めて明らかにしたもので博士論文として価値あるものである。