

氏 名（本籍）	木 村 洋 子
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 第 2754 号
学位授与年月日	平成 7 年 3 月 8 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 62 年 3 月 25 日 東北大学医学部医学科卒業
学位論文題目	遺伝的視細胞変性（rds/rds）マウス網膜におけるグルタミン酸の変化

（主 査）

論文審査委員	教授 玉 井 信	教授 高 橋 徹
	教授 近 藤 尚 武	

# 論文内容要旨

## 目 的

遺伝的視細胞変性のメカニズムを考えるに当たり、遺伝的視細胞変性ニワトリでは変性に先だってグルタミン酸の蓄積を見たとの報告があることから、我々は rds マウスにおけるグルタミン酸の変化をみることを目的とし、1) 光学顕微鏡及び透過型電子顕微鏡による免疫組織化学的検索と、2) 微量アミノ酸分析による生化学的検討を行った。これらの視細胞変性動物について、もしも変性の進行にグルタミン酸が関わっているならば、薬物的アプローチにより将来的には、ヒトの遺伝性網膜色素変性症の治療への応用についても検討し得ると考えられる。

## 方法および結果

### 1) 光学顕微鏡及び透過型電子顕微鏡による免疫組織化学的検索

マウス（それぞれ n=3）を 2 時間暗順応後、2.5% グルタルアルデヒドで灌流固定し、眼球を摘出して網膜を固定した。アセトン脱水後、LR White に包埋し、切片を作成した。affinity 精製したウサギ抗グルタミン酸 F(ab')<sub>2</sub> を一次抗体、金コロイド粒子（直径 10nm）-抗ウサギ IgG を二次抗体として、光顕では銀染色を行い、電顕ではウラン鉛二重染色を行った。光顕の写真はコンピューター画面に取り込み画像処理ソフト（NIH image）で染色密度の profile を比較した。電顕写真を撮影し単位面積当たりの金コロイド数をカウントした。同じ週齢の正常 Balb/c マウスについても同時に染色し、コントロールとした。統計的処理は t-test を用いた。

まず光顕で正常アダルトマウス網膜のグルタミン酸様免疫反応を見たところ、視細胞内節（inner segment : IS）、外網状層（outer plexiform layer : OPL）、神経節細胞層（ganglion cell layer : G）にやや強い染色が認められ、双極細胞（Bipolar cell : B）が大半を占める内顆粒層（inner nuclear layer : INL）の外層、内網状層（inner plexiform layer : IPL）にも染色が見られた。1989 年に Ross らが生化学的に高速液体クロマトグラフィー法を用いて、各層ごとに薄切したアダルトラット網膜のアミノ酸量を調べた結果と、今回のグルタミン酸抗体を用いた正常アダルトマウス網膜のグルタミン酸様免疫反応の profile の結果はよく一致していた。

次に網膜各層の比較のために、染色の強さを示す profile の高さを、双極細胞のところを 100% にして、グラフを作成した。

1 週齢では rds マウスと正常マウスで各層で差がないものの、2 週齢では視細胞内節でグルタミン酸様免疫反応の増加が見られ、rds マウスにおいて形態的な変性の始まる生後 3 週齢では視細胞内節、外網状層、内網状層で増加していた。9 週齢では視細胞内節で増加、内網状層でもや

や増加，外網状層で低下していた。

透過型電子顕微鏡を用いて定量的に金コロイド数をカウントするために一次抗体の飽和曲線を描き，飽和濃度を  $8\mu\text{g}/\text{ml}$  と決定した。同時に染色した正常コントロールを 100%とした場合の単位面積当たりの金コロイド粒子数すなわちグルタミン酸様免疫反応は rds マウスの視細胞内節においては生後 2 週齢・3 週齢・9 週齢でグルタミン酸様免疫反応の有意な増加を認めた。外網状層では有意差は認められなかった。

## 2) 微量アミノ酸分析による生化学的検討

免疫組織化学的に差の大きかった生後 3 週齢と 9 週齢の rds マウスにおいて，高速液体クロマトグラフィー（Waters 社製）による微量アミノ酸分析を行った。麻酔後眼球を摘出し，1 匹 2 眼分の網膜を 70%エタノールで除蛋白後，遠心し沈査は Lowry 法による蛋白定量に用いた。上清を凍結乾燥して，反応液（Methanol :  $\text{H}_2\text{O}$  : TEA : PITC = 7 : 1 : 1 : 1）を加え室温で 30 分反応させてから凍結乾燥後，希釈し遠心上清を測定サンプルとした。同じ週齢の正常 Balb/c マウスについても同時に操作を行い，コントロールとした（それぞれ  $n=4\sim 6$ ）。測定は 2 回行った。

高速液体クロマトグラフィーの結果では生後 3 週齢・9 週齢とも蛋白当たりのグルタミン酸濃度に有意な差は認められなかった。

以上のことから，遺伝的視細胞変性ニワトリに続いて，視細胞変性（rds）マウスにおいても，変性がみられる前の生後 2 週齢から，視細胞に比較的限局してグルタミン酸の蓄積が生じていることが面積組織化学的に示された。

## 審査結果の要旨

遺伝性網膜色素変性症は視細胞が特異的に変性を示す遺伝性疾患である。なぜ視細胞が変性するかメカニズムは近年その視物質ロドプシンおよびペリフェリン等の遺伝子異常に伴う、タンパク質の異常が引き金となっていることが明らかにされている。しかし、そのような異常タンパク質がなぜ視細胞変性にいたるかは明らかにされていない。著者は遺伝性網膜色素変性症のモデルとして知られる rds マウスを使って変性過程における視細胞のグルタミン酸の濃度変化を光学顕微鏡、電子顕微鏡による免疫組織化学的方法と微量アミノ酸分析による生化学的方法によって検討した。その結果 rds マウスにおいては、まだ視細胞が形態的に正常な生後 2 週齢ですでに視細胞内節にグルタミン酸の蓄積が認められ、形態的に変性が始まる生後 3 週齢では視細胞内節外網状層、内網状層においてグルタミン酸が増加していることが示された。これは電子顕微鏡を用いた金コロイド数の計測による定量的な方法でも示された。微量アミノ酸分析による生化学的方法によるグルタミン酸の定量は有意な増加を示すには至っていない。

これらの結果は rds マウスの視細胞変性がペリフェリン-rds 蛋白と呼ばれる視細胞外節円盤に含まれるタンパク質の遺伝子異常によってもたらされていることが明らかとなっている現在、その蛋白の異常と視細胞変性にいたる過程の間にグルタミン酸の蓄積という現象が介在しているということを発見したもので、大変興味があり博士論文として十分値する知見である。in vitro の実験においてグルタミン酸の増加が細胞のアポトーシスを誘発するとの実験結果も報告されており、rds マウスの視細胞死はグルタミン酸が関与したアポトーシスであることを示す興味深い結果であると考えられる。