

## 第 100 回 日本眼科学会総会 特別講演 II

## 虚血網膜の病態, その細胞・分子レベルでの解明

本 田 孔 士

京都大学大学院医学研究科視覚病態学教室

## 共同研究者

大平 明弘, 小椋祐一郎, 柏井 聡, 河野眞一郎, 菊地 雅史, 桐生 純一, 小岸 淳一  
 坂上 欧, 清水 久雄, 高橋 政代, 谷原 秀信, 根木 昭, 板谷 正紀, 広井 佳乃  
 本田 治, 正井 宏和, 万代 道子, 三露真理子, Pre Gauntt 三住千明, 山本 美保  
 山本 文昭, 吉田 宗徳, 吉村 長久(50 音順), 赤池 紀昭(薬学薬理)  
 岩城 正佳(愛知医大), 淀井 淳司(ウイルス研)

## 要 約

我々の虚血網膜の病態に関する研究は, 22 年前, 眼内圧上昇の網膜虚血状態での網膜電図および視覚誘発脳波という mass response(マス反応)を用いた研究で, いくつかの興味ある知見を得たのに始まる. 1990 年頃から, 我々は, ネコ *in vivo* 網膜にイオン選択性微小電極を挿入した状態で, 直視下に網膜中心動脈閉塞を行い, 虚血時の網膜細胞外の水素イオン, カリウムイオンなどの動態に関する情報が詳細に得られるようになった. 同法により, それまでのマス反応と違い, 層状に網膜活動電位などを記録し, 虚血の影響を細胞レベルまで深く掘り下げて論ずることが出来るようになった. 続いて我々は, 網膜虚血のモデルとして培養網膜細胞, 主にラット由来のアマクリン細胞を用い, 網膜神経細胞死の機序とその調節因子の役割について, 細胞また, 分子レベルでの解析を行った. 温血動物の網膜神経細胞の培養は, 技術的に難しいとされてきたが, 我々は, ラット胎児網膜神経細胞の初代培養に成功し, この技術を興奮性アミノ酸(EAA), 特にグルタミン酸神経毒性の解明に進展したものである. その結果, 網膜虚血に関するいくつかの細胞また, レセプターレベルでの重要な知見を得ることが出来た. それ以後の我々の虚血網膜の病態に関する研究を 2 つの流れに要約する. 1 つは, 興奮性アミノ酸の作用により細胞内に多量に流入した  $Ca^{++}$  に関するもので, この  $Ca^{++}$  の流入が一酸化窒素(NO)合成酵素(神経型)を持つアマクリン細胞から NO を発生させて, 半減期の短い NO が細胞膜を透過して周囲へ直ちに拡散する. 少量の NO はグルタミン酸受容体のうち, N-Methyl-D-Aspartate(NMDA)受容体を抑制して  $Ca^{++}$  の細胞内流入を阻止し網膜神経細胞保護的に働くが, 多量に生じた時はスーパーオキシドと

反応してペルオキシ亜硝酸を生じ神経細胞死を誘発する. この一連のカスケードは, いろいろな内在性または外来性因子によりコントロールされることも示した. 神経細胞では尿素サイクルに, それを構成するアルギニンからシトルリンへ, オルニチンをスキップした短絡代謝経路があり, NO がその過程で産生される. つまり, 網膜虚血における NMDA 受容体を介した  $Ca^{++}$  の細胞内負荷が, NO を橋渡しとして活性酸素, フリーラジカルの細胞障害性と接点を持ち, 虚血において 2 つの機構が関連の出来事として収斂することになった. もう 1 つは, 代謝障害に陥った組織に生じるラジカルおよび非ラジカル起炎性物質によって引き起こされる血管障害機序である. 網膜血管の閉塞で生じる炎症反応が  $Ca^{++}$  過剰負荷, アシドーシス, およびフリーラジカル過剰産生の 3 つの引き金となる. 後者に関して我々は, 分子生物学的手法を用いて虚血再灌流時の蛋白代謝の変動を mRNA レベルで検討し, インターロイキン-1  $\alpha, \beta$  が網膜グリア細胞および好中球で著明に誘導発現されることを見出した. 治療に関していえば, 内在性の dihydroxyphenylalanine (DOPA),  $Mg^{++}$ ,  $Zn^{++}$ , 前投与の superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), 最新の知見として, Vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> が網膜神経細胞の虚血障害に防衛的に働くことを明らかにした. (日眼会誌 100: 937-955, 1996)

キーワード: 遅発性神経細胞死,  $Ca^{++}$ , グルタミン酸, N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA), 一酸化窒素(NO), 一酸化窒素合成酵素(NOS)

別刷請求先: 606-01 京都府京都市左京区聖護院川原町 54 京都大学大学院医学研究科視覚病態学(旧眼科学) 本田 孔士  
 (平成 8 年 9 月 20 日受付, 平成 8 年 10 月 16 日改訂受理)

Reprint requests to: Yoshihito Honda, M.D. Department of Ophthalmology and Visual Sciences Graduate School of Medicine, Kyoto University. 54 Shogoin-Kawaramachi, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto-fu 606-01, Japan  
 (Received September 20, 1996 and accepted in revised form October 16, 1996)

## Cellular and Molecular Biology of Ischemic Retina

Yoshihito Honda

Department of Ophthalmology and Visual Sciences Graduate School of Medicine, Kyoto University

## Abstract

We introduce our studies on the retinal ischemia in light of both pre- and post-Noell viewpoints. For several years now, we have employed *in vivo* intraretinal microelectrodes for this field of experiments. This series of studies on the cat eye revealed that the sensory retina as well as the retinal pigment epithelium is severely damaged after only a ten-minute stoppage of blood flow. This phenomenon is usually masked in the routine electroretinogram, a mass electrical response of the retina monitored from the ocular surface. Our studies, employing cultured amacrine cells from embryonic rat eyes, revealed that ischemic changes in neural cells are induced by an increase in extracellular glutamate.

Among the glutamate analogs, N-methyl-D-aspartate (NMDA) is responsive to this change. An influx of calcium through NMDA receptor channels activates nitric oxide synthase (NOS), inducing intracellular nitric oxide (NO) in selected amacrine cells. Nitric oxide reacts with free radicals in the cell and induces peroxynitrite, which is toxic. This

cascade triggered by ischemia is interrupted by extracellular zinc, magnesium, hemoglobin, nitroprusside, s-nitrosocysteine, and some NMDA antagonists. In terms of clinical application, there is a possibility that dihydroxyphenylalanine (DOPA), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT), as well as vitamins B6 and B12, are important candidates for administration before an ischemic attack for prevention of damage to the retinal neurons. Gene expression of NOS, interleukin (IL)-1, IL-6, tumor necrosis factor (TNF), and transforming growth factor (TGF)-beta in the ischemic retina was investigated in order to discover reaction substances common to ischemic change and inflammation. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 937-955, 1996)

**Key words:** Delayed neuronal cell death,  $Ca^{++}$ , Glutamate, N-methyl-D-aspartate (NMDA), Nitric oxide (NO), Nitric oxide synthase (NOS)

## I 緒 言

神経組織は虚血状態に陥った時、他の臓器、組織に比べて、機能障害を受けやすい。個体発生段階で高度に機能分化した神経細胞は細胞内のグリコーゲンの備えが少ない上、低酸素状態で Embden-Meyerhof pathway から adenosine triphosphate (ATP) の供給を受けるもの、とても本来の機能維持に間に合う程のものではない。また、その嫌気性の代謝過程で発生する乳酸によるアシドーシスの処理にも神経細胞は遅れをとっている。このような虚血の網膜機能に及ぼす影響を、1950年代、科学的に追究して見せたのが Werner Noell であった。彼は iodoacetate<sup>1)</sup>, azide<sup>2)</sup>などの毒物を使って網膜色素上皮細胞を選択的に障害する研究の過程で、網膜の高い酸素依存性を実証した。当時、今回述べようとする再灌流による酸素毒性の考えはなく、酸素100%善玉説で論旨が統一されている。彼は、この分野でたくさんの論文を書いたが、内容的に重複するものが多いので、ここでは比較的入手しやすい総説的なものをいくつか選んで挙げるに止める<sup>3)~7)</sup>。

この偉大なる先人、Noellの仕事に関して、著者自身の交遊から感想を述べさせていただくと、彼は実にアイディアに優れた研究者だったと思う。プロフェッショナル

の生理学者(M.D. であるが臨床をしなかった)でありながら、流行の微小電極法を殆ど使わず、BuffaloやKansas Cityなど、少し田舎に入った静かな町で、頭で勝負した人であった。可視光線による網膜障害を初めて行ったのも Noell であり<sup>8)~10)</sup>、その後、これが大きな研究テーマとなり現在にまで至っている。ここでも、我々は彼の発想に負うところが大きい。著者の最初の Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)での発表に対し<sup>11)</sup>、鋭い励ましのコメントをもらったことが著者にとって良い思い出となった。興奮してくると、母国語のドイツ語が混ざってきて、ドイツ語を少しは理解する著者にはとても親しみが感じられた。1992年10月18日、Kansas Cityで亡くなったが、古典的な虚血網膜の代謝研究で彼の残した仕事はエポックを画するものであった。著者は、Noell前とNoell後として、この問題を論じていても良いのではないかと思う。

## II 眼内での酸素濃度測定と酸素の分散・消費の問題

網膜に虚血状態を作るには、1) 眼圧を上昇させて眼内への血流入をブロックする、2) 網膜中心動脈を硝子棒などで直接圧迫する (Brown<sup>12)13)</sup>、3) ローゼベンガル (Rose Bengal) 色素を静注し、網膜血管を強く光照射

して血栓を作る<sup>14)</sup>、4) 単に吸気の酸素分圧を下げる、などの方法がとられるが、それぞれについて、主に electroretinogram (ERG) を指標にして、盛んに機能的研究がなされてきた(後述)。しかし、データ解析上、いつも問題にされたのは、網膜での実際の酸素濃度がどのくらいなのかということ、そのために眼内局所の酸素濃度測定用のポーラログラフイーが工夫されてきた。例えば、Krause ら<sup>15)</sup>、Alm ら<sup>16)</sup>、Ernest<sup>17)</sup>、Tsacopoulos ら<sup>18)</sup>の方法があるが、いずれも原理は殆ど同じである。日本でも、例えば、宮沢ら<sup>19)~22)</sup>、上野ら<sup>23)</sup>、Sakaue ら<sup>24)</sup>がポーラログラフイーにより酸素濃度を測定してきたが、現在は簡便で安定性が良く、測定値の信頼性の高いものが市販されるまでになっている。一方、組織障害をいとわない実験研究で、イオン感受性樹脂を詰めた微小電極により網膜内の酸素分圧までも正確に測定することが可能になった<sup>25)~27)</sup>。これら酸素濃度測定に関する技術的な進歩が、今から述べようとする網膜の虚血病態の解明に大きく貢献した。また、一方、Wilson ら<sup>28)</sup>がポーラログラフイーとは全く別な magnetic resonance imaging (MRI) を使った酸素濃度測定法を発表したが、実用化に至っていない。

我々が、眼の虚血を論ずる時、眼内での酸素分布とその移動が常に問題となる。今まで様々な測定値が報告<sup>29)~33)</sup>されてきたが、眼内を前房、網膜などと大きくとらえ、その部位での濃度、消費に関する報告であり、特に代表的酸素消費源である網膜が集中的に研究されて来た<sup>34)~39)</sup>。その背景には、高濃度酸素が誘因となる未熟児網膜症の発生機序を知るため<sup>40)~47)</sup>、眼内虚血の治療として行われる網膜光凝固、冷凍凝固の網膜酸素消費、透過性に及ぼす影響<sup>20)21)48)~51)</sup>を知るため、などの目的があった。

生理学的には、視細胞が暗所で脱分極し、明所で過分極するという異例の特性を持つことが富田ら<sup>52)53)</sup>によって発見されたことが網膜の酸素消費動態を追求する上での大きな問題提起となった。中でも Roy Steinberg らの環境酸素濃度を変えて見た網膜の電気生理学的手法による酸素分布と消費に関する研究が注目される。彼のこの方面の研究は1987年のFriedenwald lecture にまとめられている<sup>54)</sup>。Mitochondria cluster と結び付け、内節周囲での生理的な虚血状態を明らかにした彼の業績は、組織としての網膜の酸素消費を考える上で大きな示唆を与えた。Steinberg のグループから出た Linsenmeier らが、その後酸素電極に技術的な改善を加えながら引き続きこの問題を扱い興味ある知見を追加している<sup>25)~27)55)56)</sup>。

### III 我々の網膜虚血現象とのかかわり

我々は約20年前、家兎で眼圧上昇による虚血状態が、網膜光変性に影響を及ぼすか否かを追求したことがある<sup>57)</sup>。結論的にいえば、急性実験の範囲で、両者の干渉は否定的であったが、その時、網膜は明所、暗所にかかわらず、盛んに酸素を消費し続けていることを実感した。続い

て我々は、手術操作の物理的な許容限界を知る目的で、眼球の牽引、回転を負荷する実験を行ったが<sup>58)</sup>、これも虚血の影響を見たものといえる。手術操作の眼内圧への波及に関する研究も、*in vivo* 眼での虚血に関連したものであった<sup>59)</sup>。他の研究者達による ERG を指標とした虚血に関する研究は、これまで枚挙にいとまがない程あるが、ここでは、30年前の小野寺<sup>60)</sup>、Usami<sup>61)</sup>、Fujino<sup>62)</sup>ら、岩手医大グループによるもの<sup>63)~66)</sup>など、その一部を挙げるに止める。虚血と網膜代謝の関係は古くから、常に新しい問題であり続けて現在に至っている。以上は *in vivo* での虚血研究であったが、我々はその後 *in vitro* でもっと直接的な虚血の研究を行うに至った。

著者が実験研究で最初に扱った問題は、ラットの視神経を摘出し、この電気刺激の伝導速度を指標にして、向神経ビタミンの作用を見るというものであった。先輩から実験装置を引き継ぎ、準備している段階で「実験の能率化のため、数本の視神経を摘出して生理食塩水中に保存し連続して測定を行うと、浮いていた神経の方が、沈んでいた神経よりより元気が良い」ということを聞いた。この状態の視神経の比重は1.0に近く、付着組織の除去の仕方によって、生食中で浮いたり沈んだりする。著者は、この「浮いている」というのは空気と接しているということではないかと思った。そこで、ストック用ボトルをガスで攪拌してみると、この差がなくなることを知った(図1)。バブルは酸素に限ったことではなく、空気でも同じであった。このことから、摘出神経が気体としての酸素を取り込み利用することがわかったが、一方この実験は、リンゲル液のような人工液の酸素保有力がいかに小さいかを示した。人工液中で酸素は単純に Henry の法則に従って、他の気体との分圧で物理的に溶けている。そこには何の生物学的、化学的効率化が存在しない。我々は、それまでに、温血動物の *in vitro* 網膜培養システムを開発し、種々の興味ある実験データを得ていたが<sup>67)~81)</sup>、この研究過程で、摘出状態の網膜または視神経の活性を高く保と

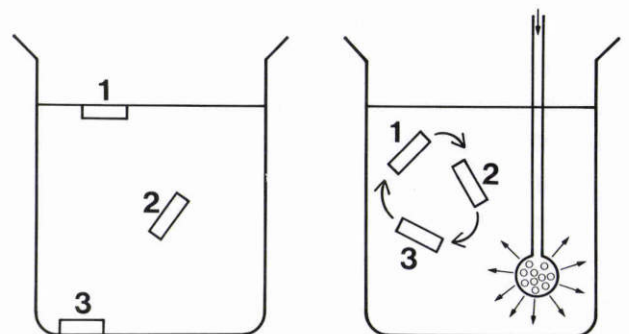


図1 ストック視神経の活性と攪拌効果。

人工液の中にストックされた1~3の摘出視神経の活動性は1が高く、2、3で低い。ところが、空気または酸素でバブリングをすると1、2、3の活動性に差がなくなる。

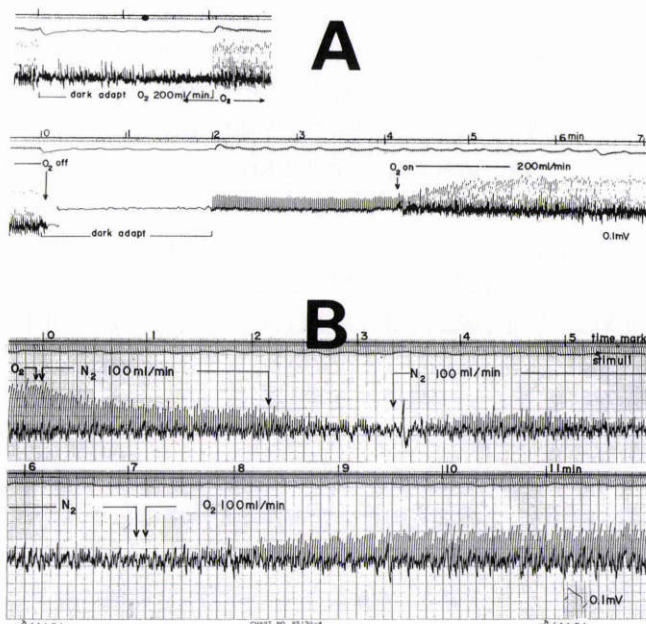


図2 灌流液への酸素吹き込みと網膜活性.

我々の *in vitro* 網膜培養装置<sup>67)</sup>でみた、家兎摘出網膜 ERG での酸素供給遮断に関する研究から<sup>82)~84)</sup>。実験 A, B ともに上から time mark, 光刺激モニター, ERG の 3 チャンネル同時記録。実験 A の上段で、光刺激を中断しても 200 ml/min の酸素供給で、electroretinogram (ERG) はその間、全く影響を受けていない。しかし、下段で、酸素供給を 2 分中断し、刺激光も中断した後、刺激を再開すると ERG 振幅は著明に減少する。その間、パブリングがないので反応のノイズが少なくなっている。中断 4 分後から酸素供給を開始すると、ERG 振幅は徐々に回復して、6 分後には、ほぼ元に戻る。実験 B で、酸素のパブリングを窒素の 100 ml/min のそれに置き換えると、Henry の法則に従って酸素分圧が下がるから、ERG 振幅が減少する。しかし、窒素中断後数分して、再び窒素でパブリングすると ERG が一過性に出現する。これは、網膜に接する液面のリニューアルによる。さらに下段に移り、窒素を酸素に置き換えると、ERG 振幅は回復に向かう。

(本田 孔士, 根本 昭, 三露 真理子: 日眼会誌 82: 331-334, 1978 より改変引用)

うと思えば、酸素を直接吹きつけるか(または高酸素環境を用意する)、網膜と接する液面を絶えず移動させ、すなわち、流れを作ることが必要なことを示した<sup>82)~84)</sup>。例えば、窒素によるパブリングでも、静的状態から一過性に網膜の活動性を向上するというパラドックスは、この接触面の更新という現象によって説明することが出来る(図 2)。これは、有赤血球の全血による灌流とは全く異なる世界の話で、*in vitro* での全眼球の機能維持に人工赤血球など、酸素運搬に関する化学的補助機能を導入した大塚ら<sup>85)86)</sup>、Thoreson ら<sup>87)</sup>の仕事の重要性を指摘しておきたい。摘出網膜の気体からの酸素取り込みは、菅<sup>88)</sup>の実験が最も良く示している。彼は、半閉鎖の wet chamber に高濃度酸素を流すことによって、血管からの灌流なしに、ラット眼を *in vitro* で正常に機能させてみせた。我々

も、菅の方法を追試して、その正しさを確認している。ネコなど大きな眼球では、Tazawa ら<sup>63)64)</sup>、Niemeyer ら<sup>89)~92)</sup>、Uji ら<sup>93)~95)</sup>、Gouras ら<sup>96)</sup>が行ったように、眼動脈からの灌流が可能であるが、ラットのような小眼球では菅の方法が優れている。

以上のような温血動物の網膜または全眼球という組織または器官の体外培養には、すべての外環境を人工的にコントロール出来るという利点があり、温度、イオン配合、薬物濃度<sup>97)</sup>などの影響がより直接的に観察される。中でも酸素供給が、他の組織に比べ網膜ではことの外重要である。ただ、それまでの研究には、未熟児網膜における血管新生での酸素の有害性がいわれた以外、再灌流による酸素毒性という考えはなかった。

#### IV ネコ *in vivo* 眼の網膜層内記録で得られた酸素消費に関する知見

ネコの *in vivo* 眼に脳定位法様に微小電極を挿入し、網膜の電気現象を観察する方法は、Brown ら<sup>12)13)</sup>により開発され、さらに Steinberg<sup>54)</sup>、Linsenmeier ら<sup>25)~27)33)39)55)56)</sup>の改良によって、電極が微細になり、イオン電極の種類も増え、K<sup>+</sup>, pH までが正確に網膜各層内で相対的に記録出来るようになった。この方法によって、Steinberg らが明らかにした網膜内での局所代謝、なかんずく、酸素消費の特異性に関する研究<sup>54)</sup>はエポックを画するものであったことは先に述べた通りである。教室の山本文昭は彼との 2 年間の共同研究からその方法を持ち帰り、そのシステムを使って我々の所でも、臨床的な視点から高炭酸ガス、低酸素のもとらす神経網膜の機能変化を多チャンネル方式で同時記録して、いくつかの重要な新知見を得ることが出来た<sup>98)~101)</sup>。その多くは、既に原著論文として発表されているので、ここでは高眼圧の作る網膜虚血下での変化について、その一部を述べるに止める。

高眼圧虚血で、我々がこの新しい研究方法で明らかにしたことの 1 つは、ERG の a, b, c 波振幅の回復をもって、あたかも網膜機能が回復したかのように解釈してきた今までの仕事への反省があった。我々は、勿論、網膜神経節細胞が ERG 各波に関与しないことから、神経節細胞の機能については visual evoked potential (VEP) または外側膝状体電位をモニターとしてきたことはいうまでもない。しかし、例えば、図 3, 4 に示すごとく、10 分の虚血負荷後 160 分経っても、1) 視細胞機能を反映する V<sub>k</sub><sup>+</sup>電位が回復しておらず、2) 網膜色素上皮細胞由来の TEP c-wave も回復が不完全、3) 神経網膜由来の slow PIII の回復も不十分ことがわかる。我々が今まで c 波回復といってきたのは、極性を逆にする 2) と 3) の和が、その障害を相殺し合うため、角膜上と強膜後極との見かけ上のネット流である表現上の c 波に騙されていたことになる。Granit<sup>102)103)</sup>の PIII の on を ERG a 波と考え、「視細胞は虚血に強い」などとしてきたことは間違いで

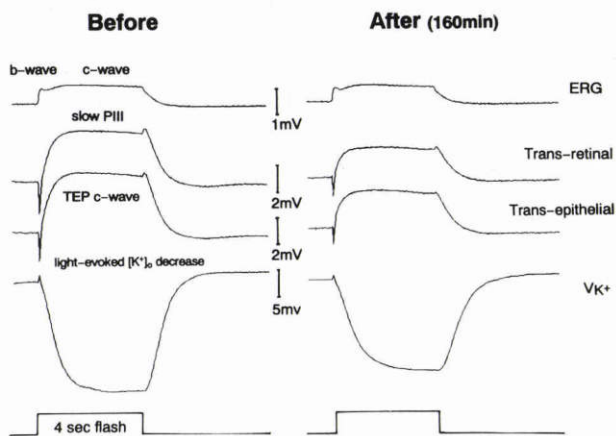


図3 網膜内電極でモニターした虚血負荷前後の網膜層状反応。

ネコ *in vivo* 眼で, inner limiting lamina から 90% の網膜深度 (ほぼ神経網膜下腔) に電極を進めての, 10 分間の虚血負荷直前(左)と負荷解除後 160 分(右)の記録。

上段は ERG, 2 段は神経網膜由来の電位で slow PIII にあたる。3 段目は色素上皮由来の c 波, 4 段目は網膜下腔での光刺激誘発性の細胞外カリウムイオンの減少を示す。最下段は 4 秒の光刺激(上向き on)。虚血の程度, 光強度などの詳細は文献 101 に示す。

(from Hiroi K, Yamamoto F, Honda Y: Invest Ophthalmol Vis. Sci. 35: 656-663, 1994)

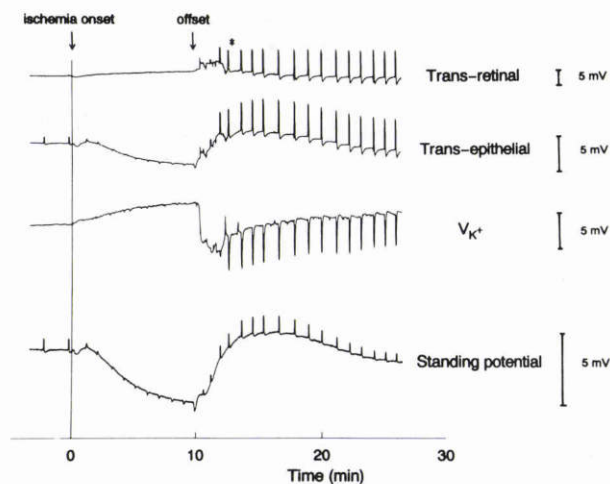


図4 虚血・再灌流後の構成電位の経過。

ネコ *in vivo* 眼で, 10 分間の虚血を負荷した直後の神経網膜由来電位(最上段), 色素上皮由来電位(2 段), 網膜下腔のカリウムイオンの動態(3 段), 網膜静止電位(最下段)の経過。各電位に乗ったスパイクは 4 秒の光刺に対する活動電位(ERG など)。10 分間の虚血負荷時に, 微小電極は網膜から抜去して保護, 解除後同じ網膜下腔に戻し(\*印で示す)記録を続けた。

(from Hiroi K, Yamamoto F, Honda Y: Invest Ophthalmol Vis. Sci. 35: 656-663, 1994)

あったことが, 今回の  $V_{K^+}$  の動態で明らかである。視覚系第 1, 第 2 ニューロンへの虚血の鋭敏なダメージは我々の網膜の分層同時記録で, 初めて明らかにされた。ま

た, 神経網膜下での水素イオン濃度のコントロールに関する色素上皮の役割も知ることが出来た<sup>98)99)</sup>, さらに, 網膜色素上皮細胞の虚血性変化を基底膜側と絨毛側で別々に論ぜられるようになったのも同法導入による進歩といえる。現在, この方面でわかっていることを誤解を恐れずに大雑把にいつてしまえば, 低酸素は視細胞内節の  $Na^+K^+$  ポンプを減速し,  $Na^+$  の代わりに細胞内に取り込まれるはずの  $K^+$  が網膜下腔にたまる。網膜色素上皮はこれを代償して角膜側陽性に電位増大(EOG の上昇)するが, これは基底膜側の脱分極によるところが大きい。この現象は, 視細胞が光照射によって  $Na^+K^+$  ポンプを減速させ, 視細胞外の  $K^+$  を増加させるとポンプの作用という意味で類似している。そもそも, 酸素分圧は視細胞外節付近では高いが, 内節付近では生理的状态でも 5 mmHg と非常に低く, しかも, 内節のミトコンドリアが cluster を作って集中して存在することから, 低酸素が誇張され内節に敏感に伝わる。低酸素で解糖系を回してアシドーシスを生むより, ATP 要求性を下げる方が細胞の生き残りに有利だからであろう。以上は, Steinberg らの研究によるところが大きい。ただ, このような病的または病変下での研究は, 決して生理学の中心的興味とはならず, 眼科医たる我々が追求せねばならない領域である。生理学者が虚血を条件に使うのは, 本来生理的な機能を分離, 脱落せしめるためで, 病的代謝そのものへの興味からではない。ここに臨床家の研究と基礎学の研究者の発想の違い, 根本的立場の違いがある。

## V 興奮性アミノ酸(EAA)の網膜神経細胞毒性

グルタミン酸は哺乳動物の中樞神経系での興奮性アミノ酸(excitatory amino acids, EAA)の一つであるが, 神経毒性をも持ち合わせている。Olney<sup>104)</sup>が, 幼若マウスにグルタミン酸を投与すると, 視床下部弓状核の神経細胞に変性が起きることを見出してから暫くして, それを支持する報告<sup>105)106)</sup>が続いた。スナネズミで一過性虚血を負荷すると, 海馬 CA1 領域の錐体細胞が特異的に脱落することが発見され<sup>107)</sup>, その局所に大量のグルタミン酸放出があることが確認された<sup>108)</sup>。我々はネコの *in vivo* 眼を用い, 眼圧 170 mmHg, 60 分間の虚血を負荷した時, 黄斑部直前の硝子体中に保持した, 半透析膜を持ったプローブ内に流出してくるアミノ酸を経時的に測定した。虚血負荷前は表 1 のごとき濃度であったが, 上記の虚血を負荷した後, 再灌流を行うと, 表 2 の示すごとく, グルタミン酸のみが 500% を超えて異常に増加するのを観察した<sup>109)</sup>。グリシン, gamma-aminobutyrate(GABA), アスパラギン酸についても測定したが, 負荷後にせいぜい 150% になる程度であった。以上では, セリン濃度を同時に測定し, その不変性を確認し, 対照とした。以上から, 虚血・再灌流により網膜内にグルタミン酸が一過性に急増

表1 正常硝子体中のアミノ酸基礎量

n=5	
アミノ酸	濃度 ( $\mu$ M)
Glutamate	1.25 $\pm$ 0.41
Serine	17.08 $\pm$ 5.76

表2 60分虚血・再灌流後に硝子体腔に出現するアミノ酸量(変化率)

アミノ酸	基礎量との百分率	
	虚血時	再灌流時
Glutamate	178 $\pm$ 16.83	514.85 $\pm$ 140.22
Serine	142 $\pm$ 13.23	151.94 $\pm$ 14.23

使用動物 妊娠 16~19 日のラット胎児  
 使用組織 網膜  
 培養液 牛胎児または馬血清を添加した Eagle MEM  
 培養期間 10~15 日  
 細胞同定 わずかに glia 細胞を含む神経細胞  
 神経細胞は 80%以上が HPC-I 陽性  
 Müller 細胞は 1%以下で、S-100 または GFAP 陽性

図5 我々のラット網膜由来細胞の培養法

することが確認されたが、これは、Louzada-Junior ら<sup>110)</sup>が家兎眼で観察した現象と一致する。このグルタミン酸の増加と、網膜での虚血細胞壊死を結び付けるため、我々は、さらに次項以後の実験を行った。振り返れば、ここでいう興奮性のアミノ酸(EAA)の一つであるグルタミンの神経毒性を最初にいったのは 1957 年の Lucas ら<sup>111)</sup>で、ネズミ網膜での形態的な萎縮観察による。また、網膜ではアスパラギン酸を用いると、ERG の III 成分が分離出来ることが Furukawa ら<sup>112)</sup>、Hanawa ら<sup>113)</sup>によって発見されており、我々は日常的にこれを実験に用いてきた。このように EAA の神経毒性の分野で、眼研究の先達はパイオニアだったわけで、ただ、この現象を虚血・再灌流と関係付ける発想がなかったことが悔やまれる。今、我々の世代が、小脳での EAA 毒性の発見を、逆に網膜の虚血・再灌流にグルタミン酸毒性として還元しようとしている。

## VI 網膜神経細胞培養系での EAA 毒性

EAA の一つ、グルタミン酸の神経毒性に関する研究は、大脳、小脳において、培養細胞系を導入することにより著しい進歩を遂げた。我々も、ラット網膜由来の初代培養細胞から、図5に示したごとき操作で、神経細胞を得ることに成功した<sup>109)</sup>。この培養細胞に対し、組織化学的所見、特に HPC-I 抗体による染色性から<sup>114)115)</sup>、その殆どがアマクリン細胞であると判定した<sup>109)116)</sup>。我々の培養法の特徴をいくつか挙げると、1) 16~19 日という胎生期眼を用いたこと、2) 細胞の単離にパイン、トリプシンと

いった消化酵素を使わず機械的に行い、150 mesh のステンレス網で濾過し、細胞懸濁液を遠沈したこと、3) 培養 8 日目に 10~5 M/L の cytosine arabinoside (Ara-C) を加え非神経細胞を除去したこと、などである。以下の実験は、すべてこの初代培養細胞を用い、細胞死はトリパンブルーの細胞外排除の有無を all or none で、定量的に評価した。すなわち、培養細胞を EAA (例えばグルタミン酸) に 10 分間暴露した後、EAA を除いた溶液でさらに 1 時間培養し、トリパンブルー染色を行い、Hoffman 干渉顕微鏡で、色素を排出した細胞を生きた細胞、色素で染まった細胞を死んだ細胞として数を数え、定量的に判定した。1 時間培養と 24 時間培養で、細胞生死の割合に大差がないことから、遅発壊死の有無は、1 時間で決着していると考えた<sup>116)</sup>。

グルタミン酸受容体はイオンチャネル直結型と、G-タンパクと共役した代謝型とに分類される<sup>117)</sup>。後者については、その分子構造がサブ・タイプごとに決定され<sup>118)</sup>、網膜についてもその異常が変性疾患と関係するのではないかと推定され、研究が進んでいる。虚血と関係するのはイオンチャネル直結型で、これは N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)型と  $\alpha$ -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸(AMPA)型、およびカイニン酸型などがある。これらは体内には実際に存在しないグルタミン酸のアゴニストで、チャネルの類型分けに用いられるものである。ラット海馬で、脳虚血による遅発性神経細胞死が、NMDA 受容体を介するものであることが既に報告<sup>119)</sup>されており、我々の実験系で、その特異的拮抗薬である MK-801 を前投与してみたところ、典型的に細胞死が抑制されることを観察した<sup>116)</sup>。この細胞死が培溶液中から  $Ca^{++}$  を除去すると全く見られなくなる(後述)、 $Mg^{++}$  で膜電位依存性にブロックされること(後述)を確認するに及び、我々はこの初代培養系を遅発性網膜細胞死を見るのに適した実験標本であると結論した<sup>116)</sup>。

## VII 遅発性網膜神経細胞死と一酸化窒素(NO)

一酸化窒素(nitric oxide, NO)が、細胞間の情報伝達物質として知られて久しい。Furchgott ら<sup>120)</sup>、Garthwaite ら<sup>121)122)</sup>、Snyder<sup>123)</sup>、Bredt ら<sup>124)</sup>などにより、1980 年から 1990 年代初めにかけてこの分野で次々と重要な発見がなされた。グルタミン酸による神経細胞死が、NO を介して活性酸素フリーラジカルと関連することが他の組織で示唆されたのを受けて、我々の系でその関係を追求した。

まず、我々の培養細胞のホモジネートで、アルギニンからシトルリンへの変換系を用いて、一酸化窒素合成酵素(NOS)の酸素活性を測定したところ 5 $\pm$ 3 pmol/min/mg protein であった。対照として測定した成熟ラット網膜のそれは 14 $\pm$ 4 pmol/min/mg protein であった。この

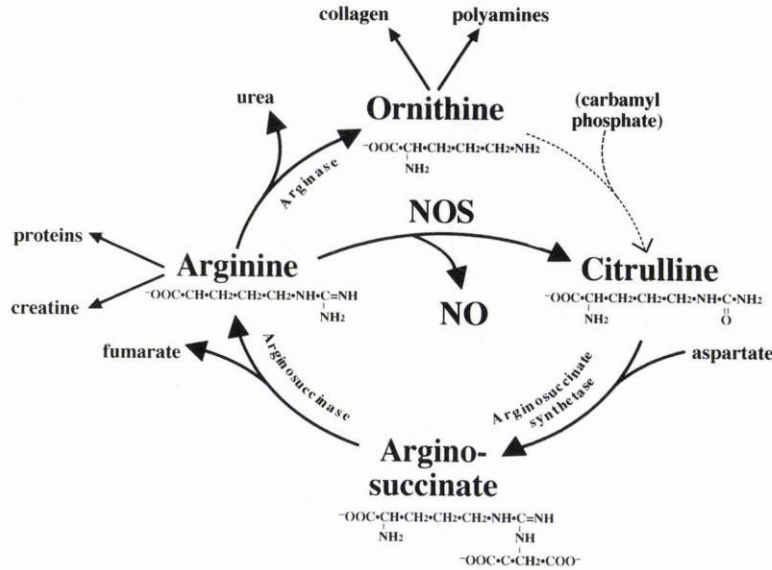


図6 一酸化窒素合成酵素と尿素サイクル.

神経組織には尿素サイクルのすべての中間代謝産物が存在するが、オルニチンとカルバモイル燐酸からシトルリンを作る酵素、オルニチン・トランスカルバミラーゼの存在が証明されていない。カルバモイル燐酸を作る合成酵素の存在も認められていない。したがって、シトルリンが何処から作られるのか、また、アルギノシトルリンが何処から作られるのかが謎であった。ところが、アルギニンから一酸化窒素合成酵素(NOS)によってシトルリンが合成されることがわかり、尿素サイクルの一部は一酸化窒素(NO)合成の基質となるアルギニンを供給する役割を果たしていることが明らかである。

反応系から nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH) または、Ca<sup>++</sup>を除くと NOS 活性は認められなくなった。また、NOS 阻害薬の N-アルギニンを加えても NOS 活性が低下した。このように、NOS から NO の存在を追うのは、NO がガス状態で半減期が 2 ~ 3 秒と短いため、我々は、安定した酵素である NOS または NO 産生体の存在で NO の出現・存在を推定した<sup>125)~127)</sup>。

そもそも、中枢神経においては、尿素サイクルを形成するはずのオルニチン・トランスカルバミラーゼの存在が認められず、どのような代謝ルートでシトルリンを合成されるのかわらなかつたが、NOS によるアルギニンからの合成ルートが明らかにされ、中枢神経における尿素サイクル不在の不思議が解決した(図6)。この尿素サイクルを横切る系以外の NO 合成系は、今のところ発見されていない。

NMDA による細胞死の NO との関係を見極めるため、我々は、NOS 阻害薬である N-アルギニンの作用、NO を捕捉するヘモグロビンの作用、NO 生成薬であるニトロプルシド(SNP)、S-ニトロソシステイン(SNOC)を用いて実験を進めた<sup>128)</sup>。その結果、我々の系で NMDA から NO 合成、そしてさらに活性酸素と結合してペルオキシ亜硝酸合成という細胞障害のルートを証明し得た(図7)。その中から特に強調しておきたいのは、SNOC の 50 μM/L という中間濃度で、本来の NMDA 毒性とは逆に保護作用を見出したことで、NO は毒性ばかりでなく、初期の低濃度で NMDA チャネルからの Ca<sup>++</sup>流入

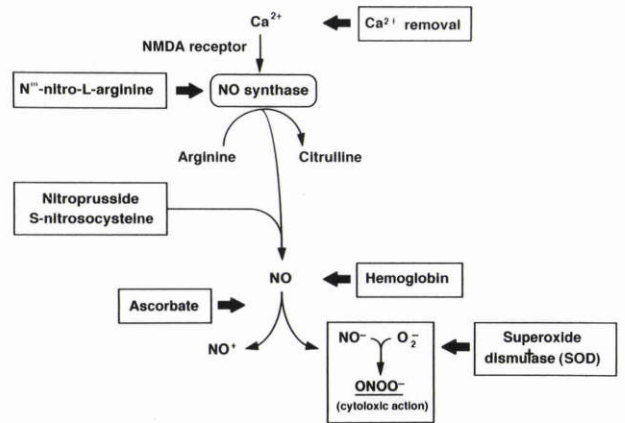


図7 カルシウムイオン流入に始まる神経細胞障害のフローチャート.

を防ぐべく、フィードバックをかけている。いい換えれば、NO の NMDA 毒性系での保護、障害の二面性という興味ある新知見を得たことである<sup>127)</sup>。

### VIII 網膜での遅発性細胞死に 防御的に働くもの

神経細胞の遅発性細胞死のきっかけが NMDA チャネルを介する Ca<sup>++</sup>の細胞内流入によるものであることが明らかにされてから、NMDA チャネルの特異的のプロツカーを用いて、この細胞死が防げないか、種々、検討が行われてきた。網膜では dextromethorphan<sup>129)~132)</sup>、MK-801<sup>133)134)</sup>、flunarizine<sup>135)</sup>など、イオンキレート薬<sup>136)137)</sup>、honghua<sup>138)</sup>、monosialoganglioside GMI<sup>139)</sup>が研究され、

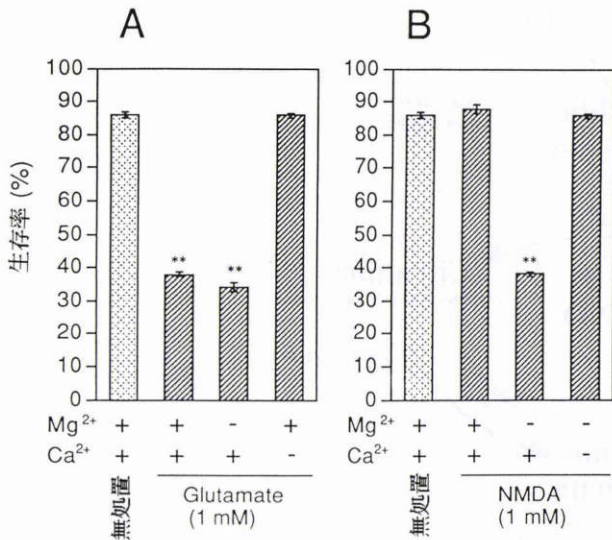


図8 細胞毒性とカルシウム、マグネシウムイオンの干渉。

我々のアマクリン培養系でのEAAの作用が遅発性細胞死であることを示す、Ca, Mgイオンとのかかわり。A (glutamate), B (NMDA)ともに、Caイオンがなければ細胞死が起こらない(AB, 各右端)。グルタミン酸系では影響が出ないが(A, 左から2列)、NMDA系ではMgイオンが存在すると細胞死が起こらない(B, 左から2列)。これはMgイオンのNMDAチャネルに対する膜電位依存性の特異的ブロックによる<sup>116)</sup>。

虚血発生前に投与しておけば、それなりに有効であることが動物実験上確認された。Allopurinol<sup>140)</sup>, flupirtine<sup>141)</sup>, barbiturates<sup>73)142)</sup>, また、抗酸化薬としてのSOD (superoxide dismutase), CAT (catalase)<sup>143)~146)</sup>, 生理活性物質<sup>147)~150)</sup>なども研究されてきた。しかし、今まで検討されてきたNMDA拮抗薬には副作用が強く<sup>151)</sup>, 臨床応用にまで至ったものはない。

我々は、前記の網膜神経細胞の遅発性細胞死のモデルとなる系を用いて、臨床的な視点から、その防御に結びつく可能性のある事項を検討してきた。以下、この方面での我々の実験結果を述べる。

1. Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>

グルタミン酸、さらに拡大してEAAによる遅発性細胞死はCa<sup>++</sup>の細胞内流入がきっかけとなるから、細胞外のCa<sup>++</sup>を取り除けば細胞死は起こらない(図8)。しかし、これは臨床的な視点から見ればあまり興味のない現象である。我々がこの実験を行った目的は、我々の系が遅発性神経細胞死現象を正しくとらえていることを示すことにあった。生体で細胞外Ca<sup>++</sup>が零という事態は作り得ない。細胞外Mg<sup>++</sup>も細胞膜の分極状態に限っていえば、電位依存性にNMDA毒性を強く抑制した<sup>116)</sup>。これらは、他のNMDA拮抗薬に優先するが、正常な生理機能を期待しながら細胞死を防ぐという観点からは、治療としての展望は開け難いと思われる。

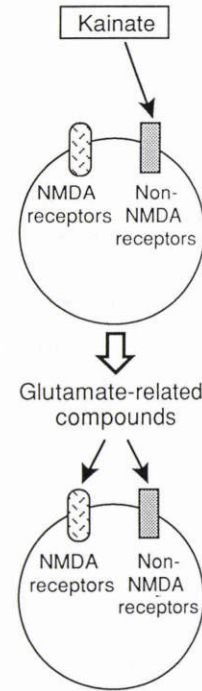


図9 カイニン酸毒性とグルタミン酸毒性のカスケード。

2. イオン型グルタミン酸チャネルの拮抗薬

グルタミン酸およびNMDAによる細胞死は、チャネル拮抗薬である10 μMのMK-801をあらかじめ投与しておくことより、完全に防ぎ得た<sup>116)</sup>。さらに興味あることに、MK-801が作用しないはずのカイニン酸系にも防御的に働いた。これは、ストリキニーネを加え、細胞膜の興奮性を抑制すると見られなくなることから、一度、カイニン酸回路で放出されたグルタミン酸が他の細胞のNMDAチャネルを興奮させるという連鎖の中で機能しているからと思われた(図9)。以上のごとく、MK-801が、我々の培養系でNMDAチャネルの特異的ブロックであることは確実であるが、前述の他の拮抗薬同様、副作用の問題から臨床応用には、未だかなりの距離がある。その選択的ブロックにより、生命維持にかかわる現象までもが抑制を受けるからである。

3. ドーパミン(DOPA)

ドーパミン(1~100 μM)をグルタミン酸およびNMDA投与前およびその後の1時間のインキュベートに添加することにより、用量依存性に細胞死の保護作用が観察された<sup>116)</sup>。このグルタミン酸毒性に対するドーパミンの保護作用はD1受容体拮抗薬のSCH 23390によって拮抗されたが、D2受容体の投与によっては拮抗されなかった。これは、ドーパミンがD1が受容体を介してグルタミン酸神経毒性に対する保護作用を発現することを示唆する。D1受容体は細胞内でアデニール酸シクラーゼと共役しているので、アデニール酸シクラーゼ刺激作用を持つフォルスコリンを投与したところ、ドーパミンと同様の保護作用が観察された。したがって、我々はドーパミンはD1受容体を介して細胞内cAMP産生を



増加することにより神経保護作用を発現すると考えた。一方、カルシウム・イオノフォアのイオノマイシンは NMDA 受容体と無関係に  $\text{Ca}^{++}$  の細胞内流入を誘発して NO を介する神経毒性を発現する。ドーパミンはこのイオノマイシンにより誘発される神経毒性に対しても保護作用を発現した。一方、SNP などの NO 生成試薬により誘発される神経毒性はドーパミン投与の影響を受けなかった<sup>127)</sup>。さらに、パッチクランプ法を用いた電気生理実験において、記録に成功したすべての細胞において、静止膜電位付近での膜電位固定下に NMDA、カイニン酸は内向き電流を誘発したが、ドーパミン (100  $\mu\text{M}$ ) はこの NMDA 誘発電流およびカイニン酸誘発電流に対して影響を及ぼさなかった。

以上から、ドーパミンは NMDA チャネルに直接作用するのではなく、c-GMP を介して NMDA 受容体刺激後の細胞内反応のうち、NOS を介する NO 合成反応を抑制し、グルタミン酸毒性を防ぐ、また、NO 合成に至ってしまえばその防御作用は既に及ばないと結論した。

#### 4. $\text{Zn}^{++}$

$\text{Zn}^{++}$  を 0.3~300  $\mu\text{M}/\text{L}$  の範囲で我々の培養系に加えると、濃度依存性にグルタミン酸毒性、NMDA 毒性の防止作用が認められた<sup>152)</sup>。その作用は、0.3  $\mu\text{M}/\text{L}$  で 40%、30  $\mu\text{M}/\text{L}$  でほぼ 100% に近く、それ以上で飽和状態になる。 $\text{Zn}^{++}$  そのものの毒性は上記の範囲で見られなかった。以上の作用はカイニン酸チャネルでは見られなかった。全細胞表面膜流を見る我々のパッチクランプ法による観察では、 $\text{Zn}^{++}$  によるブロック作用は、 $\text{Mg}^{++}$  程ではないが分極の強い場合、膜電位依存性である。したがって、 $\text{Zn}^{++}$  の結合部位をチャネルの奥深い所とこだわるより、表面近くに膜電位依存性に可変の結合部位があるとした方が合理的と思われた。すなわち、網膜神経細胞(ここではアマクリン細胞)の NMDA チャネルには  $\text{Zn}^{++}$  結合部位は 2 つあり、1 つは深く、1 つは浅く存在するのであろう。これは、Choi らが脳細胞で認めた所見と一致する<sup>153)154)</sup>。中枢神経のシナプス腔には 200~300  $\mu\text{M}/\text{L}$  の  $\text{Zn}^{++}$  の存在が知られており<sup>155)156)</sup>、我々の示した 30  $\mu\text{M}/\text{L}$  での保護作用は、生理的レベルで可動している可能性が高い。 $\text{Zn}^{++}$  は、生理的に網膜後極部に高濃度に存在し、特にネコでは反射板を作る程である。加齢性黄斑変性患者の血中の Zn 濃度が検討され、Zn 内服による治療の可能性が検討され、賛否両論<sup>157)~160)</sup>がある。体内での貯蔵や血清中での結合体など難問題は残るが、我々の実験は、今後、網膜変性の防御や網膜虚血障害の予防や治療で Zn が関与する可能性を示したと考える。

#### 5. ビタミン B 群

ビタミン B 12 には欠乏症があり、その補給的な治療効果は明らかであるが、その他に今まで、何らかの薬理的な神経保護作用があると期待されてきた。ただ、その作用機序は必ずしも明らかにされていたわけではなかった。

B 12 には類縁体があり 2 種の活性型、すなわち、メチルコバラミンとアデノシルコバラミンが知られている。メチルコバラミンはホモシスチンをメチオニンに転換する際のメチル基の供給源となる。このメチオニン合成系で、B 12 と共役して S-アデノシルメチオニン (SMA) となる。我々は、メチルコバラミンや SMA を初代培養開始と同時に培養液に投与した場合(以下、慢性投与と呼ぶ)のグルタミン酸毒性と、グルタミン酸と同時に投与した場合(以下、急性投与と呼ぶ)について、その効果を検討した。その結果は、目下、投稿中 (Kikuchi M, Kashii S, Honda Y, Tamura Y, Kaneda K, Akaike A: Protective effect of methylcobalamin, a vitamin B 12 analog, against glutamate-induced neurotoxicity in retinal cell culture, Invest Ophthalmol Vis Sci) であるので、以下、要点を予報的に述べるに止めたい。

結論として、メチルコバラミン、SAM とも慢性投与時にのみに、濃度依存性にグルタミン酸毒性を抑制した。急性投与では、両者で効果が見られなかった。もちろん、メチルコバラミン、SAM そのものの単独 100  $\mu\text{M}/\text{L}$  濃度以下の投与で、毒性がないことを確認した上でのことである。一方、シアノコバラミンは 10  $\mu\text{M}/\text{L}$  以上の単独投与で培養系に抑制的に動くため 1  $\mu\text{M}/\text{L}$  での観察であるが、慢性投与でやはりグルタミン酸毒性を防御した。以上の慢性投与という場合、グルタミン酸投与時には、既に B 12 類縁体は培養液から除去されているので、NMDA 受容体そのものへの作用ではあり得ない。イオノマイシンは NMDA 受容体と無関係に  $\text{Ca}^{++}$  依存性の神経細胞死を誘発することを前に述べたが、メチルコバラミンはイオノマイシンのこの細胞毒性をも抑制した。以上から、我々は B 12 は慢性(先行)投与の場合に限って NMDA チャネルからの  $\text{Ca}^{++}$  流入という事態が起こった以後の段階、多分、NO 合成過程で細胞死に防御的に働くとの結論に至った。B 6 についても慢性、急性両者について同様の実験を行い、やはり濃度依存性に保護作用があることを確認した。その他の B 群、B 1, B 2 では前記の保護作用が慢性でも、急性でも観察されなかった。

臨床的に、ここでいう慢性型投与はビタミン本来の使い方に近く、実験とはいえ網膜神経細胞の遅発性死を特異的に防ぐことが確認されたことから、例えば虚血性視神経症が僚眼に来ることを防ぐなどの应用到に直結する重要な発見と考える。同様の目的で、副腎皮質ステロイドホルモンを投与する(もし、それが有効だったとしても)よりはるかに合理的で、しかも副作用は少なく済むはずである。ここに示した B 12, B 6 の網膜細胞の虚血に対する保護作用は、今後いくつかの検討すべき事項があるものの、高い臨床応用の可能性を持った発見と確信する。

#### 6. 活性酸素スカベンジャー・抗酸化薬

グルタミン酸による遅発性細胞死は NOS による NO 合成に直結することを先に述べた。NO の毒性閾値以下

での NMDA チャネルへの保護的なフィードバックという、一見パラドキシカルな現象の発現についても先に示したが、NO が決定的に細胞障害性を持つのは、多量のそれが活性酸素と反応してペルオキシニ亜硝酸になってからである。したがって、一旦 NO が発生しても、再灌流による活性酸素の供給(増加することが知られている<sup>161)</sup>)を断れば網膜障害を防げるはずである。そこで、各種の活性酸素スカベンジャー・抗酸化薬が虚血治療薬の候補となる。SOD, CAT, ビタミン C, E, ユビキノンなどがそれである(図 7)。このカテゴリーで我々が検討したのは、SOD と CAT のみであるが、これらが事前に投与してあった場合、虚血障害はグロスな ERG レベルで起こりにくいことを明らかにすることが出来た<sup>162)</sup>。この我々の実験に、機序的に新しい主張はないが、活性酸素スカベンジャーや抗酸化薬の有効性は動物実験上、他にも広く認められている<sup>131)132)144)146)163)~165)</sup>。ただ臨床応用には、事前投与が必要であり、長期となるとやはり副作用が問題となる。

### 7. チオレドキシシンまたは ADF (TRX/ADF)

活性酸素の処理という意味では前項の CAT などと同列ではあるが、我々が特に研究してきたチオレドキシシン系について、ここで項を改めて述べてみたい。Adult T-cell leukemia (ATL) 患者のリンパ球培養上清から得られた adult T-cell leukemia derived factor (ADF) は、ヒトのチオレドキシシン (hTRX) と相同体で、強力な抗酸化酵素の 1 つである<sup>166)~168)</sup>。TRX/ADF はグルタチオン・システムとともにトシスチンからトシステインへ変換するチオレドキシシン・システムの主役で、機能的にはインターロイキン (IL)-2 の 2 R $\alpha$  鎖の発現に関与することが知られている。TRX/ADF の抗酸化作用に期待して、虚血および虚血・再灌流負荷時の、TRX/ADF の網膜内局在の変化を組織化学的に調べたところ、後者の負荷後、網膜色素上皮細胞に TRX/ADF が特異的に増大することを発見した<sup>169)</sup>。それらは 2 時間の虚血後、再灌流 2 時間で発現し、24 時間、48 時間と著明に発現し続ける。リコンビナントの ADF (rADF) を対照として、虚血網膜の神経網膜と網膜色素上皮細胞についてウェスタン・ブロットを行ったところ、虚血・再灌流した後者(色素上皮)にのみ、対照と同じ 13 KD に TRX/ADF のバンドが出現することを確認した。このように TRX/ADF の網膜色素上皮細胞での出現は、再灌流のもたらす活性酸素増への生体防御反応の一つで、ストレスタンパクの出現などと類縁の現象と考えられる。

我々はさらに、網膜色素上皮細胞内での TRX/ADF 発現部位を同定すべく、ラットのローズベンガル血栓虚血系<sup>14)</sup>で、電子顕微鏡組織化学法を用いて追求したところ、それがミトコンドリアに集中して発現するのを観察した(図 10)<sup>170)</sup>。細胞質には、負荷後もほとんど TRX/ADF の発現を見なかった。CuZn-SOD, Mn-SOD, Fe-

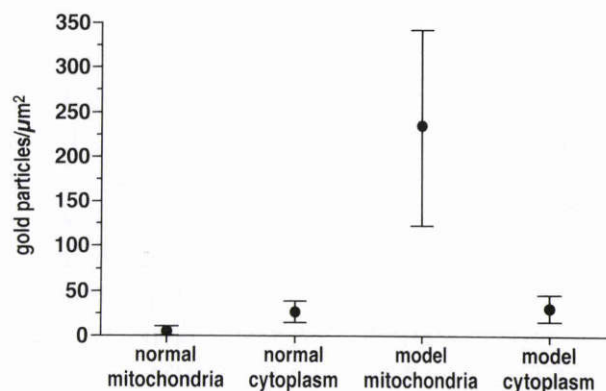


図 10 金コロイド法で定量化した網膜色素細胞内 ADF の局在。

ラット網膜で、一過性虚血を負荷した時の網膜色素細胞内の adult T-cell leukemia derived factor (ADF) 陽性部位を金コロイド法で定量的に調べたもの。点は平均値で、縦線は標準誤差を示す。サイトプラズマには、負荷前後で有意の変化がないが、ミトコンドリアで 0.1% 以下の危険率で有意差が認められた。

(from Gaunt C D, Ohira A, Honda O, Kigasawa K, Fujimoto T, Matsutani H, Yodoi J, Honda Y: Invest Ophthalmol Vis. Sci. 35: 2916-2923, 1994)

SOD のうち、ミトコンドリアに存在するのは Mn-SOD で、Fe-SOD, CuZn-SOD が細胞質に多いことを考え合わせると大変に興味ある所見と思われた。いい換えれば、虚血で増加するのは CuZn-SOD ではなく Mn-SOD ということを示唆している。また、我々はヒトの網膜色素細胞の培養系を用いて過酸化水素の有毒性に、ADF の存在が本当に防御的に働くかを追求し、濃度依存性に、また、先行投与に限り有効なことを確認した。

## IX 虚血網膜での一酸化窒素合成酵素 (NOS) の局在と遺伝子発現

NO は極めて不安定なガス状ラジカルで 2~3 秒以内にその活性が半減する。したがって、生体内で NO そのものを追いかけるのは難しい。そこで、それに代わるものとして、現在知られている生体内での唯一の NO 合成酵素である NOS の局在を持って、NO の局在を論ぜざるを得ないことを先に述べた。NOS の局在論は、1990 年 Snyder のグループが単離・精製したラット小脳の NOS に対する抗体を用いて、免疫組織化学的に中枢および末梢神経について報告<sup>171)</sup>したのに始まる。その中で、眼球に関しては NOS 陽性神経繊維が脈絡膜層に認められると記載されているのみで、網膜についての記述がない。現在、NOS には 3 種類のアイソザイムが知られており、神経由来 (nNOS)、血管内皮細胞由来 (eNOS)、そして誘導型と考えられる大食細胞由来 (iNOS) の 3 種類である。これらの 3 種類の NOS は、すべて NADPH diaphorase を補酵素とし、その結合部位は、3 種のアイソザイムに共通の C 末端にある。1991 年、神経由来の NADPH dia-

phoraseの局在がNOSと同一であることが発表されたが<sup>172)</sup>, 網膜のNADPH diaphorase陽性細胞は, 1985年, 既に種に関わらず極めて普遍的に内顆粒層のアマクリン細胞に散在性に認められることが報告<sup>173)</sup>されていた. NADPH diaphoraseを追った我々のNOS局在に関する研究では, 網膜のNOS陽性細胞の数は少なく, アマクリン細胞の一部が散在的に上記抗体に染まるのみであった<sup>109)</sup>. このことはNOが発生した時, ガスである利点を生かして細胞膜を荷電なしに自由に拡散し, 隣接した細胞に情報を伝え, 素早く消滅するからであろう. すべての細胞が同列にNOを作る必要はなく, また, これではNOの情報としての価値と拡散の特色が失われる. ただ, 同上の染色法以外に我々は, 今, 形態的にNOS陽性のアマクリン細胞を見分けるすべを持っていない. 以上のNADPH diaphoraseのアマクリン細胞局在に関する我々の研究結果はこれまでの局在報告<sup>174)~178)</sup>と矛盾しない.

我々のラット網膜からの初代培養細胞は各種マーカーによる細胞免疫化学的研究から基本的にアマクリン細胞から構成されていることは先に述べたが, そのNOS活性を成熟ラット網膜のNOS活性と比べてみたところ, 前者が $5 \pm 3$ , 後者が $14 \pm 4$  pmol/min/mg proteinであった. NOSの生理活性は認められたが, 培養系では活性が1/3に落ちていた. 次に, 虚血・再灌流を负荷して, 成熟ラット網膜でのNOS活性を経時的に調べたところ, 直後から減少し続けるものの, 15時間後に一過性に上昇するのが確認された<sup>179)</sup>. それは3種のNOSの総計であるが, iNOSに絞って虚血・再灌流網膜での変動を, mRNAレベルでreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法を用い, 経時的に測定してみた<sup>180)</sup>. 対照として $\beta$ -アクチンの発現を用いた(図11). まず, 眼動

脈を結紮した場合(LI), 再灌流後12時間でiNOS mRNA出現が著しい. 眼内圧上昇による虚血下でも, 12時間でmRNAの発現が著明で, 24時間でもその発現が引き続き見られた(PI). これに対し結紮して再灌流しなかった時(LOD), ピンセットで眼動脈に不可逆なダメージを与えた場合(FOD), また, それを切断してしまった場合(OT)などでは再灌流が行われないためか, NOSのmRNAの発現が全く見られなかった. 対照とした $\beta$ -アクチンには以上のいずれの操作でも発現に変化が認められなかった. さらに, iNOSのmRNA虚血・再灌流網膜内での局在を*in situ*ハイブリダイゼーション法で調べると虚血・再灌流後, 網膜内層では神経節細胞でない細胞, おそらくアマクリン細胞, 内層では誘導型の細胞, おそらく好中球と思われるものの中にその発現を見た. この現象が, 前述の12時間以上経過した時点でのiNOS増加に連なっている可能性が高い.

## X 虚血・再灌流網膜での, いくつかのサイトカイン(ILなど)の遺伝子発現

神経の虚血・再灌流でiNOSの発現が神経固有の細胞でなく, 浸潤した炎症系の細胞やグリア細胞にあることが示されたが, さらにいくつかのサイトカインILなどについて, 同処理後のmRNAレベルでの遺伝子発現を調べてみた<sup>181)</sup>. まずIL-1であるが, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ともに再灌流後, 6~12時間で著明に増加した. その出現型は前者で立ち上がりが早く, 持続も長い. 後者ではピークが12時間頃に来たが, さらに遅い96時間にもう一つのピークがあるかに見えた. 対照として測定した $\beta$ -アクチンには全経過を通して発現に変化が見られなかった. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ につき, *in situ*ハイブリダイゼーション法で, 網膜内でのmRNAの発現を調べたところ, IL-1 $\alpha$ については技術的な問題があったのか組織上でその局在が証明出来なかった. IL-1 $\beta$ については再灌流12時間のラット網膜で経時的に出現した好中球と思われる内網状層の細胞と, 神経細胞層ではグリア細胞, また網膜血管の内皮細胞にmRNAの発現が認められた<sup>181)</sup>(図12). IL-1は免疫反応, 炎症反応の主役を勤める活性物質であり, この所見は虚血と炎症の共通部分の存在を示唆するものである. IL-1受容体の網膜内分布が証明されていないが, 各種の血管病変, 血管新生病変とNOSとの関係を論ずる上で, 上記は有力な証拠と考えられる. また, 今後, この現象の本質に迫ることによって, これらの疾患に共通の治療が出てくる可能性がある. さらに, 我々の実験によると<sup>179)</sup>, tumor necrosing factor (TNF)は12~48時間後にmRNA発現のピークがあり, IL-6は12時間, transforming growth factor (TGF) $\beta$ -1は遅れて6時間後頃から出現し, 96時間後にピークがあった(図13). mRNAの発現が, 必ずしもそれぞれのサイトカインの合成へ連なるという保証はないが, 材料の少ない網膜でノーザン

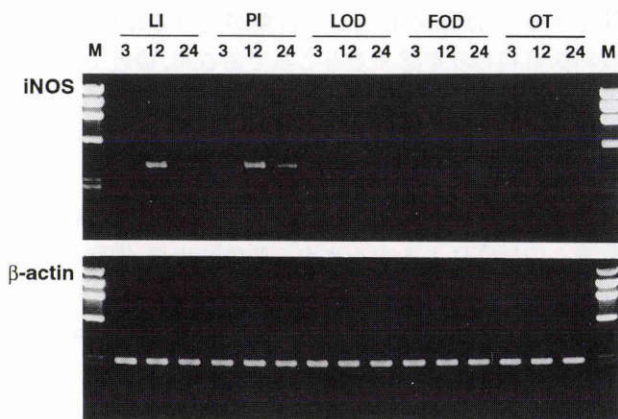


図11 虚血・再灌流後のiNOS mRNAの発現を示すゲル写真.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法にて, inducible nitric oxide synthase (iNOS)mRNAの虚血・再灌流後, 3, 12, 24時間ですったサンプルでの泳動. 上段の記号については, データの解釈とともに本文中で述べた.

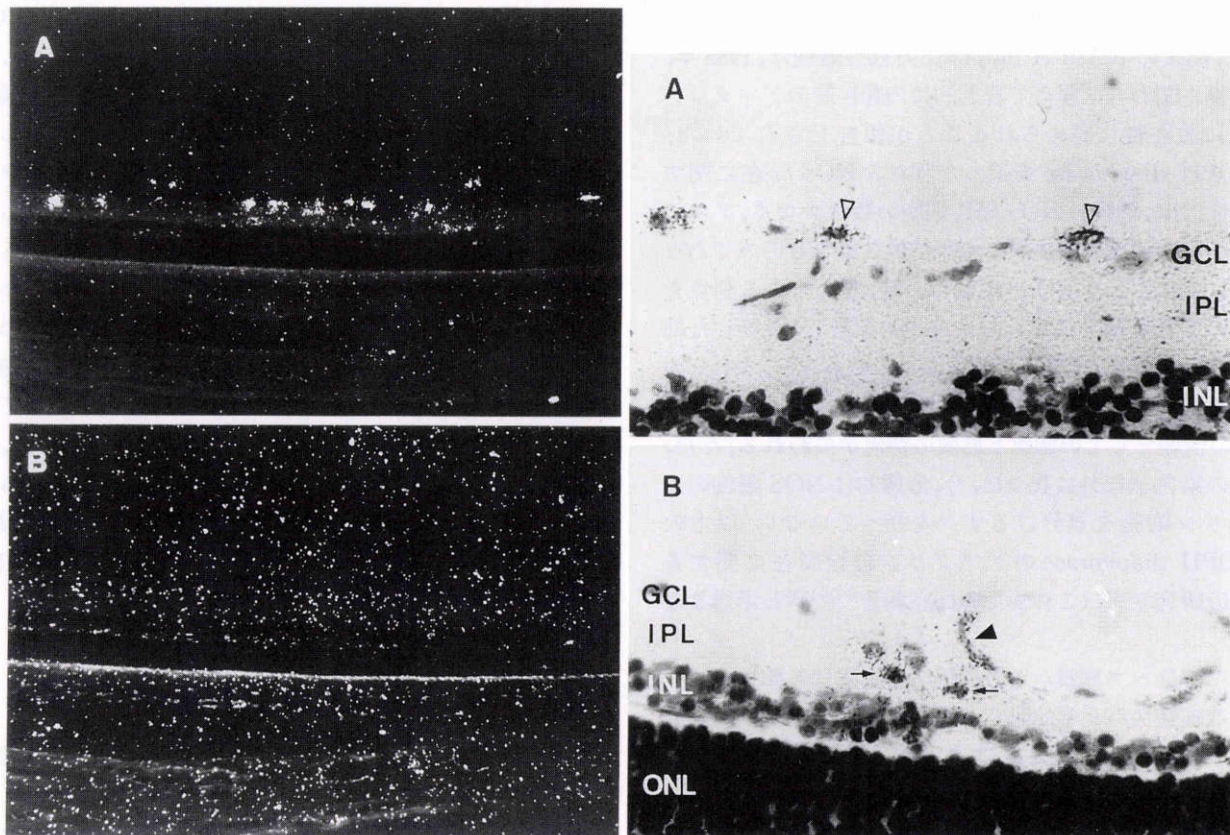


図12 虚血前後のIL-1 $\beta$  mRNA 発現.

左側は、A：虚血・再灌流12時間後の interleukin(IL)-1 $\beta$  messenger ribonucleic acid(mRNA)の発現を示す *in situ* ハイブリダイゼーションオートラジオグラフィの暗視野像。B：対照。網膜内層に mRNA の出現が見られ、内顆粒層、外顆粒層、網膜色素上皮には発現を見ない。左側 A を拡大して明視野で見ると(右側 AB), mRNA が出現しているのは神経繊維層の核濃染のグリア細胞( $\nabla$ 印), 網膜内層の血管内皮細胞( $\blacktriangledown$ 印), そして内網状層にある多核白血球(黒矢印)である。

GCL：神経節細胞層, IPL：内網状層, INL：内顆粒層, ONL：外顆粒層。

(from Hangai M, Yoshimura N, Yoshida M, Yabuuchi K, Honda Y: Invest Ophthalmol Vis. Sci. 36: 571-578, 1995)

プロットからのタンパク質分析は容易でなく, reverse transcript-polymerase chain reaction (RT-PCR)法を使った我々の方法は簡便にある程度の経時的定量性を示したと考える。このように各サイトカインごとに出現経過は異なるものの, 虚血・再灌流のもたらす生体反応は, 我々が同様な手法で調べてきた本来の炎症反応<sup>182)</sup>と類似した面を持っている。また, サイトカイン同士でも相互の干渉, クロストークがあると考えられ, 今後, これらのデータを統合する理論の構築が必要と考える。スタート時点におけるそれぞれの疾病の特色と, 途中から反応系を共有というパターンが予測されるからである。

## XI 網膜での遅発性神経細胞死とアポトーシス

以上のように, 虚血性の遅発性神経細胞死が, 途中から炎症または免疫反応と共通の系によっては進行する可能性が示唆されたが, 網膜の虚血による細胞死はいわゆる綺麗な計画死ではないかと Büchi ら<sup>183)184)</sup>によって特に

強調されてきた。アポトーシスの原語, ap-ptosis(落葉が落下する)には, ptosis という言葉が入っており<sup>185)</sup>, 我々眼科医は親しみを感ずるところであるが, 最近ではアポトーシス特有の deoxyribonucleic acid(DNA)のラダー化(断端化)を簡単に検出する TUNEL 法が出て, 網膜でも大変に研究がしやすくなった<sup>186)</sup>。今まで示されたデータから, 虚血・再灌流, グルタミン酸毒性, NO 合成, 活性酸素との反応によるペルオキシ亜硝酸出現, 細胞死という一連の現象にアポトーシスの概念が導入されると, 臨床的な種々な疾患が虚血との関連で眺められ, 治療としても統合されてくる(図14)。

## XII 結 語

以上は, 第100回日本眼科学会での同名の特別講演に加筆したものである。全体を通して総花的, レビュー的な記載で, 広く専門外の人にわかっていただけるよう極力, 平易に書いたつもりである。それぞれの実験方法, データの解析は省略したが, 我々のそれは, 出典を明確に示した

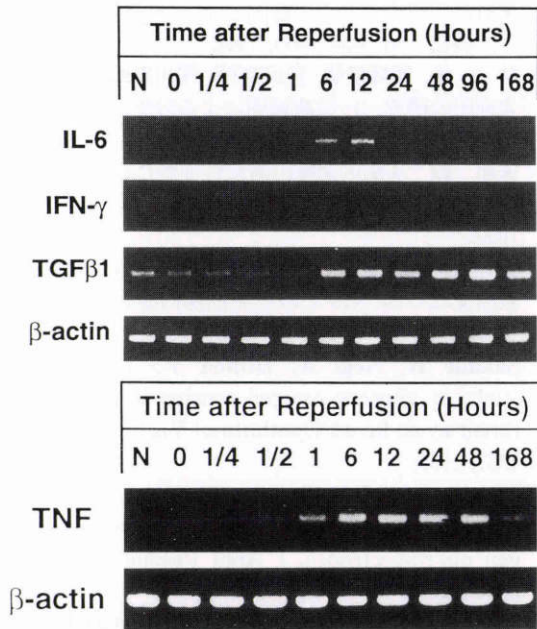


図13 虚血後のいくつかの生理活性物質 mRNA 発現。RT-PCR で, interleukin (IL)-6, interferon (IFN)- $\gamma$ , transforming growth factor (TGF)- $\beta$  1, tumor necrosing factor (TNF) mRNA の発現を経時的に定量化して見たゲルのシリーズ写真,  $\beta$ -actin は対照で, すべての経過で変化を見ていない, IL-6 は虚血・再灌流後 12 時間, TGF- $\beta$  は 6 時間以降, TNF は 12 時間以降にピークが出現する, INF- $\gamma$  については測定時間範囲で遺伝子発現を見なかった。(from Hangai M, Yoshimura N, Honda Y: Ophthalmic Res. 28: 248-254, 1996)

ので(文献 11, 24, 57~59, 67~84, 97~101, 109, 116, 125~128, 152, 162, 169, 170, 179~182),興味を持たれた方は,それぞれの原著にあたってください。これらの研究成果の一部は,すでに ARVO 総会で,1993 年に Honda が Delayed ischemic retinal cell death: Mechanisms and treatment と題する Special Interest Group (SIG) Meeting を Marmor 教授とともに組織する機会を与えられた際に,さらに,1994 年には,ARVO のメインイベントの一つである Sunday Seminar の“Nitric oxide in eye”で,NO の第一人者である RF Furchgott 教授とともに Honda が遅発性細胞死の立場から Nitric oxide and retinal neuron と題しての指名講演として発表済みのものである。また,今回は使用データに直接関与した方々の名前だけを共同研究者として挙げさせていただいたが,これ以外にも,この一連の研究を支えてくれた共同研究者がたくさんあることを記しておきたい。

視点は異なるが,前任の塚原 勇教授の第 30 回日本臨床眼科学会,第 23 回国際眼科学会,第 87 回日本眼科学会での特別講演は脈絡膜循環に関したもので<sup>187)~189)</sup>,色素上皮の視点で,統合的に虚血の問題を扱ったものと見ることが出来る。今回の著者の虚血に関する研究では,神経網膜に主眼を置いたのと,分子生物学の手法を取り入れ

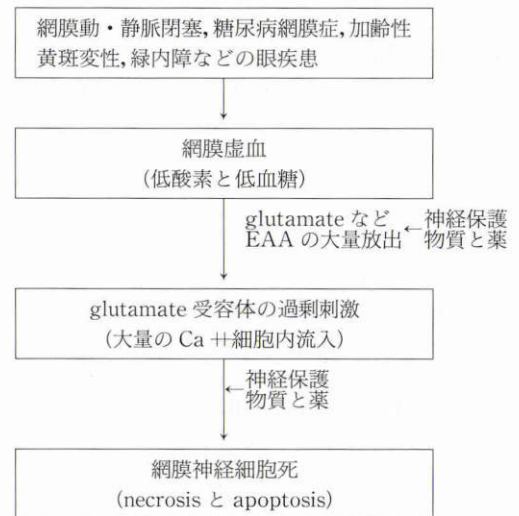


図 14 眼疾患と網膜虚血障害。

虚血・再灌流から,グルタミン酸受容体を介して大量の Ca++ の網膜内流入が起こり,遅発性細胞死が起る。そこでは壊死とアポトーシスが混在し,神経変性が進む。この流れと,治療,疾患のかかわりを示す図。

物質を追って,より現象の本質に迫ろうとしたことを特色として挙げられると思う。また,臨床的な応用という視点で,この現象を見続けてきたのが基礎の研究者との大きな相違点である。

網膜の虚血問題を扱っていて特に感じたのは,この方面の情報量の多さと進歩の速さであった。学生時代に,湯川秀樹氏の reference nothing(参考文献なし)という論文を読み,何時かこういう仕事をやってみたいものだと思ったことがあったが,今,我々のやっていることは全くその正反対で,情報の海を泳いでいるようなものである。時にはその高波に溺れそうになる程である。多くの情報の中から,重要なものを選んで,正しく効率的な研究の方向性を見据えるのが教室を預かる者の大切な仕事とってきた。

最後に,第 100 回という記録すべき時に特別講演の機会を与えていただいた日本眼科学会評議員各位,日眼会員の皆様に感謝したい。また,この研究を支えてくれた共同研究者達と京大眼科同窓会の研究助成に感謝の意を表したい。また,この一連の研究は,文部省の科学研究費「一般研究(A)…課題番号 06404062」,「一般研究(C)…課題番号 07671914」,「一般研究(C)…課題番号 07671915」,「基盤研究(A)(2)…課題番号 08407055」,厚生省特定疾患網膜脈絡膜萎縮症調査研究費,新技術事業団先端技術展開制度などの支援を受けた。

文 献

- 1) Noell WK: The effects of iodoacetate on the vertebrate retina. J Cell Comp Physiol 37: 283-307, 1951.
- 2) Noell WK: Azide-sensitive potential difference across the eye-bulb. Am J Physiol 170: 217-238, 1952.
- 3) Noell WK, Chinn HI: Failure of the visual pathway during anoxia. Am J Physiol 161: 573-

- 590, 1950.
- 4) **Noell WK**: Experimentally induced toxic effects on structure and function of visual cells and pigment epithelium. *Am J Ophthalmol* 36(Part II): 103—114, 1953.
  - 5) **Noell WK**: The origin of the electroretinogram. *Am J Ophthalmol* 38(Part II): 78—93, 1954.
  - 6) **Noell WK**: Metabolic injuries of the visual cell. *Am J Ophthalmol* 40(Part II): 60—70, 1955.
  - 7) **Noell WK**: Studies of visual cell viability and differentiation. *Ann NY Acad Sci* 74: 337—361, 1958.
  - 8) **Noell WK, Delmelle M, Albrecht R**: Vitamin A deficiency effect on retina: Dependence on light. *Science* 172: 72—76, 1971.
  - 9) **Noell WK, Albrecht R**: Irreversible effects of visual light on the retina: Role of vitamin A. *Science* 172: 76—80, 1971.
  - 10) **Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S**: Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol* 5: 450—473, 1966.
  - 11) **Honda Y**: Some observations on the effects of ouabain upon the ERG of mammals. ARVO abstract booklet, Electrophysiology and Psychophysics, Retinal slow potentials and ganglion cell. Lorrin A Riggs (Chairman), Holiday Inn, Sarasota, FL, April 24—28, 1972.
  - 12) **Brown KT, Wiesel TN**: Localization of origins of the electroretinogram components by intraretinal recording in the intact cat eye. *J Physiol* 158: 257—280, 1961.
  - 13) **Brown KT**: The electroretinogram: Its components and their origins. *Vision Res* 8: 633—677, 1988.
  - 14) **Nanda SK, Hatchell DL, Tiedeman JS, Dutton JJ, Hatchell MC, McAdoo T**: A new method for vascular occlusion: Photochemical initiation of thrombosis. *Arch Ophthalmol* 105: 1121—1124, 1987.
  - 15) **Krause AC, Goren SB**: The effects of hypoxia and hyperoxia upon the oxygen tension in the vitreous humor of the cat. *Am J Ophthalmol* 42: 764—769, 1956.
  - 16) **Alm A, Bill A**: The oxygen supply to the retina. I. Effects of changes in intraocular and arterial blood pressures, and in arterial PO<sub>2</sub> and PCO<sub>2</sub> on the oxygen tension in the vitreous body of the cat. *Acta Physiol Scand* 84: 261—274, 1972.
  - 17) **Ernest JT**: *In vivo* measurement of the optic disk oxygen tension. *Invest Ophthalmol* 12: 927—931, 1972.
  - 18) **Tsacopoulos A, Lehmenkuehler A**: A double-barrelled Pt-microelectrode for simultaneous measurement of PO<sub>2</sub> and bioelectrical activity in excitable tissues. *Experientia* 33: 1337—1338, 1977.
  - 19) 宮沢文明: 硝子体酸素分圧の研究. *眼紀* 32: 2027—2036, 1981.
  - 20) 飯塚俊明, 宮沢文明, 林 優, 阿川忠郎: 硝子体酸素分圧の研究. 2. 光凝固による分圧の変化について. *眼紀* 33: 858—865, 1982.
  - 21) 林 優, 飯塚俊明, 宮沢文明, 阿川忠郎: 硝子体酸素分圧の研究. 3. 冷凍凝固による分圧の変化について. *眼紀* 34: 763—770, 1983.
  - 22) 矢部 緑: 実験的網膜色素変性症眼における硝子体酸素分圧と脈絡膜酸素分圧. *眼紀* 41: 266—272, 1990.
  - 23) 上野則夫, 田野保雄, 山本保範, 清水芳樹, 真鍋礼三, 萩原文二: *In Situ* での家兎前房内酸素分圧の測定(予報). *眼紀* 33: 2102—2107, 1982.
  - 24) **Sakae H, Negi A, Honda Y**: Comparative study of vitreous oxygen tension in human and rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1933—1937, 1989.
  - 25) **Linsemmeier RA, Yancy CM**: Improved fabrication of double-barreled recessed cathode oxygen microelectrodes. *J Appl Physiol* 63: 2554—2557, 1987.
  - 26) **Braun RD, Linsenmeier RA, Goldstick TK**: Oxygen consumption in the inner and outer retina of the cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 542—554, 1995.
  - 27) **Haugh-Scheidt LM, Linsenmeier RA, Griff ER**: Oxygen consumption in the isolated toad retina. *Exp Eye Res* 61: 63—72, 1995.
  - 28) **Wilson CA, Berkowitz BA, McCuen BW II, Charles HC**: Measurement of preretinal oxygen tension in the vitreomized human eye using fluorine-19 magnetic resonance spectroscopy. *Arch Ophthalmol* 110: 1098—1100, 1992.
  - 29) **Alder VA, Cringle SJ**: Vitreal and retinal oxygenation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 228: 151—157, 1990.
  - 30) **Alder VA, Yu D, Cringle SJ**: Vitreal oxygen tension measurements in the rat eye. *Exp Eye Res* 52: 293—299, 1991.
  - 31) **Cringle SJ, Yu D, Alder VA**: Intraretinal oxygen tension in the rat eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 229: 574—577, 1991.
  - 32) **Shonat RD, Wilson DF, Riva CE, Cranston SD**: Effect of acute increases in intraocular pressure on intravascular optic nerve head oxygen tension in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 3174—3180, 1992.
  - 33) **Ahmed JA, Linsenmeier RA, Dunn R Jr**: The oxygen distribution in the prelaminar optic nerve head of the cat. *Exp Eye Res* 59: 457—466, 1994.
  - 34) **Alder VA, Cringle SJ, Constable IJ**: The retinal oxygen profile in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 30—36, 1983.
  - 35) **Alder VA, Ben-Nun J, Cringle SJ**: PO<sub>2</sub> profiles and oxygen consumption in cat retina with an occluded retinal circulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1029—1034, 1990.
  - 36) **Pournaras CJ, Tsacopoulos M, Riva CE, Roth A**: Diffusion of O<sub>2</sub> in normal and ischemic retinas of anesthetized miniature pigs in normoxia and hypoxia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*

- 228: 138—142, 1990.
- 37) **Ahmed JA, Braun RD, Dunn R Jr, Linsenmeier RA**: Oxygen distribution in the macaque retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 516—521, 1993.
  - 38) **Medrano CJ, Fox DA**: Oxygen consumption in the rat outer and inner retina: Light- and pharmacologically-induced inhibition. *Exp Eye Res* 61: 273—284, 1995.
  - 39) **Braun RD, Linsenmeier RA**: Retinal oxygen tension and electroretinogram during retinal artery occlusion in the cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 523—541, 1995.
  - 40) **Patz A**: The effect of oxygen on immature retinal vessels. *Invest Ophthalmol* 4: 988—999, 1965.
  - 41) **Patz A**: The role of oxygen in retrolental fibroplasia. *Trans Am Ophthalmol Soc* 66: 940—985, 1968.
  - 42) **Ashton N**: Some aspects of the comparative pathology of oxygen toxicity in the retina. *Br J Ophthalmol* 52: 505—531, 1968.
  - 43) **Gole GA, Browning J, Elts SM**: Oxygen-induced retinopathy: Ultrastructure of vitreous new vessels in the kitten model. *Curr Eye Res* 9: 741—748, 1990.
  - 44) **Penn JS, Tolman BL, Lowery LA, Koutz CA**: Oxygen-induced retinopathy in the rat: Hemorrhages and dysplasias may lead to retinal detachment. *Curr Eye Res* 11: 939—953, 1992.
  - 45) **Penn JS, Henry MM, Wall PT, Tolman BL**: The range of PaO<sub>2</sub> variation determines the severity of oxygen-induced retinopathy in newborn rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 2063—2070, 1995.
  - 46) **Reynaud X, Hansen RM, Fulton AB**: Effect of prior oxygen exposure on the electroretinographic responses of infant rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 2071—2079, 1995.
  - 47) **Holmes JM, Duffner LA**: The effect of post-natal growth retardation on abnormal neovascularization in the oxygen exposed neonatal rat. *Curr Eye Res* 15: 403—409, 1996.
  - 48) **Molnar I, Poitry S, Tsacopoulos M, Gilodi N, Leuenberger PM**: Effect of laser photocoagulation on oxygenation of the retina in miniature pigs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1410—1414, 1985.
  - 49) **Stefansson E, Hatchell DL, Fisher BL, Sutherland FS, Machemer R**: Panretinal photocoagulation and retinal oxygenation in normal and diabetic cats. *Am J Ophthalmol* 101: 657—664, 1986.
  - 50) **Alder VA, Cringle SJ, Brown M**: The effect of regional photocoagulation on vitreal oxygen tension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 1078—1085, 1987.
  - 51) **Kawahara J, Nakamura R, Wakabayashi Y, Nakano E, Agawa T, Usui M**: Effect of trans-pupillary argon laser cyclophotocoagulation on anterior chamber oxygen tension in rabbit eyes. *Jpn J Ophthalmol* 34: 450—462, 1990.
  - 52) **Tomita T**: Electrophysiological studies of retinal cell function (Proctor Medal Lecture). *Invest Ophthalmol* 15: 171—187, 1976.
  - 53) **Tomita T**: Retrospective review of retinal circuitry. *Vision Res* 26: 1339—1350, 1986.
  - 54) **Steinberg R**: Monitoring communications between photoreceptors and pigment epithelial cells: Effects of “mild” systemic hypoxia (Friedenwald Lecture). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 12: 1888—1904, 1987.
  - 55) **Linsenmeier RA**: Electrophysiological consequences of retinal hypoxia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 228: 143—150, 1990.
  - 56) **Haugh-Schmidt LM, Griff ER, Linsenmeier RA**: Light-evoked oxygen responses in the isolated toad retina. *Exp Eye Res* 61: 73—81, 1995.
  - 57) **本田孔士**: 眼圧上昇の網膜光変性に及ぼす影響に関する研究(予期). *日眼会誌* 79: 217—226, 1975.
  - 58) **Kawano S, Honda Y, Negi A, Mitsuyu M**: Vulnerability of the rabbit eye to torsion and pulling-out—A functional study, monitored by ERG and VECP. *Ophthalmic Surg* 12: 830—833, 1981.
  - 59) **Honda Y, Kawano S, Negi A**: Pressure profile of ophthalmic surgical procedure: An experimental study. *Ophthalmic Surg* 13: 387—391, 1981.
  - 60) **小野寺重季**: 網膜循環と ERG との関連に関する研究, 循環動態の変化に伴う加圧 ERG の変化に就いて. *日眼会誌* 63: 2310—2321, 1964.
  - 61) **Usami E**: The influence of the pressure on ERG of a rabbit, especially on a-wave and oscillatory potential. *Jpn J Ophthalmol* 9: 108—115, 1965.
  - 62) **Fujino T, Hamasaki DI**: Effect of intraocular pressure on the electroretinogram. *Arch Ophthalmol* 78: 757—765, 1967.
  - 63) **田沢 豊**: 酸素不足が各種哺乳動物の ERG 各波並びに網膜常存電位に及ぼす影響. *日眼会誌* 70: 1536—1547, 1966.
  - 64) **Tazawa Y, Seaman AJ**: The electroretinogram of the living extracorporeal bovine eye. The influence of anoxia and hypothermia. *Invest Ophthalmol* 11: 691—698, 1972.
  - 65) **今泉亀撒, 田沢 豊, 米良博量, 大塚忠弘, 今泉博雄**: 牛摘出灌流眼 ERG と酸素—灌流液の検討—. *眼紀* 25: 481—485, 1974.
  - 66) **高橋洋司**: 牛灌流眼 ERG 発現維持に必要な最少酸素量. *日眼会誌* 79: 1167—1176, 1975.
  - 67) **Honda Y**: Rhythmic wavelets recorded from an *in vitro* preparation of mammalian retina. *Experientia* 25: 551—553, 1969.
  - 68) **Honda Y, Nagata M**: Electrical activity of the human retina *in vitro*. *Am J Ophthalmol* 68: 925—929, 1969.
  - 69) **Honda Y**: The mode of action of insulin upon the electrical activity of mammalian retinas *in vitro*. *Experientia* 27: 395—396, 1971.

- 70) **Honda Y**: Studies on electrical activities of the mammalian retina and optic nerve *in vitro* I. Factors affecting activity of the retina. *Acta Ophthalmol Jpn* 73: 1865—1899, 1969. II. The mode and site of action of iodoacetic acid upon the *in vitro* preparation of rabbits retina. *Acta Ophthalmol Jpn* 74: 302—316, 1970. III. The effects of acetylcholine upon the ERG of rabbits retinas *in vitro*. *Acta Ophthalmol Jpn* 75: 1164—1171, 1971.
- 71) **Honda Y**: Quantitative analysis of some effects of ouabain upon the electrical activity of mammalian retina. *Invest Ophthalmol* 11: 699—705, 1972.
- 72) **Honda Y**: Some observations of the mode of action of ouabain upon the electrical activity of mammalian retinas. *Invest Ophthalmol* 11: 706—710, 1972.
- 73) **Honda Y, Nagata M**: Some observations of the effects of barbiturates upon the electroretinogram of rabbits. *Ophthalmol Res* 4: 129—136, 1973.
- 74) **Honda Y, Becker B, Podos SM**: The effects of diphenylhydantoin on the electroretinogram of rabbits. I. Effects of concentration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 12: 567—572, 1973.
- 75) **Honda Y, Becker B, Podos SM**: The effects of diphenylhydantoin on the electroretinogram of rabbits. II. Effects of hypoxia and potassium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 12: 573—578, 1973.
- 76) **Negi A, Honda Y, Kawano S**: Effects of intraocular irrigating solution on the electroretinographic B-wave: A investigation of essential factors. *Am J Ophthalmol* 92: 28—37, 1981.
- 77) **Honda Y, Negi A, Kawano S**: Ion movement in and out of the vitreous space following vitrectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 126—130, 1981.
- 78) **Negi A, Honda Y, Kawano S**: Importance of bicarbonate ion in the vitreous space. *Arch Ophthalmol* 100: 1839—1843, 1982.
- 79) **Honda Y, Negi A, Kawano S**: Mode of ion movements into the vitreous space: Equilibration after vitrectomy. *Arch Ophthalmol* 101: 105—111, 1983.
- 80) **Honda Y, Enoch JM**: The appearance of rhythmic wavelets on the ERG of alpha-chymotrypsin poisoned mammalian retina. *Doc Ophthalmol Proc Ser* 2: 91—104, 1973.
- 81) **Honda Y, Negi A, Mitsuyu M, Kawano S**: Iron poisoning and deferoxamine: Experimental studies on acute iron poisoning of the retina. *Arbeitsmedizinische Frage in der Ophthalmologie, Societas Ergophthalmologica Internationalis* (ed by Merte HJ) Karger, Munchen, 671—682, 1982.
- 82) **本田孔士**: 摘出網膜の酸素摂取に関する諸問題. *眼紀* 29: 726—728, 1978.
- 83) **本田孔士, 根木 昭, 三露真理子**: 摘出網膜灌流における酸素供給の二, 三の問題点. *日眼会誌* 82: 331—334, 1978.
- 84) **本田孔士, 根木 昭, 三露真理子**: 摘出網膜への酸素供給制限と窒素ガス, 空気吹き込みの影響. *日眼会誌* 82: 411—414, 1978.
- 85) **大塚忠弘**: 牛摘出癌灌流への人工赤血球の応用. *日眼会誌* 77: 1102—1115, 1973.
- 86) **Imaizumi K, Tazawa Y, Otsuka T, Imaizumi H**: Preservation of ERG in the isolated perfusing eye by fluorocarbon as the erythrocyte substitute. *Doc Ophthalmol Proc Ser* 10: 225—233, 1976.
- 87) **Thoreson WB, Purple RL**: Effects of using the oxygen-carrying fluorocarbon, FC43 on the ERG of the arterially perfused cat eye. *Curr Eye Res* 8: 487—498, 1989.
- 88) **菅 誠一**: 摘出ラット眼の研究(1)—ERGから見た保存条件の検討—. *日眼会誌* 76: 884—892, 1972.
- 89) **Niemeyer G**: Intracellular recording from the isolated perfused mammalian eye. *Vision Res* 13: 1613—1618, 1973.
- 90) **Niemeyer G**: ERG dependence on flow rate in the isolated and perfused mammalian eye. *Brain Res* 57: 203—207, 1973.
- 91) **Niemeyer G, Gouras P**: Rod and cone signals in S-potentials of the isolated perfused cat eye. *Vision Res* 13: 1603—1612, 1973.
- 92) **Niemeyer G**: Neurobiology of perfused mammalian eyes. *J Neurosci Methods* 3: 317—337, 1981.
- 93) **Niemeyer G, Gerber U, Uji Y**: Wirkung von beta-Blockern auf die Netzhautfunktion *in vitro*. *Klin Mbl Augenheilk* 192: 391—394, 1988.
- 94) **Uji Y, Niemeyer G, Gerber U**: The effect of beta-adrenergic agonists on cone systems in the cat eye. *Ophthalmology* 70: 77—87, 1988.
- 95) **Miyamura N, Doi M, Uji Y**: Effects of carteolol on ERG in the perfused cat eye. *Doc Ophthalmol* 84: 97—103, 1993.
- 96) **Gouras P, Hoff M**: Retinal function in an isolated, perfused mammalian eye. *Invest Ophthalmol* 9: 388—399, 1970.
- 97) **Honda Y**: The mode of action of neurotoxin and some common chemicals upon the electrophysiological properties of perfused mammalian retina. *Doc Ophthalmol Proc Ser* 15: 3—11, 1978.
- 98) **Kiryu J, Yamamoto F, Honda Y**: Effects of sodium iodate on the electroretinogram c-wave in the cat. *Vision Res* 32: 2221—2228, 1992.
- 99) **Yamamoto F, Honda Y**: Effects of intravenous iodoacetate and iodate on pH outside rod photoreceptors in the cat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2009—2017, 1993.
- 100) **Hiroi K, Yamamoto F, Honda Y**: Analysis of electroretinogram during systemic hypercapnia with intraretinal K<sup>+</sup>-microelectrodes in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3957—3961, 1994.
- 101) **Hiroi K, Yamamoto F, Honda Y**: Intraretinal study of cat electroretinogram during retinal ischemia-reperfusion with extracellular K<sup>+</sup> concentration microelectrodes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 656—663, 1994.



- 102) **Granit R**: The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve. *J Physiol* 77(Part I): 207—224, (Part II): 224—239, 1933.
- 103) **Granit R**: Sensory mechanisms of the retina. Oxford Univ Press, London, 1947.
- 104) **Olney JW, Charpe LG**: Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* 166; 386—388, 1969.
- 105) **Choi WD**: Calcium-mediated neurotoxicity: Relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11: 465—469, 1988.
- 106) **Meldrum B, Garthwaite J**: Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci* 11: 379—387, 1990.
- 107) **Kirino T**: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239: 57—69, 1982.
- 108) **Benveniste H, Drejer J, Shousboe A, Diemer NH**: Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in the rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43: 1369—1374, 1984.
- 109) **柏井 聡**: 活性酸素, フリーラジカルと網膜疾患—虚血網膜における一酸化窒素の役割について. *日眼会誌* 99: 1361—1376, 1995.
- 110) **Louzada-Junior P, Dias JJ, Santos WF, Lachat JJ, Bradford HF, Coutinho-Netto J**: Glutamate release in experimental ischemia of the retina: An approach using microdialysis. *J Neurochem* 59: 358—363, 1992.
- 111) **Lucas DR, Newhouse JP**: The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol* 58: 193—201, 1957.
- 112) **Furukawa T, Hanawa I**: Effects of some common cations on electroretinogram of the toad. *Jpn J Physiol* 5: 289—300, 1955.
- 113) **Hanawa I, Tateishi T**: The effect of aspartate on the electroretinogram of the vertebrate retina. *Experientia* 26: 1311—1312, 1970.
- 114) **Akagawa K, Takada M, Hayashi H, Uemura K**: Calcium- and voltage-dependent potassium channel in the rat retinal amacrine cells identified *in vitro* using a cell type-specific monoclonal antibody. *Brain Res* 518: 1—5, 1990.
- 115) **Barnstable CJ, Hofstein R, Akagawa K**: A marker of early amacrine cell development in rat retina. *Dev Brain Res* 20: 286—290, 1985.
- 116) **Kashii S, Takahashi M, Mandai M, Shimizu H, Honda Y, Sasa M, et al**: Protective action of dopamine against glutamate neurotoxicity in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 685—695, 1994.
- 117) **Gasic GP, Hollmann M**: Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu Rev Physiol* 54: 507—536, 1992.
- 118) **Nakanishi S**: Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258: 597—603, 1992.
- 119) **Coyle JT, Puttfarcken P**: Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689—695, 1993.
- 120) **Furchgott RF, Zawadzki JV**: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373—376, 1980.
- 121) **Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R**: Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptor in the brain. *Nature* 336: 385—388, 1988.
- 122) **Garthwaite J**: Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 14: 60—67, 1991.
- 123) **Snyder SH**: Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters? *Science* 257: 494—496, 1992.
- 124) **Bredt DS, Snyder SH**: Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 682—685, 1990.
- 125) **Mandai M, Yoshimura N, Yoshida M, Iwaki M, Honda Y**: The role of nitric oxide synthase in endotoxin-induced uveitis: Effects of N-nitro L-arginine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3673—3680, 1994.
- 126) **Mandai M, Mittag TW, Kogishi J, Iwaki M, Hangai M, Yoshimura N**: Role of nitric oxide synthase isozymes in endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 826—832, 1996.
- 127) **Kashii S, Mandai M, Kikuchi M, Honda Y, Tamura Y, Kaneda K, et al**: Dual actions of nitric oxide in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Res* 711: 93—101, 1996.
- 128) **Ujihara H, Akaike A, Tamura Y, Yokota T, Sasa M, Kashii S, et al**: Blockade of retinal NMDA receptors by sodium nitroprusside is probably due to nitric oxide formation. *Jpn J Pharmacol* 61: 375—377, 1993.
- 129) **Yoon YH, Marmor MF**: Dextromethorphan protects retina against ischemic injury *in vivo*. *Arch Ophthalmol* 107: 409—411, 1989.
- 130) **菅原岳史, 森 敏郎, 亀井俊也, 田沢 豊**: 家兔網膜虚血に対する dextromethorphan の予防効果. *日眼会誌* 96: 90—95, 1992.
- 131) **Gupta LY, Marmor MF**: Mannitol, dextromethorphan, and cataract minimize ischemic damage to retinal pigment epithelium and retina. *Arch Ophthalmol* 111: 384—388, 1993.
- 132) **Cao W, Zaharia A, Drumheller A, Casanova C, Lafond G, Brunette JR, et al**: Effects of dextromethorphan on ischemia induced electroretinogram changes in rabbit. *Curr Eye Res* 13: 97—102, 1994.
- 133) **El-Asrar AM, Morse PH, Maimone D, Torczynski E, Reder AT**: MK-801 protects retinal neurons from hypoxia and the toxicity of glutamate and aspartate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 3463

- 3468, 1992.
- 134) **Weber M, Bonaventure N, Sahel JA**: Protective role of excitatory amino acid antagonists in experimental retinal ischemia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 233: 360—365, 1995.
  - 135) **Takahashi K, Lam TT, Edward DP, Buchi ER, Tso MOM**: Protective effects of flunarizine in ischemic injury in the rat retina. *Arch Ophthalmol* 110: 862—870, 1992.
  - 136) **Gehlbach P, Purple RL**: Enhancement of retinal recovery by conjugated deferoxamine after ischemia-reperfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 669—676, 1994.
  - 137) **Ophir A, Berenshtein E, Kitrossky N, Averbukh E**: Protection of the transiently ischemic cat retina by zinc-desferrioxamine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 1212—1222, 1994.
  - 138) **Romano C, Price M, Bai HY, Olney JW**: Neuroprotectants in honghua: Glucose attenuates retinal ischemic damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 72—80, 1993.
  - 139) **Weber M, Mohand-Said S, Hicks D, Dreyfus H, Sahel JA**: Monosialoganglioside GM 1 reduces ischemia-reperfusion-induced injury in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 267—273, 1996.
  - 140) **Peachey NS, Green DJ, Ripps H**: Ocular ischemia and effects of allopurinol on functional recovery in the retina of the arterially perfused cat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 58—65, 1993.
  - 141) **Osborne NN, Schwarz M, Pergande G**: Protection of rabbit retina from ischemic injury by flupirtine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 274—280, 1996.
  - 142) **Pulido JS, Fukuda M, Howe CA, Puro DG**: Barbiturates protect retinal cells from hypoxia in cell culture. *Arch Ophthalmol* 107: 1809—1812, 1989.
  - 143) **Szabo ME, Droy-Lefaix NT, Doly M, Braquet P**: Ischaemia- and reperfusion-induced  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  shifts in rat retina: Effects of two free radical scavengers, SOD and EGB 761. *Exp Eye Res* 55: 39—45, 1992.
  - 144) **Nayak MS, Kita M, Marmor MF**: Protection of rabbit retina from ischemic injury by superoxide dismutase and catalase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2018—2022, 1993.
  - 145) **Klaeger C, de Sa L, Klaeger AJ, Carlson EJ, Good WV, Epstein CJ**: An elevated level of copper zinc superoxide dismutase fails to prevent oxygen induced retinopathy in mice. *Br J Ophthalmol* 80: 429—434, 1996.
  - 146) **Ueda T, Ueda T, Armstrong D**: Preventive effect of natural and synthetic antioxidants on lipid peroxidation in the mammalian eye. *Ophthalmol Res* 28: 184—192, 1996.
  - 147) **Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G**: Nerve growth factor promotes functional recovery of retinal ganglion cells after ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 3232—3245, 1993.
  - 148) **Unoki K, LaVail MM**: Protection of the rat retina from ischemic injury by brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor, and basic fibroblast growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 907—915, 1994.
  - 149) **Zhang C, Takahashi K, Lam TT, Tso MOM**: Effects of basic fibroblast growth factor in retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3163—3168, 1994.
  - 150) **Perlman JI, McCole SM, Pulluru P, Chang C, Lam TT, Tso MOM**: Disturbances in distribution of neurotransmitters in the rat retina after ischemia. *Curr Eye Res* 15: 589—596, 1996.
  - 151) **Olney JW, Labruyere J, Wang G, Wozniak DF, Price MT, Sesma MA**: NMDA antagonist neurotoxicity: Mechanism and prevention. *Science* 254: 1515—1518, 1991.
  - 152) **Kikuchi M, Kashii S, Honda Y, Ujihara H, Sasa M, Tamura Y, et al**: Protective action of zinc against glutamate neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 2048—2053, 1995.
  - 153) **Chouristine CW, Choi DW**: Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. *J Neurosci* 10: 108—116, 1990.
  - 154) **Legendre P, Westbrook GL**: The inhibition of single N-methyl-D-aspartate-activated channels by zinc ions on cultured rat neurons. *J Physiol* 429: 429—449, 1990.
  - 155) **Assaf SY, Chung SH**: Release of endogenous  $\text{Zn}^{2+}$  from brain tissue during activity. *Nature* 308: 734—736, 1984.
  - 156) **Howell GA, Welch MG, Fredrickson CJ**: Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature* 308: 736—738, 1984.
  - 157) **Newsome DA, Swartz M, Leone NC, Elston RC, Miller E**: Oral zinc in macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 106: 192—198, 1988.
  - 158) **The Eye Disease Case-Control Study Group**: Risk factors for neovascular age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 110: 1701—1708, 1992.
  - 159) **West S, Vitale S, Hallfrisch J, Monoz B, Muller D, Bressler S, et al**: Are antioxidants or supplements protective for age-related macular degeneration? *Arch Ophthalmol* 112: 222—227, 1994.
  - 160) **Stur M, Tittle M, Reitner A, Meisinger V**: Oral zinc and the second eye in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 1225—1235, 1996.
  - 161) **Ophir A, Berenshtein E, Kitrossky N, Berman E, Photiou S, Rothman Z, et al**: Hydroxyl radical generation in the cat retina during reperfusion following ischemia. *Exp Eye Res* 57: 351—357, 1993.
  - 162) **Yamamoto F, Hiroi K, Honda Y**: Effects of intravenous superoxide dismutase and catalase on

- electroretinogram in the cat postischemic retina. *Ophthalmic Res* 26: 163—168, 1994.
- 163) **Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, Carre C, Braquer P**: Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1471—1478, 1991.
- 164) **Bron AM, Maupoil V, Garcher G, Guyonnet G, Chelqi EH, Rochette L**: Modification of vitamin E during ischemia-reperfusion in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 1084—1087, 1995.
- 165) **De La Paz MA, Zhang J, Fridovich I**: Antioxidant enzymes of the human retina: Effect of age on enzyme activity of macula and periphery. *Curr Eye Res* 15: 273—278, 1996.
- 166) **Yodoi J, Uchiyama T**: IL-2 receptor dysfunction and adult T-cell leukemia. *Immunol Rev* 92: 135—156, 1986.
- 167) **Yodoi J, Turst T**: ADF, a growth-promoting factor derived from T cell leukemia and homologous to thioredoxin: Involvement in lymphocyte immortalization by HTLV-I and EBV. *Adv Cancer Res* 57: 381—411, 1991.
- 168) **Yodoi J, Uchiyama T**: Disease associated with HTLV-1 virus: IL-2 receptor dysregulation and redox regulation. *Immunol Today* 13: 405—411, 1992.
- 169) **Ohira A, Honda O, Gauntt CD, Yamamoto M, Hori K, Matutani H, et al**: Oxidative stress induces adult T cell leukemia derived factor/thioredoxin in the rat retina. *Lab Invest* 70: 279—285, 1994.
- 170) **Gauntt CD, Ohira A, Honda O, Kigasawa K, Fujimoto T, Matsutani H, et al**: Mitochondrial induction of adult T cell leukemia derived factor (ADF/hTx) after oxidative stress in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 2916—2923, 1994.
- 171) **Dawson TM, Bred DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH**: Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7797—7801, 1991.
- 172) **Hope B, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR**: Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2811—2814, 1991.
- 173) **Sandell JH**: NADPH diaphorase cells in the mammalian inner retina. *J Comp Neurol* 238: 466—472, 1985.
- 174) **Sagar SM**: NADPH-diaphorase reactive neurons of the rabbit retina: Differential sensitivity to excitotoxins and unusual morphologic features. *J Comp Neurol* 300: 309—319, 1990.
- 175) **Mitrofanis J, Robinson SR, Ashwell K**: Development of catecholaminergic, indoleamine-accumulating and NADPH-diaphorase amacrine cells in rabbit retinae. *J Comp Neurol* 319: 560—585, 1992.
- 176) **Yamamoto R, Bred DS, Snyder SH, Stone RA**: The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. *Neuroscience* 54: 189—200, 1993.
- 177) **Osborne NN, Barnett NL, Herrera AJ**: NADPH diaphorase localization and nitric oxide synthetase activity in the retina and anterior uvea of the rabbit eye. *Brain Res* 610: 194—198, 1993.
- 178) **Koistinaho J, Sagar SM**: NADPH-diaphorase-reactive neurones in the retina. *Progress in Retinal and Eye Res* 15: 69—87, 1995.
- 179) **Hangai M, Yoshimura N, Honda Y**: Increased cytokine gene expression in rat retina following transient ischemia. *Ophthalmic Res* 28: 255—259, 1996.
- 180) **Hangai M, Yoshimura N, Hiroi K, Mandai M, Honda Y**: Inducible nitric oxide synthase in retinal ischemia-reperfusion injury. *Exp Eye Res* (in press).
- 181) **Hangai M, Yoshimura N, Yoshida M, Yabuuchi K, Honda Y**: Interleukin-1 gene expression in transient retinal ischemia in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 571—578, 1995.
- 182) **Yoshida M, Yoshimura N, Hangai M, Tanihara H, Honda Y**: Interleukin-1 alpha, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor gene expression in endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 1107—1113, 1994.
- 183) **Büchi ER**: Cell death in the rat retina after a pressure-induced ischaemia-reperfusion insult: An electron microscopic study. I. Ganglion cell layer and inner nuclear layer. *Exp Eye Res* 55: 605—613, 1992.
- 184) **Büchi ER, Szczesny PJ**: Necrosis and apoptosis in neuroretina and pigment epithelium after diffuse photodynamic action in rats: A light and electron microscopic study. *Jpn J Ophthalmol* 40: 1—11, 1996.
- 185) **Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR**: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239—257, 1972.
- 186) **Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sesson SA**: Identification of programmed cell death *in situ* specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493—501, 1992.
- 187) **塚原 勇**: 網膜色素上皮の病変. *臨眼* 31: 329—345, 1977.
- 188) **Tsukahara I**: Disorders of the retinal pigment epithelium (main themes chapter 2). In: Shimizu K (Ed): XXIII Concilium Ophthalmologicum Kyoto 1978 Acta Part I, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, 167—175, 1979.
- 189) **塚原 勇**: 網膜色素上皮細胞の機能. *日眼会誌* 88: 1—21, 1984.