

第105回 日本眼科学会総会 宿題報告 I

眼と神経保護

網膜視神経障害に対する予防的神経保護治療へ向けての実験的研究

若倉 雅登

北里大学医学部眼科学教室, 済安堂井上眼科病院

共同研究者

真下紀美代, 阿曾 香子, 竹名 紘子(北里大学医学部眼科学教室)

川上 倫, 比留間弘美(北里大学医学部生理学教室)

岡安 薫(北里大学医学部病理学教室)

岡田 充史(北里大学医学部衛生・公衆衛生学教室)

松谷 伸二, 山本 昇(北里大学看護学部機能形態学教室)

岩田 岳, 西山 隆恒, 張 強(国立病院東京医療センター感覚器センター)

泉 雅子(済安堂井上眼科病院)

壺内 鉄郎, 久保 玲子(西葛西井上眼科病院)

要 約

網膜視神経の虚血や変性などの障害に対し, 神経保護治療が新しい戦略として台頭してきた。我々は培養網膜ニューロンとミュラ細胞を用いて, グルタミン酸アゴニスト [N-methyl-D-aspartate (NMDA), L- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)] 曝露に対する既存薬物の予防的神経保護作用の有無を知り, その可能性を有する場合はその機作を探る目的で, 種々の実験を試みた。中でもカルシウムチャンネルブロッカーであるジルチアゼムとドパミン前駆体である L-dopa 前投与の, グルタミン酸アゴニスト曝露による細胞死に対する影響を, TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method (TUNEL) 法, comet 法を含めた方法で詳しく調べた。この二つの薬物は NMDA, AMPA 曝露のいずれに対しても神経細胞死を抑制した。L-dopa は 10^{-4} M 以上でおそらく NO 産生により細胞死を促進した。これに対し, 10^{-6} M 以下では細胞死は起こさず, この低濃度で細胞死を抑制した。同じ傾向はミュラ細胞でもみられた。この細胞死抑制の機作について, ドパミン受容体を介した作用, NO

を介した作用, さらに神経栄養因子, 神経成長因子を介した作用について実験的, 文献的に検討したところ, D1, D2 ドパミン受容体を介した作用が主である可能性が推定された。これらの受容体についての検討, 特に今回初めて網膜細胞で示された細胞内粒子運動の超高感度顕微鏡による解析で D1, D2 ドパミン受容体が相反的挙動を示すことが示された。今後, D1, D2 受容体を介した神経保護作用を臨床に応用するためにも, ドパミンの網膜細胞に対する保護作用は D1, D2 個別に解析する必要がある。ちなみに, カルシウムチャンネルブロッカーと L-dopa の網膜視神経の虚血性疾患への応用についても言及した。(日眼会誌 105: 843-865, 2001)

キーワード: 神経保護, 予防的神経保護治療, 網膜神経細胞, ミュラ細胞, グルタミン酸アゴニスト, 興奮毒性アミノ酸, エルドーパ, D1 ドパミン受容体, D2 ドパミン受容体, カルシウムチャンネルブロッカー, ジルチアゼム, 神経細胞死, タネル法, コメット法

別刷請求先: 101-0062 東京都千代田区神田駿河台 4-3 済安堂井上眼科病院 若倉 雅登

(平成13年8月28日受付, 平成13年9月25日改訂受理)

Reprint requests to: Masato Wakakura, M.D. Inouye Eye Hospital. 4-3 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

(Received August 28, 2001 and accepted in revised form September 25, 2001)

A Review

Experimental Approaches to Prophylactic Neuroprotective Treatment for Retinal and Optic Nerve Disorders

Masato Wakakura

Department of Ophthalmology, Kitasato University School of Medicine and Inouye Eye Hospital

Abstract

Neuroprotective treatment is increasingly recommended as a novel intervention for ischemic or degenerative disorders in the retina and optic nerve. To determine prophylactic neuroprotective action and the mechanism of various agents against N-methyl-D-aspartate (NMDA)- or L- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)-induced cell death, *in vitro* experiments were conducted on retinal neurons and Müller cells. The effects of a calcium channel blocker, diltiazem, and a dopamine precursor, L-dopa, on glutamate agonist exposure were investigated using the TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) method and comet assay. Prior administration of either one of the above two agents showed that cell death was prevented following exposure to NMDA or AMPA. Isolated administration of L-dopa at a concentration of 10^{-4} M facilitates cell death, probably because of nitric oxide (NO) production. L-dopa concentrations of less than 10^{-6} M did not result in increased cell death, and glutamate agonist-induced cell death was significantly suppressed by prior treatment at these low concentrations. Similar induction and suppression of cell death was also shown in cultured Müller cells. Based on our experiments and other published literature, we looked at

three hypotheses for possible mechanisms for the neuroprotection of L-dopa, i.e., interactions with dopamine receptors, the anti-apoptotic action of NO, and the actions of neurotrophic or nerve growth factors. Neuroprotection appeared to occur through the D1 or D2 receptors. From data obtained from video-enhanced microscopic recordings, which can be used to observe real-time intracellular movement of particles, the movement after administration of a D1 receptor agonist was found to be remarkably different than that seen after D2 agonist administration. It is suggested that the action of dopamine on retinal cell death should be analyzed separately with respect to D1 and D2 receptors. We also discuss clinical application of these two agents in retinal and optic nerve ischemia. (J Jpn Ophthalmol Soc 105 : 843–865, 2001)

Key words : Neuroprotection, Prophylactic neuroprotective treatment, Retinal neurons, Müller cells, Glutamate agonists, Excitotoxic amino acid, L-dopa, D1 dopaminergic receptor, D2 dopaminergic receptor, Calcium channel blocker, Diltiazem, Neuronal cell death, TUNEL method, Comet assay

I はじめに(神経保護の一般的理解)

神経保護(neuroprotection)という用語が認識され始めたのは、1980年代後半ごろからの脳虚血に対する神経保護薬物(neuroprotective agents)を探索しようという戦略に端を発している^{1)~3)}。20世紀治療医学の主流は、癌の除去手術、あるいは抗生物質、抗癌薬、抗炎症薬などに代表されるように、病原体や病原を取り除くことに主眼が置かれた、いわゆる原因治療であった。それはかなり成功したといえるが、特に中枢神経系の疾患では原因は単純ではなく、したがって、原因を取り除くことができないか、仮に一部原因を取り除けても不可逆的な変化を残すという事態が発生した。そこに「神経保護」、

「神経保護治療」という新しい治療のスタンスが出てきたのである。中枢神経系の一部である網膜や視神経にこの考え方が応用されたのは自然のなりゆきである。つまり、網膜、視神経の虚血や変性疾患が生じるのは避けられないが、その後の変化を最小限に留めようというのが、神経保護治療の目標ということになる。

神経保護治療研究の戦略としては、疾患に関係する生理活性物質を制御できるようにしたり、科学的に信頼できる治療トライアル研究を推進したり、適切な薬物の到達システムを作成するなどが考えられる⁴⁾。さらに、細胞死の機序そのものに注目して、これを制御しようとする考え方⁵⁾は最も本質的なアプローチのようにみえる。しかし、そこに至るまでの長い道程を思うと、その可能

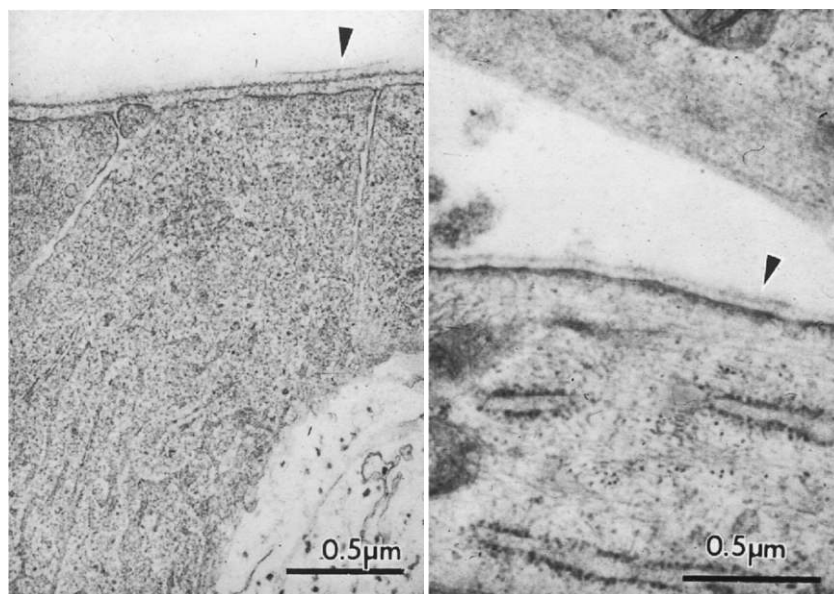


図 1 家兎ミュラ細胞電子顕微鏡写真。

左：生体内でのミュラ細胞の内層。内境界膜に基底膜(矢じり)がみられる。右：培養ミュラ細胞でも同様の基底膜(矢じり)がみられる。文献 11 より

性を示す多くの既存薬群から探し出す方法も選択肢となるはずである。事実、緑内障や網膜の虚血を念頭に置いて、これらの既存薬群やその他の候補薬の神経保護作用に関する研究が近年次々に出されているものの^{6)~9)}、まだ研究途上といえよう。また、このアプローチにも疾患発生前から予防的に薬物を使う方法と、疾患発生後に使う方法とが考えられる。著者は本宿題報告のテーマとして予防的治療法の可能性を既存薬から探し出すことに焦点をあて、*in vitro* の実験系を作成して研究したので、以下にその成績の概要を述べてゆく。

II 細胞培養

家兎網膜の無髄無血管の部位からの網膜組織を約 1×1 mm に細切した小組織片群を、高濃度グルコースを含む培地中で 1 週間から 10 日間浮遊培養する。この間に多くのニューロンは組織片から離れ培養液中に多数浮遊するようになる。小組織片の方には主としてミュラ細胞が残存しており、これを新鮮培地に移すと 3~4 日で組織片がシャーレ底に付着し、組織片周囲から非ニューロン細胞が伸長してくる。無髄無血管の部位にはアストロサイトがないため、この非ニューロン細胞はミュラ細胞と考えられる¹⁰⁾。この培養細胞がミュラ細胞であることは、既に電子顕微鏡(図 1)や免疫細胞化学、免疫電子顕微鏡により確認されている¹¹⁾¹²⁾。このミュラ細胞をもう一度継代培養するとニューロンの含まれないミュラ細胞培養が得られる。

網膜ニューロンは、このミュラ細胞の上に混合培養する(図 2)。生後 1~4 日の幼若ラット網膜を取り出し、トリプシン処理の後、培養ミュラ細胞上に蒔き、7~20

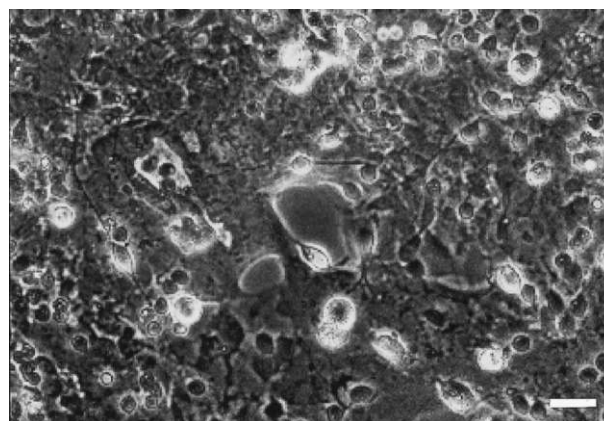


図 2 実験に使用したミュラ細胞と網膜ニューロンの混合培養の位相差顕微鏡像。

背景にミュラ細胞が培養されており、その上に散在する小さな細胞がニューロンで、多くの細胞で神経突起が観察できる。バーは 10 μm

日後に実験に供した。このニューロンは特定の網膜神経細胞ではないが、確かにニューロンであることは免疫細胞化学などで証明されている¹³⁾。

III 細胞内カルシウム濃度の測定

細胞内カルシウム濃度は、Argus 100/CA システム(浜松ホトニクス)を用いて測定した。Fura-2 AM で遊離カルシウムイオンを標識し、これを 340 nm および 380 nm の励起フィルタで蛍光強度を測定、カルシウムイオン濃度が反映される各部位の 340/380 nm の比が自動的に算出され、画像解析結果が偽カラーで示されるようになっている。また、測定は 4 秒毎に行われ、当該薬

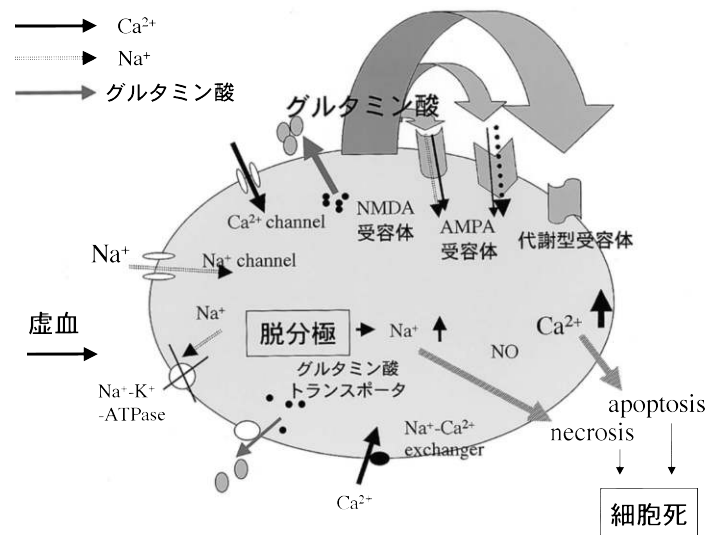


図 3 虚血から神経細胞死(necrosis, apoptosis)に至るまでに作動する機構の概略。

物投与前に 2~4 回(8~16 秒), 投与後 6 回(24 秒)以上行い, 各部位の時間的变化はグラフで示される¹⁴⁾。

IV 細胞死の検出

神経細胞死には, ネクローシス(necrosis)とアポトーシス(apoptosis)とがある¹⁵⁾。アポトーシスは遺伝子的に規定された programmed cell death であることから, ここ数年はこれに関する研究が 8,000 論文以上出ているのに対し, ネクローシスという急性細胞死に関しては僅かな研究しかない¹⁶⁾。しかし, 例えば網膜に虚血を起こすとネクローシスもアポトーシスも生じることは既によく知られた事実である¹⁷⁾し, 両者の起こり方が細胞の種類によって異なる可能性は脳虚血の研究で示されている¹⁸⁾。しかも, 細胞死を抑制するためには, アポトーシスだけを抑制すればよいのではなく, 急性期のネクローシスを抑制できなければ真の神経保護にはつながらないし, この両者の密接な相互関係を示す研究も出始めた¹⁵⁾¹⁹⁾²⁰⁾。このように, ネクローシス, アポトーシスを同列に扱うことが重要と考え, 本研究では以下の 2 つの方法で細胞死の検出を行った。1 つはアポトーシスを検出する方法で, アポトーシスを起こした細胞のクロマチン DNA はエンドヌクレアーゼにより特異的に切断され, 180 bp の倍数の単量体ヌクレオゾームが多数核内に出現するが, この DNA 断片を標識する terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP; (deoxy-uridine 酸)-biotin nick end labeling method (TUNEL 法)といわれるものである²¹⁾。いま 1 つは, ネクローシス, アポトーシスであれ, DNA の断片化が生じた細胞はすべて検出できる方法で, comet 法と呼ばれるものである²²⁾²³⁾。

V 興奮毒性アミノ酸と細胞障害

興奮毒性アミノ酸神経毒性は, 中枢神経系の虚血, 外傷や神経変性などの神経疾患の機序を模していると考えられている²⁴⁾。興奮毒性アミノ酸の代表であるグルタミン酸は脳においても網膜においても主な神経伝達物質であり, これが過剰に細胞外に放出されるとその受容体が多分に作動し, 組織内のイオン環境を変え, それに従って, 図 3 に例示するようなさまざまなカスケードを介して細胞死に導くことが推定される。特に重要なのは細胞内カルシウム濃度が上昇することによって稼動する機構である²⁵⁾²⁶⁾。網膜においても同様の機序が働くことが多くの研究で示されている^{8)27)~30)}。さらに, 非ニューロンであるミュラ細胞にもグルタミン酸受容体が存在することが既に証明されている¹⁴⁾³¹⁾。そこで, グルタミン酸イオンチャネル直結型受容体は N-methyl-D-aspartate (NMDA) と non-NMDA (または L- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)/kainate (KA) 受容体とに大別されるが, それぞれの代表である NMDA と AMPA を今回の実験では興奮毒性アミノ酸として用いた。NMDA 受容体はカルシウムイオンの透過性がよく, 神経細胞死に直接的に関係していると考えられており²⁷⁾³²⁾³³⁾, それは網膜においても同様である⁶⁾⁸⁾¹⁷⁾。一方, AMPA/KA 受容体を介した細胞毒性については, この受容体がカルシウムイオンを通しにくいことなどから, NMDA 受容体に比べると注目されていない。しかし, AMPA/KA 受容体を介した神経細胞のアポトーシスも確かに起こるとするデータも蓄積されつつある^{19)34)~37)}。ただ, こうした事情から網膜の AMPA/KA 受容体を介した神経細胞死の研究はあまり進んでいなかった。我々はこの受容体もカルシウムイオンを通すことは間違いないことを示し(図 4)¹⁴⁾³¹⁾, 1998 年

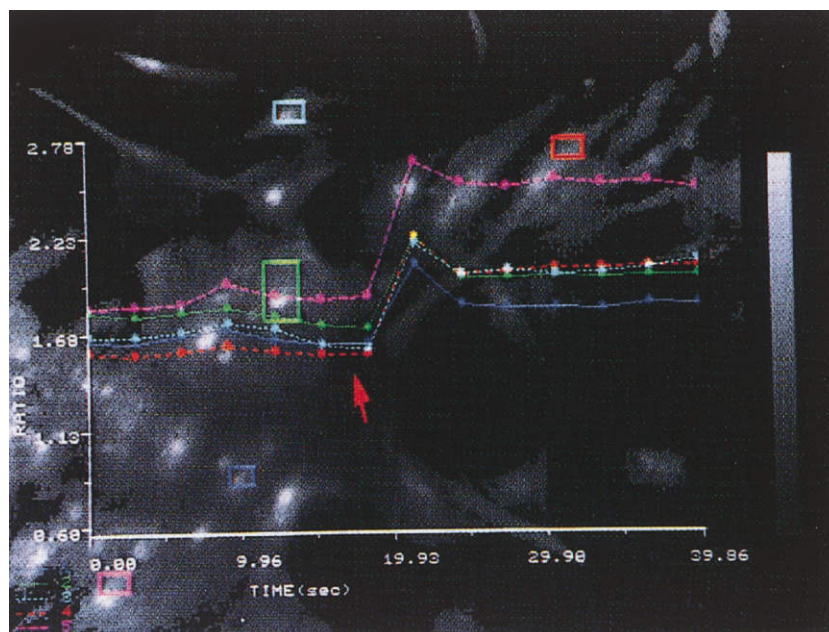


図 4 培養ミュラ細胞(図の背景に測定部位の培養細胞像がみられる)に L- α -amino-3-kydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 0.7 mM 投与前後の細胞内カルシウムイオン濃度を Fura 2-AM で標識して画像解析した結果。

縦軸は 340 nm/380 nm のフィルタで励起された蛍光濃度測光比を示し、カルシウムイオン濃度変化に対応する。横軸は時間(秒)で、矢印が AMPA を投与した時点。5 種の色の四角形の細胞部位を測定し、細胞像にスーパーインポーズされたグラフに対応する色のグラフでカルシウム濃度の時間的变化が示されている。どの部位でも明らかにカルシウムイオン濃度が明らかに上昇している。文献 14 より

Otori ら³⁸⁾が低濃度のグルタミン酸が同受容体を介して網膜神経節細胞の生存率を下げることを示したことで、網膜の細胞死においてもこの受容体の意義は無視できないものになってきた。そこで、今回の実験では、マグネシウム非存在かつグリシンを加えた Hanks 液中で NM-DA 2 mM に 1 時間曝露したものと、通常の Hanks 液中で AMPA 5 mM に曝露した 2 つの方法で細胞死を誘発して、実験を進めた。

VI 神経保護候補薬と実験手順

まずパイロット実験として、ミュラ細胞と網膜神経細胞の混合培養に対し種々の候補薬(10^{-6} , 10^{-8} M)を投与して 1 時間培養し、その後グルタミン酸 2.5 mM に 10 分間曝露、以後新鮮培養液中で 6, 24, 72 時間培養した。グルタミン酸曝露 24 時間の培養細胞は、対照培養(図 2)に比し、正常な神経突起を有するニューロンが減少し、細胞体が腫脹しているものが目立つ(図 5)。そこで、上記の各時間に全ニューロン数とその中の正常な神経突起を有するニューロン数をカウントして比率を求め、グルタミン酸のみに曝露した対照培養と比較した。その結果を図 6 A(点眼薬)、B(内服薬)に示す。この結果を参考にして、本宿題報告では、以下の 2 つの内服薬を取りあげて実験を進めた。1 つはカルシウムチャネルブロッカー diltiazem である。これは、高血圧、狭心症などに繁用されており、カルシウム L-channel を選択

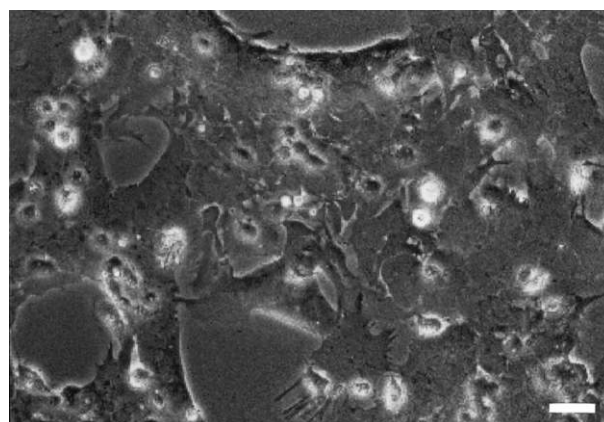


図 5 グルタミン酸(2.5 mM)への 10 分曝露後、新鮮培養液に移し 24 時間後のミュラ細胞と網膜ニューロンの混合培養位相差顕微鏡像。

図 2 と比較して神経突起を有するニューロンが減少し、細胞体も腫脹しているものが多い。背景のミュラ細胞にも形態変化が生じている。

的にブロックする。多数のカルシウムチャネルブロッカーがあるが、本薬が水溶性で濃度コントロールが容易であることから選択した。なお、我々の用いた培養ミュラ細胞の環境を High K^+ 下に置く、すなわち細胞外のカリウム濃度を急上昇させると、カルシウムチャネルが開いて細胞内カルシウム濃度上昇が起こる(図 7)。これは dihydropyridine の存在でブロックされた¹⁴⁾ことから、

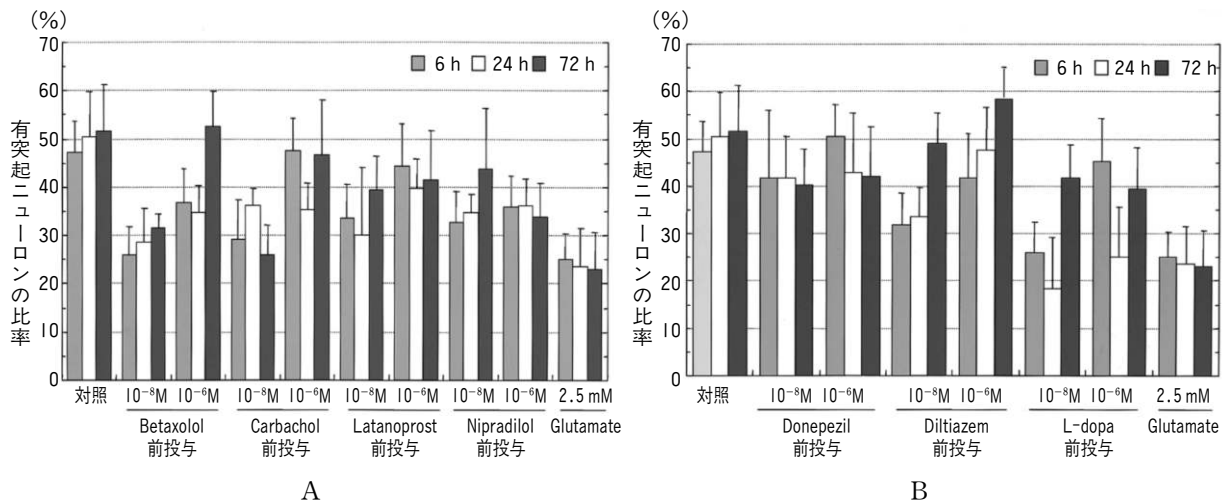


図 6 各種薬物前を二種の濃度で投与 1 時間後にグルタミン酸 2.5 mM に 10 分間曝露, 6, 24, 48 時間新鮮培養液で培養した時点での神経突起を有する細胞比率を示す。

比率は観察された全神経細胞を分母にし, そのうち明らかな神経突起を有する細胞を分子にして算出。前投与薬物として A では点眼薬, B では内服薬を示す。対照は前投薬のかわりに対照液を投与したもの。

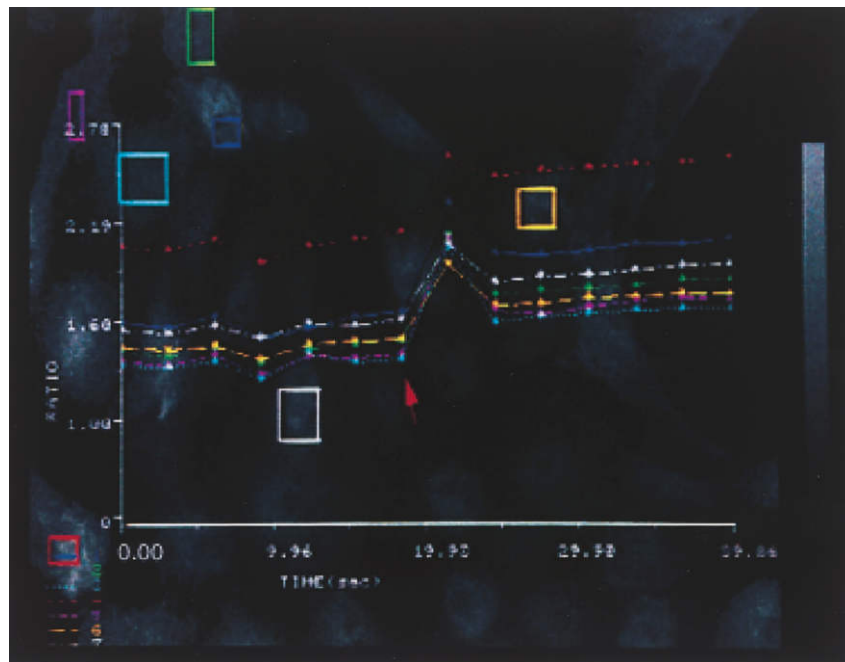


図 7 培養ミウラ細胞(図の背景に測定部位の培養細胞像がみられる)の環境をを高濃度カリウムにした前後の細胞内カルシウムイオン濃度の時間的変化が示す。

表示の詳細は図 4 の説明を参照。どの部位でも明らかにカルシウムイオン濃度が明らかに上昇している。

L-type channel であり, 用いたミウラ細胞にも L-type カルシウムチャンネルが存在していることが明らかになった。もう 1 つは, ドパミンには後述するように神経保護作用が推定されているが, その前駆体である L-dopa (L-3, 4-dihydroxyphenylalanine) を取り上げた。

図 8 は TUNEL 法を用いた場合の実験手順である。培養細胞に神経保護候補薬物を入れて 1 時間置き, その後, 高濃度の NMDA または AMPA に 1 時間曝露し, 新鮮培養液中に 24 時間静置したのち固定し, TUNEL 法を行った。我々が用いた TUNEL 法は, DNA 断片

の 3'-OH 末端に TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) の働きで, ジゴキシゲニン標識 dUTP (deoxyuridine 酸) を結合させ, 次いでアルカリフォスファターゼ標識ジゴキシゲニン抗体を作用させて, この部位を発色させる TUNEL 変法である。図 9 は comet 法の手順である。Tavergen Comet Kit として販売されているものを利用し, 図 8 の手順で実験した細胞をアガロースゲル中に集め, これをスライドガラス上に蒔く。次いで電気泳動を行うと, 断片化した DNA が核から泳動され, 核から核外に尾を引いた状態になる。これをサイバーク

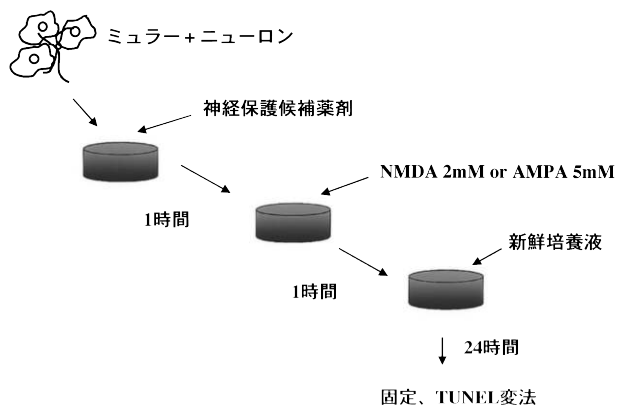


図 8 TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method (TUNEL) 変法までの手順.

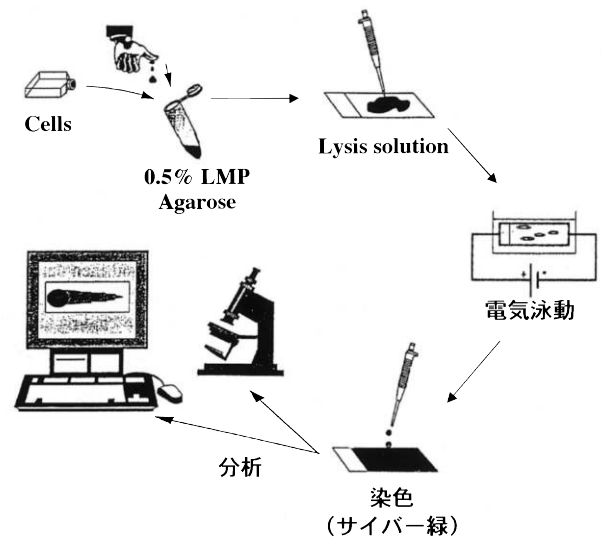


図 9 Comet 法の手順.

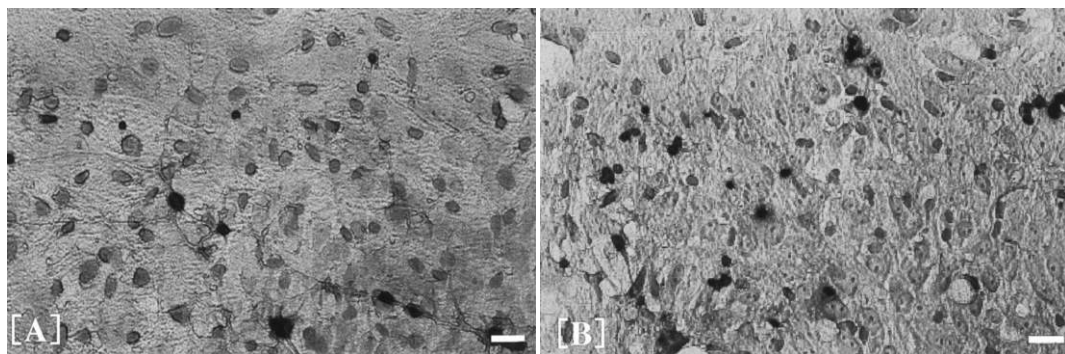


図 10 TUNEL 法の結果の例示.

A は対照, B はグルタミン酸 2.5 mM 投与後 24 時間における染色. 黒く示される細胞が TUNEL 陽性ニューロン. バーは 10 μ m

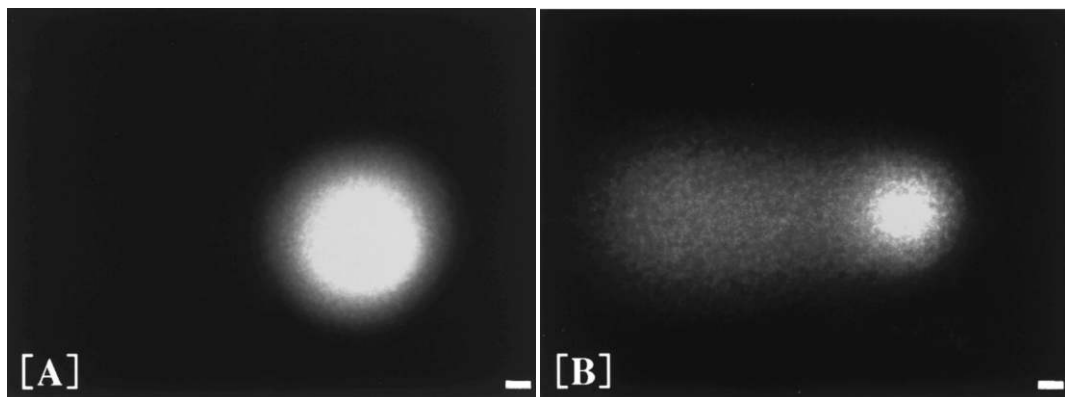


図 11 Comet 法での陰性細胞(A)と comet 陽性細胞(B).

バーは 50 μ m

リーンで染め、顕微鏡で観察、解析した。

VII グルタミン酸アゴニスト実験結果

図 10 は TUNEL 法で対照とグルタミン酸投与後の細胞をみたものである。小さな細胞はすべてニューロン

で、後方に全体に淡く染まっている大きな細胞がミュー細胞であるが、この方法ではニューロンの細胞死のみを調べた。グルタミン酸投与培養では TUNEL 陽性ニューロンが対照に比し明らかに増加した。一方 comet 法による観察写真を図 11 に示す。正常な細胞の核は図 11

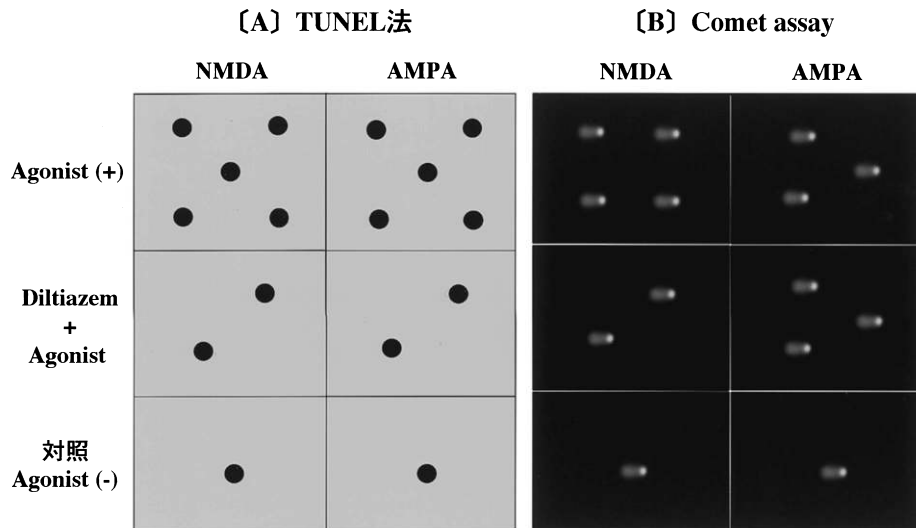


図 12 Diltiazem 10^{-6} M 前投与後 N-methyl-D-aspartate(NMDA), AMPA 曝露 24 時間後の TUNEL 法, comet 法での陽性細胞出現比.

Diltiazem 前投与で細胞死が部分的に抑制されている。

A のように正常な核が染色されるが、何らかの原因で細胞の核内の DNA が傷つくと、断片化した DNA は電気泳動されて図 11 B のように核の部位から外へ comet, すなわち彗星状の尾を引いているのが観察される。この方法ではネクロシスかアポトーシスかの確実な鑑別はできないが、核が膨化して形態的变化が著しいものはおそらくネクロシス、形態変化のほとんどないものはアポトーシスを起こした細胞ではないかと推定している。Comet の尾の長さが核の径の 2 倍を超えるものを ++, それ以下のものを + としてカウントし、全体の細胞数で除した。Comet 法ではニューロンとミユラ細胞を合わせて評価をしたが、ミユラ細胞と思われる大きな細胞のみをカウントした解析も同時に行った。

1. Diltiazem 前投与の結果

Diltiazem 前投与後 2 mM の NMDA に曝露した実験では、 10^{-6} M の diltiazem 前投与が神経毒性アミノ酸曝露のみ行った陽性対照と比し (t 検定) 明らかに細胞死を抑制し ($p < 0.001$), TUNEL 法では 10^{-8} M でも有意な抑制がみられた ($p < 0.001$)。一方、5 mM AMPA への曝露実験では、TUNEL 法で 10^{-6} M の diltiazem 前投与のみが細胞死を抑制し ($p < 0.001$), 10^{-8} M では有意差がなかった。また、comet 法では NMDA 曝露に対する 10^{-6} M diltiazem で陽性細胞が有意に減少したが、その他の条件では、diltiazem 前投与は NMDA, AMPA 曝露のいずれでも有意な細胞死抑制はみられなかった。この実験結果の代表例として、Diltiazem 10^{-6} M 投与における NMDA, AMPA 曝露時の TUNEL 法と comet 法での陽性細胞出現比を図 12 に示す。なお、前投薬も神経毒性アミノ酸曝露もしていない Hanks 液のみを投与した陰性対照でも細胞死がみられたが、NMDA, AMPA のみの投与に比し、それはいずれも有意に少な

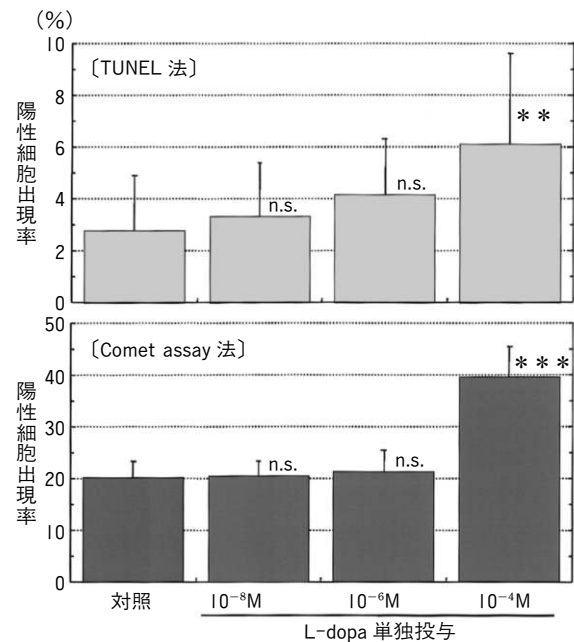


図 13 L-dopa 単独投与 24 時間後の TUNEL 法, comet 法での陽性細胞出現率.

対照(溶液のみ投与)培養との間で t 検定を行っている。*: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, n.s.: 有意差なし。

かった。

2. L-dopa 前投与の結果

L-dopa 単独投与後では、TUNEL 法, comet 法ともに 10^{-4} M で Hanks のみを投与した対照に比し明らかに細胞死が増加した(図 13, $p < 0.01$)。しかし、 10^{-6} M 以下では細胞死の増加はみられなかった。L-dopa 前投与後 NMDA 曝露実験では L-dopa の 10^{-6} , 10^{-8} M でいずれの方法でも、興奮毒性アミノ酸のみの投与培養に比し明らかに細胞死が減少した(いずれも $p < 0.001$)。TU-

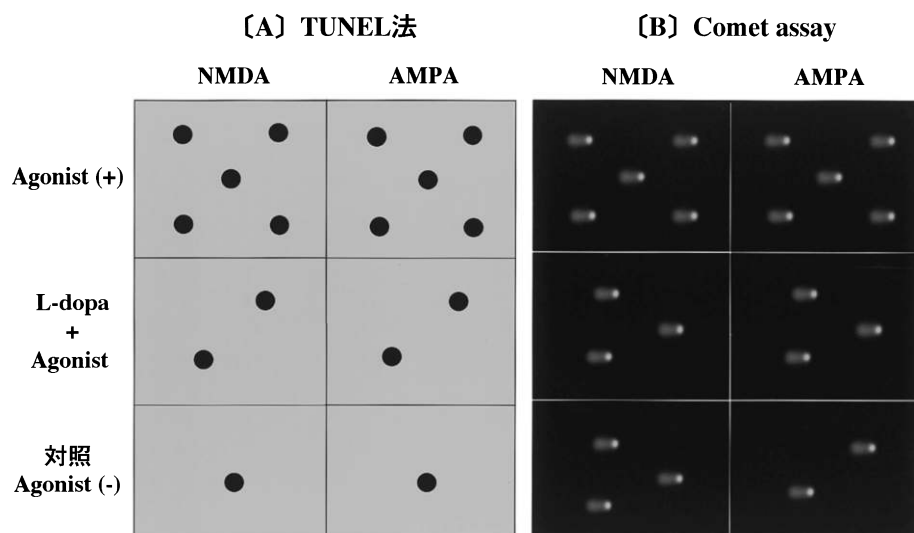


図 14 L-dopa 10^{-6} M 前投与後 NMDA, AMPA 曝露 24 時間後の TUNEL 法, comet 法での陽性細胞出現比.

L-dopa 前投与で細胞死抑制が顕著にみられている。

NEL 法では 10^{-10} M でも有意差があった ($p < 0.001$) が, 10^{-12} M では差が消失した. Comet 法でミユラ細胞のみの細胞死を検出すると, やはり細胞死が減少しており, 10^{-6} M ($p < 0.001$) でも 10^{-8} M ($p < 0.01$) でも陽性対照に比し有意差があった. L-dopa 前投与後 AMPA 曝露実験では, TUNEL 法で, 10^{-8} , 10^{-10} M でのみ細胞死が有意に抑制され ($p < 0.001$), これより高濃度の 10^{-6} M と, 低濃度の 10^{-12} M では有意差が検出できなかった. 一方, comet 法では L-dopa 10^{-6} M 前投与 ($p < 0.01$), 10^{-8} M ($p < 0.001$) ともに細胞死抑制がみられた. Comet 法でミユラ細胞のみを検討すると, 10^{-6} M で細胞死の減少傾向がみられ ($p < 0.05$), 10^{-8} M では明らかに細胞死を抑制した ($p < 0.001$). L-dopa 10^{-8} M 前投与における NMDA, AMPA 曝露時の陽性細胞出現比を図 14 に示す. 以上のように, L-dopa は高濃度では細胞死を誘発するが, 低濃度では網膜ニューロン, ミユラ細胞の興奮毒性アミノ酸による細胞死に対し, 明らかな抑制効果を有していた.

VIII カルシウムブロッカーが神経保護作用を有する理由

上記の培養網膜細胞を用いた実験で, L 型選択的カルシウムチャンネルブロッカーである diltiazem が興奮毒性アミノ酸誘発の細胞死に対し予防的神経保護作用を有することが示された. 脳虚血や脳外傷においてカルシウムチャンネルブロッカーが神経保護的な役割を果たしていることは, 多くの研究が示している^{39)~41)}. 網膜視神経に関しては緑内障との関係でカルシウムチャンネルブロッカーが視神経乳頭循環を改善するとのデータは, 近年の新しい点眼薬の出現とともに主として日本から多数報告^{42)~45)}されたが, 循環を介さない網膜細胞を直接焦点とし

たカルシウムチャンネルブロッカーの研究は少なかった. これに関する研究は, Osborne ら⁴⁶⁾⁴⁷⁾がベータブロッカー緑内障薬として用いられている薬物ベタキソロールが実験的 NMDA 毒性および網膜虚血による細胞死を抑制することを示した研究の考察で, この薬物が有するカルシウムチャンネルブロッカーとしての役割に言及したことに初まると思われる. L 型カルシウムチャンネルブロッカーであるニフェジピンがラット網膜における NMDA 誘発カルシウム流入を抑制することを, その後このグループは示している⁴⁸⁾. また, 別のグループ⁴⁹⁾も新しいカルシウムチャンネルブロッカーが NMDA 誘発またはカイニン酸誘発のラット網膜毒性を抑制することを示している. 網膜におけるグルタミン酸毒性の第一段階はカルシウムイオンの細胞内流入に他ならないが, その流入は NMDA 受容体や non-NMDA 受容体のいずれかを介しても,あるいはグルタミン酸誘発の脱分極後に電位依存性カルシウムイオンチャンネルを通じても起こり得る²⁷⁾⁵⁰⁾. こうした中で, Melena ら⁴⁸⁾はラット網膜ではあらゆるカルシウムチャンネルの中で L 型を通じた細胞内カルシウムイオン流入がほぼ 50% を占めるとしている. カルシウムチャンネルブロッカーが神経保護の役割を果たすのは, こうしたことから一応首肯できることである. しかし, NMDA 受容体や non-NMDA 受容体に直結したカルシウムイオンチャンネルを介したカルシウムイオン流入が果たす役割も無視できないし, 電位依存性カルシウムイオンチャンネルと種々のグルタミン酸受容体の相互作用を示す研究も出始めている^{51)~53)}. さらに, 先に引用したベタキソロールによる細胞死抑制のメカニズムもカルシウムブロッカーとしてだけでは説明が難しいようであり⁵⁴⁾, カルシウム流入の一つをとっても, 必ずしも単純化して考えることはできないようである.

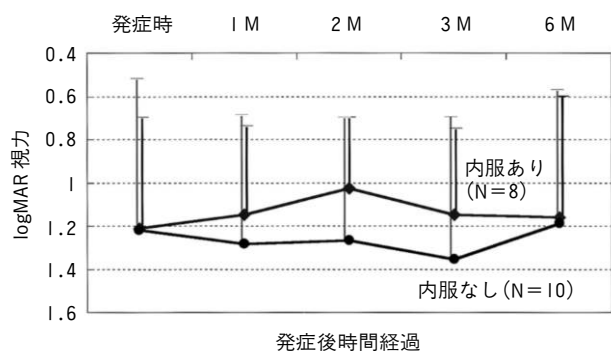


図 15 網膜中心静脈閉塞症の患者視力(logMAR で表示)の時間的推移。

カルシウムブロッカーを内服していた人(N=8)と内服していなかった(N=10)とでどの時点でも有意差は検出できなかった。

なお、虚血性網膜疾患でも頻度が多い網膜中心静脈閉塞症の患者で、早期に発見され初期治療が行われ、十分な光凝固も受けている症例で、発症当時高血圧などで、カルシウムブロッカーを内服していた人と内服していなかった人とで、視力の時間的推移が異なるかどうかを調べてみた(図 15)。発症 2.3 か月後に、内服していたグループの方が多少視力回復がよい印象があったが、症例数が少ないこととばらつきが大きいため、どの時点でも統計的有意差は得られなかった。

IX L-dopa の二面性

L-dopa は抗パーキンソン薬として実際に用いられているが、近年弱視^{55)~60)}や前部虚血性視神経症⁶¹⁾⁶²⁾に應用している臨床データが多くみられる。今回の実験で、L-dopa の 10^{-4} M という高濃度では明らかな細胞毒性を示した。これに対し、NMDA、AMPA 毒性に対する抑制効果は程度の差はあれ、 10^{-10} ~ 10^{-6} M という非常に低い濃度で証明された。L-dopa は *in vitro* 実験で神経毒性を示すとの研究が多い⁶³⁾⁶⁴⁾。そのメカニズムとして酸化ストレスが主としていわれている。また、カルシウムを除去したり、マグネシウムを加えた条件下では細胞毒性が抑制され、また L-dopa 投与後に培養液内のグルタミン酸濃度が上昇するとの成績から、グルタミン酸受容体刺激による毒性も推定されている⁶⁵⁾⁶⁶⁾。Akeo ら⁶⁷⁾は網膜色素上皮細胞培養を用いて L-dopa の種々の濃度を培養液内に投与した実験で、その細胞毒性が NO とスーパーオキシドラジカルに由来していることを示している。In vivo においては、同様の細胞毒性が生じているとの証拠は未だなく⁶³⁾⁶⁴⁾、ラットの腹腔内に L-dopa を投与した実験でも組織で NO が産生されているデータは得られていない⁶⁸⁾。過去に *in vitro* で L-dopa 毒性がみられたのは 10^{-4} ~ 10^{-5} M での実験であり⁶⁵⁾⁶⁶⁾⁶⁹⁾、 10^{-4} M で毒性が示された我々のデータとほぼ一致している。すなわち、L-dopa の細胞毒性はこの濃度以上で起

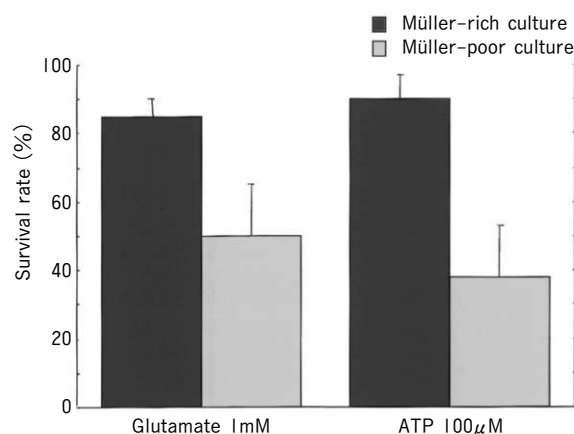


図 16 ミュラ細胞の多い培養(Müller-rich culture)と少ない培養(Müller-poor culture)の上に網膜ニューロンを培養し、1 mM グルタミン酸(左)や 0.1 mM の ATP(adenosine 5'-triphosphate, 右)を作用させ 24 時間後のニューロンの生存率。

ミュラ細胞が豊富な方が生存率が高い。

こるが、通常の投与方法ではこの濃度が血液脳関門、血液網膜関門を越えて組織に到達しないため、組織障害は起こらないのではないかと推定される。一方、今回の実験結果から 10^{-6} M 以下では興奮毒性アミノ酸による網膜細胞死を明らかに抑制することが示され、特に 10^{-8} 、 10^{-10} M というかなり低濃度の L-dopa が保護作用を有していた。このように、L-dopa はその濃度によって二面性を有するということができる。

X ミュラ細胞の関与

先の L-dopa 前投与実験結果で示されたように、細胞死に関する挙動はミュラ細胞と網膜ニューロンとは並行的であった。また、ミュラ細胞の多い培養と少ないそれの上に網膜ニューロンを混合培養し、高濃度のグルタミン酸や ATP(adenosine 5'-triphosphate)を作用させると、ミュラ細胞の豊富な方がニューロンの生存率が高いという結果が得られた(図 16)。すなわち、ミュラ細胞は網膜ニューロンの生存に寄与する可能性があるが、細胞生存、細胞死については両者は運命共同体である可能性が高い。

ミュラ細胞が従来考えられていたよりも、ずっと多機能な細胞であることが近年わかってきた⁷⁰⁾⁷¹⁾。例えば、これまで一般にニューロンにしかないと思われていた神経伝達物質受容体がこの細胞にもあることが次々証明された^{14)37)72)~74)}。また、イオンチャネルも、カルシウムチャネルの他、カリウムチャネル⁷⁵⁾、ナトリウムチャネル、クロールチャネルなど種々のものが確認され、これらは虚血などに際して変化することが知られている。グルタミン酸が細胞外に過剰に残存すれば毒性を発揮することになるが、これを処理する機構として重要なグルタミン酸トランスポーターがミュラ細胞に存在し⁷⁶⁾⁷⁷⁾、これ

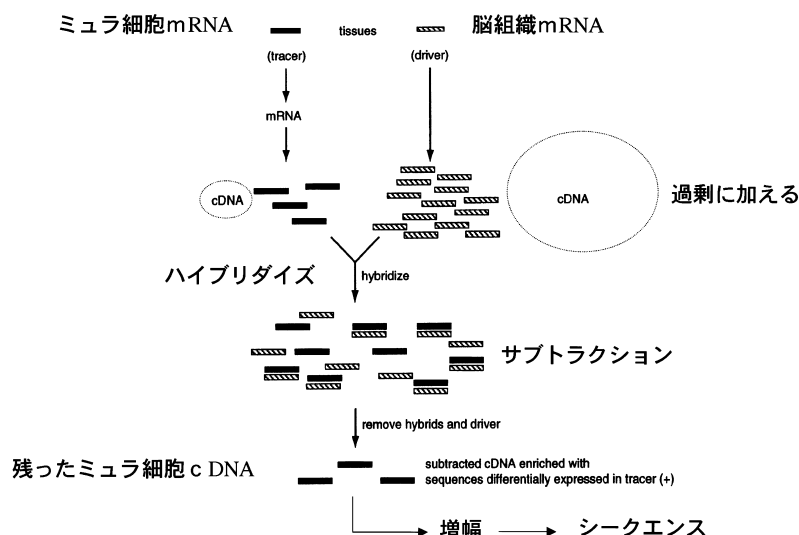


図 17 培養ミユラ細胞と脳組織を用いた cDNA サブトラクション法。

も虚血などに際して変化することが示されている。さらに、種々の神経栄養因子もミユラ細胞に発現し^{78)~81)}、あるいはそれらに対する細胞応答が存在する⁸²⁾。このような網膜の多機能細胞が、網膜ニューロンに対する虚血や興奮毒性アミノ酸曝露など種々の侵襲に対し、保護的に作用することは容易に推定でき、事実それを裏づける研究成績が多くでている^{78)79)81)83)~85)}。ミユラ細胞と網膜ニューロンとが運命共同体であったという今回の我々の結果もそのことに対応しており、神経細胞死阻止の前提として、ミユラ細胞が健全である必要があることを強く示唆している。しかるに、ミユラ細胞を介した神経保護作用のメカニズムを考察することは、機能的、効率的な神経保護を治療に取り込む上で有効な方略の一つである。

ここで、これに関連して行ったミユラ細胞に特異的に発現する遺伝子を検索する試みを紹介する。まず、ラットの培養ミユラ細胞の mRNA から脳組織の RNA を引き算してミユラ細胞に特異的な mRNA をみつけようと cDNA サブトラクション法を行った(図 17)。ミユラ培養細胞と脳組織から抽出された mRNA を cDNA に変換し、これを脳組織 cDNA が大過剰になるように双方を混ぜ合わせ、サプレッション polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて片方の cDNA にしか存在しない遺伝子のみを特異的に増幅することによってミユラ培養細胞により多く発現する遺伝子の断片を得、これをクローニングしてシーケンスすることによって同定を行った。cDNA サブトラクション法によって 38 個のクローンが得られ、このクローンをすべてシーケンスして塩基配列を解析すると、ミユラ細胞のマーカーにも使われるビメンチンを含め、膜蛋白質、酸化酵素、成長因子、転写因子など多くの既知遺伝子が見つかり、さらに 8 個の未知遺伝子と思われるものが発見された。その一つで

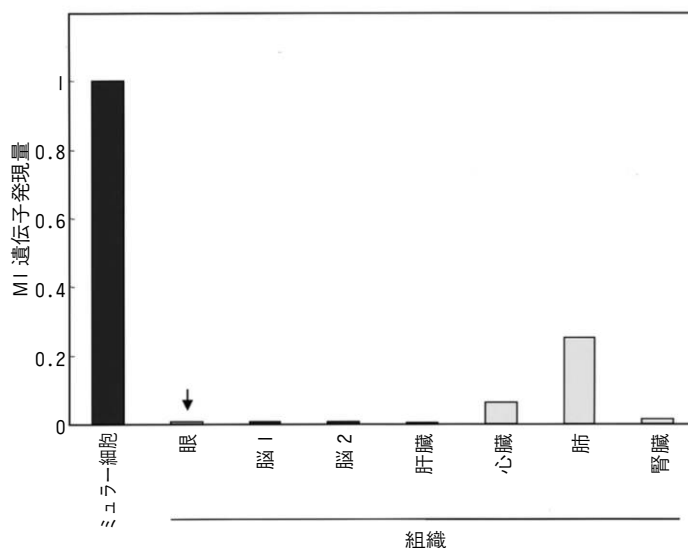


図 18 未知遺伝子 M1 のミユラ培養細胞と各組織での発現量。

特に発現量の多い、クローン M1 についてさらに解析を進めた。ミユラ培養細胞と 6 つの異なる組織での発現量を正確に測定するために、まず定量 PCR 法を行った。この定量 PCR 法とは PCR 法を使ってサンプル内の目的遺伝子のコピー数を定量する方法である⁸⁶⁾⁸⁷⁾。あらかじめコピー数がわかっているスタンダード・サンプルによって検量線を作成し、これをもとに未知サンプル内の遺伝子コピー数を計算する。なお、PCR 反応液中に含まれる cDNA 量の差を補正するインターナルコントロールとして 18 S リボゾーム遺伝子を利用した。こうして定量された未知遺伝子 M1 のミユラ培養細胞と脳組織での発現量を示す PCR 曲線で、両サンプルが一定の傾きで増加している範囲の中から特定の PCR 産物量の一つ決めて、この量に達するのに必要な PCR サイクル

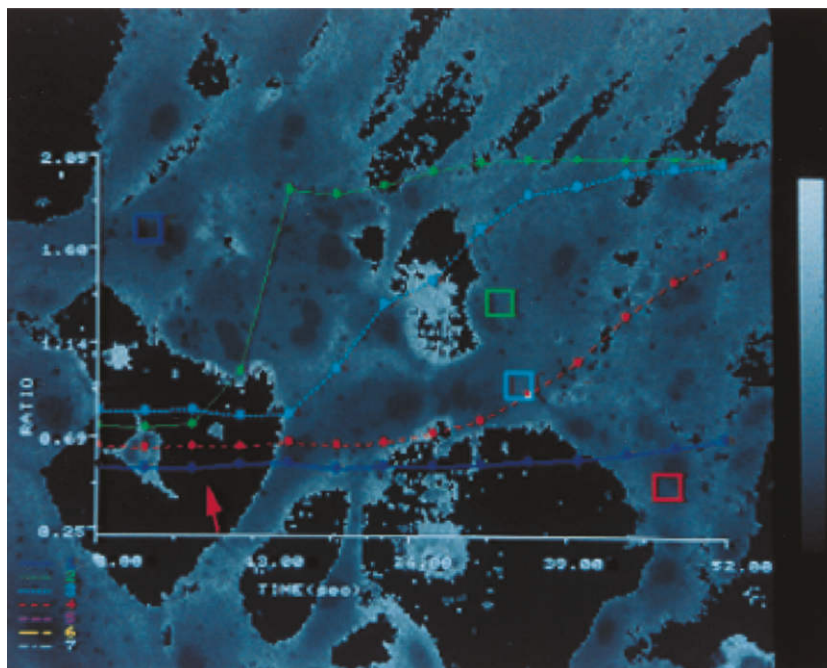


図 19 培養網膜ニューロンに D1 アゴニストである R(+)-SKF 38393 を投与した時の細胞内カルシウム上昇。
表示の詳細は図 4 の説明を参照。青で囲まれた部位以外は、アゴニスト投与後時間差を持ちながら細胞内カルシウム濃度が上昇している。

数から検量線を利用して M1 遺伝子のコピー数を計算した。M1 遺伝子はミユラ培養細胞で脳組織よりも 8 サイクル早く増幅されており、ほぼ 2 の 8 乗倍のコピー数、すなわち約 250 倍含まれていると考えられる。この方法でミユラ培養細胞と 6 つの組織から抽出された全 RNA に含まれる M1 遺伝子数を測定したところ以下の結果を得た。未知遺伝子 M1 は前述のようにミユラ培養細胞で脳組織よりも約 250 倍の発現量が確認され、さらに他の組織と比較しても著しく発現量が高いことが確認された (図 18)。ここで興味深いのは、M1 は正常な眼の組織自体には全く発現しておらず、したがって生体内のミユラ細胞にも発現していないことがわかった。この遺伝子の解析を進めた結果、最終的にコラーゲン V に相当する既知遺伝子であることが判明した。この遺伝子の下流が遺伝子バンクに登録されていなかったため未知遺伝子と当初考えたのであった。この結果は、ミユラ細胞が培養などある条件下におかれるとコラーゲンを産生する能力を潜在的に有していることを示したものであり、池田ら⁸⁸⁾も同様の結果を発表している。これが、病的な状態を示しているのか、あるいはストレス条件下に置かれた細胞が生存するのに必要な細胞保護に関与するものか、今後明らかにしていきたい。残りの 7 つの未知遺伝子についても順次明らかにしていく予定である。

XI L-dopa における予防的神経保護作用の発現機序

ここで、L-dopa の予防的神経保護作用の発現機序につき、以下の 3 つの仮説を検討してみたい。

- 1) ドパミンとしての作用。
- 2) NO を介した作用。
- 3) 神経栄養因子を介した作用。

1) ドパミンとしての作用

L-dopa はドパミン前駆体である⁶⁵⁾。しかも、ドパミンは神経保護作用を有していることが以前から指摘されていた^{89)~91)}。柏井ら⁹²⁾はパッチクランプ法を用いて網膜に対するグルタミン酸毒性に対しドパミンが D1 サブファミリーを介して神経保護的に作用することを示した。一方、別の研究は網膜へのドパミンによるグルタミン酸曝露に対する作用に、ドパミン受容体を介さない経路があることを示している⁹³⁾。ここでまず、L-dopa が示した予防的神経保護作用がドパミン受容体を介している可能性を考慮しなければならない。ドパミン受容体サブタイプは遺伝子学的に少なくとも 5 つが同定され、D1 サブファミリーと D2 サブファミリーとに大別される⁹⁴⁾。生体では D1、D2 が圧倒的に多く分布している。D1 は受容体が賦活すると興奮性 GTP 結合蛋白質 Gs を介して細胞内カルシウム濃度が上昇する。図 19 は我々の培養網膜ニューロンに D1 アゴニストである R(+)-SKF 38393 を投与した時の細胞内カルシウム上昇を示

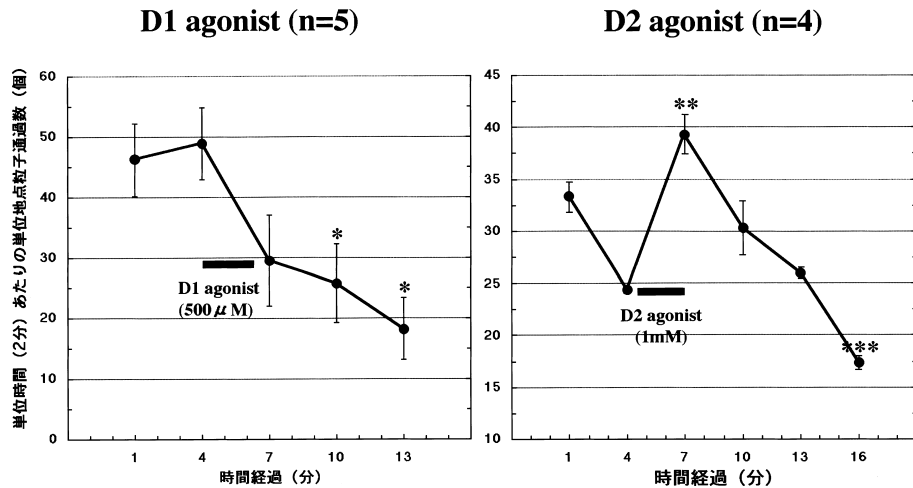


図 21 培養ミユラ細胞における D1, D2 アゴニスト投与前後の単位時間当たりの粒子運動変化。

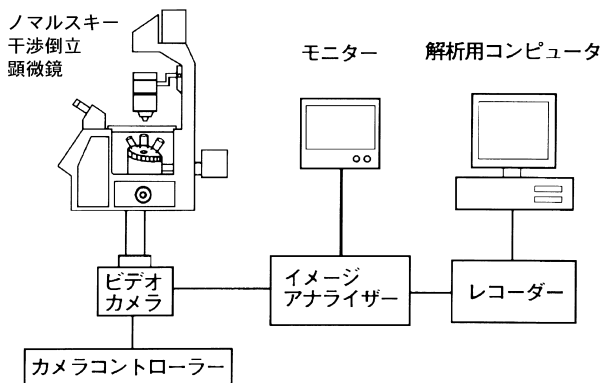


図 20 細胞内粒子運動の超高感度ビデオ画像による解析システム。

したものである。この反応はアンタゴニストの存在で明らかに抑制された。これに対し、D2 は抑制性 G 蛋白質を介し、カリウムチャンネルを活性化する。これまでラット網膜に D1, D2 受容体が主として存在していることが示されている^{95)~100)}。しかし、ミユラ細胞には D2 受容体の存在を推定した研究があるのみである¹⁰¹⁾。我々は D1 アゴニストを投与し、細胞内カルシウム濃度上昇が起こり、これがアンタゴニスト存在で抑制されたことから、ミユラ細胞には D1 受容体も存在している可能性をはじめて示した。今回は D1, D2 の両方の受容体に注目して実験を進めた。

細胞はその機能を維持するために小胞輸送やミトコンドリアの輸送など細胞内でのさまざまな動き、そして細胞自体の動きが必須となる。それを司っているものが分子モーターと呼ばれるものである¹⁰²⁾。近年、超高感度高倍率顕微鏡を用いて、細胞内粒子運動をリアルタイムに観察することができるようになった。その研究の先鞭は軸索輸送の研究にある^{103)~105)}。この方法(図 20)を用いて D1, D2 アゴニスト投与時の細胞内粒子運動の超高感度ビデオ画像による解析を行った。ミユラ細胞では、

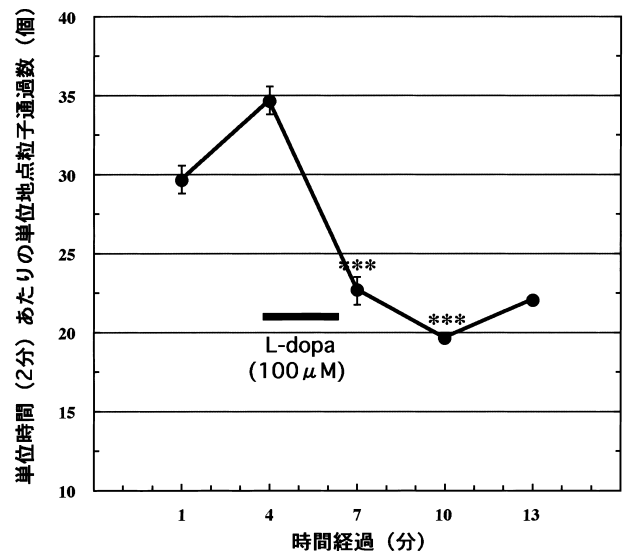


図 22 培養ミユラ細胞における L-dopa 投与前後の単位時間当たりの粒子運動変化。

D1 アゴニスト投与後粒子運動が抑制され、D2 アゴニスト投与では運動が明らかに促進された。すなわち、D1 と D2 とでは正反対の挙動をとった(図 21)。この結果は、家兎培養ミユラ細胞に D1, D2 受容体ともに存在する可能性を示したものと解釈している。ニューロンの軸索輸送でも同様の傾向であったが、ニューロンではアゴニストを投与しても変化しないものがあり、これらはドパミン受容体が存在しない細胞と推定された。L-dopa 投与時のミユラ細胞内の挙動はほとんどが投与直後に粒子運動が抑制された(図 22)。このように、多くのミユラ細胞での挙動は D1 受容体賦活時の挙動と類似した。一方、ニューロンに L-dopa を投与した場合は軸索輸送が亢進するものが比較的多くみられ、これは D2 類似の応答であるが、抑制されるものやまた変化しないものもあり、さらなる検討を要する。

さて、ドパミンの神経保護作用を我々の系で TUN-

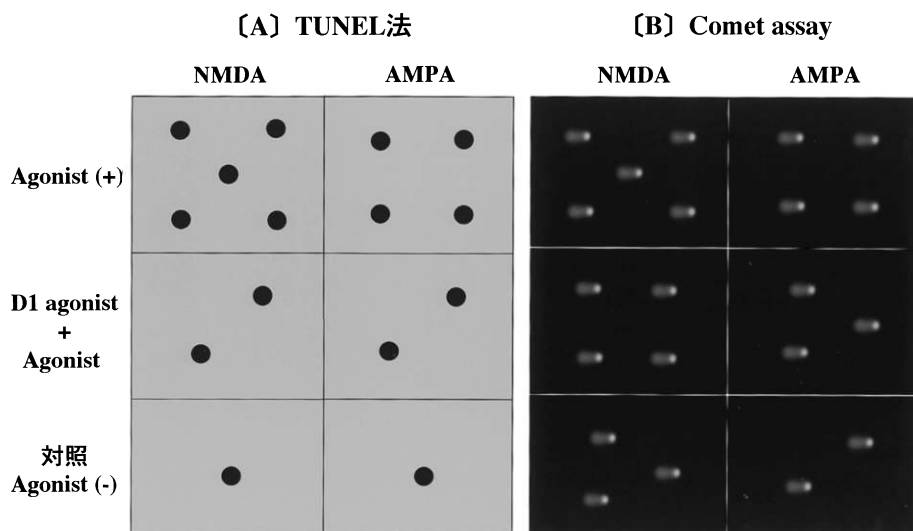


図 23 D1 アゴニストの 10^{-6} M 前投与後 NMDA, AMPA 曝露 24 時間後の, TUNEL 法, comet 法での陽性細胞出現比.

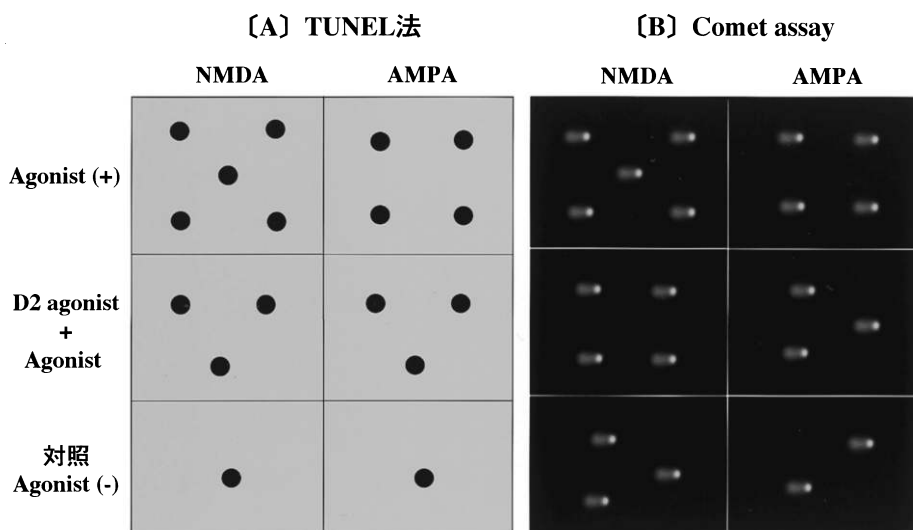


図 24 D2 アゴニストの 10^{-6} M 前投与後 NMDA, AMPA 曝露 24 時間後の, TUNEL 法, comet 法での陽性細胞出現比.

EL 法と comet 法を用いて検討した結果を次に示す。まず, ドパミン自体に細胞死を誘導する作用が知られている¹⁰⁶⁾ので, D1, D2 アゴニスト自体に毒性がないことを確かめる必要がある。 10^{-4} M の D1, D2 アゴニストとも細胞死がやや増える傾向にあったが有意差はなかった。そこで, 実験は 10^{-6} M 以下の濃度で行った。ミウラ細胞を用いて, 高濃度グルタミン酸アゴニスト曝露時の D1, D2 アゴニスト前投与の効果を comet 法でみると, AMPA, NMDA とも 10^{-4} M の D1, D2 アゴニスト前投与で, 有意な細胞死抑制効果がみられ, 10^{-6} M でも D1 アゴニスト前投与後の AMPA 曝露の場合以外, いずれも有意な細胞死抑制効果がみられた。D1 アゴニストの 10^{-6} M 前投与した場合を例に, 高濃度 NMDA, AMPA 曝露細胞の TUNEL 法, comet 法での各々陽性細胞出現比を図 23 に示す。D1 アゴニストは網

膜ニューロンのグルタミン酸毒性に対し抑制的に作用したが, 特に NMDA 誘発毒性抑制効果が最も明確に検出された。D2 アゴニストを前投与し高濃度 AMPA 曝露によるグルタミン酸アゴニスト誘発細胞死に対する抑制効果も(図 24), NMDA, AMPA いずれの誘発毒性に対してもみられた。TUNEL 法でみる限り, D1 アゴニストが NMDA, AMPA 誘発毒性とも D2 よりも強く抑制する傾向がみられたが, その傾向は comet 法では明らかでなかった。以上から, L-dopa の細胞死抑制効果の機序として, D1, D2 ドパミン受容体を介する可能性は十分あると考えられた。ところで, 細胞内粒子の運動をみても, D1, D2 受容体を介した作用は対称的であり, 両者の拮抗的薬理作用も知られている¹⁰⁷⁾¹⁰⁸⁾。その一方で D1, D2 の協同的作用も報告¹⁰⁹⁾されている。したがって, これらの受容体の網膜細胞における相互作用

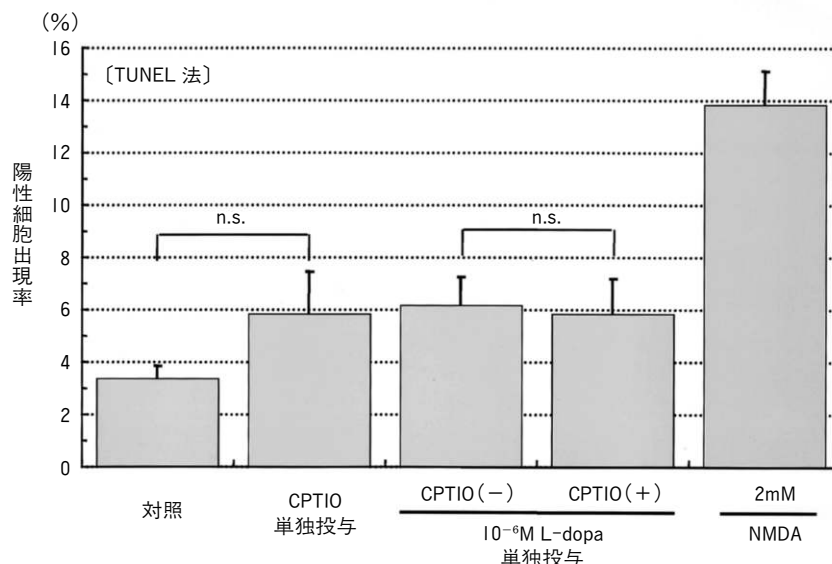


図 25 L-dopa (10^{-6} M) 前投与時に carboxy-2-phenyl-4, 4, 5, 5-tetramethyl-imidazoline-1-oxyl-3-oxide (C-PTIO) を同時投与と非投与とでの網膜ニューロンにおける NMDA 誘発細胞死抑制作用の比較 (TUNEL 法).

両者間に有意差なし (n. s.)

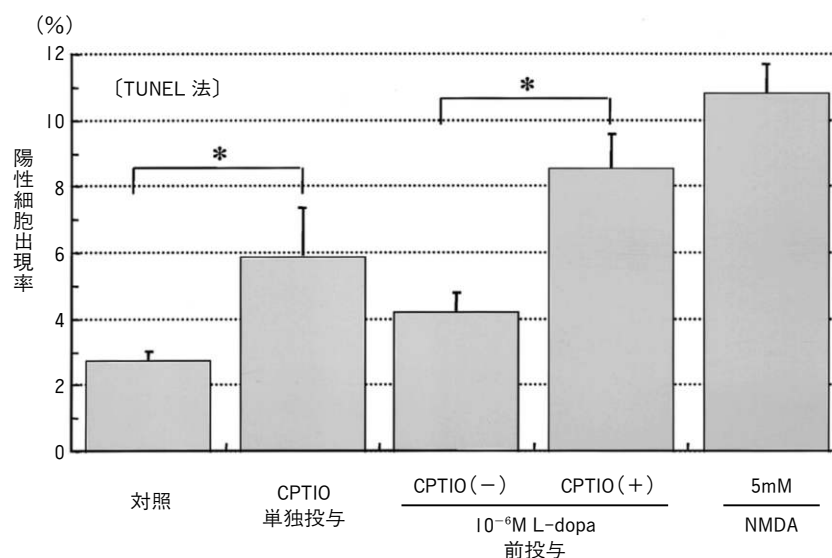


図 26 L-dopa (10^{-6} M) 前投与時に C-PTIO を同時投与と非投与とでの網膜ニューロンにおける AMPA 誘発細胞死抑制作用の比較 (TUNEL 法).

この実験では C-PTIO の存否で僅かに有意差があるが、C-PTIO 単独でも対照に比し同様の有意差があるので、結果の解釈はむずかしい。*: $p < 0.05$

が、相加的か拮抗的かなどについては今後に残された課題である。

2) NO を介した作用

次に L-dopa は自家酸化により NO を放出する⁶⁶⁾⁶⁷⁾。NO は気体であるが網膜においても神経伝達物質として作用する可能性が指摘されている¹¹⁰⁾。また、アポトーシスに関してはこれを誘導する作用がある一方、抑制作用もあるという二面性がある¹¹¹⁾¹¹²⁾。このことは、網膜ニューロンにおいても推定されている¹¹³⁾。

L-dopa が高濃度で細胞毒性を有したことは、フリー

ラジカルとしての NO が細胞障害性に作用したと推定したことは既に述べた。しかし、NO 自体にアポトーシス抑制作用があることに注目し、強力な NO スカベンジャーである carboxy-2-phenyl-4, 4, 5, 5-tetramethyl-imidazoline-1-oxyl-3-oxide (C-PTIO, 200 μ M) を L-dopa とともに前投与する実験を行った。まず、L-dopa (10^{-6} M) を C-PTIO と同時に投与した上で、グルタミン酸アゴニストに曝露したニューロンを調べた。NMDA に曝露したものでは、C-PTIO を同時に投与しなかった場合と比較して有意差は生じなかった (図 25)。一方、

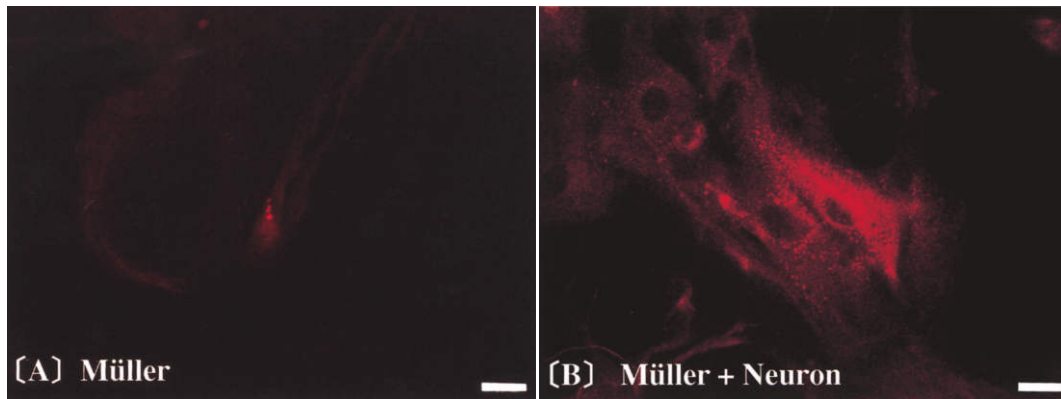


図 27 Nerve growth factor (NGF) の間接免疫蛍光法.

ミュラ細胞単独培養では陰性(A)であるが、ニューロンとの混合培養では陽性(B)を示す。バーは 20 μm

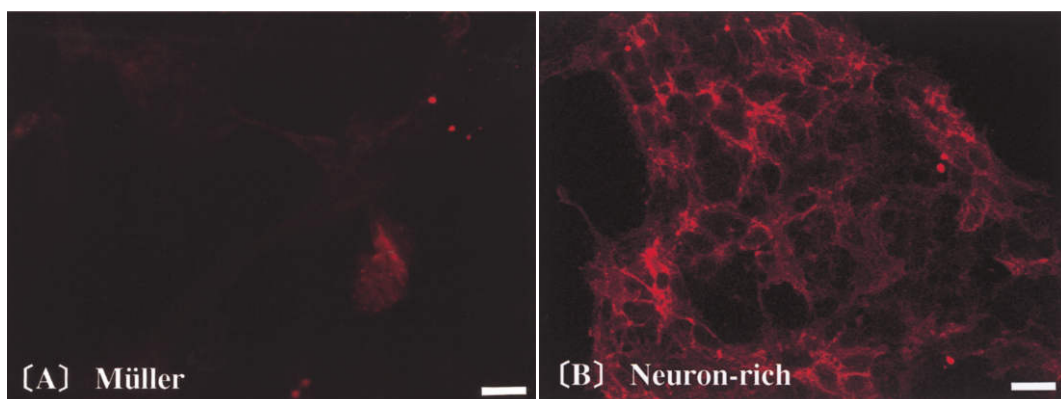


図 28 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の間接免疫蛍光法.

ミュラ細胞単独培養では陰性(A)であるが、ニューロンとの混合培養ではニューロンを中心に陽性(B)を示す。バーは 20 μm

AMPA に曝露したものでは、C-PTIO 同時投与では C-PTIO なしの L-dopa 前投与に比べ有意に TUNEL 陽性細胞が増加した(図 26)。この結果は、AMPA 曝露に対する L-dopa 前投与での細胞死抑制効果には NO が関与している可能性を推定するが、この実験系では、C-PTIO 自体に細胞障害性がないことを確認できなかった(図 26)、結論は確定的ではない。

3) 神経栄養因子を介した作用

種々の神経栄養因子や成長因子が神経保護的に作用することは多くの研究が示している^{114)~117)}。このうち、網膜においては nerve growth factor (NGF) が神経保護的のみならず¹¹⁸⁾¹¹⁹⁾、神経細胞死促進的に作動するとのデータもある¹²⁰⁾¹²¹⁾。これに対し、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) は専ら神経保護的に^{122)~124)}働くようである。L-dopa やドパミンとこうした因子を結びつける研究は非常に限られている。L-dopa が BDNF mRNA の発現を上昇させるとの *in vivo* での研究¹²⁵⁾やドパミンアゴニストがマウスの培養アストロサイトで BDNF や NGF の発現を増加させる¹²⁶⁾との研究、また発生過程で神経栄養因子の受容体であるチロシンキナーゼ受容体をドパミンが制御しているとのデータがあ

る¹²⁷⁾。しかし、一方でドパミンアンタゴニストが NGF 遺伝子の発現を誘導する¹²⁸⁾といった、先述の研究¹²⁶⁾と相反する成績も出ており、まだ謎の多い領域である。網膜においては、この点に注目した研究はまだ出ていないが、我々は次のような実験を行った。

まず、培養細胞に対して間接免疫蛍光法を試みた。NGF はミュラ細胞単独では陰性であったが、ニューロンとの混合培養ではミュラ細胞、ニューロンともに陽性であった(図 27)。そこで、ニューロンとミュラ細胞の混合培養を用いて、L-dopa 10^{-6}M で 3 時間培養した細胞に対し NGF の免疫蛍光法を行ったところ、陽性所見が得られたが、L-dopa を投与しない対照細胞に比して明らかな強陽性は示さなかった。次に BDNF の免疫蛍光では、やはりミュラ細胞単独では陰性であったが、混合培養では主としてニューロンに陽性であった(図 28)。ここで L-dopa 10^{-6}M 投与 3 時間後での BDNF 発現をみるとやはり陽性を示したが、対照細胞と比べて違いが明確でなかった。そこで、mRNA レベルで BDNF の発現が増強しているかどうか、Northern blotting 法(slot blotting 法、図 29)で調べた。これは目的とする mRNA をジゴキシゲニン標識の BDNF のプローブ(和

Northern blot (slot blot) による RNA 発現の検出

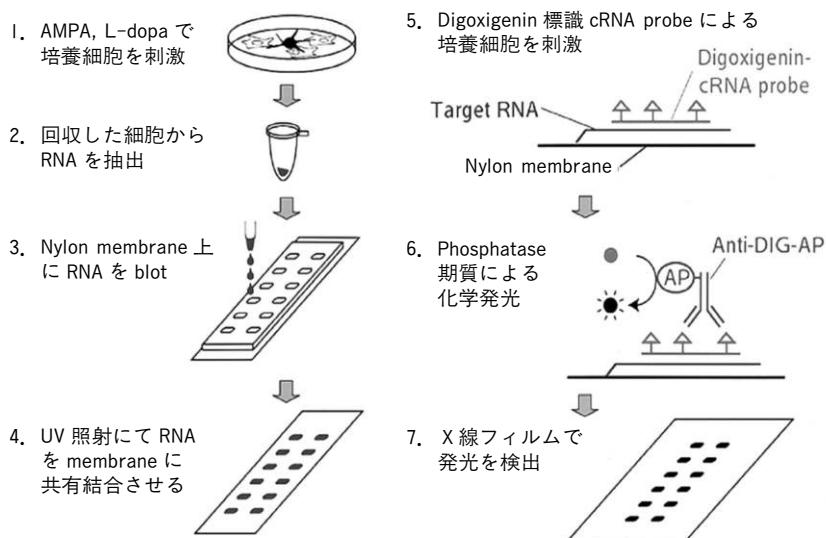


図 29 Northern blot による RNA 発現の検出法.

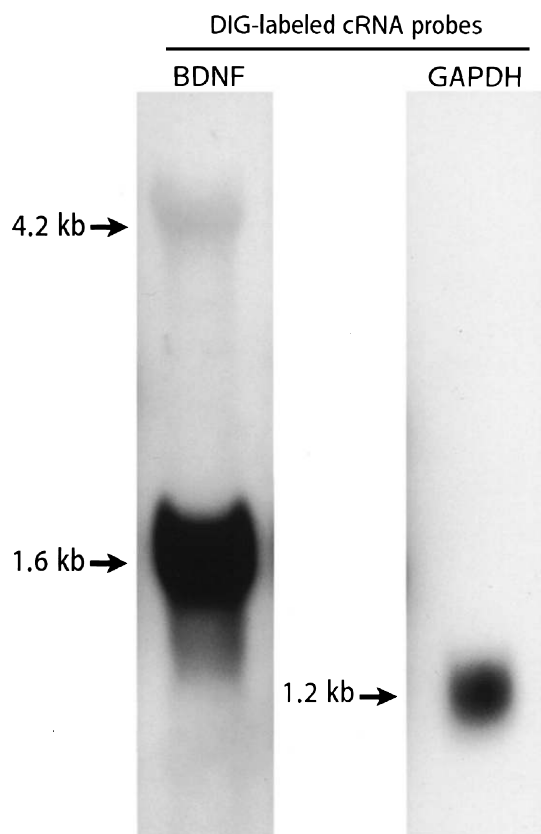


図 30 使用した probe(和歌山県立医大第 2 解剖学仙波恵美子教授ご提供)の特異性.

対照の glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) はラットの遺伝子を鋳型にして作られたプローブを利用している。

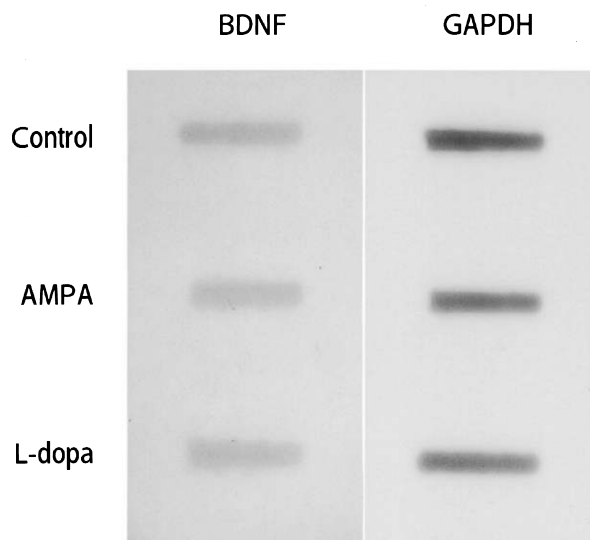


図 31 培養細胞に薬物投与した場合の BDNF 発現を示す Northern blotting.

る。このプローブは図 30 のように高い特異性を示した。培養細胞はいずれも混合培養で行ったが、ニューロンの多い場合、ミユラ細胞の多い場合などニューロンとグリアの比を変えて 4 回繰り返して実験した。BDNF は対象とした培養細胞の分布がどのような場合でも、対照細胞、AMPA 曝露細胞、L-dopa 曝露細胞ともに確かに発現した。しかし、対照細胞に比し、曝露細胞において BDNF 発現の増加は確認できなかった(図 31)。なお、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) は、多くの組織で比較的一定量の発現がみられ、GAPDH RNA の量は刺激条件によらず全 RNA 量に比例す

ることから、本法の対照によく用いられている。このバンドの濃度と各条件での BDNF RNA のバンド濃度の比をとってみたが、やはり有意な変化は検出されなかった。

以上のことは、L-dopa 投与は培養網膜ニューロンとミユラ細胞との混合培養において、NGF、BDNF の発現増加は明らかに生じないという結論に導ける。一方、免疫蛍光法で示されたように、NGF、BDNF ともミユラ細胞単独では陽性とならず、網膜ニューロンとの混合培養においてのみ陽性となった点は、ニューロンからグリアへの信号伝達の間接的証明となっていて興味ある所見と思われた。

以上から、培養網膜ニューロンとミユラ細胞において、L-dopa がグルタミン酸曝露に対し予防的神経保護作用を有する機作として、NO のアポトーシス抑制作用や神経栄養因子、神経成長因子などを介したのも完全には否定できないものの、むしろ D1, D2 受容体を介した保護作用の可能性が高いと考えられた。

XII おわりに

著者は網膜視神経障害など神経眼科疾患に対する神経保護的治療を意識して宿題報告に取り組み、特にミユラ細胞の神経保護作用に注目するとともに、既存薬の中からカルシウムチャンネルブロッカーと L-dopa の作用に焦点を当てながら、上記の問題を考察した。中でも、L-dopa は先に述べたように、実際に非動脈炎性前部虚血性視神経症患者に使用されている⁶¹⁾⁶²⁾。本症は米国での研究では年間人口 10 万人対 10.3 人の発症率で発症し、視力予後の不良な疾患である¹²⁹⁾。また、視力低下が遅発性に進行する場合もあり¹³⁰⁾、他眼の発症もまれでない¹³¹⁾¹³²⁾。治療法が確立されていない疾患であることから、今回の我々の実験で予防的神経保護作用が示された L-dopa を、保護治療的に臨床応用したい。そこで、我々も本症の慢性期症例に対し、本薬の投与を試み、玉井らにより低視力評価用に開発された low vision evaluator (LoVE)¹³³⁾を利用して検討した。今回は赤のダイオードで 9 種類の intensity で無作為に各々 3 回合計 27 回発光させ、患者が発光を認識できたら、ブザーを鳴らす方法で、刺激の総和を LoVE 値として算出した。すなわち満点は 27 である。なお、3 回の未発光刺激があり、患者にエラーがあった場合は表示されるので、再検査を行った。Levodopa と carbidopa が 10 対 1 で配合されている製剤メネシットを用い、同意の得られた患者に対し 1 日 1 錠 L-dopa として 100 mg を 3 週間投与し、3 週間休薬後 300 mg を 3 週間投与した。図 32 に投与した 9 例の平均 LoVE 値の経過を示す。3 錠投与中有意に値が上昇し、投与後には有意差が消失した。投与中のみ効果があることは、おそらくドパミン受容体などを介した神経賦活作用であろうと推定できる。今後、一眼に発

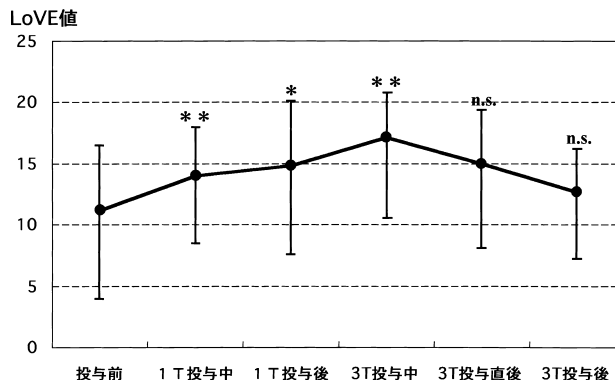


図 32 虚血性視神経症慢性期患者 (N=9) にレボドパ治療期間中の low vision evaluator (LoVE) 値の経過。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

症した患者の治療と、他眼発症の際の神経保護を期待しての予防的投与に関するデータを、患者の協力を得て蓄積したいと思う。

以上、予防的神経保護薬の候補として、カルシウムチャンネルブロッカーと L-dopa の *in vitro* での保護作用の存在を我々の研究成果で示しつつ、これらを通じて予防的神経保護作用の機序についても総説的に概観した。

本宿題報告を終えるに当たり、この機会を与えて下さいました日本眼科学会評議員の皆様ならびに座長の労をおとり下さいました猪俣 孟教授に感謝いたします。また、研究推進に当たっては、多くの方々のご指導、ご協力を得ましたが、特に終始ご鞭撻いただいた恩師石川 哲北里大学名誉教授、自由に研究する機会と場を与えていただいた清水公也北里大学教授ならびに井上治郎井上眼科病院院長にお礼を申し上げます。

本研究は旧厚生省特定疾患網膜脈絡膜視神経萎縮症研究班 (班長本田孔士教授、玉井 信教授)、旧科学技術庁目標達成型脳科学研究 (班長福田 淳教授)、旧文部省科学研究費、失明予防協会助成金および北里大学医療系大学院プロジェクト研究費の援助をそれぞれ受けました。

文 献

- 1) Hoff JT : Cerebral protection. J Neurosurg 65 : 579—591, 1986.
- 2) McDonald JW, Silverstein FS, Johnston MV : Neuroprotective effects of MK-801, TCP, PCP and CPP against N-methyl-D-aspartate induced neurotoxicity in an *in vivo* perinatal rat model. Brain Res 490 : 33—40, 1989.
- 3) Isacson O : On neural health. Trends in Neurosciences 16 : 306—308, 1993.
- 4) Shoulson I : Experimental therapeutics of neurodegenerative disorders : Unmet needs. Science 282 : 1072—1074, 1998.
- 5) Kumar S : Regulation of caspase activation in apoptosis : implications in pathogenesis and treatment of disease. Clin Exp Pharmacol Phy-

- siol 26 : 295—303, 1999.
- 6) **Nickells RW** : Retinal ganglion cell death in glaucoma : The how, the why, and the maybe. *J Glaucoma* 5 : 345—356, 1996.
 - 7) **Levin LA** : Direct and indirect approaches to neuroprotective therapy of glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol* 43(Suppl 1) : 98—101, 1999.
 - 8) **Osborne NN, Ugarte M, Chao M, Chidlow G, Bee JH, Wood JP, Nash MS** : Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol* 43(Suppl 1) : 102—128, 1999.
 - 9) **Vorwerk CK, Gorla MS, Dreyer EB** : An experimental basis for implicating excitotoxicity in glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol* 43(Suppl 1) : 142—150, 1999.
 - 10) **Shnitzer J** : Distribution and immunoreactivity of glia in the retina of the rabbit. *J Comp Neurol* 240 : 128, 1985.
 - 11) **Wakakura M, Foulds WS** : Comparative ultrastructural study of rabbit Müller cells *in vitro* and *in situ*. *Eye* 2 : 664—669, 1988.
 - 12) **Wakakura M, Foulds WS** : Immunocytochemical characteristics of Müller cells cultured from adult rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29 : 892—900, 1988.
 - 13) **Wakakura M, Foulds WS** : Laminin expressed by cultured Müller cells stimulates growth of retinal neurites. *Exp Eye Res* 48 : 577—582, 1989.
 - 14) **Wakakura M, Yamamoto N** : Cytosolic calcium transient increase through the AMPA/kainate receptor in cultured Müller cells. *Vision Res* 34 : 1105—1109, 1994.
 - 15) **Banasiaka KJ, Xiab Y, Haddadbc GG** : Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 62 : 215—249, 2000.
 - 16) **Yamashita T** : Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neural death of primates. *Prog Neurobiol* 62 : 273—295, 2000.
 - 17) **Joo CK, Choi JS, Ko HW, Park KY, Sohn S, Chun MH, Oh YJ, Gwag BJ** : Necrosis and apoptosis after retinal ischemia : Involvement of NMDA-mediated excitotoxicity and p 53. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 713—720, 1999.
 - 18) **Martin LJ, Sieber FE, Traystman RJ** : Apoptosis and necrosis occur in separate neuronal populations in hippocampus and cerebellum after ischemia and are associated with differential alterations in metabotropic receptor signaling pathways. *J Cereb Blood Flow Metabolism* 20 : 153—167, 2000.
 - 19) **Glazner GW, Chan SL, Lu C, Mattson MP** : Caspase-mediated degradation of AMPA receptor subunits : A mechanism for preventing excitotoxic necrosis and ensuring apoptosis. *J Neurosci* 20 : 3641—3649, 2000.
 - 20) **Glazner GW, Mattson MP** : Differential effects of BDNF, ADNF 9, and TNF alpha on levels of NMDA receptor subunits, calcium homeostasis, and neuronal vulnerability to excitotoxicity. *Exp Neurol* 161 : 442—452, 2000.
 - 21) **Loo DT, Rillema JR** : Measurement of cell death. *Methods Cell Biol* 57 : 251—264, 1998.
 - 22) **Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL** : A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175 : 184—191, 1988.
 - 23) **Speit G, Hartmann A** : The comet assay (Single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol* 113 : 203—212, 1999.
 - 24) **Bittigau P, Ikonomidou C** : Glutamate in neurologic diseases. *J Child Neurol* 12 : 471—485, 1997.
 - 25) **Sattler R, Tymianski M** : Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* 78 : 3—13, 2000.
 - 26) **Lipton P** : Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79 : 1431—1568, 1999.
 - 27) **Ferreira IL, Duarte CB, Carvalho AP** : Ca^{2+} influx through glutamate receptor-associated channels in retina cells correlated with neuronal cell death. *Europ J Pharmacol* 302 : 153—162, 1996.
 - 28) **Dkhissi O, Chanut E, Wasowicz M, Savoldelli M, Nguyen-Legros J, Minvielle F, et al** : Retinal TUNEL-positive cells and high glutamate levels in vitreous humor of mutant quail with a glaucoma-like disorder. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 990—995, 1999.
 - 29) **Kageyama T, Ishikawa A, Tamai M** : Glutamate elevation in rabbit vitreous during transient ischemia-reperfusion. *Jpn J Ophthalmol* 44 : 110—114, 2000.
 - 30) **Duarte CB, Ferreira IL, Santos PF, Carvalho AL, Agostinho PM, Carvalho AP** : Glutamate in life and death of retinal amacrine cells. *General Pharmacol* 30 : 289—295, 1998.
 - 31) **Minei R** : Effects of a new excitotoxic amino acid, Dysiherbaine, on cultured Müller cells. *Jpn J Ophthalmol* (in press)
 - 32) **Rossi DJ, Oshima T, Attwell D** : Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403(6767) : 316—321, 2000.
 - 33) **Koistinaho J, Hokfelt** : Altered gene expression in brain ischemia. *Neuroreport* 8 : i—viii, 1997.
 - 34) **Larm JA, Cheung NS, Beart PM** : Apoptosis induced via AMPA-selective glutamate receptors in cultured murine cortical neurons. *J Neurochem* 69 : 617—622, 1997.
 - 35) **Chan SL, Griffin WS, Mattson MP** : Evidence

- for caspase-mediated cleavage of AMPA receptor subunits in neuronal apoptosis and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 57 : 315—323, 1999.
- 36) **Cheung NS, Beart PM, Pascoe CJ, John CA, Bernard O** : Human Bcl-2 protects against AMPA receptor-mediated apoptosis. *J Neurochem* 74 : 1613—1620, 2000.
 - 37) **Nakai M, Oin ZH, Chen JF, Wang Y, Chase TN** : Kainic acid-induced apoptosis in rat striatum is associated with nuclear factor-kappaB activation. *J Neurochem* 74 : 647—658, 2000.
 - 38) **Otori Y, Wei JY, Barnstable CJ** : Neurotoxic effects of low doses of glutamate on purified rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 972—981, 1998.
 - 39) **Kobayashi T, Mori Y** : Ca^{2+} channel antagonists and neuroprotection from cerebral ischemia. *Europ J Pharmacol* 363 : 1—15, 1998.
 - 40) **Berman RF, Verweji BH, Muizelaar JP** : Neurobehavioral protection by the neuronal calcium channel blocker ziconotide in a model of traumatic diffuse brain injury in rats. *J Neurosurg* 93 : 821—828, 2000.
 - 41) **Leski ML, Valentine SL, Coyle JT** : L-type voltage-gated calcium channels modulate kainic acid neurotoxicity in cerebellar granule cells. *Brain Res* 828 : 27—40, 1999.
 - 42) **Tomita K, Araie M, Tamaki Y, Nagahara M, Sugiyama T** : Effects of nilvadipine, a calcium antagonist, on rabbit ocular circulation in NTG. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 1144—1151, 1999.
 - 43) **Shimazawa M, Sugiyama T, Azuma I, Araie M, Iwakura Y, Watari M, et al** : Effects of lomeridine, a new $\text{Ca}(2+)$ channel blocker, on the microcirculation in the optic nerve head in conscious rabbits : A study using a laser speckle technique. *Exp Eye Res* 69 : 185—193, 1999.
 - 44) **Tamaki Y, Araie M, Tomita K, Urashima H** : Effects of pranidipine, a new calcium antagonist, on circulation in the choroids, retina and optic nerve head. *Curr Eye Res* 19 : 241—247, 1999.
 - 45) **Waki M, Sugiyama T, Watanabe N, Ogawa T, Shirahase H, Azuma I** : Effect of topically applied iganidipine dihydrochloride, a novel calcium antagonist, on optic nerve head circulation in rabbits. *Jpn J Ophthalmol* 45 : 76—83, 2001.
 - 46) **Osborne NN, Cazevieuille C, Carvalho AL, Larsen AK, DeSantis L** : *In vivo* and *in vitro* experiments show that betaxolol is a retinal neuroprotective agent. *Brain Res* 751 : 113—123, 1997.
 - 47) **Osborne NN, DeSantis L, Bae JH, Ugarte M, Wood JP, Nash MS, et al** : Topically applied betaxolol attenuates NMDA-induced toxicity to ganglion cells and the effects of ischaemia to the retina. *Exp Eye Res* 69 : 331—342, 1999.
 - 48) **Melena J, Osborne NN** : Voltage-dependent calcium channels in the rat retina : Involvement in NMDA-stimulated influx of calcium. *Exp Eye Res* 72 : 393—401, 2001.
 - 49) **Toriu N, Akaike A, Yasuyoshi H, Zhang S, Kashii S, Honda Y, Shimazawa M, Hara H** : Lomerizine, a Ca^{2+} channel blocker, reduces glutamate-induced neurotoxicity and ischemia/reperfusion damage in rat retina. *Exp Eye Res* 70 : 475—484, 2000.
 - 50) **Sucher NJ, Lipton SA, Dreyer EB** : Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res* 37 : 3483—3493, 1997.
 - 51) **Shen W, Slaughter MM** : Metabotropic and ionotropic glutamate receptors regulate calcium channel currents in salamander retinal ganglion cells. *J Physiol* 510(Pt 3) : 815—828, 1998.
 - 52) **Colwell CS, Levine MS** : Metabotropic glutamate receptor modulation of excitotoxicity in the neostriatum : Role of calcium channels. 833 : 234—241, 1999.
 - 53) **Calton JL, Kang MH, Wilson WA, Moore SD** : NMDA-receptor-dependent synaptic activation of voltage-dependent calcium channels in basolateral amygdala. *J Neurophysiol* 83 : 685—692, 2000.
 - 54) **Hirooka K, Kelly ME, Baldrige WH, Barnes S** : Suppressive actions of betaxolol on ionic currents in retinal ganglion cells may explain its neuroprotective effects. *Exp Eye Res* 70 : 611—621, 2000.
 - 55) **Gottlob I, Charlier J, Reinecke RD** : Visual acuities and scotomas after one week levodopa administration in human amblyopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33 : 2722—2728, 1992.
 - 56) **Leguire LE, Rogers GL, Bremer DL, Walson PD, McGregor ML** : Levodopa/carbidopa for childhood amblyopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 3090—3095, 1993.
 - 57) **Legire LE, Walson PD, Rogers GL, Bremer DL, McGregor ML** : Longitudinal study of levodopa/carbidopa for childhood. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 30 : 354—360, 1993.
 - 58) **Legire LE, Walson PD, Rogers GL, Bremer DL, McGregor ML** : Levodopa/carbidopa treatment for amblyopia in older children. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 32 : 143—151, 1995.
 - 59) **Gottlob I, Wizov SS, Reinecke RD** : Visual acuities and scotomas after 3 weeks' levodopa administration in adult amblyopia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 233 : 407—413, 1995.
 - 60) **Procianoy F, Fuchs FD, Procianoy L, Procianoy F** : The effect of increasing doses of levodopa on children with strabismic amblyopia. *J AAPOS* 3 : 337—340, 1999.
 - 61) **Johnson LN, Gould TJ, Krohel GB** : Effect of levodopa and carbidopa on recovery of visual function in patients with nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy of longer than six

- months' duration. *Am J Ophthalmol* 121 : 77—83, 1996.
- 62) **Johnson LN, Guy ME, Krohel GB, Madsen RW** : Levodopa may improve vision loss in recent-onset, nonarteritic anterior optic neuropathy. *Ophthalmology* 107 : 521—526, 2000.
 - 63) **Melamed E, Offen D, Shirvan A, Djaldetti R, Barzilai A, Ziv I** : Levodopa toxicity and apoptosis. *Ann Neurol* 44 : S 149—S 154, 1998.
 - 64) **Jenner PG, Brin MF** : Levodopa neurotoxicity : Experimental studies versus clinical relevance. *Neurology* 50 : S 39—S 43, 1998.
 - 65) **Mena MA, Pardo B, Paino CL, Yebenes JG** : Levodopa toxicity in foetal rat midbrain neurones in culture : Modulation by ascorbic acid. *Neuroreport* 4 : 438—440, 1993.
 - 66) **Cheng N, Maeda T, Kume T, Kaneko S, Kochiyama H, Akaike A, et al** : Differential neurotoxicity induced by L-DOPA and dopamine in cultured neurons. *Brain Res* 743 : 278—283, 1996.
 - 67) **Akeo K, Amaki S, Suzuki T, Hiramatsu T** : Melanin granules prevent the cytotoxic effects of L-DOPA on retinal pigment epithelial cells *in vitro* by regulation of NO and superoxide radicals. *Pigment Cell Res* 13 : 80—88, 2000.
 - 68) **Kashihara K, Sakai K, Marui K, Shohmori T** : L-DOPA does not facilitate nitric oxide production in the rat striatum and substantia nigra : *in vivo* microanalysis study. *Life Sci* 63 : 59—64, 1998.
 - 69) **Ziv I, Zikha-Falb R, Offen D, Shirvan A, Barzilai A, Melamed E** : Levodopa induces apoptosis in cultured neuronal cells. A possible accelerator of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease? *Movement Disorders* 12 : 17—23, 1997.
 - 70) **Newmann E, Reichenbach A** : The Müller cell : A functional element of the retina. *Trends Neurosci* 19 : 307—312, 1996.
 - 71) 嶺井利沙子, 若倉雅登 : Müller 細胞における神経伝達物質受容体. *神経眼科* 16 : 5—9, 1999.
 - 72) **Kawasaki I, Wakakura M** : Possible role of AMPA/KA receptor in cultured Müller cells. *Jpn J Ophthalmol* 40 : 159—166, 1996.
 - 73) **Liu Y, Wakakura M** : P 1-/P 2-purinergic receptors on cultured rabbit retinal Müller cells. *Jpn J Ophthalmol* 42 : 33—40, 1998.
 - 74) **Wakakura M, Utsunomiya-Kawasaki I, Ishikawa S** : Rapid increase in cytosolic calcium ion concentration mediated by acetylcholine receptors in cultured retinal neurons and Müller cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 236 : 934—939, 1998.
 - 75) 日下俊次 : ミュラー細胞の K⁺チャネル. *神経眼科* 16 : 10—14, 1999.
 - 76) **Otori Y, Shimada S, Tanaka K, Ishimoto I, Tano Y, Tohyama M** : Marked increase in glutamate-aspartate transporter (GLAST/GluT-1) mRNA following transient retinal ischemia. *Mol Brain Res* 27 : 310—314, 1994.
 - 77) **Harada T, Harada C, Watanabe M** : Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 4663—4666, 1998.
 - 78) **Ju WK, Lee MY, Hofmann HD, Kirsch M, Chu MH** : Expression of CNTF in Müller cells of the rat retina after pressure-induced ischemia. *Neuroreport* 10 : 419—422, 1999.
 - 79) **Honjo M, Tanihara H, Kido N, Inatani M, Okazaki K, Honda Y** : Expression of ciliary neurotrophic factor activated by retinal Müller cells in eyes with NMDA-and kainic acid-induced neuronal death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 552—560, 2000.
 - 80) **Li F, Cao W, Steinberg RH, LaVail MM** : Basic FGF-induced down-regulation of IGF-I mRNA in cultured rat Müller cells. *Exp Eye Res* 68 : 19—27, 1999.
 - 81) **Tomita H, Ishiguro S, Abe T, Tamai M** : Increased expression of low-affinity NGF receptor in rat retinal Müller cells after ischemia and reperfusion. *Cell Str Funct* 23 : 201—207, 1998.
 - 82) **Wahlin KJ, Campochiaro PA, Zack DJ, Adler R** : Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Müller cells and other cells of the inner retina, but not photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 927—936, 2000.
 - 83) **Huster D, Reichenbach A, Reichelt W** : The glutathione content of retinal Müller (glial) cells. Effect of pathological conditions. *Neurochem Internat* 36 : 461—469, 2000.
 - 84) **Nishiyama T, Nishikawa S, Tomita H, Tamai M** : Müller cells in the preconditioned retinal ischemic injury rat. *Tohoku J Exp Med* 191 : 221—232, 2000.
 - 85) **Kawasaki A, Otori Y, Barnstable CJ** : Müller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 3444—3450, 2000.
 - 86) **Wang AM, M. V. Doyle MV, Mark DF** : Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 9717—9721, 1989.
 - 87) **Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R** : Kinetic PCR : Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11 : 1026—1030, 1993.
 - 88) **Kobayashi M, Sano K, Katsumura K, Ikeda T** : Analysis of collagen protection by retinal Müller cells. *IOVS (ARVO abstract)* 42 : S 202, 2001.
 - 89) **Lange KW, Rausch WD, Gsell W, Naumann M, Oestreicher E, Riederer P** : Neuroprotection by dopamine agonists. *J Neural Transm (Suppl)*

- 43 : 183—201, 1994.
- 90) **Yamamoto M** : Do dopamine agonists provide neuroprotection? *Neurology* 51 : 10—12, 1998.
 - 91) **Cepeda C, Colwell CS, Itri JN, Gruen E, Levine MS** : Dopaminergic modulation of early signs of excitotoxicity in visualized rat neostriatal neurons. *Europ J Neurosci* 10 : 3491—3497, 1998.
 - 92) **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.
 - 93) **Do Nascimento JL, Kubrusly RC, Reis RA, De Mello MC, De Mello FG** : Atypical effect of dopamine in modulating the functional inhibition of NMDA receptors of cultured retina cells. *Europ J Pharmacol* 343 : 103—110, 1998.
 - 94) **Emilien G, Maloteaux JM, Hoogenberg K, Cragg S** : Dopamine receptors. Physiological understanding to therapeutic intervention potential. *Pharmacol Therapeut* 84 : 133—156, 1999.
 - 95) **Tran VT, Dickman M** : Differential localization of dopamine D1 and D2 receptors in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33 : 1620—1626, 1992.
 - 96) **Behrens UD, Wagner HJ** : Localization of dopamine D1-receptors in vertebrate retinae. *Neurochem Int* 27 : 497—507, 1995.
 - 97) **Veruki ML, Wassle H** : Immunohistochemistry localization of dopamine D1 receptors in rat retina. *Eur J Neurosci* 8 : 2286—2297, 1996.
 - 98) **Veruki ML** : Dopaminergic neurons in the rat retina express dopamine D 2/3 receptors. *Eur J Neurosci* 9 : 1096—1100, 1997.
 - 99) **Nguyen-Legros J, Simon A, Caille I, Bloch B** : Immunocytochemical localization of dopamine D1 receptors in the retina of mammals. *Visual Neurosci* 14 : 545—551, 1997.
 - 100) **Derouiche A, Asan E** : The dopamine D2 receptor subfamily in rat retina : Ultrastructural immunogold and in situ hybridization studies. *Eur J Neurosci* 11 : 1391—1402, 1999.
 - 101) **Biedermann B, Friohlich E, Grosche J, Wagner HJ, Reichenbach A** : Mammalian Müller (glial) cells express functional D2 dopamine receptors. *Neuroreport* 6 : 609—612, 1995.
 - 102) **池辺光男** : 細胞の動きを決める分子. *実験医学* 17 : 436—438, 1999.
 - 103) **Kawakami T, Takenaka T, Hori H, Hashimoto Y, Kusakabe T** : Effects of acetylcholine and adrenaline on axoplasmic transport at different regions of mouse superior cervical ganglion cells in culture. *Brain Res* 683 : 88—92, 1995.
 - 104) **Hiruma H, Nishida S, Katakura T, Kusakabe T, Takenaka T, Kawakami T** : Extracellular potassium rapidly inhibits axonal transport of particles in cultured mouse dorsal ganglion neuritis. *J Neurobiol* 38 : 225—233, 1999.
 - 105) **Hiruma H, Maruyama H, Katakura T, Simada Z, Nishida S, Hoka S, et al** : Axonal transport is inhibited by a protein kinase C inhibitor in cultured isolated mouse dorsal root ganglion cells. *Brain Res* 826 : 135—138, 1999.
 - 106) **Masserano JM, Gong L, Kulaga H, Baker I, Wyatt RJ** : Dopamine induces apoptotic cell death of a catecholaminergic cell line derived from the central nervous system. *Mol Pharmacol* 50 : 1309—1315, 1996.
 - 107) **Bodis-Wollner I, Tzelepi A** : The push-pull action of dopamine on spatial tuning of the monkey retina : The effects of dopaminergic deficiency and selective D1 and D2 receptor ligands on the pattern electroretinogram. *Vision Res* 38 : 1479—1487, 1998.
 - 108) **Durham RA, Johnson JD, Eaton MJ, Moore KE, Lookingland KJ** : Opposing roles for dopamine D1 and D2 receptors in the regulation of hypothalamic tuberoinfundibular dopamine neurons. *Eur J Pharmacol* 355 : 141—147, 1998.
 - 109) **Hu XT, White FJ** : Dopamine enhances glutamate-induced excitation of rat striatal neurons by cooperative activation of D1 and D2 class receptors. *Neurosci Lett* 224 : 61—65, 1997.
 - 110) **Yamamoto R, Brecht DS, Snyder SH, Stone RA** : The localization of nitric oxide synthetase in the rat eye and related cranial ganglia. *Neurosci* 54 : 189—200, 1993.
 - 111) **Brune B, von Knethen A, Sandau KB** : Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 351 : 261—272, 1998.
 - 112) **Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billar TR, Kim YM** : Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 282 : 1075—1079, 2001.
 - 113) **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.
 - 114) **Morretto G, Xu RY, Walker DG, Kim SU** : Co-expression of mRNA for neurotrophic factors in human neurons and glial cells in culture. *J Neuropathol Exp Neurol* 53 : 78—85, 1994.
 - 115) **Kiprianova I, Freiman TM, Desiderato S, Schwab S, Galmbacher R, Gillardon F, et al** : Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death and glial activation after global ischemia in the rat. *J Neurosci Res* 56 : 21—27, 1999.
 - 116) **Semkova I, Krieglstein J** : Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors. *Brain Res Reviews* 30 : 176—188, 1999.
 - 117) **Kume T, Nishikawa H, Tomioka H, Katsuki H, Akaike A, Kaneko S, et al** : p 75-mediated neur-

- oprotection by NGF against glutamate cytotoxicity in cortical cultures. *Brain Res* 852 : 279—289, 2000.
- 118) **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.
- 119) **Lambiase A, Centofanti M, Micera A, Manni GL, Mattei E, De Gregorio A, De Feo G, Bucci MG, Aloe L** : Nerve growth factor (NGF) reduces and NGF antibody exacerbates retinal damage induced in rabbit by experimental ocular hypertension. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235 : 780—785, 1997.
- 120) **Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Barde YA** : Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p 75 receptor. *Nature* 383 : 166—168, 1996.
- 121) **Frade JM, Bovolenta P, Rodriguez-Tebar A** : Neurotrophins and other growth factors in the generation of retinal neurons. *Microsc Res Tech* 45 : 243—251, 1999.
- 122) **Unoki K, La Vail 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.
- 123) **Frade JM, Bovolenta P, Martinez-Morales JR, Arribas A, Barbas JA, Rodriguez-Tebar A** : Control of early cell death by BDNF in the chick retina. *Development* 124 : 3313—3320, 1997.
- 124) **Ikeda K, Tanihara H, Honda Y, Tatsuno T, Noguchi H, Nakayama C** : BDNF attenuates retinal cell death caused by chemically induced hypoxia in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2130—2140, 1999.
- 125) **Okazawa H, Murata M, Watanabe M, Kamei M, Kanazawa I** : Dopaminergic stimulation up-regulates the *in vivo* expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the striatum. *FEBS Letters* 313 : 138—142, 1992.
- 126) **Inoue S, Susukida M, Ikeda K, Murase K, Hayashi K** : Dopaminergic transmitter up-regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) synthesis in mouse astrocytes in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 238 : 468—472, 1997.
- 127) **Jung AB, Bennett JP** : Development of striatal dopaminergic function. III : Pre- and postnatal development of striatal and cortical mRNAs for the neurotrophin receptors trkBTK+ and trkC and their regulation by synaptic dopamine. *Dev Brain Res* 94 : 133—143, 1996.
- 128) **Ozaki T, Mui K, Yamagami S** : Comparison of the effects of dopamine D1 and D2 receptor antagonists on nerve growth factor mRNA expression. *Eur J Pharmacol* 369 : 133—143, 1999.
- 129) **Hattenhauer MG, Leavitt JA, Hodge DO, Grill R, Gray DT** : Incidence of nonarteritic anterior optic neuropathy. *Am J Ophthalmol* 103—107, 1997.
- 130) **Kline LB** : Progression of visual defects in ischemic optic neuropathy. *Am J Ophthalmol* 106 : 199—203, 1988.
- 131) **Boone MI, Massry GG, Frankel RA, Holds JB, Chung SM** : Visual outcome in bilateral nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Ophthalmology* 103 : 1223—1228, 1996.
- 132) **WuDunn D, Zimmerman K, Sadun AA, Feldon SE** : Comparison of visual function in fellow eyes after bilateral nonarteritic anterior optic neuropathy. *Ophthalmology* 104 : 104—111, 1997.
- 133) **国方彦志, 中川陽一, 角田雅宏, 玉井 信** : 重度低視力者の視機能評価とその測定機器 Low Vision Evaluator の開発. *日眼会誌* 105 : 161—166, 2001.