

発達過程の網膜における VIP (vasoactive intestinal polypeptide) の役割—雛の ERG に対する影響 (図 9)

不二門 尚・大本 達也 (大阪大学医学部眼科学教室)
趙 容子・福田 全克

Influence of Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) upon the Chick ERG during Development

Takashi Fujikado, Tatsuya Omoto, Yoko Cho and Masakatsu Fukuda

Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School

要 約

発達過程にある雛の網膜に対して ERG の正常発達, VIP 負荷の ERG に対する影響, および網膜中に含まれる VIP の含有量を調べ, 以下の結果を得た. 1. 律動様小波は孵化前 1 日より記録可能となり孵化後急激に振幅の増大および頂点時の短縮を認め, 1 週間以内に成鳥のレベルに達した. 2. VIP 負荷により OP₁ の振幅増大と OP₂ の頂点時遅延の効果が認められた. これらの効果は孵化直前から孵化後 1 週間は強く認められたが以後次第に減少し, 孵化後 3 週間目には僅かに認められるのみとなった. 3. 網膜の単位重量当たりの VIP 含有量は孵化前 4 日には検出不能であったが孵化前 1 日には微量の検出が可能となり, 孵化後急増して 5 日目に最大値をとり以後軽度で減少した. これらの事実から VIP は, 網膜のシナプス活動が開始する時期に一致して産生が開始され, 律動様小波に反映されるシナプス回路に対して, 主として発達過程において修飾物質として作用することが示唆された. (日眼 91:1256—1263, 1987)

キーワード: VIP, 発達, ERG, 雛網膜, RIA 法

Abstract

Although vasoactive intestinal polypeptide (VIP) has been immunohistochemically identified in chick retina, its physiological role is still unclear. In this study, we evaluated how VIP might affect ERG of chick retina, in vivo at various stages of development. As oscillatory potentials (OPs) are considered to reflect neuronal activities in inner layers of retina we studied particularly how OPs are modulated after intravitreal injection of VIP. In normal development, OPs were at first detectable 2~3 days before hatching and after that their peak times reduced rapidly to adult values within a week. Increase of OP₁-amplitude and retardation of OP₂-peaktime were observed 10~20 minutes after injection of VIP (100 μM, 20 μl). These effects were significant at early stages (-1~9 days) after hatching, reducing gradually with age and were only slightly observable at 3 weeks. We also studied the retinal content of VIP by radioimmunoassay. VIP was barely detectable just before hatching, increased dramatically and peaked 5 days after hatching and decreased gradually to the adult value. These observations suggest that VIP is produced concomitantly with the onset of synaptic activity in the retina and has modulatory effects on the synaptic circuits represented by OPs during development. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91:1256—1263, 1987)

別刷請求先: 553 大阪市福島区福島 1-1-50 大阪大学医学部眼科学教室 不二門 尚

Reprint requests to: Takashi Fujikado, M.D. Dept. of Ophthalmol. Osaka Univ. Medical School
1-1-50 Fukushima, Fukushima-ku, Osaka 533, Japan

(昭和62年7月14日受付) (Accepted July 14, 1987)

Key words: Vasoactive intestinal polypeptide (VIP), ERG, Development, Radioimmunoassay, Chick retina

I 緒 言

最近の免疫組織化学的検索により、各種脊椎動物網膜には、すでに、10種類以上の neuropeptide の存在が証明されている¹⁾。vasoactive intestinal polypeptide (VIP) もその一つで、内顆粒層のアマクリン細胞に限局して存在している^{1)~3)}が、VIP の網膜回路での役割については、細胞レベルでの電気生理学的研究で、VIP はコイの水平細胞に対して脱分極を誘起すること⁴⁾、また網膜の培養細胞の研究で、VIP はコリン作動性細胞の活動を修飾すること⁵⁾が見出されているに過ぎない。これらの研究から、VIP は、一部の網膜細胞に対してなんらかの修飾物質として作用することが示唆されるが、網膜全体からみた VIP の役割についてはなお明らかではない。

ERG の律動様小波は、網膜の内顆粒層および内網状層レベルでのシナプス活動を反映している^{6)~8)}と考えられている。そこでわれわれは、VIP 負荷により律動様小波に及ぼす影響がおよぶかを検討することにより、VIP の網膜内シナプス回路における役割を知ることを試みた。また、発達過程の網膜の機能的成熟については、ERG の a 波、b 波⁹⁾、視神経の伝導速度¹⁰⁾、神経節細胞の受容野¹¹⁾を指標とした研究があるが、われわれは律動様小波の正常の発達に着目し、VIP の律動様小波に対する影響を発達との関係で捉えることにより、発達過程にある網膜のシナプス回路に対する VIP の役割について検討を加えた。さらに、網膜に含有される VIP 量の発達に伴う変化についても併せて検討した。実験動物としては、明らかに、VIP 含有細胞が証明されており、かつ、内網状層の発達しているニワトリの雛を用いた。

II 実験方法

1. 実験動物：受精17日目(孵化5日前)から孵化後3週間に至る白色レグホンの雛80羽を使用した。
2. ERG の測定方法：雛を手術用覆布で包み約38℃に保温した。光刺激には Xenon フラッシュ光を使用し、眼前10cmより照射した。閃電極はコンタクトレンズ型電極を改良したものを用い、不閃電極は頭部に、接地電極は頸部においた。光刺激は20分間の暗順応の後、15秒以上間隔をあけて行い、通常0.5Jouleの刺激

光を用いた。また刺激光強度は neutral density filter (ND フィルター)を用いて対数的に変化させた。増幅器の時定数は0.03sec、high cut は1KHzとした。律動様小波の振幅(amplitude)および頂点時(peak time)の計測法は米村等の方法¹²⁾に従った。

3. 使用薬剤および投与方法：VIP (Porcine synthesized) は Sigma 社(米国)およびベプチド研究所(大阪府)のものを使用した。VIP の濃度は10 μ M ~ 300 μ M (通常100 μ M)を使用し、これを片眼の硝子体腔中に20 μ l 注入した。対眼の硝子体腔中には生理的食塩水20 μ l を注入し対照とした。

4. VIP の定量 (RIA 法)：雛の全網膜(4眼分)を摘出し、湿重量を測定した後これに2規定の酢酸を加え、100℃で10分間沸騰した後ホモジェナイズした。これを3,000rpm で10分間遠心分離した後上清を凍結乾燥して試料とした。この試料に家兎抗 VIP 血清および I²⁵³-VIP を加え4℃で72時間インキュベーションを行った。これに dextran coated charcoal を加え、2,000rpm で10分間遠心分離した後、上清をガンマカウンターで測定した。

III 結 果

1. 雛の発達と ERG の変化

律動様小波は孵化前1日(受精20日)に再現性のある記録が可能となった(a波およびb波は孵化前3日(受精16日)より記録可能であった)。Fig. 1は各発達段階の ERG を示したもので、孵化後律動様小波の頂点時の短縮および振幅の増大が認められた。Fig. 2は各群5羽について、律動様小波の頂点時および振幅の発達に伴う変化を示したもので、孵化後2~5日で頂点時の急速な短縮と振幅の増大が顕著にみられ、孵化後2週間で頂点時、振幅いずれもほぼ成鳥のレベルに達した。

2. VIP 負荷による律動様小波の変化

Fig. 3は孵化後2日目の雛においてVIP注入後の律動様小波の変化を示したものである。VIP負荷によりOP₁の振幅の増大およびOP₂の頂点時の遅延が認められた。a波およびb波には顕著な影響は認められなかった。Fig. 4にVIP注入後の律動様小波の振幅および頂点時について経時的変化を示した。VIP注入によるOP₁の振幅増大およびOP₂の頂点時遅延の効果

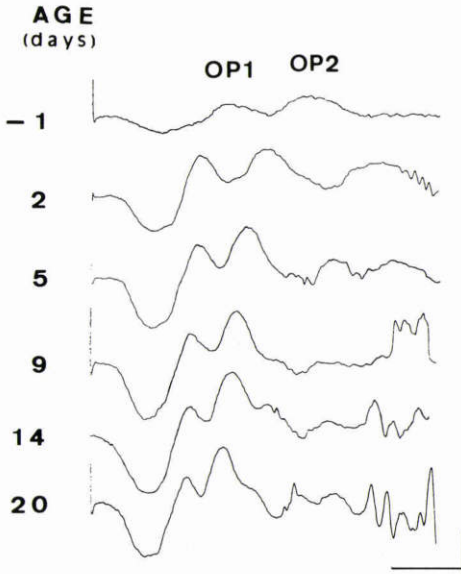


Fig. 1 発達段階にある雛の代表的 ERG. 孵化 1 日前より孵化後 20 日までの雛の代表的 ERG を示した. 律動様小波は孵化前 1 日 (受精 20 日目) に初めて記録が可能となった. 孵化後律動様小波の頂点時の短縮, および振幅の増大が認められた. (較正は $50\mu\text{V}$, 10msec)

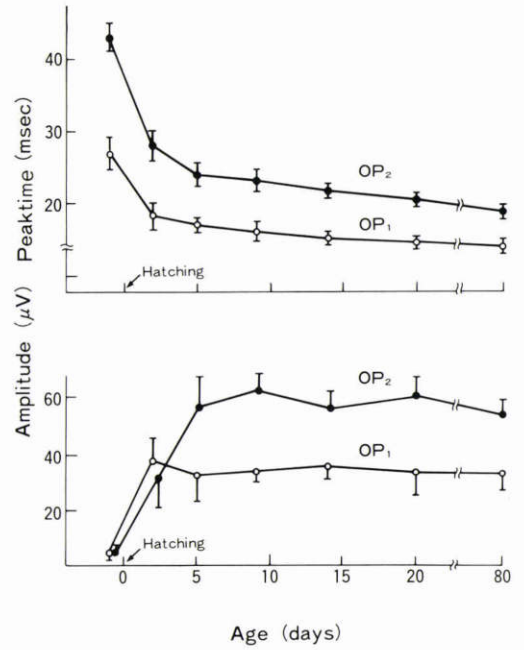


Fig. 2 律動様小波の発達に伴う変化—頂点時(図上)および振幅(図下)について—. 孵化後急速に頂点時の短縮(図上)および振幅の増大(図下)が OP_1 および OP_2 ともに見られ, 孵化後 5 日目にはほぼ成鳥のレベルに達した. (各群 5 羽の平均)

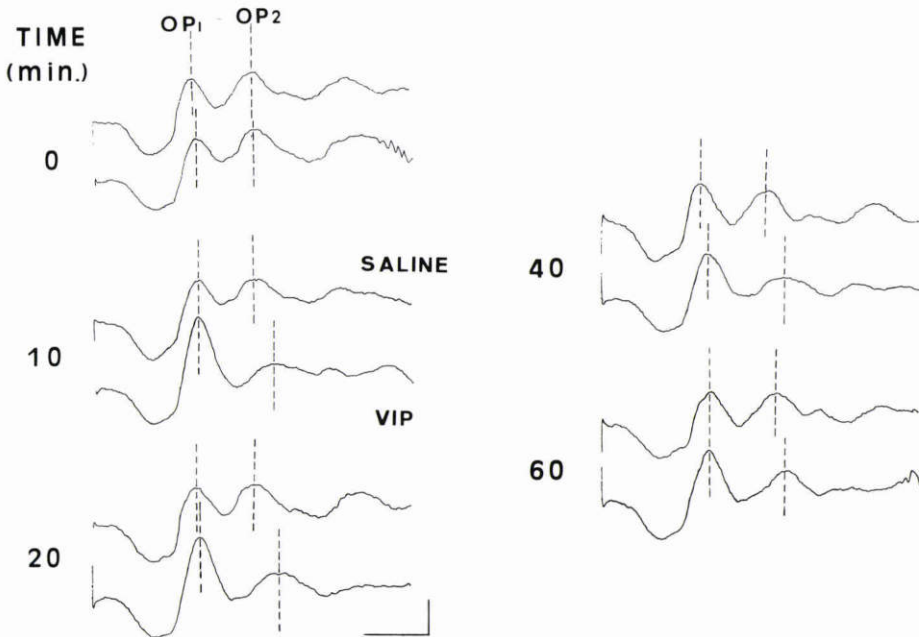


Fig. 3 VIP の律動様小波に対する影響. 孵化後 2 日目の雛について, VIP ($100\mu\text{M}$) 注入後の律動様小波の波形変化を示した(上段は対照群, 下段は VIP 注入眼). VIP 注入眼では注入 10 分後には OP_1 の振幅増大および OP_2 の頂点時遅延が認められ, この効果は少なくとも 60 分間持続した. (較正は $50\mu\text{V}$, 10msec)

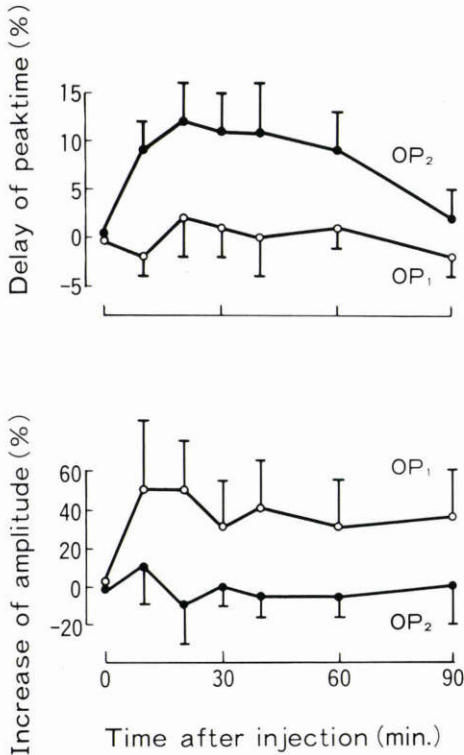


Fig. 4 VIP注入後の律動様小波の経時変化—頂点時(図上)および振幅(図下)の変化—。VIP注入後の頂点時(図上)および振幅(図下)について対照眼に対する比率(%)を示した。VIP注入によりOP₂の頂点時の遅延(図上)およびP₁の振幅増大(図下)が明確に認められた。この効果は注入後10~20分で最大となり、その後少なくとも60分は持続した。OP₁の頂点時(図上、白丸)およびOP₂(図下、黒丸)の振幅には明らかな影響は認められなかった。(孵化後2~5日の雛について4羽の平均)

は注入後10~20分で最大となり、その後少なくとも60分間持続した。OP₁の頂点時およびOP₂の振幅には明らかな影響は認められなかった。

3. VIPの効果の濃度依存性

Fig. 5に硝子体内に注入するVIPの濃度を変化させて、律動様小波の頂点時の遅延率、および振幅の増大率を対照眼に対して求めたものを示した。VIPの影響は注入濃度10 μ M(硝子体中に均一に拡散したと仮定した場合の硝子体濃度は1 μ M)では明らかではなかったが、注入濃度30 μ M(硝子体濃度3 μ M)で再現性よく認められ、さらに濃度を上げて効果に大きな差はなかった。

4. VIPの効果の刺激光強度依存性

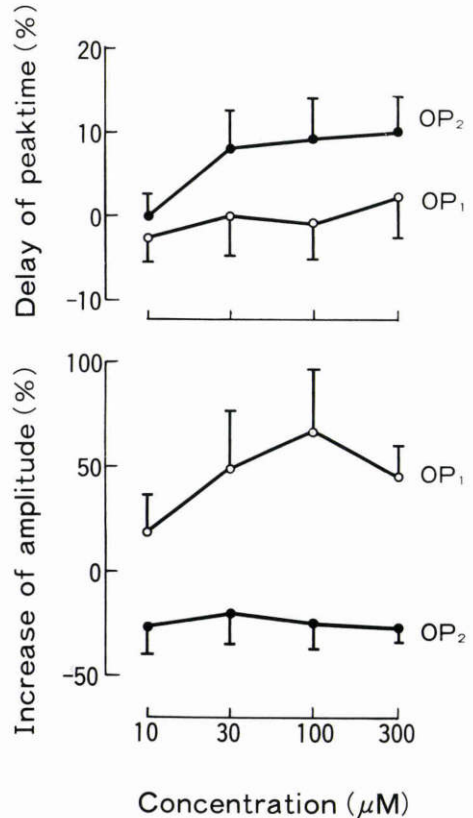


Fig. 5 VIPの効果の濃度依存性—頂点時(図上)および振幅(図下)について—。VIPの注入濃度(10 μ M~300 μ M)に対する、律動様小波の頂点時の遅延率、および振幅の増大率を対照眼に対して求めたものを示した。VIPの影響は、注入濃度10 μ M(均一に拡散したと仮定した場合の硝子体濃度は1 μ M)では明らかではなかったが、注入濃度30 μ M(硝子体濃度3 μ M)で再現性よく認められ、さらに濃度を上げて効果の大きな差はなかった。(孵化後2~5日の雛について各濃度4羽の平均)

刺激光強度を対数的に減弱させると、対照眼およびVIP注入眼ともに律動様小波の振幅は減少し頂点時は延長したが、VIP注入眼におけるOP₁の振幅増大効果は減少し、OP₂の頂点時遅延効果は増大した(Fig. 6)。従って以下の実験においては、VIPの効果を見る適切な刺激強度として0.5Jの刺激光を用いた。

5. VIPの効果の発達段階による違い。

孵化前1日から孵化後20日までの各発達段階の雛に対して、VIP負荷の影響をFig. 7に示した。孵化直前から孵化後早期にOP₁の振幅増大およびOP₂の頂点時遅延が著明に認められたが、成長とともにこの影響

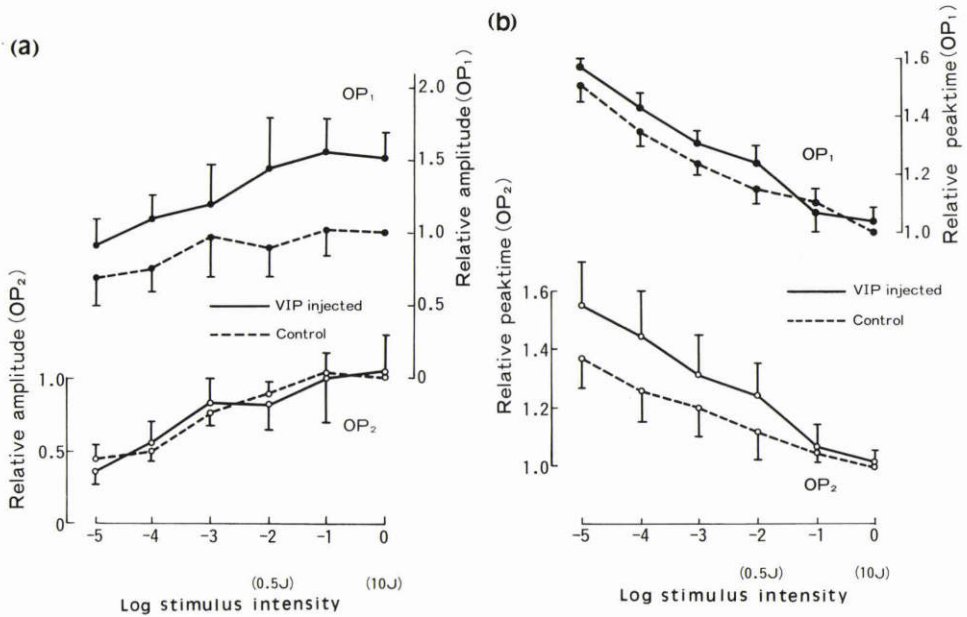


Fig. 6 VIP の効果の刺激光強度依存性—振幅 (図 a) および頂点時 (図 b) について。対照眼の刺激強度10J に対する、律動様小波の振幅 (図 a) および頂点時 (図 b) を1.0とし、ND フィルターを用いて刺激光を変化させ、各刺激光強度での対照眼およびVIP注入眼の振幅および頂点時の相対値を示した。(VIP注入後10~30分、濃度100 μ Mの条件下での測定)。刺激光強度を対数的に減少させると、対照眼およびVIP注入眼共に律動様小波の振幅の減少および頂点時の延長が認められたが、VIP注入眼でのOP₁の振幅増大効果は減少し(図 a)、OP₂の頂点時遅延効果は増大した(図 b)(孵化後2~5日の雛4羽の平均)。

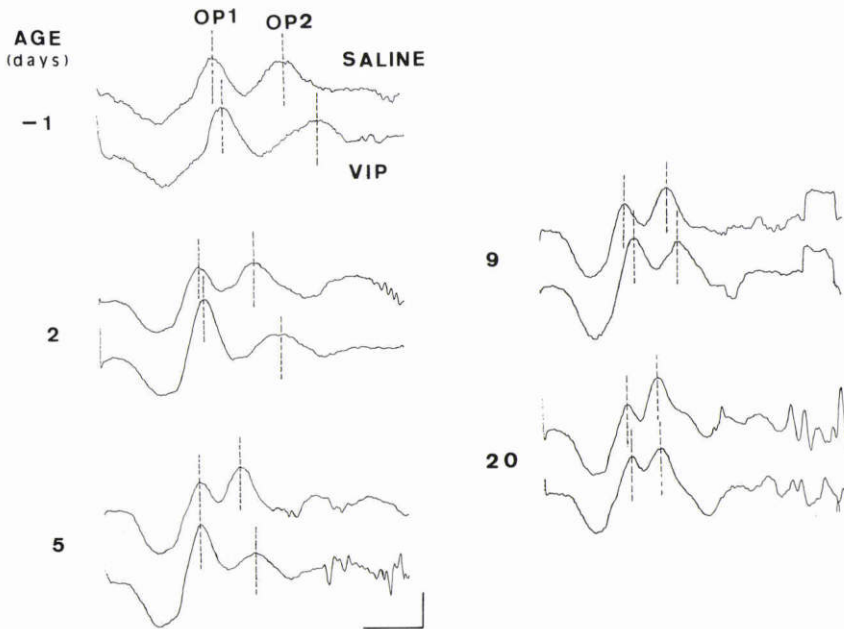


Fig. 7 VIP の効果—各発達段階の雛の代表的 ERG—。上段は対照眼、下段はVIP注入後の ERG (注入10~20分後、VIP濃度100 μ M)。孵化前1日よりOP₁の振幅増大効果およびOP₂の頂点時遅延効果が認められた。この効果は孵化後早期には顕著に見られたが、20日目には僅かに認められる程度となった。(縦線は50 μ V 横線は10msecを示す。ただし孵化前1日については振幅を2倍に表示した。)

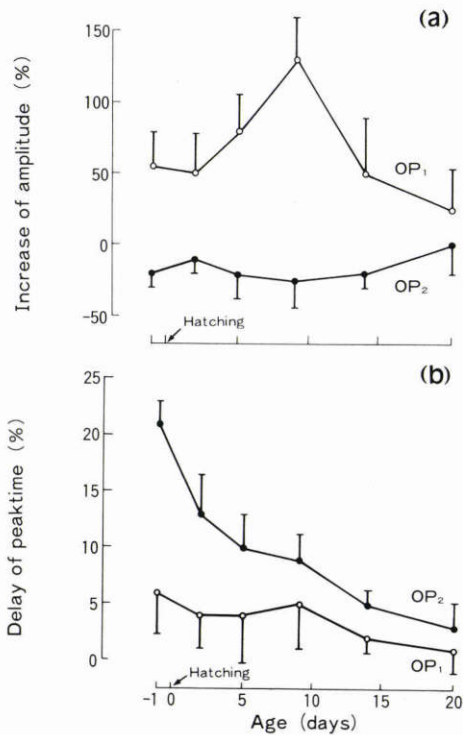


Fig. 8 VIP の効果の発達に伴う変化—振幅(図 a)および頂点時(図 b)について、各発達段階でのVIP注入眼の振幅増大率(図 a)および頂点時遅延率(図 b)を対照眼に対して求めたものを示した。OP₁の振幅増大効果は孵化直前より認められ、孵化後9日目にピークに達した後減少し20日目には軽度認められるのみとなった(図 a)。OP₂の頂点時遅延は孵化前1日に最大値をとり孵化後徐々に減少し、20日目には殆ど認められなくなった(図 b)。(各群4羽の平均)

は小さくなった。Fig. 8にVIP負荷による振幅の増大率および頂点時の遅延率の発達に伴う変化を示した。OP₁の振幅増大は孵化直前より認められ、孵化後9日目にピークに達した後減少し、3週間後には軽度で見られるのみとなった。OP₂の頂点時遅延は孵化直前が最も大きく、孵化後徐々に減少し、3週間後にはほとんど認められなくなった。

6. 網膜の単位重量当たりに含まれるVIPの発達による変化

網膜の単位重量当たりに含まれるVIPの量は、孵化前4日には検出不能であったが、孵化前1日には微量の検出が可能となり、孵化後急増し5日目にピークに達した後軽度に減少した(Fig. 9)。

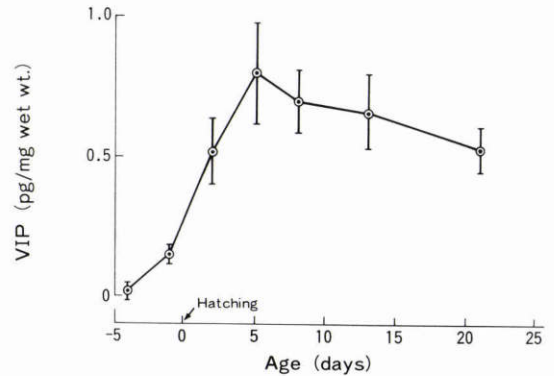


Fig. 9 VIP含有量(網膜単位重量当たり)の発達に伴う変化。網膜単位重量当たりのVIP含有量は孵化前4日には検出不能であったが孵化1日前には微量の検出が可能となり、孵化後急増し5日目にピークに達した後軽度に減少した。(各群4羽の平均)

IV 考 按

雛の網膜の発達については、受精後視細胞から神経節細胞にいたる各細胞要素が成熟するまでに13日間かかり、その後3～4日で細胞間にシナプスが形成されることが解剖学的に明らかにされている¹³⁾。孵化するのは受精後21日目である。ERGのa波およびb波は受精後18日目(孵化2日前)より記録されることが報告されているが¹⁴⁾、今回の実験でもこのことが確認された。律動様小波の発達に伴う変化については過去に報告はないが、今回の実験で律動様小波が再現性よく記録可能となったのは、a波およびb波より1～2日遅れた受精後19～20日目(孵化2日～1日前)であった。従って、律動様小波に反映される網膜内顆粒層、内網状層レベルのシナプスは、孵化直前に活動を開始し、孵化後急速に増強した後、2日～5日ではほぼ成熟すると考えられる(Fig. 2)。雛は刷込み現象で知られているように、孵化直後より視覚機能を働かせることが要求されており、従って孵化時期に向けて網膜のシナプス活動が準備され、孵化後この機能が急速に成熟することは合目的である。ラット網膜における免疫組織化学的研究では、VIP陽性細胞は開眼後2日(生後12日)頃より未熟なものが認められ(この頃よりERGの記録が可能となる)、開眼後11日には成熟することが確かめられている¹⁵⁾。今回の雛網膜におけるVIP含有量の実験からは、VIPの産生は孵化2～3日前に開始し、孵化直後に急増し、孵化後5日ではほぼ成鳥のレベルに達することが確かめられた(Fig. 9)。これらの事

実はラット同様雛においても、網膜のシナプス活動の開始する時期に一致してVIPが準備され、シナプス活動の増強する時期にVIPの産生が急速に増加することを意味しており、VIPが網膜のシナプス活動に何らかの寄与をしている可能性を示唆している。VIPの律動様小波に対する影響を発達の観点からみると、 OP_1 に反映されるシナプス回路のVIPに対する感受性は孵化直前より存在し、孵化後9日をピークとして以後減少し、孵化後3週間で軽度認められるのみとなった。また OP_2 に反映される回路に対する感受性は孵化直前が最も高く孵化後次第に減少し、孵化後3週間で殆ど認められなくなった(Fig. 7)。これらの事実は、VIPの作用は完成したシナプスよりも、むしろ形成過程にあるシナプス回路に対してより顕著であることを示している。最近の雛の網膜を用いた神経ペプチドの研究によると、グルカゴン、エンケファリンも孵化前後に網膜内含有量が急増することが認められているので¹⁶⁾、これらのペプチドも発達と関連することが予想される。またイモリの摘出網膜ではソマトスタチン、サブスタンスPが律動様小波に影響を与えるという報告もある¹⁷⁾。しかし我々が試した範囲では雛のERGに顕著な影響を与えたペプチドは現在のところVIPのみであった¹⁸⁾。従って発達過程の雛網膜においてVIPは、少なくともERGの律動様小波に関係するシナプス回路に関しては、他のペプチドより大きな修飾作用を持つと考えられる。VIPの作用機序については、鯉の水平細胞に対して膜電位を直接変化させる速い作用と、Cyclic AMPの産生促進を介した遅い作用が存在することが明らかにされている⁴⁾。網膜全体から見た今回の研究では、VIPは OP_1 に対して頂点時には影響を与えないが振幅を増大させ、 OP_2 に対しては振幅には影響を与えないが頂点時遅延をもたらすことから(Fig. 4)、VIPの OP_1 を形成するシナプス回路に対する働きと、 OP_2 を形成する回路に対する働きは異なっていることが推察される。

真鍋禮三教授の御指導、御校閲に深謝いたします。また、科学研究費(課題番号60480389、代表 福田)の援助を受けたことを記し、謝意を表します。

文 献

- 1) Brecha N: Retinal Neurotransmitters: Histochemical and Biochemical Studies. Emson PC, Ed, Chemical Neuroanatomy, 85—129, Raven Press, New York, 1983.
- 2) Fukuda M, Kuwayama Y, Shiosaka S, et al: Localization of vasoactive intestinal polypeptide and neurotensin immunoreactivities in the avian retina. *Curr Eye Res* 1: 115—118, 1981.
- 3) Lören I, Tornqvist K, Alumets J: VIP (vasoactive intestinal polypeptide)-immunoreactive neurons in the retina of the rat. *Cell Tiss Res* 210: 167—170, 1980
- 4) Lasater EM, Watling KJ, Dowling JE: Vasoactive intestinal peptide alters membrane potential and cyclic nucleotide levels in retinal horizontal cells. *Science* 221: 1070—1072, 1983.
- 5) Fukuda M, Yeh HH, Puro DG: The VIP system in retinal cell cultures: Histology and pharmacology. *Invest Ophthalmol Vis Sci (Supple)* 25: 291, 1984.
- 6) Ogden T, Wylie R: Avian retina. I. Microelectrode depth and marking studies of local ERG. *J Neurophysiol* 34: 357—365, 1971.
- 7) Yonemura D, Masuda Y, Hatta M: The oscillatory potentials of the human electroretinogram. *Jap J Physiol* 13: 129—136, 1963.
- 8) Heynen H, Wachtmeister L, Norren DV: Origin of the oscillatory potentials in the primate retina. *Vision Res* 25: 1365—1373, 1985.
- 9) Rager G: The cellular origin of the b-wave in the electroretinogram—A developmental approach. *J Comp Neur* 188: 225—244, 1979.
- 10) Rager G: Morphogenesis and physiogenesis of the retino-tectal connection in the chicken 2. The retino tectal synapses. *Proc R Soc Lond B* 192: 353—370, 1976.
- 11) Masland RH: Maturation of function in the developing retina. *J Comp Neur* 175: 275—286, 1977.
- 12) 米村大誠, 河崎一夫: ERGの分析. 臨床網膜電図学, 104—108, 医学書院, 東京, 1985.
- 13) Nishimura Y: Determination of the developmental pattern of retinal ganglion cells in chick embryos by Golgi impregnation and other methods. *Anat. Embryol* 158: 329—347, 1980.
- 14) Hughes WF, LaVelle A: On the synaptogenic sequence in the chick retina. *Anat Rec* 179: 297—302, 1974
- 15) Terubayashi H, Okumura H, Fujisawa H, Postnatal development of vasoactive intestinal polypeptide immunoreactive amacrine cells in the rat retina. *Neuroscience Letters* 33: 259—264, 1982.
- 16) Gall C, Brecha N, Paravelas J: Development of peptide immunoreactive in the hippocampus, visual cortex and retina. In: Sharma SC, Ed, Organizing Principle of Neural Development, 205—249, Plenum Press, New

- York, 1984.
- 17) **Wachtmeister L:** The action of peptide on the mudpuppy electroretinogram (ERG). *Exp Eye Res* 33: 429—437, 1983.
- 18) 大本達也, 不二門尚, 趙容子, 福田全克: ERG律動様小波に対する vasoactive intestinal polypeptide (VIP) の影響. *日眼* 90(臨時増刊号): 55, 1986.
-