網膜光受容体間基質分布の光応答に関する組織化学的研究
Ⅵ. ヒママメレクチンを用いた加齢変化の検出

上原 文行*, 大庭 紀雄*, Douglas Yasumura**, Matthew M. LaVail**
*鹿児島大学医学部眼科学教室 **カリフォルニア大学サンフランシスコ校医学部解剖学及び眼科学教室

要 約

2カ月齢と1.5歳齢のラットの明，暗順応下の網膜光受容体間基質(interphotoreceptor matrix, IPM)の螢光標識ヒママメレクチン（RCA-1）結合分布を比較することによって，IPM光応答の加齢変化について検討した．2カ月齢ラットでは，外節部と内節部との間で，杆体周囲のIPMに相当するRCA-1染色螢光の強度の差が検出され，強弱の関係が明，暗順応下で逆転したことから，IPMの光応答は正常であると判定した．一方，1.5歳齢ラットでは，明，暗順応下ともに外節部(先端部を除く)と内節先端部との間の染色螢光の強度の差はほとんど検出できなかった．そして，明暗の光の条件に関係なく，内節基底部が強く，外節先端部が弱く染色された．これらの所見は，1.5歳齢ラットではIPMの光応答が失われることを強く示唆した．なお，2カ月齢，1.5歳齢ラットとも，錐体周囲のIPMの光応答は検出されなかった．(日眼会誌 95：1244—1247, 1991)

キーワード：網膜光受容体間基質，光応答，加齢，ラット，ヒママメレクチン

Aging Effects on the Light Response of the Interphotoreceptor Matrix as Revealed by Binding of *Ricinus communis* Agglutinin-1

Fumiyuki Uehara*, Norio Ohba*, Douglas Yasumura and Matthew M. LaVail****
**Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine*
***Departments of Anatomy and Ophthalmology, University of California San Francisco, School of Medicine*

Abstract

This study intended to explore whether the light response of the interphotoreceptor matrix (IPM) is affected by aging. The binding pattern of fluorescence-labeled *Ricinus communis* agglutinin-1 (RCA) to IPM was examined histochemically in 2 month-old and 1.5 year-old rats under light- and dark-adapted conditions. Two month-old animals showed obvious light-evoked changes in the rod associated IPM : the photoreceptor inner segment zone showed a greater fluorescence than the outer segment zone in the light, whereas the staining-intensity of the former was less than that of the latter in the dark. On the other hand, 1.5 year-old rats did not show such light-evoked IPM responses as in 2 month-old animals : no light-dark differences were found in RCA-1 binding. The scarce, linear, preferential binding of RCA-1 to the cone-associated IPM was the same in both lighting conditions independent of the age. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95 : 1244—1247, 1991)

Key words : Interphotoreceptor matrix, Light response, Aging, Rat, *Ricinus communis* agglutinin-1

別刷請求先：890 鹿児島市桜ケ丘8—35—1 鹿児島大学医学部眼科学教室 上原 文行
(平成3年3月1日受付，平成3年4月19日改訂受理)
Reprint requests to : Fumiyuki Uehara, M.D. Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine.
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890, Japan
(Received March 1, 1991 and accepted in revised form April 19, 1991)

I 緒　言

網膜光受容体間基質（interphotoreceptor martix, IPM）は，網膜色素上皮と視細胞外節，内節周囲の網膜下腔を満たし，複合糖質を主要な構成成分とする．そのヒママメレクチン｛*Ricinus communis* agglutinin-1（RCA-1）｝によって認識されるN-glycoside結合型（血清型）複合糖質成分[1]の局在部位は，実験の時刻に関係なく，光環境の明・暗変化に依存する[2)3)]．すなわち，IPMの血清型成分は，暗順応下では視細胞外節部全体および内節先端部にビマン性に分布するのに対し，明順応下では視細胞外節先端部に帯状に，外節基底部から内節部全体にわたってビマン性に分布する[2)3)]．一方，1歳齢ラットでは，明順応下でIPMが視細胞外節から内節部全体にビマン性に分布することがコロイド鉄染色によって検出され[4)]，IPMの光応答に加齢変化のあることが示唆された．しかし，血清型のIPM成分以外のもの，例えば，通常，光応答のほとんどみられないムチン型IPM成分[3)]もコロイド鉄では検出されるので，厳密な意味でのIPMの光応答の加齢変化による消失の有無を確かめるためには，RCA-1を用いたレクチン組織化学によって，血清型IPM成分のみを検出する必要性がある．そこで本研究においては，1.5歳齢ラットと，2カ月齢ラットの明，暗順応下のIPMのRCA-1結合分布について比較した．

II 実験方法

正常網膜を有するラット（RCS-*rdy*$^+$あるいはRCS-*rdy*$^+$*p*$^+$；生後2カ月のもの6匹，および1.5年のもの6匹）を，明（7AM，照明on：Cage部照度は20ft-c）：暗（7PM，照明，off）＝12：12時間周期下に飼育し，2時間（9～11AM），明順応（Cage部照度は20ft-c；各3匹）あるいは暗順応（絶対暗室；各3匹）させたあと，炭酸ガスを吸引させることによって安楽死させた．ただちに，先に報告した方法[2)~4)]で，固定液として2.5% glutaraldehyde，2%paraformaldehyde（0.1M phosphate buffer，pH 7.3，37℃）を使用してラットを潅流固定した．眼窩内容除去を行い，さらに一晩浸漬固定のあと，水洗，methanol-methylcellosolveを用いて脱水，polyester waxに包埋した．8μmの組織切片を作成し，先に報告した方法[3)]で，蛍光標識RCA-1（E-Y Laboratories，San Mateo，C.A.，U.S.A.）を40分間浸漬させた．蛍光顕微鏡（青励起）下に，RCA-1で染色されるIPM成分の網膜下腔分布様式について観察した．コントロールとしては，蛍光標識RCA-1とハプテン糖（0.2M D-galactose）の混合液を同様に浸漬させ，RCA-1単独液の染色像よりも蛍光強度が減弱していた場合に，その染色部位をRCA-1結合部位と判定した．

なお，ラットの取扱いに際しては，全実験過程を通して，実験動物の飼育および保管等に関する基準（総理府告示；ARVO Resolution）に従った．

III 結　果

1. 2カ月齢のラット

明順応下，および暗順応下で，網膜色素上皮細胞表面から外境界膜まで視細胞層を横断する形の強い線状のRCA-1染色像が，散在性に観察された．また，周囲の蛍光に覆われてきわめて不鮮明ではあるが，外節根部に点状の染色蛍光が，明，暗順応下ともに観察された（図1a，b）．これら以外の領域に関しては，明順応下と暗順応下とで異なった染色像が観察された．すなわち，明順応下では，外節先端部と内節部全体にわたって，中等度の染色蛍光が検出された（図1a）．暗順応下では，外節部全体にわたって，ビマン性に中等度の染色蛍光が検出されたが，内節部のIPMはほとんど染色されなかった（図1b）．

2. 1.5歳齢のラット

明順応下，および暗順応下でRCA-1染色像に差は検出されず，両者ともに共通して以下の所見がみられた．すなわち，散在性の，視細胞層を横断する形の強い線状の染色蛍光，外節根部の点状の染色蛍光，視細胞外節先端部の帯状の弱い染色蛍光，および内節基底部の強いビマン性の染色蛍光が観察された（図1c，d，e，f）．なお，視細胞外節先端部の帯状の染色蛍光は，RCS-*rdy*$^+$*p*$^+$では，網膜色素上皮細胞突起に含まれる色素のために，一部遮蔽されている（図1e，f）．

これらの染色蛍光は，ハプテン糖の存在下でその強さが減弱したことから，RCA-1が特異的に結合したものと判定した．なお，これらの結合所見が細胞表面に限局したものか，どれ位の範囲（厚さ）にわたって細胞間隙（外節—外節間，内節—内節間）に分布しているのか光顕的には判別できなかったので，広義のIPMとして解釈，記載した．

IV 考　按

まず，RCA-1はピーナッツレクチン[5)~8)]と同様に錐体

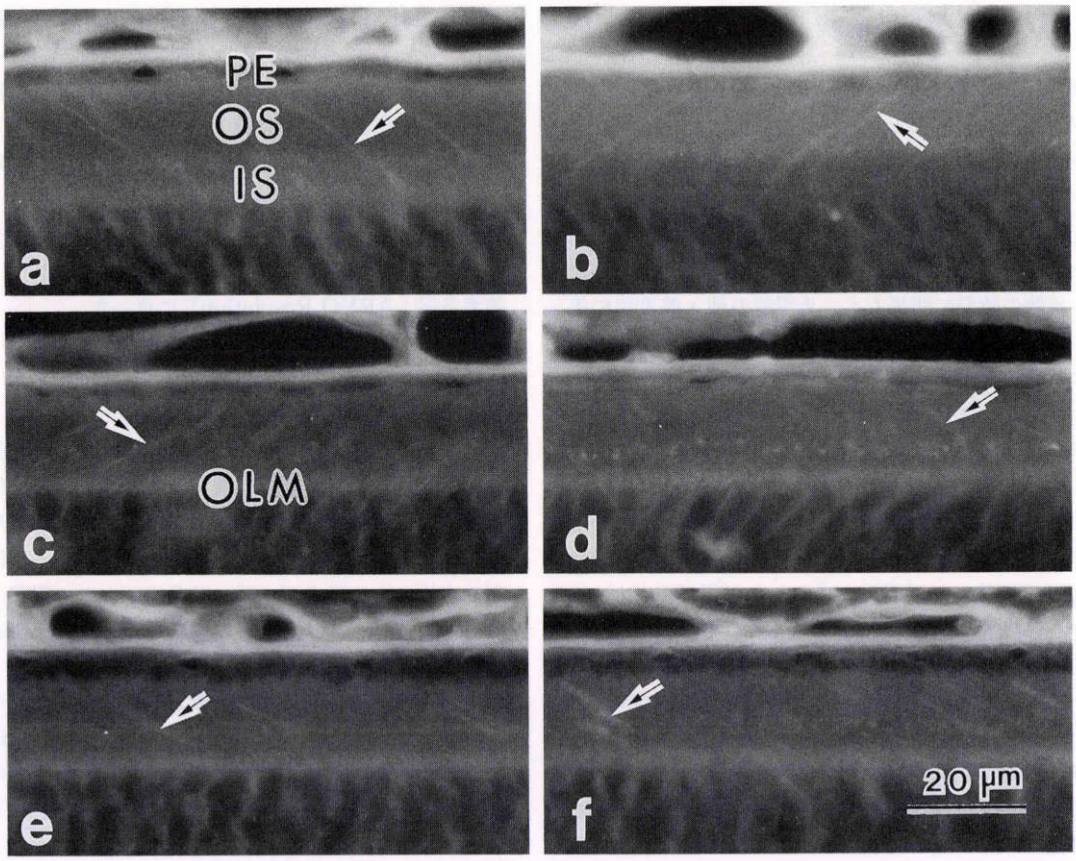

図1 ラット網膜視細胞層の蛍光標識ヒママメレクチン（RCA-1）染色像（×750）
a）2カ月齢のRCS-*rdy*⁺ラット．明順応下の所見．視細胞外節先端部が帯状に，内節部全体がビマン性に染色されている．外節部は，その先端部と錐体部以外はほとんど染色されずに真っ黒にみえ，染色された内節部と明瞭に区別できる．外節根部に点状の染色蛍光を認めるが，写真上は内節先端部の蛍光に被覆されて判別しにくい．また，まばらに散在する錐体視細胞外節，内節周囲が線状に染色されている（矢印）．PE：網膜色素上皮細胞，OS：視細胞外節，IS：内節．b）2カ月齢のRCS-*rdy*⁺ラット．暗順応下の所見．錐体外節，内節周囲が線状に染色される（矢印）とともに，外節部全体に，ビマン性の弱い染色蛍光が観察される．内節部はほとんど染色されずに真っ黒にみえ，染色された外節部と明瞭に区別できる．外節根部に点状の染色蛍光を認めるが，写真上はそれ以外の外節部の蛍光に被覆されて判別しにくい．c）1.5歳齢のRCS-*rdy*⁺ラット．明順応下の所見．d）1.5歳齢のRCS-*rdy*⁺ラット．暗順応下の所見．e）1.5歳齢のRCS-*rdy*⁺*p*⁺ラット．明順応下の所見．f）1.5歳齢のRCS-*rdy*⁺*p*⁺ラット．暗順応下の所見．1.5歳齢ラット（c, d, e, f）においては明・暗順応下の別なく，視細胞外節先端部に帯状の弱い染色蛍光がみられる．RCS-*ray*⁺*p*⁺ラットでは，網膜色素上皮細胞突起内の色素のためにその染色蛍光が一部遮蔽されている（e, f）．また，外節根部に点状に，内節基底部に強い染色蛍光が観察される．外節部と内節先端側半分との間に背景蛍光の差は認められず，外節根部の点状蛍光によって外節部と内節部とが写真上区別できる．なお，まばらに散在する錐体視細胞で，外節と内節周囲に線状の染色像（矢印）がみられ，この所見は2カ月齢ラットのそれ（a, b）と同様である．OLM：外境界膜．

およびその周囲のIPMに強く結合する[3)6)]ことから，視細胞層を横断するように線状に染色された領域は，錐体周囲のIPMであるとみなされる．1.5歳齢ラットでも2カ月齢ラット[3)]と同様に，明暗の光の条件に関係なく，この染色像が視細胞層を横断するように線状に観察されたことから，錐体周囲のIPMにおいては，年齢に関係なく光応答は検出できないことが判明した．

一方，線状に染色された部分以外の，背景蛍光として染色された領域は，杆体およびその周囲のIPMで

あるとみなされる．2カ月齢ラットでは，外節部と内節部との間で明らかにこの杆体周囲のIPM染色の強度の差が検出された．すなわち，明順応下では内節部の方が先端部を除く外節部よりも強く，暗順応下では逆に外節部の方が内節部よりも強いという所見である．だが，1.5歳齢ラットでは，このような明・暗順応によるIPMの光応答現象が明らかではなく，明暗の光の条件に関係なく，内節基底部が強く，外節先端部が弱く染色されたままであることが注目された．すなわち，RCA-1に対する結合性でみると，IPMの光応答は1.5歳齢ラットでは失われていると判定した．2カ月齢ラットでは，明順応下ではIPMが内節基底部に蓄積するが，暗順応下では内節先端部から外節部全体にビマン性に分布するようになる[2)~4)]．ゆえに，1.5歳齢ラットでは，この暗順応下での外節方向へのビマン性のIPM分布の過程が障害されている可能性が考えられる．

ところで，IPMの光応答の発現には，杆体視細胞周囲のIPMの複合糖質糖鎖末端のシアル酸の陰性荷電が，重要な役割を果たしているのではないかと筆者らは推定している[3)9)]．したがって，1.5歳齢ラットではこのシアル酸が減少することによって，IPMの光応答が消失するのではないかと推測される．すなわち，シアル酸が減少すれば，RCA-1が認識するβ-galactose残基[1)]が露出して，RCA-1の染色性が増強する．今回の実験で内節基底部のRCA-1染色蛍光の強さを1.5歳齢ラットと2カ月齢ラットについて比較すると，前者が強いようにみえる．したがって，この染色蛍光の増強は1.5歳齢ラットIPMのシアル酸の減少によって起こり，そのシアル酸が減少したIPM成分（内節で産生される）が，内節基底部から外節方向へ移動できないために，光応答が起こらないのかも知れない．

今回の研究から，1.5歳齢ラットでは血清型IPM成分の光応答が消失することが明らかになったが，これが視細胞の加齢現象との関連で，どのような生理学的意義，あるいは病的意義を有しているのか，今後明らかにしていく必要があるであろう．

文　献

1) **Olsness S:** Ricin and ricinus agglutinin, toxic lectins from castor bean. Methods Enzymology 50: 350—355, 1978.

2) **Uehara F, Yasumura D, LaVail MM,** et al: Light-evoked changes in the interphotoreceptor matrix. Science 248: 1633—1636, 1990.

3) **Uehara F, Yasumura D, LaVail MM:** Rod- and cone-associated interphotoreceptor matrix in the rat retina: Differences in light-evoked distributional changes. Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 285—292, 1991.

4) **上原文行, 大庭紀雄, LaVail MM,** 他：網膜光受容体間基質分布の2相性光応答の検出．日眼会誌 95：850—853, 1991.

5) **Uehara F, Sameshima M, Ohba N,** et al: Localizaton of fluorescence-labeled lectin binding sites on photoreceptor cells of the monkey retina. Exp Eye Res 36: 113—123, 1983.

6) **Blanks JC, Johnson LV:** Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells: A species comparison. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 546—557, 1984.

7) **Johnson LV, Hageman GS, Blanks JC:** Interphotoreceptor matrix domains ensheath vertebrate cone photoreceptor cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 129—135, 1986.

8) **Sameshima M, Uehara F, Ohba N:** Specialization of the interphotoreceptor matrices around cone and rod photoreceptor cells in the monkey retina, as revealed by lectin cytochemistry. Exp Eye Res 45: 845—863, 1987.

9) **上原文行, 大庭紀雄, LaVail MM,** 他：Neuraminidase起因性網膜変化．あたらしい眼科 7：1701—1704, 1990.