

遺伝性視細胞変性網膜光受容体間基質分布の光応答

上原 文行¹⁾, 大庭 紀雄¹⁾, Douglas Yasumura²⁾, Matthew M. LaVail²⁾

¹⁾鹿児島大学医学部眼科学教室, ²⁾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

3種類の遺伝性視細胞変性マウスの明順応網膜と暗順応網膜との間の光受容体間基質 (IPM) の分布の差について、蛍光標識小麦胚芽レクチンを用いて組織化学的に検索した。差が検出された場合には IPM の光応答有りとなり、検出されなかった場合には光応答なしと、それぞれ判定した。Nervous マウスと Purkinje cell degeneration マウスの網膜では、IPM 光応答が、視細胞外節が軽度短縮した視細胞変性の初期には少なからず検出できたのに対し、外節が中等度以上変性・短縮した時期には検出できなかった。発生学的に外節が形成されず、内節がゆっくりと変性、短縮していく Retinal degeneration slow マウスの網膜では、すべての時期にわたって、IPM 光応答は全く検出されなかった。以上から、明瞭な IPM の光応答が発現するためには、正常外節の存在が必要であることが判明した。(日眼会誌 96:473-478, 1992)

キーワード：網膜光受容体間基質, 光応答, 視細胞変性, マウス, 小麦胚芽レクチン

Light Response of the Interphotoreceptor Matrix in Inherited Degenerative Retina

Fumiyuki Uehara¹⁾, Norio Ohba¹⁾, Douglas Yasumura²⁾ and Matthew M. LaVail²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

²⁾Departments of Anatomy and Ophthalmology, University of California, San Francisco, School of Medicine

Abstract

The light-evoked distributional changes of the interphotoreceptor matrix (IPM) in mice with three types of inherited retinal degeneration were examined by histochemistry using fluorescence isocyanate-labeled wheat germ agglutinin. In mice with nervous and Purkinje cell degeneration, the light response of the IPM was still somewhat preserved during the early stage of photoreceptor degeneration, whereas it became extinct when the outer segments (OS) became moderately or markedly shortened. In mice with slow retinal degeneration mice without development of OS, the light response of the IPM was absent throughout the developmental stages. These findings suggest that the presence of normal OS is necessary for the light response of the IPM to occur. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96:473-478, 1992)

Key words: Interphotoreceptor matrix, Light response, Photoreceptor degeneration, Mouse, Wheat germ agglutinin

別刷請求先：890 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1 鹿児島大学医学部眼科学教室 上原 文行

(平成3年8月19日受付, 平成3年10月11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 August 19, 1991 and accepted in revised form October 11, 1991)

I 緒 言

網膜光受容体間基質 (interphotoreceptor matrix, IPM) の血清型複合糖質成分の局在部位は、実験の時刻に関係なく、光環境の明・暗の違いに依存して変化する。すなわち、暗順応網膜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、明順応網膜では視細胞外節先端部および基底部に帯状に分布する^{1)~3)}。一方、過度の光を短時間照射した網膜では、視細胞層全体にわたって IPM が分布する⁴⁾。通常の蛍光灯光でもそれを持続して照射すると、視細胞の変性が発現するとともに、視細胞層全体にわたるビマン性の IPM 分布が観察される⁵⁾。また、遺伝性視細胞変性網膜 (RCS ラット) でも、外節の変性に続発して IPM の光応答が失われ、IPM が視細胞層全体にわたってビマン性に分布し、とくに内節基底部に蓄積する³⁾。このように、IPM の光応答の異常に伴う分布の異常が、視細胞変性の発現あるいは進行に関係している可能性がある。今回、IPM 光応答異常と視細胞変性との関係についてさらに明確にする目的で、3種類の遺伝性視細胞変性マウスの明・暗順応網膜間の IPM 分布について、レクチン組織化学的に検索し、比較検討した。

II 実験方法

2か月齢の正常網膜マウス (C57 BL/6 J-C^{2J}マウス)、遺伝性に視細胞変性を発現する種々の日・月齢の nervous (*nr*) マウス⁶⁾、Purkinje cell degeneration (*pcd*) マウス⁶⁾、および retinal degeneration slow (*rds*) マウス⁷⁾を使用した。これらの動物を生後から明：暗=12：12時間周期下に飼育し、所定の日・月齢 (結果に記載) に達したら午前7時から9~10時にかけて2~3時間、各日・月齢マウスとも4匹ずつ明順応 (Cage部照度は20 ft-c)あるいは暗順応させた。マウスを炭酸ガス吸引させることによって安楽死させ、ただちに固定液に2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde (0.1 M phosphate buffer, pH 7.3, 37°C) を用いて灌流固定した。眼窩内容除去を行い、さらに一晚浸漬固定したあと、水洗, methanol-methylcellosolve を用いて脱水, polyester wax に包埋した。8 μ m の組織切片を作成し、先に報告した方法⁸⁾でレクチン染色を行った。すなわち、0.1 mg/ml の濃度になるように Dulbecco's phosphate buffered saline に溶解した蛍光標識小麦胚芽レクチン (FITC-

WGA; E-Y Laboratories, U.S.A.) を15分間浸漬させた。蛍光顕微鏡 (青励起) 下に、FITC-WGA で染色される IPM 成分の網膜下腔内分布様式について観察した。対照としては、FITC-WGA とそのハブテン糖である 0.2 M N, N', N''-triacetylchitotriose (Sigma Chemical Co., U.S.A.) の混合液を同様に浸漬させ、FITC-WGA 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 FITC-WGA 結合部位と判定した。

なお、マウスの取扱いに際しては、全実験過程を通して、実験動物の飼養および保管等に関する基準 (総理府告示; 鹿児島大学医学部実験動物取扱い指針; ARVO Resolution) に従った。

III 結 果

C57 BL/6 J-C^{2J}マウス。明順応網膜と暗順応網膜の間で、IPM の FITC-WGA 染色像に明瞭な差が観察された。すなわち、明順応網膜では、外節先端部および根部に帯状に IPM が染色された (図 1 a)。一方、暗順応網膜では、外節部から内節先端部にかけてビマン性に IPM が染色された (図 1 b)。

nr マウス。1か月齢では、軽度~中等度に視細胞外節が短縮していた。明順応網膜と暗順応網膜の間で、IPM の FITC-WGA 染色像に差が観察された。すなわち、明順応網膜では、外節部から内節部にかけて散在性に IPM が染色された (図 1 c)。暗順応網膜では、外節部から内節先端部にかけてビマン性に IPM が染色されたが、内節基底部の IPM はほとんど染色されなかった (図 1 d)。2か月齢では、外節は高度に短縮あるいは消失し、明・暗順応網膜ともに視細胞層全体にわたってビマン性に IPM が染色された (図 1 e, f)。7か月齢では、外節は消失し、内節は高度に短縮していた。明・暗順応網膜ともに、残存する内節部全体にわたってビマン性に IPM が染色された (図 1 g, h)。

pcd マウス。1か月齢では、視細胞外節が軽度に短縮していた。明順応網膜と暗順応網膜との間で、IPM の FITC-WGA 染色像に差が観察された。すなわち、明順応網膜では、外節部から内節部にかけて散在性に IPM が染色された (図 2 a)。暗順応網膜では、外節部から内節先端部にかけて比較的ビマン性に IPM が染色されたが、内節基底部の IPM はほとんど染色されなかった (図 2 b)。2か月齢では、外節が中等度に短縮し、明・暗順応網膜ともに、視細胞層全体にわたってビマン性に IPM が染色された (図 2 c, d)。8か月齢

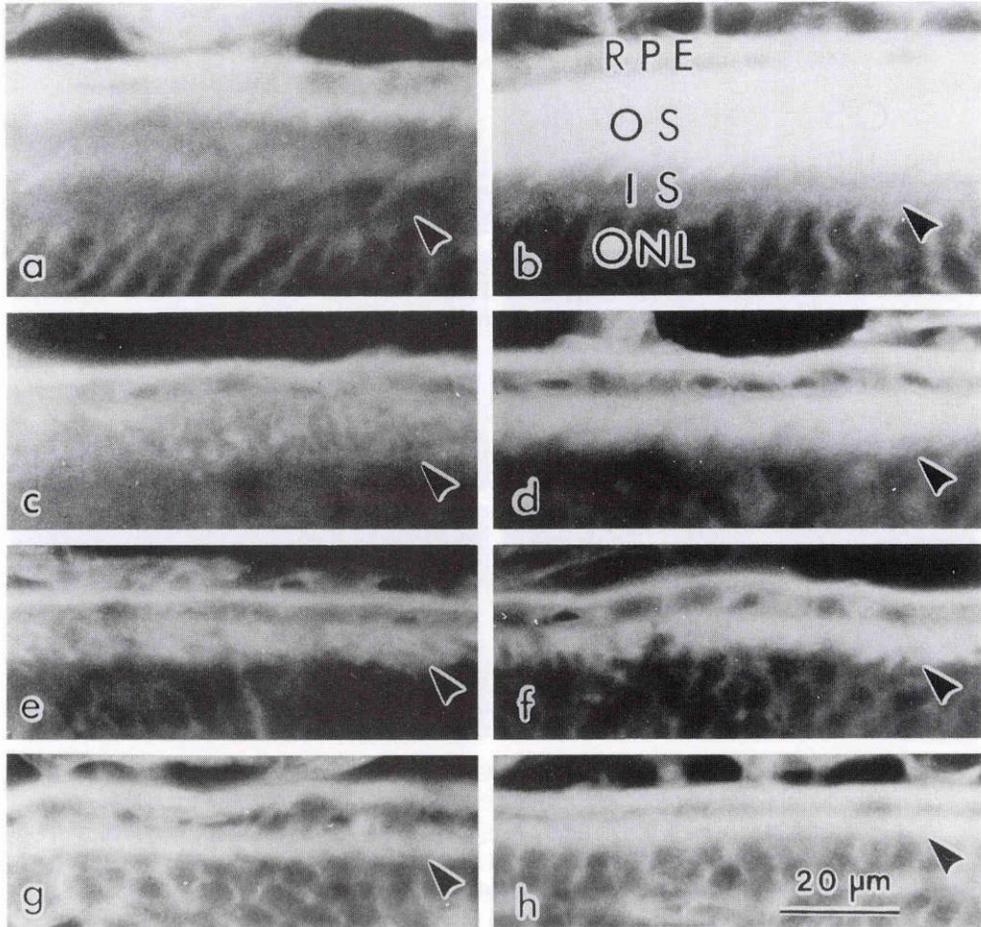


図1 C57BL/6J-C²Jマウス, および nervous マウス視細胞層の蛍光標識小麦胚芽レクチン (FITC-WGA) 染色像 (×750).

a, b: C57BL/6J-C²Jマウス, 2か月齢. (a) 明順応網膜では外節先端部および根部のIPMが带状に染色されている. (b) 暗順応網膜では外節部から内節先端部にかけてビマン性にIPMが染色されている. c~h: Nervous マウス. (c, d) 1か月齢網膜では, 軽度~中等度に視細胞外節が短縮している. (c) 明順応網膜では残存する外節先端部および基部と内節部のIPMが散在性に染色されている. (d) 暗順応網膜では残存する外節部から内節先端部にかけてビマン性にIPMが染色されている. (e, f) 2か月齢では, (e) 明順応網膜, (f) 暗順応網膜ともに外節が高度に短縮, あるいは消失し, 残存する視細胞層全体にわたってビマン性にIPMが染色されている. (g, h) 7か月齢では, (g) 明順応網膜, (h) 暗順応網膜ともに外節は消失し, 内節は高度に短縮し, 残存する内節部全体にわたってビマン性にIPMが染色されている.

では, 外節は消失しており, 内節は高度に短縮していた. 明・暗順応網膜ともに, 残存内節部全体にわたってビマン性にIPMが染色された (図2e, f).

rds マウス. すべての日・月齢 (13日, 20日, 2か月, 5か月齢) で, 明・暗順応網膜ともに, 内節だけ

と考えられる視細胞層全体にわたってビマン性にIPMが染色された. 一方, 日・月齢の増加とともに, 次第に視細胞層が変性, 短縮した (図3a~h).

これらの視細胞層の染色蛍光は, ハプテン糖の存在下でその強さが減弱したことから, FITC-WGAが特

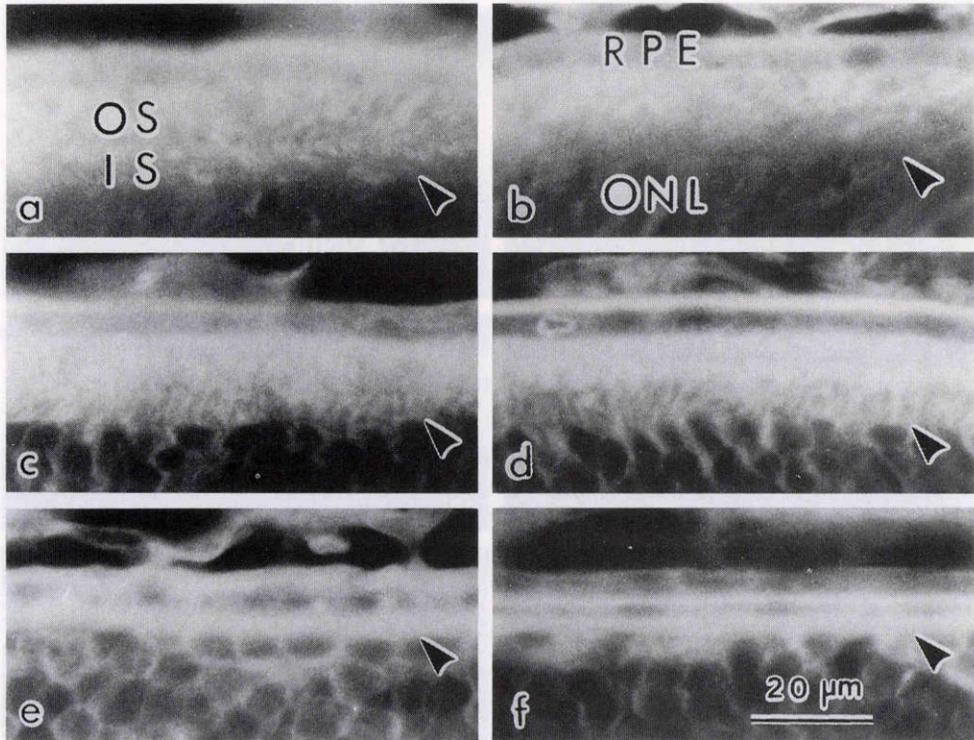


図2 Purkinje cell degeneration マウス視細胞層の FITC-WGA 染色像 (×750).
 (a, b) 1 か月齢網膜では、軽度に視細胞外節が短縮し、(a) 明順応網膜では外節部から内節部にかけて散在性に IPM が染色されている、(b) 暗順応網膜では外節部から内節先端部にかけて比較的ビマン性に IPM が染色されている。(c, d) 2 か月齢では、(c) 明順応網膜、(d) 暗順応網膜ともに中等度に外節が短縮し、残存する視細胞層全体にわたってビマン性に IPM が染色されている。(e, f) 8 か月齢では、(e) 明順応網膜、(f) 暗順応網膜ともに外節は消失し、内節も高度に短縮し、残存する内節部全体にわたってビマン性に IPM が染色されている。

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ため、広義の IPM と解釈、記載した。

IV 考 按

IPM の分布の明・暗順応網膜間の差が検出された場合に、IPM の光応答が陽性であると判定した。今回用いた *nr* マウスと *pcd* マウスは、ともに遺伝性に小脳失調と視細胞変性を発現し、外節はいったん形成された後、次第に変性・短縮すると報告されている⁶⁾。本研究では、両系統のマウスとも、視細胞変性の初期には、明順応網膜の IPM の FITC-WGA 染色像が、正常網

膜で観察されるような 2 つの帯に解離する形の典型的な明順応型を示したわけではないが、IPM 分布の明・暗順応網膜間の差が検出された。したがって、この時期には、正常網膜と発現機構が同じかどうかはわからないが、まだ IPM の光応答は少なからず存在していると判定できるであろう。しかし、外節が中等度～高度に変性・短縮した時期では、明・暗順応網膜間の IPM 分布の差が検出できなくなった。この場合、IPM の光応答は完全に消失したものと判定できるであろう。これは、RCS ラットの IPM の光応答についてしらべた結果⁹⁾と一致する。RCS ラットだけでなく、*nr* マウス、*pcd* マウスでも、IPM の光応答の完全な消失は、外節が中等度以上変性・短縮した時点で起こるものと結論できる。

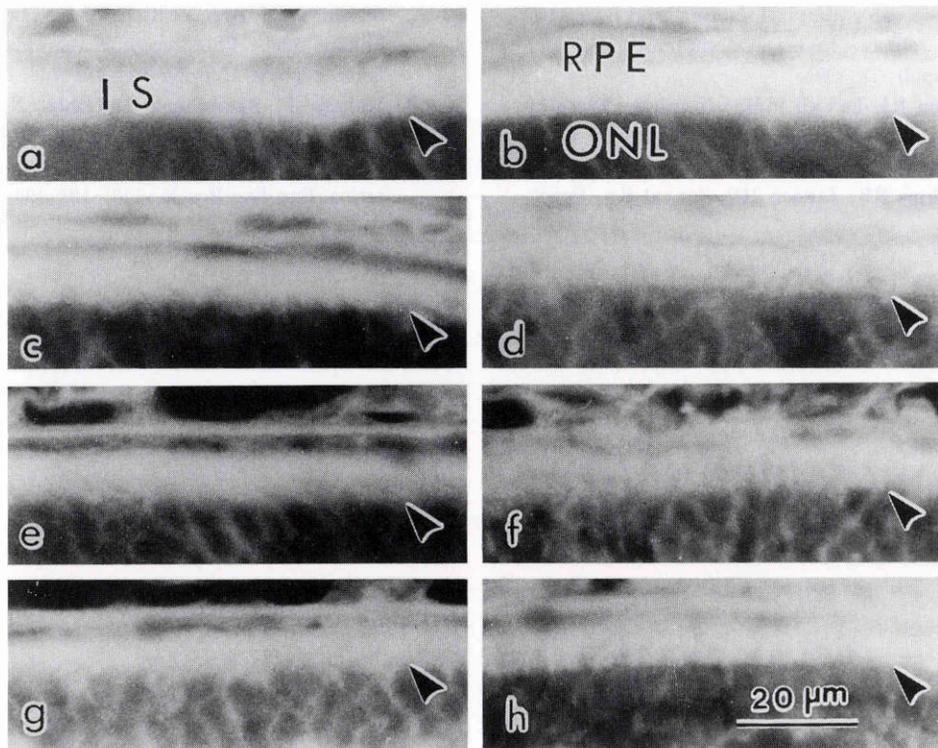


図3 Retinal degeneration slow マウス視細胞層の FITC-WGA 染色像 ($\times 750$). 13 日齢, (a) 明順応網膜・(b) 暗順応網膜, 20 日齢, (c) 明順応網膜・(d) 暗順応網膜, 2 か月齢, (e) 明順応網膜・(f) 暗順応網膜, 5 か月齢, (g) 明順応網膜・(h) 暗順応網膜のすべてで, 視細胞層 (内節部) 全体にわたってビマン性に IPM が染色されている。日・月齢の増加とともに次第に視細胞層が変性, 短縮している(a~h)。

一方, *rds* マウスでは, 内節は生後 7 日目までに正常に形成されるのに対し, 外節は生後 10~21 日目になっても全く形成されず, その後, 内節の変性が徐々に進行すると報告されている⁷⁾。本研究では, 生後 13 日目~5 か月目のすべての時期にわたって, 明・暗順応網膜ともに, 内節だけと考えられる視細胞層に, ビマン性に IPM の FITC-WGA 染色像が観察された。すなわち, *rds* マウスでは IPM の光応答は全観察過程を通じて検出されないと判定した。外節が存在しないために IPM の光応答が発現しないものと考えられる。

以上の結果から, 明瞭な IPM の光応答が発現するためには, 正常外節の存在が必要であることが判明した。

本研究は文部省科学研究費補助金 (一般 C 課題番号 03670834) の補助を受けた。付記して感謝の意を表す。

文 献

- 1) Uehara F, Yasumura D, LaVail MM, et al: Light-evoked changes in the interphotoreceptor matrix. *Science* 248: 1633-1636, 1990.
- 2) 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.
- 3) Uehara F, Yasumura D, LaVail MM: Development of light-evoked changes of the interphotoreceptor matrix in normal and RCS rats with inherited retinal dystrophy. *Exp Eye Res* 53: 55-60, 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光応答の型分類. *日眼会誌* 95: 445-448, 1991.
- 5) Yasumura D, Uehara F, LaVil MM: Development of light-evoked changes of the inter-

