

## 第99回 日本眼科学会総会 宿題報告 III

## 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

柏井 聡

京都大学医学部眼科学教室

## 要 約

網膜は虚血が負荷されると、一定の潜時をおいて領域特異的に網膜内層のアマクリン細胞および網膜神経節細胞に遅発性神経細胞死が発現する。これは虚血再灌流によって網膜に興奮性伝達物質であるグルタミン酸が多量に放出されることから始まる。放出されたグルタミン酸は、まず、非 NMDA (N-メチル-D-アスパラギン酸) 型受容体を持つ網膜神経細胞の脱分極を生じさせる。この脱分極に伴い NMDA 型受容体を抑制していた  $Mg^{2+}$  の阻害作用がはずれ、NMDA 型受容体を通じて  $Ca^{2+}$  の細胞内流入が生じる。このうち、一酸化窒素合成酵素 (NOS) 陽性アマクリン細胞において流入してきた  $Ca^{2+}$  が NOS

を活性化し、一酸化窒素 (NO) を発生させる。生じた NO は、細胞膜にかかわらず周囲へ直ちに拡散する。少量の NO は NMDA 型受容体を抑制して  $Ca^{2+}$  の細胞内流入を阻止して網膜神経細胞保護的に働くが、多量に生じた NO はスーパーオキシド ( $O_2^{\cdot-}$ ) と反応してペルオキシ亜硝酸 ( $ONOO^-$ ) を生じ、周囲の網膜神経細胞に障害性を発揮し、グルタミン酸誘発網膜神経細胞死を発現する。(日眼会誌 99: 1361-1376, 1995)

キーワード：網膜虚血、遅発性神経細胞死、グルタミン酸神経毒、NMDA、一酸化窒素

## The Role of Nitric Oxide in the Ischemic Retina

Satoshi Kashii

Department of Ophthalmology, Kyoto University Faculty of Medicine

## Abstract

Retinal ischemia induces a large increase in the release of glutamate, which exerts its toxic action by way of NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptors onto amacrine cells and retinal ganglion cells. Glutamate released during ischemia and especially during reperfusion first stimulates non-NMDA receptors and depolarizes the retinal neurons. As the membrane potentials are depolarized more from the resting membrane potentials, the blockade of NMDA receptors induced by  $Mg^{2+}$  was released.  $Ca^{2+}$ -influx through the NMDA receptors activates nitric oxide synthase of some amacrine cells, which

produce nitric oxide (NO). NO at low concentrations inhibits the NMDA receptors and thereby prevents from retinal neuronal death. By contrast, NO at higher concentrations, interacting with oxygen radicals, becomes toxic and mediates glutamate-induced delayed retinal neuronal death. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 1361-1376, 1995)

Key words: Retinal ischemia, Delayed neuronal death, Glutamate neurotoxicity, NMDA, Nitric oxide

別刷請求先：606 京都府京都市左京区聖護院川原町 54 京都大学医学部眼科学教室 柏井 聡  
(平成7年10月11日受付, 平成7年10月23日改訂受理)

Reprint requests to: Satoshi Kashii, M.D., Ph.D., Department of Ophthalmology, Kyoto University, Faculty of Medicine, 54 Shogoin-Kawaramachi, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto-fu 606, Japan

(Received October 11, 1995 and accepted in revised form October 23, 1995)

## I 緒 言

一酸化窒素(nitric oxide, NO)は、いうまでもなく気体である<sup>1)</sup>。その気体が生体内で生理的に重要な物質で、しかも、細胞間の情報伝達物質としての機能を持つという発見は、従来の生体に対する考え方に大きな衝撃を与えた<sup>2)</sup>。NOに関する研究は、1980年のFurchgottら<sup>3)</sup>の血管内皮由来弛緩因子(EDRF)の発見以来、もっぱら血管系に関する神経薬理学的研究を中心に当初展開されていた<sup>4)</sup>。一方、可溶性グアニシル酸シクラーゼとの関連から、1988年のGarthwaiteら<sup>5)</sup>の小脳でのEDRFの遊離実験を契機に中枢神経系へと発展<sup>6)7)</sup>し、1990年ついにBredtら<sup>8)</sup>によって中枢神経系の組織からNOの合成酵素(NO synthase, NOS)が単離精製され、この数年間にNOに関する研究はめまぐるしく発展した<sup>9)</sup>。

NOは反応性の極めて高い不安定なフリーラジカルの一つ(NO)である。活性酸素フリーラジカルは、古くから虚血性細胞障害の重要な担い手であると目されてきた<sup>10)~12)</sup>。一方、近年めまぐるしく発展した脳神経系の分子神経生物学的研究によって、脳虚血は、興奮性伝達物質の一つであるグルタミン酸を介して神経細胞を領域選択的に遅発性に障害するということが明らかになってきた<sup>13)</sup>。この脳虚血におけるグルタミン酸誘発神経細胞死の研究はNOを橋渡しとして活性酸素フリーラジカルとの接点を見出し、虚血における2つの機構が一連の出来事として収斂してきた<sup>14)</sup>。

グルタミン酸による神経毒性はもともと網膜において最初に発見された<sup>15)</sup>。しかし、その後は中枢神経系でももっぱら研究され<sup>16)</sup>、虚血性細胞障害とグルタミン酸神経毒性は脳神経系において結びつけられ注目されてきた<sup>13)</sup>。一方、網膜においては、虚血の病態やグルタミン酸神経毒性の研究は断片的で、両者を直接結びつける研究はなかった。そこで、ラット網膜の初代培養細胞を用いた研究から、グルタミン酸による網膜神経細胞死がN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)型受容体を介する現象であることを見出していた著者ら<sup>17)18)</sup>は、まず、虚血網膜が実際にグルタミン酸を介して網膜傷害を引き起こすかどうか *in vivo* 実験を行った。そして、虚血再灌流網膜において多量に放出されたグルタミン酸がNMDA型受容体を持つ網膜内層のアマクリン細胞と網膜神経節細胞を遅発性に傷害することを確認し、その細胞内機構について、アマクリン細胞の培養細胞を用いて *in vivo* 実験を行い、NOの関与について検討した。

## II 実験方法

### 1. *In vivo* 網膜虚血実験

#### 1) 虚血網膜におけるグルタミン酸の定量

実験にはネコを用いた。外科的処置に先立って塩酸ケタミン(ケタラル®、25 mg/kg)の筋注および硫酸アト

ロピン(0.05 mg/kg)の皮下注射後、カルバミン酸エチルエステルを初回 200 mg/kg 静注で麻酔を導入、その後手術中は 20 mg/kg/h で麻酔を維持した。また、手術中は適宜局所麻酔剤 2% リドカインを使用した。実験動物は気管切開後、臭化パンクロニウム(0.2 mg/kg/h)で非動下するとともに人工呼吸器で動脈血 pH が 7.35~7.45、酸素分圧が 90 mmHg 以上に維持するように呼吸を管理した。また、ヒーティングパッドを用いて体温を直腸温で 37~39°C に維持した。1% アトロピン点眼液で最大散瞳を得た後、前房内に挿入したカニューレにつないだ滅菌眼内灌流液の容器の高さを調整することによって眼内圧を 170 mmHg に維持して網膜に虚血を導入し 60 分間負荷した。コンタクトレンズを挿入固定した角膜を通して、検眼鏡的に直接眼底を観察することによって虚血および再灌流を確認した。眼内圧は虚血負荷中を除いて 15 mmHg に維持した。動脈血は大腿動脈から持続的に監視し 90~140 mmHg に維持した。毛様体扁平部から挿入した 15 ゲージの皮下注射針の内腔を通じて導入した分子量 20,000 以上を分離する膜長 3 mm の半透膜を付けたマイクロダイアリシスのプローベ(CMA/10, Probe, ストックホルム, スウェーデン)の先端を area centralis 部の網膜に接着させた。注射針とプローベの間は、眼内液の漏れを防ぐためにシリコンを充填し、眼内の気密性を維持した。マイクロダイアリシス内は、塩化ナトリウム(135 mM)、塩化カリウム(5 mM)、硫酸マグネシウム(1.3 mM)、リン酸水素二カリウム(1.24 mM)、炭酸水素カリウム(26 mM)から構成された灌流液(pH 7.4)を 2  $\mu$ l/min で灌流させた。プローベ導入後 2 時間待って、系の動作の安定を確認した後、実験を行った。透析された物質は 10 分間隔に 20  $\mu$ l ごとに回収(CMA/142, CMA/Microdialysis AB, ストックホルム, スウェーデン)し、虚血負荷終了後 90 分まで採取し続けた。採取したアミノ酸は OPA (ophthalaldehyde) 誘導体化させ、高速液体クロマトグラフィー(CMA 200/240 HPLC ロボット)を通じて蛍光検知器(CMA/280)で高感度分析し、得られたデータはクロマトパック C-R 6 A (島津製作所)で処理し、経時的なアミノ酸濃度分析を行い、特にグルタミン酸およびセリンについて定量した。

#### 2) 網膜の虚血負荷後の経時的組織学的変化

ラットを用いて虚血負荷・再灌流後の網膜の組織学的変化について検討した。ペントバルビタール(ネプター®、50~75 mg/kg)を腹腔内注射し麻酔した後、ネコの実験と同じ要領で前房内に挿入したカニューレを通じて眼内圧を 130 mmHg に上げて網膜に虚血を導入し 60 分間負荷した。虚血および再灌流は手術顕微鏡下に眼底を観察して確認した。網膜虚血・再灌流後、1, 4, 7 および 14 日目に眼球を摘出し、組織学的検査を施行した。非処置眼は、虚血操作に対する対照とした。眼球は、4% ホルマリンおよび 1% グルタルデハイド混合液(カコジル酸

緩衝 pH 7.4)に入れた後、10%ホルマリン(リン酸緩衝 pH 7.4)で固定した。固定後パラフィン包埋し、視神経乳頭を含む網膜表面に対して垂直な水平断によって6つの切片(5  $\mu\text{m}$ 厚)を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。虚血・再灌流眼および非処置眼(対照眼)からそれぞれ任意に3切片を選び、光学的顕微鏡下の組織像をコンピュータを用いた画像処理技術を利用して形状計測学的解析(morphometric analysis)を行った。視神経乳頭の辺縁から0.5~1 mm以内の網膜横断面において310 $\times$ 330  $\mu\text{m}$ の区画を各網膜切片につき3か所を任意に設定し、その顕微鏡画像を3板式 Change Coupled Device カメラ・モジュール(3 CCD カラー・ビデオ・モジュール XC-009, ソニー製)を介してデジタル信号化し、パーソナルコンピュータ(パワー・マッキントッシュ, 米国アップル社製)へ転送した。一設定区画の画像につき、コンピュータ画像解析ソフト(NIH イメージ, W. Rasband)を用いて、網膜内網状層(IPL), 内顆粒層(INL), および外顆粒層(ONL)の各層の厚みを設定区画内の任意の3か所について測定し、また、設定区画内一横径330  $\mu\text{m}$ 当たりの網膜神経節細胞層の細胞核数を計測し、1 mm 当たりに換算した数値を同層の直線細胞密度(/mm)とした。したがって、一標本眼の網膜の各層の厚みは9か所の測定の平均値で、網膜神経節細胞層の直線細胞密度は3か所の計測に基づく平均値で表した。データは、平均値と標準誤差によって表し、Mann-Whitney の U テストによって統計解析し、 $p < 0.05$ をもって有意差があると判断した。

## 2. *In vitro* グルタミン酸誘発遅発性網膜神経毒性実験

### 1) 網膜細胞培養法

実験には胎児ラット網膜の初代培養細胞を用いた。胎生16~19日齢の胎児ラットの網膜を実体顕微鏡下に氷冷ハンクス液中に摘出する。摘出した網膜は、ハンクス液( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ 不含)を入れたディッシュに集め、クリーンベンチ内で培地を除去し、外科用メスを用いて細切・細断する。細断した細胞を再びハンクス液( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ 不含)内に懸濁し、150 mesh のステンレスメッシュを通して濾過する。濾過した細胞懸濁液を100 g で3分間遠心し上清を除去した後、L-グルタミン(2 mM), ブドウ糖(11 mM), 炭酸水素ナトリウム(24 mM), HEPES(10 mM)を加えたウシ胎児血清(FCS, ギブコ社製)添加イーグル MEM 培地(ニッスイ社製)に細胞を懸濁する。細胞懸濁液は培養密度が $4.5\sim 6 \times 10^6$ 個/dish となるよう希釈した後、カバースリップの入った培養用ディッシュに分注する。培養細胞はインキュベーターで37°C, 5%  $\text{CO}_2$ で維持し、培養開始後9日間はFCS添加イーグル MEM 培地に培養し、その後はウマ血清(阪大微研)添加イーグル MEM 培地で培養する。培養8日目にシトシンアラビノシド(10  $\mu\text{M}$ )を加え非神経細胞を除去した。実験には、組

織化学的および電気生理学的に使用できない塊状に集簇する細胞群(cluster)は用いず、分離して存在する細胞のみを用いた。本研究の培養条件下では、分離して存在する培養細胞のほとんどが免疫細胞化学的研究によりアマクリン細胞から構成されていることがわかっている<sup>17)</sup>。実験には、培養10~12日目の細胞を用い、37°Cのイーグル液中で施行した。

### 2) 一酸化窒素合成酵素活性測定法

培養細胞および成熟ラット網膜組織から作成したホモジネートの一酸化窒素合成酵素(nitric oxide synthase, NOS)の酵素活性は、教室の万代ら<sup>19)</sup>が既報した放射活性物質 [ $^3\text{H}$ ] でラベルしたアルギニンからシトルリンへの変換率より測定した。培養細胞および網膜組織は5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptine を加えたトリス塩酸緩衝液(pH 7.4)に入れ超音波で処理した後、30,000 g で5分間遠心し、上澄液をセファデックス G-25 を通し内在性のアルギニンを取り除いたものを測定に用いた。0.1 M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5), 10  $\mu\text{M}$   $\text{MBH}_4$ , 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 10 mM NADPH, 20 nM [ $^3\text{H}$ ] アルギニン, 10 mM L-ヴァリン, 10  $\mu\text{M}$  アルギニン, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  カルモジュリン, 1.25 mM 塩化カルシウムから構成された反応溶液に20  $\mu\text{l}$  の検体試料を加えた全量50  $\mu\text{l}$  の混合溶液を作成する。溶液を25°Cで10分間インキュベートした後、EDTA(4 mM, pH 5.5)を加えたHEPES(40 mM) 300  $\mu\text{l}$  溶液を反応液に加えて反応を終了させた。反応液中の [ $^3\text{H}$ ] シトルリンを、ダウエックス AG 50 W-X 8 を用いて [ $^3\text{H}$ ] アルギニンから分離した後、放射活性を測定した。

### 3) NADPH ジアホラーゼ細胞および組織化学的染色法

培養細胞は、4% パラホルムアルデヒド(0.1 M リン酸緩衝液 PBS, pH 7.4)に4°C10分間カバースリップ上で反応させ固定した後、1 mM NADPH, 2 mM ニトロブルーテトラゾリウムおよび0.3% トリトン X-100 を含む0.1 M PBS(pH 8.0)の染色液中で37°C, 30分間インキュベートし、0.1 M PBS で洗浄することにより反応を停止した。

生後8週目のラット(200~250 g)から単離した網膜は、氷冷した0.3% グルタルアルデヒドおよび4% パラホルムアルデヒド混合溶液(0.1 M PBS, pH 7.4)に7分間反応固定し、さらに、4% パラホルムアルデヒド(0.1 M PBS, pH 7.4)に一晩反応させた後、組織の氷結防止のため15% ショ糖液に移した。固定した組織塊は-18°Cのクリオスタット(クリオトーム, 中川製作所製)で6  $\mu\text{m}$ 厚の切片を作成、ゼラチン/クロム明礬処置したスライドガラス上に載せた。組織切片を0.1 M PBS で洗浄した後、1 mM NADPH, 2 mM ニトロブルーテトラゾリウム, および0.3% トリトン X-100 を含む0.1 M PBS(pH 8.0)の染色液中に入れ、37°Cで30~60分間イ

ンキュベートした。反応は、組織片を0.1 M PBSで洗浄して停止させた。

培養細胞および組織切片は、細胞形態ならび組織学的評価を容易ならしめるためにNADPH ジアホラーゼ染色にエオジン染色を加え二重染色した。なお、細胞ならびに組織化学的対照実験として、染色液中にNADPHを欠く反応溶液を用いて同様の実験を施行したが、何ら染色されてくるものはなかった。

#### 4) 神経細胞毒性の細胞化学的定量法

興奮性アミノ酸(EAA)によって引き起こされる網膜培養細胞の神経細胞死は、既述のトリパンブルー(色素)排除法に従って定量的に評価した<sup>18)20)21)</sup>。実験は、37°C、イーグル溶液中で行った。EAAのうち、NMDAによって誘発される網膜神経細胞死は、 $Mg^{2+}$ によって抑制されるため<sup>17)</sup>、NMDA溶液を作成する際は、 $Mg^{2+}$ 不含液を用いるよう特別な配慮をした。また、組織化学的実験には、大脳皮質細胞の培養実験結果<sup>22)</sup>から、NMDA溶液にはグリシンやストリキニーネは加えていない。一方、NMDAおよび非NMDA受容体両者に作用するグルタミン酸を使用する場合は、 $Mg^{2+}$ を含む通常の培養液を用いた。培養網膜神経細胞の生存率の算定にあたっては、培養細胞を室温で10分間1.5%トリパンブルー染色液に反応させた後、直ちに2~4°Cの等張ホルマリン溶液(pH 7.0)に固定した。トリパンブルーは、生細胞においては細胞外へ直ちに除去されるため、トリパンブルーによって染色される細胞は、死細胞ないしは瀕死の細胞とみなすことができ、培養細胞の生存率を定量化するのに広く用いられている<sup>17)20)21)</sup>。固定した培養細胞は生理食塩水で洗浄した後、400倍のホルマリン型干渉顕微鏡(ニコソ社製)下に観察した。培養細胞の生存率は少なくとも200個以上の細胞を数えることによって決定した。生存率は、数えた全細胞数に対する非染色細胞(生細胞)数の割合を百分率表示した。また、各実験では、5~6枚のカバーガラスを用いて細胞の生存率に関する平均値と標準誤差を求めた。統計解析には、Dunnett two-tailedテストを用いて $p < 0.01$ をもって有意差があると判定した。

#### 5) 培養細胞の電気生理学的実験

膜電位固定下のwhole-cell電流を標準的パッチクランプ法で測定した<sup>23)24)</sup>。灌流液には、塩化ナトリウム(165 mM)、塩化カリウム(5 mM)、塩化カルシウム(2 mM)、HEPES(5 mM)、D-ブドウ糖(10 mM)、およびテトロドトキシン( $0.3 \mu M$ )から成る混合溶液(pH 7.3)を用いた。塩化セシウム(80 mM)、フッ化セシウム(80 mM)、EGTAセシウム(10 mM)、HEPES(10 mM)から成る電極内液(pH 7.3)を入れたパッチクランプ用微小電極ガラス管は、先端電極抵抗が2~4 M $\Omega$ のものを使用した。Whole-cell様式で実際の記録条件下では、全シリーズ抵抗は5~15 M $\Omega$ であった。EAAは、迅速に投与可能な氏原の作成したU字管<sup>28)</sup>を細胞の近傍、約50  $\mu m$ に置き、

whole-cell電流を誘発した。NMDAの投与に当たっては、グリシン( $10 \mu M$ )およびストリキニーネ( $10 \mu M$ )を同時に加えた溶液を用いた。Whole-cell電流は、室温でCEZ-2200パッチクランプシステム(日本光電社製)で記録し、出力信号はデジタルオシロスコープ(日本光電社製VC 11)で観察するとともに、MacLabデータ記録システム(AD Instruments)を用いてパーソナルコンピュータ(マッキントッシュIIci,アップル社製)へ取り込み保存し、後日データ解析に用いた。

### III 結果

#### 1. *In vivo* 網膜虚血実験

##### 1) 網膜からのグルタミン酸遊離量の測定

手術の侵襲からの回復および測定系の動作の安定化のため手術後2時間待つて後、ネコ網膜に虚血を負荷するため手術後2時間待つて後、ネコ網膜に虚血を負荷する前40分間(4×10分)透析試料を採取し、基礎遊離量を測定し対照値とした。虚血負荷前の対照用の透析試料中のアミノ酸濃度は測定時間の40分を通じて極めて安定で、このうち測定対象のグルタミン酸に加えてセリンを対照アミノ酸として測定比較した。グルタミン酸の基礎濃度は $1.25 \pm 0.41 \mu M$ 、セリンのそれは $17.08 \pm 5.76 \mu M$ ( $n=5$ )であった。

前房内に挿入したカニューレを通じて加圧し網膜に虚血を導入すると、図1のように虚血負荷後50~60分時点でグルタミン酸の濃度が上昇した。虚血負荷中経時的に採取した透析試料の遊離量を虚血負荷前の基礎濃度を

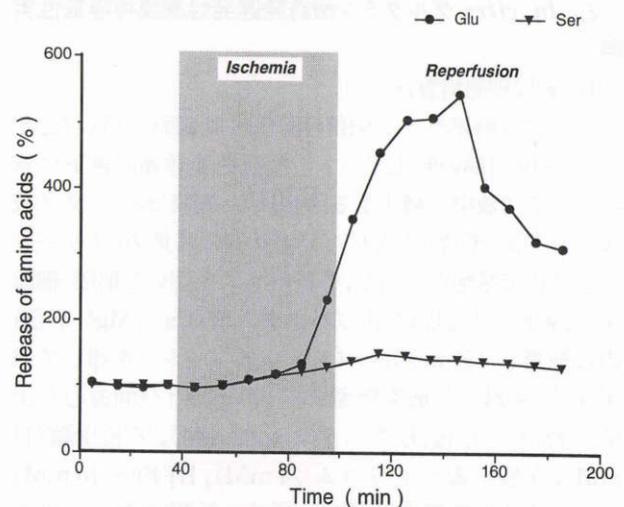


図1 網膜虚血再灌流実験における網膜からのグルタミン酸およびセリンの遊離濃度の経時的変化。

ネコ網膜に虚血を60分間負荷後、再灌流し、マイクロダイアリシス法で10分間隔に20  $\mu l$ ずつ回収した透析試料当たりの網膜から遊離されるグルタミン酸およびセリン濃度を経時的に測定した。測定系の動作の安定後、虚血負荷直前に10分間採取した透析試料の濃度を基礎濃度としその値を100%とした時の各採取時点の濃度を%コントロールとして縦軸に表した。図は典型例の一つを表す。

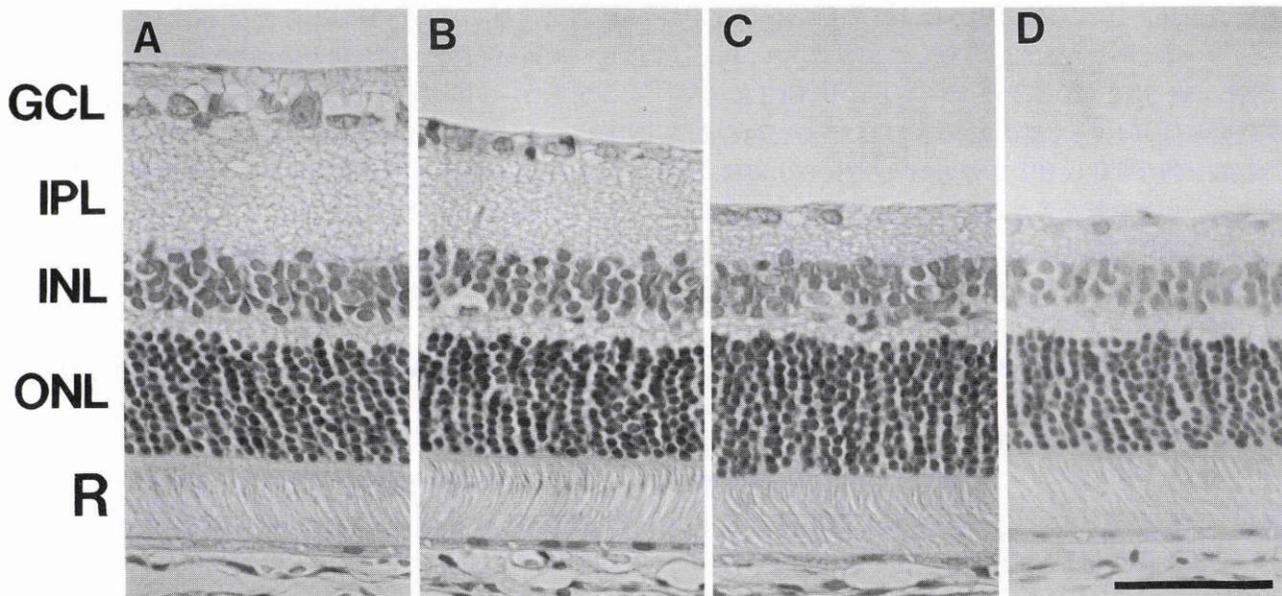


図2 網膜虚血誘発遅発性神経細胞死.

虚血負荷後の再灌流期間による網膜の組織学的変化(A)対照用の正常ラット網膜. 網膜に虚血を60分間負荷後,再灌流し4日目(B),7日目(C),14日目(D)に組織を取り出し固定しヘマトキシリン・エオジン染色を施し光学的顕微鏡下に観察した.GCL:網膜神経節細胞層,IPL:網膜内網状層,INL:網膜内顆粒層,ONL:網膜外顆粒層,R:光受容器

100%として表示した%コントロールで見ると虚血50~60分時において238±39%コントロール(n=5)のグルタミン酸の遊離量の上昇をみた.

眼内圧を正常圧に戻し虚血負荷を取り除くと,網膜は直ちに再灌流される(データは表示しないが,レーザードップラー血流計により確認している).虚血負荷後半から増加し出したグルタミン酸の遊離は,再灌流後もさらに増加し続け,最大遊離量は虚血負荷前の基礎濃度に対し634±141%コントロール(n=5)まで上昇した.

一方,セリン濃度は,虚血および再灌流を通じて安定していた(図1).

2) 虚血負荷後の網膜の経時的組織学的変化

ラットの右眼の網膜に眼内圧を上昇させて1時間虚血を負荷した後再灌流し,その後一定期間後に眼球を摘出

すると当初判然としなかったIPL内層の非薄化およびGCLの細胞脱落が時間とともに明らかとなった(図2).そこで,網膜虚血・再灌流後,1,4,7,および14日目に組織を取り出し,IPL,INL,ONL各層の厚みおよびGCLの直線細胞密度を形状計測解析装置を用いて計測し,経時変化について比較検討した.正常ラット6匹の右眼網膜のIPL,INL,ONL各層の厚みの実測値は31.1±1.1μm,20.6±0.8μm,41.9±0.7μm,また,GCLの直線細胞密度の実測値は73.3±2.9/mmであった.各再灌流後の計測値の比較にあたっては,実験動物間の個体差を考慮して,右眼(虚血負荷再灌流眼)の各実測値を左眼(非処置眼)の実測値と比較した時のその比を用いて比較検討した.したがって,対照値は,正常ラット右眼の各実測値を左眼のそれと比較し左眼を基準に%表

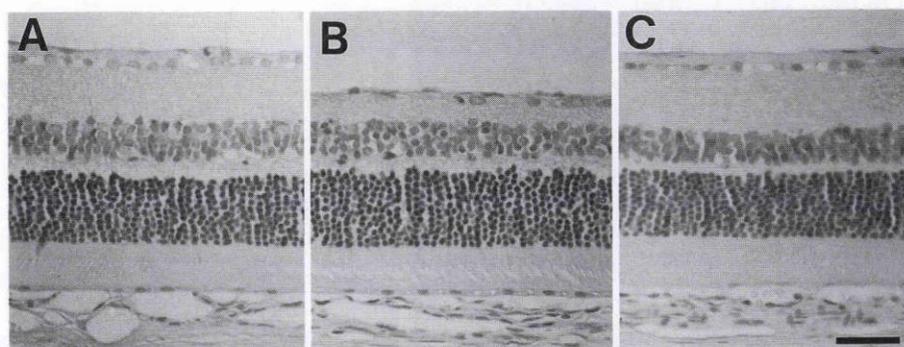


図3 NMDA受容体阻害剤MK-801による網膜虚血誘発遅発性神経細胞死の保護作用.

(A)対照の正常ラット網膜,(B)網膜に虚血を60分間負荷して再灌流し7日目に網膜を取り出しヘマトキシリン・エオジン染色した組織の顕微鏡写真.(C)虚血負荷実験30分前にラットにMK-801を3.0mg/kg静注した後,同様の虚血負荷後再灌流7日目に取り出した網膜の組織像.

示した数値(n=6)で、各層の厚みは、IPL:  $100.8 \pm 7.0\%$  コントロール、INL:  $100.7 \pm 3.6\%$  コントロール、および ONL:  $98.5 \pm 2.0\%$  コントロールとなり、GCLの直線細胞密度は  $104.9 \pm 4.3\%$  コントロールだった。再灌流後の組織学的な変化は IPLの厚みおよび GCLの直線細胞密度において有意な差が認められた。虚血負荷再灌流後1日目に細胞の膨化に基づくと思われる INLの厚みが約20%非処置眼の対照より増大したが、4日目には INLの厚みは対照と有意な変化は認められなくなった。再灌流4日目から GCLの直線細胞密度が対照値に比し有意に減少し出し、さらに、7日目から IPLの菲薄化が有意となった。虚血再灌流後7日目において、IPLの厚みは  $50.0 \pm 8.3\%$  コントロール値および GCLの直線細胞密度は  $48.9 \pm 4.9\%$  コントロール値と約半分となった。その後、再灌流14日目の各数値はほぼ同様で、7日目と14日目において有意な差はなかった。したがって、薬物処置の影響をみる実験においては、再灌流後7日目の組織の各数値を比較した。

NMDA受容体の特異的拮抗剤である MK-801 (3 mg/kg)<sup>26)</sup> を実験動物に虚血負荷30分前に静脈内注射しておく、虚血負荷再灌流後7日目に認められる虚血に基づく組織学的変化は生じず、網膜の各層の構造が保存された(図3)。生理食塩水の静注で前処置した実験動物の

虚血負荷後7日目の IPLの厚みは  $48.3 \pm 6.5\%$  コントロール値(n=6)で、GCLの直線細胞密度は  $57.3 \pm 7.4\%$  コントロール値(n=6)だった。MK-801を虚血負荷30分前に0.3~3.0 mg/kg 静注した動物においては、IPLの厚みおよび GCLの直線細胞密度は用量依存性に保存され、3.0 mg/kg では IPLの厚みは  $85.3 \pm 1.2\%$  コントロール値(n=6)、また、GCLの直線細胞密度は  $91.9 \pm 4.0\%$  コントロール値(n=6)と生理食塩水静注群に比較し有意に回復した。

## 2. *In vitro* グルタミン酸誘発遅発性網膜神経毒性実験

### 1) NOS 活性

網膜培養細胞の NOS 活性をラット網膜組織のそれと比較した。培養網膜細胞の NOS 活性は、 $5 \pm 3$  pmol/min/mg protein であった。一方、成熟ラット網膜組織の NOS 活性は、 $14 \pm 4$  pmol/min/mg protein であった。反応溶液から、NADPH あるいは  $Ca^{2+}$  を取り除くと、NOS 活性は測定できなかった。また、NOS 阻害剤である N<sup>ω</sup>-ニトロ-L-アルギニン(N-Arg, 1 mM)を反応液に加えると NOS 活性は抑制された。

### 2) NADPH ジアホラーゼ染色

ラット網膜組織標本において、内顆粒層内層および網膜神経節細胞層において NADPH ジアホラーゼ陽性

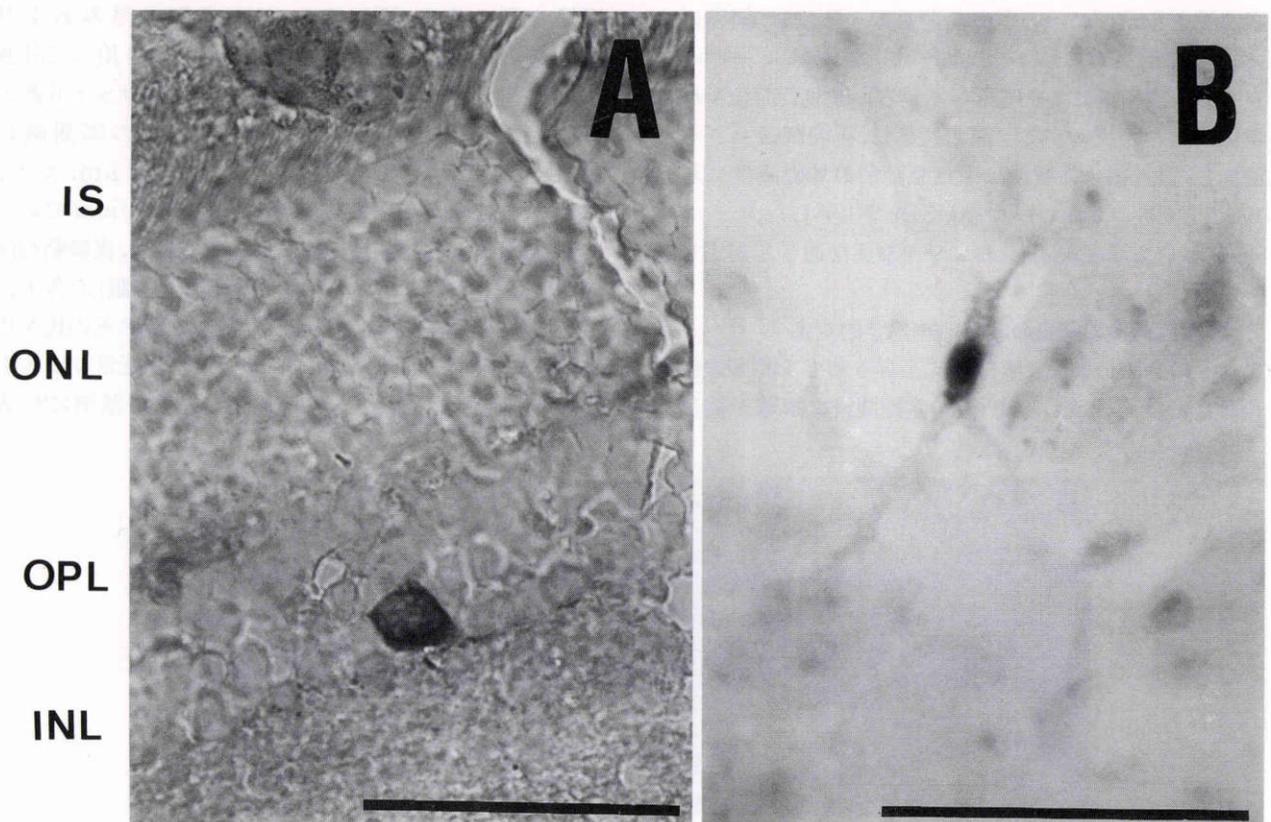


図4 成熟ラット網膜(A)およびラット初代培養網膜神経細胞(B)の NADPH ジアホラーゼ染色。(A)網膜内顆粒層内層に位置するアマクリン細胞に NADPH ジアホラーゼ陽性細胞を認める。IS: 視細胞内節, ONL: 外顆粒層, OPL: 外網状層, INL: 内網状層, (B)培養網膜神経細胞には散在性に NADPH ジアホラーゼ陽性細胞を認める。バーは 50  $\mu$ m。

ニューロンを認めた(図4A)。これら NADPH ジアホラーゼ陽性ニューロンは、分布場所およびその形状からアマクリン細胞ないしは神経節細胞層内に変移した displaced アマクリン細胞と考えられた。

培養網膜細胞においても、図4Bのように NADPH ジアホラーゼ陽性ニューロンを認めた。

3) グルタミン酸および NMDA 誘発網膜神経細胞死における NO の関与

培養細胞をグルタミン酸(1 mM)に10分間暴露した直後に、トリパンブルー染色を行って Hoffman 干渉顕微鏡下に観察すると大多数の細胞は色素を排出し、染色される死細胞はほとんどない(図5B)。ところが、グルタミン酸(1 mM)10分間暴露後、今度はグルタミン酸を含まない溶液でさらに1時間培養した後、トリパンブルー染色すると多数の細胞が染色され、著明に遅発性細胞死が発現した(図5C)。培養網膜神経細胞に対する EAA の神経細胞毒性の定量的な評価には、このトリパンブルー排除法を用いた<sup>17)18)20)21)</sup>。我々の実験条件下では、EAA の網膜神経細胞に対する細胞毒性の評価にあたって、1時間培養群と24時間培養群の間に有意の差はなかった<sup>17)</sup>。したがって、EAA によって誘発される網膜神経細胞毒性に対する薬剤の保護作用の評価は、以下のような条件で決定した。培養網膜細胞をグルタミン酸(1 mM)あるいは NMDA(1 mM)に検討対象の薬剤を添加した溶液に10分間暴露した後、対象の薬剤が入っているが、EAA を含まない溶液にさらに1時間培養した時点で評価した。

培養網膜神経細胞を NMDA(1 mM)に10分暴露直後では培養細胞の生存率に変化はないが、NMDA 不含溶液でさらに1時間培養すると著明に生存率が低下した(図6B)。ここで、NMDA(1 mM)に NOS 阻害剤である N-Arg(300  $\mu$ M)を加えた溶液に10分間暴露して、培養細胞を NMDA は含まないが、N-Arg(300  $\mu$ M)を含む培養液で1時間培養すると細胞死が著明に抑制された(図6C)。ヘモグロビン(Hb)は強力な NO 捕捉剤であるが、Hb(20  $\mu$ M)を NMDA(1 mM)と同時に加え、10分後 NMDA を含まない Hb(2.0  $\mu$ M)のみ含む溶液で1時間培養すると NMDA によって誘発される細胞死は著明に抑制された(図6D)。これら N-Arg および Hb の EAA 誘発網膜神経細胞毒に対する作用の定量的評価の結果を図7にまとめた。グルタミン酸(1 mM)あるいは NMDA(1 mM)に培養網膜細胞を10分間暴露し、その後それらを含まない溶液で1時間培養すると、細胞の生存率は著明に低下し、常に60%以上の細胞死を生じた。N-Arg(300  $\mu$ M)および Hb(20  $\mu$ M)の同時投与によって EAA による網膜神経細胞死が著明に抑制された。したがって、我々の培養網膜神経細胞において、NMDA 受容体を介するグルタミン酸誘発網膜神経細胞死に NO が関与していることが示唆された。

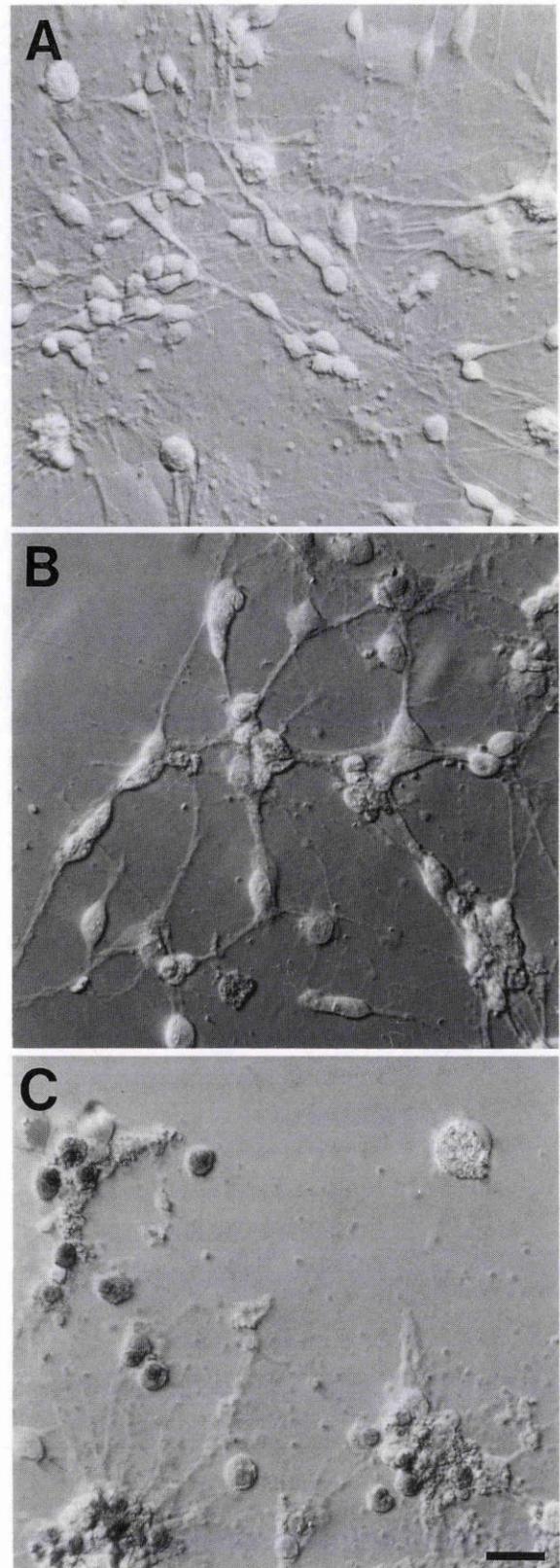


図5 培養細胞神経細胞におけるグルタミン酸誘発遅発性神経細胞死。

(A) 対照用の非処置群。(B) ラット初代培養網膜神経細胞をグルタミン酸(1 mM)に10分間暴露した直後に1.5%トリパンブルー染色し Hoffman 干渉顕微鏡で撮影した写真。(C) 10分間のグルタミン酸(1 mM)暴露後、グルタミン酸を含まない溶液中で更に1時間培養しトリパンブルー染色した顕微鏡写真。色素を体外に排出できずに染色される細胞は死細胞、染色されない細胞は生細胞と見なせる。バーは50  $\mu$ m。

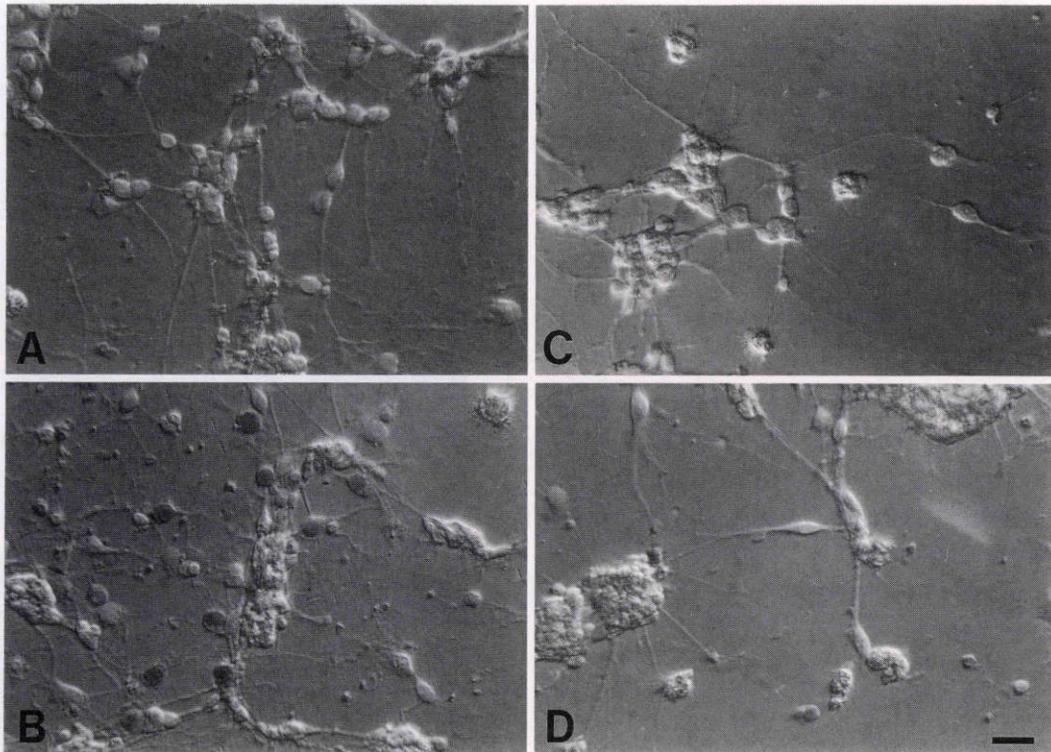


図6 NMDA受容体を介する網膜遅発性神経細胞死における一酸化窒素(NO)の関与。

(A)非処置群。(B)NMDA(1 mM)に10分間暴露した後、NMDAを含まない溶液に1時間培養しトリパンブルー染色した顕微鏡写真。色素に染色される死細胞を多数認める。(C)NMDA(1 mM)にNOS阻害剤N $\omega$ -nitro-L-arginine(N-Arg, 300  $\mu$ M)を加えて10分間培養細胞を反応させた後、NMDAは含まないN-Arg(300  $\mu$ M)のみの溶液で1時間培養しトリパンブルー染色した顕微鏡写真。(D) NO捕捉剤ヘモグロビン(Hb, 20  $\mu$ M)とNMDA(1 mM)に10分間暴露し、その後NMDAを含まないHbのみの溶液で1時間培養した後、トリパンブルー染色した培養網膜神経細胞。バーは50  $\mu$ m。

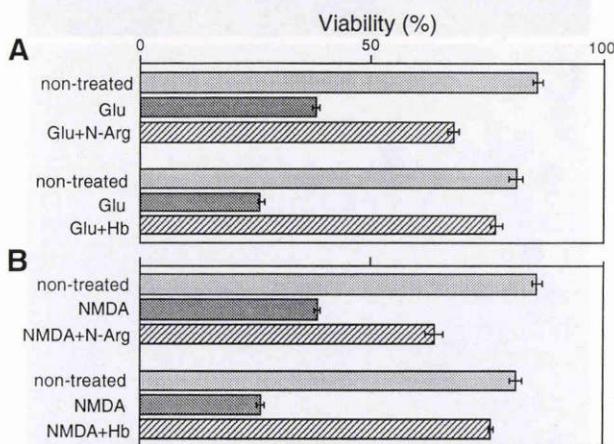


図7 N $\omega$ -nitro-L-arginine(N-Arg, 300  $\mu$ M)およびヘモグロビン(Hb, 20  $\mu$ M)のグルタミン酸(A)およびNMDA(B)誘発網膜神経細胞死に対する効果の定量的評価。

横軸は培養網膜神経細胞の生存率。各円柱および横棒は平均値と標準誤差(n=5)を示す。培養細胞はグルタミン酸(Glu, 1 mM)あるいはNMDA(1 mM)に暴露後それらを含まない溶液で1時間培養し定量した。薬物は、興奮性アミノ酸に暴露中および暴露後の正常溶液の中に入れた。

#### 4) NO生成試薬による網膜神経細胞死

NO生成試薬であるニトロプルシッド(SNP)およびS-ニトロソシステイン(SNOC)を用いて、NOの培養網膜細胞に対する影響をみた。培養細胞をSNP(500  $\mu$ M)に10分間暴露した直後では、培養細胞の生存率に変化はなかった。ところが、SNP(500  $\mu$ M)を10分間投与した後、それらを含まない溶液中でさらに1時間培養した後、生存率をみると、著明な細胞死が発現した(図8B)。NO生成試薬は、グルタミン酸誘発網膜神経細胞死と同様の遅発性細胞死を生じることがわかった。そこで、EAAの神経細胞毒性の評価と同様、培養細胞を種々の濃度のNO生成試薬に10分間暴露後、NO生成試薬を含まない溶液中でさらに1時間培養した時点で生存率を計測した(図9)。低濃度の5ないし50  $\mu$ MのSNPあるいはSNOCでは、培養細胞の生存率には影響を与えなかった。しかし、高濃度のSNP(500  $\mu$ M)あるいはSNOC(500  $\mu$ M)では、著明な遅発性細胞死が発現した。ここで、NO捕捉剤のHb(20  $\mu$ M)をSNP(500  $\mu$ M)と同時に投与したところ、細胞の生存率は著明に回復し(図10)、NO生成試薬から発生したNOを介する現象であることが示唆された。

#### 5) Ca<sup>2+</sup>流入とNO発生

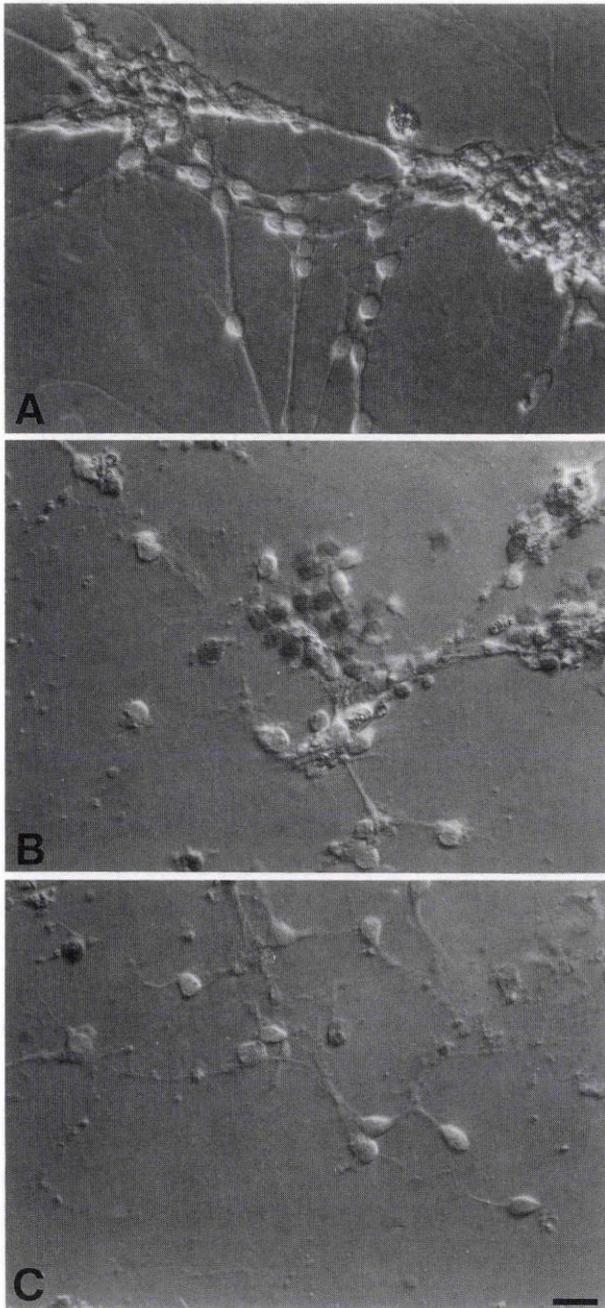


図8 NO生成試薬誘発遅発性網膜神経細胞死.

(A)非処置群(B)培養網膜神経細胞をニトロプルシッド(SNP, 500 μM)に10分間暴露後, 正常溶液中で1時間培養し, トリパンプルー染色した干渉顕微鏡写真. (C)ヘモグロビン(Hb, 20 μM)をSNP(500 μM)と同時に培養細胞に10分間暴露し, その後Hbを含むSNP不含溶液で1時間培養し, トリパンプルー染色した顕微鏡写真. バーは50 μm.

我々の培養網膜神経細胞におけるNMDA受容体を介するグルタミン酸誘発網膜神経細胞死の発現には, 細胞外液中のCa<sup>2+</sup>の存在が必須であることがわかっている<sup>17)</sup>. SNP誘発神経細胞毒性は, Hb(20 μM)の同時投与によって抑制されたが, 培養溶液からCa<sup>2+</sup>を取り除いても, あるいはNMDA受容体の拮抗剤であるMK-801を同時に投与しても, SNP誘発神経細胞毒性を抑制するこ

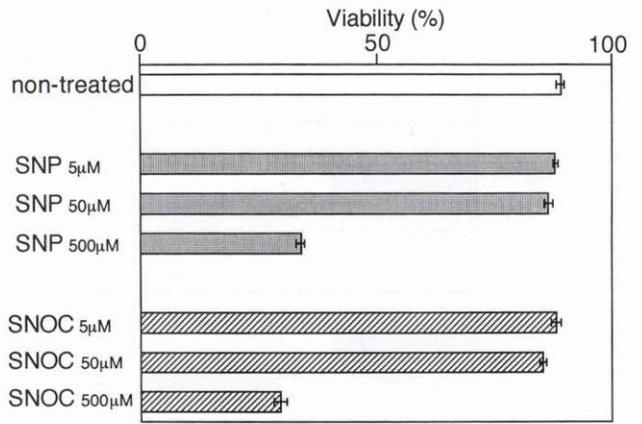


図9 NO生成試薬誘発遅発性網膜神経細胞死の定量的評価.

培養網膜神経細胞をニトロプルシッド(SNP)およびS-ニトロソシステイン(SNOC)に10分間暴露後, 正常溶液中で1時間培養した. 横軸は培養網膜神経細胞の生存率. 各円柱および横棒は平均値と標準誤差(n=5)を示す.

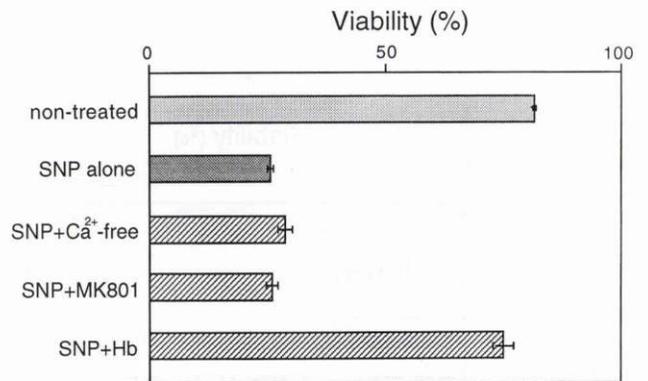


図10 ニトロプルシッド(SNP)誘発網膜神経細胞死に対する外液中のCa<sup>2+</sup>除去, MK-801およびヘモグロビン(Hb)の影響の定量的評価.

培養細胞はSNP(500 μM)に10分間暴露し, その後SNPを含まない溶液中で1時間培養した. Ca<sup>2+</sup>は, SNPを加えた溶液およびその後の1時間培養に用いたSNP不含溶液のいずれからも取り除いた. 薬物は, SNP含有溶液およびSNP不含溶液に加えた.

とはできず, 網膜神経細胞死が発現した(図10).

#### 6) NMDA あるいは NO 生成試薬誘発網膜神経細胞死におけるスーパーオキシド要求性

NOは含酸素ラジカルであるため, 生体内では, 直ちにスーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)と反応してペルオキシ亜硝酸(ONOO<sup>-</sup>)となり, 速やかに消去される<sup>27)</sup>. そこで, O<sub>2</sub><sup>-</sup>のNMDA あるいは NO 誘発網膜神経細胞死の影響を調べるため, O<sub>2</sub><sup>-</sup>消去剤であるスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)の効果をみた. 網膜培養細胞をSOD(100 U/ml)のみに1時間暴露しても細胞の生存率は84.1±0.7(%)で, 非処置群の生存率88.6±0.2(%)と差はなく, SOD単独では培養細胞に影響はなかった. しかし,

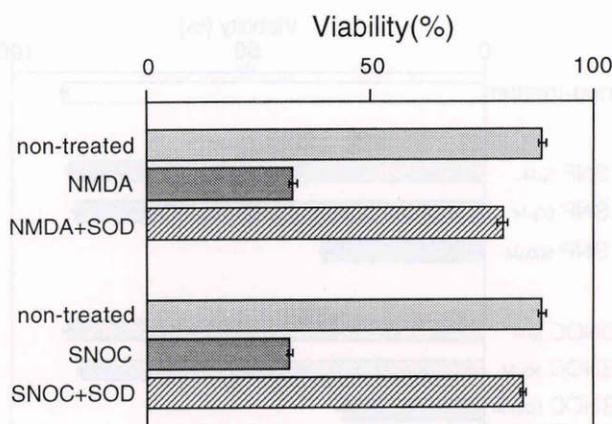


図11 NMDA およびS-ニトロソシス테인(SNOC)誘発遅発性網膜神経細胞死に対するスーパーオキシド・ディスムターゼ(SOD)の効果の定量的評価。

培養網膜神経細胞は、NMDA (1 mM)あるいはSNOC (500  $\mu$ M)に10分間暴露し、その後それらを含まない正常溶液中で1時間培養した。SOD (100 U/ml)は、NMDAあるいはSNOC含有溶液に加えるとともに、その後の1時間培養での正常溶液中にも入れた。

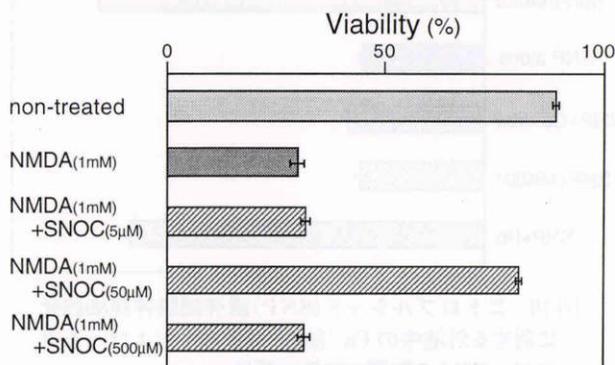


図12 NMDA誘発遅発性網膜神経細胞死に対するS-ニトロソシス테인(SNOC)の用量別効果。

培養網膜神経細胞はNMDA (1 mM)に10分間暴露し、その後NMDA不含溶液中で1時間培養した。SNOCは、NMDA含有溶液およびNMDA不含溶液の両者に加えた。

NMDA (1 mM)あるいはNO生成試薬のSNOC (500  $\mu$ M)に培養細胞を10分間暴露する際、SOD (100 U/ml)を同時に添加し、その後のNMDAあるいはSNOCを含まない溶液でそれぞれ1時間培養する際にもSOD (100 U/ml)を加えて培養すると、図11のように、NMDAあるいはSNOC誘発網膜神経細胞死が抑制され、網膜神経細胞の生存率が著明に回復した。

#### 7) NOのNMDA誘発網膜神経細胞死の保護作用

NMDA誘発網膜神経細胞死に対するNOの作用をみた(図12)。5  $\mu$ MのSNOCは、NMDA誘発網膜神経細胞死には影響はなかった。一方、50  $\mu$ MのSNOCは単独では細胞の生存率に影響はなかった(図9)が、NMDA

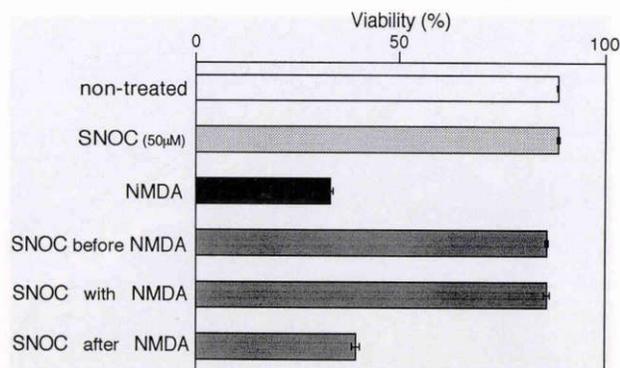


図13 S-ニトロソシス테인(SNOC)の投与時機によるNMDA誘発遅発性網膜神経細胞死の拮抗作用。

培養網膜神経細胞はNMDA (1 mM)に10分間暴露し、その後NMDA不含溶液中で1時間培養した。SNOC (50  $\mu$ M)は、NMDA暴露直前10分間反応させた(SNOC before NMDA)群、NMDAと同時に10分間反応させた(SNOC with NMDA)群、およびNMDAに10分間暴露直前に10分間反応させた(SNOC after NMDA)群に分け、それぞれNMDA投与後1時間目に定量的に評価した。

と同時に投与するとNMDA誘発網膜神経細胞死を抑制し、細胞の生存率が著明に回復した。しかし、SNOCの濃度が500  $\mu$ Mに増加するとNMDA誘発網膜神経細胞死に対する抑制効果は認められず、細胞の生存率は低下した。

NMDA誘発網膜神経細胞毒性に対して保護作用の認められた50  $\mu$ MのSNOCについて、NMDA暴露とSNOC投与時機との時間的關係を調べた(図13)。培養細胞をNMDA (1 mM)に暴露する前10分間SNOC (50  $\mu$ M)に反応させておくと、NMDAによって誘発される網膜神経細胞死は抑制され細胞の生存率は回復した。また、SNOC (50  $\mu$ M)とNMDA (1 mM)を同時に入れた溶液に10分間暴露し1時間後に生存率をみると、NMDAによって誘発される細胞死は抑制された。一方、NMDA (1 mM)に10分間暴露した後、SNOC (50  $\mu$ M)を10分間投与しても網膜神経細胞死は抑えられず、生存率は低下した。

#### 8) パッチクランプ法によるNMDA誘発電流に対するNOの効果

NMDA (50  $\mu$ M)を、 $Mg^{2+}$ 非存在下に細胞膜電位を-80 mVに固定して、培養網膜神経細胞に3秒間投与すると2相性の大きな内向き電流が誘発された(図14 Aa)。NMDA投与に先立ってSNP (500  $\mu$ M)を3分間投与した後、直ちにNMDAを投与すると電流は誘発されずに抑制された(図14 Ab)。そこで、細胞の反応性の回復をみるため、SNP投与後5分後にNMDAを再び投与すると、電流が誘発された(図14 Ac)。一方、非NMDA受容体刺激剤のカイニン酸 (50  $\mu$ M)を培養網膜神経細胞に

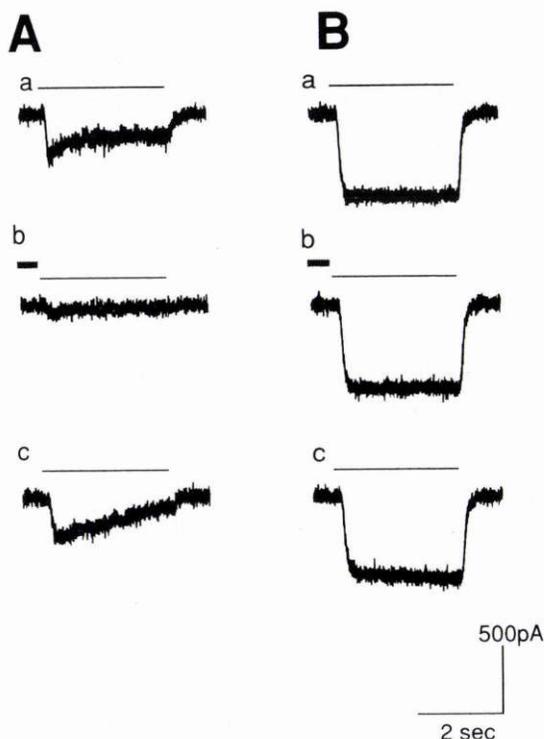


図14 培養網膜神経細胞におけるニトロプルシッド(SNP)のNMDA(A)およびカイニン酸(B)誘発電流に対する影響(文献<sup>24)</sup>より転載)。

標準的パッチクランプ法により培養網膜神経細胞の膜電位を $-80$  mVに固定し、NMDA ( $50$   $\mu$ M)およびカイニン酸 ( $50$   $\mu$ M)を3秒間投与した時誘発される whole cell 電流を記録した。記録上の細い横線はそれぞれの興奮性アミノ酸の投与期間を表す。NMDAは $Mg^{2+}$ 不含液に溶かした。(a)対照実験、(b)SNP ( $500$   $\mu$ M)を3分間投与した直後に各興奮性アミノ酸を投与し誘発電流を記録した。太い横棒はSNPの投与を示す。(c)SNP投与後5分経過した時点の各興奮性アミノ酸による誘発電流の記録。

投与すると大きな内向き電流が、3秒間の投与期間中減衰することなく誘発された。カイニン酸投与に先立ちSNP ( $500$   $\mu$ M)を3分間投与した後、直ちにカイニン酸を投与すると同様に大きな内向き電流が誘発され、SNPはカイニン酸誘発電流には影響を与えなかった<sup>28)</sup>。

#### IV 考 按

網膜虚血における一酸化窒素の役割を知るには、まず、網膜虚血とグルタミン酸誘発網膜遅発性細胞死について知る必要がある。虚血実験を行うには *in vivo* での実験が必要で、網膜の虚血実験には、これまで、網膜を灌流する血管を眼球外で直接結紮する眼動脈・網膜中心動脈結紮法、また、眼球の特徴を生かした眼球内圧を網膜の灌流血圧より上昇させて虚血を導入する眼内圧上昇法や眼底の透見性と光化学反応を利用した光照射誘発血栓法などが用いられてきた<sup>29)</sup>。これらの方法のなかでは、虚血の導入および再灌流の設定管理が容易で手術的侵襲が少な

く、また、組織学的評価についても再現性良く多くの施設で用いられている眼球内圧上昇法<sup>30)31)</sup>を用いて網膜の虚血実験を行った。

網膜が短時間の虚血の後、再灌流されると虚血による組織学的な変化は、再灌流4日目からGCLの細胞数の減少が有意に認められるようになり、再灌流7日目には神経節細胞は半減するとともにIPLの厚みも半分になり薄化し、網膜内層に著明な変化が出現した。このように網膜虚血後、時間をおいてから細胞死が発現し、しかも、網膜に虚血が加わると、網膜が均一に障害されてすべての細胞に壊死が生じるのではなく、網膜のうちの限られた神経細胞、つまり、網膜内層に分布する神経細胞が領域特異的に選択的に障害される。この網膜における一定部位のニューロンが虚血に対して選択的に脆弱で、一定の時間経過後に細胞死が発現する現象は、中枢神経系における脳虚血後の遅発性神経細胞死<sup>32)33)</sup>と同様の現象であると考えられる。一方、この虚血によって選択的に障害された網膜内層は、1957年Lucasら<sup>15)</sup>が最初に見出し、その後、Olneyら<sup>16)</sup>が網膜から中枢神経系へと発展させたグルタミン酸の持つ興奮毒性によって障害される網膜内層と一致し、網膜虚血とグルタミン酸誘発網膜神経細胞死が深く関わり合っていることが示唆される。

では、網膜虚血においてグルタミン酸が実際に放出されたのだろうか。マイクロダイアリシス法を用いてグルタミン酸の細胞外液中の濃度をネコ網膜において測定した。網膜の細胞外グルタミン酸濃度は虚血負荷後において増加し出し、さらに、再灌流後に著明に増加し約6倍のピーク値に達した。虚血後にグルタミン酸の放出が著明となることは、家兎網膜においても報告<sup>34)</sup>されており、虚血負荷後、直ちにグルタミン酸の細胞外濃度の上昇が認められる中枢神経系<sup>35)</sup>と対照的である。これは、網膜からの遊離をみる際は、マイクロダイアリシスのプローブの先端は網膜に接しているものの、一部は粘性の硝子体を介して試料を採取しているのに対し、中枢の実験では、脳組織中に完全にプローブを埋没させて採取していることが原因として考えられる。ただ、中枢神経系でもスナネズミ海馬CA1野において側脳室にカイニン酸を注入し、シナプス前神経終末を除去してシナプス後神経細胞のみにした時報告されている虚血性細胞外グルタミン酸濃度の経時変化<sup>36)</sup>は網膜とよく似ている。海馬CA1野シナプス後神経細胞のみでは虚血中にグルタミン酸は放出されるものの、シナプス前神経終末存在時よりは少なく、また、虚血後のグルタミン酸の放出の遷延化を来し、網膜における経時変化に類似している。我々の網膜虚血実験は明室下で施行したことと考え合わせると興味深い。

虚血再灌流後、細胞外に放出された高濃度グルタミン酸は、領域非特異的に観察される。では、どうして、網膜内層の限られた神経細胞のみが障害されるのだろうか。グ

グルタミン酸の受容体はイオンチャンネルと連動したイオンチャンネル型とGタンパクと共役した代謝型の2つに大きく分類できる<sup>37)38)</sup>。さらに、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体は、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)型と非NMDA型(AMPA/カイニン酸型受容体, AMPA:  $\alpha$ -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)に分かれる。このうちNMDAは、当初Olneyら<sup>16)</sup>が最も強い神経興奮性毒であると指摘し、その後、NMDA型グルタミン酸受容体拮抗剤APH(2-アミノ-7-フォスフォノヘプタノエイト)のラット海馬注入により一過性頸動脈結紮による虚血によるCA1錐体細胞の細胞死を抑制すること<sup>39)</sup>が知られ、脳虚血による遅発性細胞死がグルタミン酸受容体のうち、NMDA型受容体を介する現象であると考えられるようになってきた<sup>14)</sup>。我々のラットを用いた虚血実験でNMDA受容体の特異的拮抗剤、MK-801<sup>26)</sup>の前投与によって虚血負荷後の網膜内層の遅発性神経細胞死が抑制された。これはグルタミン酸の受容体のうち、NMDA受容体が網膜内層に位置する網膜神経節細胞およびアマクリン細胞(on-off一過性応答型)に分布していることと符合する<sup>40)</sup>。以上の*in vivo*網膜虚血実験から、虚血再灌流により網膜に多量に放出されたグルタミン酸が、NMDA型グルタミン酸受容体を介して網膜内層に分布する神経細胞に遅発性神経細胞死を発現すると考えられる。では、どのようにこのグルタミン酸誘発網膜神経細胞死がNOと関連するのだろうか、その細胞内機構を知るには、培養細胞による*in vitro*の実験が必要である。

NOは、ガス状のラジカルで、その存在そのものをみるには極めて扱いにくい。そのNOが生体内で発生することが明らかとなってきたのには、生体内に、L-アルギニンと分子状酸素を基質としてNOを発生させる酵素NOSが同定されたことに大きく依っている<sup>7)</sup>。我々の培養網膜神経細胞は、生化学的実験から、成熟ラット網膜組織の約3分の1に当たるNOS活性があることがわかった。この培養細胞のNOS活性は、NADPHおよびCa<sup>2+</sup>依存性で、また、NOS阻害剤のN-Argによって、その活性は完全に抑制された。分子生物学的なNOSの構造解析から、NOSには3つのアイソフォームが存在することが現在わかっている<sup>41)</sup>。神経細胞に内在する構成型(アイソフォームI)とサイトカインなどによって大食細胞に誘導される誘導型(アイソフォームII)、そして血管内皮型(アイソフォームIII)の3種類が現在精製・クローニングされている。このうち、Ca<sup>2+</sup>-カルモジュリン要求酵素でN-Argによって抑制されたことから、我々の培養細胞が網膜神経細胞から構成されていることを考慮すると、この培養細胞のNOSは、構成型のアイソフォームIであると考えられる<sup>41)</sup>。また、我々の培養網膜神経細胞のNOSの発現については、NADPHジアホラーゼ染色によって細胞化学的にも確かめられた。当初、NOSの抗体

を用いたSnyderのグループのBredtら<sup>42)</sup>の免疫組織化学的研究では、網膜における陽性細胞の記載はなく、脈絡膜や網膜色素上皮細胞に接して分布する神経突起に免疫学的反応を認めたとのみ報告<sup>42)</sup>された。その後、中枢神経系において、アルデヒド固定標本において認められるNADPHジアホラーゼ陽性構造がNOSであることがわかった<sup>43)44)</sup>。ところが、このNADPHジアホラーゼ陽性細胞は、すでに網膜においてラットからヒトに至るまで、種にかかわらずアマクリン細胞に普遍的に存在することをSandell<sup>45)</sup>が報告している。Snyderのグループは改めてラット網膜でのNOSの免疫組織化学的染色とNADPHジアホラーゼ組織化学染色に関して、内顆粒層内層のアマクリン細胞および網膜神経節細胞層のdisplacedアマクリン細胞に両者の陽性細胞が認められることを報告<sup>46)</sup>した。我々も、滋賀医科大学薬理学教室の戸田昇教授および吉田和秀博士がSnyderらが単離したNOSの抗体を用いて染色したイヌ網膜においてNOS陽性細胞とNADPHジアホラーゼ細胞が内顆粒層内層のアマクリン細胞および網膜神経節細胞層のdisplacedアマクリン細胞に認められることを確認した<sup>47)</sup>。同様の結果は白色家兎網膜でも報告<sup>48)</sup>されており、中枢神経系と同様に網膜においてもNADPHジアホラーゼ組織化学染色は網膜神経細胞のNOSに対するマーカーと考えてよい。以上のNOSの酵素活性および細胞化学的研究に加えて、我々の培養網膜細胞の大多数がアマクリン細胞で構成されている<sup>17)</sup>ことから、我々の培養網膜神経細胞には構成型NOSを持つアマクリン細胞があり、内因性にNOを発生させる潜在的能力があることがわかった。

そこで、NOがグルタミン酸誘発網膜神経細胞死に関与しているかどうかをみるために、NOS阻害剤のN-ArgおよびNO捕捉剤であるHbのグルタミン酸誘発網膜神経毒性に対する影響を培養網膜神経細胞を用いて調べた。いずれもグルタミン酸誘発網膜神経細胞死を抑制し、培養細胞の生存率を回復させた。また、NMDA誘発網膜神経細胞死の場合も同様にN-ArgおよびHbの投与により細胞死は抑制され網膜神経細胞は保護された。これらの結果は、NOがNMDA誘発網膜神経細胞死に関与していることを示唆する。一方、Zeevalkら<sup>49)</sup>は雛胚の網膜においてNOの合成経路は存在するが、N-Arg(100  $\mu$ M)はNMDA誘発網膜神経毒性に影響がなかったと報告<sup>49)</sup>している。この違いは、彼らはN-Argを、我々の用いた濃度の3分の1の100  $\mu$ Mのみしか調べておらず、また、実験動物の種が違っていることも関係しているものと思われる。

続いて、NOが実際に網膜神経細胞死を生じさせるかどうかをみるために、NO生成試薬であるSNPあるいはSNOCに培養網膜神経細胞を暴露しその効果を検討した。いずれのNO生成試薬も、暴露直後では網膜神経

細胞の生存率に影響を与えなかったが、その後、それらの試薬を含まない正常の溶液中で1時間培養すると培養細胞の生存率が著明に低下し、グルタミン酸やNMDA誘発網膜神経毒性の場合と同様に、遅発性細胞死が明らかとなった。このNO生成試薬による網膜神経細胞の遅発性細胞死は、NO捕捉剤のHbの投与で抑制されたことから、生成されたNOに基づく現象であると考えられた。NMDA誘発網膜神経毒性には細胞外液中のCa<sup>2+</sup>が必須で、培養液からCa<sup>2+</sup>を取り除くとNMDA誘発網膜神経細胞死は生じない<sup>17)</sup>。しかし、NO生成試薬誘発網膜神経毒性には、外液中のCa<sup>2+</sup>除去やNMDA受容体拮抗剤のMK 801の同時投与は無効で、網膜神経細胞死は抑制できなかった(図10)。つまり、NMDA受容体刺激によって一旦NOが生じると、いくらNMDA受容体をMK 801で抑制しても、また溶液からCa<sup>2+</sup>を取り除いても網膜神経細胞死を防ぐことはできず、NOを捕捉できるHbでしか、細胞死を抑制できないことを意味する。したがって、NOがNMDA受容体刺激によって誘発される網膜神経細胞死の引き金になっていると考えられる。

NO生成試薬誘発およびNMDA誘発網膜神経細胞死ともにスーパーオキシド消去剤のSODによって抑制され、細胞の生存率が回復した。NOは、生体内では、直ちにO<sub>2</sub><sup>-</sup>と反応してペルオキシ亜硝酸(ONOO<sup>-</sup>)となる<sup>27)</sup>。投与したSODは、O<sub>2</sub><sup>-</sup>を消去しONOO<sup>-</sup>の生成を抑制する。したがって、この結果は、SODによってO<sub>2</sub><sup>-</sup>を取り除きNO単独にしても、NOそのものには網膜神経細胞に毒性がないことを意味し、NOが網膜神経細胞に毒性を発揮するにはO<sub>2</sub><sup>-</sup>と反応してONOO<sup>-</sup>が生成されることが必要であることを示唆する。ONOO<sup>-</sup>の神経細胞の直接障害作用は中枢神経系の培養細胞においても観察されており<sup>50)51)</sup>、我々の実験結果からも、NOは網膜神経細胞死への引き金とはなるが、NO自体には毒性はなく、NOがO<sub>2</sub><sup>-</sup>と反応して生じたONOO<sup>-</sup>がNO誘発網膜神経細胞死を発現させるものと考えられる。

さらに、NOとNMDA誘発網膜神経毒性の相互作用から興味深い結果を得た。単独投与では網膜神経細胞の生存率に影響を与えない低濃度(50 μM)のNO生成試薬を、NMDA投与前あるいは同時に投与すると、NMDAによって誘発されるべき遅発性網膜神経細胞死が抑制され、細胞の生存率が回復した。一方、パッチクランプ法による膜電位固定化のwhole cell電流測定実験でNMDA誘発電流がNOによって抑制された<sup>28)</sup>。このwhole cell電流抑制作用はNMDA受容体に特異的で、NOがNMDA受容体に作用してイオンチャンネルを抑制することに基づいている。したがって、低濃度のNOのNMDA誘発網膜神経細胞毒性に対する保護作用は、NOがNMDA受容体を抑制することによってCa<sup>2+</sup>の細胞内への流入を阻止することによると考えられる。

以上の培養網膜神経細胞の結果をまとめると、グルタ

ミン酸はNOS陽性アマクリン細胞のNMDA受容体刺激によって生じたNOが、低濃度の時は、周囲の網膜神経細胞(我々の培養細胞の場合は、主にアマクリン細胞)のNMDA受容体を抑制してCa<sup>2+</sup>の細胞内流入を阻止して神経細胞保護的に働き、NOが多量に生じた場合は、O<sub>2</sub><sup>-</sup>と反応して生じたONOO<sup>-</sup>が神経細胞障害的に働きグルタミン酸誘発網膜神経細胞死が発現すると考えられる。NOの持っているこの相反する二面性は、網膜神経細胞だけでなく、中枢神経系の培養細胞においても、Liptonら<sup>51)</sup>のグループが報告している。彼らはNMDA受容体を構成しているチオール基(-SH)を中心とする酸化還元調節部位が、NMDA受容体のイオンチャンネルの開閉を制御し、NOは自身の酸化/還元状態によってチオール基の酸化/還元状態を変化させ、神経細胞保護性あるいは神経細胞障害性の方向性を決定していると提唱した。すなわち、チオール基が酸化されジスルフィド(S-S)結合が形成されると、NMDA受容体は抑制され細胞保護的方向へと向かい、一方、還元されるとNMDA受容体のイオンチャンネルが賦活されCa<sup>2+</sup>流入が促進され細胞障害性へと向かう<sup>52)</sup>。NOは、外来性に投与したSNPやニトロソチオール(RS-NO)のような内在性物質のNO担体中ではニトロソニウム陽イオン(NO<sup>+</sup>)としてイオン化された酸化状態にある。この酸化型NO<sup>+</sup>はNMDA受容体のチオール基を酸化し細胞保護的に作用し、NO<sup>+</sup>を還元して得られるラジカル型のNO<sup>•</sup>は、直ちにO<sub>2</sub><sup>-</sup>と反応してONOO<sup>-</sup>を生じるため細胞毒となると考え、NOSによって生成されたNOはその場の環境に応じて酸化型NO<sup>+</sup>あるいは還元型NO<sup>•</sup>となり二面性を発揮すると提唱した。我々が網膜神経細胞において見出したNMDA受容体のNOに感受性のある部位が、Liptonのいう中枢神経細胞のNMDA受容体の酸化還元部位と同一かどうかは、今後の検討を要する。

パッチクランプ法による我々の電気生理学的研究から、培養アマクリン細胞のNMDA型受容体は、大脳皮質細胞と同様、通常の静止膜電位付近ではMg<sup>2+</sup>によって抑制されているが、脱分極されるとともにMg<sup>2+</sup>の抑制がはずれ、NMDA型受容体が活性化される<sup>17)</sup>。網膜虚血により多量に放出されたグルタミン酸は、非NMDA型受容体の脱分極を生じ、それに伴いNMDA型受容体のMg<sup>2+</sup>の阻害作用がはずれ、Ca<sup>2+</sup>の細胞内流入が生じる。Ca<sup>2+</sup>の流入によりNOS陽性アマクリン細胞からNOが発生し、生じたNOは、細胞膜に拘わらず周囲に直ちに拡散する。少量のNOはNMDA受容体を抑制してCa<sup>2+</sup>の細胞内流入を阻止して網膜神経細胞保護的に働くが、多量に生じたNOはO<sub>2</sub><sup>-</sup>と反応してONOO<sup>-</sup>を生じ周囲の神経細胞に障害性を発揮することになる。NO生成試薬は速効性降圧剤のNiprideや狭心症発作のニトログリセリンなど古くから臨床で用いられてきた薬剤で、NOの持つ神経保護作用をいかにうまく引き出すかが、

網膜虚血疾患の治療の興味ある今後の課題といえる。また、臨床的には網膜中心動脈閉塞症や糖尿病網膜症での微小血管閉塞症といった網膜虚血疾患への応用もさることながら、高眼圧を負荷する網膜虚血実験は、急性緑内障発作を人工的に誘発する実験ともいえる。また、サルを用いた慢性高眼圧眼では後部硝子体中のグルタミン酸濃度が上昇していることが報告<sup>53)</sup>され、グルタミン酸誘発網膜遅発性神経細胞死が緑内障の病態を考える上で、新たな視点を提供した<sup>54)55)</sup>。緑内障眼では網膜神経節細胞のうち、外側膝状体の大細胞系へ投射する M cell 系の選択的障害が知られている<sup>56)57)</sup>が、NMDA を介する網膜神経節細胞死では神経節細胞のうち、大きな細胞が障害され、10  $\mu\text{m}$  以下の小細胞は保存されることがラットで報告<sup>58)</sup>されている。したがって、緑内障の病態に NMDA 受容体を介するグルタミン酸誘発神経細胞死が関与していることが示唆される。ことに虚血再灌流後、あるいはグルタミン酸暴露後、一定の潜時をもって遅発性に網膜神経細胞死が生じることは緑内障の病態を考える上で興味深い。

本研究は、赤池昭紀教授(京都大学薬学部薬理)の指導の下、NOS の生化学的分析および組織化学的実験は万代道子(京都大学医学部眼科)、網膜虚血実験のグルタミン酸定量および組織化学的研究は正井宏和(京都大学医学部眼科)、上田睦明(京都大学薬学部薬理)、足立 圭(京都大学薬学部薬理)、培養細胞の細胞化学的実験は田村 豊(福山大学薬学部神経薬理)、菊地雅史(京都大学医学部眼科)、培養細胞の電気生理学的実験は氏原久充(高知医科大学精神科)、笹 征史(広島大学医学部薬理)の各氏との共同研究に基づいている。また、本研究全般にわたって貴重な助言と多大な協力を下さった本田孔士教授(京都大学医学部眼科)に心から感謝するとともに赤池昭紀教授はじめ各氏の暖かい協力を深謝する。

#### 文 献

- 1) **Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J**: Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898—1902, 1992.
- 2) **Hoffman M**: A new role for gases: Neurotransmission. *Science* 252: 1788, 1991.
- 3) **Furchgott RF, Zawadzki JV**: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373—376, 1980.
- 4) **戸田 昇, 岡村 富夫**: 神経伝達と NO. *日薬理誌* 100: 173—182, 1992.
- 5) **Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R**: Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336: 385—388, 1988.
- 6) **Snyder SH**: Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters? *Science* 257: 494—496, 1992.
- 7) **Garthwaite J**: Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 14: 60—67, 1991.
- 8) **Bredt DS, Snyder SH**: Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 682—685, 1990.
- 9) **Culotta E, Koshland DE Jr**: Molecule of the year: NO news is good news. *Science* 258: 1862—1865, 1992.
- 10) **Siesjö BK**: Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanism of damage and treatment. *J Neurosurg* 77: 337—354, 1992.
- 11) **Halliwell B**: Oxidants and the central nervous system: Some fundamental questions. *Acta Neurol Scand* 126: 23—33, 1989.
- 12) **McCord JM**: Oxygen derived free radicals in postischemic injury. *N Engl J Med* 312: 159—163, 1985.
- 13) **Choi DW, Rothman SM**: The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann Rev Neurosci* 13: 171—182, 1990.
- 14) **Coyle JT, Puttfarcken P**: Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689—695, 1993.
- 15) **Lucas DR, Newhouse JP**: The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol* 58: 193—201, 1957.
- 16) **Olney JW, Ho OL, Rhee V**: Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res* 14: 61—76, 1971.
- 17) **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.
- 18) **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.
- 19) **Mandai M, Yoshimura N, Yoshida M, Iwaki M, Honda Y**: The role of nitric oxide synthase in endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3673—3680, 1994.
- 20) **Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR**: Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 7: 357—368, 1987.
- 21) **Akaike A, Kaneko S, Tamura Y, Nakata N, Shiomi H, Ushikubi F, et al**: Prostaglandin E2 protects cultured cortical neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity. *Brain Res* 663: 267—243, 1994.
- 22) **Tamura Y, Sato Y, Akaike A, Shiomi H**: Mechanism of cholecystokinin-induced protection of cultured cortical neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity. *Brain Res* 592: 317—325, 1992.
- 23) **Hamil OP, Marty A, Heher E, Sakmann B, Sigworth FJ**: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells

- and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391: 85–100, 1981.
- 24) **Ujihara H, Albuquerque EX**: Developmental changes of the inhibition by lead of NMDA-activated currents in cultured cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 868–875, 1992.
  - 25) **Fenwick EM, Marty A, Neher E**: A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J Physiol* 331: 577–597, 1982.
  - 26) **Wong EHF, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL**: The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7104–7108, 1986.
  - 27) **Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J**: Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898–1902, 1992.
  - 28) **Ujihara H, Akaike A, Tamura Y, Yokota T, Sasa M, Kashii S**: Blockade of retinal NMDA receptors by sodium nitroprusside is probably due to nitric oxide formation. *Japan J Pharmacol* 61: 375–377, 1993.
  - 29) **柏井 聡**: 網膜における遅発性神経細胞死研究の現状. *医学のあゆみ* 169: 824–828, 1994.
  - 30) **Hughes WF**: Quantification of ischemic damage in the rat retina. *Exp Eye Res* 53: 573–582, 1991.
  - 31) **Takahashi K, Lam TT, Edward DP, Buchi ER, Tso MOM**: Protective effects of flunarizine on ischemic injury in the rat retina. *Arch Ophthalmol* 110: 862–870, 1992.
  - 32) **Kirino T**: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239: 57–69, 1982.
  - 33) **Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F**: Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11: 491–498, 1982.
  - 34) **Louzada-Junior P, Dias JJ, Santos WF, Lachat JJ, Bradford HF, Coutinho-Netto J**: Glutamate release in experimental ischaemia of the retina: An approach using microdialysis. *J Neurochem* 59: 358–363, 1992.
  - 35) **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.
  - 36) **Mitani A, Andou Y, Matsuda S, Arai T, Sakana-ka M, Kataoka K**: Origin of ischemia-induced glutamate efflux in CA1 field of the gerbil hippocampus: An in vivo brain microdialysis study. *J Neurochem* 63: 2152–2164, 1994.
  - 37) **Seeburg PH**: The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci* 16: 359–365, 1993.
  - 38) **Gasic GP, Hollmann M**: Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu Rev Physiol* 54: 507–536, 1992.
  - 39) **Simon RP, Swan JH, Griffiths T, Meldrum BS**: Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 226: 850–852, 1984.
  - 40) **Dixon DB, Copenhagen DR**: Two types of glutamate receptors differentially excite amacrine cells in the tiger salamander retina. *J Physiol* 449: 589–606, 1992.
  - 41) **Schmidt HHW, Hofmann H, Ogilvie P, Sennefelder H, Weinberg RJ**: Biochemistry and regulation of nitric oxide synthase. In: Takagi H, et al (Eds): *Nitric Oxide—Roles in Neuronal Communication and Neurotoxicity*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 3–18, 1994.
  - 42) **Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH**: Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347: 768–770, 1990.
  - 43) **Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR**: Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2811–2814, 1991.
  - 44) **Dawson TM, Bredt 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.
  - 45) **Sandell JH**: NADPH diaphorase cells in the mammalian inner retina. *J Comp Neurol* 238: 466–472, 1985.
  - 46) **Yamamoto R, Bredt DS, Snyder SH, Stone RA**: The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. *Neuroscience* 54: 189–200, 1993.
  - 47) **Kashii S, Mandai M, Takahashi M, Kikuchi M, Honda Y, Akaike A**: Involvement of nitric oxide in glutamate neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 1288, 1994.
  - 48) **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.
  - 49) **Zeevalk GD, Nicklas WJ**: Nitric oxide in retina: Relation to excitatory amino acids and excitotoxicity. *Exp Eye Res* 58: 343–350, 1994.
  - 50) **Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR, Snyder SH**: Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci* 13: 2651–2661, 1993.
  - 51) **Lipton SA, Choi Y-B, Pan Z-H, Lei SZ, Chen H-SV, Sucher NJ, et al**: A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 626–632, 1993.
  - 52) **Lei SZ, Pan Z-H, Aggarwal SK, Chen H-SV, Hartman J, Sucher NJ, et al**: Effects of nitric oxide production on the redox modulatory site of

the NMDA receptor-channel complex. *Neuron* 8 : 1087—1099, 1992.

53) **Schumer RA, Podos SM, Lipton SA, Dreyer EB :** Increased glutamate in the vitreous of monkey with induced glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 1484, 1994.

54) **Schumer RA, Podos SM :** The nerve of glaucoma. *Arch Ophthalmol* 112 : 37—44, 1994.

55) **Dreyer EB, Lipton SA :** A proposed role for excitatory amino acids in glaucoma visual loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(Suppl) : 1504, 1993.

56) **Chaturvedi N, Hedley-Whyte ET, Dreyer EB :**

Lateral geniculate nucleus in glaucoma. *Am J Ophthalmol* 116 : 182—188, 1993.

57) **Dandona L, Hendrickson A, Quigley HA :** Selective effects of experimental glaucoma on axonal transport by retinal ganglion cells to the dorsal lateral geniculate nucleus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32 : 1593—1599, 1991.

58) **Benjamin E, Pan Z-H, Storm S, Lipton SA :** Greater sensitivity of larger retinal ganglion cells to NMDA-mediated cell death. *Neuro Report* 5 : 629—631, 1994.