

氏名	あ だち けい 足 立 圭
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 421 号
学位授与の日付	平 成 10 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 薬 学 専 攻
学位論文題目	虚血性網膜障害における神経細胞死の機序に関する研究

(主査)

論文調査委員 教授 赤池昭紀 教授 佐藤公道 教授 市川 厚

## 論 文 内 容 の 要 旨

緑内障, 糖尿病性網膜症, 網膜中心動脈閉塞症などの眼疾患は, 網膜の器質的障害により視機能が低下する。これらの疾患における網膜障害の重要な原因の一つとして網膜虚血により誘発される神経細胞死の関与が指摘されてきた。そこで, 本研究において著者は, 虚血性網膜障害の機序を明らかにする目的で, *in vivo*網膜虚血モデルを開発して一過性網膜虚血により誘発される神経細胞死の機序について研究を行い, 以下の新知見を得た。

## 第一章 網膜虚血モデルの確立と虚血時の網膜からのグルタミン酸遊離

はじめに, 眼圧上昇により眼内の血流を遮断する方法を開発した。すなわち, ラットを用い, 前眼房への水圧負荷により眼圧を上昇し眼底血流量を測定したところ, 血圧を越える水圧 (130mmHg) を負荷することにより完全虚血が可逆的に誘発された。一過性 (45~60分) の網膜虚血後の網膜障害は, 主として網膜内層に位置する神経節細胞層 (GCL), 内網状層 (IPL) で観察され, 内顆粒層 (INL) および外顆粒層 (ONL) では著明な変化は認められなかった。これらの網膜障害は虚血直後では観察されず, 虚血4日目から著明になり, 1週間後に最大となった。次いで, ネコを用いて虚血に伴って網膜から遊離されるグルタミン酸量を*in vivo*マイクロダイアリシス法を用いて定量した。網膜から遊離されるグルタミン酸量は, 虚血中から上昇し始め, 虚血終了後約1時間で最大に達し, その後減少した。対照として測定したセリンの遊離量に変化はみられなかった。この結果は網膜虚血に伴い網膜内で過剰に遊離されたグルタミン酸が細胞死の原因となることを示唆する。

第二章 虚血誘発神経細胞死における *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体及び一酸化窒素合成酵素 (NOS) の関与

大脳皮質や海馬などにおけるグルタミン酸神経毒性の機序としてNMDA受容体とNOSの関与が示唆されていることから, ラットを用い一過性網膜虚血により誘発される網膜内層の神経細胞死に対するNMDA受容体拮抗薬MK-801およびNOS阻害薬N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME) の作用を検討した。MK-801を虚血前に静脈内投与することにより, 虚血7日後に観察される網膜障害は用量依存的に抑制された。L-NAMEも同様の保護作用を示した。一方, L-NAMEの不活性型光学異性体であるD-NAMEは虚血性網膜障害を抑制しなかった。これらの結果より, 一過性網膜虚血により誘発される遅延性神経細胞死がNMDA受容体とNOSを介して起こることが示唆されたので, NOS含有細胞の網膜内分布およびその虚血後の変化を検討した。正常ラットの網膜では, 網膜内層に存在する神経細胞の一種であるアマクリン細胞及び網膜表面の血管にNOS陽性細胞が分布していた。網膜外層にはNOS陽性細胞は全く観察されなかった。網膜虚血後15時間から4日にかけて, NOS陽性アマクリン細胞は一過性に減少した。これらの結果より, 虚血時に遊離されたグルタミン酸がNMDA受容体を介してNOS陽性アマクリン細胞での一酸化窒素 (NO) 生成を引き起こし, 神経節細胞層の障害を誘発することが推定された。

### 第三章 NMDA硝子体内投与により誘発される神経細胞死におけるNMDA受容体及びNOSの関与

興奮性アミノ酸により誘発される神経毒性の虚血性網膜障害への関与を検証する目的で、興奮性アミノ酸硝子体内投与を行った。硝子体に投与する興奮性アミノ酸としては、アミノ酸トランスポーターの影響を受けにくいNMDAを用いた。NMDAの硝子体内投与により、投与7日後に網膜内層（GCLとIPL）に選択的な細胞死が誘発された。NMDA誘発網膜障害はMK-801およびL-NAMEにより完全に抑制された。一方、D-NAMEはNMDA誘発障害を抑制しなかった。さらに、NOSの基質であるL-arginineの過剰量を投与することによりL-NAMEの保護作用は消失した。これらの結果は、in vivoでNMDA受容体に対する過剰な刺激により虚血と同様の機序で網膜神経細胞の遅延性細胞死が誘発されることを示す。

以上、著者は、虚血性網膜障害における神経細胞死の機序として、虚血-再灌流により過剰にグルタミン酸が遊離され、NMDA受容体を介する興奮性神経毒性により網膜内層の神経細胞が遅延性に神経細胞死に至ることを示した。NMDA受容体刺激後の細胞内機構としては、神経型NOS（nNOS）により産生されるNOが重要な役割を果たすことを示唆した。本研究の成果は網膜障害をもたらす眼疾患に有効な予防・治療薬の開発に有用な知見となるとともに、網膜における神経細胞の生存維持の機構を解明するための重要な基礎的資料を提供すると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

緑内障、糖尿病性網膜症、網膜中心動脈閉塞症などの眼疾患は、網膜の器質的障害により視機能が低下する。これらの疾患における網膜障害の重要な原因の一つとして網膜虚血により誘発されるニューロン死の関与が指摘されてきた。

本研究において筆者は、虚血性網膜障害の機序を明らかにする目的で、in vivo網膜虚血モデルを開発し、一過性網膜虚血により過剰に遊離されたグルタミン酸がN-methyl-D-aspartate（NMDA）受容体を介して一酸化窒素（NO）産生を促進し、網膜内層のニューロン死を誘発することにより、遅延性網膜障害を誘発することを明らかにした。

本研究に当たって筆者は、はじめに、眼圧上昇により眼内の血流を遮断する方法を開発した。本方法をラットに適用し、一過性網膜虚血により誘発される障害を検討した結果、網膜内層に位置する神経節細胞層（GCL）と内網状層（IPL）に細胞脱落あるいは層の厚さの減少といった障害が遅延性に惹起されるのに対して、その外層に位置する内顆粒層（INL）と外顆粒層（ONL）は障害を受けないことを見出した。次いで、ネコを用いて虚血に伴って網膜から遊離されるグルタミン酸をin vivoマイクロダイアリシス法を用いて測定した結果、網膜虚血に伴い網膜内でグルタミン酸が過剰に遊離されることを見出した。これらの結果より、一過性網膜虚血により誘発される網膜内層の遅延性ニューロン死にグルタミン酸の関与することが示唆された。

次に、筆者は虚血性網膜障害におけるグルタミン酸神経毒性の役割と機序を解明を行った。ラットを用い一過性網膜虚血により誘発される網膜内層の神経細胞死のに対するNMDA受容体拮抗薬MK-801およびNOS阻害薬N-nitro-L-arginine methyl ester（L-NAME）の作用を検討した結果、MK-801を虚血前に静脈内投与することにより虚血性網膜障害は用量依存的に抑制され、L-NAMEも同様の保護作用を示すことを見出した。これらの結果より、一過性網膜虚血により誘発される遅延性神経細胞死がNMDA受容体とNO合成酵素（NOS）を介して起こることが示唆された。そこで、NOS含有細胞の網膜内分布を検討したところ、正常ラットの網膜では、網膜内層に存在する神経細胞の一種であるアマクリン細胞及び網膜表面の血管にNOS陽性細胞が分布することが明らかになった。したがって、虚血時に遊離されたグルタミン酸がNMDA受容体を介してNOS陽性アマクリン細胞でのNO生成を引き起こし、網膜内層の障害を誘発するとの結論に至った。

この結論をさらに検証する目的で、硝子体内に投与した興奮性アミノ酸の作用を検討した。NMDAの硝子体内投与により、投与7日後に網膜内層（GCLとIPL）に選択的な細胞死が誘発された。NMDA誘発網膜障害はMK-801およびL-NAMEにより完全に抑制された。一方、D-NAMEはNMDA誘発障害を抑制しなかった。さらに、NOSの基質であるL-arginineの過剰量を投与することによりL-NAMEの保護作用は消失した。これらの結果は、虚血性網膜障害とNMDA神経毒性が同一の機序により遅延性ニューロン死を惹起することを示す。

以上の研究は、網膜虚血により誘発されるニューロン死にグルタミン酸とNOが主要な役割を果たすことを示すものであり、網膜障害をもたらす眼疾患に有効な予防・治療薬の開発に有用な知見となるとともに、網膜における神経細胞の生存維持の機構を解明するための重要な基礎的資料を提供すると考えられる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成10年11月2日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。