



## Effect of glutamate analogues on red-green opponent interaction in monkey electroretinograms

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 春日, 敏郎 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1642">http://hdl.handle.net/10271/1642</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 365号	学位授与年月日	平成14年 6月28日
氏 名	春 日 敏 郎		
論文題目	Effect of glutamate analogues on red-green opponent interaction in monkey electroretinograms (グルタミン酸アナログのサル網膜電図における赤－緑反対色相互作用に対する影響)		

博士(医学) 春日 敏 郎

## 論文題目

Effect of glutamate analogues on red-green opponent interaction in monkey electroretinograms,  
(グルタミン酸アナログのサル網膜電図における赤-緑反対色相互作用に対する影響)

## 論文の内容の要旨

## [はじめに]

霊長類の網膜は3種類の錐体細胞、青錐体、緑錐体および赤錐体を有している。これらの錐体からの信号が、2つの色対立チャネル、赤-緑および青-黄チャネルでの相互作用により色覚の信号に変換される。最近の研究では、青-黄チャネルの部位は小型二層性神経節細胞であろうと推測されている。一方、赤-緑チャネルに関しては、鯉の水平細胞を用いた電気生理学的な実験などから、水平細胞の錐体選択的な極性反転性フィードバック機能がそのチャネル形成に関与しているとする説が有力視されていた。しかし、最近の実験で霊長類の水平細胞が極性反転性のフィードバック機能を持たないことが明らかにされ、水平細胞を赤-緑チャネルの場とする考えは疑問視され始めている。本実験では、水平細胞と赤-緑チャネルの関連を検討するため、視細胞から ON 型双極細胞への信号伝達を遮断するアミノホスホノ酪酸 (APB) あるいは視細胞から OFF 型双極細胞および水平細胞への信号伝達を遮断するシスベリジンジカルボン酸 (PDA) の2種類のグルタミン酸アナログを麻酔サルの硝子体内に投与し、その際の赤-緑反対色相互作用への影響を網膜電図 (ERG) により解析した。

## [材料ならびに方法]

3頭のカニクイザルを使用し、塩酸ケタミンによる鎮静後、酸素、笑気混合ガスによる人工呼吸下で、臭化ベクロニウムの持続点滴により不動化した。ERG の反応は150ワットキセノンアークランプを光源とし、白色コンタクトレンズ電極を使用して網膜全面照射により誘発した。検査光の照射開始の30秒前に、杆体細胞からの反応を抑制するため30秒間の明順応を行った。検査光は干渉フィルターにより単色光とし、白色背景光下で 200msec の点灯と 400msec の消灯を30回繰り返した。得られた30回の反応を加算平均し、ERG 波形とした。23枚の干渉フィルター (400-700nm) を用い、以上の操作により得られた23本の ERG 波形を1回の記録とした。尚、その際の各検査光の強度は等エネルギー (6.22erg/sec/filter) となるように中性フィルターにより調整した。APB あるいは PDA の硝子体内投与量は 0.05mL とし、硝子体内濃度がそれぞれ 1.5mM、2.5mM となるよう調整した。ERG の記録は、片眼を用いて硝子体内投与前、同眼への APB 投与後および PDA 投与後に1回ずつ計3回行い、次いで3~4週間後に、反対眼を用いて、投与する薬剤の順序を変えて同様に3回行った。こうして得られた薬物投与前、APB 投与後、PDA 投与後および両薬物投与後の ERG 波形から、a 波、b 波あるいは d 波の振幅を計測するとともに、各記録で得られた23本の ERG 波形を一組として主成分分析 (PCA) による解析を実施した。

## [結果]

薬物の硝子体内投与前の ERGb 波の分光振幅曲線は、赤-緑反対色相互作用の特徴である明瞭な3峰性を呈していた。また、PCA の結果得られた錐体の分光応答曲線においても、赤-緑反対色相互作用に

特有の傾向が明らかであった。APB 投与後では、ON 型双極細胞への信号伝達遮断により ERG 波形は全体的に過分極性の反応が優位となり、b 波は完全に消失した。b 波振幅曲線から赤-緑反対色相互作用の特徴を見つけることは不可能となったが、PCA で得られた各錐体の分光応答曲線は投与前とほぼ同じであり、APB は赤-緑チャンネルに影響を与えないことが示唆された。一方、PDA 投与後は OFF 型双極細胞と水平細胞への信号伝達遮断により過分極反応が消失し、b 波は増大した。b 波振幅曲線は投与前の 3 峰性から単峰性に変化し、PCA においても赤-緑反対色相互作用に特有の傾向は完全に消失した。この PCA の結果は、APB と PDA を投与して視細胞電位のみとなった ERG 波形で得られたものとほぼ同じであった。これらの結果から、PDA は赤-緑チャンネルの活動を抑制することが示唆された。

#### 〔考察〕

本試験の結果は、赤-緑チャンネルの部位が水平細胞あるいは OFF 型双極細胞にあることを示唆している。今回の実験では、水平細胞か OFF 型双極細胞かのいずれかに特定することはできないが、色覚理論の原則は異なる錐体細胞からの信号の比較にあることを考えると、錐体細胞と 1:1 で結合している双極細胞は構造的に色覚信号を形成し得ない。従って、赤-緑チャンネルの部位は水平細胞にあると推測できる。しかし、霊長類の水平細胞は色対立チャンネルを形成するとされているメカニズム、即ち視細胞への極性反転性フィードバック機能を持たず、色覚に関与していないとされており、今回の結果はこの報告と矛盾している。一方、水平細胞からのフィードバックは視細胞のシナプスゲインを増大させることがつい最近報告されており、もしこれが事実であれば、より強く興奮している錐体細胞は、水平細胞を介して他の錐体細胞の興奮に抑制的に作用することになる。即ち、赤-緑チャンネルの形成を水平細胞からの抑制性のフィードバックによって説明することが可能であり、極性反転性フィードバック機能を持たないことは色覚との関与を否定する根拠とはならないといえる。

#### 〔結論〕

以上より、水平細胞はおそらく抑制性のフィードバックを介して赤-緑チャンネルの形成に関わっていると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

霊長類の網膜は、青錐体、緑錐体および赤錐体の 3 種類の錐体細胞を有し、これらの錐体からの信号が、赤-緑および青-黄チャンネルの 2 つの色対立チャンネルでの相互作用により色覚の信号に変換される。青-黄チャンネルの部位は小型二層性神経節細胞であろうと推測されている。しかし、赤-緑チャンネルに関しては、最近の研究で霊長類の水平細胞が魚類などと異なり極性反転性のフィードバック機能を持たないことが明らかにされ、赤-緑チャンネルへの水平細胞の関与が疑問視され始めている。申請者は、水平細胞と赤-緑チャンネルの関連を検討するため、視細胞から ON 型双極細胞への信号伝達を遮断するアミノホスホノ酪酸 (APB) 及び視細胞から OFF 型双極細胞と水平細胞への信号伝達を遮断するシスビペリジンジカルボン酸 (PDA) の 2 種類のグルタミン酸アナログを麻酔サルの硝子内に投与し、赤-緑反対色相互作用への影響を網膜電図 (ERG) により解析した。

3 頭のカニクイザルを使用し、酸素、笑気混合ガスによる人工呼吸下で、臭化ベクロニウムの持続点滴により不動化した。ERG の反応は 150 ワットキセノンアークランプを光源とし、白色コンタクトレンズ

電極を使用して網膜全面照射により誘発した。刺激光は干渉フィルターにより単色光(200msec)とした。30回の反応を加算平均し、ERG 波形とした。23枚の干渉フィルター(400-700nm)により得られた23本の ERG 波形を1回の記録とした。各刺激光の強度は中性フィルターにより調整した。APB 及び PDA の硝子体内濃度はそれぞれ 1.5mM、2.5mM となるよう調整した。ERG の記録は、片眼を用いて、投与前、APB 投与後、PDA 投与後に1回ずつ行い、3~4週間の間隔を空けて、反対眼を用いて薬剤の投与順序を変えて同様にを行い、得られた ERG 波形の主成分分析(PCA)による解析を実施した。

薬物投与前の ERG の b 波の分光振幅曲線、および PCA の結果得られた錐体の分光応答曲線において、赤-緑反対色相互作用に特有の傾向が明らかであった。APB 投与後では、PCA で得られた各錐体の分光応答曲線は投与前と同様であり、APB は赤-緑チャンネルに影響を与えないことが示唆された。一方、PDA 投与後は ERG b 波振幅曲線は赤-緑反対色相互作用の特徴である明瞭な3峰性から単峰性に変化し、PCA においても赤-緑反対色相互作用に特有の傾向は完全に消失した。これらの結果から、PDA は赤-緑チャンネルの活動を抑制することが示唆された。

本研究の結果は、赤-緑チャンネルの部位が水平細胞あるいは OFF 型双極細胞にあることを示唆している。今回の実験では水平細胞か OFF 型双極細胞かのいずれかに特定することはできないが、もし赤-緑チャンネルの部位が水平細胞にあるとすると、霊長類の水平細胞は視細胞への極性反転性フィードバック機能を持たず、色覚に関与していないとする報告と矛盾する。一方で、水平細胞からのフィードバックが視細胞のシナプスゲインを増大させることが最近報告され、より強く興奮している錐体が、水平細胞を介して他の錐体を抑制することも考えられる。即ち、赤-緑チャンネルの形成を水平細胞からの抑制性のフィードバックによって説明することが可能であり、申請者らの実験結果はこれを支持するものである。

審査委員会では、今日においても未だ明らかとなっていない霊長類等高動物の色覚識別メカニズムにおいて、ERG の各錐体成分の PCA による抽出という申請者独自の分析法を用いて、水平細胞の抑制性フィードバックを介した赤-緑チャンネルの形成という仮説を導き出した点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) APB 及び PDA が作用する受容体は何か
- 2) NMDA ブロッカーのケタミンを用いて鎮静した影響は考えられないか
- 3) 双極細胞同士のシナプスで極性反転フィードバックを説明できないか
- 4) 赤錐体と緑錐体に結合した双極細胞は赤-緑チャンネルになり得ないか
- 5) 双極細胞-神経節細胞が赤-緑チャンネルの候補でないと考える根拠は
- 6) APB が錐体から ON 型双極細胞への伝達を遮断し、PDA が OFF 型双極細胞と水平細胞への伝達を遮断するという明確な根拠は何か
- 7) 視細胞の膜電位を形成するイオンチャンネルは何か
- 8) 一般的な選択的ブロッカーを使わなかった理由
- 9) 水平細胞の作用を考えるならば GABA<sub>A</sub> ブロッカーを使うべきではないか
- 10) 硝子体内薬物濃度はどのように測定したか、また希釈を考慮にいったか
- 11) ERG の b 波の3峰性が赤-緑反対色相互作用の特徴といえる理由
- 12) PCA による各錐体成分の抽出は申請者のオリジナルか
- 13) ERG に代わる新しい測定法の可能性はあるか

