

Title	培養ニワトリ網膜色素上皮細胞の経上皮的水輸送に関する因子
Author(s)	切通, 彰
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36591
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	きり 切	とおし 通	あきら 彰
学位の種類	医	学	博士
学位記番号	第	8496	号
学位授与の要付	平成元年3月10日		
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		
学位論文題目	培養ニワトリ網膜色素上皮細胞の経上皮的水輸送に関する因子		
論文審査委員	(主査) 教授 真鍋 禮三		
	(副査) 教授 鎌田 武信 教授 吉田 博		

論文内容の要旨

〔目 的〕

網膜色素上皮は、網膜の最外層に位置する単層の上皮組織で、感覚網膜の機能維持に重要な役割を果たしている。その生理機能の一つに網膜下液の脈絡膜側への輸送が挙げられる。この水輸送は少なくとも一部分はエネルギー依存性の現象と考えられているが、そのメカニズムは現在も明らかではない。そこで、培養した網膜色素上皮が単層の培養細胞下に水を溜める現象（ドーム形成）を指標として、新たな水輸送の実験系を確立し、これを用いて網膜色素上皮における水輸送の制御のメカニズムを検討した。

〔方 法〕

1) 使用した細胞および細胞培養の方法

使用した細胞は、受精後14日目のニワトリ卵より採取した。眼球後半部より網膜色素上皮層を分離し dispase を含む培養液にて個々の網膜色素上皮細胞を得た。これらの細胞をカバーガラスを底に敷いた24穴の培養皿に生着させた。

2) ouabain, 2,4-dinitrophenol を培養開始後72時間で培養液に添加し、添加直前・添加後24時間のドーム数の変化を測定した。

3) acetazolamide, furosemide のドーム形成に対する効果を上記2)の方法にて観察した。

4) isoproterenol, dipivalylepinephrine 及び dibutyryl c-AMP のドーム形成に対する効果を上記2)の方法にて測定した。

5) dipivalylepinephrine による網膜色素上皮細胞内の c-AMP の濃度変化の測定。

初代培養後72時間経過した網膜色素上皮に 10^{-5} M の dipivalylepinephrine を30分間作用させ、

6%トリクロル酢酸にて c-AMP を抽出しサクシニル化した後、radioimmunoassay にて c-AMP の濃度を測定した。

〔成績〕

- 1) 初代培養された網膜色素上皮細胞は、48~72時間後にドームを形成した。これらのドームは多数の細胞で構成され、培養後4~5日までその数および個々の大きさを増大させた。培養後72時間では、培養皿の1穴当たり10~40個のドームが形成された。この時点を基準にしたその後のドーム数の変化は、24時間後+18.1%、48時間後+11.9%、72時間後-8.4% (平均値) であった。そこで実験では、対照のドーム数の変化が+20%~-10%であった培養皿に限りデータとして採用した。
- 2) ouabainを終濃度 10^{-6} Mから 10^{-4} Mにて培養液に添加すると、ドームは24時間以内に消滅した。 10^{-7} Mでは形成されたドームに影響はなかった。終濃度 10^{-6} Mから 10^{-4} Mでは一旦消失したドームはouabainを除去してやると、72時間以内に再出現した。2,4-dinitrophenolもまた終濃度 10^{-5} M~ 10^{-3} Mで、ドームを消滅させた。しかし薬物を除去してもドームは再出現しなかった。
- 3) acetazolamide (終濃度 10^{-6} M~ 10^{-3} M) を投与した結果は、全濃度においてドーム数に有意な変化は認めなかった。しかし、furosemide (終濃度 10^{-5} M~ 10^{-2} M) ではドーム数を有意に減少させていた。
- 4) isoproterenol ではドーム数に対して有意な変化は認められなかった。epinephrine の pro-drug である dipivalylepinephrine では 10^{-6} M~ 10^{-4} Mでドーム数を有意に増加させていた。dibutyryl c-AMP を終濃度 10^{-6} M~ 10^{-3} Mにて添加すると、ドーム数はコントロールと比較して有意に増加していた。
- 5) dipivalylepinephrine を添加した培養網膜色素上皮細胞内の c-AMP の濃度は、 14.07 ± 11.37 pmol/ μ g (n=6) でコントロールの 1.64 ± 0.52 pmol/ μ g (n=5) と比較して5%以下の危険率で有意に上昇していた。

〔総括〕

培養した網膜色素上皮細胞がその本来の機能である能動的な水輸送の機能を有していることが確認された。この水輸送はNaイオンと共にClイオンの動きと密接な関係があることが明らかになった。また、アドレナリン系作動薬である dipivalylepinephrine でも水輸送を促進することが明らかになった。これは isoproterenol が無効であったことを考え合わせると、レセプターが細胞の basal 側にあることを示唆している。また、この作用は細胞内 c-AMP を介して行われていることも確認できた。

論文の審査結果の要旨

本研究は、培養された網膜色素上皮細胞を用いて、その水輸送現象を検討する上で、新たな実験系を確立し、これを用いて網膜色素上皮の水輸送におけるイオン輸送との関連、またアドレナリン系 β アゴニストおよびサイクリックAMPの役割について調べたものである。

著者はまず、単離したニワトリの網膜色素上皮細胞が、培養下にドームを形成する現象を指標として、新たな水輸送の実験系を確立した。次にこれを用いて、網膜色素上皮の水輸送が、従来報告されていたNaイオンと共にClイオンの動きと密接な関係があることを示した。また、アドレナリン系βアゴニストによっても水輸送を促進すること、このレセプターは細胞の基底膜側に存在する可能性が高いことを明らかにした。同時にこのβアゴニストの作用は、細胞内サイクリックAMPを介して行われていることを確認した。

以上の結果は、網膜色素上皮細胞の水輸送現象のメカニズムを理解し、網膜剥離や他の網膜色素上皮疾患を理解、治療する上で、その基盤となるものであり、学位授与に値する。