



Title	Co-localization of adrenergic receptors and vitamin-D-depen-dent calcium-binding protein (calbindin) in the dopaminergic amacrine cells of the rat retina
Author(s)	石本, 一郎
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37470">https://hdl.handle.net/11094/37470</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・（本籍）	いし　　もと　　いち　　ろう 石　　本　　一　　郎
学位の種類	医　　学　　博　　士
学位記番号	第　　9 5 5 7　　号
学位授与の日付	平成 3 年 3 月 5 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	Co-localization of adrenergic receptors and vitamin-D-dependent calcium-binding protein (calbindin) in the dopaminergic amacrine cells of the rat retina (網膜ドーパミン作動性細胞におけるアドレナリンレセプターならびに Vitamin-D-dependent calcium-binding protein の共存)
論文審査委員	(主査) 教　授　真鍋　　禮三 (副査) 教　授　和田　　博　　教　授　遠山　正彌

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### (目　　的)

網膜は中枢神経系の一部で視受容細胞である視細胞により感受した視覚刺激を双極細胞・神経節細胞・視神経を介して視覚中枢に伝達する重要な感覚器である。視細胞・双極細胞・神経節細胞の細胞体それぞれは外顆粒層・内顆粒層・神経節細胞層に存在し、各細胞間の刺激伝達はこちらの細胞層の間にある神経線維層である外網状層・内網状層において行われ、外網状層においては水平細胞・interplexiform細胞により、内網状層においてはアマクリン細胞・interplexiform細胞による修飾を受けていると考えられている。中枢神経系と同じくアセチルコリン・各種アミン・アミノ酸・神経ペプチドが網膜における神経伝達物質あるいは神経修飾物質として機能していると考えられているが、網膜神経線維網のなかでこれら各物質含有細胞の相互関連についてはほとんど知られていない。ドーパミン作動性細胞の形態学的特徴に関する論文は多数あるが、この細胞に入力している神経終末がどのような神経伝達物質を含むのかは未だ明らかでない。これを明らかにするため $\beta_2$ -アドレナリンレセプター (AdR) に対する抗体と、ドーパミン細胞の指標である tyrosine hydroxylase (TH) に対する抗体とを用いた免疫組織化学的二重染色法により、ドーパミン作動性細胞がアドレナリン作動性細胞による神経支配を受けているか否かを検討した。また、Vitamin-D-dependent calcium-binding protein (calbindin) 免疫活性がラット網膜のドーパミン作動性細胞に存在するか否かも検討した。

#### (方　　法)

実験動物としてはウイスター系ラットを用い、ザンボン液にて固定後クリオスタットにて $5\mu$ の連続切片を作成した。カテコールアミンの証明にはマウス抗THモノクローナル抗体を用いた。抗 $\beta_2$ -

AdR 抗体は精製  $\beta_2$ -AdR を使用して家兎で作成した。この抗体の抗体価は E L I S A 法・免疫沈降反応にて確認したがラット  $\beta_1$ -AdR とも交叉が認められた。オートラディオグラフィーでは  $\alpha_2$ -AdR・ドーパミンレセプター・ムスカリン様コリンレセプター・ロドプシンレセプターとの間に極くわずかな交叉反応が認められたが、 $\alpha_1$ -AdR との間にはほとんど認められなかった。特異性は吸収試験によっても確認した。抗 calbindin 抗体は羊を用いて作成しその特異性は吸収試験にて確認した。

TH-ならびに AdR-免疫活性の共存・TH-ならびに calbindin-免疫活性の共存は二重染色法を用いて証明した。すなわち  $\beta_2$ -AdR・calbindin は F I T C で、TH は Texas red でラベルし、異なった励起下で観察した。

## (結 果)

### 1. 網膜内局在

TH免疫陽性 (TH-I R) 細胞は内顆粒層のみ認められ、これらは  $20\mu$  のアマクリン細胞 (あるいは interplexiform 細胞) で  $10\mu$  以下のアマクリン細胞には TH-I R は認められなかった。TH-I R 線維は主に内網状層に認められ、もっとも強い反応は sublayer 1 に見られ、一部は sublayer 3 に、また sublayer 5 にも極くわずかに見られた。外網状層にも極くわずかに認められた。

AdR 免疫陽性 (AdR-I R) 細胞は網膜に広く認められたが、その多くは内顆粒層と神経節細胞層に認められた。内顆粒層においては大多数は内側部に位置し、免疫反応は細胞表面の点状蛍光として認められた。しかし  $20\mu$  以上の細胞の一部で細胞表面のみでなく細胞質も染色された。神経節細胞層では各サイズの細胞が標識され、細胞表面だけでなく細胞質も染色された。大きな神経節細胞では内網状層に延びる太い樹状突起起始部ならびにこれに連なる細胞質が強く染色された。AdR-I R 線維は認められなかった。

Calbindin 免疫陽性細胞は水平細胞とアマクリン細胞で、calbindin 陽性アマクリン細胞は  $10-20\mu$  と大きさは様々であった。

### 2. 共存

全ての TH-I R 細胞には AdR-I R が共存したが、 $10\mu$  以下の AdR-I R 細胞には TH-I R は共存せず、大型の AdR-I R 細胞のほとんどには TH-I R が共存していた。大型の calbindin 陽性アマクリン細胞の一部には TH-I R が共存していた。

## (総 括)

THならびに  $\beta_2$ -AdR に対する抗体を用いて TH-I R ならびに AdR-I R が大型のアマクリン細胞 (あるいは interplexiform 細胞) に共存することが明らかとなり、ドーパミン作動性細胞とアドレナリン作動性細胞の間に深い関係がある。すなわちアドレナリン作動性細胞より放出されたアドレナリンがドーパミン細胞のシナプス後構造にある AdR に結合し神経伝達物質あるいは神経修飾物質として作用する可能性が示唆された。また TH-I R 細胞が calbindin 免疫反応性を有することが明らかとなり、calbindin がドーパミン作動性細胞の後シナプス部において重要な役割を演じている可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

網膜は中枢神経系の一部で、視細胞にて感受した視覚刺激を双極細胞・神経節細胞さらにその軸索である視神経を介して視覚中枢に伝達する重要な感覚器であり、各細胞間の刺激伝達は、外網状層では水平細胞・interplexiform細胞による、内網状層ではアマクリン細胞・interplexiform細胞による修飾を受けていると考えられている。この網膜には中枢神経系と同じくアセチルコリン・各種アミン類・アミノ酸類・神経ペプチド類が存在し神経活性物質として機能していると考えられているが、これら各物質含有細胞の相互関係についてはほとんど知られていない。本研究ではこの相互関係を知るためドーパミン作動性細胞がアドレナリン作動性細胞より入力を受けているか否かを $\beta_2$ -アドレナリンレセプター(AdR)に対する抗体を用い検討している。

ラット網膜を用い、ドーパミン作動性細胞は抗 tyrosine hydroxylase (TH) 抗体を、AdR は抗 AdR 抗体を、calbindin は抗 calbindin 抗体を用いて標識し、共存の証明には二重染色法を用いている。この方法により TH と AdR が大型のアマクリン細胞 (interplexiform 細胞) に共存することが明らかとなり、アドレナリン作動性細胞より放出されたアドレナリンがドーパミン作動性細胞にある AdR に結合し、神経活性物質として作用する可能性を示している。また、TH 陽性細胞に Vitamin-D-dependent calcium-binding protein (calbindin) が共存することを認め、ドーパミン作動性細胞の後シナプス部において calbindin が重要な役割を演じていることが示唆されている。

以上の研究は網膜に存在するドーパミン作動性・アドレナリン作動性細胞という異なった種類の細胞がシナプスを有することを明らかにしたもので、複雑な網膜神経線維網の解明に有用であり、学位授与に値するものである。