



Title	Phagocytosis by human retinal glial cells in culture
Author(s)	真野, 富也
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37581">https://hdl.handle.net/11094/37581</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">〈a href="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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	ま 真	の 野	とみ 富	や 也
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9 2 4 0	号	
学位授与の日付	平 成 2 年 5 月 14 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	Phagocytosis by human retinal glial cells in culture (培養ヒト網膜グリア細胞による貪食)			
論文審査委員	(主査)			
	教授	真鍋	禮三	
	(副査)			
	教授	橋本	一成	教授 遠山 正弥

## 論文内容の要旨

### 〔目的〕

網膜グリア細胞による貪食は網膜の病理に深く関わっている。種々の網膜疾患において網膜グリア細胞による貪食がみられることが組織学的な検索により示唆されているが、貪食能の調整機構に関しては全く解明されていない。そこで、培養ヒト網膜グリア細胞を用いて貪食能とその調整機構について調べた。

### 〔方法〕

細胞培養：死後24時間以内に摘出された眼球より網膜を採取し、0.1% trypsin, 0.2% hyaluronidase, 4% chicken serumを加えたcalcium magnesium-free phosphate buffer液にて37度45分処理をした。その後、培養液(40% Dulbecco's modified Eagle's medium, 40% Ham's F-12 medium, 20% fetal bovine serum)中で機械的に網膜を細切し、35mm petri dishで、37度、3% CO<sub>2</sub>培養器で培養した。実験には3~5継代の細胞を使用した。

貪食能の測定：貪食物質としてfluorescent carboxyl microspheres (直径1.75μm)とヒト網膜の細切物を使用した。これらを35mm petri dishの単層培養細胞上加え、24時間培養後、洗浄し透過型電子顕微鏡の試料とした。一方、貪食能の定量にはflow cytometryを使用した。

fluorescent carboxyl microspheresを種々の濃度で35mm petri dishの単層培養細胞上加え、一定時間培養後十分洗浄し、trypsin処理をして浮遊細胞としflow cytometryの試料とした。

免疫組織化学：human glial fibrillary acidic protein (GFAP)と人網膜Muller細胞に対するmonoclonal抗体を用いてavidin-biotin-peroxidase complex法を行った。

## 〔結果〕

本実験で培養された細胞は免疫組織化学によりGFAP陽性およびMuller細胞に対するmonoclonal抗体に陽性で、網膜グリア細胞のひとつであるMuller細胞と同定された。ヒト網膜細切物と培養網膜グリア細胞を24時間培養後、電子顕微鏡にて観察すると、細胞質中に多数の網膜分解産物が貪食されていた。生物学的物質に加えて、medium中に加えられたfluorescent carboxyl microspheresも網膜グリア細胞の細胞質中に多数貪食されていた。この結果、培養ヒト網膜グリア細胞に貪食能が存在することが明らかとなった。

flow cytometryによる貪食能定量の結果、貪食細胞の割合ははじめの6時間で急速に増加し、その後18時間まで徐々に増加した。24時間から48時間の間では貪食細胞の割合はほとんど変化しなかった。一方、細胞1個あたりの蛍光量（細胞質内に貪食されたfluorescent microsphere数の指標）も同様の時間経過を示した。また、培養液中に加えるfluorescent microsphere数を増やすと貪食細胞の割合も細胞1個あたりの蛍光量もともに増加した。

種々の細胞において細胞外液中のcalcium ionが貪食に影響を及ぼすことが報告されているが、ヒト網膜グリア細胞でも細胞外液中のcalcium濃度を1.2 mMから0.2 mMに減じると貪食細胞の割合も細胞当たりの蛍光量もともに減少した。また、calcium channel blockerのnifedipineを10 $\mu$ M培養液に加えると、貪食細胞の割合も細胞当たりの蛍光量もともに減少した。また、細胞内cyclic AMPを増加させると網膜色素上皮細胞などで貪食能が低下することが知られているが、1 mMの8-bromo-cyclic AMPを添加することにより細胞内cyclic AMPを増加させると網膜グリア細胞においても貪食細胞の割合が減少し、細胞一個当たりの蛍光量も減少した。一方、10 nMの1,25-dihydroxyvitamin D3は網膜グリア細胞の貪食細胞の割合も細胞当たりの蛍光量もともに増加させた。

## 〔総括〕

ヒト網膜グリア細胞による貪食能を調べる培養系を確立した。この結果、培養ヒト網膜グリア細胞に貪食能が存在することが明らかとなった。そして、種々の物質が網膜グリア細胞の貪食の制御に関与していることが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

網膜グリア細胞による貪食は網膜の病理と深く関わっている。眼内異物や硝子体出血などの病態で網膜グリア細胞の一つであるMuller細胞による貪食作用が組織学的に示唆されていた。しかし、貪食能の調節機構に関しては全く解明されていなかった。そこで、本研究は培養系を用いて、網膜グリア細胞のMuller細胞について、貪食能とその調節機構について検討を行ったものである。

著者はまずeye bank eyeから網膜を採取し、培養を開始した。そして、この培養細胞に対して、免疫組織化学的手法を用いて、網膜グリア細胞の一つであるMuller細胞と同定している。つぎに、この培

養ヒトMuller細胞に貪食能があるかどうかを電子顕微鏡を用いて調べている。その結果、latex beadsだけでなく生物学的物質である網膜の分解物も貪食されることが明らかとなった。貪食能の定量にflow cytometryを使用し、細胞外液中のCaイオンを下げると貪食能が低下することを明らかにした。また、calcium channel blockerの一つであるnifedipineが貪食能を低下させ、Müller細胞による貪食にcalcium channelが関与していることも明らかにしている。さらに、貪食能を増強させるものとしてvitamin D3を発見している。

以上の研究結果は、ヒト網膜グリア細胞による貪食を研究する培養系を確立したもので、且つ、種々の物質がこの貪食能を調節していることを明らかとしたものであり、学位授与に値するものである。