



| | |
|--------------|---|
| Title | Monoclonal antibody C38 recognizes retinal ganglion cells in cats and rats. |
| Author(s) | 若林, 毅俊 |
| Citation | 大阪大学, 1996, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/39828 |
| 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。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

| | |
|------------|---|
| 氏名 | わかばやし たけとし 若林 毅 俊 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 第 12353 号 |
| 学位授与年月日 | 平成8年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻 |
| 学位論文名 | Monoclonal antibody C38 recognizes retinal ganglion cells in cats and rats. (モノクローナル抗体C38によるネコ及びラット網膜神経節細胞の同定) |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 福田 淳 (副査) 教授 田野 保雄 教授 三木 直正 |

論文内容の要旨

【目的】

成熟哺乳動物の網膜神経節細胞(RGCs)は、軸索を切断されると軸索を再生しないばかりか細胞体も逆行性変性に陥る。ところが切断端に末梢神経を吻合移植すると、変性が阻止され軸索をも再生する。このような実験では、生存するRGCsの数やその形態を調べるために、網膜伸展標本上での観察が必須である。この際、RGCsを同定するため蛍光色素等による逆行性標識が行われてきた。しかし、変性、再生といった長期にわたる実験では、色素の退色や、変性したRGCsからの色素漏出が起り、正確なRGCsの同定は困難であった。そこで本研究では、網膜伸展標本上でRGCsを識別できるようなモノクローナル抗体の作成を行った。さらに、軸索切断後に生存するRGCsの同定における、その抗体の有用性についても検討した。

【方法、ならびに成績】

成熟ラットの視神経を眼窩内で切断すると、2カ月後にはRGCsのみが選択的にほぼ完全に消失する。この網膜を採取し免疫抑制剤であるシクロフォスファミドとともにBalb/cマウスの腹腔内に注入すると、網膜を構成するRGCs以外の抗原に対し免疫学的寛容が導入される。その後正常ラットの網膜を同じマウスに注入し、免疫を立ち上げた。この方法によりRGCsに特異性の高い免疫が効率よく立ち上がると想定される。このマウスから脾臓を採取し、ハイブリドーマの作成に用いた。スクリーニングはラット網膜の垂直切片上で、間接蛍光抗体法にて行った。単離に成功したモノクローナル抗体のうち、C38と名付けた抗体についてさらに詳細に解析するため、ネコ及びラット網膜において垂直及び伸展標本の免疫染色を行った。また、C38が認識する抗原についての生化学的な情報を得るため、ウエスタンブロットを行った。

C38抗体を用いてネコ網膜の垂直切片を染色したところ、神経節細胞層(GCL)に存在する細胞の細胞体が染色された。細胞質が強く染色され、核及び細胞膜は染色されなかった。また神経線維層(NFL)も弱く染色された。内網状層(IPL)には2層の平行な線状の染色が認められ、その一部はGCLの細胞に連続していた。網膜伸展標本上では、C38抗体はGCLに存在する細胞体の直径が10~40 μ mの細胞を染色した。それらの細胞から軸索がNFLに伸びていた。C38抗体によって染色された細胞の網膜伸展標本上での密度分布は、Stone(1978)によるネコ網膜におけるRGCsの密度分布の報告とほぼ一致した。以上からC38抗体はネコ網膜においてほとんどすべてのRGCsを特異的に染色すると考えられた。

ラット網膜の垂直切片では、C38抗体はNFL, GCL, IPL, 内顆粒層の最外層および外網状層を染色した。GCLにある細胞の細胞体では、細胞質が強く染色された。網膜伸展標本ではGCL上の細胞が染色され、そこから軸索がNFLに伸びているのが観察された。細胞体の大きさは10~25 μ mに分布した。ラットGCLにはRGCs以外に異所性アマクリン細胞がほぼ同数存在する。そこで、RGCsをグラニューブルーで予め逆行性に標識しておき、これとC38で染色された細胞とを比較したところ、両者は90%以上が一致した。従って、C38抗体はラット網膜伸展標本上、GCLにおけるほとんどすべてのRGCsを特異的に識別すると判断した。

次に、ラットの視神経切断実験でのRGCs識別にC38抗体を利用できるかどうかを調べた。RGCsを逆行性標識したのち視神経を切断し、1.5カ月後の網膜伸展標本をC38抗体で染色した。逆行性標識では、色素漏出によりRGCs以外の細胞もラベルされた。一方、C38抗体はGCLにおいて、生存するRGCsのみを特異的に染色した。よってC38抗体は視神経切断実験において、生存するRGCsの同定に利用できると言える。

ウェスタンイムノブロットの結果、C38抗体の認識する抗原分子は分子量24kDaであり、神経系にのみ存在することが明らかとなった。C38抗体は、Thy-1.1抗体を含めすでに報告されているRGCs特異的抗体とは染色パターンおよび抗原の分子量の上で異なり、全く新しいRGCs特異的な分子を認識しているものと考えられる。

【総括】

RGCs特異的モノクローナル抗体の作成を行った。免疫抑制剤を併用することでスクリーニング効率の向上を図った。C38抗体は、ネコ、ラット網膜の伸展標本において正常なRGCsを特異的に染色するのみならず、軸索切断や軸索再生といった長期にわたる実験においても、生存するRGCsの網膜伸展標本上での識別に有用である。ネコ網膜ではRGCsに対する特異性が非常に高い抗体である。C38抗体の認識する抗原は分子量24kDaで神経系にのみ分布しており、既に報告されているRGCs特異的抗体の認識する分子とは異なるものである。

論文審査の結果の要旨

本研究では、神経節細胞以外の網膜組織に対して免疫抑制をかけることにより、効率よく神経節細胞の特異的モノクローナル抗体を作製することに成功した。作製されたモノクローナル抗体のうち、C38抗体がラット及びネコの網膜伸展標本上で神経節細胞を特異的に標識することを形態学的に明らかにし、さらにラット網膜においてはC38抗体は視神経切断後の逆行性変性過程においても残存する網膜神経節細胞の識別に有用であることを示した。また、このC38抗体は最近注目されている末梢神経移植による網膜神経節細胞の軸索再生に関する研究でも、生存する神経節細胞の特異的マーカーとして有用であることを示し、その意味でも本研究の意義は大きい。さらに、C38抗体が認識する抗原分子についての生化学的性質についても解析を進め、これまで網膜神経節細胞に存在すると報告されている既知の分子と異なる、新しい抗原分子であることを示した。C38抗原分子の解析は、将来、網膜神経節細胞の分化や発達の過程を分子レベルで追及してゆく上で有力な手がかりを与えるものと思われる。

以上、本研究は網膜神経節細胞の分子生物学的研究に大きく貢献したものとみなされ、学位に値するものと認められる。