

神経乳頭周囲の網膜神経線維層の平均厚みは視神経萎縮患者ではきわめて菲薄化しており、正常群と比べて有意に薄かった ($p < 0.001$)。特に、視神経萎縮患者の黄斑部神経線維層はきわめて菲薄化しておりほとんど検出できないほどであった。黄斑部視細胞層外節の厚みは視神経萎縮患者と正常群とで差はなかった ($p > 0.05$)。

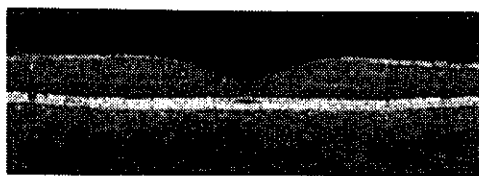


図1 正常眼の代表的OCT 3像

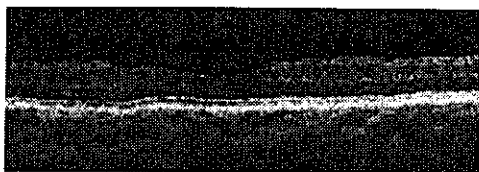


図2 視神経萎縮眼の代表的OCT 3像

D. 考察

2003年の認可により本邦でも使われるようになった新型の光干渉断層計(OCT 3)は、旧型よりもより高い解像度を持ち、網膜の層構造も美しく描出される。このため、視神経萎縮眼における検眼鏡的には認められない網膜の変化がOCT 3により捉えられるのではないかと、この仮説のもと、今回、視神経萎縮のうちでもOPA1遺伝子に異常が検出された視神経萎縮患者に対しOCT 3を用いた検査を行い結果を検討した。その結果、OCT 3により、優性遺伝視神経萎縮の患者では、網膜神経線維層が菲薄化しており、特に黄斑部において菲薄化が著しいことが検出された。また、2次的な上行性の変性は視細胞層外節にまでは及んでいない可能性がin vivoで示された。

E. 結論

OCT 3は視神経疾患の網膜厚、特に神経線維層の厚さの変化の把握に有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Nakamura M et al. Retinal and optic disc atrophy associated with a CACNA1F mutation in a Japanese family. *Arch Ophthalmol.* 121: 1028-33, 2003.
2. Guedes V et al. Optical coherence tomography measurement of macular and nerve fiber layer thickness in normal and glaucomatous human eyes. *Ophthalmology* 110:77-89, 2003.
3. Jaffe GJ et al. Optical coherence tomography to detect and manage retinal disease and glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 37:56-69, 2004.

53. ラット網膜障害後における神経再生の可能性

大音壮太郎¹⁾、赤木忠道¹⁾、影山龍一郎²⁾、秋田 穰¹⁾、万代道子^{1) 3)}、
本田孔士¹⁾、高橋政代^{1) 3)}

(¹⁾ 京都大、²⁾ 京都大ウィルス研、³⁾ 京都大探索医療センター)

研究要旨 目的：今回我々は、神経障害モデルを用いて、成体ラット網膜に再生する能力があることを観察したので報告する。

方法：NMDA を6週齢のラットの硝子体中に投与し、網膜に急性の障害を起こした。網膜障害後 BrdU を硝子体中及び腹腔内に投与し、免疫組織化学により細胞の分裂を調べた。また、外的因子としてレチノイン酸を硝子体中に投与し、分裂細胞に及ぼす影響を調べた。更に内的因子としてレトロウィルスベクターを用いて bHLH 型及びホメオボックス型の転写因子を分裂細胞に強制発現させ細胞の運命決定に与える影響について検討した。

結果：網膜障害後 2 日目に内顆粒層に分裂細胞がみられ、免疫染色よりこれらは全てミューラー細胞と思われた。分裂細胞は神経前駆細胞のマーカーを発現し、時間経過とともに一部は外顆粒層に遊走した。網膜障害後 4 週間において、分裂細胞の一部は双極細胞及び視細胞に特異的なマーカーを発現した。また、分裂細胞に Pax6 と NeuroD, Pax6 と Math3 を同時に強制発現させるとアマクリン細胞への分化が促進し、Crx と NeuroD を強制発現させると視細胞への分化が促進された。

考察：成体哺乳類の網膜において、急性障害後神経再生が起こることが示された。更に、内的因子によって再生された神経細胞の運命をある程度コントロールすることが可能である。

A. 研究目的

一般に哺乳類の網膜においては、神経再生は起こらないとされてきた。しかし近年、成体哺乳類の毛様体辺縁部に網膜幹細胞が存在することがわかり、成体網膜における神経再生の可能性が示された¹⁾。また、生後 7 日めのニワトリを用いた実験で、網膜障害に反応してミューラー細胞が前駆細胞様の働きを持ち、一部はニューロンに分化したとの報告がみられた²⁾。そこで我々は成体のラットで急性網膜障害後の神経再生の可能性を検討した。

B. 研究方法

N-methyl-D-aspartate (NMDA) を6週齢の SD ラットの硝子体中に 200 nmol 投与し、網膜に急性の障害を起こした。網膜障害後 BrdU を硝子体中に 30nmol 及び腹腔内に 150mg/kg 投与し、免疫組織化学により細胞の分裂を調べた。また障害後 2, 3, 7, 14, 28 日における分裂細胞の状態を、免疫組織化学により検討した。更に網膜障害後器官培養を行い、レトロウィルスベクターを用いて Homeobox 遺伝子や bHLH 遺伝

子を強制発現させて、分裂細胞の運命決定に及ぼす影響を調べた。

(倫理面への配慮) この研究における動物使用に関しては、京都大学医学研究科動物実験委員会の承認を得て、ガイドラインに準じて行った。

C. 研究結果

NMDA 投与後 2 日目に BrdU を投与したものにおいて、網膜切片中に BrdU 陽性の細胞が認められた。以後の実験は全て、NMDA 投与後 2 日目に BrdU を投与した。分裂している細胞が何であるか調べるため、Glutamine Synthetase (GS; ミューラー細胞のマーカ―)を用いて免疫染色したところ、障害後 2 日目の細胞は全てミューラー細胞であることがわかった。ところが障害後 3 日目において GS を発現しない分裂細胞が見られ、時間経過とともにその割合は上昇し、他の細胞に convert していることが示唆された。

次に分裂しているミューラー細胞が前駆細胞様の性質を持つかどうかを検討するため、nestin (神経前駆細胞のマーカ―)にて免疫染色したところ、障害後 2 日目において nestin が発現し、GS と重なるものが多く、ミューラー細胞が前駆細胞様の性質を獲得したことが示唆された。

上述したように時間とともに BrdU と GS が二重染色される細胞は減少していくが、障害後 14 日、28 日において、一部には PKC (bipolar cell のマーカ―)やリカバリン (視細胞のマーカ―)といった神経網膜のマーカ―と二重染色される細胞が認められた。しかしこうした神経細胞に分化した細胞は非常に少なく、その効率をあげるべく網膜

の神経細胞の運命決定に関わっている Homeobox 型や bHLH 型の転写因子をレトロウイルスベクターを用いて強制発現させて、分裂細胞の運命をコントロールできるかを調べた。レトロウイルスは分裂細胞にのみ感染するため、障害後 2 日めに感染させた細胞はミューラー細胞と考えられる。2 週間の培養の後、NeuroD および Math3 を強制発現させた細胞の一部がアマクリン細胞のマーカ―HPC-1 を発現し、Pax6 と同時に発現させることによりアマクリン細胞への分化が促進された。また、Math3 と Pax6 を同時に発現させると水平細胞のマーカ―calbindin を発現するものがみられ、ミューラー細胞から水平細胞への分化が示唆された。更に、NeuroD と Crx を同時に発現させると、視細胞のマーカ―RETP-1 の発現が促進し、視細胞への分化が促進されることが示唆された。

D. 考察

ミューラー細胞は網膜神経細胞の支持、代謝といった役割を担っているが、このように緊急時には神経網膜の再生に働く可能性をもっている。哺乳類の成体でこのような内在性網膜前駆細胞となりうる細胞が確認できたことは、将来の網膜再生を目指す上で非常に重要な意味をもつと考える。

E. 結論

成体哺乳類の網膜において、急性障害後神経再生が起こることが示された。更に、内的因子によって再生された神経細胞の運命をある程度コントロールすることが可能である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ooto S et al: Induction of the Differentiation of Lentoids from Primate embryonic Stem Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:2689-2693, 2003

2. 学会発表

S.Ooto et al: Induction of the differentiation of Lentoids from Primate Embryonic stem Cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Tropepe, V. et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287: 2032-6, 2000.
2. Fischer, A.J. & Reh, T.A. Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina *Nat Neurosci.* 4: 247-52, 2001.

54. 家兎における視神経乳頭刺激型電極による人工視覚の検討

坂口裕和、不二門尚、神田寛行、小山内実、方 肖雲、生野恭司、中内一揚
瓶井資弘、大路正人、八木哲也、田野保雄
(大阪大)

研究要旨 目的：人工視覚における刺激方式には大脳皮質刺激、網膜上、下からの網膜刺激、我々が考案した強膜脈絡膜間、強膜内からの網膜刺激など、様々な方式が提案されている。今回我々は、視神経乳頭に刺入設置した電極により視神経に電流刺激を加えることで人工視覚を誘発することが可能か否かを家兎眼を用いて検討した。方法：刺激電極として直径 200 μ m の針型白金電極を用いた。顕微鏡下にて、強膜創より電極を眼内に挿入し、先端部を視神経乳頭に刺入した。電流刺激には単相および複相型パルス刺激を用いた。電流刺激時に、後頭部視覚野より誘発電位を記録した。結果：針型白金電極を安全に視神経乳頭内に設置することができた。電流刺激により、視覚野上から誘発電位を測定記録することが可能であった。刺激電流の閾値は単相および複相型パルス刺激でそれぞれ $10 \pm 0 \mu$ A および $20 \pm 8.2 \mu$ A (0.5ms) であった。組織学的に、電気刺激によると思われる組織障害は認めなかった。結論：視神経乳頭刺激型電極による視神経刺激は安全で有用な人工視覚の誘発法となり得る可能性が示唆された。

A. 研究目的

人工視覚における刺激方式には大脳皮質刺激、網膜上、下からの網膜刺激、我々が考案した強膜脈絡膜間、強膜内からの網膜刺激など、様々な方式が提案されている。今回我々は、視神経乳頭に刺入設置した 2 本の電極により視神経に電流刺激を加えることで人工視覚を誘発することが可能か否かを家兎眼を用いて検討した。

B. 研究方法

刺激電極として直径 200 μ m の針型白金電極を用いた。強膜創を 2 箇所作成し、それぞれから電極を挿入し、顕微鏡下にて先端部を視神経内に約 0.7-0.8mm 刺入した。電流刺激には単相および複相型パルス刺激を用

いた。電流刺激時に、後頭部視覚野上の頭蓋骨に設置したネジ型埋め込み電極より誘発電位を記録した。

C. 研究結果

針型白金電極を安全に視神経乳頭内に設置することができた(図1)。電流刺激により、視覚野上から誘発電位を測定記録することが可能であった(図2)。刺激電流の閾値は単相および複相型パルス刺激でそれぞれ $10 \pm 0 \mu$ A および $20 \pm 8.2 \mu$ A (0.5ms) であった ($n=4$)。電流刺激による誘発電位は視覚誘発電位の波形に類似しており(図3)、その潜時 10.9 ± 3.2 ms および 11.9 ± 2.4 ms は視覚誘発電位の潜時 29.5 ± 4.2 ms に比較して有意に短いものであった ($n=4$, p

く.05)。組織学的に、電気刺激によると思われる組織障害は認めなかった(図4)。

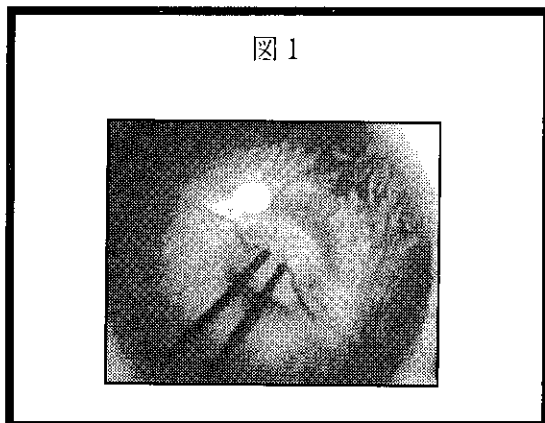


図1 針型電極視神経挿入時の眼底写真

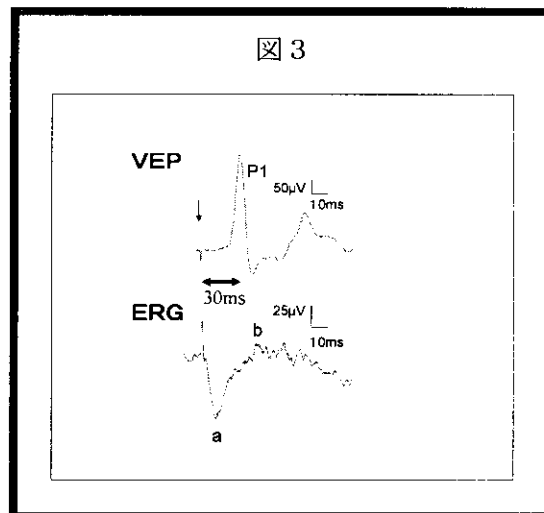


図3 視覚誘発電位 VEP と網膜電図 ERG

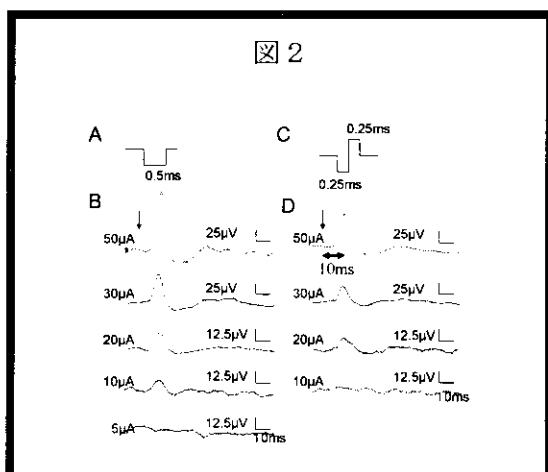


図2 視神経電気刺激時の視覚野誘発電位

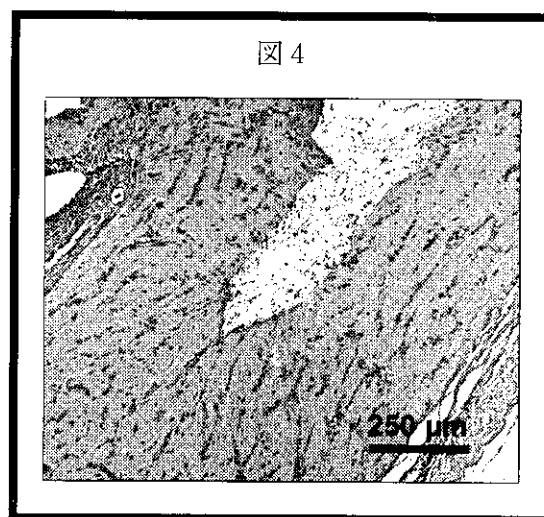


図4 視神経組織所見

D. 考察

視神経刺激型電極からの電流刺激により視覚誘発電位と同形の波形が得られたことより、進行した網脈絡膜疾患の患者においてもこの電極からの刺激により、誘発電位が得られる、つまり光の認知が得られる可能性がある。

他の刺激方法と比較すると、視野については、網膜型の電極が視覚 10° 程度なの

に対し、視神経刺激型の場合、ほぼ全視野を得られる可能性がある。

また、網膜型電極ではその設置、留置時の網膜剥離などの合併症、また大脳皮質刺激型電極ではその設置時の脳外科的手術における合併症などを考慮する必要があるが、我々の方法ではそれらの可能性は小さい。

以上より、視神経刺激型電極による刺激方法は有用であると考えられる。

また、今後、分解能を向上させるために電極数を増やし、長期留置実験を施行し、電極留置または視神経電気刺激が視神経に及ぼす影響を検討する必要があると考えられる。

E. 結論

視神経乳頭刺激型電極による視神経刺激は安全で有用な人工視覚の誘発法となり得る可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

現在投稿中

2. 学会発表

第 208 回日本眼科学会総会にて発表予定

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許出願番号：特願 2002-354330 号

出願日：平成 14 年 12 月 5 日

発明の名称：「人工視覚システム」

発明者：田野保雄，不二門尚，福田 淳、
八木哲也 以上 4 名

出願国：日本

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Dobelle WH, Miadejovsky MG.

Phosphenes produced by electrical

stimulation of human occipital cortex, and their application to the development of a prosthesis for the blind. *J. Physiol.* 243:553-76, 1974.

2. Zrenner E. Will retinal implants restore vision? *Science* 295:1022-5, 2002.
3. Veraart C, Raftopoulos C, Mortimer JT, et al. Visual sensations produced by optic nerve stimulation using an implanted self-sizing spiral cuff electrode. *Brain Res.* 813:181-6, 1998.
4. Chow AY, Chow VY. Subretinal electrical stimulation of the rabbit retina. *Neurosci Lett.* 225:13-6, 1997.
5. Zrenner E, Miliczek KD, Gabel VP, et al. The development of subretinal microphotodiodes for replacement of degenerated photoreceptors. *Ophthalmic Res.* 29:269-80, 1997.
6. Eckmiller R. Learning retina implants with epiretinal contacts. *Ophthalmic Res.* 29:281-9, 1997.
7. Walter P, Szurman P, Vobig M, et al. Successful long-term implantation of electrically inactive epiretinal microelectrode arrays in rabbits. *Retina* 19:546-52, 1999.
8. Humayun MS, de Juan E Jr, Dagnelie G, et al. Visual perception elicited by electrical stimulation of retina in blind humans. *Arch Ophthalmol.* 114:40-6, 1996.

55. 大型動物における視細胞変性モデル作成と視機能評価システムの開発

近藤峰生、上野真治、寺崎浩子、三宅養三
(名古屋大)

研究要旨

人工網膜の動物実験に重要な動物モデルとして、ヒトに近い中-大動物（ウサギ、ブタあるいはサル）における簡易な視細胞変性モデルの作成を確立させること、およびそのような動物から他覚的な視機能測定法を確立することを目的とした。簡易かつ確実に視細胞変性モデルを作成する手段としてMNU（N-methyl-N-nitrosourea）を用い、ラットに60mg/kgの全身投与で完全な視細胞変性が一週間で作成できることを確認した。次にMNUを硝子体内に投与して片眼のみの視細胞変性モデル作成を試みたが、MNUの硝子体内投与では変性は全く惹起できなかった。また、大動物における視機能評価としてアカゲザルを用い、全身麻酔の状態で眼底直視下にて目的とする部位のみを光刺激して、局所刺激による網膜電位図（ERG）および視覚誘発電位（VEP）が測定できる実験システムを確立した。

A. 研究目的

人工網膜を実際に臨床応用する前段階として、比較的ヒトに近い網膜を有する中-大動物における移植および視機能評価実験が重要である。この場合、正常な網膜に対する移植実験だけでは十分とはいえ、実際に網膜変性、特に人工網膜が適応となるような重度の網膜外層変性を有する動物モデルに対する実験が鍵となる。使用する動物としてはウサギ、イヌ、ネコ、ミニブタなどが考えられるが、最終的にはヒトとほぼ同じ網膜構造および機能をもつサルを使用することが必要になる。本研究の目的は、人工網膜移植実験に使用できるような中-大動物視細胞変性モデルの簡単な作成方法を確立すること、またそのような動物の視機能を他覚的に評価す

る方法を確立することである。

B. 研究方法

(i) 血行性薬物投与による視細胞変性モデルの作成

全身投与により視細胞変性を惹起させる薬物としてMNU（N-methyl-N-nitrosourea）を選択した。白色ラットに完全な視細胞を惹起させるMNUの投与量を調べる目的で、白色ラット（SDラット、8w）に種々の濃度のMNUを0.05%酢酸を滴下した生理食塩水に溶解させて腹腔内投与し、1週後に網膜機能を網膜電位図（ERG）を用いて測定し、また網膜組織作成した。

(ii) 硝子体内薬物投与による視細胞変性モ

デルの作成

上記の方法にてほぼ完全な視細胞変性モデルが作成できたとしても、この方法では両眼性視細胞変性となる。ブタやサルに両眼性の完全視細胞変性を作成すると、少なくとも実験期間中は動物は両眼完全失明となり、実験動物に対する倫理面を配慮するとこの方法は好ましい方法とはいえない。そこでMNUを片眼の硝子体内に直接投与し、網膜変性がおこるかどうかを観察した。(i)と同様に1週後に網膜機能を網膜電図(ERG)を用いて測定し、また網膜組織をメタカルンで固定後パラフィンで固定して4 μ m切片を作成した。

(iii) 大動物における視機能を他覚的に評価するシステムの確立

3歳と4歳の雄アカゲザル(*macaca mutata*)を使用した。麻酔にはケタミン(7 mg/kg)とキシラジン xylazine (0.6 mg/kg)の筋注を用いた。網膜局所刺激に対するERGとしては、赤外線眼底カメラに15度径のスポット刺激を組み込み、直接眼底を観察しながら任意の網膜部位を刺激して512回加算で局所ERGを記録した。また視覚誘発電位記録(VEP)は上記の網膜全視野刺激もしくは局所スポット刺激を用い、inionから1cm上の頭皮に置いた針電極により256回加算でVEPを記録した。

C. 研究結果

(i) 全身性薬物投与による視細胞変性モデルの作成

白色ラットにMNUを腹腔内投与し、1週後に網膜電図(ERG)と網膜組織切片で網膜を調べ

たところ、60 mg/kgの投与でほぼ完全な視細胞変性がおこることが確認された。この投与量ではERGは杆体成分、錐体成分とも全ての刺激強度で全く記録されず、またVEPも全く反応は認められなかった。組織学的にも視細胞層の完全な消失が確認された。視細胞層より内層の網膜構造は比較的保たれていた。

(ii) 硝子体内薬物投与による視細胞変性モデルの作成

実験動物に対する倫理面を考慮し、片眼性の完全視細胞変性モデル作成の目的で硝子体内にMUNを投与した。しかしどの投与量においても網膜変性は惹起されなかった。以上の結果により、MNUは血行投与で視細胞変性をおこすが、硝子体内投与では全く変性を惹起させないことがわかった。

(iii) 大動物における視機能を他覚的に評価する手段の研究

ヒトと2頭のアカゲザルの黄斑部を15度のスポット刺激によって局所ERGを記録したところ、サルとヒトのERGが非常に類似していることがわかった。また、全身麻酔下のサルからも比較的再現性のよい局所ERGおよびVEPが記録できることもわかった。

D. 考案

MNU60mg/kgの単回投与のみで、両眼に完全な視細胞変性がおこることが確認された。

しかし、目標がサルやブタといった大動物でとなると、長期間両眼失明の状態とすることは倫理的側面より避けなければならない。MNUを硝子体内注射することで片眼性視細胞障害モデル作成を試みたが、高濃度投与によ

っても変性を惹起させることはできず、MNUは血行性投与でなければ視細胞障害をおこさないことがわかった。

今後は、他の方法としてサルやブタの片眼に強力な光を長時間与える方法、硝子体内に視細胞毒性のある薬物を投与する方法、視細胞に特異的な蛋白に対する抗体を硝子体注入する方法などを検討したいと考えている。

E. 結論

MNU (N-methyl-N-nitrosourea) は 60mg/kg 全身投与で完全な視細胞変性モデルが一週間で作成できるが、硝子体内に投与では変性は惹起できず、大動物における視細胞変性モデルには適さないことがわかった。また、大動物における視機能評価としてアカゲザルを用い、眼底直視下にて目的とする部位のみを光刺激して、局所刺激による網膜電位図(ERG) および視覚誘発電位が安定して記録できることを確認した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kondo M et al: Foveal thickness in occult macular dystrophy. *Am J Ophthalmol* 134: 725-728, 2003.
2. Kiuchi K et al. Functional rescue of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinopathy by nicotinamide in Sprague-Dawley rats. *Curr Eye Res*

26: 355-362, 2003.

3. Piao CH et al: Multifocal electroretinograms in X-linked retinoschisis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 4920-4930, 2003.
4. Kondo M et al. Peripheral cone dystrophy: A variant of cone dystrophy with predominant dysfunction in the peripheral cone system. *Ophthalmology*, in press.
5. Ueno S et al: Luminance dependence of neural components that underlies the primate photopic Electretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. in press.

2. 学会発表

1. Kondo M et al: Complete type of congenital stationary night blindness: Puzzling macular function. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. Nagoya, Japan, 2003.
2. Kondo M et al. Occult macular dystrophy in children. The Western Hemisphere of International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. Fort Lauderdale, Florida, USA, 2003.
3. Kiuchi K et al. Functional rescue of N-Methyl-N-nitrosourea-induced retinopathy by nicotinamide in Sprague-Dawley rats. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). Fort Lauderdale, Florida, USA, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

なし

厚生労働科学研究研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

**網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究
平成15年度 総括・分担研究報告書**

平成16年3月31日 印刷・発行

発行者 厚生労働省難治性疾患克服研究事業
網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究班

主任研究者 石橋達朗

福岡市東区馬出3-1-1
九州大学医学部 眼科学教室
TEL 092-642-5648 (直通)
FAX 092-642-5663
E-mail fumie@eye.med.kyushu-u.ac.jp

印刷所 (株) 津村愛文堂
福岡市早良区室見2-16-8
TEL 092-821-0173 FAX 092-831-3329
E-mail:t-aibundo@h3.dion.ne.jp