

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

新しい無侵襲的網膜機能計測法の開発  
および臨床応用

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 角田 和繁

平成18(2006)4月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

新しい無侵襲的網膜機能計測法の開発および臨床応用  
角田 和繁

## II. 分担研究報告書

1. 動物眼における網膜内因性信号の測定および性能評価に関する研究  
谷藤 学
2. II型未熟児網膜症の早期手術による黄斑形成  
東 範行
3. 強度近視眼の非裂孔原性網膜剥離に対する硝子体手術における課題  
平形 明人
4. 経角膜網膜電気刺激によるphosphoneの惹起と網膜血管閉塞性疾患  
篠田 啓
5. 網膜内因性信号計測装置性能向上のための設計開発  
楠城 紹生

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

# I . 総括研究報告書

## 新しい無侵襲的網膜機能計測法の開発および臨床応用

主任研究者 角田和繁

東京医療センター臨床研究センター視覚生理学研究室長

研究要旨： 網膜内因性信号計測装置による新しい網膜機能評価法の確立に向けて、実験動物および正常ヒト被験者において内因性信号計測を行い、網膜内因性信号の基礎的な性質および本計測法によって評価可能な網膜の生理的諸現象について多くの知見を得た。また、測定システムの性能向上のためのハード的な改良を大幅に行い、これまでよりさらに精密な測定が可能となった。合わせて、臨床応用に向けた適応疾患の選定、および各疾患における測定条件の検索を目的として、成人および小児における網膜疾患の機能的・形態学的研究を行った。一連の研究により、網膜内因性信号計測装置の精度向上を向上させることができ、正常ヒト網膜においても内因性信号が測定可能となった。臨床応用に向けてはさらなる開発を要するが、共同研究によって網膜機能についての新しい様々な生理学的・病理学的知見も得られ、本測定法の適応疾患範囲もさらに広がる可能性が開かれた。

### 分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

谷藤学	理化学研究所脳科学総合研究センター脳統合機能研究チーム チームリーダー
東範行	国立成育医療センター 眼科医長
平形明人	杏林大学医学部眼科学教室 教授
篠田啓	東京医療センター 眼科医長
楠城紹生	株式会社ニデック医療事業部 診断機器グループ診断機器開発チームプロダクトリーダー

最近の脳科学の進歩に大きく貢献してきた。主任研究者はこの技術を網膜に応用し、高等動物における視細胞の機能を非侵襲的にマッピングすることに世界で初めて成功している。

本研究は、主任研究者らが開発した網膜内因性信号計測装置（FRG：網膜の局所的神経活動を画像化する装置）を実用段階に発展させ、これを臨床応用することで新しい非侵襲的網膜機能イメージング法を確立することを最終目標としている。目標が達成されれば、黄斑部を含む様々な網膜疾患のスクリーニング的評価、手術等の治療前後における網膜機能の客観的評価、検査の施行が困難な乳幼児における客観的網膜機能評価等について応用が可能であり、視覚的機能を的確に評価することによる眼疾患の早期発見、失明予防に大きく寄与しうる可能性がある。

平成17年度においては、1) 動物実験による網膜内因性信号の基礎的データの収集。信号源特定のための電気生理学的検査との比較。測定精度の向上。2) ヒト正常被験者による網膜内因性信号の記録。測定

### A. 研究目的

内因性信号計測法とは、光を利用した神経組織の機能的イメージング法である。これは神経活動にともなう神経組織の光散乱変化や血中ヘモグロビン飽和度の変化などを CCD カメラでイメージングするもので、

プロトコールの改良。画質向上のためのハード、ソフト面での改良。3) 臨床応用にむけた測定適応疾患の選択および測定プロトコールの決定のための各種網膜疾患における病態生理の解明、などを目的としてそれぞれの研究施設で研究が進められた。

## B. 研究方法

1) 動物実験による網膜内因性信号の基礎的データの収集。信号源特定のための電気生理学的検査との比較。測定精度の向上等については、分担研究者の谷藤、楠城および主任研究者が担当した。計測装置は従来のFRG-M2から、投光系を安定化させたFRG-M3、さらに特殊な形状の刺激を網膜面に投影することのできるFRG-M4など、順次改良を行った。実験では、内因性信号の反応閾値を調べる目的で、白色一発フラッシュ刺激を用いて内因信号を記録すると同時に、角膜コンタクト電極を用いて同一刺激によるERGを測定した。また、網膜局所刺激による反応を調べる目的で、網膜との共役面に置いたフィルターによって、様々な形状、大きさの部分刺激を作成し、一発フラッシュおよびフリッカーフラッシュにより網膜面に刺激を投影した。さらに経角膜電気刺激(Trans-corneal Electrical Stimulation, TES)による網膜内因性信号の計測においては、Burian-Allen角膜電極を通して微少パルス電流を眼内に流し、網膜面の反射率の変化を記録した。2) ヒト正常被験者による網膜内因性信号の記録。測定プロトコールの改良。画質向上のためのハード、ソフト面での改良については、主任研究者の角田らが担当した。新たにヒト専用記録装置FRG-H1を作成し、微少固視灯を用いて、低侵襲の網膜局所刺激を行った。さらに、固視運動を抑えるための特殊コンタクトレンズを取り付け、測定精度の向上を図った。3) 臨床応用にむけた測定適応疾患の選択および測定プロトコールの決定のための各種網膜疾患における病態生理の解明、については、分担研究者のうち東、平形、篠田が担当した。それぞれの施設において、II

型未熟児網膜症の早期硝子体手術による網膜復位と黄斑形成の検討、強度近視眼の非裂孔原性網膜剥離に対する硝子体手術における課題についての検討、経角膜網膜電気刺激によるphospheneの惹起と網膜血管閉塞性疾患への治療効果の検討が行われた。

### (倫理面への配慮)

実験動物の取り扱いについては、各施設における動物実験規約を遵守し、また、ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology : 米国視覚眼科研究学会) で定められた動物実験規約に従った。さらに、正常ヒト被験者において測定実験を行う際には、実験の目的、方法、安全性についての説明を十分にした上で被験者の同意を得た。

また各施設における臨床研究に関しては、必要に応じて各施設の倫理委員会の承諾を得た上で研究を遂行した。また、被験者および患者に対しては研究の趣旨、安全性についての十分な説明を行った後、インフォームド・コンセントを取得して実施した。

## C. 研究結果

動物における基礎的実験においては、網膜内因性信号計測と同一の刺激系を用いてBurian-Allen型角膜電極より暗順応ERGを記録し、内因性信号と比較した。黄斑部を除く網膜面および視神経乳頭における内因性信号の遅い反応の閾値は、ERGのb波とほぼ同一であることが分かった。また、中心窩における早い反応の閾値は、a波の閾値よりもやや高い程度であった。これは、網膜内因性信号計測法が非常に感度の高い神経機能計測法であることを示すと同時に、網膜内因性信号の信号発生源が網膜の部位ばかりでなく、早い成分と遅い成分とによっても異なることを示している。網膜局所刺激による反応を調べる実験では、網膜共役面に置いたフィルターによって、様々な形状、大きさの部分刺激を作成し、一発フラッシュおよびフリッカーフラッシュにより境界鮮明な刺激を網膜面に投影した。刺激部位においては通常のびまん性刺激と

同様の信号の発生がみられたが、非刺激部位においては、刺激部位とは極性のことなる信号（反転信号、明るくなる変化）が時間経過の後半において見られることが分かった。経角膜電気刺激による網膜内因性信号の計測においては、Burian-Allen 角膜電極を通して微小パルス電流を眼内に流し、網膜面の反射率の変化を記録した。一定電圧のもと 20Hz の矩形波による刺激においては、300 $\mu$ A 付近より網膜後極部および視神経乳頭部の内因性信号が出現し、電流の増加に伴って信号強度も増大していった。さらに、フリッカーstroボを用いた実験では、10-80Hz の様々な刺激条件下で内因性信号を記録した。輪状の局所刺激を用いた計測では、40Hz 付近のフリッカー刺激によって、一発刺激では測定不可能な低光量（stroボ光量レベル1）で境界明瞭な輪状の内因性信号マッピングを描出することができた。

ヒト正常被験者における計測では、1発フラッシュ刺激および、10-80Hz フリッカー刺激を用いて刺激後500ミリ秒以内にピークを持つ後極全体の吸光度上昇が観察された。ただし後極全体の吸光度変化は、瞳孔反応等によるアーティファクトである可能性も否定できないため、輪状局所刺激を用いて同様の実験を行ったところ、局所刺激の部位に相応する網膜内因性信号が観察された。これによって、ヒト網膜においても神経活動に伴う内因性信号を記録することが可能であることが確実に示された。

また、病的網膜における機能評価については、成育医療センターにおいて未熟児網膜症、杏林大学において高度近視眼に伴う非裂孔原性網膜剥離、慶應義塾大学において網膜血管閉塞性疾患の患者について、それぞれ今後の臨床応用を進めるうえで重要な新たな知見が得られた（詳細は分担研究報告書参照）。

#### D. 考察

網膜内因性信号を実際の臨床検査法として活用するためには、本計測法で、何が観

察されるのか（網膜10層構造のうち、視細胞、神経節細胞など、どの細胞が反応を引き起こしているのか）、どの程度の感度を有する検査法なのか（測定の sensitivity）、また、神経活動の強さと内因性信号強さとの関係（内因性信号の定量性）などの基本的データが必要不可欠である。今回の研究において、FRG 記録装置をもちいて同一眼、同一条件に置いて網膜電図を記録することにより、網膜各部位における信号成分がさまざまな起源から成り立つことが再確認された。特に、中心窩を除く網膜面および視神経乳頭における内因性信号の閾値がERGのb波とほぼ同一であることは、網膜内因性信号計測法が非常に感度の高い神経機能計測法であることを示す初めての知見であり、追従する各国の研究機関においても、同レベルの精度の高い信号検出は実現されていない。この事実は、本計測法の客観的神経機能計測法としてのさらなる高い可能性を示していると考えられた。また、反応の局所性についての研究では、市松模様刺激、円形刺激、輪状刺激、点状刺激等ももちいてフラッシュ光、およびフリッカー光による内因性信号を記録したが、いずれの刺激においても刺激部位、形状に完全に一致した信号が得られた。これは、内因性信号の優れた局所性を示すとともに、将来的には、網膜の微小局所刺激による他覚的視野検査のような方法で臨床応用できる可能性も示唆された。さらに経角膜電気刺激についての研究においては、電気刺激によっても同様の内因性信号を観察することができた。この研究の発展により、網膜内因性信号の起源の解明にも有益な知見を与えてくれるものと思われる。

ヒト正常被験者における計測では、固視微動を最小限に抑えるための微小固視灯、バイトブロック、接触型特殊コンタクトレンズ等を備えたFRGを導入することにより、輪状局所刺激に対する網膜の局所応答を初めて記録することができた。この方法が発展すれば、網膜びまん性刺激による神経活動のマッピングばかりでなく、微小局所刺激による他覚的視野検査のような方法

で本計測法を応用できる可能性がある。しかし、上述の工夫では抑えきれない固視微動、その他生理的ノイズのため動物実験に比べるとデータの質は明らかに劣っており、患者による計測まではさらなる測定精度の向上が求められる。

いっぽう各施設で得られた患者における網膜機能評価研究では、それぞれ未熟児網膜症、高度近視眼に伴う非裂孔原性網膜剥離、経角膜電気刺激療法について新たな知見が得られており、網膜内因性信号計測の適応疾患の選定、ならびに臨床検査に向けた測定条件の検討にとって非常に有意義な資料となった。

未熟児網膜症の検討においては、II型未熟児網膜症に早期硝子体手術を行い、良好な成績を得た。56%に黄斑形成が認められ、今後この構造的、機能的解析が必要である。ERGがその評価に不可欠であるが、黄斑部局所ならびに周辺部網膜の機能がERGによる網膜全体の反応とは異なっている可能性は高く、今後のFRGによる部位診断の重要性が示された。

杏林大学においては、高度近視眼に伴う黄斑分離に対する硝子体手術は、OCTの画像診断と視力経過から有用であることが確認された。そして、網膜剥離合併例には、内境界膜手技を施行することが、初回復位率を上げるために有用であることがわかった。しかし、内境界膜剥離の危険性を考慮すると、OCT画像診断だけで硝子体手術の適応時期や内境界膜剥離などの手術手技を決定することの限界もあり、生体におけるマクロな黄斑機能的マッピングを可能とするFRG検査は、本病態における硝子体手術適応・手技を決めるための非侵襲的網膜機能評価法として意義が高いと考えられた。そのためには、FRG検査が、固視不良例や屈折矯正時における症例に対応できる必要性が示唆された。

東京医療センターおよび慶應義塾大学における経角膜電気刺激の臨床研究は、網膜内因性信号の起源の解明にも有益な知見を与えてくれるものと思われる。今後は、網膜内因性信号計測によってTESの正確な

刺激強度の決定が可能となり、TESによる視機能改善のメカニズムの解明がなされる可能性も示された。

## E. 結論

網膜内因性信号計測法の臨床応用にむけて機器開発、生体基礎実験、基礎的臨床データ収集の各研究部門が大きな進展を見せ、総合的にも実用化に向けての意義ある進捗が得られた。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

角田和繁 「新たな網膜機能の画像化」

臨床眼科 眼科における最新医工学  
第59巻、第11号、  
298-299 (2005)

角田和繁 網膜における内因性信号計測  
脳21、vol.9 No.4, 88-92, 2006

角田和繁 網膜神経活動のイメージング  
—網膜内因性信号計測法— 日本視能訓練  
士協会誌 第35巻 2006 (印刷中)

### 2. 学会発表

17年4月29日

Non-invasive imaging of retinal function  
by optical imaging with intrinsic signal  
Tsunoda K, Hanazono G, Tanifuji M  
9<sup>th</sup> Annual Vision Research Conference –  
Neuroimaging the Retina –  
Fort Lauderdale, FL, USA

17年5月4日

Sources of retinal intrinsic signals  
measured by in vivo optical imaging from  
Macaque ocular fundus  
Tsunoda K, Hanazono G, Tanifuji M

2005 Annual meeting, Association for  
Research in Vision and Ophthalmology  
Fort Lauderdale, FL, USA

17年7月26日

サル網膜内因性信号における光散乱強度変化の寄与  
角田和繁、花園元、谷藤学  
第28回 日本神経科学大会  
パシフィコ横浜、横浜市

17年8月24日

A novel imaging technique for mapping  
cone- and rod-induced retinal  
responsiveness by intrinsic optical  
imaging  
Tsunoda K, Hanazono G, Oguchi Y,  
Tanifuji M, Miyake Y  
International Society for Clinical  
Electrophysiology of Vision, XLIII  
Symposium  
Glasgow, Scotland, UK

17年9月4日

光学計測法を用いた網膜内因性信号法  
(FRG)の改良  
柴田尚久、楠城紹生、角田和繁、花園元、  
谷藤学  
第41回日本眼光学学会総会  
名古屋市

17年11月13日

Evidences for the involvement of fast  
light-scattering changes in intrinsic  
signals of macaque retina  
Tsunoda K, Hanazono G, Tanifuji M  
Society for Neuroscience, 35<sup>th</sup> Annual  
Meeting  
Washington, DC, USA

平成17年11月24日

内因性信号イメージングによる視覚研究  
Intrinsic signal imaging in vision  
researches

シンポジウム「脳科学と視覚」

角田和繁  
日本光学会年次学術講演会  
東京

平成17年11月26日

網膜神経活動の非侵襲的イメージング —  
網膜内因性信号計測法: FRG—  
シンポジウム「視機能を客観的に評価する」  
角田和繁  
第46回 日本視能矯正学会  
大阪

18年2月10日

ERGによる網膜内因性信号の発生起源の検  
討  
花園元、篠田啓、三宅養三、谷藤学、角田  
和繁  
第53回日本臨床視覚電気生理学会  
宮崎市

18年2月10日

経角膜網膜刺激により視野の著名な改善を  
認めた発症後3年の網膜中心動脈閉塞症  
木村至、篠田啓、角田和繁、猪俣公一、森  
本壮、不二門尚、三宅養三、大出尚郎  
第53回日本臨床視覚電気生理学会  
宮崎市

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



## Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
分担研究報告書

動物眼における網膜内因性信号の測定および性能評価に関する研究

分担研究者 谷藤学

理化学研究所脳科学総合研究センター脳統合機能研究チーム チームリーダー

研究要旨： 網膜内因性信号計測装置（FRG）の実用化に向けて、実験動物において機器の性能向上、生理学的基礎データの収集、ヒトにおける最適記録条件の検索を目的とした実験を行った。白色一発フラッシュ刺激に対する視細胞の神経応答を計測し、同時に同一刺激を用いて網膜電図（ERG）を記録した。刺激強度と内因性信号、ERG振幅との関係を比較した場合、周辺部網膜面および視神経乳頭部における内因性信号の閾値は、暗順応ERGのb波とほぼ同一であることが分かった。これにより、FRGがERGと同様に極めて感度の高い神経機能計測法であることが示された。さらに内因性信号の起源を調べる目的で、1) 局所刺激による内因性信号計測、2) 経角膜電気刺激による内因性信号を計測し、それぞれ内因性信号が視細胞の神経活動に高く相関した信号であることが示された。また、フリッカーstroゴを用いて様々な刺激条件下で内因性信号を記録し、最も侵襲の少ない刺激光量でマッピング可能な信号を惹起するための条件を検索し、東京医療センターにおけるヒト専用記録装置の開発に応用した。

A. 研究目的

内因性信号計測法は、1990年代に発展した神経組織の機能的イメージング法である。これは神経活動にともなう神経組織の光散乱変化や血中ヘモグロビン飽和度の変化などをCCDカメラでイメージングするもので、最近の脳科学の進歩に大きく貢献してきた。主任研究者の角田はこの技術を網膜に応用し、網膜疾患を有する患者における新しい非侵襲的神経機能検査法の確立をめざしている（網膜内因性信号計測法、FRG）。本研究チームにおいては、マカク属サル網膜にて計測を行い、網膜内因性信号装置の実用化に向けて必要な、機器の性能向上、生理学的基礎データの収集、ヒトにおける最適記録条件の検索を目的とした動物実験を行った。

B. 研究方法

ニデック社との共同開発による網膜内因性信号計測装置（FRG-M3およびM4）を用いて、麻酔下マカクザルにおいて計測を行った。観察光波長は、網膜に視反応を起こさせない近赤外光（850-900nm）を用

いた。

1) 内因性信号の反応閾値を調べる実験では、白色一発フラッシュ刺激を用いて内因信号を記録すると同時に、角膜コンタクト電極を用いて同一刺激によるERGを測定した。

2) 網膜局所刺激による反応を調べる実験では、網膜との共役面に置いたフィルターによって、様々な形状、大きさの部分刺激を作成し、一発フラッシュおよびフリッカーフラッシュにより網膜面に刺激を投影した。

3) 経角膜電気刺激（Trans-corneal Electrical Stimulation, TES）による網膜内因性信号の計測においては、Burian-Allen角膜電極を通して微少パルス電流を眼内に流し、網膜面の反射率の変化を記録した。

（倫理面での配慮）

実験動物の取り扱いについては、理化学研究所における動物実験規約を遵守し、また、ARVO（Association for Research in Vision and Ophthalmology：米国視覚眼科

研究学会)で定められた動物実験規約に従った。

### C. 研究結果

フラッシュによるびまん性刺激によって視細胞が活動すると、網膜全体の反射率が低下し画像では暗く描出される。この内因性信号は、刺激後 150ms にピークを持つ早い反応(中心窩および周辺部網膜)と、刺激後 5-6s にピークを持つ遅い反応(網膜周辺部および視神経乳頭)に大きく分けられる。内因性信号のピークは中心窩では錐体視細胞に、周辺部では杆体視細胞の解剖学的な分布(rod ring)によく一致しており、網膜内因性信号の発生には視細胞が大きく寄与していると思われる。しかし遅い反応は血流の影響を大きく受けていると考えられ、網膜内層の信号発生における役割も考慮すべきである。

そこで、同一の刺激系を用いて Burian-Allen 型角膜電極より暗順応 ERG を記録し、内因性信号と比較すると、黄斑部を除く網膜面および視神経乳頭における内因性信号の遅い反応の閾値は、ERG の b 波とほぼ同一であることが分かった。また、中心窩における早い反応の閾値は、a 波の閾値よりもやや高い程度であった。これは、網膜内因性信号計測法が非常に感度の高い神経機能計測法であることを示すと同時に、網膜内因性信号の信号発生源が網膜の部位ばかりでなく、早い成分と遅い成分によっても異なることを示している。

網膜局所刺激による反応を調べる実験では、網膜共役面に置いたフィルターによって、様々な形状、大きさの部分刺激を作成し、一発フラッシュおよびフリッカーフラッシュにより境界鮮明な刺激を網膜面に投影した。刺激部位においては通常のびまん性刺激と同様の信号の発生がみられたが、非刺激部位においては、刺激部位とは極性のことなる信号(反転信号、明るくなる変化)が時間経過の後半において見られることが分かった。さらにこの反転信号は、刺激強度、暗順応時間等を変化させると信号強度が大きく変化することが見いだされた。

経角膜電気刺激による網膜内因性信号の計測においては、Burian-Allen 角膜電極を通して微少パルス電流を眼内に流し、網膜面の反射率の変化を記録した。一定電圧のもと 20Hz の矩形波による刺激においては、 $300\mu\text{A}$  付近より網膜後極部および視神経乳頭部の内因性信号が出現し、電流の増加に伴って信号強度も増大していった。

フリッカーstroboを用いた実験では、10-80Hz の様々な刺激条件下で内因性信号を記録した。輪状の局所刺激を用いた計測では、40Hz 付近のフリッカー刺激によって、一発刺激では測定不可能な低光量(strobo光量レベル1)で境界明瞭な輪状の内因性信号マッピングを描出することができた。

### D. 考察

びまん性のフラッシュ刺激を用いた計測において、内因性信号の発生源が 1) 視細胞の神経活動と強く結びついた「早い反応(ピーク:150ms)」、および 2) 視反応にともなう血流上昇と強く結びついた「遅い反応(ピーク:5s-6s)」の2つに分けられることがすでに示されている。今回、FRG 記録装置をもちいて同一眼、同一条件に置いて網膜電図を記録することにより、網膜各部位における信号成分がさまざまな起源から成り立つことが再確認された。特に、中心窩を除く網膜面および視神経乳頭における内因性信号の閾値が ERG の b 波とほぼ同一であることは、網膜内因性信号計測法が非常に感度の高い神経機能計測法であることを示す初めての知見であり、追従する各国の研究機関においても、同レベルの精度の高い信号検出は実現されていない。この事実は、客観的神経機能計測法としてのさらなる高い可能性を示している。なお、周辺部網膜における遅い反応が b 波の振幅と同様の性質を示したことは、網膜内因性信号の起源として内層の寄与が大きいことを示唆している。これは、内因性信号の起源は主に網膜外層とする従来の我々の知見と異なっており、さらなる解明が必要であると考えられた。

網膜内因性信号計測において信号の局所

性を示すことは、臨床応用を考える上で非常に重要である。すなわち、網膜機能のマッピングを目的とした場合、神経の活動部位と、内因性信号の発生部位が一致することが、空間分解能を高める上で最も重要であるためである。今回得られたデータでは、市松模様刺激、円形刺激、輪状刺激、点状刺激等もちいてフラッシュ光、およびフリッカー光による内因性信号を記録したが、いずれの刺激においても刺激部位、形状に完全に一致した信号が得られた。これは、内因性信号の優れた局所性を示すとともに、将来的には、網膜の微小局所刺激による他覚的視野検査のような方法で臨床応用できる可能性も示唆された。さらに実験の課程で、局所刺激よって非刺激部位に反転信号が出現するという現象が観察された。これは、網膜視細胞色素の褪色変化とは異なる性質の信号であり、刺激強度、暗順応時間等を変化した際に信号にも大きな変化がみられた。現時点では反転信号の起源は不明であるが、刺激部位から散乱した光による影響、杆体視細胞の活動に伴う網膜内層の代謝変化、刺激部位網膜へのヘモグロビンの移動等、いくつかの原因は推察され、今後の実験による解明が必要と思われた。

経角膜電気刺激 (Trans-corneal Electrical Stimulation, TES) は、網膜神経節細胞を電気的に刺激することによりその変性過程を遅らせ、あるいは再生を促す、網膜機能回復のための新しい治療法である。現在本邦の大阪大学、慶應義塾大学において虚血性視神経障害、網膜色素変性症、網膜血管閉塞疾患などにおいて臨床治験が行われ、これまでに有効性を示すデータがいくつか得られている。しかし網膜電気刺激により、どの部分の網膜がどの程度刺激を受けているかを客観的に示すデータは皆無であり、網膜内因性信号計測はこれを評価することのできる現在唯一の検査法である。これまでにサル眼で得られた結果から、自覚的 phosphene の出現閾値とほぼ同等の電流において内因性信号が観察されている。この研究により、経角膜電気刺激の正しい作用機序の解明、刺激部位の同定、電流を

最適な強さで網膜に到達させるための刺激プロトコルの開発などに大きく寄与するものである。また、TESによる内因性信号はフラッシュ刺激による信号と一部の性質が異なっており、研究を進めるうえで、網膜内因性信号の起源の解明にも有益な知見を与えてくれるものと思われる。

動物実験においては内因性信号計測により安定した網膜機能のマッピングを行うことができるが、ヒトにおける計測は固視微動、呼吸、心拍等の生理的ノイズなど様々な制約を受けている。これらのノイズを減少させる方法のひとつは刺激強度を最小限に押さえることであり、これによって刺激にともなう眼球運動の抑制が期待できる。フリッカーstroボを用いた実験では、もっとも固視に都合の良い輪状刺激を用いて内因性信号を記録したところ、40Hz付近のフリッカー刺激 (0.5s) によって低光量 (stroボ光量レベル1) で境界明瞭な輪状の内因性信号マッピングを描出することができた。これは、一発刺激では内因性信号が測定不可能な、かつ覚醒下の固視に十分耐えうる低照度の刺激であり、ヒトにおける刺激プロトコルの開発に重要なデータと考えられた。

## E. 結論

網膜内因性信号装置の実用化に向けて、実験動物において機器の性能向上、生理学的基礎データの収集、ヒトにおける最適記録条件の検索を目的としたさまざま実験を行った。これにより、これまで分からなかった幾つかの生理学的知見が得られ、また、ヒト用計測器の開発にとって貴重なデータを供することができた。網膜内因性信号の起源のさらなる解明のためには、非侵襲的実験以外にも薬物注入による層別ブロックなどの実験が今後は必要であると思われた。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Fukuda, M., Rajagopalan, U. Maheswari, Homma, R., Matsumoto, M., Nishizaki, M. and Tanifuji, M.  
Localization of activity-dependent changes in blood volume to submillimeter-scale functional domains in cat visual cortex. *Cerebral Cortex*. 15: 823-833

Tanifuji Manabu, Tsunoda Kazushige, Yamane Yukako. "Representation of object images by combinations of visual features in the macaque inferior temporal cortex" *From Monkey Brain to Human Brain* 2005 June, 357-370

Tanifuji, M., Tsunoda, K., Yamane, Y. (2006) Representation of object images by combinations of visual features in the macaque inferior temporal cortex. *In: Percept, Decision, Action: Bridging the gaps.* Chadwick, D.J., Diamond, M., and Goode, J., editors. pp. 217-231

Fukuda, M., Wang, P., Moon, C-H., Tanifuji, M., and Kim, S-G. (2006) Spatial specificity of the enhanced dip inherently induced by prolonged oxygen consumption in cat visual cortex: Implication for columnar resolution functional MRI. *NeuroImage* 2006 Mar; 30 (1): 70-87

Uchida, G., Fukuda, M., and Tanifuji, M. (2006) Correlated transition between two activity states of neurons. *Physical Review E* 73, 031910

ラジャゴパラン ウママヘスワリ、谷藤学  
深さ方向の内因性イメージングー機能的オプティカルコヒーレントトモグラフィー、*脳* 21 (2006) (in press)。

## 2. 学会発表

Tsunoda K, Hanazono G, Tanifuji M  
Non-invasive imaging of retinal function by optical imaging with intrinsic signals  
9th Annual Vision Research Conference – Neuroimaging the Retina –  
Fort Lauderdale, FL, USA 17年4月29日

Tsunoda K, Hanazono G, Tanifuji M  
Sources of retinal intrinsic signals measured by in vivo optical imaging from Macaque ocular fundus  
2005 Annual meeting, Association for Research in Vision and Ophthalmology  
Fort Lauderdale, FL, USA 17年5月4日

佐藤多加之、内田豪、谷藤学  
Nature of Neural Clustering in Inferotemporal Cortex of Macaque Monkey  
マカクザルの下側頭用皮質における細胞集団の性質  
第28回日本神経科学大会 パシフィコ横浜 2005年  
7月26-28日

Rajagopalan U Maheswari、Tanabu Tanifuji  
"Functional imaging of cat primary visual cortex by fct-A comparison with extracellular activities"  
第28回日本神経科学大会 パシフィコ横浜 2005年7月26-28日

角田和繁、花園元、谷藤学  
サル網膜内因性信号における光散乱強度変化の寄与  
第28回日本神経科学大会 パシフィコ横浜 2005年7月26日

Tsunoda K, Hanazono G, Oguchi Y, Tanifuji M, Miyake Y  
A novel imaging technique for mapping cone- and rod-induced retinal

responsiveness by intrinsic optical imaging  
International Society for Clinical Electrophysiology of Vision, XLIII Symposium  
Glasgow, Scotland, UK 17年8月24日

柴田尚久、楠城紹生、角田和繁、花園元、谷藤学  
光学計測法を用いた網膜内因性信号法 (FRG) の改良  
第41回日本眼光学学会総会  
名古屋市 17年9月4日

花園元、小口芳久、谷藤学、角田和繁  
「光学計測法による視神経乳頭部の機能評価」  
第59回日本臨床眼科学会、札幌 2005年10月

Tsunoda K, Hanazono G, Tanifuji M  
Evidences for the involvement of fast light-scattering changes in intrinsic signals of macaque retina  
Society for Neuroscience, 35th Annual Meeting  
Washington, DC, USA 17年11月13日

M.J.Vidal-Naquet ; N.Miyakawa ; T.Sato ; H.Nakahara ; S.Ullman ; M.Tanifuji  
"A FRAGMENT-BASED APPROACH FOR THE CHARACTERIZATION OF V1 RECEPTIVE FIELDS"  
Society for Neuroscience Annual Meeting, Washington D.C., 2005 Nov.

内田 豪、福田光洋、佐藤多加之、谷藤 学  
サル視覚連合野における神経活動の同期状態と視覚刺激応答  
日本生物物理学会第43回年会 札幌  
2005年11月23日-2005年11月25日

角田和繁  
内因性信号イメージングによる視覚研究  
Intrinsic signal imaging in vision researches  
シンポジウム「脳科学と視覚」  
日本光学会年次学術講演会  
東京 17年11月24日

内田 豪、福田光洋、佐藤多加之、谷藤 学  
Stimulus dependent modulation of synchronous activities of neurons in inferior temporal cortex of anesthetized macaque monkeys  
第6回脳と心のメカニズム冬のワークショップ  
北海道蛇田郡留寿都村 2006年1月10日-2006年1月12日

Hisashi Tanigawa, Kathleen S. Rockland, Manabu Tanifuji  
"Relationship between horizontal connections and functional structure revealed by intrinsic signal imaging, unit recording, and anatomical tracing in macaque anterior inferotemporal cortex (area TE)"  
第6回脳と心のメカニズム冬のワークショップ  
北海道蛇田郡留寿都村 2006年1月10日-2006年1月12日

佐藤多加之、内田豪、谷藤学  
"Nature of Neural Clustering in Inferotemporal Cortex of Macaque Monkey"  
脳と心のメカニズム 第6回冬のワークショップ ルスツリゾート  
2006年1月10日-2006年1月12日

Michel Vidal-Naquet , Shimon Ullman and Manabu Tanifuji  
"Natural image fragments for the characterization of receptive fields in visual cortices"  
脳と心のメカニズム 第6回冬のワークシ

ヨッピー ルスツリゾート

2006年1月10日-2006年1月12日

花園元、篠田啓、三宅養三、谷藤学、角田  
和繁

ERGによる網膜内因性信号の発生起源の  
検討

第53回日本臨床視覚電気生理学学会  
宮崎市 18年2月10日

佐藤多加之、内田豪、谷藤学

Nature of Neural Clustering in  
Inferotemporal Cortex of Macaque  
Monkey

マカクザルの下側頭用皮質における細胞集  
団の性質

第83回日本生理学会大会 群馬県民会  
館・前橋商工会議所

2006年3月28日-30日

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

## II型未熟児網膜症の早期手術による黄斑形成

分担研究者 東 範行 国立成育医療センター 眼科医長

研究要旨：重症未熟児網膜症（II型）に光凝固後早期に硝子体手術を行った。水晶体を温存した場合はすべて網膜が復位せず全剥離に移行したが、水晶体を切除して広汎な硝子体切除を行うと全例網膜復位が得られ、56%に黄斑の形成がみられた。この治療法により、良好な視力予後が期待されるが、網膜ことに黄斑の構築や機能に関しては、さまざまな方法で検討する必要がある。

### A. 研究目的

未熟児網膜症のなかで、わが国の厚生省分類でII型、国際分類でposterior aggressive retinopathy of prematurityと呼ばれている重症型は、急速に進行して網膜剥離にいたるのが特徴である。早期から広汎な光凝固治療を行っても効果がないことが多く、ひとたび網膜剥離にいたれば硝子体手術を行っても、視力は大部分が光覚や手動弁にとどまる。今回、この重症型網膜症に早期硝子体手術を行って、網膜復位と黄斑形成を検討した。

### B. 研究方法

15例30眼のII型未熟児網膜症（在胎21-30週、平均24週、出生体重466-1,676g、平均773g）に対して、光凝固を行い、網膜症の鎮静化が得られず網膜剥離が始まった22眼（stage 4A 15眼、stage 4B 7眼）に直ちに硝子体手術を行った。6眼では水晶体を温存し、16眼では水晶体を切除して広汎な硝子体切除を行った。術後の網膜復位と黄斑形成を広角度眼底カメラで検討した。

### C. 研究結果

光凝固で鎮静化したのは6眼、早期硝子体手術を行ったのは22眼であった。このうち、水晶体を温存して手術を行った6眼は全例で網膜の復位が得られず、全剥離(stage 5)へ移行した。1-2か月の増殖組織内の血管退縮を待って、再度水晶体を除去して硝子体手術を行い、全例網膜の復位を得た。しかし、いずれも網膜は広汎、高度に変性していた。

一方、早期手術の際に水晶体を切除した16眼はすべて網膜が復位した。術前 stage 4Aであった15眼ではすべて黄斑が形成された。術前 stage 4Bであった7眼のうち1眼では黄斑が形成されたが、他の6眼では網膜ひだが残存し、黄斑が形成されなかった。

術中の合併症としては、軽度の出血が全

例で起こったが、いずれも1-2週間で自然消退した。また、緑内障等の後期合併症は起こらなかった。

### D. 考察

従来は、II型未熟児網膜症治療が網膜剥離に進行すれば、増殖膜内の血管の退縮を待ってから硝子体手術を行った。早期に手術を行うと大出血を起こして失敗するためである。この期間に網膜は変性し、視力は光覚か手動弁しか得られなかった。しかし、今回の研究により、ごく早期に硝子体出血を行えば、良好な予後が得られることが判明した。水晶体を保存した場合は、硝子体切除が後極に限られ、増殖の激しいII型網膜症は治癒しない。しかし、水晶体を除去して広汎な硝子体切除を行えば、増殖組織はその足場を失って進行せず、網膜症は鎮静化した。

56%で黄斑の形成がみられた。しかし、網膜症の進行程度で結果は明瞭に異なり、stage 4Aではすべて黄斑が形成されたのに対し、stage 4Bでは1眼のみであった。これより、比較的早期に手術を行うのが重要である。

しかし、この治療を行うのは網膜の発生過程であり、ことに黄斑は生後4か月に完成するので、復位した網膜の構築と機能はまだ明らかでない。今後、OCT等の画像診断、血管造影、あるいは局所ERG等の機能的検討が必要である。

### E. 結論

II型未熟児網膜症に早期硝子体手術を行い、良好な成績を得た。56%に黄斑形成が認められ、今後この構造的、機能的解析が必要である。

### F. 健康危険情報

該当する危険は無し

### G. 研究発表



## 1. 論文発表

Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, Matsushima S, Watanabe T, Kohsaka S, Kida Y, Shiraishi T, Ogura T, Shimamura K, Nakafuku M. The *Pax6* isoform bearing an alternative spliced exon promotes the development of the neural retinal structure. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 735-745.

Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, Matsushima S, Watanabe T, Kida Y, Ogura T, Shimamura K, Nakafuku M. Transdifferentiation of the retinal pigment epithelia to the neural retina by transfer of the *Pax6* transcriptional factor. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1059-1068.

Kawase E, Nishina S, Kumagai K, Azuma N. infantile case for occlusive microvascular retinopathy after bone marrow transplantation. *Jpn J Ophthalmol* 2005; 49: 318-320.

Suzuki Y, Nishina S, Azuma N. Two case with different features of congenital optic disc anomalies in each eye. *Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006 In press

Goto K, Yasuda M, Sugawara A, Kuramochi T, Itoh T, Azuma N, Ito M. Small eye phenotype observed in a human tau gene transgenic rat. 2006; 31: 107-110.

仁科幸子・鎌田裕子・平形恭子・越後貫滋子・赤池祥子・東 範行. 水平筋上方移動術施行例の検討. *眼科臨床医報* 2005; 99: 320-325.

東 範行. 未熟児網膜症の国際分類改訂版. *日本の眼科*. 2005; 76: 1179-1180.

東 範行. 緑内障の原因遺伝子. *日本の眼科* 2005; 76: 363-354.

東 範行. 総合病院での電子カルテ化と眼科部門システム. *臨床眼科* 2005; 59: 345-353.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し
3. その他 無し

## 網膜内因性信号計測装置（FRG）の臨床応用

### 強度近視眼の非裂孔原性網膜剥離に対する硝子体手術における課題

分担研究者：平形明人

所属：杏林大学眼科

研究要旨： Intrinsic Signal Optical Imaging の技術を用いて角田らにより開発された網膜内因性信号計測法（FRG）は黄斑部を含む網膜視細胞機能を詳細に画像化することができ、その臨床応用によりこれまで困難であった視細胞機能の非侵襲的イメージングが実現する可能性がある。FRG の臨床応用を検討する場合、本邦で多数の症例が得られ、黄斑形態変化と黄斑機能変化の比較が容易で、硝子体手術という治療方法で病態が急速に変化し、しかも現在その機能評価が臨床現場で最も必要とされる病態を対象に選択する意義は高い。昨年度は OCT で黄斑分離様所見を来たす疾患のなかで、高度近視眼に続発する黄斑分離と乳頭ピット黄斑症について、OCT と視力測定における硝子体手術の適応決定の限界や課題を検討し、FRG の適応意義を追及した。

今回、高度近視眼の非裂孔原性網膜剥離の硝子体手術長期予後を検討すると、再発例や黄斑円孔網膜剥離移行例や黄斑円孔を続発する症例が存在することが判明した。黄斑円孔網膜剥離や円孔続発例は術前に視力が不良で、深い後部ぶどう腫を合併し、たけの高い黄斑分離を呈している傾向が見られた。再発例は少ないが、手術時に内境界膜剥離をせずに黄斑上膜のみ剥離した症例に見られる可能性が示唆された。手術時に採取した内境界膜はグリア細胞の異常増殖と内境界膜自体の形態異常が観察された。しかし、全例で内境界膜を剥離することも本例における手術侵襲を考えると疑問が残り、どのような症例で内境界膜を剥離すべきか、視力以外の網膜機能評価の検討が必要と思われた。その意味で、高度近視眼のような固視不良例に対する FRG 検査の課題が示唆された。

#### A. 研究目的

Intrinsic Signal Optical Imaging の技術を用いて角田らにより開発された網膜内因性信号計測法（FRG）は黄斑部を含む網膜視細胞機能を詳細に画像化することができ、その臨床応用によりこれまで困難であった視細胞機能の非侵襲的イメージングが実現する可能性がある。つまり *in vivo* での黄斑機能のマッピングを可能にせしめるため、硝子体手術の有用性を判定するために非常に適した検査手段であり、早期の臨床応用が見込まれる。

FRG の臨床応用の課題を検討するために、昨年度は硝子体手術で形態変化が OCT で有意に変化する高度近視眼に続発する黄斑分離と乳頭ピット黄斑症について、OCT と視力測定にお

ける硝子体手術の適応決定の限界や課題を検討した。本年度は、高度近視眼の硝子体手術の長期予後を検討し、本例に FRG を適応させる場合の課題を検討した。

#### B. 研究方法

OCT によって網膜形態が明らかに変化し、それに対応して視力障害が生じる高度近視眼の黄斑分離症例について、硝子体手術を施行した連続する症例の長期予後を retrospective に検討し、FRG 計測法機能を本病態に適応とする場合の課題を考察した。

高度近視眼の黄斑分離は 22 例 28 眼（男性 6 例、女性 22 例 平均 63.6 歳）であり、OCT 検査で、硝子体手術施行したものは 21 眼、その

うち7眼は黄斑分離のみ、14眼は黄斑分離に中心窩剥離を合併していた。残りの7眼は黄斑分離のみで経過観察で硝子体手術は今回の検討中には施行されていない。

OCTを含む黄斑形態変化と視力予後に関して検討し、本例にFRGを適応する場合の課題を考察した。

#### (倫理面での配慮)

本研究は、患者に対して硝子体手術の目的、利点、欠点についての十分な説明を行った後、インフォームド・コンセントを取得して実施した。臨床研究としてのデータ作成の同意を得た。

#### C. 研究結果

14眼の網膜剥離合併例は1眼を除き初診から1ヶ月以内に手術が施行されていた。術前視力は全例0.5以下で、そのうち8眼が視力0.1以下であった。初診時に黄斑分離のみの症例7眼は初診時視力が全例0.4以上で、そのうち4眼は0.8以上であった。手術時期は、初診後1から26ヶ月まで幅広く、手術直前視力は全例0.5以下であった。

手術時に内境界膜剥離を施行したものが10眼で、残る11眼は後部硝子体剥離を完成させ内境界膜は意識的には剥離しなかった。内境界膜剥離10眼中1眼で術後数ヶ月で黄斑円孔網膜剥離を合併した。内境界膜剥離をしなかった11眼中4眼で黄斑分離の再発、2眼で黄斑円孔網膜剥離を合併した。再発例は、いずれも手術後いったんは網膜復位へ改善し、視力も回復するが、半年以上、長いものは3年後に再発した。

黄斑円孔網膜剥離あるいは網膜は復位していても黄斑円孔を合併した症例は、後部ぶどう腫が深く、術前視力が不良な症例の傾向が見られたが、同じような条件でも経過が良好

なものも存在した。

硝子体手術時採取した内境界膜の組織は、グリア系細胞の増殖と内境界膜の形態異常(増殖細胞の基底膜の融合)が観察された。

硝子体手術を行わずに経過観察のみ施行している7眼では、4から20ヶ月の経過観察期間中の視力が0.5以上で自覚症状の悪化が見られなかった。

#### D. 考察

高度近視眼の非裂孔原性網膜剥離の硝子体手術の適応は、黄斑分離に網膜剥離合併例はすでに視力低下が著しく手術適応と考えられた。しかし、硝子体手術後に再発、黄斑円孔網膜剥離に移行する症例が、内境界膜非剥離例に多く、再手術を防ぐ目的から内境界膜を初回手術時に施行する意義が高いように考えられた。しかし、特に高度近視眼における網膜は非常に薄いため、内境界膜剥離操作自体による機械的損傷、手術時の黄斑円孔作成などの危険性もあり、どのような症例で内境界膜剥離を施行すべきか、すなわち組織学的に内境界膜の異常を誘発するような網膜を判定するための細胞機能評価が必要であると思われる。

黄斑分離で網膜剥離を伴わない症例では、長期間視力が変化しない症例もあり、どのような症例で進行するのか、初診時視力やOCT検査だけでは判定できず、これを検討するための網膜機能検査の必要性が望まれた。硝子体手術を施行してその結果のよいことを考えると、内境界膜の変化は網膜剥離合併例に比較して少ないことが予想され、FRGを応用した場合、視力が同等な症例における網膜剥離の合併有無による比較を行うとFRGの精度や意義を検討するために有用と思われた。

本病態の手術適応や手術手技を検討するために、FRGのような網膜機能検査が必要であることが示唆された。しかし、高度近視眼で

の機能検査は、屈折矯正が必要な上に、固視が不良な症例が多く、こういう病態にFRGを適応する場合、どのように短期間に固視変動にも耐えうる再現性の得られる機能検査が可能となるかが大きな課題である。

## E. 結論

高度近視眼に伴う黄斑分離に対する硝子体手術は、OCTの画像診断と視力経過から有用であることが確認された。そして、網膜剥離合併例には、内境界膜手技を施行することが、初回復位率を上げるために有用であることがわかった。しかし、内境界膜剥離の危険性を考慮すると、OCT画像診断だけで硝子体手術の適応時期や内境界膜剥離などの手術手技を決定する限界もあり、生体におけるマクロな黄斑機能的マッピングを可能とするFRG検査は、本病態における硝子体手術適応・手技を決めるための非侵襲的網膜機能評価法として意義が高いと考えられた。そのためには、FRG検査が、固視不良例や屈折矯正時における症例に対応できる必要性が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 報告(論文・総説)

- 1) Hirakata A, Okada AA, Hida T: Longterm results of vitrectomy without laser treatment for macular detachment associated optic disc pit. *Ophthalmology* 112:1430-1435, 2005
- 2) Hirakata A, Hida T, Ogasawara A, Iizuka N: Multi-layered retinoschisis associated with optic disc pit. *Jpn J Ophthalmol* 49:414-416, 2005

- 3) Hirakata A, Hida T, Fukuda M: Unusual posterior hyaloid strand in optic disc pit maculopathy in a young child: Intraoperative and histopathological findings. *Jpn J Ophthalmol* 49 : 264-266, 2005

- 4) 今野公士, 平形明人, 若林俊子, 永本敏之, 鶴岡一英: 内頸動脈海綿静脈洞ろうに合併した重篤な脈絡膜剥離の治療経験. *眼科手術* 18:245-248, 2005/07/30

- 5) 西脇友紀, 田中恵津子, 平形明人, 小田浩一, 気賀澤一輝, 樋田哲夫: 読書評価が診断と治療に有効であった心因性視覚障害の1例. *日本眼科学会雑誌* 109 : 761 - 765, 2005

- 6) 小幡博人, 平形明人, Alan D. Proia, 青木真祐: 前衛と後衛—未熟児網膜症の病理—. *眼科* 48:1233-1239, 2005

- 7) Yamaguchi Y, Watanabe T, Hirakata A, Hida T: Localization and ontogeny of aquaporin-1 and -4 expression in iris and ciliary epithelial cells in rats. *Cell and Tissue Research*, (in press), 2006

- 8) Hirakata A, Hida T: Vitrectomy for myopic posterior retinoschisis and/or foveal detachment. *Jpn J Ophthalmol* 50: 53-61

特許取得状況 : なし

### 2. 学会発表

- 1) 中内一揚, 不二門尚, 太田 淳, 徳田 崇, 寺澤靖雄, 神田寛行, 小澤素生, 平形明人, 田野保雄: 脈絡膜—経網膜電気刺激方式による人工網膜の長期連続刺激の効果, 第109回日本眼科学会総会 国立京都国際会