

良い方の視力と両眼視力の和との関係

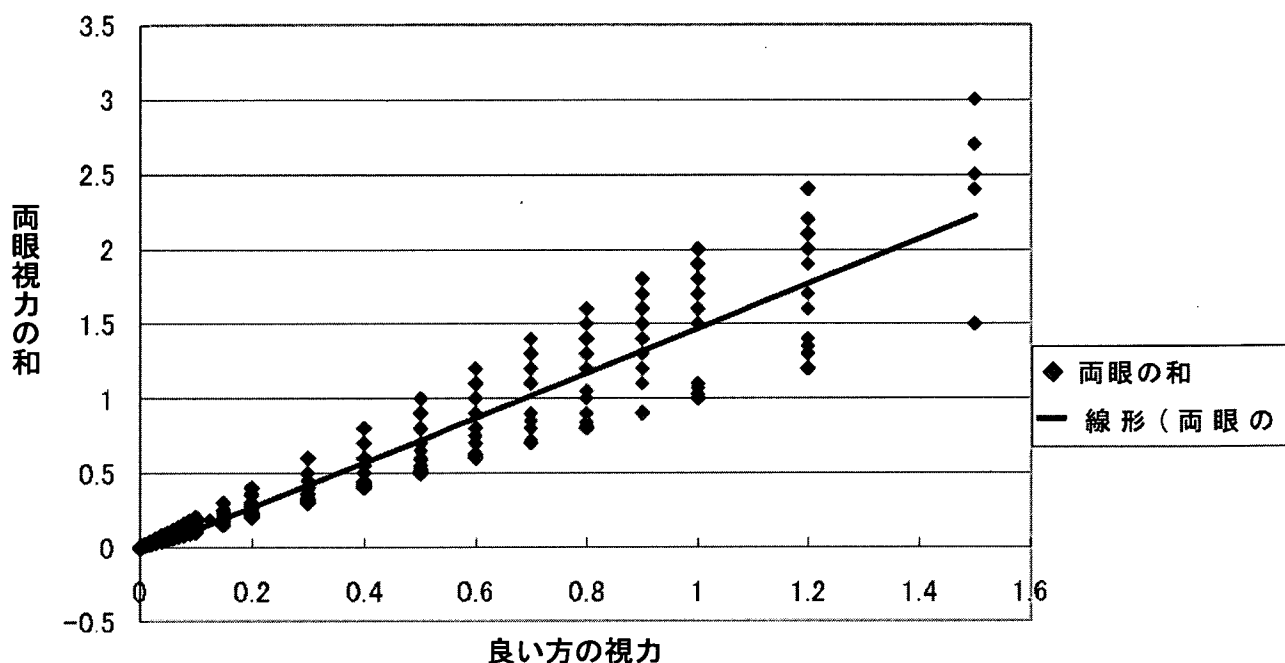


表 1 わが国の視覚障害等級表（身体障害者福祉法による）

視覚障害級別	永続する障害の状態	指数(得点)
1 級	両眼の視力の和が 0.01 以下のもの	18 点
2 級	(1) 両眼の視力の和が 0.02 以上 0.04 以下のもの	11 点
	(2) 両眼の視野がそれぞれ 10 度以内でかつ両眼による視野について視能率による損失率が 95% 以上のもの	11 点
3 級	(1) 両眼の視力の和が 0.05 以上 0.08 以下のもの	7 点
	(2) 両眼の視野がそれぞれ 10 度以内でかつ両眼による視野について視能率による損失率が 90% 以上のもの	7 点
4 級	(1) 両眼の視力の和が 0.09 以上 0.12 以下のもの	4 点
	(2) 両眼の視野がそれぞれ 10 度以内のもの	4 点
5 級	(1) 両眼の視力の和が 0.13 以上 0.2 以下のもの	2 点
	(2) 両眼による視野の 2 分の 1 以上が欠けているもの	2 点
6 級	一眼の視力が 0.02 以下、他眼の視力が 0.6 以下のもので、両眼の視力の和が 0.2 を超えるもの	1 点

2 つ以上の障害が重複する場合は各々の障害の合算指数で次のごとく判定する。

1 級 18 点以上 2 級 17~11 点 3 級 10~7 点 4 級 6~4 点 5 級 3~2 点 6 級 1 点

例えば視力 2 級 (11 点)、視野 3 級 (7 点) の人は 1 級と判定される。

表 2 矯正視力と視野損失別にみた等級

矯正視力	視野損失					
	2 級	3 級	4 級	5 級	50%未満	損失なし
1 級	1	1	1	1	1	1
2 級	1	1	2	2	2	2
3 級	1	2	2	3	3	3
4 級	2	2	3	4	4	4
5 級	2	3	4	4	5	5
6 級	2	3	4	5	6	6
級外	2	3	4	5	非認定	非認定

表 3 矯正視力と視野損失別にみた視覚障害者数

視力	視野損失						計
	2 級	3 級	4 級	5 級	50%未満	損失なし	
1 級	64	3	3	6		157	233
2 級	82	8	8	16	3	153	270
3 級	62	10	3	32	6	122	235
4 級	73	9	7	23	5	154	271
5 級	70	17	6	36	12	159	300
6 級	161	21	12	73	10	174	451
級外	140	31	12	91	非認定	非認定	274
計	652	99	51	277	36	919	2034

$$1 \text{ 級} = 64 + 82 + 62 + 3 + 8 + 3 + 6 + 157 = 385$$

$$3 \text{ 級} = 17 + 21 + 31 + 7 + 32 + 6 + 122 = 236$$

$$5 \text{ 級} = 73 + 91 + 12 + 159 = 335$$

$$2 \text{ 級} = 73 + 70 + 161 + 140 + 10 + 9 + 8 + 3 + 16 + 3 + 153 = 646$$

$$4 \text{ 級} = 6 + 12 + 12 + 23 + 36 + 5 + 154 = 248$$

$$6 \text{ 級} = 10 + 174 = 184$$

表4 良い方の矯正視力と悪い方の矯正視力との相関係数

原因疾患	相関係数	n (計算対象数)
緑内障	0.498	426
糖尿病網膜症	0.214	388
網膜色素変性症	0.882	275
黄斑変性	0.479	191
高度近視	-0.104	159
先天性の視覚障害	0.999	123
視神経萎縮	0.452	73
脳卒中・脳腫瘍	0.838	109
網膜脈絡膜萎縮	-0.071	106
角膜疾患	0.159	70
白内障	0.234	66
外傷	-0.102	63
総実数	0.700	2034

表5 良い方の視力(矯正)からみた失明・低視力別、原因疾患別障害者数

原因疾患	*失明者数 %		*低視力者数 %		*その他 %		*総数 %	
緑内障	274	24.7	75	12.8	76	22.6	425	20.9
糖尿病網膜症	201	18.1	148	25.3	38	11.3	387	19.0
網膜色素変性症	213	19.1	27	4.6	34	10.1	274	13.5
黄斑変性	76	6.8	95	16.2	19	5.7	190	9.3
高度近視	77	6.9	62	10.6	19	5.7	158	7.8
先天性の視覚障害	72	6.5	35	5.9	15	4.5	122	6.0
脳卒中・脳腫瘍	36	3.2	10	1.7	62	18.5	108	5.3
視神経網脈絡膜萎縮	88	7.9	64	10.9	23	6.8	175	8.6
角膜疾患	27	2.4	24	4.1	18	5.4	69	3.4
白内障	26	2.3	20	3.4	19	5.7	65	3.2
事故外傷	20	1.8	15	2.6	27	8.1	62	3.0
総実数	1113	100.0	585	100.0	336	100.0	2034	100.0

\*失明者数・低視力者数は複数の原因を有する場合は重複してカウントした延数

%総実数に対する割合

## 28. 内因性信号計測法によって明らかになったマカクザルにおける 経強膜電気刺激の網膜反応分布

猪俣公一<sup>1)2)3)</sup>、角田和繁<sup>2)3)</sup>、花園 元<sup>2)3)</sup>、篠田 啓<sup>2)4)</sup>

湯澤美都子<sup>1)</sup>、三宅養三<sup>2)5)</sup>、谷藤 学<sup>3)</sup>

(<sup>1)</sup> 日本大、<sup>2)</sup> 東京医療センター感覚器センター、

<sup>3)</sup> 理化学研究所脳科学総合研究センター、<sup>4)</sup> 大分大、<sup>5)</sup> 愛知淑徳大)

**研究要旨** 人工網膜の原理は、視覚皮質や眼球への電気刺激によって誘発される「電氣的閃光」という現象に基づいており、人工網膜の開発のためには、電気刺激後の網膜の神経特性を明らかにすることが必要である。そこで、内因性信号計測法を用いて、電気刺激の網膜における空間的分布、および電気刺激によって誘発される網膜内因性信号の特性および、その起源を研究した。その結果、電気刺激による網膜内因性信号は光刺激によるものとは全く異なる特性を有し、またその分布は視細胞の分布によらない均質なものであり、網膜内層～中層を起源としていることが判明した。

### A. 研究目的

網膜の神経活動を空間的にマッピング可能なイメージング法 (FRG: 網膜内因性信号計測法, Tsunoda, et al : IOVS 2004) を用いて、① 電気刺激の網膜における空間的分布 ② 電気刺激が惹起する網膜内因性信号の特性を明らかにする。

### B. 研究方法

研究対象には2匹のアカゲザル (M1、M2) を用いた。全身麻酔下にて完全な筋弛緩を得、0.5% tropicamide にて散瞳後、ハードコンタクトレンズ及び DTL 電極を装着、眼底を 840-900nm の赤外光にて観察しながら、眼底の光反射率の変化を経時的に計測した。刺激にはキセノン光の単発刺激、フリッカー刺激、及び DTL 電極を通じた二相性・矩形波の経強膜網膜電気刺激を様々な条件下で用い、それらの設定は IBM 互換機のコン

ピュータを用いて管理した。

### C. 研究結果

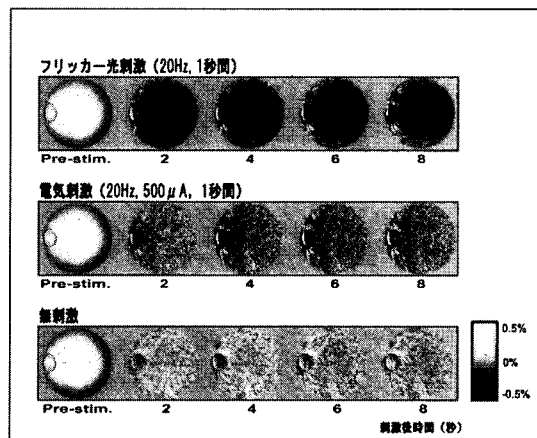


図 1

上段はキセノン光のフリッカー刺激、中段は電気刺激、下段は無刺激で撮影した。この計測法では内因性信号は黒色変化として認められ、その色調を数値化したものを内因性信号の強度として捉えている。横軸

の数字は刺激後時間、右下の図は光反射率のスケールを表わしている。無刺激に比べると、光刺激・電気刺激とも内因性信号が暗く表されているのが分かる。

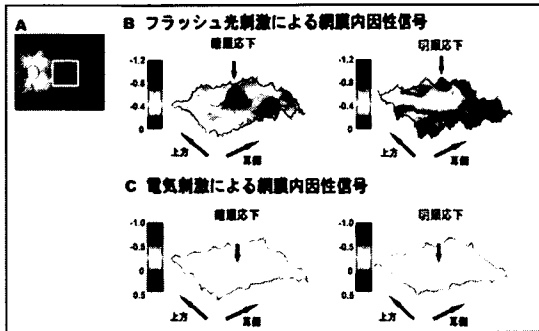


図 2

キセノン光の単発刺激と電気刺激を、暗順応及び明順応下にて行い、黄斑部における光反射率の変化をトポグラフィとして図 2 に示した。図の赤い矢印は、錐体細胞の最も多く分布する中心窩を示している。光刺激では明暗共に中心窩のピークを認め、黄斑周辺部の桿体細胞による活動分布が明順応では消失している。これに対して、電気刺激では暗順応・明順応に関わらず、ともに内因性信号はほぼ均一で、中心窩のピークも認められない。

部位別の内因性信号の特性を研究するに当たり、黄斑部、傍黄斑部網膜、及び視神経乳頭部の 3 カ所を解析した。各部位での内因性信号の経時変化は、傍黄斑部網膜と黄斑部においては、フリッカー刺激では刺激直後に急速な信号のピークを示す。一方、電気刺激では比較的緩徐に変化する。また、視神経乳頭部においては光刺激の場合も電気刺激の場合も緩徐に信号が変化する。

電気刺激の強度を 0 から 1000  $\mu A$  へと変化した場合、傍黄斑部網膜、黄斑部、視

神経乳頭部のどの部位においても、S 字曲線を描き、信号の閾値は 50  $\mu A$ 、また、およそ 400  $\mu A$  にて急速に信号強度の増大が認められ、800  $\mu A$  以上では飽和状態になる傾向があった。これらの特徴は暗順応・明順応に関係はなかった。

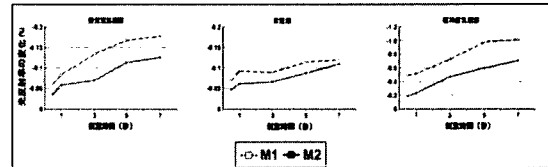


図 3

また、刺激時間を 0.5、1、3、5、7 秒間と変化させた場合の内因性信号の強度をプロットすると、図 3 のように対数曲線様の形状となった。このことから、刺激時間を長くすることによっても、内因性信号の強度は増大し、いずれは飽和状態になることが分かる。

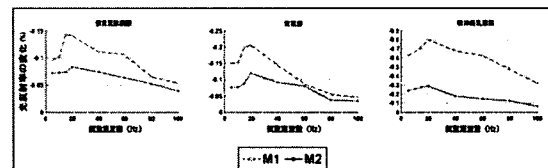


図 4

二相性波である電気刺激の周波数を、総エネルギー量が一定になるように 5 から 100Hz へと変化させプロットした (図 4)。破線と実線は各々別の個体、M1 と M2 を表している。個体・部位に関係なく山形のグラフを描き、内因性信号強度が頂点を示したのは、15~20Hz であった。

#### D. 考察

光刺激による網膜内因性信号は視細胞の分

布に一致するが、電気刺激では暗順応・明順応に関係なく、後極部網膜全体に均質に観察された。このことから、電気刺激による網膜内因性信号は、視細胞の分布とは関係なく、網膜内層～中層の活動を反映していると考えられる。また、経強膜電気刺激は網膜内層（～中層）を均一に刺激していると考えられた。

黄斑部、傍黄斑部網膜、および視神経乳頭部の各部位で内因性信号強度と電流の相関図はS字曲線を描き、閾値・最大値とも有意な相異を認めなかった。光刺激の場合は、各部位に特異的な閾値を有し、グラフの形状も全く異なり、明順応下では更に閾値が高くなると報告されている。

#### E. 結論

今回 FRG を用いることにより、電気刺激が誘発する網膜内因性信号は均質であり、以下の特性が示された。

1. 信号は電流に応じて急激に増大し、 $800\mu\text{A}$  以上で飽和状態になる。
2. 刺激時間の増大に伴い信号強度も増大するが、7秒以上では飽和状態になる。
3. 刺激周波数は15～20Hzで信号強度は最大である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Invest Ophthalmol Vis Sci., in press
2. 学会発表
1. K. Inomata et al. The Distribution of Retinal Responsiveness Evoked by

Trans-Scleral Electrical Stimulation Observed by Intrinsic Signal Imaging in Macaque Monkey. ARVO 2007. May 8, 2007.

#### 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. Humayun MS, de Juan E, Jr., Dagnelie G, Greenberg RJ, Propst RH, Phillips DH: Visual perception elicited by electrical stimulation of retina in blind humans. Arch Ophthalmol. 114:40-46, 1996
2. Humayun MS, Weiland JD, Fujii GY, Greenberg R, Williamson R, Little J, Mech B, Cimmarusti V, Van Boemel G, Dagnelie G, de Juan E: Visual perception in a blind subject with a chronic microelectronic retinal prosthesis. Vision Res. 43:2573-2581, 2003
3. Chow AY, Chow VY, Packo KH, Pollack JS, Peyman GA, Schuchard R: The artificial silicon retina microchip for the treatment of vision loss from retinitis pigmentosa. Arch Ophthalmol. 122:460-469, 2004
4. Jensen RJ, Ziv OR, Rizzo JF, 3rd: Thresholds for activation of rabbit

- retinal ganglion cells with relatively large, extracellular microelectrodes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*46:1486-1496, 2005
5. Li L, Hayashida Y, Yagi T: Temporal properties of retinal ganglion cell responses to local transretinal current stimuli in the frog retina. *Vision Res.*45:263-273, 2005
  6. Delbeke J, Pins D, Michaux G, Wanet-Defalque MC, Parrini S, Veraart C: Electrical stimulation of anterior visual pathways in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*42:291-297, 2001
  7. Gekeler F, Messias A, Ottinger M, Bartz-Schmidt KU, Zrenner E: Phosphenes electrically evoked with DTL electrodes: a study in patients with retinitis pigmentosa, glaucoma, and homonymous visual field loss and normal subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*47:4966-4974, 2006
  8. Hanazono G, Tsunoda K, Shinoda K, Tsubota K, Miyake Y, Tanifuji M: Intrinsic signal imaging in macaque retina reveals different types of flash-induced light reflectance changes of different origins. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48:2903-2912, 2007.

## 29. 骨髄由来 microglia のマウス網膜内への生着

兼子裕規、西口康二、中村 誠、加地 秀、寺崎浩子  
(名古屋大)

**研究要旨** 骨髄由来細胞の眼球内での分布、網膜傷害時の網膜内への侵入経路について報告した。正常網膜眼球内では骨髄由来細胞は毛様体・視神経・網膜下組織に生着し、遅れて網膜内に侵入した。薬剤性の網膜変性を生じると、血液中の骨髄由来細胞は網膜血管を介して網膜内に急速に侵入し microglia に分化して網膜内に分散した。変性網膜内の骨髄由来 microglia を数えたところ、約 15%の microglia が骨髄由来だった。

### A. 研究目的

網膜内での骨髄由来細胞の生着・分化を分析すること。

### B. 研究方法

生後 30 日齢の C57BL/6 マウスに放射線で骨髄抑制をし、EGFP マウス大腿骨より採取した骨髄細胞  $1 \times 10^7$  cell を腹腔内に注射しキメラマウスを作成した。骨髄移植 30 日後に flow cytometry にて EGFP 骨髄の生着を確認し(22 例)、このキメラマウスの網膜での EGFP 陽性細胞の分布の経時的変化を凍結切片・網膜フラットマウントを用いて分析した。つぎにこのキメラマウスに N-methyl-N-nitrosourea (MNU) を投与し薬剤性の網膜変性を発生させた。

#### (倫理面への配慮)

本実験に関する倫理的配慮に関し、名古屋大学動物実験施設のガイドラインに基づき承認を得た上で行った。

### C. 研究結果

EGFP 陽性細胞は骨髄移植 30 日後に視神経、毛様体、網膜色素上皮や脈絡膜に分布して

いたが網膜内には見られなかった(6 例中 6 例)。しかし、移植 3 か月後には視神経乳頭周囲の網膜内に(4 例中 2 例)、移植 6 か月後には毛様体付近の最周辺部網膜に確認された(4 例中 4 例)。最周辺部網膜の

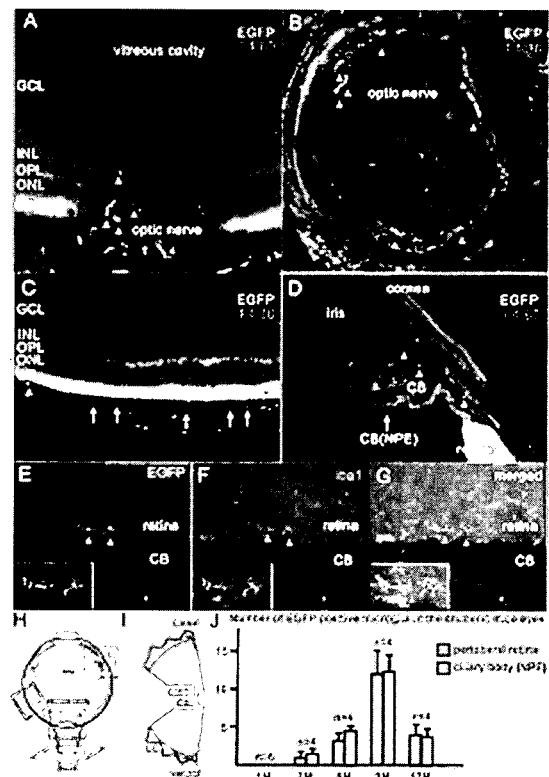


図 1 正常眼球内の EGFP 陽性細胞の分布



EGFP 陽性細胞は移植 9 か月後(4 例)に最も多く認めた。これらの細胞の多くは、microglia に特徴的な樹状突起を有する形状で、抗 F4/80 抗体あるいは抗 Ionized calcium binding adaptor molecule 1(Iba1) 抗体で免疫学的に染色陽性であった。

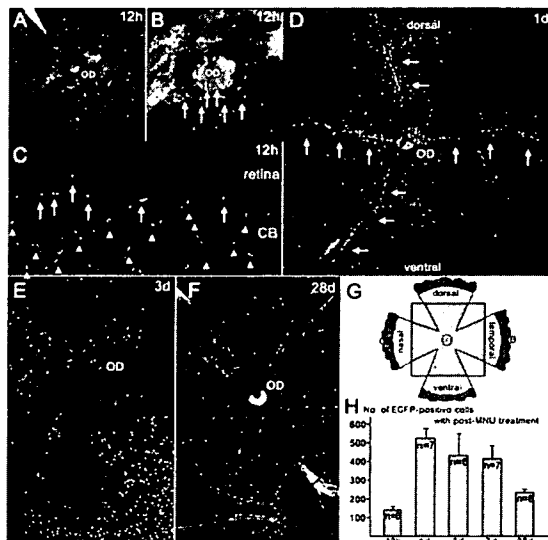


図2 EGFP 陽性 microglia の侵入

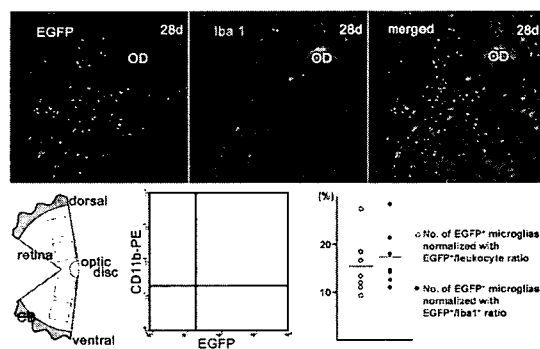


図3 変性網膜内の EGFP 陽性細胞の割合

MNU を投与したキメラマウスでは、網膜血管から microglia に分化した EGFP 陽性細胞が投与 1 日後に網膜血管を介して網膜内に急速に侵入した。変性網膜内の EGFP 陽性 microglia と、抗 Iba1 抗体で染色された microglia を数え flow cytometry で得られた骨髄移植率で補正した結果、約 15% の microglia が骨髄由来であることがわかつ

た。

#### D. 考察

正常状態の網膜内には骨髄・血球由来の細胞が非常に侵入しにくいことがわかった。しかし、骨髄・血球由来細胞は網膜血管を介して急速に変性網膜内に侵入し microglia に分化した。元来中枢神経系では、microglia の新生は resident microglia によるものと考えられていたが、今回の実験では変性網膜内の約 15% が骨髄・血球由来であることがわかった。

#### E. 結論

骨髄由来細胞は、視神経乳頭周囲と毛様体付近の網膜に他の眼内組織に遅れて生着し、microglia に分化すると考えられた。また急速な網膜変性が発生した際、骨髄由来 microglia が網膜血管を介して急速に網膜内に侵入することがわかった。

#### 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

兼子裕規 他：骨髄由来細胞のマウス網膜内への生着，第 46 回日本網膜硝子体学会総会，青森市，2007

#### 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

1. 参考文献

1. Djukic M, Mildner A, Schmidt H, Czesnik D, Bruck W, Priller J, Nau R, Prinz M: Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain*.129:2394-2403, 2006
2. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y: 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett*. 407:313-319, 1997
3. Nambu H, Yuge K, Nakajima M, Shikata N, Takahashi K, Miki H, Uyama M, Tsubura A: Morphologic characteristics of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in C57BL mice. *Pathol.Int* 47:377-383, 1997

## 30. 毛様体扁平部における視細胞前駆細胞の新生と 周辺網膜への移動

西口康二、兼子裕規、中村 誠、加地 秀、寺崎浩子  
(名古屋大)

**研究要旨** 魚類や両生類では、網膜周辺部に神経幹細胞が多数存在し、生涯を通じて網膜神経細胞が再生される。哺乳類においては、網膜に隣接した毛様体の上皮には網膜神経細胞に分化する可能性を持った幹細胞が存在することが知られている。昨年度、我々は、網膜発生段階のマウスの毛様体扁平部に網膜幹細胞と杆体・錐体視細胞前駆細胞が存在することを確認し報告した。しかし、それらの毛様体の細胞の存在は発生に局限したものであった。今年度、我々は、遺伝性の網膜変性マウスモデルを用いて、網膜組織形成後でも毛様体扁平部において網膜神経細胞が新生されることを確認した。さらにそれらの細胞が網膜内に移動することを示唆する結果を得た。本研究の成果は、毛様体内に存在する網膜神経幹細胞を利用した網膜疾患に対する神経再生治療の可能性を提起するものである。

### A. 研究目的

網膜障害下の毛様体扁平部上皮における網膜神経幹細胞の分化・分布を調べる。

### B. 研究方法

生後3日から生後60日までの先天性の網膜変性症を有する rdl マウスに BrdU50～150mg/kg を腹腔内に投与し、その3時間後に眼球を採取した。眼球より作成した網膜凍結切片、flat-mount に対し抗 rhodopsin 抗体、抗 recoverin 抗体、PNA を用いて毛様体・網膜境界部における BrdU 陽性細胞、視細胞前駆細胞の形態、分布を組織学的に解析した。

(倫理面への配慮) マウスを使ったすべての実験は名古屋大学医学部動物実験センターにその研究計画の承認を得て行っている。また本研究は動物を用いた眼研究に関する ARVO のガイドラインに沿うものである。

### C. 研究結果

生後6日の rdl マウスの網膜・毛様体境界部において、毛様体扁平部の BrdU 陽性細胞の一部が、網膜内の BrdU 陽性神経幹細胞よりなる neuroblast layer と連続していた。

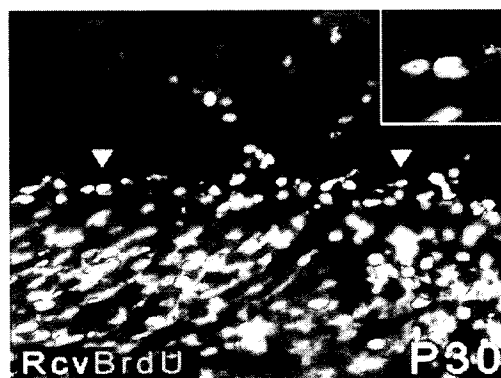


図1 毛様体扁平部における網膜組織形成後の網膜神経前駆細胞の新生

さらに、毛様体扁平部には多数の視細胞前駆細胞が存在することも確認された。生後30日の rdl マウスの毛様体扁平部においては、同日齢の野生型マウスには見られない杆体

視細胞前駆細胞の存在が認められ、リカバリン陽性細胞の数も野生型マウスに比べて約30倍多いことが判明した。これらのリカバリン陽性網膜神経前駆細胞のうち、網膜組織形成後の生後12日以降に新生されたと考えられるものは約3%以上であると推測された。また、毛様体扁平部と周辺網膜のリカバリン陽性細胞やロドプシン陽性細胞の形態が非常に似ており区別が困難であった一方、より後極網膜のそれらの細胞とは明らかに形態が異なった。さらに、生後12日にBrdUを注射して分裂細胞をラベルし、生後15日と30日に眼球を回収して毛様体と周辺網膜におけるBrdU陽性細胞の分布を組織学的に比較検討したところ、生後30日において、網膜内のBrdU陽性細胞の数が有意に多かった。

#### D. 考察

rd1マウスの毛様体扁平部と網膜は発生が非常に近く、網膜形成後も毛様体上皮に多数の神経前駆細胞が存在した。それらの細胞の中には、網膜形成後に網膜幹細胞より分化したものが含まれていた。また、神経前駆細胞が時間とともに網膜側へ移動することを示唆する結果を得た。

#### E. 結論

網膜変性を有するマウスの毛様体扁平部には、網膜形成後も多数の網膜神経前駆細胞が存在する。これらの細胞の一部は、網膜障害に反応して網膜形成後に新生されたものであり、周辺網膜の再生に関与している可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nishiguchi KM, Kaneko H, Nakamura M, Kachi S, Terasaki H: Identification of photoreceptor precursors in the pars plana during ocular development and after retinal injury. Invest Ophthalmol Vis Sci. (2007) in press

##### 2. 学会発表

H19年11月23日 第46回網膜硝子体学会シンポジウム 毛様体上皮細胞の網膜神経細胞への分化と周辺網膜の形成

#### 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. Moshiri A, et al: Retinal stem cells and regeneration. Int. J Dev. Biol. 48:1003-1014, 2004
2. Moshiri A, Reh TA: Persistent progenitors at the retinal margin of ptc<sup>+/-</sup> mice. J Neurosci. 24:229-237, 2004
3. Tropepe V, et al: Retinal stem cells in the adult mammalian eye. Science 287:2032-2036, 2000

## 31. 網膜色素変性モデルマウスの網膜変性過程における 神経栄養因子および受容体の発現変動

佐藤孝太<sup>1)2)</sup>、水越小百合<sup>1)3)</sup>、石黒誠一<sup>2)3)</sup>、中澤 満<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>弘前大、<sup>2)</sup>岩手大連合農学研究科生物資源科学、

<sup>3)</sup>弘前大農学生命科学部応用生命工学科細胞工学)

**研究要旨** 目的：網膜色素変性モデル動物 Retinal pigment epithelium 65 (RPE65) ノックアウトマウスにおける神経栄養因子および受容体の発現変動を解析する。

方法：視細胞の機能を反映する各種オプシンの mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR により確認した。錐体細胞の変性を確認するため Peanut Agglutinin (PNA) 染色をおこなった。アポトーシス細胞を検出するために TUNEL 法をおこない、さらに組織学的検討をおこなうため網膜組織切片を作製しヘマトキシリン・エオジン染色をおこなった。加えて、網膜内の神経栄養因子および受容体の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR により確認した。

結果：7 週齢の RPE65 ノックアウトマウスの網膜において、S 型-錐体細胞オプシン、M 型-錐体細胞オプシンおよびロドプシンの各 mRNA 発現量がコントロールである C57BL/6J マウスと比較して有意に減少していた。PNA 染色の結果、網膜下方において PNA 陽性細胞の減少が確認された。しかしながら、TUNEL 法によるアポトーシス細胞は検出されず、組織学的にも顕著な差は確認されなかった。CNTF、BDNF および NGF の各 mRNA 発現量について有意な差はみられず、CNTF 受容体にも有意な差は認められなかった。しかし GDNF ファミリーの受容体である RET の mRNA 発現量において有意な上昇を認めた。

結論：7 週齢の RPE65 ノックアウトマウスは細胞死および組織学的異常は生じないものの視細胞の機能低下が示唆された。同時に RET の mRNA レベルにおける発現上昇がみられた。このことから、RPE65 ノックアウトマウスでは視細胞の機能低下に伴い神経栄養因子の受容体発現が上昇することにより、視細胞死を遅延させる内在性の神経保護反応が働いている可能性が示唆された。

### A. 研究目的

網膜色素変性は成人中途視覚障害原因の第 3 位に位置する疾患であり、視覚障害対策上重要な疾患である。RPE65 は視サイクルにおいて all-*trans* retinyl ester を 11-*cis* retinol に変換する Isomerohydrolase として知られている(1)。

この遺伝子の異常により 11-*cis* retinal が合成されず視物質が供給されないことにより視覚障害に至ると考えられている。RPE65 遺伝子異常の患者は若年発症が特徴であり(2)、さらに錐体細胞に早期から異常が生じることから(3)、RPE65 遺伝子異常の網膜における分子機構の解明は臨床上の観点から

みても非常に意義深いと考える。網膜視細胞変性過程においてある種の神経栄養因子の発現が増加し、視細胞を保護する方向に働いているらしいということが知られている。そこで今回我々は、網膜色素変性モデルマウスである RPE65 ノックアウトマウスの網膜変性過程における神経栄養因子および受容体の発現を解析した。

## B. 研究方法

### 1. RPE65 ノックアウトマウスの入手

カリフォルニア大学サンフランシスコ校 (UCSF) の Lavail 氏から提供いただき、その後弘前大学動物実験施設にてノックアウトホモマウスとして系統維持している。今回の実験にはすべて 7 週齢の RPE65 ノックアウトマウスを用いた。

### 2. 遺伝子発現量解析

RPE65 ノックアウトマウスおよびコントロールである同週齢の C57BL/6J マウスの眼球より網膜を摘出し、AGCP 法により RNA を抽出した。これを逆転写酵素により cDNA 合成をおこない、得られた cDNA を鋳型としてリアルタイム PCR をおこなった。検量線を作製して相対定量し、各群の発現量を比較した。発現量補正のハウスキーピング遺伝子には  $\beta$ -actin を用いた (各群 n=3、Student's t-test、※ p<0.05、※※ p<0.01、Mean±SD)。

### 3. PNA による錐体細胞染色

マウス眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで一時間固定したのち、前眼部を除去して網膜を剥離させ網膜フラットマウント

を作製した。PBS で洗浄したのち、錐体細胞の糖タンパク質を認識する FITC 標識 PNA を 4°C で一晩反応させた。その後 PBS で洗浄したのち、蛍光顕微鏡で観察した。

### 4. 凍結切片の作製

摘出眼球をエタノール/ドライアイスにて包埋剤に包埋したのち、厚さ 5  $\mu$ m の凍結切片を作製した。

### 5. TUNEL 法

市販のキットを用い付属プロトコールに従って実験をおこなった。対比染色として DAPI による核染色をおこない、蛍光顕微鏡により観察をした。ポジティブコントロールとして、C57BL/6J マウスに *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) を腹腔内に 1.1mg 投与し 24 時間後に摘出した眼球を用いた。

### 6. 組織学的検討

網膜凍結切片を PBS で洗浄したのち、カラッチヘマトキシリンにて核染色をおこなった。その後エオジン Y で染色をおこない、脱水、透徹ののち非水溶性封入剤により切片を封入した。観察には光学顕微鏡を用いた。

## C. 研究結果

7 週齢の RPE65 ノックアウトマウスは、コントロールである C57BL/6J に比べて S 型-錐体細胞オプシン、M 型-錐体細胞オプシンおよびロドプシンの各 mRNA 発現量がそれぞれ有意に減少していた。PNA 染色の結果、網膜上方では PNA 染色陽性細胞数に顕著な差は見られなかったが、網膜下方では RPE65

ノックアウトマウスにおいて PNA 染色陽性細胞数の減少が認められた。しかしながら、RPE65 ノックアウトマウスでは TUNEL 陽性細胞は認められず、外顆粒層 (ONL) の菲薄化も認められなかった。また、CNTF、BDNF および NGF 各 mRNA 発現量について有意な差はみられず、CNTF 受容体にも有意な差は認められなかった。しかし GDNF ファミリーの受容体である RET の mRNA 発現量において有意な上昇を認めた。

#### D. 考察

網膜変性モデル動物において RET の mRNA 発現が上昇しているという報告は過去にはなく、今回の我々の報告が初めてとなる。これまでの報告では、網膜変性における神経栄養因子および受容体の発現上昇は、網膜変性に対する内在性の神経保護作用機構によるものと考えられている(4)。今回、RPE65 ノックアウトマウスにおいて RET の mRNA 発現上昇が確認されたことから、RPE65 遺伝子異常における網膜変性において RET シグナルを介した神経保護機構が働いていることが予想された。RET のリガンドである GDNF ファミリーは様々な網膜障害に対して神経保護効果を有していることがこれまでの研究により示されている(5-10)。このことから、RPE65 遺伝子異常による網膜変性において GDNF ファミリーを用いた治療の可能性が考えられる。

#### E. 結論

7 週齢の RPE65 ノックアウトマウスでは

mRNA レベルおよびタンパク質レベルで視細胞に異常が確認された。しかし、アポトーシス細胞や組織学的異常は確認されなかった。同時に RET の mRNA レベルにおける発現上昇がみられた。このことから、RET シグナルを介することにより視細胞死を遅延させる内在性の神経保護反応が働いている可能性が示唆された。

今後、GDNF ファミリーを含め他の神経栄養因子および受容体の発現解析を進め、RPE65 遺伝子異常による網膜変性に対する神経栄養因子を用いた治療の可能性について検討を進めていきたい。

#### 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

#### 1. 参考文献

1. Krzysztof Palczewski et al: The

- retinoid cycle and retina disease. *Vis Res.* 43:2957-2958, 2003
2. Birgit Lorenz et al: Early-Onset Severe Rod–Cone Dystrophy in Young Children with RPE65 Mutations. *Invest ophthalmol Vis Res.* 41(9):2735-2742, 2000
  3. Samuel G. Jacobson et al: Human cone photoreceptor dependence on RPE65 isomerase. *104(38):15123-15128, 2007*
  4. Jonathan Stone et al : Mechanisms of Photoreceptor Death and Survival in Mammalian Retina. *Prog Retin Eye Res.* 18(6):689-735, 1999
  5. Frasson M et al: Glial cell line derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. *Invest Ophthalmol Vis Res.* 40; 11:2724-2734, 1999
  6. Andrieu-Soler C et al: Intravitreal injection of PLGA microspheres encapsulating GDNF promotes the survival of photoreceptors in the rd1/rd1 mouse. *Mol Vis.* 17(11):1002-1011, 2005
  7. Schmeer C et al: Dose-dependent rescue of axotomized rat retinal ganglion cells by adenovirus-mediated expression of glial cell-line derived neurotrophic factor in vivo. *Eur J Neurosci.* 15(4):637-643, 2000
  8. Yan Q et al: Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats: comparison to and combination with brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *J Neurobiol.* 15; 38(3): 382-390, 1999
  9. Wu WC et al: GDNF gene therapy attenuates retinal ischemic injuries in rats. *Mol Vis.* 10 (10):93-102, 2004
  10. Jiang C et al: Intravitreal injections of GDNF-loaded biodegradable microspheres are neuroprotective in a rat model of glaucoma. *Mol Vis.* 24; 13:1783-1792, 2007



## 32. Retinal Degeneration Slow (rds) マウスヘテロ接合体の網膜変性に対するニルバジピンの効果

竹内侯雄<sup>1)</sup>、中澤 満<sup>1)</sup>、水越小百合<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup> 弘前大、<sup>2)</sup> 弘前大農学生命科学部細胞工学)

**研究要旨** 目的：網膜色素変性モデル動物 retinal degeneration slow (rds) マウスにおけるカルシウム拮抗剤ニルバジピン長期投与による網膜変性遅延効果を明らかにする。  
方法：ホモ rds マウスから、その野生型 balb/c マウスとのヘテロ rds マウスを作成した。ヘテロ rds マウスにニルバジピンを連日腹腔投与し、網膜電図の経過を非投与群と比較した。網膜組織の変化も光学顕微鏡および電子顕微鏡にて比較観察した。ニルバジピン投与にともなう網膜細胞での遺伝子発現の変化をマイクロアレイ法（イルミナ社）にて網羅的に検索し、マイクロアレイ法にて高発現を示した成長因子について、リアルタイム RT-PCR 法とウエスタンブロット法をおこない転写レベルと翻訳レベルでの遺伝子発現を検討した。さらに網膜における発現の局在につき免疫染色にて検討した。また、網膜色素変性原因遺伝子として知られている各種遺伝子の発現の強弱を検討した。  
結果：ヘテロ rds マウスに対するニルバジピン投与では、網膜電図において a 波・b 波とも非投与群に比べ長期にわたり振幅が有意に保たれていた ( $p < 0.01$ )。しかし光顕レベルでは、網膜組織の形態においては明らかな差異はみられなかったが、電顕レベルにおいて、ニルバジピン投与群の方が視細胞外節円板の密度が有意に高かった ( $p < 0.05$ )。マイクロアレイ法およびウエスタンブロット法にてニルバジピン投与により fibroblast growth factor (FGF)-13・22 および ciliary neurotrophic factor (CNTF) の遺伝子発現の上昇と、FGF-18 の低下が見られ、網膜における発現も同様に認められた。また、PRPF31 や RPGR 遺伝子などが 2 倍以上の発現亢進を示した。  
結論：ニルバジピンの長期投与によって、電気生理学的にも形態学的にも視細胞の変性は遅延していることが示され、この薬物による視細胞保護効果は rds マウスにおいてもはじめて証明されることとなった。分子レベルでの検索では、CNTF をはじめ FGF-13・22 の発現が上昇していたことからこれらの因子が何らかの役割を果たすことによって視細胞保護に働いていることが示唆された。その分子レベルでの要因は明らかではないものの視細胞にとって重要な働きをする遺伝子の発現がより維持されていた。とくに CNTF は、ヒトでの実際の治療に用いるべく治験が米国で計画されつつある段階であるが、本薬物の投与により内因性 CNTF の網膜での発現が高まることとが明らかになったことは本薬物の有効性を示唆するものと思われる。さらに、各種遺伝子の発現パターンは我々がかつて報告した RCS ラットでの発現パターンとは異なっており、原因遺伝子の差異により薬物による反応の分子機構が異なってくる可能性が示唆された。

## A. 研究目的

網膜色素変性は本邦における成人中途視覚障害原因の第3位に位置する疾患であり、視覚障害対策上重要な疾患である。我々は網膜色素変性の遺伝子診断や病態の理解そして有効な薬物治療の開発を目的として研究を継続してきた。とくに本研究を含む一連の研究では網膜色素変性の分子機構の理解から導かれる新しい薬物治療の有効性を検証することを目的に、各種網膜変性自然発症モデル動物を用いてカルシウム拮抗薬ニルバジピンの網膜変性に対する治療効果を、機能面、形態面および遺伝子発現などの面から検討してきた。これまでモデル動物としてヒト常染色体劣性遺伝網膜色素変性のモデルとなる Royal College Surgeons (RCS) ラット (mertk 遺伝子変異) と retinal degeneration (rd) マウス (C3H strain、pdeβ 遺伝子変異) を用いてニルバジピンの網膜変性遅延効果を明らかにしてきた<sup>1) -3)</sup> が、今回は常染色体優性網膜色素変性のモデルである retinal degeneration slow (rds) マウス (peripherin/RDS 遺伝子変異) のヘテロ接合体を作成して、ニルバジピンの有効性とその投与の遺伝子発現に及ぼす影響について検討したのでその結果を報告する。

## B. 研究方法

### 1. ヘテロ rds マウスの作成

rds マウスは九州大学眼科、石橋達朗教授と池田康博博士のご厚意により提供された。この rds マウスとその野生型である

balb/c マウスとの交配により、ヘテロ rds マウスを作成した。

### 2. ヘテロ rds マウスへのニルバジピン投与

生後 14 日目のヘテロ rds マウスに対し、200 日間連日ニルバジピンを体重 (g) あたり 0.004mg を腹腔内に投与し、これを投与群とした。また、コントロール群として、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を同容量、腹腔内投与した。さらに無処置の自然経過も自然経過群として観察した。

### 3. 機能面での解析

網膜の機能面での解析として網膜電図 (ERG) を用いた。測定にはガンツフェルド刺激が可能な動物実験用網膜電図装置 (メイヨー社製) を用い、ケタミン全身麻酔下 30 分の暗順応の後、白色閃光刺激を行い、角膜表面で電位の変化を記録した。

### 4. 形態面での評価

形態面の観察のため、一部の個体を経時的に頸椎脱臼により屠殺し、眼球を 4%パラホルムアルデヒドにより固定した後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い光学顕微鏡にて観察した。

また視細胞外節の円板構造の観察のため、眼球をエポン包埋固定し、その構造・密度について比較検討をおこなった。

### 5. マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現の検討

ニルバジピンを 200 日間連日投与したヘテロ rds マウスの眼球を赤道部にて半割し、網膜を採取、全 RNA を精製してこれをマイクロアレイ法 (マウス用、イルミナ社) に

て網羅的に転写レベルでの遺伝子発現を解析した。

#### 6. リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (リアルタイム RT-PCR)

マイクロアレイ法の結果、検討することが望ましいと判断されたいくつかの遺伝子を選択して、ニルバジピン投与の網膜について、それらの遺伝子転写物を RT-PCR 法 (TaqMan® PCR) にて定量検索した。

#### 7. ウェスタンブロット法

ニルバジピン投与後の網膜にてアポトーシス関連タンパク質の発現がどのように変化しているかを調べるため、網膜をホモジエナイズした後、遠心分離によって得られた可溶性画分を SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ナイロン膜に転写したのち、各種タンパク質に対する抗体を用いた抗原抗体反応をもとに可視化した。

#### 8. 免疫染色

マイクロアレイにて発現の上昇・低下の認められた growth factor について、マウス眼球をパラフィン包埋し、それぞれ、免疫染色を行い投与群・非投与群における網膜における発現の有無につき比較検討をおこなった。

#### C. 結果

ヘテロ rds マウスでは自然経過群ならびコントロール群いずれも、200 日間で ERG の振幅が徐々に低下した。ニルバジピン投与群では、コントロール群および自然経過群と比べ、ERG 波形は a 波および b 波とも有意にその振幅が保たれていた (Student's t-

検定、 $P < 0.05$ )。一方で形態観察では、投与 200 日目における光顕による網膜厚および外顆粒層の厚みには、いずれの群の間にも有意の差はみられなかったが、視細胞外節の円板構造を電顕によりその密度を比較したところ、ニルバジピン投与群の方が非投与群と比較して円板構造の乱れが少ない傾向が見られ、円板の密度が有意に高かった ( $p < 0.05$ )。マイクロアレイ法による転写レベルでの遺伝子発現の検討では fibroblast growth factor (FGF)-13・22 および ciliary neurotrophic factor (CNTF) の亢進がみられ、ウェスタンブロット法においても発現の亢進が見られていた。また、網膜色素変性の原因遺伝子として知られる *PRPF31* 遺伝子や *RPGR* 遺伝子などが 2 倍以上の転写亢進を示した。

上記 growth factor について、免疫染色をおこなったところ、ウェスタンブロットにおける growth factor のタンパク発現に一致して、内顆粒層および神経節細胞層にて発現が確認された。

#### D. 考察

ニルバジピンの腹腔内投与により、ヘテロ rds マウスの網膜変性の進行が ERG 上遅延することが明らかとなった。その分子レベルでの要因は明らかではないが、*PRPF31* 遺伝子や *RPGR* 遺伝子など視細胞にとって重要な働きをすることが知られ、かつそれらの異常で網膜色素変性が発症することが明らかになっている遺伝子の発現が増加していた。これは、ニルバジピン投与により視

細胞の生存や代謝活性がより保持されていることを間接的に示唆する結果であると考えられる。

FGF-13・22 は、中枢神経において、神経細胞突起の伸長・発達に関わる growth factor であり、今回、ニルバジピン投与によりタンパクレベルにおいても発現亢進していたことは、rds マウスにおける網膜変性遅延にはいくつかの因子が関わることを考えられた。さらに、ニルバジピン投与により内因性に CNTF 発現上昇が見られ、本薬物の有効性を示唆するものと考えられた。

これまでに、Sato ら<sup>2)</sup> が報告した RCS ラットを用いたニルバジピンの網膜変性保護作用の解析において、視細胞のアポトーシスに抑制的に働く FGF2 の有意な発現がみられていたが、今回の我々が行った実験では、これらの有意な発現増加はみられなかった。

このことは、RCS ラットとヘテロ rds マウスでは同じ網膜変性でも重症度や進行度に差があり、視細胞変性の分子機構にも差があるのではないかと考えられる。したがってこの考えによれば、今回の研究の結果を説明する機序として、網膜変性の原因遺伝子や網膜変性の重症度・進行度の違いにより薬物による反応の分子機構が異なってくる可能性もあるのではないかと考えられた。

## E. 結論

ヒト常染色体優性網膜色素変性のモデルであるヘテロ rds マウス網膜変性に対して、

ニルバジピン腹腔内投与は ERG の振幅低下を有意に抑制した。その分子機構についてはまだ検討の余地がある。

## 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

竹内侯雄、中澤 満、間宮和久、山崎仁志、水越小百合：Retinal Degeneration Slow (rds) マウスヘテロ接合体の網膜変性に対するニルバジピンの効果。第 112 回日本眼科学会総会、2007 年 4 月

## 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. Yamazaki H, et al.: Nilvadipine, a Ca<sup>2+</sup> antagonist preserves retinal morphology and functions in RCS rat. Invest Ophthalmol Vis Sci, 43(4): 919-926, 2002.
2. Sato M, et al.: Study of pharmacological effects of