

第 113 回 日本眼科学会総会 評議員会指名講演 II

眼疾患と動物モデル

網膜・視神経疾患動物モデルの網膜電図解析

近藤 峰生

名古屋大学大学院医学系研究科眼科学教室

共同研究者名

寺崎 浩子¹⁾, 中村 誠¹⁾, 伊藤 逸毅¹⁾, 加地 秀¹⁾, 杉田 二郎¹⁾, 米今 敬一¹⁾, 西口 康二¹⁾
 上野 真治¹⁾, 石川 浩平¹⁾, 井口 優子¹⁾, 丹羽 泰洋¹⁾, 朴 昌華¹⁾, 池野谷一輝¹⁾, 宮田健太郎¹⁾
 子安 俊行¹⁾, 中村 美晴¹⁾, 杉田 糾¹⁾, 西原 裕晶¹⁾, 栗本 幸英¹⁾, 坂井 隆夫¹⁾, 田野 保雄²⁾
 不二門 尚²⁾, 瓶井 資弘²⁾, 辻川 元一²⁾, 中内 一揚²⁾, 佐藤 茂²⁾, 森本 壮²⁾, 西田健太郎²⁾
 臼倉 治郎³⁾, 西沢 佑治⁴⁾, 古川 貴久⁵⁾, 小池千恵子⁵⁾, 酒井 勉⁶⁾, 町田 繁樹⁷⁾, 志村 雅彦⁸⁾
 中澤 徹⁹⁾, 玉置 泰裕¹⁰⁾, 柳 靖雄¹⁰⁾, Robert E. Marc¹¹⁾, Bryan W. Jones¹¹⁾

¹⁾名古屋大学大学院医学系研究科眼科学教室, ²⁾大阪大学大学院医学系研究科眼科学教室

³⁾名古屋大学エコトピア科学研究所融合プロジェクト部門, ⁴⁾中部大学生命健康科学研究所

⁵⁾大阪バイオサイエンス研究所発生生物学部門, ⁶⁾東京慈恵会医科大学眼科学教室

⁷⁾岩手医科大学医学部眼科学教室, ⁸⁾NTT 東日本東北病院眼科, ⁹⁾東北大学大学院医学系研究科眼科学教室

¹⁰⁾東京大学大学院医学系研究科眼科学教室, ¹¹⁾John A. Moran Eye Center, University of Utah School of Medicine)

研究協力者

北田 健作¹²⁾, 塩田 明¹³⁾, 吉川 眞男¹⁴⁾, 長坂英一郎¹⁴⁾, 工藤 英貴¹⁴⁾, 酒井 宏之¹⁵⁾

¹²⁾株式会社北山ラベス, ¹³⁾株式会社ワイエス研究所, ¹⁴⁾有限会社メイヨー, ¹⁵⁾参天製薬株式会社)

要 約

動物モデルは、疾患の病態の理解や新たな治療法の開発に重要である。さまざまな自然発症あるいは遺伝子操作による動物モデルがこれまで研究されてきた。動物モデルの視機能を評価する際には、網膜の他覚的な層別解析ができる網膜電図(ERG)はきわめて有用な検査法である。我々は、ERGを用いてさまざまな網膜および視神経疾患の動物モデルの視機能を解析してきた。

まず、マウスの錐体 ERG における ON 経路と OFF 経路の関与を研究する目的で、代謝型グルタミン受容体(mGluR 6)欠損マウスの ERG を調べた。このマウスの ERG の特性と *cis*-2,3 piperidine dicarboxylic acid (PDA) の眼内注射の影響を調べることによって、マウスの錐体 ERG には OFF 経路よりも ON 経路の関与の方が大きいことが分かった。また、ピカチュリン欠損マウスの ERG では、a 波は正常である一方、b 波の潜時が著しく遅延しており、このマウスでは視細胞から双極細胞への伝達に異常があることが示唆された。

我々はまた、bacterial artificial chromosome (BAC)

遺伝子改変技術を用いて、ウサギの網膜色素変性(RP)モデルであるロドプシン P347L トランスジェニック(Tg)ウサギを作製した。このウサギは杆体優位の進行性網膜変性を起こし、視細胞の変性の度合いには著しい部位的な違いがあることが分かった。このウサギの ERG は週齢とともにすべての成分が減弱したが、b 波よりも a 波の方がより障害されており、律動様小波(OPs)がすべての成分の中で最も保たれていた。興味深いことに、若い Tg ウサギの OPs は同じ週齢の野生型ウサギよりも有意に大きかった。薬理的な実験により、若い Tg ウサギにみられるこの大きな OPs は、網膜内層の二次的機能変化に起因していることが示唆された。このような OPs の増大現象は、実際の RP 患者の黄斑部局所 ERG でもみられた。

また我々は、青色背景光下に赤色スポット刺激を用いて、アカゲザルの黄斑部から局所の photopic negative response (PhNR) を記録することに成功した。局所 PhNR の振幅は、黄斑部では a 波や b 波の振幅と比較して

別刷請求先：466-8550 名古屋市昭和区鶴舞 65 名古屋大学大学院医学系研究科眼科学教室 近藤 峰生

(平成 21 年 10 月 20 日受付, 平成 21 年 12 月 7 日改訂受理) E-mail: kondomi@med.nagoya-u.ac.jp

Reprint requests to: Mineo Kondo, M. D., Ph. D. Department of Ophthalmology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsuruma-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan

(Received October 20, 2009 and accepted in revised form December 7, 2009)

大きいことが分かった。また、PhNR の振幅は黄斑部で耳側よりも鼻側で大きく、また下側よりも上側で大きかった。サルの眼内に tetrodotoxin (TTX) を注射することによって、PhNR のこのような非対称は網膜内層に存在する TTX 感受性スパイクニューロンの活動性の違いによるものであることが分かった。

このように、ERG はさまざまな動物モデルの視機能解析にきわめて有用であった。(日眼会誌 114 : 248—279, 2010)

キーワード：網膜電図, 動物モデル, トランスジェニック, ウサギ, サル

A Review

Animal Models of Human Retinal and Optic Nerve Diseases Analysed Using Electroretinography

Mineo Kondo

Department of Ophthalmology, Nagoya University Graduate School of Medicine

Abstract

Investigations of animal models with diseases found in humans are important to the understanding of their pathophysiology and for developing new treatments. Both naturally occurring and genetically-manipulated animal models of human retinal and optic nerve diseases have been studied in this manner. Electroretinography (ERG) is valuable for the evaluation of the visual function of animal models, because a layer-by-layer assessment of the retina can be done objectively. We used ERGs to analyze the visual functions of animal models of human retinal and optic nerve diseases.

To investigate the contribution of the cone ON- and OFF-pathways to the mouse photopic ERGs, we studied the properties of the photopic ERGs of metabotropic glutamate receptor subtype 6-deficient mice. The results of the ERG and the effect of an intravitreal injection of *cis*-2,3 piperidine dicarboxylic acid (PDA) in these mice suggest that the contribution of the post-synaptic ON-pathway to the photopic ERG of mice is larger than that of the OFF-pathway. The ERGs of pikachurin-deficient mice had normal a-waves with severely delayed b-waves, indicating that the signal transmission from the photoreceptors to the bipolar cells was impaired in these mutant mice.

We also generated a rabbit model of retinitis pigmentosa (RP), the rhodopsin P347L transgenic (Tg) rabbit, by using bacterial artificial chromosome (BAC) transgenesis. These rabbits showed a rod-dominant, progressive retinal degeneration with marked regional variations in the loss of photoreceptors. All ERG components of the Tg rabbits de-

creased progressively with the a-waves more affected than the b-waves, and with the oscillatory potentials (OPs) the best preserved. Interestingly, the OP amplitudes of young Tg rabbits were significantly larger than those of wild-type rabbits. Pharmacological experiments showed that the significantly larger OPs in young Tg rabbits resulted from secondary alterations in the inner retinal function. This type of supernormal OPs has also been observed in the focal macular ERGs of some RP patients.

We succeeded also in eliciting focal photopic negative responses (PhNRs) from the macula of rhesus monkeys with a red stimulus spot on a blue background illumination. The amplitudes of the focal macular PhNRs were relatively large when compared to those of the a- and b-waves. We found that the PhNR of the upper macular area was significantly larger than that of the lower macula, and the PhNR of the nasal macula was significantly larger than that of the temporal macula. Results of intravitreal injection of tetrodotoxin (TTX) in monkeys suggest that these asymmetries of PhNR are mainly caused by TTX-sensitive spiking neurons of the inner retina.

Thus, ERGs have proven to be quite useful for objectively studying the visual functions in various animal models of human retinal and optic nerve diseases.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 114 : 248—279, 2010)

Key words : Electroretinogram (ERG), Animal model, Transgenic, Rabbit, Monkey

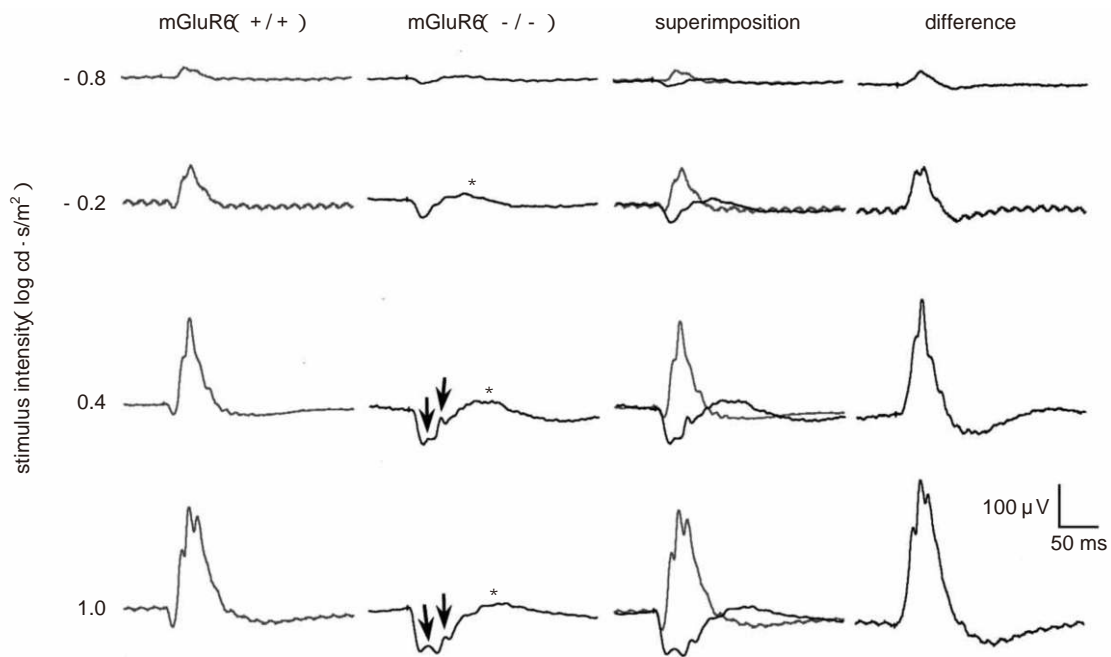


図 1 野生型マウス(mGluR6^{+/+})と mGluR6 欠損マウス(mGluR6^{-/-})の錐体網膜電図(ERG)の波形。4 段階の刺激強度で記録された波形が示されている。左から順に、野生型マウスの波形、mGluR6 欠損マウスの波形、両者の重ね合わせ、両波形の差(野生型マウス-mGluR6 欠損マウス)。mGluR6 欠損マウスの錐体 ERG では、a 波の後に早期の陽性成分(矢印)と後期の緩徐な陽性成分(*印)の 2 つの陽性成分がみられた。

(文献 22 の図を許可を得て転載)

I 緒 言

網膜電図(electroretinogram: ERG)は、眼科臨床において網膜機能を他覚的に評価することができる重要な検査である。夜盲や昼盲を来す網膜疾患の診断、中間透光体の混濁例に対する網膜機能測定、網膜血行異常や網膜虚血の評価、原因不明の視機能障害の診断、さらに小児の網膜機能判定などの際には ERG は欠かすことができない。従来の中視野 ERG 検査では、a 波、b 波、律動様小波(OPs)の 3 つの成分が主に評価の対象とされ、杆体成分と錐体成分を分離して記録する方法が一般的である¹⁾。最近ではこれに加え、網膜局所の電気反応を記録する局所 ERG^{2)~4)}や多局所 ERG^{5)~7)}、網膜内層機能を反映するパターン ERG⁸⁾⁹⁾や photopic negative response (PhNR)¹⁰⁾¹¹⁾、青錐体の機能を反映する S-cone ERG¹²⁾¹³⁾など、目的に応じてさまざまな種類の ERG を得ることが可能になってきている。

これに対して基礎研究の領域では、ERG は自覚的な検査が困難な動物モデルにおける視機能検査として長い歴史がある。ERG が網膜機能測定に使用される動物種は多岐にわたり、メダカ、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、サルなど実にさまざま¹⁴⁾¹⁵⁾であるが、動物種は異なっても ERG の基本的な波形や特性は類似している点は興味深い。

動物モデルに ERG が使用される場合は、主に以下の

3 つである。まず、ある動物モデルに網膜や視神経の機能異常があると考えられた場合に、その程度と経過を知る目的である。このような動物モデルには、自然発症のものや遺伝子改変を行ったものの両方が含まれる。例えば網膜変性のモデル動物を作る目的でマウスの遺伝子を改変した場合、本当にそのマウスが進行性の網膜機能障害を有しているかどうかは組織学的評価とともに ERG を用いて証明するのが普通である。第 2 の目的は、網膜内における役割がまだよく知られていない遺伝子の機能を研究するために、その遺伝子を改変(欠損)させた動物を作製し、その動物から ERG を記録することによって遺伝子の機能を推定するというものである。例えば *NRL* 遺伝子を欠損したマウスから ERG を記録することによって、この遺伝子が視細胞の運命決定に重要な役割を果たすことが分かった例¹⁶⁾などはこれにあたる。第 3 の目的は、既に網膜や視神経疾患の動物モデルとして確立されているものに対して何らかの治療を試み、その治療が奏功しているかどうかを ERG を用いて確認するというものである。このような場合には、やはり組織学的評価と ERG による機能評価の両方で評価することが基本となっている。このように、網膜・視神経疾患の基礎研究領域において動物モデルに ERG が施行される機会は非常に多い。

本稿では、我々が網膜および視神経疾患の動物モデルに対してこれまで取り組んできた ERG 解析について示

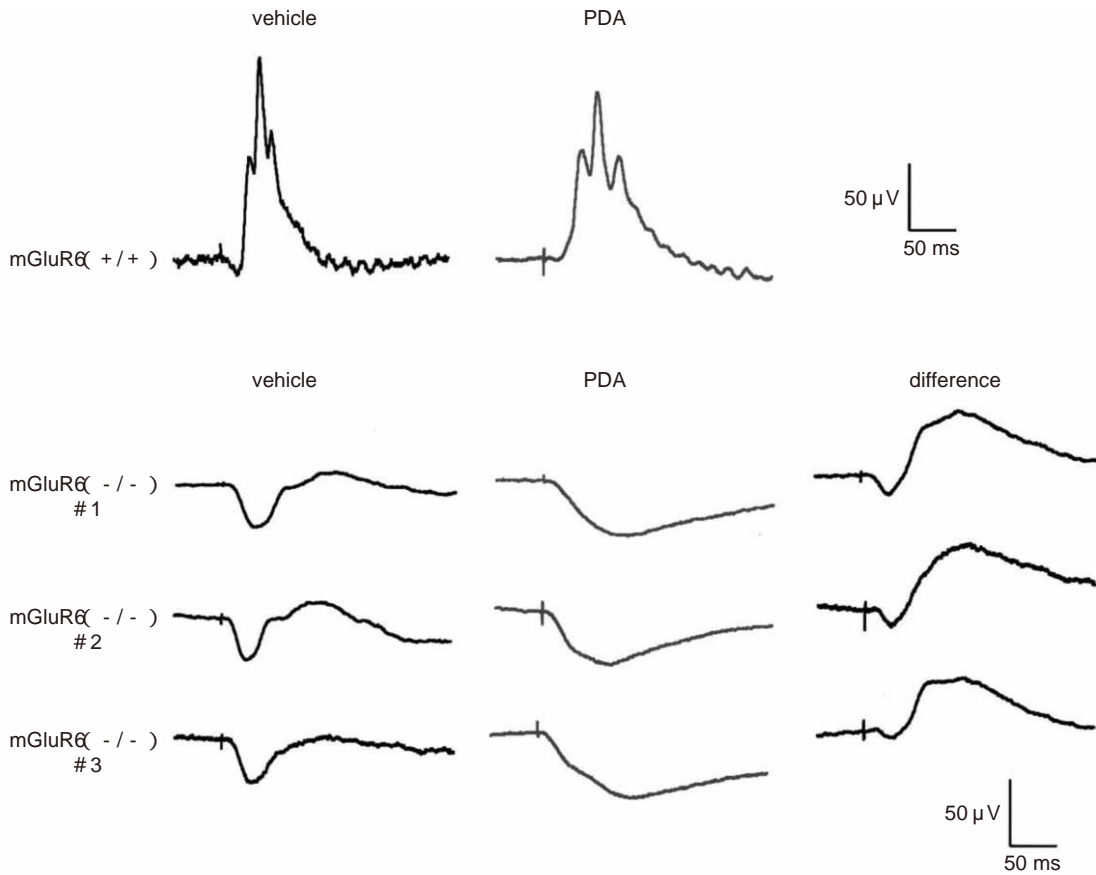


図 2 野生型マウス (mGluR6^{+/+}) と mGluR6 欠損マウス (mGluR6^{-/-}) の錐体網膜電図 (ERG) における *cis*-2,3 piperidine dicarboxylic acid (PDA) の効果.

野生型マウス 1 匹における結果を上段に、mGluR6 欠損マウス 3 匹における結果を下段に示す。硝子体内に生理食塩水を注入した結果を左列に、PDA を注入した結果を中列に、両者の差を右列に示した。mGluR6 欠損マウスの波形から PDA を作用させた後の波形を差し引くことによって、マウス錐体 ERG における OFF 経路成分を抽出することができる (右列)。

(文献 22 の図を許可を得て転載)

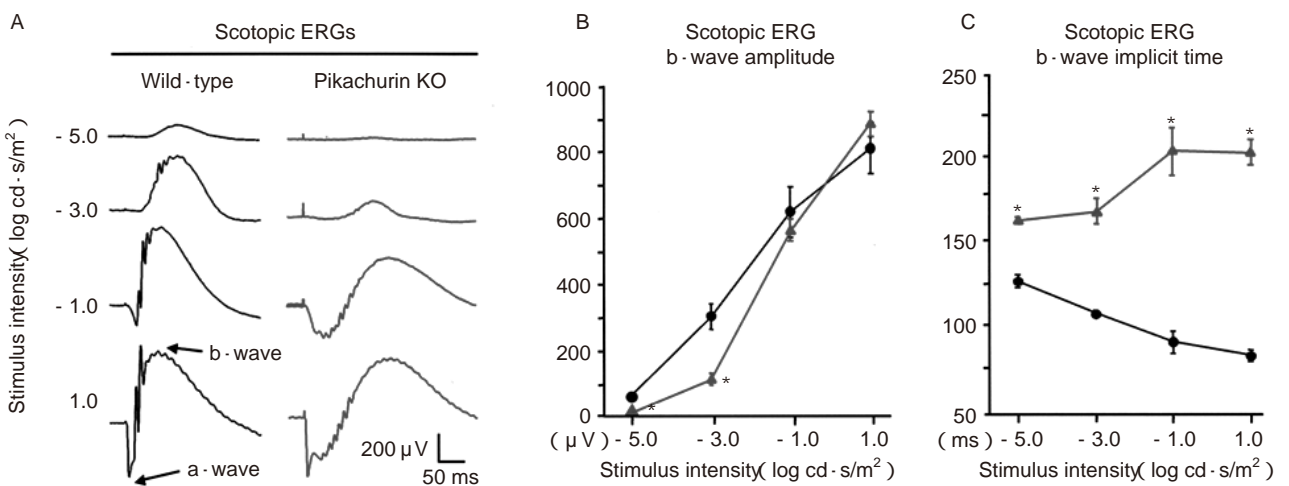


図 3 暗順応下で記録したピカチュリン欠損マウスの網膜電図 (ERG) 所見.

A: 野生型マウス (wild-type) とピカチュリン欠損マウス (pikachurin KO) の ERG 波形が示されている. B: 両マウスの暗順応下 ERG b 波の刺激—振幅曲線. ●: 野生型マウス, ▲: ピカチュリン欠損マウス. C: 両マウスの暗順応下 ERG b 波の刺激—潜時曲線. ピカチュリン欠損マウスでは, a 波は正常であるが, b 波の潜時が遅れており, また弱い刺激強度における b 波振幅が野生型マウスに比べて低いことが分かる. *: $p < 0.05$.

(文献 26 の図を許可を得て転載)

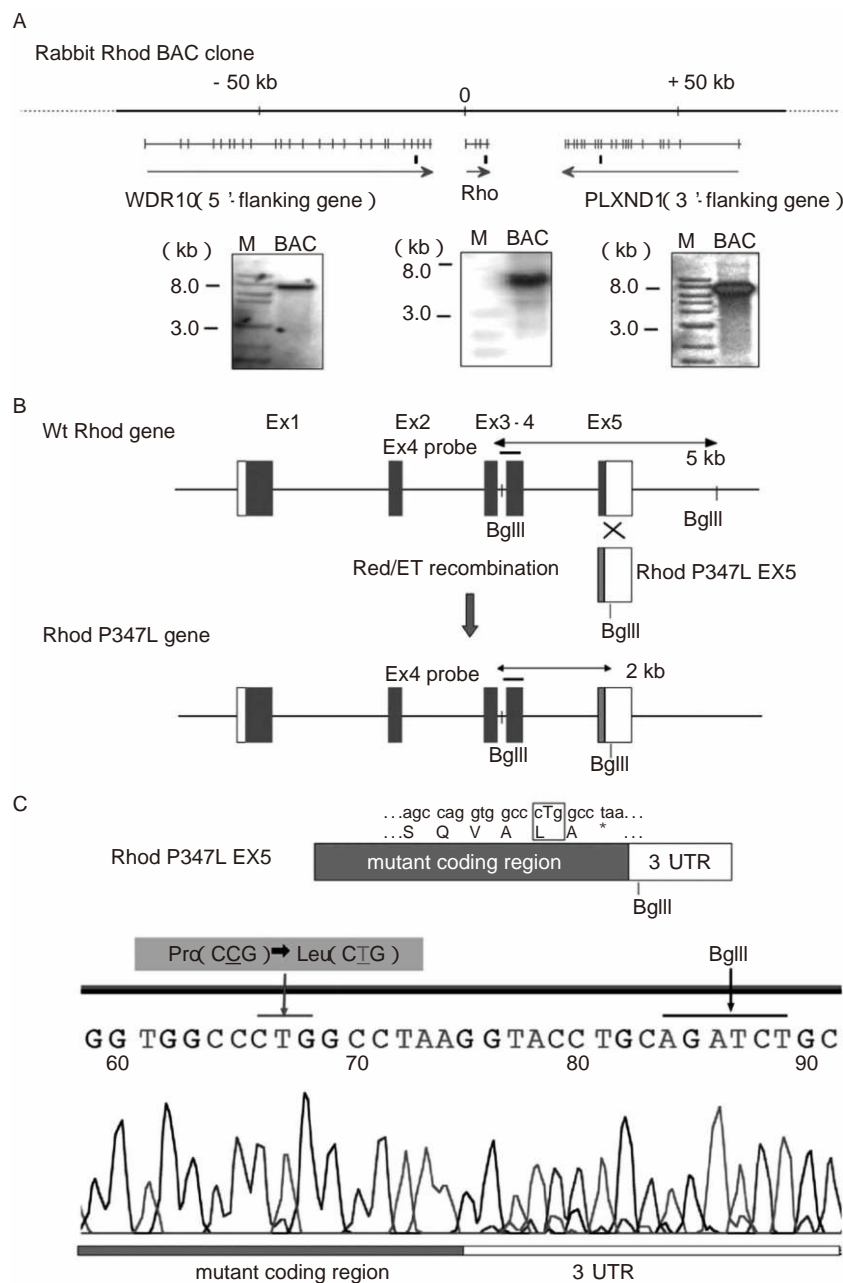


図 4 Bacterial artificial chromosome (BAC) 相同組換え法を用いた、ウサギ遺伝子の改変。

A:今回用いた、ロドプシン遺伝子の全長を含んだウサギ BAC クローン。ロドプシン遺伝子(Rho)の前後の遺伝子(WDR10 と PLXND1)を確認することで、この BAC がロドプシン遺伝子の全長を含んでいることが確認された。B:改変された BAC 遺伝子。相同組換えにより、exon 5(Ex5)に Pro347Leu 遺伝子変異が導入されている。C:BAC のシーケンス解析の結果により、確かにロドプシン遺伝子に P347L 変異が導入されていることが確認された。

(文献 35 の図を許可を得て転載)

す。特に、①マウスから記録する ERG、②トランスジェニック(Tg)ウサギの作製とその ERG 解析、③サルを用いた新たな ERG 成分の証明、の 3 項目を中心に述べる。本論文における動物実験では、常に倫理的問題に配慮し、動物の苦痛が最小限となるように工夫して行った。

II マウスから記録する ERG

1. マウスの重要性

マウスは、実験動物として現在最もよく使用されている動物である。小型哺乳類で繁殖が容易であり、全ゲノム配列が決定されていて遺伝子改変動物の作製も確立されている。網膜や視神経疾患の動物モデルにおいてもマウスは中心的な役割を果たしており、原因遺伝子が特

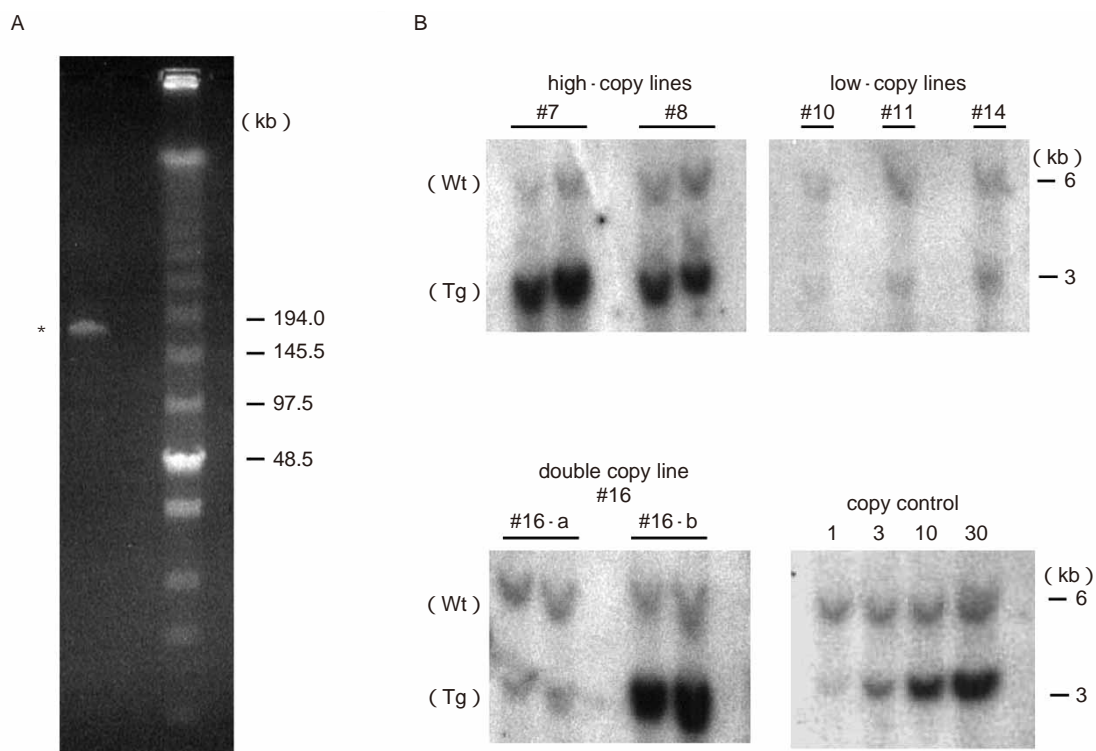


図 5 トランスジェニック(Tg)ウサギ作製に用いた変異遺伝子とサザンブロット解析の結果.

A: 今回我々が作製した, 遺伝子変異を含んだ bacterial artificial chromosome (BAC). 我々が用いた BAC (*印)は, 約 150 kb であることが分かった. B: 6つの異なるラインの Tg ウサギのサザンブロット解析の結果. 変異遺伝子の発現量が異なる 6つのラインの結果が示してある. この中のライン 7 を主に研究対象とした. なお, ライン 16 は変異遺伝子が 2 箇所挿入されたダブルコピーラインであったため, さらに 16-a と 16-b の 2つのラインに分離した.

(文献 35 の図を許可を得て転載)

定されている遺伝性網膜・視神経疾患では, ほとんどの疾患に対するマウスモデルが存在しているほどである. また, マウスの ERG 波形はヒトのそれと比較的よく似ており, マウスから得られる ERG の結果を実際の患者の ERG と比較して解釈できる利点も大きい. ここでは, 2種類の遺伝子改変マウスの ERG 解析から得られた知見について述べる.

2. mGluR6 欠損マウスの錐体 ERG 解析

哺乳類の網膜では, 杆体視細胞は ON 型双極細胞のみと連結し, 錐体は ON 型双極細胞と OFF 型双極細胞という 2種類の二次ニューロンとシナプスを形成している¹⁷⁾¹⁸⁾. mGluR6 欠損マウスは, ON 型双極細胞のシナプスに発現している代謝型グルタミン受容体(mGluR6)の機能を欠損させたマウス¹⁹⁾であり, 完全型先天存在性夜盲²⁰⁾²¹⁾の動物モデルとして知られている.

この mGluR6 欠損マウスの ERG に関しては, これまで主に杆体 ERG に関する研究が行われてきた. mGluR6 欠損マウスの杆体 ERG では, 視細胞の機能を反映する a 波は正常であるが, 杆体経路の二次ニューロンである ON 型双極細胞の機能を反映する杆体 b 波はまったく記録されない¹⁹⁾. しかしながら, このマウスの錐体 ERG の波形を詳細に研究した報告はない. 錐体系回路におい

て ON 経路が欠損して OFF 経路のみとなったマウスの ERG の波形変化を研究することは, 動物モデルとしてよく使用されるマウスの錐体系機能を知るうえできわめて興味深い. そこで今回は, mGluR6 欠損マウスの錐体 ERG の特性を研究し, マウスの錐体 ERG に対する錐体視細胞, ON 経路, OFF 経路という 3つの構成成分の関与について調べた²²⁾.

この研究では, 野生型マウスと mGluR6 欠損マウスに 70 mg/kg のケタミンと 14 mg/kg のキシラジンを筋注して全身麻酔を行った. ERG の刺激には Ganzfeld ドームを用い, 錐体 ERG の記録には, 1.3 log cd/m²の白色背景光下で 10 分間明順応した後, 最大刺激光 1.0 log cd-s/m²を 0.6 log 間隔で変化させて記録した.

野生型マウスと mGluR6 欠損マウスから記録した錐体 ERG の波形を図 1 に示す. 野生型マウスと比較すると, mGluR6 欠損マウスの錐体 ERG は b 波の振幅が小さく, 野生型マウスの b 波振幅の 35% 程度であった. この mGluR6 欠損マウスにみられる b 波は, a 波の後に続く小さな陽性波(矢印)と, それに続く緩徐な陽性波(*印)の 2つの成分から構成されていた. 一方で錐体 ERG の a 波振幅は野生型マウスよりも mGluR6 欠損マウスの方が大きく, 野生型マウスの約 180% であった.

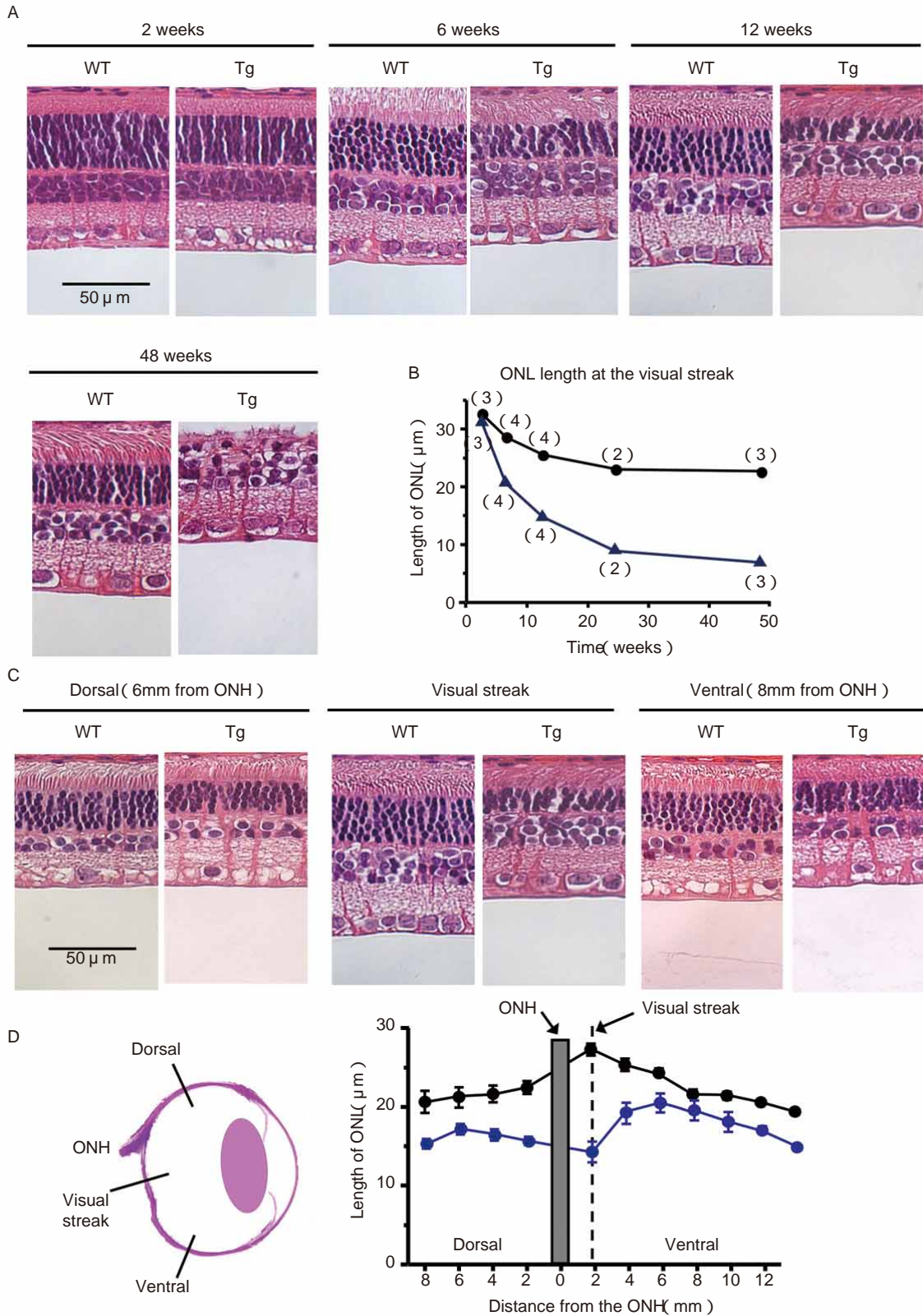


図 6 ライン7のトランスジェニック(Tg)ウサギの光学顕微鏡による網膜組織所見。

A : 野生型(WT)ウサギと Tg ウサギのさまざまな週齢における網膜組織。視神経乳頭を通る垂直断面における網膜中心部(visual streak)の組織が示されている。週齢が進むほど、網膜外層の厚みが減少している。B : 各週齢における、網膜中心部の外顆粒層(ONL)層の厚み(μm)の変化。● : 野生型ウサギ, ▲ : Tg ウサギ(ライン7)。C : 網膜の3つの部位〔背側(dorsal), 中心部(visual streak), 腹側(ventral)〕による組織所見の違い。WTウサギでは中心部(visual streak)の外顆粒層が最も厚いが、Tgウサギでは逆にこの部位が周辺部よりも薄い。D : 視神経乳頭を通る垂直断面の網膜組織における、外顆粒層の厚みのプロット。生後12週のウサギにおける結果(n=5)が示されている。ONH : 視神経乳頭。● : 野生型ウサギ(12週), ▲ : Tgウサギ(ライン7, 12週)。

(文献 35 の図を許可を得て転載)

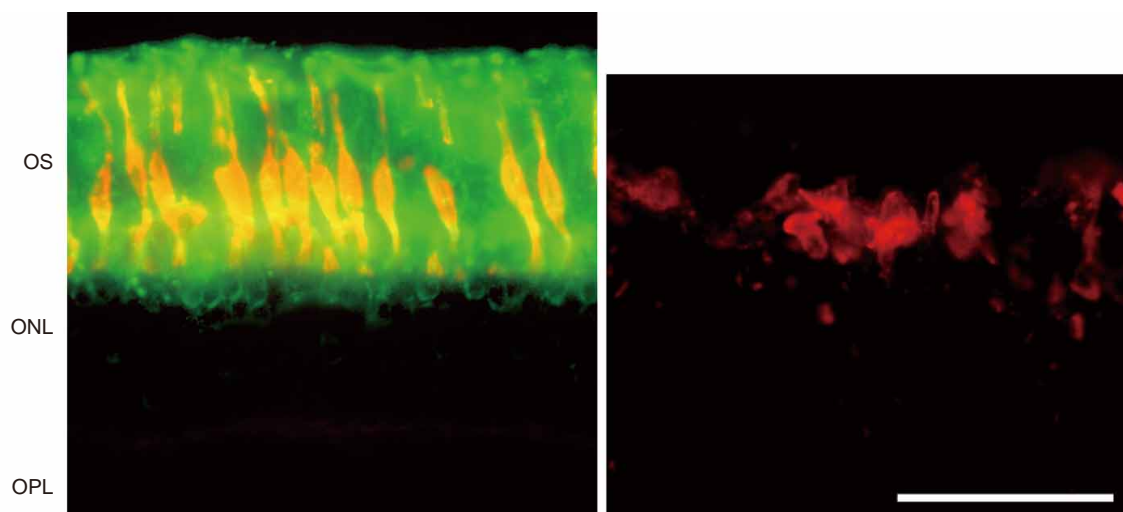


図 7 生後 48 週の野生型ウサギ(左)とトランスジェニック(Tg)ウサギ(右)の網膜の免疫組織学的結果。杆体はロドプシン抗体(緑)で、錐体は PNA-lectin(赤)で染色されている。Tg ウサギの網膜は 48 週の時点で杆体がほぼ消失し、錐体の外節も短縮していることが分かる。バーは 50 μm 。OS: 視細胞外節, ONL: 外顆粒層, OPL: 外網状層。

(文献 35 の図を許可を得て転載)

しかしながら、錐体視細胞の機能を直接反映している a 波の落ち始めの成分(leading edge)は両者で一致していたことから、mGluR6 欠損マウスの a 波振幅が大きい理由は、陽性波である b 波成分の減少による見かけ上の振幅増加であることが分かった。また、野生型マウスから mGluR6 欠損マウスの錐体 ERG を差し引いて錐体 ERG の ON 経路成分を抽出すると、マウス錐体 ERG の大部分は ON 経路の活動電位によって構成されていることが分かった(図 1, 右端の波形)。

次に、マウスの錐体 ERG における OFF 経路成分の関与を研究する目的で、mGluR6 欠損マウスの硝子体内に視細胞と OFF 型双極細胞の間の伝達を遮断する *cis*-2,3 piperidine dicarboxylic acid (PDA) を注入した(図 2)。その結果、mGluR6 欠損マウスにおいて a 波の後にみられた 2 つの陽性波は PDA 注入後にほぼ完全に消失し、緩徐な陰性波のみ(視細胞成分)が残った。さらに mGluR6 欠損マウスにおける PDA 注入前後の波形を差し引きして、マウスにおける錐体 OFF 経路成分を抽出した。その結果、OFF 経路成分として小さな陰性波とそれに続く緩徐な陽性波が得られた(図 2, 右の波形)。この結果から、キセノン光のようなフラッシュ刺激で記録されるマウスの錐体 ERG において、OFF 経路は a 波と b 波の両方の一部分のみに関与していることが分かった。

また今回の研究では、波形の差し引きによりマウスの錐体 b 波に対する ON 経路成分と OFF 経路成分の関与を直接比較することができた。両者の振幅を計測すると、OFF 経路成分の b 波の振幅(図 2 の右の波形)は ON 経路成分(図 1 の右端の波形)の b 波の振幅の 23% しかないことが分かった。この結果により、マウスの錐

体 ERG の b 波の起源として、錐体の OFF 経路成分に比べて ON 経路成分が圧倒的に優位であることが証明された²²⁾。Peachey ら²³⁾もフリッカ ERG を用いてマウスの錐体系 ERG における ON 経路成分の優位性を報告している。これに対して霊長類では、フラッシュ刺激による錐体 ERG の b 波²⁴⁾やフリッカ ERG²⁵⁾における ON 経路成分と OFF 経路成分の関与の度合いはほぼ等しいことが知られている。マウスと霊長類の錐体 ERG 波形における ON 経路成分と OFF 経路成分の関与の比重が違う理由は明らかではないが、マウスと霊長類間の ON 経路と OFF 経路の神経細胞の数あるいは電気的特性の違いに由来するものであると考えられた。この結果は、マウスの錐体 ERG の結果を解釈する際に重要な所見であると考えられた。

3. ピカチュリン欠損マウスの ERG 解析

哺乳類では、光刺激は視細胞で電気信号に変換され、リボンシナプスという特殊なシナプスを介して二次ニューロンである双極細胞および水平細胞に伝達される。このリボンシナプスでは、視細胞の末端に双極細胞と水平細胞の突起が入り込んだような構造をしており、視細胞から放出されるグルタミンが二次ニューロンに効率的に伝達されるのに都合のよい構造となっている。しかしながら、この特殊なリボンシナプスが形成される仕組みはほとんど分かっていない。Sato ら²⁶⁾は、視細胞の発生や機能にかかわる遺伝子群を網羅的にクローニングし、その結果、運動神経と骨格筋の間のシナプス形成に重要な細胞外マトリックス蛋白質と類似したドメイン構造をもつ新規の蛋白質であるピカチュリンを見出した。ピカチュリンは生後では視細胞に特異的に発現しており、リボンシナプスが存在する外網状層に局在していた。さら

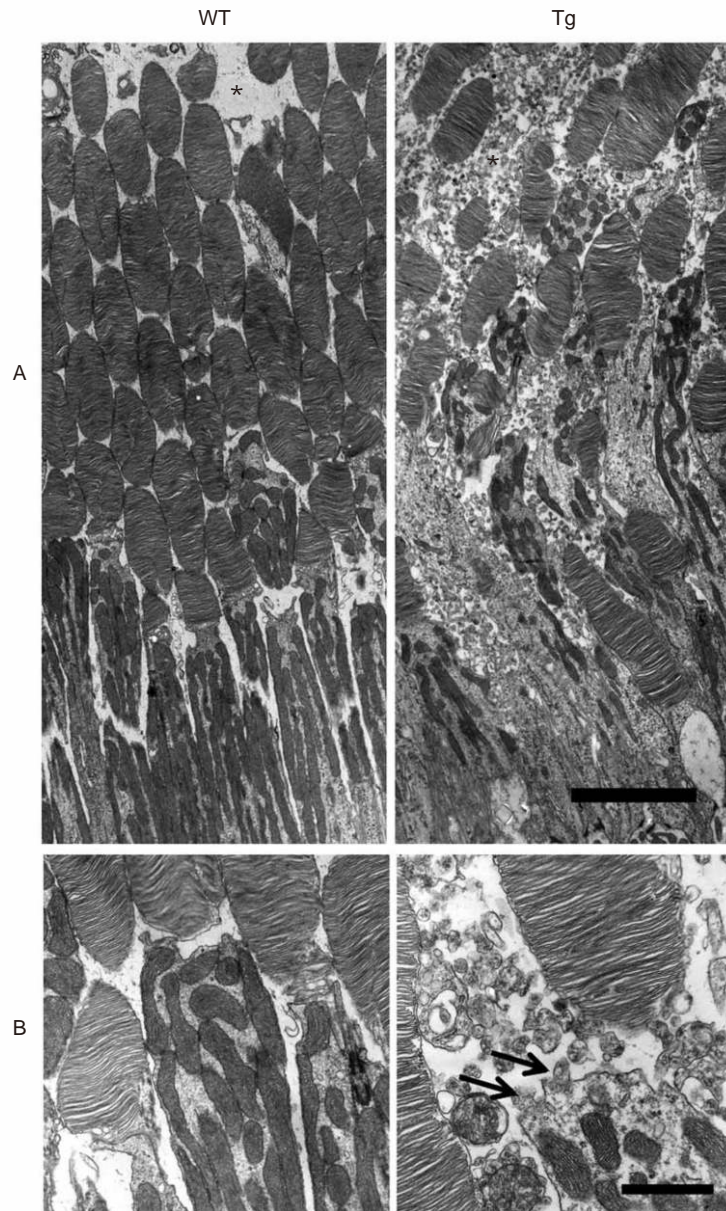


図 8 生後 6 週の野生型 (WT) ウサギ (左) とトランスジェニック (Tg) ウサギ (右) の網膜の電子顕微鏡写真。A: 視細胞間隙 (*印) をみると, Tg ウサギの網膜には多量の小胞状の沈着物 (vesicle) が存在していた。B: 拡大像。Tg ウサギの網膜にみられたこの小胞は, 視細胞の内節からちぎれるようにして産生されていた (矢印)。

(文献 35 の図を許可を得て転載)

に免疫電子顕微鏡法によって, この蛋白質はリボンシナプスのシナプス間隙に存在し, ピカチュリンを欠損させたマウスでは, 視細胞のシナプス末端に双極細胞の突起が陥入しない状態になっていることが示された²⁶⁾²⁷⁾。

ピカチュリンが視細胞と双極細胞のシナプス形成過程に重要であることが分かったが, 実際にピカチュリンを欠損させたマウスの網膜では, 光信号はどのように伝達されているのであろうか。そこで我々は, ピカチュリン欠損マウスの網膜機能を調べる目的で, このマウスから ERG を記録した。図 3 にピカチュリン欠損マウスから記録された暗順応下 ERG (scotopic ERG) を示す。ピカ

チュリン欠損マウスでは, 視細胞機能を反映する a 波はまったく正常であるが, 杆体双極細胞の機能を反映する b 波は著しい異常を示した。まず b 波の振幅に関しては, 低い刺激強度ではピカチュリン欠損マウスの b 波振幅は明らかに野生型のそれより小さい (図 3 A)。しかし刺激が強くなるにつれて b 波振幅は増加し, 最大刺激では b 波振幅は野生型とほぼ同じレベルにまで達している。この刺激—振幅曲線をプロットすると, ピカチュリン欠損マウスの曲線は, 野生型マウスの曲線をやや右にシフトさせた形状になっている (図 3 B)。この結果により, ピカチュリンを欠損させたマウスでは, 光刺激

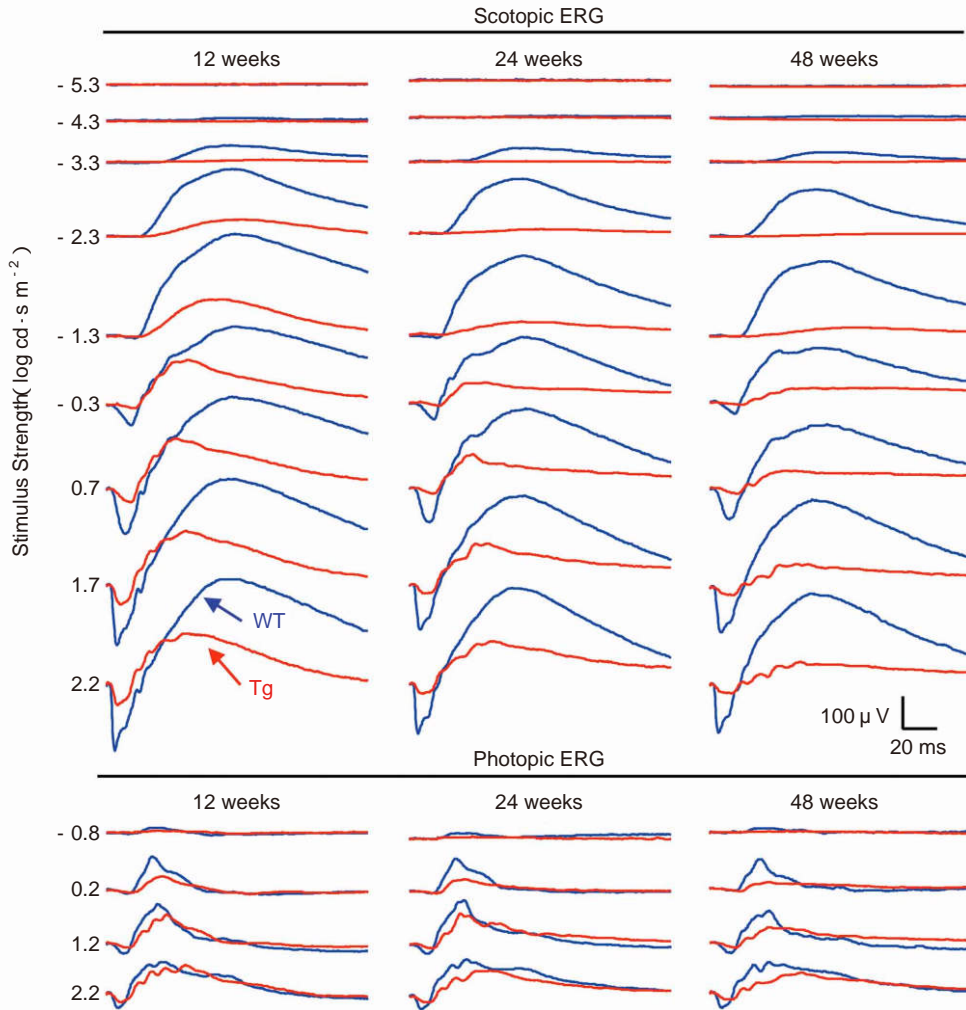


図 9 生後 12 週、24 週、48 週の野生型 (WT) ウサギ (青) とトランスジェニック (Tg) ウサギ (赤) の代表的な網膜電図 (ERG) の波形。
 上段に暗順応状態で記録された scotopic ERG, 下段に明順応状態で記録された photopic ERG を示す. 刺激フラッシュの強度が左に示されている. Tg ウサギでは, 生後 12 週の段階で既に scotopic ERG は明らかに WT ウサギのそれよりも小さく, 週齢が進むにつれて ERG の振幅はさらに低下している.
 (文献 48 の図を許可を得て転載)

は上位ニューロンに伝達されてはいるものの, 特に低い光刺激に対しては反応が弱く, また野生型マウスと同じ反応を得るには, 約 0.7 log 程度強い光刺激が必要であることが分かった.

このマウスの ERG で最も興味深かった点は, b 波の潜時の遅れであった. ピカチュリン欠損マウスの b 波の頂点潜時は野生型マウスと比較して著しく遅延しており, 最大刺激における b 波潜時と比較すると野生型が約 70 ms であるのに対しピカチュリン欠損マウスは 210 ms と, 約 3 倍近くも頂点潜時が遅れていることが分かった²⁶⁾(図 3C). この結果から, ピカチュリンが欠損すると視細胞から双極細胞への伝達効率が悪くなる(感度が低下する)ことに加えて, 二次ニューロンに伝達されるまでの時間が著しく遅延することが分かった. これらの結果は, ピカチュリン欠損マウスの電子顕微鏡所見においてシナプスの形成に著しい異常があったこととも

よく一致している.

さらにこのピカチュリン欠損マウスの行動学的実験では, 動く縞模様への眼球の追従の遅れがみられた²⁶⁾²⁷⁾. 以上の結果により, ピカチュリンは視細胞と双極細胞との間のリボンシナプスの形成と信号伝達において不可欠な役割を担っていることが判明した. 哺乳類の網膜における新規蛋白質であるピカチュリンの役割を調べた本研究において, ピカチュリン欠損マウスの ERG 解析は重要な所見を提供したといえる.

III ウサギの網膜色素変性モデルの作製

1. 網膜色素変性の中型～大型動物モデルの現状

網膜色素変性 (RP)²⁸⁾ は, 網膜の発生・構造・機能にかかわる遺伝子変異により進行性に網膜機能が低下し, 最終的には重度の視機能障害に至りうる疾患である. RP の頻度は 3,000~4,000 人に 1 人といわれており,

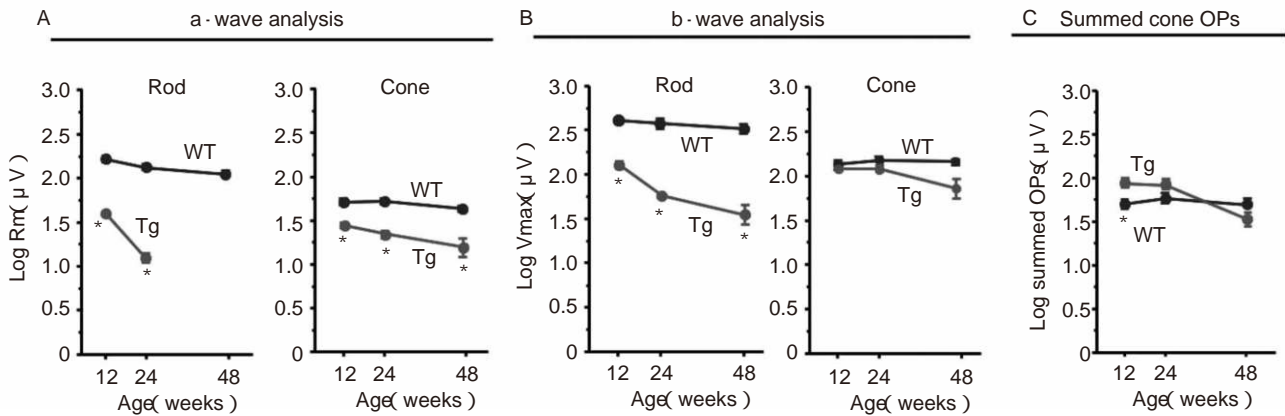


図 10 野生型(WT)ウサギとトランスジェニック(Tg)ウサギの杆体 a 波, 錐体 a 波, 杆体 b 波, 錐体 b 波, 錐体律動様小波(OPs)の最大振幅のプロット。

生後 12 週, 24 週, 48 週の結果が示されている。Y 軸の振幅の値は, 最大振幅の対数値で示されている。

A: a 波解析の結果, B: b 波解析の結果, C: 錐体 OPs 解析の結果。Tg ウサギのすべての成分が, 週齢の進行とともに振幅が低下している。また Tg ウサギでは, 錐体成分よりも杆体成分の方が低下が強く, また a 波, b 波, OPs の順に障害が大きいことが分かる。*: $p < 0.05$ 。

(文献 48 の図を許可を得て転載)

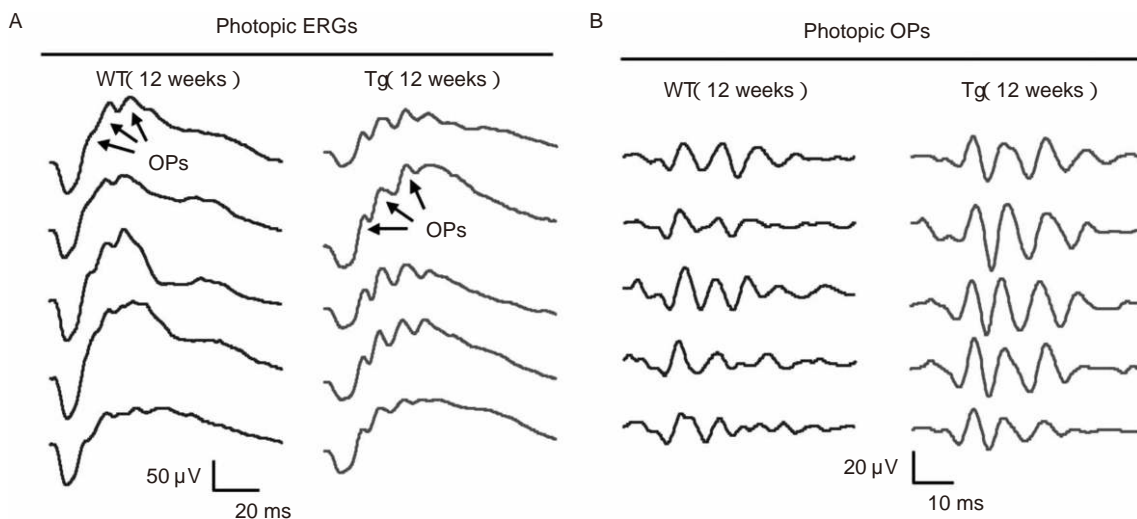


図 11 トランスジェニック(Tg)ウサギにおける律動様小波(OPs)の増大。

A: 生後 12 週の野生型(WT)ウサギ 5 羽と Tg ウサギ 5 羽から記録した錐体網膜電図(ERG)の波形。B: 85~300 Hz のデジタルフィルタを使って OPs だけを抽出した波形。Tg ウサギの OPs は, 明らかに WT ウサギのそれより目立って大きいことが分かる。

(文献 48 の図を許可を得て転載)

眼科領域における中途失明の主要な原因の一つである。現時点では RP に対する安全かつ有効な治療法は確立されていないが, 眼内栄養因子注入, 遺伝子治療, 再生治療, 人工視覚などのさまざまな新しい治療法が試みられている。

RP のような難治性疾患に対する新規治療法の開発には, 疾患の動物モデルはきわめて重要である。RP の動物モデルとして, 以前はマウスやラットのような小動物が用いられていたが, 近年ではイヌ, ネコ, ブタなどの中型~大型の動物が使用されることが多くなってきた。

中型~大型の動物は眼球の大きさがヒトに近いために, 手術操作を必要とする実験(人工視覚移植, 栄養因子を徐放するカプセル移植, 幹細胞シート移植など)が容易だからである。欧米では, 10 年以上も前から RP の中型~大型動物モデルの作製や系統維持のプロジェクトが積極的に進められており, 自然発症の RP ネコ²⁹⁾, RP イヌ³⁰⁾の発見に加えて, 遺伝子操作によるトランスジェニックブタ³¹⁾も作製されている。欧米における Leber 先天盲の遺伝子治療の臨床試験³²⁾³³⁾の前に行われた予備実験も, 同じ遺伝子変異を有するイヌのモデルを使用して

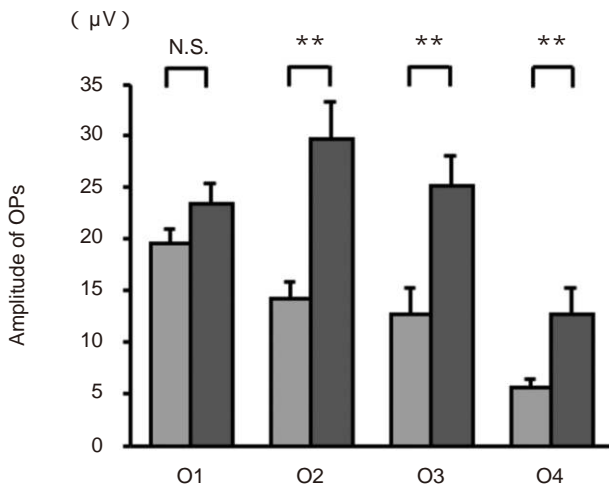


図 12 生後 12 週の野生型(WT)ウサギとトランスジェニック(Tg)ウサギにおける，律動様小波(OPs)の各波(O1~O4)の比較。

早期の O1 の振幅は両群で違いはなく，後期の O2~O4 では Tg ウサギの方が有意に大きかった。■：野生型，■：トランスジェニック。N.S：有意差なし，**：p<0.01。

(文献 48 の図を許可を得て転載)

いる³⁴⁾。このように，RP の新規治療法の開発には中型～大型の RP モデル動物は不可欠であるが，現在本邦ではラットより大きい RP モデルが存在しない。欧米で使用されている中型～大型動物モデルは貴重であるために本邦での入手はきわめて困難である。そこで我々は，中型動物として広く使用されている実験動物であるウサギの遺伝子を操作して，トランスジェニック(Tg)ウサギを作製し，RP モデルウサギを作製するプロジェクトを開始した。

2. Tg ウサギの作製方法

我々は，2004 年から RP モデルウサギを作製するプロジェクトを開始した³⁵⁾。まず米国オークランド小児研究所が所有するニュージーランド白色種(NZW 種)ウサギの bacterial artificial chromosome(BAC) 遺伝子ライブラリーから，ロドプシン遺伝子の全長を含む BAC クローンを同定した。この BAC を相同組換え技術^{36)~38)}により，ロドプシン遺伝子の 347 番目のプロリン(CCG)がロイシン(CTG)となるような変異を導入した(図 4)。この遺伝子改変 BAC は約 150 kb であり(図 5 A)，マイクロインジェクション用に濃度 1 ng/μl に調整された。

ロドプシン P347L 遺伝子変異を有する BAC は，NZW 種ウサギの受精卵にマイクロインジェクションさ

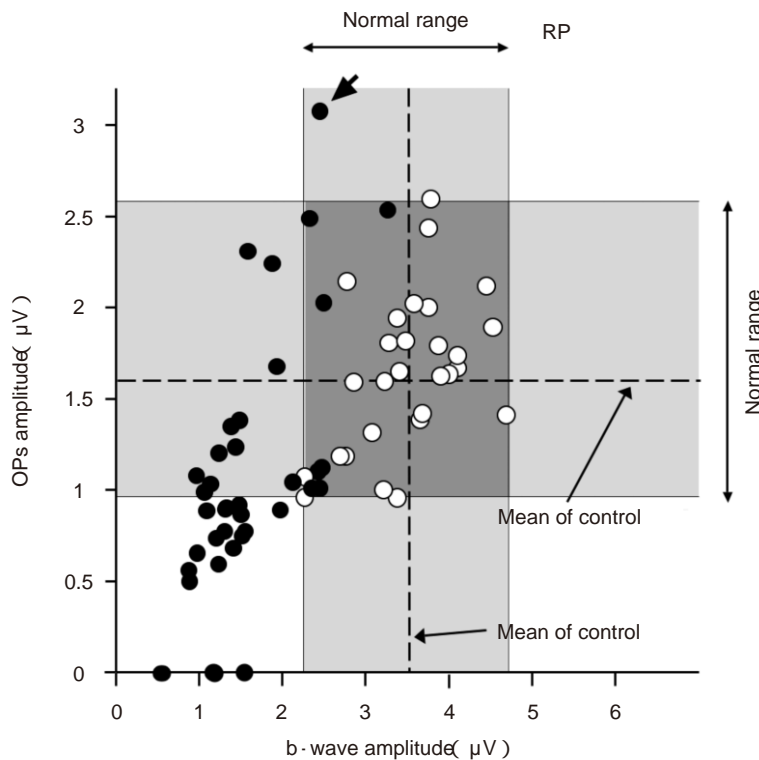


図 13 視力が良好な網膜色素変性(RP)患者 39 眼(●)と正常者 39 眼(○)から直径 10 度の円刺激を用いて黄斑部局所網膜電図(ERG)を記録し，X 軸に b 波振幅を，Y 軸に律動様小波(OPs)の振幅をプロットした図。

b 波と OPs の振幅の正常範囲が灰色で示されている。RP の患者の中に，黄斑部局所 ERG の OPs の振幅が正常者 39 名よりも大きな症例が存在していた(矢印)。

(文献 56 の図を許可を得て転載)

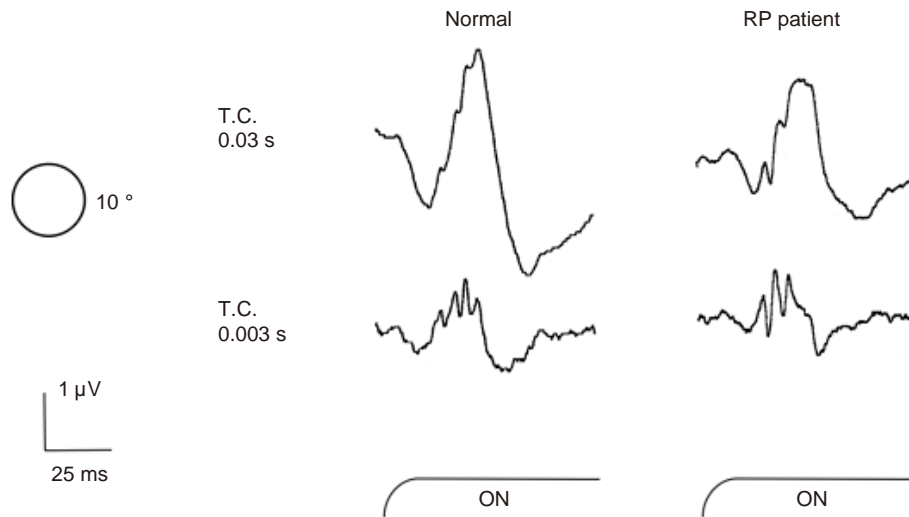


図 14 代表的な正常者 1 名(左)と、図 13 で大きな律動様小波(OPs)を示した網膜色素変性(RP)患者 1 名(右)から記録した黄斑部局所網膜電図(ERG)の波形。

刺激には直径 10 度の円を用いた。時定数(T.C.)0.03 秒の波形は a 波と b 波の解析に、T.C. 0.003 秒の波形は OPs の解析に用いた。この RP 患者では、a 波と b 波の振幅は正常者より小さいが、OPs の振幅は正常者より大きい。

(文献 56 の図を許可を得て転載、改変)

れた。今回の実験では、合計 456 個の受精卵に遺伝子変異 BAC を注入し、それを偽妊娠処理した 17 羽の雌ウサギに人工授精した。平均 32 週の妊娠期間の後に、この 17 羽の雌ウサギから産出された 80 羽の仔ウサギの耳の一部を切除してサザンブロットで解析した結果、80 羽中 12 羽が変異遺伝子陽性であることが分かった。この 12 羽のうち 10 羽が生存し、さらにこの 10 羽のうち 6 羽が次世代(F1)にも P347L 変異を引き継いだ。この 6 羽の Tg ウサギ(F1)のサザンブロット解析の結果を図 5 B に示す。この 6 つの Tg ラインの間で変異遺伝子の発現量は異なっており³⁵⁾、最も発現量が高かったのはライン 7 の Tg ウサギであった。さらに ERG で網膜変性の速度を調べた結果、このライン 7 の Tg ウサギの網膜変性が最も重度であり、変性の速度も速かった。そこで、以後の研究は主にこのライン 7 の Tg ウサギを用いて行った。

3. Tg ウサギの特徴と組織学的検査の結果

ライン 7 の Tg ウサギの眼底を生後 10 か月まで観察したが、野生型ウサギと比べて特に目立った違いはみられなかった。Tg ウサギの眼底には、RP に特徴的といわれる色素沈着はみられず、視神経乳頭も正常であった³⁵⁾。しかしながら、網膜血管径は Tg ウサギの方がやや野生型ウサギよりも細い傾向がみられた。今回、我々が白色の NZW ウサギを用いたために眼底に色素沈着が現れなかったのではないかと推定された。

この Tg ウサギが進行性の網膜変性を起こしているかどうかを知るために、Tg ウサギの網膜中心部の光学顕微鏡所見を調べた。生後 2 週の時点では、Tg ウサギの網膜の外顆粒層には 8~9 層の核が存在しており、野生

型ウサギの網膜とほとんど区別できない。しかし、6 週以降では Tg ウサギの外顆粒層の核数は徐々に減少し、生後 48 週ではわずかに 1 層の外顆粒層が残るのみであった(図 6 A, B)。しかし、この時期においても網膜内層の構造は比較的よく保たれており、我々の作製した Tg ウサギがヒトの RP と同様に進行性の視細胞変性を起こしていることが確認された。

ウサギの網膜では視細胞は均一に分布しているわけではなく、視神経乳頭の約 2 mm 下方に視細胞が最も密集している帯状の「ウサギの黄斑」が存在し、この部位は visual streak と呼ばれている。ヒトの黄斑とは異なり、ウサギではこの visual streak において杆体、錐体両方の密度が最高値となる³⁹⁾⁴⁰⁾。このような網膜をもつウサギにロドプシン遺伝子変異を導入して視細胞変性を惹起した場合に、視細胞変性の程度にどのような部位的な差がみられるのかは非常に興味深い。そこで我々は、生後 12 週の Tg ウサギと野生型ウサギの垂直断面の網膜組織切片を作製し、2 mm おきに外顆粒層の厚みを計測した。その結果、Tg ウサギの視細胞変性は visual streak で最も強く、網膜周辺部では変性が比較的軽いことが分かった(図 6 C, D)。我々は、ヒトの RP と同様に Tg ウサギも網膜周辺部から変性が始まり、徐々に中心に向かって変性が進行していくことを予想していたために、この結果は予想外であった。前述したように、ウサギでは杆体の密度が中心部の visual streak で最も高く、そのために変異ロドプシンの発現もこの部位で高いために中心部の変性が最も重度になったと考えられた⁴¹⁾⁴²⁾。興味深いことに、ロドプシン遺伝子に変異を有するイヌやブタにおいても我々の Tg ウサギと同様に網膜中心部にお

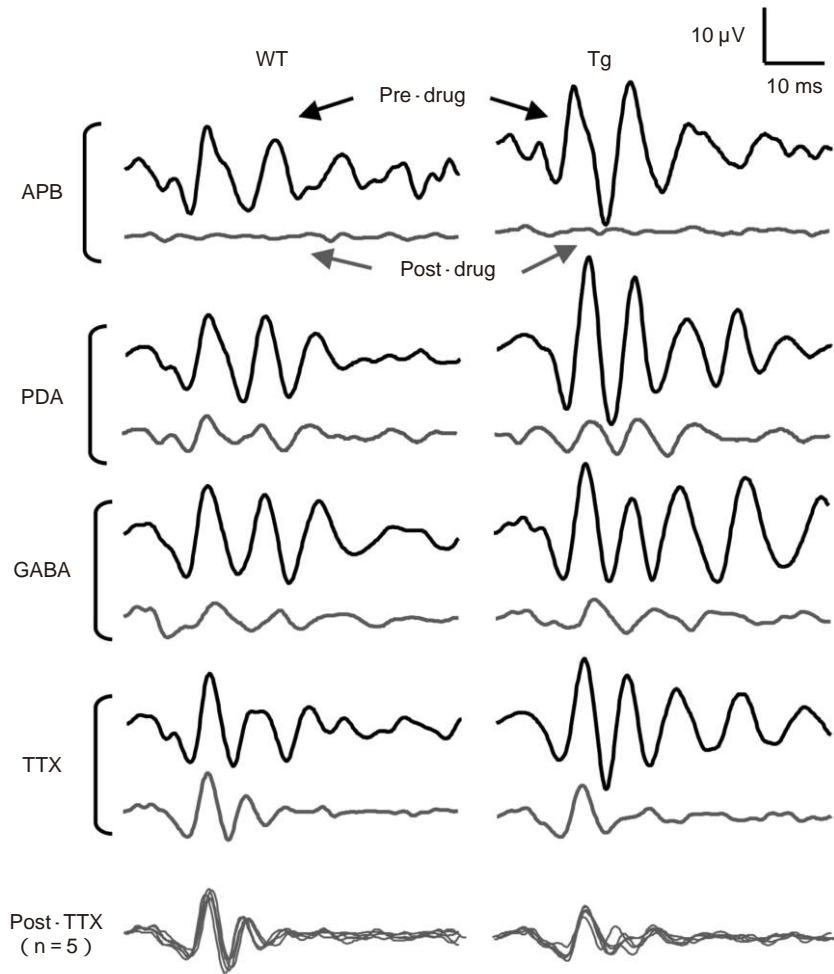


図 15 生後 16 週の野生型 (WT) ウサギとトランスジェニック (Tg) ウサギの律動様小波 (OPs) に対する、種々の薬物の影響。

上の波形が作用前の波形で、下の波形が作用後の波形である。作用させた薬物は左に示してある。最下段は、5 匹の異なったウサギにおける tetrodotoxin (TTX) 作用後の波形を重ねて示してある。APB: L-2 amino-4-phosphonobutyric acid, PDA: *cis*-2,3 piperidine dicarboxylic acid, GABA: gamma amino butyric acid. TTX 投与前は Tg ウサギの方が WT ウサギよりも OPs が大きいのが、TTX 投与後は逆に WT ウサギの方が OPs が大きくなっていることが分かる。

(文献 48 の図を許可を得て転載)

いて視細胞変性が最も強いことが報告されており³⁰⁾³¹⁾、我々の結果もこれらに一致する所見であると考えられた。

我々の作製した Tg ウサギが RP モデルとして適当であるならば、視細胞変性は杆体優位でなければならない。これを組織学的に証明するために、次に我々は Tg ウサギを免疫組織学的に調べた(図 7)。杆体をロドプシン抗体で染色し、錐体を PNA-lectin で染色して観察した。その結果、Tg ウサギでは杆体視細胞の変性が強く、どの週齢においても錐体視細胞の方が保たれていた。生後 48 週の段階では、Tg ウサギの網膜はロドプシン抗体ではほとんど染色されず、この時点で杆体はほぼ消失に近い状態になっていることが分かった。この時点で錐体はまだ PNA-lectin で染色されていたが、外節は短縮して構造は著しく変形していた。これらの結果

は、ヒトの RP の免疫組織学的所見ともよく類似していた。

今回我々は、ロドプシン遺伝子の P347L 変異を導入することによってウサギの RP モデルを作製したが、この P347L 遺伝子変異が進行性の視細胞変性を惹起する正確な機序についてはまだよく分かっていない。過剰ロドプシンによる細胞死説⁴³⁾⁴⁴⁾、ロドプシン活性化延長による細胞障害説⁴⁵⁾、異所性ロドプシンの活性化による細胞死説⁴⁶⁾、などいくつかの説がある。我々は、Tg ウサギの視細胞変性の機序を調べる目的で、Tg ウサギの視細胞を電子顕微鏡で観察した。その結果、Tg ウサギの網膜では視細胞間が多量の沈着物で占められていることが分かった(図 8 上段)。さらに拡大率を上げて観察すると、Tg ウサギでは視細胞の内節から直径 50~300 nm の小胞 (vesicle) がちぎれるようにして多量に発生してお

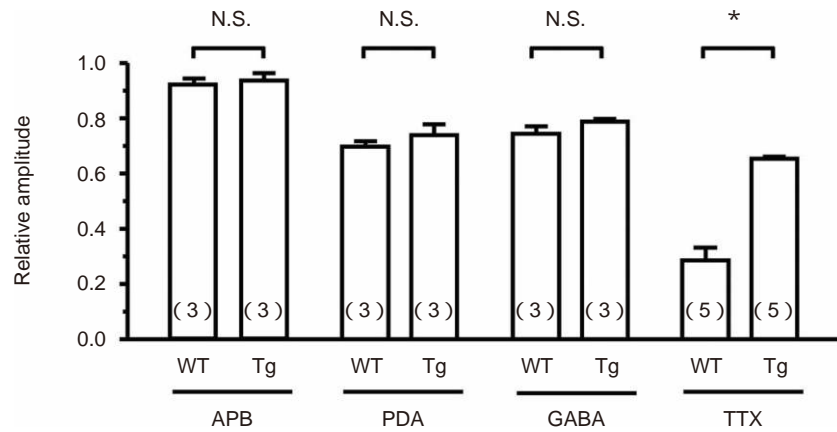


図 16 生後 16 週の野生型 (WT) ウサギとトランスジェニック (Tg) ウサギの律動様小波 (OPs) の振幅に対する、種々の薬物作用後の OPs 振幅の減弱度 (作用前の振幅に対する作用後の相対振幅) のプロット。平均値 ± 標準誤差 (括弧内は n 数) が示されている。Tetrodotoxin (TTX) を作用させると、Tg ウサギの方が WT ウサギよりも OPs の振幅の減弱度が有意に大きかった。APB: L-2 amino-4-phosphonobutyric acid, PDA: *cis*-2,3 piperidine dicarboxylic acid, GABA: gamma amino butyric acid. N.S.: 有意差なし, * : $p < 0.001$.

(文献 48 の図を許可を得て転載)

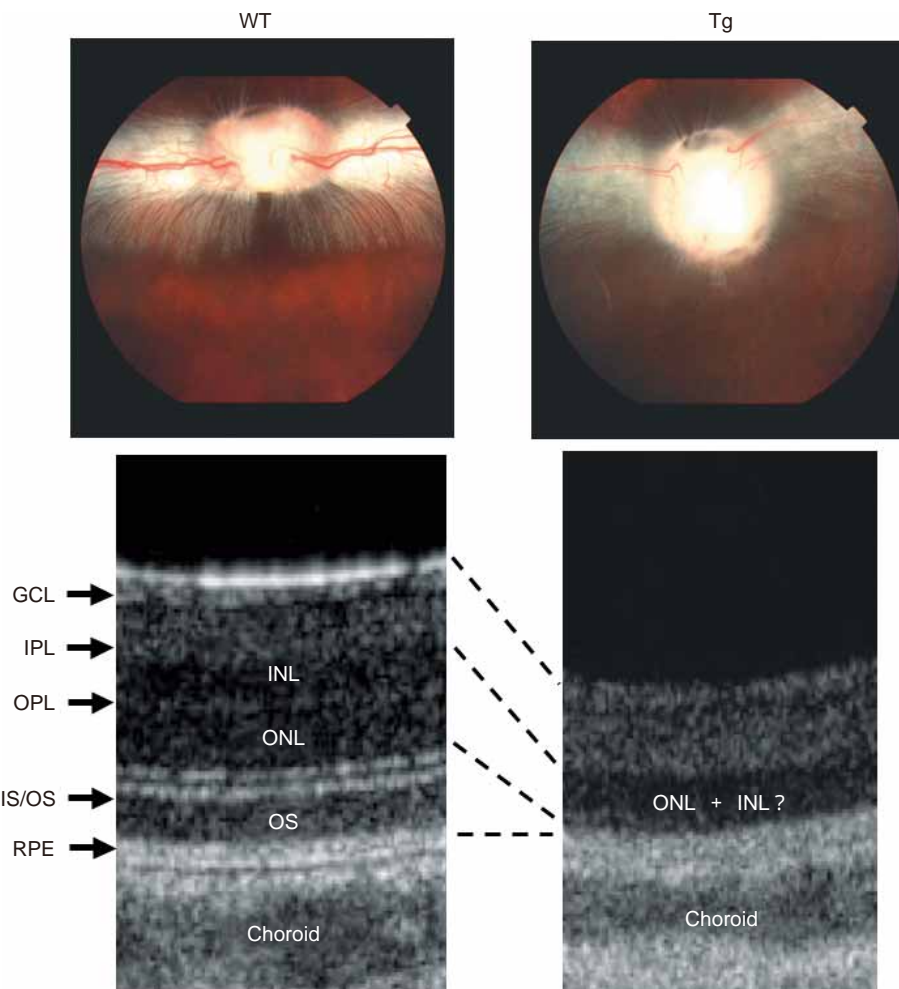


図 17 生後 48 週の有色の野生型 (WT) ウサギとトランスジェニック (Tg) ウサギの眼底写真 (上段) と光干渉断層計による visual streak 部の網膜断層面の所見 (下段)。

Tg ウサギの網膜の色調は暗く、また網膜の厚みが減少して特に視細胞層が薄くなっていることが分かる。GCL: 神経節細胞層, IPL: 内網状層, INL: 内顆粒層, OPL: 外網状層, ONL: 外顆粒層, IS/OS: 視細胞内節外節境界, OS: 視細胞外節, RPE: 網膜色素上皮層, Choroid: 脈絡膜。

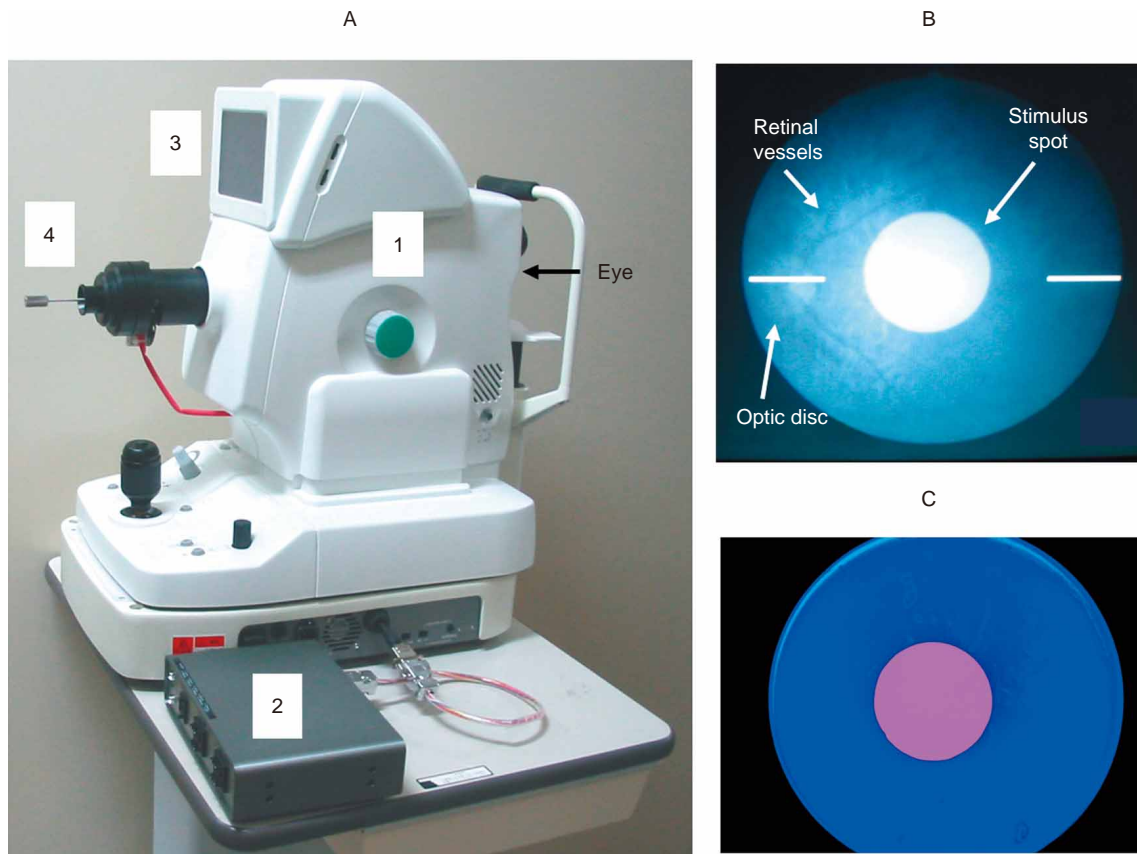


図 18 黄斑部局所 photopic negative response (PhNR) の記録装置。

A: 装置の全景。B: 赤外線眼底モニターで観察したサルの眼底。C: 被検者側からみた、青色背景と赤色刺激スポットの様子。1: 赤外線眼底カメラ, 2: 発光ダイオード(LED)のコントロールボックス, 3: 赤外線眼底モニター, 4: 刺激スポットの位置を動かすためのジョイスティック。

(文献 81 の図を許可を得て転載)

り、これが視細胞間を満たして沈着物を形成していることが分かった(図 8 下段, 矢印)。これと非常によく似た電子顕微鏡所見は、ロドプシン P347S 変異 Tg マウスでも報告されている⁴⁷⁾。この報告では、さらに変異ロドプシンの抗体を用いた免疫組織電顕も行われており、視細胞からちぎれた小胞の中に変異ロドプシンが存在していることが示されている。この論文で Li ら⁴⁷⁾は、ロドプシンの C 末端付近はロドプシンの細胞内輸送に関与していることから、ロドプシン C 末端付近の変異を有する異常なロドプシン蛋白質は外節に輸送されずに細胞内に蓄積し、その結果内節から放出されて多量の vesicle が蓄積されていると推定している。我々は、ウサギの変異ロドプシンに対する抗体の作製が困難であったため、我々の Tg ウサギの視細胞間に蓄積した vesicle 内に実際に変異ロドプシンが存在しているかどうかを確認することはできなかったが、変異の部位が Li ら⁴⁷⁾の Tg マウスと同じ 347 番目にあることと、電子顕微鏡所見の類似性から、我々の Tg ウサギの視細胞死の原因の 1 つとしてロドプシンの細胞内輸送障害と異常ロドプシンの蓄積が関与している可能性があると考えた。

4. Tg ウサギの ERG の特徴

続いて我々は、Tg ウサギの ERG を研究した⁴⁸⁾。図 9 に生後 12 週, 24 週, 48 週の野生型ウサギ(青)と Tg ウサギ(赤)の代表的な ERG 波形を重ねて示す。野生型ウサギでは週齢に伴う ERG の変化はほとんどみられない。これに対して Tg ウサギでは、生後 12 週の段階で既に scotopic ERG は明らかに野生型ウサギのそれよりも小さく、週齢が進むにつれて ERG の振幅はさらに低下している。Tg ウサギの ERG の異常は scotopic ERG でより明らかであり、photopic ERG の振幅は 48 週の時点でも比較的保たれていることが分かる。

Tg ウサギの ERG の変化を定量的に評価する目的で、a 波の解析には Hood と Birch による a-wave フィットティング式⁴⁹⁾を、また b 波の解析には Naka-Rushton の式⁵⁰⁾を用いた。さらに OPs の解析の際には、まず波形全体から a 波を差し引いて、残った成分の高周波成分をデジタルフィルタを用いて抽出した⁵¹⁾。この際、野生型ウサギと Tg ウサギの OPs が 85~300 Hz の間にあることを予備実験で確認した⁴⁸⁾。錐体成分の解析には photopic ERG をそのまま用い、杆体成分の解析には scotopic ERG から photopic ERG を差し引いた成分を用い

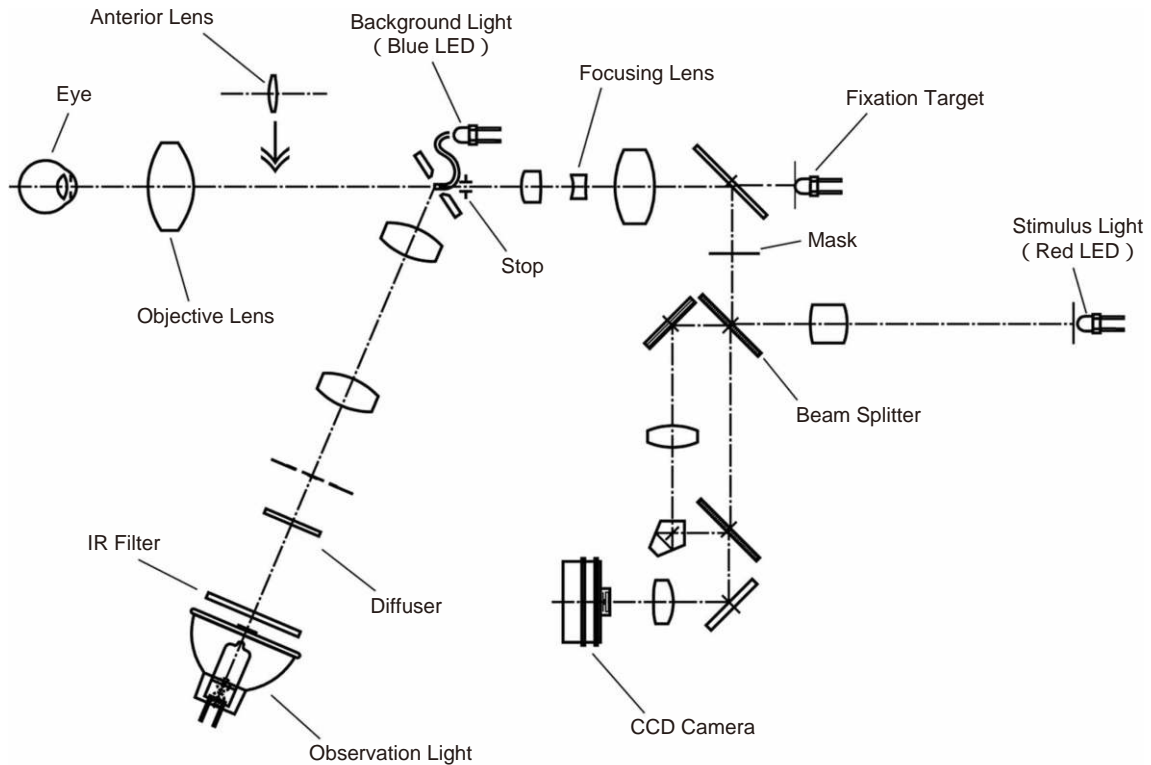


図 19 黄斑部局所 photopic negative response (PhNR) の記録システムの設計図。

PhNR の反応を最大限に引き出すために、刺激に赤の発光ダイオード(LED)を、背景に青のLEDを用いている。

(文献 81 の図を許可を得て転載)

た。OPs に関しては、杆体成分のみの OPs の抽出が困難であったので、錐体成分の OPs のみを解析の対象とした。

以上の方法によって杆体 a 波、錐体 a 波、杆体 b 波、錐体 b 波、および錐体 OPs の最大振幅を計測し、野生型ウサギと Tg ウサギとで比較した結果を図 10 に示す。各成分間における比較を容易にするために、このグラフの Y 軸は同一の対数表示を用いた。この結果から、Tg ウサギのすべての ERG 成分は週齢が進むに従って進行性に低下し、錐体成分よりも杆体成分の方が低下が強く、また a 波、b 波、OPs の順に障害が大きいことが分かった。この結果は、我々の Tg ウサギが杆体に発現しているロドプシン遺伝子に異常を有していることを考えれば当然の結果であるといえる。これまでも RP の動物モデルにおいて同様の ERG 所見を示した報告^{52)~54)}がある。

今回我々が作製した Tg ウサギの ERG 所見で最も興味深かった点は、若年期における錐体 ERG の OPs の増大であった。図 10 に示したように、Tg ウサギの ERG の最大振幅は、OPs > b 波 > a 波の順に保たれていた。しかし生後 12 週で記録すると、OPs はよく保たれているだけではなく、その振幅は野生型ウサギよりもむしろ大きかった(図 10 C)。図 11 A に、生後 12 週における野生型ウサギ 5 羽と Tg ウサギ 5 羽から記録した錐体

ERG の波形を示す。図 10 に示したように生後 12 週の Tg ウサギの錐体 ERG の a 波は野生型よりも小さく、b 波は野生型とほぼ同等であることが分かる。これに対して OPs は明らかに Tg の方が野生型ウサギより目立って大きい。ERG 波形からデジタルフィルタによって 85~300 Hz 成分、つまり OPs のみを抽出すると、両群における OPs の違いはより明らかであった(図 11 B)。また、OPs の各波(O1~O4)を比較すると、早期の O1 の振幅は両群で有意差はなかったが、後期の O2~O4 は Tg ウサギの方が大きかった(図 12)。

5. Tg ブタやヒトの RP 患者でもみられる OPs の増大

これまでに RP の動物モデルや実際の RP 患者で OPs の増大現象がみられたという報告は 2 つみられる。1 つはロドプシン遺伝子変異を有する Tg ブタ⁵⁵⁾である。このブタは我々の Tg ウサギと同様にロドプシン遺伝子の P347L 変異を有しており、進行性に杆体優位の視細胞変性を示す。この Tg ブタでは、やはり幼少時の錐体 ERG において OPs が野生型ブタよりも大きいという特徴があり、しかも早期の O1 は正常であるにもかかわらず後期の O2 以降の成分の振幅が大きく、これも我々の Tg ウサギの特徴に非常によく類似している。ロドプシンの同じ変異(P347L)を有する異なった 2 つの種(ブタとウサギ)の動物モデルで同じ ERG 変化を示したという事実は実に興味深い。

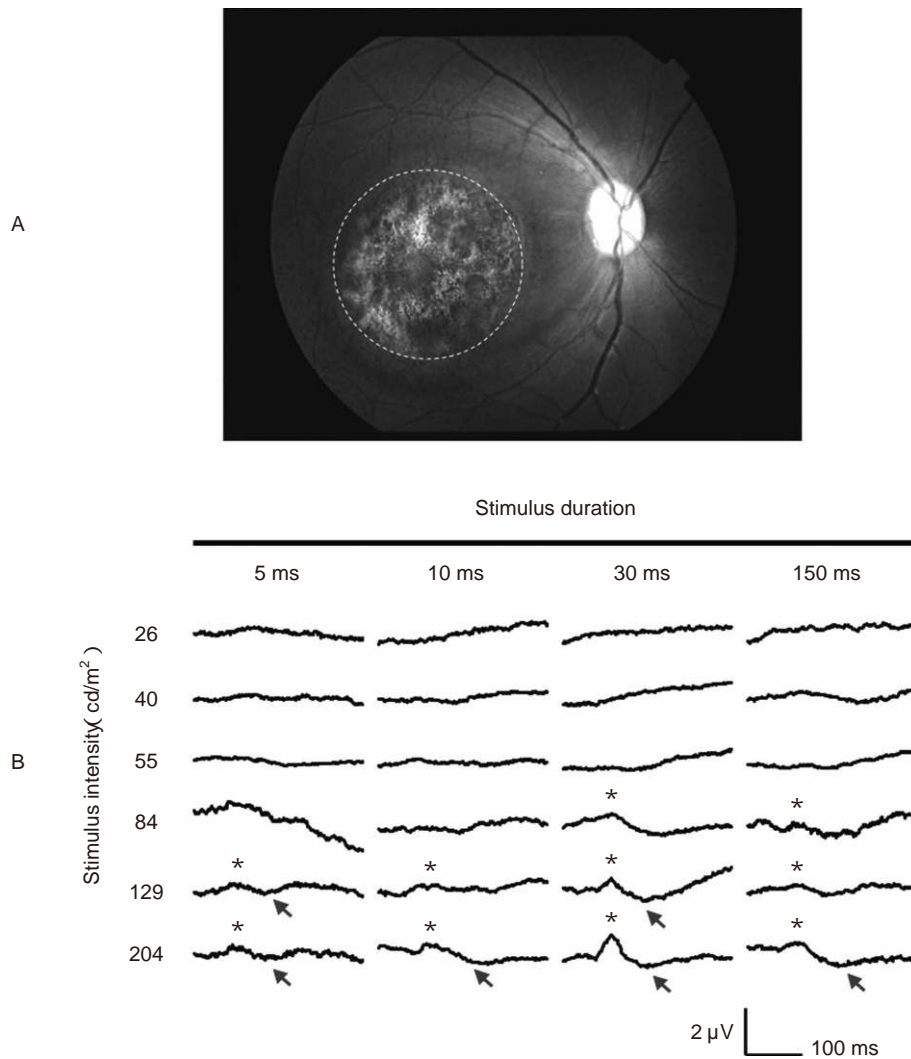


図 20 我々の用いた装置の刺激条件が局所であることの証明.

A: サルの黄斑部の直径 15 度の領域をレーザーで完全に光凝固した. B: この部位を直径 15 度の円スポットで刺激して記録した網膜電図(ERG). 100 scot cd/m^2 の一定背景光下で, 赤色刺激の強度が $55 \text{ phot cd}/\text{m}^2$ 以下であれば, 光凝固した黄斑部を刺激してもまったく ERG の反応が得られなかった. それ以上の刺激強度では, b 波様の反応(*印)や PhNR 様の反応(矢印)が記録された.

(文献 81 の図を許可を得て転載)

また我々は, 実際の RP 患者の中に黄斑部局所 ERG の OPs が正常より増大していた患者がいたことを報告している⁵⁶⁾. 我々は, 視力が良好な RP 患者 39 名 39 眼から黄斑部局所 ERG を記録し, a 波, b 波, OPs の各成分を正常者 39 名 39 眼の結果と比較した. その結果, 直径 10 度の円刺激で黄斑部局所 ERG を記録すると, RP 患者の OPs は正常者の 67% も保存されており, a 波(39%)や b 波(46%)よりも有意に保存されていることが分かった. また, b 波の振幅が正常者の下限以下でありながら OPs の振幅が正常範囲内であった RP 患者は 10 名(26%)もみられた(図 13). この臨床研究で最も興味深かった点は, OPs の振幅が正常者 39 名の上限を上回っていた RP 患者が 1 名みられたことである(図 13 矢印, 図 14). この RP 患者が正常より大きな OPs を示した機序として, この時点で我々は, 網膜外層の機能低

下を代償しようとする網膜内層の二次的変化(remodeling)が関与しているのではないかと予想した⁵⁶⁾.

6. Tg ウサギの ERG の薬理学的研究

上に述べたように, RP 患者の黄斑部局所 ERG およびロドプシン Tg 動物モデルの ERG において OPs が正常よりも大きくなる現象が報告されているが, この増大現象の機序については不明のままであった. OPs の起源としては, 網膜内層における抑制系フィードバック回路が関与していると考えられており, 特にアマクリン細胞と神経節細胞の一部が OPs の発生に重要な役割を果たしていると考えられている^{57)~61)}. ウサギの眼球は大きいので, 硝子体内に薬物を作用させることによって特定の網膜内ニューロンやシナプスをブロックさせて ERG を記録することも容易である. そこで我々は, 次に Tg ウサギの OPs 増大現象の機序を薬理的に研究

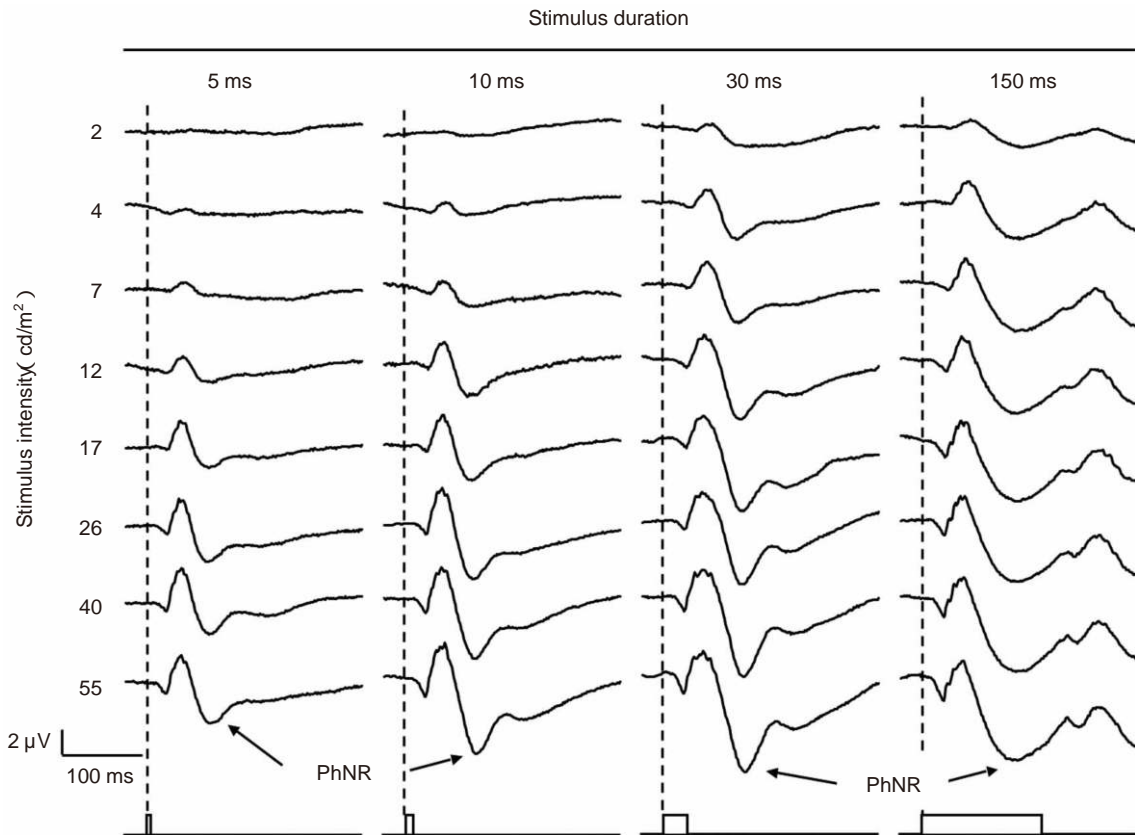


図 21 アカゲザルから直径 15 度の刺激スポットを用いて記録した、黄斑部局所 photopic negative response (PhNR) の代表波形。

局所反応が得られる 55 phot cd/m²以下の刺激強度で、刺激強度と刺激時間をさまざまに変化させて記録している。直径 15 度内の局所網膜からきれいに局所 PhNR が記録されている。

(文献 81 の図を許可を得て転載)

することとした。

図 15 では、生後 4 か月の野生型ウサギと Tg ウサギに種々の薬物を作用させた前後における OPs の波形を示す。作用前の ERG 波形は上に、作用後の ERG 波形は下に示してある。まず L-2 amino-4-phosphonobutyric acid (APB) を作用させて、視細胞から ON 型双極細胞への伝達を遮断した。その結果、Tg ウサギも野生型ウサギもともに OPs の振幅は著しく減弱したが、両群間で振幅の減弱度に差はみられなかった(図 16)。次に PDA を作用させて視細胞と OFF 型双極細胞、水平細胞、および三次ニューロンの多くを遮断し、また gamma amino butyric acid (GABA) を作用させて水平細胞とアマクリン細胞を含む網膜内層の活動を抑制した。しかし、どちらの薬物においても投与前後の OPs の振幅の変化に両群間で差はみられなかった(図 16)。最後に tetrodotoxin (TTX) を作用させて、網膜内層のスパイク性ニューロンを抑制した状態で両群のウサギから OPs を記録した。その結果、両群とも OPs の振幅は減弱したが、その減弱度は Tg ウサギの方が有意に大きかった(図 16)。その結果、TTX 投与前は Tg ウサギの方が野生型よりも OPs が大きいにもかかわらず、TTX 投与後は逆に野生

型の方が OPs が大きくなっていた。この結果は両群の 5 匹のウサギで共通してみられた(図 15, 最下段)。以上の結果により、Tg ウサギの変性早期における OPs の増大現象の起源として、アマクリン細胞と神経節細胞の中でも特に TTX に感受性のあるスパイク性ニューロンの活動増大が関与していることが分かった。

以上の結果により、我々は Tg ウサギの視細胞の変性早期に OPs の振幅が増大していた起源として、網膜内層のスパイク性ニューロンの活動が増大していることを見出したが、このスパイク性ニューロンの電気活動が増大する理由そのものについては不明であった。これにはいくつかの仮説が考えられ、①内層ニューロンのシナプスあるいは電気活動が変化した⁶²⁾⁶³⁾、②視細胞変性に伴って内層ニューロンへの抑制性入力が増加した、あるいは③視細胞死に伴って細胞外の液性因子が変化した⁶⁴⁾、などが可能性として考えられた。我々は、今後もさらに免疫組織や電子顕微鏡を用いて、Tg ウサギの網膜内層付近の細胞やシナプスの二次的変化を詳細に研究していく予定である。

7. Tg ウサギの有色系統の樹立

今回我々が作製した Tg ウサギは、NZW 種の白色ウ

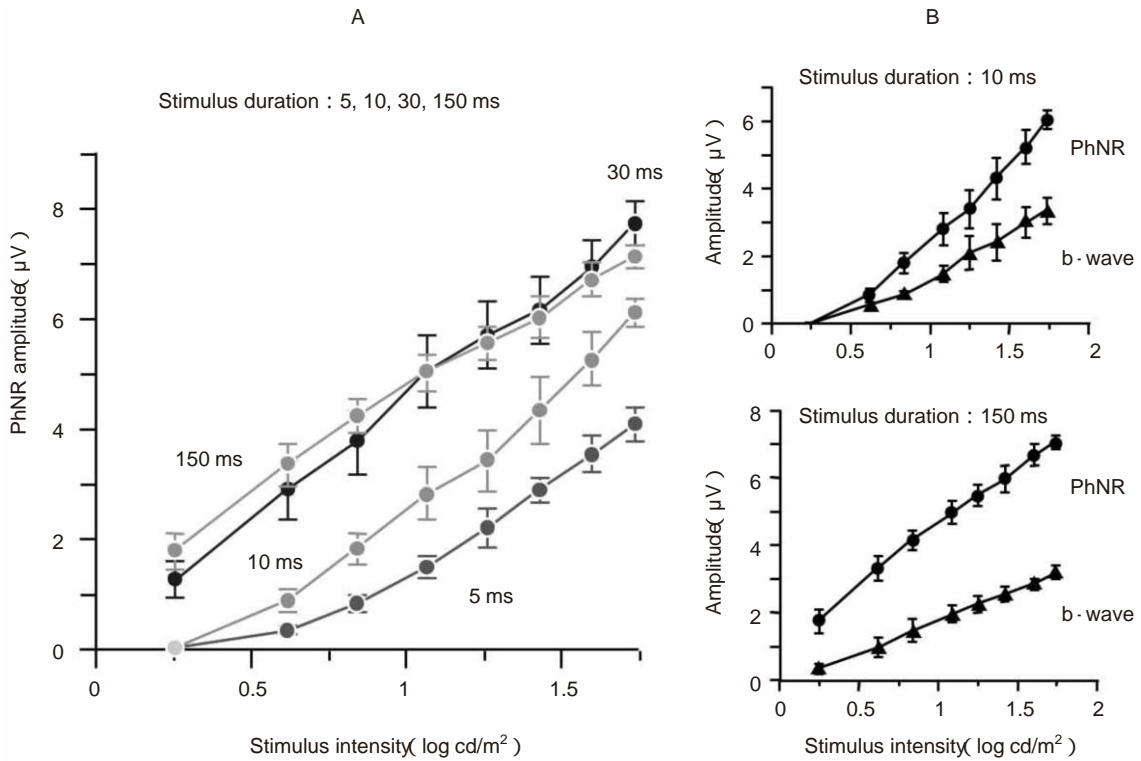


図 22 黄斑部局所 photopic negative response (PhNR) の刺激強度—振幅曲線。

A : さまざまな刺激時間で記録した, 黄斑部局所 PhNR の刺激—振幅曲線. 黄斑部局所 PhNR の振幅は, 刺激が強いほど大きな振幅を示した. B : 短時間刺激 (10 ms) を用いた場合の b 波と PhNR の振幅の比較 (上) と, 長時間刺激 (150 ms) を用いた場合の b 波と PhNR の振幅の比較 (下). 黄斑部局所 PhNR の振幅は, 10 ms の短い刺激時間で b 波振幅の約 2 倍であり, 150 ms の長い刺激時間では b 波振幅の約 3 倍であった.

サギの BAC 遺伝子を改変して, それを同種の NZW 種のウサギの受精卵に導入することによって作製したものである. しかしながら白色ウサギの網膜は, Dutch 種などの有色ウサギに比較して神経節細胞の数が少なく⁶⁵⁾, または視交叉異常がみられるなど, 動物モデルとして視機能検査に用いるには不利な点がある. また眼底に色素が存在しないために, RP の動物モデルを作製した際に特徴的な眼底変化を示さなかった可能性もある. そこで我々は, NZW 種の Tg ウサギを Dutch ウサギと交配させることで, 有色の Tg ウサギの系統を樹立する試みを行った. 雄の NZW 種の Tg ウサギの精子を用いて, 偽妊娠処理をした数匹の雌の Dutch 種ウサギに人工授精し, 得られた仔ウサギを NZW 種の仮親に授乳させる方法で飼育した. 生後 12 週程度では, 有色の野生型ウサギと有色の Tg ウサギの間に眼底所見の違いはほとんどみられなかった. しかし, 生後 48 週近くになると, Tg ウサギの網膜血管は明らかに野生型のそれよりも細く, 色素沈着はみられなかったものの, 眼底の色調は粗造であり, ヒトの RP 患者に類似した所見がみられることが分かった (図 17 上段). また, 光干渉断層計 (OCT) による網膜の断層面の撮影も, 網膜色素上皮に色素がある有色ウサギの方が詳細に観察できることが分かった (図 17 下段). 網膜の構造変化を調べる際によく用いられる組

織標本では, 固定の際などにアーチファクトを生じやすい欠点があるが, OCT 解析は直接生体の断層面の解析ができるために, 有色 Tg ウサギの経時的な構造変化の解析には有用性が高いと考えられた.

現在我々は, この有色の Tg ウサギを用いて, 人工視覚の移植実験, 細胞死を抑制する徐放剤の眼内移植療法, 細胞移植療法などの新しい治療法の評価を行っている. 今後, この Tg ウサギが国際的に広く使用される有用な RP の中型動物モデルとなることを期待している.

IV サルを用いた新たな ERG 成分の証明

1. サルから ERG を記録する利点

サルの眼球は, 解剖学的にも生理学的にヒトときわめて類似している. 特に錐体系 ERG の波形に関しては, 他の動物種と比較して同じ霊長類であるサルの波形のみがヒトの波形と類似しており, ヒトの錐体系 ERG の起源や成分分析を動物で証明したい場合²⁴⁾²⁵⁾には, サルを使用しなければ直接的な結果が得られないといわれる. また, サルはヒトのように錐体視細胞が密集した黄斑が発達しているため, 黄斑部局所 ERG や多局所 ERG の基礎実験⁶⁶⁾を行いたい場合にもサルが最も適している. 我々は, これまでもサルの硝子体内に特定の神経細胞やシナプスをブロックする薬物を注入することによって,

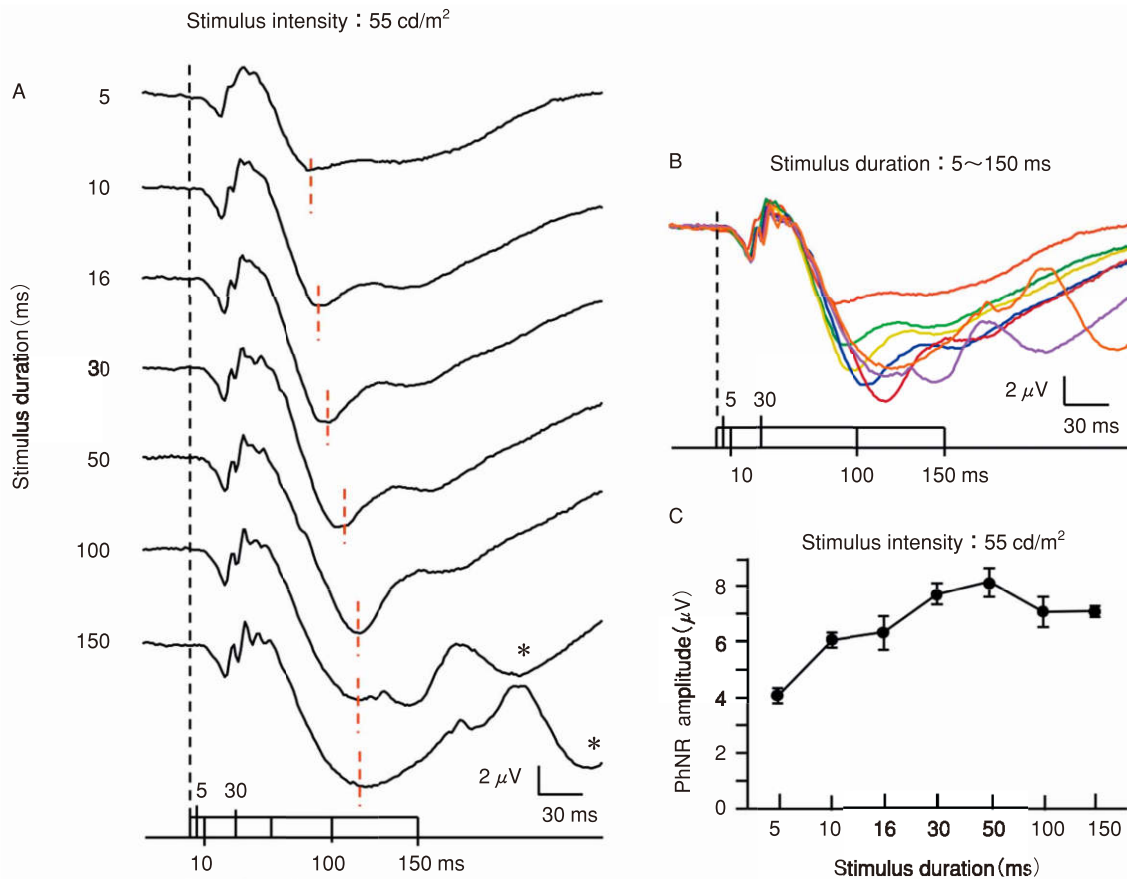


図 23 刺激光の強度を 55 phot cd/m²の一定にした状態で、刺激時間を 5 ms から 150 ms までさまざまに変化させて記録した黄斑部局所 photopic negative response (PhNR).

A: 黄斑部局所 PhNR の代表波形. 刺激時間が 100 ms 以上になると、刺激終了後にみられる PhNR-off (*印)が観察された. B: すべての波形の重ね合わせ. — : 5 ms, — : 10 ms, — : 16 ms, — : 30 ms, — : 50 ms, — : 100 ms, — : 150 ms. C: さまざまな刺激時間による PhNR の振幅のプロット. 4 匹のサルから得られた値の平均値 ± 標準誤差が示されている. 刺激時間 30~50 ms で記録すると、最も大きな黄斑部局所 PhNR が記録できることが分かった.

(文献 81 の図を許可を得て転載, 改変)

全視野錐体 ERG の起源や黄斑部局所 ERG の細胞起源を研究してきた^{67)~70)}.

今回我々は、黄斑部における PhNR の局所反応、つまり黄斑部局所 PhNR の記録を試み、その至適記録条件を決定するとともに、局所 PhNR の細胞起源を網膜神経節細胞障害モデルのサルで証明することを目的とした。

2. サルの黄斑部から局所 PhNR を記録する試み

PhNR とは、錐体 ERG において b 波の後にみられる緩やかな陰性波であり、1999 年に Viswanathan ら¹⁰⁾により初めて報告された。彼らは、PhNR の中には網膜神経節細胞を含む網膜内層に起源を有する電位が含まれていることをサルの緑内障モデルで報告している¹⁰⁾。その後実際の臨床研究において、PhNR は緑内障^{11)71)~73)}、視神経萎縮^{74)~76)}、網膜血管閉塞による網膜内層障害^{77)~79)}、さらに硝子体手術後⁸⁰⁾に低下を示すことが示されている。このように、PhNR はこれまで ERG で困難とされ

ていた網膜内層の機能を示す新しい波形成分として注目されている。しかしながら、これまで PhNR の記録は主に網膜全体を刺激して記録する全視野刺激により記録されており、眼底における刺激位置を確認しながら正確に局所網膜から PhNR を記録してその特性や起源を研究した報告はなかった。

今回、局所 PhNR を正確に記録するために、我々は三宅らによって開発された黄斑部局所 ERG 装置^{2)~4)}を新しく改良した⁸¹⁾(図 18)。眼底観察に赤外線眼底カメラを用いた点は従来の装置と同じであるが、刺激に赤色 LED ($\lambda_{\max} = 627 \text{ nm}$; LXX 2-PD 12-S00, Philips Lumileds, San Jose, USA)を用い、背景に青色 LED ($\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$; L450, Epitex, 京都)を使用した(図 19)。この赤色刺激と青色背景光の組み合わせは、PhNR を記録する際に最も理想的な刺激条件⁸²⁾⁸³⁾であり、神経節細胞に由来する電位を最も効率的に記録できる刺激であることが分かっている。

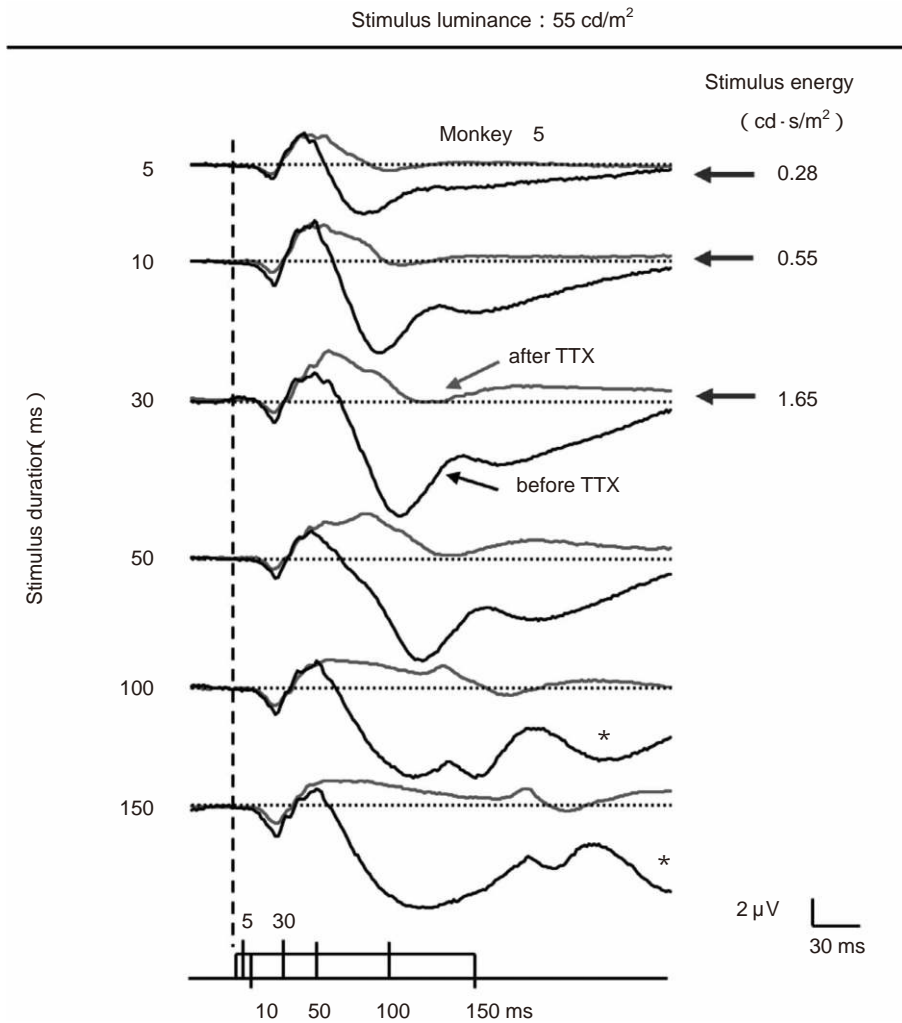


図 24 1 匹のサルの硝子体内に tetrodotoxin (TTX) を注入した前後の黄斑部局所 photopic negative response (PhNR) の変化.

TTX 投与前の波形と TTX 投与後の波形が重ねて表示されている. 刺激終了後の PhNR (PhNR-off, * 印) も TTX 投与後に減少していることが分かる.

(文献 81 の図を許可を得て転載)

まず初めに、今回の装置で記録した反応が確かに局所である条件を設定した. 既報²⁾にあるように、サルの黄斑部の直径 15 度の領域をすべてレーザーで光凝固してこの部位の網膜機能を完全に消失させた. この部位を直径 15 度の円スポットで刺激して反応が得られなければ、その刺激条件は散乱光の影響が最小限の局所刺激であるということができる²⁾. 今回の装置では、青色の定常背景光の強度として杆体活動を抑制するのに十分な 100 scot cd/m²を用いた. この一定の背景光下で、赤色刺激の強度と刺激時間をさまざまに変化させて反応を記録した. その結果、赤色刺激の強度が 55 phot cd/m²以下であれば、光凝固した黄斑部を刺激してもまったく反応は得られなかった(図 20). この結果から、本装置において 100 scot cd/m²の青色背景光の下で 55 phot cd/m²以下の赤色刺激で記録していれば局所 ERG が得られることが分かった.

3. サルから得られた局所 PhNR の特性

図 21 に、55 phot cd/m²以下の赤色刺激を用いて、刺激強度と刺激時間をさまざまに変化させてアカゲザルから記録した局所 PhNR の代表波形を示す. この記録では直径 15 度の円刺激を用いたが、この狭い範囲の局所網膜からでもきれいに b 波の後に PhNR が記録できていることが分かる. この黄斑部局所 PhNR の振幅は、刺激が強いほど、また刺激時間が長いほど振幅が大きくなる傾向があることが分かった(図 22 A). さらにサルから黄斑部局所 PhNR を記録して分かったことは、黄斑部では PhNR の振幅が a 波や b 波の振幅と比較して著しく大きいということであった. 黄斑部局所 PhNR の振幅は、10 ms や 30 ms などの比較的短い刺激時間で b 波振幅の約 2 倍あり、150 ms の長い刺激時間では b 波振幅の約 3 倍にも達していた(図 22 B). これは、過去に報告されている全視野刺激による相対的 PhNR 振

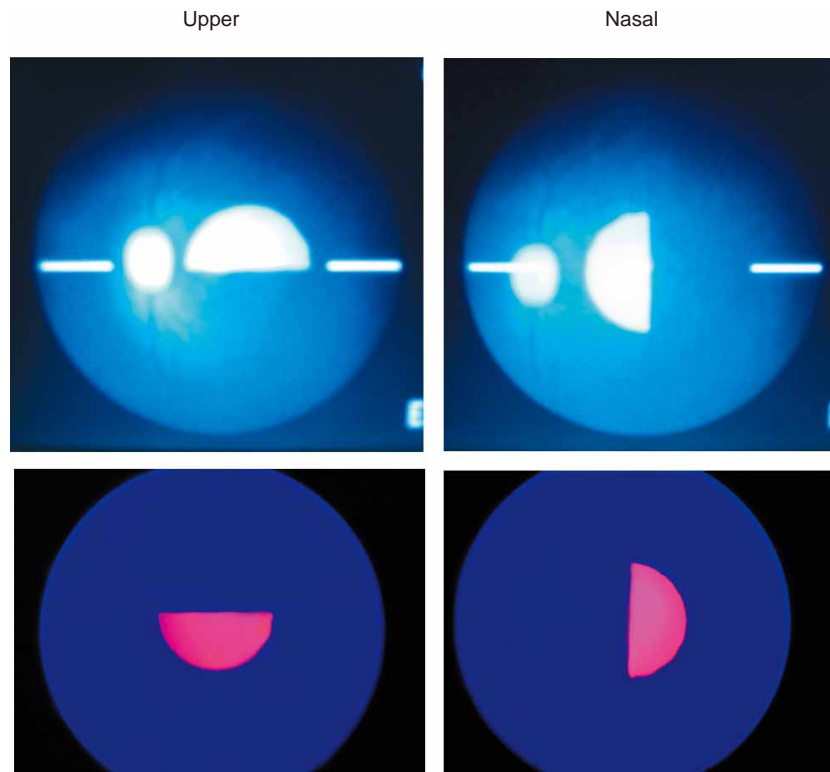


図 25 サルの黄斑部における photopic negative response (PhNR) の非対称性を研究するために用いた、直径 15 度の半円刺激。
上段は眼底モニタからみた眼底と刺激スポット，下段は被検者側からみた刺激の様子がデジタルカメラで撮影されている。

(文献 81 の図を許可を得て転載)

幅¹⁰⁾¹¹⁾と比較して明らかに大きかった。黄斑部において a 波や b 波と比較して大きな PhNR の振幅が得られた理由として、霊長類で神経節細胞の密度が黄斑部で非常に高い^{84)~89)}ことが関与していると考えられた。Curcio ら⁸⁹⁾は、ヒトの網膜における網膜神経節細胞と錐体視細胞の密度(細胞数/mm²)を中心窩から 21 mm までの範囲で 1 mm おきに計測しており、神経節細胞/錐体視細胞の比は中心付近で最も高く、周辺に向かって徐々に低くなる事実を報告している。今回我々が刺激に用いた直径 15 度の円は、中心窩からの距離に換算して半径約 2.8 mm 以内の範囲であり、Curcio らの研究で神経節細胞/錐体視細胞の比が最も高い領域に相当する⁸⁹⁾。そこで、もしもこの網膜の解剖学的特徴が黄斑部における大きな PhNR の理由であるとするならば、黄斑部は PhNR を記録するのにきわめて有利な部位であり、黄斑部局所 PhNR は黄斑部の網膜神経節細胞機能を他覚的に評価する手段として有用な検査法になりうる可能性があると考えられた。

4. 刺激の長さが黄斑部 PhNR に与える影響

PhNR は 10 ms 以内の短時間刺激で記録する方法と 100~150 ms 程度の長時間刺激で記録する方法がよく用いられているが、刺激時間の至適条件はよく知られていない。そこで我々は、刺激光の強度を 55 phot cd/m²の

一定にした状態で、刺激時間を 5 ms から 150 ms までさまざまに変化させて黄斑部局所 PhNR を記録した。その結果、50 ms までは刺激時間が長くなるほど PhNR の振幅は大きくなった(図 23)。これは、刺激時間が長くなることによって刺激の総エネルギーが増加した影響によるものであると考えられた。それより長い刺激になると PhNR の振幅は逆に小さくなり、それと同時に PhNR が刺激開始後にみられる PhNR-on と刺激終了後にみられる PhNR-off(図 23 A, *印)の 2 つの成分に分離していく様子が観察された。以上の結果から、黄斑部局所 PhNR で単純に最も大きな振幅を得たいのであれば、30~50 ms 程度の中等度の刺激時間がよいことが分かった。

5. 黄斑部局所 PhNR が内層起源であることの証明

次に我々は、今回記録した局所 PhNR が確かに網膜内層のスパイク性ニューロンの電位を多く含んでいるかどうかを調べた。この目的のために、サルの硝子体内に TTX を注入し、網膜内層のスパイク性ニューロンの活動を遮断した前後で黄斑部局所 PhNR を記録した。図 24 では、1 匹のサルに TTX を注入した前後の黄斑部局所 PhNR 波形の変化を示す。これまで示したように、サルの黄斑部 PhNR はどの刺激時間においても b 波と比較して十分大きな振幅が得られている。しかし TTX

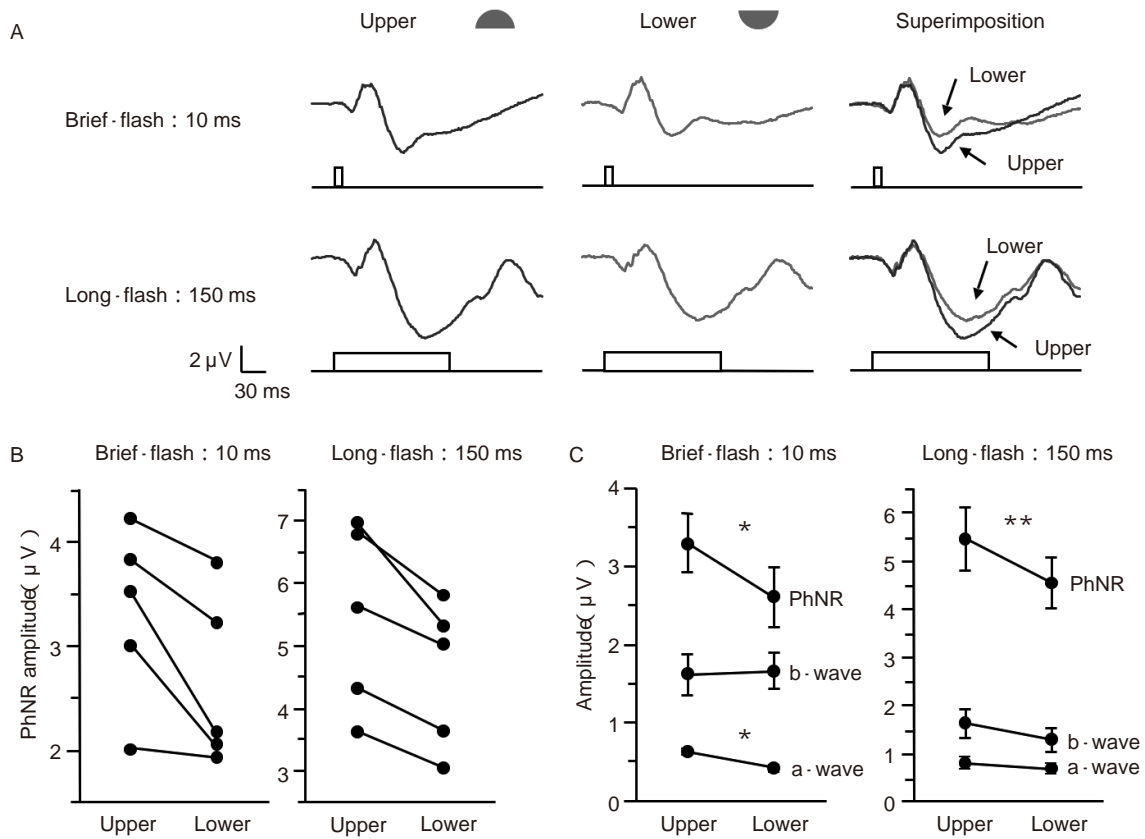


図 26 サルの黄斑部における photopic negative response (PhNR) の上-下側の非対称.

A : 直径 15 度の半円刺激を用いて記録した代表波形. 短時間刺激 (10 ms) と長時間刺激 (150 ms) の結果が示されている. 黄斑部局所 PhNR の振幅は, 下側網膜 (lower) より上側網膜 (upper) の方が振幅が大きいことが分かる. B : 5 匹の異なるサルにおける PhNR の振幅のプロット. C : 上側および下側網膜から記録した, a 波, b 波, PhNR の振幅のプロット. 5 匹の平均値 ± 標準偏差の結果が示されている. 黄斑部局所 PhNR の上-下側の非対称は有意であった. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$.

(文献 81 の図を許可を得て転載, 改変)

を硝子体内に注入するとこの PhNR は劇的に小さくなり, b 波の後の陰性波は基線レベルより上にシフトしている. これに対して, TTX 注入によって a 波や b 波の振幅はほとんど変化していない. この結果により, 我々がサルの黄斑部から記録した黄斑部局所 PhNR は, 確かに網膜内層のスパイク性ニューロンに由来する電位を含んでいることが分かった. また, 長時間刺激における PhNR 記録でみられる PhNR-off (* 印) も網膜内層成分を含んでいることが分かった.

同時に, この図において PhNR の変化分を計測することによって, 黄斑部局所 PhNR 記録の至適条件, つまり最大の網膜内層成分を引き出す刺激時間, を知ることができた. 図 24 における TTX 前後における PhNR の変化分を計測すると, 30~50 ms の刺激時間で記録した場合に最も PhNR の変化分が大きく, この刺激長が黄斑部局所 PhNR を記録する至適条件である可能性が示された.

6. 局所 PhNR の網膜内における非対称

これまででも局所 ERG や多局所 ERG を用いて, ERG の各成分の網膜内分布特性についての研究が行われてき

た. 一般的に錐体 ERG の a 波および b 波, あるいは多局所 ERG の N1 および N2 は下側網膜よりも上方網膜の方が若干振幅が大きい結果が報告されている²⁾³⁾⁹⁰⁾⁹¹⁾. また Miyake ら³⁾⁴⁾は局所 ERG を用いて黄斑部における OPs の分布特性を調べており, OPs は耳側網膜の方が鼻側網膜よりも振幅が大きく, また中心窩よりも傍中心窩の方がより振幅が大きいと報告している. しかしながら, PhNR の網膜内分布特性に関してはこれまでまったく研究されていない. そこで今回我々は, サルの黄斑部において PhNR の上-下側間および耳-鼻側間の非対称が存在するかどうかを調べた⁹²⁾.

我々はこの目的のために直径 15 度の半円刺激を作製し, 5 匹のアカゲザルの黄斑部から局所 PhNR を記録した (図 25). その結果, PhNR の振幅は下側網膜よりも上側網膜の方が, また耳側網膜よりも鼻側網膜の方が有意に大きいことが分かった⁹²⁾ (図 26 A, 図 27 A). この事実は 5 匹のサルすべてに共通しており, 統計学的にも有意であった (図 26 B, C, 図 27 B, C, $p < 0.05$).

次に我々は, この上-下側間および耳-鼻側間の PhNR の非対称の細胞起源を調べる目的で, サルの硝子体内に

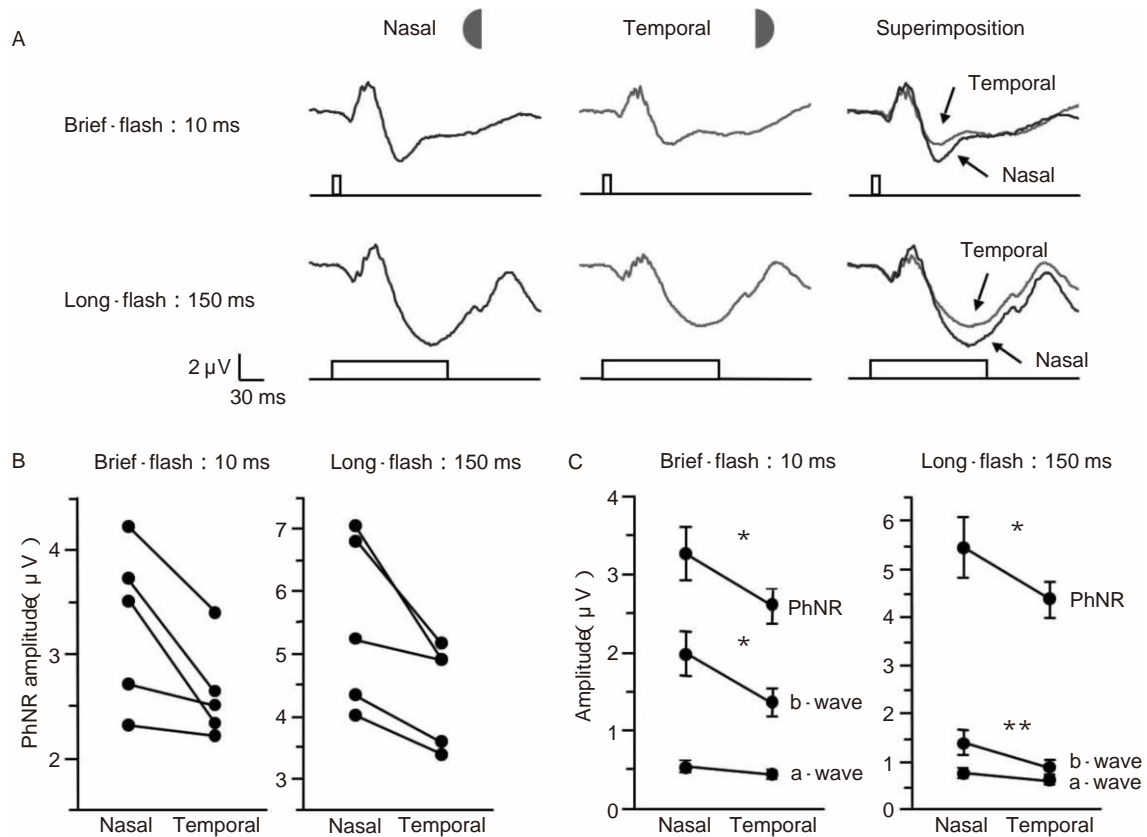


図 27 サルの黄斑部における photopic negative response (PhNR) の耳-鼻側の非対称.

A: 直径 15 度の半円刺激を用いて記録した代表波形. 短時間刺激 (10 ms) と長時間刺激 (150 ms) の結果が示されている. 黄斑部局所 PhNR の振幅は, 耳側網膜 (temporal) より鼻側網膜 (nasal) の方が振幅が大きいことが分かる. B: 5 匹の異なるサルにおける PhNR の振幅のプロット. C: 耳側および鼻側網膜から記録した, a 波, b 波, PhNR の振幅のプロット. 5 匹の平均値 ± 標準誤差の結果が示されている. 黄斑部局所 PhNR の耳-鼻側の非対称は有意であった. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

(文献 81 の図を許可を得て転載, 改変)

TTX を注入して網膜神経節細胞を含む網膜内層のスパイク性ニューロンの活動電位を遮断して, 再び局所 PhNR を記録した. その結果, TTX 注入後には PhNR の上-下側間および耳-鼻側間にみられた非対称はすべて消失した (図 28, 図 29). 逆に, 波形の差し引きによって TTX 注入により変化した成分 (TTX 感受性成分) を求めると, この成分は明らかに下側よりも上側に大きく, また耳側よりも鼻側に大きいことも分かった (図 28, 図 29). 以上の結果により, PhNR の振幅は黄斑部内で上-下側および耳-鼻側間で非対称が存在し, この非対称は TTX に感受性を有する網膜内層のスパイク性ニューロンの電位に由来していることが推定された.

今回得られた PhNR の非対称性の結果は, 過去のパターン ERG の非対称の結果とよく類似している. パターン ERG 中にも神経節細胞に由来する電位が含まれていることは古くより知られているが⁸⁹⁾, パターン ERG の振幅もやはり下側網膜よりも上側網膜の方が大きく⁹³⁾⁹⁴⁾, また耳側よりも鼻側の方が大きい^{94)~96)}. また, 今回の PhNR の結果は過去の神経節細胞の密度分布の結果ともよく一致している. Curcio ら⁸⁹⁾はヒトで, また

Perry ら⁸⁸⁾はサルで神経節細胞の数を各象限で比較している. その結果, ヒトもサルも神経節細胞の密度は相対的に下方網膜よりも上方網膜で高く, また耳側網膜よりも鼻側網膜で高かったとされている. 現在局所 PhNR は, 局所網膜の内層の機能障害を他覚的に検出する手段として重要性が増してきている. 正常網膜においてこのような PhNR の非対称が存在することを知っておくことは, 疾患における局所 PhNR の変化を検討する際にきわめて重要な基礎データであると考えられた.

7. 黄斑部局所 PhNR の臨床応用例

現在我々は, この黄斑部局所 PhNR の記録装置を用いて, 原因不明の視力低下や視野欠損の患者の診断や, 緑内障や視神経萎縮症の病態評価に用いている. 以下に, 黄斑部局所 PhNR が病態の把握に役立つ 1 例を紹介する. この症例は 28 歳の女性であり, 約 1 年前からの右眼の傍中心部の視野欠損を主訴に紹介されてきた. 矯正視力は右眼が 0.8, 左眼が 1.0 であり, 眼圧は右 12 mmHg, 左 13 mmHg であった. 静的量的視野計 (Humphrey 10-2) では, 患者の訴えのとおり, 右眼の傍中心部に小さな感度低下領域がみられた (図 30). 検

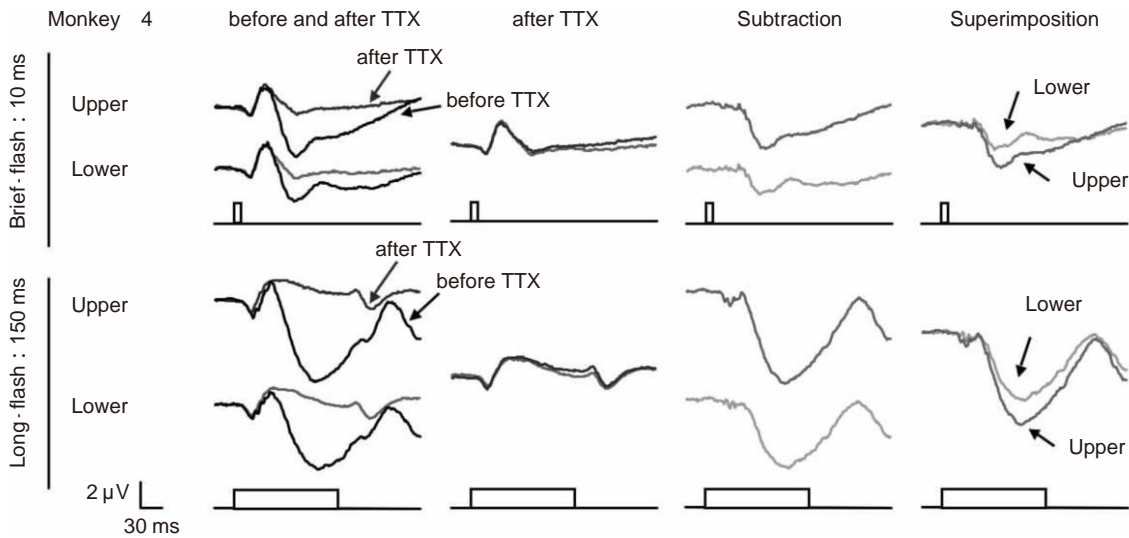


図 28 サルの黄斑部の上-下側から記録した局所 photopic negative response (PhNR) に対する tetrodotoxin (TTX) の効果.

1 匹のサルにおける TTX 前後の波形が示されている。TTX 前に存在した上-下側の非対称(最左列)が、TTX 後は消失している(左から 2 列)。TTX 前後の波形を差し引いて TTX によって消された成分を求める(左から 3 列)と、この TTX 感受性成分には上-下側の非対称が明らかであった(左から 4 列目)。

(文献 81 の図を許可を得て転載, 改変)

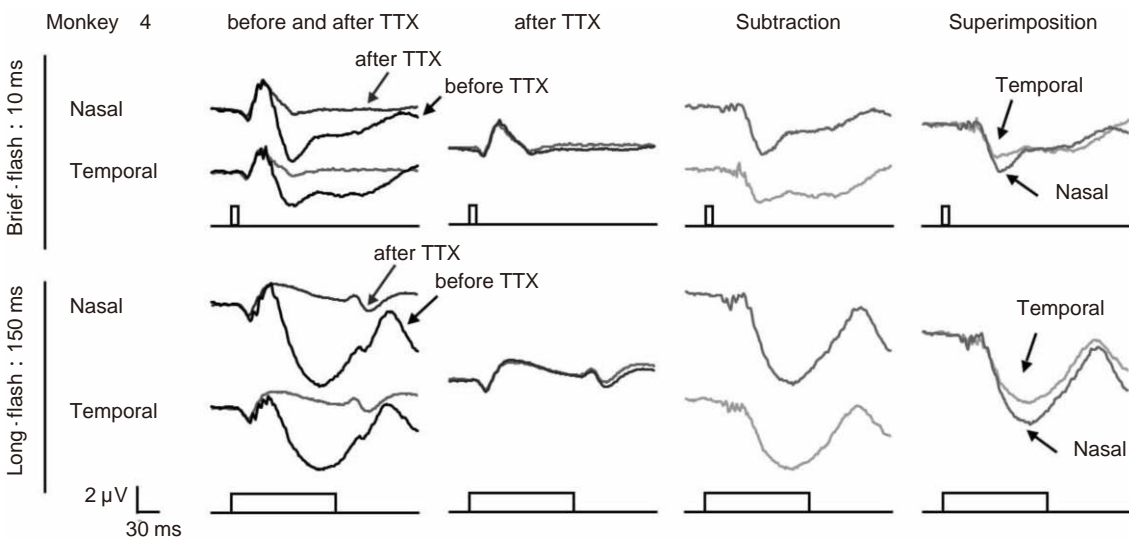


図 29 サルの黄斑部の耳-鼻側から記録した局所 photopic negative response (PhNR) に対する tetrodotoxin (TTX) の効果.

1 匹のサルにおける TTX 前後の波形が示されている。TTX 前に存在した耳-鼻側の非対称(最左列)が、TTX 後は消失している(左から 2 列)。TTX 前後の波形を差し引いて TTX によって消された成分を求める(左から 3 列)と、この TTX 感受性成分には耳-鼻側の非対称が明らかである(左から 4 列目)。

(文献 81 の図を許可を得て転載, 改変)

眼鏡的には視神経乳頭の陥凹の程度は軽度に見えたが、OCT を行うと左眼の視野欠損部位に一致して網膜神経線維層の厚みがやや減少していた。この結果からこの患者の右眼は正常眼圧緑内障と診断された。我々は、この患者の中心付近の神経節細胞の機能を他覚的に評価するために、この患者の両眼から黄斑部局所 PhNR を記録した。その結果、右眼の PhNR 振幅は左眼に比べて明

らかに低下しており、PhNR を基線から計測すると、右眼の PhNR 振幅は正常な左眼の 30% しかないことが分かった。緑内障患者において、視野異常が現れたときにはその部位に既に 50% 近くの網膜神経節細胞死が起きている⁹⁷⁾⁹⁸⁾ことが知られている。視野における感度低下がまだ軽度な時期であっても、局所の網膜神経節細胞の機能が予想以上に低下している事実を電気生理学的に知

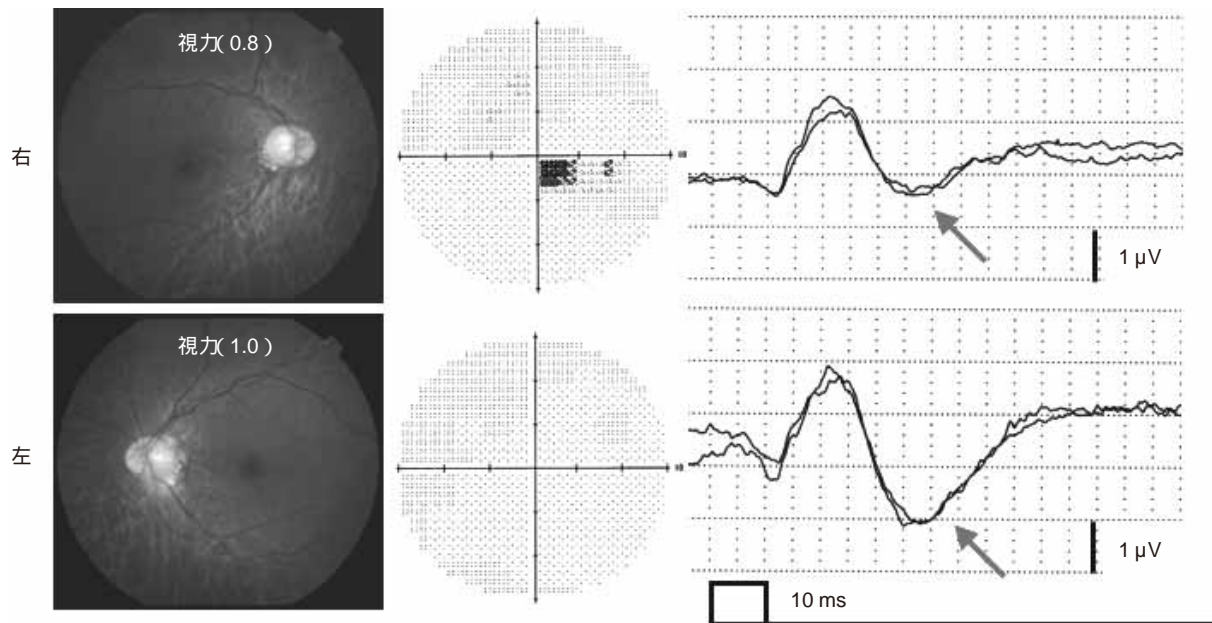


図 30 右眼が正常眼圧緑内障である 28 歳女性の両眼から記録した黄斑部局所 photopic negative response (PhNR) の結果。

左：眼底写真，中：静的量的視野検査(Humphrey 10-2)の結果，右：黄斑部局所 PhNR の波形(矢印が PhNR)。右眼の感度低下領域は広くないが，黄斑部局所 PhNR の振幅は強い減弱を示している。

ることができる本装置は，特に初期の緑内障や視神経症の評価に有用な検査となりうる可能性があると考えられた。実際に本邦の研究者により，緑内障の他覚的機能評価としての黄斑部局所 PhNR の有用性⁹⁹⁾¹⁰⁰⁾が報告されてきている。今後，黄斑部局所 PhNR のさらなる臨床応用が期待される。

V おわりに

基礎および臨床における視覚の基礎的研究において，動物モデルは欠くことができない重要な存在である。動物モデルはヒトのように視力や視野といった自覚的な検査が困難であることから，他覚的視機能評価として ERG はきわめて重要な評価手段である。以前は動物から記録が困難であった局所 ERG や多局所 ERG の記録技術や，PhNR のような新たな成分の解析が日々進歩しており，それに伴って動物モデルの視機能評価もさらに詳細な解析が可能になってきている。今後，この分野のさらなる発展を期待する。

稿を終えるにあたり，私を ERG 研究の道に導いてくださり，常に貴重なご助言と暖かい励ましの言葉をお与えくださった三宅養三名誉教授(名古屋大学)に心より感謝を申し上げます。また，本講演の機会をお与えいただいた日本眼科学会評議員の先生方，本講演に際し多大なご支援をいただいた愛知県眼科医会の先生方に心より感謝を申し上げます。今回の研究は，科学研究費補助金(基盤 C20592075)，厚生労働科学研究費補助金(H19 感覚器一般 001)，厚生労働科学研究費

補助金(H18 感覚器一般 005)より補助を受けました。

文 献

- 1) Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, Miyake Y, Brigell M, Bach M : ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). Doc Ophthalmol 118 : 69—77, 2009.
- 2) 三宅養三 : 黄斑部疾患の基礎と臨床。黄斑部局所 ERG の研究。日眼会誌 92 : 1419—1449, 1988.
- 3) Miyake Y, Shiroyama N, Horiguchi M, Ota I : Asymmetry of focal ERG in human macular region. Invest Ophthalmol Vis Sci 30 : 1743—1749, 1989.
- 4) Miyake Y, Shiroyama N, Ota I, Horiguchi M : Oscillatory potentials in electroretinograms of the human macular region. Invest Ophthalmol Vis Sci 29 : 1631—1635, 1988.
- 5) Sutter EE, Tran D : The field topography of ERG components in man : the photopic luminance response. Vision Res 32 : 433—446, 1992.
- 6) Hood DC : Assessing retinal function with the multifocal technique. Prog Retin Eye Res 19 : 607—646, 2000.
- 7) Hood DC, Bach M, Brigell M, Keating D, Kondo M, Lyons JS, et al : ISCEV guidelines for clinical multifocal electroretinography (2007 edition). Doc Ophthalmol 116 : 1—11, 2008.
- 8) Maffei L, Fiorentini A : Electroretinographic responses to alternating gratings before and after section of the optic nerve. Science 211 : 953—955, 1981.

- 9) **Holder GE** : Pattern electroretinography (PERG) and an integrated approach to visual pathway diagnosis. *Prog Retin Eye Res* 20 : 531—561, 2001.
- 10) **Viswanathan S, Frishman LJ, Robson JG, Harwerth RS, Smith EL 3rd** : The photopic negative response of the macaque electroretinogram : reduction by experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 1124—1136, 1999.
- 11) **Viswanathan S, Frishman LJ, Robson JG, Walters JW** : The photopic negative response of the flash electroretinogram in primary open angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 514—522, 2001.
- 12) **Yamamoto S, Kamiyama M, Nitta K, Yamada T, Hayasaka S** : Selective reduction of the S cone electroretinogram in diabetes. *Br J Ophthalmol* 80 : 973—975, 1996.
- 13) **Horiguchi M, Miyake Y, Kondo M, Suzuki S, Tanikawa A, Koo HM** : Blue light-emitting diode built-in contact lens electrode can record human S-cone electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 1730—1732, 1995.
- 14) **Petersen-Jones SM** : Animal models of human retinal dystrophies. *Eye* 12 : 566—570, 1998.
- 15) **Chader GJ** : Animal models in research on retinal degenerations : past progress and future hope. *Vision Res* 42 : 393—399, 2002.
- 16) **Mears AJ, Kondo M, Swain PK, Takada Y, Bush RA, Saunders TL, et al** : Nrl is required for rod photoreceptor development. *Nat Genet* 29 : 447—452, 2001.
- 17) **Schiller PH** : The ON and OFF channels of the visual system. *Trends Neurosci* 15 : 186—192, 1992.
- 18) **Schiller PH** : The ON and OFF channels of the mammalian visual system. *Prog Retina Eye Res* 15 : 173—195, 1992.
- 19) **Masu M, Iwakabe H, Tagawa Y, Miyoshi T, Yamashita M, Fukuda Y, et al** : Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. *Cell* 80 : 757—765, 1995.
- 20) **Miyake Y, Yagasaki K, Horiguchi M, Kawase Y, Kanda T** : Congenital stationary night blindness with negative electroretinogram : a new classification. *Arch Ophthalmol* 104 : 1013—1020, 1986.
- 21) **Dryja TP, McGee TL, Berson EL, Fishman GA, Sandberg MA, Alexander KR, et al** : Night blindness and abnormal cone electroretinogram ON responses in patients with mutations in the GRM 6 gene encoding mGluR 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 4884—4889, 2005.
- 22) **Koyasu T, Kondo M, Miyata K, Ueno S, Miyata T, Nishizawa Y, et al** : Photopic electroretinograms of mGluR 6-deficient mice. *Curr Eye Res* 33 : 91—99, 2008.
- 23) **Krishna VR, Alexander KR, Peachey NS** : Temporal properties of the mouse cone electroretinogram. *J Neurophysiol* 87 : 42—48, 2002.
- 24) **Sieving PA, Murayama K, Naarendorp F** : Push-pull model of the primate photopic electroretinogram : a role for hyperpolarizing neurons in shaping the b-wave. *Vis Neurosci* 11 : 519—532, 1994.
- 25) **Kondo M, Sieving PA** : Primate photopic sine-wave flicker ERG : vector modeling analysis of component origins using glutamate analogs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 305—312, 2001.
- 26) **Sato S, Omori Y, Katoh K, Kondo M, Kanagawa M, Miyata K, et al** : Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat Neurosci* 11 : 923—931, 2008.
- 27) **加藤君子, 大森義裕, 古川貴久** : シナプスの高次構造をかたちづくる細胞外マトリックス蛋白質ピカチュリン. *蛋白質核酸酵素* 54 : 1166—1172, 2009.
- 28) **Hartong DT, Berson EL, Dryja TP** : Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368 : 1795—1809, 2006.
- 29) **Narfström K** : Hereditary progressive retinal atrophy in the Abyssinian cat. *J Hered* 74 : 273—276, 1983.
- 30) **Kijas JW, Cideciyan AV, Aleman TS, Pianta MJ, Pearce-Kelling SE, Miller BJ, et al** : Naturally occurring rhodopsin mutation in the dog causes retinal dysfunction and degeneration mimicking human dominant retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 6328—6333, 2002.
- 31) **Petters RM, Alexander CA, Wells KD, Collins EB, Sommer JR, Blanton MR, et al** : Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa. *Nat Biotechnol* 15 : 965—970, 1997.
- 32) **Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN Jr, Mingozzi F, Bencicelli J, et al** : Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358 : 2240—2248, 2008.
- 33) **Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, et al** : Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358 : 2231—2239, 2008.
- 34) **Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, et al** : Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 28 : 92—95, 2001.
- 35) **Kondo M, Sakai T, Komeima K, Kurimoto Y, Ueno S, Nishizawa Y, et al** : Generation of a transgenic rabbit model of retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 : 1371—1377, 2009.
- 36) **Yang XW, Model P, Heintz N** : Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat Biotechnol* 15 : 859—865, 1997.
- 37) **Zhang Y, Buchholz F, Muyrers JP, Stewart AF** :

- A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet* 20 : 123—128, 1998.
- 38) **Muyrers JP, Zhang Y, Benes V, Testa G, Anson W, Stewart AF** : Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination. *EMBO Rep* 1 : 239—243, 2000.
 - 39) **Famiglietti EV, Sharpe SJ** : Regional topography of rod and immunocytochemically characterized “blue” and “green” cone photoreceptors in rabbit retina. *Vis Neurosci* 12 : 1151—1175, 1995.
 - 40) **Rockhill RL, Daly FJ, MacNeil MA, Brown SP, Masland RH** : The diversity of ganglion cells in a mammalian retina. *J Neurosci* 22 : 3831—3843, 2002.
 - 41) **Timmers AM, Wintjes ET, Hauswirth WW** : Fetal topography of bovine rhodopsin mRNA suggests retinotopographically determined gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 2008—2019, 1995.
 - 42) **van Ginkel PR, Timmers AM, Szél A, Hauswirth WW** : Topographical regulation of cone and rod opsin genes : parallel, position dependent levels of transcription. *Brain Res Dev Brain Res* 89 : 146—149, 1995.
 - 43) **Olsson JE, Gordon JW, Pawlyk BS, Roof D, Hayes A, Molday RS, et al** : Transgenic mice with a rhodopsin mutation (Pro23His) : a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Neuron* 9 : 815—830, 1992.
 - 44) **Tan E, Wang Q, Quiambao AB, Xu X, Qtaishat NM, Peachey NS, et al** : The relationship between opsin overexpression and photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 589—600, 2001.
 - 45) **Chen J, Makino CL, Peachey NS, Baylor DA, Simon MI** : Mechanisms of rhodopsin inactivation *in vivo* as revealed by a COOH-terminal truncation mutant. *Science* 267 : 374—377, 1995.
 - 46) **Alfinito PD, Townes-Anderson E** : Activation of mislocalized opsin kills rod cells : a novel mechanism for rod cell death in retinal disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 5655—5660, 2002.
 - 47) **Li T, Snyder WK, Olsson JE, Dryja TP** : Transgenic mice carrying the dominant rhodopsin mutation P347S : evidence for defective vectorial transport of rhodopsin to the outer segments. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 14176—14181, 1996.
 - 48) **Sakai T, Kondo M, Ueno S, Koyasu T, Komeima K, Terasaki H** : Supernormal ERG oscillatory potentials in transgenic rabbit with rhodopsin P347L mutation and retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 : 4402—4409, 2009.
 - 49) **Hood DC, Birch DG** : Rod phototransduction in retinitis pigmentosa : estimation and interpretation of parameters derived from the rod a-wave. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 2948—2961, 1994.
 - 50) **Fulton AB, Rushton WA** : The human rod ERG : Correlation with psychophysical responses in light and dark adaptation. *Vision Res* 18 : 793—800, 1978.
 - 51) **Akula JD, Mocko JA, Moskowitz A, Hansen RM, Fulton AB** : The oscillatory potentials of the dark-adapted electroretinogram in retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 5788—5797, 2007.
 - 52) **Machida S, Kondo M, Jamison JA, Khan NW, Kononen LT, Sugawara T, et al** : P23H rhodopsin transgenic rat : correlation of retinal function with histopathology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 3200—3209, 2000.
 - 53) **Aleman TS, LaVail MM, Montemayor R, Ying G, Maguire MM, Laties AM, et al** : Augmented rod bipolar cell function in partial receptor loss : an ERG study in P23H rhodopsin transgenic and aging normal rats. *Vision Res* 41 : 2779—2797, 2001.
 - 54) **Ueno S, Kondo M, Miyata K, Hirai T, Miyata T, Usukura J, et al** : Physiological function of S-cone system is not enhanced in rd7 mice. *Exp Eye Res* 81 : 751—758, 2005.
 - 55) **Banin E, Cideciyan AV, Alemán TS, Petters RM, Wong F, Milam AH, et al** : Retinal rod photoreceptor-specific gene mutation perturbs cone pathway development. *Neuron* 23 : 549—557, 1999.
 - 56) **Ikenoya K, Kondo M, Piao CH, Kachi S, Miyake Y, Terasaki H** : Preservation of macular oscillatory potentials in eyes of patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 3312—3317, 2007.
 - 57) **Wachtmeister L** : Oscillatory potentials in the retina : what do they reveal. *Prog Retin Eye Res* 17 : 485—521, 1997.
 - 58) **Dong CJ, Agey P, Hare WA** : Origins of the electroretinogram oscillatory potentials in the rabbit retina. *Vis Neurosci* 21 : 533—543, 2004.
 - 59) **Zhang K, Yao G, Gao Y, Hofeldt KJ, Lei B** : Frequency spectrum and amplitude analysis of dark- and light-adapted oscillatory potentials in albino mouse, rat and rabbit. *Doc Ophthalmol* 115 : 85—93, 2007.
 - 60) **Rangaswamy NV, Hood DC, Frishman LJ** : Regional variations in local contributions to the primate photopic flash ERG : revealed using the slow-sequence mfERG. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 3233—3247, 2003.
 - 61) **Forte JD, Bui BV, Vingrys AJ** : Wavelet analysis reveals dynamics of rat oscillatory potentials. *J Neurosci Methods* 169 : 191—200, 2008.
 - 62) **Marc RE, Jones BW, Anderson JR, Kinard K, Marshak DW, Wilson JH, et al** : Neural reprogramming in retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 3364—3371, 2007.
 - 63) **Peng YW, Hao Y, Petters RM, Wong F** : Ectopic synaptogenesis in the mammalian retina caused by

- rod photoreceptor-specific mutations. *Nat Neurosci* 3 : 1121—1127, 2000.
- 64) **Hankins M, Ikeda H** : Early abnormalities of retinal dopamine pathways in rats with hereditary retinal dystrophy. *Doc Ophthalmol* 86 : 325—334, 1994.
- 65) **Oyster CW, Takahashi ES, Fry KR, Lam DM** : Ganglion cell density in albino and pigmented rabbit retinas labeled with a ganglion cell-specific monoclonal antibody. *Brain Res* 425 : 25—33, 1987.
- 66) **Hood DC, Frishman LJ, Saszik S, Viswanathan S** : Retinal origins of the primate multifocal ERG : implications for the human response. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 1673—1685, 2002.
- 67) **Ueno S, Kondo M, Niwa Y, Terasaki H, Miyake Y** : Luminance dependence of neural components that underlies the primate photopic electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 1033—1040, 2004.
- 68) **Ueno S, Kondo M, Ueno M, Miyata K, Terasaki H, Miyake Y** : Contribution of retinal neurons to d-wave of primate photopic electroretinograms. *Vision Res* 46 : 658—664, 2006.
- 69) **Miyata K, Ueno S, Kondo M, Koyasu T, Terasaki H** : Comparison of photopic negative responses elicited by red and white xenon flashes in monkeys. *Jpn J Ophthalmol* 52 : 327—330, 2008.
- 70) **Kondo M, Ueno S, Piao CH, Miyake Y, Terasaki H** : Comparison of focal macular cone ERGs in complete-type congenital stationary night blindness and APB-treated monkeys. *Vision Res* 48 : 273—280, 2008.
- 71) **Colotto A, Falsini B, Salgarello T, Iarossi G, Galan ME, Scullica L** : Photopic negative response of the human ERG : losses associated with glaucomatous damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 2205—2211, 2000.
- 72) **Drasdo N, Aldebasi YH, Chiti Z, Mortlock KE, Morgan JE, North RV, et al** : The S-cone PhNR and pattern ERG in primary open angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 1266—1272, 2001.
- 73) **Machida S, Gotoh Y, Toba Y, Ohtaki A, Kaneko M, Kurosaka D** : Correlation between photopic negative response and retinal nerve fiber layer thickness and optic disc topography in glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 2201—2207, 2008.
- 74) **Gotoh Y, Machida S, Tazawa Y** : Selective loss of the photopic negative response in patients with optic nerve atrophy. *Arch Ophthalmol* 122 : 341—346, 2004.
- 75) **Rangaswamy NV, Frishman LJ, Dorotheo EU, Schiffman JS, Bahrani HM, Tang RA, et al** : Photopic ERGs in patients with optic neuropathies : comparison with primate ERGs after pharmacologic blockade of inner retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 3827—3837, 2004.
- 76) **Miyata K, Nakamura M, Kondo M, Lin J, Ueno S, Miyake Y, et al** : Reduction of oscillatory potentials and photopic negative response in patients with autosomal dominant optic atrophy with OPA 1 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 820—824, 2007.
- 77) **Machida S, Gotoh Y, Tanaka M, Tazawa Y** : Predominant loss of the photopic negative response in central retinal artery occlusion. *Am J Ophthalmol* 137 : 938—940, 2004.
- 78) **Kizawa J, Machida S, Kobayashi T, Gotoh Y, Kurosaka D** : Changes of oscillatory potentials and photopic negative response in patients with early diabetic retinopathy. *Jpn J Ophthalmol* 50 : 367—373, 2006.
- 79) **Chen H, Wu D, Huang S, Yan H** : The photopic negative response of the flash electroretinogram in retinal vein occlusion. *Doc Ophthalmol* 113 : 53—59, 2006.
- 80) **Ueno S, Kondo M, Piao CH, Ikenoya K, Miyake Y, Terasaki H** : Selective amplitude reduction of the PhNR after macular hole surgery : ganglion cell damage related to ICG-assisted ILM peeling and gas tamponade. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 3545—3549, 2006.
- 81) **Kondo M, Kurimoto Y, Sakai T, Koyasu T, Miyata K, Ueno S, et al** : Recording focal macular photopic negative response (PhNR) from monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 3544—3550, 2008.
- 82) **Rangaswamy NV, Shirato S, Kaneko M, Digby BI, Robson JG, Frishman LJ** : Effects of spectral characteristics of ganzfeld stimuli on the photopic negative response (PhNR) of the ERG. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 4818—4828, 2007.
- 83) **Sustar M, Cvenkel B, Breclj J** : The effect of broadband and monochromatic stimuli on the photopic negative response of the electroretinogram in normal subjects and in open-angle glaucoma patients. *Doc Ophthalmol* 118 : 167—177, 2009.
- 84) **Rolls ET, Cowey A** : Topography of the retina and striate cortex and its relationship to visual acuity in rhesus monkeys and squirrel monkeys. *Exp Brain Res* 10 : 298—310, 1970.
- 85) **Webb SV, Kaas JH** : The sizes and distribution of ganglion cells in the retina of the owl monkey. *Aotus trivirgatus*. *Vision Res* 16 : 1247—1254, 1976.
- 86) **DeBruyn EJ, Wise VL, Casagrande VA** : The size and topographic arrangement of retinal ganglion cells in the galago. *Vision Res* 20 : 315—327, 1980.
- 87) **Stone J, Johnston E** : The topography of primate retina : a study of the human, bushbaby, and new- and old-world monkeys. *J Comp Neurol* 196 : 205—224, 1981.
- 88) **Perry VH, Cowey A** : The ganglion cell and cone distributions in the monkey's retina : implications

- for central magnification factors. *Vision Res* 25 : 1795—1810, 1985.
- 89) **Curcio CA, Allen KA** : Topography of ganglion cells in human retina. *J Comp Neurol* 300 : 5—25, 1990.
- 90) **Nagatomo A, Nao-i N, Maruiwa F, Arai M, Sawada A** : Multifocal electroretinograms in normal subjects. *Jpn J Ophthalmol* 42 : 129—135, 1998.
- 91) **Wu D, Liang J, Ma J** : The characteristics of multifocal electroretinogram in normal subjects in China. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 37 : 98—103, 2001.
- 92) **Kurimoto Y, Kondo M, Ueno S, Sakai T, Machida S, Terasaki H** : Asymmetry of focal macular photopic negative responses (PhNRs) in monkeys. *Exp Eye Res* 88 : 92—98, 2009.
- 93) **Graham SL, Wong VA, Drance SM, Mikelberg FS** : Pattern electroretinograms from hemifields in normal subjects and patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 3347—3356, 1994.
- 94) **Yoshii M, Pärermann A** : Hemiretinal stimuli elicit different amplitudes in the pattern electroretinogram. *Doc Ophthalmol* : 21—30, 1989.
- 95) **Bopp M** : Predominance of the nasal hemiretina in the pattern electroretinogram of the human eye. *Pflugers Arch* 392 : 50, 1982.
- 96) **Porrello G, Falsini B** : Retinal ganglion cell dysfunction in humans following post-geniculate lesions : specific spatio-temporal losses revealed by pattern ERG. *Vision Res* : 1739—1745, 1999.
- 97) **Quigley HA, Dunkelberger GR, Green WR** : Retinal ganglion cell atrophy correlated with automated perimetry in human eyes with glaucoma. *Am J Ophthalmol* 107 : 453—464, 1989.
- 98) **Harwerth RS, Carter-Dawson L, Shen F, Smith EL 3rd, Crawford MLJ** : Ganglion cell losses underlying visual field defects from experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2242—2250, 1999.
- 99) **Machida S, Toba Y, Ohtaki A, Gotoh Y, Kaneko M, Kurosaka D** : Photopic negative response of focal electroretinograms in glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 5636—5644, 2008.
- 100) **Machida S, Tamada K, Oikawa T, Yokoyama D, Kaneko M, Kurosaka D** : Sensitivity and specificity of photopic negative response of focal electroretinogram to detect glaucomatous eyes. *Br J Ophthalmol* 94 : 202—208, 2010.
-

Comment : 宇治 幸隆

名古屋大学の近藤峰生先生は、長年にわたり臨床網膜電図(ERG)と動物モデル ERG の解析に取り組み、両者の結果を検討することによって、網膜疾患の病態解明に多大な貢献をされてきた日本の臨床視覚電気生理学のエースである。第 113 回日本眼科学会総会の評議員会指名講演「眼疾患と動物モデル」において、「網膜・視神経疾患動物モデルの ERG 解析」と題した講演をされたが、電気生理がまったく門外漢の聴衆にも、実際の動物実験の状況も理解できるように、非常に分かりやすくユーモアを交えて説明され、感動的な講演であったと思う。

網膜・視神経疾患の研究において、ヒトであれば自覚的視機能検査を最も高度な解析法の一つとして使うことができるが、動物では ERG が他覚的かつ鋭敏に、また経時的に、さらに発生源の解明から層別に解析が可能であることなどから、多くの網膜・視神経疾患の病態解明とその治療法の開発につながる研究方法であるといえる。そして組織学的研究による検証が可能なのが、得られた結果の信憑性を高める。近藤先生は常に眼科医の矜持を持って臨床に軸足を置きつつ、臨床の問題を解決する手段として動物を対象に実験を行ってこられた。

本報告はマウスの ERG、トランスジェニックウサギの作製と ERG 解析、サルを用いた新たな ERG の解析の 3 つのテーマからなる。

まず、原因遺伝子の特定がなされている網膜・視神経疾患のモデル動物として、マウスは非常に有用な存在であるが、そのマウス ERG はヒト ERG と波形がよく似ていて、その解析は ERG のさらなる理解を深めることにつながる。近藤先生は完全型先天性夜盲の動物モデルである mGluR6 欠損マウスを使って、錐体 OFF 経路成分の b 波振幅は ON 経路成分の b 波振幅の 23% しかないことから、ON 経路成分が圧倒的に優位であることを証明された。マウスの特に錐体 ERG の解析に重要な所見であると思う。さらに外網状層に局在するピカチュリン蛋白質の役割を解明しようと、ピカチュリン欠損マウスの ERG を検討し、このマウスでは、杆体双極細胞の機能を反映する b 波は著しい異常を示し、ピカチュリンは視細胞から双極細胞への伝達に重要な役割をもっていることを証明された。このような研究手法は多くの学者が取り組んでいることであるが、近藤先生のような臨床を熟知する眼科医が行う研究においては、どのような意義があるかをもう少し明確にされた方がよかったのではないかと思った。

全世界が持ち望む網膜色素変性の有効な治療法開発をめざした研究として、ヒトの網膜色素変性と同じ病態をもつ動物の研究が必須である。近藤先生は実験をするにも、またさまざまな眼科的治療操作を加えるのにも便利な動物はウサギであると考え、2004 年からトランスジェニック(Tg)ウサギの作製に取り組み、ついに成功に至るわけだが、その成果の検証に ERG は非常に大きな役割を果たす。組織学的には、Tg ウサギ 6 週以降で外網状層の核数が徐々に減少するも内網状層の構造は保たれていて、ヒトの網膜色素変性と同様に進行性の視細胞変性、特に杆体視細胞の強い変性が観察される。動物を長期に生かし 48 週まで ERG の経時変化を観察して、ヒトのそれと同様に錐体成分よりも杆体成分の低下が強く、また a 波、b 波、OP 波の順に障害が大きいことを証明された。また Tg ウサギやヒトの患者でみられた OPs の増大の解明においては、tetrodotoxin (TTX) を使った実験から網膜内層のスパイク性ニューロンの活動が増大していることを示された。さらに Tg ウサギの研究の精度を高めるべく有色 Tg ウサギの作製にも成功された。決して大げさでなく、全世界が待ち望む網膜色素変性の治療法確立に向けた確かな第一歩であると思うし、講演の中で聴衆が最も感動した部分であったろうと思う。

次にサルの黄斑部 PhNR の解析をされた。黄斑部局所 ERG 記録は三宅養三名誉教授が確立された名古屋大学の得意とする手法であるが、近藤先生は LED 刺激を用いて刺激部位を確認しながら黄斑部 PhNR を記録し、PhNR が内層起源であること、さらには網膜の部位による非対称性が存在し、それは内層の TTX 感受性スパイク性ニューロンに由来しているとの推測を示された。ヒトときわめて似ている眼底、網膜構造をもつサルで証明されたことの意義は大きいと思う。PhNR は緑内障のような網膜神経節細胞死が起きている疾患の他覚的機能評価への利用に期待が高まっているが、今後症例を増やして臨床応用を確実にされることを期待したい。

近藤先生の評議員会指名講演は網膜変性疾患のような経時的観察が必要な疾患モデルの研究において、ERG がいかに多くの情報をもたらすか、また治療効果の検証に有意義を示した報告であった。難病の治療開発をめざす多くの研究者に勇気を与えるものであると思う。