

平成 21 年 3 月 30 日現在

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2007~2008

課題番号:19592051

研究課題名(和文) 光刺激に対する ON および OFF 反応の検出による緑内障早期発見

研究課題名(英文) Examination for detection of early glaucoma with ON- and OFF-delays of subjects with normal and glaucomatous eyes

研究代表者

渡部真三(WATANABE MASAMI)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所周生期学部・主任研究員

研究者番号:10093486

研究成果の概要:

1. 緑内障の早期発見を目指して従来の視野計の改良を行った。正常と緑内障の被験者に、発光ダイオードの点滅に合わせてスイッチの点滅を行ってもらったところ、点灯に反応する時間が緑内障患者で遅い傾向を示した。2. 緑内障治療薬ウノプロストンの視神経再生促進作用を、網膜培養と視神経内軸索再生で調べた。濃度 3  $\mu\text{M}$  で促進効果が最大で、神経突起のみ伸展していた。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,400,000	420,000	1,820,000
20年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野:神経科学、神経生物学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・眼科学

キーワード:緑内障、視野計、ON 中心型神経節細胞、OFF 中心型神経節細胞、視神経再生、網膜組織培養、Unoprostone

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の中途失明第一位の病因の緑内障は、進行すると機能回復が困難で、早期発見・早期治療が望まれる病気である。緑内障の動物実験モデルには視神経切断と、NMDA 毒性が考えられている。正常網膜では ON-型神経節細胞と OFF-中心型神経節細胞が同じ割合で存在するが、視神経切断後生存している網膜神経節細胞における ON-中心型の割合は 75%で、OFF 中心型より優位に高くなっており、OFF-中心型細胞の軸索切断に対する脆弱性を示している。一方、NMDA 毒性に対しては ON、OFF 細胞の間で脆弱性に差は認められない。

## 2. 研究の目的

- (1) 緑内障眼で OFF 細胞が損傷を受けやすいか、OFF 細胞の活動の検出で早期緑内障が発見できるかを、試作した視野計で検証できるか調べた。
- (2) プロスタグランジン系緑内障治療薬ウノプロストン unoprostone によって視神経再生が促進されるかどうかを、網膜培養と視神経挫滅の実験で調べた。

## 3. 研究の方法

## (1) 視野計による反応潜時の測定

- ① 被験者:35 歳以下(若年)の健常者の右眼 (n=27)、50 歳以上(中年)の健常者の両眼 (n=26)、緑内障患者の眼の軽度緑内障が

疑われる視野を検査した。中年被験者は佐川医師が眼底検査を行い、緑内障の兆候がないことを確認した。緑内障患者は名大眼科近藤准教授が診察した中から選び、本人の承諾後、渡部主任研究員が行った。いずれも発達障害研究所「ヒトおよびヒト材料を対象とする研究」倫理委員会と、名古屋大学医学部臨床研究倫理委員会の審査と承認を得た。

② 検査方法.1 m 径の乳白色ドーム内面、視野角 5 度から 25 度に配置した赤色 LED によって、矩形と鋸歯のパルス光で刺激し、光刺激を感知したらスイッチを押し、消えたら離して、ON と OFF の反応潜時を計測した。

(2) Unoprostone の視神経再生の促進作用

① 網膜培養.深麻酔した成ネコの摘出眼球から網膜を無菌的に取り出し、1 mm 以下に細切後、網膜細片をコラゲンゲル内に封入した。培養液中に unoprostone と前駆体の M1 を 0.03~30  $\mu\text{M}$  加えた。2 週間の培養後パラホルムアルデヒド固定し、神経突起を抗 TUJ1 抗体で、グリア突起を抗 GFAP 抗体で染色し、陽性突起を数えた。

② 挫滅視神経内での軸索再生.麻酔した成ネコの視神経を 6-0 縫合糸で結紮し、神経節細胞の軸索を挫滅した。直後に 3  $\mu\text{M}$  および 10  $\mu\text{M}$  の unoprostone を、対照にはリン酸緩衝液を、挫滅部位と眼球内に注入した。12 日後 WGA-HRP を眼球内に注入し、再生線維を順行性に標識した。2 日後灌流固定して視神経を剖出した。視神経長軸方向に 30  $\mu\text{m}$  厚の凍結切片を作成し、TMB 反応によって軸索内の HRP を可視化し、再生線維の数と長さを測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 視野計による反応潜時の測定と緑内障眼での反応潜時の比較

図 1. 方形波による刺激

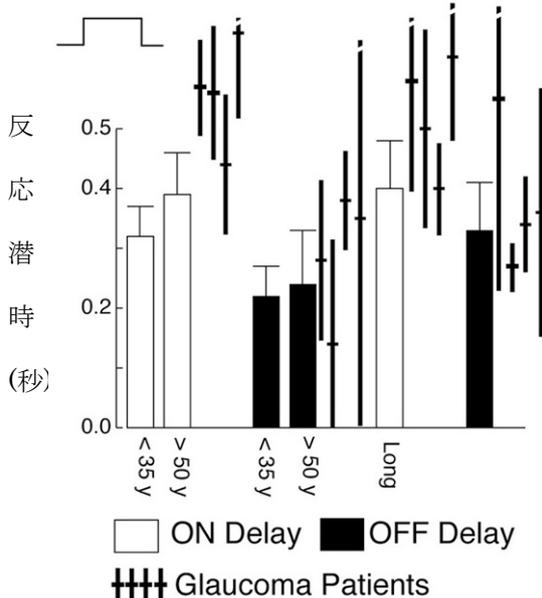


図 2. 鋸波 ( \_ / | \_ ) による刺激

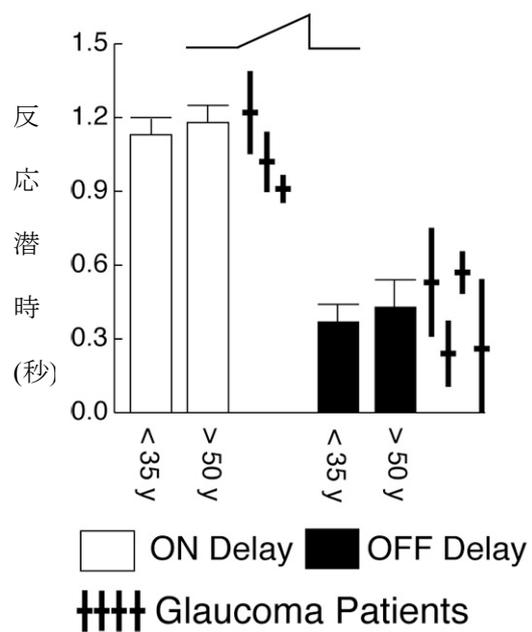
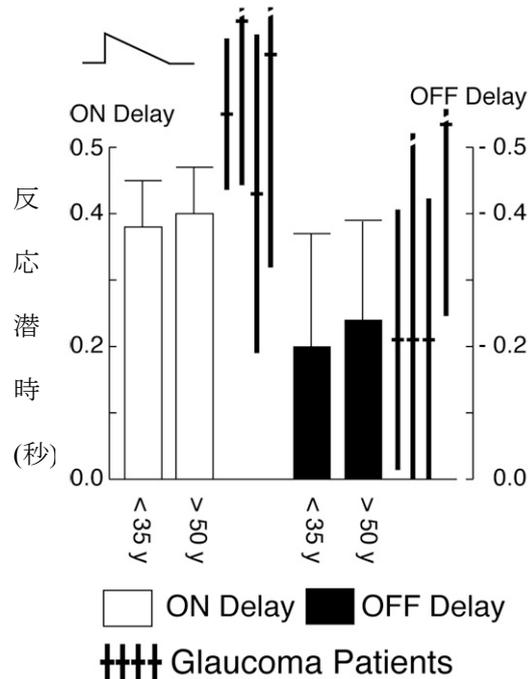


図 3. 鋸波 ( \_ | \\_ ) による刺激



① 健常眼.若年と中年の ON 反応潜時、OFF 反応潜時の比較では、中年でやや反応時間が遅れる傾向があったが(図1-3)、いずれの刺激光においても有意の差はなかった。② 緑内障眼.3 月末までに四眼しか検査できなかったため、統計処理はできず、確定的な傾向はまだ認められない。しかしいずれも急速な ON 反応潜時がやや遅い傾向が見られた(図 1-3)。OFF 反応潜時の値はいずれの刺激に対して

被験者間でばらつきが大きく、緑内障では OFF 反応の認識が正確でない可能性がある。  
 ③ 結論.ON 反応潜時の遅れが見いだされたことは予想外であり、今後の実験で確かめる必要がある。被験者の感想によれば、視野計にゲーム感覚を取り入れることにより、検査の緊張が和らげられることがわかった。

図 4. Unoprostone の神経突起伸展促進  
 ○: unoprostone, ■: M1

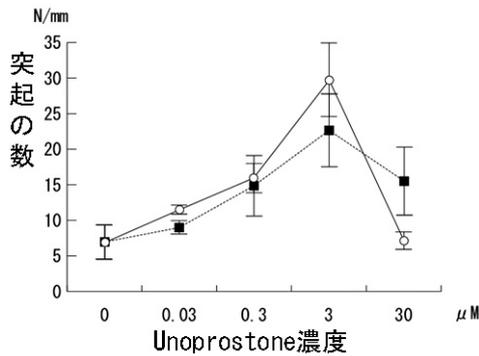
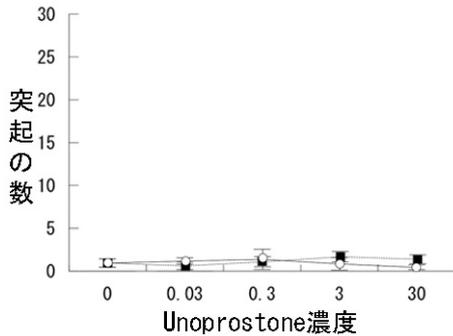


図 5. Unoprostone のグリア突起伸展促進  
 ○: unoprostone, ■: M1



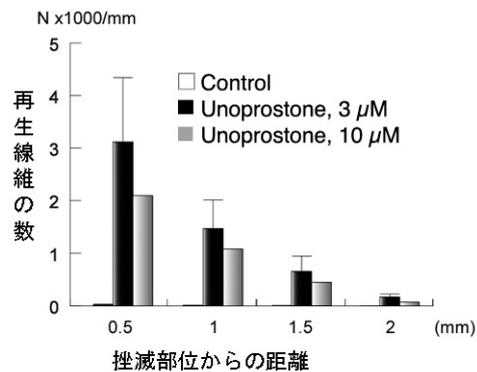
## (2) Unoprostone の視神経再生促進作用

① 培養網膜の突起伸展. ネコ網膜の TUJ1 陽性の突起伸展に対する unoprostone の促進作用は濃度依存性であった。すなわち、3 μM で最も高く、30 μM では 3 μM での突起数の 1/5 に減少し、Y39983 同様、高濃度での阻害作用を示した (図 4)。前駆体 M1 では unoprostone よりやや数が減るが、統計的に有意では無かった (図 4)。Unoprostone の溶媒を、DMSO から Polysorbate に代えても効果に変わりはなく、溶媒の作用は無視できることが示された。GFAP 陽性突起は unoprostone のいずれの濃度でもほとんど認められず (図 5)、unoprostone はグリアの突起伸展に全く効果がなく、神経突起のみに伸展作用があることがわかった。

② 挫滅視神経内での軸索再生. 3 μM 注入視神経 (3 例) の 0.5 mm 部位では平均約 3,000 で、ROCK 阻害剤の Y39983 10 μM 注入とほぼ同数の再生軸索が認められた (図 6)。10 μM 注入視神経では約 2,000 に減少していた。

③ 結論. プロスタグランジン系緑内障治療薬にも視神経再生の促進作用がある。しかしながら前駆体 M1 にも突起伸展促進作用があり、グリア突起を伸展しないにもかかわらず、視神経再生を促進していることから、Y39983 および Y-27632 とは異なった経路に作用している可能性がある。ROCK 経路を阻害している可能性も含め、細胞内伝達経路での作用分子を特定することが今後の課題である。

図 6. Unoprostone の視神経再生促進



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Sagawa H, Terasaki H, Nakamura M, Ichikawa M, Yata T, Tokita Y, Watanabe M: A novel ROCK inhibitor, Y-39983, promotes regeneration of crushed axons of retinal ganglion cells into the optic nerve of adult cats. *Exp. Neurol.* 205:230-240, 2007.
2. Yata T, Nakamura M, Sagawa H, Tokita Y, Terasaki H, Watanabe M: Survival and axonal regeneration of OFF-center retinal ganglion cells of adult cats are promoted with an anti-glaucoma drug, nipradilol, but not BDNF and CNTF. *Neuroscience* 148:53-64, 2007.
3. Ishikawa K, Kondo M, Ito Y, Kikuchi M, Nishihara H, Piao CH, Sugita T, Terasaki H. Correlation between focal macular electroretinograms and angiographic findings after photodynamic therapy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007;48:2254-2259.
4. 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.* 2007;48:3312-3317.
5. Ichikawa M, Yoshida J, Saito K, Sagawa H, Tokita Y, Watanabe M: Differential effect of ROCK inhibitors, Fasudil and Y-27632, on

promotion of optic nerve regeneration in adult cats. Brain Res. 1201:23-33, 2008.

6. Kondo M, Ueno S, Piao CH, Miyake Y, Terasaki H. Focal macular cone ERG in complete type CSNB: A comparison with APB-treated monkeys. Vision Res. 2008;48:273-280.
7. 渡部眞三: ほ乳動物の視神経再生. 神経精神薬理 28:143-148, 2008.
8. Kondo M, Kurimoto Y, Sakai T, Koyasu T, Miyata K, Ueno S, Terasaki H. Recording focal macular photopic negative response (PhNR) from monkeys. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2008;49:3544-3550.
9. Kondo M, Sakai T, Komeima K, Kurimoto Y, Ueno S, Nishizawa Y, Usukura J, Tano Y, Terasaki H. Generation of a transgenic rabbit model of retinal degeneration. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2009;50:1371-1377.

[学会発表] (計 9 件)

1. Watanabe M, Kudo H, Nakazawa T, Tamai M: Survival difference in type and function of retinal ganglion cells against NMDA toxicity in adult cats. ARVO 2007. 2007. 5. 6 (Fort Lauderdale).
2. 渡部眞三、時田義人: OFF神経節細胞とON神経節細胞の生存および軸索再生能. 日本神経科学大会, 2007.9.10, 横浜.
3. 近藤峰生. 網膜再生治療に必要な動物モデルとremodeling. シンポジウム:第7回日本再生医療学会、2008年3月14日、名古屋
4. Watanabe M, Ichikawa M, Sagawa H, Tokita Y: Effects of two Rho inhibitors on axonal regeneration into the crushed cat optic nerve. ARVO 2008. 2008. 5. 1 (Fort Lauderdale).
5. 渡部眞三, 中澤徹, 工藤英代. NMDA 毒性に対するネコ網膜神経節細胞のタイプによる感受性の違い: 視神経切断との比較. 第12回視覚科学フォーラム. 2008.8.29, 大阪.
6. Kondo M, Kurimoto Y, Terasaki H. Recording focal macular PhNR from monkeys. 18th International Congress for Eye Research, Beijing, China, September 28, 2008.
7. Kondo M, Ikenoya K, Terasaki H. Preservation of macular oscillatory potentials in eyes with retinitis pigmentosa with normal visual acuity. 18th International Congress for Eye Research. Beijing, China, September 28, 2008.
8. 近藤峰生. 網膜変性疾患の評価. シンポジウム. 「ERGによる黄斑の機能評価」. 2008年10月23日、第62回日本臨床眼科学会、東京.
9. 近藤峰生. 網膜機能解析の進歩と将来. シンポジウム「視覚機能の評価」第38回日本臨床神経生理学会. 2008年11月15日、神戸.

[図書] (計 0 件)  
なし

[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)  
なし

○取得状況 (計 0 件)  
なし

[その他]  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡部眞三 (Watanabe Masami)  
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・周生期学部・主任研究員  
研究者番号: 10093486

### (2) 研究分担者

近藤峰生 (Kondo Mineo)  
名古屋大学大学院医学系研究科・感覚器障害制御講座・准教授  
研究者番号: 80303642

### (3) 連携研究者

佐川宏恵 (Sagawa Hiroe)  
豊田刈谷総合病院眼科・医員