

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：27103

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22770245

研究課題名(和文)多原色光源を用いたmRGCの挙動特性

研究課題名(英文)Studies of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in humans by using the four-primary illumination system

研究代表者

福田 裕美 (FUKUDA, YUMI)

福岡女子大学・人間環境学部・助手

研究者番号：50551412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、非視覚系情報処理に大きな役割を担っているメラノプシン網膜神経節細胞(mRGC)の光反応は、桿体や錐体の干渉を受け、ヒトのmRGC独自の反応を把握することは難しかった。本研究では、mRGCを錐体や桿体から独立に刺激する多原色光源を用い、網膜電図にてmRGCの反応特性を把握した。

結果として、mRGCの反応ピーク潜時(約80 msec)は、過去に報告されている桿体や錐体のものと比較して長いことが示された。また、本研究で用いた実験光では、mRGC反応と光強度の間に量反応関係があり、反応は低周波刺激に対して大きく高周波刺激に対して小さいことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Although it is necessary to measure melanopsin-expressing retinal ganglion cell (mRGC) responses independent of the rods and cones, conventional approaches have not allowed us to stimulate only the mRGC in the human electroretinogram (ERG). Therefore, in this study, the four-primary illumination system has been used to modulate stimulus levels to the mRGC and cones independently, the rods having been saturated by a background stimulus.

The result showed that the implicit time of the mRGC response (~80 msec) was longer than accepted values for that of rod and cone responses (~60 msec for the rods and ~30 msec for the cones). In addition, it was found that the mRGC response increased linearly with changes in light-stimulus levels, and was higher to light stimuli at low frequencies (0.5 - 10 Hz) while the response at a high frequency (30 Hz) was essentially zero.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：人類学・応用人類学

キーワード：メラノプシン網膜神経節細胞 サークディアンリズム 網膜電図 多原色光源装置 瞳孔径

1. 研究開始当初の背景

従来、人間の光受容器は LMS の 3 つの錐体と桿体のみであると考えられてきたが、最近網膜上の新たな光受容体の存在が明らかになった (Lucas ら、2003)。この新しい光受容体がメラノプシンを含む網膜神経節細胞 (mRGC) であり、非視覚系情報処理への寄与が動物実験で報告されている (Hattar ら、2003)。光の非視覚系情報処理では、光刺激が網膜視床下部路を通じ、サーカディアンリズムへの反映やメラトニンなどの神経内分泌へ影響すると考えられている。人間においても、網膜上に存在する mRGC が非視覚系の光受容体として関与し、生体リズムの調節や瞳孔反応において重要な役割を担っていると考えられている。

しかしながら、mRGC はそれ自体が光反応性を持つと同時に、桿体や錐体の光反応を視神経へ伝達する役割も担っているため、過去の研究において mRGC 独自の光反応特性を把握することは困難であった。先行研究で用いられてきた光刺激は、mRGC を興奮させると同時に他の受光器も興奮させているため、その分光感度を直接的に示した報告はない。間接的には、短波長光のメラトニンへの影響をもとに 450-500 nm 付近に感度ピークをもつ受光特性の報告がある (Brainard ら、2001)。mRGC の光反応特性を把握することは、人間の光情報伝達に関する基礎的な知見につながるとともに、網膜に入力される輝度や色などの画像信号 (視覚情報) の変化を最小限にし、生体リズムを調整する照明デザインの提案につながるものと期待される。

2. 研究の目的

本研究は、光刺激に対する生体反応への、メラノプシンを含む神経節細胞 (mRGC) の寄与を明らかにすることを目的としている。これまで他の研究者が行ってきたように単に光刺激の色や強度を変化させて生体への影響を計測するのではなく mRGC 刺激量のみ変化させる光刺激を提示し、直接的にその対光特性を把握する。

3. 研究の方法

Receptor-silent substitution technique を応用した鹿児島大学辻村准教授が開発した多原色光源刺激装置を用いて、mRGC を桿体や錐体から独立に刺激する。LMS の 3 種類の錐体および mRGC に対する刺激量は、4 種類の LED によって構成されるテスト刺激の分光分布と、各光受容器の分光感度分布によって計算されている。mRGC の対光反応は、コンタクト型電極を角膜に付着させることにより網膜電図として直接的に計測する。

(1) 光刺激の大きさおよび周波数変調に対する mRGC の反応特性の把握

多原色光源刺激装置を用いて、錐体および桿体に対する刺激が一定で、mRGC の刺激量を

変化させる光刺激を設定し、周波数および刺激量の影響を把握した。

mRGC の反応を測定するにあたり、ERG 電極を左眼に装着した被験者に、積分球から拡散板に投射された光刺激を注視するよう指示した。積分球は 4 種類の LED (Opto Supply Limited, Hong Kong) で構成され、それぞれのピーク波長は 633、593、508、468 nm、半値幅は 13-32 nm であった。ERG 電極から得られる視細胞の活動は、データ入力システムによって 5 kHz でサンプリングされた。被験者から光刺激が投射される拡散板までの距離は 300 mm であり、光刺激 (100 mm) までの視野角は 18.9° であった。ERG 電極から得られる mRGC の反応は、データ入力システムによって 5 kHz でサンプリングされた。

テスト刺激は、基準光 (B) が mRGC に対して高刺激 (H)、低刺激 (L) へ変動する正弦波とした。テスト刺激 (3 sec) については、H、L が B に対して 5 Hz で 10、20、30、40、50% の刺激増減をもつコントラスト変化、コントラスト 50% で 0.5、1、2、5、8、12、30 Hz の周波数変化を設定した。テスト刺激は 3 sec 与えられ、基準光 (B) による 2 sec のインターバルで 30 回繰り返した。

被験者は色覚正常者の男女 10 名 (男性 5 名、女性 5 名、平均 ± SD : 24.3 ± 3.4 歳) であった。実験は 9:00 ~ 16:00 の時間帯で行われた。ERG の測定には角膜にコンタクト型電極を付着させる必要があるため、電極装着および実験安全上の指導を行う視能訓練士に実験協力を依頼した。視能訓練士が被験者の左眼に散瞳剤を点眼し、30 分後に瞳孔が完全に開いていることを確認した後に、被験者は人工気候室に入室した。被験者が ERG 電極を装着し、光刺激の前に設置された顎台に頭部を固定して基準光 (B) で 5 分間順応した後、光刺激が提示された。被験者には、3 sec のテスト刺激の間できる限り瞬きを避けるよう指示した。桿体感度はテスト刺激前の 5 分間の順応により飽和状態に達するように光源刺激を設定した。

mRGC の ERG に現れる反応の大きさと光刺激に対する反応の位相はフーリエ変換 (FFT) を用いて計算した。位相のずれを示す角度 (-180 ~ 180°) は、テスト刺激に対する反応の潜時を検討するために、潜時 (msec) に変換した。mRGC の反応の大きさと潜時は SPSS (Ver. 19.0) によって統計解析され、 $p < 0.05$ を統計的に有意と判断した。

(2) mRGC と錐体の対光挙動特性の比較

mRGC と従来から知られている光受容体である錐体との挙動特性の違いについて確認した。

(1) で用いた光源と同様のものを用いたが、被験者から拡散板までの距離は 200 mm であり、円形光刺激 (100 mm) までの視野角は 28.1° とした。

テスト刺激は、mRGC と錐体それぞれに対し

て刺激量が増える2条件を設定した。mRGCの反応を把握する際は、mRGCへの刺激量のみを基準光に対して高刺激へ50%増加させた。これに対して、錐体に関しては錐体への刺激量のみを基準光から高刺激へ30%増加させた。基準光の輝度は534 cd/m²であり、各LMS錐体に対する刺激量は443(L)、91(M)、30(S)cd/m²、mRGCに対する刺激量は116 cd/m²であった。

被験者は、ERGが適切に計測された色覚正常者5名(男性3名、女性2名、平均±SD:23.0±1.7歳)である。視能訓練士が被験者の左眼に散瞳剤を点眼し、30分後に瞳孔が完全に開いていることを確認した後に、被験者は人工気候室に入室した。被験者がERG電極を装着し、光刺激の前に設置された顎台に頭部を固定して基準光で5分間順応した後、光刺激が提示された。被験者は4secのERG計測の間、できる限り瞬きを避けるよう指示された。

統計処理の前に、5kHzでサンプリングされたデータを100項移動平均によってノイズ除去した。ERGにおけるテスト刺激開始前20msecの電位を平均してベースラインとし、ベースラインからの最大変動をピーク値とした。時間変動を解析する際は、刺激開始後0~1000msecの区間において50msec毎に平均値を求め、ベースラインからの変動を反復測定による一元配置分散分析によって分析した。

(3)mRGC刺激の周波数変調が瞳孔径に及ぼす影響

(1)の結果から、mRGCに対する光刺激に周波数変調を与えると、高周波刺激に対してmRGCの反応が小さくなることが明らかとなった。このことは、光刺激による生体リズムへの影響が光刺激の周波数変調によって変化する可能性を示している。そこで、mRGCが高い感度をもつ青色光の周波数変調がmRGCに与える影響について、瞳孔反応を指標に検討した。

Electric Stimulator(日本光電工業株式会社製)を用いて光刺激の周波数変調を調整した。テスト刺激は、周波数変調なし(連続光)1、5、10、20、50、100、500、1,000、5,000、10,000Hzの11種類の周波数変調を設定した。被験者から青色LED光源刺激(40cm×40cmのディスプレイ使用)までの距離は、連続光刺激の際は500mmであり、周波数変調刺激の際は250mmとした。電子瞳孔計(View Shot FP-10000、株式会社ティエムアイ製)を瞳孔径の測定に用いた。

青色LED光の強度は光刺激積分量を等しくするため、連続光刺激で4.4 μW/cm²、周波数変調刺激で8.8 μW/cm²とし、その分光分布は465nmをピーク波長とし、半値幅26nmであった。

被験者は、視覚色覚正常者11名(すべて女性、平均±SD:21.9±1.7歳)である。実験は10:00~16:00の時間帯で行われた。

眼帯で右目への光の照射を完全に塞いだ後、被験者は測定室で5分間の暗順応(約0 lx)を行った。暗順応後、被験者は光刺激の前に設置された顎台に頭部を固定し、各光刺激に7分間曝露された。光刺激提示後3分と6分に瞳孔径(左目・横幅)を各10秒間測定した。

4. 研究成果

(1)mRGCの波長特性の把握

刺激量が増えるにしたがってmRGC反応は線形に増加し、mRGC反応とコントラスト間には有意な相関があった(スピアマンの順位相関、 $r_s = 0.66$ 、 $p < 0.01$)。この結果は、刺激量とmRGC反応の間に量-反応関係が存在することを示している。各刺激に対する反応潜時は有意な差がなく(一元配置分散分析)、このことはテスト刺激に対して一定の潜時で現れる反応、つまりmRGCの反応を計測できたことを示している。周波数変調をもつ光刺激に対して、mRGC反応は30Hzで最少となり、2Hz以下で大きなバラツキを示した。反応の大きさは周波数によって有意に変動した(一元配置分散分析、 $p < 0.01$)。mRGC反応と周波数間には有意な相関はなかった。これらの結果は、mRGCの反応と光の周波数変化との関係は直線的ではないということを示している。各周波数に対する反応潜時は有意な差がなかった(クラスカル・ウォリス検定)が、0.5~2Hzの分散は5~30Hzの分散と比較して有意に大きくなった(ブラウン・フォーサイス検定、 $p < 0.01$)。この一要因として、mRGCに関わる神経回路のフィードバック作用の影響が考えられる。

結論として、今回用いた刺激範囲内では、光の刺激量変化とmRGC反応との間に量-反応関係があることが示された。また、高周波数域(30Hz以上)でmRGCの反応は抑制される傾向にあり、生体リズムへの影響が小さいことが示唆された。

(2)mRGCと錐体の対光挙動特性の比較

mRGCと錐体それぞれを刺激した場合、それぞれのERG波形は異なることが分かった。mRGCを刺激した際はテスト刺激開始後約80msecと280msecに陽性波(ピーク)が現れたが、錐体刺激の際には現れなかった。また、mRGC刺激の際は時間経過によって反応が有意に変動した(一元配置分散分析、 $p < 0.01$)。この結果は、mRGC刺激時と錐体刺激時においてERGに現れる反応が異なっているということ、つまり多原色光源によって異なる視細胞を刺激しているということを示している。mRGC刺激時の2つの陽性波は、既存のERG研究の中では刺激のon応答を示す脱分極由来のb波、off応答のd波と考えられるかもしれないが、ERGの発生機序については今後の十分な検討が必要である。

(3)mRGC 刺激の周波数変調が瞳孔径に及ぼす影響

mRGC 刺激に周波数変調を加えたところ、低周波 (1 Hz) 刺激で瞳孔収縮は最大になり、高周波刺激になるほど (100 Hz まで) 瞳孔収縮は小さくなる傾向が見られた。この結果は、(1)の結果 (低周波の光刺激に対して反応は大きく、高周波の光刺激に対して反応が小さくなる) を支持するものであった。

本研究の結果は解釈に検討の余地を残す部分もあるが、mRGC の非視覚的效果に関する基礎的な知見を得ることができた。この知見は、例えば明るさや演色性を損なわず、生体リズムを乱さない夜間照明のように、今後の人工照明計画への応用が可能である。また、多原色光源装置と ERG の利用が mRGC の光挙動特性の把握に有効であり、mRGC 研究に新たなアプローチを提供し得るということも示すことができたと考えている。

網膜では錐体や桿体、神経節細胞、さらにその間には水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞などが層状に存在しており、視覚の情報伝達は複雑である。また、このことは mRGC の光応答性も単純ではないことを示している。mRGC と錐体および桿体との関係性については、動物実験からの報告がいくつかあるが、動物実験での追実験はもとより、人間における網膜の信号伝達カスケードの解明が必要である。さらに、mRGC 活動の日内変動・個人差についての検討、視覚系・非視覚系機能への反映、他の光受容器との役割の差異などは、人間の生体リズムの調節や快適な光環境を考える上で、今後明らかにされるべき重要なテーマである。

本研究成果は、錐体や桿体から独立した mRGC の光反応を人間の生体で把握した最初のものであり、mRGC の挙動特性の把握および生体リズムに関わる研究分野に大きく貢献するものと思われる。多原色光源刺激装置を用いることで、錐体や桿体への影響を最小にし、メラノプシンを含む神経節細胞を特異的に刺激することが可能である。このことは、網膜に入力される輝度や色などの画像信号 (視覚情報) の変化を最小限にし、生体リズムを調整することが可能となることを示唆している。したがって、運転時や作業時における照明によって覚醒度や生体リズムを調整することや、多くの人が抱えている睡眠障害の改善が可能となるかもしれない。また、海外旅行による時差も飛行機内の照明によって調整できる可能性も示唆され、その潜在的な応用範囲は多岐にわたると考えられる。

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4件)

Y. Fukuda, S. Higuchi, A. Yasukouchi,

T. Morita: Distinct responses of cones and melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the human electroretinogram. *J Physiol Anthropol.* 31: 20, 2012, 査読有
DOI: 10.1186/1880-6805-31-20.

J. Waterhouse, Y. Fukuda, T. Morita, Daily rhythms of the sleep-wake cycle, *J. Physiol Anthropol.* 31: 5, 2012, 査読有

DOI: 10.1186/1880-6805-31-5. Review. 福田裕美, メラノプシン網膜神経節細胞に関する研究, *日本生理人類学会誌* 16: 31-37, 2011, 査読有
<http://ci.nii.ac.jp/naid/110008608247>

Y. Fukuda, S. Tsujimura, S. Higuchi, A. Yasukouchi, T. Morita, The ERG responses to light stimuli of melanopsin-expressing retinal ganglion cells that are independent of rods and cones. *Neurosci. Lett.* 479: 282-286, 2010, 査読有

DOI: 10.1016/j.neulet.2010.05.080

[学会発表](計9件)

Y. Fukuda, S. Tsujimura, S. Higuchi, A. Yasukouchi, T. Morita, Diurnal variation in responses of melanopsin-expressing retinal ganglion cells to light in the human retina, *Worldsleee2011*, 19-20 October 2011, Kyoto

福田裕美, 辻村誠一, 樋口重和, 安河内朗, 森田健, メラノプシン網膜神経節細胞と錐体の網膜電図における光応答性の違い, 平成 23 年度日本生理人類学会照明研究部会, 2011 年 8 月 5 日, 神奈川

Y. Fukuda, S. Tsujimura, S. Higuchi, A. Yasukouchi, T. Morita, Electroretinogram responses of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the human retina, XII Congress of the European Biological Rhythms Society, 23 August 2011, Oxford

Y. Fukuda, S. Tsujimura, S. Higuchi, A. Yasukouchi, T. Morita, Circadian rhythm of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the human retina, The 23rd Annual Meeting of the Society for Light Treatment and Biological Rhythms, 11 July 2011, Montréal

福田裕美, 辻村誠一, 樋口重和, 安河内朗, 森田健, メラノプシン網膜神経節細胞と錐体の網膜電図における光応答性の違い, 第 64 回日本生理人類学会, 2011 年 6 月 12 日, 福岡

福田裕美, 辻村誠一, 樋口重和, 安河内

朗, 森田健, 多原色光源装置を用いたメラノプシンを含む網膜神経節細胞の挙動把握, 第 17 回日本時間生物学会, 2010 年 11 月 21 日, 東京

Y. Fukuda, S. Tsujimura, S. Higuchi, A. Yasukouchi and T. Morita, The Independent Responses of Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion Cells with the Receptor-Silent Substitution Technique, 2010 Joint Meeting of Research Group of Environmental Physiology in Kyoto University and Lighting Research Group in JSPA, 28 September 2010, Kyoto

Y. Fukuda, S. Tsujimura, S. Higuchi, A. Yasukouchi and T. Morita, The Response of Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion Cells to Light Stimuli with Frequency Changes, The 10th International Congress of Physiological Anthropology, 11 September 2010, Fremantle

Y. Fukuda, S. Tsujimura, S. Higuchi, A. Yasukouchi and T. Morita, The ERG Responses to Light Stimulus Levels of Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion Cells with the Receptor-Silent Substitution Technique, The 22nd Annual Meeting of the Society for Light Treatment and Biological Rhythms, 1 July 2010, Vienna

〔図書〕(計 1 件)

福田裕美 他, 丸善出版, 人間科学の百科事典, 2014 (刊行予定)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fwu.ac.jp/teachersdatabase/1ist/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 裕美 (FUKUDA Yumi)

福岡女子大学・国際文理学部・助教

研究者番号: 5 0 5 5 1 4 1 2

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: