

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791871

研究課題名(和文)対光反応を応用した他覚的眼科検査法の開発

研究課題名(英文)Development of an objective ophthalmic screening test by using the pupil light response

研究代表者

浅川 賢 (ASAKAWA, KEN)

北里大学・医療衛生学部・助教

研究者番号：60582749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円、(間接経費) 450,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、メラノプシン含有網膜神経節細胞由来の対光反応を応用した他覚的検査法の確立を目的とした。特定波長光を約95%遮断させるフィルターと、光刺激の色や強さ、計測時間に変更可能な瞳孔計を試作し、健常者に対して細胞活性の最適条件を検討した。470 nmの波長光を10秒刺激すると、視細胞由来とは異なる持続的縮瞳が明らかで、視細胞を薬理的に障害させた動物モデルや、その影響を間接的に除外するフィルター装用でも、ほぼ同様の所見であった。特に家兔の縮瞳率は、網膜電図の波形振幅や網膜の組織所見と一致していた。色特性による対光反応評価は、視細胞や網膜神経節細胞障害の鑑別法として応用できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aims of this research were both to evaluate the pupil light response mediated by the melanopsin-containing retinal ganglion cells and to examine the utility of the response as a new objective screening tool. We created specific wavelength blocking filters (95% block), also developed an innovative pupillography. We then evaluated the optimal conditions during the response activation of the melanopsin. Results showed markedly sustained pupil constriction in response to the 470 nm light for 10 seconds. The similar findings were also obtained both in an animal model with pharmacological damage of the cones and rods, and when using selective wavelength blocking filters. Of note, the pupil constriction was compatible with both the amplitudes of the electroretinography and the morphologic findings of the rabbit retina. The research suggests that the evaluation of the pupil response to colored-light stimulus can be used to diagnose diseases associated with the outer or inner retina.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：瞳孔 対光反応 他覚的眼科検査法 視細胞 網膜神経節細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒトにおける網膜光受容器は、L, M, S 錐体と杆体の視細胞のみと考えられてきた。しかし、2000 年になって、内因性視物質である“メラノプシン”を含む新しい光受容器が、網膜神経節細胞において発見された。メラノプシン含有網膜神経節細胞からの神経投射は、概日リズムの中枢である視交叉上核を経て、最終的に松果体に至ることでメラトニンを調整し、一部は視蓋前域から Edinger-Westphal 核を経て、対光反応に関与している。このメラノプシン含有網膜神経節細胞の特徴は、青色光に特に感受性が高く、光刺激に対して緩やかな脱分極性で光刺激消失後も反応が持続することが、げっ歯類にて明らかとなっている。これらの事実は、視細胞障害である加齢黄斑変性や網膜色素変性にて失明に至った症例でも「朝起きて、夜眠たくなる」というように概日リズムが維持されることや、時に光刺激に対して瞳孔が縮小、すなわち対光反応が残存することから、視細胞以外の光受容器の存在は、以前より指摘されていたが、メラノプシン含有網膜神経節細胞の発見によって、これまでの概念や定説が大きく変遷している。

しかし、ヒトでの青色光刺激は、S 錐体あるいは暗順応下の杆体由来の対光反応との区別が困難であること、また、各研究者が独自の試作機を用いて種々の検討を試みているが、測定条件が明確ではなく、方法論も曖昧であるなど、文献上の詳細は不明である。

これらの背景を踏まえ、これまでの視細胞由来とは異なる色刺激光による対光反応を評価することで、視細胞（錐体）障害の加齢黄斑変性と網膜神経節細胞障害を生じる緑内障との鑑別や早期検出に繋がる可能性がある。加齢黄斑変性は欧米、緑内障は本邦における失明原因 1 位の眼疾患であり、対光反応という眼科検査において最も侵襲性のない方法にて両疾患が鑑別できれば、不要な眼科検査の施行による患者負担の軽減のみならず、失明予防のための早期発見に繋がる事が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトにおけるメラノプシン含有網膜神経節細胞の特性を明らかにし、それに由来する対光反応の最適な測定条件や評価方法を確立するとともに、その特性を応用した他覚的眼科検査法の臨床応用を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験機器の作製

本研究に先立ち、光刺激の色や強さ、計測時間などが任意に変更可能な対光反応の計測機器、赤外線瞳孔計を浜松ホトニクスと共同で試作した(図 1)。本機器では光刺激の色は 440, 470, 500, 660 nm の 4 種の波長光

を呈示することが可能で、光強度(輝度)も 10, 50, 100, 250, 300 cd/m² の 5 段階、刺激時間は 1~60 秒まで 1 秒ごとに変更することができる(図 2)。続いて、特定の波長光を遮断させるフィルターを東海光学と共同で作製した(図 3)。このフィルターは、視感透過率を一定にした上で、440, 470, 500 nm の波長を約 95%遮光し、帯域の範囲も±5 nm 以内と高性能の遮光性を有する(図 4)。

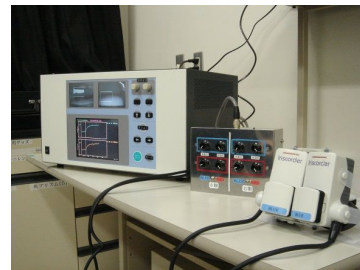


図 1 赤外線瞳孔計(浜松ホトニクス)の外観

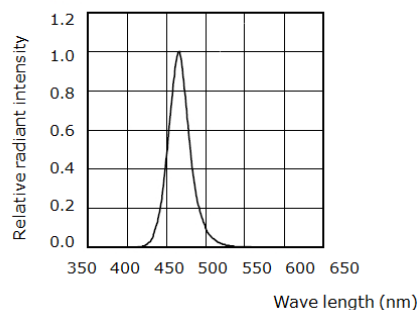


図 2 青波長光(470 nm)の光源特性



図 3 遮光フィルター(東海光学)の外観

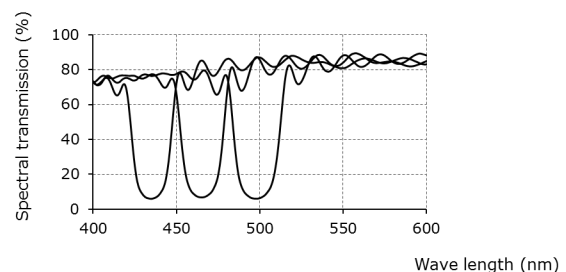


図 4 遮光フィルターの分光透過率

(2) 健常若年者に対する検討

対象は、21歳から32歳までの基準を満たした延べ30名の健常者とした。結果の信頼性を高めるため、徹夜の状態や過度な嗜好品（カフェインなど）の摂取は控えさせた。募集にあたっては研究の主旨に関して十分な説明を行い、承諾を得た場合に限り実験を行った。倫理的配慮として、測定場所は個室とし、本人以外は入室不可とした。得られた実測値は各個人の測定終了ごとに名前を匿名化、パソコン内およびCD-Rにて保存し、鍵の付いている机で厳重に保管した。

対光反応計測は、縮瞳率（光刺激前初期径-刺激中最小径/光刺激前初期径×100）を主に評価するが、痛みや苦痛を最も与えない自律神経検査の1つであることから安全性には問題ないと思われる。しかし、光刺激に伴う羞明感や一時的な眼の乾燥感から痛みの症状が起こることも考えられるが、実験中に痛みの症状が生じた被検者はいなかった。

瞳孔の日内変動を考慮して午前10時から午後14時の間に以下の測定を行った。まず、メラノプシン活性の最適波長の検討では、延べ15名を対象に15分の暗順応後、1秒と10秒とで、660 nmの赤色光による対光反応を測定し、再暗順応後に440, 470, 500 nmの青色光にて測定した。また、光強度（輝度）を10, 100, 250 cd/m²と段階的に変更させ、上記と同様に測定し、最適輝度を検討した。さらに、15名に対してS錐体やメラノプシン含有網膜神経節細胞、杆体の影響を間接的に除外可能とされる440, 470, 500 nmの波長を、それぞれ遮断させたフィルターの装用前後にて、定常状態での瞳孔径の振幅変化（最大径と最小径との差；瞳孔動揺）を20秒記録した。本検討は、北里大学医療衛生学部研究倫理審査委員会の承認を得た。

(3) 有色家兎に対する検討

本検討は、赤色・青色光刺激による家兎対光反射とメラノプシンの関与（研究代表者：石川均，研究課題番号：23592586）と同様の方法にて行った。

生後7週齢以降のDutch種、雄性の有色家兎3羽を使用した。ARVO Statementに準じ、ドミトール混合麻酔薬による麻酔下で、動物の苦痛が最小限となるように常に倫理的問題に配慮し、細心の注意を払いつつ実験を行った。

環境条件を統一させるため、毎週水曜日の午前10時から12時の間に測定を行った。60分間の暗順応後、試作の赤外線瞳孔計を用い250 cd/m²の輝度下にて660 nmと470 nmによる各60秒刺激の瞳孔反応を測定した。また、網膜電図はLE-3000（トーマー）を用い、白色LED、発光強度200 cd·s/m²のコンタクト電極による全視野刺激にて、同時刻に記録を行った。その後、網膜内のニューロンやシナプスをブロックさせる薬物であるL-2-amino-4-phosphono butyrate（以下、

L-AP4）を硝子体内に注入し、特定の神経伝達を阻害させ、対光反応と網膜電図を同様の手順で記録した。さらに、組織学的に網膜光受容器を評価するため、ホルマリン固定し、型のごとく包埋、ミクロトームを用いて厚さ4 μmの連続切片を作成、HE染色後に光学顕微鏡にて観察を行い、電子顕微鏡は組織をトリミング、超薄切し、クエン酸鉛二重染色にて観察を行った。本検討は、北里大学医学部動物実験委員会の承認を得た。

4. 研究成果

(1) 健常若年者に対する検討

メラノプシン含有網膜神経節細胞の特徴として、青色光に選択応答するが、げっ歯類に対する検討でも、光刺激時間が研究者によって異なり、実際にどれくらいの時間が最適かは不明であった。そこで、視細胞由来の対光反応評価で採用されている1秒と羞明や涙液動態などの影響を考慮した10秒とで、対光反応を測定すると、10秒光刺激が有意に縮瞳する結果となった（図5）。

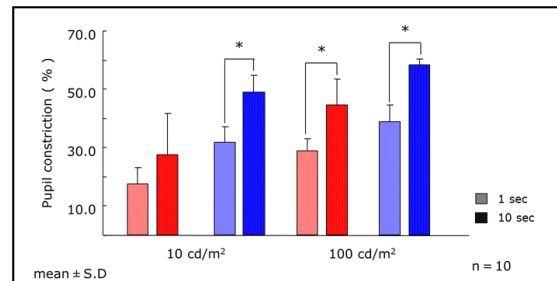


図5 1秒と10秒刺激による縮瞳率（10, 100 cd/m²の660 nm・470 nmのみ呈示）

赤（660 nm）・青（470 nm）色光ともに10秒刺激にて縮瞳率が大きい。特に100 cd/m²にて有意差を認めている。

* P < 0.05: Wilcoxon signed-rank test

この結果を踏まえ10秒刺激にて10, 100, 250 cd/m²と段階的に輝度を変更させ、同様に検討すると、10 cd/m²で赤と青刺激による縮瞳率に著明な差が見られ（図6）、100 cd/m²では青刺激中の縮瞳持続が顕著であった。

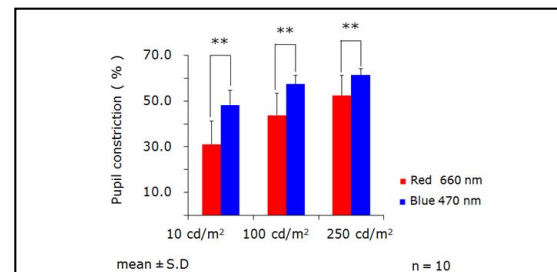


図6 10, 100, 250 cd/m²による縮瞳率

いずれの輝度も青（470 nm）色光にて顕著な縮瞳が見られているが、250 cd/m²では色による縮瞳率の差が小さい。

** P < 0.01: Wilcoxon signed-rank test

青刺激の 440, 470, 500 nm による比較では、縮瞳率には有意差が認められなかった (図 7) もの、縮瞳持続は 470 nm にて明らかであった (図 8)。一方、470 nm の選択的遮光フィルター装着下では、定常状態の瞳孔動揺 (揺らぎ) が多くなる結果が得られた (追試験中のため図は示さず)。

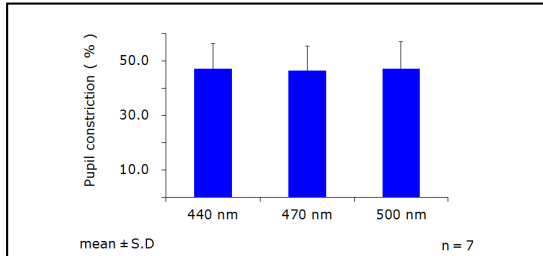


図 7 440, 470, 500 nm による縮瞳率
3 種の青色光ともに 50 %ほどの縮瞳率が得られ、有意差は認められない。

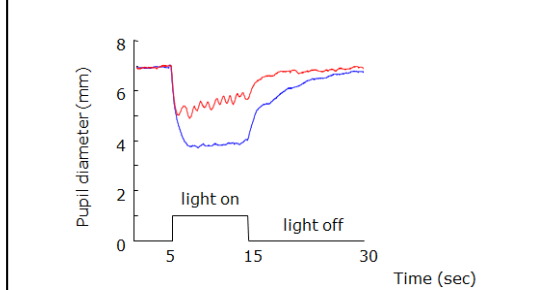


図 8 健常若年者における色刺激光による対光反応の代表波形 (21 歳, 女性)
100 cd/m² の赤 (660 nm)・青 (470 nm) 色刺激にて 10 秒間の対光反応を測定している。青色光による顕著かつ持続的な瞳孔径の縮小, 赤色光では瞳孔動揺が著明に見られている。

本実験では 470 nm の青刺激による対光反応が、メラノプシン含有網膜神経節細胞の電気生理学記録の所見と一致していた。すなわちメラノプシン含有網膜神経節細胞は、光刺激に対して持続的な脱分極性に反応することから、一過性の過分極性に反応する視細胞とは根本的に異なる光電位変換のメカニズムを有していると考えられる。既報によれば、青刺激では顕著に活動電位のスパイクを生じ、光刺激後もゆっくりと消失する持続的反応を持つものの、赤刺激では光刺激中にもかかわらず、その反応が瞬時に減衰して消失 (順応) すること、また、錐体や杆体よりも感度が低く、高輝度の光刺激に対して優先的に反応するとされている。

本結果と併せて考えると、光刺激直後の一過性瞳孔変化は視細胞由来で、光刺激中は視細胞、網膜神経節細胞両者由来、光刺激消失後は網膜神経節細胞由来の対光反応であるとみなすことができる。特に 470 nm の青刺激では顕著かつ持続的な縮瞳が見られ、

その選択的遮光フィルター装着下にて青色光刺激を与えると、縮瞳の持続相のみ不安定となるが、視細胞 (錐体) が関与する色覚には影響しないこと (論文発表), また、本検討にて瞳孔の揺らぎが多くなったことから、470 nm の青波長光がメラノプシン含有網膜神経節細胞を選択的に活性させる波長光として重要であることを示している。 (学会発表, ; 論文発表,)

(2) 有色家兎に対する検討

対光反応は、青色光では 7 週齢にて既に縮瞳が認められたが、赤色光は 12 週齢から出現した。L-AP4 作用前では、ヒトと同様に家兎でも青刺激による顕著かつ持続的な縮瞳が見られた。作用 1 週後に測定すると、赤色光に対する反応は完全に消失したが、青刺激時の縮瞳は減少するも認められた (図 9A)。網膜電図は、すべての波形 (a 波, b 波) の振幅が消失した (図 9B)。

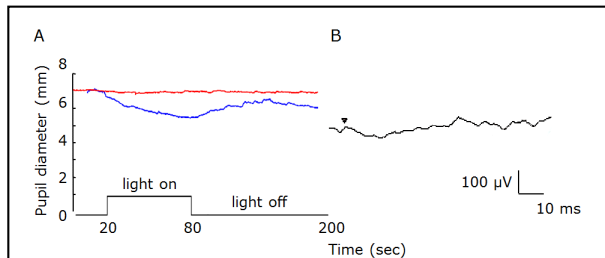


図 9 網膜外層障害モデル家兎における色刺激光による対光反応と網膜電図の代表波形

A 赤色光では瞳孔反応が消失するも、青色光にて縮瞳が残存している。
B 網膜電図は a 波 b 波ともに消失している。

電子顕微鏡による所見にて、網膜神経節細胞は存在するものの、内顆粒層が網膜色素上皮層に落込み、杆体・錐体層や外顆粒層などの細胞消失が認められた (図 10)。

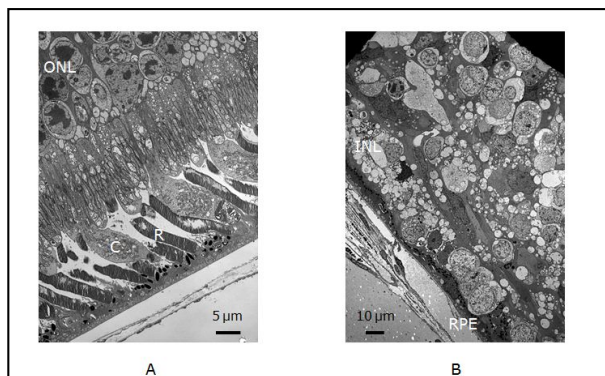


図 10 電子顕微鏡による家兎の網膜組織所見

A コントロールの有色家兎では、錐体と杆体とが規則的に認められる。
B 網膜外層障害モデル家兎にて、内顆粒層が網膜色素上皮層に落込み、視細胞層や外顆粒層などの細胞消失が認められる。
C = 錐体, R = 杆体, ONL = 外顆粒層, INL = 内顆粒層, RPE = 網膜色素上皮層

色の違いにより対光反応の出現時期が異なっていたことは、光受容器の発現と何らかの関連があると推察されるが、詳細は今後の検討課題である。(学会発表) また、青刺激時の対光反応が顕著であった結果は、メラノプシン含有網膜神経節細胞以外にS錐体や杆体の関与も否定できない。そこで、それらを薬理的に破碎して再検討すると、視細胞からの神経伝達が阻害され、網膜外層が完全に障害されたにもかかわらず、青刺激時のみに対光反応が認められた。この結果は、網膜外層である視細胞と網膜内層のメラノプシン含有網膜神経節細胞に由来する対光反応の特徴の違いを裏付けるものである。特に家兎ではあるが、対光反応(縮瞳率)の結果が、網膜電図の波形振幅のみならず、光学・電子顕微鏡による組織所見と一致していたことから、色の違いによる対光反応測定は、網膜光受容器の特性変化を非侵襲かつ簡便に評価可能であると考えられる。(学会発表, , , ; 論文発表, ,)

(3) まとめ

輝度 100cd/m² 以上の 470 nm 青波長光による 10 秒以上の刺激によって得られる持続的縮瞳は、メラノプシン含有網膜神経節細胞由来の対光反応である可能性が考えられた。

対光反応の評価は、波長光を変えることで視細胞あるいは網膜神経節細胞に障害を生じる眼疾患鑑別の他覚的眼科検査法として応用できることが示唆された。

(4) 今後の展望

本研究により得られた測定条件の下、加齢黄斑変性や緑内障症例に対して、色光刺激の違いによる対光反応を評価し、両疾患の鑑別のみならず、早期発見の可能性など、新たな眼科検査法としての臨床応用について検討していきたい。

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 13 件)

Narita Aya, Shirai Kentarou, Kubota Norika, Takayama Rumiko, Takahashi Yukitoshi, Onuki Takanori, Numakura Chikahiko, Kato Mitsuhiro, Hamada Yusuke, Sakai Norio, Ohno Atsuko, Asami Maya, Matsushita Shoko, Hayashi Anri, Kumada Tomohiro, Fujii Tatsuya, Horino Asako, Inoue Takeshi, Kuki Ichiro, Asakawa Ken, Ishikawa Hitoshi, Ohno Koyo, Nishimura Yoko, Tamasaki Akiko, Maegaki Yoshihiro, Ohno Kousaku: Abnormal pupillary light reflex with chromatic pupillometry in Gaucher disease. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 1(2): 135-140, 2014, 査読有

Asakawa Ken, Kato Sayaka, Shoji Nobuyuki, Morita Tetsuya, Shimizu Kimiya: Evaluation of optic nerve head using a newly developed stereo retinal imaging technique by glaucoma specialist and non-expert certified orthoptist. *Journal of Glaucoma* 22(9): 698-706, 2013, 査読有

石川均, 清水公也, 宇賀茂三, 吉富健志, 浅川賢, 真下紀美代, 後関利明, 池田哲也, 庄司信行, 市邊義章, 近藤峰生, 寺崎浩子, 奥英弘, 仲泊聡, Patil Popat N, 丸山茂善, 中山茂信: 神経眼科の進歩 - 瞳孔とメラノプシンによる光受容 -. *日本眼科学会雑誌* 117(3): 246-269, 2013, 査読有

石川均, 浅川賢: 対光反射の起源・経路と中枢-近年の対光反射の考え -. *神経内科* 78(2): 163-167, 2013, 査読無

加藤紗矢香, 浅川賢, 庄司信行, 森田哲也, 永野幸一, 山口純, 清水公也: 緑内障における立体眼底写真による視神経乳頭解析パラメータと Humphrey 視野計の視野指標との相関. *あたらしい眼科* 29(8): 1127-1130, 2012, 査読有

中山実, Nowak Wioletta, 石川均, 浅川賢, 市邊義章: 瞳孔対光応答の波形特徴による眼疾患の推定に関する検討. *信学技報* 111(482): 175-180, 2012, 査読有

浅川賢, 石川均, 宇賀茂三, 真下紀美代, 清水公也: 有色家兎の光受容器に対する機能的評価と組織学的観察. *日本眼科学会雑誌* 116(3): 348-349, 2012, 査読無

Ishikawa Hitoshi, Onodera Asami, Asakawa Ken, Nakadomari Satoshi, Shimizu Kimiya: Effects of selective-wavelength block filters on pupillary light reflex under red and blue light stimuli. *Japanese Journal of Ophthalmology* 56(2): 181-186, 2012, 査読有

[学会発表](計 18 件)

浅川賢, 石川均, 宇賀茂三, Palisoc Erwin, 真下紀美代, 清水公也, 近藤峰生, 寺崎浩子: 変異型ロドプシン遺伝子トランスジェニック家兎における網膜光受容器の機能的・組織学的評価. 第 51 回日本神経眼科学会, 2013, 秋田.

戸塚悟, 石川均, 後関利明, 浅川賢, 池田哲也, 斎藤彩, 清水公也: 正常者・不同視弱視患者における異なった条件下での光刺激による対光反射の検討. 第 51 回日本神経眼科学会, 2013, 秋田.

Asakawa Ken, Ishikawa Hitoshi, Palisoc Erwin, Mashimo Kimiyo, Uga Shigekazu, Shimizu Kimiya, Kondo Mineo, Terasaki Hiroko: Functional and histological characterization of retinal photoreceptor cells in transgenic rabbit with rhodopsin-induced P347L mutation. 7th Asia Neuro-Ophthalmology Society Meeting, 2013, Bali.

Palisoc Erwin, Ishikawa Hitoshi, Uga Shigekazu, Asakawa Ken, Mashimo Kimiyo, Shimizu Kimiya, Takano Masahiko, Shinkai Atsushi: The effect of zinc on ethambutol-induced toxic optic neuropathy-Functional and morphologic assessment in rabbit model-. 7th Asia Neuro-Ophthalmology Society Meeting, 2013, Bali .

浅川 賢: 瞳孔とメラノプシン . 第 49 回日本眼科学学会, 2013, 京都 .

成田綾, 白井謙太郎, 前垣義弘, 久保田智香, 高山留美子, 高橋幸利, 浅川 賢, 石川均, 鈴木義之, 大野耕策: 神経型 Gaucher 病における対光反射 . 第 11 回アジア先天代謝異常症シンポジウム, 2012, 岐阜 .

池田哲也, 石川均, 浅川 賢, 戸塚悟, 後関利明, 高野雅彦, 清水公也: 新生児と幼児における赤青光刺激による対光反射とサーカディアンリズム形成 . 第 50 回日本神経眼科学会, 2012, 京都 .

浅川 賢, 石川均, 田ヶ谷浩邦, 清水公也: 健常者における瞳孔動揺の日内変動と自然光との関連性 . 第 50 回日本神経眼科学会, 2012, 京都 .

浅川 賢: Nonmyd WX を用いた立体眼底画像による視神経乳頭解析の有用性 . 第 13 回眼科臨床機器研究会, 2012, 横浜 .

金澤正継, 浅川 賢, 魚里博: 薄暮視グレア下において遮光レンズがコントラスト感度へ与える影響 . 第 48 回日本眼科学学会, 2012, 東京 .

Asakawa Ken, Ishikawa Hitoshi, Kondo Mineo: Mechanism of photoreception in transgenic rabbit with rhodopsin P347L mutation . 19th International Neuro-Ophthalmology Society Meeting, 2012, Singapore .

藤原和子, 石川均, 神谷和孝, 浅川 賢, 清水公也: 後房型有水晶体眼内レンズ (ICL™) 挿入術前後の対光反射 . 第 116 回日本眼科学会総会, 2012, 東京 .

〔図書〕(計 1 件)

浅川 賢, 石川均: 瞳孔検査 . 眼科ケア 14 (10)(メディカ出版, 大阪): 29-34, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅川 賢 (ASAKAWA KEN)
北里大学・医療衛生学部・助教
研究者番号: 60582749

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

石川 均 (ISHIKAWA HITOSHI)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号: 80265701

宇賀 茂三 (UGA SHIGEKAZU)

北里大学・医学部・客員教授
研究者番号: 60037380