

平成 21 年 6 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592031  
 研究課題名(和文) サル高眼圧誘発視神経障害による視野及び視機能の変化  
 研究課題名(英文) Changes in visual fields and retinal function in high intraocular pressure model of monkeys.

## 研究代表者

原 英彰(HARA HIDEAKI)  
 岐阜薬科大学・薬学部・教授  
 研究者番号：20381717

## 研究成果の概要：

本研究の目的は、我々が既に確立したサル緑内障様モデルを用いて、高眼圧による視野の変化を経時的かつ部位的に検討することであった。すなわち、外側膝状体が眼圧上昇によってどのように影響を受けるかを機能的、形態学的、免疫組織化学的、分子生物学的に検討し、眼底の形態学的な変化、視野変化との関連性並びに時間的な関連性について検討した。

1. レーザー照射によって眼圧を上昇させることによって、どのように視野が障害されるかを検討した。さらにその際の網膜の眼底変化並びに外側膝状体の変化についても検討した。眼圧上昇とともに視野障害並びに網膜眼底及び外側膝状体の障害が認められた。このことから、本モデルは緑内障によって生じる視野障害のモデルとして有用であることが明らかになった。
2. 眼圧上昇後の外側膝状体における各種変化を形態学的、免疫組織化学的、分子生物学的に検討した。高眼圧サル眼の眼底写真において視神経乳頭障害はレーザー照射2週間後から観察され、時間依存的に障害の進行が認められた。また高眼圧サル眼の視神経において断面積及び視神経線維数の減少が認められ、その視神経投射領域において神経細胞体の収縮及び神経細胞数の減少が経時的に認められた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：眼科学

## 1. 研究開始当初の背景

緑内障は網膜神経節(Retinal Ganglion Cell: RGC)死と関連した典型的な視野欠損を含む進行性の疾患である。これらの変化には、これまで述べたように高眼圧や循環障害

及び過剰な興奮性アミノ酸など幾つかの要因があると考えられている。臨床においては、幾つかの緑内障の診断手法並びにその進行を評価する手法が存在し、また視野変化と視神経線維層厚測定、視神経乳頭(Optic Nerve

Head: ONH)断層撮影法などの他の代替指標に関して数多くの研究が報告されている。緑内障の病態生理の理解のためには、網膜や外側膝状体 (lateral geniculate nucleus: LGN), 視覚野を含めた視覚系の変化に関する知見は重要であるが、これらの変化や関連性をヒトで研究することは困難である。

緑内障で生じる視野とその根幹にある神経系の器質的变化との関連性を明らかにするために、神経変性の原因は異なるものの、結果として眼循環障害と同様に RGC 障害が誘発され、かつ最も一般的に汎用されているサル高眼圧モデルを用いて多くの研究が実施されている。しかしながら、同一個体のサルにおける視野と RGC, LGN の変化の関連性という重要な項目が評価されずに残されている。

グリア細胞線維性酸性蛋白質 (glial fibrillary acidic protein: GFAP) は CNS においてグリア細胞の 1 つであるアストロサイト (星状膠細胞) 中で発現する中間径フィラメント蛋白であり、GFAP の発現上昇はアルツハイマー病やクロイツフェルト・ヤコブ病などの CNS 障害の特徴とされている。網膜においても健常人のアストロサイト中に発現しており、それらの発現は幾つかの病態 (緑内障患者、サル高眼圧モデル、ラット高眼圧モデル、マウス高眼圧モデル、ラット興奮性アミノ酸障害モデル) においてアストロサイトやミュラー細胞で上昇している。しかしながら、網膜における GFAP 発現に関する研究は多いが、サル高眼圧モデルでの LGN における発現パターンに関する報告は未だ無い。

## 2. 研究の目的

本研究において、2 個体の高眼圧サルにおける視感度と RGC 数の関連性を明らかにする

とともに、緑内障性視野変化における GFAP の役割を分析するため、同一サル LGN における組織学的変化及び GFAP に対する免疫反応性の変化を検証した。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物及び飼育環境

2 頭の雄性カニクイザル (*Macaca fascicularis*, Monkey A, B; 5 歳齢; 体重 4.0 (A), 4.5 kg (B)) を被験体として用いた。各サルはマカク属サルの飼育室中に個別ケージにて飼育した。実験に用いる前に眼底写真、屈折力測定を実施し、眼球異常や高度屈折異常が無いことを確認した。各サルは毎回の実験日前には給水制限を施され、実験中の報酬として果実ジュースを与えられた。必要時には追加の水分や果物を実験終了後に与えた。食事 (サルの餌) は常時ケージ中で摂餌可能であった。

### (2) 実験的緑内障モデルの作製

眼圧上昇は、各サル右眼隅角部の線維柱帯にアルゴンブルー・グリーンレーザーを用いた光凝固焼灼を行うことにより誘発した。左眼は無処置対照眼とした。レーザー処置のため、ケタミン (8.75 mg/kg; ケタラール 50<sup>®</sup>, 三共株式会社, 東京) とキシラジン (0.5 mg/kg; セラクタール, バイエル薬品株式会社, 東京) の筋肉内投与によりサルの麻酔を行った。生理溶液 (スコピゾル<sup>®</sup>15; 千寿製薬株式会社, 大阪) を満たしたシングルミラーの Goldmann レンズ (隅角鏡) を処置眼に当てた後、標準的なスリットランプ顕微鏡 (BQ 900; Haag-Streit, Köniz, Switzerland) に接続したアルゴン光凝固装置 (Ultima 2000SE<sup>®</sup>; Coherent Inc., CA, USA) を用いて、アルゴンレーザーの焦点を線維柱帯の中間部位にあわせ、計 150 発のレーザー光を線維柱帯の 360° 周囲に当てた。最初の処置の 2

週間後に眼圧上昇を維持するため、レーザー処置を再度実施した。

#### 視野測定

実験中は薄暗い明るさに調節された防音実験室の中で、サルを頭部固定装置によって頭部を保定した状態でモンキーチェアに座らせた。22 インチのモノクロ CRT モニター (ME224f, 最大解像度: 1,600 × 1,200; 東京特殊電線株式会社, 東京) はサルの眼球から 30 cm に設置した。CRT モニターの輝度は定期的に比色輝度計 (BM-7; 株式会社トプコン, 東京) を用いて校正した。視覚刺激は、30 cm の視距離では 67° × 52° (幅 × 高さ) の範囲を占める CRT モニター上に呈示した。片眼の視野測定中は、対側眼を柔らかい眼帯で覆い、視覚を遮った。サルは、報酬であるジュースを得るためにレバーの押し離しによる視覚反応時間課題を行うように訓練された。各サルの視野を高眼圧誘発前から最初のレーザー照射 15 週間後まで 1 週間に 2 回測定した。

視野測定の前に各サルの視線を校正した。サル眼球位置測定のため、それぞれが CCD カメラ (XC-75; ソニー株式会社, 東京) 及び赤外線照射装置からなる 2 組のカメラセットを実験室内に設置した。瞳孔像はデジタル化されパーソナル・コンピュータに転送した。眼球像から輝度の違いによって瞳孔の輪郭を検出し、瞳孔にほぼ重なるような楕円の中心を計算した。毎日の実験開始時に、9 箇所の固視点を用いた視覚反応時間課題により、眼球位置測定システムのキャリブレーションを実施した。この 9 箇所のデータを用いて、眼球中心とその中心から各 9 箇所の位置へのベクトルを計算し、ビデオ像座標中でのサルの眼球位置を算出した。その後、ビデオ像座標中の最新の眼球位置を、CRT モニター座標の眼球位置に変換しモニタリングを行った。

眼球位置データは解像度 0.7°, サンプルング頻度 30 Hz で取得し、オフラインでの詳細解析用にデジタルテープに保存した。

視覚反応時間課題では、サルがレバーを押すことで試行が開始された。1 試行中を通じて、サルはレバーを押した状態を維持した。最初のレバー押しの後、一様の背景 (10 cd/m<sup>2</sup>) 上の眼球真正面に調整した位置に、固視点 (直径 0.2°, 35 cd/m<sup>2</sup>) を呈示した。サルが固視点から 2.0° もしくは 2.5° の視角範囲内 (固視窓) を 0.5~5.5 秒間固視できた場合に、54 箇所の周辺測定位置の中の 1 箇所にターゲット刺激を 1.0 秒間呈示した。固視期間は、サルがターゲット呈示を予測できないように、試行毎にランダムに変化させた。ターゲットサイズは、Goldmann III サイズ (4 mm<sup>2</sup>, ~0.43°) を採用した。テスト試行においては、HFA で採用されている中心 24-2 プログラムに従い 54 箇所の呈示可能位置の内の 1 箇所にターゲット刺激を呈示した。ターゲット刺激輝度は HFA と同様に、背景輝度に加算してデシベル (dB) スケールで表現した。しかしながら、CRT モニターの呈示限度のため、呈示輝度は 39 dB (0.40 cd/m<sup>2</sup>) から 10 dB (318 cd/m<sup>2</sup>) に限定された。サルがターゲット呈示後 1.0 秒以内にレバーから手を離れた場合に、サルがターゲットを認識したと捉え、少量のジュース (0.5 mL) を報酬として与えた。その後、1.0 秒の試行間インターバルが開始された。試行中に固視を外した場合 (即ち、レバーを離す前に)、もしくはターゲット刺激呈示前にレバーを離れた場合には、固視点は消失、その試行は報酬を与えられずに中断し、最高 5.0 秒までの懲罰期間 (如何なる応答も受け付けない期間) の後に、試行間インターバルを開始した。筆者は視野を描画するために上下法を採用した。上下法においては、ターゲット刺激の輝

度コントラスト閾値を継続的に測定することができた。本研究での各測定位置の閾値は、上下法を用い1日（左対照眼）もしくは2日（右緑内障眼）の間に行われた試行で呈示されたターゲット刺激の平均輝度として算出した。

### （3） 眼球パラメーター測定

ケタミン筋肉内投与（10 mg/kg）にて、毎週幾つかの眼科検査（眼圧測定，眼底写真撮影，屈折力測定，角膜混濁度測定）を実施した。

眼圧は 0.4 % oxibuprocaine hydrochloride（ベノキシール®；参天製薬株式会社，大阪）の局所麻酔下にて較正済みの applanation tonometer（Pneumatograph™，Alcon Inc.，TX，USA）を用いて測定した。眼底写真は眼底カメラ（Genesis；興和株式会社，愛知）を用いて撮影した。屈折力，及び角膜曲率半径はオートレフケラトメーター（ARK-700K；株式会社ニデック，愛知）を用いて測定し，その値は屈折力調整に必要なコンタクトレンズのパワーを決定するために用いた。

### （4） 灌流及び組織摘出

最終の視野測定（最初のレーザー照射 16 週間後）の後，サルは総頸動脈から室温下で 10 U/mL のヘパリンを含む 1 L の 0.9%生理食塩液で灌流し，その後 4%パラホルムアルデヒドを含む 0.01 M リン酸緩衝生理食塩液（PBS；pH 7.4）で灌流した。灌流は，ペントバルビタールナトリウムの静脈内投与による全身深麻酔下にて実施し，灌流終了後，眼球及び脳を摘出した。

### （5） 網膜組織学的解析

眼球の後眼部側を PBS（pH 7.4）で三回洗

浄し，脈絡膜と強膜とともに網膜中心部領域（中心窩を中心に約 10 mm 四方）を調整した。各調整済みサンプルはパラフィン包埋後，垂直方向に 100 µm 間隔で網膜切片を作製し（各 3 µm 切片），ヘマトキシリン・エオジンで染色した。既報[44]通り，対照眼又は緑内障眼から最大 16 箇所の視野測定位置に対応する網膜位置の組織サンプルを採取した。しかしながら，全位置のサンプル調製は技術的に困難であったため，2 頭のサルの 4 眼から合計 35 箇所のサンプルを解析した。網膜位置の決定のため，筆者は「視覚 5°」に対し「網膜 1 mm」の一定の変換値を採用した。

網膜障害は以下のように評価した。各評価位置の光顕写真を撮影し，単一の盲検下の観察者により写真内の 0.25 mm 幅の GCL 中の細胞数を計数した。評価位置毎に最大 5 サンプルのデータを平均化し，GCL 中の細胞数を評価に用いた。

### （6） LGN の組織学的解析

摘出した脳を数個の領域に分割し，4%パラホルムアルデヒドを含む PBS（pH 7.4）で最低 48 時間，4 °C で後固定した。各サンプルをパラフィン包埋し，300 µm 間隔で LGN を含む冠状断切片（各 5 µm 切片）を作製後，ニッスル染色を行った。

免疫組織化学染色のため，LGN を含む冠状断切片をスライドに載せ，0.01 M PBS で洗浄後，0.3%過酸化水素を含むメタノールで 30 分間室温にて処置した。その後，10%正常ヤギ血清（Vector）を含む 0.01 M PBS で 30 分間処置し，マウス抗 GFAP モノクローナル抗体（Ylem, Rome, Italy）で 1 日 4 °C にてインキュベートした。0.01 M PBS で洗浄後，ビオチン化抗マウス IgG でインキュベートし，30 分間室温にてアビジン - ビオチン - ペルオキシダーゼ複合体と反応させ，最後に DAB ペ

ルオキシダーゼ基質で発色させた。

ニッスル染色切片の定量のため、LGN の全 6 層の領域を測定した。大細胞層 (Magnocellular layer: M 層) と小細胞層 (Parvocellular layer: P 層) の細胞数は、40 倍の対物レンズの光学顕微鏡下にて  $250 \times 188 \times 5 \mu\text{m}$  (切片厚) の測定領域中に存在した明瞭な核を持つ全ての神経細胞を計数することで評価した。各層 3 領域から得た値から細胞数を算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験的緑内障モデルにおける眼圧及び視野変化

サルの眼圧は最初のレーザー光凝固処置 15 週間後でも、レーザー照射前の眼圧より高い状態を維持していた (図 1A, B)。各サルの眼圧は上昇していたが、その上昇程度は特にレーザー照射後の期間の後半において個体間で異なっていた。40 mmHg 以上の眼圧が維持されていた期間は、サル A, B で最初のレーザー処置から各々 1~11 週間後、3~15 週間後であり、最高眼圧は各々 60.3 mmHg, 58.7 mmHg であった。両サルにおいて、急激な眼圧上昇による一過性のわずかな角膜混濁が 2 回目のレーザー処置後に認められたが、視野測定中の固視及び個体の測定に対する動機付け指標が変化しなかったことから、この角膜混濁の視野への影響はごく僅かと考えられた。

各サルの平均閾値の変化を図 1C と D に示した。平均閾値は両サルにおいてレーザー処置後速やかに低下し、最初のレーザー処置の約 7~8 週間後にほぼ一定となった。各サルのレーザー照射前の期間の平均閾値と最終閾値との差は -8.99 dB (サル A), -9.63 dB (サル B) であった。対照的に対照眼での差は、サル A で 1.44 dB, サル B で 0.35 dB であった。

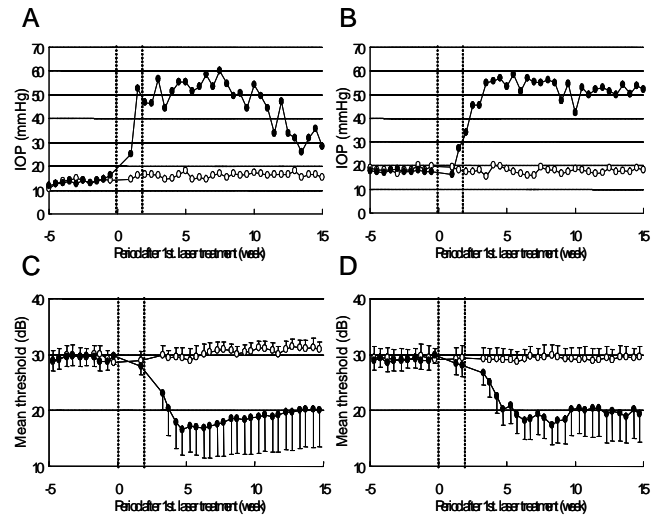


図 1 レーザー光凝固処置後のサルの眼圧及び視野平均閾値の変化

A: サル A の眼圧変化、B: サル B の眼圧変化、C: サル A の視野平均閾値の変化、D: サル B の視野平均閾値の変化。レーザー処置眼 (右眼: 黒塗り丸印), 対照眼 (左眼: 白抜き丸印)。眼圧は Mean, 視野平均閾値は Mean  $\pm$  SD。IOP: intraocular pressure (眼圧) グラフ中の縦点線はレーザー照射時期を示す。

サル A においては、鼻側視野の閾値は殆どの測定点でレーザー照射前の閾値に比べ 5 dB 以上低下していた (図 2A)。一方、耳側から中心にかけての視野のレーザー照射前の閾値に対する変化は 3 dB 未満であった。鼻側半視野 (最も周辺部の 2 点を除く 26 点), 耳側半視野 (盲点付近の 2 点を除く 24 点), 上側半視野 (盲点付近の 1 点を除く 26 点), 下側半視野 (盲点付近の 1 点を除く 26 点) それぞれの平均閾値は  $18.2 \pm 6.2$  dB,  $22.9 \pm 5.8$  dB,  $18.7 \pm 6.8$  dB,  $21.4 \pm 6.2$  dB であった。これらの平均閾値から、サル A においては鼻側半視野が最も低い感度であった。サル B においては、全ての測定点においてレーザー処置 15 週間後の閾値はレーザー照射前の閾値に比べ 5 dB 以上低下していた (図 2B)。その中で、中心と中心視野に近い数点でのみ比較的緩やかな欠損を示した。鼻側半視野, 耳側半視野, 上側半視野, 下側半視野それぞれの

平均閾値は  $19.6 \pm 4.7$  dB,  $19.8 \pm 4.8$  dB,  $17.2 \pm 5.2$  dB,  $21.5 \pm 3.7$  dB であり, サル B においては上側半視野が最も低い感度であった。なお, 最終視野測定時 (最初のレーザー処置の 15 週間後) には角膜混濁は認められなかった。

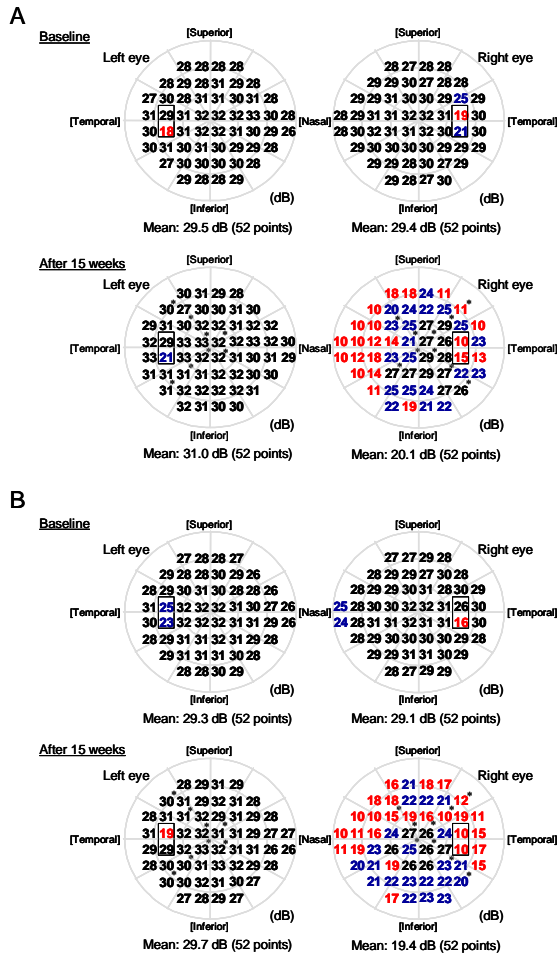


図2 レーザー光凝固処置前後のサルの視野変化

A: サル A の視野, B: サル B の視野.

10~19 dB を赤字, 20~25 dB を青字で表記. 各視野の下部に盲点付近の 2 点 (視野中の四角囲み) を除く 52 点の平均閾値を記載.

(2) 実験的緑内障における眼底及び ONH 組織切片の変化

図3の上2段の写真は各サルのレーザー処置前及び処置後の眼底写真である。両サルにおいて, 左眼対照眼の眼底は右眼へのレーザ

ー処置後も変化しなかったが, レーザー処置を行った右眼の変化は明瞭であった。両サルともに ONH の陥凹深度の増大 (陥凹拡大) が認められた。また, 両サルにおいて, 特に ONH の上側よりも下側の周縁領域 (ONH と網膜の間に存在する色度の異なる領域) の減少が認められた。視野では下側半視野よりも上側半視野でより感度低下が認められており (図2), この上側半視野に対応する箇所が ONH では下側領域になるため, ONH 下側での周縁領域の減少は妥当と考えられた。

各サルの最終視野測定後の ONH の組織学的変化を図3の最下段の写真に示した。各サルにおいて, 左眼対照眼に比べ, 右眼の視神経線維層の厚さに明らかな変化が観察された。

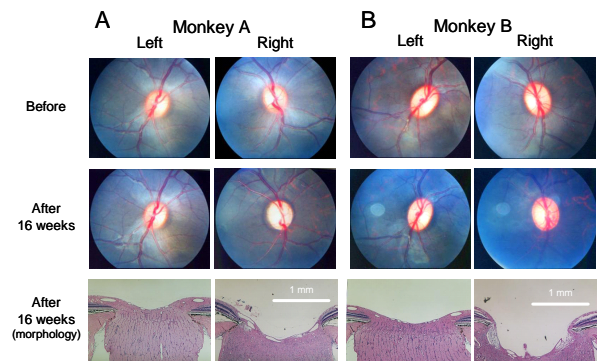


図3 サルの眼底写真及び ONH 切片

A: サル A, B: サル B. 上段及び中段: レーザー処置前及びレーザー処置 16 週間後の眼底写真. 下段: レーザー処置 16 週間後の ONH 切片像.

(3) LGN における組織学的変化並びに GFAP の発現変化

LGN における神経細胞はレーザー処置眼の同側 (右) と対側 (左) で異なる変化パターンを示した。同側 LGN では, 高眼圧眼の網膜からの入力 (M 層) と 3, 5 層 (P 層) に投射しており, これらの層では対側眼からの入力を受ける層に比べ明らかな神経細胞の消失が認められた (図4B)。対側 LGN では,



高眼圧眼の網膜からの入力は1層(M層)と4,6層(P層)に投射しており,予測通りこれらの層では神経の脱落が確認された(図4B)。全体的にみて,高眼圧眼からの投射を受ける両LGNの各3層で神経細胞数が減少した(図4A,表4)が,その減少割合はM層(約5~15%)よりもP層(約15~25%)で大きかった。

GFAPの発現は全てのLGN層を染色することで免疫組織化学的に確認された(図5A)。GFAP染色強度(茶色)は,対側無処置眼から投射を受ける層に比べ,高眼圧眼からの投射を受ける層(同側LGN:2,3,5層;対側LGN:1,4,6層)で増大していた(図5B)。

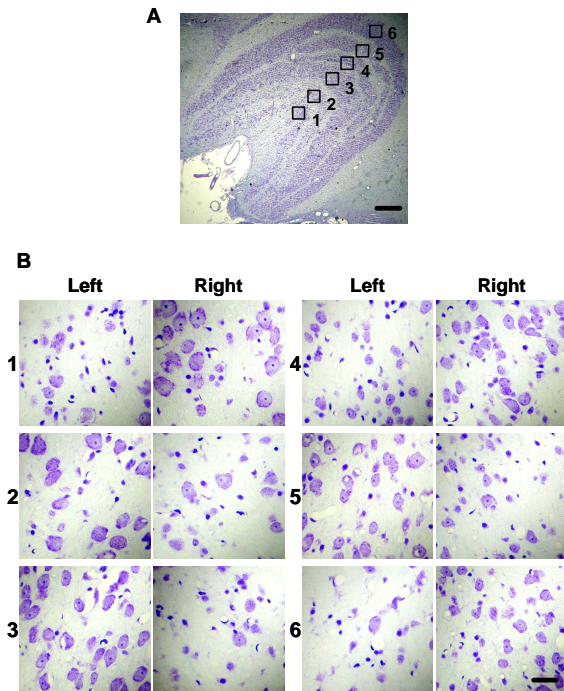


図4 LGNのニッスル染色像。

A: 左LGNの全体像、B: 左(レーザー処置眼の対側)LGN,及び右(レーザー処置眼と同側)LGN。スケールバー:100 $\mu$ m(A), 30 $\mu$ m(B)。

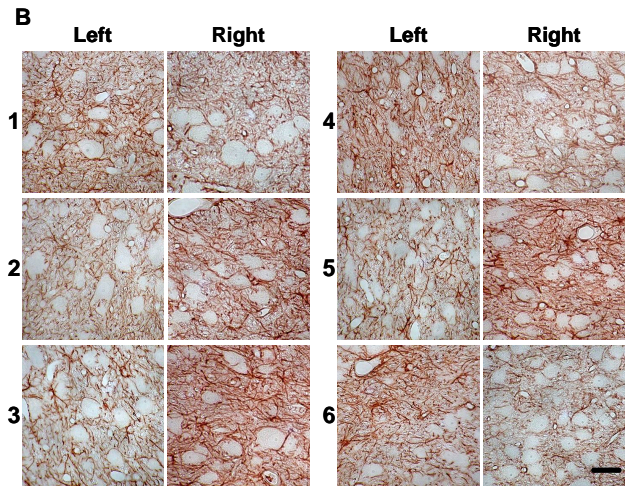
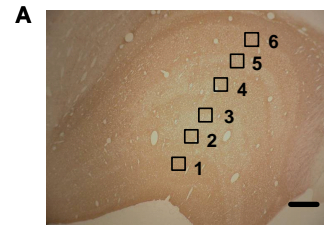


図5 LGNのGFAP免疫染色像。

A: 左LGNの全体像、B: 左(レーザー処置眼の対側)LGN,及び右(レーザー処置眼と同側)LGN。スケールバー:100 $\mu$ m(A), 30 $\mu$ m(B)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Ito Y., Shimazawa M., Chen Y. N., Tsuruma K., Yamashita T., Araie M. and Hara H. Morphological changes in the visual pathway induced by experimental glaucoma in Japanese monkeys. *Exp. Eye Res.*, in press.

Sasaoka M., Nakamura K., Shimazawa M., Ito Y., Araie M. and Hara H.

Changes in visual fields and lateral geniculate nucleus in monkey laser-induced high intraocular pressure model. *Exp. Eye Res.*, 86, 770-782, 2008.

[学会発表](計1件)

伊藤保志、嶋澤雅光、陳逸寧、山嶋哲盛、新家真、原英彰 網膜障害誘発外側膝状体(LGN)の形態的・経時的变化、第12回視覚科学フォーラム(豊中、2008、8、28-29)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

原英彰(HARA HIDEAKI)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20381717

(2)研究分担者

嶋澤 雅光 (SHIMAZAWA MASAMITSU)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80381721

(3)連携研究者

新家 眞 (ARAIE MAKOTO)

東京大学・医学部附属病院眼科・教授

研究者番号：00092122

渡辺 恭良 (WATANABE YASUYOSHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・システム

神経科学・教授

研究者番号：40144399

笹岡 正顕 (SASAKA MASAOKI)

参天製薬・研究開発センター

中村 克己 (NAKAMURA KATSUKI)

京都大学・霊長類研究所

以上