

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592677

研究課題名(和文) 視細胞変性に伴ったsynaptic remodelingが網膜機能に及ぼす影響

研究課題名(英文) How synaptic remodeling associated photoreceptor degeneration affects retinal function

研究代表者

町田 繁樹 (Machida, Shigeki)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：30285613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：網膜内層の機能変化について動物モデルと臨床例で研究を行った。網膜変性の動物モデルでは、硝子体内にシグナル伝達を遮断する薬剤を注入し、網膜各層の電気応答を分離記録した。視細胞変性の初期にはON型双極細胞の機能が亢進し、マクリン細胞のNMDAに対する感受性が増大していた。臨床研究では、硝子体手術と緑内障に着目した。黄斑円孔の硝子体手術の際にICGを用いると、網膜内層機能を反映するphotopic negative response (PhNR)が低下した。緑内障ではPhNRの低下が黄斑部では顕著で、黄斑外では網膜内層の菲薄化にともなって緩やかに低下した。緑内障は黄斑症のひとつと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated functional changes of the inner retina in animal models and clinical cases. In the animal research, we isolated electrical responses from each retinal layer by intravitreally injecting drugs that blocks synaptic transmission. In early stage of photoreceptor degeneration, responses of the ON-bipolar cells were enhanced. In addition, sensitivity of amacrine cells to NMDA increased. In clinical research, we found that the photopic negative response (PhNR) driven by the inner retina were irreversibly deteriorated in macular hole patients treated by vitrectomy using indocyanine green. In glaucoma patients, in the macular region the PhNR amplitude severely declined with loss of the inner retinal thickness while in the extra-macular region it deteriorated gradually. This suggested that glaucoma should be categorized into macular disease.

研究分野：医師薬学

キーワード：網膜電図 網膜 視細胞変性 網膜変性 緑内障 黄斑円孔

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 動物モデルでは杆体視細胞が変性脱落すると、残存した錐体視細胞と相手を失った杆体双極細胞が新たなシナプスを形成すると報告されていた。しかし、新たなシナプス形成が網膜機能にどのような影響を及ぼすかについては不明であった。

(2) 網膜の内層が障害される代表的な疾患として緑内障が挙げられる。網膜内層に由来する電気応答である photopic negative response (PhNR) に着目し、我々以前から緑内障の視機能を評価してきた。しかし、網膜細胞の変性を伴う眼底疾患において網膜内層の機能がどのように変化するかは不明であった。

## 2. 研究の目的

(1) 動物実験：視細胞変性をきたす遺伝性網膜変性動物モデルを対象とし、硝子体内にシナプス伝達を遮断する薬剤を硝子体内に注射し、網膜各層の電気応答を分離記録する。網膜各層の電気応答の変化と視細胞変性の進行との関係を明らかにする。

(2) 臨床研究(硝子体手術)：硝子体手術は洗練化され安全に行える手術となりつつある。しかし、手術中に用いる薬剤の網膜内層に対する毒性については十分に検討されていない。黄斑円孔に対して硝子体手術では内境界膜 (ILM) を行う際にはインドシアニングリーン (ICG)、プリリアントブルー G (BBG) あるいはトリアムシノロン (TA) を用いる。それぞれの網膜内層に対する毒性を PhNR で検討した。

(3) 臨床研究(緑内障)：緑内障の網膜内層の形態的变化を光干渉断層計 (OCT) で評価した。これにより、網膜内層の網膜神経節細胞 (RGC) の変性脱落を形態的評価できる。黄斑局所 ERG を用いて黄斑部と黄斑外網膜での PhNR と網膜内層の形態的变化との関係を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 動物実験(ウサギ)：遺伝性網膜変性をきたす P347L ロドプシントランスジェニック (Tg) および正常ウサギ (WT) を用いた。硝子体内に TTX+NMDA、APB および PDA の順番で薬剤を注入し、それぞれの薬剤の投与前後の錐体 ERG を subtraction した。これにより、網膜内層、ON 型双極細胞、OFF 型双極細胞および視細胞の電気応答を抽出し、それぞれが変性の進行に伴ってどのように影響するかをそれぞれの振幅を用いて 12 および 24 週齢で検討した。

(2) 動物実験(ラット)：遺伝性網膜変性をきたす Royal College of Surgeons (RCS) ラットを用いた。硝子体内に NMDA を硝子体内注射した。注射前後で最大応答 ERG の律動様小波 (OPs) の変化を 25-40 日齢で検討した。

(3) 臨床研究(硝子体手術)：48 例 48 眼の黄斑円孔を対象とし硝子体切除および ILM 剥離を施行した。ILM 剥離の際に、ICG、BBG

あるいは TA を用いた。術前、術後 1,3,6,9 および 12 ヶ月の時点で、視力、静的量的視野および錐体 ERG を記録した。錐体 ERG の a および b 波、OPs および PhNR 振幅を測定した。

(4) 臨床研究(緑内障)：51 眼 51 例の開放隅角緑内障 (OAG) および 17 眼 17 例の正常眼を対象とした。網膜内層の形態的評価として SD-OCT で得られた ganglion cell complex (GCC) 厚をマップから求めた。黄斑局所 ERG は直径 15° の上下半円と内径 15° および外径 30° の上下半リング状の刺激パターンで記録した。

(5) 臨床研究(黄斑円孔術後と緑内障の比較)：黄斑円孔術後および緑内障では黄斑部の GCC が菲薄化する。それぞれの疾患で、GCC 菲薄化が網膜内層機能にどのように影響するかを調べるために、27 眼 27 例の OAG および 28 眼 28 例の黄斑円孔術後の症例を対象とした。黄斑円孔は 12 ヶ月前に手術が施行されていた。直径 15° の眼底中心部から黄斑局所 ERG を記録し、同部位の平均 GCC 厚を SD-OCT で計測した。GCC 厚と PhNR 振幅との関係を OAG と黄斑円孔で比較した。

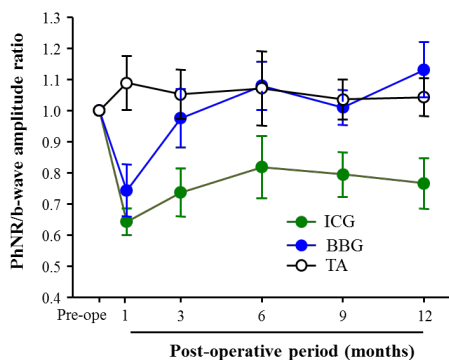
## 4. 研究成果

(1) 動物実験(ウサギ)：生後 12 週齢の Tg では、視細胞および OFF 型双極細胞からの電気応答が WT に比較して低下していた。しかし、驚くことに ON 型双極細胞の応答は増大していた。特に、刺激強度が弱から中等度では、その増大が顕著であった。つまり、ON 型双極細胞が hypersensitive な状態になっていると考えられた。24 週齢では ON 型双極細胞の電気応答の増大は認められなかったが、視細胞変性の進行にもかかわらず、その振幅は WT と同等に保たれていた。従って、Tg では視細胞変性の初期では ON 型双極細胞の応答が増大あるいは保たれることが明らかとなった。

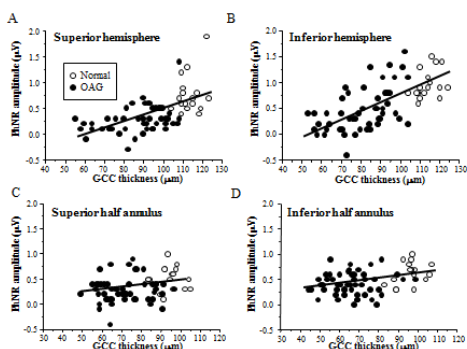
(2) 動物実験(ラット)：RCS ラットでは、視細胞の変性が急速に進行しても、網膜内層に由来する scotopic threshold response (STR) および PhNR は保たれていた。RCS ラットの STR と PhNR は、NMDA の硝子体内投与で消失した。また、律動様小波 (OPs) の振幅は、WT では NMDA 投与によって不変であったが、RCS ラットでは視細胞変性が進行すると、NMDA 硝子体内投与でその振幅は著しく低下した。従って、RCS ラットの STR、PhNR および OPs の発生メカニズムは WT とは異なり、それらの発生には網膜内の NMDA レセプターが関与すると考えられた。

(3) 臨床研究(硝子体手術)：術後視力および静的量的視野検査で求めた mean deviation は術後有意に改善した。ICG、BBG および TA 群間で有意差を認めなかった。a および b 波振幅は術後変化しなかったが、それぞれの頂点潜時は術後 1 ヶ月で有意に延長し、徐々に回復した。OPs 振幅は術後 1 ヶ月で有意に低下し、時間の経過に伴って回復を

示した。これらの変化は3群間の有意差は認められなかった。PhNR 振幅は、ICG 群では術後1ヶ月で有意に低下し、その後回復傾向を示したが、術後12ヶ月でも術前のレベルに回復することはなかった(下図)。BBG 群では、術後1ヶ月で一過性の低下を示したが、3ヶ月では術前レベルに回復した。TA 群では PhNR の振幅は術後に変化しなかった。これらの結果から、ICG を ILM 染色に用いると潜在的な RGC 障害が生じる可能性が示された。

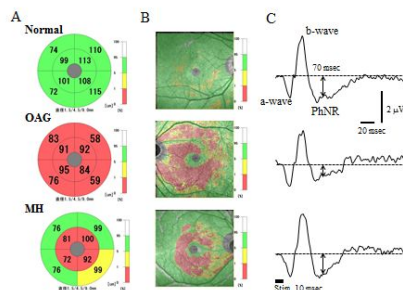


(4) 臨床研究(緑内障): PhNR 振幅は上半円の黄斑部では GCC 厚に有意に相関していた。一方、上下半リングの黄斑外網膜では、PhNR 振幅と GCC 厚との間に有意ではあるが弱い相関がみられた。PhNR 振幅と GCC 厚の関係を示す regression line の傾斜を比較すると、黄斑部(下図 A, B)では黄斑外(下図 C, D)に比較して有意に大きく、黄斑部の PhNR 振幅は GCC 厚の菲薄化に伴って黄斑外よりも低下した。このことから、黄斑部から記録される PhNR には RGC に由来する電気応答が多く含まれていると考えられる。



(5) 臨床研究(黄斑円孔術後と緑内障の比較): GCC 厚は、緑内障および黄斑円孔群で正常群に比較して菲薄化していた。PhNR 振幅および PhNR/b-波振幅比は、緑内障群では正常群に比較して低下していたが、黄斑円孔群では PhNR 振幅の低下はみられなかった(下図)。緑内障群では、PhNR 振幅および PhNR/b-波振幅比は、GCC 厚に対して正の相関を示した。それらの regression line の傾きを緑内障群と黄斑円孔群間で比較すると、傾きは緑内障群で黄斑円孔群に比較して有意に大きな値であった。この結果から、GCC

の菲薄化が黄斑部の RGC 機能に与える影響は、緑内障と黄斑円孔術後では異なることが明らかとなった。



## 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8件)すべて査読有
- Nishimura T, Machida S, Hashizume K, Kurosaka D. Structures affecting recovery of macular function in patients with age-related macular degeneration after intravitreal ranibizumab. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2014, Epub ahead of print.
- Kaneko M, Machida S, Hoshi Y, Kurosaka D. Alterations of photopic negative response of multifocal electroretinogram in patients with glaucoma. *Curr Eye Res.* 2015; 40: 77-86. DOI:10.3109/02713683.2014.915575
- Toba Y, Machida S, Kurosaka D. Comparison of retinal nerve fiber layer thickness after indocyanine green, brilliant blue G, or triamcinolone acetonide-assisted macular hole surgery. *J Ophthalmol.* 2014, 187308, Epub. DOI: 10.1155/2014/187308
- Machida S, Kaneko M, Kurosaka D. Regional variations in correlation between photopic negative response of focal electroretinograms and ganglion cell complex in glaucoma. *Curr Eye Res.* 2015; 40: 439-449. DOI: 10.3109/02713683.2014.922196
- Machida S, Tamada K, Ohzeki T, Gotoh Y, Kurosaka D. Differences in functional loss associated with ganglion cell complex thinning between patients with glaucoma and postoperative macular hole. *Curr Eye Res.* 2014; 39: 845-852. DOI: 10.1007/s00417-014-2594-6
- Machida S, Toba Y, Nishimura T, Ohzeki T, Murai K, Kurosaka D. Comparisons of cone electroretinograms after indocyanine green-, brilliant blue G-, or triamcinolone acetonide-assisted macular hole surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2014; 252: 1423-1433. DOI:

10.1007/s00417-014-2594-6

Harada T, Machida S, Nishimura T, Kurosaka D: Contribution of N-Methyl-DL-Aspartic Acid (NMDA)-sensitive neurons to generating oscillatory potentials in Royal College of Surgeons rats. Doc Ophthalmol. 2013; 127: 131-140. DOI: 10.1007/s10633-013-9394-x

Machida S: Clinical application of photopic negative response to optic nerve and retinal diseases. J Ophthalmol. 2012:397178. Epub. DOI: 10.1155/2012/397178

〔学会発表〕(計7件)

Machida S, Toba Y, Nishimura T, Ohzeki T, Murai K, Kurosaka D: Comparisons of cone electroretinograms after indocyanine green-, brilliant blue G-, or triamcinolone acetonide-assisted macular hole surgery. 13th Congress of the International Society of Ocular Toxicology. Knazawa, 2014, 10.

Machida S, Tamada K, Ohzeki T, Gotoh Y, Kurosaka D. Differences in functional loss associated with ganglion cell complex thinning between patients with glaucoma and postoperative macular hole. The 52nd International Society for Clinical Electrophysiology of Vision, Boston, 2014, 7.

Machida S, Toba Y, Nishimura T, Ohzeki T, Murai K, Kurosaka D: Comparisons of cone electroretinograms after indocyanine green-, brilliant blue G-, or triamcinolone acetonide-assisted macular hole surgery. The 51st International Society for Clinical Electrophysiology of Vision, Chongqing, 2013, 10.

Machida S, Nishimura T, Kondo M, Terasaki H, Yokoyama D, Kurosaka D: Pharmacological dissection of cone ERGs of Pro347Leu rhodopsin transgenic rabbits. The 50th International Society of Clinical Electrophysiology symposium, Valencia, 2012, 6. 3.

Machida S, Nishimura T, Tamada K, Harada T, Kurosaka D: Focal macular electroretinograms in eyes with polypoidal choroidal vasculopathy treated with reduced fluenced photodynamic therapy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. Fort Lauderdale, 2012, 5.

町田 繁樹: Photopic negative response (PhNR) の最新知見. 第117回日本眼科学会総会. 東京, 2013, 4.

町田 繁樹: 視細胞変性動物モデルの機能解析. 第116回日本眼科学会総会. 東京, 2012, 4

〔図書〕(計4件)

町田 繁樹: OCT時代のERG. MB OCULISTA No 19: 49-61, 2014

町田 繁樹: 黄斑局所 ERG. MB OCULISTA No 20: 38-46, 2014

町田 繁樹: きれいにとれる 絶対役立つ ERG. 局所 ERG. 眼科グラフィック 2: 20-24, 2013.

町田 繁樹: 新しい展望 網膜神経節細胞に由来する ERG の成分. 眼科 54: 1701-1715, 2012.

〔産業財産権〕  
○出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

町田 繁樹 (MACHIDA, Shigeki)  
獨協医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 30285613

### (2) 研究分担者

藤原 貴光 (FUJIWARA, Takamitsu)  
岩手医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 30405766

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: