

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26730149

研究課題名(和文) 網膜視機能他覚的モニタリングに向けた網膜電位図の時空間応答特性の解析

研究課題名(英文) Evaluation of retinal spatial sensitivities in cyprinid fish toward objective monitoring of the retinal function

研究代表者

針本 哲宏 (Harimoto, Tetsuhiro)

豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・特任助教

研究者番号：40387626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はiPS細胞移植による色覚機能再生過程を検証するための視機能の他覚的モニタリング法の確立に向けて、まずはコイ・キンギョ網膜の光応答分布を明らかにすることを目的とした。我々は臨床眼科で用いられている多局所網膜電位図計測システム(VERIS)をコイ網膜光応答計測実験系に組み込み、その実験系を用いたコイmfERGの計測技術を確立し、コイ眼盃標本における網膜光応答の空間分布を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Toward the future iPS cell therapies, we study about an objective monitoring scheme of retinal functions via analyses of the mfERG using mathematical models of the retina. As a preliminary study, we examined spatial sensitivities of the carp retina by using mfERG. MfERG results showed that the spatial distributions of retinal light responses in carp showed regional differences. Compared to the large response in the ventral-temporal retina region, small responses were found in the dorsal-nasal region and optic nerve located in the center of the retina. This result was in agreement with the high density of retinal ganglion cells in the ventral-temporal region of cyprinid zebrafish (Mangrum et al. 2002; Pita et al. 2015). The result in this report is an important evidence for our purpose.

研究分野：神経情報計測

キーワード：網膜電位図 多局所網膜電位図 硬骨魚類 時空間分布 マルチ電極プローブ ミシガンプローブ VERIS

1. 研究開始当初の背景

将来、iPS 細胞由来の網膜細胞移植後に構造や形の再生だけでなく、視機能に必要な固有の神経結合が正しく再構築され、色変換などの色覚機能が正常に再生されるか他覚的・経時的に評価・診断できる臨床モニタリング法の確立が必要である。

網膜電位図(ERG, Electroretinogram)は光照射により発生する網膜神経活動の集合電位であり(Granit R, J Physiol., 1933)、代表的な視機能評価法として基礎研究や臨床眼科で広く用いられてきた。コンタクトレンズ型の電極を用いることでヒトの網膜の機能障害を電気生理学的に調べ、波形から網膜の働きが正常かどうかを調べることができる。

多局所網膜電位図(mfERG, multifocal Electroretinogram)は、ランダムな 2 次元、明暗パターン刺激に対する局所網膜電位図応答から、相関法を用いて計算される局所網膜光応答の空間分布であり、他覚的かつ非侵襲的に錐体機能を評価することができる。いずれも保険適用のある検査で網膜剥離(Sasoh M et al., Doc. Ophthalmol., 1998) や網膜色素変性症(Berson EL, IOVS, 1993)など網膜の異常を発見するために用いられてきた。

一方、脊椎動物網膜神経回路は視細胞直下の外網状層と神経節細胞を出力とする内網状層から成り、色覚を有する動物の網膜外網状層では赤、緑、青の 3 種の錐体視細胞と水平細胞の選択的結合(Stell WK et al., Science, 1975)によって三原色信号から反対色信号に変換されている。このような色情報変換機構は動物種問わず共通した基本的かつ原理的な機構のひとつであるにもかかわらず、こうした色情報変換機構とその機構を有する神経回路群の細胞外電位の総和である ERG との関係は未だ十分明らかにされていない。

2. 研究の目的

コイ・キンギョの網膜は、摘出して神経電位を計測することができ、ヒトの網膜では困難な薬理実験も可能である。本研究は iPS 細胞移植による色覚機能再生過程を検証するための視機能の他覚的モニタリング法の実用化に向けて、まずはコイ・キンギョを用いた基礎研究を通して、ERG の光応答分布を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1). マルチ電極プローブを用いた ERG 計測

半導体/MEMS 技術を用いたマルチ電極プローブは、直径の小さな電極をアレイ状に高密度に配置できる。ミシガン大学が開発したマルチ電極プローブ(ミシガンプローブ)は直径 15 μm 程度の平面電極が 25 μm 間隔で、シャンクと呼ばれる針の側面にライン状に配置されており、このシャンクを測定対象に刺入することで、深さ方向に対して同時記録することができる。網膜は層構造をしており、ミシガンプローブによる多点同時計測によって、

これまで段階的に単一電極を刺入して得られていた層ごとの ERG を一度に計測する。

(2). mfERG によるコイ網膜光応答分布

多局所網膜電位図(mfERG)は、上述のように相関法を用いて局所網膜光応答の空間分布を単一電極からも得ることができる。臨床眼科で用いられる計測システム(VERIS)をコイ網膜にも適用、計測系を構築し、コイの視野部位と空間応答の関係を明らかにする。

4. 研究成果

(1). マルチ電極プローブを用いた ERG 計測

まずコイ網膜の深さ方向に対する網膜電位図の波形変化を把握するため、コイ眼球から摘出した単離網膜に単一金属電極(タングステン, $\Phi 125 \mu\text{m}$)を刺入してフラッシュ ERG(白色 LED 光刺激)を計測した。ERG は網膜視細胞側で振幅が大きく、神経節細胞側では小さくなった(図 1, 波形は極性反転させた)。単離網膜では波形の反転が見られず、視細胞由来の光応答が大きく記録されることを確認した

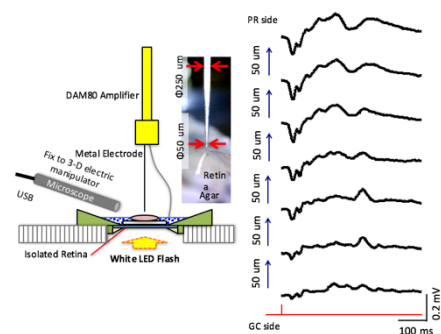


図 1. 単一金属電極刺入時のコイ ERG

研究の方法にも述べたが、単一金属電極では ERG の取得に時間を要し、網膜全体にわたって時空間分布を調べることは困難である。そこで、コイ網膜の深さ方向に対する網膜電位図を同時計測するため、ミシガンプローブ(マルチ電極プローブ、電極径 15 μm , 25 μm pitch)をコイ単離網膜に刺入し、フラッシュ ERG を記録し、単一金属と似た波形を記録できることを確認した(図 2)。

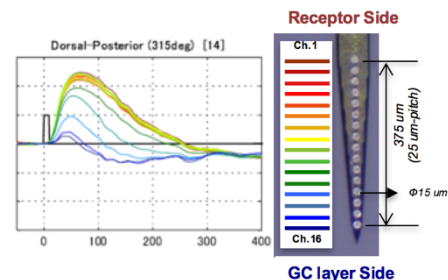


図 2. ミシガンプローブによるコイ ERG

この方法を用いて網膜全体にわたって ERG を調べた結果、網膜部位によって波形ダイナミクスが異なっており、より詳細な空間分布

を調べる必要性が生じたため、多局所網膜電位図法を用いて、コイ網膜における空間分布特性を調べた。

(2). mfERG によるコイ網膜光応答分布

コイ網膜から多局所網膜電位図を計測するためには、高頻度明滅光刺激を網膜に照射しなければならない。本研究ではモバイル DLP プロジェクター (DELL M115HD) を用いて高頻度明滅光刺激を実現し (図 3)、mfERG の計測・解析システム (VERIS, Electro-Diagnostic Imaging, USA) を用いて、コイ眼盃標本における mfERG を取得する計測・解析システムを構築した。

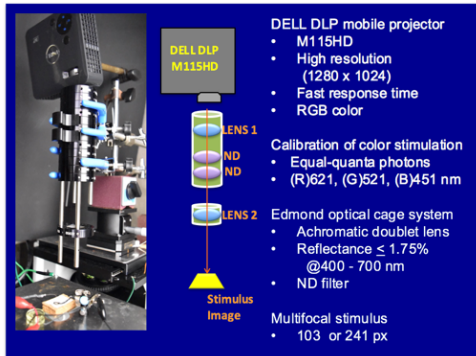


図 3. 構築した mfERG 計測システム

図 4 に上述の計測システムを用いて取得したコイ眼盃標本における mfERG を示す。実験の結果、コイの mfERG の応答分布は、背側や鼻側、網膜中央に位置する視神経の付近では応答がほとんど見られず、腹側から耳側にかけて大きな応答が見られた。図 5 は比較のため等サイズピクセルで記録したヒト mfERG である。

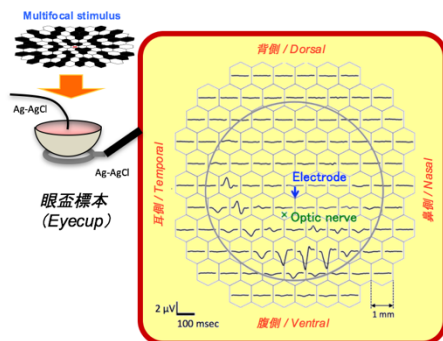
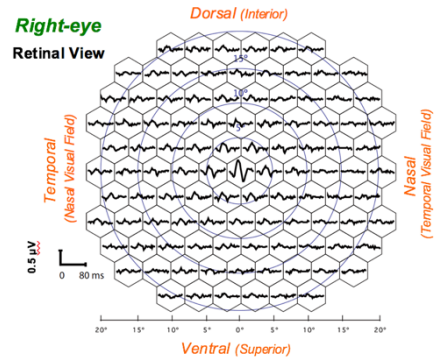


図 4. コイ眼盃における mfERG

本研究によって、中心窩にピークを持つヒトの mfERG とコイの mfERG の応答分布に違いがあることが明らかにされた。また、コイ科のゼブラフィッシュ網膜は腹側から耳側にかけて神経節細胞密度の高い領域があり (Mangrum, Dowling, and Cohen, 2002)、コイ mfERG の応答分布とも一致している。すなわち、コイ網膜の腹側から耳側にかけての領域はヒトの中心窩に相当すると考えられ、両眼前部上方の水面に浮かぶバグなどの捕獲に



適した構造になっていることが考えられる。

図 5. 等サイズ刺激によるヒト mfERG

本研究によってコイにおける ERG の光応答分布を明らかにすることができ、これまでコイ・キンギョ網膜の光応答分布は一様であると言われてきたが、網膜光応答分布には偏りがあることが確認された。今回の結果は細胞の分布や細胞密度が大きく偏っていることを示唆しており、このような空間分布の違いは、その部位で構築されている神経回路に影響し、色情報処理機構も異なることが予想される。

謝辞:mfERG 計測については有限会社メイヨーの協力を得た。深く感謝する。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 7 件)

- [1]. [Tetsuhiro Harimoto](#) and Shiro Usui, "Spatial Distribution of Multifocal Electroretinogram in Carp", The Irago (Interdisciplinary Research and Global Outlook) Conference 2014 (2014.11), AIST Tsukuba, Tsukuba-city, Ibaraki, Japan.
- [2]. Nilton L. Kamiji, [Tetsuhiro Harimoto](#) and Shiro Usui, "Low Noise Electrophysiological Setup for Intracellular Recordings from Retinal Horizontal Cells", The Irago (Interdisciplinary Research and Global Outlook) Conference 2014 (2014.11), AIST Tsukuba, Tsukuba-city, Ibaraki Japan.
- [3]. [Tetsuhiro Harimoto](#) and Shiro Usui, "Spatial Distribution of Retinal Light Responses in Carp via Multifocal Electroretinography", Proc. of the 14th Japan-China-Korea Joint Workshop on Neurobiology and Neuroinformatics (NBNI2014), p.34 (2014.12) P-2, Okazaki Conference Center, Okazaki-city, Aichi, Japan.
- [4]. N. L. Kamiji, [T. Harimoto](#) and S. Usui "Stable low noise recordings from retinal horizontal

- cells," Proc. of the 14th Japan-China-Korea Joint Workshop on Neurobiology and Neuroinformatics (NBNI2014), p. 44 (2014.12) P-12, Okazaki Conference Center, Okazaki-city, Aichi, Japan.
- [5]. 針本哲宏, 臼井支朗: コイ眼盃標本における多局所網膜電位図, 第54回日本生体医工学大会, 名古屋国際会議場 (2015.5), 生体医工学 Vol. 53, Suppl. 1, pp. 190, 2015.5.
- [6]. T. Harimoto and S. Usui, "Multifocal Electroretinogram (mfERG) from the Eyecup Preparation in the Cyprinid Fish", European Retina Meeting (ERM2015), p.144 (2015.10), Brighton, UK.
- [7]. T. Harimoto, N. L. Kamiji and S. Usui, "Evaluation of Retinal Spatial Sensitivity in Cyprinid Fish", The Irago (Interdisciplinary Research and Global Outlook) Conference 2015 (2015.10) P84, Tahara, Aichi, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

針本 哲宏 (HARIMOTO, TETSUHIRO)
豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端
融合研究所・特任助教
研究者番号: 40387626

(2) 連携研究者

臼井 支朗 (USUI, SHIRO)
豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端
融合研究所・特任教授
研究者番号: 40023337