

多局所網膜電図の2次核の起源に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4543

多局所網膜電図の2次核の起源に関する研究

金沢大学大学院医学系研究科脳医科学専攻光情報伝達学

(旧講座名：眼科学)

(主任：河崎一夫教授)

上 山 恵 巳

多局所網膜電図 (multifocal electroretinogram, MERG) は網膜の限局した領域の機能検査の新しい方法として眼科臨床的に用いられ、その2次核成分は網膜内層に由来するといわれている。しかし2次核成分は微小なためその起源を臨床的に評価することは困難であり、その起源については未だ定かでない。本研究では、MERGの2次核成分の起源に関する節細胞の関与を動物実験で検証することを目的としてネコ5匹において網膜神経節細胞(節細胞) 萎縮眼を作製し、その前後のMERGを比較した。節細胞を萎縮させるために、片眼の視神経乳頭周囲の網膜表層に熱凝固を施行して節細胞軸索を破壊した。視神経乳頭周囲全周熱凝固を3匹に、視神経乳頭上半周熱凝固を2匹に施行した。塩酸ケタミンおよびキシラジンによる全身麻酔後にコンタクトレンズ電極を装着し、Veris® Science 3.1.1を用いてMERGを記録した。刺激条件を、刺激頻度75ヘルツ(hertz, Hz)、エレメント数を37個、M-sequenceを $2^{13}-1 \sim 2^{17}-1$ (記録時間1分48秒~29分8秒) に設定した。視神経乳頭周囲全周を熱凝固したネコ眼のHE染色標本において、節細胞は著しく減少していた。視神経乳頭周囲全周熱凝固群において、熱凝固前に比べ熱凝固後には2次核成分振幅は著しく減弱していた。3匹のネコにおいて1次核成分(P1-N2)に対する2次核成分(N1-P2)の振幅比は凝固前ではそれぞれ30.6%, 30.4%, 29.0%, 凝固後では10.3%, 14.4%, 9.4%であり、すべてのネコにおいて低下していた。視神経乳頭上半周熱凝固群において、軸索が凝固されていない節細胞の分布領域(非凝固部)に比べ軸索が凝固された節細胞の分布領域(凝固部)で2次核成分は減弱していた。非凝固部における2次核成分振幅に対する凝固部における2次核成分の振幅比は2匹のネコにおいてそれぞれ50.5%, 60.2%であった。また2次核成分の頂点潜時は非凝固部に比べて凝固部において延長していた。以上、ネコ節細胞萎縮眼において2次核成分が減弱したことより、2次核成分の起源として節細胞の関与が示唆された。

Key words multifocal electroretinogram, retinal ganglion cell, intraocular diathermy, 1st-order kernel, 2nd-order kernel

従来種々の方法で網膜局所から網膜電図(electroretinogram, ERG)を記録することが試みられてきた。黄斑部からの網膜局所ERGに関しては多数の報告^{1)~5)}がある。しかし、黄斑部局所ERGは、応答が微小でありかつ固視を確認することが困難であったので、永く実用化されなかった。

1984年に至りMiyakeら^{6)~12)}は赤外線眼底カメラを改造して眼底直視のもとで固視を確認しながら黄斑部局所ERGを安定して記録することに成功し、黄斑部局所ERGによってさまざまな知見がもたらされた。しかし、彼らの装置では中心窩を中心とした直径15度までの円形、半円形あるいは輪状の刺激のみが可能であり、眼底後極部における応答の分布を詳細に描画することは不可能であった。しかも、彼らの装置では1回の記録で1箇所のみ応答しか記録できない。

一方、近年開発された多局所網膜電図 (multifocal electroretinogram, MERG) は、陰極線管ディスプレイを刺激ディスプレイとし、パーソナルコンピュータを用いて多数領域の視覚刺激を1回の記録中に提示し、得られた応答から数学的解

析を用いて、刺激領域に対応する多数の網膜局所からのERGを同時に得ることができる画期的な方法である¹³⁾¹⁴⁾。また刺激条件や解析方法を詳細に設定することができ、任意の領域同士の比較も容易である。MERGの創案は多局所の網膜の他覚的機能検査を可能にし、その臨床的意義は極めて大きい。さらに、MERGの画期的特徴の一つとして、数学的解析により網膜内層、特に網膜神経節細胞(以下、節細胞)の活動を観察できる可能性があげられる。従来、節細胞の電気的活動は一般的な全視野閃光刺激ERGには反映されないと永く考えられてきた。最近、明所視全視野閃光刺激ERGのある種の陰性波(明所視陰性波)が節細胞活動の指標となるという報告がある^{15)~18)}が、未だ定かでないうえに明所視陰性波が節細胞活動の指標となるとしても、それには局所性はない。

一方、MERGは創案以来、正常眼^{19)~27)}および種々の網膜^{28)~46)}・視神経疾患^{47)~52)}において研究され、MERGの網膜内起源の解明や網膜・視神経疾患の病態解明に利用されてきた。それらの研究から、MERGのある種の成分に局所の節細胞活動が反映

平成13年12月4日受付、平成14年1月21日受理

Abbreviations : APB, 2-amino-4-phosphono-butyric acid; ERG, electroretinogram; GABA, γ -aminobutyric acid; MERG, multifocal electroretinogram; PDA, cis-2,3-piperidine dicarboxylic acid; TTX, tetrodotoxin

されることが考えられるに至った。例えばChanら⁵⁰⁾は、節細胞の障害が病変の主体である緑内障において1次核成分および2次核成分の振幅は減弱すると報告した(1次核および2次核の詳細については考察を参照)。Hasegawaら⁴⁶⁾は、網膜内層の神経細胞障害を主な病変とする網膜動脈分枝閉塞症の症例における罹患領域に限定したMERGの変化を報告した。彼らによれば、罹患領域において1次核成分の振幅は減弱し、頂点潜時は延長し、2次核成分の振幅は著しく減弱し、ほとんど雑音に埋没する程度であったことから、MERGの2次核成分はおもに網膜内層の節細胞に由来するという。MERGに関する種々の報告によって、その1次核成分は網膜外層の機能を、2次核成分は網膜内層の機能を反映するといわれている。しかし2次核成分は微小なヒトでは良好に記録することはしばしば困難で、それゆえ2次核成分の網膜内起源をヒトの眼疾患をモデルとして臨床的に解明することは現在に至っても至難である。

動物実験に関してはFrishmanら⁵³⁾は、サル眼において2次核成分の網膜内起源を実験的に検証した。すなわち実験の緑内障および神経伝達阻害物質の硝子体内注入によって網膜内層の機能を抑制した状態において1次核成分および2次核成分が減弱し、1次核成分に比べ2次核成分の減弱が著明であったという。しかしながら著者の知る限りMERGの2次核の起源に関する実験報告は僅少である^{53)~56)}。

本研究では、MERGの2次核成分の起源に関する節細胞の関与を動物実験で検証することを目的として、全身麻酔下ネコ眼で長時間加算したMERGを記録することによって、節細胞の萎縮がMERGに及ぼす影響を調べた。

対象および方法

I. 実験動物

検眼鏡的に異常がみられなかった成ネコ5匹(体重2.5~4.2kg)の左眼に対してのみ以下の操作を行った。実験動物の使用は金沢大学宝町地区動物実験指針に従った。

II. 方法

手術およびMERGの記録は塩酸ケタミン(ケタラルール50[®]、

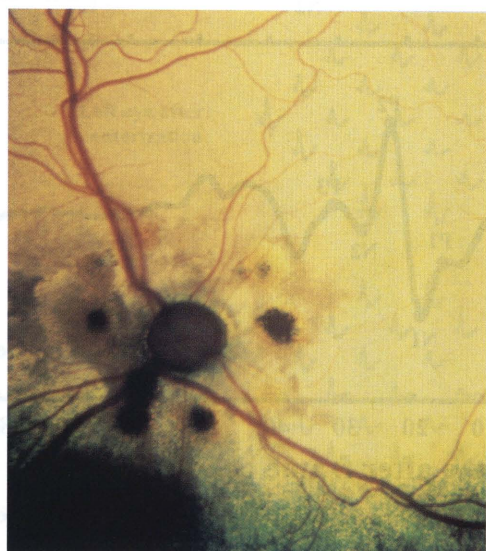


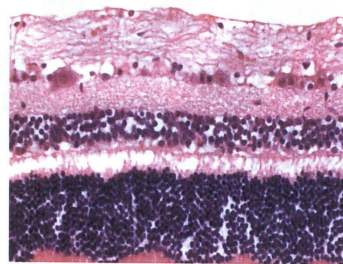
Fig. 1. Cat fundus photograph after full-circumferential peripapillary cauterization.

三共、東京) およびキシラジン(セレクトール[®]2%注射液、バイエル、レバークーゼン、ドイツ)の7:1の混合液0.5~1.0ml/kgによる全身麻酔下で行った。

1. 視神経乳頭周囲網膜の眼内熱凝固術

ネコ3匹の左眼のみに対し以下の処置を施した。瞳孔は0.5%トロピカミドと0.5%塩酸フェニレフリン混合点眼液(ミドリン[®]P、参天製薬、大阪)の点眼により十分に散大された。グルコン酸ヘキシジン(0.05%ヒビテン[®]、ICI住友、東京)を用いて眼瞼皮膚および結膜嚢を消毒後に0.4%塩酸オキシブプロカイン(ペノキシル[®]、参天製薬)にて点眼麻酔を行った。手術用顕微鏡OMS-100(トプコン、東京)下で結膜を切開し、角膜輪部から約3mm後方の毛様体扁平部に相当する強膜に20ゲージ硝子体手術用槍状刀(V-lance[®]、日本アルコン、東京)を用いて小切開を加えた。この切開創より眼内熱凝固ハンドピース(Mentor[®]、サンタバーバラ、米国)を挿入し、灌流付き硝子体手術用コンタクトレンズ(南旺光学、東京)を用いて眼底を透見しながら網膜主要血管およびその直近を除いた視神経乳頭周囲全周の網膜表層に対して熱凝固を施行した(図1)。また別のネコ2匹の左眼のみに対して、視神経乳頭周囲全周ではなく上半周のみの熱凝固にとどめた以外上記と同様の処置を施行した。熱凝固の強さは凝固斑が淡く浮き出る程度にとどめ、過剰凝固にならないように留意した。以下では視神経乳頭を中心として熱凝固を施行した範囲の角度を頂角とする眼底の扇形領域を凝固部、そうでない領域を非凝固部と呼ぶ。強膜創を針付き9-0ナイロン糸(ジョンソンエンドジョンソンメディカル、東京)で縫合し、眼科用オフロキサシン軟膏(タリビット[®]眼軟膏、参天製薬)と眼科用ベータメサゾン軟膏(リンデロン[®]眼軟膏、

A



B



200 μm

Fig. 4. Light micrographs of the cat retinas of the left eye 16 months after cauterization (B) and the control fellow right eye without cauterization (A). Hematoxylin-eosin staining.

塩野義製薬, 東京) を点入して手術を終了した。

2. MERG

Veris® Science 3.1.1 (メイヨー, 名古屋) を用いてMERGを記録した。ミドリン®-P (参天製薬) にて散瞳後, ペノキシール® (参天製薬) にて点眼麻酔を行った。電極と角膜の間に気泡の介入を防ぐためヒドロキシエチルセルロース (スコビゾル®15, 千寿製薬, 大阪) を点眼し, 双極型Burian-Allen電極 (Hansen Ophthalmic Development Laboratory, ソロン, 米国), またはEB電極 (京都コンタクト, 京都) を装着した。自動屈折計AR-3300 (ニッデク, 蒲郡) を用いて屈折異常を計測し, 刺激が網膜に結像されるように眼鏡レンズで被検眼の屈折異常を矯正した。接地電極として銀皿電極NT-614 (日本光電, 東京) を左耳介上に電極糊 (Elifix®, 日本光電) にて装着した。刺激ディスプレイの固視点を固視させるために, ネコの体部を水平の台に腹臥位に固定した後, 倒像鏡にて眼底の網膜中心領域を注視し,

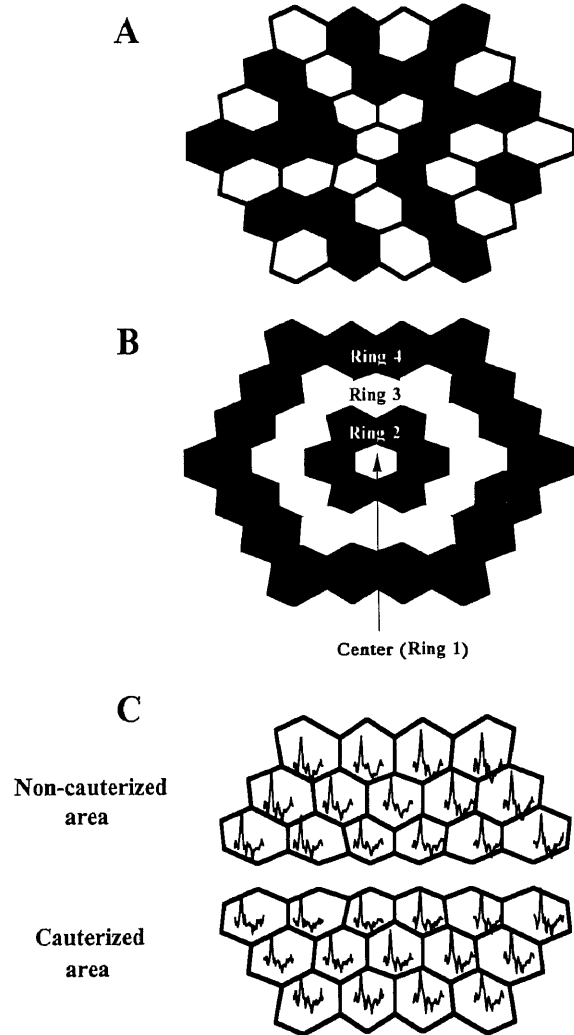


Fig. 2. Stimulus patterns and their groupings. (A) A total of 37 elements appeared on the monitor screen. Each hexagons flashed in binary m-sequence at 75 Hz. (B) The 37 elements were grouped into 4 concentric annuli. (C) In experiments where upper 180-degree peripapillary cauterization was performed, the elements, except for the 7 elements on horizontal meridian, were grouped into upper and lower hemifields.

検者とネコの目線を刺激ディスプレイの固視点と同じ高さで水平になるように, さらにネコの目線をディスプレイに対して垂直になるようにネコの頭位のみを置き換え調節することで光刺激を網膜中心部約 30° に正確に当てるようにした。

Veris® Science 3.1.1による刺激では, 刺激ディスプレイ (GB1781, 中央無線, 東京) 画面上にバイナリー-M系列に従い頻度75ヘルツ (hertz, Hz) で光刺激が点灯する37個の刺激エレメント (Hexagon 37) (図2A) を提示し, 網膜の中心約 30° の範囲を刺激した。画面の最大輝度は200カンデラ (candela, cd)/ m^2 , 最小輝度は $5cd/m^2$ であった。サンプリング周波数は1200Hzであった。応答は10-300Hzの帯域で増幅された。

M-sequenceの回数を $2^{13}-1$, $2^{14}-1$, $2^{15}-1$, $2^{16}-1$, $2^{17}-1$ すなわち75Hzの明暗反転頻度であれば1回の記録時間を1分49秒, 3分38秒, 7分17秒, 14分34秒, 29分8秒とし, 同一条件 (記録時間) での記録を3回行い, その3回の記録結果を加算して1つの応答波形とした。1次核成分波形および2次核成分波形について以下に述べる項目別に解析した。光刺激を与えた時点から波形の各頂点までの時間を頂点潜時 (msec), 基線から波形の各頂点までを振幅 ($nV/degree^2$, nV/deg^2) と定義した。図3のごとく, 1次核成分波形における上向きおよび下向きの振幅を頂点潜時の短い順にそれぞれN1, P1, N2と名付け, 2次核成分波形における上向きおよび下向きの振幅を頂点潜時の短い順にそれぞれP1, N1, P2, N2, P3と名付けて, そのうち測定可能

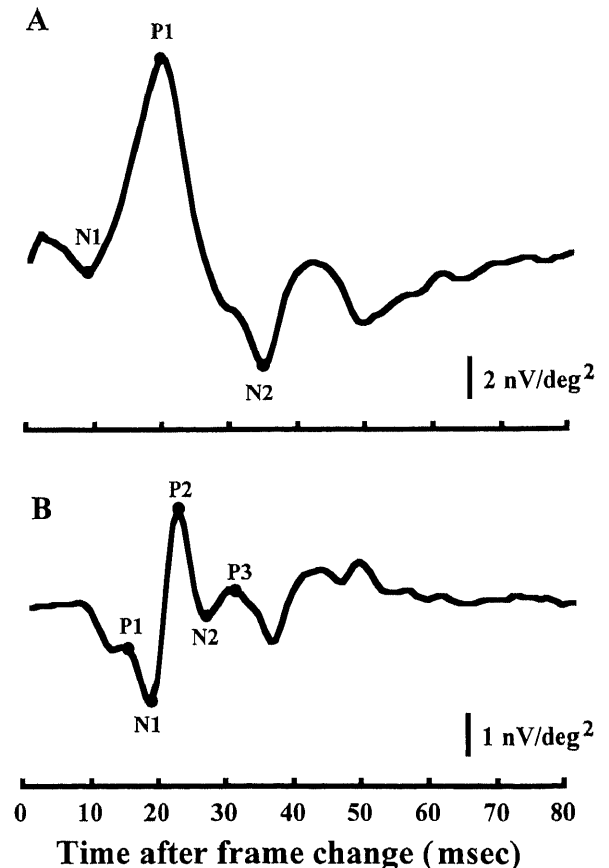


Fig. 3. The typical MERG waveforms of the 1st-order kernel responses (A) and the 2nd-order kernel responses (B). Upward deflection indicates positivity of the corneal electrode in reference to that facing the palpebral conjunctiva in all figures showing MERG waveforms.

な頂点潜時および振幅を計測した。1次核成分のP1頂点からN2の底までの振幅 (P1-N2) を1次核成分の振幅とし、2次核成分のN1の底からP2の頂点までの振幅 (N1-P2) を2次核成分の振幅として、1次核成分の振幅に対する2次核成分の振幅比 (2次核成分/1次核成分) を検討した。視神経乳頭全周熱凝固群では、図2Bのように37エレメントを同心円状に4つの群に分けRing1~4と名付けて、それぞれのRingにおける熱凝固前に対する熱凝固後の振幅比、すなわち熱凝固後のRing1/熱凝固前のRing1、熱凝固後Ring2/熱凝固前Ring2、以下同様にRing4までを検討した。視神経乳頭上半周熱凝固群では図2Cのように上下に2分割して分析を行った。非凝固部の1次核成分に対する凝固部の1次核成分の振幅比 (凝固部の1次核成分/非凝固部の1次核成分)、非凝固部の2次核成分に対する凝固部の2次核成分の振幅比 (凝固部の2次核成分/非凝固部の2次核成分)、凝固部および非凝固部それぞれにおける1次核成分に対する2次核成分の振幅比 (2次核成分の振幅/1次核成分の振幅) を検討した。

目視によれば麻酔中の眼球動揺はほとんどなく、あったとしても大きくかつ緩徐だったので容易に察知された。眼球動揺が察知された場合には、その記録中の一連の応答をすべて棄却した。

3. 網膜組織標本作製

視神経乳頭周囲全周熱凝固群の1匹のネコについて乳頭周囲熱凝固16ヶ月後にペントバルビタール (ネンプタール®, 大日

本製薬, 大阪) を過量投与し、非凝固眼および凝固眼を摘出し、ホルマリン固定、HE染色を行い、網膜を組織学的に検索した。

成 績

1. 網膜組織標本

図4に視神経乳頭周囲全周熱凝固16ヶ月後に摘出した網膜組織標本の光顕像を示す。右眼 (対照眼) では網膜内層に大きな細胞体を有する節細胞が存在した。左眼凝固眼では網膜内層に節細胞は著しく減少していた。また右眼 (対照眼) と比較して節細胞以外の内顆粒層、外顆粒層には変化がなかった。

2. 視神経乳頭周囲全周を熱凝固した群

図5に上から順に左眼の凝固前、左眼凝固後の12ヶ月後および右眼 (対照眼, 凝固なし) の3群に分けて、各エレメントにおけるMERG波形を示す。左半および右半にそれぞれ1次核成分波形および2次核成分波形を示す。各エレメントにおける1次核成分波形には左眼凝固前、左眼凝固後では変化がみられなかった。また右眼 (対照眼) においても左眼凝固前、左眼凝固後と同様な1次核成分波形がみられた。各エレメントにおける2次核成分波形は、左眼凝固前および右眼において均一に分布する微小な応答を示した。左眼凝固後の各エレメントにおける2次核成分の応答は減弱しており、特に中心部では著しく減弱していた。

図6に37個の全エレメントの加算平均波形を示す。1次核成分波形の応答密度には、左眼凝固前、左眼凝固後、右眼 (対照

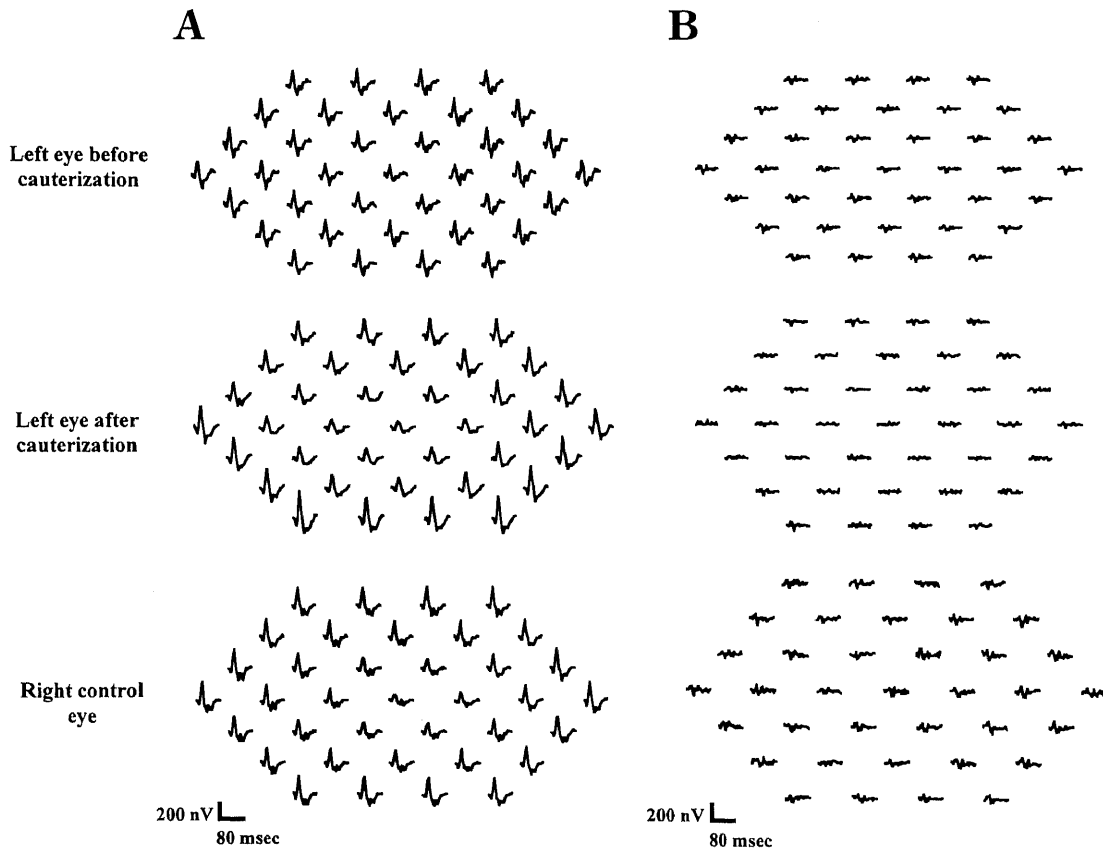


Fig. 5. The MERG waveforms at the 37 elements before and after cauterization. The upper, middle and lower groups in each panel show, respectively, the MERG before cauterization of the left eye, 12 months after cauterization of the left eye, and of the control fellow right eye without cauterization. The left (A) and right (B) panels show, respectively, the MERG of the 1st- and 2nd-order kernels.

眼)の間で差がなかったが、2次核成分波形は左眼凝固後には減弱し、そのP1はほぼ消失していた。

図7に3匹のネコのそれぞれの1次核成分および2次核成分の頂点潜時を示す。1次核成分のN1, P1, N2の頂点潜時は、左眼凝固前および右眼(対照眼)に比し左眼の視神経乳頭全周熱凝固後で有意に変化してはいなかった。2次核成分P1, N1, P2, N2, P3の頂点潜時も左眼凝固前および右眼(対照眼)に比し左眼凝固後で有意に変化してはいなかった。

1次核成分の振幅(P1-N2)および2次核成分の振幅(N1-P2)はいずれも記録毎に若干変化したので、1次核成分の振幅(P1-N2)に対する2次核成分の振幅(N1-P2)の比、すなわち2次核成分振幅(N1-P2)/1次核成分振幅(P1-N2)を検討した(図8)。3匹のネコ, cat 1~3の左眼凝固前の振幅比(N1-P2)/(P1-N2)はそれぞれ30.6%, 30.4%, 29.0%であった。右眼(対照眼)の振幅比(N1-P2)/(P1-N2)はそれぞれ28.9%, 32.7%, 27.0%であった。左眼凝固後にはcat 1~3の3匹それぞれにおいて振幅比(N1-P2)/(P1-N2)は10.3%, 14.4%, 9.4%とすべてのネコ

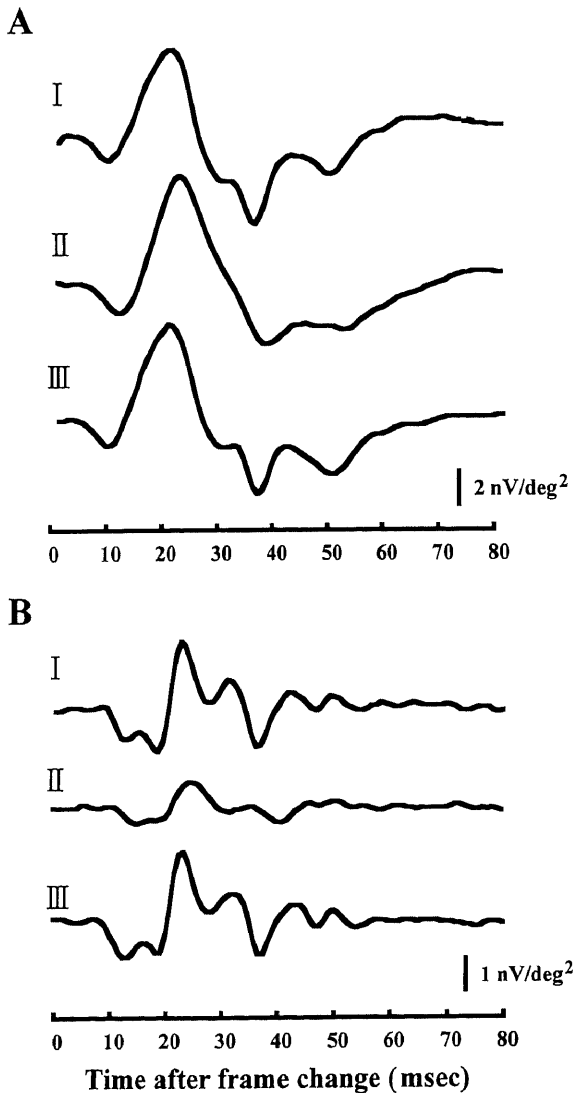


Fig. 6. The averaged MERG waveforms elicited at all of the 37 elements before cauterization of the left eye (I), 12 months after cauterization of the left eye (II), and from the control fellow right eye without cauterization (III). Panels A and B show, respectively, MERG of the 1st- and 2nd-order kernels.

で低下していた。

図9に37エレメントを同心円状に4群に分けた波形を示す。左眼凝固前と右眼(対照眼)における1次核成分の振幅(P1-N2)は、Ring1で最も大きくより周辺のRingに移るにしたがって小さくなった。左眼凝固後におけるそれは左眼凝固前に比して若干減弱し、Ring1~Ring4のいずれでもほぼ等しかった。左眼凝固前と右眼(対照眼)において2次核成分の振幅(N1-P2)もRing1で最も大きくより周辺のRingに移るにしたがって小さく

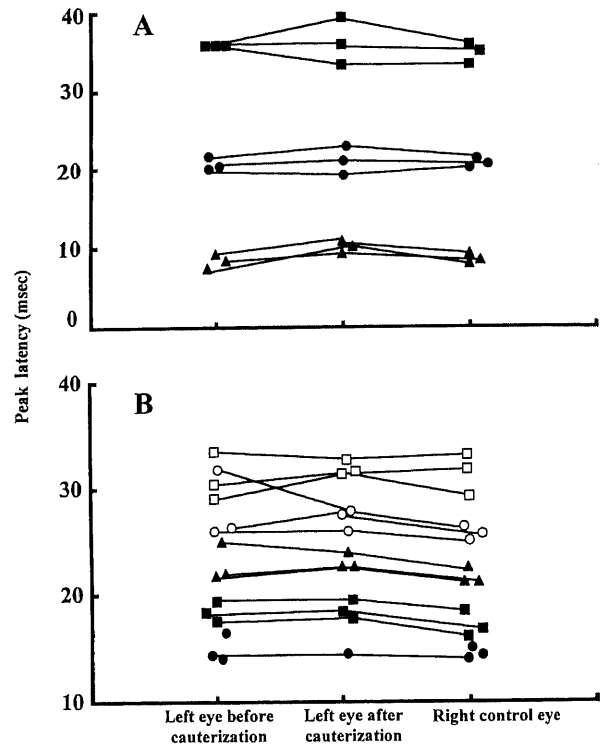


Fig. 7. Peak latencies of N1 (▲), P1 (●), N2 (■) of the 1st-order kernel (A) and P1 (●), N1 (■), P2 (▲), N2 (○), P3 (□) of the 2nd-order kernel (B) before cauterization of the left eye, 12 months after cauterization of the left eye and from the control fellow right eye without cauterization.

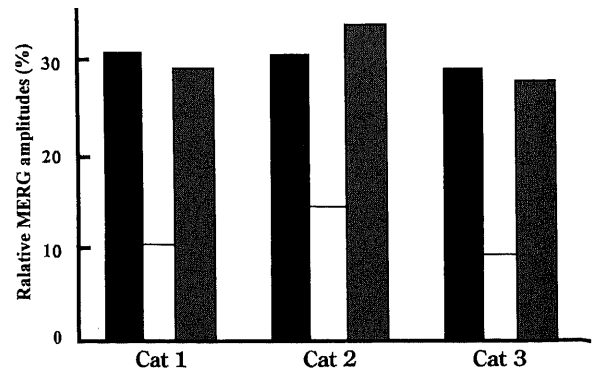


Fig. 8. Relative MERG amplitudes (2nd-order kernel/1st-order kernel) before cauterization of the left eye (■), 12 months after cauterization of the left eye (□) and from the control fellow right eye without cauterization (■) of the 3 cats (cats 1, 2 and 3).

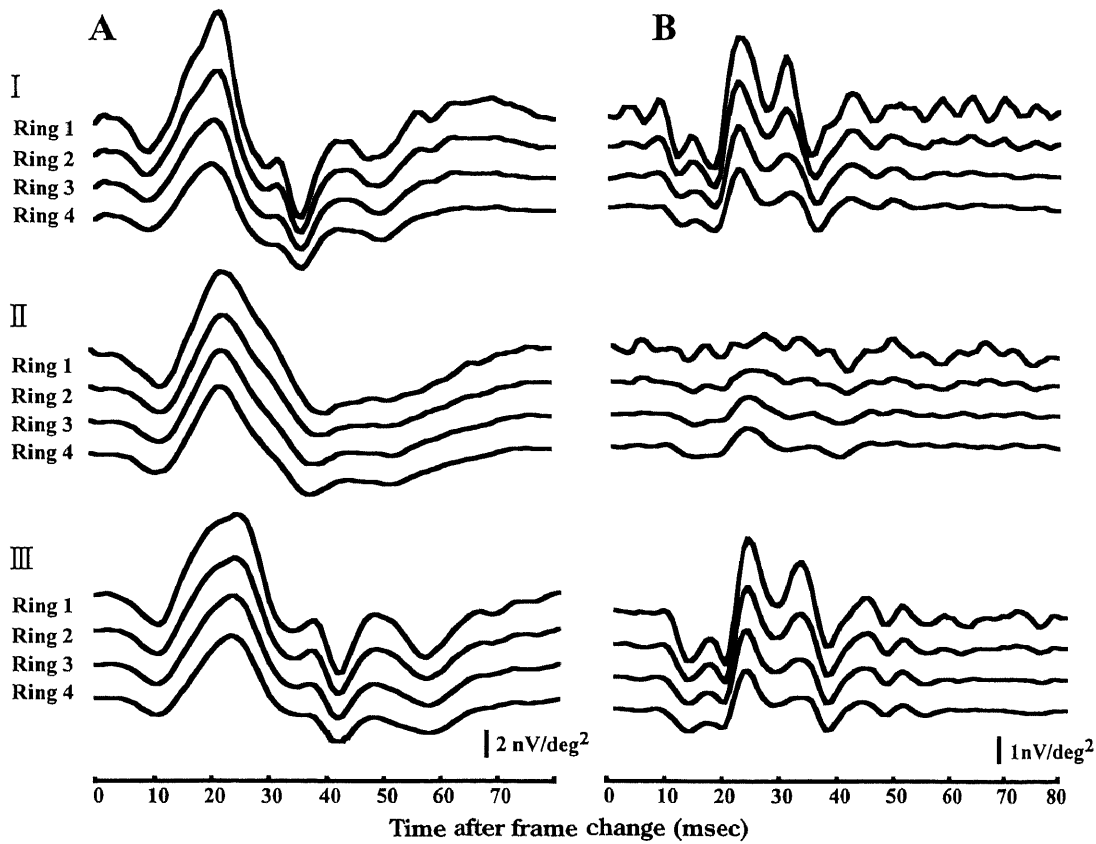


Fig. 9. The MERG waveforms of the 1st-order kernel (A) and the 2nd-order kernel (B) from the central hexagon (Ring 1) and 3 concentric annuli (Rings 2,3,4) in the left eye before cauterization (I), in the left eye after cauterization (II) and in the control fellow right eye without cauterization (III).

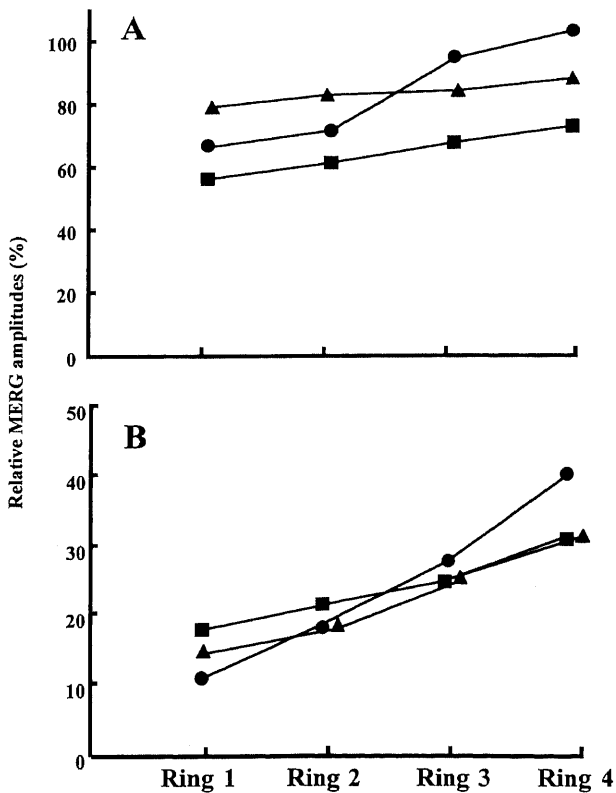


Fig.10. Relative MERG amplitude of the 1st-order kernel (A) and the 2nd-order kernel (B) from the central hexagon (Ring 1) and 3 concentric annuli (Rings 2,3,4) after cauterization. The ordinate indicates the percentage of the amplitude after cauterization to the amplitude before cauterization. ●, cat1; ■, cat 2; ▲, cat 3.

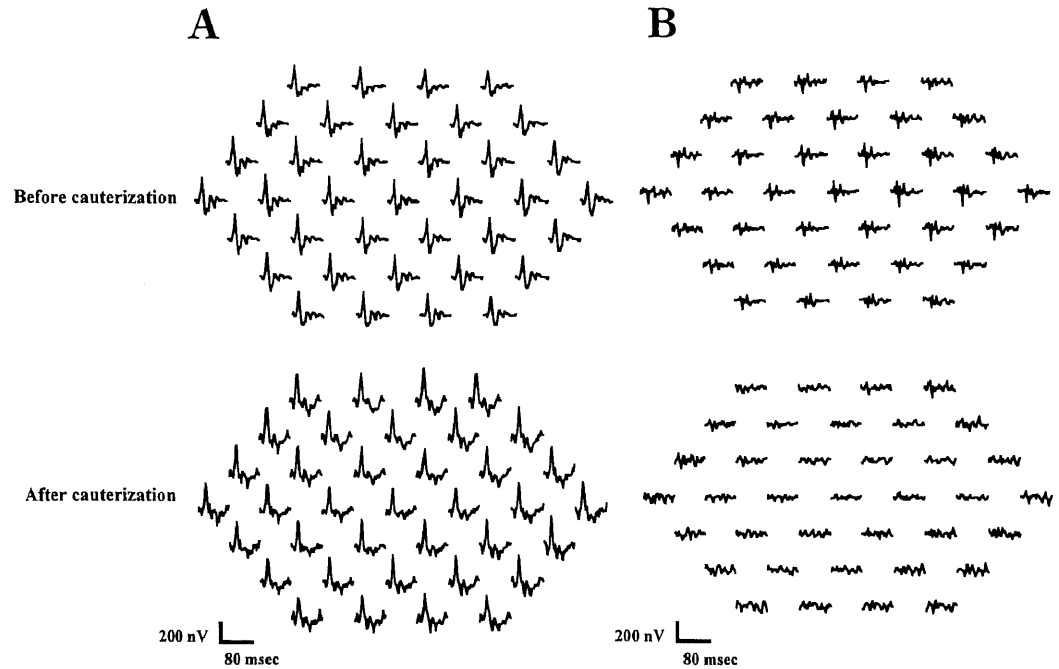


Fig. 11. The MERG trace array of the 1st-order kernel (A) and the 2nd-order kernel (B) before cauterization and 120 days after upper hemi-circumferential peripapillary cauterization.

なった。左眼凝固後のそれは左凝固前に比して著しく減弱し、特にRing1での減弱が著明であった(図9右上段1番上と右中段1番上)。

図10に1次核成分および2次核成分のRing1~4における凝固前に対する凝固後の振幅の比を示す。1次核成分の凝固前に対する凝固後の振幅の比はRing1で最も小さかった。2次核成分の凝固前に対する凝固後の振幅の比もRing1で最も小さかった。

3. 視神経乳頭周囲半周を熱凝固した群

図11の上半および下半に、それぞれ凝固前および視神経乳頭の上半周を凝固した120日後の応答アレイを示す。左半に1次核成分波形を、右半に2次核成分波形を示す。1次核成分は凝固後も凝固前と同様の波形がみられ、凝固後の凝固部と非凝固部とで同様の波形を示した。2次核成分は、凝固前には均一に分布する微小な応答を示した。2次核成分は凝固後には凝固部、非凝固部ともに著しく減弱していた。

乳頭上半周凝固部および非凝固部に対応するように37エレメントを上下の2群に分割し、それぞれの群における加算波形を検討した。1次核成分波形においては上半周凝固後も凝固部と非凝固部との間で振幅に差はみられなかった。2次核成分は凝固後では凝固前に比し、凝固部と非凝固部の両方において減弱し、また非凝固部に比し凝固部においてより著しく減弱していた(図12)。

図13に頂点潜時を示す。頂点潜時は1次核成分、2次核成分ともに非凝固部に比し凝固部において延長していた。

図14に1次核成分および2次核成分の振幅(それぞれP1-N2およびN1-P2)の非凝固部に対する凝固部の振幅比(凝固部/非凝固部)を示す。1次核成分の振幅には凝固部と非凝固部とで差がなく、振幅比は2匹のネコそれぞれにおいて99.2%、95.8%であったが、2次核成分では凝固部の応答は非凝固部の

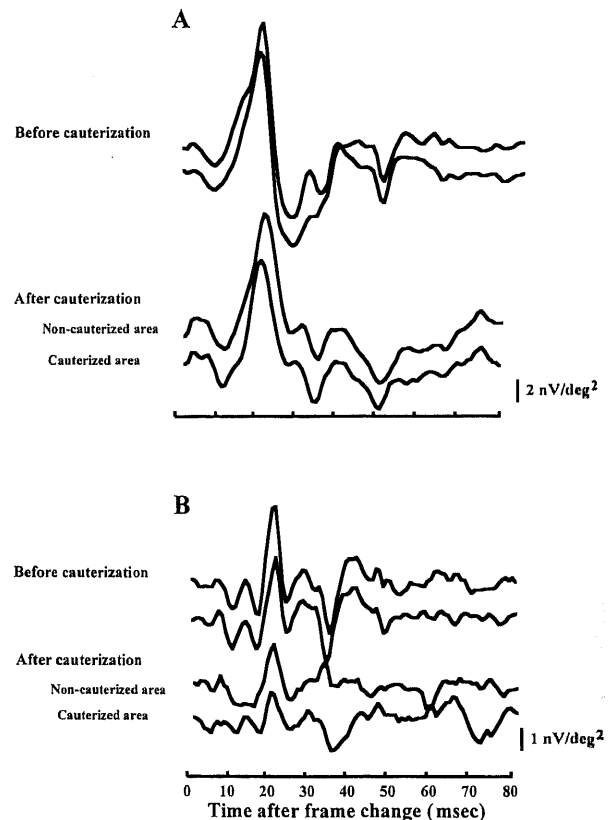


Fig. 12. The averaged MERG waveforms of 1st-order kernel (A) and 2nd-order kernel (B) after upper hemi-circumferential peripapillary cauterization. The upper and lower traces in each paired waveforms show, respectively, the responses from the lower half of the retina (not cauterized) and the upper half of the retina (cauterized).

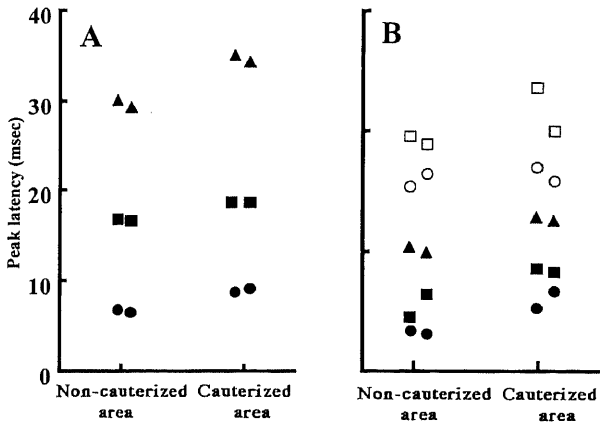


Fig. 13. The peak latencies of N1 (●), P1 (■), N2 (▲) of the 1st-order kernel (A) and P1 (●), N1 (■), P2 (▲), N2 (○), P3 (□) of the 2nd-order kernel (B) from the non-cauterized area and the cauterized area 120 days after cauterization.

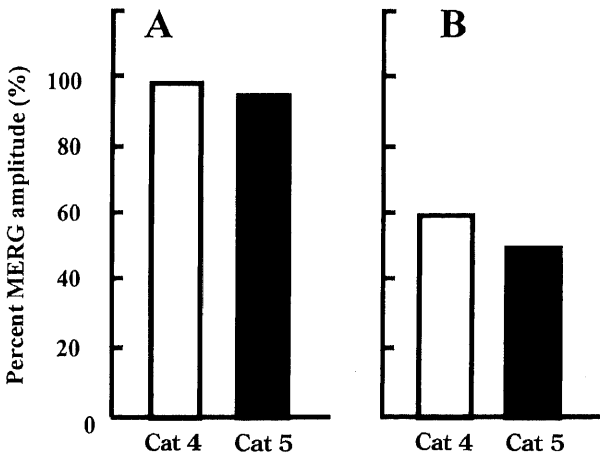


Fig. 14. Percentage amplitudes of the 1st-order kernel (A) and 2nd-order kernel (B) at the cauterized area to those at the non-cauterized area in cat 4 (□) and cat 5 (■), that underwent upper hemi-circumferential peripapillary cauterization.

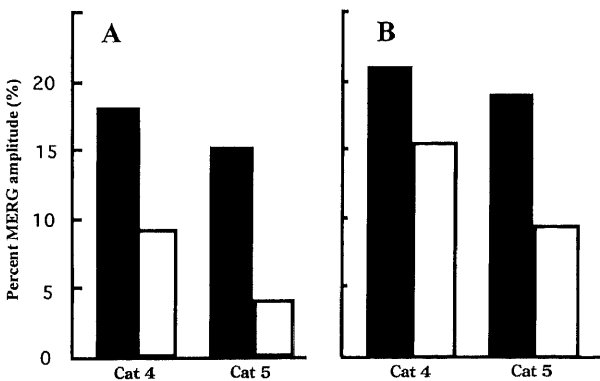


Fig. 15. Percentage amplitudes of the 2nd-order kernel responses to the 1st-order kernel responses from the cauterized area (A) and non-cauterized area (B) of the two cats (cat 4, 5), that underwent upper hemi-circumferential peripapillary cauterization. ■, Before cauterization; □, After cauterization.

応答に比べて減弱しており、振幅比は2匹のネコにおいてそれぞれ60.2%, 50.5%であった。

図15に凝固部および非凝固部におけるそれぞれの1次核成分の振幅に対する2次核成分の振幅比、すなわち $(N1-P2) / (P1-N2)$ を示す。凝固部では凝固後2次核成分が著しく減弱していたので、 $(N1-P2) / (P1-N2)$ は、2匹のネコそれぞれにおいて凝固前では18.2%, 15.6%であったのに対し、凝固後には9.2%, 4.3%に低下していた。非凝固部でも2次核成分は軽度減弱しており、2匹のネコそれぞれにおいて凝固前では21.3%, 19.2%であったのに対し凝固後では15.3%, 9.6%に低下していた。

考 察

本研究では、視神経乳頭周囲の網膜表層を熱凝固することによって節細胞軸索を破壊した場合、組織学的に節細胞の変性脱落が証明された後に2次核成分が減弱することがわかった。このように何かの操作を施した後にERG成分が減弱するという現象を解釈するには、種々の要因を考慮しなければならない。

まず全身麻酔がMERGにおよぼす影響を考慮しなければならない。しかし本研究では乳頭周囲凝固前にすでに成ネコになっていたネコを用い、ERG記録毎の体重測定でも体重は増加していなかった。そのようなネコに単位体重当たり一定の量の麻酔薬を経時的投与したので、いずれの記録においても麻酔程度は同程度と考えられ、麻酔深度の差異によって2次核成分が特異的に減弱したとは考えがたい。乳頭周囲網膜熱凝固による網膜血管の損傷も考慮されなければならない。もし乳頭周囲熱凝固が網膜血管を著しく損傷していたとすると、神経節細胞層のみならず内顆粒層などにも細胞数の著しい減少が生じなければならないはずであるが、病理学的検索によれば神経節細胞層以外の網膜構造は良好に保たれていた(図4)。したがって網膜に分布する血管への損傷は軽微であったと考えられる。ゆえに、乳頭周囲熱凝固は節細胞軸索および凝固斑直下の限局的な組織損傷のみを惹起しえたと言える。

この手法による選択的節細胞除去は当教室の小又⁵⁷⁾によっても確認されている。彼は本報と全く同様の方法で節細胞萎縮眼を作製してフラッシュERGの変化を調べた。この研究においては組織学的に節細胞の状態を検証するために、1,1'-ジオクタデシル-3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニオンパークロリン酸(1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)、アクリジンオレンジ(acridine orange)による染色法を用いて節細胞を染色し、網膜伸展標本を検討した。その結果凝固前に比べ熱凝固後には節細胞数の著しい減少が証明された。また網膜伸展標本内に僅かに残存した節細胞体内にルシファイエロー(lucifer yellow)を注入して、その形態学的特徴を調べ、以下のように報告している。網膜中心領域(area centralis)において節細胞はほとんど存在せず、主要網膜血管付近で僅かの残存した節細胞および網膜周辺部の節細胞が標識されたが、残存した節細胞は大きな細胞体を有し、樹状突起の部分的な脱落、数珠状の樹状突起、新生したと思われる突起などの形態異常を示し、節細胞変性所見がみられたという。フラッシュERGでは凝固後において凝固前と同様の反応がみられたが、パターンERGでは視神経乳頭周囲熱凝固12週以降急激に減少したと報告している。以上から、本研究で明らかになったMERG 2次核成分の減弱は麻酔深度や網膜血管損傷では説明できない。すなわち、節細胞萎縮がその基盤にあると考えられ

る。

MERGは、1992年にSutter¹³⁾¹⁴⁾によって開発された。MERGでは、刺激ディスプレイ上に多数に分割された視覚刺激をバイナリー-M系列によりランダムに点灯する刺激を行い、網膜の多局所の応答を同時に得ることができる。さらに応答を数学的理論を用いて解析することによって網膜の機能を評価することができる。得られた応答は、1次核成分(1st-order kernel)と2次核成分(2nd-order kernel)に分離され、1次核成分の解析では、明時の反応と暗時の反応との差分を計算する。2次核成分の解析では2つの連続する刺激のうち前後の刺激の異なる場合の和から前後の刺激の同じ場合の和の差分を計算する。すなわち、2次核成分は、明→暗と暗→明の和から明→明と暗→暗の和を差し引いた差分を計算する。近年、この差分(2次核成分)が網膜電図の非線形成分であり節細胞活動を表すという説がMERGの開発者によって唱えられた¹³⁾¹⁴⁾。これが正しいとすると、MERGの1次核成分は従来の全視野刺激ERGのごとく、視細胞層から内顆粒層までの活動、一方、2次核成分はそれよりも内層の節細胞層と神経線維層の活動を反映することになり網膜疾患の病態解明に極めて有用であると結論される。それゆえ、MERGは網膜疾患^{28)~46)}・視神経疾患^{47)~52)}で調べられており、1次核成分は網膜外層の機能を、2次核成分は網膜内層の機能を反映するという開発者の説を追認している。さらに開発者らは、2次核成分を視神経乳頭成分(optic nerve head component)と網膜成分(retinal component)にわけることができるとまで報告している⁵⁰⁾。

Kondoら²⁸⁾は実際に網膜疾患の症例において、従来の局所ERGとMERGを比較した。すなわち、網膜中心動脈分枝閉塞症の下耳側動脈の閉塞の症例において、視野検査では上方視野欠損がみられ、上下に2分割された局所ERGにおいては上方視野の波形が減弱し、MERGにおいても障害を受けた網膜に一致し上半視野の1次核成分の応答密度が低下していた。

視神経疾患においてもMERGは応用されている。里見ら⁴⁷⁾によると、緑内障において1次核成分の振幅および潜時のいずれも視野と相関せず、2次核成分は統計学的な検討が可能なのほどの振幅が得られなかったという。長谷川ら⁴⁸⁾も緑内障においてパターンERGとMERGを比較し、2次核成分の起源について検討したが、2次核成分は極めて微小なため節細胞の機能を反映することの証明は困難と述べた。このように、2次核成分は微小なので、その起源について臨床的に解明することは容易ではない。一方、Chanら⁵⁰⁾は緑内障においてMERGを詳細に研究した。すなわち緑内障において1次核成分および2次核成分の振幅は減弱しており、特に網膜周辺部より黄斑部において著しく減弱していると報告した。Hasegawaら⁴⁹⁾は、網膜内層が障害される疾患の一つである網膜動脈分枝閉塞症の症例においてMERGの変化を報告した。すなわち、低灌流領域において1次核成分の振幅は減弱し、N1, P1頂点潜時は延長し、2次核成分の振幅は著しく減弱したと報告した。彼らは網膜内層が障害される疾患において、1次核成分よりも2次核成分の方がより強い影響を受けていることから、2次核成分の網膜内層由来を提唱した。一方、Yoshiiら²⁷⁾は、Sutterら¹³⁾¹⁴⁾の数学的理論で網膜多局所の機能を層別にまで言及して評価できるのかという疑問を持ったため、正常眼において2次核成分を研究したところ、2次核成分の応答密度と節細胞の空間的分布にあまり関連がないという。要するに、正常眼あるいは疾患眼を用い

た2次核成分の由来の研究においては、未だに統一の見解は得られていない。

しかし、MERGの2次核成分の由来を実験的に検証した研究もある。すなわちFrishmanら⁵³⁾は、線維柱帯をレーザー光で破壊し実験的に緑内障を惹き起こしたサル眼(laser-induced experimental glaucoma)ならびにテトロドトキシン(tetrodotoxin, TTX)およびN-メチル-D-アスパラギン酸(n-methyl D aspartate, NMDA)にて網膜内層の機能を抑制したサル眼においてMERGを検討した。網膜内層の機能が抑制されたと考えられるこれらの状態において1次核成分および2次核成分が減弱していた。1次核成分に比べ2次核成分の減弱が著しく、とくに中心部において減弱が著明であったという。Hoodら⁵⁴⁾も、サル眼の硝子体中にTTXを注入しMERGを測定したが、Frishmanらと同様の結果を示した。Horiguchiら⁵⁵⁾はウサギの硝子体中にグルタミン酸アナログである2-アミノ-4-ホスホノ酪酸(2-amino-4-phosphono-butyric acid, APB)およびシス-2,3-ピペリジンジカルボン酸(cis-2,3-piperidine dicarboxylic acid, PDA)や神経伝達阻害物質であるグリシンおよびγ-アミノ酪酸(γ-aminobutyric acid, GABA)を注入し2次核成分の起源について研究した。APB, PDAによって双極細胞由来である明所視ERGが減弱した。また1次核成分も減弱した。グリシン, GABAによって網膜内層に存在するアマクリン細胞由来である明所視ERGの律動様小波は減弱した。また2次核成分も著しく減弱し、1次核成分も若干減弱した。すなわち、1次核成分と2次核成分は関連して変化し、1次核成分は網膜外層、2次核成分は網膜内層に由来するという。

しかしながら節細胞が2次核成分に関与していることを証明する動物実験は全くない。それゆえ、本研究では2次核成分の起源を研究する目的でネコの視神経乳頭周囲の網膜に熱凝固を施行して節細胞を萎縮させ、MERGの変化と病理学的所見との関連を調べた。

まず、本研究で採用した節細胞を萎縮させる手法がもっぱら節細胞のみを脱落させたということは、摘出した熱凝固眼のHE標本で明らかである(図4)。正常ネコ眼における2次核成分は中心部よりほぼ均一に同心円状に広がる分布を示し(図5)、ネコ網膜の節細胞分布⁵⁶⁾によく対応する。視神経乳頭周囲全層凝固群において1次核成分振幅は保たれていたが、2次核成分振幅は減弱していた。特に網膜中心部において減弱は著明であった。網膜中心部において2次核成分が最も影響を受けることは、前述したChanら⁵⁰⁾、Frishmanら⁵³⁾の結果と一致しており、内層障害の特徴といえる。視神経乳頭周囲熱凝固後に、網膜中心部の節細胞が著しく減少していたという小又⁵⁷⁾の組織学的報告も節細胞の障害と2次核成分の減弱に密接な関係があることを強く示唆する。頂点潜時に関しては、凝固後に1次核成分および2次核成分において延長している例もあったが、有意差はなかった。MERGの刺激は陰極線管ディスプレイ上に表示されるので明暗の時間的な位置は刺激エレメント毎に異なる。それゆえに微小な頂点潜時の変化が現れにくい可能性がある。

視神経乳頭周囲上半凝固群ではMERG振幅は凝固部において減弱し、さらに非凝固部においても減弱していた。非凝固部においても減弱していた理由として、視神経乳頭周囲上半のみを厳密に凝固することは困難であり37エレメントMERG波形を上下に2分割し検討した際実際には凝固された位からの応答が非凝固部に一部混入した可能性がある。

本研究ではネコ節細胞萎縮眼において2次核成分が減弱したことより、2次核成分の起源として節細胞の関与が強く示唆された。

結 論

MERGの2次核成分の起源を明らかにすることを目的として、ネコにおいて視神経乳頭周囲網膜の熱凝固が網膜の組織学的所見とMERGに与える影響を調べ、下記の結果を得た。

- 1) 視神経乳頭周囲網膜熱凝固16ヵ月後に節細胞は著しく減少していた。
- 2) 視神経乳頭全周凝固眼において、凝固前および非凝固対照眼に比べて、凝固後12ヵ月後の37エレメントのMERG応答および加算平均波形の1次核成分に変化はみられなかったが、2次核成分は減弱した。
- 3) 視神経乳頭全周凝固群において、凝固後12ヵ月後の37エレメントの応答アレイを同心円状に分割し検討したところ、中心部において2次核成分が最も減弱していた。
- 4) 視神経乳頭全周凝固群において、1次核成分、2次核成分の頂点潜時は凝固前に比べ、凝固後では有意差をもって変化していなかった。
- 5) 視神経乳頭上半周凝固群において、凝固前および非凝固部に比べ、凝固部において2次核成分の減弱が顕著であった。
- 6) 視神経乳頭上半周凝固群において、非凝固部に比べ凝固部の1次核成分の頂点潜時、および2次核成分の頂点潜時は延長していた。

本研究により2次核成分の起源に節細胞が関与することが明らかになった。

謝 辞

稿を終えるに望み、御指導・御校閲を賜りました恩師河崎一夫教授に深く感謝の意を表します。また本研究の遂行に多大な御指導・御協力を賜りました白尾裕助教授、瀬川要司博士に深謝致します。

なお本論文の一部は第67回日本中部眼科学会(2001, 金沢)、第49回視覚電気生理学学会(2001, 鳥羽)において発表した。

文 献

- 1) Baron WS, Boynton RM, Hammon RM. Component analysis of the foveal local electroretinogram elicited with sinusoidal flicker. *Vision Res* 19: 479-490, 1979
- 2) Biersdorf WR. Temporal factors in the foveal ERG. *Curr Eye Res* 1: 717-720, 1982
- 3) Biersdorf WR, Diller DA. Local electroretinogram in macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 68: 296-303, 1969
- 4) Birch DG, Jost BF, Fish GA. Focal electroretinogram in fellow eyes of old patients with idiopathic macular holes. *Arch Ophthalmol* 106: 1558-1563, 1988
- 5) Birch DG, Fish GA. Focal cone electroretinograms: Aging and macular disease. *Doc Ophthalmol* 69: 211-220, 1988
- 6) Miyake Y, Awaya S. Stimulus deprivation amblyopia. Stimulus recording of local macular electroretinogram and visual evoked response. *Arch Ophthalmol* 102: 998-1003, 1984
- 7) Miyake Y, Shiroyama N, Ota I, Horiguchi M. Oscillatory potentials in electroretinograms of human macular region. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 1631-1635, 1988
- 8) Miyake Y, Shiroyama N, Ota I, Horiguchi M. Local

macular electrographic responses in idiopathic central serous chorioretinopathy. *Am J Ophthalmol* 106: 546-550, 1988

- 9) Miyake Y, Shiroyama N, Horiguchi M. Bull's eye maculopathy and negative electroretinogram. *Retina* 9: 210-215, 1989
- 10) Miyake Y, Shiroyama N, Horiguchi M, Ota I. Asymmetry of focal ERG in human macular region. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1743-1749, 1989
- 11) Miyake Y, Ichikawa K, Shiose Y, Kawase Y. Hereditary macular dystrophy without visible fundus abnormality. *Am J Ophthalmol* 108: 292-299, 1989
- 12) Miyake Y. Layer-by-layer analysis of macular disease with objectively measured visual function. *Jpn J Ophthalmol* 34: 225-238, 1990
- 13) Sutter EE. The fast m-transform: a fast computation of cross-correlation with binary m-sequences. *SIAM J Compt* 20: 686-694, 1991
- 14) Sutter EE. A deterministic approach to nonlinear systems analysis. In R B Pinter, B Nabet (eds) *Nonlinear vision*. 1st ed, p171-219, CRC Press, Cleveland OH, 1992
- 15) Cursiefen C, Korth M, Horn FK. The negative response of the flash electroretinogram in glaucoma. *Doc Ophthalmol* 103: 1-12, 2001
- 16) Drasdo N, Aldebasi YH, Chiti Z, Mortlock KE, Morgan JE, North RV. The s-cone PHNR and pattern ERG in primary open angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 1266-1272, 2001
- 17) Viswanathan S, Frishman LJ, Robson JG, Walters JW. The photopic negative response of the flash electroretinogram in primary open angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 514-522, 2001
- 18) Colotto A, Falsini B, Salgarello T, Iarossi G, Galan ME, Scullica L. Photopic negative response of the human ERG: losses associated with glaucomatous damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:2205-2211, 2001
- 19) 青柳康二, 木村保孝, 磯野博明, 秋山英雄, 菅原隆博. 多局所網膜電図の再現性および波形分析. *日眼会誌* 102: 340-347, 1998
- 20) 近藤峰生, 三宅養三, 堀口正之, 鈴木 聡, 伊藤逸毅, 谷川篤宏. 正常者における多局所網膜電図の応答密度の検討. *日眼会誌* 100: 810-816, 1996
- 21) 近藤峰生, 堀口正之, 三宅養三, 鈴木 聡, 谷川篤宏. 高頻度ランダム光刺激が及ぼす影響について. *眼紀* 47: 531-535, 1996
- 22) 長友顕子, 丸岩 太, 直井信久, 澤田 惇. 多局所網膜電図による正常眼の解析. *日眼会誌* 100: 363-368, 1996
- 23) Vaegan G, Sanderson R. Absence of ganglion cell subcomponent in multifocal luminance electroretinograms. *Aust N Z J Ophthalmol* 25: 87-90, 1997
- 24) Kondo M, Miyake Y, Horiguchi M, Suzuki S, Tanikawa A. Recording multifocal electroretinogram on and off responses in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 574-580, 1998
- 25) Yoshii M, Yanashima K, Wakaguri T, Sakemi F, Kikuchi Y, Suzuki S. A basic investigation of multifocal electroretinogram: reproducibility and effect of luminance. *Jpn J Ophthalmol* 44:

- 122-127, 2000
- 26) Nabeshima T. The effects of aging on the multifocal electroretinogram. *Jpn J Ophthalmol* 45: 114-115, 2001
- 27) Yoshii M, Yanashima K, Wada H, Sakemi F, Enoki T, Okisaka S. Analysis of second-order response components of multifocal electroretinograms elicited from normal subjects. *Jpn J Ophthalmol* 45: 247-251, 2001
- 28) Kondo M, Miyake Y, Horiguchi M, Suzuki S, Tanikawa A. Clinical evaluation of multifocal electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 2146-2150, 1995
- 29) Kawabata H, Adachi-Usami E. Multifocal electroretinogram in myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 2844-2851, 1997
- 30) Huang H, Yamazaki H, Kawabata H, Ninomiya H, Adachi-Usami E. Multifocal electroretinogram in multiple evanescent white dot syndrome. *Doc Ophthalmol* 92: 301-309, 1997
- 31) Yoshii M, Murakami A, Fujii K, Saga M, Mizukawa A, Itoh J, Okisaka S, Yanashima K, Oguchi Y. Visual function in retinitis pigmentosa related to a codon 15 rhodopsin in gene mutation. *Ophthalmic Res* 30: 1-10, 1998
- 32) Seelinger MW, Kretschmann U, Zrenner E. Multifocal electroretinography in retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* 125: 214-226, 1998
- 33) Ying J, Kishi S, Aoyagi K. Assessment of macular function by multifocal electroretinogram before and after macular hole surgery. *Br J Ophthalmol* 83: 420-424, 1999
- 34) Kretschmann U, Seelinger MW, Usui T, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E. Multifocal electroretinography in patients with Stargardt's macular dystrophy. *Br J Ophthalmol* 82: 267-275, 1998
- 35) Kretschmann U, Seelinger MW, Ruether K, Usui T, Zrenner E. Spatial cone activity distribution in disease of the posterior pole determined by multifocal electroretinography. *Vision Res* 38: 3817-3828, 1998
- 36) Chan HL, Brown B. Investigation of retinitis pigmentosa using the multifocal electroretinogram. *Ophthalmic Physiol Opt* 18: 335-350, 1998
- 37) 松野員寿, 吉井 大, 沖坂重邦, 梁島謙次. 多局所網膜電図による傍中心暗点の検出. *日眼会誌* 102: 545-550, 1998
- 38) Marmor MF, Tan F. Central serous chorioretinopathy: bilateral multifocal electroretinographic abnormalities. *Arch Ophthalmol* 117: 184-188, 1999
- 39) Fortune B, Schneck ME, Adams AJ. Multifocal electroretinogram delays reveal local retinal dysfunction in early diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 2638-2651, 1999
- 40) Kondo M, Miyake Y, Tanikawa A, Suzuki S, Horiguchi M, Terasaki H. Multifocal ERG findings in complete type congenital stationary night blindness. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 1342-1348, 2000
- 41) Huang S, Wu D. The multifocal electroretinogram in age related maculopathies. *Doc ophthalmol* 101: 115-124, 2000
- 42) Chappelov AV, Marmor MF. Multifocal electroretinogram abnormalities persist following resolution of central serous chorioretinopathy. *Arch Ophthalmol* 118: 1211-1215, 2000
- 43) Oh KT, Boldt HC. Evaluation of patient with visual field defects following macular hole surgery using multifocal electroretinography. *Retina* 20: 238-243, 2000
- 44) Shimada Y, Li Y, Bearnse MA, Sutter EE, Fung W. Assessment of early retinal changes in diabetes using a new multifocal ERG protocol. *Br J Ophthalmol* 85: 414-419, 2001
- 45) Li J, Tso MO, Lam TT. Reduced amplitude and delayed latency in foveal response of multifocal electroretinogram in early age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 85: 287-290, 2001
- 46) Hasegawa S, Ohshima A, Hayakawa Y, Takagi M, Abe H. Multifocal electroretinograms in patients with branch retinal artery occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 298-304, 2001
- 47) 里見あずさ, 佐野信昭, 川端秀仁, 足立恵美子. 緑内障における多局所網膜電図の検討. *眼紀* 48: 583-587, 1997
- 48) 長谷川茂, 阿部春樹. 視神経疾患における Pattern ERG と VERIS. *眼科* 39: 1071-1080, 1997
- 49) 大出尚郎. VERIS と神経眼科. *眼科* 39: 1051-1056, 1997
- 50) Chan HL, Brown B. Multifocal ERG changes in glaucoma. *Ophthalmic Physiol Opt* 19: 306-316, 1999
- 51) Hood DC, Greenstein VG. An attempt to detect glaucomatous damage to the inner retina with the multifocal ERG. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 1570-1579, 2000
- 52) Fortune B, Johnson CA, Cioffi GA. The topographic relationship between multifocal electroretinographic and behavioral perimetric measures of function in glaucoma. *Optom Vis Sci* 78: 206-214, 2001
- 53) Frishman LJ, Saszik S, Harwerth RS, Viswanathan S, Li Y, Smith EL, Robson JG, Barnes G. Effects of experimental glaucoma in macaques on the multifocal ERG. *Doc Ophthalmol* 100: 241-245, 2000
- 54) Hood DC, Frishman LJ, Viswanathan S, Robson JG, Ahmed J. Evidence for a ganglion cell contribution to the primate electroretinogram (ERG): effects of TTX on the multifocal ERG in macaque. *Vis Neurosci* 16: 411-416, 1999
- 55) Horiguchi M, Suzuki S, Kondo M, Miyake Y. Effect of glutamate analogues and inhibitory neurotransmitters on the electroretinograms elicited by random sequence stimuli in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 2844-2851, 1998
- 56) Hood DC, Bearnse MA, Sutter EE, Viswanathan S, Frishman LJ. The optic nerve head component of monkey's (Macaca mulatta) multifocal electroretinogram (mERG). *Vision Res* 41: 2029-2041, 2001
- 57) 小又美樹. パターン反転刺激による網膜電図の起源に関する研究: 網膜神経節細胞軸索障害の影響. *十全医会誌* 104: 703-718, 1995
- 58) Stanford LR, Sherman SM. Structure/function relationships of retinal ganglion cells in the cats. *Brain Res* 297: 381-386, 1989

Study on the Origin of 2nd-order kernel of Multifocal Electroretinogram. Megumi Kamiyama, Department of Ophthalmology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa, 920-8640 — J. Juzen Med Soc., 54 — 65 (2002)

Key words multifocal electroretinogram, retinal ganglion cell, intraocular diathermy, 1st-order kernel, 2nd-order kernel

Abstract

The purpose of this study is to investigate the origin of the 2nd-order kernel of the MERG in the cat. After full-circumferential peripapillary cauterization, most of the ganglion cells were lost. The changes of MERG after the full-circumferential peripapillary cauterization and upper hem-circumferential peripapillary cauterization, were studied. In eyes that underwent full-circumferential peripapillary cauterization the ratio of the amplitude of the 2nd-order kernel to that of the 1st-order kernel decreased, particularly, in the central area. In eyes that underwent the upper hemi-circumferential peripapillary cauterization, the peak latency of the 2nd-order kernel was prolonged in the cauterized area. The ratio of the amplitude of the 2nd-order kernel in the cauterized area to that in non-cauterized area decreased. These results indicate that the ganglion cells are involved in the generation of the 2nd-order kernel of the MERG.