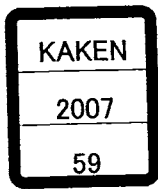


# In vivo imaging and quantitative evaluation of rat retinal ganglion cells and retinal nerve fiber layer by scanning laser ophthalmoscopy

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-05-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Higashide, Tomomi メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24517/00050729">https://doi.org/10.24517/00050729</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.





# 神経保護評価に向けた 網膜神経節細胞の細胞体と軸索の 生体内定量的観察法の確立

17591825

平成17年度～平成18年度科学研究費補助金

(基盤研究(C)) 研究成果報告書

金沢大学附属図書館



0800-16247-1

平成19年3月

研究代表者 東出朋巳

金沢大学医学部附属病院講師

## はしがき

最近の日本緑内障学会による疫学調査（多治見スタディ）によると、緑内障の有病率は40歳以上で約5%に達し、推定患者数は約300万人とされている。しかも、日本人では正常眼圧緑内障が7割を占め、治療法として唯一エビデンスのある眼圧下降療法によって進行が阻止できない症例が少なくない。そこで、眼圧下降療法を補完するものとして神経保護療法が期待されているが、いまだに確立されていない。緑内障では、網膜神経節細胞の軸索である網膜神経線維が視神経乳頭部で障害を受けることによって、網膜神経節細胞死が起こるとされている。したがって、従来から神経保護のターゲットとされてきた細胞体よりも、軸索である網膜神経線維を保護することがより効果的である可能性がある。

そこで、我々は本研究において視神経傷害モデルとして頻用されるラットを用いて網膜神経節細胞の細胞体と軸索を生体内で同時に定量的に観察する方法を確立することを試みた。この目的のために我々は走査レーザー検眼鏡（SLO）に着目した。SLOは、眼科臨床に用いられている装置で、緑内障による網膜神経線維の脱落を観察するのに非常に有用である。しかも、この装置を用いれば、蛍光染色した網膜神経節細胞の細胞体を同時に観察することが原理的に可能である。

本研究によって以下のような結果が得られた。

### SLOによるラット網膜神経線維層（RNFL）の観察と定量性の検討

Brown NorwayラットのRNFLは、SLOによって明瞭に観察された。SLOの共焦点口径を最小としてRNFLが観察される屈折値の幅（ $\Delta F$ ）を決定した。視神経挫滅モデルでは、挫滅後2週目から $\Delta F$ は有意に減少し、虚血再灌流モデルでは虚血後1週目から $\Delta F$ は有意に減少した。対照眼の $\Delta F$ は不変であった。また、両モデルにおいてSLO撮影後に網膜組織切片を作成しRNFLの厚み（NFLT）を定量したところ、SLOでの $\Delta F$ と網膜組織切片でのNFLTは有意に相関した。

### SLOによるラット網膜神経節細胞体（RGC）の観察と定量性の検討

上丘に注入されたDiA（4-(4-(dihexadecylamino) styryl)-N-methylpyridinium iodine）によって逆行染色されたRGCは、SLO（フルオレセイン蛍光眼底造影用フィルター使用）によって明瞭に観察された。SLOにて蛍光(+)細胞数を経時的に計測したところ、視神経挫滅後1週目から有意に細胞数は減少した。視神経挫滅前のSLO画像を白黒反転し、挫滅後のSLO画像と重ね合わせることによって新たに生じた蛍光点は、isolec tin B4蛍光染色によってミクログリアに一致することが判明した。したがって、視神経挫滅後にSLOにおいて新たに生じた蛍光点を差し引いて蛍光(+)細胞数を定量したところ、網膜伸展標本でのRGC数とよく一致した。

以上の結果より、SLOはラットRGCの細胞体および軸索（RNFL）を生体内で定量的に観察するのに有用であることが明らかとなった。

## 研究組織

研究代表者：東出朋巳（金沢大学医学部附属病院講師）

研究分担者：大久保真司（金沢大学医学部附属病院助手）

杉山和久（金沢大学医学系研究科教授）

交付決定額（配分額）（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	1,900,000	0	1,900,000
平成18年度	1,600,000	0	1,600,000
総計	3,500,000	0	3,500,000

## 研究発表

### （1）学会誌等

#### A. 欧文

1. Tomomi Higashide, Mami Takahashi, Akira Kobayashi, Shinji Ohkubo, Mayumi Sakurai, Yutaka Shirao, Toshihiro Tamura, Kazuhisa Sugiyama. Endophthalmitis caused by *Enterococcus mundtii*. *Journal of Clinical Microbiology* 43(3):1475-1476, 2005
2. Tomomi Higashide, Takashi Wada, Mayumi Sakurai, Hitoshi Yokoyama, Kazuhisa Sugiyama. Macular Abnormalities and optic disk anomaly associated with a new PAX2 missense mutation. *American Journal of Ophthalmology* 139(1):203-206, 2005.
3. Tomomi Higashide, Shigeki Tagawa, Kazuhisa Sugiyama. Intraoperative Healon5 injection into blebs for small conjunctival breaks created during trabeculectomy. *Journal of Cataract Refract Surgery* 31(7):1279-1282, 2005.
4. Naoki Mori, Yasutsugu Ishiba, Shinya Kubota, Akira Kobayashi, Tomomi Higashide, Margaret J. McLaren, George Inana. Truncation mutation in HRG4 (UNC119) leads to mitochondrial ANT-1-mediated photoreceptor synaptic and retinal degeneration by apoptosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47(4):1281-1292, 2006.
5. Ichiro Kawaguchi, Tomomi Higashide, Shinji Ohkubo, Hisashi Takeda, Kazuhisa Sugiyama. In vivo imaging and quantitative evaluation of the rat

- retinal nerve fiber layer using scanning laser ophthalmoscopy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47(7):2911-2916, 2006.
6. Tomomi Higashide, Ichiro Kawaguchi, Shinji Ohkubo, Hisashi Takeda, Kazuhisa Sugiyama. In vivo imaging and counting of rat retinal ganglion cells using a scanning laser ophthalmoscope. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47(7):2943-2950, 2006.
  7. Ari Maeda, Sousuke Tsujiya, Tomomi Higashide, Kazunori Toida, Takeshi Todo, Tomoko Ueyama, Hitoshi Okamura, Kazuhisa Sugiyama. Circadian intraocular pressure rhythm is generated by clock genes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47(9):4050-4052, 2006.
  8. Yasutsugu Ishiba, Tomomi Higashide, Naoki Mori, Akira Kobayashi, Shinya Kubota, Margaret J. McLaren, Hiromasa Satoh, Fulton Wong, George Inana. Targeted inactivation of synaptic HRG4 (UNC119) causes dysfunction in the distal photoreceptor and slow retinal degeneration, revealing a new function. *Experimental Eye Research* 84(3):473-485, 2007.

## (2) 口頭発表

1. 東出朋巳, 川口一朗, 大久保真司, 武田 久, 杉山和久. 走査型レーザー検眼鏡によるラット網膜神経節細胞の生体内定量的評価の試み (一般口演). 第109回日本眼科学会総会 平成17年3月24日, 京都市.
2. Yasutsugu Ishiba, Naiki Mori, Shinya Kubota, Akira Kobayashi, Tomomi Higashide, Margaret J. McLaren, George Inana. Mutation in HRG4 (UNC119) leads to mitochondrial ANT1-mediated apoptosis and retinal degeneration (Poster). 77th Association for Research in Vision and Ophthalmology. May 3<sup>rd</sup>, 2005, Fort Lauderdale, Florida, USA
3. 川口一朗, 東出朋巳, 大久保真司, 武田 久, 杉山和久. 走査型レーザー検眼鏡によるラット網膜神経線維層および網膜神経節細胞の定量的生体内同時評価の試み (一般口演). 第16回日本緑内障学会 平成17年9月16日, 熊本市

4. 杉山和久, 東出朋巳, 大久保真司, 川口一朗, 武田 久. 緑内障の病態解明への挑戦—視神経の3次元的血管構築、網膜神経節細胞の生体観察と定量— 神経科学における三次元構造解析～顕微鏡的アプローチ～. 第50回日本顕微鏡学会シンポジウム 平成17年11月1日, 福岡県春日市
5. 東出朋巳. 視神経損傷と網膜神経節細胞、グリア細胞の生体内動態の観察 —損傷中枢神経の再生— (シンポジスト). 平成17年度金沢大学重点研究経費シンポジウム 平成18年2月16日, 金沢市
6. 東出朋巳, 川口一朗, 大久保真司, 武田 久, 杉山和久. 視神経挫滅後のラット網膜神経節細胞とミクログリアのSLOによる生体内識別の可能性 (一般講演). 第110回日本眼科学会総会 平成18年4月14日, 大阪市
7. Ichiro Kawaguchi, Tomomi Higashide, Shinji Ohkubo, Hisashi Takeda, Kazuhisa Sugiyama. In vivo imaging and quantitative evaluation of rat retinal nerve fiber layer and retinal ganglion cells using a scanning laser ophthalmoscope (Poster). 78th Association for Research in Vision and Ophthalmology. May 1<sup>st</sup>, 2006, Fort Lauderdale, Florida, USA
8. Yasutsugu Ishiba, Naiki Mori, Shinya Kubota, Akira Kobayashi, Tomomi Higashide, Margaret J. McLaren, George Inana. Changes in retinal synaptic proteins in the knock-out model of HRG4 (UNC119) (Poster). 78th Association for Research in Vision and Ophthalmology. May 3<sup>rd</sup>, 2006, Fort Lauderdale, Florida, USA
9. Kazuhisa Sugiyama, Ari Maeda, Sousuke Tsujiya, Tomomi Higashide, Kazunori Toida, Hitashi Okamura. Circadian intraocular pressure rhythm is generated by clock genes. Glaucoma Society International Congress of Ophthalmology June 28<sup>th</sup>-July 1<sup>st</sup>, 2006, Vancouver, Canada
10. 前田 有, 辻屋壮介, 東出朋巳, 樋田一徳, 岡村 均, 杉山和久. 眼圧日内変動と時計遺伝子 (Cryptochrome) の関係に関する研究 (一般口演). 第17回日本緑内障学会 平成18年9月9日, 神戸市

11. Mami Takahashi, Tomomi Higashide, Kazuhisa Sugiyama. Discrepancy of similarity in IOP response between fellow eyes in on e-eye trial vs. both-eye treatment (Poster). 2006 AAO & APAO Joint Meeting. Nov. 12<sup>th</sup>, 2006, Las Vegas, USA
12. Tomomi Higashide, Mayumi Sakurai, Mami Takahashi, Kazuhisa Sugiyama. Genetic polymorphisms in prostaglandin F2 $\alpha$  receptor may predict response to latanoprost (Poster). 2006 AAO & AAO Joint Meeting. Nov. 13<sup>th</sup>, 2006, Las Vegas, USA

(3) 出版物 (なし)

研究成果による工業取得権の出願・取得状況 (なし)