

iPS 網膜における色覚機能再生過程の他覚的モニタリング法の開発に向けた基礎研究

Fundamental Research of Multifocal Electroretinogram in Carp toward the Objective Monitoring of the Retinal Color Function

2151029



研究代表者	中京大学 人工知能高等研究所	所 員	針 本 哲 宏
共同研究者	理化学研究所 BSI・NIJC	特別顧問	白 井 支 朗

〔研究の目的〕

将来、iPS 細胞由来の網膜視細胞や網膜組織の移植によって、組織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は未知である。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動物やヒトの色覚機能を理解・解釈するための網膜電位図に関する基礎研究を実施した。こうした技術は医師の的確な診断など「人間と機械の調和の促進」に貢献するものと考える。

〔網膜電位図と色情報変換機構〕

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、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。ERG はコンタクトレンズ型の角膜電極を用いることでヒト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。また、ランダムな 2 次元、明暗パターン刺激に対する局所的な ERG 応答から相関法を用いて計算される網膜光応答の空間分布は

多局所網膜電位図 (mfERG, multifocal Electroretinogram) と呼ばれ^[1]、他覚的かつ非侵襲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や網膜色素変性症など網膜の異常を発見するために用いられてきた (図 1)。

網膜の構造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



図 1 多局所網膜電位図 (mfERG)

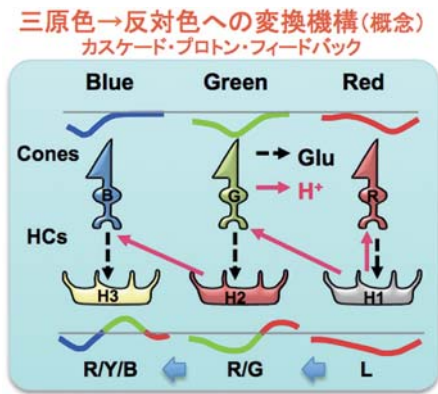


図2 網膜視細胞－水平細胞による色情報変換機構

の錐体視細胞と水平細胞の選択的結合^[2]によって三原色信号から反対色信号に変換されている。ヒトは3色型色覚を有しており、このような色情報変換機構は脊椎動物の種を問わず共通した基本的かつ原理的な機構のひとつであり、コイ・キンギョも同様の色覚機能を有する(図2)。

我々はコイ・キンギョを用いた電気生理・薬理実験を行い、色順応や色変換に関する詳細な研究を網羅的に進めてきた^{[3][4]}。しかしながら、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。

[コイ眼盂 mfERG 計測システム]

コイ網膜から mfERG 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 DLP プロジェクタ (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, EDI, USA) を用いて、コイ眼盂標本 mfERG を取得する計測・解析システムを構築した。

図4に上述の計測システムを用いて取得したコイ眼盂標本における mfERG を示す。実験の結果、コイの mfERG の応答分布は、背側や鼻側、網膜中心部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

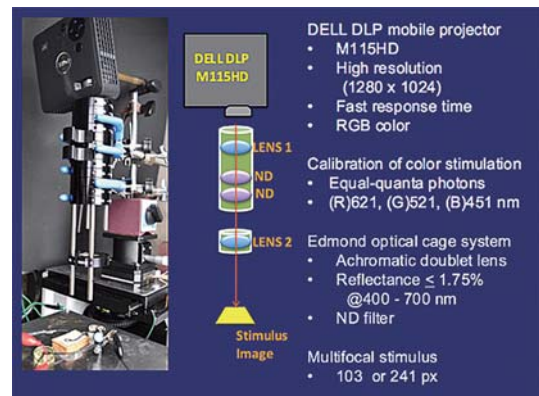


図3 コイ mfERG 計測システム

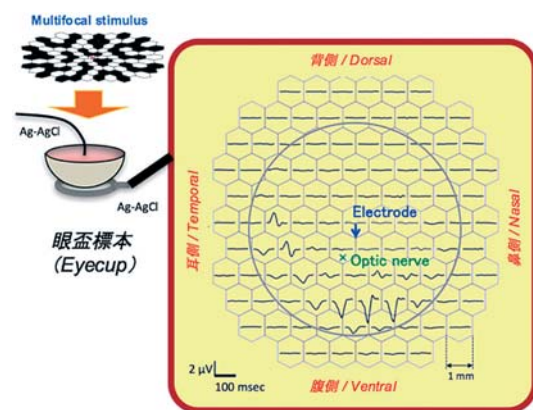


図4 コイ眼盂における mfERG

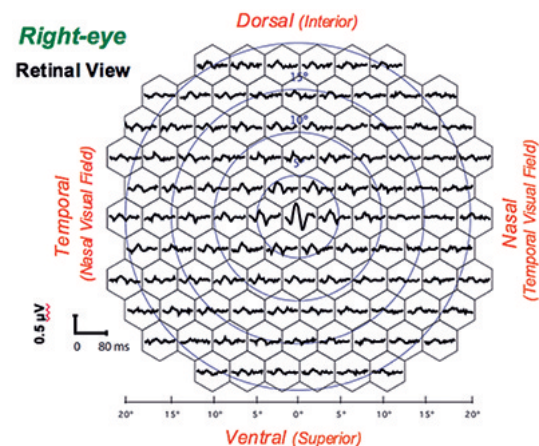


図5 等サイズ刺激によるヒト mfERG

た。また、コイとヒト網膜光応答分布を比較するため、等サイズピクセルの光刺激を用いてヒト mfERG を記録した。図5に示すように mfERG は中心窩にピークを持っており、応答部位に偏りがあったコイの mfERG 分布とは違いがあることを明らかにした。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、このような応答分布はコイ mfERG と一致した^[5]。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。

[コイ眼盃 mfERG の光応答特性]

上述のとおり、コイ・キンギョの網膜外網状層では赤、緑、青の3種の錐体視細胞 (Cones) と水平細胞 (HCs) の選択的結合 (カスケード・フィードバックによって三原色信号から反対色信号に変換されている (図2)。本研究では、色光刺激によるコイ多局所 ERG を計測し、コイ網膜の色光時空間応答特性について調べた。光刺激装置用 DLP プロジェクタの波長は (R) 621, (G) 521, (B) 451 nm であり、約 611, 529, 462 nm にピーク波長を持つコイの各錐体を十分に光刺激できる。赤/黒、緑/黒、青/黒の光刺激パターンを用いて、各錐体のピーク波長で光刺激したときの色光応答特性を記録した。図6に結果を示す^[6]。色によって反応が見られる部位が大きく変わることはなく、ERG の振幅や立ち上がりには色差が見られた。ERG の振幅はほぼ視細胞密度に比例しており、この領域では赤、緑に比べ青錐体の数が少ないと考えられる。また、ERG の陰性波は視細胞由来、陽性波は2次ニューロン由来と考えられており、コイ多局所 ERG の赤色応答の立ち上がりが早い

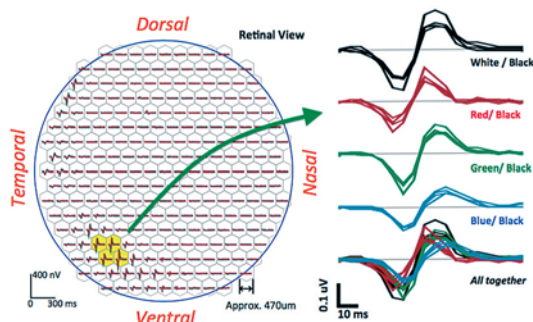


図6 コイ多局所 ERG の RGB 色光応答

のは、網膜視細胞-水平細胞による色情報変換機構 (カスケード・フィードバックが赤色からフィードバックが始まることに起因するものと考えられる。一方ヒト多局所 ERG を図7に示す。ヒト mfERG は中心窩付近の青色の振幅が赤や緑に比べ小さい。これは青錐体は中心窩付近では少ないというヒト網膜の知見と一致する。立ち上がり時間についてはピクセル位置によって異なっていることから、ヒトの色変換機構は複雑な構造を持っていることが予想される。

[今後の研究の方向、課題]

本研究ではコイ ERG の色光応答分布を実験的に調べた。これまで一様であると考えられてきたコイ網膜の色光応答分布は部位に偏りがあることを明らかにした。また、赤錐体、青錐体の立ち上がり時間の違いや、錐体分布に沿った振幅の違いなど、コイ網膜とヒト網膜ではその構造や機能に違いがあることを明らかにした。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。

近年、マウス・ラットに替わる新しいヒト疾患モデル動物であるコイ科小型魚類のゼブラフィッシュを用いた研究が盛んである。ゼブラフィッシュは、全ゲノム配列がヒトと80%の相同性があり、一生が短いため疾患モデルを容易に作成できる。コイ・キンギョは網膜研究に

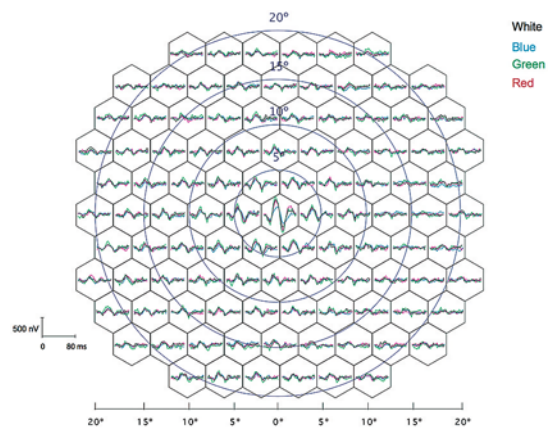


図7 色刺激によるヒト mfERG

において代表的な実験対象であるが、遺伝子改変などの技術は確立されていないため、今後、ゼブラフィッシュを用いた、より詳細な研究に発展させることで、健常な網膜と疾患網膜との比較研究などが展開できるものとする。

【参考文献】

- [1] EE Sutter, "The brain response interface: communication through visually-induced electrical brain responses", J. Microcomputer Applications, 15, 1, 31-45(1992).
- [2] WK Stell et al., "Goldfish retina: functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses", Science, 190, 989-990, Science (1975).
- [3] T. Harimoto, S. Usui et al., "Enlarged gold-tipped silicon microprobe arrays and signal compensation

for multi-site electroretinogram recordings in the isolated carp retina", Biosensors and Bioelectronics, 26, 2368-2375 (2011).

- [4] S. Usui, N.L. Kamiji, T. Harimoto, "Spectral Responses of Horizontal Cells Based on the Proton Feedback Hypothesis", ERM2013, 10, 63, Spain (2013. 10).

【成果の発表，論文等】

- [5] T. Harimoto, N.L. Kamiji, S. Usui, "Evaluation of Retinal Spatial Sensitivity in Cyprinid Fish", The Irigo Conference, P84, Aichi, Japan (2015. 10).
- [6] T. Harimoto, S. Usui, "Multifocal Electroretinogram (mfERG) from the Eyecup Preparation in the Cyprinid Fish", ERM2015, 144, Brighton, U. K. (2015. 10).