

主論文の要旨

Temporal Properties of Cone ERGs of Pikachurin Null Mutant Mouse

〔ピカチュリンノックアウトマウスの錐体フリッカ ERG のベクトル解析〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 眼科学分野

(指導：寺崎 浩子 教授)

小南 太郎

【背景と目的】

網膜機能を評価する方法として網膜電図(electroretinogram, ERG)が知られている。網膜電図は記録条件を変更することにより暗所視に関与する杆体の機能を評価することや明所視に関与する錐体の機能を評価することができる。周期的に光刺激を行い記録されるフリッカ ERG は錐体を評価する手法として広く一般に使用されており、その波形は主に 1 次ニューロンである視細胞と 2 次ニューロンである双極細胞の電位の重なりによって成り立っている。霊長類のフリッカ ERG 波形の解析は、ON 型および OFF 型の双極細胞の電位を遮断する薬物投与による波形の変化を観察することによって行われてきた。すなわち ON 型双極細胞をブロックする薬剤投与による変化分を ON 型双極細胞成分、OFF 型双極細胞をブロックする薬剤投与による変化分を OFF 型双極細胞成分、ON 型・OFF 型双極細胞の両者をブロック後に残った成分を視細胞成分として解析がなされてきた。かつて Kondo et al. は通常の振幅と潜時による解析では解明できなかったこれら 3 つの成分(視細胞、ON 型双極細胞成分、OFF 型双極細胞)の相互作用を、ベクトルを用いる方法を考案し解析した。すなわち抽出した 3 つの成分をフーリエ変換(Fast Fourier Transform, FFT)し、算出した基本周波数成分をベクトルに変換し視覚的に分かりやすく解析する方法を考案した(Invest Ophthalmol Vis Sci 2001)。今回の研究ではこのベクトル解析をマウスに応用し、ON 型双極細胞と視細胞のシナプス形成に障害が生じ ON 型双極細胞の機能が部分的に障害されたピカチュリンノックアウトマウス(Pika^{-/-})のフリッカ ERG における ON 型双極細胞の関与を検討した。

【対象と方法】

野生型(wild type, WT)、Pika^{-/-}、ON 型双極細胞機能欠損モデルマウス(mGluR6 ノックアウトマウス, mGluR6^{-/-})それぞれ 12 匹 12 眼を使用した。本研究では ON 型双極細胞の電位を遮断する薬物投与の代わりに mGluR6^{-/-}を用いた。ERG の記録条件は背景光 40cd/m²、光刺激強度 3cd-s/m²/flash とした。フリッカ ERG を 3.906Hz から 31.250Hz まで 1.953Hz ごとに刺激周波数を変化させて記録した。3 種類のマウスからフリッカ ERG を記録し、各周波数で刺激して得られたフリッカ ERG 波形に対して FFT を行い各刺激周波数に対する基本周波数成分の振幅と位相を抽出した。マウスには OFF 型双極細胞の成分はほとんどないことが知られているので、今回の検討では視細胞と ON 型双極細胞のベクトルを算出した。

まず WT, Pika^{-/-}, mGluR6^{-/-}それぞれの基本周波数成分の振幅と位相とを刺激周波数ごとに比較した。得られた振幅と位相からベクトルを作成し WT, Pika^{-/-}, mGluR6^{-/-}の成分を比較した。WT, Pika^{-/-}のそれぞれのベクトルから mGluR6^{-/-}のベクトルを差し引くことにより WT, Pika^{-/-}の ON 型双極細胞成分のベクトルを抽出した。得られた WT, Pika^{-/-}の ON 型双極細胞成分のベクトルからそれぞれの振幅を計算し刺激周波数ごとに比較した。光刺激を行わずに網膜電図を記録し、得られた反応をノイズとみなした。

【結果】

図 1 に各マウスのフリッカ ERG の代表波形を示す。Pika^{-/-}の振幅は低周波刺激において WT より有意に小さかったが 23.438Hz 以上の刺激では差がなかった。また Pika^{-/-}は mGluR6^{-/-}と比較すると波形は異なるが、いずれの周波数でも振幅に差はなかった。FFT で抽出した各マウスの振幅を各刺激周波数で比較すると Pika^{-/-}の振幅は WT に比較して 3.906Hz-17.578Hz において有意に小さかった。Pika^{-/-}の振幅と mGluR6^{-/-}の振幅との間にはどの刺激周波数においても有意差は無かった。一方、FFT で抽出した各マウスの位相を比較すると Pika^{-/-}は 3.906-11.718Hz の刺激周波数において WT と有意な差があり mGluR6^{-/-}と比較すると 3.906-9.765Hz の周波数で有意差があった (Tukey Kramer Test) (図 2)。

FFT で抽出した振幅と位相からベクトルを作成した。刺激周波数が 5.859, 11.718, 17.578, 23.438Hz でのベクトルの代表例を図 3 に示す。黒点線矢印が WT のベクトルを、赤点線矢印が Pika^{-/-}のベクトルを、青点線矢印が mGluR6^{-/-}のベクトルを、緑実線矢印が WT の ON 型双極細胞成分ベクトル (WT- mGluR6^{-/-}) を、ピンク実線矢印が Pika^{-/-}の ON 型双極細胞成分ベクトルを表し (Pika^{-/-}- mGluR6^{-/-})、それぞれ始点を原点へ合わせている。WT と mGluR6^{-/-}のベクトルとの差し引きで計算される WT の ON 型双極細胞成分のほとんどが 2 種類のマウスの ERG の振幅の差異によって生じていることが図 3 で示すベクトル解析によりわかった。一方で Pika^{-/-}と mGluR6^{-/-}のベクトルとの差し引きで計算される Pika^{-/-}の ON 型双極細胞成分はそのほとんどが Pika^{-/-}と mGluR6^{-/-}の位相の違いによって生じていることがわかった。

図 3 で示した各ベクトルの差し引きで解析した WT と Pika^{-/-}それぞれの ON 型双極細胞成分の振幅について刺激周波数ごとに抽出したものを図 4 に示す。Pika^{-/-}の ON 型双極細胞成分の振幅は 17.578Hz 以下では WT の ON 型双極細胞成分の振幅の 10-20%であったが 19.531Hz 以上になると振幅は微小になりノイズとの判別が困難になった。

【結論】

Pika^{-/-}マウスのフリッカ ERG で ON 型双極細胞成分は 17.578Hz 以下の低周波数刺激において野生型の約 10 パーセント程度で大きくはないが、フリッカ ERG の波形に関与していることが分かった。

Pika^{-/-}のように ON 型双極細胞機能の部分障害モデルマウスのフリッカ ERG の解析に、ベクトル解析は有用である。