

主論文の要旨

Temporal Properties of Flicker ERGs in Rabbit Model of Retinitis Pigmentosa

〔網膜色素変性モデル家兎におけるフリッカ ERG の周波数特性〕

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)

岡戸 聡志

【背景と目的】

網膜色素変性は約 5000 分の 1 の有病率の遺伝性網膜変性疾患であり、夜盲や進行性の求心性視野障害を呈し最終的に失明に至りうるが、現在有効な治療法は確立されていない。網膜色素変性の診断や病状の評価に網膜電図(electroretinogram, ERG)は必須の検査であり、典型的には全視野光刺激で網膜電図の消失を認める。網膜電図は網膜機能の評価する方法として眼科領域において広く用いられている。網膜電図は記録条件を変更することにより網膜全体の機能の評価のみでなく、暗所視に關与する杆体の機能の評価や明所視に關与する錐体の機能の評価することができる。周期的に光刺激を行い記録するフリッカ ERG は錐体機能の評価する方法として使用されており、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成分で構成されている。双極細胞は ON 型双極細胞と OFF 型双極細胞に分類され、それぞれの電氣的活動を阻害する薬剤を投与することによって生じる波形変化を観察することでフリッカ ERG の解析を行うことができる。過去の報告では、ON 型双極細胞の反応を阻害する薬剤投与による波形の変化分を ON 成分、OFF 型双極細胞の反応を阻害する薬剤投与による波形の変化分を OFF 成分、ON 型および OFF 型双極細胞の双方の反応を阻害後に残った波形成分を視細胞成分としてフリッカ ERG の解析がなされている。Kondo et al. は通常の網膜電図波形の振幅と潜時による解析では評価困難であったこれら 3 つの成分(視細胞成分、ON 成分、OFF 成分)の相互作用について、ベクトルを用いて評価する方法を考案した。すなわち、上述の方法で抽出した 3 つの成分をフーリエ変換(Fast Fourier Transform, FFT)し、算出された基本周波数成分をベクトルに変換することで視覚的に分かりやすく解析した(*Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001)。

今回、中型動物の網膜色素変性症モデルであるロドプシン P347L 遺伝子改変家兎と野生型家兎で記録したフリッカ ERG に上述のベクトル解析を応用し、視細胞および ON 型双極細胞、OFF 型双極細胞機能の比較、検討を行った。

【対象と方法】

72 週令の野生型白色家兎(wild type, WT) 6 羽 6 眼、網膜色素変性モデル白色家兎(ロドプシン P347L 遺伝子改変家兎, Tg) 4 羽 4 眼を対象とし、ドーム型光刺激装置を用いて 3.906Hz~50.781Hz の刺激周波数にて sine 波形刺激を行い、フリッカ ERG を記録した。続いて ON 成分を阻害する 2-amino-4-phosphonobutyric acid (APB) と OFF 成分を阻害する 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione (CNQX) を順に硝子体内投与し、それぞれを注射後のフリッカ ERG を記録した。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算出した。それらの振幅と位相から各刺激周波数に対する視細胞成分と ON 成分、OFF 成分のベクトルを算出した。これらの振幅と位相、ベクトルを WT と Tg で比較、検討した。なお、ON 成分のベクトルは APB 硝子体内投与前のフリッカ ERG のベクトルから APB 硝子体内投与後のベクトルを差し引くことで算出し、OFF 成分

のベクトルは APB 硝子体内投与後のフリッカ ERG のベクトルから CNQX 硝子体内投与後のベクトルを差し引くことで算出した。

【結果及び考察】

図 1 に記録したフリッカ ERG の代表波形、図 2 に FFT で抽出した基本周波数成分の振幅、位相のグラフを示す。WT の振幅は 3.906Hz でもっとも大きかったが、Tg では 15.625Hz で最も大きかった。Tg の位相はすべての周波数において WT と比較して遅れていた。APB 硝子体内投与後の振幅は低刺激周波数で Tg の方が WT と比較して大きい傾向にあり、CNQX 硝子体内投与後（視細胞成分）の振幅はすべての刺激周波数で Tg の方が小さい傾向にあった。

FFT で抽出した各刺激周波数における基本周波数成分から算出したベクトル解析を示す（図 3）。WT と Tg で基本周波数成分の振幅で大きな差を認めた 3.906Hz における代表例でのベクトル解析では、WT の OFF 成分のベクトルの大きさが ON 成分と比較して小さく、かつそれぞれの位相のずれが約 200° であり、視細胞成分と ON 成分、OFF 成分のベクトルの和として表される基本周波数成分のベクトルの大きさは約 10 μ V であった。一方、Tg では ON 成分と OFF 成分のベクトルの大きさが同程度であり、さらにそれぞれの位相のずれが約 180° であることから、それぞれの成分が打ち消されることにより基本周波数成分のベクトルの大きさが 1 μ V 以下となった。基本周波数成分の振幅が WT と Tg で同程度であった 15.625Hz における代表例でのベクトル解析では、Tg の方が視細胞成分の振幅が小さかったが、ON 成分と OFF 成分と合計されることにより、結果的に基本周波数成分の振幅は WT と同程度となっていた。このことから、フリッカ ERG の振幅は一次ニューロンである視細胞成分だけでなく、二次ニューロン以降の応答にも大きく影響されることが分かった。眼科の臨床においてよく用いられる 30Hz フリッカ ERG の刺激周波数に近い 31.250Hz における代表例ベクトル解析では、薬剤投与前の振幅が同じ程度の個体であっても、WT と Tg の間だけでなく Tg の各個体間においても ON 成分および OFF 成分の振幅の大きさや位相が大きく異なっていた。このことから、フリッカ ERG の振幅が同じ程度の個体であっても、網膜変性の程度によりその背景にある ON 成分や OFF 成分の応答は大きく異なると考えられた。

図 4 に ON 成分と OFF 成分の振幅のグラフを示す。有意差はないものの、ON 成分の振幅はすべての刺激周波数で WT の方が大きかったのに対し、OFF 成分の振幅は低刺激周波数において Tg の方が大きい傾向にあった。Kominami et al.による同じモデルの家兎を用いたフラッシュ ERG の報告でも OFF 成分が増大しているとの結果が得られており（*Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017）、この様な OFF 成分の増大は変性網膜における視覚伝導の機能的なリモデリングが原因であると考えている。

18 か月齢の網膜組織標本では、Tg で網膜の変性を反映した網膜外層の消失が認められた（図 5）。

【結論】

眼科臨床において 30Hz フリッカ ERG の振幅で網膜色素変性における網膜機能を評価することがあるが、網膜変性の程度により ON 成分と OFF 成分の振幅と位相が変化する事が今回の研究で示唆された。このことから、網膜変性におけるフリッカ ERG は ON 成分と OFF 成分の振幅と位相の差によって通常と異なった特性を示し、その解釈には注意を要すると考えられる。