

---

---

原 著

---

---

## 実験小動物マウスの眼底撮影法の開発とその評価

酒 井 康 弘

新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学専攻

感覚統合医学講座視覚病態学分野

(主任：阿部春樹教授)

### Establishment and Assessment of Ocular Fundus Photographing For Laboratory Mice

Yasuhiro SAKAI

*Division of Ophthalmology and Visual Science,*

*Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences*

*(Director: Prof. Haruki ABE)*

#### 要 旨

**目的：**自身が保有する網膜神経節細胞蛍光発光トランスジェニックマウス（以下、Thy-1-EGFP トランスジェニックマウス）を用いて、生体下でより鮮明な眼底画像を撮影し、網膜神経節細胞数を正確に計測できる方法並びに撮影条件を検討する。

**方法：**屈折度数の異なる前置レンズを設置した蛍光眼底カメラを開発してThy-1-EGFP トランスジェニックマウスの眼底を撮影し、画像の蛍光輝度、視界面積、網膜神経節細胞数の評価を行なった。次に網膜伸展標本を作製し、蛍光眼底カメラの撮影画像との計測網膜神経節細胞数の比較を行なった。さらにThy-1-EGFP トランスジェニックマウスで虚血再灌流モデルを作製し、一過性網膜虚血前後の眼底を麻酔下に蛍光眼底カメラを用いて経時的に撮影した。

**結果：**前置レンズを設置した蛍光眼底カメラによる眼底撮影では、個々の網膜神経節細胞を識別可能な鮮明な眼底画像が得られた。画像から同定計数した網膜神経節細胞数は、網膜伸展標本で計数される細胞数に比して少なく、蛍光眼底カメラによる眼底撮影では周辺部の歪みで焦点が甘くなるという課題が残った。一過性網膜虚血前後の蛍光眼底カメラによる経時的な眼底撮影画像では、画角全体に渡る鮮明な画像を得ることは困難であったが、虚血後に網膜神経節細胞数が減少する傾向が捉えられた。

**結論：**蛍光眼底カメラによる眼底撮影で個々の網膜神経節細胞を鮮明に描出するマウス眼底

---

Reprint requests to: Yasuhiro SAKAI  
Division of Ophthalmology and Visual Science  
Niigata University Graduate School of  
Medical and Dental Sciences  
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,  
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学  
専攻感覚統合医学講座視覚病態学分野 酒 井 康 弘

画像が得られた。この撮影法を用いて生体下で長期間に渡って網膜神経節細胞を観察、計測することは、マウスを用いた緑内障モデルや網膜神経保護の研究に有用な方法となりうる。

キーワード：網膜神経節細胞, Thy-1-EGFP トランスジェニックマウス, 蛍光眼底カメラ

## 緒 言

緑内障は、視野欠損を主症候とする慢性進行性疾患であり、その原因やメカニズムの解明のために多くの実験が行われてきたが、いまだ明確な結論は得られていない。緑内障では病理組織学的に網膜神経節細胞の選択的脱落が認められ、その原因解明においては網膜神経節細胞死の生ずるアポトーシスメカニズムの解明が必要であると言われている。この点において、動物実験により網膜神経節細胞死の分析、評価を正確に行うことは非常に重要である。

これまでにラットやマウスなど実験小動物の網膜神経節細胞死の評価方法として、網膜切片や逆行性標識により網膜神経節細胞数を計数するといった形態学的手法<sup>1)2)</sup>や、網膜神経節細胞のマーカである Thy-1 の発現量を RT-PCR 法<sup>3)</sup>や ELISA 法<sup>4)</sup>により測定するといった生化学的手法が用いられてきた。しかしこれらの方法では、不可逆的に侵襲的な操作を必要とするため測定、評価が死後の一回のみに限られ、同一個体での経時的変化を追うことは不可能であることはもちろん、その定量性も低かった。

こうした点を補うために、緑内障の原因解明のための基礎実験においては、これまでの方法よりも簡便で定量性が高く、生体下で同一個体の網膜神経節細胞死の程度を経時的に評価する方法の開発が待ち望まれていた。所属する研究室において既に作成されていた Thy-1-EGFP トランスジェニックマウスは、網膜神経節細胞特異的のマーカである Thy-1 遺伝子にクラゲ由来の蛍光物質 EGFP を遺伝子導入し、網膜神経節細胞が特異的に発光するマウスである<sup>5)</sup>。このマウスを用いれば、蛍光色素の逆行性標識など操作無しで簡便に網膜神経節細胞の組織学的な評価を行うことが可能である。また、このマウスの眼底蛍光を非侵襲

的に撮影することにより、生体下で同一個体の網膜神経節細胞死の程度を経時的変化を追うことが可能であり、実験的に網膜神経節細胞死の評価を行う上で有用なマウスであると考えられた。

そこで本研究では、前置レンズを設置した蛍光眼底カメラを用いて Thy-1-EGFP トランスジェニックマウスの眼底蛍光を撮影し、生体下で網膜神経節細胞のより詳細な観察を行うための撮影方法とその条件についての最適化を行った。また、開発した眼底撮影法を用いて、同一個体における網膜神経節細胞数の経時的変化を生体下で観察した。

## 材料と方法

### 網膜神経節細胞蛍光発光トランスジェニックマウス (Thy-1-EGFP トランスジェニックマウス)

網膜神経節細胞を特異的に標識するためにマウス thy-1.2 遺伝子プロモーター下流に緑色蛍光蛋白 (enhanced green fluorescent protein: EGFP) 遺伝子が組み込まれたトランスジェニックマウスは、すでに所属研究室で樹立されていた<sup>5)</sup>。本トランスジェニックマウスは、網膜内では網膜神経節細胞のみが EGFP の発現により特異的に蛍光発光する特徴を持つ。C57BL/6J マウス (日本 SLC 社) との交配で繁殖を行い、生後 6 週のマウス仔の尻尾よりゲノム DNA を抽出し、EGFP 遺伝子に対する PCR 法によって遺伝子型の確認を行い、生後 4 ヶ月から 6 ヶ月の時点で本トランスジェニックマウスを実験に使用した。

### 蛍光眼底カメラによる眼底撮影

実験動物の取り扱いに関しては ARVO (The association for research in vision and ophthalmology) の動物取り扱い指針に沿って行った。マウスをペントバルビタール (ネンブタール; 65mg/kg)

による全身麻酔後、0.5 % 塩酸トロピカミド（ミドリン P）にて散瞳し、Topcon 社製蛍光眼底カメラにて生体下で眼底撮影を施行した。カメラに付属の対物レンズに加えて、さらにその対物側に 14D, 28D, 40D の前置レンズを取り付けた眼底カメラを用い、Nikon 社製デジタルカメラにて眼底画像を撮影した。撮影した眼底画像全体の視界面積、平均蛍光輝度、単位面積当たりの網膜神経節細胞数を各々算出した。視界面積は、マウスの視神経乳頭径を  $100\ \mu\text{m}$  と仮定して算出した。蛍光輝度の数値化は Photoshop を用いて実施し、そのヒストグラム平均値を、眼底蛍光輝度として用いた。

### 組織学的評価

マウス眼の網膜伸展標本作製し、組織学的評価を行なった。マウスを頸椎脱臼により屠殺し、直ちに両眼の眼球を摘出し、前眼部を除去し残存した後眼部を 0.1M リン酸緩衝食塩水（PB）で希釈した 2 % パラホルムアルデヒドにて 30 分間固定した。網膜を解離し、周辺部に 4 箇所放射状切開を入れて平らに伸展させ 4 % パラホルムアルデヒドにて  $4^{\circ}\text{C}$  で 2 時間固定した。PB で数回洗った後、段階的なエタノールで脱水し、80 % グリセロールに包埋した。網膜をスライドガラス上に平らに乗せ、カバーガラスをかけて遮光下、 $4^{\circ}\text{C}$  で保存した。蛍光顕微鏡で網膜伸展標本を観察し、単位面積当たりの網膜神経節細胞数を計数した。

### 一過性網膜虚血

ペントバルビタール（ネンブタール）腹腔内注射（ $65\text{mg/kg}$ ）による全身麻酔後、点眼麻酔（0.5 % 塩酸オキシブプロカイン）を施したマウスの片眼の前房内に 30G 針を挿入し、高さ 150cm に設置した生理的食塩水を灌流させ約 120mmHg の高眼圧を 45 分間負荷した<sup>6)–8)</sup>。実験中はネンブタールによる体温低下と、それに基づく神経保護作用を回避するため、ホットプレートにて動物を保温した。

一過性網膜虚血前後の眼底の経時的变化を観察する目的で、虚血前と再灌流後 7 日の時点で同一

マウスを用いて眼底の同一部位を蛍光眼底カメラで経時的に撮影し、単位面積当たりの網膜神経節細胞数を比較した。

## 結 果

### 蛍光眼底カメラによる眼底撮影

眼底カメラに付属の対物レンズに加えて 14D, 28D, 40D の前置レンズを置き、Thy-1-EGFP トランスジェニックマウスの網膜神経節細胞蛍光発色を撮影した。蛍光眼底カメラによる眼底撮影では、マウスでは初めて、広い画角で、個々の網膜神経節細胞を分離、同定可能な鮮明な眼底画像を得ることができた（図 1A）。眼底画像の平均蛍光輝度は、前置レンズの種類により 14D では  $51.77 \pm 6.42$ , 28D では  $73.45 \pm 5.48$ , 40D では  $76.09 \pm 12.03$  と前置レンズの屈折度数が大きいほど高値を示す傾向が認められた（図 1B）。画像全体の網膜の撮像面積は、マウスの視神経乳頭径を  $100\ \mu\text{m}$  とし、撮像に歪みが無いと仮定した場合<sup>9)</sup>、前置レンズの種類により 14D では約  $2.5\text{mm}^2$ , 28D では約  $5.2\text{mm}^2$ , 40D では約  $5.9\text{mm}^2$  と前置レンズの屈折度数が大きいほど画角が広がった（図 1C）。これは、平均的なマウスの網膜面積  $13\text{mm}^2$  と比較すると 14D では約 19 %, 28D では約 40 %, 40D では 45 % の網膜範囲の撮像に成功したことを意味していた。

撮影した眼底画像全体の網膜神経節細胞数を計数し、単位面積当たりの細胞数を算出した。前置レンズの種類により、28D では約  $1630/\text{mm}^2$ , 40D では約  $1690/\text{mm}^2$  の網膜神経節細胞が計測された。個体間による差が大きいものの、眼底画像に描出される単位面積当たりの網膜神経節細胞数は前置レンズの種類によらずほぼ同様であった。なお、14D 前置レンズを用いた眼底画像では、個々の網膜神経節細胞を分離、同定できるほどの鮮明な画像は得られず、網膜神経節細胞数を計数することは不可能であった（図 1D）。

### 蛍光眼底カメラ画像と網膜伸展標本との比較

網膜伸展標本作製し、蛍光顕微鏡で組織学的

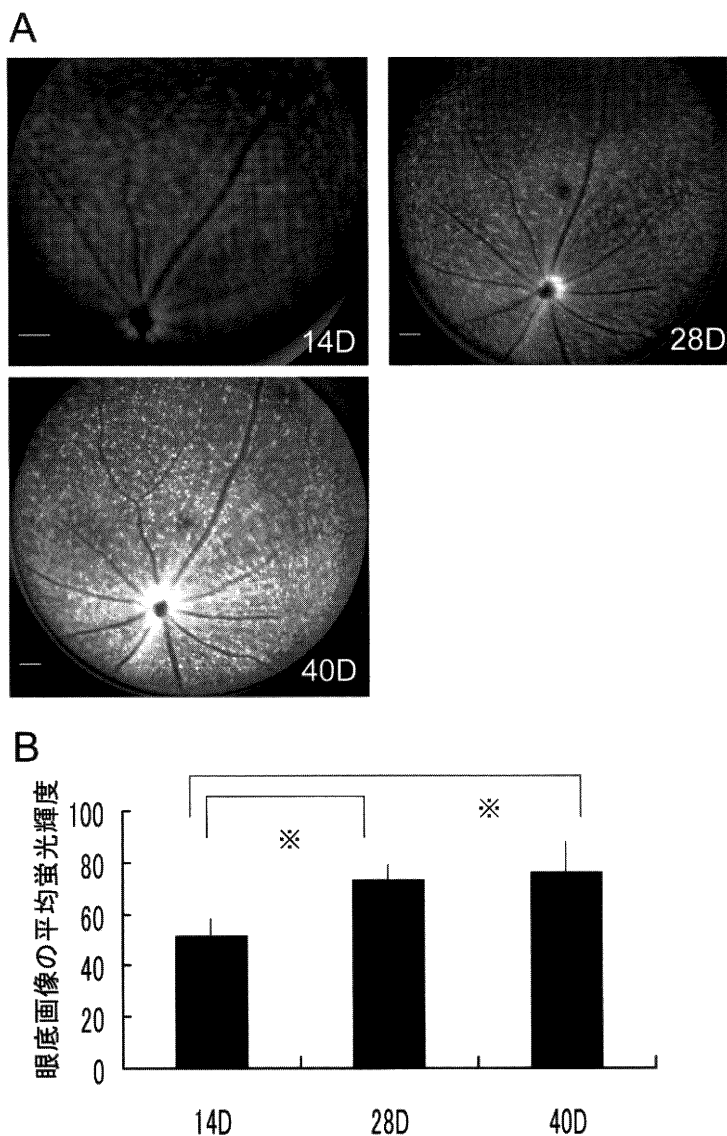


図1 蛍光眼底カメラによる眼底撮影

- A) 前置レンズの屈折率の違いによる眼底画像の比較  
 同一個体の同一部位を撮影した。前置レンズの屈折率は、左：  
 14D, 中央：28D, 右：40D (bar = 100  $\mu$ m)
- B) 眼底画像の平均蛍光輝度 (n = 4)

に撮影した網膜神経節細胞の蛍光発色と40D前置レンズを用いた眼底カメラ画像との比較を行った(図2A)。網膜伸展標本では、1 mm<sup>2</sup>あたり約

4220個の網膜神経節細胞が計数された。他方眼底カメラ画像で明瞭に同定される網膜神経節細胞数は全撮像視野平均1 mm<sup>2</sup>あたり約1690個で、肉

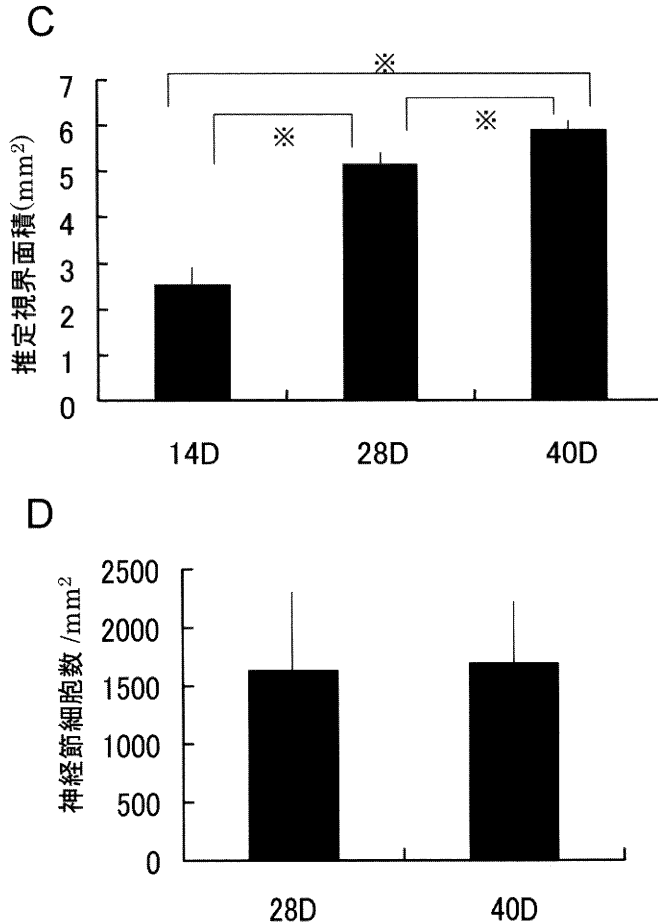


図1 蛍光眼底カメラによる眼底撮影

C) 網膜の撮像面積/視神経乳頭面積比から算出した眼底画像の推定撮像面積 (n = 4)

※一元配置分散分析法を用い統計学的に評価した。危険率5%未満を有意とした。

D) 眼底画像から同定できた単位面積当たりの網膜神経節細胞数

注) 14D 前置レンズによる撮影画像は不鮮明にて細胞数の計数は不可能であった。28D 及び 40D 前置レンズで計数された細胞数の間ではt検定にて有意差なし。

眼による計数では、網膜伸展標本の方が眼底カメラ画像に比してより多くの網膜神経節細胞を同定、描出することが示された (図2B)。

#### 一過性網膜虚血前後の経時的眼底撮影

Thy-1-EGFP トランスジェニックマウスで虚血再灌流モデルを作成し、40D 前置レンズを用いた蛍光眼底カメラで眼底撮影を行い、一過性網膜

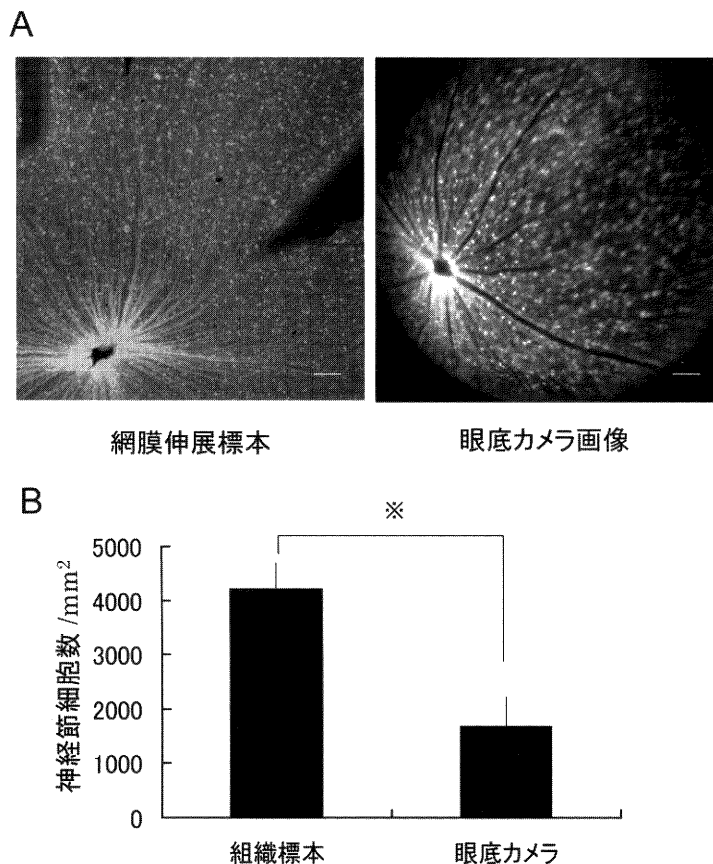


図2 網膜伸展標本と蛍光眼底カメラ画像の比較

A) 左：網膜伸展標本の蛍光顕微鏡画像 (bar = 100  $\mu$ m)

右：40D 前置レンズを設置した蛍光眼底カメラにより撮影した眼底画像 (bar = 100  $\mu$ m)

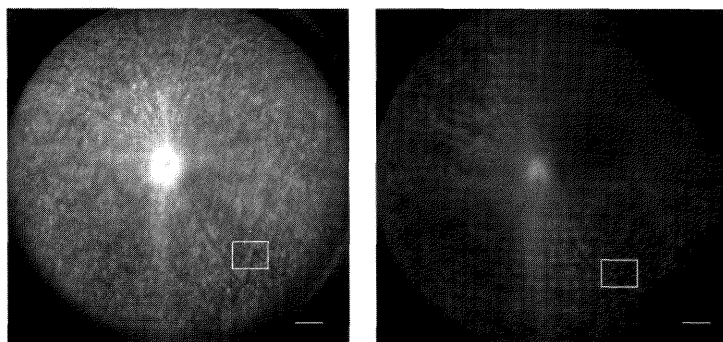
B) 網膜伸展標本と蛍光眼底カメラ画像各々から計数，算出した単位面積当たりの網膜神経節細胞数 (n = 5)

※ t 検定を用い統計学的に評価した。危険率 5 % 未満を有意とした。

虚血前後の眼底画像の比較を行なった。虚血 7 日後の眼底画像では，部分的に不鮮明な部位が出現し，画角全体に渡る鮮明な画像が得られなかった (図 3A)。撮影した眼底画像から，同一個体の同一部位で個々の網膜神経節細胞が同定，識別可能な映りの鮮明な部位を選択し，一過性網膜虚血前後の眼底画像を比較した。一過性網膜虚血後 7 日の時点で，虚血前には蛍光発色が認められていた網膜神経節細胞の蛍光発色が消失している様子が

捉えられた (図 3B)。同一個体の同一部位を選択し，網膜神経節細胞数の可視領域における一過性網膜虚血前後の単位面積当たりの網膜神経節細胞数を比較した。虚血前では，1 mm<sup>2</sup> あたり約 1580 個の網膜神経節細胞が計数された。他方虚血 7 日後では，1 mm<sup>2</sup> あたり約 920 個が計数され，一過性網膜虚血により網膜神経節細胞数が虚血前の約 60 % に減少することが認められた。

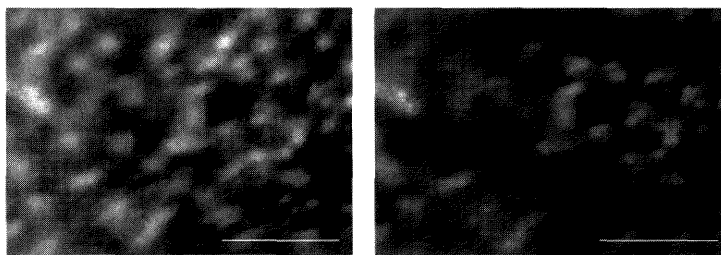
A



虚血前

虚血負荷後7日

B



虚血前

虚血負荷後7日

C

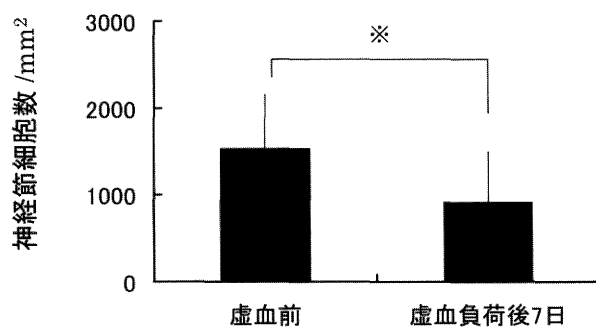


図3 蛍光眼底カメラによる一過性網膜虚血前後の経時的眼底撮影

A) 左：虚血負荷前 右：虚血負荷後7日の眼底画像 (bar = 100  $\mu$ m)

B) A) の□で囲われた可視領域における、一過性網膜虚血前後の眼底画像の拡大像

左：虚血負荷前 右：虚血負荷後7日 (bar = 50  $\mu$ m)

C) 一過性虚血負荷前後の可視領域における眼底画像から計数，算出した単位面積当たりの網膜神経節細胞数 (n = 5)

※ t検定を用い統計学的に評価した. 危険率5%未満を有意とした.

## 考 察

緑内障や視神経炎、虚血性視神経症など網膜神経節細胞が障害される疾患の病態の解明を目的とした基礎研究を行う上で、動物実験で網膜神経節細胞死の程度を評価することは非常に重要である。従来の評価方法では、組織学的手法も形態学的手法も抜眼操作を必要とするため、多くのサンプルを必要とした上に、同一個体での経時的変化を測定、評価することは不可能であった。また網膜神経節細胞の同定のため、上丘への蛍光色素注入による逆行性標識といった難易度の高い操作が必要であり、操作自体の侵襲による間接的な影響も懸念された。

Thy-1-EGFP トランスジェニックマウスは、遺伝的に網膜神経節細胞が蛍光発光しており、侵襲的操作なしに網膜伸展標本を作製するのみで簡単に細胞数の計数を行なえるのみならず、生体下で眼底撮影を行いその蛍光輝度を測定することで、同一個体の網膜神経節細胞数の経時的変化を観察、評価することができる実験動物である。これまでに、ラット眼を用いた蛍光顕微鏡による生体下での網膜神経節細胞の観察が報告されている。蛍光色素による逆行性標識を行ったラットの網膜を走査型レーザー顕微鏡 (scanning laser ophthalmoscope : SLO) で撮影することにより網膜神経節細胞の鮮明な画像が得られ、視神経挫滅モデルにおける網膜神経節細胞数の変化が生体下で観察されている<sup>10)</sup>。またマウスでも、Thy-1 遺伝子プロモーター下流に蛍光色素を遺伝子導入したトランスジェニックマウスが開発され、研究応用されているが<sup>11)</sup>、虚血再灌流モデルや視神経挫滅モデルといった障害モデルマウスにおいて網膜神経節細胞を生体下で鮮明に観察した報告は、現在までない。マウスでは、ラットと異なりすでに数多くの遺伝子改変ラインが存在しているため実験動物としての有用性はより高く、眼球がより小さく扱いが困難ではあるものの、マウス眼で生体下網膜神経節細胞の観察を行うことの意義は極めて大きいものと考ええる。

これまで私もラットでの既報と同様に、SLO を

用いて Thy-1-EGFP トランスジェニックマウスの生体下での眼底撮影を試みていたが、この方法では、マウス網膜の眼底蛍光を捉えることはできるものの、個々の網膜神経節細胞を鮮明に描出し細胞数を計数することは不可能であった。SLO で撮影された眼底画像による生体下での眼底蛍光輝度の観察は、生存網膜神経節細胞数の程度を知る上での目安にはなり得ると考えるが、さらに正確な測定を行うためにはマウスの網膜神経節細胞を生体下でより鮮明に撮影し、個々の細胞を描出し、計数し得る方法の開発が必要であると考えられた。

今回行った改良型蛍光眼底カメラによる眼底撮影像では、各種前置レンズを設置することで広角かつ鮮明な画像を得ることができ、個々の網膜神経節細胞を分離、同定することが可能であった。特に 40D の前置レンズを設置して撮影した際には網膜全領域の約半分が可視化され、その画像も鮮明な画像が得られた。Thy-1-EGFP トランスジェニックマウスの網膜伸展標本では、1 mm<sup>2</sup> あたり約 4220 個の網膜神経節細胞が計数された。これは、使用したマウス系統 C57BL/6 で報告のある網膜神経節細胞密度、5000 細胞/mm<sup>2</sup> に匹敵する数で有り、EGFP 蛍光蛋白による網膜神経節細胞の標識には問題が無かったことを意味する<sup>12)</sup>。しかし、蛍光眼底カメラによる眼底撮影像で明瞭に同定された網膜神経節細胞数は、実際のこの数に比べ明らかに少ない数値であった。これは、まず撮影画像の精度の問題と次に眼球が球体であるという形状の問題から、眼底画像では周辺部に生ずる光学的ひずみの発生を避けられないためと推定される。このことは蛍光眼底カメラでの眼底撮影でも、依然、周辺部の細胞の同定には問題があることを意味する。また今回は画像全体の面積を視神経乳頭との面積比より算出したが、当然、カメラ画像でも光学的な周辺歪みにより周辺部の面積換算に問題が残る点、また、視神経乳頭径には個体差がある点、このような理由もできるなら考慮されるべきと考える。したがって、眼底画像全体ではなく、より中心に近い標的部位に絞って網膜神経節細胞数を計測することで、より網膜伸展



標本での計測値に近い細胞数を計測できる可能性があると考えられる。

また、Thy-1-EGFP トランスジェニックマウスで緑内障類似の網膜神経節細胞死を誘導するモデルとして用いられる虚血再灌流モデルを作製し、一過性網膜虚血前後の眼底観察を行なったが、虚血負荷後に画角全体にわたる鮮明な眼底画像を得ることは困難であった。これは、虚血後の眼底画像では、虚血負荷処置時に生ずる角膜、虹彩の損傷、水晶体の混濁により画像が不鮮明になるためと推定される。しかし、鮮明な画像が得られた部位を選択し、一過性網膜虚血前後で網膜神経節細胞数を比較した際には、虚血負荷により網膜神経節細胞が減少する傾向を捉えることができた。このことは、本眼底撮影法を用いることで、マウス緑内障モデルにおける網膜神経節細胞数の経時的变化を生体下で観察可能であることを意味する。今後は、撮影法の改良、ならびに上強膜静脈結紮法による慢性高眼圧モデル<sup>13)</sup>のような前眼部、中間透光体に侵襲のかかりにくい方法で緑内障モデルを作成し、同様の方法で眼底撮影することで、生体下での網膜神経節細胞数の変化をより鮮明かつ詳細に観察できる可能性があるものと考えられる。

今回私は、Thy-1-EGFP トランスジェニックマウスの眼底を生体下で蛍光眼底カメラを用いて撮影することで、個々の網膜神経節細胞を識別可能な鮮明な眼底画像を得ることに成功した。Thy-1-EGFP トランスジェニックマウスを用いて虚血再灌流モデル、視神経挫滅モデルなどの緑内障モデルを作製し、本撮影方法で眼底を撮影すれば、緑内障モデルマウスでの網膜神経節細胞数の経時的变化を観察、評価することが可能である。また、慢性眼圧上昇モデルや神経保護作用を持つ薬剤の評価など、長期間の経時的観察が必要な実験に対しても有用な方法になり得る。また、既存の各種ノックアウトマウスと Thy-1-EGFP トランスジェニックマウスを交配させることにより、特定遺伝子が欠失したマウスにおいて網膜神経節細胞を蛍光発光させることが可能であり、そのマウスの眼底撮影を行うことにより、目的遺伝

子の網膜神経節細胞死への関与が検討できると考えられる。

以上より、今回の Thy-1-EGFP トランスジェニックマウスを用いた眼底撮影法を用いて生体下で網膜神経節細胞を観察することは、今後の緑内障を初めとした網膜神経節細胞死に関連する眼疾患の病態研究に広く応用できるものと思われる。

## 結 論

網膜神経節細胞が特異的に蛍光発色する Thy-1-EGFP トランスジェニックマウスの眼底を生体下で蛍光眼底カメラを用いて撮影し、その評価を行った。蛍光眼底カメラを用いた撮影法では、個々の網膜神経節細胞を識別可能な鮮明な眼底画像が得られた。この撮影方法を用いて生体下で経時的に網膜神経節細胞の変化を観察することは、マウスを用いた網膜神経保護の研究に有用な方法となりうる。

## 謝 辞

本研究の御指導と本稿の御校閲をいただきました那波宏之教授、武井延之助教授（脳研究所分子神経生物学教室）および阿部春樹教授に深謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) Kermer P, Klocker N, Weishaupt JH and Bahr M: Transection of the optic nerve in rats: studying neuronal death and survival in vivo. *Brain Res Protoc* 7: 255-260, 2001.
- 2) Vidal Sanz M, Lafuente MP, Mayor Torroglosa S, Miralles de Imperial J and Villegas Perez MP: Brimonidine's neuroprotective effects against transient ischemia-induced retinal ganglion cell death. *Eur J Ophthalmol* 11: S36-S40, 2001.
- 3) Nash MS and Osborne NN: Assessment of Thy-1 mRNA levels as an index of retinal ganglion cell damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 1293-1298, 1999.
- 4) Seki M, Nawa H, Morioka T, Fukuchi T, Oite T, Abe H and Takei N: Establishment of a novel

- enzyme-linked immunosorbant assay for Thy-1; quantitative assessment of neuronal degeneration. *Neuroscience Lett* 329: 185-188, 2002.
- 5) 田中隆之: 網膜神経節細胞蛍光発色トランスジェニックマウスを用いた非侵襲的網膜神経節細胞死の評価法の確立. *新潟医学会雑誌* 118: 301-308, 2004.
- 6) Anderson DR and Davis EB: Sensitivities of ocular tissues to acute pressure-induced ischemia. *Arch Ophthalmol* 93: 267-274, 1975.
- 7) Hughes WF: Quantitation of ischemic damage in the rat retina. *Exp Eye Res* 53: 573-582, 1991.
- 8) Buchi ER: Cell death in the rat retina after a pressure-induced ischemia-reperfusion insult: an electron microscopic study. I. Ganglion cell layer and inner nuclear layer. *Exp Eye Res* 55: 605-613, 1992.
- 9) Cohan BE, Pearch AC, Jokelainen PT and Bohr DF: Optic disc imaging in conscious rats and mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 160-163, 2003.
- 10) Higashide T, Kawaguchi I, Ohkubo S, Takeda H and Sugiyama K: In vivo imaging and counting of rat retinal ganglion cells using a scanning laser ophthalmoscope. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 2943-2950, 2006.
- 11) Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallance M, Nerbonne JM, Lichtman JW and Sanes JR: Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28: 41-45, 2000.
- 12) Williams RW, Strom RC, Rice DS and Goldowitz D: Genetic and environmental control of variation in retinal ganglion cell number in mice. *J Neurosci* 16: 7193-7205, 1996.
- 13) 松田英伸: マウスを用いた実験的緑内障モデルの開発とその網膜神経細胞死におけるNMDA受容体 $\epsilon 1$ サブユニットの関与. *新潟医学会雑誌* 118: 702-711, 2004.

(平成20年1月15日受付)