

さかい やすひろ

氏名	酒井 康弘
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第260号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	実験小動物マウスの眼底撮影法の開発とその評価

論文審査委員	主査 教授 阿部 春樹
	副査 教授 岡田 正彦
	副査 教授 長谷川 功

博士論文の要旨

<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は、動物実験で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侵襲的な手法が用いられてきた。このような方法では、評価が死後の1回のみに限られ、生体下で同一固体の経時的变化を観察することは不可能であった。所属する研究室において作成されていた Thy-1-EGFP トランスジェニックマウスは、Thy-1 遺伝子に蛍光物質 EGFP を遺伝子導入し、網膜神経節細胞が特異的に蛍光発光するマウスであり、その眼底蛍光を非侵襲的に撮影することが可能である。現在までに、マウスの網膜神経節細胞を生体下で鮮明に観察した報告はない。そこで本研究では、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の撮影法を開発し、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条件の最適化を試みた。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变化を生体下で観察した。

<方法>

最新型ヒト用蛍光眼底カメラを屈折度数の異なる前置レンズにより改変して Thy-1-EGFP トランスジェニックマウスの眼底を撮影できるように工夫した。この改変蛍光眼底カメラを用いて画像の蛍光輝度、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、網膜神経節細胞数の変化を観察した。

<結果>

マウスの眼球は非常に小さいため眼底撮影時にその撮像範囲や解像度を増す目的で、新型のヒト用眼底カメラに 14D、28D、40D の前置レンズを置きマウス用に改変した上で、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。この改変蛍光眼底カメラによる眼底撮影により、マウスでは初めて、広い画角で、個々の網膜神経節細胞の同定が可能な鮮明な眼底画像を得ることができた。最も良質な画像が得られた 40D レンズでの眼底画像において、単位面積当たりの網膜神経節細胞数を算出したところ、その数は実際の網膜神経節細胞数のおよそ半数程度であった。

この蛍光眼底カメラによる眼底撮影法により、一過性網膜虚血前後で Thy-1-EGFP トランスジェニックマウスの眼底を撮影し、生体下で同一個体の眼底画像の変化を観察したところ、虚血負荷後に網膜神経節細胞数が約 60%に減少する様子が観察された。

<考察>

現在までに、実験小動物として利便性の高いマウスの網膜神経節細胞を生体下で鮮明に観察した報告はない。今回行なった改変蛍光眼底カメラによる Thy-1-EGFP トランスジェニックマウスの眼底撮影像では、各種前置レンズを設置することで広角かつ鮮明なマウス眼底画像を初めて得ることができ、個々の網膜神経節細胞を分離、同定することも可能であった。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、その画像も鮮明であった。しかし、蛍光眼底カメラによる眼底撮影像ではっきり同定された網膜神経節細胞数は、網膜伸展標本から計数される実際の細胞数に比べ明らかに少なかった。これは、眼球は球体であり、眼底画像では周辺部に光学的ひずみが生ずるためと推定される。今後、周辺部でも歪みを生じさせないため、非球面の補正レンズをマウスの眼球用に開発する等の技術改善が必要であると思われる。

また、一過性網膜虚血前後の眼底観察では、虚血負荷時に生ずる眼球の損傷により虚血負荷後に画角全体に渡る鮮明な眼底画像を得ることは困難であった。しかし、鮮明な画像が得られた部位を選択し、虚血負荷前後で網膜神経節細胞数を比較することで、虚血負荷により網膜神経節細胞数が減少する傾向を生体下で経時的にとらえることができた。今後は撮影法の改良、ならびに前眼部、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緑内障モデルを作製し、本撮影方法で眼底を撮影すれば、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、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。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は、今後、網膜神経節細胞死に関連する眼疾患の病態モデル研究に広く応用できるものと思われる。

(論文審査の要旨)

緑内障は病理組織学的に網膜神経節細胞の選択的脱落を特徴とし、その病態の解明には動物実験で網膜神経節細胞死の評価を正確に行なうことが重要である。しかしこれまでは、遺伝的背景が明確な遺伝子改変ラインが多く存在し、実験動物として利便性の高いマウスの網膜神経節細胞死を生体下で評価する方法の報告はなかった。

今回の研究では、網膜神経節細胞が遺伝的に蛍光発色するThy-1-EGFP トランスジェニックマウスを使用し、マウス用に改良したヒト用眼底カメラを用いて、マウスでは初めて生体下で個々の網膜神経節細胞を同定しうる鮮明で広画角な眼底画像の撮影に成功した。また、一過性網膜虚血前後の網膜神経節細胞数の変化を眼底画像により生体下で経時的に評価することを可能にした。

本研究は、初めて生体下でマウスの網膜神経節細胞を鮮明に観察し得る眼底撮影法を開発した点と、この手法を用いて今後の緑内障を初めとする網膜神経節細胞死に関連する眼疾患の病態モデル研究に広く応用できる可能性を示した点において、学位論文としての価値を認める。