

要旨

【緒言】

緑内障性視神経障害は眼圧によるメカニカルな障害や血流障害を含む障害が機序として提案されており、その病態解明には、*in vivo* 実験系である動物眼での解析が必須である。緑内障の研究において、遺伝的に高眼圧を示すマウスや実験的に誘発された高眼圧症の動物が用いられている。遺伝的に高眼圧を示すマウスは緑内障の主因である高眼圧と緑内障様の病態が独立している可能性があり、別の病態を見ている可能性も否定できない。緑内障のメカニズムや薬剤による網膜の神経保護効果を評価するために、中脳の上丘からの色素注入による網膜神経節細胞（RGC）への逆行性染色の後に網膜フラットマウント標本で RGC 数を計測する方法が一般的であるが、脳内に侵襲的に色素を注入する煩雑さと、染色効率が課題である。近年、RGC 特異的に蛍光を発現する遺伝子改変マウスである B6.Cg-TgN(Thy1-CFP)23Jrs/J トランスジェニックマウス（CFP マウス）が利用できるようになった。CFP マウスは眼に遺伝的な異常が認められていない通常眼圧を示すマウスである。従って、CFP マウスを用いたレーザー誘導高眼圧モデルは慢性的な高眼圧を誘導でき、RGC の染色無しに緑内障性視神経障害の容易な評価を可能にする。

【目的】

CFP マウスを用いて、眼圧依存性の RGC 障害を容易に評価できる動物モデルの作製を試みた。さらに、RGC 保護効果を有する薬剤のスクリーニング系を考案し、ニルバジピンの RGC 保護効果について検討した。

【方法 1】

CFP マウスの片眼の角膜輪部をレーザー光凝固することにより、CFP マウスレーザー誘導高眼圧モデルを作製した。対側眼を無処置対照眼とした。処置後 1 週から 8 週まで、マイクロニードル法を用いて眼圧（IOP）を毎週測定した。個体毎に高眼圧処置眼と無処置対照眼について、それぞれの時間（x）と IOP（y）を用いて折れ線グラフを作成し、両線に囲まれた領域（ $\int IOP(y) dx$ ）を眼圧負荷量とし、網膜の圧力障害の代替値として計算した。9 週目に眼球を摘出し、網膜のフラットマウント標本作製した。蛍光顕微鏡撮影画像により、網膜の上下耳鼻側それぞれ乳頭から 600 μm 間隔で乳頭近傍、中間部、周辺部の 12 箇所、各面積 40000 μm^2 の RGC 数を測定し、無処置対照眼に対する高眼圧処置眼の RGC 生存率を算出し、眼圧負荷量と RGC 生存率の回帰分析を行った。

【結果 1】

高眼圧処置眼は 1 週目で平均眼圧 29.0 ± 16.2 mmHg（無処置対照眼 13.3 ± 1.1 mmHg）（平均値 \pm 標準偏差）（n=20）を示し、7 週目まで有意な眼圧上昇を示した（ $p < 0.01$ ）。眼圧負荷量と RGC 生存率は有意な負の相関を示した（ $y = -0.070x + 97.2$ 、 $r = 0.75$ 、 $p = 0.0008$ ）。更に、視神経乳頭から測定した乳頭近傍、中間部、周辺部および、網膜の上下耳鼻側の各領域の解析においても有意な負の相関を示した。

【方法 2】

次に、CFP マウスレーザー誘導高眼圧モデルの作製と同時に、基剤またはニルバジピンの腹腔内投与を開始した。処置後は方法 1 と同様に眼圧測定および網膜のフラットマウント標本から RGC 数の測定を行い、各群の眼圧負荷量と RGC 生存率の回帰分析を行った。

【結果 2】

高眼圧処置眼は基剤群 (n=23) およびニルバジピン群 (n=14) 共に、有意な眼圧上昇を示し ($p<0.01$)、両群間で眼圧負荷に差はなかった。高眼圧処置眼の RGC 数は、基剤群においては無処置対照眼に対して有意に減少したが、ニルバジピン群においては有意な減少は認められなかった。眼圧負荷量と RGC 生存率は、基剤群において有意な負の相関が認められたが ($y=-0.078x+107.8$, $r=0.76$, $p<0.001$)、ニルバジピン群において有意な相関は認められなかった ($y=-0.015x+99.9$, $r=0.43$, $p=0.128$)。

【結論】

RGC 特異的に蛍光を発現する CFP マウスを用いて、レーザー誘導高眼圧モデルを作製することができた。本モデルでは侵襲的な標識法を用いることなく眼圧依存性の RGC 障害の定量的評価が可能であった。本モデルは緑内障性視神経障害の研究に有用であると考えられた。さらに、ニルバジピンは本モデルにおいて RGC に対する強力な神経保護効果を示した。本モデルは RGC 保護効果を有する薬物のスクリーニングツールとして有用である。