

博士論文

**フェレット緑内障モデルの確立と
高眼圧による高次視覚中枢神経障害の検討**

藤代貴志

目次

I . 略語	4
II . 要旨	5
III . 序文および研究背景	7
III-1. 緑内障	7
III-2. 眼圧	12
III-3. 治療	18
III-4. 実験動物での緑内障モデル	20
IV . 研究目的	22
V . 研究 1 フェレット緑内障モデルの確立	23
V-1. 研究 1 背景	23
V-2. 研究 1 方法	26
V-3. 研究 1 結果	35
VI . 研究 2 フェレット高眼圧モデルでの緑内障による視覚中枢障害の解析	52
VI-1. 研究 2 背景	52

VI-2. 研究 2 方法.....	59
VI-3. 研究 2 結果.....	68
VII. 考按.....	95
VII-1. フェレット高眼圧モデル.....	95
VII-2. フェレットの眼圧測定と眼圧値.....	98
VII-3. 高眼圧フェレットにおける LGN のマクロ的な解析.....	100
VII-4. 高眼圧フェレットにおける LGN のミクロ的な解析.....	101
VII-5. 今回のフェレット高眼圧モデルの問題点.....	107
VII-6. 今後の展望.....	109
VIII. 謝辞.....	111
IX. 参考文献.....	112

I. 略語

緑内障視神経症 : GON

網膜神経節細胞 : RGC

正常眼圧緑内障 : NTG

外側膝状体 : LGN

視皮質 : V1

PBS : リン酸緩衝生理食塩水

DMEM : ダルベッコの最小必須培地

FBS : ウシ胎児血清

OCT : ティシュー・テック O.C.T.コンパウンド®

Cholera Toxin B : CTB

SC : 上丘

Neuronal nuclei : NeuN

Glial fibrillary acidic protein : GFAP

Ionized calcium binding adapter molecule 1 : Iba-1

PFA : パラホルムアルデヒド

POAG : 開放隅角緑内障

Ⅱ．要旨

緑内障視神経症(GON)は、組織学的には眼圧が視神経乳頭篩板の変形を来たすことに伴い、網膜神経節細胞(RGC)の軸索である視神経に障害を来とし、機能的に視野障害ひいては視力低下を来とし失明に至る疾患である。GON は RGC の軸索障害に留まらず視覚路にも影響を及ぼすことが判明しており、ヒトでは視覚中枢である外側膝状体(LGN)や視皮質(V1)の二次的損傷が病理学的に証明されている。したがって、緑内障の治療標的は、RGC と LGN、V1 に焦点を当てて考える必要がある。しかしながら、GON に伴う LGN や V1 の障害の時間的および空間的パターンのメカニズムはこれまでのところ完全には解明されていない。サルに匹敵する高度な LGN や V1 の分化をもち、両眼視を持つ動物において高眼圧モデルの開発が強く必要とされている。フェレットはヒトのような両眼視を持つ比較的小さな哺乳類であり、今回の実験に用いた。

研究 1 では、培養した結膜線維芽細胞を前房に注入して隅角からの房水流出を閉塞することにより、眼圧を上昇させる新しい方法を世界で初めて開発した。組織学的な解析で培養された結膜細胞は正常に増殖して隅角を閉塞していた。眼圧は注射後 13 週間にわたり持続的に上昇した。また、眼球の直径は眼圧上昇期間が長くなるにつれ徐々に拡大した。高眼圧の眼の視神経乳頭乳頭陥凹拡大とその投射を受けた LGN の障害は、Cholera Toxin B(CTB)による順行性標

識によって明瞭に描出することができた。フェレットは、LGN を含む視覚中枢神経系の二次変性を解析するのに有用な実験動物であると考えられた。

次に研究 2 では、高眼圧フェレットモデルで LGN の神経細胞の障害とグリア細胞系の反応を解析した。10 匹のフェレットを用いて、研究 1 と同様にして、高眼圧を誘導した。CTB による順行性軸索の標識を行い、高眼圧眼からの投射を受ける LGN の各層で神経軸索障害を確認した。次に、neuronal nuclei (NeuN)、glial fibrillary acidic protein(GFAP)、および ionized calcium binding adapter molecule 1(Iba-1)に対する抗体を用いて LGN における neuron、astrocyte、microglia を target として免疫染色を行った。高眼圧眼からの投射を受けている LGN の各層において、NeuN 陽性細胞が減少し、一部の層で GFAP および Iba-1 陽性細胞が増加した。

これらの結果から高眼圧フェレットモデルは緑内障の RGC から LGN までの神経系、およびグリア細胞の障害の解析を行うために有用であると考えられ、これまでマウスやラットでは行うことのできなかった GON による視覚中枢の解析を行うことができるようになった。当モデルを用いることで、将来的には、眼から脳までを統合的な緑内障の病態を解明し、眼圧下降を主体とした従来の治療法ではなく、神経の保護を目的としたこれまでに開発されていない神経保護治療の開発につなげて行きたい。

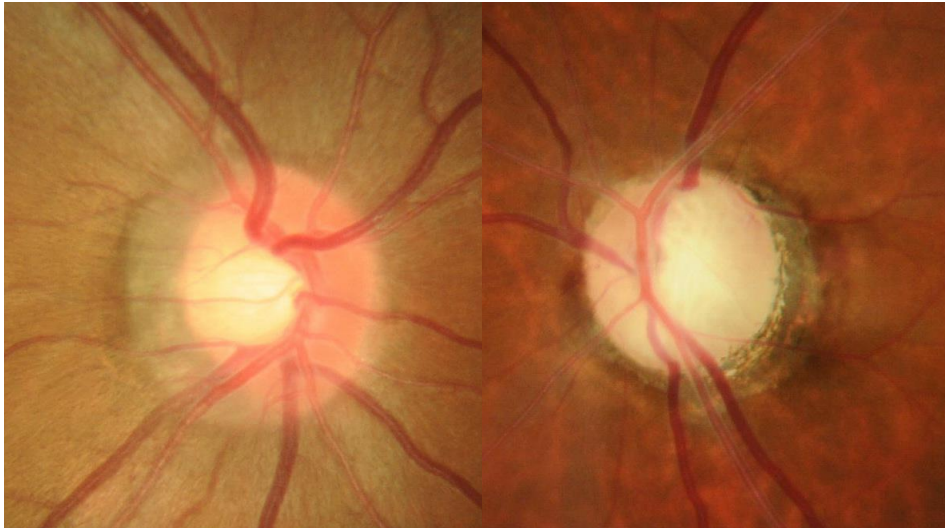
Ⅲ．序文および研究背景

Ⅲ-1．緑内障

緑内障は、「視神経と視野に特徴的変化を有し、通常、眼圧を十分に低下させることにより視神経障害を改善もしくは抑制しうる眼の機能的構造的異常を特徴とする疾患である」と緑内障診療ガイドラインにて定義されており、その本態は慢性進行性の網膜神経節細胞(RGC)の死と、それに対応した視野異常をきたす緑内障視神経症¹となる。^{2,3} また、緑内障の視神経障害および視野障害は、基本的に進行性かつ非可逆的である。(図1、2)

図1

視神経の障害



正常の視神経乳頭

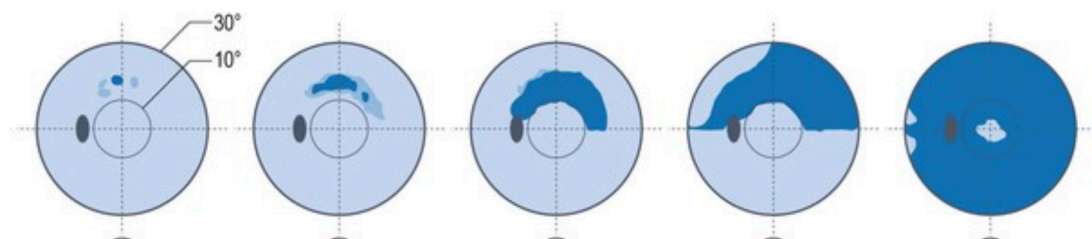
緑内障の視神経乳頭

乳頭陥凹の拡大が緑内障の視神経乳頭で見られる。

図2

視野障害

左から順番に初期から末期の視野障害を示す模式図



(Tarek M Shaarawy et al, (2015). GLAUCOMA 2nd edition Elsevier

より引用)

視神経乳頭の変性とともに、視野障害が徐々に進行していく。

世界保健機構(World Health Organization : WHO)の調査から、全世界の視覚障害者数は約3億人(約4%)であり、そのうち緑内障による失明者は 約4000万人(約0.6%)となっており、白内障に次ぐ失明原因の第2位と報告されている。

⁴ 日本においては、1988年の視覚障害(中途失明)の原因として第4位(14.6%)であったが、2004年には、第1位(20.9%)となった。最新の調査である2015年に全都道府県を対象に行われた2015年度に新規に視覚障害認定を受けた18歳以上について、年齢や原因疾患、性別等を調査した結果では、視覚障害発生年齢の割合は80-89歳(29.6%)、70-79歳(26.3%)、60-69歳(17.3%)の順に多く、原因疾患の第1位は緑内障(28.6%)、第2位は網膜色素変性(14.0%)、第3位は糖尿病網膜症(12.8%)、第4位は黄斑変性(8.0%)であり、⁵ 推定患者数は約400万人もいるため、⁶ 本疾患に対する十分な理解と適切な治療は、眼科の診療には不可欠である。また、本邦において行われた大規模疫学調査(多治見スタディ)の結果からは、40歳以上の成人の全緑内障有病率は、約5%であることが判明している。⁷ そのうち原発開放隅角緑内障は、3.9%、原発閉塞隅角緑内障は、0.6%、続発緑内障は、0.5%であった。この多治見スタディとこ

れまでに諸外国から報告された有病率(表1)を比較すると、アフリカ系黒人人種の結果を除き日本人における開放隅角緑内障の有病率が世界的に高いことが分かった。

表1

各国における緑内障疫学調査と緑内障有病率について

	施行時期	施行場所	開放隅角緑内障 有病率
Beaver Dam Eye study ⁸	1988-1990	アメリカ	2.1%
Barbados Eye study ⁹	1988-1992	中米	6.9%
Rotterdam Study ¹⁰	1990-1993	オランダ	1.1%
Blue Mountains Eye Study ¹¹	1992-1994	オーストラリア	3.0%
Andhra Pradesh Eye Study ¹²	1996-2000	インド	2.6%
多治見スタディ ⁷	2000-2001	日本(多治見市)	3.9%
Chennai Glaucoma Study ¹³	2002-2004	インド	1.6%

Singapore Malay Eye Study ¹⁴	2004-2006	シンガポール	2.5%
Namil Study ¹⁵	2007-2008	韓国	3.5%

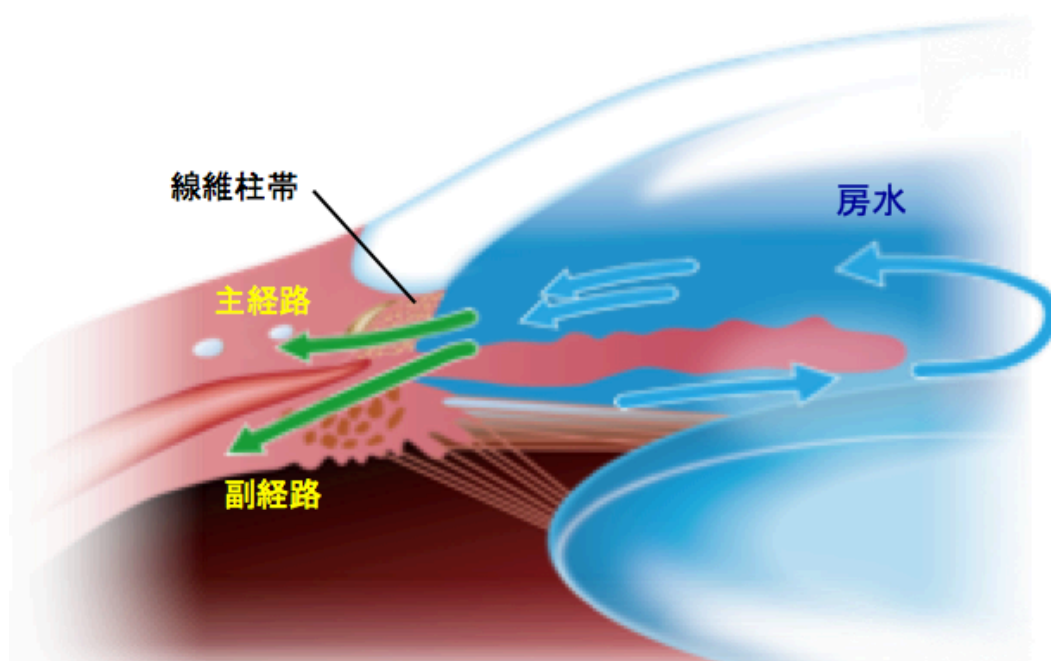
Ⅲ-2. 眼圧

この緑内障における視神経障害および視野障害の最大の病因である眼圧は、眼内を満たしている眼内液すなわち房水による圧力で、ヒトならびに脊椎動物ではほぼ10~20mmHgに保存されている。房水は毛様体上皮で産生され、眼内を還流した後、抵抗の存在する隅角組織の房水流出路を通じて眼外へ排出されることで、眼球内圧を一定に保つ働きを担っている。この働きにより、網膜を一定に伸展し、正常な像を網膜に結像することを可能にしている。また、眼内を還流することで、有害物質の排出や免疫応答においても重要な役割を果たすことが明らかになっている。¹⁶ 毛様体上皮から産生された房水は、後房－瞳孔を經由し前房から隅角組織に流れ、経シュレム管経路（主経路）と呼ばれる線維柱帯間隙－シュレム管－強膜上静脈を通るルート、および毛様体腔－上脈絡膜腔－強膜を通るぶどう膜強膜流出路（副経路）から眼外へ排出される。（図

3)

図3

眼球の前房の構造と房水の循環について

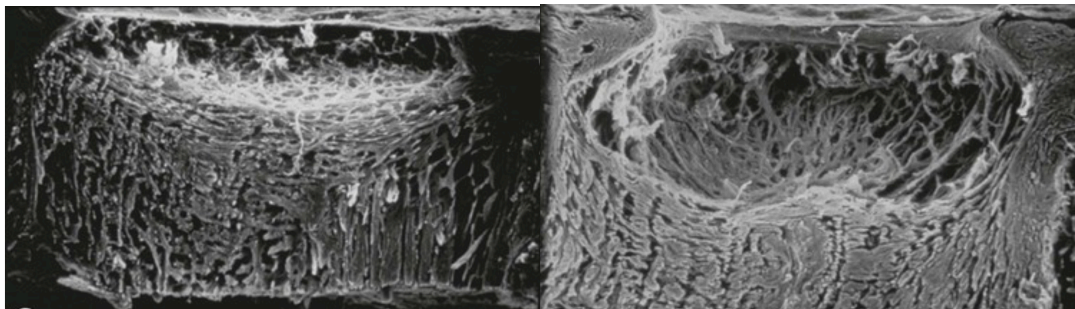


このように眼圧は、房水産生とその排出のバランスで制御されており、日本人正常眼における眼圧の統計学的正常上限値は、19.9-20.0mmHgであると言われている。⁷ この房水産生と排出のバランスが何らかの要因で崩れ、眼圧が高くなると眼内で唯一コラーゲンの強固な角膜強膜が存在しない視神経乳頭において視神経が圧迫され視神経障害が起こり、緑内障の発症・進行につながる。

(図4)

図4

視神経の走査型電子顕微鏡写真



正常の視神経

緑内障の視神経

(Tarek M Shaarawy et al, (2015). GLAUCOMA 2nd edition Elsevier

より引用)

視神経が障害されると乳頭の陥凹の拡大が生じる。

一般的に緑内障は、高眼圧により眼球の視神経障害を来し、一部が失明に至る疾患と考えられているが、日本人の場合は、眼圧が正常値にあるものの緑内障性の視神経障害を来す正常眼圧緑内障(Normal tension glaucoma : NTG)が緑内障患者全体の72%を占めている。^{17 7 18 19} しかし眼圧が統計学的に正常範囲内であっても患者各人の健常眼圧や視神経の脆弱性が異なっているため、圧依存性の視神経障害が生じると考えられおり、NTGでも現に眼圧下降効果により十分な進行抑制が可能である。

緑内障の最大の問題は、眼圧が多少高くても圧痛はない病型がほとんどで、また視野が欠損してきても両眼視や脳の充填現象で気づかないため、病気の初期から中期までは患者の自覚症状に乏しいことにある。そして自覚症状が出始めた頃には末期の障害を来しており、また不可逆的な神経変性であるため、十分に眼圧下降治療を行っても進行が完全には抑制できず、視力低下や失明に至ってしまうことも多い。従って、早期発見および早期治療が重要であるが、検診

の受診率が低いことや診断後の治療からの離脱が多いこと、点眼治療に対するアドヒアランスが悪いことなどにより、現状の治療には多くの課題を抱えている。

また最近では、緑内障による視神経障害が、RGCや視神経だけでなく、視覚中枢神経の外側膝状体(LGN)や視皮質(V1)にまで及んでいることが明らかになりつつあり、²⁰⁻²² たとえ眼内での神経障害を抑制しても、視覚中枢神経系の障害が進行すれば治療としては不十分である。現に十分な眼圧下降治療を行っても末期では進行を停止することは出来ず、視覚中枢神経系での持続的な障害が原因である可能性も否定できない。しかし、現在の緑内障の治療は下記に述べるように、眼圧下降しかない。従って、緑内障による時空間的な中枢神経系の障害を詳細に検討し、眼圧下降以外の神経保護治療法を模索することは重要である。

Ⅲ-3. 治療

緑内障の治療については、これまでの研究結果から、眼圧下降が唯一確実なエビデンスに基づいた治療であると考えられており、眼圧下降は緑内障発症や進行を抑制し、かつ緑内障の病型や病期に関わらず有用であると示されている。

^{23 24 25 26 26 27} このエビデンスを元に現在の緑内障の治療には、眼圧を下げる目的で眼圧下降剤の点眼治療、レーザー手術、観血的手術など様々な手法が用いられている。しかし、末期の緑内障患者では、手術により中心視野が消失し、著しい視力低下を起こしてしまうかもしれないという議論がされ、手術を契機に中心視野の消失と視力の著しい低下がある一定の確率で起きると考えられていて、手術の功罪が問われていた。^{28 29 30 31 32 33 34 35} そこで、2011年に私は、末期まで進行した緑内障患者への手術による影響を調査する論文発表を行い、

たとえ末期であっても眼圧下降も術後の視力障害が軽微であることを確認することができ、眼圧下降のための手術治療の有効性を検証することができた。³⁶

ただ、眼圧を下げることが有効であることは確認されているが、治療介入の時期ならびにその効果を評価するには、現在臨床的に使用されている眼底写真や光干渉断層計による視神経と網膜の組織構造変化や視野検査と視力検査による機能低下だけでは限界がある。また、緑内障の病態として、視覚中枢神経系の障害も伴っているが、現在臨床的に組織障害を把握する方法は開発されていない。従って、より詳細な緑内障性視神経症と二次的な視覚中枢神経系障害の病態を把握して診断し、適切なタイミングで治療介入を検討するためには、実験動物を用いて緑内障の眼圧下降治療の効果の検証、ならびに新たな神経保護治療法の開発が必要であることは論をまたない。

Ⅲ-4. 実験動物での緑内障モデル

緑内障研究を行う上では、代表的な実験動物であるマウス、ラットや、サルを用いた高眼圧モデルが必要で、これまでに多数の緑内障モデルが開発されてきた。マウスは経済的で実験ツールとして有用で、自然発症高眼圧モデルマウスとしての DBA/2J が有名であり、³⁷ 少なくとも 2 つの遺伝子異常が解明されているが、白内障や虹彩萎縮などの前眼部異常も伴い、長期的な実験での観察に向かないデメリットがある。その他にも、遺伝子改変 Cola1a1 マウスなどが知られている。³⁸ 人工的に作成したマウスやラットの高眼圧モデルでは、隅角へのレーザー照射モデル、^{39 40-42 43} 上強膜静脈への高張食塩水注入モデル、⁴⁴ 上強膜静脈の結紮や熱凝固を用いた閉塞モデル、^{45, 46 47 48} マイクロビーズの前房注入モデル、^{49 50 51} シリコンオイルやヒアルロンのような高粘弾剤の前房

への注入モデル、^{52, 53 54} 輪部結紮モデル⁴⁸などが報告されているが、長期間にわたり、安定した高眼圧モデルの確立はいまだに難しく、マウス、ラットではヒトと同等に緑内障を評価する実験系の確立ができていないのが課題である。また、仮にマウス、ラットを実験動物モデルとして使用できたとしても視覚中枢神経の発達が未熟であるためにヒトの緑内障病態を反映した中枢神経障害の研究には限界があった。

そのため緑内障による中枢神経系の障害を詳細に検討するモデル動物として、ヒトに近いサルが用いられてきた。サルではレーザー高眼圧モデルが確立しており、眼球組織構造及び視覚中枢神経系構造も類似しているため、非常に有用なモデルであり、高眼圧による視覚中枢神経障害の研究もある程度は報告されている。^{21 55 56} しかしながら、近年では倫理的な問題や飼育コストが高額である点からも多数の個体を用いて研究を行うことが難しく、実験から得られるデータに限界があった。

我々が用いたフェレットは、体長が約 40cm、眼球径 7mm 程度のイタチ科食肉目の哺乳動物である。マウス、ラット等に比べて眼球径が大きく、機能的に発達した大きい中枢神経系を持っているため、高度な視覚神経系を持ち、マウスでは 5%程度しか非交叉性神経線維がないのに対し、フェレットでは 15%程度の非交叉性神経線維が存在している。中枢神経系の発達はサルに比べると劣

るものの、サルと比べると1匹あたりのコストが安く、比較的安価に個体数を管理することができるという利点がある。それゆえ、欧米では実験動物としての社会的なコンセンサスが得られているが、眼科疾患への応用はこれまでのところ報告がなく、今回の研究で用いるのは、世界で初めての試みである。

以上から、マウスやラットより発達した中枢神経系をもち両眼視機能もあるが、飼育や管理がサルより容易であるフェレットが緑内障の研究を行う点で優位性が高いことに着目をした。

IV. 研究目的

- 研究 1

フェレットを用いて高眼圧によるGONを有する緑内障モデルを確立すること

- 研究 2

確立したフェレット緑内障モデルを用いて、緑内障によるGONに伴うLGNの組織学的変化を検討すること

V. 研究 1 フェレット緑内障モデルの確立

V-1. 研究 1 背景

これまでにマウスやラットを利用した多くの緑内障モデルが開発されている^{38, 42, 43, 45, 46, 57-62}が、フェレットでは、確立された緑内障モデルがない。そこでまず、背景で述べたモデル作成方法は全て試みたが、眼圧は上昇しなかった。また、レーザー光凝固による緑内障マウスモデル作成の方法を発展させ、前房水を吸引して前房を消失、虹彩を平坦化することで、虹彩と角膜の癒着を起こしやすくした上で隅角での癒着形成とそれに伴う房水排出の閉塞を目的として

隅角のレーザー光凝固を試みた。しかし、フェレットでは、隅角の癒着形成をすることができずに緑内障モデルの作成に失敗した。このように、フェレットで安定した緑内障モデルを確立するのは失敗の連続であった。(表2)

緑内障モデルの作成が極めて困難であったのは、フェレットが前房水の産生能力と隅角からの排泄能力が極めて高いためであった。上記のように前房水を人工的に抜き取っても短時間ですぐに前房が元に戻り、レーザー光凝固による癒着の形成ができないことや、前房にシリコンオイルやラテックスビーズを注入しても他の動物では、注入物質が隅角に留まることで房水の閉塞が起き眼圧が上昇するが、フェレットでは、翌日以降すぐに注入物質が隅角から結膜下へ排出されてしまい隅角閉塞を起こすことができなかった。このようにフェレットの隅角の機能と構造が特異的な点から、これまで報告された方法では、眼圧上昇を誘発することが困難であり、全く新規の方法を開発する必要があったことが、高眼圧モデル作成の難易度が非常に高い原因であった。

様々な試行錯誤の結果として最終的に、過去の侵襲が強い眼内手術後の合併症として報告されていた、迷入した結膜上皮細胞が前房内で増殖し続発性緑内障をきたすというepithelial downgrowthの病態⁶³⁻⁶⁵を模倣し、in vitroで培養した結膜細胞懸濁液の注入を試みることにした。

表2

過去に報告がある緑内障動物モデル作成方法のフェレットへの応用

緑内障モデル	動物種	利点	欠点	フェレットでの結果
強膜上静脈の閉塞 ^{60, 66-68}	マウス、ラット	眼底観察可能	眼圧上昇期間が短い	上昇なし
線維柱帯の光凝固 ^{39, 40, 69}	サル	眼底観察可能	眼圧上昇期間が	上昇なし

生理食塩水の上強膜静脈への注入 ⁴⁴	マウス、ラット	眼底観察可能	短い	上昇なし
			眼圧上昇期間が短い	
輪部結紮モデル ⁴⁸	ラット	眼底観察可能	短い	上昇なし
			眼圧上昇期間が短い	
ラテックスビーズ ⁴⁹⁻⁵¹	マウス、ラット、サル	眼圧上昇期間長い	眼底観察不可	眼外へ排出され、上昇なし
			眼圧上昇期間が短い	
ヒアルロン酸のような高粘弾性材料 ^{53, 54}	マウス、ラット	眼底観察可能	眼圧上昇期間が短い	眼外へ排出され、上昇なし
			眼圧上昇期間が短い	
シリコーンオイル ⁵²	ラット	眼底観察可能	眼底観察不可	眼外へ排出され、上昇なし
			眼圧が高度に上昇	
結膜上皮細胞注入 ⁶³⁻⁶⁵ (手術の合併症)	ヒト	眼圧上昇期間長い	眼圧が高度に上昇	高度に上昇
			眼圧が高度に上昇	

V-2. 研究 1 方法

① 実験動物

マーシャル・バイオリソーシス・ジャパン株式会社より米国の Marshall

BioResources で繁殖された 700g から 1200g(16 週から 32 週齢)のメスのフ

エレットを 22 匹購入し、実験に用いた(結膜採取用 : 1 匹、高眼圧用 : 15 匹、

コントロール : 6 匹)。また、フェレットは、購入後、実験予定日の少なくとも 1

週間前から、研究室の動物室にて飼育を行い、十分な順化期間を設けた。飼育環境は摂氏 23℃で、12 時間の明環境、12 時間の暗環境のサイクルを保ち、水と餌は飼育期間中、自由に取得できるような環境にした。すべての動物実験は東京大学大学院医学系研究科の動物実験に関する倫理ガイドライン(承認番号：1795、承認日：2010 年 2 月 10 日)に従って行われ、すべての動物実験は眼科および視覚研究における動物の使用に関する Association for Research in Vision and Ophthalmology(ARVO)のガイドラインに従って行われた。

② フェレットの麻酔方法

フェレットの実験を行うときの全身麻酔については、ケタミンとキシラジンを混合した麻酔薬を用いて、室温下(飼育環境は 23℃)で筋肉注射を行って全身麻酔をかけた。麻酔の薬剤量については、麻酔前にフェレットの体重測定を行い、

ケタミンは、30mg/kg、キシラジンは、0.7mg/kg で投与を行った。一方、眼球に対する局所麻酔については、眼球に対する処置を行う前に、オキシブプロカインの点眼を両側の眼球に対して行った。

③ 結膜細胞の準備

1匹のフェレットに全身麻酔をかけ、眼球を局所麻酔した後に、1mm × 2mm の長方形の結膜組織を別のフェレットの眼球から切除し、100 µg/ml の

ストレプトマイシンを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に入れ、結膜を小さな断片にした。その後、ダルベッコの最小必須培地(DMEM)で標準条件下(湿潤、5%CO²、37°C)のもとに培養を行った。DMEMには、20%ウシ胎児血清(FBS)、および 100 µg/ml ストレプトマイシンを添加した。細胞培養は、8 週間行うとで、結膜細胞は完全にコンフルエントとなり、結膜細胞が線維芽細胞に形質転換していることが確認できた。線維芽細胞は、完全なコンフルエントになった後、7 日ごとに繰り返し継代培養を行った。培養した線維芽細胞は、培養のために結膜を取得するのに使用していない他のフェレットへ注入するために用いた。

④ 培養細胞の前房への注入と眼の術後処置

コンフルエントの培養線維芽細胞を用いてトリプシン処理を行い細胞間の結合をなくし、細胞を単一に分離した細胞懸濁液(3.3×10^4 cells/ml)を作成した。高眼圧を誘導するために、32 ゲージの針で右眼の前房に 50 μ l ずつ懸濁液を注入し、左眼は未処置にした。(n=15)

前房への培養細胞注入後、注入した右眼と未処置の左眼の角膜を 0.3%のオフロキサシンの軟膏を塗布し乾燥と感染防止の処置を行った。また、両眼とも何も処置を行わないフェレットは、コントロールとした。(n=6)

15 匹フェレットの右眼は、前房に培養細胞を注入することによって高眼圧眼(G1)とした。その反対眼の左眼は、高眼圧眼の対側眼(G2)とした。さらに、両眼ともに処置を行わない 6 匹のフェレットの 12 眼をコントロール眼(G3)とした。

⑤ 眼圧と眼球径の測定

フェレットを前述の②のように筋肉注射で全身麻酔、眼球には局所麻酔し、腹臥位でフェレットを平らな台に置いたのちに、眼圧は TonoLab[®]（Tiolat 社、ヘルシンキ、フィンランド）を使用して測定をおこなった。

TonoLab[®]の測定は、6 回の連続した測定値を自動的に平均化された測定値をその時の眼圧として表示をする。平均測定の統計的信頼性が保たれている表示があるときの測定値は採用し、その表示がでていない時は、測定値としては採用しないこととした。眼圧測定は、細胞注入前を 0 週として、その後に細胞注入を行った翌週から 13 週間にわたり毎週、眼圧測定を行った。

眼球径は、培養細胞注入後 13 週間の間、Digimatic Caliper Absolute[™]（Mitsutoyo、栃木、日本）を使用して毎週、角膜の直径を測定した。

⑥ 視神経の乳頭陥凹と視神経軸索の組織学的検討

13 週間の高眼圧の経過観察を終えたあと、フェレットを前述の方法②の筋肉注射によって、全身麻酔、眼球の局所麻酔を行った。その後、眼球を視神経が付着した状態で頭蓋から摘出を行った。眼球は、ティッシュ・テック O.C.T. コンパウンド[®] (凍結組織切片作製用包埋剤) (Sakura Finetek、東京、日本)(OCT)に包埋し-80℃に急速凍結した。凍結後、眼球の水平断面の切片(組織厚 : 10μm)を作成し、H.E で染色を行い、光学顕微鏡を用いて組織切片を観察し、解析を行い、視神経乳頭陥凹を評価した。

次に、視神経は、眼球摘出後に眼球から切り離し、3%グルタルアルデヒドと2.5%ホルマリンで固定し、OCT に包埋し、-80℃に急速凍結した。水平断面の組織切片は、視神経の眼球付着部から約 2mm で作成(組織厚 : 10μm)を行った。その後、H.E で染色し、光学顕微鏡と蛍光顕微鏡を使用して観察と解析を行った。

⑦ フェレット高眼圧モデルにおける視覚中枢のマクロ、ミクロ解析

眼球の視神経から LGN への視覚中枢の高眼圧による神経障害を解析するために、既報に基づいて眼球に色素標識された Cholera Toxin B(CTB)を注入した。^{70 71} その方法は、Alexa 555(赤色の色素)または Alexa 488(緑色の色素)に結合した CTB をフェレットの眼球の強膜から硝子体中に 33 ゲージ針を用いて 5μl ずつ注入を行った。赤の CTB は、各フェレットの右眼に、緑の CTB は、左眼にそれぞれ注入した。

線維芽細胞注入 1 3 週後 CTB 注射 4 日後に安楽死を行い、視神経が付着した眼球と脳を摘出した。その後、OCT に包埋し-80℃に急速凍結した。凍結後、眼球の水平断面の切片(組織厚 : 10μm)を作成し、H.E で染色を行い、光学顕微鏡を用いて組織切片を観察した。視神経の神経障害を解析するために、右眼では赤 CTB、左眼では緑 CTB で染色された軸索束の数を蛍光顕微鏡でカウントして右眼が高眼圧フェレットの眼球(G1 と G2)と両眼の無処置のフェレットの眼球(G3)との間で比較を行った。

次に、LGN における神経障害の解析は、光学顕微鏡と蛍光顕微鏡を使用して、高眼圧フェレットとコントロールフェレットでマクロ的な画像撮影を行った。

撮影した画像から、高眼圧フェレットとコントロールフェレットとにおける左右の LGN を比較した。比較の際に LGN における CTB 蛍光の輝度の平均値は、Image J[®]（米国国立衛生研究所、米国メリーランド州ベセスダ、アメリカ）を使用して統計解析を行った。

⑧ 統計方法

すべてのデータは平均±標準偏差として表示した。培養細胞の注入された眼と未処置の眼の間の眼圧の違いは、ボンフェローニ補正をした対応のある t 検定によって検討した。眼の直径、軸索束の数、細胞注射された眼と未処置の眼の間の蛍光色素の輝度の平均値は、対応のない t 検定で検定を行った。

有意水準は、 $p < 0.05$ とした。

V-3. 研究 1 結果

① 眼圧の経過

以下、結膜上皮細胞注入した眼(右眼)を G1, 反対の無処置眼(左眼)を G2, コントロールのフェレットの両眼を G3 とする。まず、コントロール眼(G3)の眼圧の経過を 13 週にわたって測定した。測定開始時、13 週後での右眼と左眼の平均眼圧は、それぞれ右 15.6 ± 3.1 と左 14.8 ± 3.6 mmHg、右 14.9 ± 3.9 と左 15.4 ± 2.4 mmHg であった。コントロール眼(G3)では、右眼と左眼の眼圧に有意差はなかった。(n=6、対応のある t 検定、 $p > 0.05$; 図 5)

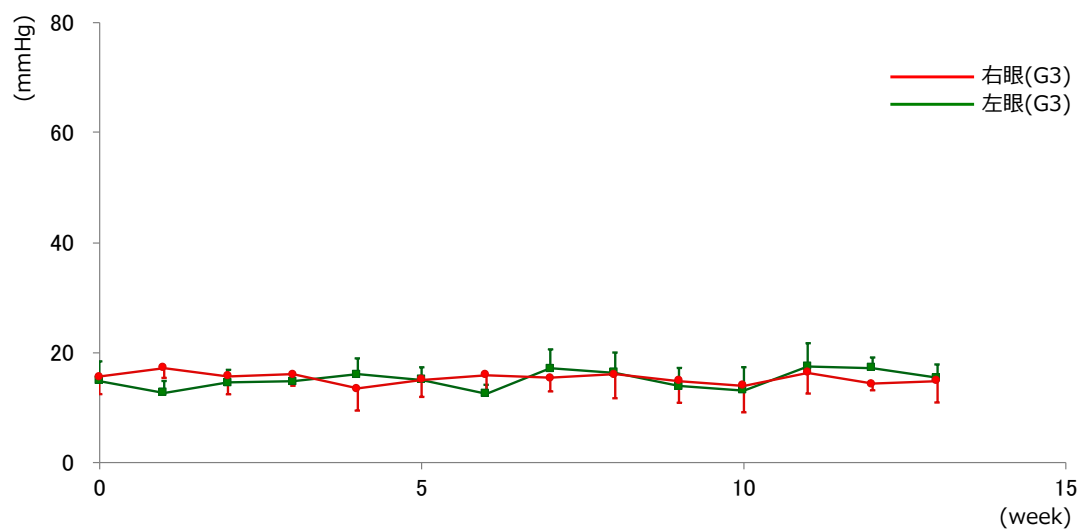
前房に培養細胞注入を行った 15 匹のフェレットの中で、眼圧上昇は細胞注入後の翌週から 14 匹のフェレットで確認できた。上昇しなかった 1 匹のフェレットでは、細胞注入から 1 週間後に右眼の細菌感染が生じていて、眼球瘻となっていた。測定開始時点での右処置眼(G1)と左無処置眼(G2)の平均眼圧は、それぞれ 18.2 ± 2.2 と 17.4 ± 2.9 mmHg であった(n=14、対応のある t 検定、 $p > 0.05$)。培養細胞注入をしてから 13 週間における右処置眼(G1)と左無処置

眼(G2)での平均眼圧は、それぞれ 42.8 ± 15.3 と 14.1 ± 3.9 mmHg であった。

右眼(G1)の眼圧は、左眼(G2)の眼圧よりも有意に上昇していた。(n=14、対応のある t 検定、 $p < 0.001$; 図 6)

図 5

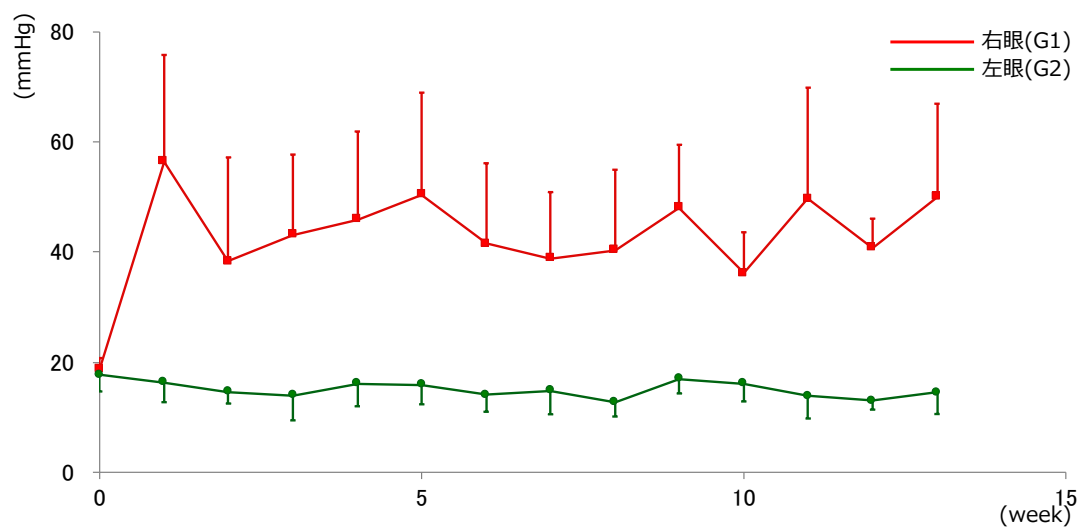
コントロールのフェレットの眼圧経過



(平均眼圧 \pm S.D.) (n=6)

図 6

高眼圧フェレットの眼圧経過



(平均眼圧±S.D.) (n=14)

② フェレット高眼圧モデルの視神経乳頭の組織学的解析

マクロ的には、虹彩表面における注入細胞の増殖、およびレンズと虹彩の間の線維性接着が、培養細胞注入の1週間後から観察された。一部の高度の高眼圧をきたしたフェレットの眼球においては、角膜浮腫がみられた。(図7)

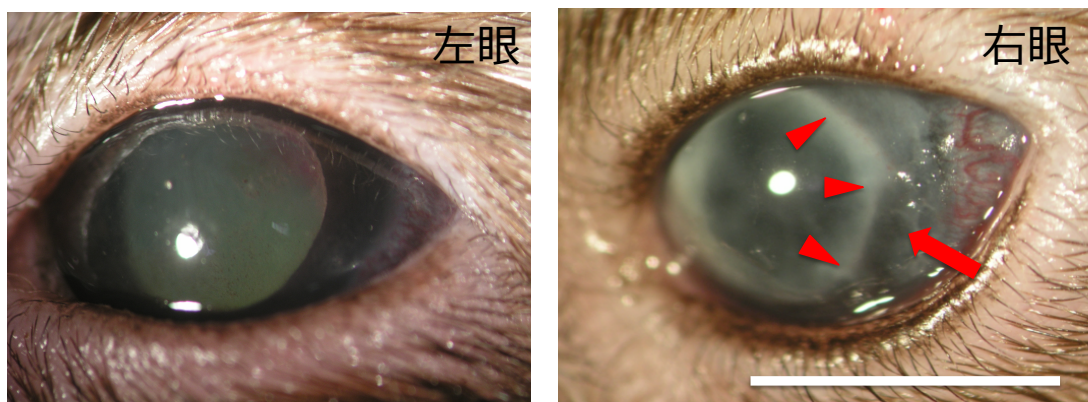
高眼圧の影響で眼球の角膜径は徐々に拡大した。細胞注入から13週間後に眼球摘出を行って、右と左の眼球の角膜径を比較すると、それぞれ $7.76 \pm 0.33 \text{ mm}$ と $6.64 \pm 0.13 \text{ mm}$ であり、有意差が見られた。(n=8、対応のあるt検定、 $p=0.00002$) (図8)

光学顕微鏡を用いて隅角の観察を行うと、注入した培養細胞が眼内で増殖を起こし、隅角が閉塞していた。(図9)

さらに、網膜の切片においては、緑内障の特徴的な所見である視神経乳頭の陥凹拡大も観察できた。(図10)

図 7

細胞注入 1 週間後の眼球

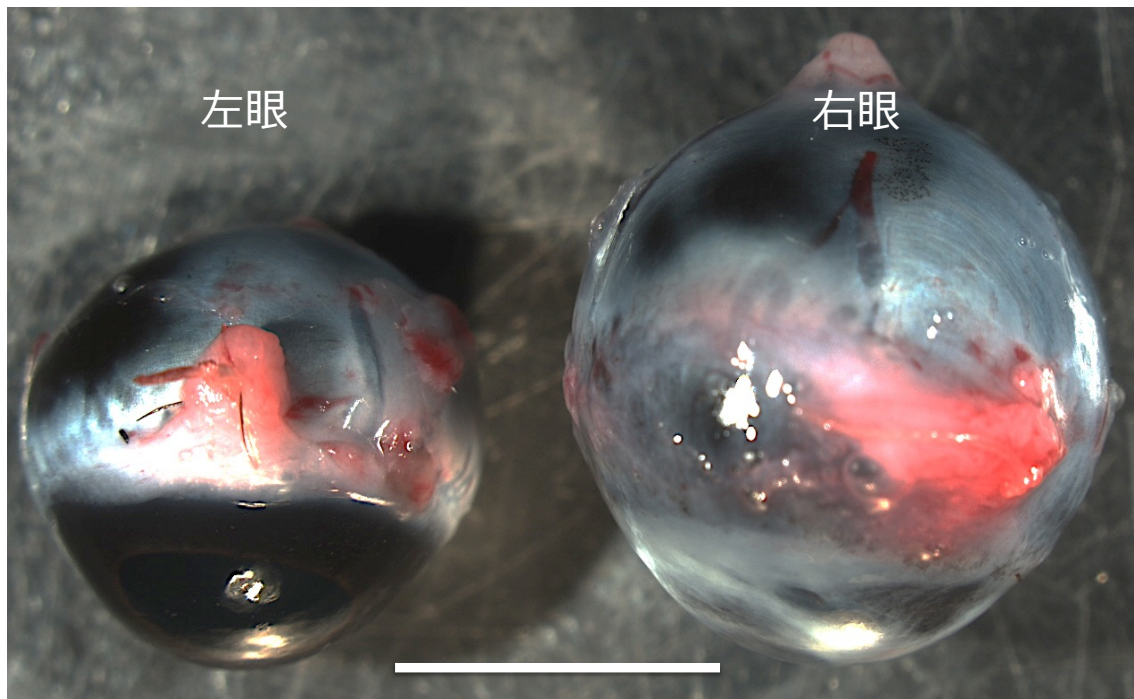


虹彩表面における培養細胞の増殖(赤矢印)、およびレンズと虹彩の間の線維性
接着(赤矢じり)が、注射の 1 週間後から観察された。角膜浮腫も一部の著明な
高眼圧眼でみられた。

白線は 5mm を示す。

図 8

右眼(G1)と左眼(G2)の眼球径の比較 (注入 13 週後で摘出)

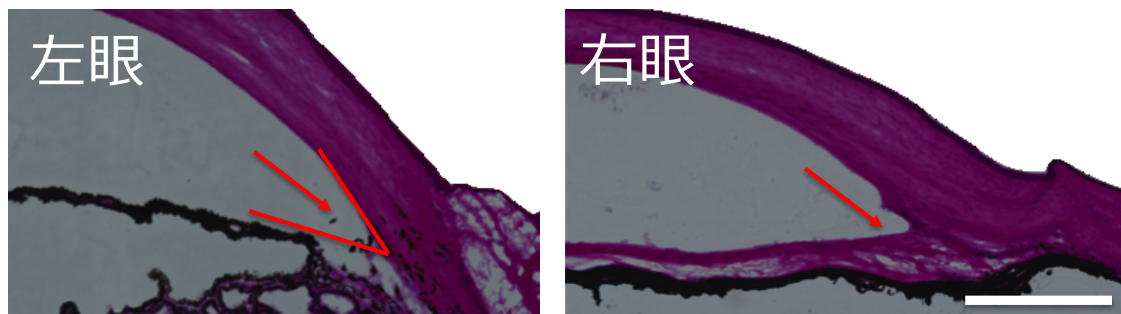


右眼は左眼と比べ眼球径の拡大がみられた。

白線は 5mm を示す。

図 9

眼球の水平断面 (H.E.染色 : 組織厚 10 μ m)

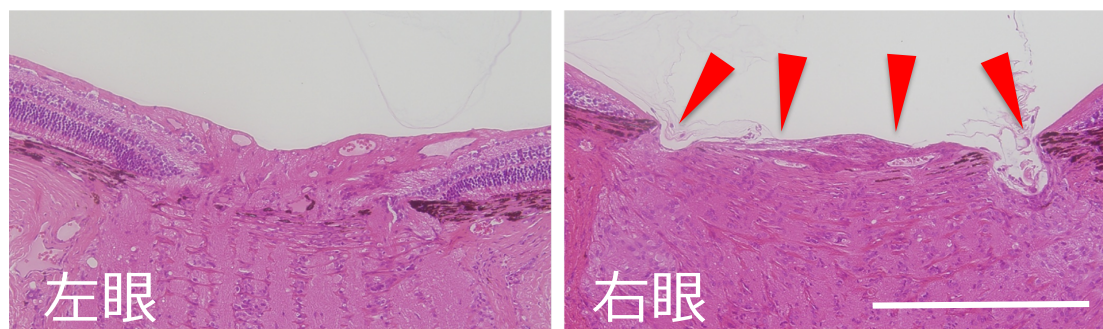


注入した培養細胞が眼内で増殖を起こし、隅角を閉塞している。(右の赤矢印)

白線は 500 μ m を示す。

図 10

右眼(G1)および左眼(G2)の視神経乳頭陥凹の写真



視神経乳頭陥凹の拡大がみられた。(H.E 染色：赤矢印)

白線は 500 μ m を示す。

③ 視神経乳頭の軸索の障害解析

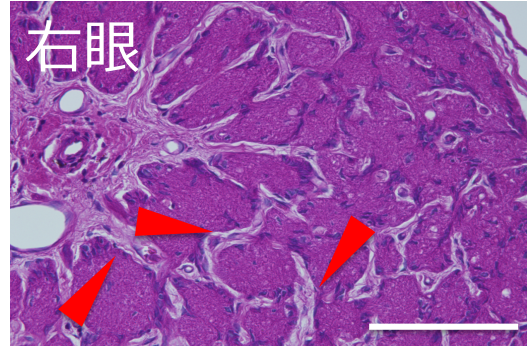
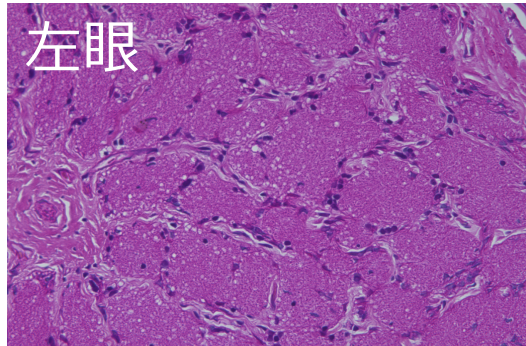
視神経乳頭付着から 2 mm のところでの視神経の水平断面の組織画像を光学顕微鏡で観察したところ、高眼圧となった右眼(G1)の視神経では、左眼(G2)の視神経と比較して軸索束を囲む結合組織が肥厚していた。(図 11)

さらに、蛍光顕微鏡での観察したところ、高眼圧となった右眼(G1)の視神経では、左眼(G2)の視神経とコントロールフェレット(G3)の視神経と比較して、染色される軸索束が明らかに減少していた。高眼圧となった右眼(G1)とその左眼(G2)の視神経における軸索束の数はそれぞれ 41.6 ± 25.8 、 132.6 ± 20.2 本であり、右眼(G1)の軸索束の有意な減少を確認できた。(n=5、対応のない t 検定、 $p=0.00016$)(図 12)

その対側の左眼(G2)の軸索束の数は、コントロールフェレット(G3)の左眼と比較して有意差はなかった。(n=5、対応のない t 検定、 $p=0.42$) (図 12)

図 11

視神経乳頭付着部から 2 mm のところで H.E で染色した視神経の水平断面の光学顕微鏡写真



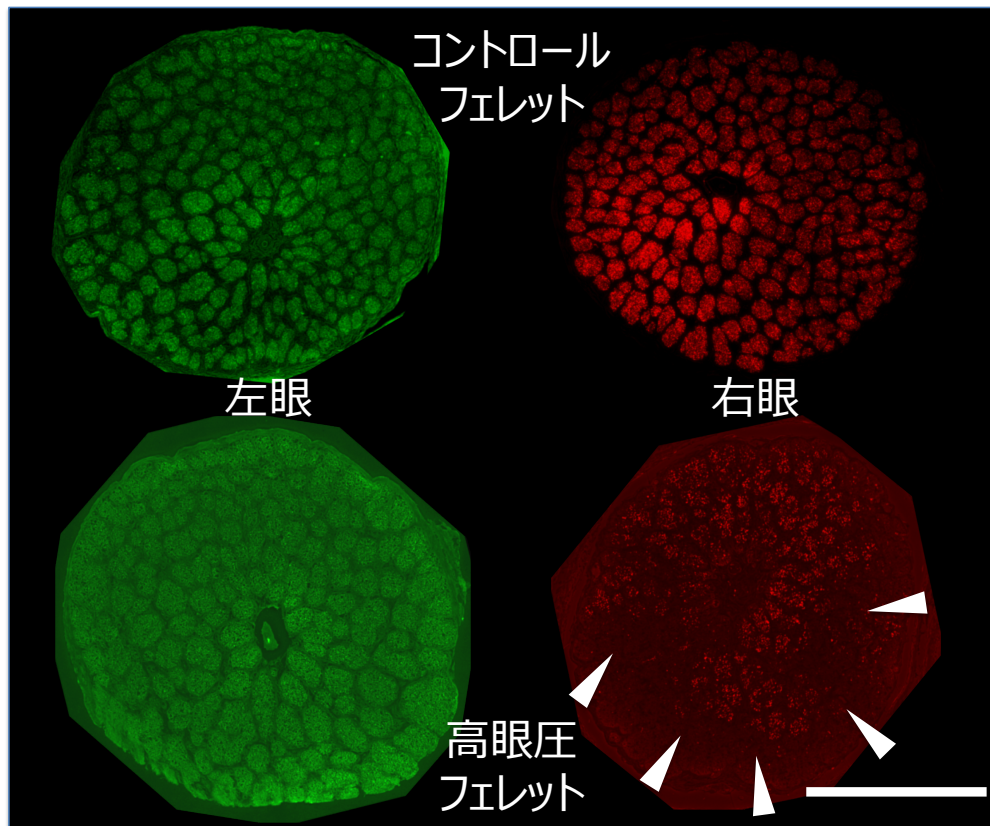
結合組織が、左眼(G2)と比較して右眼(G1)で肥厚していた。（赤矢じり）

白線は、200 μ m を示す。

図 12

視神経乳頭付着から 2 mm のところで CTB 染色された視神経の水平断面の蛍

光顕微鏡写真



高眼圧の右眼(G1)の軸索束の数は、コントロールフェレット(G3)の右眼と比較して大幅に減少していた。(白矢じり部分の軸索束の赤色素の脱落が見られた)($n=5$ 、対応のない t 検定、 $p=0.00016$)

その対側の左眼(G2)の軸索束の数は、コントロールフェレット(G3)の左眼と比較して有意差はなかった。($n=5$ 、対応のない t 検定、 $p=0.42$)

白線は、500 μm を示す。

④ フェレット高眼圧モデルにおける視覚中枢のマクロ解析

高眼圧期間が 13 週間となった後に、前述の②の筋肉注射によって、全身麻酔をかけたのちに眼球と脳を頭蓋骨から摘出し、眼球への CTB の適切な注射が行われていることと免疫組織染色について蛍光顕微鏡を用いて確認を行った。

コントロールフェレットでは、赤と緑の CTB がそれぞれ右眼と左眼に注入されていることが確認でき、上丘(SC)と LGN の両側に投射がされていた。(図 13、14)

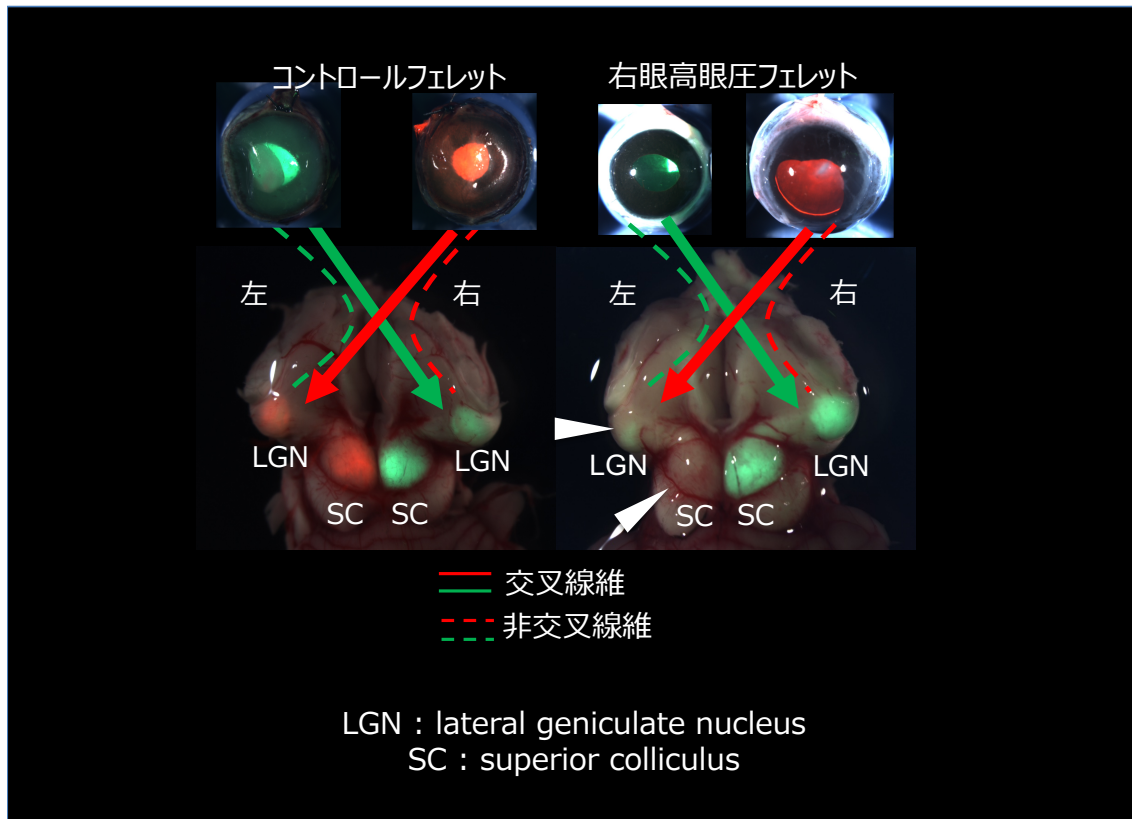
右眼に培養細胞注入を行ったフェレットでは、赤と緑の CTB がそれぞれ右眼と左眼に注入されていることが確認できたが、高眼圧となった右眼から投射する赤の CTB は、両側の SC および LGN に投射されなかった。(図 13)

8 匹の高眼圧フェレットにおける LGN 蛍光の輝度の平均値は、右 LGN (緑の CTB) で $37.4 \pm 21.7 \text{arb.unit}$ 、左 LGN (赤の CTB) で $9.1 \pm 13.9 \text{arb.unit}$ であった。輝度の平均値は、左側の LGN(赤の CTB)で有意に減少していた。

(n=8、対応のない t 検定、 $p=0.0044$)

図 13

フェレットにおける視覚中枢の光学顕微鏡と蛍光顕微鏡の写真の merge 画像



右眼と左眼にそれぞれ注入された赤と緑のCTBが対側のLGNとSCに投射されていることが確認できた。

コントロールフェレットの右眼(G3)と左眼(G3)にそれぞれ注入された赤と緑のCTBは、SCとLGNの対側に投射されている。(図左側)

コントロールフェレットの LGN では、交叉性線維が表層の LGN に投射するため、非交叉線維が投射する深層の LGN の CTB の色素の色は、この写真では、確認をすることができない。

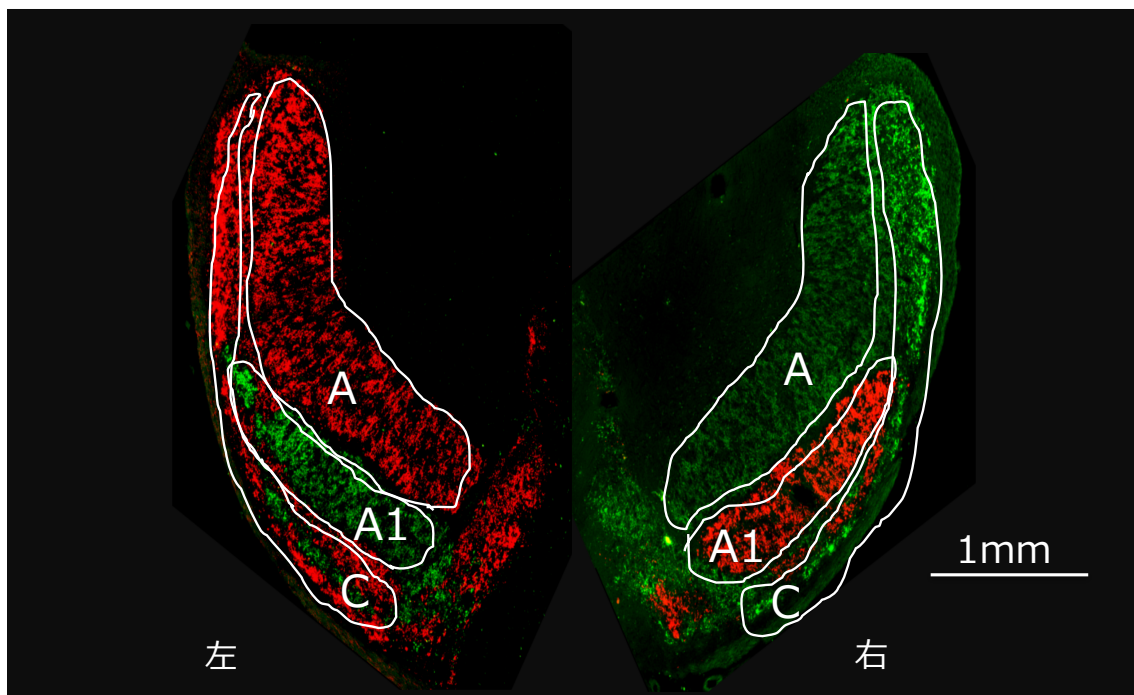
一方、右眼に培養細胞を注入した右眼が高眼圧のフェレットでは、高眼圧の右眼(G1)から投射される赤 CTB は、対側の SC および LGN に投射されていない。左眼(G2)から投射される緑 CTB は、両側の SC および LGN に投射されていた。

(図右側)

(同側性に投射する緑 CTB がこの場合は、赤 CTB の投射が減弱するため確認することができる)

図 14

コントロールフェレットの LGN の水平断面写真



LGN の水平断面を確認すると、両側に赤と緑の CTB が取り込まれていることが確認できる。

VI. 研究 2 フェレット高眼圧モデルでの緑内障による視覚中枢障害の解析

VI-1. 研究 2 背景

RGC は、ヒトを含む霊長類では、Parvo cell、Magno cell、Konio cell の 3 つの細胞型に機能的に分類され、²² フェレットでそれに対応する細胞は X、Y、W cell として知られている。⁷² (表 3)

表 3

ヒトとサルの RGC とフェレットの RGC の対応表

フェレット	サル、ヒト	RGC	機能
X	P	Parvo cell	形態覚、色覚の認識
Y	M	Magno cell	空間視、運動視の認識
W	K	Konio cell	青/黄の識別？詳細は不明

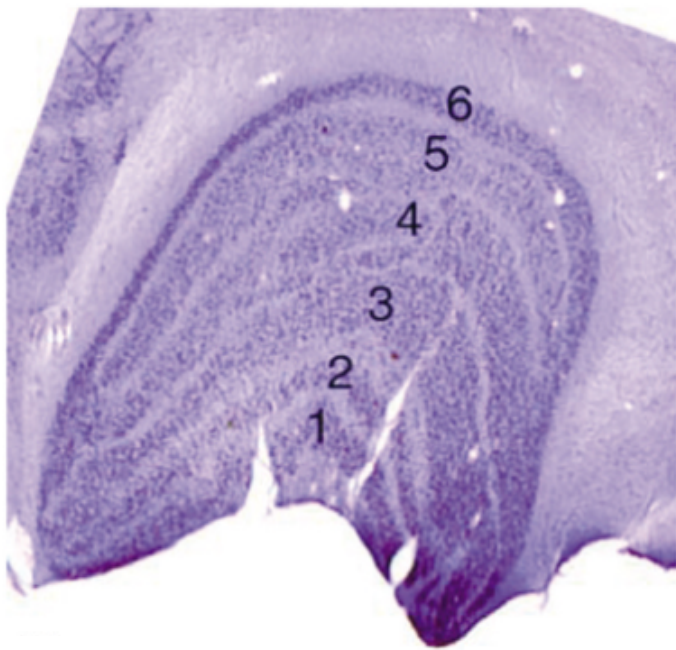
この眼球の網膜における Parvo cell、Magno cell、Konio cell の 3 つのタイプの細胞は、高眼圧による障害の感受性が異なり、視神経からシナプスを介して LGN に接続するが、LGN においても、神経変性が解剖学的な網膜からの接続部位の異なりから生じている可能性が指摘されていて、^{73 74 75 76} これらの中で、青緑/黄色の識別処理を行う Konio cell(フェレットの W cell)の障害は、緑内障初期から Parvo cell(フェレットの X cell)、Magno cell(フェレットの Y cell)の障害よりも早くから起こることが一部で報告されている。^{22 77 78} 以上のことから、ヒトやサルにおける Konio cell すなわちフェレットの W cell の緑内障における解析は非常に重要である。

また、視覚の中継核である LGN の構造は、サルやヒトと同様にフェレットでも 6 層の層構造を形成している。(図 15) サルにおける LGN の層構造は 1 から 6 層と定義され、1, 4, 6 層へは同側眼球の神経線維が投射し、2, 3, 5 層へは対側眼球の神経線維が投射している。1, 2 層は Magno cell から構成される細胞群を占めている一方、3, 4, 5, 6 層は Parvo cell から構成される細胞群で占められている。²² (図 16) Konio cell から構成される細胞群は、この 6 層にはっきりとした分布を示さず、1 から 6 層の層間にわずかに存在するだけである。ヒトやサルの LGN において、Konio cell の解析が難しいため、緑内障

の病因における Konio cell の障害に関する詳細な報告はこれまでにはほとんどなく、今後の検討が待たれていた。

図15

サルのLGNの構造

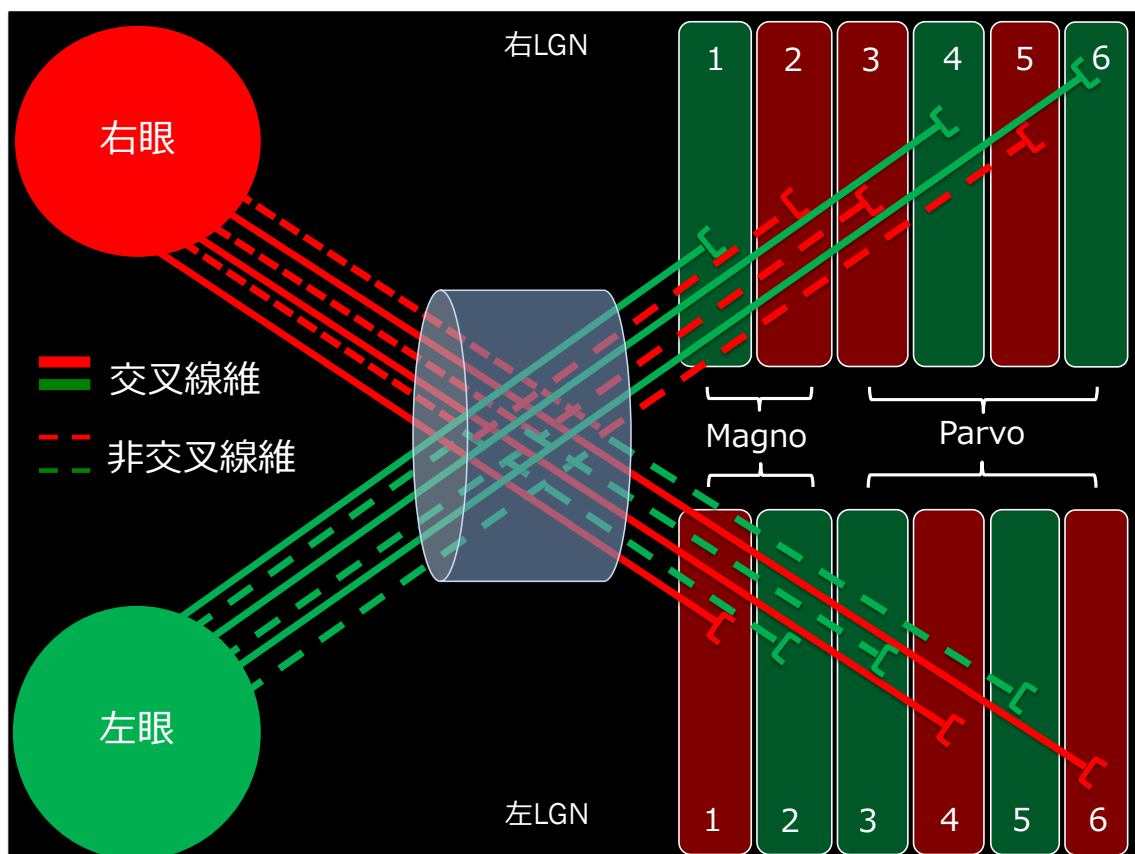


サルの LGN の画像 (参考文献 66 より転載)

1 から 6 層の層間に Konio cell が存在している。

図 16

サルの LGN の層構造の模式図



Magno cell は 1、2 層に投射する。

Parvo cell は、3、4、5、6 層に投射する。

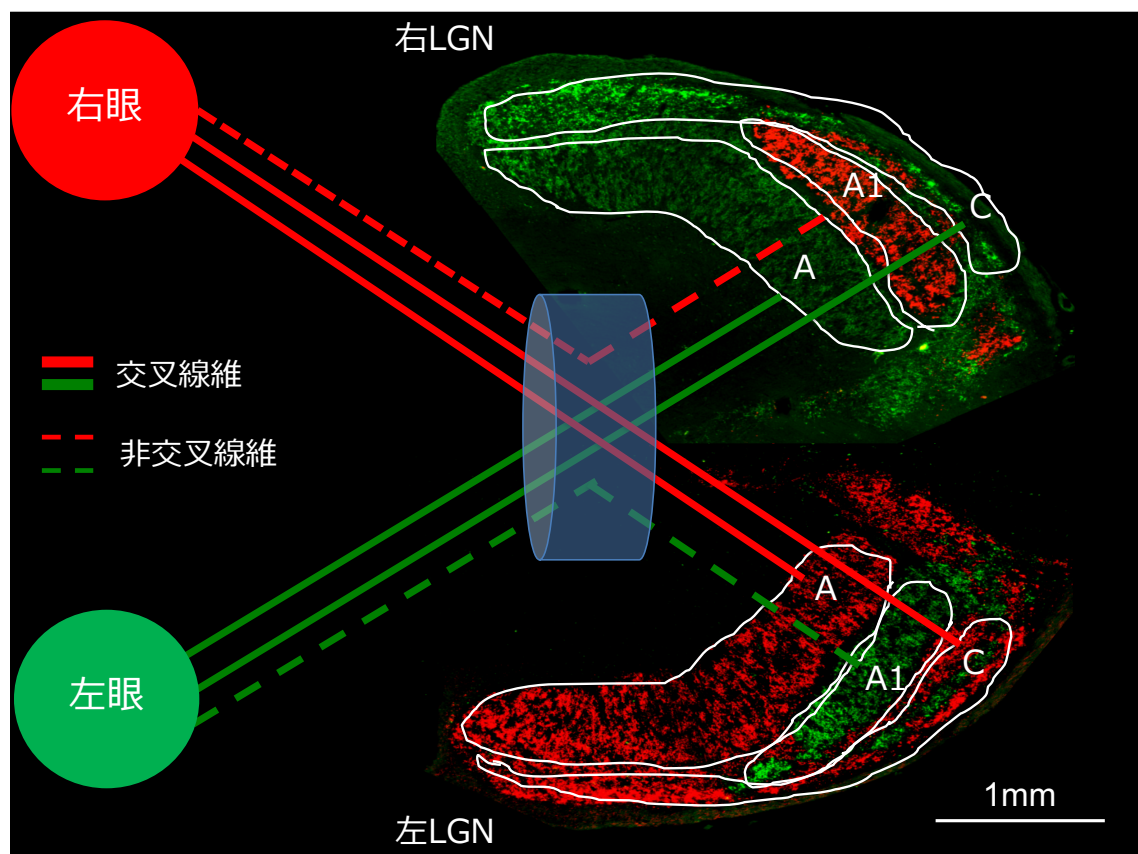
Konio cell は、層間に投射する。

一方、フェレットでは、LGN の層構造は大きく分けると 3 つの A、A1、C 層に分かれている。さらに A 層は、A on 層、A off 層の 2 層に分かれ、A1 層は、A1 on 層、A1 off 層に分かれ、C 層は、C ipsi 層、C contra 層 の 2 層に分かれ、合計 6 層から構成されると定義されている。^{70 79} (図 17) また、フェレットの W cell は LGN の C 層という背側領域に明確かつ独立して局在した層構造に投射するため、解析が容易であるという特徴がある。^{80 81 22, 77 82}

以上のことから、研究 2 では、確立したフェレット高眼圧モデルを用いて、視覚中枢神経に生じている障害を免疫組織学的に解析することにした。

図 17

フェレットの LGN の構造



A 層と C 層は対側に投射されるが、A1 層は同側に投射される。

右眼と左眼にそれぞれ注入された赤と緑のCTBは、LGNの両側に投射される。

白線は、1 mmを示す。

VI-2. 研究 2 方法

- ① 実験動物
- ② 培養線維芽細胞の準備
- ③ 培養細胞の注入と眼球のケア
- ④ 眼圧測定
- ⑤ CTB トレーサーの眼球への注入

以上の①から⑤に関しては、研究 1 と同様に実験を行った。研究 1 と異なり、研究 2 では、10 匹フェレットを対象とし、右眼は、前房に培養細胞を注入することによって高眼圧眼(G1)として、その左眼は、高眼圧眼の対側眼(G2)とした。さらに、両眼ともに処置を行わない 6 匹のフェレットの 12 眼をコントロール眼として使用した(G3)。

⑥ 高眼圧モデルにおける視覚路の解析

線維芽細胞注入 13 週後 CTB 注射 4 日後に脳の摘出を行い、視床と脳幹を大脳から分離し、OCT に包埋し、 -80°C に急速凍結した。クリオスタットを使用して、LGN(組織厚 : $14\mu\text{m}$) の水平断面の組織切片を作成した。その組織切片を 4% パラホルムアルデヒド(PFA) を含んだ PBS で 10 分間固定し、蛍光顕微鏡を使用して観察した。

高眼圧フェレット(G1、G2)とコントロールのフェレット(G3)の LGN での平均蛍光強度を比較するために、LGN の A、A1、および C 層において、 $200\times 200\mu\text{m}^2$ の画像を取得した。写真撮影をするときには、同じ手順、同じ撮像条件、同じコントラストですべての画像を取得した。データの信頼性を高めるために、A、A1、および C 層で 2 つの異なる場所(LGN の内側と外側)を $200\times 200\mu\text{m}^2$ のサイズで解析に使用した。最後に ImageJ[®] を使用して蛍光強度を測定した。LGN の各層(A 層、A1 層、C 層)の平均強度は、高眼圧のフェ

レット(n=10)(G1、G2)とコントロールのフェレット(n=6)(G3)との間で比較をした。また、蛍光強度の変化率を各層(A層、A1層、C層)において算出した。

⑦ 高眼圧モデルにおける免疫染色を用いた視覚路の解析

免疫染色は、既報に記述された方法からわずかな変更を加えて実験を行った。

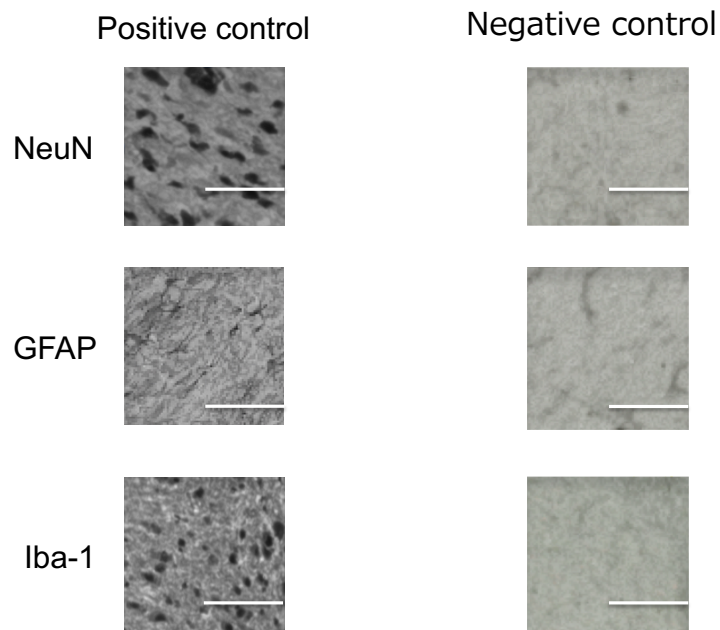
^{81, 82} 今回の実験では、最初に予備実験を行い、ニューロン、アストロサイトとミクログリアが抗 NeuN モノクローナル抗体(MAB377; Chemicon, USA)、抗 GFAP モノクローナル抗体(G3893、Sigma-Aldrich、ミズーリ州セントルイス)と抗 Iba-1 ポリクローナル抗体(019-19741;和光、大阪、日本)がそれぞれできちんと染色がされていることを確認した。⁸³ 免疫染色は同じ抗体ロットを使用し、同一の手順、画像撮像条件、コントラスト条件下で行われ、手順は同じプロトコルで同じ検者によって行われた。(図 18)

次に、組織検体の水平断面（組織厚：14 μ m）は、クリオスタットを使用し、作成し、4%PFA で 10 分間固定し、0.1%Triton X-100/PBS で透過処理し、

0.01M PBS(pH 7.4)で洗浄した。次に、0.01M PBS 中の 10%正常ヤギ血清と 30 分間ブレインキュベートし、一晩の間 4℃で 1 次抗体と混合してインキュベートした。1 次抗体は、マウス抗 NeuN モノクローナル抗体(1 : 1000 希釈)(MAB377; Chemicon、米国)、マウス抗 GFAP モノクローナル抗体(1 : 600 希釈)(G3893; Sigma、米国)、およびウサギ抗 Iba-1 ポリクローナル抗体(1 : 600 希釈)(019-19741;和光、大阪、日本)を 0.3%Triton X-100 を含んだ 0.01M PBS と 10%正常ヤギ血清混合溶液にそれぞれ溶解したものをを用いた。次に、水平切片を PBS で洗浄し、2 次抗体であるビオチン化した抗マウス IgG 抗体または抗ウサギ IgG 抗体とインキュベートした後、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体と室温で 30 分間インキュベートして反応を行った。最後に、ジアミノベンジジンをペルオキシダーゼ基質として使用して、発色反応を行った。

図 18

NeuN、GFAP、Iba-1 の免疫染色の予備実験



左側の列は、1 次抗体と 2 次抗体の両方を用いて免疫染色

右側の列は、1 次抗体なしで免疫染色

NeuN、GFAP、Iba-1 の免疫染色において 1 次抗体はきちんと作用していることが確認できた。

白線は、100 μ m を示す。

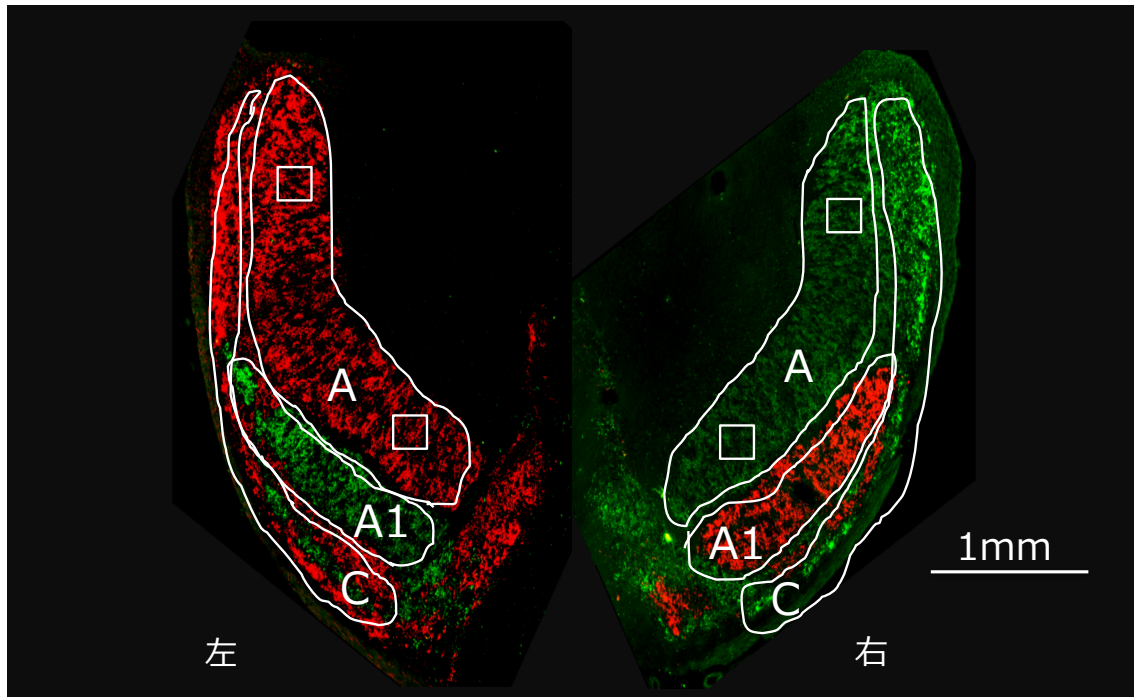
⑧ 免疫染色陽性細胞の定量化

NeuN、GFAP、および Iba-1 の陽性細胞を定量化するために、LGN の A、A1、および C 層の 200 \times 200 μ m² の画像を撮影した。定量の信頼性を高めるために、

A、A1、および C 層に 2 つの異なる場所(LGN の内側と外側)を $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ のサイズで使用した。NeuN、GFAP、および Iba-1 の陽性細胞の数は、ImageJ[®] を使用して細胞数のカウントを行った。(図 19)

図 19

LGN における $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ の画像の取得図 (A 層の場合)



A層において、2つの異なる場所(LGNの内側と外側)を $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ のサイズで使用した。A1層、C層においても同様に行った。

白線は、1mmを示す。

⑨ 統計方法

すべてのデータは平均値と標準偏差として表示した。高眼圧の右眼(G1)とその左眼(G2)の間の眼圧の違いは、ボンフェローニ補正付きの対応のある t 検定を使用して統計的に評価した。高眼圧の右眼(G1)とその左眼(G2)から投射する LGN の A、A1、および C 層における NeuN、GFAP および Iba-1 陽性細胞の数の 2 群間での有意差は、対応のある t 検定を行い評価し、3 群間での有意差は、ANOVA を行い評価した。

有意水準は、 $p < 0.05$ とした。

VI-3. 研究 2 結果

① 眼圧経過

前房に培養細胞注入を行った 10 匹すべてのフェレットで眼圧の上昇が確認できた。高眼圧フェレットの細胞注入前の、右眼と左眼の平均眼圧は、それぞれ 18.8 ± 2.0 および 17.7 ± 3.0 mmHg であった。注入後 13 週目では、右眼(G1)と左眼(G2)の平均眼圧は、それぞれ 50.0 ± 17.0 および 14.5 ± 3.9 mmHg であった。G1 の眼圧は、G2 の眼圧よりも有意に高かった。(n=10、対応のある t 検定、 $p < 0.001$)

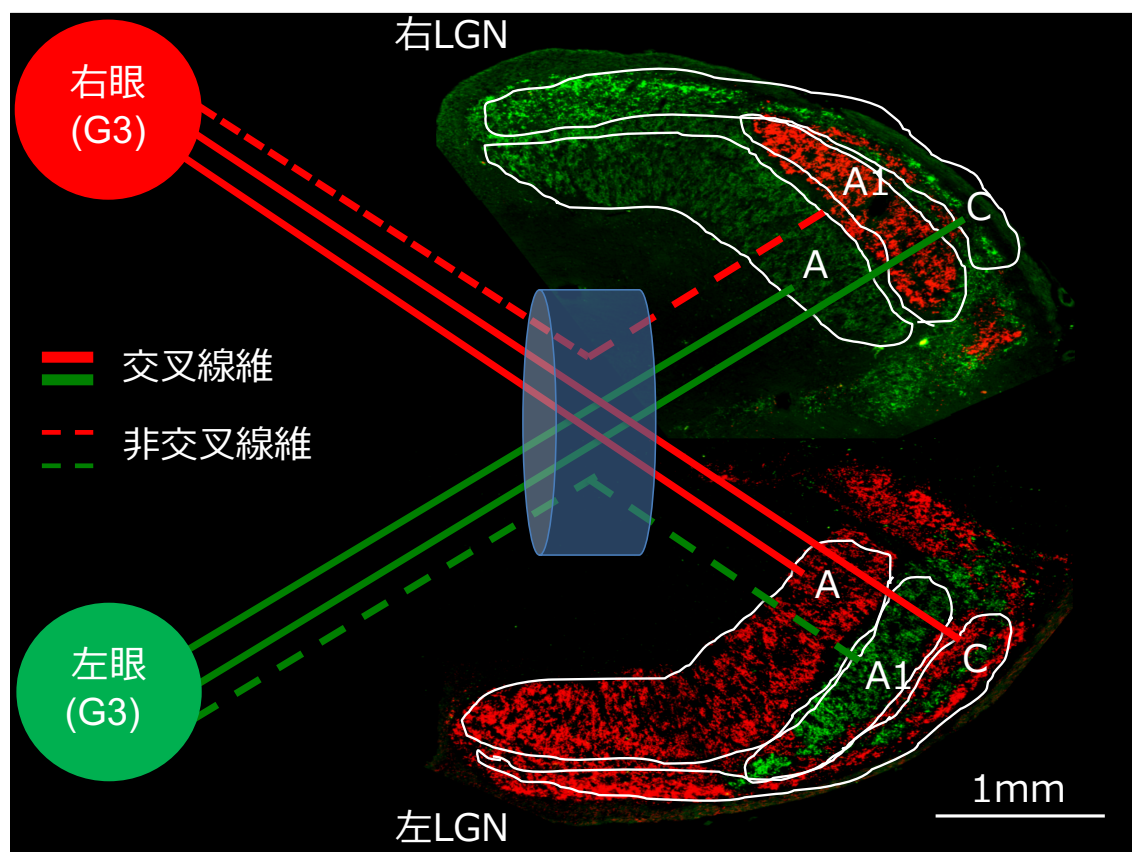
② 高眼圧フェレットモデルにおける視覚中枢の組織学的解析

眼球に CTB を注入することにより、LGN 内における眼球からの投射を可視化した。まず両眼とも正常のフェレットでは、右眼と左眼にそれぞれ注入された Alexa 555(赤)と Alexa 488(緑)の CTB は、両側の LGN の A、A1、C 層に均等に分布していた。A 層は対側眼球からの求心性の神経接続を、A1 層は同側眼球からの神経接続を受けていることがわかっている。したがって、A 層においては、左 LGN が赤 CTB で、右 LGN が緑の CTB で染色される。A1 層は左 LGN が緑 CTB で、右 LGN が赤 CTB で染色される。C 層には、対側と同側の両側からの両方の投射がある。(図 20)

右眼が高眼圧に誘導された緑内障フェレット(高眼圧の期間は、13 週間)では、右眼(G1)から投射される LGN の左 A 層と C 層、および右 A1 層が明らかに減弱した赤 CTB の染色が確認された。さらに、左眼(G2)から投射される LGN の右の A 層と C 層、および左の A1 層においても、CTB の緑色の染色が減弱していることが確認され、左眼(G2)から投射を受ける LGN において障害が起きていることが確認できた。(図 21)

図 20

コントロールフェレットの眼球から LGN の各層への神経軸索の投射の模式図

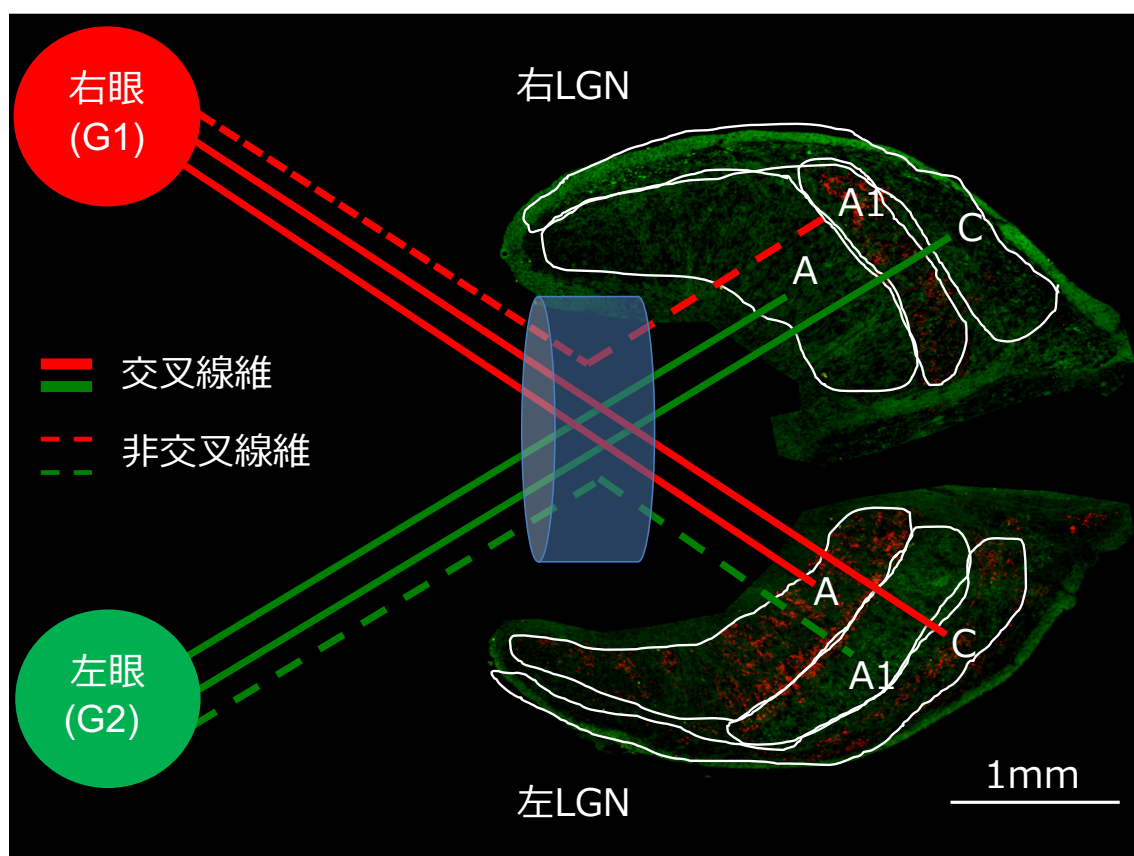


A 層と C 層は対側に投射されるが、A1 層は同側に投射される。右眼と左眼にそれぞれ注入された赤と緑の CTB は、LGN の両側に投射され、染色強度に差がなかった。

白線は、1 mm を示す。

図 21

高眼圧フェレットの眼球から LGN の各層への神経軸索の投射の模式図



右眼が高眼圧となったフェレットでは、右眼(G1)から投射される LGN の左の A および C 層と右の A1 層は、未処置の左眼(G2)に比べて CTB 染色強度が弱

いだけでなく、緑と赤の両方とも CTB 染色が図 17 で示したコントロールフェレットの LGN の染色に比べて染色強度が減弱していた。

白線は、1 mm を示す。

③ 高眼圧フェレットモデルにおける LGN の A、A1、および C 層での軸索障害の定量解析

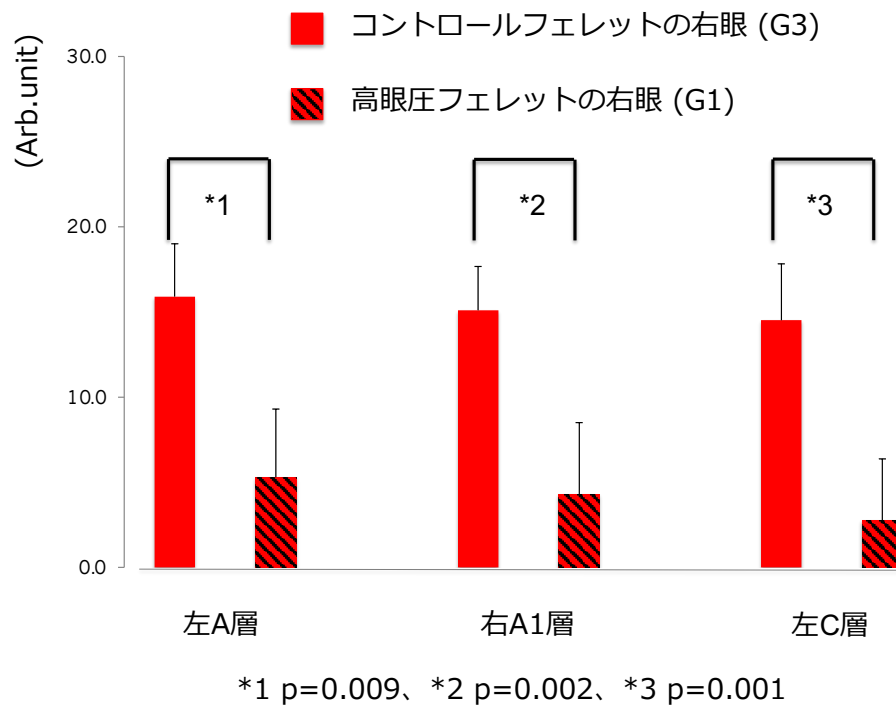
CTB の染色強度の定量解析は、コントロールフェレットと右眼が高眼圧フェレットの LGN を用いて行った。(高眼圧の期間は、13 週間。コントロールフェレットは、n=6、高眼圧のフェレットは、n=10) 高眼圧となった右眼(G1)から投射する LGN は、左の A、右の A1、および左の C 層となり、その赤 CTB 強度は、コントロールフェレットの眼(G3)から投射する LGN の各層の強度と比較して有意に減少していた。(対応のない t 検定、 $p<0.01$)(図 22) この高眼圧となった右眼(G1)から投射する LGN は、左の A、右の A1、および左の C 層では、赤 CTB 強度は、正常のフェレットの眼(G3)の強度と比較して、それぞれ 66.7%、71.5%、および 80.9%減少していたが、C 層での減少が若干大きいものの、各層毎での有意差はなかった。(ANOVA、 $p=0.85$)

次に、高眼圧フェレットの左眼(G2)から投射する LGN は、右の A、左の A1、および右の C 層となり、その緑 CTB の免疫強度は、コントロールフェレット

の眼(G3)の強度と比較していずれの層でも有意に減少していた。(対応のないt検定、 $p < 0.05$)(図 23) この高眼圧フェレットの左眼(G2)から投射する LGN は、右の A、左の A1、および右の C 層では、緑 CTB の強度は、コントロールフェレットの眼(G3)の LGN の各層の強度と比較して、それぞれ 25.1%、22.1%、および 26.8%減少していたが、C 層での減少が若干大きいものの、各層毎の有意差はなかった。(ANOVA、 $p = 0.44$)

図 22

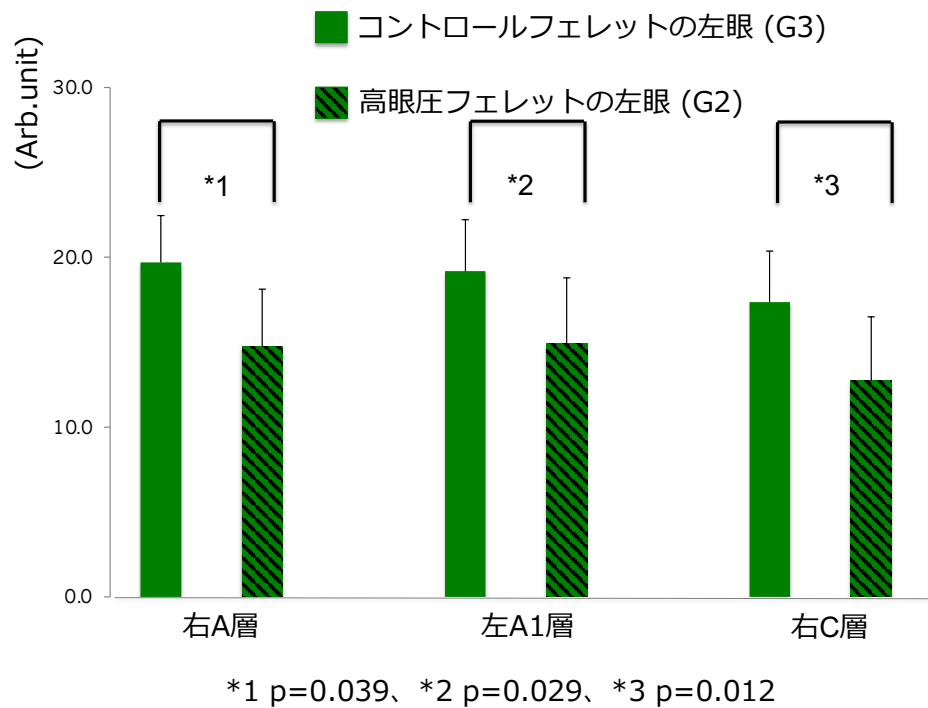
コントロールフェレットと右眼が高眼圧フェレットの LGN の各層における軸索障害の比較



コントロールフェレットの右眼(G3)(n=6)と緑内障フェレットの右眼
(G1)(n=10)から投射する LGN の各層の染色強度の比較。
(対応のない t 検定、いずれも $p < 0.01$)

図 23

高眼圧フェレットと正常フェレットの LGN の各層における軸索障害の比較



コントロールフェレットの左眼(G3)($n=6$)と高眼圧フェレットの右眼

(G1)($n=10$)から投射する LGN の各層の染色強度の比較。

(対応のない t 検定、いずれも $p<0.05$)

④ 高眼圧フェレットの LGN での免疫染色を用いた解析

- Neuron

神経系のほとんどの神経細胞で発現がみられる NeuN を Neuron のマーカーとして用いて、フェレットの LGN における NeuN の発現を解析した。(図 24)

NeuN の発現は、コントロールフェレットと右眼が高眼圧フェレットの両方の LGN の A、A1、および C 層で発現の確認ができた。(図 25)

コントロールおよび高眼圧フェレットの LGN の A、A1、および C 層における NeuN 陽性細胞数の比較(高眼圧期間、13 週間 ; コントロールフェレット n=6 ; 高眼圧フェレット n=10)を行い、LGN における神経細胞の障害の程度を解析した。コントロールフェレットでは、両側の LGN の A、A1、および C 層のそれぞれの層において、NeuN 陽性細胞の数に有意差はなかった。次にコントロールフェレットの眼球(G3)から投射する LGN の A、A1、および C 層と高眼圧フェレットの高眼圧の右眼(G1)から投射する LGN の左 A、右 A1、および左 C 層のそれぞれにおいて比較を行ったところ、NeuN 陽性細胞の数の有意な減少がみられた。(対応のない t 検定、いずれも $p < 0.01$) (図 26)

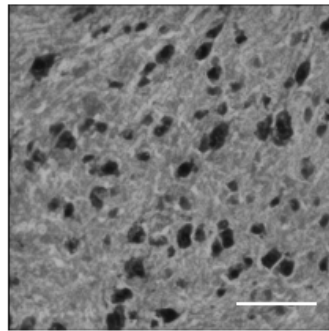
一方、高眼圧フェレットの左眼(G2)から投射する LGN の右 A、左 A1、および右 C 層の NeuN 陽性細胞の数は、コントロールフェレットの眼球(G3)から投射する LGN の A、A1、および C 層の NeuN 陽性細胞の数と比較して有意な減少はみられなかった。(対応のない t 検定、いずれも $p > 0.05$) (図 26)

次に LGN の A、A1、C 層の各層で NeuN 陽性細胞の数を正常フェレット(G3)と高眼圧フェレット(G1、G2)で比較し、神経細胞の減少率を計算した。NeuN 陽性細胞の数は、G1 から投射する LGN において、G3 から投射する LGN の左 A 層で 36.6%、右 A1 で 34.6%、左 C 層で 38.4%減少した。NeuN 陽性細胞の数の減少率は、G1 から投射する C 層で大きかったが統計的な有意差はみられなかった。(ANOVA、 $p=0.31$)

一方、NeuN 陽性細胞の数は、G2 から投射する LGN の右 A 層で 6.4%、左 A1 で 3.5%、右 C 層で 6.6%減少していたが、各層毎の有意差はなかった。(ANOVA、 $p=0.57$) (表 4)

図 24

NeuN 陽性細胞の代表的免疫染色画像



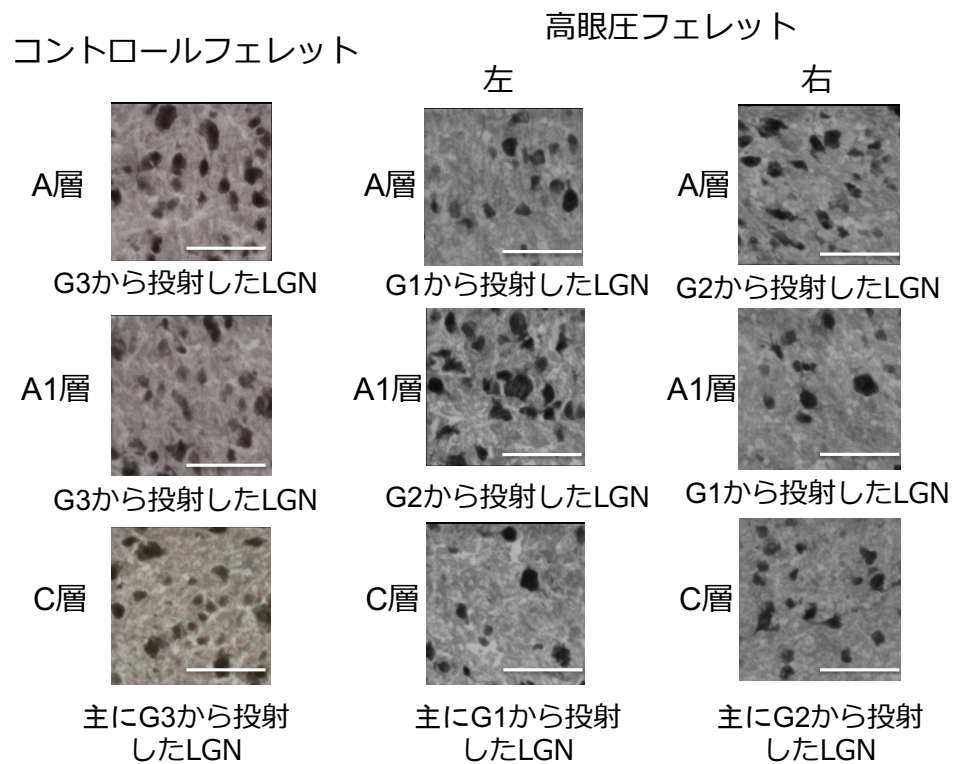
NeuN 陽性細胞の拡大写真

黒い染色像が、NeuN 陽性となっている Neuron

白線は、100 μ m を示す。

図 25

コントロールフェレットの正常眼(G3)および高眼圧フェレットの右眼(G1)とその対側眼(G2)の LGN における NeuN 陽性細胞の代表的免疫染色画像



左の列

正常フェレットの眼球(G3)から投射した LGN の NeuN の免疫染色の画像。

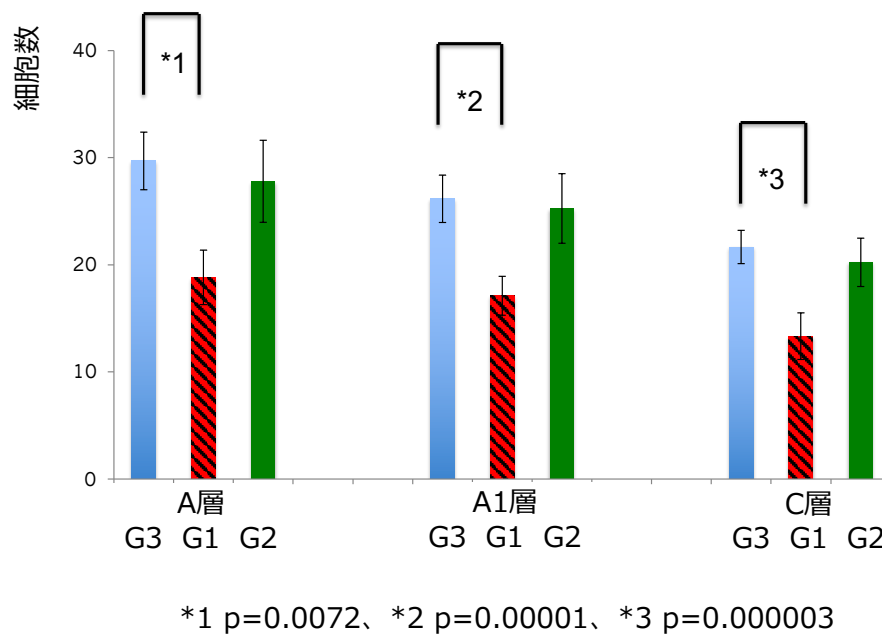
右の2列

右眼が高眼圧のフェレットの右眼(G1)と高眼圧フェレットの左の眼(G2)から
投射する LGN における NeuN の免疫染色の画像。

白線は、100 μ m を示す。

図 26

NeuN 陽性細胞数のグラフ



G3 の A、A1、および C 層と比較して、G1 の A、A1、および C 層で NeuN 陽性細胞の数の有意な減少がみられた。

(対応のない t 検定、いずれも $p < 0.01$)

- Astrocyte

LGN における GFAP 陽性細胞は、nonreactive な Astrocyte に特徴的な短くて細い突起を持つ小さな星状細胞体を示す染色像であった。(図 27)

正常なフェレットの LGN では、GFAP 陽性細胞が 3 つの A、A1、C 層に同等に分布していた。(図 28)

コントロールフェレットでは、両側の LGN の A、A1、および C 層での GFAP 陽性細胞数に有意差はなかった。一方、高眼圧フェレットでは、GFAP 陽性細胞数がすべての層で増加し、Astrocyte が確認できた。

コントロールおよび高眼圧フェレットの LGN の A、A1、および C 層の GFAP 陽性細胞の数をそれぞれ計算して、LGN の各層における細胞数の変化を計算した。(高眼圧期間、13 週間 ; 高眼圧フェレット n=10 : コントロールフェレット n=6)

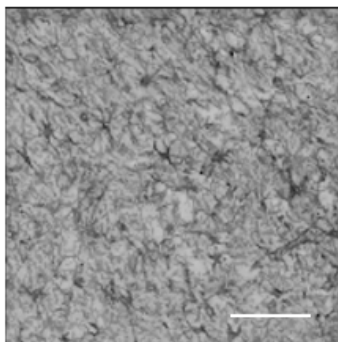
高眼圧の右眼(G1)から投射する A、A1、C 層では、GFAP 陽性細胞の数が対側眼(G2)と正常眼(G3)から投射する A、A1、C 層と比較して GFAP 陽性細胞の数が増加していて、G1 から投射される左の A 層と左の C 層の GFAP 陽性細胞の数は、G3 から投射される層の GFAP 細胞数に比べ有意に増加していた。(対応のない t 検定、 $p < 0.05$) (図 29)

次に、LGN の各層における GFAP 陽性細胞の数を、コントロールフェレットと高眼圧フェレットの間で細胞数の増加率を計算した。GFAP 陽性細胞の数は、G1 から投射する左の A、右の A1、左の C 層でそれぞれ 42.3%、6.4%、30.4% 増加していたが、GFAP 性細胞の数の増加率は、各層毎で統計的な有意差はみられなかった。(ANOVA、 $p=0.47$)

G2 から投射する右の A、左の A1、右の C 層で GFAP 陽性細胞の数は、それぞれ 4.9%、-3.1%、1.6%増加していたが、各層毎の有意差はなかった。
(ANOVA、 $p=0.63$)(表 4)

図 27

GFAP 陽性細胞の代表的免疫染色画像



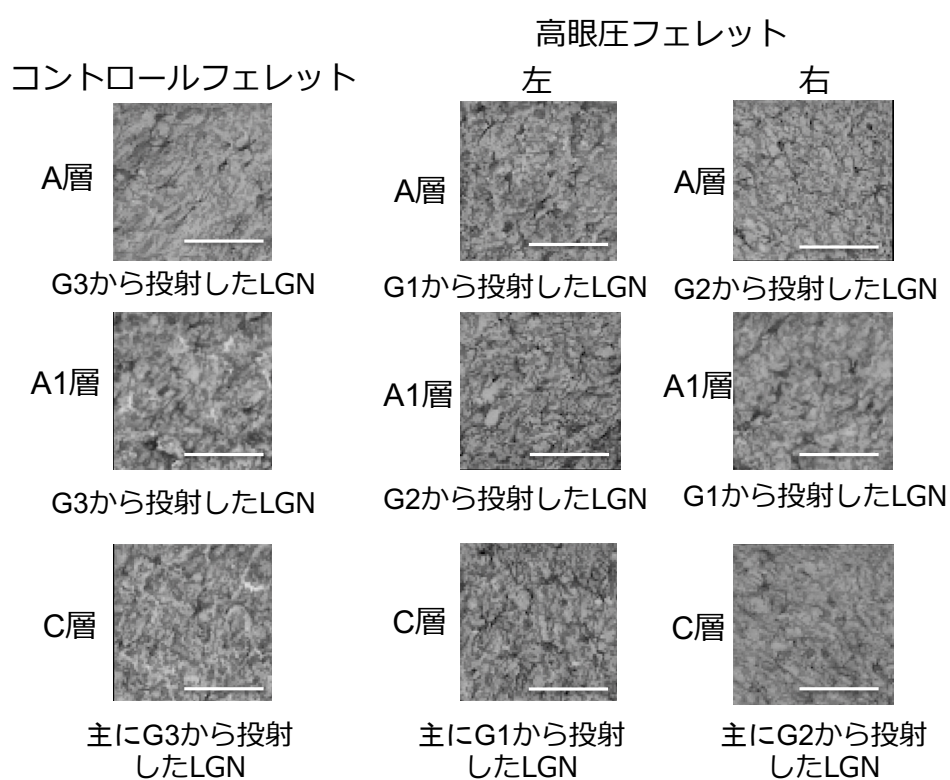
GFAP 陽性細胞の拡大写真

Astrocyte に特徴的な短くて細い突起を持つ小さな星状細胞体を示す染色像

白線は、100 μ m を示す。

図 28

コントロールフェレットの正常眼(G3)および高眼圧フェレットの右眼(G1)とその対側眼(G2)の LGN における GFAP 陽性細胞の代表的免疫染色画像



左の列

コントロールフェレットの正常な眼(G3)から投射する LGN の各層における GFAP 陽性細胞数の画像。

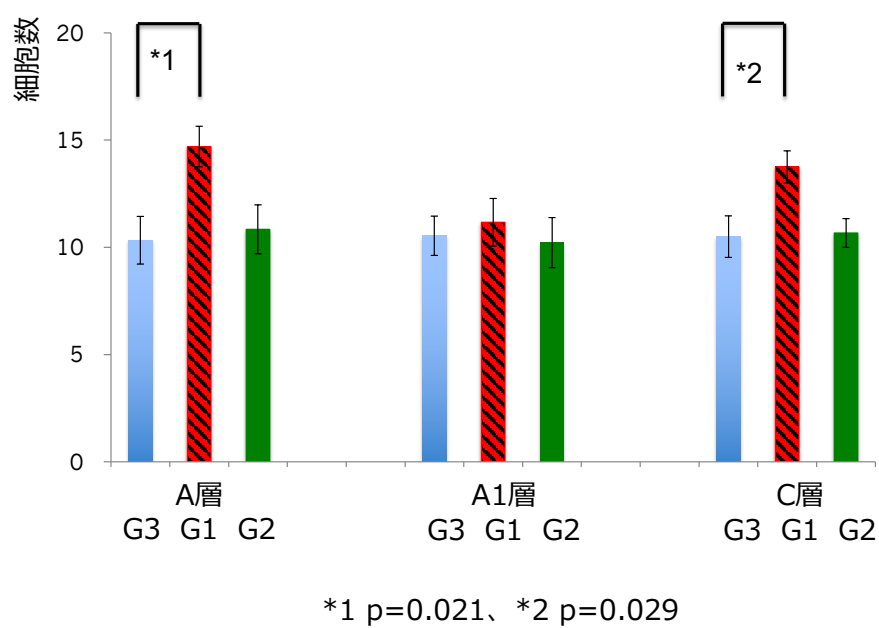
右の 2 列

高眼圧フェレットの右眼(G1)とその対側眼(G2)の Astrocyte 陽性細胞数の画像。

白線は、100 μ m を示す。

図 29

GFAP 陽性細胞数の比較グラフ



GFAP 陽性細胞数の有意な増加が、A および C 層で G3 に比較して G1 で確認できたが、A1 層においては有意差がなかった。

(対応のない t 検定、 $p < 0.05$)

- Microglia

Iba-1 は、Microglia を染色するマーカーであり、正常フェレットの LGN では、Iba-1 陽性細胞は主に細胞体が染色された。(図 30)

正常なフェレットの LGN では、Iba-1 陽性細胞が 3 つの A、A1、C 層に分布していた。(図 31)

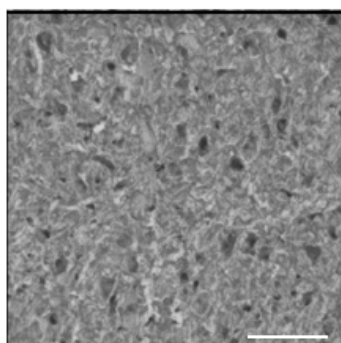
コントロールおよび高眼圧フェレットの LGN の A、A1、および C 層の Iba-1 染色陽性細胞の数を計算して、LGN 各層における Microglia 細胞数変化を解析した(高眼圧の期間は、13 週間 ; 高眼圧フェレット $n=10$; コントロールフェレット $n=6$)。コントロールフェレットの LGN と高眼圧フェレットの LGN で Iba-1 染色陽性細胞は、強く染色され、LGN における分布は均等であった。高眼圧の右眼(G1)から投射している LGN の A、A1、および C 層で Iba-1 染色陽性細胞の数が、高眼圧フェレットの対側の左眼(G2)およびコントロール眼(G3)から投射している LGN の各層と比較して、有意な細胞数の増加がみられた。(対応のない t 検定、 $p < 0.05$) (図 32)

次に、LGN の各層において、Iba-1 陽性細胞の数をコントロールフェレットと高眼圧フェレットとの間で比較し、コントロールフェレットに対する細胞数の変化率を計算した。Iba-1 陽性細胞の数は、コントロールフェレットの眼球(G3)から投射した LGN の各層に比べて、高眼圧の右眼(G1)から投射された LGN の左 A 層で 16.2%、右 A1 で 22.1%、左 C 層で 27.5%増加し、Iba-1 陽性細胞の数の増加率は、G1 から投射する C 層でもっとも大きかったが、各層毎で統計的な有意差はみられなかった。(ANOVA、 $p=0.17$) (表 4)

一方、コントロールフェレットの眼球(G3)から投射した LGN の各層に比べて、高眼圧でない左眼(G2)から投射された LGN の右 A、左 A1、および右 C 層では、それぞれ-3.2%、-2.3%、および 3.3%、Iba-1 陽性細胞の数に変化していたが、Iba-1 陽性細胞の数の増加率は、各層毎で統計的な有意差はみられなかった。(ANOVA、 $p=0.48$)(表 4)

図 30

Iba-1 陽性細胞の代表的免疫染色画像



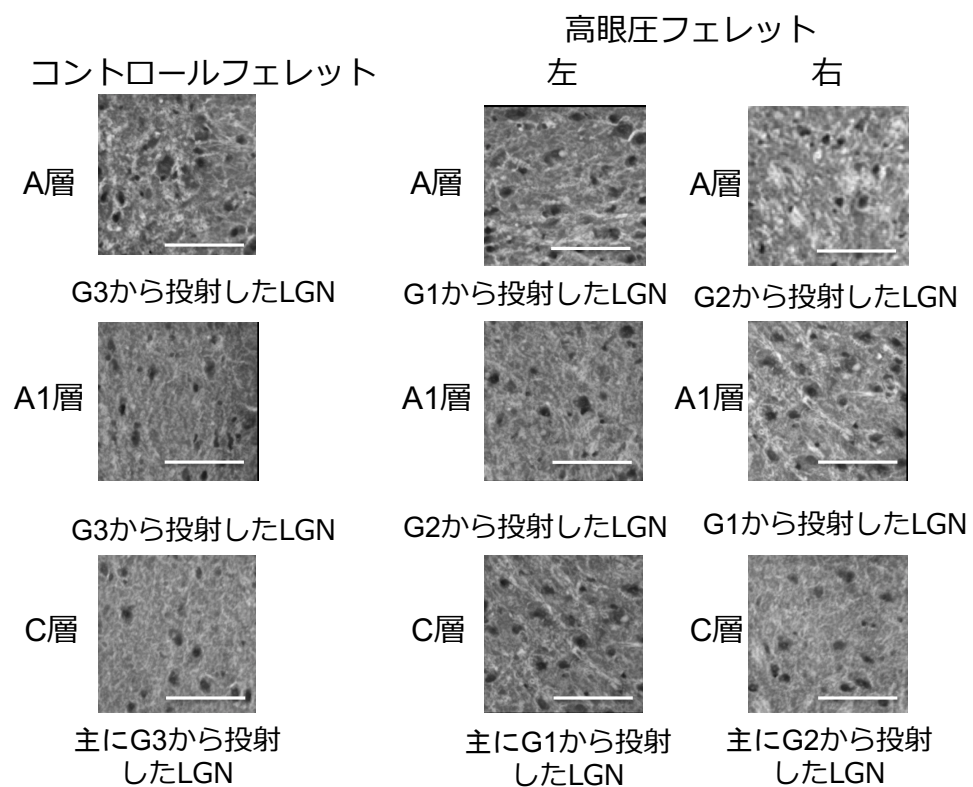
Iba-1 陽性細胞の拡大写真

Iba-1 陽性細胞は主に細胞体が染色された

白線は、100 μ m を示す。

図 31

コントロールフェレットの正常眼(G3)および高眼圧フェレットの右眼(G1)と
その対側眼(G2)の LGN における Iba-1 陽性細胞の代表的免疫染色画像



左の列

コントロールフェレットの正常な眼(G3)から投射する LGN の各層における
Iba-1 陽性細胞数の画像。

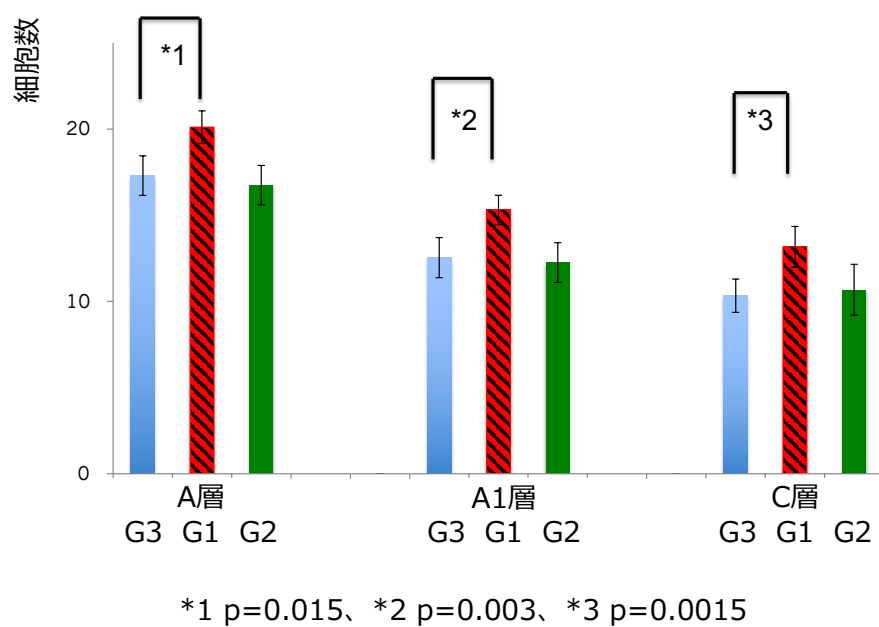
右の 2 列

高眼圧フェレットの右眼(G1)とその対側眼(G2)の Iba-1 陽性細胞数の画像。

白線は、100 μ m を示す。

図 32

Iba-1 免疫染色陽性の Microglia 細胞数の比較グラフ



Iba-1 免疫染色陽性細胞の数の有意な増加が、A、A1 および C 層で G3 に比較して G1 に対してみられた。

(対応のない t 検定、 $p < 0.05$)

表 4

高眼圧フェレット LGN の A、A1、および C 層における軸索、神経細胞と神経グリア細胞の免疫染色強度と陽性細胞数の変化

Target	Labeling Method	Red (Elevated IOP)			Green (Normal IOP)		
		A	A1	C	A	A1	C
Axon	CTB	-66.79%	-71.5%	-80.9%	-25.1%	-22.1%	-26.8%
Neuron	NeuN	-36.6%	-34.6%	-38.4%	-6.4%	-3.5%	-6.6%
Astrocyte	GFAP	+42.3%	+6.4%	+30.4%	+4.9%	-3.1%	+1.6%
Microglia	Iba-1	+16.2%	+22.1%	+27.5%	-3.2%	-2.3%	+3.3%

A : LGN の A 層、A1 : LGN の A1 層、C : LGN の C 層

高眼圧の右眼(G1)および対側の左眼(G2)から投射した LGN の各層における CTB の蛍光強度と Neuron、Astrocyte、Microglia の各抗体の陽性細胞数を対象とするコントロール眼(G3)から投射する LGN での数値からの変化率を示した。

VII. 考按

VII-1. フェレット高眼圧モデル

今回の研究によって世界ではじめて、フェレットにおいて結膜上皮細胞注入により隅角を閉塞することによる高眼圧モデルを作成することに成功できたが、今回のモデルは、ヒトの緑内障として臨床的に最も多い開放隅角緑内障とは異なり、組織学的に図11に示すように、隅角に増殖した線維芽細胞が充満していることから隅角閉塞による眼圧上昇が起きている閉塞隅角緑内障モデルである。

また、高眼圧が線維芽細胞の隅角での増殖以外の理由により発症している可能性もある。具体的には、前房中に注入した薬剤のトリプシン、DMEMによる影響が考えられるが、トリプシンとDMEMの注入だけでは、眼圧上昇は起きないことは予備実験で確認していたので可能性は低い。また、線維芽細胞の注入後

の感染や炎症によって眼圧上昇が起きている可能性もある。感染については、一時的には眼圧上昇が起きるが、その後、眼球瘻となってしまうと眼圧は下がってしまうと考えられる。今回の検討では、1眼だけ感染を起こした例があり、このような経過をたどっていた。炎症による眼圧上昇の可能性については、炎症が起きている時は眼圧上昇が起きることが一般的であるが、注入から13週間後では、炎症が起きている眼球はなく、持続した炎症による上昇も考えにくい。以上から線維芽細胞の増殖による隅角閉塞から眼圧上昇が起きていると考えた。

高眼圧の誘発に成功できたのは、今回の研究で用いたフェレットの15眼中14眼であり、そのうち13眼で、左眼(対側眼)と比較して2倍を超える眼圧上昇率を示した。この成功率と上昇率は、閉塞隅角緑内障モデルであるものの、他の実験動物を用いて作成された高眼圧の誘発方法よりいずれも大幅に高い。したがって、高眼圧を誘発する今回の新しい誘発方法を他の実験動物にも適用して、眼圧を効率的かつ効果的に高めることができる可能性があり期待される方法である。実際に、最近では高眼圧の上昇率が高いこと、高眼圧の上昇が安定して長期間続くこと、高眼圧誘発の成功率が高いことの利点から、ラットに対してこのモデルが応用され実験系として評価され、論文報告されるようになってきている。⁸⁸

今回の高眼圧モデルでは、高眼圧となった眼球は、眼圧が31～71 mmHgにまで顕著に上昇し、眼球は拡大してヒトと同様の視神経乳頭陥凹の拡大の所見を示したが、成人のヒトにおいては、高度な高眼圧になっても眼球拡大は見られず、この点は、フェレットがヒトと異なっていた。今回使用したフェレットは、週齢が比較的若いこともあり、高眼圧を軽減するために眼球拡大を起こしていると考えられ、視神経乳頭への障害を代償的に軽減することで、誘発された著明な高眼圧よりも神経障害が軽度になっている可能性がある。また、ヒトの先天性緑内障では、胎生期からの高眼圧により牛眼という高眼圧に伴う眼球拡大が起きることがわかっており、今回のフェレットのモデルに近い状態であり、フェレットの視神経障害と眼圧の関連は、ヒトの成人における緑内障による視神経障害よりも先天性緑内障の変化に近い可能性もある。これらを確認するためには、今回研究に用いていない週齢の若いものから老齢のフェレットまでの様々な個体で高眼圧を誘発することで、眼球拡大の程度が週齢と相関があるかを検討する必要がある。

視神経における障害は、図11のように高眼圧となった視神経では、視神経束の結合組織の肥厚という所見として観察された。さらに図12に示したように、視神経の軸索束に取り込まれた蛍光色素は、正常のフェレットに比べて高眼圧

のフェレットの軸索束では明らかに減少していた。以上からフェレット高眼圧モデルにおいてもたらされた眼圧上昇の期間は、視神経乳頭と視神経の軸索輸送の障害を発症するのに充分であった。しかしながら、著明な高眼圧により視神経を高度に圧迫することによる虚血性の変化による軸索輸送の障害も考えられるため、この軸索輸送の障害が純粹に高眼圧による障害だけを示しているかどうかを否定できない。従って眼圧負荷レベルとその時間が異なるより多くの個体で同様の解析を行い、眼圧因子がどの程度障害を起こしているかを今後検討する必要がある。

VII-2. フェレットの眼圧測定と眼圧値

フェレットの眼圧に関するこれまでの報告は、ほとんどなく、測定方法も報告によって異なっており、単純な比較が難しい。これまでの報告⁸⁴⁻⁸⁷では、眼圧測定は、覚醒状態のフェレットと全身麻酔下でのフェレットで、TonoPen[®]およびTonoVet[®]というフェレット専用の眼圧測定機器でなく、小動物一般の眼

圧測定機器によって行われていた。過去の報告によると眼圧は、 14.50 ± 3.27 mmHgから 22.8 ± 5.5 mmHgまでとされていて、ヒトやサルと同等であると考えられる。今回の研究では、正常のフェレットの眼圧は、過去の報告とは異なりTonoLab[®] (Tiolat、ヘルシンキ、フィンランド)を使用して測定を行い、 17.36 ± 2.93 mmHgであった。眼圧は全身麻酔下されたフェレットで測定を行っているので、麻酔薬による眼圧の変動の可能性が考えられるが、過去の報告とはほぼ同様の値であった。また、眼圧測定に関わる不確定な要素としては、フェレット体位や個体の固定の強度の変化、眼圧を測定する機器のバージョンなどもある。⁸⁵ したがって、今回の研究での眼圧の値と既報における眼圧の値を比較するには限界はあるものの、TonoLab[®]を用いた今回の眼圧測定では、標準偏差が既報で報告されている眼圧の標準偏差よりも小さく、TonoLab[®]は、フェレットの眼圧を測定した既報のTonoPen[®]およびTonoVet[®]と比べても優れた測定機器になると考えられた。

- 小括-1

線維芽細胞の前房への注入によるフェレット眼高眼圧モデルを初めて確立した。組織学的にフェレットの眼球の視神経乳頭陥凹拡大、視神経束の周囲の結

合組織の肥厚と視神経軸索輸送の障害を起こすことができた。フェレットは緑内障モデルとして今後応用できると考えられる。またTonoLab[®]を用いたフェレット眼圧測定は、精度が高く有用であることが判明した。

VII-3. 高眼圧フェレットにおける LGN のマクロ的な解析

今回、確立をした高眼圧モデルを使用することで両眼視をもつフェレットを用いて、高眼圧モデルによる神経障害を LGN、SC で組織学的に検討することができた。さらに高次の中枢神経である V1 における障害の検討も可能になるか

もしれない。サルの視覚中枢の神経経路で過去の報告から、高眼圧によって LGN の続発性の神経障害を起きていることが知られている^{20, 21, 77, 89}。今回のモデルでは、図 13 のマクロ的な観察により高眼圧眼から投射される LGN と SC の蛍光色素の取り込みが低下していることから RGC の軸索の輸送能力の低下もしくは神経障害が起きていることが分かった。しかしながら、軸索の輸送能力の低下なのか、軸索が投射する LGN や SC のレベルにおいて神経障害が起きているかを区別することはできない。また、V1 での障害の評価を行うことも必要である。LGN や V1 の障害を検討することで、眼球の障害だけでない高次の視覚中枢の障害の詳細を明らかにして、緑内障の病態理解に役立てることができる。

VII-4. 高眼圧フェレットにおける LGN のミクロ的な解析

フェレットは、マウスやラットとは異なり、視神経の 15%程度が交叉性の神経線維であり、両眼視機能をもっていることや、さらには W 細胞（ヒトやサルの Konio cell）から投射された LGN の C 層は、ヒトやサルとは異なり、独立

した層として容易にその LGN の他の層と投射部位を区別して確認することができるという利点を持っていることから LGN のミクロ的な組織解析を行う有用性が高いために今回の研究を進めた。

研究 2 の結果は、高眼圧による中枢神経障害が LGN で起きていることを示しており、高眼圧のフェレットモデルでは、解剖学的にこれまでにヒトやサルで難しかった LGN の W cell が投射する C 層の解析が出来る点で、有用性が高いことを示せた。具体的には、高眼圧の眼球から投射された LGN の A、A1、および C 層におけるニューロンの数の減少とグリア細胞数の増加が起きていた。有意差はなかったが、C 層の神経細胞の減少が相対的に多い傾向がみられた。これは、C 層に投射している W cell が、A および A1 層に投射している X および Y cell と比較して、高眼圧によって引き起こされる神経障害に対してより感受性が高い可能性を示唆している。ヒトやサルでは、K cell が比較的早期から障害されるという報告がある^{62, 77, 90}が、サルの K cell に相当するフェレットの W cell が高眼圧によって障害されやすいことはこれまで報告されておらず、詳細は不明である。W cell は、X や Y cell よりも細胞体の大きさが小さく、より小さい神経細胞ほど高眼圧に対する感受性が高い可能性があることが推察される。さらに今後の研究で、高眼圧の持続期間や眼圧の上昇の程度の異なるフェレットを用いることで W cell のみならず、X、Y cell の障害の過程を確認す

ることや神経細胞の大きさの違う他の RGC の障害の過程も検討することで、この仮説が正しいのかを明らかにしていきたい。

実験動物の高眼圧モデルにおける視覚中枢神経系の障害に関するこれまでの報告を表 5 にまとめた。高眼圧フェレットモデルでは、視神経における神経軸索障害が LGN の CTB の蛍光強度の低下という形で確認できた。さらに LGN の CTB 蛍光強度の低下は、対側の左眼(G2)から投射される神経軸索の障害も確認された。これまでのところ、実験動物の高眼圧モデルにおける片側高眼圧によって、両側の LGN 障害が確認されるという詳細な報告はない。この理由としては、LGN においては、左右の眼球から投射する各層が接しており層構造を持っているものの組織の層間に境界が明瞭にあるわけでないため、高眼圧眼から投射を受けた LGN の各層の組織変性が隣接する高眼圧でない眼球から投射を受ける各層にグリアの活性化などを介して影響を及ぼしている可能性が推測される。LGN のレベルで神経障害が両側性に発症するという事になれば、視神経乳頭部の神経保護の治療に加え、中枢かつ両側性の神経保護の重要性が高まり、眼圧下降以外の緑内障の治療を開発する必要がある。臨床的には、片側性の緑内障や、失明眼や眼球摘出されている場合においても、眼球だけでなく LGN のレベルで健側からの投射部位に二次的变化が起きている可能性がある

るが、現在まで詳細な報告はなく、LGN における神経障害の存在と発症機序の詳細について今後の検討が待たれている。^{91 92 93}

高眼圧眼から投射されたすべての層(A、A1、およびC層)でNeuN陽性細胞の数が減少した。(図24、表4) これまでの報告においては、サルのLGNのニューロン数の減少^{94, 95 20}およびヒトのLGN体積の減少が報告されており⁹⁶、フェレットでの実験結果は、これらの報告と同等の結果となっていた。AstrocyteとMicrogliaの反応については、高眼圧眼から投射されたA、A1、およびC層で細胞数が増加していた。(図29、32、表4) これまでの報告では、グリア細胞が重度のGONによりLGNで活性化や増加するという報告や、活性化や増加は起きないと報告され、議論が分かれていた。^{20, 86, 95-98} これらの結果の相違は、高眼圧の持続期間の違いが原因である可能性があると考える。我々の研究2では、高眼圧による視神経軸索障害の発生から比較的短期間である13週目にLGNの解析を行ったため、グリア細胞の活動が維持されていたと推察した。活性化されたAstrocyteとMicrogliaは通常では、放射状突起を持つ細胞として観察されるが、このような細胞はこの実験ではみられなかった。今回の実験では抗体反応性が高い凍結切片を用いたため、灌流固定組織よりも薄い切片となり細胞構造が破壊されて微細構造である放射状突起が観察できなかった可能性が高いと

考えた。今後は、組織の厚い切片を用いてAstrocyteとMicrogliaが放射状突起を持っているかを確認する必要もある。

表5

フェレット、サル、ラットにおける高眼圧からもたらされたLGN障害のこれまでの報告の比較

Target	Labeling Method	Ferret	Monkey ^{60 61}	Rat ^{56 58 99 101 53}
IOP (Elevated IOP duration)		13 w	6 m to 1 y	14 d to 8 m
Axon activity	CTB	蛍光強度の低下	-	-
Neuron	NeuN	細胞数の減少 (A、A1、C層)	細胞数の減少	細胞数の減少
Astrocyte	GFAP	細胞数の増加 (A、C層)	活性化や増加	活性化や増加
Microglia	Iba-1	細胞数の増加 (A、A1、C層)	活性化や増加	活性化や増加

- 小括-2

高眼圧フェレットの眼球におけるRGCの神経軸索障害を反映して投射部位であるLGNでの蛍光輝度が減少していた。さらに高眼圧眼から投射される両側のLGNの各層で神経細胞障害とグリア細胞が増加していた。

以上から、確立した高眼圧フェレットモデルで、眼圧による視覚中枢神経のLGNの障害の部位や障害の程度を分析できた。今後、緑内障性視神経症によるフェレットでのRGCの種別毎(X、Y、W cell)の障害の違いを解析するためのモデルとして今後用いることができる。

VII-5. 今回のフェレット高眼圧モデルの問題点

今回の研究で確立したフェレット高眼圧モデルにはいくつかの欠点もある。一つ目は、線維芽細胞の前房への注入が、前房内炎症を起こし網膜に障害を与える可能性があること。二つ目は、増殖した線維芽細胞は、角膜や水晶体などの中間透光体でも増殖するため、視神経および網膜を外側から直接観察することが難しく、同一のフェレットを用いて時系列的なin vivoイメージング法を適用できないこと。三つ目は、ヒトの開放隅角緑内障などの眼圧上昇の程度により類似した、軽度な高眼圧モデルとすることが困難であったことである。確立したモデルは閉塞隅角緑内障と同様な高眼圧レベルであるため、眼圧による障害だけでなく血流障害による虚血性視神経症も引き起こしている可能性がある。また、短期間で強い神経障害を起こしたため、通常の開放隅角緑内障(POAG)と同様なLGNにおけるニューロン障害とグリア活性化が誘発されているかは未解明である。この点をさらに解析するためには、眼圧の上昇の程度が比較的軽度になるようなモデルを作成する工夫を行うこと、眼圧上昇の期間の異なる

フェレットを使い、初期の緑内障から末期の緑内障に該当する時系列毎による神経障害とグリア活性化の違いを解析検討することが必要でないかと考える。

一方で、ヒトでの先天性緑内障で見られるような牛眼と同様な眼球拡大も確認できたため、代償性の眼球拡張により高眼圧による虚血がある程度解消されている可能性もある。炎症を伴うことなく、眼圧が軽度上昇するだけのPOAGに似た理想的な緑内障モデルを確立することは大きな課題であり、今後の高眼圧モデルの改良が必要である。

また、緑内障は多くの場合においては両側の眼球での発症が多い。そのため、LGNにおける障害は、左右の高眼圧の眼球のRGCからの投射の影響を受けているはずであり、実際の臨床における緑内障によるLGNの障害は、片眼の高眼圧の誘発だけでは、病態を正確に示しているかどうか不明である。そのため、両側に高眼圧を誘発し、両眼からのRGCの投射がLGNの障害にどのように影響をしているかを確認し、片眼の障害との比較を行う必要もあるが、動物眼両眼での障害モデルは動物倫理に抵触するためハードルが高いのが現状である。

VII-6. 今後の展望

高眼圧フェレットモデルを用いることは、緑内障による RGC から LGN までの神経系、およびグリア細胞の障害の解析を行うために有用であることがわかった。また、これまでマウスやラットでは行うことのできなかった GON による視覚中枢の解析を行うことができるようになった。今後研究を進めることで、詳細に視覚中枢神経の障害メカニズムを明らかにし、病気の早期から生じる特定の神経細胞の保護に必要な知見を得て、眼圧下降以外からのアプローチで緑内障における神経障害の保護を行う新規の治療戦略を探索していきたい。

特に日本人に多い正常眼圧緑内障（日本人の緑内障の 80%程度）においてこれまで、眼圧が正常であるため、それでも視野障害が進行してしまう場合に

は、眼圧一辺倒の治療では、満足な治療効果を得ることができないことも多い。

しかしながら、今回の高眼圧モデルを使うことによって、現状の治療方法と全く異なった神経保護という観点からの治療方法を発見することができる可能性がある。

当モデルを用いることで、将来的には、眼から脳までを統合的な緑内障の病態を解明し、眼圧下降を主体とした従来の治療法はなく、神経の保護を目的としたこれまでに開発されていない神経保護治療につなげて行きたい。

● まとめ

今回の研究によって、フェレットにおいて初めて高眼圧を誘発することに成功し、緑内障に特徴的なGONを起こすことに成功した。

さらにこの眼圧モデルを用いて、緑内障による視神経障害が視覚情報の中継核であるLGNにまで神経障害として広がっていることをマクロ的、ミクロ的に評価し、神経細胞の減少とグリア細胞の増加が起きていることを明らかにした。

今後研究を進めることで、詳細に視覚中枢神経の障害メカニズムを明らかにし、病気の早期から生じる特定の神経細胞の保護に必要な知見を得て、眼圧下降以外からのアプローチで緑内障における神経障害の保護を行う新規の治療戦略を探索していきたい。

VIII. 謝辞

本研究の機会を与えて下さり、指導教官として貴重な御指導を承りました東京大学大学院眼科学講座 相原一 教授に謹しんで感謝の意を表します。

また、本研究を進めるにあたり貴重な御指導と御協力を頂きました東京大学名誉教授・公立学校共済組合関東中央病院長 新家眞 先生、東京大学大学院眼科

学講座 本庄恵 准教授、金沢大学医薬保健研究域医学系脳神経医学研究分野

河崎洋志 教授に謹しんで感謝の意を表します。

IX.参考文献

1. Chen WW, Wang N, Cai S, et al. Structural brain abnormalities in patients with primary open-angle glaucoma: a study with 3T MR imaging. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013;54:545-554.
2. The Japan Glaucoma Society Guidelines for Glaucoma (4th

Edition). Nippon Ganka Gakkai Zasshi 2018;122:3-51.

3. Coleman AL. Glaucoma. Lancet 1999;354:1803-1810.

4. Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. Br J Ophthalmol 2012;96:614-618.

5. Morizane Y, Morimoto N, Fujiwara A, et al. Incidence and causes of visual impairment in Japan: the first nation-wide complete enumeration survey of newly certified visually impaired individuals. Jpn J Ophthalmol 2019;63:26-33.

6. Wako R, Yasukawa T, Kato A, et al. [Causes and prevalence of visual impairment in Japan]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi 2014;118:495-501.

7. Iwase A, Suzuki Y, Araie M, et al. The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese: the Tajimi Study. Ophthalmology 2004;111:1641-1648.

8. Klein BE, Klein R, Sponsel WE, et al. Prevalence of glaucoma. The Beaver Dam Eye Study. Ophthalmology 1992;99:1499-1504.

9. Leske MC, Connell AM, Schachat AP, Hyman L. The Barbados Eye Study. Prevalence of open angle glaucoma. Arch Ophthalmol

1994;112:821-829.

10. Dielemans I, Vingerling JR, Wolfs RC, Hofman A, Grobbee DE, de Jong PT. The prevalence of primary open-angle glaucoma in a population-based study in The Netherlands. The Rotterdam Study.

Ophthalmology 1994;101:1851-1855.

11. Mitchell P, Smith W, Attebo K, Healey PR. Prevalence of open-angle glaucoma in Australia. The Blue Mountains Eye Study.

Ophthalmology 1996;103:1661-1669.

12. Garudadri C, Senthil S, Khanna RC, Sannapaneni K, Rao HB. Prevalence and risk factors for primary glaucomas in adult urban and rural populations in the Andhra Pradesh Eye Disease Study.

Ophthalmology 2010;117:1352-1359.

13. Vijaya L, George R, Arvind H, et al. Prevalence of primary angle-closure disease in an urban south Indian population and comparison with a rural population. The Chennai Glaucoma Study.

Ophthalmology 2008;115:655-660 e651.

14. Zheng Y, Wong TY, Lamoureux E, et al. Diagnostic ability of Heidelberg Retina Tomography in detecting glaucoma in a population

setting: the Singapore Malay Eye Study. *Ophthalmology*

2010;117:290-297.

15. Kim CS, Seong GJ, Lee NH, Song KC, Namil Study Group KGS.

Prevalence of primary open-angle glaucoma in central South Korea the

Namil study. *Ophthalmology* 2011;118:1024-1030.

16. Ocklind A. Effect of latanoprost on the extracellular matrix of the

ciliary muscle. A study on cultured cells and tissue sections. *Exp Eye Res*

1998;67:179-191.

17. Suzuki Y, Yamamoto T, Araie M, et al. [Tajimi Study review].

Nippon Ganka Gakkai Zasshi 2008;112:1039-1058.

18. Suzuki Y, Iwase A, Araie M, et al. Risk factors for open-angle

glaucoma in a Japanese population: the Tajimi Study. *Ophthalmology*

2006;113:1613-1617.

19. Yamamoto T, Iwase A, Araie M, et al. The Tajimi Study report 2:

prevalence of primary angle closure and secondary glaucoma in a

Japanese population. *Ophthalmology* 2005;112:1661-1669.

20. Dai H, Mu KT, Qi JP, et al. Assessment of lateral geniculate

nucleus atrophy with 3T MR imaging and correlation with clinical stage of

glaucoma. *AJNR Am J Neuroradiol* 2011;32:1347-1353.

21. Shimazawa M, Ito Y, Inokuchi Y, et al. An alteration in the lateral geniculate nucleus of experimental glaucoma monkeys: in vivo positron emission tomography imaging of glial activation. *PLoS One* 2012;7:e30526.

22. Ito Y, Shimazawa M, Chen YN, et al. Morphological changes in the visual pathway induced by experimental glaucoma in Japanese monkeys. *Exp Eye Res* 2009;89:246-255.

23. Ismail R, Azuara-Blanco A, Ramsay CR. Variation of clinical outcomes used in glaucoma randomised controlled trials: a systematic review. *Br J Ophthalmol* 2014;98:464-468.

24. Chauhan BC, Mikelberg FS, Balaszi AG, LeBlanc RP, Lesk MR, Trope GE. Canadian Glaucoma Study: 2. risk factors for the progression of open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2008;126:1030-1036.

25. De Moraes CG, Liebmann JM, Levin LA. Detection and measurement of clinically meaningful visual field progression in clinical trials for glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 2017;56:107-147.

26. Comparison of glaucomatous progression between untreated

patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. Am J Ophthalmol 1998;126:487-497.

27. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators. Am J Ophthalmol 2000;130:429-440.

28. Otto J. [Loss of point of fixation after glaucoma surgery]. Klin Monbl Augenheilkd Augenarztl Fortbild 1957;131:178-195.

29. Lichter PR, Ravin JG. Risks of sudden visual loss after glaucoma surgery. Am J Ophthalmol 1974;78:1009-1013.

30. O'Connell EJ, Karsenas AG. Intraocular surgery in advanced glaucoma. Br J Ophthalmol 1976;60:124-131.

31. Kolker AE. Visual prognosis in advanced glaucoma: a comparison of medical and surgical therapy for retention of vision in 101 eyes with advanced glaucoma. Trans Am Ophthalmol Soc 1977;75:539-555.

32. Aggarwal SP, Hendeles S. Risk of sudden visual loss following

trabeculectomy in advanced primary open-angle glaucoma. Br J Ophthalmol 1986;70:97-99.

33. Costa VP, Smith M, Spaeth GL, Gandham S, Markovitz B. Loss of visual acuity after trabeculectomy. Ophthalmology 1993;100:599-612.

34. Martinez JA, Brown RH, Lynch MG, Caplan MB. Risk of postoperative visual loss in advanced glaucoma. Am J Ophthalmol 1993;115:332-337.

35. Topouzis F, Tranos P, Koskosas A, et al. Risk of sudden visual loss following filtration surgery in end-stage glaucoma. Am J Ophthalmol 2005;140:661-666.

36. Fujishiro T, Mayama C, Aihara M, Tomidokoro A, Araie M. Central 10-degree visual field change following trabeculectomy in advanced open-angle glaucoma. Eye (Lond) 2011;25:866-871.

37. Mead B, Ahmed Z, Tomarev S. Mesenchymal Stem Cell-Derived Small Extracellular Vesicles Promote Neuroprotection in a Genetic DBA/2J Mouse Model of Glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci 2018;59:5473-5480.

38. Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. Ocular hypertension in mice

with a targeted type I collagen mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1581-1585.

39. Biermann J, van Oterendorp C, Stoykow C, et al. Evaluation of intraocular pressure elevation in a modified laser-induced glaucoma rat model. *Exp Eye Res* 2012;104:7-14.

40. Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, et al. Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink. *Jpn J Ophthalmol* 1998;42:337-344.

41. Pederson JE, Gaasterland DE. Laser-induced primate glaucoma. I. Progression of cupping. *Arch Ophthalmol* 1984;102:1689-1692.

42. Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. Experimental mouse ocular hypertension: establishment of the model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4314-4320.

43. Tsuruga H, Murata H, Araie M, Aihara M. A model for the easy assessment of pressure-dependent damage to retinal ganglion cells using cyan fluorescent protein-expressing transgenic mice. *Mol Vis* 2012;18:2468-2478.

44. Morrison JC, Johnson E, Cepurna WO. Rat models for glaucoma

research. *Prog Brain Res* 2008;173:285-301.

45. Sawada A, Neufeld AH. Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure. *Exp Eye Res* 1999;69:525-531.

46. Yu S, Tanabe T, Yoshimura N. A rat model of glaucoma induced by episcleral vein ligation. *Exp Eye Res* 2006;83:758-770.

47. Pradhan ZS, Kuruvilla A, Jacob P. Surgical management of glaucoma secondary to idiopathic elevated episcleral venous pressure. *Oman J Ophthalmol* 2015;8:120-121.

48. Liu HH, Zhang L, Shi M, Chen L, Flanagan JG. Comparison of laser and circumlimbal suture induced elevation of intraocular pressure in albino CD-1 mice. *PLoS One* 2017;12:e0189094.

49. Sappington RM, Carlson BJ, Crish SD, Calkins DJ. The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:207-216.

50. Bunker S, Holeniewska J, Vijay S, et al. Experimental glaucoma induced by ocular injection of magnetic microspheres. *J Vis Exp* 2015.

51. Samsel PA, Kisiswa L, Erichsen JT, Cross SD, Morgan JE. A novel

method for the induction of experimental glaucoma using magnetic microspheres. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:1671-1675.

52. Guo XQ, Tian B, Liu ZC, et al. A new rat model of glaucoma induced by intracameral injection of silicone oil and electrocoagulation of limbal vessels. *Chin Med J (Engl)* 2011;124:309-314.

53. Moreno MC, Marcos HJ, Oscar Croxatto J, et al. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid. *Exp Eye Res* 2005;81:71-80.

54. Blanco R, Martinez-Navarrete G, Perez-Rico C, et al. A Chronic Ocular-Hypertensive Rat Model induced by Injection of the Sclerosant Agent Polidocanol in the Aqueous Humor Outflow Pathway. *Int J Mol Sci* 2019;20.

55. Sasaoka M, Nakamura K, Shimazawa M, Ito Y, Araie M, Hara H. Changes in visual fields and lateral geniculate nucleus in monkey laser-induced high intraocular pressure model. *Exp Eye Res* 2008;86:770-782.

56. Shimazawa M, Tomita G, Taniguchi T, et al. Morphometric evaluation of changes with time in optic disc structure and thickness of

retinal nerve fibre layer in chronic ocular hypertensive monkeys. *Exp Eye Res* 2006;82:427-440.

57. Gross RL, Ji J, Chang P, et al. A mouse model of elevated intraocular pressure: retina and optic nerve findings. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2003;101:163-169; discussion 169-171.

58. Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS, Allbaugh RA, Kwon YH, Kardon RH. Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4337-4346.

59. Ji J, Chang P, Pennesi ME, et al. Effects of elevated intraocular pressure on mouse retinal ganglion cells. *Vision Res* 2005;45:169-179.

60. Ruiz-Ederra J, Verkman AS. Mouse model of sustained elevation in intraocular pressure produced by episcleral vein occlusion. *Exp Eye Res* 2006;82:879-884.

61. Aihara M. [The use of mice in glaucoma research --to clarify the mechanism of intraocular pressure regulation and retinal ganglion cell damage]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi* 2010;114:217-246; discussion 247.

62. Urcola JH, Hernandez M, Vecino E. Three experimental

glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res* 2006;83:429-437.

63. Jensen P, Minckler DS, Chandler JW. Epithelial ingrowth. *Arch Ophthalmol* 1977;95:837-842.

64. Sidoti PA, Minckler DS, Baerveldt G, Lee PP, Heuer DK. Epithelial ingrowth and glaucoma drainage implants. *Ophthalmology* 1994;101:872-875.

65. Rummelt V, Naumann GO. Cystic epithelial ingrowth after goniotomy for congenital glaucoma. A clinicopathologic report. *J Glaucoma* 1997;6:353-356.

66. Bayer AU, Danias J, Brodie S, et al. Electroretinographic abnormalities in a rat glaucoma model with chronic elevated intraocular pressure. *Exp Eye Res* 2001;72:667-677.

67. Hains BC, Waxman SG. Neuroprotection by sodium channel blockade with phenytoin in an experimental model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:4164-4169.

68. Sun X, Cheng F, Meng B, Yang B, Song W, Yuan H. Pregnenolone

sulfate decreases intraocular pressure and changes expression of sigma receptor in a model of chronic ocular hypertension. *Mol Biol Rep* 2012;39:6607-6614.

69. Seki M, Tanaka T, Matsuda H, et al. Topically administered timolol and dorzolamide reduce intraocular pressure and protect retinal ganglion cells in a rat experimental glaucoma model. *Br J Ophthalmol* 2005;89:504-507.

70. Kawasaki H, Crowley JC, Livesey FJ, Katz LC. Molecular organization of the ferret visual thalamus. *J Neurosci* 2004;24:9962-9970.

71. Iwai L, Kawasaki H. Molecular development of the lateral geniculate nucleus in the absence of retinal waves during the time of retinal axon eye-specific segregation. *Neuroscience* 2009;159:1326-1337.

72. Dunn DG, Harris RK, Meis JM, Sweet DE. A histomorphologic and immunohistochemical study of chordoma in twenty ferrets (*Mustela putorius furo*). *Vet Pathol* 1991;28:467-473.

73. Vickers JC, Hof PR, Schumer RA, Wang RF, Podos SM, Morrison

JH. Magnocellular and parvocellular visual pathways are both affected in a macaque monkey model of glaucoma. *Aust N Z J Ophthalmol* 1997;25:239-243.

74. Morgan JE, Uchida H, Caprioli J. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma. *Br J Ophthalmol* 2000;84:303-310.

75. Quigley HA, Sanchez RM, Dunkelberger GR, L'Hernault NL, Baginski TA. Chronic glaucoma selectively damages large optic nerve fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:913-920.

76. Glovinsky Y, Quigley HA, Dunkelberger GR. Retinal ganglion cell loss is size dependent in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:484-491.

77. Yücel Y. Effects of retinal ganglion cell loss on magno-, parvo-, koniocellular pathways in the lateral geniculate nucleus and visual cortex in glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research* 2003;22:465-481.

78. Sato C, Iwai-Takekoshi L, Ichikawa Y, Kawasaki H. Cell type-specific expression of FoxP2 in the ferret and mouse retina. *Neurosci Res* 2017;117:1-13.

79. Huberman AD, Stellwagen D, Chapman B. Decoupling

eye-specific segregation from lamination in the lateral geniculate nucleus.

J Neurosci 2002;22:9419-9429.

80. Thompson ID, Morgan JE. The development of retinal ganglion cell decussation patterns in postnatal pigmented and albino ferrets. Eur J Neurosci 1993;5:341-356.

81. Nigel IC. [Neuroanatomy Of The Ferret Brain.] Biology And Disease Of The Ferret: (Wiley-Blackwell; 1998:71–102.

82. Iwai L, Ohashi Y, van der List D, Usrey WM, Miyashita Y, Kawasaki H. FoxP2 is a parvocellular-specific transcription factor in the visual thalamus of monkeys and ferrets. Cereb Cortex 2013;23:2204-2212.

83. Mizuguchi K, Horiike T, Matsumoto N, Ichikawa Y, Shinmyo Y, Kawasaki H. Distribution and Morphological Features of Microglia in the Developing Cerebral Cortex of Gyrencephalic Mammals. Neurochem Res 2018;43:1075-1085.

84. Montiani-Ferreira F, Mattos BC, Russ HH. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the ferret (*Mustela putorius furo*). Vet Ophthalmol 2006;9:209-213.

85. Di Girolamo N, Andreani V, Guandalini A, Selleri P. Evaluation of intraocular pressure in conscious ferrets (*Mustela putorius furo*) by means of rebound tonometry and comparison with applanation tonometry. *Vet Rec* 2013;172:396.
86. Sapienza JS, Porcher, D., Collins, B. R., Gum, G. G. & Brooks, D. E. . Tonometry in clinically normal ferrets (*Mustela putorius furo*). *Progress in Veterinary and Comparative Ophthalmology* 1991;1:291–294.
87. Hernández-Guerra AM, Rodilla V, López-Murcia MM. Ocular biometry in the adult anesthetized ferret (*Mustela putorius furo*). *Vet Ophthalmol* 2007;10:50-52.
88. Nakagawa A, Sakai O, Tokushige H, Fujishiro T, Aihara M. Development and characterization of a new rat ocular hypertension model induced by intracameral injection of conjunctival fibroblasts. *Sci Rep* 2019;9:6593.
89. Chen Z, Wang J, Lin F, Dai H, Mu K, Zhang H. Correlation between lateral geniculate nucleus atrophy and damage to the optic disc in glaucoma. *J Neuroradiol* 2013.

90. Dul M, Ennis R, Radner S, Lee B, Zaidi Q. Retinal adaptation abnormalities in primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:1329-1334.
91. Yen MY, Cheng CY, Wang AG. Retinal nerve fiber layer thickness in unilateral amblyopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2224-2230.
92. Ramirez AI, Salazar JJ, de Hoz R, et al. Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:5690-5696.
93. Park KA, Park DY, Oh SY. Analysis of spectral-domain optical coherence tomography measurements in amblyopia: a pilot study. *Br J Ophthalmol* 2011;95:1700-1706.
94. Weber AJ, Chen H, Hubbard WC, Kaufman PL. Experimental glaucoma and cell size, density, and number in the primate lateral geniculate nucleus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1370-1379.
95. Lam DY, Kaufman PL, Gabelt BT, To EC, Matsubara JA. Neurochemical correlates of cortical plasticity after unilateral elevated intraocular pressure in a primate model of glaucoma. *Invest Ophthalmol*

Vis Sci 2003;44:2573-2581.

96. Schmidt MA, Knott M, Heidemann R, et al. Investigation of lateral geniculate nucleus volume and diffusion tensor imaging in patients with normal tension glaucoma using 7 tesla magnetic resonance imaging. PLoS One 2018;13:e0198830.

97. Wang X, Sam-Wah Tay S, Ng YK. Nitric oxide, microglial activities and neuronal cell death in the lateral geniculate nucleus of glaucomatous rats. Brain Res 2000;878:136-147.

98. Gallego BI, Salazar JJ, de Hoz R, et al. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. J Neuroinflammation 2012;9:92.

99. Hoffmann KP, Garipis N, Distler C. Optokinetic deficits in albino ferrets (*Mustela putorius furo*): a behavioral and electrophysiological study. J Neurosci 2004;24:4061-4069.