

01378

霊長類（ツパイ）を用いた
近視実験モデルの確立と
近視発症メカニズムの解析

(研究課題番号：05454466)

平成5～6年度科学研究費補助金
(一般研究B)研究成果報告書

平成8年3月



研究代表者 吉田 晃 敏
(旭川医科大学医学部)

はしがき

平成5年度から、文部省科学研究費補助金（一般研究B）の助成のもとに行われた「霊長類（ツパイ）を用いた近視実験モデルの確立と近視発症メカニズムの解析」は2年間の研究期間を終了し、ここに研究成果報告書をまとめることになった。研究計画の全てが達成されたわけではないが、いくつかの新しい知見が得られたと考えている。

このように2年間の成果をまとめるにあたり、いろいろとご指導ご助言を頂いた関係者の皆様に心からお礼を申し上げます。また、この報告書についてご意見ご批判を頂ければ幸いです。

研究組織

研究代表者： 吉田 晃敏 （旭川医科大学医学部・教授）
研究分担者： 石子 智士 （旭川医科大学医学部・助手）
研究分担者： 小笠原博宣 （旭川医科大学医学部・助手）
研究分担者： 菅野 晴美 （旭川医科大学医学部・助手）

研究支援者

門 正則 （旭川医科大学医学部・講師）
高橋 正年 （旭川医科大学医学部・助手）
北谷 智彦 （旭川医科大学生体情報調節系大学院生）
安孫子 徹 （旭川医科大学生体情報調節系大学院生）
森 文彦 （旭川医科大学生体情報調節系大学院生）

研究経費

平成5年度	3,800千円
平成6年度	2,800千円
計	6,600千円

研究発表

1. 学会誌等

- 1) 石子智士、吉田晃敏、北谷智彦、安孫子徹、森文彦、
高橋正年、門正則、斉藤敬司
小動物の眼軸長測定 – ツパイ眼における検討 –
あたらしい眼科 12:1625-1627,1995
- 2) 石子智士、吉田晃敏、北谷智彦、安孫子徹、森文彦、斉藤敬司
小動物における屈折度測定法の検討
日本眼科紀要 47:382-385,1996
- 3) 石子智士、吉田晃敏、北谷智彦、安孫子徹、森文彦、
高橋正年、門正則、斉藤敬司
実験動物に対する fluorophotometry の検討
日本眼科学会雑誌 (印刷中)
- 4) 安孫子徹、石子智士、吉田晃敏、北谷智彦、森文彦、門正則、斉藤敬司
霊長類の実験動物 (ツパイ) の眼底像
日本眼科紀要 46:1281-1284,1995
- 5) 石子智士、吉田晃敏、北谷智彦、安孫子徹、森文彦、
高橋正年、門正則、斉藤敬司
ツパイの成長および加齢に伴う眼球構築変化
日本眼科紀要 46:1168-1171,1995
- 6) M. Kado, S. Ishiko, A. Yoshida, N. Kitaya
T. Abiko, F. Mori, M. Takahashi and K. Saito
Lenticular autofluorescence in normal tree shrews.
Ophthalmic Research (in press)

- 7) 北谷智彦、石子智士、吉田晃敏、安孫子徹、森文彦、斉藤敬司
実験近視作成における加齢の影響
視覚の科学（印刷中）
- 8) 石子智士、吉田晃敏、北谷智彦、安孫子徹、森文彦、斉藤敬司
実験近視眼における眼球構成要素の変化
視覚の科学（印刷中）
- 9) A. Yoshida, S. Ishiko, M. Kojima
Inward and outward permeability of the blood-retinal barrier in
experimental myopia.
Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology
(in press)

2. 口頭発表

- 1) 門正則、石子智士、高橋正年、森文彦、
安孫子徹、北谷智彦、吉田晃敏、斉藤敬司
ツパイの水晶体自然蛍光 1. 加齢による変化
第60回 日本中部眼科学会 1994年9月（神戸）
- 2) M. Kado, S. Ishiko, A. Yoshida, N. Kitaya
T. Abiko, F. Mori, M. Takahashi and K. Saito
Lenticular autofluorescence in normal tree shrews.
ARVO Annual Meeting May 1995, Florida, USA
- 3) S. Ishiko, A. Yoshida, F. Mori, T. Abiko, N. Kitaya
M. Kado, M. Kojima and K. Saito
Changes in blood-retinal barrier permeability in form deprivation
myopia in tree shrews.
ARVO Annual Meeting May 1995, Florida, USA

- 4) 石子智士、吉田晃敏、森文彦、北谷智彦、安孫子徹、
門正則、小島満、斉藤敬司
ツパイを用いた実験近視眼における血液網膜柵透過性機能の変化
第99回 日本眼科学会総会 1995年4月 (名古屋)
- 5) 安孫子徹、石子智士、吉田晃敏、北谷智彦、森文彦、門正則、斉藤敬司
霊長類の実験動物(ツパイ)の眼底像
第33回 北日本眼科学会 1995年7月 (秋田)
- 6) 石子智士、吉田晃敏、北谷智彦、安孫子徹、森文彦、
門正則、高橋正年、斉藤敬司
ツパイの加齢に伴う眼球構築変化
第33回 北日本眼科学会 1995年7月 (秋田)
- 7) 石子智士、吉田晃敏、北谷智彦、安孫子徹、森文彦、斉藤敬司
ツパイを用いた実験近視眼の眼球構築変化
第14回 屈折調節研究会 1995年9月 (金沢)
- 8) 北谷智彦、石子智士、吉田晃敏、安孫子徹、森文彦、斉藤敬司
実験近視作成における加齢の影響
第14回 屈折調節研究会 1995年9月 (金沢)

研究成果

〔研究目的〕

近視は眼科領域では最も多い疾患であり、近年では世界的に増加傾向にある。とりわけ眼軸長が延長し網脈絡膜萎縮を来す悪性近視は失明原因としても重要である。しかしながら、これらの発症メカニズムについては未だ解明されていない。そこで、その発症メカニズムを解明するため、実験的に動物を用いて軸性近視を作成し、その眼内に生じる変化をとらえようとする試みがなされている。

これまで我々は、近視の発症およびその進行に伴う変化を、臨床的にあるいはサルを用いて実験的に研究してきた。サルを用いた実験では、ヒトを対象とした研究では出来ない研究が可能であったが、一度に扱える頭数が限られており、また、近視発症までに1年の歳月を必要とし、このため一つの実験系の結果をふまえて次の実験系を考えるには、長い時間がかかった。一方、鳥類であるニワトリを用いると、1～2週間程度の短期間で近視を発症させることが可能である。しかしながら、これらの鳥類は眼球の病理解剖学的な構造がヒトとは異なり、この実験系から得られた結果をそのままヒトに当てはめて考えることはできない。

ツパイ (*Tupaia glis*) は、哺乳類のなかでも食虫目と霊長目の特徴を併せ持つユニークな動物で、近年では霊長目ー原猿類ーツパイ科に分類されている。ツパイは、齧歯類に似た容貌を持つ体重150 g程度の小動物である。生後120日程度で成熟するにもかかわらず、その寿命は5年以上の長期にわたるなど、実験動物として有用である。さらに、色覚を有すること、視覚野が発達していることなど、眼球も発達し、ヒトのそれに類似している。

本研究は、このツパイを用いて新しい近視実験モデルを確立し、これを用いることにより近視発症メカニズムを解明することを目的とした。

[研究計画・方法・結果]

I. 基礎実験

実験を始めるに当たり、ツパイ眼に生じる変化をとらえるために必要な各種測定方法の検討を試みた。さらに、これらの方法を用いて正常ツパイの眼科的特徴を明らかにした。

1. ツパイの眼球構築測定方法の検討

実験小動物の眼軸を測定するための方法を検討した。高精度な超音波装置装置をツパイ眼に用いてその有用性を検討し、実験動物の小さな眼球を測定するための十分な精度を有することを明らかにした¹⁾。

2. 小動物における屈折度測定法の検討

実験小動物の屈折度測定装置及びそこから得られた値の補正方法を検討した。この装置を用いてモデル眼を測定することにより実測値と計算値との回帰曲線を得た。これにより得られた値と、さらに眼軸長から求めたsmall eye effectを考慮することにより実際の屈折度を算出した。このようにして求めた値は、これまでの報告と同様の値を示した²⁾。

3. 小動物用眼内蛍光測定方法の検討

動物眼測定用アダプターを装着したFluorotron Masterの有用性を検討した。さらに、この装置をツパイに応用するための測定条件について検討し、血液眼内柵透過性機能を評価するためのfluorophotometryの条件を設定した³⁾。

4. ツパイの眼底像

眼底検査およびscanning laser ophthalmoscopeを用いたインドシアニンググリーンと、フルオレセインによる蛍光眼底造影検査を施行し、ツパイの眼底像の特徴をとらえた⁴⁾。

以上の研究の結果、以後に進める実験においてこれらの測定方法が有用であり、信頼性の高いことを立証できた。。

II. 正常ツパイ眼の成長および加齢に伴う変化の検討

幼若ツパイを用いて近視実験を行うにあたり、ツパイ眼の成長および加齢に伴う変化を知る必要がある。しかしながら、それらの変化を眼科的立場から詳細にしかも長期的に検討した報告は、国の内外を問わず認められない。そこでツパイの正常眼に生じる変化を、若年期から高齢にいたるまで明らかにしようと試みた。

1. 成長および加齢に伴う眼球構成要素の変化

正常ツパイにおける成長および加齢に伴う眼球構成要素の変化を検討した。角膜曲率半径は、生後約250日位までは急激に増大し、それ以降は増大の程度が緩やかになる傾向を認めた。前房深度には、加齢による変化を認めなかった。水晶体厚と眼軸長は、生後約250日位まで急激に増大し、それ以降は増大の程度が緩やかになる傾向を認めた。硝子体腔長は、生後約250日位まで急激にその長さが縮小し、それ以降は減少の程度が緩やかになる傾向を認めた。今回行った全ての測定において、左右眼による差は認めなかった。以上より、正常ツパイにおける眼球の形態的变化は左右眼でほぼ同時に進行し、生後約250日程度まで継続していることを初めて明らかにした⁵⁾。

2. 成長および加齢に伴う水晶体自然蛍光の変化

正常ツパイの水晶体自然蛍光を動物眼測定用アダプターを装着したFluorotron Masterを用いて計測した。我々の施行した水晶体自然蛍光測定法は信頼性があり、正常ツパイの水晶体自然蛍光は生後日数とのみ相関し個体差が非常に少ないと考えられた。従って、ツパイの水晶体はヒトにおける種々の水晶体疾患の病態解明に有用なモデルと考えられた⁶⁾。

以上、正常ツパイの成長および加齢に伴う眼球の変化を初めて明らかにした。

Ⅲ. 実験近視

はじめにツパイを用いての近視作製法を確立した。つぎに、近視作成に年齢が及ぼす影響を検討した。そして、近視の発症およびその進行に伴う、血液眼内細胞透過性機能の変化について検討した。

1. 形態覚遮断法の検討

ツパイを用いて実験的に軸性の近視を作製するにあたり、その作製方法を検討することは重要である。これまで、眼圧を上げたり、体温を上昇させることにより近視を作ろうとした試みもなされたが、最近では最も確実な方法として形態覚遮断が用いられるようになった。この形態覚遮断は、上下の眼瞼を縫合するいわゆる瞼々縫合という方法からはじまり、最近では、コンタクトレンズを用いる方法や、半透明の覆いを眼前に縫いつける方法、さらに頭部に支持台（Anchor）を縫着しこれを支えとしてゴーグルをとりつける方法などがある。

近視の発症に伴う眼内変化をとらえることを目標とした場合、各個体において繰り返し測定を行う必要がある。そのため我々は、ツパイの頭部にAnchorを縫着し、ゴーグル（図1）を取り付ける手法を開発した。

Anchor縫着術を11匹の幼若ツパイに施行し、全体ではその初回固定率は約50%であった。このうち後半に行った6眼では、80%以上で固定が成功している。このことは、術者の熟練が強く影響していることを意味しているとともに、この方法が実験手技として有用であることが示唆された。

2. 実験近視作製における加齢の影響

実験近視作製にあたり、加齢の影響を調べるため、壮年期から老年期に相当すると考えられるツパイを用いて、この年齢においても近視化が生じるかどうかを検討した。成熟ツパイ5匹の頭部にAnchorを固定し、ここを支柱にしてゴーグルを装着し、片側にのみサンドペーパーで研磨したコンタクトレンズを付けて15日間遮蔽した。15日目に測定した屈折度と各屈折要素の長さ、そして角膜曲率半径に関しては、遮蔽眼と対照眼で差を認めなかった。したがって、成熟期を過ぎた

ツパイでは、形態覚遮断による近視化に対する感受性が著しく低下している可能性が示唆された⁷⁾。

3. 実験近視眼における眼球構成要素の変化

生後8週以内の幼若ツパイ13匹に片眼性に形態覚遮断を行い、その屈折度および角膜曲率半径の変化と眼球屈折要素の長さの変化を観察した。それぞれの個体で遮断前、および遮断後15日目、30日目、45日目、そして60日目に、屈折度および屈折要素の長さの測定を行った。その結果、遮断眼と対照眼とを比較すると、屈折度は遮断後15日で有意に近視化し、遮断後の日数に伴って近視の程度が大きくなった。硝子体腔長は遮断後15日、眼軸は遮断後30日目に有意に延長し、遮断後の日数に伴って延長した。また角膜曲率半径は有意な変化を認めず、屈折度の近視化と硝子体腔長の延長は有意な相関を示したことから、形態覚遮断によりツパイに生じた近視は、軸性近視であることが示唆された⁸⁾。

4. 実験近視眼における近視発症およびその進行に伴う

血液網膜柵透過性機能の変化

生後8週以内の幼若ツパイに形態覚遮断を行い実験的に近視を作製し、これを用いて近視の発症および進行に伴う血液眼内柵透過性機能の変化について検討した。

8匹の幼若ツパイの片眼をゴーグル法を用いて遮断し、遮断前、および遮断後15日目、30日目、そして45日目に屈折度、角膜曲率半径、各屈折要素の長さの測定と眼内蛍光強度の測定とを行った。眼内蛍光強度の測定は、Fluorotron Master (OcuMetric社製、USA) に動物眼測定用アダプターを用いて行った。測定の詳細についてはすでに報告した方法を用いた³⁾。水晶体のスキャンに相当する部位の自然蛍光の最大値をその眼の水晶体自然蛍光値として用いた。また、これらから得られた値と、ツパイ用に改良したComputer Simulation法から血液網膜柵の内方透過性係数 (Pin値) を求めて血液網膜柵透過性機能の指標とした。また、血液房水柵透過性機能の指標として、非タンパク結合フルオレセイン (PUF)濃度曲線下の面積で、蛍光色素静注前後の前房中の最高蛍光強度の差を除いた、いわゆる前房値を用いた。また蛍光色素静注直後に蛍光眼底造影検査を施行した。

屈折度は、遮蔽後の日数に伴って近視方向へと傾き、遮蔽後15日目で有意に近視化した（図2）。角膜曲率半径には、有意な変化を認めなかった（図3）。各屈折要素（図4-7）のうち硝子体腔長および眼軸長は、遮蔽後の日数に伴って延長し、それぞれ遮蔽後15日目と30日目に有意となった（図6, 7）。水晶体自然蛍光値は遮蔽後45日目から有意な変化を示したが（図8）、血液房水柵透過性機能の指標とした前房値には変化を認めなかった（図9）。血液網膜柵透過性機能の指標として用いたPin値は遮蔽後45日目に有意となった（図10）。眼底検査および蛍光眼底造影検査では近視化による明らかな異常を認めなかった。

以上の結果から、軸性近視の進行により血液網膜柵透過性機能が変化することが示唆された。また同じ時期から水晶体自然蛍光も有意な変化を示したことから、近視の進行に伴い、眼内の恒常性維持機構になんらかの障害が生じることが推測された。

〔総括と今後の展望〕

本研究により、ツパイの眼科的特徴を明らかにする事ができた。前述したように、ツパイはその特徴から眼科領域の実験動物として有望視されている。今後眼科的実験を進める上で、その正常眼底像、成長・加齢に伴う眼球変化を知る事は非常に重要である。この点において今回の研究は有用な基礎的情報を提供するものとする。

ツパイに特殊ゴーグルを装着し、その片眼をスリガラス状のレンズで覆い形態覚遮断を行うことにより、遮蔽後15日で硝子体腔長の延長を伴う軸性近視が発症した。このモデルを確立したことにより、軸性近視発症に伴う眼球変化の研究が可能となった。

さらに、ツパイに作製した近視眼において血液網膜柵の機能が障害されることが明らかとなった。これは、以前我々がヒトを対象とした研究、すなわち近視の程度と血液網膜柵の透過性亢進が相関することをあきらかにした結果を支持するものであった。そして動物実験モデルを用いたことにより近視発症からこれらの変化を経時的に観察することが可能となり、血液眼内柵透過性機能変化による眼内環境の恒常性維持機構の崩壊が近視の進行と密接に関連している可能性が推測された。

今後は、近視の程度と、血液網膜柵の透過性機能障害の程度、網膜の形態変化、および網膜内の化学伝達物質の変動との関連を総合的に解析し、近視発症のメカニズムを解明していきたい。

図 1



○ — 対照眼 (平均土標準偏差)
 □ — 遮蔽眼 (平均土標準偏差)

図 2

屈折度の変化

屈折度 (D)

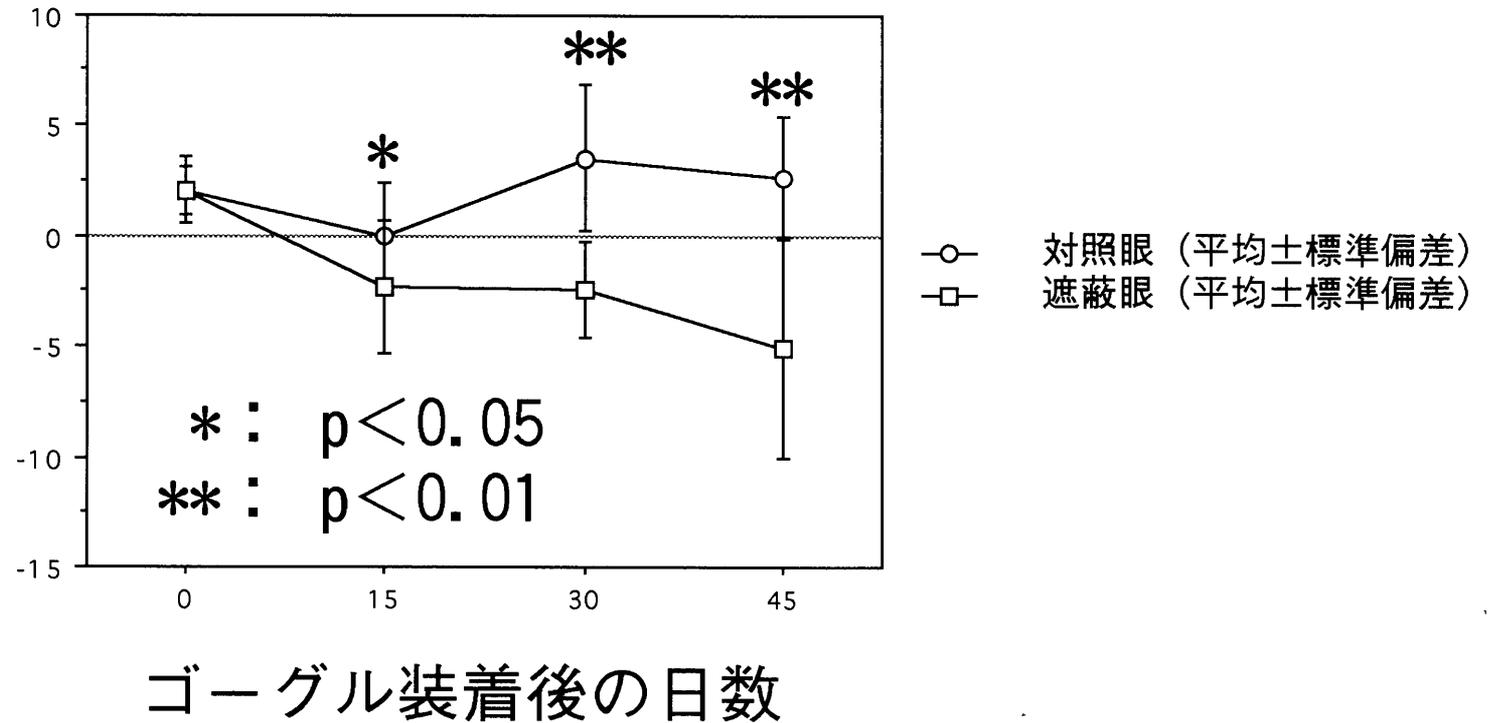
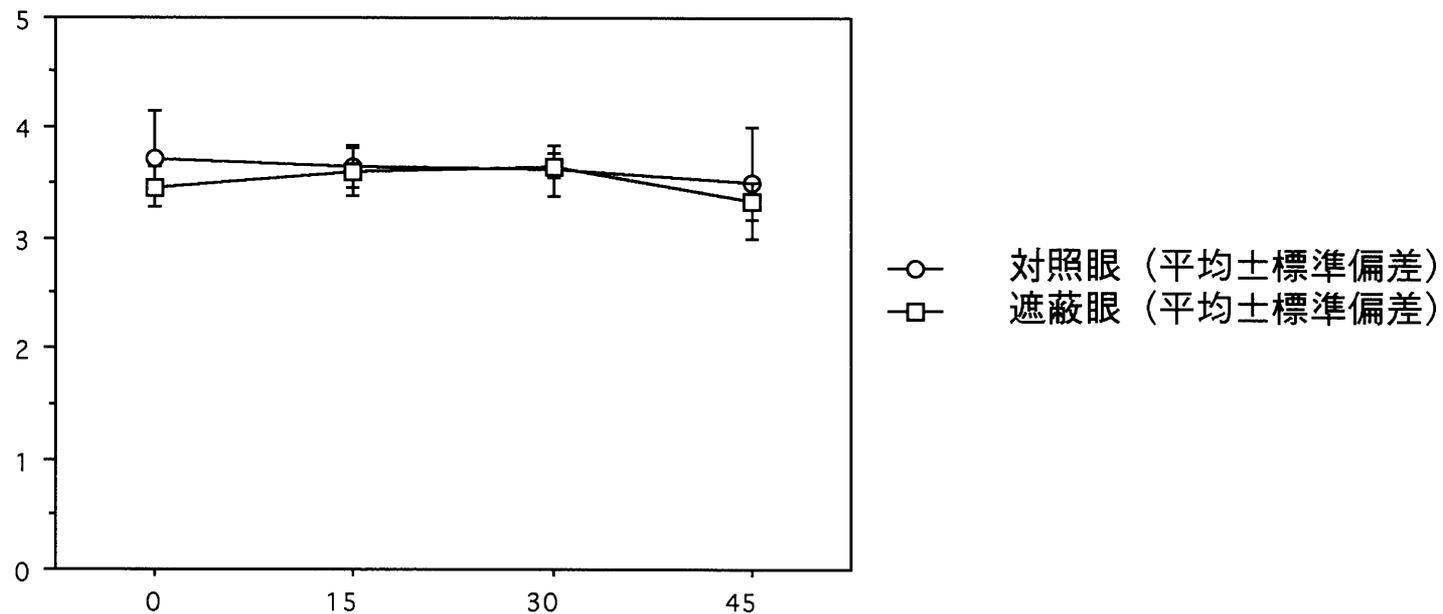


図 3

角膜曲率半径の変化

角膜曲率半径 (mm)

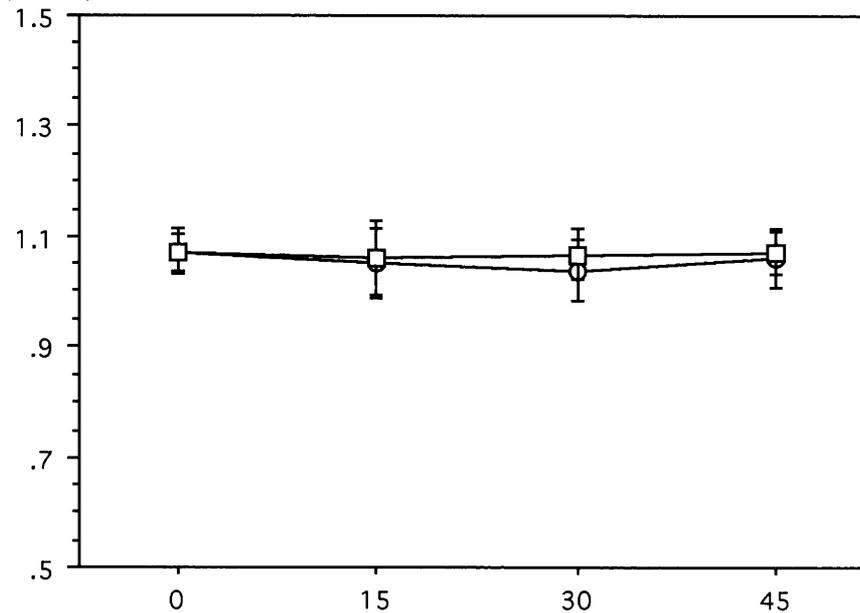


ゴースル装着後の日数

図 4

前房深度の変化

前房深度 (mm)



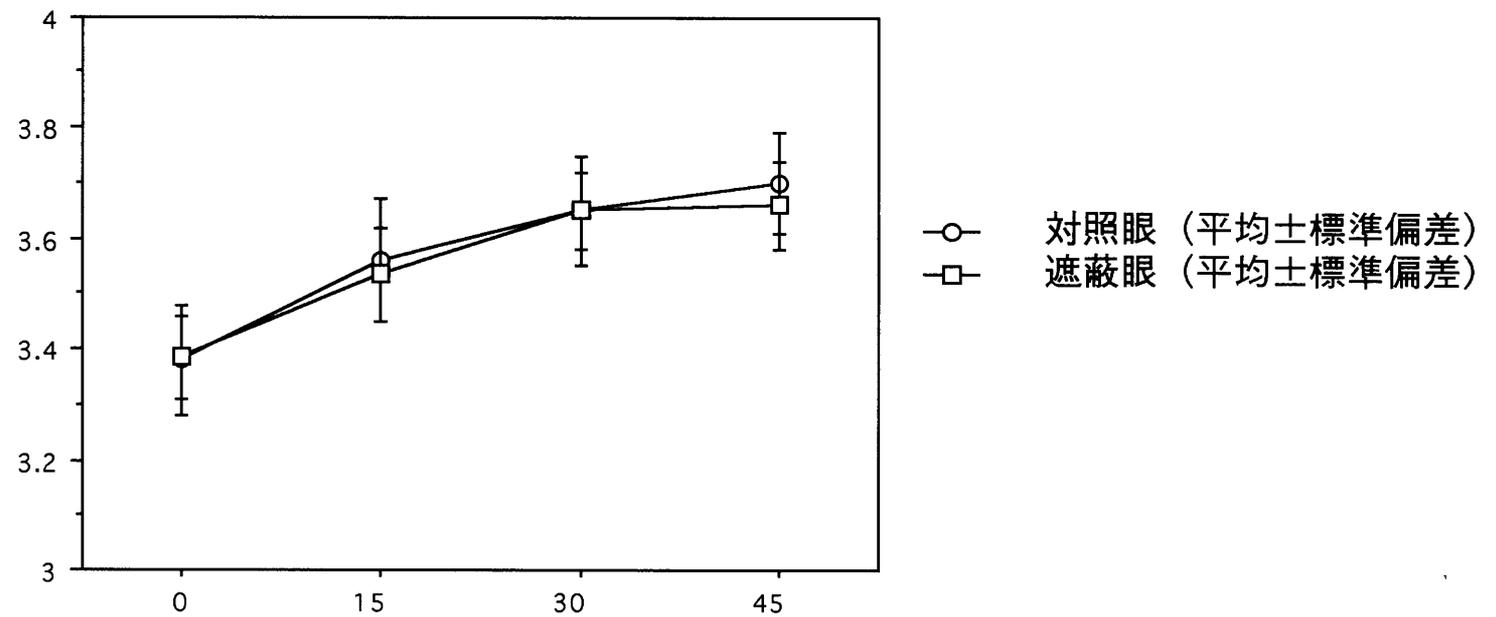
○ 対照眼 (平均±標準偏差)
□ 遮蔽眼 (平均±標準偏差)

ゴグル装着後の日数

図 5

水晶体厚の変化

水晶体厚 (mm)

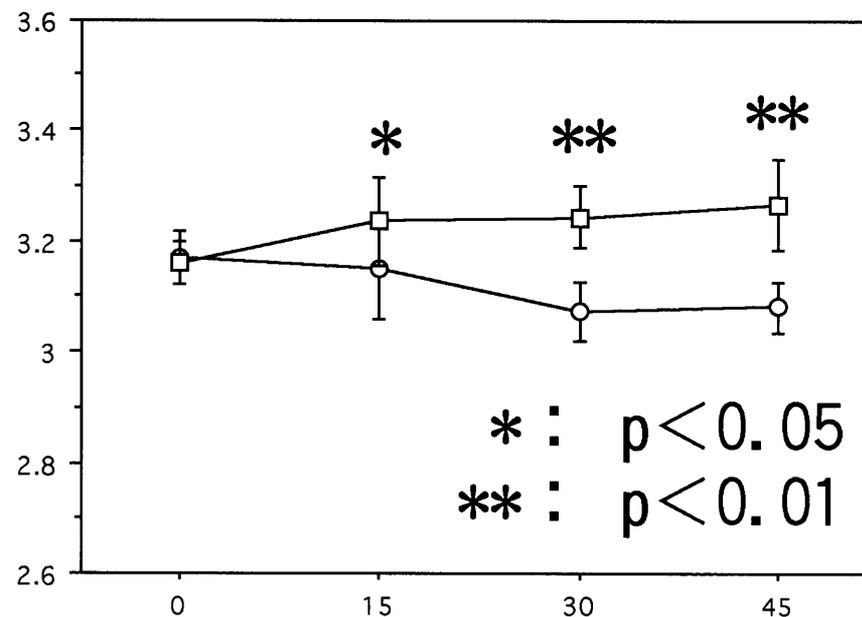


ゴークル装着後の日数

図 6

硝子体腔長の変化

硝子体腔長 (mm)



○ 対照眼 (平均±標準偏差)
□ 遮蔽眼 (平均±標準偏差)

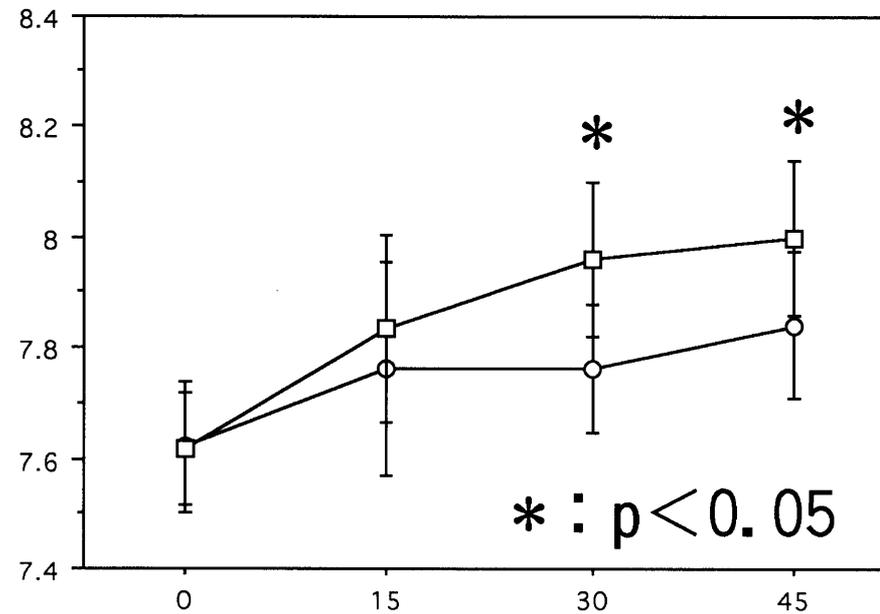
* : $p < 0.05$
** : $p < 0.01$

ゴグル装着後の日数

図 7

眼軸長の変化

眼軸長 (mm)



○ 対照眼 (平均±標準偏差)
□ 遮蔽眼 (平均±標準偏差)

ゴースル装着後の日数

図 8

水晶体自然蛍光値の変化

水晶体自然蛍光
(ngEq/ml)

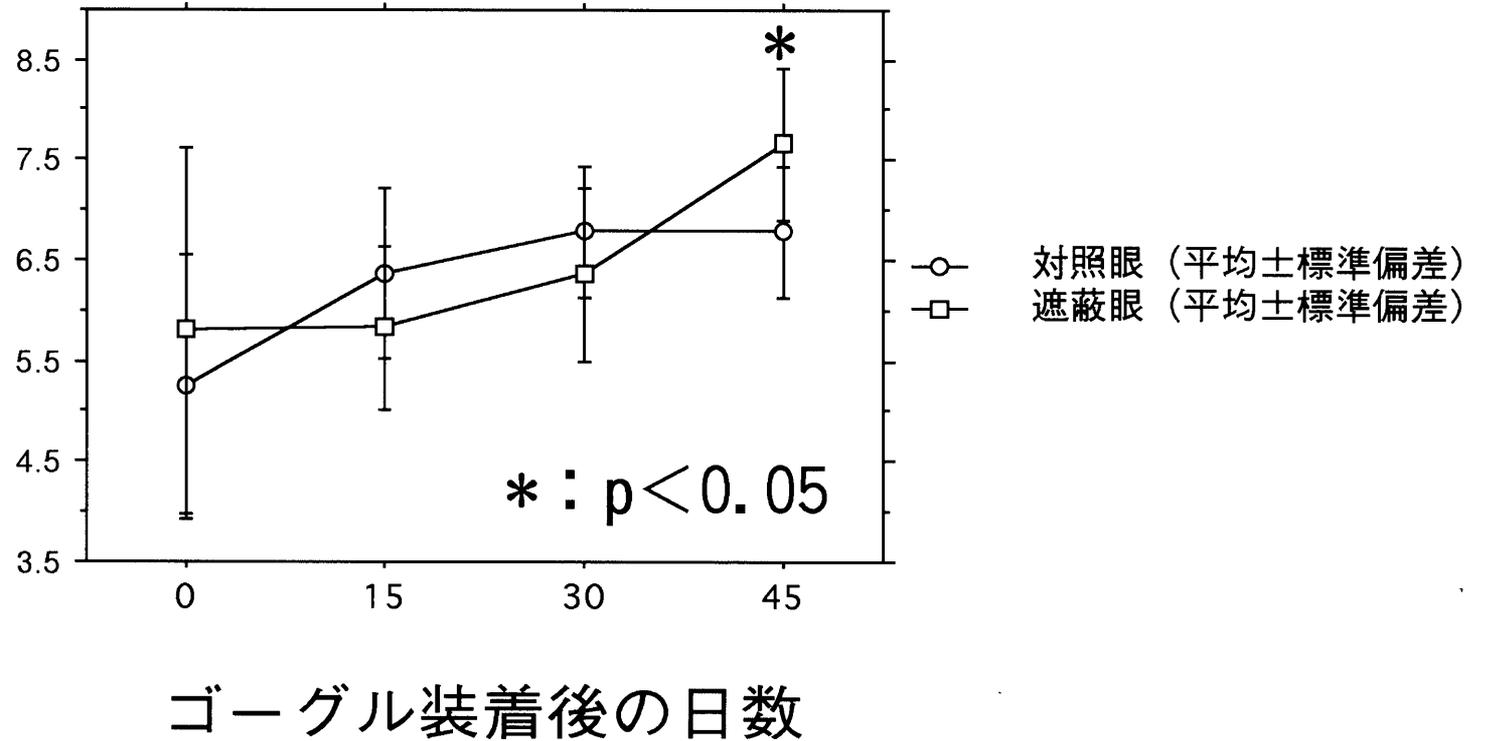
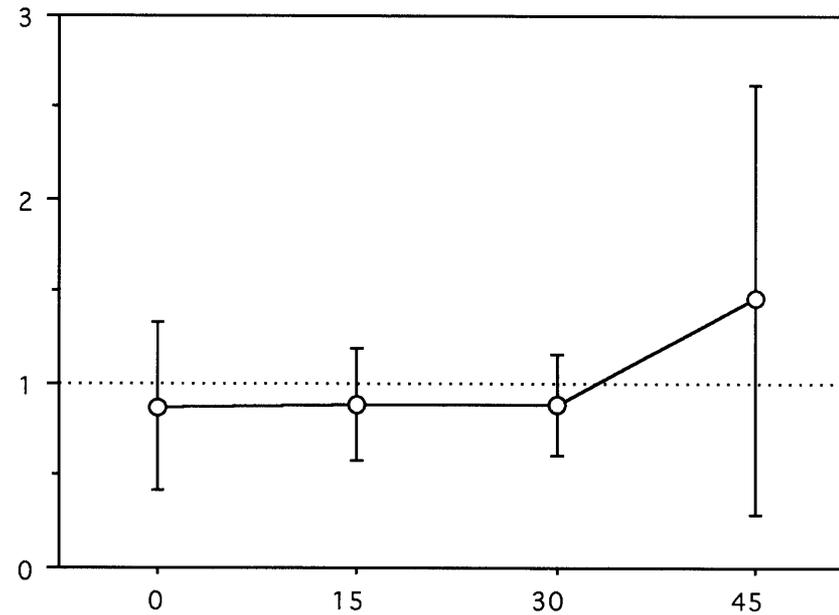


図 9

前房値の比の変化

前房値の比
(遮蔽眼/対照眼)

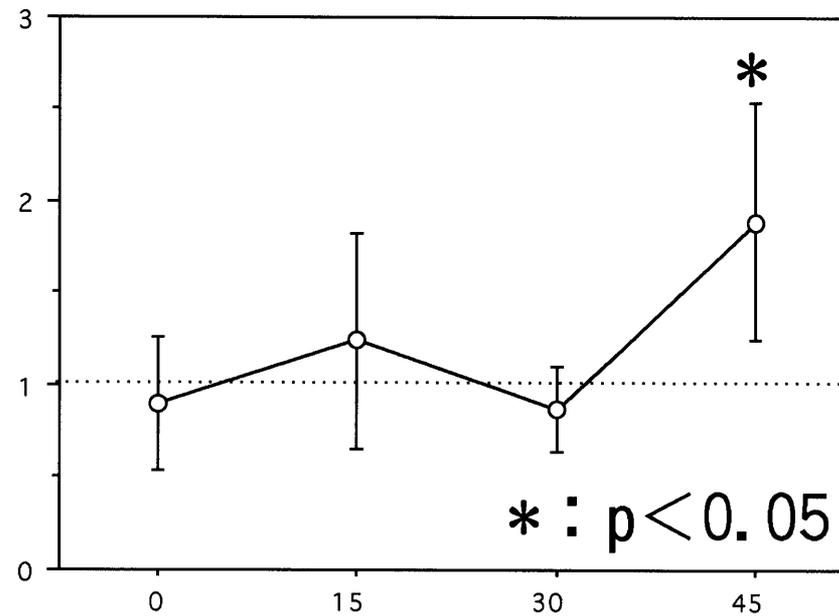


ゴーグル装着後の日数

図10

P in値の比の変化

P in 値の比
(遮蔽眼/対照眼)



ゴーグル装着後の日数