

内因性光感受性網膜神経節細胞 (ipRGC) の光応答特性に関する基礎的研究

天野 蓉子

1. はじめに

1.1 光受容器と視覚

2002年に哺乳類の網膜上に、錐体や杆体とは別の新たな光受容器が発見され、内因性光感受性網膜神経節細胞 (intrinsically photosensitive retinal ganglion cell : ipRGC) と名付けられた¹⁾。ipRGCはメラノプシンという視物質を有し、概日リズムの光同調や瞳孔反射といった意識に昇らない視覚機能に関与することが明らかにされた。ipRGCの発見により、一般に視覚と呼ばれてきた錐体・杆体を光受容器とする明暗覚、色覚、形態覚、運動覚などは、イメージ形成の視覚 (image-forming vision)、ipRGCを光受容器とする明暗覚は、非イメージ形成の視覚 (non-image-forming vision) と認識されるようになった。

イメージ形成にかかわる錐体・杆体からの光信号は、双極細胞などを介して網膜神経節細胞 (RGC) に伝わり、その軸索は神経線維として集まって視神経を作り外側膝状体神経節まで延び、大脳皮質の視覚野へ伝えられる。成人の錐体・杆体の軸索は1/100~2/100 mmであるが、神経節細胞の軸索は数 cm の長さを持つ。およそ150万の神経節細胞がヒトの網膜にはあり、メラノプシンを含む細胞 (ipRGC) はそのうち0.2%にあたる²⁾。ipRGCは視交叉上核に直接投射し、光信号を伝える (図1)。この視交叉上核に、睡眠・覚醒、血中ホルモン濃度などの概日リズムを制御する生物時計が局在するとされる。

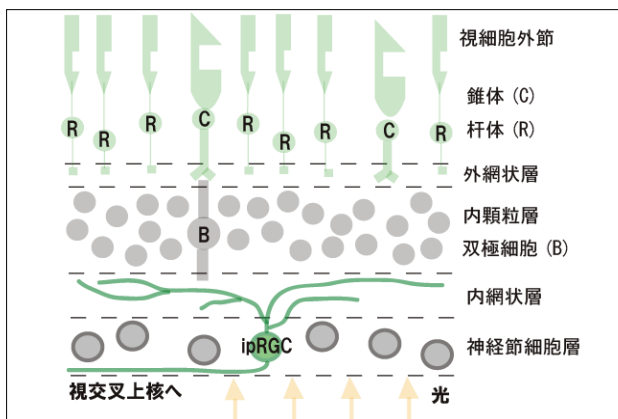


図1 網膜の ipRGC¹⁾

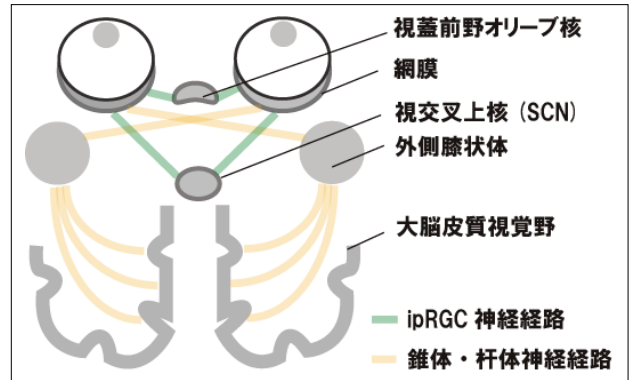


図2 目から脳への神経経路

1.2 新たなオプシン型光受容物質 (メラノプシン)

網膜には光によって色が変わる物質 (視物質) があり、この光受容物質は主にオプシンというタンパク質からなっていて、光が当たるとタンパク質部分の吸光度が変化することによってその物質の色が変わる。オプシン型光受容分子の系統を図3に示す。錐体細胞の3つの視物質と、杆体細胞の視物質 (ロドプシン) の吸収特性は互いに異なることが知られており、赤 (559nm)、緑 (531nm)、青 (419nm)、杆体 (496nm) にピークを持つ。視細胞と同様に、ipRGCも吸収特性を有する。メラノプシンという新しいオプシン型視物質を有する ipRGC の吸収特性は、オプシン型光受容分子の一般的な吸収特性の型によく一致するが、そのピーク波長は484nmであり、錐体・杆体のどれとも一致しない。

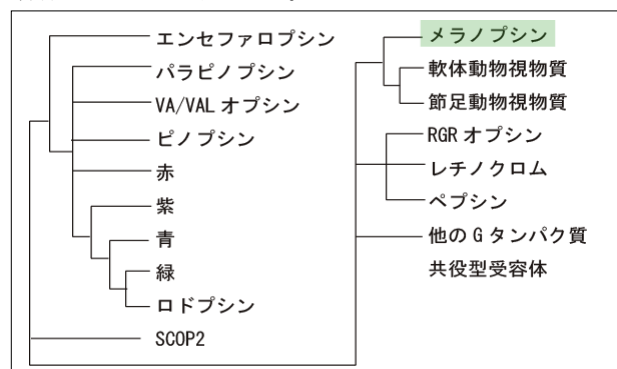


図3 オプシン型光受容分子の系統関係³⁾

ipRGCの内因性光応答は、メラノプシンによって引き起こされるものである。実際、メラノプシン遺伝子をノックアウトしたマウスにおいて ipRGCに相当する細胞が内因性の光応答を示さないことがわかっている³⁾。

1.3 ipRGCの特性

ipRGCは視細胞と異なる特性をもつ。例えば、視細胞が過分極性の光応答を示す一方、ipRGCは脱分極性の光応答を示し(神経細胞は、興奮していない状態では、細胞外の電位を基準とすると負に分極している。この分極状態が減少することを脱分極といい、増加することを過分極という)、光応答が光照射後1分以上も継続する。さらに、光刺激を与えてから反応までにかかる時間も、錐体・杆体に比べて遅い。

ipRGCの脱分極反応、ipRGCが関与する生理的応答の作用特性に関する既往の研究により、それらの光応答特性は、およそ460nmから480nmで極大となる単峰性の分布をとることが示されている。表1にipRGCが関与する光による作用特性を示す。

表1 ipRGCの関与する作用特性⁴⁾

生理的応答対象	ピーク波長	年
メラトニン抑制	495-505 nm (hamster)	1987
	504-514 nm (human)	1988
	$\lambda_{max} = 464$ nm (human)	2001
瞳孔光反射	$\lambda_{max} = 498$ nm (mouse)	2001
	$\lambda_{max} = 482$ nm (human)	2006
	$\lambda_{max} = 483$ nm (monkey)	
ipRGC細胞電極	$\lambda_{max} = 483$ nm (rat)	2002
	$\lambda_{max} = 482$ nm (monkey)	2005

電気生理学的研究では、単離した細胞の状態ではipRGCの直接的な光応答特性を調べており、正常な網膜機能を反映していないこと、メラトニン分泌や概日リズムの位相変位は、ipRGCの直接的な光応答ではないことなどの問題が残っている。また、多くのデータは齧歯類によるもので、ヒトのデータは少ない。

1.4 本研究の位置づけ

CIE第6部会「光生物学と光科学」では、ヒトの生理と行動に対する光の影響を調査・研究し、技術委員会TC6-62「Action Spectra and Eosimetric Quantities for Circadian and Related Neurobiological Effects」(概日リズムおよび関連する神経生物学的影响の作用スペクトル)では、光の時間生物学的・神経内分泌学的影响や覚醒効果の作用スペクトルに関する研究成果を収集・評価し、非視覚系の作用

に関する測光基準を作成しようとしている。

ipRGCは、その軸索をオリブ核にも投射して、瞳孔反射に関与している。このことを利用し、本研究では正常な網膜におけるipRGCの光応答特性を、直接的に把握することを目的としている。また、ipRGCの分光感度から、まだ不十分ではあるが、非イメージ形成の視覚に関する測光基準を提案するための考え方を示す。

2. 単波長光による瞳孔反射実験

2.1 実験装置

本実験では、市販の両目眼球回旋撮影装置を改良し、光刺激ユニットと撮影装置からなるシステムを作った。右目はゴーグル(図4)に内蔵したCCDカメラで撮影、左目は全視野刺激とするための半球状の拡散材をつけた状態で、光刺



図4 眼球回旋撮影装置

激を与えた。ファイバ照明装置からの光を、特定の波長域を透過させる干渉フィルタ装置に通して光刺激の波長を変え、さらにNDフィルタを用いて刺激量を変えた。1回の光刺激は、光刺激前5秒、光刺激5秒、光刺激後15秒の計25秒間であった。与えた光刺激は、400nm~600nmの間の8波長と、光量の設定7段階の組み合わせによる56条件とした。図5に示すようにCCDカメラで撮影さ

れた画像は、眼球回旋解析装置で解析され、演算ソフト表示画面左上に映し出され、その下に瞳孔を追跡測定したグラフが表示される。今回光刺激は、単波長光のみであったが、混色の光刺激による瞳孔反射実験も可能である。

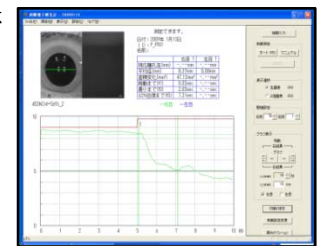


図5 表示画面

2.2 実験方法

被験者にまず、消灯した室内で30分間アイマスクをつけ、暗順応させた。その後、拡散材を着けた上からゴーグルを顔に当て、瞼が瞳孔にかからないよう、両目を大きく開けた状態で、光刺激を与え、その間の瞳孔を撮影した。

2.3 実験結果

瞳孔は、光刺激とともに収縮し、光刺激後も完全には戻らなかった。今回与えた光刺激の中では、481nmの光刺激で最

も縮瞳が起こり、601nmの光刺激で最も小さい縮瞳が起きた。また、光刺激後も継続する瞳孔収縮も、同じく481nmの光刺激で最も大きい反応が得られた。図6に481nm(16.7 log photon/cm²/s)の光と601nm(16.9 log photon/cm²/s)の光における瞳孔径の測定結果を示す。ほぼ同じ光量にもかかわらず、光照射中の瞳孔収縮、光照射後の継続した瞳孔収縮はともに、481nmの光刺激時の方が大きいことが見てとれる。

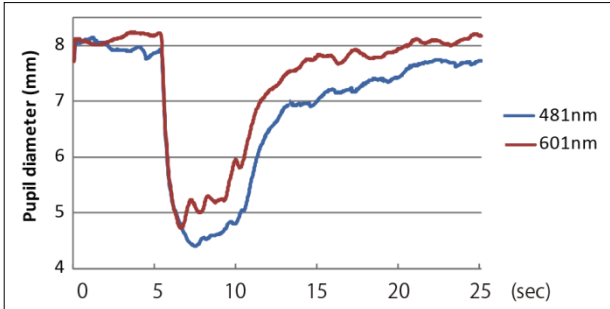


図6 瞳孔径測定結果

ipRGCの分光感度を求めるため、光射前と光照射中の瞳孔径の平均値から相対縮瞳率を求めた。瞳孔径の測定開始から、光刺激照射前までの5秒間を平均した値(a)と、光刺激中の5秒間を平均した値(b)から、相対縮瞳率を[(a-b)/a]と定義した。また、与えた光刺激の測定値から、光量子束密度を計算でもとめ、これをX軸、縮瞳率をY軸としたグラフにプロットした。

$$\text{光量子束密度(mol/m}^2\text{/s)} \times \text{NA(mol}^{-1}\text{)} = \frac{I(\text{W/m}^2) \times \lambda(\text{nm})}{h(\text{Js}) \times c(\text{m/s})}$$

NA: アボガドロ数 $6.02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ I: 放射照度 (W/m²)
h: プランク定数 $6.26 \times 10^{-34} \text{ Js}$ c: 光速 $3 \times 10^8 \text{ m/s}$

1波長につきNDは7段階で変化させたので、この7つの点に最も一致するように、ヒル方程式(シグモイド曲線)に最適化した。Iは光量子束密度、Pmaxは縮瞳率の最大値、Bは定数で、Cは最大瞳孔収縮率の半分の反応が起きるときの光量子束密度とした。図7に8波長におけるシグモイド曲線を示す。

$$\text{Pupilloconstriction} = \text{Pmax} \left[\frac{B I}{B I + C} \right]$$

401nm, 418nm, 480nmの短波長光においては、光量子束密度が小さい時でも、比較的大きな縮瞳が見られた。一方、569nm, 601nmの長波長光では、光量子束密度が小さいと、小さく縮瞳が見られた。

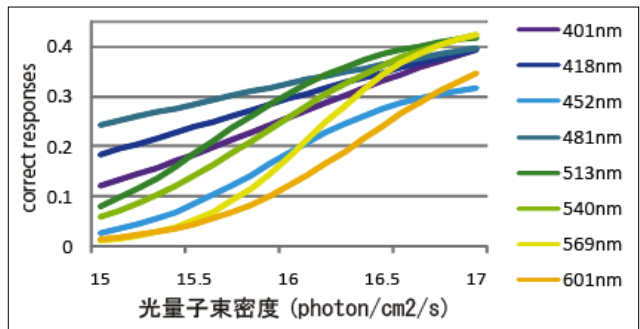


図7 シグモイド曲線

3. 内因性光感受性網膜神経節細胞(ipRGC)の光応答特性導出

波長ごとに、最大の瞳孔収縮の半分の瞳孔収縮が起きるときの光量子束密度の値Cを波長ごとにプロットした。その点と、オプシン型の光受容物質(メラノプシン)のテンプレート(AI-pigment absorbance spectra template)が最適化するように、λmaxをもとめた。その結果を図8に示す。上は縦軸を通常の線形軸、下は対数軸にとったものである。結果、ピーク波長が483nmの曲線で最もデータと一致した(R²=0.94)。

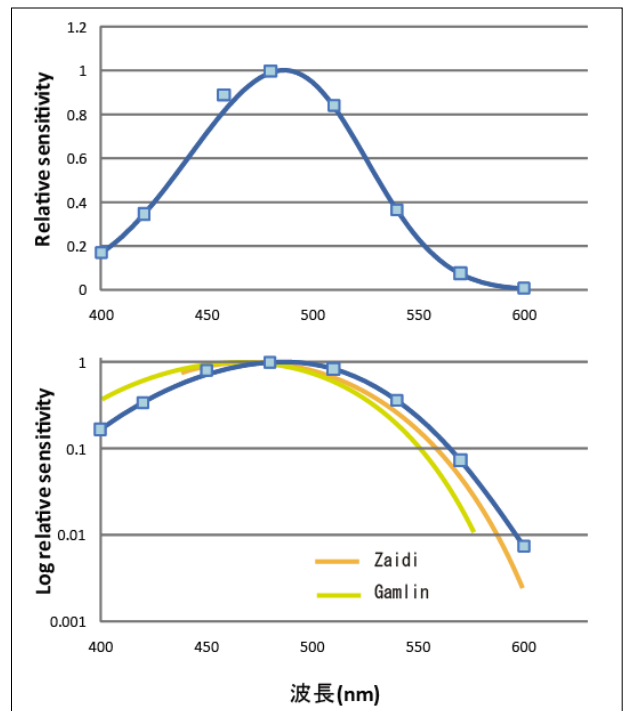


図8 光応答特性(λmax=483nm, R²=0.94)

既往研究で得られているヒト、サル、マウスの縮瞳のピーク波長を表4に示す⁵⁾⁶⁾⁷⁾。既往研究ではヨーロッパ系の人種を対象にしたものと考えられるが、今回新たに東洋人のデータが加わった。被験者はGamlinらが晴眼の男性2人、Zaidiらが常染色体優性遺伝型錐体杆体ジストロフィ患者の女性が1人であった。これらと比較すると、今回の縮瞳のピーク波長は、既往研究とほぼ等しいことがわかる。

表3 既往研究のピーク波長

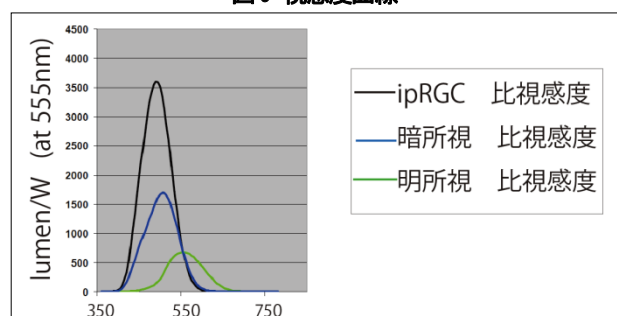
研究者	ピーク波長	年
Paul D. R. Gamlin	$\lambda_{\max} = 482\text{nm}$ (human)	2007
	$\lambda_{\max} = 483\text{nm}$ (monkey)	
Farhan H. Zaidi	$\lambda_{\max} = 476\text{nm}$ (human)	2007
Robert J. Lucas	$\lambda_{\max} = 479\text{nm}$ (mouse)	2001

4. 非イメージ形成の視覚に関する新しい測光基準の考え方

ipRGC は、主な網膜入力を視蓋前野のオリブ核に投射するとされる。この予測と一致して、Gamlin や Lucas らの研究で、ヒトやサル従来の光受容器からの光刺激信号の伝達を機能しないようにしたにもかかわらず、瞳孔反射がおこることが分かっている⁵⁾⁶⁾。ipRGC の発見以前に Bouma が瞳孔収縮と波長の関係を研究したデータでも、ピーク波長が 490nm となったが、当時は S 錐体と杆体の入力によると解釈しようとしていた。しかし、この解釈では、光刺激後も続くといった瞳孔収縮の特徴と、錐体・杆体の既知の特性とが一致しないことが指摘されていた。最近の研究により、瞳孔の光応答特性は、メラノプシンの光応答特性や、ipRGC の細胞電極による光応答特性と一致することが明らかになった⁷⁾。これらの結果から、ipRGC がかなり瞳孔反射に関与することが言える。

ipRGC の分光感度を標準化し、考慮した新たな測光基準を提案する研究もなされている。Berman ら⁸⁾の提案した視感度曲線(図 9)によると、ipRGC による視感度が極端に高いことになる。しかし、Lucas らの研究⁹⁾でメラノプシンをノックアウトしたマウスは、光量の大きい光刺激に対して完全には縮瞳できない対光反射を示すことが明らかになり、メラノプシンが大きな光刺激に対する瞳孔反射にかかわることが示唆されている。Berman 提案は、この Lucas らが示したメラノプシンの感度と一致せず、まだ ipRGC の特性を十分反映した提案はなされていない。

図9 視感度曲線



現在 ipRGC が影響する概日リズムの様々な機能に関する証拠や、網膜内部の神経経路に関する多くの研究が報告されており、光の非イメージ形成に関する視覚の機構が明らかになっている。今後、さらに研究が進めば、種々の生理的応答に関する作用を定量化した、新たな測光基準の提案につながることを期待される。

謝辞

本研究の一部は、平成 20 年度九州大学教育研究プログラム研究拠点形成プロジェクト(P&P)によった。研究にあたっては、東海大学情報理学部高雄元晴准教授に多大なご指導を頂いた。また、東海大学電子情報学部麻生恵梨香氏、須藤裕子氏、九州大学工学部建築学科の熊埜御堂令氏、三小田亮氏、東口陽子氏には実験にあたって御協力頂いた。ここに記して謝意を表する。

参考文献

- David M. Berson, Motoharu Takao: Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock, SCIENCE, vol 295 8 February, 2002
- Dennis M. Dacey: Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN, Nature, Vol 433, 2005
- 岡村均: 時計遺伝子の分子生物学, シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社, pp105-162, 2004
- G. C. Brainard: Photons, Clocks, and Consciousness, Journal of biological rhythms, vol 20 No4, August 2005
- P. D. R. Gamlin: Human and macaque pupil responses driven by melanopsin-containing retinal ganglion cells, Science Direct, Vision Research 47 946-954, 2007
- R. J. Lucas: Characterization of an ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice, nature neuroscience, vol 4 No 6 621-626, 2001
- Farhan H. Zaidi: Short-Wavelength Light Sensitivity of Circadian, Pupillary, and Visual Awareness in Humans Lacking Outer Retina, Current Biology 17, 2122-2128, 2007
- Sam M. Berman: New discoveries in vision affect lighting practice, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720
- R. J. Lucas: Diminished Pupillary Light Reflex at High Irradiances in Melanopsin-Knockout Mice, Science, 2003