

ヒトにおける内因性光感受性網膜神経節細胞活性の 最適波長の対光反射による検討

小野寺朝美¹, 石川 均^{1,2}, 浅川 賢², 仲泊 聡³

¹北里大学大学院医療系研究科感覚・運動統御医科学群視覚情報科学

²北里大学医療衛生学部リハビリテーション学科視覚機能療法学専攻

³国立障害者リハビリテーションセンター病院

背景: 近年、視細胞以外に光に反応するメラノプシン含有網膜神経節細胞、又は、内因性光感受性網膜神経節細胞 (ipRGC) の存在が明らかになった。このipRGCはサーカディアンリズムの調整や、対光反射調節といったnon-image-formingに関与するとされる。ipRGC活性の最適波長はヒトにおいては明らかになっていないため、遮光フィルターを用いて検討した。

方法: 対象は20名20眼 (平均23.6歳)。15分間の前順応の後、100 cd/m²の赤 (635 nm)・青 (470 nm) 色光刺激にて470 nmカットフィルター装用・非装用で10秒間の対光反射を測定した。測定時間は瞳孔の日内変動を考慮し10時から15時とした。検討項目は光刺激前の初期瞳孔径、光刺激による縮瞳の割合を示す縮瞳率、光刺激中の縮瞳持続の割合を示す持続率を各条件下にて比較検討した。

結果: 初期瞳孔径は全ての条件下で有意差は認めなかった。縮瞳率は青色光刺激が赤色光刺激に比べ有意に縮瞳したが、フィルター装用の影響は見られなかった ($P < 0.01$)。持続率は青色光刺激でのみフィルター装用により低下し、縮瞳持続は不良となった ($P = 0.002$)。

結論: 青色光刺激時の持続率でのみ470 nmカットフィルター装用の影響が認められたことから、ipRGCは470 nmで反応を生じ、対光反射の縮瞳持続に関与している可能性が示唆された。

Key words: メラノプシン含有網膜神経節細胞, 対光反射, 青色光刺激, 赤色光刺激, 遮光フィルター

序 文

1世紀以上もの間、光に反応する細胞、すなわち視細胞は錐体と杆体のみと考えられていた。しかし網膜色素変性症など視細胞が萎縮し、光覚を失った者でも瞳孔の対光反射が残存し、正常なサーカディアンリズムを保つ症例が存在する¹⁾。そのため対光反射の起源は錐体・杆体のみでは説明が不可能であった。そのような中、1998年にカエルの皮膚から新たな光感受性色素であるメラノプシンが発見された²⁾。その後2002年にはBersonらによりメラノプシンを含有する内因性光感受性網膜神経節細胞 (intrinsically photosensitive retinal ganglion cells, 以下ipRGC) の存在が証明され、ipRGCは視細胞からの刺激なくして脱分極する、すなわち光感受性であることが報告された。この発見により我々が1世紀以上信じてきた錐体・杆体のみが光感受性であるという説が簡単に崩れた³⁾。ipRGCは全網膜神経節細胞の1~3%程度を占めるのみで、反応には高輝度の光刺激を必要とし、潜時が長いこと^{4,6)}、持続的な縮瞳に

関与していること⁷⁾がマウスで証明された。逆に、メラノプシンノックアウトマウスでは高輝度の光刺激時のみ、対光反射が低下したという報告もされている⁸⁾。また、DaceyらはDL-2-amino-4-phosphono-butyrac acid (L-AP4), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) で錐体・杆体の伝達を薬理的に阻害すると錐体による即時的な縮瞳反応は消失するが、長時間の光刺激でipRGC由来の脱分極が生じたという報告をしている⁹⁾。

一般的に、ヒトの視機能は錐体系にて物体の認知 (image-forming) がなされ、ipRGCはサーカディアンリズムの調整や高輝度短波長での対光反射調節といった、いわゆるnon-image-formingに関与していると考えられている^{3,8)}。

ipRGCの光波長特性は、ラットでは484 nm⁴⁾、マカクザルでは482 nmで最も感受性が高く、S錐体の450 nm前後とは異なる⁵⁾特徴的な反応領域を持つ。しかし、ヒトにおいてはipRGCがどの波長で脱分極するのか、さらに光刺激による瞳孔縮瞳にどのように関与しているのかは明らかになっていない。そこでわれわれは短波

Received 28 April 2010, accepted 16 June 2010

連絡先: 小野寺朝美 (北里大学大学院医療系研究科視覚情報科学研究室)

〒252-0373 神奈川県相模原市南区北里1-15-1

E-mail: mm09011m@st.kitasato-u.ac.jp

長領域を選択的にカットする遮光フィルターを用いて ipRGC由来の対光反射への影響を検討するとともに、ヒトにおけるipRGC活性の最適波長を評価した。

対象と方法

対象は眼疾患を有さない20名20眼で平均年齢は23.6 ± 2.5歳(平均±標準偏差)。事前に本研究の目的、方法を説明し、同意を得てから行った(北里大学医療衛生学部研究倫理審査委員会承認番号2009-005)。また、自律神経系への影響を考慮し、実験前に喫煙、飲酒、カフェイン摂取を行った者は対象から除外し、前日の睡眠時間も十分にとれている者、極度の空腹・疲労のない者のみ対象とした。

使用機器は赤外線電子瞳孔計であるIrisCorder Dual C-10641(浜松ホトニクス社)を用いた。本機器は白・青・赤のLED色刺激光による瞳孔対光反射測定が可能である。本研究ではKardonらの実験を参考に⁹⁾、100 cd/m²の青色光刺激(470 nm)・赤色光刺激(635 nm)を用いた。また、実験に用いた遮光フィルター(東海光学社製)は、470 nmの波長を選択的に10%以下にシャープにカットすることが可能である。

測定時間は瞳孔の日内変動を踏まえ、10時から15時の間とした^{10,11)}。被験者は15分間暗室で暗順応させ¹²⁾、ゴーグルを装着させた後、浅川らの方法に従い、瞳孔対光反射測定を開始した¹³⁾。光刺激前の10秒間、光刺激中の10秒間、光刺激後の15秒間、計35秒間の瞳孔反射測定を1回とし記録した。

瞳孔反射測定は青色光刺激にて、フィルターなし、470 nmカットフィルター(以下、フィルター470)装用下、各々を測定し、同様に赤色光刺激でもフィルター

なし、フィルター470装用下の瞳孔径測定を行った。各測定順はランダムとした。また各測定の間には5分間の暗順応を行った¹⁴⁾。測定で得られた典型波形をFigure 1に示す。波形より初期瞳孔径、最小瞳孔径、光刺激後瞳孔径を求め、その値から初期瞳孔径に対する光刺激による縮瞳の割合を示す縮瞳率と光刺激中の縮瞳持続の割合である持続率、縮瞳反応速度を算出した。それぞれの式については以下に示す。

1. 縮瞳率 (%) =
$$\frac{\text{初期瞳孔径} - \text{最小瞳孔径}}{\text{初期瞳孔径}} \times 100$$
2. 持続率 (%) =
$$100 - \frac{\text{光刺激後瞳孔径} - \text{最小瞳孔径}}{\text{初期瞳孔径} - \text{最小瞳孔径}} \times 100$$
3. 縮瞳反応速度 (mm/s) =
$$\frac{\text{初期瞳孔径} - \text{最小瞳孔径}}{\text{刺激後最少瞳孔径になるまでの時間}}$$

またフィルターが視機能に及ぼす影響を確認するために視力検査(字づまり視力表、検査距離5 m、室内照明下500 lx以上)、コントラスト感度検査(CSV-1000、ベクタービジョン社、検査距離2.5 m)をフィルターなし、フィルター470装用下にて行った(9名9眼、平均年齢22.1 ± 0.9歳)。尚、初期瞳孔径、縮瞳率の解析にはScheffé test、持続率の解析にはWilcoxon signed-rank testを用い全ての結果において有意水準は5%以下とした。

結 果

初期瞳孔径・縮瞳率・持続率の結果をTable 1に示す。全ての実験前に被験者の初期瞳孔径については有意差は見られなかった。実験開始時の瞳孔径の平均は5.0 ± 0.1 mm (n = 20眼)であった。

縮瞳率はフィルターなし、フィルター470装用下ともに青色光刺激が赤色光刺激より有意に縮瞳する結果

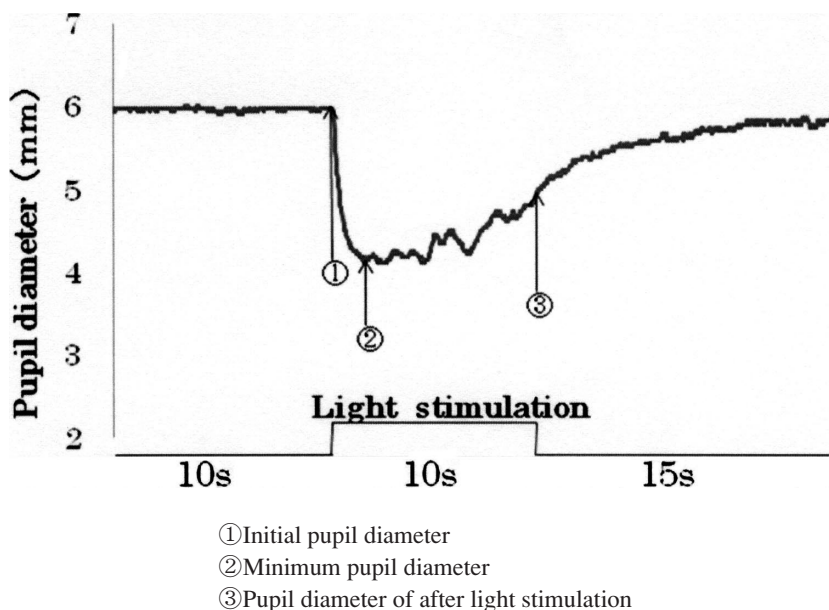
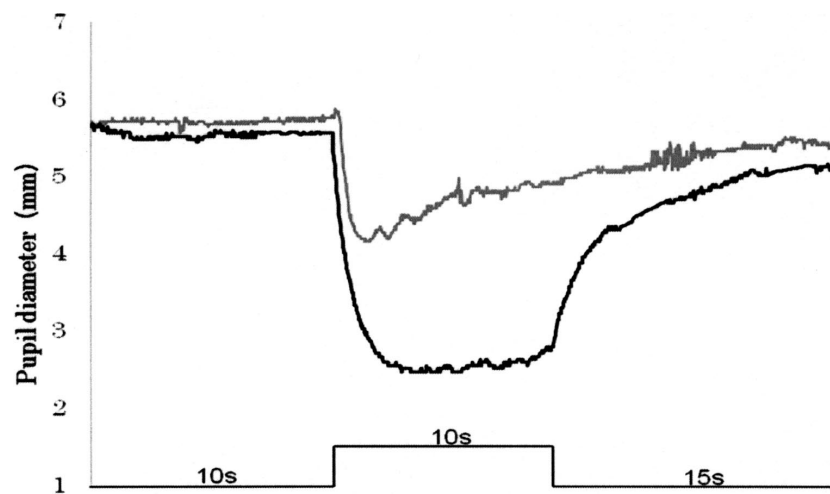


Figure 1. Change of pupil diameter by red light stimulation

Table 1. Effects of blue and red light stimulation on pupil response

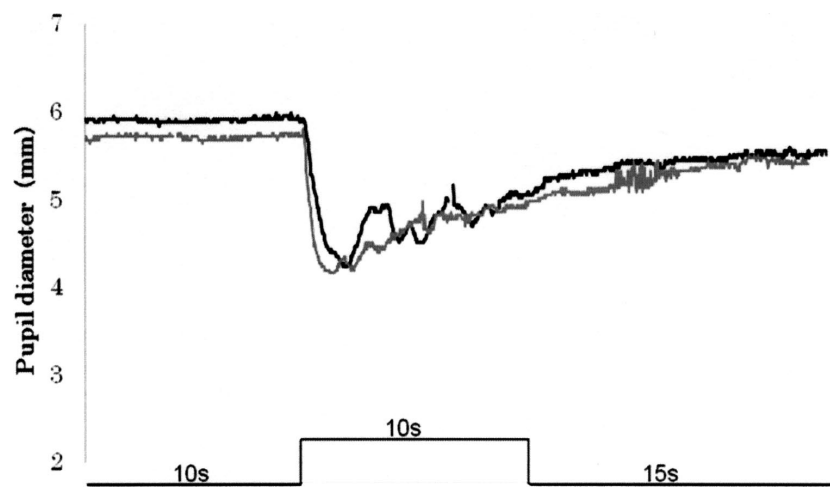
		Initial pupil diameter (mm)	Constriction rate (%)	Sustainability rate (%)
Red light	filter (-)	5.1 ± 0.5	29.7 ± 11.4	54.3 ± 16.4
	filter (+)	5.0 ± 0.4	32.2 ± 8.0	
Blue light	filter (-)	5.0 ± 0.5	51.2 ± 11.3	86.7 ± 6.4
	filter (+)	4.9 ± 0.6	47.0 ± 11.3	

*P < 0.01, N.S.: not significant



Black line: blue light stimulation; gray line: red light stimulation

Figure 2. Pupil constriction by blue and red light stimulation



Black line: no filter; gray line: filter 470

Figure 3. Change of pupil diameter by red light stimulation

Pupil constriction during red light stimulation is unstable.

となった ($P < 0.01$) (Table 1, Figure 2)。しかし赤・青色光刺激ともにフィルターなしとフィルター470装用下での縮瞳率に有意差は見られなかった (Table 1)。

光刺激中の縮瞳持続の割合を示す持続率については赤色光刺激ではフィルター装用の有無にかかわらず徐々に散瞳し持続は不良で、フィルター470装用の影響は認められなかった (Table 1, Figure 3)。一方、青色光刺激では刺激中の縮瞳は安定し (Figure 4)、持続率はフィルターなし $86.7 \pm 6.4\%$ 、フィルター470装用下 $75.4 \pm 10.0\%$ となり、フィルターなしとフィルター470装用下の間に有意差が見られた (Table 1; $P < 0.01$)。すなわち、フィルター470装用下では縮瞳の持続が不良となった (Figure 4)。

縮瞳反応速度は青色光刺激で 0.73 ± 0.3 mm/s、赤色光刺激で 1.00 ± 0.5 mm/s となり、有意差は見られなかった。

視機能について矯正視力はフィルター装用・非装用とも (1.2) を確認、コントラスト感度においてはフィルター装用による影響は認められなかった。

考 察

Gamlinらはマカクザルの視細胞をL-AP4, CNQX, D-2-amino-5-phosphonovaleric (D-AP5) を用いて実験的に破壊した結果、赤色光刺激時の縮瞳が完全に消失したのに対して、青色光刺激時では縮瞳の減弱と延長が認められたのみと述べている⁷⁾。さらにKardonらは100 cd/m²青色光刺激時では赤色光刺激時よりも縮瞳の持続が安定して見られたと報告している⁹⁾。Gamlin, Kardonによるこの赤・青色光刺激での瞳孔反応の差は青色光刺激時の縮瞳及び縮瞳持続に視細胞以外が関与

することを示唆している。また、家兔の対光反射を正常眼・視細胞破壊眼を用い、光刺激時間5秒と15秒で記録すると、光刺激5秒では破壊眼は第1相 (初期相) の縮瞳反応の低下が認められるが、刺激開始後3秒程には第2相 (持続相) とも言える縮瞳を生じる。光刺激時間を15秒にすると第2相による縮瞳はより顕著となり、刺激開始後10秒程経過すると正常眼と同程度の縮瞳が見られる⁶⁾。彼らの結果から対光反射に伴う縮瞳は初期相と持続相に分けられ、初期相は視細胞由来、持続相はそれ以外のファクター、特にipRGCが関与していると述べている⁷⁾。ipRGCは錐体に比較し光刺激に対してゆっくりとした潜時を経て脱分極し、刺激後も反応はゆっくり減弱することがBersonのラットを用いた基礎実験で述べられている⁴⁾。

方法で記述した通り、われわれの実験で使用したフィルター470は波長をきわめてシャープにカットするもので、470 nmに対する透過率が10%と非常に低いものであり、フィルター470装用の青色光刺激時では当然眼内に入る光量は減少する。しかし、縮瞳率、反応速度など初期縮瞳相にはフィルターの影響は全く認められなかった。特記すべきは持続率でフィルター470装用時に青色光刺激でのみ縮瞳持続が不良となった。これは470 nmをカットするフィルターを用いたことによりipRGCの縮瞳持続が減弱したものと示唆され、ipRGCが高輝度・短波長での縮瞳持続に関与するという上述した報告を全て支持する結果と言える。

また視力やコントラスト感度の結果がフィルター470はフィルターなしと有意差が見られなかったことから、主に錐体が司る視機能 (image-forming)、には影響を及ぼさないことも確認出来た。

青色光刺激時におけるS錐体の影響は常に問題と

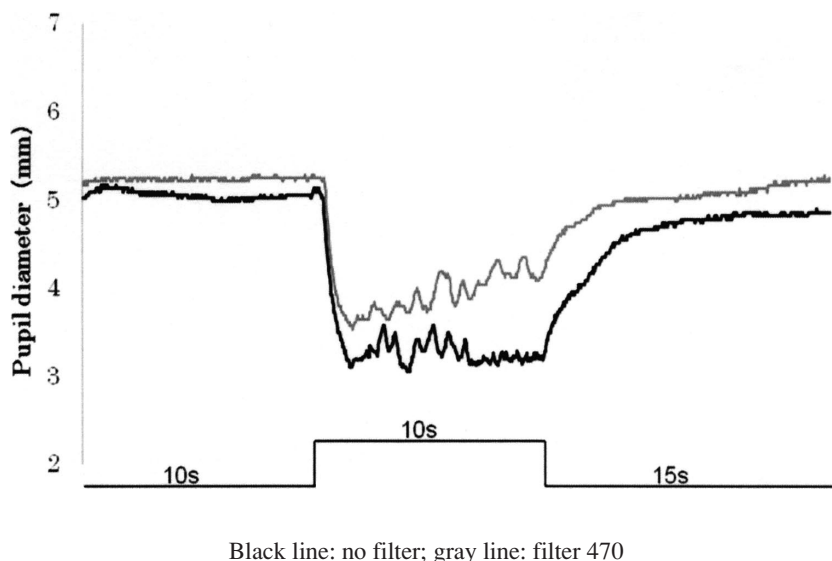


Figure 4. Change of pupil diameter by blue light stimulation

During blue light stimulation, sustained pupil contraction was declined by filter 470.

なるが、視細胞由来と考えられる初期縮瞳相では全ての検討項目においてフィルターによる有意差は認められず、持続相でのみ有意差が見られた。前述の通り、フィルター470は錐体による視機能には影響を及ぼさないことから、フィルター470装用時の持続相の変化は、ipRGCの反応でS錐体の関与は少ないと思われる。

以上の結果よりヒトのipRGCは470 nmの波長と100 cd/m²の刺激輝度で反応が生じ、視機能 (image-forming) には影響せず、対光反射の持続、サーカディアンリズム調整に関与するものであろう。

謝辞

最後に本研究を行うにあたり、ご厚意により遮光フィルターを作成して下さった東海光学株式会社様 (TOKAI OPTICAL Co. Ltd) に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Klerman EB, Shanahan TL, Brotman DJ, et al. Photic resetting of the human circadian pacemaker in the absence of conscious vision. *J Biol Rhythms* 2002; 17: 548-55.
- 2) Provencio I, Jiang G, DeGrip WJ, et al. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 340-5.

- 3) Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 2002; 295: 1070-3.
- 4) Berson DM. Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *TRENDS in Neurosciences* 2003; 26: 314-20.
- 5) Dacey DM, Liao HW, Peterson BB, et al. Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature* 2005; 433: 749-54.
- 6) Young RSL, Kimura E. Pupillary correlates of light-evoked melanopsin activity in humans. *Vision Research* 2008; 48: 862-71.
- 7) Gamlin PDR, McDougal DH, Pokorny J, et al. Human and macaque pupil responses driven by melanopsin-containing retinal ganglion cells. *Vision Research* 2007; 47: 946-54.
- 8) Lucas RJ, Hattar S, Takao M. Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* 2003; 299: 245-7.
- 9) Kardon R, Kawasaki A. Clinical implications of new aspects of the pupil light reflex mediated by melanopsin containing retinal ganglion cells. *神経眼科* 2008; 25: 216-27.
- 10) 内海隆: Open-loop赤外線電子瞳孔計による瞳孔反応の日内変動について. *神経進歩* 1978; 22: 615-23.
- 11) 内海隆: 眼科におけるイリスコーダーの応用. *神経眼科* 1993; 10: 131-6.
- 12) 石川哲: 正常瞳孔反応データ. *神経眼科* 2001; 18: 154-6.
- 13) 浅川賢, 石川均: ヒト対光反応におけるメラノプシン含有網膜神経節細胞の検討. *自律神経* 2009; 46: 236-40.
- 14) 石川哲: 赤外線電子瞳孔計の開発. *医科器械学* 2003; 73: 746-50.

Most suitable wavelength of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in human using light reflex

Asami Onodera,¹ Hitoshi Ishikawa,² Ken Asakawa,² Satoshi Nakadomari³

¹Kitasato University Graduate School of Medical Sciences

²Kitasato University, School of Allied Health Sciences

³National Rehabilitation Center for Persons with Disabilities

Background: A novel photoreceptor of the mammalian retina has recently been discovered. They are melanopsin-containing retinal ganglion cell or intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGC). It is reported that ipRGC participates in non-image-forming such as adjustment of the circadian rhythm and pupillary light reflex. At present, the most suitable wavelength of ipRGC does not clear in human. Therefore, we examined the most suitable wavelength of ipRGC in humans, using a 470 nm-blue-light shielding filter (470 filter).

Methods: The subjects were asked to wait in a dark room to adapt, darkness and then to wear goggles before recording their pupillary light reflex. One set of pupillary recordings consisted of three recordings: 10 seconds each of before and during stimulation and 15 seconds after stimulation. The pupillary response under blue and red stimulation was measured with no filter and with a 470 filter. Then, the following were calculated from the discovered values: (1) constriction rate, and (2) sustainability rate.

Results: The initial pupil diameters of subjects before starting the experiments showed no significant difference. The constriction rate suggests that the constriction was significantly larger under the blue light stimulation than under the red light stimulation in all experiments without filters, with 470 filter ($P < 0.01$). The pupillary constriction was stable during the blue light stimulation, and the sustainability rate was $86.7 \pm 6.4\%$ without a filter, and $75.4 \pm 10.0\%$ with a 470 filter which showed a significant difference ($P = 0.002$).

Concerning the vision, the filter did not have any influence on the contrast sensitivity or visual acuity.

Conclusions: These results signify the ipRGC in humans responds to the 470 nm-wavelength, and there is a possibility of influencing the continuation phase of light reflex without influence on visual performance, such as image-forming.

Key words: melanopsin-containing retinal ganglion cell, pupillary light reflex, blue light stimulation, red light stimulation, light-shielding filter