瞳孔対光反射の分光感度に対する 視物質メラノプシンを含む網膜神経節細胞の寄与

正会員 高橋 良香 (千葉大学) 非会員 勝浦 哲夫 (千葉大学)

非会員 岩永 光一 (千葉大学) 非会員 下村 義弘 (千葉大学)

Contribution of Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells on Action Spectrum for Pupillary Light Reflex

Member **Yoshika Takahashi** (Chiba University), Non Member **Tetsuo Katsuura** (Chiba University)
Non Member **Koichi Iwanaga** (Chiba University) and Non Member **Yoshihiro Shimomura** (Chiba University)

KEYWORDS : pupil, action spectrum, melanopsin, lens, aging, template

1. はじめに

錐体でも杆体でもない光受容器が発見されたり、それは視物質メラノプシンを含む網膜神経節細胞 (ipRGC) であり、その神経出力は生体リズムの中核である視交叉上核や瞳孔対光反射に関係する視蓋前域オリブ核、外側膝状体の一部の層へ投射している²⁾。生体リズムおよび瞳孔対光反射に代表される非視覚的作用には錐体や杆体などの既知の光受容器と ipRGC が共に関与していて、これら3種類の光受容器のすべてを働かなくさせると生体リズムや瞳孔対光反射への光入力がなくなることが報告されている³⁾。このことから、生体リズムや瞳孔対光反射への光入力は錐体、杆体、ipRGCに限られることが示されている。

瞳孔対光反射に ipRGC が関与することはマウス³⁾⁴⁾、マカクザル⁵⁾、ヒト⁵⁾⁶⁾を対象とした実験から報告されており、高放射量曝露時の瞳孔対光反射に ipRGC が関与することがマウスを使った実験から示唆されている³⁾⁴⁾。そこで、本研究ではヒトを対象に、瞳孔対光反射の分光感度を調べ、ipRGC が関与すると考えられる分光感度特性が現れるかを調べることを研究目的とした。

2. 実験方法

2.1 研究デザイン

瞳孔対光反射の分光感度は低放射量曝露時には杆体⁷⁾で調節され、高放射量曝露時には ipRGC で調節されるという仮説を立てた。この仮説を確かめるため、プルキンエ現象 (図1) の概念を利用し、中心波長が 457 nm と 539 nm の2種類の単色光による放射量と瞳孔径の関係を調べた。分光感度変化があった時は、2つの単色光による放射量と瞳孔径の関係を表す近似曲線が交差すると考えた。

図1の杆体の分光感度は $V(\lambda)$ から作成し、ipRGCの分光感度は視物質テンプレート⁸⁾と水晶体の分光吸収特性⁹⁾から作成した。ipRGCの視物質のピーク波長は 484 nm¹⁾とした。プロットは 457 nm と 539 nm における杆体 (●) と ipRGC (○) の感度である。

図1 ipRGCと杆体の分光感度

Fig.1 Spectral sensitivities of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (solid line), rod (bold line).

2.2 被験者

平均年齢 26 歳 (22~33 歳) の男性被験者 4 名 (被験者 A : 33 歳, 被験者 B : 25 歳, 被験者 C : 24 歳, 被験者 D : 22 歳) が実験に参加した。すべての被験者の色覚が正常であることを Farnsworth-Munsell 100 Hue TEST によって確認した。

2.3 実験方法

実験は午前中に実施した。被験者はまず、30 秒間暗順応した後、30 秒間の光曝露中、250 mm 前方にある固視点を両眼で注視した。その後、30 秒間休憩した。これを同一条件で 5 回繰り返した後、室内灯 (白熱電球) を点灯して、2 分間休憩した。

光量は 457 nm 光が $0.0122 \sim 7.26 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ($0.0280 \sim 16.7 \times 10^{12} \text{ photons}/\text{cm}^2/\text{s}$), 539 nm 光が $0.0314 \sim 12.5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ($0.0853 \sim 33.9 \times 10^{12} \text{ photons}/\text{cm}^2/\text{s}$) の範囲で、各 10 段階の条件があった。1 回の実験では 10 段階の条件を放射量の大きい 5 条件と小さい 5 条件に分け、いずれかの条件が用いられた。5 条件内の順

番は大から小，小から大への放射量の変化が同数になるようにした．各測定条件の繰り返し数は被験者 A が 40 回，他の 3 名が 20 回だった．

2.4 実験装置

500 W のタングステンランプと狭帯域透過型干渉フィルタを組み合わせることで単色光を作り出した(半値全幅 11 nm の中心波長 457 nm の光と半値全幅 12 nm の中心波長 539 nm の光)．単色光は被験者の 250 mm 前方にある 20 deg の円形開口部から曝露した．開口部には乳白色アクリル板があり，拡散光を被験者は観察した．被験者の角膜位置における単色光の分光放射照度は分光放射照度計 HSR-8100 (マキ製作所) で計測した．

瞳孔径は赤外線 LED 付き瞳孔検出カメラを使った眼球運動計測装置 EMR-8 (ナックイメージテクノロジー) によって，暗順応と光曝露をしている間，左目を 60 Hz のサンプリングレートで記録した．瞳孔計測中，被験者の頭部はあご台で固定した．

2.5 分析方法

瞳孔径の測定値には光曝露開始後 10～20 秒の平均値を用いた．放射量と瞳孔径の関係は(1)式の 4 パラメータロジスティック関数を用いて分析した．

最大瞳孔径 A_1 は各被験者の暗所下における瞳孔径の実測値(被験者 A : 6.17 mm, 被験者 B : 7.02 mm, 被験者 C : 7.06 mm, 被験者 D : 6.10 mm)を用いた．最小瞳孔径 A_2 は 2 mm とした．

$$Y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (X/X_{50})^p} + A_2 \dots \dots \dots (1)$$

Y: 瞳孔径, X: 放射照度, A_1 : 最大瞳孔径, A_2 : 最小瞳孔径, X_{50} : A_1 と A_2 の中間の反応を示した時の放射照度, p : A_1 と A_2 の間にある曲線部分の傾き

3. 実験結果

3.1 分光感度変化の有無

図 2 に 4 名の被験者の放射量に対する瞳孔径の実験結果を示す．プロットは実験結果，近似曲線は(1)式を使った実験結果の近似曲線である．4 名の被験者のすべてで放射量が増加することで 457 nm 光と 539 nm 光の近似曲線が交差した．

3.2 近似曲線の交点の放射量と測光量 (年齢補正前)

近似曲線の交点を分光感度特性が変化する放射量と仮定した．457 nm 光と 539 nm 光による近似曲線の交点は被験者 A が 35.0 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ，被験者 B が 2.26 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ，被験者 C が 1.15 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ，被験者 D が 4.68 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ だった．平均値と 95%信頼区間は対数に変換して計算した．平均値は 4.54 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ，95%信頼区間は 0.432 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ，47.7 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ だった．瞳孔対光反射の分光感度は杆体の分光感度で調節されるものと考えられているため，暗所視照度で表すと，平均値は 46.0 scotopic lx，95%信頼区間は 4.38

図2 457 nm 光と 539 nm 光を用いた放射量に対する瞳孔径 (年齢補正前)
Fig.2 Mean pupil diameter $\pm$ SEM as a function of irradiance using 457 nm light (solid line) and 539 nm light (broken line).

scotopic lx, 483 scotopic lx だった。

3.3 近似曲線の交点の放射量と測光量（年齢補正後）

水晶体の分光透過率の加齢による変化の影響を取り除くため、各光条件の放射量を各被験者の年齢に応じた水晶体の分光透過率¹⁰⁾をかけて、網膜位置における放射量に変換した。その後、被験者の平均年齢（26 歳）の水晶体の分光透過率¹⁰⁾をもつ被験者の角膜位置における放射量に変換して、近似曲線の交点の放射量を求めた。

年齢補正後の近似曲線の交点は被験者 A が 4.49 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、被験者 B が 2.32 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、被験者 C が 1.21 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、被験者 D が 5.55 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ だった。平均値と 95%信頼区間は対数に変換して計算した。平均値は 2.89 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、95%信頼区間は 0.963 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、8.67 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ だった。暗所視照度で表すと、平均値は 29.3 scotopic lx、95%信頼区間は 9.76 scotopic lx、87.8 scotopic lx だった。

3.4 交点の前後の分光感度

近似曲線の交点の前後で実験条件を 2 つに分け、交点の前後で瞳孔対光反射の分光感度を求めた。2 種類の単色光から分光感度を求める方法は Bronstein らの分光感度の推定方法¹¹⁾を用いた。具体的には、 A_1 、 A_2 、 p を共通にした(1)式で、457 nm 光と 539 nm 光の実験結果を表す近似曲線を作成し、457 nm 光、539 nm 光の X_{50} を求めた。次に、得られた X_{50} を逆数にし、正規化して 457 nm 光と 539 nm 光の感度差を算出した。457 nm と 539 nm の感度差が実験結果と一致する視物質のピーク波長を視物質テンプレート⁸⁾から求めた。この方法により、分析に用いた区間の瞳孔対光反射を調節する視物質のピーク波長を推定した。また、分析に用いた各光条件の放射量は被験者の年齢に応じた水晶体の分光透過率¹⁰⁾をかけ、網膜位置における放射量に変換したものをを用いた。

交点より暗い時の瞳孔対光反射を調節する視物質のピーク波長の推定値は被験者 A が 506 nm、被験者 B が 512 nm、被験者 C が 513 nm、被験者 D が 510 nm だった。4 名の被験者の平均値は 510 nm だった。交点より明るい時の瞳孔対光反射を調節する視物質のピーク波長の推定値は被験者 B が 478 nm、被験者 C が 481 nm だった。被験者 A、D は分析に使用できる条件数が十分ではなかったため、分析できなかった。2 名の被験者の平均値は 479 nm だった。

4. 考察

4 名の被験者のすべてで 457 nm 光と 539 nm 光による放射量と瞳孔径の関係を表す近似曲線が交差したことから、放射量が変化することで瞳孔対光反射の分光感度に変化があったことが考えられる。分光感度が変化した放射量、測光量を求める方法として、457 nm 光と 539 nm 光による実験結果を近似した曲線の交点を利用された。水晶体の分光透過特性の加齢変化を考慮したことで、交点の放射量の個人差が小さくなった。このことから、交点の放射量の値は加齢によって変化すると思われる。近似曲線の交点前後の条件数が被験者によって異なり、全体的に高放射量側の条件数が少なかった。このことから、より高い放射量の光条件を設定することができれば、今回得られた値よりも交点の放射量の値は小さい値になったかもしれない。

今回、2 種類の単色光から分光感度を推定した結果、瞳孔対光反射を調節する視物質のピーク波長は交点より暗い時には 510 nm、交点より明るい時には 479 nm にあることが示された。交点より暗い時の 510 nm は既知の視物質の中では杆体のピーク波長が最も近かった。瞳孔対光反射は杆体の分光感度で調節されるという既往報告⁷⁾があることから、今回の実験結果は既往報告⁷⁾に準じたものと考えられる。実験結果が杆体の視物質のピーク波長（496 nm）¹²⁾と一致しなかった理由としては、暗順応時間が短かったことが考

えられる。交点より明るい時の 479 nm は ipRGC の視物質のピーク波長（479～484 nm）¹³⁾と一致した。このことから、交点より明るい時の瞳孔対光反射の分光感度は ipRGC のみによって調節されることが示唆される。今回の分析によって、高放射量曝露時の瞳孔対光反射の分光感度に ipRGC の関与があるのか、あるとしたら錐体や杆体と協調しているのかという疑問に対する 1 つの解を示すことができた。ただ、2 種類の単色光を使った分析方法は精度の点で不安があるため、より多くの単色光を使った分析方法による検証が行われるべきだと考えられる。

ipRGC が関与する生物学的反応に関する研究では、網膜疾患のある動物を使ったり、遺伝子操作や薬理学的な処理を施すことによって、各光受容体の働きが調べられている³⁾⁻⁶⁾。しかし、錐体や杆体から ipRGC にシナプス入力があり¹⁴⁾、その入力が ipRGC の光反応を抑制していることが示唆されている¹⁵⁾。そして、ipRGC が関与する反応の 1 つである夜間の光曝露によるメラトニン分泌の抑制作用はその作用スペクトル¹⁶⁾¹⁷⁾から複数の光受容体が協調していることが示唆されている。以上より、ipRGC が関与する生物学的反応は複数の光受容体が協調していることが示唆されており、協調状態について理解するためには、複数の光受容体が協調する状態で、その状態が推定できる実験をする必要があると考えられる。

5. まとめ

2 種類の単色光を用いた実験から、瞳孔対光反射の分光感度が放射量に応じて変化することが分かった。被験者 4 名の平均年齢の水晶体をもつ被験者を仮定したところ、29.3 scotopic lx 付近で分光感度が変化することが示された。高放射量曝露時の瞳孔対光反射が ipRGC のみによって調節されることが示唆された。

謝辞

本報告は社団法人照明学会第 15 回（平成 18 年度）研究・教育助成課題（奨励研究：ipRGC が関与する生物学的反応に関する研究）の助成によって行われました。また、今回の研究を進めるにあたり、実験方法および解析方法を改良するきっかけとなるコメントを下された関西大学の加藤末佳氏に感謝いたします。

参考文献

- (1) D. M. Berson, F. A. Dunn and M. Takao : Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock, Science, 295-5557, pp.1070-1073 (2002).
- (2) S. Hattar, H.-W. Liao, M. Takao, D. M. Berson and K.-W. Yau : Melanopsin-containing retinal ganglion cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity, Science, 295-5557, pp.1065-1070 (2002).
- (3) S. Panda, I. Provencio, D. C. Tu, S. S. Pires, M. D. Rollag, A. M. Castrucci, M. T. Pletcher, T. K. Sato, T. Wiltshire, M. Andahazy, S. A. Kay, R. N. Van Gelder and J. B. Hogenesch : Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice, Science, 301-5632, pp.525-527 (2003).
- (4) R. J. Lucas, S. Hattar, M. Takao, D. M. Berson, R. G. Foster and K.-W. Yau : Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice, Science, 299-5604, pp.245-247 (2003).
- (5) P. D. R. Gamlin, D. H. McDougal, J. Pokorny, V. C. Smith,

- K.-W. Yau and D. M. Dacey : Human and macaque pupil responses driven by melanopsin-containing retinal ganglion cells, *Vision Res.*, 47-7, pp.946-954 (2007).
- (6) F. H. Zaidi, J. T. Hull, S. N. Peirson, K. Wulff, D. Aeschbach, J. J. Gooley, G. C. Brainard, K. Gregory-Evans, J. F. Rizzo III, C. A. Czeisler, R. G. Foster, M. J. Moseley and S. W. Lockley : Short-wavelength light sensitivity of circadian, pupillary, and visual awareness in humans lacking an outer retina, *Curr. Biol.*, 17-24, pp.2122-2128 (2007).
- (7) I. H. Wagman and J. E. Gullberg : The relationship between monochromatic light and pupil diameter. The low intensity visibility curve as measured by pupillary measurements, *Am. J. Physiol.*, 137-4, pp.769-778 (1942).
- (8) T. D. Lamb : Photoreceptor spectral sensitivities: Common shape in the long-wavelength region, *Vision Res.*, 35-22, pp.3083-3091 (1995).
- (9) A. Stockman, L. T. Sharpe and C. Fach : The spectral sensitivity of the human short-wavelength sensitive cones derived from thresholds and color matches, *Vision Res.*, 39-17, pp.2901-2927 (1999).
- (10) J. Pokorny, V. C. Smith and M. Lutze : Aging of the human lens, *Appl. Opt.*, 26-8, pp.1437-1440 (1987).
- (11) D. M. Bronstein, G. H. Jacobs, K. A. Haak, J. Neitz and L. D. Lytle : Action spectrum of the retinal mechanism mediating nocturnal light-induced suppression of rat pineal gland N-acetyltransferase, *Brain Res.*, 406-1-2, pp.352-356 (1987).
- (12) H. J. A. Dartnall, J. K. Bowmaker and J. D. Mollon : Human visual pigments: microspectrophotometric results from the eyes of seven persons, *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 220-1218, pp.115-130 (1983).
- (13) G. C. Brainard and J. P. Hanifin : Photons, clocks, and consciousness, *J. Biol. Rhythms*, 20-4, pp.314-325 (2005).
- (14) D. M. Dacey, H.-W. Liao, B. B. Peterson, F. R. Robinson, V. C. Smith, J. Pokorny, K.-W. Yau and P. D. Gamlin : Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN, *Nature*, 433-7027, pp.749-754 (2005).
- (15) F. A. Dunn and D. M. Berson : Are intrinsically photosensitive retinal ganglion cells influenced by rods or cones, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43, E-Abstract 2982 (2002).
- (16) G. C. Brainard, J. P. Hanifin, J. M. Greeson, B. Byrne, G. Glickman, E. Gerner and M. D. Rollag : Action spectrum for melatonin regulation in humans: Evidence for a novel circadian photoreceptor, *J. Neurosci.*, 21-16, pp.6405-6412 (2001).
- (17) K. Thapan, J. Arendt and D. J. Skene : An action spectrum for melatonin suppression: Evidence for a novel non-rod, non-cone photoreceptor system in humans, *J. Physiol.*, 535-1,

pp.261-267 (2001).

(受付日 2010 年 4 月 26 日 / 採録日 2010 年 8 月 6 日)

高橋 良香 (正会員)

千葉大学大学院自然科学研究科
〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1-33
1977 年 1 月 4 日生まれ。2001 年 3 月千葉大学自然科学研究科像科学専攻博士前期課程修了。2004 年 4 月千葉大学大学院自然科学研究科人間環境デザイン科学専攻博士後期課程入学。現在在学中。日本視覚学会, 照明学会, 日本色彩学会, 日本時間生物学会, 日本生理人類学会会員。

勝浦 哲夫 (非会員)

千葉大学大学院工学研究科
〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1-33
1950 年 1 月 30 日生まれ。1972 年 3 月九州芸術工科大学芸術工学部工業設計学科卒。1986 年京都大学理学博士。1974 年九州芸術工科大学芸術工学部助手, 1980 年千葉大学工学部講師, 1986 年同助教授を経て, 1996 年同教授。専門は生理人類学, 環境人間工学。2007 年より日本生理人類学会会長。

岩永 光一 (非会員)

千葉大学大学院工学研究科
〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1-33
1958 年 8 月 5 日生まれ。1981 年 3 月九州芸術工科大学大学院芸術工学研究科修士課程修了。九州芸術工科大学助手, 千葉大学助教授等を経て, 現在千葉大学教授。博士(理学)。日本生理人類学会等会員。

下村 義弘 (非会員)

千葉大学大学院工学研究科
〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1-33
1972 年 12 月 20 日生まれ。2000 年 3 月千葉大学大学院自然科学研究科修了, 同年 4 月千葉大学大学院助手, 現在同大学准教授, 博士(工学), 日本生理人類学会理事, 日本人間工学会, 日本デザイン学会等会員。