

近視性眼底変化を呈するマウスの眼球形状測定

榊屋 啓志^{*}, 池田 恭子^{*}, 覚正 信徳[†], 佐藤 肇[#], 横田 秀夫[†],
若菜 茂晴^{*}, 城石 俊彦^{*},

^{*} 理化学研究所 GSC ゲノム機能情報研究グループ

茨城県つくば市高野台 3-1-1

e-mail: hmasuya@gsc.riken.go.jp

[†] 理化学研究所 生体力学シミュレーション特別研究ユニット

埼玉県和光市広沢 2-1

e-mail: hyokota@postman.riken.go.jp

[#] 東北大学病院 眼科・視覚科学分野

宮城県仙台市青葉区星陵町 1-1

e-mail: hasato@oph.med.tohoku.ac.jp

要旨 ヒト眼球の眼軸長伸長による単純近視は、眼底像検査における”コーヌス”と呼ばれる眼底変化所見とリンクしている。我々は、化学的変異原であるエチルニトロソウレア (ENU) を用いた、マウスの大規模突然変異誘発 (ミュータジェネシス) における表現型スクリーニングにより、眼底にコーヌスを示す変異体 M100921 を得た。このマウスは眼球組織解析においてもヒト単純近視眼の病理所見と一致する異常を示し、眼軸長が伸長していることが強く示唆されることから、初めての遺伝性近視モデルマウスとなることが期待される。我々はこのマウスにおいて眼軸長の伸長が実際に起こっているのかどうかを確認するために、マウス眼球の3次元内部構造顕微鏡を用いた眼軸長測定を試みている。

1. 始めに

マウスは、多くの突然変異が知られていることで、古くから遺伝学的解析に用いられて来たが、ヒトおよびマウスでのゲノム DNA の完全解読がほぼ完了した現在では、突然変異リソースの不足が遺伝子機能の全貌の解明に対して大きな障害となっている。このため、世界中で様々な手法によりマウスの突然変異作製が行われている。理研 GSC におけるマウス ENU ミュータジェネシスプロ

プロジェクトでは、化学変異原によって新規突然変異を誘発し、これらを表現型スクリーニングにより抽出する、いわゆる「Phenotype Driven」な方法により、突然変異コレクションを行っている（図1）。我々は、特にヒト遺伝疾患モデルとなるような変異マウスを抽出することを目的として、可視的表現型（形態、行動）、血液像、生化学、聴覚、発癌等のそれぞれについて、ハイスループットな検査系が統合された、網羅的表現型解析プラットフォームを構築し、これにより表現型スクリーニングを行っている。「Phenotype Driven」な変異体スクリーニングでは、言うまでも無く、今まで測定することが出来なかったマウス表現型を解析することが出来れば、新規の変異体を得ることが出来るため、我々は近年発達している生物の内部構造を透視、解析等を行うイメージング手法に注目している。今回は、眼底像検査によって得られたマウス変異体の眼球の形状計測を、3次元内部構造顕微鏡を用いた例について報告したい。

2. 材料：ヒト近視性眼底変化を呈する変異マウス

上記 ENU ミュータジェネシスによって得られた変異マウス、M100921 は、眼底像検査により検出された。眼底像検査は眼科の医療現場で一般的に行われる検査で、眼底カメラと呼ばれる装置により、瞳孔を通して視神経乳頭、網膜、網膜の血管などを観察できる。M100921 は、眼底に"コーヌス"と呼ばれる眼底変化を示した。これは、眼底上視神経乳頭に隣接する網膜の網膜色素上皮に変化が生じ、その外側にある強膜が透見されることにより、月のような形をした白い斑として観察される変化である。ヒトでは、殆どの場合、コーヌスは眼球の前後軸が伸びることにより網膜が引き伸ばされて起こる単純近視とリンクしている。マウスの視力を眼科の視力検査におけるレベルで測定する方法は開発されていないため、近視モデルマウスは現在まで開発されていない。M100921 において、眼軸長（角膜から視神経乳頭までの距離）の伸長を検出できれば、世界で初めて遺伝性近視モデルマウスを開発し、かつ、病変の直接的な解析方法を提供することになると期待される。

3. 解析

A. 眼底の組織解析

M100921 の網膜のヒストロジー解析を行ったところ、視神経乳頭に隣接する網膜の網膜色素上皮細胞に変化が生じていることが観察された。これはヒトにお

ける単純近視眼の病理所見と一致しており、このマウスにおいて眼軸長の伸長が起こっていることを強く示唆する。

B. 3次元内部構造顕微鏡による眼球形状測定

ヒストロジー解析でマウスの眼軸長を通る切片を作製するのは困難である。そもそもマウスの眼球形状に関する資料は少なく、眼軸の位置を決定するためには、高精度で撮影した3次元画像上で多方向から眼球形状を観察することが必要である。よって、我々はマウスの眼球に対して、3次元内部構造顕微鏡による観察を行なうこととした。まず、マウス全身包埋標本と摘出眼球の凍結包埋を行い、3次元内部構造顕微鏡によってボクセルデータを得、これにおける眼球形状の歪みを比較したところ、摘出眼球の包埋の方が明らかに眼球形状の歪みは少なかった。全身包埋では眼球周囲の組織の包埋時の膨張等によって変形が引き起されたと考えられる。次に、摘出眼球のボクセルデータを用いて、眼軸の決定を試みた。虹彩とレンズの境界を指標にして角膜、虹彩、レンズに垂直な面を割り出し、この面の平行移動により角膜の頂点となる点を角膜の中心点とした。この点と視神経乳頭を通る線が眼軸となるが、前述の角膜に垂直な面を並行移動すると、視神経側の頂点に視神経乳頭が来ることが判明した。このことにより、マウスの眼球はヒトの眼球とは違い、おおまかに眼軸を軸とする回転対称体であると推定された(図2)。今後は、この眼軸決定方法に従って、M100921と野生型マウスの眼軸長比較を行なう予定である。

4. 考察

現在までの結果では、遺伝性近視モデルマウス解析への3次元内部構造顕微鏡解析の有効性を示すに至っていないが、フルカラーボクセルデータを用いた解析は、視神経乳頭等の各組織を容易に判別でき、これによってマウス眼球が回転対称体であることを比較的簡単に示すことが出来た。このことから、この解析が従来行うことが困難だったマウス眼球形状の解析に大きな光を投げかける可能性は高いと言える。ただし、現時点では、特に全身包埋における眼球の変形をはじめ、固定のステップにおけるいくつかの課題も提示された。

変異体スクリーニングという観点では、スループットが問題となるが、今回のように変異体の詳細解析においても、従来得られなかった情報をもたらす、極めて有効な解析法となることが期待される。

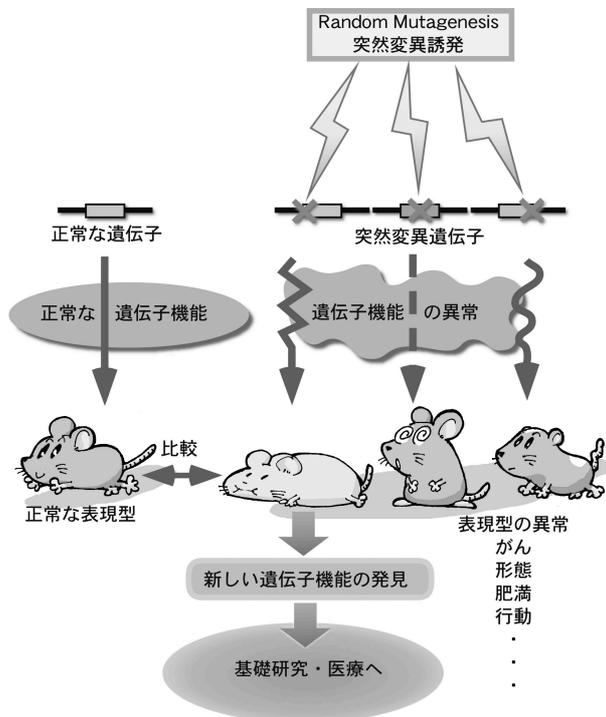


図1：ENU マウスミュータジェネシスの概念図

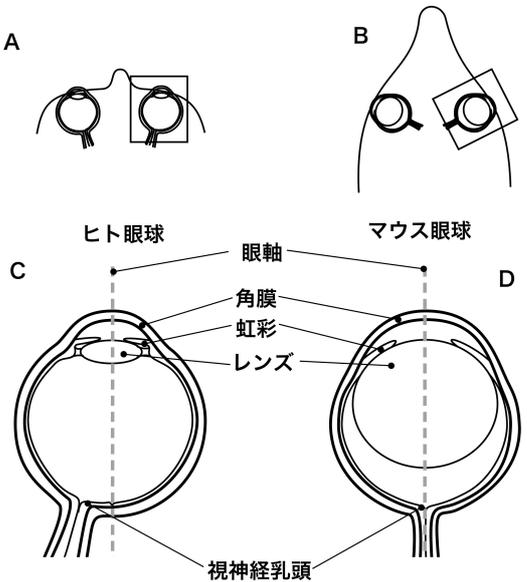


図2：ヒト眼球とマウス眼球の形態の違い

A, B： ヒト、マウスそれぞれの眼球、視神経と頭部の位置関係を模式図で示した。C, D：ヒト、マウスそれぞれの眼球の形態を模式図で示したもの。