

カニクイザルでの網膜電図を用いた薬剤誘発性網膜機能障害の評価
に関する研究

2013 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

木下 順三

目次

| | |
|--|----|
| 略語一覧 | ii |
| 緒言 | 1 |
| 第 1 章 Standard full-field ERG : 杆体経路及び錐体経路の分離評価 | 9 |
| 1. 序論 | 9 |
| 2. 実験材料及び実験方法 | 11 |
| 3. 実験結果 | 14 |
| 4. 考察 | 15 |
| 5. 小括 | 17 |
| 第 2 章 a-wave analysis : 一次ニューロン (視細胞) の評価 | 22 |
| 1. 序論 | 22 |
| 2. 実験材料及び実験方法 | 23 |
| 3. 実験結果 | 28 |
| 4. 考察 | 30 |
| 5. 小括 | 33 |
| 第 3 章 ON-OFF response : 二次ニューロン (双極細胞) の評価 | 45 |
| 1. 序論 | 45 |
| 2. 実験材料及び実験方法 | 46 |
| 3. 実験結果 | 49 |
| 4. 考察 | 51 |
| 5. 小括 | 52 |
| 第 4 章 Photopic negative response : 三次ニューロン (網膜神経節細胞) の評価 | 58 |
| 1. 序論 | 58 |
| 2. 実験材料及び実験方法 | 59 |
| 3. 実験結果 | 62 |
| 4. 考察 | 64 |
| 5. 小括 | 65 |
| 総括 | 76 |
| 謝辞 | 79 |
| 文献 | 80 |

略語一覧

本文及び図表で用いた略語は以下の通りである。

| | |
|-------------------------|--|
| APB: | 2-amino-4-phosphonobutyric acid |
| AUC _{0-inf} : | Area under the concentration-time curve up to infinity |
| AUC _{tau} : | Area under the concentration-time curve during dosing interval |
| AUC _{tau,ss} : | Area under the concentration-time curve during dosing interval at steady state |
| AUC _{0-24h} : | Area under the concentration-time curve up to 24 hours after dosing |
| cGMP: | Cyclic guanosine monophosphate |
| C _{max} : | Maximum concentration |
| ERG: | Electroretinogram |
| ICH: | International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use |
| iGluR: | Ionotropic glutamate receptor |
| ISCEV: | International Society for Clinical Electrophysiology of Vision |
| L-cones: | Long wavelength sensitive cones |
| LED: | Light-emitting diode |
| M-cones: | Middle wavelength sensitive cones |
| mGluR6: | Metabotropic glutamate receptor type 6 |
| ND: | Neutral density |
| NMDA: | N-methyl-D-aspartic acid |
| PDA: | cis-2,3-piperidine dicarboxylic acid |
| PDE5: | Phosphodiesterase type 5 |
| PDE6: | Phosphodiesterase type 6 |
| PhNR: | Photopic negative response |
| QOL: | Quality of life |
| RGC: | Retinal ganglion cell |
| S-cones: | Short wavelength sensitive cones |
| TK: | Toxicokinetics |
| TTX: | Tetrodotoxin |

緒言

網膜は眼球壁の最も内側に位置する膜組織であり (Fig. 1)、組織学的には外側より、網膜色素上皮、杆体錐体層、外境界膜、外顆粒層、外網状層、内顆粒層、内網状層、神経節細胞層、神経線維層、及び内境界膜の 10 層からなる (Fig. 2)。このうち網膜色素上皮以外の 9 層は感覚網膜と呼ばれ、角膜や水晶体によって構成される眼球の光学系によって屈折した像がこの感覚網膜に結像する。網膜に達した光は、一次ニューロンである視細胞によって膜電位の変化という電気信号に変換される。その視覚情報はさらに、二次ニューロンである双極細胞及び三次ニューロンである網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell: RGC) を含む網膜内の神経細胞ネットワークによって処理、統合される。また、網膜内の神経回路には暗所での視覚情報の伝達を主に担う杆体経路と、明所での視覚情報の伝達を主に担う錐体経路が存在し、両者は相互に影響を及ぼし合っていることが知られる。このように、種々の神経細胞が複雑なネットワークを形成する網膜は、視覚情報の発生及び伝達に不可欠の組織である。

一方、網膜は薬剤あるいは化学物質の影響を受けやすい組織でもある。その理由としては、脈絡膜血流量が極めて多いこと、脈絡膜毛細血管が有窓型であること、脈絡膜及び網膜色素上皮にメラニンが存在すること、視細胞でのミトコンドリアの酸化的代謝活性が高いこと、視細胞外節の代謝回転が高いこと、網膜内に多様な神経伝達及び神経調節物質が存在すること等、数多くが挙げられる⁽¹⁴⁾。この網膜の薬剤による障害、つまり薬剤誘発性網膜障害は視覚の異常につながる。視覚は社会的生活を営む上で極めて重要な機能であり、一般的にヒトは情報の約 80%を視覚から得ていると言われる。つまり、薬剤誘発性網膜障害は致命的ではないが生活の質 (quality of life: QOL) を著しく損なう。そのため、医薬品メーカーには、薬剤誘発性網膜障害のリスクを医薬品開発の過程、特に非臨床安全性試験において適切に評価することが求められている。

日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (International Conference on Harmonisation of Technical

Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: ICH) の合意に基づき作成された単回及び反復投与毒性試験ガイドライン (S4) には医薬品の製造販売承認申請に際して実施すべき一般毒性試験での評価項目及びその方法が定められており、網膜の評価も同ガイドラインに準じて実施される。同ガイドラインにて評価が義務付けられており網膜障害と関連のある評価項目としては、一般状態の観察、眼科学的検査、及び病理組織学的検査が挙げられる。網膜の評価は形態学的評価法と機能的評価法に大別できる。非臨床安全性試験における網膜の形態学的評価は薬剤の投与開始前及び投与期間中の検眼鏡を用いた眼底検査及び解剖後の病理組織学的検査が該当し、両検査から薬剤による網膜の形態変化に関する多くの情報を得ることが可能である。一方、機能的評価としては、一般状態観察によって視覚の異常と関連した行動が観察される可能性がある。しかし、一般的に動物では行動観察から軽度の視覚異常を検出することは極めて困難である。さらに、行動観察は網膜から大脳視覚野に至るまでの視覚伝導路の総合的評価であるため、網膜機能を直接評価しているとは言えない。そのため、同ガイドラインでも、必要に応じて視覚に関する機能検査を別途実施することが推奨されている。実際に、類似薬の情報、薬理作用、化学的構造等から網膜機能障害が懸念される場合、網膜機能の電気生理学的な評価方法である網膜電図 (electroretinogram: ERG) がしばしば用いられる⁽⁴⁵⁾。

ERG とは光刺激によって誘発される網膜の電位変化を記録したものである。光刺激により眼球に発生する細胞外電流の概念図を Fig. 3 に示す。一般的な ERG は、同図にて B で表した回路、すなわち硝子体及び角膜を経て網膜を離れた後に脈絡膜及び網膜色素上皮を経て網膜に戻る回路に沿って記録される。ERG の波形は順応条件及び光刺激の強度等の記録条件によって大きく変化するが、網膜機能の異常の有無を調べる目的では、暗所にて一定以上の時間順応した状態である暗順応下にて中等度の強度の閃光刺激によって誘発される応答が記録されることが一般的である。Fig. 4 に同応答の典型例を示す。同応答では光刺激の直後に陰性波が、続いて陽性波が観察され、それぞれ a 波及び b 波と呼ばれる。一般的に、ERG の a 波は網膜の一次ニューロンである視細胞に、b 波は二次ニューロンである双極細胞

に、それぞれ主とした起源を有すると考えられている。

ヒトの臨床では、ERG が網膜機能を他覚的に評価することのできる重要な検査と位置付けられている。中間透光体混濁例あるいは小児の網膜機能判定、網膜血管異常及び網膜虚血の評価、原因不明の視機能障害の診断等、多くの場面で ERG が活用されている。これに対して動物実験の領域では、ERG は自覚的な検査が困難な動物モデルでの視覚機能の評価に主に用いられている。ERG が視覚の評価に用いられる動物種は多岐にわたり、メダカ、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、及びサルなど実に様々である^(6, 53)。また、ERG の波形には種差があり、これは網膜の解剖学的及び生理学的差異を反映したものと考えられる。例えば、視細胞に占める錐体の割合がヒトと比較して小さいげっ歯類では、錐体経路の機能を反映する ERG である錐体系応答(後述)に a 波がほとんど認められない。さらに、ERG の波形成分の起源にも種差が知られる⁽³⁷⁾。そのため、動物実験にて ERG を記録する際は、実験目的に合致した動物種を選択することが重要である。

非臨床安全性試験にて網膜障害を評価する上では、以下の 3 つの利点によりカニクイザルが最も適切な動物種だと考えられる。第一の利点として、サルの眼は解剖学的にヒトと極めて類似していることが挙げられる。例えば、サルの網膜ではヒトのように錐体の密集した黄斑が発達しており、視細胞の杆体と錐体の比率及び分布がサルとヒトで近いことが知られている^(10, 75)。この高い類似性は、試験結果をヒトに外挿する際に有利であることを意味する。例えば、網膜毒性について最も広範囲に研究された薬剤の一つにクロロキンがある(クロロキン網膜症)。クロロキン網膜症患者の眼底像では bull's eye maculopathy と呼ばれる特徴的な病変が黄斑部に認められることが知られている⁽⁶⁷⁾。しかし、非臨床安全性試験に用いられる動物種のうち黄斑を持たないマウス、ラットあるいはイヌにおいて同病変を再現することは不可能である。第二の利点は、カニクイザルを含むマカク属では、その ERG の波形成分の起源に関する研究が進んでいることである。記録される波形成分の起源が他の動物種よりも明らかなため、試験結果から網膜内での薬剤の作用部位が判明し、それが視覚障害の機序解明につながる可能性がある。第三の利点としては、カニクイザル

が非臨床安全性試験に一般的に用いられる動物種の一つであることが挙げられる。*In vivo* 評価系として、試験に用いる動物が安定的に供給されていることは重要である。さらに、反復投与毒性試験等に評価系を組み込むことが可能となるため、同一試験内で得られる曝露情報や他の検査結果と合わせてヒトでの網膜機能障害のリスクをより適切に評価することにつながると考えられる。一方、げっ歯類及びイヌと比べるとハンドリングに危険が伴うことがサル類を実験に用いることの欠点として挙げられるが、この危険は試験従事者の適切な教育によって大幅に軽減することが可能である。これらのことから、カニクイザルでの確立された ERG の記録及び解析法は、非臨床安全性試験にて網膜機能障害を検出及びモニタリングし、さらに網膜中での薬剤の作用部位を詳細に調べる手法として非常に有用であることが期待される。

近年、非臨床安全性試験におけるサルの ERG が注目され、その方法の標準化も試みられ始めた。⁽²⁾しかし、薬剤誘発性網膜機能障害の評価系としてのカニクイザルでの ERG 記録及び解析法に限定すると、これまでのところ情報は極めて少ない。例えば、ヒト臨床では網膜内の杆体経路と錐体経路に由来する ERG を分離して記録する標準化された手法⁽⁴⁴⁾が確立されているが、薬剤等を投与したカニクイザルで杆体経路と錐体経路を考慮した ERG を記録した報告は非常に少ない。^(19,29)また、カニクイザルでの ERG を用いて網膜内の特定の神経細胞に及ぼす薬剤の影響を調べた報告は、著者の知る限りない。これらのことから、非臨床安全性分野において、カニクイザルでの ERG 記録が網膜障害のリスク評価に十分に活用されていないのが現状である。そこで本研究では、カニクイザルにおける薬剤誘発性網膜機能障害の体系的な評価法の構築を目的として、ヒトあるいはマカク属での既報を参考に、網膜の各構成成分に焦点を当てた各種 ERG の記録及び解析方法を検討した。第一章では、網膜内の経路として2つに大別される杆体経路及び錐体経路の機能評価に着目した。第二～四章では、それぞれ網膜内の一、二、及び三次ニューロンである視細胞、双極細胞、及び RGC の機能評価に着目した。

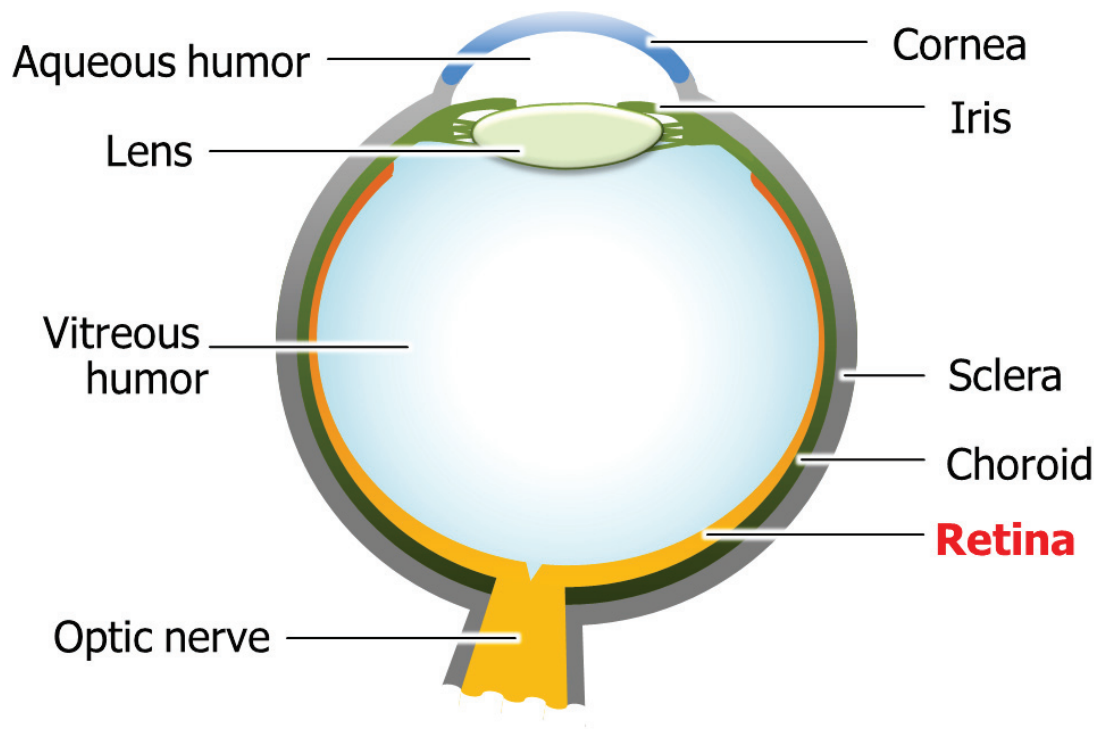


FIGURE 1. Diagram of a horizontal section of the eye.

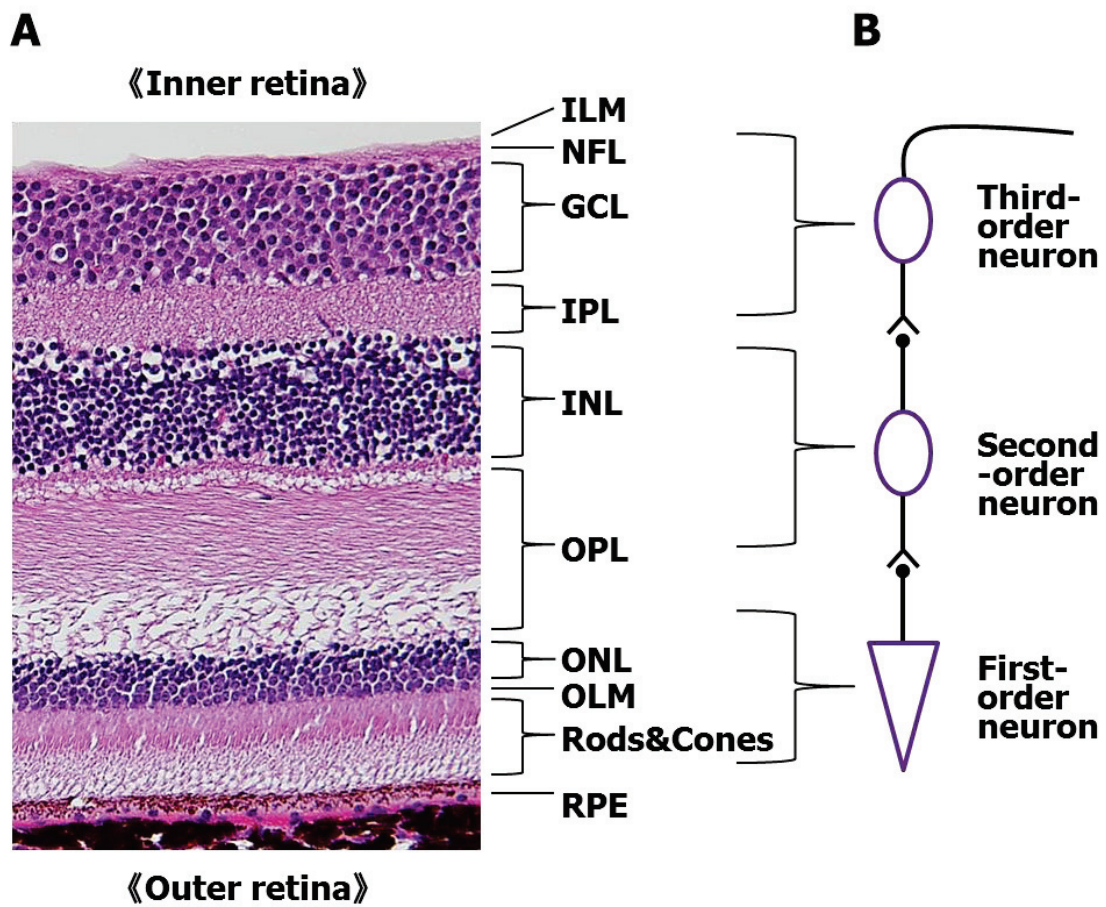


FIGURE 2. (A) A photomicrograph of a vertical section through the central retina in a cynomolgus monkey and (B) diagram of the corresponding nerve circuit of the retina. ILM, inner limiting membrane; NFL, nerve fiber layer; GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; OLM, outer limiting membrane; RPE, retinal pigment epithelium.

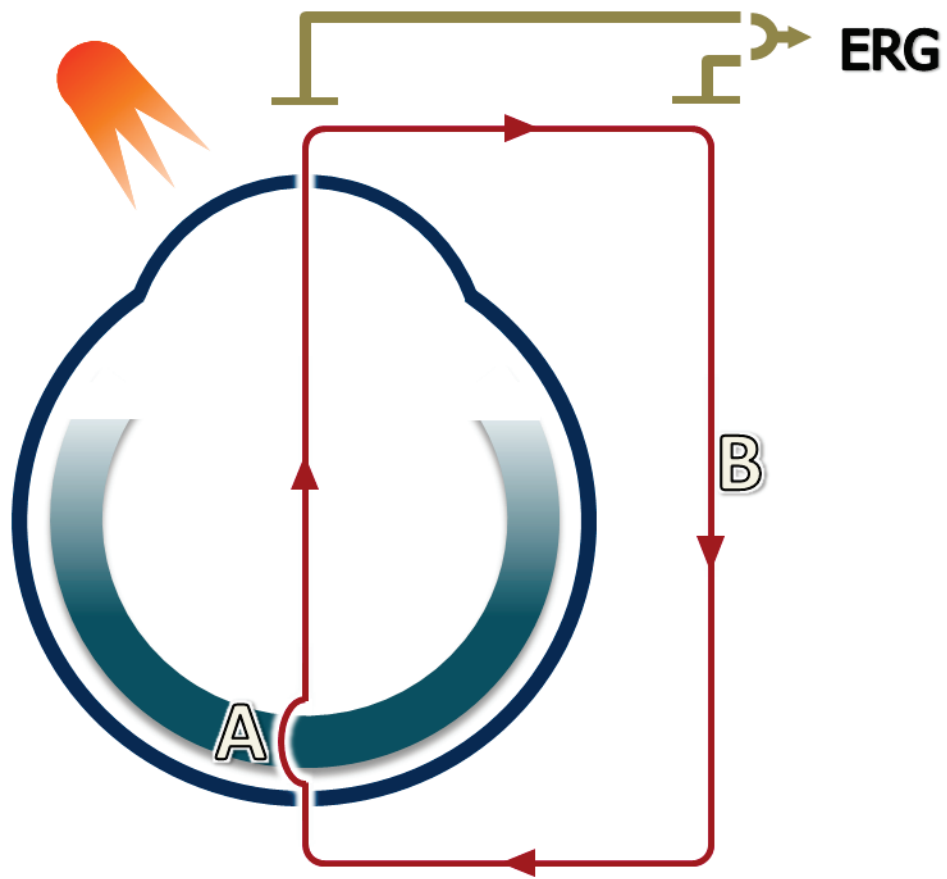


FIGURE 3. A schematic representation of the extracellular currents that are formed following light stimulation. The pathway “A” represents local currents within the retina, while pathway “B” shows the currents leaving the retina through the vitreous and the cornea and returning to the retina through the choroid and the pigment epithelium. ERG recording is done along the pathway B.

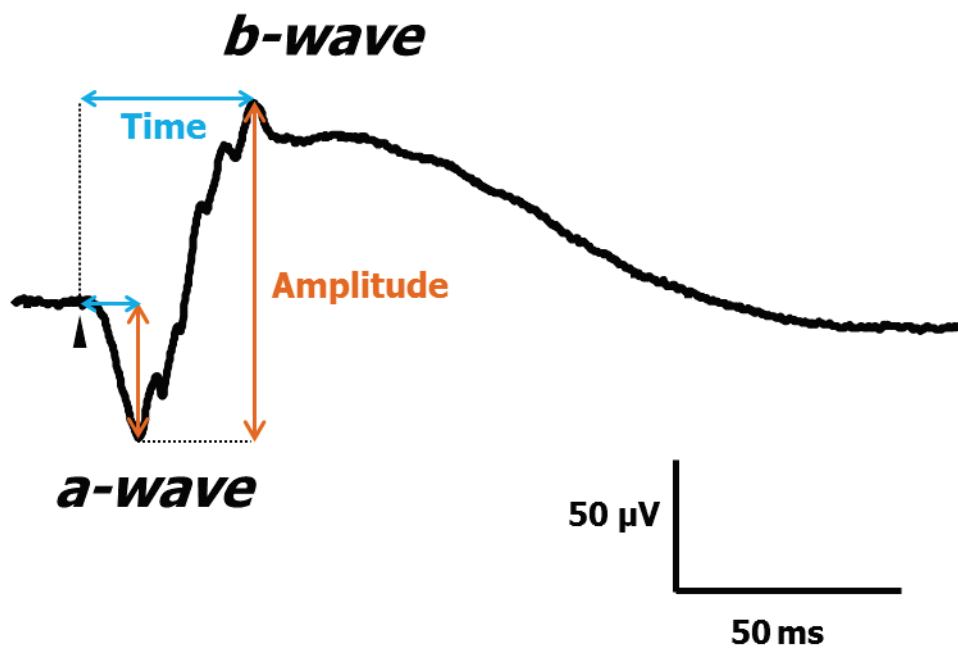


FIGURE 4. A typical waveform of the ERG response elicited by the white light flash of moderate intensity in a dark-adapted cynomolgus monkey. Arrowhead indicates onset of the light flash. Two components that are most often measured are the a- and b-waves. The a-wave is the first large negative component, followed by the b-wave which is corneal positive and usually larger in amplitude. Two principal measures of the ERG waveform are taken: 1) The amplitude from the baseline to the negative trough of the a-wave, and the amplitude of the b-wave measured from the trough of the a-wave to the following peak of the b-wave; and 2) the time from flash onset to the trough of the a-wave and the time from flash onset to the peak of the b-wave. It is well known that the waveform of ERGs recorded in cynomolgus monkeys is quite similar to that recorded in humans.

第1章 Standard full-field ERG：杆体経路及び錐体経路の分離評価

1. 序論

網膜内の光受容体である視細胞には、光量が少ない状況での視覚、すなわち暗所視を担う杆体と、光量が充分にある状況での視覚、すなわち明所視を担う錐体の二つのタイプが存在する。また、網膜内で杆体に由来する視覚情報の伝導路は杆体経路、錐体に由来する視覚情報の伝達路は錐体経路とそれぞれ呼ばれる。ERGでは、光に対する感度あるいは時間分解能等、杆体と錐体における生理学的特性の差異を利用し、杆体経路及び錐体経路の反応をそれぞれ杆体系応答及び錐体系応答として分離して記録することが可能である。これによって、網膜内で機能異常が存在する部位をより正確に把握することができる。

ヒト臨床では、ERGは網膜機能を他覚的に評価することのできる重要な検査と位置付けられている。錐体ジストロフィーや先天性夜盲等の網膜疾患は、その診断に上記の杆体経路と錐体経路の反応をそれぞれ分離して記録したERGが欠くことができない。その反面、ヒト臨床では各施設が独自に設定した条件によってERGが記録されてきた経緯があり、このため長らく施設間のERGの比較が困難であった。この問題を解決するため、1989年に国際臨床視覚電気生理学学会（International Society for Clinical Electrophysiology of Vision: ISCEV）が、ヒト臨床にて杆体経路と錐体経路の反応を分離して記録する標準化プロトコール（ISCEVプロトコール）を提案した⁽⁴⁰⁾。現在、ISCEVプロトコールはヒト臨床にてERGを記録する際の標準的な方法として定着しており、同プロトコールに準拠して記録されたERGはstandard full-field ERGsと呼ばれる⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾。

これに対して非臨床安全性分野でも、杆体経路と錐体経路の機能を分離して評価するstandard full-field ERGの記録が複数の動物種で試みられ、いくつかのプロトコールが提案されている^(1, 59)。しかし、これまでのところ、それらは普及には至っていない。その原因としては、非臨床安全性試験に一般的に用いられる動物種が複数存在すること、心電図等他の

電気生理学的検査と比較すると非臨床安全性分野で ERG を熟知した研究者が少ないことから、これまでに得られている情報が少なく、standard full-field ERG の有用性が十分理解されていないことが挙げられる。しかしながら、網膜に対して何らかの機能的影響を及ぼすことが明らかな化合物を医薬品として開発する場合、非臨床安全性試験にて standard full-field ERGs を記録することにより有用な情報が得られると考えられる。すなわち、得られた ERG の変化からヒトでの視覚障害の質を予測し、さらに臨床試験と同一のマーカーにて非臨床安全性試験で発現する機能障害をモニタリングすることが可能になると考えられる。

一方、トリアゾール系抗真菌剤であるポリコナゾールは、ヒトに対して投与後に羞明、霧視、色覚の変化等の視覚障害を一過性に誘発することが報告されている^(11, 12, 18, 55, 66)。ポリコナゾールの臨床試験では、健常人に反復経口投与した際の網膜機能の変化が standard full-field ERGs にて評価された⁽¹²⁾。この試験では、杆体経路と錐体経路の両経路の機能を反映する混合応答で有意な振幅低下が検出された一方で、錐体経路の機能を反映する錐体系応答には顕著な変化は観察されなかった。この結果から、ヒトにおけるポリコナゾールによる網膜機能への影響が杆体経路で顕著であったことが示唆される。また、ヒト臨床にてうっ血性心不全の治療薬として使用されているジゴキシンは、中毒患者に視力低下、霧視、黄視等の視覚異常を可逆的に誘発することが知られている^(8, 39, 49, 54, 74)。症例報告^(49, 74)によると、中毒時の ERG の異常として、錐体系応答の可逆的な減弱及び遅延が認められており、錐体経路の機能障害が強く示唆される。一方、同報告における杆体系応答は、中毒時には正常範囲内であったものの休薬により潜時短縮あるいは減弱が認められたことから、中毒時の杆体経路の反応はむしろ増大傾向を示していたと推察される。

本研究では、非臨床安全性試験に一般的に用いられる動物種であるカニクイザルを対象とし、ISCEV プロトコルを参考に standard full-field ERGs、すなわち、杆体系応答 (rod response)、混合応答 (combined rod-cone response) 及び錐体系応答 (single-flash cone response 及び 30 Hz flicker) の記録条件を設定した。また、前述のようにヒトでそれぞれ杆体経路及び錐体経路に対して選択性の高い機能障害を誘発することが知られるポリコナゾール及び

ジゴキシンの作用が、カニクイザルでの standard full-field ERGs によって検出可能であるかを検討した。

2. 実験材料及び実験方法

本実験は、第一三共株式会社の動物実験委員会の承認（動物実験承認番号：C800264 及び C800044）を得て実施した。

2.1. 動物

一般状態及び眼底に異常のない雌雄各 6 例、計 12 例の中国産カニクイザル（3–5 歳齢、体重 2.8–3.8 kg）を用いた。雌雄各 3 例、計 6 例はポリコナゾール投与群（3–4 歳齢、体重 2.8–3.5 kg）に、残りの 6 例はジゴキシンの投与群（3–4 歳齢、体重 2.8–3.8 kg）に振り分けた。動物は ERG 実験中を除き、温度 24°C、湿度 60%、照明 12 時間/日（7:00–19:00）、照度 150–300 ルクス、換気回数 10–15 回/時間に設定した試験室にて、ステンレス製ケージ内に個別飼育した。給餌は、サル用固形飼料（PS；オリエンタル酵母工業株式会社、東京）を 1 日 1 回 100 g 与えた。給水は、水道水を給水ノズルから自由に摂取させた。

2.2. 投与

ヒトで杆体経路に強い影響を及ぼすことが知られている薬剤として、ポリコナゾールを選択した。ポリコナゾール（ブイフェンド静注用 200 mg; Pfizer Inc., New York, NY, USA）は生理食塩液にて希釈して投与液を調製した。投与液は、6 例の動物に 0（生理食塩液）、3、6、及び 12 mg/kg の用量を各用量が単回投与と同様とみなせると考えられる 1 週間以上の間隔を設けて漸増静脈内投与（0.2 mL/kg/min×10 min）し、24 時間後まで観察した。投与用量は、視覚障害を呈するヒトと同程度の血漿中ポリコナゾール濃度を ERG 記録時に見込める用量として 6 mg/kg を設定し、さらにその 1/2 及び 2 倍の用量を設定した。投与は、シリ

ンジポンプ (22; Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA, USA) を用いて伏在静脈から行った。

ヒトで錐体経路に強い影響を及ぼすことが知られている薬剤として、ジゴキシンを選択した。ジゴキシリン (ジゴシン注 0.25 mg ; 中外製薬株式会社、東京) は生理食塩液にて希釈して投与液を調製した。投与液は、上記とは別の 6 例に 0.1 mg/kg の用量にて単回静脈内投与 (0.05 mL/kg/min×40 min) し、投与 28 日後まで観察した。投与用量は、ヒト臨床での推奨用量 (0.125-0.25 mg/men/day、経口) ⁽⁶⁵⁾とヒトでの生体内利用率 (66%) ⁽⁶⁰⁾に基づき、ヒト患者を上回る曝露が得られると見込まれた用量として設定した。ジゴキシリンを投与する 6 日前には、生理食塩液を同 6 例に同様に投与した。投与は、シリンジポンプ (22 ; Harvard Apparatus, Inc.) を用いて伏在静脈から行った。

2.3. ERG

2.3.1. 前処置

動物は、塩酸ケタミン (ケタラール筋注用 500 mg ; 第一三共株式会社、東京) (導入 : 10 mg/kg、維持 : 5-10 mg/kg/h) 及びキシラジン塩酸塩 (セラクター ; バイエルメディカル株式会社、大阪) 0.6 mg/kg の筋肉内投与により麻酔した。瞳孔はトロピカミド及びフェニレフリン塩酸塩 (ミドリ P 点眼液 ; 参天製薬株式会社、大阪) の点眼により散瞳させた。角膜は塩酸オキシブプロカイン (ベノキシール点眼液 0.4% ; 参天製薬株式会社) の点眼により麻酔した後、ヒドロキシエチルセルロース (スコピゾル眼科用液 ; 武田薬品工業株式会社、大阪) の点眼により保護した。

2.3.2. 光刺激

ERG の誘発にはキセノンランプを光源とする全視野刺激装置 (Ganzfeld Stimulator Model 2503S; LKC Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA) を使用した。全視野刺激装置のドーム表面にて実測した最大刺激強度は 6.3 cd·s/m² であり、光刺激の強度は Neutral density (ND) フィルター (Wratten gelatin filter; EASTMAN KODAK COMPANY, Rochester, NY, USA) を用

いて減弱させることで調節した。

2.3.3. 記録及び解析

ISCEV の推奨する方法⁽⁴⁴⁾を参考に、白色の刺激光及び背景光を用いて standard full-field ERGs を記録した。記録電極として双極型コンタクトレンズ電極 (H6515NFC ; 有限会社メイヨー、愛知) を左眼に、接地電極として針電極 (TN208-016 ; 株式会社ユニークメディカル、東京) を頭頂部の皮下にそれぞれ設置した。40 分以上の暗順応後、0.007 及び 2.7 cd·s/m² の強度の光刺激にて、それぞれ杆体系応答 (rod response) 及び混合応答 (combined rod-cone response) を誘発した。その後、40 cd/m² の輝度の背景光にて 10 分間の明順応を行い、同背景光下にて 2.7 cd·s/m² の強度の光刺激にて錐体系応答 (single-flash cone response 及び 30 Hz flicker) を誘発した。上記の ERG は、ポリコナゾールの投与直後及び投与 24 時間後、あるいはジゴキシンの投与前 (媒体の投与 24 時間後)、投与直後、投与 24 時間、7、14 及び 28 日後にそれぞれ記録した。

すべての応答は 0.5–1000 Hz の帯域フィルターを通して増幅した後に、誘発電位検査装置 (MEB-9104 ; 日本光電株式会社、東京) に記録した。同一条件にて記録された 3 から 6 波形を用いて加算平均波形を算出した。波形成分の解析として、a 波の振幅 (基線から a 波トラフまで) 及び潜時 (光刺激から a 波トラフまで) を combined rod-cone response 及び single-flash cone response の波形から、b 波の振幅 (a 波トラフから b 波頂点まで) 及び潜時 (光刺激から b 波ピークまで) を rod response、combined rod-cone response、single-flash cone response、及び 30 Hz flicker の波形からそれぞれ計測した。なお、ポリコナゾール投与群では振幅のみを評価対象とした。

2.4. 眼底検査

ERG の各評価ポイントにて、ERG 記録終了直後に双眼倒像検眼鏡 (HEINE OMEGA 500; HEINE Optotechnik GmbH & Co. KG, Herrsching, Germany) を用いて両眼の眼底を観察した。

2.5. 統計学的解析

ポリコナゾールあるいはジゴキシンの投与後に記録した standard full-field ERGs の各計測値は平均値±標準偏差 (SD) で表し、対応のある *t* 検定を用いて投与前値 (媒体投与後の値) と比較した。P<0.05 をもって統計学的に有意な変化と判断した。

3. 実験結果

3.1. ポリコナゾール

3.1.1. ERG

波形変化の代表例を Fig. 5 に示す。また、解析した各波形成分を Tab. 1 に示す。

各波形成分には、投与用量と関連して以下の変化が認められた。Rod response では b 波の顕著な減弱あるいは消失が認められた。投与直後の b 波振幅は、投与前値と比較して有意な低値であった (3 mg/kg 投与時 P<0.05、6 及び 12 mg/kg 投与時 P<0.01)。Combined rod-cone response は negative ERG (b 波振幅が a 波振幅よりも小さい) であり、b 波及び律動様小波の減弱が顕著だった。投与直後の b 波振幅及び b/a 比は、投与前値と比較して有意な低値であった (12 mg/kg 投与時 P<0.01)。a 波振幅には有意な変化は認められなかった。Single-flash cone response は軽度に変化し、a 波トラフの平坦化及び b 波の軽度な減弱が観察された。投与直後の b 波振幅は、投与前値と比較して有意な低値であった (6 及び 12 mg/kg 投与時 P<0.01)。a 波振幅には有意な変化は認められなかった。同様に 30 Hz flicker も軽度に変化し、b 波の軽度な減弱が観察された。投与直後の b 波振幅は、投与前値と比較して有意な低値であった (6 mg/kg 投与時 P<0.05、12 mg/kg 投与時 P<0.01)。投与直後に認められたすべての変化は、各投与の 24 時間後には完全に回復した。また上記の ERG の変化に、明らかな雌雄差は観察されなかった。

3.1.2. 眼底検査

いずれの観察ポイントにおいても明らかな異常は認められなかった。

3.2. ジゴキシシン

3.2.1. ERG

波形変化の代表例を Fig. 6 に示す。また、解析した各波形成分を Tab. 2 に示す。

Rod response では応答の遅延及び増幅が認められ、投与後の b 波に投与前値と比較して有意な潜時延長及び振幅増加（ともに $p<0.01$ ）が検出された。Combined rod-cone response では応答の遅延が認められ、投与後の a 波及び b 波に投与前値と比較して有意な潜時の延長（ともに $p<0.01$ ）が検出された。振幅には a 波あるいは b 波のいずれにも著変は観察されなかった。Single-flash cone response 及び 30 Hz flicker では、ともに応答の遅延が認められた。両応答の投与後の b 波潜時は、投与前値と比較して有意に延長した（ともに $p<0.01$ ）。また、統計学的有意差は検出されなかったが、投与後の single-flash cone response 及び 30 Hz flicker の b 波振幅は 5/6 例で投与前よりも低値を示した。上記のすべての変化は投与 24 時間後が最も顕著であった。Single-flash cone response の b 波に認められた潜時延長は投与 24 時間後以降に回復傾向を示したものの、投与 28 日後での b 波潜時は投与前値と比較して有意な高値（ $p<0.05$ ）であった。それ以外のすべての変化は、投与 28 日後までに投与前と同程度まで回復した。また、上記の ERG の変化に、明らかな雌雄差は観察されなかった。

3.2.2. 眼底検査

いずれの観察ポイントにおいても明らかな異常は認められなかった。

4. 考察

トリアゾール系抗真菌剤であるボリコナゾールは、ヒト臨床にて重症又は難治性真菌感

染症の治療薬として使用されている。ポリコナゾールはヒトに対して投与後に羞明、霧視、色覚の変化等の視覚障害を一過性に誘発することが報告されており、臨床試験にて評価された ERG の結果からはポリコナゾールが網膜機能、なかでも杆体経路の機能に顕著な影響を及ぼすことが示唆される⁽¹²⁾。

本実験のカニクイザルでは、ポリコナゾールの投与後に杆体系応答は消失して混合応答は律動様小波の減弱を伴う negative ERG を示し、杆体経路への顕著な影響が認められた。一方、錐体系応答には減弱が認められたものの軽度であり、錐体経路への影響は杆体経路と比較すると軽度であった。以上より、本実験にて検出されたポリコナゾールによる standard full-field ERGs の変化は、ヒトにおける変化と一致したものと考えた。

さらに、本実験にて記録した standard full-field ERGs のすべての応答で主として双極細胞に由来する b 波の減弱が認められた一方、主として視細胞に由来する a 波にはいずれの応答にも明らかな変化は観察されなかった。この結果から、ポリコナゾールの投与を受けたカニクイザルでは、視細胞の機能は比較的温存されている一方、双極細胞の機能は顕著に障害されることが強く示唆された。

ヒト臨床にてうっ血性心不全又は頻脈の治療薬として使用されているジゴキシンは、中毒患者に視力低下、霧視、黄視等の視覚異常を可逆的に誘発することが知られている^(8, 39, 49, 54, 74)。症例報告^(49, 74)においてジゴキシン中毒患者で評価された ERG の結果からは、錐体経路の可逆的な機能障害が強く示唆される一方、杆体経路の反応はむしろ増大傾向を示していたと推察される。

本実験のカニクイザルでは、錐体系応答の潜時延長及び振幅の低下傾向が認められ、錐体経路の障害を強く示唆する結果が得られた。一方、杆体系応答は増幅を示し、杆体経路の反応が増大していたことが示唆された。またこれらの ERG の変化は可逆的であった。以上より、本実験のカニクイザルにて検出されたジゴキシンによる standard full-field ERGs の変化は、ヒトにおける変化に一致したものと考えた。

5. 小括

ヒトで薬剤誘発性の ERG の変化を示すことが知られているポリコナゾール及びジゴキシンを、それぞれカニクイザルに投与して standard full-field ERGs を記録した。その結果、これらの薬剤を投与されたカニクイザルでは、それぞれ杆体経路及び錐体経路に選択的かつ可逆的な網膜機能障害を示唆する変化が検出された。前述の変化はヒトでの報告で示された結果と一致していたことから、カニクイザルでの standard full-field ERGs 記録によって、ポリコナゾールの杆体経路への顕著な影響、及びジゴキシンの錐体経路への顕著な影響を検出可能であることが示された。

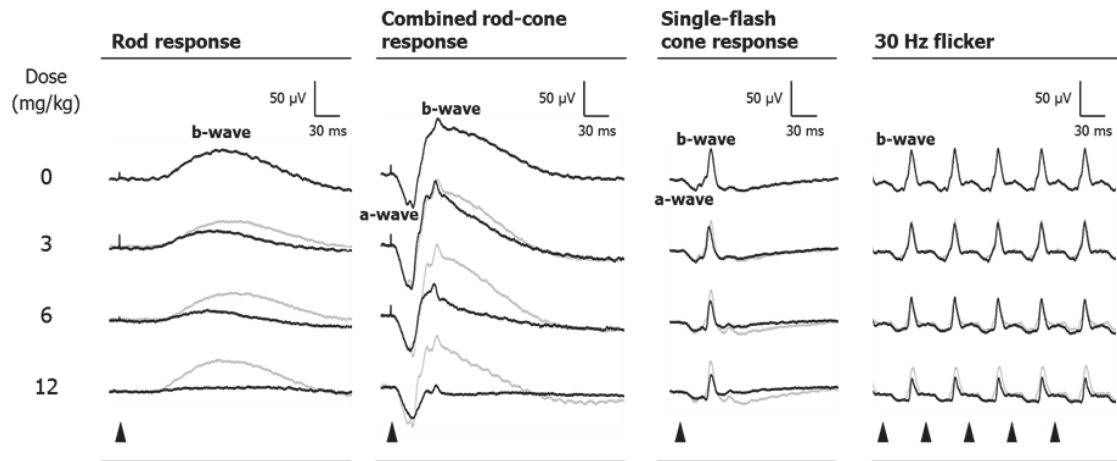


FIGURE 5. Typical waveforms of the standard full-field ERGs in a voriconazole-treated cynomolgus monkey. Voriconazole was administered intravenously with increasing doses of 0 (vehicle), 3, 6 and 12 mg/kg at intervals of one week or more, and the standard full-field ERGs were obtained as described in the text. Arrowheads indicate onset of the light flashes. The responses recorded 24 hours after each dosing (gray trace) are superimposed on those recorded immediately after each dosing (black trace). Each trace represents an average of three responses.

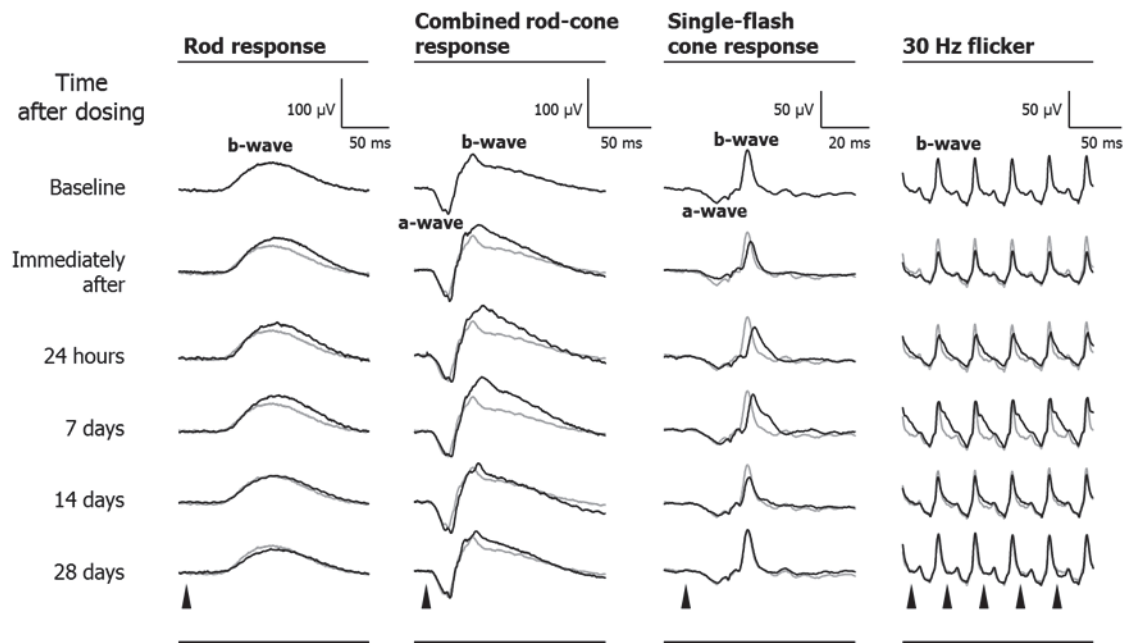


FIGURE 6. Typical waveforms of the standard full-field ERGs in a digoxin-treated cynomolgus monkey. Digoxin was administered intravenously at a dose of 0.1 mg/kg, and the standard full-field ERGs were obtained as described in the text. Arrowheads indicate onset of the light flashes. The responses recorded before dosing (gray trace) are superimposed on those recorded after dosing (black trace). Each trace represents an average of three responses.

TABLE 1. Effects of Voriconazole on the Standard Full-Field ERGs in Cynomolgus Monkeys

| | Dose (mg/kg) | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| | 0* | 3 | | 6 | | 12 | |
| | Immediately After | Immediately After | 24 h After | Immediately After | 24 h After | Immediately After | 24 h After |
| Rod Response | | | | | | | |
| Amplitude (μ V) | | | | | | | |
| b-wave | 43.9 \pm 9.97 | 34.2 \pm 13.80 [†] | 44.8 \pm 13.93 | 16.5 \pm 6.47 [‡] | 47.7 \pm 8.23 | 9.7 \pm 5.73 [‡] | 40.8 \pm 12.03 |
| Combined Rod-Cone Response | | | | | | | |
| Amplitude (μ V) | | | | | | | |
| a-wave | 52.8 \pm 9.10 | 49.0 \pm 8.97 | 51.0 \pm 7.50 | 45.4 \pm 8.77 | 54.8 \pm 6.53 | 46.1 \pm 12.40 | 63.7 \pm 8.50 |
| b-wave | 123.5 \pm 24.93 | 121.9 \pm 22.94 | 126.1 \pm 21.81 | 89.9 \pm 14.79 | 132.5 \pm 19.17 | 60.5 \pm 13.88 [‡] | 135.7 \pm 21.41 |
| Single-Flash Cone Response | | | | | | | |
| Amplitude (μ V) | | | | | | | |
| a-wave | 12.7 \pm 1.81 | 12.9 \pm 2.36 | 12.7 \pm 1.21 | 11.1 \pm 2.34 | 13.5 \pm 2.22 | 11.0 \pm 2.67 | 14.6 \pm 2.31 |
| b-wave | 53.8 \pm 6.63 | 47.7 \pm 7.17 | 55.3 \pm 5.42 | 41.3 \pm 5.77 [‡] | 60.3 \pm 11.23 | 33.0 \pm 5.11 [‡] | 64.2 \pm 12.23 |
| 30 Hz Flicker | | | | | | | |
| Amplitude (μ V) | | | | | | | |
| b-wave | 52.4 \pm 6.62 | 48.1 \pm 8.04 | 55.3 \pm 3.80 | 45.6 \pm 6.08 [†] | 59.6 \pm 12.32 | 35.3 \pm 5.09 [‡] | 58.1 \pm 11.89 |

Data are expressed as the mean \pm SD of six animals.

All the animals were treated with low to high doses at intervals of one week or more.

* Physiological saline was administered as a vehicle control.

[†] $p < 0.05$, [‡] $p < 0.01$; significantly different in comparison with the vehicle-control value by the paired t -test

TABLE 2. Effects of Digoxin on the Standard Full-Field ERGs in Cynomolgus Monkeys

| | Times After Dosing | | | | | |
|-----------------------------------|------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | Baseline ¹⁾ | Immediately | 24 hours | 7 days | 14 days | 28 days |
| Rod Response | | | | | | |
| Implicit Time (ms) | | | | | | |
| b-wave | 83.5 ± 2.82 | 87.0 ± 2.27‡ | 91.3 ± 4.49‡ | 89.5 ± 5.42† | 84.2 ± 1.95 | 84.8 ± 2.52 |
| Amplitude (μV) | | | | | | |
| b-wave | 49.0 ± 6.60 | 58.9 ± 16.58 | 72.3 ± 12.32‡ | 59.8 ± 20.06 | 47.5 ± 14.40 | 51.3 ± 9.48 |
| Combined Rod-Cone Response | | | | | | |
| Implicit Time (ms) | | | | | | |
| a-wave | 17.3 ± 0.48 | 17.4 ± 0.30 | 18.4 ± 0.64‡ | 18.0 ± 0.69‡ | 17.8 ± 0.78† | 17.3 ± 0.44 |
| b-wave | 38.0 ± 1.81 | 39.4 ± 1.66‡ | 42.9 ± 2.56‡ | 40.9 ± 3.29† | 38.7 ± 1.81 | 38.2 ± 1.41 |
| Amplitude (μV) | | | | | | |
| a-wave | 58.4 ± 8.44 | 58.6 ± 6.89 | 57.5 ± 8.09 | 57.9 ± 9.16 | 66.8 ± 15.83 | 65.0 ± 9.59 |
| b-wave | 141.5 ± 16.36 | 138.6 ± 19.59 | 148.2 ± 11.19 | 168.6 ± 23.35 | 158.0 ± 31.08 | 159.0 ± 23.94 |
| Single-Flash Cone Response | | | | | | |
| Implicit Time (ms) | | | | | | |
| a-wave | 11.6 ± 0.43 | 11.8 ± 1.08 | 12.4 ± 1.09 | 12.6 ± 0.88 | 12.0 ± 0.42 | 11.9 ± 0.34 |
| b-wave | 23.9 ± 0.71 | 24.7 ± 1.00† | 26.2 ± 1.00‡ | 26.1 ± 1.11‡ | 25.1 ± 0.61‡ | 24.6 ± 0.69† |
| Amplitude (μV) | | | | | | |
| a-wave | 14.4 ± 2.64 | 12.3 ± 1.10 | 13.7 ± 2.45 | 14.7 ± 4.09 | 14.8 ± 1.70 | 13.5 ± 2.81 |
| b-wave | 57.7 ± 10.90 | 53.0 ± 7.41 | 47.9 ± 7.85 | 53.7 ± 14.71 | 60.5 ± 7.31 | 59.5 ± 10.69 |
| 30 Hz Flicker | | | | | | |
| Implicit Time (ms) | | | | | | |
| b-wave | 25.7 ± 0.67 | 26.3 ± 0.69† | 27.1 ± 0.69‡ | 26.9 ± 0.77‡ | 26.7 ± 0.88† | 26.2 ± 0.59 |
| Amplitude (μV) | | | | | | |
| b-wave | 57.8 ± 6.77 | 54.5 ± 9.51 | 47.8 ± 9.96 | 54.5 ± 15.36 | 61.1 ± 8.57 | 61.5 ± 6.55 |

Data are expressed as the mean ± SD of six animals.

1) Recorded 24 hours after dosing of physiological saline.

† p<0.05, ‡ p<0.01; significantly different in comparison with the vehicle-control value by the paired *t*-test

第 2 章 a-wave analysis : 一次ニューロン (視細胞) の評価

1. 序論

網膜の一次ニューロンである視細胞は、その外節に存在する視物質にて光子を吸収し、結果として自らの膜電位を変化させる光受容体である。視物質による光子の吸収から膜電位の変化に至るまでの過程は光情報変換 (Fig. 7) と呼ばれ、これまで多くの研究者によって調べられてきた。この光情報変換の結果である視細胞の膜電位の変化は、ERG では光刺激の後の最初の陰性波である a 波 (Fig. 4) に最も反映されることがよく知られる。そのため、一般的に ERG の a 波は視細胞機能の指標とされる。

第 1 章では、カニクイザルでの standard full-field ERGs 記録によって薬剤による杆体経路あるいは錐体経路への選択的な作用が検出可能であることを示した。しかし、standard full-field ERGs の結果が視細胞への作用を示唆するものであった際に、その作用をより詳細に調べるためには、視細胞の機能評価に焦点を当てた別の手法が必要となる。すなわち、standard full-field ERGs に視細胞杆体の機能を直接反映する波形成分は含まれず、また、一般的に視細胞錐体の機能の指標とされる standard full-field ERGs における明順応下 ERG の a 波には、錐体の反応に加えて錐体 OFF 経路 (OFF 型双極細胞及び水平細胞) の反応も多分に含まれることが報告されているからである^(5, 23)。

一方、Hood ら^(24, 27)はヒトの患者で視細胞杆体の機能を正確かつ詳細に把握するため、ERG の a 波の初期部分を杆体の光情報変換に由来する数式モデルにフィッティングし、得られたモデルパラメータから光情報変換過程を含めて杆体機能を評価する手法を考案した (a-wave analysis)。さらに錐体についても同様に、Hood らによって上記の杆体機能評価法と類似の方法が確立されている⁽²⁶⁾。これらの方法をカニクイザルでの安全性試験に応用することで、薬剤による視細胞機能への作用を詳細に評価できるようになると期待される。

一方、選択的 5 型ホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase type 5: PDE5) 阻害剤であり勃

起不全及び肺動脈性肺高血圧症の治療薬として用いられているシルデナフィルは、患者に一過性の視覚障害を誘発することが知られている⁽³³⁾。シルデナフィルは 6 型ホスホジエステラーゼ (PDE type 6: PDE6) に対する阻害作用も有し⁽⁷⁷⁾、この PDE6 は視細胞外節における光情報変換の重要な酵素の一つである。そのため、上記の視覚障害はシルデナフィルによる視細胞の PDE6 阻害と関連したものと考えられている⁽³³⁾。また、ヒトで可逆的な視覚障害を誘発することが知られるジゴキシンを含むジギタリスは、視細胞内節の $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ の活性を阻害する⁽⁴⁾。この視細胞の $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ は、細胞内に K^+ を汲み入れることで視細胞の光応答に重要な役割を果たすことから、上記の視覚障害はジゴキシンによる視細胞の $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ 阻害と関連したものと考えられている⁽³⁹⁾。

そこで本研究では、非臨床安全性試験に一般的に用いられる動物種であるカニクイザルを用いて、Hood らの方法⁽²⁸⁾を参考に a-wave analysis の評価条件を設定した。また、同 a-wave analysis にて、前述のシルデナフィル及びジゴキシンによる視細胞への作用を反映した変化が検出可能か検証した。

2. 実験材料及び実験方法

本実験は、第一三共株式会社の動物実験委員会の承認（動物実験承認番号：A1200207 及び C800264）を得て実施した。

2.1. 動物

一般状態及び眼底に異常のない雌雄各 12 例、計 24 例のベトナム産あるいはインドネシア産のカニクイザル（3–5 歳齢、体重 2.6–5.1 kg）を用いた。予備検討を行った結果、ERG パラメータについてはカニクイザルの産地による明らかな差が認められなかった。そのうち、雌雄各 8 例、計 16 例をシルデナフィル投与実験に用い、別の雌雄各 4 例、計 8 例をジゴキシン投与実験に用いた。シルデナフィル投与実験では、各 4 例を媒体対照群（3–4 歳

齢、体重 2.5–3.4 kg)、シルデナフィル 1 mg/kg 群 (4 歳齢、体重 2.6–3.0 kg)、シルデナフィル 3 mg/kg 群 (4–5 歳齢、体重 2.6–3.4 kg)、及びシルデナフィル 10 mg/kg 群 (3–4 歳齢、体重 2.6–3.2 kg) にそれぞれ振り分けた。ジゴキシン投与実験では、各 4 例を媒体対照群 (4–5 歳齢、体重 2.6–4.6 kg) 及びジゴキシン群 (3–5 歳齢、体重 2.6–5.1 kg) にそれぞれ振り分けた。動物は 1 章と同様に飼育した。

2.2. 投与

視細胞の機能に可逆的な影響を及ぼすことが知られている薬剤として、シルデナフィル及びジゴキシンを選択した。

シルデナフィル (Sildenafil citrate salt; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) は生理食塩液に溶解させた後、孔径 0.2 μm のシリンジフィルター (Minisart; Sartorius stedim biotech, Gottingen, Germany) を用いてろ過滅菌して投与液を調製した。投与液は、各 4 例からなる媒体対照群、シルデナフィル 1、3 及び 10 mg/kg 群に、それぞれ 0、1、3 及び 10 mg/kg の用量にて単回静脈内投与 (0.2 mL/kg/min \times 10 min) した。投与用量は、ヒトの臨床と同程度の曝露を見込める用量として 1 mg/kg を設定した。投与は、シリンジポンプ (22; Harvard Apparatus, Inc.) を用いて伏在静脈から行った。

ジゴキシン群の 4 例には、第 1 章と同様にジゴキシンを 0.1 mg/kg の用量にて単回静脈内投与し、媒体対照群の 4 例には生理食塩液を同様に投与した。

2.3. ERG

2.3.1. 前処置

動物は、第 1 章と同様に塩酸ケタミン (導入 : 10 mg/kg、維持 : 5-10 mg/kg/h) 及びキシラジン塩酸塩 0.6 mg/kg の筋肉内投与により麻酔した。瞳孔はトロピカミド及びフェニレフリン塩酸塩の点眼により散瞳させた。角膜は塩酸オキシブプロカインの点眼により麻酔した後、ヒドロキシエチルセルロースの点眼により保護した。

2.3.2. 光刺激

ERG の誘発には発光ダイオード (light-emitting diode: LED) 及びキセノンランプの両光源を内蔵した全視野刺激装置 (BigShotGanzfeld; LKC technologies, Inc.) を使用した。本実験では、キセノンランプ光源のみを使用した。キセノンランプによる光刺激の最大強度 (実測値) は $826.7 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ であり、刺激条件は刺激制御用 PC にインストールされたソフトウェア (Ganzfeld control panel; LKC technologies, Inc.) にて制御した。光刺激強度の単位は、Hood らの報告^(24, 26)に一致させて網膜照度 (troland : td) にて表し、暗所視輝度は「scot td」、明所視輝度は「phot td」とそれぞれ表記した。

2.3.3. 記録及び解析

Hood らの報告^(24, 26, 27)を参考に、a-wave analysis (ERG の記録、減算、及びフィッティング) を以下のように実施した。

記録電極として双極型コンタクトレンズ電極 (H6515NFC; 有限会社メイヨー) を左眼に、接地電極として針電極 (TN208-016; 株式会社ユニークメディカル) を頭頂部の皮下にそれぞれ設置した。40 分以上の暗順応後、3.7、4.0、及び 4.3 log scot td-s の強度の光刺激に対する ERG である混合応答 (combined rod-cone response) を順次誘発した。なお、杆体の暗順応を維持するため、光刺激の間隔は 30 秒間以上設けた。その後、paired-flash technique を用いて混合応答と同一強度の一連の光刺激 (3.4、3.7、及び 4.0 log phot td-s) にて錐体系応答 (cone response) を誘発した。paired-flash technique による錐体系応答の記録は Friedburg ら⁽¹⁶⁾ 及び Jeffrey ら⁽³⁰⁾の報告を参考に、暗順応下にて 4.0 log scot td-s の強度の conditioning flash を発光させ、その 0.5 秒後に任意の強度の光刺激にて誘発した。なお、予試験にて 4.0 log scot td-s の 1 対の光刺激を様々な刺激間隔にて実施して 1 対のうちの 2 回目の光刺激に対する a 波の変化を調べた結果 (Fig. 8) から、カニクイザルでは 4.0 log scot td-s の光刺激の 0.3–0.7 秒後に誘発される応答は錐体に由来する応答 (錐体系応答) と判断した。以上の応答は、

シルデナフィル投与実験では投与前、投与直後及び投与 24 時間後に、ジゴキシン投与実験では投与前、投与 24 時間及び 1 ヶ月後にそれぞれ記録した。

すべての応答は 0.5–1000 Hz の帯域フィルターを通して増幅した後に、誘発電位検査装置 (MEB-9104 ; 日本光電株式会社) に記録した。同一強度の光刺激に対する応答を、混合応答では 3 波形、錐体系応答では 6 波形記録し、それらの加算平均波形を算出した。錐体系応答を同一強度の光刺激にて誘発された混合応答から減算し、杆体系応答 (rod-isolated response) を求めた。Rod-isolated response の算出の概要を Fig. 9 に示す。

杆体系応答の a 波の初期部分 (Rod a-wave) に、Lamb 及び Pugh の杆体光情報伝達モデル⁽³²⁾の Hood 及び Birch による改変モデル⁽²⁴⁾である式 (1) をフィッティングした。つまり、実波形 (Rod a-wave) と式 (1) で表される推定波形の残差二乗和が最少となった際のモデルパラメータ (後述) を求めた。

$$R(I, t) = \{1 - \exp[-I \cdot S \cdot (t - t_d)^2]\} \cdot R_{\max} \quad (t > t_d) \quad (1)$$

R は振幅 (μV)、 I は光刺激強度 (log scot td-s)、 S は感度 ($\text{s}^{-2}(\text{td-s})^{-1}$)、 R_{\max} は最大振幅 (μV)、 t は光刺激後時間 (ms)、 t_d は光刺激後の短時間の遅れ (ms) をそれぞれ表す。 t_d は健常なカニクイザル 20 例の平均値であった 3.1 ms に固定し、推定対象のモデルパラメータは S 及び R_{\max} の二者とした。

錐体系応答の a 波の初期部分 (Cone a-wave) には、前述の式 (1) に low-pass exponential filter を組み込んだモデルをミカエリスメンテン式で表した式 (2)⁽²⁶⁾ を杆体系応答と同様にフィッティングした。

$$R(I, t) = \left\{ \frac{I \cdot S \cdot (t - t_d)^3}{I \cdot S (t - t_d)^3 + 1} \right\} \cdot R_{\max} \quad (t > t_d) \quad (2)$$

R は振幅 (μV)、 I は光刺激強度 (log phot td-s)、 S は感度 ($\text{s}^{-3}(\text{td-s})^{-1}$)、 R_{\max} は最大振幅 (μV)、 t は光刺激後時間 (ms)、 t_d は光刺激後の短時間の遅れ (ms) をそれぞれ表す。 t_d は健常なカニクイザル 20 例の平均値であった 1.8 ms に固定し、推定対象のモデルパラメータは S 及び

R_{max} の二者とした。

2.4. 眼底検査

ERGの各評価ポイントにて、ERG記録終了直後に双眼倒像検眼鏡（HEINE OMEGA 500; HEINE Optotechnik GmbH & Co. KG）を用いて両眼の眼底を観察した。

2.5. トキシコキネティクス

本実験におけるERGの変化と血中シルデナフィル濃度の関係を調べることに、及び本実験のカニクイザルでのシルデナフィルの曝露をヒトと比較することを目的として、トキシコキネティクス（toxicokinetics: TK）解析を行った。シルデナフィルの投与後にERGを記録した際、血液約0.5 mLを大腿静脈から採取した。さらに、シルデナフィル投与後にERGを記録してから2週間以上経過した後、シルデナフィル1、3、及び10 mg/kg群の計12例にシルデナフィルを再度同様に投与し、投与前、投与開始10及び30分後、2、4、7、及び24時間後に、同様に採血した。血液を11,200 g及び4°Cにて5分間遠心して得られた血漿は、高速液体クロマトグラフィーによる血漿中シルデナフィル濃度測定に用いた。TKパラメータとして無限大時間までの血中濃度-時間曲線下面積（area under the concentration-time curve up to infinity: AUC_{0-inf} ）を算出した。

また、本実験のカニクイザルでのジゴキシンの曝露をヒトと比較することを目的として、TK解析を行った。ジゴキシンの投与1ヵ月後のERGを記録してから10日間以上経過した後、ジゴキシンの群の4例にジゴキシンを再度同様に投与した。投与前、投与開始20及び40分後、1、2、4、7、24、48、及び72時間後に、血液約0.6 mLを大腿静脈から採取した。血液を20分間室温にて静置した後に1,200 gにて10分間遠心して得られた血清は、酵素免疫法（Emit 2000 Digoxin Assay; Dade Behring Inc., Cupertino, CA, USA）による血清中ジゴキシンの濃度測定に用いた。TKパラメータとして AUC_{0-inf} を算出した。

2.6. 統計学的解析

投与前後におけるシルデナフィル群の各モデルパラメータは平均値±標準偏差（SD）で表し、パラメトリック Dunnett 検定を用いて媒体対照群と比較した。ジゴキシン投与後の各モデルパラメータは平均値±標準偏差（SD）で表し、対応のある t 検定を用いて投与前値と、対応のない t 検定を用いて媒体対照群とそれぞれ比較した。P<0.05 をもって統計学的に有意な変化と判断した。

3. 実験結果

3.1. シルデナフィル

3.1.1. ERG

Rod a-wave 及び Cone a-wave における波形変化の代表例を、それぞれ Fig. 10 及び Fig. 11 に示す。また、解析した各モデルパラメータを Tab. 3 に示す。

投与直後に、Rod a-wave では 10 mg/kg 投与で、Cone a-wave では 3 及び 10 mg/kg 投与で傾きの減少が観察された。これらの波形変化は、投与 24 時間後には投与前と同程度まで回復した。

フィッティングの結果、推定波形の実波形からの顕著な逸脱はいずれの動物でも認められず、前節（材料及び方法）にて述べた条件にて良好なフィッティングが得られたことが確認された。Rod a-wave では S の減少が認められ、投与直後におけるシルデナフィル 10 mg/kg 群の S は媒体対照群と比較して有意な低値（P<0.01）を示した。Cone a-wave では投与用量と関連した S の減少が認められた。媒体対照群と比較して、投与直後におけるシルデナフィル 3 及び 10 mg/kg 群の S は有意な低値（ともに P<0.01）であった。投与 24 時間後では、媒体対照群とシルデナフィル群の間に明らかな S の差は認められなかった。一方、 R_{max} には明らかな変化は認められなかった。上記の ERG の変化に、明らかな雌雄差は観察されなかった。

3.1.2. 眼底検査

いずれの観察ポイントにおいても、眼底に明らかな異常は認められなかった。

3.1.3. トキシコキネティクス

シルデナフィル投与後の血漿中シルデナフィル濃度及び TK パラメータを Tab. 4 に示す。

シルデナフィル投与直後の ERG 記録時（投与開始後 42-51 分）の血漿中シルデナフィル濃度は、1、3、及び 10 mg/kg 群でそれぞれ 378 ± 82.9 、 1190 ± 181 、及び 3610 ± 639 ng/mL であった。シルデナフィル投与 24 時間後の ERG 記録時（投与開始後 24 時間 34-56 分）の血漿中シルデナフィル濃度は、1 及び 3 mg/kg 群では全例で検出限界（1 ng/mL）を下回っており、10 mg/kg 群では 1.54 ± 1.09 ng/mL であった。また、シルデナフィルの単回投与後の AUC_{0-inf} は、1、3、及び 10 mg/kg 群でそれぞれ 1000 ± 121 、 4250 ± 748 、及び 12900 ± 2020 ng·h/mL であった。

3.2. ジゴキシシン

3.2.1. ERG

Rod a-wave 及び Cone a-wave における波形変化の代表例を、それぞれ Fig. 12 及び Fig. 13 に示す。また、解析した各モデルパラメータを Tab. 5 に示す。

Rod a-wave には、投与後に明らかな変化は認められなかった。一方、Cone a-wave は投与 24 時間後に顕著な減弱を示した。フィッティングの結果、推定波形の実波形からの顕著な逸脱はいずれの動物でも認められず、前節（材料及び方法）にて述べた条件にて良好なフィッティングが得られたことが確認された。Cone a-wave では R_{max} の減少が認められた。ジゴキシシン群の投与 24 時間後の R_{max} は、投与前値（ $P < 0.01$ ）及び媒体対照群（ $P < 0.05$ ）と比較して有意な低値であった。投与 1 ヶ月後のジゴキシシン群の R_{max} には、投与前値あるいは媒体対照群との明らかな差は認められなかった。一方、Cone a-wave の S には統計学的有意差は検出されなかった。また、Rod a-wave では S あるいは R_{max} のいずれにも明らかな変化

は認められなかった。上記の ERG の変化に、明らかな雌雄差は観察されなかった。

3.2.2. 眼底検査

いずれの観察ポイントにおいても、眼底に明らかな異常は認められなかった。

3.2.3. トキシコキネティクス

ジゴキシン投与後の血清中ジゴキシン濃度及び TK パラメータを Tab. 6 に示す。

ジゴキシンの単回投与後の AUC_{0-inf} は 334.4 ± 65.43 ng·h/mL であった。

4. 考察

Hood らの考案した a-wave analysis⁽²⁷⁾では、杆体あるいは錐体に由来する ERG の a 波初期部分に数式モデルをそれぞれフィッティングすることで、杆体あるいは錐体の機能に関するモデルパラメータである S (感度パラメータ) 及び R_{max} (最大振幅パラメータ) がそれぞれ求められる。 S は視細胞外節における光情報変換の過程を反映すると考えられている。一方、 R_{max} は各視細胞の最大反応の総和を意味するとされる。

Hood ら⁽²⁷⁾によると、 S の減少からは、主として視細胞外節での光情報変換の異常が示唆される。例えば、網膜中心静脈閉塞症等の視細胞が低酸素となる病態のヒトの患者では、 R_{max} の変化を伴わずに S が選択的に減少することが報告されている⁽³¹⁾。これは、低酸素によって起きる代謝性アシドーシスにより、視細胞外節での光情報変換が二次的に影響を受けているものと推察されている。

一方、 R_{max} の減少は、主として視細胞の数的減少又は視細胞外節の短小化等の視細胞の器質的な病理変化を示唆するものと考えられている⁽²⁷⁾。例えば、視細胞の変性疾患である網膜色素変性症の患者では、 S と比較すると R_{max} が顕著に減少する⁽⁶⁸⁾。また、a-wave analysis にてフィッティングに用いる ERG を背景光の存在下で記録すると、 S は変化せずに R_{max} が

選択的に減少することが知られる⁽²⁷⁾。この変化の原因が視細胞の器質的変化ではないことは明らかである。これは、背景光によって視細胞外節の環状グアノシンリン酸 (cyclic guanosine monophosphate: cGMP) 依存性 Na⁺チャネルの開口が減少し、それにより各視細胞において暗時に細胞外液を内節から外節に向かって流れる電流である暗電流が一時的に減少した結果 (膜電位の過分極による光応答の圧縮) であると推察されている^(25, 27)。

本実験のサルにおけるシルデナフィル単回投与後の AUC_{0-inf} は 1、3、及び 10 mg/kg 群でそれぞれ 1000 ± 121、4250 ± 748、及び 12900 ± 2020 ng·h/mL であった。一方、健常人に臨床用量 (50 mg) のシルデナフィルを単回経口投与した際の血漿中シルデナフィルの AUC_{0-inf} が 700 ng·h/mL であったことが報告されている⁽⁷⁶⁾。そのため、臨床用量 (50 mg/men) の投与を受けたヒトと比較して、本実験のサルでのシルデナフィルの全身曝露は、1 mg/kg 群では同程度、3 及び 10 mg/kg 群ではそれぞれ約 6 及び 18 倍であり大きく上回っていたと考えた。

勃起不全及び肺動脈性肺高血圧症の治療薬として用いられているシルデナフィルは、患者に一過性の視覚障害を誘発することが知られている⁽³³⁾。またシルデナフィルは、視細胞外節における光情報変換の重要な酵素の一つである PDE6 に対する阻害作用を有する⁽⁷⁷⁾。そのため、上記の視覚障害はシルデナフィルによる視細胞の PDE6 阻害と関連したものと一般的に考えられている⁽³³⁾。これらのことから、a-wave analysis によって検出されるシルデナフィルによる視細胞機能の変化としては、光情報変換の過程を反映する感度パラメータ (*S*) の選択的な減少が予想される。

本実験の結果、シルデナフィル投与直後に *S* の減少が認められ、Cone a-wave では 3 mg/kg 以上の投与群で、Rod a-wave では 10 mg/kg 投与群で減少した。一方、最大振幅パラメータである *R_{max}* には Rod a-wave あるいは Cone a-wave のいずれにも明らかな変化は認められず、本実験で観察されたモデルパラメータの変化は *S* に選択的であった。また、血漿中シルデナフィル濃度が検出限界以下まで低下した投与 24 時間後における *S* は投与前値及び媒体対

照群と同程度であったことから、 S の減少がシルデナフィルの血漿中濃度と関連しかつ可逆的であることが示された。さらに、本実験にて S が Rod a-wave よりも Cone a-wave でより低用量から変化したことから、シルデナフィルが杆体と比較して錐体の機能をより強く障害することが示唆された。このことは、精製した視細胞由来の PDE6 に対するシルデナフィルの阻害活性を調べたところ錐体が杆体よりもより低濃度から阻害を受けたとする *in vitro* 実験の報告⁽⁷⁷⁾からも支持される。以上より、本実験にて検出された感度パラメータ S の選択的かつ可逆的な減少は、シルデナフィルによる視細胞の PDE6 阻害作用を反映した変化と考えた。

本実験のサルにおけるジゴキシン単回投与後の AUC_{0-inf} は 334.4 ± 65.43 ng·h/mL であった。一方、健常人に臨床用量 (0.25 mg/men/day) のジゴキシンを反復経口投与したところ、定常状態における投与間隔 (24 時間) 毎の血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC during dosing interval at steady state: $AUC_{tau, ss}$) の平均値が 15.4 ng·h/mL であったことが報告されている⁽¹⁷⁾。そのため、本実験でのジゴキシンの AUC は、臨床用量の投与を受けたヒトの約 22 倍であったと考えた。

ヒトで視覚障害を誘発するジギタリスが、視細胞内節の $Na^+ - K^+ ATPase$ の活性を阻害することは古くから知られている⁽⁴⁾。また、視細胞の $Na^+ - K^+ ATPase$ は、細胞内に K^+ を汲み入れることで暗電流の発生に重要な役割を果たす。Madreperla らは、単離したトラフサンショウウオの視細胞における光応答がジゴキシンの濃度依存的に減弱し、その減弱は杆体と比較して錐体で顕著であったことを報告した⁽³⁹⁾。この現象を Madreperla らは、ジゴキシンが視細胞、特に錐体の $Na^+ - K^+ ATPase$ 活性を強く阻害することで暗電流が減少し、その結果として錐体優位な視細胞の機能障害が誘発されていると考えた。この解釈に従うと、ジゴキシンによる視細胞内節の $Na^+ - K^+ ATPase$ 阻害は、暗電流を減少させるが外節での光情報変換の過程には特に影響を及ぼさないという点で、前述の背景光による cGMP 依存性 Na^+ チャネルの開口減少と類似している。また、前述のように *in vitro* にて確認されているジゴキシンによる視細胞の抑制は錐体に顕著なものである。これらのことから、a-wave analysis によって

検出されるジゴキシンによる視細胞機能の変化としては、Cone a-wave における最大振幅パラメータ (R_{max}) の顕著な減少が予想される。

本実験の結果は上記の仮説と一致するものであり、Rod a-wave における S 及び R_{max} 、Cone a-wave における S 及び R_{max} の4つのモデルパラメータのなかで、ジゴキシンの投与後に Cone a-wave における R_{max} のみが明らかな減少を示した。この変化は回復したため、その原因が視細胞の器質の変化にあるとは考え難い。以上より、本実験にて検出された Cone a-wave における可逆的な R_{max} の減少は、ジゴキシンによる視細胞の Na^+ - K^+ ATPase 阻害作用を反映した変化と考えた。

5. 小括

シルデナフィル及びジゴキシンをそれぞれ投与したカニクイザルで a-wave analysis を実施した。その結果、それぞれ感度パラメータ S 及び最大振幅パラメータ R_{max} の選択的な減少が検出された。この S 及び R_{max} の変化は、それぞれシルデナフィルによる視細胞外節の PDE6 阻害作用及びジゴキシンによる視細胞内節の Na^+ - K^+ ATPase 阻害作用から予想されるモデルパラメータの変化と一致するものであった。以上より、カニクイザルでの a-wave analysis によって、シルデナフィル及びジゴキシンによる一次ニューロン（視細胞）の機能に対する既知の作用を反映する変化を検出することが可能であることが示された。

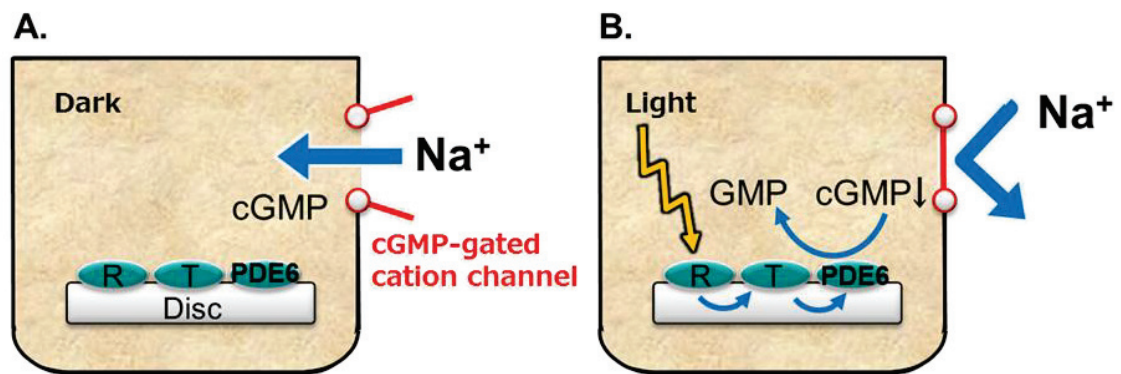


FIGURE 7. A schematic representation of the phototransduction cascade at the outer segment of the rod photoreceptors. (A) In the dark, cGMP-gated cation channel is open. (B) Light transduces the visual pigment via the following enzyme cascade: photons - rhodopsin - transducin - phosphodiesterase type 6 - closes a membrane bound cGMP-gated cation channel. Abbreviations: R, rhodopsin; T, transducin; PDE6, phosphodiesterase type 6.

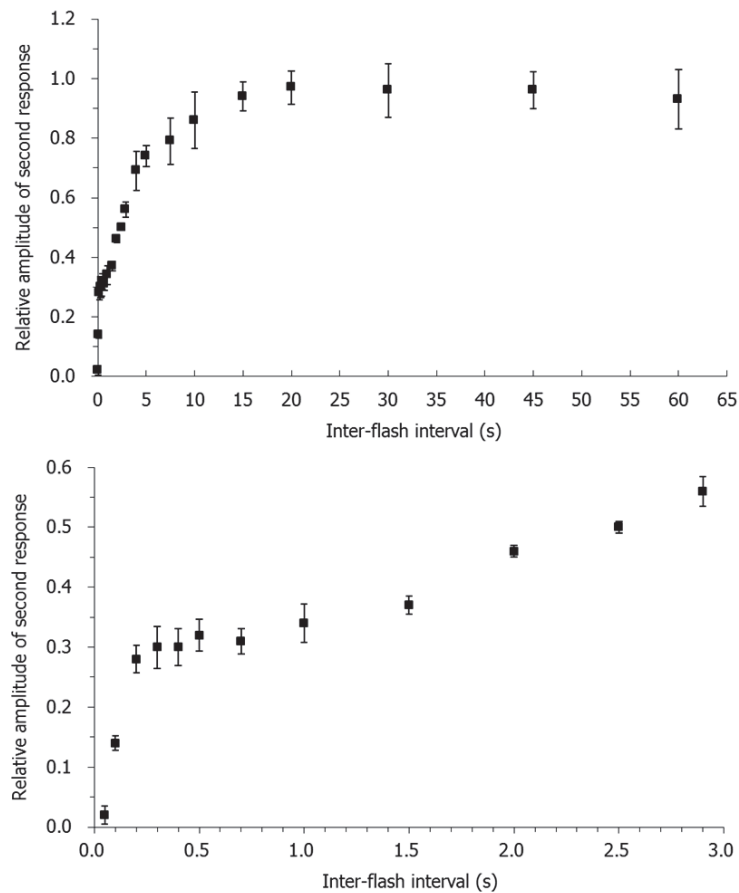


FIGURE 8. Recovery of the response amplitude for the second stimulation in a pair of bright flashes in cynomolgus monkeys. Pairs of identical white bright flashes of 4.0 log scot td-s were delivered at a range of inter-flash intervals. Symbols plot the response amplitude of the a-wave for the second flash, as a fraction of the response amplitude of the a-wave for single flashes under fully dark-adapted conditions at a measurement time of 8.0 ms. Each symbol represents the mean \pm SD of three animals. The lower panel shows the same results as the upper panel, but on a faster time scale and an enlarged vertical scale. One component of the response recovered rapidly, reaching a plateau of approximately 30% of the maximal ‘rod + cone’ level about 0.3 s, and it was interpreted that this reflected recovery of the ‘cone’ component of the ERG. A second component of recovery began subsequently (after 1.0-1.5 s), and reached the final level after 15-20 s for flashes delivered in darkness, and it was interpreted that this reflected recovery of the ‘rod’ component of the ERG.

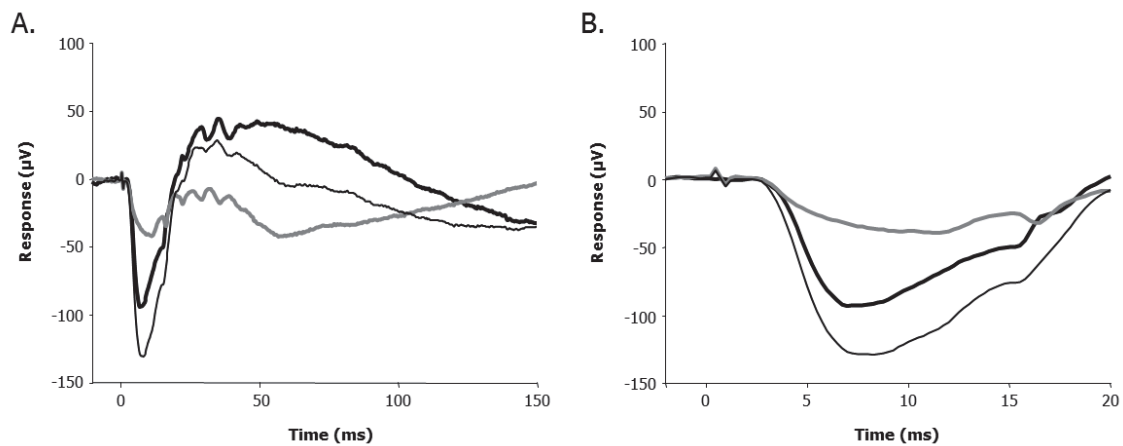


FIGURE 9. The schema of obtaining the rod-isolated response in cynomolgus monkeys. (A) Combined rod-cone responses (thin black line) were elicited by white bright flashes in fully dark-adapted state. Thereafter, cone responses (thick gray line) were elicited by flashes of the same intensity presented 0.5 s after a rod-saturating conditioning flash at 4.0 log scot td-s. The difference between these two responses is the rod-isolated response (thick black line). The traces represent the responses elicited by light flashes at 4.3 log scot td-s from one representative animal. (B) The first 20 ms of the records in panel A is shown. The traces of the combined rod-cone response and the cone response represent averages of three and six responses, respectively.

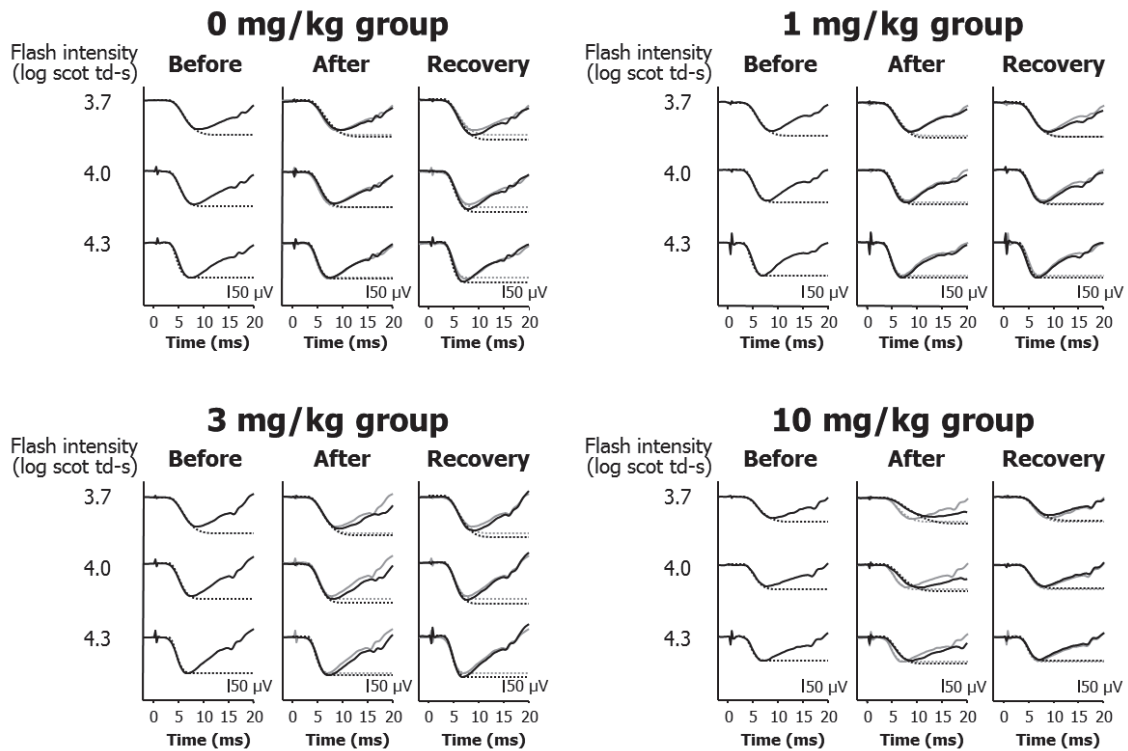


FIGURE 10. Typical waveforms of the rod a-wave in vehicle- and sildenafil-treated cynomolgus monkeys. The solid curves in each panel represent the rod a-waves, which were derived by subtracting cone responses from combined rod-cone responses as described in the text. The dotted lines are the curves fit from the equation (1). The responses obtained before dosing (gray trace) are superimposed on those obtained after dosing (black trace) in the middle (After, immediately after) and right (Recovery, 24 hours after) panels.

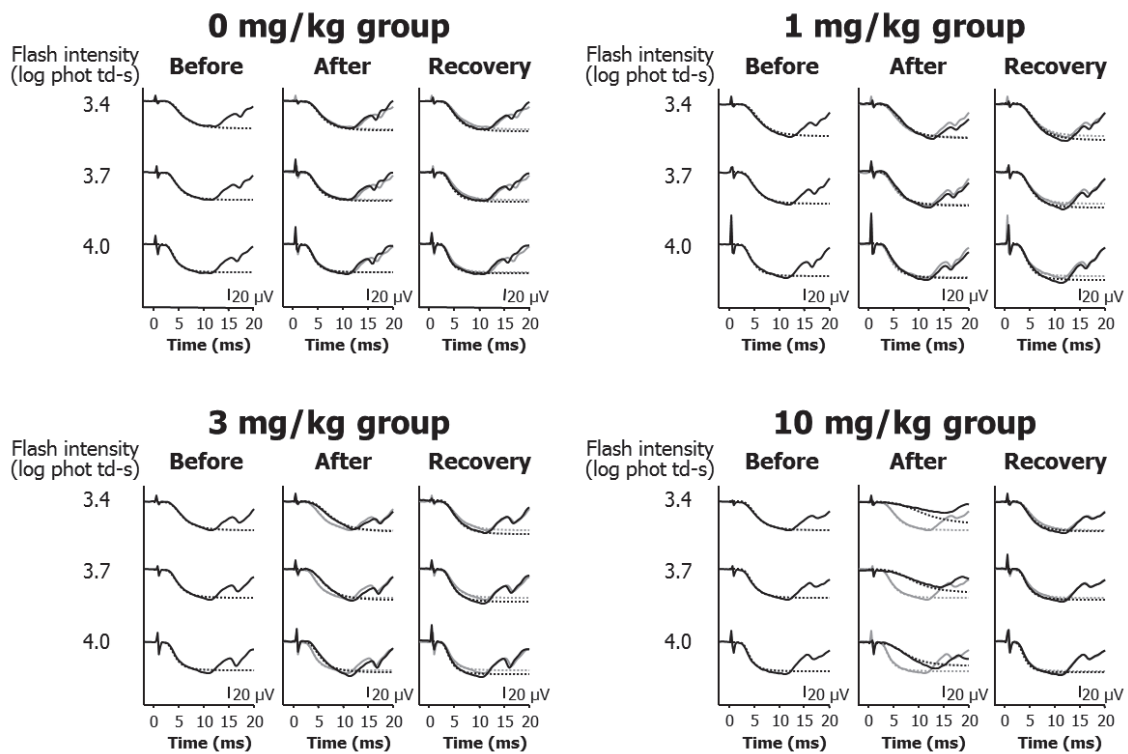


FIGURE 11. Typical waveforms of the cone a-wave in vehicle- and sildenafil-treated cynomolgus monkeys. The solid curves in each panel represent the cone a-waves, which were derived by means of the paired-flash technique as described in the text. Each trace represents the average of six responses. The dotted lines are the curves fit from the equation (2). The responses obtained before dosing (gray trace) are superimposed on those obtained after dosing (black trace) in the middle (After, immediately after) and right (Recovery, 24 hours after) panels.

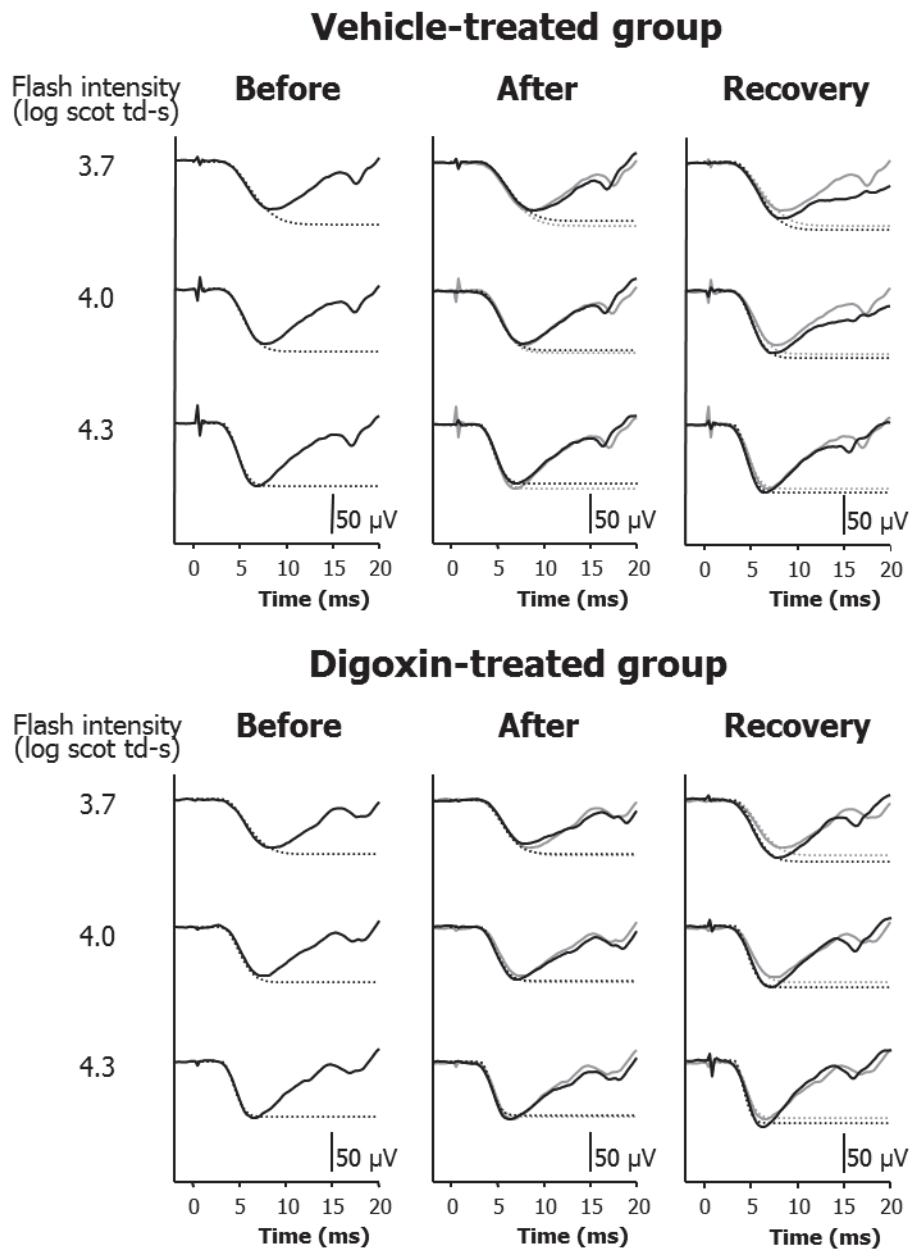


FIGURE 12. Typical waveforms of the rod a-wave in vehicle- and digoxin-treated cynomolgus monkeys. The solid curves in each panel represent the rod a-waves, which were derived by subtracting cone responses from combined rod-cone responses as described in the text. The dotted lines are the curves fit from the equation (1). The responses obtained before dosing (gray trace) are superimposed on those obtained after dosing (black trace) in the middle (After, 24 hours after) and right (Recovery, one month after) panels.

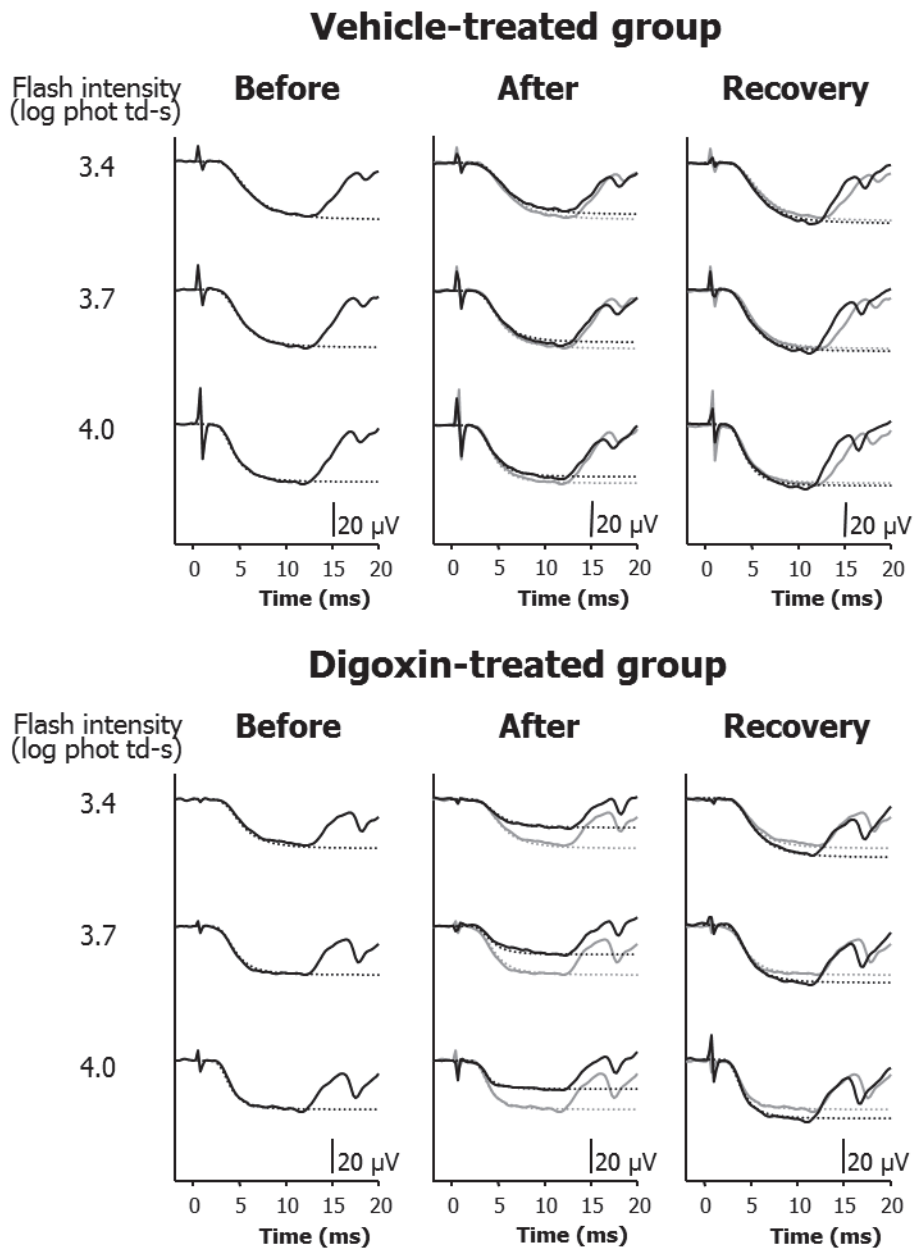


FIGURE 13. Typical waveforms of the cone a-wave in vehicle- and digoxin-treated cynomolgus monkeys. The solid curves in each panel represent the cone a-waves, which were derived by means of the paired-flash technique as described in the text. Each trace represents the average of six responses. The dotted lines are the curves fit from the equation (2). The responses obtained before dosing (gray trace) are superimposed on those obtained after dosing (black trace) in the middle (After, 24 hours after) and right (Recovery, one month after) panels.

TABLE 3. Effects of Sildenafil on the A-wave Analysis Parameters in Cynomolgus Monkeys

| | Dose (mg/kg) | Before | After ¹⁾ | Recovery ²⁾ |
|---------------------------------|-----------------|--------------|---------------------|------------------------|
| Rod a-wave | | | | |
| Log S ($s^{-2}(td-s)^{-1}$) | 0 | 1.15 ± 0.086 | 1.12 ± 0.108 | 1.20 ± 0.038 |
| | 1 | 1.17 ± 0.141 | 1.14 ± 0.152 | 1.12 ± 0.113 |
| | 3 | 1.22 ± 0.078 | 1.15 ± 0.073 | 1.21 ± 0.074 |
| | 10 | 1.12 ± 0.057 | 0.77 ± 0.167 ** | 1.13 ± 0.116 |
| Log R_{max} (μV) | 0 | 2.07 ± 0.222 | 2.10 ± 0.189 | 2.11 ± 0.190 |
| | 1 | 2.06 ± 0.040 | 2.12 ± 0.068 | 2.11 ± 0.081 |
| | 3 | 2.11 ± 0.065 | 2.14 ± 0.059 | 2.13 ± 0.084 |
| | 10 | 2.04 ± 0.047 | 2.08 ± 0.034 | 2.06 ± 0.093 |
| Cone a-wave | | | | |
| Log S ($s^{-3}(td-s)^{-1}$) | 0 | 3.81 ± 0.120 | 3.77 ± 0.113 | 3.77 ± 0.137 |
| | 1 | 3.79 ± 0.101 | 3.56 ± 0.091 | 3.70 ± 0.107 |
| | 3 | 3.80 ± 0.044 | 3.12 ± 0.166 ** | 3.83 ± 0.062 |
| | 10 | 3.84 ± 0.084 | 2.56 ± 0.083 ** | 3.92 ± 0.085 |
| Log R_{max} (μV) | 0 | 1.72 ± 0.181 | 1.75 ± 0.140 | 1.76 ± 0.144 |
| | 1 | 1.74 ± 0.050 | 1.80 ± 0.044 | 1.79 ± 0.046 |
| | 3 | 1.75 ± 0.048 | 1.84 ± 0.102 | 1.77 ± 0.033 |
| | 10 | 1.68 ± 0.101 | 1.71 ± 0.121 | 1.68 ± 0.130 |

Data are expressed as the mean ± SD of four animals.

1) Recorded immediately after dosing.

2) Recorded 24 hours after dosing.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; significantly different in comparison with the vehicle-treated group by the Dunnett's test.

TABLE 4. Plasma Sildenafil Concentrations and Toxicokinetic Parameters After Sildenafil Dosing

| Dose (mg/kg) | Plasma Concentration (ng/mL) | | | | | | | AUC _{0-inf} (ng·h/mL) | C _{max} (ng/mL) | t _{1/2} (h) |
|-----------------|---|----------------|--------------|---------------|---------------|----------------|------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| | Time After the Start of 10-min Infusion | | | | | | | | | |
| | Pre | 10 min | 30 min | 2 h | 4 h | 7 h | 24 h | | | |
| 1 | NC* | 1070 ±66.8 | 515 ±90.4 | 57.5 ±18.7 | 10.7 ±5.03 | 1.16 ±0.836 | NC* | 1000 ±114 | 1070 ±66.8 | 0.835 ±0.211 |
| 3 | NC* | 5610 ±1670 | 1630 ±558 | 188 ±59.3 | 21.2 ±3.07 | 2.46 ±0.557 | NC* | 4250 ±748 | 5610 ±1670 | 0.785 ±0.0860 |
| 10 | NC* | 15600 ±2610 | 5880 ±955 | 634 ±276 | 86.6 ±81.0 | 11.3 ±5.83 | NC* | 12900 ±2020 | 15600 ±2610 | 2.65 ±2.09 |

Data are expressed as the mean ± SD of four animals.

NC, Not calculated.

* Individual values were below the lower limit of quantitation (1 ng/mL).

TABLE 5. Effects of Digoxin on the A-wave Analysis Parameters in Cynomolgus Monkeys

| | Vehicle-Treated Group | | | Digoxin-Treated Group | | |
|--|-----------------------|---------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------------|------------------------|
| | Before | After ¹⁾ | Recovery ²⁾ | Before | After ¹⁾ | Recovery ²⁾ |
| Rod a-wave | | | | | | |
| Log S ($s^{-2}(\text{td-s})^{-1}$) | 1.14 ± 0.195 | 1.11 ± 0.138 | 1.20 ± 0.113 | 1.18 ± 0.095 | 1.08 ± 0.176 | 1.32 ± 0.131 |
| Log R_{max} (μV) | 2.00 ± 0.153 | 2.00 ± 0.161 | 2.03 ± 0.097 | 1.97 ± 0.137 | 2.00 ± 0.158 | 2.03 ± 0.111 |
| Cone a-wave | | | | | | |
| Log S ($s^{-3}(\text{td-s})^{-1}$) | 3.74 ± 0.114 | 3.75 ± 0.108 | 3.85 ± 0.098 | 3.88 ± 0.120 | 3.86 ± 0.228 | 3.90 ± 0.222 |
| Log R_{max} (μV) | 1.63 ± 0.099 | 1.62 ± 0.122 | 1.66 ± 0.099 | 1.63 ± 0.124 | 1.39 ± 0.130 ^{**†} | 1.69 ± 0.124 |

Data are expressed as the mean ± SD of four animals.

1) Recorded 24 hours after dosing.

2) Recorded one month after dosing.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; significantly different in comparison with the baseline value by the paired t -test.

† $P < 0.05$, ‡ $P < 0.01$; significantly different in comparison with the vehicle-treated group by the Student's t -test.

TABLE 6. Serum Digoxin Concentrations and Toxicokinetic Parameters After Digoxin Dosing

| Dose (mg/kg) | Serum Concentration (ng/mL) | | | | | | | | | | AUC _{0-inf} (ng·h/mL) | C _{max} (ng/mL) | t _{1/2} (h) |
|-----------------|---|-----------------|-----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| | Time After the Start of 40-min Infusion | | | | | | | | | | | | |
| | Pre | 20 min | 40 min | 1 h | 2 h | 4 h | 7 h | 24 h | 48 h | 72 h | | | |
| 0.1 | NC* | 41.5 ± 11.44 | 52.1 ± 24.97 | 22.5 ± 4.47 | 9.7 ± 2.19 | 5.5 ± 0.94 | 4.8 ± 0.62 | 2.7 ± 0.38 | 2.0 ± 0.45 | 1.4 ± 0.24 | 334.4 ± 65.43 | 52.7 ± 24.61 | 44.8 ± 25.00 |

Data are expressed as the mean ± SD of four animals.

NC, Not calculated.

* Individual values were below the lower limit of quantitation (0.3 ng/mL).

第3章 ON-OFF response：二次ニューロン（双極細胞）の評価

1. 序論

網膜の二次ニューロンである双極細胞は、神経伝達物質であるグルタミン酸を介して、視細胞からの視覚情報を受け取る。また、哺乳類の網膜では、視細胞は光の増大に対して過分極を示す。一方、双極細胞には光の増大に対しては脱分極を、減少に対しては過分極を示す ON 型双極細胞と、その逆の反応を示す OFF 型双極細胞の 2 種類が存在することが知られる⁽⁵⁰⁾。この ON 型及び OFF 型双極細胞の反応の違いは、視細胞とのシナプスにおける樹状突起に存在するグルタミン酸受容体のタイプが異なることによるものであるが、これは視覚情報伝達における ON 経路と OFF 経路が双極細胞のレベルで始まることを意味する⁽⁵⁰⁾。

光に対する双極細胞の膜電位の変化は、ERG では a 波の後に認められる陽性波である b 波 (Fig. 4) に最も反映される。そのため、一般的に ERG の b 波は双極細胞の機能指標として用いられる。一方、ERG は閃光刺激にて誘発されるフラッシュ ERG が一般的であるが、数百ミリ秒間持続する長時間刺激によっても ERG は誘発され、この応答は ON-OFF response と呼ばれる⁽⁴⁴⁾。ON-OFF response では、光の増大に対する網膜の反応つまり ON 応答と、光の減少に対する網膜の反応つまり OFF 応答が分離して記録されるため、フラッシュ ERG では困難な ON 経路と OFF 経路を分離した評価が可能となる。実際に、Sieving らは特異的なシナプス遮断薬を硝子体内投与したマカク属にて ON-OFF response を記録した結果から、霊長類における明順応下 ERG の b 波は ON 型双極細胞と OFF 型双極細胞の相互作用によって形成されることを報告した⁽⁶²⁾。この ON-OFF response を非臨床安全性試験に応用することで、薬剤による網膜への影響を ON 経路と OFF 経路に分けてより詳細に評価することが可能になると考えられる。

一方、ホスホノ酪酸（2-amino-4-phosphonobutyric acid: APB）は ON 型双極細胞に選択的に発現する抑制性受容体である代謝型グルタミン酸受容体 6 型（metabotropic glutamate receptor type 6: mGluR6）の選択的アゴニストであり、mGluR6 の持続的な活性化を介して視細胞から ON 型双極細胞へのシナプス伝達を選択的に遮断する^(51, 63, 71)。また、ピペリジンジカルボン酸（cis-2,3-piperidine dicarboxylic acid: PDA）は OFF 型双極細胞等に発現する興奮性受容体であるイオンチャンネル型グルタミン酸受容体（ionotropic glutamate receptor: iGluR）の選択的アンタゴニストであり、視細胞から OFF 型双極細胞へのシナプス伝達は PDA によって遮断される^(48, 64)。

本研究では、非臨床安全性試験に一般的に用いられる動物種であるカニクイザルを対象とし、Sieving らの報告等^(5, 62)を参考に ON-OFF response の記録条件を設定した。また、同 ON-OFF response にて前述の APB 及び PDA による二次ニューロン（双極細胞）に対する作用が検出されるか調べた。さらに、本法を用いて、第 1 章の結果から双極細胞に強く作用することが示唆されたポリコナゾールの双極細胞への作用を精査した。

2. 実験材料及び実験方法

本実験は、第一三共株式会社の動物実験委員会の承認（動物実験承認番号：C900335）を得て実施した。

2.1. 動物

一般状態及び眼底に異常のない雄 4 例雌 6 例、計 10 例の中国産カニクイザル（4-8 歳齢、体重 2.9-5.3 kg）を用いた。各 2 例を APB 投与群（5-8 歳齢、体重 3.5-5.3 kg）及び APB + PDA 投与群（5-7 歳齢、体重 2.9-3.3 kg）にそれぞれ振り分けた。さらに、別の各 3 例を媒体対照群（5-8 歳齢、体重 2.9-5.3 kg）及びポリコナゾール投与群（5-7 歳齢、体重 3.5-4.2 kg）にそれぞれ振り分けた。動物は 1 章と同様に飼育した。

2.2. 投与

双極細胞のうち ON 型双極細胞の反応を選択的に抑制する薬物として APB⁽⁶³⁾を、OFF 型双極細胞の反応を選択的に抑制する薬物として PDA⁽⁶⁴⁾をそれぞれ用いた。APB (Sigma-Aldrich) 及び PDA (Sigma-Aldrich) を、Bush らの報告⁽⁵⁾を参考に、生理食塩液に溶解させてそれぞれ 40 及び 200 mM の濃度の投与液を調製した。塩酸ケタミン (ケタラール筋注用 500 mg ; 第一三共株式会社) 10 mg/kg 及びキシラジン塩酸塩 (セラクタール ; バイエルメディカル株式会社) 0.6 mg/kg の筋肉内投与により動物に麻酔を施した後、塩酸オキシブプロカイン (ベノキシール点眼液 0.4% ; 参天製薬株式会社) の点眼により角膜表面の局所麻酔を行った。硝子体内投与の方法は既報^(5, 62)に準じ、投与液 0.05 mL を右眼球の耳側上方で角膜輪部から後方約 4 mm の強膜上から 30 ゲージ注射針を通して硝子体内に緩徐に注入した。2 例には APB を、別の 2 例には APB 及び PDA (APB+PDA) を投与した。全 4 例の左眼には生理食塩液を同様に投与した。

第 1 章の結果から双極細胞に強く作用することが示唆されたポリコナゾール (ブイフェンド静注用 200 mg; Pfizer Inc.) を生理食塩液にて希釈して投与液を調製した。投与液は、上記とは別の 3 例に、6 mg/kg の用量にて単回静脈内投与 (0.2 mL/kg/min×10 min) した。さらに別の 3 例には、生理食塩液を同様に投与した。

2.3. ERG

2.3.1. 前処置

動物は、第 1 章と同様に塩酸ケタミン (導入 : 10 mg/kg、維持 : 5-10 mg/kg/h) 及びキシラジン塩酸塩 0.6 mg/kg の筋肉内投与により麻酔した。瞳孔はトロピカミド及びフェニレフリン塩酸塩の点眼により散瞳させた。角膜は塩酸オキシブプロカインの点眼により麻酔した後、ヒドロキシエチルセルロースの点眼により保護した。

2.3.2. 光刺激

ERG の誘発には、発光ダイオード LED を光源とする LED 内蔵型コンタクトレンズ電極 (W390; 有限会社メイヨー) を使用した。光源の LED は、白色光となるよう青色 LED ($\lambda_{\max} = 464 \text{ nm}$) に蛍光体 ($\lambda_{\max} = 563 \text{ nm}$) を組み合わせたものを用いた。光刺激光の輝度及び持続時間は、カラーLED 発光装置 (LS-C; 有限会社メイヨー) にて制御した。

2.3.3. 記録及び解析

カラーLED 発光装置 (LS-C; 有限会社メイヨー) に接続した LED 内蔵型コンタクトレンズ電極 (W390; 有限会社メイヨー) を両眼に、針電極 (TN208-016; 株式会社ユニークメディカル) を不関電極として頭頂部の皮下に、接地電極として大腿部の皮下にそれぞれ設置した。31.6 cd/m^2 の輝度の背景光にて 10 分間の明順応を行った後、同背景光下にて 63.0 cd/m^2 の輝度の長時間刺激 (200 ms) に対する ERG (ON-OFF response) を誘発した。なお、ポリコナゾール投与前後の ERG は、左眼のみから誘発した。上記の ERG は、シナプス遮断薬の投与前及び投与後 (60–90 分後)、あるいはポリコナゾールの投与前及び投与直後にそれぞれ記録した。

すべての応答は 0.5–1000 Hz の帯域フィルターを通して増幅した後に、誘発電位検査装置 (MEB-9104; 日本光電株式会社) に記録した。記録された 6 から 10 波形を用いて加算平均波形を算出した。波形成分の解析として、ポリコナゾールの投与前後に記録した応答を対象に、b 波の振幅 (a 波のトラフから b 波のピークまで) 及び d 波の振幅 (光刺激の終了から d 波のピークまで) をそれぞれ計測した。

2.4. 眼底検査

ERG の各評価ポイントにて、ERG 記録終了直後に双眼倒像検眼鏡 (HEINE OMEGA 500; HEINE Optotechnik GmbH & Co. KG) を用いて両眼の眼底を観察した。

2.5. トキシコキネティクス

本実験のカニクイザルでのポリコナゾールの曝露をヒトと比較することを目的として、TK 解析を行った。ポリコナゾール投与後に ON-OFF response を記録してから数ヵ月間経過した後、同 3 例にポリコナゾールを再度同様に投与した。投与前、投与開始 10 及び 30 分後、1、2、4、7 及び 24 時間後に、血液約 0.5 mL を大腿静脈から採取した。血液を 11,200 g 及び 4°C にて 5 分間遠心して得られた血漿は、高速液体クロマトグラフィーによる血漿中ポリコナゾール濃度測定に用いた。TK パラメータとして投与 24 時間後までの血中濃度-時間曲線下面積 (AUC up to 24 hours after dosing: AUC_{0-24h}) 及び最高血漿中濃度 (maximum plasma concentration: C_{max}) を算出した。

2.6. 統計学的解析

ポリコナゾール投与後の ON-OFF response の各計測値は平均値±標準偏差 (SD) で表し、対応のある *t* 検定を用いて投与前値と、対応のない *t* 検定を用いて媒体対照群とそれぞれ比較した。P<0.05 をもって統計学的に有意な変化と判断した。

3. 実験結果

3.1. APB

3.1.1. ERG

波形変化の代表例を Fig. 14 に示す。a 波の初期部分に明らかな変化は認められなかった。また、b 波は顕著な減弱を示した一方、d 波に明らかな減弱は観察されなかった。

3.1.2. 眼底検査

眼底に明らかな異常は認められなかった。

3.2. APB+PDA

3.2.1. ERG

波形変化の代表例を Fig. 15 に示す。a 波の初期部分は軽度の減弱を示した。一方、b 波及び d 波は顕著に減弱した。

3.2.2. 眼底検査

眼底に明らかな異常は認められなかった。

3.3. ポリコナゾール

3.3.1. ERG

波形変化の代表例を Fig. 16 に、解析した各波形成分を Tab. 7 にそれぞれ示す。a 波の初期部分に明らかな変化は認められなかった。ポリコナゾールにより b 波は顕著な減弱を示し、投与後の b 波振幅は、投与前値及び媒体対照群と比較して有意な低値 ($P<0.01$) であった。一方、d 波に明らかな減弱は観察されなかった。

3.3.2. 眼底検査

眼底に明らかな異常は認められなかった。

3.3.3. トキシコキネティクス

ポリコナゾール投与後の血漿中ポリコナゾール濃度及び TK パラメータを Tab. 8 に示す。ポリコナゾール投与後の AUC_{0-24h} 及び C_{max} は、それぞれ $37.60 \pm 6.239 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 及び $5.62 \pm 1.271 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

4. 考察

APB⁽⁶³⁾はON型双極細胞に選択的に発現する抑制性受容体である mGluR6 の選択的アゴニストであり、mGluR6 の持続的な活性化を介して視細胞から ON 型双極細胞へのシナプス伝達を選択的に遮断する^(51,71)。一方、PDA⁽⁶⁴⁾は OFF 型双極細胞等に発現する興奮性受容体である iGluR の選択的アンタゴニストであり、視細胞から OFF 型双極細胞へのシナプス伝達は PDA によって遮断される⁽⁴⁸⁾。また、マカク属の明順応下 ERG に認められる陽性波である b 波及び d 波はともに、網膜内層の活動を選択的に抑制するテトロドトキシン (Tetrodotoxin: TTX) 及び NMDA (N-methyl-D-aspartic acid) の硝子体内投与によって大きく変化しないことから^(69, 70)、マカク属ではこれら波形成分への網膜内層の関与は極めて低いと考えられている。以上のことから、APB によって選択的に減弱する明順応下 ERG の陽性成分は主として ON 型双極細胞由来であり、また、APB にさらに PDA を加えることで選択的に減弱する明順応下 ERG の陽性成分は主として OFF 型双極細胞由来と考えられる。

本実験の結果、APB の硝子体内投与によって ON-OFF response の b 波が選択的に減弱したことから、本実験の条件にてカニクイザルから記録された ON-OFF response の b 波は主に ON 型双極細胞に由来することと推察された。また、APB 及び PDA を硝子体内投与した動物の ON-OFF response と上記の APB のみを投与した動物の ON-OFF response を比較すると、前者では d 波が顕著に小さかった。このことから、本実験の条件にてカニクイザルから記録された ON-OFF response の d 波は、主として OFF 型双極細胞に由来することと推察された。

本実験のサルにおけるポリコナゾール投与後の AUC_{0-24h} 及び C_{max} は、それぞれ $37.60 \pm 6.239 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ 及び $5.62 \pm 1.271 \mu\text{g/mL}$ であった。一方、臨床用量のポリコナゾールの投与 (6 mg/kg を 12 時間間隔にて静脈内投与) を受けた被験者 9 名のうち 3 名が視覚障害を呈し、同 9 名の被験者におけるポリコナゾール投与後の投与間隔毎の血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC during dosing interval: AUC_{tau}) 及び C_{max} が、それぞれ $13.2 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ 及び $4.70 \mu\text{g/mL}$

であったことが報告されている⁽⁵⁶⁾。これらより、本実験でのポリコナゾールの曝露は、視覚障害を呈するヒトで報告されている曝露と同等以上であったと考えた。

本実験の結果、ポリコナゾールの投与後に ON-OFF response の a 波に明らかな変化はなく、b 波は消失あるいは顕著に減弱し、d 波に明らかな変化は認められなかった。マカク属で記録された明順応下 ERG の a 波は、視細胞錐体に加えて錐体 OFF 経路の反応を含むことが知られている⁽⁵⁾。また、本実験にて記録された b 波及び d 波は、前述のようにそれぞれ主として ON 型及び OFF 型双極細胞に由来すると考えられる。これらより、本実験の結果は、ポリコナゾールの投与を受けたカニクイザルの錐体経路では、ON 型双極細胞の機能は顕著に障害されている一方、視細胞錐体及び OFF 型双極細胞の機能は温存されていることを強く示唆するものと考えた。

5. 小括

APB 及び APB/PDA 混合液をそれぞれ硝子体内投与したカニクイザルで ON-OFF response を記録したところ、APB 投与眼では b 波が減弱し、APB/PDA 混合液投与眼では b 波に加えて d 波も減弱した。これらの変化は、APB による ON 型双極細胞の mGluR6 受容体アゴニスト作用、及び PDA による OFF 型双極細胞の iGluR 受容体アンタゴニスト作用から予想される波形変化と一致するものであった。以上より、カニクイザルでの ON-OFF response によって、APB 及び PDA による二次ニューロン（双極細胞）の機能に対する既知の作用を反映する変化を検出可能であることが示された。さらに、本法を用いることで、ヒトで一過性の視覚障害が報告されているポリコナゾールが、ON 型双極細胞に選択的な双極細胞機能障害を誘発することを示唆する結果が得られた。

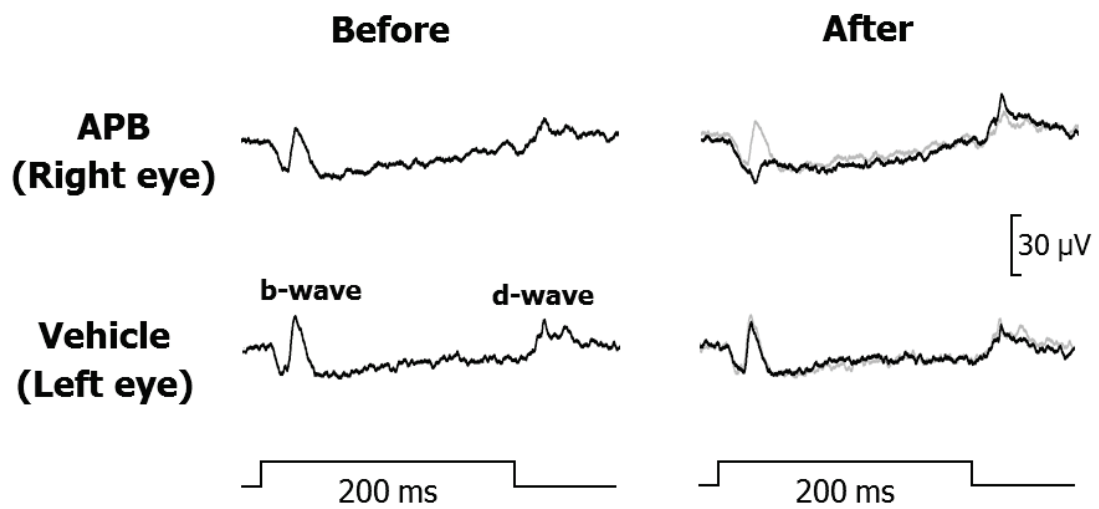


FIGURE 14. Typical waveforms of the ON-OFF response from APB- and vehicle-treated eyes in a cynomolgus monkey. APB and vehicle were injected into the right and left eyes, respectively, of the animal, and the ON-OFF responses were recorded as described in the text. The responses obtained before injection (gray trace) are superimposed on those obtained after injection (black trace) in the right panel. Each trace represents an average of six responses.

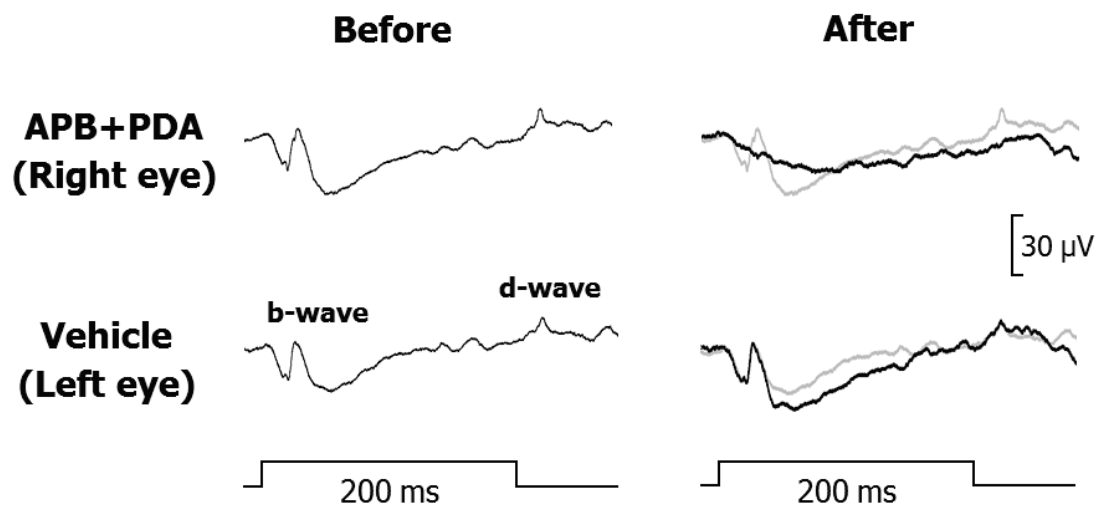


FIGURE 15. Typical waveforms of the ON-OFF response from APB+PDA- and vehicle-treated eyes in a cynomolgus monkey. APB+PDA and vehicle were injected into the right and left eyes, respectively, of the animal, and the ON-OFF responses were recorded as described in the text. The responses obtained before injection (gray trace) are superimposed on those obtained after injection (black trace) in the right panel. Each trace represents an average of six responses.

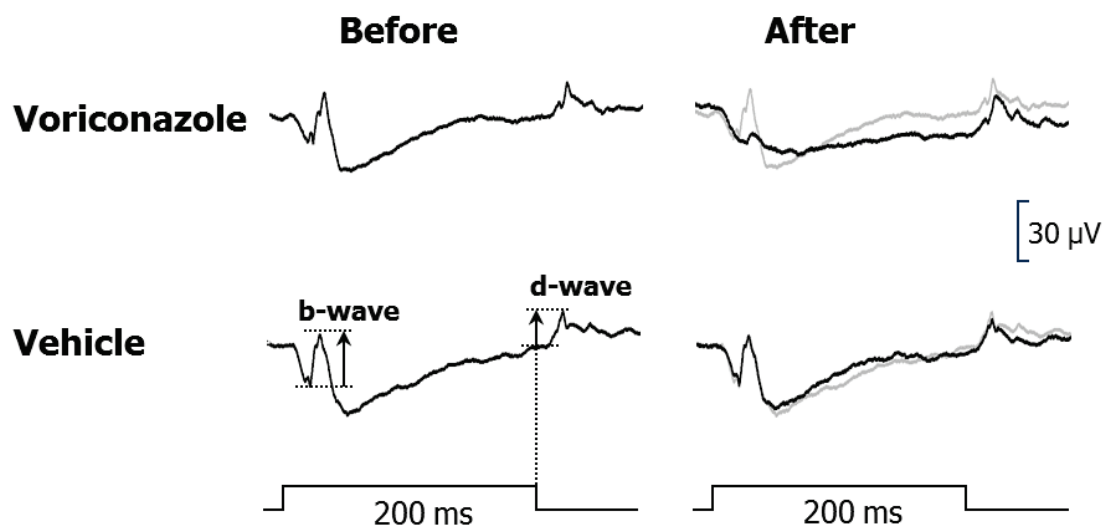


FIGURE 16. Typical waveforms of the ON-OFF response in voriconazole- and vehicle-treated cynomolgus monkeys. Voriconazole at a dose of 6 mg/kg or vehicle was administered intravenously, and the ON-OFF responses were recorded as described in the text. The responses obtained before dosing (gray trace) are superimposed on those obtained after dosing (black trace) in the right panel. Each trace represents an average of six responses.

TABLE 7. Effects of Voriconazole on the ON-OFF Response in Cynomolgus Monkeys

| ON-OFF Response ^{a)} | Vehicle-Treated Group | | Voriconazole-Treated Group | |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| | Before | After ^{b)} | Before | After ^{b)} |
| Amplitude (μ V) | | | | |
| b-wave | 46.6 \pm 9.91 | 41.3 \pm 9.20 | 46.1 \pm 2.65 | 5.8 \pm 5.03 * † |
| d-wave | 40.5 \pm 7.47 | 34.1 \pm 3.53 | 33.0 \pm 10.35 | 38.3 \pm 7.32 † |

Data are expressed as the mean \pm SD of three animals.

a) Elicited with 200-ms white-light stimuli under white background light.

b) Recorded immediately after dosing.

* $p < 0.01$; significantly different in comparison with the pre-dosing value by the paired *t*-test.

† $p < 0.01$; significantly different in comparison with the vehicle-treated eye by the Student's *t*-test.

TABLE 8. Plasma Voriconazole Concentrations and Toxicokinetic Parameters After Voriconazole Dosing

| Dose (mg/kg) | Plasma concentration ($\mu\text{g/mL}$) | | | | | | | | $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$) | C_{max} ($\mu\text{g/mL}$) | t_{max} (h) |
|-----------------|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--|--|-------------------------|
| | Time after the start of 10-min infusion | | | | | | | | | | |
| | Pre | 10 min | 30 min | 1 h | 2 h | 4 h | 7 h | 24 h | | | |
| 6 | NC* | 5.42 ± 1.616 | 4.61 ± 0.862 | 3.74 ± 0.722 | 3.62 ± 0.442 | 2.89 ± 0.291 | 1.79 ± 0.391 | 0.05 ± 0.039 | 37.60 ± 6.239 | 5.62 ± 1.271 | 0.28 ± 0.192 |

Data are expressed as the mean \pm SD of three animals.

NC, Not calculated.

* Individual values were below the lower limit of quantitation (0.01 $\mu\text{g/mL}$).

第4章 Photopic negative response：三次ニューロン（網膜神経節細胞）の評価

1. 序論

第1章にて、カニクイザルでの standard full-field ERGs 記録によって薬剤による杆体経路あるいは錐体経路への顕著な作用が検出可能であることを示した。しかし、standard full-field ERGs から、網膜内の三次ニューロンである RGC に対する薬剤の作用を的確に検出することは困難である。何故なら、standard full-field ERGs の各波形成分は、主として一次ニューロンである視細胞及び二次ニューロンである双極細胞の電位から構成されると考えられているためである。

Viswanathan ら⁽⁷²⁾は、アカゲザルにおいて青色背景光下で赤色刺激にて誘発された明順応下 ERG (photopic ERG) には、b 波の直後に RGC 由来の陰性波が認められることを報告し、これを photopic negative response (PhNR) と命名した。その後、ヒト臨床でも緑内障^(9, 36)、視神経萎縮^(20, 47, 57)、網膜血管閉塞による内層障害^(7, 35)などの RGC が強く障害される病態にて PhNR が選択的に減弱することが示され、PhNR はヒトでの RGC 機能の客観的指標として確立されつつある。この PhNR による RGC 機能評価を非臨床安全性試験に応用することでヒトでの RGC 障害をよりの確に予測し、さらに必要に応じて臨床試験にて非臨床安全性試験と同一の手法で RGC 障害をモニタリングすることが可能になると考えられる。

一方、フグ毒であり電位依存性 Na チャネルを選択的に遮断する TTX は、網膜に対しては、同チャネルが発現する RGC 及び一部のアマクリン細胞の機能に対して選択的に作用する^(3, 22)。また、抗結核薬であるエタンブトールは、長期投与によって患者に視神経症を誘発することが知られており^(15, 34)、動物では、エタンブトールを反復投与したラットの網膜組織において RGC の選択的な減少が観察されたことが報告されている⁽²¹⁾。

そこで本研究では、非臨床安全性試験に一般的に用いられる動物種であるカニクイザルを対象とし、Viswanathan らの方法⁽⁷³⁾を参考に PhNR の記録条件を設定した。また、同 PhNR

にて前述の TTX 及びエタンブトールによる三次ニューロン (RGC) に対する作用が検出可能であるか検証した。

2. 実験材料及び実験方法

本実験は、第一三共株式会社の動物実験委員会の承認 (動物実験承認番号 : C000278 及び C000528) を得て実施した。

2.1. 動物

一般状態及び眼底に異常のない雄 5 例雌 4 例、計 9 例のカニクイザル (3-8 歳齢、体重 2.4-5.9 kg) を用いた。動物は、中国産、インドネシア産、又はベトナム産のいずれかであった。予備検討を行った結果、ERG パラメータについてはカニクイザルの産地による明らかな差が認められなかった。そのなかから、3 例を TTX 投与群 (4-8 歳齢、体重 2.4-5.9 kg) とし、さらに別の各 3 例を媒体対照群 (3-4 歳齢、体重 2.6-3.5 kg) 及びエタンブトール投与群 (3 歳齢、体重 2.8-3.7 kg) にそれぞれ振り分けた。動物は 1 章と同様に飼育した。

2.2. 投与

網膜内の神経細胞のうち RGC の反応を主に抑制する薬物として TTX^(3, 22)を用いた。TTX (Sigma-Aldrich) は、Ueno らの報告⁽⁶⁹⁾を参考に、蒸留水を用いて 160 μ M の濃度の投与液に調製した。第 3 章と同様の方法にて、3 例の右眼には TTX 投与液を、同 3 例の左眼には蒸留水をそれぞれ 0.05 mL/eye の容量で硝子体内投与した。

網膜内の神経細胞のうち RGC を主に障害する薬剤として、長期投与によりヒトの患者で視神経症を誘発することが知られるエタンブトールを選択した。エタンブトールは、上記の TTX を投与した動物とは別の 3 例に反復経口投与した。投与用量は Schmidt らの報告⁽⁶¹⁾を参考に 400 mg/kg/day にて開始し、投与 14 週目 (97 日目) より 800 mg/kg/day に増量した。

蒸留水に溶解させた塩酸エタンブトール (Sigma-Aldrich) を 1 日 1 回、最長で 39 週間 (273 日間) 投与した。さらに別の 3 例には、蒸留水を同様に 39 週間 (273 日間) 投与した。個体別の投与実績を Tab. 9 に示す。

2.3. ERG

2.3.1. 前処置

動物は、第 1 章と同様に塩酸ケタミン (導入 : 10 mg/kg、維持 : 5-10 mg/kg/h) 及びキシラジン塩酸塩 0.6 mg/kg の筋肉内投与により麻酔した。瞳孔はトロピカミド及びフェニレフリン塩酸塩の点眼により散瞳させた。角膜は塩酸オキシブプロカインの点眼により麻酔した後、ヒドロキシエチルセルロースの点眼により保護した。

2.3.2. 光刺激

ERG の誘発には LED 及びキセノンランプの両光源を内蔵した全視野刺激装置 (BigShotGanzfeld ; LKC technologies, Inc.) を使用した。本実験では、LED 光源のみを使用した。LED 光源は、赤色 ($\lambda_{\max} = 627 \text{ nm}$)、橙色 ($\lambda_{\max} = 590 \text{ nm}$)、緑色 ($\lambda_{\max} = 530 \text{ nm}$)、及び青色 ($\lambda_{\max} = 470 \text{ nm}$) の 4 種類から構成されており、白色光はこれらのうち橙色以外の 3 種類 (赤、緑、青) の LED の組み合わせにより調製した。LED による白色刺激光の最大強度 (実測値) は $27.3 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ であり、刺激条件は刺激制御用 PC にインストールされたソフトウェア (Ganzfeld control panel; LKC technologies, Inc.) にて制御した。

2.3.3. 記録及び解析

Viswanathan らの方法⁽⁷²⁾を参考に、青色背景光下にて赤色刺激光を用いて誘発した錐体系応答である single-flash cone response (R/B) にて PhNR を評価した。さらに、比較のために、1 章にて記録条件を決定した standard full-field ERGs に含まれ、白色の背景光及び刺激光により誘発される single-flash cone response (W/W) も記録した。記録電極として双極型コンタクト

レンズ電極 (H6515NFC ; 有限会社メイヨー) を左眼に、接地電極として針電極 (TN208-016 ; 株式会社ユニークメディカル) を頭頂部の皮下にそれぞれ設置した。6.9 cd/m² の輝度の青色背景光 ($\lambda_{\max} = 470$ nm) にて 10 分間の明順応を行った後、同背景光下にて 2.9 cd·s/m² の強度の赤色刺激光 ($\lambda_{\max} = 627$ nm) によって single-flash cone response (R/B) を誘発した。続いて、29.0 cd/m² の輝度の白色背景光下にて 2.8 cd·s/m² の強度の白色刺激光によって single-flash cone response (W/W) を誘発した。上記の ERG は、TTX の投与前及び投与後 (60 – 90 分後)、あるいはエタンブトールの反復投与開始前及び開始後 (1 ヶ月に 1 回程度の頻度にて経時的) にそれぞれ記録した。なお、TTX の投与前後は single-flash cone response (R/B) のみを記録した。

すべての応答は 0.5 – 1000 Hz の帯域フィルターを通して増幅した後に、誘発電位検査装置 (MEB-9104 ; 日本光電株式会社) に記録した。記録された 6 から 10 波形を用いて加算平均波形を算出した。波形成分の解析として、a 波の振幅 (基線から a 波トラフまで)、b 波の振幅 (a 波のトラフから b 波のピークまで)、及び PhNR の振幅 (基線から PhNR のトラフまで) をそれぞれ計測した。さらに、b 波に対する PhNR の振幅比として PhNR/b-wave ratio⁽¹³⁾ を算出した。

2.4. 眼底検査

ERG の各評価ポイントにて、ERG 記録終了直後に双眼倒像検眼鏡 (HEINE OMEGA 500; HEINE Optotechnik GmbH & Co. KG) を用いて両眼の眼底を観察した。

2.5. 病理学的検査

エタンブトールを投与した全 3 例 (02M02、02F01、及び 02M01) は、それぞれ投与 23、28、及び 39 週目に、媒体を投与した 3 例中 1 例 (01F01) は投与 39 週目に解剖した。動物は全身麻酔下にて頸動脈からの放血により安楽死させ、解剖して肉眼的に観察した。眼球を採材し、ブアン液又はグルタルアルデヒド・ホルマリン液にて固定し、常法に従って

パラフィンブロックを作製した。パラフィンブロックから作製した薄切切片はヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を施し、光学顕微鏡で観察した。

2.6. トキシコキネティクス

本実験のカニクイザルでのエタンブトールの曝露をヒトと比較することを目的として、TK 解析を行った。投与 1、28、94、及び 122 日目の投与前、投与 1、2、4、7 及び 24 時間後に、それぞれ血液約 0.3 mL を大腿静脈から採取した。血液を 11,200 g 及び 4°C にて 5 分間遠心して得られた血漿は、高速液体クロマトグラフィーによる血漿中エタンブトール濃度測定に用いた。TK パラメータとして AUC_{0-24h} 及び C_{max} を算出した。

2.7. 統計学的解析

TTX 投与後の single-flash cone response (R/B) の各計測値は平均値±標準偏差 (SD) で表し、対応のある t 検定を用いて投与前値と、対応のない t 検定を用いて媒体対照眼とそれぞれ比較した。また、エタンブトールの反復投与後の single-flash cone response (R/B) 及び single-flash cone response (W/W) の各計測値は平均値±標準偏差 (SD) で表し、対応のある t 検定を用いて投与前値と、対応のない t 検定を用いて媒体対照群とそれぞれ比較した。P<0.05 をもって統計学的に有意な変化と判断した。

3. 実験結果

3.1. TTX

3.1.1. ERG

Single-flash cone response (R/B) の波形変化の代表例を Fig. 17 に、解析した各波形成分を Tab. 10 に示す。

全 3 例で PhNR の顕著かつ選択的な減弱が観察された。TTX 投与後の PhNR 振幅は、投

与前値 ($P<0.05$) 及び媒体対照眼 ($P<0.01$) と比較して有意な低値であった。

3.1.2. 眼底検査

眼底に明らかな異常は認められなかった。

3.2. エタンブトール

3.2.1. ERG

反復投与後の single-flash cone response (R/B)及び single-flash cone response (W/W)の波形変化の代表例を Fig. 18 に、解析した各波形成分を Tab. 11 に示す。また、PhNR/b-wave amplitude ratio の個体別の推移を Fig. 19 に示す。

Single-flash cone response (R/B)における PhNR の選択的な減弱が、1 例 (02M02) では投与 22 週目 (150 日目) に、別の 1 例 (02F01) では投与 28 週目 (192 日目) にそれぞれ認められた。反復投与後の single-flash cone response (R/B)における PhNR 振幅及び PhNR/b-wave amplitude ratio は、媒体対照群と比較して有意な低値 ($P<0.05$) であった。一方、single-flash cone response (W/W)には明らかな変化は観察されなかった。

3.2.2. 眼底検査

いずれの観察ポイントにおいても、眼底に明らかな異常は認められなかった。

3.2.3. 病理学的検査

網膜に認められた病理組織学的所見を Tab. 12 に示す。

いずれの動物にも病理解剖学的な異常は観察されなかった。ERG にて PhNR 減弱が認められた 2 例 (02M02 及び 02F01) の網膜に、RGC の単細胞壊死及び RGC の数的減少が観察された (Fig. 20)。正常では網膜の他の領域よりも多くの RGC を含む傍中心窩では、RGC の減少が明らかであった。さらに、同 2 例の網膜では神経線維層に小膠細胞の増加が観察

された。一方、網膜の神経節細胞層及び神経線維層以外の層には、明らかな異常は観察されなかった。

3.2.4. トキシコキネティクス

エタンブトール投与後の血漿中エタンブトール濃度及びTKパラメータを Tab. 13 に示す。

投与 1、28、94、及び 122 日目のエタンブトール投与後の AUC_{0-24h} は、それぞれ 235 ± 44.0 、 221 ± 57.0 、 458 ± 128 、及び $441 \pm 145 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ であり、同 C_{max} は、それぞれ 33.0 ± 10.2 、 33.7 ± 9.32 、 66.4 ± 11.1 、及び $48.5 \pm 7.46 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

4. 考察

TTX は電位依存性 Na チャネルの選択的遮断薬であり⁽²²⁾、同チャネルは網膜内では活動電位を発生することが知られる RGC 及び一部のアマクリン細胞に存在する⁽³⁾。そのため、TTX の存在により選択的に消失あるいは減弱する ERG の波形成分は、主として RGC に起源を持つと考えられる。本実験の結果、TTX の硝子体内投与によって PhNR が選択的に減弱したことから、本実験にて記録された PhNR は、主として RGC に由来することと推察された。

本実験のサルにおける投与 1、28、94、及び 122 日目のエタンブトール投与後の AUC_{0-24h} は、それぞれ 235 ± 44.0 、 221 ± 57.0 、 458 ± 128 、及び $441 \pm 145 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ であり、同 C_{max} は、それぞれ 33.0 ± 10.2 、 33.7 ± 9.32 、 66.4 ± 11.1 、及び $48.5 \pm 7.46 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。一方、臨床用量 (25 mg/kg) の塩酸エタンブトールを健常人に単回経口投与した際のエタンブトールの $AUC_{0-\text{inf}}$ 及び C_{max} の平均値が、それぞれ $29.6 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 及び $3.83 \mu\text{g}/\text{mL}$ であったことが報告されている⁽⁵²⁾。これらより、本実験でのエタンブトールの曝露は、臨床用量を投与されたヒトと比較して、400 mg/kg/day 投与時は C_{max} で約 9 倍、AUC で約 8 倍、800 mg/kg/day 投与時は C_{max} で約 13 倍、AUC で約 15 倍と考えられた。

エタンブトールはヒト臨床にて抗結核薬として用いられており、長期投与によって患者

に視神経症を誘発することが知られている^(15, 34)。動物では、エタンブトールを反復投与したラットの網膜組織において RGC の選択的な減少が観察されたことが報告されている⁽²¹⁾。

本実験にてエタンブトールを投与したカニクイザルにて、3 例中 2 例で PhNR の選択的な減弱が検出された。PhNR の明らかな変化が検出された後に速やかに解剖された同 2 例の網膜の病理組織学的検査では、三次ニューロンつまり神経節細胞層及び神経線維層にのみ明らかな異常所見が観察された。以上の結果は、本実験にて記録された PhNR は、主として網膜の三次ニューロンに由来することを示すものと考えた。

エタンブトールを投与したカニクイザルで顕著な減弱が認められた PhNR は、青色背景光下にて赤色刺激光を用いて記録された。一方、同例において白色背景光下にて白色刺激光を用いて記録された PhNR には、明らかな減弱は観察されなかった。この背景光及び刺激光の色による PhNR の結果の違いは、マカク属にて複数の色の組合せの背景光及び刺激光にて PhNR を記録した Rangaswamy らの報告⁽⁵⁸⁾と一致している。彼らは、振幅の大きい PhNR を記録する最良の刺激光は、一つのタイプの錐体のみを刺激する刺激光であると結論付けた。また彼らは、長波長感受性錐体 (long wavelength sensitive cones: L-cones) の優先的な刺激は、中波長感受性錐体 (middle wavelength sensitive cones: M-cones) 及び短波長感受性錐体 (short wavelength sensitive cones: S-cones) と比較して成功しやすいとも考察した。本実験で使用した赤色刺激光の λ_{\max} は 627 nm であり、S-cones 及び M-cones よりも L-cones を強く刺激していると考えられる。そのため、本実験で用いた青色背景光と組み合わせた赤色刺激光は RGC 機能を評価するための PhNR を記録する条件として適切であったと考えた。

5. 小括

TTX をカニクイザルに硝子体内投与したところ、選択的な PhNR の減弱が認められた。この変化は、TTX による RGC の電位依存性 Na チャネル遮断作用から予想される波形変化と一致するものであった。続いて、網膜内で RGC を顕著に障害することが知られる薬剤で

あるエタンブトールを反復投与したカニクイザルで PhNR をモニタリングした。その結果、PhNR の選択的な減弱が検出され、さらに病理組織学的にも RGC に選択的な異常所見を伴うことが確認された。以上より、カニクイザルでの PhNR 記録によって、TTX 及びエタンブトールによる三次ニューロン (RGC) に対する既知の作用を反映する変化が検出可能であることが示された。

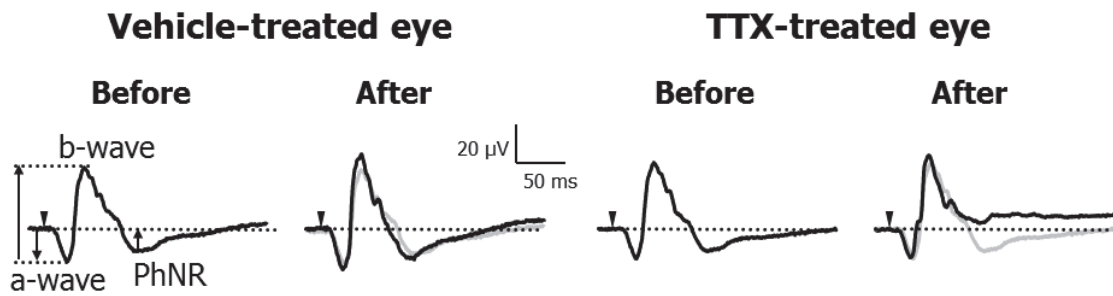


FIGURE 17. Typical waveforms of the single-flash cone response (R/B) from TTX- and vehicle-treated eyes in a monkey. TTX and vehicle were injected into the right and left eyes, respectively, and the single-flash cone responses (R/B), elicited with red light flashes under blue background light, were recorded. The responses obtained before injection (gray trace) are superimposed on those obtained after injection (black trace) in the right panel. Each trace represents an average of six to ten responses.

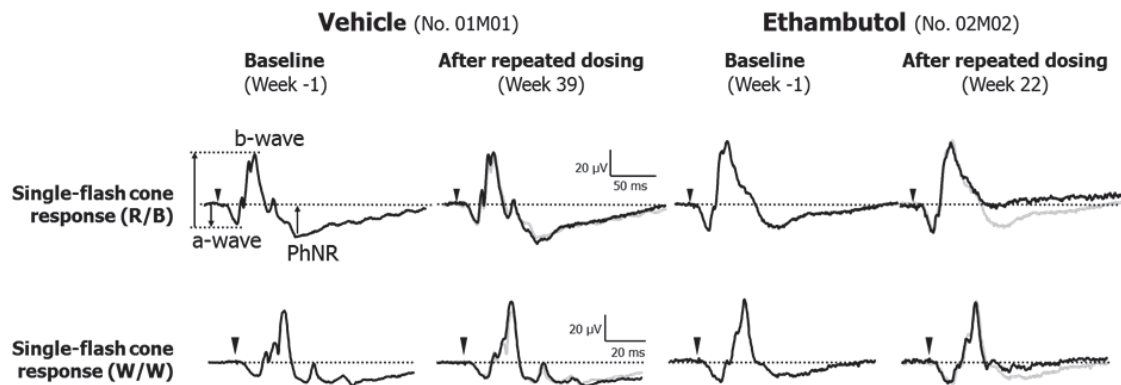
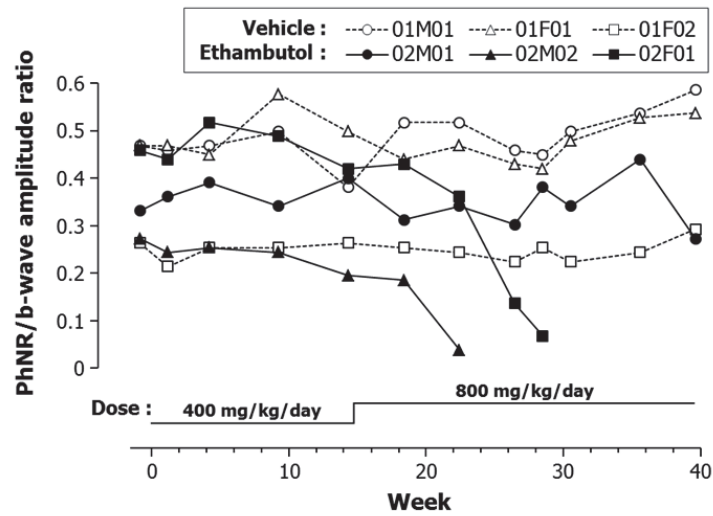


FIGURE 18. Typical waveforms of the single-flash cone responses at baseline and those recorded after repeated dosing in ethambutol- and vehicle-treated monkeys. Ethambutol or vehicle was orally administered to monkeys for a maximum of 39 weeks. The single-flash cone responses, elicited with two color combinations of stimuli and background, were serially recorded in the monkeys: 1) the single-flash cone responses (R/B), red light flashes under blue background light; 2) the single-flash cone responses (W/W), white light flashes under white background light. The responses after repeated dosing were recorded within Weeks 22 to 39. The responses at baseline (gray trace) are superimposed on those obtained after repeated dosing (black trace) in the right panel. Each trace represents an average of six to ten responses.

A: Single-Flash Cone Response (R/B)



B: Single-Flash Cone Response (W/W)

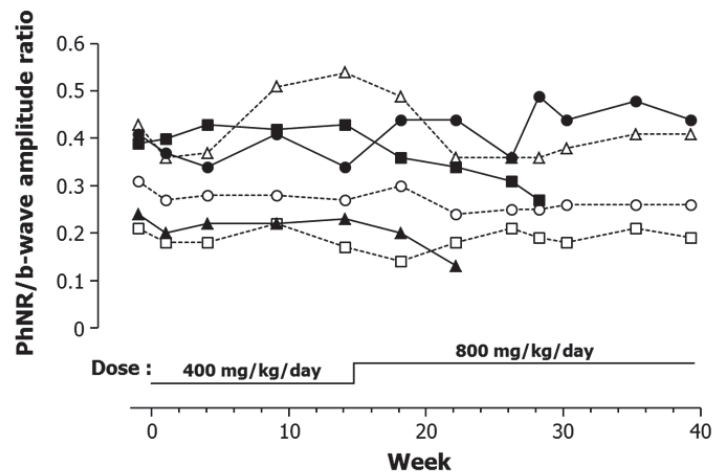


FIGURE 19. Time course of the PhNR/b-wave amplitude ratio in ethambutol- and vehicle-treated monkeys. The single-flash cone responses elicited with red light flashes under blue background light (A) and with white light flashes under white background light (B) were serially recorded. The PhNR/b-wave amplitude ratio was calculated as the ratio of the PhNR amplitude to the b-wave amplitude from these responses. Open symbols with dotted line and closed symbols with solid line signify the data from a vehicle- and ethambutol-treated animals, respectively. Markedly decreased ratio in the single-flash cone response (R/B) was observed in two ethambutol-treated monkeys (No. 02M02 and 02F01).

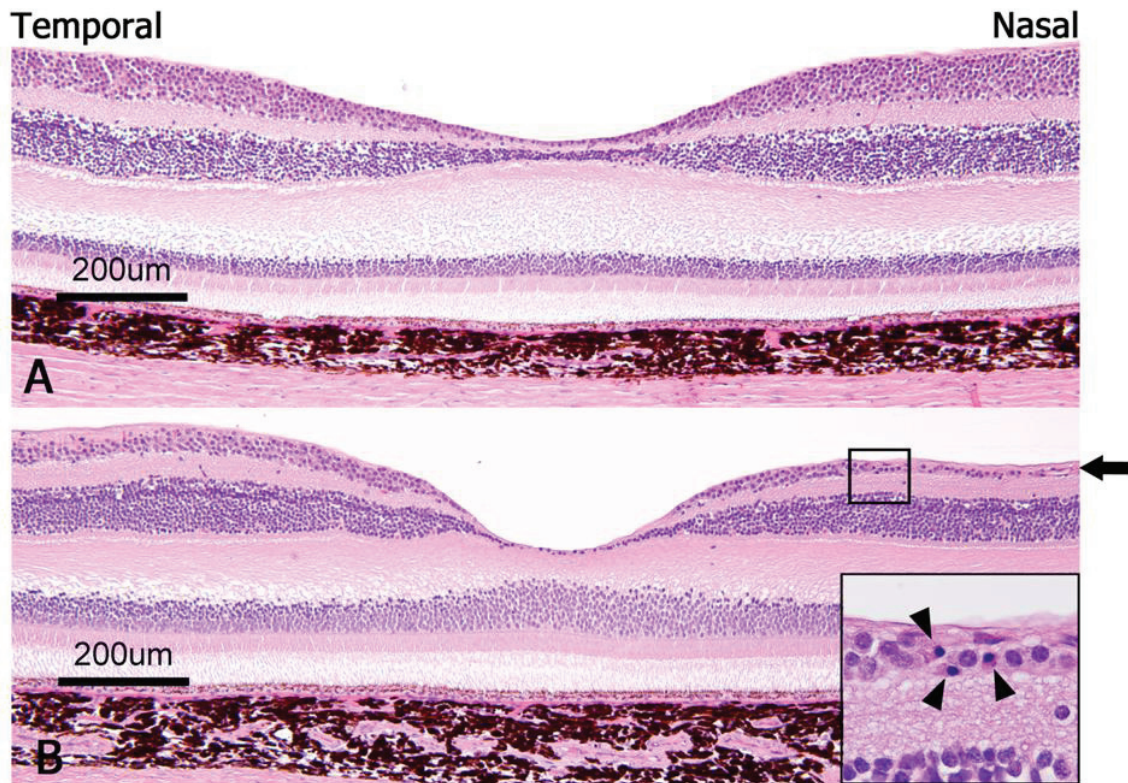


FIGURE 20. Photomicrographs of the retina in (A) vehicle- and (B) ethambutol-treated monkeys. Single cell necrosis of the retinal ganglion cells (RGCs) (arrowhead) and decreased RGCs in the parafovea (arrow) were observed in the retinas of ethambutol-treated animals. Note that the decrease in RGCs in the parafovea was more pronounced in the nasal area compared with that in the temporal area. Stain, HE. Animal Nos: A, 01F01; B, 02F01.

TABLE 9. Dosage Regimen and Clinical Course in This Study

| Group | Animal No. | Dosage Regimen (mg/kg/day×weeks, p.o.) | Clinical Course | Week (Day) of Necropsy |
|------------|------------|---|---|---------------------------|
| | 01M01 | 0×39 | - | NE |
| Vehicle | 01F01 | 0×39 | - | Week 39 (Day 274) |
| | 01F02 | 0×39 | - | NE |
| | 02M01 | 400×13 → 800×26 | - | Week 39 (Day 274) |
| Ethambutol | 02M02 | 400×13 → 800×10 | Anorexia on Days 159 and 160; incomplete eyelid opening and prone position on Day 160* | Week 23 (Day 160) |
| | 02F01 | 400×13 → 800×15 | - | Week 28 (Day 196) |

-, no noteworthy findings.

NE, not examined pathologically.

* Recovered mostly within one hour.

TABLE 10. Effects of TTX on the Single-Flash Cone Response (R/B) in Cynomolgus Monkeys

| Single-Flash Cone Response (R/B) ^{a)} | Vehicle-Treated Eye | | TTX-Treated Eye | |
|--|---------------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| | Before | After ^{b)} | Before | After ^{b)} |
| Amplitude (μ V) | | | | |
| a-wave | 21.4 \pm 1.73 | 25.1 \pm 6.66 | 20.1 \pm 2.05 | 19.1 \pm 5.56 |
| b-wave | 66.1 \pm 9.46 | 77.4 \pm 7.49 | 62.7 \pm 1.80 | 77.3 \pm 8.20* † |
| PhNR | 21.9 \pm 5.93 | 23.7 \pm 6.71 | 20.4 \pm 5.10 | -4.8 \pm 2.63 † |

Data are expressed as the mean \pm SD of three animals.

a) Elicited with red light flashes under blue background light.

b) Recorded 60 to 90 minutes after intravitreal injection.

* $p < 0.05$; significantly different in comparison with the pre-dosing value by the paired *t*-test.

† $p < 0.01$; significantly different in comparison with the vehicle-treated eye by the Student's *t*-test.

TABLE 11. Effects of Ethambutol on the Single-Flash Cone Response in Cynomolgus Monkeys

| | Vehicle-Treated Group | | Ethambutol-Treated Group | |
|--|-----------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| | Baseline | After * Repeated Dosing | Baseline | After ** Repeated Dosing |
| Single-Flash Cone Response (R/B) ^{a)} | | | | |
| a-wave (μ V) | 16.1 \pm 4.24 | 14.5 \pm 2.54 | 15.5 \pm 1.79 | 16.7 \pm 0.31 |
| b-wave (μ V) | 49.8 \pm 7.18 | 43.9 \pm 4.74 | 44.9 \pm 7.12 | 47.6 \pm 7.80 |
| PhNR (μ V) | 18.9 \pm 5.30 | 19.8 \pm 5.39 | 14.9 \pm 2.22 | 4.7 \pm 4.67 \dagger |
| PhNR/b-wave amplitude ratio | 0.39 \pm 0.121 | 0.46 \pm 0.161 | 0.34 \pm 0.097 | 0.11 \pm 0.131 \dagger |
| Single-Flash Cone Response (W/W) ^{b)} | | | | |
| a-wave (μ V) | 16.7 \pm 5.73 | 14.6 \pm 3.00 | 15.7 \pm 3.06 | 18.1 \pm 2.21 |
| b-wave (μ V) | 68.6 \pm 24.88 | 63.3 \pm 22.41 | 60.4 \pm 6.21 | 58.3 \pm 3.71 |
| PhNR (μ V) | 20.5 \pm 5.15 | 16.6 \pm 1.51 | 21.1 \pm 7.38 | 16.1 \pm 9.37 |
| PhNR/b-wave amplitude ratio | 0.32 \pm 0.110 | 0.29 \pm 0.112 | 0.35 \pm 0.093 | 0.28 \pm 0.155 |

Data are expressed as the mean \pm SD of three animals.

a) Elicited with red light flashes under blue background light.

b) Elicited with white light flashes under white background light.

* Week 39 (Day 269) for all animal.

** Week 22 (Day 150), Week 28 (Day 192) or Week 39 (Day 269) in one animal each.

\dagger $p < 0.05$; significantly different compared with the vehicle-treated group by the Student's t -test.

TABLE 12. Histopathological Findings in the Retina in Ethambutol-Treated Monkeys

| Tissue Findings | Dose (mg/kg/day) | 400→800 * | | | |
|--|---------------------------|-----------|----------|----------|----------|
| | Animal No. | 0 | 02M01 | 02M02 | 02F01 |
| | Week (Day) of Necropsy | 39 (274) | 39 (274) | 23 (160) | 28 (196) |
| Retina | | | | | |
| Single cell necrosis, ganglion cell | | - | - | 1 | 1 |
| Decrease, ganglion cell, parafovea | | - | - | 1 | 1 |
| Increase, microglia, nerve fiber layer | | - | - | 1 | 1 |

Grade: -, within normal limits; 1, slight.

* 400 mg/kg/day on Days 1 to 96 and 800 mg/kg/day on Days 97 to 273.

TABLE 13. Plasma Ethambutol Concentrations and Toxicokinetic Parameters After Ethambutol

Dosing

| Dose (mg/kg/day) | Week (Day) | Pre | Plasma Concentration ($\mu\text{g/mL}$) | | | | | $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$) | C_{max} ($\mu\text{g/mL}$) | t_{max} (h) |
|---------------------|---------------------------|---------------------|---|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|--|--|-------------------------|
| | | | 1 h | 2 h | 4 h | 7 h | 24 h | | | |
| 400 | 1 (1) | NE | 23.5 ± 6.43 | 26.9 ± 5.94 | 30.9 ± 11.3 | 8.49 ± 2.72 | 0.974 ± 0.127 | 235 ± 44.0 | 33.0 ± 10.2 | 3.3 ± 1.2 |
| | 4 (23) | 1.07 ± 0.342 | 33.3 ± 10.1 | 26.9 ± 9.74 | 20.3 ± 8.49 | 8.50 ± 2.36 | 1.29 ± 0.207 | 221 ± 57.0 | 33.7 ± 9.32 | 2.0 ± 1.7 |
| 800 | 14 (97 [†]) | 1.89 ± 0.121 | 57.7 ± 4.12 | 51.5 ± 12.4 | 44.8 ± 29.8 | 18.3 ± 4.71 | 3.19 ± 0.748 | 458 ± 128 | 66.4 ± 11.1 | 2.0 ± 1.7 |
| | 18 (125 [‡]) | 3.10 ± 0.434 | 40.1 ± 16.5 | 47.3 ± 8.73 | 42.2 ± 11.7 | 19.1 ± 9.14 | 3.77 ± 0.596 | 441 ± 145 | 48.5 ± 7.46 | 2.7 ± 1.2 |

Data are expressed as the mean \pm SD of three animals.

Animals were treated with ethambutol hydrochloride at dose levels of 400 mg/kg/day on Days 1 to 96 and 800 mg/kg/day on Days 97 to 273.

Lower limit of quantitation is 0.5 $\mu\text{g/mL}$.

NE, not examined.

[†] The first day of dosing at dose level of 800 mg/kg/day. [‡] The 29th day of dosing at dose level of 800 mg/kg/day.

総括

カニクイザルは、ヒトと極めて類似した網膜を持ち、そのため ERG の波形成分の起源がよく研究されており、さらに非臨床安全性試験に一般的に用いられる動物種の一つである。そのため、非臨床安全性試験においてカニクイザルで ERG を記録することは臨床試験における網膜機能障害のリスクを適切に評価する上で重要と考えられるが、薬剤誘発性網膜機能障害の評価法としてのカニクイザルでの ERG 記録及び解析法は十分に確立されていない。そこで、本研究では、ヒトあるいはマカク属で報告のある種々の ERG の記録及び解析法をカニクイザルに応用し、非臨床安全性試験における薬剤誘発性網膜機能障害の体系的な評価法の構築を試みた。

第 1 章では、ヒト臨床にて網膜の杆体経路及び錐体経路の機能を分離して評価するための標準的な方法⁽⁴⁴⁾を参考に条件を決定した standard full-field ERGs にて、薬剤による網膜の杆体経路あるいは錐体経路への影響が検出可能であるか検討した。その結果、カニクイザルにおいても、ヒトで知られている薬剤誘発性の ERG 変化であるポリコナゾールの杆体経路への顕著な影響、及びジゴキシンの錐体経路への顕著な影響を検出することが可能であった。このことから、本法が薬剤誘発性網膜機能障害を的確に検出し、さらに臨床試験と同一マーカーでの網膜機能障害モニタリングを可能にする手法として有用であることが示唆された。

第 2 章では、網膜の一次ニューロンである視細胞の機能評価に着目した。ヒト臨床にて患者の視細胞機能を詳細に評価するために考案された a-wave analysis^(24, 26)をカニクイザルに応用し、同手法を用いて既知のメカニズムによる薬剤誘発性の視細胞機能障害を反映した変化が検出可能であるか検討した。その結果、シルデナフィルによる視細胞外節の 6 型ホスホジエステラーゼ PDE6 阻害作用及びジゴキシンの視細胞内節の $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ 阻害作用を反映すると考えられる変化をそれぞれ検出可能であり、本法が薬剤による一次ニューロン（視細胞）機能への影響を精査するための *in vivo* 評価系として有用であることが

示唆された。

第 3 章では網膜の二次ニューロンである双極細胞の機能評価に着目した。ヒト及びマカク属で網膜の ON 経路及び OFF 経路の評価に用いられている ON-OFF response^(5, 46, 62)のカニクイザルでの記録条件を決定し、同応答にて薬物による ON 型双極細胞あるいは OFF 型双極細胞への選択的な作用が検出可能か検討した。その結果、APB による ON 型双極細胞の mGluR6 アゴニスト作用、及び PDA による OFF 型双極細胞の iGluR アンタゴニスト作用を反映する変化をそれぞれ検出可能であった。さらに、本法を用いることで、ヒトで一過性の視覚障害が報告されているポリコナゾールが、ON 型双極細胞に選択的な機能障害を誘発することを強く示唆する結果が得られた。これらより、本法が薬剤による二次ニューロン（双極細胞）機能への影響を精査するための評価系として有用であることが示唆された。

第 4 章では、網膜の三次ニューロンであり、第 1 章で確立した standard full-field ERGs からはその機能評価は困難とされている RGC の機能評価に着目した。RGC に由来する電位を含む ERG 波形成分であり、近年ヒト臨床にて RGC の機能指標として期待されている PhNR^(38, 72)のカニクイザルでの記録条件を決定し、まず薬物の RGC への既知の作用が PhNR によって検出可能か検討した。その結果、TTX による RGC の電位依存性 Na チャネル遮断作用を反映する変化が検出可能であった。続いて、網膜内で RGC を顕著に障害することが知られる薬剤であるエタンプトールを反復投与したカニクイザルで PhNR をモニタリングした。結果、PhNR の選択的な減弱が検出され、さらにこの機能的変化は病理組織学的にも RGC 選択的な異常所見を伴うことが確認された。これらより、PhNR が非臨床安全性試験にて薬剤による三次ニューロン（RGC）機能への影響を的確に検出し、さらに臨床試験と同一マーカーでの網膜機能障害モニタリングを可能にする手法として有用であることが示唆された。

以上、本研究にて得られた知見から、カニクイザルを用いた薬剤誘発性網膜機能障害の体系的な評価が可能になったと考えた。具体的には、standard full-field ERGs と PhNR を組み合わせて評価することで、杆体経路及び錐体経路の各機能、一次、二次及び三次ニュー

ロンの各機能に関する幅広い情報が得られ、網膜機能に影響を及ぼす薬剤を的確に検出するとともに、同薬剤によって影響を受ける網膜内の構成成分をある程度特定することが可能である。さらに、上記の評価から一次ニューロン及び二次ニューロンの障害が示唆された場合は、それぞれ a-wave analysis 及び ON-OFF response を用いることで、より正確かつ詳細な情報が取得可能である。これらの情報は、網膜機能障害の機序解明につながる可能性がある。本研究の成果として、ヒトと類似した眼を持つカニクイザルにおいてヒトでも実施可能な種々の ERG の記録及び解析法を体系的に構築することができた。これによって、非臨床安全性試験にてヒトで起こりうる網膜内の主要な神経細胞の機能障害を的確に検出し、さらに必要に応じてその機序を検討することが可能となった。最後に、本研究の成果として得られた体系的な網膜機能評価系の非臨床安全性試験への効果的な組み込みが、臨床試験での副作用発現の防止、あるいは臨床試験にて発生した視覚に関する副作用の機序解明及び副作用対応処置策定の一助となることを期待する。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に終始暖かいご指導とご教示を賜りました東京農工大学 西藤公司准教授、岩崎利郎博士に深甚の謝意を表します。また、論文をご精読いただきました帯広畜産大学 古林与志安教授、岩手大学 古濱和久教授、東京農工大学 佐々木一昭准教授、岐阜大学 海野年弘教授に深謝致します。

また、本研究の遂行にあたり、ご支援、ご配慮を賜りました第一三共株式会社 高崎渉博士に深く感謝致します。加えて、研究の細部にわたり、絶えず有意義なご指導を頂きました第一三共株式会社 安田充也博士、肝付智文博士に心から御礼申し上げます。

さらに、本研究を進めるにあたり、ご助言を頂きました第一三共株式会社 石坂智路博士、前嶋孝典氏に感謝するとともに、実験にご協力頂きました第一三共株式会社 大場充広氏、岩田憲明氏、菅野昭永氏、吉松優氏、三家本慧氏、小澤み乃り氏、下田瞳氏ならびに青木貴志氏をはじめとする第一三共株式会社 安全性研究所の方々に心から感謝致します。

文献

1. Bayer, A. U., Cook, P., Brodie, S. E., Maag, K. P., and Mittag, T.(2001).Evaluation of different recording parameters to establish a standard for flash electroretinography in rodents.Vision Res.41,2173-2185.
2. Bee, W. H.(2001).Standardized electroretinography in primates: a non-invasive preclinical tool for predicting ocular side effects in humans.Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.4,81-91.
3. Bloomfield, S. A.(1996).Effect of spike blockade on the receptive-field size of amacrine and ganglion cells in the rabbit retina.J. Neurophysiol.75,1878-1893.
4. Bonting, S. L., Caravaggio, L. L., and Canady, M. R.(1964).Studies on Sodium-Potassium-Activated Adenosine Triphosphatase. X. Occurrence in Retinal Rods and Relation to Rhodopsin.Exp. Eye Res.3,47-56.
5. Bush, R. A., and Sieving, P. A.(1994).A proximal retinal component in the primate photopic ERG a-wave.Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.35,635-645.
6. Chader, G. J.(2002).Animal models in research on retinal degenerations: past progress and future hope.Vision Res.42,393-399.
7. Chen, H., Wu, D., Huang, S., and Yan, H.(2006).The photopic negative response of the flash electroretinogram in retinal vein occlusion.Doc. Ophthalmol.113,53-59.
8. Chuman, M. A., and LeSage, J.(1985).Color vision deficiencies in two cases of digoxin toxicity.Am. J. Ophthalmol.100,682-685.
9. Colotto, A., Falsini, B., Salgarello, T., Iarossi, G., Galan, M. E., and Scullica, L.(2000).Photopic negative response of the human ERG: losses associated with glaucomatous damage.Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.41,2205-2211.
10. Curcio, C. A., Sloan, K. R., Jr., Packer, O., Hendrickson, A. E., and Kalina, R. E.(1987).Distribution of cones in human and monkey retina: individual variability and radial asymmetry.Science.236,579-582.
11. Eiden, C., Peyriere, H., Cociglio, M., Djeddar, S., Hansel, S., Blayac, J. P., and Hillaire-Buys, D.(2007).Adverse effects of voriconazole: analysis of the French Pharmacovigilance Database.Ann. Pharmacother.41,755-763.
12. FDA Antiviral Drugs Advisory Committee.(2001). Briefing document for voriconazole (oral and intravenous formulations). Visual disturbances,pp.138-142.
13. Fortune, B., Bui, B. V., Cull, G., Wang, L., and Cioffi, G. A.(2004).Inter-ocular and inter-session reliability of the electroretinogram photopic negative response (PhNR) in non-human primates.Exp. Eye Res.78,83-93.
14. Fox, D. A., and Boyes, W. K.(2001).Toxic responses of the ocular and visual system. *In*:Klaassen, C. D.[eds] Casarett and Doull's Toxicology,6th ed.,pp.565-596.McGraw-Hill Medical Publishing

Division, New York.

15. Fraunfelder, F. W., Sadun, A. A., and Wood, T.(2006).Update on ethambutol optic neuropathy.*Expert. Opin. Drug. Saf.*5,615-618.
16. Friedburg, C., Thomas, M. M., and Lamb, T. D.(2001).Time course of the flash response of dark- and light-adapted human rod photoreceptors derived from the electroretinogram.*J. Physiol.*534,217-242.
17. Friedrich, C., Ring, A., Brand, T., Sennewald, R., Graefe-Mody, E. U., and Woerle, H. J.(2011).Evaluation of the pharmacokinetic interaction after multiple oral doses of linagliptin and digoxin in healthy volunteers.*Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*36,17-24.
18. Ghannoum, M. A., and Kuhn, D. M.(2002).Voriconazole -- better chances for patients with invasive mycoses.*Eur. J. Med. Res.*7,242-256.
19. Goralczyk, R., Buser, S., Bausch, J., Bee, W., Zuhlke, U., and Barker, F. M.(1997).Occurrence of birefringent retinal inclusions in cynomolgus monkeys after high doses of canthaxanthin.*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*38,741-752.
20. Gotoh, Y., Machida, S., and Tazawa, Y.(2004).Selective loss of the photopic negative response in patients with optic nerve atrophy.*Arch. Ophthalmol.*122,341-346.
21. Heng, J. E., Vorwerk, C. K., Lessell, E., Zurakowski, D., Levin, L. A., and Dreyer, E. B.(1999).Ethambutol is toxic to retinal ganglion cells via an excitotoxic pathway.*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*40,190-196.
22. Hille, B.(1966).Common mode of action of three agents that decrease the transient change in sodium permeability in nerves.*Nature.*210,1220-1222.
23. Hirota, R., Kondo, M., Ueno, S., Sakai, T., Koyasu, T., and Terasaki, H.(2012).Photoreceptor and post-photoreceptor contributions to photopic ERG a-wave in rhodopsin P347L transgenic rabbits.*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*53,1467-1472.
24. Hood, D. C., and Birch, D. G.(1994).Rod phototransduction in retinitis pigmentosa: estimation and interpretation of parameters derived from the rod a-wave.*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*35,2948-2961.
25. Hood, D. C., and Birch, D. G.(1995).Computational models of rod-driven retinal activity.*IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*14,59-66.
26. Hood, D. C., and Birch, D. G.(1995).Phototransduction in human cones measured using the alpha-wave of the ERG.*Vision Res.*35,2801-2810.
27. Hood, D. C., and Birch, D. G.(1996).Assessing abnormal rod photoreceptor activity with the a-wave of the electroretinogram: applications and methods.*Doc. Ophthalmol.*92,253-267.
28. Hood, D. C., and Birch, D. G.(2006).Measuring the health of the human photoreceptors with the leading edge of the a-wave. *In:*Heckenlively, J. R. and Arden, G. B.[eds] *Principles and practice of clinical electrophysiology of vision*,2nd ed.,pp.487-501.The Mit Press,Massachusetts.
29. Jacobson, S. G., Boye, S. L., Aleman, T. S., Conlon, T. J., Zeiss, C. J., Roman, A. J., Cideciyan,

- A. V., Schwartz, S. B., Komaromy, A. M., Doobrajh, M., Cheung, A. Y., Sumaroka, A., Pearce-Kelling, S. E., Aguirre, G. D., Kaushal, S., Maguire, A. M., Flotte, T. R., and Hauswirth, W. W.(2006).Safety in nonhuman primates of ocular AAV2-RPE65, a candidate treatment for blindness in Leber congenital amaurosis.Hum. Gene Ther.17,845-858.
30. Jeffrey, B. G., and Neuringer, M.(2009).Age-related decline in rod phototransduction sensitivity in rhesus monkeys fed an n-3 fatty acid-deficient diet.Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.50,4360-4367.
 31. Johnson, M. A., and Hood, D. C.(1996).Rod photoreceptor transduction is affected in central retinal vein occlusion associated with iris neovascularization.J. Opt. Soc. Am. A. Opt. Image Sci. Vis.13,572-576.
 32. Lamb, T. D., and Pugh, E. N., Jr.(1992).A quantitative account of the activation steps involved in phototransduction in amphibian photoreceptors.J. Physiol.449,719-758.
 33. Laties, A., and Zrenner, E.(2002).Viagra (sildenafil citrate) and ophthalmology.Prog. Retin. Eye Res.21,485-506.
 34. Lloyd, M. J., and Fraunfelder, F. W.(2007).Drug-induced optic neuropathies.Drugs Today (Barc).43,827-836.
 35. Machida, S., Gotoh, Y., Tanaka, M., and Tazawa, Y.(2004).Predominant loss of the photopic negative response in central retinal artery occlusion.Am. J. Ophthalmol.137,938-940.
 36. Machida, S., Gotoh, Y., Toba, Y., Ohtaki, A., Kaneko, M., and Kurosaka, D.(2008).Correlation between photopic negative response and retinal nerve fiber layer thickness and optic disc topography in glaucomatous eyes.Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.49,2201-2207.
 37. Machida, S., Raz-Prag, D., Fariss, R. N., Sieving, P. A., and Bush, R. A.(2008).Photopic ERG negative response from amacrine cell signaling in RCS rat retinal degeneration.Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.49,442-452.
 38. Machida, S.(2010).ERG component originating from retinal ganglion cells: photopic negative response (PhNR).Neuro-ophthalmol. Jpn.27,66-75.
 39. Madreperla, S. A., Johnson, M. A., and Nakatani, K.(1994).Electrophysiologic and electroretinographic evidence for photoreceptor dysfunction as a toxic effect of digoxin.Arch. Ophthalmol.112,807-812.
 40. Marmor, M. F., Arden, G. B., Nilsson, S. G., and Zrenner, E.(1989).Standard for clinical electroretinography. International Standardization Committee.Arch. Ophthalmol.107,816-819.
 41. Marmor, M. F., and Zrenner, E.(1995).Standard for clinical electroretinography (1994 update).Doc. Ophthalmol.89,199-210.
 42. Marmor, M. F., and Zrenner, E.(1998).Standard for clinical electroretinography (1999 update). International Society for Clinical Electrophysiology of Vision.Doc. Ophthalmol.97,143-156.
 43. Marmor, M. F., Holder, G. E., Seeliger, M. W., and Yamamoto, S.(2004).Standard for clinical electroretinography (2004 update).Doc. Ophthalmol.108,107-114.

44. Marmor, M. F., Fulton, A. B., Holder, G. E., Miyake, Y., Brigell, M., and Bach, M.(2009).ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update).Doc. Ophthalmol.118,69-77.
45. Matsuzawa, T., Hashimoto, M., Nara, H., Yoshida, M., Tamura, S., and Igarashi, T.(1997).Current status of conducting function tests in repeated dose toxicity studies in Japan.J. Toxicol. Sci.22,375-382.
46. Miyake, Y., Yagasaki, K., Horiguchi, M., and Kawase, Y.(1987).On- and off-responses in photopic electroretinogram in complete and incomplete types of congenital stationary night blindness.Jpn. J. Ophthalmol.31,81-87.
47. Miyata, K., Nakamura, M., Kondo, M., Lin, J., Ueno, S., Miyake, Y., and Terasaki, H.(2007).Reduction of oscillatory potentials and photopic negative response in patients with autosomal dominant optic atrophy with OPA1 mutations.Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.48,820-824.
48. Morigiwa, K., and Vardi, N.(1999).Differential expression of ionotropic glutamate receptor subunits in the outer retina.J. Comp. Neurol.405,173-184.
49. Nagai, N., Ohde, H., Betsuin, Y., Matsukura, S., Kigasawa, K., Mashima, Y., and Oguchi, Y.(2001).[Two cases of digitalis toxicity with reversible and severe decrease of visual acuity].Nihon Ganka Gakkai Zasshi.105,24-30.
50. Nakanishi, S.(1995).Second-order neurones and receptor mechanisms in visual- and olfactory-information processing.Trends Neurosci.18,359-364.
51. Nomura, A., Shigemoto, R., Nakamura, Y., Okamoto, N., Mizuno, N., and Nakanishi, S.(1994).Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells.Cell.77,361-369.
52. Peloquin, C. A., Bulpitt, A. E., Jaresko, G. S., Jelliffe, R. W., Childs, J. M., and Nix, D. E.(1999).Pharmacokinetics of ethambutol under fasting conditions, with food, and with antacids.Antimicrob. Agents Chemother.43,568-572.
53. Petersen-Jones, S. M.(1998).Animal models of human retinal dystrophies.Eye (Lond).12,566-570.
54. Piltz, J. R., Wertenbaker, C., Lance, S. E., Slamovits, T., and Leeper, H. F.(1993).Digoxin toxicity. Recognizing the varied visual presentations.J. Clin. Neuroophthalmol.13,275-280.
55. Purkins, L., Wood, N., Ghahramani, P., Greenhalgh, K., Allen, M. J., and Kleinermans, D.(2002).Pharmacokinetics and safety of voriconazole following intravenous- to oral-dose escalation regimens.Antimicrob. Agents Chemother.46,2546-2553.
56. Purkins, L., Wood, N., Greenhalgh, K., Eve, M. D., Oliver, S. D., and Nichols, D.(2003).The pharmacokinetics and safety of intravenous voriconazole - a novel wide-spectrum antifungal agent.Br. J. Clin. Pharmacol.56 Suppl 1,2-9.
57. Rangaswamy, N. V., Frishman, L. J., Dorotheo, E. U., Schiffman, J. S., Bahrani, H. M., and Tang, R. A.(2004).Photopic ERGs in patients with optic neuropathies: comparison with primate ERGs

- after pharmacologic blockade of inner retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45,3827-3837.
58. Rangaswamy, N. V., Shirato, S., Kaneko, M., Digby, B. I., Robson, J. G., and Frishman, L. J.(2007).Effects of Spectral Characteristics of Ganzfeld Stimuli on the Photopic Negative Response (PhNR) of the ERG.*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48,4818-4828.
 59. Rosolen, S. G., Rigaudiere, F., Le Gargasson, J. F., and Brigell, M. G.(2005).Recommendations for a toxicological screening ERG procedure in laboratory animals.*Doc. Ophthalmol.* 110,57-66.
 60. Santostasi, G., Fantin, M., Maragno, I., Gaion, R. M., Basadonna, O., and Dalla-Volta, S.(1987).Effects of amiodarone on oral and intravenous digoxin kinetics in healthy subjects.*J. Cardiovasc. Pharmacol.* 9,385-390.
 61. Schmidt, I. G.(1966).Central nervous system effects of ethambutol in monkeys.*Ann. N. Y. Acad. Sci.* 135,759-774.
 62. Sieving, P. A., Murayama, K., and Naarendorp, F.(1994).Push-pull model of the primate photopic electroretinogram: a role for hyperpolarizing neurons in shaping the b-wave.*Vis. Neurosci.* 11,519-532.
 63. Slaughter, M. M., and Miller, R. F.(1981).2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research.*Science.* 211,182-185.
 64. Slaughter, M. M., and Miller, R. F.(1983).An excitatory amino acid antagonist blocks cone input to sign-conserving second-order retinal neurons.*Science.* 219,1230-1232.
 65. Taggart, A. J., and McDevitt, D. G.(1980).Digitalis: its place in modern therapy.*Drugs* 20,398-404.
 66. Tan, K., Brayshaw, N., Tomaszewski, K., Troke, P., and Wood, N.(2006).Investigation of the potential relationships between plasma voriconazole concentrations and visual adverse events or liver function test abnormalities.*J. Clin. Pharmacol.* 46,235-243.
 67. Tzekov, R.(2005).Ocular toxicity due to chloroquine and hydroxychloroquine: electrophysiological and visual function correlates.*Doc. Ophthalmol.* 110,111-120.
 68. Tzekov, R. T., Locke, K. G., Hood, D. C., and Birch, D. G.(2003).Cone and rod ERG phototransduction parameters in retinitis pigmentosa.*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44,3993-4000.
 69. Ueno, S., Kondo, M., Niwa, Y., Terasaki, H., and Miyake, Y.(2004).Luminance dependence of neural components that underlies the primate photopic electroretinogram.*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45,1033-1040.
 70. Ueno, S., Kondo, M., Ueno, M., Miyata, K., Terasaki, H., and Miyake, Y.(2006).Contribution of retinal neurons to d-wave of primate photopic electroretinograms.*Vision Res.* 46,658-664.
 71. Vardi, N., Duvoisin, R., Wu, G., and Sterling, P.(2000).Localization of mGluR6 to dendrites of ON bipolar cells in primate retina.*J. Comp. Neurol.* 423,402-412.
 72. Viswanathan, S., Frishman, L. J., Robson, J. G., Harwerth, R. S., and Smith, E. L., 3rd.(1999).The photopic negative response of the macaque electroretinogram: reduction by experimental glaucoma.*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40,1124-1136.

73. Viswanathan, S., Frishman, L. J., Robson, J. G., and Walters, J. W.(2001).The photopic negative response of the flash electroretinogram in primary open angle glaucoma.*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*42,514-522.
74. Weleber, R. G., and Shults, W. T.(1981).Digoxin retinal toxicity. Clinical and electrophysiological evaluation of a cone dysfunction syndrome.*Arch. Ophthalmol.*99,1568-1572.
75. Wikler, K. C., Williams, R. W., and Rakic, P.(1990).Photoreceptor mosaic: number and distribution of rods and cones in the rhesus monkey retina.*J. Comp. Neurol.*297,499-508.
76. Wilner, K., Laboy, L., and LeBel, M.(2002).The effects of cimetidine and antacid on the pharmacokinetic profile of sildenafil citrate in healthy male volunteers.*Br. J. Clin. Pharmacol.*53 Suppl 1,31S-36S.
77. Zhang, X., Feng, Q., and Cote, R. H.(2005).Efficacy and selectivity of phosphodiesterase-targeted drugs in inhibiting photoreceptor phosphodiesterase (PDE6) in retinal photoreceptors.*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*46,3060-3066.