

厚生省特定疾患

網膜脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班

平成11年3月

班 長 玉 井 信  
東北大学医学部 眼科

厚生省特定疾患

網膜脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班

平成11年3月

班 長 玉 井 信  
東北大学医学部 眼科

# 目 次

網膜脈絡膜・加齢黄斑変性視神経萎縮症調査研究班 .....	1
( 東北大学医学部眼科 ) 玉井 信	
シュワン細胞による視神経再生の誘導 .....	6
( 千葉大学医学部眼科 ) 出沢真理、根岸久也 忍足俊幸、安達恵美子	
培養シュワン細胞を用いた人工移植片による網膜神経節細胞の生存・再生率の評価 .....	8
( 千葉大学医学部眼科 ) 根岸久也、出沢真理 忍足俊幸、安達恵美子	
レーベル病のmtDNA変異部位周辺に見られる正常者における変異 .....	20
( 北里大学病院臨床検査部 ) 豊岡裕子、山辺晴美 ( 北里大学医学部臨床病理 ) 大谷英樹 ( 北里大学医学部眼科 ) 市辺義章、若倉雅登	
特発性視神経炎と区別すべきステロイド剤依存性視神経症の存在 .....	31
( 北里大学医学部眼科 ) 若倉雅登	
特初制視神経炎および前部虚血性視神経症の診断基準作成について .....	39
( 井上眼科医院・北里大学医学部眼科 ) 若倉雅登	
網膜視神経細胞死のメカニズム .....	50
( 信州大学医学部眼科 ) 渋木宏人、黒岩さち子 黒川 徹、吉村長久	
ウノプロストン点眼液のラット光照射網膜変性に対する保護効果 .....	74
( 慶應義塾大学医学部眼科 ) 緋田芳樹、真島行彦 小口芳久	
網脈絡膜萎縮症の分子病態の解明 .....	77
( 札幌医科大学眼科 ) 大黒 浩、前田亜希子 前田忠郎、小川佳一 丸山幾代	
アレスチン遺伝子異常をともなう網膜変性について .....	101
( 弘前大学医学部眼科 ) 中沢 満 ( 東北大学医学部眼科 ) 和田裕子、玉井 信 ( 山形大学医学部眼科 ) 川崎 良、山口克宏	
日本人X染色体劣性網膜色素変性病におけるRP2遺伝子異常および臨床像の検索 .....	107
( 東北大学医学部眼科 ) 和田裕子、阿部俊明 玉井 信 ( 弘前大学医学部眼科 ) 中沢 満	
わが国のX連鎖性網膜分離症の原因はXLRS1遺伝子異常による .....	110
( 順天堂大学医学部眼科 ) 堀田喜裕、藤木慶子 早川志つ子、太田 隆 藤巻拓郎、玉城宏一	

	(杏林大学医学部眼科)	横山利幸、金井 淳	
	(国立小児病院眼科)	平方明人、樋口哲夫	
		西田幸子、東 範行	
ヒト網膜特異的アミノキシダーゼ遺伝子：大腸菌および哺乳類培養での発現システムの構築	117		
	(慶應義塾大学眼科)	今村 裕、真島行彦	
		小口芳久	
	(慶應義塾大学分子生物)	工藤 純、高柳 淳	
		清水信義	
癌関連網膜症患者血清が認識する新しい網膜変性関連遺伝子のクローニング	132		
	(信州大学医学部眼科)	菊池孝信、新井 純	
		立岩 尚、市川正樹	
		吉村長久	
白色光による網膜色素変性の光覚弁視力のグレード分類	136		
	(東北大学医学部眼科)	国方彦志、中川陽一	
萎縮型加齢黄斑変性におけるABCR遺伝子の解析	144		
	(東北大学医学部眼科)	布施昇男、鈴木健史	
		和田裕子、吉田まどか	
		阿部俊明、玉井 信	
	(弘前大学医学部眼科)	中沢 満	
ABCR遺伝子異常と加齢黄斑変性	147		
	(信州大学医学部眼科)	吉村長久、黒岩さち子	
		小島秀伸、菊池孝信	
カニクイザルに見出された黄斑変性眼網膜におけるメダロチオネインII (MTII) の局在に関する免疫組織化学的検討	153		
	(順天堂大学医学部眼科)	Ruth M. 山藤	
		藤木慶子、早川むつ子	
		金井 淳	
	(順天堂大学医学部病理)	中村眞二	
	(憐予防衛生協会)	鈴木通弘	
	(東京大学農学部)	吉川泰弘	
加齢黄斑変性とadvanced glycation end products (AGEs)	158		
	(九州大学眼科)	石橋達朗	
	(南カリフォルニア大学ドヘニー眼研究所)	村田敏規	
	(熊本大学第二生化学)	永井竜児、堀内正公	
実験的脈絡膜新生血管発生過程における血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) とその受容体 (KDR)、形質転換成長因子 (TGF $\beta$ ) 受容体の発現	171		
	(関西大学医学部眼科)	緒方奈保子、高橋寛二	
		和田光正、中山理江	
		宇山昌延	
トラニラストによる実験的脈絡膜新生血管抑制	185		
	(信州大学医学部眼科)	吉村長久、竹花泰雄	
		黒川 徹	
実験的脈絡膜血管新生へのレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入効果	197		
	(九州大学医学部眼科)	本田祐恵、石橋達朗	
	(南カリフォルニア大学ドヘニー眼研究所)	村田敏規	
BDNF導入虹彩色素上皮細胞の性質と網膜神経細胞に対する保護効果	212		
	(東北大学医学部眼科)	鹿野哲也、櫻木素子	

		阿部俊明、富田浩史 玉井 信	
加齢黄斑変性に対する細胞移植の基礎実験と臨床応用 .....	216		
	( 東 北 大 学 医 学 部 眼 科 )	阿部俊明、富田浩史 吉田まどか、鹿野哲也 大橋利吏、佐藤雅美 玉井 信	
脈絡膜新生血管のOCTによる形態解析とインターフェロン併用弱度光凝固治療の試み .....	219		
	( 関 西 医 科 大 学 眼 科 )	高橋寛二、和田光正 福地俊雄、宇山昌延	
滲出性加齢黄斑性における術後視力に影響する要因 .....	222		
	( 駿 河 台 日 本 大 学 病 院 眼 科 )	島田宏之、磯前貴子 清水早穂、湯沢美都子	
透明窓内に血管新生を誘導する新しいテクニック放射線治療に関連して .....	227		
	(東北大学加齢医学研究所腫瘍循環研究分野) ( 東 北 大 学 医 学 部 眼 科 )	堀 勝義 玉井 信	
加齢黄斑変性に対する低線量放射線治療の眼循環に与える影響 .....	230		
	( 九 州 大 学 医 学 部 眼 科 )	馬場恵子、吉田綾子 廣石悟朗、本田祐恵 吉川 洋、藤澤公彦 石橋達朗	
小型脈絡膜新生血管を有する加齢黄斑変性への放射線療法 .....	233		
	( 弘 前 大 学 医 学 部 眼 科 )	松橋英昭、野田康子 大橋大介	
	( 弘 前 大 学 医 学 部 放 射 )	真理谷 靖	
加齢黄斑変性に対する放射線治療の長期経過 .....	237		
	( 京 都 大 学 医 学 部 放 射 線 ) ( 名 古 屋 市 立 大 学 医 学 部 眼 科 )	万代道子、高橋政代 小椋祐一郎	
加齢黄斑変性に対する放射線治療の無作為前向き臨床試験々々短期経過の検討 .....	241		
	( 名 古 屋 市 立 大 学 医 学 部 眼 科 )	尾関年則、小椋祐一郎	
	( 東 北 大 学 医 学 部 眼 科 )	玉井 信	
	( 札 幌 医 科 大 学 眼 科 )	大黒 浩	
	( 弘 前 大 学 医 学 部 眼 科 )	中沢 満	
	( 日 本 大 学 駿 河 台 病 院 眼 科 )	湯沢美都子	
	( 順 天 堂 大 学 医 学 部 眼 科 )	堀田喜裕	
	( 北 里 大 学 医 学 部 眼 科 )	若倉雅登	
	( 京 都 大 学 医 学 部 眼 科 )	万代道子	
	( 関 西 医 科 大 学 眼 科 )	高橋寛二	
	( 九 州 大 学 医 学 部 眼 科 )	高橋達朗	
	( 京 都 大 学 医 学 部 放 射 線 )	笹井啓資	
	( 東 北 大 が 杭 が 九 分 公 衆 衛 )	辻 一 郎	
加齢黄斑変性の中心窩脈絡膜新生血管全体のレーザー光凝の視力予後 .....	246		
	( 日 本 大 学 医 学 部 眼 科 )	森 隆三郎、湯沢美都子	
軟性ドレーゼンに対する光凝固とその臨床試験の中間報告 .....	250		
	( 日 本 大 学 駿 河 台 病 院 眼 科 )	石原菜奈恵、湯沢美都子	
	( 東 北 大 学 医 学 部 眼 科 )	吉田まどか、玉井 信	
	( 慶 應 義 塾 大 学 医 学 部 眼 科 )	石田 晋、篠田 啓 小口芳久	

( 札幌医科大学眼科 ) 大黒 浩

三色光を用いた黄斑疾患における視機能評価の新しい試み ..... 255

( 東北大学医学部眼科 ) 中川陽一、山田 翼  
國方彦志、吉田まどか  
玉井 信

## 研究班構成

玉井 信	班長、研究総括、症例の整理	東北大・眼科	教授
小口 芳久	症例の管理	慶應大・眼科	教授
小椋 祐一郎	放射線療法の集計	名市大・眼科	教授
中沢 満	症例の管理	弘前大・眼科	教授
吉村 長久	症例の管理	信州大・眼科	教授
石橋 達朗	症例の管理	九大・眼科	助教授
湯沢 美都子	光凝固療法の集計	日大駿河台・眼科	助教授
若倉 雅登	症例の管理	北里大・眼科	助教授
阿部 俊明	症例の管理	東北大・眼科	助教授
堀 勝義	病理組織学的治療効果判定	東北大・加齢研究所	助教授
堀田 善裕	症例の管理	順天大・眼科	講師
高橋 寛二	症例の管理	関西医大・眼科	講師
大黒 浩	症例の管理	札医大・眼科	講師
出沢 真理	症例の管理	千葉大・眼科	講師

# 特定疾患網脈絡膜萎縮、加齢黄斑変性、視神経萎縮症調査研究班

班長 玉 井 信

東北大学医学部眼科

## 総合研究報告概要（3年間まとめ）

我々は平成8年、新しい班研究の開始に当たって下記の課題を設定し、3年間でその目的を達成するべく努力した。特に日本人の高齢化にともないこの期間中にも加齢黄斑変性による患者の社会的な失明状態が増加し、治療法の開発が問題となった。そのため平成9年度評価委員よりご指摘を受けた症例対照研究について、特定疾患疫学班辻一郎助教授（東北大学）のご協力のもとに限られた範囲ではあるが臨床試験を加えた。その結果、効果をはっきりさせるため特定疾患重点研究に採用され、その部分は平成10年度より正式な多施設無作為臨床試験として発足した。

### 課題1. 網膜色素変性症の病態解明と治療法の開発

近年解明が進んでいる本疾患ではあるが視細胞における視興奮調節のいろいろなレベルにおける遺伝子異常の解明はまだまだ進んでいない。そこで基礎実験と臨床症例におけるさらなる研究の促進と、遺伝子治療の本症への応用の可能性を探りたい。さらにその前段階として遺伝子操作を加えた自己色素上皮細胞の網膜下移植による治療法の臨床応用の可能性も追及してみたい。世界的には3箇所ですでに胎児視細胞、色素上皮細胞移植の臨床応用が試みられている。

### 課題2. 加齢黄斑変性症の病態解明と治療法の開発

特に視力予後の悪く日本人に多い浸出型における血管新生発生病因の実験モデルにおける解明と薬物による抑制効果の検討、すでに一部では臨床試験が始まっているものもあるがその臨床応用と効果を検討する。外科的な治療法に伴って必然的に除去されてしまう網膜色素上皮細胞の移植による治療効果も是非行いたい研究である。

課題3. 原因不明の視神経疾患の病態解明と治療法の開発。Leber病や多発硬化症など視神経には難治性疾患が多い。その病態解明をまずやらなければならないと同時にそのもととなる網膜神経節細胞死のメカニズムと如何にそれを再生させるかを目指す。そのためには密接なグリア細胞の研究も重要である。

特に日本人の高齢化にともないこの期間中にも加

齢黄斑変性による患者の社会的な失明状態が増加し、治療法の開発とその評価法が問題となった。そこで次の課題を加えた。

課題4. 加齢黄斑変性に対する低線量放射線照射、黄斑ドルーゼンに対するレーザー光照射療法の効果判定に関する研究。

これらの治療法は海外で少数、retrospectiveに行われ、又日本においても京都大学、弘前大学等で行われていた。何れも現在のRCTに乗っ取っていないため、我々の班員全員参加の上で特定疾患疫学班辻一郎助教授（東北大学）のご協力のもとに限られた範囲ではあるが封筒法による二重盲検試験の形で治療を行う。臨床試験を行った。その結果、効果をはっきりさせるため特定疾患重点研究に採用され、その部分は平成10年度より正式な多施設無作為臨床試験として発足した。

課題5. 極低視力のグレード分類のための新しい機器の開発。

網脈絡膜萎縮、視神経萎縮では病気が進むと光も分からなくなり、完全な失明状態となる。しかし加齢黄斑変性でも、黄斑部が障害されるために中心視力が0.02以下の社会的な高度障害者に分類される。我々の班の目的である薬物治療、その他の新しい治療法の開発ではこのような低視力でも治療効果の有無を判定するにはこのような低視力の中でどのような効果があったのかを判別することが重要であると考え、その測定機器の開発を試みることにした。我々の研究班では下記のようなシンポジウム、班会議を開催し研究の進展を目指した。

1) 平成8年10月5日-9日

VII International Symposium on Retinal Degeneration

14ヶ国110人（日本人：班員他20名）

網脈絡膜萎縮症の病態と治療法に関するシンポジウム

場所：蔵王山麓ホテルロイヤル

2) 平成8年11月28日

場所：東北大学良陵会館：遺伝子治療を目指して-基礎と臨床

坂田恒昭室長（株式会社デナベック研究所）：



デナベック研究所の目指すもの

—情報を創薬へ—

加藤郁之進所長（宝酒造バイオ研究所）：

組み替えフィブロネクチンの遺伝子治療への利用

浅野茂隆教授（東京大学医科学研究所）：

遺伝子治療臨床研究の現状と問題点

- 3) 平成8年11月29日  
第1回班会議：東北大学医学部良陵会館
- 4) 平成9年1月17日  
第2回班会議：東北大学医学部良陵会館
- 5) 平成9年5月15日  
第3回班会議：京都国際会館
- 6) 平成10年1月23日  
第4回班会議：慶応大学大会議室
- 7) 平成10年5月20日  
第5回班会議（重点研究第1回）  
仙台国際センター
- 8) 平成10年9月5日  
第6回班会議（重点研究第2回）  
ホテルニューオータニ
- 9) 平成10年10月24日  
第7回班会議（重点研究第3回）  
神戸ポートピア会議場
- 10) 平成11年1月27日  
第8回班会議  
北里講堂（慶応大学医学部図書館2階）

3年間の成果

成果1. 網膜色素変性症及びその類縁疾患の病態解明と治療法の開発

網膜色素変性症の原因遺伝子解明の研究として、すでに知られている常染色体優性遺伝型の原因遺伝子であるrhodopsin, peripherin/RDS, ROMIの解析、常染色体劣性網膜色素変性における原因遺伝子としてarrestin, cGMP phosphodiesterase alpha, beta subunit, X染色体劣性、若年性網膜分離症、またRPの類縁疾患であるchoroideremiaについてCME遺伝子異常の解析を、各疾患の染色体DNAの分離精製、PCR法による遺伝子の調整、増幅、SSCP法によるscreeningで行った（中沢、堀田、玉井）。また網膜特異的新規遺伝子のcloningを行い現在知られていない疾患との関連を探った（小口）。さらに疾患の発症と網膜視細胞に特異的に発現し、視興奮関連蛋白質であるrhodopsin, arrestin, recoverin、や悪性腫瘍と網膜変性類似の症状を呈する、いわゆる癌関連網膜症の症例報告が相次いでいるが、その発症機序の分子機構を明らかにすることが出来た（大黒、吉村）。又RPに認められる

rhodopsin mutationとrhodopsin機能（磷酸化）との関係が解明できた（大黒）。この研究課題では難病特別研究員の大黒がすばらしい成果を上げ、難病医学財団の奨励助成金（平成9年度）を受賞した。

成果2. 加齢黄斑変性症の病態解明と治療法の開発  
網膜色素上皮（RPE）の加齢に伴う機能低下によって脈絡膜新生血管膜が形成され、発症することが知られている。そこで血管内皮細胞と血管新生関連物質の遺伝子発現、RPEにおける細胞増殖因子、増殖抑制因子との関連を明らかにすることが出来た（玉井、石橋、高橋）。さらにごく最近アメリカで報告された加齢黄斑変性症の原因遺伝子が日本人にもその異常が見つかるか否かについても検索し、これはかなり欧米、すなわち白人に特徴的な遺伝子異常であることが明らかにされた。（玉井、吉村）血管内皮細胞と血管新生関連物質の遺伝子発現、加齢に伴って生じる網膜色素上皮（RPE）の細胞増殖因子、増殖抑制因子分泌能の変化と血管新生との関連、実験的脈絡膜新生血管モデルの作成、それに対する放射線療法の有効性の評価も新たに明らかになったり、研究が進行しつつある。（石橋、高橋、堀）これらの研究に対し高橋の共同研究者である緒方（関西医科大学）が第4回Rothe Awardを受賞した。

成果3. 原因不明の視神経疾患の病態解明と治療法の開発

視神経萎縮に対しmitochondria遺伝子を中心に解析を行った。（小口、若倉、大黒）遺伝性視神経萎縮とmitochondria遺伝子異常の解析。視神経炎、多発硬化症および類縁疾患である急性酸財政脳脊髄炎とrhodopsin, arrestin, recoverin等の視細胞特異的な蛋白質との関連性の検索。遺伝性視神経萎縮に対しmitochondria遺伝子を中心に解析を行う。（若倉、小口）さらにこの疾患に対する薬物療法を試みた。（小口）

成果4. 加齢黄斑変性に対する低線量放射線照射、黄斑ドルーゼンに対するレーザー光照射療法の効果判定に関する研究。

治療法として議論の多いレーザー光凝固療法、黄斑下新生血管膜除去、放射線照射療法の視力予後に対する効果を判定し治療法として何れがもっとも効果的かを判定するために努力した。（全員）すなわち現在有効な治療法がない本疾患に対して低線量放射線照射、レーザー光照射療法の視力予後に対する有効性を判定することを大きな目的に設定した。平成9年度評価委員の方々からご指摘を受けた、この疾患に対する症例対照研究について、特定疾患疫学班辻一郎助教授（東北大学）のご協力のもとに研究

を行った（全員）。このは患者の選別、治療費の面からみて限られたものであったが、一部有効の判定が得られた。この治療法についてはその後も海外で議論が多く、どこでも正式な無作為臨床試験はなされていない。幸いこの課題は平成10年度重点研究に取り上げられたため、その項で述べるとおり、出来る限り完全な形でのプロトコールが完成し、正式な無作為抽出法で正式に臨床試験研究を行っている。

成果5. 細胞（組織）移植による網脈絡膜萎縮、加齢黄斑変性、視神経萎縮に対する治療法の開発に関する基礎的研究と臨床応用。

移植による我々の3疾患群の治療法の開発は発足時からの夢であった。

特に、網膜色素上皮は視細胞を維持するために特に重要で、網脈絡膜萎縮、加齢黄斑変性の治療には最も有効である可能性を秘めている。そこでこの色素細胞またはそれに代わりうる虹彩色素上皮細胞の移植の可能性を目指して研究を行った。（玉井）網膜変性モデル動物（RCSラット）では両者とも視細胞変性阻止効果がみられた。変性阻止に重要な役割を果たしていると考えられる塩基性線維芽細胞成長因子のcDNAを組み込んだIPE移植ではその効果が更に高まった。研究2年目霊長類での安全性の実験のあと、3年目には東北大学倫理委員会の承認を得て、実際に患者本人の色素上皮を採取、培養し患者に戻すという世界で初めての試みを6例に行い、現在効果を経過観察中である。さらに人網膜及び虹彩色素上皮細胞に対する遺伝子技術によるcytokineの導入、その細胞の移植効果等はこれからの課題である。（玉井）

現在、視神経萎縮後の視神経再建を目的に視神経再生の為の末梢神経移植、培養Schwann細胞移植の可能性を追求している。（出沢）実験的には、かならずしも末梢神経そのものを用いなくても、培養シュワン細胞を利用して、人工チューブを用いても、その中を神経節細胞の軸索が延びることが明らかにされ、今後の臨床応用の可能性が出たことは大きな成果である。（出沢）この研究に対し出沢は難病医学財団奨励助成金（平成10年度）を受賞した。

成果6. 我々の扱っている疾患は現在有効な治療法にない典型的なものがある。特に世界的に患者団体が出来ており”World Retina”となづけられ、患者側から研究を支援し、治療法の開発を促す活動が活発である。1998年スイス ルガノでの大会で日本支部が3年後2002年に日本で世界大会を開催することが決定されている。これらの疾患に対して”移植”のみならず、薬物治療の開発も急がれている。日本においては保険適用薬品として5種類が投

与されているが、その有効性は誰も明らかにしていない。その理由はこれらの特定疾患の患者の視力が末期には数字では表すことが出来ないような低視力のレベルであるためであった。すなわち”指数弁、手動弁、光覚弁”そして”無光覚：失明”である。しかし、このような概略的な表現では治療法の有効性の有無、視力の経過を正確に評価することは困難であることが世界的に問題になっていた。そこで極低視力のグレード分類のための新しい機器Low Vision Evaluator(LoVE)と名付けた新しい機器を開発した。（玉井）これは白色光、赤、緑、青の3色光で刺激することが出来る。そのため白色光による桿体機能評価のみでなく、黄斑機能を反映する錐体機能評価も可能で、この機器をさらに改良し、今後の我々の班が対象にする3疾患の治療法の開発だけでなく、現在有効であると考えられている治療薬が果たしてどの程度有効なのかの評価に役立てていきたい。この機器はアメリカ網膜色素変性症財団も大きな興味を示しており、世界の本疾患研究者が視力評価のための標準機器として使用することの可能性を検討してもらっている。

# 特定疾患網脈絡膜萎縮加齢黄斑変性、視神経萎縮症調査研究班

班長 玉井 信

東北大学医学部眼科

総括研究報告概要：平成10年度

1. 網脈絡膜萎縮およびその類縁疾患、加齢黄斑変性、視神経萎縮の病態の分子遺伝学的解明。(中沢、堀田、小口、大黒、玉井、吉村、若倉)

これらの特定疾患の分子遺伝学的な解析がなされた。特にアレスチン異常による臨床像の異質性は大きな発見である。またX染色体劣性網膜色素変性や加齢黄斑変性の遺伝子異常の検索では欧米での報告に比べに日本人では極端に低く、人種による特徴として考えられることが明らかになった。又網膜色素上皮特異蛋白の遺伝子異常で網脈絡膜萎縮が発症する症例が発見されたことは色素上皮移植による治療の可能性を示唆するものである。

そのほか若年性網膜分離症の原因遺伝子の解析、最近注目を集めている癌関連網膜症に関する関連遺伝子クローニング、網膜特異蛋白の解析をとうして候補遺伝子の探索も行った。

2. 加齢黄斑変性の病態に対する研究(石橋、高橋、玉井、阿部、湯沢、堀)

本疾患は何らかの理由で脈絡膜から血管新生が発症し、色素上皮または色素上皮と視細胞層に進入することが原因で、特に黄斑部に起きることが視力予後を考える上で問題となる。この病態には非酵素的糖付加反応によって生じるAdvanced glycation end products (AGEs)が沈着するためであることが明らかにされた。又新生血管膜発生過程では血管内皮細胞成長因子(VEGF)とその受容体、形質転換成長因子(TGF $\beta$ )受容体の発現が見られることなどが明らかにされた。

3. 加齢黄斑変性の治療法の開発。(1)(吉村、堀、高橋、石橋)

次の項で述べることに他に、薬物治療としてトラニラストの有効性、インターフェロンによる治療効果が述べられた。さらに実験的ではあるがウイルスベクターを用いた遺伝子導入や、リポフェクション法による成長因子遺伝子導入が試みられ、新生血管膜の直接的な抑制や、視細胞死の抑制の試みがなされた。さらに低線量放射線照射療法の実験的な裏づけとして動物実験モデルシステムの開発が目指され、透明窓を用い独創的な実験モデルが出来つつある。

4. 加齢黄斑変性の治療法の開発。(2)

a. 加齢黄斑変性の低線量放射線治療。

b. 加齢黄斑変性の前駆症である軟性ドルーゼンに対するレーザー治療。

世界的に議論が続いている本疾患に対する治療は辻一郎研究協力者のお蔭で不完全な形ではあるが封筒法により治療効果を推測することが出来た。平成10年1月の班会議では症例数がごく限られていたが、この1年間で何とか各施設治療群、対照群の増加により治療法として確立できるか否かの目途を得ることが出来たことは意義があった。(小椋、湯沢及び全員)

この治療法が真の意味で治療研究としてスタートし、結果を公表出来るためには、班研究評価委員会でも指摘された通り、患者の治療費が研究費から全額負担され、各大学の倫理委員会の承認を得る必要があった。そのため、平成10年度の厚生省厚生科学研究費に申請を行い、重点研究として採択された。この治療研究は別途資料のとおり分担研究者との検討の結果プロトコル、症例報告書が完成し、各50例の低線量放射線治療群、経過観察群と、同様に50例ずつのレーザー照射による軟性ドルーゼン治療群、経過観察群の他施設無作為臨床試験を開始した。コントローラーは基礎班の辻一郎助教授(東北大学公衆衛生学)である。症例は2年間の経過観察を必要としているため全経過のまとめには3年間を要すると思われる。

5. 細胞移植による網脈絡膜萎縮、加齢黄斑変性、視神経萎縮に対する治療法の開発。

細胞移植により加齢黄斑変性、網膜色素変性の治療も漸く基礎実験の段階を終え、世界的には数カ所、20数例に行われたという報告が研究会等でなされている。我々の研究班では本人の虹彩移植を用い、東北大学医学部倫理委員会の承認を受け(平成10年1月)本年度6例の加齢黄斑変性に行うことが出来た(玉井)。経過観察と、他の治療法との比較は今後に残された課題である。網脈絡膜萎縮のあるタイプの症例の遺伝子異常が網膜色素上皮細胞に存在するビタミンAの代謝に重要な蛋白(RPE65)に見つかっており、その症例群には色素上皮または虹彩移植も効果があると思われ、計画中である。

視神経移植についても、かならずしも末梢神経を

移植する必要がなく、培養シュワン細胞の利用ですむ可能性もある。特に視神経萎縮の原因となる病態を選べば近い将来臨床応用も可能になると思われる。  
(出沢)

#### 6. 極低視力のグレード分類のための新しい機器の開発。(玉井)

我々が対象としている特定疾患は何れも病期が進めば数字では表すことが出来ない視力のレベルに陥ってしまう。すなわち指の数が分かる”指数弁”、手が動いているのが分かる”手動弁”、光の有無を判別出来る”光覚弁”そしてそれも失われる”無光覚：失明”である。しかし、このような概略的な表現ではあまりに漠然としており治療法の有効性の有無を正確に評価することは困難であることが世界的に問題になっていた。そこでLow Vision Evaluator (LoVE)と名づけてた新しい機器を開発した。これは白色光、赤、緑、青の3色光で刺激することが出来、桿体のみでなく、黄斑機能を推測できる錐体の機能も評価できる。これを用いて、今後の我々の班が対象にする3疾患の治療法の開発に役立てていきたい。

# シュワン細胞による視神経再生の誘導

Optic nerve regeneration induced by Schwann cell transplantation

研究者氏名：出沢真理（千葉大学医学部眼科）

共同研究者氏名：根岸久也、忍足俊幸、安達恵美子（千葉大学医学部眼科）

Mari Dezawa, Hisanari Negishi, Toshiyuki Oshitari, Emiko Adachi-Usami

Department of Ophthalmology, Chiba University School of Medicine,

## 【抄録】

障害を受けた視神経は再生しないと考えられてきたが、我々はこれまでの研究から末梢神経由来のシュワン細胞を主成分とする環境に置き換えることによって、視神経の再生が誘導されることを明かにしてきた。ラット眼球側切断視神経への移植を再生モデルとして用い解析した。その結果、末梢神経移植の実験からin vivoにおける視神経再生では、細胞外基質や神経成長因子の供給では不十分であり、生きたシュワン細胞を足場とした直接的な接触と構造的接着機構の介在が必要であることが判った。これらの見知をもとに人工移植片を作成したところ、培養シュワン細胞を主成分とし、細胞外基質と神経成長因子の三者を組合せた移植片において、20 - 30%の網膜神経節細胞の生存・再生を認めた。以上の結果から、シュワン細胞には視神経再生誘導能があり、人為的に移植という手段を用いて視神経環境を変換することによって再生させることが可能であることが明かとなった。

Injured optic nerve is thought to be incapable of regeneration. We have found that the intrinsic capacity of optic nerve to regenerate is induced when provided with Schwann cells. In this study, transplantation to retinal stump of transected adult rat optic nerve is used as a regeneration model. The peripheral nerve transplantation study suggested that extracellular matrix or growth factors are insufficient for successful regeneration in vivo, instead, the direct contact of optic nerve axons to viable Schwann cells is indispensable for regeneration, making mechanical and adhesive structures. Artificial Schwann cell graft made by cultured Schwann cell, extracellular matrix and neurotrophins provided suitable substrate for regeneration, resulted in 20 to 30 % survival and regeneration of retinal ganglion cell. These results suggested that viable Schwann cells have ability to induce stable optic nerve regeneration, and that artificial milieu made by cultured Schwann cell can substantially enhance optic nerve regeneration.

キーワード：視神経、再生、移植、シュワン細胞、成長因子、移植片 Key Words: Optic nerve, Regeneration, Transplantation, Schwann cell, Growth factor, graft,

## 目的

これまで、変性過程に陥った視神経は再生不能であると考えられてきた。1) しかし人為的操作による再生への可能性を模索すべく、我々は末梢神経移植、さらに末梢神経の構成細胞であるシュワン細胞を用いた人工移植片による視神経再生を試み、再生における必須要件を検討してきた。また再生時の視神経内グリア細胞の反応を解析し、変性過程の視神経と比較検討し、シュワン細胞によるグリア細胞への影響も検討した。

## 方法

末梢神経に含まれる3要素、即ち細胞外基質、神経成長因子、シュワン細胞はこれまで主としてin vitroの実験を通じて、神経再生において大きく関与していることが示唆されてきた。2), 3) そこでこれらの因子と視神経再生との関連を検討するために以

下3種の自家移植片を作成し、成体ラットの切断視神経に移植した。①細胞性移植片（シュワン細胞、細胞外基質、成長因子が存在する坐骨神経）；②無細胞性移植片（細胞外基質のみ）；③部分細胞性移植片（細胞外基質と成長因子から構成される）。移植後の視神経再生を微細形態学的、並びに免疫組織化学的手法を用いて細胞接着構造、細胞接着分子の観点から観察した。さらに人為的に作成した移植片による視神経再生を試みた。即ち培養シュワン細胞、細胞外基質であるMatrigel、さらに神経成長因子（NGF, BDNF, NT-4）の三者を組み合わせ、diIによる再生網膜神経節細胞の標識を行い、再生における最適条件を評価した。また末梢神経移植による再生視神経内グリア細胞の反応を共焦点レーザー顕微鏡、電顕にて比較検討した。

## 結果

末梢神経移植においては生きたシュワン細胞が存在する細胞性移植片において視神経再生が確認され、シュワン細胞のない無細胞性及び部分細胞性移植片では見られなかった。また再生視神経は、末端である成長円錐を含めて軸索は移植片内のシュワン細胞と直接接触しながら伸長していた。4) 再生視神経とシュワン細胞との関連を詳しく観察すると、両者の間にNCAM, L1等の視神経発生時に発現する細胞接着因子の局在、接着構造であるtight junction、さらにconnexin 32, 43等のgap junction蛋白の免疫反応を認めた。5) 特にtight junctionにおいては、freeze-fracture法と免疫電顕を用いて解析したところ、小規模で局所的な構造をとりZO-1のtight junction associate proteinの発現を認めた。人工移植片の実験においては細胞外基質のみを成分とした移植片では再生がほとんど見られず(2 - 3%)、培養シュワン細胞、細胞外基質、神経成長因子の3者が構成する人工移植片において高い再生率をdIL逆行性標識において観察した(25%前後)。また、BDNFの硝子体注入を組合せることによって、30%前後の再生を認めた。シュワン細胞移植による視神経内グリア細胞の変化では、変性視神経において通常グリオーシスを起こすとされているアストロサイトは、再生視神経ではシュワン細胞と直接接触し、再生神経を受け渡していると思われる像が観察された。また、再生を直接阻害するとして知られるオリゴデンドロサイトのマーカーO4の減弱、及びマクロファージ/ミクログリア系を標識するED1陽性細胞の視神経内への侵入も再生初期に観察され、シュワン細胞による視神経再生はグリア細胞の種々の変化も引き起こしている可能性を示唆した。

#### 結論

以上の結果より、1)シュワン細胞との直接的な接着は視神経再生において必須要件であり、細胞接着分子や接着構造(tight junction, gap junction)を介した機構が存在する。2)培養シュワン細胞を用いて人為的に作成した人工移植片の環境であっても視神経の再生が誘導可能であり、細胞外基質や神経成長因子の存在は再生率を向上させるが、それ以上にシュワン細胞の存在は必須条件である。3)本来再生にとって阻害的であるグリア細胞はシュワン細胞の存在によって影響を受けることが示唆された。特にアストロサイトはシュワン細胞と協同して支持的に働く可能性が考えられた。また、多くのサイトカインを分泌することで知られているマクロファージ/ミクログリア系細胞の視神経内への侵入が見られ、これらの細胞の積極的関与が考えられた。今後、人工移植片の上丘への架橋手術における機能的解析、並びに網膜神経節細胞への生存因子の遺伝子導入を

通じて、視神経再生への総合的アプローチを検討している。

#### 文献

- 1) So KF, Aguayo AJ. Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. *Brain Res*, 328: 349-354, 1985.
- 2) Thanos S, Baehr M, Barde YA, Vanselow J. Survival and axonal elongation of adult rat retinal ganglion cells; in vitro effects of lesioned sciatic nerve and brain derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci*, 1: 19-26, 1989.
- 3) Bixby JL, Lilien J, Reichardt LF. Identification of the major proteins that promote neuronal process outgrowth on Schwann cells in vitro. *J Cell Biol*, 107: 353-361, 1988.
- 4) Dezawa M, Kawana K, Adachi-Usami E. The role of Schwann cells during retinal ganglion cell regeneration induced by peripheral nerve transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997; 38: 1401-1410.
- 5) Dezawa M, Nagano T. Immunohistochemical localization of cell adhesion molecules and cell-cell contact proteins during regeneration of the rat optic nerve induced by sciatic nerve autotransplantation. *The anatomical record*. 1996; 246: 114-126.

# 培養シュワン細胞を用いた人工移植片による 網膜神経節細胞の生存・再生率の評価

Survival and regenerating rate of retinal ganglion cells  
after transplantation of artificial Schwann cell graft

根岸久也、出沢真理、忍足俊幸、安達恵美子（千葉大学医学部眼科）

Hisanari Negishi, Mari Dezawa, Toshiyuki Oshitari, Emiko Adachi-Usami Department  
of Ophthalmology, Chiba University School of Medicine

## 要約

損傷や変性に対して再生しない視神経が、培養シュワン細胞を主成分とする人工移植片を移植することにより再生が誘導されるかを検討し、また網膜神経節細胞の生存・再生率も合わせて評価した。培養シュワン細胞に各種操作を加えて人工移植片を作成し、成熟ラットの視神経を切断後移植した。術後3週目、移植片内への神経線維の再生が確認され、再生関連タンパク（GAP-43, MAG）、細胞接着分子（L1, NCAM）の発現が認められた。電子顕微鏡観察では多くのものがシュワン細胞に接触しており、再ミエリン化の像も観察された。網膜神経節細胞の生存・再生率は、移植片内に神経成長因子を加えたものはコントロールと比較して23%前後であった。硝子体へのBDNF注入を追加したものは最も高く27%であった。以上の結果より、人為的な環境下においても視神経の再生が誘導可能であり、また各種神経成長因子の投与によりその再生・生存率を増加させることが可能であった。

We assessed the condition of artificial milieu for the induction of optic nerve regeneration, and evaluated the degree of survival and regenerating retinal ganglion cell (RGC). Culture Schwann cells, which were purified from dorsal root ganglion of newborn rats, were suspended in Matrigel containing neurotrophic factor. They were transferred into the silicon tube and transplanted to the retinal stump of the transected adult rat optic nerve. After 3 weeks post-operation, regenerating optic nerve fibers were recognized, and the expression of GAP-43 and cell adhesion molecules (NCAM, L1) were detected in the nerve fiber within the graft. In electron microscopic study, regenerating axons always contact with Schwann cells, some of them were myelinated by Schwann cells. The degree of surviving RGC was about 23% when supplemented with cultured Schwann cells and neurotrophins. The combination of BDNF intravitreal injection showed 27%. These results suggest that the combination of Schwann cells, growth factors and extracellular matrix are efficient substrates for optic nerve regeneration. Apparently cell adhesion molecules and neurotrophin receptors are involved in optic nerve regeneration.

キーワード：視神経、神経再生、網膜神経節細胞、シュワン細胞、神経成長因子、移植

Key Words: optic nerve, regeneration, retinal ganglion cell, transplantation, Schwann cell, nerve growth factor, cell adhesion molecules, GAP-43, glial cells,

## 目的

哺乳類の視神経は、損傷や変性に対して再生することができない。1)この再生を阻む最大の要因は、そのグリア環境にあることがこれまで示唆されてきた。つまり、視神経を取り巻くグリア細胞の一つであるアストロサイトは、視神経損傷後、肥大・増殖し再生しようとする神経線維の進路を塞いでしまう。

2) また、オリゴデンドロサイトのミエリン残渣は、直接的に神経突起の伸長を阻害することが示されている。3) これに対し、細胞構成の異なる末梢神経は損傷に対し旺盛に再生し、また末梢神経系は視神経の再生を誘導することも判っている。4) 我々はこれまで末梢神経自家移植の研究を通して、視神経線維と末梢神経内のシュワン細胞との直接的な接触が再生にとって必要不可欠であり、その際様々な細

胞接着分子や再生関連タンパクを発現させ、再生神経線維がシュワン細胞を足場としながら伸長していくことを示してきた。5) - 7) このような見知より、培養シュワン細胞を主成分とする人工移植片を作成し、切断視神経に移植することにより視神経の再生が誘導可能であるかどうか、またその際の網膜神経節細胞の再生・生存率についても合わせて検討した。

#### 方法

1) 人工移植片の作成：生後1日の新生仔ラット(Wistar種)脊髄後根神経節よりシュワン細胞を単離・培養し、S-100にて確認の後、細胞数約106個/mlとLaminin, Fibronectin, type IV collagen等の細胞外基質を含むMatrigelを80%、NGF, BDNF, NT-4 いずれかの神経成長因子を50ng/ml濃度に調整し、各種組み合わせで内径約1mmのシリコンチューブに包埋し移植片を作成した。成熟ラット(Wistar種)の視神経を眼窩内で切断後、眼球側視神経に移植片を吻合し、遠位端は生体ボンドを用いて盲端とした。

2) 人工移植片における視神経再生：術後3週目における移植片内を、GAP-43, L1, NCAM, MAG, neurofilament等の免疫組織化学により解析した。また、電子顕微鏡を用いて、移植片内の神経線維とシュワン細胞との関係も形態学的に観察した。

3) 人工移植片移植による網膜神経節細胞の再生・生存率評価：移植術後3週目に再度移植片を露出し、移植片を中程にて切断しdiI色素を投与し逆行性に網膜神経節細胞を標識した。標識された細胞数をMacintosh NIHimage softwareを用いて計算し、無処置の対象群と比較して再生・生存率を計算した。

#### 結果

術後3週目の共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察において、人工移植片内の再生神経線維が確認され、神経線維にそって再生関連タンパクであるGAP-43やL1, NCAM等の細胞接着分子の発現が認められた。またミエリン化の初期に発現されるといわれているミエリン関連タンパク(MAG)もneurofilamentとの2重染色により、再生線維に発現していることが確認された。術後3週目の電子顕微鏡観察では、移植片内に認められるほとんどの再生線維はシュワン細胞と接触しており、単独で細胞外基質の中を伸長する像は認められなかった。再生線維の中にはシュワン細胞による再ミエリン化が生じているものも認められた。網膜神経節細胞の逆行性標識による再生・生存率は、シュワン細胞を加えず細胞外基質成分だけをシリコンチューブに入れた場合では $2 \pm 1.01\%$ であったが、シュワン細胞や各種神経成長因子を加えることにより $23 \pm 6.98\%$ に増加し、さらに硝子体に

BDNF (50ng/ml)を加えたものでは、一番高く $27 \pm 16.47\%$ であった。

#### 結論

以上の結果より、

1、培養シュワン細胞、細胞外基質成分、神経成長因子を用いて人為的に作成した人工移植片の環境においても、視神経切断時に網膜神経節細胞の再生を誘導させることが可能であった。

2、再生神経線維のほとんどが、シュワン細胞と接触しており、人工移植片内の再生神経線維においても、末梢神経移植の時と同様に、再生関連分子(GAP-43, MAG)や細胞接着分子の発現が認められた。

3、電子顕微鏡観察において、人工移植片内の再生視神経に、再ミエリン化が認められた。

4、切断された網膜神経節細胞の生存、再生において、NGF, BDNF, NT-4などの神経成長因子の投与は効果的であった。

#### 考察

本来は再生しないはずの中枢神経のひとつである視神経も、シュワン細胞との直接的な接着により再生が誘導される。このことに着目し、培養シュワン細胞を主成分とした人工移植片を用いて視神経を再生させるという試みは、本研究の独創的な点であると考えられる。視神経が再生する際には、その再生軸索が常にある種の細胞成分、特にシュワン細胞と接触することが必要であるが、末梢神経移植の場合、そこに含まれるシュワン細胞の数を増やすことができない。培養シュワン細胞を用いた人工移植片の場合、これまでの実験結果からそこに含まれるシュワン細胞の数を、末梢神経移植の場合に対し約100倍近く増やすことが可能である。そのため、視神経がより多くのシュワン細胞と接触することができるため、網膜神経節細胞の生存率や、視神経再生率を上げることができると考えられる。また末梢神経の自家移植のような煩雑さがなく、投射領域の人為的制御なども人工移植片であれば可能である。

今後は、上位中枢である上丘へ移植片を伸ばし、さらなる視神経再生・生存率向上や視神経回路網の再構築へ向けて研究を進める予定である。

#### 文献

- 1) Aguayo AJ. Axonal regeneration from injured neurons in the adult mammalian central nervous system. In: Cotman CW, eds. Synaptic Plasticity. New York: Guilford Press; 1985:457-484.
- 2) Luizzi FJ, Lasek RJ. Astrocytes block



axonal regeneration in mammals by activating the physiological stop pathway. *Science* 1987; 237: 642-645.

3) Schwab ME, Caroni P. Rat CNS myelin and a subtype of oligodendrocytes in culture represent a nonpermissive substrate for neurite growth and fibroblast spreading. *J Neurosci*. 1988; 8: 2381-2393.

4) Weinberg H. J. and Spencer, P.S. (1978) The fate of Schwann cells isolated from axonal contact. *J. Neurocytol.* 1978; 7: 555-569.

5) Dezawa M, Nagano T. Contact between regenerating axons and the Schwann cells of sciatic nerve segments grafted to the optic nerve of adult rats. *J Neurocytol.* 1993; 22: 1103-1112.

6) Dezawa M, Nagano T. Immunohistochemical localization of cell adhesion molecules and cell-cell contact proteins during regeneration of the rat optic nerve induced by sciatic nerve autotransplantation. *The anatomical record.* 1996; 246: 114-126.

7) Dezawa M, Kawana K, Adachi-Usami E. The role of Schwann cells during retinal ganglion cell regeneration induced by peripheral nerve transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38: 1401-1410.

19980849

報告書 P. 11－14は下記に掲載

**Effects of Light and Dark Environment on Regeneration of Carp Optic Nerves. (Letter to the editors)**

Mari Dezawa, Akiko Ohtsuka, Yukio Shimoda, Emiko Adachi-Usami, John D. Steeves and Eisuke Eguchi

Experimental Eye Research. Volume 66 Number 5, pp.681-684, 1998

19980849

報告書 P. 15－19は下記に掲載

**Putative gap junctional communication between axon and regenerating Schwann cells during mammalian peripheral nerve regeneration. (Letter to Neuroscience)**

M. Dezawa, T. Mutoh, A. Dezawa and E. Adachi-Usami  
Neuroscience. Volume 85 Number 3, pp.663-667, 1998

# レーベル病のmtDNA変異部位周辺に見られる正常者における変異

Mitochondrial DNA polymorphisms adjacent to known Leber's hereditary optic neuropathy-associated mutations in normal subjects.

豊岡裕子<sup>1</sup> 山辺晴美<sup>1</sup> 大谷英樹<sup>2</sup> 市辺義章<sup>3</sup> 若倉雅登<sup>3</sup>

1) 北里大学病院臨床検査部 2) 同医学部臨床病理

3) 同眼科

Yuko Toyo-oka<sup>1</sup> Harumi Yamabe<sup>1</sup> Hideki Ohtani,MD<sup>2</sup> Yoshiaki Ichibe,MD<sup>3</sup> Masato Wakakura,MD<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical laboratory,<sup>2</sup>Clinical Pathology, and <sup>3</sup>Ophthalmology, Kitasato University, School of Medicine, Sagami-hara, Kanagawa, Japan

## 和文抄録

遺伝性の視神経疾患であるレーベル病 (Leber's hereditary optic neuropathy) ではミトコンドリアDNA (mt DNA) の点突然変異が存在する。日本人においては、NADH脱水素酵素サブユニット4 (ND4) 領域の第11778番G → A変異の頻度が欧米人に比べ高いのが特徴である。今回我々はmt DNA11778変異をはじめとする4カ所の領域をPCRで増幅し、non-RI SSCP (Single Strand Conformation Polymorphisms)、ダイレクトシーケンスを用いて、日本人における正常61名のmt DNAの変異の頻度を検索した。61名中1名にSecondary mutationの一つと考えられている3394T → C変異が1名検出された。その他アミノ酸変化を伴う11696G → A変異1名、アミノ酸変化を伴わない14476G → A変異5名、14471T → C変異2名が確認された。これらは遺伝的多型であった。9804を含む領域では変異は認められなかった。

Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) is known to carry specific mitochondrial DNA (mtDNA) mutations and in Japanese patients, a G11778A mutation is most frequently found. In our laboratory, mtDNA mutations are determined using polymerase chain reaction (PCR)-non radioisotopic-single strand conformation polymorphisms (non-RI SSCP) followed by direct sequencing method. To detect mtDNA mutations in normal subjects, blood cells from sixty-one healthy Japanese volunteers are analyzed using this method. A T3394C which is considered a secondary mutation was found in one (female) subject. Other mutations which are considered non-pathogenetic polymorphisms included G11696A in one subject, G14476A in 5 and T14471C in 2. The latter two mutations are not accompanied by amino acid replacement. The region containing 9804 where a very rare possibly pathogenetic mtDNA mutation is found in one patient with LHON was highly preserved in normal subjects.

## キーワード

Leber's hereditary optic neuropathy (レーベル病)  
mitochondrial DNA (ミトコンドリアDNA)  
non-RI single strand conformation polymorphisms (non-RI SSCP)  
adjacent polymorphisms (遺伝的多型)

## 【はじめに】

レーベル病 (Leber's hereditary optic neuropathy) は両眼性の急激な視力低下で発症し、視神経萎縮へ進行する遺伝性の視神経疾患である1)~3)。その遺伝形式は母性遺伝でミトコンドリアDNA (mt DNA) の点突然変異が見出されている。日本人においては、NADH脱水素酵素サブユニット4 (ND4) 領域の第11778番G → A変異の頻度が欧米

人に比べ高いのが特徴である1)~3)。今回我々はmt DNA11778変異をはじめとする4カ所の領域をPCRで増幅し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動と銀染色を組み合わせたnon-RI SSCP (Single Strand Conformation Polymorphisms)法を用いて、日本人における正常61名のmt DNAの変異の頻度を検索したので報告する。