

【材料および方法】

A. 検索対象・DNA抽出 21～53歳の正常対象男性20名、女性41名の末梢血を検索に使用した。DNA抽出は既報の方法に従って行った⁴⁾⁵⁾。また同様に、過去に当検査部でmtDNA変異が同定されレーベル病と診断された18家系34例についても再検討した。

B. PCR

PCRに用いたPrimerを下記に示す。

(mtDNA11778)

P-1:5'>CGTAGTAACAGCCATTCTCAT<3'(11647-11667)

P-2:5'>GAGGCTTGCTAGAAAGTCATC<3'(11851-11832)

(mtDNA3460)

P-1:5'>TTGTACCCATTCTAATCGCAA<3'(3355-3353)

P-2:5'>AGGTCGGGGCGGTGATGTA<3'(3535-3517)

(mtDNA14484)

P-1:5'>TCTTTCACCCACAGGACGAA<3'(14351-14370)

P-2:5'>GTGGTCGGGTGTGTTATTAT<3'(14565-14546)

(mtDNA9804)

P-1:5'>CTGAGCTCACCATAGTCTAAT<3'(9641-9661)

P-2:5'>GCTTCGAAGCCAAAGTGATG<3'(9916-9897)

PCRは既報に従い、97°C1分、55°C1分、72°C1分の酵素反応を1サイクルとし、25 サイクルの増幅を行った⁴⁾⁵⁾。

C. non-RI SSCP

既報の方法にてPhast System (Pharmacia, Uppsala, Sweden)を用いて、20%ホモジニアスポリアクリルアミドゲル・250V 10mA 10°C 400vh、15°C 420VhのSSCP電気泳動を行い、Silver Stain Kit (Pharmacia)にて検出した⁴⁾⁵⁾。D. ダイレクトシーケンス Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Perkin Elmer, Foster City, CA, USA)を用いてサイクルシーケンス反応を行い、310Genetic Analyzer (Applied Biosystems)にて解析した。

【結果】

A. mtDNA11778を含む領域

non-RI SSCPの解析の結果、正常51名中1名(2.0%)にバンドシフトが検出された(図1; レーン5)。このバンドシフトは11778G→A変異を持つレーベル病患者およびその家族のホモプラスミー(図1; レーン2, 7)やヘテロプラスミー(図1; レーン3)

のバンドパターンとは異なっていた。ダイレクトシーケンスの結果、11696G→Aの一塩基置換が確認された。また、レーベル病患者にも11778G→A変異と11696G→A変異の両方を持つ症例も見られた(図1; レーン6)。

B. mtDNA3460を含む領域

正常61名中1名(1.6%)にバンドシフトが検出された(図2; レーン2)。ダイレクトシーケンスの結果、3394T→Cの一塩基置換が確認された。この変異によりND1のコドン30のチロシンがヒスチジンに変化していた。

C. mtDNA14484を含む領域

non-RI SSCPの解析の結果、2種類のバンドシフトが検出された(図3)。ダイレクトシーケンスの結果、正常61名アミノ酸置換を伴わない一塩基置換が5名(14476G→A), 2名(14471T→C)見られた。

D. mtDNA9804を含む領域

non-RI SSCPの解析で正常61名からバンドシフトは見られなかった。

【考察】

レーベル病に関するmtDNAの変異を含む4カ所の領域を、日本人の正常61名についてnon-RI SSCPを用いてスクリーニング、解析を行った。11696G→Aの一塩基置換はND4のコドン313のバリンがメチオニンに変化を伴うが、このコドン313は異種間で保存性の低いアミノ酸であり、遺伝的多型と考えられた⁷⁾。この変異は11778変異を有するレーベル病患者でも18家系中1家系(5.6%)に見られ、解析上注意を要する。Johnsは制限酵素消化法の解析で、レーベル病原因遺伝子付近に偽陽性率2～7%で遺伝的多型が見られると報告している⁸⁾。また、Secondary mutationの一つと考えられている3394T→C変異が1名検出されたが、この変異は正常人で頻度1～2%以内と報告されている³⁾。Secondary mutationは疾患の発症や程度、あるいは経過などの臨床所見と関係しているか否か明確になっていないが、正常人での変異頻度が極めて低く、ミトコンドリア機能に変化が起こる可能性のあるもので、レーベル病における変異発現部位として注目してゆくべき領域と考える。この他にも、mtDNAには多くの多型が存在し⁹⁾、今回も3つの多型が検出されている。一方9804を含む領域では今回の対象では1例もバンドシフトが見られず、この領域はより保存性が高いと考えられた。これまで1例、9804変異を有する視神経症を発見しているが⁹⁾、今後もこの領域には注目して解析例を増やしたいと考えている。

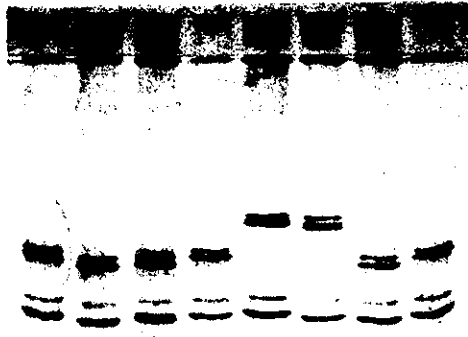
レーベル病のmtDNAの変異について、多くの研究者の報告により今までPrimary mutationと考えられていた変異がSecondaryに置き換えられ、また

mtDNA9101のように新たな変異の可能性が示されるものもある¹⁰⁾。多くの変異についてスクリーニングを行うにはnon-RI SSCPが適しており、それに伴い今後も正常人のデータを蓄積、比較が必要と考えられた。

文献

- 1) Wallace DC, et al : Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242 : 1427~1430, 1988
- 2) Newman NJ : Leber's hereditary optic neuropathy. *Arch Neurol* 50 : 540~548, 1993
- 3) 小口芳久 : Leber病. 臨床DNA診断法(古床敏行, 他編), 東京 : 金原出版, 1995. p693~695
- 4) 豊岡裕子, 他 : メチルマロン酸血症の一家系における新しい遺伝子異常とその非RI-SSCP法による検出. *臨床病理* 43 : 625~629, 1995
- 5) Wada C, et al : Genomic instability of microsatellite repeats and its association with the evolution of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 83 : 3449~3456, 1994
- 6) Wakakura M, et al : Bilateral optic neuropathy with mitochondrial DNA 9804 mutation detected by non-isotopic single-strand conformational polymorphism. *Neuro-ophthalmology* 19 : 7~12, 1998
- 7) 豊岡裕子, 他 : レーベル病におけるミトコンドリアDNA11778変異の非RI-SSCPによる解析. *臨床病理* 44 : 676~680, 1996
- 8) Johns DR, Newfeld MJ : Pitfall in the molecular genetic diagnosis of Leber's hereditary optic neuropathy(LHON). *Am. J Human Genetics* 53 : 916-920, 1993
- 9) Anderson S, et al : Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290 : 457~465, 1981
- 10) Lamminen T, et al : ATPase 6/9101 mutation in LHON. *Neuro-ophthalmology* 20 : 20, 1998(abstract)

1 2 3 4 5 6 7 8



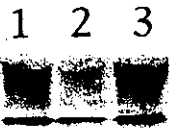
- 1 Normal
- 2 nt11778G→A(100%)
- 3 nt11778G→A(60%)
- 4 Normal
- 5 nt11696G→A
- 6 nt 11778G→A+nt11696G→A
- 7 nt11778G→A(100%)
- 8 Normal

20%H,10°C,400vh
mt11778p-1,2

non-RF-SSCP

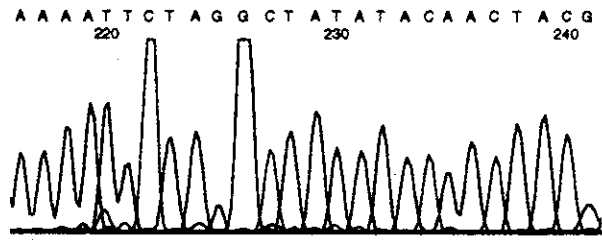
図1 レーベル病患者および正常人におけるnt11778を含む領域のnon-RF SSCP

nt11778を含む領域で正常人1名に遺伝的多型の11696G→A変異が検出された。non-RF SSCPにおいてこの変異のバンドシフトは(レーン5)、レーベル病患者11778変異ホモプラスミー(レーン2, 7) その家族ヘテロプラスミー(レーン3)のバンドパターンとは異なっていた。また、レーベル病患者にも11778G→A変異と11696G→A変異の両方を持つ症例も見られた(レーン6)。



Normal

TAT (Tyr)



- 1 Normal
- 2 nt3394T→C
- 3 Normal

20%H,10°C,400vh
mt3460p-1,2

non-RF-SSCP

VBC-98

CAT(His)

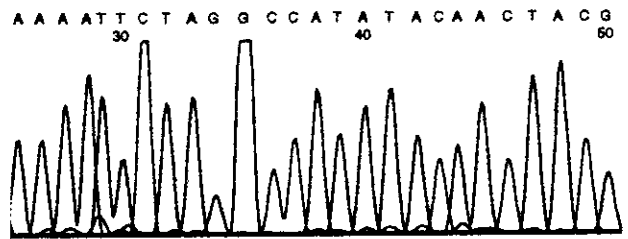
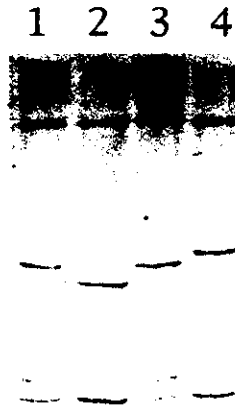


図2 nt3460を含む領域で見られた変異

nt3460を含む領域のnon-RF SSCPにおいて正常人1名にバンドシフトが見られ(レーン2)、ダイレクトシーケンスの結果nt3394T→Cの一塩基置換が検出された。

Sequence



- 1 Normal
- 2 nt14476G→A
- 3 Normal
- 4 nt14471T→C

20%H, 10°C, 400vh
mt14484p-1,2

non-RI-SSCP

図3 nt1484を含む領域のnon-RI SSCP

nt1484を含む領域のnon-RI SSCPで正常人に2つのバンドシフトパターンが見られた。これらはアミノ酸置換を伴わない遺伝的多型で、nt14476G→A5名（レーン2）、14471T→C2名（レーン4）であった。

19980849

報告書 P. 25－30は下記に掲載

Bilateral optic neuropathy with mitochondrial DNA 9804 mutation detected by non-isotopic single-strand conformational polymorphism. (Clinical research)

Masato Wakakura, Eri Hayashi, Yuko Toyo-oka, Harumi Yamabe, Chieki Wada, Hideki Ohtani, Satoshi Ishikawa

Neuro-ophthalmology. Volume 19 Number 1, pp.7-12, 1998

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

Corticosteroid-dependent Optic Neuropathy may be Independent Clinical Entity
Differentiated from Idiopathic Optic Neuritis

研究者：若倉雅登 所属：北里大学医学部眼科

Masato Wakakura Department of Ophthalmology, Kitasato University School of Medicine

要約

日米の視神経炎多施設治療トライアルの結果により、特発性視神経炎に対するパルス療法を含むステロイド剤治療は、最終視機能で対照群と差がないとの結論が得られたが、特発性視神経炎と臨床所見は酷似しているものの、ステロイド剤に高い依存性を有する症例が存在することを報告する。ステロイド剤の減量や中止後に再発する例は7例確認でき、発症年齢は9-59歳（平均37.9歳）で、男女比は6:1で、2度以上の再発をくり返し、経過中を含め両眼とも障害されたものが計5例であった。自己抗体が全例証明され、抗核抗体陽性（40倍以上）5例とmicrosome testなどの甲状腺関連抗体陽性3例が多く、P型抗好中球細胞質抗体（PANCA）陽性も2例にみられた。全経過を通じてMRI上脱髄ブランクはなく、また最終視力0.1以下の例が3例で、回復例でもかなりの視野異常が残存するのが特徴で、これらを自己免疫性視神経症として、特発性視神経症と区別すべきと考えられた。

Multicentric optic neuritis treatment trial performed in Japan and USA independently indicated that corticosteroid treatment (including pulse treatment) did not gain any beneficial effects on final outcome of vision. The present study shows the presence of corticosteroid-dependent optic neuropathy which may be difficult to differentiate clinically from idiopathic optic neuritis. Seven patients (9 to 58 years, male to female ratio is 1:6) with corticosteroid-dependently recurrence were confirmed in clinical records. These patients recurred at least twice and five patients of them had bilateral diseases. Autoantibodies were detected in all patients; Positive antinuclear antibody ($> \times 40$) was seen in 5 patients, thyroid-related antibodies including microsome test and thyroid test, in 3 and perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody (P-ANCA), in 2 patients. The disease is characterized by negative demyelinating plaques and residue of highly visual loss or prominent visual field defects even in patients with good visual recovery. This type of corticosteroid-dependent and autoimmune optic neuropathy should be considered as a clinical entity independent of idiopathic optic neuritis.

キーワード：ステロイド剤依存性視神経症、特発性視神経炎、自己免疫性視神経症、自己抗体、甲状腺関連抗体

corticosteroid-dependent optic neuropathy, idiopathic optic neuritis, autoimmune optic neuropathy, autoantibody, thyroid-related autoantibodies.

目的

視神経炎多施設治療トライアルの結果が米国および日本で得られ、特発性視神経炎に対してステロイド剤のパルス治療は、初期の回復速度を上げるものの、最終視機能では対照群と差がないことが明らかになった^{1,2)}。また内服治療は再発率を上げるので、禁忌であることが、米国のトライアルで証明された¹⁾。しかし、臨床経験の中でステロイド依存性を示す視神経症が確かに存在し、それは治療上からも特発性視神経炎とは区別して考えるべきである。本研究

究ではそうしたステロイド依存性視神経症が臨床的特徴から特発性視神経炎と区別できないかを検討した。

方法

過去5年間に北里大学眼科で経験した、ステロイド剤の減量や中止後に再発を繰り返す、ステロイド依存性を示した視神経症の症例のうち、初発より10カ月以上経過が追跡されているものを選択し、臨床的特徴と経過を調査した。

結果

ステロイド依存性を示した視神経症は7例(男1:女6)あり、発症年齢は9-59歳であった(表1)。視力低下は初発時片眼性3例、両眼性4例であるが、片眼発症のうち1例も経過中両眼視力低下を来したので、結局両眼の障害は5(71%)であった。初発の視力低下は全例0.3以下で、最終視力が0.1以下になったものは3例6眼であった。視力低下前後に眼痛を伴った例が2例存在した。経過中MRIで脱髄プラークが発見された症例はなかった。全例が何らかの自己抗体が検出された。複数の抗体がみられた症例が多かったが、最も陽性率が高かったのは抗核抗体(40倍以上の症例が5例)で、次いで甲状腺関連抗体3例(thyroid test 2例、microsome test 2例)が多かった。甲状腺関連抗体陽性例はいずれも甲状腺機能は正常であったが、1例で過去に橋本病が診断されていた。なおこの例では重症筋無力症も合併しており、アセチルコリン受容体抗体も陽性であった。P型抗好中球細胞質抗体(PANCA)陽性は2例あったが、うち1例(58歳女性)はステロイド剤中止後3カ月に両眼無光覚弁となり、最終的には画像より特発性肥厚性硬膜炎と診断された。

考察

Kupersmithらのグループが提唱した自己免疫性視神経症は若年女性におこる再発性の視神経症で、抗核抗体や抗dsDNA抗体、リウマチ因子などが同定される膠原病性血管症による視神経症であるが³⁾、まだ独立した範疇として十分確立あるいは認識されていなかった。特に日本では確実例の報告がほとんどなく、筆者らが以前これに相当する症例を見い出そうとしたが、明確な例には当たらなかった。今回見い出された症例は抗核抗体陽性例が多いが、これは特に女性でははやや非特異的な所見である可能性もある。しかし、抗核抗体以外の自己抗体を合わせ持っている症例が多く、そのような場合はより診断的価値がでるかもしれない。今回の症例で際立った特徴は、これまで指摘のない甲状腺関連抗体陽性例が多かったことである。thyroid test, microsome testは抗体検出法としてはやや古い検査であるが、橋本病の診断やeuthyroid Graves病の診断には、なお重要性のある検査法である。症例3のような橋本病合併例も存在し、甲状腺関連抗体陽性視神経症は、あるいは独立的な範疇かもしれず、今後注意してゆくべき点と考える。また、最近報告されはじめたPANCA陽性例⁴⁾も2例存在した。1例は特発性肥厚性硬膜炎と最終的に診断されたやや高齢者なので、他の症例とは区別すべきかもしれないが、P-ANCAはもうひとつの視神経症に結びつく自己抗体として、注目すべきと思われる。今回挙げた症例は、好発年

齢、視力などの視力低下の程度、眼痛の有無などからは特発性視神経炎と非常に区別しにくいものであったが、いくつかの特徴によって最終的には区別できるものと思われる。たとえば、いずれの症例もMRIで脱髄所見が得られない点は、極めて本質的な特徴である。また、視力低下例が多く、視力の回復例でもかなりの視野異常が残っていたことも特徴であり、自己免疫性視神経症の提唱者は血管症と考えているが³⁾、そんなことを支持する臨床所見とも考えられる。甲状腺関連抗体陽性例、P-ANCA陽性例も含めて、ステロイド依存性であること、脱髄巣が決してみられないこと、しばしば他の自己抗体も証明されるといった共通した特徴を有することから、「ステロイド剤依存性視神経症」もしくは広義の「自己免疫性視神経症」として特発性視神経炎とは区別して、独立した疾患範疇として扱うべきことを提唱する、今後の症例の蓄積、適切な治療方法の検討が必要である。

文献

- 1) Beck RW, Cleary PA, Anderson MM et al: A randomized, controlled trial of corticosteroids in the treatment of acute optic neuritis. *New Eng J Med* 326:581-588,1992.
- 2) Wakakura M, Mashimo K, Oono S et al. and ONMRG: Multicenter clinical trial for evaluating methylprednisolone pulse treatment of idiopathic optic neuritis in Japan. *Jpn J Ophthalmol* (in press)1999.
- 3) Kupersmith MJ, Burde RM, Warren FA et al: Autoimmune optic neuropathy: Evaluation and treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51:1381-1386,1988.
- 4) Harada T, Ohashi T, Harada C et al: A case of bilateral optic neuropathy and recurrent transverse myelopathy associated with perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA). *J Neuro-ophthalmology* 17:254-256,1997.

表 1

case	age/sex	visual loss (period) final vision OD/OS	antibody	steroid	副作用
1M.N.	36F	L→L→L→L (18M) 1.5/0.6	ANA x180, RAHA x320, RA x80	yes	DM, myopathy depression, moon face
2N.A.	9F	B→B→L→R (60M) 1.2/1.2	anticariolipin-IgG 1.2 ANA x40, microsome test x1600	yes	moon face
3I.K.	38F	B→B→B(48M) 0.08/nd	ANA x320, AchRab+, microsome test x1600 thyroid test x100	yes	DM, moon face
4W.K.	43F	L→L→R→R(33M) 0.06/0.02	ANA x160, (VWF 225%)	yes	moon face
5D.K.	33F	L→L(6M) 1.2/0.6	ANA x80, thyroid test x1600	yes	-
6K.H.	59F	B→B(6M) NLP/NLP	ESR>50mm/h VWF 180% p-ANCA 65	yes	特発性肥厚性硬膜炎
7T.H.	47M	R→R→B(12M) 0.08/1.0	p-ANCA 64	yes	パルス治療後 p-ANCA ↓

L:left eye, R:right eye, B:both eyes, M:month(s)

ANA:antinuclear antibody, AchRab:acetylcholine receptor antibody, VWF: von Willebrand factor,
p-ANCA: perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody

19980849

報告書 P. 34-38は下記に掲載

視神経炎治療多施設トライアル研究の概要. (特集)視神経炎治療多施設トライアル.

若倉雅人

神経眼科. 15 卷 1 号, pp.10-14, 1998

特発性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。 Diagnostic criteria for idiopathic optic neuritis and anterior ischemic optic neuropathy

井上眼科病院・北里大眼科 若倉雅登
Masato WakakuraInouye Eye Hospital and
Department of Ophthalmology, Kitasato University School of Medicine

和文抄録

疫学研究班の要請に従い、特発性視神経炎および前部虚血性視神経症の診断基準案を作成した。この目的での診断基準は、他の疾患やその可能性を残す非典型例を極力除外することが必要である。基準は過去の前向き研究 (prospective study) で用いられた基準を用いて作成したが、今後当研究班で十分協議して最終案を出したい。

On request of the clinical survey research group in Japan, diagnostic criteria for idiopathic optic neuritis and anterior ischemic optic neuropathy have been served. The criteria need to avoid misclassification as well as to exclude atypical features that suggest the possibility of an alternative pathogenesis. The present criteria were designed based on those used in previously reported prospective study of the diseases. Final proposal of the criteria will be determined following intensive discussion in this research group.

キーワード特発性視神経炎、前部虚血性視神経症、診断基準
idiopathic optic neuritis, anterior ischemic optic neuropathy, diagnostic criteria

はじめに

この度、厚生省特定疾患調査研究班事業特定疾患に関する疫学研究班より、非特定疾患の疫学調査にあたり、難治性視神経症の診断基準を示すよう要請があった。しかし、我が国にはそのようなものは存在せず、とりあえず著者が作成した。しかし、これは斑として十分吟味し、完成したものを作成する必要があると考える。以下に提出した特発性視神経炎および前部虚血性視神経症の診断基準を示し、当研究班で最終案を提出するための検討課題としたい。

診断基準

- 1) 特発性視神経炎14歳-55歳であって、急性の片眼または両眼性の視力低下がみられ、眼底所見、対光反応などによりその原因が視神経に存在すると考えられたもののうち、次の項目の2項以上があてはまるもの
 1. 発症前後に眼窩痛、眼球運動痛を自覚
 2. 神経内科などから多発性硬化症と診断されているか、MRIのT2強調画像で、脳室周囲に高信号プラークが複数存在
 3. 画像にて患眼視神経の径拡大またはT2強調MRIで高信号
 4. 発症2週間以内にあつては、患眼視神経乳頭は浮

腫もしくは正常

5. 慢性期にあつては患眼視神経乳頭の褪色もしくは神経線維層の著明な菲薄化
ただし、検査もしくは病歴より次の疾患の可能性の高いものは除く。
 - 1) 虚血性視神経症、2) 中毒性視神経症、3) 栄養欠乏性視神経症、4) 遺伝性視神経症、5) 外傷性視神経症、6) 腫瘍などによる圧迫性視神経症、7) SLE, リウマチ性関節炎, 橋本病など自己免疫疾患の存在
 - 2) 前部虚血性視神経症急性の片眼の視力低下がみられ、乳頭は浮腫もしくは蒼白浮腫を呈するもののうち次の項目のうち2項目以上があてはまるもの
 1. 55歳以上、ただし55歳未満にあつては項目2の全身疾患を有していて、そのコントロールが極めて悪いか、患眼に視神経低形成もしくは傾斜乳頭を認める場合に限る。
 2. 高血圧、高脂血症、動脈硬化、糖尿病、心臓弁膜症、血液疾患が存在するか、側頭動脈炎が診断されている。
 3. 下半盲、上半盲、中心暗点を示し、改善しても大きな不可逆的部分が残存する。

考按

診断基準の内容はその目的によってかなり異なるも

のにならざるを得ない。例えば、日常臨床で用いる場合は、予め大きな網をかぶせて包含し、その上で除外診断を進めてゆくような過程を考えて、詳細な基準を作るべきである。なぜならば、非典型例の中にもその疾患である例が含まれている可能性があり、また必要な情報をその時点から得ることができるからである。また、治療トライアルなどに用いられる基準となると、その疾患の中でも治療対象となるかならないかが問題となり、当該疾患の一部のみが対象となるので、疾患の全体を見渡すことは当然できない。一方、今回のように、過去に遡っての、多施設での調査のための診断基準となると、対象疾患以外のものが入ってくることは避ける必要がある。すなわち、当該疾患に間違いなしという典型例を対象とし、他の疾患やその可能性を残す非典型例を極力除外することが必要となる。しかも、過去の症例に対する調査であるから、基準の内容が詳細すぎるのは、そうした情報はもはや得られない場合が多いので不適切であり、基準が複雑になれば調査協力施設が減少することは間違いない。今回示した基準案は、特発性視神経炎の基準は米国¹⁾と日本²⁾においてそれぞれ行われた視神経炎治療トライアルで用いられたものを参考にしてしている。また、前部虚血性視神経症の診断基準は、米国における視神経鞘減荷手術の多施設トライアルに用いられたものと³⁾、視力障害が発生する時間帯を調べたプロスペクティブ研究⁴⁾に用いられたものを参考とした。これらは非動脈炎性のもので含まれているので、今回の調査では、まれながらも動脈炎性のもも含むべきと考えたので、それを付け加える基準案を作成した。いずれの疾患においても、除外診断が重要であり、急性期以外の症例では、診断が困難な場合があるなど、多くの問題が存在している。今後当研究班で十分協議して最終案を出したいと考える。

1)Beck RW et al: A randomized, controlled trial of corticosteroids in the treatment of acute optic neuritis. New Eng J Med 326:581-588,1992.

2)Wakakura M, et al., Optic neuritis treatment trial multicenter cooperative research group (ONMRG):Baseline features of idiopathic optic neuritis as indicated by the multicenter treatment trial in Japan. Jpn J Ophthalmol (in press)

3)Anonymous:characteristics of patients with nonarteric anterior optic neuropathy eligible for the ischemic optic neuropathy decompression trial. 114:1366-1374,1996.

4)Hayreh SS et al:Nonarteric anterior optic

19980849

報告書 P. 41－49は下記に掲載

Up-to-date management to prevent and control optic nerve diseases

Masato Wakakura

Asian Medical Journal. Volume 41 Number 7, pp.353-361, 1998

網膜神経細胞死のメカニズム

Mechanism of neuronal cell death in retina

研究者：渋谷 宏人、黒岩 さち子、黒川 徹、吉村 長久
Hiroto Shibuki, Sachiko Kuroiwa, Toru Kurokawa, Nagahisa Yoshimura
所属：信州大学医学部眼科学教室
Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine

抄録

網膜神経細胞のアポトーシスのメカニズムについて、ラット網膜虚血-再灌流障害モデルを用いて検討した。アポトーシスは細胞周期の調節異常によって発生することが言われており、網膜虚血-再灌流障害で生じるアポトーシスにおいてc-Jun, cyclin D1といった細胞周期関連遺伝子が発現しているか調べたところ、電子顕微鏡観察、電気泳動法によるDNAはしご状断片化、TUNEL染色などで確認したアポトーシスに陥っている網膜細胞においてc-Jun, cyclin D1の異常発現が認められた。また、フリーラジカルスカベンジャーである成人T細胞白血病由来因子(ADF)や脳由来神経栄養因子(BDNF)の投与によってTUNEL染色陽性細胞数が減少し、網膜神経細胞の保護効果を持つことが確認された。ADF投与の場合はc-Jun, cyclin D1の発現も減少させた。網膜虚血-再灌流障害で発生するアポトーシスは、reactive oxygen speciesを介した細胞周期関連遺伝子の異常発現が考えられた。

Apoptosis of dividing cells normally involves a signal transduction cascade that interacts with the signals that control cell cycle. We sought to determine if expression of cell cycle regulators are involved in retinal cell death induced by transient ischemia-reperfusion. Apoptosis of neuronal cells in retina was confirmed by Ultrastructural studies, DNA ladder formation and TUNEL method. Immunostaining was positive for the cell cycle-related gene products c-Jun and cyclin D1. The time course of TUNEL-positive cells and that of c-Jun or cyclin D1 positive cells in the inner nuclear layer was similar. Double labeling study with propidium iodide or TUNEL and immunohistochemistry revealed that dying cells expressed c-Jun and cyclin D1. We have also shown that adult T-cell leukemia-derived factor (ADF), a free radical scavenger, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protect retinal ischemia-reperfusion injury. In the ischemic retina protected by ADF, expression of c-Jun and cyclin D1 was downregulated. These data suggest that aberrant expression of cell cycle-related genes plays an important role in the cell death induced by reactive oxygen species that accompanies retinal ischemia-reperfusion injury.

キーワード 網膜神経細胞死, アポトーシス, 網膜虚血-再灌流障害,
細胞周期関連遺伝子, c-Jun, cyclin D1,
成人T細胞白血病由来因子(ADF), 脳由来神経栄養因子(BDNF),
フリーラジカル

目的

加齢黄斑変性症、網膜色素変性症は、日本における重要な失明原因である。これらの疾患では網膜の神経細胞の細胞死がその病態に大きな役割を果たしている。これまで、漠然と神経細胞の障害と認識されてきたこのような疾患で神経細胞にアポトーシスが発生することが近年明らかとなってきた。この研究では、ラット網膜虚血-再灌流障害をモデルに使用し、網膜神経細胞のアポトーシスのメカニズムにつ

いて検討した。

方法

7週齢の雄SDラットに高眼圧負荷あるいは視神経結紮による一過性の虚血-再灌流障害(1時間)を加えた。再灌流確認後、経時的に眼球を摘出し組織切片を作成した。また、神経網膜よりRNAを抽出し、cDNAを合成した。組織切片について、TUNEL染色、PI(propidium iodide)染色を行い、細胞

死を評価した。また、電子顕微鏡による観察、網膜 DNA の電気泳動も行った。細胞死のメカニズムを知るために、細胞周期関連遺伝子産物 (c-Jun, cyclin D1) の発現を免疫組織化学的に検討した。更に、free radical scavenger である成人 T 細胞白血病由来因子 (ADF) や neurotrophic factor である脳由来神経栄養因子 (BDNF) による神経細胞の保護効果についても検討した。ADF は尾静脈より虚血直前と再灌流直後に 0.5 mg ずつ投与し、神経保護効果の評価として経時的に網膜電図 (ERG) の記録、眼球摘出後網膜内層厚の測定、TUNEL 染色陽性細胞数の測定を行った。また、網膜神経細胞の障害の原因が free radical であることを確認するために、free radical の発生に付随して生じる脂質の過酸化を免疫組織化学的に抗 lipid peroxide 抗体、抗 nitrotyrosine 抗体を用いて検討し、そして TBA 法にて網膜中の過酸化脂質の定量を行った。BDNF は 0.6 μ g 硝子体内に投与し、神経保護効果の評価として網膜伸展標本において神経節細胞数の測定と TUNEL 染色陽性細胞数の測定を行った。ADF と BDNF の投与網膜において c-Jun, cyclin D1 の発現変化についても免疫組織化学的に検討した。

結果

網膜虚血-再灌流モデルでは、網膜神経節細胞層、内顆粒層、外顆粒層の順に TUNEL, PI 染色陽性細胞が出現した (図 1)。電子顕微鏡による観察、DNA 電気泳動による DNA はしご状断片化によってもアポトーシスが確認された。PI 染色と免疫組織化学染色の二重染色により、dying cell が c-Jun, cyclin D1 などの細胞周期関連遺伝子を発現していることが明らかとなった¹⁾。そして、c-Jun, cyclin D1 の異常発現を認めるようなアポトーシスに陥っている dying cell はアマクリン細胞に多い傾向にあった³⁾。更に、dying cell あるいはその近傍に抗 lipid peroxide 抗体、抗 nitrotyrosine 抗体陽性反応が認められ、free radical の発生に伴う過酸化脂質の蓄積がアポトーシスを誘導する原因の一つであることが示唆された。網膜神経細胞死は、ADF や BDNF の投与により保護されることが分かった。ERG の記録においては、a 波の振幅の回復は ADF 投与群とコントロール群の間に統計学的に有意差はなかったが、b 波と律動様小波 (OP) の振幅が再灌流後 7 日から 28 日まで ADF 投与群において統計学的に有意に良好な回復を示した ($P < 0.01$) (図 2)。網膜内層厚の計測では再灌流後 4 日から 28 日まで ADF 投与群において統計学的に有意に厚く ($P < 0.01$) (図 3)、また TUNEL 陽性細胞は再灌流後 1 日と 2 日で ADF 投与群におい

て統計学的に有意に減少していた ($P < 0.01$) (図 4) 2)。この時、c-Jun, cyclin D1 発現細胞数は有意に減少していた ($P < 0.01$) (図 5)。また、ADF の投与は、網膜中の過酸化脂質を有意に減少させた ($P < 0.01$) (図 6)。BDNF 投与網膜においては再灌流後 7 日で網膜神経節細胞数がコントロール群に比べ有意に多く、また TUNEL 陽性細胞は再灌流後 6 時間で有意に減少していた ($P < 0.01$) (図 7)。この時、c-Jun 発現細胞数には影響がなかった。

結論

網膜虚血-再灌流障害では、網膜神経細胞にアポトーシスが発生する。free radical scavenger である ADF 投与することでこのアポトーシスが抑制されたことから、アポトーシスのメカニズムとして、reactive oxygen species を介した細胞周期関連遺伝子の異常発現が考えられた。

参考文献 及び 業績

- 1) Kuroiwa et al. Expression of cell cycle-related genes in dying cells following retinal ischemic injury in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:610-617.
- 2) Shibuki et al. Protective effect of adult T cell leukemia-derived factor on retinal ischemia-reperfusion injury in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:1470-1477.
- 3) Kuroiwa S, Katai N, and Yoshimura N. Apoptosis and necrosis in retina ischemia-reperfusion injury: A possible role of p16INK4 in the determination of cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; in press.

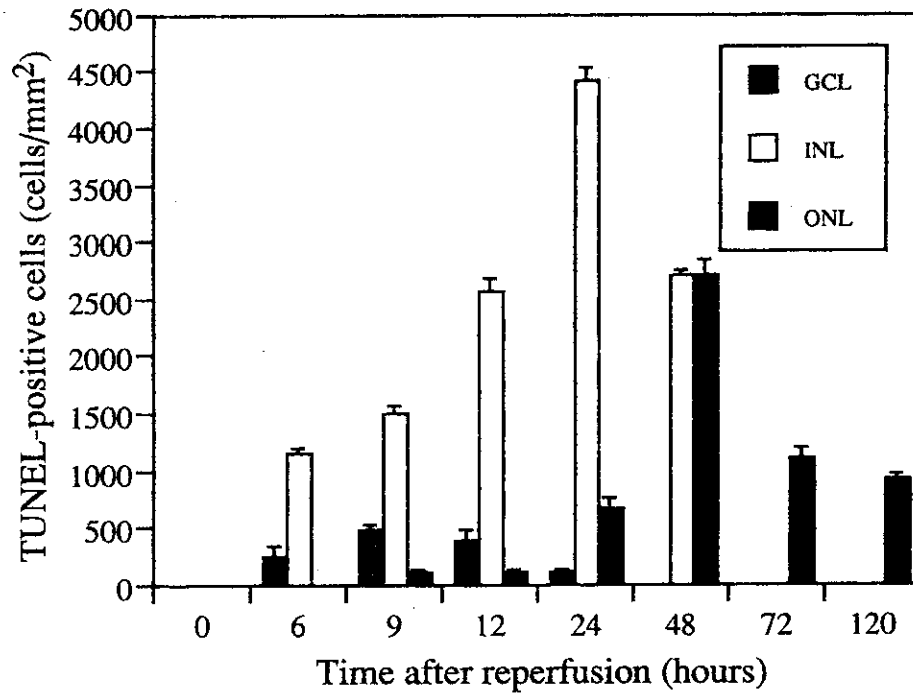


図1. 虚血-再灌流障害網膜（視神経結紮法による虚血1時間）における TUNEL 染色陽性細胞の経時変化^{1)より引用}

GCL: ganglion cell layer (神経節細胞層)、

INL: inner nuclear layer (内顆粒層)、

ONL: outer nuclear layer (外顆粒層) (n = 25)

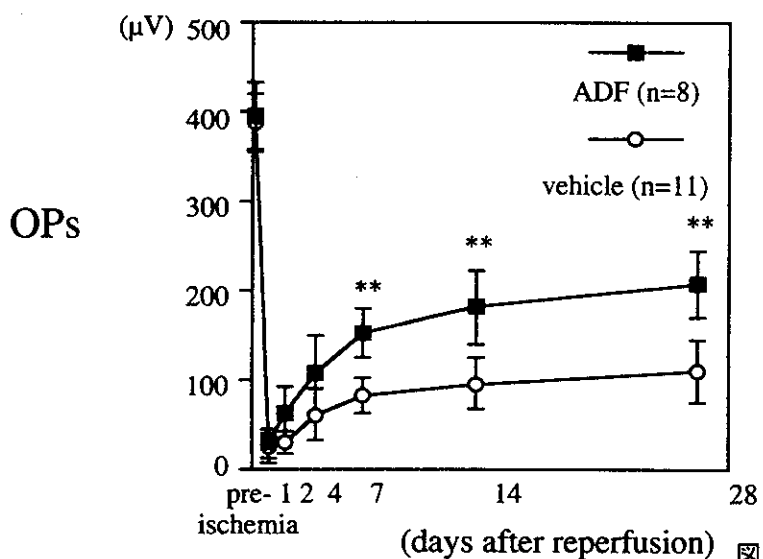
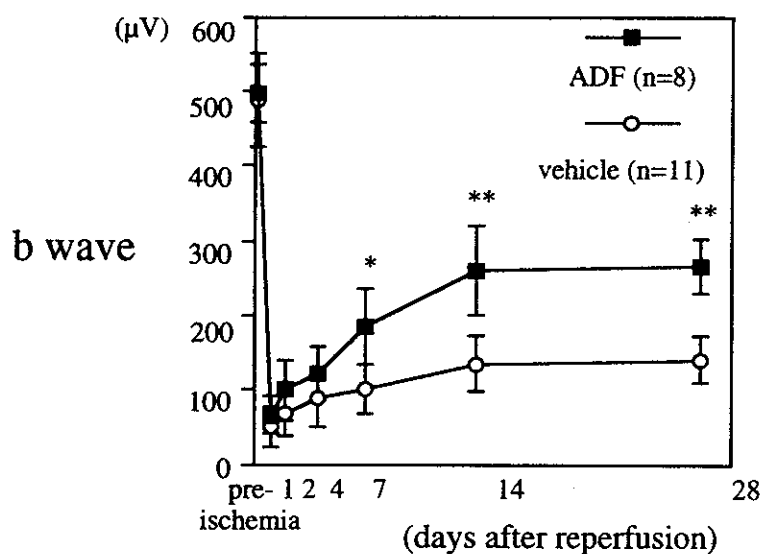
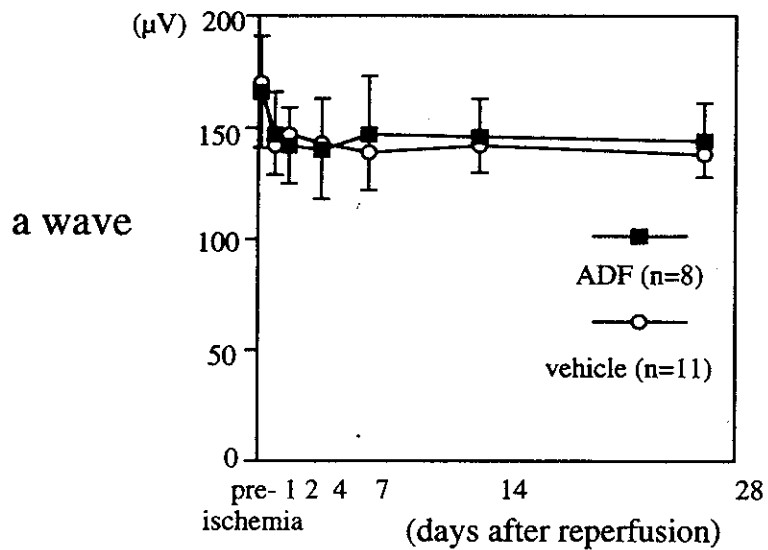


図2. 網膜虚血-再灌流後（高眼圧負荷法による虚血1時間）の網膜電図（ERG）振幅の経時変化：ADF投与ラットとの比較

ADF: 虚血直前と再灌流直後に 0.5 mg (in PBS 0.4 ml) ずつ尾静脈より投与

vehicle: 同様に PBS 0.4 ml のみ投与

OPs: oscillatory potentials (律動様小波)

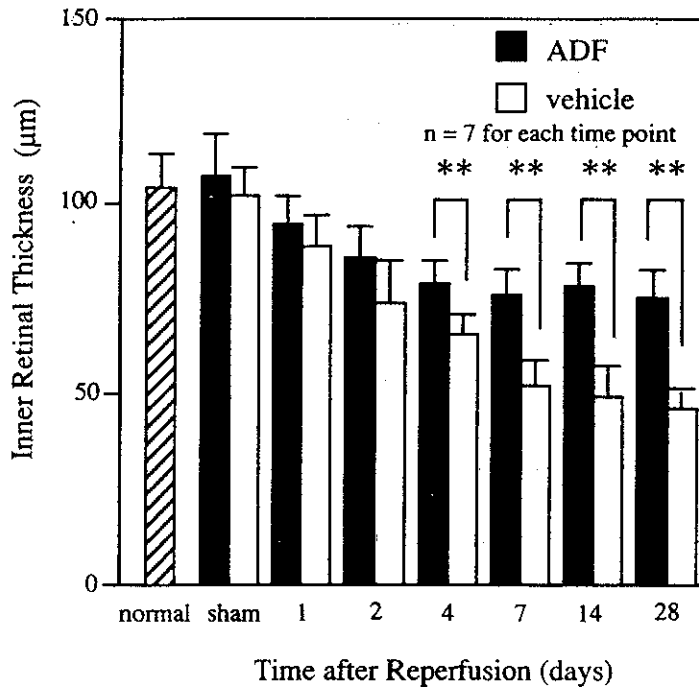


図3. 網膜虚血-再灌流後（高眼圧負荷法による虚血1時間）の網膜内層厚の経時変化: ADF投与ラットとの比較^{2)より引用}

網膜内層厚: 組織切片上での内境界膜から外網状層までの厚さ

ADF: 虚血直前と再灌流直後に 0.5 mg (in PBS 0.4 ml) ずつ尾静脈より投与

vehicle: 同様に PBS 0.4 ml のみ投与

** P < 0.01 Bonferroni post hoc test

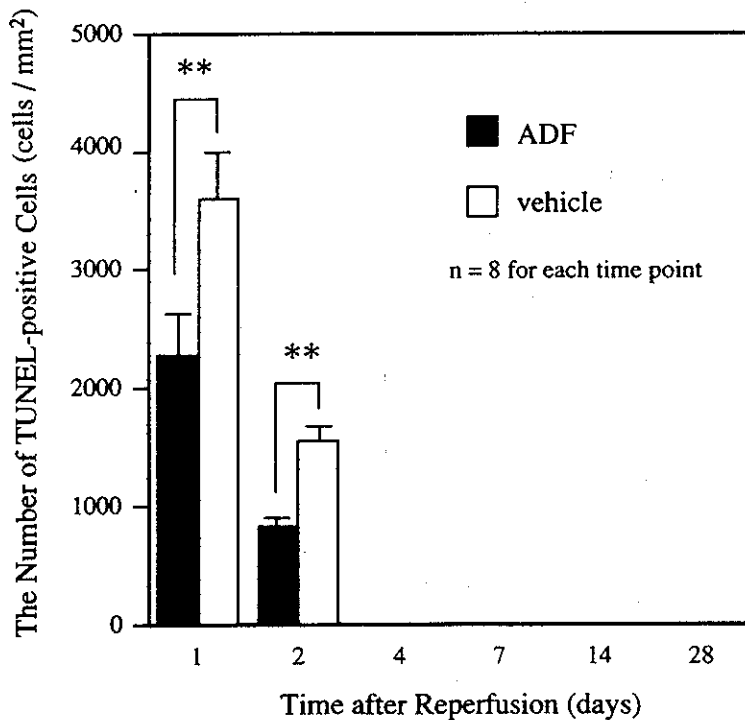


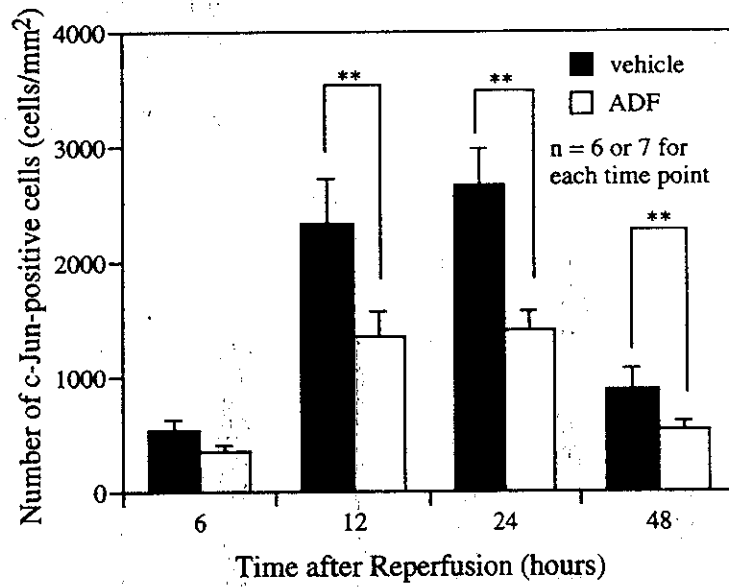
図4. 虚血-再灌流障害網膜（高眼圧負荷法による虚血1時間）の内顆粒層における TUNEL 染色陽性細胞の経時変化: ADF投与ラットとの比較^{2)より引用}

ADF: 虚血直前と再灌流直後に 0.5 mg (in PBS 0.4 ml) ずつ尾静脈より投与

vehicle: 同様に PBS 0.4 ml のみ投与

** P < 0.01 Bonferroni post hoc test

A



B

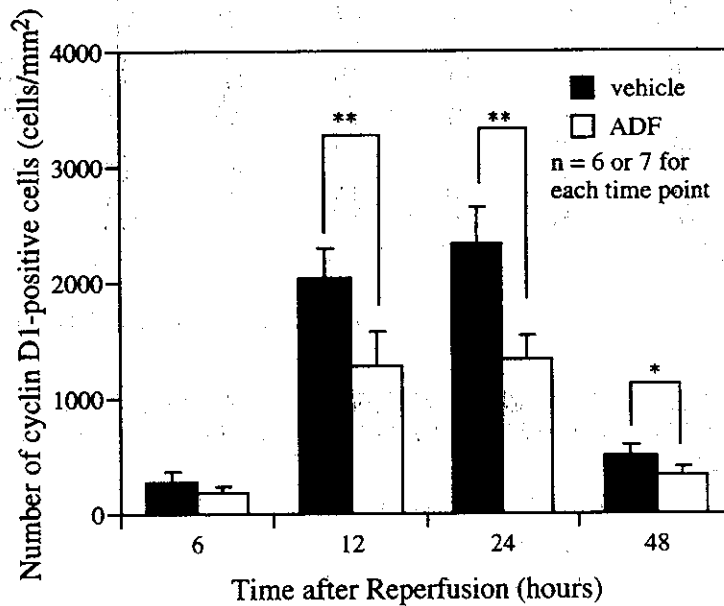


図5. 虚血-再灌流障害網膜（高眼圧負荷法による虚血1時間）の内顆粒層における c-Jun (A), cyclin D1 (B) 陽性細胞の経時変化: ADF投与ラットとの比較

ADF: 虚血直前と再灌流直後に 0.5 mg (in PBS0.4 ml) ずつ尾静脈より投与

vehicle: 同様に PBS 0.4 ml のみ投与

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ Scheffe's post hoc test

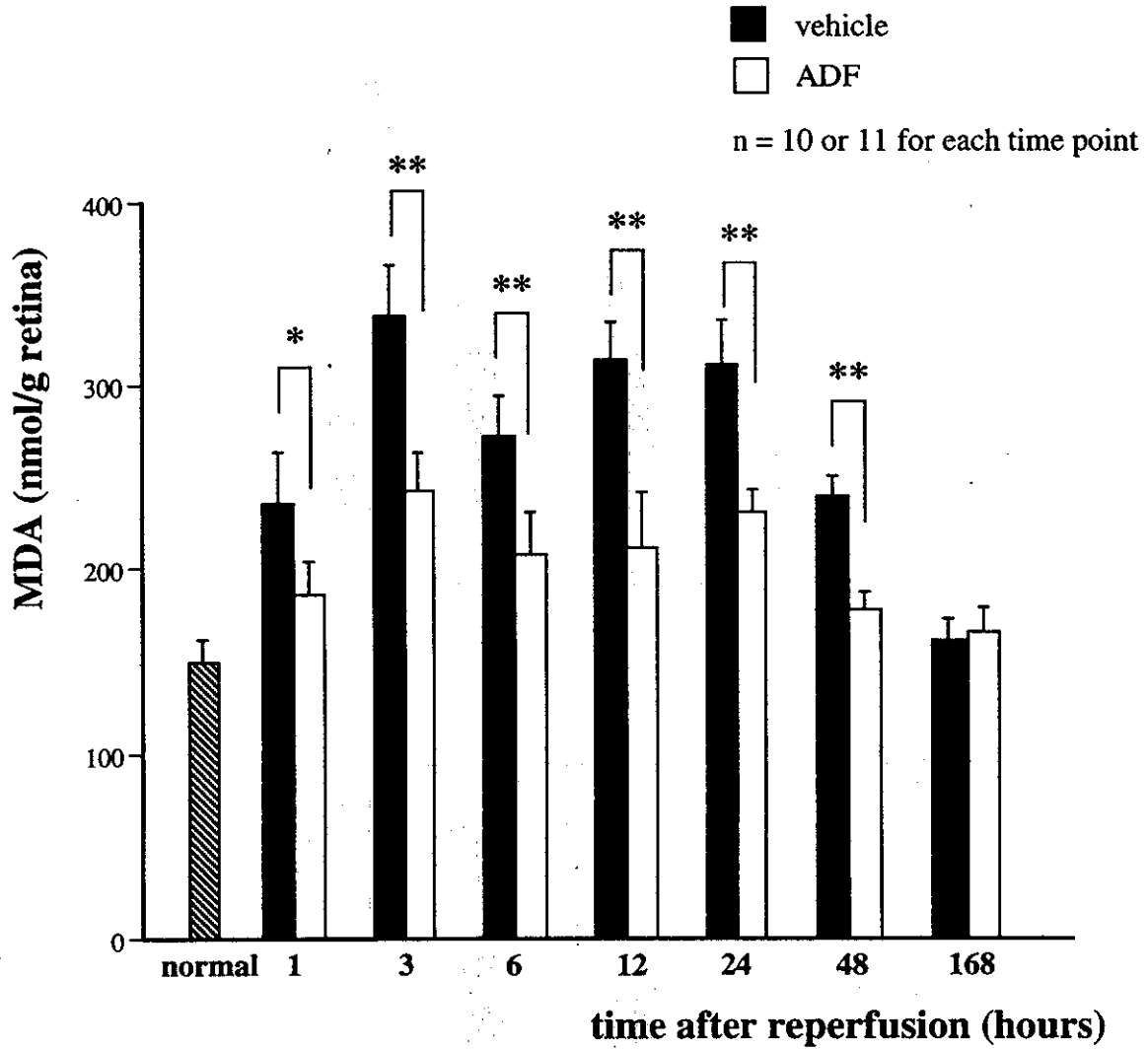


図6. 虚血-再灌流障害網膜（高眼圧負荷法による虚血1時間）における網膜中の過酸化脂質の定量（TBA法）：ADF投与ラットとの比較

ADF: 虚血直前と再灌流直後に 0.5 mg (in PBS 0.4 ml) ずつ尾静脈より投与

vehicle: 同様に PBS 0.4 ml のみ投与

MDA: malondialdehyde

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ Scheffe's post hoc test

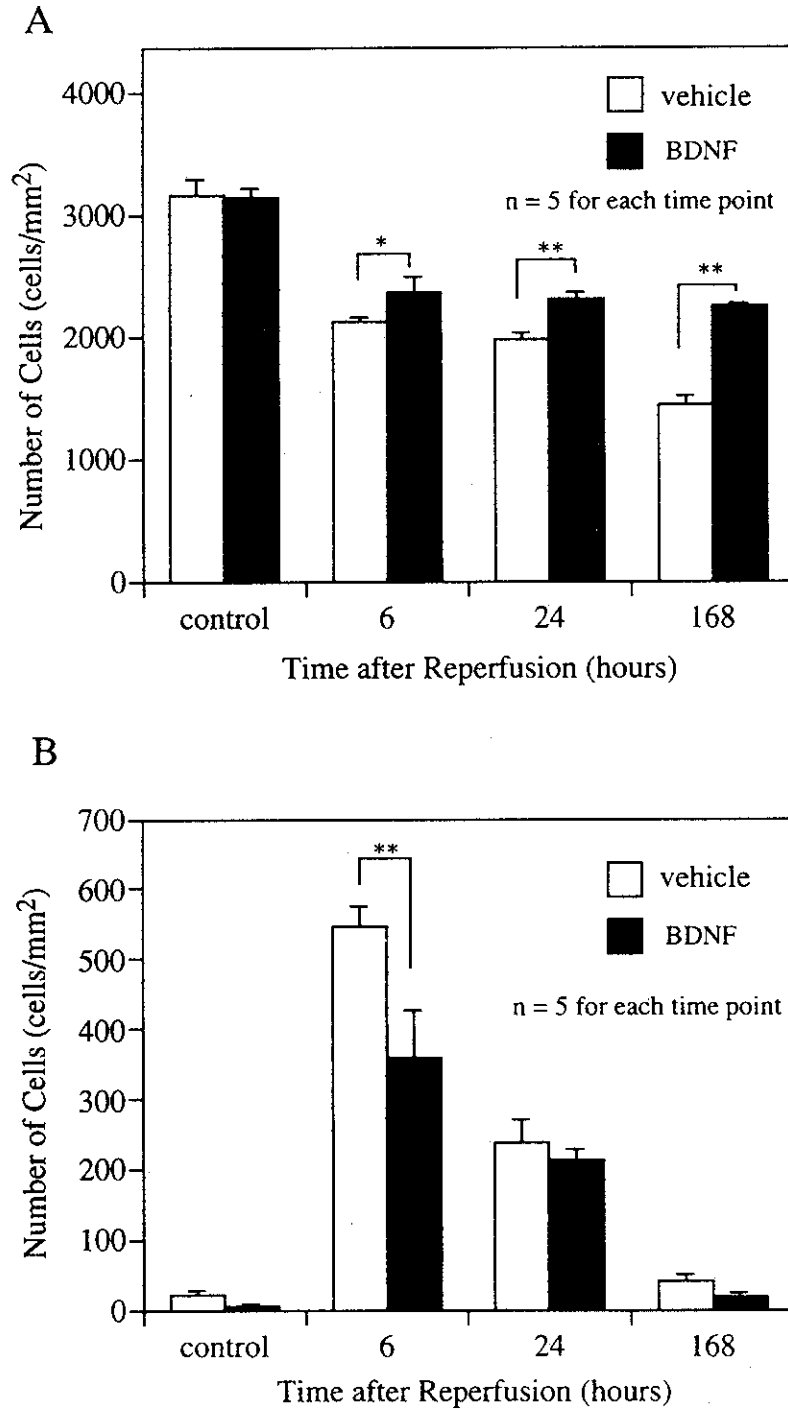


図7. 網膜虚血-再灌流後（高眼圧負荷法による虚血1時間）の網膜神経節細胞（A）と網膜神経節細胞の TUNEL 染色陽性細胞（B）の経時変化: BDNF投与ラットとの比較BDNF: 再灌流直後に 6 μ g (in PBS 0.2 ml) 硝子体内投与 vehicle: 同様に PBS 0.2 ml のみ投与
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ Bonferroni post hoc test