

199900513A・B

(研究課題)

---

頻度の高い視聴覚障害の発症機序並びに治療法に関する研究 (難治性黄斑疾患に対する外科的内科的治療)

---

(研究課題番号 H10-感覚器-004)

平成9年～11年度 厚生科学研究費補助金(感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業)

平成12年3月

研究代表者 田野保雄

(大阪大学医学系研究科 教授)

厚生大臣 丹羽 雄哉 殿

住所

フリガナ タノ ヤスオ  
 研究者 氏 名 田野 保雄  
 (所属施設 大阪大学医学部)

平成 11 年度厚生科学研究費補助金(感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業(感覚器障害研究分野継続研究事業))に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名(課題番号) : 頻度の高い視聴覚障害の発症機序並びに治療法に関する研究  
 (難治性黄斑疾患に対する外科的内科的治療)(H10-感覚器-004)

国庫補助金精算所要額 : 金 30,000,000 円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書
3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書
4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名(雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
1. Ohji, M., Nao-i, N., Saito, Y., Hayashi, A., Tano, Y.: Prevention of visual field defect after macular hole surgery by passing air used for fluid-air exchange through water. Am. J. Ophthalmol. 127(1):62-66, 1999.			
2. Tsujikawa, M., Kurahashi, H., Tanaka, T., Nishida, K., Shimomura, Y., Tano, Y., Nakamura, Y.: Identification of the gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy. Nat. Genet. 21(4):420-423, 1999.			
3. Tsujikawa, M., Tsujikawa, K., Lewis, J.M., Tano, Y.: Change in retinal sensitivity due to excision of choroidal neovascularization and its influence on visual acuity outcome. Retina 19(2):135-140, 1999.			
4. Çekiç, O., Ohji, M., Hayashi, A., Fujikado, T., Tano, Y.: Foveal translocation surgery in age-related macular degeneration. Lancet. 354:340, 1999.			
5. Saito, Y., Lewis, J.M., Park, I., Ikuno, Y., Hayashi, A., Ohji, M., Tano, Y.: Nonvitrectomizing vitreous surgery: a strategy to prevent postoperative nuclear sclerosis. Ophthalmology 106(8):1541-1545, 1999.			
6. Kawasaki, Y., Fujikado, T., Hosohata, J., Tano, Y., Tanaka, Y.: The Effect of Nitric Oxide on the Contractile Tone of Muller Cells. Ophthalmic Res. 31(6):387-391, 1999.			
7. Kusaka, S., Horio, Y., Fujita, A., Matsushita, K., Inanobe, A., Gotow, T., Uchiyama, Y., Tano, Y., Kurachi, Y.: Expression and polarized distribution of an inwardly rectifying K <sup>+</sup> channel, Kir4.1, in rat retinal pigment epithelium. J. Physiol. (Lond) 520(Pt 2):373-381, 1999.			
8. Mikajiri, K., Okada, A.A., Ohji, M., Morimoto, T., Sato, S., Hayashi, A., Kusaka, S., Saito, Y., Tano, Y.: Analysis of vitrectomy for idiopathic macular hole by optical coherence tomography. Am. J. Ophthalmol. 128(5):655-657, 1999.			
9. Yoshida A, Yoshida S, Ishibashi T, Inomata H. Intraocular neovascularization. Histol Histopathol 14: 1287-1294, 1999			
10. Tahara Y, Sakamoto T, Oshima Y, Ishibashi T, Inomata H, Murata T, Hinton DR, Ryan SJ. The anti depressant hypericin inhibits progression of experimental proliferative vitreoretinopathy. Curr Eye Res 19: 323-329, 1999.			
11. Sakamoto T, Oshima Y, Nokagawa K, shibashi T, Inomata H, Sueishi K. Target gene transfer of tissue plasminogen activator to cornea by electric pulse inhibits intracameral fibrin formation and corneal cloudiness. Hum Gene Ther 10:2551-2557,1999			
12. Yoshida A, Yoshida S, Ishibashi T, Kuwano M, Inomata H. Suppression of retinal neovascularization by the NF-kB inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 40: 1624-1629,			

1999

13. Hayashi A, Kim HC, and de Juan, Jr. E. Alterations in protein tyrosine kinase pathways following retinal vein occlusion in the rat. *Curr Eye Res* 1999; 18: 231-239.
14. Hayashi A, Majji AB, Fujioka S, Kim HC, Fukushima I, de Juan E, Jr. A surgical model of degeneration and regeneration of choriocapillaris in rabbits. *Graefe's Arch Exp Clin Ophthalmol* 1999; 237: 668-677.
15. Majji AB, Hayashi A, Kim HC, Grebe RR, de Juan E, Jr. Inhibition of choriocapillaris regeneration with tyrosine kinase inhibitor genistein. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999; 40: 1477-1486.
16. Fujikado T, Ohji M, Hayashi A, Tano Y: Foveal translocation with scleral shortening with myopic neovascular maculopathy, eds, Lin LLK, Shih TF, Hung PT, In *Myopia Updates II*. 2000, Springer, Tokyo, pp149-150.
17. Y Inoue, S Yamamoto, M Okada, M Tsujikawa, T Inoue, AA Okada, S Kusaka, Y Saito, K Wakabayashi, Y Miyake, T Fujikado & Y Tano. X-linked retinoschisis with point mutations in the XLR1 gene. *Arch Ophthalmol*. 2000; 118: 93-96.

総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業（感覚器障害研究分野））  
頻度の高い視聴覚障害の発症機序並びに治療法に関する研究  
（難治性黄斑疾患に対する外科的内科的治療）

主任研究者 田野 保雄 大阪大学医学系研究科眼科学教室教授

研究要旨：社会的に活動度の高い年齢層の中途失明の原因として、増加傾向にある血管新生黄斑症（加齢性黄斑変性および変性近視）は、有効な治療法がなかった。過去2年間の臨床的および実験的研究により、当該施設で開発した、「網膜部分切開による中心窩移動術」および「強膜短縮による中心窩移動術」は限られた症例に対して有効であるが、移動距離が小さいこと（平均 0.6 乳頭径）および前者では手術侵襲が大きいことが問題点として認められた。また、後者では移動方向の予測が困難である点、網膜皺襞の形成が不可避で、これが黄斑部におよぶと視力向上が得られないことなどが判明した。

本年度は、より移動距離が大きく予測可能な術式である「網膜全周切開による中心窩移動術」に関する臨床的および基礎的研究を行った。手術成績に関しては、網膜全周切開による中心窩移動術を施行した 43 例中、視力改善は 12 例（28%）に認められた。視力改善率は、近視性血管新生黄斑症の方が加齢黄斑変性より良好であった。この術式では平均 1.6 乳頭径の中心窩移動距離が得られ、新生血管膜の大きい加齢黄斑変性においても適応可能であることが見出された。重篤な網膜の合併症は見られず、また網膜回旋に伴う像の回旋も、回旋斜視の手術を併用することにより解決できることが分かった。

実験的研究では、サル眼を用いて網膜全周切開による中心窩移動術の術式の検討、術後網膜の電気生理学的、組織学的検討を行った。強膜短縮による方法と異なり、術後網膜にアポトーシスを認めなかった。術後の網膜電図では、1ヶ月目で術前の30%、2ヶ月目で45%まで回復した。電子顕微鏡による術後中心窩の組織像では、視細胞の部分的消失を認めた。意図的網膜剥離の作製を容易にするため、カルシウムイオン(Ca<sup>++</sup>)およびマグネシウムイオン(Mg<sup>++</sup>)を含まない灌流液の網膜に与える影響を家兎で検討した結果、網膜電図の変化は可逆的であり、走査型電子顕微鏡で視細胞と網膜色素上皮間の接着力低下が示された。これらの動物実験は、臨床で行う手術操作の安全性および有効性を確立する上で、大変有益な基礎データとなった。

黄斑障害を来す原因遺伝子の解析では、黄斑変性を来す遺伝性疾患である、X連鎖性若年性網膜分離症の原因遺伝子である XLR51 に関して、5つの新規遺伝子異常を見出した。網膜下血管新生およびそれに伴う線維化を抑制するための遺伝子導入法の開発としては、可溶性 TGF- $\beta$  の受容体を分泌する cDNA を持つアデノウイルスベクター AdTb-ExR と TGF- $\beta$  の変異受容体の cDNA を過剰発現するアデノウイルスベクター AdTb-TR を作成して、ラット光凝固による網膜下血管新生モデルに投与した結果、網膜下血管新生は抑制されただけでなく線維化も抑制された。これらの分子生物学的研究は、平成 9-10 年度の研究成果を発展させたもので、すぐに臨床応用できる性質のものではないが、新生血管黄斑症の根本治療および予防的な対策を希求する上で、有用な基礎データとなった。

血管新生黄斑症の外科的治療と内科的治療に関する 3 年間の研究により、血管新生黄斑症の治療法が視力回復可能な積極的なものになり、また予測可能で安全なものとなった。この結果、本治療法が多施設に普及しつつあり、これまで視力低下により、社会的な活動が困難であった人の多くが視力改善し、社会的な活動が可能になることが期待される。

分担研究者	石橋 達朗	九州大学医学部助教授
白神 史雄	岡山大学医学部助教授	不二門 尚 大阪大学医学部教授
山本 修士	大阪大学医学部助手	林 篤志 大阪大学医学部助手

## A. 研究目的

難治性黄斑疾患である血管新生黄斑症に対して、過去2年間の臨床的および実験的研究により、当該施設で開発した、「網膜部分切開による中心窩移動術」および「強膜短縮による中心窩移動術」は限られた症例に対して有効であるが、移動距離が小さいこと（平均0.6乳頭径）および前者では手術侵襲が大きいことが問題点として認められた。また、後者では移動方向の予測が困難である点、網膜皺襞の形成が不可避で、これが黄斑部におよぶと視力向上が得られないことなどが判明した。本年度は、より移動距離が大きく予測可能な術式である「網膜全周切開による中心窩移動術」を新たに開発し、本術式の成績を臨床的に検討するとともに、成績を向上させるための外科的、内科的治療に関する基礎的研究を行った。

## B. 研究方法

以下の研究において、臨床研究は Helsinki 宣言に基づき患者に対して十分な informed consent をとった上で行った。動物実験は、ARVO の規約に基づき動物愛護の精神に配慮した上で行った。

### (1) 外科的治療法の研究。

#### (i) 網膜全周切開術と外眼筋手術の同時手術による中心窩移動術の成績（臨床研究）

加齢黄斑変性 29 眼(平均年齢 72.3 歳)、近視性血管新生黄斑症 9 眼(平均年齢 63.9 歳)、その他 5 眼(平均年齢 61.8 歳) 計 43 例 43 眼(男性 26 例、女性 17 例)に対して中心窩移動術をおこなった。経過観察期間は 3~14 ヶ月(平均 6.5 ヶ月)であった。新生血管膜の大きさは、加齢黄斑変性 0.7~4.2 乳頭径(平均 1.9)、近視性血管新生黄斑症 0.5~1.2 乳頭径(平均 0.9)、その他 0.6~3.0 乳頭径(平均 1.6)であった。これらの疾患において術後、中心窩移動距離、視力予後、複視など検討を行った。

#### (ii) 網膜回旋に対する斜視手術（臨床研究）

網膜回転に伴う像の傾きを矯正するために行う、回旋斜視手術の効果を検討した。

#### (iii) 中心窩移動術における視機能評価（臨床

## 研究)

近視性血管新生黄斑症の 11 症例に対して、中心窩移動術の術前および術後に走査レーザー検眼鏡による微小視野測定 (SLO microperimetry)、reading chart による読書視力の測定を行い、本術式の手術適応に関する検討を行った。

(iv) 網膜全周切開による中心窩移動術の手術侵襲。

#### ① 中心窩移動術の網膜への影響（基礎研究）

10 頭のカニクイサルを用いて、中心窩移動術の前に眼底写真、蛍光眼底写真および網膜電図を測定した。網膜電図は、フラッシュ、桿体、錐体、30Hz フリッカーの 4 種類を測定した。手術は、全身麻酔下にて、水晶体切除、硝子体切除を施行し、カルシウム、マグネシウムを含まない灌流液にて眼内灌流を行った後、意図的網膜剥離を全範囲に作製した。網膜最周辺部を全周切開し、中心窩を上方へ約 20 度回旋させて網膜を復位させた。シリコンに置換して手術を終了し、術後 2 週目にシリコン抜去を行った。

術後 1, 2, 3 ヶ月目に術前と同様に眼底写真、蛍光眼底写真、網膜電図を測定し、術後経過を観察した。また、術後経時的に眼球摘出し、組織学的検討を行った。TUNEL 染色によるアポトーシスの検出、glial fibrillary acidic protein(GFAP)の免疫染色を術後網膜において行った。また、術後 3 ヶ月目に摘出した眼球の網膜中心窩の電子顕微鏡観察を行った。

#### ② 意図的網膜剥離の作製を容易にする灌流液の網膜に与える影響（基礎研究）

意図的網膜剥離の作製を容易にすることを目的として用いる、Ca<sup>++</sup>および Mg<sup>++</sup>を含まない part 1 BSS plus 灌流液の網膜毒性および網膜接着力への影響を家兎を用いて検討した。ウサギ眼を用いて BSS plus 灌流液を対照として検討した。水晶体切除および硝子体切除後、part 1 BSS plus あるいは BSS plus で硝子体灌流を 20 分間行った後、意図的網膜剥離を作製し、剥離下の網膜色素上皮を走査電子顕微鏡で観察した。また、硝子体灌流後、経時的に網膜

電図を測定し、術前と比較検討した。

## (2) 内科的治療法の研究。

(i) 黄斑変性の原因遺伝子の検索 (臨床研究)  
加齢黄斑変性の原因遺伝子を検討する一環として、遺伝性黄斑ジストロフィーのひとつである X 染色体伴性劣性網膜分離症の原因遺伝子の検索を行った。

## (ii) 血管新生抑制に関する遺伝子導入の研究 (基礎研究)

加齢黄斑変性における網膜下増殖組織には、トランスフォーミング増殖因子 (TGF-b) が豊富に存在しているので、TGF-b が病態形成に関与していると推測される。そこで TGF-b の作用と網膜下血管新生の関連を調べた。

① *in vitro* 実験; 培養ヒト網膜色素上皮細胞に、TGF-b1 を作用させた場合の血管新生関連因子の発現を調べた。因子としてはアンジオポイエチン 1 (Ang1)、アンジオポイエチン 2 (Ang2)、Tie-1、Tie-2、血管内皮増殖因子 (VEGF) を選び、mRNA の変化および蛋白発現の変化を調べた。

② 遺伝子導入実験; アデノウイルスベクターに分泌型 TGF-b 受容体を組み込んだもの (AdTb-ExR) とドミナントネガティブ受容体を組み込んだもの (AdTb-TR) を作成した。AdTb-ExR を感染させた細胞の上清が TGF-b の作用を抑制することを、PAI-1 プロモーターの下流にルシフェラーゼ cDNA をトランスフェクションしたミンク肺細胞を用いて調べた。また、AdTb-TR が TGF-b1 の作用を抑制することを、色素上皮細胞のコラーゲン産生を指標として評価した。

③ *in vivo* 遺伝子導入実験; 光凝固によるラットの網膜下血管新生モデルにアデノウイルスベクター AdTb-ExR と AdTb-TR を用いて、網膜下血管新生に及ぼす TGF-b の影響を調べた。尚、光凝固は krypton レーザー (0.1 秒、100mm、120 mW) を用いて行った。アデノウイルスベクターは 10-8 pfu/rat を用いて行い、蛍光眼底造影所見により網膜下血管新生をスコア化した。病変部におけるマクロファージの浸潤と glial acidic fibrillary protein (GFAP) の発現を免疫染色で比較した。コントロールとして LacZ 遺伝子をもつ AdLacZ を用いた。

## (iii) 近視の進行防止

① 近視の進行防止に関する drug delivery system の開発

ひよこを用いた実験近視モデルに対して osmotic minipump を皮下に埋没し、持続的に眼球の強膜に薬剤を注入する System の有効性を検討した。

② 強度近視における眼軸長延長防止のための黄斑バツクル装着法の開発。

MRI 検査時にも問題の起こらないチタン性の黄斑バツクルを開発し、家兎の強膜に縫着して強膜、網膜に与える影響を検討した。

## C. 研究結果

### (1) 外科的治療法の研究

(i) 網膜全周切開術と外眼筋手術の同時手術による中心窩移動術の成績 (臨床研究)

全周網膜切開による中心窩移動術は、網膜全剥離を作成の後に鋸状縁付近の網膜を 360 度にわたり切開し、液体パーフルオロカーボンを用いて網膜を一部復位させ、視神経乳頭を中心に内方回旋させて、中心窩を上方に移動させた。網膜切開に沿って光凝固を行いシリコンタンポナーデを行い終了した。2~4 週間後にシリコン抜去と眼内レンズの 2 次挿入を行なった。本術式では網膜の回旋角度が大きくすることができ、中心窩を大きく移動させることが可能であるため、術後に回旋斜視による複視や強い像の傾きを訴えるため、網膜の手術に先立ち上斜筋の後転と下斜筋の縫縮を行うことにより眼球を外方回旋し、網膜の内方回旋に対処する術式を併用した。中心窩の移動距離は 0.6~3.6 乳頭径 (平均 1.6 乳頭径) であり、全例で中心窩を新生血管外に移動することが可能であった。視力変化を最終視力で判定した場合には、0.2 log MAR unit 以上の視力改善は 12 眼 (28%)、不変 16 眼 (37%)、悪化 15 眼 (35%) であった。疾患別では加齢黄斑変性では 7 眼 (24%) が改善し、11 眼 (38%) で視力維持ができ、近視性血管新生黄斑症では 5 眼 (56%) で視力改善が得られ、3 眼 (33%) で視力の維持が可能であった。加齢黄斑変性症では 0.1 以上の最終視力が得られた症例は 18 眼 (62%) で、0.5 以上の最終視力は 4 眼 (14%) で達成できた。一方、近視性血管新生黄斑症では 0.1 以上の最終視力が得られた症例は 7 眼 (78%)、0.8 以上の非常に良好な最終視力も 4 眼 (44%) で達成できた。術後合併症として、網膜剥離が 16 眼 (37%) にみられ、その内、増殖性硝子体網膜症は 5

眼であった。術後の新生血管の再発が2例でみられたが、移動後の中心窩から十分な距離があったため光凝固で治療し得た。術後に3例で斜視手術の追加を行い、最終的に複視を訴えたのは3例(7%)にとどまった。

(ii) 網膜回旋に対する斜視手術 (臨床研究)  
全周網膜切開による中心窩移動術では平均30.0° 網膜が内回旋し、これに対する斜視の手術は上斜筋後転術+下斜筋縫縮術にて行った。斜視手術の効果は術直後より約10°の戻りがあり、安定期で平均22.9°であった。平均6.9°の外回旋が残存したが、多くの症例で融像または抑制が起こり、複視を訴えた症例は3例のみであった。

(iii) 中心窩移動術における視機能評価 (臨床研究)

術後遠見視力は8/11例で0.2 log MAR以上改善、2/11例で不変、1/11例で悪化を認めた。術前にSLO microperimetryで固視点が直径が0.4乳頭径の円内に集中していた4/10例では術後視力は0.4以上であり、1乳頭径以上の範囲に散在していた2/10例では、視力0.1以下に留まった。固視点の分布が0.4乳頭径以上1乳頭径未満の症例では、術後視力良好例と不良例が存在した。またreading chartによる読書視力の評価では、臨界文字サイズ(読書速度を落とさないで読める、最小の文字サイズ)は、術前遠見視力が良好でも、不良の症例が多かった。術後5/7例で臨界文字サイズは0.2 log MAR以上改善した。また読みにくさを訴える症例では、術前遠見視力と臨界文字サイズで測定される読書視力に解離がみられた。

(iv) 網膜全周切開による中心窩移動術の手術侵襲。

①中心窩移動術の網膜への影響 (基礎研究)  
強膜短縮による方法と異なり、術後網膜にアポトーシスを認めなかった。術後の網膜電図では、1ヶ月目で術前の30%、2ヶ月目で45%まで回復した。電子顕微鏡による術後中心窩の組織像では、視細胞の部分的消失を認めた。サル眼は網膜と網膜色素上皮の間の接着が強く、意図的網膜剥離作製が困難であったことが視細胞の部分消失につながり、これが網膜電図における振幅低下を生じたと考えられた。

②意図的網膜剥離を容易にする灌流液の網膜

に与える影響 (基礎研究)。

Part 1 BSS plus 灌流液 (Ca<sup>++</sup>およびMg<sup>++</sup>を含まない)、灌流後1日目では、網膜電図のb波がBSS plus 灌流液 (Ca<sup>++</sup>およびMg<sup>++</sup>を含む)による灌流眼(対照)に比較して有意に低下したが、7日後には、術前の振幅値まで回復していた。また、part 1 BSS plusの硝子体腔灌流直後に作製した網膜剥離下の網膜色素上皮の観察では、対照では、網膜色素上皮上に多数のcone matrix sheathが付着していたのに対し、part 1 BSS plus 灌流後は、cone matrix sheathをほとんど認めなかった。

(2) 内科的治療法の研究

(i) 黄斑疾患の原因遺伝子の検索

遺伝性黄斑ジストロフィーのひとつであるX染色体伴性劣性網膜分離症の患者に対して、XLR S1遺伝子は、10名の患者において、8つの変異を発見した。このうち5つは、新規発見の遺伝子異常であった。

(ii) 血管新生抑制に関する遺伝子導入の研究  
TGF- $\beta$ の添加により、Ang1、Tie-1、Tie-2の発現は影響を受けなかったが、Ang2の発現はmRNAレベルでも蛋白レベルでも減少した。一方、VEGFの発現はmRNA、蛋白レベルでもそれぞれ2.5倍および3倍増加した。

AdTb-xRに感染した細胞から分泌された蛋白は濃度依存性にTGF- $\beta$ の活性を阻害した。また、AdTb-TRに感染した細胞はTGF- $\beta$ のシグナルを特異的に抑制した。以上のことからAdTb-ExRおよびAdTb-TRの双方がTGF- $\beta$ の作用をブロックすることが判ったのでin vivoの実験を行った。その結果、AdTb-ExRをラットの大腿筋に注射した場合、網膜下血管新生はコントロールに比べ約71+/-12%(P<0.05)の発生率に抑制された。一方AdTb-TRを網膜色素上皮細胞に感染させたラットの網膜下新生血管発生率は約80+/-15%に抑制された。AdTb-ExRを注射したラットの光凝固斑部ではコントロールに比べ弱いGFAPの発現が見られたに過ぎなかった。また、マクロファージの浸潤もAdTb-ExR処理したラットでは軽度であった。

(iii) 近視の進行防止

①近視の進行防止に関するdrug delivery systemの開発

Osmotic minipumpは、接続するチューブを皮下組織に3ヶ所固定することにより、体重が

2倍になる雛の急成長期においても安定して薬剤を球後に持続注入可能であることが判明した。Matrix metalloprotease 阻害剤は、統計的に有意ではないが、近視化を抑制する傾向が見出された

②強度近視における眼軸長延長防止のための黄斑バックル装着法の開発。

黄斑ブロンベの縫着部では、強膜が平坦化した。縫着部位と非縫着部位縫着の強膜のMatrix metalloprotease 活性は、Zymography においては差は認められなかった。蛍光眼底造影、眼底写真では、縫着部位における変性、血流低下は見られなかった。局所網膜電図においても、縫着部位と非縫着部位の振幅に差は認められなかった。

MRI 検査時にも問題の起こらないチタン性の黄斑バックルを開発し、家兎の強膜に縫着して眼球に与える影響を検討した結果、正常眼に対しては脈絡膜および網膜への影響はなく、また強膜の Matrix Metalloprotease への影響もないことが、Zymography で確認された。

#### D. 考察

社会的に活動度の高い人の中途失明の原因として、増加傾向にある血管新生黄斑症（加齢性黄斑変性および変性近視）に対しては、レーザー光凝固法が、進行防止に有効な治療法であるが、視力回復が得られる治療法はなかった。中心窩移動術は、中心窩を網膜下組織が健全な部位に移動させることにより、視機能を回復させることを目的とした、新しい術式である。過去2年間の臨床的および実験的研究により、当該施設で開発した、「網膜部分切開による中心窩移動術」および「強膜短縮による中心窩移動術」は限られた症例に対して有効であるが、移動距離が小さいこと（平均 0.6 乳頭径）および前者では手術侵襲が大きいことが問題点として認められた。また、後者では移動方向の予測が困難である点、網膜皺襞の形成が不可避で、これが黄斑部におよぶと視力向上が得られないことなどが判明した。

本年度は、より移動距離が大きく予測可能な術式である「網膜全周切開による中心窩移動術」に関する臨床的および基礎的研究を行った。手術成績に関しては、網膜全周切開による中心窩移動術を施行した 43 例中、視力改善は 12 例（28%）に認められた。視力改善率

は、近視性血管新生黄斑症の方が加齢黄斑変性より良好であった。この術式では平均 1.6 乳頭径の中心窩移動距離が得られ、新生血管膜の大きい加齢黄斑変性においても適応可能であることが見出された。重篤な網膜の合併症は見られず、また網膜回旋に伴う像の回旋も、回旋斜視の手術を併用することにより解決できることが分かった。

実験的研究では、サル眼を用いて網膜全周切開による中心窩移動術の術式の検討、術後網膜の電気生理学的、組織学的検討を行った。強膜短縮による方法と異なり、術後網膜にアポトーシスを認めなかった。術後の網膜電図では、1ヶ月目で術前の30%、2ヶ月目で45%まで回復した。電子顕微鏡による術後中心窩の組織像では、視細胞の部分的消失を認めた。意図的網膜剥離の作製を容易にするため、Ca<sup>++</sup>およびMg<sup>++</sup>を含まない灌流液の網膜に与える影響を家兎で検討した結果、網膜電図の変化は可逆的であり、走査型電子顕微鏡で視細胞と網膜色素上皮間の接着力低下が示された。これらの動物実験は、臨床で行う手術操作の安全性および有効性を確立する上で、大変有益な基礎データとなった。

黄斑障害を来す原因遺伝子の解析では、黄斑変性を来す遺伝性疾患である、X連鎖性若年性網膜分離症の原因遺伝子であるXLR51に関して、5つの新規遺伝子異常を見出した。網膜下血管新生およびそれ抑制された。これらの分子生物学的研究は、平成9-10年度の研究成果を発展させたもので、すぐに臨床応用できる性質のものではないが、新生血管黄斑症の根本に伴う線維化を抑制するための遺伝子導入法の開発としては、可溶性TGF-βの受容体を分泌するcDNAを持つアデノウイルスベクターAdTb-ExRとTGF-βの変異受容体のcDNAを過剰発現するアデノウイルスベクターAdTb-TRを作成して、ラット光凝固による網膜下血管新生モデルに投与した結果、網膜下血管新生は抑制されただけでなく線維化も治療および予防的な対策を希求する上で、有用な基礎データとなった。

強度近視における眼軸長延長防止は、強度近視における網脈絡膜萎縮の進行防止のため重要な課題であるが、本年度は臨床応用に直結する強膜補強法に関して、黄斑バックルによる外科的治療法および、強膜の菲薄化防止

の内科的治療法につき検討した。動物実験では、これらの治療法の実用化に向けて一步を踏み出す成果をえた。

血管新生黄斑症の外科的治療と内科的治療に関する3年間の研究により、血管新生黄斑症の治療法が視力回復可能な積極的なものになり、また予測可能で安全なものとなった。この結果、本治療法が多施設に普及しつつあり、これまで視力低下により、社会的な活動が困難であった人の多くが視力改善し、社会的な活動が可能になることが期待される。

#### E. 結論

血管新生黄斑症に対して、外科的治療法として周辺部網膜を360°切開する方法で中心窩移動を行う術式を開発し、3割の症例に視力改善が得られた。この方法は強膜短縮による中心窩移動術と比較して、中心窩が大きく移動するため有効視野が多く取れ、読書視力の改善が得られること、新生血管が再発した場合も移動した中心窩との距離があるためレーザー治療が可能なこと、移動距離を術中にコントロール可能なこと、網膜の皺襞形成が起こらないため、見え方の質が良好であることなど多くの優れた点があることが判明した。術式の進歩により、当初欠点と考えられていた増殖硝子体網膜症の発症頻度は低く押さえることが可能となった。また像の傾きに関しては斜視手術を併用することにより、許容限度内に留めることが可能となった。網膜に対する侵襲は、Ca<sup>++</sup> および Mg<sup>++</sup> イオンを含まない灌流液を用いることにより、軽減されることが実験的に確かめられた。外科的治療の今後の課題としては、神経網膜の保護をいかに行うかということである。内科的治療は実験段階であるが、黄斑疾患に関連する遺伝子が次々と見出され、ヒトの全ゲノムの解析が完了しようとしている現在、加齢黄斑変性に関する遺伝子が分かる日も近いと考えられる。遺伝子導入法も様々なアプローチが考案され、短期的ではあるが、血管新生抑制効果が確かめられた。今後より安全で、効果の持続する導入法を検討していく必要がある。近視の進行防止に関しては、強膜の補強を外科的方法および薬物療法を組み合わせることで、眼軸延長を予防できる可能性が示唆され、近い将来臨床応用されることが期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Oshima, Y., Ohji, M., Inoue, Y., Harada, J., Motokura, M., Saito, Y., Emi, K., Tano, Y.: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Infections after Scleral Buckling Procedures for Retinal Detachments Associated with Atopic Dermatitis. *Ophthalmology*. 106(1):142-147, 1999.
2. Ohji, M., Nao-i, N., Saito, Y., Hayashi, A., Tano, Y.: Prevention of visual field defect after macular hold surgery by passing air used for fluid-air exchange through water. *Am. J. Ophthalmol.* 127(1):62-66, 1999.
3. Tsujikawa, M., Kurahashi, H., Tanaka, T., Nishida, K., Shimomura, Y., Tano, Y., Nakamura, Y.: Identification of the gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Nat. Genet.* 21(4):420-423, 1999.
4. Tsujikawa, M., Tsujikawa, K., Lewis, J.M., Tano, Y.: Change in retinal sensitivity due to excision of choroidal neovascularization and its influence on visual acuity outcome. *Retina* 19(2):135-140, 1999.
5. Ikeda, T., Fujikado, T., Tano, Y., Tsujikawa, K., Koizumi, K., Sawa, H., Yasuhara, T., Maeda, K., Kinoshita, S.: Vitrectomy for rhegmatogenous or tractional retinal detachment with familial exudative vitreoretinopathy. *Ophthalmology*. 106(6):1081-1085, 1999.
6. Çekiç, O., Ohji, M., Hayashi, A., Fujikado, T., Tano, Y.: Foveal translocation surgery in age-related macular degeneration. *Lancet*. 354:340, 1999.
7. Yamaguchi, T., Nagano, H., Yamaguchi, M., Suzuki, T., Saito, Y., Tano, Y.: The effects of kallidinogenase on choroidal blood flow in a hypertensive rabbit model. *Curr. Eye Res.* 18(6):417-422, 1999.
8. Saito, Y., Lewis, J.M., Park, I., Ikuno, Y., Hayashi, A., Ohji, M., Tano, Y.: Nonvitrectomizing vitreous surgery: a strategy to prevent postoperative nuclear sclerosis. *Ophthalmology* 106(8):1541-1545, 1999.
9. Kusaka, S., Horio, Y., Fujita, A., Matsushita, K., Inanobe, A., Gotow, T., Uchiyama, Y., Tano, Y., Kurachi, Y.: Expression and polarized distribution

of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel, Kir4.1, in rat retinal pigment epithelium. *J. Physiol. (Lond)* 520(Pt 2):373-381, 1999.

10. Mikajiri, K., Okada, A.A., Ohji, M., Morimoto, T., Sato, S., Hayashi, A., Kusaka, S., Saito, Y., Tano, Y.: Analysis of vitrectomy for idiopathic macular hole by optical coherence tomography. *Am. J. Ophthalmol.* 128(5):655-657, 1999.

2. 学会発表

1. 1/24-28/1999, Retina'99 Hilton Waikoloa Village, Hawaii, Hawaii

Foveal translocation with retinotomy

Limited foveal translocation without retinotomy

Non-vitrectomizing vitreous surgery for macular pucker

2. 3/12-13/1999, Advanced Vitreoretinal Course Antwerp, Belgium

New instrumentation

Non-vitrectomizing vitreous surgery for macular pucker

Macular hole surgery: personal experience

Evolution of macular translocation surgery

3. 4/2-4/1999 第25回医学会総会 東京ビックサイト, 東京

シンポジウム五感障害の治療: 視覚障害の治療

4. 6/25/1999 名古屋市立大学

招待講演: 中心窩移動術の是非

5. 8/21/1999 マクラクラブ 蒲郡、愛知  
中心窩移動術

6. 9/17-19/1999, Ophthalmology and Visual Sciences in the 21<sup>st</sup> Century

Ritz-Carlton, Cleveland, Ohio, U.S.A.

New instrumentation in vitreous surgery

7. 10/2-6/1999, XXXIII Turkish Ophthalmology Congress Izmir, Turkey

Foveal translocation: Comparative evaluation of three techniques

New instrumentation in vitreous surgery

Update in macular hole surgery

Non-vitrectomizing vitreous surgery for macular pucker

8. 11/20/1999 硝子体研究会 目黒雅叙園、東京

特別講演: 中心窩移動術: 手術法の比較検討

9. 12/1-4/1999, 32<sup>nd</sup> Annual Scientific Meeting of the Retina Society Maui, Hawaii

Comparison of three techniques of foveal translocation

Ohji, M., Fujikado, T., Hyashi, A., Kusaka, S., Okada, A.A., Tano, Y.

## 分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業（感覚器障害研究分野））  
頻度の高い視聴覚障害の発症機序並びに治療法に関する研究  
（難治性黄斑疾患に対する外科的内科的治療）

分担研究者 石橋達朗 九州大学医学部眼科学教室助教授

研究要旨：網膜下血管新生およびそれに伴う線維化を抑制するために、可溶性 TGF- $\beta$  の受容体を分泌する cDNA を持つアデノウイルスベクター AdTb-ExR と TGF- $\beta$  の変異受容体の cDNA を過剰発現するアデノウイルスベクター AdTb-TR を作成して、ラット光凝固による網膜下血管新生モデルに投与した。その結果、網膜下血管新生は抑制されただけでなく線維化も抑制された。TGF- $\beta$  を抑制する治療は、加齢黄斑変性の新しい側面からの治療法となりうる。

### A 研究目的

加齢黄斑変性の視力増悪要因として、網膜下血管新生があげられる。網膜下血管新生にともなう組織障害の原因としては、出血そのものに加えて、それにとまなう網膜・網膜下組織の線維化があげられる。さらに、加齢黄斑変性における網膜下増殖組織にはトランスフォーミング増殖因子 (TGF- $\beta$ ) が豊富に存在しているので、TGF- $\beta$  が病態形成に関与していると推測される。そこで今回は TGF- $\beta$  の作用と網膜下血管新生の関連を調べた。

### B 研究方法

*in vitro* 実験；培養ヒト網膜色素上皮細胞に、TGF- $\beta$ 1 を作用させた場合の血管新生関連因子の発現を調べた。因子としてはアンギオポイエチン 1 (Ang1) アンギオポイエチン 2 (Ang2)、Tie-1、Tie-2、血管内皮増殖因子(VEGF)を選び、mRNA の変化および蛋白発現の変化を調べた。遺伝子導入実験；アデノウイルスベクターに分泌型 TGF- $\beta$  受容体を組み込んだもの(AdTb-ExR)とドミナントネガティブ受容体を組み込んだもの(AdTb-TR)を作成した。AdTb-ExR を感染させた細胞の上清が TGF- $\beta$  の作用を抑制することを、PAI-1 プロモーターの下流にル

シフェラーゼ cDNA をトランスフェクションしたミンク肺細胞を用いて調べた。また、AdTb-TR が TGF- $\beta$ 1 の作用を抑制することを、色素上皮細胞のコラーゲン産生を指標として評価した。

*in vivo* 遺伝子導入実験；光凝固によるラットの網膜下血管新生モデルにアデノウイルスベクター AdTb-ExR と AdTb-TR を用いて、網膜下血管新生に及ぼす TGF- $\beta$  の影響を調べた。尚、光凝固は krypton レーザー (0.1 秒、100mm、120 mW) を用いて行った。アデノウイルスベクターは  $10^{-8}$  pfu/rat を用いて行い、蛍光眼底造影所見により網膜下血管新生をスコア化した。病変部におけるマクロファージの浸潤と glial acidic fibrillary protein (GFAP) の発現を免疫染色で比較した。コントロールとして LacZ 遺伝子をもつ AdLacZ を用いた。

### C 結果

TGF- $\beta$  の添加により、Ang1、Tie-1、Tie-2 の発現は影響を受けなかったが、Ang2 の発現は mRNA レベルでも蛋白レベルでも減少した。一方、VEGF の発現は mRNA、蛋白レベルでもそれぞれ 2.5 倍および 3 倍増加した。AdTb-xR に感染した細胞から分泌された蛋白

は濃度依存性に TGF- $\beta$  の活性を阻害した。また、AdTb-TR に感染した細胞は TGF- $\beta$  のシグナルを特異的に抑制した。以上のことから AdTb-ExR および AdTb-TR の双方が TGF- $\beta$  の作用をブロックすることが判ったので in vivo の実験を行った。その結果、AdTb-ExR をラットの大腿筋に注射した場合、網膜下血管新生はコントロールに比べやく  $71 \pm 12\%$  ( $P < 0.05$ ) の発生率に抑制された。一方 AdTb-TR を網膜色素上皮細胞に感染させたラットの網膜下新生血管発生率は約  $80 \pm 15\%$  に抑制された。AdTb-ExR を注射したラットの光凝固斑部ではコントロールに比べ弱い GFAP の発現が見られたに過ぎなかった。また、マクロファージの浸潤も AdTb-ExR 処理したラットでは軽度であった。

#### D 考察

我々が、1 年次 2 年次に報告してきたような方法で、眼内あるいは全身に遺伝子導入を行って VEGF の作用を抑制すると実験的網膜下血管新生が抑制可能である。また、近年の薬物開発の進歩や特殊外科治療（放射線療法などを含む）の進歩により血管新生という現象自体は治療可能になるかもしれない。しかし、網膜下血管新生病変の際の視力予後に最も悪影響を及ぼす網膜機能不全（グルオーシスやアポトーシスなどの広義の網膜変性）に関する治療は今後も重要な問題となると思われる。我々は、今回 TGF- $\beta$  に注目した。その理由は、TGF- $\beta$  は網膜下血管組織に豊富に存在すること、TGF- $\beta$  は線維化を促進すること、TGF- $\beta$  は炎症細胞を呼び寄せる働きがあるためである。その目的で AdTb-ExR と AdTb-TR という 2 種類のアデノウイルスベクターを作成し、ラット光凝固網膜下血管新生モデルに投与した。その結果、AdTb-ExR を投与されたラッ

トの網膜下血管新生の強さならびに GFAP の発現強度はコントロールに比べ明らかに抑制された。一方、AdTb-TR を投与されたラットはそれぞれ軽度の抑制を示したに留まった。その理由は、AdTb-TR を投与したラットでは網膜色素上皮の TGF- $\beta$  に対する感受性を落としたに過ぎなかったためであろう。さらに、TGF- $\beta$  は、通常は血管新生を抑制する方向に働くのために、今回のように TGF- $\beta$  を抑制すると血管新生が強まると思われる。しかし、in vitro のデータで示したように TGF- $\beta$  には網膜色素上皮細胞を刺激して VEGF を放出させる作用があるので、今回の実験モデルでは血管新生を抑制できたのかもしれない。

#### F 研究発表

- (1) Yoshida A, Yoshida S, Ishibashi T, Inomata H. Intraocular neovascularization. *Histol Histopathol* 14:1287-1294, 1999
- (2) Tahara Y, Sakamoto T, Oshima Y, Ishibashi T, Inomata H, Murata T, Hinton DR, Ryan SJ. The antidepressant hypericin inhibits progression of experimental proliferative vitreoretinopathy. *Curr Eye Res* 19: 323-329, 1999
- (3) Kurihara K, Ishibashi T, Oshima K. The residual epiretinal membrane after vitrectomy for macular hole. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237: 648-653, 1999
- (4) Sakamoto T, Oshima Y, Nakagawa K, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K. Target gene transfer of tissue plasminogen activator to cornea by electric pulse inhibits intracameral fibrin formation and corneal cloudiness. *Hum Gene Ther* 10:2551-2557, 1999
- (5) Ito S, Sakamoto T, Tahara Y, Goto Y, Akazawa K, Ishibashi T, Inomata H. The effect on experimental proliferative vitreoretinopathy.

Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol 237: 691-696, 1999

(6) Yoshida A, Yoshida S, Ishibashi T, Kuwano M, Inomata H. Suppression of retinal neovascularization by the NF- $\kappa$ B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate in mice.

Invest Ophthalmol Vis Sci 40: 1624-1629, 1999

(7) Oshima Y, Sakamoto T, Nakamura T, Tahara, Y, Goto Y, Ishibashi T, Inomata H. The comparative benefits of glaucoma filtering surgery with an electric pulse targeted drug delivery system demonstrated in an animal model. Ophthalmology 106: 1140-1146, 1999

## 2. 学会発表

第 73 回久留米大学眼科研究会（記念講演）福岡市 1999 年 3 月 28 日 石橋達朗. 加齢黄斑変性-最近の話題-

第 103 回日本眼科学会総会 千葉市 1999 年 4 月 21-24 日 石橋達朗. 眼内血管病変の細胞生物学（宿題報告）

1999, May 9 to May 16, ARVO 99, at Fort

Lauderdale, FL, USA: Sakamoto T, Ito S,

Yamanaka I, Yoshikawa H, Ishibashi T, Inomata H.

Tissue factor of the aqueous humor in diabetic retinopathy

Hata Y, Yamauchi T, Kagokawa K, Yoshikawa H, Ishibashi T, Aiello LP: Expression and function of prostacyclin-stimulating factor in the retina

Yoshikawa H, Ishibashi T, Inomata H, Ngai R,

Horiuchi S.: Localizations of N  $\epsilon$  -

(Carboxyethyl)Lysine, N  $\epsilon$  (Carboxymethyl)Lysine and pyraline in diabetic and non-diabetic human retinas

Oshima Y, Sakamoto T, Ishibashi T, Inomata H.:

Targeted gene transfer to corneal stroma in vivo by electric pulses

Okada K, Yamanaka I, Yoshikawa H, Sakamoto T,

Ishibashi T, Inomata H.:

Localization of angiotensin converting enzyme in diabetic and non-diabetic rat retina

Honda M, Ishibashi T, Inomata H.:

Intravitreal injections of Vascular endothelial growth factor (VEGF) cause hyperpermeability of a retinal blood vessels and Retinal neovascularization in Rats

Yoshida A, Yoshida S, Ishibashi T, Inomata H.:

Suppression of retinal neovascularization by the NF- $\kappa$  B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate in mice

Ymanaka I, Hata Y, Yoshikawa H, Sakamoto T,

Ishibashi T, Inomata H.:

Localization of tight junction-associated proteins in vivo and in vitro

## 分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業（感覚器障害研究分野））

頻度の高い視聴覚障害の発症機序並びに治療法に関する研究

（難治性黄斑疾患に対する外科的内科的治療）

分担研究者 不二門 尚 大阪大学大学院医学系研究科・器官機能形成学教授

研究要旨：近視性血管新生黄斑症に対する中心窩移動術の手術適応に関して、臨床的検討を行い、走査レーザー検眼鏡による微小視野測定による固視の安定性が、残存する中心窩機能の一つの指標になる可能性が示唆された。しかしながら、術前新生血管膜が活動期にある状態である場合には、固視の安定性が不十分でも術後視力改善する症例が存在することから、手術適応は、遠見視力だけでなく固視の安定性、新生血管の活動性、読書視力などを総合的に判断して決める必要があることが示唆された。近視化防止のための強膜補強手術として、黄斑バツクルの効果を家兎で検討し、短期的には縫着部強膜が平坦化し、同部位の網脈絡膜循環および強膜の remodelling には大きな影響を与えないことが判明した。強膜補強に対する薬物療法に関しては、白色レグホンの雛に対して osmotic minipump を皮下に留置することにより、持続的に眼球後部に薬剤を投与できる可能性が示された。今後強膜補強に関する手術療法と Matrix metalloprotease 阻害剤をはじめとする、強膜補強に有効と考えられる薬剤の持続注入療法を組み合わせることにより、近視における眼軸延長防止法をさらに検討する必要がある。

### A. 研究目的

日本人には強度近視に起因する血管新生黄斑症が多く見られ、重篤な視力障害を生じる結果社会的活動を著しく損ねている。本研究班が開発した中心窩移動術は、視力改善に有効な症例が多いが、視力改善が得られない場合もある。また、加齢に伴い網膜脈絡膜萎縮を生じると、長期的な視力の維持は困難である。本研究では、近視性血管新生黄斑症の視機能に関して、術前と術後の視機能を比較し、手術適応に関して検討した。また、眼軸延長防止のために臨床応用可能な方法として、強膜補強のための手術療法および薬物療法に関する基礎的な実験を行った。

### B. 研究方法

1、近視性血管新生黄斑症の11症例に対して、中心窩移動術の術前および術後に走査レーザー検眼鏡による微小視野測定（SLO microperimetry）、reading chartによる読書視力の測定を行った。

2、家兎に2羽に対して黄斑ブロンベを6ヶ月縫着し、縫着部位と非縫着部位における強膜の Matrix metalloprotease の活性を Zymography で比較した。また網脈絡膜に対する影響を、蛍光眼底造影、眼底写真、および網膜電図で検討した。

3、孵化後6日目の白色レグホンの雛に半透明のゴーグルを縫着して実験的近視眼を作成し、同時に Osmotic minipump を皮下に導入し、眼球後部に持続的に7日間 Matrix metalloprotease 阻害剤を注入するシステムを確立し、近視化に対する影響を検討した。

### C. 研究結果

1、術後遠見視力は8/11例で0.2 log MAR以上改善、2/11例で不変、1/11例で悪化を認めた。術前に SLO microperimetry で固視点が直径が0.4乳頭径の円内に集中していた4/10例では術後視力は0.4以上であり、1乳頭径以上の範囲に散在していた2/10例では、視力

0.1以下に留まった。固視点の分布が0.4乳頭径以上1乳頭径未満の症例では、術後視力良好例と不良例が存在した。またreading chartによる読書視力の評価では、臨界文字サイズ（読書速度を落とさないで読める、最小の文字サイズ）は、術前遠見視力が良好でも、不良の症例が多かった。術後5/7例で臨界文字サイズは0.2 log MAR以上改善した。また読みにくさを訴える症例では、術前遠見視力と臨界文字サイズで測定される読書視力に解離がみられた。

2、黄斑ブロンベの縫着部では、強膜が平坦化したが、縫着部位と非縫着部位縫着の強膜のMatrix metalloproteinase活性は、Zymographyにおいては差は認められなかった。蛍光眼底造影、眼底写真では、縫着部位における変性、血流低下は見られなかった。局所網膜電図においても、縫着部位と非縫着部位の振幅に差は認められなかった。

3、Osmotic minipumpは、接続するチューブを皮下組織に3ヶ所固定することにより、体重が2倍になる雛の急成長期においても安定して薬剤を球後に持続注入可能であることが判明した。Matrix metalloproteinase阻害剤は、統計的に有意ではないが、近視化を抑制する傾向が見出された。

#### D. 考察

中心窩移動術は、視力低下後比較的早期に手術を行わないと網膜機能が不可逆的に障害され、術後の視力回復は望めない。近視性血管新生黄斑症においては、出血、吸収を繰返し、視力低下期間が明確でない症例も存在するため、術前の網膜機能の客観的な評価が必要となる。今回の検討では、SLO microperimetryで、術前固視が良好な症例は術後視力が良好で、固視不良の症例は術後視力も不良である

ことが示され、術前の固視点の安定性が、残存する中心窩機能の一つの指標になる可能性が示唆された。しかしながら、術前新生血管膜が出血を伴う活動性の状態である場合には、固視の安定性が不十分でも術後視力改善する症例が存在した。また、読みにくさを訴える症例では、術前遠見視力が良好でも臨界文字サイズで測定される読書視力は不良であったが、術後多くの症例で読書視力は改善した。従って手術適応は、遠見視力だけでなく固視の安定性、新生血管の活動性、読書視力などを総合的に判断して決める必要があると考えられた。

近視の実験モデルにおいては、局所網膜の網膜像のボケが近視化のトリガーになっていることが証明されている。われわれは、平成9-10年度の研究で、網膜内の神経修飾物質である一酸化窒素(NO)の合成酸素阻害剤であるL-NAMEが、実験近視の抑制に有効である可能性を示した。本年度の研究では、実験的近視眼の強膜で、Matrix metalloproteinaseの活性が上昇しているという過去の報告を参考に、臨床応用しやすい、強膜からのアプローチによる近視化防止法を検討した。黄斑ブロンベ縫着による近視化防止の可能性に関して、正常家兎を用いて検討した結果、縫着部位と非縫着部位縫着強膜のMatrix metalloproteinase活性に差は認められなかったことから、黄斑ブロンベは強膜の細胞外マトリックスのリモデリングに大きな影響は与えないと考えられた。また蛍光眼底造影、眼底写真、局所網膜電図で、縫着部位における網膜に変化が見られなかったことから、圧迫による網膜への影響もないと考えられた。眼軸への影響はさらに長期観察する必要がある。

Osmotic minipumpを用いて、球後に安定して薬剤を持続注入できるシステムを確立した。

今後は Matrix metalloprotease 阻害剤をはじめとする、強膜の補強に有効な薬剤の眼軸への影響を検討する予定である。

#### E.結論

近視性血管新生黄斑症に対する中心窩移動術の手術適応は、遠見視力の低下期間だけでなく固視の安定性、新生血管の活動性、読書視力などを総合的に判断して決める必要がある。近視化防止のための強膜補強手術として、黄斑バツクルが可能性のある治療法として考えられるが、今後さらに長期的な効果を動物実験で検討する必要がある。強膜補強に対する薬物療法は、osmotic minipump を用いることにより、持続的に眼球後部に薬剤を投与できる可能性が示された。Matrix metalloprotease 阻害剤をはじめとする、強膜の補強に有効な薬剤の眼軸延長への影響を今後検討する必要がある。

#### F.研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Kawasaki Y, Fujikado T et al.: The effect of nitric oxide on the contractile tone of Mueller cells. *Ophthalmic Res.* 1999;31:387-391.

(2) Fujikado T, Ohji M, Tano Y, et al: Comparison of visual function after foveal translocation with 360° retinotomy and with scleral shortening in a patient with bilateral myopic neovascular maculopathy. *Am J Ophthalmol*, in press

(3) Fujikad T, Ohji M, Hayashi A, Tano Y: Foveal translocatopn with scleral shortening with myopic neovascular maculopathy, eds, Lin LLK, Shih TF, Hung PT, In *Myopia Updates II*. 2000, Springer, Tokyo, pp149-150.

##### 2. 学会発表

(1) ARVO meeting (May 9 to May 16, 99, at Fort

Lauderdale, FL, USA)

Fujikado T, Ohji M, Hayashi A, Tano Y: Foveal translocatopn with scleral shortening with myopic neovascular maculopathy.

## 分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業（感覚器障害研究分野））  
頻度の高い視聴覚障害の発症機序並びに治療法に関する研究  
（難治性黄斑疾患に対する外科的内科的治療）

分担研究者 山本修士 大阪大学大学院医学系研究科 眼科学教室助手

研究要旨：遺伝子導入に関する研究を行う上で、原因不明の遺伝性眼疾患の原因遺伝子を調べることが必須となる。黄斑部を障害する標的黃斑症の中には、XLR S 1 遺伝子変異が原因となる症例が存在することを分子レベルで明らかにした。また、本邦の眼底白点症の原因遺伝子を発見した。遺伝子解析が、確定診断と予後判定に有効であることを示した。

れており、10名の患者において、8つの変

### A. 研究目的

遺伝性眼疾患の原因遺伝子を検索し、その病態発 生メカニズムを解明することを目的とする。遺伝性眼疾患を分子レベルで診断し、さらに新しい治療法（遺伝子導入）の開発につなげることが、最終目的である。

### B. 研究方法

900例を超える眼疾患患者さんより、承諾を得て、染色体DNA抽出のための採血に協力いただいた。候補遺伝子の存在する症例に対しては、各候補遺伝子のエクソン領域をPCR法でそ増幅し、変異の有無をSSCP法にて検討する。変異の有無はDNAシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。アミノ酸レベルでの異常がみつかった場合は、患者家族内で変異の有無が眼疾患の発症と一致しているか否かを調べた。

### C. 研究結果

黄斑部に障害を持つ標的黃斑症の解析を行ったところ、XLR S 1 遺伝子に変異を持つ症例が存在することを分子レベルで確認することができた。XLR S 1 遺伝子は、X連鎖性若年性網膜分離症の原因遺伝子として知ら

れており、10名の患者において、8つの変異を発見した。このうち5つは、新規発見の遺伝子異常であった。

その他、網膜色素変性症および類縁疾患患者の遺伝子解析の過程で、3家系の患者で、11cis-retinal dehydrogenase 遺伝子の変異を2つ発見することができた。いずれも日本人特有の遺伝子変異と考えられた。この遺伝子の変異検索は、進行性の白点状網膜炎と停止性の眼底白点症との鑑別に非常に有用と考えられた。

### D. 考察

原因不明とされてきた標的黃斑症の中には、XLR S 遺伝子変異が原因となる症例が存在することが明らかになった。このような症例では、遺伝子解析を行うことによって、確定診断をつけることが可能である。また、進行性の白点状網膜炎と停止性の眼底白点症とを鑑別し、確定診断をつけることは、非常に重要で、遺伝子診断をすることで、予後判定をすることが可能になった。

### E. 結論

黄斑部を障害する標的黃斑症のなかには、

XLR S 1 遺伝子解析を行うことで、分子レベルでの確定診断が可能な症例が存在することが明らかになった。

眼底白点症の遺伝子診断が可能になった。

mutations among patients with corneal dystrophy

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Y Inoue, S Yamamoto, M Okada, M Tsujikawa, T Inoue, AA Okada, S Kusaka, Y Saito, K Wakabayashi, Y Miyake, T Fujikado & Y Tano. X-linked retinoschisis with point mutations in the XLR S 1 gene. *Arch Ophthalmol.* 2000; 118: 93-96.

2) E Hirose, Y Inoue, H Morimura, N Okamoto, M Fukuda, S Yamamoto, T Fujikado & Y Tano. Mutations in the 11-cis retinol dehydrogenase gene in Japanese patients with fundus albipunctatus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* in press.

### 2. 学会発表

S Yamamoto. The spectrum of BIGH3 gene in Japan. ARVO meeting 1999, May 12, Fort Lauderdale, USA

## 分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業（感覚器障害研究分野））

頻度の高い視聴覚障害の発症機序並びに治療法に関する研究

（難治性黄斑疾患に対する外科的内科的治療）

分担研究者 林 篤志 大阪大学大学院医学系研究科・眼科学教室助手

研究要旨：網膜全周切開による中心窩移動術の術式の検討、術後網膜の電気生理学的、組織学的検討をサル眼を用いて行った。強膜短縮による方法と異なり、術後網膜にアポトーシスを認めなかった。術後の網膜電図では、1ヶ月目で術前の30%、2ヶ月目で45%まで回復した。電子顕微鏡による術後中心窩の組織像では、視細胞の部分的消失を認めた。今後、中心窩移動術に伴う網膜侵襲を軽減するため、網膜保護作用をもつ薬剤などの併用、術式のさらなる改良が望まれる。

### A. 研究目的

我々は、難治性黄斑疾患に対する外科的治療としての中心窩移動術を動物眼を用いて検討してきた。今年度は、網膜全周切開による中心窩移動術の術式の検討および中心窩の電気生理学的および組織学的検討を行うため、中心窩をもつサル眼において網膜全周切開による中心窩移動術を施行し、術後経過を経時的に検討した。また、意図的網膜剥離作製時に生理的網膜接着力を低下させる灌流液として、part 1 BSS plus を使用し、網膜毒性および網膜接着力に与える影響について検討した。

### B. 研究方法

10頭のカニクイサルを用いて、術前に眼底写真、蛍光眼底写真および網膜電図を測定した。網膜電図は、フラッシュ、桿体、錐体、30Hzフリッカーの4種類を測定した。全身麻酔下にて、水晶体切除、硝子体切除を施行し、カルシウム、マグネシウムを含まない灌流液にて眼内灌流を行った後、意図的網膜剥離を全範囲に作製した。網膜最周辺部を全周切開し、中心窩を上方へ約20度回旋させて網膜を復位させた。シリコンに置換して手術を終了し、術後2週目にシリコン抜去を行った。

術後1, 2, 3ヶ月目に術前と同様に眼底写真、蛍光眼底写真、網膜電図を測定し、術後経過を観察した。また、イヌ眼と同様に術後経時的に眼球摘出し、組織学的検討を行った。TUNEL染色によるアポトーシスの検出、glial fibrillary acidic protein(GFAP)の免疫染色を術後網膜において行った。また、術後3ヶ月目に摘出した眼球の網膜中心窩の電子顕微鏡観察を行った。part 1 BSS plus 灌流液の網膜毒性および網膜接着力への影響は、ウサギ眼を用いてBSS plus 灌流液を対照として検討した。水晶体切除および硝子体切除後、part 1 BSS plus あるいはBSS plus で硝子体灌流を20分間行った後、意図的網膜剥離を作製し、剥離下の網膜色素上皮を走査電子顕微鏡で観察した。また、硝子体灌流後、経時的に網膜電図を測定し、術前と比較検討した。

### C. 研究結果

サル眼は、人眼と網膜構造がほぼ同じであるが、イヌ眼よりも網膜接着力が強いいため、意図的網膜剥離の作製時に網膜色素上皮に機械的障害をおこしやすかった。網膜色素上皮障害は、術後眼底における網膜色素上皮の局所的な過増殖と低色素斑として認められた。ま

た、中心窩下に及んだ場合は、網膜電図や組織学的に中心窩障害として検出された。網膜全周切開による中心窩移動術により中心窩を上方へ約20度回旋させた。手技的には、45度程度まで回旋可能であった。術後網膜のTUNEL染色では、アポトーシスは全く検出されなかった。GFAP染色では、術後いずれの時点においても網膜に強いGFAP陽性反応を認めた。網膜電図による術後網膜機能の評価においては、術後1ヶ月では、フラッシュ、桿体、錐体、30Hzフリッカーの網膜電図はそれぞれ術前の測定値の41%、15%、22%、31%と低下していたが、術後2ヶ月になると、それぞれ術前の測定値の54%、49%、34%、43%まで回復した。中心窩移動術後の中心窩の電子顕微鏡による観察では、視細胞が部分的に消失していた。ウサギ眼におけるカルシウム、マグネシウムを含まない part 1 BSS plus の硝子体腔灌流の検討では、灌流後1日目では、網膜電図のb波が対照に比較して有意に低下したが、3日目以降では、対照と有意差なく、7日後には、術前の振幅値まで回復していた。また、part 1 BSS plus の硝子体腔灌流直後に作製した網膜剥離下の網膜色素上皮の観察では、対照では、網膜色素上皮上に多数の cone matrix sheath が付着していたのに対し、part 1 BSS plus 灌流後は、cone matrix sheath をほとんど認めなかった。

#### D. 考察

網膜全周切開による中心窩移動術をサル眼で行いことにより、人眼と同様の検討を行うことができた。まず、術式については、単に機械的に意図的網膜剥離を作製すると網膜色素上皮障害を起こし、術後、網膜機能の回復が不良となることから、生理的網膜接着を弱めるため part 1 BSS plus の硝子体腔灌流が有効

であることが明らかとなった。網膜全周切開による中心窩移動術後の網膜においては、強膜短縮の場合と異なり、網膜襞形成がなく、網膜色素上皮上に再接着できることから網膜にアポトーシスを認めなかったと考えられる。一方、GFAP 陽性反応は意図的網膜剥離作製という侵襲により生じると考えられた。また、中心窩をもつサル眼を用いることで術後の中心窩の組織学的、電気生理学的検討を行うことができた。中心窩移動術後の網膜電図による網膜機能の回復は、術後1ヶ月では30%程度であったが、2ヶ月後には45%まで回復した。電子顕微鏡による観察で中心窩視細胞の部分的消失を認めたことより、意図的網膜剥離作製に伴う網膜への侵襲は大きいと考えられた。

#### E. 結論

網膜全周切開による中心窩移動術は、臨床的にも視力回復に大変有効な治療法であり、手技的に問題なく施行可能であるが、本手術の成績をさらに向上させるため、網膜接着力を低下させ、かつ剥離作製に伴う網膜侵襲に対して保護作用をもたせるなどの手術手技、薬剤などの開発が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Hayashi A, Kim HC, and de Juan, Jr. E.

Alterations in protein tyrosine kinase pathways following retinal vein occlusion in the rat. *Curr Eye Res* 1999; 18: 231-239.

2) Hayashi A, Majji AB, Fujioka S, Kim HC, Fukushima I, de Juan E, Jr. A surgical model of degeneration and regeneration of choriocapillaris in rabbits. *Graefe's Arch Exp Clin Ophthalmol* 1999; 237: 668-677.