

厚生科学研究費補助金研究報告書

厚生大臣 丹羽 雄哉 殿

平成 12 年 4 月 10 日

フリガナ アライ マコト  
 申請者 氏名 新家 眞  
 東京大学医学部眼科学教室

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））に係る研究事業を完了したので次の通り報告する。

研究課題名（課題番号）：緑内障の発症、経過解析、治療に関する研究（H10-感覚器-005）  
 国庫補助金清算所要領額：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（別添え 1 の通り）
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書（別添え 2 の通り）
3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書（別添え 3 の通り）
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）	刊行日	刊行書店	執筆者氏名
Effects of prandipine, a new calcium antagonist, on circulation in the choroid, retina and optic nerve head. Current Eye Research 19: 241-247	1999		Yasuhiro TAMAKI, Makoto ARAIE, Ken TOMITA, & Hiroki URASHIMA
Influence of myopic disc shape on the diagnostic precision of the heidelberg retina tomograph. Japanese Journal Ophthalmology 43:392-397	1999		Yoshio YAMAZAKI, Kenji YOSHIKAWA, Shiho KUNIMATU, Nobuyuki KOSEKI, Yasuyuki SUZUKI, Shun MATUMOTO, & Makoto ARAIE.
Effect of oral brovincamine on visual field damage in normal tension glaucoma with low-normal pressure. Journal of Glaucoma 8:117-123	1999		Nobuyuki KOSEKI, Makoto ARAIE, Junkichi YAMAGAMI, Shiroaki SHIRATO, & Seiichiro YAMAMOTO

Effect of lomerizine, a new calcium channel blocker, on the microcirculation in the optic nerve head in conscious rabbits: A study using a laser speckle technique. <i>Experimental Eye Research</i> 69: 185-193	1999	Masamitu SHIMAZAWA, Tetuya SUGIYAMA, Ikuo AZUMA, <u>Matoto ARAIE</u> , Yasushi IWAKURA, Mihoko WATARI, Takanori SAKAI & Hideki HARA
Effects of nilvadipine, a calcium antagonist, on rabbit ocular circulation and optic nerve head circulation in normal tension glaucoma subjects. <i>Investigative Ophthalmology &amp; Visual Science</i> . 40: 1144-1151	1999	Ken TOMITA, <u>Makoto ARAIE</u> , Yasuhiro TAMAKI, Miyuki NAGAHARA, & Tetuya SUGIYAMA
Real-time blood velocity measurements in human retinal veins using the laser speckle phenomenon. <i>Japanese Journal of Ophthalmology</i> 43:186-195	1999	Miyuki NAGAHARA, Yasuhiro TAMAKI, <u>Makoto ARAIE</u> , & Hitoshi FUJII
Effect of topical amosulalol on tissue circulation in the optic rabbit nerve head. <i>Japanese Journal of Ophthalmology</i> 15: 217-224	1999	Yasuhiro TAMAKI, <u>Makoto ARAIE</u> , & Kenji MUTA
Effect of topical dorzolamide on tissue circulation in the optic nerve head. <i>J Ocular Pharmacology &amp; Therapeutics</i> .15:217-224	1999	Yasuhiro TAMAKI, <u>Makoto ARAIE</u> , & Kenji MUTA
Effect of continuous intravenous infusion of carteolol chloride on tissue blood flow in rabbit optic nerve head. <i>Jpn J Ophthalmol</i> 43:490-494	1999	Sugiyama TETSUYA, Ikuo AZUMA, Makoto ARAIE, Shigeki FUJISAWA, Hiroki URASHIMA, & Masakazu NAGASAWA
Effects of topical nipradilol, a $\beta$ -blocking agent with $\alpha$ -blocking and nitroglycerin-like activities, on intraocular pressure and aqueous dynamics in humans. <i>British Journal of Ophthalmology</i> 84:293-299	2000	Mikiko KANNO, <u>Makoto ARAIE</u> , Hiroshi KOIBUCHI, & Kanjirou MASUDA
Peripapillary atrophy in primary angle-closure glaucoma: a comparative study with primary open-angle glaucoma. <i>Am J Ophthalmol</i> 127: 121-128	1999	Uchida H, Yamamoto T, Tomita G, Kitazawa Y

Risk factors for visual field damage progression in normal-tension glaucoma eyes. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 237: 105-108	1999		Daugeliene L, Yamamoto T, Kitazawa Y
Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. Hum Mol Genet 8: 899-905,	1999		Fingert JH, Heon E, Dickinson J, Liebmann JM, Yamamoto T, Craig JE, Rait J, Kawase K, Hoh ST, Buys YM, Dickinson J, Hockey RR, Williams-Lyn D, Trope G, Kitazawa Y, Ritch R, Mackey DA, Alward WL, Sheffield VC Stone EM
Prevalence of normal-tension glaucoma and primary open-angle glaucoma in patients with collagen diseases. Jpn J Ophthalmol 43: 539-542	1999		Yamamoto T, Maeda M, Sawada A, Sugiyama K, Taniguchi T, Kitazawa Y, Oyama Z, Ichihashi N, Takagi H, Kitajima Y
Optic nerve and peripapillary choroidal microvasculature of the rat eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 40: 3084-3090	1999		Sugiyama K, Gu ZB, Kawase C, Yamamoto T, Kitazawa Y
Role of trabeculectomy and calcium-channel blockers in the treatment of normal-tension glaucoma. Glaucoma Update Vol VI. Ed. by Krieglstein GK p163-166	1999	Springer Verlag	Yamamoto T, Kitazawa Y, Ishida K, Daugeliene L
Calcium channel blockers and ocular blood flow in normal tension glaucoma. Current Concepts on Ocular Blood Flow in Glaucoma. Ed by Pillunat LE, Harris A & Greve EL p235-240	1999	Kugler Publications	Kitazawa Y, Yamamoto T, Tomita G, Niwa Y
ラット実験的緑内障におけるN-メチル-D-アスパラギン酸受容体阻害薬の神経保護作用の検討. 日眼会誌 104: 11-16	2000		谷照斌、山本哲也、川瀬千鶴、松原正幸、川瀬和秀、澤田明、北澤克明
Rat retinal ganglion cells culture enriched with the magnetic cell sorter. Neurosci. Lett. 259, 111-114	1999		K. Shoge, H.K. Mishima, S. Mukai, M. Shinya, K. Ishihara, K. Kanno and M.Sasa
Attention by PACAP of glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons Brain Res. 839, 66-73	1999		K. Shoge, H.K. Mishima, T. Saitoh, K. Ishihara, Y. Tamura, H. Shiomi and M.Sasa
最近発売された3種類の緑内障治療薬. 日本の眼科,70: 759-761	1999		塚本秀利、三嶋弘

Efficacy and safety of latanoprost eye drops for glaucoma treatment : A 1-year study in Japan. Jpn J Ophthalmol 44 : 33-38	2000		Masanobu Suzuki, Hiromu K. Mishima, Kanjiro Masuda, Makoto Araie, Yoshiaki Kitazawa, Ikuo Azuma
Genomic organization of the human myocilin gene (MYOC) responsible for primary open angle glaucoma (GLC1A). Biochem Biophy Res Commun 242:396-400	1998		Kubota R, Kudoh J, Mashima Y, Asakawa S, Minoshima S, Hejtmancik JF, Oguchi Y, Shimizu N
Mouse myocilin gene expression in oculartissues. Biochem Biophy Res Commun 248:104-109	1998		Takahashi H, Noda S, Imamura Y, Nagasawa A, Kubota R, Mashima Y, Kudoh J, Oguchi Y, ShimizuN
The myocilin (MYOC) gene expression in the human trabecular meshwork. Curr Eye Res 20(2):81-84	2000		Takahashi H, Noda S, Mashima Y, Kubota R, Ohtake Y, Tanino T, Kudoh J, Oguchi Y, Shimizu N

5.研究成果による特許権等の知的財産権の修得状況

なし

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)  
総括研究報告書

緑内障の発症, 経過解析, 治療に関する研究  
主任研究者 新家 眞 東京大学医学部眼科学教室 教授

研究要旨 我が国の2大失明原因の一つである緑内障の初期診断・スクリーニング・経過観察および治療法に関して新しい方法及び理論的基礎を確立し、さらに病態生理を解明することを目的として、臨床および基礎的研究両面から他施設共同研究により、その発症機序、自然経過を総合的に解析した。臨床研究としては新たな緑内障薬の開発・検討、新しい診断機器による緑内障早期発見の試み、緑内障の視野進行に関するより高精度の経過・予後診断解析法の開発を行い、緑内障の診断・スクリーニング能力の向上およびより綿密な経過観察法の確立と新たな治療法の検討を行うことができた。また、基礎研究としては緑内障における循環因子の関与に関する検討、緑内障における視神経乳頭組織および網膜組織の障害様式に関する検討、緑内障遺伝子の役割の検討を行い、緑内障病態生理に関する新知見を多数得ることができた。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

北澤克明 岐阜大学眼科学教室教授

三嶋 弘 広島大学眼科学教室教授

阿部春樹 新潟大学眼科学教室教授

小口芳久 慶應義塾大学眼科学教室教授

#### A.研究目的

緑内障は、本邦における2大失明原因の一つで、最近行われた全国緑内障疫学共同調査により、40才以上における有病率が3.6%もの高きに達することが明らかになった。本研究は緑内障の最も効果的な治療法及び初期診断、経過解析法を確立し、さらに病態整理を解明することを目的として、臨床および基礎的研究両面から他施設共同研究により、その発症機序、自然経過を総合的に解析したものである。緑内障のスクリーニング、診断、経過観察及び治療法を確立し、さらに分子遺伝学・分子生物学的手法および細胞生物学的手法を用いてその病因の本態を明らかにする。このことにより、緑内障による失明者の減少、緑内障罹患者の社会生活能力維持及び制限のない生活の実現、その結果として国民の保険・医療・福祉の向上ならびに国民医療費・国民福祉経費の削減が期待される。

#### B.研究方法

1) 眼圧下降薬: 眼圧下降薬として現在ももっとも有望視されているブドウ膜強膜路を介する房水流出を促進する薬剤の一つであるラタノプロストについて、その眼圧下降効果および臨床的有効性等について検討した。また、同様にぶどう膜強膜路を介した房水流出促進薬剤であるイソプロピルウノプロストンの視神経乳頭血流に与える変化に関してスキャニングドップラーフローメーターにより検討した。また点眼薬の眼内薬物動態特に後眼部に到達する経路について RI を用いることにより検討した。

2) 正常眼圧緑内障: 正常眼圧緑内障発症および悪化に関する循環動態および乳頭出血の関与について検討した。また、正常眼圧緑内障患者を対象として炭酸ガス負荷により視神経および視神経乳頭領域の血流が改善するかいなかに関して検討した。また、ニルバジピン等のカルシウム拮抗薬の正常眼圧緑内障の視神経領域の循環動態に対する影響を検討し、また手術による眼圧下降が正常眼圧緑内障の視野障害進行の停止に有用で有るか否かを検討した。

3) 緑内障の診断・スクリーニング: 網膜神経線維厚測定装置および Frequency Doubling Illusion を応用した新しい視野測定装置である FDT スクリーナーを用いて、その緑内障診断への可能性について検討するとともに、共焦点レ

レーザーによる視神経乳頭形状3次元解析装置の出力パラメーターこの相関も検討した。

4) 緑内障経過・予後判定法: 前年度までの研究で決定された視野のセクターパターンをもととして統計学的手法を用いて局所的視野欠損進行および全体的な視感度低下を同時に検出可能な視野進行測定アルゴリズムについて、その特性を検討するとともに従来の方法との比較を行う。

5) 緑内障における循環因子の研究: レーザースペックル眼底血流法によって視神経乳頭における循環動態を検討し、また超音波カラードプラー法により眼球後部の循環動態も検討した。眼圧上昇および低下に対する視神経乳頭における血流の autoregulation に関与する因子に関しても検討を行った。

6) 分子生物学的研究: サルを用いた実験緑内障モデル、ラット高眼圧モデル、ラット視神経虚血モデル、ラット視神経坐減モデルを作成し、実験緑内障眼を用いた視神経乳頭組織および網膜神経節細胞に対する神経栄養因子・NMDA 受容体遮断薬等の影響を検討した。および培養網膜神経節細胞に関してはカルシウム画像解析装置を用いてグルタミン酸刺激に対する反応性を検討した。また、この刺激応答が眼科領域で降圧剤として用いられている交感神経  $\beta 1$  受容体の選択的阻害薬である Betaxolol によって修飾されるかどうかについても検討した。緑内障遺伝子産物であるミオシリンのマウスおよびブタにおける眼内分布を観察した。またミオシリン遺伝子および CYP1B1 遺伝子に関して変異検索を行った。

### C. 研究結果

1) 眼圧下降薬: ブドウ膜強膜路を介する房水流出を促進する薬剤の一つであるラタノプロストが実際に十分な眼圧下降効果を持ち、臨床的に非常に有用であることが確認された。また、同様にぶどう膜強膜路を介した房水流出促進薬剤であるイソプロピルウノプロストンに視神経乳頭血流増加作用があることが示された。一方、点眼薬の眼内薬物動態特に後眼部に到達する経路について RI を用いることにより検討した。その結果、 $\alpha$ -遮断作用および  $\beta$  遮断作用を有

し、毛様体における房水産生低下作用に加えブドウ膜強膜を介する房水流出促進作用のあるニプラジロールおよび水溶性カルシウムチャネルブロッカーであるイガニジピンが点眼により網膜を含む後眼部に到達しうることを示したが、そのような薬剤が視神経乳頭循環改善効果をもたらしうることを明らかにした。

2) 正常眼圧緑内障: 正常眼圧緑内障においては、末梢循環障害、乳頭出血等の非眼圧要因が重要な病因となっている事を明らかにした。炭酸ガス負荷により緑内障の視神経および視神経乳頭領域の血流が改善する事を示した。乳頭出血は本症の予後を有意に不良とする重要な因子である事を示した。また、ニルバジピン等のカルシウム拮抗薬が正常眼圧緑内障の視神経領域の循環動態を改善する事を明らかにした。手術による十分な眼圧下降が正常眼圧緑内障の視野障害進行の停止に有用なことを示した。

3) 緑内障の診断・スクリーニング: 網膜神経線維厚測定装置および Frequency Doubling Illusion を応用した新しい視野測定装置である FDT スクリーナーは緑内障の早期診断に有用であり、また視神経乳頭形状における緑内障変化とも一致した結果が得られることが明らかになった。

4) 緑内障経過・予後判定法: 新たに開発して視野進行測定アルゴリズムについて、緑内障性視野障害を従来のどの方法よりも鋭敏にとらえることができるが、特に全般的な視野低下について、より鋭敏であることが明らかになった。

5) 緑内障における循環因子の研究: 眼圧上昇および低下に対する視神経乳頭における血流の autoregulation に少なくとも一部 NO が関与していることが明らかとなった。

6) 分子生物学的研究: 培養網膜神経節細胞のカルシウム画像解析装置による検討により、網膜神経節細胞におけるグルタミン酸誘発  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は他の神経細胞と異なり、主として Non-NMDA 受容体を介していることが明らかとなった。また、眼科領域で降圧剤として用いられている交感神経  $\beta 1$  受容体の選択的阻害薬である Betaxolol のグルタミン酸誘発  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に対する抑制効果を持ち、グルタミン酸誘発細胞死

を抑制することが示唆された。また、ラット実験緑内障モデルによる実験では NMDA 受容体遮断薬投与、FK-506(タクロリムス)、ベタキソロールによっても、網膜神経節細胞の障害を抑制可能な事を示した。さらに、ラット眼における視神経近傍の血管系の解剖を明らかにした。サル眼の慢性緑内障モデルによる検討では、主に前篩状板部に神経線維の脱落による海綿様変性を認め、同部位の透過電顕像では軸索中に著明に肥大した変性ミトコンドリアの散在を認めた。一部の外膜は破綻し、クリステの構造は消失し、結晶様構造を呈する Inclusion body を内包していた。急性モデルにおいても同様のミトコンドリアの変化が観察され、網膜の神経線維層では、眼圧上昇の 24 時間後にはすでに Caspase-3 の活性化がみられた。また、TUNEL 陽性の網膜神経節細胞は、眼圧上昇の 3 日後から多数確認された。また、NMDA 受容体サブユニットのノックアウトマウスを用いた実験により  $\epsilon 1$  サブユニットノックアウトマウスが虚血負荷による網膜神経節細胞死に抵抗性を示した。しかしその程度は  $\epsilon 1$  サブユニットノックアウトマウスで認められる抵抗性よりかなり低いものであった。一方、緑内障遺伝子産物であるでミオシリンのマウスおよびブタにおける眼内分布をみた実験では神経節細胞およびその軸索に沿いミオシリンの発現が確認された。マウス視神経内の星状膠細胞に特異的な発現を認めた。また、ブタの視神経乳頭と篩状板部において、特に星状膠細胞の突起を含む細胞質内にミオシリン蛋白の局在を認めた。培養ブタ星状膠細胞において、明かなステロイドの影響はみられなかった。さらに、緑内障遺伝子の解析に関してはミオシリン遺伝子および CYP1B1 遺伝子に関して変異検索を行った結果、ミオシリン遺伝子に関しては 140 家系中 4 家系(家族歴有り)において疾患の発症に関連すると思われたアミノ酸の置換がみられた(Arg 46 stop、Arg158Gln、Asn360Lys、Ala363Thr)。これらは日本人固有の変異であった。2 家系は正常眼圧緑内障が疑われている家系であった(Arg 46 stop、Arg158Gln)。直接発症には関連しないと思われたアミノ酸の置換は 6カ所にみられた(コドン 19、76、208、439、470、488)。ミオシリン遺伝子頻度は 3%であった。

CYP1B1 遺伝子変異に関しては 65 家系の先天緑内障患者を解析し、疾患の発症と関連すると思われた 5 つの変異を同定した。これらの変異は日本人固有のものであった。多型が 5カ所認められた。先天緑内障患者の中で CYP1B1 遺伝子異常の頻度としては約 10%であった。

#### D. 考察

ラタプロストが実際に多数の緑内障患者において非常に大きな眼圧下降効果を持つことが確認されまた、イソプロピルウプロロトンが循環改善薬としても有用である可能性が示された。一方、点眼薬が後眼部に移行可能であることが明らかになったため、今後点眼薬による視神経乳頭循環改善および網膜神経節細胞死阻害効果をもたらすことがわかった。このような結果より、正常眼圧緑内障に対する治療法の幅がより広がっていく可能性が示された。緑内障の診断・スクリーニングとして網膜神経線維厚測定装置および Frequency Doubling Illusion を応用した新しい視野測定装置である FDT スクリーナーが有用であり今後の積極的な臨床応用が期待された。同様に新たに開発した視野進行測定アルゴリズムについて、緑内障性視野障害を従来のどの方法よりも鋭敏にとらえることができたことより、今後の臨床応用の可能性が期待された。緑内障における循環因子の研究の結果視神経乳頭における血流の autoregulation に少なくとも一部 NO が関与していることが明らかとなったことは、視神経乳頭循環改善療法に新たなターゲットを生み出すこととなった。培養網膜神経節細胞および実験的緑内障眼での実験では Betaxolol の有用性を示唆する結果が得られ、今後の展開が期待される。一方、緑内障遺伝子産物であるでミオシリンのマウスおよびブタにおける眼内分布をみた実験では神経節細胞およびその軸索に沿いミオシリンの発現が確認され、さらにマウス視神経内の星状膠細胞に特異的な発現を認めた。このことはミオシリンが従来考えられていたように隅角線維柱帯のみで重要な働きをしているのではなく、網膜神経節細胞障害にも関与している可能性を示唆した。緑内障遺伝子変異解析ではミオシリン遺伝子および CYP1B1 遺伝子それぞれで、3%および約 10%

で遺伝子変異を認めた。このことは、この両者の遺伝子異常で説明できる緑内障患者はごく一部に限られること、しかしながら正常者に比べた場合、かなり多く存在しうることが明らかとなった。

#### E. 結論

本研究により、緑内障の発症機序、病態生理に関する新たな知見が得られ、また緑内障の新たな治療方法の開発およびより鋭敏な緑内障診断、経過観察を一部確立することができた。これらの結果は現在の緑内障診断、スクリーニング、経過観察および治療に大きな影響を与えると共に今後の緑内障研究の基礎となる成果であると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yasuhiro TAMAKI, Makoto ARAIE, Ken TOMITA, & Hiroki URASHIMA. Effects of pranidipine, a new calcium antagonist, on circulation in the choroid, retina and optic nerve head. *Current Eye Research* 19: 241-247, 1999

Yoshio YAMAZAKI, Kenji YOSHIKAWA, Shiho KUNIMATU, Nobuyuki KOSEKI, Yasuyuki SUZUKI, Shun MATUMOTO, & Makoto ARAIE. Influence of myopic disc shape on the diagnostic precision of the heidelberg retina tomograph. *Japanese Journal Ophthalmology* 43:392-397, 1999

Nobuyuki KOSEKI, Makoto ARAIE, Junkichi YAMAGAMI, Shiroaki SHIRATO, & Seiichiro YAMAMOTO. Effect of oral brovincamine on

visual field damage in normal tension glaucoma with low-normal pressure. *Journal of Glaucoma* 8:117-123, 1999

Masamitsu SHIMAZAWA, Tetuya SUGIYAMA, Ikuo AZUMA, Matoto ARAIE, Yasushi IWAKURA, Mihoko WATARI, Takanori SAKAI & Hideki HARA. Effect of lomerizine, a new calcium channel blocker, on the microcirculation in the optic nerve head in conscious rabbits: A study using a laser speckle technique. *Experimental Eye Research* 69: 185-193, 1999

Ken TOMITA, Makoto ARAIE, Yasuhiro TAMAKI, Miyuki NAGAHARA, & Tetuya SUGIYAMA. Effects of nilvadipine, a calcium antagonist, on rabbit ocular circulation and optic nerve head circulation in normal tension glaucoma subjects. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 40: 1144-1151, 1999

Miyuki NAGAHARA, Yasuhiro TAMAKI, Makoto ARAIE, & Hitoshi FUJII. Real-time blood velocity measurements in human retinal veins using the laser speckle phenomenon. *Japanese Journal of Ophthalmology* 43:186-195, 1999

Yasuhiro TAMAKI, Makoto ARAIE, & Kenji MUTA. Effect of topical amosulalol on tissue



circulation in the optic rabbit nerve head.

Japanese Journal of Ophthalmology 15: 217–224, 1999

Yasuhiro TAMAKI, Makoto ARAIE, & Kenji MUTA Effect of topical dorzolamide on tissue circulation in the optic nerve head. J Ocular Pharmacology & Therapeutics.15:217–224, 1999

Sugiyama TETSUYA, Ikuo AZUMA, Makoto ARAIE, Shigeki FUJISAWA, Hiroki URASHIMA, & Masakazu NAGASAWA: Effect of continuous intravenous infusion of carteolol chloride on tissue blood flow in rabbit optic nerve head. Jpn J Ophthalmol 43:490–494, 1999.

Mikiko KANNO, Makoto ARAIE, Hiroshi KOIBUCHI, & Kanjiro MASUDA. Effects of topical niprodrilol, a  $\beta$ -blocking agent with  $\alpha$ -blocking and nitroglycerin-like activities, on intraocular pressure and aqueous dynamics in humans. British Journal of Ophthalmology 84:293–299, 2000.

Masanobu Suzuki, Hiromu K. Mishima, Kanjiro Masuda, Makoto Araie, Yoshiaki Kitazawa, Ikuo Azuma : Efficacy and safety of latanoprost eye drops for glaucoma treatment : A 1-year study in Japan. Jpn J Ophthalmol 44 : 33–38, 2000  
塚本秀利、三嶋弘：最近発売された3種類の緑内障治療薬。日本の眼科,70: 759–761, 1999.  
K. Shoge, H.K. Mishima, S. Mukai, M. Shinya, K. Ishihara, M. Kanno and M. Sasa: Rat retinal

ganglion cells culture enriched with the magnetic cell sorter. Neurosci. Lett. 259, 111–114, 1999

K. Shoge, H.K. Mishima, T. Saitoh, K. Ishihara, Y. Tamura, H. Shiomi and M.Sasa: Attention by PACAP of glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons. Brain Res. 839, 66–73, 1999

Takahashi H, Noda S, Mashima Y, Kubota R, Ohtake Y, Tanino T, Kudoh J, Oguchi Y, Shimizu N. The myocilin (MYOC) gene expression in the human trabecular meshwork. Curr Eye Res 20(2):81–84, 2000.

Ohtake Y, Tanino T, Miyata H, Mashima Y. Identification of novel compound heterozygous mutations in the cytochrome P450B1 gene (CYP1B1) in a Japanese patient with primary congenital glaucoma. Ophthalmic Genet in press  
Kubota R, Mashima Y, Ohtake Y, Tanino T, Kimura T, Hotta Y, Kanai A, Tokuoka S, Azuma I, Tanihara H, Inatani M, Inoue Y, Kudoh J, Oguchi Y, Shimizu N. Novel mutations in myocilin gene in Japanese glaucoma patients. Hum Mutation, Mutation in Brief in press.

Niwa Y, Harris A, Kagemann LE, Yamamoto T, Matsubara M, Takahashi D, Kitazawa Y: The effect of carbon dioxide on orbital hemodynamics determined by color Doppler imaging. Jpn J Ophthalmol 43: 16–19, 1999

Uchida H, Yamamoto T, Tomita G, Kitazawa Y: Peripapillary atrophy in primary angle-closure glaucoma: a comparative study with primary open-angle glaucoma. Am J Ophthalmol 127: 121–128, 1999

Daugeliene L, Yamamoto T, Kitazawa Y: Risk factors for visual field damage progression in normal-tension glaucoma eyes. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 237: 105–108, 1999

Fingert JH, Heon E, Dickinson J, Liebmann JM, Yamamoto T, Craig JE, Rait J, Kawase K, Hoh ST, Buys YM, Dickinson J, Hockey RR, Williams-Lyn D, Trope G, Kitazawa Y, Ritch R, Mackey DA, Alward WL, Sheffield VC Stone EM: Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. Hum Mol

Genet 8: 899-905, 1999

Yamamoto T, Kitazawa Y, Ishida K, Daugeliene L: Role of trabeculectomy and calcium-channel blockers in the treatment of normal-tension glaucoma. *Glaucoma Update Vol VI*. Ed by Krieglstein GK p163-166 Springer Verlag, Heidelberg, Germany, 1999

Kitazawa Y, Yamamoto T, Ishida K: Disc hemorrhage as a risk factor for progression of normal-tension glaucoma. *Pathogenesis and Risk Factors of Glaucoma*. Ed by Gramer E & Grehn F p145-154 Springer Verlag, Heidelberg, Germany, 1999

Kitazawa Y, Yamamoto T, Tomita G, Niwa Y: Calcium channel blockers and ocular blood flow in normal tension glaucoma. *Current Concepts on Ocular Blood Flow in Glaucoma*. Ed by Pillunat LE, Harris A & Greve EL p235-240 Kugler Publications, The Hague, The Netherlands, 1999

Yamamoto T, Maeda M, Sawada A, Sugiyama K, Taniguchi T, Kitazawa Y, Oyama Z, Ichihashi N, Takagi H, Kitajima Y: Prevalence of normal-tension glaucoma and primary open-angle glaucoma in patients with collagen diseases. *Jpn J Ophthalmol* 43: 539-542, 1999

Sugiyama K, Gu ZB, Kawase C, Yamamoto T, Kitazawa Y: Optic nerve and peripapillary choroidal microvasculature of the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 3084-3090, 1999

谷照斌、山本哲也、川瀬千鶴、松原正幸、川瀬和秀、澤田明、北澤克明: ラット実験的緑内障眼における N-メチル-D-アスパラギン酸受容体阻害薬の神経保護作用の検討. *日眼会誌* 104: 11-16, 2000

Hagiwara Y, Yamamoto T, Kitazawa Y: The effect of mitomycin C trabeculectomy on the progression of visual field defect in normal-tension glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238: 232-236, 2000

サル実験緑内障の視神経乳頭部における形質転換増殖因子  $\mu\beta$ 、血小板由来増殖因子の変化 福地健郎、上田潤、羽入貴子、阿部春樹、沢口昭一 *日本眼科学会雑誌* 103(3):

193-200、平成11年

## 2.学会発表

Hidetoshi Tsukamoto and Hirom K Mishima.: Clinical trial of Xalatan in Japan. *Xalatan Launching Symposium*, Cheju, Korea, 1999.

Koji Jian, Hidetoshi Tsukamoto, Hiroki Nii, Masanobu Suzuki, Makiko Masumoto and Hiromu K Mishima: When to shift from medical treatment to surgical treatment of open-angle glaucoma. *Congress of the European Society of Ophthalmology*. Stockholm, Sweden, 1999.

三嶋 弘: 新しい緑内障治療薬への期待、日本臨床眼科学会、東京、1999

三嶋 弘: 緑内障薬物療法の新しい展望、日本緑内障学会、宇治、1999.

横山知子、塚本秀利、岡田康志、岡田真弓、三嶋 弘: 広島大学におけるラタノプロストの使用経験、広島地方眼科学会、広島、1999

塚本秀利: 緑内障薬物療法の展望、中国四国眼科学会、宇部、1999

塚本秀利: 最新の治療-薬物療法-、日本臨床眼科学会、東京、1999

塚本秀利: 薬物療法と手術療法の接点、日本手術学会、名古屋、2000

新矢誠人、向井 聖、正化圭介、三嶋 弘、石原熊寿、笹 征史

磁気細胞分離システムを用いたラット培養網膜神経節細胞におけるグルタミン酸誘発細胞内カルシウムイオン濃度の測定。第 103 回 日本眼科学会総会 1999. 4.17-19 千葉

向井 聖、正化圭介、新矢誠人、三嶋 弘、石原熊寿、笹 征史: 磁気細胞分離システムを用いたラット培養網膜神経節細胞におけるイオン型グルタミン酸レセプターサブタイプの電気生理学的検討。第 103 回 日本眼科学会総会 1999. 4.17-19 千葉

正化圭介、三嶋 弘、向井 聖、新矢誠人、石原熊寿、笹 征史: 磁気細胞分離システムを用いたラット培養網膜神経節細胞培養。第 103 回 日本眼科学会総会 1999. 4.17-19 千葉

M. Shinya, S. Mukai, K. Shoge, H. K. Mishima, K. Ishihara, M. Sasa. Involvement of Glutamate Receptors in Cytosolic  $Ca^{2+}$  increase in Rat Cultured Retinal Ganglion Cells Enriched with a

Magnetic Cell Sorter. ARVO 1999. 5.9-14, Fort Lauderdale, Florida, USA

S. Mukai, K. Shoge, M. Shinya, H. K. Mishima, K. Ishihara, M. Sasa. An electrophysiological study of ionotropic glutamate receptor subtypes in rat retinal

ganglion cells cultured after separation with a magnetic cell sorter. ARVO 1999. 5.9-14, Fort Lauderdale, Florida, USA

正化圭介: シンポジウム: グルタミン酸誘発網膜ニューロン死。第 19 回日本眼薬理学会・第 12 回国際眼研究会議(日本部会)合同会議。1999, 9.17-18 広島

M. Shinya, H.K. Mishima, K. Shoge, S. Mukai, K.Ishihara, M.Sasa. The protective effects of betaxolol against glutamate neurotoxicity in cultured retinal ganglion cells. 第 73 回日本薬理学会年会 2000. 3.23-25 横浜

S. Mukai, K. Shoge, M. Shinya, H.K. Mishima, K.Ishihara, M.Sasa. Characteristics of ionotropic glutamate receptor subtypes in cultured rat retinal ganglion cells - a whole-cell patch clamp study. 第 73 回日本薬理学会年会 2000.3.23-25 横浜

真島行彦、窪田 良、大竹雄一郎、谷野富彦、小口芳久: 開放隅角緑内障患者におけるミオシリン変異の解析。第 10 回日本緑内障学会 平成 11 年 9 月 3 日

尾羽澤実、野田節子、窪田 良、真島行彦、小口芳久、工藤 純、清水信義: 緑内障病因遺伝子ミオシリン(MYOC)と同蛋白質の視神経乳頭および篩状板部における発現について。第 10 回日本緑内障学会 平成 11 年 9 月 3 日

打田素子、大竹雄一郎、長澤朱美、谷野富彦、真島行彦: SLO microperimetry を用いた局所視野測定の見直し。第 10 回日本緑内障学会 平成 11 年 9 月 3 日

木村 至、篠田 啓、川島晋一、角田和繁、石田晋、谷野富彦、真島行彦: イソプロピルウノプロトン点眼による視神経血流変化のスキヤニングレーザードップラーフローメーターによる測定。第 10 回日本緑内障学会 平成 11 年 9 月 3 日

谷野富彦、大竹雄一郎、木村 至、真島行彦:

スキヤニングレーザードップラーフローメーターにおける視神経血流に対する散瞳点眼剤の影響。第 10 回日本緑内障学会 平成 11 年 9 月 3 日

Ohtake Y, Tanino T, Miyata Y, Mashima Y : Identification of novel compound heterozygous mutations in the cytochrome P4501B1 gene (CYP1B1) in a Japanese patient with primary congenital glaucoma. 1999 ARVO Meeting, May Kawase K, Gu Z, Matsubara M, Yamamoto T, Kitazawa Y: Memantine reduces the retinal ganglion cell loss in an experimental glaucoma model in the rat. The Fourth Annual Meeting of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics 1/30/99. Irvine, USA

北澤克明、山本哲也、富田剛司、谷照斌、川上秀昭、松原正幸: 緑内障視神経障害の発生機序。第 25 回日本医学会総会。4/3/99. 東京都丹羽義明、山本哲也、川上秀昭、北澤克明: 正常眼圧緑内障における二酸化炭素とニルバジピンの眼窩内血流動態への影響の関連。第 103 回日本眼科学会。4/21/99. 千葉市

石田恭子、杉山和久、山本哲也、北澤克明: 正常眼圧緑内障の視野進行因子としての乳頭出血。第 103 回日本眼科学会学術展示。4/21-22/99. 千葉市

別所京子、稲積幸介、山本哲也、北澤克明: 正常眼圧緑内障における角膜厚と眼圧の関係。第 103 回日本眼科学会学術展示。4/21-22/99. 千葉市

堀暢英、山本哲也、北澤克明: マイトマイシンC 併用トラベキュラーの長期成績。第 103 回日本眼科学会学術展示。4/21-22/99. 千葉市

松原正幸、川瀬和秀、谷照斌、山本哲也、北澤克明: ラット網膜挫滅モデルにおける memantine 投与後の網膜神経節細胞数変化。第 103 回日本眼科学会学術展示。4/21-22/99. 千葉市

川上秀昭、望月清文、川瀬和秀、川瀬千鶴、山本哲也、北澤克明: ラット網膜挫滅モデル眼における ERG の経時変化。第 103 回日本眼科学会学術展示。4/22-23/99. 千葉市

杉山和久、谷照斌、川瀬千鶴、山本哲也、北澤克明: ラット視神経および乳頭周囲脈絡膜の微小血管構築について。第 103 回日本眼科学会

学術展示. 4/22-23/99. 千葉市

Kawase K, Alward WLM, Kawase C, Fingert JH, Udo M, Stone E, Yamamoto T, Sheffield VC, Kitazawa Y: Sequence variation of GLC1A (MYOC/TIGR) gene in Japanese patients with normal-tension glaucoma and ocular hypertension. ARVO 1999 poster presentation. 5/9/99. Ft. Lauderdale, USA

Kitazawa Y, Hori N, Yamamoto T: An eight-year follow-up result of trabeculectomy with adjunctive mitomycin C. ARVO 1999 poster presentation. 5/10/99. Ft. Lauderdale, USA

Matsubara M, Gu ZB, Kawase K, Yamamoto T, Kitazawa Y: Memantine reduces secondary degeneration of the retinal ganglion cell in a high intraocular pressure model and an optic nerve crush model in the rat. ARVO 1999 poster presentation. 5/10/99. Ft. Lauderdale, USA

Niwa Y, Yamamoto T, Kawakami H, Kitazawa Y: The relationship between the effect of carbon dioxide inhalation and that of nilvadipine on orbital blood flow in normal-tension glaucoma. ARVO 1999 poster presentation. 5/11/99. Ft. Lauderdale, USA

Sugiyama K, Gu ZB, Kawase C, Yamamoto T, Kitazawa Y: Optic nerve and peripapillary choroidal microvasculature of the rat eye. ARVO 1999 poster presentation. 5/12/99. Ft. Lauderdale, USA

Ishida K, Sugiyama K, Yamamoto T, Kitazawa Y: Disc hemorrhage is a significantly negative, prognostic factor in normal-tension glaucoma. ARVO 1999 oral presentation. 5/13/99. Ft. Lauderdale, USA

川上秀明、望月清文、川瀬和秀、川瀬千鶴、山本哲也、北澤克明:ラット視神経挫滅モデル眼におけるERGおよびVEPの経時変化. 第47回日本臨床視覚電気生理学学会. 7/2/99. 新潟市  
谷照斌、山本哲也、松原正幸、川瀬和秀、澤田明、北澤克明:ラット眼圧上昇モデルにおける網膜神経節細胞数の減少とタクロリムス(FK-506)によるその抑制. 第10回日本緑内障学会. 9/3/99. 三重県磯部町

辻明、谷照斌、川瀬和秀、澤田明、山本哲也、

北澤克明:ラット眼圧上昇モデルにおけるbetaxolol投与後の網膜神経節細胞数の変化. 第10回日本緑内障学会. 9/3/99. 三重県磯部町

中井義幸、川瀬和秀、谷照斌、木村正志、岡野幸雄、山本哲也、北澤克明:ラット眼圧上昇モデルにおけるBax及びBcl-2RNAの変化. 第10回日本緑内障学会学術展示. 9/3-4/99. 三重県磯部町

谷照斌、松原正幸、川瀬和秀、澤田明、山本哲也、北澤克明:ラット眼圧上昇モデルを用いたmemantineの神経保護作用の研究(和訳). 1999年中国緑内障学会. 9/10/99. 中国湖南省大庸市

Sawada A, Tsuji A, Gu Z, Yamamoto T, Kitazawa Y: Neuroprotective effects of betaxolol against RGC death induced by elevated IOP in the rat. The Second Congress of the Asian-Oceanic Glaucoma Society. Symposium 10. Neuroprotection. 10/5/99. Tokyo (symposium coauthor)

石田恭子、杉山和久、山本哲也、北澤克明:正常眼圧緑内障における視神経乳頭出血出現部位と視野進行部位の関連. 第53回日本臨床眼科学会. 10/7/99. 東京都

近藤雄司、丹羽義明、山本哲也、北澤克明:正常眼圧緑内障における眼圧・視野の左右差と眼窩血流動態. 第53回日本臨床眼科学会. 10/7/99. 東京都

\*Fukuchi T, Ueda J, Hanyuu T, Yamamoto S, Yaoeda K, Hashimoto K, Sawaguchi S, Yue B, Abe H. Distribution and expression of TGF- $\beta$ , PDGF and their receptors in the normal and glaucomatous monkey optic nerve heads. 1999, ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale, USA.

\*Ueda J, Fukuchi T, Hanyuu T, Abe H, Sawaguchi S. Involvement of mitochondrial disruption in apoptosis of rat glaucoma model. 1999, ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale, USA.

#### G.知的所有権の取得状況

- 1.特許取得:なし
- 2.実用新案登録:なし
- 3.その他:なし

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)  
分担研究報告書

緑内障の発症, 経過解析, 治療に関する研究  
分担研究者 三嶋 弘 広島大学医学部眼科学教室 教授

**研究要旨** プロスタグランジンF2 $\alpha$ 関連物質の新薬であるラタノプロストは、緑内障患者に対して、単独療法のみならず併用療法や切り替え療法においても、優れた眼圧下降効果ならびに安全性を示した。また、緑内障治療において、薬物療法から手術療法への移行のタイミングを示し、今後、緑内障治療に対する新薬開発の必要性を考える際の基礎資料とした。また、網膜神経節細胞の培養系は、緑内障の発症機序のひとつと考えられるグルタミン酸誘発性網膜神経節細胞死の実験モデルとして有用であり、グルタミン酸誘発[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇を抑制するNon-NMDA受容体遮断薬は、視神経保護の観点からの緑内障治療薬になりうる可能性がある。

**A.研究目的**

1)ラタノプロストの緑内障患者に対する使用成績

我々が長年開発に携わってきたプロスタグランジン F2 $\alpha$ 関連薬であるラタノプロストが、平成11年5月に本邦で上市された。既に報告したように、発売前の臨床試験において、ラタノプロスト単独療法は、短期ならびに長期の使用において、これまでの緑内障治療薬にはない優れた眼圧下降効果ならびに安全性を示した。

我々は、緑内障患者において、ラタノプロストの短期使用成績(効果ならびに安全性)を検討するとともに、単独療法だけでなく、併用療法ならびに切り替え療法においても、優れた眼圧下降効果ならびに安全性を有するか、を検討し、今後の緑内障新薬開発における問題点を明らかにする。

2)薬物療法から手術療法への移行のタイミング

強力な眼圧下降作用をもつラタノプロストの出現に伴い、緑内障患者において薬物療法から手術療法への移行のタイミングが変化することが予想される。薬物療法から手術療法への移行のタイミングが、ラタノプロスト発売前と発売後において異なるかどうかを検討し、薬物療法が緑内障治療全体の中で占める重要性ならびに緑内障新薬開発の必要性を明らかにする。

3)網膜神経細胞のアポトーシスに関する研究

緑内障は臨床の現場においては未だ降圧治

療が主であり、神経保護という観点からの治療は一般的ではない。緑内障における不可逆性の神経障害には、早期虚血によるグルタミン酸濃度上昇/細胞内へのCa流入と、それに伴う神経細胞死が関わっていると考えられている(グルタミン酸-Ca仮説)。網膜神経を保護することにより従来の治療法では得られなかった病態の視機能を保存できる可能性がある。この神経細胞死の病態(含アポトーシス)を明らかにするために、従来私共が行ってきた網膜神経細胞の培養系に加え、緑内障の障害の標的細胞である網膜神経節細胞の分離培養の確立が必要である。私共は新たに開発した培養手技で網膜神経節細胞の分離培養に成功した(平成10年度)。この神経節細胞を用いることで、種々の実験が可能になり、今まで不明な点が多かった網膜神経節細胞死のメカニズム、および保護因子の検索が可能であると考え以下の研究を行った。

**B.研究方法**

1)ラタノプロストの緑内障患者に対する使用成績

広島大学眼科で、平成11年5月から10月までの間にラタノプロストを処方した緑内障患者195人336眼において、その眼圧下降効果ならびに安全性をラタノプロストの処方パターン別に検討した。なお、処方パターンは、以下の3つのパターン、新規(初めての緑内障治療薬としてラ

タノプロストを処方)、追加(現在使用している緑内障治療薬にラタノプロストを追加)、変更(現在使用している緑内障治療薬の一部または全てをラタノプロストに変更)とした。

## 2) 薬物療法から手術療法への移行のタイミング

広島大学眼科で、ラタノプロスト発売前の期間(平成6年から10年)に、緑内障手術を受けた原発開放隅角緑内障患者99人124眼において、薬物療法から手術療法へ移行した時の、視力、眼圧、視野、視神経乳頭、点眼薬、内服薬の有無を調べた。また、各項目をスコア化し、緑内障の重症度を客観的に判断する指標とした。

次に、ラタノプロスト発売後(平成11年5月以降)において、ラタノプロストを使用したにもかかわらず、緑内障手術が必要であった原発開放隅角緑内障患者に対して、同様の検討を試みた。

## 3) 網膜神経細胞のアポトーシスに関する研究

網膜神経節細胞の分離培養に関しては、昨年度報告した私共が開発した磁気細胞分離システムを用いて行った。得られた網膜神経節細胞のグルタミン酸に対する特性を解析するために昨年度に引き続きホールセルパッチクランプ法やfura-2を用いたカルシウム画像解析装置(ARGUS HiSCA)を用いて神経生理学、薬理学的検討を行った。また、グルタミン酸負荷に対する細胞死のメカニズムの検討やそれを保護する物質の検索も合わせて行った。アポトーシスに関しては、従来のアポトーシス誘導遺伝子の導入に加えて、細胞外条件を変化させることでアポトーシスを誘導するモデルの開発を行う。

## C. 研究結果

### 1) ラタノプロストの緑内障患者に対する使用成績

全症例においてラタノプロスト開始前の眼圧(平均±標準偏差)は $18.8 \pm 5.8$ mmHg、開始後平均12.0週目の眼圧は、 $16.3 \pm 5.1$ mmHg(下降幅 $2.5 \pm 3.7$ mmHg)で、眼圧は有意( $p < 0.0001$ 、対応のあるt検定)に下降した。処方パターン別の眼圧下降幅は、新規 $3.3 \pm 4.2$ mmHg、追加 $2.6 \pm 3.6$ mmHg、変更 $2.2 \pm 3.5$ mmHgで、全てにおいて有意( $p < 0.0001$ )であった。副作用は50人79眼に出現したが、重篤なものはなかった。

### 2) 薬物療法から手術療法への移行のタイミング

ラタノプロスト発売前において、薬物療法から手術療法へ移行した際の、平均視力は0.44、平均眼圧は22.7mmHg、ゴールドマン動的量的視野検査で湖崎分類3以上が58%、視神経乳頭陥凹の面積比は平均0.63、点眼薬の使用本数は平均2.3本、内服薬の使用は29%であった。また、各項目の合計スコア(15点満点)は平均7.6点であった。

なお、ラタノプロスト発売後の調査に関しては、ラタノプロスト発売後まだ間がなく、ラタノプロストが無効で手術療法に移行した症例が少ないため、今回は、統計解析を行うことができなかった。

### 3) 網膜神経細胞のアポトーシスに関する研究

ホールセルパッチクランプ法を用いた検討では、3種類のイオンチャネル型グルタミン酸受容体サブタイプが培養網膜神経節細胞に発現しているのが認められた。それらの電気生理学的、薬理学的特性を詳細に解析し、他の中枢神経細胞に発現しているイオンチャネル型グルタミン酸受容体サブタイプと特性が類似していることが明らかになった。

培養網膜神経節細胞に対し種々の濃度のグルタミン酸を暴露し、カルシウム画像解析装置を用いて、細胞内カルシウム濃度( $[Ca^{2+}]_i$ )を測定し、実験に最適なグルタミン酸の至適濃度を決定した。この系を用いてグルタミン酸受容体拮抗物質の影響を検討した。NMDA受容体拮抗物質であるMK-801では $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は96.2%にしか抑制されなかったが、Non-NMDA受容体拮抗物質であるCNQXでは35.5%までに抑制された。この結果網膜神経節細胞におけるグルタミン酸誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は他の神経細胞と異なり、主としてNon-NMDA受容体を介していることが明らかとなった。

眼科領域で降圧剤として用いられている交感神経 $\beta_1$ 受容体の選択的阻害薬であるBetaxololのグルタミン酸誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する影響を検討した。10mMグルタミン酸暴露による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はBetaxolol100mM同時投与により66.7%に抑制された。Non-NMDA受容体を介して開口する電位依存性Caチャネルを介する

[Ca<sup>2+</sup>]I 上昇を抑制している可能性が考えられる。

培養網膜神経節細胞に種々の濃度のグルタミン酸を 24 時間暴露し、暴露前後での生存細胞数を比較し生存率を計測した。10mM では 60.6%、100mM では 39.6%と濃度依存的に生存率が低下するのを認めた。次にグルタミン酸 10mM と Betaxolol 100mM を同時投与したところ、グルタミン酸 10mM 暴露による生存率は 64.4%であったが、Betaxolol 100mM 同時投与により生存率は 79.9%に上昇し、神経保護作用が認められた。

これらの結果、Betaxololの神経保護作用はグルタミン酸誘発[Ca<sup>2+</sup>]I 上昇を抑制することによりグルタミン酸誘発細胞死を抑制することで発現していると考えられる。

#### D.考察

##### 1)ラタノプロストの緑内障患者に対する使用成績

本邦において、ラタノプロストの使用成績の報告は、臨床試験におけるラタノプロスト単独療法の報告しかなかったが、今回、我々は、単独療法のみならず併用療法ならびに切り替え療法においても、ラタノプロストが優れた眼圧下降効果ならびに安全性を有することを示した。また、実際の緑内障患者において、ラタノプロストの短期使用成績(効果ならびに安全性)を検討し、その問題点を明らかにすることにより、今後の新薬開発の課題とした。

##### 2)薬物療法から手術療法への移行のタイミング

新薬を開発する際には、そのバックグラウンドとして、現在の薬物療法の現状ならびに新薬開発の必要性を知ることが重要である。緑内障薬物療法から手術療法への移行のタイミングを把握し、薬物療法の現状ならびに薬物療法が治療全体に占める重要性を知ることが、新薬開発を行ううえでの長期的な戦略を考える際の基礎資料となった。

##### 3)網膜神経細胞のアポトーシスに関する研究

ホールセルパッチクランプ法の結果から、培養網膜神経節細胞には種々のグルタミン酸受容体が発現していた。またカルシウム画像解析装

置を用いた検討が可能でグルタミン酸誘発[Ca<sup>2+</sup>]I 上昇の培養網膜神経節細胞での特性も明らかになった。

この培養系では、網膜神経節細胞のグルタミン酸神経毒性発現機序の解明および治療薬開発の神経保護実験、特にグルタミン酸誘発性[Ca<sup>2+</sup>]I 上昇の部分での検討に非常に有用であった。

#### E.結論

##### 1)ラタノプロストの緑内障患者に対する使用成績

プロスタグランジン F<sub>2</sub>α 関連薬であるラタノプロストは、発売後の臨床使用調査において、単独療法のみならず併用療法ならびに切り替え療法においても優れた眼圧下降効果ならびに安全性を示した。

##### 2)薬物療法から手術療法への移行のタイミング

薬物療法から手術療法への移行のタイミングを把握し、薬物治療が緑内障治療全体に占める重要性を示した。

##### 3)網膜神経細胞のアポトーシスに関する研究

私共の新たに確立した網膜神経節細胞の培養系は、緑内障の発症機序のひとつと考えられるグルタミン酸誘発性網膜神経節細胞死の実験モデルとして有用であった。グルタミン酸誘発[Ca<sup>2+</sup>]I 上昇を抑制するNon-NMDA受容体遮断薬が神経保護の観点からの緑内障治療薬になりうる可能性を示した。

#### F.研究発表

##### 1.論文発表

Masanobu Suzuki, Hiromu K. Mishima, Kanjiro Masuda, Makoto Araie, Yoshiaki Kitazawa, Ikuo Azuma : Efficacy and safety of latanoprost eye drops for glaucoma treatment : A 1-year study in Japan. Jpn J Ophthalmol 44 : 33-38, 2000  
塚本秀利、三嶋弘：最近発売された3種類の緑内障治療薬. 日本の眼科,70: 759-761, 1999.  
K. Shoge, H.K. Mishima, S. Mukai, M. Shinya, K. Ishihara, M. Kanno and M. Sasa: Rat retinal ganglion cells culture enriched with the magnetic cell sorter. Neurosci. Lett. 259, 111-114, 1999

K. Shoge, H.K. Mishima, T. Saitoh, K. Ishihara, Y. Tamura, H. Shiomi and M.Sasa: Attention by PACAP of glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons. Brain Res. 839, 66-73, 1999

## 2.学会発表

Hidetoshi Tsukamoto and Hirom K Mishima.: Clinical trial of Xalatan in Japan. Xalatan Launching Symposium, Cheju, Korea,1999.

Koji Jian, Hidetoshi Tsukamoto, Hiroki Nii, Masanobu Suzuki, Makiko Masumoto and Hiromu K Mishima: When to shift from medical treatment to surgical treatment of open-angle glaucoma. Congress of the European Society of Ophthalmology. Stockholm, Sweden, 1999.

三嶋 弘:新しい緑内障治療薬への期待、日本臨床眼科学会、東京、1999

三嶋 弘:緑内障薬物療法の新しい展望、日本緑内障学会、宇治、1999.

横山知子、塚本秀利、岡田康志、岡田真弓、三嶋 弘:広島大学におけるラタノプロストの使用経験、広島地方眼科学会、広島、1999

塚本秀利:緑内障薬物療法の展望、中国四国眼科学会、宇部、1999

塚本秀利:最新の治療-薬物療法-、日本臨床眼科学会、東京、1999

塚本秀利:薬物療法と手術療法の接点、日本手術学会、名古屋、2000

新矢誠人、向井 聖、正化圭介、三嶋 弘、石原熊寿、笹 征史

磁気細胞分離システムを用いたラット培養網膜神経節細胞におけるグルタミン酸誘発細胞内カルシウムイオン濃度の測定。第103回日本眼科学会総会 1999. 4.17-19 千葉

向井 聖、正化圭介、新矢誠人、三嶋 弘、石原熊寿、笹 征史:磁気細胞分離システムを用いたラット培養網膜神経節細胞におけるイオン型グルタミン酸レセプターサブタイプの電気生理学

的検討。第103回日本眼科学会総会 1999. 4.17-19 千葉

正化圭介、三嶋 弘、向井 聖、新矢誠人、石原熊寿、笹 征史:磁気細胞分離システムを用いたラット培養網膜神経節細胞培養。第103回日本眼科学会総会 1999. 4.17-19 千葉

M. Shinya, S. Mukai, K. Shoge, H. K. Mishima, K. Ishihara, M. Sasa. Involvement of Glutamate Receptors in Cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase in Rat Cultured Retinal Ganglion Cells Enriched with a Magnetic Cell Sorter. ARVO 1999. 5.9-14, Fort Lauderdale, Florida, USA

S. Mukai, K. Shoge, M. Shinya, H. K. Mishima, K. Ishihara, M. Sasa. An electrophysiological study of ionotropic glutamate receptor subtypes in rat retinal

ganglion cells cultured after separation with a magnetic cell sorter. ARVO 1999. 5.9-14, Fort Lauderdale, Florida, USA

正化圭介:シンポジウム:グルタミン酸誘発網膜ニューロン死。第19回日本眼薬理学会・第12回国際眼研究会議(日本部会)合同会議。1999, 9.17-18 広島

M. Shinya, H.K. Mishima, K. Shoge, S. Mukai, K.Ishihara, M.Sasa. The protective effects of betaxolol against glutamate neurotoxicity in cultured retinal ganglion cells. 第73回日本薬理学会年会 2000. 3.23-25 横浜

S. Mukai, K. Shoge, M. Shinya, H.K. Mishima, K.Ishihara, M.Sasa. Characteristics of ionotropic glutamate receptor subtypes in cultured rat retinal ganglion cells - a whole-cell patch clamp study. 第73回日本薬理学会年会 2000.3.23-25 横浜

## G.知的所有権の取得状況

- 1.特許取得:なし
- 2.実用新案登録:なし
- 3.その他:なし



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)  
分担研究報告書

緑内障の発症、経過解析、治療に関する研究  
分担研究者 小口芳久 慶應義塾大学眼科学教授

研究要旨

1) 緑内障遺伝子であるミオシリンに関して、視神経乳頭部星状膠細胞におけるミオシリン発現の検討および、2) 緑内障患者におけるミオシリン遺伝子解析を行った。3) 先天緑内障の病因遺伝子であるCYP1B1に関して、先天緑内障患者を解析した。また、4) 緑内障治療薬に関して、乳頭部血流に及ぼす影響をスキヤニングレーザードップラーフローメーター(以下 HRF)を用いて検討した。

1) 視神経乳頭と篩状板部において、特に星状膠細胞の突起を含む細胞質内にミオシリン蛋白の局在を認め、ミオシリンの異常により星状膠細胞が機能異常を来し、視神経の脆弱性をもたらすことが示唆された。2) 日本人開放隅角緑内障においてミオシリン遺伝子異常は約3%の患者にみられた。3) 先天緑内障においてCYP1B1遺伝子異常は約10%の患者にみられた。4) レスキュラ点眼によって視神経乳頭部・後極部網膜の血流が増加していることが示唆され、正常眼圧緑内障患者の治療法の可能性が考えられる。

A. 研究目的

緑内障は多因子疾患とされるので、家族性で報告された遺伝子変異は非家族性の緑内障患者においても存在することが考えられる。この遺伝子変異がもし一般の緑内障患者においても同定されれば、緑内障発症の危険因子の1つとなりうるので、多数例の日本人において解析する必要がある。遺伝子レベルで危険因子の有無を調べることにより、発症前診断が可能となり、早期に予防することができる。また、緑内障遺伝子の発現と眼圧上昇の機序が解明し、更にこの遺伝子の誘発因子や抑制因子が判明すれば、これらの情報は将来的には新しい治療薬の開発につながる。

B. 研究方法

1) 緑内障遺伝子ミオシリンの発現を視神経乳頭部において調べる。対象はマウスおよびブタの視神経を用いる。抗ミオシリン抗体を用いて免疫組織化学および免疫電顕にて微細構造を検討した。培養ブタ星状膠細胞を用いて、ステロイドによる影響を検討した。  
2) 40歳以下発症の開放隅角緑内障、若年の高眼圧症患者、および正常人の血液を多数集め、ミオシリン遺伝子変異をスクリーニングする。ミオシリン遺伝子を9カ所に分け、PCR-SSC

P法にて遺伝子変異をスクリーニングした。

3) 先天緑内障患者において、疾患遺伝子である Cytochrome P4501B1 遺伝子(CYP1B1) 変異をスクリーニングする。CYP1B1 遺伝子を8カ所に分け、PCR-SSCP法にて遺伝子変異をスクリーニングした。

4) 正常人および正常眼圧緑内障患者において、イソプロピルウノプロストン点眼剤が乳頭部における血流状態に及ぼす影響(flow値)をHRFを用いて検討を行った。

C. 研究結果

1) ミオシリン遺伝子の視神経における発現

マウスの神経節細胞およびその軸索に沿ってミオシリンの発現が確認された。マウス視神経内の星状膠細胞に特異的な発現を認めた。また、ブタの視神経乳頭と篩状板部において、特に星状膠細胞の突起を含む細胞質内にミオシリン蛋白の局在を認めた。培養ブタ星状膠細胞において、明かなステロイドの影響はみられなかった。

2) 緑内障患者におけるミオシリン遺伝子解析

緑内障患者としては、40歳までに発症したを対象とした。検査に際し同意を得た後、末梢血を採取し、DNAを抽出した。140家系を解析した。4家系(家族歴有り)において疾患の発症に関連すると思われるアミノ酸の置換がみられた

( Arg 46 stop、Arg158Gln、Asn360Lys、Ala363Thr)。これらは日本人固有の変異であった。2家系は正常眼圧緑内障が疑われている家系であった(Arg 46 stop、Arg158Gln)。直接発症には関連しないと思われたアミノ酸の置換は6カ所にみられた(コドン 19、76、208、439、470、488)。ミオシリン遺伝子頻度は3%であった。

### 3) 常染色体劣性遺伝先天緑内障の疾患遺伝子 *CYP1B1* 解析

65 家系の先天緑内障患者を解析した。検体は主に慶應義塾大学、東京大学、京都大学、国立小児病院より提供された。検査に際し親の同意を得た後、末梢血を採取し、DNAを抽出した。疾患の発症と関連すると思われる5つの変異を同定した。これらの変異は日本人固有のものであった。多型が5カ所認められた。先天緑内障患者の中で *CYP1B1* 遺伝子異常の頻度としては約 10%であった。

4) 健常成人、正常眼圧緑内障患者いずれにおいても、イソプロピルウノプロストン点眼を行った眼については、視神経および後極部網膜血流ともに点眼後2時間のflowの値は、点眼前と比較し増加傾向を示した。

## D. 考案

1) ミオシリンが視神経乳頭と篩状板部の星状膠細胞の機能に重要な役割を演じ、ミオシリンの異常により星状膠細胞が機能異常を来し、視神経の脆弱性をもたらすことが示唆された。

2) 日本人においては、ミオシリン遺伝子異常の緑内障家系は約3%と少ないと思われるが、症例が少ないので今後とも症例を増やして検討していく予定である。

3) 日本人においては、先天緑内障患者における *CYP1B1* 異常の頻度は欧米に比べると少ないことが判明したが、これは本邦においては血族結婚がすくないことに起因すると思われた。

4) イソプロピルウノプロストン点眼によって視神経乳頭部や後極部網膜の血流が増加していることが示唆され、正常眼圧緑内障患者の治療法の可能性が考えられる。

## E. 結論

ミオシリンは線維柱帯組織(線維柱帯細胞内

および細胞外)において、その正常な構築を維持する上で重要と考えられるが、視神経乳頭部の星状膠細胞にも強く発現していた。更に、ミオシリン変異が正常眼圧緑内障患者にもみられたことから、ミオシリンの異常により視神経、特に篩状板における脆弱性も発症に関連することが考えられた。視神経乳頭部における血流改善を目的とした場合、イソプロピルウノプロストン点眼薬はその効果が期待できると思われた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Takahashi H, Noda S, Mashima Y, Kubota R, Ohtake Y, Tanino T, Kudoh J, Oguchi Y, Shimizu N. The myocilin (MYOC) gene expression in the human trabecular meshwork. *Curr Eye Res* 20(2):81-84, 2000.

Ohtake Y, Tanino T, Miyata H, Mashima Y. Identification of novel compound heterozygous mutations in the cytochrome P450B1 gene (*CYP1B1*) in a Japanese patient with primary congenital glaucoma. *Ophthalmic Genet* in press  
Kubota R, Mashima Y, Ohtake Y, Tanino T, Kimura T, Hotta Y, Kanai A, Tokuoka S, Azuma I, Tanihara H, Inatani M, Inoue Y, Kudoh J, Oguchi Y, Shimizu N. Novel mutations in myocilin gene in Japanese glaucoma patients. *Hum Mutation, Mutation in Brief* in press.

### 2. 学会発表

真島行彦、窪田 良、大竹雄一郎、谷野富彦、小口芳久: 開放隅角緑内障患者におけるミオシリン変異の解析。第10回日本緑内障学会 平成11年9月3日

尾羽澤実、野田節子、窪田 良、真島行彦、小口芳久、工藤 純、清水信義: 緑内障病因遺伝子ミオシリン(MYOC)と同蛋白質の視神経乳頭および篩状板部における発現について。第10回日本緑内障学会 平成11年9月3日

打田素子、大竹雄一郎、長澤朱美、谷野富彦、真島行彦: SLO microperimetry を用いた局所視野測定の見直し。第10回日本緑内障学会 平成11年9月3日

木村 至、篠田 啓、川島晋一、角田和繁、石田

晋、谷野富彦、真島行彦：イソプロピルウノプロ  
ストン点眼による視神経血流変化のスキヤン  
ニングレーザードップラーフローメーターによる測  
定。第10回日本緑内障学会 平成11年9月3  
日

谷野富彦、大竹雄一郎、木村 至、真島行彦：  
スキヤンニングレーザードップラーフローメータ  
ーにおける視神経血流に対する散瞳点眼剤の  
影響。第10回日本緑内障学会 平成11年9月  
3日

Ohtake Y, Tanino T, Miyata Y, Mashima Y :  
Identification of novel compound heterozygous  
mutations in the cytochrome P4501B1 gene  
(CYP1B1) in a Japanese patient with primary  
congenital glaucoma. 1999 ARVO Meeting, May

G.知的所有権の取得状況

- 1.特許取得なし
- 2.実用新案登録無し
- 3.その他なし

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)  
分担研究報告書

緑内障の発症、経過解析、治療に関する研究  
分担研究者 北澤克明 岐阜大学医学部教授

#### 研究要旨

正常眼圧緑内障における循環障害の果たす役割について検討し、末梢循環障害、乳頭出血等の非眼圧要因が眼圧要因とともに重要な病因となっている事を明確に示した。また、超音波ドップラー装置を用い、カルシウム拮抗薬が緑内障眼、特に正常眼圧緑内障の視神経領域における循環動態改善に有用なことを証明した。手術による十分な眼圧下降が正常眼圧緑内障の視野障害進行の停止に有用なことを長期観察結果から明らかにした。ラット高眼圧モデル、ラット視神経坐滅モデルを用い、各種薬物の神経保護効果を検討し、NMDA受容体遮断薬、ベタキソロール投与により網膜神経節細胞の消失を用量依存性に抑制できることを明らかにした。さらに同モデルを用いた電気生理学的検討により薬物の作用機序を推定した。

#### A. 研究目的

正常眼圧緑内障における循環障害の果たす役割について検討し、末梢循環障害、乳頭出血等の非眼圧要因が眼圧要因とともに重要な病因となっている事を超音波ドップラー装置等を用いて確認する。カルシウム拮抗薬が緑内障眼の視神経領域における循環動態及ぼす影響を検討する。手術による十分な眼圧下降が正常眼圧緑内障の視野障害進行の停止に有用なことを長期観察結果から明らかにする。ラット高眼圧モデル、ラット視神経坐滅モデルを用い、各種薬物の神経保護効果を、神経軸索輸送機能の変化と電気生理学的変化により検討する。

#### B. 研究方法

正常眼圧緑内障データベースを用い、末梢循環障害、乳頭出血等の非眼圧要因と眼圧要因の本症予後に及ぼす影響を多変量解析により検討した。また、本症患者に対し、新たに開発した炭酸ガス負荷装置を用いて炭酸ガスを負荷し、緑内障眼の視神経および視神経乳頭領域の血流動態を検討した。

カルシウム拮抗薬投与前後における正常眼圧緑内障の視神経領域における循環動態を超音波ドップラー装置を用いて検討した。また、手術例データベースを元に手術治療の正常眼圧緑内障の視機能に及ぼす影響を検討した。

緑内障性視神経症検討の動物モデルとして作成したラット高眼圧モデル、ラット視神経坐滅モ

デルを用い、NMDA受容体遮断薬(MK-801やメマンチン)、FK-506(タクロリムス)、交感神経β遮断薬(ベタキソロール)の効果を軸索輸送と電気生理学的指標をもとに検討した。

#### C. 研究結果

正常眼圧緑内障においては、末梢循環障害、乳頭出血等の非眼圧要因が重要な病因となっている事を明らかにした。炭酸ガス負荷により緑内障眼の視神経および視神経乳頭領域の血流が改善する事を示した。乳頭出血は本症の予後を有意に不良とする重要な因子である事を示した。

原発開放隅角緑内障において傍乳頭網脈絡膜萎縮がきわめて高頻度に認められる事、機械的要因が主とされる原発閉塞隅角緑内障とは形態が異なる事を示し、本症における循環動態不全の緑内障視神経症発症への関与を示唆した。また、本症における遺伝子解析より、新たな遺伝子変異を発見した。

ニルバジピン等のカルシウム拮抗薬が正常眼圧緑内障の視神経領域の循環動態を改善する事を明らかにした。手術による十分な眼圧下降が正常眼圧緑内障の視野障害進行の停止に有用なことを示した。

NMDA受容体遮断薬投与により網膜神経節細胞の消失を用量依存性に抑制できることを明らかにした。また、FK-506(タクロリムス)、ベタキソロールによっても、網膜神経節細胞の障害