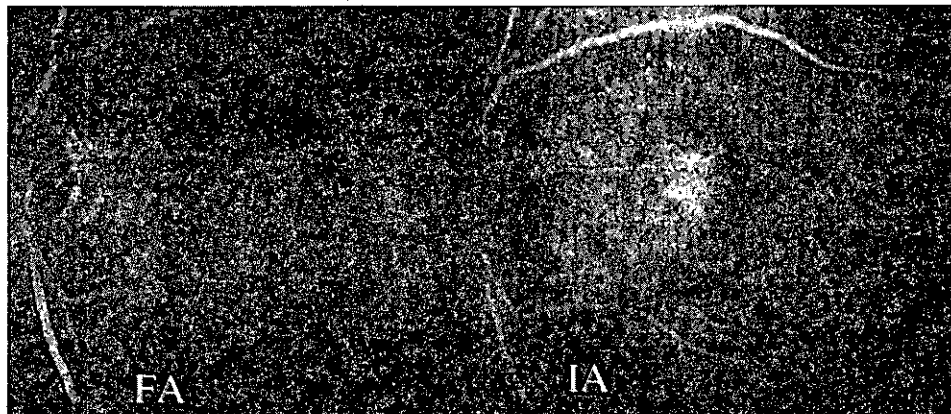


術前4か月



術前3か月



図3：症例2の術前4か月（上）および術前3か月（下）のFA・IA所見

# 加齢黄斑変性症に対する低用量放射線治療、光凝固療法の 効果に関する無作為割付け比較 対照試験：平成12年12月31日時の症例登録状況と ベースライン要因の検討

Randomized controlled trials on low-dose radiotherapy or laser photocoagulation for age-related macular degeneration: A comparison of baseline factors of the cases registered by December 2000.

辻 一郎<sup>1)</sup>、玉井 信<sup>2)</sup>

1) 東北大学医学部公衆衛生学教室 2) 東北大学医学部眼科学教室

Ichiro Tsuji<sup>1)</sup>, Makoto Tamai<sup>2)</sup>

1) Department of Public Health, Tohoku University School of Medicine

2) Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine

## 【抄録】

加齢黄斑変性症に対する放射線治療、軟性ドルーゼンに対するレーザー光凝固療法の効果判定のための無作為割付け比較対照試験（RCT）に関して、平成12年12月31日時の症例登録状況を総括し、治療群と対照群との間で基本的な要因を比較する。

放射線治療では、67症例（治療群＝37例、対照群＝30例）が登録された。性・年齢・眼側・視力・新生血管の大きさとも、治療群と対照群との間に有意な差はなかった。

滲出型加齢黄斑変性症の対側の軟性ドルーゼンに対するレーザー光凝固療法では、37症例（治療群＝18例、対照群＝19例）が登録された。上記の変数のいずれも、治療群と対照群との間に有意な差はなかった。

両側性軟性ドルーゼンに対するレーザー光凝固療法では18症例が登録され、無作為に一方の眼を治療眼、他側を対照眼とした。治療眼と対照眼との間で、小数視力、log MAR 視力とも有意な差はなかった。

## Abstract

We compared baseline characteristics between the treatment group and the control group in this randomized controlled trials (RCTs) for age-related macular degeneration testing the efficacy of low-dose radiotherapy and laser photocoagulation of soft drusen, respectively.

In the RCT on low-dose radiotherapy, 37 cases have been allocated into the treatment group, and 30 cases into the control group. No significant differences was seen between the treatment and the control groups in sex, age, side of eyes, visual acuity, or neovascularization.

Regarding the trial on laser photocoagulation of soft drusen, 18 cases have been allocated into the treatment group, and 19 cases into the control group. There were no significant difference between the groups in sex, age, side of eyes, visual acuity, or neovascularization.

For 18 cases with bilateral soft drusen, we randomly allocated one side for laser photo-coagulation and another for control. Visual acuity was not different between the eyes for treatment and those for control.

キーワード：加齢黄斑変性症、放射線治療、軟性ドルーゼン、レーザー光凝固療法、無作為割付け比較対照試験（RCT）

## 研究目的

加齢黄斑変性症は高齢者における中途失明の最大原因に位置づけられているが、その治療法はまだ確立していない。それに対して、加齢黄斑変性症に対する放射線治療、軟性ドルーゼンに対するレーザー光凝固療法の効果を評価することを目的として、全国多施設共同研究による無作為割付け比較対照試験

（RCT）が本研究班の事業の1つとして行われている。

RCTが適正に行われるには、先ず第1に、研究対象者における諸要因（性・年齢・疾病の重症度・予後関連要因など）について、治療群と対照群との間で差がないことが望ましい。そこで、症例登録の段階において、治療群と対照群との間で基本的な要

因を定期的に比較すべきであるとされている。

本報告では、平成12年12月31日時点における症例の登録状況を総括し、治療群と対照群との間で基本的な要因を比較するものである。

#### 方法

加齢黄斑変性症に対する放射線治療について、平成12年12月末の時点で登録されている67症例（治療群＝37例、対照群＝30例）を対象に、治療群と対照群との間で、性・年齢・対象眼側（左右）・小数視力・log MAR 視力・新生血管の大きさを比較した。

滲出型加齢黄斑変性症の対側の軟性ドレーゼンに対するレーザー光凝固療法について、平成12年12月末の時点で登録されている37症例（治療群＝18例、対照群＝19例）を対象に、治療群と対照群との間で、性・年齢・対象眼側（左右）・小数視力・log MAR 視力・新生血管の大きさを比較した。

両側性軟性ドレーゼンに対するレーザー光凝固療法では、18症例が登録されている。左右の眼のうち1方を無作為に治療眼とし、他側を対照眼とした。治療眼と対照眼との間で、視力を比較した。

なお性・対象眼側（左右）については $\chi^2$ -検定、小数視力についてはMan-Whitney のU-検定、その他についてはt-検定を行った。

#### 結果と考察

##### (1) 放射線治療：ベースライン要因の比較

加齢黄斑変性症に対する放射線治療に登録された症例数を施設別に表1に示す。施設によって登録症例数は異なり、最多は日本大学駿河台病院11例で、弘前大学と九州大学（各10例）が次いでいた。

治療群と対照群のベースライン要因を表2に示す。男女比には両群間で差がなかった。治療群で平均年齢が高い傾向があったが、その差は有意ではなかった。対象眼は、治療群で右眼が多い傾向があったが、有意ではなかった。小数でもlog MAR でも、視力に群間差はなかった。新生血管に有意な差はなかった。

以上より、現時点において、ベースライン要因に偏りはなく、無作為割付けが適正に行われていることが示唆された。

##### (2) 滲出型加齢黄斑変性症の対側の軟性ドレーゼンに対するレーザー光凝固療法：ベースライン要因の比較

登録症例数を施設別に表3に示す。登録が最も多かった施設は淀川キリスト教病院（8例）であり、札幌医科大学（5例）が次いだ。

治療群と対照群のベースライン要因を表4に示す。男女比には両群間で差がなかった。対照群で平均年

齢が2歳ほど高かったが、その差は有意でなかった。小数でもlog MAR でも、視力に群間差はなかった。新生血管に有意な差はなかった。

以上より、現時点において、ベースライン要因に偏りはなく、無作為割付けが適正に行われていることが示唆された。

(3) 両側性軟性ドレーゼンに対するレーザー光凝固療法：ベースライン要因の比較 登録症例数を施設別に表5に示す。登録が最も多かった施設は淀川キリスト教病院（5例）であり、札幌医科大学（4例）が次いだ。

ベースライン時点では、小数視力、log MAR 視力とも、治療眼と対照眼との間で有意な差はなかった（表6）。

#### 結論

無作為割付けの状況を評価するために、登録症例に対して、基本的な要因に偏りがなくどうかを検討した。

3つのトライアルに共通して、治療群と対照群との間で、ベースライン要因には有意な群間差は観察されなかった。したがって、症例の無作為割付けは適切に行われていることが示された。今後、さらに症例の登録を続けるとともに、当初から予定していた1年間の追跡をすべての症例に対して行い、本症の治療法に対する科学的な評価を行うものである。

表1 各施設の症例登録状況  
(加齢黄斑変性症に対する低用量放射線治療)

施設名	治療群	対照群	合計
札幌医科大学	1	0	1
弘前大学	5	5	10
東北大学	2	2	4
群馬大学	2	1	3
日本大学駿河台病院	5	6	11
順天堂大学	1	0	1
北里大学	1	0	1
名古屋大学	3	3	6
名古屋市立大学	1	1	2
国立名古屋病院	4	3	7
京都大学	2	2	4
関西医科大学	2	1	3
高知医科大学	1	1	2
九州大学	6	4	10
熊本大学	1	1	2
合計	37	30	67

表2 加齢黄斑変性症に対する放射線治療トライアルにおける治療群と対照群との比較

項目	治療群 (N=37)	対照群 (N=30)	P値
性 (男:女)	25 : 12	21 : 9	0.831
年齢 (SD)	72.1 (6.7)	71.4 (7.3)	0.718
眼側 (左:右)	12 : 25	15 : 15	0.145
小数視力 (SD)	0.36 (0.23)	0.28 (0.24)	0.101
log MAR 視力 (SD)	-0.565 (0.387)	-0.683 (0.339)	0.194
新生血管 (SD)	0.736 (0.254)	0.733 (0.273)	0.143

\* FAG法による (タテ・ヨコの大きい方の値)

表3 各施設の症例登録状況  
(加齢黄斑変性症の対側眼の軟性ドローゼンに対する光凝固)

施設名	治療群	対照群	合計
札幌医科大学	3	2	5
弘前大学	2	2	4
群馬大学	1	1	2
日本大学駿河台病院	2	2	4
順天堂大学	1	0	1
北里大学	0	1	1
千葉大学	0	1	1
杏林大学	1	2	3
淀川キリスト教病院	4	4	8
信州大学	1	1	2
名古屋大学	1	2	3
岡山大学	1	1	2
熊本大学	1	0	1
合計	18	19	37

表4 浸出型加齢黄斑変性症の対側眼の軟性ドローゼンに対する光凝固トライアルにおける治療群と対照群の比較

項目	治療群 (N=18)	対照群 (N=19)	P値
性 (男:女)	9 : 9	10 : 9	0.873
年齢 (SD)	74.4 (8.0)	76.6 (6.0)	0.354
眼側 (左:右)	7 : 11	8 : 11	0.842
小数視力 (SD)	0.79 (0.38)	0.82 (0.32)	0.867
log MAR 視力 (SD)	-0.17 (0.27)	-0.12 (0.17)	0.549
新生血管 (SD)	0.89 (0.37)	0.99 (0.21)	0.317

\* FAG法による (タテ・ヨコの大きい方の値)

表5 各施設の症例登録状況  
(両眼性軟性ドローゼンに対する光凝固)

施設名	右眼群	左眼群	合計
札幌医科大学	2	2	4
弘前大学	1	0	1
日本大学駿河台病院	1	0	1
順天堂大学	0	1	1
杏林大学	1	2	3
淀川キリスト教病院	3	2	5
名古屋市立大学	1	0	1
信州大学	0	1	1
九州大学	1	0	1
合計	10	8	18

表6 両側性軟性ドローゼンに対する光凝固トライアルにおける治療眼と対照眼との比較

項目	治療眼 (N=18)	対照眼 (N=18)	P値
小数視力 (SD)	0.856 (0.21)	0.750 (0.26)	0.193
log MAR 視力 (SD)	-0.083 (0.12)	-0.159 (0.20)	0.169

# ポリープ状脈絡膜血管症の病理組織学的検討

Pathological features of surgically-excised polypoidal choroidal vasculopathy membranes

黒岩さち子、立岩尚、春日勇三、吉村長久（信州大学）石橋達朗（九州大学）

Sachiko Kuroiwa, MD, PhD1, Hisashi Tateiwa, MD1, Yuzo Kasuga, MD1,

Tatsuro Ishibashi, MD, PhD2 and Nagahisa Yoshimura, MD, PhD1\*

1Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine,

2Department of Ophthalmology, Kyushu University Graduate School of Medicine

## 【抄録】

ポリープ状脈絡膜血管症（PCV）の病態を明らかにするため、病理組織学的検討を行った。1995年4月から1998年4月までの3年間に加齢黄斑変性と診断され、脈絡膜新生血管膜摘出術を施行した37例37眼中、インドシアニングリーン、フルオレセイン蛍光眼底造影検査の再検討の結果PCVと診断した、5例5眼の摘出組織について検討した。症例は男性3例、女性2例、平均年齢68.8歳。5例中4例の摘出組織中に脈絡膜細動脈と併走する細静脈が認められた。この脈絡膜細動脈は内弾性板を伴い、新生血管とは異なるものであり、これらの血管はブルッフ膜下に存在していた。細動脈には壁の肥厚、細静脈には異常拡張を認め、動脈硬化所見と考えられた。

To report the histopathologic features of surgically-excised membranes from patients with polypoidal choroidal vasculopathy (PCV). Five patients with PCV (3 men and 2 women, mean age, 68.8 years), diagnosed by indocyanine green angiography, were studied. The excised membranes were initially observed by stereomicroscopy, and then embedded in epon and histopathologic examination was done by light microscopy. In four of the five cases, large choroidal arterioles and venules were found in the specimens. The arterioles had inner elastic lamina showing that they were not neovascular vessels. Also, the vessels of the choriocapillaris were found in three cases, and these vessels were mostly found beneath the Bruch's membrane. Typical choroidal neovascular tissue was found in one case that had been treated by laser photocoagulation before the surgery. The results indicate that there are large choroidal arterioles and venules in the membranes of patients with PCV.

キーワード：ポリープ状脈絡膜血管症

polypoidal choroidal vasculopathy (PCV)

病理組織学

ブルッフ膜

## 緒言

ポリープ状脈絡膜血管症（PCV）は、1990年に Yannuzzi ら<sup>1)</sup>により疾患概念が提唱されて以来、その臨床学的特徴から加齢黄斑変性滲出型とは区別して取り扱われている。しかし、この10年間でその疾患概念が拡張され<sup>2)~7)</sup>加齢黄斑変性以外にも鑑別疾患として、網膜色素線条症や中心性漿液性網脈絡膜症等が問題となっている<sup>8), 9)</sup>。PCVの臨床学的な特徴がどの様な病態を反映しているのか明らかにするためには、病理組織学的な検討が必要となるが、現在までに数例の報告を見るのみである<sup>10)~12)</sup>。今回我々は、手術により摘出されたPCV症例の病理組織学的な検討をした。

## 方法

1995年4月から1998年4月までの3年間に当科において加齢黄斑変性と診断され、脈絡膜新生血管膜摘出術を施行した37例37眼のうち、初診時から術前までの走査レーザー検眼鏡によるインドシアニンググリーン蛍光眼底造影（IA）、フルオレセイン蛍光眼底造影検査（FA）の再検討の結果PCVと診断した、5例5眼の摘出組織について検討した。症例は、男性3例、女性2例、平均年齢68.8歳（表1）。摘出組織は、2.5%グルタルアルデヒドで固定後、実体顕微鏡による表面観察を施行し、エボン包埋、トルイジンブルー染色後、光学顕微鏡にて観察した。

## 結果

5例中4例において、摘出組織中に脈絡膜細動脈と

併走する細静脈が認められた。この脈絡膜細動脈は内弾性板を伴い、脈絡膜新生血管とは異なるものであり、これらの脈絡膜血管は主にブルッフ膜下に存在していた。さらに細動脈には壁の肥厚、細静脈には異常拡張を認め、これらは動脈硬化所見と考えられた。また、脈絡膜毛細血管も2例に認められ、これらの一部はブルッフ膜内に存在していた。レーザー治療2ヶ月後に摘出術を施行した1例では、典型的な脈絡膜新生血管が認められた。摘出組織の大部分が脈絡膜細動脈、細静脈であった2症例は、術中脈絡膜からの大出血により術後視力は不良であった。一方、組織の一部に大血管を認めるが、大部分を脈絡膜毛細血管が占めていた2症例は明らかな視力の改善を認めた。

### 考案

これまで加齢黄斑変性に関する病理組織学的な検討は数多くされてきたが、PCVに関する報告は数例しかない<sup>10)~13)</sup>。特にPCVはGassによる脈絡膜新生血管の組織学的なタイプ分類では網膜色素上皮下に存在するため、いわゆる1型に相当し脈絡膜新生血管摘出術の良い適応とならない。そのため、手術による摘出組織の報告は少なく二次的に典型的な脈絡膜新生血管が発生した症例の報告がほとんどである<sup>12, 13)</sup>。また剖検例による報告も、網膜下出血等を繰り返した癍痕化の強い状態のものが多い<sup>10), 11)</sup>。また、PCVの診断には、IAが不可欠であるが、Lafautらの提示しているIA所見は、典型的な異常血管とポリープ様病変からなるPCV症例ではなく、かなり癍痕化の進行した巨大な症例を提示している。これまでの報告に炎症所見が多く報告されているのもこのような原因によると考えられる。我々の症例では、手術前にレーザー治療を施行し網膜下出血を引き起こし摘出術を施行した2症例でリンパ球やマクロファージ等の滲出を認めたが、それ以外は比較的早期のPCV症例と考えられた。

今回の検討で特記すべきこととして、加齢黄斑変性の病理組織と比較し大血管が存在していたことが挙げられる。これらの血管は、内弾性板を伴い明らかに動脈であると確認できた。またこれらの血管はループ状に蛇行しこの細動脈と併走する拡張した細静脈を認めた。このように動脈が組織に含まれていたことは、PCVの臨床特徴の一つである造影検査における拍動所見の原因と推測される。また血管の異常拡張はこれまでの報告でも多く認める所見であり<sup>10)~12)</sup>、動脈硬化を基本とした圧負荷の存在を示唆するものと考えられる。

異常血管の存在部位については、これまで多くがブルッフ膜内に存在していたと報告されている<sup>10)~12)</sup>。一方、光干渉断層計からは、ブルッフ膜

下にポリープ様病変が存在することが示唆されている<sup>14), 15)</sup>。今回の検討では、細動脈、細静脈といった比較的大きな血管はブルッフ膜下に存在し、それより細い脈絡膜毛細血管はブルッフ膜内に存在するものが多かった。術後視力予後も摘出組織の大部分をブルッフ膜下の脈絡膜細動脈、静脈で占めた2症例は、摘出時に脈絡膜大出血を起こし不良であった。PCVの中で網膜下出血を繰り返し巨大化するような症例では、今回認めたような大血管が中心になっている可能性が示唆された。

### 文献

1. Yannuzzi LA, Sorenson J, Spaide RF, et al. Idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy. *Retina* 1990;10:1-8.
2. Yannuzzi LA, Ciardella A, Spaide RF, et al. The expanding clinical spectrum of idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy. *Arch Ophthalmol* 1997;115:478-85.
3. Moorthy RS, Lyon AT, Rabb MF, et al. Idiopathic choroidal vasculopathy of the macula. *Ophthalmology* 1998;105:1380-5.
4. Yannuzzi LA, Nogueira FB, Spaide RF, et al. Idiopathic choroidal vasculopathy: a peripheral lesion. *Arch Ophthalmol* 1998;116:382-3.
5. Uyama M, Matsubara T, Fukushima I, et al. Idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy in Japanese patients. *Arch Ophthalmol* 1999;117:1035-42.
6. Yannuzzi LA, Wong DW, Sforzolini BS, et al. Polypoidal choroidal vasculopathy and neovascularized age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 1999;117:1503-10.
7. Ahuja RM, Stanga PE, Vingerling JR, et al. Polypoidal choroidal vasculopathy in exudative and haemorrhagic pigment epithelial detachments. *Br J Ophthalmol* 2000;84:479-84.
8. Yannuzzi LA, Freund KB, Boldbaum M, et al. Polypoidal choroidal vasculopathy masquerading as central serous chorioretinopathy. *Ophthalmology* 2000;107:767-77.
9. Wong DWK, Spaide RF, Goldbaum M, et al. Idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy in a patient with angioid streaks. *Retina* 2000; in press.
10. MacCumber MW, Dastgheib K, Bressler NM, et al. Clinicopathologic correlation of the multiple recurrent serosanguineous retinal pigment epithelial detachments syndrome. *Retina* 1994;14:143-52.



11. Spraul CW, Grossniklaus HE, Lang GK. Idiopathische polypose choroidale vaskulopathie (IPCV). *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1997;210:405-6.
12. Lafaut BA, Aisenbrey S, Broecke C, et al. Polypoidal choroidal vasculopathy pattern in age-related macular degeneration. *Retina* 2000;20:650-54.
13. Shiraga F, Matsuo T, Yokoe S, et al. Surgical treatment of submacular hemorrhage associated with idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy. *Am J Ophthalmol* 1999;128:147-54.
14. Iijima H, Imai M, Gohda T, et al. Optical coherence tomography of idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy. *Am J Ophthalmol* 1999;127:301-5.
15. Iijima H, Iida T, Imai M, et al. Optical coherence tomography of orange red subretinal lesions in eyes with idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy. *Am J Ophthalmol* 2000;129:21-6.

# 新生血管網に対する放射線照射の影響 ：照射後の血管密度と循環機能の経日的変化

Effect of irradiation on neovascularization induced in rat skin fold chamber: change in vascular density and tissue blood flow after irradiation

堀 勝義<sup>1</sup>, 齋藤祥子<sup>2</sup>, 窪田和雄<sup>3</sup>, 玉井 信<sup>4</sup>

東北大学加齢医学研究所腫瘍循環研究分野1, 医用細胞資源センター2,  
機能画像研究分野3, 東北大学医学部眼科学教室4

Katsuyoshi Hori<sup>1</sup>, Sachiko Saito<sup>2</sup>, Kazuo Kubota<sup>3</sup> and Makoto Tamai<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Vascular Biology, <sup>2</sup>Department of Cancer cell Repository,

<sup>3</sup>Department of Nuclear Medicine and Radiology, Institute of Development,  
Aging and Cancer, Tohoku University;

<sup>4</sup>Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine

## 【要約】

【目的】現在、わが国で、脈絡膜新生血管に対する低線量放射線治療の臨床効果が検討されているところである。治療の意義を明らかにするには、新生血管に対するX線照射の影響を知ることが重要である。そのために、本研究では、ラット透明窓内に誘発した新生血管網モデルにX線を照射し、照射後に誘導される組織血流量と血管密度の変化を解析した。

【方法と結果】塩化ビニル製の透明窓をラット背部皮下に装着すると、数日で血管拡張が起こり、スラッジを伴う血管密度の高い新生血管網が窓内に誘導された。この新生血管網に10 GyのX線照射を行うと、48時間後に新生血管網のスラッジが改善され、血管は著しく細くなり、低倍率で観察すると、あたかも血管が消失したかのように見えた。照射前、組織血流量は $39.9 \pm 9.8$  ml/min/100gであったが、照射96時間後には $22.5 \pm 7.7$  ml/min/100gにまで低下した。また、血管密度は $43.3 \pm 4.5\%$ から $23.9 \pm 1.9\%$ に低下し、正常皮下組織のレベルに近づいた。しかし、7日後に同じ場所に、再び異常な血管が出現した。

【考察】X線は新生血管網の循環機能を著明に改善する効果を持つが、本実験モデルでは、その効果は長期間にわたって持続するものではないことが示された。再発した新生血管網に対する再照射の影響について、さらに詳しい検討が必要である。

Purpose: The clinical efficacy of low-dose radiation therapy for choroidal neovascularization is currently under investigation in Japan. In order to clarify its therapeutic significance, it is important to know the effect of irradiation on newly formed vessels. In the present study, using a novel rat skin fold chamber technique, the effect of irradiation on neovascularization induced in the chamber was investigated. Method and Results: Prominent neovascularization was induced within several days after the installation of the chamber made of polyvinyl chloride. Slowing of blood flow in neovascularization was improved and many dilated vessels became narrower approximately 48 h after 10 Gy irradiation. Although blood flow in the neovascular bed was  $39.9 \pm 9.8$  ml/min/100g before irradiation, it decreased to  $22.5 \pm 7.7$  ml/min/100g 96 h after irradiation. The vascular level also decreased from  $43.3 \pm 4.5$  to  $23.9 \pm 1.9\%$ . However, neovascularization appeared again 7 days after irradiation. Conclusion: The present study demonstrated that suitable irradiation improves microcirculation of the neovascular bed and leads to morphological normalization of abnormal angioarchitecture, but the effect of irradiation did not continue long. It is necessary to further examine the effect of irradiation against the recurrent neovascularization.

キーワード：ラット透明窓, 新生血管網, X線照射, 組織血流量, 血管密度

はじめに

1993年、Chakravarthyらは、加齢黄斑変性の脈絡膜新生血管に対し、10あるいは15 Gyの放射線治

療を行った。12ヶ月の経過観察の結果、視力改善、新生血管の退縮が認められたと報告され、加齢黄斑変性症に対する低線量照射の有効性が示唆された

(1)。しかし、この治療法が有効であるかどうかについては、まだ最終的な結論が出ておらず、現在、わが国でも、治療効果の検討が行われているところである。低線量照射が、新生血管網およびその循環機能にいかなる影響を与えるのかについての基礎研究も、あまり多くは報告されていない。臨床研究のための補助的情報として、まず照射により新生血管網の形態と機能がどのように変化するかを、動物実験で把握することが重要である。本研究では、この目的を達成するために、ラット皮下透明窓を用いた新生血管網モデルを新たに開発した(2)。

今回は、ラット透明窓内の新生血管網モデルにX線を照射し、血管密度と組織血流量の経日的変化の定量的解析を行った。また、再発した新生血管に再度照射した時の影響も観察した。

### 方法

動物と透明窓：用いた動物は8週齢の雄ドンリュウラットである。微小血管の生体観察はチタン合金枠のサンドイッチ式透明窓(3)を用いて行った。透明窓の材質として塩化ビニル樹脂を使用し、そこに水素電極を留置することにより、窓

内に誘導される新生血管網の形態と血流量を同時に記録した。血管新生の判定：本研究では、新たに生じた血管の他に、既存の血管が著しく変形し、血管密度が増したものをも含めて血管新生と定義した。

X線照射：照射には、実験用照射装置(日立製MBR1520R-X線照射装置)を用いた。装置内にラットを置き、麻酔下で窓内の新生血管網に対し、正確に10 Gy 1回照射を行った。1週間後に再発した新生血管に再び照射する場合も、照射線量は10 Gyとした。

血管密度の測定：5分の1に希釈した診断用フルオレスチンを静脈から投与し、映し出された血管網をトレースした。その血管面積をNIH imageで測定し、組織に占める血管の%を算出した。

組織血流量の測定：組織血流量は水素クリアランス法により測定した。水素電極を透明窓内に留置し、照射後の同一部位の血流量を経時的に測定した。

新生血管網に対するX線照射の影響の解析：新生血管網に照射を行い、24時間後、48時間後、96時間後の新生血管網の密度と組織血流量の測定を行い、その形態と循環機能変化を解析した

### 結果

透明窓の材質として塩化ビニルを用いると、装着後数日以内にまず既存の真性毛細血管の拡張が起り、既存の血管が顕在化した。さらに血流の増加と新生血管による分岐の変化が血管走行を大きく変え、それに伴い血管密度が著しく高まった。この新生血管網に10 Gy 1回照射を行うと、48時間後までにスラッ

ジは改善された。すなわち拡張し、鬱血していた新生血管網は著しく細くなり(図1)、血管一本一本のレベルで血流速度が増加した。新生血管網の組織血流量は照射前 $39.9 \pm 9.8$  ml/min/100g (n = 6)であったが、10 Gy 1回照射により徐々に低下しはじめ、96時間後には $22.5 \pm 7.7$  ml/min/100gにまで低下し(図2)、正常皮下の組織血流量(12-15 ml/min/100g)のレベルに近づいた。血管密度は照射前 $43.3 \pm 4.5\%$  (n = 6)であったが、照射96時間後に $23.9 \pm 1.9\%$ に低下した(図3)。この変化により、低倍率で観察すると、あたかも血管が消失したかのように見える領域も多かった。しかし、約1週間後、同じ部位に異常な血管網が再び出現した。再発新生血管に再び10 Gy 1回照射を行ったが、循環状態改善の反応は、初回照射後の反応よりも弱いように思われた(図4)。

### 考察

新生血管網の微小循環は、10 Gy 1回照射により形態的にも機能的にも著しく改善し、正常血管網に近づくような所見が得られた。しかし、照射後1週間で、再び異常な血管網が出現した。このことは、X線は新生血管網の状態を改善するが、その効果は長期間にわたって持続するものではないことを示唆している。さらに、再発した血管網には、同じ線量の放射線が効きにくい所見が得られた。今後、再発の頻度、再発した新生血管網の放射線感受性について、さらに実験例を増やし、検討する必要があると思われた。

### 文献

- 1) Chakravarthy U, Houston RF, Archer DB: Treatment of age-related subfoveal neovascular membranes by telthetrapy: a pilot study. Br J Ophthalmol, 77: 265-273, 1993.
- 2) 堀勝義、玉井信：透明窓内に血管新生を誘導する新しいテクニック：放射線治療に関連して。厚生省特定疾患 網膜脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班平成11年3月, 227-229
- 3) Horii K, Saito S, Nihei Y, Suzuki M, Sato Y: Antitumor effects due to irreversible stoppage of tumor tissue blood flow: evaluation of a novel combretastatin A-4 derivative, AC7700. Jpn J Cancer Res, 90: 1026-1038, 1999.

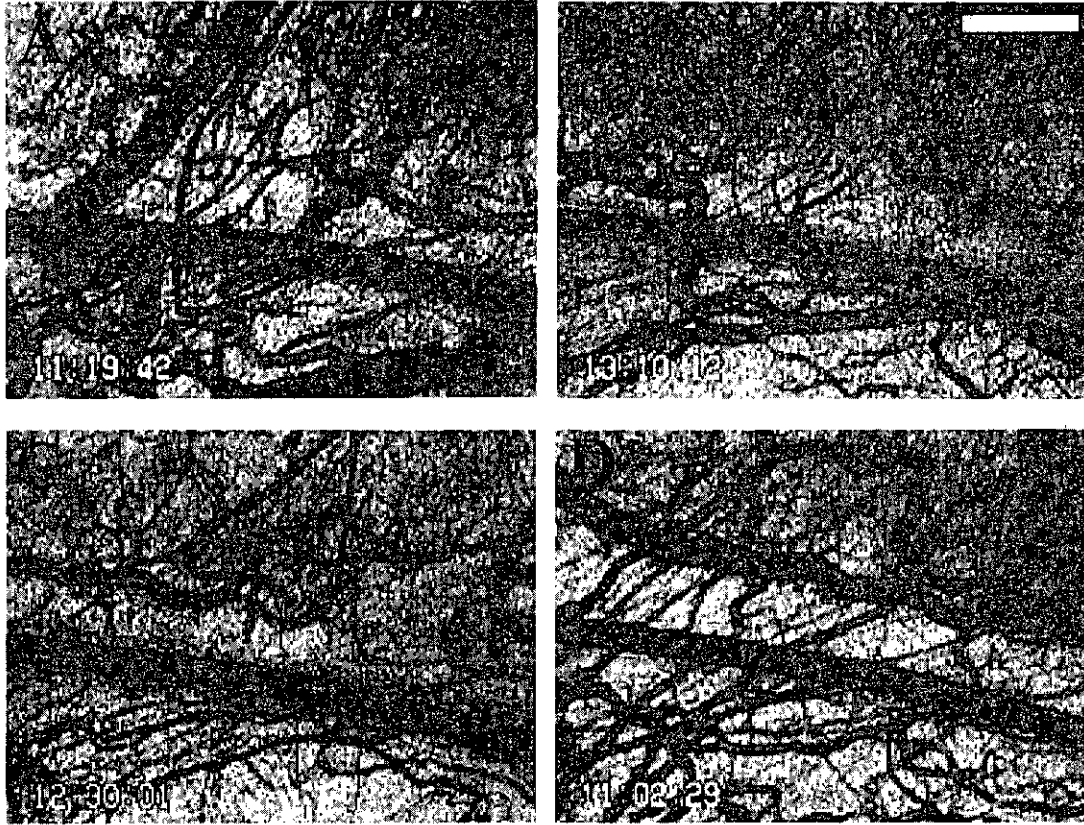


図1：10 Gy 1回照射による新生血管網の変化。A, 照射前；B, 48時間後；C, 96時間後。D, 168時間後。96時間後には血管密度は著しく低下し、血管網の構築は正常化したように見える。しかし、168時間（7日）後、再び異常な血管が出現した。

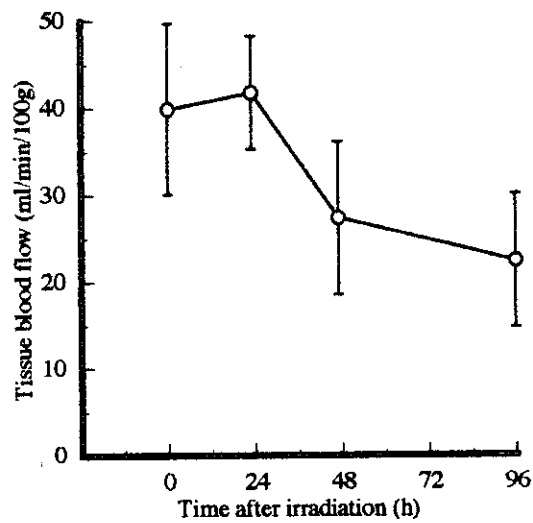


図2：10 Gy 1回照射による新生血管網の組織血流量の変化。ラット皮下透明窓内に留置した水素電極により、同一部位の組織血流量を経時的に測定した。縦軸、組織血流量；横軸、10 Gy 1回照射後の時間。照射後、組織血流量は徐々に低下し、96時間後には正常皮下の組織血流量のレベルに近づいた。

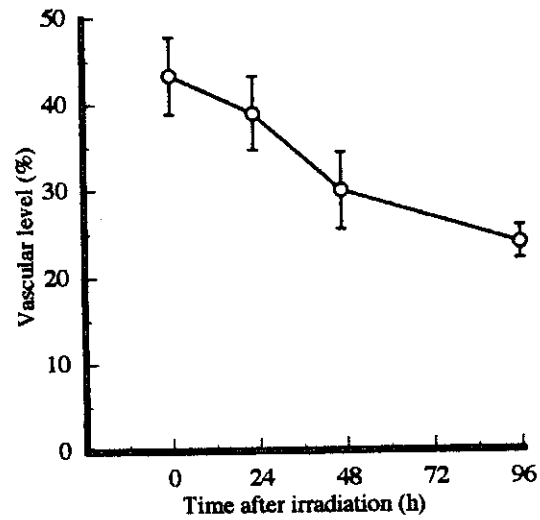


図3：10 Gy 1回照射による新生血管網の血管密度の変化。蛍光色素を静脈内注射することにより映し出された血管網をトレースし、画像解析で血管面積を求め、組織に占める血管密度を算出した。縦軸、血管密度；横軸、10 Gy 1回照射後の時間。照射後、血管密度は徐々に低下し、96時間後には正常皮下の血管密度のレベルに近づいた。

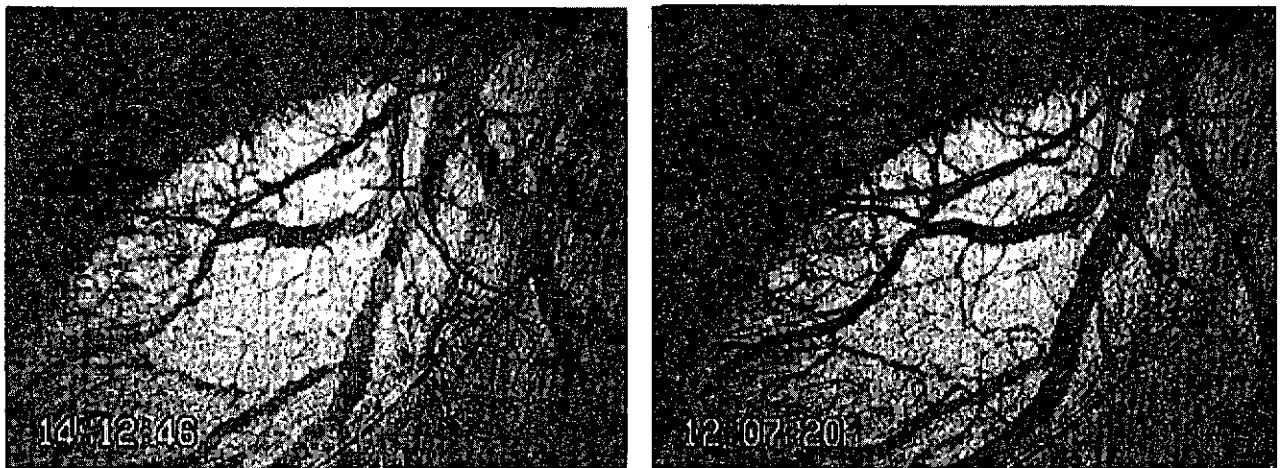


図4：再発新生血管網に対する10Gy 1回照射の効果。A, 照射前の再発新生血管網；B, 照射46時間後。10 Gy 1回照射後も血管密度の低下は少なく、組織血流量もそれほど減少しなかった。

# 実験的脈絡膜新生血管における Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF) の発現

Expression of Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF) in Experimental  
Choroidal Neovascularization

緒方奈保子、和田光正、城 信雄、高橋寛二、松村 美代 (関西医大眼科)  
Joyce Tombran-Tink (George Washington University Medical Center)  
Nahoko Ogata, Mitumasa Wada, Nobuo Jo, Kanji Takahashi, Miyo Matsumura  
(Department of Ophthalmology, Kansai Medical University)  
Joyce Tombran-Tink (George Washington University Medical Center)

## 【抄録】

目的：Pigment epithelium derived factor (PEDF) は、網膜色素上皮から産生される蛋白で神経保護因子であるが、強力な眼内血管新生抑制作用をもつことが示唆されている。我々は、実験的脈絡膜新生血管モデルにおいてPEDFの発現を検討した。

方法：成熟有色ラットの後極部眼底に強度の光凝固を行い、脈絡膜新生血管を実験的に作成した。光凝固後3日、1週、2週に眼球を摘出、切片を作成。正常ラット眼、および脈絡膜新生血管組織のPEDF mRNAの発現をin situ hybridization法にて検討した。

結果：正常ラット眼においてPEDFは、毛様体上皮細胞、網膜色素上皮、神経節細胞、網膜内顆粒層の一部に発現していた。脈絡膜新生血管モデルでは光凝固後3日、新生血管発生部の網膜色素上皮などにPEDFは強く発現していたが、その後徐々に発現は弱まった。

結論：正常ラット眼においてPEDFが産生されており、網膜の神経保護、眼内血管新生抑制に働いていると考えられる。脈絡膜新生血管発生早期にPEDFの発現が強く、VEGFなどの血管新生因子と血管新生抑制因子のPEDFのバランスで脈絡膜血管新生が発生すると考えられた。

## Abstract

Purpose: Pigment epithelium-derived factor (PEDF), a protein produced from retinal pigment epithelial cells, was reported as a neuroprotective factor. A recent study has implicated PEDF in activities that are inhibitory to angiogenesis. In this study, we investigated the expression of PEDF in normal rat eyes and also in the experimental choroidal neovascularization induced by laser photocoagulation.

Methods: PEDF mRNA was investigated using in situ hybridization.

Results: In normal adult rat eyes, PEDF mRNA was mainly observed in the ciliary epithelial cells, the ganglion cells, the inner nuclear layers and the retinal pigment epithelial cells. During the development of choroidal neovascularization, PEDF mRNA was strongly detected at 3 days after photocoagulation, then gradually declined. However, PEDF mRNA was still strongly expressed in the retinal pigment epithelial cells those proliferated and over-sealed neovascular tissues at 2 weeks.

Conclusions: Our findings demonstrate that PEDF is normally produced in rat eyes and may play a role as a neuroprotective factor and also as an inhibitor of ocular angiogenesis. The expression of PEDF was detected in choroidal neovascular tissues early after photocoagulation. Therefore we supposed that the interaction between angiogenic factors, e.g., VEGF and anti-angiogenic factors, e.g., PEDF, modulates the process of choroidal neovascularization.

キーワード：1. 色素上皮由来因子 2. 脈絡膜新生血管 3. 血管新生 4. 網膜色素上皮 5. 血管新生抑制因子  
6. 血管新生因子 7. サイトカイン 8. 眼内血管新生 9. 神経保護

Key words：1. pigment epithelium derived factor (PEDF) 2. choroidal neovascularization 3. Angiogenesis  
4. retinal pigment epithelium 5. anti-angiogenic factor 6. angiogenic factor 7. cytokine  
8. ocular neovascularization 9. neuroprotection

## 緒言

Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF) はヒト胎児網膜色素上皮の培養上清より同定、精製された約50kDaの蛋白で、serin protease inhibitor (serpin) gene familyに属す1、2)。PEDFはretinoblastoma cellの神経細胞への分化を誘導すること、glutamate誘導による障害から小脳顆粒細胞を保護すること、網膜においてもPEDFが正常網膜の発生に必要であるだけでなく、網膜の変性を防ぐことが報告されている3-7)。さらにラットの網膜虚血再環流モデルで、PEDFの投与が網膜神経節細胞の傷害をふせぐことも報告された8)。PEDFは眼内では、網膜色素上皮細胞、毛様体上皮細胞、Inter photoreceptor matrix、硝子体、前房水に多く存在するといわれる9)。

そして近年PEDFが、強力な血管新生抑制因子と報告された。血管内皮細胞の遊走を抑制し、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor; bFGF)、血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)などに誘導される血管内皮細胞の増殖を抑制する。眼においては角膜の血管新生を抑制し、また硝子体からPEDFを除くと血管新生が促進されると報告された10)。このことは、PEDFが眼内血管新生を抑制していることを示唆する。

そこで、我々は、正常ラットおよびラット実験的脈絡膜新生血管モデルにおいてPEDFの発現を検討した。

## 実験方法

1. 有色ラット眼底に強度光凝固(100 $\mu$ m、100mW、0.1秒)を行い、実験的脈絡膜新生血管を作成。2. 光凝固後3日、1週、2週に経時的に眼球摘出、4%パラホルムアルデヒドで固定の後、パラフィン包埋し、約4 $\mu$ mの薄切片を作成した。3. in situ hybridization法。mouse PEDFcDNAからジゴキシンゲン(DIG)標識非放射性antiense RNAおよびコントロールsenseプローブを作成した。切片をprotenase K, acetic anhydrideによる前処置の後、摂氏55度で16時間、それぞれのプローブとhybridizationを行い、洗浄。抗DIG抗体で抗体反応を行ったのち、BCIPとNBTでmRNA発現部位を青色に発色させ、メチルグリーンで対比染色を行い、PEDFmRNAの発現を検討した。4. 正常ラット眼からも同様に組織切片を作成してin situ hybridization法でPEDFmRNAの発現を検討した。

## 結果

1. 正常ラット眼のPEDFmRNAの発現。  
コントロールのsenseプローブでは全く反応がなかつ

たが、antiense RNAプローブで神経節細胞、網膜内顆粒層の一部、網膜色素上皮細胞に青色の反応がみられ、PEDFmRNAの発現のあることがわかった。(図1a、b)。毛様体では毛様体上皮細胞にPEDFmRNAが発現していた(図2a、b)。

2. 実験的脈絡膜新生血管モデルでのPEDFmRNAの発現。

光凝固後3日、新生血管発生部の網膜色素上皮細胞などの増殖した細胞にPEDFmRNAの発現が強くみられた(図3a、b)。光凝固後1週では、脈絡膜新生血管組織のPEDFmRNAの発現は全体として弱まってきた。しかし、脈絡膜新生血管を取り囲むように増殖した網膜色素上皮細胞にはPEDFmRNAの発現が比較的強くみられた(図4a、b)。光凝固後2週、脈絡膜新生血管組織のPEDFmRNAの発現は弱まってきたが、新生血管組織を囲い込むように増殖した網膜色素上皮細胞にはPEDFmRNAの発現がみられた。

## 考案

正常ラット眼においてPEDFmRNAは、網膜色素上皮細胞、神経節細胞、網膜内顆粒層の一部、毛様体上皮細胞に発現していた。このことから、正常ラット眼においてこれらの部位よりPEDFが産生されていることがわかった。PEDFは神経保護作用、血管新生抑制作用をもつので、正常網膜の神経保護、また眼内血管新生抑制に働いていることが示唆された。

脈絡膜新生血管モデルでは、光凝固後3日、新生血管発生部の網膜色素上皮細胞などにPEDFは強く発現していたが、その後徐々に発現は弱まった。しかし、増殖して脈絡膜新生血管組織を取り囲むように増殖した網膜色素上皮細胞には比較的長く発現が強くみられた。脈絡膜新生血管発生早期にVEGF、bFGFなどの血管新生因子の発現が強いことが報告されている11-14)。PEDFも脈絡膜新生血管発生の早期に発現が強くみられたが、PEDFは新生血管発生の早期に発現する血管新生因子に拮抗するように血管新生抑制因子として分泌されており、新生血管の発生早期には、血管新生因子と血管新生抑制因子のPEDFのバランスで脈絡膜血管新生が発生すると考えられた。また、新生血管の退縮期に新生血管組織を囲い込むように増殖した網膜色素上皮細胞にもPEDFの発現がみられた。この時期にはPEDFの血管新生抑制作用が優位に働いている可能性があると思われた。

## 文献

1. Tombran-Tink J, Johnson LV. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced

- by medium conditioned by human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30:1700-1707, 1989
2. Steele FR, Chader GL, Johnson LV, Tombran-Tink J. Pigment epithelium-derived factor: Neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1526-1530, 1992
  3. Tombran-Tink J, Chader GJ, Johnson LV. PEDF: A pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res* 53:411-414, 1991
  4. Taniwaki T, Hirashima N, Becerra SP, Chader GL, Etcheberrigaray R, Schwartz JP. Pigment epithelium-derived factor protects cultured cerebellar granule cells against glutamate-induced neurotoxicity. *J Neurochem* 68:26-32, 1997
  5. DeCoster MA, Schabelman E, Tombran-Tink J, Bazan NG. Neuroprotection by pigment epithelium-derived factor (PEDF) on primary hippocampal neurons against glutamate toxicity. *J Neurosci Res* 1999; 56: 604-610
  6. Jablonski MM, Tombran-Tink J, Mrazek DA, Iannaccone A. Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal. *J Neurosci* 20 : 7149-7157, 2000
  7. McGinnis JG, Chen W, Tombran-Tink J, et al.. Retinal neurons in primary cell culture: Inhibition of apoptosis by pigment epithelium-derived factor (PEDF). In: Hollyfield eds. *Retinal degenerative diseases and experimental therapy*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, NW: 527-537, 1999
  8. Ogata N, Tombran-Tink, Wang R, et al. Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. *Curr Eye Res* 20: in press, 2001
  9. Wu Y-Q, Becerra P. Proteolytic activity directed toward pigment epithelium derived factor in vitreous of bovine eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37:1984-1993, 1996
  10. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: A potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285:245-248, 1999
  11. Ogata N, Matsushima M, Takada Y, et al. Expression of basic fibroblast growth factor mRNA in developing choroidal neovascularization. *Curr Eye Res* 15: 1009-1018, 1996
  12. Matsushima M, Ogata N, Takada Y, et al. FGF receptor 1 expression in experimental choroidal neovascularization. *Jpn J Ophthalmol* 40: 329 - 338, 1996
  13. Yi, XJ, Ogata N, Komada M, et al : Vascular endothelial growth factor expression in choroidal neovascularization in rats. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 235 : 313 - 319, 1997
  14. Wada M, Ogata N, Otsuji T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR/flk-1) mRNA in experimental Choroidal Neovascularization. *Curr Eye Res* 18: 203-213, 1999



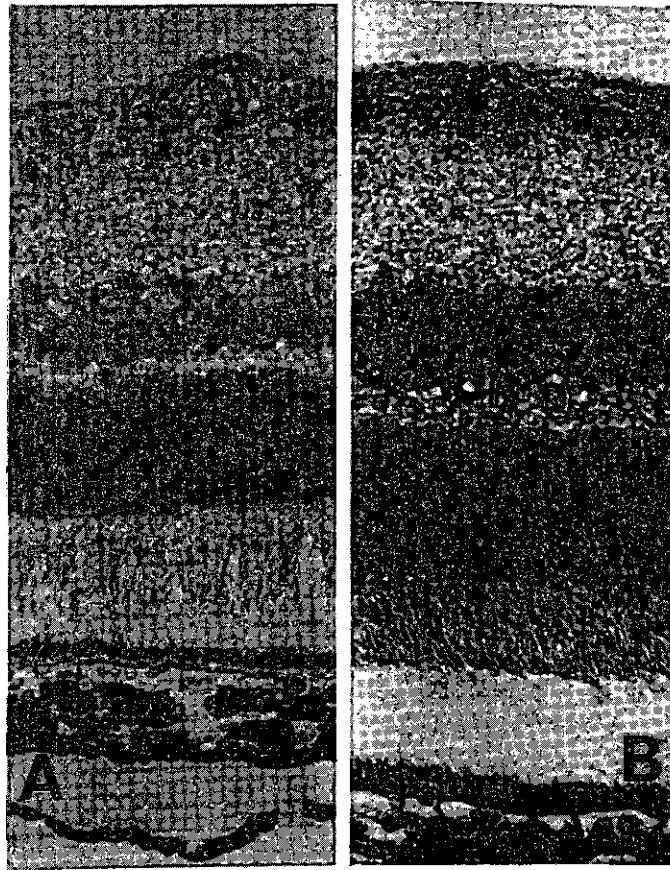


図1：正常網膜のPEDFmRNAの発現

- A) senseコントロールプローブの結果。反応は見られない。
- B) antisense プローブの結果。青色のPEDFmRNA発現が網膜色素上皮細胞、神経節細胞、網膜内顆粒層の一部にみられた。



図2：毛様体のPEDFmRNAの発現

- A) senseコントロールプローブの結果。反応は見られない。
- B) antisense プローブの結果。PEDFmRNA発現が毛様体上皮細胞にみられた。

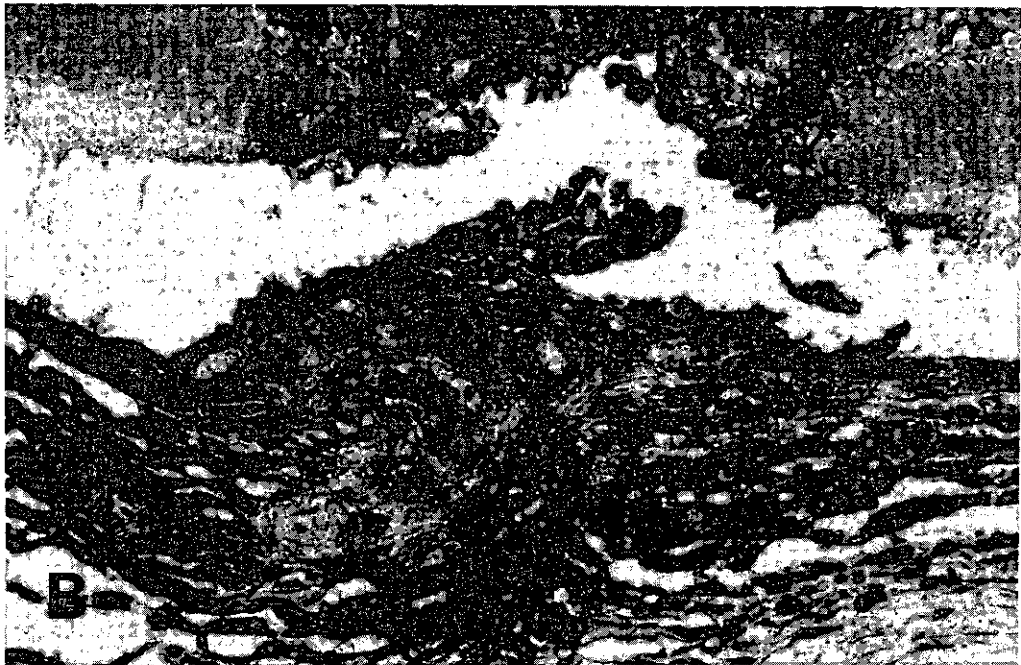
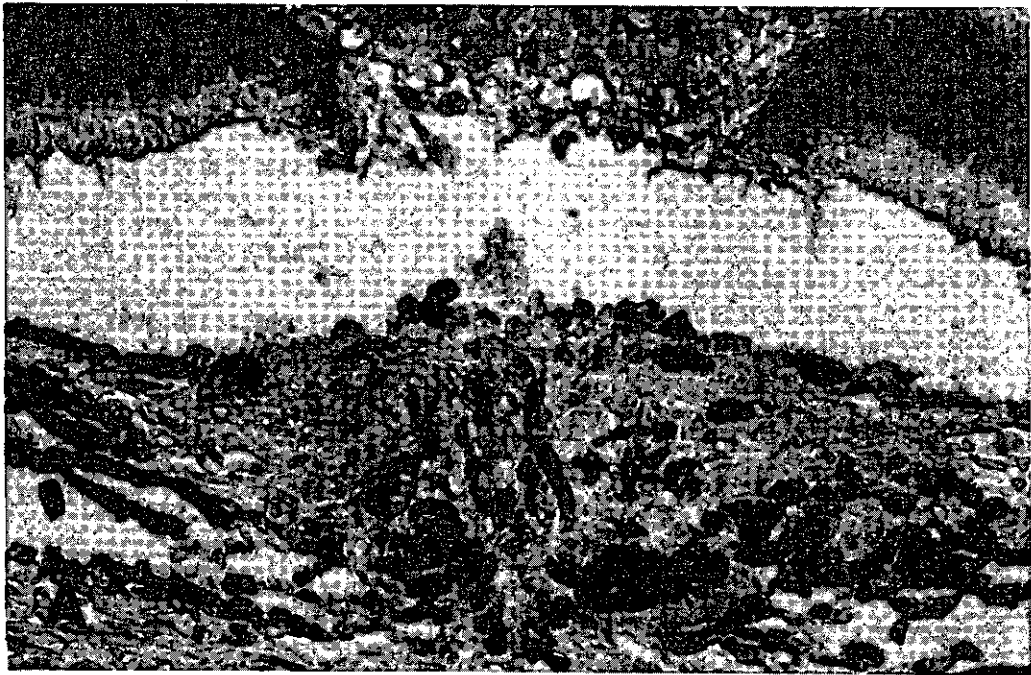


図 3 : 光凝固後3日、脈絡膜新生血管発生部のPEDFmRNAの発現  
A) senseコントロールプローブの結果。反応は見られない。  
B) antisense プローブの結果。新生血管発生部の増殖した網膜色素上皮などに強くPEDFmRNAの発現がみられた。



図 4 : 光凝固後1週、脈絡膜新生血管発生部のPEDFmRNAの発現

- A) antisense プローブの結果。新生血管発生部のPEDFmRNAの発現は弱まっていた。
- B) a)の拡大。脈絡膜新生血管組織を増殖して取り囲んだ増殖した網膜色素上皮にはPEDFmRNAの発現が比較的強くみられた。

# 金属配位結合を利用した薬物-高分子複合体による 脈絡膜新生血管へのターゲティング

Targeted delivery of interferon  $\beta$  to choroidal neovascularization by use of dextran and metal coordination.

木村英也<sup>1</sup>、安川 力<sup>2</sup>、上水流広史<sup>2</sup>、田畑泰彦<sup>3</sup>、小椋祐一郎<sup>1</sup>

1名古屋市立大学医学部眼科、2京都大学大学院医学研究科視覚病態学、3京都大学再生医科学研究所  
Hideya Kimura<sup>1</sup>, Tsutomu Yasukawa<sup>2</sup>, Hiroshi Kamizuru<sup>2</sup>, Yasuhiko Tabata<sup>3</sup>, Yuichiro Ogura<sup>1</sup>  
Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School, Nagoya, Japan.  
Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine,  
Kyoto, Japan.

Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan.

## 【抄録】

Interferon (IFN)  $\beta$ を高分子修飾することにより、IFN  $\beta$ の血中半減期を延長させ、CNVに受動的にターゲティングすることが可能であるかを検討した。水溶性の多糖であるデキストランに亜鉛イオンを介してIFN  $\beta$ を配位結合させた複合体を作成した。家兔眼のCNVモデルを用いて、IFN  $\beta$ 単独投与群と複合体投与群とでIFN  $\beta$ のCNVへの集積をELISAを用いて測定した。同モデルを用いて、生食投与群、IFN  $\beta$ 単独投与、複合体投与群に分けて、そのCNVへの効果を経時的に蛍光眼底造影検査で評価した。IFN  $\beta$ を複合体化することにより、より効果的にCNV組織にIFN  $\beta$ を集積させ、その総投与量を減少させ、更に強い抑制効果が得られた。IFN  $\beta$ のような血管新生抑制作用を有する生理活性タンパク質もこの方法を用いることにより、生理活性を維持した状態でCNVにターゲティングできる可能性が示唆された。

The purpose of this study was to evaluate the effect of IFN  $\beta$ -dextran conjugates bound through metal coordination on experimental choroidal neovascularization (CNV) in the rabbit. IFN  $\beta$  was conjugated with dextran having metal chelating, diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) residues in an aqueous solution containing Zn<sup>2+</sup> through a simple mixing. Experimental CNV was induced by subretinal injection of gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor in rabbits. Three weeks after implantation of microspheres, the rabbits were intravenously treated with 7.5 MIU/kg/day of free IFN  $\beta$  or IFN  $\beta$ -DTPA-dextran conjugate containing equal amount of IFN  $\beta$  twice a week for 2 weeks, IFN  $\beta$ -DTPA-dextran with 0.75 MIU/kg/day of IFN  $\beta$  twice a week for 4 weeks, or saline. CNV was evaluated by fluorescein angiography for following 4 weeks. While both doses of IFN  $\beta$ -DTPA-dextran significantly inhibited the development of CNV in rabbit, longer-term administration of lower dose of IFN  $\beta$ -DTPA-dextran can successfully sustained the inhibitory effect on the progression of CNV. These results suggest that this targeted delivery of IFN  $\beta$  achieved through a simple procedure based on metal coordination may have a potential as a treatment modality for choroidal neovascularization.

キーワード：脈絡膜新生血管、高分子、金属配位結合、インターフェロン、加齢黄斑変性、ターゲティング、デキストラン

我々は金属配位結合を利用したタンパク質と高分子との結合を開発し、interferon  $\beta$ とデキストランとを亜鉛との配位結合を介して結合させた複合体を作成することに成功した。今回は、IFN  $\beta$ を高分子修飾することにより、IFN  $\beta$ の血中半減期を延長させ、CNVに受動的にターゲティングを試みた。これにより総投与量の減少及び治療効率向上の可能性を検討した。

## 方法

デキストランの水酸基にジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA) 残基を導入したもの (DTPA-dextran) を作成した。IFN  $\beta$ 、DTPA-dextran、塩化亜鉛水溶液を混合させることにより複合体 (IFN  $\beta$ -DTPA-dextran) を作成した。

家兔眼の網膜下に塩基性線維芽細胞増殖因子含有ゼラチンマイクロスフェアを投与することによりCNVを作成した<sup>1</sup>。CNVへのIFN  $\beta$ の集積をみるために、蛍光漏出を認めるCNV (3週間目) を伴う家兔