

厚生科学研究費補助金(感覚器障害研究事業)

小児・若年者の難治性網膜疾患の
原因と治療に関する研究

(課題番号H13-感覚器-006)

平成13年度 総括・分担報告書

平成14年(2002年)3月

主任研究者 東 範 行
(国立成育医療センター眼科医長)

目 次

I. 総括研究報告書

- 小児・若年者の難治性網膜疾患の原因と治療に関する研究
東 範行 国立成育医療センター 眼科 1

II. 分担研究報告書

1. 硝子体手術における眼底観察像の光学的解析
後極部眼底観察像の色収差の評価
野田 徹 国立病院東京医療センター 眼科 7
2. 糖尿病患者における血液所見と電気生理学的所見との関連に関する研究
瀬川 要司 国立金沢病院眼科 12
3. ムコ多糖症 VII 型マウスの網膜および中枢神経病変に対する遺伝子治療法の開発
奥山虎之 国立成育医療センター 遺伝診療科 14
4. 遺伝性網膜・視神経形成異常の遺伝子解析と疾患の原因解明に関する研究
東 範行 国立成育医療センター 眼科 16

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 19

IV. 研究成果の刊行物、別刷 21

小児・若年者の難治性網膜疾患の原因と治療に関する研究

(課題番号H12-感覚器-006)

主任研究者 東 範行 国立成育医療センター眼科医長

研究要旨：小児・若年者の難治性網膜疾患の治療において、眼底観察像の光学的解析と後極部眼底観察像の色収差の評価を行い、高屈折素材コンタクトレンズの利点欠点を明らかにした。糖尿病では、血液所見と電気生理学的所見との関連から脂質代謝異常や血液凝固亢進の関与が示唆された。また、治療に関しては、動物実験ではムコ多糖症の中樞・網膜疾患に対する新たな遺伝子治療技術を開発した。さらに疾患原因の検索として、ヒトで先天視神経形成不全でPAX6遺伝子の変異をみつけてその意義を明らかにした。

分担研究者

野田 徹 国立病院東京医療センター
眼科医長
瀬川要司 国立金沢病院眼科医長
奥山 虎之 国立小児病院小児医療研究センター
先天異常研究部奇形研究室長

A. 研究目的

小児・若年者では成人と異なる多くの難知性網膜疾患がある。その多くは先天異常にであるが、出生後も未熟児網膜症や網膜剥離では増殖機転が強いために通常の成人に対する治療法では難治なことが多い。本研究では、小児・若年者の難治性網膜疾患の原因を明らかにするとともに、新しい検査や治療法を開発することを目的とする。

初年度は先天黄斑形成不全と網膜分離症の遺伝子検索を行い、疾患原因を考察するとともに遺伝相談への応用を試みた。また、検査では小児・若年者に適する網膜硝子体の新たな観察機器を開発し、治療では無症候性網膜剥離の早期手術の必要性を検討した。本年度は、引き続き先天異常の遺伝子変異検索を行って視神経形成不全の変異を発見した。さらに、動物実験ではあるが、網膜疾患に対する新たな遺伝子治療技術を開発した。また、臨床では硝子体手術において眼底観察に用いる器具の光学的解析、色収差の評価を行い、若年性糖尿病における網膜機能の研究を行った。

B. 研究方法

1) 硝子体手術における眼底観察像の光学的解析 後極部眼底観察像の色収差の評価

眼底の光軸上の点の手術顕微鏡による観察像を想定し、眼底観察用コンタクトレンズを角膜上に前置し、その頂点から観察される眼底虚像までの距離を異なる波長毎に求めることにより、手術観察条件毎に、各種前置コンタクトレンズによる眼底観察像の色収差の発生状態の違いについて検討した。

2) 糖尿病患者における血液所見と電気生理学的所見との関連に関する研究

糖尿病患者でEOGの薬物誘発応答(NaHCO₃応答、高浸透圧応答、ダイアモックス応答)、律動様小波のO1頂点潜時およびO1~O4の振幅和(ΣO)と血糖コントロール、腎機能、脂質代謝異常などの臨床検査値との関連を検討した。

3) ムコ多糖症 VII 型マウスの網膜および中樞神経病変に対する遺伝子治療法の開発

β-グルクロニダーゼ発現アデノウイルスベクターを作成し、ムコ多糖症 VII 型マウスに生後早期に投与した。脳および眼で治療効果を検討した。

4) 遺伝性網膜・視神経形成異常の遺伝子解析と疾患の原因解明に関する研究

遺伝性視神経形成不全で眼形成遺伝子PAX6の変異解析を行った。また、培養細胞でPAX6とPAX2の相互関係を解析し、みつけたPAX6変異の機能的意義も検討した。

C. 研究結果および考察

1) 硝子体手術における眼底観察像の光学的解析 後極部眼底観察像の色収差の評価

光学計算プログラムを用いた解析を行い、以下の結果を得た。

①通常の観察条件では、前置きする平凹型コンタクトレンズの素材の高屈折率化に伴うアッベ数の低下は眼底観察像の色収差の増加を生じ、観察像の劣化の原因となる。しかし高屈折素材コンタクトレンズでは、より高いアッベ数を有する素材を用いることにより色収差の発生が抑制される。

②メニスカス型のコンタクトレンズは、高屈折素材においても色収差の少ない良好な観察条件が得られ、黄斑部の詳細な操作に適している。

③液・空気置換時の両凹（ズボラ）型コンタクトレンズによる眼底観察では、アッベ数の高低にかかわらず高屈折率素材のコンタクトレンズでは色収差が大きく生じている。

④眼内レンズの形状に関して、平凸眼内レンズは両凸眼内レンズに比し、色収差に関しては有利な眼底観察条件とはならない。

これらの解析結果は、今後、硝子体手術において、より良好な眼底の観察条件を得るためのシステムの開発、さらにその映像化における条件設定において有用な情報となると考える。

2) 糖尿病患者における血液所見と電気生理学的所見との関連に関する研究

NEFA、HDL およびアポ蛋白 A-I は 7% NaHCO₃ 応答と正の相関を、BUN、TG、VLDL、アポ蛋白 B および FDP は 7%NaHCO₃ 応答と負の相関を、BUN および VLDL は O1 頂点潜時と正の相関を、アポ蛋白 E は O1 頂点潜時と負の相関を、アンチトロンビン III は Σ と負の相関を、HbA1c および HbA1C は高浸透圧応答と負の相関を、NEFA はダイアモックス応答と負の相関を示した。律動様小波および 7%NaHCO₃ 応答は血管硬化および易血栓性に、高浸透圧応答は血糖コントロールに、ダイアモックス応答は易血栓性に影響されやすく、糖尿病による網膜内外層障害の発生および進行には血糖コントロールのみならず、脂質代謝異常や血液凝固亢進が関与している可能性が高いと考えられた。

3) ムコ多糖症 VII 型マウスの網膜および中枢神経病変に対する遺伝子治療法の開発

投与 30 日後のマウスでは、 β -グルクロニダーゼの活性染色で、脳および網膜組織で多数の β -グルクロニダーゼ陽性細胞が検出された。さらに、リソゾームの蓄積に伴う細胞内空胞の消失がみられ、病理学的な正常化が示された。同様の実験を生後 30 日のマウスで行った場合、中枢神経および網膜の病理的改善はまったく認めなかった。以上の結果から、生後早期の遺伝子治療がムコ多糖症の眼合併症治療に有用であることが示された。

4) 遺伝性網膜・視神経形成異常の遺伝子解析と疾患の原因解明に関する研究

視神経疾患でははじめて 7 例の変異 (P68S、Q205X、F258S、S292I、Q378R、M381V、T391A) を見出した。表現型はコロボーマ、視神経低形成/無形成、朝顔症候群であり、遺伝子上での変異の場所 (遺伝子型) と表現型の間には相関がなかった。さらに、変異の生化学的検討では、PAX6 遺伝子と PAX2 遺伝子が相互に抑制しあい、今回みつかった変異ではこの働きが障害されていることが判明した。したがって、PAX6 は視神経の形成に関与し、その過程では PAX2 と相互に影響あるいは役割分担していることが示唆された。

D. 結論

眼底観察像の光学的解析と後極部眼底観察像の色収差の評価を行い、高屈折素材コンタクトレンズの利点欠点を明らかにした。糖尿病では、血液所見と電気生理学的所見との関連から脂質代謝異常や血液凝固亢進の関与が示唆された。また、動物実験ではムコ多糖症の中核・網膜疾患に対する新たな遺伝子治療技術を開発し、ヒトでは先天視神経形成不全で PAX6 遺伝子の変異をみつけてその意義を明らかにした。

E. 健康危険情報

本研究の結果、また得られた成果に関して、国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報として、特に報告するものはない。

F. 研究発表

1) 論文・著作

野田 徹：手術顕微鏡. 眼科診療プラクティス 71：32-40,2001

野田 徹、細田ひろみ：硝子体手術における眼底観察-コンタクトレンズ・観察システム眼科診療プラクティス 71：27-31,2001

Negishi K, Noda T, et al, for the Policy-based Medical Services Network Study Group for Intraocular Lens and Refractive Surgery: Effect of Chromatic Aberration on Contrast sensitivity in Pseudophakic Eyes, Arch Ophthalmol. 119:1154-1158,2001

若林俊子、小西美奈子、野田 徹他：重症ドライアイにおける涙点プラグの有用性. 眼紀 52：257-260,20015.

安部 聡、根岸一乃、野田 徹他：含水ゲル眼内レンズ挿入眼の術後早期コントラスト感度. 臨眼 55(4)：565-567,2001

大野建治、野田 徹：蛍光濾過フィルターを用いた細隙灯顕微鏡による角結膜フルオレセイン染色所見. 眼紀 (印刷中), 2002

野田 徹：視力・コントラスト感度. 臨床検査 45(12), 1534-1542,2001

細田ひろみ、野田 徹：追加ガスタンプナーデの適応と実際. 眼科診療プラクティス 69,66-69,2001

野田 徹：飛蚊症. 今日の治療指針 2001, 山口徹、北原光夫編 p916-917, 医学書院, 東京, 2002

秋山邦彦、野田 徹：眼瞼結膜腫瘍摘出術. 谷 昌尚編, 手術術式の完全解説, p392, 医学通信社, 東京, 2001

秋山邦彦、野田 徹：結膜腫瘍摘出術. 谷 昌尚編, 手術術式の完全解説, p392, 医学通信社, 東京, 2001

野田 徹、秋山邦彦：黄斑下手術. 谷 昌尚編, 手術術式の完全解説, p392-394, 医学通信社, 東京, 2001

野田 徹、秋山邦彦：絛毛様体扁平部水晶体切除術. 谷 昌尚編, 手術術式の完全解説, p394, 医学通信社, 東京, 2001

河崎一夫、白尾裕、瀬川要司他. 律動様小波が関与する網膜内情報処理とその異常. 日本眼科学会雑誌、1998;102:813-836

Kamata Y, Okuyama T, et al. Adenovirus-mediated gene therapy for corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII. Mol Ther 4:307-312, 2001.

Fujino M, Okuyama T, et al. Selective repopulation of mice liver after Fas-resistant hepatocyte transplantation. Cell Transplant 10:353-361, 2001.

Kosuga M, Okuyama T, et al. Engraftment of genetically engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. Mol Ther 3:139-148, 2001.

Fujino M, Okuyama T, et al. In vitro prevention of cell-mediated xeno-graft rejection via the Fas/FasL-pathway in CrmA-transduced porcine kidney cells. Xenotransplantation 8:115-124, 2001.

Li XK, Okuyama T, et al. Fulminant hepatitis by Fas-ligand expression in MRL-lpr/lpr mice grafted with Fas-positive livers and wild-type mice with Fas-mutant livers. Transplantation 71:503-508, 2001.

Ohba M, Okuyama T, et al. Long-term graft acceptance in rat heart transplantation by CTLA4Ig gene transfection combined with FTY720 treatment. World J Surg 25:391-397, 2001.

Kosuga M, Okuyama T, et al. Widespread distribution of adenovirus-transduced monkey amniotic epithelial cells after local intracerebral injection: Implication for cell-mediated therapy for lysosome storage disorders. Cell Transplant 10:435-439, 2001.

東 範行. 日本眼科学会宿題報告 黄斑疾患 黄斑形成と中心視成立の分子細胞生物学 2001;104:960-985.

Kawase E, Azuma N. A case of atypical WAGR syndrome with anterior segment anomaly and microphthalmos. Arch Ophthalmol 2001; in press.

Nishina S, Azuma N. Severe macular pucker after infantile retinal detachment surgery. Br J Ophthalmol 2001; in press.

東 範行. 視線を合せる脳の領域. 日本の眼科 2001;72:335.

東 範行. 未熟児網膜症. あたらしい眼科 2001;12: 1460-1488.

東 範行. 未熟児網膜症の眼底検査法. 日本の眼科 2001;73:11-14.

2) 学会発表

<特別講演・教育講演>

東 範行. 特別講演 小児の眼の診方 長崎眼科研究会 2001年7月 (長崎)

東 範行. 特別講演 小児・若年者の緑内障管理. みちのく緑内障懇話会 2001年10月 (東京)

東 範行. 教育講演 先天白内障の管理. 東京眼科医会 2001年10月 (東京)

東 範行. 教育講演 小児の視覚管理. 東京眼科医会 2001年12月 (東京)

東 範行. 教育講演 小児の視覚管理. 神奈川県眼科医会 2002年1月 (横浜)

東 範行. 眼の形成異常における遺伝子変異. 感覚器障害研究事業発表 2002年2月(東京)

東 範行. 特別講演 眼の形成と進化 宮崎眼科研究会 2002年2月(宮崎)

東 範行. 未熟児網膜症の管理 日大講演会 2002年2月(東京)

<シンポジウム>

東 範行. シンポジウム 白内障と遺伝子. 日本白内障学会 2001年6月(福岡)

東 範行. シンポジウム 小児の硝子体手術. 北日本眼科学会 2001年7月(札幌)

東 範行. シンポジウム 小児眼科学会 形態形成遺伝子の変異と機能. 日本臨床眼科学会 2001年10月(京都)

東 範行. シンポジウム 日本眼科医会 電子カルテ(病院). 日本臨床眼科学会 2001年10月(京都)

東 範行. ワークショップ 眼の発生と進化 日本分子生物学会 2001年12月(横浜)

野田 徹: 網膜硝子体手術: 小児の眼科手術における合併症とその対策. 第26回日本小児眼科学会総会. 2001. 東京

<一般口演>

Nefishi K, Kobayashi K, Ohno K, Noda T: Visual simulation system according to the point spread function analysis in various patients. American Society of Cataract and Refractive Surgery, Annual meeting, 2001, San Diego, USA

Kobayashi K, Shibusaki M, Takeuchi G, Ohnuma K, Noda T, Negishi K, Ohno K: A comparison of scattering reflection and specular reflection for double-pass MTF of the human eye. The association for research in vision and ophthalmology, Annual meeting, 2001, Florida, USA

Negishi K, Kobayashi K, Shibusaki M, Takeuchi G, Ohnuma K, Hirayama N, Ohno K, Noda T: Evaluation of visual function using a new point spread function analysis system in normal, cataractous, and pseudophakic eye. The association for research in vision and ophthalmology, annual meeting, 2001, Florida, USA

根岸 一乃、大沼一彦、平山典夫、大野建治、野田 徹: 眼内レンズ挿入眼における色収差の偽調節への影響. 第24回日本手術学会爽快, 2001 大阪

根岸一乃、大野建治、平井香織、高橋慶子、野田 徹、林 達敏: オゾン水による LASIK 術前消毒とフラップ下洗浄. 第17回角膜移植学会第25回角膜カンファランス. 2001, 大阪(2001年2月8日~10日)

大野建治、野田 徹、平井香織、黒川直行、根岸一乃、佐野雄太: 蛍光濾過フィルターを用いた細隙灯顕微鏡による角結膜フルオレセイン染色所見の観察・撮影法 第17回角膜移植学会 第25回角膜カンファランス. 2001, 大阪(2001年2月8日~10日)

大野建治、小林克彦、渋谷雅博、竹内 楽、大沼一彦、平山典夫、根岸一乃、野田 徹: Point Spread Function 解析システムによる人眼眼球光学系 double-pass MTF の解析: 第105回日本眼科学会総会 2001, 横浜(2001年4月19日~22日)

根岸一乃、小林克彦、渋谷雅博、竹内 楽、大沼一彦、平山典夫、大野建治、野田 徹: 新しい Point Spread Function 解析装置による正常眼、白内障眼および偽水晶体眼の視機能評価. 第105回日本眼科学会総会 2001, 横浜

平井香織、細田ひろみ、大野建治、野田 徹、根岸一乃: 前?切開窓の完全閉鎖に対し Nd:YAG レーザー前嚢切開術を行った1例. 第16回日本眼内レンズ屈折手術学会, 2001, 福岡

黒川直行、細田ひろみ、林 康司、野田 徹、根岸一乃、森實秀子、秋山健一、野田 徹: 自然治癒をみた朝顔症候群に伴う網膜剥離の1例. 第26回日本小児眼科学会総会, 2001, 東京(2001年5月19日)

根岸一乃、小林克彦、渋谷雅博、竹内 楽、平山典夫、大野建治、野田 徹: Point Spread Function 解析装置による LASIK 術後眼の視機能評価. 第55回日本臨床眼科学会総会, 2001, 京都

白内障手術患者のクリティカルパス 患者立脚型医療アウトカムによる臨床評価 感覚器政策医療ネットワーク眼内レンズ・屈折矯正手術研究グループ(細田ひろみ、尾藤誠司、野田 徹、水野谷智、柳田隆、砂川光子、石本一郎、大島浩一、小木曾正博、高木郁江、久保田敏昭、手島倫子、

田中靖彦)．第 55 回日本臨床眼科学会，2001，京都 (2001 年 10 月 11 日～14 日)

大野建治、平井香織、野田 徹、佐野雄太、山崎重典、清水里美、根岸一乃：LASIK 術後の近見視機能の変化．第 55 回日本臨床眼科学会総会，2001，京都 (2001 年 10 月 11 日～14 日)

春畑裕二、大野建治、兼田英子、野田徹、根岸一乃、佐野雄太、大野美季、鈴木喜尊：エキシマーレーザー・トラッキングシステムの有効性．第 25 回日本眼科手術学会総会，2002，広島

野田 徹、大野建治、秋山邦彦、黒川直行、春畑裕二、林 康司、細田ひろみ、根岸一乃、小林克彦、平山典夫、大沼一彦：Point Spread Function 解析による人眼光学機能評価．第 56 回国立病院療養所総合医学会，仙台，2000.11

秋山邦彦、野田 徹、大野建治、黒川直行、春畑裕二、林 康司、細田ひろみ：)、根岸一乃、小林克彦、平山典夫、大沼一彦：Poing Spread Function 解析システムによる人眼眼球光学系 double-pass MTF の解析—正常眼における年齢別の散乱反射成分および鏡面反射成分の比較．第 56 回国立病院療養所総合医学会，仙台，2001.11

林 康司、横山真介、兼田英子、春畑裕二、黒川直行、秋山邦彦、細田ひろみ、大野建治、野田 徹、田中靖彦、井上洋一、甲状腺眼症に対する経上顎洞眼窩減圧術の効果．第 56 回国立病院療養所総合医学会，仙台，2000.11

根岸一乃、野田 徹、大野建治、秋山邦彦、黒川直行、春畑裕二、林 康司、細田ひろみ、小林克彦、平山典夫、大沼一彦：Point Spread Function 解析装置による LASIK 術後眼の視機能評価．第 56 回国立病院療養所総合医学会，仙台，2001.11

(感覚器政策医療ネットワーク)細田ひろみ、尾藤誠司、野田 徹、水野谷智、柳田隆、砂川光子、石本一郎、大島浩一、小木曾正博、高木郁江、久保田敏昭、手島倫子、田中靖彦：白内障手術患者のクリティカルパス：患者立脚型医療アウトカムによる臨床評価．第 56 回国立病院療養所総合医学会，仙台，2001.11

春畑裕二、横山真介、兼田英子、黒川直行、秋山邦彦、細田ひろみ、大野建治、林 康司、野田 徹、田中靖彦、ほか：アトピー性皮膚炎患者の結膜？細菌培養．第 56 回国立病院療養所総合医学会，仙台，2000.11

大野建治、野田 徹、秋山邦彦、黒川直行、春畑裕二、林 康司、細田ひろみ、根岸一乃：蛍光濾過フィルターを用いた細隙灯顕微鏡による角結膜フルオレセイン染色所見の観察・撮影法．第 56 回国立病院療養所総合医学会，仙台，2000.11

黒川直行、細田ひろみ、林 康司、野田 徹、根岸一乃、森實秀子、秋山健一、野田 徹：朝顔症候群に伴う網膜剥離．第 56 回国立病院療養所総合医学会，仙台，2000.11

瀬川要司、Heidelberg Retina Flowmeter による網膜毛細血管流測定のコツと落とし穴、第 104 回日本眼科学会総会ランチョンセミナー、平成 12 年 4 月 6 日、京都市

瀬川要司、多局所網膜電図における瞳孔径の影響、第 11 回日本緑内障学会、平成 12 年 9 月 1 日～3 日、神戸市

瀬川要司、正常眼における多局所網膜電図二次核成分波形の解析、第 48 回日本臨床視覚電気生理学学会、平成 12 年 9 月 28 日、盛岡市

瀬川要司、多局所網膜電図波形における非対称性、第 39 回日本網膜硝子体学会総会、平成 12 年 10 月 6 日、神戸市

瀬川要司、多局所網膜電図波形における非対称性、第 24 回日本眼科手術学会総会、平成 13 年 1 月 27 日、大阪市

瀬川要司、大久保真司、武田 久、長田裕子、岩口由香里、奥田徹彦、横川英明、裸眼視力良好な偽水晶体眼における術後屈折値と眼軸長の相関、第 307 回金沢眼科集談会、平成 13 年 4 月 15 日、金沢市

瀬川要司、多局所網膜電図波形における一次核成分と二次核成分の応答密度の大きさの比較、第 105 回日本眼科学会総会、平成 13 年 4 月 19 日、横浜市

瀬川要司、大久保真司、武田 久、岩口由香里、奥田徹彦、裸眼視力良好な偽水晶体眼における術後屈折値と眼軸長の相関、第 40 回日本白内障学会、第 16 回日本眼内レンズ屈折手術学会、平成 13 年 6 月 15 日、福岡市

Kawashita T, Caton M, Ghsh SS, Takahashi M, Roy-Chowdhury N, Okuyama T, Guha C, Whitley

CB, Strayer DS, Roy-Chowdhury J. Recombinant SV40 vector-mediated transfer of β -glucuronidase gene into mucopolysaccharidosis type VII mice. The fourth annual meeting of the American society of gene therapy, May 30-June 3, 2001, Seattle WA, USA.

Kosuga M, Tanabe A, Sasaki K, Li XK, Azuma N, Suzuki S, Koiwai O, Yamada M, Okuyama T. Long-term morphological normalization in the brain of mucopolysaccharidosis type VII mice by neonatal systemic administration of an adenoviral vector expressing beta-glucuronidase. The fourth annual meeting of the American society of gene therapy, May 30-June 3, 2001, Seattle WA, USA

Okuyama T, Muroya K, Ogata T. Sex-determining Gene(s) on distal 9p. 31st International Symposium GH and Growth Factors in Endocrinology and Metabolism, April 27-28, 2001, Valletta, Malta.

Kamata Y, Azuma N, Kosuga M, O'hira A, Tanabe A, Sasaki K, Yamada M, and Okuyama T. Rapid and long-term pathological correction of corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII using novel vector administration procedure "lamellar keratotomy." The 7th annual meeting for Japan Society of Gene Therapy, July 5-7, 2001, Tokyo.

小須賀基通, 田辺亜希子, 山田正夫, 奥山虎之, 垣下浩二, 小野史子, 高橋悟, 桜川宣男. リソゾーム蓄積症の治療を目的とした遺伝子導入サル羊膜細胞の脳内移植療法の検討. 第 46 回日本人類遺伝学会, 2001 年 10 月 3-5 日, (さいたま).

東 範行・田所恵子・山田正夫・川瀬英理子・高橋泉・赤沢智宏・高坂新一・中福雅人. Shh による Pax6 の制御と神経網膜の発生. 日本分子生物学会 2001 年 12 月 (神戸)

川瀬英理子・山田正夫・小椋利彦・東 範行. Pax6,Pax2,Tbx5 の相互作用. 日本分子生物学会 2001 年 12 月 (神戸)

東 範行・山田正夫・半田宏・中福雅人. Pax6 による色素上皮細胞から神経網膜への分化転換. 日本眼科学会 2001 年 4 月 (横浜)

川瀬英理子・山田正夫・小椋利彦・東 範行.

Pax6,Pax2,Tbx5 の相互作用. 日本眼科学会 2001 年 4 月 (横浜)

高本紀子・奥山虎之・山田正夫・東 範行. オプシンプロモーターと Cre/loxP システムを用いた網膜視細胞への選択的遺伝子導入. 日本眼科学会 2001 年 4 月 (横浜)

鎌田裕子・奥山虎之・山田正夫・東 範行. 全身投与による先天ムコ多糖症 IV 型マウスの遺伝子治療. 日本眼科学会 2001 年 4 月 (横浜)

仁科幸子・富田 香・東 範行. 乳幼児のロービジョンケアの現状と問題点. 日本小児眼科学会 2001 年 5 月 (東京).

仁科幸子・富田 香・東 範行. ロービジョンケアにおけるグレアテスター. 日本弱視斜視学会 2001 年 6 月 (静岡).

新井千賀子・仁科幸子・富田 香・東 範行. 視覚障害児の相談における医療機関の連携事例報告 2 例. 2001 年 5 月 (東京).

東 範行. Pax6 遺伝子の選択的スプライスの機能. Japan Macula Club 2001 年 8 月 (軽井沢)

仁科幸子・富田 香・東 範行. ロービジョンケアにおける眼鏡装用の問題点. 日本臨床眼科学会 2001 年 10 月 (京都).

高本紀子・東 範行. 早期発症の先天無虹彩に伴う緑内障の手術. 日本臨床眼科学会 2001 年 10 月 (京都).

川瀬英理子・東 範行. 乳幼治にみられた骨髄移植後網膜症の 1 例. 日本臨床眼科学会 2001 年 10 月 (京都).

川瀬英理子. PAX6 と EYA1 の変異と相互関係. 日本分子生物学会 2001 年 12 月 (横浜)

硝子体手術における眼底観察像の光学的解析 後極部眼底観察像の色収差の評価

分担研究者 野田 徹 国立病院東京医療センター眼科医長
臨床研究部視覚研究室

研究要旨：硝子体手術において、各種材質・形状のコンタクトレンズを前置して観察される眼底像の色収差について光学計算プログラムを用いた解析を行い、以下の結果を得た。

1. 通常の観察条件では、前置する平凹型コンタクトレンズの素材の高屈折率化に伴うアッペ数の低下は眼底観察像の色収差の増加を生じ、観察像の劣化の原因となる。しかし、高屈折素材コンタクトレンズでは、より高いアッペ数を有する素材を用いることにより色収差の発生が抑制される。
2. メニスカス型のコンタクトレンズは、高屈折素材においても色収差の少ない良好な観察条件が得られ、黄斑部の詳細な操作に適している。
3. 液・空気置換時の両凹（ズボラ）型コンタクトレンズによる眼底観察では、アッペ数の高低にかかわらず高屈折率素材のコンタクトレンズでは色収差が大きく生じている。
4. 眼内レンズの形状に関して、平凸眼内レンズは両凸眼内レンズに比し、色収差に関しては有利な眼底観察条件とはならない。

これらの解析結果は、今後、硝子体手術において、より良好な眼底の観察条件を得るためのシステムの開発、さらにその映像化における条件設定において有用な情報となると考える。

A. 研究目的

硝子体手術は、小児眼科領域においても、特に失明に関わる難治性網膜硝子体疾患においては極めて重要な治療法となった。硝子体手術の基本は、詳細な眼底視察であり、近年さまざま眼底観察システムが開発されている。われわれは、これまで眼底観察法の開発改良に関する研究を行ってきた。さらに近年、画像工学技術領域においては、肉眼よりも低照度で観察可能な高解像度の映像システムが既に開発されており、手術および診断手技としての顕微鏡による眼底観察における基本観察形態の革新も近未来において極めて現実的な視野に入った。今後、硝子体手術における眼底観察系に関しては、眼光学系、観察レンズ、手術顕微鏡及び映像システムを総合的に開発していく必要があるといえる。しかし、その上で基本となるべき眼内観察像の質に関する客観的な光学的分析はほとんど行われておらず、その解析に基づく最良の観察条件の実現を可能とする観察系の開発が急務と考えられる。今回は、現在汎用されている硝子体手術用コンタクトレンズによる眼底観察像を想定し、光線追跡法を用いてその色収差に関する評価を行った。

B. 研究方法

眼底の光軸上の点の手術顕微鏡による観察像を想定し、眼底観察用コンタクトレンズを角膜上に前置し、その頂点から観察される眼底虚像までの距離を異なる波長毎に求めることにより、手術観察条件毎に、各種前置コンタクトレンズによる眼底観察像の色収差の発生状態の違いについて検討した。

解析に用いた波長は、C線（赤）656.27nm、d線（緑）587.56nm、F線（青）486.13nmとし、それぞれの波長毎に顕微鏡で観察される眼底虚像の結像位置を光学計算プログラム CODEV を用いて光線追跡法により算出し、各条件で眼底の観察倍率が眼底等倍になるように顕微鏡倍率を補正して、各観察条件における各波長光の眼底像の結像位置の違いを算出した。

今回の検討では、観察眼は眼内レンズ挿入眼とし、眼球光学系の条件は、LeGrandのデータを用い、眼内レンズは、代表的な形状の20D PMMA素材の両凸型および平凸型レンズの光学条件、手術顕微鏡はTOPCON社 OMS610（東京）の光学系を想定し、対物レンズの開口は直径11mm、前置コンタクトレンズからの距離は200mmに設定

した。

前置するコンタクトレンズについては、硝子体手術用に用いられている代表的な形状および素材のコンタクトレンズの光学的条件を想定してシュミレーションを行った。レンズ素材は、石英、高屈折素材、シリコン、さらに高屈折素材においては、アッベ数の異なる2種類の素材を設定した。レンズ形状は、平凹型、拡大観察用の凸凹(メニスカス)型、硝子体腔を液・空気置換した場合に用いられる両凹型(通称ズボラ型)を設定した。

手術観察条件は、通常状態と硝子体腔を液・空気置換した場合を想定した。尚、涙液層の形成状態は観察条件毎に異なることが考えられるが、予備的な計算により、涙液層の厚みなどによる光学条件への影響は極めて少ないことが確認されている。

C. 研究結果

波長の変化に伴って、虚像の形成位置の差が大きい程(つまり縦軸の変化が大きい程)、色収差が大きく、観察される眼底象の質の劣化の原因となることを示唆した。

(1) 硝子体腔：通常観察条件

1) 両凸眼内レンズ挿入眼

最も一般的な観察条件での両凸眼内レンズ挿入眼のシュミレーションでは、平凹型コンタクトレンズを前置した場合、前置レンズ素材の高屈折率化、アッベ数の低下により、眼底観察像の色収差は増加し、観察像の質の劣化の原因となっていることが示唆された。特に、高屈折率素材の前置レンズでは、色収差の発生が大きくなるが、同じ高屈折でもアッベ数の比較的高い素材で色収差の発生が大きくなるが、同じ高屈折でもアッベ数の比較的高い素材では、色収差の発生が少ないことがわかり、臨床的な観察結果を裏付ける結果が得られた。

凸凹(メニスカス)型のコンタクトレンズを前置した場合も、平凹型のコンタクトレンズと同様の傾向が認められるが、一般にどの素材の前置レンズも色収差の発生は非常に少なく、良好な観察条件であった。特に、高屈折素材もアッベ数の比較的高い素材では、石英と共に、殆ど色収差が生じない良好な観察条件が得られていた。

2) 平凸眼内レンズ挿入眼

平凸眼内レンズ挿入眼でのシュミレーション結果も、両凸眼内レンズ挿入眼と同様の傾向が認められた。従来、硝子手術における眼底観察の可能性が考慮される症例においては、眼底の観察条件から、両凸眼内レンズよりも平凸眼内レンズの選択がのぞましいとの指摘があるが、色収差の評価に関する限り平凸眼内レンズの利点は認めら

れなかった。

(2) 硝子体腔：液・空気置換時

1) 両凸型眼内レンズ挿入眼

屈折率の高い素材のコンタクトレンズほど色収差が大きくなることがわかる。平凹型コンタクトレンズの場合は、アッベ数の高い素材では色収差が比較的少ない計算となるが、実際の手術では、観察条件によっては、虚像の形成位置が深すぎたり、観察視野が狭くなる場合がある。通常手術で本観察条件で汎用される両凹型(所謂ズボラ型)のコンタクトレンズでは、高屈折素材のものは、アッベ数の値に関わらず、非常に大きな色収差を生じていることが判明した。

2) 平凹型眼内レンズ挿入眼

両凸型眼内レンズ挿入眼の場合と同様に、屈折率の高いコンタクトレンズほど色収差が大きく、高屈折素材の両凹(ズボラ)型レンズでは、アッベ数の違いにかかわらず、特に大きな色収差が生じていた。液・空気置換条件においても、光学シュミレーション上の色収差の評価に関する限り、平凹眼内レンズは両凸眼内レンズに比して観察条件が良いとはいえないという結果が得られた。

D. 考察

近年、硝子体手術で用いられる眼底観察用のコンタクトレンズは、観察視野が広く、液・空気置換時の視認性に優れた高屈折素材の前置コンタクトレンズが汎用されているが、一般に、高屈折素材ほど低くなり、色分散が拡大する。そこで近年、高屈折でありながらアッベ数の比較的高い素材のレンズの利点が指摘され、臨床応用がなされている。そこで今回の検討では、石英に加え、高屈折素材では、アッベ数の異なる2種類の素材、さらに、最近ディスプレイレンズとして臨床使用が開始されたシリコンの各素材のコンタクトレンズを設定して検討した。

通常観察条件では、前置する平凹型コンタクトレンズの素材の高屈折率化に伴うアッベ数の低下は眼底観察像の色収差の増加を生じ、観察像の劣化の原因となり、同じ高屈折素材では、より高いアッベ数を有する素材を用いることにより色収差の発生が抑制されることが裏付けられた。コンタクトレンズの形状では、メニスカス型レンズの光学条件は極めて良好であった。メニスカスレンズは観察倍率が高いというだけでなく、アッベ数がある程度良好な素材を選択すれば、ほとんど色収差を伴わない眼底観察が可能であることから、近年臨床的に発展している黄斑部手術には特に適した選択であると考えられた。一方、硝子体腔の液・空気置換時に両凹型レンズを用いた観察では色収差の発生は極めて大きく、現状のレン

ズ形状においてはアッペ数の良好な素材を用いても、色収差はあまり抑制されないという結果を得た。今後、あらたな対策を講じる必要があると考えられる。

眼内レンズの形状では、主に臨床経験から、両凸よりも平凸眼内レンズが手術眼底観察に適した選択であるとの指摘があるが、色収差の発生に関する限り、平凸眼内レンズが良好な光学的条件となることはないと考えられる。

硝子体手術には、詳細な眼底観察が基本となる。さまざまな眼底観察システムが開発されており、さらに近年、画像工学技術領域において、肉眼よりも低照度で観察可能な高解像度の映像システムが既に実用段階として開発されており、手術および診断手技としての手術顕微鏡眼底観察における基本観察形態の革新がなされる可能性が極めて現実的な視野に入った。今後、硝子体手術における眼底観察系に関しては、眼光学系、観察レンズ、手術顕微鏡および映像システムを総合的に開発していく必要があるといえる。しかし、その上で基本となるべき眼内観察像の質に関する客観的な光学的分析はほとんど行われておらず、その解析に基づく最良の観察条件の実現を可能とする観察系の開発が急務と考えられる。

これらの解析結果は、今後、硝子体手術における、より良好な眼底の観察条件を得るための観察システムの開発、さらにその映像化における条件設定において有用な情報となると考える。但し、今回の解析結果は、色収差の発生状況のみに関するものであり、総合的な眼底観察像の質の評価ではないことを併せて明記する。

E. 結論

本研究による硝子体手術における眼底観察条件の解析結果から以下の結論を得た。但し、これらの解析結果は、色収差の発生状況のみに関するものである。

1. 通常の観察条件では、前置する平凹型コンタクトレンズの素材の高屈折率化に伴うアッペ数の低下は眼底観察像の色収差の増加を生じ、観察像の劣化の原因となる。しかし、高屈折コンタクトレンズでは、より高いアッペ数を有する素材を用いることにより色収差の発生が抑制される。
2. メニスカス型のコンタクトレンズは、高屈折素材においても色収差の少ない良好な観察条件が得られ、黄斑部の詳細な操作に適している。
3. 液・空気置換時の両凹（ズボラ）型コンタクトレンズによる眼底観察では、アッペ数の高低にかかわらず高屈折率素材のコンタクトレンズでは色収差が大きく生じている。
4. 眼内レンズの形状に関して、平凸眼内レンズ

は両凸眼内レンズに比し、色収差に関しては有利な眼底観察条件とはならない。これらの解析結果は、今後、硝子体手術における、より良好な眼底の観察条件を得るための観察システムの開発、さらにその映像化における条件設定において有用な情報となると考える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文・著作

1. 野田 徹：手術顕微鏡. 眼科診療プラクティス 71：32-40,2001
2. 野田 徹、細田ひろみ：硝子体手術における眼底観察-コンタクトレンズ・観察システム眼科診療プラクティス 71：27-31,2001
3. Negishi K, Noda T, et al, for the Policy-based Medical Services Network Study Group for Intraocular Lens and Refractive Surgery: Effect of Chromatic Aberration on Contrast sensitivity in Pseudophakic Eyes, Arch Ophthalmol. 119:1154-1158,2001
4. 若林俊子、小西美奈子、野田 徹他：重症ドライアイにおける涙点プラグの有効性. 眼紀 52：257-260,20015.
5. 安部 聡、根岸一乃、野田 徹他：含水ゲル眼内レンズ挿入術の術後早期コントラスト感度. 臨眼 55(4)：565-567,2001
6. 大野建治、野田 徹：蛍光濾過フィルターを用いた細隙灯顕微鏡による角結膜フルオレセイン染色所見. 眼紀（印刷中），2002
7. 野田 徹：視力・コントラスト感度. 臨床検査 45(12), 1534-1542,2001
8. 細田ひろみ、野田 徹：追加ガスタンプナーデの適応と実際. 眼科診療プラクティス 69,66-69,2001
9. 野田 徹：飛蚊症. 今日の治療指針 2001, 山口徹、北原光夫編 p916-917, 医学書院, 東京, 2002
10. 秋山邦彦、野田 徹：眼瞼結膜腫瘍摘出術. 谷 昌尚編, 手術術式の完全解説, p392, 医学通信社, 東京, 2001
11. 秋山邦彦、野田 徹：結膜腫瘍摘出術. 谷 昌尚編, 手術術式の完全解説, p392, 医学通信社, 東京, 2001
12. 野田 徹、秋山邦彦：黄斑下手術. 谷 昌尚編, 手術術式の完全解説, p392-394, 医学通信社, 東京, 2001
13. 野田 徹、秋山邦彦：絨毛様体扁平部水晶体切除術. 谷 昌尚編, 手術術式の完全解説, p394, 医学通信社, 東京, 2001

2) 学会発表

<シンポジウム>

1. 野田 徹：網膜硝子体手術：小児の眼科手術における合併症とその対策. 第 26 回日本小児眼科学会総会. 2001. 東京

<一般口演>

1. Nefishi K, Kobayashi K, Ohno K, Noda T: Visual simulation system according to the point spread function analysis in various patients. American Society of Cataract and Refractive Surgery, Annual meeting, 2001, San Diego, USA

2. Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Noda T, Negishi K, Ohno K: A comparison of scattering reflection and specular reflection for double-pass MTF of the human eye. The association for research in vision and ophthalmology, Annual meeting, 2001, Florida, USA

3. Negishi K, Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Hirayama N, Ohno K, Noda T: Evaluation of visual function using a new point spread function analysis system in normal, cataractous, and pseudophakic eye. The association for research in vision and ophthalmology, annual meeting, 2001, Florida, USA

4. 根岸 一乃、大沼一彦、平山典夫、大野建治、野田 徹：眼内レンズ挿入眼における色収差の偽調節への影響. 第 24 回日本手術学会爽快, 2001 大阪

5. 根岸一乃、大野建治、平井香織、高橋慶子、野田 徹、林 達敏：オゾン水による LASIK 術前消毒とフラップ下洗浄. 第 17 回角膜移植学会 第 25 回角膜カンファランス. 2001, 大阪 (2001 年 2 月 8 日～10 日)

6. 大野建治、野田 徹、平井香織、黒川直行、根岸一乃、佐野雄太：蛍光濾過フィルターを用いた細隙灯顕微鏡による角結膜フルオレセイン染色所見の観察・撮影法 第 17 回角膜移植学会 第 25 回角膜カンファランス. 2001, 大阪 (2001 年 2 月 8 日～10 日)

7. 大野建治、小林克彦、渋谷雅博、竹内 楽、大沼一彦、平山典夫、根岸一乃、野田 徹：Point Spread Function 解析システムによる人眼眼光学系 double-pass MTF の解析：第 105 回日本眼科学会総会 2001, 横浜 (2001 年 4 月 19 日～22 日)

8. 根岸一乃、小林克彦、渋谷雅博、竹内 楽、大沼一彦、平山典夫、大野建治、野田 徹：新しい Point Spread Function 解析装置による正常眼、白内障眼および偽水晶体眼の視機能評価. 第 105 回日本眼科学会総会 2001, 横浜

9. 平井香織、細田ひろみ、大野建治、野田 徹、根岸一乃：前?切開窓の完全閉鎖に対し Nd:YAG レーザー前囊切開術を行った 1 例. 第 16 回日本眼内レンズ屈折手術学会, 2001, 福岡

10. 黒川直行、細田ひろみ、林 康司、野田 徹、根岸一乃、森實秀子、秋山健一、野田 徹：自然治癒をみた朝顔症候群に伴う網膜剥離の 1 例. 第 26 回日本小児眼科学会総会, 2001, 東京 (2001 年 5 月 19 日)

11. 根岸一乃、小林克彦、渋谷雅博、竹内 楽、平山典夫、大野建治、野田 徹：Point Spread Function 解析装置による LASIK 術後眼の視機能評価. 第 55 回日本臨床眼科学会総会, 2001, 京都

12. 白内障手術患者のクリティカルパス 患者立脚型医療アウトカムによる臨床評価 感覚器政策医療ネットワーク眼内レンズ・屈折矯正手術研究グループ (細田ひろみ、尾藤誠司、野田 徹、水野谷智、柳田隆、砂川光子、石本一郎、大島浩一、小木曾正博、高木郁江、久保田敏昭、手島倫子、田中靖彦). 第 55 回日本臨床眼科学会, 2001, 京都 (2001 年 10 月 11 日～14 日)

13. 大野建治、平井香織、野田 徹、佐野雄太、山崎重典、清水里美、根岸一乃：LASIK 術後の近見視機能の変化. 第 55 回日本臨床眼科学会総会, 2001, 京都 (2001 年 10 月 11 日～14 日)

14. 春畑裕二、大野建治、兼田英子、野田 徹、根岸一乃、佐野雄太、大野美季、鈴木喜尊：エキシマーレーザー・トラッキングシステムの有効性. 第 25 回日本眼科手術学会総会, 2002, 広島

15. 野田 徹、大野建治、秋山邦彦、黒川直行、春畑裕二、林 康司、細田ひろみ、根岸一乃、小林克彦、平山典夫、大沼一彦：Point Spread Function 解析による人眼眼光学機能評価. 第 56 回国立病院療養所総合医学会, 仙台, 2000.11

16. 秋山邦彦、野田 徹、大野建治、黒川直行、春畑裕二、林 康司、細田ひろみ、根岸一乃、小林克彦、平山典夫、大沼一彦：Point Spread Function 解析システムによる人眼眼光学系 double-pass MTF の解析—正常眼における年齢別の散乱反射成分および鏡面反射成分の比較. 第 56 回国立病院療養所総合医学会, 仙台, 2001.11

17. 林 康司、横山真介、兼田英子、春畑裕二、黒川直行、秋山邦彦、細田ひろみ、大野建治、野田 徹、田中靖彦、井上洋一、甲状腺眼症に対する経上鵜洞眼窩減圧術の効果. 第 56 回国立病院療養所総合医学会, 仙台, 2000.11

18. 根岸一乃、野田 徹、大野建治、秋山邦彦、黒川直行、春畑裕二、林 康司、細田ひろみ、小林克彦、平山典夫、大沼一彦：Point Spread Function 解析装置による LASIK 術後眼の視機能評価. 第 56 回国立病院療養所総合医学会, 仙台, 2001.11

19. (感覚器政策医療ネットワーク) 細田ひろみ、尾藤誠司、野田 徹、水野谷智、柳田隆、砂川光子、石本一郎、大島浩一、小木曾正博、高木郁江、久保田敏昭、手島倫子、田中靖彦：白内障手術患

者のクリティカルパス：患者立脚型医療アウトカムによる臨床評価. 第56回国立病院療養所総合医学会, 仙台, 2001.11

20. 春畑裕二、横山真介、兼田英子、黒川直行、秋山邦彦、細田ひろみ、大野建治、林 康司、野田 徹、田中靖彦、ほか：アトピー性皮膚炎患者の結膜?細菌培養. 第56回国立病院療養所総合医学会, 仙台, 2000.11

21. 大野建治、野田 徹、秋山邦彦、黒川直行、春畑裕二、林 康司、細田ひろみ、根岸一乃：蛍光濾過フィルターを用いた細隙灯顕微鏡による角結膜フルオレセイン染色所見の観察・撮影法. 第56回国立病院療養所総合医学会, 仙台, 2000.11

22. 黒川直行、細田ひろみ、林 康司、野田 徹、根岸一乃、森實秀子、秋山健一、野田 徹：朝顔症候群に伴う網膜剥離. 第56回国立病院療養所総合医学会, 仙台, 2000.11

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

糖尿病患者における血液所見と電気生理学的所見との関連に関する研究

分担研究者 瀬川要司 国立金沢病院眼科医長

研究要旨：糖尿病患者において、眼球電位図（EOG）および網膜電図（ERG）と、血液所見との間にどのような関連があるかを検討した。糖尿病患者を対象に EOG の薬物誘発応答（7%NaHCO₃ 応答、高浸透圧応答、ダイアモックス応答）、律動様小波の O1 頂点潜時および O1～O4 の振幅和(ΣO)と血糖コントロール、腎機能、脂質代謝異常などの各種臨床検査値との関連について検討した。律動様小波および 7%NaHCO₃ 応答は血管硬化および易血栓性に、高浸透圧応答は血糖コントロールに、ダイアモックス応答は易血栓性に影響されやすく、糖尿病による網膜内外層障害の発生および進行には血糖コントロールのみならず、脂質代謝異常や血液凝固亢進が関与している可能性が高いと考えられた。

A. 研究目的

糖尿病患者において、眼球電位図（EOG）によって検出可能な網膜色素上皮層障害および網膜電図（ERG）の律動様小波によって検出可能な網膜内層障害と、血液所見との間にどのような関連があるかについて検討した。

B. 研究方法

糖尿病患者 36 例 66 眼を対象に EOG の薬物誘発応答(7%NaHCO₃ 応答、高浸透圧応答、ダイアモックス応答)、律動様小波の O1 頂点潜時および O1～O4 の振幅和(ΣO)と血糖コントロール、腎機能、脂質代謝異常などの各種臨床検査値との関連について検討した。

C. 研究結果

NEFA、HDL およびアポ蛋白 A-I は 7%NaHCO₃ 応答と正の相関を、BUN、TG、VLDL、アポ蛋白 B および FDP は 7%NaHCO₃ 応答と負の相関を、BUN および VLDL は O1 頂点潜時と正の相関を、アポ蛋白 E は O1 頂点潜時と負の相関を、アンチトロンビン III は ΣO と負の相関を、HbA1 および HbA1C は高浸透圧応答と負の相関を、NEFA はダイアモックス応答と負の相関を示した。

D. 考察

糖尿病患者における高頻度の高脂血症の合併は、糖尿病性網膜症における微小血栓形成やそれに引き続き生ずる毛細血管床閉塞形成を助長し、糖尿病性網膜症の増悪に大きく関与している可能性が考えられる。その中で特に高 VLDL 血症、低 apo E 血症、AT III の活性低下などの血管硬化や血栓形成の促進因子が O1 頂点潜時延長や ΣO

減弱の発現に関与している可能性が高く、VLDL 血症、低 apo E 血症、AT III の活性低下の症例では血管硬化や易血栓性から網膜が容易に虚血状態に陥り、網膜内層の器質的・機能的障害を惹起し律動様小波の異常を引き起こす一因となると考えられる。また NEFA の高値も微小血栓形成やそれに引き続き生ずる毛細血管床閉塞形成を助長し、糖尿病性網膜症を増悪させている重要な因子であると考えられる。

E. 結論

律動様小波および 7%NaHCO₃ 応答は血管硬化および易血栓性に、高浸透圧応答は血糖コントロールに、ダイアモックス応答は易血栓性に影響されやすく、糖尿病による網膜内外層障害の発生および進行には血糖コントロールのみならず、脂質代謝異常や血液凝固亢進が関与している可能性が高いと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

河崎一夫、白尾裕、瀬川要司他. 律動様小波が関与する網膜内情報処理とその異常. 日本眼科学会雑誌、1998;102:813-836

2. 学会発表

瀬川要司、Heidelberg Retina Flowmeter による網膜毛細血管流測定のコツと落とし穴、第 104 回日本眼科学会総会ランチョンセミナー、平成 12 年 4 月 6 日、京都府

瀬川要司、多局所網膜電図における瞳孔径の影響、第11回日本緑内障学会、平成12年9月1日～3日、神戸市

瀬川要司、正常眼における多局所網膜電図二次核成分波形の解析、第48回日本臨床視覚電気生理学会、平成12年9月28日、盛岡市

瀬川要司、多局所網膜電図波形における非対称性、第39回日本網膜硝子体学会総会、平成12年10月6日、神戸市

瀬川要司、多局所網膜電図波形における非対称性、第24回日本眼科手術学会総会、平成13年1月27日、大阪市

瀬川要司、大久保真司、武田 久、長田裕子、岩口由香里、奥田徹彦、横川英明、裸眼視力良好な偽水晶体眼における術後屈折値と眼軸長の相関、第307回金沢眼科集談会、平成13年4月15日、金沢市

瀬川要司、多局所網膜電図波形における一次核成分と二次核成分の応答密度の大きさの比較、第105回日本眼科学会総会、平成13年4月19日、横浜市

瀬川要司、大久保真司、武田 久、岩口由香里、奥田徹彦、裸眼視力良好な偽水晶体眼における術後屈折値と眼軸長の相関、第40回日本白内障学会、第16回日本眼内レンズ屈折手術学会、平成13年6月15日、福岡市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

ムコ多糖症 VII 型マウスの網膜および 中枢神経病変に対する遺伝子治療法の開発

分担研究者 奥山 虎之 国立成育医療センター遺伝診療科

研究要旨：ムコ多糖症は、小児先天代謝異常症に属する遺伝性全身性疾患であるが、眼合併症として、角膜混濁とともに網膜変性を高頻度に認める。現状では、この症状に対する有効な治療手段は確立されていない。今回、網膜変性に対する遺伝子治療法を開発する目的で、生後早期のムコ多糖症マウスに経静脈的にβ-グルクロニダーゼを発現するアデノウイルス AxCAhGUS を投与し、その網膜病変および中枢神経病変に対する治療効果を検討した。投与 30 日後のマウスでは、β-グルクロニダーゼの活性染色で、脳および網膜組織で多数のβ-グルクロニダーゼ陽性細胞が検出された。さらに、リソゾームの蓄積に伴う細胞内空胞の消失がみられ、病理学的な正常化が示された。同様の実験を生後 30 日のマウスで行った場合、中枢神経および網膜の病理的改善はまったく認めなかった。以上の結果から、生後早期の遺伝子治療がムコ多糖症の眼合併症治療に有用であることが示された。

A. 研究目的

ムコ多糖症は、小児先天代謝異常症に属する遺伝性疾患である。リソゾーム酵素のひとつであるβ-グルクロニダーゼの先天性欠損により全身にムコ多糖が過剰蓄積され、多臓器が同時に障害される全身性疾患である。眼合併症として、角膜混濁とともに網膜変性を高頻度に認めるが、有効な治療法は確立されていない。われわれは、おとなのマウスを用いた実験で、アデノウイルスベクターを使った遺伝子治療が、ムコ多糖症の内臓病変には有効であることを報告した。今回、より臨床的に重要である中枢神経および網膜病変の治療について検討した。

B. 研究方法

ヒトβ-グルクロニダーゼを発現するアデノウイルスベクター AxCAhGUS を COS-TPC 法で作成し、生後 1 日以内と生後 30 日以後のムコ多糖症 VII 型マウスに経静脈的に投与した。生後早期に投与したマウスについては、日齢 30 日の時点で屠殺し、脳および眼を摘出し、β-グルクロニダーゼの活性染色により遺伝子導入効率を組織学的に評価した。さらに、遺伝子治療の治療効果を病理学的に評価するため、リソゾームの腫大に伴う細胞内空胞変性の消失について検討した。

（倫理面への配慮）

本研究では、ヒト材料を用いた研究は計画されていない。実験動物を用いる研究は、国立小児病院小児医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、以下の点について留意

する。

- (1) 実験計画の立案において、動物愛護ならびに動物福祉の観点から、動物実験の範囲を研究目的に必要な最小限度にとどめる。
- (2) 実験者は管理者と相互に協力し、適切な環境のもとで、飼育管理を行う。
- (3) 実験者は目的に合致した適切な実験操作を行い、麻酔等の手段によって動物の苦痛を最小限にとどめるように配慮する。

C. 研究結果

1) 中枢神経病変に対する治療効果

生後早期にアデノウイルスを全身投与されたマウスでは、脳全体に GUSB 陽性細胞が認められた。また、神経およびグリア細胞内の空胞変性はほぼ完全に消失し、病理学的な正常化が確認された。一方、生後 30 日を経過したマウスに、アデノウイルスを投与した場合は、脳内に GUSB 陽性細胞はまったく見られず、病理学的な改善も得られなかった。

2) 網膜病変に対する治療効果

生後早期にアデノウイルスを全身投与されたマウスでは、網膜色素上皮を含む網膜全層で GUSB 陽性細胞が認められ、網膜色素細胞の病理学的正常化も確認された。これに対して、生後 30 日をすぎたマウスでは、アデノウイルスを投与しても網膜細胞への遺伝子導入も病理学的改善も得られなかった。

D. 考察

ムコ多糖症のような全身性疾患の遺伝子治療

を考える場合、静脈内投与のような全身投与による治療がもっとも有効と考えられるが、血液脳関門や血液網膜関門のために、血液から組織への物質の輸送が制限されている組織では、血管内投与によりベクターを組織に効率よく輸送することは困難である。この問題を解決するため、これらの関門が完成していない生後早期のベクター投与を試みた。その結果、おとなのマウスでは遺伝子導入が認められなかった脳および網膜への効率のよい遺伝子導入が可能となり、病理学的な正常化も確認された。以上の検討から、生後早期の遺伝子治療による中枢神経および網膜病変の治療と予防の可能性が示された。

E. 結論

ムコ多糖症の遺伝子治療は、生後早期にはじめることにより、網膜変性や中枢神経系の異常を予防することができる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kamata Y, Okuyama T, et al. Adenovirus-mediated gene therapy for corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII. *Mol Ther* 4:307-312, 2001.

Fujino M, Okuyama T, et al. Selective repopulation of mice liver after Fas-resistant hepatocyte transplantation. *Cell Transplant* 10:353-361, 2001.

Kosuga M, Okuyama T, et al. Engraftment of genetically engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol Ther* 3:139-148, 2001.

Fujino M, Okuyama T, et al. In vitro prevention of cell-mediated xeno-graft rejection via the Fas/FasL-pathway in CrmA-transduced porcine kidney cells. *Xenotransplantation* 8:115-124, 2001.

Li XK, Okuyama T, et al. Fulminant hepatitis by Fas-ligand expression in MRL-lpr/lpr mice grafted with Fas-positive livers and wild-type mice with Fas-mutant livers. *Transplantation* 71:503-508, 2001.

Ohba M, Okuyama T, et al. Long-term graft acceptance in rat heart transplantation by CTLA4Ig gene transfection combined with FTY720 treatment. *World J Surg* 25:391-397, 2001.

Kosuga M, Okuyama T, et al. Widespread

distribution of adenovirus-transduced monkey amniotic epithelial cells after local intracerebral injection: Implication for cell-mediated therapy for lysosome storage disorders. *Cell Transplant* 10:435-439, 2001.

2. 学会発表

Kawashita T, Caton M, Ghosh SS, Takahashi M, Roy-Chowdhury N, Okuyama T, Guha C, Whitley CB, Strayer DS, Roy-Chowdhury J. Recombinant SV40 vector-mediated transfer of β -glucuronidase gene into mucopolysaccharidosis type VII mice. The fourth annual meeting of the American society of gene therapy, May 30-June 3, 2001, Seattle WA, USA.

Kosuga M, Tanabe A, Sasaki K, Li XK, Azuma N, Suzuki S, Koiwai O, Yamada M, Okuyama T. Long-term morphological normalization in the brain of mucopolysaccharidosis type VII mice by neonatal systemic administration of an adenoviral vector expressing beta-glucuronidase. The fourth annual meeting of the American society of gene therapy, May 30-June 3, 2001, Seattle WA, USA

Okuyama T, Muroya K, Ogata T. Sex-determining Gene(s) on distal 9p. 31st International Symposium GH and Growth Factors in Endocrinology and Metabolism, April 27-28, 2001, Valletta, Malta.

Kamata Y, Azuma N, Kosuga M, O'hira A, Tanabe A, Sasaki K, Yamada M, and Okuyama T. Rapid and long-term pathological correction of corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII using novel vector administration procedure "lamellar keratotomy." The 7th annual meeting for Japan Society of Gene Therapy, July 5-7, 2001, Tokyo.

小須賀基通, 田辺亜希子, 山田正夫, 奥山虎之, 垣下浩二, 小野史子, 高橋悟, 桜川宣男. リソゾーム蓄積症の治療を目的とした遺伝子導入サル羊膜細胞の脳内移植療法の検討. 第46回日本人類遺伝学会, 2001年10月3-5日, (さいたま).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生省科学研究費補助金 (感覚器障害研究事業)

遺伝性網膜・視神経形成異常の遺伝子解析と疾患の原因解明に関する研究

分担研究者 東 範行 国立成育医療センター眼科医長

研究要旨:視神経の形成に関して、遺伝性形成不全の症例で眼の形態形成遺伝子 PAX6 の変異を検索し、7例の変異を見出した。表現型はコロボーマ、視神経低形成/無形成、朝顔症候群であり、遺伝子上での変異の場所(遺伝子型)と表現型の間には相関がなかった。さらに、変異の生化学的検討では、PAX6 遺伝子と PAX2 遺伝子が相互に抑制しあい、今回みつかった変異ではこの働きが障害されていることが判明した。したがって、PAX6 は視神経の形成に関与し、その過程では PAX2 と相互に影響あるいは役割分担していることが示唆された。

A. 研究目的

視神経は網膜神経節細胞からの神経線維が束ねられて中脳に向かう場所であり、視覚に欠くことができない。その形成には、視茎の発生、胎生裂の形成と閉鎖、神経線維の投射など、多くの過程があり、多くの形態形成遺伝子が関与していることが考えられる。すでにコロボーマでは PAX2 の変異がみついている。しかし、視神経の発生初期や網膜では PAX6 遺伝子も発現している。本研究は視神経形成不全における PAX6 遺伝子の変異を検索し、その遺伝子の機能を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) 先天視神経形成不全の遺伝子解析

遺伝性視神経形成不全 150 例において、眼形成のマスターコントロール遺伝子である PAX6 の変異解析を行った。インフォームドコンセントを得たのち、白血球から DNA を抽出し、PAX6 遺伝子の全エキソンとエキソン・イントロン結合部位を PCR で増幅し、SSCP でスクリーニングし、バンドシフトがあったものは塩基配列を決定した。

2) PAX6 と PAX2 の相互関係の解析

PAX6 遺伝子と PAX2 遺伝子の強制発現プラスミドを作成してエフェクターとし、PAX2 あるいは PAX6 遺伝子のプロモーター領域を組み込んだクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) をレポーターとして CAT アッセイを行い、PAX6 から PAX2 への、PAX2 から PAX6 への影響を検討した。

3) PAX6 変異の機能解析

今回視神経斑形成不全でみつかった PAX6 遺

伝子変異の強制発現プラスミドを作成しエフェクターとし、PAX2 のプロモーター領域を組み込んだ CAT をレポーターとして CAT アッセイを行い、PAX6 野生体に比べて変異でいかなる変化が起こっているかを検討した。

(倫理面での配慮)

従来から疾患遺伝子の変異の解析については倫理的問題を十分考慮し、ゲノム DNA 取り扱いにおいては、書面によるインフォームドコンセントを行ってきた。国立小児病院倫理委員会に「眼先天異常における形態形成遺伝子異常の検索」課題で平成 11 年 10 月に審査を申請し、平成 12 年 3 月に承認を受けた。

C. 研究結果

1) 先天視神経形成不全の遺伝子解析

視神経疾患では初めてとなる以下の 7 例で PAX6 の変異がみつかった。

両朝顔症候群	C619→T	P68S
両視神経低形成	C1030→T	Q205X
両眼コロボーマ	T1190→C	F258S
両視神経萎縮	G1292→T	S292I
両視神経無形成	A1550→G	Q378R
両視神経無形成	A1558→G	M381V
両視神経無形成	A1588→G	T391A

2) PAX6 と PAX2 の相互関係の解析

CAT アッセイでは、PAX6 は PAX2 を、PAX2 は PAX6 を、相互に抑制した。

3) PAX6 変異の機能解析

PAX6 野生体が PAX2 遺伝子を抑制するのとは比べて、今回みつかった変異はいずれも抑制効果の減弱ないしはかえって PAX2 を亢進していた。

D. 考察

PAX6遺伝子は眼の形態形成に関わる転写因子遺伝子で、最初に先天無虹彩の原因遺伝子として発見された。この遺伝子をショウジョウバエの胚で異所性に発現させると触覚や翅、肢などに複眼が発生するので、下等動物では眼の器官形成全体を支配するマスターコントロール遺伝子であると考えられている。PAX6は種を越えてほぼすべての動物に存在し、ヒト標本のin situ hybridizationや免疫染色で、初期には眼球全体に、その後角膜、水晶体、網膜に発現することから、ヒトでも重要な役割を果たすことが示唆されていた。この遺伝子に異常が起これば、網膜を含めてさまざまな眼の形成異常が起こることが予測される。これまでに先天無虹彩、前眼部形成不全、黄斑形成不全で変異がみついていたが、今回新たに多くの先天視神経形成不全症例で変異が見出されたことは、この遺伝子が視神経の形成に関わっていることを示している。

PAX6遺伝子がコードするPAX6蛋白は、転写活性部位 paired domainが標的遺伝子に接着してこれを制御する。さらに、homeodomainも標的遺伝子に接着する部位であり、その5'側にはproline-serin-threonine-rich activating domainが存在する。今回見つかった変異は大部分がミスセンスでありアミノ酸置換はさまざまなdomainで起こっていたが、疾患の表現型もさまざまであり、かつ遺伝子型と表現型に明らかな相関はなかった。

これまでに視神経コロポーマでPAX2の変異が発見されてきた。PAX2は発生初期の視神経および眼球腹側に発現するが、PAX6も視神経に発現する。また、視神経ではPAX6が発現している間はPAX2の発現が少なく、PAX2が発現している間はPAX6の発現が少なくなるので、両者は棲み分けられないしは相互に抑制しあっていることが推測される。今回のCATアッセイではPAX6とPAX2が相互に抑制しあっていること、PAX6に変異が起こればPAX2の発現様式に変化が起こることが、培養細胞内の生化学的変化ではあるが、示唆された。したがって、視神経の形成ではPAX6とPAX2が相互に影響しあって、あるいはいくつもの過程を役割分担して関与していると考えられる。

今回得られたこれらの所見は、視神経形成不全の原因遺伝子が明らかになって出生前診断を含む臨床遺伝に寄与するばかりではなく、形態形成遺伝子の機能をさらに解明して再生医学などへ応用できることも期待できる。

E. 結論

遺伝性視神経形成不全で眼の形態形成遺伝子PAX6の変異を発見し、PAX6が視神経の形成に関与していることを示した。また、変異の生化学

的検討を行い、PAX6遺伝子とPAX2遺伝子が相互に影響しあっていることを明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

東 範行. 日本眼科学会宿題報告 黄斑疾患 黄斑形成と中心視成立の分子細胞生物学 2001;104:960-985.

Kamata Y, Okuyama T, Kosuga K, O'hira A, Kanaji A, Sasaki K, Yamada M, Azuma N.

Adenovirus-mediated gene therapy for corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII. Molecular Therapy 2001; in press.

Kosuga M, Sasaki K, Tanabe A, Li XK, Okawa H, Ogino I, Okuda O, Arai H, Sakuragawa N, Kamata Y, Azuma N, Suzuki S, Yamada M, Okuyama T.

Engraftment of genetically engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in Mucopolysaccharidosis type VII mice. Molecular therapy 2001; 3: 139-148.

Kawase E, Azuma N. A case of atypical WAGR syndrome with anterior segment anomaly and microphthalmos. Arch Ophthalmol 2001; 119:1855-1856.

Nishina S, Azuma N. Severe macular pucker after infantile retinal detachment surgery.

Br J Ophthalmol 2001; in press.

東 範行. 視線を合せる脳の領域. 日本の眼科 2001;72:335.

東 範行. 未熟児網膜症. あたらしい眼科 2001;12: 1460-1488.

東 範行. 未熟児網膜症の眼底検査法. 日本の眼科 2001;73:11-14.

2. 学会発表

東 範行・田所恵子・山田正夫・川瀬英理子・高橋泉・赤沢智宏・高坂新一・中福雅人. ShhによるPax6の制御と神経網膜の発生. 日本分子生物学会 2001年12月(神戸)

川瀬英理子・山田正夫・小椋利彦・東 範行. Pax6, Pax2, Tbx5の相互作用. 日本分子生物学会 2001年12月(神戸)

東 範行・山田正夫・半田宏・中福雅人. Pax6

による色素上皮細胞から神経網膜への分化転換.
日本眼科学会 2001年4月(横浜)

川瀬英理子・山田正夫・小椋利彦・東 範行.
Pax6,Pax2,Tbx5 の相互作用. 日本眼科学会
2001年4月(横浜)

高本紀子・奥山虎之・山田正夫・東 範行. オ
プシンプロモーターと Cre/loxP システムを用い
た網膜視細胞への選択的遺伝子導入. 日本眼
科学会 2001年4月(横浜)

鎌田裕子・奥山虎之・山田正夫・東 範行. 全
身投与による先天ムコ多糖症 IV 型マウスの遺伝
子治療. 日本眼科学会 2001年4月(横浜)

仁科幸子・富田 香・東 範行. 乳幼児のロー
ビジョンケアの現状と問題点. 日本小児眼科学
会 2001年5月(東京).

仁科幸子・富田 香・東 範行. ロービジョン
ケアにおけるグレアテスター. 日本弱視斜視学
会 2001年6月(静岡).

新井千賀子・仁科幸子・富田 香・東 範行. 視
覚障害児の相談における医療機関の連携事例報
告2例. 2001年5月(東京).

東 範行. シンポジウム 白内障と遺伝子. 日
本白内障学会 2001年6月(福岡)

東 範行. シンポジウム 小児の硝子体手術.
北日本眼科学会 2001年7月(札幌)

東 範行. 特別講演 小児の眼の診方 長崎眼
科研究会 2001年7月(長崎)

東 範行. Pax6 遺伝子の選択的スプライスの機
能. Japan Macula Club 2001年8月(軽井沢)

東 範行. シンポジウム 小児眼科学会 形態
形成遺伝子の変異と機能. 日本臨床眼科学会
2001年10月(京都)

東 範行. シンポジウム 日本眼科医会 電子
カルテ(病院). 日本臨床眼科学会 2001年10
月(京都)

仁科幸子・富田 香・東 範行. ロービジョン
ケアにおける眼鏡装用の問題点. 日本臨床眼
科学会 2001年10月(京都).

高本紀子・東 範行. 早期発症の先天無虹彩に
伴う緑内障の手術. 日本臨床眼科学会 2001年
10月(京都).

川瀬英理子・東 範行. 乳幼治にみられた骨髄
移植後網膜症の1例. 日本臨床眼科学会 2001年
10月(京都).

東 範行. 特別講演 小児・若年者の緑内障管
理. みちのく緑内障懇話会 2001年10月(東
京)

東 範行. 教育講演 先天白内障の管理. 東京
眼科医会 2001年10月(東京).

東 範行. 教育講演 小児の視覚管理. 東京
眼科医会 2001年12月(東京)

東 範行. ワークショップ 眼の発生と進化
日本分子生物学会 2001年12月(横浜)

川瀬英理子. PAX6 と EYA1 の変異と相互関係.
日本分子生物学会 2001年12月(横浜)

東 範行. 教育講演 小児の視覚管理. 神奈
川県眼科医会 2002年1月(横浜)

東 範行. 眼の形成異常における遺伝子変異.
感覚器障害研究事業発表 2002年2月(東京)

東 範行. 特別講演 眼の形成と進化 宮崎眼
科研究会 2002年2月(宮崎)

東 範行. 未熟児網膜症の管理 日大臨床講演
会 2002年2月(東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし