

図 5 *GUCY2D* 遺伝子に変異が検出された錐体杆体ジストロフィー 4 家系 5 症例の全視野 ERG の結果。錐体 ERG では殆ど反応が記録されず、30Hzフリッカー ERG の反応も著しく低下していた。杆体 ERG の反応はやや減弱しているものの明らかに認められた。

FSCN 2 遺伝子208delG変異ともなう錐体桿体ジストロフィーの2家系

Autosomal dominant retinitis pigmentosa associated with the 208delG mutation in the FSCN 2

和田裕子、板橋俊隆、川村后幸、佐藤 肇、阿部俊明、玉井 信
(東北大学医学部眼科)

Yuko Wada, Toshitaka Itabashi, Miyuki kawamura, Hajime Sato, Toshiaki Abe, Makoto Tamai
(Department of ophthalmology, tohoku university school of medicine)

【要 約】

2001年我々は、FSCN 2 遺伝子 208delG 変異が日本人常染色体優性遺伝網膜色素変性の原因遺伝子異常であり、さらに3.3%に208delG変異を認めたことを報告、さらに208delG変異をもつ常染色体優性網膜色素変性の家系に、黄斑部に境界鮮明な萎縮巣を伴っている症例を経験した。FSCN 2 遺伝子異常をともなう臨床像の多様性により、FSCN 2 遺伝子異常が、日本人常染色体優性錐体桿体ジストロフィーに関与しているか否かを検討した。2家系5名に208delG変異を認めた。

FSCN 2 遺伝子 208delG 変異は日本人常染色体優性錐体桿体ジストロフィーの原因遺伝子異常であることが示唆された。

Abstract

To assess the clinical and genetic characteristics of two Japanese families with autosomal dominant retinal degeneration associated with a 208delG mutation in the FSCN 2 gene.

The 208delG mutation in the FSCN 2 gene was identified in 14 members of 4 Japanese with autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP), and in 5 members of 2 Japanese families with autosomal dominant cone-rod dystrophy (ADCRD). The characteristic features associated with this mutation led to 2 different phenotypes, ADRP and ADCRD. We conclude that the 208delG mutation in the FSCN 2 gene produces not only ADRP but also ADCRD in Japan.

This mutation is relatively common in Japanese patients with autosomal dominant retinal degeneration and showed clinical variability.

キーワード：FSCN 2 遺伝子、常染色体優性錐体桿体ジストロフィー、208delG 変異

Key words : FSCN 2 gene, autosomal dominant cone rod dystrophy, 208delG mutation

緒言：現在までに、錐体桿体ジストロフィーの候補遺伝子は、8種類報告されている。常染色体優性網膜色素変性においては、28種類の候補遺伝子が報告されている。それらの候補遺伝子の中で、Peripherin/RDS遺伝子は、常染色体優性網膜色素変性のみならず、錐体桿体ジストロフィーも起こすことが報告されている。

昨年の班会議で、我々は、FSCN 2 遺伝子 208delG 変異が、日本人常染色体優性網膜色素変性を起こすことを報告した。FSCN 2 遺伝子は、Peripherin/RDS 遺伝子同様、視細胞の構造タンパクであり、今回我々は、FSCN 2 遺伝子異常が、常染色体優性錐体桿体ジストロ

フィーの原因遺伝子異常になるかを解明する事を目的とした。

対象及び方法：遺伝子解析に同意が得られた54家系錐体桿体ジストロフィー、200家系常染色体劣性網膜色素変性、200人の単発例を対象とした。100人の正常コントロールで比較した、FSCN 2 を候補遺伝子としスクリーニングを開始した。FSCN 2 遺伝子に対しては9個のプライマーをデザインし、全ての翻訳領域をPCRにて増幅した。ABI3100で、Direct sequence法により塩基配列の決定を行った。さらに、遺伝子変異が、表現型と連鎖しているかを確認した。

眼科的検査として、矯正視力、精密細隙灯、ゴールドマン動的量的視野、眼底検査、蛍光眼底撮影、色覚および網膜電図を行った。ゴールドマン動的量的視野はsteradian解析を行い、定量化した。

結果：日本人常染色体優性網膜色素変性2家系5名にFSCN2遺伝子の208番目のGが欠失(208delG)する変異をヘテロ接合体で認めた。その結果、359bp下流で終止コドンが生じていた。臨床像は、同一家系内においても、重症な錐体桿体ジストロフィーの症例から網膜色素上皮がわずかに粗造になっている症例まで、多様性に富んでいた。

2症例については、10年間の経過観察を行っているが、10年の経過で明らかに変性が進行していた。

考察：今回の我々の検索によりFSCN2遺伝子は、常染色体優性網膜色素変性の原因遺伝子のみならず、錐体桿体ジストロフィーの原因遺伝子であることが考えられた。さらに、この変異は、

現在まで日本人にのみ報告されている遺伝子変異であり、人種差が関与している事が示唆された。

文献

Wada Y, Abe T, Takeshita T, Sato T, Tamai M. Mutation of Human retinal fascin gene (FSCN 2) causes autosomal dominant retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42:2395-2410.

Jacobson SG, Cideciyan AV, Kemp CM, Sheffield VC, Stone EM. Photoreceptor function in heterozygotes with insertion or deletion mutations in the RDS gene. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1996;37:1662-1674.

Nakazawa M, Naoi N, Wada Y, Nakazaki S, Maruiwa F, Sawada A, Tamai M. Autosomal dominant cone-rod dystrophy associated with a Val200Glu mutation of the peripherin/RDS gene. Retina. 1996;16:405-410.

208delG mutation

```

ATG CCG ACG AAC GGC CTG CAC CAG GTG CTG AAG ATC CAG TTT GGC CTC GTC
M P T N H G L H Q V L K I D F G L V
AAC GAG ACT GAC CGE TAC CTA CAG CTG AGA GCT TCG GCT TGA AGG TCA ATG
N D T D R Y L Q L R A S A S R G M
CCT CGG CAC CCA GGC TCA AGA GGA AGC AGA CCT GGG TCG TCG AAC CCG ACC
P R H P A S R G S R P G C W N P T
CAG GAC AAG GCA GGG CTG TGC TGC TCC GEA GCA GGC ACC TGG GGC GGT ACC
Q D K A R L C D S A A T W A A T
TGT CCG CAG AAG AGG ACC GGC GGG TGG CCT GTG AGG CAG AAG AGC CCG DCC
C K D K R T G A W P V R Q S S R A
GTG ACT GGC GCT TCC TGG TCC TCC GGC AGC CAG ATG GGC GCT GGG TGC TGC
V T A A S W S C R S D H D A G C C
GCT CCG AGC GGC ACG GGC GCT TCT TCG GAG GCA CCG AGG ACC AGC TGT GCT
G P S R T A A S S E A P R T S C P
GCT TCG CCA CAG CCG TTT CCG CCG CCG AGC TGT GGA CCG TCG ACC TGG CCA
A S P Q P F P R P S C G P L T W P
TCC AGC CCG ACG CCG ACC TGC TGA GGG TGA GGC GGC GGT ACG TGC ACC
S T R R P F C
TGT GGC GGC GGG AGG AGG AGA TGG GGG CAG ACG GAG ACA AGC CCT GGG GGG
TGG ACG CCG TCG TCA CCG TCA TCT TCC GGA GGC GAC GGT ACT CCG TCA AGT
CCT GTG ACA GGC GCT ACC TGC GCA GGG ACG GGC GTC TGG TCT GGG AGC CTG
AGC CCG GTG CCT GCT ACA CCG TGG AGT TCA ACG CCG GCA AGC TGG CTT TCA
AGG ACT GGG AGC GGC ACT ACC TGG CAG CCG TGG GGC CCG CAG GCA CCT CAA
GGC CCG GGS AAG CAG GGG ACC TGG CAA GSA TGA GGT GTT TGA TGT GGA GSA
GAG TCA CCG ACA GGT GGT GGT GGT TGC CAA CCA CCG CTA GGT CTC TGT
GGG GCA AGS GGT CAA GGT CTC AGC CAA TCA TGA TGA ACT AGA CCA CCA
GAC CTT CCT GAT CCA AAT TCA CCA GGA GAC AAG AAG GAA GTS DAC CTT GTA TTC
CAG CAG TGG GGG CTA CTG GAC GGT GAT CAG CCA TGA TGG GGG GAT TGA CCG SAC
AGC CAC ACA AGT TTC GCA CAC CAT GTT TGA GAT GGA GTG GGG TGG CCG
GGG GGT AGC ACT CAA AGC DAG CAA CCG GCG CTA DST GTG CAT GAA GAA GAA
TGG GCA GCT GGC GGC TAT CAG CGA TTT TGT GGG CAA GGA CBA AGA CTT CAC
CCT CAA GCT CAT CAA CCG GGC CAT CCT GGT GGT GGG GCG CTT GCA CCG GGT
CCT CTG CCA CCA CCG CCG CTC CAA CCA GCT GSA CAC CAA CCG CTC CGT CTA
GCA GGT CTT CCA CCT GAG CTT CAG CBA GGG GCG CTA CCG GAT CCG AGG CCG
GBA CCG AGG GTT CTG GTA CAC GGG DAG TLA CAG CAG GGT GTG CAG CBA CCG
GAA AGG CCG CBA GAA CTT GGT CTT GSA GTH GGT GGG GGG CCG CTT GGC
CAT CCG CCG CCG GAG CCG CAA GTA CCT GCG CCG CCG CCG CTC GGG CTT GCT
GGG GCG CBA TGC CBA GCG CCG GCG GAC CCG GCT TTG GSA GTA ETG AGG
CGG CCG CBA GAC CAG CTT GTC GGG CAT TAA AAC GGT GTC TCT CCG GCA AAA
AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA

```

図1. 208delG 変異で、終止コドンがくる場所を示す。

208delG変異をもつ錐体桿体ジストロフィー

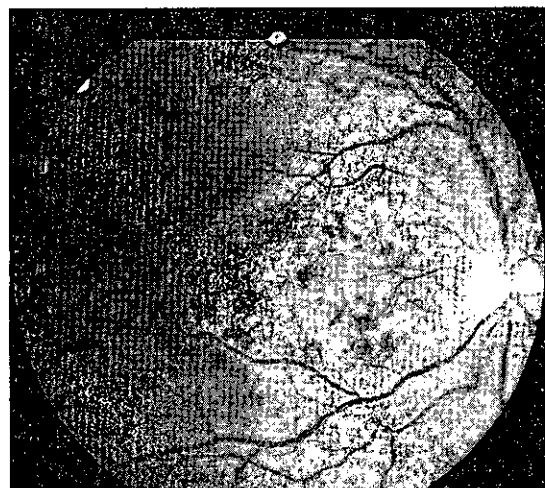


図2. 眼底写真を示す。

20010828

P. 127-132 は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので下記の資料をご参照ください。

資料

Wada Y, Abe T, Takeshita T, Sato T, Tamai M. Mutation of Human retinal fascin gene (FSCN 2) causes autosomal dominant retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42: 2395 - 2410.

強膜内インプラントを用いた網膜硝子体への薬物送達の試み

Biodegradable intrascleral implant for drug delivery to the posterior segment of the eye

岡部純子、 木村英也、 岡部高明、 久納紀之、 小椋祐一郎
(名古屋市立大学医学部眼科)

Junko Okabe, Hideya Kimura, Komei Okabe, Noriyuki Kunou, Yuichiro Ogura
(Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School)

【要 約】

目的：リン酸ベタメサゾン（betamethasone phosphate：BP）を含む生体分解性高分子インプラントを家兎眼の強膜内に埋め込み、眼内薬物動態と生体適合性について評価した。

方法：In vitro では、リン酸緩衝液（phosphate buffered saline：PBS）中にインプラントを入れ定期的にPBSに溶出しているBP濃度を計測した。In vivo では家兎眼強膜にインプラントを埋め込み、1、2、4、8、12週後に硝子体、網脈絡膜中のBP濃度を計測した。また病理組織学的にも検討した。

結果：In vitro では約8週間の徐放がみられた。家兎眼においては硝子体組織で約8週間、網脈絡膜組織では約12週間炎症抑制に対する有効濃度を維持した。病理組織学的に明らかな網膜毒性はみられなかった。

結論：強膜内インプラントは今後、後眼部への新しい薬物送達システムとして期待できると考えられた。

Abstract

PURPOSE : We evaluated the feasibility of biodegradable intrascleral implant containing betamethasone phosphate (BP) to the posterior segment of the eye as a sustained drug delivery system.

METHODS : The intrascleral implants were placed in phosphate buffered saline, and at predetermined intervals, the amount of BP released into the medium was measured in vitro. In vivo, the device was implanted intrasclerally in the rabbit eye. At weeks 1, 2, 4, 8 and 12 after implantation, the concentrations of BP in the vitreous and the retina/choroid were measured. Possible adverse effects of the intrascleral implant on ocular tissues were evaluated histopathologically.

RESULTS : BP was released from the intrascleral implant for about 8 weeks in vitro. In vivo study, BP concentration was maintained the effective level for inflammation for about 8 weeks in the vitreous and about 12 weeks in the retina/choroid. No substantial toxic reactions were observed histologically.

CONCLUSIONS : These results suggest that the intrascleral implant may have a potential as a drug delivery system to the posterior pole of the eye.

キーワード：強膜、ステロイド、インプラント、薬物、高分子

Key Words : sclera, steroid, implant, drug, polymer

緒言

網膜硝子体疾患に対する薬物療法において問題となるのは薬物の眼内移行性である。点眼では後眼部への薬物移行が難しく、全身投与においては治療効果を得るために大量投与が必要になることがしばしばあり副作用が問題になる。直接的な方法として、薬物の硝子体注入があるが、頻回の投与が必要となる場合が多く、硝子体出血や網膜剥離などの合併症

の危険性が高くなる。このような問題を解決するためには眼内への薬物徐放システムの開発が必要であろう。

最近、薬物送達のターゲットとして強膜が注目されている。強膜は、構造的には角膜実質と類似しており、眼球において最も大きい表面積を有している。薬物が強膜を拡散して、脈絡膜組織まで移行するためには、薬物と強膜がある一定以上の時間接触

していなければならない。このため、通常の特ノン囊下投与では、十分量の薬物が眼内に移行しない。しかしながら、強膜内に持続的に薬物を投与した場合、分子量依存性にかなり大きい分子量の薬物も、脈絡膜、色素上皮、網膜を通過して、硝子体内まで通過できることが報告されている¹⁾。今回ステロイドを徐放する生体分解性高分子インプラントを家兎眼の強膜内に埋め込み、網膜硝子体組織への薬物移行を評価した。

方法

生体分解性高分子であるポリ乳酸(分子量20,000)とリン酸ベタメサゾン(betamethasone phosphate: BP)を酢酸に溶解し、凍結乾燥してできた混合物を圧縮した。これを直径4 mm、厚さ0.5mmの円盤状に打錠し、BPを25%含有するインプラントを作成した。

In vitroでの薬物の徐放性を検討した。2 mlのリン酸緩衝液(phosphate buffered saline: PBS)を入れた密封容器の中にインプラントを入れ、37°Cの恒温振盪水槽で溶出させた。定期的にPBSを採取し、溶出しているBP濃度を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で計測した。

In vivoにおける薬物動態を家兎眼を用いて検討した。家兎の結膜を切開して強膜を露出させた後、メス、クレセントナイフを用いて強膜ポケットを作成した。インプラントをポケットに挿入し、強膜創、結膜を7-0シルク糸でそれぞれ1針ずつ縫合した。1、2、4、8、12週後に眼球を摘出し、硝子体、網脈絡膜中のBP濃度をHPLCで計測した。また、インプラント8週後および12週後の埋め込み部位の組織反応を光学顕微鏡的に評価した。

結果

In vitroでは、BPは二相性の放出を示した(図1)。最初に約55%放出し、その後約8週間の徐放がみられた。

家兎眼においては硝子体組織で約8週間、網脈絡膜組織では約12週間炎症抑制に対する有効濃度(0.15-4.00 μg/ml)を維持した(図2)。

インプラントは強膜内で膨潤したのち徐々に吸収消失した。組織学的には、インプラントは結合組織に置換され(図3)、インプラント近傍の網膜には変化はみられなかった(図4)。

考察

生体分解性高分子を強膜ポケット内に埋め込み、眼内への経強膜的薬物徐放システムの可能性について評価した。In vitroでは、二相性の薬物放出がみられた。これは初期バーストと拡散による徐放から

なる²⁻⁴⁾。初期バーストはインプラントの表面に分布している薬物の急速な溶解によるものであり、今回約半量が放出された。徐放期は高分子の加水分解に伴う薬物の溶出によるものであり、約8週間の薬物放出がみられた。

家兎眼では網脈絡膜組織で約12週間、硝子体組織で約8週間有効濃度を維持することができた。脈絡膜と網膜の間には血液網膜関門である網膜色素上皮があり、多くの物質の通過がここで遮断されるが、脂溶性物質は透過することができるとされている⁵⁾。リン酸ベタメサゾンは水溶性物質であるが、分子量が516と小さく、細胞間の単純拡散により通過したと考えられた。

我々は今までに、硝子体手術の際に使用する強膜プラグに類似した形状で、毛様体扁平部に固定し硝子体腔に薬物を徐放する形の生体分解性インプラントを開発し、網膜硝子体組織への薬物送達システムとしての有用性に関して報告してきた^{2,6-13)}。プラグ型のインプラントは薬物放出後期に高分子の崩壊に伴い硝子体刺入部で切断され、硝子体腔に一部脱落する可能性も考えられるが、強膜内に埋め込む場合その危険は回避できる。また、眼内との交通もなく、より侵襲の少ない方法といえる。生体分解性であるため薬物を徐放した後も除去の必要がなく、また眼圧上昇などの不都合が生じた場合には比較的容易に除去することができる。病理組織学的に網膜に毒性はみられず、生体適合性の面でも問題はないと思われた。

以上より、この強膜内インプラントは後眼部に対する新しい薬物送達システムとして今後期待できると考えられた。

文献

1. Ambati J, Graroudas ES, Miller JW, You TT, Miyamoto K, Delori FC, Adamis AP: Transscleral delivery of bioactive protein to the choroid and retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 41: 1186-1191, 2000
2. Kunou N, Ogura Y, Hashizoe M, Honda Y, Hyon SH, Ikada Y: Controlled intraocular delivery of ganciclovir with use of biodegradable scleral implant in rabbits. Controlled Release 37: 143-150, 1995
3. Pitt CG, Gratzl MM, Jeffcoat AR, Zweidinger R, Schindler A: Sustained drug delivery systems II: Factors affecting release rates from poly(ε-caprolactone) and related biodegradable polymers. J Pharm Sci 68: 1534-1538, 1979
4. Hora MS, Rana RK, Nunberg JH, Tice TR, Gilley RM, Hudson ME: Release of human serum

albumin from poly (lactide-co-glycolide) microspheres. Pharm Res 7 : 1190-1194, 1990

5. Cunha-Vaz J : The blood-ocular barriers, review. Surv Ophthalmol 23 : 279-296, 1979.
6. Kimura H, Ogura Y, Hashizoe M, Nishiwaki H, Honda Y, Ikada Y : A new vitreal drug delivery system using an implantable biodegradable polymer device. Invest Ophthalmol Vis Sci 35 : 2815-2819, 1994
7. Hashizoe M, Ogura Y, Kimura H, Moritera T, Honda Y, Kyo M, Hyon SH, Ikada Y : Scleral plug of biodegradable polymers for controlled drug release in the vitreous. Arch Ophthalmol 112 : 1380-1384, 1994
8. Hashizoe M, Ogura Y, Takanashi T, Kunou N, Honda Y, Ikada Y : Implantable biodegradable polymeric device in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy. Curr Eye Res 14 : 473-477, 1995
9. Hashizoe M, Ogura Y, Takanashi T, Kunou N, Honda Y, Ikada Y : Biodegradable polymeric device for sustained intravitreal release of

ganciclovir in rabbits. Curr Eye Res 16 : 633-639, 1997

10. Miyamoto H, Ogura Y, Hashizoe M, Kunou N, Honda Y, Ikada Y : Biodegradable scleral implant for intravitreal controlled release of fluconazole. Curr Eye Res 16 : 930-935, 1997
11. Yasukawa T, Kimura H, Kunou N, Miyamoto H, Honda Y, Ogura Y, Ikada Y : Biodegradable scleral implant for intravitreal controlled release of ganciclovir. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 238 : 186-190, 2000
12. Kunou N, Ogura Y, Yasukawa T, Kimura H, Miyamoto H, Honda Y, Ikada Y : Long-term sustained release of ganciclovir from biodegradable scleral implant for the treatment of cytomegalovirus retinitis. J Control Rel 68 : 263-271, 2000
13. Kunou N, Ogura Y, Honda Y, Hyon SH, Ikada Y : Biodegradable scleral implant for controlled intraocular delivery of betamethasone phosphate. J Biomed Mater Res : 51 : 635-641, 2000

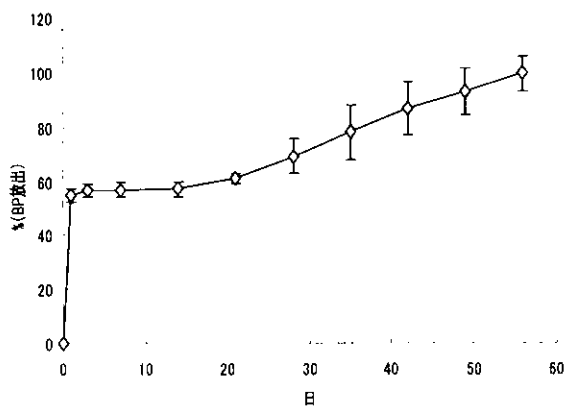


図 1 : In vitroにおける薬物放出パターン。

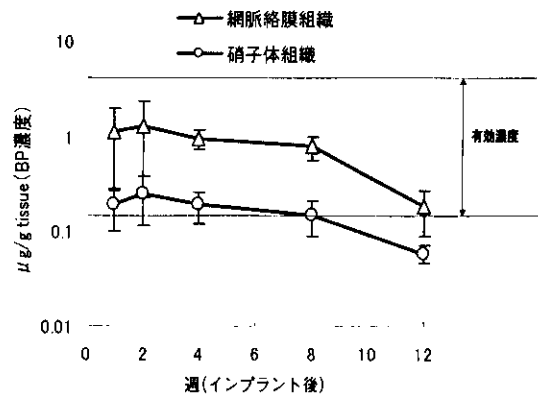


図 2 : 家兎眼の硝子体、網脈絡膜におけるBP濃度。

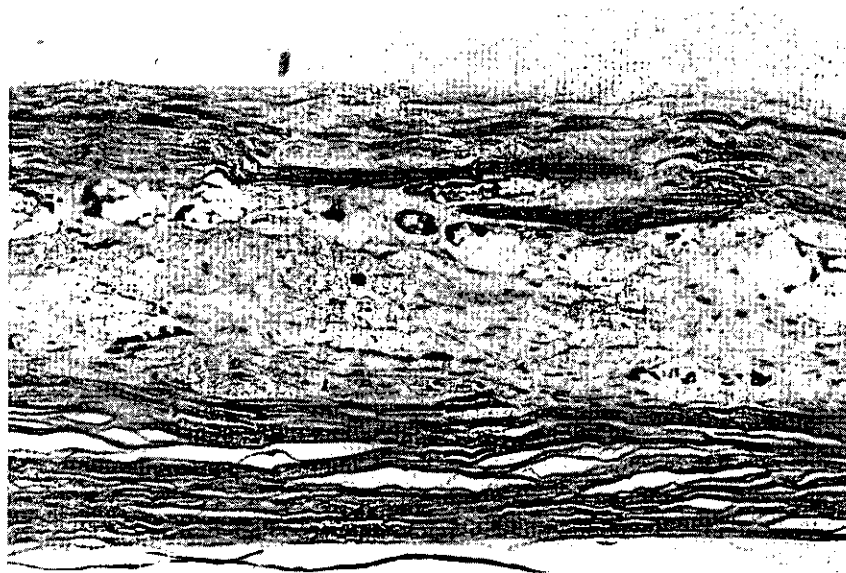


図3：インプラント12週後の光学顕微鏡写真。強膜内のインプラント占拠部は結合組織に置き換えられている。



図4：インプラント12週後の光学顕微鏡写真。網膜の構造に明らかな変化はみられなかった。

近視性新生血管黄斑症に対する強膜短縮黄斑移動術

Limited Macular Translocation with Scleral Shortening for Myopic Neovascular Maculopathy

島田宏之、 福田 匠、 藤田京子、 湯沢美都子
(日本大学医学部眼科学教室)

Hiroyuki Shimada, Takumi Fukuda, Kyoko Fujita, Mitsuko Yuzawa
(Department of Ophthalmology, School of Medicine, Nihon University)

【抄 録】

目的：近視性新生血管黄斑症の中心窩脈絡膜新生血管（CNV）抜去術は、術後の網膜脈絡膜萎縮の拡大のため視力の改善が少ないことから、強膜短縮黄斑移動術につき検討した。

対象と方法：2000年以降に近視性新生血管黄斑症に対して強膜短縮黄斑移動術を行い、6か月以上経過観察できた10眼である。適応は、術前視力0.3以下、中心窩CNVで、蛍光造影でCNVの活動性があるものとした。

結果：黄斑移動距離は平均0.4乳頭径で、乱視増加量は平均1.3Dであった。術前視力では、0.09以下が4眼、0.1～0.3が6眼で、最終視力は、0.09以下が2眼、0.1～0.3が2眼、0.4以上が6眼であった。黄斑移動距離、最終視力、乱視増加量との間には互いに正の相関がえられた。黄斑移動部位の網膜色素上皮の萎縮は、術後0.4以上えられた6眼には認められなかった。1眼に限局性網膜剥離が発生した。

結論：術後視力は良好で、術後乱視や網膜剥離も少なかったことから、近視性新生血管黄斑症に対する強膜短縮黄斑移動術は有用であると考えた。

Abstract

Purpose : Surgical removal of subfoveal choroidal neovascularization (CNV) in myopic neovascular maculopathy achieved little improvement of visual acuity due to postoperative expansion of retinochoroidal atrophy. We examined the usefulness of limited macular translocation with scleral shortening for myopic neovascular maculopathy.

Subjects and Methods : Ten eyes that underwent limited macular translocation with scleral shortening for maculopathy since 2000 and had been followed for 6 months or longer were included in this study. Surgical indications were preoperative visual acuity of 0.3 or below and observation of CNV activity in foveal CNV by fluorescein angiography.

Results : The mean distance of macular translocation was 0.4 disc diameter, and the mean change of astigmatism was 1.3 diopter. Preoperative visual acuity was 0.09 or below in 4 eyes and 0.1–0.3 in 6 eyes. The final visual acuity was 0.09 or below in 2 eyes, 0.1–0.3 in 2 eyes, and 0.4 or above in 6 eyes. A positive correlation was observed between the distance of macular translocation, final visual acuity and change of astigmatism, respectively. Atrophy of retinal pigmented epithelium at the site of macular translocation was not observed in 6 eyes that achieved postoperative visual acuity of 0.4 or above. Localized retinal detachment occurred in 1 eye.

Conclusion : From the results of good postoperative visual acuity and little postoperative astigmatism and retinal detachment, limited macular translocation with scleral shortening was considered useful myopic neovascular maculopathy.

キーワード：近視性新生血管黄斑症、黄斑移動術、強膜短縮、乱視増加量

Key words : myopic neovascular maculopathy, limited macular translocation, scleral shortening, change of astigmatism

目的

近視性新生血管黄斑症では、中心窩に脈絡膜新生血管（CNV）が生じると大多数の症例が0.1以下の視力になることが知られている。従来我々は、高度近視ではCNV抜去術を選択してきたが、術後の網膜脈絡膜萎縮の拡大のため視力の改善は軽度であった。そこで今回、強膜短縮を用いた黄斑移動術を行い、その有用性を検討した。

対象と方法

症例は2000～2001年までに、高度近視に伴って生じた中心窩のCNVに対して強膜短縮による黄斑移動術を行った10例10眼（男性3例、女性7例）、年齢49～72歳である。経過観察期間は、6～16か月である。-6.0D以上か、眼軸長26,5mm以上を高度近視とした。手術適応は、フルオレセイン蛍光造影検査（FA）で造影後期に明らかな蛍光漏出のみられる中心窩CNVで、0.3以下の視力のものとした。

手術方法は、角膜輪部から10mmの上耳側の部位に5-0ダクロンを設置（短縮幅：5mmを3眼、7mmを7眼）（短縮角度：90度を3眼、120度を7眼）した後に、インフュージョンポートを作成し、白内障手術と眼内レンズ（6.5mm、PMMA）を挿入した（図1）。次に、硝子体切除と意図的後部硝子体剥離の作成を行い、基底部の硝子体を十分に切除した。その後、上耳側の中間周辺部網膜から39G曲の網膜下注入針（Synergetic社、rigid micro injection cannula）で網膜下にBSSプラスRを注入し、耳側180度に網膜剥離を作成した。網膜下への液注入は、基本的に1か所とし、注入の方向で網膜剥離の向きを決定した。眼圧を10mmHgに低下させた状態で、強膜を圧迫・内陥させながら5-0ダクロンRで縫合し強膜を短縮した。最後に液空気置換をして、手術を終了した。術後は、座位を1日、45度のベット挙上を2日行った。黄斑移動距離が少なかった例への再移動術、術後のCNVへの光凝固は行わなかった。

視力の推移は、術前視力、術後最高、最終視力で比較し、平均視力は相乗平均視力、統計処置にはlogMAR視力を用いて検討した。術後視力と、術前要因（CNV径、眼軸長、年齢）、術後要因（短縮幅と短縮角度、乱視変化量、黄斑移動距離、黄斑が移動した部位の網膜色素上皮の状態）との関係について検討した。黄斑移動距離は、FA上で乳頭中央部とCNV下縁を結ぶ線を引き、この線とCNVとの移動距離を黄斑移動距離とし、乳頭縦径を1500 μ mとしてマイクロノギスで計測し算出した。CNV径は、FA初期像から、最大径を測定した。

症例

55歳の女性。CNV径は0.3乳頭径で、術前視力0.1、眼軸長は27.9mmであった。最終視力は0.6で、黄斑移動距離は0.7乳頭径、乱視は術前の-0.5Dから-3.5Dへ増加した（図2）。

結果

術前眼軸長は、平均29.2（27.4～30.8）mmで、CNV径は平均0.8（0.3～1.8）乳頭径であった。黄斑移動距離は平均0.4（0.2～0.7）乳頭径、術前乱視は平均-0.9D（0～-3.0D）、術後乱視は平均-2.2D（-0.75～-4.0D）、術後乱視増加量は平均1.3D（0.5～3.5D）であった。平均視力は術前0.11であり、最高0.30（paired t検定、 $P < 0.03$ ）、最終0.27（paired t検定、 $P < 0.05$ ）ともに有意に視力は改善していた（図3）。術後0.4以上の視力は最高視力で6眼、最終視力でも6眼に得られた（図4）。最高視力と最終視力に影響する術前要因について検討（単回帰分析）してみると、CNV径（ $p = 0.2$ 、 $p = 0.2$ ）、眼軸長（ $p = 0.4$ 、 $p = 0.4$ ）、年齢（ $p = 0.2$ 、 $p = 0.3$ ）で、いずれも有意差はなかった。最高視力と最終視力に影響する術後要因について検討（Mann-WhitneyのU検定）してみると、短縮幅は5mmより7mmの方が術後視力は良好（ $p = 0.6$ 、 $p = 0.5$ ）、短縮角度も120度の方が90度より良好（ $p = 0.2$ 、 $p = 0.3$ ）であったがいずれも有意差はなかった。最高視力や最終視力との相関は、乱視増加量は（ $p < 0.009$ 、 $p < 0.006$ ）、黄斑移動距離は（ $p < 0.0008$ 、 $p < 0.0005$ ）で、いずれも有意差（単回帰分析）を認めた（図5、6）。黄斑移動距離と乱視変化量との間には、有意な相関がみられた（単回帰分析： $p < 0.02$ 、 $R = 0.76$ ）（図7）。最終視力で0.4以上の視力が得られた6眼中4眼で、1.5D以上の乱視が生じていた。また、0.4以上得られた6眼は、いずれも0.3乳頭径以上の黄斑移動距離が得られていた。黄斑が移動した部位の網膜色素上皮萎縮は、術後最高・最終視力で0.4以上の視力が得られた6眼には認められなかった。

術後合併症として、49歳女性（術前視力0.3）に網膜下に液を注入した部位から限局性の網膜剥離が生じた。外来で、液空気置換を行い、光凝固を追加することで網膜の復位が得られ、最高視力0.3、最終視力0.2である。58歳男性（術前視力0.04）に、術後にCNVが再燃したため、最高視力0.6から0.1に低下した。CNVを抜去することで、最終視力0.5を維持している。

考案

強膜短縮を用いた黄斑移動術は、Imaiら¹⁾の動物実験に基づき、de Juanら²⁾によって始められた方

法である。この術式で、術中に CNV 抜去を併用すると、抜去部位から網膜下液が流出してしまうため、黄斑が移動しにくいとされている。そこで今回は、抜去術を併用しなかった。加齢黄斑変性などでは、黄斑移動術後に CNV の光凝固、経瞳孔的温熱療法、CNV 抜去などが行われていることもあるが、近視性黄斑症では、CNV は小さく、自然退縮傾向があるため、術後にこれらの治療も行わず経過観察した。今回、10眼中1眼で、術後に CNV の再燃により視力が低下したため、CNV 抜去し最終視力 0.5 を維持できた。したがって、移動術後も定期的に経過観察し、CNV の拡大、網膜下出血などにより視力が低下した場合には、中心窩に CNV が及ぶ前に抜去術などを早急に行うことが大切であると考ええる。

近視性新生血管黄斑症に対する強膜短縮を用いた黄斑移動術の術後成績について、Ichibe ら³⁾は、10眼中6眼で 0.6 以上の視力が得られ、術後の網膜剥離は2眼、中心窩を横切る網膜ひだが1眼に生じたとしている。今回、10眼中5眼で 0.5 以上の視力が得られ、術後の網膜剥離が1眼であったが、中心窩を横切る網膜ひだは生じなかった。Ichibe ら³⁾は、術後に移動距離が不十分であった2眼に対して再移動術を行っている。今回、我々は再移動術を行わず、比較的良好な手術成績を得たが、今度、黄斑移動距離が不十分であった症例では再移動術を検討する必要がある。

従来、強膜を半層切除する強膜短縮黄斑移動術では、術後の乱視が問題⁴⁾であったが、最近の強膜半層切除しない方法では平均 3.2D (1~5D)³⁾と少ない。今回の結果では、術後乱視は -0.75~-4.0D、乱視増加量は平均 1.3D とさらに乱視は少なかったが、これは黄斑移動距離が従来の平均 0.78D³⁾と比べて少なかったことと関係していると考ええる。今回、術後最終視力と乱視増加量とには有意な相関がみられており、最終視力で 0.4 以上の視力が得られた6眼中4眼の乱視増加量は 1.5D 以上であった。したがって、術後に比較的良好な視力を得るためには、1.5D 以上の乱視増加量が出現することを、術前に説明しておく必要がある。

今回、術後最終視力と黄斑移動距離とには有意な相関がみられており、最終視力 0.3 以下であった4眼では、いずれも 0.3 乳頭径以下の移動距離しか得られていない。黄斑移動距離が平均 0.4 乳頭径と少ないことを考えれば、中心窩の中央に CNV がある例では少なくとも 1.0 乳頭径以内の CNV、あるいは大きくてもその中心が中心窩上方にあって中心窩からの CNV 下縁までの距離が短くないと、積極的な適応となりにくいと考える。

近視性新生血管黄斑症で、中心窩下方に限局性網

膜萎縮を伴う場合には、黄斑が萎縮部位に移動してしまえば、視力の改善が得られないと予測される。幸い、今回の症例のうち、0.3 乳頭径以上移動できた例では、すべて 0.4 以上の最終視力が得られた例では新しい中心窩下に萎縮はなかった。しかし、黄斑下方の萎縮の範囲、程度も術前に考慮する必要がある。

文献

- 1) Imai K, Loewenstein A, de Juan E Jr: Translocation of the retina for management of subfoveal choroidal neovascularization I: experimental studies in the rabbit eye. *Am J Ophthalmol* 125:627-634, 1998.
- 2) de Juan E Jr, Loewenstein A, Bressler NM, et al: Translocation of the retina for management of subfoveal choroidal neovascularization II: a preliminary report in humans. *Am J Ophthalmol* 125:635-646, 1998. *Ophthalmology* 96:96-103, 1989.
- 3) Ichibe M, Imai kazuyuki, Ohta M, et al: Foveal translocation with scleral imbrication in patients with myopic neovascular maculopathy. *Am J Ophthalmol* 132:164-171, 2001.
- 4) Fujikado T, Ohji M, Saito Y, et al: Visual function after foveal translocation with scleral shortening in patients with myopic neovascular maculopathy. *Am J Ophthalmol* 125:647-656, 1998.

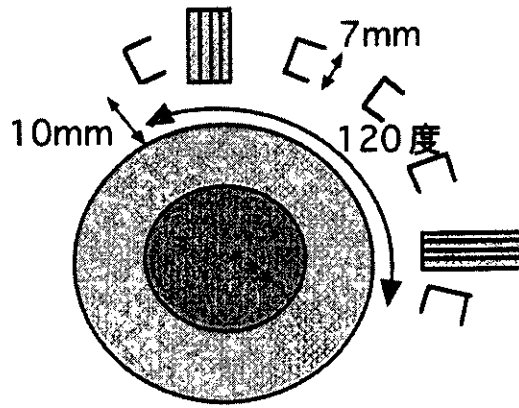


図1：角膜輪部から10mmの上耳側の部位に5-0ダクロンを設置、短縮幅7mm、短縮角度120度を基本とした。

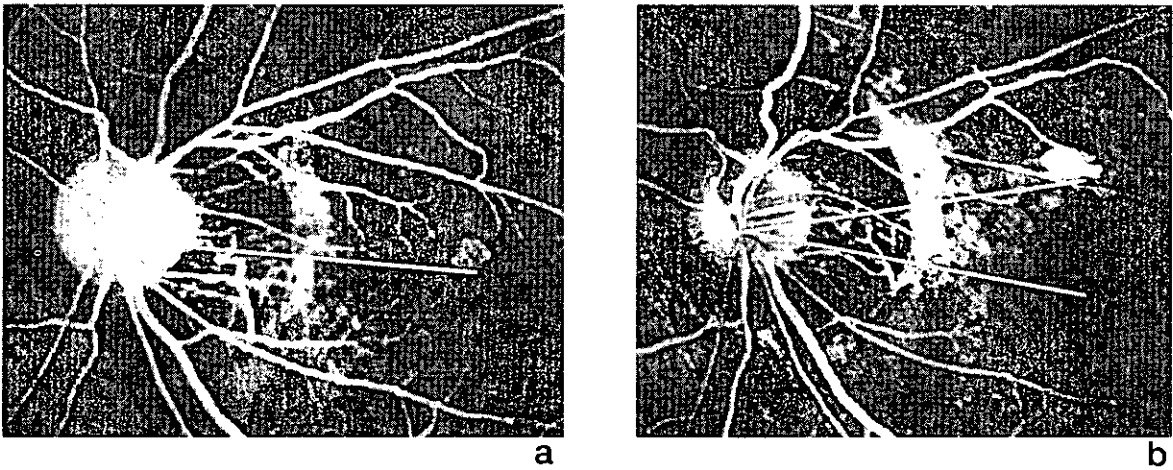


図2：55歳の女性。術前後のFA (a：術前、b：術後)
黄斑移動距離は0.7乳頭径で、視力は0.1から0.6に改善した。

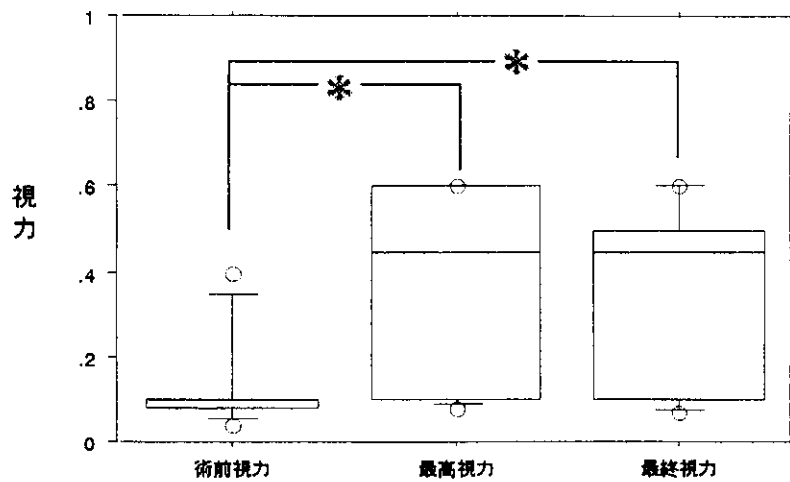


図3：視力の推移
術前視力より、最高・最終視力は有意に改善した (*： $p < 0.05$ 、paired t検定)。

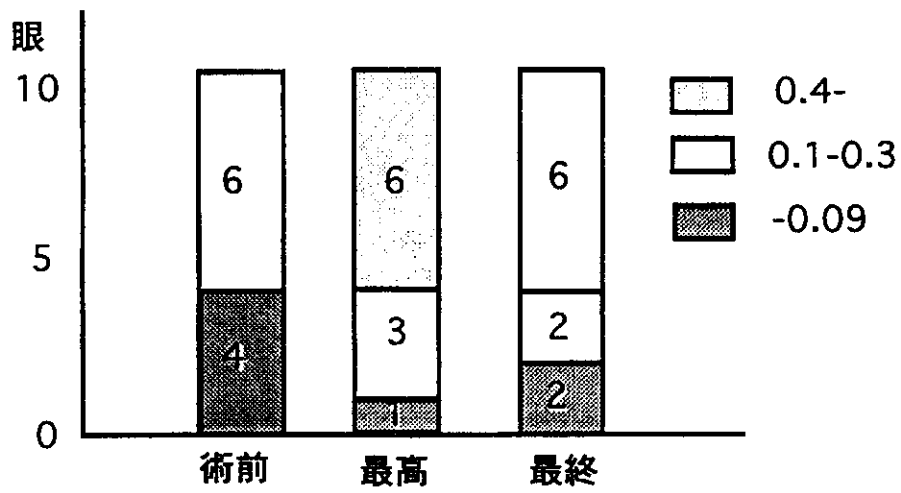


図4：術前後視力

術後0.4以上の視力は最高視力で6眼、最終視力でも6眼に得られた。

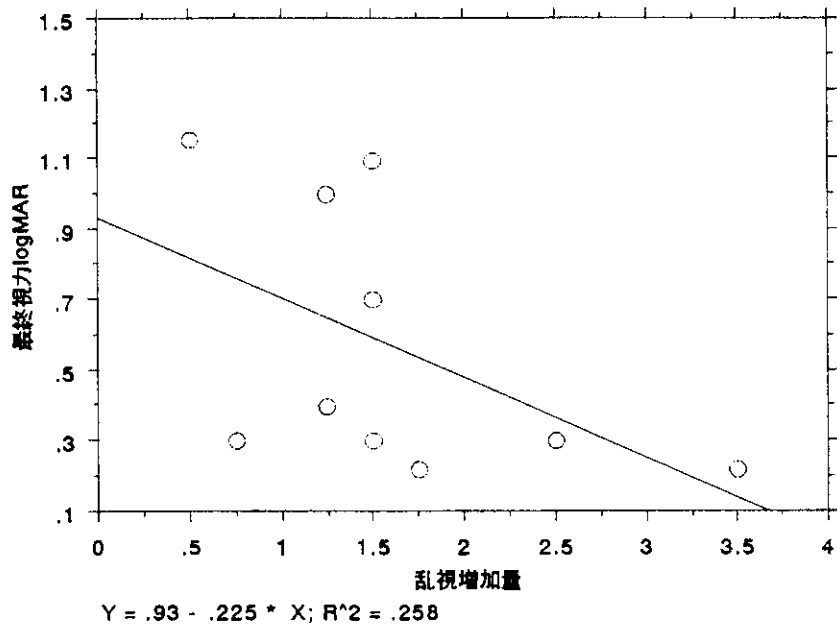
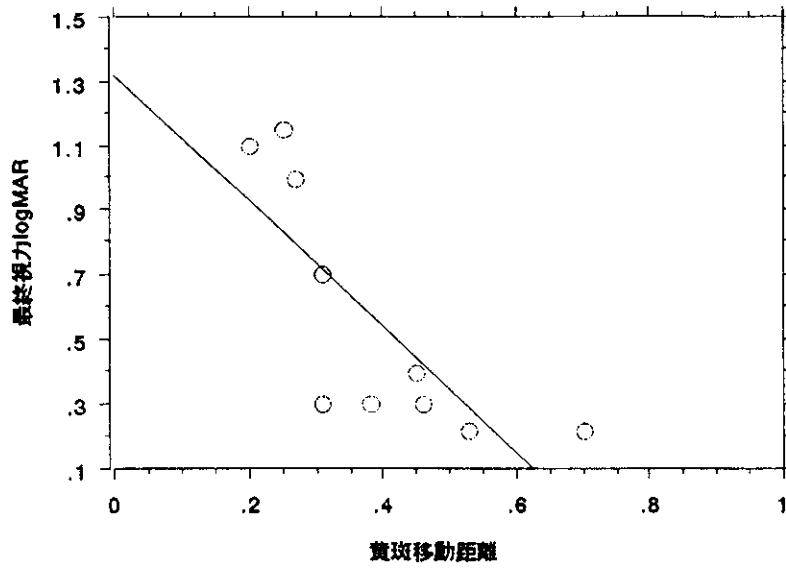


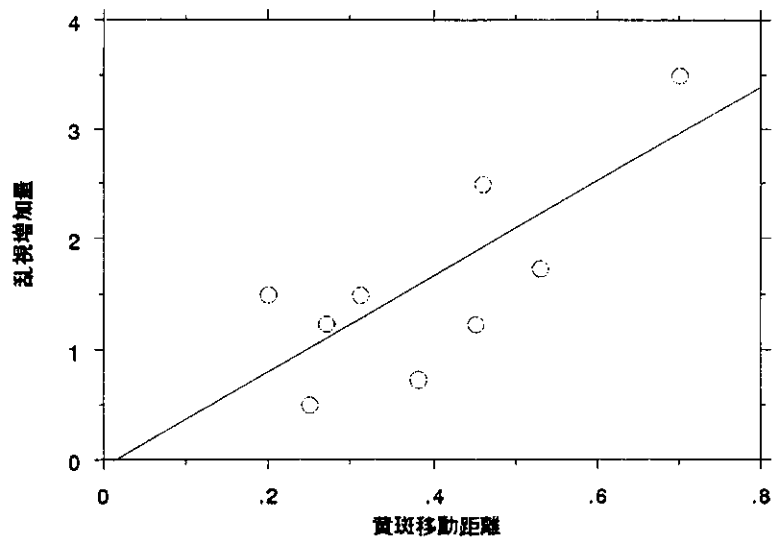
図5：乱視増加量と最終logMAR視力

単回帰分析で、 $R=0.51$ 、 $p<0.006$ である。



$Y = 1.326 - 1.959 * X; R^2 = .606$

図 6：黄斑移動距離と最終logMAR視力
単回帰分析で、 $R=0.78$ 、 $p<0.0005$ である。



$Y = -.062 + 4.306 * X; R^2 = .577$

図 7：黄斑移動距離と乱視増加量
単回帰分析で、 $R=0.76$ 、 $p<0.02$ である。

Royal College of Surgeons (RCS) ラットの adeno associated virus (AAV) ベクターを用いた遺伝子治療

Gene therapy using the AAV vector of a Royal College of Surgeons (RCS) rat

宮原照良、 秋元正行、 新井 純、 黒川 徹、 菊池孝信、 吉村長久
(信州大学医学部眼科学教室)
水上浩明、 ト部匡司、 小澤敬也
(自治医科大学分子病態治療研究センター)

Teruyoshi Miyahara, Masayuki Akimoto, Jun Arai, Toru Kurokawa, Takano Kikuchi, Nagahisa Yoshimura
(Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine)
Hiroaki Mizukami, Masashi Urabe, Keiichi Ozawa
(Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi medical school, Japan)

【抄 録】

目的：網膜変性モデルである RCS ラットに、アポトーシス抑制遺伝子である bcl-xL 遺伝子を AAV ベクターにて導入し、視細胞がレスキューされるかを検討する。

方法：21日齢の RCS ラットの網膜下に recombinant AAV-bcl-xL (rAAV-bcl-xL) と recombinant AAV-lacZ (rAAV-lacZ) を混合したものを 2.5 μ l 注入した。コントロールとして、何も注入しないもの、rAAV-lacZ 各々を同量注入したものをおいた。注入後 2 週、4 週の時点で ERG 施行及び眼球摘出し、パラホルムアルデヒドで軽く固定した後、 β -galactosidase 発現部位を特定できるように X-gal 染色を行った。青染部位をオリエンテーションとして標本作製し、H. E. 染色にて観察を行った。

結果：ヒト由来 bcl-xL 遺伝子と大腸菌由来 β -galactosidase 遺伝子が、AAV ベクターにより視細胞に導入された。組織学的検討では、局所的ではあるが rAAV-bcl-xL + rAAV-lacZ 注入部位は明らかに外顆粒層の核数がコントロールに比べて多かった。ERG では、b 波が注入 4 週後で rAAV-bcl-xL + rAAV-lacZ 注入群が $23.7 \pm 1.7 \mu$ V、非注入群では $2.7 \pm 2.0 \mu$ V だった。(P < 0.05, n = 15) a 波には統計的に有意な差は認められなかった。

結論：AAV ベクターを用いた bcl-xL 遺伝子導入により、RCS ラットの photoreceptor がレスキューされることがわかり、今後、本法を用いた網膜変性疾患の治療の可能性が示唆された。

Abstract

Purpose : To evaluate the gene transduction to photoreceptor cells and the rescue effect by recombinant adeno-associated virus (AAV) carrying the human bcl-xL gene in Royal College of Surgeons (RCS) rats.

Methods : AAV-bcl-xL mixed with AAV-lacZ carrying the cDNA of bacterial beta-galactosidase were injected into the subretinal space of the eyes of RCS rats at the age of 21 days. Control eyes were uninjected, or injected with AAV-lacZ alone. X-gal staining was performed as an orientation of the injection part of recombinant AAV. Produced Bcl-xL protein was evaluated by an immunohistochemical method. The degree of retinal degeneration was assessed by electroretinogram (ERG) recording, and by counting the number of outer nuclear layer (ONL) cells at 0, 2, and 4 weeks after the injections.

Results : Human bcl-xL and bacterial beta-galactosidase genes were both transferred to photoreceptor cells by recombinant AAV vectors. In eyes injected with AAV-bcl-xL, the semiquantitative analysis of ONL cell numbers revealed a significant protective effect up to at least 4 weeks after the injections. On the other hand, there was no protective effect in the eyes with PBS or AAV-lacZ injections. In ERG, the amplitude of b-wave in the eyes injected with AAV-bcl-xL was significantly larger than

control eyes at 4 weeks after injection. At 4 weeks after injection, the amplitude of ERG b-wave was $23.7 \pm 1.7 \mu V$ (Mean \pm SEM) in the eyes injected with both and $2.7 \pm 2.0 \mu V$ in the uninjected eyes ($P < 0.05$, $n = 15$). The amplitudes of a-wave in eyes with AAV-bcl-xL injected eyes were not significantly larger than control eyes. No significant inflammatory response was detected.

Conclusions : These results demonstrate that recombinant AAV carrying the bcl-xL gene has a protective effect histologically and electrophysiologically for photoreceptor cells in RCS rats in vivo. Gene therapy with bcl-xL may provide a new strategy to target retinal degenerative diseases.

キーワード : RCSラット、遺伝子治療、AAV、Bcl-xL

key words : RCS rat, gene therapy, AAV, Bcl-xL

I はじめに

RCSラットにおける視細胞変性にはアポトーシスが関与しており、caspase like proteinの活性が増加し、そのinhibitorを硝子体注入することで一過性にTUNEL陽性細胞、すなわちアポトーシスが起きている細胞数が減少したと報告されている。そこで、アポトーシス抑制遺伝子の一つであるbcl-xL geneをAAVベクターを用いて視細胞に導入しその効果をみたので報告する。

II 方法

21日齢のRCSラットにてERG施行した後、右眼にAAVlacZのみ、AAVlacZとAxbcl-xLを等量ずつ混合したものを、網膜下に $2.5 \mu l$ 注入した。ウイルスは生理食塩水にて調整し、 2.4×10^{13} particles/mlとした。

注入2、4、8週間後にそれぞれERG施行した後、回収し評価した。ウイルス注入部位が確実に切り出せるように、X-gal染色し、4% PFAにて固定した。青染部分と視神経を通る子午線で $4 \mu m$ 毎の切片を作製。H.E.染色にて、核数を評価した。なお、下記のようにグループ分けした。

Group A : 無治療群

Group B : AAVlacZ 単独注入群

Group C : AAVlacZ + Axbcl-xL 混合注入群

III 結果

- ・ X-gal染色および免疫染色により、視細胞および網膜色素上皮への遺伝子導入および発現が確認された。(図1)
- ・ 組織学的には注入2週間後だと差がなかったが、4、8週間後だと有意な差が認められた。(図2, 3)
- ・ 電気生理学的には4週間のみ差が認められた。(図4)

IV 結論

AAVベクターを用いたBcl-xL遺伝子導入により、網膜変性ラットモデルにおいて視細胞保護効果が認められた。今後、本法を用いた網膜変性疾患の治療の可能性が示唆された。

文献

1. Matsuoka N, Yukawa H, Ishii K, Hamada H, Akimoto M, Hashimoto N, Miyatake S. Adenovirus-mediated gene transfer of Bcl-xL prevents cell death in primary neuronal culture of the rat. *Neurosci Lett.* 1999 Aug 6 ; 270(3) : 177-80.
2. Akimoto M, Miyatake S, Kogishi J, Hangai M, Okazaki K, Takahashi JC, Saiki M, Iwaki M, Honda Y. Related Articles Adenovirally expressed basic fibroblast growth factor rescues photoreceptor cells in RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Feb ; 40(2) : 273-9.
3. Katai N, Kikuchi T, Shibuki H, Kuroiwa S, Arai J, Kurokawa T, Yoshimura N. Spaselike proteases activated in apoptotic photoreceptors of Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Jul ; 40(8) : 1802-7.
4. Grant CA, Ponnazhagan S, Wang XS, Srivastava A, Li T. Evaluation of recombinant adeno-associated virus as a gene transfer vector for the retina. *Curr Eye Res.* 1997 Sep ; 16(9) : 949-56.
5. Rolling F, Shen WY, Barnett NL, Tabarias H, Kanagasigam Y, Constable I, Rakoczy PE. Long-term real-time monitoring of adeno-associated virus-mediated gene expression in the rat retina. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2000 Oct ; 28(5) : 382-6.
6. Lau D, McGee LH, Zhou S, Rendahl KG, Manning WC, Escobedo JA, Flannery JG. Retinal

- degeneration is slowed in transgenic rats by AAV-mediated delivery of FGF-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 Oct ; 41(11) : 3622-33.
7. D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, Vollrath D. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Genet.* 2000 Mar 1 ; 9 (4) : 645 - 51.
8. Joseph RM, Li T. Overexpression of *Bcl-2* or *Bcl-XL* transgenes and photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996 Nov ;

- 37(12) : 2434-46.
9. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB. *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell.* 1993 Aug 27 ; 74(4) : 597-608.
10. LaVail MM, Battelle BA. Influence of eye pigmentation and light deprivation on inherited retinal dystrophy in the rat. *Exp Eye Res.* 1975 Aug ; 21(2) : 167-92.

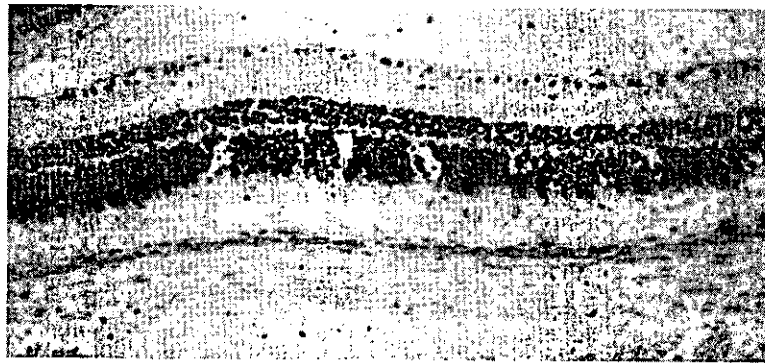


図1. 注入4週後 X-gal 染色+Nuclear Fast Red 染色
青染部分が β -galactosidase発現部位 Bcl-xLの発現が示唆される。

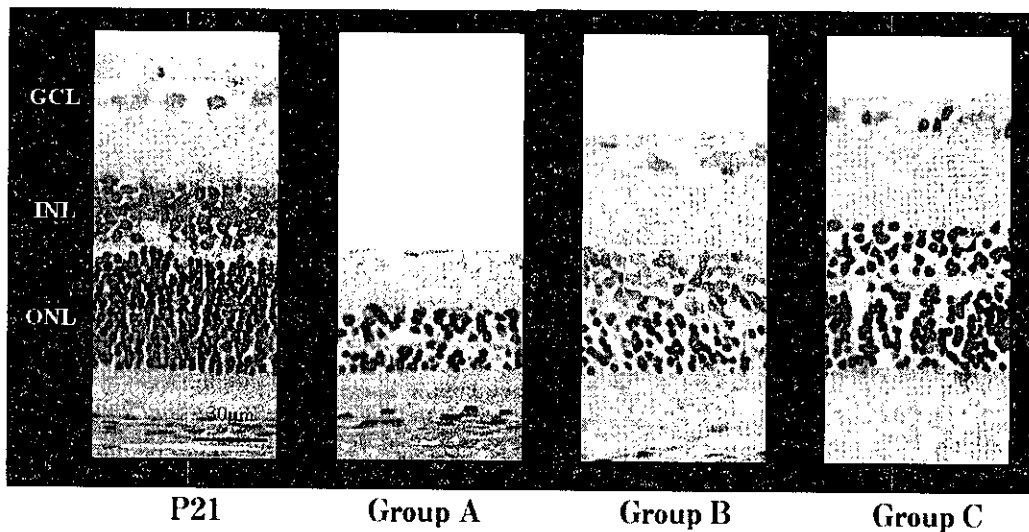


図2. 7週齢比較 (注入後4週)
A < B < C群の順に ONL が厚くなっている。

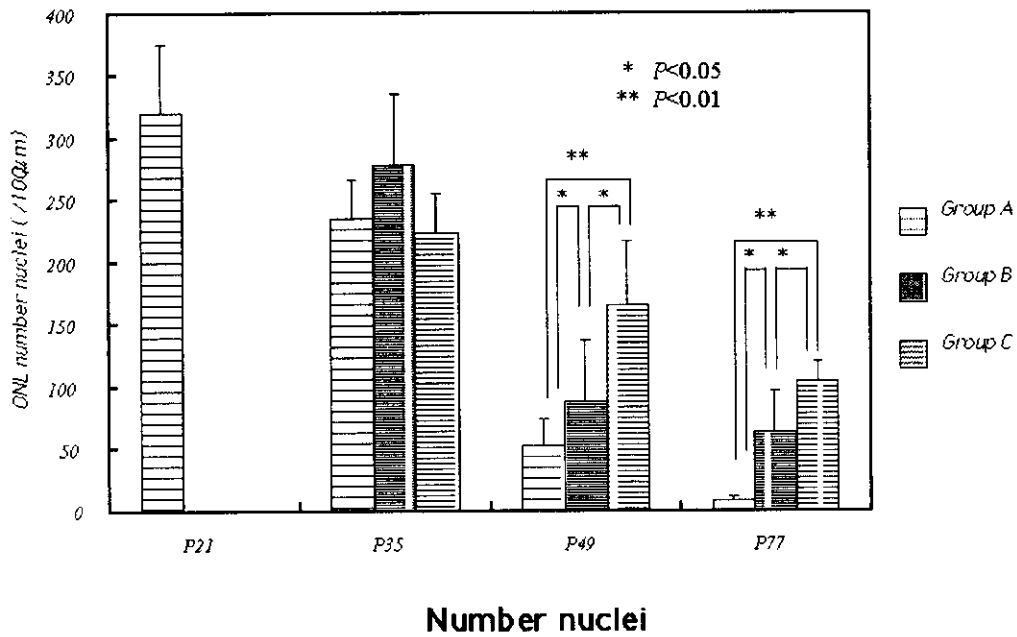


図 3. 核数グラフ

注入 4, 8 週間後で A 群に比し、B, C 群で有意に、また B 群に比し C 群で有意に核数が多い。

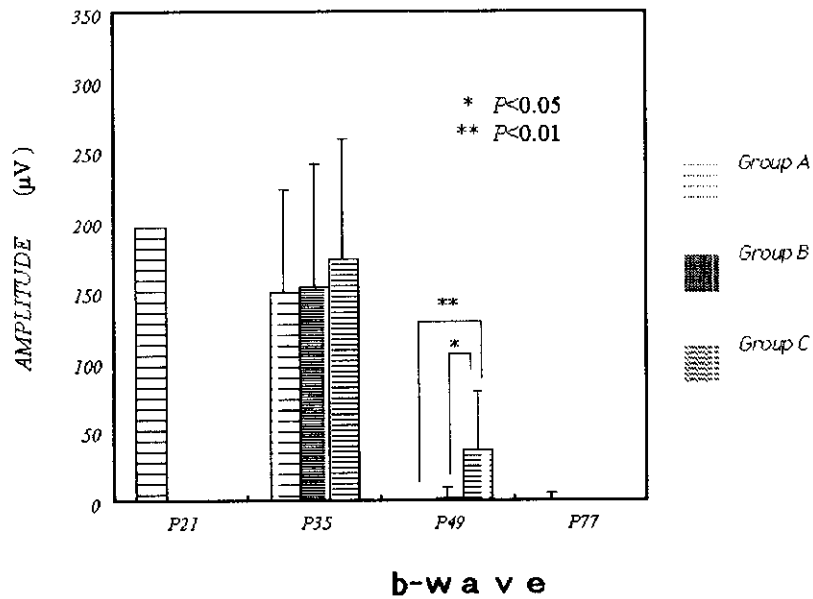


図 4. ERG b 波

注入 4 週後でのみ、A 群に比し、B, C 群で有意に、また B 群に比し C 群で有意に b 波が保たれている

RCSラットの網膜変性に対するカルシウム拮抗剤の効果

Drug effects of Ca antagonist on retinal degeneration In RCS rat

佐藤元哉、 大黒 浩、 山崎仁志、 柳橋さつき、 中沢 満
(弘前大学医学部眼科学教室)

Motoya Sato, Hiroshi Ohguro, Hitoshi Yamazaki Satsuki Yanagihashi, Mitsuru Nakazawa
(Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine)

【抄 録】

目的：以前、我々はカルシウム拮抗剤が RCS ラットの網膜変性を遅延させる可能性があることを報告した。しかし、その機序については不明な点が多い。今回、DNA マイクロアレイ法を用い RCS ラットにカルシウム拮抗剤を投与した際に発現が変化した遺伝子について解析検討した。

対象と方法：RCS ラット三週令にそれぞれニルバジピン、または基剤を14日間連続で腹腔内投与した。その後、摘出網膜から mRNA を抽出し DNA マイクロアレイ法を用いて網膜における各種遺伝子の発現を mRNA レベルで解析した。対象として用いたのはラットでの発現がすでに確認されている1101個の遺伝子とした。

結果：ニルバジピン投与により非投与に比べ25個の遺伝子において2倍以上の発現の増減がみられた。いくつかのG蛋白共役型受容体、ホルモン受容体に加え、アポトーシス関連遺伝子の発現変化が認められた。

結論：カルシウム拮抗剤が RCS ラットの網膜変性を遅延させる機序としてアポトーシスを抑制している可能性が示唆された。

Abstract

Purpose ; To profile changes of gene expression in the retina of RCS rat administrated Ca²⁺-channel blocker, nilvadipine, using DNA microarray technique.

Methods ; we administrated nilvadipine, or its vehicle solution to RCS rats (postnatal 21 days) everyday for 2 weeks. After that, enucleated eye ball under general anesthesia, mRNA was extracted from retina (under the manufacture's protocol). With use of DNA microarray technique, the changes of gene expression were evaluated. In 1101 genes, 25 genes were varied significantly (18genes, downregurated, 7 genes, upregurated). In these, several genes associated with apoptosis were included.

Conclusions ; Our present data suggest that the absorption of the subretinal fluid was prolonged, we speculated that there might be the damage of the pigment epithelium associated with serous macular detachment.

キーワード：DNAマイクロアレイ、アポトーシス、Ca 拮抗剤、RCSラット、網膜変性

Key words : DNA microarray, apoptosis, Ca antagonist, RCS rat, retinal degeneration

目的

網膜色素変性症に対する有効な治療法はいまだ確立されていないが、最近カルシウム拮抗剤が網膜変性の動物モデルであるRDマウスの網膜変性に抑制的に作用することが報告された。加えて、当科ではカルシウム拮抗剤であるニルバジピン投与によりRCSラットの網膜変性が遅延することを、組織学的、電気生理学的に証明している。しかしながら、その分子生物学的機序についてはほとんど解明されていない。そこで、今回我々はRCSラットへのニルバジピン投与により変動する遺伝子についてDNAマイクロアレイ法を用いて解析、検討した。

方法

網膜変性の始まる3週令のRCSラットに、ニルバジピンまたは基剤を14日間連続で腹腔内投与し、その後、網膜を摘出し、mRNAを抽出、DNAマイクロアレイ法にてニルバジピン投与による遺伝子発現の変動について解析した。遺伝子はすでにラットでの発現が確認されている1101個の遺伝子を対象とし、発現比率2倍以上の変化を有意とした。

結果

ニルバジピン投与により1101個の遺伝子の内、25個の遺伝子で2倍以上の発現変動がみられた。ニルバジピン投与により発現量が減少した遺伝子は18個で、各種ホルモン、ニューロペプチドのレセプターに加え、いくつかのアポトーシスに関連する遺伝子の変動がみられた。また、レニンやバゾプレッシン・レセプターなど、すでに知られたカルシウム拮抗剤の影響と考えられる遺伝子変動がみられた。発現量が増加した遺伝子は7個で、GG蛋白共役型受容体、サイトカインなどが含まれていた。

考察

ニルバジピン投与により1101個の遺伝子の内、25個の遺伝子で2倍以上の発現変動がみられた。個々の遺伝子についての検証や生物学的意義については現在検討中であるが、アポトーシスに関連する遺伝子の変動がみられたことが注目される。近年、網膜変性ではアポトーシスが生じていることが明らかにされており、ニルバジピンの投与はアポトーシスに何らかの影響を及ぼすことが示唆された。

結論

カルシウム拮抗剤であるニルバジピンがRCSラットの網膜変性を遅延させる機序としてアポトーシスを抑制している可能性が示唆された。

参考文献

1. Ohguro H, Ogawa K, Nakagawa T. Both recoverin and hsc 70 are found as autoantigens in patients with cancer-associated retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40 : 82-89.
2. Maeda A, Ohguro H, Maeda T, Kuroki Y. Low expressions of a-A crystallins and rhodopsin kinase of photoreceptors in retinal dystrophy rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40 : 2788-2794.
3. Ohguro H, Ogawa K, Maeda T, Maeda A, Maruyama I. Cancer-associated retinopathy induced by both anti-recoverin and anti-hsc70 antibodies in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40 : 3160-3167.
4. Suzuki J, Ohguro H, Oguri N, Satoh M, Kon S, Kogawa K, Nakagawa T. Clinicopathologic and immunologic analysis of mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas arising in conjunctiva. *Jan J Ophthalmol* 1999, 43 : 155-161.
5. Ohguro H, Ohguchi S. A case of retinoblastoma suspected by optic nerve invasion by MR imaging. *Tumor Res* 1999, 34 : 83-87.
6. Masaoka N, Emoto Y, Sasaoka A, Fukushima A, Ueno H, Ohguro H. Fluorescein angiographic findings in case of cancer-associated retinopathy. *Retina* 1999, 19 : 462-464.
7. Ohguro H. Retinal 33kDa protein is recognized by autoantibodies from patients with melanoma-associated retinopathy. *Tumor Res* 1999, 34 : 41-48.
8. Maeda T, Ohguro H, Maeda A, Ogawa K, Nakagawa T, Hirai I, Ito N. Identification of antigenic site within hsc 70 by serum autoantibody in patients with cancer-associated retinopathy. *Tumor Res* 1999, 34 : 49-56.
9. Maeda A, Ohguro H, Maeda T, Wada I, Sato N, Kuroki Y. Aberrant expression of photoreceptor specific calcium binding protein (recoverin) in cancer cell lines. *Cancer Res* 2000, 60 : 1914-1920.
10. Maruyama I, Ohguro H, Ikeda Y. Retinal ganglion cells recognized by serum autoantibody against g-enolase found in glaucoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, 41 : 1657-1665.
11. Maeda T, Ohguro H, Sohma H, Kuroki Y, Wada H, Okisaka S, Murakami A. Purification and characterization of bovine cone arrestin (cArr). *FEBS Lett* 2000, 470 : 336-340.