

目的

中枢神経の再生には2つの種類がある。神経細胞自体の再生と軸索の再生である。神経軸索の再生については網膜においても視神経の再生として古くから研究が行われている。一方、神経細胞の再生は変性して消失してしまった網膜内の細胞を移植によって補うという方法が考えられ、網膜色素変性患者に対して胎児網膜移植がすでに試みられている(1、review)。しかし、胎児網膜の利用は倫理的ならびに量的問題がある。そこで、胎児網膜にかわる視細胞移植の細胞源を得ることを目的として眼球組織からの視細胞分化誘導を試みた。

方法

毛様体色素上皮細胞の培養と神経分化誘導

3～4週齢DAラットの眼球を摘出し虹彩組織を単離した。虹彩組織をラミニンコートしたディッシュ上で色素上皮細胞側が下面になるようにして接着させ、塩基性線維芽細胞増殖因子を加えた無血清培地を用いて接着培養を行った。神経への分化誘導のためには、引き続き牛胎児血清を添加した培地に移行して3週間培養を継続した。

ウイルスベクターの作成と遺伝子導入

視細胞の特異的ホメオボックス遺伝子である*Crx* 遺伝子およびレポーター遺伝子である*GFP* 遺伝子を発現コスミドカセットに組み込む。相同的遺伝子組み替えを用いて、それぞれの遺伝子を発現するアデノウイルスを作成する。得られた組換えアデノウイルスは293細胞に感染させて増殖させ、塩化セシウムを用いたステップグラジエント法によってウイルスを精製する。

また、IRESを用いて*Crx* 遺伝子と*GFP* 遺伝子を共に発現するレトロウイルスベクター (CLIG-Crx) を作成し、パッケージング細胞に導入しレトロウイルスを作成した。

虹彩由来の培養細胞に対し、アデノウイルスあるいはレトロウイルスを用いて*Crx* 遺伝子を導入した。コントロールには*GFP* のみを発現するアデノあるいはレトロウイルスを用いた。また、海馬由来の神経幹細胞にも同様に*Crx* を導入した。それぞれの遺伝子を導入後神経分化条件で引き続き培養し、免疫細胞化学的解析により神経分化に与える効果を判定した。

免疫細胞化学

培養細胞は培地を吸引除去後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、スキムミルクを用いてブロッキングを行う。神経マーカーとしてニューロフィラメント200、視細胞のマーカーとしてロドプシンとリカバリンを至適倍率に希釈して反応させたのち、蛍光標識された二次抗体にて可視化させた。

結果

成体ラットの虹彩組織を塩基性線維芽細胞増殖因子存在下の無血清培地で培養すると、多くの細胞が増殖してきた。この虹彩細胞は組織から増殖して来る時には色素を持っており、虹彩色素上皮細胞と考えられた。この細胞を神経分化誘導条件下に移行させて3週間培養を続けると神経細胞のマーカーであるニューロフィラメント200を発現する細胞が観察された。しかしこの培養条件下では視細胞蛋白であるロドプシンやリカバリンを発現する細胞は全く認められなかった。

アデノウイルスベクターを用いて*Crx* を虹彩細胞に遺伝子導入し、神経分化誘導の培養条件下に移行して引き続き3週間培養を行うと視細胞特異的蛋白であるロドプシン(10.6%)や視細胞蛋白であるリカバリン(11.8%)を発現する細胞が認められた。しかし同様にコントロールの*GFP* 遺伝子を虹彩細胞に導入したときには、これらの視細胞蛋白は全く認められなかった。

アデノウイルスベクターによる*Crx* 遺伝子導入では視細胞蛋白を発現する虹彩細胞は分裂細胞由来であるのか、分裂を完了した分化細胞由来であるのかが判別できない。そこで分裂細胞にしか遺伝子導入されないレトロウイルスベクターを用いて*Crx* の遺伝子導入を試みた。レトロウイルスベクターを用いて*Crx* と*GFP* 遺伝子を同時に虹彩細胞に強制発現させると、*GFP* 陽性細胞の96%で視細胞特異的蛋白であるロドプシンの発現が検出された。一方、同様にコントロールの*GFP* 遺伝子のみを強制発現した虹彩細胞ではロドプシンの発現は全く得られなかった。

一方、アデノウイルスベクターを用いて海馬由来神経幹細胞に*Crx* を遺伝子導入し、神経分化誘導条件下に移行してもロドプシンを発現する細胞は全く得られなかった。

考案

発生時における網膜神経前駆細胞からの視細胞への分化は外的因子だけでなく、内的因子によっても制御されている。これらの内的因子のうち*Crx* は視細胞の発生と機能維持に重要な役割を示すホメオボックス遺伝子である(2)。海馬由来の神経幹細胞は網膜移植によって網膜神経類似の形態を呈する(3)にもかかわらず*Crx* に応答することができなかったのに対し、虹彩細胞は*Crx* に応答して視細胞蛋白を発現した(4)。虹彩色素上皮細胞は発生学的に神経網膜と同じ眼杯内層に由来するため、虹彩細胞のみが*Crx* に応答して視細胞蛋白を発現できるのかもしれない。

今後虹彩由来のロドプシン陽性細胞が視細胞とし

ての機能を完全に備えているかどうかを検討する必要がある。

参考文献

- 1) Lund RD, Kwan AS, Keegan DJ, Sauve Y, Coffey PJ, Lawrence JM. Cell transplantation as a treatment for retinal disease. *Prog Retin Eye Res.* 20 : 415-49 (2001).
- 2) Furukawa, T. et al. Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* 91, 531-541 (1997).
- 3) Takahashi M, Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Mol. Cell. Neurosci.* 12 : 340-8 (1998).
- 4) Haruta M, Kosaka M, Kanegae Y, Saito I, Inoue T, Kageyama R, Nishida A, Honda Y, Takahashi M. Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. *Nat Neurosci.* 4 : 1163-4 (2001).

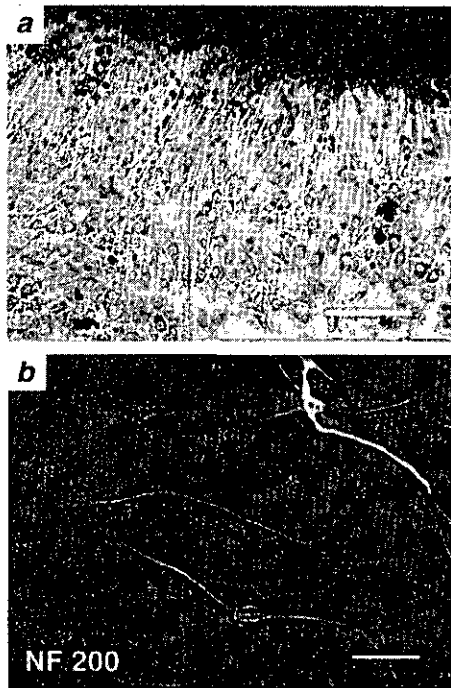


図1 成体ラット虹彩細胞の培養。(文献4より引用)
 a. 神経幹細胞と同様の条件で培養。虹彩組織(上部)から細胞が増殖している。
 b. さらに神経分化誘導条件で3週間培養後。神経細胞のマーカであるニューロフィラメント200陽性の細胞が出現する。

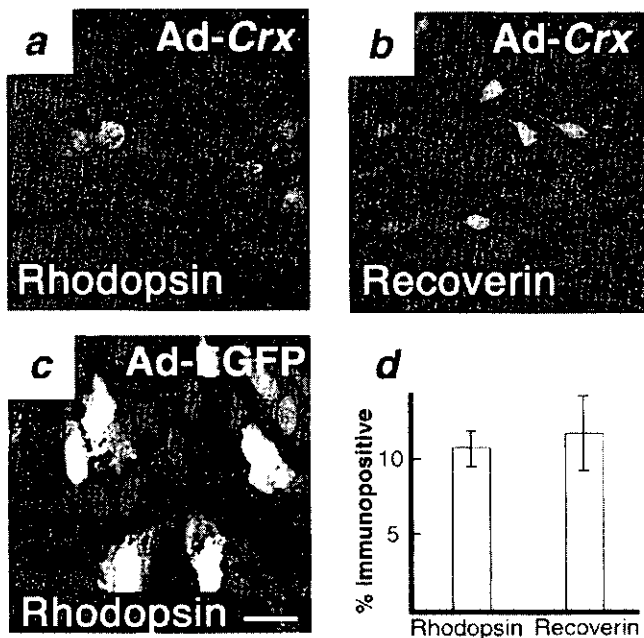


図2 成体ラット虹彩由来細胞に対するCrx遺伝子導入。(文献4より引用)
 アデノウイルスでCrxを導入後、分化誘導を行うとロドプシン(a)およびリカバリン(b)陽性細胞が出現する。GFP遺伝子の導入(c)ではロドプシン陽性細胞は認めない。
 d. ロドプシン、およびリカバリン陽性細胞率。

20010828

P. 215-218 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

- 4) Haruta M, Kosaka M, Kanegae Y, Saito I, Inoue T, Kageyama R, Nishida A, Honda Y, Takahashi M. Induction of photoreceptor - specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. Nat Neurosci. 4 : 1163 - 4 (2001).

血小板由来増殖因子による硝子体細胞の増殖・遊走能促進

Platelet-derived growth factor upregulates proliferation and migration of hyalocytes.

野田佳宏、畑 快右、中村由香、佐々山季生、
中尾新太郎、久富智朗、坂本泰三、石橋達朗
(九州大学大学院医学研究院眼科)

Yoshihiro Noda, Yasuaki Hata, uka Nakamura, Yukio Sassa,
Shintaro Nakao, Toshio Hisatomi,
Taiji Sakamoto, Tatsuro Ishibashi

(Department of ophthalmology, graduate school of medical sciences, Kyushu University)

【抄 録】

【目的】硝子体細胞の機能的解析は殆どなされていない。我々はウシより硝子体細胞を分離・培養し、血小板由来増殖因子 (PDGF) がその増殖・遊走能に与える影響について検討した。

【方法】報告に従い、免疫細胞学的に硝子体細胞を同定した。硝子体細胞をPDGF-BBで刺激し、PDGF受容体の発現およびリン酸化をwestern blotにて解析した。増殖能はサイミジン取り込み、遊走能はBoyden chamber法にて評価した。さらに細胞内シグナル伝達についても検討を加えた。

【結果】硝子体細胞はPDGF受容体 α 、 β をともに発現しており、いずれもPDGF-BB刺激により速やかにリン酸化された。PDGF-BBは硝子体細胞の増殖能・遊走能を濃度依存性に促進した。PDGF依存性増殖はMEK 1 阻害でほぼ完全に、遊走はPI 3 K阻害、p38MAPK阻害でそれぞれ約50%抑制された。

【結論】PDGF-BBは硝子体細胞に対して、異なる細胞内シグナル伝達を介して増殖および遊走能を促進する。糖尿病網膜症、加齢黄斑変性などで、PDGF濃度が上昇する部位へ硝子体細胞が増殖・遊走し、病態を修飾する可能性が示唆された。

Abstract

【**Object**】 Hyalocytes studied scantily. We isolated and cultured bovine hyalocytes, and investigated whether platelet-derived growth factor (PDGF) upregulates proliferation and migration of hyalocytes.

【**Method**】 We isolated hyalocytes immunohistologically as preliminary report. We investigated the expression and phosphorylation of PDGF receptor by means of western blot using hyalocytes stimulated by PDGF-BB. We also investigated the proliferation and migration of hyalocytes by means of thymidine uptake and Boyden chamber assay. Furthermore, we investigated signal transduction with the use of various inhibitors.

【**Result**】 Hyalocytes expressed PDGF receptor both α and β , which were rapidly phosphorylated by PDGF-BB. It promoted the function of proliferation and migration concentration-dependently. Proliferation induced by PDGF was completely inhibited by MEK 1 inhibitor, and migration was approximately halved by PI 3 K inhibitor and p38MAPK inhibitor.

【**Conclusion**】 PDGF-BB promote proliferation and migration of bovine hyalocytes by another signal transduction. Hyalocytes will proliferate, migrate, and modify the pathosis in the situation of high concentration of PDGF, for instance, about diabetic retinopathy and Age-related macular degeneration.

キーワード：硝子体細胞、血小板由来増殖因子、増殖、遊走、細胞内シグナル伝達

Key words : hyalocyte, platelet-derived growth factor, proliferation, migration, signal transduction

【緒言】

血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor: PDGF) は糖尿病網膜症、加齢黄斑変性など、網膜・硝子体出血を来す病態で高値となり¹⁾²⁾、各種細胞の増殖、遊走、生理活性物質の発現などに影響するほか、発生、分化など多様な働きをすることで知られている³⁾。

硝子体中には通常細胞成分はほとんどなく、後極にマクロファージ系の細胞がわずかに認められる⁴⁾。Lazarusu らによってこの硝子体細胞は通常の組織マクロファージとは異なり、硝子体独特の細胞であることが示された⁵⁾。硝子体細胞は網膜色素細胞や、血管内皮の増殖を抑制する^{6) 7) 8)} ことが知られているが、硝子体細胞の機能については殆ど研究がされていない。我々はウシより硝子体細胞を分離、培養し、PDGF による増殖、遊走能の変化について検討した。

【方法】

分離・培養

Lazarusu の報告^{5) 7)} をもとに少しの修正を加え、ウシの硝子体細胞を分離、培養した。(Fig 1) 培養液にはウシ血清を20%混入した DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) を用い、シャーレには fibronectin をコートしたものをを用いた。

PDGF受容体の発現およびリン酸化

硝子体細胞を PDGF-BB10ng/ml で刺激し、0分(刺激なし)、2分、5分、15分、30分、60分後に細胞を回収した。可溶性蛋白よりPDGF受容体 α 、 β のポリクローナル抗体を用いて免疫沈降し、Western blot を用いて PDGF 受容体の発現およびリン酸化を評価した。

増殖能

硝子体細胞を PDGF-BB 0, 0.1, 1, 10 ng/ml の濃度で刺激し、3日でラベルした thymidine の取り込みにて増殖能を評価した。また Mitogen/extracellular signal-regulated kinase 1 (MEK 1) 阻害剤 (PD98059: 50 μ M)、phosphatidylinositol 3 kinase (PI 3 K) 阻害剤 (wortmannin: 100nM)、を用いて PDGF-BB 依存性増殖を抑制効果についても検討した。各種阻害剤は PDGF を加える 1 時間前に加えた。

遊走能

硝子体細胞を PDGF-BB 0, 1, 10 ng/ml の濃度で刺激し、Boyden chamber 法を用いて走化性・遊走能を評価した。MEK 1 阻害剤 (PD98059: 20 μ M)、遊走は PI 3 K 阻害剤 (wortmannin: 100nM、

LY294002: 20 μ M)、p38MAPK (mitogen activated protein kinase) 阻害剤 (SB203580: 10 μ M) を用いて PDGF-BB 依存性遊走の抑制についても検討した。各種阻害剤は PDGF を加える 10 分前より加えた。

【結果】

PDGF受容体の発現およびリン酸化

PDGF 受容体は α 、 β ともに発現していた。PDGF 受容体 α は PDGF-BB により 5 分をピークとしてリン酸化された。PDGF 受容体 β は速やかにリン酸化され、2 分後には著明なリン酸化を確認した。(Fig 2)

増殖能

硝子体細胞は PDGF-BB 濃度依存性の増殖能を示した。(Fig 3) MEK 1 阻害剤により増殖はほぼ抑制されたが、PI 3 K 阻害剤では抑制は見られなかった。(Fig 4)

遊走能

硝子体細胞は PDGF-BB 濃度依存性の遊走能を示した。MEK 1 阻害剤により遊走能は抑制されなかったが、PI 3 K 阻害剤、p38MAPK ではそれぞれ約 50% 抑制された (Fig 5, 6)

【考察】

血小板由来増殖因子、PDGF は血小板 α 顆粒中に主に存在し、血管内皮細胞、線維芽細胞などの増殖、遊走など創傷治癒に大きく関わるほか、発生段階において分化誘導など多くの生理活性を持っている³⁾。また、血小板だけでなく、マクロファージなど多くの細胞で PDGF が合成、分泌されている。眼科領域においても網膜のグリア細胞⁹⁾、網膜色素上皮¹⁰⁾ や網膜血管内皮¹¹⁾ の増殖・遊走に促進的に作用することが知られている。また糖尿病網膜症、増殖硝子体網膜症、加齢黄斑変性においても局所において PDGF 濃度が上昇している^{2) 12)}。

硝子体細胞の機能については、網膜色素上皮、血管内皮細胞の増殖を抑制するという報告があるが^{6) 7) 8)}、硝子体細胞の機能の全容は未だ不明である。加齢黄斑変性患者の硝子体中にステロイド徐放剤の投与が試みられ¹⁵⁾、また硝子体手術が日常的に行われるようになった現在、硝子体の病態生理および手術をはじめとした治療の作用機序の解明が急務である。今回の我々の実験では、硝子体細胞は PDGF-BB に反応して増殖能、遊走能が亢進した。また増殖能、遊走能はそれぞれ異なった細胞内シグナル伝達に依ることが示された。即ち、増殖には p44/42MAPK、遊走能には PI 3 K、p38MAPK のカ

スケードにより PDGF 刺激に応答する。

このことから糖尿病網膜症、加齢黄斑変性、硝子体出血等、生体内の PDGF 濃度上昇に対し硝子体細胞が集簇、増殖していることが予想され、またその病態を修飾する可能性が示唆された。

硝子体細胞の機能、硝子体の病態生理には未知の領域が多く残っており、解明にはなお多くの実験が必要である。

引用文献

1. Freyberger H, Brocker M, Yakut H, Hammer J, Effert R, Schifferdecker E, Schatz H, Derwahl M. Increased levels of platelet-derived growth factor in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2000 ; 108 : 106-109.
2. Ren G, Fuse N, Abe T, Tamai M. mRNA expression of proto-oncogenes and platelet-derived growth factor in proliferative vitreoretinal diseases. *Jpn J Ophthalmol*. 2000 May - Jun ; 44 : 308 - 311.
3. Betsholtz C, Karlsson L, Lindahl P. Developmental roles of platelet-derived growth factors. *Bioessays*. 2001 ; 23 : 494-507.
4. Szirmai JA, Balas EA. Studies on the structure of the vitreous. III. Cells in the cortical layer. *Arch. Ophthalmol*. 1958 ; 59 : 34-38
5. Lazarus HS, Hageman GS. In situ characterization of the human hyalocyte. *Arch Ophthalmol*. 1994 ; 112 : 1356-1362.
6. Schonfeld CL. Hyalocytes inhibit retinal pigment epithelium cell proliferation in vitro. *Ger J Ophthalmol*. 1996 Jul ; 5 : 224-228.
7. Lazarus HS, Schoenfeld CL, Fekrat S, et al. Hyalocytes synthesize and secrete inhibitors of retinal pigment epithelial cell proliferation in vitro. *Arch Ophthalmol*. 1996 Jun ; 114 : 731-736.
8. Zhu M, Penfold PL, Madigan MC, Billson FA. Effect of human vitreous and hyalocyte-derived factors on vascular endothelial cell growth. *Aust N Z J Ophthalmol*. 1997 ; 25 Suppl 1 : S57 - 60.
9. Uchihori Y, Puro DG. Mitogenic and chemotactic effects of platelet-derived growth factor on human retinal glial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991 ; 32 : 2689 - 2695
10. Leschey KH, Hackett SF, Singer JH, et al. Growth factor responsiveness of human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis*

Sci 1990 ; 31 : 839-846

11. Koyama N, Watanabe S, Tezuka M, et al. Migratory and proliferative effect of platelet-derived growth factor in rabbit retinal endothelial cells : evidence of an autocrine pathway of platelet-derived growth factor. *J Cell Physiol* 1994 ; 158 : 1 - 6
12. Cassidy L, Barry P, Shaw C, et al. Platelet derived growth factor and fibroblast growth factor basic levels in the vitreous of patients with vitreoretinal disorders. *Br J Ophthalmol*. 1998 ; 82 : 181-185.
13. Penfold PL, Wong JG, Gyory J, et al. Effects of triamcinolone acetonide on microglial morphology and quantitative expression of MHC-II in exudative age-related macular degeneration. *Clin Experiment Ophthalmol* 2001 ; 29 : 188-192

Figure Legend

Figure 1 硝子体細胞の光学位相差顕微鏡写真
硝子体細胞は多様な形態であった。

Figure 2 PDGF受容体発現およびリン酸化
PDGF受容体 α は 5 分をピークにリン酸化され、
PDGF受容体 β は 2 分で著名なリン酸化を確認した。

Figure 3 PDGF濃度依存性増殖能
硝子体細胞はPDGF濃度依存性にthymidineを取り込んだ。

Figure 4 各薬剤による硝子体細胞の増殖能阻害
MEK 1 阻害剤 (PD98059) によりPDGF依存性増殖はほぼ完全に抑制されたが、PI 3 K阻害剤であるWortmanninでは抑制されなかった。

Figure 5 Boyden's chamber membrane の光学顕微鏡写真 (ギムザ染色) A : PDGF (-) , B : PDGF (+)
PDGF (-) に比してPDGF (+) では遊走した硝子体細胞が著名に増加していた。膜の孔の直径は 8 μ m である。

Figure 6 遊走能
硝子体細胞はPDGF濃度依存性の遊走能を示した。
MEK 1 阻害剤 (PD) ではPDGF依存性遊走は抑制されなかったが、PI 3 K阻害剤 (Wm, LY) およびp38MAPK阻害剤 (SB) では抑制された。

Fig 1A

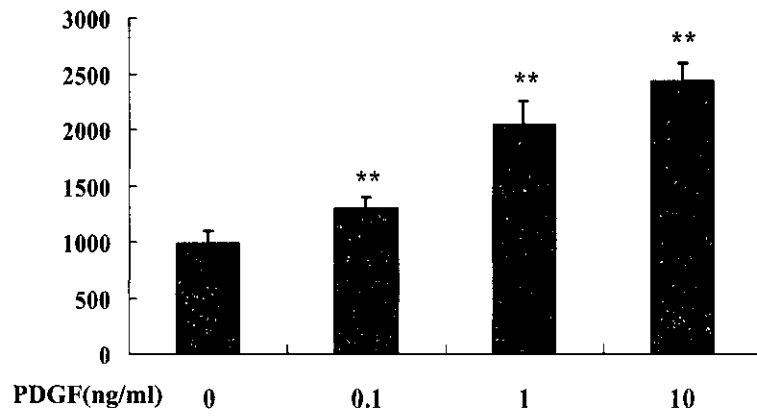


Fig 1B

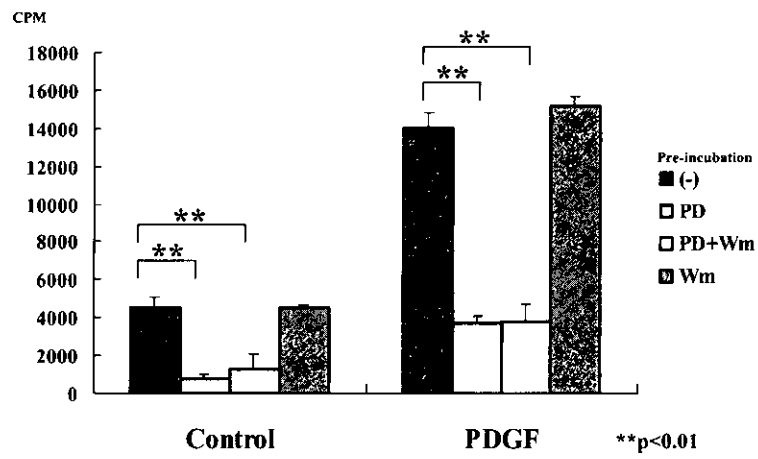
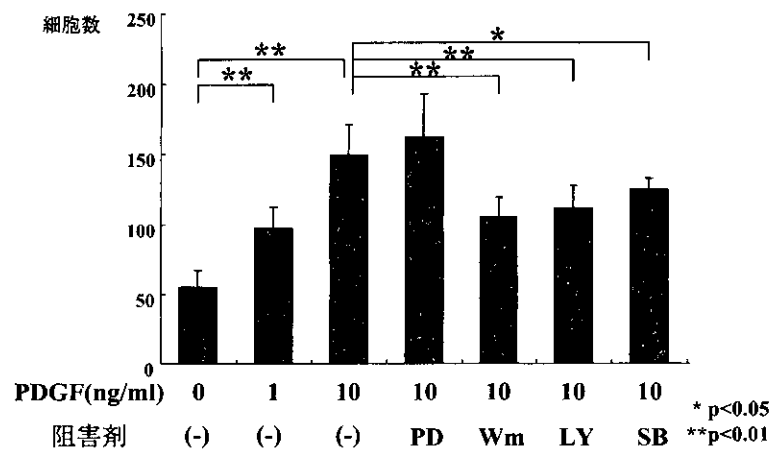


Fig 2



実験的脈絡膜新生血管における Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF) と 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の発現

Expression of Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF) and Vascular
Endothelial Growth Factor in Experimental Choroidal Neovascularization

緒方奈保子、尾辻 剛、和田 光正、城 信雄、松村 美代
(関西医大眼科)

Nahoko Ogata, Tsuyoshi Otsuji, Mitumasa Wada, Nobuo Jo, Miyo Matsumura
(Department of Ophthalmology, Kansai Medical University)

【抄 録】

目的: Pigment epithelium derived factor (PEDF) は神経保護因子であり、また強力な血管新生抑制因子である。我々は実験的脈絡膜新生血管において PEDF および血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の発現を検討する。

方法: 正常ラット眼、脈絡膜新生血管モデルにおける mRNA および蛋白の発現を検討。

結果: 正常ラット眼で PEDF は角膜、水晶体、毛様体上皮細胞、網膜色素上皮細胞、網膜神経節細胞層に発現していた。脈絡膜新生血管モデルでは早期に新生血管発生部に PEDF および VEGF は強く発現していた。その後 PEDF、VEGF とともに発現は徐々に弱まったが、2 週でも脈絡膜新生血管を覆い囲む増殖した網膜色素上皮細胞に PEDF の発現が強く見られた。

結論: 正常ラット眼において PEDF が産生され網膜の神経保護、眼内血管新生抑制に働いていると考えられる。脈絡膜血管新生の発生には VEGF などの血管新生因子と血管新生抑制因子の PEDF のバランスが関与する。

Abstract

Purpose: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is a neuroprotective factor and recent studies have implicated PEDF in activities that are inhibitory to angiogenesis. In this study, we investigated the expression of PEDF in normal rat eyes and in eyes with an experimentally-induced choroidal neovascularization and compared it to the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF).

Methods: Choroidal neovascularization was induced by laser photocoagulation in rat eyes. PEDF mRNA was investigated using in situ hybridization. Protein expression of PEDF and VEGF was studied immunohistochemically.

Results: In normal adult rat eyes, PEDF was observed mainly in the corneal epithelial and endothelial cells, lens epithelial cells, ciliary epithelial cells, retinal ganglion cells, and the RPE cells. During the development of choroidal neovascularization, PEDF and also VEGF were strongly detected within the laser lesions at 3 days after photocoagulation then gradually declined. However, PEDF was still expressed in the RPE cells that proliferated and covered the 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. Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF) 2. 血管内皮細胞増殖因子
3. 脈絡膜新生血管 4. 血管新生 5. 網膜色素上皮 6. 血管新生抑制因子
7. 血管新生因子 8. 脈絡膜新生血管モデル 9. 神経保護

Key words: 1. Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF) 2. vascular endothelial growth factor
3. choroidal neovascularization 4. angiogenesis 5. retinal pigment epithelium
6. anti-angiogenic factor 7. angiogenic factor
8. a model of choroidal neovascularization 9. neuroprotection

I. 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精製、同定された約50kDaの蛋白で、serin protease inhibitor (serpin) gene family に属す^{1, 2)}。PEDF は神経保護因子としての作用を持つことが報告されてきた。眼においても網膜の変性を防ぐことが報告されている³⁻⁸⁾。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、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⁾。また、われわれは、糖尿病網膜症患者の硝子体内 PEDF 濃度が低下していることを報告した¹¹⁾。これらの報告は、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、正常ラット眼の PEDF の発現およびラット実験的脈絡膜新生血管における PEDF の発現と VEGF の発現を検討した。

II. 実験方法

1. 有色ラット眼底片眼に強度光凝固 (100 μ m、100mW、0.1秒) を行い、実験的脈絡膜新生血管を作成。片眼は光凝固をおこなわず正常眼コントロールとした。
2. 光凝固後 3 日、1 週、2 週に経時的に眼球摘出、固定、パラフィン包埋し薄切切片を作成した。
3. PEDFmRNA の発現は、PEDFcDNA から作成したジゴキシゲニン (DIG) 標識 RNA プロンプを用い in situ hybridization 法で検討した。Hybridization の後、抗 DIG 抗体で抗体反応を行い、BCIP と NBT で mRNA 発現部位を青色に発色させた。
4. PEDF および VEGF 蛋白の発現は免疫組織学的にLSAB法で行った。PEDF は家兎抗ウシ PEDF polyclonal 抗体、VEGF は家兎抗ヒト VEGF polyclonal 抗体を一次抗体として用いた。抗体との反応のあと発色には AEC を用い、蛋白の発現部を赤色に発色させた。

III. 結果

1. 正常ラット眼の PEDF の発現。

角膜 (上皮細胞、内皮細胞) (図 1 A)、水晶体上皮細胞 (図 1 B)、毛様体上皮細胞、網膜神経節細胞、網膜内顆粒層の一部、網膜色素上皮細胞に PEDFmRNA の発現がみられた。PEDF 蛋白の発現は、角膜 (上皮細胞、内皮細胞)、水晶体上皮細胞、毛様体上皮細胞、網膜神経線維層、神

経節細胞層、網膜内網状層、網膜色素上皮にみられた (図 1 C)。

2. 実験的脈絡膜新生血管モデルでの PEDF および VEGF 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 および PEDF 蛋白の発現が強くみられた (図 2 A)。その後、脈絡膜新生血管組織の PEDF の発現は全体として弱まった。しかし、光凝固後 2 週でも、脈絡膜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 PEDF の発現が強くみられた (図 2 B)。VEGF の発現は、光凝固後 3 日 (図 3 B)、新生血管発生部の増殖した細胞に強く発現していた。その後、徐々に発現は弱まり、2 週では新生血管内皮細胞に弱く発現するのみであった (図 3 B)。

IV. 考案

正常ラット眼において PEDFmRNA は、無血管組織の角膜 (角膜上皮、内皮)、水晶体 (水晶体上皮細胞) に発現していた。また、毛様体上皮細胞、網膜神経節細胞、網膜内顆粒層の一部、網膜色素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ことから、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る。

脈絡膜新生血管モデルでは、光凝固後 3 日、新生血管発生部の増殖した細胞に PEDF および VEGF 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おおい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 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¹²⁻¹⁵⁾。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 PEDF の発現が強くみられたことから、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 : 245-252, 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, Tombran-Tink J, Nishikawa M, et al. Pigment epithelium derived factor in the vitreous is low in diabetic retinopathy and high in rhegmatogenous retinal detachment. *Am J Ophthalmol.* 2001 ; 132 : 378-382.
12. 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
13. Matsushima M, Ogata N, Takada Y, et al. FGF receptor 1 expression in experimental choroidal neovascularization. *Jpn J Ophthalmol* 40 : 329-338, 1996
14. 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
15. 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

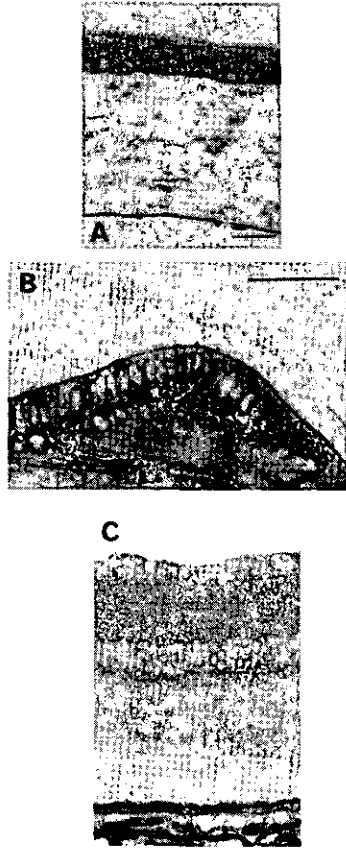


図1：正常ラット眼の PEDF の発現

- A) 角膜の PEDFmRNA の発現。antisense プローブの結果。青色の PEDFmRNA 発現が角膜上皮細胞、角膜内皮細胞にみられた。
- B) 水晶体の PEDFmRNA の発現。antisense プローブの結果。青色の PEDFmRNA 発現が水晶体上皮細胞にみられた。
- C) 網膜の PEDF 蛋白の発現。網膜神経線維層、神経節細胞層、網膜内網状層、網膜色素上皮にみられた。

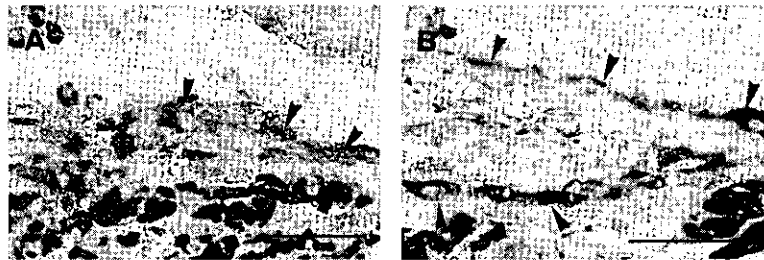


図2：実験的脈絡膜新生血管の PEDF 蛋白の発現

- A) 光凝固後 3 日。新生血管発生部の増殖した網膜色素上皮などに強く PEDF の発現がみられた (矢頭)。
- B) 光凝固後 2 週。新生血管組織内の PEDF の発現は弱まっていたが、脈絡膜新生血管を増殖しておおい囲む網膜色素上皮には PEDF の発現が比較的強くみられた (矢頭)。

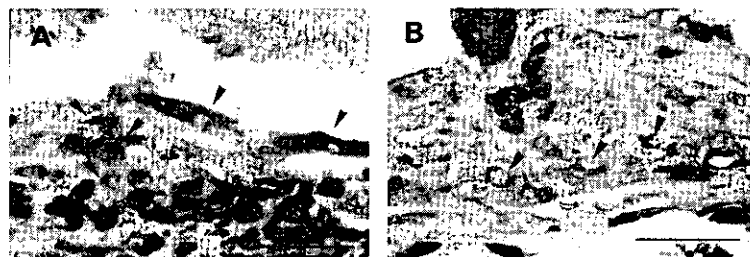


図3：実験的脈絡膜新生血管の VEGF 蛋白の発現

- A) 光凝固後 3 日。新生血管発生部の増殖した細胞に強く VEGF の発現がみられた (矢頭)。
- B) 光凝固後 2 週。新生血管組織内の VEGF の発現は弱まっており、新生血管内皮細胞に弱く発現がみられるのみであった (矢頭)。

20010828

P. 227-232 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

Ogata N, Tombran-Tink J, Nishikawa M, et al. Pigment epithelium derived factor in the vitreous is low in diabetic retinopathy and high in rhegmatogenous retinal detachment. Am J Ophthalmol. 2001 ; 132 : 378-382.

脈絡膜血管新生におけるマクロファージの役割

The role of infiltrating macrophages in developing choroidal neovascularization (CNV)

堤 千佳子、 園田康平、 石橋達朗

(九州大学大学院医学研究院眼科)

Chikako Tsutsumi, Kouhei Sonoda, Tataro Ishibashi

(Department of Ophthalmology, Graduate school of medicine, Kyushu University)

【抄 録】

【目的】 脈絡膜血管新生 (CNV) の病態形成におけるマクロファージの役割について検討した。

【方法】 C57BL/6 マウスに光凝固 (PC) を行い、実験的脈絡膜新生血管モデルを作成した。PC 後にフローサイトメトリーで眼浸潤マクロファージを調べた。また CCR2 KO マウスで CNV の形成を調べた。さらにマクロファージを Magnetic antibody cell separation (MACS) 法で分離し、背部皮下法を用いて血管新生能を、RT-PCR 法で血管新生因子の mRNA を調べた。

【結果】 PC照射マウスでは48時間後をピークとしてマクロファージが増加した。CCR2 KOマウスではPC 6日後の脈絡膜血管新生が抑制された。PC後の眼浸潤マクロファージは背部皮下法で血管新生反応を示し、VEGF, bFGF, TNF α の mRNA を発現していた。

【考察】 実験的脈絡膜血管新生で眼浸潤マクロファージは血管新生を促進する。

Abstract

PURPOSE : Our aim was to elucidate of the role of infiltrating macrophages in CNV formation.

METHODS : CNV was induced in female C57BL/6 mice by laser photocoagulation (PC). The ratio and numbers of infiltrating macrophages were analyzed by flow cytometry. Furthermore, macrophages were isolated by magnetic beads and examined angiogenetic capacity by dorsal air sac (DAS) assay and gene expression by RT-PCR. We also examined PC-induced CNV in CC chemokine receptor-2 (CCR2) knockout (KO) mice.

RESULTS : The number of infiltrating macrophages were increased with the peak of 48hours post PC and they showed angiogenetic ability in DAS assay and express the mRNA of VEGF, bFGF and TNF α . In contrast to control mice with the same genetic background, CCR2 KO mice failed to develop CNV.

CONCLUSIONS : Infiltrating macrophages are crucial for CNV generation

Key words : choroidal neovascularization (CNV), Photocoagulation, macrophage, angiogenesis, chemokine, CC chemokine receptor-2

目的

脈絡膜血管新生 (CNV) の発症原因、形成メカニズムにおける細胞動態などの病態の詳細は不明である。過去の報告から、CNV にマクロファージの関与が示唆されてきた。近年、腫瘍や創傷治癒、慢性炎症などでマクロファージが血管新生に働くことが報告されている。そこで、われわれは、実験的マウスCNVモデルを用いて CNV 形成におけるマクロファージの役割を調べた。

方法

レーザー光凝固 (PC) を 8 週齢の C57BL/6 マ

ウスの眼底に照射し実験的脈絡膜新生血管モデルを作成した。PC 後眼球摘出し、網脈絡膜の細胞を分離してフローサイトメトリーで解析した。ラット抗マウス F4/80抗体とラット抗マウス CD45に二重陽性細胞 (眼浸潤マクロファージ) の数を調べた。また MCP-1 のレセプターである CC chemokine receptor-2 (CCR2) knockout (KO) マウスで同様の実験を行った。CNV は FITC 標識の高分子デキストランをマウス心腔内に注入し、眼球摘出後、網膜を除去し、脈絡膜のフラットマウントを製作して行った。PC 後のマウス眼球から眼浸潤マクロファージ、コントロールとしてマウス肺胞洗浄液

から肺胞マクロファージを Magnetic antibody cell separation (MACS) 法で分離した。これらの両マクロファージを用いて、マウス背部皮下法により *in vivo* の血管新生能を調べた。また、RT-PCR 法で、VEGF, bFGF, TNF α の mRNA を調べた。

結果

PC後のマウス眼球では、無処置群のマウスに比べてフローサイトメトリーでマクロファージの割合が増加していた (Fig. 1A)。眼浸潤マクロファージの数は PC 後48時間でピークを示していた (Fig. 1B)。ラット抗マウス F4/80抗体を用いた免疫組織化学検索でもPC部位にマクロファージの集積がみられた (Fig. 1C)。CCR2 KO マウスでは PC 後48時間のマクロファージの眼浸潤が抑制され (Fig. 2A)、PC後6日目の CNV 形成早期の CNV 面積が抑制されていた (Fig. 2B, C)。MACS 法を用いてマクロファージを分離した (Fig. 3A)。背部皮下法において眼浸潤マクロファージ挿入マウスでは、蛇行した新生血管がみられた (Fig. 3B)。眼浸潤マクロファージは肺胞マクロファージに比べて ClassII, CD40, B7-1, B7-2 の活性化マーカーで活性化を示し (Fig. 4)、RT-PCR 法で VEGF, bFGF, TNF α の mRNA を発現していた (Fig. 5)。

考察

実験的 CNV モデルでは PC 後早期にマクロファージが浸潤する。マクロファージ浸潤に主要な役割をされるといわれるケモカインに MCP-1 がある。MCP-1 のレセプターである CCR2 の遺伝子ノックアウトマウスは発育、血液細胞は正常だが、炎症時のマクロファージの浸潤が抑制される¹⁾。今回の実験的 CNV モデルにおいて CCR2 ノックアウトマウスでは、PC 後48時間のマクロファージの眼浸潤が抑制された。また、PC 後6日目の CNV 形成早期が抑制された。このことから CNV 形成において MCP-1 の媒介する単球由来のマクロファージの浸潤がおり、それが血管新生を誘導する働きをもつことが示唆された。この眼浸潤マクロファージは活性化し、VEGF, bFGF, TNF α などの血管新生促進サイトカインを産生して CNV 形成に働くと考えられる。実験的 CNV モデルにおけるマクロファージと VEGF の関係は Ishibashi ら、Yi らが報告している^{2, 3)}。今回のわれわれの結果はこれを裏付けるものである。一方、Oh らは摘出脈絡膜新生血管膜の解析で、CNV でのマクロファージの血管新生への促進効果を報告しているが、マクロファージでの VEGF 産生を認めていない⁴⁾。これは我々の実験結果と異なるが、これはマクロファージの解析のタイミングの違いのためと考えられる。

我々は PC 後48時間における眼浸潤マクロファージについて解析した。この時点ではマクロファージはそれ自体、活性を持ち血管新生に働くが、時間経過とともに、活性を持たない phenotype へその性質が変化したのではないかと考えられる。この光凝固による実験的 CNV モデルは網膜深層から脈絡膜にかけての傷害による創傷治癒過程での血管新生と考えられている。近年、皮膚の創傷治癒においてマクロファージの血管新生促進効果が報告されている^{5, 6)}。また、CCR2 のリガンドの MCP-1 のノックアウトマウスモデルで皮膚の創傷治癒での血管新生が阻害されたとの報告もある⁷⁾。このように、創傷治癒過程の血管新生においてもマクロファージ浸潤が促進的に関与していると考えられている。今後、マクロファージをはじめとする炎症細胞の CNV に果たす役割を解明することで、炎症細胞およびケモカイン制御による CNV 抑制の可能生が示唆される。

文献

- 1) Kurihara, T., Warr, G. Loy, J., Bravo, R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med* 186 : 1757-62, 1997
- 2) Ishibashi, T., Hata, Y., Yoshikawa, H., Nakagawa, K., Sueishi, K., Inomata, H. Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235 : 159-67, 1997
- 3) Yi, X., Ogata, N., Komada, M., Yamamoto, C., Takahashi, K., Omori, K., Uyama, M. Vascular endothelial growth factor expression in choroidal neovascularization in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235 : 313-9, 1997
- 4) Oh, H., Takagi, H., Takagi, C., Suzuma, K., Otani, A., Ishida, K., Matsumura, M., Ogura, Y., Honda, Y. The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 1891-8, 1999
- 5) Haroon, Z. A., Raleigh, J. A., Greenberg, C. S., Dewhirst, M. W. Early wound healing exhibits cytokine surge without evidence of hypoxia. *Ann Surg*, 231 : 137-47, 2000
- 6) Crowther, M., Brown, N. J., Bishop, E. T., Lewis, C. E. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol* 70 : 478-90, 2001
- 7) Low, Q. E., Drugea, I. A., Duffner, L.

A., Quinn, D. G., Cook, D. N., Rollins, B. J., Kovacs, E. J., DiPietro, L. A. Wound healing in MIP-1 α (-/-) and MCP-1 (-/-) mice. *Am J Pathol.* 159:457-63, 2001

8) Hangai, M., Murata, T., Miyawaki, N.,

Spee, C., Lim, J. I., He, S., Hinton, D. R., Ryan, S. J. Angiopoietin-1 upregulation by vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* : 42:1617-25, 2001

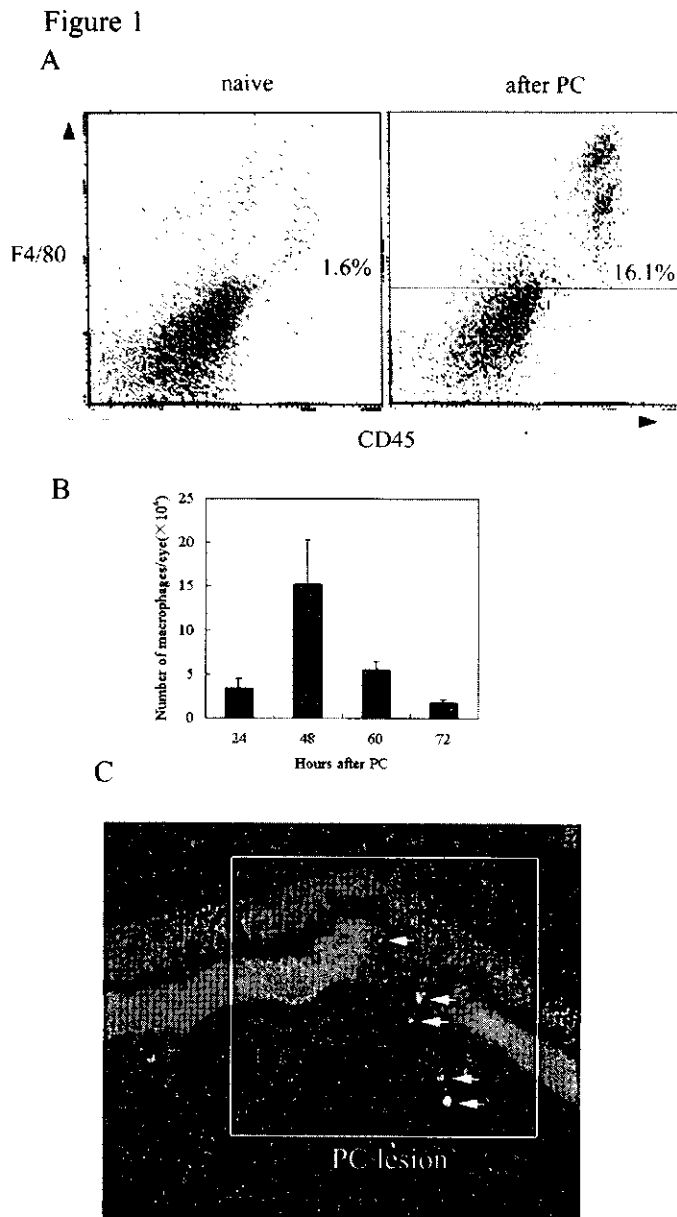


Figure 1. 光凝固後のマクロファージ浸潤

1 A. 光凝固後のマクロファージ浸潤の時間経過

光凝固後48時間をピークに眼球あたりの浸潤マクロファージ数 (CD45high and F4/80 high cells) が増加している。

1 B. 光凝固後48時間の眼球浸潤細胞のフローサイトメトリー

無処置眼 (naive) に比べて光凝固眼 (PC) ではマクロファージ (CD45high and F4/80 high cells) の割合が増加している。

1 C. 光凝固後48時間の免疫組織化学

光凝固部位にマクロファージ (F4/80 high cells) が集積している

Figure 2

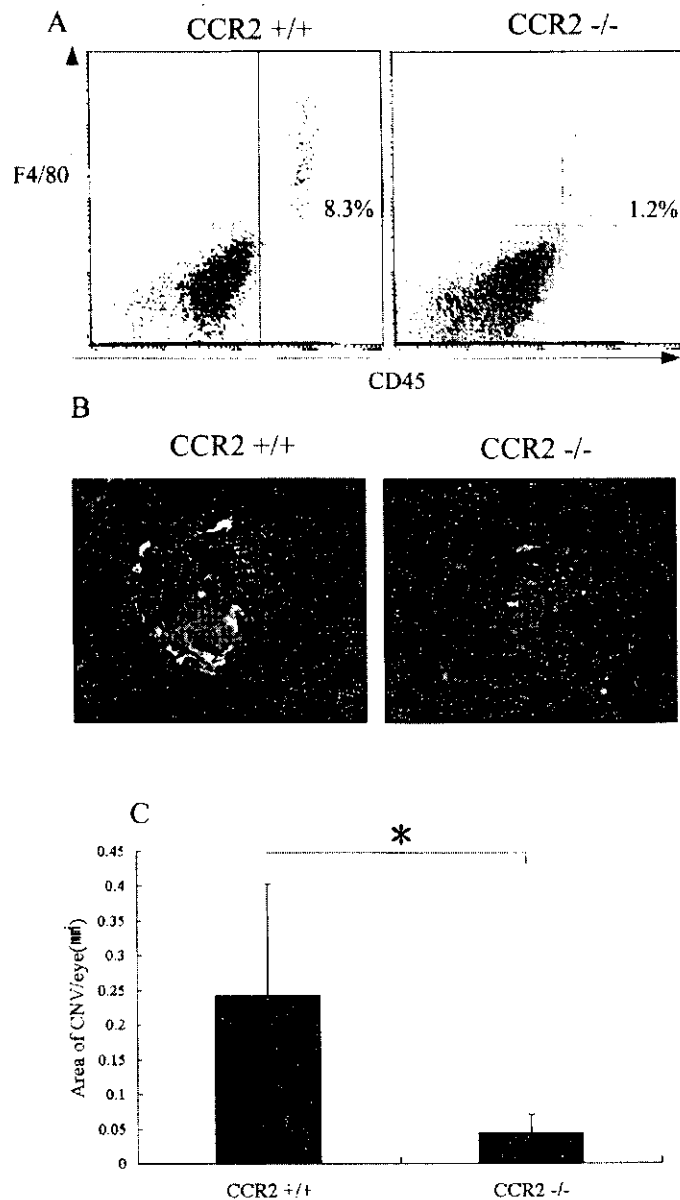


Figure 2. CCR2 ノックアウトマウスでの CNV 形成抑制

2 A. CCR2 ノックアウトマウスにおけるマクロファージ眼浸潤抑制 (光凝固後 4 8 時間後)。

フローサイトメトリー解析において、遺伝的背景が同じコントロールマウス (CCR2 control) に比べて、ノックアウトマウス (CCR2 KO) では光凝固後のマクロファージ浸潤が抑制されている。

2 B, 2 C. CCR2 ノックアウトマウスにおける CNV 形成抑制。

脈絡膜フラットマウントでノックアウトマウス (CCR2 KO) では CNV 形成 (眼球あたりの CNV 面積) が有意に抑制されている。ファージ (コントロール) を分離した。(date not shown)

3 B. マウス背部皮下法 (Dorsal air sac : DAS) によるマクロファージ血管新生能。

MACS 法で分離した眼浸潤マクロファージ (3 A) と肺胞マクロファージ、細胞保存液 (complete medium) をそれぞれフィルターチャンバーに入れ、マウス背部皮下に埋め込んだ。5 日後に背部皮膚をとりだした。眼浸潤マクロファージ挿入群では蛇行した新生血管 (矢印) がみられる。

Figure 3

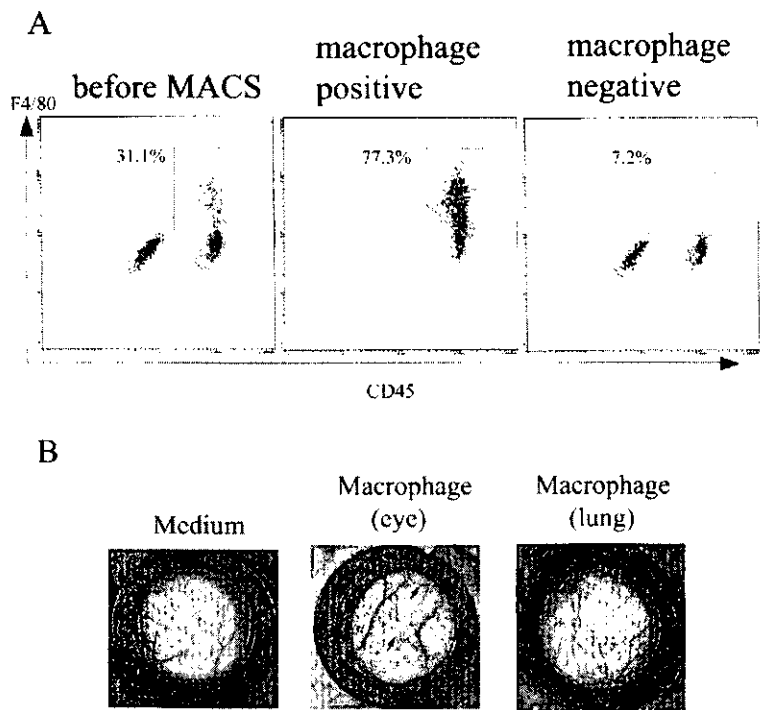


Figure3. 分離マクロファージの血管新生能

3 A. 眼浸潤マクロファージの分離 (macrophages by magnetic antibody cell separation : MACS法)。

光凝固後48時間の眼球から、ビオチン標識ラット抗マウスF4/80抗体とStreptavidin MicroBeadsを用いて眼浸潤マクロファージを分離した。

before MACS : マグネットカラムを通過させる前の眼球細胞浮遊液

macrophage positive cells : マグネットカラムに吸着された細胞群 (macrophage enrich)

macrophage negative cells : マグネットカラムを通過した細胞群 (macrophage poor)

同様に、同マウスの肺胞洗浄液より肺胞マクロファージ (コントロール) を分離した。 (date not shown)

3 B. マウス背部皮下法 (Dorsal air sac : DAS) によるマクロファージ血管新生能。

MACS法で分離した眼浸潤マクロファージ (3 A) と肺胞マクロファージ、細胞保存液 (complete medium) をそれぞれフィルターチャンバーに入れ、マウス背部皮下に埋め込んだ。5日後に背部皮膚をとりだした。眼浸潤マクロファージ挿入群では蛇行した新生血管 (矢印) がみられる。

Figure 4

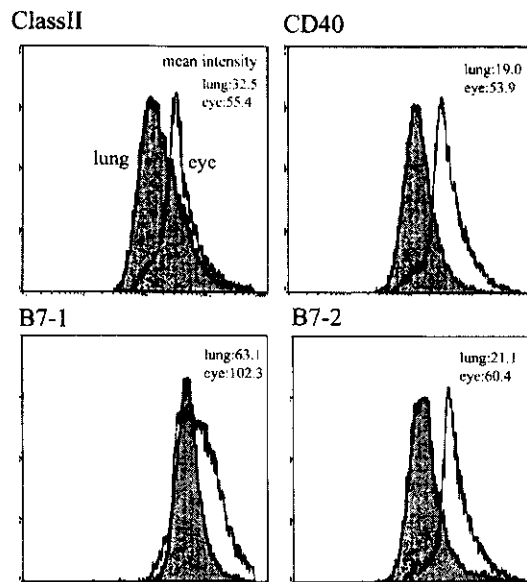


Figure4. マクロファージの活性化。

マクロファージ活性化マーカーを光凝固後48時間の眼浸潤マクロファージ、肺胞マクロファージと比較した。(フローサイトメトリー)

眼浸潤マクロファージでは MHC classII, CD40, B7-1, B7-2 の mean intensity がいずれも肺胞マクロファージに比べて高値を示している (右側にシフト)。

Figure 5

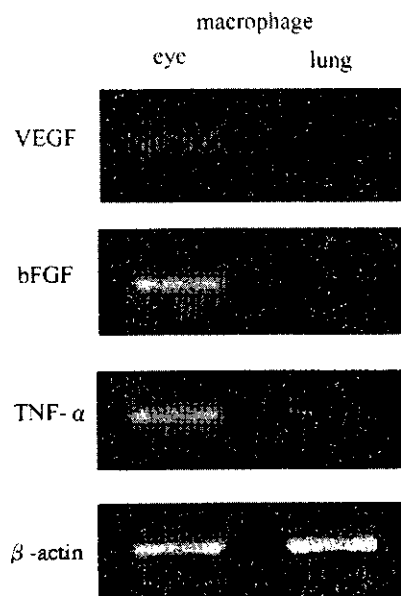


Figure5. マクロファージの血管新生因子の mRNA 発現 (RT-PCR)

MACS 法 (Fig. 3A) で分離した眼浸潤マクロファージと肺胞マクロファージの VEGF、bFGF、TNF α の mRNA 発現を調べた。眼浸潤マクロファージは VEGF、bFGF、TNF α を発現している。TNF α は肺胞マクロファージにも発現がみられたが眼マクロファージよりも発現は弱い。

加齢黄斑変性における傍・外中心窩の脈絡膜新生血管抜去術

Surgical Removal of Perifoveal and Extrafoveal Choroidal Neovascularization in Age-related Macular Degeneration

島田宏之、 三國絵梨、 森隆三郎、 根本 愛、 湯沢美都子
(日本大学医学部眼科学教室)

Hiroyuki Shimada, Eri Mikuni, Ryuzaburo Mori, Ai Nemoto, Mitsuko Yuzawa
(Department of Ophthalmology, School of Medicine, Nihon University)

【抄 録】

目的：加齢黄斑変性（AMD）における、傍中心窩、中心窩近傍の外中心窩の脈絡膜新生血管（CNV）への光凝固は、中心窩への影響が懸念されるため、CNV 抜去術の有用性を検討した。

対象と方法：傍中心窩、中心窩近傍の外中心窩の CNV 抜去術を行い、1年以上経過観察できた AMD 15眼である。手術適応は、術前視力 0.3 以下で、眼底造影で CNV の活動性があるものとした。

結果：0.4 以上の視力は、最高視力で60%、最終視力で47%であった。最高平均視力は、Gass 分類 type 2 で 0.51、type 1 + 2 で 0.51、type 1 で 0.21 であった。Type 1 + 2 と type 2 で術前中心窩網膜感度が 25dB 以上の例では、良好な術後視力が得られた。Type 1 では、抜去に伴い網膜色素上皮欠損が中心窩に生じるため視力改善が少なかった。

結論：AMD の傍中心窩、中心窩近傍の外中心窩 CNV で、type 2、type 1 + 2 のものは手術適応であり、特に術前中心窩網膜感度が 25dB 以上の例では比較的良好な術後視力が得られることから積極的な手術適応であると考えた。

Abstract

Purpose : In the treatment of age-related macular degeneration (AMD), the effect on the fovea by photocoagulation of perifoveal choroidal neovascularization (CNV) and extrafoveal CNV near the fovea has been a concern. The usefulness of surgical excision of CNV was examined.

Subjects and Methods : Fifteen eyes with AMD that underwent removal of perifoveal CNV and extrafoveal CNV near the fovea and had been followed for over one year were included in the present study. Surgical indications were preoperative visual acuity 0.3 or below and observation of CNV activity by fundus angiography.

Results : Visual acuity of 0.4 or above was obtained in 60% of the eyes for best visual acuity and 47% for final visual acuity. The mean best visual acuity was 0.51 in Gass type 2 cases, 0.51 in type 1+2, and 0.21 in type 1. Good postoperative visual acuity was obtained in type 2 and 1+2 cases with preoperative foveal retinal sensitivity of 25 dB or above. There was little improvement of visual acuity in type 1 because the retinal pigmented epithelium defect occurred at the fovea.

Conclusion : For perifoveal CNV and extrafoveal CNV near the fovea in AMD, type 2 and 1+2 cases are both indication for surgery. Especially, relatively good postoperative visual acuity was obtained in cases with preoperative foveal retinal sensitivity of 25 dB or above, and active surgical removal is indicated for these cases.

キーワード：加齢黄斑変性、脈絡膜新生血管抜去術、傍中心窩脈絡膜新生血管、
外中心窩脈絡膜新生血管、中心窩網膜感度

Key words : age-related macular degeneration, surgical removal of choroidal neovascularization, perifoveal choroidal neovascularization, extrafoveal choroidal neovascularization, foveal retinal sensitivity

目的

脈絡膜新生血管 (CNV) への光凝固は、CNV の周囲100 μm を含めて光凝固するため、CNV が傍中心窩にあれば中心窩に凝固斑が生じることがある。中心窩近傍の外中心窩に CNV がある例では、中心窩近傍に絶対暗点ができることや、中心窩側の光凝固が不十分になりやすいため、CNV の遺残、再発も懸念される。さらに、atrophic creep が生じれば、暗点の拡大、視力低下が生じる可能性がある¹⁻³⁾。そこで今回、加齢黄斑変性 (AMD) の傍中心窩、中心窩近傍の外中心窩 (傍・外中心窩) の CNV に対して抜去術を行い術後成績を検討した。

対象と方法

1998年3月～2000年4月までに駿河台日大病院で傍・外中心窩 CNV を有する AMD に対して CNV 抜去術を行い、1年以上、平均26カ月 (12～45カ月) 経過観察できた15例15眼である。年齢は50～77歳 (平均64.2歳)、男性13例13眼、女性2例2眼である。手術適応は、術前視力が0.3以下、CNV が傍中心窩および中心窩近傍の外中心窩にあり、フルオレセイン蛍光眼底造影 (FA)、インドシアニングリーン蛍光眼底造影 (IA) 検査で CNV の活動性があるものとした。手術は、白内障同時手術後に硝子体手術を行い、後部硝子体剥離の無い症例では後部硝子体剥離を作成した。高灌流圧下に、Thomas スーパーテル (ドルク社) で CNV と感覚網膜、網膜色素上皮から分離した。次に、網膜下用水平鑷子 (ドルク社) で CNV を抜去後、液-空気置換を行った。

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、Gass 分類、中心窩から CNV 辺縁までの距離、CNV 径、年齢、中心窩網膜感度との関係について検討した。Gass分類は、術前のFA、IA、光干渉断層計 (OCT) 所見から CNV を、type 1、type 1 + 2、type 2 の3群に分類した。CNV径は、FAの初期像からCNVの最長径をマイクロノギスで計測し、乳頭縦径を1500 μm として算出した。同様に、中心窩無血管域中央からCNV辺縁までの距離を計測した。中心窩網膜感度と固視点の位置は、術前後に SLO (Rodentstock 社) を用いた microperimetry 検査で行い、刺激は Goldmann に相当するものを用い、刺激の強さは 0 dB (約6.00cd/m²) から30dBまで5段階で測定した。

結果

傍中心窩 CNV は6眼、外中心窩 CNV は9眼であった。Gass 分類の結果では、type 1 が4眼、type

1 + 2 が5眼、type 2 が6眼であった。CNV 径は平均1.1乳頭径 (0.4～3.5)、中心窩中央から CNV 辺縁までの距離は、平均210 μm (120～310) であった。

術前平均視力 0.15 に対して、最高平均視力 0.41 (paired t 検定、 $P < 0.002$)、最終平均視力 0.32 (paired t 検定、 $P < 0.007$) といずれも有意に視力は改善していた (図1)。術後 0.4 以上の視力は最高視力で9眼60%、最終視力で7眼47%に得られた (図2)。Gass 分類別の術前視力と最高・最終視力は、type 1 では0.09、0.21、0.13、type 1 + 2 では0.15、0.51、0.41、type 2 では0.22、0.51、0.50であり、type 1 の最終視力は type 2 (Fisher PLSD: $p < 0.04$) や type 1 + 2 (Fisher PLSD: $p < 0.02$) より有意に不良であった (図3)。最高視力で0.4以上の視力は、type 1 で1眼、type 1 + 2 で3眼、type 2 で5眼であった。術後最高・最終 logMAR 視力と、術前 logMAR 視力、($p = 0.7$ 、 $p = 0.3$) 中心窩から CNV 辺縁までの距離 ($p = 0.7$ 、 $p = 0.8$)、CNV径 ($p = 0.8$ 、 $p = 0.8$)、年齢 ($p = 0.2$ 、 $p = 0.2$) との単相関はいずれもみられなかった。CNV 抜去時に網膜色素上皮の欠損が中心窩に及んだため、術後の固視点の網膜感度が低下した例は type 1 で3眼、type 1 + 2 で1眼、type 2 では0眼であった。Microperimetry検査では、術前の固視点は全例で中心窩にあった。Type 1 を除いたtype 2 と type 1 + 2 の11眼を対象に検討した場合、術前の網膜中心窩感度は、25dB以上の例では、25dB未満の例より有意に最高視力が良好であった (Mann-Whitney のU検定: 最高視力 $p < 0.05$ 、最終視力 $p = 0.07$ 、図4)。術中、術後の合併症はなかったが、1眼で術後10カ月に、中心窩に再発を生じたため抜去術を行った。

症例

50歳男性で中心窩鼻側の CNV に対して光凝固を行った後に、中心窩側に type 1 + 2 の傍中心窩 CNV が再発した。術前視力 0.3、CNV 径は 1.8 乳頭径で術前固視点は中心窩で感度 30dB であった。術後最高視力は 1.2 で、固視点は中心窩にみられ、感度は 30dB であった (図5)。

考按

AMD など種々の疾患に伴う傍・外中心窩 CNV に対する光凝固は有用と報告されているが、その視力予後は満足できるものではない。また、暗点の拡大、網膜色素上皮裂孔、atrophic creep などの合併症も報告されている¹⁻³⁾。そこで今回、傍・外中心窩 CNV に対して抜去術を行うことにより、より良い術後視力が得られるか否か、どのような症例を選