

厚生労働科学研究費補助金(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 H12-感覚器-002)

平成14年度 総括・分担報告書

平成15年(2003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. 顕微鏡による眼底観察像の光学的解析 Goldmann 3 面鏡型コンタクトレンズによる細隙灯顕微鏡眼底観察像の解析 野田 徹 国立病院東京医療センター 眼科	8
2. 小児・若年者の網膜疾患の視機能の研究 佐藤美保 浜松医科大学医学部 眼科	13
3. 網膜芽細胞腫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	16
4. 網膜の形成に関わる遺伝子の機能解析 東 範行 国立成育医療センター 眼科	18

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	22
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物、別刷	25
-----------------	----

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-002)

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において、眼底観察像の光学的解析評価を行った。また検査の難しい視力・屈折検査において、効率良く検査が行える方法を明らかにした。遺伝子診療としては、網膜に特異的に遺伝子を導入させる技術を開発したが、これは網膜芽細胞腫や網膜ジストロフィの治療へ応用できることが期待される。また、眼の形態形成遺伝子 PAX6 を網膜色素上皮細胞に導入してほぼ完全な層構造をもつ神経網膜を作るに成功し、exon 5a をもつ isoform が黄斑などの網膜の高度構造の形成に関与していることが示された。

分担研究者

野田 徹 国立病院東京医療センター
眼科医長
佐藤 美保 浜松医科大学眼科助教授
奥山 虎之 国立成育医療研究センター
遺伝診療科医長

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由来するが、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。第2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。本年度は、眼底観察像の光学的解析評価を行い、検査の難しい小児の視力・屈折検査方法を検討した。また遺伝子診療として、網膜に特異的に

遺伝子を導入させる技術を開発し、眼の形態形成遺伝子 PAX6 の研究では神経網膜を作り、exon 5a をもつ isoform が黄斑の形成に関わる機構を検討した。

B. 研究方法

1) 眼底観察像の光学的解析

Goldmann 3 面鏡型コンタクトレンズによる細隙灯顕微鏡で、異なる 3 波長のスポットダイアグラムおよび MTF を光線追跡法により算出し、非点収差および色収差に関する評価を行った。

2) 視機能検査に関する研究

屈折検査：

アンケート調査により屈折検査方法、検影法の習熟度を検討した。また、3 歳児健診における屈折異常者発見の程度を調査した。

網膜電図記録：

小型化した高輝度白色 LED 内臓コンタクトレンズ電極を持ち運び可能なトーマー社製 PE2000 を改造した装置を用い、桿体 ERG、錐体 ERG、背景光下で錐体 ERG、Flicker ERG を記録した。

眼底撮影：

広画角デジタル眼底カメラ Ret Cam 120 を用いて、蛍光眼底造影を行った。

3) 網膜に特異的に遺伝子を発現させるシステムの開発

Cre/loxP 遺伝子組み換えシステムに視細胞の青、赤あるいは緑オプシンを利用した組織特異的発現を可能にするウイルスベクターを作成した。マーカー遺伝子として LacZ を用いた。

これをヒト網膜芽細胞腫由来の培養細胞 WERI 細胞、およびヒト網膜芽細胞腫の摘出標本から得られた一時培養細胞に感染させ、遺伝子発

現を LacZ の活性染色で評価した。

4) PAX6 遺伝子の網膜形成に関する機能

鶏胚網膜色素上皮へ電気穿孔法で PAX6 遺伝子導入し実体顕微鏡下と病理組織で変化を検討した。また、PAX6 の isoform の発現を鶏胚各 stage の網膜組織（前部と後部）を用いた RT-PCR と、exon5a によってコードされる 14 アミノ酸に対する抗体を作成してマーマセツト網膜で免疫染色を行った。さらに、PAX6 の各 isoform を鶏胚網膜へ電気穿孔法で導入し、変化の違いを実体顕微鏡下と病理変化を検討した。

C. 研究結果および考察

1) 眼底観察像の光学的解析

Goldmann 3 面鏡型により観察される周辺部眼底観察系において、

1. 非点収差、非対称収差を含む収差の発生を伴い、観察像の質の低下を招いていると考えられた。
3. 本観察系の観察像の光学条件の補正には非対称収差のために限界があるものの、非点収差補正のみでも、観察される眼底像の質は向上することが示唆される。
2. プリズムレンズを用いた観察のような色収差の発生の影響は少ない。

これらの解析結果は、今後、硝子体手術を含めた診断、治療上必要な眼底観察条件を得るためのシステム開発、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られる。

2) 視機能検査に関する研究

屈折検査：

健診後の精密検査のために、大きな市町村であれば眼科医院を選ぶことが可能であるが、小さな市町村ではそれが不可能である。約 1/6 の眼科医院でオートレフ以外の屈折検査ができないという現状では、健診の精密健診をうけても、見逃しがおきるという危険がある。屈折検査は、眼科診療の基本であるため生涯教育として屈折検査技術の修練を積むことが必要であろう。

網膜電図：

ベッドサイドで ISCEV protocol に沿った ERG を記録して桿体機能と錐体機能を評価することが可能であるため、本装置は小児の網膜機能評価や網膜疾患と視神経疾患等の鑑別においても非常に有用であると考えられた。

眼底撮影：

広画角デジタル眼底カメラ (RetCam 120) を用いることにより、小児でも容易に蛍光眼底造影を行うことができた。デジタル画像、デジタルビデオによる連続撮影によって、過去の画像と比較検討したり、画像をその場で確認しながら的確に局所治療を行うことが可能であった。網膜芽細胞腫

の保存療法や小児網膜へのレーザー治療を行うに当たって、蛍光眼底造影は有用であると思われる。

3) 網膜に特異的に遺伝子を発現させるシステムの開発

WERI 細胞にたいして感染させると 10-20% の遺伝子導入が可能であった。さらに網膜芽細胞腫の摘出腫瘍組織に導入すると視細胞のみに LacZ の発現がみられた。マーカー遺伝子のかわりに、HSTK 遺伝子やアポトーシス関連遺伝子などを用いることにより、周辺の非腫瘍組織に障害を与えることなく網膜芽細胞腫に限局した遺伝子発現を実現できることを示しており、安全で確実な遺伝子治療への応用が期待される成績と考えられた。

4) PAX6 遺伝子の網膜形成に関する機能

眼の形態形成遺伝子 PAX6 を網膜色素上皮細胞に導入すると、ほぼ完全な層構造をもつ神経網膜を作ることができた。PAX6 は exon 5a がコードする 14 アミノ酸を余分にもつ isoform が存在するが、この機能は不明であった。黄斑低形成でみつけた変異は、この PAX6(+5a) isoform にみられたので、網膜における特徴を検討したが、その結果、鶏胚を用いた RT-PCR でも抗体を作成した免疫染色でも黄斑を中心とする網膜後極部に強く発現することが判明した。Pax6 を発生期網膜に過剰導入すると網膜細胞の密度と分化が亢進したが、その能力は PAX6(+5a)の方がはるかに顕著であり、発生後期には異所性に錐体視細胞を形成した。したがって、PAX6(+5a)は黄斑などの網膜の高度な視覚に関する網膜構造の形成に関与していることが示唆された。

D. 結論

小児・若年者の難治性網膜疾患において、眼底観察像の光学的解析評価を行った。また検査の難しい視力・屈折検査において、効率良く検査が行える方法を明らかにした。遺伝子診療で網膜に特異的に遺伝子を導入させる技術を開発し、眼の形態形成遺伝子 PAX6 を網膜色素上皮細胞に導入して神経網膜を作り、exon 5a をもつ isoform が黄斑などの網膜の高度構造の形成に関与していることを示した。

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、秋山邦彦：血管新生緑内障に対する網膜硝子体手術。眼科手術 vol.15 No.4 447-454 2002

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の観察・撮影法。眼紀 53 202-204,2002

細田ひろみ、野田 徹：真性小眼球に伴う uveal effusion に対するマイトマイシンC併用強膜開窓術。臨床眼科 56(4),613-616,2002

野田 徹：MTF, P S F. 角膜トポグラファーと波面センサー,224-229,メジカルビュー社,東京,2002

Kurokawa N, Hayashi K, Konishi M, Yamada M, Noda T, Mashima Y : Increasing Ofloxacin Resistance of Bacterial Flora from Conjunctival Sac of Preoperative Ophthalmic Patients in Japan. J J Ophthalmol 2002; 46; 586-589

Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Miyake Y, Noda T, Negishi K, Ohno K : Measurement of the single-pass MTF and simulation of the retinal image of the human eye developed Point Spread Function Analysis System., Proceeding of SPIE's Biomedical Optics 2003 of Ophthalmic technologies VIII

Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Kubotera Y, Ohnuma K, Miyake Y, Noda T, Negishi K, Ohno K : Measuring the single-pass MTF and simulating using the incoherent polarized reflection component of the human eye., Journal of Biomedical Optics(in press)

天野恵美、佐藤美保 網膜芽細胞腫の最近の治療戦略。現代医学 49 101-105 2001

佐藤美保 小児屈折検査の現状。視覚の科学 印刷中

天野恵美、佐藤美保、岡本洋子、寺崎浩子、三宅養三 広画角デジタル眼底カメラ Ret Cam 120 による蛍光眼底造影。臨床眼科 印刷中

Takahashi M, Deb NJ, Kawashita Y, Lee SW, Furgue J, Okuyama T, Roy-Chowdhury N, Bhadrasain Vikram, Jayanta Roy-Chowdhury, Guha C. A Novel strategy for in vivo expansion of transplanted hepatocytes using preparative hepatic irradiation and FasL-induced hepatocellular apoptosis. Gene Therapy (in press)

Kurosawa K, Sasaki H, Sato Y, Yamanaka M,

Shimizu M, Ito Y, Okuyama T, Matsuo M, Imaizumi K, Kuroki Y, Nishimura G Paternal UPD14 is responsible for a distinctive malformation complex. Am J Med Genet 110:268-272, 2002.

Li XK, Kosuga M, Tokieda K, Kanaji A, Fukuhara Y, Hashimoto M, Okabe K, Yaginuma H, Yamada M, Suzuki S, Okuyama T. Prolongation of transgene expression by coexpression of cytokine response modifier a in rodent liver after adenoviral gene transfer. Mol Ther 5: 262-268, 2002.

Fujino M, Li XK, Guo L, Kitazawa Y, Funeshima N, Fukuda S, Kimura H, Miyashita T, Okuyama T, Amano T Suzuki S. T-cell apoptosis triggered by FTY720 via mitochondrial pathway. Transplant Proc 33: 3084-3085, 2002.

Abe Y, Takamura M, Sawada M, Hisano M, Tsuji Y, Saikawa N, Okuyama T, Odajima Y, Fujita K, Chikaoka H, Iikura Y. Case of insertion, inversion and deletion of chromosome 6. Pediatr Int 44:530-533, 2002.

遺伝性疾患の治療：小児科学第2版、医学書院 248-251 2002年3月

Kamata Y, Tanabe A, Kanaji A, Kosuga M, Fukuhara Y, Li X-K, Suzuki S, Yamada M, Azuma N, Okuyama T. Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adenovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharoidosis. Gene Therapy 2002; in press.

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 mucopolysaccharoidosis type VII. Mol Ther 4:307-312, 2001.

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

Nishina S, Azuma N. Severe macular pucker after infantile retinal detachment surgery. Br J Ophthalmol 86:354-355, 2002.

Sano Y, Yamada J, Ishino Y, Adachi W, Kawasaki S, Suzuki T, Kinoshita S, Okuyama T, Azuma N. Non-cleavable mutant Fas ligand transfection of donor cornea abrogates ocular immune privilege. Exp Eye Res 75:475-83, 2002

Ayaki M, Ohoguro N, Azuma N, Majima Y, Yata K,

Ibaraki N, Singh DP, Ko V, Shinohara T. Detection of cytotoxic anti-LEDGF autoantibodies in atopic dermatitis. *Autoimmunity* 35:319-27,2002

Mashima Y, Suzuki Y, Sergeev Y, Ohtake Y, Tanino T, Kimura I, Miyata H, Aihara M, Tanihara H, Inatani M, Azuma N, Iwata T, Araie M. Novel cytochrome P4501B1 (CYP1B1) gene mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2211-2216, 2002

仁科幸子・新井千賀子・越後貫滋子・赤池祥子・富田 香・守田好江・千田耕基・東 範行. 乳幼児のロービジョンケアの現状と問題点ー医療機関と教育機関の共同ケアによる成果. *眼臨医* 96:37-61, 2002.

仁科幸子・越後貫滋子・赤池祥子・三井田千春・東 範行・富田 香. 視覚障害児に対する遮光レンズ選定のためのコントラストグレアテストの利用. *眼臨医* 96:395-399, 2002

東 範行. 分子生物学による疾患の解明ー眼形態形成遺伝子とその変異ー. *眼科* 44:813-821, 2002.

東 範行. 先天白内障の問題点. *日眼会誌* 106:263-264, 2002.

東 範行. 検眼鏡による視神経乳頭のみかた. *眼科診療プラクティス* 5:2-11, 2002.

東 範行. 機能弱視. *薬の知識* 53:2-4, 2002.

東 範行. 国立成育医療センター. *日本の眼科* 73:879-890, 2002.

東 範行. 見下すことによって距離を判断する. *日本の眼科* 73:225-226, 2002.

東 範行. 骨髄由来の網膜血管新生. *日本の眼科* 73:995-996, 2002.

東 範行. 分子生物学による疾患の解明. *日眼会誌増刷「20世紀における眼科学の総括」* 259-262, 2002.

2) 学会発表

野田徹、大沼一彦、福間康文、岡崎芳郎、響庭秀綱、平山典夫、大野建治、横山真介、根岸一乃: 硝子体手術におけるプリズム型コンタクトレンズによる眼底周辺部の手術用顕微鏡観察像の評価. 第106回日本眼科学会総会 2002, 仙台

大野建治、春畑裕二、林 康司、野田 徹、佐野雄太: 蛍光励起、濾過フィルターを設置した細隙灯顕微鏡を用いたフルオレセイン染色による結膜上皮障害の評価. 第26回角膜カンファランス 2002, 横浜

小林克彦、渋谷雅博、竹内楽、大沼一彦、三宅洋一、根岸一乃、野田徹: Point Spread Function 解析装置による完全矯正時及凸レンズ付加時の視力の推定. 第106回日本眼科学会総会 2002, 仙台

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: Point Spread Function 解析装置による単焦点および多焦点コンタクトレンズ挿入眼の光学特性評価. 第106回日本眼科学会総会 2002, 仙台

佐藤裕理、秋山邦彦、大野建治、林康司、野田徹、根岸一乃: 新しいアクリル眼内レンズ AR40 挿入眼の術後早期の屈折変化. 第17回日本眼内レンズ屈折手術学会 2002, 東京

大野建治、春畑裕二、野田徹、佐野雄太、根岸一乃: エキシマレーザー・アイトラッキングシステムの術後早期成績. 第17回日本眼内レンズ屈折手術学会 2002, 東京

鈴木健太郎、大沼一彦、小林克彦、根岸一乃、大野建治、野田徹: PSF 解析装置によるシングルパス MTF とコントラスト感度からの推定 MTF との比較. 第38回日本眼光学学会・第17回眼科 ME 学会合同学会, 2002, 浜松

小林克彦、渋谷雅博、窪寺裕美、大沼一彦、三宅洋一、根岸一乃、大野建治、野田 徹: 凸レンズ付加によるデフォーカス時の PSF 解析装置による推定される視力と自覚視力との比較. 第38回日本眼光学学会・第17回眼科 ME 学会合同学会, 2002

竹内楽、小林克彦、渋谷雅博、大沼一彦、三宅洋一、根岸一乃、大野建治、野田 徹: PSF 解析装置によるシングルパス MTF と光線追跡シミュレーションによる MTF との比較. 第38回日本眼光学学会・第17回眼科 ME 学会合同学会, 2002

鈴木健太郎、大沼一彦、根岸一乃、大野建治、野田 徹: 水晶体の位相分布推定方法. 第38回日本眼光学学会・第17回眼科 ME 学会合同学会, 2002, 浜松

根岸一乃、横山康弘、平松宏一、大沼一彦、小林克彦、大野建治、野田徹: PSF 解析装置による単

焦点および二重焦点ハードコンタクトレンズ装着眼の視機能評価.第 56 回臨床眼科学会 2002,福岡

野田徹、大沼一彦、福岡康文、岡崎芳郎、響庭秀綱、平山典夫、大野建治、横山真介、根岸一乃: 硝子体手術における手術用顕微鏡観察像の評価: プリズムレンズによる眼底観察像の光学的解析. 第 57 回国立病院療養所総合医学会,2002, 福岡

春畑裕二、野田徹、大沼一彦、福岡康文、岡崎芳郎、響庭秀綱、平山典夫、大野建治、横山真介、根岸一乃: 硝子体手術における眼底観察像の評価: 各種コンタクトレンズによる後極部眼的観察像の色収差. 第 57 回国立病院療養所総合医学会,2002, 福岡

桜井美晴、小林克彦、渋谷雅博、竹内楽、大沼一彦、三宅洋一、根岸一乃、野田徹: Point Spread Function 解析装置によるデフォーカス状態における他覚的視機能評価. 第 57 回国立病院療養所総合医学会,2002, 福岡

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: Point Spread Function 解析装置による単焦点および多焦点コンタクトレンズ挿入眼の他覚的視機能評価. 第 57 回国立病院療養所総合医学会,2002, 福岡

林康司、佐藤裕理、秋山邦彦、大野建治、野田徹、根岸一乃: Foldable 眼内レンズ挿入術後の屈折変化. 第 57 回国立病院療養所総合医学会,2002, 福岡

大野建治 野田 徹: 励起・濾過フィルターを設置した細隙灯顕微鏡を用いたフルオレセイン染色による眼表面の観察. 第 57 回国立病院療養所総合医学会,2002, 福岡

秋山邦彦 野田 徹: 視覚刺激による functional MRI の試み. 第 57 回国立病院療養所総合医学会,2002, 福岡

小林克彦、渋谷雅博、竹内 楽、窪寺裕美、大沼一彦、根岸一乃、大野建治、野田 徹: P S F アナライザーによる生体眼コントラスト特性の他覚的測定. 第 44 回日本交通眼科学会,2002,東京

野田 徹 大野建治、小林克彦、渋谷雅博、竹内楽、窪寺裕美、大沼一彦、根岸一乃、P S F アナライザーによる運転免許取得基準視力の他覚的評価. 第 44 回日本交通眼科学会,2002,東京

山崎重典、根岸一乃、清水里美、大野建治、野田徹: 自覚式波面収差解析装置 WFA1000 の使用経験. 第 26 回日本眼科手術学会総会 2002,京都

大野建治、春畑裕二、桜井美晴、佐藤麻紀、逸見睦子、村井徳子、野田 徹: 地域における当院での屈折矯正手術の取り組み. 第 2 回世田谷区医師会医学会 2002 11.30

Yokoyama S, Negishi K, Ohnuma K, Fukuma Y, Kitajima N, Okazaki Y, Aeba H, Hirayama N, Hayashi K, Noda T: Evaluation of the quality of peripheral fundus images observed in vitreous surgery through prism-type contact lenses using asurgical microscope. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting, 2002, Fort Lauderdale, USA

Kobayashi K, Ohnuma K, Negishi K, Ohno K, Shibutani M, Takeuchi G, Miyaka Y, Noda T: Prediction of Defocusing Visual Acuity using square-wave MTF in human eyes. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting, 2002, Fort Lauderdale, USA

Shibutani M, Ohnuma K, Negishi K, Ohno K, Kobayashi K, Kubotera Y, Miyake Y, Noda T: Prediction of Defocused visual acuity by simulated retinal images of Landolt's rings in human eyes. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting, 2002, Fort Lauderdale, USA

Negishi K, Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Hirayama N, Ohno K, Noda T: Comparison of the visual function in eyes with a monofocal with a multifocal contact lens using a new point spread function analysis system. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting, 2002, Fort Lauderdale, USA

Kaneda E, Negishi K, Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Hirayama N, Noda T: Evaluation of visual function using a new point spread function analysis system in pseudophakic eyes with aftercataract. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting, 2002, Fort Lauderdale, USA

Ohno K, Negishi K, Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Hirayama N, Noda T: Evaluation of visual function using a new point spread function analysis system in LASIK patients. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting, 2002, Fort Lauderdale, USA

Takeuchi G, Kobayashi K, Ohnuma K, Miyake Y, Negishi K, Hirayama N, Ohno K, Noda T: Comparison of Single-pass MTF using a new point spread function analysis system with MTF obtained by raytracing of lens data in the same human eye. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting, 2002, Fort Lauderdale, USA

Negishi K, Ohnuma K, Ikeda T, Noda T: Visual simulation of images through a decentered refractive multifocal IOL. 2002 Joint Meeting, American Academy of Ophthalmology and Pan-American Association of Ophthalmology, 2002, Orlando, USA

Noda T, Negishi K, Ohno K, Hirayama N, Ohnuma K: Quality of optic fundus images observed through a variety of diagnostic lenses in pseudophakic eyes. Symposium on cataract, IOL, and Refractive Surgery, 2002, Philadelphia, USA

Negishi K, Kobayashi K, Ohnuma K, Ohno K, Noda T: Clinical Applications of the new point spread function analyzer. Symposium on cataract, IOL, and Refractive Surgery, 2002, Philadelphia, USA

Negishi K, Ohnuma K, Ikeda T, Noda T: Assessment of visual images through a decentered monofocal or refractive multifocal intraocular lens using a new image simulation system. XX congress of the European Society of Cataract & Refractive Surgeons, 2002, Nice, France.

佐藤美保 小児屈折検査の現状 屈折調節研究会 2002.9.26 東京

天野恵美 佐藤美保 岡本洋子 寺崎浩子 三宅養三 網膜芽細胞腫の化学療法およびレーザー温熱化学療法前後の蛍光眼底造影所見 第26回小児眼科学会 2001 東京

上野真二 佐藤美保 谷川篤宏 鈴木聡 三宅養三 小児における高輝度LED内臓コンタクトレンズ電極を用いた桿体系と錐体系網膜電図の分離記録 第26回小児眼科学会 2001 東京

小須賀 基通, 田辺 亜希子, 佐々木 恭子, 東 範行, 松尾 宣武, 山田 正夫, 奥山 虎之 ムコ多糖症 VII 型の遺伝子治療: 生後早期のアデノウイルス全身投与による中枢神経病変の改善について. 第43回日本先天代謝異常学会, 東京, 10月19-21日, 2000.

室谷 浩二, 緒方 勤, 涌井 敬子, 福嶋 義光,

奥山 虎之, 山森 俊治 9p 上の性決定遺伝子: 6例における臨床的および分子遺伝学的解析. 日本人類遺伝学会第45回大会, 福岡, 10月25-27日, 2000.

奥山 虎之, 小須賀 基通, 山田 正夫, 鎌田 裕子, 東 範行 アデノウイルスベクターを用いたムコ多糖症 VII 型角膜病変に対する遺伝子治療. 日本人類遺伝学会第45回大会, 福岡, 10月25-27日, 2000.

田辺 亜希子, 小須賀 基通, 佐々木 恭子, 東 範行, 山田 正夫, 奥山 虎之 ムコ多糖症 VII 型の遺伝子治療: 生後早期のアデノウイルス全身投与による中枢神経病変の改善について. 日本人類遺伝学会第45回大会, 福岡, 10月25-27日, 2000.

小須賀 基通, 奥山 虎之, 佐々木 恭子, 山田 正夫, 田村 明彦, 鈴木 盛一 肝クッパー細胞の排除がアデノウイルスベクターによる肝細胞遺伝子治療に与える効果. 日本人類遺伝学会第45回大会, 福岡, 10月25-27日, 2000.

東 範行. ワークショップ 視覚進化と高等動物の視覚. 日本分子生物学会 2001年12月(横浜)

川瀬英理子・山田正夫・東 範行. Pax6 と Pax2 の相互作用. 日本分子生物学会 2001年12月(横浜)

東 範行. 小児の視覚. 東京都眼科医会 2001年12月(東京)

東 範行. 小児の視覚障害とその管理. 神奈川県眼科医会 2002年2月(横浜)

東 範行. 眼の形態形成遺伝子とその変異. 感覚器障害研究講演会 2002年2月(東京)

東 範行. 眼の形態形成遺伝子. 宮崎眼科医会 2002年2月(宮崎)

東 範行. シンポジウム「20世紀の総括」分子生物学による疾患の解明. 日本眼科学会 2002年5月(仙台)

東 範行. 講習会 小児眼科の診療「後眼部疾患」. 日本小児眼科学会 2002年4月(豊橋)

川瀬英理子・山田正夫・東 範行. Pax6 と Pax2

の相互作用. 日本小児眼科学会 2002年4月
(豊橋)

仁科幸子・東 範行・宮内 潤・金子 剛. 眼
瞼に再発を繰り返した若年性黄色肉芽腫の1例.
日本小児眼科学会 2002年4月(豊橋)

Kamata Y, Tanabe A, Kanaji A, Kosuga M, Fukuhara
Y, Li X-K, Suzuki S, Yamada M, Azuma N, Okuyana
T. Long-term normalization in the central nervous
system, ocular manifestations, and skeletal
deformities by a single systemic adovirus injection
into neonatal mice with mucopolysaccharoidosis.
米国遺伝子治療学会 2002年6月(ボストン)

東 範行. シンポジウム 眼の形態形成遺伝子
の機能と眼先天異常における変異. 日本先天異
常学会 2002年6月(宮崎)

東 範行. 電子カルテ. Japan Macula Club 2002
年8月(蒲郡)

東 範行. 小児の視覚障害とその管理. 信州眼
科医会 2002年9月(松本)

東 範行. 電子カルテ. 日本臨床眼科学会
2002年9月(盛岡)

東 範行. 生涯教育講習会 乳幼児の集団検診.
日本臨床眼科学会 2002年9月(盛岡)

川瀬英理子・山田正夫・東 範行. 視神経先天
異常におけるPAX6遺伝子の変異. 日本臨床眼

科学会 2002年9月(盛岡)

野田英一郎・仁科幸子・東 範行. 小角膜を伴
う両眼先天白内障の手術成績. 日本臨床眼科
学会 2002年9月(盛岡)

仁科幸子・東 範行. 乳幼児における遮断弱視
の治療経過. 日本臨床眼科学会 2002年9月(盛
岡)

鎌田裕子・仁科幸子・川瀬英理子・高本紀子・東
範行・河村益徳. 眼科診療における電子カルテ
運用のためのデータファイリングシステムの効
用. 日本臨床眼科学会 2002年9月(盛岡)

綾木 雅彦・大黒伸行・末野利治・東 範行・馬
嶋清如・他:アトピー性皮膚炎患者では水晶体上
皮細胞由来の自己抗体が高い. 日本臨床眼科
学会 2002年9月(盛岡)

仁科幸子・野田英一郎・東 範行. 重複障害児
における両眼先天・発達白内障術後のハビリテー
ション. 日本ロービジョン学会 2002年10月
(仙台).

東 範行. 特別講演 眼を作るしくみ. 九州硝
子体研究会 2002年10月(宮崎)

東 範行. 眼の形成とPax6. 開放的融合研究
公開シンポジウム「ゲノム機能から個体発生を探
る」2002年10月(東京)

顕微鏡による眼底観察像の光学的解析 Goldmann 3 面鏡型コンタクトレンズによる細隙灯顕微鏡眼底観察像の解析

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
研究協力者 大沼一彦 千葉大学工学部情報画像工学科
応用情報工学講座認識情報工学分野

研究要旨：眼底観察像の光学的解析を目的とし、Goldmann 3 面鏡型コンタクトレンズを前置して周辺部眼底の観察を行った場合の観察像の光学的収差につき検討した。光学データは、LeGrand 模型眼に Goldmann 3 面鏡型コンタクトレンズを前置し、細隙灯顕微鏡を用いて観察される推定眼底像を想定し、その geometrical PSF と各波長光における geometrical MTF を光線追跡法により算出することにより、色収差および非点収差の発生状態の評価を行った。Goldmann 3 面鏡型により観察される周辺部眼底観察像には、非点収差、非対称収差を含む収差の発生を伴い、観察像の質の低下を招いていると考えられた。プリズムレンズを用いた観察のような色収差の発生の影響は少ないと考えられた。本観察系の観察像の光学条件の補正には非対称収差のために限界があるものの、非点収差補正のみでも、観察される眼底像の質は向上することが示唆される。

A. 研究目的

網膜硝子体疾患の診断、治療の基本は眼底観察にある。近年、顕微鏡を用いた詳細な眼底観察法は診断のみならず、レーザー治療、硝子体手術に応用されている。一方、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、手術および診断技術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がなされる可能性が極めて現実的となった。従って、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な開発を推進する必要があるといえる。しかし、その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、網膜硝子体疾患の眼底周辺部の観察法の中で、診断からレーザー治療を含めた技法で最も基本となる細隙灯 Goldmann 3 面鏡型コンタクトレンズを前置して細隙灯顕微鏡で周辺部眼底の観察を行った場合の光学的収差につき解析を行った。

B. 研究方法

LeGrand 模型眼に、Goldmann 3 面鏡型コンタクトレンズを前置し、細隙灯顕微鏡で観察される推

定眼底像における異なる 3 波長のスポットダイアグラムおよび MTF を光線追跡法により算出し、非点収差および色収差に関する評価を行った。解析波長は、C 線 656.27nm、e 線 546.07nm、F 線 486.13nm とし、顕微鏡の様々な観察倍率毎 (4.3x、6.3x、10.6x、16.9x、21.2x) に観察されると考えられる眼底虚像の位置において、それぞれの波長光のスポットダイアグラムと MTF を光学計算プログラム CODE V を用いて算出した。

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 模型眼、眼内レンズは代表的形状の 20D PMMA 素材の両凸型眼内レンズ、細隙灯顕微鏡は TOPCON 社 SL7S (東京)、前置するコンタクトレンズは、代表的な形状 (反射鏡角度: 67°) および素材 (PMMA) の Goldmann 3 面鏡型コンタクトレンズの各光学的条件を想定してシミュレーションを行った。可変円柱レンズおよび可変色分散プリズムレンズは、実際に手術に用いる顕微鏡に搭載可能なシステムを想定し、その光学データを設定した。

* 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、類液層の厚みなどの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。

*

＜倫理面への配慮＞

各種光学条件は機器の設計上のデータを用い、必要な場合は、実測して値を求め、光学計算ソフト上で解析を行うものであり、倫理上の問題は無い。

C. 研究結果

Geometrical Point Spread Function (PSF) : スポットダイアグラムによる解析結果を図 1 に示した(図の横軸はフォーカス位置:右が対物レンズ方向を示す)。また、色収差の発生が少ないため、可視光の代表的波長となる e 線の Geometrical Modulation Transfer Function (MTF)プロファイルによる解析結果を 2 に示した。Goldmann 3 面鏡型により観察される周辺部眼底観察系には、非点収差、非対称収差を含む収差の発生を伴い、観察像の質の低下を招いていると考えられた。一方、プリズムレンズを用いた観察の場合に生じる色収差の影響は少ないと考えられた。

図 1 Geometrical Point Spread Function (C, e, F-line)

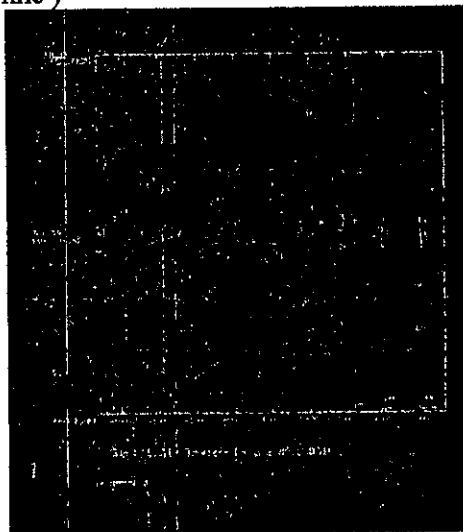
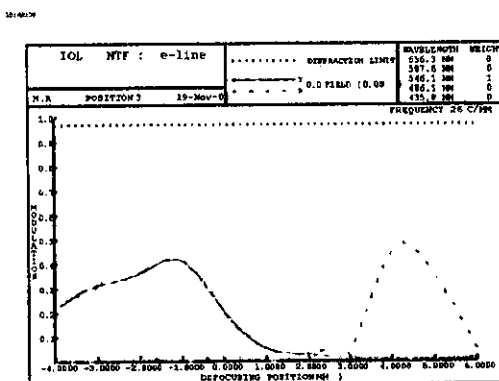


図 2 Geometrical Modulation Transfer Function (e-line)



D. 考察

近年、白内障手術における眼内レンズの有用性、安全性は確立され、適応の拡大と共に手術件数の飛躍的な増加と手術年齢の若年化を生じている。それは即ち眼内レンズ挿入眼として長い年月を生活する人口の増加を意味し、日常診療における診断、治療のなかで眼内レンズ挿入眼占める割合は年々増加している。しかし、眼内レンズ挿入眼はその光学的条件の特殊性から、周辺部眼底の観察に困難を伴うとの問題がある。眼底周辺部は、失明に深く関わる網膜剥離などの重篤な疾患の原因病巣の発生部位であり、診断のみならず、レーザー治療、硝子体手術において、それら眼科臨床の基礎はその観察にあることから、眼内レンズ挿入眼においての周辺部眼底の詳細な観察を可能とする方法論の確立は急務であるといえる。

眼底周辺部の顕微鏡(診断およびレーザー治療においては細隙灯顕微鏡、硝子体手術においては手術顕微鏡)による主な観察法には、プリズムレンズ、凹レンズ内部に鏡を組み込んだ型のレンズ(Goldmann 3 面鏡、Tano ダブルミラーレンズ)、倒像広角型の高屈折前置レンズを用いる方法がある。今回は、網膜硝子体疾患の眼底周辺部の観察法の中で、診断からレーザー治療を含めた技法で最も基本となる細隙灯 Goldmann 3 面鏡型コンタクトレンズを前置して細隙灯顕微鏡で周辺部眼底の観察を行った場合の光学的収差につき解析を行った。

本観察系の観察像には、主に、非点収差および非対称収差を含む、いわゆる“斜め収差”の発生を伴っていることが明らかとなった。これらの結果は、実際の網膜疾患の診断、治療の現場において周辺部眼底観察を行う際に感じられる視認性の悪さの原因と考えられる。本研究で示された結果から、本観察系の光学条件の補正には非対称収差のために限界はあるものの、非点収差補正のみでも、観察される眼底像の質は向上する可能性が示唆される。

網膜硝子体疾患の診療の基本は詳細な眼底観察にあり、さまざまな眼底観察システムが開発されている。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実用段階として開発されており、手術および診断技術としての手術顕微鏡眼底観察の基本形態の革新が極めて現実的なものとなった。今後、診断、レーザー治療、硝子体手術の基礎となる眼底観察に関しては、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。

近未来的には、顕微鏡を用いた眼底観察は、レンズ光学系を介して肉眼的に行う系とCCDをはじめとする光学素子を介して画像をディスプレイに表示して観察する場合とが考えられる。前者では、光学的補正が、後者ではそれに加えてデジタル処理による画像補正が最良の観察条件を得る手法の可能性として考えられる。いずれの場合を想定しても、今回の解析結果は、今後、硝子体手術における良好な眼底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必要な情報となると考える。但し、今回の解析結果は、非点収差および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 Goldmann 3 面鏡を前置し、細隙灯顕微鏡を用いて観察した周辺部眼底観察像の光線追跡プログラムによる Geometrical PSF および Geometrical MTF プロファイル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、非点収差および色収差の発生状況のみに関するものである。

1. 非点収差、非対称収差を含む収差の発生を伴い、観察像の質の低下を招いていると考えられた。
3. 本観察系の観察像の光学条件の補正には非対称収差のために限界があるものの、非点収差補正のみでも、観察される眼底像の質は向上することが示唆される。

2. プリズムレンズを用いた観察のような色収差の発生の影響は少ない。

これらの解析結果は、今後、硝子体手術を含めた診断、治療上必要な眼底観察条件を得るためのシステム開発、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) 論文発表

1. 野田 徹、秋山邦彦：血管新生緑内障に対する網膜硝子体手術。眼科手術 vol.15 No.4 447-454 2002
2. 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の観察・撮影法。眼紀 53 202-204,2002
3. 細田ひろみ、野田 徹：真性小眼球に伴う

uveal effusion に対するマイトマイシンC併用強膜開窓術。臨床眼科 56(4),613-616,2002

4. 野田 徹：MTF, PSF. 角膜トポグラフィと波面センサー,224-229,メジカルビュー社,東京,2002
5. Kurokawa N, Hayashi K, Konishi M, Yamada M, Noda T, Mashima Y: Increasing Ofloxacin Resistance of Bacterial Flora from Conjunctival Sac of Preoperative Ophthalmic Patients in Japan. J J Ophthalmol 2002; 46; 586-589
6. Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Miyake Y, Noda T, Negishi K, Ohno K: Measurement of the single-pass MTF and simulation of the retinal image of the human eye developed Point Spread Function Analysis System., Proceeding of SPIE's Biomedical Optics 2003 of Ophthalmic technologies VIII
7. Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Kubotera Y, Ohnuma K, Miyake Y, Noda T, Negishi K, Ohno K: Measuring the single-pass MTF and simulating using the incoherent polarized reflection component of the human eye., Journal of Biomedical Optics(in press)

2) 学会発表

1. 野田徹、大沼一彦、福岡康文、岡崎芳郎、響庭秀綱、平山典夫、大野建治、横山真介、根岸一乃：硝子体手術におけるプリズム型コンタクトレンズによる眼底周辺部の手術用顕微鏡観察像の評価。第106回日本眼科学会総会 2002,仙台
2. 大野建治、春畑裕二、林 康司、野田 徹、佐野雄太：蛍光励起、濾過フィルターを設置した細隙灯顕微鏡を用いたフルオレセイン染色による結膜上皮障害の評価。第26回角膜カンファランス 2002,横浜
3. 小林克彦、渋谷雅博、竹内楽、大沼一彦、三宅洋一、根岸一乃、野田徹：Point Spread Function 解析装置による完全矯正時及凸レンズ付加時の視力の推定。第106回日本眼科学会総会 2002,仙台
4. 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：Point Spread Function 解析装置による単焦点および多焦点コンタクトレンズ挿入眼の光学特性評価。第106回日本眼科学会総会 2002,仙台
5. 佐藤裕理、秋山邦彦、大野建治、林康司、野田徹、根岸一乃：新しいアクリル眼内レンズAR40 挿入眼の術後早期の屈折変化。第17回日本眼内レンズ屈折手術学会 2002,東京
6. 大野建治、春畑裕二、野田徹、佐野雄太、根岸一乃：エキシマレーザー・アイトラッキング

- グシステムの術後早期成績.第17回日本眼内レンズ屈折手術学会 2002,東京
7. 鈴木健太郎、大沼一彦、小林克彦、根岸一乃、大野建治、野田徹: PSF 解析装置によるシングルパス MTF とコントラスト感度からの推定 MTF との比較. 第 38 回日本眼光学学会・第 17 回眼科 ME 学会合同学会,2002,浜松
 8. 小林克彦、渋谷雅博、窪寺裕美、大沼一彦、三宅洋一、根岸一乃、大野建治、野田 徹: 凸レンズ付加によるデフォーカス時の PSF 解析装置による推定される視力と自覚視力との比較, 第 38 回日本眼光学学会・第 17 回眼科 ME 学会合同学会,2002
 9. 竹内楽、小林克彦、渋谷雅博、大沼一彦、三宅洋一、根岸一乃、大野建治、野田 徹: PSF 解析装置によるシングルパス MTF と光線追跡シミュレーションによる MTF との比較, 第 38 回日本眼光学学会・第 17 回眼科 ME 学会合同学会,2002
 10. 鈴木健太郎、大沼一彦、根岸一乃、大野建治、野田 徹: 水晶体の位相分布推定方法. 第 38 回日本眼光学学会・第 17 回眼科 ME 学会合同学会,2002,浜松
 11. 根岸一乃、横山康弘、平松宏一、大沼一彦、小林克彦、大野建治、野田徹:PSF 解析装置による単焦点および二重焦点ハードコンタクトレンズ装着眼の視機能評価.第 56 回臨床眼科学会 2002,盛岡
 12. 野田徹、大沼一彦、福間康文、岡崎芳郎、響庭秀綱、平山典夫、大野建治、横山真介、根岸一乃: 硝子体手術における手術用顕微鏡観察像の評価:プリズムレンズによる眼底観察像の光学的解析. 第 57 回国立病院療養所総合医学会,2002, 福岡
 24. 春畑裕二、野田徹、大沼一彦、福間康文、岡崎芳郎、響庭秀綱、平山典夫、大野建治、横山真介、根岸一乃: 硝子体手術における眼底観察像の評価: 各種コンタクトレンズによる後極部眼的観察像の色収差. 第 57 回国立病院療養所総合医学会,2002, 福岡
 25. 桜井美晴、小林克彦、渋谷雅博、竹内楽、大沼一彦、三宅洋一、根岸一乃、野田徹: Point Spread Function 解析装置によるデフォーカス状態における他覚的視機能評価. 第 57 回国立病院療養所総合医学会,2002, 福岡
 26. 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: Point Spread Function 解析装置による単焦点および多焦点コンタクトレンズ挿入眼の他覚的視機能評価. 第 57 回国立病院療養所総合医学会,2002, 福岡
 27. 林康司、佐藤裕理、秋山邦彦、大野建治、野田徹、根岸一乃: Foldable 眼内レンズ挿入術後の屈折変化. 第 57 回国立病院療養所総合医学会,2002, 福岡
 28. 大野建治 野田 徹: 励起・濾過フィルターを設置した細隙灯顕微鏡を用いたフルオレセイン染色による眼表面の観察. 第 57 回国立病院療養所総合医学会,2002, 福岡
 29. 秋山邦彦 野田 徹: 視覚刺激による functional MRI の試み. 第 57 回国立病院療養所総合医学会,2002, 福岡
 19. 小林克彦、渋谷雅博、竹内 楽、窪寺裕美、大沼一彦、根岸一乃、大野建治、野田 徹: P S F アナライザーによる生体眼コントラスト特性の他覚的測定. 第 44 回日本交通眼科学会,2002,東京
 20. 野田 徹 大野建治、小林克彦、渋谷雅博、竹内 楽、窪寺裕美、大沼一彦、根岸一乃、: P S F アナライザーによる運転免許取得基準視力の他覚的評価. 第 44 回日本交通眼科学会,2002,東京
 21. 山崎重典、根岸一乃、清水里美、大野建治、野田徹: 自覚式波面収差解析装置 WFA1000 の使用経験. 第 26 回日本眼科手術学会総会 2002, 京都
 22. 大野建治、春畑裕二、桜井美晴、佐藤麻紀、逸見睦子、村井徳子、野田 徹: 地域における当院での屈折矯正手術の取り組み. 第 2 回世田谷区医師会医学会 2002 11.30
 23. Yokoyama S, Negishi K, Ohnuma K, Fukuma Y, Kitajima N, Okazaki Y, Aeba H, Hirayama N, Hayashi K, Noda T: Evaluation of the quality of peripheral fundus images observed in vitreous surgery through prism-type contact lenses using asurgical microscope. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting, 2002, Fort Lauderdale, USA
 24. Kobayashi K, Ohnuma K, Negishi K, Ohno K, Shibutani M, Takeuchi G, Miyaka Y, Noda T: Prediction of Defocusing Visual Acuity using square-wave MTF in human eyes. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting, 2002, Fort Lauderdale, USA
 25. Shibutani M, Ohnuma K, Negishi K, Ohno K, Kobayashi K, Kubotera Y, Miyake Y, Noda T: Prediction of Defocused visual acuity by simulated retinal images of Landolt's rings in human eyes. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting, 2002, Fort Lauderdale, USA
 26. Negishi K, Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Hirayama N, Ohno K, Noda T: Comparison of the visual function in eyes with a

- monofocal with a multifocal contact lens using a new point spread function analysis system. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting, 2002, Fort Lauderdale, USA
27. Kaneda E, Negishi K, Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Hirayama N, Noda T: Evaluation of visual function using a new point spread function analysis system in pseudophakic eyes with aftercataract. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting, 2002, Fort Lauderdale, USA
 28. Ohno K, Negishi K, Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Hirayama N, Noda T: Evaluation of visual function using a new point spread function analysis system in LASIK patients. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting, 2002, Fort Lauderdale, USA
 29. Takeuchi G, Kobayashi K, Ohnuma K, Miyake Y, Negishi K, Hirayama N, Ohno K, Noda T: Comparison of Single-pass MTF using a new point spread function analysis system with MTF obtained by raytracing of lens data in the same human eye. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting, 2002, Fort Lauderdale, USA
 30. Negishi K, Ohnuma K, Ikeda T, Noda T: Visual simulation of images through a decentered refractive multifocal IOL. 2002 Joint Meeting, American Academy of Ophthalmology and Pan-American Association of Ophthalmology, 2002, Orlando, USA
 31. Noda T, Negishi K, Ohno K, Hirayama N, Ohnuma K: Quality of optic fundus images observed through a variety of diagnostic lenses in pseudophakic eyes. Symposium on cataract, IOL, and Refractive Surgery, 2002, Philadelphia, USA
 32. Negishi K, Kobayashi K, Ohnuma K, Ohno K, Noda T: Clinical Applications of the new point spread function analyzer. Symposium on cataract, IOL, and Refractive Surgery, 2002, Philadelphia, USA
 33. Negishi K, Ohnuma K, Ikeda T, Noda T: Assessment of visual images through a decentered monofocal or refractive multifocal intraocular lens using a new image simulation system. XX congress of the European Society of Cataract & Refractive Surgeons, 2002, Nice, France.

3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

小児・若年者の網膜疾患の視機能の研究

分担研究者 佐藤美保 浜松医科大学医学部眼科助教授

研究要旨：小児・若年者の網膜疾患の視機能研究として、屈折検査方法の評価、網膜電図記録装置の開発、手持ちデジタル眼底カメラの評価を行った。据え置き型オートレフラクトメータで屈折検査ができない場合、約 17%の施設では屈折検査ができないという現状が明らかになった。我々が開発した網膜電図記録装置はベッドサイドで ISCEV protocol に沿った ERG を記録して桿体機能と錐体機能を評価することが可能であるため、小児の網膜機能評価や網膜疾患と視神経疾患等の鑑別においても非常に有用であった。また、接触型広画角デジタル眼底カメラを用いて、種々の小児網膜疾患の蛍光眼底造影を行った。本装置は習熟を必要とせず、デジタル化された画像の転送・保存も容易で広く小児眼底検査に用いることが可能であると思われた。

A. 研究目的

自覚応答のはっきりしない小児・若年者においては、網膜疾患を含むすべての眼病変で治療効果を判定することは困難である。成人のように視力検査や屈折検査は容易ではなく、眼底疾患の記録のための眼底写真撮影も容易ではない。そこで、まず、多くの眼科診療で行われている屈折検査方法を調査し、問題点を明らかにし、その解決方法を検討した。国際臨床視覚電気生理学学会（International Society of Clinical Electrophysiology of Vision 以下 ISCEV）の提唱する protocol に沿った全視野の網膜電図（以下 ERG）を手術室で全身麻酔下の小児においても簡便に記録することが可能な小型の装置を開発し、その臨床的有用性について検討した。また眼底疾患記録の方法として、デジタル化され、広画角で撮影の可能な眼底カメラを用いて、種々の小児網膜疾患にたいして蛍光眼底造影を行い、その結果を評価した。

B. 研究方法

屈折検査：

小児屈折検査の現状については、名古屋大学、浜松医科大学および関連病院、静岡県、愛知県の開業医にたいして、屈折検査装置の保有状況を郵送によるアンケートを行った。アンケートの内容は、保有する屈折検査装置、従来の据え置き型屈折検査装置で屈折検査が不可能な場合の屈折検査方法をどのようにするか、検査法にどの程度習熟しているかとした。次に、豊橋市の協力を得て、3歳児健診における屈折検査導入前後の異常者発見の程度を調査した。

網膜電図記録：

従来より小型化した高輝度白色 LED 内臓コンタ

クトレンズ電極と持ち運び可能なトーマー社製 PE2000 を改造した装置を用いた。対象は網膜に異常のない先天白内障あるいは斜視患者 5 人 10 眼、年齢 3 か月～30 か月（平均 13.8 か月）である。患者または親の同意を得た上で、手術時に全身麻酔下で散瞳させて 20 分間の暗順応後に ISCEV protocol に沿った桿体 ERG、桿体錐体 ERG、背景光下で錐体 ERG、Flicker ERG を記録した。

眼底撮影：

広画角デジタル眼底カメラ Ret Cam 120 を用いて、網膜芽細胞腫 4 例、コーツ病 3 例、網膜血管病変 1 例、家族性滲出性硝子体網膜症（FEVR）2 例の合計 10 例に 25 回の蛍光眼底造影を行った。全身麻酔下にバンガーター式あるいはバラック式開瞼器を用い、ヒドロキシメチルセルロースを十分角膜にのせ、カメラを角膜に接触させた。眼球を押さえすぎないように注意深くカメラの保持を行う医師、眼底カメラのフットペダルを踏み撮影を行う医師の 2 人で撮影を行った。フルオレセインナトリウムを静脈内投与し、デジタルビデオ撮影およびデジタルカメラ撮影を行った。あらかじめカラー眼底撮影の状態ではフォーカスを調整したのち、カメラのケーブルをカラー撮影用照明ボックスから FA 用照明ボックスに差し替えることで、造影初期から鮮明な画像を得るようにした。フルオレセインナトリウム 0.075～0.15ml/kg を静脈内投与し、投与開始と同時に時間の計測および、ビデオ撮影、デジタル画像撮影を行った。造影は初期の眼底後極部を撮影したのち、カメラの角度をかえながら全周網膜の撮影を行った。その後、一旦カメラを角膜からはずし、約 6 分後から後期像の撮影を行った。得られた画像を参考にして、症例によっては検査に引き続きレーザー光

凝固を行った。

C. 研究結果

屈折検査：

総合病院61施設中54施設(88.5%)、開業医84施設中62施設(73.8%)、合計145施設中116施設(80.0%)から回答を得られた。多くの総合病院および眼科クリニックでオートレフラクトメーターと検影法の設備を持っている。しかしその一方で、オートレフラクトメーターができないと屈折検査ができず自覚検査のみになるか、検査不能となる施設が全体の17%(1/6)見られた。検影法は安価で保有率の高い装置であるが、検査に不慣れで大変ストレスを感じる開業医が25%いるのに対し、全くストレスではないあるいは、むしろ信頼しているという医師が25%いるのは注目に値する。大学病院の医師は、眼科専門医取得者は少なくとも一回は検影法を使ったことがあるが、自信を持って使っている医師はやはり25%と少なかった。非専門医では使い方を知らない医師が多く、大学病院での指導の必要性が感じられた。一方、豊橋市で行われている眼科医によるフォトスクリーナーを用いる屈折スクリーニングの結果で注目すべきことは、これを始めた平成11年に精検者中の正常者の割合が前年の約二倍にふくれあがっていることである。これは、健診を続けることで低下しており、平成13年には24パーセントに低下している。

網膜電図：

シールドルームではない手術室においても雑音の少ない良好なERGを短時間で簡単に記憶することができた。それぞれの平均振幅、潜時は桿体ERG153.2 μ V, 114.9ms, 錐体ERG a波254.9 μ V, 10.0ms, b波358.6 μ V, 65.7ms 錐体ERG a波21.3 μ V, 14.2ms, b波57.7 μ V, 30.3ms, flicker ERG72.3 μ V, 34.2msであった。

眼底撮影：

小児の蛍光眼底造影は、全身麻酔下に天井から垂直につり下げ固定した眼底カメラや、上下左右に首が振れる手持ち眼底カメラ等を用いねばならず、これらの方法はカメラの設置、撮影技術、得られる画角の限界等の点から容易ではない。まず広画角デジタル眼底カメラの利点として、①撮影操作が比較的容易で、広画角であるため造影初期から広い範囲を観察可能、②その場で過去のカラー眼底写真や蛍光眼底画像を呼び出し、今回の所見と比較することが可能、③カラーモニターにて、カラー眼底や蛍光眼底造影をその場で複数の医師が観察可能であり、所見を見て引き続き適切な局所療法が行える、④静止画像はその場で印刷可能で、同日患者の家族や他科の医師等へ説明できる、⑤画像情報はコンピューターに保存するため

に画像の劣化がなく、保存のための場所をとらず、また今後ネットワークを通じて画像を共有することもでき、遠隔地医療の可能性が広がる、⑥動画をデジタルビデオに記録可能、などの点があげられる。特に小児に対する眼底後極部のレーザー治療においては、カラー眼底像とFA像を拡大して確認しながら行う方法が大変有用であると思われる。また欠点としては、①広画角ゆえ画像の解像度は従来のカメラに劣る、②高価、③撮影手順がやや煩雑である、④眼球に接触するため全身麻酔下でない小児には使用不可能なことがあげられた。

D. 考察

屈折検査：

眼科医が同行してもフォトスクリーナーによる屈折スクリーニングは決して容易ではない。フォトスクリーナーによる健診は欧米のほうが我が国より広く行われているようである。しかし、健診の精度については偽陽性が多いため、決して高いとは言えない。健診に視能訓練士が参加している地域では、手持ち式屈折検査装置を用いてスクリーニングを行っている地域もある。フォトスクリーナーが看護師や保健師で行っているのに対し、手持ち式屈折検査装置はやや操作が複雑なことで、価格が約二倍であることが、多くの保健所で導入することを困難にしている。検影法に習熟した視能訓練士が参加すれば費用の問題は解決されるが、技術面での努力が必要になってくる。各眼科クリニックには、据え置き型オートレフラクトメーター以外に小児用オートレフラクトメーターを整備するか、安価で有用な検影法に習熟するように訓練を受ける必要があると考えられる。

網膜電図：

ベッドサイドでISCEV protocolに沿ったERGを記録して桿体機能と錐体機能を評価することが可能であるため、本装置は小児の網膜機能評価や網膜疾患と視神経疾患等の鑑別においても非常に有用であると考えられた。

眼底撮影：

①の画質については、通常の撮影およびレーザー治療に用いるには全く問題はないと思われた。③の撮影手順であるが、カメラへのフィルターの装着、カメラのケーブルの差し替え、コンピューター上での設定の切り替え、ビデオカメラのテープの残量確認、撮影光の調整などを行わなくてはならず、確実に造影・記録できるように撮影前には指さし確認を行うようにした。FA撮影において問題となる点としては、励起光による網膜光障害

である。安全のために FA 光源での照射量は ISO 基準を参考にした。カメラが広画角であるため、網膜全周を撮影するためには 8 象限の撮影で十分であり、1 回の露光時間は早期像 3-4 分、後期像 2-3 分であった。

E. 結論

屈折検査：

健診後の精密検査のために、大きな市町村であれば眼科医院を選ぶことが可能であるが、小さな市町村ではそれが不可能である。約 1/6 の眼科医院でオートレフ以外の屈折検査ができないという現状では、健診の精密健診をうけても、見逃しがおきるという危険がある。屈折検査は、眼科診療の基本であるため生涯教育として屈折検査技術の修練を積むことが必要であろう。

網膜電図：

ベッドサイドで ISCEV protocol に沿った ERG を記録して桿体機能と錐体機能を評価することが可能であるため、本装置は小児の網膜機能評価や網膜疾患と視神経疾患等の鑑別においても非常に有用であると考えられた。

眼底撮影：

広画角デジタル眼底カメラ (RetCam 120) を用いることにより、小児でも容易に蛍光眼底造影を行うことができた。デジタル画像、デジタルビデオによる連続撮影によって、過去の画像と比較検討したり、画像をその場で確認しながら的確に局所治療を行うことが可能であった。網膜芽細胞腫の保存療法や小児網膜へのレーザー治療を行うに当たって、蛍光眼底造影は有用であると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

天野恵美、佐藤美保 網膜芽細胞腫の最近の治療戦略. 現代医学 49 101-105 2001

佐藤美保 小児屈折検査の現状. 視覚の科学 印刷中

天野恵美、佐藤美保、岡本洋子、寺崎浩子、三宅養三 広画角デジタル眼底カメラ Ret Cam 120 による蛍光眼底造影. 臨床眼科 印刷中

2. 学会発表

佐藤美保 小児屈折検査の現状 屈折調節研究会 2002.9.26 東京

天野恵美 佐藤美保 岡本洋子 寺崎浩子 三宅養三 網膜芽細胞腫の化学療法およびレーザー温熱化学療法前後の蛍光眼底造影所見 第 26 回小児眼科学会 2001 東京

上野真二 佐藤美保 谷川篤宏 鈴木聡 三宅養三 小児における高輝度 LED 内臓コンタクトレンズ電極を用いた桿体系と錐体系網膜電図の分離記録 第 26 回小児眼科学会 2001 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

網膜芽細胞腫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：研究要旨：網膜組織に特異的に遺伝子を発現させるために、オプシンのプロモーターを組み込んだアデノウイルスベクターを作成し、Cre/loxP 組み替えシステムを応用して、網膜培養細胞および網膜芽細胞腫摘出標本への遺伝子導入を検討した。培養細胞では、10-20%の細胞に遺伝子導入が可能であった。また、網膜芽細胞腫では、ロゼット細胞に特異的な遺伝子導入が可能であり、網膜芽細胞腫の遺伝子治療への応用の可能性が示された。

A. 研究目的

網膜芽細胞腫の治療として、放射線治療および手術療法が確立されているが、再発例や両眼性腫瘍においては、必ずしも満足できる治療法とはいえない。本研究では、網膜組織に特異的なプロモーターを利用した新しい遺伝子治療法の可能性について検討する。

B. 研究方法

1. Cre/loxP 遺伝子組み換えシステムを利用した組織特異的発現を可能にするウイルスベクターの開発

Cre 組み換えシステムを用いた組織特異的遺伝子発現を可能にするアデノウイルスベクターの遺伝子発現メカニズムを図 1 に示す。マーカー遺伝子である LacZ 遺伝子が発現するためには、Cre 組み換え酵素の存在が必要である。そこで、Cre 組み換え酵素が、網膜組織特異的に発現できる発現カセットを含むアデノウイルスベクター AxOPNCre を作成した。これと以前に作成した LacZ 発現ウイルス AxCALNLacZ、AxCALacZ、および組織非特異的に Cre 組み換え酵素を発現するウイルス AxCANCre を実験に供した。

2. 培養細胞への遺伝子導入実験

ヒト網膜芽細胞腫由来の培養細胞 WERI 細胞、およびヒト網膜芽細胞腫の摘出標本から得られた一時培養細胞に上記のベクターを感染させ、遺伝子発現を LacZ の活性染色で評価した。

C. 研究結果

1. WERI 細胞への遺伝子導入

WERI 細胞にたいして、AxCANCre および AxCALNLacZ を MOI を 10 で感染させたところ、60-70%の細胞が LacZ 陽性を示していた。一方、AxOPNCre と AxCALNLacZ を共感染させた場合

は、10-20%の遺伝子導入が可能であった。

2. 網膜芽細胞腫摘出標本への遺伝子導入

生後 7 か月に両眼性網膜芽細胞腫が発見され、片眼を摘出。摘出眼球より一部の腫瘍組織を切除し一次培養を行った。腫瘍は眼球内に充満し、病理ではロゼット形成を認めた。このロゼットに一致して視細胞と思われる細胞のみに LacZ の発現がみられた。

D. 考察

今回の検討により、オプシンプロモーターによる WERI 細胞への遺伝子導入が可能であり、さらにオプシンプロモーターを用いた発現システムにより網膜芽細胞腫のロゼットに局限した遺伝子発現が認められることが明らかとなった。これらの成績は、マーカー遺伝子のかわりに、HSTK 遺伝子やアポトーシス関連遺伝子などを用いることにより、周辺の非腫瘍組織に障害を与えることなく網膜芽細胞腫に局限した遺伝子発現を実現できることを示しており、安全で確実な遺伝子治療への応用が期待される成績と考えられる。

E. 結論

オプシンプロモーターを組み込んだアデノウイルスベクターによる網膜芽細胞腫の遺伝子治療の可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi M, Deb NJ, Kawashita Y, Lee SW, Furgue J, Okuyama T, Roy-Chowdhury N, Bhadrasain Vikram, Jayanta Roy-Chowdhury, Guha C. A Novel strategy for in vivo expansion of transplanted

hepatocytes using preparative hepatic irradiation and FasL-induced hepatocellular apoptosis. *Gene Therapy* (in press)

Kamata Y, Tanabe A, Kanaji A, Kosuga M, Fukuhara Y, Li XK, Suzuki S, Yamada M, Azuma N, Okuyama T. Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adenovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharidosis VII. *Gene Therapy* (in press)

Kurosawa K, Sasaki H, Sato Y, Yamanaka M, Shimizu M, Ito Y, Okuyama T, Matsuo M, Imaizumi K, Kuroki Y, Nishimura G. Paternal UPD14 is responsible for a distinctive malformation complex. *Am J Med Genet* 110:268-272, 2002.

Li XK, Kosuga M, Tokieda K, Kanaji A, Fukuhara Y, Hashimoto M, Okabe K, Yaginuma H, Yamada M, Suzuki S, Okuyama T. Prolongation of transgene expression by coexpression of cytokine response modifier a in rodent liver after adenoviral gene transfer. *Mol Ther* 5: 262-268, 2002.

Fujino M, Li XK, Guo L, Kitazawa Y, Funeshima N, Fukuda S, Kimura H, Miyashita T, Okuyama T, Amano T, Suzuki S. T-cell apoptosis triggered by FTY720 via mitochondrial pathway. *Transplant Proc* 33: 3084-3085, 2002.

Sano Y, Yamada J, Ishino Y, Adachi W, Kawasaki S, Suzuki T, Kinoshita S, Okuyama T, Azuma N. Non-cleavable mutant Fas ligand transfection of donor cornea abrogates ocular immune privilege. *Exp Eye Res* 75:475-83, 2002.

Abe Y, Takamura M, Sawada M, Hisano M, Tsuji Y, Saikawa N, Okuyama T, Odajima Y, Fujita K, Chikaoka H, Iikura Y. Case of insertion, inversion and deletion of chromosome 6. *Pediatr Int* 44:530-533, 2002.

遺伝性疾患の治療：小児科学第2版、医学書院 248-251. 2002年3月

2. 学会発表

小須賀 基通, 田辺 亜希子, 佐々木 恭子, 東 範行, 松尾 宣武, 山田 正夫, 奥山 虎之 ムコ多糖症 VII 型の遺伝子治療：生後早期のアデノウイルス全身投与による中枢神経病変の改善について. 第 43 回日本先天代謝異常学会, 東京, 10月19-21日, 2000.

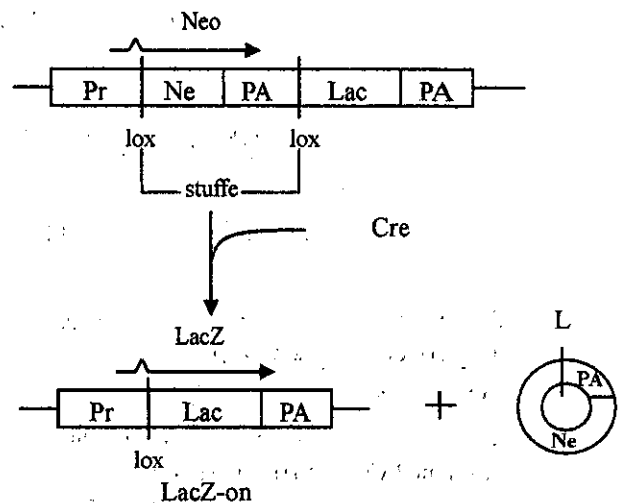


図. Cre 組み換え酵素の存在下で LacZ 遺伝子を組織特異的に発現させるための遺伝子構造。

室谷 浩二, 緒方 勤, 涌井 敬子, 福嶋 義光, 奥山 虎之, 山森 俊治 9p 上の性決定遺伝子：6 例における臨床のおよび分子遺伝学的解析. 日本人類遺伝学会第 45 回大会, 福岡, 10月25-27日, 2000.

奥山 虎之, 小須賀 基通, 山田 正夫, 鎌田 裕子, 東 範行. アデノウイルスベクターを用いた ムコ多糖症 VII 型角膜病変に対する遺伝子治療. 日本人類遺伝学会第 45 回大会, 福岡, 10月25-27日, 2000.

田辺 亜希子, 小須賀 基通, 佐々木 恭子, 東 範行, 山田 正夫, 奥山 虎之 ムコ多糖症 VII 型の遺伝子治療：生後早期のアデノウイルス全身投与による中枢神経病変の改善について. 日本人類遺伝学会第 45 回大会, 福岡, 10月25-27日, 2000.

小須賀 基通, 奥山 虎之, 佐々木 恭子, 山田 正夫, 田村 明彦, 鈴木 盛一 肝クッパー細胞の排除がアデノウイルスベクターによる肝細胞遺伝子治療に与える効果. 日本人類遺伝学会第 45 回大会, 福岡, 10月25-27日, 2000.

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

網膜の形成に関わる遺伝子の機能解析

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：眼の形態形成遺伝子 PAX6 は網膜の形成に関与している。我々は黄斑低形成で PAX6 の変異を発見し、この遺伝子が黄斑の形成にも関わっていることを示した。PAX6 を網膜色素上皮細胞に導入すると、ほぼ完全な層構造をもつ神経網膜を作ることができた。PAX6 は exon 5a がコードする 14 アミノ酸を余分にもつ isoform(PAX6(+5a))が存在するが、この isoform の機能は不明であった。黄斑低形成でみつけた変異は、この PAX6(+5a) isoform にみられたので、網膜における特徴を検討した。その結果、発生期に PAX6(+5a)が網膜後極部に強く発現することが判明した。Pax6 を発生期網膜に過剰導入すると網膜細胞の密度と分化が亢進したが、その能力は PAX6(+5a)の方がはるかに顕著であり、発生後期には異所性に錐体視細胞を形成した。したがって、PAX6(+5a)は黄斑などの網膜の高度な視覚に関する網膜構造の形成に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

PAX6遺伝子はほとんどすべての動物で眼の形成に重要な働きをしていることが知られており、網膜の形成にも重要であることが明らかになっている。ヒトでは先天無虹彩を中心にPAX6の変異がみついているが、我々は黄斑低形成でもの変異を発見し、ヒトではこの遺伝子が黄斑の形成にも関わっている可能性を示した。したがって、本年度はPAX6遺伝子の網膜形成能について検討した。

PAX6には脊椎動物以上の高等な動物では、exon 5a がコードする 14 アミノ酸を余分にもつ isoform (PAX6(+5a)) が存在する。この isoform と 14 アミノ酸をもたない PAX6(-5a)の機能の違いについては全く知られていない。しかし、黄斑低形成でみつけた変異は、PAX6(+5a) isoform が働く部位にみられたので、この isoform 網膜形成における特徴も検討した。

B. 研究方法

1) 鶏胚網膜色素上皮へのPAX6遺伝子導入

鶏受精卵を孵卵器で発生を進め、2-7 日胚の網膜色素上皮に Pax6 遺伝子を導入した。強制発現プラスミドベクター-pCAGGS にヒト PAX6 遺伝子 cDNA を組み込み、これを電気穿孔法で鶏胚に導入した。その後、孵卵器で発生を進め、10-20 胚を実体顕微鏡下と病理組織的に変化を検討した。

2) RT-PCRによる網膜形成におけるPax6の

isoformの発現

鶏胚の各stageの網膜組織（前部と後部）を摘出し、mRNAを調整した。RT-PCRでcDNAを作成し、PCRでPax6の両isoform、Pax6(-5a)とPax6(+5a)の発現量を検討した。

3) 免疫染色による網膜形成におけるPAX6の isoformの発現

PAX6のexon5aによってコードされる14アミノ酸に対するポリクローナル抗体を作成した。出生前後のコモンマーモセットの網膜で免疫染色を行った。

4) 鶏胚網膜へのPAX6遺伝子導入

鶏受精卵を孵卵器で発生を進め、2-7 日胚の網膜色素上皮に Pax6 遺伝子を導入した。強制発現プラスミドベクター-pCAGGS に PAX6(-5a)あるいは PAX6(+5a)遺伝子を組み込み、これを電気穿孔法で鶏胚に導入した。その後、孵卵器で発生を進め、10-20 日胚で実体顕微鏡下と病理変化を検討した。

C. 研究結果

1) 鶏胚網膜色素上皮へのPAX6遺伝子導入

Pax6を導入した網膜色素上皮は、実体顕微鏡下で白色となって盛り、組織は神経網膜に変化していた。多くはほぼ完全な層構造の網膜になっていたが、層の方向性はいずれも本来ある神経網膜と背あわせであった。視神経近傍で作られた神経網膜の神経線維は、視神経を通り中枢へ投射していた。この所見は導入した遺伝子PAX6(-5a)あるいは