

近年、RCS ラットに対して光障害をあたえることにより、網膜変性が抑制されるという報告がされており<sup>10)</sup>、興味深い。現在、当教室ではRCS ラットに対して種々の光刺激を加え、網膜の機能・形態の評価を行っているところである。

#### 文 献

- 1) Goldman AI, O'Brien PJ. Phagocytosis in the retinal pigment epithelium of the RCS rat. *Science*. 1976; 192:799.
- 2) Edwards RB, Szamier RB. Defective phagocytosis of isolated rod outer segments by RCS rat retinal pigment epithelium in culture. *Science*. 1977; 197: 1001.
- 3) Chaitin MH, Hall MO. Defective ingestion of rod outer segments by cultured dystrophic rat pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1983; 24: 812-820.
- 4) Nir I, Sagie G, Papermaster DS. Opsin accumulation in photoreceptor inner segment plasma membranes of dystrophic RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1987; 28: 62-69.
- 5) Mirshahi M, Thillaye B, Tarraf M, de Kozak Y, Faure JP. Light-induced changes in S-antigen (arrestin) localization in retinal photoreceptors: differences between rods and cones and defective process in RCS rat retinal dystrophy. *Eur J Cell Biol*. 1994; 63: 61-67.
- 6) Clarke IS, Dzialoszynski T, Sanford SE, Trevithick JR. A possible relationship between cataract, increased levels of the major heat shock protein HSP 70 and decreased levels of S-antigen in the retina of the RCS rat. *Exp Eye Res*. 1991; 53: 545-548.
- 7) Kawamura S. Rhodopsin phosphorylation as a mechanism of cyclic GMP phosphodiesterase regulation by S-modulin. *Nature*. 1991; 362: 855-857.
- 8) Frasson M, Sahel JA, Fabre M, Simonutti M, Dreyfus H, Picaud S. Retinitis pigmentosa: rod photoreceptor rescue by a calcium-channel blocker in the rd mouse. *Nature Med*. 1999; 5: 1183-1187.
9. Imai J, Omata K, Kamizuki M, et al. Antihypertensive effects of nilvadipine determined by ambulatory blood pressure monitoring. *Ther Res*. 1996; 17: 1847-1856.
- 10) Ohtsuka M, Ono T, Hirai J, Esumi K, Kikuchi H, Kumada S. Comparison of the cardiovascular effect of FR34235, a new dihydropyridine, with other calcium antagonists. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1983; 5: 1074-1082.
- 11) Tomita K, Araie M, Tamaki Y, Nagahara M, Sugiyama T. Effects of nilvadipine, a calcium antagonist, on rabbit ocular circulation and optic nerve head circulation in NTG subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999; 40: 1144-1151.
- 12) Kitazawa Y, Shirai H, Go FJ. The effect of Ca<sup>2+</sup>-antagonist on visual field in low-tension glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1989; 27: 408-412.
- 13) Sawada A, Kitazawa Y, Yamamoto T, Okabe I, Ichien K. Prevention of visual field defect progression with brovincamine in eyes with normal-tension glaucoma. *Ophthalmology*. 1996; 103: 283-288.
- 14) Izbak Nir, Joseph M. Harrison, Changdong Liu, and Rong Wen. Extended Photoreceptor Viability by Light Stress in the RCS Ratts but not in the Opsin P23H Rats. . *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42: 842-849.

# アポトーシスを起こした視細胞の処理機構と網膜保護

Clearance of apoptotic photoreceptors and protection for retinal function

久富智朗<sup>1</sup>、坂本泰二<sup>2</sup>、園田康平<sup>1</sup>、堤千佳子<sup>1</sup>、喬 紅<sup>1</sup>、石橋達朗<sup>1</sup>  
九州大学大学院医学研究院眼科学<sup>1</sup>、鹿児島大学眼科学<sup>2</sup>

Toshio Hisatomi<sup>1</sup>, Taiji Sakamoto<sup>2</sup>, Koh-hei Sonoda<sup>1</sup>,  
Chikako Tsutsumi<sup>1</sup>, Hong Qiao<sup>1</sup>, Tatsuro Ishibashi<sup>1</sup>,

1 : Department of Ophthalmology, Graduate school of Medical Sciences, Kyushu University,

2 : Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine,

## 【抄録】

目的：今回視細胞にアポトーシスを生じる網膜剥離モデルを用いてこれらの処理過程を検討した。

方法：網膜剥離は麻酔後、経強膜的に Brown Norway Rat 網膜下に Sodium Hyaluronate を注入し網膜を剥離させた。DNA 断片化検出には TUNEL 法を用いた。貪食細胞の同定には免疫染色を用い、貪食細胞による処理過程を観察した。

結果：視細胞はアポトーシスの進行に伴い、アポトーシス小体を形成しつつ細分化されながら、外境界膜を越えて網膜下腔へと排出された。網膜下腔には ED1 陽性マクロファージが観察され、TUNEL 陽性のアポトーシス小体の選択的貪食像が見られた。電顕では網膜裏面に浸潤するマクロファージがアポトーシス小体を選択的に貪食していた。

考察：アポトーシスを起こした視細胞は網膜下腔に排出され、マクロファージがこれらを選択的に貪食・処理しており、残二次的ネクロシスの発生を抑制し、網膜を保護する機構の存在が考えられた。

Purpose: Retinal photoreceptors undergo apoptosis after retinal detachment (RD). We examined the phagocytotic process of the apoptotic photoreceptors.

Methods: RD was produced by subretinal injection of sodium hyaluronate, and the sections were analysed by immunohistochemistry, transmission electron microscopy, immuno-electron microscopy and scanning electron microscopy.

Results: The ultrastructural and immuno-phenotypic analysis demonstrated that apoptotic photoreceptors are selectively eliminated from their physiological localization, the outer nuclear layer, to the subretinal space, and then phagocytosed by monocyte-derived macrophages.

Conclusions: To our knowledge, this is the first report describing the mechanisms through which apoptotic photoreceptors are selectively eliminated from retina via a directional process in the subretinal space?

キーワード：網膜剥離、マクロファージ、網膜下腔

Key Words : Keywords retinal detachment, macrophage, subretinal space

## 緒言

アポトーシス細胞が効果的に処理されることは神経組織の恒常性維持において重要である。破壊されていないアポトーシス細胞の貪食細胞による速やかな認識と貪食は二次的ネクロシスを抑制するうえで重要で、炎症性の細胞内産物や潜在的免疫原性自己抗原の放出を抑制する。

網膜視細胞は網膜剥離になるとアポトーシスを起こすことが知られている。視細胞のアポトーシス発生過程は幾つかの報告があるが、これらの細胞の処理過程は未だ不明であった。これらの細胞が適切に処理されずネクロシスが生じると網膜

には強いグリオシスが生じる。今回我々はアポトーシスを起こした視細胞の処理過程を検討した。

## 方法

### 実験的網膜剥離

ラットは十分量のペントバルビツールを腹腔内注射して麻酔し、トロピカミドとフェニレフリンを用いて散瞳した。網膜剥離は網膜下にヒアルロン酸を注入することで作成した。前房穿刺、硝子体内ヒアルロン酸投与眼をシャムオベとしてコントロールに設定した。眼球を6、12時間、1、3、5、7、14、28日後に摘出しそれぞれの方法で解

析した。

アポトーシスの判定

DNA Nick-End Labeling (TUNEL 法)

視細胞の判定は TUNEL 法で行った。Apop Tag Direct Detection Kit を用いて TUNEL 法を行った。切片は核の観察が容易になるよう Propidium iodide で二重染色し蛍光顕微鏡で観察した。

AIF と ED1、ED2 免疫染色

パラフィン包埋切片を用いて免疫染色を行った。作成した抗 AIF 血清は100倍希釈して4℃で一晩反応させた。陰性コントロールとして無免疫血清と合成 AIF であらかじめ吸収した血清を用いた。ED、ED2 抗体は100倍希釈したものを使用した。二次抗体は Cy5 色素で標識したものを200倍希釈し20分間反応させた。TUNEL 法で二重染色した後蛍光顕微鏡で観察した。

透過型電子顕微鏡と免疫電子顕微鏡

後眼部を1%グルタル、パラフォルムアルデヒド混合溶液で固定した。次に剥離網膜を摘出し、オスミウム酸を用いて後固定し、脱水処理の後エポキシ樹脂に包埋した。免疫電顕用には試料をパラフォルムアルデヒドで固定し、ロンドンレジン樹脂に包埋した。抗 AIF 血清は150倍希釈とし、4℃で一晩反応させた。10nm 金コロイド標識二次抗体を30倍希釈で90分反応させた。

走査型電子顕微鏡

後眼部を1%グルタル、パラフォルムアルデヒド混合溶液で固定した。次に剥離網膜を摘出し、オスミウム酸を用いて後固定し、脱水処理後、t-ブチルアルコールに置換し、凍結乾燥した。イオンスプッターで表面をコートした後、走査型電子顕微鏡で観察した。

## 結果

実験的網膜剥離によるアポトーシス

網膜は少しずつ変性し、特に視細胞が減少した。コントロール眼の非剥離網膜では TUNEL 陽性細胞は観察されなかったが、網膜剥離眼では処置12時間後には視細胞に TUNEL 陽性細胞が出現し、3日後に最も多く観察され、次第に減少した(図2、3)。透過型電子顕微鏡所見ではアポトーシス視細胞はクロマチンの凝集や細胞の収縮、アポトーシス小体の形成など典型的所見を示した。アポトーシス小体形成の過程で、核を構成するクロマチンは凝集し、幾つかの顆粒状の部分にわか

れた。これらの高電子密度の核由来物質は、本来の視細胞層から外境界膜を越え、ミトコンドリアなどの細胞内小器官と混ざりながら視細胞外節層、更に網膜下腔へと移動した。

AIF、ED1、ED2の免疫染色

細胞内でアポトーシスのシグナル伝達にかかわる重要な因子である apoptosis-inducing factor (AIF) は、ミトコンドリアから閥内へと移行することが知られている。網膜剥離では、アポトーシス細胞核に陽性所見がみられ、網膜下腔に移動した核も陽性であった。

ED1の免疫染色では、網膜下腔に局限して陽性細胞が見られ、TUNEL 陽性アポトーシス小体を貪食している像が観察された。

貪食細胞の透過型、走査型電子顕微鏡所見

網膜下腔には二種類の浸潤細胞が見られた。一種類は中型のマクローフェージ様細胞でリソソームや細胞突起が豊富であり、もう一種は大型の球形細胞でメラニン色素を豊富に含んでいた。大部分の浸潤細胞は前者のマクローフェージ様細胞で、アポトーシス小体の貪食像が見られた。後者は網膜周辺部に分布していた。

## 考察

今回の実験は、網膜剥離で視細胞がアポトーシスをおこすと本来の視細胞層から網膜下腔に移動し、網膜下腔に浸潤したマクローフェージにより選択的に貪食され、効果的にアポトーシス細胞が処理されることを示した。

アポトーシス視細胞の処理過程

網膜では様々な病態で神経細胞がアポトーシスをおこすがこれらの処理機構は不明であった。網膜剥離ではアポトーシスの過程で視細胞は典型的な、クロマチンの凝集、細胞の収縮、アポトーシス小体の形成などの所見を示した。さらにアポトーシス小体形成過程で、これらのアポトーシス小体が外境界膜を越えて網膜下腔に移動した。

浸潤細胞の同定

大部分の浸潤細胞は網膜下腔に分布し、ED1陽性で、電子顕微鏡所見もあわせて、浸潤マクローフェージと考えられた。少数の網膜色素細胞も剥離周辺部網膜に浸潤し、貪食にも関与していた。

結果としてアポトーシスをおこした視細胞が、視細胞層にとどまらず網膜下腔に排出されることで、視細胞層は二次的ネクローシスによる組織破壊から逃れ、貪食細胞が網膜下腔に局限し排出さ

れたアポトーシス細胞を貪食することで、神経網膜内への炎症細胞浸潤が抑制されていた。これらは網膜剥離における機能障害を最小限に抑制する機構として効果的に働いていると考えられた。

#### 文 献

- 1) Cook B, Lewis GP, Fisher SK, Adler R: Apoptotic photoreceptor degeneration in experimental retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995, 36: 990-6.
- 2) Berglin L, Algvere PV, Seregard S: Photoreceptor decay over time and apoptosis in experimental retinal detachment. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997, 235: 306-12.
- 3) Lewis GP, Linberg KA, Geller SF, Guerin CJ, Fisher SK: Effects of the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor in an experimental model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40: 1530-44.
- 4) Sakai T, Lewis GP, Linberg KA, Fisher SK: The ability of hyperoxia to limit the effects of experimental detachment in cone-dominated retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001, 42: 3264-73.
- 5) Hisatomi T, Sakamoto T, Murata T, Yamanaka I, Oshima Y, Hata Y, Ishibashi T, Inomata H, Susin SA, Kroemer G: Relocalization of apoptosis-inducing factor in photoreceptor apoptosis induced by retinal detachment in vivo. *Am J Pathol* 2001, 158: 1271-8.
- 6) Hisatomi T, Sakamoto T, Goto Y, Yamanaka I, Oshima Y, Hata Y, Ishibashi T, Inomata H, Susin SA, Kroemer G: Critical role of Photoreceptor Apoptosis in Functional Damage after Retinal Detachment. *Curr Eye Res* 2002, 24: 161-72
- 7) Hisatomi T, Sakamoto T, Yamanaka I, Sassa Y, Kubota T, Ueno H, Ohnishi Y, Ishibashi T: Photocoagulation-Induced Retinal Gliosis is Inhibited by Systemically Expressed Soluble TGF- $\beta$ s Receptor Type II via Adenovirus Mediated Gene Transfer. *Lab Invest* 2002, 82: 863-70
- 8) Hisatomi T, Sakamoto T, Sonoda K, Tsutsumi C, Qiao H, Enaida H, Yamanaka I, Kubota T, Ishibashi T,

Kura S, Susin SA, Kroemer G: Clearance of apoptotic photoreceptors: Elimination of apoptotic debris into the subretinal space and macrophage-mediated phagocytosis via phosphatidylserine receptor and integrin  $\alpha v \beta 3$ . *Am J Pathol* 2003, in press.

# 錐体 ERG における ON 成分と OFF 成分の干渉

Interplay of ON- and OFF-components in photopic electroretinogram

近藤峰生、上野真治、丹羽泰洋、寺崎浩子、三宅養三  
名古屋大学 眼科

Mineo Kondo, Shinji Ueno, Yasuhiro Niwa, Hiroko Terasaki, and Yozo Miyake  
Ophthalmology, Nagoya University School of Medicine

## 【抄録】

目的：種々の刺激強度における錐体 ERG の b 波の起源を神経遮断薬を用いて調べること。

方法：5 匹のアカゲおよびカニクイザルを用いた。キセノンフラッシュの強度を様々に変化させて錐体 ERG を記録した。硝子体内投与薬物として、ON および OFF 型双極細胞の活動を遮断する目的で APB と PDA を用い、3 次ニューロンを遮断する目的で TTX と NMDA を用いた。

結果：TTX と NMDA を投与しても基本的な錐体 ERG の b 波の刺激-振幅機能に変化はなかった。APB を投与して錐体 ON 経路を遮断すると、強い刺激領域では陽性波の振幅減少とともにその潜時が著しく遅れた。APB と PDA を投与して視細胞電位のみとすると、波形は陰性波のみとなり、この陰性成分の振幅は刺激強度の増加に伴い増大した。

結論：錐体 ERG の b 波の起源は刺激強度に依存しており、その起源には錐体視細胞と ON 経路と OFF 経路の加算と打ち消し合いが関与していた。

Purpose: To study the origin of the photopic ERG b-wave with intravitreal injection of various pharmacological agents in monkey.

Methods: 5 adult monkeys (macaca mutata and macaca fascicularis) were used. Stimuli were elicited by strong xenon strobe-flashes, and were changed by ND filters. Drugs included APB and PDA to block ON- and OFF-bipolar activities, respectively, and NMDA and TTX to suppress inner retinal activities.

Results: After APB administration, the positive wave (d-wave) decreased and delayed at highest intensities, and a large, wide negative waveform remained at highest intensities. After PDA administration, a sharp, positive wave was seen at moderate intensities, but it became wide and decayed at highest intensities. After APB+ PDA injection, the remaining negative photoreceptor component became deeper and wider with increasing intensities to highest intensities.

Conclusion: These results suggest that the summation and "push-pull" interplay between ON-, OFF-, and photoreceptor components contribute to the origin of the photopic ERG b-wave.

キーワード：網膜電図、錐体、ON 経路、OFF 経路、b 波

Key Words : electroretinogram, ON-pathway, OFF-pathway, b-wave

目的：網膜の機能を他覚的に評価する手段として光に対する網膜の電気的反応である網膜電図 (ERG) が臨床に広く用いられている。網膜の電気経路には明所視にかかわる錐体経路と暗所視にかかわる杆体経路があるが、特に網膜色素変性症のように早期より杆体機能が障害される疾患では、錐体機能のみが残存しており、このような疾患群の網膜機能を正確に評価するには錐体 ERG を記録する必要がある。錐体 ERG を記録する方法としては、杆体活動を十分に抑制する背景光下にフラッシュ刺激を用いる方法と、杆体が追従できないような高速 (30Hz などの) のフリッカー刺激

を用いる方法がある。フリッカー ERG の起源<sup>1), 2)</sup>については近年徐々に明らかにされてきているが、フラッシュ刺激による錐体 ERG の起源にはまだ不明な点が多く残されている。また、錐体 ERG の b 波は、光の刺激強度の上昇に伴い振幅が増大するが、さらに強くしていくと逆に振幅が小さくなる現象 (photopic hill)<sup>3), 4)</sup> が知られている。今回我々はサル硝子体内に種々の薬物を投与して特定のニューロンを遮断した状態で<sup>5)</sup>様々な刺激強度に対するフラッシュ錐体 ERG の b 波を観察し、フラッシュ錐体 ERG の b 波の起源を調べるとともに photopic hill がお

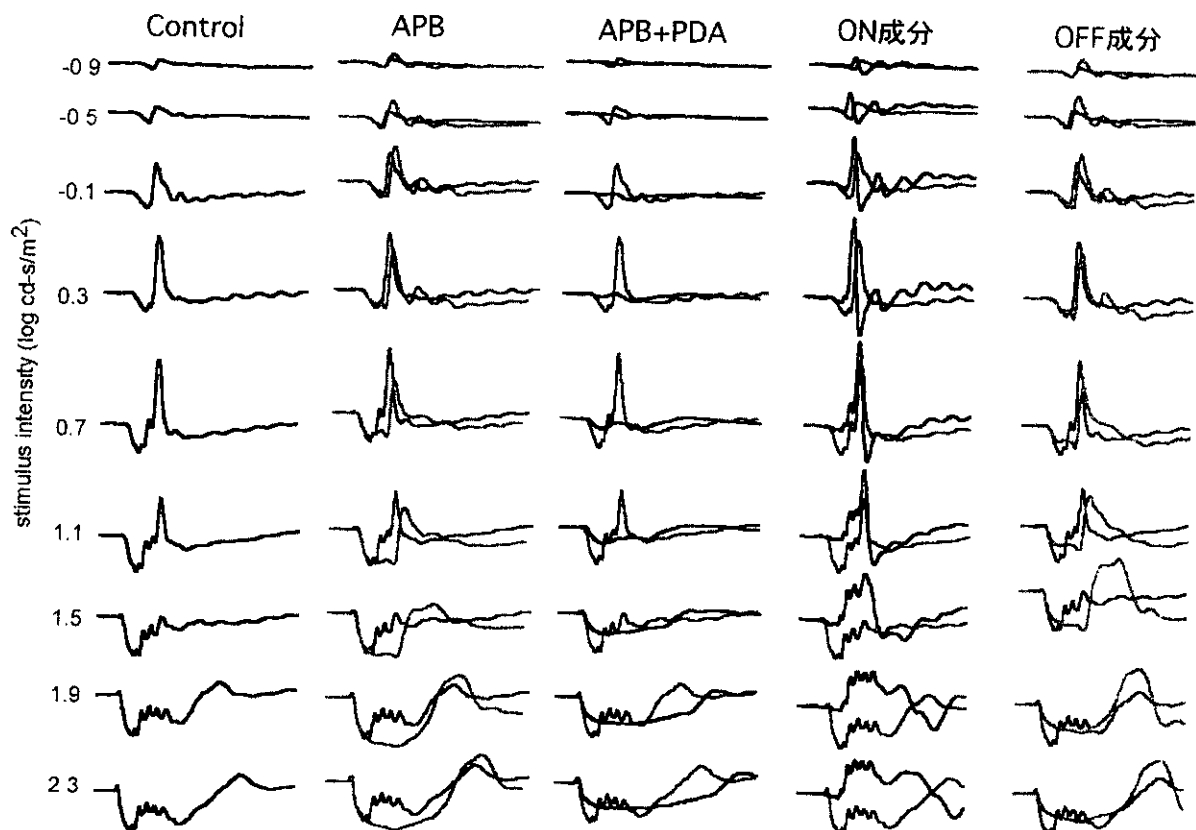
このメカニズムを調査した。

方法：5匹7眼のアカゲおよびカニクイザルを用いた。刺激には強いキセノンフラッシュを用い、その刺激強度を neutral density filter を使って 0.4log ステップで変化させて錐体 ERG を記録した。背景光として 40cd/m<sup>2</sup> の白色光を使用した。硝子体内投与薬物として、ON および OFF 型双極細胞の活動を遮断する目的で APB と PDA を用い、3次ニューロンを遮断する目的で TTX と NMDA を用いた。

結果：TTX と NMDA を投与しても基本的に錐体 ERG の b 波の刺激-振幅曲線に大きな変化はみられず、錐体 ERG の b 波の細胞起源として 3次ニューロンの関与が小さいことが示唆された。APB を投与して錐体 ON 経路を遮断すると、弱い刺激強度では陽性波 (d-wave) 振幅に大きな変化はなかったが、この頂点潜時は少し延長していた。強い刺激領域では、この d-wave の振幅減少とともにその潜時が著しく遅れた。PDA を投与して錐体 OFF 経路を遮断すると、刺激強度の増加に伴って一旦増大した陽性波の振幅が、最強

刺激ではわずかに低下して、最強刺激強度では幅広い陽性波が残った。APB と PDA を投与して視細胞電位のみとすると、波形は単純な陰性波のみとなり、この陰性成分の振幅は刺激強度の増加に伴い増大し、幅広い陰性波を形成した。さらに、薬物投与前後の波形を差し引きして ON 経路と OFF 経路成分を抽出した結果、最強刺激領域では視細胞成分と OFF 経路成分による深く幅広い陰性波と ON 成分による高く幅広い陽性波が互いに打ち消し合い (self-cancellation) していることがわかった。

考案：今回の結果により、錐体 ERG の b 波の網膜内細胞起源は刺激強度によって著しく異なることがわかった。つまり、比較的弱い刺激強度では b 波は ON 型双極細胞と OFF 型双極細胞の脱分極の加算 (summation) によって主に形成されているようであった。しかしこの加算は単純な線形加算ではなく、潜時を少しずらした形で打ち消し合いも働いており、この部位における ON 成分と OFF 成分の干渉が存在することがわかった。これに対して強い刺激強度になっていくと、on 経路成分による脱分極のピークは劇的に遅れて b



アカゲザルから記録した種々の刺激強度による錐体 ERG、および薬物作用後の波形変化。(左端)薬物作用前。(左から 2 番目) APB により ON 経路を遮断した波形。(左から 3 番目) さらに PDA を作用させて視細胞のみを残した波形。(左から 4 番目) 薬物作用前後の波形を差し引くことにより抽出された ON 経路成分。(右端) 差し引きにより抽出された OFF 成分。

波の時間帯より遠ざかり、b波の存在する時間帯には逆に深く幅広い陰性波を残した。この最強の刺激強度では陽性のb波を構成するものはON経路成分が主体となる。そして視細胞成分もOFF成分もこれを打ち消す方向に働くようであった。長年そのメカニズムが不明であった photopic hill<sup>3), 4)</sup>の原因についても、ON成分そのものが強い刺激領域で振幅が若干減少すること、またOFF成分が強い刺激で潜時がのびること、さらにON成分の陽性波とOFF経路成分と視細胞より構成される深い陰性成分と打ち消しあいを生ずること、異常の3つの要因によって photopic hill 現象がおこることが明らかにされた。

#### 文 献

- 1) Kondo M, Sieving PA: Primate sinewave ERG: Primate photopic sine-wave flicker ERG: Vector modeling analysis of component origins using glutamate analogs. Invest Ophthalmol Vis Sci 42; 305-312: 2001.
- 2) Kondo M, Sieving PA. Post-photoreceptor activity dominates primate photopic 32-Hz ERG for sine-, square-, and pulsed stimuli. Invest Ophthalmol & Vis Sci. 43: 2500-2507, 2002.
- 3) Wali N, Leguire LE. The photopic hill: A new phenomenon of the light adapted electroretinogram. Doc Ophthalmol. 1992; 80: 335-342.
- 4) Kondo M, Piao CH, Tanikawa A, Horiguchi M, Terasaki H, Miyake Y. Amplitude decrease of photopic ERG b-wave at higher stimulus intensities in humans. Jpn J Ophthalmol. 2000 Jan-Feb; 44 (1): 20-8.
- 5) Sieving PA, Murayama K, Naarendorp F. Push-pull model of the primate photopic electroretinogram: a role for hyperpolarizing neurons in shaping the b-wave. Visual Neurosci. 1994; 11: 519-532.

# 網膜血管新生に關与する遺伝子の検索

Characterization of the gene expression changes at the early stage of retinal neovascularization

佐藤敦子、片井直達、渋谷宏人、菊池孝信、吉村長久  
信州大学眼科学教室

Atsuko Sato, Naomichi Katai, Hiroto Shibuki, Takanobu Kikuchi, Nagahisa Yoshimura  
Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine

## 【抄録】

高酸素負荷マウス網膜血管新生モデルを用いてDNA マイクロアレイによる遺伝子発現の解析を行った。血管新生初期に關与する遺伝子を調べるため、蛍光眼底造影による評価を行い、生後15日 (postnatal day 15: P15) で網膜血管新生を認めた。P15で高酸素負荷群およびコントロール群マウスより網膜を摘出し、マイクロアレイにより遺伝子発現の解析を試みた。2倍以上の発現の増減を認めたのは129遺伝子 (1.03%) であった。高酸素負荷群にて発現の増加を認めたのは49遺伝子であり、増殖因子・転写因子・細胞外基質などに分類された。血管新生に關与する既知の遺伝子の発現増加に加え、網膜における機能が明らかでない遺伝子の発現増加もみられており、現在、その局在と機能に対する解析を進めている。

Gene expression changes in a mouse model of oxygen induced retinopathy were investigated by using a gene microarray system. To characterize gene expression changes at the early stage of retinal neovascularization, fluorescein angiography was used to determine the day on which oxygen induced retinal neovascularization occurs. Retinal neovascularization occurred on postnatal day 15, when eyes were enucleated from the control mice and mice suffered from oxygen induced retinopathy. Microarray analysis was carried out using Affimetrix Gene Chip. 1.03% of cDNA and ESTs showed significant changes (over 2-fold) in expression between hyperoxia and normoxia groups. The up-regulated genes could be classified into some groups such as growth factors, transcription factors, and extracellular matrix. Also, there were some up-regulated genes that have not been reported to play a role in retinal neovascularization. Further study is now going to reveal the mechanisms of retinal neovascularization in this model.

キーワード: oxygen-induced retinopathy、マイクロアレイ、網膜血管新生

## 緒言

高酸素負荷マウス網膜血管新生モデルは、幼若マウスを高酸素に暴露することで、網膜に血管新生を惹起するモデルであり、血管新生に対する様々な研究に用いられている。このモデルでは、網膜血管新生は生後17日 (P17) にピークに達するといわれている。今回我々は、このモデルを用い、血管新生初期に關与する遺伝子検索を行ったので報告する。

## 方法

C57BL/6J マウスを生後7日から5日間、母親とともに75%酸素に暴露した後、通常酸素濃度下にて飼育した。コントロール群マウスは生後より通常酸素濃度下にて飼育した。FITC (fluorescein isothiocyanate) -dextran をマウス左心室に注入した後、眼球を摘出し、網膜伸展

標本を作製して網膜血管新生の評価を行った。また、摘出眼球を4% paraformaldehyde 固定し、パラフィン包埋切片を作製して光学顕微鏡で観察した。網膜に血管新生が認められた日齢で高酸素負荷群およびコントロール群マウスより眼球を摘出し、網膜を採取した。Affimetrix Gene Chip (MGU74Av2) にてマイクロアレイを行い、遺伝子発現の解析を行った。

## 結果

蛍光眼底造影の結果、P15において網膜血管野と無血管野の境界部に血管新生が認められた。網膜血管新生はP17前後が最も著明であった。網膜切片を光学顕微鏡にて観察したところ、P15において網膜表面に vascular tuft と呼ばれる塊状の新生血管が認められた。

MGU74A チップには約12,500個の cDNA およ



び ESTs (expressed sequence tags) が含まれており、そのうち 2 倍以上の発現の増減を示したのは 129 遺伝子であった。高酸素負荷群において発現増加を示した遺伝子は、増殖因子、転写因子、細胞外基質等に分類された。

VEGF (vascular endothelial growth factor)、preproinsulin-like growth factor IA も増加しており、これまでの報告と一致した。

#### 考 按

高酸素負荷マウス網膜血管新生モデルは、未熟児網膜症のモデルのみならず、網膜血管新生に対するモデルとして汎用されているが、特に血管新生の抑制に関する報告においてはピークである生後 17 日または 18 日が評価として用いられている。しかし我々は、このモデルにおける血管新生がピークを過ぎると減少していくことより、血管新生初期に関与する遺伝子を検索する時期として生後 17、18 日は不適當であると考えた。そこで、蛍光眼底造影を施行した結果より、今回は生後 15 日における遺伝子発現の増減を比較することとした。

マイクロアレイの結果、およそ 1% の遺伝子で 2 倍以上の発現増減が認められた。その中には血管新生に関わると以前より報告されていた遺伝子の他に、網膜における機能が明らかでない遺伝子も含まれていた。これらの遺伝子が網膜血管新生に関与するものであるかどうかを明らかにするため、現在、その機能と局在について更なる検討を進めている。

#### 文 献

- 1) Smith LEH, Wesolowski E, MacLellan A, et al. Oxygen induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35: 101-111
- 2) Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, et al. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 10457-10461
- 3) Ozaki H, Seo MS, Ozaki K, et al. Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *Am J Pathol.* 2000; 156: 697-707
- 4) Fruttiger M. Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 43: 522-527
- 5) Smith LEH, Shien W, Perruzzi C, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor- dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nature Med.* 1999; 5: 1390-1395

# マイクロアレイを用いたヒト網膜の加齢に関する 遺伝子発現の解析

Microarray analysis of gene expression in the aging human retina

吉田茂生、吉田綾子、石橋達朗  
九州大学大学院医系研究院眼科学分野

Shigeo Yoshida, Ayako Yoshida, Tatsuro Ishibashi

Department of Ophthalmology, Kyushu University Graduate school of Medicine, Fukuoka, Japan.

目的：ヒト網膜において、加齢に伴って発現レベルの変化する遺伝子を検討する。

方法：若年（13-14歳）と老年（62-74歳）のヒト網膜よりRNAを抽出し、各々ビオチンあるいはDNPで標識したcDNAターゲットを合成した。2400のヒト遺伝子を含むcDNAマイクロアレイに同時にハイブリダイズし、Cyanine (Cy) -5とCy-3レポーター分子で視覚化した後、両チャンネルの蛍光強度を定量した。

結果：アレイ上の2400遺伝子のうち、50%以上がcDNAターゲットにハイブリダイズした。このうち24遺伝子が若年と老年網膜の間で異なる発現レベルを示した。これらの遺伝子は、エネルギー代謝、ストレス反応、細胞増殖、神経伝達の4つの機能的遺伝子群に分類し得た。

結論：加齢に伴って、ヒト網膜の遺伝子発現レベルが変化することが明らかとなった。これらの遺伝子発現の変化が加齢性の網膜疾患の病因と関与している可能性を考えた。

PURPOSE: To develop gene expression profiles of young and elderly human retinas. METHODS: Gene microarray slides containing 2400 human genes were hybridized to biotin or dinitrophenyl (DNP)-labeled target cDNAs that were synthesized using total RNAs from young (13-14 years) and elderly (62-74 years) human retinas. Hybridization signals were visualized with cyanine (Cy)-5 or Cy-3 fluorescent reporter molecules, and the fluorescence intensities of the images were analyzed by computer.

RESULTS: Of the 2400 genes represented on the microarray slides, more than 50% hybridized to the retinal cDNA targets. Expression of a majority of these genes was not altered during aging; nonetheless, changes in the expression of 24 genes were detected between young and elderly retinas. These genes could be clustered into four categories: energy metabolism, stress response, cell growth, and neuronal transmission/signaling.

CONCLUSIONS: The authors show that aging of the human retina is associated with changes in patterns of gene expression. These studies lay the foundation for future studies defining the genetic basis of aging-associated retinal diseases.

キーワード：加齢、網膜、マイクロアレイ、遺伝子発現

## 目的

近年の高齢化社会の進行に伴い、加齢黄斑変性、緑内障、網膜上膜といった網膜の加齢が関与する疾患が増加しているが、その病因は不明な点が多い。網膜の加齢に関する分子的背景を把握することは、加齢性の網膜疾患の把握に有用である可能性がある。

最近しばしば用いられてきたマイクロアレイは、包括的な遺伝子のプロファイリングを可能にし、多因子の関与が考えられる加齢の研究にも有用であることが予想される。今回我々は、DNAマイクロアレイ技術を用いて、ヒト網膜において、加齢に伴って発現レベルの変化する遺伝子（Genes

Altered in Aged Retina: GAAR）を検討した。

## 方法

若年（13-14歳）と老年（62-74歳）のヒト網膜よりRNAを抽出し、各々ビオチンあるいはDNPで標識したcDNAターゲットを合成した。2400のヒト遺伝子（80%がヒト脳由来）を含むcDNAマイクロアレイに同時にハイブリダイズし、Cyanine (Cy) -5とCy-3レポーター分子で視覚化した後、両チャンネルの蛍光強度をSCANALYZEソフトウェア (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>) で定量した。発現に差がみられた遺伝子について、Northern

blotあるいはreal-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR)で発現レベルを再検討した。さらに、PubGene (www.pubgene.org)を用いてデータマイニングを試みた。

### 結果

アレイ上の2400遺伝子のうち、50%以上がcDNAターゲットにハイブリダイズした。若年と老年の網膜間で、2倍以上の発現レベルの差を

示したものをGAARとして抽出したところ、24遺伝子が若年と老年網膜の間で異なる発現レベルを示した。これらの遺伝子は、エネルギー代謝、ストレス反応、細胞増殖、神経伝達の4つの機能的遺伝子群に分類し得た(表1)。Northern blotとqRT-PCRでは、検討した10遺伝子のうち、8遺伝子でマイクロアレイと同様の結果を得た(図1)。PubGeneを用いた解析では若年および老年優位遺伝子の文献ネットワークの中心に、それぞれソマトスタチンとインターロイキン-1

表1 若年-老年網膜間の遺伝子発現レベルの変化

遺伝子名	Gene Symbol	Accession No.	発現変化(倍)	
			マイクロアレイ	qRT-PCR
<b>若年</b>				
<b>細胞周期制御</b>				
Interferon-inducible fragment (cDNA 6-16)	IFI616	X02492	-70.7 ~ -3.5	
IFN-responsive transcription factor subunit*	ISGF3G	M87503	-5.0 ~ -2.3	1.4 ± 0.6
TGF-β receptor interacting protein 1*	TRIP1	U36764	-6.1 ~ -2.2	-2.3 ± 1.4
LPS-induced TNF- factor-α	PIG7	AF010312	-13.1 ~ -2.0	-6.3 ± 0.9
α1(E)-catenin	CTNNA1	L23805	-3.4 ~ -3.0	-1.6 ± 0.5
<b>DNA/RNA 合成</b>				
Tetratricopeptide repeat domain 3	TTC3	D84296	-7.5 ~ -4.4	
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	HNRPF	L28010	-6.3 ~ -3.2	
Arginine methyltransferase	HRMT1LI	X99209	-4.1 ~ -2.8	
<b>蛋白合成</b>				
26S proteasome subunit p97	PSMD2	D78151	-3.6 ~ -2.0	
Ubiquitin hydrolase	USP9X	X98296	-9.8 ~ -2.0	-3.6 ± 0.7
Membrane cofactor protein	MCP	Y00651	-2.7 ~ -2.3	
<b>エネルギー代謝</b>				
Phosphoglycerate mutase	PGAM1	J04173	-14.3 ~ -3.6	
Muscle specific enolase	ENO3	X51957	-7.9 ~ -2.4	
<b>神経伝達</b>				
2 calcium channel isoform I	CACNA2D2	AF042793	-8.9 ~ -2.2	
GABA receptor s-3 subunit	GABRB3	M82919	-4.6 ~ -2.6	-3.5 ± 0.8
p64 CLCP protein	CLIC1	X87689	-3.2 ~ -2.3	
<b>その他</b>				
KIAA0120*	KIAA0120	D21261	-4.6 ~ -2.0	
<b>老年</b>				
<b>ストレス反応</b>				
Cold inducible RNA-binding protein	CIRBP	D78134	2.4 ~ 3.8	
α-1 Type VII collagen	COL7A1	L02870	2.6 ~ 3.4	-1.2 ± 1.1
Myristoylated alanine-rich protein kinase C	MACS	D10522	2.1 ~ 3.3	
<b>エネルギー代謝</b>				
Creatine kinase B*	CKB	L47647	2.2 ~ 6.8	6.3 ± 1.2
<b>その他</b>				
Endogenous retrovirus type C oncovirus	N/A	M74509	2.0 ~ 5.1	
B-cell CLL/lymphoma 9	BCL9	Y13620	2.3 ~ 3.0	
Pancreatic amylase	AMY2A	M28443	2.6 ~ 5.3	1.6 ± 0.6

正の値は加齢に伴う遺伝子発現の増加、負の値は減少を示す。

\*これらの遺伝子発現はノーザンプロットでも解析した。

が出現した (図2)。

### 考 察

加齢に伴って、ヒト網膜の遺伝子発現レベルが変化することが明らかとなった。また、神経伝達やストレス反応の変化が網膜の加齢と密接に関与していることが示唆された。

今回の研究について、いくつかの問題点も明らかになった。マイクロアレイ解析は遺伝子発現の新しい知見を提示できる可能性があるが、まだ発展途上であり、ターゲットラベル法、ノーマライズ法、画像スキャン法、データプロセッシングやマイニングなどさらに最適化する必要がある。またヒトのサンプルを用いたため、遺伝子発現に無視しえない個人差が観察された。このため、現在、遺伝学的により均一な背景をもつマウス網膜を用いると同時に、マイクロアレイのもうひとつの主要なタイプであるオリゴヌクレオチドアレイを用いて、同様の実験を行っている。また、今回は老若間で2倍以上の差を示したものをGAARとして抽出したが、網膜の加齢に伴って変化する遺伝子のうち、発現レベルの変化が2倍より小さいものも相当数存在することが予想される。この発現レベルの変化の比較的小さな遺伝子を抽出するため、パレート多目的最適化法 (ファジイ理論に基づいたアルゴリズム) を導入し、さらなるGAARを抽出し、興味深い知見を得つつある。

これらのGAARのバリエーション (遺伝子多型) が、加齢性の網膜疾患の発症を部分的に規定していると考えている。

### 文 献

- 1) Yoshida, S, Yashar, BM, Hiriyanna, S, Swaroop, A (2002) Microarray analysis of gene expression in the aging human retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 43(8): 2554-2560.

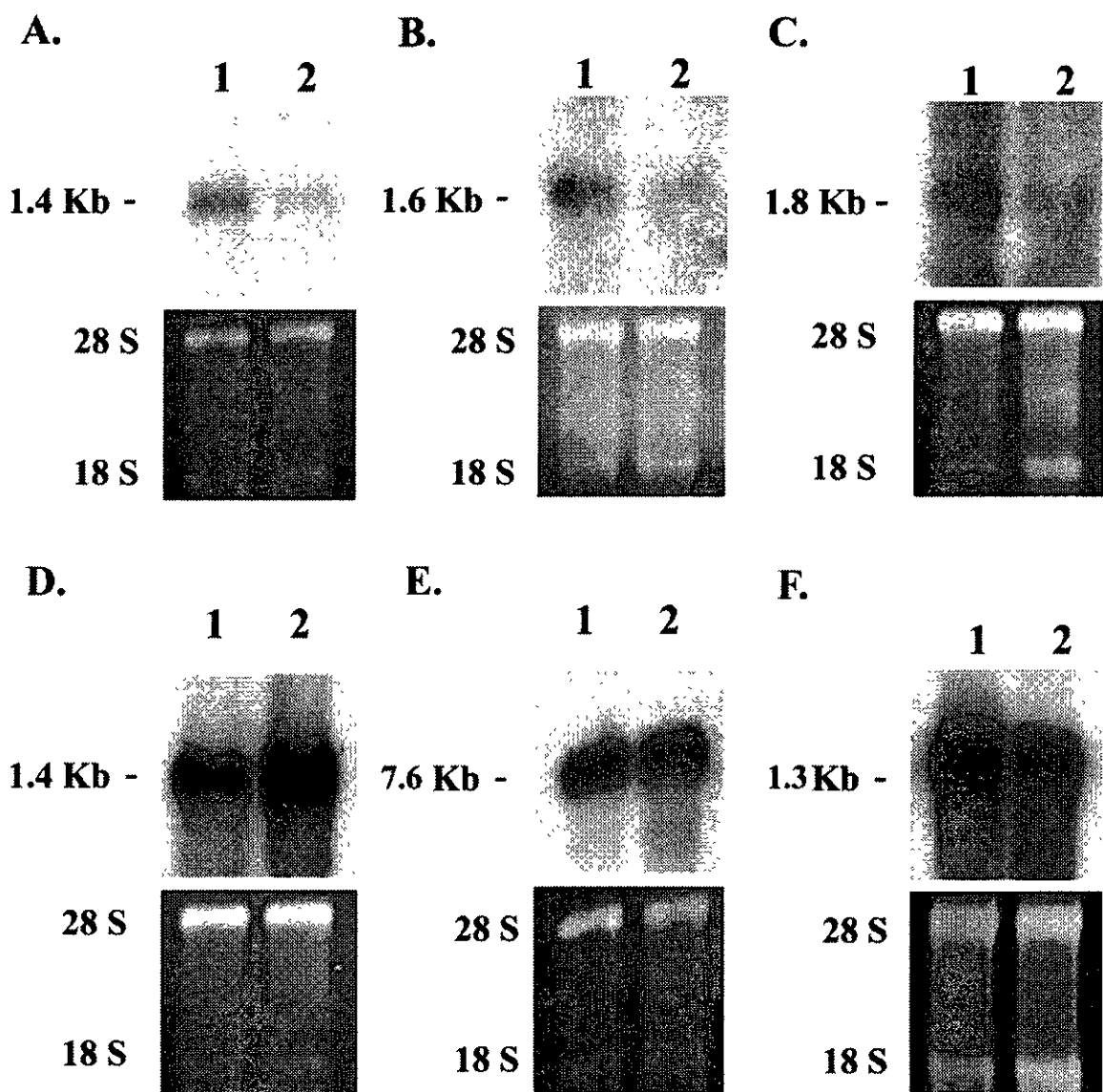
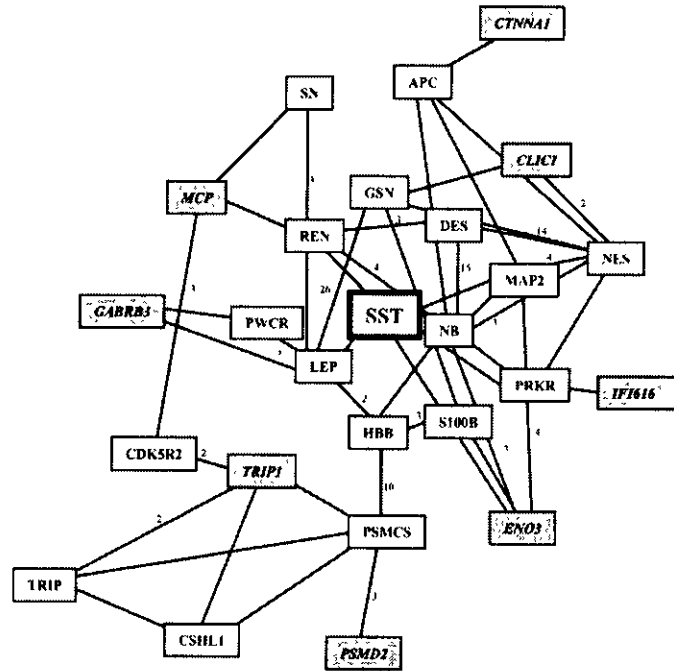


図1 マイクロアレイで抽出した網膜遺伝子の Northern blot による解析  
 若年 (レーン1) と老年 (レーン2) のヒト網膜由来の RNA を抽出、メンブレンフィルターに転写し、 $^{32}\text{P}$  でラベルした cDNA プローブとハイブリダイズした。cDNA は次のものを用いた。(A) KIAA0120、(B) TGF-s receptor interacting protein 1、(C) IFN-responsive transcription factor subunit、(D) creatine kinase B、(E) transferrin、(F) GADPH。

A.



B.

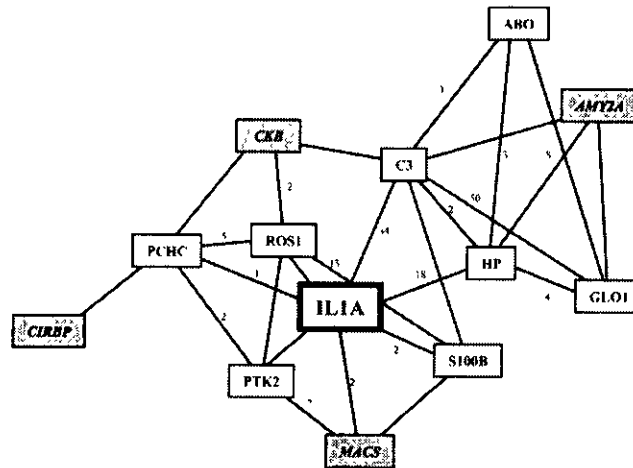


図2 若年 (A) と老年 (B) 網膜間で発現レベルに差のみられた遺伝子群の文献ネットワーク

PubGene が認識した若年あるいは老年優位遺伝子群はイタリック体で、各文献ネットワークの中心に出現した遺伝子は太字で示してある。二つの遺伝子を結ぶ線の横の数字は、MEDLINE 中で両方の遺伝子が引用された文献の数を表している。数字無し  
の線は二遺伝子が引用された文献が1つであることを示している。  
SST、ソマトスタチン、IL1A、インターロイキン1-。

# 網膜静脈分枝閉塞症に対する テノン嚢下トリアムシノロン注射の効果

The effects of posterior subtenon injection of triamcinolone acetonide in patients with macular edema due to branch retinal vein occlusion

五味 文、松村永和、沢 美喜、生野恭司、瓶井資弘、大路正人、田野保雄  
大阪大学大学院医学系研究科 眼科学教室

Fumi Gomi, Nagakazu Matsumura, Miki Sawa, Yasushi Ikuno,  
Motohiro Kamei, Masahito Ohji, Yasuo Tano  
Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School

## 【抄録】

目的：テノン嚢下トリアムシノロン注射の、網膜静脈分枝閉塞症（BRVO）に伴う黄斑浮腫に対する有効性を検討する。

対象および方法：対象は光干渉断層計（OCT）を用いた測定で中心窩に黄斑浮腫が明らかな BRVO 14例14眼で、トリアムシノロン12～20mg をテノン嚢下に注射し、処置前後の最大網膜厚を OCT を用いて測定した。

結果：最大網膜厚の平均値は、処置前と比較し、注入1週、4週と経時的に減少したが、注入12週では再度増加傾向にあった。処置後1ヶ月以内に浮腫が完全に消失した例は14眼中6眼（43%）あったが、網膜厚にほとんど差の見られない無効例も5眼（36%）あった。注入に伴う合併症として眼圧上昇例が1眼あり、また再発が6眼にみられた。

結論：BRVO に合併する黄斑浮腫に、トリアムシノロンのテノン嚢下注射が有効であった例が存在した。今後、有効例と無効例、及び再発例の見極めについてより詳細な検討が必要である。

Purpose: To evaluate the efficacy of posterior subtenon injection of triamcinolone acetonide in patients with macular edema due to branch retinal vein occlusion.

Methods: Fourteen eyes of fourteen patients with macular edema associated to branch retinal vein occlusion were treated with 12~20 mg of subtenon injection of triamcinolone. The response was measured by clinical examination and optical coherence tomography (OCT).

Results: The mean maximal macular thickness as measured by OCT decreased gradually at the 1-week, 1-month, but increased again at 3-month follow-up intervals, respectively. Six of 14 eyes (43%) showed the complete resolution of macular edema, while 5 eyes (36%) showed no obvious change in retinal thickness. Intraocular pressure exceeded 21 mmHg in 1 eye at 1-month after injection. Macular edema recurred in 6 eyes from 1 to 6 months after injection.

Conclusions: Subtenon injection of triamcinolone may be a therapeutic option for macular edema due to branch retinal vein occlusion. Further study will be needed to assess the long-term efficacy and safety, and the necessity for retreatment.

キーワード：網膜静脈分枝閉塞症、黄斑浮腫、トリアムシノロン、テノン嚢下注射、光干渉断層計

Key Words : branch retinal vein occlusion, macular edema, triamcinolone, subtenon injection, optical coherence tomography

## 緒言

トリアムシノロンのテノン嚢下注射はぶどう膜炎の消炎目的で用いられてきたが<sup>1)</sup>、我々は、硝子体手術後も遷延する糖尿病黄斑浮腫例に対してトリアムシノロンのテノン嚢下注入を行い、浮腫が消退する例を経験している<sup>2)</sup>。今回は網膜静脈

分枝閉塞症（BRVO）に合併した黄斑浮腫に対し同処置を行い、網膜厚及び視力の推移について調べるとともに合併症についても検討した。

## 対象および方法

対象は光干渉断層計（OCT）を用いた測定で

中心窩に黄斑浮腫が明らかな網膜静脈閉塞症14例14眼である。男性9例、女性5例、年齢は45歳から80歳、平均年齢63歳、注射前視力は0.1から0.9、平均0.44、視力低下自覚からの期間は平均5.9ヶ月であった。

これらの症例に対し、結膜切開の後トリアムシノロン12~20mgをテノン嚢下に注射し、注射前後の黄斑部最大網膜厚をOCTを用いて測定するとともに視力変化についても検討した。注射後の経過観察期間は2ヶ月から12ヶ月、平均5.4ヶ月であった。

### 結果

黄斑部の最大網膜厚の平均値は注射前と比較し、注射後1週、4週と漸減したが、注射後12週では再度増加傾向にあった。注射4週後には、最大網膜厚の平均値は $452 \pm 102 \mu\text{m}$ で、注射前の $516 \pm 77 \mu\text{m}$ と比較し、87.8%に減少した。この時点で、2段階以上の視力改善を示した例は14眼中5眼であった。

注射後3ヶ月以内に浮腫が完全に消退したものは14眼中6眼(43%)であった。一方14眼中5眼(36%)は網膜厚にほとんど変化をみなかった。両者の症例間には、年齢、視力低下からの期間、OCTにおける浮腫の形態などに明らかな違いは認められなかった。

注射に伴う合併症として注射後1ヶ月で眼圧上昇を認めた例が1眼あり、点眼治療を必要としたが、時間経過とともに正常化した。眼圧上昇以外の重篤な合併症は認めていない。また、6眼で浮腫の再発をみたが、これらは注射後1ヶ月から6ヶ月、平均3.2ヶ月で認めた。

代表症例のOCT所見の経過を図に示す。症例は64歳女性で、1年6ヶ月前に左眼のBRVOを発症。視力低下は8ヶ月前から自覚し、OCT所見で中心窩を含む嚢胞様黄斑浮腫を認めた。トリアムシノロンのテノン嚢下注射をおこなったところ、処置後4週で視力は視力(0.5)から(1.0)に回復、中心窩の浮腫も減少した。その後視力(1.0)を維持していたが、注射後6ヶ月目ごろより変視の増加を自覚、OCTにて浮腫の再発を認めた。再度テノン嚢下注射をおこない、浮腫は軽

快している。

### 結論

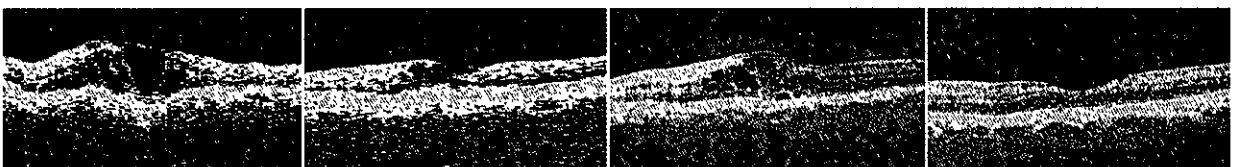
BRVOに続発する黄斑浮腫は、視力予後を不良とする大きな要因である。このような黄斑浮腫に対し、我々はトリアムシノロンのテノン嚢下注射を試みた結果、浮腫が軽快する例が存在することが明らかとなった。現時点では、処置前に有効例と無効例を予測することはできなかったものの、43%の症例で浮腫が完全に消退したこと、眼圧上昇以外の重篤な合併症を経験しなかったことなどを考え合わせると、比較的簡便で低侵襲の本治療は、BRVOに伴う黄斑浮腫例に対し、治療法の選択肢の1つとして積極的に行ってもよいと考えられる。

黄斑浮腫に対するトリアムシノロンの使用は、最近では硝子体内注入の報告がなされてきている<sup>3)~9)</sup>。網膜への移行の効率を考えると、硝子体内注入のほうがテノン嚢下注入に勝る可能性があるものの、文献的には、硝子体内注入によっても有効例と無効例が存在すること、3ヶ月目以降には再発例もみられることも報告されている。一方硝子体内注入には、網膜剥離や眼内炎を惹起する恐れがあり、この点からもテノン嚢下経路を優先して行うことが推奨される。

今後、有効例と無効例をより詳細に検討し、本治療が適当とされる病態について予測できることを目指すとともに、再発をくりかえす例への対処についても検討することが必要である。

### 文献

- 1) Helm CJ, Holland GN : The effects of posterior subtenon injection of triamcinolone acetonide in patients with intermediate uveitis. *Am J Ophthalmol.* 120: 55-64, 1995.
- 2) 大黒伸行、山中栄美子、他：糖尿病黄斑浮腫に対するトリアムシノロン・テノン嚢下投与の効果。第56回日本臨床眼科学会抄録 p81、2002.
- 3) Benhamou N, Massin P, et al.: Intravitreal triamcinolone for refractory pseudophakic macular edema. *Am J*



64歳女性のBRVOに伴う黄斑浮腫。左より、テノン嚢下注射前、注射後4週、注射後6ヶ月、再注射後2週のOCT所見を示す。再発時を含めて注射により速やかな浮腫の軽快がみられる。



- Ophthalmol. 135: 246-249, 2003.
- 4) Jonas JB, Kreissig I, et al.: Intravitreal injection of triamcinolone for diffuse diabetic macular edema. Arch Ophthalmol. 121: 57-61, 2003.
  - 6) Ip MS, Kumar KS. Intravitreal triamcinolone acetonide as treatment for macular edema from central retinal vein occlusion. Arch Ophthalmol. 120: 1217-9, 2002.
  - 7) Martidis A, Duker JS, et al.: Intravitreal triamcinolone for refractory diabetic macular edema. Ophthalmology 109: 920-7, 2002.
  - 8) Greenberg PB, Martidis A, et al. : Intravitreal triamcinolone acetonide for macular oedema due to central retinal vein occlusion. Br J Ophthalmol. 86: 247-8, 2002.
  - 9) Antcliff RJ, Spalton DJ, et al.: Intravitreal triamcinolone for uveitic cystoid macular edema: an optical coherence tomography study. Ophthalmology. 108: 765-72, 2001.

# 近視性黄斑円孔網膜剥離に対する内境界膜剥離の意義

The rationale of internal limiting membrane peeling during vitrectomy for macular hole and retinal detachment in highly myopic eyes.

生野恭司、沢 美喜、五味 文、瓶井資弘、大路正人、田野保雄  
大阪大学大学院医学系研究科 眼科学教室

Yasushi Ikuno, MD, Miki Sawa, MD, Fumi Gomi, MD,  
Motohiro Kamei, MD, Masahito Ohji, MD, and Yasuo Tano, MD  
Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School

## 【抄録】

目的：黄斑円孔網膜剥離（MHRD）に対する硝子体手術で内境界膜剥離の有効性を検討する。

対象及び方法：1992年から10年間に硝子体手術を施行した MHRD 30症例30眼の術後視力、初回復位率、円孔閉鎖率を検討した。内訳は non-ILM 群17眼、ILM 群13眼で、術後円孔閉鎖は光干渉断層計が測定できた20眼（non-ILM 群9眼、ILM群11眼）で検討した。

結果：初回復位率は non-ILM 群が82%に対して ILM 群92%、術後最終視力の間値は non-ILM 群が0.1、ILM 群0.07と non-ILM 群が若干良好であった。術後円孔閉鎖率は non-ILM 群が44%、ILM 群においても36%であった。

結論：有意差を認めなかったが、MHRD に対する内境界膜剥離併用は初回復位率を若干上げるが、最終視力は若干低下せしめた。また、内境界膜剥離の有無にかかわらず円孔閉鎖率は低率であった。

Purpose: We compared the surgical results of patients who received vitrectomy with internal limiting membrane (ILM) peeling and those without in MHRD in order to evaluate the efficacy of this manipulation. Subjects and Methods: Thirty highly myopic eyes of 30 patients who underwent vitrectomy for MHRD were included in the study. ILM peeling was performed in 13 of 30 study eyes (ILM group) and not performed in the rest of 17 eyes (non-ILM group). Surgical results including visual outcome, retinal reattachment rate after the initial surgery, and macular hole closure rate were compared between the groups. The macular hole closure rate was studied using Optical Coherence Tomography in 20 eyes (11 eyes of ILM group and 9 of non-ILM group).

Results: Retina was totally reattached in 82% of non-ILM group and 92% of ILM group. Median value of postoperative final visual acuity was 0.1 in non-ILM group, while 0.07 in ILM group. Macular hole closure rate was 44% in non-ILM group and 36% in ILM group after the surgery.

Conclusions: Although there was not statistically significant difference in any analysis, ILM peeling seems to raise retinal reattachment rate after the initial surgery. Visual outcome was somewhat lower in eyes with ILM peeling. In either groups macular hole closure rate was low.

キーワード：黄斑円孔、網膜剥離、強度近視、硝子体手術、内境界膜

Key Words : Macular hole, Retinal detachment, High myopia, Vitrectomy, Internal limiting membrane

## 目 的

強度近視眼の特色として黄斑円孔に続発する網膜剥離（MHRD）をきたすことが知られている。従来から難治性疾患として知られており、強膜側からの黄斑バックリング、硝子体切除術あるいは強膜短縮術など様々な手術が試みられてきたがどの術式においても満足できる網膜復位率を得ることは困難であった。近年硝子体手術の進歩によって硝子体手術とガスタンポナーデが好んで用いられる傾向にあるが、それでも初回復位率は7割程

度とその他の網膜剥離と比較して低い。<sup>1)</sup> また本疾病が好発する強度近視眼では網膜の萎縮性変化も手伝って視力予後は従来の黄斑円孔よりも悪いとされている。

MHRD の原因として硝子体皮質の網膜面に対する牽引が考えられている。癒着した後部硝子体膜が収縮することにより求心方向の力が生じ、網膜剥離を生じるのである。牽引を除去する最も有効な手段として円孔周囲の内境界膜（ILM）をインドシアニングリーン（ICG）で染色し剥離す

る方法が有効と考えられ、少数例ではあるが試みられている。<sup>2), 3)</sup> しかしながら ICG そのものの毒性や ILM による網膜の物理的あるいは機能的傷害も報告されており、<sup>4)~6)</sup> その有効性は未だ定かではない。本研究では ILM 剥離の有効性を検討するために、硝子体切除術を施行した MHRD 例を ILM 剥離を併用した ILM 群と ILM 剥離を併用しなかった non-ILM 群の 2 群に分類し術後成績を比較検討した。

#### 対象および方法

1992年から2002年までの期間に大阪大学医学部付属病院にて硝子体手術を施行した強度近視眼における MHRD 例連続30例30眼である。術後経過観察期間が6ヶ月未満の症例、脈絡膜新生血管を併発した症例は除外した。近視眼の定義として屈折値が-8ディオプター以上もしくは、超音波 A モードで測定した眼軸長が25mm 以上のものとした。これら症例をレトロスペクティブに調査を行い、術後手術成績について検討した。検討項目は術後視力、初回網膜復位率、そして光干渉断層計 (OCT) を用いた黄斑円孔閉鎖の有無である。術式は全例硝子体切除術を最初に行い、できるだけ丁寧に後部硝子体皮質を網膜面から除去した。その後 ILM 群では ICG で ILM を染色し、後極部 ILM を鑷子で円形に剥離した。Non-ILM 群では ILM 剥離を行わなかった。その後眼内液ガス置換を行い C3F8 を用いた長期ガスタンボナーデを行った。硝子体手術は熟練した3人の術者が行い、特に重篤な術中併発症はなかった。OCT は熟練した同一検者が行い、中心窩の状態をスキャンして黄斑円孔が術後開存しているのか閉鎖しているのかを判定した。

#### 結果

最終的には両群ともに全例で網膜は完全復位した。初回復位率は non-ILM 群が17眼中14眼 (82%) に対して ILM 群13眼中12眼 (92%) と ILM 剥離を行ったほうがやや良好であった。術後最終視力の間値は non-ILM 群が0.1、ILM 群0.07 と non-ILM 群が若干良好であった。術後円孔閉鎖率は non-ILM 群が44%、ILM 群においても36%と両者でも低率であった。どの検討においてもノンパラメトリック検定もしくは Fisher の正確確率検定で両群間に有意差を認めなかった。

#### 結論

今回の検討では有意差を認めなかったが、MHRD に対する ILM 併用は初回復位率を若干上げるが、最終視力は若干低下せしめた。これは

ILM 剥離により牽引を確実に解除できるが、逆に網膜を障害する可能性があることを示唆するものである。しかしながらいずれの検討においても統計学的に有意差を認めるには至らなかったため今後症例を追加して検討する予定である。また、ILM 剥離の有無にかかわらず円孔閉鎖率が極めて低率であったことは眼軸長の極度の延長が関与している可能性がある。

#### 文献

- 1) Wolfensberger TJ, Gonvers M. Surgical treatment of retinal detachment owing to macular hole. *Semin Ophthalmol*. 15: 122-127., 2000.
- 2) Kadonosono K, Yazama F, Itoh N, et al. Treatment of retinal detachment resulting from myopic macular hole with internal limiting membrane removal. *Am J Ophthalmol*; 131: 203-207., 2001.
- 3) Kusaka S, Hayashi N, Ohji M, et al. Indocyanine green facilitates removal of epiretinal and internal limiting membranes in myopic eyes with retinal detachment. *Am J Ophthalmol*; 131: 388-390., 2001.
- 4) Terasaki H, Miyake Y, Nomura R, et al. Focal macular ERGs in eyes after removal of macular ILM during macular hole surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 42: 229-234., 2001.
- 5) Gandorfer A, Haritoglou C, Gass CA, Ulbig MW, Kampik A. Indocyanine green-assisted peeling of the internal limiting membrane may cause retinal damage. *Am J Ophthalmol*; 132: 431-433., 2001.
- 6) Enaida H, Sakamoto T, Hisatomi T, Goto Y, Ishibashi T. Morphological and functional damage of the retina caused by intravitreal indocyanine green in rat eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*; 240: 209-213., 2002.

# 成体網膜幹細胞の性状解析

Adult retinal stem cells in rabbits give rise to neuron, glia and retinal pigment epithelium.

柳 靖雄<sup>1</sup>、井上祐治<sup>1</sup>、玉置康裕<sup>2</sup>、新家 眞<sup>2</sup>、大河内仁志<sup>1</sup>

1) 国立国際医療センター研究所・細胞組織再生医学研究部、2) 東京大学医学部・眼科学教室

Yasuo Yanagi<sup>1</sup>、Yuji Inoue<sup>1</sup>、Yasuhiro Tamaki<sup>2</sup>、Makoto Araie<sup>2</sup>、Hitoshi Okochi<sup>1</sup>

1 : Department of Regenerative Medicine, Research Institute, International Medical Center of Japan,

2 : Department of Ophthalmology, University of Tokyo school of medicine,

## 【抄録】

両生類や魚類と異なり、ほ乳類の完成した網膜には幹細胞が存在せず、そのため、網膜障害による視機能障害は回復する手段がないと考えられている。

しかしながら、非常に最近になってマウスにおいて成体に網膜幹細胞が存在することが報告された。生体内でのその機能は不明であるが、試験管内で増殖し、双極細胞や視細胞に分化することが判明し、これらの幹細胞が、細胞を用いた移植療法に役立つ可能性があると考えられるようになった。本研究では成体家兎より網膜幹細胞を取得し、それらがいかなる眼疾患治療のために有用となりうるかを明らかにするために、特に細胞の分化能に着目しその性状を *in vitro* で解析した。その結果、哺乳動物の毛様体色素上皮には幹細胞が存在し、無色素上皮には分化の進んだ網膜前駆細胞が存在する可能性が示唆された。更に、感覚網膜細胞のみならず網膜色素上皮細胞も成体網膜幹細胞から作られる可能性が強く示唆された。

**PURPOSE:** A self-renewing, multipotential retinal stem cell in adult mammalian has been identified in mice. In the present study, adult retinal stem cells in rabbits are identified and characterized *in vitro*.

**METHODS:** To clarify the localization of stem cells in adult rabbits, the cells from peripheral neural retina, peripheral retinal pigment epithelium (RPE), ciliary body and iris were subjected to neurosphere forming assay, an assay widely employed for the isolation of neural stem cells, to yield cell clusters called "spheres". Self-renewal capability was tested by subculturing the dissociated cells from the spheres, and multipotency of the cells was examined by immunocytochemistry using pan-neuronal and astrocytic marker, as well as mature retinal cell markers.

**RESULTS:** Only the epithelial cells from the ciliary body could proliferate to form sphere colonies. Cells constituting sphere colonies expressed Chx10, a marker of retinal progenitor cells. Dissociated cells from spheres could proliferate to generate daughter sphere colonies. When spheres were cultured under differentiation conditions, the cells expressed pan-neuronal and astrocytic markers as well as selective markers of retinal cells; i.e. a photoreceptor specific marker protein, opsin, a ganglion cell marker,  $\beta$  III tubulin, a horizontal cell marker, neuro-filament M, a Muller cell marker, glutamine synthetase, a bipolar cell marker, protein kinase C  $\alpha$  and an RPE marker,  $\beta$ -catenin.

**CONCLUSION:** Ciliary body of adult rabbits contains retinal stem cells that can give rise to neuron, glia and RPE.

**Key Words :** Retinal stem cell, retinal regeneration, ciliary body

## はじめに

哺乳動物の感覚網膜は七種類のニューロンより構成される。発生生物学的検討から、発育初期から生後網膜が完成するまでに存在する網膜幹細胞<sup>1)</sup>が、すべての感覚網膜細胞を生み出すものと考えられていた<sup>2)</sup>。また、感覚網膜細胞層は網膜色素上皮に取り囲まれている<sup>3)</sup>。感覚網膜と網膜色素上皮は眼杯の内側層と外側層に由来し、網膜

発生初期には眼杯は眼胞と呼ばれる両者の起源は共通であるものの、両者に共通の前駆細胞の存在は同定されていない。

両生類や魚類と異なり<sup>3)</sup>、ほ乳類の完成した網膜には幹細胞が存在せず、そのため、網膜障害による視機能障害は回復する手段がないと考えられている。

しかしながら、非常に最近になってマウスにお