

いて成体に網膜幹細胞が存在することが報告された⁴⁾。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。

細胞移植療法が実現するためには実験動物を使った移植実験が必要になる。さらに、その細胞の性状解析も必要になる。この目的には大きな眼球を持ち、人に応用可能な手術法を考案するのにウサギがもっとも適した動物の一つであると考えられる。また、ウサギにおいては薬剤誘発性網膜障害モデルがヒト疾患モデルとなりうることが報告されている。

そのため、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。

方法と対象

実験動物

ダッチラビット (2 から 2.4Kg) およびジャパニーズホワイトラビット (2 から 2.4kg) を用いた。すべての実験は ARVO Statement for Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research に従った。

細胞の準備

ペントバルビタールの過剰量投与によって安楽死後、ウサギより眼球を摘出し虹彩、毛様体、網膜色素上皮、感覚網膜よりトリプシン処理およびピペッティングにて細胞を単一にして取得した。なお、ウサギにおいては虹彩後面に突起物が認められる (Fig 1 A, B) が、ラットやマウス等のほかの齧歯類あるいはサルやヒトなどの霊長類においてはこのような突起構造は毛様体の特徴的構造であるので、本研究においては突起物は虹彩ではなく毛様体として取り扱った。

ニューロスフェア法による幹細胞の取得

細胞培養はこれまでに報告のあるように行った⁴⁾。すなわち、細胞密度 $10/\mu\text{l}$ で DMEM/F12 培地に N2 supplement を添加し培養を開始した。さらに、EGF および bFGF を隔日で最終濃度 $10\text{ng}/\text{ml}$ 、 $20\text{ng}/\text{ml}$ となるように培地中に添加した。細胞は増殖し、培養開始から 14 日後にニューロスフェアと呼ばれるクラスターを形成した。スフェアの直径の計測には倒立顕微鏡を用いた。

自己複製能力の確認に培養 14 日後にスフェアを

トリプシンで消化し単一細胞にした後に $10/\mu\text{l}$ もしくは $100/\mu\text{l}$ の細胞濃度で播種しさらに 14 日間培養して 2 次スフェアの形成を観察した。さらに、2 次スフェアはトリプシン処理にて再度単一細胞にして培養を行い、3 次スフェアの形成を同様の条件下で観察した。

スフェアに由来する細胞の分化

分化誘導のためにスフェアもしくはスフェアよりバラバラにした細胞を胎児牛血清 FBS の存在下で 1 日間培養することによって pol-D-lysine と laminin でコートされたディッシュに付着させた。その後 1% FBS、 $10\mu\text{l}/\text{ml}$ の bFGF あるいは両者の存在下で 14 日間培養を行った。

免疫細胞化学

スフェアもしくは細胞はメタノールで 30 分間固定し 1% スキムミルクを含んだ PBS で 10 分間ブロックした。抗 Bromodeoxyuridine (BrdU) での染色のためには BrdU でラベルされたスフェアをブロッキングの前に 4M HCl で処理した。サンプルは、1 次抗体で 2 時間反応し、ブロッキングバッファーで 2 度洗った後に 2 次抗体を用いて 2 時間反応させた。用いた抗体および希釈は以下の通りである。マウスモノクローナル anti-BrdU-FITC (Roche Diagnostics 社、1 : 200)、ヤギポリクローナル anti-Chx10-N terminal (Exalpha 社、1 : 100)、マウスモノクローナル anti-MAP2 (Sigma、1 : 200)、ラビットポリクローナル anti-GFAP (Dako、1 : 500)、マウスポリクローナル anti- β III tubulin (Babco、1 : 500)、ラビットポリクローナル anti-neurofilament-M (Chemicon International、1 : 200)、マウスモノクローナル anti-PKC (BD Biosciences、1 : 200)、マウスモノクローナル anti-glutamine Synthetase (BD Biosciences、1 : 200)、マウスモノクローナル anti-opsin (Sigma、1 : 200)。2 次抗体には Alexa-488 conjugated donkey IgG against mouse IgG, Alexa-488 conjugated donkey IgG against sheep IgG, Alexa-488 conjugated donkey IgG against rabbit IgG を用いた。すべての 2 次抗体は Molecular Probe 社のものを 1 : 200 で用いた。1 次抗体を添加しないスライドを negative control とした。サンプルは、Carl Zeiss 社の共焦点顕微鏡 LSM510 を用いて観察した⁵⁾。

結果

ウサギにおける成体網膜幹細胞の局在

まず、成体網膜幹細胞の局在を明らかにするために、有色家兎（ダッチラビット）の眼球を周辺部感覚網膜、周辺部網膜色素上皮、毛様体、虹彩に分け、それぞれの部分より取得した細胞をニューロスフェア法に供した。その結果、毛様体上皮由来の細胞からにおいてのみ、スフェアの形成が認められた。増殖因子を添加しないでもいくつかのコロニー形成が認められたが、コロニーの形成は上皮成長因子（EGF）および線維芽細胞増殖因子（bFGF）存在下で促進された（Fig 1 C）。ほとんどのコロニーは色素を伴った細胞を中心に含んでいたが（Fig 1 E）、全く色素を含まないスフェアもいくつか観察された（Fig 1 F）。Albinoのウサギにおいても同様の結果が得られた（Fig 1 D）。すなわち、これらの結果から毛様体上皮由来の細胞のみがEGF、bFGFに反応して増殖することがわかった。

さらに、BrdUを添加し24時間培養したところ取り込みが認められ（fig 1 G）、コロニー形成が播種した細胞が単純にaggregationを作ったのではなく、実際に増殖していることが確認された。スフェアは、網膜前駆細胞のマーカであるChx10陽性であったが（Fig 1 H）、MAP2や、GFAP等の成熟ニューロンあるいはグリアのマーカでは染色されなかった。

スフェアの自己複製能

次にそれらのスフェアの自己複製能を確認するために、スフェア由来の細胞をバラバラにし、さらなるスフェア形成が認められるかを検討した。その結果2次スフェアの形成が認められ（Fig 2 A）、自己増殖能があるということが確認された。興味深いことに、すべての2次スフェアは色素を持った細胞を中心に含んでいた。色素を持った細胞を中心に含む1次スフェア由来の細胞と、色素を持った細胞を含まない1次スフェア由来の細胞を別々のディッシュで培養すると前者からは2次スフェアが形成されるのに対し後者からは2次スフェアは形成されなかった（data not shown）。2次スフェアは細胞の播種濃度を上げ、1次スフェアを形成させたcondition mediumを用いることによって形成率が上昇した（Fig 2 A）。さらに、2次スフェアから3次スフェアが形成され自己複製能があることが確認された（Fig 2 A）。しかしながら、3度のpassageの後では、スフェアは形成されなかった。

はじめに培養を開始した直後は直径の大きな1次スフェアが形成されたが、passage毎に新た

に作られたスフェアの直径は小さくなっていった（Fig 2 B）。

これらの結果から、成体網膜幹細胞は、胎生網膜幹細胞と同様に⁶⁾ passageの後では、増殖能が低下することが判明した。

成体網膜幹細胞はニューロン、グリア、色素上皮細胞を産生する。

まず、スフェア由来の細胞が、神経系の細胞へと分化することができるかどうかを検討するために、細胞を神経およびアストロサイトのマーカで染色した。その結果1次スフェアをpoly D lysine/laminineコートディッシュで1% FBS存在下で14日間培養後にMAP2、GFAPを発現することがわかった（Fig 3 A, B）。さらに、2次スフェアを同様の培養条件で分化させたところ、同様にMAP2、GFAPを発現することがわかった（data not shown）。つぎに、網膜細胞選択的なマーカを発現するかどうかを確認するために、24時間血清存在下でpoly D lysine/laminine coatディッシュで培養しスフェアを接着させ、さらに、1% FBS、bFGFあるいは両者の存在下で、21日間スフェアを培養し、視細胞特異的マーカのオプシン、神経節のマーカの β III tubulin (TuJ1)、水平細胞のマーカであるNeurofilament M (NF-M)、Muller細胞のマーカであるGlutamine Synthetase、双極細胞のマーカであるProtein kinase C (PKC)、および網膜色素上皮のマーカである β -cateninで染色した（Fig 3 C to H）。BFGF単独分化を誘導した際は半分以上の細胞がPKCを発現しており、NF-M陽性細胞は約20%であった。しかしながら、1% FBSおよび、1% FBSに血清を添加した際にはこれらの細胞の出現はまれ（0.1%以下）であった。一方、すべての培養条件下において15-25%の細胞がオプシン陽性であった。また、TuJ1、GS陽性細胞はいずれの培養条件においても非常にまれ（0.1%以下）であった。また、 β -catenin陽性細胞も一定の割合で観察されたが、クラスター形成のためその定量は困難であった。

考察

ウサギ毛様体上皮より自己複製能を有し多分化能を有する網膜幹細胞の取得に成功した。

胎生期には成長因子の添加によって網膜色素上皮から感覚網膜細胞への分化転換が起こる報告されている⁷⁾が、physiologicalな状態でこのような現象は観察されていない。また、胎生後期においてその分化転換能もなくなり、さらに、感覚網膜細胞の前駆細胞から網膜色素上皮が形成された

報告も存在しない。すなわち、感覚網膜前駆細胞および、網膜色素上皮前駆細胞がそれぞれの成熟した細胞を形成することはわかっているが、これらに共通の前駆細胞は同定されていなかった。さらなる検討が必要であるが、本研究では β -catenin 陽性細胞が認められたこと、さらに、サルにおいて cytokeratin 陽性細胞が同様のスフェアから取得されたことから、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る。

これまでの研究においては網膜の最周辺部において幹細胞が存在することがわかっていたが、哺乳動物における幹細胞の正確な局在はわかっていた³⁾。本研究で有色ウサギにおいて色素細胞を含んだスフェアと色素細胞を含まないスフェアが同定された。また、われわれは、サルにおいても同様の結果を得ている。しかしながら、すべての2次スフェアは色素を含まなかった。色素を含まないスフェアは元々色素を持った細胞が培養中に色素を失った可能性もあるものの、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。

また、我々の結果から、EGF、bFGFの添加がウサギ網膜幹細胞の分裂を促進することが示された。しかしながら、それらの増殖因子の存在下においても passage 後は増殖能が低下していくことが示された。同様の結果はマウスやサルにおいても観察されている。すなわち、網膜幹細胞の in vitro での旺盛な発育のためにはほかの因子の添加が必要であるか、もしくは、これらの幹細胞は内的要素によって限られた増殖能しか有していない可能性がある。

網膜下、あるいは、硝子体中が免疫学的特権を有するという昔からの考えは、非常に最近の実験によって覆されている。免疫学的な問題を考慮した際に、autograft が allograft よりすぐれていることは当然である。ヒトにおいて毛様体は視機能を保持したままで取得できるということは臨床研究において判明しているので autograft を用いた移植療法のために自己網膜幹細胞を取得することは可能であると考えられる。しかしながらこのような細胞が移植療法に用いることができるかどうかはさらなる実験が必要である。この点でウサギは比較的大きな眼球を有し、小動物の小さな眼球を用いた実験でよく見られるような出血などの合併症の起こりにくい再現性のよい手術を行うことが可能である。今後は移植実験を行い移植された幹細胞の振る舞いについて in vivo で検討する予定である。

文 献

- 1) Turner DL, Cepko CL. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development *Nature* 1987; 328: 131-136.
- 2) Marquardt T, Gruss P. Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all *Trends Neurosci* 2002; 25: 32-38.
- 3) Perron M, Harris WA. Retinal stem cells in vertebrates *Bioessays* 2000; 22: 685-688.
- 4) Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye *Science* 2000; 287: 2032-2036.
- 5) Yanagi Y, Tamaki Y, Obata R, et al. Subconjunctival Administration of Bucillamine Suppresses Choroidal Neovascularization in Rat *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 3495-3499.
- 6) Ahmad I, Dooley CM, Thoreson WB, Rogers JA, Afiat S. In vitro analysis of a mammalian retinal progenitor that gives rise to neurons and glia *Brain Res* 1999; 831:1-10.
- 7) Pittack C, Jones M, Reh TA. Basic fibroblast growth factor induces retinal pigment epithelium to generate neural retina in vitro *Development* 1991; 113: 577-588.

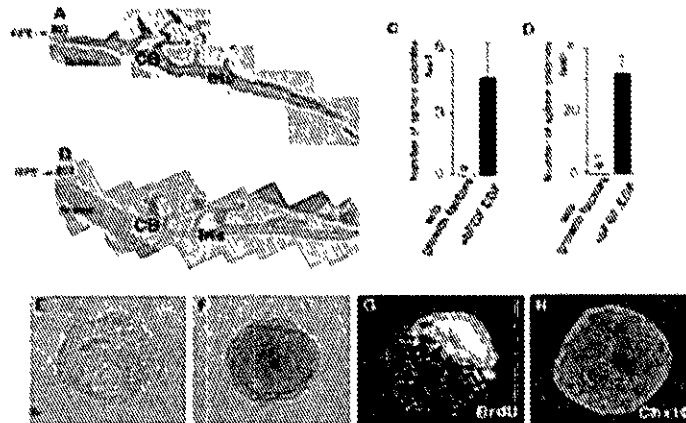


Fig1

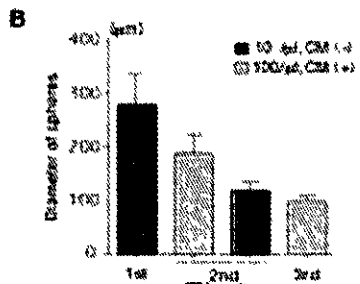
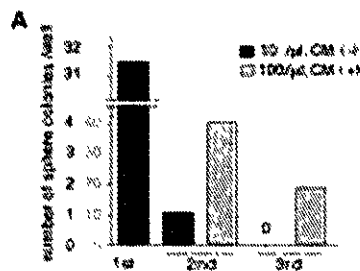


Fig2

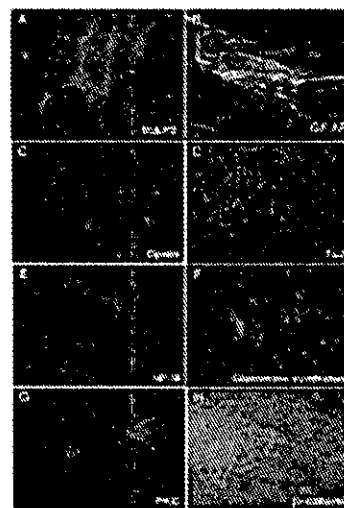


Fig3

Fig1 毛様体上皮由来1次スフェアの性状。

有色家兎 (A) および白色家兎 (B) の網膜周辺部の構造。虹彩裏面に突起が認められることに注意。本研究では虹彩裏面の突起は毛様体として扱った。有色家兎 (C) および白色家兎 (D) 毛様体上皮由来スフェアの形成数。細胞は、10/μlの播種濃度で24 well dishに播種し、14日後に形成されたスフェアの数数を数えた。有色家兎毛様体上皮由来スフェアは色素を持った細胞を全く含まないスフェア (E) および中心に色素を持った細胞を含んだスフェアが形成された。1次スフェアのBRDUの取り込み、およびCHX10 (網膜前駆細胞のマーカー) の発現を免疫学的方法により検出した。

Fig2 スフェアの自己複製能

1次スフェア由来の細胞をトリプシン処理にて単一細胞に分離した後、さらに増殖因子を含む培地で培養を行った。培養開始から14日後にスフェアの数 (A) および大きさ (B) を計測した。

Fig3 スフェアに由来する細胞の多分化能

スフェアを1% FBS存在下で14日培養した後にMAP2 (A) およびGFAPで免疫染色を行った。さらに視細胞のマーカーであるOpn、ganglion cellのマーカーであるβIII tubulin、水平細胞のマーカーであるNF-M、ミュラー細胞のマーカーであるGlutamine Synthetase、双極細胞のマーカーであるPKCおよび網膜色素上皮細胞のマーカーであるβ-cateninで染色を行った。

サル ES 細胞から分化誘導した網膜色素上皮細胞

Differentiation of retinal pigment epithelial cells from primate embryonic stem cells

春田雅俊¹、笹井芳樹²、河崎洋志³、雨宮かおり⁴、大音壮太郎⁴、末盛博文⁵、
中辻憲夫⁵、北田容章⁶、井出千束⁶、本田孔士⁴、高橋政代¹

1 : 京都大学医学部附属病院探索医療センター、2 : 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター

3 : 京都大学再生医科学研究所再生誘導研究分野、4 : 京都大学大学院医学研究科視覚病態学

5 : 京都大学再生医科学研究所発生分化研究分野、6 : 京都大学大学院医学研究科機能微細形態学

Masatoshi Haruta¹, Yoshiki Sasai², Hiroshi Kawasaki³, Kaori Amemiya⁴,
Sotaro Ooto⁴, Hirofumi Suemori⁵, Norio Nakatsuji⁵, Masaaki Kitada⁶,
Chizuka Ide⁶, Yoshihito Honda⁴, Masayo Takahashi¹

1 : Department of Experimental Therapeutics, Translational Research Center, Kyoto University Hospital

2 : Organogenesis and Neurogenesis Group, Center for Developmental Biology, RIKEN

3 : Department of Medical Embryology and Neurobiology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

4 : Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Graduate School of Medicine, Kyoto University

5 : Department of Development and Differentiation, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

6 : Department of Anatomy and Neurobiology, Graduate School of Medicine, Kyoto University

【抄録】

目的：網膜色素変性の一部や加齢黄斑変性は網膜色素上皮細胞の障害が視機能低下の大きな原因である。これらの疾患に対する網膜色素上皮細胞移植の細胞源として胚性幹細胞（ES細胞）を用いることができるかどうかを検討する。

方法：カニクイサル ES 細胞をマウス頭蓋骨髄由来 PA6 細胞をフィーダー細胞として分化誘導培養液にて培養する（SDIA 法）。色素を持つ細胞をピックアップし、マトリゲル上で網膜色素上皮細胞と同条件で培養し増殖させた後、4%パラホルムアルデヒドにて固定、細胞を抗 ZO1 抗体を用いて免疫染色を行った。また、western blot 法にて網膜色素上皮細胞固有の CRLBP および RPE65 蛋白産生を検出した。さらに電子顕微鏡を用いて微細構造を観察し、ビーズ貪食能を有するかどうかを検討した。

結果：サル ES 細胞から六角形敷石状の色素を持った細胞が得られた。細胞間はタイトジャンクションを形成していることを示唆する ZO1 の細胞辺縁部の染色を認めた。Western blot 法にて網膜色素上皮細胞固有の CRLBP および RPE65 蛋白が陽性であった。電子顕微鏡にて表面に微柔毛があり、多数の色素顆粒を持った 1 層の細胞が観察され、培養液中にビーズを混入した後はビーズを貪食した像が観察された。

結論：サル ES 細胞から得られた色素細胞は網膜色素上皮細胞であり、タイトジャンクションで結合された細胞シートとして増殖させることができた。

The retinal pigment epithelium (RPE) plays critical roles in visual functions and in the viability of photoreceptors. Here, we show that retinal pigment epithelial cells can be generated, enriched, and expanded in vitro from embryonic monkey stem cells. These primate embryonic stem cell-derived pigment epithelial cells exhibit the characteristics expected of the RPE. Considering the close phylogenetic relationship between humans and cynomolgus monkeys, we can also expect to apply the same method of differentiation used to generate pigmented epithelial cells to human ES cells. The present study raises the possibility that embryonic stem cells constitute a new source of cells for retinal transplantation in patients with RPE dysfunction.

キーワード：胚性幹細胞、ES 細胞、網膜色素上皮細胞、再生医療、加齢性黄斑変性、網膜色素変性、分化誘導、網膜移植、カニクイサル

緒言

哺乳類の初期胚に由来する胚性幹細胞 (embryonic stem cells; ES 細胞) は未分化な状態を維持して培養することが可能で、ほぼすべての組織細胞に分化できる全能性幹細胞である。1981年にマウスの ES 細胞株¹⁾が樹立されたのに続き、1998年にはヒトの ES 細胞株²⁾も樹立された。これまでに樹立されたヒト ES 細胞株からは神経細胞、心筋細胞、血液細胞、膵臓細胞などへの分化も報告されている。これらのヒト ES 細胞は無尽蔵に増殖させることができることから、再生移植医療における新たな細胞源としてその可能性が注目されている。我々は2002年、カニクイサル ES 細胞³⁾を PA6 ストローマ細胞 (マウス頭蓋骨由来株) と共培養すると、効率よく色素上皮細胞が誘導できることを報告した⁴⁾。今回は色素細胞が真の網膜色素上皮細胞に分化しているかどうかを確認した。

方法

カニクイサル ES 細胞をマウス頭蓋骨髄由来 PA6 細胞をフィーダー細胞として分化誘導培養液にて培養する (SDIA 法)。色素を持つ細胞をピックアップし、マトリゲル上で網膜色素上皮細胞と同条件で培養し増殖させた後、4%パラホルムアルデヒドにて固定、細胞を抗 ZO1 抗体を用いて免疫染色を行った。また、western blot 法にて網膜色素上皮細胞固有の CRLBP および RPE65 蛋白産生を検出した。さらに電子顕微鏡を用いて微細構造を観察し、ビーズ貪食能を有するかどうかを検討した。

結果

Western blot 法にて網膜色素上皮細胞固有の CRLBP および RPE65 蛋白が陽性であった。

結果

サル ES 細胞から六角形敷石状の色素を持った細胞が得られた (図1)。眼杯のマーカーである Pax6 を発現しており、網膜の細胞に分化していると思われた。Phalloidin によって actin の分布を見ると細胞壁に細胞をかたどるように分布する網膜色素上皮細胞に特有の配列を観察できた。また、タイトジャンクションの形成を示唆する ZO1 の細胞辺縁部の染色を認めた。

RT-PCR では RPE65、CRLBP といった網膜色素上皮細胞固有蛋白の mRNA が確認された。

電子顕微鏡にて表面に微柔毛があり、多数の色素顆粒を持った1層の細胞が観察され、培養液中にビーズを混入した後はビーズを貪食した像が観

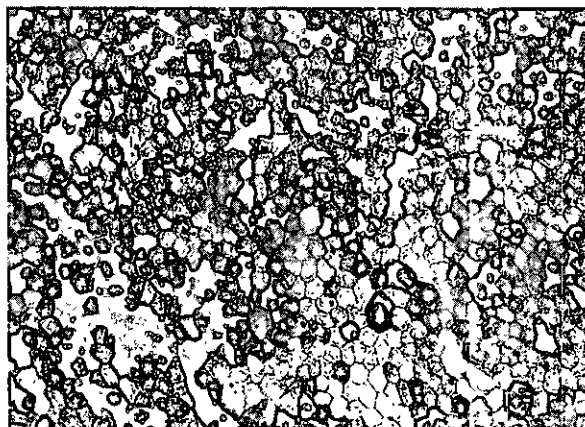


図1 サル ES 細胞から分化誘導した網膜色素上皮細胞

図1の説明、サル ES 細胞を PA6 ストローマ細胞と共培養すると網膜色素上皮細胞のコロニーが高頻度に出現する。写真はコロニーを選別して網膜色素上皮細胞を細胞シートとして培養したもの。多角形の細胞形態に加えて、色素顆粒を有している。文献4より改変して引用。

察された。

考察

以上の結果からカニクイサル ES 細胞から得られた色素細胞は網膜色素上皮細胞に分化した細胞であると考えられた。また、網膜色素上皮細胞の重要な働きである貪食能を有していた。

この色素上皮細胞は色素を有していること、典型的な多角形の細胞形態から顕微鏡下で容易に同定が可能で、その部分を採取すれば網膜色素上皮細胞を細胞シートとして選択的に増殖できる。サル ES 細胞は同じ霊長類であるヒト ES 細胞と性質が似ていることが報告されており、将来ヒト ES 細胞の研究が認可されれば、この網膜色素上皮細胞への分化誘導法はヒトの ES 細胞にもそのまま適用できる可能性が高いと考えられる。

加齢性黄斑変性では脈絡膜新生血管からの網膜下への滲出性漏出が視力低下の主な原因となる。硝子体手術により脈絡膜新生血管を抜去することも行われているが、抜去と同時にその部位の網膜色素上皮細胞も除去されてしまうため、術後の視力改善が得られないことが多い。そのため網膜色素上皮欠損部に、虹彩色素上皮や胎児網膜色素上皮の細胞懸濁液を移植することが実際の臨床で試みられている。

ヒト ES 細胞からもサルと同様にして網膜色素上皮細胞が誘導できれば、脈絡膜新生血管抜去後の網膜色素上皮の細胞移植として利用することが考えられる。この場合、網膜色素上皮が細胞シー

トとして培養できるため、細胞極性を保った状態で移植することも可能である。網膜色素上皮細胞は視物質の代謝だけでなく、視細胞外節の貪食や血液網膜関門の形成などの役割を担っている。したがって、ES 細胞由来の網膜色素上皮細胞を細胞シートで移植すれば、色素上皮の細胞懸濁液移植と比べてその移植効果も期待できると考えられる。今後ヒト ES 細胞を再生移植医療として臨床応用するためには、その細胞移植による医学的な効果を動物実験で十分検討する必要がある。また拒絶反応の問題や安全性の問題も解決しなければならない。さらにヒト初期胚を利用することの倫理上の問題についての議論もなされねばならない。

ES 細胞からは短期間かつ簡便に網膜色素上皮細胞を分化させることができ、網膜色素上皮の機能再建を考えるうえで重要な移植源のひとつとなりうると考えられる。また ES 細胞は未分化な状態を維持して無限に増殖させることができるため、霊長類の網膜色素上皮細胞の発生や病理を研究するための研究材料を提供できる。さらに網膜色素上皮細胞を標的とした新規薬剤開発やその他の治療法の開発にも利用できる可能性がある。

文 献

- 1) Evans, MJ et al: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-6, 1981
- 2) Thomson, JA et al: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-7, 1998
- 3) Suemori, H et al: Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. *Dev Dyn* 222: 273-9, 2001
- 4) Kawasaki, H et al: Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1580-5, 2002

参考となる論文の別冊

Kawasaki, H et al: Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1580-5, 2002

網膜侵襲の少ない人工網膜電極の試作

Retinal prosthesis with less damage to retina

鈴木 聡、寺崎浩子、三宅養三
名古屋大学 医学部 眼科

Satoshi Suzuki, Hiroko Terasaki, Yozo Miyake
Department of Ophthalmology, Nagoya University, School of Medicine,

網膜色素変性症に対する人工網膜が開発されつつある。その一つである網膜上電極は硝子体側から網膜上に刺激電極を移植し、現在は網膜タックにより固定される。従来の刺激電極は板状の形状をしており、強く押し付けすぎると電極の下の網膜は潰れてしまう。これを防ぐために電極の下にスペーサを設け、スペーサ部以外は網膜を圧迫しない形状を考案した。考案した電極の実用性を実証するため、ウサギを実験に使用することを目的にウサギ用電極模型を試作した。

ウサギ用電極模型の設計のため、ウサギ網膜厚を光干渉断層計（OCT）にて計測し、その網膜厚計測値をスペーサの高さを決定することに利用した。素材はシリコンを使用した。

実際にウサギに移植すると現在のシリコンの硬さでは電極の角で網膜を傷害することがわかり、より柔らかいシリコンの使用が必要であることが示唆された。

Many investigators are developing retinal prosthesis for retinitis pigmentosa. Epiretinal prosthesis is one of that, which is now fixed by retinal tack on the patient's retina from vitreous side. The shape of usual prosthesis is "plate". If we press too much, it makes damage to retina. To prevent this, we designed the new shape which has the spacer under the prosthesis. The parts of spacer will make damage but other areas of prosthesis make no damage. For the proof of the utility, we manufactured the rabbit's prosthesis because of rabbit's experiments.

To design the rabbit's prosthesis, we measured the retinal thickness of rabbit by OCT for decide the height of spacer. The material is silicone.

When we implanted this prosthesis, the edge of this made damage to retina. So we considered we had better to use softer silicone for material.

キーワード：人工網膜 網膜上電極 網膜色素変性症

目 的

失明者に対する視覚補助具として人工眼開発が始まっている¹⁾。これは失明者の残存細胞に電気機械的に情報を送り視覚として脳内で認識されることを目的としている。人工眼には視細胞の変性により失明する網膜色素変性症に対する人工網膜と視神経の機能が残っていない疾患に対する脳内電極タイプがある。また、人工網膜は網膜上に移植する網膜上電極と網膜下に移植する網膜下電極の二つのタイプがあり、現在我々は網膜上電極を開発の対象としている。網膜上電極は硝子体側から網膜上に刺激電極を移植し、現在は網膜タックにより固定されている。その従来の刺激電極は板状の形状をしており²⁾（図1）、強く押し付けすぎると電極の下の網膜は潰れてしまう。これを防ぐために電極の下にスペーサを設け、スペーサ部以外は網膜を圧迫しない形状を考案した（図2）。

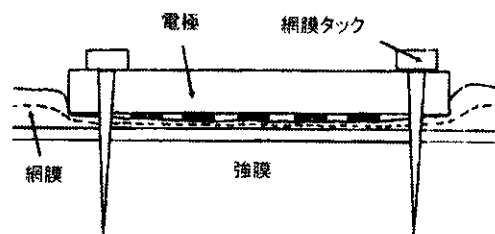


図1

板状電極を過度な力で固定すると網膜が押しつぶされてしまう。

考案した電極の実用性を実証するため、ウサギを実験に使用することを目的にウサギ用電極模型を試作した。

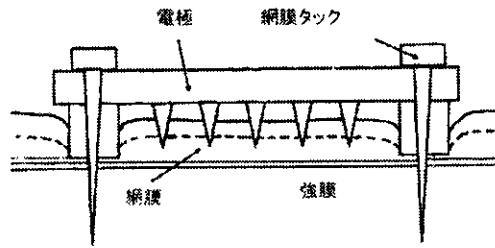


図 2

板状電極の下にスペーサを設けると刺激したい部分が障害を受けない。

方 法

電極の設計

ウサギ用電極模型の設計のため、ウサギ網膜厚を光干渉断層計 (OCT) にて計測し、その網膜厚計測値をスペーサの高さを決定することに利用した。

シリコンの硬度は3種類とした。OCTよりウサギ網膜厚は約100~120 μ mであり、スペーサを100 μ m、120 μ m、140 μ mとした。電極の縦横は5mm \times 6mmであり、厚さは1mmとした。固定には金属製網膜タックを使用した。

実験対象、移植方法

対象はウサギ5匹10眼である。ウサギをケタミン、キシラジンにて麻酔し、3ポートビトロクトミーを行った。一つのポートを5mmに切開を広げ、硝子体鑷子により電極を硝子体内に挿入した。広げたポートを縫い縮め、金属製網膜タックにより網膜上に固定した。

結 果

我々の使用した電極で効果的に固定に成功したものはなかった。原因はI) ほぼ全例に術中の大量出血 (硝子体出血、網膜下出血) が起こり手術継続が困難であった。II) 網膜の形状に電極が合わなかった。現在のシリコンの硬度では網膜に合わせて電極を反らせることができず、電極の角で網膜を傷つけてしまい、また中心部は網膜に接することができなかった。

考 察

I) の術中出血に関しては我々のウサギに対する手術手技が未熟であり、移植法の改良が必要であった。またII) については網膜の形状に合わせて反った電極を使用するか、より柔らかいシリコンを使用し網膜にスペーサ以外の部分が障害を与えないように再設計しなくてはならないことがわかった。

文 献

1) 鈴木 聡: 人工眼。玉井信ほか編。NEW

MOOK 眼科「眼組織移植と免疫」、金原出版、東京、95-102、2002

2) Majji AB, Humayun MS, Weiland JD, Suzuki S, D'Anna SA, de Juan E Jr: Long-term histological and electrophysiological results of an inactive epiretinal electrode array implantation in dogs. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999; 40(9): 2073-81

サル由来レンチウイルス (SIV) ベクターを用いた 色素上皮由来因子 (PEDF) 遺伝子導入による RCS ラットの視細胞変性抑制効果

Simian Lentiviral Vector-mediated Retinal Gene Transfer of Pigment Epithelium-Derived Factor
Protects Retinal Degeneration and Electrical Defect in Royal College of Surgeons Rats

宮崎勝徳^{1, 2}、池田康博^{1, 2}、米満吉和¹、後藤純信³、坂本泰二⁴、田端寿晃⁵、
上田泰次⁵、長谷川護⁵、飛松省三³、石橋達朗²、居石克夫¹

1 : 九州大学病理病態学、2 : 九州大学眼科、3 : 九州大学神経生理学、
4 : 鹿児島大学眼科、5 : DNAVEC 研究所

Masanori Miyazaki^{1, 2}、Yasuhiro Ikeda^{1, 2}、Yoshikazu Yonemitsu¹、Yoshinobu Goto³、
Taiji Sakamoto⁴、Toshiaki Tabata⁵、Yasuji Ueda⁵、Mamoru Hasegawa⁵、
Shozo Tobimatsu³、Tatsuro Ishibashi² and Katsuo Sueishi¹

1 : Division of Pathophysiology and Experimental Pathology, Department of Pathology,
2 : Department of Ophthalmology, and
3 : Clinical Neurophysiology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan.
4 : Department of Ophthalmology, Kagoshima University, Kagoshima, Japan.
5 : DNAVEC Research Inc., Tsukuba-city, Ibaraki, Japan.

我が国独自に開発されたサル由来レンチウイルス (SIV) ベクターを用いて網膜色素変性症モデルである RCS ラットに、神経保護因子である色素上皮由来因子 (PEDF) 遺伝子を導入し、その視細胞変性抑制効果を検討した。SIV-PEDF、SIV-nls-lacZ、BSS の 3 種類の溶液を RCS ラット 3 週齢の網膜下腔に注入し、遺伝子導入を行った。組織学的に SIV-PEDF 治療群では導入後 12 週まで視細胞が有意に残存していた。電気生理学的には、治療群において導入後 8 週まで ERG 波形における a 波の振幅が有意に高かった。また導入 4 週後の組織における TUNEL 染色では、総視細胞数に対する TUNEL 陽性細胞数の比率が有意に低かった。このことから SIV ベクターを用いた PEDF 遺伝子長期発現により、RCS ラットの視細胞変性を有意に抑制することができ、またその効果は視細胞のアポトーシス抑制によるものと考えられた。

To test a gene therapy strategy for RP using a neurotrophic factor gene, we assessed the effect of simian lentivirus (SIV)-mediated subretinal gene transfer of pigment epithelium-derived factor (PEDF), a potent neurotrophic factor, during the disease progression in Royal College of Surgeons (RCS) rats, a well-accepted animal model of RP. LacZ and PEDF gene transfer via SIV into the peripheral subretinal space of 3 weeks old rat was performed. Histologically, PEDF gene transfer significantly protected the loss of photoreceptor cells (PCs) corresponding to the regions of the gene transfer compared to those of control groups until 12 weeks after gene transfer. The anti-apoptotic effect of PEDF on PCs is likely to be a related mechanism, because a significant reduction of TUNEL-positive PC numbers was found in PEDF-treated eyes compared to those of the control group. Significant amplitudes of a-waves were observed in the group of SIV-PEDF-injected rats until 8 weeks after gene transfer. These findings clearly show that neuroprotective gene therapy using PEDF can protect the retinal degeneration and functional defects in individuals with RP.

Key Words . retinitis pigmentosa, simian immunodeficiency virus, pigment epithelium-derived factor, Royal College of Surgeons rats, apoptosis

目的

網膜色素変性症は視細胞、網膜色素上皮細胞を障害する遺伝性疾患で、失明原因疾患の上位に位置するにもかかわらず、未だ有効な治療法は存在しない。近年遺伝子治療技術が向上し、種々のウイルスベクターを用いた動物モデルでの治療効果が報告され、その臨床応用への可能性が示唆されている。我々はこれまで、我が国独自に開発された長期発現型であるサル由来レンチウイルスベクターの遺伝子導入特性について明らかにしてきた¹⁾。今回このベクターを用いて、神経保護因子である色素上皮由来因子 (PEDF) を網膜で高発現させることにより、網膜色素変性症モデルである RCS ラットの視細胞変性効果を検討し、その治療法としての可能性について考察した。

対象と方法

対象は網膜色素変性症モデルである Royal College of Surgeons (RCS) rat の 3 週齢を用いた。SIV ベクターは 3' および 5' LTR (long terminal repeat) の U3 領域を欠失させる SIN (self inactivation) 化により安全性を高め、また水疱口内炎ウイルスエンベロープの glycoprotein G (VSV-G) でシュードタイプ・パッケージングすることで幅広い細胞腫に感染可能とした²⁾。ラットを吸入麻酔下にて 30G 針で前房穿刺し眼圧を下降させ、強膜側からのアプローチにより鼻側網膜周辺部の網膜下腔に 10 μ l のベクター溶液を注入し、遺伝子導入を行った (図 1 a、b)。溶液は、治療群として PEDF 遺伝子を

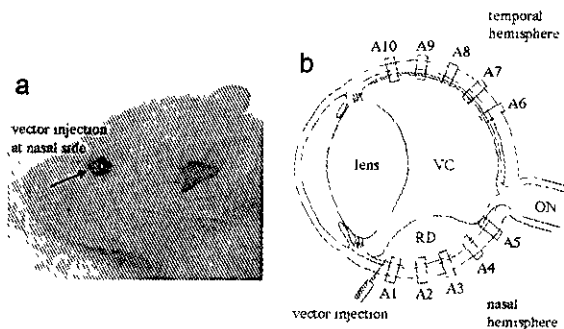


図 1 遺伝子導入方法

強膜側からのアプローチにより鼻側網膜周辺部の網膜下腔に 10 μ l のベクター溶液を注入し、網膜 10 箇所 (A1-10) において組織学的検討を行った。

搭載した SIV ベクター (SIV-PEDF)、コントロール群として核移行シグナル付加 lacZ 遺伝子を搭載した SIV-nls-lacZ、および BSS を用いた。ウイルスベクターの濃度は 2.5×10^7 TU/ml とした。SIV-nls-lacZ 投与群の組織標本において経時的に X-gal 染色を行い、網膜下注入による遺伝子

発現の局在と期間を検討した。さらに PEDF に対する免疫染色を行い、SIV-PEDF 投与後の PEDF の発現を確認した。視細胞変性抑制効果は、導入後 4、8、12、24 週後に組織学的に網膜切片 10 箇所における 100 μ m 当たりの視細胞数を計測し、各群で比較検討した。また視細胞のアポトーシスを検討するために導入後 4 週の組織において TUNEL 染色を行った。さらに電気生理学的機能評価を導入後 4、8 週後に ERG にて行い、a 波、b 波の振幅を計測し、比較検討した。

結果

X-gal 染色により SIV-nls-lacZ の遺伝子発現は注入時に生じた網膜剥離領域に一致して認められ、組織学的には網膜色素上皮細胞に局限していることが示された (図 2 a、b)。その発現は観察期間である導入後 24 週までの長期間認められた (図 2 c)。また導入 4 週間における PEDF 対す

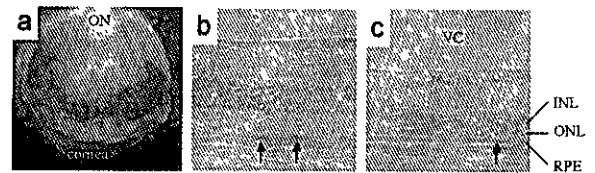


図 2 SIV-nls-lacZ 網膜下投与後の遺伝子発現の局在と期間の検討

X-gal 染色により lacZ 遺伝子発現は注入時に生じた網膜剥離部位に一致して認められ (a)、組織学的には網膜色素上皮細胞に特異的であった (b)。その発現は観察期間である注入後 24 週まで認められた (c)。

る免疫染色では、注入側の網膜色素上皮細胞層にほぼ一致して陽性所見が認められ、その反対側網膜 (導入していない部位) では陰性であった (図 3 a、b)。治療効果に関しては、SIV-PEDF 治

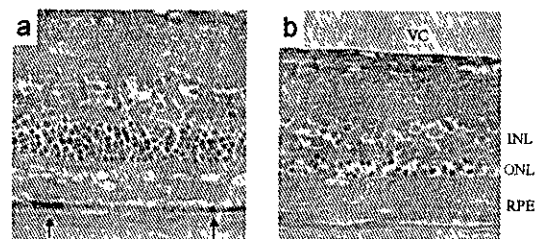


図 3 SIV-PEDF 網膜下投与 4 週後の PEDF に対する免疫染色

注入側の網膜色素上皮細胞層にほぼ一致して PEDF 陽性所見が認められ (a)、その反対側網膜では陰性であった (b)。

療群でコントロール群と比較して導入後 12 週まで組織学的に視細胞が有意に残存しており、その効

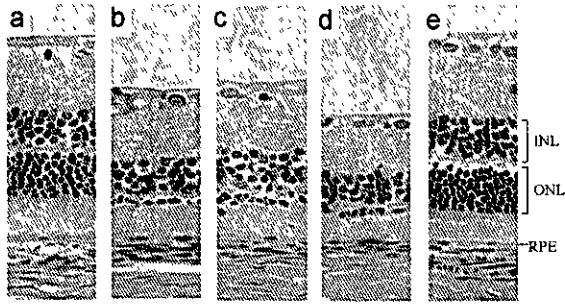


図4 導入4週後における各群の網膜組織の比較
SIV-PEDF 治療群において、組織学的に視細胞が保護されていた。 a : Wild type、 b : 未処置群、 c : BSS 投与群、 d : SIV-nls-lacZ 群、 e : SIV-PEDF 群

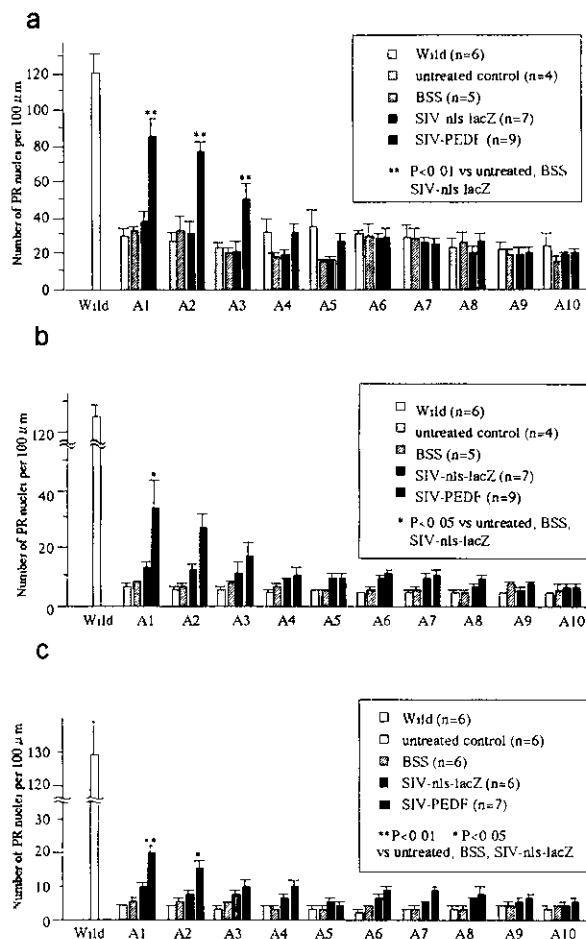


図5 網膜10箇所における100 μm 当たりの視細胞核数の比較
導入4週後では、注入部位に近い3箇所 (A1-3) において有意に視細胞が保護されていた ($p < 0.01$) (a)。8、12週後においてもほぼ同様の傾向を示した (b、c)。

果は注入部位に近いほど高く認められた (図4 a-e、図5 a-c)。また導入後4週の組織における総視細胞数に対する TUNEL 陽性細胞数の比率は治療群で有意に低かった (図6 a-d)。電気生理

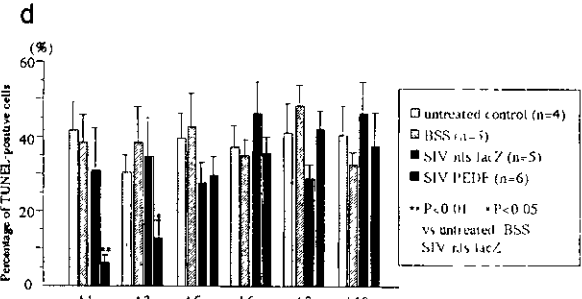
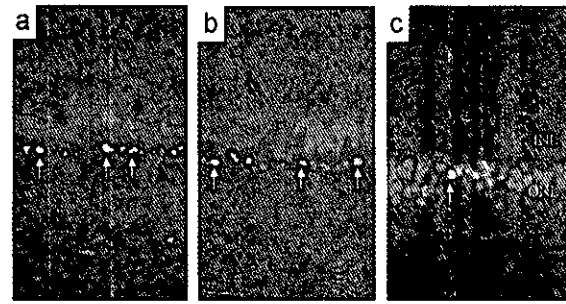


図6 TUNEL 染色による視細胞のアポトーシスの検討 (導入4週後)

未処置群 (a)、BSS 投与群 (b) においては約1層に減少した視細胞核層に高い頻度で TUNEL 陽性細胞を認めるが、一方 SIV-hPEDF 治療群では TUNEL 陽性細胞の比率が低い (c)。統計学的に注入部位に近い2箇所 (A1、3) で有意にアポトーシス細胞の割合が低かった (d)。

Time (after injection)	n of eyes	treatment	a wave (μV)	b wave (μV)
4w	2	wild type	344.1 ± 14.5	991.4 ± 11.2
	10	SIV-PEDF	72.5 ± 23.2*	47.0 ± 15.3
	6	SIV-nls-lacZ	14.7 ± 7.9	5.5 ± 3.9
	6	BSS	0.0	0.20 ± 0.20
	8	untreated	0.09 ± 0.09	0.15 ± 0.15
8w	8	SIV-PEDF	25.9 ± 8.0*	10.5 ± 5.3
	6	SIV-nls-lacZ	0.8 ± 0.5	3.3 ± 2.2
	1	BSS	0	0
	3	untreated	0	0

表1 各群における ERG の a 波、b 波の振幅の比較 (導入4、8週後)
平均値 ± 標準誤差。* : $p < 0.05$ vs SIV-nls-lacZ

学的には、コントロール群ではほぼ全例で電気的反応が認められないのに対して、治療群では反応が認められる個体が多く存在した。統計学的に導入後8週まで ERG 波形における a 波の振幅が有意に高かった ($P < 0.05$) (表1)。

考察

この疾患モデルに対する網膜下投与においても、SIV ベクターの発現は観察期間である最長6ヶ月まで認められ、この長期発現可能なベクターは網膜色素変性症を含めた慢性疾患に対する遺伝子治療に有用であると考えられた。また網膜下投与

による発現部位は網膜色素上皮細胞に特異的であり、このことは変性に陥る視細胞に対して、神経保護因子を網膜色素上皮細胞で発現・分泌させ、保護するという我々の方法が効果的であることを示している。結果から SIV-PEDF 治療群で、遺伝子導入された部位にほぼ一致して視細胞変性抑制効果が認められていた。またその部位のアポトーシスに陥った視細胞の比率から、分泌された PEDF がアポトーシス抑制により視細胞を保護する可能性が示唆された。また、ERG による電気生理学的検討により、組織学的に保護された視細胞が実際に機能を有することが示された。

結 論

SIV ベクターを用いた PEDF 遺伝子長期発現により、網膜色素変性症モデルラットの視細胞変性を組織学的及び電気生理学的に抑制することができた。またその変性抑制効果は、視細胞のアポトーシス抑制によるものと考えられた。今後は大動物における安全性試験等の検討を行い、ヒトへの臨床応用を目指している。

文 献

- 1) Ikeda Y, et al. Long-term histological and functional analysis for Simian Immunodeficiency Virus (SIV)-based lentiviral vector -mediated intraocular gene transfer in adult rats. *Gene Ther* 2003 (in press).
- 2) Nakajima T, et al. Development of novel simian immunodeficiency virus vectors carrying a dual gene expression system. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 1863-1874.

日本人における加齢黄斑症の危険因子：久山町研究

Risk factors for age-related maculopathy in the Japanese population: The Hisayama Study

宮崎美穂¹、石橋達朗¹、中村秀敏²、久保充明²、清原 裕²

1：九州大学大学院医学研究院眼科学、2：九州大学大学院病態機能内科学

Miho Miyazaki¹, Tatsuro Ishibashi¹, Hidetoshi Nakamura², Michiaki Kubo², Yutaka Kiyohara²

1：Department of Ophthalmology,

2：Department of Medicine and Clinical Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

【抄録】

目的：日本人における加齢黄斑症（ARM）の危険因子を調査する。

対象および方法：1998年福岡県久山町に住む50歳以上の全住民3054人のうち、1482人（48.5%）を対象とした。左右何れかの眼に ARM の所見を認めたものを ARM 有病者とした。年齢、白内障、高血圧、糖尿病、高脂血症、喫煙、飲酒、BMI、白血球数の9因子について ARM との関連を統計学的に検討した。統計解析方法はロジスティック解析モデルを使用した。

結果：ARM 有病者は男性116人（17.7%）、女性132人（13.3%）であった。男性の有病率は有意に女性より高くなった。（オッズ比=1.32、95%信頼区間= 1.01-1.72）男女別に多変量ロジスティック回帰分析を行った結果、男性では年齢と高血圧が ARM と有意な関連が見られた。女性では年齢以外に ARM と有意な関連を示す因子はなかった。

結論：日本人においては、加齢と男性が ARM に関係する重要な危険因子であり、さらに男性では高血圧が危険因子である可能性が示唆された。

Purpose: to examine the risk factors for age-related maculopathy (ARM) in a general Japanese population.

Subject and methods: Among a total of 3,054 residents aged 50 years or older living in Hisayama town, Japan, 1,482 (48.5%) consented to participate in the study. We defined the subject having ARM if the subject had ARM at least in either eye. We selected 9 possible risk factors for ARM including age, cataract, hypertension, diabetes, smoking habits, alcohol intake, BMI and WBC. Logistic regression model was utilized to evaluate risk factors for ARM.

Results: In men, the 116 subjects were found to have ARM (17.7%), and in women, the 132 subjects were found to have ARM (13.3%). The prevalence of ARM was higher in men than in women, and after adjusting for age, men were found to have a significantly higher prevalence of ARM than women (odds ratio, 1.32; 95% confidence interval (CI), 1.01 to 1.72). As the results of the multiple logistic regression analysis, age and hypertension were significantly associated with ARM in men, while age was significantly associated with ARM in women.

Conclusion: The present population-based study suggests that aging and male are significant relevant factors of ARM in the Japanese general population, and that hypertension is an additional risk factor in men

キーワード：加齢黄斑症、危険因子、久山町研究、男性、高血圧

Key Words : Age-related maculopathy, risk factor, The Hisayama Study, men, hypertension.

欧米諸国では加齢黄斑症（ARM）の大規模な疫学研究が行なわれ、有病率、発生率、危険因子が報告されている^{1)~4)}が、日本では今まで行なわれていない。日本においても ARM の大規模な疫学研究を行ない、その特徴や危険因子を明らかにすることが必要とされる。そこで我々は、日本人の代表的疫学研究として1961年から福岡県久山町で40才以上の住民を対象に行なわれている前向きコホート調査（久山町研究）に参加し加齢黄

斑症の危険因子を調査した。

対象および方法

福岡県久山町に住む50才以上の住民3054人（男性1346人、女性1708人）のうち、1998年久山町住民健診で内科健診と眼科健診を受診した1482人（男性596人、女性886人）を対象とした。対象者全員に1.0トロピカミドと10%フェニレフリンを使用して散瞳させた後、倒像鏡とスーパーフィー

ルドレンズを使用した眼底検査、45度範囲の眼底写真撮影を行なった。症状など何も教えられていない2人の眼科専門医が、眼底所見と眼底写真からARMの診断および分類を行なった。診断および分類には国際ARM疫学研究グループ分類プロトコール⁵⁾とウィスコンシンARM分類システムグリッド⁶⁾を使用し、ARMを初期ARMと後期ARMの2つに分類した。初期ARMは軟性ドローゼンあるいは網膜色素上皮異常があり、他方の眼に後期ARMのないものとし、後期ARMは新生血管を伴う加齢黄斑変性あるいは新生血管のない網膜色素上皮の地図状萎縮があるものとした。左右いずれかの眼に初期ARMあるいは後期ARMの所見を認めたものをARM有病者と定義した。白内障は、水晶体皮質混濁、核硬化、後囊下混濁のうちいずれか1つでも認めるものを白内障ありとして評価し、白内障手術既往者は白内障ありに含めた。収縮期血圧、拡張期血圧は座位にて3回測定しその平均値を使用し、収縮期血圧140mmHg以上または拡張期血圧90mmHg以上または降圧薬内服者を高血圧とした。空腹時血糖126mg以上または食後2時間血糖値200mg以上のものとインスリン使用者を糖尿病とした。飲酒習慣や喫煙習慣の情報は問診票を使用して入手した。現在飲酒習慣のある人を飲酒あ

りとして評価した。喫煙習慣は、現在喫煙習慣がある人、過去に喫煙習慣のあった人、喫煙習慣がまったくない人の3群に分けて評価した。BMIは薄い衣服を着て脱靴状態で身長と体重を測定して計算した。

統計解析方法は、男女別にARM有病者と非ARM有病者で9つの背景因子の平均値あるいは頻度をStudent's t検定あるいは χ^2 乗検定を使用して比較した。また、加齢黄斑症と背景因子の関連を評価するためにステップワイズ法による多変量ロジスティック回帰分析を行なった。すべての統計解析は、統計ソフトウェアパッケージSAS (SAS Institute, Cary, N. C., USA) を使用して行なった⁷⁾。P<0.05を統計学的に有意であるとした。

結 果

男性では対象者596人のうちARM有病者116人(17.7%)、女性では対象者886人のうちARM有病者132人(13.3%)であった。また男性では初期ARMの有病率は18.5%、後期ARMの有病率は1.0%、女性では初期ARMの有病率は14.8%、後期ARMの有病率は0.1%であった。(表1)男女別に解析に使用した背景因子の平均値と頻度を表2に示す。男性においては、年齢、白内障、高血圧がARM有病者群に有意に多く見られた

表1 年齢階級別有病率

年齢	男 性		女 性	
	初期加齢黄斑症 (%)	後期加齢黄斑症 (%)	初期加齢黄斑症 (%)	後期加齢黄斑症 (%)
50-59	19 (12.3)	1 (0.7)	34 (12.0)	0 (0.0)
60-69	43 (18.6)	2 (0.9)	40 (12.2)	0 (0.0)
70-79	36 (20.2)	2 (1.1)	40 (18.9)	1 (0.5)
80+	12 (36.4)	1 (3.0)	16 (29.1)	0 (0.0)
	110 (18.5)	6 (1.0)	131 (14.8)	1 (0.1)

表2 背景因子の平均値と頻度

背景因子	男 性		女 性	
	非 ARM 有病者	ARM 有病者	非 ARM 有病者	ARM 有病者
年齢 (才)	65±9	68±9**	64±9	68±10**
白内障 (%)	61.3	68.1*	65.5	75.0*
高血圧 (%)	47.5	62.3*	39.8	48.3
糖尿病 (%)	19.6	16.4	10.1	13.6
高脂血症 (%)	44.2	40.5	59.7	58.3
喫 煙 (%)	34.8	33.6	4.5	4.6
飲 酒 (%)	65.8	61.2	13.4	9.9
Body Mass Index (kg/m ²)	23.1±3.0	23.2±2.9	23.1±3.3	23.0±3.6
White blood cells (x10 ⁶ /l)	6.3±1.7	6.0±1.4	5.5±1.3	5.3±1.4

* P<0.05、** P<0.01

($P < 0.05$)。また白血球数は ARM 有病者群に有意に少なかった ($P < 0.05$)。女性においては、年齢、白内障が ARM 有病者群に有意に多く見られた ($P < 0.05$)。年齢調整後のロジスティック回帰分析の結果、男性では年齢、高血圧が ARM と有意に関連が見られた ($P < 0.05$)。(表 3) 女性では年齢調整後、ARM と有意な関連が見られる因子はなかった。(表 3) ステップワイズ法による多変量ロジスティック回帰分析を行なった結果、最終的に男性では年齢 (オッズ比=1.04、95%信頼区間=1.02-1.06) と高血圧 (オッズ比=1.59、95%信頼区間=1.06-2.40) が ARM と有意に関連が見られ、女性では年齢 (オッズ比=1.04、95%信頼区間=1.03-1.06) のみが ARM と有意な関連を認めた。(表 4) 男女とも加齢とともに ARM 有病の危険が高くなり、さらに男性では高血圧を伴うと ARM 有病の危険が有意に高くなった。

考 察

大規模な疫学調査に基づく ARM の危険因子の報告では、本研究は日本人に関する最初の報告である。男女別の有病率では男性は女性に比べて有意に有病率が高いという結果になった。これまでの欧米の疫学調査では女性に多いという報告が多く^{1)~3)} 本結果とは相反する。人種により発生率に差があることは報告されており^{8)~10)}、本結

果は人種により男女の有病率にも差があることを示唆するものと思われる。

加齢が危険因子であることは良く知られている。我々の多変量解析の結果においても、男女とも加齢は ARM と有意な関連を認めた。さらに男性では高血圧と ARM に有意な関連を認めた。フラミンガムスタディにおける ARM の危険因子の報告でも ARM と高血圧の関連が指摘されている¹¹⁾。ARM の患者では脈絡膜毛細血流が減少しているという報告があり¹²⁾、長期間の高血圧により脈絡膜毛細血管の動脈硬化性変化が進み血流が減少し、ARM の危険を高めている可能性が推測される。

結 論

日本人においては、加齢と男性が ARM に係る重要な危険因子であり、さらに男性では高血圧が危険因子である可能性が示唆される。

文 献

- 1) Klein R, Klem BEK, Jensen SC, et al. Age-related maculopathy in a multiracial United States population. The National Health and Nutrition Examination Survey III. Ophthalmology 1999; 106: 1056-1065.
- 2) Vingerling JR, Dielemans I, Hofman A, et al. The prevalence of age-related

表 3 年齢調整後のロジスティック解析結果

背景因子	男 性		女 性	
	OR †	95% CI ‡	OR †	95% CI ‡
白 内 障	1.05	0.66-1.70	1.17	0.74-1.86
高 血 圧	1.59*	1.06-2.40	0.98	0.67-1.43
糖 尿 病	0.80	0.46-1.37	1.30	0.75-2.27
高脂血症	0.95	0.62-1.44	0.94	0.64-1.37
喫煙：現在	0.80	0.73-1.35	1.22	0.40-3.71
：過去	0.94	0.46-1.93	1.19	0.44-3.19
飲 酒	0.91	0.59-1.39	0.58	0.32-1.07
B M I	1.04	0.96-1.11	1.00	0.94-1.06
白血球数	0.89	0.77-1.01	0.87	0.75-1.01

† OR; odds ratio, ‡ CI; confidence interval, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 4 ステップワイズ法による多変量ロジスティック解析結果

背景因子	男 性		女 性	
	OR †	95% CI ‡	OR †	95% CI ‡
年 齢	1.03**	1.01-1.06	1.04**	1.02-1.06
高血圧	1.58*	1.03-2.41		

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

- maculopathy in the Rotterdam Study.
Ophthalmology 1995; 102: 205-210.
- 3) Mitchell P, Smith W, Attebo K, Wang JJ.
Prevalence of age-related maculopathy in
Australia. The Blue Mountains Eye Study.
Ophthalmology 1995; 102: 1450-1460.
- 4) Klein R, Klein BEK, Linton KLP.
Prevalence of age-related maculopathy.
The Beaver Dam Eye Study.
Ophthalmology 1992; 99: 933-943.
- 5) Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, et al.
An international classification and
grading system for age-related
maculopathy and age-related macular
degeneration. The International ARM
Epidemiological Study Group. Surv
Ophthalmol 1995; 39: 367-374.
- 6) Klein R, Davis MD, Magli YL, et al.
The Wisconsin age-related maculopathy
grading system. Ophthalmology 1991; 98:
1128-1134.
- 7) SAS Institute Inc.: In SAS User's Guide:
Statistics, version 5. Cary, North
Carolina: SAS Institute Inc, 1985: 763-774.
- 8) Schachat AP, Hyman L, Leske MC, et al.
Features of age-related macular
degeneration in a black population.
Arch Ophthalmol 1995; 113: 728-735.
- 9) Friedman DS, Katz J, Bressler NM, et al.
Racial differences in the prevalence of age-
related macular degeneration. The
Baltimore Eye Survey. Ophthalmology
1999; 106: 1049-1055.
- 10) Klein R, Rowland ML, Harris MI.
Racial/ethnic differences in age-related
maculopathy. Third National Health and
Nutrition Examination Survey.
Ophthalmology 1995; 102: 371-381.
- 11) Sperduto RD, Hiller R. Systemic
hypertension and age-related maculopathy
in the Framingham Study. Arch
Ophthalmol 1996; 104: 216-219.
- 12) Pauleikhoff D, Chen JC, Chisholm IH, et
al. Choroidal perfusion abnormality with
age-related Bruch's membrane change.
Am J Ophthalmol 1990; 109:211-217.

レーザースペックル法を用いた 萎縮型加齢黄斑変性の脈絡膜循環の検討

Choroidal blood flow in nonexudative age-related macular degeneration using laser speckle flowgraphy

沢 美喜、五味 文、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感覚器外科学視覚科学眼科学教室

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

【抄録】

目的：萎縮型加齢黄斑変性では、レーザードップラー法で中心高脈絡膜血流量が低下していると報告されている。(Grunwald, et al, IOVS, 1998) レーザースペックル法を用いて萎縮部分の脈絡膜循環を検討した。

対象：片眼性の萎縮型加齢黄斑変性7例(60±7才、53~71才)、矯正視力は0.6~1.2であった。

方法：レーザースペックル法で求めた血流の相対速度(square blur rate, SBR値)をカラーコード化することによって二次元的にカラーマップで評価した。フルオレセイン・インドシアニングリーン蛍光眼底造影所見とカラーマップとを比較し、脈絡膜中大血管を含まないように、患眼の萎縮部分で径200μmの四角形を囲み、平均SBR値を求めた。同一眼で萎縮が存在しない部位と対側眼でも同様にして平均SBR値を測定した。

結果：萎縮部分のSBR値は、同一眼で萎縮が存在しない部位に対して、81±26%(47~123%)であった。対側眼に対しては、68±12%(52~85%)であった。

結論：対側眼との比較では、全例で萎縮部分のSBR値の低下がみられ、同一眼の検討で差がみられない症例では、黄斑全体の脈絡膜血流が低下している可能性があると思われた。

Purpose: Decreases in choroidal blood flow in the fovea was reported in nonexudative age-related macular degeneration (AMD) using laser Doppler flowmetry. (Grunwald, et al, IOVS, 1998) We measured choroidal blood flow in patients with nonexudative AMD by using laser speckle flowmetry.

Subjects: Seven patients (age ranged 53-71 years, 60±7 years) with unilateral nonexudative AMD were evaluated. Best corrected visual acuity ranged from 0.6 to 1. 2.

Methods: Laser speckle flowgraphy provides two-dimensional color map coded by relative blood velocity. Atrophic area was defined by fundus photography, fluorescein angiography as well as indocyanine green angiography. Average square blur rate (SBR), index of relative blood velocity, was measured in 200 μm square inside atrophic area avoiding large choroidal vessels. SBR obtained from atrophic area was compared to that of either from non-atrophic area in the same eye or in the fellow eye.

Result: Average SBR ratio between the atrophic area and non-atrophic area in the same eye was 81±26% (mean±S.D., range; 47-123%) and between atrophic area and non-atrophic area in the fellow eye was 68±12% (range; 52-85%).

Conclusion: Choroidal blood flow in the atrophic area decreases compared to the non-atrophic area in the fellow eye in patients with nonexudative AMD. The SBR range was more prominent in the same eye compared to both eyes.

キーワード：萎縮型加齢黄斑変性、レーザースペックル法、脈絡膜、血流、血流速度、黄斑

Key Words : nonexudative age-related macular degeneration, laser speckle flowgraphy, choroid blood flow, blood flow velocity macula

目的

中心窩には網膜血管が存在しないため、黄斑の神経網膜を栄養する脈絡膜血流は、正常な視機能を営む上で重要な役割を担っている。レーザードップラーフローメトリー法を用いた検討で、加齢とともに脈絡膜血流は低下すると報告されている。(文献1、2) また、中心窩下の脈絡膜血流の低下は加齢黄斑変性の原因の一つとも言われ、(文献3、4) レーザードップラー法で萎縮型加齢黄斑変性での脈絡膜血流の低下が報告されている。(文献5)

今回レーザー-speckle法を用いて萎縮型加齢黄斑変性の黄斑の脈絡膜循環を検討した。今回レーザー-speckle法を用いた利点としては、レーザードップラー法の測定範囲が約200 μm の大きさであるのに対し、レーザー-speckle法では測定面積が約1 mm^2 と大きく、レーザードップラー法の約40倍に相当するので、比較的広範囲の血流を測定できる。(図1) レーザー-speckle法の半導体

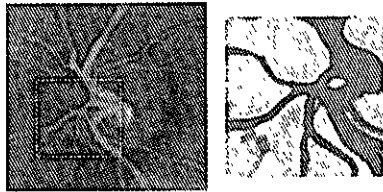


図1

左：インドシアニングリーン蛍光眼底造影
右：カラーマップ

左図の四角の部分に右図のカラーマップに相当する。

レーザーは波長830nmなので、組織深達性がよく脈絡膜血流の評価が可能である。求められる測定指標、Normalized Blur (NB値)、Square Blur Rate (SBR値)は相対値であるが、血流量に比例すると実験的に示されている。(文献6、7) カラーマップで表示されるので、二次元的な評価が可能であり、血流が多いところは赤色、少ないところは青色で示されるため、画像評価が可能である。これらの利点から、レーザー-speckle法による検討を試みた。

対象・方法

対象は、片眼性の萎縮型加齢黄斑変性7例、男性6例女性1例、年齢は60 \pm 7歳(53~71歳)、高血圧を合併しているのは1例のみであった。矯正視力は0.6~1.2、漿液性網膜剥離がみられず、両眼とも白内障がほとんど存在せず、等価球面屈折値に左右差がない症例とした。

方法は、眼底写真、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)をおこない、萎縮部分を検討した。レーザー-speckle法の内部固視誘導装置、レチナビ(r)(文献8)を用いて固視中心部とその周囲4象限を測定した。この5枚のカラーマップを合成して、二次元的な画像評価をおこなった。カラーマップで脈絡膜中大血管を含まないように、萎縮部分で径200 μm の四角形を囲み、平均SBR値を求めた。同一眼で萎縮が存在しない部位、対側眼でも同様に、脈絡膜中大血管を含まないようにして、平均SBR値を求めた。萎縮部分が、同一眼、対側眼に対する平均SBR値の割合を求めた。

結果

症例1は73歳男性で、左眼の萎縮型加齢黄斑変性で、視力は右(1.2)、左(0.6)であった。両眼ともに全体的に寒色が強くみられ、平均SBR値は萎縮部分で2.7、同一眼の萎縮の存在しない部分では4.1、対側眼では4.3であった。(図2)

症例2は53歳女性で、左眼の萎縮型加齢黄斑変

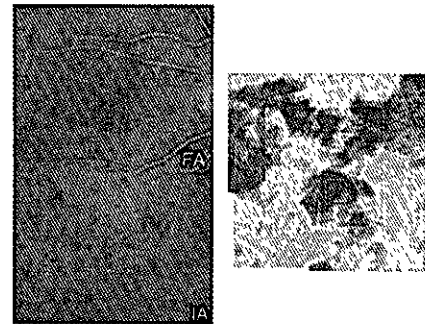


図2 左

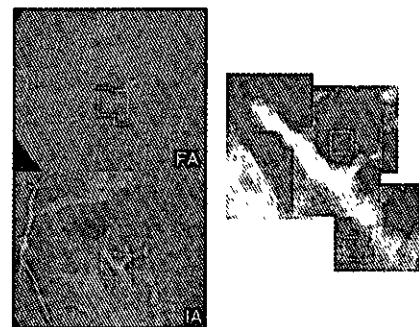


図2 右

症例1の右眼(左)左眼(右)のフルオレセイン蛍光眼底造影(FA)、インドシアニンググリーン蛍光眼底造影(IA)、カラーマップ。FA、IAの線で囲まれた部分はカラーマップに相当する。左図の四角のSBR値:4.3、右図の萎縮部(上の四角)のSBR値:2.7、萎縮のない部分(下の四角)のSBR値:4.1

性で、視力は右(1.2)、左(0.8)であった。対側眼の右眼に比べて左眼は寒色が強く、平均SBR値は萎縮部分で10.2、同一眼の萎縮の存在

しない部分では10.7、対側眼では14.6であった。
(図3)

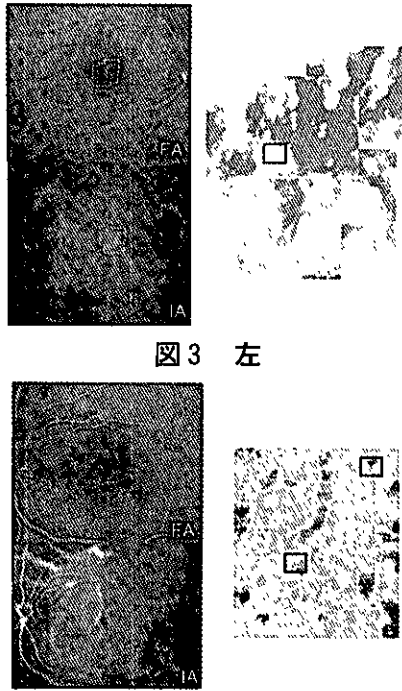


図3 左

図3 右

症例2の右眼(左)左眼(右)のFA、IA、カラーマップ。左図の四角のSBR値:14.6、右図の萎縮のない部分(上の四角)のSBR値:10.7、萎縮部(下の四角)のSBR値:10.2

カラーマップの画像評価では、対側眼に比べて患眼の萎縮(血流減少、もしくは血流低下)が強いのは7例中5例であり、ほとんど差がないのは2例であった。萎縮部分の平均SBR値の割合は、同一眼の萎縮が存在しない部分に対しては $81 \pm 26\%$ (47~123%)で、対側眼に対しては $68 \pm 12\%$ (52~85%)であり、全例とも低下していた。(図4)

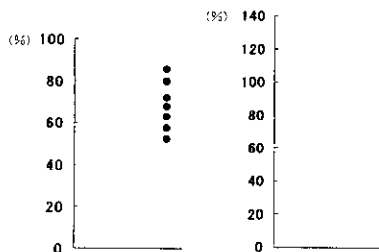


図4

(左図)対側眼に対する萎縮部分のSBR値の割合。(右図)同一眼の萎縮が存在しない部分に対する萎縮部分のSBR値の割合

まとめ

レーザースペックル法は各眼で散乱強度が異なる

ため、左右眼での比較には慎重な解釈を要するので、今回は同じ屈折、白内障のない症例を選択した。

その結果、レーザードップラー法での検討同様、レーザースペックル法を用いて萎縮型加齢黄斑変性での黄斑の脈絡膜血流低下が示唆された。対側眼との比較では、全例で萎縮部分のSBR値の低下がみられたものの、同一眼内の検討では、萎縮部分と萎縮が存在しない部分の比較では、低下している症例と差がない症例とがみられた。70%以下に低下していたのは、3例であり、局所的な血流低下が示唆された。差がみられない症例では、黄斑全体の脈絡膜血流が低下している可能性があると思われる。

文献

- 1) Grunwald JE, Hariprasad SM, DuPont J. Effect of aging foveolar choroidal circulation. *Arch Ophthalmol.* 1998; 116: 150-154.
- 2) Straubhaar M, Orgul S, Gugleta S, et al. Choroidal laser Doppler flowmetry in healthy subjects. *Arch Ophthalmol.* 2000; 118: 211-215.
- 3) Grunwald JE. Choroidal blood flow. In: Berger JW, Fine SL, Maguire MG, eds. *Age-Related Macular Degeneration.* 1st ed. St. Louis: Mosby; 1999: 167-178.
- 4) Fine SL, Berger JW, Maguire MG, et al. Age-related macular degeneration. *New Engl J Med.* 2000; 342: 483-492.
- 5) Grunwald JE, Hariprasad SM, DuPont J, et al. Foveolar choroidal blood flow in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39: 385-390.
- 6) Tamaki Y, Araie M, Kawamoto E, et al. Non-contact, two-dimensional measurement retinal microcirculation using laser speckle phenomenon. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35: 3825-3834.
- 7) Tamaki Y, Araie M, Tomita K, et al. Real-time measurement of human optic nerve head and choroid circulation, using the laser speckle phenomenon. *Jpn J Ophthalmol.* 1997; 41: 49-54.
- 8) Lee M-C, Yamahara M, Konishi N, et al. Fixation-line control in the LSFG system. *Jpn J Vis Sci.* 2000; 21: 87-91.