

ねらった治療であるため、経過が長いほど無治療では視力が低下するので、差が明らかになると考える。よって、今後経過観察期間をのばすことにより、TTTの有効性が明らかになる可能性がある。

白内障があると治療の有無に関わらず6か月後に視力低下をおこしやすく、また白内障が治療例の6か月後の視力低下に強い関連があった。この理由としては、白内障の進行が考えられた。治療前の視力が悪いと治療6か月後に視力低下をおこしにくかった。これはすでに視力が悪い場合はそれ以上数値的な低下をおこしにくいためと考えた。治療例のCNV径は大きいほど視力低下をおこしやすかった。大きなCNVにはTTTの効果が弱い可能性があると考えた。以上のことから6か月の時点では、白内障の手術が終了していて、比較的視力良好な小さいCNVを選んでTTTを行うと効果的である可能性があると言える。再治療例は6か月後の所見が改善しにくかった。再治療をおこなった症例ではTTTの効果がなかったと言える。

#### 文 献

- 1) Elias Reichel, MD, Audina M. Berrocal, MD, Michael Ip, MD, Arnold J. Kroll, MD, Vinay Desai, MD, Jay S. Duker, MD, Carmen A. Puliafito, MD: Transpupillary thermotherapy of occult subfoveal choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmology*; 106: 1908-1914. 1999
- 2) Newsom RS, McAlister JC, Saeed M, McHugh JD: Transpupillary thermotherapy (TTT) for the treatment of choroidal neovascularization. *Br J Ophthalmol*, 85 (2): 173-178. 2001.
- 3) N. E. Miller-Rivero, H. J. Kaplan. Hudson Retina, Poughkeepsie, NY: Transpupillary thermotherapy in the treatment of occult and classic choroidal neovascularization. Abstract. ARVO. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41 (4): S179. May 2001.
- 4) S. Petrone, G. Staurenghi, L. Migliavacca, M. Ottociani, N. Orzalesi: Transpupillary Thermotherapy for Subfoveal Choroidal Neovascularization in Age-related Macular Degeneration. Abstract. ARVO. May 2001.
- 5) Campos CC, Nehemy MB, Moraes JG, Rodrigues RP, Magalhes EP, Passos E: Transpupillary Thermotherapy of Occult Choroidal Neovascularization Associated to Age-related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42 (4): S443. 2001.
- 6) Lanzetta P, Michieletto P, Pirracchio A, Ambesi M, Menchini F, Virgili G, Menchini U, Bandello F: Short-Term Angiographic Changes After Transpupillary Thermotherapy of Choroidal Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42 (4): S443. 2001.
- 7) Benner JD, Ahuja RM, Schwartz JC, Butler JW, Steidl SM: Macular Infarction After Transpupillary Thermotherapy in the Treatment of Occult Subfoveal Choroidal Neovascular Membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42 (4): S444. 2001.
- 8) Kaga T, Fonseca RA, Dantas MA, Spaide RF.: Transient Appearance of Classic Choroidal Neovascularization After Transpupillary Thermotherapy for Occult Choroidal Neovascularization. *Retina* 21 (2); 172-173, 2001.

# 脈絡膜新生血管に対する経瞳孔温熱療法と トリアムシノロンテノン嚢下球後注射の併用療法

Combined treatment of transpupillary thermotherapy and triamcinolone  
sub-Tennon's retrobulbar injection for choroidal neovascularization

田中茂登、阿部通子、野本浩之、山地英孝、白神史雄  
香川医科大学医学部眼科学教室

Shigeto Tanaka MD, Michiko Abe MD, Hiroyuki Nomoto MD, Hidetaka Yamaji MD, Fumio Shiraga MD  
Department of Ophthalmology, Kagawa Medical University

## 【抄録】

加齢黄斑変性 (AMD) およびポリープ状脈絡膜血管症 (PCV) に対して経瞳孔温熱療法 (TTT) とトリアムシノロンテノン嚢下注射併用療法を行いその効果について検討した。対象は2002年4月から8月に TTT を施行し、直後にトリアムシノロン20mg テノン嚢下注射を行った連続症例10例10眼 (AMD 7眼、PCV 3眼) である。TTT は810nm 半導体レーザーを用い、照射径3mm、出力は300-400mWで60秒間照射した。治療前後の視力、眼圧、眼底検査、フルオレセイン蛍光造影検査を行なって検討した。治療後視力の改善もしくは不変が8眼、2眼で2段階以上の視力低下をみとめた。治療後3ヵ月のFAにより活動性の低下がみられたのは10眼中6眼であった。TTT とトリアムシノロンテノン嚢下注射併用はAMDやPCVの脈絡膜新生血管に対して有効な治療である可能性がある。

We evaluated the feasibility of combined treatment of transpupillary thermotherapy (TTT) and triamcinolone sub-Tennon's retrobulbar injection for age-related macular degeneration (AMD) and polypoidal choroidal vasculopathy (PCV). Ten eyes of 10 consecutive patients (seven eyes; AMD, three eyes; PCV) underwent TTT and sub-Tennon's retrobulbar injection of 10mg triamcinolone done immediately after TTT. TTT was performed with a 3-mm spot at 300 to 400mW of power for 60 seconds using 810 diode laser. The best-corrected visual acuity, intraocular pressure, biomicroscopic fundus examination and fluorescein angiography were examined before and after the treatment. The visual acuity increased by two or more lines or stabilized in eight eyes, and worsened in two eyes. In six of the ten eyes, the activity of choroidal neovascularization decreased at three months after the treatment. This combined therapy may be effective for choroidal neovascularization secondary to AMD or PCV.

キーワード：経瞳孔温熱療法 (TTT)、トリアムシノロン、加齢黄斑変性 (AMD)、  
ポリープ状脈絡膜血管症 (PCV)、併用療法

## 目 的

脈絡膜新生血管 (CNV) に対する経瞳孔温熱療法 (TTT)<sup>1), 2)</sup> の有効性については未だ確定的ではなく、治療後活動性の低下がみられない症例も少なくなく、何らかの血管新生抑制療法の併用が必要と思われる。そこで今回我々は、加齢黄斑変性 (AMD) およびポリープ状脈絡膜血管症 (PCV) に対してこの TTT に、最近 CNV に対する治療として用いられているトリアムシノロンテノン嚢下球後注射<sup>3)</sup> との併用療法を行いその効果について検討した。

## 対象および方法

対象は、2002年6月から8月に香川医大眼科において、AMDならびにPCVと診断され、TTTの適応となった症例10例10眼 (AMD 7眼、PCV 3眼)。TTTを施行し、直後にトリアムシノロン20mg テノン嚢下注射を行い、3ヶ月以上経過を観察した。年齢は57-90歳 (平均72.6歳)、観察期間3-6ヶ月 (平均4.2ヶ月) だった。なお、トリアムシノロンの併用効果を見るため、岡山大学眼科において TTT のみを施行し、3ヶ月以上経過を観察した症例21例21眼 (AMD11眼、PCV10眼、年齢53~86歳 (平均76.8±8.3歳) 観察期間3~6ヶ月 (平均4.9ヶ月) の治療成績と比較した。

方法はまず、TTTを施行し、直後にトリアムシノロン20mg（ケナコルト（r）-A懸濁液40mg／1mlの0.5ml、ブリストル製薬）のテノン嚢下注射を施行した。TTTは、810nm半導体レーザーを用い、照射径3mm、出力は250～400mWで60秒間照射した。CNV全体を少し超える程度のスポットサイズで照射。複数のスポットを要する場合は中心窩への照射は1回のみとし、網膜の色調に変化がでない程度に照射し、わずかでも変化がみられた場合は直ちに中止した。

### 結果

#### 1. NVの活動性（表1）

CNVの活動性の評価法は、検眼鏡での浮腫、網膜下液の程度、ならびに、フルオレセイン蛍光造影FAでの蛍光漏出、CNVの大きさの変化で、判定した。なお、OCTはこの研究期間にはまだ当科に導入されていなかったため、OCTによる評価は施行していない。トリアムシノロン併用療法においてCNVが退縮、活動性の低下した症例は10眼中6眼、活動性の変化のなかったものが10眼中3眼、活動性の増悪、CNVの拡大したものが1眼認められた。一方TTT単独では活動性の低下した症例は21眼中9眼43%、活動性の変化のなかったものが21眼中7眼33%、活動性の増悪、CNVの拡大したものが21眼中5眼24%認められた。

	TTT + triamcinolone	TTT
CNVの活動性低下	60% (6/10)	43%(9/21)
活動性変化なし	30% (3/10)	33%(7/21)
CNVの拡大、活動性増悪	10% (1/10)	24%(5/21)

表1 CNVの活動性

#### 2. 術前後での視力（表2）

術前後での視力は、トリアムシノロン併用療法で術前が幾何平均で0.12、術後が0.10、TTT単独では、術前が0.10、術後が0.09と統計学的に有意差はいずれの群間にも認めなかった。

	TTT + triamcinolone	TTT
術前視力	0.12 (logMAR 0.93±0.40)	0.10 (logMAR 0.96±0.33)
術後視力	0.10 (logMAR 1.01±0.47)	0.09 (logMAR 1.04±0.47)

表2 術前後の視力

#### 3. 視力変化（表3、図1、図2）

視力変化では、0.2以上のlogMAR視力の改善がみられたものが10眼中1眼、不変だったものが7眼、悪化したものが2眼であった。一方TTT単独は改善がみられたものが21眼中2眼9.5%、不変であったものが15眼71.5%、悪化したものが4眼19.0%であった。両者間に有意差は認めなかった。

	TTT + triamcinolone	TTT
改善	10% (1/10)	9.5% (2/21)
不変	70% (7/10)	71.5% (15/21)
悪化	20% (2/10)	19.0% (4/21)

表3

術前後の視力変化。0.2以上のlogMAR視力変化を有意の変化とした。

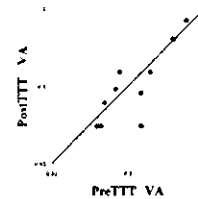


図1 TTT + triamcinoloneの術前後視力

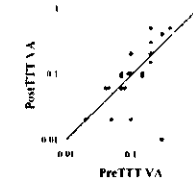


図2 TTTのみの術前後視力

#### 4. 眼圧の経過

トリアムシノロンテノン嚢下注射に関しての合併症は、眼圧上昇が報告されている。今回は、平均で、治療前16.1±2.2mmHg、治療後1週間後13.9±3.4mmHg、11ヶ月後17.0±2.1mmHg、3ヶ月後16.7±2.1mmHgで、各群で有意な差はなかった。また症例ごとでも、眼圧上昇は1例も認めなかった。

#### 5. 症例呈示

1例症例を呈示する。79歳男性、中心窩下にpredominantly classic CNVを認め、その周囲に漿液性網膜剥離を認めた（図3）。術前視力は（0.1）であった。TTT（spot size 3.0mm、power 350mW、duration 60秒）を施行し、直後にトリアムシノロンテノン嚢下注射を施行した。術後5ヶ月、検眼鏡、FAにてCNVは退縮し、

漿液性剥離は消失した（図4）。視力は（0.15）であった。

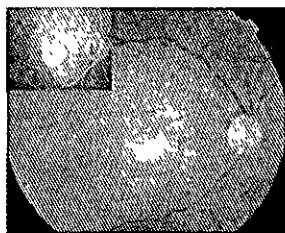


図3 症例の術前眼底写真  
（左上：フルオレセイン蛍光眼底写真）

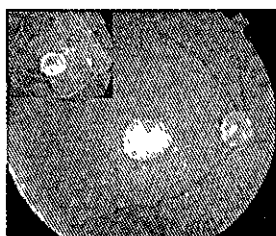


図4 症例の術後5ヵ月の眼底写真  
（左上：フルオレセイン蛍光眼底写真）

#### 結 論

TTTとトリアムシノロンテノン嚢下注射併用により60%の症例に活動性の低下が得られ、80%の症例で視力が維持できた。一方TTT単独の成績では活動性の低下は43%であった。この併用療法は脈絡膜新生血管に対して有効である可能性がある。

#### 文 献

- 1) Reichel E, Berrocal AM, Ip M, Kroll AJ, Desai V, Duker JS, Puliafito CA. Transpupillary thermotherapy of occult subfoveal choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 1999; 106: 1908-14.
- 2) Newsom RS, McAlister JC, Saeed M, McHugh JD. Transpupillary thermotherapy (TTT) for the treatment of choroidal neovascularisation. *Br J Ophthalmol*. 2001; 85: 173-8.
- 3) Ranson NT, Danis RP, Ciulla TA, Pratt L. Intravitreal triamcinolone in subfoveal recurrence of choroidal neovascularisation after laser treatment in macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 2002; 86: 527-9

# 実験的脈絡膜新生血管に対するトリアムシノロンの 後部テノン嚢下投与による抑制効果の検討

Suppression of Laser-Induced Choroidal Neovascularization by  
Posterior Subtenon Administration of Triamcinolone Acetonide

加藤亜紀、木村英也、岡部高明、岡部純子、久納紀之、野崎実穂、小椋祐一郎  
名古屋市立大学大学院医学研究科視覚科学

Aki Kato, Hideya Kimura, Komei Okabe, Junko Okabe, Noriyuki Kunou, Miho Nozaki, Yuichiro Ogura  
Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Department of  
Ophthalmology and Visual Science.

## 【抄録】

目的：トリアムシノロンアセトニド（TA）の後部テノン嚢下投与による実験的脈絡膜新生血管に対する抑制効果を評価した。方法：BN ラット28匹の片眼にクリプトンレーザーを用いて網膜にレーザーを照射した。照射直後に、10眼に TA 2 mg、8眼に TA 0.5mg を後部テノン嚢下投与した。対照群として10眼に生食水を同様に投与した。2週間後に蛍光眼底造影を行い、新生血管からの蛍光色素の漏出をスコア化した。さらに、脈絡膜新生血管膜の厚みを測定した。また TA 2 mg を投与3日後、7日後に眼球摘出を行い、組織中の TA の濃度を測定した。結果：蛍光眼底造影において、TA 治療群は有意にスコアを減少させ、新生血管の厚みについても TA 治療群は有意に厚みを減少させた。TA は、投与後眼内に移行し、投与7日目でも脈絡膜内に検出された。結論：TA の後部テノン嚢下投与は脈絡膜新生血管に対する治療法として可能性があると考えられた。

Purpose: To evaluate the inhibitory effect of choroidal neovascularization (CNV) by posterior subtenon administration of triamcinolone acetonide (TA) using laser-induced CNV model in the rat.

Methods: Experimental CNV was induced by laser photocoagulation in Brown-Norway male rats.

Experimental eyes received posterior subtenon administration of either 2 mg (n=10) or 0.5 mg (n=8) of TA. Control eyes (n=10) received posterior subtenon administration of isotonic sodium chloride solution. Two weeks after treatment, CNV was evaluated by fluorescein angiography and histopathologic examination. TA concentrations in the vitreous, retina, choroid, were determined by high performance liquid chromatography at 3 and 7 days after posterior subtenon administration.

Results: The eyes treated with 2 mg of TA showed statistically significant inhibition of fluorescein leakage by fluorescein leakage compared with the control eyes and the eyes with 0.5 mg of TA. The thickness of CNV membrane in the eyes treated with 2 mg of TA also statistically significantly decreased compared with the control eyes. TA diffused into the eye and was detected in the choroid even 7 days after administration.

Conclusion: Posterior subtenon administration of TA may be a useful treatment for CNV associated with age-related macular degeneration.

キーワード：脈絡膜新生血管、トリアムシノロンアセトニド、後部テノン嚢下投与

Key Words : Choroidal Neovascularization, Triamcinolone Acetonide, Subtenon Injection

## 緒言

トリアムシノロンアセトニド（TA）は難水溶性ステロイドであり眼科領域では従来から視神経炎やぶどう膜炎の治療に広く用いられてきた。近年では糖尿病やぶどう膜炎などによる難治性黄斑浮腫の治療にも用いられている<sup>1)~3)</sup>。また加齢黄斑変性の治療への応用も試みられている<sup>4)</sup>。

ステロイドの後部テノン嚢下投与は、後部ぶど

う膜炎治療において確立された方法であり、硝子体内投与と比較して侵襲が少なく、安全な投与方法である。また後極部により効率よくステロイドを作用させることが可能でありステロイドによる高眼圧の発症頻度は少ないと考えられている。

今回 TA の後部テノン嚢下投与による脈絡膜新生血管に対する抑制効果をラットのレーザー光凝固による実験的脈絡膜新生血管モデルを用いて評

価した。

### 方法

麻醉下でBNラット28匹の片眼にクリプトンレーザーを用いて視神経乳頭から1~2乳頭径離れた網膜に5~7箇所レーザーを照射した(50 $\mu$ m、0.1sec. 130~150mw)。照射直後に、10眼にTA懸濁液2mg(40mg/mL, 50 $\mu$ l)、8眼にTA懸濁液0.5mg(10mg/mL, 50 $\mu$ l)を27G針を用いてテノン嚢下投与した。対照群10眼には生理的食塩水50 $\mu$ Lを同様にテノン嚢下投与した。

脈絡膜新生血管の評価は2週間後にフルオレセインナトリウムを尾静脈より注入し、蛍光眼底造影を行い、新生血管からの蛍光色素の漏出を4段階でスコア化した(score 0: no staining, score 1: slightly stained, score 2: moderately stained, score 3: strongly stained)<sup>9)</sup>。さらに、眼球を摘出し、固定、脱水後HE染色を行い組織学的に脈絡膜新生血管膜の厚みを測定した。

TA 2 mg を投与 3 日後、7 日後に眼球摘出を

行い、組織を硝子体、網膜、脈絡膜に分けそれぞれのTAの濃度を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定した。

### 結果

フルオレセイン造影において、TA 2 mg 投与群の平均スコアは1.17、TA 0.5 mg 投与群のスコアは1.81、対照群のスコアは1.86であり、TA 2 mg 投与群は対照群、0.5 mg 投与群と比較して有意にスコアを減少させた(P<0.01, Kruskal-Wallis test)(図1、図2)。

さらに新生血管の厚みについてもTA治療群(2 mg 投与群)は40.7 $\pm$ 8.2 $\mu$ m、対照群は59.6 $\pm$ 8.2 $\mu$ mであり、有意に厚みを減少させた(P<0.01, t-test)(図3、図4)。

組織中には3日後では、硝子体(4.68mg/g)、網膜(2.80mg/g)、脈絡膜(4.68mg/g)に、7日後では脈絡膜(3.33mg/g)にTAが検出された。7日後の硝子体、網膜では検出限界以下であった(表1)。

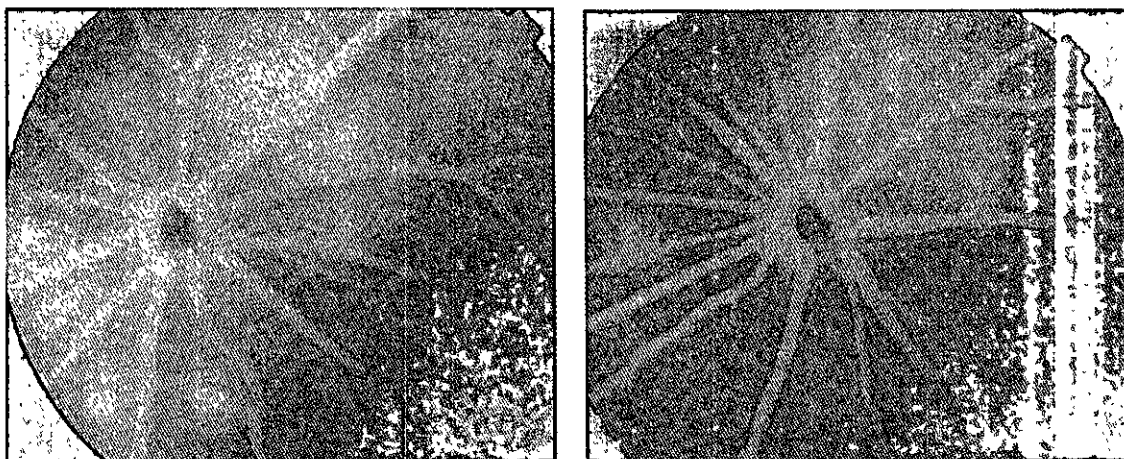


図1 蛍光眼底造影写真。a) 対照群。b) TA 2 mg 投与群。

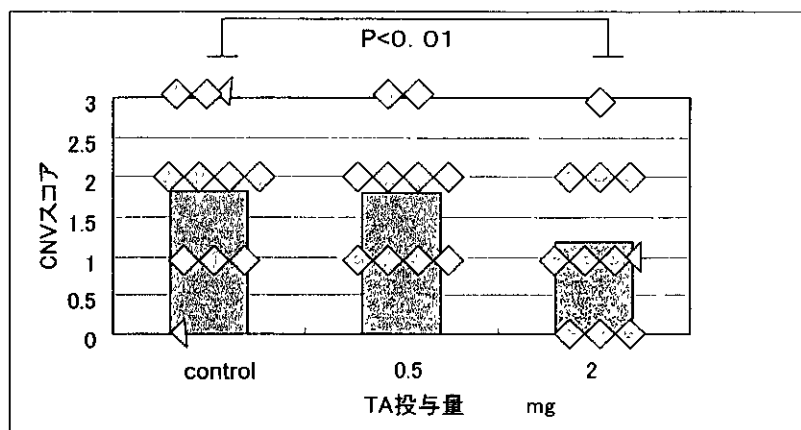


図2 CNVの各スコア数と、平均スコア。◇ひとつは5スコアを示す。

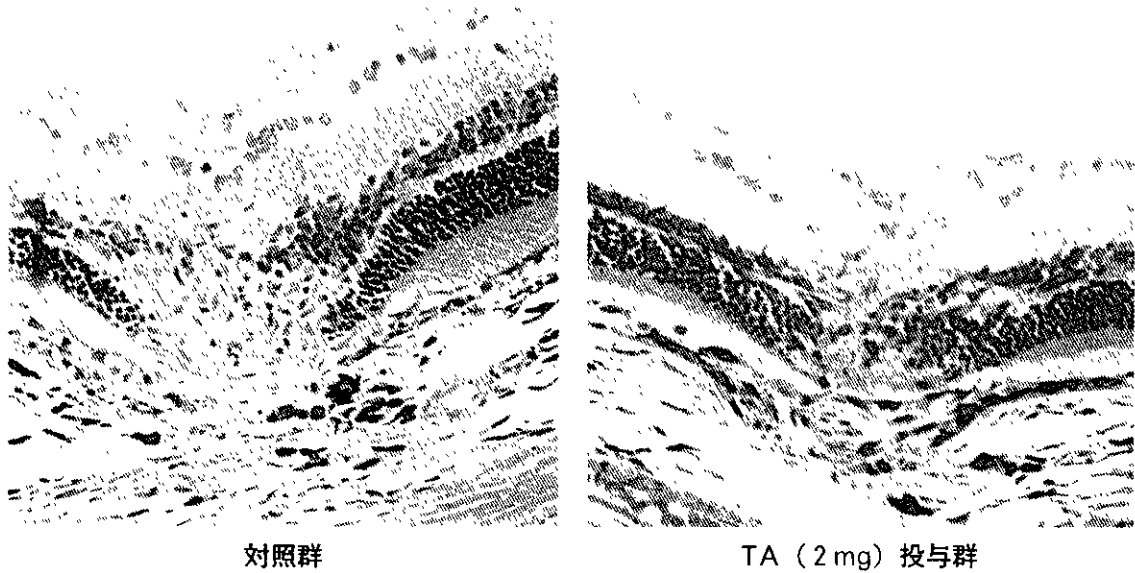


図3 脈絡膜新生血管膜の組織像

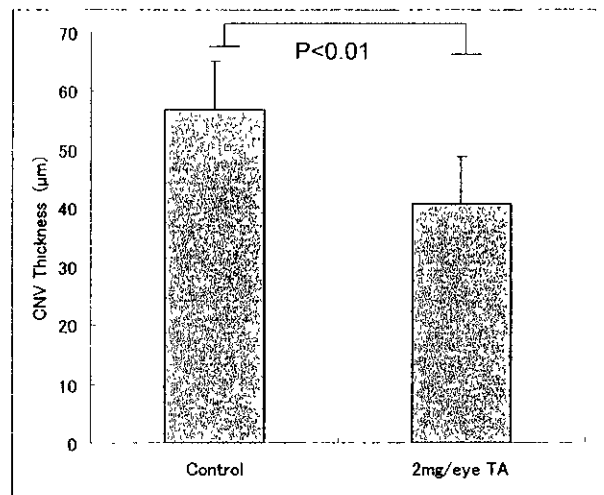


図4 新生血管膜の厚み。対照群 $59.6 \pm 8.2 \mu\text{m}$ 、TA治療群 $40.7 \pm 8.2 \mu\text{m}$ 。

投与後 (日)	TA 濃度 (mg/g)		
	硝子体	網膜	脈絡膜
3	$4.68 \pm 1.98$ (n=4)	2.80 (n=2)	$22.53 \pm 18.60$ (n=4)
7	N.D.	N.D.	$3.33 \pm 0.85$ (n=3)

N.D.=not detectable  
 検出限界: 1.25 mg/g (硝子体、網膜), 2.50 mg/g (脈絡膜)

表1 眼組織 TA 濃度。

## 考 察

加齢黄斑変性 (ARMD) は欧米では高齢者の主な失明原因となっており、特に脈絡膜新生血管を伴う滲出型は重度の視力障害を来す。これまでも網膜光凝固術、黄斑下手術、放射線治療、光力学療法、経瞳孔的温熱療法などが有用とされているが十分な効果を得ることは困難である。

血管新生 (angiogenesis) は何らかの刺激に対して、さまざまな血管新生因子や単球/マクロファージが関与し、既存血管からの血管内皮細胞の増殖、遊走によって生じるとされており、その制御に VEGF (vascular endothelial growth factor) や bFGF (basic fibroblast growth factor)、TGF  $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ) などが重要な働きをしていると考えられている。

脈絡膜新生血管 (CNV) においても ARMD 患者の組織において VEGF、b-FGF、TGF  $\beta$  が発現していると報告されており<sup>6)~10)</sup>、動物モデルでは VEGF によりレーザー誘発 CNV が促進されることが確認されている<sup>11)~14)</sup>。また VEGF のシグナルを抑制することにより CNV が抑制されることも示されている<sup>15)、16)</sup>。

TA を含め、ステロイドは血管新生抑制作用があることはよく知られており、その作用機序は不明な部分も多いがマクロファージをはじめ炎症細胞の反応を抑制し、種々の増殖因子の発現を抑え、それにより血管新生や接着因子の誘導、血管透過性因子の誘導を抑えたと考えられている。ステロイドにより VEGF、b-FGF、TGF  $\beta$  の発現が抑えられることがわかっており<sup>17)~19)</sup>、それにより血管新生が抑制されていると思われる。ラットのレーザー誘発 CNV においてもデキサメサゾンの経口投与や TA の硝子体注入によって血管新生が抑制されたとの報告がなされている<sup>20)、21)</sup>。

今回 TA を後部テノン嚢下に投与したことにより、蛍光眼底造影検査においても、組織学的な新生血管膜の厚みの測定においても脈絡膜新生血管の抑制が確認された。また眼組織内に TA が移行していることも示された。TA が網脈絡膜のレーザー照射部位に作用、VEGF や FGF を介した血管新生作用を抑制したと考えられる。

実際に加齢黄斑変性における脈絡膜新生血管とレーザーによる新生血管とは発症機序や経過も異なり今後更なる検討が必要であるが、トリアムシノロンアセトニドの後部テノン嚢下投与は脈絡膜新生血管に対する治療法として可能性があると考えられた。

## 文 献

- 1) Martidis A, Duker JS, Greenberg PB et al. Intravitreal triamcinolone for refractory diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2002; 109: 920-927.
- 2) Jonas JB, Kreissig I, Degenring, R.F. Intravitreal triamcinolone acetate as treatment of macular edema in central retinal vein occlusion. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2002; 240: 782-783
- 3) Antcliff RJ, Spalton DJ, Stanford MR et al. Intravitreal triamcinolone for uveitic cystoid macular edema: An optical coherence tomography study. *Ophthalmology*. 2001; 108: 765-772.
- 4) Danis RP, Ciulla TA, Pratt LM, Anliker W. Intravitreal triamcinolone acetate in exudative age-related macular degeneration. *Retina*. 2000; 20: 244-250.
- 5) Takehara Y, Kurokawa T, Kitamura T et al. Suppression of Laser-Induced choroidal neovascularization by oral tranilast in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 459-466, 1999.
- 6) Franc RN, Aim RH, Elliott D et al. Basic fibroblast growth factor are present in epiretinal and choroidal neovascular membranes. *Am J Ophthalmol* 122: 393-403, 1996.
- 7) Frank RN: Growth factors in age-related macular degeneration. pathogenic and therapeutic implications. *Ophthalmic Res* 29: 341-353, 1997.
- 8) Amin R, Puklin JE, Frank RN. Growth factor localization in choroidal neovascular membranes of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3178-3188, 1994.
- 9) Kiffen M, Sharma HS, Mooy CM et al. Increased expression of angiogenic growth factors in age-related macular degeneration maculopathy. *Br J Ophthalmol* 81: 154-162, 1997.
- 10) Lopez PF, Sippy BD, Lambett HM et al. Trans differentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest*



- Ophthalmol Vis Sci 37: 855-868, 1996.
- 11) Ryan SJ. Subretinal neovascularization: natural history of an experimental model. Arch Ophthalmol 100: 1804-1809, 1982.
- 12) Yi X, Ogata N, Komada M et al. Vascular endothelial growth factor expression in choroidal neovascularization in rats. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 235: 313-319, 1997.
- 13) Ishibashi T, Hata Y, Yoshikawa H et al. Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 235: 159-167, 1997.
- 14) Ogata N, Matsushima M, Takada Y et al. Expression of basic fibroblast growth factor mRNA in choroidal neovascularization. Curr Eye Res 15: 1008-1018, 1996.
- 15) Seo MS, Kawak N, Ozaki H et al. Dramatic inhibition of retinal and choroidal neovascularization by oral administration of a kinase inhibitor. Am J Pathol 154: 1743-1753, 1999.
- 16) Kwak N, Okamoto N, Wood JM et al. VEGF is major stimulator in model of choroidal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci 41: 3158-3164, 2000.
- 17) Blum, S, Issbrucker, K, Willuweit, A. et al. An inhibitory role of the phosphatidylinositol 3-kinase-signaling pathway in vascular endothelial growth factor-induced tissue factor expression. J Biol Chem 276: 33428-33434, 2001.
- 18) Blei, F, Wilson EL, Mignatti P et al. Mechanism of action of angiostatic steroids: suppression of plasminogen activator activity via stimulation of plasminogen activator inhibitor synthesis. J Cell Physiol 155: 568-578, 1993.
- 19) Renner UP, Lohrer P, Schaaf L et al. Transforming growth factor-beta stimulates vascular endothelial growth factor production by folliculostellate pituitary cells. Endocrinology 143: 3759-3765, 2002
- 20) Edelman JL, Castro MR. Quantitative image analysis of laser-induced choroidal neovascularization in rat. Exp Eye Res 71: 523-533, 2000.
- 21) Ciulla TA, Criswell MH, Danis RP et al. Intravitreal triamcinolone acetonide inhibits choroidal neovascularization in a laser-treated rat model. Arch Ophthalmol 119: 399-404, 2001.

# Retinal Angiomatous Proliferation の治療経過

Result of treatment for retinal angiomatous proliferation

新井恵子、湯沢美都子  
日本大学病院眼科 駿河台

Keiko Arai, Mitsuko Yuzawa  
Department of Ophthalmology, Surugadai Hospital of Nihon University

## 【抄録】

目的：Retinal angiomatous proliferation (RAP) に対する治療結果を明らかにする。

対象と方法：平成8年4月から平成14年12月に治療した RAP 12眼の経過を retrospective に検討した。

結果：治療の内訳は、RAP が中心窩に達していなかった Stage I 3眼、Stage II 6眼、Stage III 1眼に光凝固、達していた Stage II 1眼に低線量放射線療法、Stage III 1眼に経瞳孔温熱療法 (TTT) であった。

光凝固を行った Stage I 1眼と Stage II 1眼は、新生血管が中心窩に拡大し、TTT を行った。治療後の眼底所見は、光凝固を行った症例では6眼で改善し、TTT を追加した2眼を含む4眼で悪化した。改善した症例でも、全例で2から9回 (平均3.7回) の光凝固が必要だった。Stage II の低線量放射線療法を行った1眼は悪化した。Stage III に TTT を行った1眼は、病巣部の瘢痕化が進行し、網膜下液が吸収した。

視力は、光凝固眼では、1眼で改善、6眼で不変、TTT を追加した2眼を含む3眼で悪化した。低線量放射線療法を行った1眼では不変、Stage III に TTT を行った1眼では改善した。

結論：Stage I と II の RAP には、頻回な光凝固が有効なことがある。Stage II と III では、放射線治療や TTT は無効なことが多く、治療法を再考する必要がある。

Purpose: We evaluated the results of retinal angiomatous proliferation (RAP) treatment.

Methods: Medical records of 12 patients (12 eyes) with RAP who had undergone treatments between April 1996 and December 2002 were reviewed retrospectively.

Results: Photocoagulation had been performed for three eyes in Stage, six eyes in Stage and one eye in Stage, in which lesions were outside the fovea. Low dose radiation therapy was selected for one eye in Stage and transpupillary thermotherapy (TTT) for one eye in Stage because the lesions were foveal. Additional TTT was necessitated by deterioration after photocoagulation in one eye in Stage and one eye in Stage. Macular findings improved in six eyes and worsened in four eyes after photocoagulation. Several photocoagulations (2 to 9, average 3.7) were needed even in the six eyes which showed improvement. The one eye which had undergone low dose radiation therapy for Stage showed deterioration. The one eye which had undergone TTT showed rapid scar formation and absorption of subretinal fluid. Visual acuity after photocoagulation improved in one eye, was maintained in six eyes and deteriorated in three eyes. One eye to which low dose radiation therapy had been administered, maintained visual acuity. One eye showed improved visual acuity after TTT

Conclusion: Several photocoagulations for RAP in Stages and appeared to be quite effective. As low dose radiation therapy and TTT were ineffective on many occasions, the treatment method for RAP in Stages and should be reconsidered.

Key Words : retinal angiomatous proliferation, age-related macular degeneration

## 緒言

加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration : 以下、AMD) における新生血管は、脈絡膜血管由来と考えられていた。しかし、2001年、Yannuzziら<sup>1)</sup>は、網膜血管由来の新生血管 retinal angiomatous proliferation (以下、

RAP) を生じる AMD の一型が存在するという新しい概念を報告し、病期を3期に分類した。RAP は、まだ報告例が少なく、発病原因、病状経過など不明な点も多いため、治療に対する一定の見解は得られていない。今回筆者らは、光凝固、低線量放射線療法、経瞳孔温熱療法

(transpupillary thermotherapy : 以下 TTT) を行った RAP の治療結果を検討した。

### 対象

平成8年4月から平成14年12月に治療した RAP 12眼を対象にした。これらのフルオレセイン蛍光眼底造影 (fluorescein angiography : 以下、FA) とインドシアニングリーン蛍光眼底造影 (indocyanine green angiography : 以下、IA) の所見に基づいた治療前の診断名を retrospective に調べ、Yannuzzi らの報告に従って RAP を病期分類した。また、治療法、治療後の経過および治療前と治療後最終経過観察時の視力も調べた。

治療効果の判定は、新生血管が退縮し、出血や滲出が減少または消失したものを改善、新生血管が拡大し出血や滲出が増加したものを悪化とした。視力は、治療前と治療後最終経過観察時を比較して logMAR 0.2 以上の変化を改善あるいは悪化とした。

### 結果

12眼は、治療前から RAP と診断していた訳ではなく、また病期も様々であり、治療法も異なっていた (表1)。

症例	年齢	性別	治療前の診断名	治療前の病期	治療法	経過	視力
1	78	男	網膜動脈瘤	Stage I	光凝固 2 回 (その後の AMD - 光凝固 1 回)	改善	改善
2	81	女	AMD	Stage I	光凝固 1 回	悪化	悪化
3	76	男	RAP	Stage I	光凝固 2 回	改善	不変
4	76	女	RAP	Stage II	光凝固 4 回	悪化	不変
5	73	女	AMD	Stage II	光凝固 3 回	改善	不変
6	75	女	AMD	Stage II	光凝固 3 回	悪化	不変
7	72	女	AMD	Stage II	光凝固 4 回	改善	悪化
8	75	女	AMD	Stage II	光凝固 4 回 TTT 1 回	悪化	悪化
9	79	女	血管吻合のある AMD	Stage II	光凝固 2 回	改善	不変
10	88	男	AMD	Stage II	低線量放射線療法	悪化	不変
11	72	女	血管吻合のある AMD	Stage III	光凝固 2 回	改善	不変
12	78	女	血管吻合のある AMD	Stage III	TTT 1 回	改善	改善

表1

表1 治療前の診断名と行った治療法

治療の内訳は、新生血管が中心窩に及んでいなかった Stage I 3眼、Stage II 6眼、Stage III 1眼に光凝固、中心窩に及んでいた Stage II 1眼に低線量放射線療法、Stage III 1眼に TTT であった。Stage I 1眼と Stage II 1眼は、光凝固を行った後に、新生血管が中心窩に及んだため TTT を行った。

光凝固を行った10眼では、治療後の眼底所見は、改善6眼、悪化4眼 (TTT を追加した2眼を含む) であった。また、視力は、改善1眼、不変6眼、悪化3眼 (TTT を追加した2眼を含む) であった。光凝固が奏効し眼底所見が改善した6眼の凝固回数は、2から9回 (平均3.7回) であり、いずれも複数回の治療を要した。

### 症例提示

症例1 : 76歳 男性 (図1)

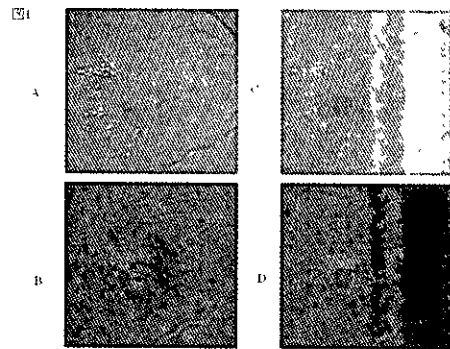


図1 症例1 : 網膜細動脈瘤を疑って光凝固を行った Stage I

- A 初診時には、網膜内病巣周囲に網膜内出血、網膜浮腫、硬性白斑がみられた。
- B 初診時の FA 後期。網膜内病巣に一致した境界やや不鮮明な過蛍光 (矢印)。周囲には網膜浮腫と囊胞様黄斑浮腫による蛍光貯留がみられた。
- C 1回目の光凝固後、網膜内出血が増加。
- D 1回目の光凝固後の FA 後期。網膜浮腫は減少していない。

網膜細動脈瘤または大きな毛細血管瘤を疑って、網膜細動脈瘤に準じた弱い光凝固 (黄色波長、凝固径500 $\mu$ m、出力0.15w、凝固時間0.5秒) を2回行ったが、網膜浮腫と網膜内出血が減少しなかった。そのため、AMD に準じた光凝固 (赤色および黄色波長、凝固径200 $\mu$ m、出力0.2w、凝固時間0.2秒) を病巣部へ行った。その後、次第に網膜浮腫と網膜内出血は減少した。logMAR 視力は1.00から0.30へ改善した。

症例2 : 81歳 女性 (図2)

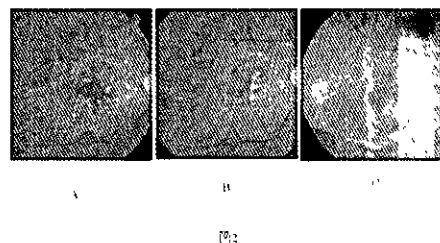


図2 症例2 : AMD と診断して光凝固を行い、その後 TTT を行った

- A 初診時には、網膜内出血、網膜浮腫がみられた。
- B 光凝固後3か月には、網膜浮腫、網膜剥離が増加。
- C TTT 後、広範囲に線維性瘢痕が生じた。

AMD と診断し、AMD に準じた光凝固を行っ

たが、光凝固後に新生血管が拡大して中心窩に及び、網膜剥離を生じた。そのため、経瞳孔温熱療法 TTT（照射径1.5mm、出力0.18w、時間60秒）を2回行ったが、広範囲に線維性瘢痕が生じ、logMAR 視力は-0.08から1.52へ低下した。

症例4：76歳 女性

RAP Stage IIと診断し、やや強めの光凝固（赤色および黄色波長、凝固径100~200 $\mu$ m、出力0.24~0.28w、凝固時間0.2秒）を6回行ったが、中心窩に病巣が近く、網膜内出血を伴っていたため凝固が不十分であり、経過観察期間内では、色素上皮剥離の吸収が得られなかった。logMAR 視力は0.52から0.70と不変であった。

症例10：86歳 男性（図3）

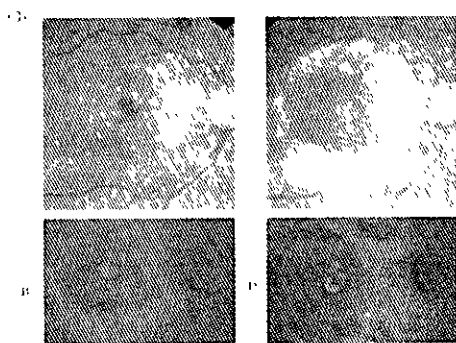


図3 症例10：AMDと診断して低線量放射線療法を行ったStage II

- A 初診時には、網膜内出血、網膜色素上皮剥離、網膜剥離がみられた。
- B 初診時のIA後期。新生血管は約 $\frac{1}{4}$ 乳頭径大。
- C 治療6か月後には、網膜色素上皮剥離と網膜剥離はやや拡大。
- D 治療6か月後のIA後期。新生血管は約 $\frac{1}{2}$ 乳頭径大に拡大。

AMDと診断し、Stage IIに低線量放射線療法（1日2Gy、合計20Gy）を行ったが、6か月後には、新生血管が拡大し、網膜剥離と網膜色素上皮剥離も拡大したが、視力は1.00から1.15と不変だった。

症例12：79歳 女性（図4）

網膜血管と吻合のあるAMDと診断し、Stage IIIにTTT（照射径3mm、出力0.4w、時間60秒と照射径2mm、出力0.27w、時間60秒の2発）を行った。その後、病巣部の瘢痕化が進行して網膜剥離が減少し、logMAR 視力は1.52から1.05へ改善した。

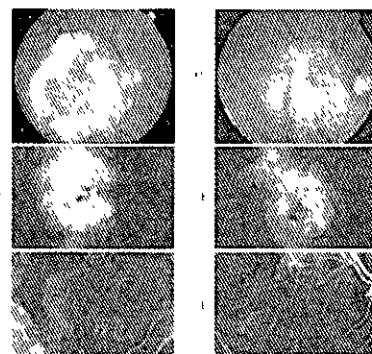


図4 症例12：網膜脈絡膜血管吻合のあるAMDと診断してTTTを行ったStage III

- A 初診時には、灰白色の隆起性病巣、網膜内出血、網膜剥離、硬性白斑がみられた。
- B 初診時のFA後期。病巣部に一致した境界不鮮明な過蛍光がみられた。
- C 初診時のIA中期。病巣部で網膜血管の吻合がみられた。
- D TTT後1年の眼底写真。病巣部は、瘢痕化傾向にあり、網膜剥離、硬性白斑が減少。
- E TTT後1年のFA後期。蛍光漏出が減少。
- F TTT後1年のIA中期。網膜血管の吻合が増加している。

#### 考案

RAPは、Yannuzziら<sup>1)</sup>により、網膜血管由来の新生血管を生じるAMDの一型として報告された新しい疾患概念である。そのため以前は、今回の症例のように、Stage Iでは網膜細動脈瘤あるいは糖尿病網膜症や網膜静脈分枝閉塞症などの毛細血管瘤、Stage IIでは脈絡膜血管由来のAMD、Stage IIIでは網膜血管と吻合のあるAMDなどと診断して治療を行っていたと考えられる。疾患概念が広まった今日でも、これらの疾患とRAPとの鑑別は困難なことが多い。RAPと診断するには、正しい認識と詳細な眼底検査および立体撮影を含めた造影検査が必要である。

脈絡膜血管由来のAMDに対する治療には、中心窩以外では光凝固、中心窩では黄斑下手術、低線量放射線療法、TTTなどがある。今回の症例では、中心窩以外では光凝固、中心窩に達していれば低線量放射線療法あるいはTTTを行った。網膜細動脈瘤に準じて光凝固を行ったStage Iでは、新生血管が退縮しなかったことから、弱い光凝固は無効と考えられる。AMDに準じた条件で光凝固を行った症例では、1回の凝固で眼底所見が改善したものはなかった。しかし、繰り返し複数回の光凝固を行った場合、眼底所見は7眼中4眼で改善し、視力は4眼で維持できた。RAPと診断した2眼では、AMDに対するよりもさらに

強い光凝固を行った。このうち、Stage I では新生血管が退縮したが、Stage II では複数回の凝固でも新生血管が退縮しなかった。光凝固の条件は、今後検討が必要と考えられるが、RAP であると早期に正しく診断し、新生血管が中心窩外で光凝固が可能な場合には、頻回な光凝固によって所見が改善される可能性があると考えられた。

また今回、TTT は、光凝固が無効であった 2 眼を含め 3 眼に行った。1 眼では、そのまま病巣部が癒痕化して網膜剥離が減少した。しかし、残りの 2 眼では新生血管が拡大し、そのうちの 1 眼は、広範囲に急激な線維性癒痕が生じて視力が低下した。TTT は長波長であるため、網膜血管に由来する感覚網膜下の新生血管を有する Stage II では、奏効しない可能性が高い。また、Stage II の 1 眼に対する低線量放射線療法も無効であったことを総合すると、中心窩の感覚網膜下にすでに新生血管が拡がっている Stage II や、さらに進行した Stage III の RAP は、難治であると考えられるので、治療の条件を再考するとともに手術、光凝固と光線力学療法など他の治療法の可能性についても考える必要がある。

#### 文 献

- 1) Yannuzzi LA, Negrao S, et al: Retinal angiomatous proliferation in age-related macular degeneration. *Retina* 21: 416-434, 2001.

# 虹彩色素上皮細胞における内在性 lysosome の 発現と貪食能について

Expression of endogenous lysosomal activities and phagocytic ability in Iris Pigment Epithelial cells

菅野江里子、富田浩史、阿部俊明、平 光、玉井 信  
東北大学眼科

Eriko Sugano, Hiroshi Tomita, Toshiaki Abe, Hikari Taira, Makoto Tama  
Department of Ophthalmology, Tohoku University, school of Medicine

## 【抄録】

目的 . 当科では加齢黄斑変性に対して、自己虹彩色素上皮細胞 (IPE) 移植による治療を実施している。これら移植細胞に網膜神経細胞保護を有する因子を導入し、移植することが検討されている。そこで網膜色素上皮細胞 (RPE) の役割の一つである貪食能について IPE において比較検討する。

方法 : Long Evans ラット眼球より、IPE および RPE を分離し、培養した。2-3 週間培養した細胞から mRNA を抽出し、cathepsin D と cathepsin S の発現を real time PCR にて調べた。これら酵素の活性は蛍光基質を用い測定した。蛋白としての発現は western blotting 法を用いた。また、神経保護因子等を培地中に添加した IPE 培養細胞に外節を与え、その蓄積を Flow cyto metry で評価した。Nitric oxide (NO) 存在下での cathepsin S 活性を測定した。

結果 . IPE において RPE と比較して cathepsin D 活性が顕著に低かった。Cathepsin S について mRNA 発現で10倍、活性で 4 倍、IPE では RPE に比較して低いことが分かった。抗酸化物質である tocopherol と hBDNF 添加群において外節の蓄積が抑制された。NO 存在下では cathepsin S の活性は抑制された。

結論 . IPE と RPE の消化酵素について調べた結果、cathepsin D と cathepsin S が共に存在するが、その機能は IPE では RPE に劣っていることが明らかとなった。これらは hBDNF の導入や抗酸化物質の添加により機能を付加できると考えられた。NO により貪食の阻害が報告されているが、cathepsin S が関与している可能性がある。

PURPOSE. The phagocytosis is one of the important functions in retinal pigment epithelial (RPE) cells, We report that the phagocytic ability of IPE cells with comparing to that of RPE cells and the effect of neurotrophic factors on phagocytosis process.

METHODS. The rat IPE and RPE were isolated from Long Evans rat eyes. The mRNA expression of cathepsin D and cathepsin S in cultured- IPE, or RPE were investigated by semi-quantitative RT-PCR. The enzyme activity of cathepsin D and cathepsin S in cultured IPE or RPE was measured by using fluorogenic substrate. The western blot analysis for both proteins was also performed. Effects of neurotrophic factors in phagocytosis process were investigated in cultured IPE. IPE cells were cultured with the medium containing neurotrophic factors, and the accumulations of lipofuscin were evaluated by flow-cytometric analysis. Cathepsin S activities treated with NO (Nitric Oxide) were also measured.

RESULT. The activity of cathepsin D was lower in IPE than in RPE cells. In cathepsin S of IPE cells, mRNA expression was 10 times and the activity was 4 times lower than that of RPE cells. The results were also comparable with that of western blot analysis. The accumulation of lipofuscin was inhibited by the treatment with anti-oxidant substitute (tocopherol) or neurotrophic factor (hBDNF, hCNTF, hFGF). The activity of cathepsin S was inhibited by NO treatment.

CONCLUSIONS. We investigated expressions of two major lysosomal-digestive enzymes (cathepsin D and cathepsin S). We demonstrated that these two enzymes presented in IPE and RPE cells. But the activities of these enzymes in IPE cells were lower than that in RPE cells. We also demonstrated the possibility these digestion abilities were affected by treatment of neurotrophic factors. It has been reported that Nitric Oxide (NO) inhibit the phagocytosis, the mechanism of which might be directly inhibition of cathepsin S by NO.

キーワード : 貧食、ライソソーム、虹彩色素上皮細胞、網膜色素上皮細胞、移植

Key Words . Phagocytosis, Lysosome, Iris pigment epithelium, Retinal pigment epithelium, Transplantation

## 緒言

RPEの主要な役割のひとつとして、視細胞外節(ROS)の取り込みと分解が挙げられる。取り込まれたROSはlysosomeと癒合し、分解される。このファゴソーム中には、40種類程度の過水分解酵素が存在することが知られている。その中でもaspartic protease familyのひとつであるCathepsin DはRPEに豊富に存在する酵素で、主な消化酵素として考えられている。Cathepsin Dを添加したRPE細胞群においてはROSの消化が急速に行われることや、ロドプシンに精製したcathepsin Dを添加したものでは、37kDaのロドプシンがすみやかに分解されることから、rhodopsinの消化にcathepsin Dが積極的に関与していると考えられてきた。しかし、Cathepsin Dインヒビターを用いた系では貪食の抑制がかかりづらいことなどから、その他の因子の関与も示唆されてきた。近年cystein proteaseのcathepsin SがRPEにおいて発現していることが明らかになり、培養細胞を用いた系では他のproteaseに比べてcysteine proteaseがROS消化過程に重要なはたらきをもつことが示されてきている。

そこで本研究では、①IPEにおけるこれら2つの消化酵素の発現をRPEと比較するとともに、②消化過程に及ぼすサイトカインの影響について検討した。さらに、③NOによる貪食抑制のメカニズムについても若干の検討を加えた。

## 方法

### ①RPEとIPEにおけるCathepsin DとSの発現比較

Long Evans ラットよりIPE、RPEを分離し、以下の実験に用いた。Cathepsin D、SのmRNAの定量はReal-time PCR system (TAKARA)を用いて行い、酵素活性についてはそれぞれに特異的な蛍光基質を用いて測定した。蛋白としての発現はwestern blotting法を用いた。

### ②消化過程に及ぼすサイトカインの影響

IPEの貪食能はRPEの60-70%程度であることがすでに報告されているが、我々は、bFGFを安定的に発現させたIPEではRPEと同程度の貪食能(取り込み)を示すことをすでに報告している。そこで、IPEの貪食能のうち消化能がこれらサイトカインにより変化するかについて調べた。RPEをサイトカインを含む培地で培養を行うと共に、豚眼より精製した外節を2週間培地中に添加した。その後、lipofuscineの蓄積をフローサイトメーターにより評価した。また、RPE培

養細胞に外節を2週間与えlipofuscineを蓄積し、その後外節を与えずにサイトカインを添加してさらに1週間培養を行い、lipofuscineの蓄積をフローサイトメーターにより評価した。

### ③NO存在下における貪食能とCathepsin S活性

サイトカインにより貪食が抑制されることが知られている。炎症により誘導されたlipopolysaccharideやinterferon- $\gamma$ はRPEを刺激し、NOを産生する。この結果、RPEにおいて貪食が抑制されることが報告されている。ROSにNO処理を前もって行ったものをRPEに貪食させても、RPEの貪食を抑制しないことから、NOが直接RPEに影響を与えている可能性が考えられてきた。そこで、NO存在下における貪食能とCathepsin S活性について測定した。

## 結果

### ①RPEとIPEにおけるCathepsin DとSの発現比較

cathepsin DのmRNA発現はIPEとRPEの間に統計学的に有意な差は認められなかったが、その活性はRPEで有意に高いことが確認された。cathepsin SではmRNAの発現、酵素活性ともRPEで有意に高いことが明らかとなった。またこれら培養細胞から蛋白を抽出し、Western blot法によりcathepsin D、Sについて調べた結果、Cathepsin Dではpro-cathepsin Dとactive-cat Dが検出され、active formにおいてはRPEで有意に蛋白発現が高いことが分かった。

### ②消化過程に及ぼすサイトカインの影響

サイトカイン添加した全ての群でlipofuscineの蓄積が少なく、ROS消化がすみやかに行われていると考えられた。しかし、BDNF、CNTFの添加によりその取り込みに減少が認められたことから、取り込み能の低下によるLipofuscineの蓄積減少も示唆された。そこでlipofuscineが既に蓄積しているモデルを作製し、蓄積したlipofuscineの消化に対するサイトカインの影響をフローサイトメーターにより評価した。その結果、サイトカインを添加した全ての群で消化が促進されることが明らかとなった。

### ③NO存在下における貪食能とCathepsin S活性

RPEの貪食能をNO存在下で調べた結果、NO-donor (SNAP)を添加していないRPEのlipofuscineの蓄積に比較して、500 $\mu$ M SNAP存在下では2.6倍の蓄積増加を示した。この結果からNOがlipofuscineの蓄積をひきおこしている可能性が考えられた。このNOによる蓄積増

加のメカニズムを調べるため、NO 存在下での Cathepsin S 活性について調べた結果、cathepsin S 活性は SNAP 濃度依存的に活性が阻害され、またその抑制効果は NO-scavenger である hydroxocobalamin の添加により濃度依存的に抑制された。

### 結 論

#### ① RPE と IPE における Cathepsin D と S の発現比較

IPE と RPE における Cathepsin D 活性の差は mRNA level ではなく、active form を形成する過程に違いがあると考えられた。cathepsin S は RPE で優位に蛋白発現が高く、これらの結果から RPE では IPE より優れた消化分解能力をもつと考えられた。

#### ② 消化過程に及ぼすサイトカインの影響

サイトカイン添加により外節消化能の亢進が認められ、IPE にこれらのサイトカインを発現させることにより、消化能の面からも RPE の代用になると考えられた。

#### ③ NO 存在下における食食能と Cathepsin S 活性

cathepsin S の活性が NO により直接阻害されることが明らかとなり、NO による消化分解能の低下は Cathepsin S 活性抑制によると考えられた。

### 文 献

- 1) Abe, T., Tomita, H., Kano, T., Yoshida, M., Ohashi, T., Nakamura, Y., Nishikawa, S., Tamai, M. (2000). Autologous iris pigment epithelial cell transplantation in monkey subretinal region. *Curr Eye Res* 20, 268-275.
- 2) Abe, T., Tomita, H., Ohashi, T., Yamada, K., Takeda, Y., Akaishi, K., Yoshida, M., Sato, M., Tamai, M. (1999). Characterization of iris pigment epithelial cell for auto cell transplantation. *Cell Transplant* 8, 501-510.
- 3) Alverve, P. V., Berglin, L., Gouras, P., Sheng, Y. (1994). Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 232, 707-716.
- 4) Becquet, F., Courtois, Y., Goureau, O. (1994). Nitric oxide decreases in vitro phagocytosis of photoreceptor outer segments by bovine retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Physiol* 159, 2, 256-62.
- 5) Bromme, D., Steinert, A., Friebe, S., Fittkau, S., Wiederanders, B., Kirschke, H. (1989). The specificity of bovine spleen cathepsin S. A comparison with rat liver cathepsins L and B. *Biochem J* 264, 475-481.
- 6) Burke, J. M., Twining, S. S. (1988). Regional comparisons of cathepsin D activity in bovine retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29, 1789-1793.
- 7) Dntelmann, T. S., Hemann, K., Kayatz, P., Schraermeyer, U. (1999). Comparative study of ROS degradation by IPE and RPE cells in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237, 830-839.
- Ivy, G. O., Kanai, S., Ohta, M., Smith, G., Sato, Y., Kobayashi, M., Kitani, K. (1989). Lipofuscin-like substances accumulate rapidly in brain, retina and internal organs with cysteine protease inhibition. *Adv Exp Med Biol* 266, 31-45; discussion 45-47.
- 8) Kageyama, T. (1995). Procathepsin E and cathepsin E. *Methods Enzymol* 248, 120-136.
- 9) Katz, M.L., Shanker, M. J. (1989). Development of lipofuscin-like fluorescence in the retinal pigment epithelium in response to protease inhibitor treatment. *Mech Ageing Dev* 49, 23-40.
- 10) Kennedy, C. J., Rakoczy, P. E., Constable, I. J. (1995). Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye* 9 (Pt 6), 763-771.
- 11) Kirschke, H., Wiederanders, B. (1994). Cathepsin S and related lysosomal endopeptidases. *Methods Enzymol* 244, 500-511.
- 12) Kogishi, J. I., Akimoto, M., Mandai, M., Kuriyama, S., Hall, M. O., Honda, Y., Yoshimura, N. (2000). Nitric oxide as a second messenger in phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32, 4, 138-42.
- 13) Krupa, J. C., Mort, J. S. (2000). Optimization of detergents for the assay of cathepsins B, L, S, and K. *Anal Biochem*



283, 99-103.

- 14) Petanceska, S., Canoll, P., Devi, L. A. (1996). Expression of rat cathepsin S in phagocytic cells. *J Biol Chem* 271, 4403-4409.
- 15) Rakoczy, P. E., Baines, M., Kennedy, C. J., Constable, I. J. (1996). Correlation between autofluorescent debris accumulation and the presence of partially processed forms of cathepsin D in cultured retinal pigment epithelial cells challenged with rod outer segments. *Exp Eye Res* 63, 159-167.
- 16) Rakoczy, P. E., Lai, M. C., Baines, M. G., Spilsbury, K., Constable, I. J. (1998). Expression of cathepsin S antisense transcripts by adenovirus in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 2095-2104.
- 17) Rakoczy, P. E., Mann, K., Cavaney, D. M., Robertson, T., Papadimitreou, J., Constable, I. J. (1994). Detection and possible functions of a cysteine protease involved in digestion of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 4100-4108.
- 18) Regan, C. M., de Grip, W. J., Daemen, F. J., Bonting, S. L. (1980). Degradation of rhodopsin by a lysosomal fraction of retinal pigment epithelium: biochemical aspects of the visual process. *XLI. Exp Eye Res* 30, 183-91.
- 19) Rezai, K. A., Lappas, A., Farrokh-siar, L., Kohen, L., Wiedemann, P., Heimann, K. (1997). Iris pigment epithelial cells of Long Evans rats demonstrate phagocytic activity. *Exp Eye Res* 65, 23-29.
- 20) Sakuragi, M., Tomita, H., Abe, T., Tamai, M. (2001). Changes of phagocytic capacity in basic fibroblast growth factor-transfected iris pigment epithelial cells in rats. *Curr Eye Res* 23, 185-191.
- 21) Werle, B., Staib, A., Julke, B., Ebert, W., Zladoidsky, P., Sekirnik, A., Kos, J., Spiess, E. (1999). Fluorometric microassays for the determination of cathepsin L and cathepsin S activities in tissue extracts. *Biol Chem* 380, 1109-1116.
- 22) Wilcox, D. K. (1988). Vectorial

accumulation of cathepsin D in retinal pigmented epithelium: effects of age. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29, 1205-1212.

- 23) Yasuda, Y., Kageyama, T., Akamine, A., Shibata, M., Kominami, E., Uchiyama, Y., Yamamoto, K. (1999). Characterization of new fluorogenic substrates for the rapid and sensitive assay of cathepsin E and cathepsin D. *J Biochem (Tokyo)* 125, 1137-1143.

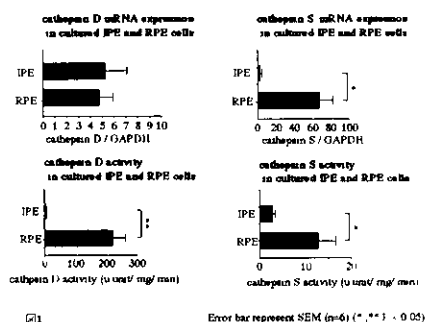


図 1

Long Evans ラット眼球より、IPE および RPE を分離し、培養した。2 - 3 週間培養した細胞から mRNA を抽出し、cathepsin D と cathepsin S の発現を real time PCR にて調べた。これら酵素の活性は蛍光基質を用い測定した。

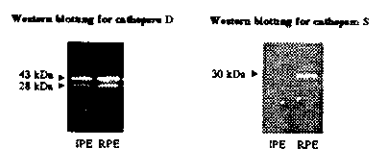


図 2

Long Evans ラット眼球より、IPE および RPE を分離し培養した。2 - 3 週間培養した細胞から蛋白を抽出し、western blotting 法により cathepsin D と cathepsin S それぞれの発現を調べた。

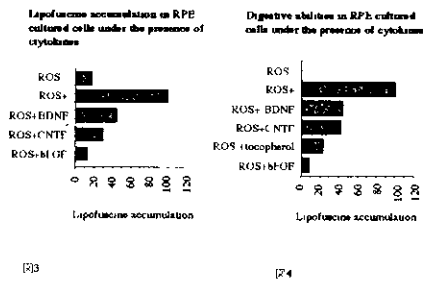


図3 2週間サイトカインを含む培地で培養を行うと共に、外節を与えた。その後 lipofuscine の蓄積をフローサイトメーターにて評価した。

図4 ROSを2週間過酸化状態で加え、急激にROSを蓄積させた。その後、ROSを与えずに過酸化ストレス下でサイトカインまたは抗酸化剤として tocopherol を加え、蓄積した ros の消化をフローサイトメーターにて評価した。

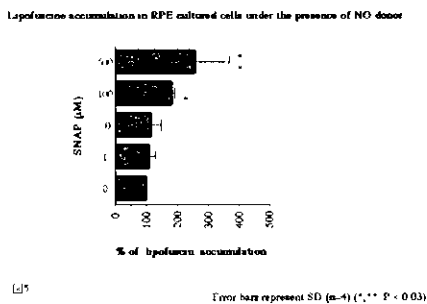


図5 培養した RPE 細胞に NO donor である s-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) を濃度を変えて培地中に添加し、1週間 ROS を与えた。1週間後にフローサイトメーターにより lipofuscin の蓄積を解析した。

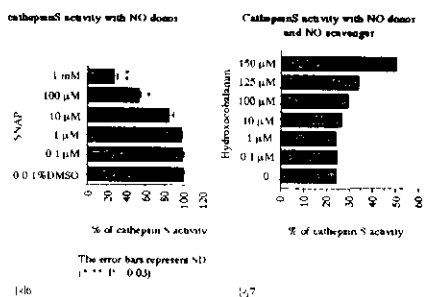


図6 精製した cathepsin S を NO donor である SNAP を加え、その活性を量った。

図7 cathepsin S に SNAP を 1mM となるように加え、これらにさらに NO-Scavenger の hydroxocobalamin を様々な濃度で加えた。

# 実験的脈絡膜血管新生における眼浸潤炎症細胞の種類と役割

The role and kinds of infiltrating inflammatory cells in experimental choroidal neovascularization

堤千佳子、園田康平、石橋達朗  
九州大学大学院医学研究院眼科学分野

Chikako Tsutsumi, Koh-hei Sonoda, Tatsuro Ishibashi  
Department of Ophthalmology, graduate school of medicine, Kyushu University

## 【日本語抄録】

【目的】実験的脈絡膜血管新生 (CNV) における眼球浸潤炎症細胞の関与を検討した。【方法】PCを用い、マウスで実験的 CNV を作成した。PC後の眼浸潤細胞をフローサイトメトリーで測定した。中和抗体を腹腔内投与して好中球、T細胞、NK細胞を除去し、PC後7日目のCNV形成を脈絡膜 flat mount で解析した。また、CCR2 KO マウスで同様の実験を行った。【結果】PC後、多数の好中球、マクロファージの眼球浸潤を認めた。T細胞、NK細胞の浸潤はわずかで、B細胞浸潤はほとんど検出できなかった。好中球、T細胞、NK細胞いずれを除去してもCNV形成に有意差はなかった。ただしマクロファージの局所浸潤が見られないCCR2 KO マウスで好中球を除去するとCNV形成が抑制された。【結論】実験的CNVでは各種浸潤炎症細胞が観察された。CNV形成におけるリンパ球、NK細胞の影響は少なく、好中球の部分的関与が示唆された。

PURPOSE: Our aim of this study was to investigate the role of ocular-infiltrating inflammatory cells in developing experimental CNV. METHODS: Choroidal neovascularization (CNV) was induced in mice by laser photocoagulation (PC). After photocoagulation, the percentage of infiltrated inflammatory cells into the eye were investigated by flow cytometry at several time points. And to examine the effect of each inflammatory cells on CNV, each inflammatory cells were depleted using neutralizing antibodies. Seven days after PC, the area of CNV was measured by choroidal flat mount. To clear the effect of macrophages to CNV, CC chemokine receptor-2 (CCR 2) knockout mice was used. RESULTS: A large number of ocular-infiltrating neutrophils and macrophage were observed. Infiltration of NK cells and T lymphocytes were detected barely. The area of CNV had no significant difference among neutrophils, NK cells and T cells depletion mice. The depletion of neutrophils in CCR 2 KO mice resulted to reduction of CNV formation. CONCLUSIONS: Some ocular-infiltrating inflammatory cells were detected in experimental CNV. Lymphocytes and NK cell had little effect to CNV formation. Neutrophils contribute to CNV partially.

キーワード：脈絡膜血管新生、photocoagulation、好中球、NK細胞、T細胞、CCR2ノックアウトマウス、中和抗体

Key Words :

## 目 的

脈絡膜血管新生 (CNV) の発症機序にはいまだ定説がないが、病態の原因の一つとして、局所炎症説があげられている<sup>1)</sup>。しかし個々の炎症細胞の動態、および関与については詳細な検討はなされていない。近年、血管新生の代表的病態である、腫瘍、炎症性疾患、創傷治癒などで、炎症細胞と血管新生の関与が報告されている<sup>2), 3), 4)</sup>。前回の班会議で我々は、CNV形成に眼球浸潤マクロファージが促進的に働くことを報告した。今回は他の眼球浸潤炎症細胞、特に血管新生を促進する可能性がある好中球、リンパ球、NK細胞の関与を検討した。

## 方 法

C57BL/6 マウスの網膜外層から脈絡膜部分をレーザー光凝固 (PC) で破壊し、実験的 CNV を作成した。PC後の眼浸潤細胞をフローサイトメトリーで測定し、12時間、24時間、2日後、5日後、7日後と時間経過を追った。好中球を抗マウス好中球中和抗体 (Gr-1) で、Tリンパ球を抗マウス CD4 (GK.1.5)、CD8 (53-6.6.72) 中和抗体で、NK細胞を抗 Asialo GM1 抗体を腹腔内投与して除去した。抗体投与後1日後にPCを行い、PC後7日目に眼球摘出し、CNVの大きさを脈絡膜 flat mount により解析した。また CCR2 knockout (KO) マウスを用いて同様の

実験を行った。

### 結果

PC後24時間をピークに好中球、48時間をピークにマクロファージの眼球への浸潤を認めた。Tリンパ球、NK細胞の浸潤はわずかに認められた。Bリンパ球はほとんど検出できなかった (Fig.1)。好中球を除去したマウスでは、無処置マウスに比べ、CNV形成に、若干抑制傾向がみられたものの有意な差は認められなかった (Fig.2)。CD4細胞、CD8細胞の両細胞を除去した群では、コントロール群と比較してCNV形成に差がなかった。NK細胞の除去マウスにおいてもCNVの形成に差はみられなかった (Fig.3)。そこで、マクロファージの影響を除去した状態でのCNVを調べるためにCCR2 KOマウスを用いた。このCCR2 KOマウスで同様に好中球を除去した群では無処置のCCR2 KOマウスに比べて有意にC

NVの形成が抑制された (Fig.4)。

### 考察

実験的CNVモデルではPC処置後、様々な炎症細胞 (マクロファージ、好中球、NK細胞、T細胞) が浸潤した。その中でマクロファージと好中球の浸潤が目立った。前回我々は、マクロファージがCNV形成において血管新生促進的に働くことを報告した。マクロファージの血管新生作用は腫瘍などの血管新生のおこる病態でも重要な鍵を握る<sup>1)</sup>。

一方、好中球は部分的に血管新生促進作用を持つと考えられた。今回は強い血管新生作用を持つと考えられるマクロファージの影響を除いた状態で調べるためにCCR2 KOマウスを用いて検討した。CCR2は、単球系マクロファージの浸潤に関わるCCケモカインの一種、MCP-1のメインのレセプターで、CCR2 KOマウスでは炎症

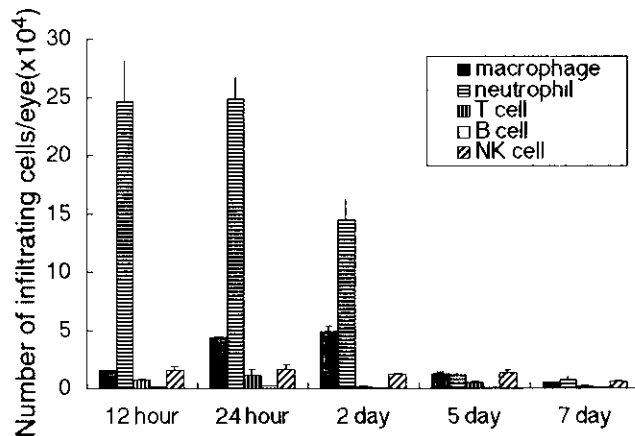


Figure 1 PC後の眼球浸潤炎症細胞の時間経過

PC後の眼球浸潤細胞を細胞分離し、フローサイトメトリーで眼球あたりの浸潤細胞数を調べている。PC後24時間をピークに眼球あたりの浸潤好中球数 (CD45<sup>high</sup> and Gr-1<sup>high</sup> cells) が、2日後をピークにマクロファージ数 (CD45<sup>high</sup> and F4/80<sup>high</sup> cells) が増加している。T細胞 (TCR<sup>high</sup> cells)、NK細胞 (NK1.1<sup>high</sup> cells) はわずかに浸潤がみられる。B細胞 (CD19<sup>high</sup> cells) の浸潤はほとんど検出できていない。

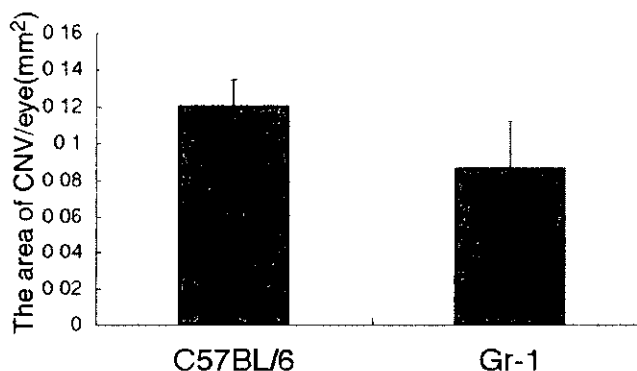


Figure 2 CNV形成における好中球除去の効果

PC 7日後の眼球あたりのCNVの面積。抗マウス好中球抗体 (Gr-1) を投与した群 (n=13) は、無処置群 (C57BL/6) (n=22) に比べて、CNV面積に有意差はみられない。