

図1. 組換えアデノウイルス感染IPEを移植した  
光障害モデルラットの網膜組織

#### D. 考察

アデノウイルスベクターを用いて神経栄養因子の導入をした IPE 細胞は *in vitro* 及び *in vivo* で視細胞保護効果があった。当科では加齢黄斑変性の新生血管膜剥去術後に培養自己 IPE 細胞の移植を行ってきたが、この IPE 細胞に神経栄養因子遺伝子を導入することによってより効果を期待できる。臨床応用に向けては遺伝子導入法など更なる検討が望まれる。

#### E. 結論

本研究で、神経栄養因子遺伝子導入組換えアデノウイルスを感染させた IPE 細胞は *in vitro* と *in vivo* の実験で神経網膜の保護効果があることを証明した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

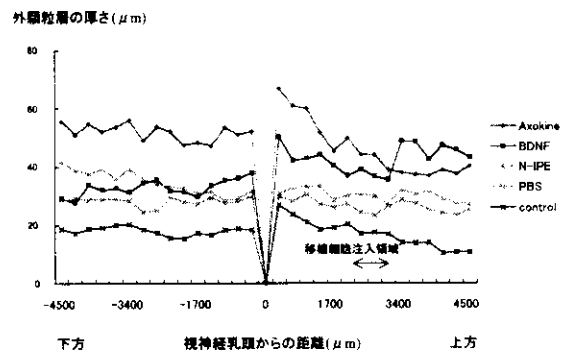
なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



#### I. 参考文献

1. Abe T. et al. Autologous iris pigment epithelial cell transplantation in monkey subretinal region. *Curr Eye Res* 20: 268-75, 2000.
2. Abe T. et al. Auto iris pigment epithelial cell transplantation in patients with age-related macular degeneration: short-term results. *Tohoku J Exp Med*. 191: 7-20, 2000.
3. Abe T. Regeneration of the retina using pigment epithelial cell transplantation. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 106: 778-803; discussion 804, 2002.

4. Kano T. et al. Protective effect against ischemia and light damage of iris pigment epithelial cells transfected with the BDNF gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43: 3744-53, 2002.
5. Takahashi R., Hirabayashi, M., Yanai, N., Obinata, M. & Ueda, M. Establishment of SV40-tsA58 transgenic rats as a source of Conditionally immortalized cell lines. *Exp Anim.* 48: 255-61, 1999.

## 45. 遺伝性網膜変性疾患モデルラットへの light-stress の影響

石川 太、大黒 浩、大黒幾代、間宮和久、目時友美、山崎仁志  
高野淑子、伊藤 忠、中澤 満  
(弘前大)

**研究要旨** 網膜色素変性症をはじめとする遺伝性網膜変性の分子病理モデルである The Royal College of Surgeons (RCS) rat の網膜変性に対して mild light-stress がその変性を若干遅延させる効果があることが報告<sup>1)2)</sup>されている。本研究では RCS rat の網膜変性の治療研究として RCS rat における light-stress の影響を検討する前段階として、RCS rat のコントロールである Sprague Dawley (SD) rat, Brown Norway (BN) rat に対して様々な照度・照射時間で light-stress を与え、光学顕微鏡による組織学的検討、網膜電図 (ERG) による機能評価、TaqMan@PCR を用いた apoptosis pathway の諸因子の変化を検討した。SD rat, BN rat とともに mild light-stress では網膜光傷害のパターンは示さず、ERG の振幅は一過性に低下し、light-stress 後 9 日には回復した。apoptosis pathway の変化においては SD rat で apoptosis pathway 諸因子に up-regulate や down-regulate がみられたが、apoptosis の促進あるいは抑制といった一定の傾向はなかった。BN rat では apoptosis pathway の諸因子に有意な変化はみられなかった。今回の結果から、SD rat, BN rat においては mild light-stress で網膜光傷害とはならず、RCS rat においても同程度の light-stress で網膜光傷害が起こらない mild light-stress となり得ると考えられた。

### A. 研究目的

遺伝性網膜変性の分子病理モデルとして広く用いられている RCS rat の網膜変性に対して mild light-stress がその変性を若干遅延させる効果があることが報告<sup>1)2)</sup>されている。本研究では RCS rat を使用しての網膜変性治療研究の前段階として RCS rat のコントロールである SD rat, BN rat における light-stress の影響を検討することを目的とした。

### B. 研究方法

SD rat, BN rat に対して照度 650, 1300,

2500, 5000 lux・照射時間 12 時間または 24 時間で light-stress を与え、光学顕微鏡による組織学的検討、網膜電図 (ERG) での機能評価、TaqMan@PCR を用いた apoptosis pathway の諸因子の変化を検討した。

本研究は弘前大学医学部附属動物実験施設における動物実験倫理委員会の承認を得て施行された。

### C. 研究結果

2500, 5000 lux の強照度の light-stress を与えた場合、SD rat, BN rat とともに ERG

の振幅は一過性に低下し、light-stress 後 9 日には回復をみせるものの、light-stress を与えないコントロールと比較して振幅は完全には回復しなかった(図 1)。また、組織学的にも網膜光傷害のパターンを示した。一方で 650, 1300 lux の弱照度の light-stress では ERG の振幅低下は light-stress 直後こそみられるが、light-stress 後 9 日には回復した(図 1)。組織学的にも網膜光傷害はみられなかった。650, 1300 lux の弱照度の light-stress を与えた場合の apoptosis pathway 諸因子の変化では SD rat で apoptosis pathway 諸因子に up-regulate や down-regulate がみられたが、apoptosis の促進あるいは抑制といった一定の傾向はなかった。BN rat では apoptosis pathway の諸因子に有意な変化はみられなかった。

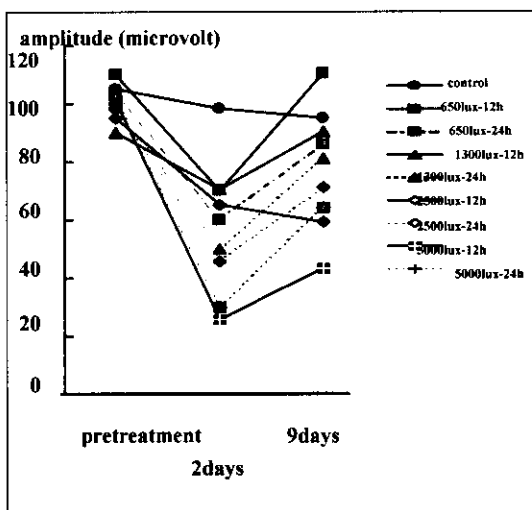


図 1 : SD rat の ERG 振幅の経時的変化

#### D. 考察

Nir らの報告<sup>1)2)</sup>では RCS rat の網膜変性を遅延させる mild light-stress の条件として照度約 1300 lux、10 時間が示されている。今回の研究で検討した結果からも照度 2500, 5000 lux では網膜光傷害がおこり、

mild light-stress とはなり得ないことがわかった。一方で 650, 1300 lux 程度の弱照度の light-stress では、一過性の機能障害こそ生じるが、その後機能回復がみられ、さらに組織学的に網膜光傷害がみられなかったことから、Nir らが報告した約 1300 lux という light-stress の条件は mild light-stress として妥当であるかと考えられた。照射時間に関しては 1300 lux、24 時間の light-stress にても経時的機能回復がみられ、網膜光傷害がおこらなかったことから、照度とは異なり条件に比較的、幅があることがわかった。

#### E. 結論

照度 1300 lux 程度までの light-stress は RCS rat の網膜変性を遅延させる mild light-stress となり得る可能性がある。引き続き、RCS rat における検討を行う予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

石川 太 他 : RCS ラットの網膜変性に対する光刺激の効果. 視覚科学フォーラム 大阪, 2003.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

#### 1. 参考文献

1. Izhak Nir et al: Extended photoreceptor viability by light stress in the RCS rats but not in the opsin P23H mutant rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42: 842-9, 2001
2. Izhak Nir et al: Light treatment enhances photoreceptor survival in dystrophic retinas of Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40: 2383-90, 1999.

## 46. RCS ラットの網膜変性に対する Ca 拮抗剤の効果

山崎仁志、大黒 浩、大黒幾代、目時友美、石川 太、中澤 満  
(弘前大)

### 研究要旨

目的：我々は最近の研究で、L-type の Ca 拮抗剤であるニルバジピンが RCS ラット網膜変性に対して保護効果があることを報告した。今回我々は、L-type とは異なる N-type の Ca 拮抗剤であるシルニジピンの効果について評価したので報告する。

方法：ニルバジピン、シルニジピン、および基剤を RCS ラットの腹腔内に投与し形態学的、機能的分析を行った。

結果：これら Ca 拮抗剤のうちニルバジピンの投与のみが、RCS ラットの網膜変性の初期段階において形態学的な保護作用を示し、また ERG において機能的な保護作用を示した。

結論：種々の Ca 拮抗剤のうち、ニルバジピンが最も RCS ラットにおいて有意な視細胞保護作用があり、ある種の網膜色素変性症患者の治療薬となり得る。

### A. 研究目的

Retinitis Pigmentosa (RP) は夜盲、輪状暗点、網膜の骨小体様色素沈着を特徴とした遺伝性網膜変性であるが、効果的な治療法は確立されていない。RP の実験モデルとして RCS ラットがしばしば用いられている。<sup>1-3)</sup> D' Cruz らは、RCS rat の網膜変性の原因として、receptor tyrosine kinase MerTK の mutation を発見したが、この遺伝子異常はヒト RP 患者においてもみられるため、この実験モデルにおいて治療効果が得られれば、網膜変性疾患への応用が期待される。以前我々は、臨床で用いられる様々な L-type の Ca 拮抗剤、すなわちニルバジピン、ニカルジピン、ジルチアゼム、ニフェジピンを生後 3 週から視細胞の変性が始まる RCS rats (3 週令) に腹腔内投与したところ、ニルバジピンのみが、RCS rat の

網膜変性に対して形態学的、機能的保護効果があることを報告した。今回我々は、L-type とは異なる N-type の Ca 拮抗剤であるシルニジピンの効果について、網膜機能は ERG で評価し、形態学的評価は光学顕微鏡により組織学的に検討したので報告する。

### B. 研究方法

臨床でもっとも用いられている L-type の Ca 拮抗剤であるニルバジピン、N-type の Ca 拮抗剤であるシルニジピン、および基剤を RCS ラットの腹腔内に生後 3 週令から 2 週間、連日投与し形態学的、機能的分析を行った。

本研究は弘前大学医学部付属動物実験施設における動物実験倫理委員会の承認を得て施行された。

### C. 研究結果

RCS rats における Ca 拮抗剤の効果を検討するために、以前効果のみられた L-type の Ca 拮抗剤ニルバジピンと、type の異なる N-type の Ca 拮抗剤シルニジピン、および、その基剤を 3 週令の RCS rats に連日、2 週間腹腔内投与し、網膜各層の厚さを比較した。Fig. 1 に示すように、シルニジピン、基剤投与例では、網膜形態に効果は示されなかった。しかし対照的に、ニルバジピン投与例では control に比べ、網膜層が 4、5 週令で有意に厚さが保たれていた。また、各々の網膜各層を計測したところ、ニルバジピン投与群では、外顆粒層が、4 週令・5 週令共に、未治療網膜と比べて有意に厚くなっていた。また、視細胞外節においても同様の現象が見られた。電子顕微鏡による観察では、未治療の網膜は、視細胞外節の不整が見られたのに対し、ニルバジピンを投与した網膜では、その構造はより保たれていた。

これらの形態学的な違いは、Fig. 2 に示すように、ニルバジピン投与群と未治療群間に ERG で見られる網膜機能の違いとも一致していた。ニルバジピン投与群では 4 週令、5 週令ともに control に比べて a 波および b 波の振幅が有意に保てれていた ( $P=0.001$ )。しかしながら、シルニジピンでは ERG 反応に影響を及ぼさなかった。以上から、ニルバジピンの腹腔内投与は RCS ラットの網膜形態および機能を保護することが強く示唆された。

さらに免疫蛍光顕微鏡では、組織学的障害が見られたのにもかかわらず、ニルバジピン投与例では、RCS では通常減少してい

るロドプシンキナーゼや  $\alpha$ -A-クリスタリンの発現が 4 週令、5 週令ともに多かった (Fig. 3)。

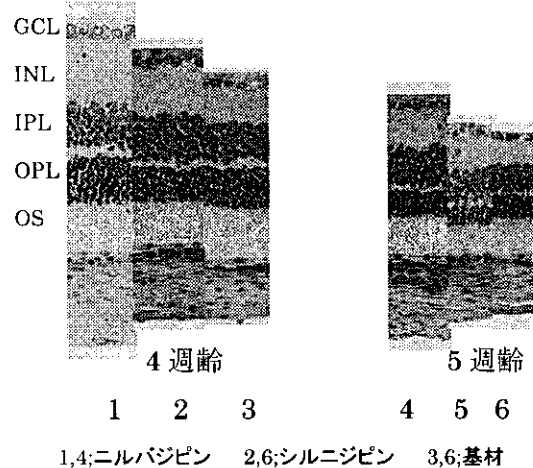


Fig.1 網膜H.E.染色

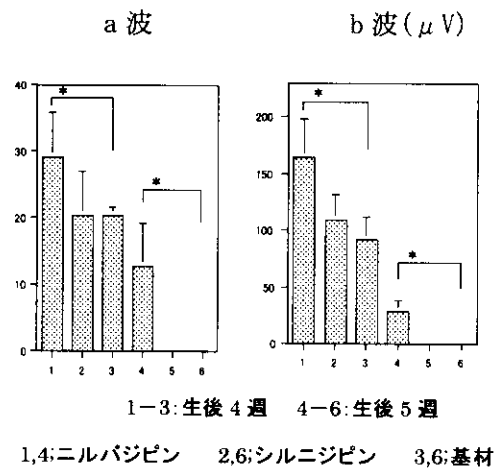


Fig.2 網膜電位図

### D. 考察

この研究で我々は、Ca 拮抗剤のうちニルバジピンのみが、RCS rats の網膜変性に対して視細胞の保護効果があることを発見した。1) 形態学的に、光学顕微鏡で有意に網膜層が厚くなっており、電子顕微鏡では視細胞外節の構造、外顆粒層のシナプス・シナ

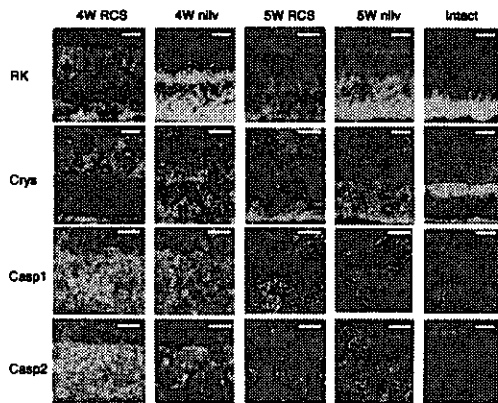


Fig.3 蛍光免疫染色

プスリボン形態の保護が観察された。2) 機能的に、ERGでa波・b波の振幅が保護されていた。3) ロドプシンキナーゼや $\alpha$ -A-クリスタリンの発現の保護が、免疫組織化学・RT-PCRで認識された。

高血圧に対して広く治療に用いられているCa拮抗剤は、細胞内へのCaの流入を阻止し、平滑筋細胞を弛緩させ、さまざまな臓器の局所的な血流を増加させる。報告によるとニルバジピンは、高血圧がない場合、全身の血圧に対して最小限の効果を示すdihydropyridine Ca拮抗剤であり、犬の実験ではニフェジピン・ニカルジピンよりも、より血流を増加させており<sup>4)</sup>、ウサギの実験では、視神経乳頭血流および血流速度は、脈絡膜・網膜と同様に増加していた<sup>5)</sup>。ゆえにニルバジピンは神経保護として機能していると考えられ、事実、脳梗塞のような中枢神経系の疾患発症後の神経細胞死に対する保護のために臨床的に使われている。また、いくつかのCa拮抗剤は緑内障患者の視野欠損の進行を効果的に遅らせると推測されている。特に正常眼圧緑内障に対する血管拡張作用による眼血流の増加が注目されている<sup>6,7)</sup>。これらのことから、L-typeのCa拮抗剤であるニルバジピンは脳血液

関門を通過できるため、その腹腔内投与により、網膜組織をはじめとした中枢神経系に作用し、細胞保護レベルにまで達することができると考えられる。また、ニルバジピンはその作用機序において、他のCa拮抗剤に比べてCa channel選択性が高いことが知られており、このことも大きく関与しているのかもしれない。

## E. 結論

我々の今回の研究で、ニルバジピンのみがRCS ratの網膜変性に対して視細胞の形態・機能を保護していた。同様にMertk遺伝子にmutationがあるという点で、RCS ratsとRP患者は一致しているため、今後さらなる検討を加えることにより、ニルバジピンの効果が臨床的にRPの治療に応用される可能性があると考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1.論文発表

Yamazaki H, et al: Preservation of retinal morphology and functions in Royal College Surgeons rat by nilvadipine, a  $Ca^{2+}$  antagonist. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43, 919-26, 2002.

### 2.学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1.特許取得

ニルバジピンによる網膜変性の治療

### 2.実用新案登録



なし

3.その他

なし

#### 1. 参考文献

1. Goldman AI, O'Brien PJ. Phagocytosis in the retinal pigment epithelium of the RCS rat. *Science* 192:799,1976.
2. Edwards RB, Szamier RB. Defective phagocytosis of isolated rod outer segments by RCS rat retinal pigment epithelium in culture. *Science* 197:1001, 1977.
3. Chaitin MH, Hall MO. Defective ingestion of rod outer segments by cultured dystrophic rat pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 24:812-20, 1983.
4. 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.* 5:1074-82, 1983.
5. 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.* 40: 1144-51, 1999.
6. 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.* 227: 408-12, 1989.
7. 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* 103:283-8,1996.

## 47. rd マウス網膜に対するカルシウム拮抗剤の影響

高野淑子、大黒 浩、大黒幾代、間宮和久、目時友美、山崎仁志  
石川 太、中澤 満  
(弘前大)

**研究要旨** 網膜色素変性症の分子病態の解明に、retinal degeneration (rd) マウスや Royal College of Surgeons (RCS) ラットなど、種々の網膜変性モデル動物が用いられている。近年 Frasson らは、rd マウスにおいてカルシウム拮抗剤である D-cis diltiazem が視細胞変性を抑制することを報告した<sup>1)</sup>。さらに、Yamazaki らは、RCS ラット網膜において、カルシウム拮抗剤である nilvadipine が網膜の形態および機能を効果的に保護することを示した<sup>2)</sup>。そこで本研究では、RCS ラットとは遺伝形式の異なる rd マウスの網膜変性に対するカルシウム拮抗剤の有効性を検討することを目的とした。前回までの検討では、L 型カルシウム拮抗剤である nilvadipine、nifedipine、diltiazem および nicardipine とその基剤を rd マウスに腹腔内投与したところ、nicardipine と nilvadipine 投与では視細胞層が基剤投与に比べ有意に厚く保たれており、さらに nilvadipine は網膜微細構造も保護することが示唆された<sup>3)</sup>。しかし、ERG による網膜機能の検討では、有意な差が得られなかった。そこで今回の研究では、L 型の他に T、N 型カルシウム拮抗剤 (cilnidipine、efonidipine) の網膜に対する影響を検討した。cilnidipine、efonidipine 投与では、網膜組織において基剤投与に比べ有意差はみられなかったものの、Ganzfeld 型 ERG による網膜機能の解析では、有意に振幅の保存がみられた。今回の結果から、今後 nilvadipine 投与群等も Ganzfeld 型 ERG による機能の再検討を要することが示唆された。

### A. 研究目的

rd マウスの網膜変性に対するカルシウム拮抗剤の有効性を検討するために、前回は L 型カルシウム拮抗剤である nilvadipine、nifedipine、diltiazem、nicardipine の効果について研究した。今回の研究では、T、N 型カルシウム拮抗剤 (cilnidipine、efonidipine) の影響を Ganzfeld 型 ERG による機能解析も含め、検討することを目的とした。

### B. 研究方法

前回と同様の方法で<sup>3)</sup>、生後 9 日目の rd

マウスに 1 週間連日 cilnidipine、efonidipine とその基剤を腹腔内投与し、網膜形態を光学顕微鏡レベルで、網膜機能を Ganzfeld 型 ERG を用いて検討した。

本研究は弘前大学医学部付属動物実験施設における動物実験倫理委員会の承認を得て施行された。

### C. 研究結果

cilnidipine、efonidipine 投与では網膜組織において基剤投与に比べ視細胞層の厚さが

若干保たれていたが、有意差はみられなかった(図1)。Ganzfeld型ERGによる網膜の保存がみられた(図2)。

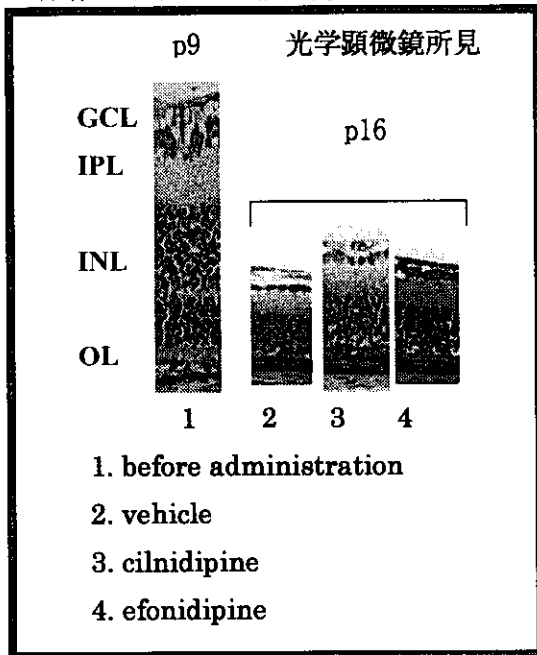


図1. rd マウス網膜形態に対するカルシウム拮抗剤の影響

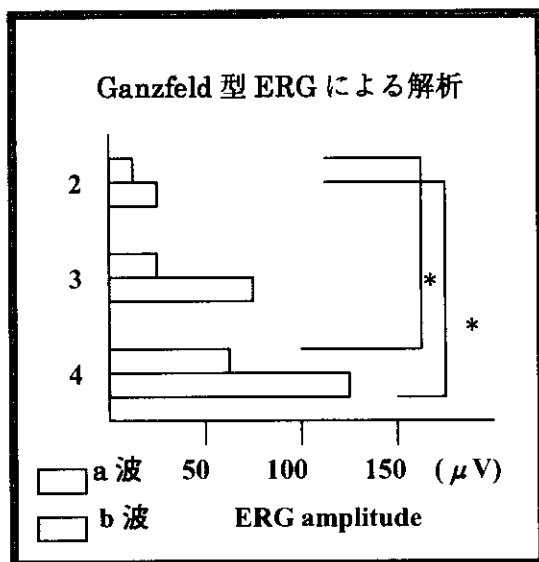


図2. rd マウス網膜機能に対するカルシウム拮抗剤の影響 (2-4; 図1の2-4に対応)

#### D. 考察

機能の解析では、2 剤とも有意に振幅の保存がみられ、特に efonidipine 投与では a 波

rd マウスの網膜変性に対するカルシウム拮抗剤の有効性について検討した。前回は L 型カルシウム拮抗剤である nilvadipine、nifedipine、diltiazem、nicardipine の効果について研究したが、nicardipine と nilvadipine 投与群では視細胞層が基剤投与群に比べ有意に厚く保たれており、さらに nilvadipine は網膜微細構造も保護することが示唆された<sup>3)</sup>。しかし、ERG による網膜機能の検討では、有意な差が得られなかった。その原因の一つとして前回使用した ERG の感度が悪いことが考えられた。従って今回 Ganzfeld 型 ERG による機能解析も含め、T、N 型カルシウム拮抗剤 (cilnidipine、efonidipine) の影響につき検討したところ、ERG において 2 剤投与群とも基剤投与群に対し有意に振幅が保存された。前回の研究では網膜組織において nilvadipine 投与群をはじめ網膜変性抑制効果がみられたものの網膜機能においては有意差がみられなかった。しかし、今回は感度の良い Ganzfeld 型 ERG を用いたことにより、逆に網膜機能の面で有意な差がみられた。

#### E. 結論

rd マウスの網膜変性に対して、カルシウム拮抗剤 nicardipine、nilvadipine は形態学的に網膜変性抑制効果がみられた。また、cilnidipine、efonidipine は機能的に網膜変性抑制効果がみられたため、nilvadipine 等も Ganzfeld 型 ERG による網膜機能解析において有意な差が出る可能性があり、今後再検討が必要である。

## F. 健康危険情報

2004.

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Takano Y et al: Study of drug effects of calcium blockers on retinal degeneration of rd mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 1015-1022, 2004.

### 2. 学会発表

高野 淑子 他: rd マウス網膜に対する Ca 拮抗剤の影響. 第 107 回 日本眼科学会総会, 福岡, 2003.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## I. 参考文献

1. Frasson M et al. Retinitis pigmentosa: rod photoreceptor rescue by a calcium channel blocker in the rd mouse. *Nat Med*. 5, 1183-7, 1999.
2. Yamazaki H et al.: Preservation of retinal morphology and functions in royal college surgeons rat by nilvadipine, a Ca antagonist. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43: 919-26, 2002.
3. Takano Y et al: Study of drug effects of calcium blockers on retinal degeneration of rd mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. 313: 1015-22,

## 48. 原因遺伝子の異なる2種類の網膜色素変性症モデルにおける

### 遺伝子治療

#### —サル由来レンチウイルスベクターを用いた FGF2 遺伝子導入—

宮崎勝徳<sup>1)</sup>、池田康博<sup>1)</sup>、米満吉和<sup>2)</sup>、後藤純信<sup>3)</sup>、坂本泰二<sup>4)</sup>、田畑寿晃<sup>5)</sup>、上田泰次<sup>5)</sup>、  
長谷川護<sup>5)</sup>、飛松省三<sup>3)</sup>、石橋達朗<sup>1)</sup>、居石克夫<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup>九州大、<sup>2)</sup>九州大病理病態学、<sup>3)</sup>九州大神経生理学、<sup>4)</sup>鹿児島大、<sup>5)</sup>DNAVEC 研究所)

**研究要旨** 遺伝性難治性疾患である網膜色素変性症に対し、我々は独自に開発したサル由来レンチウイルス (SIV) ベクターを用いた遺伝子治療に取り組んでいる。今回、神経保護因子 FGF2 遺伝子導入による、2種類のモデル動物 (RCS ラット、rds マウス) における神経保護効果を検討した。RCS ラットでは、導入後8週まで組織学的・電気生理学的に有意な視細胞保護効果が認められ、同様に rds マウスでも、導入後24週において有意な保護効果が観察された。以上から SIV ベクターを用いた FGF2 遺伝子発現により、原因遺伝子の異なる2種類の網膜色素変性症モデルの視細胞変性を有意に抑制することができ、多様なヒト網膜色素変性症に対応できる治療法と成り得ることが示唆された。

#### A. 研究目的

長期遺伝子発現というレンチウイルスベクターの特性から、緩徐に進行する網膜変性疾患は遺伝子治療のよい対象になると考えられる。我々は、ヒトに病原性を有しないサル由来レンチウイルス (SIV) ベクターを独自に開発し、その網膜への導入特性、さらに神経保護因子 PEDF を用いた疾患モデルの治療効果を報告してきた。今回、神経保護因子である FGF2 遺伝子導入による、原因遺伝子の異なる2種類のモデル動物 (RCS ラット、rds マウス) における神経保護効果を検討した。

#### B. 研究方法

FGF2 遺伝子を搭載した SIV ベクター溶液

を RCS ラットおよび rds マウス 3 週齢の網膜下腔に注入し、遺伝子を導入した。病理組織学的評価を光学顕微鏡的に、電気生理学的機能評価を網膜電図を用いて経時的に 6 ヶ月間検討した。

#### (倫理面への配慮)

動物を用いた実験は、九州大学の動物実験施設のガイドラインをふまえ、学内委員会の許可を得ている。DNA 組換え実験・それに準ずる実験は、「大学等における組換え DNA 実験指針」をふまえ、文部科学大臣の承認に加え、学内審査による実験許可を得ている。

#### C. 研究結果

RCS ラットでは、組織学的に導入後 8 週までは視細胞核が有意に残存しており、その効果は注入部位に近いほど高く認められた。電気生理学的には、導入後 8 週まで ERG 波形における b 波の振幅が有意に高かった。同様に rds マウスでも、導入後 2 4 週において組織学的にも電気生理学的にも有意な保護効果が認められた。

#### D. E. 考察・結論

SIV ベクターを用いた FGF2 遺伝子発現により、2 種類の網膜色素変性症モデルの視細胞変性を有意に抑制することができた。このことから神経保護因子を用いた遺伝子治療が原因遺伝子によらず有効であり、多様なヒト網膜色素変性症に対応できうることが示唆された。現在感染宿主であるサルを対象とした安全性試験を実施中であり、SIV ベクターの高いポテンシャルを臨床の場に還元することを目指している。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### I. 参考文献

Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Goto Y, Sakamoto T, Tabata T, Ueda Y, Hasegawa M, Tobimatsu S, Ishibashi T, Sueishi K. Simian lentiviral vector-mediated retinal gene transfer of pigment epithelium-derived factor protects retinal degeneration and electrical defect in Royal College of Surgeons rats. *Gene Ther.* 10:1503-11,2003.

## 49. 緑内障治療における結膜 matrix metalloproteinases と tissue inhibitor of matrix metalloproteinases の動態とその効果

間宮和久、大黒 浩、目時友美、大黒幾代、石川 太、中澤 満  
(弘前大)

**研究要旨 目的)** 手術時の濾過胞形成に重要な結膜を含む眼表面に対する点眼薬の影響における検討は、まだ十分ではない。そこで今回、日常診療で使用される8種類の抗緑内障点眼薬における結膜組織での matrix metalloproteinases (MMPs)とその阻害物質である tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs)の変化を検討した。また当科において緑内障手術時に結膜下組織を切除し、同意を得られた8例の患者で、そのMMPsとTIMPsの変化も検討した。**方法)** 8種類の点眼薬を生後6週のSDラットに1日1回2週間点眼した後、結膜を採取し、TaqMan®PCRにてその発現を検討した。患者から採取した結膜下組織 TaqMan®PCRにて評価した。**結果)** 抗緑内障点眼薬の中には、ラットおよびヒト結膜においてMMPsとTIMPsのバランスを変化させ、細胞外マトリックス(ECM)の代謝に影響する薬剤があることが判明した。**結論)** 抗緑内障点眼薬の結膜組織のECMに対する影響は、治療薬を選択する上での参考因子の1つになる可能性が示唆され、今後の更なる検討を要すると思われた。

### A. 研究目的

緑内障治療の主体は点眼薬による薬物療法であり、近年の新薬登場により薬物療法の選択の幅が広がってきている。しかし、眼圧下降作用、神経保護作用については注目され、多くの検討がなされてきているが、手術時の濾過胞形成に重要な結膜を含む眼表面に対する点眼薬の影響における検討は、まだ十分ではない。そこで今回、日常診療で使用される8種類( $\beta$ 遮断薬、 $\alpha\beta$ 遮断薬、 $\alpha 2$ 刺激薬、プロスタグランジン製剤)の抗緑内障点眼薬における結膜組織での matrix metalloproteinases (MMPs)とその阻害物質である tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs)の変化を検討した。また当科において緑内障手術時に結

膜下組織を切除し、同意を得られた8例の患者でそのMMPsとTIMPsの変化も検討した。

### B. 研究方法

8種類の点眼薬を生後6週のSDラットに1日1回2週間点眼した後、結膜を採取し、TIMP1-3およびMMP3のmRNA発現量をTaqMan®PCR法にて検討した。術中テノン組織の肥厚が認められ、術後のlaser suturelysisが困難を考えられた8症例から、同意を得た上で結膜下組織を採取し、MMP1-3およびTIMP1-4の発現をTaqMan®PCR法にて評価した。

(倫理面への配慮)

結膜を採取した症例は術前に、本研究目的

を説明し承諾を得た。

### C. 研究結果

ラットにおける各種緑内障点眼での、TaqMan®PCR 法による解析では、TIMPs および MMP3 発現は、timolol、betaxolol では TIMPs の亢進すなわち細胞外マトリックスの分解抑制の方向に傾いていた(図 1)。その他の点眼薬は、細胞外マトリックス分解に作用していた。

	TIMP			MMP
	1	2	3	3
timolol	↑	↑	↑	↓
betaxolol		↑		
carteolol				↑
levobunolol	↓			↑
nipradilol	↓		↓	↑
bunazosin	↓		↓	
burimonidine	↓		↓	↑
latanoprost			↓	↑

図1 TaqMan®PCR 法による mRNA の発現(ラット結膜)

症例	TIMP				MMP		
	1	2	3	4	1	2	3
1	—	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—	—
3	—	↑	—	↑	—	—	↑
4	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	↑	↑	—	—
7	—	—	—	—	—	↑	—
8	—	—	—	↑	↑	—	—

図2 TaqMan®PCR 法による mRNA の発現(ヒト結膜下組織)

ヒト結膜下組織での TaqMan®PCR 法による解析では、ある特定の見解は得られなかったものの、TIMPs および MMPs の発現の変化が認められた(図 2)。

### D. 考察

緑内障点眼における眼表面に対する影響は、Mietz ら<sup>1)</sup>によりウサギ結膜に 18 ヶ月の長期点眼により、timolol においてコラーゲン密度の増加が認められる一方で、latanoprost 点眼では、MMP3 の up-regulation が認められるものの、細胞外マトリックスの蓄積には、影響が見られなかったという報告がある。本研究では、ラット結膜において同様の結果が得られたものの、ヒト結膜においては特定の見解が得られなかった。これは各症例における各種緑内障点眼の併用、あるいは治療期間に差があるため、点眼による眼表面への影響に大きな違いが生じているためと考察された。

### E. 結論

本研究において、緑内障点眼が眼表面へ影響を与える可能性が示唆された。このことは緑内障点眼薬が濾過胞形成維持という観点から治療薬を選択することにもつながる可能性があり、なお今後の検討を要する。また、今回検討した症例は、前向きに調査を開始している。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし



## 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## I. 参考文献

1. Mietz H et al: Effect of latanoprost and timolol on the histopathology of the rabbit conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42: 679-87,2001.

## 50. 網膜虚血再灌流による網膜障害に対する

### D-アロースの保護作用

広岡一行<sup>1)</sup>、板野俊文<sup>2)</sup>、馬場哲也<sup>1)</sup>、徳田雅明<sup>3)</sup>、白神史雄<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>香川大、<sup>2)</sup>香川大脳神経生物学、<sup>3)</sup>香川大細胞情報生理学)

**研究要旨** 稀少糖（自然界に微量にしか存在しない単糖）の一つである D-アロースには活性酸素の産生を濃度依存性に抑制する作用があることが判明している。一過性眼虚血モデルを用いて虚血開始 30 分前に 200 mg/kg D-アロースを腹腔内に投与すると、虚血・再灌流中に放出されるグルタミン酸濃度は抑制された。また 1 週間後に眼球を摘出し、網膜切片を作成したところ、網膜組織では、生食投与群では網膜内層の神経節細胞層と内網状層に障害がみられたのに対し、D-アロース投与群では神経節細胞層及び内網状層の障害はほとんどみられなかった。D-アロースは網膜虚血再灌流時に放出されるグルタミン酸を抑制することにより、神経細胞死に対して保護的に働く可能性が考えられた。

#### A. 研究目的

Bhuiyan ら<sup>1)</sup>は自然界に微量にしか存在しない単糖（稀少糖）を自然界に多量に存在する単糖（ブドウ糖、果糖など）から生産することに成功した。最近稀少糖の一つである D-アロースには活性酸素の産生を濃度依存性に抑制する作用がある<sup>2)</sup>ことや癌細胞増殖抑制作用<sup>3)</sup>が明らかとなった。そこで我々は一過性眼虚血モデルを用いて D-アロースの網膜細胞に対する保護効果について検討した。

#### B. 研究方法

ラットの前房内に 27 ゲージ針を刺入し前房内圧を 130 mmHg に上昇させることにより網膜虚血を行った。45 分間の虚血の後、再灌流し、虚血時及び再灌流後に放出されるグルタミン酸濃度を測定した。また、虚血再灌流中は体温を 37°C 前後に保った。腹

腔内に 200 mg/kg D-アロース投与群と生食のみ投与した群に分け、虚血開始 30 分前に投与した。また 1 週間後に眼球を摘出し、網膜切片を作成して H-E 染色を施行し、網膜障害の程度を評価した。

#### (倫理面への配慮)

動物の保護及び管理に関する法律及び実験動物の飼養及び保管等に関する基準に従って実験を行った。

#### C. 研究結果

生食投与群では、グルタミン酸濃度は虚血開始約 20 分後と再灌流を行った約 20 分後にピークをもつ 2 峰性の変化を示した（図 1）。これに対し、D-アロース投与群では虚血中も再灌流後も細胞外のグルタミン酸濃度の上昇は抑制された（図 1）。網膜組織では、生食投与群では網膜内層の神経節細胞

層と内網状層に障害がみられたのに対し、D-アロース投与群では神経節細胞層及び内網状層の障害はほとんどみられなかった(図2)。

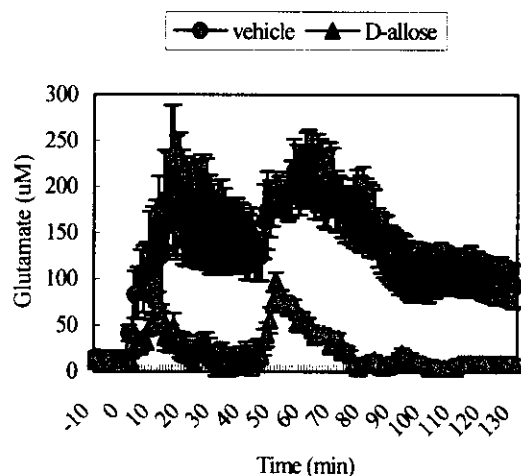


図1 細胞外グルタミン酸濃度

#### D. 考察

一過性眼虚血における遅発性神経細胞死のカスケードとして、虚血はグルタミン酸による受容体刺激や脱分極を介して細胞内へのカルシウム流入を促進し、それが細胞内のフリーのカルシウムイオンの上昇をもたらすことが細胞死を決定する重要な因子であると考えられている。D-アロースを投与することにより虚血及び再灌流中の細胞外へのグルタミン酸の放出を抑制することにより、遅発性神経細胞死を抑制すると考えられる。

#### E. 結論

D-アロースは網膜虚血再灌流時に放出されるグルタミン酸を抑制することにより、神

#### F. 健康危険情報

なし

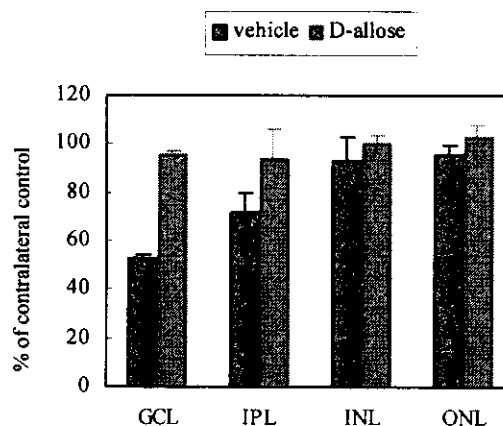


図2 神経細胞死に対して保護的に働く可能性が示唆された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

2003年5月22日に希少糖の生理活性作用の利用方法および希少糖を配合した組成物(整理番号:PCT-03-RS01)の名称で特許の出願を行った。

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### I. 参考文献

1. Bhuiyan SH, Itami Y, Rokui Y,

- Katayama T, Izumori K. D-Allose production from D-psicose using immobilized L-rhamnose isomerase. *J Ferment Bioeng.* 85:539-41,1998.
2. Murata A, Sekiya K, Watanabe Y, et al. A novel inhibitory effect of D-allose on production of reactive oxygen species from neutrophils. *J Biosci Bioeng.* 96: 89-91,2003.
  3. Sui L. The inhibitory effect of D-allose on cancer cell proliferation. The 1<sup>st</sup> Symposium of International Society of Rare Sugars, Kagawa, Japan 23-27, 2002.