

て ephrinB2 とその受容体である EphB4 の発現の空間的・時間的プロファイリングを行い、さらに ephrinB2 の条件的過剰発現マウスを用いて機能的解析を試みた。

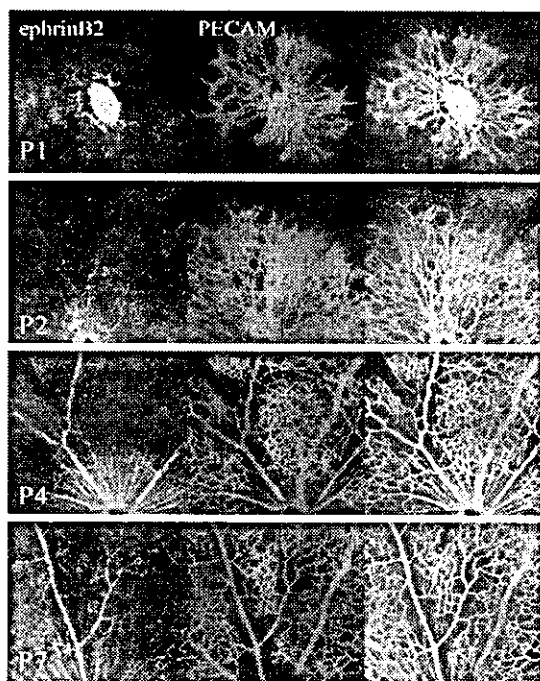


図1 網膜血管発生における ephrinB2 の発現

(倫理面への配慮)

動物の取り扱いにあたっては、ARVOの動物取り扱いガイドラインを遵守した。

C. 研究結果

マウス新生児の網膜血管は、生下直後から視神経乳頭部より網膜周辺部へと放射状に血管新生が進行することにより形成されるが、ごく初期段階の網膜血管は視神経乳頭部の静脈叢から発生し大部分が EphB4 陽性であったが、ephrinB2 陽性血管が一部、硝子体動脈との吻合部付近にみられた。その後徐々に ephrinB2 の発現部位は拡大してやがて動脈全体へと分布するようになる

(図1) 一方、EphB4 の発現は網膜血管の発育に伴い主に大静脈へと収束していった(図2)。角膜新生血管は輪部の静脈と毛細血管から発生し、輪部の動脈からの発生はほとんど認められなかったが、発芽している毛細血管の多くは ephrinB2 を発現しており、その発現と発芽の有無には特に関連性がなかった。新生血管は互いに融合して

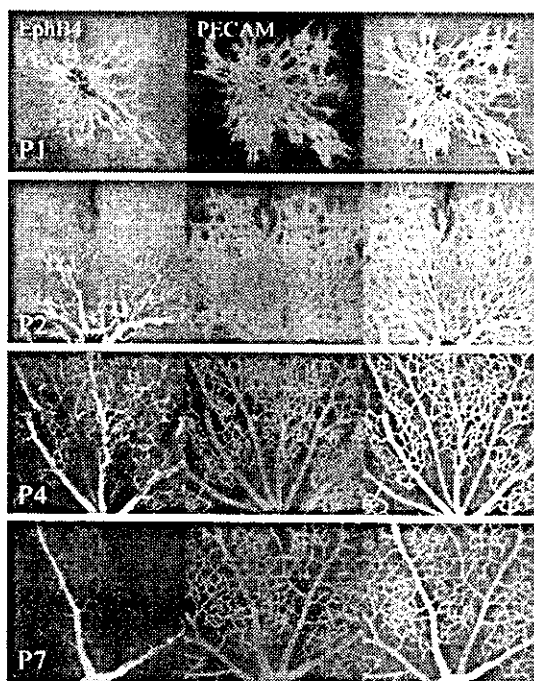


図2 網膜血管発生における EphB4 の発現

血管網を形成したが、ephrinB2 は概して動脈に近い血管ほど強く発現するという傾向が見られた。ephrinB2 の条件的過剰発現マウスを用いた実験では網膜・角膜いずれにおいても血管発生初期の段階ではその異所性過剰発現の影響はほとんど認められなかったが、発生後長期間経過した定常状態にある血管では異常な形態変化が惹起された(図3)。

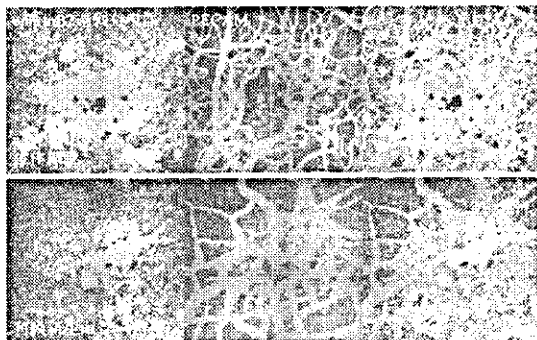


図3 定常状態の血管網における ephrinB2 異所性過剰発現

D. 考察

ephrinB2 は最初からある特定の血管内皮細胞にその発現が運命付けられているというよりは、血管発生の初期段階では動脈性の血流を持つ血管に可塑的に誘導され、血管網が形成された後の血流動態を反映すると考えられるが、定常状態にある血管においては血管網の恒常性維持に関わっていると考えられた。

E. 結論

本研究により、血管新生に関わる分子のメカニズムの一部を解明することができたと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿準備中

2. 学会発表

Katsuta H, et al. Control of vessel patterning by heterotypic endothelial interactions. *International Vascular*

Biology Meeting, Toronto, 2004

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. Wang HU, et al. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell*. May 29;93(5):741-53, 1998.
2. Adams RH, et al. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev*. Feb 1;13(3):295-306, 1999.
3. Gerety SS, et al. Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell*. Sep;4(3):403-14, 1999
4. Shin D, et al. Expression of ephrinB2 identifies a stable genetic difference between arterial and venous vascular smooth muscle as well as endothelial cells, and marks subsets of microvessels at sites of adult

- neovascularization. *Dev Biol.* Feb 15;230(2):139-50, 2001
5. Gale NW, et al. Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells. *Dev Biol.* Feb 15;230(2):151-60, 2001
 6. Oike Y, et al. Regulation of vasculogenesis and angiogenesis by EphB/ephrin-B2 signaling between endothelial cells and surrounding mesenchymal cells. *Blood.* Aug 15;100(4):1326-33, 2002
 7. le Noble F, et al. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development.* Jan;131(2):361-75. Epub Dec 17, 2004.

29. マクロファージ遊走関連ケモカインとそのレセプターの ノックアウトマウスにおける脈絡膜新生血管抑制効果

櫻井英二^{1) 2)}、Jayakrishna Ambati²⁾、小椋祐一郎¹⁾

(¹⁾ 名古屋市立大、²⁾ Department of Ophthalmology, University of Kentucky)

研究要旨 マクロファージ遊走に関連したケモカインおよびそのレセプターのノックアウトマウスにおけるレーザー誘発の脈絡膜新生血管 (CNV) の抑制効果を検討した。

それぞれ雄の生後約6週の *Ccl2* ノックアウトマウス、*Ccr2* ノックアウトマウス、*Ccl3* ノックアウトマウス、*Ccr5* ノックアウトマウスおよび対照として *C57BL/6J* に対しレーザー光凝固を行った。2週間後に眼球を取り出してフラットマウントを作成し、CNVの容積を測定し比較検討した。また Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) の発現を比較検討するため、眼底に多数光凝固して ELISA により測定した。それぞれの群のマクロファージの脈絡膜・色素上皮細胞に対する集積をフローサイトメトリーにより検出した。マクロファージの遊走に関連したケモカインおよびそのレセプターをノックアウトすると、レーザー誘発の CNV を有意に抑制できた。CNV の容積はそれぞれの群の VEGF の発現量に一致していた。またマクロファージの集積と VEGF の発現量は一致しており、脈絡膜新生血管における主な VEGF の源はマクロファージであると考えられた。CNV 発症において、マクロファージは重要な役割を担っていると考えられた。

A. 研究目的

近年、加齢黄斑変性の原因として、炎症が取り上げられている^{1, 2)}。ドルーゼンの組成が免疫学的手法および分子生物学的手法によりリポフスチン、IgG、フィブリノーゲン、アミロイド、補体結合反応に必要な C3, C5 や AP3 などといった、炎症起因物質であることが判明したためである。また、古くから脈絡膜新生血管周囲や網膜色素上皮周囲にマクロファージを認め、脈絡膜新生血管生成とマクロファージとの関係が論議されてきた。近年我々は、マクロファージを減少させると、レーザー発症の脈絡膜新生血管を有意に抑制されることを報告³⁾した。さらに検討を加えるため、マクロフ

ァージ遊走ケモカインである *Ccl2* とそのレセプターの *Ccr2*、また *Ccl3* とそのレセプターの *Ccr5* のノックアウトマウスを用い、レーザー発症の脈絡膜新生血管の抑制効果を検討した。

B. 研究方法

雄の6-8週の *Ccl2* *Ccr2* *Ccl3* *Ccr5* のノックアウトマウスと対照として *C57BL* に対しレーザー光凝固 (200mW, 75um, 100 ms, 532 nm) を行った。2週間後に眼球を取り出してフラットマウントを作成し、CD31 抗体で血管内皮を染色してコンフォーカルマイクروسコピーで CNV の容積を測定し比較検討した。また Vascular

Endothelial Growth Factor(VEGF)の発現を比較検討するため、多数のレーザー光凝固(20発)をそれぞれの眼に行い、3日後に眼球を取り出しそれぞれの群をELISAにより測定した。それぞれの群のマクローファージの脈絡膜・色素上皮細胞に対する集積を測定するために、多数のレーザー光凝固術を行い、3日後に色素上皮・脈絡膜を取り出してF4/80で染色して、フローサイトメトリーにより検出した。

(倫理面への配慮)

動物実験の取り扱いにはARVOに準じた。

C. 研究結果

C57BL/6J、Ccl2^{-/-}、Ccr2^{-/-}、Ccl3^{-/-}およびCcr5^{-/-}のCNVの容積はそれぞれ758.95±26.07、172.89±41.15、214.37±24.14、407.6±38.17、446.45±39.78(×10³ μm³)であった(図1)。またVEGFの発現はそれぞれ、100.1±20.7、59.6±8.3、65.3±4.0、67.8±5.2、78.0±12.5(pg/mg protein)であった(図2)。マクローファージの集積はそれぞれ、22.57±1.92、4.33±8.63、4.94±0.82、3.05±0.57、4.55±0.08(%)であった(図3)。

D. 考察

マクローファージを遊走するケモカインとそのレセプターをノックアウトすることで、レーザー発症の脈絡膜新生血管を抑制できた。CNVの抑制効果、VEGF発現量、マクローファージの色素上皮・脈絡膜への集積は一致し、脈絡膜新生血管発症過程においてもマクローファージが主なVEGFの源であることが示唆された。

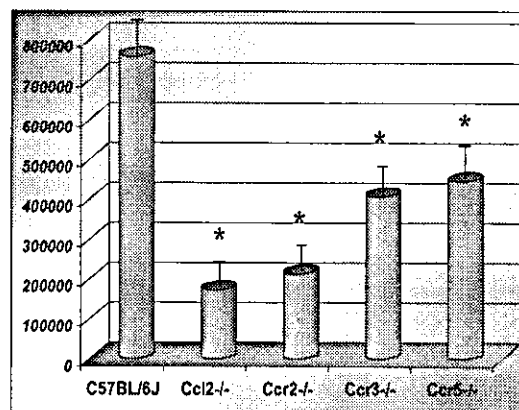


図1 各群のCNV容積(μm³)(*P<0.0001). N=30 for all groups. 各群とも対照と比較して有意にCNV生成が抑制されている。

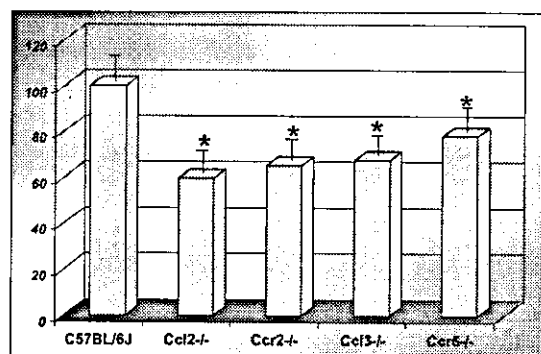


図2 各群のレーザー3日後のVEGF発現量(pg/mg protein)(*P<0.001). N=5 for all groups. 各群とも有意にVEGF発現量が少ない。

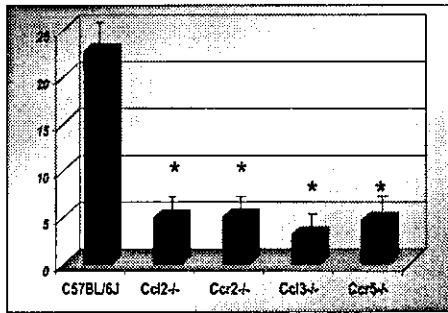


図3 各群のレーザー光凝固3日後のマクロファージ集積 (%) (* P < 0.001). N = 5 for all groups. 各群とも、有意に色素上皮・脈絡膜に対するマクロファージの集積が少ない。

E. 結論

一般的な新生血管の発症機序と同様に脈絡膜新生血管発症過程においてもマクロファージが重要な役割を担っていることが考えられた。

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

1. E.Sakurai et al. Targeted disruption of macrophage recruitment chemokines and chemokine receptors inhibits choroidal neovascularization. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, 2004.

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. Anderson DH et al: A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol*, 134, 411-431, 2002
2. Sakurai E et al: Targeted disruption of the CD18 or ICAM-1 gene inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2743-2749, 2003.
3. Sakurai E et al: Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 3578-3585, 2003.

30. Hypoxia Inducible Factor (HIF) 1 α ・HIF2 α の 脈絡膜新生血管における発現

井上裕治、松浦恭祐、柳 靖雄、高橋秀徳、小畑 亮、玉置泰裕、新家 眞
(東京大)

研究要旨 ヒト脈絡膜新生血管の発症に関与しうる因子の一つとして、低酸素状態で発現し、VEGF等の血管新生因子の発現を誘導する転写因子であるHypoxia Inducible Factor (HIF) 1 α ・HIF2 α の発現について解析した。硝子体切除術および脈絡膜新生血管抜去術にて摘出した加齢黄斑変性の患者6例6眼のヒト脈絡膜新生血管膜を用いて、凍結切片を作成し、抗HIF1 α ・HIF2 α 抗体を用いて免疫染色を行い、各症例における発現の有無を検討した。また、血管内皮細胞・マクロファージ・網膜色素上皮細胞・グリア細胞の各マーカー(CD-34、CD-68、cytokeratin、glial fibrillary acidic protein)とHIF1 α ・HIF2 α それぞれとの間で二重免疫染色を行い、発現部位を検討した。

6眼中5眼にHIF1 α の発現を、6眼中6眼にHIF2 α の発現を認めた。二重免疫染色によって、HIF1 α ・HIF2 α は血管内皮細胞・マクロファージに発現していることが分かった。一方、網膜色素上皮細胞・グリア細胞には発現を認めなかった。

HIF1 α ・HIF2 α はそれぞれヒト脈絡膜新生血管において高頻度に認められ、血管内皮・マクロファージに発現していることが分かった。このことから、HIFがヒト脈絡膜新生血管の発症に関与することが示唆された。

A. 研究目的

加齢黄斑変性において慢性炎症あるいは虚血、低酸素状態が脈絡膜新生血管の発生の原因になると考えられている^{1,2}。

また、Hypoxia Inducible Factor (HIF) は、低酸素状態³や炎症⁴により安定化し、転写因子として、VEGF等の血管新生因子の発現を誘導することが報告されている。眼科領域においては、マウスで虚血網膜においてHIF1 α ⁵・HIF2 α ⁶の発現が認められ、網膜新生血管を誘導することが報告されている。

今回、我々は加齢黄斑変性におけるヒト脈絡膜新生血管でのHIF1 α ・HIF2 α の発現について解析し、HIFのヒト脈絡膜新生血管

の発症への関与について検討した。

B. 研究方法

対象は、加齢黄斑変性患者で、傍中心窩または中心窩下に新生血管があり、脈絡膜新生血管抜去術にて摘出した6例6眼の摘出組織。年齢は、65歳から86歳、平均78.7 \pm 7.2歳。方法は、通常の3ポート硝子体手術にて、後極部の硝子体を切除後、サブプレチナルスパーテルを用いて網膜を小切開しサブプレチナル鉗子で脈絡膜新生血管膜把持し、摘出した。ただちに、4%パラホルムアルデヒドで固定した。OCT compoundで包埋し、液体窒素を用いて凍結し、8mmに薄切した。抗HIF1 α ・HIF2 α 抗体を用いて蛍光抗体法

にて免疫染色を行い、各症例における発現の有無を検討した。また、ABC法を用いて、血管内皮細胞・マクロファージ・網膜色素上皮細胞・グリア細胞の各マーカー（CD-34、CD-68、cytokeratin、glial fibrillary acidic protein）とHIF1 α ・HIF2 α それぞれとの間で二重免疫染色を行い、発現部位を検討した。

（倫理面への配慮）

ヘルシンキ宣言を遵守し、倫理的に行った。

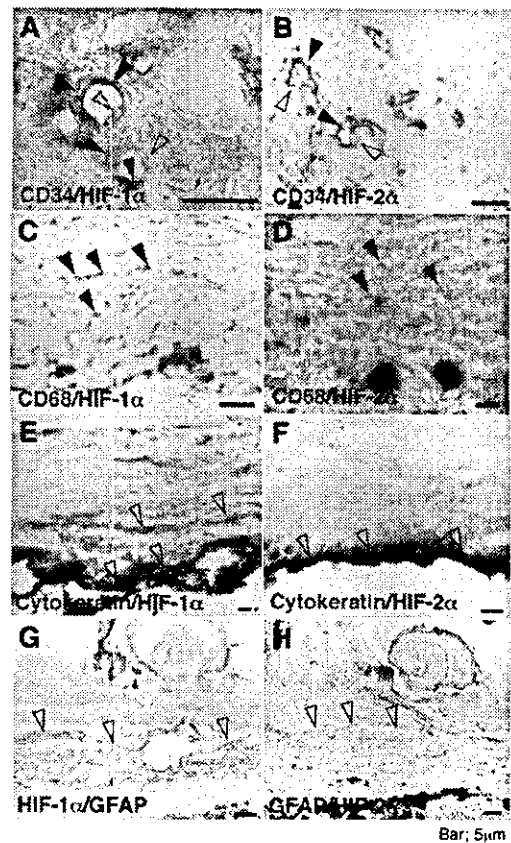
C. 研究結果および考察

加齢黄斑変性症6眼中5眼にHIF1 α の発現が、6眼中6眼にHIF2 α の発現が高率に認められた。

また、既報^{7,8}の通り、新生血管膜には、抗CD-34抗体陽性の血管内皮細胞、抗CD-68抗体陽性のマクロファージ、抗cytokeratin抗体陽性の網膜色素上皮細胞、抗glial fibrillary acidic protein抗体陽性のグリア細胞が存在した。抗HIF1 α 抗体・抗HIF2 α 抗体と二重免疫染色すると、血管内皮細胞・マクロファージにはHIF1 α ・HIF2 α がともに発現していた（図1）。血管内皮細胞では一部の細胞にのみHIFの発現が認められたが、マクロファージではほぼすべての細胞に発現が認められた。

一方、網膜色素上皮細胞・グリア細胞にはHIF1 α ・HIF2 α ともに発現を同定できなかった。

血管新生因子の一つであり、HIFの標的遺伝子の一つであるVEGFが、加齢黄斑変性患者の脈絡膜新生血管膜において、血管内皮細胞、網膜色素上皮細胞、およびグリア細



（図1）脈絡膜新生血管膜におけるHIFの発現（黒矢頭：第1抗体および第2抗体陽性細胞、中抜き矢頭：第1抗体のみ陽性細胞）

胞で発現が認められることが報告されている^{7,8}。今回の我々の結果では、血管内皮細胞およびマクロファージでHIFの発現が認められた。その結果よりHIFは血管内皮細胞におけるVEGFを介した血管新生に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

HIF1 α ・HIF2 α はそれぞれヒト脈絡膜新生血管において高頻度に認められ、血管内皮・マクロファージに発現していることが分かった。このことから、ヒト脈絡膜新生血管の発症に関与することが示唆された。

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

1. 井上裕治ら、Hypoxia inducible Factor (HIF) 1a, 2a の脈絡膜新生血管における発現、第 58 回日本臨床眼科学会、東京、2004

H. 知的財産権の出願・取得状況

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. Kent D and Sheridan C et al: Choroidal neovascularization: a wound healing perspective. *Mol Vision*, 9, 747-755, 2003.
2. Luty G et al: Changes in choriocapillaris and retinal pigment epithelium(RPE) in age-related macular degeneration. *Mol vision*, 5, 35, 1999.
3. Wang GL et al: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci Neurosci*, 92, 5510-5514, 1995.
4. Wenger RH: Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sebsubg protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J*, 16:1151-1162, 2002
5. Ozaki H et al: Hypoxia inducible factor-1 a is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40, 182-189, 1999.
6. Masanobu Morita et al: HLF/HIF-2a is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin. *EMBO J*, 22, 1134-1146, 2003.
7. Oh H et al: The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40, 1891-1898, 1999
8. Lopez PF et al: Transdifferentiated retinal pigment epithelium 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

31. マウス脈絡膜新生血管モデルの活動性に対する加齢の影響

高橋秀徳¹⁾、小畑 亮²⁾、柳 靖雄¹⁾、玉置泰裕¹⁾、新家 眞¹⁾

(¹⁾東京大、²⁾さいたま赤十字病院)

研究要旨 若年者で見られる特発性脈絡膜新生血管(CNV)は高齢者に見られる滲出型加齢黄斑変性 (AMD) における CNV と比較し、大きさが小さく、漏出も少なく、早期に網膜色素上皮に覆われ沈静化する特徴を有する。しかしながらその詳細は不明であるので、種々の週齢のマウスで CNV モデルを作成し、CNV の活動性を検討した。37 から 502 日齢 (平均 189 日齢) の C57Bl/6J マウス 111 匹を用いた。マウス右眼眼底に半導体レーザーを 3 箇所照射し CNV モデルを作成した。レーザー照射 5 日後にフルオレセイン溶液を尾静脈より静注し、蛍光眼底撮影を行った。撮影画像からフルオレセイン漏出量の定量指標を求め、1 匹ごとに 3 箇所の平均を求めた値を解析に用いた。この指標と日齢の相関を検討した。また、5 日目で開胸し、心臓から FITC 結合 lectin で灌流し血管内腔を染色した後、眼球を摘出した。摘出した眼球の連続切片を蛍光顕微鏡で観察し、網膜色素上皮欠損面積、CNV 体積、血管内腔体積を求めた。結果、フルオレセイン漏出量・網膜色素上皮欠損面積・CNV 体積・血管内腔体積は日齢に依存して増加した。また、組織学的には、高齢マウスほど CNV 内部の色素細胞が少なかった。よってマウスにおいてレーザーで誘発される CNV は高齢マウスほど活動性が高い。

A. 研究目的

AMD は米国をはじめとする欧米先進国においては成人失明原因の第一位であり、大きな社会問題となっている。日本でも人口の高齢化および生活の欧米化に伴いその患者数は急増している。現在のところ、AMD に対する治療法として、レーザーおよび手術療法があるが、いずれも侵襲的治療であるため施術後視力低下を招くことも多くその適応には限界があり、十分な治療法は確立していない。また、両眼に発症することが非常に多い疾患であるが、片眼に発症した場合に他眼の発症を予防する方法もない。AMD は脈絡膜由来の新生血管 (CNV) により惹起される疾患であるが、若年者で見

られる特発性 CNV は高齢者に見られる滲出型 AMD における CNV と比較し、大きさが小さく、漏出も少なく、早期に網膜色素上皮に覆われ沈静化する特徴を有する。しかしながらその詳細は不明であるので、種々の週齢のマウスで CNV モデルを作成し、CNV の活動性を検討した。

B. 研究方法

37 から 502 日齢 (平均 189 日齢) の C57Bl/6J マウス 111 匹の右眼眼底に半導体レーザー(スポットサイズ 200 μ m、照射時間 0.01 秒、出力 220mW)を 3 箇所照射し CNV モデルを作成した。レーザー照射 5 日後にフルオレセイン 10%溶液を尾静脈より

70 μ l/kg 静注し、4 分後から 6 分後の間に 3 回蛍光眼底撮影を行った。撮影画像におけるレーザー非照射部位の毛細血管領域の輝度を 0、網膜大血管の最大輝度を 1 と規定し、フルオレセイン漏出部位の各画素の輝度を合計した値をフルオレセイン漏出量の定量指標とした。照射部位ごとに 3 回の指標の平均を算出し、更に 1 匹ごとに 3 箇所を求めた値を解析に用いた。この指標と日齢の相関を検討した。また、5 日目で摘出した眼球の組織切片を作成し、組織学的に検討した。

(倫理面への配慮)

マウスに侵襲を加える際は全身麻酔下に行った。

C. 研究結果

フルオレセイン漏出量は日齢に依存して増加した(相関係数 0.5654, $p < 0.0001$)。網膜色素上皮欠損面積は日齢に依存して増加した(相関係数 0.6752, $p < 0.05$)。CNV 体積は日齢に依存して増加した(相関係数 0.7177, $p < 0.01$)。

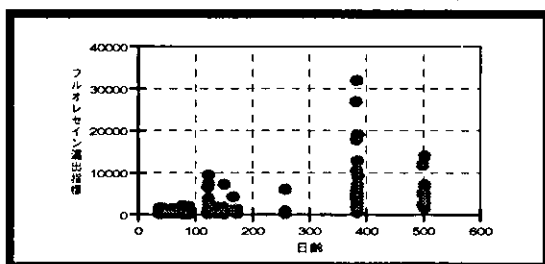


図1 フルオレセイン漏出量

血管内腔体積は日齢に依存して増加した(相関係数 0.9129, $p < 0.001$)。また、組織学的には、高齢マウスほど CNV 内部の色素細胞が少なかった。

D. 考察

同じ条件で CNV を誘発したのにもかかわらず、

高齢マウス程 CNV の体積が大きく、その内部の血管も大きく、フルオレセイン漏出量も多かった。成因によらず、CNV は加齢により増大する。

E. 結論

マウスにおいてレーザーで誘発される CNV は高齢マウスほど活動性が高い。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

発表予定。

2. 学会発表

1. 高橋秀徳他、マウス脈絡膜新生血管モデルの活動性に対する加齢の影響。第 108 回日本眼科学会、京都、2005。
2. Takahashi H, et al. Influence of age on the activity of experimental CNV in mice model. Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, 2005.

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. T. Tobe, S. Ortega, J. D. Luna, H. Ozaki, N. Okamoto, N. L. Derevjaniuk, S. A.

Vinores, C. Basilico, and P. A.
Campochiaro, Targeted disruption of
the FGF2 gene does not prevent
choroidal neovascularization in a
murine model, *Am J Pathol* 153
1641-1646, 1998

Effective accumulation of polyion complex micelle to experimental choroidal neovascularization in rats

Ryuichi Ideta^{a,1}, Yasuo Yanagi^{a,*}, Yasuhiro Tamaki^a, Fumitaka Tasaka^{a,b,1}, Atsushi Harada^c, Kazunori Kataoka^d

^aDepartment of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

^bResearch and Development Division, Santen Pharmaceutical Co., Ltd., 8916-16 Takayama-cho, Ikoma, Nara 630-0101, Japan

^cDepartment of Applied Materials Science, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

^dDepartment of Materials Science and Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

Received 26 September 2003; revised 6 November 2003; accepted 7 November 2003

First published online 22 December 2003

Edited by Guido Tettamanti

Abstract Exudative age-related macular degeneration, characterized by choroidal neovascularization (CNV), is a major cause of visual loss. In this study, we examined the distribution of the polyion complex (PIC) micelle encapsulating FITC-P(Lys) in blood and in experimental CNV in rats to investigate whether PIC micelle can be used for treatment of CNV. We demonstrate that PIC micelle has long-circulating characteristics, accumulating to the CNV lesions and is retained in the lesion for as long as 168 h after intravenous administration. These results raise the possibility that PIC micelles can be used for achieving effective drug targeting to CNV.

© 2003 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Key words: Age-related macular degeneration; Choroidal neovascularization; Drug delivery system; Nanotechnology; Polyion complex micelle

1. Introduction

Exudative age-related macular degeneration (AMD), characterized by choroidal neovascularization (CNV), is a major cause of visual loss in developed countries [1,2]. Photocoagulation of the entire CNV is an effective treatment option for exudative AMD proved in large randomized control studies performed by the Macular Photocoagulation Study Group [3]. However, since most CNV extends to the subfovea, permanent central visual loss is inevitable immediately after photocoagulation. Thus, alternative treatments for CNV with minimal damage to the healthy retina, such as photodynamic therapy, are being developed [4]. In addition, compounds with anti-angiogenic properties are under intensive study for possible clinical applications [5,6]. Although studies *in vivo* using

animal CNV models have demonstrated the favorable results of several anti-angiogenic drugs such as interferon- β and thalidomide, these drugs were not effective in inhibiting the development of CNV in humans. To develop a pharmacological therapy for CNV with minimal systemic adverse effects, it is necessary to achieve a high local concentration of the drug [7].

These results have prompted the search for an alternative drug delivery system. Macromolecules can accumulate and prolong their retention in perivascular regions of solid tumors to a greater extent than in normal tissues because newly formed vessels in solid tumors exhibit high substance permeability compared with those in normal tissues, and the lymph systems in tumor tissue are incomplete [8,9]. This effect is known as the enhanced permeability retention (EPR) effect [10]. CNV membranes have high permeability and several studies have demonstrated that macromolecules accumulate in experimental CNV presumably through the EPR effect [7].

The size of the molecules is an important factor in exerting the EPR effect. Polymeric micelles have a size range of several tens of nanometers with a very narrow distribution, similar to that of viruses and lipoproteins [8]. Thus, they accumulate in solid tumors through the EPR effect [11,12]. In addition, compared with the drug delivery system based on macromolecule conjugates, polymeric micelle can stably encapsulate chemical compounds with high efficiency [8]. On the basis on this together with their high drug-loading capacity, polymeric micelles are expected to become a novel drug delivery system. In fact, we have developed a drug delivery system with polymeric micelles encapsulating doxorubicin [13] and it is now in phase II clinical trial for the treatment of solid tumors [14].

We have recently developed a novel type of polymeric micelle formed through electrostatic interaction (polyion complex (PIC) micelle) [8,15]. Unlike polyion complexes formed from an oppositely charged pair of simple homopolymers or statistical copolymers, PIC micelles from charged block copolymers are totally water-soluble and are narrowly distributed. In this study, to investigate whether PIC micelle can be used for treatment of CNV, we examined the distribution of the PIC micelle in blood and in experimental CNV in rats.

*Corresponding author. Fax: (81)-3-3817 0798.
E-mail address: yanagi-ky@umin.ac.jp (Y. Yanagi).

¹ These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: AMD, age-related macular degeneration; CNV, choroidal neovascularization; DLS, dynamic light scattering; EPR, enhanced permeability retention; PIC, polyion complex

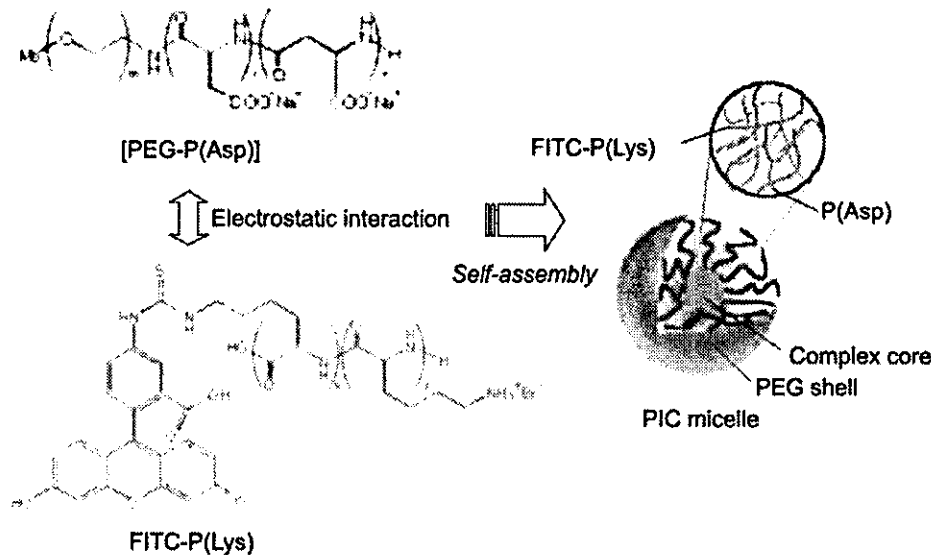


Fig. 1. Preparation and schematic structure of PIC micelle encapsulating FITC-P(Lys). PIC micelle consists of an inner complex core formed by the P(Asp) segment and FITC-P(Lys), and an outer PEG shell.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Brown Norway rats weighing 100–120 g were obtained from Saitama Animal Lab (Saitama, Japan). All experiments were conducted in accordance with the Animal Care and Use Committee and the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

2.2. Experimental CNV

A general anesthesia was induced with an intraperitoneal injection (1000 μ l/kg) of a mixture (7:1) of ketamine hydrochloride (Ketalar[®], Sankyo, Tokyo, Japan) and xylazine hydrochloride (Cefactal[®], Bayer, Tokyo, Japan) or by inhalation of diethyl ether. The pupil was dilated with one drop of 0.5% tropicamide (Mydrin[®] M, Santen Pharmaceutical, Osaka, Japan) for photocoagulation. Experimental CNV was created as previously described [16,17]. Fifty laser photocoagulations were applied to each eye between the major retinal vessels around the optic disc with a diode laser photocoagulator (DC-3000[®], Nidek, Osaka, Japan) and a slit lamp delivery system (SL150, Topcon, Tokyo, Japan) at a spot size of 75 μ m, duration of 0.05 s, and intensity of 200 mW.

2.3. Preparation of PIC micelle encapsulating fluorescein isothiocyanate-labeled poly-L-lysine (Fig. 1)

Fluorescein isothiocyanate-labeled poly-L-lysine [FITC-P(Lys), 100.0 mg; polymerization degree = 105, FITC = 0.004 mol/mol of Lys] and 48.6 mg of polyethylene glycol-*block*-poly- α,β -aspartic acid [PEG-P(Asp); PEG MW = 5000 g/mol, polymerization degree of P(Asp) segment = 78] were dissolved in 10.0 and 5.0 ml of phosphate-buffered saline (PBS), respectively. PIC micelle solution was prepared by mixing the same volume (5.0 ml) of FITC-P(Lys) and PEG-P(Asp) solutions, in which the molar ratio of Lys and Asp residues was adjusted to unity. As a control, 5.0 ml of FITC-P(Lys) solution was diluted in 5.0 ml of PBS. Both PIC micelle and control solutions included the same concentration (5.0 mg/ml) of FITC-P(Lys). The average diameter and polydispersity index of PIC micelles was evaluated by dynamic light scattering (DLS) measured at 25°C, using a light scattering spectrophotometer (DLS-7000, Otsuka Electronics, Osaka, Japan) with a vertically polarized incident beam at 632.8 nm supplied by a He/Ne laser. A scattering angle of 90° was used in this study.

2.4. Accumulation of PIC micelle to CNV lesions: histological analysis

To investigate the accumulation of PIC micelle to the CNV lesions, 50 photocoagulations were applied to the right eye of a total of 23 rats. The left eyes served as non-photocoagulation controls. By tail

injection, 400 μ l of PIC micelle encapsulating 5.0 mg/ml FITC-P(Lys) or 400 μ l of free FITC-P(Lys) at a concentration of 5.0 mg/ml ($n=3$) was administered to rats 7 days after photocoagulation. There was high mortality in rats receiving FITC-P(Lys) after 1 h, suggesting that P(Lys) has toxicity.

After the rats were killed with an overdose of sodium pentobarbital, the eyes were immediately enucleated, snap-frozen in OCT compound 1, 4, 8, 24, and 168 h later for the PIC micelle group ($n=4$ at each time point) and 1 h later for the FITC P(Lys) group ($n=3$). Then frozen sections were mounted with the ProLong Antifade Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and observed under a fluorescent microscope (model IX, Olympus, Tokyo, Japan).

2.5. Measurement of the concentration of PIC micelle in laser-treated eyes and blood

To investigate the concentration of FITC-P(Lys) in laser-treated eyes and blood, rats received PIC micelle encapsulating FITC-

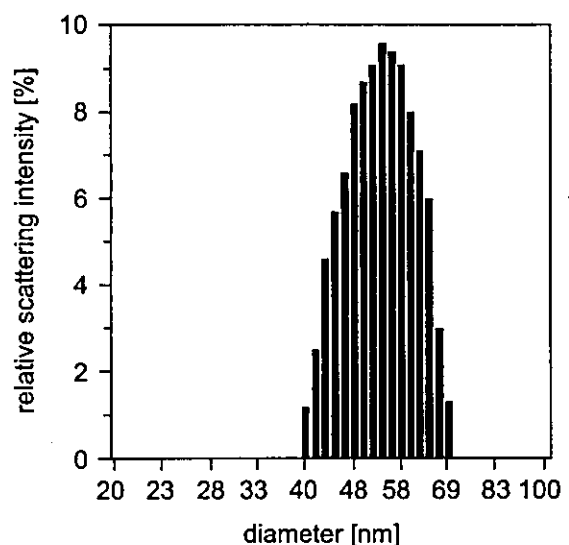


Fig. 2. DLS histogram of PIC micelle encapsulating FITC-P(Lys). The average diameter and polydispersity index of PIC micelles were evaluated by DLS measurement at 25°C, using a light scattering spectrophotometer. PIC micelle was narrowly dispersed with a size around 50.7 nm.

P(Lys) ($n=20$) or free FITC-P(Lys) ($n=3$) intravenously 7 days after photocoagulation. They were killed with an overdose injection of sodium pentobarbital 1, 4, 8, 24 and 168 h after receiving the PIC micelles encapsulating FITC-P(Lys) ($n=4$ at each time point) and 1 h after receiving free FITC-P(Lys) ($n=3$). Immediately after death, blood samples were collected and the eyes were enucleated. The blood samples were centrifuged at 12000 rpm for 5 min and the supernatant was collected and subjected to spectrophotometric analysis. The retina/choroid was collected after the anterior segment and vitreous were removed. Then, the retina/choroid samples were homogenized in 0.1 ml of PBS and suspended in a total of 0.3 ml of PBS. The homogenates were then centrifuged at 12000 rpm for 5 min and the supernatant was collected and subjected to spectrophotometric analysis. The fluorescence intensity was measured in a fluorescence spectrophotometer (FP-6500, Jasco, Tokyo, Japan) with an excitation wavelength of 495 nm and an emission wavelength of 520 nm. The actual concentration of FITC-P(Lys) was calculated by means of a calibration curve.

2.6. Statistical analysis

Mann-Whitney's *U*-test was used. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Preparation of PIC micelle encapsulating FITC-P(Lys)

Precipitation after mixing FITC-P(Lys) and PEG-P(Asp) solutions at 25°C was not observed, even after a period of over 2 months, suggesting the high storing stability of PIC micelle. Fig. 2 shows the size distribution of PIC micelle obtained from histogram analysis of DLS measurements. It was clear that the prepared PIC micelle had a unimodal size distribution. Also the average diameter and polydispersity index of PIC micelle were determined to be 50.7 nm and 0.046 by using the cumulant approach of DLS measurement, indicating the formation of PIC micelle with an extremely narrow size distribution.

3.2. Accumulation of PIC micelle to CNV lesions

3.2.1. PIC micelle group. Fluorescent staining was observed in the CNV lesions and also in the choriocapillaris

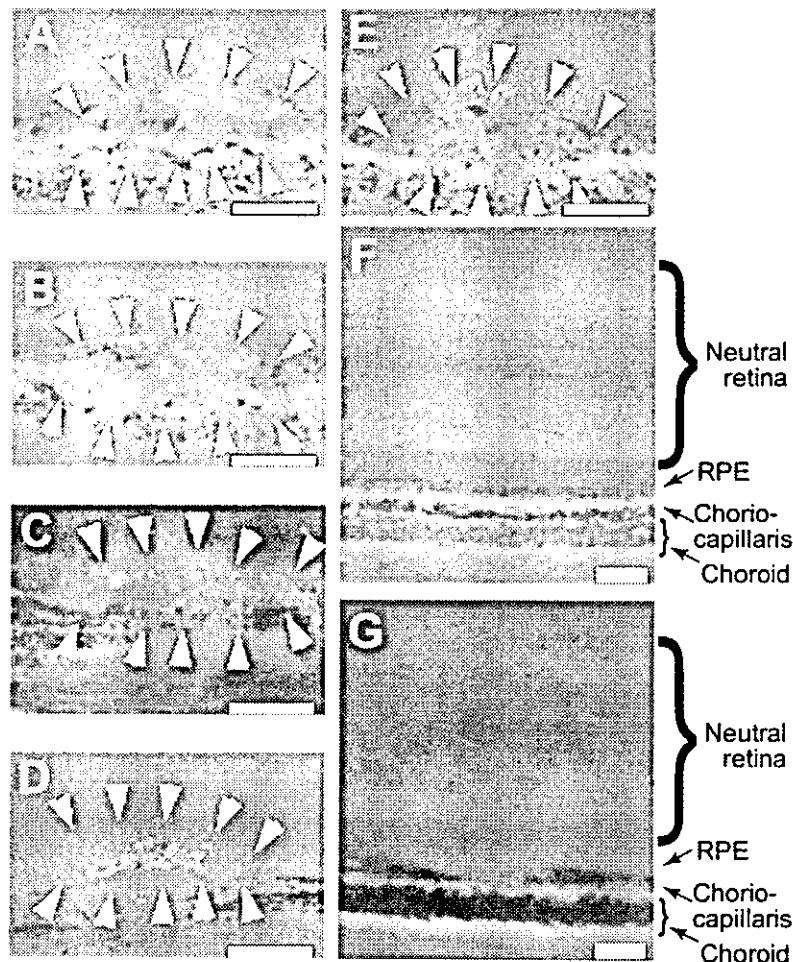


Fig. 3. Accumulation of PIC micelle to CNV lesion. The frozen sections of the CNV lesions were observed under a fluorescent microscopic 1 (A), 4 (B), 24 (C) and 168 (D) h after rats received PIC micelle-incorporated FITC-P(Lys). Note that FITC-P(Lys) initially diffuses to the CNV lesion and choriocapillaris (A,B), and becomes confined to the CNV lesion thereafter (C,D). Bright fluorescence was observed in the CNV lesions up to 168 h (D). One hour after rats received an intravenous injection of free FITC-P(Lys), FITC-P(Lys) distributes to the CNV lesion and choriocapillaris (E). Arrowheads in A–E indicate CNV lesions. Most rats died 1 h after free FITC-P(Lys) administration. In the laser-non-treated eyes, fluorescence was observed in the choriocapillaris 1 h after rats received PIC micelle (F) and the fluorescence became invisible 4 h after the injection of PIC micelle (G). Note that PIC micelle effectively accumulated to the CNV lesion throughout the studied period. Scale bar, 25 μ m.

for up to 4 h (Fig. 3A,B). Twenty-four hours after the administration, accumulation of FITC-P(Lys) to the CNV lesion was more evident and fluorescence became invisible outside the photocoagulated lesion including the choroidal and retinal vasculature (Fig. 3C). The fluorescence was observed for up to 168 h (Fig. 3D). In the non-laser-treated eyes, the fluorescence was visible in the choroidal vessels for up to 4 h (Fig. 3F), and the fluorescence became invisible at 24 h and thereafter (Fig. 3G and data not shown). Light microscopic analysis revealed no abnormalities in other retinal structures.

3.2.2. Free FITC-P(Lys) group. Most rats died 1 h after the FITC-P(Lys) administration. When evaluated 1 h after intravenous administration, fluorescence was observed in the CNV lesion and choriocapillaris (Fig. 3E). In order to reduce the toxic effect of free FITC-P(Lys), rats received a lower dose (10 mg per injection) of free FITC-P(Lys). However, all rats died before 2 h after the administration ($n > 10$).

3.3. Concentration of FITC-P(Lys) in the laser-treated eyes

3.3.1. PIC micelle group. FITC-P(Lys) was detected in the retina/choroid from the laser-treated eyes as early as 1 h and the concentration peaked at 4 h and the residual FITC-P(Lys) was still evident 168 h after intravenous administration (Fig. 4). The concentration of FITC-P(Lys) was below the detectable level in the non-laser-treated eyes.

3.3.2. Free FITC-P(Lys) group. When evaluated 1 h after intravenous administration, the concentration of FITC-P(Lys) in the free FITC-P(Lys) group was significantly lower compared to that in the PIC micelle group (Fig. 4).

3.4. Concentration of PIC micelle in blood

Fig. 5 shows the concentration of FITC-P(Lys) in blood after a single injection of either free FITC-P(Lys) or PIC micelle encapsulating FITC-P(Lys). The residual amount of FITC-P(Lys) in blood was 5.0, 7.8, 3.8 and 0.5% of the in-

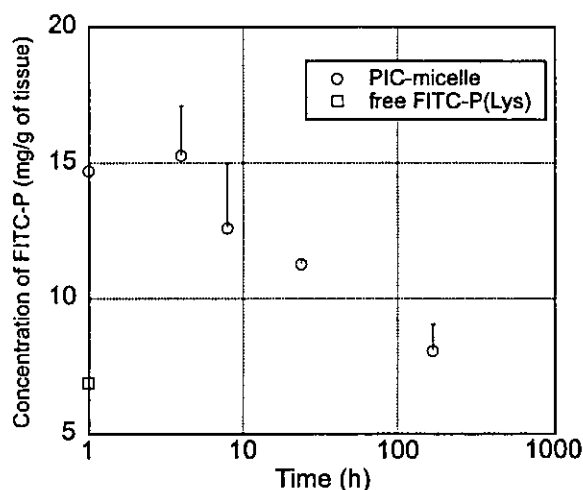


Fig. 4. Concentration of FITC-P(Lys) in retina/choroid. Concentrations of FITC-P(Lys) in retina/choroid after rats received equivalent doses of FITC-P(Lys) of PIC micelle-incorporated FITC-P(Lys). Note that FITC-P(Lys) was detected in retina/choroid from the laser-treated eyes of the PIC micelle group as early as 1 h and the concentration peaked at 4 h and was still evident 18 h after intravenous administration, whereas the concentration of FITC-P(Lys) in the free FITC-P(Lys) group was significantly lower compared to that in the PIC micelle group 1 h after injection. Most rats died 1 h after free FITC-P(Lys) administration. Error bars indicate S.D.

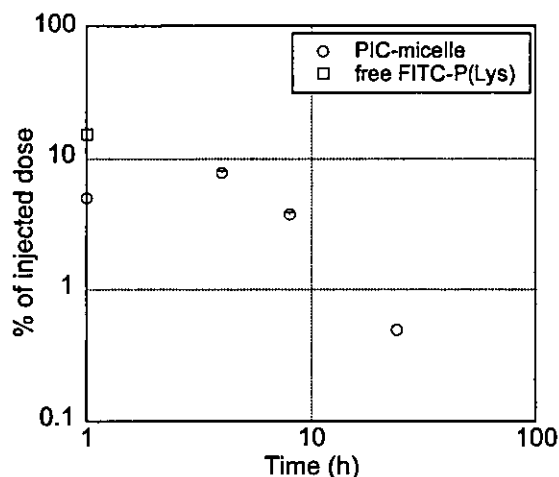


Fig. 5. Concentration of PIC micelle in blood. Concentration of FITC-P(Lys) in blood after rats received 400 μ l of free FITC-P(Lys) at a concentration of 5.0 mg/ml or 400 μ l of PIC micelles encapsulating 5.0 mg/ml FITC-P(Lys). The residual amount of FITC-P(Lys) in blood was 5.0, 7.8, 3.8 and 0.5% of the injected dose at 1, 4, 8 and 24 h, respectively, after intravenous injection of PIC micelles encapsulating FITC-P(Lys). Most rats died 1 h after free FITC-P(Lys) administration, whereas no rats died after intravenous injection of PIC micelles encapsulating FITC-P(Lys). Error bars indicate S.D.

jected dose at 1, 4, 8, and 24 h, respectively, after intravenous injection of PIC micelles encapsulating FITC-P(Lys). After 168 h, it was below the detectable level. The concentration of FITC-P(Lys) in blood was 15% of the injected dose 1 h after free FITC-P(Lys) injection.

4. Discussion

In this study, FITC-P(Lys) was retained in the CNV lesion for as long as 168 h after intravenous injection of PIC micelle encapsulating FITC-P(Lys) as demonstrated by histological analysis and confirmed by the measurement of the concentration in the retina/choroid of the laser-treated eyes. Because it was impossible to distinguish free FITC-P(Lys) and FITC-P(Lys) encapsulated into PIC micelle, the data presented here do not address whether FITC-P(Lys) was present in a free form or encapsulated in the PIC micelle. Together with the high mortality rate associated with free FITC-P(Lys) administration, it was not directly proven whether encapsulation of FITC-P(Lys) into PIC micelle enhanced the accumulation of FITC-P(Lys) to the CNV lesions throughout the studied period. However, it was demonstrated that a significantly higher amount of FITC-P(Lys) accumulated to the CNV lesions 1 h after the injection in the PIC micelle group compared to the free FITC-P(Lys) group. It is of note that the amount of FITC-P(Lys) in the non-laser-treated eyes was below the detectable level. In addition, because CNVs are highly permeable similar to the newly formed vessels in solid tumors, it is plausible to speculate that the PIC micelle is likely to accumulate to CNV lesions presumably through the EPR effect. This idea is consistent with recent studies that have demonstrated that macromolecules accumulate in the CNV lesion in rabbits [18].

We have reported that polymeric micelles have long-circulating characteristics [8] and that the stability of PIC micelles

in the blood stream can be controlled by the charge ratio and the length of the poly-amino acid, one of the block copolymers that constitute PIC micelles [19]. In this study, 0.5% of the injected dose was retained in the blood even 24 h after injection of PIC micelle encapsulating FITC-P(Lys). Generally, the concentration of compounds in the blood decreases rapidly to less than 0.1% of the injected dose in a few hours after intravenous injection of low molecular weight compounds such as fluorescein sodium. In fact, the concentration of fluorescein sodium 1 h after intravenous injection was at a non-detectable level (data not shown). Taken together, PIC micelle encapsulating FITC-P(Lys) also have long-circulating characteristics, which is a great advantage to exert the EPR effect.

The concentration of FITC-P(Lys) delivered by PIC micelle to the retina/choroid peaked 4 h after injection, and remained as long as 7 days at a concentration higher than 15 µg/g protein after only one intravenous injection. Because a total of 2 mg FITC-P(Lys) was administered, the total amount of FITC-P(Lys) was approximately 300 ng in the retina/choroid when it was delivered by PIC micelles. As deduced from these results, 0.02% of the injected dose accumulated to and was retained within the retina/choroid for as long as 7 days. In the blood, 5% and 0.5% of the injected dose were retained 1 and 24 h after the injection of PIC micelle, respectively. Thus, the FITC-P(Lys) in blood vs. that in the retina/choroid at 1 and 24 h after the injection was 340:1 and 45:1, respectively, suggesting that PIC micelle could be effectively targeted to the retina/choroid through the EPR effect, in spite of the low concentrations in blood. Moreover, we found that the administration of free FITC-P(Lys) was associated with high mortality, whereas administration of PIC micelles encapsulating FITC-P(Lys) was not. This is in line with previous studies which demonstrated that modification of compounds with a polymeric carrier results in a decreased adverse effect [20]. Our observation supports that the PIC micelle attenuated the adverse effect, although the underlying cause of this lethal toxicity remains to be unraveled. Such characteristics of the PIC micelle are a great advantage to achieve effective targeting of drug while reducing systemic adverse effects.

The concentration of PIC micelles increased in the liver and spleen but gradually decreased in the kidney and lung within 24 h after intravenous injection (data not shown), suggesting that the PIC micelle is mainly eliminated through the spleen.

In summary, it has been demonstrated that the PIC micelle effectively accumulates to the CNV lesion. The distribution of drug-loaded polymeric micelles in the body may be determined mainly by their size and surface properties and is less

affected by the properties of loaded drugs if they are embedded in the inner core of the micelles. Since PIC micelles are demonstrated to be able to reserve a variety of drugs, enzymes [21] and DNA in the core and can serve as non-viral gene delivery vectors [9,19,22], we believe that PIC micelles have great potential for achieving effective drug targeting to CNV.

References

- [1] Ferris III, F.L., Fine, S.L. and Hyman, L. (1984) *Arch. Ophthalmol.* 102, 1640–1642.
- [2] Bressler, N.M., Bressler, S.B. and Fine, S.L. (1988) *Surv. Ophthalmol.* 32, 375–413.
- [3] Macular Photocoagulation Study Group (1991) *Arch. Ophthalmol.* 109, 1242–1257.
- [4] Treatment of age related macular degeneration with photodynamic therapy (TAP) Study Group (1999) *Arch. Ophthalmol.* 117, 1329–1345.
- [5] Ciulla, T.A., Danis, R.P. and Harris, A. (1998) *Surv. Ophthalmol.* 43, 134–146.
- [6] Hunt, D.W. and Margaron, P. (2003) *IDrugs* 6, 464–469.
- [7] Kimura, H., Yasukawa, T., Tabata, Y. and Ogura, Y. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52, 79–91.
- [8] Kataoka, K., Harada, A. and Nagasaki, Y. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 113–131.
- [9] Kakizawa, Y. and Kataoka, K. (2002) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 203–222.
- [10] Matsumura, Y. and Maeda, H. (1986) *Cancer Res.* 46, 6387–6392.
- [11] Nakanishi, T. et al. (2001) *J. Control. Release* 74, 295–302.
- [12] Nishiyama, H., Kato, Y., Sugiyama, Y. and Kataoka, K. (2001) *Pharm. Res.* 18, 1035–1041.
- [13] Kataoka, K., Matsumoto, T., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Fukushima, S., Okamoto, K. and Kwon, G.S. (2000) *J. Control. Release* 64, 143–153.
- [14] Nishiyama, N. and Kataoka, K. (2003) *Adv. Exp. Med. Biol.* 519, 155–177.
- [15] Harada, A. and Kataoka, K. (1995) *Macromolecules* 28, 5294–5299.
- [16] Yanagi, Y., Tamaki, Y., Obata, R., Muranaka, K., Homma, N., Matsuoka, H. and Mano, H. (2002) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 3495–3499.
- [17] Yanagi, Y., Tamaki, Y., Inoue, Y., Obata, R., Muranaka, K. and Homma, N. (2003) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 751–754.
- [18] Yasukawa, T., Kimura, H., Tabata, Y., Miyamoto, H., Honda, Y., Ikada, Y. and Ogura, Y. (1999) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 2690–2696.
- [19] Harada-Shiba, M., Yamauchi, K., Harada, A., Takamisawa, I., Shimokado, K. and Kataoka, K. (2002) *Gene Ther.* 9, 407–414.
- [20] Mizumura, Y. et al. (2001) *Jpn. J. Cancer Res.* 92, 328–336.
- [21] Harada, A. and Kataoka, K. (2001) *J. Control. Release* 72, 85–91.
- [22] Harada, A., Togawa, H. and Kataoka, K. (2001) *Eur. J. Pharm. Sci.* 13, 35–42.

32. 加齢黄斑変性に対する光線力学療法の1週間後の効果

栃木香寿美、森隆三郎、石原菜奈恵、藤田京子、湯沢美都子
(日本大)

研究要旨 加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration : AMD) に対する光線力学療法 (photodynamic therapy : PDT) 施行後 1 週間は脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization : CNV) の閉塞効果が最も強く、predominantly classic CNV (病変の 50%以上が classic CNV) は PDT が効きやすいと報告されている。今回 predominantly classic CNV を有する 10 例 10 眼について PDT 施行前と施行 1 週間後に視力検査、フルオレセイン蛍光造影 (fluorescein angiography : FA)、インドシアニン蛍光造影 (indocyanine angiography : IA)、光干渉断層計 (optical coherence tomography : OCT) を行い、PDT 後 1 週間の効果について検討した。1 週間後、視力は 9 眼で改善もしくは不変であった。IA では 10 眼全てで照射範囲に一致した脈絡毛細血管板の閉塞による低蛍光を認めたが、FA では 4 眼で CNV は閉塞していなかった。1 眼で脈絡毛細血管板に加え、脈絡膜中大血管の循環障害を認めた。

A. 研究目的

PDT の適応は FA で中心窩 CNV を有する AMD であるが、FA での病型は 3 つに分類できる。classic CNV が病変の 50%以上の predominantly classic CNV、50%未満の minimally classic CNV、classic CNV のない occult with no classic CNV である。Predominantly classic CNV は PDT が効きやすく、PDT 後 1~7 日で CNV の閉塞が得られると¹⁻³⁾ 報告されている。本研究の目的は FA で predominantly classic CNV を有する AMD に対して PDT を施行し、1 週間後の効果を造影所見の関点から評価することである。

B. 研究方法

対象は 2004 年 6 月から 7 月に当院で PDT を施行した、中心窩に predominantly

classic CNV を認める AMD 10 例 10 眼である。男性 5 例、女性 5 例、PDT 前の年齢は 57~82 歳 (平均 72 歳)、log MAR 視力は -1.35~-0.3 (平均 log MAR 視力は -0.7)、病変の最大径 (greatest linear demetion : GLD) は 900~5400 μm (平均 3060 μm) であった。規定の方法で PDT を行い、施行前と 1 週間後に視力検査、カラー眼底撮影、FA、IA、OCT を行い視力の変化、FA 所見、IA 所見、OCT での網膜下液や嚢胞様黄斑浮腫 (cystoid macular edema : CME) を比較し、PDT 施行 1 週間後の効果を評価した。log MAR 視力で 0.2 以上の変化を改善あるいは悪化とした。

(倫理面への配慮)

なし

C. 研究結果

1 週間後の視力は改善 3 眼、不変 6 眼、悪

化1眼であった。FAでは早期にPDT照射範囲に一致した、明瞭な低蛍光を10眼全例に認めた。classic CNVに一致した過蛍光を造影早期には2眼に、後期には classic CNVからの蛍光漏出を4眼に認めたが、いずれも漏出の程度はPDT前よりも減少していた。IAでは、早期から後期までPDT照射範囲に一致した低蛍光を10眼全例に、後期に classic CNVに一致した一段と強い低蛍光を3眼に認めた。1眼では、PDT前に脈絡膜大血管の軽度の狭窄がみられていたが(図1矢印)、PDT1週間後には同部位の著明な狭窄と、照射範囲の脈絡毛細血管板と脈絡膜中等度の血管の閉塞がみられた(図2矢印)。



図1 PDT施行前 IA

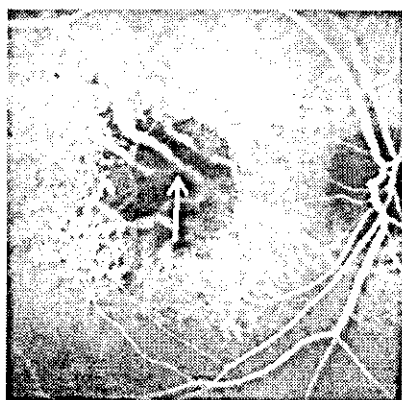


図2 PDT1週間後 IA

OCTでの網膜下液の改善は1眼、不変は9眼であった。施行前にCMEを認めた1眼では改善がみられた。

D. 考察

Predominantly classic CNVはPDTによる閉塞効果が得やすく、PDT1~7日後で閉塞が認められ、その閉塞効果は4週間前後まで続くと報告されている¹⁻⁴⁾。しかし今回FAでは10眼中4眼で predominantly classic CNVは閉塞していなかった。その原因には、閉塞効果の低い non-responderの存在や、CNVの活動性の差などいろいろなものが考えられる。またIAでは全例で、PDT照射範囲に一致して低蛍光を認めた。照射範囲の低蛍光は主に脈絡毛細血管板の閉塞による循環障害と考えられているが、修飾する因子として、Parodi⁵⁾らは脈絡毛細血管板の閉塞と網膜色素上皮(RPE)の膨化による蛍光 block、Ulsula Schmidt⁶⁾らは照射範囲のRPEや脈絡膜血管のバリアー機能の破綻により、蛋白成分に富んだ浸出液が貯留しするための蛍光 block、Flower⁷⁾らは、脈絡膜血管内皮への直接障害により発生した遊離ヘモグロビンによる蛍光 blockを考えている。今回、脈絡毛細血管板の循環障害に加え、脈絡膜大血管の著明な狭窄と、脈絡膜中等度の血管の閉塞を1眼で認めたことから、PDTはCNVと脈絡毛細血管板だけではなく、脈絡膜中大血管にも影響を与える可能性があることがわかった。しかし、脈絡膜中大血管の閉塞がみられた例でも視力低下はなく、脈絡毛細血管板の循環障害も視力には影響しないと考えられた。

E. 結論

1回 PDT1 週間後、FA では predominantly classic CNV は高率に閉塞していなかった。全例で IA で照射範囲の脈絡毛細血管板の循環障害に加え、低率ではあるが循環障害をおこしていた。

3か月後までに、predominantly classic CNV と照射範囲の脈絡膜循環障害の変化、および視力や視野との関係を明らかにする必要があると考えた。

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

1. 梶木香寿美 他：加齢黄斑変性に対する光線力学療法 の 1 週間後の効果. 第 43 回日本網膜硝子体学会, 前橋, 2004

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. Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy (TAP) Study Group: Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in

age-related macular degeneration with verteporfin : one year results of 2 randomized clinical trials-TAP report. Arch Ophthalmol 117 : 1329-1345 , 1999

2. Bressler NM, Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy (TAP) Study Group : Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization with verteporfin : two-year results of 2 randomized clinical trials TAP report 2. Arch. Ophthalmol 119 : 198-207 , 2001

3. Bressler NM, Arnold J, et al : Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration : additional information regarding baseline lesion composition's impact on vision outcomes-TAP report No.3. Arch. Ophthalmol 120 : 1443-1454, 2002

4. Rubin GS, et al : Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy(TAP) Study Group: Effects of verteporfin therapy on contrast on sensitivity: Results From the Treatment of Age-Related Macular Degeneration With Photodynamic Therapy (TAP) investigation- TAP report No.4. Arch. Retina 22: 536-544, 2002

5. Parodi M, et al : Angiographic features after photodynamic therapy for choroidal neovascularization in age