

amination, fluorescein angiography, and electroretinography (ERG) [17]. The color vision was tested with the panel D-15 and the Ishihara pseudoisochromatic plates.

Standardized full-field, photopic, flicker, and scotopic ERGs were recorded as recommended by the Standardization Committees of the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV). After pupillary dilatation was achieved with 0.5% tropicamide and 0.5% phenylephrine hydrochloride and 30 min of dark adaptation, the scotopic ERGs were elicited by a white stimulus at a luminance of $80 \times 0.12 \text{ cd/sec } \mu\text{m}^2$. The rod-cone single-flash ERGs were elicited by a white stimulus at an intensity of $20 \text{ cd/sec } \mu\text{m}^2$. The photopic single flash ERG and the 30-Hz flicker ERG were elicited by a white stimulus at a luminance of 1.2 and $0.6 \text{ cd/sec } \mu\text{m}^2$, respectively, on a white background of 25 cd/m^2 .

DNA sequence analysis: DNA was extracted from the blood of the patient and his parents with the QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), and the DNA was used to screen for genetic mutations following protocols described in references [18-21]. The genomic DNAs of exon 11 of the *SAG* gene were amplified using appropriate forward primer (SAG11F, 5'-GGT CCA TGG CAG CTT TGA TG-3') and reverse primer (SAG11R, 5'-CTT ATT CCC TGA GCC TCG AG-3'). The conditions for polymerase chain reaction (PCR) were as follows: 10 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 30 s at 72 °C, 94 °C for 30 s, and 60 °C for 30 s with a final extension step at 72 °C for 5 min. The PCR products were purified and sequenced using the Big Dye Terminator sequencing kit (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA). The products were resolved on an ABI Prism 3100 sequencer

(Perkin Elmer Applied Biosystems). The mutated nucleotides and substituted amino acids were numbered according to the Genbank accession number NM_000541.

LightCycler polymerase chain reaction: PCR and melting curve analyses were performed on the LightCycler detection system (Roche Diagnostics) using protocols in references [16,22-25]. Schematic diagrams of the LightCycler hybridization analyses used in our assay are shown in Figure 1. The hybridization probes for the *SAG* gene were designed with the LightCycler Probe Design Software (Roche Diagnostics). The probe sequences were as follows: the anchor probe SAG11Flu, AGG CATTGC CCT GGA TGG GAAAAT CAA G-Fluorescein, and the sensor probe SAG11LCRed, LC Red 640-ACG AGG ACA CAA ACC TTG.

When the probes hybridized to the same DNA strand internal to the PCR primers, the probes came in close proximity and produced a fluorescence resonance energy transfer (FRET). During the FRET, a donor fluorophore, which is excited by the LED light source, transfers its energy to an acceptor fluorophore only when it is positioned in close vicinity of the former. After a complete PCR run, it is possible to perform a melting point analysis, during which the temperature is lowered below the annealing temperature of the probes and then slowly increased. The fluorescence signal decreases when the detection probe melts off its target.

The reaction mixtures were prepared in glass capillaries containing 0.5 μl of purified genomic DNA, 0.2 μM of each primer, 0.2 μM of each probe, 10 μl LightCycler Fast Start DNA Master Hybridization Probes mix, and processed according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics).

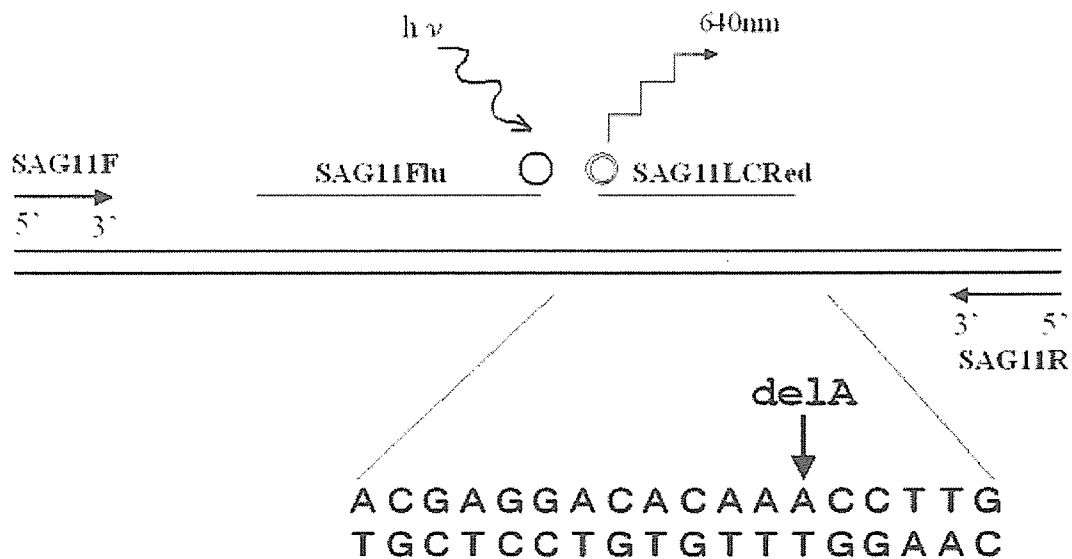


Figure 1. Schematic illustration of polymerase chain reaction primers, anchors, and detection probes for the *SAG* gene. The probe for *SAG11Flu* is labeled with fluorescein at the 3' end and serves as an anchor probe for *SAG11LCRed*. The sensor probes, *SAG11LCRed*, is labeled with LCRed640 at the 5' end and spans the DNA region having the mutations. The region of the mutations of the *SAG* gene is shown below the illustration, and the mutation sites corresponding to 926delA, are shown in bold letters and are indicated by arrows. Circle represents fluorescein; double circle represents LC-Red 640.

Real-time PCR was performed by an initial denaturation at 95 °C for 10 s, followed by 40 cycles of 95 °C for 10 s, 55 °C for 15 s, and 72 °C for 9 s. Following the amplification phase, a melting curve analysis was performed at 40 °C for 20 s followed by a slow heating at 0.2 °C/s to 85 °C to determine the melting points by monitoring the reporter dye fluorescence emission in channel F2/F1 (640 nm).

Melting curves were converted into melting peaks by plotting the negative derivative of the fluorescence signal against the temperature. The sudden drop in the fluorescence signal is then transformed to a peak, allowing the easy identification of the melting temperature (T_m) mismatches between the hybridization probe and the target.

RESULTS

Case report: Our case was a 14-year-old man who first visited us three years ago for evaluation of night blindness. He had a slight myopia with a correction of -2.5 diopters in both eyes, and his best-corrected visual acuity was 1.5 in each eye.

There was no consanguinity in his family, but his paternal grandmother had a history of night blindness. He had normal color vision according to the results of the Farnsworth Panel D-15. The Goldmann kinetic visual fields showed no abnormalities. Fundus examination revealed a golden-yellow glistening color throughout the retinas of both eyes, but after 4 h of dark adaptation, this fundus appearance became normal, confirming the presence of a Mizuo-Nakamura phenomenon (Figure 2).

The full-field rod ERGs after 30 min of dark adaptation could not be recorded in both eyes. The photopic ERGs and the 30-Hz flicker ERGs were normal. The bright-flash, mixed cone-rod ERGs demonstrated a negative-type ERG with the amplitude of the b-wave smaller than that of the a-wave. In addition, the amplitude of the a-wave was reduced (Figure 3).

LightCycler analyses: Direct sequencing of all coding regions of the *SAG* gene in the patient revealed a homozygous 926delA (Asn309 (1-bp del)) of the *SAG* gene (Figure 4), which meant there would be a shift in the reading frame and a pre-

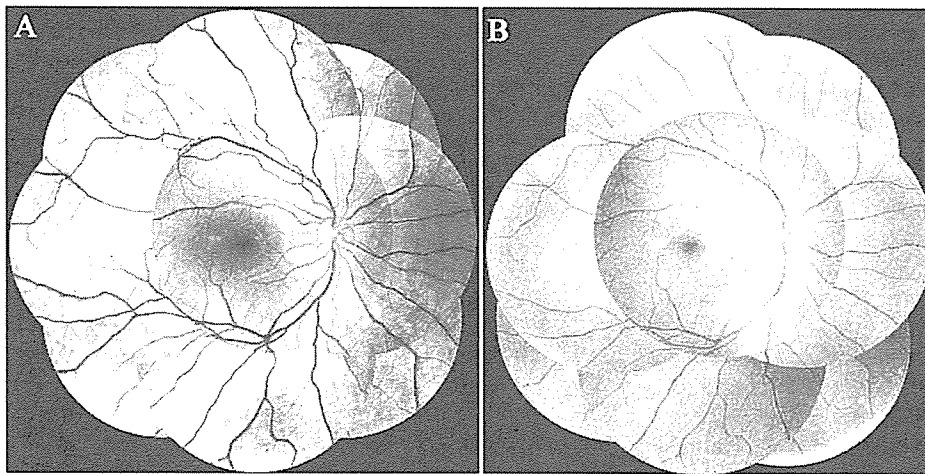


Figure 2. Fundus photographs of a 14 year-old patient with mutations of the *SAG* gene. A: Left eye, without dark adaptation. Golden-yellow retinal discoloration can be seen. B: Left eye, after 4 h of dark adaptation. Fundus color appears normal.

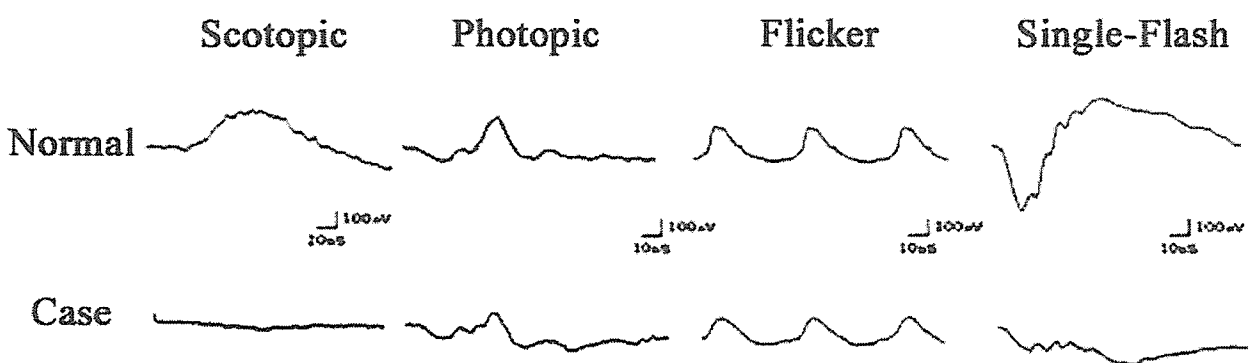


Figure 3. Comparison electroretinographic recordings from the affected individual and a normal subject. The full-field rod electroretinogram (ERG) after 30 min of dark adaptation was undetectable. The photopic ERG response and the 30-Hz flicker ERGs were normal. The bright-flash, mixed cone-rod ERG was a negative-type ERG with the amplitude of the b-wave smaller than that of the a-wave. The control (normal) subject was a 28-year-old Japanese woman recruited for the study. With appropriate correction she had full visual acuity, with no history of eye diseases and no serious general diseases.

mature termination of translation. Both parents were heterozygous for the same deletion mutation.

To develop a reliable and rapid method of genotyping based on the hybridization probe assays, we designed two sequence-specific primers and fluorophore-labeled probes for exons 11 of the *SAG* gene were (Figure 1). The LightCycler detection system was standardized by analyzing the sequence-verified DNA from the patient, his parents, and normal controls. (For normal controls, three normal volunteers were recruited. With appropriate correction they had a full visual acuity, and there was no history of eye diseases and no serious general diseases. Their ages were 25, 28, and 29 years.) With this technique, we were able to distinguish the disease genotypes by the distinct melting peaks (Figure 5). Homozygous wild-type (926AA) showed a single peak at 62.0 °C. Heterozygous 926delA decreased the T_m with a heterozygous pattern of two peaks at 62.0 °C and 54.0 °C. The single peak at 54.0 °C indicated a homozygous 926delA mutation (Figure 5).

It required approximately 54 min for one thermal cycle to complete. DNA samples were examined under the same PCR conditions in triplicate, and all results were 100% in concordance with the genotypes determined by DNA sequencing. We observed scant intra assay variation, and neither shifts of the hybridization probe melting temperatures nor inaccurate melting curves of individual samples were observed (data not shown).

DISCUSSION

We have developed a rapid PCR-based fluorescein assay for the detection of the 926delA mutation, a hotspot in patients with Oguchi disease, in the *SAG* gene. Because the 926delA mutation accounts for most Japanese patients with Oguchi disease, this probe set can detect the most common mutation in the *SAG* gene, and is thus particularly useful for a rapid initial screening in the clinic. The precision of the assays was 100% demonstrating a complete reliability of our new high-speed genotyping assay [16].

One conventional method used to detect mutations in patients with Oguchi disease is direct genomic sequencing. Even

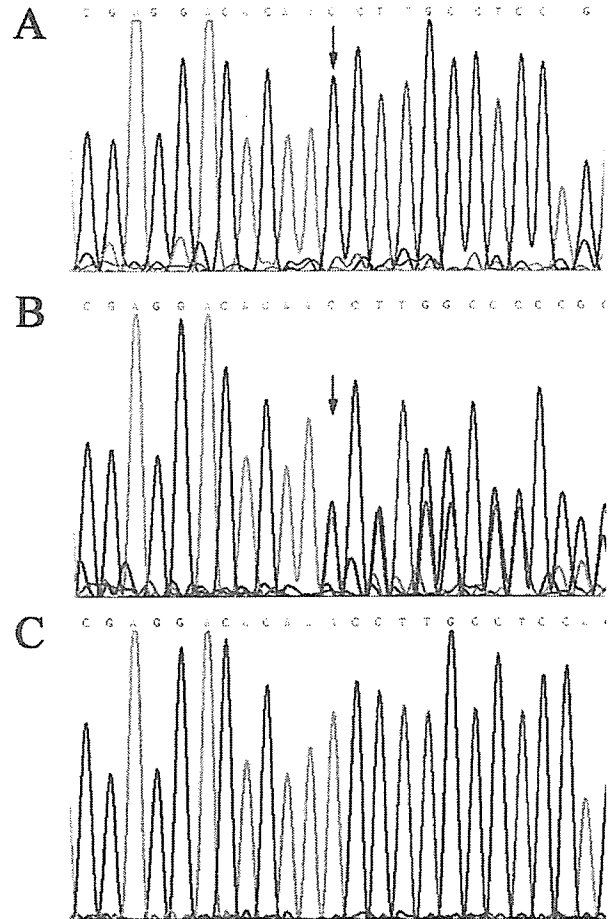


Figure 4. Electropherogram of the sense strand of genomic DNA. A: In this electropherogram from the affected individual, the arrow marks a homozygous 926delA mutation. B: Electropherogram done on the affected individual's parents showed a heterozygous 926delA mutation. C: Electropherogram from a normal control.

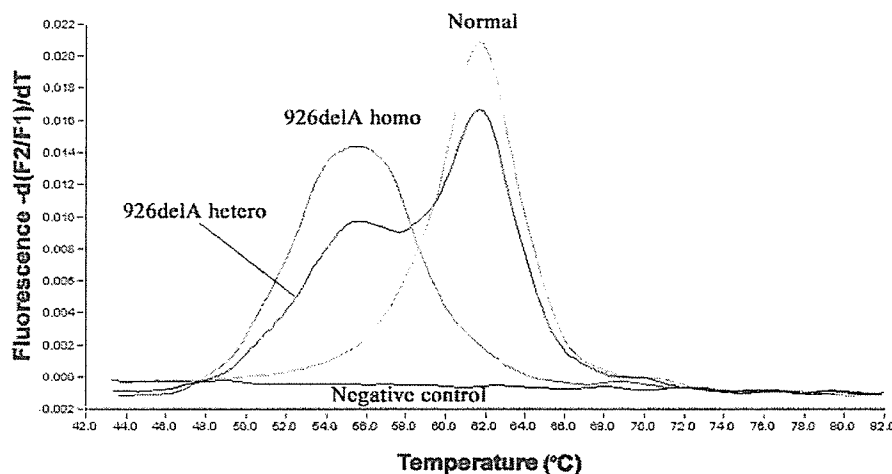


Figure 5. Real-time genotyping of the *SAG* gene around the nucleotide by hybridization probe melting curve analysis. Analysis was done by plotting the first negative derivative of the fluorescence with respect to temperature [$-(dF/dT)$ versus T]. The melting peak temperatures obtained from the derivative melting curves are as follows: 62.0 °C for homozygous wild-type, 62.0 °C and 54.0 °C for the heterozygous 926delA, and 54.0 °C for homozygous mutated type. Genotypes are indicated on top of each peak.

though the method provides more data, it is more labor-intensive and expensive. Another method, the PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay for detecting the 926delA genotypes, requires a PCR amplification followed by digestion with a mutation-specific restriction enzyme of the amplicons and then gel electrophoresis. Both methods require several hours and more manual interventions, such as gel electrophoresis, resulting in a higher risk of contamination by displaced amplicons and exposure of the investigators to potentially toxic reagents such as the ethidium bromide stain. In contrast, our rapid PCR-based fluorescein assay is a closed-tube system that does not require any post-PCR sample manipulation, which enables reliable genotyping in less than one hour and is suitable for routine clinical use. In addition, our new assay can also be used for screening autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by the 926delA mutation of the *SAG* gene.

It was suggested that mutation 926delA of the *SAG* gene is the mutational hot spot in Oguchi disease, however there have been reports of increasing numbers of rare gene mutations, such as a homozygous 577C>T (Arg193stop) [26], a compound heterozygous 523C>T (Arg175stop) and 926delA [27], a homozygous 874C>T (Arg292stop) of *SAG* gene. [27] and compound heterozygous 1139T>A (Val 380 Asp) and 1607del4bp [5], and a homozygous deletion of Exon 5 of *GRK1* gene [5] have been recently reported. More recently, a variant form of Oguchi disease was reported with a c.827+623_883del mutation of the *GRK1* gene [28]. These findings indicate that there is likely to be a broader spectrum of genetic heterogeneity associated with Oguchi disease than previously believed. Our method should help identify the gene defects associated with *SAG* or *GRK1* mutations in Oguchi disease with a rapid and reliable identification and the exclusion of the frequent mutations in the *SAG* gene. This should accelerate our ability to gain insight into Oguchi disease enable us to and understand more precisely the mechanisms underlying night blindness associated with clinically diagnosed Oguchi disease or *SAG*-associated retinitis pigmentosa.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ms. Naomi Higuchi for technical assistance. This work was supported in part by grants from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan (T.I. and S.Y.), Japanese Retinitis Pigmentosa Society (S.Y.), Clinical Research Foundation (S.Y.), The Japan Health Foundation (S.Y.), and Japan National Society for the Prevention of Blindness (S.Y.).

REFERENCES

- Oguchi C. On a type of night-blindness. *Acta Soc Ophthalmol Jpn* 1907; 11: 123-34.
- Mizuo G. A new discovery in dark adaptation in Oguchi disease. *Acta Soc Ophthalmol Jpn* 1913; 17: 1148-50.
- Yamamoto S, Hayashi M, Takeuchi S, Shirao Y, Kita K, Kawasaki K. Normal S cone electroretinogram b-wave in Oguchi's disease. *Br J Ophthalmol* 1997; 81:1043-5.
- Fuchs S, Nakazawa M, Maw M, Tamai M, Oguchi Y, Gal A. A homozygous 1-base pair deletion in the arrestin gene is a frequent cause of Oguchi disease in Japanese. *Nat Genet* 1995; 10:360-2.
- Yamamoto S, Sippel KC, Berson EL, Dryja TP. Defects in the rhodopsin kinase gene in the Oguchi form of stationary night blindness. *Nat Genet* 1997; 15:175-8.
- Nakamachi Y, Nakamura M, Fujii S, Yamamoto M, Okubo K. Oguchi disease with sectoral retinitis pigmentosa harboring adenine deletion at position 1147 in the arrestin gene. *Am J Ophthalmol* 1998; 125:249-51.
- Nakazawa M, Wada Y, Fuchs S, Gal A, Tamai M. Oguchi disease: phenotypic characteristics of patients with the frequent 1147delA mutation in the arrestin gene. *Retina* 1997; 17:17-22.
- Yoshii M, Murakami A, Akeo K, Nakamura A, Shimoyama M, Ikeda Y, Kikuchi Y, Okisaka S, Yanashima K, Oguchi Y. Visual function and gene analysis in a family with Oguchi's disease. *Ophthalmic Res* 1998; 30:394-401.
- Yamada T, Matsumoto M, Kadoi C, Nagaki Y, Hayasaka Y, Hayasaka S. 1147 del A mutation in the arrestin gene in Japanese patients with Oguchi disease. *Ophthalmic Genet* 1999; 20:117-20.
- Saga M, Mashima Y, Kudoh J, Oguchi Y, Shimizu N. Gene analysis and evaluation of the single founder effect in Japanese patients with Oguchi disease. *Jpn J Ophthalmol* 2004 Jul-Aug; 48:350-2.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 2000; 15:7-12. Erratum in: *Hum Mutat* 2002 Nov;20(5):403.
- Nakazawa M, Wada Y, Tamai M. Arrestin gene mutations in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 1998; 116:498-501.
- Gotting C, Schulz V, Hendig D, Grundt A, Dreier J, Szliska C, Brinkmann T, Kleesiek K. Assessment of a rapid-cycle PCR assay for the identification of the recurrent c.3421C>T mutation in the *ABCC6* gene in pseudoxanthoma elasticum patients. *Lab Invest* 2004; 84:122-30.
- Yoshida S, Yoshida A, Ishibashi T, Elner SG, Elner VM. Role of MCP-1 and MIP-1alpha in retinal neovascularization during postischemic inflammation in a mouse model of retinal neovascularization. *J Leukoc Biol* 2003; 73:137-44.
- Yoshida S, Yoshida A, Matsui H, Takada Y, Ishibashi T. Involvement of macrophage chemotactic protein-1 and interleukin-1beta during inflammatory but not basic fibroblast growth factor-dependent neovascularization in the mouse cornea. *Lab Invest* 2003; 83:927-38.
- Yoshida S, Yamaji Y, Yoshida A, Noda Y, Kumano Y, Ishibashi T. Rapid genotyping for most common TGFB1 mutations with real-time polymerase chain reaction. *Hum Genet* 2005; 116:518-24.
- Yoshida S, Yamaji Y, Yoshida A, Kuwahara R, Yamamoto K, Kubota T, Ishibashi T. Novel triple missense mutations of *GUCY2D* gene in Japanese family with Cone-rod dystrophy: Possible use of genotyping microarray. *Mol Vis* 2006; in press.
- Yoshida S, Arita R, Yoshida A, Tada H, Emori A, Noda Y, Nakao S, Fujisawa K, Ishibashi T. Novel mutation in *FZD4* gene in a Japanese pedigree with familial exudative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol* 2004; 138:670-1.
- Yoshida S, Honda M, Yoshida A, Nakao S, Goto Y, Nakamura T, Fujisawa K, Ishibashi T. Novel mutation in *ABCC6* gene in a Japanese pedigree with pseudoxanthoma elasticum and retinitis pigmentosa. *Eye* 2005; 19:215-7.
- Yoshida S, Kumano Y, Yoshida A, Hisatomi T, Matsui H, Nishida T, Ishibashi T, Matsui T. An analysis of *BIGH3* mutations in patients with corneal dystrophies in the Kyushu district of Ja-

- pan. *Jpn J Ophthalmol* 2002 Jul-Aug; 46:469-71.
21. Yoshida S, Kumano Y, Yoshida A, Numa S, Yabe N, Hisatomi T, Nishida T, Ishibashi T, Matsui T. Two brothers with gelatinous drop-like dystrophy at different stages of the disease: role of mutational analysis. *Am J Ophthalmol* 2002; 133:830-2.
 22. Lay MJ, Wittwer CT. Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem* 1997; 43:2262-7.
 23. Bernard PS, Lay MJ, Wittwer CT. Integrated amplification and detection of the C677T point mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves. *Anal Biochem* 1998; 255:101-7.
 24. von Ahsen N, Schutz E, Armstrong VW, Oellerich M. Rapid detection of prothrombotic mutations of prothrombin (G20210A), factor V (G1691A), and methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) by real-time fluorescence PCR with the LightCycler. *Clin Chem* 1999; 45:694-6.
 25. Kyger EM, Krevolin MD, Powell MJ. Detection of the hereditary hemochromatosis gene mutation by real-time fluorescence polymerase chain reaction and peptide nucleic acid clamping. *Anal Biochem* 1998; 260:142-8.
 26. Maw M, Kumaramanickavel G, Kar B, John S, Bridges R, Denton M. Two Indian siblings with Oguchi disease are homozygous for an arrestin mutation encoding premature termination. *Hum Mutat* 1998; Suppl 1:S317-9.
 27. Nakamura M, Yamamoto S, Okada M, Ito S, Tano Y, Miyake Y. Novel mutations in the arrestin gene and associated clinical features in Japanese patients with Oguchi's disease. *Ophthalmology* 2004; 111:1410-4.
 28. Zhang Q, Zulfiqar F, Riazuddin SA, Xiao X, Yasmeen A, Rogan PK, Caruso R, Sieving PA, Riazuddin S, Hejtmancik JF. A variant form of Oguchi disease mapped to 13q34 associated with partial deletion of GRK1 gene. *Mol Vis* 2005; 11:977-85.

The print version of this article was created on 6 Dec 2006. This reflects all typographical corrections and errata to the article through that date. Details of any changes may be found in the online version of the article.

9. 一般住民を対象とした正常眼の黄斑部網膜厚

野田佳宏^{1,2)}、安田美穂¹⁾、畑 快右¹⁾、野瀬善明²⁾、清原 裕³⁾、飯田三雄⁴⁾、石橋達朗¹⁾

(¹⁾九州大、²⁾九州大医療情報学、³⁾九州大環境医学、⁴⁾九州大病態機能内科学)

研究要旨 【目的】正常眼における黄斑部網膜厚について検討する。【対象】2005年に久山町住民健診を受診し、疫学調査に同意された40歳以上の男女1969名（男性：800名、女性：1169名）のうち、少なくとも片眼が黄斑部網膜厚に影響を与える眼疾患（糖尿病網膜症、高血圧性網膜症、網膜静脈閉塞症、黄斑前膜、近視性黄斑萎縮、緑内障性視神経萎縮、加齢黄斑変性、黄斑円孔など）をもたず、かつ黄斑部網膜厚、眼底写真、眼軸長、身長が全て解析可能な精度で測定された1696名（全受診者の86.1% 正常眼の95.3%）

【方法】黄斑部網膜厚測定にはZeiss社OCT3000™のFast Macula Thickness Mapモードを用い、「中心窩を中心とする直径3mmの平均網膜厚」と「直径1mmの円で分割された直径3mmの黄斑部の平均網膜厚の内外差」を求めた。眼軸長の測定にはZeiss社のIOL Master™を用いた。多変量解析は黄斑部網膜厚を結果因子、性別、年齢、眼軸長、身長を説明因子として重回帰分析を行った。【結果】重回帰分析では性別、年齢、眼軸長が網膜厚に影響を与える有意な因子であった。平均黄斑部網膜厚は女性、高齢、短眼軸で薄くなり、黄斑部網膜厚の内外差は男性、高齢、長眼軸で小さくなった。身長と網膜厚との関係は有意ではなかった。【結論】女性は男性に比して中心窩網膜が薄かった。このことは特発性黄斑円孔有病率の男女差と関係あるかもしれない。他には年齢、眼軸長が網膜厚に影響した。

A. 研究目的

黄斑疾患には男女差があるものが知られており、特発性黄斑円孔は女性に高頻度に見られることが知られている。光干渉断層系(optical coherence tomography : OCT)を用いた正常人の黄斑部網膜厚については少数のボランティアによる研究報告¹⁾があるが、一般住民を対象とした正常人網膜厚の報告は小児のものがある²⁾のみで、成人に対して行われたものは我々が調べうる限りない。本研究の目的は久山町40歳以上の住民における正常眼の黄斑部網膜厚の傾向について検討することである。

B. 研究方法

【対象】2005年に久山町住民健診を受診し、疫学調査に同意された40歳以上の男女1969名（男性：800名、女性：1169名）のうち、少なくとも片眼が黄斑部網膜厚に影響を与える眼疾患（糖尿病網膜症、高血圧性網膜症、網膜静脈閉塞症、黄斑前膜、近視性黄斑萎縮、緑内障性視神経萎縮、加齢黄斑変性、黄斑円孔など）をもたず、かつ黄斑部網膜厚、眼底写真、眼軸長、身長が全て解析可能な精度で測定された1696名（全受診者の86.1% 正常眼の95.3%）を統計解析の対象とした。両眼が解析可能であった場合は、右眼のデータを用いた。

【方法】《網膜厚測定》黄斑部網膜厚 Zeiss 社 STRAUS OCT3000 の Fast Macular Thickness Map モードで測定し、Retina Map Analysis で網膜厚のパラメーターを算出した。中心窩を中心とする直径 3mm の黄斑網膜上の円を直径 1mm の同心円で分割し、それらを内周と外周と定義した。直径 3mm の平均黄斑部網膜厚 (average macular thickness) および内周と外周の平均網膜厚の差 (macular dimple depth) を解析に用いた。内部プログラムで決定された網膜の境界ラインが妥当でないもの、中心窩を中心としたスキャンができていないものは解析から除外した。境界ラインは Fast Macular Thickness Map で測定したスキャンを retinal thickness analysis を用いて表示、検討した。

《眼底写真》トプコン社無散瞳眼底カメラ TRC-NW200 を無散瞳下で使用した。小瞳孔のため無散瞳で写真が鮮明でない場合は散瞳して撮影した。網膜疾患のある眼は解析から除外した。

《眼軸長》Zeiss 社 IOL マスターを用いて角膜頂点から網膜色素上皮層までの長さを測定した。角膜疾患や中間透光体の混濁のため測定不能であった症例は解析から除外した。

《統計解析》平均黄斑部網膜厚・平均網膜厚の内外差・年齢・眼軸長・身長は連続量として扱った。男女間の平均黄斑部網膜厚・平均網膜厚の内外差の差について単変量および多変量解析を行った。多変量解析は年齢・眼軸長・身長について単独または複数を調整因子として用いた。全ての解析には SAS を用いた。

(倫理面への配慮)

この研究は九州大学の倫理委員会の許可を得ている。また研究の対象者全員に書面で同意を得ている。

C. 研究結果

性差に年齢、眼軸、身長と調整因子を加えて標準回帰係数(standardized regression coefficient : SRC)、偏相関係数(partial correlation coefficient : PCC)を算出した。男女差のみのモデル、男女差に年齢を調整したモデル、前モデルに眼軸長を調整したモデル、さらに身長を調整したモデルを用いた。平均黄斑部網膜厚、平均網膜厚の内外差の両者とも性差は全モデルで有意であった。また年齢・眼軸は有意であったが身長を入れたモデルでは身長は有意にならなかった。男性に比して女性は平均黄斑部網膜が薄く、網膜厚の内外差が大きかった。年齢が上がると平均黄斑部網膜が薄く、網膜厚の内外差は小さくなった。眼軸長が長くなると平均黄斑部網膜が厚く、網膜厚の内外差が小さくなった。年齢階級別の平均黄斑部網膜厚、平均網膜厚の内外差についてそれぞれ性別、年齢、眼軸長の影響を検討した。平均黄斑部網膜厚は 60 歳代を除いて性差が見られた。眼軸長の影響は 60 歳未満ではあまり強く見られなかったが、いずれの年代でも眼軸長が伸びると網膜厚が厚くなった。平均網膜厚の内外差にはどの年代にも眼軸長の影響が認められ、長い眼軸と黄斑部の平坦化に相関があることが年代を超えて示された。

Macular thickness				
	regression coefficient	SRC	PCC	P value
crude				
gender	-5.64	-0.17	-0.17	<.0001
age-adjusted model				
gender	-6.27	-0.19	-0.20	<.0001
age	-0.35	-0.23	-0.24	<.0001
multi-adjusted model 1				
gender	-5.52	-0.17	-0.17	<.0001
age	-0.30	-0.20	-0.20	<.0001
axial length(mm)	1.53	0.12	0.12	<.0001
multi-adjusted model 2				
gender	-4.29	-0.13	-0.09	0.0002
age	-0.27	-0.18	-0.16	<.0001
axial length(mm)	1.45	0.11	0.11	<.0001
height(cm)	-4.33	0.05	0.04	0.1468
Macular dimple depth				
	regression coefficient	SRC	PCC	P value
crude				
gender	5.18	0.14	0.14	<.0001
age-adjusted model				
gender	4.31	0.11	0.12	<.0001
age	-0.48	-0.28	-0.28	<.0001
multi-adjusted model 1				
gender	2.79	0.07	0.08	0.0016
age	-0.58	-0.33	-0.32	<.0001
axial length(mm)	-3.07	-0.20	-0.20	<.0001
multi-adjusted model 2				
gender	2.63	0.07	0.05	0.0451
age	-0.58	-0.34	-0.29	<.0001
axial length(mm)	-3.06	-0.20	-0.20	0.0016
height(cm)	-0.01	-0.01	-0.004	0.8664

SRC : standardized regression coefficient

PCC : partial correlation coefficient

表 1 男女間の平均黄斑部網膜厚、平均網膜厚の内外差

D. 考察

対象集団の男女間には黄斑部網膜厚、黄斑部の陥凹の大きさの他に年齢、眼軸長、身長に有意な差が認められた。男女間には黄斑部パラメーターと年齢、眼軸長、身長の間共通した傾向があり、残差の検討からも男女間で回帰直線の傾きの差は有意ではなかったため、男女間の検討および性別調整を行う際には男女込みのモデルで解析を行った。女性は黄斑部網膜が薄いという結果となったが、これは女性に特発性黄斑円孔が多いことと関連があるかもしれない。

眼軸は男性が長く、女性が短かった。これは過去のアジア人やラテン系民族の研究と一致していた^{3,4}。

黄斑部網膜厚・黄斑部の陥凹に影響する因子として性別の他に年齢と眼軸長が有意

Macular thickness					
Age Group (n)		regression coefficient	SRC	PCC	P value
40-49 (222)	gender	-11.01	-0.36	-0.36	<.0001
	age	0.21	0.04	0.04	0.5180
	axial length	0.13	0.01	0.01	0.8558
50-59 (440)	gender	-8.02	-0.26	-0.26	<.0001
	age	-0.76	-0.14	-0.14	0.0031
	axial length	0.86	0.07	0.08	0.1102
60-69 (555)	gender	-1.44	-0.05	-0.05	0.2901
	age	-0.23	-0.04	-0.04	0.3330
	axial length	2.63	0.20	0.19	<.0001
70-92 (479)	gender	-5.35	-0.16	-0.16	0.0007
	age	-0.39	-0.10	-0.11	0.0196
	axial length	2.17	0.13	0.13	0.0042
Macular dimple depth					
Age Group (n)		regression coefficient	SRC	PCC	P value
40-49 (222)	gender	2.70	0.08	0.08	0.2119
	age	0.13	0.02	0.03	0.7097
	axial length	-2.70	-0.23	-0.23	0.0005
50-59 (440)	gender	4.55	0.13	0.14	0.0035
	age	-0.77	-0.13	-0.13	0.0057
	axial length	-3.54	-0.28	-0.28	<.0001
60-69 (555)	gender	0.94	0.02	0.02	0.5779
	age	-0.63	-0.09	-0.09	0.0334
	axial length	-3.65	-0.22	-0.22	<.0001
70-92 (479)	gender	3.28	0.09	0.09	0.0587
	age	-0.77	-0.18	-0.19	<.0001
	axial length	-1.72	-0.09	-0.09	0.0401

SRC : standardized regression coefficient

PCC : partial correlation coefficient

表 2 年齢階級別の平均黄斑部網膜厚、平均網膜厚の内外差

であった。年齢が上がると網膜は薄くなり、黄斑部の内外差も小さくなった。眼軸長は長くなると網膜は厚くなり、黄斑部の内外差は小さくなった。平均黄斑部網膜厚の傾向は小児の過去の報告²と反対の結果であったが、網膜厚の内外差については同様であった。眼軸長と平均網膜厚の正の相関は60歳未満では弱く、50歳未満では特に弱かった。この関係は高齢者に特に認められる関係である可能性がある。身長は網膜厚に多変量解析では有意な影響は見られなかった。その他の生活習慣の影響はまだわからないが、今後の研究によって明らかにしていく

るものとする。

E. 結論

久山町一般住民において女性は男性に比して平均黄斑部網膜厚が薄く、黄斑部の内外差が大きかった。他には年齢と眼軸長が影響した。

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. Lim MC, Hoh ST, Foster PJ et al. Use of optical coherence tomography to assess variations in macular retinal thickness in myopia. Invest Ophthalmol Vis Sci. 46: 974-978, 2005.
2. Luo HD, Gazzard G, Fong A et al. Myopia, axial length, and OCT characteristics of the macula in Singaporean children. Invest Ophthalmol Vis Sci. 47: 2773-2781, 2006.
3. Xu L, Li J, Cui T et al. Refractive error in urban and rural adult Chinese in Beijing. Ophthalmology. 112: 1676-1683, 2005.

4. Shufelt C, Fraser-Bell S, Ying-Lai M et al. Los Angeles Latino Eye Study Group. Refractive error, ocular biometry, and lens opalescence in an adult population: the Los Angeles Latino Eye Study. Invest Ophthalmol Vis Sci. 46: 4450-4460, 2005.

10. 糖尿病網膜症患者の硝子体液中における

サイトカイン・ケモカイン濃度の包括的解析

菅原美香、吉村 武、園田康平、望月泰敬、江内田寛、
大島裕司、上野暁史、畑 快右、石橋達朗
(九州大)

研究要旨 糖尿病網膜症の病態形成において、免疫炎症反応は重要と考えられている。近年硝子体液中サイトカイン及びケモカイン濃度に関して個々の報告は散見されるが、同時に多数の液性因子を測定した報告はない。今回、糖尿病網膜症患者の硝子体液中のサイトカイン・ケモカイン濃度を包括的に測定・解析したので報告する。対象は糖尿病黄斑浮腫(DME)群 52例、増殖糖尿病網膜症(PDR)群 89例、黄斑円孔・黄斑上膜など 49例(対照群)である。手術時に硝子体液を採取し、蛍光マイクロビーズアレイシステム(Luminex[®])を用いて種々のサイトカイン・ケモカイン濃度を同時測定した。測定項目はGM-CSF, IL-1b, IL-6, IL-8, IL-17, TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-15, EGF, VEGF, basic FGF, G-CSF, GM-CSF, eotaxin, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTESである。DME群及びPDR群の硝子体液では、対照群と比較してIL-6, IL-8, MCP-1, VEGFの濃度が有意に高値であった。更にPDR群ではDME群と比較してVEGFが有意に高値であった。Luminex[®]を用いて硝子体液性因子を包括的に解析できた。糖尿病網膜症の病態に、IL-6, IL-8, MCP-1, VEGFが関与することが示唆された。

A. 研究目的

糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化等の代謝性疾患には内皮細胞の炎症による微小血管障害が関与しているとされており、糖尿病網膜症患者の硝子体液中の炎症性サイトカインの解析については個々の報告が散見される。例えば Elner²⁾らは IL-8, MCP-1, M-CSF について、Demircan³⁾らは IL-1, TNF- α の関与について報告している。しかし、我々が調べた限り、このようなサイトカインについて包括的に解析した報告はなく、また、各々について糖尿病網膜症の病期によって比較した報告はない。そこ

で我々は糖尿病網膜症患者の硝子体液について、Luminex 100[®] (Luminex 社)を用いた蛍光マイクロビーズアレイシステムにより、眼炎症に関与する液性因子を包括的に多症例を同時解析した。

B. 研究方法

対象は2005年9月～2006年8月の期間に九州大学で硝子体手術を施行した190例で、手術開始時に採取した硝子体サンプルを用いた。内訳は、control群(黄斑円孔・黄斑上膜)51例、糖尿病黄斑浮腫(DME)群51例、増殖糖尿病網膜症(PDR)群88例であっ

た。年齢の平均は control 群 66±8 歳、DME 群 35-86 歳・平均 63±10 歳、PDR 群 29-80 歳・平均 55±14 歳、性別は control 群 男性 13 例女性 38 例、DME 群 男性 21 例女性 30 例、PDR 群 男性 65 例女性 23 例であった。硝子体サンプルを PBS にて 10 倍希釈し、Biosource 社の Antibody beads kit を説明書通り使い、Luminex 社の Luminex 100[®] を用いて包括的にサイトカイン・ケモカイン濃度を測定した。測定した項目は以下の通りである：サイトカイン 12 項目；IL-1 β , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, TNF- α , ケモカイン 7 項目；IL-8, eotaxin, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, 増殖因子；EGF, VEGF, bFGF, G-CSF, GM-CSF。

(倫理面への配慮)

硝子体サンプルの採取については九州大学倫理委員会の承認を得た上、患者にはインフォームドコンセントを行った。

C. 研究結果

測定した 24 因子のうち、IL-6, IL-8, MCP-1, VEGF は検出感度以上で解析可能であった。この 4 因子は control 群と比較し、DME・PDR 両群で有意に高い結果となった。IL-6, IL-8, MCP-1 では、DME 群と PDR の間には有意差を認めなかったが、VEGF は DME 群と比較し PDR 群で有意に高値であった(図 1, 2)。

この 4 因子の相関関係について Spearman 解析を行い、個々の症例レベルで各々を比較したところ、VEGF 以外の 3 因子はお互いに強い相関が見られた($p < 0.01$)。DME 群と比較し PDR 群で上昇していた VEGF について、相関関係を調べたところ、唯一 IL-

8 のみが 0.01 未満の強い相関を認めた(図 3)。

D. 考察

今回測定した液性因子 24 因子のうち、糖尿病網膜症患者では IL-6, IL-8, MCP-1, VEGF が高値であった。このことより T 細胞系ではなく自然免疫系の液性因子が糖尿病網膜症の病態に強く関与することが示唆された。

IL-8 は炎症を介して血管新生を惹起するといわれており、IL-8 は網膜の低酸素状態で glial cell や endothelial cell から産生される⁴⁾。VEGF との相関について検討したところ、唯一 IL-8 に強い相関がみられた。このことは、糖尿病網膜症の病態に血管新生と炎症の両方の要因があるとする仮説を支持する結果となった。

今回の研究は Luminex 100[®] を用いて行った。Luminex は感度・定量性は ELISA とほぼ同様であるのに加え、少量のサンプル(10 μ l)から多数の項目(24 因子)を低コストで解析できるという利点があった。また、フローサイトメトリーの技術を利用しており、高速測定が可能であった。硝子体は粘性によりマイクロビーズとからまるという問題点があったが、希釈することで解消できた。測定値の再現性については、今後数回施行し検討する必要がある。

E. 結論

Luminex[®] を用いて、少量の硝子体サンプルより多症例・多因子を同時に測定することができた。

糖尿病網膜症に伴う炎症機序には、基本的に IL-6, IL-8, MCP-1 が重要である。一方、

その増悪には IL-8 を介した VEGF の上昇が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 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. Nguyen TT et al: Retinal vascular manifestations of metabolic disorders. Trends Endocrinol Metab. 17: 262-268, 2006.
- 2. Elner SG., et al: Cytokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. Curr Eye Res. 14: 1045-1053, 1995.
- 3. Demircan N et al: Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. Eye. 20: 1366-1369, 2006.
- 4. Yoshida S et al: Induction of IL-8, MCP-1, and bFGF by TNF-alpha in retinal glial cells: implications for retinal neovascularization during post-ischemic inflammation. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 242: 409-413, 2004.

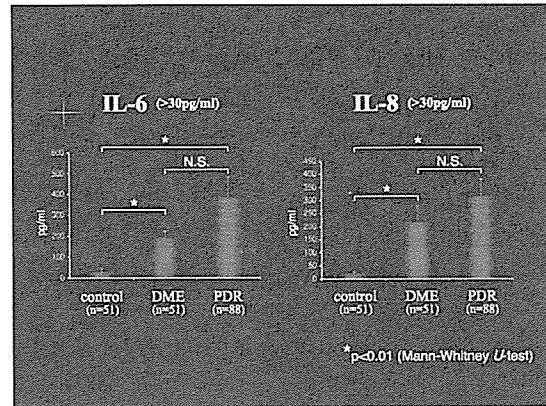


図 1

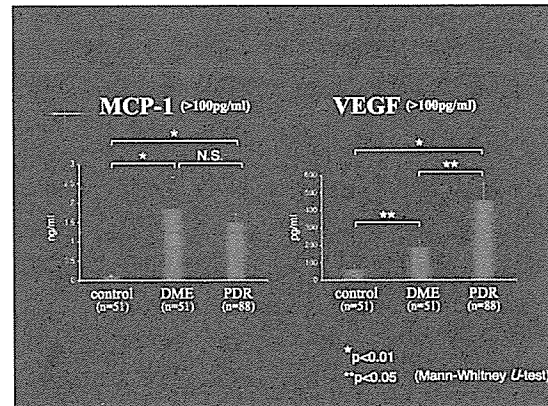


図 2

相関解析 (Spearman's correlation)

	DME	PDR
IL-6 vs IL-8	p<0.01	p<0.01
IL-6 vs MCP-1	p<0.01	p<0.01
IL-8 vs MCP-1	p<0.01	p<0.01
IL-6 vs VEGF	p<0.01	p=0.11
IL-8 vs VEGF	0.027	p<0.01
MCP-1 vs VEGF	p=0.48	p=0.094

図 3

11. 網膜静脈閉塞症患者硝子体中の SDF-1、VEGF、

炎症性サイトカイン濃度の評価

有村 昇¹⁾、喜井裕哉¹⁾、野田佳宏²⁾、山切啓太¹⁾、土居範仁¹⁾

橋口照人³⁾、丸山征郎³⁾、志村雅彦⁴⁾、坂本泰二¹⁾

(¹⁾鹿児島大、²⁾九州大、³⁾鹿児島大・血管代謝病態解析学、⁴⁾NTT 東北病院)

研究要旨 stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) は血管新生に関わるケモカインとして注目されている。網膜静脈閉塞症 (RVO) 患者硝子体中の SDF-1、VEGF、炎症性サイトカイン濃度を測定し、RVO への関与を検討した。硝子体手術を施行した RVO 患者 20 例 20 眼、黄斑部網膜上膜 (ERM) 患者 9 例 9 眼を対象にした。硝子体手術時に硝子体を採取し、SDF-1、VEGF 濃度は ELISA 法、炎症性サイトカイン (IL-8, 1 β , 6, 10, 12p70・TNF- α) 濃度は Cytometric Bread Array を用いて測定した。RVO 患者を Active RVO 群 (A 群; 4 眼) と Quiescent RVO 群 (Q 群; 16 眼) にわけ、統計学的解析を行った。SDF-1 濃度は A 群と Q 群 (278.95 vs 61.18 pg/ml)、A 群と ERM 群 (37.32 pg/ml) で有意差 ($P < 0.01$, Mann-Whitney-U 検定) が認められたが、Q 群と ERM 群では認められなかった。VEGF、IL-8、IL-6 でも同様の有意差が認められ、VEGF、IL-8 では Q 群と ERM 群でも有意差を認めた ($P < 0.001$)。RVO において VEGF と IL-6 に有意な相関を認めた ($P < 0.05$) が、その他のサイトカイン間に有意な相関は認められなかった (Spearman 順位相関係数)。SDF-1 は明らかな虹彩新生血管を認めた RVO においてのみ高値を示し、RVO の血管新生機序において中心的な役割を担っている可能性が示唆された。

A. 研究目的

増殖性変化、血管新生は網膜静脈閉塞症 (RVO) を含めた網膜虚血性疾患の視覚予後悪化につながる難治な病態であり、種々のサイトカインの関与が示唆されている。近年、血中の造血幹細胞を末梢の組織に捕捉し、血管新生を促進するケモカインとして stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) が注目されており、糖尿病網膜症について病態への関与が報告されている。本報では RVO 患者硝子体中の SDF-1 を含めた複数のサイトカインを測定し、病態への関与を検討し

た。

B. 研究方法

RVO 患者 20 例 20 眼、黄斑部網膜上膜 (ERM) 患者 9 例 9 眼を対象とした。硝子体手術時に硝子体を採取し、SDF-1、vascular endothelial growth factor (VEGF) 濃度は ELISA (R & D systems, Minneapolis, Minn)、炎症性サイトカイン (Interleukin (IL)-8, 1 β , 6, 10, 12p70・tumor necrosis factor- α (TNF- α)) 濃度は Cytometric Bread Array (BD Biosciences Pharmingen,

San Diego, CA)を用いて測定した。RVO 患者を虹彩新生血管の有無から Active RVO 群(A 群;4 眼)と Quiescent RVO 群(Q 群;16 眼)にわけ、統計学的解析を行った(Mann Whitney-U 検定、Spearman 順位相関係数)。

(倫理面への配慮)

患者硝子体の使用に際しては鹿児島大学病院倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

SDF1 濃度は A 群と Q 群 (278.95 vs 61.18pg/ml)、A 群と ERM 群(37.32pg/ml) で有意差 ($P < 0.01$) を認めたが、Q 群と ERM 群では認められなかった(図 1)。VEGF、IL-8、IL-6 でも同様の有意差が認められ、VEGF、IL-8 では Q 群と ERM 群でも有意差を認めた ($P < 0.001$)。TNF- α など他のサイトカインにおいては有意差を認めなかつ

た(図 2)。RVO において VEGF と IL-6 に有意な相関を認めた ($P < 0.05$) が他のサイトカインの間で有意な相関は認められなかつた。(表 1)

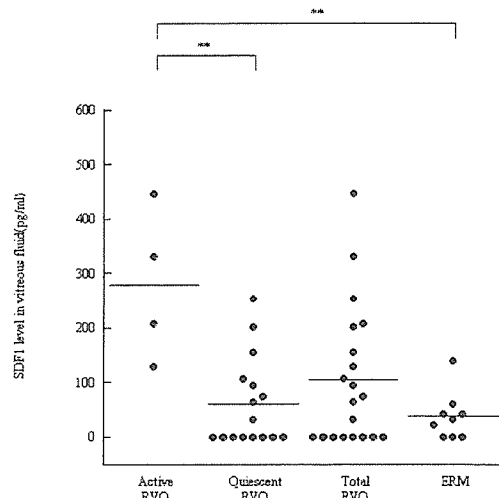


図 1. 硝子体中 SDF1 濃度 (**: $P < 0.01$)

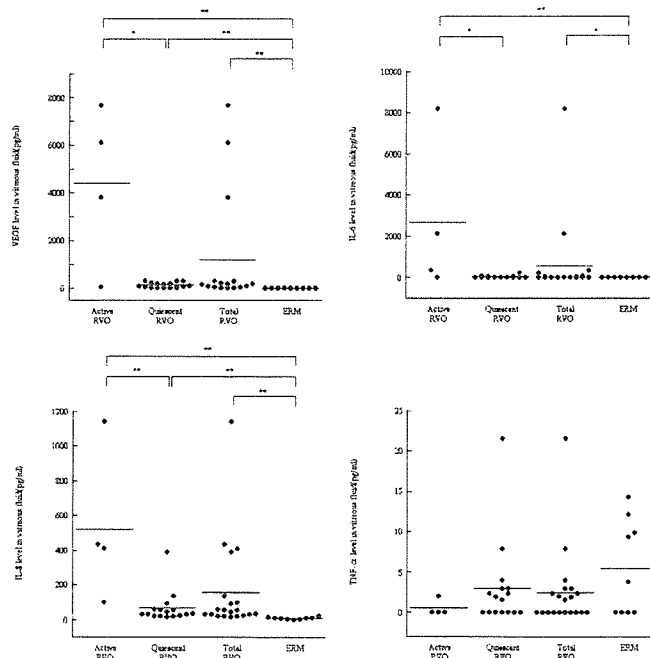


図 2. 硝子体中 VEGF、IL6、8、TNF- α 濃度 (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)

表 1. RVO におけるサイトカインの相関		
	相関係数	P 値
SDF-1 vs VEGF	0.40021	0.0804
SDF-1 vs IL-12p70	0.22542	0.3393
SDF-1 vs TNF- α	-0.17985	0.448
SDF-1 vs IL-10	0.23123	0.3266
SDF-1 vs IL-6	0.32937	0.1562
SDF-1 vs IL-1b	-0.2389	0.3104
SDF-1 vs IL-8	0.39229	0.0871
VEGF vs IL-6	0.47311	0.0351*
VEGF vs IL-8	0.42121	0.0644
IL-6 vs IL-8	0.38647	0.0923
*:P<0.05 Spearman 順位相関係数		

D. 考察

VEGF、IL-6, 8 は血管新生の有無に関わらず RVO において高値を示したのに対し、SDF-1 は明らかな血管新生を認めた RVO においてのみ高値を示した。VEGF は血管新生作用のほか、血管透過性亢進作用により網膜浮腫増悪を起こし、また IL-6, 8 は炎症により二次的に VEGF 産生を亢進させ、血管新生に至る以前においても病態悪化に関わるとされる既報と一致した結果であると考えられた。SDF-1 は VEGF 同様 hypoxia inducible factor(HIF)-1 により誘導されることが報告されているため、SDF-1 とその他のサイトカインの相関を確認したが、有意な相関は認められなかった。ひとつの原因としてサンプル数が少ないために有意な結果が得られなかった可能性はあるが、一方で VEGF と IL-6 においては有意な相関を認めた。以上より、RVO の病態に関与するサイトカイン

ンの中で、SDF-1 は特に血管新生機序特異的に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

SDF-1 は RVO における血管新生機序において中心的な役割を担っている可能性がある。

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 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. Grant MB et al: Nat Med. 8: 607-612, 2002.
2. Ceradini DJ et al: Nat Med. 10:858-64, 2004.
3. Brooks HL Jr et al: Arch Ophthalmol. 122: 1801-1807, 2004.
4. Butler JM et al: J Clin Invest. 115: 86-93, 2005.

12. 抗血管内皮増殖因子抗体のラット網膜神経節細胞に及ぼす影響

入山 彩、柳 靖雄、玉置泰裕、新家 眞
(東京大)

研究要旨 近年、黄斑浮腫、眼内血管新生に対する治療として、我が国でも抗ヒト血管内皮増殖因子(VEGF)抗体 (ペバシズマブ ; Avastin®) の硝子体内投与が行われている。ペバシズマブは齧歯類を用いた実験では網膜毒性がないと報告されているが、実際には、ペバシズマブはヒト特異的で齧歯類 VEGF に反応しない。今回我々は、齧歯類の抗 VEGF 抗体およびペバシズマブを用いて、VEGF 抑制の感覚網膜、特に網膜神経節細胞 (RGC) に対する影響を検討した。その結果、抗 VEGF 抗体投与は *in vitro*, *in vivo* において RGC を含め、感覚網膜の細胞死に有意な影響を与えない事が示された。これより、ペバシズマブの硝子体内投与は、RGC に対して安全な治療である事が示唆された。

A. 研究目的

近年、黄斑浮腫、眼内血管新生に対する治療として、抗ヒト血管内皮増殖因子(VEGF)抗体の硝子体投与が行われ、有効であるとの報告が多数なされている¹⁾²⁾。我が国でも抗 VEGF (ペバシズマブ ; Avastin®) の硝子体内投与が行われている。ペバシズマブは齧歯類を用いた実験では網膜毒性がないと報告されているが³⁾⁴⁾、実際には、ペバシズマブはヒト特異的で齧歯類 VEGF に反応しない⁵⁾。今回我々は、齧歯類の抗 VEGF 抗体およびペバシズマブを用いて、VEGF 抑制の感覚網膜、特に網膜神経節細胞 (RGC) に対する影響を検討した。

B. 研究方法

ラット RGC を two-step immunopanning 法で単離し⁶⁾、VEGF(10ng/mL)、ペバシズマブ(0.25mg/mL)、抗ラット VEGF 抗体(IgG)(1 μg/mL)、Control IgG(1 μg/mL)を添加して3日間培養し、RGC 細胞数を計測

した。又、ペバシズマブ、抗ラット VEGF 抗体、IgG をラット硝子体注入し、Fluo gold による *retrolabelling* 法により1週間後 RGC 細胞数を計測した。また、投与一週後に網膜パラフィン切片を作成し光学顕微鏡で形態学的変化を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は ARVO Statement に従い行った。

C. 研究結果

培養ラット RGC 生存率は、コントロール群と比較して、VEGF(0.99±0.29)ペバシズマブ(1.0±0.23)、抗ラット VEGF 抗体(0.98±0.18)、IgG 負荷群(0.98±0.19)と有意な差を認めなかった(図1)。

又、*in vivo* の実験で RGC 数はペバシズマブ(2613±230/mm²)、抗ラット VEGF 抗体(2600±140/mm²)、IgG 硝子体注入群(2634±240/mm²)においてコントロール群(2656±150/mm²)と有意な差は認められなかった(図2)。

The number of RGCs

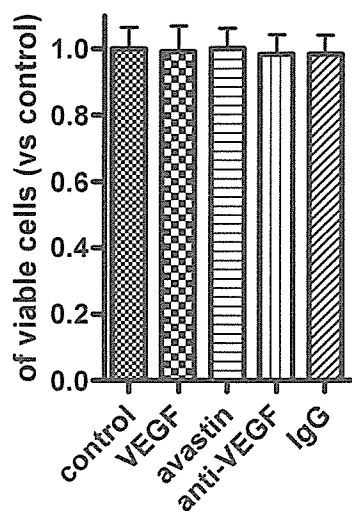


図1 培養ラット RGC 数

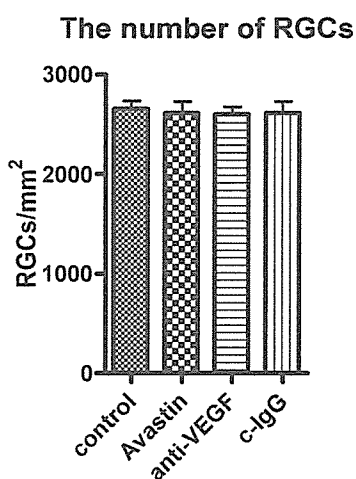


図2 RGC 細胞数

また、パラフィン切片による組織学的にもコントロール群とペバシズマブ、抗ラット VEGF 抗体、IgG 硝子体注入群では変化を認めなかった。

D. 考察

今回我々は、本研究において、一般に臨床で使用される濃度のペバシズマブを用いた。

又抗 VEGF 抗体においても中和可能な十分量を用いて行った。従って今回の研究の結果から臨床で使用されている、ペバシズマブ硝子体投与による抗 VEGF 作用は in vitro, in vivo において RGC を含め、感覚網膜の細胞死に有意な影響を与えない事が、示唆された。

E. 結論

抗 VEGF 抗体投与は in vitro, in vivo において RGC を含め、感覚網膜の細胞死に有意な影響を与えない。ペバシズマブの硝子体内投与は、RGC に対して安全な治療である事が、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. 入山 彩 他；リポフスチン構成成分 A2e の網膜色素上皮細胞および脈絡膜新生血管に及ぼす影響. 第 110 回日本眼科学会総会, 大阪市, 2006.
2. 入山 彩 他；光線力学的療法 of 3 ヶ月後の再治療率及び脈絡膜毛細血管板の閉塞に対するトリアムシロンの影響. 第 57 回日本臨床眼科学会, 名古屋市, 2006.

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. Rosenfeld PJ, Nisgfehu AA, Puliafito CA et al: Ophthalmic Surg Lasers Imaging 36: 331-335, 2005.
2. Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD. et al: Ophthalmology. 113: 363-372, 2006.
3. Shahar J, Avery RL, Heilweil G et al: ARVO Abstract #2102, 2006.
4. Luthra S, Narayanan R, Marques LE et al: Retina. 26: 512-518, 2006
5. Fuh G, Wu P, Liang WC et al : J Biol Chem. 10: 2816625-31, 2006.
6. Otori Y, Wei JK. et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 39: 972-981, 1998.

13. Bevacizumab 片眼投与における非投与眼への移行性の評価

野本浩之、福田恒輝、溝手雅宣、廣岡一行、田中茂登、山地英孝、白神史雄
(香川大)

研究要旨 Bevacizumab は血管内皮増殖因子に対するヒト型リコンビナント抗体である。最近、bevacizumab は増殖糖尿病網膜症患者を中心に使用が広まりつつある。本研究は bevacizumab の片眼投与における非投与眼への移行性を評価することを目的とした。¹²⁵I ラベルした bevacizumab を 25mg/ml および 2.5mg/ml の濃度でラットの片眼に点眼および硝子体内投与し、投与 7 日後に両眼球摘出し眼球内放射活性を計測したところ、点眼投与、硝子体内投与ともに非投与眼にも眼球内放射活性を認めた。Beveracizumab は点眼および硝子体内投与にて非投与眼にも移行する可能性があると考えられた。

A. 研究目的

血管内皮増殖因子(VEGF)に対する抗体である bevacizumab の片眼投与における非投与眼への移行性を評価すること。

B. 研究方法

¹²⁵I ラベルした bevacizumab (Avastin®, Genentech 社) を 25mg/ml および 2.5mg/ml の濃度で Brown Norway ラットの片眼に投与した。投与経路は点眼投与および硝子体内投与とした。点眼投与では 1 眼あたり 1 回につき 5 μ l を 1 日 6 回右眼のみに点眼し、7 日間連続投与した。硝子体内投与では 30 ゲージ針にて 1 眼あたり 5 μ l を 1 回だけ右眼のみに投与した。それぞれ投与開始から 7 日後に両眼球摘出し、眼球内残存放射活性を測定し、投与全放射活性に対する残存率を算出し(眼球内放射活性残存率)、bevacizumab 移行性の指標とした。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

【結果】 眼球内残存放射活性の投与全放射活性に対する平均残存率は、点眼投与 (n = 4) において 25mg/ml では投与眼 4.9 $\times 10^{-3}$ %、非投与眼 1.3 $\times 10^{-3}$ %、2.5mg/ml では投与眼 2.5 $\times 10^{-3}$ %、非投与眼 1.7 $\times 10^{-3}$ %であった。硝子体内投与 (n = 4) において 25mg/ml では投与眼は 1.6 $\times 10^{-1}$ %、非投与眼 2.1 $\times 10^{-2}$ %、2.5mg/ml では投与眼は 1.6 $\times 10^{-1}$ %、非投与眼 1.2 $\times 10^{-2}$ %であった(表 1)。

		平均眼球内放射活性残存率 (%)	
	濃度 (mg/mL)	注射眼	反対眼
点眼投与	25mg/mL	4.9 $\times 10^{-3}$	1.3 $\times 10^{-3}$
	2.5mg/mL	2.5 $\times 10^{-3}$	1.7 $\times 10^{-3}$
硝子体内投与	25mg/mL	1.6 $\times 10^{-1}$	2.1 $\times 10^{-2}$
	2.5mg/mL	1.6 $\times 10^{-1}$	1.2 $\times 10^{-2}$

表 1 平均眼球内放射活性残存率

D. 考察

Bevacizumab は VEGF に対するヒト型リコンビナント抗体である。¹⁾Avery らは増殖糖尿病網膜症患者に対し 1.25mg の bevacizumab

を硝子体内投与した症例において非投与眼の網膜新生血管および虹彩新生血管の退縮を認めたとしている。²⁾ 今回の結果では¹²⁵Iラベルした bevacizumab の片眼点眼投与および硝子体内投与の両者において、非投与眼で放射活性が認められた。硝子体非投与眼への移行経路は明らかではないが血行性に移行した可能性が高いと考えられる。

点眼では投与眼と非投与眼では同程度の値となり、点眼では非投与眼に移行する量はわずかであると考えられた。硝子体内投与では点眼に比較して投与眼において約100倍、非投与眼において10倍の放射活性率であった。点眼の方が相対的に非投与眼への移行が高いのは、涙点から鼻涙管を通る経路が考えられ、血中移行が高いのかもしれない。粘膜からの吸収が関与しているかもしれない。

また Avery らは通常硝子体内注入量である1.25mgの1/200の濃度にあたる6.2μgの硝子体内投与で注射眼への効果を認めたとしている。²⁾ 眼外に移行する可能性があるならば、ヒトに使用する際の投与量を減らす必要があると考えられた。

今後の課題は1)移行を最小限に抑える投与量の検討、2)移行経路の同定、3)他の投与方法(後部テノン嚢下注射や結膜下注射)での移行の検討4)移行した抗体の眼球内局在の同定であると考えている。

E. 結論

Bevacizumab は点眼および硝子体内投与において非投与眼に移行する可能性があると考えられた。

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
田中茂登 他:虹彩ルベオーシスに対するベバシズマブ結膜下注射の効果
第45回日本網膜硝子体学会, 東京都, 2006.

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. Ferrara N: Vasucular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25: 581-611, 2004
2. Avery RL et al: Intravitreal Bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 113: 1695-1705, 2006