

終了後2年とし、被験者の登録が可能な医療機関で実施する。

5. 被験者の選択, 除外, 中止基準

5.1 選択基準

30歳以上70歳未満で、肥満のある（過去のBMIが25以上も含む）2型糖尿病（糖尿病網膜症や腎症を有しない、あるいは単純一前増殖網膜症/早期腎症の一方または両方を有し、HbA_{1c} 5.8%以上）を有し、さらに高血圧を有し、以下の(1)(2)の両方満たす者を本試験の対象とする。

(1) 血糖値

以下のいずれかの治療を受けているにもかかわらず、HbA_{1c}が5.8%以上の患者。

- ① 食事療法および運動療法のみ
- ② 3剤以内の経口糖尿病薬による治療

(2) 血圧

外来受診時の随時血圧が以下のいずれかに該当する患者。

- ① 降圧薬を使用しておらず、収縮期血圧 140 mm Hg 以上または拡張期血圧 90 mm Hg 以上
- ② アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、長時間作用型 Ca チャネル遮断薬のいずれか1剤または2剤を服用中で、収縮期血圧 130 mm Hg 以上または拡張期血圧 80 mm Hg 以上

5.2 除外基準

- (1) 増殖網膜症以上の網膜症
- (2) 腎不全(血清クレアチニンが男性で2.0mg/dl以上、女性で1.5mg/dl以上)
- (3) 非糖尿病性腎疾患
- (4) 過去に心不全の既往があり、または現在心不全を合併
- (5) 1型糖尿病及びその他特定の機序、疾患による糖尿病を合併している患者
- (6) 遺伝性の脂質代謝異常
- (7) LDL コレステロールが 200mg/dl 以上の患者
- (8) 妊娠中または妊娠の可能性のある患者
- (9) 心筋梗塞・狭心症・脳卒中・閉塞性動脈硬化症(ASO)の既往があるか、これらを治療中の患者
- (10) 重篤な外傷や重症感染症を有する患者
- (11) 手術前あるいは手術後3ヶ月以内の患者
- (12) 重篤な肝障害(AST and/or ALT>100U)を有する患者
- (13) 薬物療法にもかかわらず血圧コントロール不良(収縮期血圧 200mmHg 以上または拡張期血圧 120mmHg 以上)の場合

(14)腎実質性高血圧以外の2次性高血圧の疑いがある場合

(15)その他医師が不相当と認めたもの

5.3 個々の被験者の中止基準

下記の理由により試験治療の継続が不可能となった場合、担当医師は試験治療を中止し、中止日および中止理由を記録するとともに、データセンターに中止を報告する。

(1) 重篤な大血管症または重篤な細小血管症（失明，人工透析等）の発現

(2) その他の重篤な疾患の併発

(3) 有害事象の発現により継続困難

(4) 症状悪化により継続困難

(5) 患者からの申し出

(6) 死亡

(7) その他、担当医師が試験継続を困難と判断した場合

6. 試験治療

治療に関しては、各群とも生活習慣（減量，食事，運動，禁煙），血糖，血圧を以下のようにコントロールする。なお，薬物療法によって血糖，血圧，脂質をコントロールする場合は各薬剤の添付文書を確認し，「禁忌」にあたる被験者には当該薬剤を使用しないように注意する。

6.1 生活習慣に対する指導

6.1.1 減量

各群，BMIの目標値を25以下とする。各群とも，体重が標準体重未満に達していればその値を維持する。また，糖尿病性腎症を合併している場合は，糖尿病性腎症の食事基準に従って目標体重を達成するようにする。

6.1.2 食事

各群，糖尿病診療ガイドラインに従って総エネルギー摂取量を指導する。また，適宜減塩を指導する。食事は日本糖尿病学会編「糖尿病食事療法のための食品交換表（第6版）」を用いて指導する。また，両群とも，糖尿病性腎症を合併する被験者に対しては日本糖尿病学会編「糖尿病治療ガイド」に従って蛋白制限食を摂取するように指導する。

6.1.3 運動

各群，糖尿病診療ガイドラインに従って運動療法を指導する。

6.2 血糖値の管理

HbA_{1c}の目標値をA, B群では5.8%未満, C, D群では6.5%未満とし, 原則として月に1回以上通院することとする。通院による治療で目標値に達しない場合は, 入院での治療も考慮する。

使用する薬剤については, 以下の通りで, 各薬剤の使用については, α -GI 薬若しくはグリニドを使用し, HbA_{1c}が目標値に達しない場合, SU薬/BG薬の一方若しくは両方を用いる。この治療においても, 目標値に達しない場合, チアゾリジン誘導体を追加するものとする。上記治療で目標値に達しない場合は, インスリン療法の導入を検討する。以上の薬剤使用を原則とするが, 最終的には担当医師の判断に委ねるものとする。

- (1) SU薬: アマリール(グリメピリド), オイグルコン/ダオニール(グリベンクラミド), グリミクロン(グリクラジド)
- (2) BG薬: メルビン(塩酸メトホルミン)
- (3) α -GI薬: グルコバイ(アカルボース), ベイスン(ボグリボース)
- (4) グリニド: スターシス/ファスティック(ナテグリニド), グルファスト(ミチグリニド)
- (5) チアゾリジン誘導体: アクトス(塩酸ピオグリタゾン)

6.3 血圧の管理

降圧目標をA, C群では120/80 mmHg未満, B, D群では130/80 mmHgとし, 原則として月に1回以上通院することとする。

使用する薬剤については, 以下の通りで, 各薬剤の使用については, ARB若しくはACIを使用し, 目標値に達しない場合, Ca拮抗薬を用いる。上記治療で目標値に達しない場合は, 降圧利尿薬, β 遮断薬, α 遮断薬の順に適宜追加する。以上の薬剤使用を原則とするが, 最終的には担当医師の判断に委ねるものとする。

- (1) ARB: プロプレス(カンデサルタンシレキセチル), ディオバン(バルサルタン), オルメテック(オルメサルタンメドキシミル)
- (2) ACI: レニベース(マレイン酸エナラプリル)
- (3) Ca拮抗薬: アダラートCR(ニフェジピン), コニール(塩酸ベニジピン)

6.4 脂質の管理

いずれの群も中性脂肪150mg/dl未満, HDL-C 40mg/dl以上, LDL-C 120mg/dl未満を目標とし, 目標値に達しない場合, スタチンを用いる。

- (1) スタチン: メバロチン(プラバスタチン), リパロ(ピタバスタチン)

7. 観察・評価スケジュール

表1に観察・評価スケジュールを示した。

7.1 データセンターへの報告

被験者に大血管症または細小血管症が発現した場合は, その疾患名, 所見, 発現日, 糖尿病との

因果関係をデータセンターに報告する。

7.2 データセンターからの確認

データセンターは、各群に割付けた被験者の体重、HbA_{1c}、血圧、脂質の状況を6ヶ月ごとに問い合わせ、各目標値を達成しているかどうかを確認する。目標値を達成していない場合は、目標値を達成するように促す。

8. 有効性の評価

8.1 主要評価項目

以下の(1), (2), (3)を主要評価項目とする。

- (1) 網膜病変の発症・進展状態
- (2) 頸動脈肥厚度
- (3) 脳・心血管系イベントの発症の有無

8.2 副次評価項目

以下の(1), (2)を副次評価項目とする。

- (1) 腎症の発症・進展状態
- (2) 神経障害の発症・進展状態

8.3 評価内容・イベント診断基準

- (1) 網膜病変の発症・進展：国際分類に準じて網膜症重症度分類を
網膜症なし
軽症ー中等度非増殖網膜症
重症非増殖網膜症
増殖網膜症

の4段階に分類し、

- a. 網膜症なしから軽症ー中等度非増殖網膜症への進展
- b. 軽症ー中等度非増殖網膜症から重症非増殖網膜症への進展
- c. 重症非増殖性網膜症から増殖網膜症への進展

のいずれかがおこったことを確認できたものとする。

さらに、

- ① 黄斑部網膜浮腫に対する血糖、血圧管理の効果を検討すべく、OCTにより網膜厚の変化の測定(網膜浮腫に対する効果)、ハンフリー視野計による網膜中心部の感度の評価を行う。
- ② 眼底写真による網膜動脈硬化症の所見(網膜動静脈交叉現象、網膜動脈の径不同、血管反射亢進等)と大血管症との関連について検討する。

- (2) 頸動脈肥厚度：頸動脈中内膜の最大肥厚部位測定を行い、全経過を通してその変化を評価する。
- (3) 狭心症：心筋梗塞の疑診または狭心症の診断のもとに、心インターベンションあるいは、それ以外の治療のために入院を必要としたもの
- (4) 心筋梗塞：急性心筋梗塞が疑われる症状を有し、心電図若しくは心逸脱酵素等により診断されたものを確定診断とし、確定診断のもとに心インターベンションが行われたものは、心筋梗塞として取り扱う。
- (5) 脳梗塞：24 時間以上持続する神経学的症状を有し、CT 若しくは MRI 等により梗塞巣が確認されたもの、若しくは発症から 24 時間以内の死亡であっても CT 若しくは MRI 等により梗塞巣が確認されたものを確定診断とする。
- (6) 脳出血：24 時間以上持続する神経学的症状を有し、CT 若しくは MRI 等により出血部位が確認されたもの、若しくは発症から 24 時間以内の死亡であっても CT 若しくは MRI 等により出血部位が確認されたものを確定診断とする。
- (7) 腎症の発症・進展状態：随時尿中アルブミン（尿中クレアチニン 1g あたりの排出量とする）を
 正常（尿中アルブミン 30mg/g クレアチニン未満）
 微量アルブミン尿（尿中アルブミン 30 以上 300mg/g クレアチニン未満）
 顕性アルブミン尿（尿中アルブミン 300mg/g クレアチニン以上）
 の 3 段階に分類し、3 ヶ月以内に行った 2 回の検査にて
 d. 正常から微量または顕性アルブミン尿への進展
 e. 微量アルブミン尿から顕性アルブミン尿への進展
 f. 血清クレアチニン値が登録時の 2 倍以上、若しくは 2.0mg/dl 以上に上昇
 のいずれかがおこったことを確認できたものとする。
- (8) 神経障害の発症・進展状態：糖尿病が存在し、糖尿病性神経障害以外の末梢神経障害を否定できるものの中で、以下の 3 項目のうち 2 項目以上を認めた場合とし、全経過を通して発症状態を評価する。
 a. 糖尿病性神経障害に基づくものと思われる自覚症状
 b. 両側アキレス腱反射の低下あるいは消失
 c. 両側内踝の振動覚低下 (128 音叉にて 10 秒未満)
 また、R-R CV 値についても評価する。

9. 安全性の評価

9.1 用語の定義

本試験では、「有害事象」「副作用」を以下のように定義する。

① 有害事象

試験治療を受けた後に生じた好ましくない（または意図しない）症状および徴候（臨床検査値の異常を含む）のすべてを指し、試験治療との因果関係の有無は問わない。すなわち、たとえ試験治

療との因果関係が否定できるとしても、試験治療を受けた被験者に生じた好ましくない症状および徴候は、すべて「有害事象」として記録する。

② 副作用

試験治療を受けた後に生じた好ましくない（または意図しない）症状および徴候（臨床検査値の異常を含む）のうち、試験治療との因果関係が否定できないものを指す。すなわち、上記で定義した「有害事象」のうち、試験治療との因果関係を完全には否定できないものを副作用として扱う。

9.2 有害事象の収集

試験中、担当医師は有害事象を収集し、有害事象が発現した場合、データセンターへその内容を報告する。

10. 倫理

10.1 倫理基準の遵守

本試験は、ヘルシンキ宣言、「臨床研究に関する倫理指針（平成 15 年厚生労働省告示第 255 号）」及びこれに関連する通知（平成 15 年 7 月 30 日付医政発第 0730009 号，平成 16 年 12 月 28 日医政発第 1228001 号）に従って実施する。本試験に関係するすべての研究者は、上記の倫理基準を遵守する責務を負う。

10.2 審査委員会

本試験の実施に先立ち、実施医療機関の審査委員会（医療機関が小規模であるなどの事由により当該医療機関に審査委員会を設置できない場合は、他の医療機関の長と共同で設置した審査委員会または民法第 34 条の規定に従った公益法人が設置した審査委員会）は本臨床試験の倫理的および科学的妥当性を審査する。本試験は、審査委員会の承認を得た後に実施する。

審査委員会の審議結果が「修正の上で承認する」であった場合は、審議結果に基づいて実施計画書または症例報告書、同意説明文書等を修正した後、本試験を実施する。

10.3 被験者の同意

試験担当医師は、被験者が本試験に参加する前に以下の内容を説明する。

- ① 試験への参加は任意であること、試験参加に同意しない場合でも、いかなる不利益も受けないこと
- ② 被験者はいつでも同意を撤回でき、同意の撤回によっていかなる不利益も受けないこと
- ③ 本試験の内容（本試験を実施する理由、試験の目的、試験治療の内容、試験期間）
- ④ 本試験に参加することによって期待される利益（注：推定する試験治療の「効果」を説明するのではない）
- ⑤ 本試験への参加によって生ずる可能性のある不利益または不便、予想される有害事象の内容とそ

れらが生じた場合の対処法

- ⑥ 被験者が希望する場合、他の被験者の個人情報保護や本試験の独創性の確保に支障がない範囲内で、試験計画等の資料を入手または閲覧できること
- ⑦ 本試験に参加しない場合の治療方法
- ⑧ 個人情報の取扱い、個人情報の提供先
個人情報の守秘に最大の努力が払われること。ただし、試験期間内は継続的に情報を収集するため、被験者個人を正確に特定できるよう個人情報（イニシャル、カルテ番号）を用いること。個人情報は当該医療機関のほかにはデータセンターのみに伝えられること。被験者が転院した場合、転院先にデータセンターが連絡し、被験者本人から再度同意を得たうえで、診療情報を集める可能性があること。被験者を特定できないようにしたうえで、本試験の成果が公表されること。
- ⑨ 治療にかかる費用は保険制度でまかなわれ、健康被害が生じた場合の補償は一般診療の場合と同様であることの説明。
- ⑩ 研究者等の氏名および職名

以上の内容を説明し、被験者に予定するものが試験の内容等を理解したことを確認したうえで、本試験参加の可否を打診する。試験参加に同意した場合は、本計画書とは別に用意する同意説明文書（または、用意した文書を基に個々の医療機関が改変し、当該医療機関の倫理審査員委員会が承認した同意説明文書）を用いて、被験者本人から文書で同意を取得する。同意書には、説明をした医師名、同意した被験者の氏名、住所、電話番号、同意年月日を記載し、被験者および医師の両者が署名する。

同意文書は3部コピーし、1部は被験者本人、1部は医療機関が保管する。残る1部はデータセンターに郵送する。原本はカルテに保管する。

11. プライバシー保護と被験者識別

データセンターは、被験者の登録時に当該被験者の氏名、住所等の個人情報が医療機関から知らされる。しかし、登録後のデータセンターから各医療機関への照会には、登録時に発行する登録番号、生年月日、カルテ番号を使用し、第三者が通信内容を傍受した場合でも直接被験者を識別できないように配慮する。

カルテ番号を用いる以上、個人情報漏洩の危険は常に存在するが、カルテ番号を用いないと、被験者の同定が医療機関側の個人情報管理に依存することになる。追跡期間が長期に亘り、転院または転居が生ずる可能性のある本試験の場合、医療機関の個人情報管理のみに頼ると被験者の同定が不可能となる危険性がある。追跡不能になる被験者数が増えれば、試験結果の信頼性が損なわれ、政策に反映することが困難になる。

以上から、本試験では個人を特定できる情報をデータセンターが扱うこととする。ただし、すべての研究者は個人情報の取扱いに配慮するとともに、被験者にも個人情報の取扱いの範囲と内容を

表 1. 観察・評価スケジュールの概要

内科的調査項目の観察・評価スケジュール

	登録時	定期来院時 ¹⁾	6ヶ月	12ヶ月	18ヶ月	24ヶ月
身長	○					
臍周囲径	○		○	○	○	○
体重	○	○	○	○	○	○
血圧, 脈拍	○	○	○	○	○	○
空腹時血糖, HbA _{1c}	○	○	○	○	○	○
空腹時インスリン	○		○	○	○	○
空腹時C-ペプチド	○		○	○	○	○
hs-CRP	○		○	○	○	○
アゾイボネクチン(HMW)	○		○	○	○	○
IL-6	○		○	○	○	○
ヘモグラム, 総コレステロール, LDL-C ²⁾ , HDL-C, 中性脂肪	○	○	○	○	○	○
AST, ALT, γ-GTP, Cr, BUN, CPK	○	○	○	○	○	○
尿中アルブミン ³⁾ (または尿中蛋白)..	○	(○) ⁴⁾	○	○	○	○
尿中8-OHdG						
心電図, R-R CV 値, ABI, PWV	○		○	○	○	○
胸部X線	○		○	○	○	○
頸部超音波検査	○		○	○	○	○
Cer, アキレス腱反射検査, 音叉検査	○		○	○	○	○

¹⁾ 被験者の通院スケジュールにあわせて, 全試験期間を通して定期的に測定する.

²⁾ 直接法にて測定する.

³⁾ 随時尿での尿中クレアチニン1g当たりの排出量.

⁴⁾ 腎症イベント発生時には3ヶ月以内に再検査で確認する(10.3節参照).

.....の検査項目については, 6ヶ月, 18ヶ月はサンプルストックのみ.

眼科的調査項目の観察・評価スケジュール

	登録時	定期来院時 ^{*1}	6ヶ月	12ヶ月	18ヶ月	24ヶ月
眼底写真撮影 (4+9 方向, 視神経乳頭拡大), 視力	○		○	○	○	○
蛍光眼底造影 (網膜血管・脈絡膜血管) ³	(○)		(○) ^{*2}	○	(○) ^{*2}	○
静的視野計による閾値測定 ^{*4}	(○)		(○) ^{*2}	○	(○) ^{*2}	○
光学的干渉法による網膜断層図(OCT)	○		(○) ^{*2}	○	(○) ^{*2}	○

^{*1} 被験者の通院スケジュールにあわせて, 全試験期間を通して定期的に測定する.

^{*2} 網膜病変の発症・進展を認めた場合

^{*3} Severe な非増殖網膜病変を認めた場合

^{*4} 医師が必要であると判断した場合



Effect of pitavastatin on experimental choroidal neovascularization in rats[☆]

Nina Sagara, Takahiro Kawaji*, Akiomi Takano, Yasuya Inomata, Masaru Inatani, Mikiko Fukushima, Hidenobu Tanihara

Department of Ophthalmology and Visual Science, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, 1-1-1 Honjo, Kumamoto 860-8556, Japan

Received 14 September 2006; accepted in revised form 1 February 2007

Available online 11 February 2007

Abstract

The association between the use of statins and age-related macular degeneration (AMD), a leading cause of blindness, has been evaluated in many clinical studies; however, the results have been contradictory. We evaluated the effect of pitavastatin administration on laser-induced experimental choroidal neovascularization (CNV) in rats. Brown Norway rats received pitavastatin (1.0 mg/kg per day) for 1 day prior to laser-induced CNV and continued to receive the drug for 14 days. Fluorescein angiograms were graded by masked observers. CNV area and thickness were assessed by fluorescein isothiocyanate-labeled dextran angiography and histology, respectively. Vascular endothelial growth factor (VEGF), monocyte chemoattractant protein-1 (Ccl-2; also known as MCP-1), and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mRNA levels were measured using reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time quantitative RT-PCR. Pitavastatin-treated rats had significantly less fluorescence leakage compared with the vehicle-treated rats estimated by CNV score using fluorescein angiography. Both the area and the thickness of CNV in pitavastatin-treated rats were significantly reduced compared with the vehicle-treated rats. Gene expression of VEGF, Ccl-2, and ICAM-1 were significantly decreased by pitavastatin administration in experimental CNV. Thus, we demonstrated that the therapeutic dose of pitavastatin for human hypocholesterolemia effectively suppressed experimental CNV in rats. The use of pitavastatin may be helpful in preventing CNV development in AMD patients.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: choroidal neovascularization; HMG-CoA reductase inhibitor; pitavastatin; age-related macular degeneration

1. Introduction

The exudative form of age-related macular degeneration (AMD) is the major cause of visual loss in well-developed countries (Fine et al., 2000). The main pathological change of the exudative form of AMD is choroidal neovascularization (CNV). An essential element in the growth of CNV is the rupture of Bruch's membrane and the proliferation of blood vessels through breaks in the membrane. However, the

pathogenesis of CNV is not completely understood (Zarbin, 2004).

In recent years, statins, the 3-hydroxy-3-methylglutaryl co-enzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors, have been widely used in the treatment of atherosclerotic diseases and hyperlipidemia (Mahley et al., 1999; Vaughan et al., 2000). In addition to their lipid-lowering properties, statins have been thought to exert an expanded profile of non-lipid-related pleiotropic effects, including improved endothelial function and decreased low-density lipoprotein oxidation, foam cell formation, leukocyte–endothelium interactions, plaque rupture, and smooth muscle cell proliferation (Bellosta et al., 2000; Hess and Fagan, 2001; Takemoto and Liao, 2001). Furthermore, statins have been found to exert both anti-inflammatory and anti-angiogenic effects, which are relevant to vascular disease and may also be relevant in the pathogenesis of AMD (Pruefer

[☆] Supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan from the Ministry of Health and Welfare, Japan.

* Corresponding author. Tel.: +81 96 373 5247; fax: +81 96 373 5249.

E-mail address: kawag@white.plala.or.jp (T. Kawaji).

et al., 1999; Jialal et al., 2001; Kwak et al., 2001). These lipid and non-lipid-related effects are considered to be protective against cardiovascular diseases (Plenge et al., 2002; Wassmann et al., 2003).

Recently, many extensive epidemiological studies have demonstrated that AMD shares a number of overlapping risk factors with atherosclerosis, including age, cigarette smoking, hypertension, obesity, and increased dietary fat intake (Mitchell et al., 1995; Klaver et al., 2001; McCarty et al., 2001; Mitchell et al., 2002). Considering their well-established effectiveness in cardiovascular disease, statins may also be effective in the management of AMD. In recent years, a small cross-sectional survey suggested that statins exert a protective effect in AMD (Hall et al., 2001). However, subsequent studies have produced inconsistent results (McCarty et al., 2001; McGwin et al., 2003; Klein et al., 2003; Wilson et al., 2004; McGwin et al., 2006).

In this study, we evaluated the effect of the administration of pitavastatin (so-called vascular statin), which has a high affinity for vascular endothelium, on experimental CNV created by laser-induced rupture of Bruch's membrane, which stimulates preexisting capillaries to proliferate into new capillary networks, in rats. The murine model of experimental CNV was used because rats are resistant to the hypocholesterolemic effect of statins.

2. Materials and methods

2.1. Experimental CNV model in rats

Six-week-old male Brown Norway (BN) rats (Seac Yoshitomi, Fukuoka, Japan) weighing 120–160 g were used. The animals were handled in accordance with institutional guidelines and the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The BN rats were anesthetized by intramuscular injection of a 1 mL/kg mixture (1:1) of ketamine hydrochloride (Ketalar; Sankyo, Tokyo, Japan) and xylazine hydrochloride (Celactal; Bayer, Tokyo, Japan), and their pupils were dilated with tropicamide (0.5% Mydrin M; Santen Pharmaceutical, Osaka, Japan). Experimental CNV was created as described previously (Takehana et al., 1999). Briefly, four laser photocoagulations were applied to each eye between the major retinal vessels around the optic disk under the following conditions: power 150 mW, wavelength 521 nm, duration 100 ms and spot size 100 μ m. Bruch's membrane was breached, as evidenced clinically by central bubble formation, without intraretinal or choroidal hemorrhage.

2.2. Drug administration

The total 38 BN rats were divided into two groups: pitavastatin-treated ($n = 19$) and vehicle-treated ($n = 19$). Pitavastatin (Livalo, previously known as NK-104) was kindly provided by Kowa (Tokyo, Japan). It was dissolved in 0.5% carboxymethylcellulose (CMC) sodium salt (Wako, Osaka, Japan) and administered at a dose of 1 mg kg⁻¹ day⁻¹ (pitavastatin-treated rats). Control rats (vehicle-treated rats)

received 0.5% CMC vehicle. Oral gavage was performed with a 20-gauge blunt feeding needle for 1 day prior to the laser induction of CNV and continued daily until the rats were killed and evaluated.

2.3. Fluorescein angiography

At day 14 after laser induction of CNV, the laser lesions were studied by fluorescein angiography to evaluate CNV development and its activity. Each rat was injected with 0.5 ml of 10% fluorescein sodium (Fluorescite; Alcon, Tokyo, Japan) intraperitoneally, and fundus angiogram photographs were taken at early and late phases using a scanning laser ophthalmoscope (SLO101; Rodenstock, Germany). The formation of CNV was evaluated according to the size and the presence or absence of dye leakage, as described previously (Takehana et al., 1999; Tanemura et al., 2004). The guideline for CNV scoring was as follows: no leakage (score 0); minimum leakage or a staining of tissue with no leakage (score 1); small but evident leakage less than 1/4 disc area (score 2); large evident leakage (score 3). A typical photograph of each CNV score is shown in Fig. 1. Two examiners judged the scores in a masked fashion. When the two scores given for a particular lesion did not coincide, the higher score was used for the analysis.

2.4. FITC-dextran angiography

Fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran angiography was performed on the rats 14 days after laser induction of CNV by the method described previously (Edelman and Castro, 2000; Semkova et al., 2003), with slight modifications. The rats were deeply anesthetized and perfused with 50 mL phosphate buffered saline (PBS) with 5 mg/mL FITC-labeled dextran (MW 2×10^6 ; Sigma, St Louis, MO, USA) via the left ventricle through a 12-gauge cannula. The animals were sacrificed, and the eyes were enucleated and fixed in 4% paraformaldehyde for 5 h. Retinal pigment epithelium (RPE)-choroid-sclera flat mounts were obtained by hemisectioning the eye and peeling the neural retina away from the eyecup. The flat mounts were laid flat onto a microscope slide with the RPE facing up. All flat mounts described here and later were examined with a fluorescence microscope (BX51; OLYMPUS, Tokyo, Japan) using FITC filters. The images of the laser lesions (= CNV area) were measured with computer-assisted image-analysis software (Lumina Vision; Mitani Corporation, Fukui, Japan).

2.5. Histopathologic studies

Histopathologic studies were performed on eyes from pitavastatin-treated rats and vehicle-treated rats at day 14 after laser induction of CNV. The rats were killed with an overdose of sodium pentobarbital. The eyes were enucleated and immersed overnight in PBS containing 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde. The retina-choroid-sclera were dehydrated and embedded in paraffin. Serial sections of 6- μ m thickness were cut to determine the center of each lesion and stained

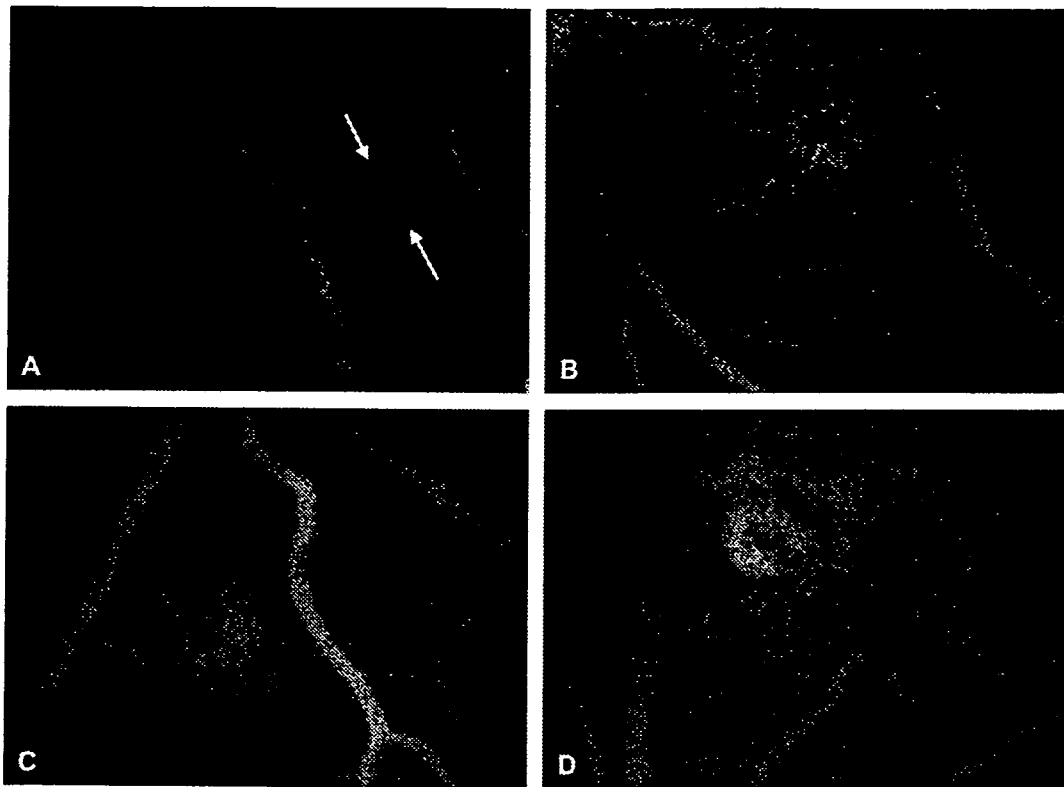


Fig. 1. Typical examples of each CNV score in the fluorescein angiogram after laser-induced CNV in rat retina. Each laser spot was scored from 0 to 3 according to the size and the presence or absence of dye leakage on the early and late phase angiogram photographs. The guideline for the CNV scoring was as follows: (A) no leakage (score 0); (B) minimum leakage or a staining of tissue with no leakage (score 1); (C) small but evident leakage less than 1/4 disc area (score 2); (D) large evident leakage (score 3).

with hematoxylin and eosin (H&E) for light microscopy. Subsequent measurements were performed by examining stained sections under a microscope (BX51; OLYMPUS, Tokyo, Japan). The maximum CNV thickness, from the bottom of the pigmented choroidal layer to the top of the neovascular membrane, was measured using the middle section of each lesion of each eye.

2.6. RT-PCR and real-time quantitative RT-PCR

Five eyes from five rats each in the vehicle-treated and pita-
vastatin-treated groups were obtained to evaluate the angiogenic and inflammatory mechanism in the laser-induced CNV model, including the mRNA levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), monocyte chemoattractant protein-1 (Ccl-2; also known as MCP-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). Total RNA was isolated from the retina-RPE-choroid-sclera 3 days after laser photocoagulation using the SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol. To remove genomic DNA, the total RNA preparation was treated with DNase I (Promega, Tokyo, Japan). Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed with 10 ng of total RNA on a 9800 Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and Taqman Gene Expression assays (Applied Biosystems) to check

expression of mRNAs for rat VEGF, Ccl-2, ICAM-1 and actin beta (Actb). The assay IDs are as follows: VEGF assay ID, Rn 00582395_m1; Ccl-2 assay ID, Rn 00580555_m1; ICAM-1 Assay ID, Rn 005642227_m1; and Actb Assay ID, Rn00667869_m1. Although these sequences of commercially available primers were undocumented, these primers were designed for spanning between exon 2 and exon 3 so that cDNA fragments were easily distinguishable from genomic fragments. Total RNA was reverse transcribed into cDNA by one cycle at 50 °C for 30 min and one cycle at 95 °C for 10 min. The cDNA was amplified for 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Ten micro liter samples of these PCR products were applied to a 3% agarose gel, electrophoresed, stained with ethidium bromide, and photographed.

In addition, real-time quantitative RT-PCR was performed with 10 ng of total RNA on an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using the SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq and Taqman Gene Expression assays, to quantify the mRNAs for rat VEGF, Ccl-2, ICAM-1, and Actb. Total RNA was reverse transcribed into cDNA under the same conditions as the RT-PCR. The cDNA was amplified for 50 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Specificity of amplification products was confirmed by conducting a melting curve of the samples after each run. The threshold cycle of fluorescence units was evaluated to quantify the amount of each mRNA. VEGF, Ccl-2, and ICAM-1 mRNA levels were normalized by the Actb mRNA level.

2.7. Statistical analysis

All results are expressed as mean \pm standard error (SE). The statistical significance of CNV score, CNV area, and CNV thickness was determined using an unpaired *t*-test. VEGF, Ccl-2, and ICAM-1 mRNA levels were statistically analyzed using the Mann–Whitney *U*-test. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Fluorescein angiography

Laser spots in each vehicle-treated rat ($n = 8$) and pitavastatin-treated rat ($n = 8$) were applied and scored as follows: score 0, 1 spot, 5 spots; score 1, 14 spots, 22 spots; score 2, 19 spots, 18 spots; score 3, 11 spots, 0 spot (Fig. 2A). As shown in Fig. 2B, the mean CNV scores in pitavastatin-treated and vehicle-treated rats were 1.29 ± 0.09 and 1.89 ± 0.12 , respectively. There was a statistically significant difference between these two groups ($P < 0.05$, unpaired *t*-test).

3.2. FITC-dextran angiography

In the current study, FITC-dextran was used to label the blood vessel lumen, and RPE-choroid-sclera flat mounts were examined by fluorescence microscopy to follow experimental CNV 14 days after laser photocoagulation. Fig. 3A,B show fluorescent images of CNV in laser lesions in RPE-choroid-sclera flat mounts from vehicle-treated (3A) and pitavastatin-treated (3B) rats. CNV appeared as a network of broad, flat microvessels, reminiscent of choriocapillaries that spanned a circular area approximately 300 μm in diameter. The mean CNV area in pitavastatin-treated rats ($n = 11$, $29.5 \pm 2.85 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) was significantly smaller than that in vehicle-treated rats ($n = 11$, $41.2 \pm 2.48 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) ($P < 0.05$, unpaired *t*-test) (Fig. 3C).

3.3. Histopathologic studies

Fig. 4A,B show representative H&E-stained sections from CNV lesions 14 days after laser photocoagulation. In the laser lesions, multilayered fusiform proliferative membranes were seen in the central area of the lesion underlying the RPE to the choroid, and blood vessels with red blood cells were also seen. The thickness of CNV lesions in pitavastatin-treated rats ($n = 3$, $73.4 \pm 15.4 \mu\text{m}$) was significantly thinner than that in vehicle-treated rats ($n = 3$, $114.2 \pm 8.1 \mu\text{m}$) ($P < 0.05$, unpaired *t*-test) (Fig. 4C).

3.4. RT-PCR and real-time quantitative RT-PCR

To investigate the mechanism of the inhibitory effect of pitavastatin on experimental CNV, we performed RT-PCR and real-time quantitative RT-PCR (Fig. 5). RT-PCR revealed that VEGF, Ccl-2, and ICAM-1 mRNA levels in pitavastatin-treated rats were lower than those in vehicle-treated rats (Fig. 5A). Furthermore, real-time quantitative RT-PCR analysis revealed that VEGF, Ccl-2, and ICAM-1 mRNA levels in pitavastatin-treated rats were significantly lower than those in vehicle-treated rats ($P < 0.05$, Mann–Whitney *U*-test) (Fig. 5B–D). The expression rate of Actb almost unchanged in pitavastatin-treated rats similar to vehicle-treated rats.

4. Discussion

In the present study, we demonstrated that the therapeutic dose of pitavastatin for human hypocholesterolemia effectively suppressed experimental CNV in rats. The pitavastatin-treated group had significantly less fluorescence leakage compared with the vehicle-treated group on fluorescein angiography. The area of CNV measured by FITC-dextran angiography in the pitavastatin-treated group was also significantly smaller than that in the vehicle-treated group. In addition, through histopathologic studies we showed that

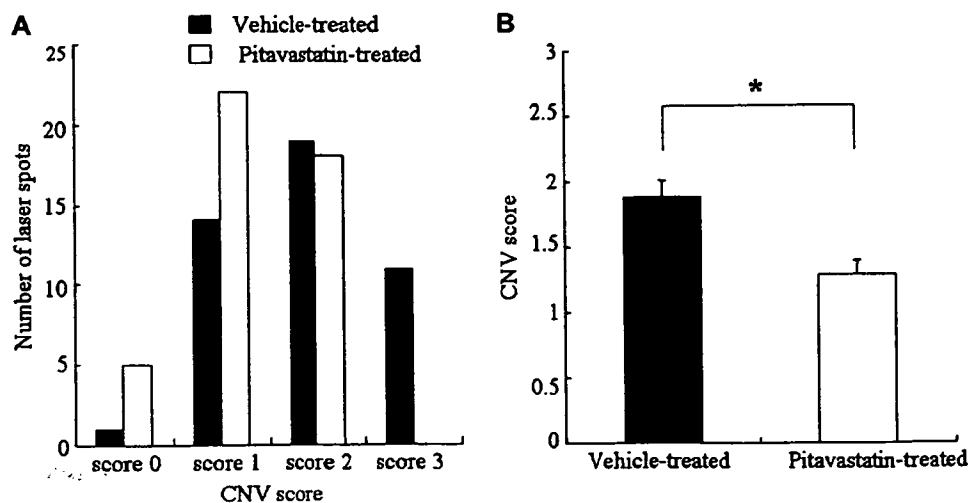


Fig. 2. Effect of pitavastatin on CNV score 14 days after laser-induced CNV in rat retina. Number of laser lesions of each 0–3 CNV scores in vehicle-treated and pitavastatin-treated rats (A). The mean CNV score in vehicle-treated and pitavastatin-treated rats (B). *, $P < 0.05$ compared with vehicle-treated.

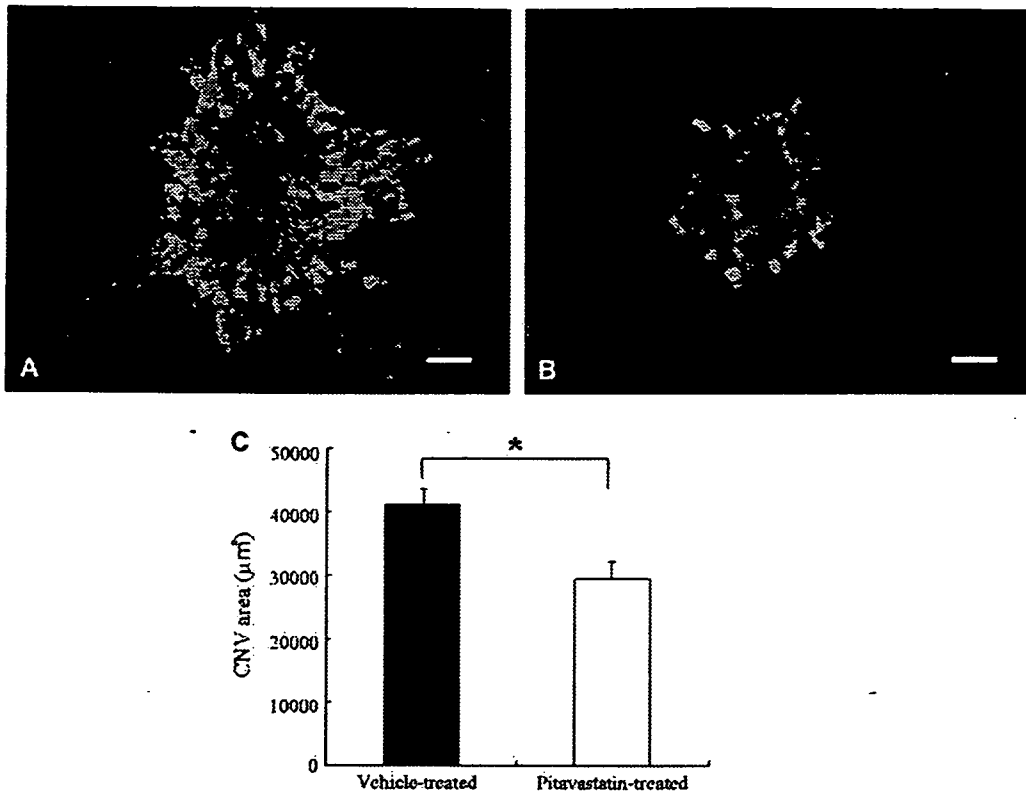


Fig. 3. Effect of pitavastatin on CNV area 14 days after laser-induced CNV in rat retina. CNV is described with green fluorescence by FITC-dextran angiography in vehicle-treated rats (A) and in pitavastatin-treated rats (B). Computer image analysis of CNV area in pitavastatin-treated rats was significantly smaller than the area in vehicle-treated rats (C). Scale bar = 100 µm (A and B). *, $P < 0.05$ compared with vehicle-treated.

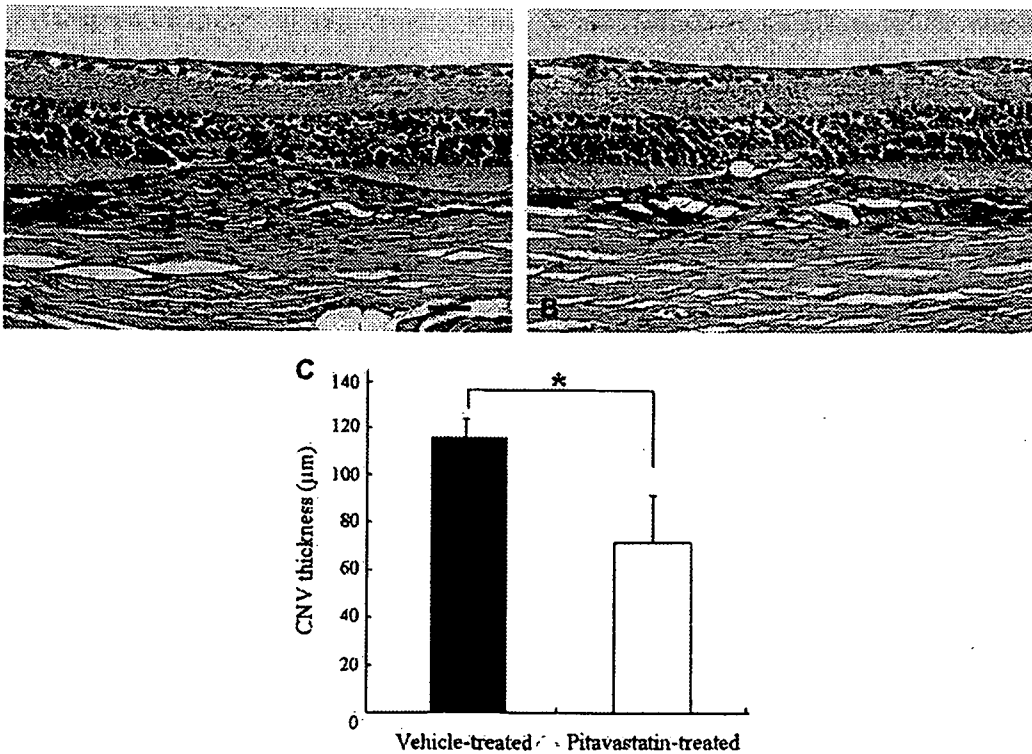


Fig. 4. Effect of pitavastatin on CNV thickness 14 days after laser-induced CNV in rat retina. Light micrographs of Hematoxylin and Eosin stained sections of the CNV lesions in vehicle-treated rats (A) and pitavastatin-treated rats (B) 14 days after laser photocoagulations. Computer image analysis of CNV thickness in pitavastatin-treated rats was significantly thinner than that in vehicle-treated rats (C). Scale bar = 100 µm (A and B). *, $P < 0.05$ compared with vehicle-treated.

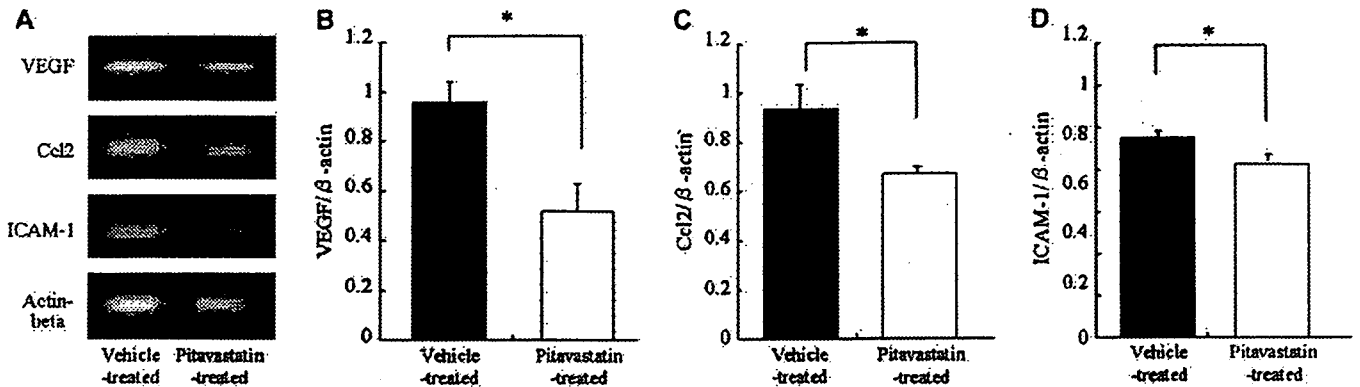


Fig. 5. Effect of pitavastatin on expression of VEGF, Ccl-2, and ICAM-1 mRNA 3 days after laser-induced CNV. RT-PCR analysis showed that VEGF, Ccl-2, and ICAM-1 mRNA expressions in pitavastatin-treated rats were lower than those in vehicle-treated rats (A). Real-time quantitative RT-PCR analysis revealed that VEGF, Ccl-2, and ICAM-1 mRNA levels in pitavastatin-treated rats were significantly decreased than those in vehicle-treated rats (B,C and D). *, $P < 0.05$ compared with vehicle-treated.

the CNV lesions in pitavastatin-treated rats were thinner than those in vehicle-treated rats. These data suggest that pitavastatin reduced the formation and development of experimental CNV. Furthermore, we present the first in vivo evidence that gene expression of VEGF, Ccl-2, and ICAM-1, which are important factors in the pathogenesis of AMD, was significantly decreased, suggesting that part of the mechanism of experimental CNV in rats is independent of the cholesterol-lowering effects of pitavastatin.

The etiology of AMD is obscure and the pathogenic pathways mediating the development of CNV are not understood. AMD and atherosclerosis have been shown to share a number of risk factors (Delcourt et al., 2001), leading to suggestions that they may have similar etiologies. The association between the use of statins and AMD has been evaluated in many clinical studies; however, the results have been contradictory (Hall et al., 2001; McCarty et al., 2001; McGwin et al., 2003; Klein et al., 2003; Wilson et al., 2004; McGwin et al., 2006). Moreover, the known pharmacodynamics of statins, such as their anti-inflammatory and anti-angiogenic effects, raises some possible mechanisms through which they may exert a protective effect in AMD.

Expression of VEGF has been demonstrated in surgically removed CNV tissues (Kvanta et al., 1996; Lopez et al., 1996) and in experimental CNV (Yi et al., 1997; Shen et al., 1998). It is well known that VEGF is the major stimulator in angiogenesis and has been shown to be correlated with the amount of inflammatory cells in CNV from AMD patients (Kvanta et al., 1996). The available in vitro data suggest that statins promote angiogenesis at lower doses, while under certain conditions some statins have the opposite effect (Urbich et al., 2002; Weis et al., 2002; Frick et al., 2003). Recently, it has been reported that therapeutic doses of pitavastatin reduced the incidence of CNV formation, but on increasing the dosage by 100-fold may exacerbate CNV leakage in experimental CNV in mice. However, retinal VEGF lysate levels did not mirror the changes in fluorescein leakage and CNV area on histological examination, suggesting a VEGF-independent mechanism for the statin effect (Zambarakji et al., 2006). In

addition, we showed that therapeutic doses of pitavastatin not only reduced the incidence of CNV formation in rats but also suppressed VEGF gene expression, although we did not measure the retinal VEGF protein levels. VEGF synthesis has been shown to depend on the conditions under investigation, and the effects on VEGF were not paralleled by the angiogenic activity of endothelial cells (Frick et al., 2003).

It is well known that macrophages may play a role in the pathogenesis of AMD. Ccl-2 (also known as MCP1) is one of the most potent macrophage-recruiting molecules and is considered to be associated with the progression of CNV (Grossniklaus et al., 2002; Ambati et al., 2003). In addition, ICAM-1, which is involved in leukocyte endothelial adhesion and leukocyte migration through its receptor lymphocyte function associated antigen-1 (Mesri et al., 1994), has been proposed to be involved in the experimental CNV model (Shen et al., 1998; Sakurai et al., 2003). It has been reported that statins inhibit the expression in vitro and in vivo production of Ccl-2 (Romano et al., 2000), and leukocyte-endothelial interaction by blocking P-selectin and ICAM-1 in an ischemia-reperfusion injury model (Honjo et al., 2002). In this study, we demonstrated that pitavastatin effectively reduces gene expression of VEGF, Ccl-2, and ICAM-1 in an experimental CNV model in rats. Although we did not fully study the complex molecular mechanisms of the observed effect of pitavastatin on experimental CNV, it is possible that pitavastatin may attenuate experimental CNV development in rats through both anti-angiogenic and anti-inflammatory effects, independent of the lipid-lowering effect. Furthermore, pitavastatin (so-called vascular statin) has a high affinity for vascular endothelium. This high affinity might have had an effective on the experimental CNV.

Current treatment options for AMD are limited and to date have had little impact on the rate of blindness. Prevention of CNV formation may be important in maintaining visual function. Current preventive advice includes a suggestion for not to smoke, and possibly information regarding various supplementations; however, further preventive strategies are needed. Our data suggest that the use of pitavastatin could be helpful in

preventing CNV development in AMD patients. Furthermore, a prospective randomized controlled trial is needed to definitively address the question of statins and AMD.

References

- Ambati, J., Anand, A., Fernandez, S., Sakurai, E., Lynn, B.C., Kuziel, W.A., Rollins, B.J., Ambati, B.K., 2003. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat. Med.* 9, 1390–1397.
- Bellosta, S., Ferri, N., Bernini, F., Paoletti, R., Corsini, A., 2000. Non-lipid-related effects of statins. *Ann. Med.* 32, 164–176.
- Delcourt, C., Michel, F., Colvez, A., Lacroux, A., Delage, M., Vernet, M.H., 2001. Associations of cardiovascular disease and its risk factors with age-related macular degeneration: the POLA study. *Ophthalmic Epidemiol.* 8, 237–249.
- Edelman, J.L., Castro, M.R., 2000. Quantitative image analysis of laser-induced choroidal neovascularization in rat. *Exp. Eye Res.* 71, 523–533.
- Fine, S.L., Berger, J.W., Maguire, M.G., Ho, A.C., 2000. Age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 342, 483–492.
- Frick, M., Dulak, J., Cisowski, J., Jozkowicz, A., Zwick, R., Alber, H., Dichtl, W., Schwarzwacher, S.P., Pachinger, O., Weidinger, F., 2003. Statins differentially regulate vascular endothelial growth factor synthesis in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 170, 229–236.
- Grossniklaus, H.E., Ling, J.X., Wallace, T.M., Dithmar, S., Lawson, D.H., Cohen, C., Elner, V.M., Elner, S.G., Sternberg Jr., P., 2002. Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Mol. Vis.* 8, 119–126.
- Hall, N.F., Gale, C.R., Syddall, H., Phillips, D.I., Martyn, C.N., 2001. Risk of macular degeneration in users of statins: cross sectional study. *BMJ* 323, 375–376.
- Hess, D.C., Fagan, S.C., 2001. Pharmacology and clinical experience with simvastatin. *Expert Opin. Pharmacother.* 2, 153–163.
- Honjo, M., Tanihara, H., Nishijima, K., Kiryu, J., Honda, Y., Yue, B.Y., Sawamura, T., 2002. Statin inhibits leukocyte–endothelial interaction and prevents neuronal death induced by ischemia-reperfusion injury in the rat retina. *Arch. Ophthalmol.* 120, 1707–1713.
- Jialal, I., Stein, D., Balis, D., Grundy, S.M., Adams-Huet, B., Devaraj, S., 2001. Effect of hydroxymethyl glutaryl coenzyme a reductase inhibitor therapy on high sensitive C-reactive protein levels. *Circulation* 103, 1933–1935.
- Klaver, C.C., Assink, J.J., van Leeuwen, R., Wolfs, R.C., Vingerling, J.R., Stijnen, T., Hofman, A., de Jong, P.T., 2001. Incidence and progression rates of age-related maculopathy: the Rotterdam Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 2237–2241.
- Klein, R., Klein, B.E., Tomany, S.C., Danforth, L.G., Cruickshanks, K.J., 2003. Relation of statin use to the 5-year incidence and progression of age-related maculopathy. *Arch. Ophthalmol.* 121, 1151–1155.
- Kvanta, A., Algever, P.V., Berglin, L., Seregard, S., 1996. Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 1929–1934.
- Kwak, B., Mulhaupt, F., Veillard, N., Pelli, G., Mach, F., 2001. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits IFN-gamma induced MHC class II expression in human vascular endothelial cells. *Swiss. Med. Wkly.* 131, 41–46.
- Lopez, P.F., Sippy, B.D., Lambert, H.M., Thach, A.B., Hinton, D.R., 1996. Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 855–868.
- Mahley, R.W., Huang, Y., Rall Jr., S.C., 1999. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *J. Lipid Res.* 40, 1933–1949.
- McCarty, C.A., Mukesh, B.N., Fu, C.L., Mitchell, P., Wang, J.J., Taylor, H.R., 2001. Risk factors for age-related maculopathy: the Visual Impairment Project. *Arch. Ophthalmol.* 119, 1455–1462.
- McGwin Jr., G., Modjarrad, K., Hall, T.A., Xie, A., Owsley, C., 2006. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors and the presence of age-related macular degeneration in the Cardiovascular Health Study. *Arch. Ophthalmol.* 124, 33–37.
- McGwin Jr., G., Owsley, C., Curcio, C.A., Crain, R.J., 2003. The association between statin use and age related maculopathy. *Br. J. Ophthalmol.* 87, 1121–1125.
- Mesri, M., Liversidge, J., Forrester, J.V., 1994. ICAM-1/LFA-1 interactions in T-lymphocyte activation and adhesion to cells of the blood–retina barrier in the rat. *Immunology* 83, 52–57.
- Mitchell, P., Smith, W., Attebo, K., Wang, J.J., 1995. Prevalence of age-related maculopathy in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 102, 1450–1460.
- Mitchell, P., Wang, J.J., Smith, W., Leeder, S.R., 2002. Smoking and the 5-year incidence of age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Arch. Ophthalmol.* 120, 1357–1363.
- Plenge, J.K., Hernandez, T.L., Weil, K.M., Poirier, P., Grunwald, G.K., Marcovina, S.M., Eckel, R.H., 2002. Simvastatin lowers C-reactive protein within 14 days: an effect independent of low-density lipoprotein cholesterol reduction. *Circulation* 106, 1447–1452.
- Pruefer, D., Scalia, R., Lefer, A.M., 1999. Simvastatin inhibits leukocyte–endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normocholesterolemic rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 2894–2900.
- Romano, M., Diomedea, L., Sironi, M., Massimiliano, L., Sotocorno, M., Polentarutti, N., Guglielmotti, A., Albani, D., Bruno, A., Fruscella, P., Salmons, M., Vecchi, A., Pinza, M., Mantovani, A., 2000. Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins. *Lab. Invest.* 80, 1095–1100.
- Sakurai, E., Taguchi, H., Anand, A., Ambati, B.K., Gragoudas, E.S., Miller, J.W., Adamis, A.P., Ambati, J., 2003. Targeted disruption of the CD18 or ICAM-1 gene inhibits choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 2743–2749.
- Semkova, I., Peters, S., Welsandt, G., Janicki, H., Jordan, J., Schraermeyer, U., 2003. Investigation of laser-induced choroidal neovascularization in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 5349–5354.
- Shen, W.Y., Yu, M.J., Barry, C.J., Constable, I.J., Rakoczy, P.E., 1998. Expression of cell adhesion molecules and vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularisation in the rat. *Br. J. Ophthalmol.* 82, 1063–1071.
- Takehana, Y., Kurokawa, T., Kitamura, T., Tsukahara, Y., Akahane, S., Kitazawa, M., Yoshimura, N., 1999. Suppression of laser-induced choroidal neovascularization by oral ranilast in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 459–466.
- Takemoto, M., Liao, J.K., 2001. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1712–1719.
- Tanemura, M., Miyamoto, N., Mandai, M., Kamizuru, H., Ooto, S., Yasukawa, T., Takahashi, M., Honda, Y., 2004. The role of estrogen and estrogen receptorbeta in choroidal neovascularization. *Mol. Vis.* 10, 923–932.
- Urbich, C., Dernbach, E., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., 2002. Double-edged role of statins in angiogenesis signaling. *Circ. Res.* 90, 737–744.
- Vaughan, C.J., Gotto Jr., A.M., Basson, C.T., 2000. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 35, 1–10.
- Wassmann, S., Faul, A., Hennen, B., Scheller, B., Bohm, M., Nickenig, G., 2003. Rapid effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition on coronary endothelial function. *Circ. Res.* 93, e98–e103.
- Weis, M., Heeschen, C., Glassford, A.J., Cooke, J.P., 2002. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* 105, 739–745.
- Wilson, H.L., Schwartz, D.M., Bhatt, H.R., McCulloch, C.E., Duncan, J.L., 2004. Statin and aspirin therapy are associated with decreased rates of choroidal neovascularization among patients with age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 137, 615–624.
- Yi, X., Ogata, N., Komada, M., Yamamoto, C., Takahashi, K., Omori, K., Uyama, M., 1997. Vascular endothelial growth factor expression in choroidal neovascularization in rats. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 235, 313–319.
- Zambarakji, H.J., Nakazawa, T., Connolly, E., Lane, A.M., Mallemaadugula, S., Kaplan, M., Michaud, N., Hafezi-Moghadam, A., Gragoudas, E.S., Miller, J.W., 2006. Dose-dependent effect of pitavastatin on VEGF and angiogenesis in a mouse model of choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 2623–2631.
- Zarbin, M.A., 2004. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 122, 598–614.

臨床報告

増殖糖尿病網膜症手術後の良好な視力予後に関連する因子の検討

中野早紀子 山本 禎子 山下 英俊

臨 床 眼 科

第61巻 第9号 別刷

2007年9月15日 発行

医学書院

増殖糖尿病網膜症手術後の良好な視力予後に関連する因子の検討

中野早紀子*1 山本 禎子*2 山下 英俊*1

*1 山形大学医学部視覚病態学講座 *2 山形大学医学部附属病院眼細胞工学講座

要約 目的：増殖糖尿病網膜症に対する硝子体手術の視力転帰に関連する因子の検討。**対象と方法：**増殖糖尿病網膜症に対して初回硝子体手術を行った 55 例 64 眼を対象とした。男性 47 眼、女性 17 眼であり、年齢は 24~84 歳（平均 56 歳）であった。同時手術として、超音波乳化吸引術を 40 眼、眼内レンズ挿入を 37 眼、ガスタンポナーデを 22 眼、眼内レンズ光凝固を 56 眼に行った。成績は手術後 6 か月で判定した。**結果：**0.5 以上の視力は、術前には 2 眼（3%）、術後 22 眼（34%）であり、有意差があった。術後視力 0.5 以上と有意に関連する術前因子は、後部硝子体剥離があること、網膜剥離がないこと、インスリン治療を行っていることであった。**結論：**増殖糖尿病網膜症に対する硝子体手術の良好な視力転帰に関連する術前因子は、後部硝子体剥離があること、網膜剥離がないこと、インスリン治療を行っていることである。

Factors relevant to outcome of vitrectomy for proliferative diabetic retinopathy

Sakiko Nakano*1 Teiko Yamamoto*2 Hidetoshi Yamashita*1

*1 Dept of Ophthalmol and Vis Sci, Yamagata Univ Fac of Med *2 Dept of Ocu Cel Engi, Yamagata Univ Hosp

Abstract. Purpose : To identify prognostic factors for the outcome of vitrectomy for proliferative diabetic retinopathy. **Cases and Method :** This retrospective study was made on 64 eyes of 55 cases who received vitrectomy for diabetic retinopathy. The series comprised 47 male eyes and 17 female eyes. The age ranged from 24 to 84 years, average 56 years. Simultaneously, 40 eyes received phacoemulsification-aspiration, 37 eyes received intraocular lens implantation, 22 eyes received gas tamponade, and 56 eyes received intraocular photocoagulation. Visual outcome was evaluated 6 months after surgery. **Results :** Visual acuity of 0.5 or over was present in 2 eyes (3%) before and in 22 eyes (34%) after surgery. The difference was significant. Following preoperative factors were correlated with visual acuity of 0.5 or over after surgery : presence of posterior vitreous detachment, absence of retinal detachment, and use of insulin. **Conclusion :** Postoperative visual acuity of 0.5 is correlated with posterior vitreous detachment, no retinal detachment, and insulin therapy prior to surgery.

Pinsho Ganka (Jpn J Clin Ophthalmol) 61(9):1747-1753, 2007

2006. 12. 19 受付 2007. 3. 15 受理

別刷請求先：中野早紀子（なかの・さきこ）〒990-9585 山形市飯田西 2-2-2 山形大学医学部視覚病態学講座
Reprint requests to : Sakiko Nakano Department of Ophthalmology and Visual Science, Yamagata University Faculty of Medicine, 2-2-2 Iida-nishi Yamagata 990-9585, JAPAN

二 緒言

増殖糖尿病網膜症 (proliferative diabetic retinopathy: 以下, PDR) に対する治療の1つに硝子体手術が挙げられる。これまでは硝子体手術により失明を予防することを目的としており, 手術適応決定については diabetic retinopathy vitrectomy study (以下, DRVS, 1985~1990年) のみが多施設研究に基づくエビデンスである^{1~3)}。しかし, その後の眼内レーザー光凝固の導入などの技術進歩, 新生血管を含む増殖膜形成, 硝子体との関連などの病態の解明を含む病態研究の進歩により硝子体手術が安全に行えるようになり, 手術適応が拡大しよりよい術後視力を獲得することが求められている。

DRVS では 0.5 以上の良好な視力を得るための手術適応を検討し, 著しい視力低下をきたした硝子体出血の手術に際しては, 6 か月以内に行う早期手術の視力予後がよいことを報告しているが, 上記のように DRVS において手術適応とされた症例以外にも適応は拡大していると考えられ^{4~8)}, DRVS のエビデンスは現在の状況に即さなくなってきたといえる。

最終的にこの問題を解決しエビデンスに基づいた治療ガイドラインを確立するためには, 新たに多施設, ランダム振り付け, 前向き研究が必要であり, 良好な手術予後の目標として, 視力改善ではなく一定レベルの視力予後の設定の必要性がある。多施設, ランダム振り付け, 前向き研究のためには多大な労力が必要であるので, その前段階として手術の予後予測をするために各施設での症例の検討が報告されてきている^{9~15)}。

本研究でも手術の予後予測について検討するために, 当施設で行った PDR に対する硝子体手術成績をレトロスペクティブに調査し, 手術成績に関連する因子 (術前, 術式, 術後の眼科因子, 全身因子) を検討したので報告する。

三 対象と方法

1. 対象

2004年2月~2006年1月に山形大学医学部附属病院眼科で初回硝子体手術を施行した PDR 125例 156眼のうち, 当科で6か月以上経過観察

することができた 55例 64眼 (男性 39例 47眼, 女性 16例 17眼) である。年齢は 24~84歳 (55.6±13.2歳) であった。糖尿病黄斑浮腫に対する手術例は除外した。

2. 手術術式

手術は3ポートシステムによる経毛様体扁平部硝子体切除術を施行し, 超音波乳化吸引術 40眼, 眼内レンズ挿入術 37眼, ガスタンポナーデ 22眼, 術中眼内光凝固 56眼を同時に施行した。

3. 方法

術後成績は初回手術後6か月で判定し, 0.5以上の視力, 0.025以上の視力, 光覚なし, 視力の推移 (改善: 2段階以上改善, 悪化: 2段階以上悪化, 不変: それ以外), 解剖学的復位, 術後血管新生緑内障発症について検討を行った。術後6か月の時点で0.5以上の視力に関連する可能性のある因子として, 眼科所見 (術前眼底所見, 術前視力, 手術内容) および全身的背景を診療録に基づきレトロスペクティブに調査した。今後の硝子体手術が一定レベルの視力予後を目指す必要性があると考え, 良好な視力予後の条件として, 術後視力の改善ではなく片眼読書が可能な視力である0.5以上と設定した。

検討した眼科所見は, 手術時期, 術前視力, 硝子体出血, 術前網膜光凝固, 増殖膜, 後部硝子体剝離 (posterior vitreous detachment: 以下, PVD), 血管新生重症度, 網膜剝離, 黄斑剝離の有無, 手術内容 (白内障手術の有無, ガスタンポナーデ施行の有無, 硝子体手術再手術の回数) である。

手術時期は患者が視力低下を自覚してからの期間が6か月未満と6か月以上の2群に分類した。術前視力は0.01未満 (光覚, 手動弁, 指数弁), 0.01以上0.1未満, 0.1以上の3群に分類した。血管新生重症度は DRVS 3報に準じて乳頭上およびそれ以外の血管新生の大きさ分布により4群 (least severe, moderately severe, severe, very severe) に分類した²⁾。分類に際して眼底写真, 手術記録, 診療記録により判定できたのが least severe 12眼, moderately severe 5眼, severe 10眼, very severe 18眼であった。PVDは完全に起こっていた群と不完全またはまったく起こっていない場合の2群に分類した。硝子体出血, 術前網膜光凝固, 増殖膜, 網膜剝離, 黄斑剝離については存在の有

□ : 光覚なし □ : 0.1以上0.5未満
 □ : 光覚, 手動弁, 指数弁 □ : 0.5以上
 □ : 0.01以上0.1未満

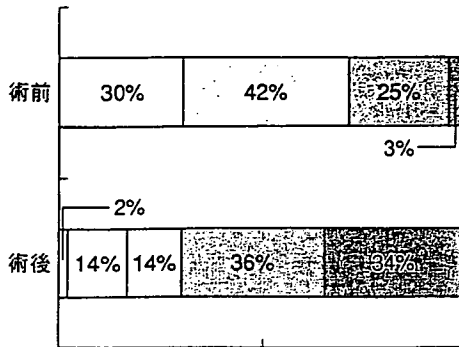


図1 硝子体手術の術前・術後6か月の視力分布
 術前・術後の視力の分布に統計学的に有意な差がみられた。 $p=0.0000023$, Fisherの正確確率検定。 $n=64$ (眼)。

無により2群に分類した。全身的背景としては、年齢、性別、糖尿病罹病期間、ヘモグロビンA_{1c}(以下、HbA_{1c})、インスリン使用の有無、高血圧、糖尿病腎症、大血管症(脳梗塞、心筋梗塞)について診療録の記載に基づき調査した。

4. 統計学的有意差検定

Fisherの正確確率検定, Wilcoxonの順位和検定を用いた。いずれの検定でも危険率5%未満を有意差ありとした。術前因子により術後6か月の視力0.5以上に関連する因子を解析するため重回帰分析を用いた。独立変数の選択にステップワイス法を用いた。

結果

1. 全症例における手術成績

術前視力の分布は、光覚なし0眼、0.01未満(光覚, 手動弁または指数弁)19眼(30%), 0.01以上0.1未満27眼(42%), 0.1以上0.5未満16眼(25%), 0.5以上2眼(3%)であった。術後6か月における視力分布は、光覚なし1眼(2%), 0.01未満が9眼(14%), 0.01以上0.1未満9眼(14%), 0.1以上0.5未満23眼(36%), 0.5以上22眼(34%)となり、0.5以上の割合は術前3%であったが術後6か月には34%と著しく増加していた。両群間の視力分布に有意差がみられ、術後有意に視力が改善していることが示された(Wilcoxonの順位和検定, $p=0.0000023$) (図1)。

術前に比較し術後視力が改善したものは48眼(75%), 不変だったものが6眼(9%), 悪化した

表1 硝子体手術後6か月の視力0.5以上と眼局所因子および全身因子の検討

		眼数	術後視力が0.5以上(%)	p
手術までの期間	6か月未満	47	40	0.760
	6か月以上	17	34	
術前視力	0.01未満	19	32	0.775
	0.01以上0.1未満	27	41	
	0.1以上	18	28	
新生血管重症度	least severe	12	42	0.057
	moderately severe	5	80	
	severe	10	30	
	very severe	18	17	
後部硝子体剥離	完全	13	62	0.046
	±/-	50	28	
硝子体出血	あり	32	28	0.430
	なし	32	41	
網膜光凝固	あり	26	42	0.295
	なし	38	29	
増殖膜	あり	35	31	0.607
	なし	29	38	
網膜剥離	あり	10	0	0.024
	なし	54	44	
黄斑剥離	あり	3	0	0.312
	なし	39	36	
再手術	あり	49	39	0.231
	なし	15	20	
性別	男性	48	38	0.544
	女性	16	25	
インスリン	あり	31	48	0.031
	なし	31	19	
高血圧	あり	32	31	0.793
	なし	32	38	
糖尿病腎症	あり	16	31	1.000
	なし	48	35	
大血管症	あり	5	20	0.652
	なし	59	36	

Fisherの正確確率検定。

ものが10眼(16%)であった。初回手術後6か月の時点で、シリコーンオイルを抜去できない症例は解剖学的に非復位に含めると、解剖学的復位を得られなかった症例は3眼(5%)であり、血管新生緑内障を発症した症例は2眼(3%)であった。

2. 術後成績に関連する因子の検討

(1) 術後6か月の視力予後に関連する因子の検討(表1, 2)

眼科所見として、PVDについて完全にPVDが