

#### D. 考察

酸化ストレスによる細胞死には、アポトーシスとネクローシスの双方の細胞死が関与しているが、主にネクローシスの主経路であるプロテアーゼが働いていることが、阻害剤により初めて検討された。臨床的に眼圧下降薬としてしようされているベタキソロールは弱いカルシウムチャネル拮抗作用があり、またニプラジロールはNO放出により、神経保護作用を呈する可能性があるが、今回チモロールも含め各薬剤酸化ストレス負荷に対し同等の神経保護作用を呈した。しかし、その作用はカルシウムイオン流入の抑制効果や、NOの放出だけでは十分に説明できず、直接的なβブロッカーの神経保護作用が存在すると考えられたが、現在のところ判明せず今後の検討を要する。昨年度の報告も含めβ遮断薬の一部は酸化ストレスおよび低酸素負荷に対しても濃度依存的な有意な細胞死抑制効果が認められ、(図6)点眼により十分量が後眼部に到達することが判明すれば、眼圧下降作用以外の神経保護作用も期待できることが示唆された。

**図6. NTG関連非眼圧性細胞障害因子による細胞死に対するβ遮断薬の神経保護効果**

負荷	betaxolol	nipradilol	timolol	carteolol
虚血再灌流 Rat in vivo	○ Osborne 1999	○ Taniai 2002	○ Wood 2003	○ 森本 2005日眼
グルタミン酸 Rat in vitro or in vivo	○ Osborne 1999	○ Mizuno 2001 Maruyama 2002	○ Melena 2002	○ 関 2003 日眼
低酸素 Rat in vitro RGC	○ 陳、相原 2007 Brain Res	○ 陳、相原 2007 Brain Res	○ 陳、相原 2007 Brain Res	— 陳、相原 2007 Brain Res
酸化ストレス Rat in vitro RGC	○ 余、相原 2007 Mol Vision	○ 余、相原 2007 Mol Vision	○ 余、相原 2007 Mol Vision	— 余、相原 2007 Mol Vision

#### E. 結論

今回検討した4種類の交感神経作動眼圧下降薬のうち、3種は酸化ストレス負荷に対するラット網膜神経節細胞死を軽減させた。交感神経作動性眼圧下降薬は眼圧下降効果以外に網膜神経節細胞に直接作用し低酸素による細胞死を抑制する可能性が示された。従って眼圧下降以外にも臨床投与の際に付加価値が存

在すると考えられる。

## F. 健康危険情報

特記すべき事なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Yi-Ning Chen, Hideyuki Yamada, Wei Mao, Shigemi Matsuyama, Makoto Aihara, Makoto Araie. Hypoxia-Induced Retinal Ganglion Cell Death and the Neuroprotective Effects of Beta-adrenergic Antagonists *Brain Research* 2007;7;1148:28-37..
- Yu ZK, Chen YN, Aihara M, Mao W, Uchida S, Araie M Effects of beta-adrenergic receptor antagonists on oxidative stress in purified rat retinal ganglion cells. *Mol Vis* 2007 Jun 11;13:833-9.
- Saito H, Tomidokoro A, Yanagisawa M, Aihara M, Tomita G, Araie M. Scanning laser polarimetry with enhanced corneal compensation in patients with open-angle glaucoma. *J Glaucoma*. 2008 Jan-Feb;17(1):24-9.

### 2. 学会発表

平成19年度

第111回日本眼科学会総会

- 堤妙、新家眞、他。立体ビューワー応用によるステレオ眼底写真視神経乳頭形状定量解析装置の開発。
- 斎藤瞳、新家眞、他。トプコン立体ビューワーを応用した新しい視神経乳頭形状定量解析装置による乳頭評価
- 内田英哉、新家眞、他。Heidelberg Retina Tomograph 2による日本人乳頭での緑内障診断。
- 陳逸寧、新家眞、他。圧負荷とグルタミン酸誘発ラット網膜神経節細胞死。

第61回日本臨床眼科学会

- 富所敦男、新家眞、他。フーリエ・ドメインOCTによる三次元マッピングを用いた網膜神経線維層欠損の検出能。
- 坂田礼、新家眞、他。タイムドメインOCTとフーリエ・ドメインOCTによる網膜神経線維層厚測定結果の比較
- 今野伸介、新家眞、他。フーリエ・ドメインOCTによる乳頭周囲網膜神経線維層厚解析の再現性と視野障害の相関

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1.特許取得

- スペクトラル・ドメインOCTを用いた網膜神経線維層厚の新しい評価法について特許出願中

### 2.実用新案登録

なし

### 3.その他

特になし

## 厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）分担研究報告書

### Latex microspheresの前房内注入による小動物慢性眼圧上昇モデルの作製と ヒト視神経乳頭部の結合組織線維及びグリア細胞ネットワークの観察

分担研究者 阿部春樹 新潟大学教授

#### 1. Latex microspheresの前房内注入による小動物慢性眼圧上昇モデルの作製

##### 研究要旨

世界的に緑内障の発症機序・病態解析・新治療の開発・発症予防に向けて、簡易で再現性の高い小動物の慢性眼圧上昇モデルの作製が望まれている。現在までに、小動物眼圧上昇モデルの作製方法は、線維柱帯の選択的レーザー凝固、上強膜静脈の結紮・凝固、上強膜静脈への高張食塩水注入、前房内への赤血球やヒアルロン酸の注入が報告されているが、簡便に効率よく、慢性的に眼圧上昇を引き起こすことは比較的困難である。

今回我々は、簡便で再現性のある眼圧上昇モデルの作製法と、隅角、視神経乳頭、眼球外視神経の病理組織学的検討結果を報告する。

##### A. 研究目的

緑内障の発症機序・病態解析・新治療の開発・発症予防に向けて、動物実験は必要不可欠である。猿などの哺乳類を用いることが最良ではあるが、倫理的な問題、費用の面および入手方法の面からも困難である。その為、扱いが容易で入手しやすい小動物が動物実験には最適であることは周知である。現在までに、小動物眼圧上昇モデルの作製方法は、線維柱帯の選択的レーザー凝固、上強膜静脈の結紮・凝固、上強膜静脈への高張食塩水注入、前房内への赤血球やヒアルロン酸の注入が報告されているが、再現性に乏しい、方法が煩雑であるなど問題点が多いのが現状である。そこで我々は、簡便に効率よく、慢性的に眼圧上昇を引き起こす方法が必要であると考えた。さまざまな緑内障研究に有用である小動物慢性眼圧上昇モデルの作製法を確立し、同時に緑内障の病理組織学的特徴を示しているかについて、隅角、視神経乳頭、眼球外視神経の病理組織学的検討をすることを目的とした。

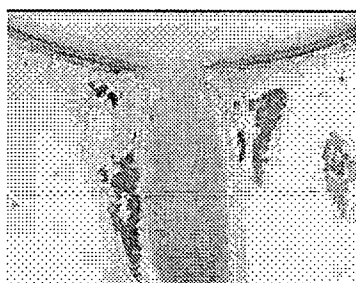
##### B. 研究方法

ラットを使用し、直径 0.5  $\mu\text{m}$  と 5  $\mu\text{m}$  の latex microspheres の等量混合物を、角膜輪部より前房水を抜いた後、32G 針で右眼前眼房に 20  $\mu\text{l}$  注入した。反対側左眼は、control 眼とした。眼圧測定は rebound tonometer を用いた。

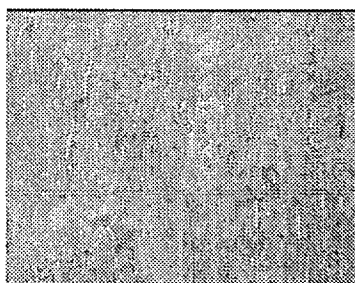
倫理面への配慮に関しては、Association of Research of Vision and Ophthalmology (ARVO) 決議を順守しながら十分な倫理的配慮を加えた。

### C. 研究結果

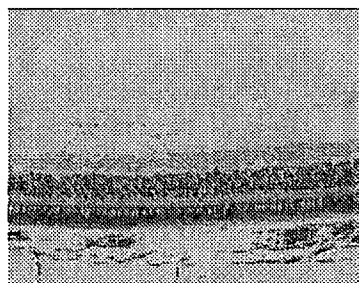
ラットの眼前房内に平均 4.5 回 latex microspheres を注入することによって、眼圧上昇を約 70% の成功率で達成することができた。また、病理組織学的検討により、緑内障に特徴的である視神経乳頭陥凹の拡大や網膜神経節細胞の減少、網膜神経線維層の菲薄化、有髄神経線維の空胞変性、glia 細胞の増加などが観察できた。約 3ヶ月間の眼圧上昇によって上記の病理組織学的特徴が顕著に認められるようになった。眼圧上昇を継続できなかったものに関しては、網膜剥離、眼内炎などを認めたが少数であった。



正常ラット視神経



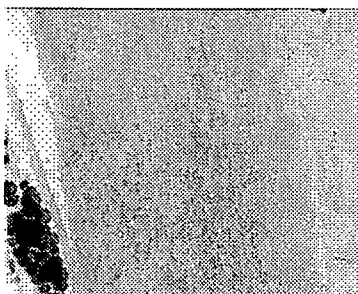
正常眼球外視神経拡大



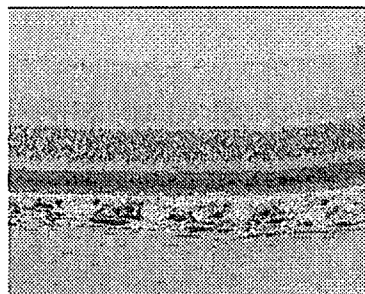
正常ラット網膜



緑内障モデルラット視神経



緑内障モデルラット眼球外視神経拡大



緑内障モデルラット網膜

### D. 考察

現在までに、小動物眼圧上昇モデルの作製方法は、線維柱帯の選択的レーザー凝固、上強膜静脈の結紮・凝固、

上強膜静脈への高張食塩水注入、前房内への赤血球やヒアルロン酸の注入が報告されているが、従来の諸方法の成功率は約20~60%程度であり、再現性に乏しい、方法が煩雑であるなど問題点が多かった。この為、世界的に緑内障の発症機序・病態解析・新治療の開発・発症予防に向けて、簡易で再現性の高い小動物の慢性眼圧上昇モデルの作製が望まれている。今回我々が考案した方法は、latex microspheresを注入するのみで簡易で再現性が高く、合併症の少ないものである。眼圧上昇機序に関しては、病理組織学的検討から隅角部の線維柱帯において、マクロファージの貪食も伴った隅角を閉塞させることによるものであった。さらにシュレム管への流入はほとんどなく、また肺、管、脾臓の観察でもほとんどlatex microspheresは観察されなかった為、全身循環系への流入はほとんど認めず、全身への影響もほぼないと考えられる。

## E. 結論

latex microspheresを前眼房に注入する方法により、簡単で再現性があり、合併症も少なく、成功率の高い(70%程度)ラット慢性眼圧上昇モデルを作製することに成功した。このラット緑内障実験モデルは、病理組織学的にも緑内障の特徴(視神経乳頭陥凹の拡大、有髄神経線維の空胞変性、網膜神経線維層の菲薄化、網膜神経節細胞の減少など)を有した。また、緑内障特有の病理組織学的所見は、眼圧上昇後約3ヶ月目に顕著になった。この実験モデルは、さまざまな緑内障実験に応用が可能であり、有用であると思われる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

現在投稿中

### 2. 学会発表

H19年9月 第18日本緑内障学会、 H20年 第113回 日本解剖学会

### 2. ヒト視神経乳頭部の結合組織線維とグリア細胞ネットワークについて <光学顕微鏡および走査電子顕微鏡による微細構造の観察>

## 研究要旨

病理組織学的に緑内障の発症機序・病態解析、さらには新治療の開発・発症予防に向けて、正常組織の正確な微細構造の理解は非常に重要である。緑内障の発症機序に関しては主原因の1つとして非常に重要なものが眼圧であり、眼圧による視神経乳頭部への機械的圧迫が進行の主原因の1つと考えられている。現在までにヒト視神経乳頭

の形態学的検討は多くの報告があるが、三次元微細構造の観察に関しては少数の報告があるのみである。また、過去の報告は結合組織線維だけのものであり、細胞成分について三次元微細構造の観察は現在までに報告はない。今回我々は、詳細な結合組織線維(膠原線維および弾性線維)と細胞成分(グリアコンポーネント)の三次元的微細構造の解析を光学顕微鏡および走査電子顕微鏡を用いて行い、その結果を報告する。

## A. 研究目的

緑内障の発症機序・病態解析・新治療の開発・発症予防に向けて、ヒト視神経乳頭の正常構造の把握は研究の原点であり非常に重要である。現在までにヒト視神経乳頭の形態学的検討は多くの報告があるが、三次元微細構造の観察に関しては少数の報告があるのみである。また、過去の報告は結合組織線維だけのものであり、細胞成分について三次元微細構造の観察は現在までに報告はない。今回我々は、詳細な結合組織線維(膠原線維および弾性線維)と細胞成分(グリアコンポーネント)の三次元的微細構造の解析を光学顕微鏡および走査電子顕微鏡を用いて行った。さらに、その結果から緑内障の発症機序、および緑内障発症機序に対して正常眼で保護的に作用する構造の組織学的検討をすることを目的とした。

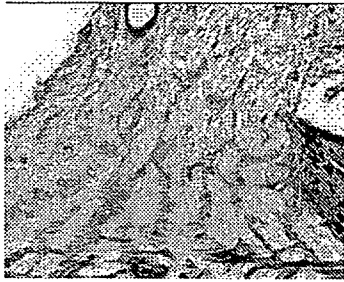
## B. 研究方法

学生実習で用いられるヒト検体の眼球を使用し、光学顕微鏡および走査電子顕微鏡観察の為に試料を作製した。光学顕微鏡観察の為に、4%パラホルマリン浸漬固定を行い、パラフィン切片を作製した。その後、ヘマトキシリン・エオジン染色、アルデヒドフクシン・マッソンゴールドナー染色、bielshoesky-Maresch染色の変法、glial fibrillary acidic protein (GFAP) 免疫染色を行った。走査電子顕微鏡観察の為に、2%グルタルアルデヒド後固定を行い、その後10%NaOH処理および30%KOH処理、さらに1%オスミウム固定を行った。臨界点乾燥、白金コーティングを施し観察をした。

## C. 研究結果

ヘマトキシリン・エオジン染色、アルデヒドフクシン・マッソンゴールドナー(AF-MG)染色、bielshoesky-Maresch染色の変法により、詳細に視神経乳頭部を4つの部位(表層神経線維層、前篩状板部、篩状板部、後篩状板部)に分けることができた。AF-MG染色、bielshoesky-Maresch染色の変法により、前篩状板部、篩状板部、後篩状板部の膠原線維および弾性線維の詳細な分布を理解できた。またGFAP染色により、星状膠細胞の分布を観察し、glial columnと呼ばれる構造の把握が膠原線維および弾性線維とともに絡み合うように存在していることが分かった。以上の結果をふまえて、走査電子顕微鏡の観察を行い、前篩状板部の非常に繊細な膠原線維束の存在を三次元立体構造でとらえることができた。また後篩状板部での近傍の視神経線維束の連絡路の三次元立体観察が可能であった。さらに、視神経乳頭部の細胞成分の三次元的立体構造の観察を始めて行った。これにより現在までに光学顕微鏡レベ

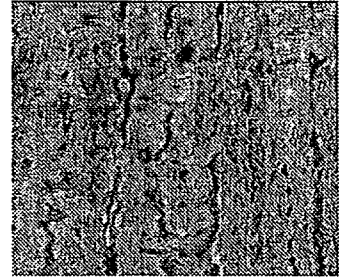
ルや透過電子顕微鏡レベルの観察を超えて、近傍の視神経線維をつなげる神経線維束や、glial columnを三次元的に理解することができた。



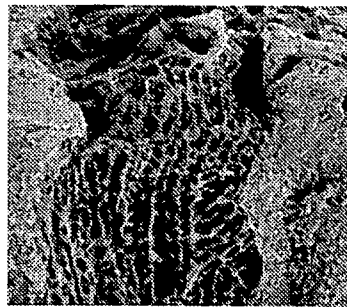
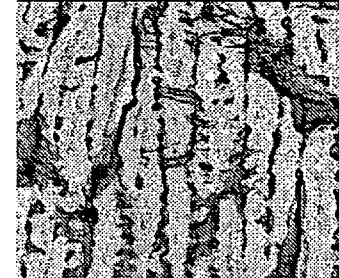
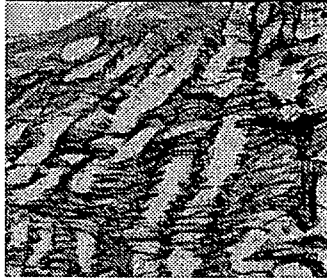
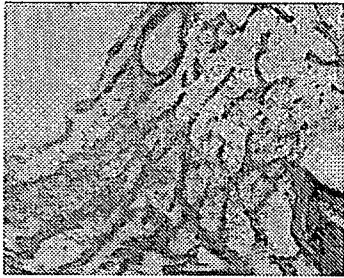
前篩状板部



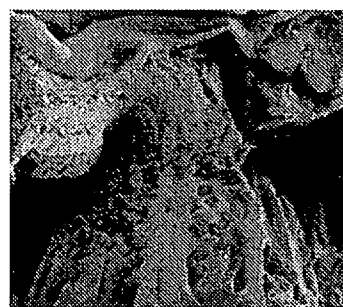
篩状板部



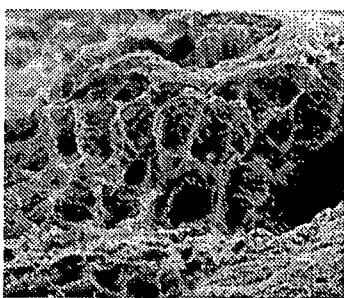
後篩状板部



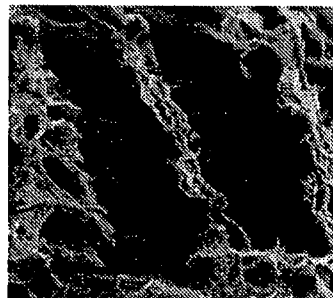
結合組織線維



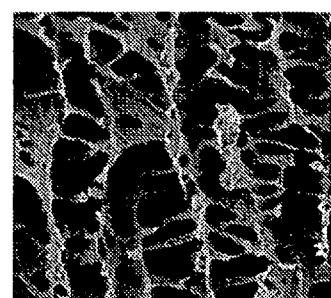
細胞成分(グリアコンポーネント)



前篩状板部

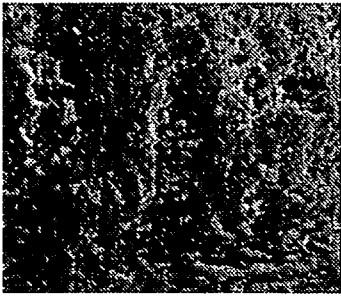


篩状板部

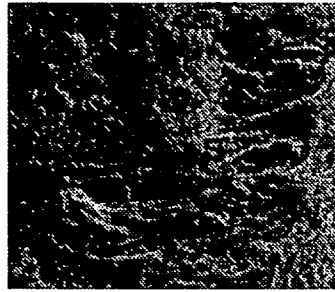


後篩状板部

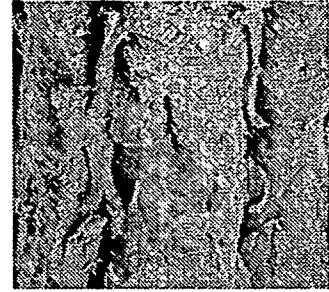




前篩状板部



篩状板部



後篩状板部

#### D. 考察

現在までにヒト視神経乳頭の形態学的検討は多くの報告があるが、三次元微細構造の観察に関しては少数の報告があるのみである。また、過去の報告は結合組織線維だけのものであり、細胞成分について三次元微細構造の観察は現在までに報告はない。今回我々は、詳細な結合組織線維(膠原線維および弾性線維)と細胞成分(グリアコンポーネント)の三次元的微細構造の解析を光学顕微鏡および走査電子顕微鏡を用いて行った。これにより、前篩状板部での視神経線維束周囲の結合線維が多く存在し、視神経を保護するように配置していることが分かった。またglial columnも同様に前篩状板で神経線維束を取り囲むように存在していた。視神経乳頭での視神経線維束同士の連絡など三次元的に観察でき、これらのことから緑内障における眼圧による視神経乳頭部への負荷を考えると篩状板のみではなく、前篩状板部での機械的圧迫も視神経障害および軸索流障害に影響を与えているのではないかと推測される。また、光学顕微鏡観察の結果より、視神経乳頭部において弾性線維が豊富に存在し、眼圧による急激な機械的な歪みに緩和的に働く作用があるとも考えられた。慢性的な眼圧による機械的な拮抗作用は、過去の報告のように膠原線維が関与していると考えられる。しかし、前篩状板での神経線維束および血管周囲に存在し連結している細網線維の存在も今回詳細に明らかになり前篩状板での神経線維保護の重要性も示唆された。

#### E. 結論

光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡の観察を合わせて検討することにより、ヒト視神経乳頭部での三次元的立体構造の正常構造を詳細に把握することができた。緑内障の発症機序・病態解析・新治療の開発・発症予防に関して検討する際には、篩状板部のみでなく前篩状板部の構造も理解しておくことが重要である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Oyama T., Abe H., Ushiki T.(2006) The connective tissue and glial framework in the optic nerve head of the normal human eye: light and scanning electron microscopic studies. Arch Histol Cytol. 69 (5): 341-356

##### 2. 学会発表



疫学データに基づく狭隅角眼の眼球構造の解析とリスクファクターの検討

分担研究者 澤口昭一 琉球大学教授

**研究要旨**

閉塞隅角緑内障は欧米に比べアジア諸国で有意に有病率が高いことが知られ、またひとたび急性発作が発症し、適切な処置が遅れば重篤な不可逆的視機能障害に直結する重要な眼疾患のひとつである。沖縄県ではこれまでも閉塞隅角緑内障が多いことが経験的に語られていたが、系統だった疫学調査はこれまでに行われておらず、閉塞隅角緑内障を含む緑内障の有病率やそれによる視機能障害の頻度は不明のままであった。今回、沖縄県久米島町において40歳以上の全住民を対象に緑内障を中心とした眼疾患に関する疫学調査を実施した。平成18年度中に現地調査が終了し平成19年度中に眼底写真、視野検査、隅角鏡検査の結果より緑内障の病型別有病率を算出し、これらの結果の一部を国内学会において発表した。また、超音波生体顕微鏡検査により得られた画像を新規に開発した解析ソフトウェアで定量的に解析した。現在、各種測定結果の統計的解析を行っている。

**A. 研究目的**

沖縄県の有人離島である久米島（久米島町）において40歳以上の全住民を対象に緑内障を中心に失明につながる眼疾患の有病率について検討する。また緑内障については最新の眼科検査機器を用いてその病因についても検討する。

**B. 研究方法**

検診を始める前に、法律専門家を含めて久米島町住民の代表と個人情報保護、プライバシーの保護などを話し合い、これらを遵守することで了解を得て合意文書を作成した。本研究の遂行は久米島町役場および沖縄県離島医療組合の協力のもとに行った。検診には参加者本人の自由意思で参加し、検診内容について詳細な説明を行い、実施の前に文章による同意を得た。

参加者に対して、眼科一般検査、緑内障診断に必要な検査、特殊検査を行った。検診はスクリーニングの1次検診と、診断確定のための2次検診が行われた。検診で得られた超音波生体顕微鏡による前眼部断層像の定量的解析のためのオリジナルソフトウェアを新規開発した。

1次検診（スクリーニング）の項目：

問診、身長・体重・血圧測定、屈折・視力検査、角膜厚・角膜内皮計測(スペキュラマイクロスコープ)、走査式周辺前房深度計(SPAC)、眼軸長測定(IOLマスター)、視野検査(FDTによるスクリーニング)、ステレオ眼底撮影(無散瞳眼底カメラ) 細隙灯顕微鏡検査、周辺前房深度(van Herick法)、隅角検査(Goldmann 2ミラー)、眼圧検査(Goldmann圧平眼圧計)、角膜径測定(Haab瞳孔計)

1次検診で少なくとも1眼が下記のいずれかを満たす者について2次検診を行った。

視力 < 0.7、眼圧 > 19 mmHg、垂直C/D比 ≥ 0.6、垂直C/D比の左右差 ≥ 0.2、上方または下方のR/D比 ≤ 0.2、網膜神経線維層欠損または乳頭出血、細隙顕微鏡または眼底に何らかの異常、van Herick検査 ≤ 2度、FDTスクリーニング検査で1点以上の異常点

2次検診の項目：

精密静的量的視野検査(HFA 30-2 SITA standardプログラム)、高周波超音波による前眼部・隅角画像診断(超音波生体顕微鏡：UBM)

(倫理面への配慮)

上記のように、検診を始める前に、法律専門家を含めて久米島町住民の代表と個人情報保護、プライバシーの保護などを話し合い、これらを遵守することで了解を得て合意文書を作成した。本研究の遂行は久米島町役場および沖縄県離島医療組合の協力のもとに行った。検診には参加者本人の自由意思で参加し、検診内容について詳細な説明を行い、実施の前に文章による同意を得た。

## C. 研究結果

### 1. 対象母集団：

久米島町の40歳以上の住民全員 4632人

年齢： 40-100歳 (61.8±14.0歳)

男性： 2388人 (60.0±13.2歳)

女性： 2244人 (63.5±14.4歳) (平均±標準偏差)

### 2. 検診参加率

全体： 81.2% (3762 / 4632人)

男性： 76.8% (1833 / 2388人)

女性： 86.0% (1929 / 2244人)

受診率：81.23%

全緑内障有病率：約10%

閉塞隅角緑内障：約3%

急性閉塞隅角緑内障：0.6%

開放隅角緑内障有病率 約4%（正常眼圧緑内障 約3%強）

その他の緑内障 3%。

閉塞隅角緑内障予備軍の頻度

現在最終診断の確定のための検討を行っている。

#### D. 考察

日本本土で2000年～2001年に行われた多治見スタデーにおける緑内障有病率は40歳以上の成人人口の約5%であった。本研究では約10%であり、2倍の有病率であった。また多治見スタデーでは正常眼圧緑内障の有病率が3.7%であり、本邦における緑内障病型としては非常に頻度の高いことが報告された。

一方、沖縄県ではこの正常眼圧緑内障の有病率は多治見スタデーに比べ若干少ないものの、ほぼ同程度であり、諸外国に比べその有病率は非常に高いことが確認された。多治見スタデーでは閉塞隅角緑内障有病率は0.6%であったが、今回の久米島スタデーでは3%強であり、正常眼圧緑内障に若干及ばないもののこれまでの多治見スタデーを含めた諸外国の報告に較べきわめて高いことが証明された。

#### E. 結論

緑内障の2大病型として開放隅角緑内障と閉塞隅角緑内障が知られている。沖縄県では閉塞隅角緑内障の有病率が本邦および諸外国に比べ非常に高いことを証明できた。閉塞隅角緑内障はレーザー治療、早期の白内障手術で治癒させることが可能であり、適切なスクリーニング方法の開発と臨床応用が求められる。現在、そのスクリーニング方法として今回の検診で行った超音波生態顕微鏡(UBM)と走査型前房検査装置(SPAC)の解析と検討を行っているところであり、その結果についても今後報告の予定である。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

なし

##### 学会発表

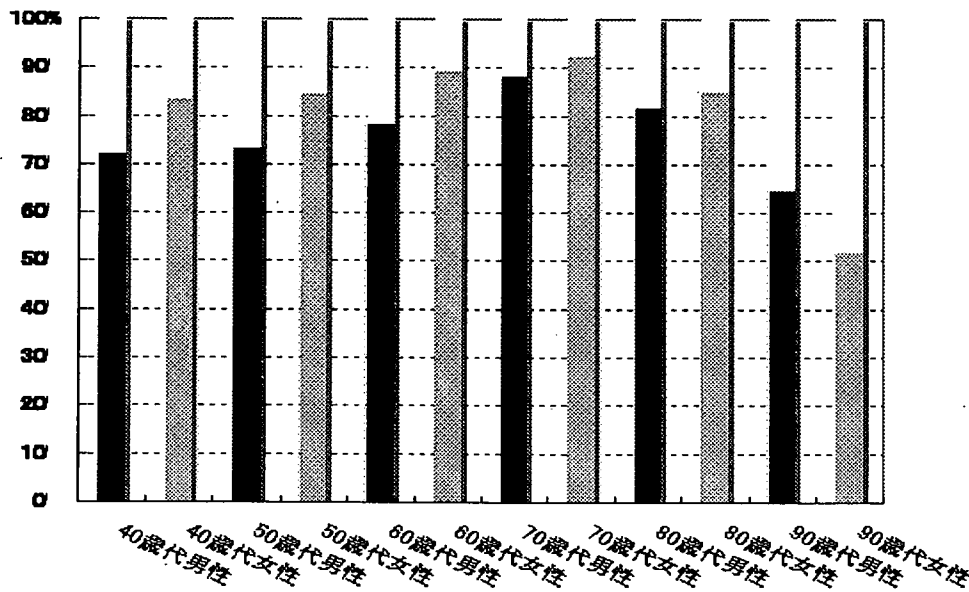
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. シンポジウム「閉塞隅角緑内障のあたらしい動き」澤口昭一：久米島検診で見えてきた閉塞隅角緑内障、第17回日本緑内障学会 16巻 73ページ 2006年：発表内容は閉塞隅角緑内障の発症予備軍（危険群）の頻度である。もっとも単純な細隙灯顕微鏡検査による閉塞隅角緑内障予備軍の頻度は多治見スタディでは5.3%であったが久米島スタディでは約28%であり6倍の頻度であった。性差と加齢による変化についても報告した。

2. 「翼状片有病率と閉塞隅角緑内障危険因子」澤口昭一、第18回日本緑内障学会 17巻 90ページ 2007年：発表内容は久米島疫学調査の進捗状況報告である。久米島町の40歳以上の人口での翼状片有病率は31.0%であること、

3. 「久米島スタディの実施概要と検診参加率」平安山市子、仲村優子、酒井寛、澤口昭一、岩瀬愛子、富所敦男、新家 眞、第18回日本緑内障学会 17巻 164ページ 2007年：久米島検診の受診率を性別、年代別に検討した。検診受診率は81.2%であり、男性76.8%、女性86.0%と女性の方が高かった。また、90歳以上を除き高齢者の方が高かった。

図：年代・性別の検診受診率

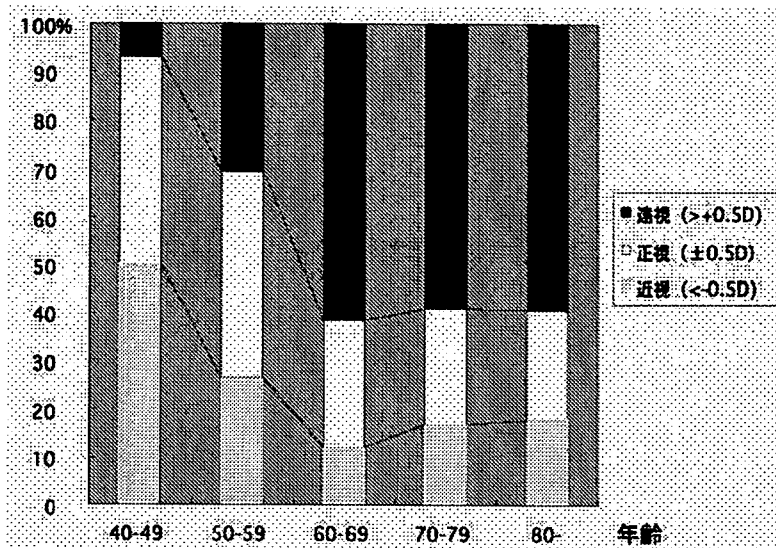


4. 「久米島スタディにおける翼状片のリスクファクター」城間弘喜、澤口昭一、比嘉明子、岩瀬愛子、富所敦男、新家 眞、第61回日本臨床眼科学会、学会抄録 83ページ 2007年：久米島町における翼状片の有病率は過去の疫学研究に比べ高かった。高齢者、男性、屋外従事者(野外活動歴)が翼状片のリスクファクターであり、この結果は過去の報告と同傾向であった。また、帽子着用者の有病率は予想に反し非着用者より高かった。

5. 「久米島スタディ参加者の屈折異常」比嘉明子、仲村佳巳、澤口昭一、岩瀬愛子、富所敦男、新家 眞、第61回日本臨床眼科学会、学会抄録 40ページ 2007年：久米島における屈折異常の頻度・分布を検討した。屈折異常(等価球面度数)は日本本土での結果(多治見スタディ)と比較して遠視側に偏っていた。近視の頻度は多治見スタディより低く、遠視の頻度は高かった。

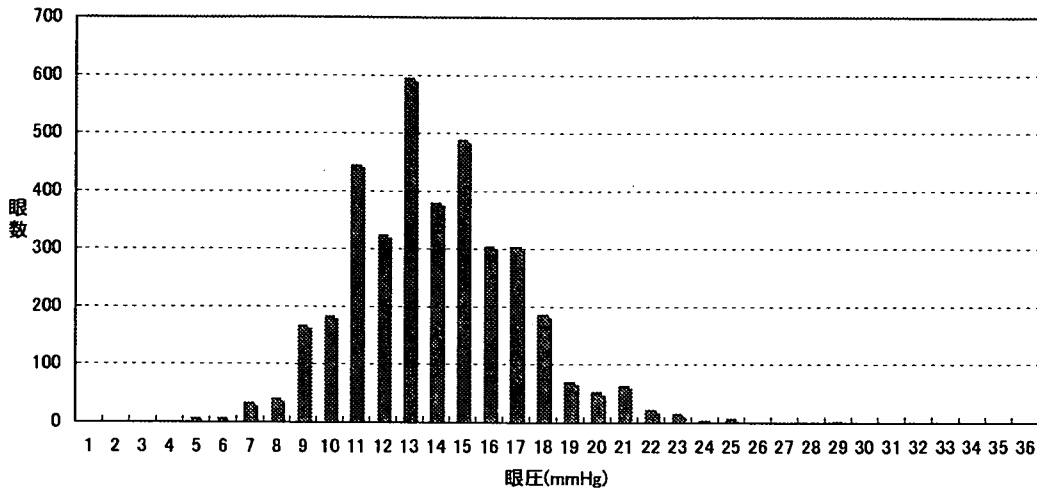
	N (人)	% (95%CI)
正視 SE ≤ ±0.5D	1081	34.7 ( 33.0-36.4 )
近視 < -0.5D	900	28.9 ( 27.3-30.5 )

	<-1.0D	605	19.4 ( 18.1-20.8 )
	<-6.0D	47	1.50 ( 1.10-2.00 )
遠視	>+0.5D	1136	36.4 ( 34.8-38.2 )
乱視	> 0.5D	1929	61.9 ( 60.2-63.6 )
	> 1.0D	1075	34.5 ( 32.8-36.2 )



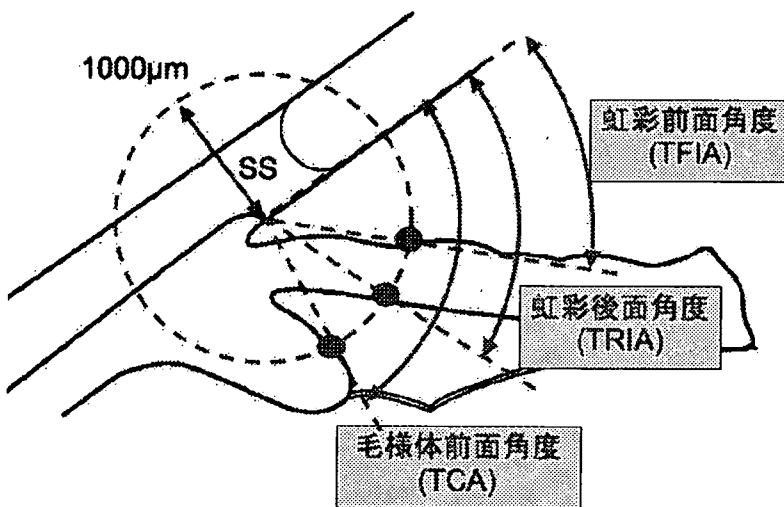
6. 「久米島スタディ参加者の眼圧の分布と関連因子」友寄絵厘子、酒井寛、澤口昭一、石川修作、岩瀬愛子、富所敦男、新家眞、第61回日本臨床眼科学会、学会抄録 78ページ 2007年：久米島における眼圧の分布と関連因子について眼圧の分布と関連因子について検討し本土(多治見スタディ)のそれと比較し報告した。久米島スタディ参加者の平均眼圧久米島スタディ参加者の平均眼圧(右眼)は 14.9mmHgであり、高齢者ほど眼圧が低かった。ボディーマスインデックス (BMI)、収縮期血圧、中心角膜厚は、年齢補正後にも眼圧と正の相関があった。眼圧と関連する因子は多治見スタディでの眼圧と相関結果とほぼ類似していた。

図：久米島検診受診者の眼圧の分布 (右眼)

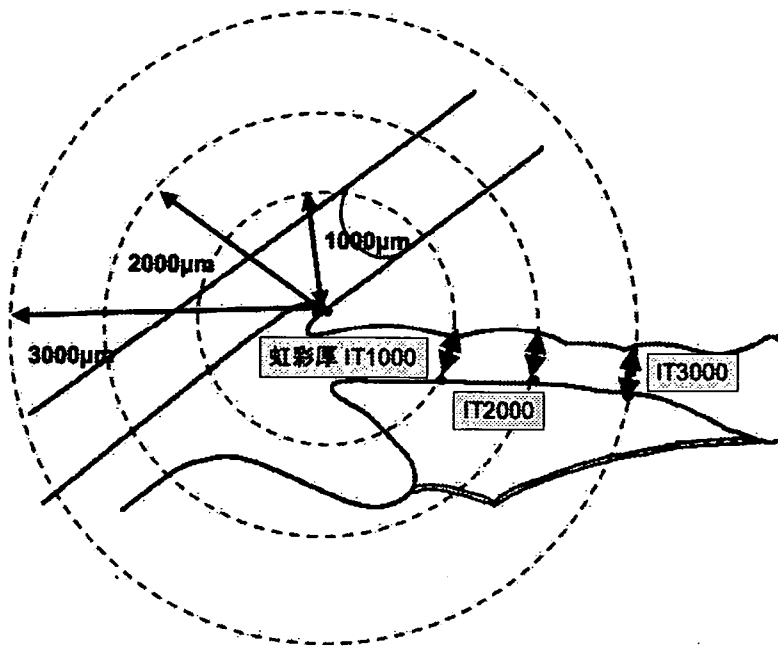


7. 「超音波生体顕微鏡による前眼部構造測定結果の新しい定量的表現法」平安山市子、酒井寛、仲村優子、澤口昭一、富所敦男、新家眞、高田英夫、第61回日本臨床眼科学会、学会抄録 79ページ 2007年：久米島検診受診者の前房隅角構造を高周波超音波画像診断装置である超音波生体顕微鏡検査を用いて撮影した。得られた画像を新規に開発した解析ソフトウェアで定量的に解析した。この新規ソフトウェアは強膜岬を中心とした円と角膜内皮面、虹彩前面・後面、毛様体前面との交点を基準とした新しいパラメータにより隅角形態を数値化するものである。また、その測定方法について信頼性を確かめるために検者内再現性を検討した。結果として、新しく開発したUBMの定量的パラメータの検者内再現性は従来のパラメータに比べ、ほぼ同等かやや良好であった。特に、緑内障の罹患危険群と考えられる狭隅角眼においても広隅角眼とほぼ同等の再現性が得られた点はこのソフトとウェアの有用性を示している。

図：新しく開発した超音波生体顕微鏡画像解析のパラメータ







#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 特許取得

超音波生体顕微鏡の定量的解析法について特許申請中

##### 実用新案登録

なし。

##### その他

なし。

## 網膜神経細胞死における小胞体ストレスの関与

分担研究者 原 英彰 岐阜薬科大学教授

### 研究要旨

近年、アルツハイマー病などの神経変性疾患において、小胞体 (endoplasmic reticulum: ER) ストレスと神経細胞死との関連性が指摘され、神経変性疾患における小胞体ストレスの関与が注目されている。一方、緑内障をはじめとする網膜神経細胞死における小胞体ストレスの関与についてはほとんど明らかにされていない。これまで我々は、前年までの報告においてマウス硝子体内に *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) を投与すると網膜障害に先行して小胞体ストレスが誘導され、さらに tunicamycin (小胞体ストレス誘導剤) の硝子体投与により小胞体ストレスが誘導され網膜神経細胞死が観察されることを明らかにした。このことから、網膜神経細胞死に小胞体ストレスが関与していることが示唆された。そこで今回我々はラット由来網膜神経節細胞株 (RGC-5) を用いてリン酸化 double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) (図1) の活性化が ER ストレスによる網膜神経節細胞に関与しているか否かを RGC-5 及びマウス NMDA 網膜障害モデルを用いて検討した。その結果、PKR の活性化が ER ストレス網膜細胞死に関与していること、PKR の活性化の抑制が ER ストレスを介した網膜細胞障害に対して有効であることが示唆された。

- インターフェロンにより誘導されるセリン/スレオニンリン酸化タンパク質で、ウイルス感染に対する防御機構の重要な因子。
- リン酸化された活性化型 PKR がアルツハイマー病患者脳で確認された上に、リボザイムライブラリーを用いてツニカマイシン処理をした神経芽細胞腫において細胞死促進的に働くことが見出された (Onuki et al., EMBO J, 2004)。

図1 リン酸化 double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) とは？

### A. 研究目的

アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病、プリオン病、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) などに代表される神経変性疾患において、神経細胞内に異常なタンパク質が凝集体を形成していることが認められ、その神経変性との関連性が示唆されてきた。しかしながら、凝集体と神経細胞死とを結ぶ分子機構についてその詳細は不明であった。近年、それら神経変性疾患において、

小胞体ストレスと神経細胞死との関連性が指摘され、神経変性疾患における小胞体ストレスの役割が注目されている<sup>1)</sup>(図2)。一方、緑内障をはじめとする網膜神経細胞死における小胞体ストレス細胞死の関与についてはほとんど明らかにされていない。そこで、筆者らは小胞体ストレスと神経細胞死の関係をラット由来網膜神経節細胞株(RGC-5)及び*in vivo* マウス網膜障害モデルを用いて検討した。

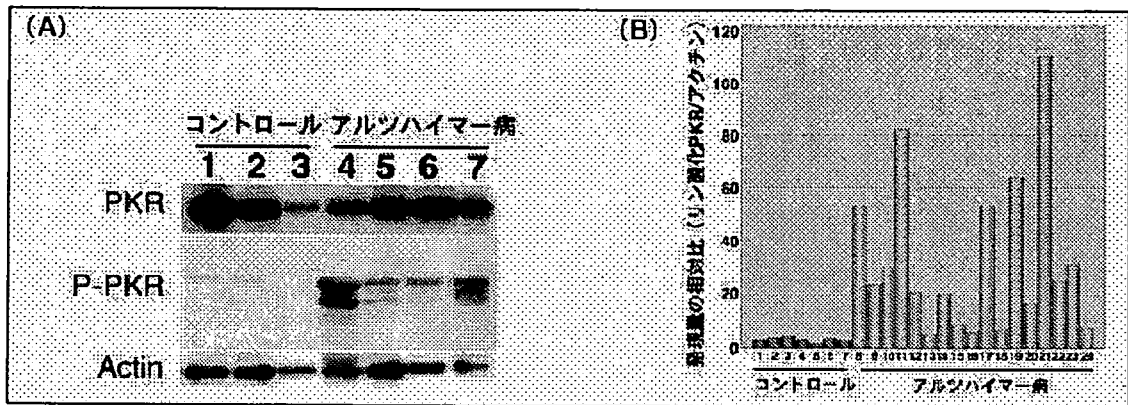


図2 アルツハイマー病患者におけるリン酸化型PKRの発現  
(A) はそれぞれのタンパクに対する抗体を用いたウエスタンブロッティング  
(B) はバンドの強度を測定し、アクチン量でリン酸化型PKR量を補正

Onuki et al., EMBO J, 23, 959-968, 2004

## B. 研究方法

実験に用いたピロリジノベンゾチアゾール誘導体PKR阻害薬を図3及びその作用プロフィールを示した成績を図4に示す。実験はラット由来網膜神経節細胞株(RGC-5)(図5)及び*in vivo* マウス網膜障害モデル(図6)を用いて検討した。詳細は下記研究発表論文1及び2に記載している。

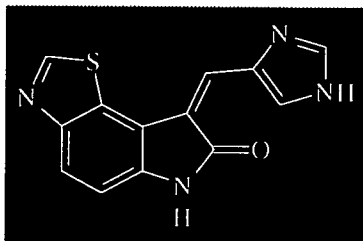


図3 PKR阻害薬の化学構造式

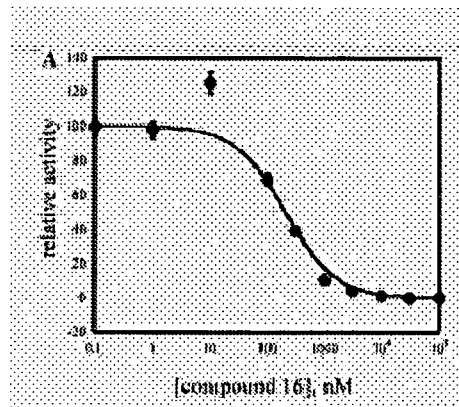


図4 A potent, ATP-binding site directed inhibitor of RNA-dependent protein kinase (PKR). Shown to effectively inhibit RNA-induced PKR autophosphorylation ( $IC_{50} = 210$  nM) and rescue PKR-dependent translation block ( $IC_{50} = 100$  nM).

Jammi et al., Biochem Biophys Res Commun, 308, 50- 57, 2003.

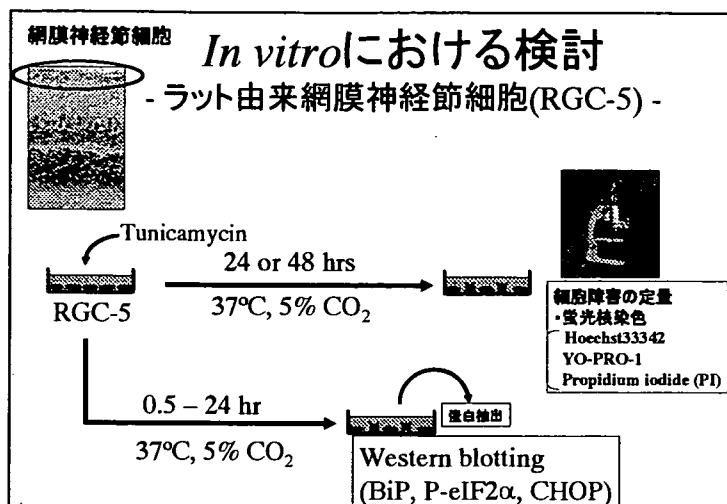


図5 ラット由来網膜神経節細胞株 (RGC-5) を用いた *in vitro* 実験方法

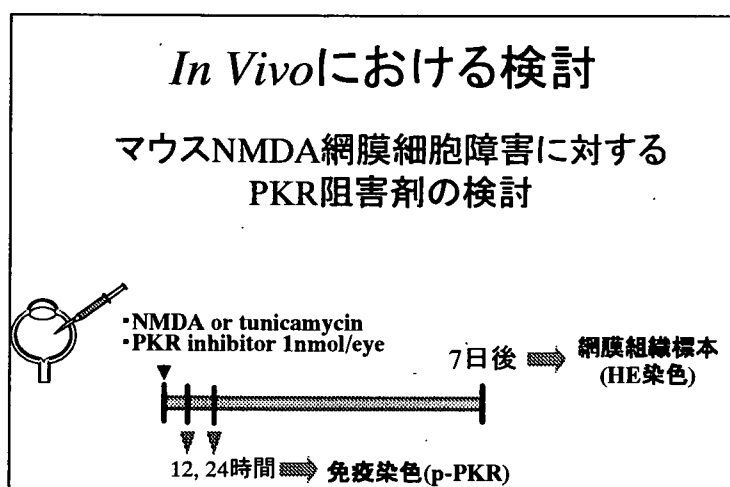


図6 マウス網膜障害モデルを用いた *in vivo* 実験方法

### C. 研究結果

小胞体ストレス誘導剤である tunicamycin を RGC-5 に添加することにより時間依存的に細胞死が誘導された。また、その細胞死に先行して小胞体分子シャペロンである glucose-regulated protein (GRP) 78/BiP、転写因子である activating transcription factor 4 (ATF-4) 及び C/EBP-homologous protein (CHOP) 蛋白質が誘導された (図7)。また、マウスの硝子体内に *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) または tunicamycin を投与することにより、その7日後に網膜障害が観察され (図8)、それに先行して BiP 及び CHOP が網膜神経節細胞において発現していた (図9, 10)。これらのことから、網膜細胞死に小胞体ストレスが関与していることが示唆された<sup>2)</sup>。