

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 <sup>1)</sup>	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 <sub>1c</sub>	○	○	○	○	○	○
空腹時インスリン	○		○	○	○	○
空腹時Cペプチド	○		○	○	○	○
hs-CRP	○		○	○	○	○
アズンボネクチン(HMW)	○		○	○	○	○
IL-6	○		○	○	○	○
ヘモグロビン, 総コレステロール, LDL-C <sup>2)</sup> , HDL-C, 中性脂肪	○	○	○	○	○	○
AST, ALT, $\gamma$ -GTP, Cr, BUN, CPK	○	○	○	○	○	○
尿中アルブミン <sup>3)</sup> (または尿中蛋白).. 尿中8-OHdG	○	(○) <sup>4)</sup>	○	○	○	○
心電図, R-R CV 値, ABL, PWV	○		○	○	○	○
胸部 X 線	○		○	○	○	○
頸部超音波検査	○		○	○	○	○
Cr, テキレス腫区放射検査, 普叉検査	○		○	○	○	○

<sup>1)</sup> 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.

<sup>2)</sup> 直接法にて測定する.

<sup>3)</sup> 随時尿での尿中クレアチニン 1g 当たりの排出量.

<sup>4)</sup> 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プのみ.

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 <sup>*1</sup>	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) <sup>3</sup>	(○)		(○) <sup>*2</sup>	○	(○) <sup>*2</sup>	○
静的視野計による閾値測定 <sup>*1</sup>	(○)		(○) <sup>*2</sup>	○	(○) <sup>*2</sup>	○
光学的干渉法による網膜断層図(OCT)	○		(○) <sup>*2</sup>	○	(○) <sup>*2</sup>	○

<sup>\*1</sup> 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.

<sup>\*2</sup> 網膜病変の発症・進展を認めた場合

<sup>\*3</sup> Severe な非増殖網膜病変を認めた場合

<sup>\*4</sup> 医師が必要であると判断した場合

「メタボリックシンドロームの動脈硬化症早期発見と治療を目的とした網膜病変解析の有効性に関する前向き調査」研究メンバー

氏名	所属	住所	Phone	Fax	e-mail
研究代表者	熊本大学大学院医学薬学研究部代謝内科学	〒860-8556熊本本庄1-1-1	096-373-5169	096-366-8397	sarakib@kjuu.med.kumamoto-u.ac.jp
研究分担者	熊本大学大学院医学薬学研究部視機能病態学 (眼科)	〒860-8556熊本本庄1-1-1	096-373-5247	096-373-5249	kushinaga@pearl.ocn.ne.jp
谷原秀信	山形大学医学部医科学器官病態制御学講座液性病態診断医学 (臨床検査医学)	〒990-9835山形市東田西2-2-2	023-628-5404	023-628-5409	miyagami@med.id.yamagata-u.ac.jp
五十嵐雅彦	山形大学医学部医科学情報構造制御学講座視覚病態学 (眼科)	〒990-9835山形市東田西2-2-2	023-628-5374	023-628-5376	hyama-thy@unin.ac.jp
山下英俊	国立病院機構熊本医療センター内科	〒860-0008熊本本庄二の丸1-5	096-333-6501	096-325-2519	toyomaga@kumamoto2.hosp.go.jp
豊永哲至	熊本大学大学院医学薬学研究部環境保健学	〒860-8556熊本本庄1-1-1	096-373-5106	096-373-5108	a-ueda@gpo.kumamoto-u.ac.jp
上田 厚	熊本大学大学院医学薬学研究部代謝内科学	〒860-8556熊本本庄1-1-1	096-373-5169	096-366-8397	sshimoda@gpo.kumamoto-u.ac.jp
下田誠也					
研究協力者					
富永実琴	医療法人社団みゆき会 糖尿病内科クリニック	〒990-2461山形市南藤4-1-45	023-647-7555	023-647-7557	mfominaga@miyuuki.or.jp
榎島美紀子	熊本大学大学院医学薬学研究部視機能病態学 (眼科)	〒860-8556熊本本庄1-1-1	096-373-5247	096-373-5249	mihiko@kjuu.med.kumamoto-u.ac.jp
平田昭彦	山形大学医学部医科学器官病態制御学講座液性病態診断医学 (臨床検査医学)	〒990-9835山形市東田西2-2-2	023-628-5404	023-628-5409	ahitani@med.id.yamagata-u.ac.jp
山本祐子	山形大学医学部附属病院眼科学講座 (眼科)	〒990-9585山形市東田西2-2-2	023-628-5374	023-628-5376	tsuko-y@med.id.yamagata-u.ac.jp
望月典子	山形大学医学部情報構造制御学講座視覚病態学 (眼科)	〒990-9585山形市東田西2-2-2	023-628-5374	023-628-5376	m.noriko@med.id.yamagata-u.ac.jp
児玉重子	国立病院機構熊本医療センター内科	〒860-0008熊本本庄二の丸1-5	096-333-6501	096-325-2519	skodama@kumamoto2.hosp.go.jp
鎌 長年	熊本大学大学院医学薬学研究部環境保健学	〒860-8556熊本本庄1-1-1	096-373-5106	096-373-5108	cwveti@gpo.kumamoto-u.ac.jp
後藤理英子	熊本大学大学院医学薬学研究部代謝内科学	〒860-8556熊本本庄1-1-1	096-373-5169	096-366-8397	gotos@gpo.kumamoto-u.ac.jp
後藤秀生	国立病院機構熊本南病院	〒861-0933宇城市松崎町豊福2338	096-432-0826	096-432-3207	
榎原賢司	国立病院機構熊本南病院	〒861-1102西合志町須屋2659	096-242-1000	096-242-2619	kenjiet@saisyunso.hosp.go.jp
金子健吾	熊本労災病院	〒866-8333八代市竹原町1-670	096-531-4151	096-532-4405	naka-kkaneko@kumamotooh.rofuku.go.jp
小野恵子	NTT西日本九州病院	〒862-8655熊本市新屋敷1-17-27	096-364-6000	096-362-5204	keiko@ncc@bfnm.or.jp
松尾智人	済生会熊本病院	〒861-4193熊本市近見5-3-1	096-351-8000	096-351-8697	yamakiy@nmc.com
岡上泰二	八代総合病院	〒866-8660八代市弥生町2-26	0965-32-7111	0965-32-2772	mitchy102@sho.ne.jp



## Effect of pitavastatin on experimental choroidal neovascularization in rats<sup>☆</sup>

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 coenzyme 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

<sup>☆</sup> 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](mailto: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  $\mu$ 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<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> (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  $2 \times 10^6$ ; 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- $\mu$ m thickness were cut to determine the center of each lesion and stained

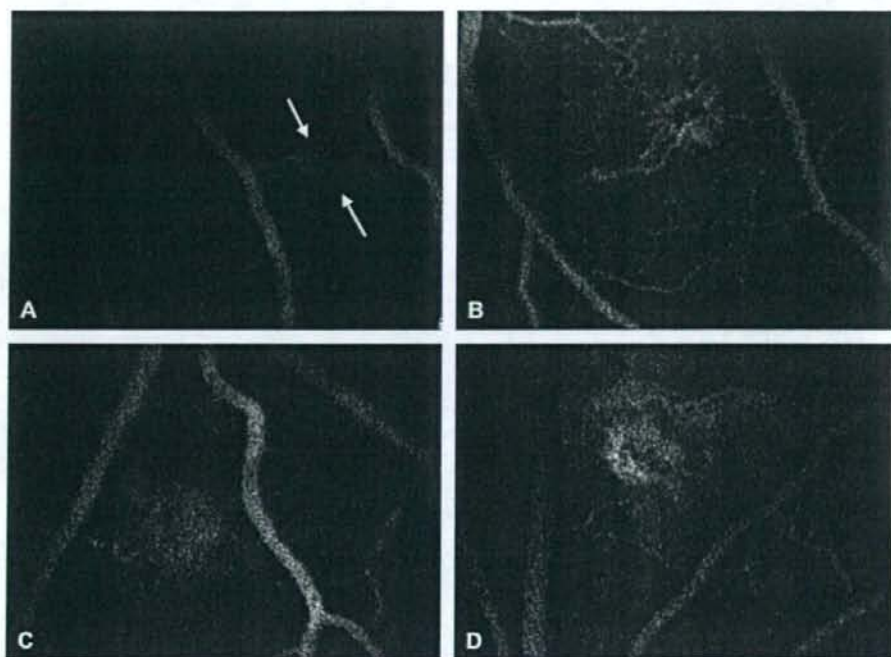


Fig. 1. Typical examples of each CNV score in the fluorescein angiogram after laser-induced CNV in rat retina. Each laser spot was scored from 0 to 3 according to the size and the presence or absence of dye leakage on the early and late phase angiogram photographs. The guideline for the CNV scoring was 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  $1.29 \pm 0.09$  and  $1.89 \pm 0.12$ , 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  $\mu\text{m}$  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

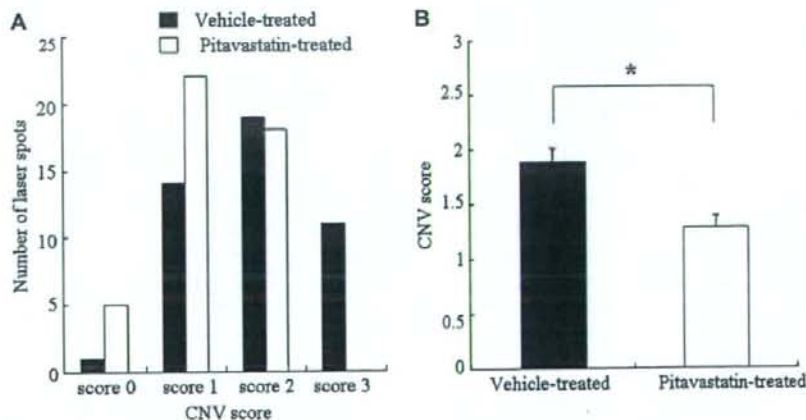


Fig. 2. Effect of pitavastatin on CNV score 14 days after laser-induced CNV in rat retina. Number of laser lesions of each 0–3 CNV scores in vehicle-treated and pitavastatin-treated rats (A). The mean CNV score in vehicle-treated and pitavastatin-treated rats (B). \*,  $P < 0.05$  compared with vehicle-treated.

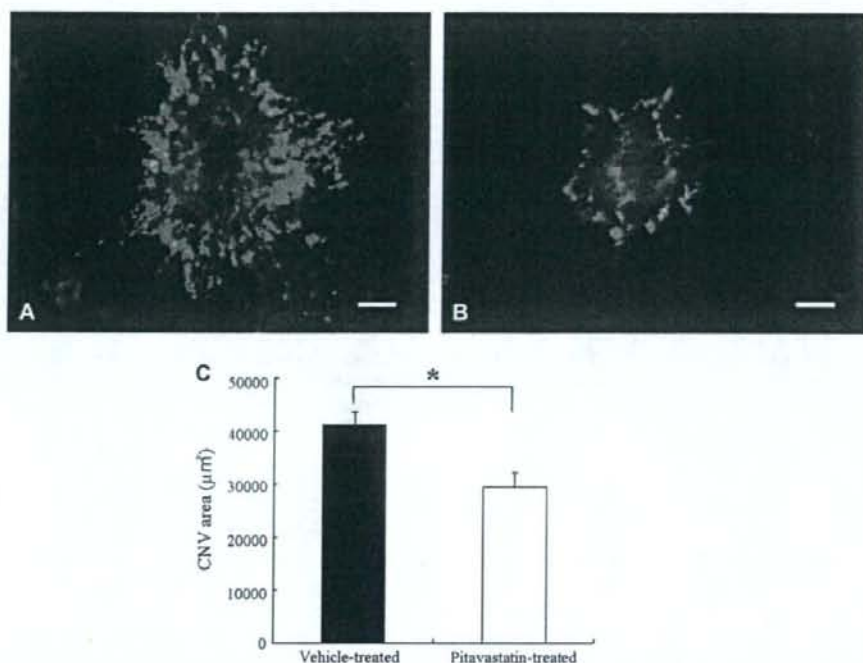


Fig. 3. Effect of pitavastatin on CNV area 14 days after laser-induced CNV in rat retina. CNV is described with green fluorescence by FITC-dextran angiography in vehicle-treated rats (A) and in pitavastatin-treated rats (B). Computer image analysis of CNV area in pitavastatin-treated rats was significantly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

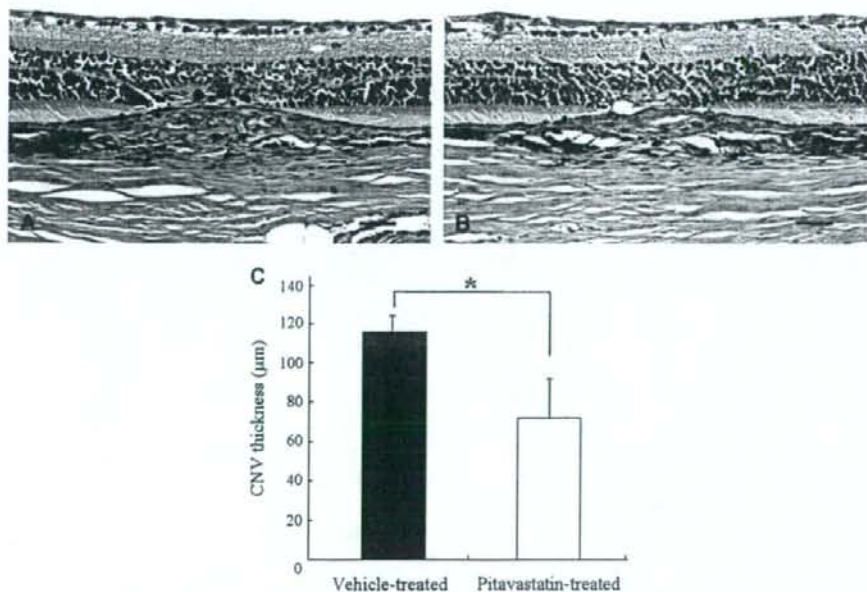


Fig. 4. Effect of pitavastatin on CNV thickness 14 days after laser-induced CNV in rat retina. Light micrographs of Hematoxylin and Eosin stained sections of the CNV lesions in vehicle-treated rats (A) and pitavastatin-treated rats (B) 14 days after laser photocoagulations. Computer image analysis of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



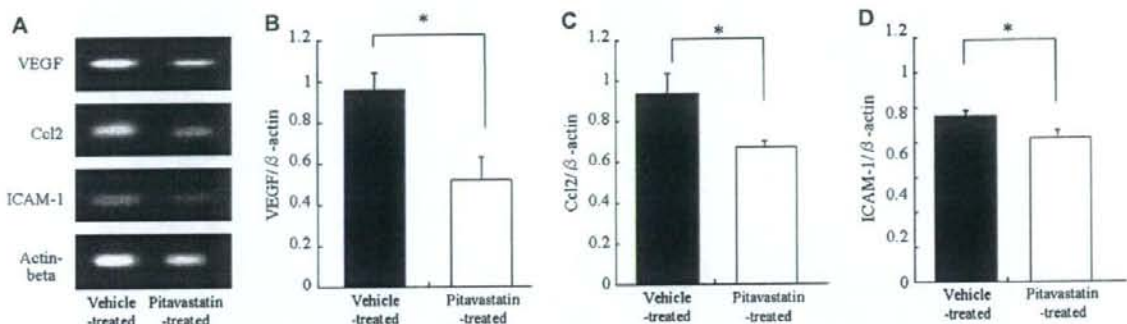


Fig. 5. Effect of pitavastatin on expression of VEGF, Ccl-2, and ICAM-1 mRNA 3 days after laser-induced CNV. RT-PCR analysis showed that VEGF, Ccl-2, and ICAM-1 mRNA expressions in pitavastatin-treated rats were lower than those in vehicle-treated rats (A). Real-time quantitative RT-PCR analysis revealed 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 effect 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 supplements; 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., Lacroix, A., Delage, M., Vemet, 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., Alverge, 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.
- Prufer, 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., Diomed, L., Sironi, M., Massimiliano, L., Sottocorno, M., Polentarutti, N., Guglielmotti, A., Albani, D., Bruno, A., Fruscella, P., Salmona, 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., Adams, 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 tranilast 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.* 35, 313–319.
- Zambarakji, H.J., Nakazawa, T., Connolly, E., Lane, A.M., MalleMadugula, 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\*<sup>1</sup> 山本 禎子\*<sup>2</sup> 山下 英俊\*<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup> 山形大学医学部視覚病態学講座 \*<sup>2</sup> 山形大学医学部附属病院眼細胞工科学講座

**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、ガスタンポナーテを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、後部硝子体剝離があること、網膜剝離がないこと、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、後部硝子体剝離があること、網膜剝離がないこと、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\*<sup>1</sup> Teiko Yamamoto\*<sup>2</sup> Hidetoshi Yamashita\*<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup> Dept of Ophthalmol and Vis Sci, Yamagata Univ Fac of Med \*<sup>2</sup> 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.

Rinsho 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

## 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<sup>1~3)</sup>。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<sup>4~8)</sup>, 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<sup>9~15)</sup>。

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。

## 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, ガスタンボナーデ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, ガスタンボナーデ施行の有無, 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DRVS3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<sup>2)</sup>。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

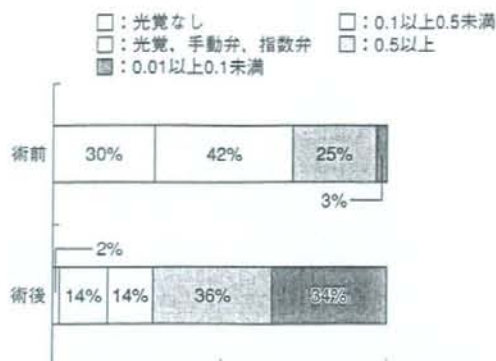


図1 硝子体手術の術前・術後6か月の視力分布  
術前・術後の視力の分布に統計学的に有意な差がみられた。p=0.0000023, Fisherの正確確率検定。n=64(眼)。

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<sub>1c</sub>(以下、HbA<sub>1c</sub>)、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ズ法を用いた。

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

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

表 2 硝子体手術後 6 か月の視力 0.5 以上と全身因子の検討

	0.5 以上	0.5 未満	p
年齢 (歳)	52.8±11.8	57.6±13.7	0.174
糖尿病罹病期間 (年)	14.9±8.1	12.8±11.1	0.162
HbA <sub>1c</sub> (%)	7.8±2.3	8.1±2.2	0.355

数値は平均±標準偏差。Wilcoxon の順位和検定。

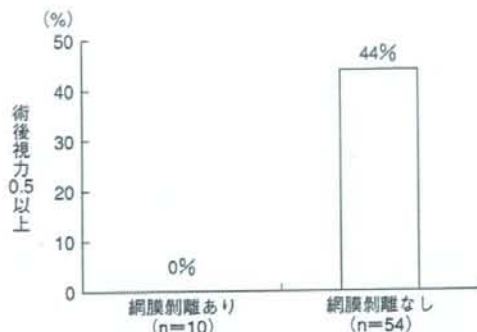


図 3 網膜剥離の有無と硝子体手術後 6 か月の視力 0.5 以上の割合

統計学的に有意な関連がみられた。p=0.0246, Fisher の正確確率検定。

生じていた 13 眼中術後視力 0.5 以上が 8 眼 (62%) であったのに対し、部分 PVD または PVD が発生していなかった 50 眼においては 14 眼 (28%) と有意差があった (Fisher の正確確率検定, p=0.0467, 1 眼は診療録で PVD の状態の記載が確認できなかった) (図 2)。

網膜剥離の有無については、網膜剥離がある 10 眼中術後視力 0.5 以上が得られた症例がなかったのに対して、網膜剥離がなかった 54 眼中術後視力 0.5 以上は 22 眼 (44%) であり、2 群間に有意差があった (Fisher の正確確率検定, p=0.0246) (図 3)。網膜剥離を起こしていた 10 眼のうち、裂孔原性網膜剥離は 1 眼、牽引性網膜剥離が 9 眼であった。PVD と網膜剥離の間には有意な関連はなかった (Fisher の正確確率検定, p=0.100)。手術術式としてガスタンボナーデを行った症例のうち、術後視力 0.5 以上は 14%, 行わなかった症例では、術後視力 0.5 以上は 49% であり有意差があった (Fisher の正確確率検定, p=0.00651)。ガスタンボナーデと術前網膜剥離には

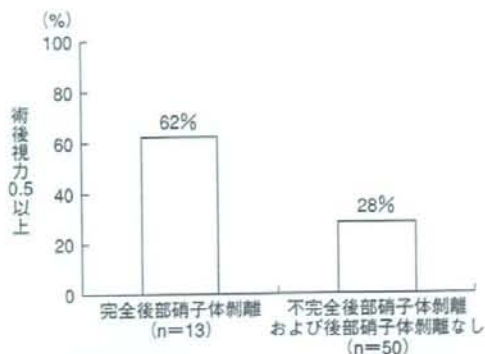


図 2 後部硝子体剥離の状態と硝子体手術後 6 か月の視力 0.5 以上の割合

統計学的に有意な関連がみられた。p=0.0467, Fisher の正確確率検定。

有意な関連があった (Fisher の正確確率検定, p=0.00000895)。

手術時期、術前視力、硝子体出血、術前網膜光凝固、増殖膜、血管新生重症度、黄斑剥離、白内障手術については、術後 6 か月で視力 0.5 以上の割合に有意差がなかった (表 1)。初回硝子体手術後に再手術を施行した症例は 10 眼であり、再手術の回数は 1 回が 7 眼、2 回が 2 眼、3 回が 1 眼であった。再手術の理由の内訳は、再出血 6 眼、術後網膜剥離 3 眼、シリコンオイル抜去 2 眼、血管新生緑内障 1 眼 (重複あり) であった。再手術を行わなかった 54 眼中 20 眼 (37%) は術後 6 か月での視力が 0.5 以上となった。1 回以上行った 10 眼中術後 6 か月の時点で 0.5 以上を得られた症例は 2 眼 (20%) であり、この 2 群で有意差はなかった (Fisher の正確確率検定, p=0.472)。術後視力 0.5 以上を得られた症例は、再手術を行わなかった眼の 34%, 1 回行った眼の 14%, 2 回の 50%, 3 回の 0% であり、手術回数と 0.5 以上の視力予後には関連がなかった (Fisher の正確確率検定 p=0.656)。術前網膜剥離のみられた 10 眼のうち 30% に黄斑剥離があった。

全身的背景の 1 つである術前インスリン使用の有無について、インスリン治療中の 31 眼中 15 眼 (48%) で術後 6 か月の視力が 0.5 以上であったのに対し、インスリンを使用していなかった 31 眼中術後視力 0.5 以上であったのが 6 眼 (19%) と有意に低率であった (Fisher の正確確率検定, p=0.031)。その他の年齢、糖尿病罹病期間、HbA<sub>1c</sub>

で有意差がなかった(表2)。術後視力0.5以上の割合は、性別(男性48眼中38%、女性16眼中25%、Fisherの正確確率検定、 $p=0.544$ )、高血圧(ありの32眼中31%、なしの32眼中38%、Fisherの正確確率検定、 $p=0.793$ )、糖尿病性腎症(ありの16眼中31%、なしの48眼中35%、Fisherの正確確率検定、 $p=1.000$ )、大血管症(ありの5眼中20%、なしの59眼中36%、Fisherの正確確率検定、 $p=0.652$ )の各因子においていずれも有意差はなかった。術前のインスリン治療とHbA<sub>1c</sub>(Wilcoxonの順位和検定、 $p=0.776$ )、腎症(Fisherの正確確率検定、 $p=0.556$ )、大血管症(Fisherの正確確率検定、 $p=0.394$ )、高血圧(Fisherの正確確率検定、 $p=0.588$ )に有意な関連はなかった。なお、表1、2での各群の数は診療録に記載が確認されたもののみを用いたため、総数が対象眼総数64眼未満になっている項目がある。

## (2) 重回帰分析

術前因子により、術後6か月の時点で0.5以上の視力を獲得するのに関連する因子を検討する目的で行った。従属変数は術後6か月の視力0.5以上になる割合、独立変数としては上記の検討で術後6か月の視力0.5以上との個々の因子の関連の解析で危険率が0.1以下となった術前因子である血管新生重症度、術前網膜剥離、PVD、インスリン治療の4因子で、ステップワイズ法で独立変数の選択を行った。すべての因子がそろって解析できた44眼において解析を行った。術後6か月の視力0.5以上は相互に関係のない因子として術前網膜剥離、インスリン治療との関連がみられ、重相関係数は0.478、 $p=0.00485$ であった。

## 考 按

### 1. 増殖糖尿病網膜症に対する硝子体手術の結果に関連する因子について

本研究ではPDRに対する硝子体手術の予後予測をするために、レトロスペクティブに診療録を調べ、手術結果に影響する因子を検討した。これまでPDRに対する硝子体手術の適応を決めるためのエビデンスとしてはDRVSが報告されている。DRVS2報および5報では、deferral vitrectomy groupに比較してearly vitrectomy groupでは視力予後がよいことを示している。今後、単に失明を

防ぐだけではなく、よりよい視力予後を目指した診療体系の構築が必要になると考え、本研究では片眼読書可能とされる術後視力0.5以上に関連する術前、術中、術後の条件について検討を行った。

その結果、術前の眼科的所見としてはPVDの有無、網膜剥離の有無、手術の術式としてはガスタンボナーデの施行、全身因子としてはインスリン治療の有無が術後6か月における視力0.5以上の達成に統計学的に有意に関連していた。個々の因子の臨床的な意義について以下に検討を加える。

### 2. 術前の眼科所見

完全なPVDが生じていること、および網膜剥離を生じていないことが術後視力0.5以上と有意に関連していた。PVDと網膜剥離の間には有意な関連はなかった( $p=0.100$ )。PVDが生じることで新生血管の伸展が抑制される<sup>16)</sup>ことや、網膜への牽引が弱まり牽引性網膜剥離が生じにくくなることも考えられるが、今回の検討では有意な関連はなかった。病態としては相互に関連している可能性があるとは考えられるが、後述のようにPVD、術前網膜剥離の両方を独立変数として加えて多変量解析を行うと、網膜剥離の有無が術後6か月の視力0.5以上に関与する因子としてインスリン治療とともに選択された。術前網膜剥離のある症例はそのほとんどが牽引性網膜剥離であった。

この結果からPDRにおいては網膜剥離、特に牽引性網膜剥離を生じる前に手術を行ったほうが視力予後がよいと考えられる<sup>10,15)</sup>。術前網膜剥離がみられた眼のうち30%のみが黄斑剥離を起こしているだけであった。これまでの研究では術前黄斑剥離があると視力予後が悪いことが報告されているが<sup>9,12-14)</sup>、今回の結果をみると必ずしも黄斑剥離のみが視力予後と関連するのではないことが推定される。網膜血管病変が進行して線維血管性増殖膜の形成を生じるような網膜の病態では、黄斑浮腫や虚血、視神経機能の障害など良好な視力予後を期待することが難しい条件が発生しているのかもしれない。

### 3. 術式について

ガスタンボナーデを行った症例は術後視力0.5以上の割合が有意に低かった。ただし、ガスタンボナーデを施行した症例は、網膜剥離と有意に関連していたことからガスタンボナーデという手技



自体と術後視力の関連については慎重に考える必要がある。

#### 4. 再手術について

初回硝子体手術後、再手術を施行した症例は10眼であり、再手術の回数と術後視力との関連は認められなかった。再手術の原因としては再出血が最も多く、次いで再剥離となっていた。石田ら<sup>17)</sup>も再手術の理由の最多は硝子体出血、次いで血管新生緑内障としている。さらに石田ら<sup>17)</sup>は初回手術の術前視力より低下したものの50%、失明24眼中2眼(8%)とその厳しい視力予後を報告している。

今回の筆者らの症例では、術後6か月の時点で0.5以上になる確率は再手術を行わなかった場合37%、再手術を行った場合には20%であったが、統計学的に有意差はなかった。筆者らの対象眼と石田ら<sup>17)</sup>の報告の対象眼の重症度が異なっていた可能性もあり、結果の解釈は慎重に行う必要があるが、再手術を行っても必ずしも良好な視力予後についての成績が低くなるわけではないことを今回の結果は示している。

#### 5. 全身因子について

全身因子について検討した結果、術後視力と有意に関連が認められたものはインスリン治療のみであった。これまでの報告でも、血糖のコントロールと硝子体手術の結果に関連を示す報告があることから<sup>12,18)</sup>、インスリン治療とHbA<sub>1c</sub>、さらには他の全身因子との間に関連がないかを検討したがどの因子とも関連はなかった。特に血糖コントロールの状態を示すHbA<sub>1c</sub>値と関連が認められなかったことから、インスリン治療が術後視力に影響する意義について今回の検討では明らかにできなかった。

#### 6. 多因子での解析と術後視力予後予測について

術前の因子で術後6か月の視力0.5以上を予測するために多変量解析を行った。術後6か月に関連する相互に関係のない術前網膜剥離、インスリン治療との関連がみられ、重相関係数は0.478( $p=0.00485$ )であった。木内ら<sup>19)</sup>は眼局所因子として術前網膜剥離が起こらない前に手術を行うことを検討する意味のあることを示している。坂本ら<sup>9)</sup>は多変量解析を行い、術後視力改善と視力改善後低下した群を分ける重要な因子を解析し、術

前乳頭線維性増殖、術後黄斑変性が関連することを示している。小田ら<sup>20)</sup>は1年以上経過観察ができた糖尿病網膜症に対する硝子体手術の術後視力予後について、多変量解析を用いて検討した結果、術後0.5以上の視力に関連する因子として、術前因子としては手術の理由が硝子体出血、術前視力0.1以上、腎症なし、術前網膜光凝固があること、黄斑剥離なし、虹彩新生血管がないことなどを挙げている。

今回の筆者らの結果とは、小田ら<sup>20)</sup>の報告での網膜剥離の有無については同様の結果が得られているが、他の因子では必ずしも一致していない。理由としては手術の対象となった患者の状態が異なっていることが最も考えられるが、PDRの網膜虚血→血管新生→線維性増殖膜形成とつながる病態の重症度と関連する因子として、術前乳頭線維性増殖、硝子体出血、術前網膜光凝固などが関連することが考えられ、同様の傾向をもった結果と考えられる。

以上、本研究では当施設でのPDRに対する硝子体手術後に0.5以上の視力を達成するといった良好な視力予後と関連する因子、所見について検討した。多変量解析の結果、有意に関連する因子として、網膜剥離がないこと、およびインスリン治療を行っていることが認められた。手術適応の決定や患者への説明に役立てるためにさらにデータを集積して検討したい。

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(C)の補助を受けた。

#### 文 献

- 1) The Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group: Early vitrectomy for severe vitreous hemorrhage in diabetic retinopathy. DRVS Report 2. Arch Ophthalmol 103: 1644-1652, 1985
- 2) The Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group: Early vitrectomy for severe proliferative diabetic retinopathy in eyes with useful vision. DRVS Report 3. Ophthalmology 95: 1307-1320, 1988
- 3) The Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group: Early vitrectomy for severe vitreous hemorrhage in diabetic retinopathy. Four-year results of a randomized trial: DRVS Report 5. Arch Ophthalmol 108: 958-964, 1990

- 4) 大家義則・中田こう・坂口裕和・他：糖尿病網膜症に対する硝子体手術例の変遷。眼紀 54：339-343, 2003
- 5) 樋口暁子・山田晴彦・河合江実・他：増殖糖尿病網膜症の硝子体手術—10年前との比較。日眼会誌 109：134-141, 2005
- 6) 佐藤幸裕：手術療法。眼科 46：177-183, 2004
- 7) 藤田ひかる・村田敏規：糖尿病網膜症の治療。硝子体手術を行う good timing は？ あたらしい眼科 21：471-476, 2004
- 8) 大越貴志子：糖尿病網膜症の治療—新しい展開。眼科 47：29-36, 2005
- 9) 坂本泰二・藤澤公彦・川野庸一・他：糖尿病網膜症に対する硝子体手術後の視力低下要因。臨眼 54：1491-1498, 2000
- 10) 石田政弘・竹内 忍：増殖糖尿病網膜症に対する硝子体手術の長期成績。日眼会誌 105：457-462, 2001
- 11) 小川邦子・中尾 功・松井淑江・他：視力改善保持を目的とした術前視力良好の糖尿病網膜症に対する硝子体手術。眼科手術 14：493-496, 2001
- 12) 荒川 明：増殖糖尿病網膜症の良好な術後視力に關与する因子について。眼紀 52：838-841, 2001
- 13) 花井 徹・小柴祐介・渋谷宏人・他：50歳未満の増殖糖尿病網膜症に対する硝子体手術成績。臨眼 55：1195-1198, 2001
- 14) 野間英孝・皆本 敦・溝手秀秋・他：増殖糖尿病網膜症における黄斑部を含む牽引性網膜剥離に対する手術成績。眼紀 53：870-873, 2002
- 15) 植木麻理・南 政宏・今村 裕・他：増殖糖尿病網膜症の硝子体手術適応。臨眼 57：1831-1834, 2003
- 16) Kakehashi A, Ohno R, Yamagami H et al：Progression of posterior vitreous detachment and prognosis of diabetic retinopathy. Diabetologia 46：A393, 2003
- 17) 石田正也・玉置 晋・西垣士郎・他：再手術を要した糖尿病網膜症。眼紀 52：855-858, 2001
- 18) 小川邦子・馬渡祐記・石郷岡均・他：若年者性糖尿病網膜症に対する硝子体手術に影響を与える諸因子の検討。眼紀 51：22-25, 2000
- 19) 木内克治・山田晴彦・河合江実・他：糖尿病網膜症に対する硝子体手術施行症例の傍眼から検討した硝子体手術の施行時期。眼紀 55：96-99, 2004
- 20) 小田 仁・今野公士・三井恭子・他：糖尿病網膜症に対する硝子体手術—最近の5年間の検討。日眼会誌 109：603-612, 2005

医療事故を防ぐために医療者が察知すべきことは何か

## 患者安全の システムを創る

米国JCAHO推奨のノウハウ

監訳 相馬孝博 名古屋大学医学部附属病院医療安全管理部・助教授

「患者に害を与えてはならない」という医療行為における古からの大前提は、近年いっそう先鋭的に問われている。米国で蓄積された医療事故の膨大なデータベースからそれが起こる様々な状況を分析し、医療者が察知すべき指標を提唱した患者安全確保のための実践書の翻訳。訳出にあたり用語を慎重に吟味し、原著の内容を忠実に伝える。

● B5 頁224 2006年 定価3,990円(本体3,800円+税5%) [ISBN978-4-260-00147-2]



医学書院

〒113-8719 東京都文京区本郷1-28-23 <http://www.igaku-shoin.co.jp>  
 【販売部】TEL 03-3817-5657 FAX 03-3815-7804 E-mail [sd@igaku-shoin.co.jp](mailto:sd@igaku-shoin.co.jp)  
 振替 00170-9-96693 消費税率変更の場合、上記定価は税率の差額分変更になります。