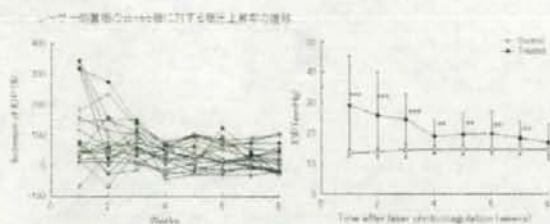


ント法による蛍光発現RGCを計測して、障害度を比較した。

高眼圧モデルと神経保護

図21 レーザー高眼圧モデルの長期眼圧推移



左: 各マウスの眼圧推移。8週目まで持続している。右: 眼圧平均のグラフ。7週までは対照組に比して有意に眼圧上昇している。

C. 研究結果

(4) 緑内障動物モデルおよび分子生物学的研究

4-1 3種のフラボノイドによる低酸素負荷

に対する細胞死の抑制効果 (図2, 3, 4)

Kaempferol 3-o-rutinoside, Quercetin 3-o-rutinoside and Quercetin 3-o-rhamnosideは濃度依存性に、それぞれ1nM、1nM、100nMの濃度から細胞死の抑制効果を示した。(p<0.05, Dunnet test) Quercetin 3-o-rhamnoside の効果が最も弱かった。

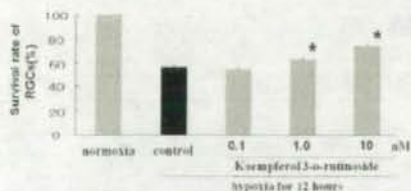


Figure 2: Effects of Kaempferol 3-o-rutinoside against hypoxia-induced RGCs death. The survival rate of RGCs increased significantly in a dose-dependent manner with Kaempferol 3-o-rutinoside at 1.0 and 10nM. Each value represents mean \pm S.D. (n=8). Asterisk indicates p<0.05 vs. hypoxia control (black bar) by Dunnet test.

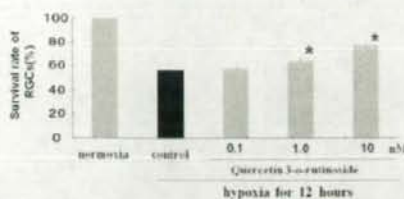


Figure 3: Effects of Quercetin 3-o-rutinoside against hypoxia-induced RGCs death. The survival rate of RGCs increased significantly in a dose-dependent manner with Quercetin 3-o-rutinoside at 1.0 and 10nM. Each value represents mean \pm S.D. (n=8). Asterisk indicates p<0.05 vs. hypoxia control (black bar) by Dunnet test.

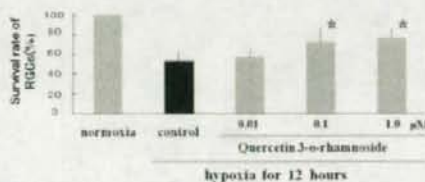


Figure 4: Effects of Quercetin 3-o-rhamnoside against hypoxia-induced RGCs death. The survival rate of RGCs increased significantly in a dose-dependent manner with Quercetin 3-o-rhamnoside at 0.1 and 1μM. Each value represents mean \pm S.D. (n=8). Asterisk indicates p<0.05 vs. hypoxia control (black bar) by Dunnet test.

4-2 3種のフラボノイドによるグルタミン酸負荷に対する細胞死の抑制効果 (図5, 6, 7)

Kaempferol 3-o-rutinoside, Quercetin 3-o-rutinoside and Quercetin 3-o-rhamnosideは濃度依存性に、それぞれ1nM、1nM、100nMの濃度から細胞死の抑制効果を示した。(p<0.05, Dunnet test) Quercetin 3-o-rhamnoside の効果が最も弱かった。

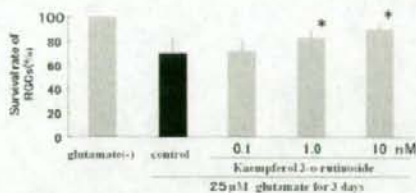


Figure 5: Effects of Kaempferol 3-o-rutinoside against glutamate-induced RGC's death. The survival rate of RGC's increased significantly in a dose-dependent manner with Kaempferol 3-o-rutinoside at 1.0 and 10nM. Each value represents mean \pm S.D.(n=10). Asterisk indicates $p < 0.05$ vs. glutamate control (black bar) by Dunnet test.

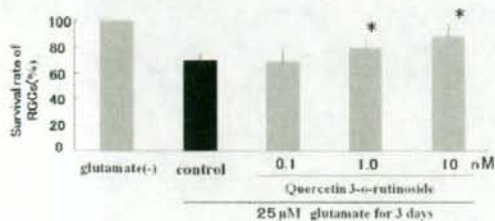


Figure 6: Effects of Quercetin 3-o-rutinoside against glutamate-induced RGC's death. The survival rate of RGC's increased significantly in a dose-dependent manner with Quercetin 3-o-rutinoside at 1.0 and 10nM. Each value represents mean \pm S.D.(n=10). Asterisk indicates $p < 0.05$ vs. glutamate control (black bar) by Dunnet test.

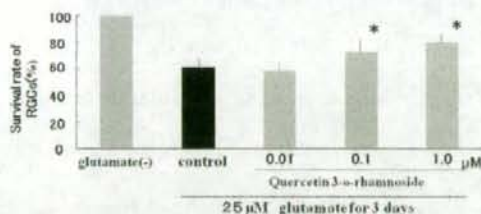


Figure 7: Effects of Quercetin 3-o-rhamnoside against glutamate-induced RGC's death. The survival rate of RGC's increased significantly in a dose-dependent manner with Quercetin 3-o-rhamnoside at 0.1 and 1 μ M. Each value represents mean \pm S.D.(n=10). Asterisk indicates $p < 0.05$ vs. glutamate control (black bar) by Dunnet test.

4-3 3種のフラボノイドによる酸化ストレス負荷に対する細胞死の抑制効果 (図8)

Kaempferol 3-o-rutinoside, Quercetin 3-o-rutinoside and Quercetin 3-o-rhamnosideは濃度依存性に、それぞれ1nM、0.1nM、100nMの濃度から細胞死の抑制効果を示した。

($p < 0.05$, Dunnet test) Quercetin 3-o-rutinoside の効果が最も強いことが判明した。

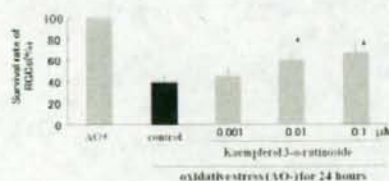


Figure 10: Effects of Kaempferol 3-o-rutinoside against oxidative stress-induced RGC's death. The survival rate of RGC's increased significantly in a dose-dependent manner with Kaempferol 3-o-rutinoside at 0.01 and 0.1 μ M. Each value represents mean \pm S.D.(n=10). Asterisk indicates $p < 0.05$ vs. (ACU-) control (black bar) by Dunnet test.

4-4 低酸素、グルタミン酸負荷による細胞

死に対するアポトーシスシグナルの関与

カスパーゼ3の濃度は低酸素負荷によりコ

ントロール群Quercetin 3-o-rutinoside群

でそれぞれ0.802 \pm 0.14、0.576 \pm 0.21 (A

405nm吸光度Arbitrary unit)で有意に (N=6,

$p < 0.05$, t-test) Quercetin 3-o-rutinoside

群におけるカスパーゼ3濃度が減少してい

た。(図11) 同様に、グルタミン酸負荷でも

コントロール群Quercetin 3-o-rutinoside

群でそれぞれ0.843 \pm 0.25、0.613 \pm 0.15 (A

405nm吸光度Arbitrary unit)で有意に (N=6,

$p < 0.05$, t-test) Quercetin 3-o-rutinoside

群におけるカスパーゼ3濃度が減少してい

た。(図12) 従って低酸素負荷およびグルタ

ミン酸負荷実験系ではおもにアポトーシス

による細胞死が起こり、フラボノイドがそれ

を抑制していることが判明した。

Figure 11

ルチンの低酸素に対するカスパーゼ3の濃度測定結果

試薬名	A _{405nm}
コントロール	0.802±0.14
ルチン (濃度 = 10 ⁻⁶ M)	0.576±0.21 *

コントロール=低酸素負荷12時間

ルチン= Quercetin 3-O-rutinoside

Mean±SD, t-test *p<0.05 vs. N=6

Figure 12

ルチンのグルタミン酸に対するカスパーゼ3の濃度測定結果

試薬名	A _{405nm}
コントロール	0.843±0.25
ルチン (濃度 = 10 ⁻⁶ M)	0.613±0.16 *

コントロール=Glutamate25μM負荷72時間

ルチン= Quercetin 3-O-rutinoside

Mean±SD, t-test *p<0.05 vs. N=10

4-5 酸化ストレスによる細胞死に対するネクロシスシグナルの関与

カルパインの濃度は酸化ストレス負荷によりコントロール群Quercetin 3-o-rutinoside群でそれぞれ0.782±0.19、0.501±0.23 (A_{405nm}吸光度Arbitrary unit)で有意に (N=6, p<0.05, t-test) Quercetin 3-o-rutinoside群におけるカルパイン濃度が減少していた。(図13) 従って酸化ストレス負荷実験系ではおもにネクロシスによる細胞死が起こり、フラボノイドがそれを抑制していることが判明した。

Figure 13

ルチンの酸化ストレスに対するカルパインの濃度測定結果

試薬名	A _{405nm}
コントロール	0.782±0.19
ルチン (濃度 = 10 ⁻⁶ M)	0.501±0.23 *

コントロール=酸化ストレス負荷24時間

ルチン= Quercetin 3-O-rutinoside

Mean±SD, t-test *p<0.05 vs. N=6

5. in vivo蛍光蛋白発現網膜神経節細胞を用いたレーザー高眼圧モデルの作成とカルシウムチャンネル拮抗薬の神経保護効果

5-1. 高眼圧モデル作成と眼圧の推移

図15に施行した高眼圧モデルの方法と成功率を示す。残念ながら、レーザー高眼圧以外には効果が低く、今後レーザー高眼圧モデルによる実験を進めることにした。図16はレーザー照射状況を示す。高眼圧になると周辺隅角が閉塞し、前房も深くなることわかる(図17)組織学的にも隅角が閉塞していることわかる(図18)眼圧負荷量を算出する例を示す(図19)。レーザー照射により早期に炎症が惹起されるが、非常に高眼圧になれば眼圧負荷を凌駕する虚血性視神経症を惹起する可能性があり、高眼圧モデルとしては不適當である。今回初期の眼圧変動を詳細に検討したところ、(図20)虚血性視神経症をおこすような眼圧上昇は確認できなかった。図21に全マウスの眼圧推移と平均眼圧のグラフを示す。術後7週間まで、処置眼が有意に眼圧が高かった。

図15

高眼圧モデル作成

方法	成功率
レーザー光凝固で隅角を焼灼	80%
ラテックス粒子を前房に注入	10%
ghost cellを前房に注入	0%
熱ゲル化基剤を前房に注入	0%
上強膜静脈を焼灼または結紮	0%
結膜嵌入	0%



レーザー高眼圧モデル以外は作成不可能であった

図16

高眼圧モデル作成: 前眼部写真



左 前房水を除去して、前房を消失させた後にレーザー照射を行う。右 レーザー照射後2週目の前眼部写真。輪廊レーザー照射部位に色素斑が見える。

図17

高眼圧モデル作成

対照眼 処置眼



左の対照眼に比して右では前房が深くなっていることがわかる

図18

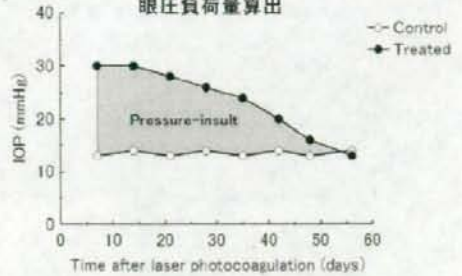
高眼圧モデル作成: 組織学的検討



レーザー高眼圧モデル前眼部の組織切片。左はコントロール眼であり、右のレーザー処置眼では隅角が閉塞していることがわかる。

図19

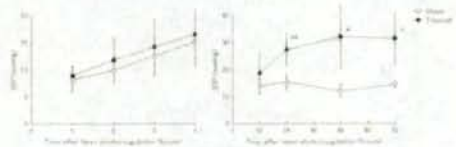
眼圧負荷量算出



レーザー高眼圧モデルの眼圧負荷量の算出。8週目までの眼圧をプロットし、処置眼の眼圧と対照コントロール眼の眼圧によりかまれた塗りつぶし部分を眼圧負荷量として算出した。

図20

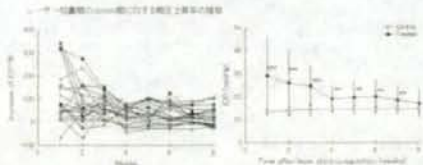
レーザー高眼圧モデルの早期眼圧推移



左 レーザー処置後4時間までの眼圧上昇 右 レーザー照射後7時間までの眼圧上昇

図21

レーザー高眼圧モデルの長期眼圧推移



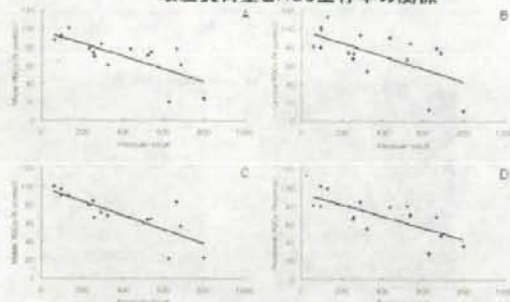
左 各マウスの眼圧推移。8週目まで持続している。右 眼圧平均のグラフ。7週までは対照眼に比して有意に眼圧上昇している。

5-2. 眼圧上昇による RGC 生存率の全体及び部位別検討

図22, 23に示すように、全体および12カ所の網膜、中央、中間、周辺および4象限において、いずれも眼圧負荷値に関連した生存率の低下がみられた。上方の細胞がやられやすい傾向が判明した。図24は2ヶ月後のRGC減少を示すフラットマウント像を示している。

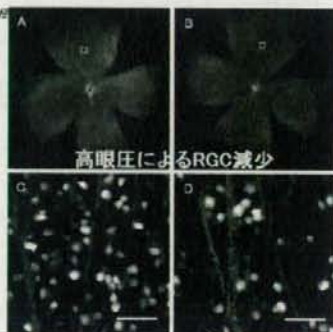
図23

眼圧負荷量とRGC生存率の関係



網膜全体ならびに中央、中間、周辺3エリアの眼圧負荷量とRGC生存率の相関図。いずれも有意に相関する。

図24



高眼圧によるRGC減少

Flat mount網膜蛍光顕微鏡写真。AC: コントロール眼の全体と上方のRGC BD: 高眼圧眼の全体と上方のRGC

5-3 ニルバジピン腹腔内投与による神経保護効果の検討

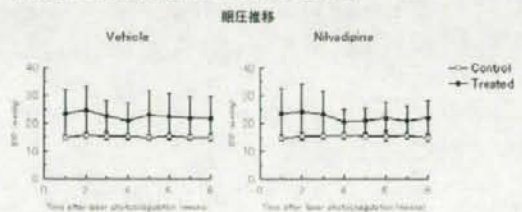
治療群とコントロール群の眼圧推移(図25)体重推移(図26)の経過を示す。両群間に差は見られなかった。2ヶ月後の全体および中心、中間、周辺の3カ所の細胞数を計測したところ(図27)高眼圧コントロール群では全体で 1156 ± 351 、ニルバジピン治療群では 1366 ± 131 と有意にニルバジピン腹腔内投与によるRGCの生存率上昇が見られた。図28, 29に部位別の眼圧負荷値と生存率の散布図を示す。有意にニルバジピン投与群において、眼圧負荷値に対しての生存率低下が少な

く、ニルバジピン腹腔内投与は高眼圧による神経保護効果に有効であることが判明した。図30は蛍光顕微鏡写真による生存したRGC像である。ニルバジピン投与群における蛍光発現量が多いのが明瞭である。

図25

高眼圧による細胞死に対するニルバジピンの神経保護効果

片眼レーザーによる高眼圧。倣眼をコントロールとしたマウスを2群に分け、2ヶ月間観察
1群(N=23)はvehicle投与、2群(N=14)はニルバジピン投与

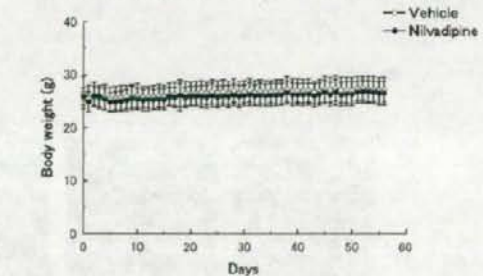


眼圧推移

眼圧負荷に両群間の差はない

図26

ニルバジピン治療群とコントロール群における体重推移



体重変動に両群間の差はない

図27

ニルバジピンによる神経保護効果: RGC生存数

	RGC number			
	Non-treated		Laser treated	
	Vehicle	Nivabazine	Vehicle	Nivabazine
Central	1449 ± 150	1466 ± 97	1139 ± 376	1361 ± 176*
Middle	1471 ± 161	1467 ± 120	1181 ± 366	1401 ± 139
Peripheral	1465 ± 137	1380 ± 127	1148 ± 326	1336 ± 140*
Whole	1462 ± 120	1440 ± 69	1156 ± 351	1366 ± 131*

AUC	Non-treated		Laser treated	
	Vehicle	Nivabazine	Vehicle	Nivabazine
	730 ± 31.4	739 ± 37.4	1085 ± 255.6	1059 ± 252.9

レーザー高眼圧群無治療群では有意にRGCが減少するが、ニルバジピン腹腔内投与により、レーザー無知群と同じ細胞数を保つことができる。

図28

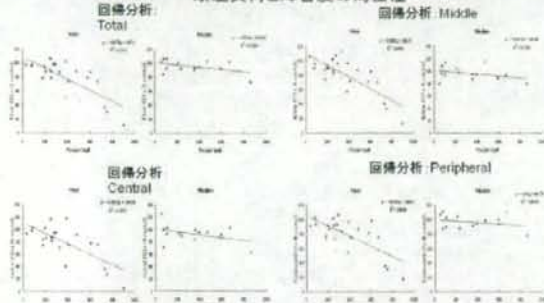
高眼圧による細胞死に対するニルバジピンの神経保護効果
正常眼圧 高眼圧負荷



ニルバジピン投与により眼圧負荷に対する細胞死が有意に減弱する

図29

高眼圧による細胞死に対するニルバジピンの神経保護効果
眼圧負荷と障害度の局在性



ニルバジピン投与により眼圧負荷に対する細胞死が有意に減弱する

図30

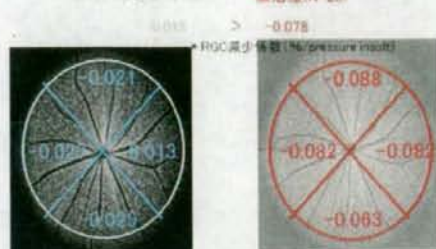
部位別細胞減少



ニルバジピン投与により眼圧負荷に対する細胞死が有意に減弱するが、部位による明らかな差はない

図31

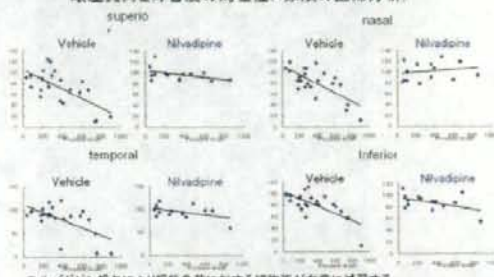
高眼圧によるRGC細胞死に対するニルバジピンの保護効果
薬治療(N=23)



ニルバジピン投与により眼圧負荷に対する細胞死が有意に減弱する

図32

高眼圧による細胞死に対するニルバジピンの神経保護効果
眼圧負荷と障害度の局在性(4象限の回帰分析)



ニルバジピン投与により眼圧負荷に対する細胞死が有意に減弱する

D. 考察

4. in vitroラット網膜神経節初代培養系を用いたフラボノイドによる細胞死抑制効果

側鎖の異なる3種のフラボノールは、糖鎖一つの置換により大きく薬理作用が変化したことより、何らかの活性基を介して薬理作用を起こす物質群と考えられる。我々の実験系では酸化ストレス負荷は主にネクロシス、グルタミン酸負荷は主にアポトーシスによる細胞死を誘導することから、今回用いた3種のフラボノイドは異なる細胞死に共通するシグナルを抑制していると考えられ、緑内障などの多因子による細胞死を惹起する病態に有用である可能性がある。中でも、Que

retin 3-o-rutinosideは極めて高い活性を有する可能性が示唆された。10-11Mの低濃度で効果的な薬剤は非常に少なく、これまでの発表でも極めて低濃度での神経保護効果を有することが判明したことが興味深い。おそらく糖鎖と水酸基の位置が重要であると考えられ、今後、類似物質を用いた活性相関を検討することで、より強い生理活性を持つフラボノイドを見いだせる可能性がある。

5. *in vivo*蛍光蛋白発現網膜神経節細胞を用いたレーザー高眼圧モデルの作成とカルシウムチャンネル拮抗薬の神経保護効果
今まで人工的に作成した高眼圧モデルマウスでの神経保護効果を試みた報告はない。自然発症高眼圧モデルマウスであるDBA2Jマウスはマウス個体間の眼圧上昇のばらつきが大きく、両眼が高眼圧になるため、片眼をコントロール眼として利用できないため、コントロール群はバックグラウンド系統のマウスを持ちいらざるを得ず、真の対照群との比較が困難であり大きな欠点である。なおかつ、大量のマウスを用いる必要と、RGCの障害を評価するために大脳上丘から侵襲的に逆行性に蛍光色素を投与する必要があることから、実験に多大な労力を有する。この点で、我々のCFPマウスによるレーザー高眼圧モデル法は細胞計数も容易であり且つ、無処置眼である対側をコントロールにおけることからより正確な評価が可能となった。短期間で数も揃えやすく扱いも簡単なマウスでのモ

デルおよび評価系は、NTGの治療に有望な血流改善や神経保護薬をスクリーニングする系として極めて有用である。現にカルシウムチャンネル拮抗薬の一つであるニルバジピンの腹腔内投与により、神経保護効果が証明されたことは極めて興味深い。眼圧下降とは異なる機序での神経保護効果を有する薬剤の開発は特にNTGの多い日本では急務であり、今回の結果は極めて有意義であると考えられる。

E. 結論

4. *in vitro*ラット網膜神経節初代培養系を用いたフラボノイドによる細胞死抑制効果

今回検討した3種類のフラボノイドは全て緑内障性視神経障害に関与するストレスである、低酸素、グルタミン酸、および酸化ストレスによるラット網膜神経節細胞死を軽減させた。フラボノイドは細胞死の両形態アポトーシス、ネクローシス双方に対して網膜神経節細胞に直接作用し細胞死を抑制する可能性が示された。従って経口摂取可能で植物に多く含まれるこれらのフラボノイドは神経保護薬として将来期待できる薬物である。

5. *in vivo*蛍光蛋白発現網膜神経節細胞を用いたレーザー高眼圧モデルの作成とカルシウムチャンネル拮抗薬の神経保護効果
短期間で数も揃えやすく扱いも簡単なマウスでの高眼圧モデルとそのRGC評価方法を確立した。本モデルおよび評価系は、NTGの治

療に有望な血流改善や神経保護薬をスクリーニングする系として極めて有用である。カルシウムチャンネル拮抗薬の一つであるニルバジピンの腹腔内投与による神経保護効果を証明し、眼圧下降とは異なる機序での神経保護効果を有する薬剤の開発に向けての成果が得られた。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Saeki T, Ohashi M, Aihara M, Araie M. The efficacy of Tonolab in detecting physiological and pharmacological changes of mouse intraocular pressure - comparison with TonoPen and Microneedle manometry. *Curr Eye Res* 2008 33(3):247-52.

2. Murata H, Aihara M, Chen YN, Ota T, Numaga J, Araie M. Imaging Mouse Retinal Ganglion Cells and Their Loss in vivo by a Fundus Camera in the Normal and Ischemia-Reperfusion Model. *IOVS* 2008 49:5546-5552

Saito H, Tomidokoro A, Yanagisawa M, Iwase A, Araie M. Sensitivity and specificity with the glaucoma probability score in Heidelberg Retina Tomograph II in Japanese eyes. *J Glaucoma*. 2009 Mar;18(3):227-32.

Abe H, Shirakashi M, Tsutsumi T, Araie M, Tomidokoro A, Iwase A, Tomita G, Yamamoto T; Tajimi Study Group. Laser scanning tomography of optic discs of the normal Japanese popul

ation in a population-based setting. *Ophthalmology*. 2009 Feb;116(2):223-30. Epub 2008 Dec 12.

Saito H, Tomidokoro A, Tomita G, Araie M, Wakakura M. Optic disc and peripapillary morphology in unilateral nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy and age- and refraction-matched normals. *Ophthalmology*. 2008 Sep;115(9):1585-90. Epub 2008 Mar 14.

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

- 2008 第112回日本眼科学会総会 毛蔚 (東京大学), 佐伯忠陽朗, 陳逸寧, 相原一, 新家真フラボノイドの網膜神経節細胞保護効果 その細胞内Pathwayの検討
- 2008 第112回日本眼科学会総会 鶴我英和(東京大学), 相原一, 村田博史, 新家真CFP発現マウスを用いた眼圧依存性網膜神経節細胞障害の評価
- 2008 ARVO(視覚と眼科における国際研究会議)アメリカ合衆国フロリダ州フォートローダーデール H. Tsuruga, M. Aihara, H. Murata, M. Araie A Model for Easy Assessment of Pressure-Dependent Damage of Retinal Ganglion Cells Utilizing CFP-Expressing Transgenic Mouse

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

タイトル

緑内障患者におけるサイトカインの関与

分担研究者 阿部春樹 新潟大学教授

研究要旨:

緑内障の病態に関与する因子として、眼圧が神経障害の主因であることは明かである一方、どのような経路で視神経障害に至るかは明らかにされていない。特に正常眼圧緑内障では何故、眼圧が正常範囲内に留まるにも関わらず、視神経が障害されていくメカニズムや、網膜神経節細胞が選択的に障害されるメカニズムについては不明な点も多い。しかし、近年の研究から視神経障害の発症・進展を助長する因子として、循環障害、酸化ストレス、自己抗体などの免疫異常、サイトカイン・増殖因子の動態(TNF- α など)、細胞外マトリックスを消化する酵素であるマトリックスメタロプロテイナーゼ活性(MMP)の異常などを指摘するデータが明らかとなってきた。神経節細胞障害を来す機序として、近年ではTNF- α の関与が研究されるようになり、眼圧上昇に続いて眼内濃度が上昇し、神経障害機序がみられること、さらにはTNF- α の投与のみで同様の障害がみられることが明らかとなってきた。これらの機序は、緑内障性視神経障害の機序を解明する重要な鍵として注目される存在であり、緑内障症例での詳しい関与の解明が必要であると考えている。この、眼圧以外の神経障害促進因子として大きく関与していると考えられる、TNF- α に注目し、緑内障患者の眼内における濃度を測定し病態との関連を調べる計画を立てた。

A.研究目的

これまでの緑内障による病因・病態メカニズムに関する研究において、それぞれの因子の位置づけが曖昧であった。この研究ではサイトカインを緑内障の発症・進展に関わる因子として、関与の有無、さらに関与の程度を調査することを目的とした。緑内障の病型の中で、TNF- α 濃度に差がみられるか否かを検討する。差が見られた場合には、どのような病態と相関があるのかを検討する。

B.研究方法

対象は、緑内障患者の各病型(狭義の開放隅角緑内障、正常眼圧緑内障、落屑緑内障、原発閉塞隅角緑内障)、コントロールは加齢性白内障患者とした。眼内のサイトカインの調査をするため、前房水採取を各症例に対して施行した。前房水採取は手術中に執刀医が通常の濾過手術あるいは水晶体再建術の際に手術手技として作成した角膜穿刺創から

行った。採取には 27G ヒーロン針をツベルクリンシリンジに取り付けた容器を用いて約 0.1cc を採取した。採取後の前房水は研究責任医師及び研究分担医師によって速やかに冷凍保存し、倦怠中の抗酸化酵素活性値、TNF- α 濃度測定を検査試薬にて分析した。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮に関しては、新潟大学歯学部総合病院設置の院内倫理委員会の承認を得て、研究の参加には参加者本人の自由意思で参加し、内容については詳細説明を行い、実施前に文書による同意を得た。また、プライバシーの保護についても細心の注意をもち、データ管理は個人情報保護法に基づき行い、十分な倫理的配慮を加えた。

C. 研究結果

前房水中の TNF- α 陽性率は、緑内障群が加齢白内障群より有意に高かった。緑内障病型別比較の結果、原発開放隅角緑内障と正常眼圧緑内障では加齢性白内障患者より高い陽性率を認めたものの有意差はなく、嚢性緑内障患者では有意差をもって高かった。術前眼圧値と TNF- α 値との相関は見られなかった。

D. 考察

前房水中の TNF- α は緑内障の神経障害を示唆する因子であるといえるが、眼圧上昇のみが影響を与えているわけではないと考え

られる。緑内障病型の中でも高眼圧を示すことが多い落屑緑内障での TNF- α 陽性率が高かったことや、動物モデルで高眼圧に続いて眼内の TNF- α 濃度上昇を来していることから、眼圧との関与はあると考えられ、更なる検討が必要な課題である。しかしながら、今回の結果から緑内障眼では TNF- α の検出率が加齢白内障症例より有意差を持って高いことは、眼内における TNF- α 上昇は緑内障眼におけるグリア細胞障害の進行を示唆していると考えられた。緑内障における神経障害のメカニズムとして TNF- α が介在している可能性は高いと考えられた。

E. 結論

緑内障患者の前房水における TNF- α の検出率が有意に高く、神経障害の進行を示唆する可能性があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

The Concentration of TNF-alpha in Aqueous Humor of Glaucoma Patients 投稿中

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3.その他

なし。

タイトル

分担研究者 澤口昭一 琉球大学教授

研究要旨

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 Rowe されておらず、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 $> 19 \text{ mmHg}$ 、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、細隙灯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）

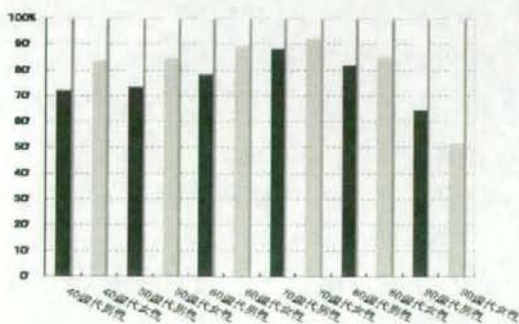
2. 検診参加率

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%



+ 検診参加率

■久米島町在住、40歳以上の住民 4632人中 3762名（81.2%）が参加

■参加者は女性が多かった。



3. 緑内障有病率

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%

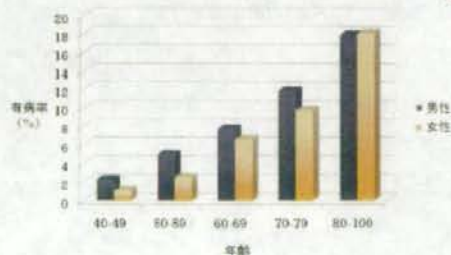
開放隅角緑内障有病率 約4%（正常眼圧緑内障約3%強）

その他の緑内障 3%。

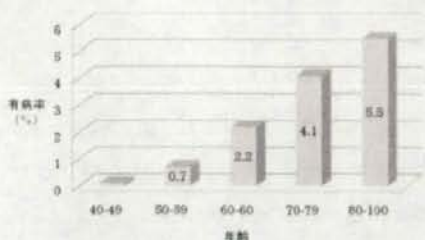
+ 緑内障の有病率：病型別

Diagnosis	number	Rate (%)	95% CI
原発開放隅角緑内障	150	3.99	(3.40-4.70)
原発閉塞隅角緑内障	81	2.15	(0.17-0.27)
水晶体毒性緑内障	14	0.37	(0.20-0.60)
その他の続発性緑内障	14	0.37	(0.20-0.60)
分類不詳	8	0.21	(0.10-0.40)

+ 男女別年代別有病率：緑内障



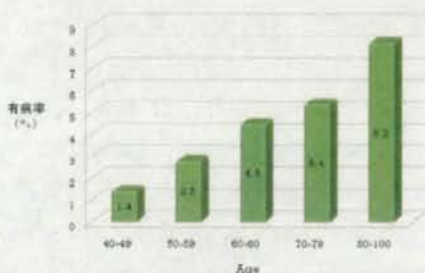
年代別有病率：原発閉塞隅角緑内障



原発開放隅角緑内障の有病率
世代別、男女間の比較

年齢	有病率 (男性)	有病率 (女性)	P値 (χ ² 検定)
Total	4.81 (98/214 (45.3))	5.11 (121/443)	P=0.55
45-49	2.05	0.68	NS
50-59	11.2 (4.0)	10.2 (3.7)	
60-69	12.3 (4.0)	11.9 (3.8)	
70-79	8.21 (41/9.4)	2.84 (12/9.5)	NS
80-89	8 (8/6 (16.5))	8.04 (14.5 (16.5))	NS

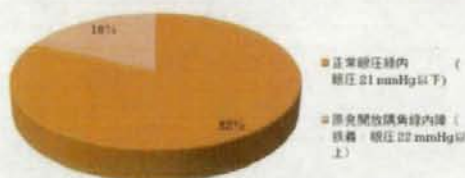
年代別有病率：原発開放隅角緑内障



原発閉塞隅角緑内障の有病率
世代別、男女間の比較

年齢	有病率 (男性)	有病率 (女性)	P値 (χ ² 検定)
Total	1.42 (1.2-2.1)	2.89 (2.2-3.7)	P=0.01
45-49	0	0.22	NS
50-59	0 (0.8)	0 (1.2)	NS
60-69	0.5 (2.0)	0.6 (2.0)	
70-79	1.54 (9.9-9.2)	3.16 (1.7-6.7)	NS
80-89	2.2 (6.3)	2.9 (6.9)	NS
90-99	2.04 (1.0-6.9)	5.84 (4.6-10.5)	NS

原発開放隅角緑内障に占める
正常眼圧緑内障の割合



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。

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

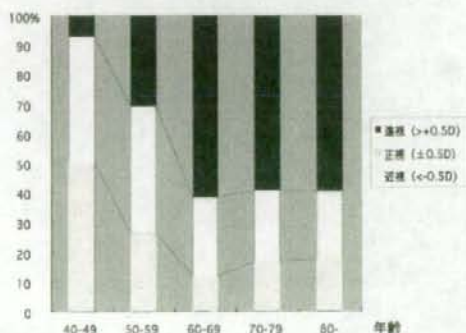
86.0%と女性の方が高かった。また、90歳以上を除き高齢者の方が高かった。

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。

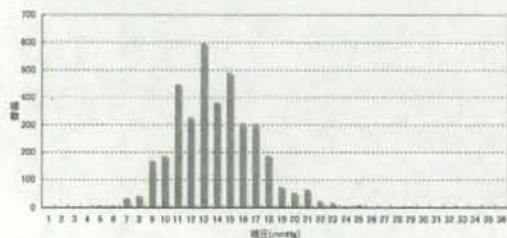
5. 「久米島スタディ参加者の屈折異常」比嘉明子、仲村佳巳、澤口昭一、岩瀬愛子、富所敦男、新家 眞、第61回日本臨床眼科学会、学会抄録 40ページ 2007年：久米島における屈折異常の頻度・分布を検討した。屈折異常（等価球面度数）は日本本土での結果（多治見スタディ）と比較して遠視側に偏っていた。近視の頻度は多治見スタディより低く、遠視の頻度は高かった。

	SE \leq \pm 0.5D	N (人)	% (95%CI)
正視	SE \leq \pm 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)

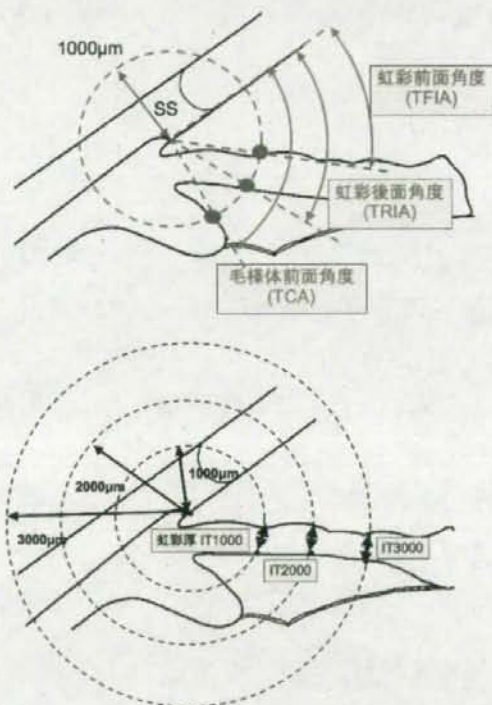


7. 「超音波生体顕微鏡による前眼部構造測定結果の新しい定量的表現法」平安山市子、酒井寛、仲村優子、澤口昭一、富所敦男、新家眞、高田英夫、第61回日本臨床眼科学会、学会抄録 79ページ 2007年：久米島検診受診者の前房隅角構造を高周波超音波画像診断装置である超音波生体顕微鏡検査を用いて撮影した。得られた画像を新規に開発した解析ソフトウェアで定量的に解析した。この新規ソフトウェアは強膜岬を中心とした円と角膜内皮面、虹彩前面・後面、毛様体前面との交点を基準とした新しいパラメータにより隅角形態を数値化するものである。また、その測定方法に

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取得済み

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、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認めら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。さらに我々は、ラット由来網膜神経節細胞株 (RGC-5) 用いてリン酸化 double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) (参照補足説明) の活性化が小胞体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 の活性化が小胞体ストレス網膜細胞死に関与していること、PKR の活性化の抑制が小胞体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。

本年度は小胞体の分子シャペロンである BiP のプロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイ系スクリーニングより BiP 選択的誘導剤 (BiP inducer X: BIX) を見出し、BIX が小胞体ストレス誘発の神経細胞障害に有効であることを見出した。

以上、小胞体ストレスを制御する PKR 阻害薬及び BiP 選択的な誘導剤は緑内障などの網膜障害における新規治療薬となる可能性が示唆された。

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。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、本年度筆者らは下記の目的で検討を行った。

- 1) BiPのプロモーター配列を利用したBiPレポーターシステムを利用してBiPのメッセージを誘導する化合物の探索を行った。
- 2) 上記1)で見出された化合物について緑内障様動物モデルを用いて効果を検証し、緑内障に基づく網膜神経細胞保護薬のリード化合物を見出した。

B. 研究方法

実験は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(図1)を用いて検討した。



図1 マウス網膜障害モデルを用いた *in vivo* 実験方法とBIXの効果の検討

C. 研究結果

[目的] アルツハイマー病、パーキンソン病、

ハンチントン病及び筋萎縮性側索硬化症(ALS)などに代表される神経変性疾患において、多くの場合、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が示唆されてきた。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。小胞体に特異的に発現する分子シャペロン BiP/GRP 78 が小胞体ストレスにより誘導され、また *in vitro* において BiP の発現上昇が小胞体ストレスによる障害を軽減することが報告されている。BiP のプロモーター配列を利用した BiP レポーターシステムを利用して BiP のメッセージを誘導する化合物の探索を行った。さらに、そこで見出した化合物 BiP 選択的誘導剤 BiP inducer X (BIX) (図2, 3) を用いて、BiP の特異的発現上昇が小胞体ストレスによる網膜障害を軽減するか否かを検討した。

[方法] *In vitro*: ラット由来網膜神経節細胞株 (RGC-5) を用いて BIX の濃度及び時間依存的な BiP の誘導をリアルタイム PCR により検討した。さらに、tunicamycin 処置 12 時間前に BIX (0.2 ~ 5 μ M) を添加し、tunicamycin 処理 24 または 48 時間後の細胞生存率を測定した。*In vivo*: *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 40 nmol のマウス硝子体内投与により網膜障害を惹起させた。BIX 5 nmol は NMDA と同時に硝子体内