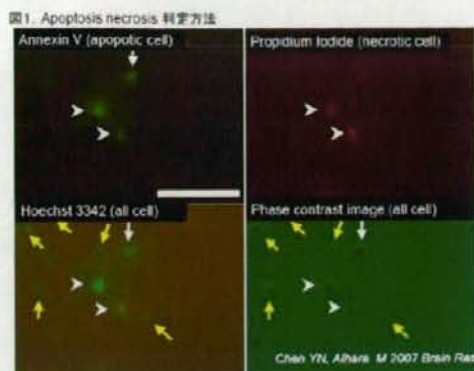


(図1)



3. 酸化ストレスによる細胞死に対するネクローシスシグナルの関与の可能性を考え、ネクローシス誘導蛋白プロテアーゼの阻害薬、cathepsin B proinhibitor (E-64-d) および thiol protease inhibitor (Ca-074 Me)を用いて、細胞死が抑制可能かを検討した。

4. 酸化ストレスによる細胞死のシグナルを検討するために bax inhibiting peptide (BIP)を用いて bax 経路のミトコンドリア経路が関与しているかを検討した。

5.最終濃度 10<sup>-8</sup>M、10<sup>-7</sup>M、10<sup>-6</sup>Mのベタキソロール、ニブラジロール、チモロール、カルテオロール添加後の細胞死の抑制効果は無添加群と比較検討した。

#### (4) 分子生物学的研究及び緑内障動物モデル研究

本邦における NTG の重要性に鑑み、その有効且つ新規の治療に直結し得る最新の分子生物学的手法や緑内障モデル動物を用いた検討を行った。

#### B. 研究方法

In vitro ラット網膜神経節初代培養系を用いた  $\beta$  遮断薬による酸化ストレスによる細胞死抑制効果とそのシグナルの解明

1. 生後 6-7 日令ラット網膜から two step immunopanning 法で網膜神経節細胞を単離し無血清培地で培養した。抗酸化剤を除去した培地に交換することで酸化ストレス負荷をかけ、37°C で 12 時間培養後にカルセイン A M 染色により生存細胞を検出し、全細胞数との比から神経節細胞の生存率を無添加群 (コントロール) と検討した。

2. 酸化ストレスによる細胞死のパターンをアポトーシス、ネクローシス検出法を用いて検討した。

(4) 緑内障動物モデルおよび分子生物学的研究  
4-1 酸化ストレスによる細胞死のパターン (図2)  
図2に培養 RGC の酸化ストレス2時間後の状態を示す。AはannexinVによりアポトーシス細胞およびネクローシス細胞が染色されている。Bはpropidium iodideにより細胞膜が破壊された細胞の細胞核が染色され、ネクローシス細胞が染色されている。CではHoechst33342により全細胞の核が染色されている。従って、白矢印がアポトーシス細胞、矢頭がネクローシス細胞、黄矢印が生存細胞を示す。この方法によりスタウロスポリンを細胞死惹起薬のコントロールとして細胞死を検討したのが図3である。

図2. 酸化ストレスによる細胞死形態

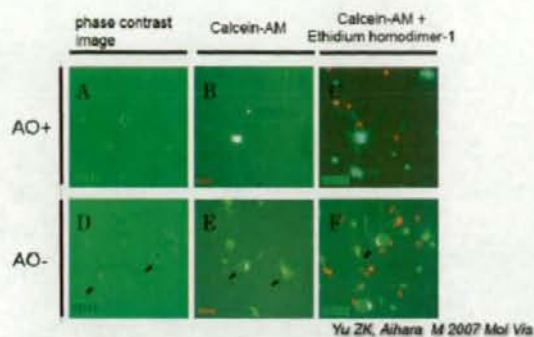
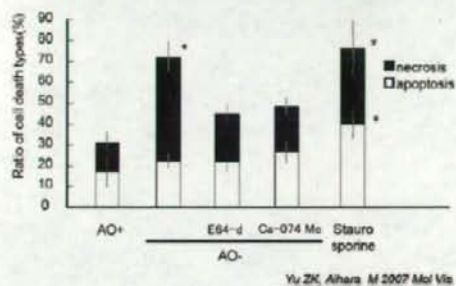


図3. 酸化ストレスによる細胞死とプロテアーゼ阻害薬の効果



細胞死のポジティブコントロールである staurosporine により  $40.1 \pm 7.1\%$  がアポトーシスをおこし、コントロール  $17.0 \pm 7.7\%$  より有意に増加したが、(n=8,  $p < 0.05$  by Dunnet test) 酸化ストレス負荷による細胞死  $22.3 \pm 3.6\%$  はコントロールと有意差がなかった。また、酸化ストレス負荷により  $49.6 \pm 7.6\%$  staurosporine により  $36.3 \pm 13.1\%$  がネクローシスをおこし、コントロール  $14.3 \pm 4.9\%$  より有意に増加した (n=8,  $p < 0.05$  by Dunnet test)。従って酸化ストレス負荷実験系ではおもにネクローシス細胞死が起こっていることが判明した。

#### 4-2 酸化ストレスによる細胞死に対するネクローシスシグナルの関与

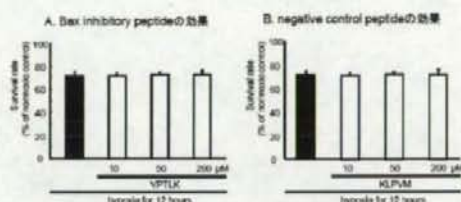
ネクローシス誘導蛋白プロテアーゼの阻害薬、cathepsin B proinhibitor (E-64-d) および thiol protease inhibitor (Ca-074 Me) により、酸化ス

トレスによって増加したネクローシスによる細胞死は  $22.5 \pm 4.7\%$ ,  $21.8 \pm 3.9\%$  と阻害薬の内酸化ストレス群と比べ有意に抑制され、酸化ストレスのないコントロールと有意差がなかった。従って酸化ストレス負荷実験系ではおもにネクローシスによる細胞死が起こっていることが判明した。(図3)

#### 4-3. BIP による酸化ストレス負荷による細胞死の抑制効果

酸化ストレス負荷に対し BIP の active peptide である VPTLK および negative control peptide は効果がなかった。(図4)

図4. 酸化ストレスによる細胞死とBIP阻害ペプチドの効果



Chen YN, Aihara M 2007 Brain Res

#### 4-4 4種のβ遮断薬による酸化ストレス負荷に対する細胞死の抑制効果 (図5)

ベタキソロール、ニブラジロール、チモロールは濃度依存性に  $0.01 \mu\text{M}$  の濃度から細胞死の抑制効果を示した。しかしカルテオロールは細胞死の抑制効果を示さなかった。



図4. 酸化ストレスによる細胞死に対するβ遮断薬の効果

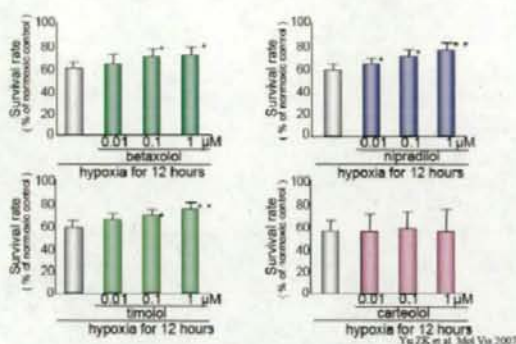


図5. NTG製造非線形性細胞培養因子による細胞死に対するβ遮断薬の神経保護効果

負荷	betaxolol	nipradilol	timolol	carteolol
虚血再灌流	○	○	○	○
Rat in vitro	Osborne 1999	Taylor 2002	Wood 2002	Wu et al. 2002
グルタミン酸	○	○	○	○
Rat in vitro or in vivo	Osborne 1999	Milnes 2001 Muller 2002	Wu 2002	Wu 2002 記載
低酸素	○	○	○	—
Rat in vitro RGC	Wu, 2002 Shen, 2002	Wu, 2002 Shen, 2002	Wu, 2002 Shen, 2002	Wu, 2002 Shen, 2002
酸化ストレス	○	○	○	—
Rat in vitro RGC	Wu, 2002 Bel Vidan	Wu, 2002 Mc Vicker	Wu, 2002 Mc Vicker	Wu, 2002 Mc Vicker

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。

4-2. 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

1. 生後6-7日令ラット網膜からtwo step immunopanning法で網膜神経節細胞を単離し無血清培地で培養した。5%O<sub>2</sub>による低酸素負荷12時間、25μMグルタミン酸負荷3日間、抗酸化剤を除去した培地による酸化ストレス負荷24時間をかけ、37℃で12時間培養後にカルセインAM染色により生存細胞を検出し、全細胞数との比から神経節細胞の生存率を無添加群（コントロール）と検討した。
2. 最終濃度10-8Mから10-11Mの3種類のフラボノイド、Kaempferol 3-o-rutinoside, Quercetin 3-o-rutinoside and Quercetin 3-o-rhamnoside添加後の細胞死の抑制効果は無添加群と比較検討した。(n=10) これら3種の薬剤は多くの水酸基を持つ骨格に異なる糖鎖がついており、活性が異なる可能性があるフラボノイドである。(図1)

#### 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シスの双方の細胞死が関与しているが、主にネクロ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、またニブラジロールは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。

### 実験に使用した3種のフラボノール系フラボノイド



3. 細胞死の作用機序を生化学的に検証した。低酸素およびグルタミン酸負荷に対してはアポトーシスシグナルの関与の可能性を考え、アポトーシス関連蛋白であるカスパーゼ3のELISAによる濃度測定を行い、負荷なしのコントロール群との比較を行った。また、酸化ストレスによる細胞死に対するネクロトーシスシグナルの関与の可能性を考え、ネクロトーシス誘導蛋白プロテアーゼ、カテプシンのELISAによる濃度測定を行い、負荷なしのコントロール群との比較を行った。フラボノイドは最も強力な作用を持つQuercetin 3-o-rutinosideを対象に行った。

4-3. 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ネル拮抗薬の神経保護効果

#### 1. 高眼圧モデル作成

マウスを用いた眼圧上昇モデルは少なく、追試されているものはレーザー高眼圧モデルのみである。しかし、既報のレーザー高眼圧モデルは2ヶ月の一過性の眼圧上昇であり、成功率も悪かったことから今回改めてレーザー照射方法を改良した。それと共に別の方法を試みた。ラテックス小粒子を前房内に注入する、赤血球をもちいたghost cellの前房内注入、熱ゲル化基剤の前房内注入以上の3種の新しい方法、ならびにラットで主に用いら

れる上強膜静脈を焼灼または結紮する方法を試みた。さらに、結膜上皮を眼内に増殖させる目的で結膜陥入も行った。いずれも一匹につき片眼のみ処置を行い、対側眼はコントロールとした。

レーザー高眼圧モデル作成には全身麻酔下で、532 nm wavelength, 200 mW power, 0.05 second duration, 200 μm spot sizeの照射条件で輪部に50-63 shots施行した。術後は1週間局所のステロイドと抗生剤の点眼を行った。

#### 2. マウス

マウスはthe Use of Animals in Ophthalmic and Vision Researchに関する ARVO Statementに準じて使用した。Thy1promoterを用いて蛍光蛋白CFPを発現する遺伝子改変マウス、B6.Cg-TgN(Thy1-CFP)23Jrs/J miceを米国Jackson Laboratoryより購入し、21° Cの明暗サイクルで飼育、最低でも16週齢のマウスを使用した。

#### 3. 眼圧測定方法ならびにスケジュール

眼圧測定はマイクロニードル法とトノラボを併用した。マウス眼圧測定におけるトノラボの有用性は、当グループで確認済みである。術後一過性の高眼圧による虚血性視神経症の有無を確認するために、4時間まで毎時間、72時間まで12-24時間の間隔で眼圧を測定し、その後は週に1度眼圧を測定して、高眼圧の持続状態を確認した。

#### 4. 眼圧負荷量の計算とRGC生存率の部位別評価方法

眼圧負荷量は術後8週までの対側コントロール眼と比較した眼圧上昇と期間を積算した数字を用いた(図21) RGCの障害は8週目でのフラットマウント網膜を中心から、中央、中間、周辺の3カ所さらに上下耳鼻側の4象限に分けた、合計12カ所の測定点における蛍光画像を用いてRGCを手動で計測した。高眼圧眼とコントロール眼の対応する測定点で、コントロール眼を基準としたRGC生存率



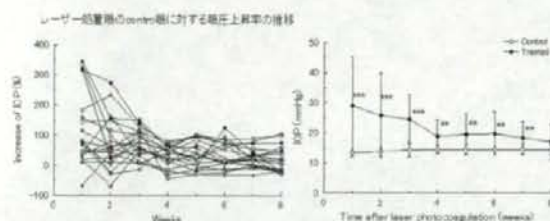
を算出した。

## 5. ニルバジピン腹腔内投与

レーザー高眼圧マウスを2群にわけ、治療群には、神経保護効果の可能性を持つ、カルシウムチャンネル拮抗薬であるニルバジピン腹腔内投与をレーザー高眼圧術前と術後毎日投与した。一方、コントロール群には生理食塩水を腹腔内投与した。2ヶ月間、眼圧測定、体重測定を行い、最終的に網膜フラットマウ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週までは対照眼に比して有意に眼圧上昇している。

## <結果>

4-2 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。

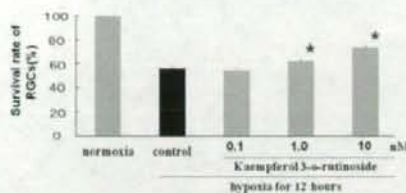


Figure 2: Effects of Kaempferol 3-o-rutinoside against hypoxia-induced RGCs death. The survival rate of RGCs increased significantly in a dose-dependent manner with Kaempferol 3-o-rutinoside at 1.0 and 10nM. Each value represents mean  $\pm$  S.D.(n=8). Asterisk indicates p<0.05 vs. hypoxia control (black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

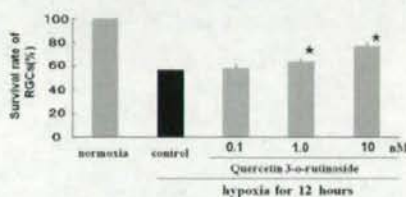


Figure 3: Effects of Quercetin 3-o-rutinoside against hypoxia-induced RGCs death. The survival rate of RGCs increased significantly in a dose-dependent manner with Quercetin 3-o-rutinoside at 1.0 and 10nM. Each value represents mean  $\pm$  S.D.(n=8). Asterisk indicates p<0.05 vs. hypoxia control (black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

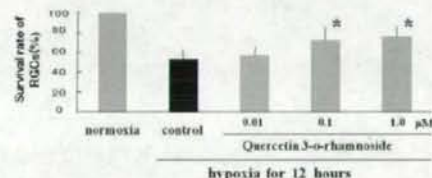


Figure 4: Effects of Quercetin 3-o-rhamnoside against hypoxia-induced RGCs death. The survival rate of RGCs increased significantly in a dose-dependent manner with Quercetin 3-o-rhamnoside at 0.1 and 1μM. Each value represents mean  $\pm$  S.D.(n=8). Asterisk indicates p<0.05 vs. hypoxia control (black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

4-3 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。

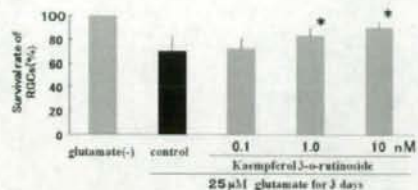


Figure 5: Effects of Kaempferol 3-o-rutinoside against glutamate-induced RGC's death. The survival rate of RGCs increased significantly in a dose-dependent manner with Kaempferol 3-o-rutinoside at 1.0 and 10nM. Each value represents mean  $\pm$  S.D.(n=10). Asterisk indicates  $p < 0.05$  vs. glutamate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

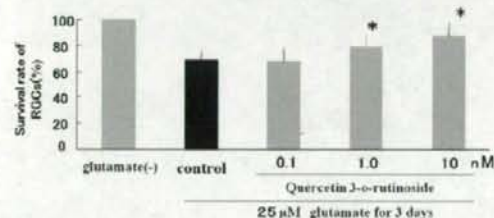


Figure 6: Effects of Quercetin 3-o-rutinoside against glutamate-induced RGC's death. The survival rate of RGCs increased significantly in a dose-dependent manner with Quercetin 3-o-rutinoside at 1.0 and 10nM. Each value represents mean  $\pm$  S.D.(n=10). Asterisk indicates  $p < 0.05$  vs. glutamate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

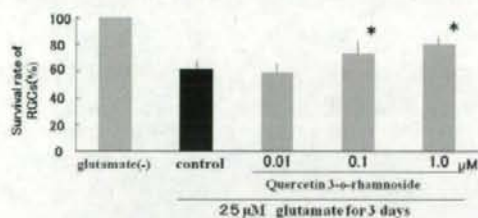


Figure 7: Effects of Quercetin 3-o-rhamnoside against glutamate-induced RGC's death. The survival rate of RGCs increased significantly in a dose-dependent manner with Quercetin 3-o-rhamnoside at 0.1 and 1μM. Each value represents mean  $\pm$  S.D.(n=10). Asterisk indicates  $p < 0.05$  vs. glutamate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

Quercetin 3-o-rutinoside の効果が最も強いことが判明した。

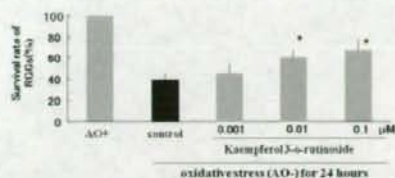


Figure 10: Effects of Kaempferol 3-o-rutinoside against oxidative stress-induced RGC's death. The survival rate of RGCs increased significantly in a dose-dependent manner with Kaempferol 3-o-rutinoside at 0.01 and 0.1μM. Each value represents mean  $\pm$  S.D.(n=10). Asterisk indicates  $p < 0.05$  vs. AO+ 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 (A405nm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 (A405nm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 <sub>405nm</sub>
コントロール	0.802 $\pm$ 0.14
ルチン (濃度 = 10 <sup>-8</sup> M)	0.576 $\pm$ 0.21*

コントロール=低酸素負荷12時間

ルチン= Quercetin 3-O-rutinoside

Mean $\pm$ SD, t-test \* $p < 0.05$  vs. N=6

4-4 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)



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 <sub>405nm</sub>
コントロール	0.843±0.25
ルチン (濃度 = 10 <sup>-6</sup> M)	0.613±0.15*

コントロール=Glutamate 25μM 負荷 72時間

ルチン= Quercetin 3-O-rutinoside

Mean±SD, t-test \*p&lt;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<sub>405nm</sub>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 <sub>405nm</sub>
コントロール	0.782±0.19
ルチン (濃度 = 10 <sup>-6</sup> 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&lt;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。

高眼圧モデルと神経保護  
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

高眼圧モデルと神経保護  
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0.5秒目の前眼部写真。輪部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



左の対照眼に比して右では前房が浅くなっていることがわかる

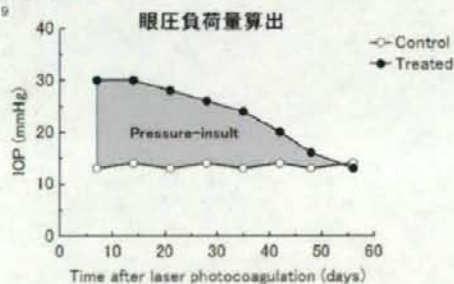
図18

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、右のレーザー処置部では構造が崩壊していることがわかる。

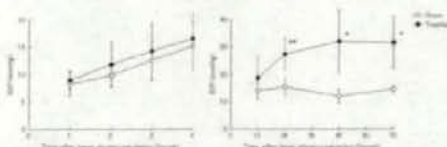
図19



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こ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

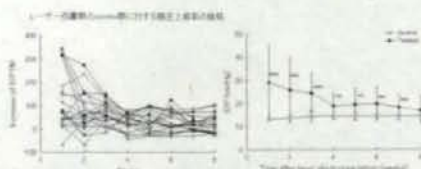
レーザー高眼圧モデルの早期眼圧推移



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72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



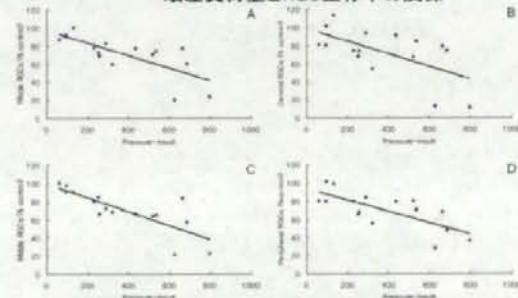
左 各マウスの眼圧推移。8週目まで持続している。右 眼圧平均のグラフ。7週までは対照眼に比して有意に眼圧上昇している。

5-2. 眼圧上昇による RGC 生存率の全体及び部位別検討

図 2 2, 2 3 に示すように、全体および 1 2 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相関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 2 4 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。

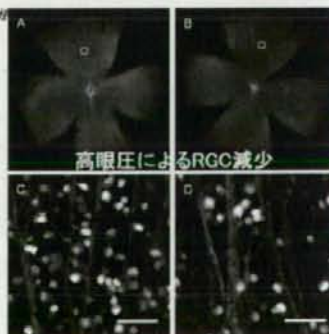
図22

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



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



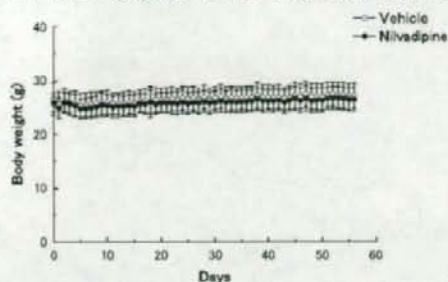
### 5-3 ニルバジピン腹腔内投与による神経保護効果の検討

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  $1156 \pm 351$ 、ニルバジピン治療群では  $1366 \pm 131$  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。

高眼圧モデルと神経保護

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

高眼圧モデルと神経保護

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	Nivadipine	Vehicle	Nivadipine
Central	1449 ± 150	1486 ± 97	1139 ± 376	1361 ± 176*
Middle	1471 ± 161	1487 ± 120	1181 ± 366	1401 ± 139
Peripheral	1465 ± 137	1389 ± 127	1148 ± 325	1336 ± 140*
Whole	1462 ± 120	1440 ± 69	1156 ± 351	1366 ± 131*

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

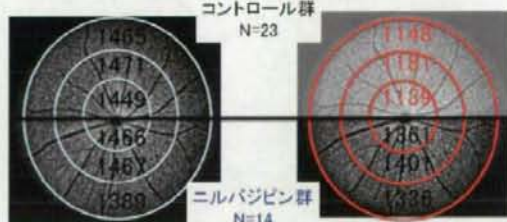
レーザー高眼圧群無治療では有意にRGCが減少するが、ニルバジピン腹腔内投与により、レーザー無処置群と同じ細胞数を保つことができる。

高眼圧モデルと神経保護

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 \* RGC密度表示  
 $1462 \pm 120 > 1156 \pm 351$



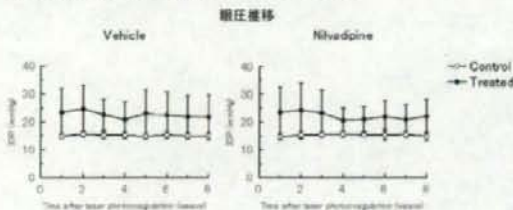
ニルバジピン投与により眼圧負荷に対する細胞死が有意に減弱する

高眼圧モデルと神経保護

図25

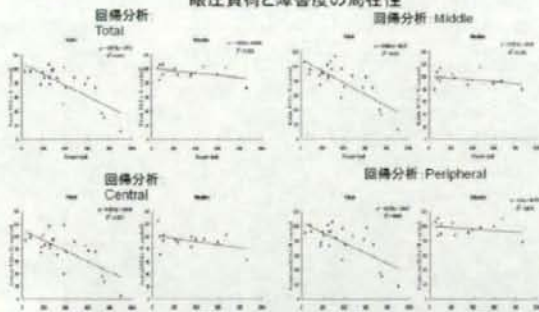
### 高眼圧による細胞死に対するニルバジピンの神経保護効果

片眼をレーザーによる高眼圧、他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



眼圧負荷に両群間の差はない

図20 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

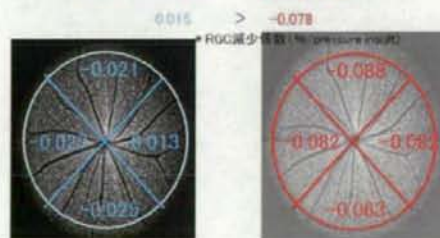
図30 部位別細胞減少



Nivadipine

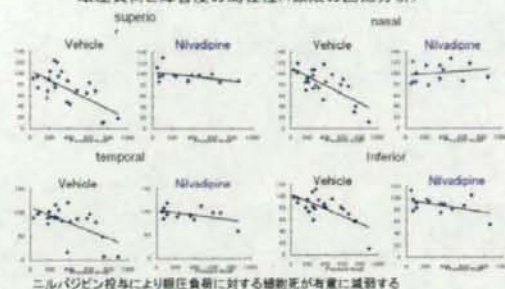
ニルバジピン投与により眼圧負荷に対する細胞死が有意に減弱するが、部位による明らかな差はない

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  
ニルバジピン(N=14) 無治療(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

#### <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ーシス、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、Quercetin 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

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

- 2008 第112回日本眼科学会総会 毛蔚(東京大学), 佐伯忠賜朗, 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
- 第111回日本眼科学会総会 堤妙、新家真、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。
- 第111回日本眼科学会総会 斎藤瞳、新家真、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
- 第111回日本眼科学会総会 内田英哉、新家真、他。Heidelberg Retina Tomograph 2による日本人乳頭での緑内障診断。
- 第111回日本眼科学会総会 陳逸寧、新家真、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、新家真、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。
- 第61回日本臨床眼科学会 坂田礼、新家真、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
- 第61回日本臨床眼科学会 今野伸介、新家真、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済

##### 2.実用新案登録

なし

##### 3.その他

特になし



緑内障患者における酸化ストレス・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

1. 緑内障患者における酸化ストレスの関与

緑内障は、我が国でも多くの中途失明を来す重要な眼疾患の一つである。近年行われた多治見スタディーにて、40歳以上の人口の約5.78%が何らかの緑内障性視神経障害を認めるという結果が明らかになり、その中でも正常眼圧緑内障は圧倒的に多いことが判明した。緑内障の病態解明においては、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については不明な点も多い。しかし、近年の研究からNTGでは視神経障害の発症・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- $\alpha$ 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。中でも酸化ストレスやサイトカインに関する研究は近年増加の一途をたどり、その関与を強く示唆するデータも見られるようになってきた。

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、酸化ストレスに注目し、緑内障患者の眼内における濃度を測定した研究結果を報告する。

2. 緑内障患者におけるサイトカインの関与

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- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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。

## 1. 緑内障患者における酸化ストレスの関与

### 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。緑内障の病型の中でも特に、正常眼圧緑内障や高眼圧によって比較的早い神経障害の進行経過をたどる落屑緑内障に関してはその病態解明が具体的な治療に応用できる可能性が高い。この研究では活性酸素を緑内障の発症・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。

### 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。眼内の酸化ストレスの調査をするため、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であるスーパーオキシドデスムターゼ(SOD)、及びカタラーゼ(CAT)活性値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、新潟大学医学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

加齢性白内障の前房水中の抗酸化酵素は、白内障進行例で SOD 活性が有意に上昇していたが、CAT 活性値に有意差はみられなかった。

### D. 考察

白内障進行に伴い、水晶体自体から抗酸化酵素が漏出する可能性も考えられた。

### E. 結論

白内障進行例においては、前房水内の SOD 活性が高くなる。

## 2. 緑内障患者におけるサイトカインの関与

### 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- $\alpha$  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- $\alpha$  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、新潟大学医歯学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- $\alpha$  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- $\alpha$  値との相関は見られなかった。

#### D. 考察

前房水中の TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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。

### 3. COX-2 ノックアウトマウスを用いた網膜虚血と網膜神経節細胞死との関与

#### A. 研究目的

我々が既に作成した網膜神経節細胞蛍光発光トランスジェニックマウス (Thy1-EGFP トランスジェニックマウス) と cyclooxygenase-2 (COX-2) ノックアウトマウスを掛け合わせて新たなマウス系統を確立し、一過性網膜虚血後の COX-2 の動態と網膜神経節細胞死の関係を検討する。

#### B. 研究方法

ラット眼で虚血再灌流モデルを作成し、一過性虚血後の網膜での COX-2 mRNA・蛋白量を RT-PCR 法、Western blot 法により測定した。次に Thy1-EGFP トランスジェニックマウスに選択的 COX-2 阻害剤 Celecoxib を投与し、一過性虚血後の残存網膜神経節細胞数を網膜伸展標本にて計数し、非投与群と比較した。また Thy1-EGFP トランスジェニックマウスと COX-2 ノックアウトマウスを交配させ、PCR 法によって遺伝子型が確認された配合マウスを用いて同様に一過性虚血後の残存網膜神経節細胞数を計数し、COX-2 非ノックアウトマウス群と比較した。

#### (倫理面への配慮)

実験動物の取り扱いに関しては ARVO (The

association for research in vision and ophthalmology) の動物取り扱い指針に沿って行った。

### C. 研究結果

#### 網膜虚血後の COX-2 の発現

RT-PCR 法による解析の結果、一過性虚血後のラット網膜での COX-2 mRNA レベルは、虚血後 1 時間の時点で最も増加し、以後 24 時間後まで正常コントロールに比べ発現レベルが増加していることが確認された。Western blot 法による解析では、COX-2 蛋白質量は虚血後 6 時間の時点で顕著に増加が認められた。これらより、一過性虚血後、網膜では早期に COX-2 が誘導され、発現が上昇することが確認された。

#### 網膜虚血後の網膜神経節細胞死に対する COX-2 の選択的阻害効果

COX-2 の選択的阻害剤である Celecoxib を Thy1-EGFP トランスジェニックマウスに投与し、一過性虚血後の網膜神経節細胞死に対する COX-2 の選択的阻害効果を検討した。虚血負荷後 7 日の時点で網膜伸展標本作製し網膜神経節細胞数を計数したところ、Celecoxib 非投与群ではおよそ 65% の網膜神経節細胞の損失が認められた。他方 Celecoxib 投与群では、およそ 38% の損失にとどまった。ラットを用いた既報の結果と同様に、Celecoxib 投与群では非投与群に比して多くの網膜神経節細胞が残存しており、細胞死が明らかに抑制されていることが確認された。片眼に虚血負荷をかけた同一マウスの他眼をコントロールとして用いた。

#### COX-2 ノックアウトマウスにおける一過性虚血後の網膜神経節細胞数の変化

Thy1-EGFP トランスジェニックマウスと COX-2 ノックアウトマウスを交配させて生まれた個体のうち、PCR 法で遺伝子型が確認された Thy1-EGFP Tg/COX-2 KO 配合マウスを用いて、一過性虚血後の網膜神経節細胞死の検討を行った。虚血負荷後 7 日の時点で網膜伸展標本作製し網膜神経節細胞数を計数したところ、Thy1-EGFP Tg マウス群ではおよそ 62% の網膜神経節細胞の損失が認められた。他方 Thy1-EGFP Tg/COX-2 KO マウス群では、およそ 31% の損失にとどまった。これは前述の COX-2 選択的阻害剤である Celecoxib を投与したマウス群での結果と同様の傾向を示し、Thy1-EGFP Tg/COX-2 KO マウス群では Thy1-EGFP Tg マウス群に比して多くの網膜神経節細胞が残存しており、一過性虚血後の細胞死が明らかに抑制されていることが確認された。片眼に虚血負荷をかけた同一マウスの他眼をコントロールとして用いた。Thy1-EGFP Tg マウス群と Thy1-EGFP Tg/COX-2 KO マウス群両者のコントロール間で、網膜神経節細胞数に有意な差は認められなかった。

#### SLO 眼底撮影によるマウス眼底蛍光の変化

Thy1-EGFP Tg/COX-2 KO 配合マウスを用いて、虚血負荷後の同一マウスの網膜神経節細胞蛍光発色を SLO にて生体下で経時的に撮影した。眼底蛍光を定量的に評価するため、同一眼の虚血負荷前をコントロールとして蛍光輝度を計測した。

Thy1-EGFP Tg マウス群では、眼底蛍光は虚血解除後 4 日後で約 71%、7 日後で約 52% に減少した。他方 Thy1-EGFP Tg/COX-2 KO マウス群では、虚血解除後 4 日後で約 79%、7 日後で約 69% に減少した。眼底蛍光は虚血負荷後に両者で減少するものの、Thy1-EGFP Tg/COX-2 KO マウス群では Thy1-EGFP Tg マウス群に比して減少率は低値を示した。虚血解除後 7 日後の眼底蛍光と網膜伸展標本での細胞



数の減少とを比較検討すると、減少率に差はあるものの両者の変化には同様の傾向が認められた。

#### D. 考察

脳では、COX-2 ノックアウトマウスを用いて同様に虚血後の神経細胞死と COX-2 の関与が報告されている。COX-2 ノックアウトマウスでは、一過性脳虚血後の神経損傷の程度が野生型マウスより軽度であることが報告されている。網膜では、ラット網膜において COX-2 阻害剤を用いると、神経細胞死が抑制されるという報告がされている。また、眼に関連して、炭酸脱水素酵素を阻害することにより眼圧下降作用を持つという報告がある。今回、我々は COX-2 ノックアウトマウスを実験に用いて、COX-2 阻害剤と同様に COX-2 の遺伝的な欠失が虚血後の網膜神経節細胞死の程度を軽度にするを示した。COX-2 ノックアウトマウスを用いることにより、COX-2 阻害剤を用いた実験結果から予想された虚血後網膜における網膜神経節細胞死と COX-2 の関与をより確実に証明することができた。

正常網膜において、COX-2 はアマクリン細胞、水平細胞、網膜神経節細胞といった神経系にわずかに存在しており、虚血後には急速に発現上昇しミューラー細胞でも発現が確認される。後眼部領域では、COX-2 を阻害することにより脈絡膜血管新生や虚血に関連した網膜血管新生が抑制されると報告されている。また、COX-2 阻害による神経保護作用に関しては、ラット網膜での一過性虚血後の神経細胞死に対する保護作用や、亜鉛キレート剤が COX-2 を阻害し神経保護作用につながる、などの報告がある。今回我々は、COX-2 を阻害することによる虚血後早期の網膜神経節細胞保護効果を COX-2 ノックアウトマウスを用いた実験により示した。

#### E. 結論

今回の実験と同様の手法を用いて、既存の各種ノックアウトマウスと Thy1-EGFP トランスジェニックマウスを交配させることにより、特定遺伝子が欠失したマウスの網膜神経節細胞を蛍光発光させることが可能である。さらに、こうしたマウスを用いて虚血再灌流モデルを初めとした負荷モデルを作成することにより、目的遺伝子の網膜神経節細胞死への関与が検討できると考えられる。以上より、今回と同様に Thy1-EGFP トランスジェニックマウスと既存の遺伝子改変マウスを組み合わせ、その網膜神経節細胞を観察することは、今後の緑内障を初めとした網膜神経節細胞死に関連する眼疾患の病態の解明につながる可能性を秘めていると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Hideko Sawada, Takeo Fukuchi, Haruki Abe : Oxidative Stress Markers in Aqueous Humor of Patients with Senile Cataracts : Current Eye Reserch :34 ; 36-41 :2009
- 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。

## 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

### 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

##### 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進行されておらず、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  $> 19$  mmHg、垂直 C/D 比  $\geq 0.6$ 、垂直 C/D 比の左右差  $\geq 0.2$ 、上方または下方の R/D 比  $\leq 0.2$ 、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)

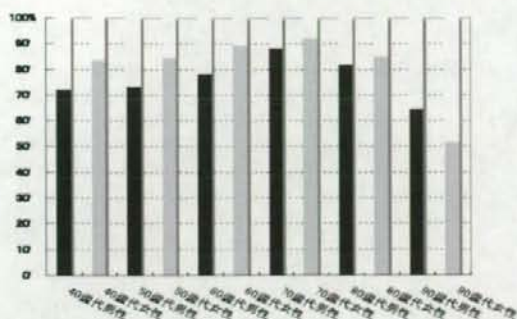
### 2. 検診参加率

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%



### + 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

■ 参加者は女性に多かった。



### 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%

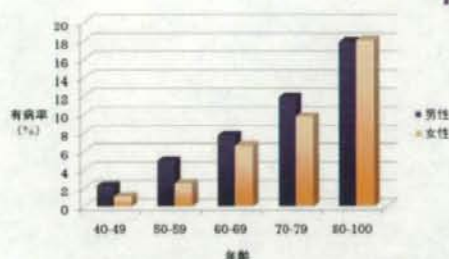
開放隅角緑内障有病率 約4% (正常眼圧緑内障 約3%強)

その他の緑内障 3%。

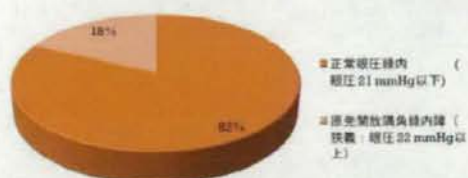
### + 緑内障の有病率：病型別

Diagnosis	number	Rate (%)	95% CI
原発閉塞隅角緑内障	180	3.99	(3.45-4.70)
原発閉塞隅角緑内障	81	2.15	(0.17-0.27)
水晶体変性性緑内障	14	0.37	(0.20-0.60)
その他の緑内障	14	0.37	(0.20-0.60)
分類不能	8	0.21	(0.10-0.40)

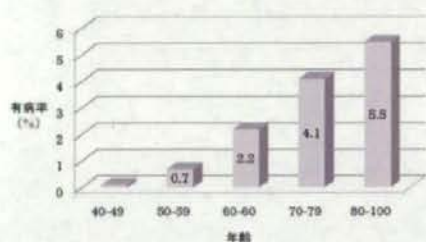
男女別年代別有病率：緑内障



原発開放隅角緑内障に占める正常眼圧緑内障の割合



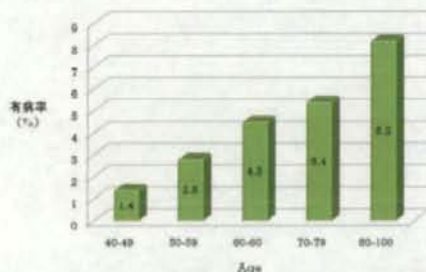
年代別有病率：原発閉塞隅角緑内障



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 (性別)
Total	4.91 (95% CI: 4.0-6.0)	3.11 (2.4-4.0)	P<0.01
40-49	2.25 (1.2-4.0)	0.06	NS
50-59	3.59 (2.3-6.0)	1.81	NS
60-69	6.21 (4.1-9.4)	2.84	NS
70-79	6.78 (4.6-9.9)	4.37	NS
80-99	5 (3.6-16.1)	6.94	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 (性別)
Total	1.42 (1.0-2.1)	2.35 (2.2-3.7)	P<0.01
40-49	0	0.22	NS
50-59	0.08 (0.2-2.0)	0.12	NS
60-69	1.24 (0.6-3.2)	3.16	NS
70-79	3.79 (2.3-6.3)	4.37	NS
80-99	2.84 (1.0-6.9)	6.94	NS

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