

ラジエント分離できる条件を決定した。高極性脂質を溶出する溶媒条件では、ガングリオシドのエレクトロスプレー効率が高いので安定なイオン化を保つために開発したフッ素化コーティングされた超撥水性 ESI チップ (FortisTip) を介してオンラインでイオントラップ型 MS 装置 LCQdec-XPPlus (ThermoFischerScientific 社) に接続した。pmol オーダの感度で MS スペクトルと MS/MS スペクトルを自動的に安定して測定できた。シアル酸は負電荷を持つので負極性のデータ依存性 MS<sup>n</sup> スキャンを行うことが可能で一回のクロマトグラフィーで多くの情報を採取することができるようにした。脂質は、MS/MS と MS<sup>3</sup> スキャンにより同定した。

#### (倫理面への配慮)

臨床サンプルに関しては、対象患者からインフォームドコンセントと感覚器センターの倫理委員会の承諾を得たのちに研究に使用した。

#### C. 研究結果

本システムでは、順相シリカゲル HPLC により脂質を低極性のものから順に極性に従いクラス分離できるので、ガングリオシドを含有糖鎖の少ないものから多いものに順に分離できた。さらに、シアル酸の結合位置の違いにより生じる構造異性体もシリカゲルにより分離が可能である。たとえば、シアル酸を二個含有し一個づつ別の糖に結合する GD1a と二個のシアル酸が同じ糖に二個つながる GD1b が完全に分離され、それぞれのピークにおける MS/MS スキャンによる構造データを参考にすることにより異性体の同定に威力を発揮した。一方、

逆相 HPLC ではガングリオシドが含有する脂肪酸の長さ起因する疎水性度の違いにより分離されるので、糖鎖の数による分離や異性体の分離が困難である。本システムは、この点において海外や国内で開発中の逆相 HPLC を用いるあるいは MS のみによるガングリオシド分析システムに比べ優れていた。

角膜内皮障害と関連する炎症モデルとしてマクロファージ系培養細胞にエンドトキシンを作用させた場合のガングリオシド等の組成変化を本システムを用いて調べた。GM1 と GD1a が主要成分で GM2 と GM3 が検出できた。スフィンゴミエリンのピーク面積で結果をノーマライズしたとき、エンドトキシン処理により GM2 と GM3 はそれぞれ 1.5 倍、1.8 倍含量が増加しており炎症との関連が示唆された。

すでに開発したシステムで測定した涙液ワックスエステル分子組成は非常に複雑であるが、モノエン脂肪酸を含む分子種が主に検出された。また、ステロールを含むワックスエステルも検出できた。涙液には、症例によってはセラミドや中性糖脂質が検出できた。

#### D. 考察

本研究により、中性脂質からリン脂質までの一斉分析とガングリオシドなどの高極性脂質の分析が順相 HPLC/MS システムで可能になった。順相 HPLC は上記のような利点があるが HPLC の運用技術が難しく、質量分析計との接続にも工夫があるのでほとんど用いられていないが、本研究により実用化のめどがたった。今後は、臨床サンプルに本システムを応用して問題点を追及し

て、本格的な臨床リポドミクスによる臨床脂質マーカーの探索に応用してゆきたい。

涙液ワックスエステル解析では、オンライン多段階タンデム質量分析を駆使した方法を試みているが、高分子量分子種の衝突解裂効率が低く改良が必要である。また中性脂質とリン脂質の間に溶出されるセラミドや糖脂質の検出感度の向上も検討する必要がある。

#### E. 結論

新たに開発したカラムスイッチング3溶媒グラジエントHPLC/イオントラップMS法により中性脂質(コレステロールエステル、ワックスエステル)とリン脂質に加え、シアル酸を含む糖鎖を持つガングリオシドなどの高極性スフィンゴ糖脂質の自動化分析が可能になった。さらにこのシステムを改良することにより、角膜内皮機能不全症を含む角膜疾患に関連する病態マーカー検索の実用化が可能である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tanabe, A., Matsuda, M., Fukuhara, A., Miyata, Y., Komuro, R., Shimomura, I., and Tojo, H. Obesity causes a shift in metabolic flow of gangliosides in adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 547-552 (2009) (査読有)
2. Jin, ZX., Huang, CR., Dong, L., Goda, S., Kawanami T., Sawaki T., Sakai T., Tong XP., Masaki Y., Fukushima T., Tanaka M., Mimori T., Tojo, H., Bloom, ET., Okazaki T., and Umehara, H. Impaired TCR signaling through dysfunction of lipid rafts in sphingomyelin synthase 1 (SMS1)-knock down T cells. *Int. Immunol.* **20**, 1427-1437 (2008) (査読有)

3. Mizutani, Y., Kihara, A., Chiba, H., Tojo, H., and Igarashi, Y. 2-Hydroxy-ceramide synthesis by ceramide synthase family: enzymatic basis for the preference of FA chain length. *J. Lipid Res.* **49**, 2356-2364 (2008) (査読有)

##### 2. 学会発表

1. Tojo, H. Sphingolipidomic Profiling of the Stratum Corneum of Mice with Keratinocyte-specific Deletion of Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Gene. 56th American Society for Mass Spectrometry (ASMS) Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. 2008年6月4日
2. Tojo, H., Igura, T., Nonomura, S., Sumi, R., Bando, Y., and Ito, T. A beneficial effect of polyphenol oligomers, oligonol, on choline deficiency-induced fatty liver in mice. 49th International Conference on the Bioscience of Lipids 2008年8月29日
3. Tojo, H. and Tanabe, A. Lipidomics shows that obesity causes a shift in steady-state metabolic flow of gangliosides downstream from GM3 in adipose tissues of murine genetic and nutritional disease models. Lipidomics and Lipids in Mass Spectrometry. 2009 ASMS Sanibel conference 2009年1月24日
4. 竹村 浩昌、東城博雅、近藤玄 遣伝子変異マウスを用いたホスホリパーゼ B/リパーゼの生理的機能の解析. *BMB* (2008) 2008年12月9日
5. 田邊文, 福原淳範, 下村伊一郎, 東城博雅 肥満脂肪組織におけるスフィン

ゴ糖脂質代謝の変化－ HPLC/質量分析による解析. BMB 2008 2008年12月9日

6. 福田哲也, 遠藤洋子, 野村将春, 安藤純江, 藤井清永, 東城博雅, 板東泰彦, 西山隆太郎, Krizman David, 加藤治文, 西村俊秀 初期肺腺がんに対する病期・予後・悪性度マーカー検証の新規アッセイ法 BMB 2008 2008年12月11日
7. 石田哲夫, 田中裕之, 山本篤, 東城博雅, 堀池喜八郎 フロントアルゲルクロマトグラフィーに基づく高精度結合曲線微量自動測定装置によるタンパク質・リガンド相互作用の精密解析 BMB 2008 2008年12月11日

H. 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

## ヒト角膜内皮細胞培養技術の確立

分担研究者：東 範行

国立成育医療センター 眼科医長

研究要旨：全層角膜移植以外の角膜内皮機能不全の治療法として、角膜内皮部分移植や培養角膜内皮細胞移植、人工角膜移植、角膜再生医療などが研究されている。角膜内皮部分移植は角膜全体ではなく角膜の実質深層とデスメ膜、内皮細胞層のみを移植する方法である。培養角膜内皮細胞移植は患者自身の角膜内皮を取り出して培養技術で増殖させ、再び眼内に戻せば理想的な治療となりうると考えられるが、角膜内皮細胞は培養が難しいために現在は実験段階にとどまっている。そこで本研究では、同意を得た患者から提供を受けた眼組織手術検体を用いて、角膜内皮細胞の培養株を樹立した。

### A. 研究目的

眼組織中に幹細胞が存在し、その眼組織由来幹細胞が増殖させることが可能になれば、角膜内皮系幹細胞の採取および利用が可能になる。本研究は、ヒト眼組織由来幹細胞の存在を明らかにし、その採取・分離・培養のための条件を確立するものである。本年度は角膜内皮細胞の株樹立をおこなった。

### B. 研究方法

片眼性網膜芽細胞腫の3歳患児より得られた摘出眼の半球から、インフォームドコンセントを得て、実験顕微鏡下で角膜内皮を分離し、培養した。継代した初代培養細胞に、組換えレトロウィルスを用い、不死化遺伝子 HPV16 E6E7、hTERT、cdk4、cyclinD1を、単独あるいは種々の組み合わせで導入した。全10種類の遺伝子導入細胞をクローンニングし、Western blot法で導入した各遺伝子の蛋白発現を解析した。遺伝子導入細胞が初代培養細胞に比べ細胞分裂回数の延長が認められることを確認する目的で、3種類の遺伝子導入細胞の増殖曲線を作成した。初代培養細胞と全10種類の遺伝子導入細胞の形態的特徴を位相差顕微鏡で比較し、かつ遺伝子導入細胞の性状を、蛍光抗体免疫染色、RT-PCRを用い検討した。蛍光抗体免疫染色ではZo-1、Na<sup>+</sup>-k<sup>+</sup> ATPaseの発現を、RT-PCRではNa<sup>+</sup>-k<sup>+</sup> ATPaseなどの mRNAの発現を解析した。また、遺伝子導入細胞のポンプ機能を、Ussing chamberを用いて測定した。

（倫理面への配慮）

当センターにおいては、ヒト細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療センター研究所、受付番号25、26及び27、平成15年1月承認、受付番号49、

平成15年10月承認、受付番号55、平成15年11月承認、受付番号88、89、90、91平成16年7月承認、受付番号55、平成16年11月追加承認、受付番号146、平成17年4月承認、受付番号156、平成17年7月承認）。また、倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、最新の社会的な影響を十分に考慮し研究を行った。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行っている。

### C. 研究結果

1) 遺伝子導入細胞におけるHPV16 E6E7、hTERT、cdk4、cyclinD1の発現

全10種類(#1~#10)の遺伝子導入細胞と初代培養細胞における HPV16 E6E7、hTERT、cdk4、cyclinD1の発現をWestern blot法で解析した。各遺伝子の蛋白発現は下記の如くであった。#1 cdk4/cyclinD1、#2 cdk4/cyclinD1/hTERT、#3 cdk4 #4 cdk4/hTERT、#5 cdk4/cyclinD1、#6 cdk4/cyclinD1、#7 cdk4/cyclinD1/hTERT、#8 HPV16 E6E7、#9 HPV16 E6E7/hTERT、#10 hTERT

2) 初代培養細胞と遺伝子導入細胞の増殖能  
ヒト角膜内皮細胞は、30日世代数で増殖停止、すなわち細胞老化が誘導された。これに対し、遺伝子導入細胞#4、#5、#6は、120日世代数経過しても分裂速度に変化なく継代培養可能であり、不死化したと考えられた。

3) 遺伝子導入細胞の形態学的な観察  
遺伝子導入細胞は、形態学的に小型小円形で初代培養細胞と類似するものと、紡錘形で線維芽細胞様の2種があった。

4) 遺伝子導入細胞の性質  
全10種類の遺伝子導入細胞で、蛍光抗体免疫染色に

よりZo-1、Na<sup>+</sup>-k<sup>+</sup> ATP aseの蛋白発現が確認され、RT-PCRによりNa<sup>+</sup>-k<sup>+</sup> ATP aseなどの角膜内皮固有mRNAの発現が確認された。

#### 5) 遺伝子導入細胞のポンプ機能

遺伝子導入細胞 #4 を Ussing chamber に入れ、電位差および短路電流が安定した後、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP ase 阻害剤ウアバイン 0.1mM を添加し、電位差および短路電流を再測定した。測定から 1、5、および 10 分後に明瞭な電位差が出現した。ウアバインを添加した後、5 分以内に電位差が 0 mV になった。測定から 1、5、および 10 分後に短路電流が観察され、ウアバインを添加した後、5 分以内に短路電流は 0μA になった。

#### D. 考察

初代培養細胞に不死化遺伝子 HPV16 E6E7、hTERT、cdk4、cyclinD1 を、単独あるいは種々の組み合わせで導入し、全10種類のヒト角膜内皮細胞株を樹立した。これらはいずれも蛍光抗体免疫染色にて Zo-1、Na<sup>+</sup>-k<sup>+</sup> ATP ase が陽性で、RT-PCR で Na<sup>+</sup>-k<sup>+</sup> ATP ase、○、○ mRNA が検出された。また、Ussing chamber による検討から、これら細胞株がポンプ機能を維持していることが示唆された。以上より今回得られた全10種類の細胞株はヒト角膜内皮細胞の形質を忠実に反映していることが示唆された。近年、角膜輪部近傍から角膜内皮前駆細胞が同定され、これらを用いた再生医療の実現が希求されているが、今回樹立した細胞株化技術を用いれば、より安定した実験系の構築が可能と思われる。また各種疾患の病態解明のみならず、各種薬剤の角膜内皮における安全性や効果を効率よく評価するためにも有用と思われる。

小児眼科手術検体組織内には間葉系細胞と同様の培養条件で分離可能であり、増殖する細胞が存在することを明らかである。本研究によって、ヒト角膜内皮の有用な培養株樹立に成功した。角膜は免疫応答寛容があり、内皮移植に臨床応用できる可能性がある。この細胞は片側の allele に Rtb 遺伝子の変異がある可能性もあるが、網膜芽細胞腫は two hit theory によって起こり、網膜細胞のみに生ずるので、この内皮細胞ががん化する可能性は殆どないと思われる。しかし、臨床応用においては、正常角膜内皮を用いることが望ましい。今後は、まず培養細胞シートを作成して、さらに構造と機能の検討を行い、動物において移植実験を試みる予定である。

#### E. 結論

網膜芽細胞腫の摘出眼球から角膜内皮細胞を採取し、さまざまな遺伝子を導入して培養細胞株樹立に成功した。この技術は、角膜内皮細胞移植へ応用できることが期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

原著論文

1. Yokoi T, Nishina S, Azuma N. Glial extrusion from the regressed retinoblastoma after conservative treatment. *Acta Ophthalmol Scand* 2008; 86:462-464.
2. Azuma N, \* Hida T, Kohsaka S. Hypovascular glial overgrowth from the optic nerve head in fetuses of 16 weeks gestation. *Acta Ophthalmol Scand* 2008; In press
3. Hiraoka M, Nishina S, Nakagawa A, Matsuoka K, Azuma N. Case of aggressive posterior retinopathy of prematurity with atypical neovascular growth. *Jpn J Ophthalmol* 2008; 417-419.
4. Yokoi T, Nakagawa A, Matsuoka K, Koide R, Azuma N. Analysis of pathology in type I Stickler syndrome. *Acta Ophthalmol Scand* 2008; In press
5. Suzuki Y, Yokoi T, Hiraoka M, Nishina S, Azuma N. Congenital rotated macular rotation. *Jpn J Ophthalmol* 2008; In press
6. Nishina S, Suzuki Y, Azuma N. Exudative retinal detachment following cataract surgery in Hallermann-Steffens syndrome. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246:453-455.
7. Seko Y, Azuma N, Takahashi Y, Makino H, Morito T, Muneta T, Matsumoto K, Saito H, Sekiya I, Umezawa A. Human sclera maintains common characteristics with cartilage throughout evolution. *PLoS ONE* 2008; 3(11):e3709. Epub 2008 Nov 12.
8. Iso M, Fukami M, Horikawa R, Azuma N, Kawashiro N, Ogata T. SOX10 mutation in Warrdenburg syndrome type II. *Am J Med Genet* 2008; 146A:2162-2163.
9. Yokoi T, Hiraoka M, Miyamoto M, Yokoi T, Kobayashi Y, Nishina S, Azuma N. Vascular abnormalities of aggressive posterior retinopathy of prematurity by fluorescein angiography findings. *Ophthalmology* 2008; In press.
10. Nishina S, Yokoi T, Yokoi T, Kobayashi Y, Hiraoka M, Azuma N. Effect of early vitreous surgery for aggressive posterior retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 2009 inpress
11. Kobayashi Y, Suzuki K, Oba S, Nishina S, Azuma N, Okuyama M. Ocular manifestations and prognosis of shaken baby syndrome in Japanese children's hospitals. *JJO* in press

##### 総説

1. 東 範行: 黄斑を形成する遺伝子システムと再生医療への応用. *医学のあゆみ* 2008; 226:965-972
2. 東 範行: 未熟児網膜症の最新の医療. *医療* 2009; 62: In press
3. 東 範行: 未熟児網膜症の診断と治療. *日本眼科医会* 2009; In press

##### 著書

1. 東 範行: 眼疾病学 丸尾敏夫・栗屋忍 視能矯正学 改訂第2版増補 金原出版 125-137 2008.
2. 東 範行: 未熟児網膜症. 視能訓練士用語解説辞

典 メディカル英 2009; In press

3. 東 範行: 網膜裂孔. 視能訓練士用語解説辞典  
メディカル英 2009; In press

#### H. 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

## 培養ヒト角膜内皮細胞に対するshear stressの影響の研究

分担研究者：大橋裕一

愛媛大学大学院医学系研究科教授

### 研究要旨

レーザー虹彩切開術後水疱性角膜症の発症に術後の前房水動態の変化が関与していると推測し、特に虹彩切開窓からの噴出流によるshear stressの角膜内皮細胞への影響について検討した。

### A. 研究目的

角膜内皮細胞はバリア機能とポンプ機能によって角膜含水量を制御して角膜の透明性を維持する役割を担っている。しかし、内皮細胞数が高度に減少すると不可逆的な角膜浮腫、混濁を生じ、ついには水疱性角膜症となる。最近、レーザー虹彩切開術(以下 LI)に起因する水疱性角膜症の報告が増加しているが、我々は、LI 後眼では虹彩切開窓を通じて後房から前房へ向かう房水の噴出流が形成され、角膜内皮へ衝突して物理的な刺激となることを明らかにした。(Demonstration of Aqueous Streaming through a Laser Iridotomy Window Against Corneal Endothelium. Yamamoto Y, Uno T, et.al. Archives of Ophthalmol, 124;387-393, 2006)

今回、角膜内皮細胞がこの噴出流から受けるshear stressが、角膜内皮に与える影響について、培養内皮細胞にshear stressを負荷して検討する。

### B. 研究方法

培養したヒト角膜内皮細胞に対して培養液をペリスタティックポンプで持続もしくは断続的に灌流することにより、shear stressを与える。培養スライドは日本ジェネティクス株式会社の細胞培養スライドチェンバー  $\mu$ -slid I にタイプIVコラーゲンをコートしたものと、付属するflow kitをもちいる。これにGILSON社のペリスタティックポンプ・ミニバルス3、およびPVC(ポリ塩化ビニル)フローチューブで還流回路を構成する。さらに、ON OFF時間をそれぞれ設定できるタイマー装置を自作し、ポンプの作動と休止を交互に繰り返すことで、断続的な流れを負荷

することを可能にした。負荷するshear stressの強さは、既報した動物実験における噴出流速測定値から流体解析手法を用いて算出した結果により決定した。

(実験 1)コンフルエントに培養した角膜内皮細胞にshear stressを0.12dyn/cm<sup>2</sup>、0.16 dyn/cm<sup>2</sup>、0.58 dyn/cm<sup>2</sup>で4時間、16時間負荷し、細胞の形態の変化や脱落を顕微鏡で観察する。

(実験 2) shear stressを0.12 dyn/cm<sup>2</sup>、0.58 dyn/cm<sup>2</sup>でポンプを2秒 on、8秒 offをくりかえし、4時間断続的にshear stressを負荷し、細胞の形態の変化や脱落を顕微鏡で観察する。

(実験3) shear stressを連続で0.12 dyn/cm<sup>2</sup>、0.16 dyn/cm<sup>2</sup>、0.58 dyn/cm<sup>2</sup>および、断続で0.12 dyn/cm<sup>2</sup>、0.58 dyn/cm<sup>2</sup>ンでそれぞれ4時間負荷し、スライド上に残存する細胞数をDAPIで核染色してcountして比較する。

### C. 研究結果

(実験 1) shear stressを0.12 dyn/cm<sup>2</sup>、0.16 dyn/cm<sup>2</sup>、0.58 dyn/cm<sup>2</sup>で4時間負荷では、それぞれshear stress強さに従って細胞が伸張し、0.58 dyn/cm<sup>2</sup>負荷では脱落する細胞もみとめた。16時間負荷すると0.12 dyn/cm<sup>2</sup>負荷でも細胞が脱落するものが増え、さらに細胞の収縮も認められた。

(実験 2)断続的にshear stressを負荷すると、0.12 dyn/cm<sup>2</sup>でも4h負荷で飛び石状に細胞が脱落した領域を広範囲に認め、0.58 dyn/cm<sup>2</sup>ではより脱落細胞は増え、ほとんどの残存する細胞も収縮した。

(実験3) 平均残存細胞数は、shear stressを負荷なし (control) , 連続0.12 dyn/cm<sup>2</sup>、連続0.16 dyn/cm<sup>2</sup>、連続0.58 dyn/cm<sup>2</sup>および、断続0.12 dyn/cm<sup>2</sup>、断続0.58 dyn/cm<sup>2</sup>でそれぞれ81.5±4.3、58.8±7.5、53.8±5.0、44.8±3.6、33.5±5.6、12.8±1.8、(個/視野) だった。

#### D. 考察

今回の実験の結果から、L I後の“噴出流”で発生するレベルと性状のshear stressを培養ヒト角膜細胞に負荷すると、shear stressが強いほど、また負荷時間は長いほど残存細胞数は低下した。また、断続負荷ではさらに残存数が少なく、0.12 dyn/cm<sup>2</sup>でもコントロールの半数以下だったことから、断続的shear stressは連続するshear stressよりもその影響は増幅することが示唆された。

#### E. 結論

培養細胞の実験系で示した剥離や脱落は直接臨床的な角膜内皮障害をあらわしているとはいえないが、L I後の噴出流によって角膜内皮細胞に加わるshear stressは角膜内皮細胞の接着や恒常性維持に少なからず影響している可能性が推測された。

#### 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  
別紙のとおり

2. 学会発表  
別紙のとおり

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし



### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山田 昌和	こどもの目やに抗菌薬でいいの？	黒坂 大次郎	眼科インストラクション コース18 眼科診療の スキルアップ 白内障・小児・ぶどう膜炎 編	メジカル ビュー	東京都	2008	123-127
山田 昌和	繰り返すヘルペス性角膜炎	若倉雅登/清澤 源弘/山田昌和	続・解決！ 目と視覚 の不定愁訴・不明愁 訴	金原出版	東京都	2008	159-160
山田 昌和	ドライアイなら人工涙液をたくさんつければよい？	若倉雅登/清澤 源弘/山田昌和	続・解決！ 目と視覚 の不定愁訴・不明愁 訴	金原出版	東京都	2008	199-200
山田 昌和	点眼にまつわるいろいろな質問 その1	若倉雅登/清澤 源弘/山田昌和	続・解決！ 目と視覚 の不定愁訴・不明愁 訴	金原出版	東京都	2008	201-202
山田 昌和	点眼にまつわるいろいろな質問 その2	若倉雅登/清澤 源弘/山田昌和	続・解決！ 目と視覚 の不定愁訴・不明愁 訴	金原出版	東京都	2008	203-204
山田 昌和	結膜弛緩症って病気なの？	若倉雅登/清澤 源弘/山田昌和	続・解決！ 目と視覚 の不定愁訴・不明愁 訴	金原出版	東京都	2008	221-222
山田 昌和	デルモイド	後藤 浩	眼科プラクティス 24 見た目が大事！ 眼腫瘍	文光堂	東京都	2008	60-61

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山田 昌和	角膜・結膜・全眼部の加齢変化	樋口哲夫/江口秀一郎	眼科プラクティス 22 抗加齢眼科学	文光堂	東京都	2008	23-27
山田 昌和	ドライアイ(乾性角膜炎・Sjogren 症候群)	根木 昭編	眼科プラクティス 23 眼科薬物療法AtoZ	文光堂	東京都	2008	47-48
山田 昌和	びまん性表層角膜炎・点状表層角膜炎	根木 昭編	眼科プラクティス 23 眼科薬物療法AtoZ	文光堂	東京都	2008	73-75
山田 昌和	デルモリポーマ	後藤 浩	眼科プラクティス 24 見た目が大事！ 眼腫瘍	文光堂	東京都	2008	62-63
山田 昌和	保存角膜を利用した輪部デルモイドの治療	後藤 浩	眼科プラクティス 24 見た目が大事！ 眼腫瘍	文光堂	東京都	2008	91
山田 昌和	感染性角膜炎にステロイドは禁忌だろうか	樋口哲夫/江口秀一郎	眼科診療のコツと落とし穴 4 薬物療法	中山書店	東京都	2008	24-25

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山田 昌和	ドライアイの診断にはgolden standardがない	樋口哲夫/江口秀一郎	眼科診療のコツと落とし穴 3 検査・診断	中山書店	東京都	2008	26-27
山田 昌和	薬物障害	水流 忠彦編	看護のための最新医学講座 第2版20巻 眼科疾患	中山書店	東京都	2008	242-249
東 範行	眼疫病学	丸尾敏夫・栗屋忍	視能矯正学改訂第2版増補	金原出版	東京都	2008	125-137
東 範行	未熟児網膜症	山本 節	視能訓練士用語解説辞典	メディカル葵	東京都	2009	印刷中
東 範行	網膜裂孔	山本 節	視能訓練士用語解説辞典	メディカル葵	東京都	2009	印刷中

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hatou S, Yamada M, Mochizuki H, Shiraishi A, Joko A, Nishida T.	The effects of dexamethasone on the Na,K-ATPase activity and pump function of corneal endothelial cells.	Curr Eye Res.		in press	2009
Hatou S, Yamada M, Mochizuki H, Nishida T.	Role of protein kinase C in regulation of Na <sup>+</sup> and K <sup>+</sup> -Dependent ATPase activity and pump function in corneal endothelial cells.	Japanese Journal of Ophthalmology		in press	2009
Mochizuki H, Yamada M, Hatou S, Tsubota K.	Turnover rate of tear film lipid layer determined by Fluorophotometry.	Br J Ophthalmol		in press	2009
Yamada M, Mizuno Y, Miyake Y, the Cataract Survey Group of National Hospital Organization in Japan.	A multicenter study on health-related quality of life of cataract patients: baseline data	Japanese Journal of Ophthalmology		in press	2009
Araki-Sasaki K, Osakabe Y, Miyata K, Amano S, Yamada M, Kitagawa K, Hirano K, Kinoshita S.	What is this thing called amyloidosis?	Cornea		in press	2009
Mochizuki H, Yamada M, Hatou S, Nishida T	Fluorophotometric measurement of the precorneal residence time of topically applied hyaluronic acid	Br J Ophthalmol	92	108-111	2008
Yamada M, Hatou S, Yoshida J	In Vitro Susceptibilities of Bacterial Isolates From Conjunctival Flora to Gatifloxacin, Levofloxacin, Tosufloxacin, and Moxifloxacin	Eye & Contact Lens	34(2)	109-112	2008
Yamada M, Yoshida J, Hatou S, Yoshida T, Minagawa Y	Mutations in the quinolone resistance determining region in Staphylococcus epidermidis recovered from conjunctiva and their association with susceptibility to various fluoroquinolones	Br J Ophthalmol	92	848-851	2008
Yamada M, Hatou S, Mochizuki H	Conjunctival Fixation Sutures for Refractory Superior Limbic Keratoconjunctivitis	Br J Ophthalmol		online first	
Mochizuki H, Yamada M, Hatou S, Kawashima M, Hata S	Deposition of Lipid, Protein, and Secretory Phospholipase A2 on Hydrophilic Contact Lenses	Eye & Contact Lens	34(1)	46-49	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
山田 昌和	加齢と眼表面疾患	眼科	50(4)	429-434	2008
羽藤 晋, 山田 昌和	角膜内皮機能不全の治療	医療	62(8)	451-457	2008
山田 昌和	眼科領域の臨床疫学、効用研究	医療	62	695-700	2008
山上 聡, 新家 眞, 天野 史郎, 臼井 智彦, 三村 達哉, 横尾 誠一, 青山 佳世, 大沢 稔也, 上羽 悟史, 松島 綱治, 林 孝彦, 田中 香純, 水木 信久, 海老原 信行, 村上 晶, 諸星 計, 宮崎 大, 井上 幸次, Hamrap P, Liu Y, Dana MR, 中野 英樹, 羽藤 晋, 山田 昌和, 羽室 淳爾, 山田 潤, 後藤 晋, 小杉 正明, 鈴木 洋, 北川 全	目の感染と免疫 拒絶反応のない理想的な角膜移植を目指して-全層角膜移植から内皮細胞移植へ-	日眼会誌	112(3)	266-278	2008
山田 昌和	先天性遺伝性角膜内皮ジストロフィ	あたらしい眼科	26(2)	163-166	2009
永井 正子, 羽藤 晋, 大野 建治, 望月 弘嗣, 山田 昌和	結膜弛緩症に対する結膜縫着術	あたらしい眼科	25(11)	1557-1560	2008
Tanabe A, Matsuda M, Fukuhara A, Miyata Y, Komuro R, Shimomura I, Tojo H, Zhe-Xiong J, Cheng-Ri H, Lingli D, Goda S, Kawanami T, Sawaki T, Sakai T, Xiao-Peng T, Masaki Y, Fukushima T, Tanaka M, Mimori T, Tojo H, Eda T.B, Okazaki T	Obesity causes a shift in metabolic flow of gangliosides in adipose tissues	Biochemical and Biophysical Research Communications	379	547-552	2009
	Impaired TCR signaling through dysfunction of lipid rafts in sphingomyelin synthase 1 (SMS1)-knockdown T cells	International Immunology	20(11)	1427-1437	2008
Mizutani Y, Kihara A, Chiba H, Tojo H, Igarashi Y	Synthesis of 2-hydroxy-ceramide by ceramide synthase family members: enzymatic basis for the preference of fatty acid chain length in cultured cell models	Journal of Lipid Research	-	-	2008
Hiraoka M, Nishina S, Nakagawa A, Matsuoka K, Azuma	Case of Aggressive Posterior Retinopathy with Atypical Neovascular Growth	Japanese Journal of Ophthalmology	52	417-419	2008
Nishina S, Suzuki Y, Azuma N	Exudative retinal detachment following cataract surgery in Hallermann-Streiff syndrome	Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	246(3)	453-455	2008
Iso M, Fukami M, Horikawa R, Azuma N, Kawashiro N, Ogata T	SOX10 mutation in Waardenburg syndrome type II	American Journal of Medical Genetics Part A	146A(16)	2162-2163	2008
Yokoi T, Nishina S, Azuma N	Glial extrusion from the regressed retinoblastoma after conservative treatment	Acta Ophthalmol Scand	86	462-464	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Seko Y, Azuma N, Takahashi Y, Makino H, Morito T, Muneta T, Matsumoto K, Saito	Human sclera maintains common characteristics with cartilage throughout evolution. 2008 Nov 12	Plos ONE	3(11)	e3709.Epub	2008
Azuma N, Hida T, Kohsaka S.	Hypovascular glial overgrowth from the optic nerve head in fetuses of 16 week gestation	Acta Ophthalmol Scand	86	Epub	2008
Yokoi T, Nakagawa A, Matsuoka K, Koide R, Azuma N.	Analysis of pathology in type I Stickler Syndrome	Acta Ophthalmol Scand	86	Epub	2008
Suzuki Y, Yokoi T, Hiraoka M, Nishina S, Azuma N.	Congenital rotated macula with relatively good vision and binocularity	Japanese Journal of Ophthalmology	-	In press	2009
Kobayashi Y, Suzuki K, Oba S, Nishina S, Azuma N, Okuyama M.	Ocular manifestations and prognosis of shaken baby syndrome in Japanese children's hospitals	Japanese Journal of Ophthalmology	-	In press	2009
Yokoi T, Hiraoka M, Miyamoto M, Kobayashi Y, Nishina S, Azuma N	Vascular abnormalities of aggressive posterior retinopathy of prematurity by fluorescein angiography findings	Ophthalmol	-	In press	2009
Nishina S, Yokoi T, Kobayashi Y, Hiraoka M, Azuma N	Effect of early vitreous surgery for aggressive posterior retinopathy of prematurity detected by fluorescein angiography	Ophthalmol	-	In press	2009
東 範行	黄斑を形成する遺伝子システムと再生医療への応用	医学のあゆみ	226(11)	965-971	2008
東 範行	未熟児網膜症の最新の医療	医療	63	In press	2009
東 範行	未熟児網膜症の診断と治療	医療	-	In press	2009
Suzuki T, Wada T, Kozai S, Ike Y, Michael S.G, Ohashi Y	Contribution of secreted proteases to the pathogenesis of postoperative Enterococcus faecalis endophthalmitis	J Cataract Refract Surg	34(10)	1776-1784	2008
Zheng Xiaodong, Kodama T, Ohashi Y	Eye ball luxation in Bacillus cereus-induced panophthalmitis following a double-penetrating ocular injury	Japanese Journal of Ophthalmology	52(5)	419-422	2008
Narioka J, Ohashi Y	Transcanalicular-Endonasal Semiconductor Diode Laser-Assisted Revision Surgery for Failed External Dacryocystorhinostomy	Am J Ophthalmol	146(1)	60-68	2008
Suzuki T, Ohashi Y	Corneal Endotheliitis	Seminars in Ophthalmology	23(4)	235-240	2008
Suzuki T, Uno T, Guangming Chen, Ohashi Y	Ocular distribution of intravenously administered micafungin in rabbits	Journal of Infection and Chemotherapy	14(3)	204-207	2008
Narioka J, Ohashi Y	Dacryocystography with nasolacrimal probing under fluoroscopic guidance for treatment of congenital dacryocystocele	Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus	12(3)	299-301	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Koizumi N, Suzuki T, Uno T, Chihara H, Shiraishi A, Hara Y, Inatomi T, Sotozono C, Kawasaki S, Yamasaki K, Mochida C, Ohashi Y, Kinoshita S,	Cytomegalovirus as an Etiologic Factor in Corneal Endotheliitis	American Academy of Ophthalmology	115(2)	292-297	2008
白石 敦, 原 祐子, 大橋 裕一	シリコーンハイドロゲルコンタクトレンズの連続装用が前眼部環境に及ぼす影響と安全性の検討	あたらしい眼科	25(12)	1701-1707	2008
今安 正樹, 白石 敦, 大橋 裕一, 島田 昌一	培養角膜上皮細胞のサイトカイン遺伝子発現に対するマルチパーパスソリューションの影響	あたらしい眼科	25(11)	1567-1572	2008
鈴木 崇, 大橋 裕一	細菌性角膜炎臨床分離株に対する Fractional Inhibitory Concentration Index を用いた抗菌薬併用効果の検討	あたらしい眼科	25(11)	1561-1565	2008
佐野 研二, 植田 喜一, 宇津見 義一, 高野 繁, 吉田 博, 伊藤 信一, 三宅 謙作, 糸井 素純, 梶田 雅義, 渡邊 潔, 大橋 裕一, 大瀧 守彦, 井上 隆久, 大橋 敏夫, 大竹 康裕, 岡野 憲二, 田中 英成	インターネットによるコンタクトレンズ眼障害 アンケート調査の集計結果報告	日本の眼科	79(9)	69-75	2008
菊池 正晃, 宇野 敏彦, 山口 昌彦, 原 祐子, 白石 敦, 大橋 裕一	Barron Artificial Anterior Chamber を用いた表層角膜移植および輪部移植術	眼科手術	21	361-365	2008
川崎 史朗, 溝上 志朗, 山口 昌彦, 大橋 裕一	涙液層安定性解析装置によるマレイン酸チモロールゲル化剤点眼後の涙液層への影響の検討	日本眼科学会雑誌	112(6)	539-544	2008
末廣 久美子, 溝上 志朗, 川崎 史朗, 水川 憲一, 大橋 裕一	初診時に中期の視野障害が認められた若年者正常眼圧緑内障の1例	あたらしい眼科	25(5)	697-700	2008
三好 知子, 鈴木 崇, 高岡 明彦, 大橋 裕一	流行性耳下腺炎後に発症した小児両側性球後視神経炎の1例	あたらしい眼科	25(4)	569-572	2008
野田 恵理子, 白石 敦, 坂根 由梨, 原 祐子, 山口 昌彦, 宇野 敏彦, 大橋 裕一	生体レーザー共焦点顕微鏡(HRT II-RCM)が診断, 経過観察に有用であった角膜真菌症の1例	あたらしい眼科	25(3)	385-388	2008



#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

## ●インストラクションポイント

- ・患児の年齢、罹患眼、経過、随伴症状に区切って考えていくと、原因を絞り込みやすい
- ・小児では結膜炎の頻度が高い。年齢によって起炎菌が異なることを覚えておこう
- ・結膜炎を繰り返す場合には、先天鼻涙道閉鎖、睫毛内反症など基礎疾患の存在を疑う
- ・麦粒腫の初期は結膜炎と誤ることがある。麦粒腫を起こしやすい患児ではフリクテン性角結膜炎の合併に注意しよう

## 戦略

## 年齢と罹患眼、経過をまず考慮しよう

小児の眼脂といえば、結膜炎のことが多く、特に乳幼児では頻度が高い。結膜炎は細菌性、ウイルス性、アレルギーなどに大別され、原因となる細菌やウイルスは多彩であるが、患児の年齢(新生児、乳幼児、学童)、罹患眼(片眼性、両眼性)、経過(急性、慢性、再発性)、随伴症状(全身症状、眼症状)に区切って考えていくと、原因を絞り込みやすい。ここでは、小児の感染性結膜炎について概説するとともに、結膜炎と思っていたが治らない場合、繰り返す場合について考えていこう。症例の項では、小児の目やにの原因として、結膜炎以外に注意したい疾患について述べる。

## 新生児の結膜炎

新生児期に眼脂や充血がみられる場合の代表疾患は新生児結膜炎と新生児涙囊炎である。新生児結膜炎は両眼性のことが多いが、新生児涙囊炎は涙道通過障害が根底にあり、通常は片眼性の疾患である。

新生児の結膜炎は産道感染によるものであり、細菌性のものが多い。新生児期の抗菌薬(フルオロキノロンやエリスロマイシンなど)点眼により、ほとんどは数日以内に問題なく治癒する。

## ◆性感染症による結膜炎

注意したいのは、性感染症によるものであり、治らない新生児結膜炎の原因となる。淋菌性結膜炎、クラミジア結膜炎が該当する。

淋菌による新生児結膜炎は、新生児膿漏眼として有名であるが、実際には新生児膿漏眼はわが国ではきわめてまれな疾患である。淋菌による新生児結膜炎は潜伏期間が生後2~4日と短く、経過によっては角膜穿孔をきたすことがある。治療はペニシリン系の頻回点眼が基本であるが、市販の点眼製剤はなく、フルオロキノロン、セフェムやエリスロマイシンには薬剤耐性の問題がある。治療にはセフェム系の抗菌薬の全身投与に加えて、ペニシリン系の注射用製剤から点眼薬を調整するなどの工夫が必要である。

## 新生児涙囊炎

先天鼻涙道閉鎖によって生じる。抗菌薬を点眼すると眼脂が軽快するが、中止すると再発するという経過をたどる。涙道通水検査から診断は容易である

## 淋病

淋病は近年再び増加傾向を示しており、15,000~20,000人/年(男性が多い)程度の発症数がある。最近、成人の淋菌性結膜炎の報告が散見され、フルオロキノロン耐性、セフェム耐性など多剤耐性化していることが問題となっている

新生児のクラミジア結膜炎(新生児封入体結膜炎)は、潜伏期間は通常5~19日とされ、両眼の眼瞼腫脹、眼脂、充血がみられる。新生児では結膜関連リンパ装置が未発達であるため、成人と異なり濾胞形成はみられない。治療はフルオロキノロン、マクロライドの点眼とともに、エリスロマイシン(40mg/kg/日)やクラリスロマイシンの内服(10~15mg/kg/日)が推奨される。

#### クラミジア

性器クラミジアの発症数は35,000人程度であるが、不顕性感染が多く、一般妊婦の子宮頸管からのクラミジア検出率は3~5%にのぼる

## 乳幼児の結膜炎

### 【図1】 睫毛内反症

流涙、羞明とともに、乳幼児の繰り返す結膜炎の原因となる。



乳幼児の結膜炎は細菌性結膜炎、特にインフルエンザ菌によるものが多い。典型的には、かぜをひいて鼻づまりがあるときに生じる。

インフルエンザ菌による結膜炎は、眼瞼結膜の充血が強く、球結膜の充血は軽度で、いわゆるpink eyeを呈する。片眼性または両眼性である。たいいていの抗菌薬に感受性を示し、結膜炎自体も数日で治癒するので、臨床的にはあまり問題にならない。

#### ◆睫毛内反による結膜炎

乳幼児で結膜炎症状を繰り返す場合には、睫毛内反を疑うとよい【図1】。睫毛内反の典型的な症状は、流涙や羞明であるが、結膜炎になりやすいのも特徴の一つである。睫毛が慢性的に眼表面と接触していることが、細菌感染のリスクを高めているものと推測される。

#### 細菌性結膜炎

通常は急性で多くの例が4日以内、長くても1週間以内に治癒する。遷延する場合には他の疾患や基礎疾患の存在を疑ったほうがよい

## 学童の結膜炎

【図2】ブドウ球菌による結膜炎



睑結膜の充血が強いが、球結膜の充血は軽く、pink eyeを呈する

【図3】流行性角結膜炎



睑結膜、球結膜の双方に強い充血があり、睑結膜には濾胞形成がみられる

【図4】流行性角結膜炎

小児では高度の多発性角膜上皮浸潤を伴いやすい。



学童の結膜炎は大人と類似しているが、学校という集団生活の場があるために流行性角結膜炎など伝染性の高いものが含まれやすく、診断によっては通学停止などの処置をとらなければならないので注意したい。

### ◆細菌性結膜炎

この年齢での細菌性結膜炎は、肺炎球菌やブドウ球菌が多いとされ、成人とほぼ同じパターンを示す。片眼性が多く、黄色い眼脂がみられ、睑結膜の充血は高度であるが、球結膜はあまり充血しない(pink eye【図2】)。経過は急性で1週間以内に治癒する。

結膜炎と間違えやすい前眼部感染性疾患として麦粒腫や眼瞼炎がある。腫瘍形成や膿点があれば診断は容易であるが、初期には眼瞼全体の腫脹、結膜充血と眼脂などが主症状のことがあり、結膜炎と診断されやすい。眼瞼を触診して圧痛や腫瘍がないか確かめることが重要である。この年齢では、麦粒腫のようなMeibom腺感染を基盤として発症するフリクテン性角結膜炎にも注意を要する。

### ◆ウイルス性結膜炎

ヘルペスウイルスやアデノウイルスが原因になりやすい。単純ヘルペスウイルスによるものは多くは初感染であるが、不顕性感染も多いとされ、原因を特定できないことも多い。