

200828006B

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

角膜内皮機能不全に対する
新しい治療方法の開発

平成18年度～平成20年度 総合研究報告書

研究代表者 山田 昌和

平成21年（2009）4月

厚生労働科学研究費補助金
感覚器障害研究事業

角膜内皮機能不全に対する
新しい治療方法の開発

平成18年度～平成20年度 総合研究報告書
研究代表者 山田 昌和

平成21年（2009）4月

目 次

I. 総合研究報告書

角膜内皮機能不全に対する薬物治療のための基礎研究
山田 昌和

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行物・別刷

I . 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究障害）
総合研究報告書

角膜内皮機能不全に対する新しい治療法の開発

主任研究者：山田昌和

独立行政法人国立病院機構東京医療センター・臨床研究センター・部長

研究要旨：

角膜内皮機能不全は角膜疾患のなかで最も失明に至る頻度が高く、角膜移植を待機する患者の過半数を占める疾患である。本研究は角膜内皮機能不全に対する新しい治療法として、薬物療法と培養角膜内皮細胞移植による手術治療の開発を行うことを目的とした。

角膜内皮機能不全の薬物療法の開発を目的とした研究では、角膜内皮細胞のポンプ機能の担い手である Na-K ATPase の活性に影響を及ぼす薬剤のスクリーニングを行い、デキサメサゾンとインスリンが Na-K ATPase の活性を亢進させることを見いだした。ステロイドによる Na-K ATPase 活性化は酵素蛋白合成による Na-K ATPase の発現量増加を介すると考えられた。これに対してインスリンによる角膜内皮の Na-K ATPase 活性化は PKC を介し、Na-K ATPase の α サブユニットの脱リン酸化によることが示された。インスリンの作用は cyclooxygenase 阻害剤のインドメサシンを添加することにより増強された。以上より、Na-K ATPase の活性制御には異なる複数の経路が存在していると考えられ、デキサメサゾンとインスリン、インドメサシンの組み合わせによって Na-K ATPase 活性を制御できれば、水疱性角膜症を薬物で治療できる可能性があると考えられた。

培養角膜移植による手術治療については、ヒト角膜内皮細胞の培養技術の確立に関する研究を行った。網膜芽細胞腫の患児より得られたヒト角膜内皮細胞に、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、ヒト角膜内皮細胞株を作製した。このヒト角膜内皮細胞株は角膜内皮としての性質、機能を保持していることから、今後の角膜内皮研究や培養角膜移植の細胞源になる可能性があると考えられた。また、生体内での角膜内皮細胞の増殖制御、角膜内皮創傷時の治癒機転を解明する目的で、培養角膜内皮細胞の増殖および遊走に対する TGF- β 2 の役割について検討した。さらに、TGF- β 2 刺激による培養内皮細胞の遊走、増殖と MAP キナーゼ細胞内シグナルとの関連について明らかにした。また、角膜内皮細胞の増殖や機能の制御には、プロスタグランジン、フォスファチジルイノシトールなど様々な脂溶性メディエータ、炎症メディエータが関連している可能性がある。本研究では、角膜内皮機能不全症を含む角膜疾患に関連する脂質性バイオマーカーあるいは標的マーカーを検索するための高速液体クロマトグラフィー/質量分析システムの開発を行った。

分担研究者氏名・所属機関名及び
所属機関における役職名

東城 博雅 大阪大学大学院医学系
研究科 生化学分子生物
学 生命機能研究科細胞
ネットワーク・生化学
准教授

東 範行 国立成育医療センター
眼科医長

大橋 裕一 愛媛大学大学院医学系研
究科 教授

A. 研究目的

角膜内皮機能不全は角膜疾患のなかで最も失明に至る頻度が高く、角膜移植を待機する患者の過半数を占める疾患である。本研究は角膜内皮機能不全に対する新しい治療法として、薬物療法と培養角膜内皮細胞移植による手術治療の開発を行うことを目的とした。角膜内皮機能不全症例のうち、軽症例は薬物療法による機能維持を目指し、重症例は自己または同種の培養角膜内皮細胞移植による手術によって治療することを企図したものである。

角膜内皮は角膜の最後面に位置する一層の細胞層であり、ポンプ機能とバリア機能により角膜実質の含水率を制御し、角膜の透明性の維持に寄与している。角膜内皮細胞はヒトでは生後は再生能力がなく、その細胞数は加齢と共に低下し、コンタクトレンズの長期装用や眼手術などの侵襲によって減少、低下することが知られている。細胞数の減少がある段階に達すると内皮機能不全となり、角膜浮腫から水疱性角膜症により失明状態に陥

る。内皮機能不全の治療法は現状では角膜移植しかなく、角膜移植の適応となる最大の疾患となっている。本邦では提供眼不足のために、6000人の患者が数年間角膜移植手術を待機している状態であり、角膜移植によらない本疾患の治療法の開発が急務と考えられる。

本研究では、角膜内皮機能不全の治療法として、従来ほとんど考慮されてこなかった薬物療法の開発を目的とした研究を行った。角膜内皮細胞のポンプ機能は主としてNa-K ATPaseにより発揮されるが、その詳細には不明の点が多い。本研究ではデキサメサゾン、インスリン及びインドメサシンによる角膜内皮細胞のNa-K ATPase活性制御とその機序、相互作用について検討した。

培養角膜内皮移植に関しては、ヒト角膜内皮細胞の培養技術の確立に関する研究を行った。網膜芽細胞腫の患児より得られたヒト角膜内皮細胞に、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、ヒト角膜内皮細胞株を試みた。また、生体内での角膜内皮細胞の増殖制御、角膜内皮創傷時の治癒機転を解明する目的で、培養角膜内皮細胞の増殖および遊走に対するTGF- β 2の役割について検討した。

B. 方法

薬物治療の実験には、マウス由来の角膜内皮細胞株(C3H由来)を培養し、継代培養したものを用いた。培養した角膜内皮細胞の培養液中に種々の濃度及び反応時間でデキサメサゾン、インスリン及びp protein kinase C (PKC) 活性化薬のphorbol dibutyrate (PDBu)を添加した。PDBuのC3H細胞内におけるPKC活性化の確認はenzyme

me-linked immunosorbent assay (ELISA)法で行った。また、protein phosphatase阻害剤のokadaic acid、cyclooxygenase阻害剤のindomethacin、cytochrome P₄₅₀阻害剤のresorufinの存在下で 10^{-9} Mから 10^{-5} MのPDBUを添加することで、細胞内伝達経路の検討を行った。

Na-K ATPase の酵素活性測定は、培養液中にアデノシン 3 リン酸 (ATP) を加えて、ATPase により生成される無機リン酸量をリンモリブデン反応による呈色反応を用いることを行い、Na-K ATPase の特異的阻害剤であるウアバインを添加した場合と添加しない場合の差を求めてNa-K ATPase 活性とした。Na-K ATPase のポンプ機能の測定は角膜内皮細胞シートをUssing chamber に組み込み、ポンプ機能により生じる角膜内皮細胞シートの表裏間の short circuit current を測定することで行った。また、デキサメサゾンによるNa-K ATPase α 1-subunit 発現量への影響を、ウサギ抗 Na-K ATPase α 1-subunit 抗体を用いた Western blotting 法により測定した。

培養角膜内皮細胞株の樹立に関しては、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⁺-K⁺ ATPaseの発現を、RT-PCRではNa⁺-K⁺ 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。

内皮細胞の増殖制御機構の実験には、輸入角膜より得られたヒト角膜内皮細胞を培養し、5 継代目の内皮細胞を使用した。TGF- β 2 の細胞増殖に対する効果を、リアルタイム細胞計測システム(Wako)にて検討した。また、培養内皮細胞に創傷部を作製し、増殖刺激を与えた際の TGF- β 2 の細胞増殖に与える影響を BrdU の取り込みにて検討した。TGF- β 2 の細胞遊走に対する効果は、Boyden chamber 法を用いて、TGF- β 2 (10 ng/ml)の遊走に及ぼす影響を TGF- β レセプター I キナーゼ阻害剤の存在下を含めて検討した。TGF- β 2 添加 (10 ng/ml)時の主要 MAP キナーゼ (ERK, JNK, p38)のリン酸化を Bio-Plex™ リン酸化タンパク質アッセイ (BIO-RAD)およびウエスタンブロット法にて検討した。また、TGF- β 2 (10 ng/ml)存在下における p38 特異的阻害剤添加による細胞遊走への影響を検討した。

C. 結果

(1) 薬物治療の開発

マウス由来の培養角膜内皮細胞にデキサメサゾンを投与後 48 時間での Na-K ATPase ポンプ機能を Ussing chamber を用いて測定したところ、角膜内皮 Na-K ATPase ポンプ機能は濃度依存的に増加し、 10^{-5} M のときにコントロールの 10.6 倍となった。Na-K ATPase 酵素活性も濃度依存的に増加し、濃度が 10^{-5} M のときにコントロールの約 3.9 倍に増加した。酵素活

性もポンプ機能も濃度依存的に増加するのがみられ、デキサメサゾンによる Na-K ATPase 酵素活性の亢進は、ポンプ機能という角膜内皮の機能面に反映されていることが示された。

このデキサメサゾンの作用は蛋白合成阻害剤である cycloheximide の存在下で阻害され、デキサメサゾンによる Na-K ATPase 活性化は蛋白合成を介していることが示唆された。デキサメサゾンが Na-K ATPase α 1-subunit 発現量に及ぼす影響を検討した。 10^{-7} M から 10^{-5} M のデキサメサゾンを投与し 48 時間後の Na-K ATPase α 1-subunit 発現量を Western blotting 法により測定した。デキサメサゾンの濃度依存的に Na-K ATPase α 1-subunit 発現量が増加するのがみられた。デキサメサゾンによる Na-K ATPase 活性化は、蛋白合成による Na-K ATPase の発現量増加を介していることが示された。

インスリンが Na-K ATPase ポンプ機能に及ぼす影響を検討するために 10^{-9} M から 10^{-5} M のインスリンを投与し 6 時間後の Na-K ATPase ポンプ機能を測定した。ポンプ機能はインスリン濃度が 10^{-7} M において頂点となりコントロールの約 3.7 倍の増加がみられ、bell shape 型の用量反応曲線となった。Na-K ATPase 活性も、インスリン濃度が 10^{-7} M において頂点に達しコントロールの約 2.6 倍の活性増加がみられた。インスリンの作用は PKC と protein phosphatase を介するかどうかを検討した。インスリンが培養角膜内皮細胞の PKC 活性に与える影響をみたところ、 10^{-7} M 以上の濃度でインスリンは PKC 活性を亢進することが示された。インスリンによる Na-K ATPase 酵素活性化は PKC 阻害剤である Staurosporine 存在下では阻害された。また、protein

phosphatase 阻害剤である okadaic acid によってもインスリンによる Na-K ATPase 酵素活性化は阻害された。以上から、インスリンによる Na-K ATPase 酵素活性化は PKC と protein phosphatase が関与していることが示された。また、 10^{-6} M の indomethacin、 10^{-6} M の resorufin、 10^{-6} M の indomethacin + resorufin の存在下で 10^{-7} M インスリンが Na-K ATPase 酵素活性に及ぼす影響を検討した。その結果、インスリンによる Na-K ATPase 酵素活性化作用は indomethacin、resorufin の存在下で作用が増強され、特に indomethacin + resorufin 存在下で最も活性が増加することが示された。インスリンの作用発現に重要な PKC 経路の下流には、protein phosphatase による亢進系と cyclo-oxygenase などの抑制系が同時に存在するためと考えられた。インスリンが Na-K ATPase α 1-subunit とリン酸化 α 1-subunit の発現量に及ぼす影響を検討するために 10^{-7} M のインスリンを投与し 6 時間後の Na-K ATPase α 1-subunit、リン酸化 α 1-subunit 発現量を Western blotting 法により測定した。 α 1-subunit とリン酸化 α 1-subunit の比を取ると、インスリンによりリン酸化された α 1-subunit の比率が減少することが明らかとなった。Na-K ATPase α 1-subunit は脱リン酸化された状態が活性型であるので、インスリンによる Na-K ATPase 活性化は、 α 1-subunit の脱リン酸化による酵素活性増加を介していることが示された。

インスリンとデキサメサゾン、インドメサシンの相互作用を検討した結果を図 6 に示す。インスリン単独、デキサメサゾン単独の場合に比べ、Na-K ATPase 活性はインスリンとデキサメサゾンの併用により活性が増強され、これにインドメ

サシンを加えた場合に最も活性が亢進することが示された。

(2) ヒト培養角膜内皮細胞株の樹立

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。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。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。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⁺-K⁺ ATPaseの蛋白発現が確認され、RT-PCRによりNa⁺-K⁺ ATPaseなどの角膜内皮固有mRNAの発現が確認された。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⁺-K⁺ ATPase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分後で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。以上から、作製したヒト培養角膜内皮細胞株は内皮細胞としての性質と機能を保持していると考えられた。

(3) 内皮細胞の増殖制御機構

TGF-β2を培養液に添加

(0.5-10.0ng/ml)することにより、培養角膜内皮細胞の増殖は有意に抑制された。培養内皮細胞に創傷部を作製し、増殖刺激を与えた際にもTGF-β2の存在したではBrdUの取り込みはTGF-β2の濃度依存的(1.0-10.0ng/ml)に抑制された。TGF-β2の細胞増殖抑制効果はTGF-βレセプターIキナーゼ阻害剤の存在下で回復した。

一方、TGF-β2刺激あるいはbFGF刺激により培養HCECsの遊走は有意に促進された。TGF-β2の作用は、TGF-βレセプターIキナーゼ阻害剤の添加により有意に抑制された。

TGF-β2添加(10 ng/ml)時の主要MAPキナーゼ(ERK, JNK, p38)のリン酸化を検討したところ、TGF-β2添加によってp38のリン酸化が誘導されることが明らかとなった。ERK, JNKのリン酸化は誘導されなかった。TGF-β2の作用機序にはp38MAPキナーゼのリン酸化が関与していることが推測された。これを確かめるために、p38に対する特異的阻害剤の添加による細胞遊走抑制効果を検討したところ、TGF-β2による細胞遊走効果はp38に対する特異的阻害剤によって有意に抑制された。

D. 考察

角膜内皮Na-K ATPaseの酵素活性測定においても、Ussing chamberを用いたshort circuit currentによる角膜内皮ポンプ機能測定においてもデキサメサゾンとインスリンはNa-K ATPase活性を上昇させることが示された。また、デキサメサゾンとインスリンのNa-K ATPase活性の制御機序は異なることも示された。

デキサメサゾンによるNa-K ATPase活性の上昇は比較的長時間を要し、その作用は濃度依存的であった。デキサメサゾン

ンによる Na-K ATPase 活性上昇は、蛋白合成阻害剤によって阻害されたこと、Western blotting 法により Na-K ATPase α 1-subunit 発現量の増加が確認されたことから、デキサメサゾンによる Na-K ATPase 活性化は新たな酵素蛋白合成による Na-K ATPase の発現量増加を介していると考えられた。

インスリンによる Na-K ATPase 活性の上昇は短時間でみられ、その作用は濃度依存的ではなく、 10^{-7} M で頂点となる bell-shape 型の反応曲線を示した。他の細胞種での報告から、インスリンは PKC などの protein kinase 群を介して Na-K ATPase 活性へ影響を及ぼすと考えられている。今回の結果でも、インスリン濃度と Na-K ATPase 活性の用量反応曲線は、PDBu 濃度と Na-K ATPase 活性の用量反応曲線と類似の bell-shape 型を示した。また、PKC 活性化の阻害薬である staurosporine 存在下ではインスリンによる Na-K ATPase の活性化は抑制された。以上から、インスリンは PKC の活性化を介して Na-K ATPase を活性化していると推測された。

PKC の下流では、protein phosphatase 群、特に protein phosphatase 1 および protein phosphatase 2A を介し Na-K ATPase の α -subunit を脱リン酸化して Na-K ATPase の活性を上昇させる経路が指摘されている。一方で PKC の下流では cyclooxygenase や、cytochrome P_{450} を介して Na-K ATPase 活性を抑制する経路も指摘されている。今回の結果でも、protein phosphatase 1 および 2A の阻害剤である okadaic acid の存在下では、PKC を活性化することにより Na-K ATPase の活性はほぼ完全に抑制され、一方で indomethacin の存在下では PKC を活性化することにより Na-K ATPase の活

性が増強されることが示された。このように角膜内皮細胞においても PKC の下流には、protein phosphatase を介する Na-K ATPase 活性を亢進する経路と cyclooxygenase を介する Na-K ATPase 活性を抑制する経路が併存していることが示された。インスリンも同様に、indomethacin の存在下では Na-K ATPase の活性を増強することが示された。従って、インスリンによって Na-K ATPase を効率よく活性化するためには、抑制的に働く経路の阻害剤である indomethacin を同時に投与する必要があると考えられた。

以上の結果から、デキサメサゾンとインスリンでは、異なる機序で Na-K ATPase 活性を亢進させることが示された。また、インスリンの作用は indomethacin によって増強できることも明らかとなった。これらの薬剤の組み合わせによって角膜内皮細胞の Na-K ATPase 活性を制御できれば、水疱性角膜症に対する薬物治療となる可能性があると考えられた。

E. 結論

角膜内皮機能不全の薬物療法の開発を目的とした研究を行い、角膜内皮細胞のポンプ機能の担い手である Na-K ATPase は、デキサメサゾン、インスリンによって活性化できることを明らかにした。ステロイドによる Na-K ATPase 活性化は酵素蛋白合成による Na-K ATPase の発現量増加により、インスリンによる角膜内皮の Na-K ATPase 活性化は PKC を介し、Na-K ATPase の α サブユニットの脱リン酸化によることが示された。インスリンの作用は cyclooxygenase 阻害剤の indomethacin を添加することにより増強された。以上より、Na-K ATPase の活性制御には異なる複数の経路が存在してい

ると考えられ、これらの薬剤の組み合わせによってNa-K ATPase 活性を制御できれば、水疱性角膜症を薬物で治療できる可能性があると考えられた。

ヒト角膜内皮細胞の培養技術の確立に関する研究を行い、片眼性網膜芽細胞腫の患児より得られた摘出眼の角膜内皮由来の初代培養細胞に、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することでヒト角膜内皮細胞株を作製することができた。全10種類の遺伝子導入細胞のうち少なくとも3種類の細胞は形態学的にもZo-1、Na⁺-K⁺ ATPaseの発現など免疫組織化学的にも、ポンプ機能など機能的にも角膜内皮細胞の性質を表現していることが明らかとなった。ヒト培養角膜内皮細胞株を樹立できたことは今後の基礎研究や臨床応用に向けて重要な細胞源となると考えられた。

これらの研究によって、角膜内皮機能不全の新しい治療法として考えられる2つの方法、薬物療法と培養角膜内皮細胞移植による手術治療の基礎を作ることができた。臨床応用にはどちらもまだ数多くの問題点、検討すべき点が残されているが、今後も検討を続け、角膜内皮機能不全症例のうち、軽症例は薬物療法による機能維持を目指し、重症例は自己または同種の培養角膜内皮細胞移植による手術によって治療することを将来的に実現させたいと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

1. 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)
2. Hatou S, Yamada M, Mochizuki H, Nishida T. Role of protein kinase C in regulation of Na⁺ and K⁺-Dependent ATPase activity and pump function in corneal endothelial cells. *Jpn J Ophthalmol* (in press)
3. Mochizuki H, Yamada M, Hatou S, Tsubota K. Turnover rate of tear film lipid layer determined by Fluorophotometry. *Br J Ophthalmol* (in press)
4. 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. Jpn J Ophthalmol (in press)
5. 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)
6. Mochizuki H, Yamada M, Hatou S, Nishida T. Fluorophotometric Measurement of the Precorneal Residence Time of Topically Applied Hyaluronic Acid. Br J Ophthalmol 2008;92:108-111.
7. Yamada M, Hatou S, Yoshida J. In Vitro Susceptibilities of Bacterial Isolates from Conjunctival Flora to Gatifloxacin, Levofloxacin, Tosufloxacin, and Moxifloxacin. Eye Contact Lens 34:109-112, 2008
8. 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. 2008;92:848-851.
9. Yamada M, Hatou S, Mochizuki H. Conjunctival Fixation Sutures for Refractory Superior Limbic Keratoconjunctivitis. Br J Ophthalmol. 2008 (online first)
10. 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 25:1557-1560, 2008
11. Kawashima M, Mochizuki H, Kawakita T, Hatou S, Shimazaki J, Yamada M. Presumed stromal graft rejection after automated lamellar therapeutic keratoplasty: case report. J Med Case Report 2007, 1:10
12. Kawai M, Yamada M, Kawashima M, Inoue M, Goto E, Mashima Y, Tsubota K. Quantitative evaluation of tear

- meniscus height from fluorescein photographs. *Cornea*. 2007;26:403-6.
13. Sotozono C, Ang LP, Koizumi N, Higashihara H, Ueta M, Inatomi T, Yokoi N, Kaido M, Dogru M, Shimazaki J, Tsubota K, Yamada M, Kinoshita S. New grading system for the evaluation of chronic manifestations in patients with Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology*. 114:1294-302, 2007
14. Tatematsu-Ogawa Y, Yamada M, Kawashima M, Yamazaki Y, Bryce T, Tsubota K. The Disease Burden of Keratoconus in Patients' Lives: Comparisons to a Japanese Normative Sample. *Eye Contact Lens* 2008;34:13-16
15. 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* 2008;34:46-49
16. 羽藤晋, 南川洋子, 山田昌和. 結膜囊から分離されたブドウ球菌に対する二変量ノンパラメトリック密度を用いた薬剤感受性分布解析. *あたらしい眼科* 2007;24:663-667.
17. 山田昌和. 治療用コンタクトレンズの適応と管理の注意点について教えてください. *あたらしい眼科* 23:206-208, 2007
18. 山田昌和. これだけは知っておこう 点眼薬の基本. *眼科ケア* 9:542-545, 2007
19. 羽藤晋, 山田昌和. 角膜疾患. *眼科ケア* 9 (増刊): 60-67, 2007
20. 山田昌和. 細隙灯顕微鏡. *眼科* 49: 1259-1264, 2007
21. Yamada M, Ishikawa K, Mochizuki H, Kawai M. Corneal Penetration of Simultaneously Applied Topical Levofloxacin, Norfloxacin and Lomefloxacin in Human Eyes. *Acta Ophthalmol* 2006;84:182-186.
22. Yamada M, Mochizuki H, Kawashima M, Hata S. Phospholipids and Their Degrading Enzyme in Tears of Soft Contact Lens Wearers. *Cornea* 2006;25:S68-S72.

23. Funayama T, Mashima Y, Kawashima M, Yamada M. Lattice Corneal Dystrophy Type III in Patients with a Homozygous L527R Mutation in the TGFBI Gene. *Jpn J Ophthalmol* 2006;50:62-64.

24. 櫻井美晴, 望月弘嗣, 大野建治, 山田昌和. 白内障術前患者の角膜内皮細胞減少例とその要因. *臨眼* 2006;60:73-77

25. 櫻井美晴, 羽藤晋, 望月弘嗣, 山田昌和. フルオロキノロン剤が角膜上皮細胞および実質細胞に与える影響. あたらしい眼科 2006;23:1209-1212.

26. 羽藤晋, 山田昌和. 日常診療に役立つ最新の薬物治療と副作用対策, 眼症状. *小児科* 2006;47:691-699.

27. 山田昌和. 眼感染症—古くて新しい問題—. *Ophthalmology Update* 2006;21:3-7.

総説、著書

1. 山田昌和. 加齢と眼表面疾患. *眼科* 50:426-434, 2008

2. 山田昌和. 感染性結膜炎. こどもの感染症の診かた. 13:5-7, 2008

3. 山田昌和. 眼科領域の臨床疫学、効用研究. *医療* 62:695-700, 2008

4. 羽藤晋, 山田昌和. 角膜内皮機能不全の治療. *医療* 62: 451-457, 2008

5. 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, 海老原伸行, 村上晶, 諸星計, 宮崎大, 井上幸次, HamrahP, LiuY, DanaMR, 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. 拒絶反応のない理想的な角膜移植手術を目指して. 全層角膜移植から内皮細胞移植へ. *日眼会誌* 112: 266-278, 2008

6. 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 26:163-166, 2009

7. 山田昌和. 角膜・結膜・前眼部の加齢性変化. *眼科プラクティス* 22, 抗加齢眼科学. 坪田一男編, 23-27, 文光堂, 2008

8. 山田昌和. 薬剤障害. 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, 水流忠彦編, 242-249, 2008

9. 山田昌和. 感染性角膜炎にステロイドは禁忌だろうか. *眼科診療のコツと落とし穴、薬物療法*. 樋田哲夫, 江口秀一郎編. 中山書店, 24-25, 2008

10. 山田昌和. ドライアイの診断には golden standard がない. *眼科診療のコツと落とし穴、検査・診断*. 樋田哲夫, 江口秀一郎編. 中山書店, 26-27, 2008

11. 山田昌和. ドライアイ (乾性角結膜炎・Sjogren 症候群). *眼科プラクティス* 23, 眼科薬物療法 AtoZ. 根木昭編, 47-48, 文光堂, 2008

12. 山田昌和. びまん性表層角膜症・

- 状表層角膜症. 眼科プラクティス 23、
眼科薬物療法 AtoZ. 根木昭編、73-75、
文光堂、2008
13. 若倉雅登、清澤源弘、山田昌和、編
著. 続・解決、目と視覚の不定愁訴・
不明愁訴. 金原出版、2008
14. 山田昌和. デルモイド. 眼科プラク
ティス 24、見た目が大事、眼腫瘍.
後藤浩編、60-61、文光堂、2008
15. 山田昌和. デルモリポーマ. 眼科プ
ラクティス 24、見た目が大事、眼腫
瘍. 後藤浩編、62-63、文光堂、2008
16. 山田昌和. こどもの目やに、抗菌薬
でいいの? 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. 黒坂
大次郎編、123-127、メジカルビュー、
2009
17. 山田昌和. 保存角膜を利用した輪部
デルモイドの治療. 眼科プラクティ
ス 24、見た目が大事、眼腫瘍. 後藤
浩編、91、文光堂、2008
18. 山田昌和. 前眼部疾患と両眼視. 両眼
視. 大月洋編、金原出版、2007
19. 山田昌和. 表層角膜炎、角膜びらん、
ドライアイの薬物療法. 眼科疾患の薬
物療法、山岡桂子編. 15-20、薬事
新報社、2007
20. 山田昌和. Propionibacterium acnes 角
膜炎. 眼科プラクティス 18、前眼部ア
トラス. 大鹿哲郎編、184、文光堂、
2007
21. 山田昌和. デレン. 眼科プラクティス
18、前眼部アトラス. 大鹿哲郎編、216、
文光堂、2007
22. 山田昌和. 角膜脂肪変性. 眼科プラク
ティス 18、前眼部アトラス. 大鹿哲郎
編、249-250、文光堂、2007
23. 山田昌和. 細隙灯顕微鏡検査. 眼科プ
ラクティス 20、小児眼科診療. 樋田哲
夫編、62-64、文光堂、2008
24. 山田昌和. 移植か虹彩付きコンタクト
レンズか? 美容的手術への対応. 眼科
プラクティス 13、角膜外科のエッセン
ス.
坪田一男編、85-87、文光堂、2007
25. 山田昌和. 感染性結膜炎. 眼科プラク
ティス 20、小児眼科診療. 樋田哲夫編、
122-125、文光堂、2008
26. 山田昌和. アレルギー性結膜炎. 眼科プ
ラクティス 20、小児眼科診療. 樋田哲
夫編、126-129、文光堂、2008
27. 秋山邦彦、山田昌和. 白内障の診断. 白
内障、11-16、金原出版、2006
28. 若倉雅登、清澤源弘、山田昌和、石郷岡
純(編著). 解決、目と視覚の不定愁訴、
不明愁訴. 金原出版、2006
29. 山田昌和、羽藤晋. 角膜移植後の感染症.
眼感染症ケース別まるごとマスター. 前
田直之、黒坂大次郎編、82-87、メジカ
ルビュー社、2006

30. 後藤浩, 山田昌和, 吉川啓司, 飯野倫子
(編著). 眼科開業医のための疑問難問解
決策. 診断と治療社, 2006

31. 山田昌和. 前眼部疾患と両眼視. 両眼視.
大月洋編, 115-118, 金原出版, 2007

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

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

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 ⁺ and K ⁺ -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	
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kawashima M, Mochizuki H, Kawakita T, Hatou S, Shimazaki J, Yamada M.	Presumed stromal graft rejection after automated lamellar therapeutic keratoplasty: case report	Journal of Medical Case Reports	10	1-3	2007
Kawai M, Yamada M, Kawashima M, Inoue M, Goto E, Mashima Y, Tsubota K.	Quantitative Evaluation of Tear Meniscus Height From Fluorescein Photographs	Cornea	26	403-406	2007
Sotozono C, Leonard P, K Ang, Koizumi N, Higashihara H, Ueda M, Inatomi T, Yokoi N, Kaido M, Murato D, Shimazaki J, Tsubota K, Yamada M, Kinoshita S.	New Grading System for the Evaluation of Chronic Ocular Manifestations in Patients with Stevens-Johnson Syndrome	American Academy of Ophthalmology	7	1294-1302	2007
Tatematsu Y- Ogawa, Yamada M, Kawashima M, Yamazaki Y, Thomas Bryce, Tsubota K.	The Disease Burden of Keratoconus in patients' Lives: Comparisons to a Jaapanese Normative Sample	Eye & Contact Lens	34(1)	13-16	2008
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
羽藤晋、南川洋子、 山田昌和.	結膜囊から分離されたブドウ球菌に対 する二変量ノンパラメトリック密度を用 いた薬剤感受性分布解析.	あたらしい眼科	24	663-667	2007
山田 昌和.	治療用コンタクトレンズの適応と管理 の注意点について教えてください	あたらしい眼科	23	206-208	2007
山田 昌和.	細隙顕微鏡	眼科	49	1259-1264	2007
Yamada M, Ishikawa K, Mochizuki H, Kawai M,	Cornea Penetration of Simultaneously Applied Topical Levof loxacin, Norfloxacin and Lomefloxacin in Human Eyes.	Acta Ophthalmol	84	182-186	2006
Yamada M, Mochizuki H, Kawahima M, Hata S.	Phospholipids and Their Degrading Enzyme in Tears of Soft Contact Lens Wearers.	Cornea	25	S68-S72	2006
Funayama T, Mashima Y, Kawashima M, Yamada M.	Lattice Corneal Dystrophy Type III in Patients with a Homozygous L527R Mutation in the TGFB1 Gene.	Jpn J Ophthalmol	50	62-64	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
櫻井美晴, 望月弘嗣, 野 健治, 山田昌和	白内障術前患者の角膜内皮細胞減少例とその要因	臨眼	60	73-77	2006
櫻井美晴, 羽藤晋, 望月弘嗣, 山田昌和	フルオロキノロン剤が角膜上皮細胞および実質細胞に与える影響	あたらしい眼科	23	1209-1212	2006
羽藤晋, 山田昌和	日常診療に役立つ最新の薬物治療と副作用対策	眼症状. 小児科	47	691-699	2006
山田昌和	眼感染症-古くて新しい問題-	Ophthalmology Update	21	3-7	2006