

## 15. 網膜色素変性の診断において蛍光眼底撮影は必須か？

山本修一、萩原章、平松彩子、小片一葉、菅原岳史  
(千葉大)

**研究要旨** 網膜色素変性 (RP) の特定疾患申請時には、フルオレセイン蛍光眼底撮影 (FA) が必須とされているが、造影剤に対するアレルギーの問題から施行を躊躇する医師、患者も多く、またその必要性についての疑問も広く提起されつつある。そこで従来 FA が必要とされてきた理由について検証するとともに、代替の検査法について検討した。RP における FA の特徴的所見は、網膜色素上皮萎縮による点状過蛍光、脈絡膜毛細血管の萎縮による脈絡膜中大血管の透見化とされている。大多数を占める定型 RP では FA を行わずとも、眼底所見、視野、網膜電図 (ERG) から診断可能である。無色素性 RP では、FA によりびまん性点状過蛍光が観察されるが、入念な眼底検査を行えば網膜血管の狭細化と脱色素斑は明らかであり、視野と ERG により診断は確定される。非侵襲的検査である眼底自発蛍光を行えば、より確実である。RP の亜型であるコロイデミアでは色素上皮と脈絡膜毛細血管の萎縮による脈絡膜大血管の透見化が特徴的であるが、これも眼底検査での診断が可能であり、何より症例数がきわめて少ない。同じく亜型の錐体ジストロフィには眼底所見に乏しいものがあるが、ERG による機能的診断が決め手となる。また RP の 10~20% に嚢胞様黄斑浮腫が伴い、かつては FA がその診断に用いられたが、現在では光干渉断層計 (OCT) に取って代わられている。このように RP の診断においては特徴的眼底所見に加えて、視野や ERG などの機能的所見が重要であり、また OCT や眼底自発蛍光などの新たな非侵襲的検査の登場により、造影剤によるショックが懸念されるフルオレセイン蛍光造影検査はもはや必須の検査とは言いがたい。

### A. 研究目的

網膜色素変性 (RP) の特定疾患申請時には、フルオレセイン蛍光眼底撮影 (FA) が必須とされているが、造影剤に対するアレルギーの問題から施行を躊躇する医師、患者も多く、またその必要性についての疑問も広く提起されつつある。そこで従来 FA が必要とされてきた理由について検証するとともに、代替の検査法について検討した。

### B. 研究方法

RP の診断における FA の必要性について、文献的考察と実際の症例における検討を行った。また FA に代わる検査法について、自験例における検討を行った。さらに FA の合併症について、過去の報告を渉猟検討した。

### C. 研究結果

特定疾患の診断基準では、臨床検査所見の一つとして「蛍光眼底造影所見で網膜色素上皮萎縮による過蛍光」が判定に必須の項目とされている。ただしアレルギーがあり

検査が不可能な場合は除外が認められている。骨小体様色素沈着を伴う定型 RP でも、色素沈着の見られない無色素性 RP でも、通常の眼底検査あるいは眼底写真上から網膜色素上皮 (RPE) 萎縮による脱色素斑は明瞭であり、これに視神経萎縮や網膜血管狭細化などの特徴的眼底所見と、視野や ERG の所見から診断は確定される。非定型 RP である中心型 RP や傍中心型 RP でも RPE 萎縮所見は眼底検査で明らかであり、むしろ診断の確定には、他の検査所見が重要となる。幼少児期から重篤な視機能障害をきたすレーベル先天盲では、幼少時であるが故に FA の施行はさらに困難であり、眼振などの随伴症状や ERG が診断には重要である。

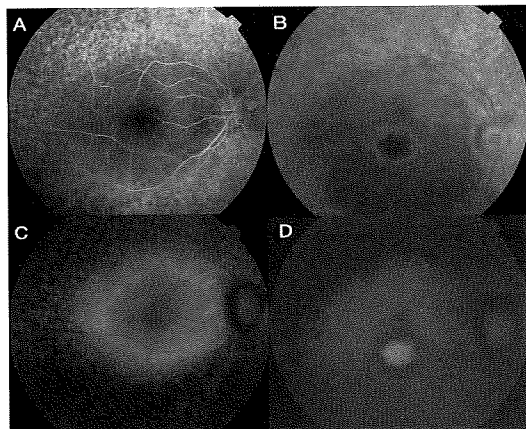


図 1 定型RPにおけるFA(A)と眼底自発蛍光(C)、および黄斑部の自発蛍光増強を示す定型RPにおけるFA(B)と眼底自発蛍光(D)

最近、急速に普及しつつある眼底自発蛍光は、RPE に含まれるリポフスチンに由来するもので、RPE の機能を非侵襲的に捉える検査法として注目されている。すなわち強い自発蛍光は高齢者、RPE の外節貪食代謝亢進、病的代謝低下の RPE などで認められ、弱い自発蛍光は若年者、RPE の外節貪食代謝障害、RPE の萎縮、欠損などで認められ

る。定型 RP では、RPE の萎縮が進行した部位では自発蛍光は消失し、一方、萎縮が進行しつつある部位では、リポフスチンの代謝が低下するために自発蛍光が逆に強くなる (図 1)。また通常の眼底検査や FA で一見正常に見える黄斑部が、RPE の機能低下により自発蛍光の増強を示すこともあり、FA よりも鋭敏かつ詳細に RPE の状態を示している (図 1)。

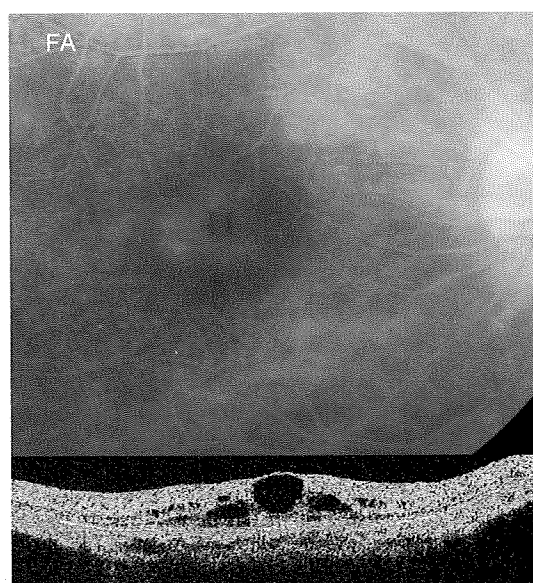


図 2 嚢胞様黄斑浮腫を伴う定型RPのFAと黄斑部OCT

また RP の 10~20%に嚢胞様黄斑浮腫が伴い、かつては FA がその診断に用いられたが、現在では光干渉断層計 (OCT) に取って代わられ、はるかに鋭敏かつ非侵襲的に検出している (図 2)。

フルオレセインの合併症としては、悪心・嘔吐、くしゃみ、掻痒感などの一過性のものから、生命に危険をもたらすアナフィラキシーショック、心筋梗塞、心停止などの重篤なものまであり、特に重症の合併症の出現頻度は 0.002~0.03%と報告され

ている。一般臨床においては、このような合併症を回避するために検査前に皮内テスト行うが、合併症予知の有効性はほとんど否定的である。

#### D. 考察

糖尿病網膜症をはじめとする血管性病変ではFAの有用性は疑う余地もない。新生血管の存在や毛細血管レベルでの血流状態などは、いかに熟練した眼科医であっても通常の眼底検査のみで完璧な判定は困難であり、FAなくして正確な診断はできない。また血管からの漏出性変化についても同様であり、OCTにより滲出性変化の有無は判定できても、部位の特定までは不可能である。しかしRPの診断においてFAに求められているのは、RPE萎縮による変化であり、これは入念な眼底検査で十分に検出可能であり、また眼底自発蛍光を用いれば、より詳細かつ非侵襲的に評価できる。さらなる視力低下の原因となる黄斑浮腫については、OCTが高い検出力を誇っている。その一方で、フルオレセインには死亡に至る重篤な副作用の危険性があり、しかもその予知はほとんど不可能である。

#### E. 結論

特定疾患におけるRPの診断においては、FAを診断基準から除外し、より有用性が高く、しかも非侵襲的な検査である眼底自発蛍光やOCTと置き換えるべきである。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1. 相澤さやか 他：網膜色素変性における眼底自発蛍光、視細胞内節外節境界、視機能の変化. 第113回日眼総会、東京、2009

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### I. 参考文献

1. 水野谷智、山本修一. Autofluorescence (自発蛍光検査)で何がわかるか. あたらしい眼科 23: 1133-1137、2006.
2. 三田村佳典、山本修一. 眼底自発蛍光. 臨床眼科 62: 433-439、2008.
3. 山本修一. 眼底の自発蛍光と意義. 日本の眼科 80: 453-454、2009.

## 16. 網膜色素変性における脈絡膜厚の評価

木枕弘樹<sup>1) 2)</sup>、大石明生<sup>1) 2)</sup>、平見恭彦<sup>1) 2)</sup>、高橋政代<sup>1) 3)</sup>、栗本康夫<sup>1) 2)</sup>

(<sup>1)</sup> 神戸市立医療センター中央市民病院、<sup>2)</sup> 先端医療センター病院、<sup>3)</sup> 理化学研究所)

**研究要旨** 網膜色素変性(RP)は視細胞が徐々に失われる進行性の遺伝子疾患であるが、その変性過程は複雑であり網膜内の代謝環境の変化の関与も報告されてきている。そこで RP において OCT を用い脈絡膜厚を評価し、病態との関連を検討した。

黄斑部脈絡膜厚は  $228 \mu\text{m}$  と既報の日本人正常眼 ( $354 \mu\text{m}$ ) と比べ薄くなっていた。また黄斑部においても IS/OS を認めない進行した症例では特に薄かった ( $185 \mu\text{m}$ )。しかし黄斑部脈絡膜厚と視細胞層厚の間には明らかな相関関係を認めなかった。脈絡膜の萎縮過程も症例により異なり、原因遺伝子の違いの関与が示唆された。

### A. 研究目的

網膜色素変性(RP)は進行性の視細胞・色素上皮の遺伝子疾患であるが、網膜内の代謝環境の変化も変性過程に寄与していることが報告されてきている。組織学的検討にて進行した RP において脈絡膜が萎縮していることが報告されているが、組織学的検討では時間経過を追えず、さらに多数例による検討が難しい。近年の光干渉断層計(OCT)の発達により、強度近視眼や正常眼における脈絡膜厚が報告されてきている。今回我々は、RP 患者において OCT を用い、脈絡膜厚の評価及び視細胞の進行との関連を検討した。

### B. 研究方法

Spectral-domain OCT にて解析可能な画像の得られた定型的 RP51 例 51 眼を検討対象とした。RP 以外の網膜・視神経病変を認める場合、 $-6\text{D}$  以上の強度近視の症例は除外した。原則右眼を対象眼とし、上記認めた

場合は左眼を、両眼とも認めた場合は検討から除外した。これらの症例において中心窩及び中心窩より上下鼻耳側  $1.5\text{mm}$ 、 $3.0\text{mm}$  の位置での脈絡膜厚・視細胞層を測定、これらの相関を検討した (図 1)。

### C. 研究結果

対象は右眼 48 眼・左眼 3 眼、平均年齢は  $48.6 \pm 17.3$  歳、等価球面度数の平均は  $-1.8 \pm 1.7\text{D}$  であった。中心窩下での脈絡膜厚は  $228 \pm 74 \mu\text{m}$ 、 $3\text{mm}$  における厚さはそれぞれ鼻側  $104 \pm 51 \mu\text{m}$ 、耳側  $197 \pm 66 \mu\text{m}$ 、上側  $220 \pm 64 \mu\text{m}$ 、下側  $174 \pm 61 \mu\text{m}$  であった。上側以外の 3 方向において脈絡膜厚は中心窩より有意に薄かった。中心窩視細胞層厚と脈絡膜厚の間に相関を認めなかったが (図 2)、上下鼻耳側の視細胞層厚の平均と中心窩脈絡膜厚は有意に相関した ( $R^2=0.13$ 、 $P<0.05$ )。

また中心窩においても IS/OS line を認めない進行した症例では中心窩下脈絡膜厚は

185 ± 56 μm とより薄くなっていた。

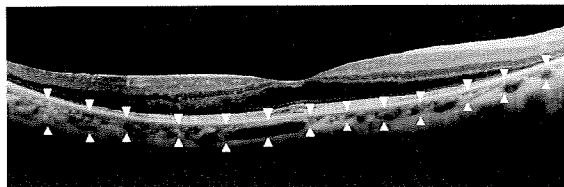


図1 黄斑部における脈絡膜の OCT 像

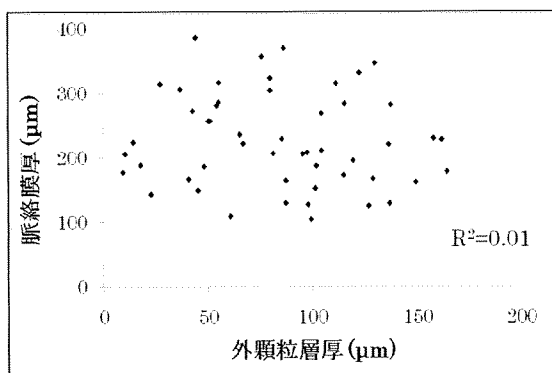


図2 脈絡膜厚・外顆粒層厚の散布図

#### D. 考察

中心窩下の脈絡膜厚は Ikuno らの既報の日本人正常眼(354 μm)より 126 μm 薄かった。原因としては網膜色素上皮の萎縮に伴い脈絡膜毛細血管板が萎縮している、視細胞の変性により必要な脈絡膜血流量が減少したことなどが考えられる。

しかし、脈絡膜厚と外顆粒層厚には弱い相関しか認めなかったが、その原因としては RP がそもそも様々な遺伝子異常によって引き起こされる多様な疾患群であり、原因遺伝子により脈絡膜の萎縮への寄与も異なるのではないかと考えられた。

#### E. 結論

RP では脈絡膜厚が薄くなっており、進行した症例ではより薄くなっていた。しかし、非常に variation に富んでおり原因遺伝子による脈絡膜への影響が異なることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

#### I. 参考文献

1. Ikuno Y, Kawaguchi K, Yasuno Y, Nouchi T: Choroidal Thickness in Healthy Japanese Subjects. Invest Ophthalmol Vis Sci 2009.
2. Stone J, Maslim J, Valter-Kocsi K, et al: Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. Prog Retin Eye Res 18: 689-735, 1999.
3. Tanito M, Kaidzu S, Anderson RE: Delayed loss of cone and remaining rod photoreceptor cells due to impairment of choroidal circulation after acute light exposure in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 48: 1864-1872, 2007.

## 17. 網膜色素変性のスペクトラルドメイン光干渉断層計画像

### における網膜内の顆粒状所見

平見恭彦<sup>1)2)3)</sup>、畑 匡侑<sup>1)</sup>、高橋政代<sup>2)3)</sup>、栗本康夫<sup>1)2)</sup>

(<sup>1)</sup> 神戸市立医療センター中央市民病院、<sup>2)</sup> 先端医療センター病院、<sup>3)</sup> 理化学研究所)

**研究要旨** 【目的】近年、スペクトラルドメイン光干渉断層計(SD-OCT)により、網膜内の詳細な観察が可能となった。今回、網膜色素変性患者のSD-OCT画像において網膜内顆粒層(INL)および外顆粒層(ONL)の異常所見と考えられる顆粒状所見について検討した。

【対象】2009年1月から9月に神戸市立医療センター中央市民病院の眼科外来を受診した初診または経過観察中の網膜色素変性患者107例214眼(14~80歳、平均50.2±16.4歳)

【方法】対象患者の両眼のSD-OCT(Spectralis HRA+OCT, Heiderberg Engineering社)画像所見を、視細胞内節外節境界(IS/OS)の有無、INLおよびONLの顆粒状所見の有無について検討した。

【結果】214眼中IS/OSの存在したのは138眼で、その内顆粒状所見が観察されたものはINL、ONL両方が82眼、ONLのみが12眼、INLのみが36眼であった。INLの顆粒状所見はIS/OSの残存する領域の内側に、ONLの顆粒状所見はIS/OSの残存する領域の周辺側に多くみられた。IS/OSの存在しなかった76眼でも、部分的に島状の外節様の構造が残存しているような像が見られる例もあり、顆粒状所見が観察されたものはINL、ONL両方が42眼、ONLのみが34眼であった。

【結論】SD-OCTによる網膜内の画像の検討で、網膜色素変性患者のINL、ONLにみられる顆粒状所見は、網膜色素変性の進行にともなう各層内の構造の変化が描出されている可能性があり、変性の進行様式を示唆するとも考えられる。

#### A. 研究目的

網膜色素変性は遺伝子の異常による網膜視細胞の細胞死が進行性の網膜変性を引き起こす遺伝性網膜変性疾患である。主要な症状は夜盲、視野狭窄であり、進行例では徐々に視力低下をきたすが、その進行速度は多様で、若年のうちに失明状態になる症例もあれば、高齢になっても比較的視野、視力ともに保たれている症例もある。症例ごとに進行速度が異なる理由として、原因遺伝

子の違いや生体内外の様々な環境要因の影響が推測されているが、各遺伝子の変異から視細胞の細胞死にいたる過程には未知の部分が多く、疾患の進行パターンとの関係もまだ多くは明らかでない。

OCTによる網膜病変の観察は現在、眼科における一般的検査となりつつある。近年OCTの高速化、高解像度化が進み、網膜内の構造が詳細に描出されるようになり<sup>1)</sup>、患者網膜を組織学的レベルに近い状態で観

察することができるようになったと同時に、OCT で描出される所見と実際の病理組織像との対応、OCT 所見の意義については今後明らかにされるべき点も多い。今回、スペクトラルドメイン OCT による網膜色素変性患者の網膜像において、網膜各層内にみられる所見について検討を行った。

## B. 研究方法

2009年1月から9月の間に神戸市立医療センター中央市民病院の眼科外来を受診した初診または経過観察中の網膜色素変性患者107例214眼(14~80歳、平均50.2±16.4歳)に対し、SD-OCT(Spectralis HRA/OCT, Heiderberg Engineering 社)を用いて両眼の中心窩を含む網膜の水平断面を撮像した。アイトラッキング機能を用いて同一箇所を40回以上撮像し、それらの画像を加算平均して得られた画像の網膜内の所見について、視細胞内節外節境界(IS/OS)の有無、INLおよびONLの顆粒状所見の有無について検討した。

### (倫理面への配慮)

OCTによる網膜画像診断は通常の保険診療で行われる非侵襲的な眼科検査である。画像を用いた臨床研究は当施設の倫理委員会で承認され被験者の同意を得て行った。

## C. 研究結果

RP患者の画像所見において、Spectralisを用いた一回のBスキャンにより得られる画像と比較すると、同一箇所の加算平均を行った画像では、網膜内の構造がより詳細に描出されていた。すなわち、単一のBスキャン画像でも見られる視細胞内節外節(IS/OS)接合部の消失、外顆粒層(ONL)、

網膜色素上皮(RPE)とブルッフ膜(BM)の反射の菲薄化に加えて、内顆粒層(INL)、ONLおよび網膜下に顆粒状の所見がみとめられた。各層内の顆粒状所見は、存在する場所によって異なる特徴を呈していた。INLの顆粒状所見はIS/OSの残存する領域の内側に多くみられた。正常眼でもINLに顆粒状所見がみられるものもあったが、正常眼における顆粒状所見は外網状層との境界に並ぶように存在していたのに対し、RP眼ではINLの層内に散在していた。また、ONLの顆粒状所見はIS/OSの残存する領域の周辺側に多くみられ、RPE/BMの菲薄化を伴っていたが、IS/OS接合部が存在しない部分のONLに全く顆粒状所見がみられない症例も存在した。一方IS/OS接合部が中心窩に観察されない症例では、全例にONLあるいは網膜下の顆粒状所見がみとめられた。眼底の骨小体様色素沈着と一致する部分ではINLあるいはONLに高反射の色素沈着と思われる顆粒状所見の集積をみとめた。全214眼中IS/OS接合部の観察されたのは138眼で、その内顆粒状所見が観察されたものはINL、ONL両方が82眼、ONLのみが12眼、INLのみが36眼であった。IS/OS接合部の観察されなかった76眼で、顆粒状所見が観察されたものはINL、ONL両方が42眼、ONLのみが34眼であった。

## D. 考察

RP眼の病理組織所見に関する過去の報告によれば、RP眼における網膜内の変化は最初、視細胞外節の短縮が起こり、続いて視細胞の変性、脱落による外顆粒層の菲薄化が起こる。さらに変性の進行した網膜では、RPE細胞の網膜内層への侵入が起こり、網膜内

層の血管周囲に沈着することにより典型的な骨小体様の色素沈着を形成するとされている<sup>2)</sup>。今回の検討では、加算平均を行った RP 眼の SD-OCT 画像において、IS/OS 接合部の消失、ONL の菲薄化に加えて ONL あるいは網膜下に顆粒状の所見をみとめた。一部の症例では顆粒状所見に伴って RPE/BM の反射の菲薄化をみとめる症例や、眼底の骨小体様色素沈着と一致する部分に顆粒状反射の集積をみとめる症例もあり、網膜内へ侵入した RPE 細胞が描出されているものと考えられた。

また INL にも、正常眼でみられるものとは異なる顆粒状所見をみとめた。IS/OS 接合部や ONL が比較的残存している部分でみられる INL の顆粒状所見の意義は明らかではないが、過去の病理組織所見の報告では、RP 眼の網膜内層にはミュラー細胞の反応性グリオシス、マイクログリアの活性化とみられる所見が観察される<sup>3)</sup>こと、視細胞やアマクリン細胞、水平細胞の突起伸長が観察されており、こうした網膜内の構造の変化が OCT 画像における変化に反映されている可能性があるとも考えられた。

#### E. 結論

網膜色素変性症例で SD-OCT 画像にみられる網膜内の所見は、網膜内の構造の変化が描出されていると考えられ、病態や進行度の把握に有用であると思われる。網膜内所見は多様な像を持っており、遺伝形式や原因遺伝子との関連を検討することにより、病態の解明に役立つと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

平見恭彦、畑匡侑、高橋政代、栗本康夫.  
網膜色素変性のスペクトラルドメイン光干渉断層計画像における網膜内の顆粒状所見.  
第 63 回日本臨床眼科学会総会、福岡、  
2009. 10. 9-12

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### I. 参考文献

1. Hangai M, Yamamoto M, Sakamoto A et al: Ultrahigh-resolution versus speckle noise-reduction in spectral-domain optical coherence tomography. *Opt Express* 17: 4221-4235, 2009.
2. Milam AH, Li ZY, Fariss RN : Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res* 17: 175-205, 1998.
3. Gupta N, Brown KE, Milam AH: Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 76: 463-471, 2003.



## 18. 補償光学適用走査型レーザー検眼鏡による

### 中心性漿液性網脈絡膜症の視細胞構造

大音壮太郎、板谷正紀、尾島優美子、田村 寛、  
山城健児、大谷篤史、辻川明孝、吉村長久  
(京都大)

**研究要旨** 【目的】補償光学適用走査型レーザー検眼鏡(AO-SLO)を用いて中心性漿液性網脈絡膜症(CSC)の網膜復位後の視細胞構造について検討を行い、スペクトラルドメイン光干渉断層計(SD-OCT)所見との比較を行った。

【対象と方法】健常眼 20 例 20 眼および京都大学医学部附属病院にて中心性漿液性網脈絡膜症と診断され、経過観察中に漿液性網膜剥離の消失を認めた 38 例 45 眼。漿液性網膜剥離の消失後 AO-SLO により黄斑部を撮影し、中心窩から 0.2, 0.5, 1.0mm 離れた部位における視細胞密度を測定した。また同日 SD-OCT による計測を行い、中心窩平均網膜厚(中心 1mm)を求め、視細胞内節・外節接合部(IS/OS)不整像の有無および IS/OS と網膜色素上皮の間に認める第三の線(VM)の不整像の有無を評価した。

【結果】健常眼全例で視細胞がモザイク状に可視化された。これに対し CSC では全例で 5-100 細胞大の視細胞脱落像が斑状に観察された。中心窩から鼻側 0.2, 0.5, 1.0mm の部位で、健常眼では 58000, 28000, 14000 個/mm<sup>2</sup> の平均視細胞密度であったが、CSC 症例の平均視細胞密度は 31300, 19000, 10100 個/mm<sup>2</sup> であった(P<0.001)。中心窩から鼻側 0.2mm における平均視細胞密度は平均 logMAR および中心窩平均網膜厚と有意に相関した(P<0.001)。SD-OCT 像での視細胞内節・外節接合部(IS/OS)不整群は正常群に比べ有意に視細胞密度が低く、VM 不整群は正常群に比べ有意に視細胞密度が低かった(P<0.001)。

【結論】AO-SLO により CSC おける網膜復位後の視細胞構造が可視化された。CSC では視細胞密度が減少し、視力・網膜厚と相関する。剥離網膜における視細胞のアポトーシスが原因で視細胞密度が減少すると考えられる。

#### A. 研究目的

中心性漿液性網脈絡膜症(CSC)は黄斑部の漿液性網膜剥離を特徴とする疾患である。多くの症例では漿液性網膜剥離(SRD)は自然消退し、視力が回復するが、SRD が消退後も比較暗点や変視症・色覚異常を自覚す

る症例も多い。また慢性型では恒久的な視力障害を残すことが知られている。

これまで光干渉断層計(OCT)を用いた研究により、CSC 症例で視細胞内節・外節接合部(IS/OS)に異常をきたすことや、中心窩網膜厚が菲薄化することが報告され、CSC

では視細胞層に障害がもたらされていることが示唆されてきたが、個々の視細胞にどのような異常が生じているのかは不明であった。今回我々は、研究開発した補償光学を適用した走査型レーザー検眼鏡(AO-SLO)を用いてSRDの消退したCSC症例の視細胞構造について検討を行い、SD-OCT所見および視力との関係を調べた。AO-SLOはSLOに眼球全体の収差を補正する補償光学技術(adaptive optics: AO)を付加したもので、視細胞や網膜神経繊維・白血球動態を細胞レベルで観察することが可能な診断機器である。

## B. 研究方法

対象は健常眼20例20眼および京都大学医学部附属病院にてCSCと診断され、経過観察中にSRDの消失を認めた38例45眼。SRDの消失後AO-SLOにより黄斑部を撮影し、中心窩から0.2, 0.5, 1.0mm離れた部位における視細胞密度を測定した。また同日SD-OCTによる計測を行い、中心窩平均網膜厚(中心1mm)を求め、視細胞内節・外節接合部(IS/OS)不整像の有無およびIS/OSと網膜色素上皮の間に認める第三の線(VM)の不整像の有無を評価した。

### (倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言に基づき、京都大学「医の倫理委員会」の承認を得て施行した。また全例インフォームドコンセントを取得し、同意書に署名を得た。

## C. 研究結果

健常眼全例で視細胞がモザイク状に可視化された。これに対しCSCでは全例で5-100細胞大の視細胞脱落像が斑状に観察された。

中心窩から0.2, 0.5, 1.0mmの部位における平均視細胞密度は、健常眼では67,900, 33,320, 14,450個/mm<sup>2</sup>であったが、CSC症例では31,290, 18,760, 9,980個/mm<sup>2</sup>であった(P=0.009, 0.007, 0.004)。

CSC症例は残存視細胞構造により2群に分類され、グループ1では規則性のある視細胞モザイク構造で、小さな視細胞欠損像が斑状に認められたのに対し、グループ2では不規則な視細胞モザイク構造で、大きな視細胞欠損像を伴っていた。グループ1に比べ、グループ2では平均視細胞密度が低く(P<0.001)、平均視力も低かった(P<0.001)。

中心窩から0.2mmの部位における平均視細胞密度は平均logMAR視力および中心窩平均網膜厚と有意な相関がみられた(P<0.001)。またSD-OCT像での視細胞内節・外節接合部(IS/OS)不整群はIS/OS正常群に比べ有意に視細胞密度が低く(P<0.001)、VM不整群はVM正常群に比べ有意に視細胞密度が低かった(P<0.001)。

## D. 考察

本研究によりCSC症例ではSRD消失後も視細胞密度が減少していることが示された。また視細胞密度と視力は正の相関を示し、視細胞密度の減少が後遺症としての視力障害に関与していることが明らかとなった。残存視細胞のモザイク構造は2種類に分類され、視細胞モザイク構造が規則的なグループ1と比べ、視細胞モザイク構造が不規則なグループ2では平均視細胞密度が低く、平均視力も低い結果となった。この結果は残存視細胞モザイク構造による分類が視細胞障害の程度を反映していることを示唆し

ている。

Carroll らは先天性色覚異常症例で、3 種類の錐体細胞のうち、特定の種類の錐体細胞が欠損していることを示した。<sup>1</sup> 今回の検討でグループ 1 の視細胞障害パターンは Carroll らの報告で示された視細胞欠損パターンと類似しており、CSC 寛解症例において、残存視細胞のバランス異常が後遺症としての色覚障害に関与している可能性が示唆される。

SD-OCT における中心窩網膜厚と AO-SLO における視細胞密度には相関が見られた。また SD-OCT における IS/OS 異常および VM 異常が AO-SLO における視細胞密度低下と関連することが明らかとなった。しかしながら、IS/OS が正常な症例でも視細胞密度は低下しており、視細胞障害を検出する上で、AO-SLO は SD-OCT よりも更に有用であると考えられた。この違いは、SD-OCT の面分解能が 20 $\mu$ m 程度であり、個々の視細胞を描出不可能であるのに対し、AO-SLO の面分解能は 2 $\mu$ m であり、個々の視細胞、あるいは視細胞数個単位での異常を検出可能であるためと考えられる。

#### E. 結論

AO-SLO により CSC おける網膜復位後の視細胞構造異常が明らかとなった。CSC では視細胞密度が減少し、残存視細胞密度は視力・網膜厚と相関する。AO-SLO は CSC の病態理解に有用である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Ooto S et al: High resolution imaging of resolved central serous chorioretinopathy using adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy. *Ophthalmology*, in press.

#### 2. 学会発表

1. 大音壮太郎 他：補償光学を適応した走査型レーザー検眼鏡を用いた中心性漿液性網脈絡膜症の視細胞構造, 第 45 回日本眼科学学会総会, 東京, 2009.
2. 大音壮太郎 他：補償光学適用走査型レーザー検眼鏡による中心性漿液性網脈絡膜症の視細胞構造, 第 63 回日本臨床眼科学会, 博多市, 2009.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### I. 参考文献

1. Carroll J et al: Functional photoreceptor loss related with adaptive optics: An alternate cause of color blindness. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8461-8466, 2004.

## 19. サル iPS 細胞の作製と網膜色素上皮細胞への分化誘導

鎌尾浩行<sup>1) 2)</sup>、岡本理志<sup>2)</sup>、平見恭彦<sup>2) 3)</sup>、桐生純一<sup>1)</sup>、高橋政代<sup>2) 3)</sup>

(<sup>1)</sup> 川崎医大、<sup>2)</sup> 理化学研究所、<sup>3)</sup> 神戸市立医療センター中央市民病院)

**研究要旨** 網膜色素変性等の網膜色素上皮 (RPE) 疾患に対する RPE 移植にむけて、拒絶反応の有無を検証するため大型動物モデルであるサルの iPS 細胞を作製し RPE への分化誘導を試みた。サルの皮膚の体細胞に OCT3/4、Sox2、Klf4、c-Myc 遺伝子を導入し、feeder 細胞上で培養するとサルの iPS 細胞が得られた。またサルの iPS 細胞を、Wnt 及び Nodal シグナル阻害剤存在下の血清培地中で 1 週間浮遊培養後、接着培養を行うと RPE 細胞が得られた。ヒト iPS 細胞と同様の方法でサル iPS 細胞からも RPE が得られた。今後この RPE を移植し、拒絶反応の有無を検討する予定である。

### A. 研究目的

網膜色素変性や加齢黄斑変性などの 1 次的もしくは 2 次的に RPE が障害される疾患に対し、RPE の移植は機能維持や回復への 1 つの手段と考えられる。我々はすでにヒト iPS 細胞から RPE への分化誘導に成功しているが<sup>1)</sup>、今後臨床応用するにあたり拒絶反応の有無を検証する必要がある。その理由として、作製した iPS 細胞が ES 細胞と全く同じ細胞かが未だ不明であることや、拒絶反応が無いと推測されている自己 iPS 細胞由来の RPE も様々な因子を入れ作製するため、本当に拒絶反応が無いかが不明であるからである。また ES 細胞由来の RPE の移植は拒絶反応がないという報告<sup>2)</sup>もあり、これらを検証するにあたり大型動物モデルであるサルの iPS 細胞を作製し RPE への分化誘導を試みた。

### B. 研究方法

サル iPS 細胞

オスのカニクイザルの腹部の皮膚を培養し、OCT3/4、Sox2、Klf4、c-Myc 遺伝子を導入したレトロウイルスを感染させた。その後 feeder 細胞上で培養し、免疫細胞染色による ES 細胞のマーカーの発現と SCID マウスの精巣移植による奇形腫の発生を検討した。サル RPE 細胞

サル iPS 細胞を、Wnt 及び Nodal シグナル阻害剤存在下の血清培地中で 1 週間浮遊培養後、接着培養を行い RPE のマーカーの発現を免疫染色にて検討した。また得られたコロニーを単離し再培養し、単独での維持培養が可能かを検討した。

### C. 研究結果

サル iPS 細胞

培養開始後すぐに皮膚周囲から繊維芽細胞が出現し、ある程度増殖したところで皮膚を取り除き繊維芽細胞のみ培養を続けた。得られた繊維芽細胞に OCT3/4、Sox2、Klf4、c-Myc 遺伝子を導入後、feeder 細胞上で培

養すると約 1~2 週間で一部に ES 細胞とよく似た細胞が出現した。この細胞は ES 細胞のマーカであるアルカリフォスファターゼ (AP)、Oct3/4、Nanog、SSEA4 の発現を認め (図 1)、また SCID マウスの精巣に移植すると、三胚葉系の各種組織を含む奇形腫を形成したため (図 2)、得られた細胞は iPS 細胞と考えた。

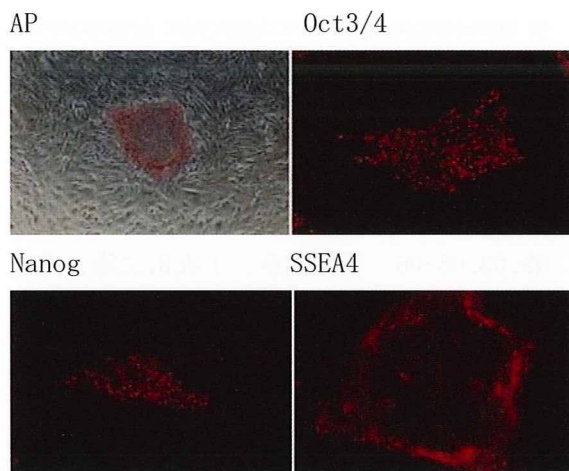


図1 ES 細胞マーカ-の発現

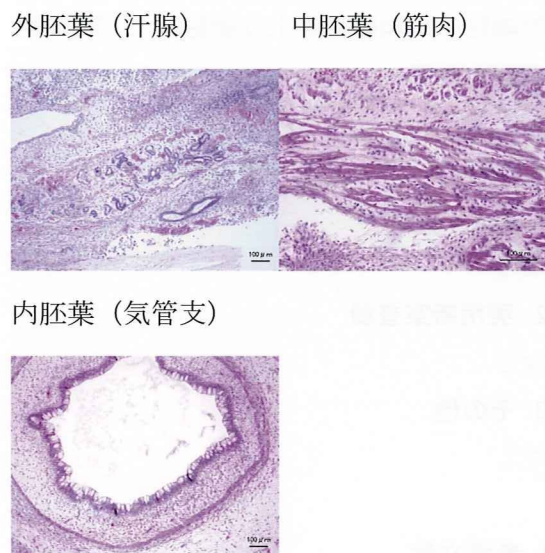


図2 奇形腫の組織図

### サル RPE 細胞

分化開始後、約 3 週間で色素を有する多角形の敷石状構造からなる細胞が出現した。この細胞は、密着結合の構成蛋白である ZO-1 と神経組織に発現する接着結合の構成蛋白である N-cadherin を発現していたため (図 3)、成熟した RPE のシートが作製できたと考えた。また得られた細胞のコロニーを単離し再培養すると、コロニー周囲より再増殖を始め、単独での維持培養が可能であることも確認した (図 4)。

### 光顕像

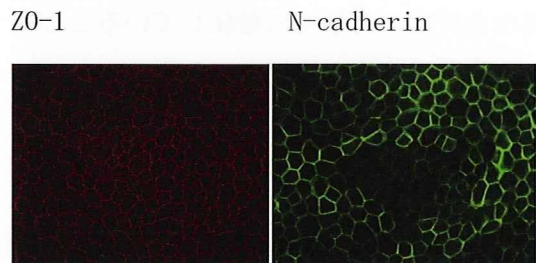


図3 RPE 細胞の免疫細胞染色像

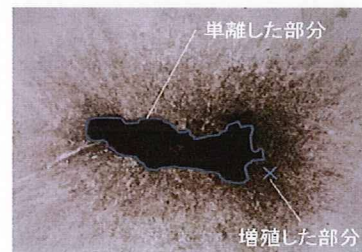


図4 単離した RPE コロニー

#### D. 考察

障害を受けた RPE を補う治療法である RPE 移植は比較的古くから研究・開発が行われており、特に RCS ラットにヒト胎児 RPE を移植し良好な結果が得られた後<sup>3)</sup>、よりヒトに近い動物への移植実験が行われるようになった。また網膜下は免疫特権部位であることから、過去に臨床実験として加齢黄斑変性疾患に対するヒト胎児 RPE 移植<sup>4)</sup>も行われたが、結果はほとんどが拒絶されてしまった。加齢黄斑変性の様な RPE 移植の適応となるような疾患では、RPE の血液網膜関門が障害され移植細胞が免疫系に暴露されたためとされ、自己由来の細胞を移植する必要があると考えられている。最近では自己の周辺部 RPE を脈絡膜ともに剥離し黄斑部に移植する治療の報告<sup>5)</sup>がなされているが、術後に増殖性硝子体網膜症など重篤な合併症が高頻度に発症していることから、実際の治療で選択される事は少ない。一方すでに我々が作成したヒト iPS-RPE は自己由来の細胞であるから拒絶されないと推測され、また移植細胞をどの様な形式で移植するかにより異なるが、手術侵襲が従来より少なく済むため今後臨床応用できると考えている。今後、今回作成したサル iPS-RPE を用い拒絶反応や手術方法を検討しヒトへの臨床応用に繋げたい。

#### E. 結論

ヒト iPS 細胞と同様の方法で、サル iPS 細胞の作製と RPE への分化誘導に成功した。今後この細胞をサルへの自家・他家移植、又サル ES 細胞由来の RPE を移植し、それぞれの拒絶反応の有無の比較や移植細胞の生着・機能などを検討する予定である。

#### F.健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hirami Y, Mandai M, Takahashi M, Teramukai S, Tada H, and Yoshimura N: Association of clinical characteristics with disease subtypes, Initial visual acuity, and visual prognosis in neovascular age-related macular degeneration. *Jpn J Ophthalmol* 53: 396-407, 2009.

##### 2. 学会発表

1. 第 8 回日本再生医療学会総会 09.03.05-06 平見恭彦、小坂田文隆、高橋和利、山中伸弥、栗本康夫、高橋政代。ヒト人工多能性幹細胞由来網膜色素上皮細胞および視細胞の分化誘導
2. 第 113 回日本眼科学会総会 09.04.16-19 平見恭彦、小坂田文隆、高橋和利、山中伸弥、栗本康夫、高橋政代。ヒト人工多能性幹細胞由来網膜色素上皮細胞および視細胞の分化誘導

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許習得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### I. 参考文献

1. Osakada F et al: Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*

26: 215-224, 2008.

2. Anthony Vugler et al: Elucidating the phenomenon of HESC-derived RPE: Anatomy of cell genesis, expansion and retinal transplantation. *Experimental Neurology* 214: 347-361, 2008.
3. Little CW et al: Transplantation of human fetal retinal pigment epithelium rescues photoreceptor cells from degeneration in the Royal college of Surgeons rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 204-211, 1996.
4. Algvare PV et al: Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization. *Grafe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 32: 707-716, 1994.
5. Jousseaume AM et al : Autologous translocation of the choroid and retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 142: 17-30, 2006

## 20. マウス変性網膜への視細胞移植の条件検討

高橋政代、万代道子、本間耕平、山田千佳子

(理化学研究所)

**研究要旨** マウス変性網膜 (C3H/HeJ : rd 1) における変性過程を免疫組織学的に検討したところ、杵体視細胞が変性する生後4週までの時期には、ミュラー細胞のGFAP発現増強、マイクログリアの外層への集積がみられるが、その後一旦これらの変化は沈静化する。その後、外境界膜の染色像は断続した状態が続き、4週以降錐体細胞、2次ニューロンの杵体双極細胞共に生後12週くらいまで減少していく。12週以降では、網膜外側のGFAP染色性が再び増強した。これらの変化から、4週から8週くらいまでの間に移植をするのが適切と考えられた。P3-P7のNr1-GFP網膜細胞を用いて4-8週令のrdマウスに移植を行った所、いずれの週令においても移植細胞の生着がみられたが、6週以降の移植ではChondroitinase ABC (ChABC)が、4-6週の移植ではvalprolic acid (VPA)を添加することにより、移植細胞の生着が向上した。またVPAを用いた移植では、移植視細胞と双極細胞が接する像も観察され、シナプスを形成する可能性も示唆された。

### A. 研究目的

変性網膜における移植に適した時期的ウィンドウをみつけるために、変性過程の特徴を、グリアの状態、マイクログリアの集積、外境界膜の状態、2次ニューロンや錐体細胞の残存状態などから総合的に推察する。又これらの時期に視細胞移植を行い、生着を検討し、加えて生着を良くする因子の有無について、グリオシス抑制因子、シナプス形成促進因子、細胞浸潤促進因子などについて検討する。

### B. 研究方法

rd1マウスを生後2週から15週、2-3週毎に経時的に以下について免疫組織学的に観察した。ミュラー細胞 (GFAP)、マイクログリア (Iba1)、外境界膜 (zo-1)、杵体双極細胞 (PKC) 錐体視細胞 (PNA)。また、こ

れらの結果より、生後4週から8週令のrdマウスに対し、生後3から7日令のNr1-GFP網膜細胞を移植し、2週後眼球をパラフィン固定し、100 $\mu$ m毎に生着した細胞数を計数した (n=3)。さらに移植時、これまでの我々の報告を参考に<sup>1), 2)</sup>、1mM valprolic acid (VPA)、Wnt (100ng/ml)、1、10nM17- $\beta$ estradiol (E2)、100 $\mu$ M cobalt (18時間 preincubation)、25U/ml chondroitinase ABC (ChABC)を細胞懸濁液に添加、生着率の違いを調べた。

(倫理面への配慮)

全ての実験はARVOの動物実験規定に従った。

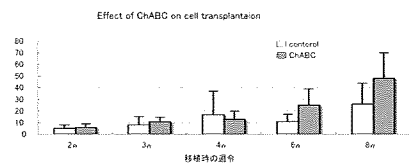
### C. 研究結果

杵体細胞死が顕著な生後2週の網膜ではGFAP発現増強が見られ、マイクログリアの



外層への集積がみられたが、4週以降は一旦沈静化した。外境界膜の指標であるZO-1染色性は4週以降断続性であった。また、

#### A



#### B

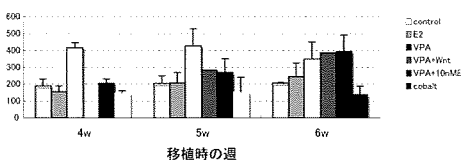


図1 添加因子による移植細胞の生着

A ChABC の効果

B 様々な添加因子の効果

4週以降錐体細胞、杵体双極細胞共中心部より顕著に減少し、錐体細胞も12週後には周辺部のみ残存した状態となる。このことから移植の評価を1月後までに想定して、生後4週から8週の間で移植するのが適切と考えた。

次に実際に生後2週から8週の時期に網膜細胞の移植を行ったところ、4週から8週の移植ではいずれの時期においても2週後の時点で生着がみられた。各種添加因子の効果を調べると、ChABCは6週令以降の移植で有効であった(図1)また、4-6週令の移植においてはVPAが有効であった(図2)。又、VPA添加群においては、移植細胞と杵体双極細胞の接する像も観察され、シナプスを形成する可能性も示唆された。

#### D. 考察

変性進行期にはミュラーグリアやマイクログリアの活性化がみられるが、その後、しばらくこれらの活性化状態は落ち着く時期

があり、その間に今度は徐々に錐体細胞や杵体双極細胞が2次的な変性に陥ると思われた。移植はこの2次的な変性の比較的早期に行うのが適切と考えられた。この時期に移植すると実際に視細胞の生着がみられ、ChABCの6週以降の効果より、2次変性の進行と共にグリオシスによるバリア形成の可能性が示唆された。また、VPAはシナプス形成の促進により、生着をよくする可能性が示唆された。

#### E. 結論

網膜変性モデルでは、2次変性早期に細胞を移植するのが適切と考えられた。この時期の移植にはVPAの添加が有効であり、変性の進行と共にグリオシス融解因子であるChABCの添加も有効であった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

OIST Retinal Workshop 2009

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## I. 参考文献

1. Suzuki T, Akimoto M, Imai H, Ueda Y, Mandai M, Yoshimura N, Swaroop A, Takahashi M: Chondroitinase ABC treatment enhances synaptogenesis between transplant and host neurons in model of retinal degeneration. *Cell Transplant* 16: 493-503, 2007.
2. Osakada F, Ooto S, Akagi T, Mandai M, Akaike A, Takahashi M: Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *J Neurosci* 27: 4210-4219, 2007.

## 21. 網膜色素上皮細胞に対する肥満細胞放出因子の作用

海老原伸行、戸倉智子、宮崎 愛、松田 彰、村上 晶

(順天大)

**研究要旨** ヒト網膜色素上皮細胞における肥満細胞放出因子に対する受容体の発現と機能を *in vitro* で検討した。培養ヒト網膜色素上皮細胞には protease activator receptor 2 (PAR2)、ヒスタミン受容体 I、TNF- $\alpha$ 受容体 I、ケモカイン受容体 (CCR1、CCR3、CCR4、CCR8、CCR11) が発現していた。また、トリプターゼは PAR2 を介し IL-8 の産生を誘導した。また、細胞増殖・移動を亢進させた。一方、キマーゼは細胞の増殖・移動を抑制した。TNF- $\alpha$  は MCP-1、IL-8 の産生を亢進させた。ヒスタミン、TNF- $\alpha$ 、トリプターゼは VEGF の産生を亢進させたが、MIP-1 $\alpha$  (CCR1 リガンド)、eotaxin (CCR3 リガンド)、I309 (CCR8 リガンド) にはその作用がなかった。

### A. 研究目的

ヒト脈絡膜組織に常在する肥満細胞の生理的・病的役割について検討する。

ラニン染色)

(2) ヒト網膜色素上皮細胞において PAR2・Histamin RI・TNF- $\alpha$ RI・CCR1・3・4・8・11 の発現を m-RNA・蛋白レベルで認めた。

### B. 研究方法

*in vitro* での検討

- 使用細胞 (ARPE-19)
  - 受容体の発現 (RT-PCR、FACS)
  - ケモカイン・VEGF の産生 (protein-array、ELISA)
  - 細胞増殖・移動 (Alamar Blue 法、*in vitro* scratch-assay)
- (倫理面への配慮)

今回は培養細胞のみ使用のため、倫理的には問題ありません。

(3) トリプターゼは網膜色素上皮細胞の増殖・移動を亢進させ、IL-8 の産生も増強させた。

(4) キマーゼは網膜色素上皮細胞の増強・移動を抑制した。

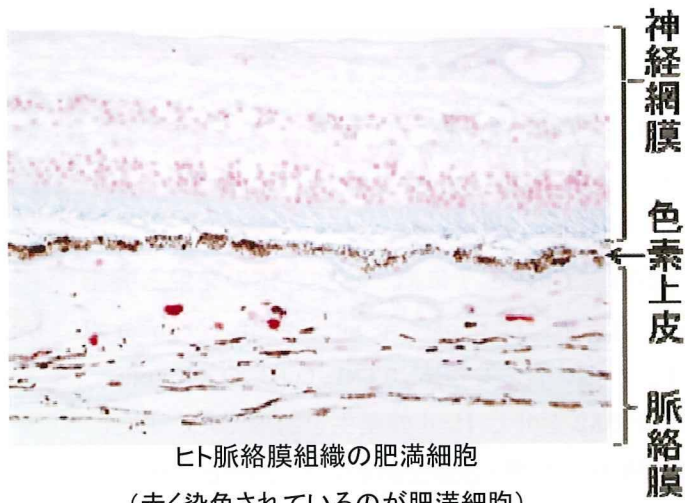
(5) TNF- $\alpha$  は網膜色素上皮細胞からの IL-8・MCP-1 の産生を増強した。

(6) ヒスタミン、TNF- $\alpha$ 、トリプターゼは網膜色素上皮細胞からの VEGF 産生を増強させたが、MIP-1 $\alpha$ 、eotaxin、I-309 にはその作用がなかった。

### C. 研究結果

(1) ヒト脈絡膜組織の浅層 (色素上皮細胞層の近傍) に結合組織型の肥満細胞を多数認めた。(アルシアンブルー、サフ

図



#### D. 考察

ヒト網膜色素上皮細胞には肥満細胞放出因子に対する受容体が発現しており、肥満細胞が脱顆粒を起こした時、多様な生理反応が惹起される可能性がある。

#### E. 結論

脈絡膜肥満細胞と網膜色素上皮細胞間には相互作用がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

2010年度日本眼科学会総会で発表予定

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### I. 参考文献

なし