

2009.

4. Ikuno Y, Tano Y: Retinal and choroidal biometry in highly myopic eyes with spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 3876–3880, 2009.

5. Hayreh SS: In vivo circulation and its watershed zones. *Eye* 4: 273–289, 1990.

6. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West P: *Larsen's Human Embryology*: Philadelphia, Elsevier, 602-616, 2009.

36. 「身体障害者の視力判定の問題点」解決のためのパイロットスタディ

— 加齢黄斑変性の視力と日常生活の困難さ —

湯澤美都子¹⁾、石橋達朗²⁾、本田孔士³⁾、久保田伸枝⁴⁾；

日本学術会議 視覚障害者との共生小委員会

(¹⁾ 日本大・駿河台、²⁾ 九州大、³⁾ 大阪赤十字病院、⁴⁾ 帝京大)

研究要旨 少なくとも1眼に加齢黄斑変性のある患者151名のDLTV(the daily living task dependent on vision) 総スコアと視力の関係を調べ、身障者の視力等級判定の改善法を検討した。その結果、良い方の眼の遠見矯正視力と総スコアの Spearman 相関係数は0.76であった。良い方の眼の矯正視力0.3、0.4の総スコアの平均点はそれぞれ62.5と69.3であった。以上の結果から、身障者の視力判定は良い方の眼の矯正視力で行い、視力障害の上限は0.3か0.4に設定するのが妥当と考えた。

A. 研究目的

現行の視覚障害認定基準は、平成7年に交付、平成16年に一部が改正されたもので、現在では既応できない種々の問題がある。平成20年、日本学術会議障害者との共生小委員会は現行の視覚障害の判定についての問題点を提言した。そのうちの視力判定についての主な問題点は、1. 等比級数でない小数視力の両眼の和を用いる。2. 6級は、日常生活の困難さを適切に判定していない。3. 判定には矯正視力を用いるが、矯正に耐えられないものは裸眼視力で判定する。があげられる¹⁾。加齢黄斑変性(age-related macular degeneration: AMD)は中高年の視力低下を生じる代表疾患であり、身体障害者手帳交付の4位を占める。DLTVはAMDの日常生活の困難さを測る尺度として作られた質問票である²⁾。日本学術会議障害者との共生小委員会が提言した視力障害の問題点を解決するために、パイロットスタディ

としてAMD症例のDLTVを調べ、視力障害を判定するのに適した検査法、視力とDLTV総スコアの間関係を明らかにする。

B. 研究方法および倫理面への配慮

対象は駿河台日本大学病院眼科を受診中の少なくとも片眼に視力低下があるAMD151例である。年齢は53-89歳(平均77.4歳)、男性111例 女性40名で、滲出型AMDは149例、萎縮型2例で、滲出型では病変の活動性は問わない。良い方の眼の遠見矯正視力は0.5以上 31名、0.2-0.4 40名、0.05-0.1 40名、0.4以下 40名であった。遠見、近見矯正視力に加え、NM-read Jを用いて読書試験を行い、最大読書速度、臨界文字サイズを求めた。またDLTVの聞き取り調査を行った。DLTVは遠見視力、近見視力、コントラスト感度、明順応、暗順応、視野に関する行動の困難さについての22問の質問からなっている。各々の質問の答

えは「困難ない」に4点、「少し困難」に3点、「かなり困難」に2点、「できない」に1点が配点され、22問の合計を100点に換算し、総スコアとする²⁾。検討方法は良い方の目の遠見矯正視力、両眼の遠見矯正視力の和、良い方の眼の近見矯正視力、両眼の近見矯正視力の和、読書試験の最大読書速度と臨界文字サイズの平均値のいずれがDLTV総スコアと関連が強いかを、Spearman係数で比較した。また151眼の良い方の眼の遠見矯正視力別にDLTV総スコアの平均値を求めた。

C. 研究結果

151名の良い方の眼の遠見矯正視力、両眼の遠見矯正視力の和、良い方の眼の近見矯正視力、両眼の近見矯正視力の和とDLTV総スコアのSpearman相関係数はそれぞれ0.76、0.77、0.76、0.77で差がなく、いずれも高い相関を示した。視力が悪く、読書試験を行えなかった62眼を除く89眼の臨界文字サイズと最大読書速度はそれぞれ-0.66、0.68であった(図1)。

臨床パラメータ	眼数	Spearman相関係数
遠見矯正視力	135*	
良い方の眼		0.76
両眼の和		0.77
近見矯正視力	134*	
良い方の眼		0.76
両眼の和		0.77
読書試験(良い方の眼)		
臨界文字サイズ	89**	-0.66
最大読書速度	89**	0.68

* 両眼が同じ視力の人は除く。
** 読書試験が行えない人は除く、両眼が同じ視力の人はスコアを平均

図1 DLTV総スコアと臨床パラメータの関係

151名の良い方の眼の遠見矯正視力別DLTV総スコアの平均は視力0.07、0.08、0.9では施行した眼数が少なく、DLTV総スコアには

らつきがあるためそれらを除くと、0.5までは視力が良いほどDLTV総スコアの平均点がよく、0.01未満の8.5からスコアは増加し、0.3では62.5、0.4では69.3、0.5では75.8であった。一方0.6、0.7、0.8、1.0、1.2、1.5の総スコアの平均点はそれぞれ89.5、83.3、90.7、89.0、96.4、95.3で、スコアに大きな差はなかった。

D. 考察

DLTVはAMDの日常生活困難を調べるために作られた問診票で、すでに欧米ではこれを用いて報告もされており²⁾、AMD症例のDLTVを測るのに有用であると考えた。

良い方の眼の遠見矯正視力、両眼の遠見矯正視力の和、良い方の眼の近見矯正視力、両眼の近見矯正視力とDLTV総スコアの相関係数はいずれも0.76~0.78で高い相関を示し、値は類似していた。このことはこれらのいずれの指標も視力に基づく日常生活の困難さを示す指標として適していることを示唆していると考えた。これらのうち良い方の眼の矯正視力を視力判定に用いれば、両眼の等比級数でない両眼遠見矯正視力の和を用いている現行の身障者の視力判定の問題点を解決できる。また、両眼視力障害を有する多くの人は偏心視であるので、それらの人の日常生活に用いている視力を正しく評価できる。さらに日常診療で行う検査であるため現実に即している。そこで今回検討した4つの視力測定法の中では良い方の眼の遠見矯正視力が身体障害者の視力等級の判定に適していると考えた。

一方、近見視力による行動、すなわち主に読み書きは視力障害による日常生活困難の中心を占めている。今回の検討では良い方

の眼の読書試験は視力が不良な 62 眼では行えなかった。臨界文字サイズ、最大読書速度はそれぞれ 0.67、0.68 であり、遠見、近見視力との相関係数より低かった。このことから読書試験は視力不良者では行えないことがあり、生活困難を測る指標としては適切でないと考えた。

今回の検討では、良い方の眼の遠見矯正視力が 0.6 では DLTV 総スコアの平均は 89.5 で、それ以上の視力の場合の総スコアと比べて大差がなかった。新聞の本文を読むのに必要な視力はかな 0.4、漢字 0.5、文庫本を読むのに必要な視力はかな 0.3、漢字 0.4 であり、0.6 の視力では読み書きはほとんど問題なく行えることが、スコアが良い原因と考えられた。一方、視力 0.3、0.4 では DLTV の総スコアはそれぞれ 62.5、69.3 と悪かった。これは 0.4 以下では読み書きが困難になるためと考えられた。これらのことから、視力障害としての認定の上限は現在の 0.6 ではなく 0.3 か 0.4 にするのが妥当であると考えられた。

今後は高度近視など AMD 以外の視力障害を生ずる他疾患を含めた中高年の多数例について DLTV あるいはさらに適切な質問表を用いて調査を行うとともに、就学児童に適した調査票を用いて大規模な調査を行い、両眼開放視力と良い方の眼の遠見視力との差異、視力と日常生活の困難さとの関係を明らかにする必要がある。それらをもとに視力等級を 6 段階に分けることの妥当性や各等級の視力の範囲について再検討する必要がある。

E. 結論

AMD に対する DLTV を用いたパイロットスタ

ディの結果からは、身体障害者等級を決めるための視力は良い方の眼の遠見矯正視力で判定し、等級の上限視力は、現行の 0.6 でなく、0.3 あるいは 0.4 に設定するのが妥当であると考えられた。

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

湯澤美都子、久保田伸枝、石橋達朗、本田孔士: 身体障害者の視力・視野判定の問題. 第 63 回日本臨床眼科学会 (シンポジウム)、福岡、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. 日本学術会議臨床医学委員会 障害者との共生分科会 提言 身体障害者との共生社会の構築を目指して: 視覚・聴覚・運動器障害認定に関する諸問題. 10-12、2008.
2. McClure Me, et al: Macular degeneration: do conventional measurements of impaired visual function equate with visual disability? Br J Ophthalmol 84: 244-250, 2000.

37. 本邦加齢黄斑変性の効用測定値

柳 靖雄¹⁾、玉置泰裕¹⁾、新家 眞¹⁾、福田 敬²⁾、橋本英樹³⁾

(¹⁾ 東京大、²⁾ 東京大保健医療経済学、³⁾ 東京大臨床疫学経済)

研究要旨 効用値とはQOLに付加された一元的な尺度であり医療経済評価に利用される。加齢黄斑変性(AMD)の対費用効用に関するこれまでの西欧諸国での先行研究では効用値は視力を基にして既報より算定されてきた。今回、本邦AMD患者の効用値を測定し、対費用効用の算定に用いる妥当性を評価した。まず、東大病院眼科黄斑外来に受診した両眼性のAMD症例のうち面接による聴取が可能であった48例(男性41例、女性7例、59~91歳(平均75.9歳)を対象に効用値算定を時間得失Time-trade off (TTO) 法および基準的賭けStandard Gamble (SG) 法を用いて効用値を算出した。その結果、SG法を用いた場合には効用値は視力による差を認めず、TTO法では視力カテゴリー別に集計すると段階が見られた。従って、TTO法で得られた効用値が本邦AMD患者の効用値算定に使用可能であると考えられた。次に対費用効用検討を行い、感度分析を行った。その結果PDT, ranibizumabは同等の対費用効果であり、pegaptanibは対費用効果が低いという結果が得られた。また、いずれの治療も視力良好な症例に対しては対費用効果が高い事が判明した。ここで、日本人の効用値を用いた場合、対費用効用比はいずれも既報を用いた場合と比較して高く算出された。以上より AMD 患者の視力低下による効用値は日本人を対象に TTO 法の測定に基づいた値を使用するのがよいと考えられた。

A. 研究目的

効用値とは QOL に付加された一元的な尺度であり医療経済評価に利用される。すなわち、医療経済評価においては個人の瞬間の QOL を効用値という尺度で表現し、ある個人の全体的な生命の質の尺度：Quality-adjusted life years (QALYs:質調節生存年)を一定期間の効用値の積算で表現できると考える。そして、医療経済評価の手法として用いられる対費用効用解析とは特定の介入に要する費用と、その介入によって得られる QALY を算出する事で 1QALY 生命の質を上昇させるために要する費用を

(増分) 費用効用比：(Incremental) Cost/QALY として求めその介入の経済的な評価を試みるものである。このため、医療経済評価のためには効用値の測定が必須である。

加齢黄斑変性(AMD)の対費用効用に関するこれまでの西欧諸国での先行研究では AMD 患者の効用値は視力を基にして既報¹⁾より算定されてきた。しかしながら本邦 AMD 患者における効用値測定の報告は存在しない。このため、本研究では本邦 AMD 患者による視力低下が効用値に及ぼす影響を測定し、既報の効用値を本邦 AMD 患者の対費用効用

解析に用いる妥当性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

2009年8月に東大病院眼科黄斑外来に受診した両眼性のAMD症例のうち面接による聴取が可能であった48例(男性41例、女性7例、59~91歳(平均75.9歳)を対象に効用値を時間得失 Time-trade off (TTO) 法および基準的賭け Standard Gamble (SG) 法を用いて効用値を算出し、両者の効用値の有用性を検討した。なお、本研究は東京大学の倫理委員会の承認を得て行った

C. 研究結果

1. 効用値測定

視力カテゴリ別の結果、および年齢を65歳、男性として推計し直した結果を表1、2に示す。

一般的にSG法を用いた場合にはTTO法を用いた場合より効用値が高く算出され、視力良好例において効用値の既報¹との乖離を認めた。また、今回の効用値は視力による差がほとんどない事より、本邦AMD患者の効用値算定には向かないと考えられた。

一方、TTO法では視力良好例で既報との乖離が目立つものの視力の悪いところでは大きな差異を認めなかったまた、視力カテゴリ別に集計するとより段階が見られた。従って、TTO法で得られた効用値が本邦AMD患者の効用値算定に使用可能であると考えられた。

表1: TTO 法および SG 法で得られた視力カテゴリ別の効用値

TTO				SG			
視力	n	Utility	95% CI	視力	n	Utility	95% CI
≤ 0.15	11	0.534	0.400-0.667	≤ 0.15	11	0.686	0.535-0.838
0.2-0.3	15	0.574	0.487-0.660	0.2-0.3	15	0.695	0.595-0.794
0.4-0.6	11	0.613	0.523-0.703	0.4-0.6	11	0.703	0.601-0.804
0.8 ≥	11	0.653	0.513-0.793	0.8 ≥	11	0.711	0.555-0.867

表2: TTO 法および SG 法で得られた視力カテゴリ別の効用値 (年齢65歳、男性で推計、Brownらの報告値を同カラムの下に示す)

TTO			SG		
視力	Utility	95% CI	視力	Utility	95% CI
≤ 0.15	0.650 0.621	0.464-0.836 0.555-0.687	≤ 0.15	0.762 0.742	0.552-0.972 0.672-0.812
0.2-0.3	0.690 0.708	0.539-0.840 0.653-0.764	0.2-0.3	0.770 0.769	0.598-0.942 0.696-0.842
0.4-0.6	0.729 0.797	0.581-0.878 0.762-0.833	0.4-0.6	0.778 0.897	0.609-0.947 0.869-0.925
0.8 ≥	0.769 0.908	0.590-0.948 0.875-0.942	0.8 ≥	0.786 0.948	0.583-0.990 0.924-0.972

2. 対費用効用解析

次にモデルケースを用い対費用効用解析に既報の効用値を使用し、感度分析に今回のTTOによる効用値を使用し、両者の違いを比較検討した。

Base caseとして

75歳、男性

・矯正視力: 治療眼 50 letters, 僚眼 0

・時間範囲(time horizon) : 1 year, lifetime (11years)

・治療: PDT, Pegaptanib, Ranibizumab vs Best Supportive Care (BSC)⁴

-2年目以降視力: BSCを除き継続治療による視力維持を仮定(治療回数: PDT: 0.9/yr, Pegaptanib 8/yr, Ranibizumab 3.4/yr)を仮定した。

Better eyeの視力を基にBrownらの効用値に基づきQALYを算出し対費用効用を計算した結果が表3の通りである。経過観察を1年と設定した場合には11年と設定した場合と比較して対費用効用比が高く算出された。これは、AMDの治療は初期治療に関わる費用と比較して維持治療に関わる費用が少ない事が原因であると考えられた。実際のAMDの治療は、長期の治療を要する慢性疾患である事、11年の経過観察期間を設定した方が1年の経過観察を設定するよりも対費用効用比が比較的妥当な値であると考えられた事などから11年の観察期間を感度分析に用いた。

感度分析では治療前視力(40letter, 60letterと変化させた場合)、視力変化(治療群のみ1年以降視力変化がないと仮定した場合、治療群も非治療群1年以降は視力変化なしと仮定した場合)のパラメーターを変化させ、それぞれについてBrownらの効用値を用いて解析した場合と今回得られた値を使用した場合について検討した。

その結果、PDT, ranibizumabは同等の対費用効果であり、pegaptanibは対費用効果が低いという結果を支持した。また、いずれの治療も視力良好な症例に対しては対費用効果が高い。ここで、日本人のdataを用いた場合、全般的な傾向は変わらなかったものの対費用効用比はいずれも既報を用いた場合と比較して高く算出された。

D. 考察

QALY算出において既報の効用値の使用した場合QALY gainは高く算出されるために対費用効用が良好に算定されるため、注意が必要であると考えられた。本邦AMD症例の効用値はTTO法によって得られた値を用いるのがよいと考えられる。また、本検討においては視力良好例では既報よりも低かった。これは、症例選択、Ethnic groupの違い、高齢者の背景因子の違いが原因であると考えられた。

なお、今回の対費用効用の解析は保険診療点数などをもとに算出した費用のみをもとに行っており、その結果には社会的失明に伴う社会的コストなどを含んでいない事には留意が必要である。

表3: Base caseの解析結果

	Incremental cost	QALY gained	¥ per QALY
<i>1-year time horizon</i>			
PDT	¥1,094,833	0.0814	13,450,000
Pegaptanib	¥1,034,536	0.0451	22,930,000
Ranibizumab	¥2,194,180	0.1279	17,150,000
<i>11-year time horizon</i>			
PDT	¥4,455,883	1.1276	4,160,000
Pegaptanib	¥11,388,596	0.7681	16,530,000
Ranibizumab	¥7,519,226	1.6790	4,720,000

表4: 感度分析結果

		PDT	Pegaptanib	Ranibizumab
Reference case	Treated eye, 50	4,160,000	16,530,000	4,720,000
	今回のTTO dataを使用	12,060,000	43,650,000	12,460,000
Baseline VA	Treated eye, 60	2,820,000	9,840,000	3,570,000
		7,810,000	25,580,000	9,340,000
	Treated eye, 40	7,380,000	35,500,000	7,300,000
		25,500,000	111,750,000	20,290,000
VA: 2 - 11 years	無治療で全群維持	4,450,000	5,080,000	1,670,000
		13,320,000	13,410,000	4,330,000
	無治療で治療群のみ維持	3,380,000	3,180,000	1,380,000
		9,810,000	8,410,000	3,640,000

E. 結論

AMD 患者の視力低下による効用値は日本人を対象に TTO 法の測定に基づいた値を使用するのがよいと考えられた。

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

I. 参考文献

1. Brown et al: Utility values and age-related macular degeneration. Arch Ophthalmol 118: 47-51, 2000.

38. アクアポリン 1 と 4 の発現変化は、自然発症糖尿病トリイ(SDT)ラット

網膜における神経変性と同調する

中村 誠、福田昌秀、中西頼子、根木 昭

(神戸大)

研究要旨 糖尿病を有するヒトないし動物の網膜では、毛細血管症に加えて神経細胞のアポトーシスやグリア細胞の活性化が生じている。種々の病態で、網膜の水チャンネル aquaporin (AQP) 1 と 4 の発現量と局在が変化することが知られている。しかし、糖尿病動物における網膜神経変性と AQP1 と 4 の発現変化の経時的関連に関する報告は数少ない。15 週前後で糖尿病を発症し始める SDT ラット網膜においてこれらの関連を検討した。40 週の SDT ラットは、10 週の SDT ラットならびに 40 週の Sprague-Dawley (SD) ラットに比べて神経節細胞層のアポトーシス細胞数が有意に増加した。Glial fibrillary acidic protein (GFAP) の免疫染色性は、前者では網膜全層を貫くのに対して、後者では神経線維層に限局していた。SD ラットおよび 10 週の SDT ラットでは、視細胞と外顆粒層に AQP1 が、網膜内層の血管周囲のグリア細胞に AQP4 が発現していた。40 週の SDT ラットでは網膜表層血管周囲の AQP の発現が 4 から 1 ヘシフトしていた。糖尿病発症後の SDT ラット網膜における神経変性は AQP1 と 4 の発現変化と同調していた。

A. 研究目的

糖尿病を有するヒトないし動物の網膜では、毛細血管症に加えて神経細胞のアポトーシスやグリア細胞の活性化が生じている。種々の病態で、網膜の水チャンネル aquaporin (AQP) 1 と 4 の発現量と局在が変化することが知られている。しかし、糖尿病動物における網膜神経変性と AQP1 と 4 の発現変化の経時的関連に関する報告は数少ない^{1,2}。本研究の目的は、15 週前後で糖尿病を発症し始める自然発症糖尿病トリイ (SDT) ラット網膜において、これらの関連を検討することである。

B. 研究方法

網膜切片ないし伸展標本を作成した。アポトーシスのカウントは terminal dUTP nick-endlabeling (TUNEL) 染色ならびに活性化型 caspase-3 免疫染色で行った。グリア細胞活性の評価と水チャンネルの発現分布は GFAP と AQP1 と 4 の免疫染色で行った³。これらの実験は神戸大学動物実験施設の承認を受けて行った。

C. 研究結果

40 週の SDT ラットは、10 週の SDT ラットならびに 40 週の Sprague-Dawley (SD) ラットに比べて、神経節細胞層における単位面

積あたりの TUNEL 陽性細胞数ならびに活性化 caspase-3 陽性細胞数ともに有意に増加した ($p < 0.0001$)³。

GFAP の免疫染色性は、前者では網膜全層を貫くものに対して、後者では神経線維層に局限していた。SD ラットおよび 10 週の SDT ラットでは、網膜外層の神経細胞に AQP1 が、網膜内層の血管周囲のグリア細胞に AQP4 が発現していた。40 週の SDT ラットでは網膜表層血管周囲の AQP の発現が 4 から 1 へシフトしていた³。

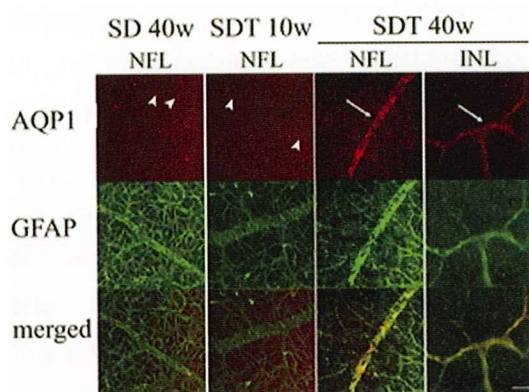


図1 網膜伸展標本による AQP1 と GFAP の免疫染色(NFL=神経線維層、INL=内顆粒層。文献3の図4を引用)。

D. 考察

AQP は浸透圧勾配に反応して水分子を選択的に輸送する膜蛋白質である。水の移動は、網膜における神経細胞の情報伝達、グリア細胞の移動と血管新生、神経細胞死への影響等、様々な生理的・病的変化と密接な関係があることが知られつつある⁴。糖尿病網膜におけるグリア細胞の AQP isoform の発現変化は、糖尿病により誘導される神経細胞死や毛細血管症の発症を誘導・修飾している可能性が推察される。

E. 結論

糖尿病発症後の SDT ラット網膜における神経変性は AQP1 と 4 の発現変化と同調していた。

G. 論文発表

1. Fukuda M et al: Altered expression of aquaporins 1 and 4 coincides with neurodegenerative events in retinas of spontaneously diabetic Torii rats. *Exp Eye Res* 90: 17-25, 2010.

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

I. 参考文献

1. Iandiev I et al: Diabetes alters the localization of glial aquaporins in rat retina. *Neurosci Lett* 421: 132-136, 2007.
2. Pannicke T et al: Diabetes alters osmotic swelling characteristics and membrane conductance of glial cells in rat retina. *Diabetes* 55: 633-639, 2006.
3. Fukuda M et al: Altered expression of aquaporins 1 and 4 coincides with neurodegenerative events in retinas of spontaneously diabetic Torii rats. *Exp Eye Res* 90: 17-25, 2010.
4. Verkman AS et al: Functions of aquaporins in the eye. *Prog Retin Eye Res* 27: 420-433, 2008.

39. ラット緑内障モデルにおけるアンジオテンシン II タイプ I 受容体

拮抗薬の神経保護効果

廣岡一行、楊 宏偉、福田恒輝、白神史雄
(香川大)

研究要旨 アンジオテンシン II タイプ I 受容体 (AT1) 拮抗薬であるカンデサルタンのラット緑内障モデルにおける効果について検討した。ラットの上強膜静脈を熱凝固することにより緑内障モデルを作成し、カンデサルタンあるいは蒸留水を一日一回経口投与した。眼圧はコントロール眼に比べ手術眼では約 2.5 倍の上昇が得られ、カンデサルタンを投与することにより網膜神経節細胞死は抑制された。眼圧上昇 3 週後の蒸留水投与群では網膜神経節細胞に AT1 陽性細胞が認められたが、眼圧上昇 10 週後では AT1 陽性細胞が減少していた。レニン・アンジオテンシン系が緑内障モデルにおける細胞死に関与し、カンデサルタンを投与することにより細胞死が抑制される可能性が示唆された。

A. 研究目的

昨年の本会議で筆者らはアンジオテンシン II タイプ I 受容体 (AT1) を阻害することにより、網膜虚血・再灌流モデルにおける網膜障害に対して神経保護的に働くことを報告した。今回 AT1 拮抗薬 (ARB) であるカンデサルタンのラット緑内障モデルにおける効果について検討した。

B. 研究方法

ラットの 3 本の上強膜静脈を熱凝固することにより緑内障モデルを片眼に作成した。ラットを 2 群に分け、緑内障モデルを作成する 3 日前からカンデサルタン (1mg/kg) あるいは蒸留水を一日一回経口投与した。眼圧と血圧は手術前と手術後は週に一回計測した。9 週後に fast blue を両側の上丘内に注入し、その 1 週後に網膜伸展標本を

作製し、標識された網膜神経節細胞 (RGC) を計測した。また AT1 の局在を調べるため免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は香川大学動物実験実施指針に基づき計画し、香川大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

コントロール眼に比べ 10 週間にわたって手術眼では約 2.5 倍の眼圧上昇が得られた。蒸留水を投与したラットに比べカンデサルタンを投与したラットの眼圧はわずかに低くなっていたが、有意差は認めなかった。カンデサルタン投与 10 週にわたって血圧には影響を与えなかった。蒸留水投与群の手術眼の網膜神経節細胞は正常眼圧である僚眼に比べ、

46.5%であったのに対して、カンデサルタン投与群では84.2%であった ($P < 0.05$; 対応のない t 検定)。正常眼の網膜 (図 1 A) では、AT1 は網膜血管にのみ認められたのに対して、眼圧上昇 3 週後の蒸留水投与群 (図 1 D) 及び眼圧上昇 10 週後のカンデサルタン投与群 (図 1 B) では RGC に AT1 陽性細胞が認められた。これに対し、眼圧上昇 10 週後の蒸留水投与群 (図 1 C) では AT1 陽性細胞は減少していた。

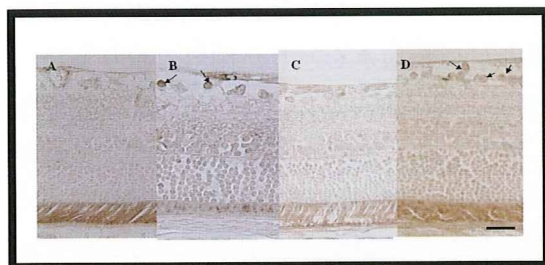


図1 網膜における AT1 受容体の発現

D. 考察

眼圧上昇 3 週後の蒸留水投与群では RGC に AT1 陽性細胞が認められたのに対し、眼圧上昇 10 週後の蒸留水投与群では AT1 陽性細胞が減少していたのは、AT1 陽性細胞がアポトーシスを生じたためと考えられる。これに対し、眼圧上昇 10 週後のカンデサルタン投与群では RGC に AT1 陽性細胞が認められたのは、カンデサルタンを投与することにより、アポトーシスが抑制されたためと考えられる。

E. 結論

レニン・アンジオテンシン系が慢性緑内障モデルにおける細胞死に関与し、カンデサルタンを投与することにより細胞死が抑制される可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yang H, Hirooka K, Fukuda K, Shiraga F: Neuroprotective effects of angiotensin II type I receptor blocker in a rat model of chronic glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci 50: 5800-5804, 2009.

2. 学会発表

1. ラット緑内障モデルにおけるアンジオテンシン II タイプ I 受容体拮抗薬の神経保護効果. 廣岡一行、楊宏偉、福田恒輝、白神史雄 第 20 回日本緑内障学会、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

なし

40. 高濃度グルコース誘導神経細胞死における 神経保護因子の救済効果の検討

忍足俊幸、芳田奈津代、山本修一

(千葉大)

研究要旨 高濃度グルコース負荷が神経細胞死に関与するかを検討し、種々の神経栄養因子により高濃度グルコース誘導神経細胞死が救済できるか 3 次元培養したラット網膜で検討した。3 次元培養した網膜切片を正常濃度 (NG)・高濃度グルコース (HG) 群に分け、培養液に BDNF, NT-4, citicoline, VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ を付加した。培養 7 日で再生突起数を観察したのち切片を固定し、TUNEL 染色を施行した。HG 群では GCL の TUNEL 陽性率は有意に増加し、再生突起数は有意に減少した。BDNF, NT-4, citicoline, VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ を付加した HG 群では TUNEL 陽性率は有意に改善した。BDNF, NT-4, citicoline 付加群では再生突起数も有意に増加した。高濃度グルコースは biochemical な injury として神経細胞死を誘導し、再生突起数を減少させることが示唆された。また、BDNF, NT-4, citicoline は神経細胞死を有意に救済し再生突起数を増加させることが示唆された。これらの保護因子は細胞死メカニズムを共有するストレスの場合にはダメージを受けた神経細胞に対し救済効果を発揮できることが期待される。

A. 研究目的

糖尿病網膜症は失明原因の第 2 位であり、その病態に血管病変と神経病変が関与することは既に知られている。しかしながら、糖尿病網膜症の初期から観察される神経細胞死の正確なメカニズムについては不明である。神経細胞死は視機能の悪化に直結する不可逆的な変化であるためそのメカニズム究明、救済策の検討は早急の課題である。我々は慢性高血糖そのものが神経病変を進行させる重要な因子であると仮定し、3 次元網膜培養を用いて高濃度グルコース負荷が神経細胞死を誘導しうるかどうかを検討した。次いで種々の神経栄養因子が高濃度

グルコース誘導神経細胞死を救済しうるかを TUNEL 染色、再生突起数の観察を通して検討した。

B. 研究方法

6 匹の成熟 SD ラット網膜を無菌下で単離し、type I コラーゲンのゲルに包埋し無血清培養液で培養維持した。網膜切片は正常濃度グルコース (7.5 mM; NG) と高濃度グルコース (45 mM; HG) に分け HG 群には 100 ng/ml brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、100 ng/ml neurotrophin-4 (NT-4)、1 mM citicoline、100 ng/ml VEGF₁₂₀、100 ng/ml VEGF₁₆₄ を付加した。再生突起数の観

察は培養 7 日後位相差顕微鏡を用いて行った。突起観察後網膜切片を固定し凍結切片を作成した。次いで TUNEL 染色を施行し、DAPI で核染色を行った。網膜神経節細胞層 (GCL) における TUNEL 陽性率を (GCL における TUNEL 陽性数) / (GCL における DAPI 染色数) で解析した。統計解析は Mann-Whitney U test を用いた。P<0.05 を統計的有意とした。

C. 研究結果

HG 群では TUNEL 陽性率は NG 群に比べて有意に増加し、再生突起数は有意に減少した ($40.7 \pm 7.7\%$ vs. $28.1 \pm 11.9\%$; $p<0.01$, $37.8 \pm 7.0/\text{mm}^2$ vs. $77.7 \pm 13.3/\text{mm}^2$; $p<0.01$)。BDNF、NT-4、citicoline、VEGF₁₂₀、VEGF₁₆₄ を付加した HG 群では付加しなかった HG 群に比べて TUNEL 陽性率は有意に改善した ($27.6 \pm 10.8\%$ vs. $40.7 \pm 7.7\%$; $p<0.01$, $22.5 \pm 11.1\%$ vs. $40.7 \pm 7.7\%$; $p<0.01$, $26.4 \pm 7.4\%$ vs. $40.7 \pm 7.7\%$; $p<0.01$, $31.5 \pm 9.2\%$ vs. $40.7 \pm 7.7\%$; $p<0.01$, $31.7 \pm 8.7\%$ vs. $40.7 \pm 7.7\%$; $p<0.01$)。BDNF、NT-4、citicoline を付加した HG 群では付加しなかった HG 群に比べて再生突起数は有意に増加した ($119.4 \pm 31.1/\text{mm}^2$ vs. $37.8 \pm 7.0/\text{mm}^2$; $p<0.01$, $187.5 \pm 50.5/\text{mm}^2$ vs. $37.8 \pm 7.0/\text{mm}^2$; $p<0.01$, $63.9 \pm 14.1/\text{mm}^2$ vs. $37.8 \pm 7.0/\text{mm}^2$; $p<0.01$)。VEGF₁₂₀、VEGF₁₆₄ を付加した HG 群では付加しなかった HG 群と再生突起数に有意な差は得られなかった ($47.2 \pm 17.7/\text{mm}^2$ vs. $37.8 \pm 7.0/\text{mm}^2$,

$55.6 \pm 20.0/\text{mm}^2$ vs. $37.8 \pm 7.0/\text{mm}^2$)。

D. 考察

高濃度グルコース負荷は biochemical な injury として神経細胞死を誘導し、再生突起数を減少させることが考えられた。また、高濃度グルコース負荷による神経細胞死を BDNF、NT-4、citicoline、VEGF₁₂₀、VEGF₁₆₄ は有意に救済した。このうち BDNF、NT-4、citicoline は突起再生を増加させることができた。とりわけ NT-4 は最も救済効果・再生誘導が強い結果となった。VEGF の保護作用は他の神経保護作用に比べると若干劣るようである。このため突起再生では有意差を得ることはできなかった。これらの知見は anti-VEGF 治療において有用な情報を与えるものと思われる。また、副作用が少ないことを考慮すると citicoline は糖尿病網膜症に対する有用な神経保護剤として臨床応用可能かもしれない。例えば術中・術後の神経保護剤としての使用などが具体的に考えられる。これらの保護因子は細胞死メカニズムを共有するストレスの場合にはダメージを受けた神経細胞に対し救済効果を発揮できることが期待される。今後は細胞死のメカニズム解明のため種々の神経細胞死関連因子の免疫染色とその定量解析を行い、人糖尿病網膜の神経細胞死との関連を検討していく予定である。

E. 結論

高濃度グルコース負荷は培養網膜に神経細胞死を誘導し、再生突起数を抑制した。ま

た、BDNF、NT-4、citicoline は細胞死を有意に救済し、再生突起数を増加させることができた。これらの保護因子は細胞死メカニズムを共有する病態においてはダメージを受けた神経細胞に対し救済効果を発揮す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

なし

2. 学会発表

1. Oshitari T et al: Enhancement of neurite regeneration in isolated adult rat diabetic retinas by neurotrophic factors and citicoline. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting (ARVO). Fort Lauderdale, Florida. 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Barber AJ et al: Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. J Clin Invest 102:

783-791, 1998.

2. Oshitari T et al: Diabetes: a potential enhancer of retinal injury in rat retinas. Neurosci Lett 390: 25-30, 2005.

3. Oshitari T et al: Mitochondria- and caspase-dependent cell death pathway involved in neuronal degeneration in diabetic retinopathy. Br J Ophthalmol 92: 552-556, 2008.

41. Cre recombinase を網膜色素上皮細胞特異的に発現する

マウス系統の樹立

井上達也¹⁾、上田高志¹⁾、柳 靖雄¹⁾、玉置泰裕¹⁾、新家 眞¹⁾、古川貴久²⁾

(¹⁾ 東京大、²⁾ 大阪バイオサイエンス研究所)

研究要旨 ノックアウトマウスを用いた研究は、生体内における分子機能の解明に重要な役割を担っている。しかしながら、目的の遺伝子を全身で欠失させたことにより胎性致死を引き起こし、分子の機能が明らかにできないこともしばしば経験する。最近、これらの問題を回避するため、Cre-loxP system を用いて組織特異的に遺伝子を欠失させたコンディショナルノックアウトマウスが作製されるようになった。本研究でわれわれは、成体における網膜色素上皮細胞 (RPE) 特異的に Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスを作製した。これにより、成体マウスの RPE における目的遺伝子の分子機能の解明に役立つと考えられた。

A. 研究目的

ノックアウトマウスを用いた研究は、in vivo における分子機能の解明に重要な役割を担っているが、胎性致死にいたるようなノックアウトマウスでは、本来調べたい組織における機能が十分に見ることができないという難点がある。そこで、Cre-loxP system を用いたコンディショナルノックアウトマウスが組織に固有の分子機能のみをみる際に作製されるようになった。バクテリオファージ由来の相同組み換え酵素である Cre recombinase は、34bp の特異的配列である loxP 配列を認識する。あらかじめゲノム上の目的の遺伝子の前後に loxP 配列を導入した場合、Cre recombinase の存在下で、2 箇所の loxP 配列の間を欠失させることが可能となる。ゲノムに 2 箇所の loxP 配列を導入したマウスを flox マウスと呼び、

様々な遺伝子について組織特異的な役割を解明するため flox マウスが作製されている。

一方で Cre recombinase がどの細胞で発現しているかは、Cre を組織特異的に発現するトランスジェニックマウスの作製によって決定される。Cre recombinase の配列の上流に組織特異的な発現誘導ができるようなプロモーターをおくことにより、Cre の発現をコントロールすることが可能になる。今回われわれは、成体の網膜色素上皮細胞 (RPE) 特異的に Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスを作製する目的で、RPE65 遺伝子のプロモーターを使用した。このプロモーター領域の下流に Cre をつなげた DNA 配列を受精卵にインジェクションし、成体 RPE 特異的に Cre を発現するトランスジェニックマウスを作製した。

本研究により、これまで成体期 RPE における機能が明らかにできなかった分子についても機能解析を行うことが可能になると考えられた。

B. 研究方法

Cre recombinase の上流に使用するプロモーター領域として、RPE に特異的に発現する遺伝子 RPE65 のプロモーターに着目した。RPE65 の発現パターンを生後 3 日、10 日、21 日のマウス RPE を用いて RT-PCR をおこなった。この結果、RPE65 は既に報告されているように生後 21 日目で強い発現を認めたが、生後 3 日目、10 日目ではほとんど発現がみられなかった。したがって、RPE65 遺伝子の発現を再現するためにこのプロモーターを使用し、Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスを作製する方法が適切であると考えられた。さらにわれわれは、プロモーターの転写誘導活性を確認するため、既報の通り、マウス RPE65 遺伝子の発現に重要と考えられる転写開始点の上流 700bp の領域を PCR 法を用いてサブクローニングした。このプロモーター領域の下流にルシフェラーゼをつないだベクターを作製し、ルシフェラーゼアッセイをおこなった。比較対象として、RPE 特異的に発現することが知られているヒト VMD2 遺伝子のプロモーター領域 500bp をルシフェラーゼの上流に用いたベクターも作製した。両者の転写誘導活性を網膜視細胞の cell line である 661W 細胞、ヒト RPE の cell line である ARPE19 細胞、D407 細胞でそれぞれ比較検討した。

さらに、RPE での組織特異性が確認できたマウス RPE65 遺伝子のプロモーター領域の

下流に Cre recombinase をつないだ DNA 配列を作製した。これを B6/C3 F1 マウスの受精卵に遺伝子導入することでトランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックマウスの判定には tail DNA をもちいた PCR をおこなった。

得られたトランスジェニックマウスの系統の中で、実際に RPE で Cre recombinase を発現している系統を見出すために、各々の系統の成体 RPE から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。さらに Cre を RPE で発現している系統の中でより組織特異性の高いものを調べるため、抗 Cre 抗体を用いた生後 21 日目の網膜切片の免疫染色を行った。

C. 研究結果

ルシフェラーゼアッセイでは、マウス RPE65 の 700bp プロモーター領域はヒト VMD2 のプロモーターと比較して、より RPE の cell line (ARPE19 細胞、D407 細胞) における転写誘導活性が高いことが明らかとなった (図 1)。網膜視細胞の cell line である 661W 細胞では、どちらのプロモーター領域も非特異的な転写誘導活性は認めなかった。したがって、マウス RPE65 の 700bp プロモーター領域は、本研究における成体マウスの RPE で Cre recombinase を発現するのに適したプロモーターであると考えられた。

RPE65 遺伝子のプロモーター領域の下流に Cre recombinase をつないだ DNA 配列を作製し、受精卵にインジェクションすることで、トランスジェニックマウスを作製した。少なくとも tail DNA を用いた PCR 法で 5 系統のトランスジェニックマウスが存在することが確認できた。これら 5 系統のマウスの成体 RPE の RNA を各々採取し、RT-PCR に

て Cre recombinase が実際に発現しているものを調べた所、3 系統については、Cre が発現していた。さらに、RPE に特異的な発現がみられるかを、成体網膜切片を用いた免疫染色にて確認した。この結果、2 系統で RPE 特異的に Cre recombinase が発現していることを見出した (図 2)。

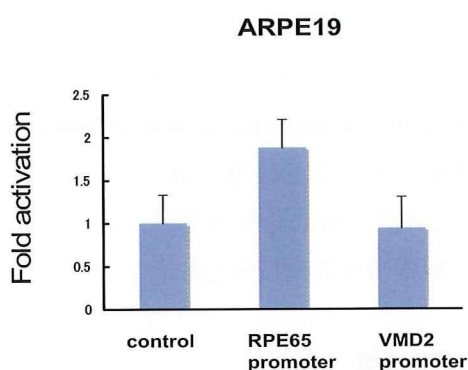


図 1

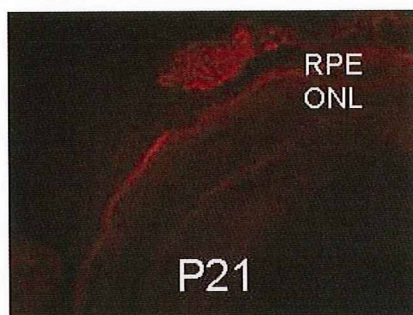


図 2

D. 考察

これまでに、既にいくつかの RPE 特異的に Cre recombinase を発現するマウスが報告されている。Mori 等によって報告された TRP1 遺伝子のプロモーターを用いたものは胎生 12 日目から RPE に Cre が発現しており、また間脳など他の組織にも発現がみられるものであった。また、VMD2 のプロモーター領域を用いた Cre 発現マウスは、RPE にお

ける組織特異性はあり、tet on system を用いてテトラサイクリンを投与することで時間的かつ空間的に Cre recombinase の発現をコントロールできる反面、2 つのトランスジェニックマウスの掛けあわせが必要となるため、やや使用が複雑なものであった。今回の我々の作製した Cre トランスジェニックマウスは、特に成体の RPE での発現がみられるものであり、成体期の RPE において目的の遺伝子を欠失させたい場合、より有利であり、掛けあわせの際も簡便なものといえる。

ルシフェラーゼアッセイの結果、RPE65 遺伝子と VMD2 遺伝子のそれぞれのプロモーターにおいて特に ARPE19 細胞では明らかに RPE65 プロモーターのほうが転写誘導活性が高かった。VMD2 プロモーターも RPE 特異的な発現を誘導するのに適したものであることが既に報告されているが、今回比較のために使用した 500bp は以前報告されている Cre を誘導するために用いたプロモーターが 2,900bp であったことを考慮すると、少し短かった可能性が考えられる。いずれにしても、既報の長さのプロモーター領域を使用したとしても、VMD2 の発現が胎生期の RPE で既に認められることから、成体になってから遺伝子を欠失させる目的は満たせないで、RPE65 の 700bp のプロモーターを使用することが最適と考えられた。

本研究にて作製した Cre 発現マウスは、成体マウスの RPE における目的遺伝子の機能解析に役立つものであると考えられた。

E. 結論

成体の RPE において特異的に Cre recombinase を発現するトランスジェニック

クマウスを作製した。目的の遺伝子の flox マウスと掛けあわせる事で、成体 RPE における新たな機能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

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

I. 参考文献

1. Mori M et al: Site-specific somatic mutagenesis in the retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 43(5): 1384-1388, 2002.
2. Le YZ et al: Inducible expression of cre recombinase in the retinal pigmented epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 49(3): 1248-1253, 2008.
3. Ueki Y: Expression of Cre recombinase in retinal Müller cells. Vision Res 49(6): 615-621, 2009.

42. 脳回転状脈絡網膜萎縮症の網膜色素上皮細胞における

アルギナーゼ II の役割

大中誠之^{1) 2)}、芦高恵美子²⁾、金子志帆¹⁾、安藤 彰¹⁾、伊藤誠二²⁾、高橋寛二¹⁾

(¹⁾ 関西医大、²⁾ 関西医大医化学)

研究要旨 脳回転状脈絡網膜萎縮症(Gyrate atrophy of the choroid and retina:GA)は、網脈絡膜変性による進行性の視野欠損を特徴とする遺伝性疾患で、ミトコンドリア内のオルニチンアミノ基転移酵素(OAT)遺伝子変異が原因で高オルニチン血症をきたす(参考文献1)。OAT 遺伝子欠損マウスでは、網膜色素上皮(RPE)細胞が最初に傷害されることが報告されており(参考文献2)、その病態に高オルニチンあるいは低プロリン状態が関係することが示唆されているが、傷害機序は不明である。これまでに我々は、ヒト培養 RPE 細胞に OAT の特異的阻害剤である 5-フルオロメチルオルニチン(5-FMO)とオルニチンを添加することで細胞傷害を起こす *in vitro* の GA モデルを確立した(参考文献3)。GA モデルにおけるマイクロアレイ解析から、ミトコンドリアでアルギニンを基質としてオルニチンの産生を触媒するアルギナーゼ(ARG) II の発現上昇を認めたことから、細胞傷害への ARGII の関与を明らかにすることを目的として解析を行った。ARGII は、オルニチンの濃度と作用時間に依存して発現が上昇し、siRNA による発現抑制により GA モデルでの細胞傷害を増強した。さらに、細胞傷害はアルギニンの添加によっても増強した。また、一酸化窒素(NO)はアルギニンを基質として NO 合成酵素(NOS)によって合成されることから、GA モデルにおける細胞傷害と NO の関与について解析を行った。その結果、NO ドナーの濃度と作用時間に依存して細胞傷害が認められた。また GA モデルにおいて、経時的な誘導型 NOS(iNOS)の発現誘導と NO 産生の上昇が認められ、さらにこの NO 産生は、ARGII の発現抑制でより上昇した。これらの結果から、GA 発症に伴う細胞内オルニチンの増加が、ARGII の発現を誘導し、細胞内アルギニンの低下と NO 産生の抑制を介して細胞保護に作用することが示唆された。

A. 研究目的

脳回転状脈絡網膜萎縮症(GA)は、オルニチンアミノ基転移酵素(OAT)遺伝子変異が原因で高オルニチン血症をきたす。OAT 遺伝子欠損マウスでは、網膜色素上皮(RPE)細胞が最初に傷害されることが報告されているが、傷害機序は不明である。これまでに我々

は、ヒト培養 RPE 細胞に OAT の特異的阻害剤である 5-フルオロメチルオルニチン(5-FMO)とオルニチンを添加することで細胞傷害を起こす *in vitro* の GA モデルを確立した。GA モデルにおけるマイクロアレイ解析から、ミトコンドリアでアルギニンを基質としてオルニチンを産生するアルギナ