

された。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### H. 参考文献

1. Teper SJ, Nowinska A, Pilat J, et al : Involvement of genetic factors in the response to a variable-dosing ranibizumab treatment regimen for age-related macular degeneration. *Molecular Vision* 16:2598-2604, 2010.
2. Kloeckener-Gruissem B, Barthelmes D, Labs S, et al : Genetic association with response to intravitreal ranibizumab in patients with neovascular AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:4694-4702, 2011.
3. 鈴木美砂、佐々木真理子、厚東隆志、他：加齢黄斑変性に対するラニビズマブ治療における無効症例の検討. 第 65 回日本臨床眼科学会、東京、2011
4. 石川恵理、上甲武志、別所建一郎、他：滲出型加齢黄斑変性に対するラニビズマブ単独療法における反応不良例の検討. 第 50 回日本網膜硝子体学会、東京、2011.

## 36. 加齢黄斑変性におけるラニビズマブ硝子体内投与の

### 治療効果と硝子体網膜癒着との関連

野村陽子、藤村茂人、高橋秀徳、小畑 亮、柳 靖雄  
(東京大)

**研究要旨** 本邦の滲出型加齢黄斑変性 (AMD) 症例における硝子体網膜癒着 (VMA) のラニビズマブ硝子体内投与 (IVR) の治療効果への関与を明らかにするため、東大病院眼科外来、さいたま赤十字病院眼科、東京厚生年金病院眼科を受診した 97 例 97 眼を対象とし、VMA の有無と治療経過を比較検討した。VMA(-)群では IVR により 1 ヶ月時より視力改善効果を認め、12 ヶ月まで維持されたが、VMA(+群では視力改善効果を認めなかった。中心窩網膜厚 (CRT) は VMA(-)群では 1 ヶ月時より有意に減少し、12 ヶ月時まで維持されたが、VMA(+群では一旦減少するものの 12 ヶ月時には治療前と差がなくなった。典型的 AMD と PCV においてサブグループ解析を行うと、典型的 AMD では全体での解析と同様に VMA(+群では視力改善が得られなかったが、PCV では VMA(+群でも視力改善傾向を示した。AMD において VMA が存在すると IVR による視力改善が得られにくく、その関与は PCV と比較して典型的 AMD でより明らかであった。

#### A. 研究目的

近年、AMD では後部硝子体剥離 (PVD) の頻度が低く、VMA の頻度が高いと報告されている<sup>1-3</sup>。我々も本邦の AMD において典型的 AMD では海外での報告と同様に PVD が少なく、かつ VMA が存在すると病巣径が大きい、一方、PCV においては PVD や VMA の頻度はコントロールと比較して差がないことをこれまで示してきた<sup>4</sup>。これらにより VMA が AMD の増悪因子の一つである可能性が考えられているが、本邦の AMD 症例での VMA と治療成績との関連に関する報告は存在しないため、本研究は本邦の AMD における VMA の IVR 治療成績への関与を明らかとすることを目的とした。

#### B. 研究方法

東大病院眼科外来、さいたま赤十字病院眼科、

東京厚生年金病院眼科を受診した 97 例 97 眼 (男性 65 名、女性 32 名、平均年齢 73.3 歳) を対象とした。スペクトラルドメイン OCT (TOPCON 3DOCT-1000) を用いて初回治療前の VMA の頻度をレトロスペクティブに調べ、VMA の有無と IVR 投与における視力変化、中心窩網膜厚変化、総治療回数との関連を検討した。次に典型的 AMD と PCV とにわけて同様に検討した。

#### (倫理面への配慮)

東大倫理委員会の承認を得て行った。

#### C. 研究結果

VMA は 12 眼に認められた。logMAR 視力は VMA(-)群では初回治療前が 0.34 であり、1、3、6、12 ヶ月はそれぞれ 0.30、0.25、0.24、0.26 と治療前と比較してすべての時点で有意に改善

していた ( $p=0.011$ 、 $<.0001$ 、 $<.0001$ 、 $0.0012$ )。一方、VMA(+)群では治療前が  $0.60$  であったが、1、3、6、12 ヶ月時にはそれぞれ  $0.62$ 、 $0.63$ 、 $0.68$ 、 $0.62$  と治療前と比較して視力改善を認めなかった ( $p=0.79$ 、 $0.68$ 、 $0.63$ 、 $0.68$ 、 $0.62$ ) (図 1)。

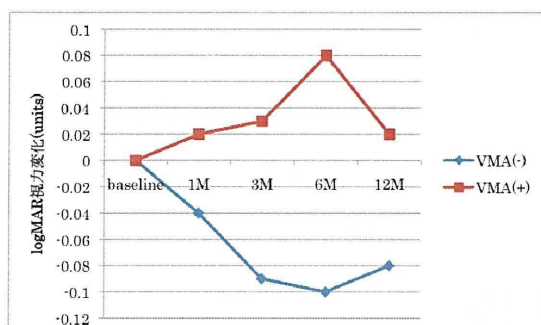


図1 logMAR 視力変化

中心窩網膜厚は VMA(-)群では治療前は  $335 \mu\text{m}$ 、12 ヶ月時に  $216 \mu\text{m}$  と有意に改善していたが ( $p=0.0001$ )、VMA(+)群ではそれぞれ  $460 \mu\text{m}$ 、 $441 \mu\text{m}$  と改善を認めなかった ( $p=0.66$ ) (図 2)。

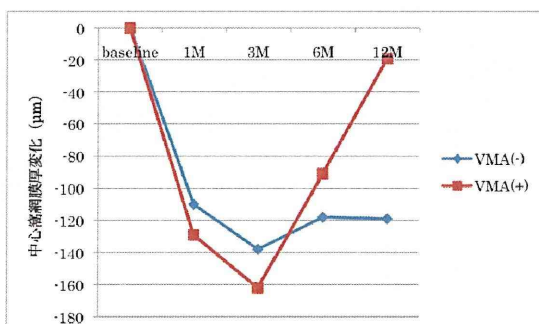


図2 中心窩網膜厚変化

典型的 AMD と PCV にわけて解析すると典型的 AMD では全体での解析と同様に VMA(+)群では視力改善を認めなかったが、PCV では VMA(+)群でも視力改善傾向を認めた。

## D. 考察

AMD において VMA が存在すると IVR における視力経過が不良であった。このことより AMD では VMA が病態に関与していると考えられた。AMD を典型的 AMD、PCV にわけて検討すると VMA の視力経過への関与は PCV と比較して典型的 AMD でより明らかであった。

## E. 結論

AMD では VMA が存在すると IVR における視力経過が不良である。その傾向は PCV と比較して典型的 AMD でより明らかであった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

野村陽子、他：加齢黄斑変性におけるラニビズマブ硝子体内投与の治療効果と硝子体網膜癒着との関連。50 回日本網膜硝子体学会総会、東京、2011。

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## H. 参考文献

1. Mojana F, et al: The role of abnormal vitreomacular adhesion in age-related macular degeneration: Spectral optical coherence tomography and surgical results. *Am J Ophthalmol* 146:218-227, 2008.
2. Krebs I, et al: Posterior vitreomacular adhesion: A potential risk factor for exudative age-related macular degeneration? *Am J Ophthalmol* 144:741-746, 2007.
3. Lee SJ, et al: Posterior vitreomacular

adhesion and risk of exudative age-related macular degeneration: paired eye study. *Am J Ophthalmol* 147:621-626, 2009.

4. Nomura Y, et al: Vitreomacular interface in typical exudative age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Ophthalmology* 118:853-859, 2011.

## 37. 加齢黄斑変性に対する

### HLA\*A 拘束性抗 VEGFR ワクチン療法の第 I 相臨床試験

辻川元一<sup>1)</sup>、沢 美喜<sup>1)</sup>、五味 文<sup>1)</sup>、大路正人<sup>2)</sup>、白神史雄<sup>3)</sup>、高橋寛二<sup>4)</sup>、西田幸二<sup>1)</sup>  
(大阪大<sup>1)</sup>、滋賀医大<sup>2)</sup>、香川大<sup>3)</sup>、関西医大<sup>4)</sup>)

**研究要旨** 我々は、難治性・進行性で視力予後不良な疾患である血管新生黄斑症を対象として、その実態調査、病態解明、治療法開発を目的とする。特に、世界的に見て新規の治療法である VEGFR に対する HLA 拘束性ペプチドワクチン療法の開発を行ってきた。

血管新生黄斑症は視力をつかさどる黄斑部に何らかの原因をもって新生血管が発生し、そこからの滲出性の変化も相まって、進行性に黄斑部の解剖学的棄損をもたらし、さらには不可逆性の視力低下を引き起こす疾患群である。加齢黄斑変性はその代表的疾患であり、近年の生活の欧米化に伴い、おもに高齢者の失明の主要な原因として増加し続けている。

今回我々は標準療法不応例の血管新生黄斑症を対象として VEGFR に対する HLA 拘束性ペプチドワクチン療法の医師指導型第 I 相臨床試験を行った。この結果より、この療法については安全性に問題となる所見を認めず、即効性はないものの従来療法無効例に対しては従来療法に比して効果も同等以上である可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

標準療法無効新生血管黄斑症に対する VEGFR を標的とした HLA-A 拘束性エピトープペプチドによる医師指導型第 I 相臨床試験をおこない、黄斑変性症に対する VEGFR に対する HLA 拘束性ペプチドワクチン療法の安全性、有効性を評価すること。

#### B. 研究方法

対象の患者は現在、新生血管黄斑症の標準治療である PDT もしくは抗 VEGF 薬の硝子体注が無効であったか、または、滲出性変化のある新生血管黄斑症であるが、患者意思により上記治療を選択しなかった者で、かつ、同意取得時の年齢が 40 歳以上 85 歳以下、かつ、

HLA-A\*201 もしくは HLA-A\*2402 を有することである。方法は、ペプチドそれぞれを 1mg づつをそれぞれ不完全フロイントアジュバント 1mL と混合し、患者腋下またはソケイ部の皮下に投与した。ペプチド製剤はエピトープペプチド (VEGFR1 および 2 由来) の混合ペプチドを用いる。投与間隔は 1 週間ごとにおこなった。4 週間ごとに、明らかな病状の悪化が認められなかった場合、投与を継続した。投与が行われたものにたいして安全性の評価、免疫学的評価を、2 年間の継続観察がされたものに対して臨床的有効性の評価をおこなった。同意書取得後に HLA 不適合のためワクチン投与に入らなかった群を対照として視力の変化を統計学的に検討した。

### (倫理面への配慮)

本研究は大阪大学医学部倫理委員会の審査を経て承認を受け行っている。

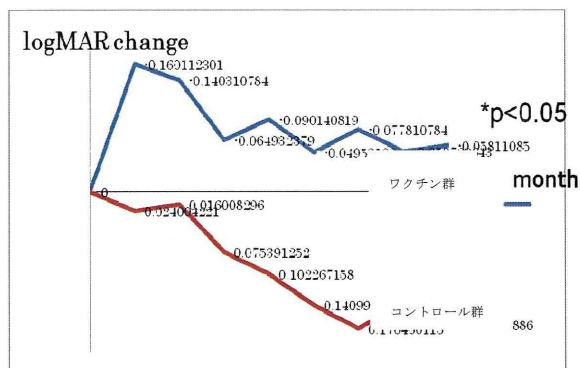
### C. 研究結果

\*A24-02 に関しては 9 名\*A02-01 に関しては 7 名が3か月の投与を終了した。年齢平均 71.8 歳。男性 11 例 女性 5 例であった。これらの症例において安全性を検討した。このうち、希望により 12 例に対して希望により加療を続け 2 年間の経過を追えたため個の群にて有効性を判定した(後述)。

安全性に関して、現在まで安全性を疑わせる重篤な問題は生じていない。

全身副作用として投与後の頭痛が一例(A\*0201)存在したが、2か月で自然消失した。局所副作用として投与部(腋下)の発赤、硬結が 81%(13/16)に認められたが、潰瘍形成にいたったは 2 例のみであった(A\*0201)。

OCT の所見上、滲出性変化が改善したと思われる症例は 3 例。LogMAR 視力の変化は HLA ミスタイプによりワクチン投与ができなかった 8



例9眼に比して、ワクチン投与群において有意に良好であった( $p < 0.05$ ; 上図)。

### D. 考察

我々は従来療法無効例の加齢黄斑変性に対し、HLA\*A 拘束性抗 VEGFR ワクチン療法の

第 I 相試験を行った。主要評価項目の安全性については問題なく、有効性についてもある程度示されたが、一方、この療法は理論的裏付けからも即効性はなく、この点には改良の余地があるものと考えられた。

### E. 結論

HLA\*A 拘束性抗 VEGFR ワクチン療法は加齢黄斑変性に対する新規治療として安全であり、即効性はないものの従来療法に比して効果も同等以上である可能性が示唆された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

- 辻川元一、沢美喜、五味文、大路正人、白神史雄、高橋寛二、西田幸二:加齢凹版変性に対する HLA\*A 拘束性抗 VEGFR ワクチン療法. 第 65 回日本臨床眼科学会、東京、2012.
- Tsujikawa M, Sawa M, Ikuno Y, Gomi F, Nishida K, Yoshida K, Tsunoda T, Nakamura Y: Phase I trial of anti-VEGFR vaccine therapy for neovascular maculopathy. American Academy of Ophthalmology annual meeting, Florida, 2011.
- Tsujikawa M: Phase I trial of anti-VEGFR vaccine therapy for neovascular maculopathy. 2011 Hong-Kong International Ophthalmology Symposium (招聘講演)、香港、2011.

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 38. 網膜色素変性患者の臨床所見の特徴

池田康博、吉田倫子、納富昭司、久富智朗、宮崎勝徳、石橋達朗  
(九州大)

**研究要旨** 九州大学病院(当院)を受診した網膜色素変性(RP)患者の臨床所見を後ろ向きに調査し、RP患者の臨床的特徴について検討した。対象は、平成20年4月から平成22年3月までの間に当院を受診したRP患者463例(男性199例、女性264例)。平均年齢は52.6歳。検討項目は、患者背景(遺伝形式、障害者手帳の有無、全身合併症)、視力、視野検査(ゴールドマン視野)、細隙灯検査所見、眼底検査所見。当院におけるRP患者の臨床所見は概ね既報と同様の結果であったが、硝子体嚢胞を高頻度に合併することが明らかとなった。また、RP患者では前部硝子体中の細胞が増加しており、眼内に慢性的な炎症が生じていることが示唆された。

### A. 研究目的

九州大学病院(当院)を受診した網膜色素変性(RP)患者の臨床所見を後ろ向きに調査し、RP患者の臨床的特徴について検討した。

### B. 研究方法

対象は、平成20年4月から平成22年3月までの間に当院を受診したRP患者463例(男性199例、女性264例)。平均年齢は52.6歳。それぞれの患者背景(遺伝形式、障害者手帳の有無、全身合併症)、視力、視野検査(ゴールドマン視野)、細隙灯検査所見、眼底検査所見について後ろ向きに検討した。

#### (倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言を遵守し、検討を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 患者背景

遺伝形式を調査できた329例において、孤発が188例(57.1%)と最も多く、常染色体優性遺伝64例(19.5%)、常染色体劣性遺伝75例(22.8%)、伴性劣性遺伝2例(0.6%)であった。

身体障害者手帳2級以上を有する患者が、305例中136例(44.6%)。全身合併症として、Usher症候群15例、ムコ多糖代謝異常症2例、Laurence-Moon-Biedl症候群1例を認めた。

#### 2. 視力(図1)

小数視力別の割合と年齢別視力について検討した。視力0.1以下の割合が全体の20%以上を占め、年齢とともに視力が低下し、60歳以上の平均視力は0.1以下であることが明らかとなった。

#### 3. 視野検査(図2)

ゴールドマン視野検査を年齢別に検討した結果、40歳以上の40%以上の眼にV/4指標で10°以内の求心性狭窄、または中心視野欠損を認めた。

#### 4. 細隙灯検査

白内障は213例394眼(42.7%)に認められた。また、眼内レンズ挿入眼を137例238眼(25.8%)、人工的無水晶体眼を5例8眼(0.9%)に認めた。また、スリット光1x9mm中で観察される前部硝子体中の細胞数をカウントし、Boldreyらの方法に一部変更を加えて以下の

格付けを行った(文献1)。0個=「-」、1-4個=「±」、5-9個=「1+」、10-30個=「2+」、31-100個=「3+」、無数=「4+」。検討できた509眼のうち、1以上の炎症細胞を100例190眼(37.3%)に認めた。さらに、低年齢層において細胞数が多い症例が多い傾向にあり、前部硝子体中の細胞数が多い症例では、視機能が低下している傾向にあった。

### 5. 眼底検査

星状硝子体症を12例15眼(1.6%)に認め、硝子体嚢胞を25例34眼(3.7%)に認めた。また、黄斑部合併症として、黄斑上膜を136例233眼(25.2%)に、嚢胞様黄斑浮腫を55例82眼(8.9%)に認めた。

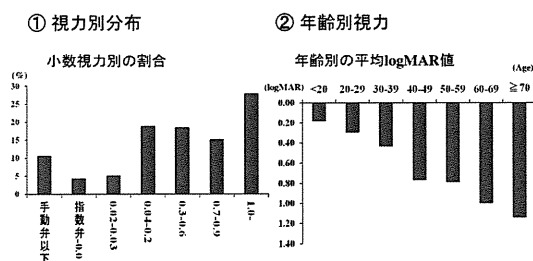


図1 視力の分布

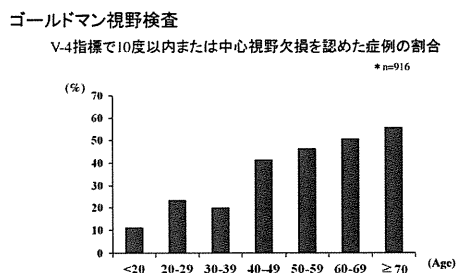


図2 ゴールドマン視野検査の年齢別分布

### D.E. 考察・結論

当院におけるRP患者の臨床所見は概ね既報

(文献2)と同様の結果であったが、硝子体嚢胞を高頻度に合併することが明らかとなった。また、RP患者では前部硝子体中の細胞が増加しており、眼内に慢性的な炎症が生じていることが示唆された。さらに、硝子体中に炎症性サイトカインが増加していることから(文献3)、慢性的に生じている炎症がRPの病態を修飾している可能性があると考えられた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

- 吉田倫子、池田康博、他:網膜色素変性における慢性炎症の病態への関与. 第115回日本眼科学会総会、東京、2011.
- 吉田倫子、池田康博、他:網膜色素変性における前部硝子体炎症の病態への関与. 第65回日本臨床眼科学会、東京、2011.
- 吉田倫子、池田康博、他:網膜色素変性患者の臨床所見の特徴. 第50回日本網膜硝子体学会、東京、2011.

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

### H. 参考文献

- Boldrey EE: Vitreous cells as an indicator of retinal tears in asymptomatic or not recently symptomatic eyes. *Am J Ophthalmol* 123: 263-264, 1997.
- Hayakawa M, et al: A multicenter study of typical retinitis pigmentosa in Japan. *Jpn J Ophthalmol* 37, 156-164, 1993.



## 39. 多施設からの網膜変性疾患試料収集

### および遺伝子診断システムの構築

石上智愛<sup>1)</sup>、和田裕子<sup>3)</sup>、亀岡洋祐<sup>4)</sup>、岩田 岳<sup>5)</sup>、万代道子<sup>1)2)</sup>、高橋政代<sup>1)2)</sup>  
(<sup>1)</sup>理化学研究所、<sup>2)</sup>神戸市立医療センター中央市民病院、<sup>3)</sup>わだゆうこ眼科クリニック、  
<sup>4)</sup>医薬基盤研究所、<sup>5)</sup>東京医療センター臨床研究センター)

**研究要旨** 網膜変性疾患の原因遺伝子同定は遺伝形式決定や疾患の鑑別に有用であり、患者は遺伝子治療や再生治療の可能性が広がる。そこで、われわれは全国から患者試料を収集し網羅的解析を行う検査施設の一つを目指し、遺伝子診断システムの構築に取り組んできた。しかし研究の一環として遺伝子診断を行うのでは、研究終了後に遺伝子診断サービスを継続させることができない。そこで、NPO 法人オーファンネット・ジャパン(Orphan Net Japan:ONJ)を介して、検査に伴う費用を依頼者から徴収することで、全国の医療機関に継続可能な遺伝子検査サービスを提供することが可能になった。

#### A. 研究目的

医薬基盤研究所難病研究資源バンクを利用して網膜変性疾患患者の試料と情報を収集し、遺伝子診断を行うシステムを構築した。遺伝子診断体制が整いつつある中、次の課題としてこれを継続させる方法を考える必要がある。この稀少疾患の遺伝子診断を提供する研究室が共通に抱える問題を解決すべく設立されたONJ に遺伝子検査を登録することで、継続可能な遺伝子診断サービスを提供する。

#### B. 研究方法

網膜色素変性(常染色体優性遺伝、X連鎖劣性遺伝)、クリスタリン網膜炎、小口病、眼底白点症、白点状網膜炎、若年網膜分離症を対象とする遺伝子検査と、*PRPH2*遺伝子、*RHO*遺伝子、*ABCA4*遺伝子を対象とする単独遺伝子検査を提供する。検査方法はDHPLC法と直

接シーケンシング法を用いて各原因遺伝子のコーディング領域の配列解析を行う。さらに検出した塩基変化についてデータベースの検索を行い、既知変異か新規変異かを判別する。新規変異のうち、SNPについてはin silico解析を行い病的変化の可能性を判定した上で、依頼者に報告する。

#### (倫理面への配慮)

各施設の倫理委員会に計画書を提出し承認された。計画は厚労省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」にのっとり、患者からのインフォームドコンセントを得て採血した。個人情報 は連結可能匿名化して厳重に管理している。

#### C. 研究結果

ONJ による遺伝子検査の結果は依頼者に帰属する。依頼者の許可を得ているものは遺伝

子変異データベースに登録する。

#### **D. 考察**

ONJは検査受託、検体搬送、費用支払いに伴う手続きを代行するため、全国の患者を対象に円滑で継続可能な遺伝子検査サービスを提供することが可能になる。

#### **E. 結論**

有償の検査で変異が見つからなかった場合は、難病研究資源バンクを介して研究のための試料収集を行い、未知の原因遺伝子探索や新たに報告された遺伝子の解析を行う。

#### **F. 研究発表**

なし

#### **G. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

## 40. 網膜色素変性患者におけるハンフリー10-2 視野のセクター解析

荻野 顕、大谷篤史、大石明生、中川聡子、牧山由希子、小嶋洋史、  
栗本雅史、吉村長久  
(京都大)

**研究要旨** 網膜色素変性症患者の治療効果を判定する上で視野変化は重要な評価項目である。ハンフリー視野検査は静的視野検査の代表的なものであるが、プロトコルがいくつかあり、どのサイズのプロトコルが適切かは定まっていない。今回我々は網膜色素変性症の視野が求心性に狭窄していくことから、今までに行った 10-2 視野検査結果を同心円状に区切って解析を行った。重症例では中心 4 点のみを評価するとばらつきが少ないという結果であったが、軽症例では 10° 全体を評価した方が良かった。重症度によって、適切な視野検査のサイズが異なることが示唆された。重症度は IS/OS ラインの残存する長さで評価を行った。

### A. 研究目的

網膜色素変性症における視野狭窄の進行をとらえるために、適切な視野検査プロトコルを推測する。

ンフリー視野検査を行った患者を対象に、カルテを後ろ向きに検討したものであり、京都大学医学部附属病院、医の倫理委員会の承認を得ている。

### B. 研究方法

2003 年 1 月から 2010 年 12 月までに京大病院眼科でハンフリー 10-2 SITA standard を 3.5 年以上かつ 5 回以上(最初の 1 回を除く) 検査できた定型的網膜色素変性患者 19 例を対象とする。固視不良 20%以上、偽陽性、偽陰性 33%以上の症例は除外。片眼のみの解析とし、両眼が該当する場合は視力の良い眼を選択する。10-2 データの実測値を図 1 のようにセクターに分け、同心円状セクター、環状セクターの 2通りについて解析した。セクターごとに実測値の平均値を求め、それを縦軸にとり、経過年数を横軸にとり、直線回帰を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究は網膜変性疾患の経過観察目的にハ

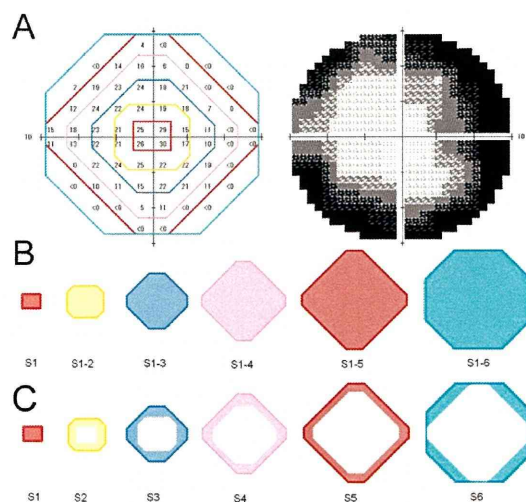


図 1 A.ハンフリー実測値とグレースケール、B.同心円状セクター、C.環状セクター

### C. 研究結果

同心円状セクターにおいて 19 眼中 10 眼で R2

が S1 で最も大きかった。環状セクターにおいても 19 眼中 7 眼で S1 の回帰線の傾きが大きかった。しかし、図 2 で示すように分布は二峰性となっており、全体もしくは外側のセクターを観察した方が R2 および傾きが大きい症例も認められた。

そこで、症例を 2 群に分け、特徴を調べたところ、内側のセクターで R2、傾きが大きい症例は外側で R2、傾きが大きい症例よりも残存する IS/OS ラインの長さが大きいことがわかった。

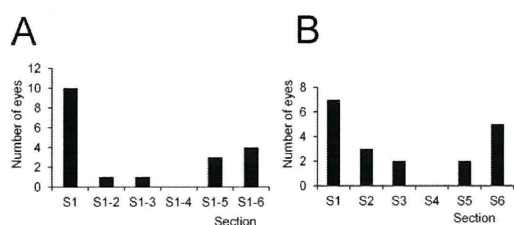


図 2 A.R2 の最大値をとるセクターの分布(同心円状セクター)と B.傾きの最大値をとるセクターの分布(環状セクター)

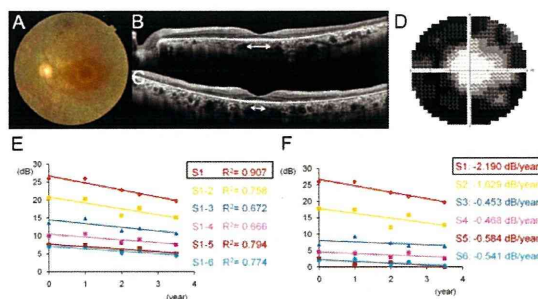


図 3 S1 で R2、傾きが大きい症例

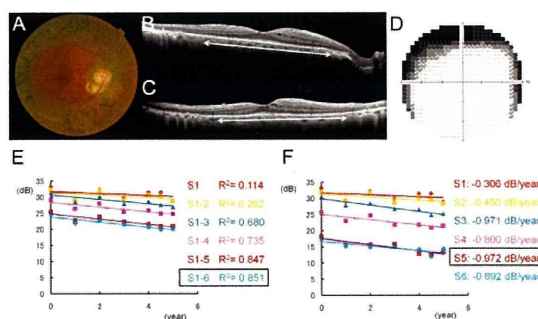


図 4 S1-6 で R2、S5 で傾きが大きい症例

## D. 考察

今回の検討では、比較的高齢で進行例を主に対象としていることが影響していると考えられるが、10° の中でも、特に中心 4 点の平均値を観察すると検査のばらつきが小さく、進行をとらえやすいという結果であった。しかし、10° 全体で観察した方が適切と考えられる症例も認めた。IS/OS ラインの長さを比較してみると、10° 全体を観察した方が良い症例の方が長かった。

つまり、残存する網膜外層構造の違い(網膜色素変性の重症度)により、適切な視野検査サイズは異なることが示唆された。中心 10° の視野検査は網膜色素変性症の多くの患者で有効であり、特に進行した症例では 10° の中でも中心 4 点が良い指標となる可能性があるが、一方で若年者などの軽症例では 30° やそれ以上の範囲を対象とした視野検査が適している場合もあると考えられる。

## E. 結論

網膜色素変性症の視野進行をとらえやすい視野検査プロトコールは、病期により異なる可能性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

投稿中

### 2. 学会発表

荻野 頭、他:網膜色素変性患者におけるハンフリー10-2 視野セクター解析.TEAM2011、東京、2011.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### H. 参考文献

1. Hirakawa H, et al: Progression of defects in the central 10-degree visual field of patients with retinitis pigmentosa and choroideremia. *Am J Ophthalmol* 127:436-442, 1999.
2. Rangaswamy NV, et al: A comparison of visual field sensitivity to photoreceptor thickness in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:4213-4219, 2010.

## 41. 網膜色素変性症に対する

### 血管内皮前駆細胞の機能解析に関する研究

福田慎一<sup>1)</sup>、長野真澄<sup>2)</sup>、山下年晴<sup>2)</sup>、大根田修<sup>2)</sup>、大鹿哲郎<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>筑波大、<sup>2)</sup>筑波大・再生幹細胞生物学)

**研究要旨** 網膜色素変性症は、日本において中途失明の三大原因の一つであり、杆体細胞が主に障害されると同時に、網膜血管の委縮も徐々に進行していく。網膜血管の萎縮を抑制し血流を保護する事による神経保護を目的とし、我々は Aldehyde dehydrogenase (ALDH)活性を指標とし、機能性の高い EPC の分離を試み、ALDH 活性の低い EPC(Alde-Low EPC)において網膜色素変性モデルマウスへ投与したところ、血管委縮および神経変性に対して抑制的に作用することが明らかとなった。組織学的解析により Alde-Low EPC を投与した網膜には大量のマクロファージが遊走してくる事が明らかとなった。機能性の高い Alde-Low EPCs は単球遊走因子である CCL2 を高発現しており、CCL2 およびマクロファージの関与を検討するために EPCs の CCL2 の発現を低下、又は CCL2 を過剰発現させ血管・神経保護効果を検討した。同時にマクロファージの機能を低下させるために Liposome を用い血管・神経保護作用に対する関与について検討した。

#### A. 研究目的

機能性の高い血管内皮前駆細胞(Alde-Low EPC)を用いて、神経変性疾患であるとともに血管委縮性疾患でもある網膜色素変性モデルマウスへ投与し、血管・神経保護作用について検討を行うとともに CCL2 およびマクロファージの関与を検討する事。

#### B. 研究方法

C3H 系マウスは Pde6b(rd1)に遺伝子点変異があり約 4 週で視細胞の消滅および網膜深層血管の委縮を認める。生後 6 日の C3H 系マウスをアバチン(0.9g トリプロモエタノール+625μl イソamilアルコール/50ml を 0.16-0.20ml/g 腹腔注射)にて全身麻酔。生後 6 日の C3H 系マウスはまだ開眼していないためスプリングハン

ドル剪刀にて切開、その後市販散瞳用点眼液ミドリンP(参天製薬)を一滴点眼し散瞳させた後、33G イトーマイクロシリンジにて Alde-Low および-High EPC、HUVEC、PBS、を硝子体内注射( $1 \sim 2 \times 10^5$ cells/0.5μl)。網膜下注射( $0.5 \sim 1 \times 10^5$ cells/0.2~0.3μl)を行った。生後 10 日、13 日、17 日、21 日に病理学的組織解析および免疫染色を用いてマウス網膜視細胞層、網膜深層血管評価を行った。培養した機能性の高い Alde-Low EPCs および機能性の低い Alde-High EPCs に対し関連因子の遺伝子発現を検討した。CCL2 およびマクロファージの関与を検討するために、機能性が高く CCL2 の発現が高い Alde-Low EPCs に対し shRNA を用いて CCL2 の発現を低下させた(CCL2 sh-Low)。一方、機能性が低く CCL2 の

発現が低い Alde-High EPCs に対し CCL2 を過剰発現させた(CCL2-High)。これらの細胞を rd1 マウスの硝子体内に投与後、視細胞層・網膜深層血管評価を行った。マクロファージの機能を低下させるために Liposome を用い Alde-Low EPCs と共に注入した。rd1 マウスの硝子体内に投与後、視細胞層・網膜深層血管評価を行った。

### C. 結果

CCL2 sh-Low 投与、Liposome+Alde-Low EPCs 投与群ではそれぞれ血管・神経保護作用は低下した。CCL2-High 投与では血管・神経保護作用が回復した。

### D. 考察

網膜色素変性症の治療法に関して、遺伝子治療、網膜移植、人工網膜などの研究が主として動物実験で行われている。そのうちのひとつとして造血幹細胞(HSC)が含まれている骨髄を網膜色素変性症のモデルマウスの硝子体に注入することにより視細胞の変性の一部をくい止める事が報告された。骨髄には造血幹細胞以外に、EPC が含まれており、EPC が網膜血管の委縮を抑制し、血流が保たれることにより神経保護因子の枯渇が抑制され視細胞の変性の一部をくい止めるのではないかと推測されている。

近年、狭心症・心筋梗塞・閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患に対して、骨髄・末梢血 EPC を用いた臨床応用が国内外で行われている。EPC には階層性があり、未分化で増殖能の高い EPC と、増殖能の低い EPC が混在していることが報告されている。増殖性の高い EPC を分離するのに有効なマーカーについて報告がなかったが、我々は Aldehyde dehydrogenase(ALDH)活性の低い EPC にお

いて細胞増殖能が高いことが明らかにした。昨年度、我々は活動性が高い Alde-Low EPC を硝子体内注射および網膜下注射することにより、血管委縮および神経変性に至る速さを抑制した。

一方活動性の低い Alde-High EPC は血管委縮および神経変性に至る速さを抑制しなかった。今回、Alde-Low EPCs は CCL2 を分泌し、マクロファージを遊走させる事により神経・血管保護効果を示した。

CCL2、別名 Monocyte chemoattractant Protein 1 (MCP1)は、CXC サブファミリーの一員であり網膜の炎症・障害・慢性的な病態において単球・マクロファージや好塩基球の遊走を引き起こす。これまで EPCs 自体 CCL2 を多く分泌していると報告されているが、その役割・機能については不明な点が多かった。近年、CCL2 自身が微弱な神経保護効果を持つ事が報告されているが、今回の我々の検討では、Liposome により神経・血管保護効果が消失した結果より、神経保護効果は直接 CCL2 自身ではなく遊走してきたマクロファージによるものと考えられる。

### E. 結論

活動性が高い Alde-Low EPC は網膜色素変性症における血管委縮および神経変性を遅らせる可能性があり、その神経血管保護に CCL2 の分泌およびマクロファージの遊走が関与している可能性が示唆された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

Fukuda S, et al: Kawana K, Yasuno Y, Oshika T: Endothelial progenitor cells from umbilical

cord blood rescued vessel and photoreceptor with retinal degeneration. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, 2011.

**G. 知的所有権の取得状況**

なし



## 42. 人工網膜用の多孔化電極の網膜機能画像による評価

不二門尚<sup>1)</sup>、神田寛行<sup>1)</sup>、森本 壮<sup>1)</sup>、三好智満<sup>2)</sup>、広原陽子<sup>3)</sup>、  
三橋俊文<sup>3)</sup>、瓶井資弘<sup>4)</sup>、西田幸二<sup>4)</sup>

(<sup>1)</sup>大阪大・感覚機能形成学、<sup>2)</sup>大阪大・統合生理学、<sup>3)</sup>(株)トプコン・研究開発センター、<sup>4)</sup>大阪大)

**研究要旨** 脈絡膜上-経網膜刺激(STS)方式の人工網膜の解像度向上のために、白金電極表面を電気化学的に多孔化処理することで、高い電荷注入能力を有する多孔化電極を開発した。この電極の機能評価の目的で Optical Imaging 眼底カメラを用いて網膜内の神経興奮の分布を計測した。ネコ眼球(n=7)に多孔化電極を埋植し、STS方式で通電を行った。Optical Imaging は刺激前後を含む計 26 秒間行った。同試行を合計 10 回繰り返して、画像を平均化し、刺激前後の画像の差分をとることで解析画像を取得した。電極の接触度合いを評価するために、眼底写真撮影とインピーダンスの測定を行った。その結果、多孔化電極での STS に対して、刺激部位近傍に限局した反応が得られた。反応の閾値は  $35 \mu\text{A} - 1.5\text{mA}$  で、組織学的評価および電極インピーダンス値から電極の接触度合いが強い時ほど閾値が低くなる傾向が見られた。多孔化電極は限局した網膜部位を刺激し、電極の接触状態コントロールすることで、刺激閾値を低減できることがわかった。

### A. 研究目的

人工網膜とは、網膜への電気刺激で生じる疑似光覚を利用して視覚を再建する医療機器である。将来の失明治療として期待されており、現在各国で研究開発が進められている。我々の研究グループでは 2001 年度より人工網膜の研究を開始し、独自の網膜刺激方式を開発した。これは脈絡膜上-経網膜刺激(STS)方式と呼ばれ、安全性が高く、広い視野が確保できる点が特長である。

さらに我々は STS 方式人工網膜の解像度を向上させるために新型の刺激電極(多孔化電極)を開発した。この電極は、白金電極表面が電気化学的に多孔化処理されており、高い注入電荷能力を有する。これにより、安全性を保ちつつ電極サイズを小さくすることが可能となった。

ただ STS 方式の人工網膜の刺激電極としてこの多孔化電極が有効に機能するかどうかまだ十分には検討されていない。そこで、多孔化電極で網膜を刺激した際に有効に神経活動を惹起可能か検証することを目的に実験を行った。

実験には Optical Imaging 眼底カメラを用いた。この装置は、網膜の内因性シグナルを光学的に捉えることで、網膜内神経活動の空間的・時間的特性を計測することが可能である。この装置を用いて網膜通電時の網膜内神経活動の分布を計測した。

### B. 研究方法

実験には成ネコ(n=7)を実験に用いた。実験中は pentobarbital sodium (1 mg/kg/hr) と pancuronium bromide (0.2 mg/kg/hr)の混合

液を静脈内に持続注入行うことで、動物の麻酔および不動化を行った。さらに酸素と笑気ガスの混合ガス(1:1)で人工呼吸を行った。

刺激電極には、直径 0.5 mm で高さ 0.3 mm の多孔化電極をパレン基盤上に 2 極配列された多極電極を用いた(図1)。電極間距離は 1.5mm だった。左眼球の後極部強膜に大きさ 5mm 角の強膜ポケットを作成し、多極電極を挿入して縫着した。術後に刺激電極-帰還電極間の電気インピーダンスを計測した。また一部の個体(7 例中 4 例)では、すべての実験終了後に眼球摘出を行い、電極設置部の網膜および強膜の組織学的検索を行った。

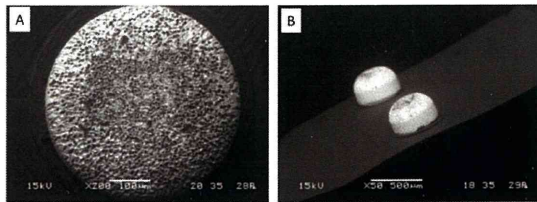


図1 多孔化電極の電顕写真

電気刺激には4秒間のパルス列を用いた。このパルス列は刺激頻度 20 Hz パルス幅 0.5 ms の cathodic-first biphasic pulses で構成した。電流強度は 30  $\mu$  A から最大 2000  $\mu$  A まで段階的に変化させた。

網膜内の神経活動は Optical Imaging 眼底カメラで計測した。このカメラは照明光に 800-880 nm の赤外光を用い、毎秒 40 回の眼底撮影を行う。撮影は通電前後を含む計 26 秒間連続的に行った。S/N 比を向上させるため、同試行を 75 秒間隔で合計 10 回繰り返し、眼底像を平均化した。さらに、通電前の基準眼底像と差分を行うことで反射率の変化を 2 次元的にとらえた。この反射率の変化は神経応答を反映していることが知られている(Okawa et al, IOVS 2007)。反応の大きさの評価を行うために、20

グレースケール値を超える反射率の変化が見られた各ピクセルに対して、反応の変化量で面積分を行った(Boxel scale value: BSV)。さらに一回の試行にて得られた BSV の最大値と刺激電流値と関係から刺激閾値を求めた。

### C. 研究結果

刺激を行うと電極設置部近傍に局限して反射率の変化が見られた。これは、刺激により局限した神経活動が生じたことを示す。(図2Bの矢印)

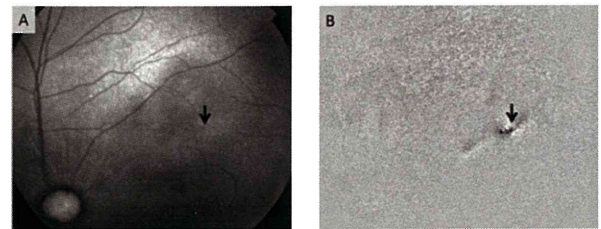


図2 STS時のOptical Imaging像

次に電極周囲 100 ピクセル角の領域について BSV を算出した。BSV は刺激開始後から 2 秒にかけて急激に増加し、刺激終了に伴い徐々に減少した。刺激電流の増加に伴い BSV の値も増加した(図3)。

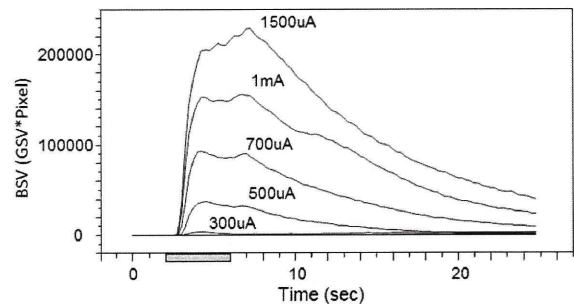


図3. 各刺激電流値における BSV の時間変化

刺激閾値の平均値は 370  $\mu$  A だった。この閾値は個体間でばらつきが大きく、最小が 35  $\mu$  A で最大が 1.5 mA だった(標準偏差 438  $\mu$  A)。

電極埋植部の組織切片から残存強膜厚を計測し(図4A)、閾値との関係を調べた(図4B)。その結果、強膜厚と閾値との間に正の強い相関を認めた( $R^2=0.854$ )。つまり、強膜厚が厚いほど閾値が増加する傾向が認められた。さらに電極のインピーダンスと閾値との関係を調べた。その結果、インピーダンスが高いほど閾値が低下する傾向が認められた(図5)。

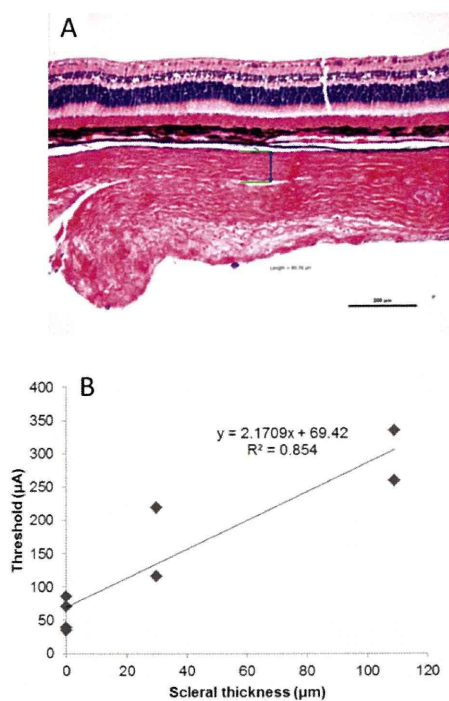


図4. 残存強膜厚と閾値の関係

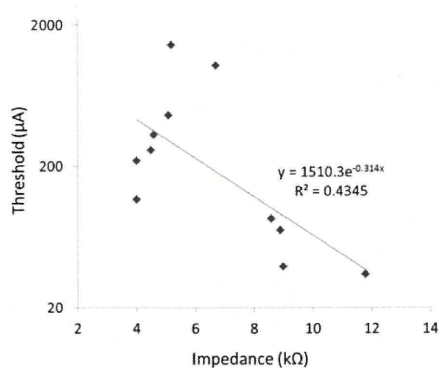


図5. インピーダンスと閾値の関係

#### D. 考察

開発した多孔化電極を使って STS 法で網膜に

電気刺激を与え、Optical Imaging で網膜内内因性シグナルを計測した。その結果、刺激部位に限局して反応が生じた。Optical imaging の反応は神経活動を反映していることが知られている。つまりこの結果は、多孔化電極で限局した神経活動を惹起可能であることを示している。神経活動の領域が狭いことは、人工網膜の解像度向上につながる。

刺激閾値にはばらつきがみられたが、これらは残存強膜厚が薄いほど低く、またインピーダンスが高いほど低くなる傾向が認められた。残存強膜厚が薄いほどより電極と網膜との距離が近くなる。また電極の接触状態が強くなるほどインピーダンスが高くなることが知られている。つまり、強膜ポケットを深く掘って電極と組織との接触状態を強くすることで閾値が軽減できることを示唆している。今回の実験の中でも電極の接触状態によっては  $100 \mu A$  以下で反応を惹起することができた。この値は刺激電流値の安全限界よりも一桁低く、また他の刺激方式の閾値と比べても遜色ない。

#### E. 結論

多孔化電極は限局した網膜部位を刺激し、電極の接触状態コントロールすることで、刺激閾値を低減できることがわかった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Morimoto T, et al: Chronic implantation of newly developed suprachoroidal-transretinal stimulation prosthesis in dogs. Invest Ophthalmol Vis Sci 52:6785-6792, 2011.

2. Fujikado T, et al: Testing of semichronically implanted retinal prosthesis by suprachoroidal-transretinal stimulation in

patients with retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci 527:4726-4733, 2011.

## 2. 学会発表

1. Fujikado T, et al : Feasibility of semi-chronically implanted retinal prosthesis by suprachoroidal-transretinal stimulation in patients with retinitis pigmentosa. ARVO, Fort Lauderdale, Florida, 2011.
2. Endo T, et al: Identification of electrodes in visual prosthesis using suprachoroidal-transretinal stimulation. ARVO, Fort Lauderdale, Florida, 2011.
3. Kanda H, et al: Evaluation of the safety of long-term suprachoroidal-transretinal stimulation. ARVO, Fort Lauderdale, Florida, 2011.
4. Sakaguchi H, et al: Surgical approach for semi-chronic implantation of retinal prosthesis by suprachoroidal-transretinal stimulation (STS) in patients with retinitis pigmentosa. ARVO, Fort Lauderdale, Florida, 2011.
5. 神田寛行、他: 脈絡膜上-経網膜刺激方式による長期通電の安全性評価. 第115回日本眼科学会、東京、2011.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし