

房水を採取した 19 眼を用いた。前房水は、 -80 度にて解析まで保存した。前房水内の VEGF_{165b} 濃度の測定は、サンドイッチ法 ELISA を用いて行った。また、AMD 症例では、疾患サブタイプ別、OCT にて測定した中心窩網膜厚 (CFT)、中心窩網膜下液 (SRF) と VEGF_{165b} 濃度との関係を検討した。

本研究は当院倫理委員会の承認を得た上で、患者からインフォームドコンセントを取得し行った。

C. 研究結果

検出限界値 (15.0pg/ml) 以上であったものは、AMD 群 57% (中央値 16.4pg/ml)、RVO 群 35% (中央値 <15.0pg/ml)、PDR 群 40% (中央値 <15.0pg/ml) であり、コントロール群 63% (中央値 20.6pg/ml) に比べて、AMD 群は有意差なし、RVO ($P=0.06$)、PDR ($P=0.18$) で前房水中 VEGF_{165b} 濃度は低い傾向にあった。AMD 群では、サブタイプ別、中心窩網膜厚、中心窩網膜下液と前房水 VEGF_{165b} 濃度との間に有意な関係は見られなかった。

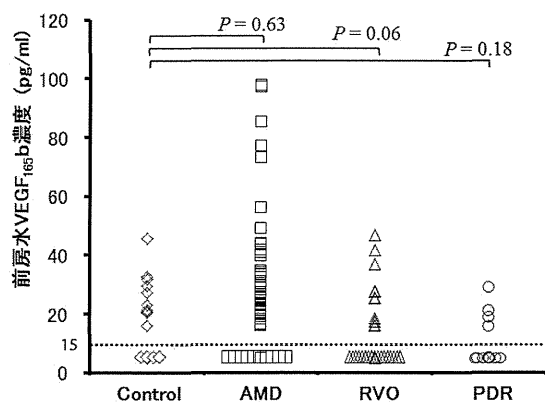


図 1 前房水中の VEGF_{165b} 濃度

D. 考察

前房水中 VEGF_{165b} 濃度は、AMD ではコントロールとほぼ同等、RVO、PDR ではコントロールよりも低い傾向があった。RVO、PDR では、眼内液の VEGF は増加していることが知られており、ここでいう VEGF は血管新生促進的に働くものであることから、血管新生抑制的 VEGF である VEGF_{165b} はこれらの疾患では相対的に低値となっていることがわかる。逆に、VEGF_{165b} を増加させることにより、内因性の血管新生抑制効果が期待でき、新規治療に結びつく可能性があると考えられる。

E. 結論

血管新生抑制的 isoform である VEGF_{165b} は RVO や PDR では低い傾向にあった。何らかの方法により、VEGF_{165b} 濃度を増加させることができれば眼内血管新生を原因とする眼底疾患の治療を行うことが可能となるかもしれない。

H. 参考文献

1. Bates DO, et al: VEGF_{165b}, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 62, 4123-4131, 2002.
2. Konopatskaya O, et al: VEGF_{165b}, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice. *Mol Vis* 12, 626-32, 2006.
3. Baba T, et al: VEGF_{165b} in the developing vasculatures of the fetal human eye. *Dev Dyn* 241, 595-607, 2012.

37. iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞シートの

移植用ハンドピースの開発と移植方法の検討

鎌尾浩行¹⁾²⁾、三田 修³⁾、原田宜久³⁾、桐生純一²⁾、高橋政代¹⁾

(¹⁾理化学研究所、²⁾川崎医大、³⁾株式会社ニデック)

研究要旨 日本における中途失明原因の上位に位置する加齢黄斑変性に対し、ヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞シート (hiPS-RPE シート) の臨床応用を目指している。しかし、現在の手術器具ではこれを移植することができないため、今回移植器具を開発しこれを用いた手術手技に関する検討を行った。その結果、術直後の移植片は、fold が 2/12 眼、長軸方向の右方化が 2/12 眼、術 2 週後の移植片は、透見不可が 2 眼あり、fold が 2/12 眼、収縮が 4/10 眼であった。移植片の fold は網膜剥離の範囲が小さいこと、長軸方向の右方化は、移植器具の挿入方向と流路が同軸で無いこと、また移植片の収縮の原因として不十分な排液が原因として考えられ、これらを満たした手術は安定した移植を行う事ができた。以上より、作製した移植器具は臨床応用の際の移植器具に適していると考ええる。

A. 研究目的

臨床研究を目指しているヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞シート (hiPS-RPE シート) は、現在の手術器具では移植することができないため、網膜下移植器具を開発する必要がある。このため我々は、臨床応用を前提とした介助者を必要としない移植器具を開発し、これを用いた手術手技に関する検討を行った。

B. 研究方法

手術器具は留置針外筒、1mm シリンジとこれに着脱可能なハンドピースで構成され、留置針外筒の先端部分を、網膜下鑷子と同程度の角度で扁平形状に加工した。

手術手技の検討は、12羽のウサギに 1.3mm×3.0mm の hiPS-RPE シートを網膜下移植した。移植の評価は、術直後の移植片の①損傷・

fold、②表側・裏側、③移植位置 (center・near・far)、④長軸の方向 (前方・後方・右方・左方) と、術 2 週後の移植片の収縮・fold を眼底写真にて評価した。また 8羽のウサギに、移植片の保存液を粘弾性物質濃度 50% とした hiPS-RPE シートを網膜下移植し同様の評価を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験時には Association for Research in Vision and Ophthalmology の定めた動物実験のためのガイドラインを厳守し、動物愛護上の配慮を十分に行った。

C. 研究結果

術中、全ての移植片において明らかな損傷はなく、介助者なしで網膜下移植する事ができた。術直後の移植片は、①fold が 2/12 眼、②表側

が 12/12 眼、③位置は center が 12/12 眼、④方向は前方が 10/12 眼、右方が 2/12 眼であった。移植片の fold は網膜剥離の範囲が小さかったことが原因と考えられ、また移植片が右方向となった原因は、移植器具の挿入方向と流路が同軸で無かったことが考えられた。術 2 週後の移植片は、透見不可が 2 眼あり、fold が 2/12 眼、収縮が 4/10 眼であった。また、保存液中に粘弾性物質を含有した hiPS-RPE シートは全例で移植片が収縮したため、移植片の収縮の原因として不十分な排液が考えられた。

D. 考察

開発した手術器具は、適切な剥離範囲の作製、移植器具の挿入方向と流路を同軸にすることや十分な排液を行う事で、安定した移植を行う事ができたため臨床応用に適していると考ええる。今後は、よりヒトの眼球に近いサル眼球を用いて検討を行う予定である。

E. 結論

本手術器具は hiPS-RPE シート移植の臨床応用の際の移植器具に適している。

F. 研究発表

2. 学会発表

1. 鎌尾浩行、他:iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞シートの移植用ハンドピースの開発と手術手技の検討. 第 66 回日本臨床眼科学会、東京、2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. WO2012115244:網膜色素上皮細胞シートの製造方法、公開日:2012 年 8 月 30 日.

2. 特願 2012-028966:医療用器具、出願日:2012 年 2 月 13 日.

38. In vitro におけるレチノールの網膜色素上皮細胞に対する作用

譚 雪、高橋秀徳、入山 彩、湯田健太郎、野村陽子、井上達也、
小畑 亮、柳 靖雄
(東京大)

研究要旨 これまで我々は栄養素摂取調査により滲出型加齢黄斑変性患者は健常人と比較しレチノールの摂取量が多いことを示してきた。しかしながら、レチノールの血管新生への関与は明らかになっていない。今回、in vitro でレチノールの網膜色素上皮細胞に対する作用を調べた。Laminin-coated transwell で4~6週培養したヒト網膜色素上皮細胞株 (ARPE19)、細胞培養プレートで通常培養したヒト急性単球性白血球細胞株 (THP-1) およびサル網膜脈絡膜血管内皮細胞 (CRVEC) へそれぞれレチノールを濃度を 10^{-11} ~ 10^{-9} M にふって添加し、24時間培養後 ELISA で VEGF 濃度を測定した。さらに VEGF の発現を RT-PCR にて検討した。また、マトリゲルに培養した HUVEC 細胞に ARPE19 細胞培養上清 (Condition medium: CM) を添加し、tube formation assay を用いて全体の細胞における管腔を形成している細胞の割合を測定し評価を行った。

ELISA では ARPE19 細胞でレチノール添加群の VEGF 濃度はレチノール濃度依存的に上昇し、 10^{-9} M ではコントロール群と比較して 1.4 ± 0.2 倍と有意に上昇したが、THP1 細胞ではコントロール群と比較して変化はなかった。また、CRVEC 細胞では VEGF はコントロール群およびレチノール添加群において検出限界以下であった。ARPE19 細胞では VEGF-A mRNA が 10^{-9} M のレチノール添加により発現上昇した。また、HUVEC 細胞による tube formation assay では管腔を形成している細胞の割合はコントロール群よりレチノール添加 condition medium 使用群が有意に多かった ($p < 0.01$)。

レチノールによる VEGF の発現上昇が ARPE19 細胞で特異的に認められ、血管新生に関与する可能性があると考えられた。

A. 研究目的

2011年に東大病院黄斑外来で行った栄養素摂取調査ではこれまでの報告通り滲出性加齢黄斑変性患者では健常人と比較して ω 3 脂肪酸や β クリプトキサンチンの摂取量が有意に少なかった。しかし、従来の報告になかったレチノール摂取量も滲出性 AMD では少ないことが判明した。レチノールは visual cycle の代謝産物であり、レチノールの過剰摂取は

visual cycle の回転を通じて all-trans retinal および A2E などのリボフスチン沈着を促進することにより細胞障害をきたすことが報告されているが、レチノールの血管新生への直接の関与は明らかになっていない。今回、in vitro でレチノールの網膜色素上皮細胞に対する作用を調べた。

B. 研究方法

Laminin-coated transwell で4~6週培養したヒト網膜色素上皮細胞株 (ARPE19)、細胞培養プレートで通常培養したヒト急性単球性白血球細胞株 (THP-1) およびサル網膜脈絡膜血管内皮細胞 (CRVEC) へそれぞれレチノールを濃度を 10^{-11} ~ 10^{-9} M にふって添加し、24時間培養した。レチノールの毒性の有無を評価するために ARPE19 細胞で細胞増殖アッセイ (WST-1 assay) を行い、その後3種類の細胞について ELISA で VEGF 濃度を測定し、さらに RT-PCR にて VEGF mRNA の発現を検討した。また、マトリゲルに培養した HUVEC 細胞に ARPE19 細胞培養上清 (Condition medium: CM) を添加し、tube formation assay を用いて全体の細胞における管腔を形成している細胞の割合を測定し評価を行った。

C. 研究結果

ARPE19 細胞における WST-1 assay ではレチノール添加後細胞生存率の変化はなかったため、all-trans retinol は細胞毒性がないと考えられた。

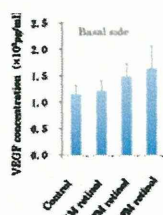


図1 VEGF 濃度

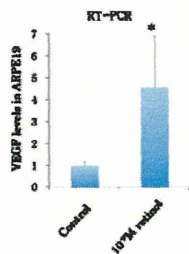


図2 VEGF-A mRNA レベル

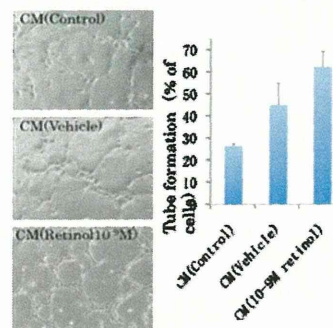


図3 tube formation assay

ELISA では ARPE19 細胞で basal side のレチノール添加群の VEGF 濃度はレチノール濃度依存的に上昇し、 10^{-9} M ではコントロール群と比較して有意に上昇した (1.4 倍 vs control, $p < 0.05$) (図 1) が、THP1 細胞ではコントロール群と比較して変化はなかった。また、CRVEC 細胞では VEGF 濃度はコントロール群およびレチノール添加群において検出限界以下であった。ARPE19 細胞では VEGF-A mRNA が 10^{-9} M のレチノール添加によりコントロール群と比較し 4.3 倍と発現上昇した ($p < 0.05$) (図 2)。また、HUVEC 細胞による tube formation assay では管腔を形成している細胞の割合はコントロール群 26.5%、vehicle 群 44.9% に対してレチノール添加 condition medium 使用群 66.2% と多かった ($p < 0.01$) (図 3)。

D. 考察

これまで all-trans retinal は光曝露下で活性酸素を発生し、VEGF 等のサイトカインを介してまたは直接的に RPE を障害することや all-trans retinoic acid が VEGF 発現を誘発し、新生血管を促進すること等が報告されている。しかし、all-trans retinol の RPE への直接作用の報告はない。過去には all-trans retinol は細胞内で retinoic acid へ変換されるとの報告があったが、all trans retinol は ARPE19 細胞で all trans retinoic acid へ変換されて、VEGF

の発現を誘発させる可能性もあるかもしれない。この機序を解明するためにさらなる検討が必要である。

E. 結論

レチノールによる VEGF の発現上昇が ARPE19 細胞で特異的に認められ、血管新生に関与する可能性があると考えられた。

H. 参考文献

1. Baylor D, et al: How photons start vision. *Proc. Natl Acad Sci* 93, 560-565, 1996.
2. Arshavsky VY, et al: Photoreceptor signaling: supporting vision across a wide range of light intensities. *J Biol Chem* 287, 1620-1626, 2012.
3. Maeda T, et al: Retinal photodamage mediated by all-trans-retinal. *Photochem Photobiol* 88, 1309-1319, 2012.
4. Maeda A, et al: Retinopathy in mice induced by disrupted all-trans-retinal clearance. *J Biol Chem* 283, 26684-26693, 2008.
5. Chen Y, et al: Mechanism of all-trans retinal toxicity with implications for stargardt disease and age-related macular degeneration. *J Biol Chem* 287, 5059-5069, 2012.
6. Maeda A, et al: Involvement of all-trans-retinal in acute light-induced retinopathy of mice. *J Biol Chem* 284, 15173-15183, 2009.
7. Sonoda S, et al: A protocol for the culture and differentiation of highly polarized human retinal pigment epithelial cells. *Nat Protoc* 4, 662-673, 2009.
8. Dunn KC, et al: ARPE-19, a human retinal

pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res* 62, 155-169, 1996.

9. Kannan R, et al: Stimulation of apical and basolateral VEGF-A and VEGF-C secretion by oxidative stress in polarized retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis* 12, 1649-1659, 2006.

10. Iriyama A, et al: A2E, a pigment of the lipofuscin of retinal pigment epithelial cells, is an endogenous endogenous Ligand for retinoic acid receptor. *J Biol Chem* 283, 11947-11953, 2008.

11. Akiyama H, et al: Visible light exposure induces VEGF gene expression through activation of retinoic acid receptor- α in retinoblastoma Y79 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C913-C920, 2005.

12. Williams JB, Napoli JL: Metabolism of retinoic acid and retinol during differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4658-4662, 1985.

39. 極性・非極性網膜色素上皮細胞の

細胞間接着装置・細胞骨格についての検討

白澤 誠、寺崎寛人、川野浩輝、大塚寛樹、園田祥三、坂本泰二
(鹿児島大)

研究要旨 transwell 上で一定期間以上培養することにより極性を獲得した網膜色素上皮 (RPE) と、それらが未熟である非極性 RPE の細胞間接着装置・細胞骨格について解析した。また、それぞれの細胞を腫瘍壊死因子 (TNF- α) で刺激することにより起こる細胞間接着装置・細胞骨格の変化を解析した。

A. 研究目的

RPE によるバリアの維持と破壊は滲出型加齢黄斑変性 (AMD) や中心性漿液性網脈絡膜症 (CSC)、増殖硝子体網膜症 (PVR) などの病態形成に重要な働きをしている。従来、RPE 細胞機能解析は培養細胞を用いて行われてきたが、通常培養ではバリア機能を十分に発達させる事ができず、RPE 細胞の役割を十分に解析することが困難であった。今回、transwell 上培養により、極性を獲得した網膜色素上皮 (RPE) と、それらが未熟である非極性 RPE の細胞間接着装置・細胞骨格について解析した。また、それぞれの細胞を腫瘍壊死因子 (TNF- α) で刺激することにより起こる細胞間接着装置・細胞骨格の変化を解析した。

B. 研究方法

transwell 上で 14 日間培養を行い、経上皮電気抵抗 (TER) が $150 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上・VEGF 極性分泌を確認済のものを極性 RPE と定義、3 日間培養を行いこれらが未熟なものを非極性 RPE と定義した。極性・非極性 RPE の細胞間接着装置関連蛋白 (タイト結合; ZO-1、

occludin、claudin-19、接着結合;N-cadherin)、細胞骨格構成蛋白(F-actin)について western blotting・免疫染色を行い、その発現・局在について検討した。また、腫瘍壊死因子 (TNF- α : 10ng/ml) 刺激による細胞間接着装置・細胞骨格の変化をそれぞれ解析した。

(倫理面への配慮)

動物の取り扱いにあたっては、ARVO の動物取扱いガイドラインを遵守した。

C. 研究結果

Western blotting では、非極性 RPE と比べ極性 RPE ですべてのタイト結合蛋白の発現増加を認めた。

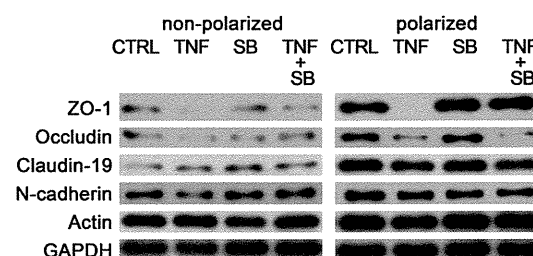


図: Western blotting

TNF 刺激で極性 RPE のタイト結合蛋白の発現

は減少したが、非極性 RPE ではタイト結合蛋白への影響は限定的であった。免疫染色で非極性 RPE では TNF 刺激により細胞骨格が大きく変化するが、極性 RPE ではあまり変化なかった。

D. 考察

TNF- α 刺激に対し極性・非極性 RPE では細胞間接着装置・細胞骨格への影響が異なることから、TNF 刺激によっておこる下流のシグナル伝達経路が極性の有無により異なる可能性が示唆された。

E. 結論

極性を獲得した RPE はタイト結合が発達しており、TNF 刺激はタイト結合蛋白の発現低下を引き起こした。非極性 RPE と極性 RPE では TNF 刺激によって引き起こされる細胞間接着装置・細胞骨格の変化に相違がみられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Experimental Eye Research (in press)

2. 学会発表

1. Shirasawa M, Terasaki H, Arimura N, Sonoda S, Sakamoto T: Effect of TNF- α on barrier function in polarized RPE cells. Annual meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, 2012.

2. 白澤 誠、他: TNF- α 刺激による非極性・極性 RPE の細胞間接着装置・細胞骨格への影響. 第 51 回日本網膜硝子体学会総会、山梨、2012.

H. 参考文献

1. Zech JC, Pouvreau I, Cotinet A, Goureau O, Le Varlet B, de Kozak Y: Effect of cytokines and nitric oxide on tight junctions in cultured rat retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 39, 1600-1608, 1998.
2. Shi G, Maminishkis A, Banzon T, et al: Control of chemokine gradients by the retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 49, 4620-4630, 2008.
3. Arakawa S, Takahashi A, Ashikawa K, et al: Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for exudative age-related macular degeneration in the Japanese population. Nat Genet 43, 1001-1004, 2011.

40. 網膜虚血再灌流障害による網膜アンジオテンシノーゲンの増加と

アリスキレンの神経保護効果

廣岡一行、天雲香里、新田恵里、藤田智純、白神史雄
(香川大)

研究要旨 網膜虚血再灌流障害におけるレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (RAAS) の活性化の引き金となる因子の同定とアリスキレンの神経保護効果を検討した。ラットの前房内圧を 130 mmHg に 45 分間上昇させて網膜虚血を行った。虚血再灌流後のプロレニンとアンジオテンシノーゲンの発現はポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR)、(プロ)レニン受容体の発現はウエスタンブロットで調べた。直接的レニン阻害薬であるアリスキレン (25 mg/kg/day) を浸透圧ポンプに注入し、虚血前日に皮下に埋め込むことにより投与した。虚血再灌流後のプロレニンと (プロ)レニン受容体の発現量は正常網膜と比べ変化はなかったが、アンジオテンシノーゲンは再灌流 3 時間後に増加を認めた。アリスキレンを投与することにより虚血再灌流による網膜障害は抑制された。更にアリスキレン投与することにより、プロレニンの発現は増加した。網膜虚血再灌流後にアンジオテンシノーゲンが増加することで RAAS が活性化された。またアリスキレンは網膜虚血再灌流障害に対して保護効果を有した。

A. 研究目的

網膜虚血再灌流障害によるレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (RAAS) の活性化の引き金となる因子の同定とアリスキレンの神経保護効果を調べること。

B. 研究方法

ラットの前房内圧を 130 mmHg に 45 分間上昇させて網膜虚血を行った。(プロ)レニン受容体はウエスタンブロット、プロレニンとアンジオテンシノーゲンは PCR にて発現量を調べた。また直接的レニン阻害薬であるアリスキレン (25 mg/kg/day) を浸透圧ポンプに注入し、皮下に埋め込むことにより投与した。1 週後に眼球を摘出した後、神経節細胞数および内顆粒

層厚、内網状層厚で障害の程度を評価した。

(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。

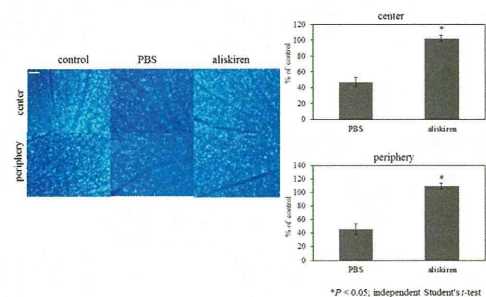


図1 アリスキレンの効果

C. 研究結果

虚血再灌流 3、6、12 時間後の(プロ)レニン受容体と(プロ)レニンの発現量は正常網膜と同等度であったが、再灌流 3 時間後のアンジオテンシノーゲンの発現量は正常網膜に比べ有意に増加した。基剤投与群では内網状層厚、内顆粒層厚は正常網膜に比べ虚血網膜では、それぞれ $64.8 \pm 2.9\%$ 、 $79.0 \pm 3.3\%$ であったが、アリスキレン投与群ではそれぞれ $98.9 \pm 2.9\%$ 、 $102.3 \pm 1.5\%$ で有意に障害は抑制された ($P < 0.001$; 対応のない t 検定)。また神経節細胞数は基剤投与群では正常網膜に比べ虚血網膜では $47.0 \pm 5.7\%$ であったのに対して、アリスキレン投与群では $102.3 \pm 4.3\%$ であった ($P < 0.001$; 対応のない t 検定)。またアリスキレン投与によりプロレニンの発現は正常網膜に比べ $197.7 \pm 18.4\%$ ($P < 0.001$; 対応のない t 検定)であり、有意に増加した。

D. 考察

プロレニン/レニンが(プロ)レニン受容体に結合することにより細胞内シグナル伝達が活性化するが、虚血再灌流後にアンジオテンシノーゲンの発現が増加することにより、この活性は加速される。また、アリスキレン投与により RAAS が抑制され、フィードバックループを介して、プロレニンの産生が増加したと考えられる。従来の我々の報告^{1)–3)}と合わせて考えると、アリスキレンは RAAS を抑制することにより神経保護効果を有すると考えられる。

E. 結論

網膜虚血再灌流後アンジオテンシノーゲンが増加することで RAAS が活性化された。また直接的レニン阻害薬であるアリスキレンは網膜虚血再灌流障害に対して保護効果を有した。

H. 参考文献

1. Fukuda K, et al: Neuroprotection against retinal ischemia-reperfusion injury by blocking the angiotensin II type 1 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 3629–3638, 2010.
2. Liu Y, et al: Activation of the aldosterone/mineralocorticoid receptor system and protective effects of mineralocorticoid receptor antagonism in retinal ischemia-reperfusion injury. *Exp Eye Res* 96, 116–123, 2012.
3. Fujita T, et al: Neuroprotective effects of angiotensin II type 1 receptor (AT1-R) blocker via modulating AT1-R signaling and decreased extracellular glutamate levels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 4099–4110, 2012.

41. 白色 LED 全視野光刺激装置を使用した

ゼブラフィッシュ網膜電図の記録

松原 央¹⁾、田中利男²⁾、西村有平²⁾、山本哲朗³⁾、近藤峰生¹⁾

(¹⁾三重大、²⁾三重大・薬理ゲノミクス、³⁾三重大・システム神経科)

研究要旨 疾患モデル動物としてゼブラフィッシュ(Zebra Danio)が使用されているが、網膜機能評価に網膜電図(ERG)が不可欠である。今回、白色 LED を使用した全視野光刺激装置を作成し、稚魚および成魚で生体から scotopic、photopic ERG を記録した。全視野刺激装置の使用により、刺激光の入射方向調整操作が不要なため操作性が向上し、ERG の記録が安定した。今回作製した白色 LED 内蔵全視野光刺激装置はゼブラフィッシュ ERG の記録に有用であった。

A. 研究目的

治療薬開発には疾患モデル動物は不可欠であるが、開発に関わる費用の縮小や時間の短縮のため、薬物スクリーニングや遺伝子組換えを早く、大量に、かつ安価に行うことが可能なゼブラフィッシュなどの小型魚類がヒト疾患モデル動物として使用されている。ゼブラフィッシュの ERG 記録方法には、全眼球摘出により記録されているが、生体からの直接記録が生体反応をより正確に反映すると考えられる。しかし、水棲生物であることと眼球が小さいことから、陸棲ほ乳類での記録とは異なる手技や装置が必要となる。電極の設置に実体顕微鏡を使用するため、光ファイバーを使用し外部光源から光刺激を導入する方法¹⁾が行われている。今回、白色 LED を内蔵した全視野光刺激装置を

作製し、ゼブラフィッシュ生体から ERG を記録することを試みた。

B. 研究方法

受精後 5 日-14 日のゼブラフィッシュ(Zebra Danio)稚魚 (n=5) と生後 3 か月以上の成魚 (n=3) を使用した。Makhankov らの方法 (2004) 2) に準じ記録した。0.02% 3-aminibenzoic acid methyl ester (MESAB) による全身麻酔を行い記録台へのせ、E3 溶液を浸したティッシュペーパーで全身を覆った後、稚魚にはエチルセルロースを滴下し、成魚には 0.02% MESAB E3 溶液を口からえらへ持続灌流した。関電極としてガラス管微小電極を角膜に接着し、不関電極として Ag 板を生体下に設置した。新たに作製した白色 LED 全視野光刺激装置 (図 1) によ

り刺激光を加え(最大刺激光量 360mW/m²、背景光 20mW/m²)、刺激時間 1000msec、Bandpass は0.08Hz~300Hz、得られた10~30回の反応の加算平均を行った。scotopic ERG は60分程度の暗順応の後、photopic ERG は15分以上の明順応の後に上記記録を行った。

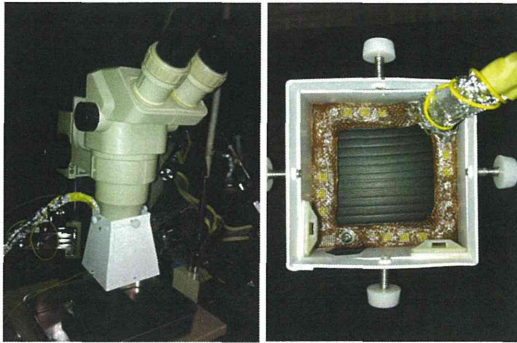


図1: 白色LED内蔵全視野光刺激装置

(倫理面への配慮)

動物の取り扱いにあたっては、三重大学実験動物取り扱いガイドラインを遵守した。

C. 研究結果

稚魚、成魚とも scotopic, photopic ERG ともに ERG は記録可能であった。稚魚では、光量に応じてb波、d波とも振幅は増加した(図2、3、4、5)。

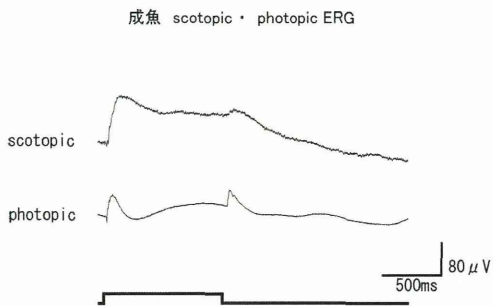


図2: 成魚 scotopic・photopic ERG

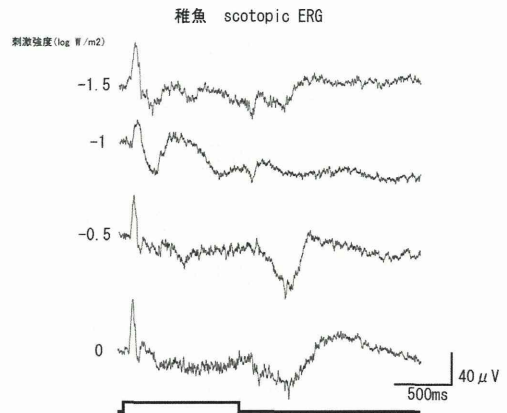


図3: 稚魚 scotopic ERG

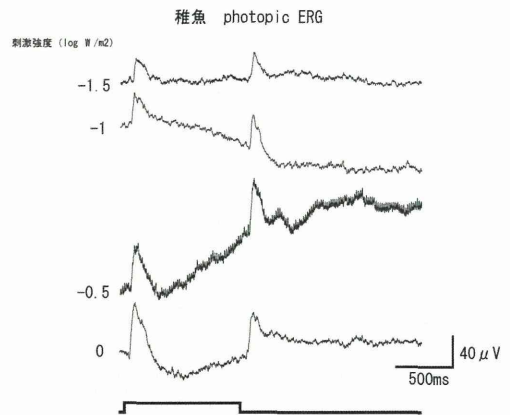


図4: 稚魚 photopic ERG

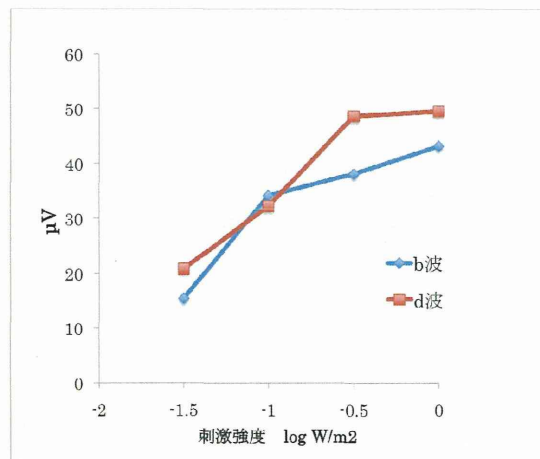


図5: 稚魚 photopic ERG 刺激強度とb・d波振幅

D. 考察

稚魚の角膜直径は約 200 μm と小型であるため、指向性のある光源に常に眼球を向けてガラス管電極を接着させることは難しい。今回作製した白色 LED 内蔵全視野刺激装置は実体顕微鏡と一体化させたため、眼球位置によらず一定した刺激が行えた。また眼球位置と刺激光の入射位置の調整がなく操作性は向上した。

aquatic vertebrates. J Neurosci Methods 135, 205-210, 2004.

E. 結論

試作した白色 LED による全視野刺激装置はゼブラフィッシュ ERG 記録に有用であった。

F. 研究発表

2. 学会発表

1. 松原央, 他: ゼブラフィッシュからの網膜電図の試み. 第 60 回日本臨床視覚電気生理学学会, 名古屋市, 2012.
2. 松原央, 他: ゼブラフィッシュの稚魚と成魚での網膜電図記録の検討. 第 59 回中部日本生理学会, 岡崎市, 2012.

H. 参考文献

1. Seeliger MW, et al: Ganzfeld ERG in zebrafish larvae. Doc Ophthalmol 104, 57-68, 2002.
2. Makhankov YV, et al: An inexpensive device for non-invasive electroretinography in small

42. 超広角走査型レーザー検眼鏡による網膜色素変性症の

眼底自発蛍光所見

小椋俊太郎、安川 力、吉田宗徳、小椋祐一郎
(名古屋市大)

研究要旨 超広角走査型レーザー検眼鏡(Optos®200Tx)は周辺部を含む広範囲の眼底を一度に撮影できる。本研究では網膜色素変性症(RP)における Optos®200Tx の眼底自発蛍光(AF)(Optos AF)の所見と視野欠損の関連性を検討したところ、ゴールドマン視野検査(GP)の暗点部分と Optos AF の低蛍光部の割合は強い正の相関関係を示した。また中心の 60° において両者は非常によく一致していた。Optos AF は RP 進行の客観的な指標として用いることができる可能性がある。

A. 研究目的

以前より網膜色素変性症(RP)進行の評価にゴールドマン視野検査(GP)が用いられてきたが、GP は自覚的検査であり、検者、被検者因子にその結果が強く依存する欠点があった。超広角走査型レーザー検眼鏡(Optos®200Tx)では一度に広角眼底撮影ができ、客観的な情報が得られる利点がある。Optos®200Tx の眼底自発蛍光(AF)(Optos AF)が RP において有用であるかを検討する。

B. 研究方法

評価方法として、画像解析ソフト Image J®を用いて、GP の V4 イソプターにおける視野と AF における低蛍光でない部分(過蛍光を含む背景蛍光残存部位)および逆に、GP 視野欠損部位と AF の低蛍光部位の比較をした。また Adobe Photoshop®を用いて GP と Optos AF を合成し、中心 60° において一致率を検討した。

(倫理面への配慮)

倫理面では個人情報の漏洩がないよう留意した。

C. 研究結果

Optos AF での低蛍光部の面積は GP における V4/I4 イソプターの視野欠損部の面積と強い正の相関を示した($R=0.86$, $P<0.000001$)。(図 1)

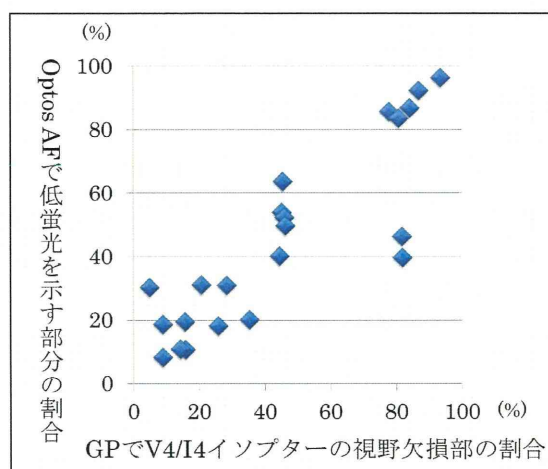


図 1 低蛍光部の割合と視野欠損の割合の相関

中心 60° における GP の視野欠損部に対する AF の低蛍光部の、また V4 イソプターに対する低蛍光でない部分の一致率はそれぞれ 91.0 ± 7.7%、84.5 ± 7.4%であった。(図 2)

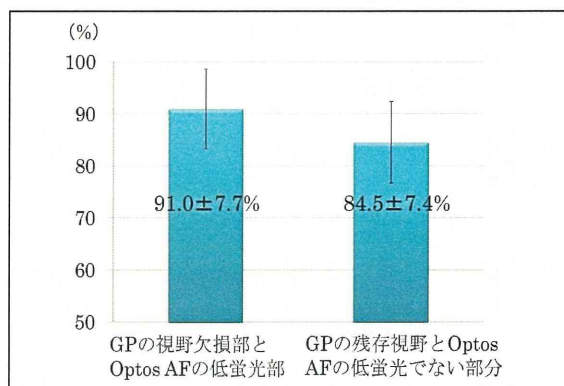


図 2 中心 60° における GP に対する Optos AF の一致率

また 7 眼において、Optos AF では低蛍光を呈したものの、GP では暗点と判断されない部分を認めた。(図 3)

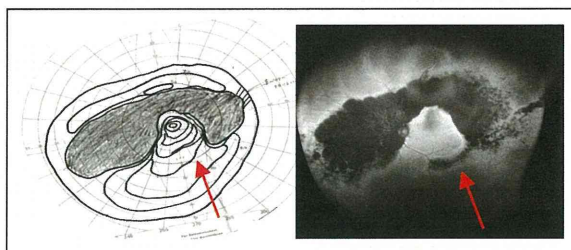


図 3 GP (左) と Optos AF (右) の比較

D. 考察

Optos AF の異常部位は GP の V4 イソプター視野と負の相関を示したと報告されており¹⁾、我々も同様な結果を得た。また傍中心窩異常自発蛍光 (Ring AF) の異常過蛍光が RPE 萎縮の境界領域であると推測されている^{2,3)}のと同様に、ring AF 様の過蛍光が Optos AF の低蛍光部の境界領域にも認められた。Optos AF における今後の低蛍光化が視野狭窄の拡大

を予測する有意義な指標となる可能性がある。

E. 結論

視野検査の異常は視細胞異常を、AF の異常は網膜色素上皮の異常をそれぞれ反映していると考えられるが、RP において両者は密接に関係している。両者がよく一致していたことから、Optos AF 異常所見は、GP と併用することにより RP 進行の客観的指標として用いることができる可能性があると考えられた。

H. 参考文献

1. 大石明生、他：超広角走査型レーザー検眼鏡による網膜色素変性症の眼底自発蛍光所見. 第 66 回日本臨床眼科学会総会、京都、2012.
2. Murakami T, Akimoto M, et al: Association between abnormal autofluorescence and photoreceptor disorganization in retinitis pigmentosa. Am J Ophthalmol 145, 687-694, 2008.
3. Iriyama A, Yanagi Y : Fundus autofluorescence and retinal structure as determined by spectral domain optical coherence tomography, and retinal function in retinitis pigmentosa. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 250, 333-339, 2012.

43. 網膜色素変性患者における

黄斑部網脈絡膜血流量と中心視機能との関連

村上祐介、池田康博、秋山雅人、吉田倫子、鍋島崇寛、納富昭司、

久富智朗、江内田寛、石橋達朗

(九州大)

研究要旨 網膜色素変性 (retinitis pigmentosa: RP) における錐体細胞死には、桿体細胞死に続いて起こる網脈絡膜環境の変化が重要と考えられている。以前に我々は、ウノプロストン片眼の点眼により、RP 患者の両眼の網膜中心感度が保持されることを報告した。今回の研究では、本薬剤の作用機序として網脈絡膜循環の改善作用に注目し、その変化について検討した。さらに RP 患者における網脈絡膜循環と視機能の関連について検討を行った。

定型 RP 患者 12 例、健常者 12 例を対象とし、0.12%ウノプロストンを片眼に点眼した。網脈絡膜血流量の測定にはレーザースペックル (LSFG-NAVI) を用い、点眼前、点眼 1、3、5 時間後に両眼の黄斑部 mean blur rate (MBR) を計測した。健常者では、ウノプロストン点眼 3 および 5 時間後に、MBR が 1.3 倍に上昇し ($p < 0.01$)、点眼を受けていない対側眼でも MBR が 1.2 倍に亢進した ($p < 0.01$)。RP 患者でも同様に、ウノプロストン点眼 5 時間後に、点眼側および反対側の MBR が有意に亢進した (1.15 倍、 $p < 0.05$)。また RP 患者では、健常者と比較し MBR 値が有意に低下していた ($p = 0.0017$)。次に定型 RP 患者 58 例 108 眼を対象として、MBR と視力、ハンフリー (HFA) 10-2 プログラム検査の MD 値、網膜感度との相関を解析した。RP 患者の黄斑部 MBR 値は、HFA10-2 の MD 値、中心 4 点・12 点平均感度と有意な相関を認めた ($p < 0.01$)。これらの結果から、片眼のウノプロストン点眼による両眼の黄斑部循環改善作用が、RP 患者の中心感度保持に寄与した可能性が示唆された。また RP 患者の中心視機能は網脈絡膜循環と関連しており、錐体細胞死の進展に参与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

網膜色素変性 (retinitis pigmentosa: RP) は未だ有効な治療法が確立されていない難治性網膜変性疾患で、遺伝子異常による視細胞桿体のアポトーシスに続いて、中心視力に重要な錐体が障害される。近年 RP に対する新しい治療の試みとして、緑内障治療薬であるウノプロストンの RP に対する中心感度保持効果が報

告されている (1)。また当教室の臨床研究において、ウノプロストン片眼の点眼により、RP 患者の両眼の網膜中心感度が保持される結果が得られた。今回の研究では、対側眼への作用機序としてウノプロストンの循環改善作用に注目し、本薬剤の網脈絡膜循環への影響について検討した。さらに RP 患者における網脈絡膜循環と視機能の関連について検討した。

B. 研究方法

定型 RP 患者 12 例、健常者 12 例を対象とし、0.12%ウノプロストンを片眼に点眼した。網脈絡膜血流量の測定にはレーザースペックル (LSFG-NAVI) を用いて、点眼前、点眼 1、3、5 時間後に両眼の黄斑部 mean blur rate (MBR) を計測した。MBR はレーザー散乱光の干渉波形の時間変化率から算出され、網脈絡膜血流の速度変化に対して線形変化すると報告されている(2)。

また定型 RP 患者 58 例 108 眼を対象として、黄斑部 MBR と視力、ハンフリー (HFA) 10-2 プログラム検査の MD 値、中心 4 点・12 点平均網膜感度との相関を解析した。

(倫理面への配慮)

当臨床研究は当該施設の倫理委員会の承認を得た後に、ヘルシンキ宣言の規定に従って行った。全ての患者から同意書を取得の上、介入研究が行われた。

C. 研究結果

健常者では、ウノプロストン点眼 3 および 5 時間後に、MBR が 1.3 倍に上昇し ($p < 0.01$)、点眼を受けていない対側眼でも MBR が 1.2 倍に亢進した ($p < 0.01$)。RP 患者でも同様に、ウノプロストン点眼 5 時間後に、点眼側および反対側の MBR が有意に亢進した (1.15 倍、 $p < 0.05$)。また RP 患者では、健常者と比較し MBR 値が有意に低下していた ($p = 0.0017$)。次に RP 患者における MBR と視機能の関連について検討したところ、黄斑部 MBR 値は、HFA10-2 MD 値、中心 4 点・12 点平均感度と有意に相関していた ($p < 0.01$)。

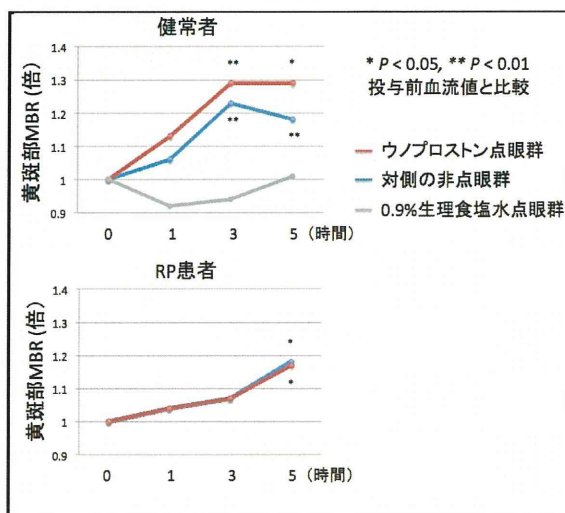


図1 ウノプロストンによる網脈絡膜循環の変化

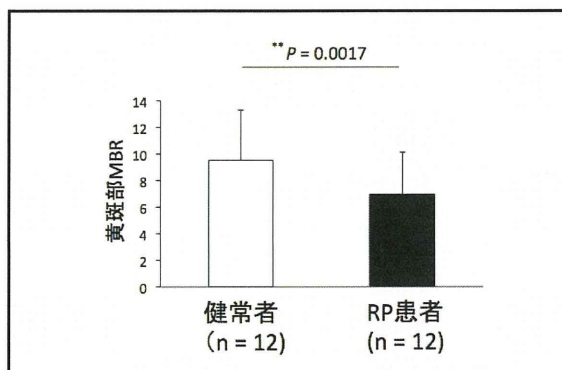


図2 健常者とRP患者間での黄斑部MBR値の比較

D. 考察

ウノプロストンの血流改善作用については、これまでに健常人、緑内障患者で報告があるものの、RP 患者での検討はなされていなかった。今回の検討から RP 患者においても、ウノプロストンは黄斑部の血流を改善することが明らかとなった。さらに本薬剤の点眼により、対側眼においても血流改善効果が得られることが分かった。近年 Yamamoto らは、ウノプロストンは点眼後速やかに血中に移行し、活性体に変換されることを報告しており(1)、これらは本薬剤の両眼の網脈絡膜循環への作用を支持する結果と考えられる。

RP における錐体細胞死には、桿体のアポトーシスに続いておこる網膜環境の変化が重要と考えられている(3)。本研究の結果から、RP 患者の中心網膜感度は網脈絡膜血流量と良く相関することが分かった。レーザードップラー法を用いた他施設での解析においても同様に、RP 患者の網膜電位と網脈絡膜循環との相関が報告されている。これらの結果から、錐体細胞死に関与する環境因子の一つとして、網脈絡膜の血流低下が関与する可能性が考えられる。

E. 結論

片眼のウノプロストン点眼による両眼の黄斑部循環改善作用が、RP 患者の中心感度保持に寄与した可能性が示唆された。また RP 患者の中心視機能は網脈絡膜循環と相関しており、錐体細胞死の進展に関与している可能性が考えられた。

F. 研究発表

2. 学会発表

1. 秋山雅人、他:網膜色素変性に対する緑内障点眼薬の神経保護効果の検討. 第 65 回日本臨床眼科学会、東京、2011.
2. 村上祐介、他:ウノプロストン点眼による網膜色素変性患者の網膜血流量変化. 第 66 回日本臨床眼科学会、京都、2012.

H. 参考文献

1. Yamamoto S, et al: Topical isopropyl unoprostone for retinitis pigmentosa: micropertimetric results of the phase 2 clinical study. *Ophthalmol Ther*, 2012.
2. Wang L, et al: Anterior and posterior optic nerve head blood flow in nonhuman primate

experimental glaucoma model measured by laser speckle imaging technique and microsphere method. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 8303-8309, 2012.

3. Yoshida N, et al: Clinical evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 120, 100-105, 2013.

44. マイクロアレイを用いた

網膜変性疾患の網羅的遺伝子スクリーニング

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

研究要旨 網膜色素変性の遺伝子スクリーニングには、知識、人手、そして何より費用が多く必要とされるため、できるだけ、効率的にスクリーニングをすすめる必要がある。我々が今回の研究を開始した 2010 年時点では次世代シーケンサーの利用は今ほど現実的ではなく、マイクロアレイによる既知の遺伝子の網羅的なスクリーニングは有効であると予想された。今回の結果、マイクロアレイによるスクリーニングは日本人の網膜色素変性においては検出力が低く、Leber 先天盲、クリスタリン網膜症、錐体-（桿体）ジストロフィー、黄斑ジストロフィーなどで変異の検出力が高いことが示された。

A. 研究目的

網膜変性疾患の原因遺伝子をスクリーニングする。

B. 研究方法

2011 年 1 月から 12 月に京都大学附属病院眼科網膜変性外来を受診し、採血および遺伝子解析に同意した 84 家系 87 症例を対象とした。臨床情報から、常染色体優性遺伝の網膜色素変性(36 家系 38 症例)、常染色体劣性遺伝・弧発例の網膜色素変性(6 家系 6 症例)、Leber 先天盲(4 家系 4 症例)、錐体-（桿体）ジストロフィー(24 家系 25 症例)、黄斑ジストロフィー(Stargardt 病含む 7 家系 7 症例)、クリスタリン網膜症(7 家系 7 症例)と診断した症例について解析を行った。肘静脈より 20ml 採血し、ゲノム DNA を抽出し、遺伝子解析は ASPER BIOTECH 社 (Estonia) の受託サービス (<http://www.asperbio.com/asper-ophthalmic>) を利用

した。検索方法はマイクロアレイを用いて一次スクリーニング、変異が疑われた場合にはダイレクトシーケンスを行い確認した。

(倫理面への配慮)

本研究は採血および、遺伝子の解析、DNA の海外への搬出については、当院倫理委員会の承認を得 (G-380)、書面による全ての患者からの同意を得ている。

C. 研究結果

サンプルを送付してから 45-105 日で結果が得られた。認められた変異を表に示す。常染色体劣性遺伝の網膜色素変性では変異が認められた家系はなかった。遺伝形式及び in silico prediction により原因と考えられる遺伝子変異を確定できたのは常染色体優性遺伝の網膜色素変性では 36 家系中 1 家系 (2.8%)、Leber 先天盲では 4 家系中 2 家系 (50%)、錐体-（桿体）ジストロフィ

一では 24 家系中 3 家系 (12.5%)、黄斑ジストロフィーでは 7 家系中 1 家系 (14.2%)、クリスタリン網膜症 7 家系中 4 家系 (57.1%) であった。多くの変異が検出されたものの 2 つ目の変異が見つからない劣性遺伝の症

例が多く、原因遺伝子変異を確定できた症例は少ない結果であった。錐体ジストロフィーの同一家系からは同じ変異が検出された (*GUCY2D* c.2512C>T)。

臨床診断	遺伝子	変異	アレル頻度	In silico prediction
優性遺伝	<i>RP1</i>	c.2951A>G (p. D984G)	1/72	Benign/Tolerated
網膜色素変性	<i>FSCN2</i>	c.72delG (p. T25fs)	1/72	
	<i>RHO</i>	c.891C>T (p. S297S)	1/72	
Leber 先天盲	<i>RPE65</i>	c.118G>A (p. G40S)	2/8*	Probably damaging/Damaging
	<i>CRB1</i>	c.1576C>T (p. R526Ter)	2/8*	
錐体-(桿体) ジストロフィー	<i>ABCA4</i>	c.763C>T (p. R255C)	1/48	Possibly damaging/Damaging
		c.1294G>A (p. E432K)	1/48	Benign/Tolerated
		c.1699G>A (p. V567M)	4/48	Possibly damaging/Damaging
		c.1760+2T>G	1/48	
		c.3626T>C (p. M1209T)	1/48	Benign/Tolerated
		c.4283C>T (p. T1428M)	3/48	Benign/Tolerated
	<i>GUCY2D</i>	c.2101C>T (p. P701S)	4/32 †	Possibly damaging/Tolerated
		c.2512C>T (p. R838C)	2/32 ‡	Probably damaging/Damaging
	<i>CEP290</i>	c.829G>C (p. E277Q)	2/32	Probably damaging/Damaging
	<i>CRX</i>	c.121C>T (p. R41W)	1/32	Probably damaging/Damaging
黄斑ジストロフィー	<i>ABCA4</i>	c.161G>T (p. C54F)	1/14	Probably damaging/Damaging
		c.2798A>T (p. N933I)	1/14	Probably damaging/Damaging
		c.4195G>A (p. E1399K)	1/14	Probably damaging/Tolerated
		c.6445C>T (p. R2149Ter)	1/14	
クリスタリン網膜症	<i>CYP4V2</i>	c.802-8_810del17/insGC	9/14#	
		c.1199G>A (p. R400H)	1/14	Probably damaging/Damaging

*ホモ接合体 †ホモ接合体 2 家系 ‡ヘテロ接合体 1 家系 2 サンプル #ホモ接合体 3 家系、ヘテロ接合体 3 家系。ミスセンス変異については Polyphen2/SIFT による in silico prediction を行った。