

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462638

研究課題名(和文)黄斑機能に対する黄斑色素の臨床及び基礎的検討

研究課題名(英文)Clinical and basic examination of the macula pigment for the macula function

研究代表者

小山 泰良 (Koyama, Yasurou)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：60325058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性(AMD)における光線力学療法(PDT)治療後の黄斑色素量変化の検討と、黄斑色素の網膜機能への影響についての動物モデルを用いた基礎的検討を行った。AMD患者についてPDT施行前、1、3、6および12ヵ月後の視力、網膜中心厚、黄斑色素量を測定した。黄斑色素はPDT後でも上昇する事、施行前後で黄斑色素量と視力との間に有意な相関関係がある事が明らかとなった。ラットにルテインを投与すると視機能が改善する傾向が見られ、網膜光障害モデルではルテイン投与により濃度依存的に障害が抑制された。網膜、血中からルテインは検出されず、ルテインは抗酸化因子等に作用する事で網膜保護に関与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We evaluate macular pigment optical density (MPOD) changes after photodynamic therapy (PDT) on exudative age-related macular degeneration (AMD) and the influence of lutein on retinal function in animal model. The correct of treatment results were patients with a minimum of 12 months of follow-up from first PDT. Best-corrected visual acuity (BCVA), central macular thickness (CRT), and MPOD levels were examined pre PDT and post PDT on 1 month, 3 months, 6months, and 12months. MPOD also increased after PDT and significantly correlation between MPOD and BCVA at pre PDT and post PDT. In animal model, lutein improved retinal function and decrease retinal damage after intense light exposure in rats. Lutein is not detected from the retina and blood, therefore lutein may participate in retinal protection by acting on another factor, like antioxidants.

研究分野：眼科学

キーワード：加齢黄斑変性 黄斑色素 ルテイン

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (AMD) の進行は、欧米を初めとした先進国において成人の失明や視力障害の主要原因となっている。高齢化が進む我が国でも増加傾向にあると考えられる。近年、黄斑色素量の減少と加齢黄斑変性との関連が欧米人を中心に報告されており、その重要性が再認識されている。

黄斑色素はカロテノイド色素の一種でルテインとゼアキサンチンからなる。これまで、生体眼における黄斑色素の測定法として蛍光フィルターを用いた方法が主に行われてきたが、AMD 眼では、黄斑下に沈着したドルーゼンからの自家蛍光により、黄斑色素測定が困難であるとの問題点が存在する。我々は共鳴ラマン分光法を用いた生体眼での黄斑色素測定法を行ってきており、本法を用いた日本人正常眼および AMD 眼での黄斑色素量について報告を行った (Obana A et al, *Ophthalmology* 115(1); 147-157, 2008)。この報告により、黄斑色素量は加齢と共に減少すること、AMD の信仰と共に減少することが明らかとなっている。

現在本邦では、滲出型 AMD に対して光線力学療法、抗 VEGF 抗体を用いた抗血管新生療法が標準的な治療として行われている。本治療による視力の維持・改善効果については多数の報告がなされているが、本治療による黄斑色素量に対する効果については我々の知る限り報告は無い。

光線力学療法、抗 VEGF 抗体を用いた抗血管新生療法で、AMD 眼で低下している黄斑色素量が回復するかどうかは、黄斑色素の視機能への関与を推測する上で重要な知見である。

ルテイン、ゼアキサンチンは細胞障害性の強い青色光を吸収するフィルターとしての効果と一重項酸素などの活性酸素を消去する抗酸化作用により、黄斑組織を保護し、その機能を維持する効果があると推測されているが、網膜の光酸化ストレスに対する効果を証明した報告はこれまでほとんどない。海外の報告では、正常成人で 6 カ月間のルテイン摂取により Focal Electroretinogram の振幅が増加するという報告がなされており、黄斑色素の網膜機能への関与が推測されている。このため、黄斑色素の網膜機能への影響について更なる基礎的検討が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、加齢黄斑変性における治療後の黄斑色素量変化の検討と、黄斑色素の網膜機能への影響についての基礎的検討を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 光線力学療法による黄斑色素量の変化

対象は島根大学医学部附属病院を受診した AMD の患者 28 名 (男性 22 名、女性 6 名、平均年齢  $77.4 \pm 1.4$  歳) 患者は、蛍光造影 (FA)、インドシアニングリーン蛍光造影 (IA)、光干渉断層法 (OCT) により AMD による活動性の脈絡膜新生血管があり、他の眼疾患がないことを確認した。また、瞳孔径が 7mm 以下で、他の網膜疾患や PDT、光凝固術、抗 VEGF 薬による治療歴のある患者は除外した。光線力学療法 (PDT) の施行前、1、3、6 および 12 か月後の視力 (BCVA)、網膜中心厚 (CRT)、黄斑色素量 (MPOD) を測定した。CRT は spectral-domain OCT (3D OCT-1000、2000、Topcon, Inc., Tokyo, Japan) を用い、網膜色素上皮 (PRE) と硝子体網膜界面との間の距離から算出した。黄斑色素量は 488nm の光によって励起されるカロテノイド分子由来の炭素二重結合の散乱強度により測定した。測定は 3 回行い、最も高い値を結果として用いた。

Table 1. Demographic Data of Subjects

	n	28
Age, yrs		
Mean $\pm$ SE (range)		77.4 $\pm$ 1.4 (58-89)
Sex, n		
Male / Female		22 (79 %) / 6 (21 %)
Follow up (month)		
Mean $\pm$ SE (range)		23.9 $\pm$ 1.7 (12-38)
AMD type, n		
predominantly classic CNV		5 (18 %)
minimally classic CNV		8 (29 %)
occult with no classic CNV		10 (36 %)
CNV*		1 (3 %)
PCV		4 (14 %)
PDT, n		
Mean $\pm$ SE (range)		1.4 $\pm$ 0.1 (1-4)
GLD ( $\mu$ m)		
Mean $\pm$ SE (range)		3101 $\pm$ 205 (1277-5965)
Smoking status, n		
Current smokers		2 (7 %)
Past smokers		6 (21 %)
Never smoked		20 (72 %)
BMI, kg/m <sup>2</sup>		
Mean $\pm$ SD (range)		23.4 $\pm$ 2.7 (18.1-28.0)
Lens status, n		
Phakia		27 (97 %)
Pseudophakia		1 (3 %)
Lutein supplements, n		
Yes		1 (3 %)
No		27 (97 %)
Systemic diseases, n		
Systemic Hypertension		14 (50 %)
Diabetes mellitus		1 (4 %)
Hyperlipidemia		1 (4 %)
Ischemic heart disease		2 (7 %)
Cerebral infarction		2 (7 %)

SE = standard error ; AMD = age-related macular degeneration ; PDT = photodynamic therapy ; CNV = choroidal \* : examined by indocyanine green angiography only neovasacular ; PCV = polypoidal choroidal vasculopathy ; RAP = retinal angiomatous proliferation ; GLD = greatest linear dimension ; BMI = body mass index.

\* : examined by indocyanine green angiography only

## (2) ルテイン投与による視機能の変化

アルビノラット (Sprague-Dawley, 雄性, 5-6 週齢) に 50mg/kg body weight のルテイン (21.3%ルテイン, 2.4%ゼアキサンチン) あるいは溶媒であるベニバナ油を 1 日 1 回、14 日間経口投与した。また、何も与えないラットを正常コントロールとし、同一個体で網膜電図 (ERG) がどのように変化するかを調べた。ERG 測定後に採血を行い、網膜と水晶体を摘出してルテイン含有量を測定した。

## (3) 網膜光障害モデルを用いたルテインの網膜保護作用

アルビノラット (Sprague-Dawley, 雄性, 8 週齢) にルテインを 100 mg, 200 mg/kg body weight となるように 4 日間経口投与した後、5000 ルクス白色光を 12 時間照射した。照射中のラットは拘束せず、餌・水は自由に摂取できるようにした。照射後 3 日目までルテイン投与を継続し、照射終了後 7 日目に ERG を測定と採血を行った。血液は直ちに遠心分離を行い、血漿中の酸化ストレスマーカーの計測を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 光線力学療法による黄斑色素量の変化

視力 : PDT 施行前の logMAR 視力は  $0.65 \pm 0.06$  であった。PDT 後 1 カ月後では、 $0.61 \pm 0.07$ 、3 か月後では  $0.60 \pm 0.07$ 、6 か月後では  $0.56 \pm 0.08$ 、12 か月後では  $0.58 \pm 0.08$  であった。

中心網膜厚 : PDT 施行前は  $321 \pm 19 \mu\text{m}$ 、1 カ月後では  $266 \pm 15 \mu\text{m}$ 、3 カ月後では  $253 \pm 14 \mu\text{m}$ 、6 か月後では  $245 \pm 14 \mu\text{m}$ 、12 か月後では  $251 \pm 13 \mu\text{m}$  であった。

黄斑色素量 : PDT 施行前は  $457 \pm 54$  ラマンカウント (RC)、1 カ月後では  $578 \pm 88$  RC、3 カ月後では  $629 \pm 101$  RC、6 か月後では  $666 \pm 81$  RC、12 か月後では  $594 \pm 71$  RC であった。

PDT 施行前、PDT 施行 3 カ月後、6 カ月後、12 カ月後の視力と黄斑色素量には有意な相関関係が見られた。

Table 2. Changes in BCVA(logMAR), CRT, MOPD from baseline

n=28	pre PDT	Time after PDT			
		1month	3months	6months	12months
BCVA (logMAR)	$0.65 \pm 0.06$	$0.61 \pm 0.07$	$0.60 \pm 0.07^*$	$0.56 \pm 0.08^*$	$0.58 \pm 0.08^*$
amount of change from baseline		$-0.04 \pm 0.06$	$-0.05 \pm 0.06$	$-0.09 \pm 0.07$	$-0.07 \pm 0.07$
CRT ( $\mu\text{m}$ )	$321 \pm 19$	$266 \pm 15^*$	$253 \pm 14^*$	$245 \pm 14^*$	$251 \pm 13^*$
amount of change from baseline		$-58 \pm 14$	$-69 \pm 16$	$-76 \pm 19$	$-71 \pm 17$
MPOD (RC)	$457 \pm 54$	$578 \pm 88$	$629 \pm 101$	$666 \pm 81^*$	$594 \pm 71^*$
amount of change from baseline		$121 \pm 57$	$172 \pm 78$	$209 \pm 58$	$137 \pm 46$
					(mean $\pm$ SE)

BCVA = best corrected visual acuity; CRT = central retinal thickness; MPOD = macular pigment optical density; RC = Raman counts; SE = standard error sign test, \* :  $P < 0.05$

PDT 施行 3 カ月後および 12 カ月後のベースラインから変化量で、視力と黄斑色素の間に有意な相関関係が認められたが、中心網膜厚と黄斑色素の間に有意な相関関係は認められなかった。

Table 3. Correlation between BCVA(logMAR), CRT and MPOD

n=28	pre PDT	Time after PDT			
		1month	3months	6months	12months
BCVA(logMAR) vs MPOD					
r A		-0.216	-0.424*	-0.430*	-0.538**
r B		-0.118	-0.414*	-0.032	-0.376*

rA = actual value; rB = amount of changes from baseline

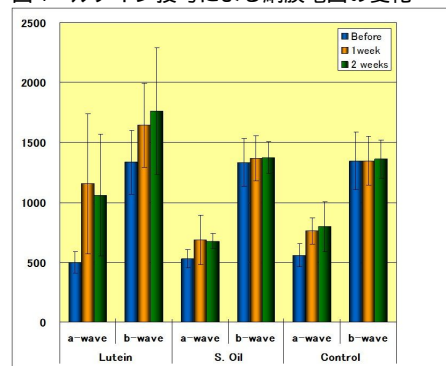
Spearman's correlation coefficient \* $P < 0.05$ , \*\*: $P < 0.01$

黄斑色素は PDT の後でも上昇すること、また、PDT 施行前後で黄斑色素量と視力との間に有意な相関関係があることが明らかとなった。

### (2) ルテイン投与による視機能の変化

体重はルテイン投与群およびベニバナ油投与群で実験期間中のいずれの段階でも有意差は見られなかった。ルテイン投与群、ベニバナ油投与群、正常コントロール群のいずれも投与前と投与 1 週間目、2 週間目で a-wave、b-wave の振幅に統計学的な有意差は見られなかった。しかし、ルテイン投与群では有意差は出なかったものの、投与前に比べて振幅が大きくなる傾向が見られた。

図 1 ルテイン投与による網膜電図の変化

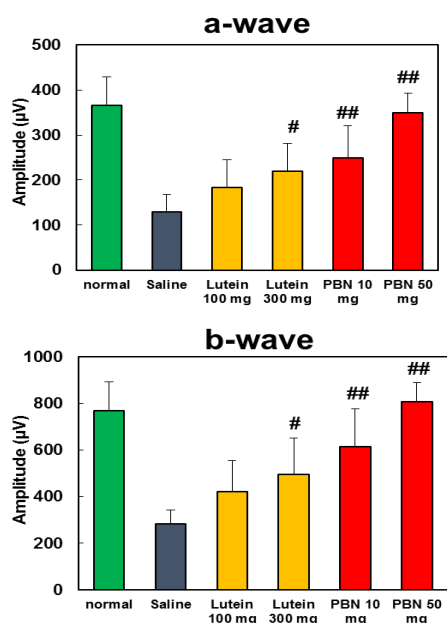


一方で、血漿、網膜、水晶体からはルテイン検出されなかったため、ルテイン投与による網膜電図の振幅増大傾向はその他の因子が関与している可能性が高いと考えられる。

(3) 網膜光障害モデルを用いたルテインの網膜保護作用

対照群では未照射の網膜と比較して a 波、b 波共に有意に振幅が減弱していた。100 mg 投与群では対照群と同様に振幅が減弱しており、有意差はなかったが、300mg 投与群では a 波、b 波共に対照群と比較して有意に振幅の減弱が抑制されていた。その抑制効果は抗酸化物質である phenyl t-butyl nitrone (PBN) 10mg/kg を投与した場合とほぼ同等であった。

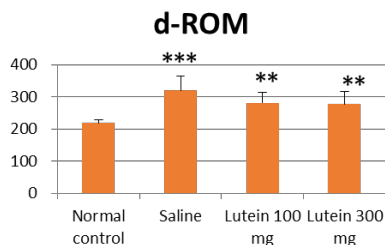
図2 光照射後の網膜電図



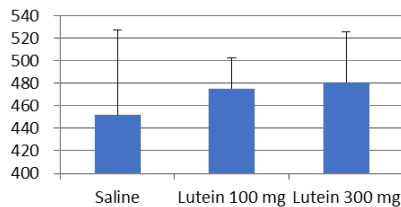
dunnett 法 両側検定, vs Saline, # P<0.05, ## P<0.01

更に、血中の酸化ストレスマーカーについても測定を行った。光照射によって血中の酸化ストレス度 (d-ROM テスト) は上昇していたが、ルテイン投与群では対照群より上昇度が低かった。血中の抗酸化力 (BAP テスト) は全ての群で光照射により上昇していたが、ルテイン 300mg 投与群でより顕著であった。血中の総チオール基 (SHp テスト) は変化が見られなかった。

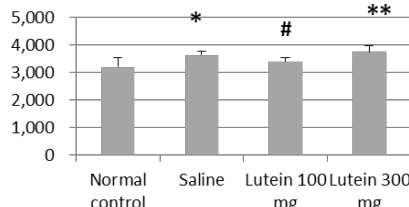
図2 血中酸化ストレスマーカー



SH-p



BAP



dunnett 法 両側検定, vs Normal Control; \*: P<0.05, \*\*: <0.01, vs Saline; # P<0.05, ## P<0.01.

ルテイン投与により血中の抗酸化力が上昇し、光酸化ストレスが濃度依存的に軽減される可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 泰良 (KOYAMA, Yasurou)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：60325058

(2) 研究分担者

海津 幸子 (KAIDZU, Sachiko)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：00325052

谷戸 正樹 (TANITO, Masaki)

島根大学・医学部・研究員

研究者番号：30284037

大平 明弘 (OHIRA, Akihiro)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：00169054