

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592006
 研究課題名（和文） 緑内障の後眼部血流の生理的性状及び薬理効果 猿緑内障モデル眼と
 僚眼の比較
 研究課題名（英文）Studies of blood flow in posterior ocular segment in glaucomatous eyes：
 Comparison between the glaucoma model monkey eyes and the contralateral normal eyes.
 研究代表者
 富所 敦男（TOMIDOKORO ATSUO）
 東京大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：80227628

研究成果の概要：

現在緑内障の治療方法は薬剤や手術による眼圧下降に限られているが、一部の症例ではその効果がなく、視神経乳頭には血流障害のあることが推測されている。本研究によりサルを対象として人の緑内障に近いモデルを作成できることが確かめられ、このサルやウサギを対象として薬剤が血流に与える効果を検討した結果、すでに臨床で利用可能な複数の薬剤が視神経乳頭の血流増加作用を持ち、緑内障の新たな治療方法となる可能性を持つことが明らかになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 眼科学

キーワード：緑内障、眼血流、猿

1. 研究開始当初の背景

(1) 緑内障治療における眼圧下降治療の有効性が確立されている一方、手術等により十分な低眼圧が得られてもなお緑内障による視神経障害の完全な抑制ができない症例がある。薬物による眼圧下降効果には限界があり、また手術療法には感染症等、重篤な合併症のリスクがあるため、眼局所の循環動態への作用や網膜神経節細胞への直接的な神経保護

効果を発揮する薬剤による、眼圧下降以外の機序を介した緑内障治療薬の開発とその臨床的效果の評価が求められている。緑内障における神経細胞障害の主座は視神経乳頭や網膜等、後眼部組織であり、神経細胞に対する薬剤の薬理効果もこれらの部位で発揮されることが期待される。しかし、特に視神経組織の脆弱性と多彩な背景因子を有する緑内障患者を対象としてこれらの研究を行う

ことは、実際には非常に困難である。

我々はこれまで、点眼薬として局所に投与された薬剤が眼内及び眼周囲組織へ移行し、前眼部のみならず後眼部組織に対しても、臨床的に有効な薬理作用の発現が期待できる濃度で到達し得ることを、家兔や猿を用いて明らかにし、点眼薬による後眼部治療の可能性を証明した。さらに猿を用いて高眼圧緑内障モデル眼を作製し、高眼圧緑内障モデル眼の視神経乳頭の形態学的変化を共焦点レーザー眼底走査装置により定量的かつ経時的に検討した。その結果、ヒト緑内障にみられる変化にそれがよく相似することを示し、緑内障モデルとしての妥当性を明らかにしている。特に猿は人と非常に類似性の高い後眼部の網膜視神経構造、血管構造を持つ唯一の実験動物であり、猿の緑内障モデルは緑内障の基礎的・薬理学的研究を行う際の最も優れた対象と考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、サル緑内障モデルを対象としてその眼血流動態や視神経乳頭の形態的・組織的な変化を検討するとともに、眼圧変化や全身的な血管作動薬投与、あるいは緑内障治療薬の点眼の眼血流への影響に関して、正常眼との違いを中心に解析することにより、緑内障眼における血流動態の生理学的・薬理学的特徴を明らかにすることにある。

既報では猿の緑内障モデル作成の試みは複数報告されているが、モデル眼の組織の形態的变化を検討し眼圧下降治療の効果、薬剤の分布動態や安全性を評価するとともに、そのようなモデル眼を用いて後眼部の循環動態を対象として行う薬理学的研究は世界的にも報告がない。さらに片眼性の緑内障モデルを対象とすることにより、同一個体の無処置の対側眼を比較対象として検討することが可能となり、眼循環に関する非常にすぐれた実験系となる。このような実験対象を用いることで、現在ほとんど明らかにされていない緑内障眼における後眼部血流動態の変化と、その血管拡張・収縮薬に対する反応性について新たな知見が得られることが期待される。

本研究の成果は、これまで詳細が明らかになっていない緑内障眼における後眼部の循環動態の変化に関する新たな知見をもたらす、緑内障の病態の解明と眼圧下降以外の機序による新たな緑内障治療薬の開発に大きく寄与し、さらには後眼部の循環障害を原因とする虚血性視神経症や網膜血管閉塞症などの多彩な疾患の治療方法にも応用可能であると考えられる。

3. 研究の方法

以下の全ての動物実験にあたっては、国際基準となっている Association for Research in Vision and Ophthalmology の定めた動物実験のガイドラインを遵守し、動物愛護上の十分な配慮の下に行った。測定・実験は頻回の全身麻酔による悪影響を避けるため可能な場合局所麻酔のみで施行したが、サルに苦痛を与える恐れがある時はケタミンの筋肉内注射による鎮静、あるいはネプタール静脈注射による全身麻酔を行ったうえで施行した。

(1) 猿高眼圧緑内障モデル眼の後眼部循環動態の検討

カニクイ猿(メス、体重 2.2-4.5kg、10匹)の片眼の線維柱帯にアルゴンレーザー照射を行い、持続的な高眼圧による片眼性の高眼圧緑内障モデルを作製した。その後サルを長期飼育し、レーザー処置の前後に、ニューモトノメーターにより眼圧を、超音波眼軸測定装置により眼軸長を、また共焦点レーザー走査型検眼鏡(Heidelberg Retina Tomograph; HRT)を用いて視神経乳頭の断層撮影像による3次元形態の測定を定期的に繰り返し行い、緑内障モデル作成後の変化を定量的に解析した。

また、視神経乳頭部における組織血流動態を、緑内障モデル作成前後でレーザースペックル眼循環解析装置を用いて定量的に測定した。

(2) 一酸化窒素合成阻害薬、カルシウム拮抗薬等の血管作動薬の全身投与がサル緑内障モデルの視神経乳頭血流に与える影響の検討

上述の片眼性のサル緑内障モデルにおいて、血管作動薬の全身投与が視神経乳頭血流に与える影響を検討した。血管拡張薬として一酸化窒素(NO)合成の前駆体であるL-Arginine(L-アルギニン)を、血管収縮薬としてNO合成阻害薬であるL-NAME(NG-ニトロアルギニンメチルエステル)をそれぞれ30mg/kgの量で静脈内投与し、視神経乳頭血流速度の変化をレーザースペックル眼循環解析装置を用いて経時的に解析した。

さらに、血管拡張薬であるカルシウム拮抗薬としてニルバジピン0.001mg/kg、ロメリジン0.01mg/kgの静脈内投与を行い、同様に視神経乳頭血流速度の変化を投与後60分間、経時的に解析した。

(3) 刺激薬、およびプロスタグランドン関連薬の点眼投与がサル緑内障モデルの視神経乳頭血流に与える影響の検討

上述の片眼性のサル緑内障モデルを対象として、交感神経刺激薬(受容体刺激薬)

である塩酸フェニレフリン（5%）と、プロスタグランジン関連薬であるタフルプロスト（0.0015%）を点眼投与した場合の視神経乳頭血流速度の変化を、レーザースペックル眼循環解析装置を用いて検討した。前者は散瞳薬として眼科検査あるいは手術時に頻用されており、後者は眼圧下降作用をもつ緑内障治療薬として臨床的に用いられている薬剤である。

(4) プロスタグランジン関連薬点眼の点眼が、家兔視神経乳頭血流に与える影響と、エンドセリン硝子体注射により惹起される網膜血管収縮に対する影響の検討

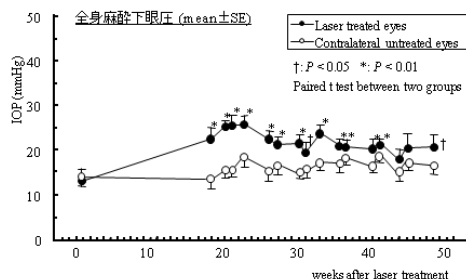
有色家兔を対象として、緑内障治療薬として臨床で利用されているプロスタグランジン関連薬のうち、ウノプロストン（0.12%）、トラボプロスト（0.004%）の単回点眼およびそれぞれ1日あたり2回、1回の7日間の連続点眼後の視神経乳頭血流速度をレーザースペックル法で解析した。さらに、それぞれの薬剤を点眼する30分前に5 mg/kgのインドメタシンを静脈内投与を行ったうえで、同様に視神経乳頭血流速度の変化を評価した。

また、血管収縮物質であるエンドセリン-1（ET-1）を硝子体内に注射した後に惹起される網膜血管の収縮を、眼底カメラによる網膜撮影像のデジタルイメージ上で血管径を定量化し検討した。さらに、ウノプロストン、トラボプロストの7日間の連続点眼後に同様のET-1の硝子体内投与を行い、その効果を解析した。

4. 研究成果

(1) 猿高眼圧緑内障モデル眼の後眼部循環動態の検討

レーザ-処置眼における眼圧は、初回レーザ-照射後には有意に上昇しなかったが、2回目のレーザ-照射直後から平均40-45mmHgに達する有意な上昇を認め、ほぼ全てのサルでレーザ-照射前、かつレーザ-照射を行わなかった対側無処置眼に比べて有意に高い眼圧がその後1年間以上にわたり維持された（ $P < 0.05$ ）。一時的な角膜浮腫やわずかな前房出血を3匹に認めたが、それらはレーザ-照射の後数週間以内に消失した。



レーザ-処置眼の眼軸長は、処置前に平均で18.4mmであったが、処置の6週間後には19.4mmに有意に増加しており（ $P < 0.01$ ）以後は有意に変化しなかった。

HRT測定と眼底写真撮影は眼圧上昇の4週間後からすべてのレーザ-処置眼で可能になった。緑内障モデル眼のHRTのパラメータの中で、緑内障性変化に特徴的なcuppingの拡大とrimの減少に関連するパラメータ（cup area, cup/disc area ratio, cup volume, mean cup depth, maximum cup depth, cup shape measure, rim area, rim volume）は対側眼に比べ有意な増加あるいは減少を、ほとんどの検査時点で認めた（ $P < 0.05$ ）。緑内障モデル眼と対側眼の差は眼圧上昇の4週間後の測定時に最大となり、以後は徐々に減少する傾向であった。

視神経乳頭部における組織血流速度を緑内障モデル作成前後でレーザースペックル眼循環解析装置を用いて測定したが、個体により結果の変動が大きく有意な結果が得られなかった。緑内障モデル作成前後での視神経乳頭の形態変化が強く、測定部位の標準化が困難なためと考えられた。

以上より、カニクイザルの片眼線維柱帯にレーザ-照射を行うことで、有意な高眼圧と視神経乳頭の緑内障に特徴的な形態変化を惹起できることが確認できた。このサルの片眼性高眼圧緑内障モデルが、以降の眼血流およびそこに対して薬物の与える効果を検討する実験において、適切な対象となることが示唆された。

(2) 一酸化窒素合成阻害薬、カルシウム拮抗薬等の血管作動薬の全身投与がサル緑内障モデルの視神経乳頭血流に与える影響の検討

L-arginine投与後、血圧は有意に変化せず（ $P > 0.3$ ）、心拍数は30分後にやや低下した（ $P < 0.05$ ）。視神経乳頭血流速度は緑内障モデル眼と対側無処置眼の双方で同様の変化を示し、L-arginineの投与5分後に約6%、有意に増加したあとすぐに下降して20分後には投与前の水準に戻った。眼圧は実験中、緑内障モデル眼で対側無処置眼に比べて有意に高かったが、L-arginine投与前後ではいずれも有意に変化せず、眼灌流圧には両眼間、またL-arginine投与前後で有意な変化はなかった（ $P > 0.05$ ）。

L-NAME投与後、他の動物での過去の報告と同様に有意な血圧の上昇と心拍数の低下がみられた（ $P < 0.05$ ）。視神経乳頭血流速度は対側無処置眼ではL-NAME投与20分後に約7%の有意な低下を示した（ $P < 0.05$ ）のに対し、緑内障モデル眼では有意な変化が見られな

かった ($P>0.8$)。眼圧は緑内障モデル眼と対側無処置眼いずれも、L-NAME 投与前に比べ投与 30 分後に有意に減少した ($P<0.01$) が、眼灌流圧の変化は統計学的に有意ではなかった ($P>0.05$)。

ニルバジピンの投与後、緑内障モデル眼と対側無処置眼の薬剤投与前の平均眼圧はそれぞれ 18.9 mmHg、14.0 mmHg、60 分後は 11.3 mmHg、9.7 mmHg であり両眼で有意な下降 ($P<0.01$) があつたが、眼圧と眼灌流圧に両眼間で有意差はなかった ($P>0.05$)。経過観察中、血圧に有意な変化はなかったが ($P>0.3$) 心拍数は有意に下降した ($P<0.05$)。視神経乳頭血流速度は、対側無処置眼で投与前に比べ投与 5-10 分後に最大約 12% ($P<0.01$) の有意な増加が認められたのに対し、緑内障モデル眼では約 5% の増加が認められ、統計学的に有意な増加ではあつたが ($P<0.01$) その程度は減弱していた。両眼の視神経乳頭血流速度変化の AUC (血流速度 - 時間曲線下面積) には有意差を認めた ($P<0.05$)。

ロメリジンの投与後、緑内障モデル眼と対側無処置眼の薬剤投与前の平均眼圧はそれぞれ 24.1 mmHg、14.8 mmHg、60 分後は 17.3 mmHg、10.7 mmHg であり、薬剤投与後に両眼で有意な下降 ($P<0.01$) があつたが、眼圧と眼灌流圧に両眼間で有意差があつた ($P<0.05$)。薬剤投与後、血圧に有意な変化はなかったが ($P>0.3$) 心拍数は有意に下降した ($P<0.05$)。視神経乳頭血流速度には、対側無処置眼で薬剤投与前に比べ投与 5-10 分後に最大約 11% ($P<0.01$) の有意な増加が認められたのに対し、緑内障モデル眼では約 6% の増加であり、統計学的に有意な増加ではあつたが ($P<0.01$) その程度は減弱していた。両者の視神経乳頭血流速度変化の AUC には有意差を認めた ($P<0.05$)。

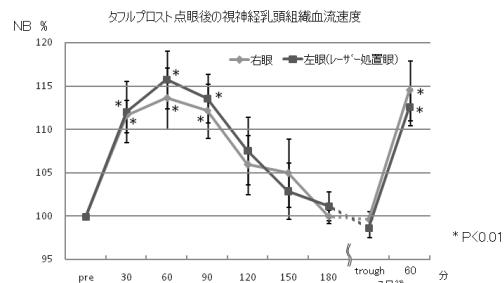
以上より、全身投与された NO 合成の基剤およびカルシウム拮抗薬は、緑内障モデル眼においても他の動物や正常のサル、ヒトでの報告と同様の、有意な血流増加作用を視神経乳頭血流に対して及ぼすものの、カルシウム拮抗薬の血流増加作用は緑内障モデル眼で有意に減弱していることが明らかになった。また一方で、NO 合成阻害薬の投与は、対側無処置眼と異なり緑内障モデル眼では視神経乳頭血流速度に有意な影響を与えなかった。これらの結果は緑内障モデル眼では視神経乳頭血流の薬剤反応性に変化が生じていることを示しその変化の原因としては、血管の器質的・機能的な変化や両眼の眼圧差が推測された。

(3) 刺激薬、およびプロスタグランジン関連薬の点眼投与がサル緑内障モデルの視神経乳頭血流に与える影響の検討

交感神経 受容体刺激薬であるフェニレ

フリンの単回点眼後、180 分間にわたってレーザー-speckle 法による視神経乳頭血流速度、眼圧、血圧等を測定した。対側無処置眼の視神経乳頭血流速度は点眼後 60-150 分にわたって 8-11% の有意な減少を示したが ($P<0.01$) 緑内障モデル眼では 90 分後に 4% の低下を示し ($P<0.05$)、両眼の血流の変化の程度には統計学的な有意差が認められた ($P<0.05$)。点眼後の眼圧には両眼とも有意な変化はなく ($P>0.05$)、血圧には点眼後の有意な上昇 ($P>0.01$)、心拍数には有意な低下 ($P<0.01$) が認められた。

プロスタグランジン関連薬 (FP 受容体アゴニスト) であるタフルプロストの点眼後、同様に 180 分間にわたってレーザー-speckle 法による視神経乳頭血流速度、眼圧、血圧等を測定した。点眼後の視神経乳頭血流速度は、対側無処置眼、緑内障モデル眼、いずれも、60 分後をピークとしてそれぞれ 14%、16% の有意な増加を認め、120 分後以降、点眼前と同等のレベルに戻った。また、タフルプロストの 1 日 1 回 7 日間の連続点眼を行った後に 7 日目の点眼前と点眼 60 分後に測定を行うと、両眼で最終点眼直前の視神経乳頭血流速度は初回点眼前のレベルに戻っており、最終点眼 60 分後には両眼で 13-15% の血流増加が再現され、いずれの時点でも、緑内障モデル眼と対側無処置の視神経乳頭血流速度の変化に有意差を認めなかった。



対側無処置眼、緑内障モデル眼の眼圧は点眼前にそれぞれ 17.8 mmHg、25.7 mmHg と緑内障モデル眼で有意に高く、点眼後に対側無処置眼では有意な変化はなかったが ($P>0.05$)、緑内障モデル眼では点眼 180 分後に 16.9 mmHg へ有意に低下した。血圧には点眼後有意な変化はなく ($P>0.05$)、心拍数には有意な低下 ($P<0.01$) が認められた。

臨床的に頻用される交感神経 受容体刺激薬の点眼が、視神経乳頭血流速度を有意に減少させることを我々は過去に報告しており、緑内障患者に与える影響が懸念されていたが、今回の緑内障モデル眼における検討結果から、緑内障眼において交感神経 受容体刺激薬の点眼が視神経乳頭血流に与える影響は小さいことが推測された。また、緑内障

治療薬であるプロスタグランジン関連薬（ラタノプロスト）の点眼後に視神経乳頭血流速度が増加することを我々は過去にサル眼、家兔眼で報告しているが、緑内障において同様の効果が得られるかどうかは未知であった。今回、緑内障モデル眼において、プロスタグランジン関連薬（タフルプロスト）が同様の血流増加作用を示したことは、緑内障患者においてもこれらの点眼薬による血流増加作用が期待できることを示唆し、臨床的意義が大きい。

(4)プロスタグランジン関連薬点眼の点眼が、家兔視神経乳頭血流に与える影響と、エンドセリン硝子体注射により惹起される網膜血管収縮に対する影響の検討

ウノプロストン、トラボプロストをそれぞれ家兔の片眼に単回点眼した60分後に、視神経乳頭血流速度は約20%有意に増加し（ $P < 0.05$ ）、基剤を点眼した対側の対照眼には有意な血流速度の変化を認めず、両眼の間に有意差を認めた（ $P < 0.05$ ）。眼圧は、それぞれの薬剤で点眼前に16.4mmHgと17.0mmHg、点眼60分後にそれぞれ17.0mmHgと16.0mmHgとなり、有意な変化は認めなかった（ $P > 0.05$ ）。それぞれの薬剤で、7日間の連続点眼後にも同様の視神経乳頭血流速度の有意な増加が認められた。次に、インドメタシンを前投与後に両薬剤を点眼した場合の視神経乳頭血流速度は、インドメタシン投与後から両薬剤の点眼後60分まで、有意な変化を認めなかった（ $P > 0.05$ ）。

ET-1の硝子体注射後、網膜血管径は有意に減少した（ $P < 0.05$ ）。ウノプロストンの単回あるいは1週間連続点眼後、またトラボプロストの単回点眼後には、ET-1投与後の網膜血管収縮は同様に認められた一方、トラボプロストの1日1回の7日間連続点眼後にはこの網膜血管収縮は有意に抑制された（ $P < 0.05$ ）。このトラボプロストの持つ網膜血管収縮抑制効果は、インドメタシンを事前に全身投与することで消失した。

以上の結果から、プロスタグランジン関連薬の緑内障治療薬であるウノプロストン、トラボプロストの点眼が、家兔眼において、点眼側の視神経乳頭血流速度を有意に増加させることから、これらの薬剤が眼局所の経路によって後眼部に薬理的有効濃度で移行し、視神経乳頭において血管拡張作用を發揮したことが示唆された。そしてこの効果がインドメタシンの前投与によって阻害されたことから、これらの薬剤の血流増加作用は内因性のプロスタグランジン産生を介した機序で発現していることが推測された。

さらに、ET-1による網膜血管収縮抑制効果がトラボプロストの7日間連続点眼により抑制されたことは、トラボプロストが点眼後

に薬理的有効濃度で網膜に移行し、ET-1による血管収縮作用に拮抗したことが示唆された。そしてこの効果がインドメタシンの前投与によって阻害されたことから、この作用もやはり内因性のプロスタグランジン産生を介した機序で発現していることが推測された。これらの作用がウノプロストン点眼後に認められずトラボプロストの点眼後のみに認められた要因としては、トラボプロストのプロスタグランジン FP レセプターに対する親和性が、ウノプロストンの親和性に比べて相当程度高いことが関係していると推測された。

これらの結果から、プロスタグランジン関連薬による点眼が視神経乳頭血流の増加作用をもち、特にトラボプロストは緑内障で存在が推測されているET-1に関連した視神経乳頭血流障害に対して、抑制的な作用を持つ可能性が示された。

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2件）

石井清、間山千尋、太田貴史、佐伯忠賜朗、富所敦男、新家眞「塩酸フェニレフリン点眼のサル高眼圧緑内障モデル眼の視神経乳頭末梢循環への影響」第111回日本眼科学会総会、2007年4月19日、大阪

間山千尋、石井清、太田貴史、佐伯忠賜朗、富所敦男、新家眞「ニルバジピン静脈内投与のサル片眼緑内障モデル視神経乳頭循環への影響」第111回日本眼科学会総会、2007年4月19日、大阪

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

特記すべき用件なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

富所 敦男 (TOMIDOKORO ATSUO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80227628

(2)研究分担者

永原 幸 (NAGAHARA MIYUKI)

東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50262134

(3)連携研究者
なし。

(以上)