

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592021

研究課題名 (和文) 微小循環改善薬点眼による未熟児網膜症進行抑制治療の開発

研究課題名 (英文) Pharmacological treatment for retinopathy of prematurity using an eye drop of microcirculation dilator.

研究代表者

塚原康友 (TSUKAHARA YASUTOMO)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20236855

研究成果の概要：高酸素負荷によって誘導した血管新生網膜症モデルマウスにおいて、 $\alpha 1$  受容体阻害薬である塩酸ブナゾシンを点眼することによって網膜虚血の改善と血管新生の抑制を行うことができた。組織学的検討からは  $\alpha 1$  受容体が網膜血管ではなく、神経節細胞に分布していることが明らかになり、塩酸ブナゾシンが血管拡張を通して作用したのではなく、何らかの抗  $\alpha 1$  作用を介して無血管野の減少に貢献したことが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2008 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

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：未熟児網膜症、動物モデル、 $\alpha 1$  受容体阻害薬、点眼治療

## 1. 研究開始当初の背景

近年の未熟児管理技術の発達に伴って超早産児の救命率が上がると、網膜の未熟性に起因する重症の未熟児網膜症 (ROP) の発生率も上昇している。このような ROP は従来の網膜光凝固のみでは止めることが困難で、重度の瘢痕を残すことになる。最近では重症化する前に早期の硝子体手術を行うことが推奨

されるようになってきたが、これはどの医療機関でもできるものではなく、また全身麻酔をかけるなど児への身体的負担も大きい。従って ROP 診療に関しては予防、特に重症化の予防に最大限の努力がなされるべきであるが、現在行なわれている輸液や酸素管理等による予防効果にはおのずと限界があり、よって有効な薬物治療の確立が真に待ち望まれるところである。薬剤による ROP 治療は以前

からビタミン E, インターフェロンの全身投与や NSAID の点眼療法などが試みられているものの、広く効果が認められているものはない。

出生早期から開始できる安全な薬物療法の開発はその後の網膜光凝固や硝子体手術の必要性を減らしたり、施行時期を遅らせることで児の全身的成長を待つことができるメリットがある。

## 2. 研究の目的

我々は ROP の病初期において血管の未熟性を元に高酸素投与が網膜血管成長末端の閉塞を起こす点に着目し、血管拡張作用を持つ薬剤の点眼による局所薬物療法の開発を試みた。点眼治療によって全身への影響をできる限り抑えつつ網膜血管閉塞の改善あるいは解除が可能になれば網膜血管の正常な生育が促進され、ROP の重症化やそれにとまらぬ失明を阻止できるものと考えた。

## 3. 研究の方法

- (1) 生後高酸素負荷による ROP モデルラットを作成し、蛍光剤注入後の網膜展開標本および凍結組織切片にて無血管野や新生血管の発生状態を確認する。
- (2) 同条件で  $\alpha 1$  受容体遮断薬(塩酸ブナゾシン) の点眼を連日施行し、無血管野や新生血管の発生に変化があるかどうかを調べる。また、凍結切片にて新生血管の発生状態を観察する。

- (3) 免疫組織染色によって網膜の発達各時期における  $\alpha 1$  受容体および血管発生に重要な分子の発現と分布を調べる。

## 4. 研究成果

- (1) 新生児マウスを 75%酸素下で 5 日間飼育した後、大気中酸素下でさらに 5 日間飼育を続けた結果、網膜血管床の閉塞と後極部の無血管野の発生を認めた(図 1)。
- (2) 上記の実験系において大気酸素下におかれた時点で微小循環改善薬点眼(塩酸ブナゾシン) を点眼開始した群では対照群(生食を点眼) に比べて総じて実験終了時(実験開始から 10 日目)における無血管野の減少を認めた(図 1、2)。また、塩酸ブナゾシン点眼群は対照群よりも実験終了時の体重が有意に少なかった。
- (3) 塩酸ブナゾシン腹腔内投与群では点眼実験と同様、対照群に比べ無血管野の減少を認めたものの、固体差が存在した。
- (4)  $\alpha 1$  受容体の局在を調べるために上記マウス網膜の凍結切片を作成し、免疫組織染色を行ったところ、網膜の主要血管には  $\alpha 1$  受容体の発現を認めず、神経節細胞と思われる細胞への発現を認めた(図 3)。これは塩酸ブナゾシンが血管拡張を通して作用したのではなく、何らかの抗  $\alpha$

1 作用を介して無血管野の減少に貢献したことを示唆した。

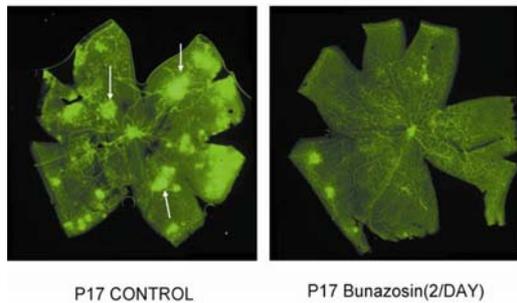


図 1 塩酸ブナゾシンによる血管新生抑制  
左：コントロール眼では広い無血管野と新生血管の発芽(矢印)を多数認める。右：塩酸ブナゾシン点眼群では無血管野と発芽がいずれも大幅に改善されている。

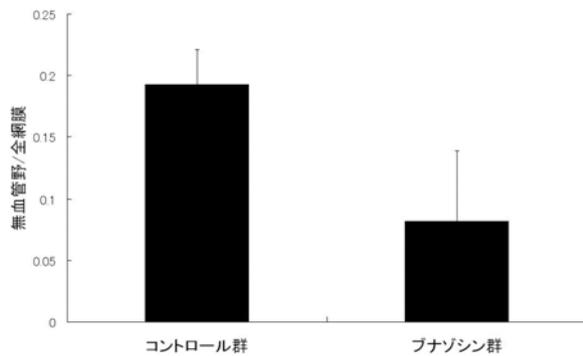


図 2 コントロール群 (n=8) と塩酸ブナゾシン群 (n=7) における総網膜面積に対する無血管野の比率 塩酸ブナゾシン群では有意な無血管野の減少を認める (Mann-Whitney の u 検定にて  $p=0.0018$ )。

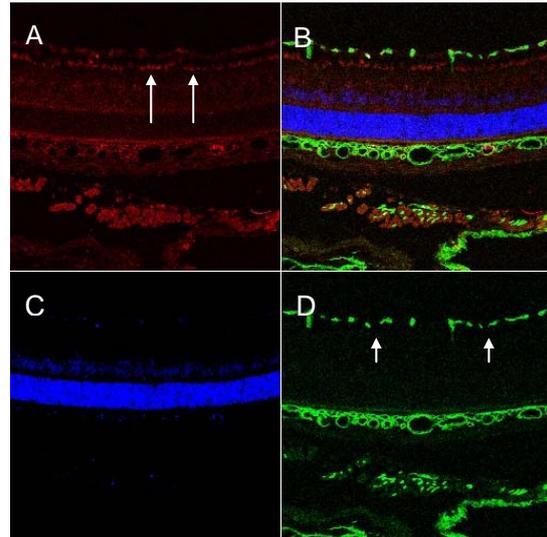


図 3  $\alpha 1$  受容体局在の免疫組織学的同定  
(A)  $\alpha 1$  受容体の免疫反応 (B) 3 種の免疫反応を重ね合わせたもの (C) Topro3 による核染色 (D) PECAM-1 による血管壁(内皮)染色  $\alpha 1$  受容体は網膜内では神経節細胞(長い矢印)に分布し、網膜血管(短い矢印)には存在しない。

現時点では  $\alpha 1$  阻害薬が神経節細胞の受容体にどのように作用し、その後どのような機序で網膜無血管野の減少に寄与するのかわかりません。今後、神経節細胞の細胞株を用いて高酸素時、あるいは低酸素時における  $\alpha 1$  阻害薬の薬理作用を解明する必要があります。また、塩酸ブナゾシン点眼群がコントロール群に比べてエンドポイントにおける体重が少ない事に関しても、同薬の全身への影響についてさらなる検討が必要と思われる。

## 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 2 件)

1. Tagami M, Kusuvara S, Honda S, Tsukahara Y, Negi A. Expression of ATP-binding cassette transporters at the inner blood-retinal barrier in a neonatal mouse model of oxygen induced retinopathy. Brain Res. 2009; Jun 5. [Epub ahead of print] (査読あり)
2. Honda S, Hirabayashi H, Tsukahara Y, Negi A. Acute contraction of the proliferative membrane after an intravitreal injection of bevacizumab for advanced retinopathy of prematurity. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2008;246:1061-1063. (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

1. 田上瑞記、平林宏章、本田茂、森岡一朗、横山直樹、松尾雅文、根木昭. 母体喫煙の重症未熟児網膜症進展に対する抑止効果について 第 62 回日本臨床眼科学会 2008. 10. 23 ~26 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塚原康友 (TSUKAHARA YASUTOMO)  
神戸大学・医学研究科・准教授  
研究者番号 : 20236855

### (2) 研究分担者

本田茂 (HONDA SHIGERU)  
神戸大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号 : 60283892

石橋一樹 (ISHIBASHI KAZUKI)  
神戸大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号 : 2032493

### (3) 連携研究者

該当なし