

第100回 日本眼科学会総会 宿題報告 III

網膜視神経移植

網膜色素上皮移植

玉井 信

東北大学医学部眼科学教室

共同研究者

石黒 誠一, 中沢 満, 山田 孝彦, 阿部 俊明, 吉田 晶子
西川 真平, Durlu YK, 赤石 佳子, 佐久間健彦, 山田 桂
武田 宜之, 吉田まどか, 赤坂 佳子, 金久保喜則

要 約

社会の高齢化に伴い, その頻度が増した加齢黄斑変性と, 現在治療のない網膜色素変性は視力障害の重篤なことで患者数の多さから網膜における代表的な疾患である。近年, 移植によってこれらの難治性疾患の視機能回復をはかることが考えられるようになった。我々は視細胞維持のために欠くことのできない網膜色素上皮細胞(RPE)を移植するための基礎研究を行った。

1) RPEは合成するcytokineおよびその受容体の多様性が特徴的である。関連するcytokineには多くのものが知られ, それぞれがautocrine, juxtacrine, paracrine的に眼内組織を構成する細胞に作用し, その多彩な機能を発現している(cytokine network)ことを文献的に考察した。さらに, ヒト網膜色素変性と発症のメカニズムは異なるものの, 生後1~2か月で視細胞が変性消失するRoyal Collage of Surgeon's (RCS)ラットを用いRPE移植によってその進行が阻止されること, 同様の効果が塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)の投与でも起きることから, 視細胞保持のためRPE移植またはこのcytokineの利用もあり得ることを示した。

2) 臨床応用を考え, 移植に使用する色素細胞をどこから得ることができるかを考察した。新鮮または培養に必要な患者自身のRPE(自己: autograft)を得ることを試みたが成功しなかった。そこで, 何らかの理由で妊娠中絶した胎生21週以前の胎児からRPE(同種: allograft)を分離した。このRPEは分離直後の新鮮なもの,

それを様々な期間培養したもの, その培養細胞を2か月まで同様に凍結保存し, 再度融解したものなどを移植実験に利用した。また, 自己組織(autoraft)を利用するため, 採取可能な自己の虹彩色素細胞(IPE)の利用が考えられることを実験的に示した。培養および凍結保存によるRPE, IPEの性質の変化は, 色素細胞の標識酵素であるtyrosinase, tyrosinase related protein IとII(TRP-IとII)の発現を分子生物学的な手法を用いて調べた。長期間凍結保存しても細胞活性は低下せず, また, 色素細胞に特徴的な性質も保持されていた。これらの結果は, 将来HLAの適合性も含め, 症例によって適したRPEまたはIPEを随時利用可能な“色素上皮細胞バンク”とも呼ぶべき施設設置の可能性を示している。

3) 同種または異種RPE移植による免疫反応の有無は, 臨床応用を考える上で大切である。過去に報告された通り, 我々の動物実験では同種はもとより, 異種(xenograft)であるヒトのRPE, IPEを移植してもはっきりした炎症反応はみられない。さらに, モデル動物のRCSラットでは異種である培養ヒトRPE移植により, 視細胞の変性が阻止されるとともに本来視細胞の変性過程で出現するmajor histocompatibility(MHC)class II陽性細胞の出現も抑制されることが明らかになった。しかし, 異種であるヒトRPEをcollagen sheetに培養し, ウサギ前房に長期間移植した場合には網膜電図(ERG)が減弱し, 網膜下腔には大食細胞の遊走も観察された。移

別刷請求先: 980-77 宮城県仙台市青葉区星陵町1-1 東北大学医学部眼科学教室 玉井 信
(平成8年10月24日受付, 平成8年11月14日改訂受理)

Reprint requests to: Makoto Tamai, M.D. Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine.
1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi-ken 980-77, Japan

(Received October 24, 1996 and accepted in revised form November 14, 1996)

植していない僚眼にも影響が現れており、全身的な何らかの免疫反応が起きていることを示していた。これは臨床応用を考える上で今後慎重に検討する必要がある。

4) 網膜変性症モデル動物の RCS ラットでは、同種、異種 RPE, IPE を移植した結果視細胞変性を阻止することが出来た。さらに、細胞増殖因子として働く cytokine がこのモデル動物の視細胞変性を阻止できるという実験結果に基づき遺伝子操作を加え、bFGFcDNA を導入した同種 IPE を作成、移植を試み、視細胞変性阻止効果を確認した。これと遺伝子の運び屋である vector のみのもの、本来の IPE と比較し、差があるかどうかはまだ明らかでないが、視細胞死を有効に阻止することができれば、このような遺伝子技術を用いて特定の性質に

変換させた色素細胞移植という方法も、安全で将来役立つものと思われる。さらに、臨床応用を念頭においてウサギ、サル眼球で硝子体手術後に網膜裂孔を作成し、培養 RPE や IPE の移植を行った。特に明らかな免疫反応はみられなかったし、術後6か月を経ても増殖性硝子体網膜症などの変化は示さなかった。(日眼会誌 100: 982-1006, 1996)

キーワード：網膜色素上皮移植, 眼内免疫, 虹彩色素上皮移植, 培養細胞, 冷凍保存, 神経栄養因子, 神経成長因子, サイトカイン, 遺伝子導入, 塩基性線維芽細胞成長因子

Retinal Pigment Epithelial Cell Transplantation: Perspective

Makoto Tamai

Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine

Abstract

Age-related macular degeneration is one of the most serious diseases in elderly people because of its disastrous visual outcome and its prevalence. Even if the submacular and choroidal neovascular membranes could be surgically excised, severe damage or evacuation of retinal pigment epithelium is inevitable in the operated area. Pigmentary dystrophy is also a devastating hereditary eye disease with severe visual disturbance. Up to now, there have been no effective treatments for either of them. We conducted basic experiments on retinal pigment epithelium (RPE) culture, transplantation of the cells to the subretinal space of animals, especially, the Royal College of Surgeon's (RCS) rat, a model of hereditary retinal degeneration, and observed their effects in preventing photoreceptor cell death.

1) We reviewed recent reports of RPE function in relation to cytokine production and autocrine/paracrine function of these ligands. Some cytokines with strong mitogenic effects as nerve trophic/growth factors were able to rescue photoreceptor cell death in dystrophic, ischemic, and light-damaged retinas in the rats. We transplanted allograft pigmented RPE from Long Evans rats or xenograft, human and bovine RPE into the subretinal space of RCS rats, and could observe the retardation of the photoreceptor cell death.

2) As a source of human transplantable RPE in clinical practice, we could use patients' own RPE cells as autografts or those from aborted human fetus eyes as allografts. At present, we cannot use RPE cells from different species as xenografts. We

tried to obtain enough RPE cells for culture *in vitro* from patients with large or giant retinal tears, but were unsuccessful. Cells were easily obtained from fetus eyes, and could be cultured and transplanted as fresh, primary, or multiple passage cells. We also tried cryopreservation of these cells for up to 3 months. Enzymatic expression of tyrosinase, tyrosinase related protein I and II and some other enzymes was examined by proliferating chain reaction to detect possible transformation during the procedure. The cell characteristics were well preserved. In the future, if these RPE cells could be safely kept and available in deep-frozen condition, we could use them clinically at the appropriate time and in appropriate numbers for patients as an "RPE bank" just like an "eye bank" for corneal transplantation.

3) Immunological reaction is very important if we consider this technique for clinical application. Up to now, in experimental animals, no immunological reaction has been reported even for xenograft human RPE in rats, in funduscope and histological examination, because the intraocular space is an immunologically privileged site. But transplantation of human RPE cells with a collagen sheet into the anterior chamber in rabbits caused a definite reaction detected by suppression of the electroretinogram and macrophage infiltration into the subretinal space, not only in the operated eye but also in the contralateral non-operated eye. These results suggest that we must be cautious in clinical use of heterogenous RPE transplantation. The expression

of MHC class II cells was observed in the course of photoreceptor cell degeneration in the RCS rats but it was suppressed if they were rescued by the transplantation of human cultured RPE in these animals.

4) For clinical application of this technique, autografts are naturally much better than the xeno grafts or allografts. We tried to use iris pigment epithelium (IPE) for transplantation because it consists of pigmented cells of neural origin and enough could be obtained with ease by peripheral iridectomy. We also tried transfection of a vector (pCNX2) or vector-inserted cDNA of rat bFGF into the rat IPE and transplanted into the subretinal space of RCS rats. These transfected cells expressed strong mRNA of bFGF. The photoreceptors were

well preserved and immunological reaction could not be detected by funduscopical or histological examination. If we could use the IPE of the patients themselves for transplantation, either wild or modified with molecular techniques, it would be much safer and easier. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 982-1006, 1996)

Key words: Transplantation of retinal pigment epithelium, Intraocular immune reaction, Iris pigment epithelium, Cultured cell, Cryopreservation, Neurotrophic factor, Nerve growth factor, Cytokine, Gene transfection, Basic fibroblast growth factor

I 緒 言

様々な生体組織の移植技術が進むにつれて、角膜移植術の長い伝統を持つ眼科領域においてもその可能性が話題になるのは当然のことである。日本眼科学会創立100周年の記念すべき宿題報告として、視覚系における“移植”が取り上げられたことは、次の100年に向かって何をすべきかを考える時、実に意義深いものと考えている。

眼球内が移植の場として利用されてからすでに100年以上の歴史がある。それはこの空間が観察しやすいのみでなく、移植された個体から免疫的な攻撃を受けないため移植片の生着がよいことがわかってきたためであった。さらに、網膜の移植が眼球内に試みられるようになったこと、Royal College of Surgeon's (RCS) ラット網膜下に異種網膜色素上皮(RPE)を移植することにより視細胞(PR)の変性が阻止できたという驚くべき結果の報告をみてからRPE移植が現実味を帯びてきたように思う^{1)~3)}。我々は過去数年にわたって視覚系のうち、PRおよびRPEに焦点を当て、その培養と*in vitro*における分化、RPEによる外節貪食能などについて報告⁴⁾し、さらに、“移植”の可能性についても考えてきた⁵⁾。視覚研究におけるこの分野は、その言葉の持つ魅力ある“響き”にもかかわらず、研究者および研究機関が限られており、研究結果が蓄積されてきたのは最近数年である。しかし、情報網の発達、科学技術の進歩が急激なため驚くべきことに、すでにPRまたはRPE移植の臨床応用が一部の国で行われ、マスコミにその情報が流されている。しかし、その内容は実験的な意味合いが強く、結果も不十分で、その是非については議論の余地がある。

我々は宿題報告者として指名されてから2年間、特にRPEの移植に限っていろいろな面から、そして当然のことながら、最終的には臨床応用を目指して研究を進めてきた。そこで、RPEの機能異常が病態の主役を演じていると考えられる疾患を、その“移植”によって治療しよう

と考えた場合、現在どんなことが問題になっているか、それを確立するためにはどんな問題があるかについて、以下の項に従って述べてみたい。

1. 最近明らかになったRPEの機能。
2. どんな疾患がRPE移植の対象となるか。
3. 移植に使うRPEはどこから得るか。
4. RPE移植で免疫反応は起きるか。
5. 動物のRPE移植実験でわかったこと。
6. 将来への展望—治療目的にあったRPEの作成と移植法。

今回の実験はすべての操作が日本眼科学会倫理規定に基づき、かつ、東北大学倫理委員会の承認のもとに行われた。

II 最近明らかにされたRPEの機能

我々の生体において細胞相互の働きは独立したのではなく、生理活性物質(bioactive substance)またはcytokineと呼ばれる比較的分子量の小さな蛋白質を介してその細胞自身、また、比較的近接した細胞の働きと密接に関係していることが明らかにされつつある。この働きにはcytokine自身(ligand)とともに細胞表面の膜に存在する受容体(receptor)が深く関与していることもわかった。RPEが神経外胚葉から分化した上皮細胞であり、良く知られた柵機構、貪食能などの働きの他に表1に示す様々なcytokineを分泌し、RPE自身(autocrine)、それに接する周囲の細胞(juxtacrine)、経血液循環ほどではないが、少し離れた所にある細胞(paracrine)に対し大きな働きをしている神経分泌細胞と表現しても良いことが近年急速に明らかにされ、幾つかの眼内病変がRPEの働きを中心とした分子のレベルで説明されるようになりつつある⁶⁾。以下に現在まで報告されたcytokineについて略記する。なお、表中の+は蛋白質として存在が証明されたもの、-はまだ報告がないことを示す。

表 1 網膜色素上皮(RPE)に存在するサイトカインおよびその受容体

蛋白 受容体			蛋白 受容体		
b-FGF	+	+	PDGF	+	+
EGF	+	+	VEGF	+	+
TGF- α	+	+	TNF- α	+	+
TGF- β	+	-	IGF-1	+	+
PEDF	+	-	IL-1, 2, 6, 8,	+	+

b-FGF: basic fibroblast growth factor, EGF: epidermal growth factor, TGF- α : transforming growth factor- α , TGF- β : transforming growth factor- β , PEDF: pigment epithelium-derived factor, PDGF: platelet-derived growth factor, VEGF: vascular endothelial growth factor, TNF- α : tumor-necrosis factor- α , IGF-1: insulin-like growth factor-1, IL-1, 2, 6, 8: interleukin-1, 2, 6, 8

1. Pigment epithelium-derived factor(PEDF)

ヒト胎児 RPE から分離されたもの⁷⁾で、Y-79 細胞の分化、すなわち花冠状の形態、neuron specific enorase の発現を促すという⁸⁾、DNA およびアミノ酸配列から serine protease inhibitor (serpin) supergene family であることが明らかにされた⁹⁾。

2. Platelet-derived growth factor(PDGF)

PDGF-A chain(PDGF-A), PDGF-B chain(PDGF-B), PDGF receptor alpha and PDGF receptor beta が知られており、ヒトおよび多くの実験動物の RPE で産生され、存在する¹⁰⁾¹¹⁾、RPE, glia に対し angiogenic, mitogenic, chemotactic に働くことが明らかになっている^{12)~14)}。

3. Transforming growth factor alpha and beta (TGF- α and β)

最初に発見された細胞増殖抑制機能を持つ cytokine で、ヒトを含めた哺乳類の RPE で産生され、血管内皮細胞や RPE の成長、創傷治癒と関係している^{15)~17)}。しかし、TGF- β 1 と TGF- β 2 があり、前者は RPE では産生されず、その増殖を抑えるのに対し¹⁸⁾¹⁹⁾、後者は RPE で産生され増殖、運動、collagen, glycoprotein の合成を促すといわれる²⁰⁾。

4. basic fibroblast growth factor(bFGF)

神経細胞の分化、維持、分裂促進、血管新生、硝子体増殖性疾患に関与し、さらに、培養 RPE が bFGF を産生すること、また、それ自身が bFGF 受容体を持つために autocrine 効果を持つことが示されている^{21)~24)}、RPE が血管内皮細胞と同様に、血管新生に対して刺激作用を持つ cytokine を分泌していることは興味深い。ヒト加齢黄斑変性(age-related macular degeneration, ARMD)のサンプルから TGF- β およびその受容体とともに存在が確認されており、この疾患の病態に深くかかわっていることを示している^{25)~27)}。

5. Insulin-like growth factor(IGF)

インスリン類似の構造を持つ peptide で二種類(IGF-

1, IGF-2)が知られている。いずれもヒト RPE で合成されており、受容体も確認されている。この peptide は他の cytokine と異なり、循環血液中に多量に含まれ、RPE に対し強力な分裂、増殖促進作用を持ち、インスリン同様に代謝促進作用を持つ。IGF-1 は視細胞間物質にも含まれ、PR, RPE 間で autocrine-paracrine 的に働いていることが確認されている^{28)~30)}。

6. Interleukin(IL) : IL-1, 2, 6, 8

RPE が炎症細胞、線維芽細胞、astrocyte, Müller cell などが産生する IL 群の cytokine、特に IL-1 β , TNF- α の刺激に反応し、IL-6, 8 を合成、分泌することはぶどう膜炎の病態解明と関連して研究されている。IL-8 は別名を neutrophil chemotactic factor と呼ばれるように好中球やリンパ球遊走を引き起こす³¹⁾、IL-6 は白血球系の細胞と同じように B-リンパ球、T-リンパ球の活性化と深くかかわっている他に、astrocyte を刺激して神経成長因子を分泌させるため、神経網膜の成長、維持、修復に重要である^{32)~35)}。IL-6 は硝子体手術を必要とする糖尿病網膜症や増殖性網膜症の硝子体に多く含まれている³⁶⁾。

7. Tumor necrosis factor alpha(TNF- α)

非常に強い増殖促進作用を持つ。特に、endothelial growth factor(EGF) に比べ細胞数が比較的少ないときに強い作用を発揮するという³⁷⁾、また、この cytokine は IL-1 β で刺激されると発現するようになることが報告³⁸⁾されている。

8. Vascular endothelial growth factor(VEGF)

眼内の血管新生に深くかかわっていることが明らかになった VEGF が RPE から合成分泌され、さらに、bFGF と相乗的(synergistic)に働くため、より強力な血管新生活性を示すことが明らかになった³⁹⁾⁴⁰⁾。このように血管内皮細胞だけでなく、RPE から産生されている VEGF は眼内血管新生の主役を演じ、臨床的にも今後大きな問題になるだろう⁴¹⁾⁴²⁾。

以上の報告は、cytokine に関して *in vivo*, *in vitro* の RPE を使って調べた結果である。このように多様な機能を持つ RPE は、正常状態では PR, Müller 細胞と視細胞間物質(interphotoreceptor matrix, IPM)を介して相対し、極性をもって Bruch 膜に接着している。視細胞を正常に維持するためには IPM も重要で、RPE と視細胞によって分泌され、両方の細胞形態、極性、分化、遺伝子発現、代謝活性などに影響を与え、生存そして細胞死に大きく関与していることが報告⁴³⁾されている。これら多くの因子が状況に応じて変化し、ここに述べた cytokine によって修飾され、それぞれの細胞膜に存在する受容体を介して細胞内に情報を伝え、細胞骨格蛋白を介して核にそれが伝達される。我々の様々な器官が cytokine によって影響し合っている関係は“cytokine network”と表現されている⁴⁴⁾が、眼内空間の RPE に限ってみても、例えば bFGF は強力な分裂促進作用を持つが、RPE 自身に

よって産生され、自身の受容体を介して autocrine 的に働き、また周囲の RPE に juxtacrine, paracrine 的に働いて、状況に応じて多様な反応を引き起こし、さらに、type-1 plasminogen activator inhibitors や NO, NOX との関係ももっていることが明らかになっている⁴⁵⁾。

このような RPE の多様な性質を知るとき、我々が臨床において RPE のどの性質、または機能を必要として移植を行うのかを常に念頭におく必要がある。それは次に述べる“対象となる疾患”によっても異なるであろうし、新しい知見が得られるたびに変わって来るであろう。例えば、成長因子/栄養因子が視細胞の生存に欠くことのできないことが最近の研究で明らかにされ、さらに、遺伝子工学の手法を用いて確かめられて来ると、成長因子によって視細胞をその死から救うことができないかと熱心に考えられるようになる⁴⁶⁾。

III どんな疾患が移植の対象となり得るか

RPE が柵機能や貪食能の他に、前項で述べたような多くの cytokine を産生、分泌し積極的に網膜全体の恒常性を保つために大きな働きをしていることは、とりもなおさず、一層の RPE が生涯、神経網膜を栄養、保持し続けなければならないために備えられた装置であろうと思われる。その異常は即座に視機能を脅かすことになりかねない。

RPE は眼底の部位により機能的、形態的の違いがあることは報告⁴⁷⁾⁴⁸⁾されているが、それが病型にどのように影響するかは現在まで問題にされていない。例えば黄斑部から生じ、ほとんどその部に限られる疾患、周辺部から発症し、決して後極部に向かわないもの、最終的には黄斑部も含んで眼底全体が侵されてしまうもの、などがあるということは光学的特性や脈絡膜循環の部位による相違に加えて RPE の機能的、形態的の違いも影響しているであろう。このような視点から眼底疾患を考えることは興味深いが、現在のところ RPE 移植に関してそのような細かいレベルでは対応できていない。

RPE を移植する目的は大きく二つに分けて考えることができる。第一は意図的であれ、手術による二次的であれ、欠損した RPE の代わりに新しい健康な細胞を移植し、補うことによって今までと同じ機能、例えば貪食機能や柵機能を発揮させようとするものである。この場合、適応となる疾患は病変が眼底の局所、特に黄斑部に限られることが原則であろう。理由は眼底全体を神経網膜を損傷することなく、新しい RPE で置き換えることは現在のところ考えられないからである。第二の適応となるであろう疾患は、RPE の機能が本来は正常範囲であっても、他の細胞、例えば視細胞に異常があり、変性脱落してしまう場合、その発症を防いだり、正常とまではいかなくても少しでも機能を維持させる目的で移植しようとするものである。後者の場合、移植した RPE は分泌機能とし



図1 加齢黄斑変性眼底(術前)。

- a: 走査レーザー検眼鏡赤外光(SLO: IR)で撮影したもの。
- b: 蛍光眼底撮影後期。新生血管膜に蛍光色素が貯留している。
- c: SLO によりインドシアニンググリーン(ICG)蛍光眼底撮影。増殖膜が脈絡膜血管の像をかくしている。(図3, 4のa~cも同じ方法で撮影した写真である。)

てある種の物質、例えば cytokine を分泌し、その作用が十分強力であれば必ずしも本来の位置、すなわち、Bruch 膜上に、極性をもって一層に並んでいるという状態になくともよいかも知れない。さらに、遺伝子工学の技術により特別の機能を持たせることができれば、すでにある RPE の能力に相乗的に加わえることによって目的を達することができる可能性がある。この考えはいい変えれば、生きた細胞を用いた drug delivery system (DDS) と考えられ、中枢神経系ではすでにこの発想に基づいて、基

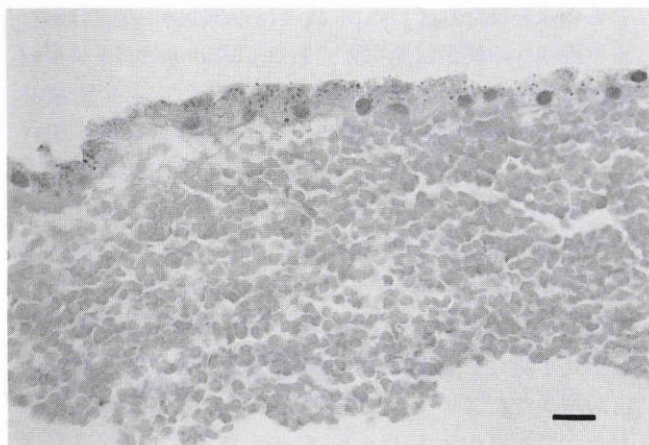


図2 黄斑下手術により除去された凝血塊。

手術時に採取された増殖組織や血腫を見ると視細胞側は必ず色素上皮細胞が縁取っており、手術によってこの細胞層が増殖組織と一緒に除去されてしまうことを示している。ヘマトキシリン・エオジン染色、バーは5 μm

礎研究のみでなく臨床応用がされている⁴⁹⁾⁵⁰⁾。移植に対するこれら二つの考え方を厳密に区別するのは困難かも知れないが、眼科領域で我々がその適応となるであろう、と考えている疾患の代表例を述べてみよう。

1. 加齢黄斑変性(Age-related macular degeneration: ARMD)

移植が第一の目的に含まれる疾患はARMDである。本疾患はRPEの加齢に伴う機能異常によって、脈絡膜からBruch膜を通して黄斑部またはその近傍に形成されるRPE下および神経網膜下の新生血管を伴う結合組織の増殖である⁵¹⁾(図1)。それは結果的に視機能にとって最も重要な黄斑部錐体細胞の変性、脱落を加速させてしまう。現在までのところ、laser光凝固療法では満足すべき結果が得られない。最近、cytokine-blocking strategiesや全身的なreceptor antagonistsの投与、さらには放射線照射によって血管新生を抑制することが可能であると報告⁵²⁾⁵³⁾されている。しかし、すでに完成された症例には手術によって増殖組織を除去することが試みられ、次第に普及しつつある^{54)~58)}。ところが、摘出した組織の検索、術後の眼底所見から外科的な操作を加えると、必然的にRPEと一緒に除去してしまうことも明らかになった⁵⁹⁾⁶⁰⁾(図2)。術前、後の画像解析をしてみるとRPEが欠損していることは明らかで、時間の経過とともに脈絡膜血管も萎縮してしまうことがわかる(図1, 3, 4)。ARMDと異なり、presumed ocular histoplasmosis syndrome(POHS)では術後視力が良好である理由はRPEが保持されるためであるといわれ⁶⁰⁾、ARMDでも視細胞が十分機能し、術後の視機能を高めるためには欠損部をRPEで再び覆う必要があると考えるのは自然である。現在、最も移植対象として考えられている疾患は、このような増殖組織除去後のARMDである。他の症

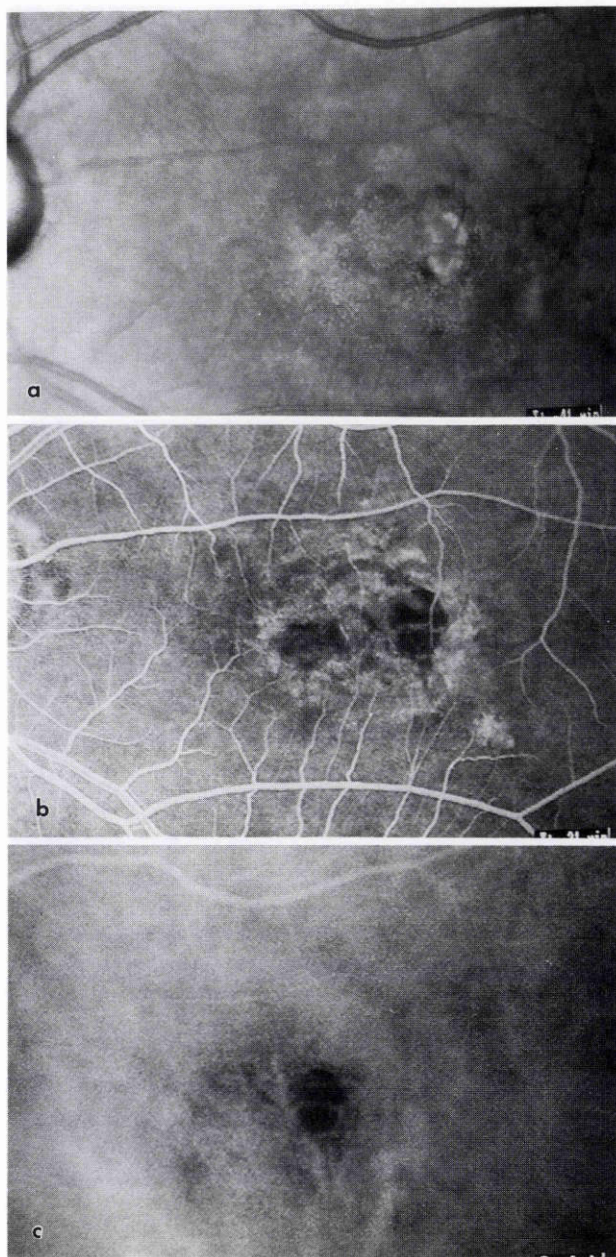


図3 図1に示した症例の術後2週間目の眼底像。黄斑下にあった増殖膜は除去されている。しかしcにみられる通りRPEは欠如し、脈絡膜血管板が萎縮したために強膜まで透けて見える。

例で欠損部がRPEで再び覆われれば機能が回復することは推測され、きちんと経過観察できた色素上皮裂孔の症例ではすでに明らかにされている⁶¹⁾⁶²⁾。

2. 網膜色素変性

現在まで明らかになった網膜色素変性の視細胞変性メカニズムは、常染色体優性遺伝型式の場合 rhodopsin, peripherin/RDS, ROM-1 の各遺伝子異常、常染色体劣性遺伝型式の場合 cGMP phosphodiesterase beta-subunit, arrestin の各遺伝子異常、性染色体性遺伝子異常などが同定されている⁶³⁾⁶⁴⁾。これらの原因遺伝子はいずれも視細胞に特異的に発現しているの、それによってのみ視細胞が変性することがこの疾患の本体であると

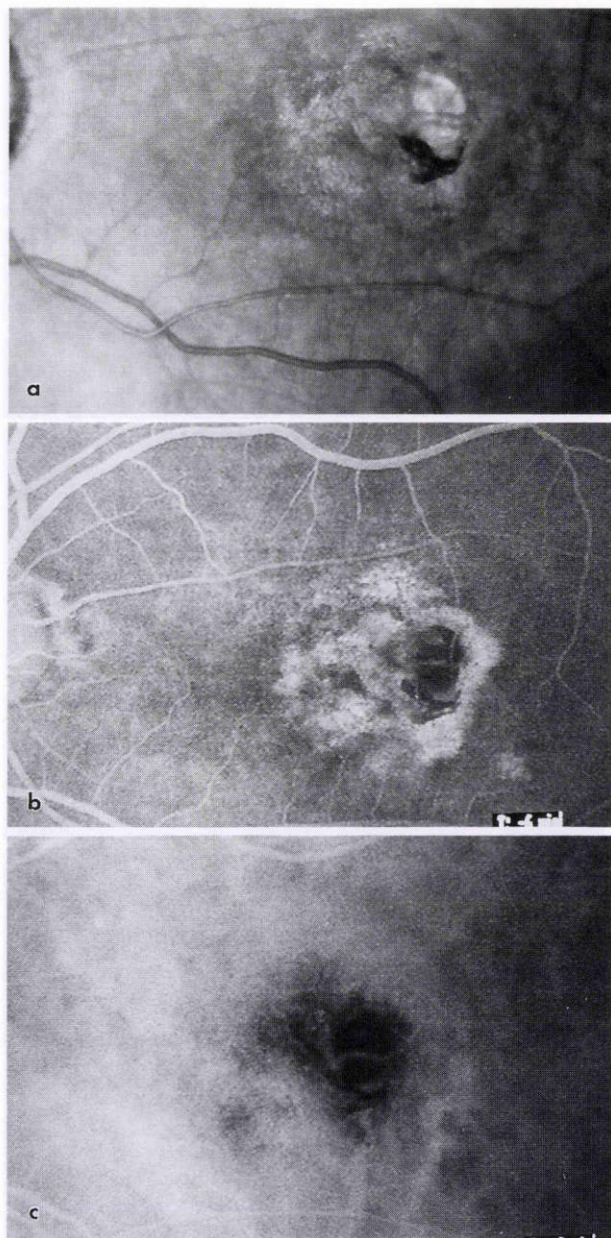


図4 図1に示した症例の術後2か月目の眼底像。網膜色素上皮(RPE)の傷害による黄斑部のRPE, 脈絡膜の欠損部が拡大している。周囲のRPEが増殖して欠損部を埋めることはみられなかった。

すれば、それぞれの症例に対して、少なくとも劣性遺伝型式の場合正常野性型遺伝子を導入することが本来この疾患に対する遺伝子治療となる。しかし、様々な工夫をするにしても遺伝子導入を *in vivo*, *ex vivo*で行ったり、正常(野性型)視細胞移植をし、中枢側神経細胞とシナプス結合を再形成させるのは容易でない。さらに、優性遺伝型式の場合、このような方法でも困難であろう。

一方、遺伝子異常の部位が決定されたとしても、その異常と最終的な視細胞死が直接つながっているとは限らず、両者の間にあるメカニズムは未だ不明である⁶⁵⁾。興奮性アミノ酸は神経細胞毒としての性質をもつことが近年脳虚血の研究から明らかにされ、網膜の病態を考える上

でも興味を持たれているが、我々は視細胞から双極細胞、水平細胞への興奮伝達物質である glutamic acid が視細胞死に関係しているのではないかと考えている⁶⁶⁾。我々の研究から、視細胞にこのアミノ酸の過度の蓄積が起きていることから、それによって神経細胞の虚血時にみられるようなメカニズムで視細胞死が引き起こされている可能性は十分にある⁶⁷⁾。また、別のメカニズムによる計画的細胞死(programmed cell death: apoptosis)も考えられ得るかも知れない。もしそうであれば、何らかの方法で細胞死を防ぐことができれば、遺伝子異常による異常蛋白が産生されていても、視細胞をさらに長く保つことができるであろう。いい換えれば、先に述べたような神経栄養因子と呼ばれる一群の cytokine が細胞の生存に深くかかわっていることから、もし、RPE が神経栄養因子を分泌する特殊機能を遺伝子導入技術によって付与され、移植されれば視細胞死を防ぎ、結局は網膜色素変性の治療に役立つことになる可能性がある。実際、ヒト色素変性網膜で、神経栄養因子の一つである bFGF が残存視細胞に高濃度に存在することが示されているし、のちに述べる通り、実験動物では高濃度 bFGF 投与によって視細胞変性が阻止されている⁶⁸⁾⁶⁹⁾。

IV 移植に使用する RPE はどこから得るか

RPE の移植を考える場合、移植する細胞(donor cell)は得られたものを新鮮なままで使用する場合と、一旦培養系に移した後に用いる場合とがあり得る。しかし、継代培養すると増殖能を持つ変わりに細胞は培地を交換する度に(multiple passages)その細胞の持つ分化した性質を失う(脱分化)ことは一般的である。それを避けるためには初代培養(primary culture)細胞を用いるが、いずれにしてもそれぞれの細胞の特性を考えた上で RPE の臨床応用を考えるべきであろう。

1. 自家移植の場合 autograft)

1) 自分自身の RPE

自己組織移植は非自己組織の移植を考える場合、避けることのできない拒絶反応がないという意味では最も理想的な方法である。しかし、RPE の場合、移植に十分な量をどのように採取するかが問題である。例えば、片眼が何らかの理由で機能しておらず、しかも、RPE の機能は正常でその利用が可能であるとすれば、摘出したうえで十分に時間をかけて採取し、利用できるであろう。しかし、一般的には、同じ眼球の、視力に関係しない周辺部から採取しなければならない。この方法では得られた RPE を primary culture し、増殖させ移植するのに十分な細胞数を得ることは危険を伴うし、困難である。また、下記の5の条件で数を増やしたくても、現在知られている増殖因子の利用では、ある程度の数の細胞がなければ培養系で増殖させることができない。RPE に対し非常に強力な分裂増殖を促進する $TNF\alpha$ でも一つの培養皿に数千から数

表 2 虹彩色素上皮の遺伝子発現

		Tyrosinase	TRP-1	TRP-2	CRALBP	IL-6	b-FGF
新鮮		+	+	+	—	+	+
培養(P-4)		+	+	+	—	+	+
培養(P-15)		—	+	+	—	+	+
保存(−80℃)	3 日	—	+	+	—	+	+
	10 日	—	+	+	—	+	+
	30 日	—	+	+	—	+	+

TRP-1: tyrosinase-related protein-1, TRP-2: tyrosinase-related protein-2, CRALBP: cellular retinaldehyde-binding protein, IL-6: interleukin-6, b-FGF: basic fibroblast growth factor

万個が必要である。我々はヒト硝子体手術と同じ条件を課した実験動物(ウサギ,サル)の眼から培養に必要な十分量(細胞数)を採取することも試みたが,成功しなかった。強膜—脈絡膜—網膜の生検の方法は報告されているが我々は試みていない⁷⁰⁾。

2) 自分自身の虹彩色素上皮細胞

虹彩色素上皮細胞(iris pigment epithelium, IPE)は発生学的に眼杯内板と外板の前端部が色素上皮に分化したもので,神経堤由来の虹彩実質と結合した構造をしている⁷¹⁾。そのため,本来 RPE と同じ遺伝形質をもっているはずで,もし IPE が RPE の機能を発現し,視細胞を維持することができれば,採取しやすいこと,安全に十分量を得ることができること,局所麻酔で都合のよいときに採取を行えること,自己の細胞であるため免疫反応を考慮する必要がない,など理想的である。そのため,autograft を考えるとすれば IPE 利用を工夫することが重要であろうと考える。さらに,虹彩は RPE,網膜などとともに増殖因子によって細胞分裂を起こす活性をもっている⁷²⁾。しかし,もし網膜下に移植しても RPE としての働きをもっていないとすれば,そのままの形では利用することはできない。例えば RPE の場合,線維芽細胞を増殖促進させるのに対し,IPE を培養すると培養液中に分泌される物質は逆に抑制効果を示すという⁷³⁾。これは TGF-β 産生によって現れる性質であるらしい⁷⁴⁾。これは次に述べる眼内の免疫反応の特徴とも関係することで,虹彩—毛様体がリンパ球の増殖抑制を示し,眼内の免疫反応を抑制していることはよく知られている⁷⁵⁾。このような性質から IPE をそのまま移植に使うことが適当であるかどうかは現在のところわからない。しかし,RPE 自身も先に述べたように,状況によっては TGF-β を産生するわけであるから¹⁶⁾¹⁷⁾,移植の目的にそって,その性質を如何に調節するかにかかっている。我々は polymerase chain reaction(PCR)法によりさまざまな条件での IPE における mRNA の発現をみた(表 2)。Tyrosinase, TRP-I, II は色素細胞として特徴的なもの,IL-6 は炎症に深くかかわっており,cellular retinaldehyde-binding protein(CRALBP)は retinoid metabolism に不可欠な蛋白であるが IPE には発現されないことがわかった。bFGF は神経栄養因子として神経細胞機能維持に強い効

果を持つ。培養細胞では継代が進むにつれ tyrosinase 活性を失う。これは細胞が無色素状態になることと一致する。30 日間凍結保存しても凍結前の状態と発現が変わらないことがわかる。これらの IPE の分子生物学的な性質は必ずしも RPE と全く異なっているとはいえず,RPE 類似細胞の条件として最も大切な神経外胚葉由来であること,色素細胞であること,などの条件を満たしていることから,移植に用いる可能性は十分ある。

2. 同種移植の場合(allograft)

中枢神経系では特定の機能を発揮するのに重要な細胞の失活によって発症する疾患に対して神経細胞,特に胎児の幼若細胞を罹患部位に移植することが効果をもつことはよく知られている。それは幼若細胞は局所環境に適応する能力を持ち,そこに生着し,失われた因子を分泌することができること,さらに,遺伝子技術で cytokine 分泌能力を持たせた神経細胞を移植することで障害が改善されることを目的にしたものである(Trophic treatment)⁴⁹⁾⁷⁶⁾。妊娠中絶胎児組織の利用はすでに米国,欧州各国では法的に認められている。RPE の場合もこのようにして得られた細胞を利用することは最も現実的である。しかし,日本では胎児組織のみでなく,眼球銀行から提供された眼球の RPE でさえ,法制上も含めて利用できる段階になっていないのが現状である。

3. 異種移植の場合(xenograft)

最近,移植外科では臓器移植に必要な提供者があまりにも少ないこと,免疫現象が解明されて拒絶反応を何とか遺伝子工学の技術で抑制できる可能性があることから,ブタや狒々のような異種の RPE も将来利用されるようになるかも知れない⁷⁷⁾。

4. 以上述べた細胞を新鮮なままで移植する場合

この場合,時間的制約から細胞分離に伴う余分な組織も移植されてしまう危険性,さらに細胞の生存率が悪いことが問題となる。

5. 一度培養系に移してから利用する場合

1) 継代培養しているものをそのまま利用する場合
新鮮な細胞を移植するよりも一旦培養系に移して,bFGF などの増殖因子を加え,さらに clone 化して用いれば一定の性質を持ち,長期間の継代培養が可能となり,最も目的に合致していると考えられる^{78)~80)}。また,培養

細胞として維持できれば入手しやすく、手術に利用するのに適しているが、分化した RPE 特有の諸性質が変化している可能性が問題であり、移植した後どのような経過で本来の性質を再び獲得するのか今後の研究が必要である。RPE は *in vivo* に移植された後、再び分化した細胞の性質を示すことが Y-79 ヒト網膜芽細胞腫で示されている⁸¹⁾。さらに、50 μ M retinoic acid と 0.5 mM butyrate を培地に加えることにより培養細胞の分裂を止め、分化を促すような操作を加えられればそれも一つの方法であろう⁸²⁾。

2) 培養細胞を凍結保存し、必要に応じて解凍し利用する場合

冷凍保存した組織を移植に利用する考えは角膜や中枢神経系で試みられているし⁸³⁾、骨髄細胞ではすでに臨床に利用されている⁸⁴⁾。我々は胎児眼球から得られた RPE を用い、初代培養、継代培養したもの、 -80°C に 3 日～6 か月の様々な期間保存した RPE を再び溶解し、一度培地に移し傷害された細胞を除いてから、移植実験に使用した。培養条件については別に詳しく述べられている⁸⁵⁾。その方法を略述すると、何らかの理由で妊娠中絶された胎児の眼球から前眼部、硝子体を除き trypsin/ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) を含んだ Hank's balanced salt solution (HBSS) に 15 分間浸し、神経網膜と色素上皮を剥離、さらに、10% fetal bovine serum (FBS)/MEM 液でピペットを用いて RPE を集めた。1,000 rpm で 5 分間遠心し RPE を含んだ pellet とし、trypsin/EDTA 液で洗浄後、培養した。培地には 10% FBS, 10 ng/ml bFGF, 17 U/ml heparin を含む MEM に 1×10^4 個の RPE を入れ、 37°C 、5% CO_2 95% air の環境で培養した。培地は 3～4 日毎に交換した(図 5)。

培養 RPE は 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) を含んだ FBS を用いて冷凍保存した。保存前後の細胞の生着率は trypan blue dye exclusion test, microculture tetrazolium assay (MTA), tissue culture, transplantation after cryopreservation の各方法で行った。各々が RPE であることは RPE 標識蛋白である cytokeratin および John C Saari 教授 (University of Washington) から供与された抗体を用い CRALBP 免疫染色し同定した。凍結保存の方法を略述すると、RPE 細胞 1×10^6 /ml を氷冷した冷凍保存用の 10% DMSO を含んだ FBS に入れ、2 ml 用の蓋つき tube に入れた。Tube は 4°C に保持された Biological Freezing Vessel (Nihon Freezer Co.) に入れ、 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速さで -80°C 迄冷凍した。これらの細胞は使用されるまでそのまま保存された。凍結保存した細胞は様々な保存期間ののち解凍、培養したが、観察した限りでは凍結前の RPE と差がなかった。このような方法は将来“RPE バンク”として臨床目的に RPE を提供するシステムとして有益なものになるだろう。

こうして培養された RPE は、凍結保存による mes-

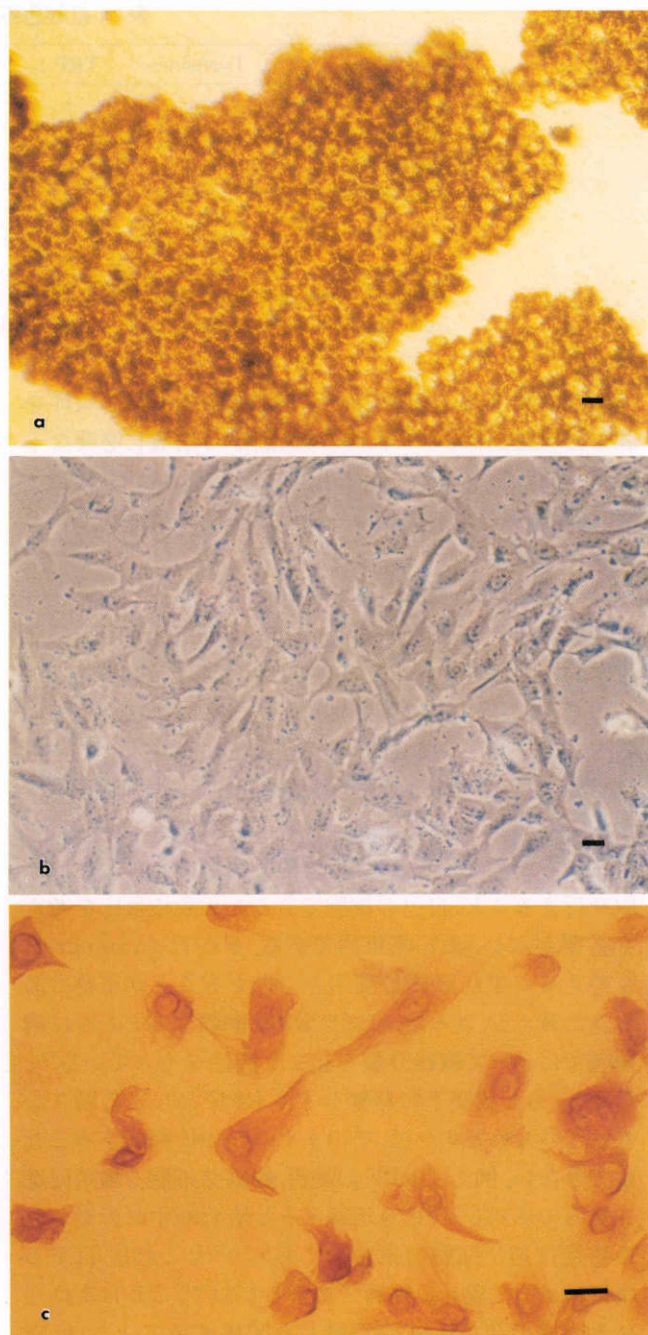


図 5 ヒト色素上皮細胞の形態。

- a: 胎生 18 週胎児から分離したヒト網膜色素上皮細胞。シート状に分離されている。
 - b: a の細胞をばらばらにしてから 5 代継代培養したもの。メラニン色素はすでに含まれていない。活発な増殖を示す。
 - c: 上皮細胞であることを示すために cytokeratin の免疫染色を行った。すべての細胞が陽性に染色され、RPE であることを示している。
- バーは各々 20 μm

sege 発現への影響の有無を melanogenesis の marker である tyrosinase, TRP-1, TRP-2, 機能をみる上での marker として retinoid metabolism に関係する CRALBP, 極性と機能分化の特徴を示すものとして Na, K-ATPase について PCR 法により調べた(表 3)。その結

表 3 網膜色素上皮の遺伝子発現

		Tyrosinase	TRP-1	TRP-2	CRALBP	Na, K-ATPase	
						α 1	β 1
新鮮		+	+	+	+	+	+
培養 (P-3)		+	+	+	+	+	+
培養 (P-9)		+	+	—	+	+	+
保存 (-80°C)	3 日	+	+	—	+	+	+
	14 日	+	+	—	+	+	+
	65 日	+	+	—	+	+	+

TRP-1: tyrosinase-related protein-1, TRP-2: tyrosinase-related protein-2, CRALBP: cellular retinaldehyde-binding protein

果,表に示す通り長期間凍結保存をしても性質は保持され,再度融解して培地に戻すと十分生育できることが明らかになった.この他に cytokeratin の発現でも RPE としての性質は凍結保存後も良く保たれており⁸⁵⁾,十分使用可能であること,RPE としての性質はかなり保存されていること,IPE も凍結保存後の性質の変化はなく(表 2),使用し得る可能性があることが明らかになった.

V RPE 移植で免疫反応は起きるか

臓器移植を考えたとき,移植を受ける側の免疫機構に

よって移植臓器が異種蛋白として拒絶反応が起きることは免れない.中枢神経系では microglia が MHC class II (major histocompatibility complex class II)分子を発現する⁸⁶⁾.ところが,RPE 移植ではほとんど免疫反応はみられないと報告されている.それは眼内空間が免疫反応が起こりにくい場所(immunologically privileged compartment)であるためであり,この状態は anterior chamber associated immune deviation (ACAID)と呼ばれている.それが進化論的にみて,免疫反応に起因する視覚機能の傷害を避けるために眼球に備わったもので,他に脳,卵巣,精巣など特殊な部位で獲得されたものと同様

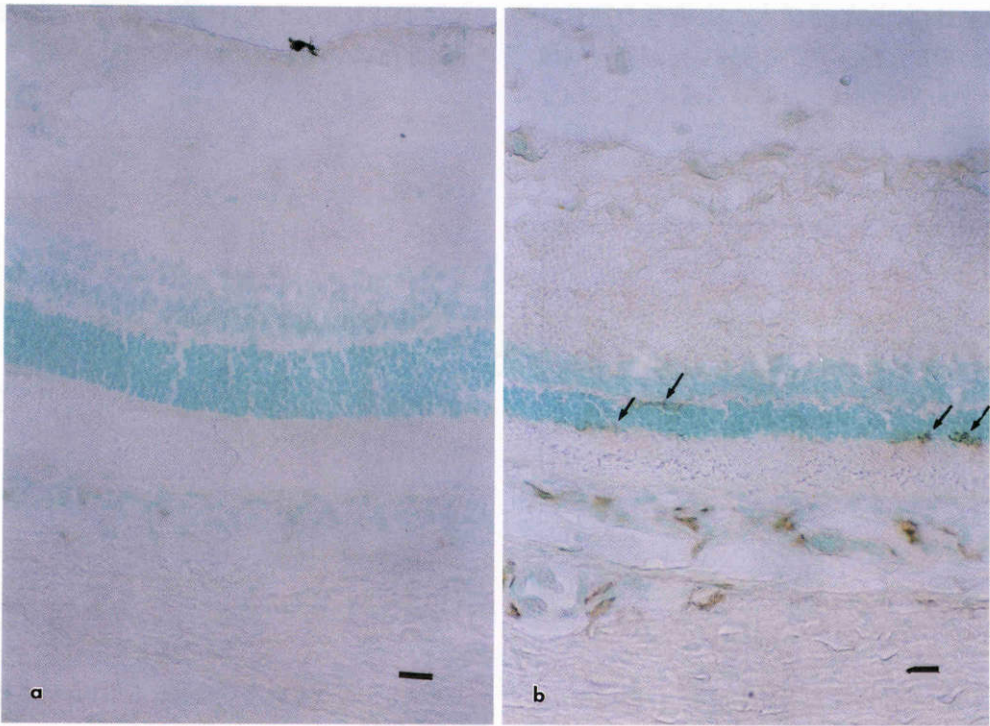


図 6 Royal college of surgen's(RCS)ラット (rdy/rdy)網膜の major histocompatibilty complex (MHC)class II 陽性細胞.

バーは各々20 μ m.眼球摘出後,PLP 固定をし,dry ice-acetone 中で OCT compound に包埋し,10 μ m の凍結切片にした.一次抗体に mouse anti rat Ia(OX-6 clone),二次抗体には peroxidase-conjugated goat anti mouse IgG を使用し,DAB で発色した.

a: 生後 20 日の RCS ラット.ほとんど陽性細胞がみられない.網膜は正常に分化,発育を示す.
b: 同 42 日の網膜で視細胞層に茶褐色に染まった MHC class II 陽性細胞がみられる(矢印).視細胞の変性が進み,外顆粒層の厚さも半分程度に減少している.

のメカニズムであると推測されている。それは確かに眼内のいろいろな物質、例えばS-抗原などに対する自己免疫疾患でみられるような反応を抑制することにも役立っていると考えられる⁸⁷⁾⁸⁸⁾。

これらの考えのもとに、RPE移植の実験においても、移植細胞は拒絶されることなく生着し、機能を果たしていることが報告⁸⁹⁾されてきた。それは同種間のみでなく、異種間でも示された⁹⁰⁾⁹¹⁾。特にヒト RPE は抗原提示能力があるにもかかわらず⁹²⁾、これを用いた異種間の移植実験で RPE の機能は果たされていると報告され、その理由として、① 血液-眼柵の存在、② 実際上のリンパ系が眼内には存在しないこと、③ 導出系の特徴、④ 眼内は免疫反応が抑制される状態にあることなどが挙げられている⁹³⁾⁹⁴⁾。

我々は RCS ラットの網膜変性過程において、免疫反応の一端として脈絡膜、網膜における主要組織適合性複合体(MHC) class II 陽性細胞の出現と、RPE 移植によって視細胞変性が阻止される過程での変化について免疫組織化学的に検索を行った。経時的に視細胞変性と MHC class II 陽性細胞数を観察後、RCS ラットにとっては異種である継代培養したヒト胎児 RPE を生後 20 日目、すなわち、視細胞変性前に移植し、その後の経過を観察した。その結果、視細胞の変性過程で外網状層、脈絡膜、毛様体に MHC class II 陽性細胞が認められ、変性の進行とともにその数は増加したが、RPE を移植した個体と同様に陽性細胞の出現頻度を比較したところ減少しており、少なくとも RCS ラットにおいては、視細胞変性が阻止

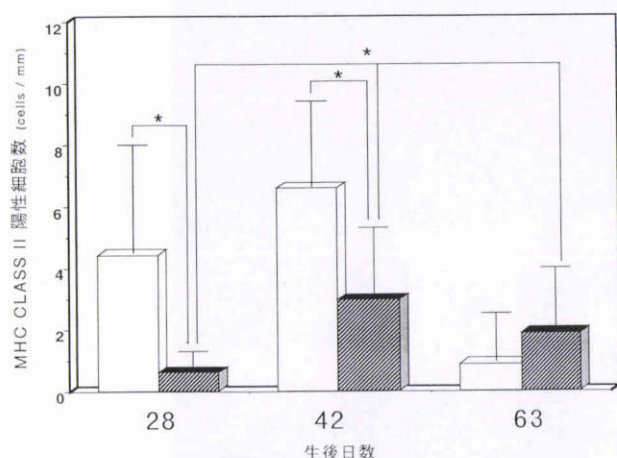


図7 RCS ラット変性過程と MHC class II 陽性細胞数に対する RPE 移植の効果。

視細胞外節の変性につれ陽性細胞数が増加し、ほとんどの視細胞が変性消失する生後2か月では減少している(control)。これに対して同種 RPE 細胞を移植したところ有意に減少した。生後 63 日目では逆に増加しているのは移植によって視細胞が保持され、細胞数が保たれているためと考えられる。■：移植眼、□：非移植眼、*： $p < 0.01$ (Welch の t 検定による。)

されると抗原提示細胞の出現を抑える効果のあることが明らかになった(図 6, 7)⁹⁵⁾⁹⁶⁾。これは RPE 移植が視細胞変性によって生じる免疫反応を抑えていると考えられることができ、大変示唆に富んでいるように思う。以前から網膜色素変性は何らかの視細胞関連物質に対する自己免疫が生じ、血清抗体価 IgM が上昇することと関連して発症している可能性が報告⁹⁷⁾されている。この報告はその後確認されていないが、自己免疫性が高まっていることは確かであるらしく⁹⁸⁾、視細胞外節の変性に伴って microglia が侵入してくるメカニズムとともに興味深い問題である⁹⁹⁾。今回の RCS ラットにおける結果は、RPE 移植によって視細胞の変性が止まれば、変性過程で生じる免疫反応も減少する可能性があり、ヒト網膜色素変性における免疫系の果たす役割を考える上で示唆に富んでいる。

別の実験であるが、collagen の膜にヒト RPE を培養し網膜下に移植した研究では網膜電図(ERG)が2週間後に減弱し、4週間後に回復したと報告された。形態的にも視細胞は良好に保たれていたという¹⁰⁰⁾。我々はウサギ前房内に同様の collagen sheet に培養した RPE を移植したところ、移植後1週間、3週間でERGが減少し、10週後には回復した¹⁰¹⁾(図8)。そのため、この経過中の検眼鏡所見では異常はみられなかったが、10週後の組織像からは少なくとも大食細胞の網膜下への浸潤が示された(図9)。この減少が免疫反応によるぶどう膜炎などが原

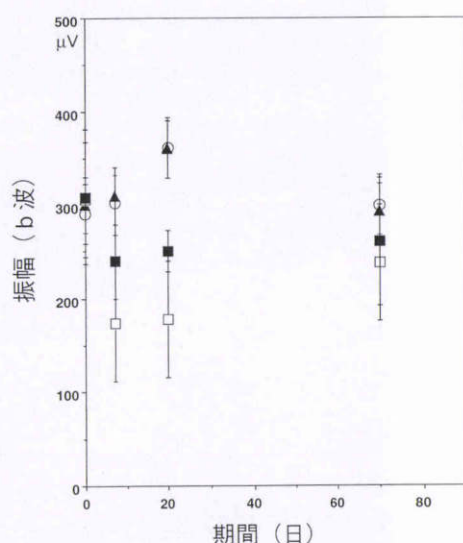


図8 ウサギ前房に培養ヒト RPE 移植後の ERG の変化。

ヒト RPE は collagen sheet 上に培養し、それごと前房内に移植した。移植後全経過中2か月まで移植眼、僚眼ともに反応が抑制され網膜電図(ERG) b 波が減弱している。

- ：collagen sheet のみの移植眼
- ▲：その僚眼
- ：ヒト RPE+collagen sheet の移植眼
- ：その僚眼

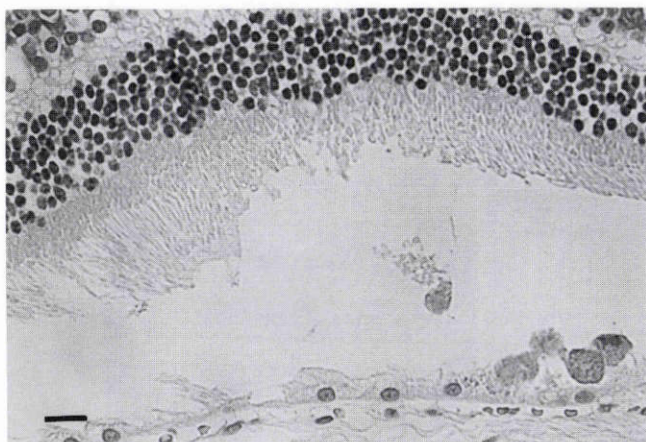


図9 図8で移植10週目にERGを観察後に摘出したウサギ眼球の組織像。

この間ウサギ前房、硝子体、眼底に検眼鏡的な変化はみられなかった。網膜剥離は固定操作の段階で生じたものと思われるが、RPE層は浮腫状を呈し、網膜下腔には大食細胞の遊走がみられ異常な組織反応があったことを示唆している。バーは5 μ m

因である可能性は否定できない。さらに、対側眼(僚眼)のERGもほぼ同じ経過で有意に減少を示しており、全身の免疫反応が起きていることを示している。この結果は、網膜下移植でもこのような反応が起きる可能性があり、単純に眼内は免疫系が抑えられていると信じていてはいけないことを示唆している。今後ヒトへの応用を考える場合、移植による局所、全身の免疫系の反応を長期間にわたって詳細に調べることが是非必要であろう。すなわち、網膜下移植でも、注意深い観察と現在まで報告されているような短期間ではなく、もっと長い観察を行えば免疫抑制剤の投与を必要とするに至るような免疫反応もみられるはずである。最近ではapoptosisの概念と実験結果から、眼内のimmune privilegeについて新しい考え方に基づいた説明がなされつつある¹⁰²⁾。

VI 動物の移植実験でわかったこと

現在までに試みられたRPE移植の方法は、①角膜を打ち抜いてopen-skyにするか、経毛様体扁平部硝子体手術のいずれかの方法で網膜を経由して移植細胞を網膜下に挿入する方法¹⁰³⁾と、②経強膜的に脈絡膜、RPEを通して網膜下に挿入する方法の二つがとられている¹⁰⁴⁾。いずれの方法も特徴をもっており、例えば経硝子体法は直接観察できることから、RPEを移植する部位も正確に予測できる。ところが、硝子体に流出したRPEはPVRの原因となり得る可能性があるし、網膜を意図的に切開し、必要以上に剥離させなければならない。一方、経強膜法では脈絡膜血管層や毛細管板を通過しなければならないし、術中経瞳孔的に直視下にRPE注入のblebを観察できないため、注入針の先端を確認しながら移植できないこともこの方法の限界である。しかし、報告によっては

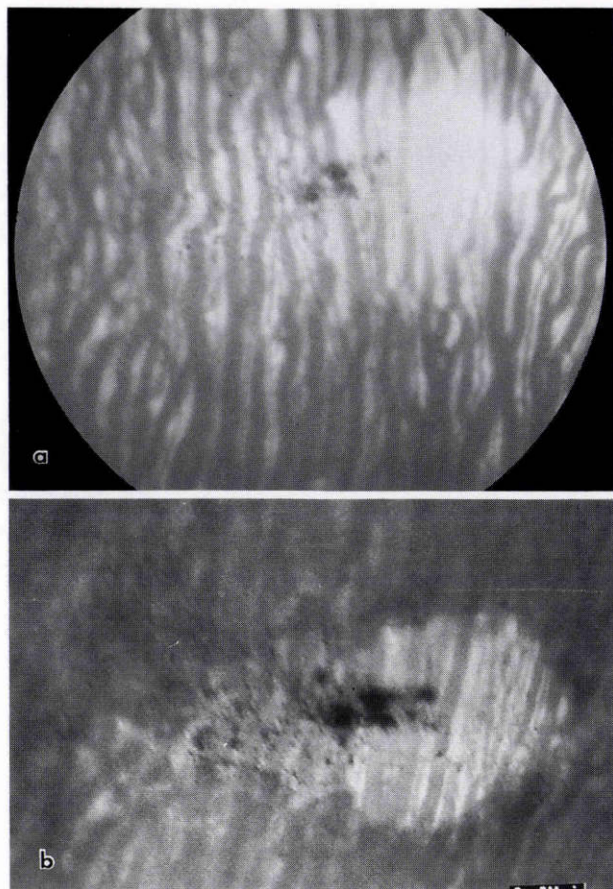


図10 白色ウサギへの有色RPE移植。

a: 眼底色素上皮擦過部の強膜がすけて白く見える。
b: 同じ眼底、PRE擦過部と移植された有色RPEが良くわかる。細胞浮遊液を網膜下に注入する方法では硝子体腔への散布の危険があり大量の細胞数は困難であった。

多数のRPEをBruch膜上に移植することができるという¹⁰⁵⁾。我々は臨床応用を念頭においてサル、ウサギでは、①の方法を、ラットでは眼球の大きさから技術的な問題があるため②の方法で移植実験を行った。

移植後一定期間をすぎた後、組織学的にその効果を判定する場合、そこに存在するRPEが確かに移植したもので、本来あった細胞ではないことを証明することは重要である。組織学的に移植細胞であることを証明するために幾つかの工夫がなされた。その主なものは、①無色素(albino)の動物に有色(pigmented)のRPEを移植する(図10)、②5-bromodeoxyuridineでラベルする、③炭素粒子など代謝されない物質で培養RPEの貪食能を利用してラベルし、移植する、④3 H-thymidineを取り込ませ、radio-isotopeラベルしたもの、⑤各種の蛍光色素でラベルしたものを移植するなどである⁹¹⁾¹⁰⁵⁾。

移植された細胞が実際に機能しているか否かの評価も難しい問題である。現在まで移植実験には、次に述べる生後一定の経過で視細胞が変性するRCSラットがもっぱら使用されてきた。しかし、同じメカニズムで視細胞変性

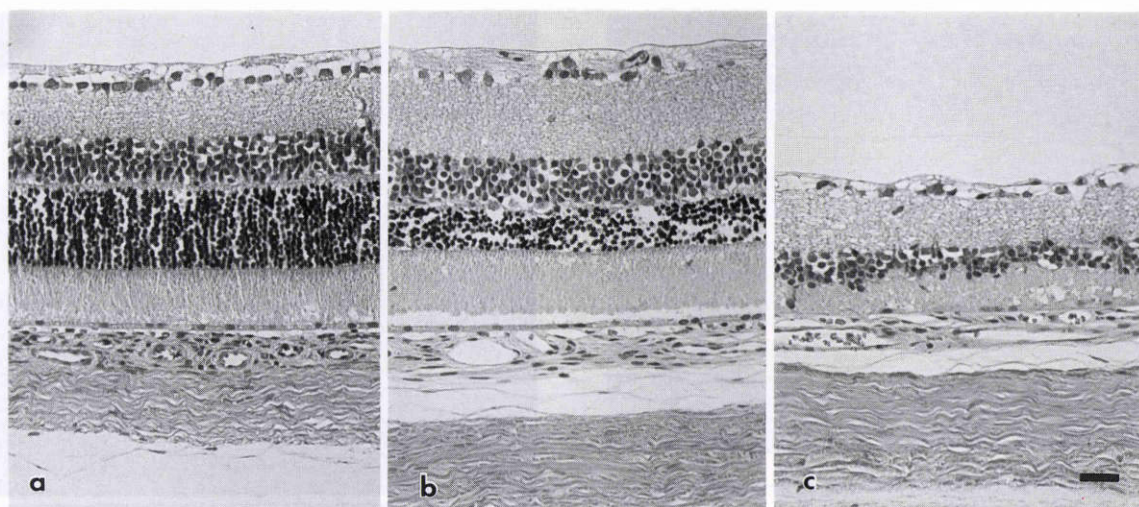


図 11 RCS ラット (rdy/rdy) の視細胞の変性過程.

- a: 生後 20 日の網膜. この頃までは網膜各層が RCS 対照ラットと同じく分化発育を続ける.
 b: 生後 40 日の網膜. その後視細胞外節が PRE に貪食されないため, この層が徐々に厚くなり, それとともに外顆粒層に変性が生じる. 生後 40 日ごろには半分の厚さになり, 2~3 か月でほぼ消失し, 光覚を失う.
 c: 生後 23 週の網膜. 3 か月をすぎると内顆粒層の細胞も徐々に減少する. RPE との間にあるのは貪食されずに残った外節由来の物質.
 バーは 20 μ m (a, b も同じ)

を起こすヒト眼底疾患は知られていない. さらに, bFGF の受容体が欠如しているという報告²⁷⁾もあり, RCS ラットを用いた移植実験の評価をヒトの場合に当てはめて考える場合注意が必要である. この動物では RPE 移植後, 神経網膜がどのように働いているか, 神経網膜の synapse 構成が保たれ, 電気生理学的に神経節細胞の光に対する応答で調べたり, 移植前後の RCS ラットの行動面からの評価も行われ, 実際に機能していることが報告^{106)~108)}されている.

1. RCS ラットを用いた実験

RCS ラットは先に述べた通り, RPE の視細胞外節貪食能の欠損という先天的な機能異常によって, 一旦正常に分化した視細胞が形態的には生後 3 週をすぎたころから徐々に変性を始め, 40 日ごろにはその数が半分に減少し, 60 日ごろにはほぼすべての視細胞が変性消失する網膜変性動物である¹⁰⁹⁾¹¹⁰⁾(図 11). このモデル動物はその大きさ, 実験のやりやすさ, 変性の責任部位が RPE にあることなどから, RPE 移植の研究に利用されてきた. その結果, 移植 RPE により視細胞の変性が阻止されること(図 12), 救われた視細胞の代謝も視細胞外節の再生の速さ, 貪食された円板の量, IPM から移植 RPE は正常に機能していることが明らかにされた²⁾³⁾¹¹¹⁾¹¹²⁾. IPM は網膜と色素上皮の接着の役割や, 外節の貪食, retinoids の輸送, 代謝物質の輸送, 拡散にとっても重要であることが報告されており, それが正常網膜と変わらないということは移植 RPE は完全にその役割を果たしていると考えてよいのかも知れない⁴³⁾¹¹³⁾. これらの研究の多くは同種移植(allograft)によってなされたが, 視細胞変性阻止効果は同種のみでなく, ヒト RPE など異種細胞(xeno-

graft)でも起こることが報告¹¹⁴⁾された. さらに, 我々は RPE 移植のみでなく, 網膜剥離手術時に得られる網膜下液を注入することによって視細胞死を阻止できることを示した¹¹⁵⁾. これは網膜剥離腔を形成する RPE が先に述べた通り, bFGF や PDGF を初め各種の神経栄養因子を分泌することから, 網膜下液がそれを含んでおり, 一過性に視細胞変性阻止効果を示したもので, 直接硝子体腔に bFGF を注入した場合と同じ効果を示したものと考えられる⁶⁹⁾. しかし, 自己であれ, 非自己であれ, RPE がこのモデル動物の網膜下に置かれた時の視細胞変性阻止のメカニズムはよくわかっていない. RPE は先にも述べた通り, 沢山の種類の cytokine や神経栄養因子, 成長因子を合成, 分泌しており, その働きが直接, 間接に視細胞膜にある受容体に伝えられ, 細胞内情報に変換され, 核内に伝達されて特定の遺伝子の活性化を起こすのかも知れない.

2. ウサギを使った移植実験

我々は入手しやすさ, 硝子体手術が可能であるだけ眼球が大きいこと, 色素を持った有色ウサギの RPE と持たないものが存在すること, 移植後の眼底検査がしやすく移植した RPE の動態を観察しやすいこと, 比較的安価であるなどの理由でウサギを用いて実験を行った. 2~3 kg の白色ウサギを麻酔後, 角膜輪部から 2 mm の部で 3 か所挿入孔を作成し, ヒトと同じ方法で硝子体手術を行った. その後, 図 13 a に示すような部位に網膜切開を置き, 意図的に網膜を剥離させ, 剥離部に黒ウサギから採取しておいた新鮮有色 RPE, 継代培養してあるもの, 凍結保存後再度融解し, 培養液で活性を確認したもの, 自身の IPE など, いろいろな RPE, IPE を網膜下に

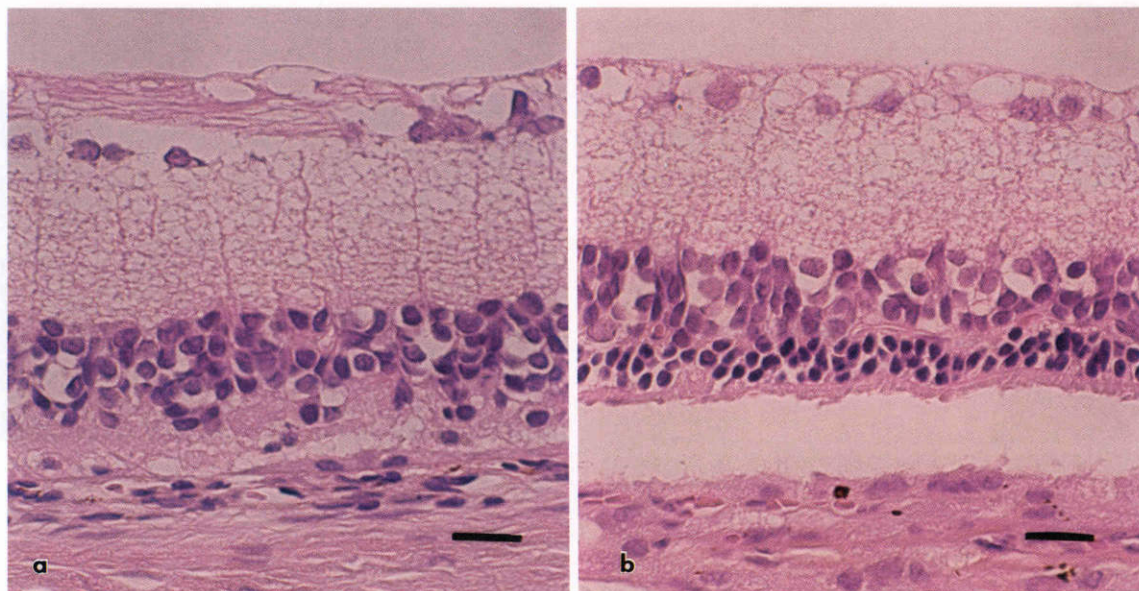
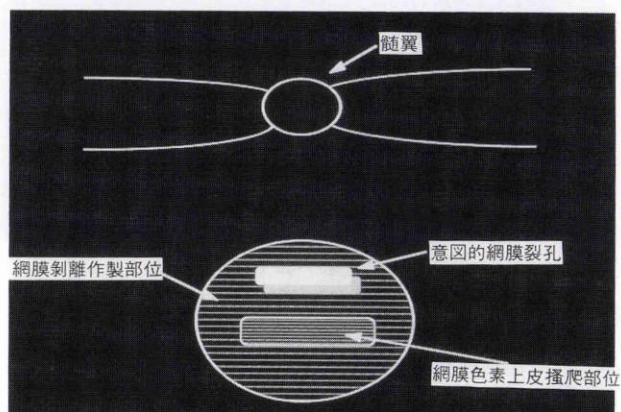


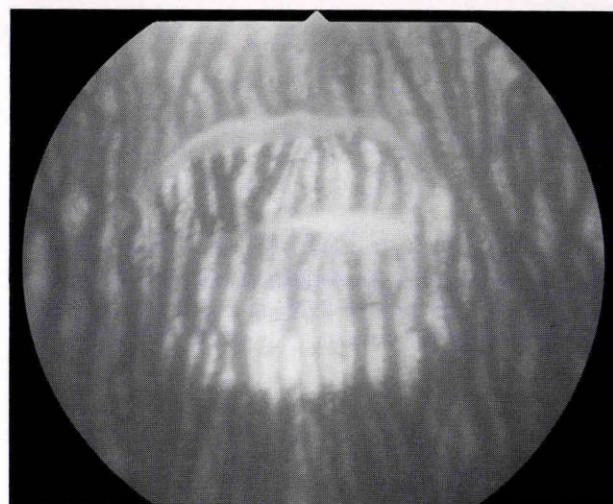
図 12 RCS 網膜変性ラットに対する RPE 移植効果.

a: 生後 3 か月の RCS ラット.

b: 上記ラットと同一腹で生まれた生後 20 日目のものに培養ウシ RPE を 20 日間凍結保存し, 再び解凍して培養液に戻した細胞 $30,000/\mu\text{l}$ を移植した. 3 か月後の組織である (a と同じ日齢). 2~3 層の視細胞が保持され, 異種 RPE も移植効果を持つことを示している. バーは各々 $20\mu\text{m}$



a



b

図 13 ウサギを RPE 移植モデルとするために我々の実験方法.

a: ウサギではヒト硝子体手術と同じように 3-ports を作成し, 硝子体を除去, 図の様に視神経と髄翼を目標に網膜に切開を置き, 意図的に剥離させた網膜下で RPE をシリコンブラシ針で擦過して除去した. その部にあらかじめ用意した有色ウサギ RPE や本文で述べた, 様々な RPE を移植した. 硝子体腔に出た細胞はできるだけ除去した.

b: そのような操作を行った直後のウサギ眼底. まだ網膜は剥離している. 特に液-空気置換を行わなくても剥離は 1 週間以内に消失した.

移植した. 硝子体側に流出した余分の細胞はできるだけ吸引除去した. ウサギにおいては手術後数日で剥離は吸収されるため, 有色 RPE のその後の状態を容易に観察することができた (図 13b).

この実験系で調べられたことは IPM, 視細胞, 移植した RPE, IPE が形態的にどのように変化するかなどで

あった¹¹⁶⁾¹¹⁷⁾ (図 14). 移植する RPE も受ける網膜も正常なため, 移植によってどのような効果があったかをはっきり捕まえることは困難であった. しかし, 人為的な RPE の剥離, 除去によって RPE が再生増殖することができるか (図 15), 視細胞に apoptosis が起き RPE を移植すればその過程を止めることができるかなど効果判定

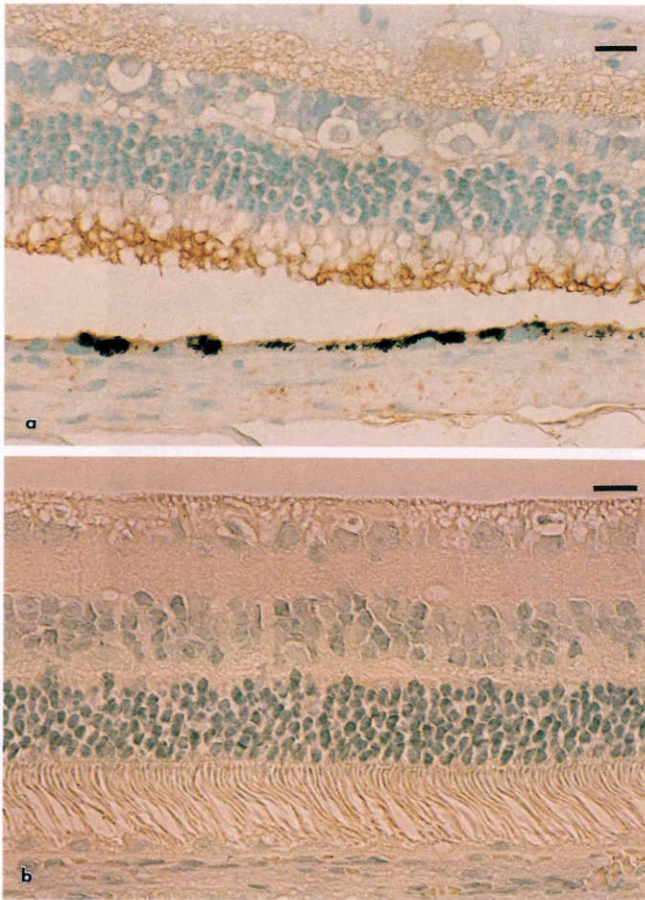


図14 白色ウサギに同種有色 RPE を移植, 1 か月後の組織像.

視細胞間マトリックスに含まれる複合糖質を小麦胚芽レクチン(wheat germ agglutinin, WGA)を用いて免疫染色した.

a: メラニンを含む有色色素上皮細胞が Bruch 膜の上に一部存在している. 外節は乱れ, 短くなっているが WGA を用いたレクチン染色による DAB 反応が認められ, 視細胞間マトリックスが存在していることを示している.

b: WGA を加えない対照網膜.

バーは各々5 μ m

法を工夫すれば, この系は移植実験に有効であるということもできる¹¹⁸⁾. 虹彩全層の場合, RPE 除去部への IPE の増殖はあまりなく, 視細胞も変性していた. IPE のみを移植した場合も, 次に述べるサルの場合に比較してきれいな色素上皮層を形成していなかった¹¹⁹⁾.

3. サルを使った実験

我々は日本サルを用いて硝子体法で黄斑部の耳側に網膜裂孔を作成し, あらかじめ採取しておいた同じ個体の虹彩色素上皮を網膜下に自家移植し, 経過を観察した. 3 か月後の眼底写真(図16), 蛍光眼底写真(図17)と組織像(図18)である. 虹彩色素は Bruch 膜上に生着し, 炎症細胞などの浸潤もなく生着していることがわかる. 網膜切開をおいた所には眼底検査ではわからなかったが, 蛍光眼底写真で新生血管が認められた(図17). 硝子体腔に



図15 有色ウサギ RPE の再生能.

上記の方法で色素上皮を擦過し, 移植なしで経過をみ, 15 か月後の網膜, RPE は重層して再生している. それに対する視細胞層の破壊は手術操作が大きな原因である. トリイジンブルー染色, バーは5 μ m

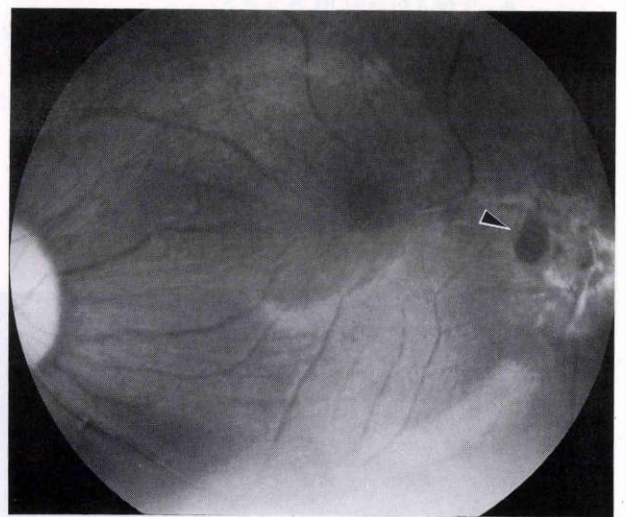


図16 サル眼への IPE の移植.

a: 左眼黄斑部の耳側に網膜切開を置き, 同じ眼球からあらかじめ切除, 培養液に用意しておいた IPE を挿入した3か月後の眼底写真. 一部手術操作で RPE が乱れているところがみられる. 黄斑部の耳側に1/3乳頭径大の IPE が移植されている(矢印).

伸びることはなかったが, 臨床応用の際は注意が必要である. 組織でみると, 線維芽細胞の多少の増殖と網膜切開部に細い新生血管はみられるものの, 炎症細胞もなく, 非常に良い状態である. このことは, 自己虹彩色素上皮がもし視細胞機能を保持するのに必要な機能があれば, 移植は可能であることを示している. また, 採取も我々眼科医にとって全く容易である.

VII 将来への展望

1. 現在までに報告されたヒトへの応用

実際, ヒトに RPE 移植を行った報告は日本にはないが, 海外ではいずれも加齢黄斑変性と網膜色素変性に対

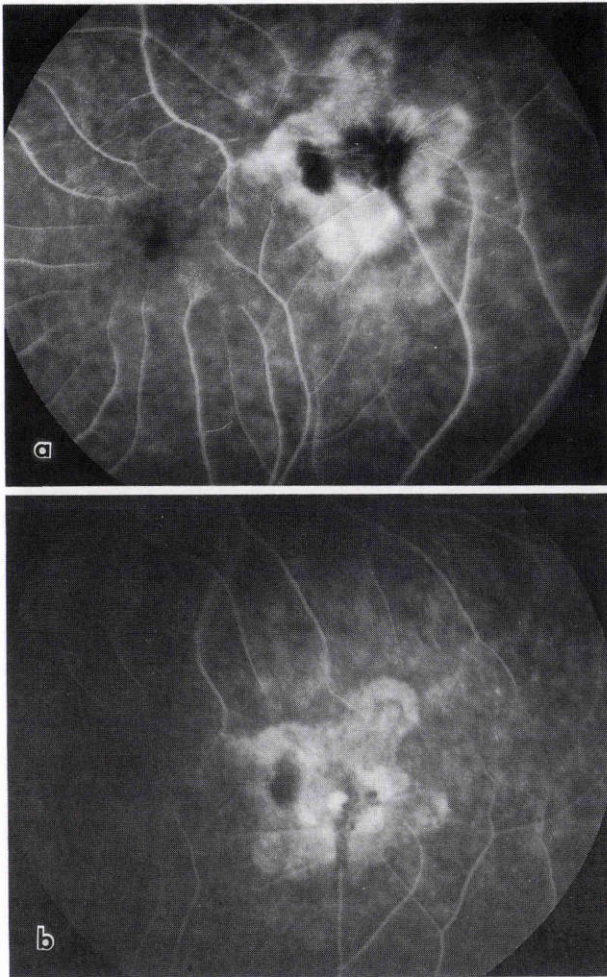


図 17 図 16 の蛍光眼底写真.

- a: 早期像(179 秒): 網膜裂孔作成部は低蛍光で, 脈絡膜毛細管が傷害された可能性がある. 過蛍光部は色素上皮を擦過した部である. 新生血管が周囲の網膜から裂孔部に侵入していることがわかる. 検眼鏡的にはみつからない程度にごく細いもので, 硝子体腔へは伸びていなかった.
- b: 後期像(571 秒): 新生血管からの蛍光色素の洩れによって低蛍光部は消えている. この様な新生血管の存在については臨床例では報告されていない.

して行われている. その内容を略記してみる^{120)~124)}.

1) Luisiana 大学の研究者は加齢黄斑変性患者の 2 症例で, 網膜下の増殖組織を除去した後にヒト色素上皮細胞を移植した. 1 例は本人の RPE, 他の 1 例は死体眼からのもので, 満足すべき結果は得られなかった¹²⁰⁾.

2) スウェーデンの Karolinska 研究所と Columbia 大学眼科の研究者達はヒト胎児から得た RPE を培養し, 13 例の加齢黄斑変性患者に移植した. 5 例の患者には外科的な新生血管膜の除去後, RPE の sheet 状の移植片を黄斑下においた. 術後 15 か月, 視力は改善していない. 4 例の同様の患者には直径 0.5 mm の丸い色素上皮片を移植した. 術後 6 か月で視力は保持されているという. 別の 4 例の地図状萎縮の患者には RPE 浮遊液を注入した. 術前にあった drusen が消失したという. しかし, い



図 18 上記サル眼の組織像.

移植された虹彩色素上皮は Bruch 膜上にあり良く生着している. 周囲に炎症細胞はなく, 視細胞外節は短いもののきれいに存在している. ヘマトキシリン・エオジン染色, バーは 10 μ m.

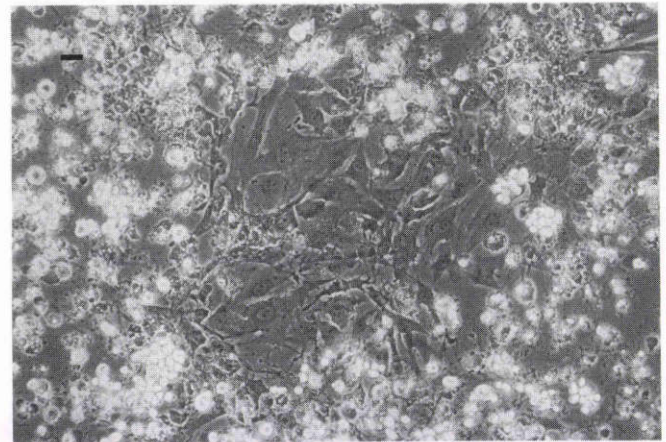


図 19 Geneticin™ (Life Technologies Inc., USA) による遺伝子導入された細胞の選別.

RCS ラット IPE を培養し, lipofectAMINE™ (Life Technologies Inc. USA) を用いて上記の pCNX 2 を取り込ませた. この vector を取り込んだ細胞は neomycin 耐性であるため geneticin を培地にいれると, 遺伝子を導入しなかった細胞のみが死滅し, 浮いてくる. 白く粒状のもの. バーは 20 μ m

ずれの症例も視力改善は得られていない¹²¹⁾¹²²⁾.

3) 米国 Rochester 大学とインド Hyderabad 眼研究所病院の研究者達は視力光覚弁の男性網膜色素変性患者 3 例に, 14~16 週の胎児網膜組織の培養細胞浮遊液を黄斑部耳側に注入した. 免疫反応は術後 9 か月でみられず, 視力は 2 例で光覚のままであったものの, 1 例では 9 か月後に 20/200 (0.1) に改善したという¹²³⁾.

4) Washington 大学の研究者達も網膜色素変性患者 3 例に眼球銀行から得た眼球から視細胞を分離し, gelatin に包埋する方法でおよそ 600,000 個の視細胞を網膜下に挿入, 移植した. 術前視力は無光覚で術後も同じで

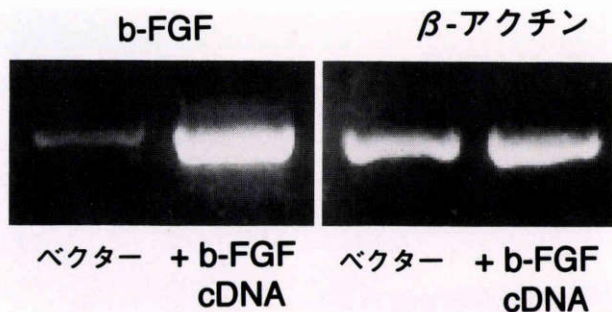


図20 遺伝子導入された IPE の遺伝子発現。

Vector のみ取り込ませたもの、b-FGF cDNA を組み込んだ vector を取り込ませた IPE で bFGF の遺伝子発現を比較した。圧倒的に強く発現されているのがわかる。β-actin 発現量を見ると両者に差はなく、細胞数の差でないことがわかる。

あったという¹²⁴⁾。

2. 自家移植片の利用は可能か

自家移植片として考えられる色素細胞は RPE と IPE の2種類である。周辺部の RPE を黄斑部に移植した Peymann ら¹²⁰⁾の試みはあるがその後報告がない。RPE を移植するのではなく、黄斑部をまだ RPE が障害されていない部に移動させるという発想の手術が報告¹²⁵⁾され、我々を驚かせた。この方法も神経網膜に対する侵襲が大きく、一般の硝子体術者でも容易には試みられない方法である。我々は手術中に RPE 採取の試みを二つの方法で行った。まず、黄斑円孔や意図的裂孔底から静かに吸引する方法、次に、比較的大きな網膜裂孔または巨大裂孔の剥き出しになった RPE 層から直接同様に吸引する方

法である。先に述べたように、培養系に移して増殖できるほど十分な量を得ることはできなかった。自己の RPE を使おうとすれば、周辺網膜に強膜側から操作し、脈絡膜を含めた一塊として採取し、そこから RPE を分離する方法しかない。これは眼内腫瘍、特に脈絡膜悪性黒色腫に対して行われている方法であり、不可能ではないが侵襲の大きな手術になることは避けられない⁷⁰⁾。

これに対し、もし IPE を利用できるとすれば、現在の手術で周辺虹彩切除によって十分な量の細胞数を得ることができる。両者の膜の性質、形質発現の差などについては先に述べたが、さらに今後の研究が必要である。今年度の米国視覚眼学会では IPE 移植の試みが我々も含め数か所の研究施設から報告^{119)126)~128)}されている。

3. 遺伝子操作を加えた虹彩色素細胞の利用は可能か

外因性の bFGF が神経細胞を変性から救うことは *in vitro* でも *in vivo* でもよく知られている。また、神経系における傷害部位の神経細胞や星状膠細胞に bFGFmRNA が発現されていることから、内因性 bFGF が神経細胞の救助に役立っていることが考えられてきた。それには神経節細胞や RPE も含まれる^{129)~131)}。RCS ラットの硝子体腔に 1 μg の bFGF を注入すると変性が免れることが報告⁶⁹⁾され、さらにラットにおいて持続光照射によって生じる視細胞変性も様々な神経栄養因子によって阻止できることから¹³²⁾、このような cytokine、特に bFGF が注目されるに至った。実際、視細胞が変性に陥るときには bFGF の産生が視細胞自身に増加していることがヒトを含めた各種の変性症のみでなく、光により引き起こされる変性時にもみられることが報告⁶⁸⁾¹³³⁾¹³⁴⁾さ

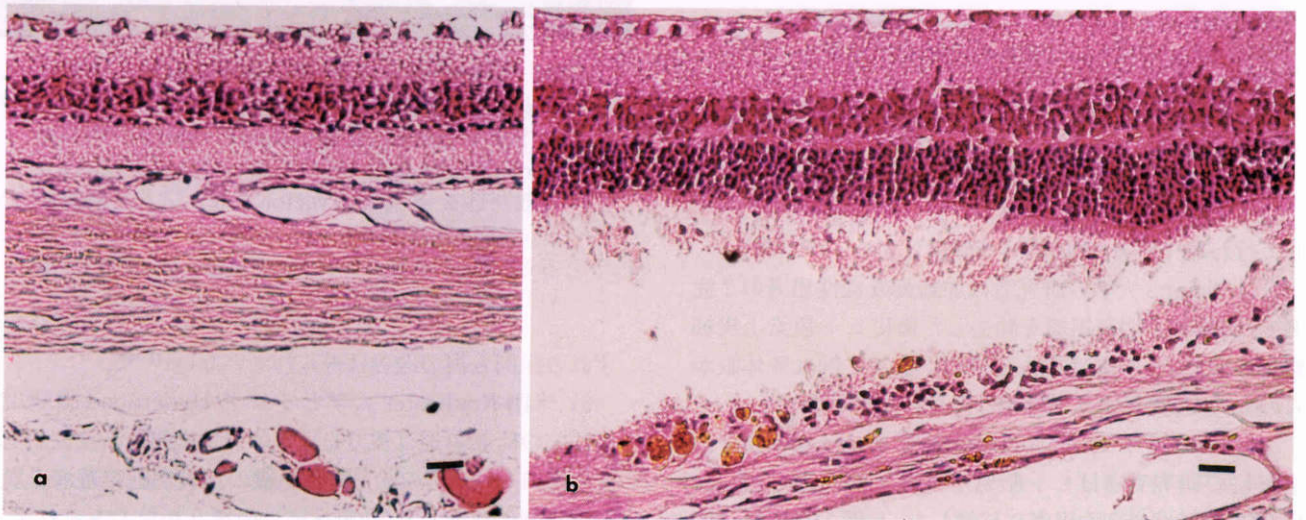


図21 bFGF cDNA 遺伝子導入 IPE を RCS ラットに移植したもの。

生後 21 日目の網膜変性 RCS ラットに bFGF cDNA を導入した培養同種 IPE を移植して 4 週間後に観察した。

a: 移植部位から視神経乳頭を越えて対側の網膜。移植 IPE の効果はみられず、ほとんど視細胞は残存していない。

b: 移植部位の視細胞は非常に良好に保たれている。

バーは各々 20 μm

れている。著者らは、この現象は視細胞が何らかのストレスや傷害を受けたときに、それを保護するため、または救済する因子として内因性の bFGF 合成能が増加するのであろうと考えている。この結果は、白色ラット bFGF を光傷害を与える数日前から投与しておくで光傷害を防ぐことができるの実験結果とも一致する¹³⁵⁾。

そこで、我々は IPE に遺伝子工学の技術を用い bFGF を活発に産生するような性質をもつ遺伝子導入を試みた。我々は培養したラット IPE に東北大学加齢医学研究所宮崎教授から頂いた真核細胞に対し、高発現 vector である pCXN 2 に武田薬品工業(株)から頂いたラット bFGF の cDNA を導入し用いた¹³⁶⁾¹³⁷⁾。Plasmid DNA にネオマイシン耐性遺伝子を組み込んであるので、この plasmid が細胞に取り込まれれば neomycin analog の G 418 による選別が可能となる(図 19)。このようにして得られた遺伝子導入 IPE が強い bFGF の mRNA を発現していることを知った上で(図 20)、この IPE を生後 21 日目の RCS ラット網膜下に移植し 4 週間後に観察したところ、図に示す通り(図 21)移植部位から遠く離れた所ではほとんど視細胞が消失しているのに、IPE の移植された部位では良好に保持されていた。この結果は、上記のような遺伝子操作を行った IPE の移植が有効である可能性を示している。この方法は現在、北海道大学で行われている日本で初めての遺伝子治療である ADA 欠損症患者(Adenosine deaminase deficiency)に対する方法と同じである。Ex vivo 法、すなわち、患者のリンパ球または幹細胞をとりだし、試験管の中で上記の Adenosine deaminase 発現ベクターを導入し、患者に戻すという方法はこの遺伝子の場合、10% 程度取り込まれても有効に働くこと、この酵素は過剰に発現しても生体に何らの異常を来さないことなどの特徴があるため臨床応用されたものである。我々の用いたベクターはそれとほとんど同じであるが、ADA-cDNA の代わりにラット bFGF-cDNA を組み込んである。臨床応用を考えると、ヒト bFGF-cDNA を組み込めばいいと考えられるが、発現の有無の評価や bFGF が過剰発現したときの副作用など、今後慎重な実験が必要であることはいうまでもない。しかし、SV 40 transformed RPE cell の移植が有効であることは報告¹³⁸⁾されているが、遺伝子組み換えによって bFGF 産生能を高めた遺伝子の導入ははじめての試みである。

このように RPE が神経栄養因子を分泌することが視細胞を始めとする神経網膜のさまざまな傷害に対して保護的に働くとすれば、trophic treatment と呼ばれる通り、そのような性質を RPE に持たせ、傷害に対して反応性に分泌を増加させるか、神経栄養因子を外から補って神経細胞死を防ぐこと、またはその分泌能だけを刺激し発現させることも治療となるはずである⁸⁶⁾。bFGF を中心としたサイトカインを硝子体に注入する急性実験では

変性阻止でも、光や虚血による視細胞変性阻止にしても、その投与濃度は驚くほど高く、臨床に応用する場合、当然他の細胞に対する目的以外の働きを副作用として考えなければならない⁶⁹⁾¹³²⁾¹³⁹⁾。それに比べ、このような遺伝子工学を用い、遺伝子操作した細胞の利用は移植した所でのみ発現するのであり、また、移植細胞が生存する限り組み込まれた神経栄養因子を分泌し続けるとは限らないが、もし成功すれば画期的で性能の良い投与方法と考えられる。医学の領域での分子生物学の進展には目覚ましいものがあり、先端医学として注目されていたものが、いつのまにか日常臨床の場に導入されているのが現況である。

4. 治療法のない疾患への応用は可能か

最近の遺伝子解析により沢山の遺伝子異常が網膜変性の原因になることが明らかになった。現在までのところ、ヒト優性遺伝型網膜色素変性の原因となる rhodopsin 遺伝子異常だけでも 50 種類以上が発見されている⁶⁴⁾。しかし、研究が進むにつれ、一つの遺伝子が一つの蛋白質を規定している原則(one gene-one protein)、さらに、一つの遺伝子が一つの疾患を規定しているとする考え(one gene-one disease)からは説明がつかない事実が明らかになってきた¹⁴⁰⁾。先にも述べたように、これらの疾患の治療法は現在まで全く知られていない。いずれも視細胞に含まれる視物質または光変換にかかわる物質の遺伝子異常であるから、視細胞変性が直接それによって引き起こされているとすれば、正常(野性型)RPE の移植で効果があるとは考えにくい。しかし、現実の症例や遺伝子組み替え実験から興味ある新しい事実が明らかにされつつある。例えば、同一眼の下半分が変性し、上方は機能が保たれるという症例¹⁴¹⁾、peripherin/RDS の遺伝子異常がみつかった患者で後極部から周辺にかけて大部分の錐体の機能は十分保たれているのに、黄斑部の錐体のみが極端に変性し視力は手動弁にまで低下してしまっている症例¹⁴²⁾、さらに、rhodopsin の遺伝子異常の場所が明らかになっている場合でも、異常のないはずの錐体視細胞まで何故変性してしまうかという事実はどうに説明したら良いのか。このことは、遺伝子組み換えの技術を用いた transgenic animal では正常の視細胞と rhodopsin の Pro 347-Ser の点突然変異を持つ両方の視細胞が一樣に変性していくことから、視細胞死が rhodopsin 蛋白質の異常そのもので引き起こされるというよりは、何か他の因子のために全体が一樣に変性するのだらうとの推測がなされている¹⁴³⁾。すなわち、多くの遺伝子異常が網膜色素変性の関連で報告されているが、何故視細胞死を起こすか、その最後の引金は何か、については現在まだ明らかにされていないということである。我々の研究でも示されたように、視細胞に含まれる視物質の遺伝子異常の他に、細胞を変性させる最終的な共通のメカニズムとして glutamic acid の蓄積がある可能性を示している⁶⁷⁾¹⁴⁴⁾。

特に、RPE が先に述べたように幾つかの cytokine を分泌する一種の分泌細胞であることが明らかになってから、この考えは現実味を帯びてきた。本年度の The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) で興味ある報告があった。先に述べたように、最も大切な視細胞死が直接の異常遺伝子に由来する蛋白によらず、何らかの機序で最終的な細胞死, apoptosis が引き起こされているとすれば、それを阻止するような遺伝子操作を加えても治療となり得るはずである。bcl-2 の導入された網膜変性 (rd) マウスで実際に視細胞の変性が阻止できたという⁶⁵⁾¹⁴⁶⁾。さらに、視細胞変性のメカニズムがどこにあるのか、一つの家系内で同じ遺伝子の異常をもっているにもかかわらず、変性から免れている家族が何故存在するのか、網膜内で変性する細胞と保たれる細胞が存在するメカニズムを研究すれば将来必ず治療法をみつけることができるであろう。そのときに RPE または IPE の移植が必ず役に立つものと信じている¹⁴⁷⁾。特に、ヒト網膜色素変性の視細胞に bFGF の蓄積が起き、その細胞が保持されるという今年の ARVO の報告⁶⁸⁾は我々を勇気づけてくれるものであった。

VIII ま と め

日本においては、法的に眼球銀行で利用される眼球も、角膜を除けば利用できないことになっている。さらに、胎生 24 週以前の胎児組織を利用することは十分な informed consent を得た上で利用することはあり得るが、日常の症例にその都度入手することは無理である。アメリカやヨーロッパにおいては胎児組織の利用が認められ、すでに述べた通り加齢黄斑変性や網膜色素変性に対して移植が行われている。さらに、中枢神経系疾患では新鮮組織のみでなく、その凍結保存された細胞も行われようとしている⁴⁹⁾⁵⁰⁾。眼科領域でも、もしその細胞を使うことが移植成功と視機能回復にとって必須のことであるならば、今後問題提起をする必要がある。“色素上皮細胞バンク”のような形で凍結保存しておいた細胞を必要に応じて培養系に戻し、移植できるようになれば理想的である。特に、MHC タイプ分けなど詳細な検査をし、分類しておけば最も良く患者にマッチしたものを選ぶことができ、移植に際しての免疫反応を最小限に抑えることが可能である。RPE の凍結保存については過去に報告¹⁴⁸⁾もあるが、今回我々が示したように、細胞の凍結保存技術は大変進歩しており、さらに、最新の分子生物学的な手法を用いれば、単にどの位の細胞数が生存したかという興味のみでなく、RPE 自身の本質的な膜の性質や機能がどのように保持され、また失われたかのレベルで考え、臨床応用に向かうことができるであろう⁸⁵⁾。遺伝子工学技術の発達により、もし他種属の RPE を遺伝子操作をした上で使用できればそれでもよい。特にブタを用いた実験では拒絶反応を引き起こす細胞マーカーを潰す“knock

out”技術により器官をより長く生着させ得ることが試みられている⁷⁷⁾¹⁴⁹⁾。将来、このような技術が色素上皮にも応用されれば、RPE をどこから得るかについては問題がなくなるであろう。

遺伝子発現が明らかになった疾患では遺伝子治療が問題となり、網膜色素変性も当然その対象となる。実験動物、特にマウスの網膜変性 retinal degeneration slow (rds) と retinal degeneration (rd) においては、最近 transgenic technology で視細胞が変性しないことが示された¹⁵⁰⁾¹⁵¹⁾。この方法は、成功率の問題や使用する遺伝子の運び屋 (vector) など多くの問題を抱えている。ヒトにおける現在の遺伝子治療は、① 単一遺伝子異常の疾患であること、② 厳密な意味で遺伝子発現の調節を必要としないこと、③ 放置しておくことと致死的な結末をもたらす疾患であることなどの制約が付けられている。このような意味では、現在の眼科疾患には遺伝子治療は適応とならない。

これからの時代は技術が急速に進歩すると、今回述べたような先端技術を用いた生物研究は、まだ基礎実験が不十分なうちから biotechnology 関連の企業先導で営利目的に利用されることもあり得る。実際、視細胞移植については米国ですでに数年前にそのような企業が現れ、宣伝を開始した¹⁵²⁾。幸い、良識ある研究者集団によって患者が惑わされることなく現在に至っていると聞いている。さらに、本年 1 月 10 日付け Japan Times にはスウェーデンで RPE 移植の臨床応用の記事が掲載された。国民性の違い、科学技術の取り入れ方など、日本人としてはとてもすぐには信じられない気持ちである。今回の我々の研究が意味するところは、まだまだ解決しなければならない多くの問題があることを示しており、臨床応用する場合には、① 如何に安全性が確保されているか、② どのような効果が期待できるか、③ その“治療”を受ける患者がすべての経過を完全に理解しているか、を厳しくチェックすることが大切である。眼内レンズ導入に際し、我々眼科医が経験した虹彩支持レンズ、前房レンズ、後房レンズの道のりを振り返って考えれば慎重の上にも慎重でなければならないと考える。しかも、“色素細胞移植術”は眼内レンズ開発のときに必要とした科学的知識と技術とは比較できないほどに広く、深いものが要求されるであろう。それを乗り越えるためには眼科臨床医学が細胞生物学、分子生物学、免疫学、物理化学、そして遺伝子工学などの基礎研究者と緊密に討議し、共同で研究を進めなければならないし、21 世紀はそのような時代であると考ええる。その研究成果はもちろん、網膜色素変性、加齢黄斑変性を始めとする難治性疾患患者にとって最も喜ばしいものであるべきで、どれほど多くの問題を抱えていても、科学の歴史が何時でもそうであったように、もし、色素細胞移植が有効であれば、いつかは問題が解決される日がくるであろうと確信する。

先にも述べたように、この困難な、しかし、夢の多いタイトルが記念すべき第100回日本眼科学会総会の宿題報告に選定され、その一員に指名されてからほぼ2年間、医局員とともに多くの研究をし、新しい知見を得ようと努力し、その過程を楽しむことができた。しかし道は遠く、得られた結果はあまりにも少ないが、それでも続けなければ臨床応用に到達できないのも事実である。

平常の研究活動に加えて移植の研究を遂行することができたのは文部省科学研究費(総合研究A:課題番号07307016, 一般研究A:課題番号06404061), 厚生省特定疾患調査研究費の公的な援助の他に、日本失明予防協会(山田孝彦—平成3年度, 阿部俊明—平成4年度), 三島済一記念眼科研究国際交流基金(Durlu YK), さらに、宮城県眼科医会会員の諸先生、東北大学医学部眼科教室同窓会諸兄姉の絶大なご援助があったおかげである。また、本研究の遂行にあたりご協力いただいた東北大学加齢医学研究所宮崎淳一教授、武田薬品工業(株)医薬開拓研究所の方々に厚く御礼申し上げる。相良淑子, 佐藤エイ子, 飯塚敦子, 小野真理子, 明石直子, 阿部雄三の諸氏の協力にも感謝したい。

文 献

- 1) Hammer RM, Yinon U: Intraocular retinal transplantation. A review. J Neural Transplant Plast 2: 81—89, 1991.
- 2) Li L, Turner JE: Inherited retinal dystrophy in the RCS rat. Prevention of photoreceptor degeneration by pigment epithelial cell transplantation. Exp Eye Res 47: 911—916, 1988.
- 3) LaVail MM, Li L, Turner JE, Yasumura D: Retinal pigment epithelial cell transplantation in RCS rats; normal metabolism in rescued photoreceptors. Exp Eye Res 55: 555—562, 1992.
- 4) Tamai M, Takahashi J, Noji T, Mizuno K: Development of photoreceptor cells *in vitro*. Influence and phagocytic activity of the homo- and heterogenic pigment epithelium. Exp Eye Res 26: 581—590, 1978.
- 5) 山口克宏: 網膜移植研究の展開. 日眼会誌 97: 555—562, 1993.
- 6) Bok D: The retinal pigment epithelium: A versatile partner in vision. J Cell Sci Suppl 17: 189—195, 1993.
- 7) Tombran-Tink JT, Chader GJ, Johnson LV: PEDF: A pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. Exp Eye Res 53: 411—414, 1991.
- 8) Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink JT: Pigment epithelium-derived factor: Neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. Proc Natl Acad Sci USA 90: 1526—1530, 1993.
- 9) Taniwaki T, Becerra SP, Chader GJ, Schwartz JP: Pigment epithelium-derived factor is a survival factor for cerebellar granule cells in culture. J Neurochem 64: 2509—2517, 1995.
- 10) Robbins SG, Mixon RN, Wilson DJ, Hart CE, Robertson JE, Westra I, et al: Platelet derived growth factor ligands and receptors immunolocalized in proliferative retinal diseases. Invest Ophthalmol Vis Sci 35: 3649—3663, 1994.
- 11) Yoshida M, Tanihara H, Yoshimura N: Platelet-derived growth factor gene expression in cultured human retinal pigment epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 189: 66—71, 1992.
- 12) Campochiaro PA, Sugg R, Grotendorst G, Hjelmeland LM: Retinal pigment epithelial cells produce PDGF-like proteins and secrete them into their media. Exp Eye Res 49: 217—227, 1989.
- 13) Campochiaro PA, Hackett SF, Viores SA, Freund J, Csaky C, LaRochelle W, Henderer J, et al: Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells. J Cell Sci 107: 2459—2469, 1994.
- 14) Viores SA, Henderer JD, Mahlow J, Chiu C, Derevjani NL, Larochelle W, et al: Isoforms of platelet-derived growth factor and its receptors in epiretinal membranes; immunolocalization to retinal pigmented epithelial cells. Exp Eye Res 60: 607—619, 1995.
- 15) Tucker RF, Shipley GD, Moses HL, Holley RW: Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to the platelet type beta transforming growth factor. Science 226: 705—707, 1984.
- 16) Connor TB, Robenrts AB, Sporn MB, Davis J, Glaser BM: RPE cells synthesize and release transforming growth factor-beta, a modulator of endothelial cell growth and wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci 29: S307 (ARVO), 1988.
- 17) Tanaihara H, Yoshida M, Matsumoto M, Yoshimura N: Identification of transforming growth factor-beta expressed in cultured human pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 34: 413—419, 1993.
- 18) Kehel JH: Transforming growth factor-beta: An important mediator of immunoregulation. Cell 9: 438—450, 1991.
- 19) Kishi H, Mishima HK, Yamashita U: Growth regulation of retinal pigment epithelial (RE) cells *in vitro*. Curr Eye Res 13: 661—668, 1994.
- 20) Pasquaale LR, Dorman-Pease ME, Luttly GA, Quigley HA, Jampel HD: Immunolocalization of TGF-beta 1, TGF-beta 2 and TGF-beta 3 in the anterior segment of the human eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 34: 23—30, 1993.
- 21) Pittac C, Jones M, Reh TA: Basic fibroblast growth factor induces retinal pigment epithelium to generate neural retina *in vitro*. Development 113: 577—588, 1991.
- 22) Schweigerer L, Malerstein B, Neufeld G, Gospodarowicz D: Basic fibroblast growth factor is synthesized in cultured retinal pigment epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 143: 934—940, 1987.
- 23) Sternfeld MD, Robertson JE, Shipley GD, Tsai J, Rosenbaum JT: Cultured human retinal pig-

- ment epithelial cells express basic fibroblast growth factor and its receptor. *Curr Eye Res* 8: 1029—1037, 1989.
- 24) **Baird A, Esch F, Gospodarowicz D, Guillemin R**: Retina- and eye-derived endothelial cell growth factor: Partial molecular characterization and identity with acidic and basic fibroblast growth factors. *Biochemistry* 24: 7855—7865, 1985.
 - 25) **Amin R, Puklin JE, Frank RN**: Growth factor localization in choroidal neovascular membranes of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3178—3188, 1994.
 - 26) **Green WR, Key SN**: Senile macular degeneration: A histopathologic study. *Trans Am Ophthalmol Soc* 75: 180—254, 1977.
 - 27) **Malecaze F, Mascarell F, Bugra K, Fuhrmann G, Courtois Y, Hicks D**: Fibroblast growth factor receptor deficiency in dystrophic retinal pigmented epithelium. *J Cell Physiol* 154: 631—642, 1993.
 - 28) **Waldbilg RJ, Pfeffer BA, Schoen TJ, Adler AA, Shen OZ, Scavo L, et al**: Evidence for an insulin-like growth factor autocrine-paracrine system in the retinal photoreceptor-pigment epithelial cell complex. *J Neurochem* 57: 1522—1533, 1991.
 - 29) **Martin DM, Yee D, Feldman EL**: Gene expression of the insulin like growth factors and their receptors in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Mol Brain Res* 12: 181—186, 1992.
 - 30) **Takagi H, Yoshimura N, Tanihara H, Honda Y**: Insulin-like growth factor-related genes, receptors, and binding proteins in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 916—923, 1994.
 - 31) **Elnor VM, Strieter RM, Elnor SG, Baggiolini M, Lindlery I, Kunkel S**: Neutrophil chemotactic factor (IL-8) gene expression by cytokine treated retinal pigment epithelial cells. *Am J Pathol* 136: 745—750, 1990.
 - 32) **Elnor VM, Scales W, Elnor SG, Danforth J, Kunkel SL, Strieter RM**: Interleukin (IL-6) gene expression and secretion by cytokine stimulated human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 54: 361—368, 1992.
 - 33) **Planck SR, Dang TT, Graves D, Tara D, Ansel JC, Rosenbaum JT**: Retinal pigment epithelial cells secrete interleukin-6 in response to interleukin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 78—82, 1992.
 - 34) **Planck SR, Huangm X, Robertoson JE, Rosenbaum JT**: Retinal pigment epithelial cells produce interleukin-1b and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in response to interleukin-1a. *Curr Eye Res* 12: 205—212, 1993.
 - 35) **Sippy BD, Hofman FM, He S, Osusky R, Sheu SJ, Walker SM, et al**: SV40-immortalized and primary cultured human retinal pigment epithelial cells share similar patterns of cytokine-receptor expression and cytokine responsiveness. *Curr Eye Res* 14: 495—503, 1995.
 - 36) **Kojima S, Yamada T, Tamai M**: Quantitative analysis of interleukin-6 in the vitreous from patients with proliferative vitreoretinal diseases. In preparation, 1996.
 - 37) **Burke JM**: Stimulation of DNA synthesis in human and bovine RPE by peptide growth factors: The response to TNF- α and EGF is dependent upon culture density. *Curr Eye Res* 8: 1279—1286, 1989.
 - 38) **Tanihara H, Yoshida M, Yoshimura N**: Tumor necrosis factor α gene is expressed in stimulated retinal pigment epithelial cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 1029—1034, 1992.
 - 39) **Adamis AP, Shima DT, Yeo KT, Yeo TK, Brown LF, Berse B, et al**: Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 631—638, 1993.
 - 40) **Aiello LP, Morthrup JM, Keyt BA, Takagi H, Iwamoto MA**: Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol* 113: 1538—1544, 1995.
 - 41) **Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al**: Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331: 1480—1487, 1994.
 - 42) **Malecaze F, Clamens S, Simorre-Pinatel V, Mathis A, Chollet P, Favard C, et al**: Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 112: 1476—1482, 1994.
 - 43) **Hewitt AT, Lindsey JD, Carbott D, Adler R**: Photoreceptor survival-promoting activity in interphotoreceptor matrix preparations: Characterization and partial purification. *Exp Eye Res* 50: 79—88, 1990.
 - 44) **Balkwill FR, Burke F**: The cytokine network. *Immunol Today* 10: 299—304, 1989.
 - 45) **Sparrow JR, Nathan C, Vodovotz Y**: Cytokine regulations of nitric oxide synthase in mouse retinal pigment epithelial cells in culture. *Exp Eye Res* 59: 129—139, 1994.
 - 46) **Adler R**: Mechanisms of photoreceptor death in retinal degenerations. From the cell biology of the 1990s to the ophthalmology of the 21st century? *Arch Ophthalmol* 114: 79—83, 1996.
 - 47) **Boulton M, Moriarty P, Jarvisvans J, Marcyniuk B**: Regional variation and age related changes of lysosomal enzymes in the human retinal pigment epithelium. *Br J Ophthalmol* 78: 125—129, 1994.
 - 48) **Burke JM, McKay BS, Jaffe GJ**: Retinal pig-

- ment epithelial cells of the posterior pole have fewer Na/K adenosine triphosphatase pumps than peripheral cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 2042—2046, 1991.
- 49) **Spencer DP, Robbins RJ, Naftolin F, Phil D, Marek KL, Vollmer T, et al**: Unilateral transplantation of human fetal mesencephalic tissue into the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 327: 1541—1548, 1992.
 - 50) **Dong JF, Detta A, Hitchcock ER**: Susceptibility of human foetal brain tissue to cool- and freeze-storage. *Brain Res* 621: 242—248, 1993.
 - 51) **Sarks SH**: Retinal pigment epithelium (RPE) dysfunction, atrophy and degeneration have been implicated as the cause of many retinal disease, including age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 57: 951—965, 1973.
 - 52) **Hammes H-P, Brownlee M, Jonczyk A, Sutter A, Preissner KT**: Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nature Med* 2: 529—533, 1996.
 - 53) **Finger PT, Berson A, Sherr D, Riley R, Balkin RA, Bosworth JL**: Radiation therapy for sub-retinal neovascularization. *Ophthalmology* 103: 878—889, 1996.
 - 54) **Blinder KJ, Peyman GA, Paris CL, Gremillion CM Jr**: Submacular scar excision in age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol* 15: 215, 1991.
 - 55) **Lambert HM, Capone A Jr, Aaberg TM, Sternberg P Jr, Mandell BA, Lopez PF**: Surgical excision of subfoveal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 113: 257—262, 1992.
 - 56) **Thomas MA, Grand MG, Williams DF, Lee CM, Pesin SR, Lowe MA**: Surgical management of subfoveal choroidal neovascularization. *Ophthalmology* 99: 952—968, 1992.
 - 57) **Berger AS, Kaplan HJ**: Clinical experience with the surgical removal of subfoveal neovascular membranes. *Ophthalmology* 99: 969—976, 1992.
 - 58) 山田孝彦, 菅野俊雄, 君塚佳宏, 玉井 信: 加齢黄斑変性症の12症例に対する硝子体手術による治療の試み. *臨眼* 48: 1236—1237, 1994.
 - 59) 山田孝彦, 菅野俊雄, 君塚佳宏, 玉井 信: 老人性円盤状黄斑変性症の網膜下線維血管病巣についての組織学的検索. *臨眼* 47: 826—827, 1993.
 - 60) **Gass JDM**: Biomicroscopic and histopathologic considerations regarding the feasibility of surgical excision of subfoveal neovascular membranes. *Am J Ophthalmol* 118: 285—298, 1994.
 - 61) 君塚佳宏, 菅野俊雄, 武藤 勉, 山田孝彦, 玉井 信: 加齢黄斑変性症において網膜下血腫, 増殖組織除去を行った症例の網膜色素上皮の動態. *臨眼* 47: 290—293, 1993.
 - 62) 菅野俊雄, 武藤 勉, 君塚佳宏, 山田孝彦, 玉井 信: 網膜色素上皮穿孔を伴う胞状網膜剝離の自然寛解例. *臨眼* 47: 1142—1143, 1993.
 - 63) 中沢 満: 網膜色素変性症の分子生物学的研究. *日眼会誌* 97: 1394—1405, 1993.
 - 64) **Daiger SP, Sullivan LS, Rodriguez JA**: Correlation of phenotype with genotype in inherited retinal degeneration. *Behavioral Brain Sci* 18: 452—467, 1995.
 - 65) **Papermaster DS**: Necessary but insufficient. *Nature Med* 1: 874—875, 1995.
 - 66) 玉井 信: 網膜における興奮性アミノ酸の持つ二面性. *日眼会誌* 98: 411—418, 1994.
 - 67) **Tamai M**: Glutamate accumulation in the photoreceptor—Presumed final common path of photoreceptor cell death. *Behavioral Brain Sci* 18: 490, 1995.
 - 68) **Li Z-Y, Chang J, Milam AH**: Localization of FGF-2 in normal and RP human retinas. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 37: ARVO Abstract S789, 1996.
 - 69) **Faktovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM**: Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature* 347: 83, 1990.
 - 70) **Peyman GA, Fishman GA, Sanders DR, Apple DJ, Vlachek JK**: Biopsy of human scleral-chorio-retinal tissue. *Invest Ophthalmol* 14: 707—710, 1975.
 - 71) 岩崎雅行, 猪俣 孟, 吉富健志, 伊藤祐之: 虹彩および瞳孔の解剖と機能. *神経進歩* 29: 710—719, 1985.
 - 72) **Barritault D, Arruti C, Courrois Y**: Is their a ubiquitous growth factor in the eye? Proliferation induced in different cell types by eye derived growth factors. *Differentiation* 18: 29—42, 1981.
 - 73) **Zheng-jun F, Hou-ren W, Qiang W**: Inhibition of fibroblast proliferation by human iris pigment epithelial cells *in vitro*: Preliminary results. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 234: 64—66, 1996.
 - 74) **Knisely TL, Bleicher PA, Vibbard CA, Granstein RD**: Production of latent transforming growth factor- β and other inhibitory factors by cultured murine iris and ciliary body cells. *Curr Eye Res* 10: 761—766, 1991.
 - 75) **Streilein JW, Bradley D**: Analysis of immunosuppressive properties of iris and ciliary body cells and their secretory products. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 2700—2710, 1991.
 - 76) **Zhang W, Lee W-H, Triarhou LC**: Grafted cerebellar cells in a mouse model of hereditary ataxia express IGF-I system genes and partially restore behavioral function. *Nature Med* 2: 65—71, 1996.
 - 77) **Cozzi E, White DJG**: The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nature Med* 1: 964—966, 1995.
 - 78) **Durlu YK, Tamai M**: *In vitro* expression of

- epidermal growth factor receptor by human retinal pigment epithelial cells. In: Anderson RE, et al (Eds): Degenerative Disease of the Retina. Plenum Press, New York, 1995.
- 79) **Song M-K, Lui GM**: Propagation of fetal human RPE cells: Preservation of original culture morphology after serial passage. *J Cell Physiol* 143: 196—203, 1990.
 - 80) **Ray J, Peterson DA, Schinstine M, Gage FH**: Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3602—3606, 1993.
 - 81) **del Cerro M, Notter MF, Seigel G, Lazar E, Chader G, del Cerro C**: Intraretinal xenografts of differentiated human retinoblastoma cells integrate with the host retina. *Brain Res* 583: 12—22, 1992.
 - 82) **Davis A, Bernstein P, Bok D, Turner J, Nachtigal M, Hunt R**: A human retinal pigment epithelial cell line that retains epithelial characteristics after prolonged culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 955—964, 1995.
 - 83) **Capella JA, Kaufman HE, Ploack FM**: Prognosis of keratoplasty in phakic and aphakic patients and use of cryopreserved donor tissue. *Trans Am Acad Ophthalmol Otol* 76: 1275—1285, 1972.
 - 84) **Gluckman E, Devergie A, Thierry D, Esperou BH, Traineau R, Gerrota J, et al**: Clinical applications of stem cell transfusion from cord blood and rationale for cord blood banking. *Bone Marrow Transplant* 9: 114—117, 1992.
 - 85) **Durlu YK, Tamai M**: Transplantation of retinal pigment epithelium using viable cryopreserved cells. *Cell Transplant*. In press, 1996.
 - 86) **McMillian MK, Thai L, Hong J-S, O'Callaghan JP, Pennypacker KR**: Brain injury in a dish: A model for reactive gliosis. *Trends Neurosci* 17: 138—142, 1994.
 - 87) **Niederborn JY**: Immune privilege and immune regulation in the eye. *Adv Immunol* 48: 191—226, 1990.
 - 88) **Streilein JW**: Anterior chamber associated immune deviation: The privilege of immunity in the eye. *Surv Ophthalmol* 35: 67—73, 1990.
 - 89) **Sheedlo HJ, Li L, Gaur VP, Young RW, Seaton A, Stovall SV, et al**: Photoreceptor rescue in the dystrophic retina by transplantation of retinal pigment epithelium. *Int Rev Cytol* 138: 1—149, 1992.
 - 90) **Jiang LQ, Jorquera M, Streilein JW**: Sub-retinal space and vitreous cavity as immunologically privileged sites for retinal allografts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 3347—3354, 1993.
 - 91) **Ye J, Wang H-M, Ogden TE, Ryan SJ**: Allogeneic transplantation of rabbit retinal pigment epithelial cells double-labelled with 5-bromodeoxyuridine (BrdU) and natural pigment. *Curr Eye Res* 12: 629—639, 1993.
 - 92) **Liversidge JM, Sewell HF, Forrester JV**: Human retinal pigment epithelial cells differentially express MHC class II (HLA DP DR and DQ) antigens in response to *in vitro* stimulation with lymphokine or purified IFN- γ . *Clin Exp Immunol* 73: 489—494, 1988.
 - 93) **Streilein JW**: Immunological non-responsiveness and acquisition of tolerance in relation to immune privilege in the eye. *Eye* 9: 236—240, 1995.
 - 94) **Little CW, Castillo B, DiLoreto DA, Cox C, Wyatt J, del Cerro C, et al**: Transplantation of human fetal retinal pigment epithelium rescues photoreceptor cells from degeneration in the Royal College of Surgeons rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 204—211, 1996.
 - 95) **Akaishi K, Durlu YK, Ishiguro SI, Tamai M**: The localization of MHC class II-positive cells in posterior segment of RCS rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: S544, ARVO 1996.
 - 96) **Akaishi K, Ishiguro S-I, Durlu YK, Yamada K, Takeda Y, Tamai M**: The localization of MHC class II-positive cells in posterior segment of Royal College of Surgeons rat after transplantation of retinal pigment epithelium. In preparation, 1996.
 - 97) **Rahi AHS**: Autoimmunity and the retina. II. Raised serum IgM levels in retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 57: 904—909, 1973.
 - 98) **Chat SM, Heckenlively J, Meyers-Elliott RH**: Autoimmunity in hereditary retinal degeneration. I. Basic studies. *Br J Ophthalmol* 69: 19—24, 1985.
 - 99) **Roque RS, Imerial CJ, Caldwell RB**: Microglial cells invade the outer retina as photoreceptors degenerate in Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 196—203, 1996.
 - 100) **Bhatt NS, Newsome DA, Fenech T, Hessburg TP, Diamond JG, Miceli MV, et al**: Experimental transplantation of human retinal pigment epithelial cells on collagen substrates. *Am J Ophthalmol* 117: 214—221, 1994.
 - 101) **Tamai M, Durlu YK, Abe T, Ishiguro S**: The comparison of anterior chamber implanted and *in vitro* cultures of human retinal pigment epithelial cells using laminin-coated collagen sheet support. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: S382, ARVO, 1996.
 - 102) **Gliffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA**: Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270: 1189—1192, 1995.
 - 103) **Gouras P, Flood MT, Kjeldbye H, Bilek MK, Eggers H**: Transplantation of cultured human retinal epithelium to Bruch's membrane of the owl monkey's eye. *Curr Eye Res* 4: 253—265, 1985.
 - 104) **Sheedlo HJ, Li L, Turner JE**: Functional and structural characteristics of photoreceptor cells rescued in RPE-cell grafted retinas of RCS dystrophic rats. *Exp Eye Res* 48: 841—854, 1989.

- 105) **Wongpichedchai S, Weiter JJ, Weber P, Dorey CK**: Comparison of external and internal approaches for transplantation of autologous retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 3341—3352, 1992.
- 106) **Yamamoto S, Du J, Gouras P, Kjeldbye H**: Retinal pigment epithelial transplants and retinal function in RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 3068—3075, 1993.
- 107) **Coffey PJ, Lund RD, Rawlins JNP**: Retinal transplant-mediated learning in a conditioned suppression task in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7248—7249, 1989.
- 108) **Sauve Y, Klassen H, Whiteley SJO, Litchfield T, Lund RD**: Functional preservation following RPE grafting: 1. Retinotopic mapping in the superior colliculus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: S443, ARVO 1996.
- 109) **Heron WL, Riegel RW, Meyers OE, Rubin ML**: Retinal dystrophy in the rat—A pigment epithelial disease. *Invest Ophthalmol* 8: 595—604, 1969.
- 110) **Bok D, Hall MOM**: The role of the pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol* 49: 664—682, 1971.
- 111) **Gouras P, Lopez R, Kjeldbye H, Sullivan B, Britis M**: Transplantation of retinal epithelium prevents photoreceptor degeneration in the RCS rat. In: LaVail MM, et al (Eds): *Inherited and Environmentally Induced Retinal Degenerations*. New York: Alan R. Liss; 659—671, 1989.
- 112) **Sheedlo H, Li L, Turner J**: Functional and structural characteristics of photoreceptor cells rescued in RPE-cell grafted retinas of RCS dystrophic rats. *Exp Eye Res* 48: 841—854, 1989.
- 113) **Porrello K, Yasumura D, LaVail MM**: The interphotoreceptor matrix in RCS rat: Histochemical analysis and correlation with the rate of retinal degeneration. *Exp Eye Res* 43: 413—429, 1986.
- 114) **Little CW, Castillo B, DiLoreto DA, Cox C, Wyatt J, del Cerro C, et al**: Transplantation of human fetal retinal pigment epithelium rescues photoreceptor cells from degeneration in the Royal College of Surgeons rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 204—211, 1996.
- 115) **武田宣之, 山口克宏, 山田 桂, 玉井 信**: 人網膜下液によるラット遺伝性網膜変性の抑制. *眼紀* 47: 418—420, 1996.
- 116) **Yamada T, Kanno T, Tamai M**: Changes and recovery in the interphotoreceptor matrix and rod outer segments of the reattached retina after artificial retinal detachment and ablation of RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: S1071, ARVO 1992.
- 117) **Tamai M, Kanno T, Kimizuka Y, Yamada T**: Histological and histochemical analysis of the artificial damaged rabbit retina with transplanted retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*: S1112, ARVO 1993.
- 118) **Kanno T, Yamada T, Tamai M**: Apoptosis detected in rabbit neural retina of experimental retinal pigment epithelial (RPE) damage and RPE transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: S93, ARVO 1996.
- 119) **Yamada T, Kanno T, Tamai M**: The differences between transplanted iris and transplanted iris pigment epithelium in the artificially damaged retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: S94, ARVO 1996.
- 120) **Peyman GA, Blinder KJ, Paris CL, Alturk W, Nelson NC Jr, Desai U**: A technique for retinal pigment epithelium transplantation for age-related macular degeneration secondary to extensive sub-foveal scarring. *Ophthalmic Surg* 22: 102—108, 1991.
- 121) **Algvere PV, Berglin L, Gouras P, Sheng Y**: Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 232: 707—716, 1994.
- 122) **Algvere PV, Berglin L, Gouras P, Sheng Y**: Human fetal RPE transplants in age related macular degeneration (ARMD). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: S96, ARVO 1996.
- 123) **Das TP, del Cerro M, Lazar ES, Jalali S, DiLoreto DA, Little CW, et al**: Transplantation of neural retina in patients with retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: S96, ARVO 1996.
- 124) **Kaplan HJ 他**: 1996年度 ARVO で発表. 抄録無し.
- 125) **Machemer R, Steinhorst UH**: Retinal separation, retinotomy, and macular relocation: II. A surgical approach for age-related macular degeneration? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 231: 635—641, 1993.
- 126) **Rezaei KA, Kohen L, Heimann K, Wiedermann P**: Iris pigment epithelium transplants rescue photoreceptors in dystrophic RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: S94, ARVO 1996.
- 127) **Gelanz M, Meneses P, Brittis M, Rosenfeld MR, Duvoisin RM, Coleman DJ**: Transplantation into the subretinal space of iris pigment epithelial cells labeled using a lacZ-encoding defective HSV. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: S94, ARVO 1996.
- 128) **Brittis M, Gelanz M, Coleman DJ**: Iris pigment epithelial cells from iridectomy as source for autologous retinal pigment epithelial transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: S94, ARVO 1996.
- 129) **Morrison RS, Sharma A, de Vellis J, Bradshaw RA**: Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7537—7541, 1986.
- 130) **Sievers J, Hausemann B, Unsicker K, Berry M**: FGF promote the survival of adult rat retinal ganglion cells after transection of the optic nerve.

- Neurosci Lett 76 : 157—162, 1987.
- 131) **Park CM, Hollenberg MJ**: Growth factor-induced retinal regeneration *in vivo*. Int Rev Cytol 146 : 49—74, 1993.
 - 132) **LaVail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH**: Multiple growth factors, cytokines and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. Proc Natl Acad Sci USA 89 : 11249—11253, 1992.
 - 133) **Gao H, Hollyfield JG**: Basic fibroblast growth factor in retinal development: Differential levels of expression and content in normal and retinal degeneration (rd) mice. Develop Biol 169 : 168—184, 1995.
 - 134) **Gao H, Hollyfield JG**: Basic fibroblast growth factor: Increased gene expression in inherited and light-induced photoreceptor degeneration. Exp Eye Res 62 : 181—189, 1996.
 - 135) **LaVail MM, Yasumura D, Faktorovich EG, Heler IM, Matthes MT, Pearson KL, et al**: Basic fibroblast growth factor protects photoreceptors from light induced degeneration in albino rats. Ann NY Acad Sci 638 : 1341—1347, 1991.
 - 136) **Niwa H, Yamamoto KI, Miyazaki JI**: Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene 108 : 193—200, 1991.
 - 137) **Kurokawa T, Seno M, Igarashi K**: Nucleotide sequence of rat basic fibroblast growth factor cDNA. Nucleic Acids Res 16 : 5201, 1988.
 - 138) **Litchfield T, Whiteley SJO, Greenwood J, Adamson P, Lund RD**: Grafting SV40 transformed rat retinal epithelial cells to the sub-retinal space. Invest Ophthalmol Vis Sci 37 : S444, ARVO, 1996.
 - 139) **Unoki K, LaVail MM**: Protection of the rat retina from ischemic injury by brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor, and basic fibroblast growth factor. Invest Ophthalmol Vis Sci 35 : 907—915, 1994.
 - 140) **Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP**: Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. Science 264 : 1604—1608, 1994.
 - 141) **Li Z-Y, Jacobson SG, Milam AH**: Autosomal dominant retinitis pigmentosa caused by the threonine-17-methionine rhodopsin mutation: Retinal histopathology and immunocytochemistry. Exp Eye Res 58 : 397—408, 1994.
 - 142) **Nakazawa M, Wada Y, Tamai M**: Macular dystrophy associated with monogenic ARG172TRP mutation of the peripherin/RDS gene in a Japanese family. Retina 15 : 518—523, 1995.
 - 143) **Huang PC, Gaitan AE, Hao Y, Petters RM, Wong F**: Cellular interactions implicated in the mechanism of photoreceptor degeneration in transgenic mice expressing a mutant rhodopsin gene. Proc Natl Acad Sci USA 90 : 8484—8488, 1993.
 - 144) **Noro Y, Ishiguro S-I, Tamai M**: Accumulation of glutamate-like immunoreactivity in the rds/rds mouse retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 35 : 1362, ARVO 1994.
 - 145) **Flannery JG, Oh P, Matthes MT, Yasumura D, Lau-Villacorta C, Steinberg RH, et al**: Bcl-2 over expression reduces apoptotic photoreceptor cell death caused by constant light. Invest Ophthalmol Vis Sci 36 : S1122, ARVO 1996.
 - 146) **Adler R**: Mechanisms of photoreceptor death in retinal degenerations. Arch Ophthalmol 114 : 79—83, 1996.
 - 147) **Bok K**: Retinal transplantation and gene therapy. Present realities and future possibilities. Invest Ophthalmol Vis Sci 34 : 473—476, 1993.
 - 148) **白川弘泰, 松村美代, 荻野誠周**: ニフトリ胚培養網膜色素上皮細胞の凍結保存法について. 日眼会誌 87 : 621—626, 1983.
 - 149) **Bach FH, Robson SC, Winkoer H, Ferran C, Stuhlmeier KM, Wrighton CJ, et al**: Hancock WW: Barriers to xenotransplantation. Nature Med 1 : 869—873, 1995.
 - 150) **Lem J, Flannery JG, Li T, Applebury ML, Farber D, Simon M**: Retinal degeneration is rescued in transgenic rd mice by expression of the cGMP phosphodiesterase b subunit. Proc Natl Acad Sci USA 89 : 4422—4426, 1992.
 - 151) **Travis GH, Groshan KR, Lloyd M, Bok D**: Complete rescue of photoreceptor dysplasia and degeneration in transgenic retinal degeneration slow (rds) mice. Neuron 9 : 113—119, 1992.
 - 152) **Photogenesis, First Quarter Report**: Photogenesis Incorporated, Los Angeles, CA. USA 1993.