

第 105 回 日本眼科学会総会 宿題報告 II

眼と神経保護

緑内障性視神経症に対する神経保護的治療の黎明

山本 哲也

岐阜大学医学部眼科学教室

共同研究者

北澤 克明, 杉山 和久, 谷口 徹, 内田 英哉, 川瀬 和秀, 澤田 明
谷 照斌, 近藤 雄司, 中井 義幸, 松原 正幸, 川上 秀昭, 石田 恭子
丹羽 義明, 辻 明, Daugeliene L, Karim MDZ, 川瀬 千鶴

望月 清文, 早川 友康(岐阜大学医学部眼科学教室)

富田 剛司(東京大学大学院医学系研究科外科学専攻眼科学)

植松 俊彦(岐阜大学医学部薬理学教室)

岡野 幸雄(岐阜大学医学部分子病態学教室)

Neufeld A(米国 Washington 大学医学部)

Harris A, Kagemann L(米国 Indiana 大学医学部)

要 約

目的：神経保護的緑内障治療は、網膜神経節細胞の細胞死機構の直接的な修飾による細胞死の阻止を介する緑内障治療と定義できる。著者らはこの新たな緑内障治療の黎明期に当たり、最終目標である緑内障患者の quality of life 向上を図るために下記の研究を行った。

方法と結果：1. 眼圧非依存性の緑内障進行因子の検討。緑内障性視神経症の発症進行因子を種々の方法で検討し、視神経乳頭出血、乳頭周囲網脈絡膜萎縮、眼窩血流動態異常などの眼圧非依存性の発症進行因子の存在を証明した。2. 眼圧下降を介さない緑内障治療。正常眼圧緑内障の長期観察成績から、緑内障性視神経症に対する、カルシウム拮抗薬による眼圧下降を介さない治療の有用性を証明した。3. 緑内障動物モデルの確立。緑内障性視神経症に対する神経保護的治療の研究のための動物実験モデルとして、ラット急性緑内障モデルと視神経挫滅モデルを作製するとともに、視神経症の定量的経過観察用の電気生理学実験システムを構築した。4. 各種薬物の実験緑内障眼における神経保護効果の検討。上記実験モデルを用いて各種薬物の緑内障性視神経症に対す

る神経保護効果の検討を行った。検討の対象となった薬物は MK-801 および memantine [N-メチル-D アスパラギン酸(NMDA)受容体非拮抗阻害薬], T-588(神経伝達物質遊離促進剤), タクロリムス(免疫抑制剤), betaxolol(β 遮断薬), イガニジピン(カルシウム拮抗薬)である。NMDA 受容体阻害薬などのアポトーシス機構の変調に関連した薬物が眼圧下降を介さずに緑内障性視神経症による網膜神経節細胞の細胞死を有意に抑制することを明らかにした。

結論：緑内障性視神経症では眼圧とは独立の発症進行因子が存在し、少なくとも一部の症例では眼圧下降を介さずに緑内障性視神経症が治療可能である。また、動物眼においてアポトーシス変調により、緑内障性視神経症の進行を抑制可能である。これらのことは、ヒト緑内障性視神経症に対する神経保護治療の可能性を示唆するものである。(日眼会誌 105: 866-883, 2001)

キーワード：緑内障, 緑内障性視神経症, 神経保護, 正常眼圧緑内障, アポトーシス

別冊請求先：500-8705 岐阜市司町 40 岐阜大学医学部眼科学教室 山本 哲也
(平成 13 年 8 月 29 日受付, 平成 13 年 9 月 17 日改訂受理)

Reprint requests to: Tetsuya Yamamoto, M. D. Department of Ophthalmology, Gifu University School of Medicine,
40 Tsukasa-machi, Gifu 500-8705, Japan

(Received August 29, 2001 and accepted in revised form September 17, 2001)

A Review

The Dawn of Neuroprotective Therapy for Glaucomatous Optic Neuropathy

Tetsuya Yamamoto

Department of Ophthalmology, Gifu University School of Medicine

Abstract

Background : Neuroprotective therapy for glaucoma can be defined as treatment of the recalcitrant disease via direct modification of the molecular mechanism involving retinal ganglion cell death. I and my collaborators, at the dawn of the neuroprotective era, elaborated and conducted the following investigations in order to pursue our final goal, i. e., substantial improvement of the quality of life of glaucoma patients.

Methods and Results : 1. Investigation of intraocular pressure (IOP) independent prognostic factors in glaucomatous optic neuropathy. Clinical investigation along with multivariate analyses revealed that some IOP-independent factors including optic disc hemorrhage and compromised retrobulbar hemodynamics are associated with the development and progression of glaucomatous optic neuropathy. 2. Glaucoma therapy other than ocular hypotensive therapy. A long-term follow-up study demonstrated that calcium-channel blockers are efficacious in stabilizing the visual field in normal-tension glaucoma. 3. Establishment of animal models for glaucomatous optic neuropathy. Experimental animal models were created to conduct neuroprotective research for glaucomatous optic neuropathy : an IOP elevation model and an optic nerve crush model

in the rat. In addition, a system was constructed for electrophysiological study in the rat to quantitatively investigate neuroprotective effect on the retina and the optic nerve. 4. Neuroprotective effects of several agents on experimental optic neuropathies. Several agents were studied for their neuroprotective effects on optic neuropathies induced in the rat. Some apoptosis-modifying agents were found to possess neuroprotective effects against optic neuropathy.

Conclusions : IOP-independent prognostic factors exist in glaucomatous optic neuropathy. Glaucomatous optic neuropathy can be stabilized by IOP-unrelated therapy like calcium-channel blockers, at least in a subset of the disease. Modification of the apoptosis mechanism can protect retinal ganglion cells from damage caused by optic neuropathy in the rat models. All of the present studies suggest that neuroprotective therapy will probably become the treatment of choice in the near future for glaucomatous optic neuropathy. (J Jpn Ophthalmol Soc 105 : 866—883, 2001)

Key words : Glaucoma, Glaucomatous optic neuropathy, Neuroprotection, Normal-tension glaucoma, Apoptosis

I 緒 言

緑内障性視神経症では、視神経乳頭部の神経組織とグリア組織がほぼ均等に消失していくことが知られており^{1)~4)}、視神経乳頭の軸索の消失は網膜内層に存在する網膜神経節細胞の数の減少と対応している。網膜神経節細胞の数の減少、換言すると網膜神経節細胞の細胞死を起こす視神経症の発症機序解明が緑内障性視神経症の大きな課題である。現時点では、緑内障における網膜神経節細胞の細胞死のメカニズムとしてアポトーシスが重要と考えられている^{5)~7)}。実験動物眼、ヒト緑内障眼における網膜神経節細胞においてアポトーシスを証明した報告^{8)~11)}はいくつかある。Kerriganら¹¹⁾の報告はその一つであり、剖検例のヒト緑内障眼と正常眼における TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUN-

EL)陽性細胞出現率が検討されている。それによれば、TUNEL陽性細胞は、正常眼には細胞10,000個当たり0.12個みられたにすぎないが、緑内障の初期例では1.15個と9.6倍、末期例では3.40個と28.3倍の出現率であったとされる。また、superoxide dismutase 1遺伝子変異が明らかにされ、カスパーゼ1が病態に関与している可能性の高い筋萎縮性側索硬化症^{12)~14)}の眼球ではTUNEL陽性細胞は12.66個であり、正常眼の106倍の陽性細胞出現率とされた。ここで示された末期緑内障眼における網膜神経節細胞10,000個当たり3.40個のTUNEL陽性細胞出現率は、十数年の経過でTUNEL陽性細胞の出現する機序のみで網膜神経節細胞の99%が死を迎えるのに必要十分な数字と計算されている。現在ではTUNEL陽性細胞の出現が必ずしもアポトーシスを意味するわけではないと知られているものの、緑内

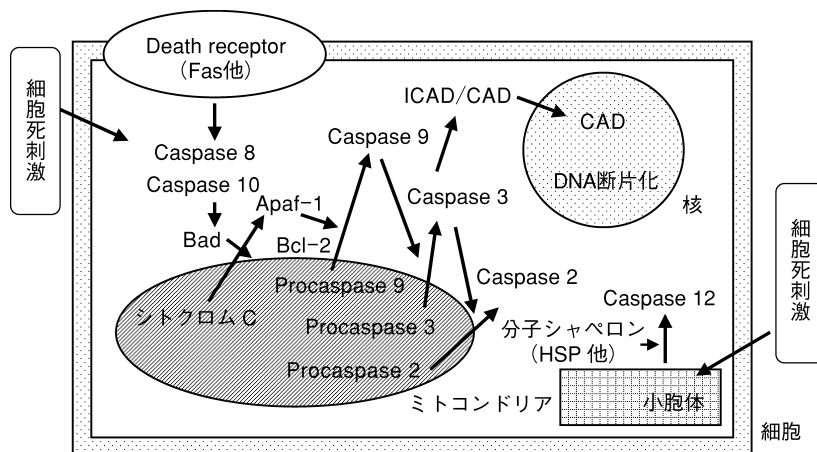


図1 網膜神経節細胞におけるアポトーシス機構の概略。

他の細胞のアポトーシス機構と基本的に同一である。CAD : caspase activated DNase, ICAD : inhibitor of caspase activated DNase.

障性視神経症による細胞死をアポトーシスで説明することが十分に可能と考えられる。

緑内障性視神経症で生じる網膜神経節細胞内のアポトーシスの分子機構の概略を図1に示す。細胞のアポトーシスは細胞死刺激により誘発される。そのメインルートとして、いくつものカスパーゼを介するカスケードが有名である^{15)~17)}。しかしながら、例えば小胞体を介する経路¹⁸⁾など、最終的にアポトーシスに至る経路が複数存在することが明らかにされている。また、アポトーシスに至る細胞死刺激の系として、グルタミン酸、nitric oxide(NO)合成酵素、NOを介する有名なカスケードがある¹⁹⁾。また、グルタミン酸-NO機構ほどには分子機構が明確にされていない別の系として、nerve growth factorなどの神経栄養因子の欠乏、サイトカインなど種々の生理活性物質の過剰などもアポトーシスを惹き起こすことが知られている。

いわゆる神経保護的緑内障治療は、網膜神経節細胞の細胞死機構を直接的に修飾することによる細胞死の阻止を介しての緑内障治療と定義することができる^{20)~29)}。網膜神経節細胞の細胞体あるいは軸索を直接のターゲットとして、薬物あるいは物理的的刺激を作用させることで細胞死を抑制し治療効果を得ようとするものである。従来の緑内障治療の主体である眼圧下降治療は神経保護治療とは一線を画されているが、眼圧下降治療の効果の発現メカニズム解明は神経保護治療の研究にも応用可能であろうと考える。

このように緑内障性視神経症の発症機構が分子レベルで議論されるようになり、緑内障が必ずしも眼圧下降によらなくとも治療可能であるという夢のような話を研究者が語りだすようになった。本稿では、著者らが行ってきた研究を中心として、こうした緑内障治療に新しい方向性が打ち出されようとしている時期における緑内障の治療を考えてみたい。緑内障性視神経症の発症進行因

子、特に眼圧非依存因子の関与、眼圧下降を介さない緑内障治療、緑内障性視神経症の動物モデルの確立、同モデルを用いた各種薬物の緑内障性視神経症に対する神経保護効果の検討の順に述べる。

II 眼圧非依存性の緑内障進行因子および眼圧下降を介さない緑内障治療

緑内障の神経保護治療を考える前に、緑内障性視神経症における眼圧非依存性の発症進行因子が存在するか否かを検討することは意義のあることと考えられる。加えて、眼圧非依存因子の修飾で緑内障性視神経症の予後を変えることが可能か否かを検討することは神経保護治療とも相通するものがあり、試みるに値すると思われる。我々の研究グループは正常眼圧緑内障を中心とした緑内障患者群のデータ解析により、この点について検討を続けており、現在までに、緑内障性視神経症における、よく知られた進行因子である眼圧とは別の、眼圧非依存性の進行因子があることを示してきた。また、それと並行して眼圧下降を介さない緑内障性視神経症の治療法を模索してきた。それらについて簡単にまとめる。

1. 視神経乳頭出血と緑内障性視神経症の進行

視神経乳頭出血が緑内障性視神経症の発症進行と緊密な関連を有していることを示した^{30)~32)}。465例から診断基準を満たした70例70眼の正常眼圧緑内障を選択し、24~138か月(平均67.3か月)経過観察した。その結果、乳頭出血の存在(既往)は視野進行の確率を3.28~20.34倍上昇させる極めて重大な危険因子であることを明らかにした(図2)³²⁾。

2. 乳頭周囲網脈絡膜萎縮と緑内障性視神経症の進行

また、乳頭周囲網脈絡膜萎縮(peripapillary atrophy, PPA)は視神経乳頭近傍の視神経の循環障害と関連を有することが推定される所見であるが、PPAが緑内障性視神経症の発症進行に関連することを明らかにした。原

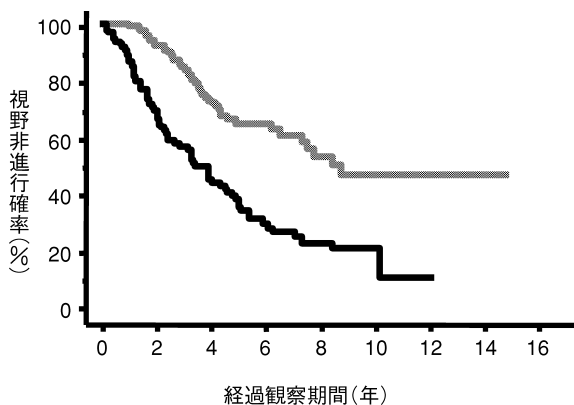


図 2 視神経乳頭出血既往の有無と正常眼圧緑内障の進行。

視野進行を、隣接した2点の10 dB以上の進行、あるいは隣接した3点の5 dB以上(うち1点は10 dB以上)進行で、かつ2回連続してみられるものと定義した。網線：乳頭出血の既往のない症例120眼、観察終了時点の視野非進行確率(予測確率±標準誤差)は46.4±7.0%。黒線：乳頭出血の既往を有する症例98眼、観察終了時点の視野非進行確率は10.2±7.6%。

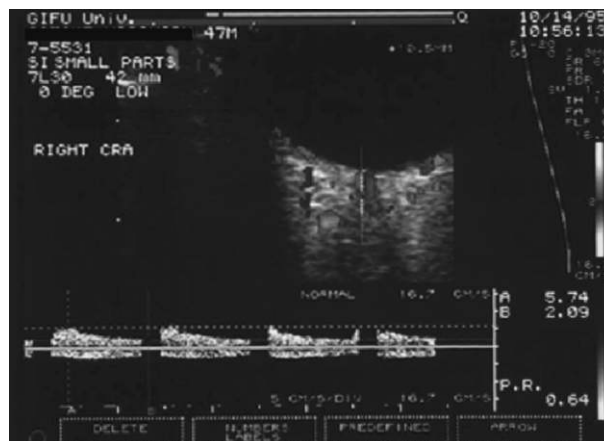


図 4 超音波カラードップラ法による測定の一例。網膜中心動脈の計測例。

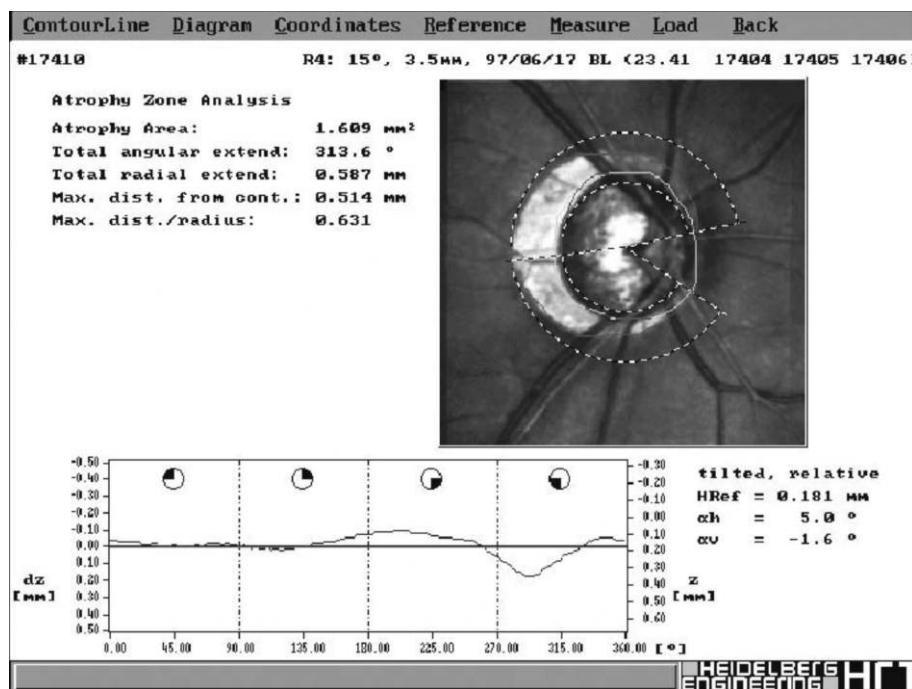


図 3 Heidelberg Retina Tomograph の peripapillary atrophy 計測用ソフトウェアによる解析の一例。乳頭周囲網脈絡膜萎縮の角度、面積、部位などの情報が得られる。

発開放隅角緑内障と原発閉塞隅角緑内障の PPA の比較検討で、両者の性状および PPA と視神経症の関連から、両病型における緑内障性視神経症の発症機序は異なることを推測した(図 3)³³⁾。

3. 視神経乳頭出血と乳頭周囲網脈絡膜萎縮の関連

さらに、乳頭出血と PPA に密接な関連のあることを明らかにした^{34)~35)}。1~3 項の結果は乳頭出血、PPA、緑内障性視神経症の間に密接な関係があることを示すも

のである。特に乳頭出血と PPA の発生メカニズムを考えると、視神経近傍の循環動態異常と緑内障性視神経症発症の関連が強く推定される。

4. 正常眼圧緑内障における眼窩血流動態異常

また、正常眼圧緑内障における眼窩の血流動態を color Doppler imaging の手法で解析し(図 4)³⁶⁾³⁷⁾、眼窩血流動態の異常をみることで、とりわけ、眼圧あるいは眼灌流圧の左右差のある症例で眼圧(眼灌流圧)のより低い眼

表 1 正常眼圧緑内障の進行に関する因子
218 眼の Cox 比例ハザードモデルによる検討

因子	ハザード比	95% 信頼区間	p 値
乳頭出血(解析対象眼)	3.043	2.086~4.438	0.0001
カルシウム拮抗薬使用	0.371	0.245~0.560	0.0001
最高眼圧 (5 mmHg 上昇あたり)	2.211	1.338~3.656	0.0035
皮膚温回復率(7 分) (10% 上昇あたり)	0.825	0.700~0.970	0.0249



図 5 寒冷負荷試験.

氷水に 10 秒間手首まで浸し、その後の指尖の体温変化を計測する。

でより強い視野障害をみるときに眼窩血流動態異常の強いことを明らかにした³⁸⁾。

5. 膠原病患者における開放隅角緑内障の発症頻度

また、膠原病患者で開放隅角緑内障(原発開放隅角緑内障, 正常眼圧緑内障)の有病率を検討し、膠原病の女性患者において、一般集団よりも開放隅角緑内障の有病率が高いことを示した³⁹⁾。

6. 正常眼圧緑内障の視野進行因子

正常眼圧緑内障 218 例 218 眼の視野進行に関する因子を Cox 比例ハザードモデルで検討した(表 1)。視神経乳頭出血, カルシウム拮抗薬治療, 寒冷負荷試験(図 5)における指尖皮膚温度回復率(7 分値)などの眼圧に関係しない要因が無治療日内変動測定時の最高眼圧と並んで、視野進行因子として同定された(文献 40 のアップデートデータ)。

7. カルシウム拮抗薬による緑内障性視神経症の治療

前項のデータが示すように、カルシウム拮抗薬治療は少なくとも正常眼圧緑内障の一部症例に有効と推定される⁴¹⁾。当教室における上記 218 例 218 眼の視野進行を検討した成績を図 6 に示す。視野進行を隣接した 2 点が 10 dB 以上の進行, あるいは隣接した 3 点が 5 dB 以上(うち 1 点は 10 dB 以上)進行で 2 回連続してみられるものと定義した。カルシウム拮抗薬投与例(85 眼)では 15 年の経過観察終了時点で視野進行のみられない確率は 45.4±9.2% (予測確率±標準偏差)と計算され、非投与

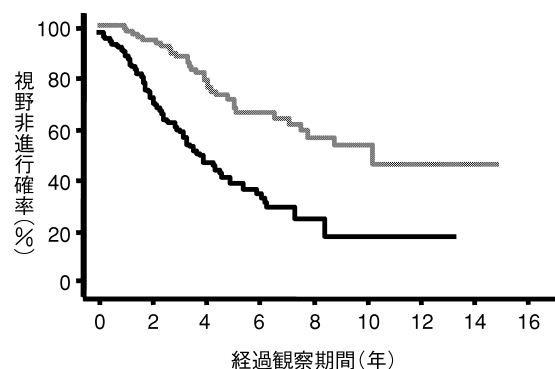


図 6 正常眼圧緑内障に対するカルシウム拮抗薬の臨床的効果.

視野進行の定義は図 2 と同じ。網線: カルシウム拮抗薬投与例 85 眼, 観察終了時点の視野非進行確率(予測確率±標準誤差)は 45.4±9.2%。黒線: カルシウム拮抗薬非投与例 133 眼, 観察終了時点の視野非進行確率は 19.8±5.6%。

例(133 眼)における観察終了時点での視野非進行確率 19.8±5.6% と比較して有意の差がみられた。

8. カルシウム拮抗薬による眼窩血流動態の改善

また、カルシウム拮抗薬であるニルバジピンの投与により、正常眼圧緑内障の眼窩血流動態の改善がみられた^{42)~46)}。

上述の結果は、緑内障性視神経症の発症に眼圧に依存しない因子が深くからんでいることを強く推定させるものである⁴⁷⁾⁴⁸⁾。また、眼窩血流も改善するカルシウム拮抗薬投与により、正常眼圧緑内障の視野に良好な影響があることも推定される。

III 緑内障動物モデルの確立

緑内障の研究上での悩みの一つとして、疾患の経過が極めて慢性であり、適切な動物モデルがないことがあげられる。我々は神経保護の緑内障研究のために適した動物モデル作製について検討した。検討したのは、ラットを用いた眼圧上昇モデルと視神経挫滅モデルである。また、網膜電図(ERG), 視覚誘発電位(VEP)による電気生理学的な検討を行った。

緑内障性視神経症の動物モデルとしてのラットの利点として、ヒト視神経乳頭との構造の類似性、視神経近傍の血管構築がヒトに類似し、かつその詳細が明らかにされていること⁴⁹⁾、扱いやすさ、価格などがあげられる。

1. 眼圧上昇モデル

実験には Wistar 系の白色ラットを用いた。右眼を緑内障眼, 左眼を対照眼とした(図 7)⁵⁰⁾。実験は可能な限り無痛的に行い、実験動物の扱いは「動物の保護ならびに管理に関する法律」および「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」に準じた。ラットの全身麻酔には塩酸ケタミン(ケタラール®)75mg/kgBW と塩酸キシラジン(セラクター®)7.5 mg/kgBW の腹腔内注射を用い、



図 7 ラット緑内障モデル(右眼).

点眼麻酔には塩酸オキシブプロカイン(ベノキシール®)を用いた。眼圧上昇モデルは Ueda ら⁵¹⁾の方法に準じて作製した。前処置として、pneumatometer(Model Classic 30: Mentor, Norwell, MA, 米国)を用いて両眼の眼圧を測定した後、右眼前房を 30 ゲージ針で穿刺し前房水を吸引した。その後、約 30 μ l の 35% 墨汁を注入した。墨汁注入 4 日後に、出力 150~250 mW、スポットサイズ 150~200 μ m、照射時間 0.2 秒で、輪部全周に約 80 発、アルゴンレーザーを照射した。凝固直後に網膜中心動脈閉塞の有無の確認を目的として、全例に対して眼底検査を施行したが、網膜中心動脈の閉塞をみたものはなかった。

輪部全周レーザー凝固の 5 日後に眼圧を測定し、右眼眼圧上昇を確認した後、3% Fast Blue 1.5 μ l を頭骨面から深さ 4 mm の両側上丘内にゆっくりと注入した(図 8)。Fast Blue 注入 3 日後(レーザー照射による眼圧上昇処置の 8 日後)、4% ホルマリン溶液(pH 7.4)による全身灌流固定後、直ちに両眼球摘出を行った。摘出眼球は、角膜、水晶体および硝子体を除去した後、4% ホルマリン溶液で 12 時間固定の後、網膜伸展標本作製した。逆行性に標識された網膜神経節細胞を蛍光顕微鏡(Axioskop, Carl-Zeiss, Jena, ドイツ)と蛍光フィルタ(Blue-Violet 395~440 nm)を使用し、視神経乳頭縁から 1 mm 離れた部位を視野の中心として、上、下、耳側、鼻側の 4 か所を 50 倍で撮影した(図 9)。蛍光顕微鏡写真をパソコンに取り込んだ後、画像解析ソフト NIH image 1.61 またはオプティマスを用いて標識細胞数をカウントした。網膜神経節細胞標識率を緑内障眼(右眼)における標識神経節細胞数と無処置対照眼(左眼)の標識細胞数の比として算出した(図 9)。網膜神経節細胞のカウントは実験側の識別を不能として、網膜伸展標本作製とは別の研究者が行った。

眼圧上昇モデルの眼圧は、レーザー照射 5 日後に 19.4~21.3 mmHg 程度に上昇する。眼圧上昇モデルでの網

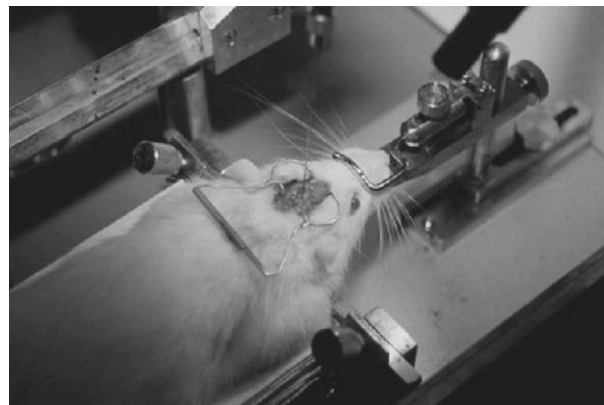


図 8 標識物質の上丘内注射.

膜内メッセンジャーRNA(mRNA)の発現量の変化を reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)法で調べたところ、Bcl-2 の発現が著明に低下していたのに対し、Bax- α の発現は変化をみなかった(図 10)⁵²⁾。このことは、アポトーシス抑制的に作用する Bcl-2 の発現低下により網膜神経節細胞のアポトーシスが起ることを推定させる所見である。

2. 視神経控減モデル

実験には眼圧上昇モデルと同じ Wistar 系の白色ラットを用いた。右眼を視神経控減眼、左眼を対照眼とした。実験は可能な限り無痛的に行い、実験動物の扱いは「動物の保護ならびに管理に関する法律」および「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」に準じた。ラットの麻酔法は眼圧上昇モデルと同様であった。視神経控減は動物実験クリップ、把持力 40 g(AS-1, 動物実験用ディスプレイブルクリップ, 協和時計工業)を用いた。顕微鏡下において、右眼の耳側結膜を切開し、外側筋、血管に注意を払いつつ結合組織を分離し視神経を露出した。眼球後極から 2 mm の位置で、動物実験用クリップで視神経をはさみ、10 秒間視神経を控減した(図 11)。左眼は視神経の露出までは同様に行い、控減処置を行わない対照眼とした。直後に全例に対して眼底検査を施行したが、網膜中心動脈の閉塞をみたものはなかった。

一定期間経過の後、眼圧上昇モデルと同様に 3% Fast Blue 1.5 μ l を頭骨面から深さ 4 mm の両側上丘内にゆっくりと注入した。その後の網膜神経節細胞標識および神経節細胞のカウントは眼圧上昇モデルと同様に施行した。予備実験の結果に基づき、視神経控減モデルでは眼球摘出は控減処置の 28 日後とした。

3. 統計学的処置

眼圧上昇モデル、視神経控減モデルともに、網膜神経節細胞の標識率の統計処理には、基本的な一元配置分散分析(ANOVA)を用いた。群間に有意差がみられた場合には、Fisher's protected least significant difference

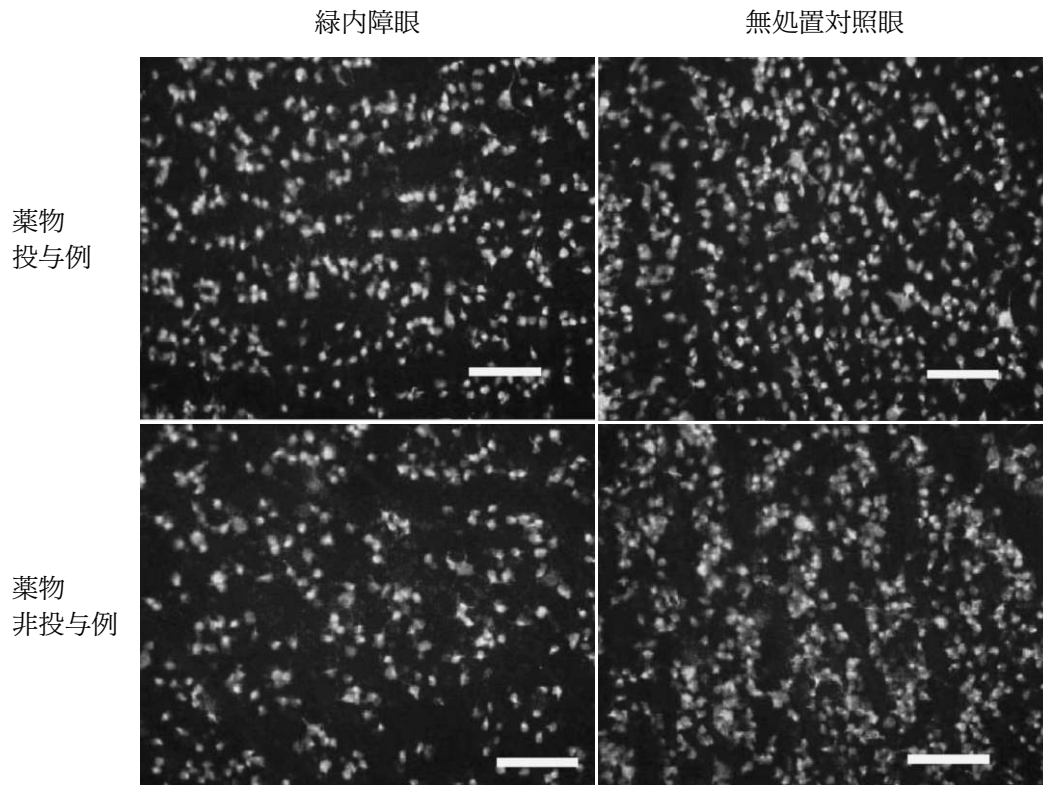


図 9 網膜神経節細胞の標識.

薬物投与例では緑内障眼の網膜神経節細胞の標識率は対照眼の 75.4%, 非投与例では 61.1% である. バーは 100 μm

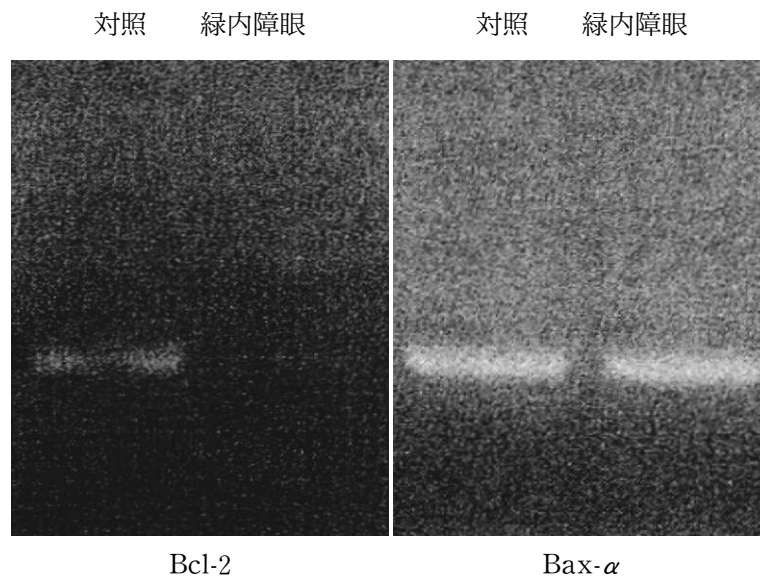


図 10 緑内障モデル網膜における mRNA 発現量の変化(RT-PCR 法).

実験緑内障眼における Bcl-2 の発現は低下しており, Bax- α の発現は不変. RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction.

(PLSD)の多重比較を行った. なお, 危険率 5% 未満の場合を有意差ありと判定した.

4. 電気生理学的検討(ERG, VEP)

視神経症の定量的観察のための ERG, VEP 記録システムを構築した. その後, ERG, VEP による電気生理学的検討を, ラット眼において行った⁵³⁾. 不関電極を

bregma の前方 1 mm, 外側 1 mm の 2 か所に, 関電極を bregma の後方 7 mm, 外側 3 mm の 2 か所に設置した. また, 接地電極を bregma の前方 5 mm に設置した. ERG, VEP 測定に先立ち, ラットの頭蓋に VEP 測定用のねじ式の電極を埋め込んだ(図 12, 13). ERG, VEP 測定は電極設置後 1 週間以上あけて行った. ERG

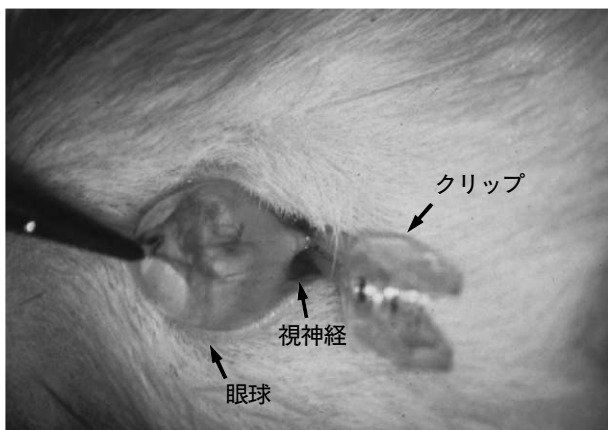


図 11 視神経挫減モデルの作製。

視神経クリッピングは把持力 40 g のクリップを用い、10 秒間施行した。他眼は sham-operated.

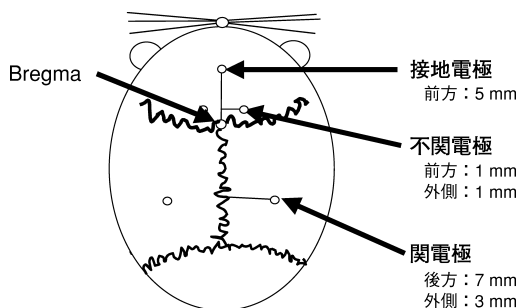


図 12 視覚誘発電位 (VEP) の電極配置。

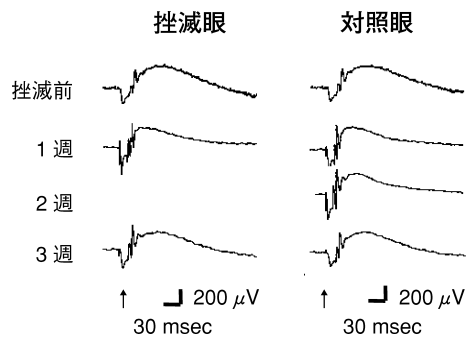


図 14 ERG 経時変化の 1 例。
時定数 0.3 秒。

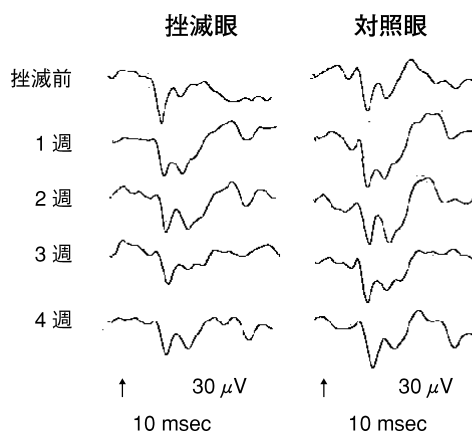


図 15 VEP 経時変化の 1 例。
時定数 0.3 秒。

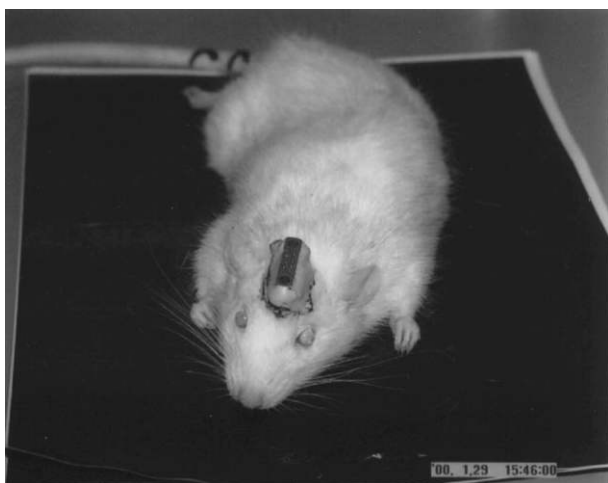


図 13 網膜電図(ERG), VEP による検討に先立ち、ラットに電極を設置した。

測定では、白色フラッシュ光 20 J を用いた。ERG 電極はコンタクトレンズ型電極(京都コンタクト製)を用い、関電極を角膜、不関電極を鼻部皮下に設置した。ERG 測定は 1 時間の暗順応後に行った(図 14)。VEP 測定には白色フラッシュ光 1 J を用い、刺激間隔 1 Hz の 50 回加算平均とした(図 15)。VEP 測定は ERG 測定後さらに 1 時間の暗順応を行った後に施行した。

IV 各種薬物の実験緑内障における神経保護効果の検討

ラットモデルを用いて、アポトーシスに変調を来し得るいくつかの薬物の緑内障性視神経症に対する神経保護効果を検討した。

検討対象としたのは、NMDA 受容体非拮抗阻害薬である MK-801 と memantine, 神経伝達物質遊離促進剤 T-588, 免疫抑制剤タクロリムス, β 遮断薬 betaxolol, カルシウム拮抗薬イガニジピンである。

1. NMDA 受容体非拮抗阻害薬

N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体は細胞内へのカルシウムイオンの流入を制御しているチャンネルの一つである。

MK-801⁵⁴⁾は非拮抗的な NMDA 受容体阻害薬である。ほぼ完全な NMDA 受容体阻害作用を有し、カルシウムチャンネルに 1.5 時間滞留する。この薬物は向神経作用が強いが、脳血管障害などの動物モデルでは発症後の投与でも神経保護作用があるとされる。

Memantine⁵⁵⁾も非拮抗的な NMDA 受容体阻害薬で、ヨーロッパなどでは、Alzheimer 病や Parkinson 病の治療薬として認可されている。受容体での滞留時間は

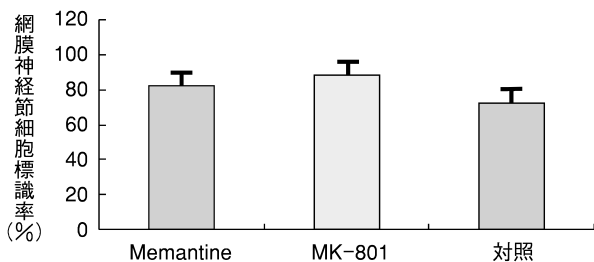


図 16 緑内障モデルにおける N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体阻害薬の結果。

各群 N=10, 薬物投与量はともに 30 mg/kgBW. 網膜神経節細胞の標識率は memantine 投与群では 81.9 ± 7.4%, MK-801 投与群では 88.0 ± 9.8%, 対照群では 73.1 ± 7.7% であった. 3 群間に統計学的有意差がみられた ($p=0.0017$; ANOVA). 両薬物ともに対照群との間に有意差がみられた (memantine 投与群: $p=0.0248$, MK-801 投与群: $p=0.0004$; Fisher's PLSD).

MK-801 の約 50% である. この薬物にも MK-801 よりは弱いものの神経作用がみられている. 脳血管障害などの動物モデルでは発症後の投与でも有効とされている.

なお, 以下で緑内障モデルとは眼圧上昇モデルを意味することとする.

1) 緑内障モデルにおいての検討⁵⁰⁾

緑内障モデルで, 輪部全周レーザー照射の直前に memantine (Merz, Frankfurt, ドイツ) 30 mg/kgBW あるいは MK-801 (Research Biochemicals International, Natick, MA, 米国) 30 mg/kgBW を腹腔内注射で投与した. 対照群では 1.8 ml の phosphate-buffered saline (PBS) を腹腔内投与した. 各群 10 匹を対象とした. 経過中の緑内障眼の眼圧には 3 群間に有意差はみられなかった.

上丘からの Fast Blue を用いた逆行性標識で標識された網膜神経節細胞数は, memantine 投与群では緑内障眼 1,005.4 ± 191.2 (755.9 ~ 1,268.9) 個/mm² (平均値 ± 標準偏差, レンジ, 以下同じ), 無処置対照眼では 1,233.9 ± 273.0 (879.0 ~ 1,656.3) 個/mm² であった. MK-801 投与群では緑内障眼 1,034.6 ± 113.9 (896.2 ~ 1,201.8) 個/mm², 無処置対照眼では 1,192.6 ± 97.3 (1,017.6 ~ 1,287.9) 個/mm² であった. 対照群では緑内障眼 959.4 ± 210.6 (728.3 ~ 1,339.5) 個/mm², 無処置対照眼では 1,320.2 ± 233.5 (986.6 ~ 1,676.1) 個/mm² であった. 網膜神経節細胞の標識率は, memantine 投与群では 81.9 ± 7.4 (70.3 ~ 90.8)%, MK-801 投与群では 88.0 ± 9.8 (71.2 ~ 100.7)%, 対照群では 73.1 ± 7.7 (59.2 ~ 81.3)% であった (図 16). 3 群間に統計学的有意差がみられた ($p=0.0017$; ANOVA).

また, 両薬物ともに対照群との間に有意差がみられた (memantine 投与群: $p=0.0248$, MK-801 投与群: $p=0.0004$; Fisher's PLSD).

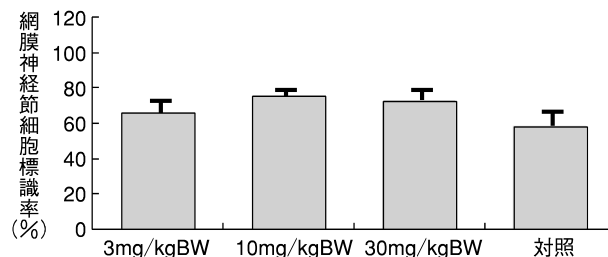


図 17 視神経挫滅モデルにおける memantine の結果.

各群 N=10. 網膜神経節細胞の標識率は 30 mg/kgBW 投与群では 72.9 ± 5.8%, 10mg/kgBW 投与群では 75.5 ± 2.7%, 3 mg/kgBW 投与群では 65.9 ± 9.2%, 対照群では 58.5 ± 7.7% であった. 4 群間に統計学的有意差がみられた ($p<0.0001$; 一元配置分析 (ANOVA)). 3 mg/kgBW 投与群と対照群および 10 mg/kgBW 投与群との間には有意差がみられた (3 mg/kgBW 投与群と対照群: $p=0.0190$, 3 mg/kgBW 投与群と 10 mg/kgBW 投与群: $p=0.0035$; Fisher's PLSD). 10 mg/kgBW と 30 mg/kgBW の結果には有意差はみられなかった ($p=0.4152$; Fisher's PLSD).

2) 視神経挫滅モデルにおける検討

視神経挫滅の直前に memantine (Merz, Frankfurt, ドイツ) 30 mg/kgBW, 10 mg/kgBW あるいは 3 mg/kgBW を 1 回腹腔内注射で投与した. 対照群では 1.8 ml の PBS を腹腔内投与した. 各群 10 匹を対象とした. 経過中の眼圧には 3 群間に有意差はみられなかった.

Fast Blue の上丘内投与により標識された網膜神経節細胞の標識率は, memantine 30 mg/kgBW 投与群では 72.9 ± 5.8%, memantine 10 mg/kgBW 投与群では 75.5 ± 2.7%, memantine 3mg/kgBW 投与群では 65.9 ± 9.2%, 対照群では 58.5 ± 7.7% であった (図 17). 4 群間に統計学的有意差がみられた ($p<0.0001$; ANOVA). Memantine 3 mg/kgBW 投与群と対照群および memantine 10 mg/kgBW 投与群との間には有意差がみられた (3mg/kgBW 投与群と対照群: $p=0.0190$, 3mg/kgBW 投与群と 10 mg/kgBW 投与群: $p=0.0035$; Fisher's PLSD). Memantine 10 mg/kgBW と 30 mg/kgBW の結果には有意差はみられなかった ($p=0.4152$; Fisher's PLSD).

以上のように, MK-801 と memantine は網膜神経節細胞の保護作用を有していた.

2. T-588

(-)-R-1-(Benzo[b]thiophen-5-yl)-2-[2-(N,N-diethylamino)ethoxy] ethanol hydrochloride (コード名: T-588, 富山化学: 以下, T-588) は, アセチルコリン, モノアミンの遊離促進, 抗セロトニン作用, NGF 誘導神経突起伸張作用など, 神経系における多様な薬理作用を有するとされ (富山化学社内資料), 現在研究開発中の薬物である.

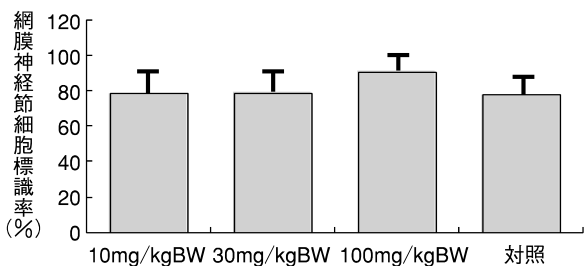


図 18 緑内障モデルにおける T-588 の結果。

網膜神経節細胞の標識率は 10 mg/kgBW 投与群 (N=11) では $78.7 \pm 12.9\%$, 30 mg/kgBW 投与群 (N=10) では $79.1 \pm 13.0\%$, 100 mg/kgBW 投与群 (N=9) では $91.0 \pm 9.0\%$, 対照群 (N=10) では $78.0 \pm 11.6\%$ であった。100 mg/kgBW 投与群と対照群, 30 mg/kgBW 投与群, および 10 mg/kgBW 投与群との間には有意差がみられた (対照群: $p=0.0219$, 対 30 mg/kgBW 投与群: $p=0.0347$, 対 10 mg/kgBW 投与群: $p=0.0258$; Fisher's PLSD)。対照群, 30 mg/kgBW 投与群, および 10 mg/kgBW 投与群との間には有意差はみられなかった。

1) 緑内障モデルにおける検討

輪部全周レーザー照射の 24 時間前に蒸留水 1.45 ml に溶解させた T-588 (10 mg/kgBW (11 匹), 30 mg/kgBW (10 匹) または 100 mg/kgBW (9 匹)) を, 胃ゾンデを用いて 1 回胃内に投与した。対照群 (10 匹) では蒸留水 1.45 ml を同様に投与した。

経過中の緑内障眼の眼圧には 4 群間に有意差はみられなかった。

Fast Blue の上丘内投与により標識された網膜神経節細胞の標識率は, T-588 10 mg/kgBW 投与群では $78.7 \pm 12.9\%$, 30 mg/kgBW 投与群では $79.1 \pm 13.0\%$, 100 mg/kgBW 投与群では $91.0 \pm 9.0\%$, 対照群では $78.0 \pm 11.6\%$ であった (図 18)。T-588 100 mg/kgBW 投与群と対照群, T-588 30 mg/kgBW 投与群, および T-588 10 mg/kgBW 投与群との間には有意差がみられた (対照群: $p=0.0219$, 対 30 mg/kgBW 投与群: $p=0.0347$, 対 10 mg/kgBW 投与群: $p=0.0258$; Fisher's PLSD)。対照群, T-588 30 mg/kgBW 投与群, および T-588 10 mg/kgBW 投与群との間には有意差はみられなかった。

T-588 は 100 mg/kgBW で神経保護作用を有しており, 10 mg/kgBW と 30 mg/kgBW では神経保護作用は明らかでなかった。

3. タクロリムス (FK-506)

タクロリムス (FK-506)⁵⁶⁾⁵⁷⁾ は, カルシニューリンの触媒部位の立体構造を障害し, 活性阻害を起こす薬物で, 通常は免疫抑制の目的で使用される。カルシニューリンは活性が上昇すると, プロアポトーシス作用のある Bad が脱リン酸化され, ミトコンドリアからのシトクロム C の放出によりアポトーシスが誘導される^{58)~60)}。タクロリムスは, この Bad 脱リン酸化を阻害し, ミト

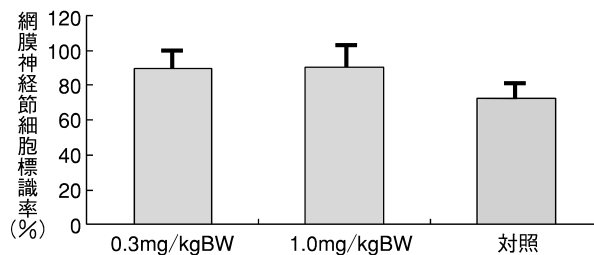


図 19 緑内障モデルにおけるタクロリムスの結果。

各群 N=10。網膜神経節細胞の標識率は 0.3 mg/kgBW 投与群で $89.9 \pm 11.3\%$, 1.0 mg/kgBW 投与群で $90.9 \pm 11.7\%$, 対照群では $73.1 \pm 7.7\%$ であり, 3 群間に有意差がみられた ($p=0.0009$, ANOVA)。0.3 mg/kgBW 投与群と対照群および 1.0 mg/kgBW 投与群と対照群との間には有意差がみられたが, 0.3 mg/kgBW 投与群と 1.0 mg/kgBW 投与群の間には有意差はみられなかった (各, $p=0.0012$, $p=0.0007$, $p=0.8354$; Fisher's PLSD)。

コンドリアからのシトクロム C の放出を抑制し, アポトーシス抑制に働くことが知られている。また, 本薬物はその点眼用製剤がぶどう膜炎の治療などの目的で検討されたことがあり, 将来的に局所投与の経路も考えられないことはない。そこで, タクロリムスの網膜神経節細胞保護作用を緑内障モデルと視神経挫滅モデルで検証した。

1) 緑内障モデルにおける検討

眼圧上昇処置直前にタクロリムス (0.3 mg/kgBW, 1.0 mg/kgBW), または生理食塩水 1.5 ml を 1 回腹腔内投与した。各群 10 匹ずつを用いた。経過中の緑内障眼の眼圧には 4 群間に有意差はみられなかった。

Fast Blue の上丘内投与により標識された網膜神経節細胞の標識率は, 0.3 mg/kgBW 投与群で $89.9 \pm 11.3\%$, 1.0 mg/kgBW 投与群で $90.9 \pm 11.7\%$ であり, 対照群では $73.1 \pm 7.7\%$ であり, 3 群間に有意差がみられた (図 19) ($p=0.0009$, ANOVA)。タクロリムス 0.3 mg/kgBW 投与群と対照群およびタクロリムス 1.0 mg/kgBW 投与群と対照群との間には有意差がみられたが, タクロリムス 0.3 mg/kgBW 投与群と 1.0 mg/kgBW 投与群の間には有意差はみられなかった (それぞれ, $p=0.0012$, $p=0.0007$, $p=0.8354$; Fisher's PLSD)。

2) 視神経挫滅モデルでの検討

視神経挫滅の直前にタクロリムス (0.3 mg/kgBW, 1.0 mg/kgBW), または生理食塩水 1.5 ml を 1 回腹腔内注射で投与した。各群 10 匹を対象とした。

網膜神経節細胞の標識率は, タクロリムス 0.3 mg/kgBW 投与群では $66.4 \pm 6.6\%$, タクロリムス 1.0 mg/kgBW 投与群では $68.2 \pm 6.2\%$, 対照群では $58.5 \pm 7.7\%$ であった (図 20)。3 群間に統計学的有意差がみられた ($p=0.0086$, ANOVA)。タクロリムス 0.3 mg/kg-

BW 投与群と対照群およびタクロリムス 1.0 mg/kgBW 投与群と対照群との間には有意差がみられた(それぞれ, $p=0.0154$, $p=0.0038$; Fisher's PLSD).

以上のように, タクロリムスは 0.3 mg/kgBW の投与で, 緑内障モデルにおいても視神経挫滅モデルにおいても網膜神経節細胞の保護作用を有していた。

3) 電気生理学的検討⁵³⁾

視神経挫滅モデルにおいて, 0.3 mg/kgBW タクロリムス投与後の ERG (図 21) と VEP (図 22) を検討した。タクロリムス投与群 7 匹, 非投与群 8 匹を対象とした。ERG では, タクロリムス投与群, 非投与群ともに, 4 週間の経過観察期間において, b 波の振幅 (図 23) と OP 波の頂点潜時 (図 24) に, 有意の変化はみられなかった。VEP では, 0.3 mg/kgBW タクロリムス投与群においては挫滅前と比較して, P_1-N_1 amplitude に有意の差はみられなかったが, タクロリムス非投与群では挫滅前に比較して, 4 週間の経過観察期間中, P_1-N_1 amplitude は有意に減少していた ($p=0.02$, Wilcoxon signed-rank test) (図 25)。また, 4 週間の経過観察期間中, タク

ロリムス投与群, 非投与群ともに, P_1 潜時 (図 26) および N_1 潜時 (図 27) に有意の変化はみられなかった。

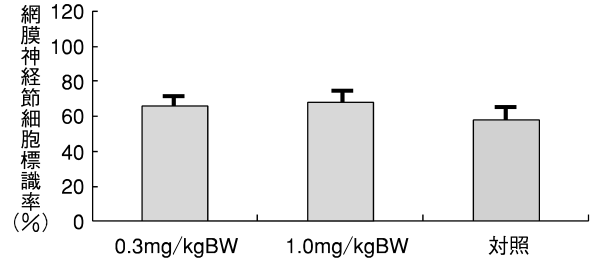


図 20 視神経挫滅モデルにおけるタクロリムスの結果。各群 N=10。網膜神経節細胞の標識率は 0.3mg/kgBW 投与群では $66.4 \pm 6.6\%$, 1.0 mg/kgBW 投与群では $68.2 \pm 6.2\%$, 対照群では $58.5 \pm 7.7\%$ であった。3 群間に統計学的有意差がみられた ($p=0.0086$, ANOVA)。0.3 mg/kgBW 投与群と対照群および 1.0 mg/kgBW 投与群と対照群の間には有意差がみられた (各, $p=0.0154$, $p=0.0038$; Fisher's PLSD)。

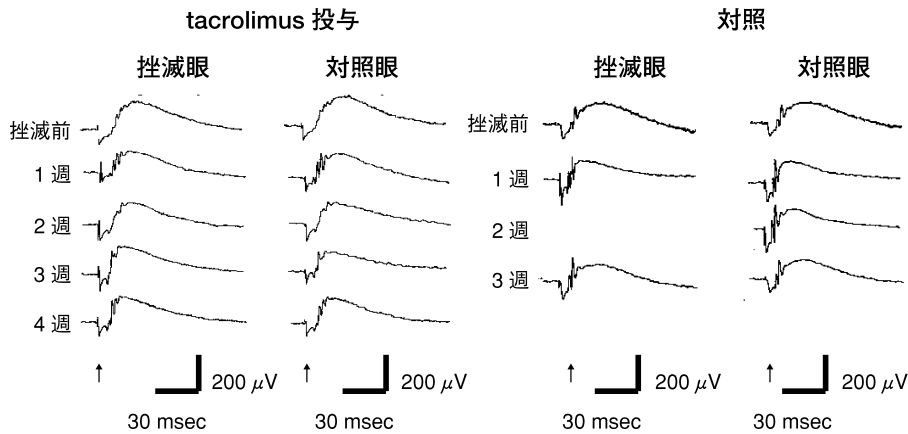


図 21 タクロリムス 0.3 mg/kgBW 投与後の ERG 経時変化。左: タクロリムス投与例, 右: 対照群, 時定数 0.3 秒。

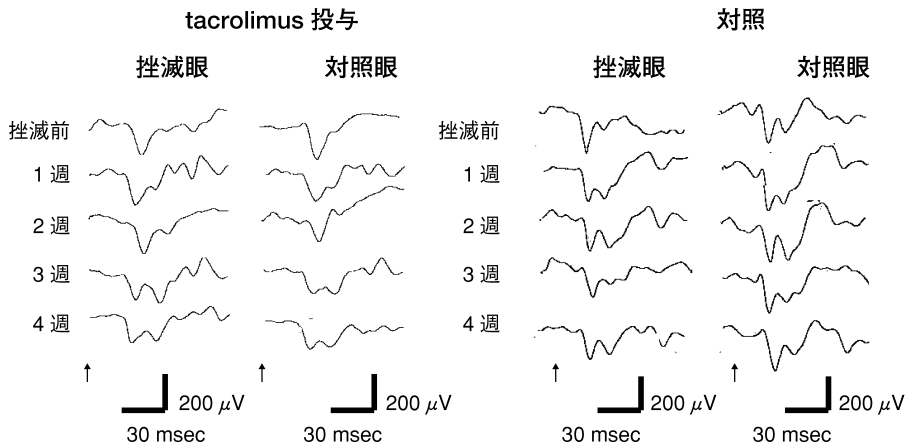


図 22 タクロリムス 0.3 mg/kgBW 投与後の VEP 経時変化。左: タクロリムス投与例, 右: 対照群, 時定数 0.3 秒。

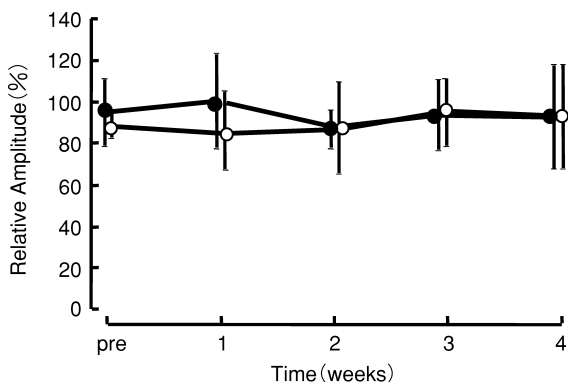


図 23 タクロリムス 0.3 mg/kgBW 投与後の ERG, b 波振幅の経時変化。
両群ともに投与前値との間に有意な変化はみられなかった。●：タクロリムス投与例，○：対照群。

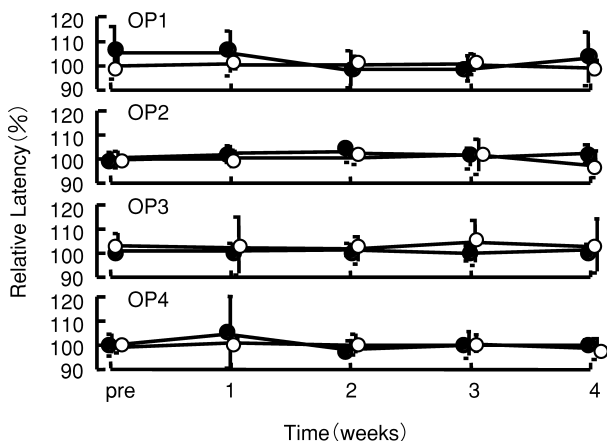


図 24 タクロリムス 0.3 mg/kgBW 投与後の ERG, 律動様小波(OP)頂点潜時の経時変化。
両群ともに投与前値との間に有意な変化はみられなかった。●：タクロリムス投与例，○：対照群。

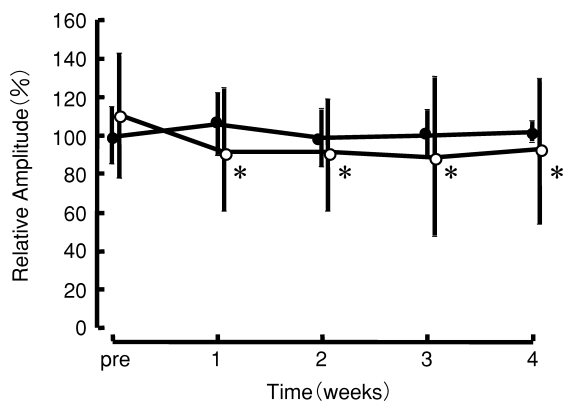


図 25 タクロリムス 0.3 mg/kgBW 投与後の VEP, P₁-N₁ amplitude の経時変化。
* : p<0.05, Wilcoxon signed-rank test. ●：タクロリムス投与例，○：対照群。

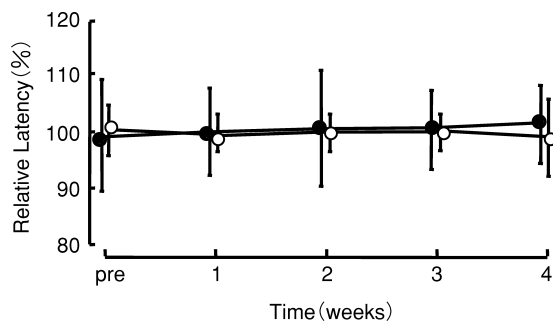


図 26 タクロリムス 0.3 mg/kgBW 投与後の VEP, P₁ 潜時の経時変化。
両群ともに投与前値との間に有意な変化はみられなかった。●：タクロリムス投与例，○：対照群。

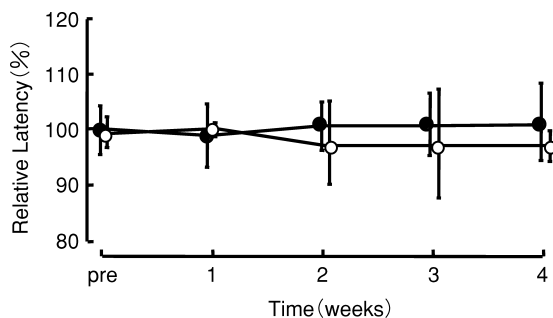


図 27 タクロリムス 0.3 mg/kgBW 投与後の VEP, N₁ 潜時の経時変化。
両群ともに投与前値との間に有意な変化はみられなかった。●：タクロリムス投与例，○：対照群。

4) 組織学的検討

視神経挫滅モデルにおけるタクロリムスの効果を 0.3 mg/kgBW のタクロリムスを 1 回投与し挫滅処置後、4 週間の時点で組織学的に検討した。タクロリムス投与群、非投与群ともに網膜内層には明らかな変化はみられなかった(図 28)。網膜神経節細胞の消失は、タクロリムス投与群では軽度であったが、非投与例では中等度であった。

4. Betaxolol

眼圧下降薬である betaxolol は、眼圧下降を介さずに神経保護効果を発揮する可能性が指摘されている^{61)~63)}。Betaxolol の神経保護作用はまだ十分に解明されていないが、シナプス前細胞からのグルタミン酸放出抑制、電位依存性チャンネルを介したカルシウムイオンの流入阻害、細胞質内カルシウムイオンのミトコンドリアへの流入抑制などを介するなどの説がある。

1) 緑内障モデルにおける検討⁶⁴⁾

眼圧上昇処置直前に betaxolol (2 mg/kgBW, 10 mg/kgBW)、または蒸留水 1.5 ml を 1 回腹腔内投与した。2 mg/kgBW 投与群は 6 匹、10 mg/kgBW 投与群は 6 匹、または蒸留水投与対照群 8 匹を用いた。経過中の緑内障眼の眼圧には 3 群間に有意差はみられなかった。

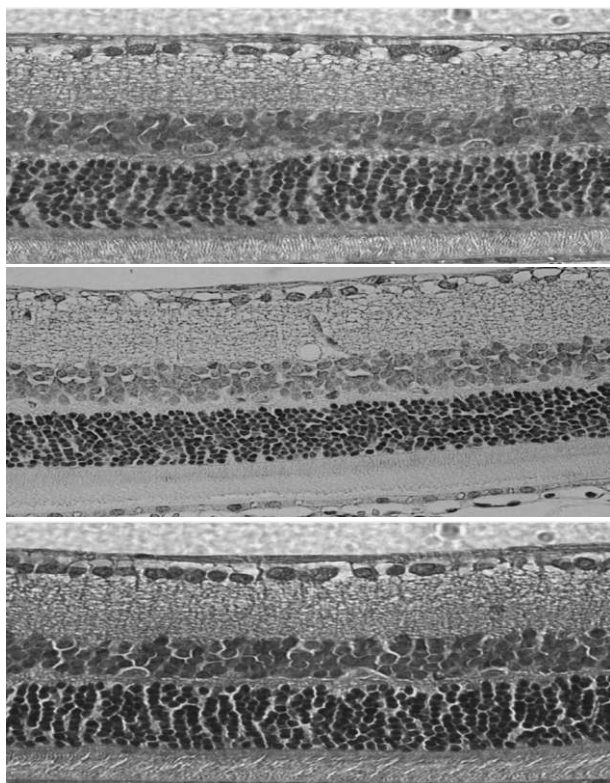


図 28 タクロリムス 0.3 mg/kgBW 投与後の網膜組織所見。

上：タクロリムス投与例。中：タクロリムス非投与例。下：正常眼。タクロリムス投与例、非投与例とも網膜内層には明らかな変化はみられない。タクロリムス投与例では軽度の網膜神経節細胞の消失、非投与例では中等度の消失をみる。

Fast Blue の上丘内投与により標識された網膜神経節細胞の標識率は、2 mg/kgBW 投与群で $81.6 \pm 8.1\%$ 、10 mg/kgBW 投与群で $95.2 \pm 18.2\%$ であり、対照群では $75.2 \pm 3.8\%$ であり、3 群間に有意差がみられた(図 29) ($p=0.038$, ANOVA)。10 mg/kgBW 投与群と対照群の間には有意差がみられた ($p=0.011$; Fisher's PLSD)。Betaxolol 投与例でも眼圧は対照に比較して下降しなかったため、betaxolol は眼圧下降を介することなく、緑内障性視神経症による網膜神経節細胞の死を抑制できる可能性を有しているかと思われる。

5. イガニジピン

イガニジピン(iganidipine)は現在開発中のカルシウム拮抗薬である。イガニジピンは従来のカルシウム拮抗薬とは異なり、点眼投与可能な製剤であり、眼科用神経保護製剤開発の可能性という点できわめて注目される。また、実際に点眼投与によりラット視神経血流量の増加を起し得ることが報告⁶⁵⁾されている。本薬物は、カルシウム拮抗薬として、電位依存性カルシウムチャンネルを介して作用する。イガニジピンの作用を緑内障モデルと視神経挫滅モデルで検討した。

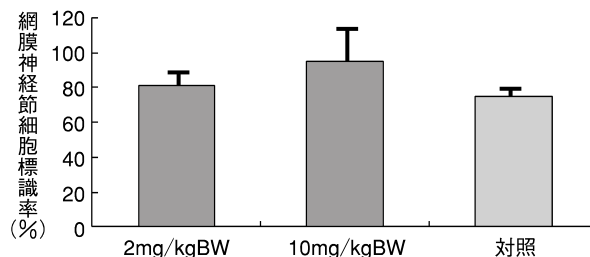


図 29 緑内障モデルにおける betaxolol 全身投与の結果。

網膜神経節細胞の標識率は 2 mg/kgBW 投与群で $81.6 \pm 8.1\%$ 、10 mg/kgBW 投与群で $95.2 \pm 18.2\%$ 、対照群では $75.2 \pm 3.8\%$ であり、3 群間に有意差がみられた ($p=0.038$, ANOVA)。10 mg/kgBW 投与群と対照群の間には有意差がみられた ($p=0.011$; Fisher's PLSD)。

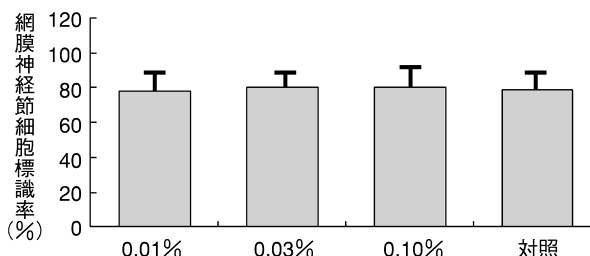


図 30 緑内障モデルにおけるイガニジピン点眼の結果。

網膜神経節細胞の標識率は 0.01% 点眼群 (N=10) で $78.5 \pm 11.1\%$ 、0.03% 点眼群 (N=11) で $80.2 \pm 10.3\%$ 、0.1% 点眼群 (N=11) で $80.5 \pm 13.1\%$ 、基剤点眼群で $78.9 \pm 12.1\%$ であり、4 群間に有意差はみられなかった ($p=0.975$, ANOVA)。

1) 緑内障モデルにおける検討

眼圧上昇処置に先立つ墨汁の前房内注射の日から、眼球摘出の前日まで、11 日連続して 1 日 2 回、イガニジピン(千寿製薬)0.01、0.03%、または 0.1%、あるいは基剤の点眼を両眼に行った。薬物の振り分けはブラインドで行い、網膜神経節細胞カウント終了まで薬物濃度は実験者には不明な状態とした。各群 10 匹を用いた。経過中の緑内障眼の眼圧には 4 群間に有意差はみられなかった。

Fast Blue の上丘内投与により標識された網膜神経節細胞の標識率は、イガニジピン 0.01% 点眼群で $78.5 \pm 11.1\%$ 、0.03% 点眼群で $80.2 \pm 10.3\%$ 、0.1% 点眼群で $80.5 \pm 13.1\%$ 、基剤点眼群で $78.9 \pm 12.1\%$ であり、4 群間に有意差はみられなかった(図 30) ($p=0.975$, ANOVA)。

2) 視神経挫滅モデルでの検討

視神経挫滅の前、14 日間および挫滅後 35 日間の計 49 日連続して 1 日 2 回、イガニジピン 0.1% あるいは基剤の点眼を両眼に行った。薬物の振り分けはブラインドで行い、網膜神経節細胞カウント終了まで実験者には不明

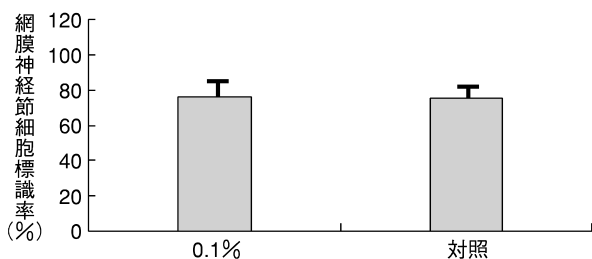


図 31 視神経挫滅モデルにおけるイガニジピンの結果。網膜神経節細胞の標識率は 0.1% 点眼群で $76.5 \pm 10.6\%$ 、基剤点眼群で $75.7 \pm 6.5\%$ であり、両群間に有意差はみられなかった。各群 $N=15$ 。(Mann-Whitney U test)。

な状態とした。各群 15 匹を用いた。経過中の緑内障眼の眼圧には両群間に有意差はみられなかった。なお、イガニジピンの実験に限り、眼球摘出は視神経挫滅の 35 日後に行った。

網膜神経節細胞の標識率は、イガニジピン 0.1% 点眼群で $76.5 \pm 10.6\%$ 、基剤点眼群で $75.7 \pm 6.5\%$ であり、両群間に有意差はみられなかった(図 31) (Mann-Whitney U test)。

V 考 按

緑内障は形態学的には視神経乳頭の辺縁部の菲薄化と網膜神経線維層欠損、対応する視野変化を特徴とする特異な視神経症であり、眼圧の異常はその視神経症の発症進行にかかわる因子の一つに過ぎない。眼圧が緑内障研究において重視されてきたのは古くからよく知られている危険因子であったことに加えて、多くの症例において視神経症の発症進行への寄与の度合いが大きいことによると思われる^{66)~71)}。確かに眼圧の寄与度は大きいものの、完全ではない。そのことは、今回示したように、眼圧非依存性の因子により緑内障性視神経症の予後が異なることに端的に示されている。視神経乳頭出血、乳頭周囲網脈絡膜萎縮、眼窩血流動態異常などがそれら眼圧非依存因子の例である。その中に循環動態に関連した因子の多いことは注目に値する。緑内障性視神経症の病因としての“循環障害説”は、実験モデルが作製できない、ヒトの全身的循環障害で緑内障性視神経症が生じないなど、直接的な証明に乏しいことが難点であるが、現時点では、眼圧下降に依存しない緑内障治療への突破口としても諸々の循環動態異常に注目することは理にかなっていると思われる⁴⁸⁾。

その意味からも、カルシウム拮抗薬の緑内障性視神経症への良好な効果は注目される。緑内障性視神経症に対するカルシウム拮抗薬の作用機序に関しては、現在も推測の域を出ていないが、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介する Ca^{2+} の細胞内流入阻止による末梢血管平滑筋拡張による血流改善が基本的に考えられる。また、カルシ

ウム拮抗薬が細胞内 Ca^{2+} の調整に関与していることから、神経保護的な作用を推定する考え方もある。

今回動物実験の検討対象とした薬物は、NMDA 受容体非拮抗阻害薬 MK-801 および memantine、神経伝達物質遊離促進剤 T-588、免疫抑制剤タクロリムス、 β 遮断薬 betaxolol、点眼用カルシウム拮抗薬イガニジピンであった。このうち、イガニジピンを除く薬物の投与により、本動物実験モデルにおいて神経保護作用がみられた。今回示した各種薬物の実験結果は、アポトーシスの抑制方向に働く薬物の多くが動物眼における緑内障性視神経症による網膜神経節細胞の細胞死に対して細胞保護的に作用するというを示すものであった。薬物実験で変調を来したと考えられる部位を図 32、33 にまとめて示したが、グルタミン酸-NO 機構(図 32)を介しても、神経栄養因子、生理活性物質への作用を介しても、また、カスパーゼを介する細胞内カスケードを変調させること(図 33)によっても、緑内障性視神経症を軽快させ得る可能性が示された。このことは、アポトーシス抑制により緑内障性視神経症の治療が可能という大きな方向性を示しているものと考えられる。

これからの神経保護的緑内障治療の可能性を展望してみる。最初に考えたいことは、アポトーシスによる細胞死は「死」という言葉の持つイメージと異なり、生理的な現象であるということである。したがって、アポトーシスの全身的な修飾は他の正常器官に及ぼす影響がきわめて大きいことが予測される。したがって、全身投与にはリスクが伴うと考えられ、標的器官に的を絞った drug delivery の方法論の確立が必要となる。神経保護的緑内障治療を実用化するために、今後必要な課題を挙げてみる。第一に、網膜神経節細胞の細胞死の分子機構のさらなる解明が必要である。これは、より効率的な薬剤開発のための必須条件である。第二に、神経保護的治療の臨床応用を行うことになるが、その過程で、緑内障治療体系の中での神経保護的治療の位置付けが論議される必要がある。第三に、臨床応用に向けては、候補薬物の開発と選定が重要であることはいままでもないが、予測される中枢神経系などへの副作用の対策として、候補薬物のデザイン変更、drug delivery の応用が検討されなければいけない。第四に、臨床試験の試験デザインとして、眼圧下降治療を十分に行っている症例を対象にすることになるので、試験期間が長期にわたること、試験費用が高額となることは問題で、対象薬物の選択がより厳密に行われることになるだろう。

神経保護治療が真に緑内障患者の予後改善に結びつくまでには、このようにまだ克服されるべき課題がたくさんある。しかしながら、緑内障性視神経症には、眼圧とは独立の発症進行因子が存在し、少なくとも一部の症例では眼圧下降を介さない治療が有用である。また、動物眼においてアポトーシス変調により、緑内障性視神経症

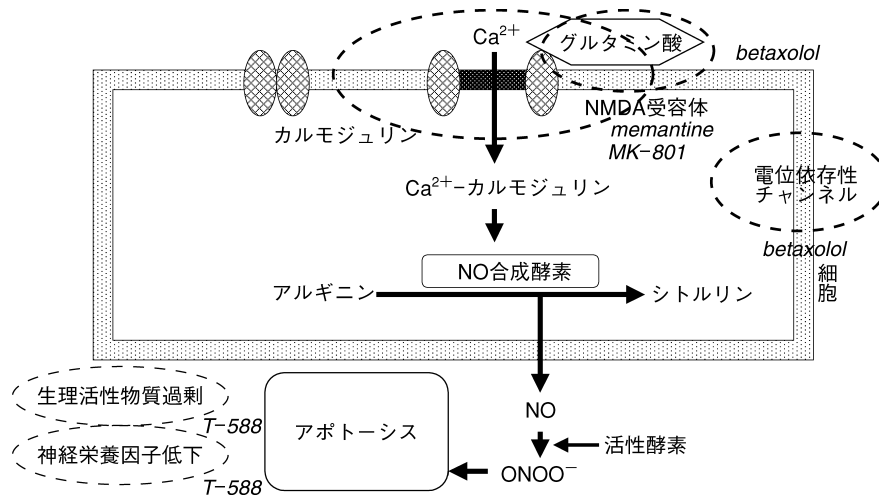


図 32 薬物によるアポトーシス関連分子機構の修飾(1).

イタリック体は今回の実験に用いた薬物で、丸(破線)はその薬物の推定される作用部位。

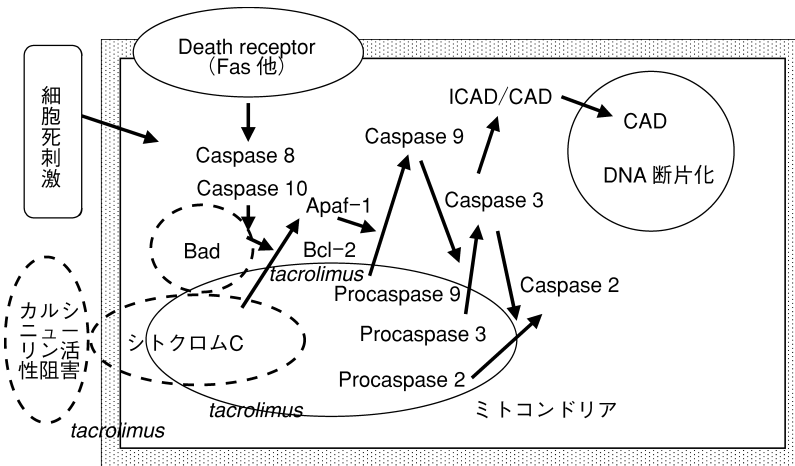


図 33 薬物によるアポトーシス関連分子機構の修飾(2).

イタリック体は今回の実験に用いた薬物で、丸(破線)はその薬物の推定される作用部位。

の進行を抑制することができる。したがって、神経保護治療は、近未来の緑内障治療として、きわめて魅力的である。

VI ま と め

1. 緑内障性視神経症において、眼圧非依存性の発症進行因子の存在を証明した。
2. 緑内障性視神経症において、カルシウム拮抗薬による眼圧下降を介さない治療の有用性を証明した。
3. 緑内障性視神経症に対する神経保護的治療の研究のための動物実験モデルを作製した。
4. 同モデルを用いて各種薬物について検討し、NMDA 受容体阻害薬などのアポトーシス機構の変調に関連した薬物が眼圧下降を介さずに緑内障性視神経症による網膜神経節細胞の細胞死を有意に抑制することを明らかにした。

稿を終えるに当たり、宿題報告の機会をいただきました日

本眼科学会評議員各位、座長をお務めいただいた猪俣 孟名 誉教授(九州大学)、指名討論をいただいた澤口昭一教授(琉球大学)に心より感謝申し上げます。また、長年ご指導をいただきました北澤克明名誉教授(岐阜大学)をはじめ共同研究者の方々ならびに本論文作成にご協力いただいた澤田陽子さんに深謝いたします。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金ならびに厚生省厚生科学補助金の研究助成を受けたことを付して、謝意を表します。なお、著者は本文中に取り上げた各種薬物などに学問以外の興味を有していないことをお断りいたします。

文 献

- 1) **Quigley HA, Green WR**: The histology of human glaucoma cupping and optic nerve damage. Clinicopathologic correlation in 21 eyes. *Ophthalmology* 86: 1803-1830, 1979.
- 2) **Quigley HA, Addicks EM, Green WR, Maume-**

- nee AE : Optic nerve damage in human glaucoma. II : The site of injury and susceptibility to damage. *Arch Ophthalmol* 99 : 635—649, 1981.
- 3) **Quigley HA, Hohman RM, Addicks EM, Massof RW, Green WR** : Morphologic changes in the lamina cribrosa correlated with neural loss in open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 95 : 673—691, 1983.
 - 4) **Quigley HA, Addicks EM** : Chronic experimental glaucoma in primates. II : Effect of extended intraocular pressure elevation on optic nerve head and axonal transport. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19 : 137—152, 1980.
 - 5) **村上 晶, 沖坂重邦** : 緑内障性視神経障害における神経細胞死機構. *日眼会誌* 102 : 645—653, 1998.
 - 6) **Farkas RH, Grosskreutz CL** : Apoptosis, neuroprotection, and retinal ganglion cell death : An overview. *Int Ophthalmol Clin* 41 : 111—130, 2001.
 - 7) **McKinnon SJ** : Glaucoma, apoptosis, and neuroprotection. *Curr Opin Ophthalmol* 8 : 28—37, 1997.
 - 8) **Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA, Pease ME, Thibault DJ, Zack DJ** : Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 774—786, 1995.
 - 9) **Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J, Sharma SC** : Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 61 : 33—44, 1995.
 - 10) **Okisaka S, Murakami A, Mizukawa A, Ito J** : Apoptosis in retinal ganglion cell decrease in human glaucomatous eyes. *Jpn J Ophthalmol* 41 : 84—88, 1997.
 - 11) **Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, Smith SD, Pease ME** : TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 115 : 1031—1035, 1997.
 - 12) **Friedlander RM, Brown RH, Gagliardini V, Wang J, Yuan J** : Inhibition of ICE slows ALS in mice. *Nature* 388 : 31, 1997.
 - 13) **Pasinelli P, Borchelt DR, Houseweart MK, Cleveland DW, Brown RH Jr** : Caspase-1 is activated in neural cells and tissue with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations in copper-zinc superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 15763—15768, 1998.
 - 14) **Li M, Ona VO, Guegan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, et al** : Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 288 : 335—339, 2000.
 - 15) **Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al** : Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397 : 441—446, 1999.
 - 16) **Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X** : Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90 : 405—413, 1997.
 - 17) **Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al** : Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91 : 479—489, 1997.
 - 18) **Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al** : Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403 : 98—103, 2000.
 - 19) **柏井 聡** : 虚血網膜における一酸化窒素の役割について. *日眼会誌* 99 : 1361—1376, 1995.
 - 20) **Ritch R** : Neuroprotection : Is it already applicable to glaucoma therapy? *Curr Opin Ophthalmol* 11 : 78—84, 2000.
 - 21) **Schwartz M, Yoles E** : Neuroprotection : A new treatment modality for glaucoma? *Curr Opin Ophthalmol* 11 : 107—111, 2000.
 - 22) **Bautista RD** : Glaucomatous neurodegeneration and the concept of neuroprotection. *Int Ophthalmol Clin* 39 : 57—70, 1999.
 - 23) **Weinreb RN, Levin LA** : Is neuroprotection a viable therapy for glaucoma? *Arch Ophthalmol* 117 : 1540—1544, 1999.
 - 24) **Osborne NN, Chidlow G, Nash MS, Wood JP** : The potential of neuroprotection in glaucoma treatment. *Curr Opin Ophthalmol* 10 : 82—92, 1999.
 - 25) **Osborne NN, Ugarte M, Chao M, Chidlow G, Bae JH, Wood JP, et al** : Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol* 43 : S 102—S 128, 1999.
 - 26) **Schwartz M, Yoles E** : Optic nerve degeneration and potential neuroprotection : Implications for glaucoma. *Eur J Ophthalmol* 9 : S 9—S 11, 1999.
 - 27) **Yoles E, Schwartz M** : Potential neuroprotective therapy for glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol* 42 : 367—372, 1998.
 - 28) **Caprioli J** : Neuroprotection of the optic nerve in glaucoma. *Acta Ophthalmol Scand* 75 : 364—367, 1997.
 - 29) **Schwartz M, Belkin M, Yoles E, Solomon A** : Potential treatment modalities for glaucomatous neuropathy : Neuroprotection and neuroregeneration. *J Glaucoma* 5 : 427—432, 1996.
 - 30) **Daugeliene L, Yamamoto T, Kitazawa Y** : Effect of trabeculectomy on visual field in progressive normal-tension glaucoma. *Jpn J Ophthalmol* 42 : 286—292, 1998.
 - 31) **Kitazawa Y, Yamamoto T, Ishida K** : Disc hemorrhage as a risk factor for progression of normal-tension glaucoma. In : Gramer E, et al (Eds) : *Pathogenesis and Risk Factors of Glaucoma*. Springer Verlag, Heidelberg, 145—154, 1999.
 - 32) **Ishida K, Yamamoto T, Sugiyama K, Kitazawa Y** : Disk hemorrhage is a significantly negative,

- prognostic factor in normal-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol* 129 : 707—714, 2000.
- 33) **Uchida H, Yamamoto T, Tomita G, Kitazawa Y** : Peripapillary atrophy in primary angle-closure glaucoma : A comparative study with primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 127 : 121—128, 1999.
 - 34) **Hayakawa T, Sugiyama K, Tomita G, Kawase K, Onda E, Shinohara H**, et al : Correlation of the peripapillary atrophy area with optic disc cupping and disc hemorrhage. *J Glaucoma* 7 : 306—311, 1998.
 - 35) **Sugiyama K, Tomita G, Kitazawa Y, Onda E, Shinohara H, Park KH** : The associations of optic disc hemorrhage with retinal nerve fiber layer defect and peripapillary atrophy in normal-tension glaucoma. *Ophthalmology* 104 : 1926—1933, 1997.
 - 36) **Niwa Y, Yamamoto T, Kawakami H, Kitazawa Y** : Reproducibility of color Doppler imaging for orbital arteries in Japanese patients with normal-tension glaucoma. *Jpn J Ophthalmol* 42 : 389—392, 1998.
 - 37) **Niwa Y, Harris A, Kagemann LE, Yamamoto T, Matsubara M, Takahashi D**, et al : A new system to supply carbon dioxide safely to glaucoma patients. *Jpn J Ophthalmol* 43 : 16—19, 1999.
 - 38) **Kondo Y, Niwa Y, Yamamoto T, Sawada A, Harris A, Kitazawa Y** : Retrobulbar hemodynamics in normal-tension glaucoma with asymmetric visual field change and asymmetric ocular perfusion pressure. *Am J Ophthalmol* 130 : 454—460, 2000.
 - 39) **Yamamoto T, Maeda M, Sawada A, Sugiyama K, Taniguchi T, Kitazawa Y**, et al : Prevalence of normal-tension glaucoma and primary open-angle glaucoma in patients with collagen diseases. *Jpn J Ophthalmol* 43 : 539—542, 1999.
 - 40) **Ishida K, Yamamoto T, Kitazawa Y** : Clinical factors associated with progression of normal-tension glaucoma. *J Glaucoma* 7 : 372—377, 1998.
 - 41) **Sawada A, Kitazawa Y, Yamamoto T, Okabe I, Ichien K** : Prevention of visual field defect progression with brovincamine in eyes with normal-tension glaucoma. *Ophthalmology* 103 : 283—288, 1996.
 - 42) **Yamamoto T, Niwa Y, Kawakami H, Kitazawa Y** : The effect of nilvadipine, a calcium-channel blocker, on the hemodynamics of retrobulbar vessels in normal-tension glaucoma. *J Glaucoma* 7 : 301—305, 1998.
 - 43) **Niwa Y, Yamamoto T, Harris A, Kagemann L, Kawakami H, Kitazawa Y** : Relationship between the effect of carbon dioxide inhalation or nilvadipine on orbital blood flow in normal-tension glaucoma. *J Glaucoma* 9 : 262—267, 2000.
 - 44) **Yamamoto T, Kitazawa Y, Ishida K, Daugeliene L** : Role of trabeculectomy and calcium-channel blockers in the treatment of normal-tension glaucoma. In : Krieglstein GK (Ed) : *Glaucoma Update Vol VI*. Springer Verlag, Heidelberg, 163—166, 1999.
 - 45) **Kitazawa Y, Yamamoto T, Tomita G, Niwa Y** : Calcium channel blockers and ocular blood flow in normal tension glaucoma. In : Pillunat LE, et al (Eds) : *Current Concepts on Ocular Blood Flow in Glaucoma*. Kugler Publications, The Hague, 235—240, 1999.
 - 46) **Tomita G, Niwa Y, Shinohara H, Yamamoto T, Kitazawa Y** : Changes in optic nerve head blood flow and retrobulbar hemodynamics following calcium-channel blocker treatment of normal-tension glaucoma. *Int Ophthalmol* 23 : 3—10, 2000.
 - 47) **Daugeliene L, Yamamoto T, Kitazawa Y** : Risk factors for visual field damage progression in normal-tension glaucoma eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237 : 105—108, 1999.
 - 48) **Yamamoto T, Kitazawa Y** : Vascular pathogenesis of normal-tension glaucoma : A possible pathogenic factor, other than intraocular pressure, of glaucomatous optic neuropathy. *Prog Retin Eye Res* 17 : 127—143, 1998.
 - 49) **Sugiyama K, Gu ZB, Kawase C, Yamamoto T, Kitazawa Y** : Optic nerve and peripapillary choroidal microvasculature of the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 3084—3090, 1999.
 - 50) 谷 照斌, 山本哲也, 川瀬千鶴, 松原正幸, 川瀬和秀, 澤田 明, 他 : ラット実験的緑内障における N-メチル-D-アスパラギン酸受容体阻害薬の神経保護作用の検討. *日眼会誌* 104 : 11—16, 2000.
 - 51) **Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, Yaoeda K, Fukuchi T, Abe H**, et al : Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink. *Jpn J Ophthalmol* 42 : 337—344, 1998.
 - 52) 中井義幸, 谷 照斌, 川瀬和秀, 山本哲也 : ラット高眼圧実験モデル網膜における網膜神経節細胞数の変化及び bcl-2, bax mRNA 発現量の変化. *岐阜大医紀* 48 : 176—181, 2000.
 - 53) 川上秀昭, 望月清文, 川瀬千鶴, 川瀬和秀, 山本哲也, 北澤克明 : ラット視神経挫滅の網膜に及ぼす影響に関する電気生理学的, 組織学的検討. *岐阜大医紀* 48 : 166—175, 2000.
 - 54) **Solberg Y, Rosner M, Turtz J, Belkin M** : MK-801 has neuroprotective and antiproliferative effects in retinal laser injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 1380—1389, 1997.
 - 55) **Lagrèze WA, Knörle R, Bach M, Feuerstein TJ** : Memantine is neuroprotective in a rat model of pressure-induced retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 1063—1066, 1998.
 - 56) **Freeman EE, Grosskreutz CL** : The effects of FK506 on retinal ganglion cells after optic nerve

- crush. Invest Ophthalmol Vis Sci 41 : 1111—1115, 2000.
- 57) **Kikuchi M, Kashii S, Mandai M, Yasuyoshi H, Honda Y, Kaneda K**, et al : Protective effects of FK506 against glutamate-induced neurotoxicity in retinal cell culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 39 : 1227—1232, 1998.
- 58) **Yardin C, Terro F, Lesort M, Esclaire F, Hugon J** : FK506 antagonizes apoptosis and c-jun protein expression in neuronal cultures. Neuroreport 9 : 2077—2080, 1998.
- 59) **Herr I, Martin-Villalba A, Kurz E, Roncaioli P, Schenkel J, Cifone MG**, et al : FK506 prevents stroke-induced generation of ceramide and apoptosis signaling. Brain Res 826 : 210—219, 1999.
- 60) **Ankarcrona M, Dypbukt JM, Orrenius S, Nicotera P** : Calcineurin and mitochondrial function in glutamate-induced neuronal cell death. FEBS Lett 394 : 321—324, 1996.
- 61) **Gross AL, Hensley SO, Gao F, Yang XL, Dai SC, Wu SM** : Effects of betaxolol on light responses and membrane conductance in retinal ganglion cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 41 : 722—728, 2000.
- 62) **Osborne NN, Cazevielle C, Carvalho AL, Larsen AK, DeSantis L** : *In vivo* and *in vitro* experiments show that betaxolol is a retinal neuroprotective agent. Brain Res 750 : 113—123, 1997.
- 63) **Osborne NN, DeSantis L, Bae JH, Ugarte M, Wood JP, Nash MS**, et al : Topically applied betaxolol attenuates NMDA-induced toxicity to ganglion cells and the effects of ischaemia to the retina. Exp Eye Res 69 : 331—342, 1999.
- 64) 辻 明, 谷 照斌, 澤田 明, 山本哲也, 北澤 克明 : ラット実験的緑内障眼における交感神経 β_1 選択性遮断薬の神経保護作用の検討. 岐阜大医紀 48 : 182—187, 2000.
- 65) 和気充典, 杉山哲也, 渡辺則子, 小河貴裕, 白波 瀨弘明, 東 郁郎 : 新規 Ca^{2+} 拮抗薬・塩酸イガニジピン点眼の家兎視神経乳頭循環に及ぼす影響. 日眼会誌 104 : 541—546, 2000.
- 66) **Anderson DR, Hendrickson A** : Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve. Invest Ophthalmol 13 : 771—783, 1974.
-