

博士論文

眼炎症疾患の現状とプロスタグランジン D2 の関与

曾我 拓嗣

眼炎症疾患の現状とプロスタグランジン D2 の関与

所属 医学系研究科 外科学専攻

指導教官 相原 一

申請者 曾我 拓嗣

目次

要旨.....	4
序論.....	5
第 1 章 高齢者のぶどう膜炎の疫学検討.....	18
1.1 緒言.....	18
1.2 方法.....	20
1.2.1 対象.....	20
1.2.2 研究デザイン.....	20
1.2.3 ぶどう膜炎の診断基準.....	21
1.2.4 統計解析.....	24
1.3 結果.....	25
1.3.1 高齢者のぶどう膜炎患者の臨床的特徴.....	25
1.3.2 高齢者におけるぶどう膜炎の病因分類.....	28
1.3.3 高齢者のぶどう膜炎の原因.....	29
1.3.4 高齢者および非高齢者の性別によるぶどう膜炎の原因.....	30
1.4 考察.....	34
第 2 章 プロスタグランジン D2 のラット実験的自己免疫性ぶどう膜炎(EAU) model への関与.....	38
2.1 緒言.....	38
2.2 方法.....	41
2.2.1 実験動物.....	41
2.2.2 炎症の惹起.....	41
2.2.3 炎症の評価.....	42
2.2.4 薬物の投与.....	43
2.2.5 尿中 PGDM、PGEM の測定.....	44
2.2.6 統計解析.....	45

2.3 結果	45
2.3.1 EAU スコアの自然経過の検討	45
2.3.2 HPGDS, LPGDS 阻害薬投与による EAU スコアの変化	46
2.3.3 眼炎症時の尿中 PGDM、PGEM 濃度の測定	47
2.4 考察	50
第 3 章 マウスレーザー誘起脈絡膜血管新生(Laser induced CNV)model への DP2 の 関与	53
3.1 緒言	53
3.2 方法	56
3.2.1 CNV の誘導	56
3.2.2 CNV サイズの測定	57
3.2.3 免疫染色	57
3.2.4 酵素結合免疫吸着法(ELISA)	58
3.2.5 CNV へのマクロファージ遊走の測定	59
3.2.6 DP2 拮抗薬投与	60
3.2.7 Ex Vivo Choroid Sprouting Assay	60
3.2.8 RT-PCR 法を用いた ARPE-19、HUVEC 細胞における DP2 受容体の発現検 討	61
3.2.9 HUVEC 細胞の tube formation assay	63
3.2.10 ARPE-19 細胞の培地上清の ELISA による VEGF、MCP-1 濃度測定	63
3.2.11 統計解析	64
3.3 結果	65
3.3.1 レーザー照射部位の免疫染色	65
3.3.2 高週齢マウスにおける CNV サイズの測定	66
3.3.3 8 週齢、56 週齢の WT、DP2KO マウスにおける CNV サイズの測定	67
3.3.4 2 種類の DP2 拮抗薬(CAY10471 と OC000459)の CNV サイズへの影響 ..	69
3.3.5 希釈した DP2 拮抗薬の CNV サイズへの影響	70

3.3.6 マクロファージ浸潤アッセイ	71
3.3.7 レーザー後 3 日目の眼内の VEGF,MCP-1 濃度	71
3.3.8 DP2 拮抗薬投与下での眼内 VEGF、MCP- 1 濃度	73
3.3.9 Choroidal sprouting assay	75
3.3.10 ARPE-19、HUVEC 細胞における DP2 受容体の発現	76
3.3.11 ARPE-19 細胞における PGD2 刺激下での VEGF、MCP- 1 産生	77
3.3.12 HUVEC 細胞の tube formation assay	79
3.4 考察	81
4 まとめ	86
参考文献	91
略語一覧	102

要旨

1 章では東大病院のぶどう膜外来に受診したぶどう膜炎患者を解析し、高齢者のぶどう膜炎の疫学上の特徴を解析し、感染性ぶどう膜炎、仮面症候群が多いことが明らかになった。

2 章ではラット自己免疫性ぶどう膜炎モデルを用いて、眼炎症に伴い全身の PGD2 の産生が上昇し、PGD2 合成酵素阻害薬を投与すると、ぶどう膜炎が軽症化することが明らかになった。

3 章では加齢黄斑変性の動物モデルであるマウスのレーザー誘発 CNV モデルを用いて、PGD2 受容体の 1 つの DP2 阻害により CNV サイズが縮小することが明らかとなった。

ぶどう膜炎や加齢黄斑変性の炎症性疾患において、PGD2 は新規治療標的となりうる可能性が示唆された。

序論

炎症が病態の首座と考えられる眼科疾患を眼炎症性疾患と呼び、角膜炎、ぶどう膜炎、網膜炎、強膜炎、視神経炎など様々な疾患が含まれる（表序-1）。糖尿病網膜症や加齢黄斑変性などの疾患は慢性に経過する網膜疾患であり、以前は非炎症性疾患と考えられていたが、それらの病態には炎症性サイトカインによる網膜血管内皮細胞の活性化や障害が関与することが明らかとなっており、これらの疾患も広義の眼炎症性疾患と考えられるようになってきている。

表序-1 主な眼炎症性疾患

角膜炎

ぶどう膜炎（原田病、ベーチェット、サルコイドーシスなど）

網膜炎（加齢黄斑変性、糖尿病網膜症、バードショット網膜脈絡膜症など）

強膜炎

視神経炎

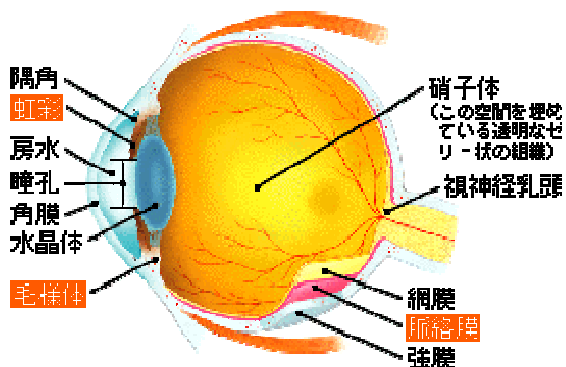
角膜移植後拒絶反応

甲状腺眼症

眼窩筋炎（外眼筋炎）

眼窩炎症性偽腫瘍、IgG4 関連眼疾患

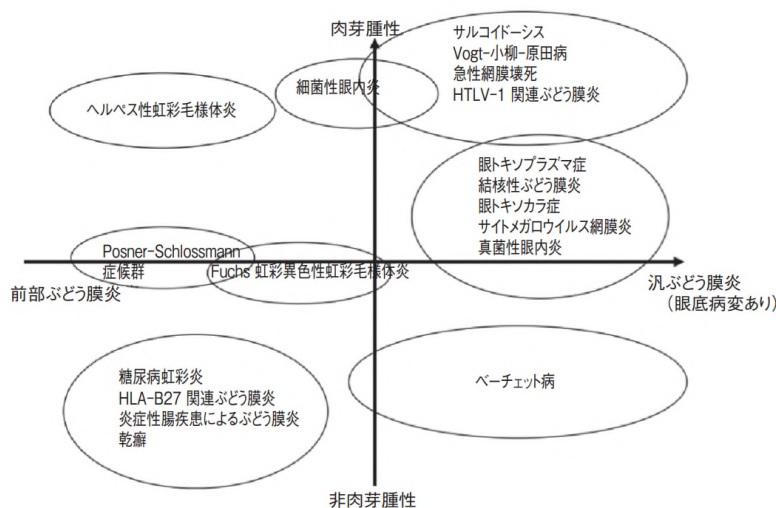
ぶどう膜炎(uveitis)はぶどう膜を主座とする炎症性疾患の総称である。ぶどう膜とは虹彩、毛様体、脈絡膜を総称する言葉である（図序-1）。これらの組織は血管が多く、摘出眼球において果物のぶどう(ラテン語で uva)の皮に似ていることから、ぶどう膜(uvea)と名づけられた。ぶどう膜に炎症が起こると、強膜毛様充血、虹彩炎、毛様体炎、網脈絡膜血管炎となり、眼内房水や硝子体の透明組織に出血やフィブリン、また組織全体に新生血管や線維性血管膜を生じて、二次的に緑内障や白内障がおき、視力、視野障害を生じるために、炎症の発作や再発をできる限り抑制する必要がある。



図序-1 眼球の構造（三和化学研究所ホームページより引用）

ぶどう膜炎の原因には、大きく分けて感染性と非感染性、および仮面症候群（腫瘍性ぶどう膜炎）がある。

内因性ぶどう膜炎は自己免疫疾患などの全身性炎症性疾患に合併することが多いが、眼単独でも生じ、自己免疫などの過剰な免疫反応が原因と考えられている。感染性ぶどう膜炎は眼内への病原体（細菌やウイルス（HSV、VZV、CMV など））の感染が原因であり、消炎治療のみならず病原体に対する抗菌剤や抗ウイルス剤、抗真菌剤が必要である。一方、腫瘍性では抗がん剤が必要であり、それぞれの治療法は大きく異なる。そのためぶどう膜炎診療では早期の鑑別診断が重要であり、年齢や性別、両眼性片眼性、炎症の性状（肉芽腫性、非肉芽腫性）、炎症の首座（前部、中間部、後眼部、汎ぶどう膜炎）などの臨床症状を手掛かりとする¹(図序-2)。



図序-2 ぶどう膜炎の性状、首座による分類(1より引用)

HTLV-1: human T-lymphotropic virus type 1 HLA: Human Leukocyte Antigen

また、前房水や硝子体液を用いて、病原体特異的な DNA 配列を PCR 法で検索し、HSV、VZV、CMV などのウイルスの DNA を検出することができる。また、腫瘍性ぶどう膜炎は原発および転移性の腫瘍によるが、現在眼内リンパ腫が大部分を占め、本邦で増加傾向である。眼内リンパ腫は眼内液中のサイトカイン(IL-10, IL-6)濃度や眼内液を用いた病理細胞診により確定診断することが出来る。このように分子生物学的診断が導入されたことにより、感染及び仮面症候群については診断力が向上したが、いまだに臨床症状や既知の診断基準だけでは診断困難な症例も多く、2016 年に行われたぶどう膜炎初診患者の全国調査では、全体の 37.3%が分類不能であった²(図 序-3)。

ぶどう膜炎の内訳

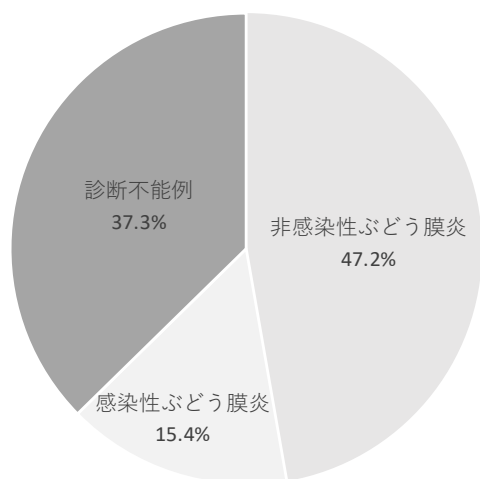


図 序-3 2016 年の日本のぶどう膜炎の種類 (2 より引用)

年齢はぶどう膜炎の原因疾患別頻度に大きな影響を与えるため、現在、先進国を中心に世界的に平均寿命の延長・高齢化が進んでいることから、日本でもぶどう膜炎の原因疾患の頻度が変化している可能性があり、経時的に把握することが重要である。

ぶどう膜炎の中で最も頻度が多い非感染性ぶどう膜炎の治療は、抗炎症薬で眼内の炎症を抑え、眼球組織（網膜、視神経など）の不可逆的な損傷を予防すること、白内障や緑内障など合併症を抑制することを目的として行う（図序-3）。消炎のために、まずはステロイドの点眼やテノン嚢下注射などの局所投与を行う。それでも炎症が収まらない場合は、全身投与や免疫抑制剤の併用を追加して行う。

現在、抗炎症薬として、ステロイド薬の点眼、内服やシクロスポリンなどの免疫抑制剤、インフリキシマブやアダリムマブ^{3,4}などの TNF 阻害薬がある。しかし、これらを用いても眼内炎症の再燃を抑制できず、不可逆的な視力障害に

至る症例もまだ多く存在するため、更なるぶどう膜炎の炎症の機序の解明や新規薬剤の開発が臨まれる。

また、網膜炎症性疾患である加齢黄斑変性は中心視力の低下をきたし社会的失明をきたす重大な疾患である。我が国でも食の欧米化に伴い増加しており、視覚障害の原因疾患の4位(8.0%)となっている⁵。

加齢黄斑変性には滲出型と萎縮型がある。萎縮型は、ドルーゼンと呼ばれる細胞外沈着物の増加、網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelium: RPE)、光受容体、脈絡膜毛細管の減少を特徴とする地図状萎縮を特徴とする⁶。萎縮型には積極的な治療はなく、経過観察、ライフスタイルや食生活の改善、Age-Related Eye Disease Study (AREDS) に基づくサプリメントの摂取を行う⁷。

滲出型は脈絡膜血管新生 (choroidal neovascularization: CNV) を特徴とする(図序-4)。CNVにより滲出液や網膜色素上皮剥離、または血管新生房の周囲の線維症を引き起こす。レーザー光凝固、光線力学的療法(photodynamic therapy : PDT)、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) に対する阻害薬 (抗 VEGF 薬) などの薬物療法を単独、もしくは併用

して治療していく。しかしながら、治療への反応性が乏しい症例があること、抗 VEGF 薬が高額であること、通常複数回の投与で継続的投与が必要なことが多いこと、硝子体内注射が必要で感染や網膜剥離のリスクがあること、炎症が抑制できても線維性血管膜が残存したり、構造が破壊されるため、視力の回復には限度がある、など、様々な問題点があり、患者負担が大きい。新たな病態・発症機序の解明や新規薬剤の開発が望まれている。

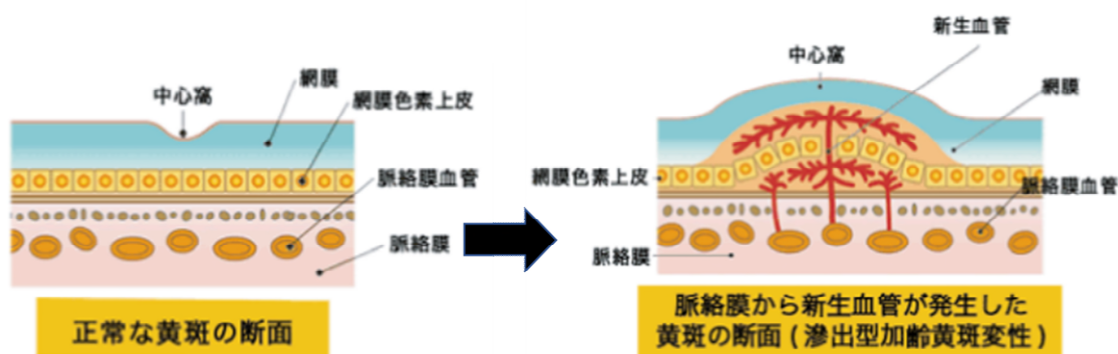


図 序-4 正常な黄斑と滲出型加齢黄斑変性（ノバルティス ファーマの加齢黄斑ドットコムより引用）

加齢黄斑変性の病態には、喫煙、食生活、光への暴露量等の環境要因に加え、加齢、遺伝要因などの様々な要因が関与する。また、その病態には炎症関連サイトカイン（炎症誘発性および抗炎症性サイトカインのバランス）や白血球（マクロファージ、樹状細胞、好中球、T リンパ球および B リンパ球）による

炎症性機序が関与していると考えられている⁸(図序-5)。老化により酸化的損傷が蓄積し、損傷したタンパク質、脂質、DNA、およびミトコンドリアの機能不全が起こり、終末糖化産物 (Advanced Glycation Endproducts : AGE) やマロンジアルデヒド (malondialdehyde : MDA) などの酸化特異的エピトープを生成し、炎症誘発性応答を誘発し⁹、マクロファージの浸潤と分極を促進すると考えられている^{9,10}。

滲出型 AMD に特徴的である CNV の発生には、炎症性サイトカイン、補体系の活性化の他、マクロファージやミクログリアの促進や阻害が関連していると言われている¹¹。

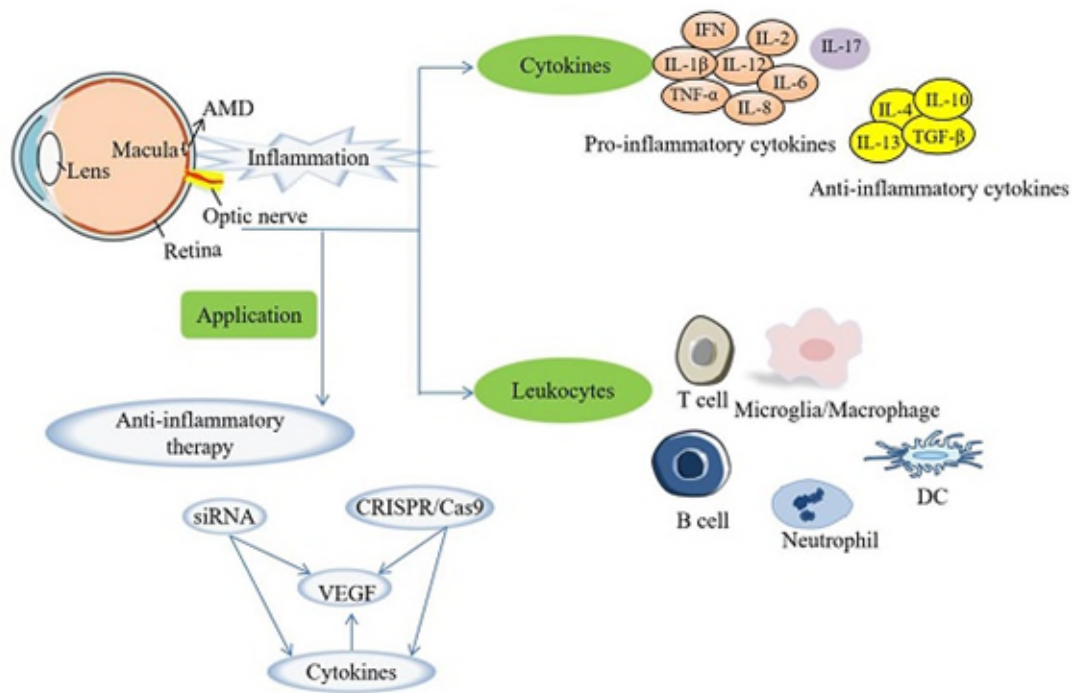
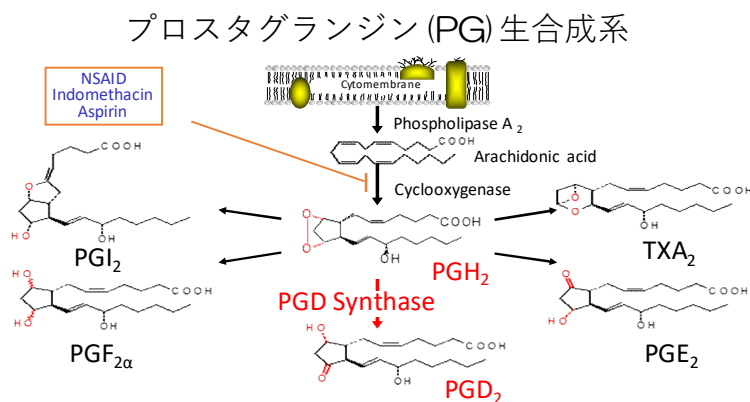


図 序-5 加齢黄斑変性に関わるサイトカイン、白血球（8より引用）

眼炎症性疾患に対する現状の課題をもとに、我々は古くから炎症や免疫に関与するプロスタグランジンに着目し、その関与を検討することにした。炎症や免疫に関与する細胞に刺激が加わると、細胞膜や核膜の構成する構成脂質から活性化ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) により様々な不飽和脂肪酸が産生される。その一つにアラキドン酸がある。アラキドン酸がシクロオキシゲナーゼにより、PGG₂、PGH₂が産生され、さらにプロスタグランジン合成酵素により PGD₂,

PGE₂, PGI₂などが合成される。また5-リポキシゲナーゼによりロイコトリエン (LT) が合成される¹²。このうち PGD₂は PGH₂より PGD 合成酵素により産生される (図序-6)。



図序-6 PG 生合成系

Prostaglandin D₂(PGD₂)は I 型アレルギーにおいて主要な働きをするマスト細胞が分泌する主要なプロスタノイドである。喘息発作やアトピー性皮膚炎での炎症部位に産生がみられ、アレルギーと密接に関係している¹³。マウスの喘息モデル実験において、正常マウスに比べ PGD₂ 受容体である Type D Prostanoid receptor (DP 受容体)欠損マウスは、好酸球、リンパ球の肺への浸潤が減少し、気道過敏性の減少がみられ、粘液産生細胞の増加がみられず、Th 2

サイトカインの産生が減少し、アレルギー性喘息症状の軽減を示した¹⁴。

また PGD2 は脳でも多く産生されており、睡眠誘導作用も持っている¹⁵。

PGD2 の合成酵素には H 型（造血型）と L 型（リポカリン）の 2 種類がある（図序-7）。H 型 PGD2 合成酵素（HPGDS）は血管透過性と続く血管新生を減少させることで関節炎を改善する¹⁶。L 型 PGD2 合成酵素（LPGDS）由来の PGD2 は血管内皮バリアー形成を高めることで、急性肺障害を減衰すると言われている¹⁷。

2 種類の PGD2 合成酵素

リポカリン型 (L型)

(Urade et al., JBC 1985)

中枢神経系
雄性生殖器
心臓循環器系

(Urade et al., JBC 1989;
Eguchi et al., PNAS1997)

睡眠調節

(Qu et al., PNAS 2006)

造血型 (H型)

(Urade et al., JBC 1987)

肥満細胞
Th2 リンパ球
ミクログリア細胞

(Urade et al., JBC 1989;
Urade et al., JI 1990)

アレルギー・炎症

(Mohri et al., JNS 2006)

図序-7 2 種類の PGD2 合成酵素

PGD2 の受容体にも 2 種類あり、DP1 受容体と DP2 受容体がある¹⁸（図序-8）。

DP1 受容体は Gs-共役型で cAMP が上昇し、血小板の凝集抑制や血管平滑筋

の筋弛緩、脳の睡眠に関与している。DP2 (CRTH2) 受容体は Gi/q-共役型で、cAMP の低下、Ca²⁺の上昇、Th2 リンパ球、好酸球、好塩基球の走化性に関与している。

眼における PGD₂ の報告としては、50μg の PGD₂ をウサギ眼に点眼すると30 分以内に眼圧が低下する¹⁹、ラットでは PGD₂ 受容体である DP 受容体 (DP1) の mRNA が軟膜、視細胞、虹彩上皮、毛様体突起に優位に発現している²⁰といった報告があるが、ぶどう膜炎や加齢黄斑変性に関する報告はない。つまり、眼炎症性疾患への PGD₂ の関与については未だ不明な状態にある。そこで今回、眼炎症性疾患における PGD₂ の関与について検討することにした。

2種類のPGD ₂ 受容体	
DP1 (DP)	DP2 (CRTH2)
Gs-共役型 (cAMP ↑)	Gi/q-共役型 (cAMP ↓, [Ca ²⁺] _i ↑)
血小板 (凝集抑制) 血管平滑筋 (筋弛緩) 脳 (睡眠)	Th2 リンパ球 好酸球/好塩基球 (走化性)

図序-8 2種類の PGD₂ 受容体

まず1章では眼炎症性疾患でも特に年齢による疾患頻度を受けるぶどう膜炎について、最近の東大病院における高齢者のぶどう膜炎の特徴を調査し、診断の補助となる疫学上の新たな情報を検討した。

2章では非感染性内因性ぶどう膜炎の動物モデルであるラットの実験的自己免疫性ぶどう膜炎モデルを用いて、ぶどう膜炎におけるPGD2の関与を検討した。

3章では非感染性炎症性網膜炎の代表的疾患である加齢黄斑変性の動物モデル（マウスレーザー誘導網脈絡膜血管新生モデル）、およびヒト網膜色素上皮細胞（ARPE-19）、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いて、加齢黄斑変性へのPGD2の関与を検討した。

第1章 高齢者のぶどう膜炎の疫学検討

1.1 緒言

眼炎症性疾患であるぶどう膜炎は、先進国では失明の主要な原因となっている²¹。近年、ぶどう膜炎の診断に有用な様々な検査方法が開発されており、光干渉断層撮影法²²や、感染物質を検出するための眼内液のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)分析法²³などがある。その結果、ぶどう膜炎の確定診断率は徐々に増加しており、本邦におけるぶどう膜炎初診患者の全国調査でも2002年の調査では61.1%であったが、2009年には66.5%、2016年には63%が確定診断されていた²⁴⁻²⁶。しかし、最近の調査でもぶどう膜炎患者の37%は確定診断が得られなかった²⁷⁻²⁹。したがって、ぶどう膜炎の原因疾患別頻度に関する疫学的情報は、臨床医がぶどう膜炎の原因病名を診断する上で重要である。

多くの先行研究では、世代、民族、国によってぶどう膜炎の原因疾患別頻度が大きく異なることが報告されている^{24, 25, 30-32}。年齢はぶどう膜炎の原因疾患別頻度に大きな影響を与える。現在、先進国を中心に世界的に平均寿命の延長・高齢化が進んでおり、将来的にはさらに高齢者の割合が増加すると予測されて

いる³³。内閣府によると、本邦の65歳以上の人口割合は2036年に33.3%となり、その後も高齢化率は上昇を続け、2065年には38.4%に達すると推計されている³⁴。しかし、日本を含むアジア諸国の高齢者のぶどう膜炎の疾患別頻度に着目した報告はほとんどなく、症例数も少ない(表1-1)³⁵⁻³⁷。日本の高齢化は他国に比べても特に進んでおり³⁸、日本の高齢者のぶどう膜炎の疫学的特徴を明らかにすることは、将来世界での高齢者のぶどう膜炎の疫学的変化を予想する上で有用ではないかと考えた。

表1-1 高齢者のぶどう膜炎の疫学の既報

	秋山ら (n=98)	永岡ら (n=67)	山村ら (n=109)	本研究 (n=543)
地域	東京	佐賀	金沢	東京
期間(年)	1971~2001	1991~1997	1974~1985	2013~2018
年齢	>60	>60	>50	>65
ぶどう膜炎の原因疾患の多い順				
1位	診断不能(64.2%)	診断不能(32.8%)	診断不能(83.5%)	診断不能(46.6%)
2位	サルコイドーシス (12.2%)	HTLV-1 (19.4%)	サルコイドーシス (9.1%)	サルコイドーシス (12.3%)
3位	原田病 (6.1%)	サルコイドーシス (14.9%)	原田病 (3.6%)	眼内リンパ腫 (8.8%)
4位	ベーチェット病 (6.1%)	真菌性眼内炎 (8.9%)	ベーチェット病 (1.8%)	サイトメガロウイルス虹彩炎(5.9%)

本研究では、非高齢者と高齢者のぶどう膜炎のパターンを比較することで、高齢者のぶどう膜炎の特徴を明らかにすることを目的とした。

1.2 方法

1.2.1 対象

2013年1月から2018年12月までの期間に、東京大学医学部附属病院眼科ぶどう膜炎外来を初診したぶどう膜炎患者の臨床記録をレトロスペクティブに調査した。ぶどう膜炎に関する紹介初診患者のうち、ぶどう膜炎の既往はあるが、最近活動性の眼内炎症がない患者は本研究から除外した。本研究は東京大学医学部倫理委員会の規定に準拠して実施した（審査番号2217）。

1.2.2 研究デザイン

患者は、初診時の年齢によって2つのグループに分類した。世界保健機関（WHO）が提示した高齢者の定義³⁹に従い、65歳をグループ分けのカットポイントとした。A群は65歳以上の患者、B群は65歳未満の患者で構成され

た。その後、診断が確定した患者を2つのグループからそれぞれ抽出した。診断が確定した患者を3つのカテゴリー（感染性ぶどう膜炎、非感染性ぶどう膜炎、仮面症候群）に分け、それぞれのカテゴリーの割合を2群間で比較した。次に、ぶどう膜炎の各タイプの割合を両群間で比較した。最後に、高齢者（A群）と非高齢者（B群）を男性と女性のサブグループに分けた。さらに、各性別グループから上位5種類のぶどう膜炎を選択し、各疾患の割合を男性サブグループと女性サブグループで比較した。この分析に先立ち、各グループの各タイプのぶどう膜炎の割合を以下の式に基づいて算出した。（各タイプのぶどう膜炎の割合）＝（各タイプのぶどう膜炎の患者数）／（各グループの確定診断例の患者数）。この値を用いて、各タイプのぶどう膜炎の発生率を2群間で比較した。

1.2.3 ぶどう膜炎の診断基準

本研究では、2009年に日本で行われたぶどう膜炎初診患者の全国的前向き調査で使用されたぶどう膜炎の分類システムを使用した²⁵。ぶどう膜炎症例の解剖学的特徴は、Standardization of Uveitis Nomenclature Working Groupの分類を

用いて評価し、前部ぶどう膜炎、中間部ぶどう膜炎、後部ぶどう膜炎、汎ぶどう膜炎に分類した⁴⁰。

ぶどう膜炎初診患者は全員、初診時にぶどう膜炎の原因検索を目的とした血液検査を受け、末梢血球数、赤血球沈降速度、血清アンジオテンシン変換酵素 (ACE)、空腹時血糖値、リウマチ因子、免疫グロブリン IgA、IgG、IgM、一本鎖および二本鎖 DNA に対する抗体、カルシウム、血中尿素窒素、クレアチニン、クレアチンキナーゼ、迅速血漿反応、ラテックス凝集反応、抗ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型抗体 (HTLV-1 抗体)、C 反応性タンパク質 (CRP)、グロブリン分画、トキソプラズマ、単純ヘルペスウイルス (HSV)、水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV)、サイトメガロウイルス (CMV) の IgM および IgG などを測定した。また、尿検査、胸部 X 線撮影、ツベルクリン反応検査を行った。さらに、必要に応じて、房水や硝子体液を用いた定量的 PCR 分析、インターフェロン・ガンマ放出アッセイ (T スポット[®])、ヒト白血球抗原 (HLA) タイピングを行った。

ベーチェット病の診断は、日本ベーチェット病調査研究班が定めた診断基準⁴¹

を用いた。

またサルコイドーシスによるぶどう膜炎（眼サルコイドーシス）の診断は International Workshop on Ocular Sarcoidosis (IWOS) の診断基準に基づいて診断した²⁷。この基準では、眼サルコイドーシス症例を3つのグループ（確定眼サルコイドーシス、推定眼サルコイドーシス、眼サルコイドーシス疑い）に分類している^{42,43}。本研究では、確定眼サルコイドーシスおよび推定眼サルコイドーシスに分類されたサルコイドーシス患者を、サルコイドーシス確定診断症例と定義した。

Vogt-Koyanagi-Harada 病については、国際的に使用されている診断基準を採用した⁴⁴。HSV および CMV 虹彩炎については、特徴的な眼所見を示した患者を対象に、房水を用いた定量的 PCR を実施した。100 コピー/mL 以上の HSV-DNA または CMV-DNA の存在を陽性と定義した²⁷。VZV 虹彩炎については、眼部帯状疱疹と考えられる眼瞼周囲の水疱様皮疹を有する患者は臨床的に確定診断とした。一方、皮膚病変を有さない患者でもウイルス性虹彩炎が疑われる患者に対して房水を用いて定量的 PCR を施行し、100 コピー/mL 以上の VZV-DNA の存在は陽性と判定した²⁷。急性網膜壊死（acute retinal necrosis:

ARN) の診断は、日本で既に報告されている ARN の基準⁴⁵または米国ぶどう膜炎協会の基準⁴⁶に基づいて行った。CMV 網膜炎については、特徴的な眼所見と眼内液を用いた PCR 法の結果に基づいて診断した。眼内リンパ腫の診断は、以下の 4 つの検査のうち少なくとも 2 つ陽性を満たした場合に確定診断とした：(1) (ライトギムザ染色およびパパニコロウ染色された細胞標本を用いたパパニコロウの分類による細胞学的結果) >クラス 3⁴⁷、(2) 眼内液中のインターロイキン (IL) -10/IL6 比>1 または IL-10>50 pg/mL^{48 49}、(3) 蛍光活性化細胞選別法における κ/λ 比の強い偏差⁵⁰、(4) 免疫グロブリン重鎖遺伝子再配列の PCR 陽性⁵¹⁻⁵³。急性前部ぶどう膜炎 (acute anterior uveitis: AAU) については、強直性脊椎炎、潰瘍性大腸炎、乾癬などの特異な症状を持つ患者は、全身疾患関連ぶどう膜炎と診断し、HLA-B27 陽性患者を AAU と診断した。一方、HLA-B27 陰性の患者や HLA タイピングを施行しなかった症例は、分類不能なぶどう膜炎と診断した。小児の慢性虹彩毛様体炎 (Juvenile chronic iridocyclitis: JCI) とフックス異色性虹彩毛様体炎は、過去の報告^{54, 55}にあるように、典型的な眼所見と臨床経過に基づいて診断された。

1.2.4 統計解析

数値は平均値±標準偏差で示した。グループ間の連続変数の比較は、Mann-Whitney U 検定を用いて行い、比率の比較は、カイ二乗検定を用いて行った。Mann-Whitney U 検定およびカイ二乗検定は、GraphPad Prism ソフトウェアバージョン 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて行った。p 値が 0.01 より小さい場合は有意とした。

1.3 結果

1.3.1 高齢者のぶどう膜炎患者の臨床的特徴

本研究では、合計 1,424 名のぶどう膜炎患者 (659 名の男性、765 名の女性) が登録された。A 群 (高齢者群) は 543 名 (男性 247 名[45.5%])、B 群 (非高齢者群) は 881 名 (男性 412 名[46.8%]) であった。

表 1-2 に両群の患者背景と解剖学的特徴を示す。平均年齢は、A 群が 74.0±6.3 歳、B 群が 44.4±14.6 歳であった。A 群で前部ぶどう膜炎の占める割合は B 群に比べて有意に低かった (33.0%vs.40.0%, $p=0.0081$)。逆に、A

群で汎ぶどう膜炎の占める割合は B 群よりも有意に高かった (56.9% vs.47.2%、 $p=0.0004$)。また、確定診断を受けた患者の割合は、A 群では B 群よりも有意に低かった (53.4%vs.61.1%、 $p=0.0039$)。

表 1-2 患者背景と解剖学的特徴

	65 歳以上 (Group A)	65 歳未満 (Group B)	<i>p</i> 値
総患者数	543	881	-
性別(男/女) (男性の%)	247:296 (45.5%)	412:469 (46.8%)	0.6388
平均年齢	74.0 ± 6.3	44.4 ± 14.6	^a < 0.0001
炎症部位			
前部ぶどう膜炎 (%)	179 (33.0%)	352 (40.0%)	^a 0.0081
中間部ぶどう膜炎 (%)	5 (0.9%)	8 (0.9%)	0.9804
後部ぶどう膜炎 (%)	50 (9.2%)	105 (11.9%)	0.1107
汎ぶどう膜炎 (%)	309 (56.9%)	416 (47.2%)	^a 0.0004
確定診断例 (%)	290 (53.4%)	539 (61.1%)	^a 0.0039

a: p-value significant at $p < 0.01$

1.3.2 高齢者におけるぶどう膜炎の病因分類

感染性ぶどう膜炎（35.5%vs.17.8%、 $p < 0.0001$ ）、仮面症候群（17.9% vs.5.0%、 $p < 0.0001$ ）の割合は、A群がB群に比べて有意に高かった（表 1-2）。仮面症候群では、A群に眼内リンパ腫（ $n = 48$ ）、白血病（ $n = 3$ ）、がん関連網膜症（ $n = 1$ ）が含まれ、B群に眼内リンパ腫（ $n = 25$ ）、両側びまん性ぶどう膜メラノサイト増殖（ $n = 1$ ）、白血病（ $n = 1$ ）が含まれた。非感染性ぶどう膜炎の占める割合（46.6%vs.77.2%、 $p < 0.0001$ ）は、A群の方がB群よりも有意に低かった（表 1-3）。

表 1-3 高齢者と非高齢者のぶどう膜炎の病因分類

分類	65 歳以上 (Group A) ($n = 290$) n (%)	65 歳未満 (Group B) ($n = 539$) n (%)	p 値
感染性ぶどう膜炎	103 (35.5%)	96 (17.8%)	^a < 0.0001
非感染性ぶどう膜炎	135 (46.6%)	416 (77.2%)	^a < 0.0001
仮面症候群	52 (17.9%)	27 (5.0%)	^a < 0.0001

a: p-value significant at $p < 0.01$

1.3.3 高齢者のぶどう膜炎の原因

サルコイドーシス (23.1%vs.9.3%、 $p < 0.0001$)、眼内リンパ腫 (16.6% vs.4.6%、 $p < 0.0001$)、CMV 虹彩炎 (11.0%vs.5.6%、 $p = 0.0043$)、CMV 網膜炎 (5.2%vs.1.5%、 $p = 0.0020$) の割合が、A 群では B 群に比べて有意に高かった (表 1-4)。

表 1-4 高齢者に多い上位 5 疾患と非高齢者でのその疾患の頻度の比較

原因疾患	65 歳以上 (Group A) ($n = 290$) n (%)	65 歳未満 (Group B) ($n = 539$) n (%)	p 値
65 歳以上に多いぶどう膜炎			
サルコイドーシス	67 (23.1%)	50 (9.3%)	^a < 0.0001
眼内リンパ腫	48 (16.6%)	25 (4.6%)	^a < 0.0001
サイトメガロウイルス虹彩炎	32 (11.0%)	30 (5.6%)	^a 0.0043
原田病	17 (5.9%)	50 (9.3%)	0.0854
サイトメガロウイルス網膜炎	15 (5.2%)	8 (1.5%)	^a 0.0020

a: p-value significant at $p < 0.01$

サルコイドーシスでは、合計 117 名の患者が確定診断を受けた（高齢者[A 群]67 名、非高齢者[B 群]50 名）。そのうち、確定診断された眼サルコイドーシスは、A 群で 23 名、B 群で 20 名であった。診断が確定した全患者における確定眼サルコイドーシス患者の割合を比較したところ、A 群（34.4%）よりも B 群（40.0%）の方が高かったものの、有意な群間差は認められなかった。

CMV 網膜炎の原因と考えられた全身疾患は、A 群では悪性リンパ腫（n=8）、不明（n=4）、純赤血球無形成（n=1）、後天性免疫不全症候群（n=1）、肝移植後の免疫抑制（n=1）であった。一方、B 群では、悪性リンパ腫（n=5）、原因不明（n=1）、後天性免疫不全症候群（n=1）、肝移植後の免疫抑制（n=1）であった。

1.3.4 高齢者および非高齢者の性別によるぶどう膜炎の原因

男性に多い上位 5 疾患（表 1-5）、女性に多い上位 5 疾患(表 1-6)を表に示す。

A 群および B 群では、サイトメガロウイルス虹彩炎の割合は、女性よりも男性の方が有意に高かった（16.1% vs. 6.1%, $p = 0.0068$; 8.1% vs. 3.0%, $p =$

0.0088）。B 群では、眼内リンパ腫の占める割合が女性よりも男性の方が有意

に高かった (7.0%vs.2.2%、 $p=0.0080$)。また A 群、B 群の両方において、サルコイドーシスの割合は、女性よりも男性の方が有意に低かった (14.7% vs.31.3%、 $p=0.0008$; 5.6%vs.13.0%、 $p=0.0029$) (表 1-5、1-6)。

表 1-5 高齢者および非高齢者における男性に多い上位 5 疾患とその女性での頻度の比較

原因疾患	65 歳以上の 男性患者 (<i>n</i> = 143)	65 歳以上の 女性患者 (<i>n</i> = 147)	<i>p</i> 値
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	
眼内リンパ腫	24 (16.8%)	24 (16.3%)	0.9167
サイトメガロウイルス虹彩炎	23 (16.1%)	9 (6.1%)	^a 0.0068
サルコイドーシス	21 (14.7%)	46 (31.3%)	^a 0.0008
サイトメガロウイルス網膜炎	10 (7.0%)	5 (3.4%)	0.1674
帯状疱疹ウイルス虹彩炎	10 (7.0%)	4 (2.7%)	0.0897
	65 歳未満の 男性患者 (<i>n</i> = 270)	65 歳未満の 女性患者 (<i>n</i> = 269)	
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	
ベーチェット病	30 (11.1%)	32 (11.9%)	0.7752
原田病	25 (9.3%)	25 (9.3%)	0.9890
サイトメガロウイルス網膜炎	22 (8.1%)	8 (3.0%)	^a 0.0088
ポスナーシュロツスマン症候群	21 (7.8%)	13 (4.8%)	0.1597
眼内リンパ腫	19 (7.0%)	6 (2.2%)	^a 0.0080

a: p-value significant at $p < 0.01$

表 1-6 高齢者および非高齢者における女性に多い上位 5 疾患とその男性での頻度の比較

原因疾患	65 歳以上の 女性患者 (<i>n</i> = 147)	65 歳以上の 男性患者 (<i>n</i> = 143)	<i>p</i> 値
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	
サルコイドーシス	46 (31.3%)	21 (14.7%)	^a 0.0012
眼内リンパ腫	24 (16.3%)	24 (16.8%)	0.9167
原田病	10 (6.8%)	7 (4.9%)	0.4893
サイトメガロウイルス網膜炎	9 (6.1%)	10 (7.0%)	0.7645
HTLV-1 関連ぶどう膜炎	7 (4.8%)	3 (2.1%)	0.2139
	65 歳未満の 女性患者 (<i>n</i> = 269)	65 歳未満の 男性患者 (<i>n</i> = 270)	
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	
サルコイドーシス	35 (13.0%)	15 (5.6%)	^a 0.0029
ベーチェット病	32 (11.9%)	30 (11.1%)	0.7991
原田病	25 (9.3%)	25 (9.3%)	0.9890
若年性慢性虹彩毛様体炎	24 (8.9%)	7 (2.6%)	^a 0.0016
ポスナーシュロツスマン症候群	13 (4.8%)	21 (7.8%)	0.1597
HLA-B27 関連ぶどう膜炎	13 (4.8%)	14 (5.2%)	0.8512

a: p-value significant at $p < 0.01$

HTLV-1: human T-lymphotropic virus type 1 HLA: Human Leukocyte Antigen

1.4 考察

この研究では、65歳以上の患者（高齢者）と65歳未満の患者（非高齢者）でぶどう膜炎の原因を比較した。感染性ぶどう膜炎と仮面症候群は、いずれも非高齢者と比べて高齢者に著しく多いことがわかった。また、サルコイドーシス、眼内リンパ腫、CMV虹彩炎、CMV網膜炎は、高齢者の方が非高齢者に比べて高率にみられた。アジアでは、これまでにぶどう膜炎の病型別頻度の報告が多数報告されている^{24, 25, 30-32}。これらの研究と比較して、本研究の新規性は、高齢者のぶどう膜炎のパターンを非高齢者のものと比較することで、高齢者のぶどう膜炎の特徴を明らかにしたことである。また、本研究の特筆すべき強みは、登録された高齢者ぶどう膜炎患者の確定診断症数が290例と多かったことである。

今回の研究で、高齢者と非高齢者でのぶどう膜炎の病型別頻度の相違が明らかとなった。まず高齢者におけるサルコイドーシスの割合は、非高齢者に比べて約2.5倍高かった。先行研究では、サルコイドーシスは二峰性の年齢分布（20代と60代）で発症することが報告されている⁵⁶。日本人の高齢化に伴い、高

高齢者発症のサルコイドーシスの症例が増加したのではないかと推測される⁵⁷。

また高齢者患者群で観察された眼内リンパ腫の割合は、非高齢者患者群に比べて約 3.6 倍であった。これは、悪性リンパ腫が高齢者に多く見られるためと考えられる⁵⁸。さらに非高齢者患者群と比較して、高齢者患者群の CMV 虹彩炎および CMV 網膜炎の割合は、それぞれ約 2.0 倍および約 3.5 倍高かった。一般に、免疫力は加齢とともに低下する⁵⁹。CMV 網膜炎は免疫力の低下により発症するため⁶⁰、CMV 網膜炎の割合が高齢者では非高齢者よりもはるかに高い結果になったと考える。しかし CMV 網膜炎の原因のなった全身疾患⁶¹は、高齢者と非高齢者の間で大きな違いはなかった。

本邦で高齢者のぶどう膜炎の特徴を検討した先行研究として、2003 年から 2008 年にかけての福岡での研究が報告されている⁶²。この報告では、高齢者（60 歳以上）のぶどう膜炎の原因として、サルコイドーシス（15.8%）、Vogt-小柳-原田病（7.5%）、ヘルペス性虹彩炎（4.8%）が多かった⁶²。この研究と比較して、本研究では、高齢者における眼内リンパ腫および CMV 網膜炎の割合が著しく高かった。眼内リンパ腫⁶³や感染性ぶどう膜炎^{64,65}の診断法

が進歩したことが、これらの疾患の発見率を高めたのではないかと推測している。

性別によるぶどう膜炎の原因別頻度の検討では、既報の通り高齢者、非高齢者ともに男性において女性よりもサイトメガロウイルス虹彩炎に罹患しやすく、また高齢者、非高齢者ともに女性では男性よりもサルコイドーシスに罹患しやすかった^{66,67}。また非高齢者における眼内リンパ腫の割合は、男性の方が女性より約3倍高かったが、高齢者では男女ともほぼ同程度であった。これまでの研究では、すべての年齢層の検討で眼内リンパ腫の有病率に性差があり男性に多いとされていたが^{67,68}、本研究では、非高齢者においてのみ眼内リンパ腫の占める割合に性差があるという新たな知見が得られた。

この研究にはいくつかの限界がある。第1に、この研究はレトロスペクティブ研究であるため、選択バイアスがある。第2に、大学の専門外来のケースシリーズであるため、合併症のない症例は大学の専門外来に紹介されにくいなどの理由から、地域社会における症例の全体像を正確に反映していない可能性がある

る。第3に、本研究における年齢に関する情報は、ぶどう膜炎の発症年齢を必ずしも反映していないため、高齢者のぶどう膜炎の特徴を正確に反映していない可能性がある。最後に、この研究は単一の大学病院で行われたため、日本のぶどう膜炎患者全体を代表するものではない。これらの制約はあるものの、本研究は東京地区における1,424例と言う非常に多数のぶどう膜炎症例について検討したものであり、我々はこの結果が日本の高齢者ぶどう膜炎の臨床的特徴について重要な洞察を与えてくれるものと考えられる。

結論として、非高齢者と高齢者の間にぶどう膜炎の疾患別頻度に明確な違いがあることがわかった。ぶどう膜炎の疾患別頻度に関する情報は、眼科医がぶどう膜炎の病名診断を考える上で有用である。したがって、本研究の結果は、眼科医が高齢のぶどう膜炎患者を診察し、病名診断を下す際に役立つと思われる。

第2章 プロスタグランジン D2 のラット実験的自己免疫性ぶどう膜炎(EAU)

model への関与

2.1 緒言

ぶどう膜炎は虹彩、毛様体、脈絡膜により構成されるぶどう膜組織を主座とした眼炎症をきたす疾患の総称である。ぶどう膜炎の発生率は年間人口10万人あたり17～52人と推定されており、有病率は人口10万人あたり38～714人と推定されている⁶⁹⁻⁷³。ぶどう膜炎は、発展途上国における社会的失明の最大25%に関係していると考えられている⁷⁴。ぶどう膜炎の原因は大きく分けて感染性、非感染性、腫瘍性があり、それぞれ治療法がことなる。

感染性ぶどう膜炎は細菌やウイルス（HSV、VZV、CMV など）などの感染が原因であり、抗生剤や抗ウイルス薬を用いて治療する。一方、非感染性ぶどう膜炎は、関節リウマチ、強直性脊椎炎、若年性特発性関節炎などの全身性の病気と関連することがあり、血液検査やレントゲンなどの全身検査を行う必要がある。腫瘍性ぶどう膜炎は腫瘍の眼内浸潤により引き起こされる眼内炎症であり、眼内リンパ腫や白血病の眼内浸潤が原因となる。

眼球内の炎症が続くと、白内障や緑内障、黄斑浮腫などの合併症を引き起こし、視力障害の原因となるため、炎症の再発をできる限り抑制する必要がある。現在、ステロイド薬の点眼、内服やシクロスポリンなどの免疫抑制剤、インフリキシマブやアダリムマブなどの分子標的薬（TNF 阻害薬）があるが、それでも炎症の再発を抑制できない症例もあり、新たな炎症抑制剤の開発が必要である。

ぶどう膜炎の動物モデルには、実験的自己免疫性ぶどう膜炎（Experimental Autoimmune Uveitis: EAU）がある⁷⁵。EAU は網膜特異抗原をアジュバンドと混和・皮下注射して能動免疫することにより誘発される神経網膜および関連組織を標的とする、臓器特異的な T 細胞介在性自己免疫疾患である⁷⁶。EAU の病理像は、網膜抗原に対する免疫応答によると推定されるヒトにおける自己免疫性ぶどう膜炎疾患の病理像とよく似ている。EAU と同様の病態で、患者の末梢血中に網膜蛋白に応答する循環リンパ球を高頻度に認める疾患の例は、交感性眼炎、バードショット網膜脈絡膜症、ベーチェット病などである^{77,78}。

一方、炎症や免疫に関与する白血球などの細胞に刺激が加わると、細胞膜や核膜の構成脂質に活性化ホスホリパーゼ A2（phospholipase A2 :PLA2）が作用して

様々な不飽和脂肪酸が産生される。その一つのアラキドン酸は、さらに酵素的に代謝され、プロスタグランジン(PG)とロイコトリエン (LT) に代表される様々な生理活性脂質 (エイコサノイド) に変換される。このうち、プロスタグランジン D₂ (PGD₂) はまずアラキドン酸がシクロオキシゲナーゼによって PGH₂に変換され、さらに PGD₂ 合成酵素によって PGD₂ が産生される⁷⁹。

PGD₂ の合成酵素 (prostaglandin (PG) D synthase: PGDS) には主にリポカリン型 (L 型, LPGDS) と造血器型 (H 型, HPGDS) の 2 種類がある。LPGDS は中枢神経系、雄性生殖器、心臓循環器系に分布し、睡眠調節に関わっている。ラットの虹彩、毛様体、眼内液中に発現しているとの報告もある²⁰。

PGD₂ の受容体にも 2 種類あり、DP1 受容体と chemoattractant receptor homologous molecule expressed on Th2 cells (CRTH2、DP2)受容体がある¹⁸。

DP1 受容体は G_s-共役型で cAMP が上昇し、血小板の凝集抑制や血管平滑筋の筋弛緩、脳の睡眠に関与している。DP2 (CRTH2) 受容体は Gi/q-共役型で、cAMP の低下、Ca²⁺の上昇し、Th2 リンパ球、好酸球、好塩基球の走化性に関与している。

眼における PGD₂ の報告としては、PGD₂ をウサギ眼に 50μg 点眼すると 30

分以内に眼圧を低下させる¹⁹、ラットでは DP 受容体 (DP1) の mRNA が軟膜、視細胞、虹彩上皮、毛様体突起に優性に発現している²⁰といった報告があり、PGD2 は眼への様々な影響を与えることが予想される。

今回、EAU モデルを用いて、眼炎症における PGD2 の関与、PGD2 の合成酵素阻害薬の関与について検討した。

2.2 方法

2.2.1 実験動物

実験には 6 週齢の雌性 Lewis ラット (日本 SLC 株式会社) を使用した。室温 23 ± 3 °C、湿度 30~70%、12 時間ごとの明暗サイクルによる人工照明の環境下で、固形飼料および水道水を自由摂取させた状態で飼育した。すべての動物実験は東京大学の規定に準拠して実施した (承認番号: 医-P19-059)。

2.2.2 炎症の惹起

day0 に光受容体間レチノイド結合タンパク質 (interphotoreceptor retinoid

binding protein : IRBP, Eurogentec, Belgium, #AS-64549) の合成ペプチドであるペプチド(R16) 50 μ g/匹と complete Freund adjuvant (富士フイルム和光純薬, 大阪, #014-09541) 50 μ l/匹を混和し、後頸部に皮下注射した。また、眼内炎症の惹起を促進するために、百日咳毒素(pertussis toxin: PTX, #179A; List Biologicals, Campbell, CA, USA) 1 μ g/匹を day0 と day7 に腹腔内投与した。

2.2.3 炎症の評価

下記の EAU スコア⁸⁰ で眼内炎症を 0～4 の 5 段階で評価した(図 2-1)。

0 : 炎症所見なし

1 : 瞳孔血管の拡張あり

2 : フィブリンの小塊がある

3 : フィブリンが瞳孔領の半周近くあるが全周ではない

4 : フィブリンが瞳孔領の全周にある、又は前房出血を認める

ラットの臨床的EAUスコア

- 0：炎症所見なし
- 1：瞳孔血管の拡張あり
- 2：フィブリン（↓）の小塊がある
- 3：フィブリンが瞳孔縁の半周近くあるが全周ではない
- 4：フィブリンが瞳孔縁の全周にある、又は前房出血を認める

ラットEAUの前眼部観察像

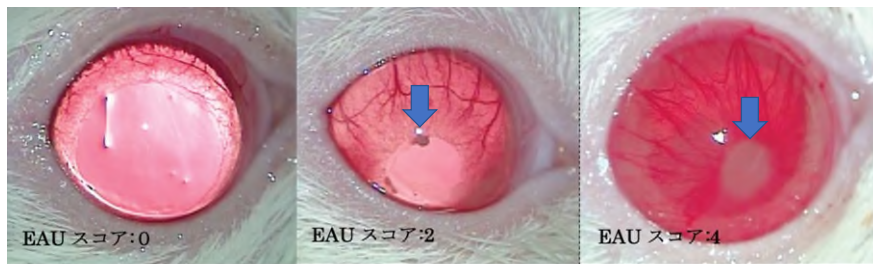


図 2-1 ラットの臨床的 EAU スコアの基準とその前眼部写真

EAU : Experimental Autoimmune Uveitis

2.2.4 薬物の投与

HPGDS 阻害薬 (HQL-79、Cayman Chemical, #10134) 0.2mg/day、LPGDS

阻害薬(AT-56, Cayman Chemical, # 162640-98-4) 0.2mg/day、Control (メチル

セルロース, ナカライテスク, 京都, #07326-95) をそれぞれ Day7 より連日皮下

注射した。溶媒として 0.5%メチルセルロース溶液を用いた。HQL-79、AT-56

は、それぞれ強力で選択的な経口 HPGDS、LPGDS 阻害剤で、PGD2 の合成を高度に選択的に阻害する。

2.2.5 尿中 PGDM、PGEM の測定

眼内の PGD2 を直接測定することは眼球摘出の操作で PGD2 が産生されてしまう可能性があり、血中で PGDM、PGEM を測定したという報告は文献を渉猟したかぎりではなかった。また尿中 tetranor-PGDM が PGD2 の産生を反映しており⁸¹、尿中 tetranor-PGDM が Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)の患者で上昇している報告⁸²や食物アレルギー患者の症状の重症度と比例するという報告⁸³があるため、尿中の PGDM,PGEM を測定することとした。

全身における PGD2 の産生を検討するために、尿中の PGD2 代謝物

(Prostaglandin D Metabolite : PGDM) として tetranor-PGDM、PGE 代謝物(Prostaglandin E Metabolite : PGEM) として tetranor-PGEM を測定した。

炎症の惹起の処置日を Day0 とし、Day6~7, Day7~8, Day11~12, Day12~13

の 4 回に分けて 1 ケージあたり 1 匹の Lewis ラットを飼育し、50ml の紙チップ

をした。毎日紙チップを回収し、ケージを 30ml 脱イオン蒸留水で洗浄

してその洗浄液も回収した。つまり、1日に排泄された尿を30mlの脱イオン蒸留水と50mlの紙チップに容量を統一して回収した。

回収した紙チップと蒸留水をもちいて、液体クロマトグラフィー (LC-MS/MS) を用いて PG 代謝産物 (PGDM、PGEM) を既報⁸²のように定量した。d6-tetranor-PGDM と d6-tetranor-PGEM (Cayman Chemical) を内部標準として追加した。定量は神戸薬科大学 竹内敦子先生に依頼して行った。

2.2.6 統計解析

数値は平均値±標準誤差で示した。グループ間の連続変数の比較は、Student's unpaired t-test を用いて行った。統計ソフト R (R version 3.5.1; The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を用いて行った。p 値が 0.05 より小さい場合は有意とした。

2.3 結果

2.3.1 EAU スコアの自然経過の検討

Day 0 に免疫後、EAU は Day9 ごろより発症し始め、Day11~14 にかけて

EAU スコアはピークになり、その後自然消退していった (図 2-2)。

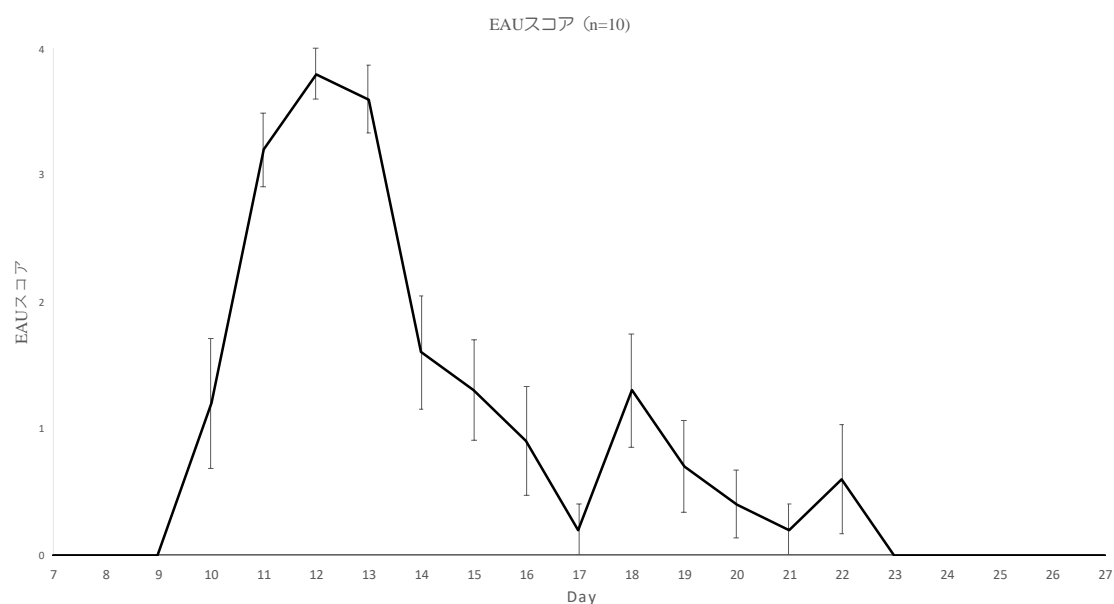


図 2-2 EAU スコアの自然経過

2.3.2 HPGDS, LPGDS 阻害薬投与による EAU スコアの変化

6 週雌齢 Lewis rat に HPGDS 阻害薬 (HQL-79) 0.2mg/day、LPGDS 阻害薬 (AT-56) 0.2mg/day、メチルセルロース (Control) をそれぞれ Day7 より連日皮下注射した。Day15 以降の EAU スコアが対照群にくらべて有意に低下してい

た ($p < 0.05$, one-way ANOVA, Tukey-Kramer, 図 2-3)

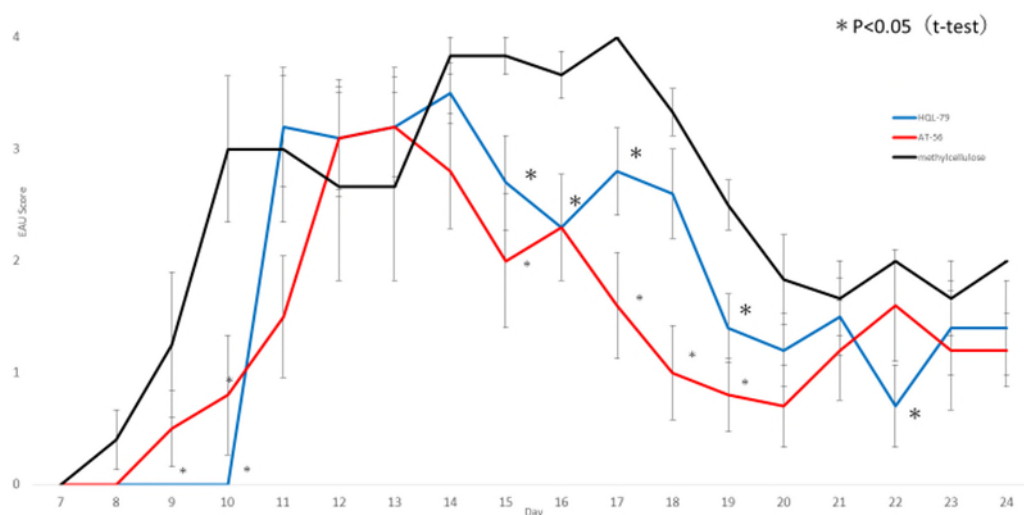


図 2-3 HPGDS, LPGDS 阻害薬投与による EAU スコア

HPGDS: hematopoietic prostaglandin D synthase

LPGDS: lipocalin-type prostaglandin D synthase

2.3.3 眼炎症時の尿中 PGDM、PGEM 濃度の測定

A: ペプチド R16 (+)、PTX (day0+, day7+)

B: ペプチド R16 (-)、PTX (day0+, day7+)

C: ペプチド R16 (+)、PTX (day0+, day7-)

各群 7 匹ずつ

Day6~7, Day7~8, Day11~12, Day12~13 の 4 回に分けて、紙チップを回収し、ケージ内を 50ml の蒸留水で洗浄し、洗浄液も回収した。尿中 PGDM, PGEM(PGD2、PGE の代謝物) 濃度を測定した。ペプチド R16 を投与しなかった B 群では、眼炎症はおこらず、A, C 群は眼内炎症が同時期におきた(図 2-4a)。眼炎症が起きなかった B 群では尿中 PGDM の上昇がみられなかった。A、C 群では、眼炎症がない時期 (Day 6~7) に比べ眼炎症時(Day12~13)には尿中 PGDM は上昇していた。尿中 PGEM は経過中有意な変化はみられなかった(図 2-4b、c)。

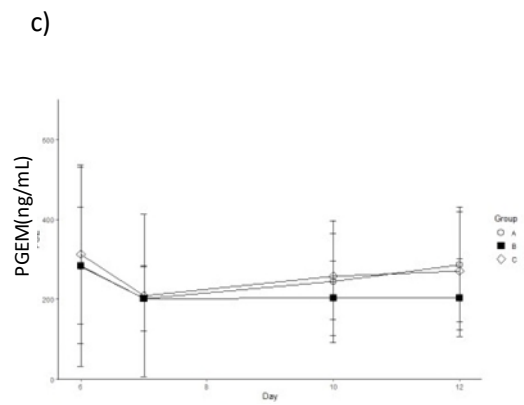
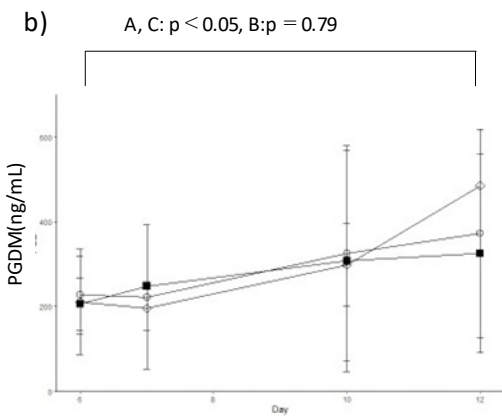
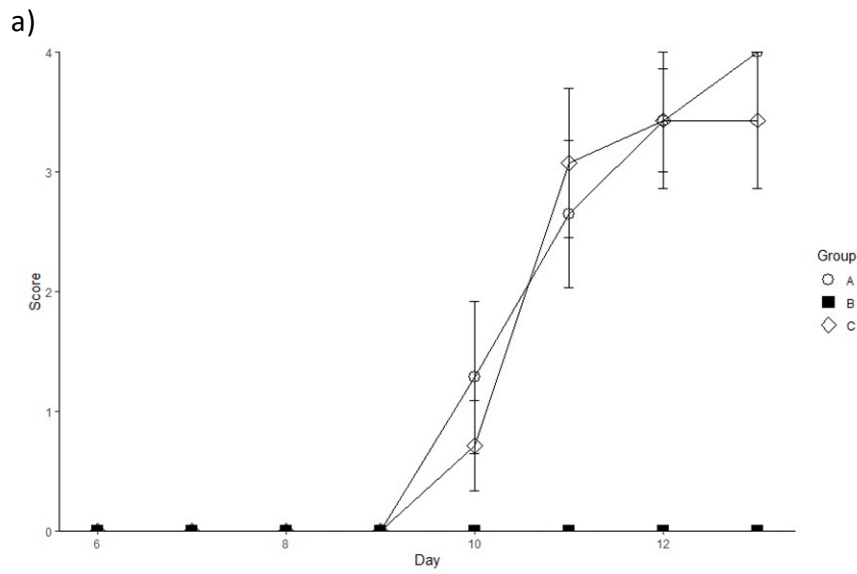


図 2-4 EAU スコアの推移と尿中 PGDM、PGEM 濃度の推移

PGDM: Prostaglandin D Metabolite PGEM: Prostaglandin E Metabolite

2.4 考察

今回のラットのEAUモデルでは、眼内炎症が起きた際に尿中PGDMが上昇していた。この結果は、全身でPGD2産生が眼炎症時に上昇したことを示唆している。ただ洗浄液（蒸留水）中にアルブミンを追加し、尿中PGDMの溶解を促進すべきだった。尿中tetranor-PGDMの濃度が、Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)の患者で上昇している報告⁸²や食物アレルギー患者の症状の重症度と比例するという報告⁸³があり、尿中代謝物を測定することで、非侵襲的に経時的にPGD2の産生を測定した。

一方、HPGDS, LPGDS阻害薬投与により眼内炎症が発症後期において抑制される傾向がみられたが、炎症のピーク時にはEAUスコアを低下させることはできなかった。これはPGD2以外にも様々な炎症機序がEAUの発症に関与するためであると予想される。例えば、ロイコトリエンB4 (LTB4)の阻害は、EAUによる網膜の構造的損傷を防ぐとともに、エフェクターTヘルパー17細胞および炎症性マクロファージを著しく減少させ、EAUの治療に有用である⁸⁴。また、2.3.1での既報通りの単相性ピークを持つEAUの自然経過と異なり、2.3.2では後半にも炎症のピークがあった理由としては、個体差やメチルセ

ルロース溶液の影響も考えられる。

今回の検討では、眼炎症の評価が EAU スコアのみであり、眼内の炎症性サイトカインの測定や病理学的 EAU スコアなどの複数の評価項目を設定すべきであった。

PGD2 は炎症に対して、促進的な役割を果たす報告^{85,86}と抑制的な役割⁸⁷を果たす報告があるが、今回の検討からは眼内炎症に関しては促進的な役割を果たしているようであったが、今回の実験では評価項目の不足や阻害薬を投与した場合の PGDM や眼内 PGD2 の評価をしておらず、不十分であった。これまでにラットぶどう膜炎モデルを PGD2 を阻害することで抑制できるという報告はない。今回、新たにぶどう膜炎には PGD2 が関与しており、眼炎症が強くなるにつれ、PGD2 の産生が上昇していること、PGD2 合成酵素阻害薬で眼炎症が発症後期において軽減するが分かった。

PGD2 の合成酵素阻害薬は遷延するぶどう膜炎に対して新たな治療のターゲットとなりうると考える。実際に、裏出らが創製した HPGDS 阻害薬(TAS-205)は Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)の治療薬として、DMD 患者での第 I 相臨床試験を経て TAS-05 の有効性を探索的に検証する前期第 II 相試験が

2016年5月に開始された⁸⁸。今後、PGD2合成酵素阻害薬の他、受容体拮抗薬によるぶどう膜炎抑制効果についてもさらなる検討が必要である。

第3章 マウスレーザー誘起脈絡膜血管新生(Laser induced CNV)model への

DP2 の関与

3.1 緒言

網膜炎症性疾患である加齢黄斑変性 (AMD) は、現在世界中で視覚障害の主要な原因となっている。AMD は新生血管性 AMD (nAMD) と萎縮型 AMD に分けられる⁷。nAMD は、脈絡膜から網膜下腔への血管の増殖である脈絡膜新生血管 (CNV) を伴う。CNV は、炎症と血管新生のプロセスが組み合わさることで発症する^{89,90}。

抗 VEGF 薬の硝子体注射は、nAMD の第一選択の治療法として用いられている^{91,92}。しかし、抗 VEGF 薬は高価であり、また硝子体注射が必要であるため、患者さんの経済的・身体的負担が大きいのが現状である。また、抗 VEGF 療法の反応が乏しい症例もしばしば経験され、問題となっている^{93,94}

そのため、抗 VEGF 薬以外の新たな治療ターゲットを開発することが求められている。

シクロオキシゲナーゼ (COX) は、プロスタグランジン・エンドペルオキシド

シンターゼ (PTGS) とも呼ばれ、アラキドン酸からトロンボキサンやプロスタグランジンを生成する酵素である。COX には COX-1 と COX-2 の 2 つのアイソザイムがあることが知られており、炎症時には COX-2 を介して PGE2 や PGI2 等の産生が亢進し、炎症性免疫反応に関与することが知られている。

眼における COX に関する研究として、COX2 が網膜色素上皮 (RPE) 細胞に発現し、VEGF7-9 の発現を調節することで CNV 形成と関連することが報告されている⁹⁵⁻⁹⁷。さらに、マウス CNV モデルでは、Cox2 アンタゴニストがマクロファージの浸潤や RPE-脈絡膜複合体における VEGF のダウンレギュレーションを抑制することが報告されている⁹⁸。しかし、CNV 形成においてどのようなプロスタグランジンが VEGF 産生に関与しているのかは、未だ不明な点が多い。

PGD2 は COX 代謝産物の一つで、睡眠を促進したり、炎症反応を媒介することが報告されている。S Virtue らは、HPGDS が産生する PGD2 がマクロファージを M2、抗炎症状態に偏向させることを報告している⁹⁹。HPGDS は、マクロファージで主に発現していることが報告されている⁹⁹。RAW264.7 マクロファージにおいて、シクロオキシゲナーゼ (COX) -2 阻害剤である

CAY10404[3-(4-methylsulphonylphenyl)-4-phenyl-5-trifluoromethylisoxazole]

は、LPS を介したマクロファージの遊走を 4 時間後（初期）には完全に阻害したが、8 時間後（後期）には部分的にしか阻害しなかったことから、PG 依存性および非依存性の経路が存在することが示唆された¹⁰⁰。

PGD2 受容体には、DP 1 受容体と DP2（CRTH2 とも呼ばれる）が知られている。CRTH2 はヒト Th 1 細胞と Th 2 細胞の発現遺伝子比較により、Th 2 細胞選択的に発現しているケモアトラクタント様受容体としてクローニングされ、Chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th 2 cells を略して名付けられた¹⁰¹。CRTH2 は、Th 2 細胞以外に、好酸球、好塩基球といった炎症性の細胞にも発現している。PGD2 は CRTH2 受容体を介して炎症細胞のランダムな移動（ケモキネシス）を刺激し、炎症細胞の遊走に関与することが知られている。CRTH2 欠損マウスおよび HPGDS 欠損マウスの腹膜マクロファージでは、LPS 刺激による遊走が遊走初期または後期のいずれかの段階において有意に抑制された¹⁰⁰。しかし、CNV 形成における DP2（CRTH2）の関与は未だ検討されていない。

本研究では、PGD2 の受容体の一つである DP2 に着目した。DP2 アンタゴニ

ストを用いて、レーザー照射により誘発されるマウス CNV モデルへの影響を調べた。

3.2 方法

3.2.1 CNV の誘導

CNV の誘導は、既報に従い下記のように行った¹⁰²。すべての動物実験は東京大学の規定に準拠して実施した（承認番号：医-P18-079）。マウスは、ケタミン（80mg/kg、第一三共プロファーマ株式会社、東京、日本）とキシラジン（16mg/kg、Bayer, Leverkusen, Germany）の混合物を滅菌生理食塩水で腹腔内注射することで麻酔をかけた。瞳孔は5%-フェニレフリンおよび0.5%-トロピカミド点眼液（参天製薬、大阪、日本）で散瞳させた。コンタクトレンズにはカバースリップを使用した。レーザー光凝固は、ダイオードレーザー（DC-3300、日本電産株式会社、愛知県）を用いて、スポットサイズ 50 μ m、照射時間 50msec、出力 150mW で行った。レーザースポットは視神経から 2~3 乳頭分離れた位置に配置した。CNV のサイズ、マクロファージ、免疫組織化学の評価では、1 眼あたり 4~8 個のレーザースポットを作成した。一方、眼内液中

のサイトカイン濃度の検討では、1眼あたり12個のレーザースポットを作成した。

3.2.2 CNV サイズの測定

CNV サイズの測定は CNV の誘導後 7 日目に腹腔内麻酔後、右心房切開し、10 倍希釈 Concanavalin A, Alexa Fluor™ 488 Conjugate 1ml で灌流し、眼球摘出した。10%パラホルムアルデヒドで 15 分固定後、flat mount にして BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japan) で観察した。面積は ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて測定した。レーザースポットの大きさが平均 CNV サイズの 5 倍以上の場合、または平均 CNV サイズの 5 分の 1 以下の場合はそのレーザースポットは除外した¹⁰³

3.2.3 免疫染色

レーザー光凝固の 3 日後または 7 日後に、眼球を摘出し、OCT コンパウンド (OCT, Sakura, Kobe, Japan) に包埋し、液体窒素で凍結した。横方向に

10 μ m の切片を切り、ガラススライドに集め、4%パラホルムアルデヒドで 20 分間固定した。Blocking One Histo (#06349-64) でブロッキングした後、これらの切片を、1:100 のラット抗マウス F4/80 抗体 (1:100 希釈、MCA497、Bio-Rad) およびウサギ抗マウス DP2 抗体 (1:50 希釈、ab235830、abcam) のいずれかの一次抗体と一晩 4°C でインキュベートした。続いて、ヤギ抗ラット IgG (H+L) 二次抗体、Alexa Fluor 594 コンジュゲート (1:250, Invitrogen, Carlsbad, CA, Product # A-11007) およびヤギ抗ウサギ IgG (H+L) 高交差吸着二次抗体、Alexa Fluor 488 (1: 250, Invitrogen, Carlsbad, CA, Product # ab150077) をそれぞれ使用し室温 2 時間インキュベートした後、洗浄し、BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japan) で観察した。

3.2.4 酵素結合免疫吸着法(ELISA)

レーザー照射 3 日後にマウスを安楽死させ、プロテアーゼインヒビターカクテルを含む 500 μ l の RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) で眼球全体をホモジナイズした後、遠心分離 (5000g、5 分) し、上清を測定に用いた。

VEGF、MCP-1 の発現を評価するために、Quantikine® Mouse Immunoassay Kit (R&D Systems MMV00, MJE00B) をメーカーの指示に従って使用した。

各濃度は、マイクロプレートリーダー (2030 ARVO X3, Perkin Elmer Japan, Kanagawa, Japan) を用いて、溶液の色の濃さを測定した。濃度は、既知の濃度を用いた標準曲線を比較して算出した。結果は pg/mg protein で表した。

3.2.5 CNV へのマクロファージ遊走の測定

CNV 形成に重要な役割を果たしていると考えられるマクロファージに対する DP2 欠損および DP2 拮抗薬の影響を調べるために、野生型および DP2 欠損マウスを用いて、既報^{104, 105} を一部改変して CNV へのマクロファージの遊走を測定した。雄の成体 (8 週齢) の野生型マウスおよび DP2 欠損マウスの眼にスポットサイズ 50 μ m, 照射時間 50 msec, 出力 150 mW で 4~8 発のレーザー光凝固を行った。レーザー光凝固の 3 日後にすべてのマウスを頸椎脱臼で安楽死し、眼球を摘出して、4%パラホルムアルデヒドで 15 分固定し、RPE-脈絡膜-強膜複合体のフラットマウントを作成した。Blocking One Histo(#06349-64)でブロッキングした後、これらの RPE-脈絡膜-強膜複合体フラットマウントを作

成し、前記の手順で免疫染色を行った。各レーザー光凝固部位の F4/80 陽性細胞を ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて計測した。

3.2.6 DP2 拮抗薬投与

DP2 特異的阻害剤 OC000459(Cayman Chemical, #12027)および Cay10471(Cayman Chemical, #10006735)を 1:100 DMSO in PBS に溶解し、2mg/mL または 0.2mg/mL とした。

Alzet[®]ポンプに OC000459 と Cay10471 の溶液と溶媒 (PBS に 1:100 の DMSO) を注入し、レーザー照射の 1 日前に背中 of 皮下に移植した。Alzet[®]ポンプは、OC000459、Cay10471 または溶媒を 7 日間にわたり 0.5 μ l/hr で徐々に放出した。OC000459(2mg/mL), Cay10471(0.2mg/mL)の 1 日あたりの薬剤投与量は、それぞれ 1.2mg/kg/day, 0.12mg/kg/day であった。

3.2.7 Ex Vivo Choroid Sprouting Assay

脈絡膜新生血管形成における DP2 の影響を検討する目的で、Ex Vivo Choroid

Sprouting Assay を行った。48well plate の底に野生型または DP2 欠損マウスの Basal membrane extract(BME) Matrigel をおき、1x1mm 大にした RPE/choroid/sclera complex を Basal membrane extract(BME) matrigel の中に置いた。30 分以上 37°C でインキュベートし、BME matrigel を重合させた。ペニシリン/ストレプトマイシン(10000 U/mL)入りの Complete classic medium with serum and Culture Boost (Cell systems, #4Z0-500)培地を加え、5% CO₂/95% 空気中 37°C で培養し、6 日後に脈絡膜萌芽領域の面積を Image J で測定した。野生型マウスの培地には CAY10471 100 μ M, CAY10471 10 μ M, 溶媒をそれぞれ加えた。

3.2.8 RT-PCR 法を用いた ARPE-19、HUVEC 細胞における DP2 受容体の発現検討

ARPE-19、HUVEC 細胞における DP2 受容体の発現を定性的 RT-PCR で検討した。ARPE-19、HUVEC 細胞から TRI Reagent(Cosmo Bio, Carlsbad, CA, USA, #TR118)を用いて total RNA の抽出を行った。cDNA は random hexamer プライマーと逆転写酵素として ReverTra Ace qPCR RT Master Mix

with gDNA Remover (Toyobo Co., Ltd, Osaka, Japan)を用いて合成した。合成された cDNA を Takara Ex Taq (Takara Bio) と各種プライマー(表 3-1)を用いて Thermal Cycler Dice Real System II TP900 (Takara Bio Inc.)で、以下の反応条件で増幅した。

- ① 95 °C、1 分間を 1 サイクル
- ② 98 °C、30 秒間、60 °C、30 秒間、72 °C、30 秒間を 35 サイクル
- ③ 72 °C、5 分間を 1 サイクル

その後、2 %アガロースゲルで 20 分電気泳動し、それぞれの発現を検討した。

表 3-1 DP2、GAPDH のプライマー配列

Gene	Forward (5' -3')	backward (3' -5')	size
DP2	TGGACACGTGGTGCAT TTTG	TGCATACAGGCACAATCC TAGG	124
GAPDH	AATTCCATGGCACCGT CAAG	ATCGCCCCACTTGATTTT GG	104

3.2.9 HUVEC 細胞の tube formation assay

DP2 阻害薬の血管内皮細胞の分化・増殖能への影響を検討する目的で、HUVEC 細胞の tube formation assay を行った。前述のごとく 50 μ l BME matrigel を 96well plate に 37°C で 30 分以上インキュベーションし、重合させた。BME を底に重合させた 96well plate に HUVEC(p2) を 2×10^4 cell/50 μ l PBS/ well ずつ入れ、EGM 培地に培地で希釈した Vehicle(DMSO)、CAY10471 1 μ M, CAY10471 10 μ M, CAY10471 100 μ M を 50 μ l/well ずつ投与した。

5%CO₂/95%空気中、37°C で培養し、18 時間後に分岐点の数を計測した。

3.2.10 ARPE-19 細胞の培地上清の ELISA による VEGF、MCP-1 濃度測定

ARPE-19 細胞の DP2 刺激による VEGF、MCP-1 産生を *in vitro* で検討した。

ARPE-19 細胞は、10%牛胎児血清 (FBS ; Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) と 1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (Gibco ; Thermo Fisher Scientific, Inc.) を添加した DMEM/F-12 (DMEM ; Sigma-

Aldrich, St.Louis, MO, USA) を用いて、5%CO₂/95%空气中、37°Cで培養した。培養液は48時間ごとに交換した。実験では、6ウェルプレート (Nunc, NY, USA) に、2mlの血清含有培地で100,000細胞/ウェルの密度で細胞をプレーティングし、5日間培養した。コンフルエントな細胞培養物をPBSで洗浄後、無血清DMEM/F-12培地に交換した。さらに、DP2 antagonistであるCAY10471(Cayman Chemical, #10006735)15μMまたは溶媒のみ(コントロール)を投与した。2時間のインキュベーション後にDP2 agonistである15(R)-15-methyl Prostaglandin D₂(Cayman Chemical, #12720) 15μMを投与した。22時間インキュベーション後、ELISAのために培地を回収した。VEGFとMCP-1の濃度は、ELISAキット(R&D Systems, DVE00, DCP00)を用いて、メーカーの指示に従って測定した。

3.2.11 統計解析

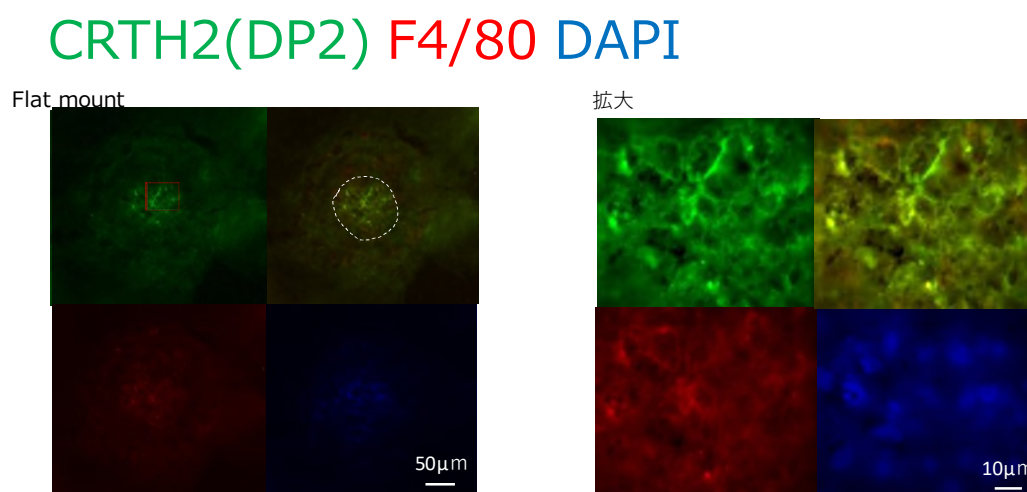
数値は平均値±標準誤差で示した。グループ間の連続変数の比較は、Student's unpaired t-testを用いて行った。統計ソフトR(R version 3.5.1; The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)を用いて行った。p値

が 0.05 より小さい場合は有意とした。

3.3 結果

3.3.1 レーザー照射部位の免疫染色

レーザー後 3 日目の目の凍結切片(a)と flat mount(b)を DP2(緑)と F4/80 抗体(赤)でレーザー凝固部位を免疫染色したところ、両者が共染している部位が見られた。DP2 を発現しているマクロファージを確認した (図 3-1)。



CRTH2(DP2) F4/80 DAPI

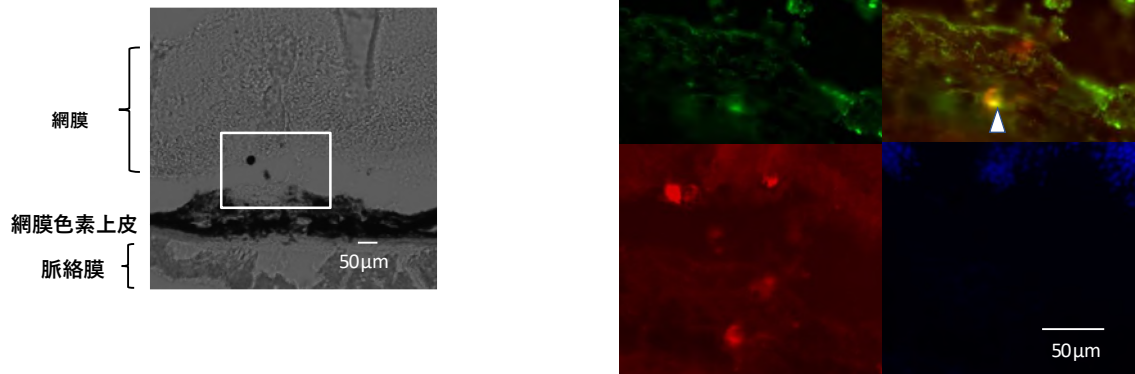


図 3-1 レーザー照射部位の免疫染色

赤線、白線四角部位を拡大したものを右図に示した。

点線円：レーザー凝固部位 矢頭：DP2 陽性マクロファージ

3.3.2 高週齢マウスにおける CNV サイズの測定

高週齢（56～62 週齢）の HLPGDSKO (HPGDS と LPGDS 両方をノックアウトし

たもの)マウス、DP1KO マウス、DP2KO マウス、WT マウスにおける CNV サイ

ズの測定を行った。マウスの CNV サイズは、DP2KO マウス (n=32 スポッ

ト、 $27615.3 \pm 4981.5 \mu\text{m}^2$) において、WT マウス (26 スポット、

$69557.3 \pm 8803.8 \mu\text{m}^2$) と比較して有意に小さかった ($p < 0.01$, Student's

unpaired t-test, 図 3-2)。

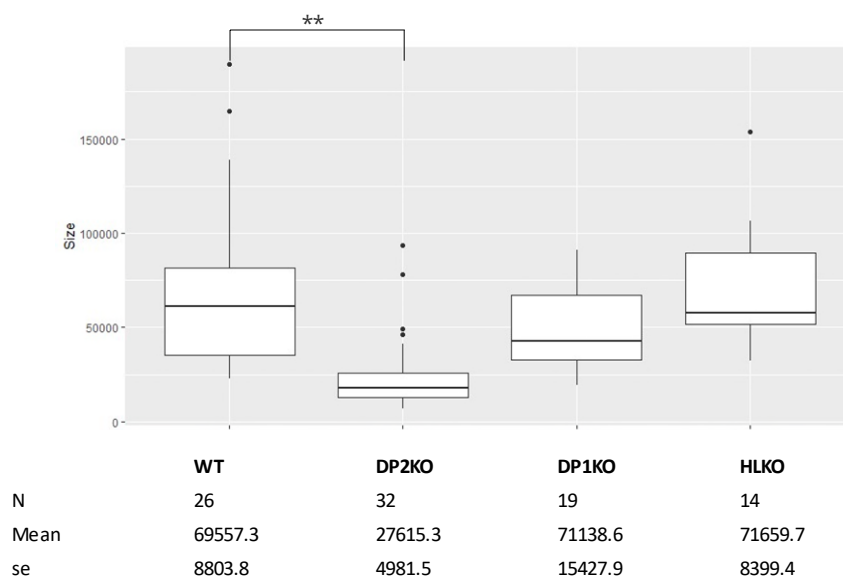


図 3-2 高週齢マウスにおける CNV サイズ

(** $p < 0.01$, one-way ANOVA, Tukey-Kramer)

CNV: choroidal neovascularization

3.3.3 8 週齢、56 週齢の WT、DP2KO マウスにおける CNV サイズの測定

8 週齢マウスの CNV サイズは、DP2KO グループ (n=83 スポット、

$20534.7 \pm 1621.0 \mu\text{m}^2$) の方が、WT グループ (74 スポット、

$29275.3 \pm 2870.9 \mu\text{m}^2$) よりも有意に小さかった (図 3-3a)。

56 週齢マウスの CNV サイズは、DP2KO グループ (32 スポット、

27615.3±4981.5μm²)の方が、WTグループ(26スポット、

69557.3±8803.8μm²)よりも有意に小さかった(図3-3b)。

8週齢のマウス、56週齢のマウスいずれにおいても、WTとDP2KOの間には

有意な差があった(それぞれ**p<0.01,***p<0.001, Student's unpaired t-test,

図3-3a,b)。

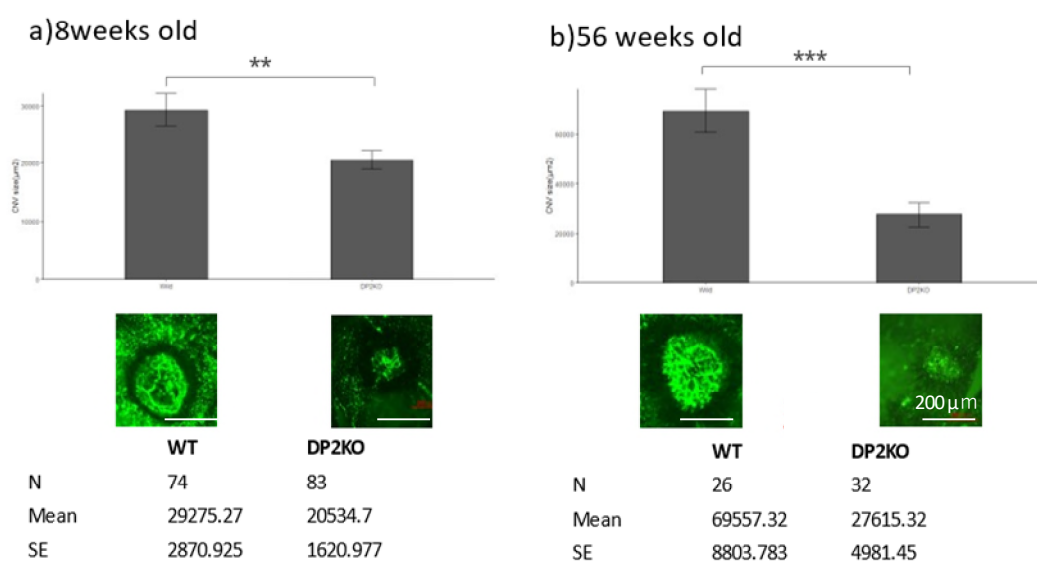


図3-3 8週齢と56週齢のWT、DP2KOマウスにおけるCNVサイズ

(**p<0.01、***p<0.001) スケールバー: 200μm

3.3.4 2 種類の DP2 拮抗薬(CAY10471 と OC000459)の CNV サイズへの影響

2 種類の DP2 拮抗薬(CAY10471 と OC000459)投与下での CNV サイズの測定を行った。CAY10471(2mg/L)、OC000459(2mg/mL)、Vehicle をレーザー照射の前日から 7 日間、アルゼットポンプを用いて皮下投与した。CAY10471 投与群と OC000459 投与群の CNV サイズは、溶媒投与群 (コントロール) に比べて有意に小さかった (49spots, $20973.7 \pm 2870.9 \mu\text{m}^2$, * $p < 0.05$, 79spots $19398.4 \pm 1518.9 \mu\text{m}^2$, ** $p < 0.01$, 74spots, $29275.3 \pm 2277.0 \mu\text{m}^2$, それぞれ Student's unpaired t-test, 図 3-4)。

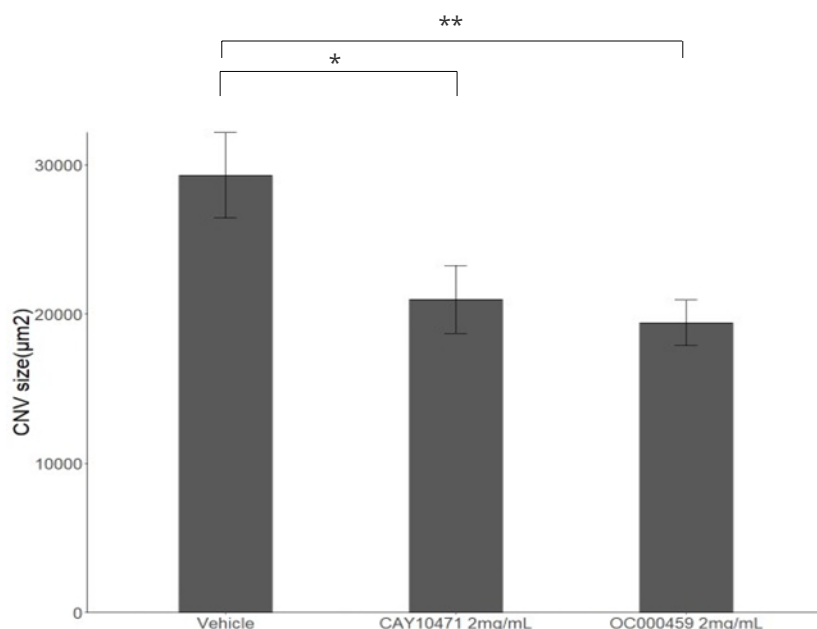


図 3-4 DP2 拮抗薬の CNV サイズへの影響

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, one-way ANOVA, Tukey-Kramer)

3.3.5 希釈した DP2 拮抗薬の CNV サイズへの影響

DP2 拮抗薬(OC000459) 2 mg/mL, 0.2mg/mL 投与下での CNV サイズの測定

を行った。OC000459 (0.2mg/mL) 投与群の CNV サイズは

24854.1 ± 4047.3 μm² (n=44) であった。OC000459 (0.2mg/mL) 投与群と溶媒投

与群の CNV サイズには、有意な差はなかった (p = 0.36, one-way ANOVA,

Tukey-Kramer)。OC000459 の投与量を減量すると、容量依存的に CNV 縮

小効果が低下した (図 3-4)。

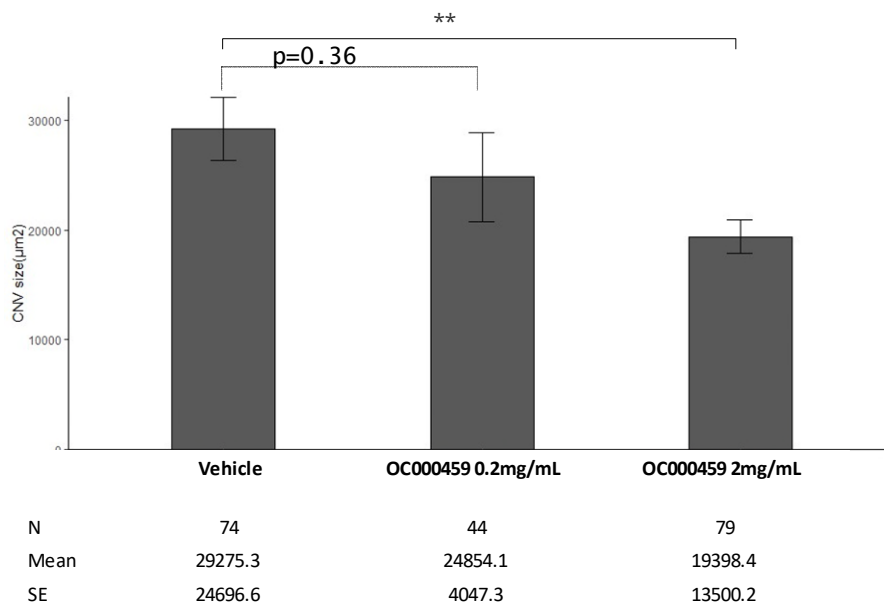


図 3-5 OC000459 希釈による CNV サイズへの影響

(p = 0.36, **p < 0.01 one-way ANOVA, Tukey-Kramer)

3.3.6 マクロファージ浸潤アッセイ

WT マウスおよび DP2KO マウスの PC 後 3 日目のレーザースポット部位に浸潤したマクロファージの数 (cells/spot) を測定した。レーザースポット部位に浸潤したマクロファージの数 (cells/spot) は、DP2KO マウスでは野生型マウスに比べて有意に少なかった ($n=76, 24.2 \pm 0.83$ vs. $n=93, 41.1 \pm 1.6$ counts/photocoagulation site, $***p < 0.001$, Student's t-test, 図 3-6)。

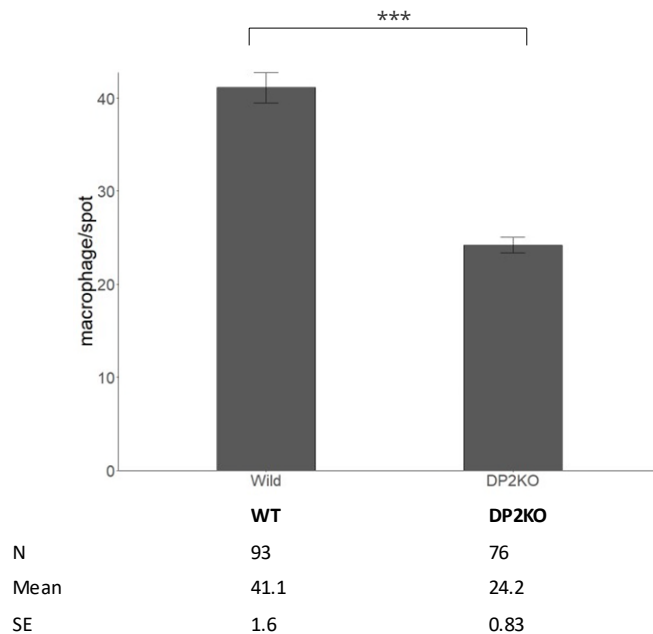


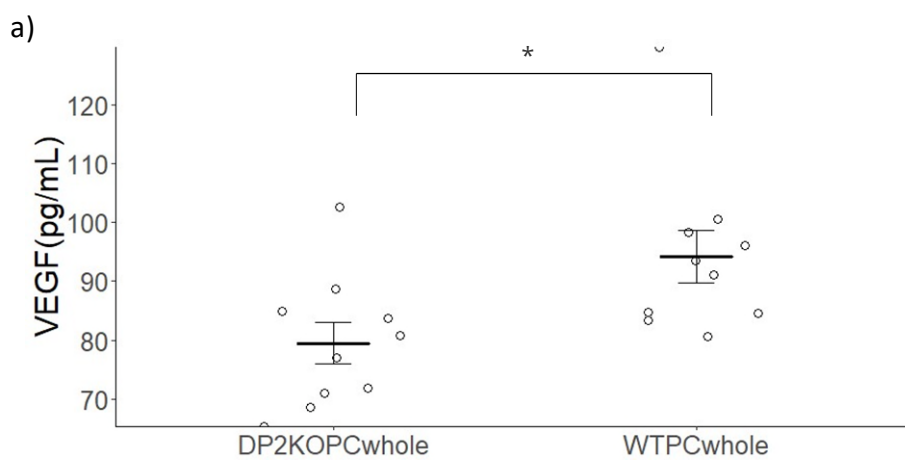
図 3-6, レーザースポットへのマクロファージ浸潤

($***p < 0.001$, Student's t-test)

3.3.7 レーザー後 3 日目の眼内の VEGF, MCP-1 濃度

WTマウスと DP2KO マウスについて、レーザー照射 3 日後に前記の方法で眼球全体をホモジナイズし、眼内の VEGF、MCP-1 濃度を ELISA で測定した。

DP2KO マウスの VEGF 濃度は WT マウスと比べ有意に低値であった (n=10, 79.5 ± 3.5 pg/mg vs. n=10, 94.2 ± 4.5 pg/mg, *p<0.05, Student's unpaired t-test、図 3-7a) 。一方、MCP-1 濃度には有意な差は見られなかった (n=10, 36.6 ± 10.1 pg/mg vs. n=10, 27.1 ± 7.0 pg/mg, p=0.45, Student's unpaired t-test、図 3-7b) 。



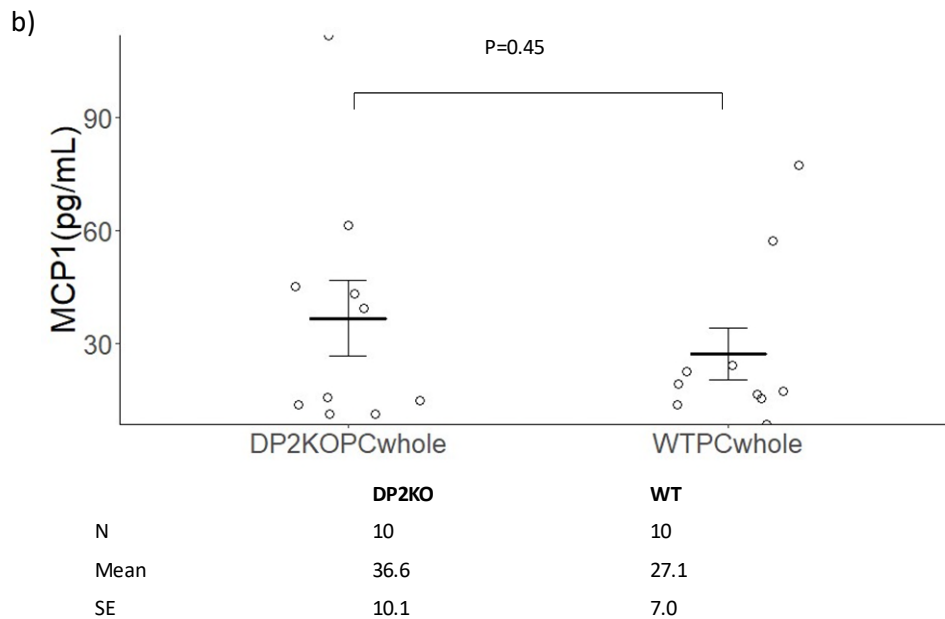


図 3-7 レーザー後 3 日目の眼内の VEGF, MCP-1 濃度
 (* $p < 0.05$, Student's unpaired t-test)

3.3.8 DP2 拮抗薬投与下での眼内 VEGF、MCP-1 濃度

8 週齢 WT マウスにレーザーの前日 (Day-1) にそれぞれ Cay10471 2mg/ml、0.2mg/ml、OC000459 2mg/ml、0.2mg/ml、Vehicle の入った Alzet pump を 8wB6NCrSLC 雄マウスの皮下に埋没した。Day0 にレーザーを 12 発ずつ照射し、Day3 に全眼球をホモジナイズし、遠心後、その上清の VEGF、MCP-1 濃度を ELISA で測定した。VEGF, MCP-1 とも、どの群間においても有意差は認めなかった (図 3-8, $p > 0.05$, one-way ANOVA)。

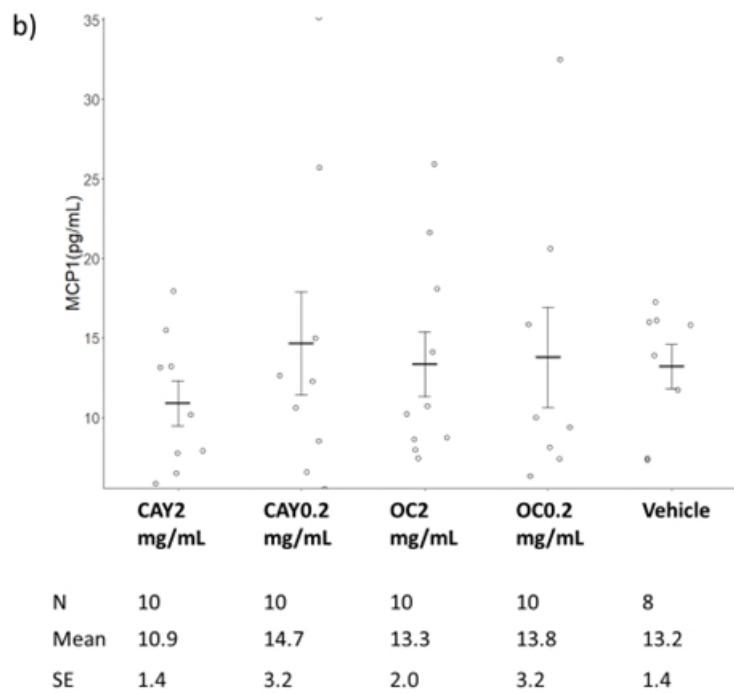
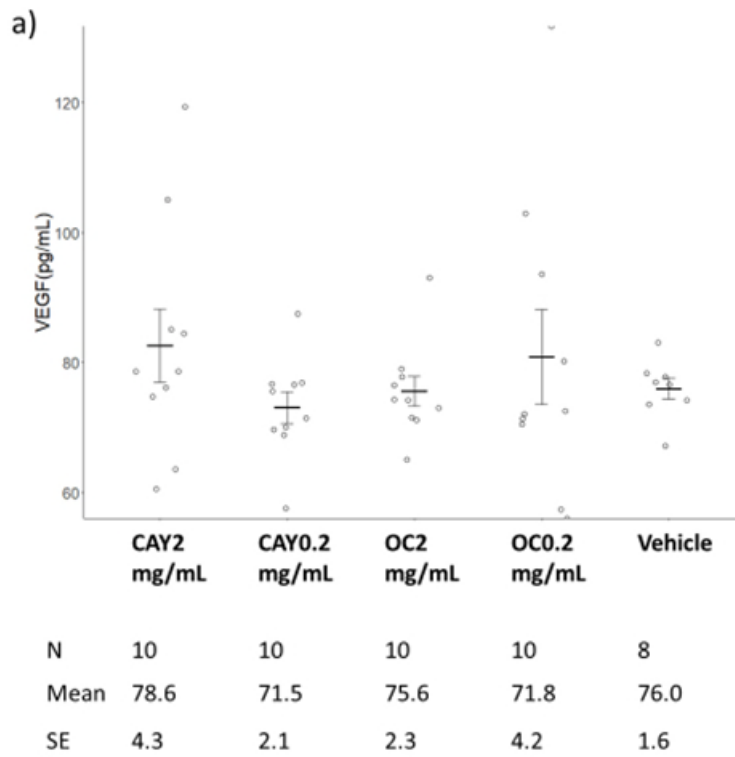


図 3-8 DP2 拮抗薬投与下での眼内 VEGF、MCP-1 濃度

3.3.9 Choroidal sprouting assay

野生型または DP2 欠損マウスの脈絡膜強膜複合体を BME の中に置き、培地を加え 6 日後に脈絡膜萌芽領域の面積を測定した。野生型マウスの培地には CAY10471 100 μ M, CAY10471 10 μ M, 溶媒をそれぞれ加えた。CAY10471 投与群 (100 μ M, 10 μ M)、溶媒投与群の間に有意差は認めなかった(図 3-9, $p > 0.05$, one-way ANOVA)。

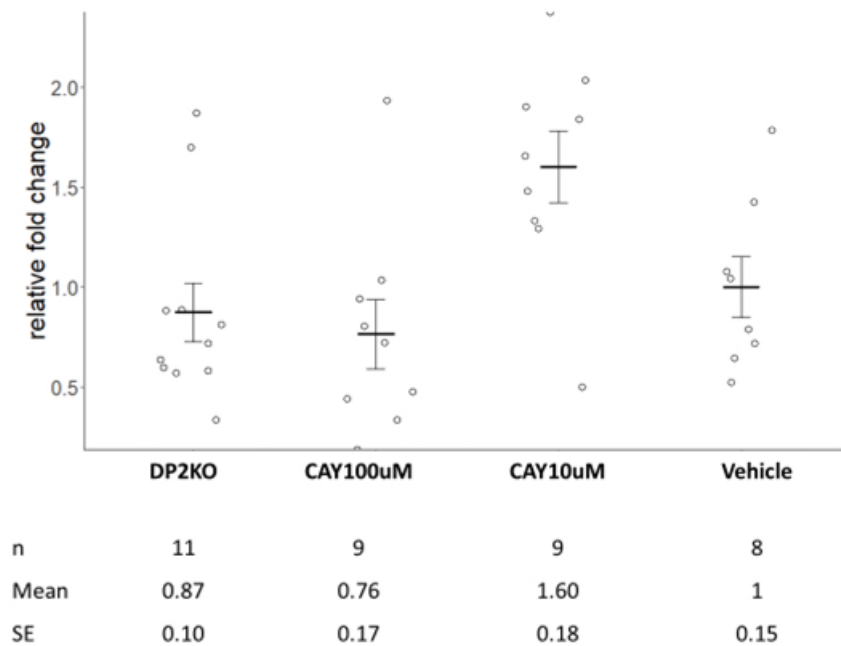


図 3-9 DP2KO, DP2 拮抗薬投与での Choroidal sprouting assay

3.3.10 ARPE-19、HUVEC 細胞における DP2 受容体の発現

ARPE-19、HUVEC 細胞における DP2 受容体の発現を RT-PCR 法で検討した。ARPE-19、HUVEC の全 RNA を抽出し、cDNA を作成し、DP2、GAPDH のプライマーを用いて PCR を行い、電気泳動を行った。は ARPE-19、HUVEC 細胞はいずれも DP2 を発現していることが分かった (図 3-10)。

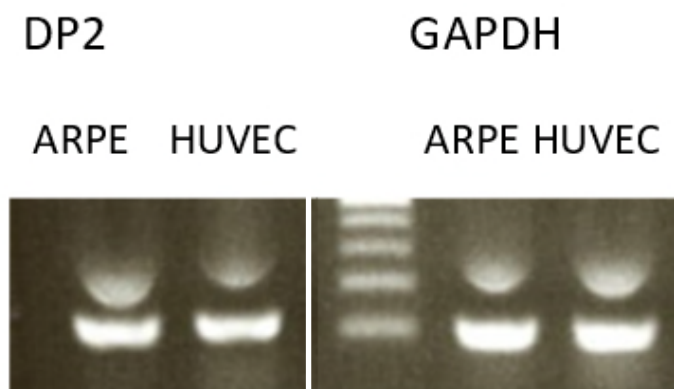


図 3-10 DP2、GAPDH プライマーによる RT-PCR

3.3.11 ARPE-19 細胞における PGD2 刺激下での VEGF、MCP- 1 産生

ARPE-19 細胞における 15(R)-15-methyl Prostaglandin D2 刺激下、非刺激下での VEGF、MCP- 1 産生および DP2 拮抗薬 CAY10471 投与による産生の変化を検討した。

15(R)-15-methyl Prostaglandin D2 刺激下、非刺激下ともに、CAY10471 を添加すると ARPE-19 細胞の培養液中の VEGF 濃度が、CAY10471 を添加しない場合と比べて有意に低値だった ($562.8 \pm 13.8 \text{ pg/mg}$ $n=12$, $553.2 \pm 24.5 \text{ pg/mg}$ $n=12$, $443.0 \pm 19.2 \text{ pg/mg}$ $n=12$, one-way ANOVA, Tukey-Kramer, $*p < 0.05$ 、
図 3-11a)。MCP-1 濃度には有意差なかった ($4339.0 \pm 262.9 \text{ pg/mg}$ $n=12$, $3946.1 \pm 135.3 \text{ pg/mg}$ $n=12$, $4158.0 \pm 282.6 \text{ pg/mg}$ $n=12$, one-way ANOVA, $p > 0.05$, 図 3-11b)

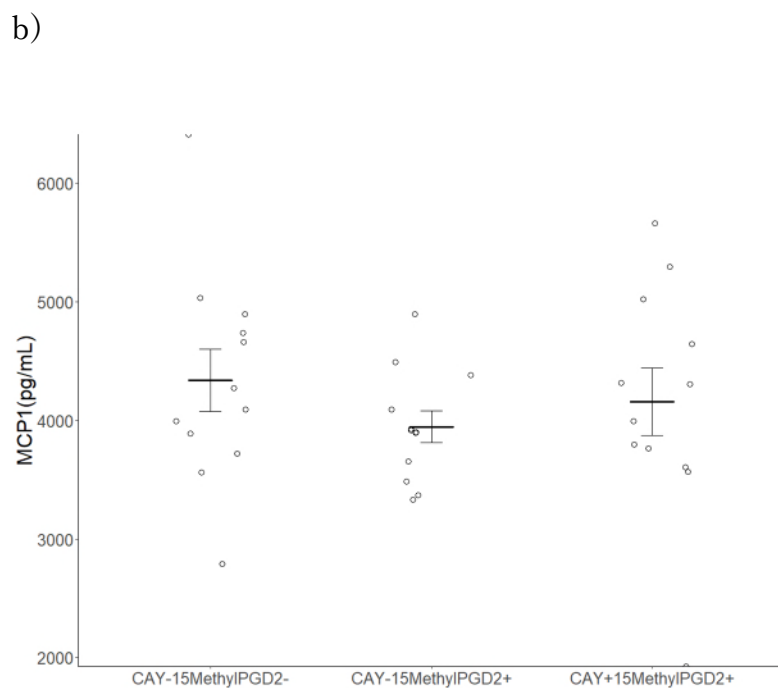
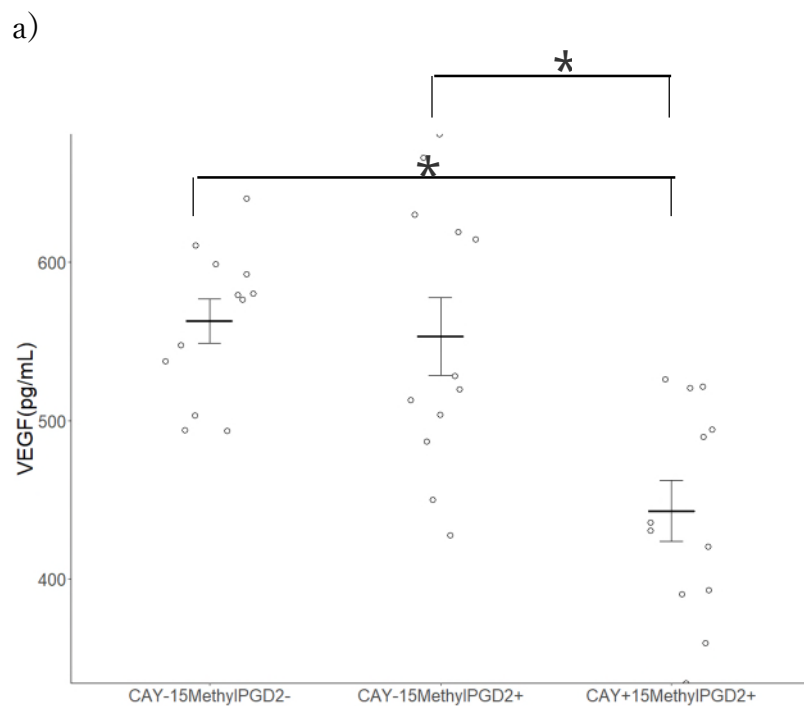
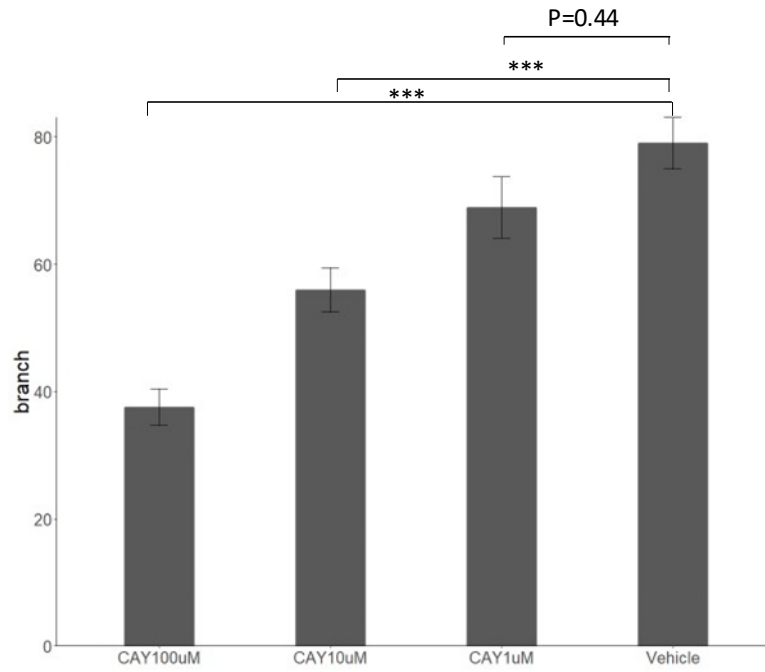


図 3-11 ARPE-19 細胞における PGD2 刺激下での拮抗薬投与での VEGF、MCP- 1 産生(* $p < 0.05$, one-way ANOVA, Tukey-Kramer)

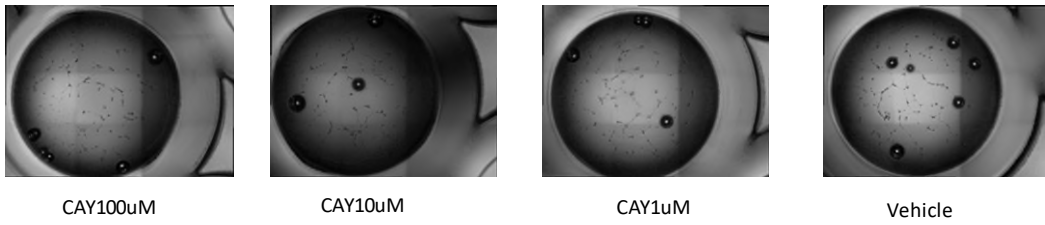
3.3.12 HUVEC 細胞の tube formation assay

DP2 拮抗薬の血管内皮細胞の分化・増殖能への影響を調べる目的で、HUVEC 細胞の tube formation assay を行った。BME を底に重合させた 96 well plate に 2×10^4 cell/50 μ l PBS/ well の HUVEC を入れた。Vehicle(DMSO)、CAY10471 1 μ M, CAY10471 10 μ M, CAY10471 100 μ M を投与し、5%CO₂/95%空气中、37°Cで培養し、18 時間後に分岐点の数を計測した。HUVEC 細胞の分岐数は、HUVEC が細胞間ネットワークを形成する能力の指標とされている。分岐数は CAY1 μ M では有意差はなかった (one-way ANOVA, Tukey-Kramer, $p=0.44$ 、図 3-11 a) が、CAY10 μ M、CAY100 μ M では濃度依存的に分岐数は有意に減少した (one-way ANOVA, Tukey-Kramer, $***p<0.001$, 図 3-12 a) 。それぞれの群の代表写真と標本数、平均値、標準誤差を示す (図 3-12 b,c) 。

a)



b)



c)

	CAY100μM	CAY10μM	CAY1μM	Vehicle
N	12	12	12	12
Mean	37.5	55.9	68.9	79.0
SE	2.9	3.5	4.8	4.1

図 3-12 HUVEC 細胞の tube formation assay (***) $p < 0.001$)

3.4 考察

本研究では加齢黄斑変性の動物モデルであるマウス CNV モデルを用いて、CNV における PGD2 受容体 DP2 の関与を検討した。8 週齢、52 週齢マウスどちらにおいても、DP2KO マウスは WT マウスに比べ CNV サイズが減少していた。また 56 週齢の高齢マウスの方が CNV サイズの減少率が大きかった（図 3-3）。2 種類の DP2 アンタゴニスト (CAY10471 と OC000459) どちらを投与しても、CNV サイズが減少した（図 3-4）。DP2 アンタゴニスト (OC000459) の投与量を減らすと CNV サイズの減少効果は容量依存的に減弱した（図 3-5）。

レーザースポットに遊走したマクロファージ数は DP2KO マウスでは有意に減少していた（図 3-6）。

レーザー凝固 3 日後の眼球内の VEGF、MCP-1 濃度は、DP2KO マウスでは WT マウスに比べ有意に VEGF 濃度は低かったが、MCP-1 は有意差がなかった（図 3-7）。また、2 種類の DP2 拮抗薬を全身投与した場合には、非投与群と比べ眼球内の VEGF、MCP-1 濃度はいずれも有意差はみられなかった

(図 3-8)。つまり拮抗薬投与では有意差はみられなかったが、DP2KO マウスではレーザー後の眼内 VEGF 濃度は WT に比べて有意に低下していた。

Choroidal Sprouting Assay では摘出した脈絡膜強膜複合体を 6 日間培養した脈絡膜萌芽領域の面積を測定した。DP2KO マウスの脈絡膜強膜複合体、WT マウスの脈絡膜強膜複合体、WT マウスの脈絡膜強膜複合体に DP2 拮抗薬を投与したものの 3 群間に有意差を認めなかった (図 3-9)。つまり Choroidal Sprouting Assay では、DP2KO、DP2 拮抗薬による脈絡膜血管新生への影響は明かではなかった。

Prostaglandin D2 刺激下では、ARPE-19 細胞の培養液中の VEGF 濃度は、DP2 拮抗薬投与により有意な低下がみられた (図 3-11)。

HUVEC 細胞の tube formation assay では、DP2 拮抗薬投与で容量依存的に血管新生の抑制効果がみられた (図 3-12)。

以上の結果より、マウス CNV モデルにおいて DP2 の阻害により、マクロファージの病変局所への遊走が抑制され、CNV サイズを小さくすることが明らかとなった。この結果は DP2 阻害が加齢黄斑変性を改善する可能性があることを示唆する。DP2 阻害がマウス CNV モデルでの CNV サイズを縮小させる機

序を明らかにするために、マクロファージを遊走させるサイトカインの MCP-1 やマクロファージが分泌する代表的な血管新生因子である VEGF のレーザー後における眼球内濃度を調べた。DP2 ノックアウトマウスにおけるレーザー後 3 日目の眼内の VEGF 濃度はコントロール群と比べて有意に低下していた (図 3-7)。しかし 2 種類の DP2 拮抗薬を全身投与では、コントロール群と比べ眼球内の VEGF、MCP-1 濃度はいずれも有意差はみられなかった (図 3-8)。この原因として、DP2 拮抗薬では DP2 ノックアウトと比べて眼内での DP2 阻害が不十分であり、有意差が出なかった可能性がある。しかし前者の結果から DP2 ノックアウトは眼内の VEGF 濃度の低下を介して CNV サイズを縮小させることが示唆された。この結果は Prostaglandin D2 刺激による ARPE-19 細胞の VEGF 産生が、DP2 拮抗薬投与により有意に低下することとも一致する (図 3-11)。Prostaglandin D2 刺激により ARPE-19 細胞の VEGF 産生が上昇していなかった理由としては、無血清培地を使用していたがウシ血清アルブミンなどを入れておらず、15(R)-15-methyl Prostaglandin D2 が十分溶解できず、十分な刺激が入らなかった可能性がある。

既報ではマクロファージが VEGF を産生¹⁰⁶し、Cox-2 の阻害薬投与により、

マクロファージ浸潤減弱と VEGF のダウンレギュレーションを介して CNV を縮小させる⁹⁸、あるいは COX 阻害薬 (Ketorolac) 局所投与により laser 後の網膜硝子体中の VEGF と PGE2 濃度が低下し、CNV サイズも 27%減少していた¹⁰⁷という報告があり、今回の結果と矛盾しない。

また、Leukotriene B4 (LTB4)は LTB4 受容体 1(BLT1)を介して M2 マクロファージを引き寄せ、CNV を発生させるという報告¹⁰⁸がある。

これまでに DP2 阻害薬や DP2 ノックアウトマウスで CNV サイズが縮小するという報告はなく、また DP2 阻害薬が HUVEC 細胞の管腔形成を抑制するという報告もない。今回の結果は DP2 が眼内での VEGF 発現やマクロファージの遊走阻害を介して加齢黄斑変性の病態に関与し、DP2 抑制が加齢黄斑変性の新規治療標的となりうることを示唆するものと考えられる。以上の結果をまとめ、予想される PGD2 に関する予想関係図は図 3-13 のようになる。レーザーにより傷害を受けた網膜色素上皮細胞から産生された PGD2 が、網膜色素上皮細胞、マクロファージ、血管内皮細胞が受け取り、VEGF 産生、遊走、管腔形成を介し、CNV 形成に関与すると考えられる。Cox-2 は抗 VEGF 薬ほど CNV 抑制効果がなく、現在加齢黄斑変性の治療にはあまり用いられていない。しかし

Cox-2 阻害では CNV 形成阻害因子、促進因子ともに抑制されている可能性があり、より特異的に CNV 形成促進因子だけを抑制できればより強い CNV 抑制効果を期待できる。Cox-2 の下流にある CNV 形成促進因子作用である PGD2 の阻害効果を検討することで新たな薬剤の開発の可能性があり、今後さらなる検討が必要である。

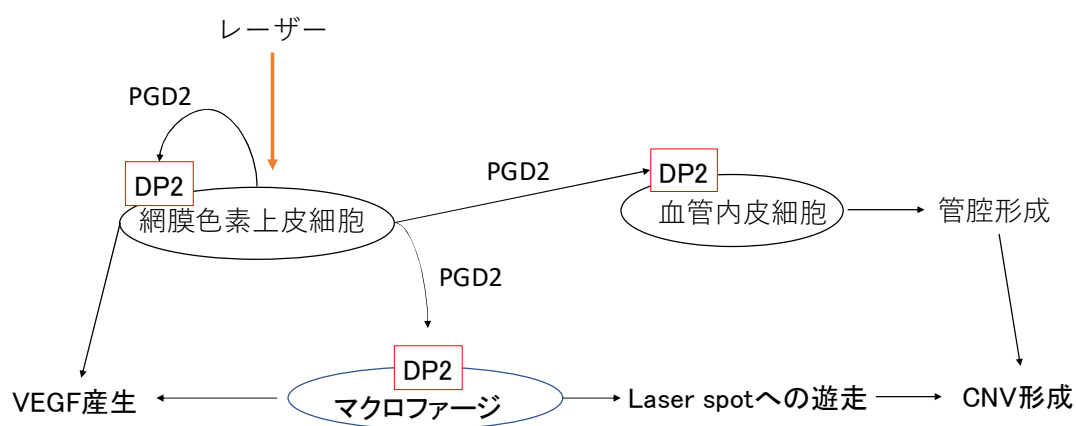


図 3-13 CNV モデルでの PGD2 に関する予想関係図

4 まとめ

第 1 章では、2013 年 1 月から 2018 年 12 月までに受診した東京大学医学部付属病院の合計 1,424 名のぶどう膜炎患者を検討し、65 歳以上の高齢者に特徴的なぶどう膜炎の特徴や疫学を調べた。高齢者群は 543 名（男性 247 名 [45.5%]）、65 歳未満の非高齢者群は 881 名（男性 412 名 [46.8%]）であった。65 歳未満の非高齢者群に比べ、感染性ぶどう膜炎（35.5% vs 17.8%、 $p < 0.0001$ ）と仮面症候群（17.9% vs 5.0%、 $p < 0.0001$ ）はいずれも高齢者群に有意に多かった。サルコイドーシス（23.1% 対 9.3%、 $p < 0.0001$ ）、眼内リンパ腫（16.6% vs 4.6%、 $p < 0.0001$ ）、CMV 虹彩炎（11.0% vs 5.6%、 $p = 0.0043$ ）、CMV 網膜炎（5.2% vs 1.5%、 $p = 0.0020$ ）の割合は、65 歳以上の高齢者群が 65 歳未満群に比べて有意に高かった。このように高齢者と非高齢者にはぶどう膜炎の疫学に大きな違いがあることが新たに分かった。

第 2 章では非感染性ぶどう膜炎の動物モデル（ラット自己免疫性ぶどう膜炎モデル）を用いて PGD2 の関与を検討した。EAU スコアの自然経過は Day12～14 にかけて眼炎症がピークになり、その後自然消退した。

次に、Day 7 から PGD2 の合成酵素（HPGDS、LPGDS）阻害薬（それぞれ

HQL-79、AT-56) を連日投与し、EAU スコアで炎症の程度を評価した。

Day15 以降の EAU スコアが対照群にくらべ有意に低下していた。

Day6~7, Day7~8, Day11~12, Day12~13 の 4 回に分けて、紙チップを回収し、尿中 PGDM, PGEM(PGD2、PGE の尿中代謝物) 濃度を測定した。その結果、眼炎症がない時期 (Day 6~7) に比べ眼内炎症時(Day12~13)には尿中 PGDM は上昇していた。尿中 PGDM は眼内炎症が強くなると増加するのに対し、尿中 PGEM は変化しないことが分かった。

以上の結果から、ぶどう膜炎に PGD2 が促進的に働いている可能性を示唆する新しい知見が得られた。

第 3 章では加齢黄斑変性の動物モデルであるマウスレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルを用いて、CNV における PGD2 の関与を調べた。8 週齢、52 週齢マウスどちらにおいても、DP2KO マウスは WT マウスにくらべ CNV サイズが減少していた。また 56 週齢の高齢マウスの方が CNV サイズの減少率が大きかった (図 3-2)。2 種類の DP2 アンタゴニスト (CAY10471 と OC000459) どちらを投与しても、CNV サイズが減少した (図 3-3)。DP2 アンタゴニスト (OC000459) の投与量を減らすと CNV サイズの減少効果は容量依存的に減

弱した (図 3-4) 。レーザースポットに遊走したマクロファージ数は DP2KO マウスでは有意に減少していた (図 3-5) 。以上の結果から、マウス CNV モデルにおいて DP2 の阻害により、マクロファージの病変局所への遊走が抑制され、CNV サイズを小さくすることが明らかとなった。しかし、DP2 阻害がマウス CNV モデルでの CNV サイズを縮小させる機序を明らかにするため、マクロファージを遊走させるサイトカインの MCP-1 やマクロファージが分泌する代表的な血管新生因子である VEGF のレーザー後における眼球内濃度を調べた。DP2KO マウスでは WT マウスに比べ VEGF 濃度の有意な減少がみられたが、拮抗薬投与では有意な減少を認めなかった。MCP-1 に関してはいずれも有意差は見られなかった。DP2 拮抗薬では DP2 ノックアウトと比べて眼内での DP2 阻害が不十分であり、有意差が出なかった可能性がある。しかし前者の結果から DP2 ノックアウトでは眼内の VEGF 濃度の低下を介して CNV サイズを縮小させることが示唆された。この結果は Prostaglandin D2 刺激による ARPE-19 細胞の VEGF 産生が、DP2 拮抗薬投与により有意に低下することとも一致した (図 3-11) 。今後さらなる検討が必要である。

これまでに DP2 阻害薬や DP2 ノックアウトにより CNV サイズが縮小すると

いう報告はなく、また DP2 阻害薬が HUVEC 細胞の管腔形成を抑制するとの報告もない。今回の結果は DP2 が眼内での VEGF 産生を介して加齢黄斑変性の病態に関与し、DP2 抑制が加齢黄斑変性の新規治療標的となりうることを示唆するものと考ええる。

謝辞

研究の機会を与えて下さり、4年間にわたり終始ご懇意なるご指導、ご鞭撻を賜った東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻 感覚運動機能医学講座眼科学 相原 一教授に心より感謝申し上げます。

実験は主に東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚運動機能医学講座眼科学教室で行いました。本研究において、元同眼科准教授 現自治医科大学附属さいたま医療センター眼科教授 蕪城 俊克先生には終始ご懇意なるご指導、有益な助言、ご鞭撻を賜り厚く感謝申し上げます。

第2章の研究で、PG代謝産物（PGDM、PGEM）の定量をして頂いた神戸薬科大学 竹内敦子先生に厚く感謝申し上げます。

本研究に際して数々のご助言、ご協力を頂きました 東京大学アイソトープ総合センター 裏出良博先生、横浜市立大学附属市民総合医療センター眼科 井上達也先生、東京大学眼科 上田高志先生、自治医科大学眼科 川島秀俊教授を始め、ご指導いただきました皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Committee for the Preparation of Clinical Treatment of Ocular Lesions Related to Behcet's Disease. Guidelines for the clinical management of ocular Behçet's disease. *Nippon Ganka Gakkai zasshi* 2012;116:394-426.
2. Koh-Hei Sonoda, Eiichi Hasegawa, Kenichi Namba, Ayame Okada Annabelle, Nobuyuki Ohguro, Hiroshi Goto. Epidemiology of uveitis in Japan: a 2016 retrospective nationwide survey. *Japanese journal of ophthalmology* 2021;65:184-190.
3. Kara C. LaMattina, Debra A. Goldstein. Adalimumab for the treatment of uveitis. *Expert Review of Clinical Immunology* 2017;13:181-188.
4. Joseph N Martel, Elizabeth Esterberg, Agnieszka Nagpal, Nisha R Acharya. Infliximab and adalimumab for uveitis. *Ocular immunology and inflammation* 2012;20:18-26.
5. Yuki Morizane, Noriko Morimoto, Atsushi Fujiwara, Ryo Kawasaki, Hidetoshi Yamashita, Yuichiro Ogura, Fumio Shiraga. Incidence and causes of visual impairment in Japan: the first nation-wide complete enumeration survey of newly certified visually impaired individuals. *Japanese journal of ophthalmology* 2019;63.
6. Jared Knickelbein. Age-related macular degeneration in 2019. *Alleghenynews*; 2019.
7. Kanji Takahashi, Yuichiro Ogura, Tatsuro Ishibashi, Fumio Shiraga, Mitsuko Yuzawa. Treatment guidelines for age-related macular degeneration. *Nippon Ganka Gakkai zasshi* 2012;116:1150-1155.
8. Wei Tan, Jingling Zou, Shigeo Yoshida, Bing Jiang, Yedi Zhou. The Role of Inflammation in Age-Related Macular Degeneration. *International journal of biological sciences* 2020;16.
9. Sayantan Datta, Marisol Cano, Katayoon Ebrahimi, Lei Wang, James T Handa. The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Progress in retinal and eye research* 2017;60.
10. Zhaojiang Du, Xuemei Wu, Meixia Song, Peng Li, Li Wang. Oxidative damage induces MCP-1 secretion and macrophage aggregation in age-related macular degeneration (AMD). *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2016;254.
11. Keijiro Ishikawa, Ram Kannan, David R Hinton. Molecular mechanisms of subretinal fibrosis in age-related macular degeneration. *Experimental eye research* 2016;142.

12. Paloma Martín Sanz, Sonsoles Hortelano, Lisardo Bosca, Marta Casado. Cyclooxygenase 2: understanding the pathophysiological role through genetically altered mouse models. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2006;11.
13. Robert A. Lewis, Nicholas A. Soter, Diamond PT, K. Frank Austen, John A. Oates, L. Jackson Roberts II. Prostaglandin D2 generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1982;129.
14. Toshiyuki Matsuoka, Masakazu Hirata, Hiroyuki Tanaka, Yoshimasa Takahashi, Takahiko Murata, Kenji Kabashima, Yukihiko Sugimoto, Takuya Kobayashi, Fumitaka Ushikubi, Yoshiya Aze, Naomi Eguchi, Yoshihiro Urade, Nobuaki Yoshida, Kazushi Kimura, Akira Mizoguchi, Yoshihito Honda, Hiroichi Nagai, Shuh Narumiya. Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science* 2000;287:2013-2017.
15. Osamu Hayaishi, Yoshihiro Urade. Prostaglandin D2 in sleep-wake regulation: recent progress and perspectives. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 2002;8.
16. Yoshiki Tsubosaka, Toko Maehara, Daiki Imai, Tatsuro Nakamura, Koji Kobayashi, Nanae Nagata, Wataru Fujii, Takahisa Murata. Hematopoietic prostaglandin D synthase-derived prostaglandin D 2 ameliorates adjuvant-induced joint inflammation in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2019;33.
17. Daiki Horikami, Naoki Toya, Koji Kobayashi, Keisuke Omori, Nanae Nagata, Takahisa Murata. L-PGDS-derived PGD 2 attenuates acute lung injury by enhancing endothelial barrier formation. *The Journal of pathology* 2019;248.
18. Hiroyuki Hirai, Kazuya Tanaka, Osamu Yoshie, Kazuyuki Ogawa, Kazumi Kenmotsu, Yasushi Takamori, Michiko Ichimasa, Kazuo Sugamura, Masataka Nakamura, Shoichi Takano, Kinya Nagata. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *The Journal of experimental medicine* 2001;193.
19. Goh Yasumasa, Masayuki Nakajima, Ikuo Azuma, Osamu Hayaishi. Prostaglandin D2 reduces intraocular pressure. *The British journal of ophthalmology* 1988;72:461-464.
20. Dmitry Gerashchenko, Carsten T. Beuckmann, Yoshihide Kanaoka, Naomi Eguchi, William C. Gordon, Yoshihiro Urade, Nicolas G. Bazan, Osamu Hayaishi. Dominant expression of rat prostanoid DP receptor mRNA in leptomeninges, inner segments of photoreceptor cells, iris epithelium, and ciliary processes. *Journal of*

neurochemistry 1998;71.

21. Omar Durrani, Nasrin Najim-Tehrani, Jane E Marr, Phillip Moradi, Panagiota Stavrou, Philip I Murray. Degree, duration, and causes of visual loss in uveitis. 2004.
22. Kaivon Pakzad-Vaezi, Chris Or, Steven Yeh, Farzin Forooghian. Optical coherence tomography in the diagnosis and management of uveitis. *Canadian Journal of Ophthalmology* 2014;49:18-29.
23. Thomas W. Harper, Darlene Miller, Joyce C. Schiffman, Janet L. Davis. Polymerase Chain Reaction Analysis of Aqueous and Vitreous Specimens in the Diagnosis of Posterior Segment Infectious Uveitis. *American Journal of Ophthalmology* 2009;147:140-147.
24. Hiroshi Goto, Manabu Mochizuki, Kunihiro Yamaki, Satoshi Kotake, Masahiko Usui, Shigeaki Ohno. Epidemiological Survey of Intraocular Inflammation in Japan. *Japanese Journal of Ophthalmology* 2007;51:41-44.
25. Nobuyuki Ohguro, Koh-Hei Sonoda, Masaru Takeuchi, Miyo Matsumura, Manabu Mochizuki. The 2009 prospective multi-center epidemiologic survey of uveitis in Japan. *Japanese Journal of Ophthalmology* 2012;56:432-435.
26. Koh-Hei Sonoda, Eiichi Hasegawa, Kenichi Namba, Ayame Okada Annabelle, Nobuyuki Ohguro, Hiroshi Goto. Epidemiology of uveitis in Japan: a 2016 retrospective nationwide survey. *Japanese journal of ophthalmology* 2021;65.
27. Shintaro Shirahama, Toshikatsu Kaburaki, Hisae Nakahara, Rie Tanaka, Mitsuko Takamoto, Yujiro Fujino, Hidetoshi Kawashima, Makoto Aihara. Epidemiology of uveitis (2013–2015) and changes in the patterns of uveitis (2004–2015) in the central Tokyo area: a retrospective study. *BMC Ophthalmology* 2018;18:1-8.
28. Hisae Nakahara, Toshikatsu Kaburaki, Mitsuko Takamoto, Kimiko Okinaga, Junko Matsuda, Yasuhiro Konno, Hidetoshi Kawashima, Jiro Numaga, Fujino Y, Amano S. Statistical analyses of Endogenous Uveitis Patients (2007–2009) in central Tokyo area and Comparison with Previous Studies (1963–2006). <http://dxdoiorg/103109/092739482014920036> 2015.
29. Hisae Nakahara, Toshikatsu Kaburaki, Rie Tanaka, Mitsuko Takamoto, Kazuyoshi Ohtomo, Ayako Karakawa, Keiko Komae, Kimiko Okinaga, Junko Matsuda, Yujiro Fujino. Frequency of Uveitis in the Central Tokyo Area (2010–2012). <https://doiorg/103109/0927394820151133840> 2016.
30. Jessica Marie Abaño, Pia Regina Galvante, Paul Siopongco, Kunny Dans, Juan Lopez. Review of Epidemiology of Uveitis in Asia: Pattern of Uveitis in a Tertiary

Hospital in the Philippines. <https://doi.org/10.1080/0927394820171335755> 2017.

31. De-Kuang Hwang, Yiing-Jeng Chou, Cheng-Yun Pu, Pesus Chou. Epidemiology of Uveitis among the Chinese Population in Taiwan: A Population-Based Study. *Ophthalmology* 2012;119:2371-2376.
32. Tyler Hyungtaek Rim, Sung Soo Kim, Don-Il Ham, Seung-Young Yu, Eun Jee Chung, Sung Chul Lee. Incidence and prevalence of uveitis in South Korea: a nationwide cohort study. 2018.
33. Uhlenberg Peter. *International Handbook of Population Aging*; 2021.
34. 内閣府. 令和3年版高齢社会白書; 2021.
35. 山村 敏明, 狩野 宏成, 佐々木 一之. 高年齢層発症の内因性ぶどう膜炎に関する検討. *臨床眼科* 1986;40:384-385.
36. 秋山 和英, 沼賀 二郎, 小関 信之, 高山 淳, 大橋 正明, 山上 明子, 吉田 淳, 蕪城 俊克, 川島 秀俊, 藤野 雄次郎. 高齢者の内因性ブドウ膜炎の臨床統計. *日本眼科紀要* 2002;53:467-471.
37. 永岡 信一郎, 沖波 聡, 大坪 貴子, 小川 明子, 齋藤 伊三雄. 高齢者のブドウ膜炎. *日本眼科紀要* 2001;52:43-46.
38. Hiroki Nakatani. Population aging in Japan: policy transformation, sustainable development goals, universal health coverage, and social determinates of health. *Global Health & Medicine* 2019;1:3-10.
39. World Health Organization. Men, ageing and health : achieving health across the life span. 2001.
40. Douglas A Jabs, Robert B Nussenblatt, James T Rosenbaum, Standardization of Uveitis Nomenclature (SUN) Working Group. Standardization of Uveitis Nomenclature for Reporting Clinical Data. Results of the First International Workshop. *American Journal of Ophthalmology* 2005;140:509-516.
41. Manae Suzuki Kurokawa, Norimichi Suzuki. Behcet's disease. *Clinical and Experimental Medicine* 2004;4:10-20.
42. Mochizuki M, Smith JR, Takase H, Kaburaki T, Acharya NR, Rao NA. Revised criteria of International Workshop on Ocular Sarcoidosis (IWOS) for the diagnosis of ocular sarcoidosis. 2019.
43. Manabu Mochizuki, Justine R Smith, Hiroshi Takase, Toshikatsu Kaburaki, Nisha R Acharya, Narsing A Rao. Revised criteria of International Workshop on Ocular Sarcoidosis (IWOS) for the diagnosis of ocular sarcoidosis. 2019.
44. Russell W Read, Gary N Holland, Narsing A Rao, Khalid F Tabbara, Shigeaki Ohno, Lourdes Arellanes-Garcia, Paola Pivetti-Pezzi, Howard H Tessler, Masahiko

- Usui. Revised diagnostic criteria for Vogt-Koyanagi-Harada disease: report of an international committee on nomenclature1. *American Journal of Ophthalmology* 2001;131:647-652.
45. Hiroshi Takase, Annabelle Ayame Okada, Hiroshi Goto, Nobuhisa Mizuki, Kenichi Namba, Nobuyuki Ohguro, Koh-Hei Sonoda, Makoto Tomita, Hiroshi Keino, Takeshi Kezuka, Reo Kubono, Kazuomi Mizuuchi, Etsuko Shibuya, Hiroyuki Takahashi, Ryoji Yanai, Manabu Mochizuki. Development and validation of new diagnostic criteria for acute retinal necrosis. *Japanese Journal of Ophthalmology* 2014;59:14-20.
46. Gary N. Holland. Standard Diagnostic Criteria for the Acute Retinal Necrosis Syndrome. *American Journal of Ophthalmology* 1994;117:663-666.
47. Toshikatu Kaburaki, Kazuki Taoka, Junko Matsuda, Hideomi Yamashita, Izuru Matsuda, Hideki Tsuji, Rie Tanaka, Kumi Nakazaki, Fumihiko Nakamura, Kohei Kamiya, Mineo Kurokawa, Kuni Ohtomo, Makoto Aihara. Combined intravitreal methotrexate and immunochemotherapy followed by reduced-dose whole-brain radiotherapy for newly diagnosed B-cell primary intraocular lymphoma. *British journal of haematology* 2017;179.
48. Nathalie Cassoux, Alain Giron, Bahram Bodaghi, Thi H. C. Tran, Sylvie Baudet, Frédéric Davy, Chi C. Chan, Phuc Lehoang, Hélène Merle-B  ral. IL-10 Measurement in Aqueous Humor for Screening Patients with Suspicion of Primary Intraocular Lymphoma. *Investigative ophthalmology & visual science* 2007;48:3253-3259.
49. Scott M. Whitcup, Virginia Stark-Vancs, Robert E. Wittes, Diane Solomon, Marvin J. Podgor, Robert B. Nussenblatt, Chi-Chao Chan. Association of Interleukin 10 in the Vitreous and Cerebrospinal Fluid and Primary Central Nervous System Lymphoma. *Archives of Ophthalmology* 1997;115:1157-1160.
50. Janet L Davis, Daniel M Miller, Phillip Ruiz. Diagnostic testing of vitrectomy specimens. *American journal of ophthalmology* 2005;140.
51. Joachim M Baehring, Sofia Androudi, Janina J Longtine, Rebecca A Betensky, Jeffrey Sklar, C Stephen Foster, Fred H Hochberg. Analysis of clonal immunoglobulin heavy chain rearrangements in ocular lymphoma. *Cancer* 2005;104.
52. Sunao Sugita, Hiroshi Takase, Yoshiharu Sugamoto, Ayako Arai, Osamu Miura, Manabu Mochizuki. Diagnosis of intraocular lymphoma by polymerase chain reaction analysis and cytokine profiling of the vitreous fluid. *Japanese journal of ophthalmology* 2009;53.
53. Kouichi Ohta, Kenji Sano, Takefumi Suzuki, Eiko Hidaka, Akiko Yoshida,

- Takanobu Kikuchi. B cell clonality of primary central nervous system and primary intraocular lymphomas. *Japanese journal of ophthalmology* 2007;51.
54. Shigeaki Ohno, Devron H. Char, Samuel J. Kimura, G. Richard O'connor. HLA antigens and antinuclear antibody titres in juvenile chronic iridocyclitis. *The British journal of ophthalmology* 1977;61.
55. Yao Liu, Hana L Takusagawa, Teresa C Chen, Louis R Pasquale. Fuchs heterochromic iridocyclitis and the rubella virus. *International ophthalmology clinics* 2011;51.
56. Sawsen Salah, Sébastien Abad, Dominique Monnet, Antoine Pierre Brézin. Sarcoidosis. *Journal francais d'ophtalmologie* 2018;41.
57. Hiroki Nakatani Population aging in Japan: policy transformation, sustainable development goals, universal health coverage, and social determinates of health. *Global Health & Medicine.*; 2019.
58. Jooryung Huh. Epidemiologic overview of malignant lymphoma. *The Korean journal of hematology* 2012;47.
59. Eduardo Fuentes, Manuel Fuentes, Marcelo Alarcón, Iván Palomo. Immune System Dysfunction in the Elderly. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 2017;89.
60. Alexander D Port, Anton Orlin, Szilard Kiss, Sarju Patel, Donald J D'Amico, Mrinali P Gupta. Cytomegalovirus Retinitis: A Review. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2017;33.
61. Anne Berenbom, Davila RM, Huey-Shyan Lin, J William Harbour. Treatment outcomes for primary intraocular lymphoma: implications for external beam radiotherapy. *Eye* 2006;21:1198-1201.
62. Shin-Ichi Hikita, Koh-Hei Sonoda, Kuniaki Hijioka, Takeshi Fujimoto, Takako Ito, Tatsuro Ishibashi. Incidence of uveitis in the northern Kyushu region of Japan -- comparison between the periods of 1996-2001 and 2003-2008. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 2012;116:847-855.
63. Mandeep S Sagoo, Hemal Mehta, Andrew J Swampillai, Victoria M L Cohen, Sepideh Z Amin, P Nicholas Plowman, Sue Lightman. Primary intraocular lymphoma. *Survey of ophthalmology* 2014;59.
64. Manabu Ogawa, Sunao Sugita, Ken Watanabe, Norio Shimizu, Manabu Mochizuki. Novel diagnosis of fungal endophthalmitis by broad-range real-time PCR detection of fungal 28S ribosomal DNA. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2012;250:1877-1883.

65. Manabu Ogawa, Sunao Sugita, Norio Shimizu, Ken Watanabe, Ichiro Nakagawa, Manabu Mochizuki. Broad-range real-time PCR assay for detection of bacterial DNA in ocular samples from infectious endophthalmitis. *Japanese journal of ophthalmology* 2012;56.
66. Shintaro Shirahama, Toshikatsu Kaburaki, Sachiko Takada, Hisae Nakahara, Rie Tanaka, Keiko Komae, Yujiro Fujino, Hidetoshi Kawashima, Makoto Aihara. Comparison of visual field defect progression in secondary Glaucoma due to anterior uveitis caused by three types of herpes viruses. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2020;258.
67. Sirichai Pasadhika, James T Rosenbaum. Ocular Sarcoidosis. *Clinics in chest medicine* 2015;36.
68. Kendra Peterson, Kathleen B. Gordon, Murk-Hein Heinemann, Lisa M. DeAngelis. The clinical spectrum of ocular lymphoma. *Cancer* 1993;72.
69. Richard W. Darrell, Henry P. Wagener, Leonard T. Kurland. Epidemiology of uveitis. Incidence and prevalence in a small urban community. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)* 1962;68.
70. Van Tao Tran, Carlos Auer, Yan Guex-Crosier, Nancy Pittet, Carl P. Herbort. Epidemiology of uveitis in Switzerland. *Ocul Immunol Inflamm* 1994;2:169-176.
71. Taina Päivönsalo-Hietanen, Juhani Tuominen, Hanna Vaahtoranta-Lehtonen, K. Matti Saari. Incidence and prevalence of different uveitis entities in Finland. *Acta ophthalmologica Scandinavica* 1997;75.
72. David C Gritz, Ira G Wong. Incidence and prevalence of uveitis in Northern California; the Northern California Epidemiology of Uveitis Study. *Ophthalmology* 2004;111:491-500.
73. Lalit Dandona, Rakhi Dandona, Rajesh K John, Catherine A McCarty, Gullapalli N Rao. Population based assessment of uveitis in an urban population in southern India. *The British journal of ophthalmology* 2000;84:706-709.
74. Santiago Muñoz-Fernández, Emilio Martín-Mola. Uveitis. *Best practice & research Clinical rheumatology* 2006;20:487-505.
75. Rachel R. Caspi. Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse. *Current protocols in immunology* 2003;Chapter 15.
76. Rachel R. Caspi, Francois G. Roberge, Cathy G. Mcallister, Magda El-Saied, Toichiro Kuwabara, Igal Gery, Edgar Hanna, Robert B. Nussenblatt. T cell lines mediating experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in the rat. *Journal of*

- immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1986;136:928-933.
77. Robert B. Nussenblatt, Scott M. Whitcup, Alan G. Palestine. *Uveitis: fundamentals and clinical practice*. St. Louis, MO: Mosby - Year Book, Inc.; 1996.
78. Igal Gery, Manabu Mochizuki, Robert B. Nussenblatt. Retinal specific antigens and immunopathogenic processes they provoke. *Progress in Retinal Research* 1986;5:75-109.
79. Seiji Ito, Shuh Narumiya, Osamu Hayaishi. Prostaglandin D2: a biochemical perspective. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 1989;37:219-234.
80. Rajeev K. Agarwal, Phyllis B. Silver, Rachel R. Caspi. Rodent models of experimental autoimmune uveitis. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2012;900:443-469.
81. Wen-Liang Song, Miao Wang, Emanuela Ricciotti, Susanne Fries, Ying Yu, Tilo Grosser, Muredach Reilly, John A Lawson, FitzGerald GA. Tetranor PGDM, an abundant urinary metabolite reflects biosynthesis of prostaglandin D2 in mice and humans. *The Journal of biological chemistry* 2008;283:1179-1188.
82. Taku Nakagawa, Atsuko Takeuchi, Ryohei Kakiuchi, Tomoko Lee, Mariko Yagi, Hiroyuki Awano, Kazumoto Iijima, Yasuhiro Takeshima, Yoshihiro Urade, Masafumi Matsuo. A prostaglandin D2 metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8 years old. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2013;423:10-14.
83. Shingo Maeda TN, Hiroaki Harada, Yuri Tachibana, Kosuke Aritake, Tatsuo Shimosawa, Yutaka Yatomi, Takahisa Murata,. Prostaglandin D 2 metabolite in urine is an index of food allergy. *Scientific reports* 2017;7:17687.
84. Malihe E, Yi-Hsing C, A NM, E CS, Wynne W-D, L CV. Leukotriene B 4 and Its Receptor in Experimental Autoimmune Uveitis and in Human Retinal Tissues: Clinical Severity and LTB 4 Dependence of Retinal Th17 Cells. *The American journal of pathology* 2021;191:320-334.
85. David L Emery, TD Djokic, Paul D Graf, Jay A Nadel. Prostaglandin D2 causes accumulation of eosinophils in the lumen of the dog trachea. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* 1989;67:959-962.
86. Donald G. Raible, Edward S. Schulman, James Dimuzio, Richard Cardillo, Thomas J. Post. Mast cell mediators prostaglandin-D2 and histamine activate human eosinophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1992;148:3536-3542.
87. David F. Woodward, Stephen B Hawley, Linda S. Williams, Tracy Ralston, Charles E. Protzman, Clayton Spada, Amelia L Nieves. Studies on the ocular

- pharmacology of prostaglandin D2. *Investigative ophthalmology & visual science* 1990;31:138-146.
88. 裏出 良博, 有竹 浩介. 造血器型プロスタグランジン D 合成酵素阻害薬による Duchenne 型筋ジストロフィーに対する進行軽減療法. 2016;259:37-42.
89. *No authors listed.* Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy. Five-year results from randomized clinical trials. Macular Photocoagulation Study Group. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)* 1991;109:1109-1114.
90. Don H. Anderson, Robert F. Mullins, Gregory S. Hageman, Lincoln V. Johnson. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *American Journal of Ophthalmology* 2002;134:411-431.
91. Tien Y Wong, Gerald Liew, Paul Mitchell. Clinical update: new treatments for age-related macular degeneration. *Lancet (London, England)* 2007;370:204-206.
92. Richard F Spaide, Ketan Laud, Howard F Fine, James M Klancknik Jr, Catherine B Meyerle, Lawrence A Yannuzzi, John Sorenson, Jason Slakter, Yale L Fisher, Michael J Cooney. Intravitreal bevacizumab treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Retina (Philadelphia, Pa)* 2006;26:383-390.
93. Priyatham S Mettu, Michael J Allingham, Scott W Cousins. Incomplete response to Anti-VEGF therapy in neovascular AMD: Exploring disease mechanisms and therapeutic opportunities. *Progress in retinal and eye research* 2020;82.
94. Fassnacht-Riederle Heidi, Becker Matthias, Graf Nicole, Michels Stephan. Effect of aflibercept in insufficient responders to prior anti-VEGF therapy in neovascular AMD. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2014;252:1705-1709.
95. Marian S. Chin, Chandrasekharam N. Nagineni, Laura C. Hooper, Barbara Detrick, John J. Hooks. Cyclooxygenase-2 Gene Expression and Regulation in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 2001;42:2338-2346.
96. I-Mo Fang, Chang-Hao Yang, Chung-May Yang, Muh-Shy Chen. Linoleic acid-induced expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II via p42/44 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathway in retinal pigment epithelial cells. *Experimental eye research* 2007;85:667-677.
97. Kasra A Rezaei, Hassanain S Toma, Jiyang Cai, John S Penn, Paul Sternberg, Stephen J Kim. Reduced choroidal neovascular membrane formation in cyclooxygenase-2 null mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011;52:701-707.
98. Ruoshuang Zhang, Zheli Liu, Han Zhang, Yi Zhang, Dong Lin. The COX-2-

Selective Antagonist (NS-398) Inhibits Choroidal Neovascularization and Subretinal Fibrosis. *PloS one* 2016;11.

99. Samuel Virtue, Mojgan Masoodi, Barbara A De Weijer, Marco van Eijk, Chupp Yew Mok, Michael Eiden, Martin Dale, A Pirraco, MJ Serlie, Julian L. Griffin, Antonio Vidal-Puig. Prostaglandin profiling reveals a role for haematopoietic prostaglandin D synthase in adipose tissue macrophage polarisation in mice and humans. *International journal of obesity (2005)* 2015;39:1151-1160.

100. Tsuyoshi Tajima, Takahisa Murata, Kosuke Aritake, Yoshihiro Urade, Hiroyuki Hirai, Masataka Nakamura, Hiroshi Ozaki, Masatoshi Hori. Lipopolysaccharide induces macrophage migration via prostaglandin D(2) and prostaglandin E(2). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2008;326:493-501.

101. Kinya Nagata, Kazuya Tanaka, Kazuyuki Ogawa, Kazumi Kemmotsu, Toshio Imai, Osamu Yoshie, Hiroyuki Abe, Kohtaro Tada, Masataka Nakamura, Kazuo Sugamura, Shoichi Takano. Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1999;162.

102. Vincent Lambert, Julie Lecomte, Sylvain Hansen, Silvia Blacher, Maria-Luz Alvarez Gonzalez, Ingrid Struman, Nor Eddine Sounni, Eric Rozet, Pascal de Tullio, Jean Michel Foidart, Jean-Marie Rakic, Agnès Noel. Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. *Nature protocols* 2013;8:2197-2211.

103. Yan Gong, Jie Li, Ye Sun, Zhongjie Fu , Chi-Hsiu Liu, Lucy Evans, Katherine Tian, Nicholas Saba, Thomas Fredrick, Peyton Morss, Jing Chen, Lois E H Smith. Optimization of an Image-Guided Laser-Induced Choroidal Neovascularization Model in Mice. *PloS one* 2015;10.

104. Monika Jasielska, Irina Semkova, Xuan Shi, Kristina Schmidt, Dimitrios Karagiannis, Despina Kokkinou, Jerzy Mackiewicz, Norbert Kociok, Antonia M Jousen. Differential role of tumor necrosis factor (TNF)-alpha receptors in the development of choroidal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science* 2010;51:3874-3883.

105. Shigeto Fujimura, Hidenori Takahashi, Kentaro Yuda, Takashi Ueta, Aya Iriyama, Tatsuya Inoue, Toshikatsu Kaburaki, Yasuhiro Tamaki, Kouji Matsushima, Yasuo Yanagi. Angiostatic effect of CXCR3 expressed on choroidal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science* 2012;53:1999-2006.

106. J. McLaren, Andrew. Prentice, David S. Charnock-Jones, Millican SA, K.arin H. Müller, Andrew M. Sharkey, Stephen K. Smith. Vascular endothelial growth factor is

produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *The Journal of clinical investigation* 1996;98:482-489.

107. Hassanain S Toma, Joshua M Barnett, John S Penn, Stephen J Kim. Inhibition of Prostaglandins is Associated With Decreased Retinal VEGF Expression Levels in an Animal Model of AMD. *Investigative ophthalmology & visual science* 2021;51:6153-6153.

108. Fumiyuki Sasaki TK, Mai Ohba, Kazuko Saeki, Toshiaki Okuno, Keijiro Ishikawa, Takahito Nakama, Shintaro Nakao, Shigeo Yoshida, Tatsuro Ishibashi, Hamid Ahmadi, Mozghan Rezaei Kanavi, Ali Hafezi-Moghadam, Josef M Penninger, Koh-Hei Sonoda, Takehiko Yokomizo,. Leukotriene B4 promotes neovascularization and macrophage recruitment in murine wet-type AMD models. *JCI insight* 2018;3.

略語一覽

AGE: Advanced Glycation Endproducts

AMD: Age-related macular degeneration

AREDS: Age-Related Eye Disease Study

ARN : acute retinal necrosis

ARPE-19: Adult Retinal Pigment Epithelial cell line-19

BME: Basement Membrane Extract

cAMP : cyclic adenosine monophosphate

CMV: Cytomegalovirus

CNV: choroidal neovascularization

COX: cyclooxygenase

CRTH2 : chemoattractant receptor homologous molecule expressed on T-helper type 2 cells

DP1: Prostaglandin D2 receptor 1

DP2: Prostaglandin D2 receptor 2

EAU : Experimental Autoimmune Uveitis:

HLA: Human Leukocyte Antigen

HPGDS: hematopoietic prostaglandin D synthase

HSV: Herpes Simplex Virus

HTLV-1: human T-lymphotropic virus type 1

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Ig: Immunoglobulin

IL : interleukin

INF- γ : interferon-gamma

JCI : Juvenile chronic iridocyclitis

LPGDS:lipocalin-type prostaglandin D synthase

LT : leukotriene

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1

MDA : malondialdehyde

mRNA : messenger ribonucleic acid

PBS : phosphate-buffered saline

PDT: photodynamic therapy

PG : prostaglandin

PGDM: Prostaglandin D Metabolite

PGEM: Prostaglandin E Metabolite

PLA2 : phospho lipase A2

RPE: retinal pigment epithelium

Th : T helper

TNF- α : tumor necrosis factor-alpha

TXA2 : thromboxane A2

VEGF: vascular endothelial growth factor

VZV: Varicella zoster virus