

イヌの緑内障発生状況と視覚予後調査ならびに眼房水の
蛋白質解析、眼組織における免疫組織化学的研究

酪農学園大学大学院

獣医学研究科 獣医学専攻

臨床獣医学 伴侶動物医療学 画像診断学

久保 明

伴侶動物医療教育分野 画像診断学教育ユニット

指導教員 教授 中出哲也

2018 年度

目次

| | 頁 |
|--|----|
| 凡例 | |
| 緒論 | 1 |
| 第 I 章 イヌの緑内障発生状況と視覚予後調査（2011 年～2017 年における日本の回顧的研究） | |
| 小諸 | 3 |
| 材料と方法 | 5 |
| 結果 | 9 |
| 考察 | 17 |
| 小括 | 22 |
| 第 II 章 イヌの緑内障の眼房水における 2DE ならびに MALDI-TOF MS を用いた網羅的蛋白質解析 | |
| 小諸 | 24 |
| 材料と方法 | 26 |
| 結果 | 31 |
| 考察 | 33 |
| 小括 | 36 |
| 第 III 章 イヌの緑内障眼組織における ON の免疫組織化学的検索 | |
| 小諸 | 37 |
| 材料と方法 | 39 |

| | |
|--|----|
| 結果 | 41 |
| 考察 | 43 |
| 小括 | 45 |
| | |
| 第IV章 イヌの緑内障における ELISA 法を用いた眼房水中の ON 定量解析 | |
| 小諸 | 47 |
| 材料と方法 | 49 |
| 結果 | 52 |
| 考察 | 56 |
| 小括 | 59 |
| | |
| 総括 | 61 |
| | |
| 謝辞 | 65 |
| | |
| 引用文献 | 66 |
| | |
| 英文要約 | 74 |

凡例

AGV : アーメド緑内障バルブ

AN : アセトン

AUC : 曲線下面積 (area under the curve)

CBB : クーマシーブリリアントブルー

ECM : 細胞外基質

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

FPF : 偽陽性率 (false positive fraction)

IEF : 等電点電気泳動

KM 曲線 : カプランマイヤー曲線

MALDI : マトリックス支援レーザー脱離イオン化

MALDI-TOF MS : マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型
質量分析計

ON : オステオネクチン

PBS : カルシウムマグネシウム不含 0.01M リン酸緩衝食塩水

ROC 曲線 : 受信者動作特性 (Receiver operating characteristic) 曲線

SDS-PAGE : SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

TFA : トリフルオロ酢酸

TPF : 真陽性率 (true positive fraction)

2DE : 二次元電気泳動

緒論

緑内障とは、ヒト医学では視神経と視野に特徴的変化を有し、通常、眼圧を十分に下降させることにより視神経障害を改善もしくは抑制しうる眼の機能的構造的異常を特徴とする疾患と定義されている[35]。また、獣医学領域では、近年、緑内障は眼圧上昇や網膜神経節細胞の機能低下・壊死、視神経軸索の喪失、視神経乳頭の生理的陥凹の拡大、進行性視覚障害や盲目を伴うひとつの疾患群であり、神経変性疾患と考えられるようになってきた[33, 38]。緑内障はヒトにおいて失明原因の最上位疾患のひとつであり、動物眼科領域においても例外ではない。イヌの緑内障は他の眼疾患を伴わずに発生する「原発緑内障」と、その他の眼疾患の結果として生じる「続発緑内障」および先天性に生じる「先天緑内障」に分類される。また、原発緑内障は隅角形状によって開放隅角緑内障と狭隅角または閉塞隅角緑内障に分類され、臨床的には後者を診断する機会が多い。

イヌの原発緑内障の原因については、開放隅角緑内障の発症に関与する遺伝子変異をはじめとする様々な研究が進んでいる[1, 13, 27, 28, 30, 36, 37]。いっぽう、イヌの緑内障で最も多い閉塞隅角緑内障の発症要因については、好発犬種があること、犬種によってはメスにおける発生が多く、性差が認められることおよび好発年齢が中高齢であることから、単純な遺伝的素因だけではなく、加齢性変化も含めた多因子が関与する複雑な病態であると考えられている[38]。

緑内障の診断については、ヒトの場合、診断機器の進歩によって緑内障発症リスクの判定と早期診断が可能となっているが、ヒト用の診断機器を動物に臨床応用することは、費用の問題のみならず技術的にも現時点では非常に困難である。よって、現在の動物、特にイヌの緑内障の診断はほと

んどが強い眼疼痛に伴う眼瞼痙攣や強膜のうっ血、びまん性角膜浮腫などの顕著な臨床症状と眼圧測定によって行われ、診断に至った時点では既に病勢が進行し、重度な視覚障害を生じているか、またはすでに失明していることが多い[24, 38]。

緑内障治療と治療予後については、ヒトの場合では早期診断が可能であることから、主に抗緑内障薬の点眼治療による視覚予後は比較的良好である。いっぽう、イヌの場合では先述のとおり、診断時には既に重篤化していることが多く、そのために治療予後は非常に不良である。これらのことから、イヌの緑内障において良好な治療成績を得るためには病勢が進行していないより早いステージでの診断が重要であると考えられる。そのためには臨床症状や眼圧測定だけではなく、その他に臨床応用可能な客観的な診断パラメーターの開発が重要と考えられる。

本研究ではイヌの緑内障診断と治療における課題の検討のために、当院におけるイヌの緑内障発生状況ならびに治療成績について調査を行い、次いで、早期診断のための客観的な補助的診断パラメーターの作出を目的とした、イヌの緑内障症例と健常犬の眼房水中蛋白質の網羅的解析ならびに免疫組織化学的検討を行った。

第 I 章 イヌの緑内障発生状況と視覚予後調査（2011 年～2017 年における日本の回顧的研究）

小緒

イヌの緑内障発生状況について、海外での報告はいくつかあるが[3, 15, 46, 47, 49]、飼養環境の違いなどから日本とは状況が異なっている可能性が考えられる。実際に国内でのイヌの緑内障発生に関してはふたつの大学施設において、いずれも柴犬ならびにシー・ズーの発生率が高かったと報告されており、欧米における、アメリカン・コッカー・スパニエル、バセット・ハウンド、ワイヤー・フォックス・テリアおよびボストン・テリアなどの発生率が高いとされるイヌの緑内障発生状況と相違が認められている[26, 29]。また、これらの報告はいずれもイヌの緑内障の発生状況調査であり、治療開始後の視覚予後に影響する因子や内科的および外科的な治療成績を含めての調査、検討はされていない。

緑内障は不治の病であり、視覚維持、眼圧管理のためには抗緑内障薬または外科治療による継続した治療が必要である。特にイヌの緑内障では様々な治療を行っても、最終的には眼圧管理が困難となり視覚を喪失するエンドステージに至ることとなる。よって、イヌの緑内障の治療では可能な限り長期間の適正な眼圧管理と視覚維持を行うことが重要な目的となる。視覚維持と眼圧管理のための緑内障治療の主体は、現在も抗緑内障薬の点眼薬および内服による内科的治療であるが、近年では優れた緑内障手術デバイスや手術機器が開発され、以前よりも長期間の視覚維持が期待できるようになってきた。緑内障手術としては AGV を用いた緑内障シャント手術や内視鏡的毛様体レーザー凝固術が主に実施されており、それぞれの手術

成績については多く報告されている[6, 10, 16, 17, 21, 41]。しかし、これらの報告はそれぞれの術法による術後成績の検討が多く、点眼薬を主体とした内科的治療と外科的治療の治療成績についての比較検討を行った報告はない。以上のことから、緑内障治療を行う際に重要となる視覚維持と眼圧管理を目的とした緑内障治療の治療方針を選択する際の視覚予後についての情報が不足していると考えられる。

そこで本章では、イヌの緑内障診断と治療における課題について検討、確認することを目的として、獣医眼科の二次診療施設におけるイヌの緑内障発生状況調査を調査するとともに、視覚予後に影響する要因、すなわち内科的治療のみ行った症例と AGV を用いた緑内障手術を行った症例の視覚予後に関して比較検討した。また、さらに内科的治療のみを行った症例に対して、緑内障原因、性別、犬種による視覚予後について回顧的に調査した。

材料と方法

1. 対象

2011年10月から2017年10月までの6年間に獣医眼科二次診療病院である「どうぶつ眼科 VECS」に初診として来院したイヌ 1,990 頭のうち、初診時に緑内障と診断され、かつ治療開始後 30 日以上の経過観察が可能であった 207 頭 228 眼について調査を行った (図 1)。すべての症例について威嚇瞬目反応、眩目反射、眼圧測定、スリットランプ検査、眼底検査を含む一般的な眼科検査を実施した。

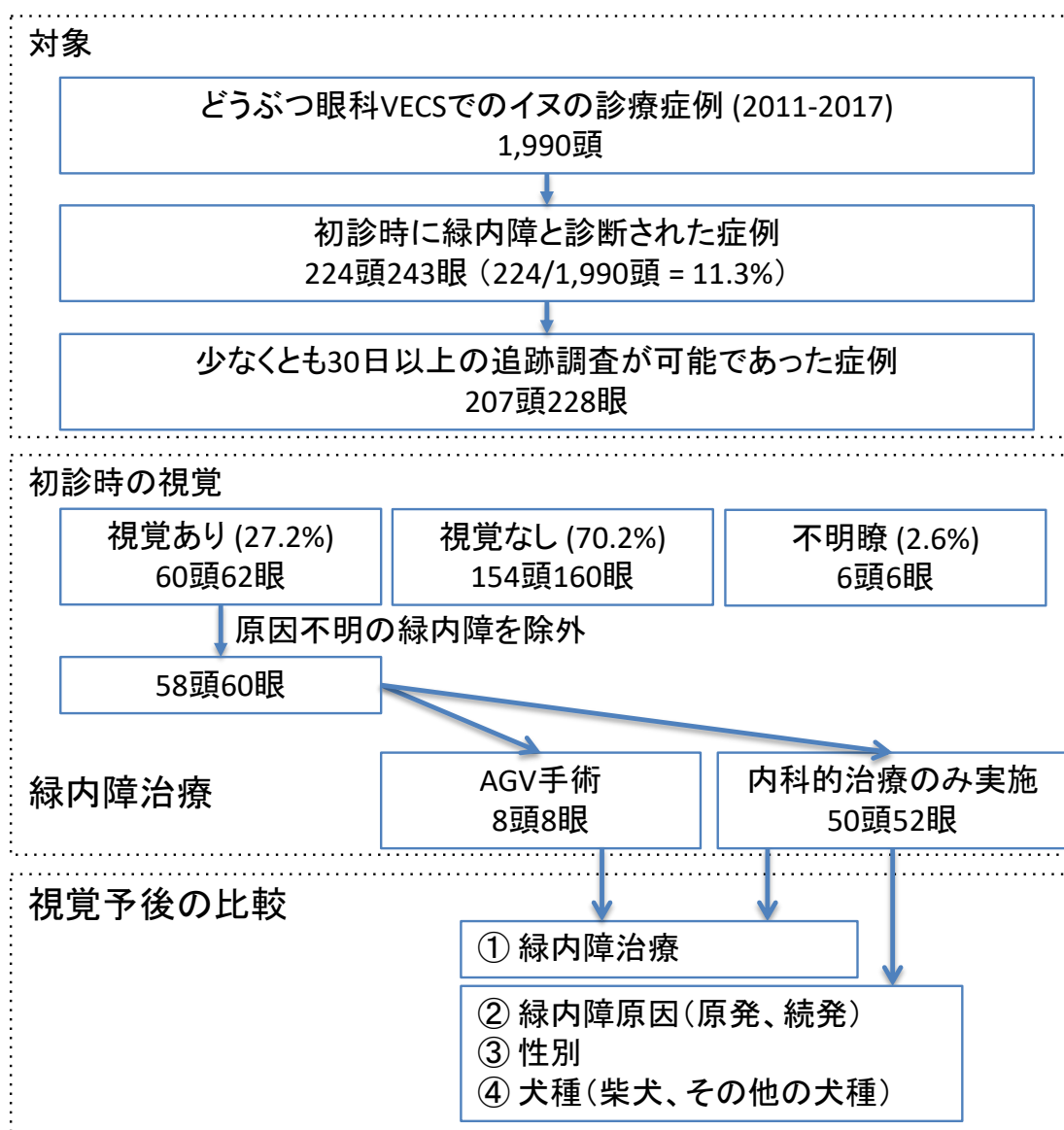


図 1. 本研究の対象ならびに視覚予後比較の比較対象

6年間に受診した1,990頭のうち、初診時に緑内障と診断されたイヌは224頭(11.3%)であり、207頭228眼については初診から30日以上の追跡調査が可能であった。初診時に「視覚あり」と判断されたものから原因不明の緑内障症例を除外した58頭60眼を視覚予後比較の対象とした。視覚予後の検討として、まずAGV群と内科的治療群との比較(①)を行ない、次いで、内科的治療群を対象に緑内障原因(②)、性別(③)ならびに犬種(④)による視覚予後の検討を行った。

2. 緑内障の分類と発生状況調査

対象症例を原因により原発緑内障、続発緑内障および原因不明の緑内障の原因別に分類し、それぞれの発生頭数（眼数）、年齢、性別ならびに犬種について調査した。犬種については6頭以上の犬種を示し、5頭以下の場合にはその他の犬種に分類した。また、続発緑内障については緑内障と同時に認められた所見についても調査した。

3. 初診時の視覚

緑内障症例の初診時の視覚について原因別、性別、犬種別に調査を行った。なお、視覚の判定については威嚇瞬目反応または眩目反射のいずれかが陽性である場合は「視覚あり」、両者が陰性の場合は「視覚なし」、威嚇瞬目反応または眩目反射のいずれかが陰性で、残りの一方の反応・反射の判定が不明瞭（つまり±）であり、判定が困難または両方の反応・反射が不明瞭で判定が困難な場合は「不明瞭」と評価した。眩目反射は手持ち式スリットランプ（SL-15, Kowa Company, Aichi, Japan）の最大光量を用いて評価した。

4. 視覚予後の比較

まず、初診時に「視覚あり」と判断された症例を対象に内科的治療のみを行った群（以下、内科的治療群）とAGV手術を実施した群（以下、AGV群）の視覚予後について比較検討を行った。次いで、内科的治療群を対象として緑内障の原因（原発緑内障、続発緑内障）、性別ならびに犬種について視覚予後の比較検討を行った。内科的治療群の治療には点眼剤の抗緑内障薬であるアドレナリン受容体遮断薬（0.25%ニプラジロール、0.5%マレイン酸チモロール、2%塩酸カルテオロール）、炭酸脱水酵素阻害薬（1~2%

塩酸ドルゾラミド、1%布林ゾラミド)、プロスタグランジン関連薬 (0.005%ラタノプロスト、0.0015%タフルプロスト、0.03%ビマトプロスト)、イオンチャンネル開口薬 (0.12%イソプロピルウノプロストン)、ステロイド点眼 (0.05%ジフルプレドナート、0.1%酢酸プレドニゾロン、0.1%デキサメサゾン、0.1%メチルプレドニゾロン)、非ステロイド性消炎剤 (NSAIDs) 点眼 (0.1%ジクロフェナク、0.1%プラノプロフェン) を使用した。また全身投与ではプレドニゾロン内服 (1~2 mg/kg/day)、コハク酸メチルプレドニゾロンの静脈内投与 (10~15 mg/kg)、NSAIDs の内服または皮下投与 (カルプロフェン、フィロコキシブ、ロベナコキシブ) を行い、利尿薬の全身投与 (50%グリセリン経口投与、マンニトール静脈内投与) を実施した。

AGV 手術は全ての症例で同じタイプの AGV (VFP-8, CARA Life, Rancho Cucamonga, CA, U.S.A.) を移植し、1名の術者によって定法に従って行われた[14]。

5. 統計分析

統計分析は全て BellCurve for Excel (Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて実施した。緑内障の発生状況調査における平均年齢についてはスチューデントの t 検定、犬種、性別については分割表分析により統計学的評価を行った。初診時の視覚についての緑内障原因別、性別による比較分析はカイ二乗検定、犬種別については分割表分析を用いた。緑内障治療方法 (内科的治療群と AGV 群) ならびに原因、性別、犬種による視覚予後の比較検討は Kaplan-Meier 法ならびにログランク検定によって実施した。すべての統計学的検定で有意水準は 5%とした。

結果

1. 緑内障の発生状況調査

原発緑内障は 68 頭 81 眼 (35.5%)、続発緑内障は 108 頭 115 眼 (50.4%)、原因不明の緑内障は 31 頭 32 眼 (14.0%) であった。原発緑内障、続発緑内障および原因不明の緑内障症例の平均年齢はそれぞれ 9.8 ± 0.3 、 10.4 ± 0.3 、 10.9 ± 0.4 歳で、それぞれの間には有意差は認められなかった。続発緑内障の症例で緑内障と同時に認められた所見は白内障 (68 眼、59.1%)、水晶体不安定症 (44 眼、38.3%)、網膜剥離 (25 眼、21.7%)、ぶどう膜炎 (7 眼、6.1%)、白内障手術 (6 眼、5.2%)、ぶどう膜腫瘍 (6 眼、5.2%)、色素性緑内障 (2 眼、1.7%)、角膜穿孔 (1 眼、0.9%) であった。また、原因不明の緑内障の多くは慢性緑内障であり、大半は慢性経過によりすでに水晶体不安定症や網膜剥離が生じていたために、原因分類が困難である症例であった。

犬種別の緑内障発生眼数を図 2 に示した。犬種別の緑内障発生率はシー・ズーが最も多く 18.9%、次いで柴犬が 17.5%、ミニチュア・ダックスフンドが 12.3%、アメリカン・コッカー・スパニエルならびにトイ・プードルがそれぞれ 8.3%、パピヨンが 6.6%、チワワが 3.9%、雑種が 7.9%、その他の犬種が 16.2% であった。その他の犬種にはグレート・ピレニーズ、フラットコーテッド・レトリバー、フレンチ・ブルドッグ、ポメラニアン、パグ、マルチーズ、バセンジー、ミニチュア・シュナウザー、ジャック・ラッセル・テリア、ウェスト・ハイランド・ホワイトテリア、ウェルシュ・コーギー・ペンブローク、キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル、ケアン・テリア、ゴールデン・レトリバー、ラブラドル・レトリバー、ブリュッセル・グリフォン、ボーダー・コリー、ボストン・テリア、ミニチュ

ア・ピンシャー、ヨークシャー・テリア、ダルメシアンが含まれていた。犬種別の緑内障発生眼数では、柴犬は他犬種よりも原発緑内障が多く、続発緑内障が少ない、ミニチュア・ダックスフンドでは他犬種よりも原発緑内障が少なかった。さらに、トイ・プードルでは原因不明の緑内障が有意に多かった。

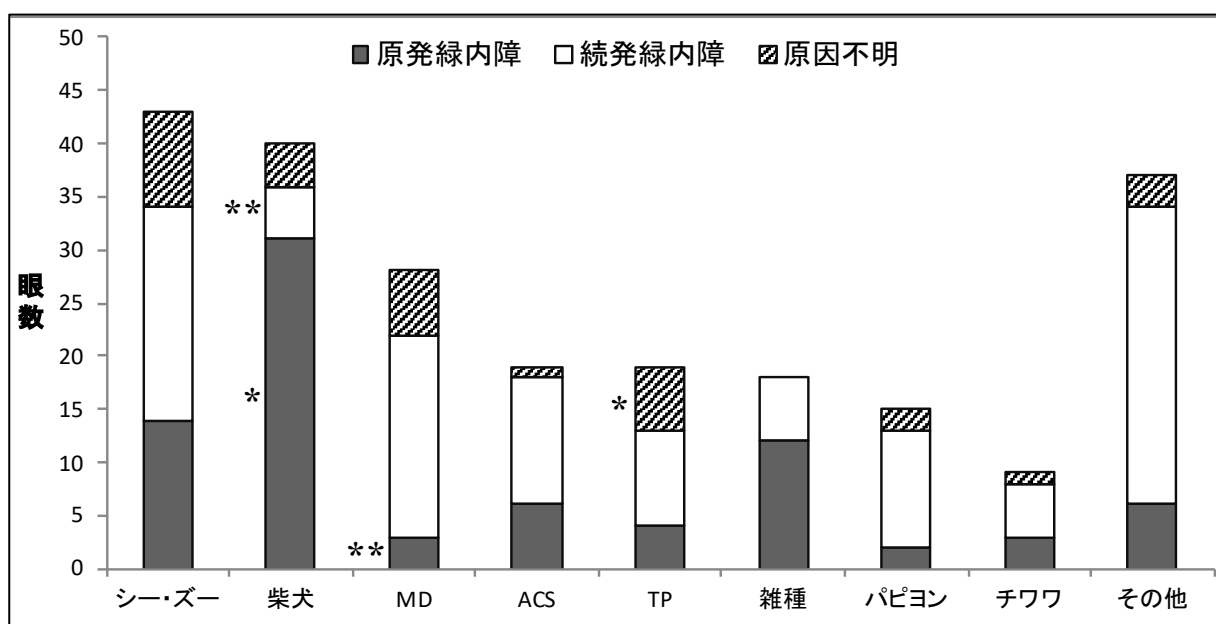


図 2. 犬種別の緑内障発生状況

犬種別の緑内障発生眼数ではシー・ズーが最も多く（18.9%）、次いで柴犬（17.5%）、ミニチュア・ダックスフンド（12.3%）という結果であった。また、分割表分析の結果、柴犬は他犬種よりも原発緑内障が多く、続発緑内障が少ない、ミニチュア・ダックスフンドでは他犬種よりも原発緑内障が少ない、さらにトイ・プードルでは原因不明の緑内障が多いということが統計学的に有意な差をもって認められた。MD：ミニチュア・ダックスフンド、ACS：アメリカン・コッカー・スパニエル、TP：トイ・プードル。図中の「*」は他の犬種よりも有意に多い犬種、「**」は他の犬種よりも有意に少ない犬種を示している（ $P < 0.05$ ）。

緑内障発生眼数の性差はオス 100 眼（うち去勢オス 74 眼）、メス 128 眼（うち避妊メス 89 眼）であり、統計学的に有意な差は認められなかった。

2. 初診時の視覚

初診時に「視覚あり」と判断された症例は 207 頭 228 眼のうち 60 頭 62 眼で全体の 27.2%であり、いっぽう、初診時に「視覚なし」と判断された症例は 154 頭 160 眼で全体の 70.2%であった。なお、「視覚なし」と判断された症例に関しては以降の治療によって視覚が回復し、維持できた症例は 2 頭 2 眼のみであった。また「不明瞭」と判断された症例は 6 頭 6 眼(2.6%)であった。

緑内障原因別による初診時の視覚については、「視覚あり」と判断された症例は原発緑内障では 81 眼中 34 眼（42.0%）、続発緑内障では 115 眼中 26 眼（22.6%）、原因不明の緑内障では 32 眼中 2 眼（6.3%）であり、原発緑内障では初診時の視覚維持率が有意に高く、原因不明の緑内障では視覚維持率が有意に低いことが示された（図 3）。

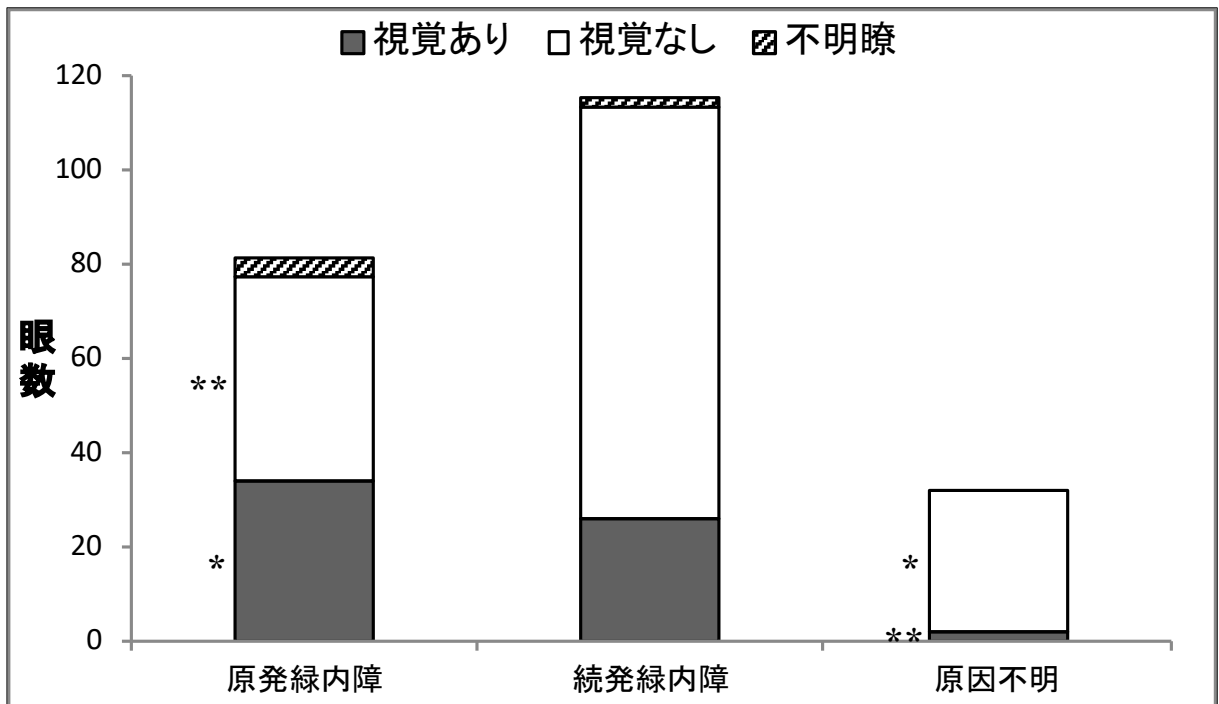


図 3. 緑内障原因別の初診時の視覚

原発緑内障では明らかに「視覚あり」が多く、原因不明の緑内障では「視覚なし」が多い。分割表分析により他の緑内障原因と比較して有意に多い場合を「*」、少ない場合を「**」で示した ($P < 0.05$)。

性別による初診時の視覚については、「視覚あり」と判断されたオスは 62 眼中 29 眼 (うち去勢オスは 19 眼)、メスは 160 眼中 33 眼 (うち避妊メスは 25 眼) であり、有意な差は認められなかった。

犬種別の初診時の視覚を図 4 に示した。柴犬は他の犬種に比べて「視覚あり」が多く、「視覚なし」が少ないことから、初診時の視覚維持率が高いことが示された。いっぽう、シー・ズーでは他の犬種よりも「視覚あり」が少なく、「視覚なし」が多いことから、初診時の視覚維持率が低いことが示された。また、雑種では他の犬種に比べて初診時の視覚が「不明瞭」である場合が多く、「視覚なし」が少なかった。

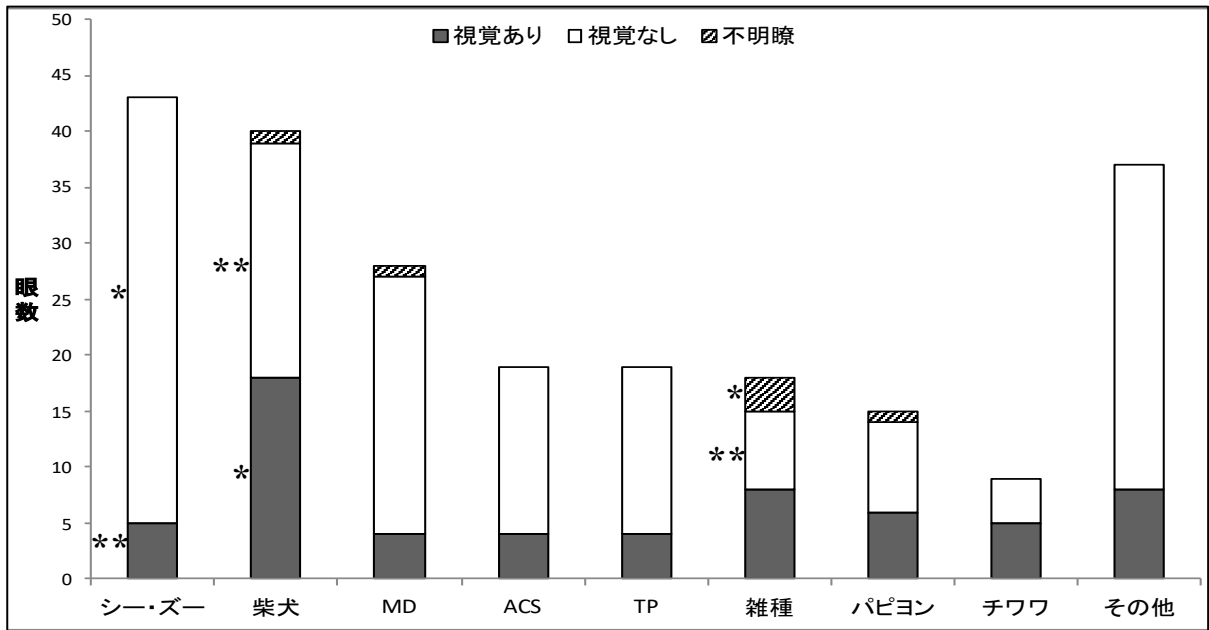


図 4. 各犬種における初診時の視覚

柴犬の初診時の視覚は他の犬種と比べると「視覚あり」が多く、「視覚なし」が少なかった。シー・ズーでは「視覚あり」が少なく、「視覚なし」が多かった。雑種では「不明瞭」が多く、「視覚なし」が少なかった。MD：ミニチュア・ダックスフンド、ACS：アメリカン・コッカー・スパニエル、TP：トイ・プードル。分割表分析により他の犬種よりも有意に多い場合は「*」、少ない場合は「**」で示した ($P < 0.05$)。

3. 視覚予後

初診時に視覚ありと判断された 60 眼 62 頭から原因不明の緑内障症例 (2 頭 2 眼) を除いた 58 頭 60 眼において、内科的治療群 (50 頭 52 眼、うち原発緑内障は 25 頭 27 眼、続発緑内障が 25 頭 25 眼) と AGV 群 (8 頭 8 眼、原発緑内障 7 頭 7 眼、白内障手術後の続発緑内障 1 頭 1 眼) の間で視覚予後についての比較検討を行った。KM 曲線では AGV 群が内科的治療群に比べて有意に高い視覚維持率で推移した (図 5)。視覚維持期間の中央値は内科的治療群が 9.9 週、AGV 群が 76.4 週であった。また、AGV 群においては

治療開始後 13 週以上では 8 頭のうち 6 頭 (75.0%)、1 年間以上では 5 頭 (62.5%) で視覚が維持された。いっぽう、内科的治療群では治療開始後 13 週以上で視覚維持できたのは 13 眼 (25.0%)、26 週以上では 8 眼 (15.4%)、1 年間以上では 4 眼 (7.7%) であった。

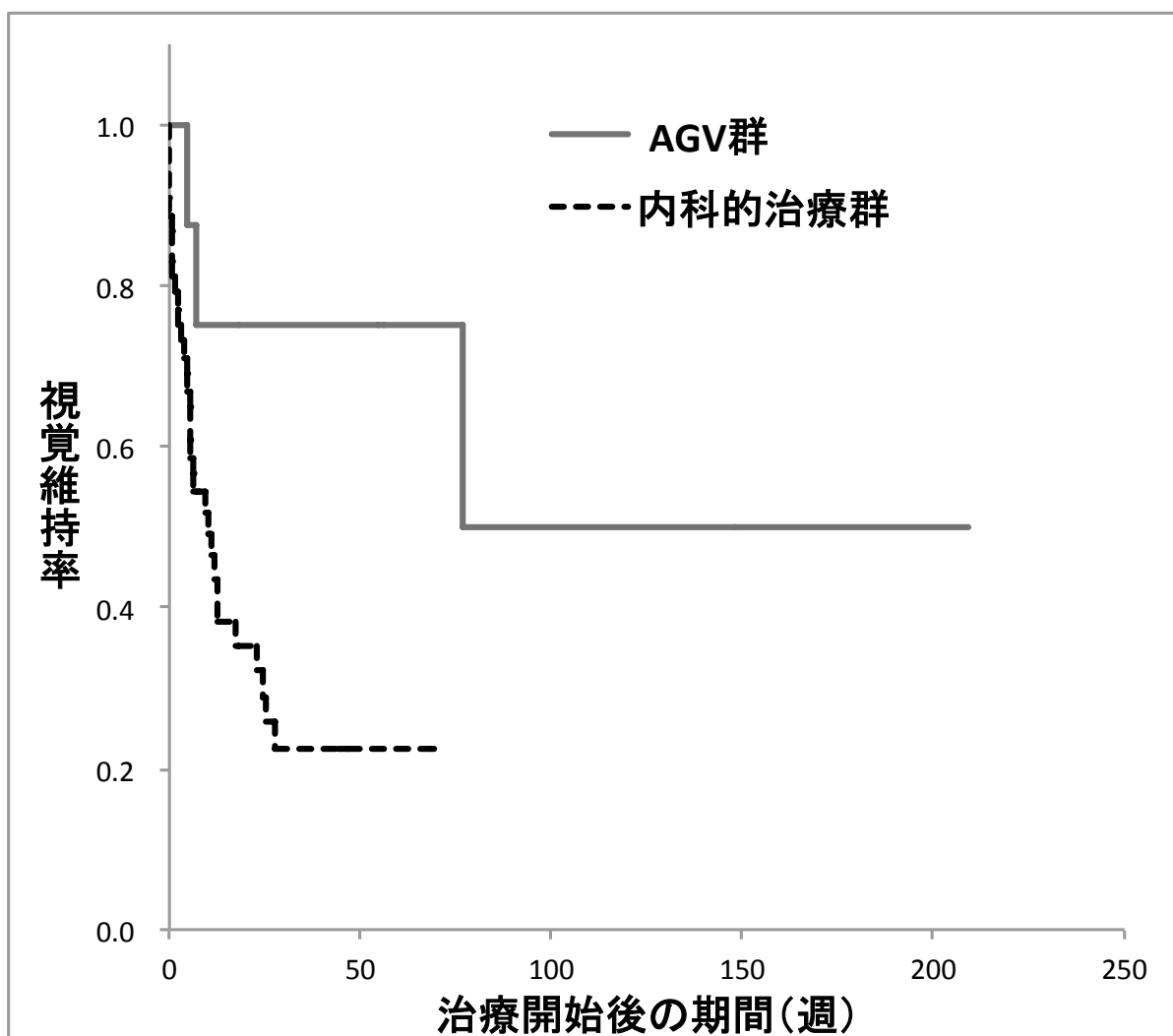


図 5. 治療方法による視覚予後の比較

AGV 手術を行った場合の視覚維持率は、内科的治療のみを行った場合よりも明らかに高く推移し、統計学的な有意差が認められた ($P < 0.05$)。

次に内科的治療群 50 頭 52 眼を対象に緑内障原因、性別、犬種による視覚予後の比較検討を行った。緑内障原因別の比較では KM 曲線は原発緑内障と続発緑内障とではほぼ同様な推移を示し、両群間に有意差は認められなかった (図 6A)。視覚維持期間の中央値は原発緑内障 7.0 週、続発緑内障 11.0 週であった。また、性別による視覚予後の比較についても KM 曲線はオスとメスでほぼ同様な推移を呈し、両群間に有意差は認められなかった (図 6B)。視覚維持期間の中央値はオスで 5.1 週、メスは 17.7 週であった。内科的治療群の犬種別内訳では特に柴犬が 14 頭 15 眼と多く、その他の犬種ではパピヨン 6 頭 6 眼、チワワ 5 頭 5 眼、ミニチュア・ダックスフンド 4 頭 4 眼、アメリカン・コッカー・スパニエル 4 頭 4 眼、シー・ズー 3 頭 3 眼、ミニチュア・ピンシャー 2 頭 2 眼、雑種 7 頭 7 眼、その他はそれぞれ 1 頭 1 眼でトイ・プードル、キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル、ケアン・テリア、ボーダー・コリー、マルチーズ、ヨークシャー・テリアであった。これらの結果から、柴犬以外の各犬種の頭数が少ないため、本研究では柴犬とその他の犬種の間で比較検討を行った。柴犬の KM 曲線はその他の犬種よりも明らかに低く推移し、統計学的有意差が検出された (図 6-C)。視覚維持期間の中央値については柴犬で 5.3 週、その他の犬種は 12.4 週と明らかな差が認められ、特に柴犬では初診後 22.6 週までに全ての症例で失明に至った。

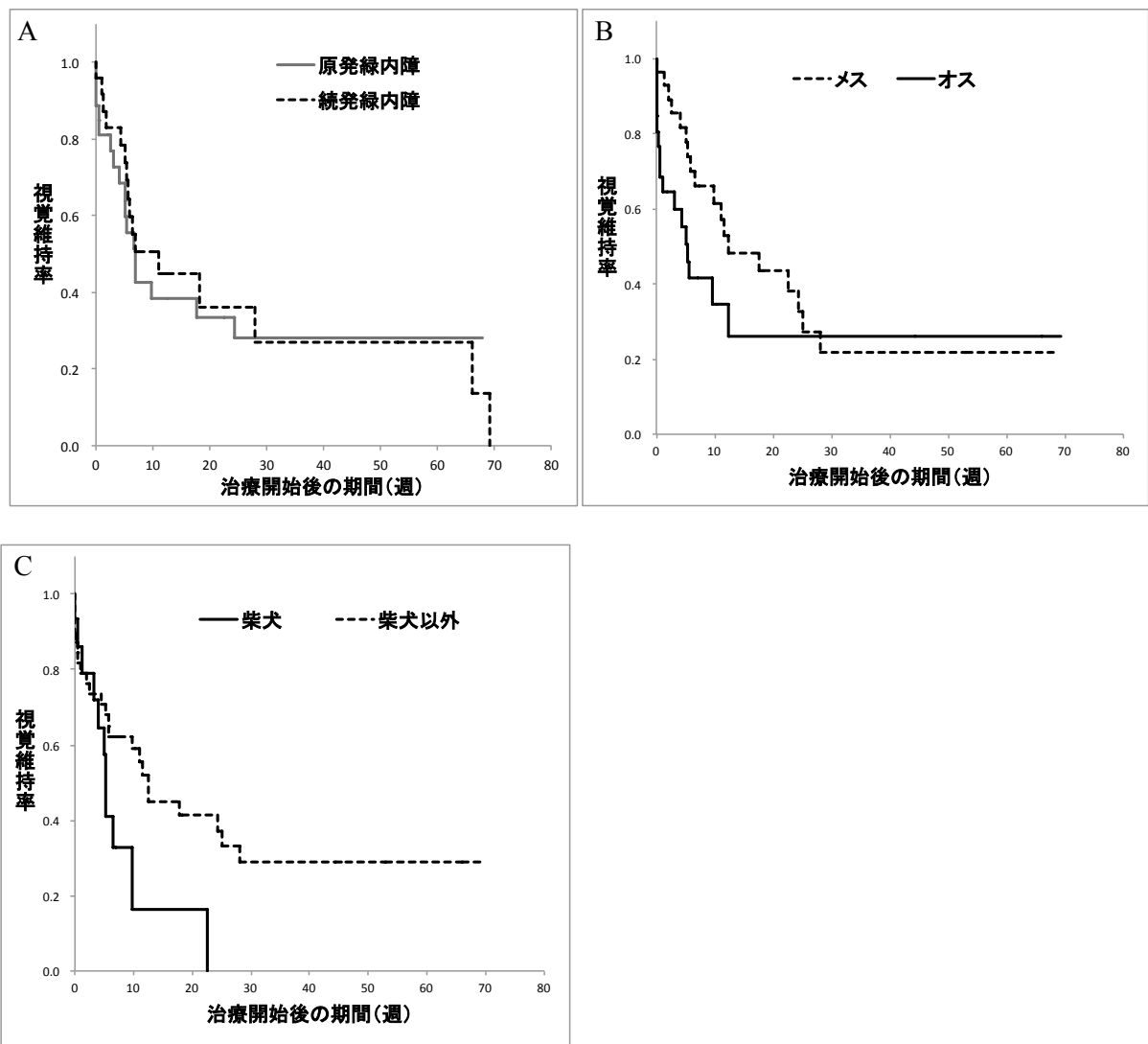


図 6. 内科的治療群における視覚予後の比較

緑内障原因別 (A)、性別 (B) による視覚維持率には統計学的な差は認められなかった。犬種別 (C) では柴犬の視覚維持率は柴犬以外の犬種と比較して明らかに低く推移し、統計学的有意差が認められた ($P < 0.05$)。

考察

犬の緑内障の発生状況については北米など海外での報告[3, 15, 46, 47, 49]が存在するが、本研究ではそれら既報の結果とは、特に品種差や性差、続発緑内障における併発眼病変について異なる成績となった。北米での調査では原発緑内障の好発犬種としてはアメリカン・コッカー・スパニエル、バセット・ハウンド、ワイヤー・フォックス・テリアおよびボストン・テリアなどが挙げられているが、本研究ではこれらの犬種における原発緑内障の好発傾向は認められず、統計学的に好発傾向が認められたのは柴犬のみであり、この成績は以前の日本での調査報告と同様であった[26, 29]。また、本研究ではトイ・プードルにおいて原因不明の緑内障の好発傾向が認められたが、北米での調査で本犬種は原発緑内障の好発傾向が認められており、この点についても異なる結果となった。イヌの続発緑内障の症例で同時に認められた眼所見は既報では白内障、ぶどう膜炎、水晶体不安定症が主体であったが、本研究ではこれらに加えて網膜剥離が多い傾向が認められ、網膜剥離を呈した 25 眼のうち 14 眼はシー・ズーであった[15, 25]。また、シー・ズーの続発緑内障症例 20 眼のうち網膜剥離が認められたのは 15 眼と高い割合であった。これらの要因として、シー・ズーは日本では人気犬種であり、飼養頭数が多いこと、シー・ズーは網膜剥離の好発犬種であることが推測されたが、今後はシー・ズーの緑内障について着目したより詳細な検討が必要であると考えられた[23]。イヌの原発緑内障では品種によりメスにおける好発傾向が知られているが、本研究では統計学的に有意な性差を認めた品種は無く、既報と異なる成績となった[15, 46]。本研究では日本における調査報告と同様な成績が得られたいっぽうで、それぞれの国における発生状況調査とは成績の相違を生じている要因としては、調査が行

われた地域のイヌの飼養状況（品種や環境）の差が大きく影響しているのではないかと推測された。

イヌの緑内障の初診時の視覚維持率について、原発閉塞隅角緑内障では急性うっ血性緑内障として症状を発現し、動物診療施設の受診時には約50%の症例はすでに失明しており、以降の内科的治療による反応が不良であるという報告がある[38]。また、日本での研究では、73.3%の症例で発症後3日以内に動物診療施設を受診しており、発症後3日以内に受診した症例の視覚維持率は54.5%であるが、発症後4日以降の場合では顕著に低下（8.9%）することが報告されている[24]。本研究における初診時の視覚維持率は以前の報告に比べて非常に低い成績（27.2%）であった。この要因としては、当院が二次診療施設であることから、飼い主が症状に気づいてホームドクターを受診し、紹介を受けて当院を受診するまでに時間が経過していることが考えられた。今回の研究ならびに既報の結果から、緑内障は急速に視覚喪失に至る眼科緊急疾患であるということの啓蒙をより一層努め、失明に至る前に適切な緑内障治療を開始できるように努力する必要があると考えられた。そのためには、より早期に客観的な診断をするための眼圧測定以外の補助的診断検査の作出も重要であると考えられた。

緑内障原因別の視覚予後比較では、原発緑内障における初診時視覚維持率が続発緑内障や原因不明の緑内障よりも高い割合であった。この要因として、本研究における原発緑内障症例では柴犬の割合が有意に高く、また犬種別の初診時視覚維持率は柴犬で有意に高いことが関連していると考えられた。柴犬の緑内障のほとんどは原発閉塞隅角緑内障であり[29]、初期に急性うっ血性緑内障を生じて強い眼疼痛を呈する傾向が認められる。本研究では、発症後に動物診療施設へ受診するまでの日数についての検討を行ってはいないが、柴犬の緑内障では急性期に生じる強い眼疼痛によって、

飼い主が眼の異常に気付きやすく、その結果、発症後早期に動物診療施設を受診することが多いのではないかと推測された。いっぽうでシー・ズーでは初診時の視覚維持率が他の犬種よりも低い傾向が認められた。本研究ではシー・ズーの緑内障の半数以上が続発緑内障であり、その大半で続発緑内障と同時に網膜剥離が観察されたことから、シー・ズーでは続発緑内障と診断された時点ですでに網膜剥離によって失明していることが多く、それがシー・ズーにおける初診時の低い視覚維持率に反映されたのではないかと推測された。

イヌの緑内障治療については、近年、様々な手術デバイスならびに手術機器が応用可能となり、視覚維持のための外科的治療の選択肢が増えた。イヌの緑内障についての視覚と眼圧維持のための緑内障手術の成績について多くの報告があるが、いずれも術後成績の報告が主体であり、手術を行わずに内科的治療のみを行った場合との比較検討が行われていない[6, 10, 16, 17, 21, 41]。これには内科的治療には抗緑内障薬や消炎鎮痛薬を含めて非常に多くの治療選択肢が含まれているため、比較検討が非常に困難であるということも原因であったと考えられた。しかしながら本研究では、手術以外の内科的治療のみを行った場合と外科手術を併用した場合の二群に大別することで、より客観的な比較検討を行った。本研究では初診時に視覚が維持されており、その後に AGV 手術を行った症例数が少ない点がリミテーションとはなるが、統計学的解析により AGV 手術群では内科的治療群よりも視覚予後が良好との成績が得られた。また、内科的治療群の視覚維持期間の中央値が 9.6 週で、さらに経時的な視覚維持率の明瞭な低下から、イヌの緑内障では内科的治療による長期的な視覚維持は非常に困難であることを裏付けるデータが得られた。したがって、長期間の視覚維持を期待するのであれば、手術適応可能な症例の場合は内科的治療よりも積極的に

AGV 手術を検討すべきであると考えられた。また、本研究で得られた調査結果は内科的治療のみを実施した場合にも、その視覚予後情報を飼い主に提示する場合の有用な情報材料になると考えられた。

本研究では内科的治療群において、緑内障原因や性別、犬種による治療後の視覚予後について比較検討を行ったが、同様の検討を行った報告は著者の知る限り存在しない。よって、本研究と他の研究との比較検討はできないが、本研究の成績は今後の研究の基礎データとなると考えられた。既報では、一般には原発緑内障においては急速に失明に至ることが多いため、続発緑内障に比べて視覚予後が不良であると考えられているが、本研究では原発緑内障と続発緑内障の間で視覚予後に有意な差は認めらなかった [24, 38]。犬種別の治療成績については、特に柴犬での視覚維持率は有意に低下することが認められ、最終的には全ての柴犬の症例で失明に至り、柴犬での内科的治療予後は他犬種よりも不良であることが示された。よって、本研究では、柴犬は他犬種に比べて原発緑内障の好発傾向があり、初診時の視覚維持率が高いにも関わらず、内科的治療による視覚予後が不良であるとの特徴が示された。したがって、柴犬の緑内障症例では視覚維持のために AGV 手術を特に積極的に検討すべきであると考えられた。

本章におけるリミテーションは、一点目に他の報告と同様に回顧的研究であること、二点目に眼科二次診療施設における調査であること、三点目に対象とした犬種の地域的な相違により、他の地域では異なった成績となる可能性が十分にあることであると考えられる。よって、今後は様々な地域において同様の検討を行う必要があると考えられた。また、イヌの内科的な緑内障治療では視覚維持のために非常に多彩な薬剤の投与を行うことが多く、本研究においても内科的治療群での投薬内容、投薬回数や投与経路などの条件が一定ではなかったこともあり、今後は条件設定を統一化し

た前向き研究を行う必要があると考えられた。

小括

本章ではイヌの緑内障診断と治療における課題について検討、確認することを目的として獣医眼科の二次診療施設「どうぶつ眼科 VECS」におけるイヌの緑内障発生状況を調査するとともに、視覚予後に影響する要因（内科的治療のみ行った症例と AGV 手術を行った症例の比較、さらに内科的治療のみを行った症例を対象として緑内障原因、性別、犬種による比較）について回顧的に調査した。当院に初診として来院し、緑内障と診断され、かつ治療開始後 30 日以上経過観察が可能であった 207 頭 228 眼について調査を行った。

緑内障原因別の発生状況は原発緑内障が 35.5%、続発緑内障が 50.4%、原因不明の緑内障が 14.0%であり、各群間に有意差は認められなかった。犬種別の緑内障発生率では、柴犬は他犬種よりも原発緑内障が多く、続発緑内障が少ない、ミニチュア・ダックスフンドでは他犬種よりも原発緑内障が少ない、さらにトイ・プードルでは原因不明の緑内障が多いという統計学的有意差が認められた。緑内障発生率に性差は認められなかった。視覚予後についての調査では初診時に「視覚あり」と判断されたのは 27.2%であった。継時的な視覚維持率は内科的治療群に比べて AGV 群で統計学的に有意に高く推移し、視覚維持期間の中央値も AGV 群の方が長かった。また、内科的治療群における視覚予後については原因別や性別では有意差が認められなかったが、柴犬では柴犬以外の犬種に比べて継時的な視覚維持率は有意に低く推移し、視覚維持期間の中央値も短いという結果であった。

イヌの緑内障発生状況調査では欧米での調査と比較して、とくに品種差や性差、続発緑内障における併発眼病変について異なる成績となった。いっぽうで、日本での調査報告とは同様な成績であり、この成績の相違には

調査が行われた地域のイヌの飼養状況（品種や環境）の差が大きく影響しているものと推測された。また、初診時の視覚維持率は既報に比べて、著しく低く、これらのことより、イヌの緑内障ではより早期に、かつ適切な診断、治療を開始することが重要な疾患であることについて、一層の啓蒙に努めるべきであると考えられた。さらに、早期診断のために眼圧測定以外の有用な補助的診断法の作出も重要であると考えられた。緑内障治療による視覚予後比較から内科的治療のみを行うよりも AGV 手術を併用した方が視覚予後は良好であることが示唆された。よって、イヌの緑内障では視覚が維持されており、かつ適切な症例であれば AGV 手術を考慮すべきであり、とくに柴犬の場合は内科的治療のみでは視覚予後が不良である傾向が認められたことから、より積極的に AGV を検討すべきであると考えられた。

第Ⅱ章 イヌの緑内障の眼房水における 2DE ならびに MALDI-TOF MS を用いた網羅的蛋白質解析

小緒

近年の医学では技術や機器の発達により、早期段階でヒトの緑内障診断が可能となった。緑内障はヒトにおける失明原因の主要な原因となっているものの、技術や機器の発展によって病態が複雑である場合を除いては、一般に安定した治療経過を辿り、視覚予後も概して良好である。いっぽう、ヒト医学領域で応用されている新しい診断技術や診断機器は獣医眼科学領域での臨床応用は非常に困難である。このため、病態についての理解が深まった今日においても、イヌの緑内障診断のためには、未だ特徴的な臨床症状や眼底所見ならびに眼圧測定に頼らざるを得ない。特徴的臨床症状や眼底所見はイヌの緑内障が重度に進行しないと不明瞭であることから、積極的な治療を行ったとしても視覚予後は不良であることが多い。したがって、より早期に診断を行い、治療による視覚予後を改善するためには、臨床応用可能な新しい診断法や診断機器の開発が必要であると考えられる。

眼房水は前房、瞳孔、後房を満たす無色透明の液体であり、眼内の無血管組織への栄養供給や代謝産物の排泄といった役割を担っている。眼房水の産生と排出は、単に前眼部の解剖学的な構造だけでなく、神経伝達物質、ホルモン、プロスタグランジン、蛋白質およびプロテオグリカンなどを含む多数の内因性物質によっても影響を受ける[19, 33]。眼房水は前房穿刺によって採取可能であり、細胞診、細菌培養や抗生剤感受性試験、蛋白質測定、PCR および抗体価測定など、検査サンプルとしても活用されている[12]。特に近年では、様々な眼疾患の研究のためにヒトやその他の動物の眼房水

を用いた蛋白質解析が行なわれている[8, 11, 18, 44, 45]。

本研究はイヌの緑内障における新たな診断パラメーターの作出を目的として、正常なイヌと緑内障症例の眼房水を用いて 2DE ならびに MALDI-TOF MS による網羅的な蛋白質解析を行った。

材料と方法

本研究は「どうぶつ眼科 VECS」ならびに酪農学園大学附属動物医療センターにおいて、飼い主の同意のもとで、酪農学園大学動物実験委員会の定めるガイドラインに基づいて実施した。（承認番号：第 VH21B24 号）

1. 正常なイヌの眼房水サンプル採取

酪農学園大学において飼養されている正常なビーグル 5 頭（表 1、No. 1～5）をコントロールとし、それぞれについて威嚇瞬目検査、対光反射、眩目反射、眼圧測定、スリットランプ検査、眼底検査、隅角鏡検査を含めた眼科検査を実施し、眼圧に影響を与えるような眼科疾患（緑内障、水晶体亜脱臼、重度な硝子体の前房内逸脱、進行した白内障）が存在しないことを確認した。眼房水採取は、ミダゾラム 0.15 mg/kg（Midazolam, FujiPharma, Toyama, Japan）、酒石酸ブトルファノール 0.025 mg/kg（Vetorphale, Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan）、塩酸メデトミジン 0.01 mg/kg（Domitor, ZENOAQ, Fukushima, Japan）の静脈内投与により不動化、鎮静を行い、さらに 0.4% 塩酸オキシブプロカイン点眼液（Benoxil ophthalmic solution 0.4%, Santen, Osaka, Japan）の点眼投与による点眼麻酔を行った上で角膜輪部より 27G 皮下注射針を前房内へ刺入して採取した。なお、眼房水採取は各犬よりランダムに選択した片眼のみから実施した。採材終了後は塩酸アチパメゾール 0.05 mg/kg（Antisedan, ZENOAQ, Fukushima, Japan）を静脈内投与して覚醒を確認した。また、眼房水の採取終了後の細菌感染予防として 0.3% オフロキサシン点眼液（PHARXACIN Ophthalmic solution 0.3%, KYORIN Rimedio, Toyama, Japan）の点眼投与を 1 日 3～4 回、ぶどう膜炎の予防としてテポキサリン（Zubrin, Intervet, Tokyo, Japan）の経口投与（10 mg/kg）を 1 日 1 回、

1 週間継続した。採取した眼房水は分析が行われるまで-80°Cで保存した。

表 1. 正常犬および緑内障犬の一覧

| No. | 犬種 | 年齢(歳) | 性別 | 被検眼 | 眼疾患 | 眼房水採取前の 眼圧(mmHg) |
|-----|-----------------------|-------|------|-----|-----------------|---------------------|
| 1 | ビーグル | 1 | オス | 右眼 | なし、コントロール | 17 |
| 2 | ビーグル | 1 | メス | 左眼 | なし、コントロール | 17 |
| 3 | ビーグル | 6 | メス | 左眼 | なし、コントロール | 11 |
| 4 | ビーグル | 7 | オス | 左眼 | なし、コントロール | 11 |
| 5 | ビーグル | 7 | メス | 右眼 | なし、コントロール | 13 |
| 6 | 柴犬 | 8 | 避妊メス | 右眼 | 原発緑内障 | 26 |
| 7 | シー・ズー | 9 | メス | 左眼 | 原発緑内障 | 23 |
| 8 | シー・ズー | 3 | オス | 右眼 | 原発緑内障 | 69 |
| 9 | キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル | 5 | オス | 左眼 | 続発緑内障(白内障、網膜剥離) | 62 |
| 10 | ミニチュア・ダックスフンド | 10 | オス | 左眼 | 続発緑内障(白内障) | 39 |
| 11 | ジャック・ラッセル・テリア | 7 | メス | 右眼 | 続発緑内障(白内障) | 51 |

続発緑内障の括弧内は原発眼疾患を示す。

2. 緑内障症例からの眼房水サンプル採取

獣医眼科二次診療病院である「どうぶつ眼科 VECS」において原発緑内障と診断された3頭3眼、続発緑内障と診断された3頭3眼(表1、No. 6~11)について、強膜内シリコンボール移植術(No. 6~10)および硝子体内ゲンタマイシン注入術(No. 11)を行なう際に全身麻酔下で外科処置を開始する前に正常犬と同様な方法で眼房水を採取し、保存した。また、これらの緑内障症例術前に正常犬と同様の眼科検査を行った。続発緑内障における併発眼疾患は白内障と水晶体原性ぶどう膜炎(No. 9~11)および網膜剥離(No. 9)であった。また、眼圧と眼房水採取後の房水所見、緑内障の罹患期間、治療のために投与された薬剤については表1と表2に示した。

表 2. 緑内障症例における眼房水採取前の眼房水所見、緑内障罹患期間および投薬内容

| No. | 房水フレア または 眼房水中浮遊細胞 | 罹患期間 | 眼房水採取前の投薬内容 | | | |
|-----|--------------------------|------|--|------------|--|--------------------------|
| | | | 抗緑内障薬の点眼投与 | 抗緑内障薬の全身投与 | 消炎剤の点眼投与 | 消炎剤の全身投与 |
| 6 | - | 19カ月 | 2% 塩酸カルテオロール点眼(BID) | - | - | - |
| 7 | - | 3カ月 | 0.12% イソプロピルウノプロストン点眼(BID) | - | - | - |
| 8 | - | 1カ月 | 0.25% ニブラジロール点眼 (BID) 1.0% 塩酸ドルゾラミド点眼 (TID) 0.005% ラタノプロスト点眼 (BID) | - | 1.0% 酢酸プレドニゾン点眼 (TID) | カルプロフェン (2.2 mg/kg, BID) |
| 9 | - | 23日 | 1.0% 塩酸ドルゾラミド点眼 (TID) | - | 0.1% デキサメサゾン/ネオマイシン/ポリミキシンB混合点眼 (SID-TID) 0.1% ジクロフェナクナトリウム点眼 (TID) | フィロコキシブ (5 mg/kg, SID) |
| 10 | - | 9カ月 | 0.005% ラタノプロスト点眼 (BID) | - | - | - |
| 11 | - | 9日 | 0.5% マレイン酸チモロール点眼 (BID) 1.0% 塩酸ドルゾラミド点眼 (TID) 0.005% ラタノプロスト点眼 (TID) | - | 0.1% ジクロフェナクナトリウム点眼 (BID) | カルプロフェン (4.4 mg/kg, SID) |

3. 2DE による眼房水中蛋白質の分離

正常犬 5 頭 5 眼、原発緑内障 3 頭 3 眼、続発緑内障 3 頭 3 眼より採取した眼房水サンプルを蛋白質の濃縮と脱塩のために Amicon Ultra[®] (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) を用いて 4°C で処理した。これら全ての濃縮サンプルの蛋白質濃度を 2D-Quant kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) により測定した。IEF には PROTEANR IEF Cell electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いた。総蛋白質量を 8μg に調整したサンプルと 8M 尿素、2% CHAPS、0.5% carrier ampholytes (Bio Lyte[®] 3-10 buffer, Bio-Rad)、18mM DTT ならびに bromophenol blue を含む溶

液を総量 125 μ L になるように混合し、immobilizing pH gradient gels (ReadyStripTM IPG Strips; 7cm, 3-10 NL, Bio-Rad) に 20°C、14 時間で浸潤させた。IEF は 250V で 1 時間、4,000V で 2 時間、4,000V で 30,000V-hr で実施した。Focused strip gel は 64.8mM DTT を含む平衡化緩衝液中で 30 分間平衡化し、135mM iodoacetamide 中で 30 分間アルカリ化した。Laemmli の方法[32]に従い、bromophenol blue 色素がゲル底部に到達するまで 4°C、5mA/gel で SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE 後、ゲルを銀染色 (DodecaTM silver stain kit; Bio-rad) および CBB 染色を実施した。

4. In-gel digestion ならびに MALDI-TOF MS による蛋白質同定

CBB 染色により観察されたスポットに対応し、銀染色により認められ蛋白質スポットを切り出し (ゲル小片)、50mM NH₄HCO₃ と 50% メタノールの混合液により脱色した。ゲル小片を Milli-Q 水により洗浄した後、50mM NH₄HCO₃ と 50% AN の混合液により脱水し、さらに、100% AN により脱水した。5 μ L の 50mM NH₄HCO₃ に溶解したブタトリプシン (50ng; Promega, Madison, WI, USA) と 5 μ L の 100mM Tris-HCl (pH8.8) をゲル小片に加え、ゲル中の蛋白質を 37°C、15 時間で消化した。生じたペプチドを 50% AN / 0.1% TFA によってゲル小片から溶出し、液量が 20 μ L になるまで吸引濃縮した。サンプルを 50% AN / 0.1% TFA、さらに 90% AN / 0.1% TFA で溶出し、カラムチップ (ZipTip[®]; Millipore Corporation) を用いて浄化し、MALDI のターゲットに塗布した。続いて、0.5 μ L の 25% α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) と 50% AN ならびに 0.1% TFA を重層し、MALDI のターゲット上でサンプルと混合した。消化されたペプチド断片を MALDI-TOF MS (Autoflex[®], Bruker Daltonics) を用いて分析し、MASCOT 解析プログラム (www.matrixscience.com) で質量分光計データか

ら得られたペプチド配列を同定した。得られたデータの質量と pI 値の比較から得られた蛋白質を同定した。これらの方法を用いて、正常犬と緑内障症例の眼房水において観察された蛋白質スポットの同定を行った。

結果

正常犬と緑内障症例における泳動パターンの比較では、発現が異なる蛋白質のスポットが3カ所観察された(図7)。2DEにおいて、正常犬では明瞭で、原発緑内障、続発緑内障の症例では不明瞭なスポットとして Spot1 (S1) が検出され、MALDI-TOF MS ならびに MASCOT 解析プログラムにより S1 は ON と同定された。いっぽう 2DE において、正常犬では不明瞭で、原発緑内障、続発緑内障では明瞭なスポットとして Spot2 (S2) および Spot3 (S3) が検出され、MALDI-TOF MS ならびに MASCOT 解析プログラムにより S2 は補体 B 因子と同定されたが、S3 は同定には至らなかった。原発緑内障症例と続発緑内障症例については 2DE 像に特異的な相違は認められなかった。

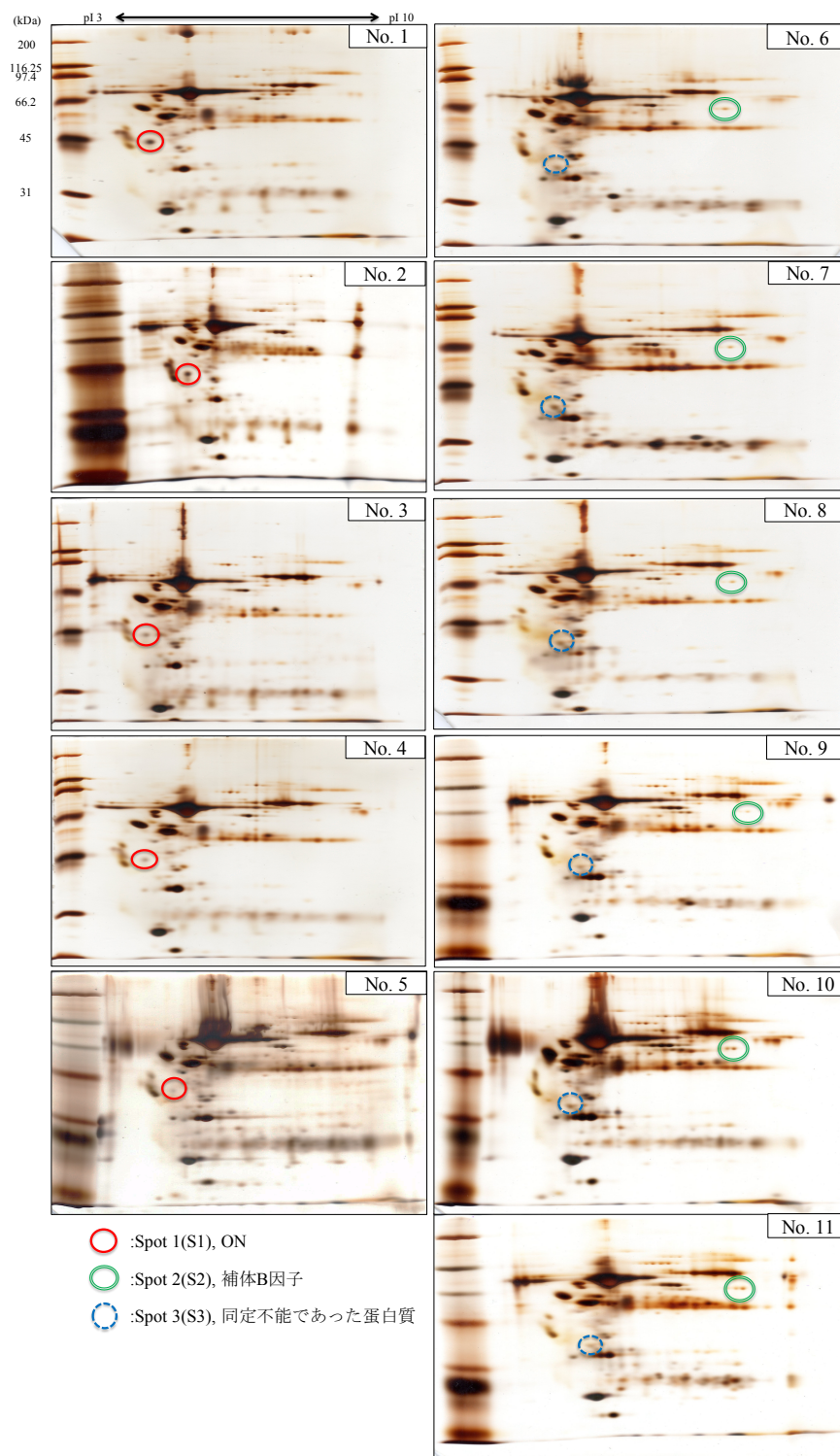


図 7. 眼房水サンプルの 2DE 像

症例番号は表 1 に対応。No. 1～5：正常犬、No. 6～8：原発緑内障症例、No. 9～11：続発緑内障症例。

考察

眼房水を材料とした 2DE による蛋白質解析はヒトやウサギにおいて、緑内障をはじめ、様々な眼疾患との関連性についての研究に利用されている [8, 11, 18, 44, 45]。しかし、イヌでは正常犬の眼房水の 2DE についての報告やその他の疾患との関連性を検討した報告は筆者の知る限りには見当たらない。今回、我々が実施した 2DE ならびに MALDI-TOF MS を用いた正常犬と緑内障症例との眼房水中蛋白質の網羅的比較検討は、イヌの眼疾患に対する検討を行った初めての報告である。

ON は分子量 43kDa の糖蛋白質であり、SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein) あるいは BM-40 とも呼ばれ、カルシウム接着性 *matricellular protein* として主に細胞外基質のリモデリングの役割を担っていると考えられており [4, 7]、緑内障と ON の関連性についてはいくつかの研究報告がある。一つはヒトの原発閉塞隅角緑内障の症例で ON と I 型コラーゲンの発現が顕著に増加しており、ON が原発閉塞隅角緑内障の発展へ関与していることを示唆する報告がある。また、同報告では原発開放隅角緑内障の症例でも対照と比べて ON ならびに I 型コラーゲンの発現が増加したとの成績であった [9]。また、ON 発現が起こらない SPARC-null mouse を用いた研究では、正常なマウスに比べて眼圧は低値であったと報告されている [20]。本研究における緑内障症例での眼房水中の ON 量の低下はこれらの研究とは相反する成績となった。本研究ではこの相違が生じた原因の特定はできないが、ヒトとイヌでは緑内障の形成機序が大きく異なる可能性があるかと推測された。

緑内障と補体との関連性についてはいくつかの報告があるが [22, 31, 43, 48]、本研究における緑内障症例の眼房水中に増加が認められた補体 B 因子

に関しての報告はない。一般に補体は炎症性、免疫介在性反応のメディエーターであることから、本研究で検出された緑内障症例における補体 B 因子の眼房水中の増加は炎症性、免疫介在性変化の結果であるとも考えられた。

本研究では、緑内障症例において 3 種類の眼房水中蛋白質の動態の変化が検出されたが、これら蛋白質出現レベルの変化が緑内障の形成に關与しているのか、または緑内障の結果として生じているのかは今回の研究では十分に検討できなかった。しかしながら、特に緑内障症例における眼房水中の ON 出現量の低下は非常に明瞭で特徴的な所見であると考えられ、イヌの緑内障における補助的な診断パラメーターになり得る可能性が示唆された。さらに、本研究で認められた補体 B 因子および特定に至らなかった S3 の眼房水中の増加についても引き続き検討することによって、より有意な緑内障診断が可能になるかも知れないと考えられた。

以上より、2DE ならびに MALDI-TOF MS を用いた眼房水中の蛋白質比較解析は、正常犬と緑内障症例についての比較解析を行う際に非常に有用な手法であり、さらにイヌの緑内障における新たな診断パラメーターとなり得る可能性がある、または診断パラメーター作出のために有用な解析方法であると考えられた。なお、本研究は眼房水を用いた研究であり、眼組織におけるそれぞれの蛋白質の発現状況は不明である。今後は緑内障症例において眼房水中で出現量に変化が認められた蛋白質についての眼組織中の発現を免疫組織化学的検索等により検証を行う必要があると考えられた。また、本研究ではあくまで蛋白質出現レベルの定性的な比較検討であったため、今後は正確な定量的な比較検討が課題であると考えられた。本研究において、眼房水の採取が可能であった緑内障症例は全てエンドステージの症例であったため、病初期におけるこれらの眼房水蛋白質の動態につい

ては不明である。よって、今後は様々な病期ステージの症例における検討を行い、これらの眼房水中蛋白質の発現変化の病態への関連性ならびに緑内障早期診断への応用の可能性について検討を行う必要があると考えられた。

小括

本研究はイヌの緑内障症例における新たな診断パラメーターの作出を目的として、正常なイヌと緑内障症例の眼房水を用いて 2DE ならびに質量分析による網羅的蛋白質解析を行った。正常なビーグル 5 頭ならびにイヌの緑内障症例 6 頭（原発緑内障 3 頭、続発緑内障 3 頭）から眼房水サンプルを採取し、2DE ならびに MALDI-TOF MS による眼房水中の蛋白質解析を行った。正常犬と緑内障症例の 2DE 像比較では 3 種の異なる蛋白質スポットが検出され、うち 2 種は MALDI-TOF MS により ON、補体 B 因子と同定されたが、1 種は同定に至らなかった。緑内障症例では正常犬に比較し、眼房水中の ON 出現量の低下、補体 B 因子および同定不能であった蛋白質の出現量の増加が認められた。また、原発緑内障症例と続発緑内障症例との 2DE 像の比較では相違は認められなかった。

本研究で実施した眼房水の網羅的蛋白質解析により、とくに ON、補体 B 因子などの蛋白質の動態の変化を捉えることが可能であった。よって、本手法は正常犬と病犬との比較検討に有用な分析方法であり、さらにイヌの緑内障における新たな診断パラメーターとなり得る可能性がある、または診断パラメーターの作出のために有用な解析方法であると考えられた。今後は、本章で検出された眼房水中の蛋白質についての眼組織内での発現状況と定量的解析および様々な病期ステージにおける検討を行う必要があると考えられた。

第Ⅲ章 イヌの緑内障眼組織における ON の免疫組織化学的検索

小緒

イヌの緑内障における眼圧上昇は眼房水の排出路である隅角（虹彩角膜角）およびぶどう膜強膜流出路における眼房水流出抵抗が生じて発生すると考えられている。また、イヌの原発緑内障は他の眼疾患の存在しない状態で眼圧上昇が生じ、多くの犬種で遺伝性要因が示唆されており、両眼性に発症する。原発緑内障は眼房水排出の主経路を司る線維柱帯細胞の異常な生化学的代謝または生理的な瞳孔ブロック効果および虹彩角膜角や毛様体裂における形態学および機能的変化の結果生じると推測されている[38]。さらにイヌの開放隅角緑内障では隅角を形成する線維柱帯網から毛様体裂、静脈強膜洞における ECM の変化による、また閉塞隅角緑内障では主に先天性の隅角形成異常（隅角異形成）による眼房水流出抵抗が関連すると推測されているが、未だ原因は明らかとなっていない。緑内障症例において、眼房水の主流出路である隅角を形成する櫛状靭帯、線維柱帯網、毛様体裂ならびに強膜静脈洞、副流出路であるぶどう膜強膜流出路における分子学的変化は未だ分かっていないものの、これら組織における ECM のターンオーバーは緑内障の病態において重要な一要因を担っていると考えられている[2, 5, 39, 40, 51]。

ON は分子量 43kDa の糖蛋白質であり、SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein) あるいは BM-40 と呼ばれ、カルシウム接着性 matricellular protein として、主に ECM のリモデリングの役割を担っていると考えられており、緑内障と ON の関連性についてはいくつかの研究報告がある[9, 20, 42]。

本論文第Ⅱ章において、イヌの緑内障症例における特徴的所見として眼房水中の ON 出現レベルの顕著な低下が検出された。本所見はイヌの緑内障の病態に ON が何らかの関連性を有することを示唆する所見であると考えられたが、緑内障症例における眼組織中の ON 発現については不明であり、その検証が今後の課題として残された。そこで本章では、緑内障症例において認められた眼房水中の ON の変化が眼組織内での発現と関連しているかを確認することを目的として、正常眼、原発緑内障症例、続発緑内障症例の眼球を対象に ON についての免疫組織化学的検索を実施した。

材料と方法

1. 供試動物

酪農学園大学において所蔵する正常なイヌの眼球 5 眼（ビーグル 4 頭 4 眼、柴犬 1 頭 1 眼）ならびに獣医眼科二次診療病院である「どうぶつ眼科 VECS」において採取した原発緑内障症例の眼球 3 眼（柴犬 1 頭 1 眼、ミニチュア・ダックスフンド 1 頭 2 眼）ならびに続発緑内障症例の眼球 2 眼（シー・ズー 1 頭 1 眼：水晶体前方脱臼、フレンチ・ブルドック 1 頭 1 眼：網膜剥離ならびに眼内出血）を使用した（表 3）。採材した眼球は 10% 中性緩衝ホルマリンにて 24～48 時間浸漬により固定した。

表 3. 対象症例一覧

| No. | 犬種 | 年齢 | 性別 | 対象眼 | 初発疾患 |
|------|---------------|----|------|-----|-----------|
| 正常 1 | ビーグル | 1 | オス | 不明 | なし |
| 正常 2 | ビーグル | 3 | オス | 不明 | なし |
| 正常 3 | ビーグル | 5 | 避妊メス | 右眼 | なし |
| 正常 4 | 柴犬 | 9 | メス | 左眼 | なし |
| 正常 5 | ビーグル | 13 | メス | 不明 | なし |
| 原発 1 | 柴犬 | 9 | 去勢オス | 右眼 | なし |
| 原発 2 | ミニチュア・ダックスフンド | 11 | 避妊オス | 左眼 | なし |
| 原発 3 | ミニチュア・ダックスフンド | 11 | 避妊メス | 右眼 | なし |
| 続発 1 | シー・ズー | 8 | メス | 右眼 | 水晶体前方脱臼 |
| 続発 2 | フレンチ・ブルドック | 8 | 去勢オス | 左眼 | 網膜剥離、眼内出血 |

正常：正常眼、原発：原発緑内障症例、続発：続発緑内障症例

2. 免疫組織化学的検索（酵素抗体法）

ホルマリン固定された眼球はアルコール、キシレンに浸漬し、パラフィン包埋した。パラフィン包埋後、5 μ m の厚さにパラフィン切片を作製した。免疫組織化学的検索は ABC（ABC; Vectarstain Elite ABC Kit, Vector Laboratory Inc., Burlingame, CA, U.S.A.）法により行った。一次抗体には抗ウシ ON 抗体（AON-1; Developmental Studies Hybridoma Bank, IA, U.S.A.）を使用し、一次抗体に対する抗原賦活化は行わなかった。作製パラフィン切片をキシレンにて脱パラフィンし、エチルアルコールを通した後、水洗した。十分な流水洗を行い、内因性ペルオキシダーゼの不活化を目的として、0.05% HIO₄ 水溶液に室温で 15 分間の浸漬を行った。非特異的反応除去を目的として、ブロックエース（Block Ace[®]; DS Farma Biomedical, Osaka, Japan）に 37°C で 30 分間の浸漬を行った。一次抗体は PBS にて 200 倍に希釈し、希釈一次抗体を切片上にのせ、保湿箱内で 4°C で一昼夜反応させた。一次抗体反応終了後、PBS 洗浄と 0.05% トライトンへの浸漬を行い、二次抗体としてビオチン標識抗マウス IgG 抗体（Vector Laboratories., Burlingame, CA, U.S.A.）を用いて室温で 30 分間反応させた。二次抗体反応後、十分な PBS 洗浄を行い、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（Vector Laboratories., Burlingame, CA, U.S.A.）に室温で 30 分間反応させ、0.05% 3,3-diaminobenzidine in PBS、0.01% H₂O₂ 水溶液（DAB, KANTO CHEMICAL, Tokyo, Japan）を用いて発色反応を行った。すべての組織の対比染色には Mayer のヘマトキシリン染色（MUTO PURE CHEMICALS, Tokyo, Japan）を行った。一次抗体の陽性対象にはウシの骨肉腫組織切片を用いた。陰性対象には一次抗体または二次抗体のそれぞれ混和のない溶液を使用した。

結果

陽性対照であるウシの骨肉腫組織切片では腫瘍細胞の核に顕著な ON 陽性像が認められ、陰性対照では ON 陽性像は認められなかった（データ不掲載）。イヌの正常眼の免疫組織化学的検査では、ON 陽性像は主に毛様体無色素上皮の核に観察され（図 8-A）、その他に角結膜上皮（図 8-F）、網膜神経節細胞、網膜の内外顆粒層、強膜の実質細胞および眼球内外の血管内皮細胞にも観察された。原発緑内障症例では、毛様体無色素上皮をはじめとする眼内組織（図 8-B, C）ならびに眼瞼結膜や外眼筋などの眼球外組織（図 8-G, H）において、正常眼と比較して顕著な ON 陽性細胞の減少が認められた。続発緑内障の症例では、眼内組織や角膜ならびに眼球結膜、強膜において原発緑内障症例と同様に ON 陽性細胞の顕著な減少が認められた（図 8-D, E）が、眼瞼結膜組織、眼瞼ならびに外眼筋の血管内皮細胞を含めた眼球外組織（図 8-I, J）では正常眼と同様に ON 陽性細胞が認められた。

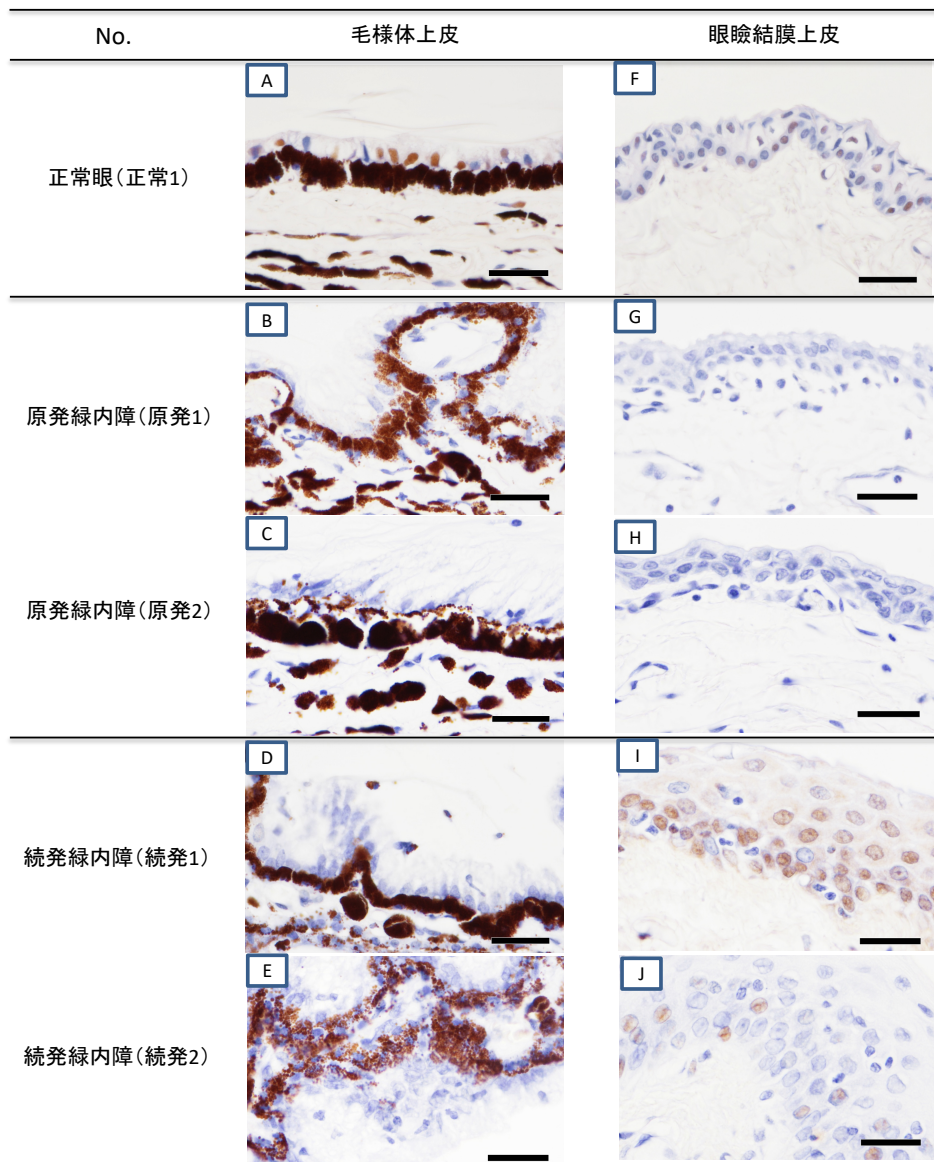


図 8. 毛様体上皮ならびに眼瞼結膜上皮における ON 染色性 (免疫組織化学的染色)

A~E: 毛様体上皮、F~J: 眼瞼結膜上皮。ON 陽性像 (茶褐色) は正常眼の毛様体上皮 (A)、眼瞼結膜上皮 (F) ならびに続発緑内障症例の眼瞼結膜上皮 (I, J) において明瞭に観察された。原発緑内障症例の全ての組織 (B, C, G, H) および続発緑内障の毛様体上皮 (D, E) では ON 陽性細胞は顕著に減少していた。No. は表 3 に対応。図中のスケールバーは全て 30 μ m を表し、顕微鏡倍率は $\times 400$ である。

考察

本論文第Ⅱ章では、眼房水中の蛋白質変化を網羅的に捉える方法として2DEならびに質量分析を応用して解析を実施し、正常犬と緑内障症例との比較の結果、3種の蛋白質の動態の変化が検出された。その中でも特に緑内障症例の眼房水中出現レベルが顕著に低下していたONについては特徴的所見であると考えられ、ONがイヌの緑内障の病態に何らかの関連因子となっている可能性が示唆された。そこで本章では、正常なイヌと緑内障症例の眼組織中のON発現について免疫組織化学的検索を行った。同様な手法での眼内のON発現を調査した報告として正常なウシの眼球についての調査が存在するが、そこでは発育中の眼球に比べ、成体の眼球でONの発現が多く、とくに網膜の神経節細胞、星状膠細胞でのON発現が検出され、また角膜、毛様体上皮、網膜色素上皮、眼房水や硝子体、線維柱帯網ならびに水晶体上皮細胞におけるON発現も報告されている[42, 52]。本研究における正常なイヌの眼球組織でも既報と同様な部位にON発現が認められ、正常なイヌの眼球においても豊富にONが発現していることが示された。

正常眼と比較して原発緑内障症例および続発緑内障症例ともに眼内組織のON発現の明らかな低下が認められ、この所見は眼房水中のON出現レベルを反映する結果となった。なお、正常眼と続発緑内障症例では眼表面や眼内組織以外の眼瞼や外眼筋などの眼球外組織におけるON発現は同様に陽性であったのに対して、原発緑内障症例でのみ顕著なON発現低下が認められ、本所見は原発緑内障において特異的な所見であると考えられた。

原発緑内障と続発緑内障の眼表面ならびに眼内組織に共通した変化としては眼圧上昇に伴う物理的圧迫が考えられる。よって、原発緑内障と続発

緑内障の眼表面ならびに眼球内組織における ON 発現の低下は眼圧上昇やその物理的影響に伴う変化ではないかと推測された。眼瞼結膜や外眼筋を含む眼球外組織は眼表面や眼内組織とは異なり、眼圧による直接的影響を受けない部位であると考えられる。よって、原発緑内障において特異的に認められた眼球外組織の ON 発現低下は眼圧上昇の結果ではなく、病態形成に関連する変化である可能性が考えられ、さらに原発緑内障と正常眼および続発緑内障を鑑別する際の補助診断となる可能性が示唆された。

本研究では調査頭数が少なかったことから、今後はより多くの検体を用いた研究が必要であると考えられた。また、第 II 章の眼房水中の蛋白質解析と併せて免疫組織化学的検索は定性的な検索方法であることから、今後は ON の定量解析も含めた検討が必要であると考えられた。本研究では眼球摘出後の眼組織の組織切片を用いた検索を行ったが、様々な病期ステージの症例での検索やより早期に診断を行うためには、生体からの検体採取が必要であると考えられた。そのためには侵襲性が少なく、容易に採材可能な検体の応用も検討が必要であり、今後は他の採材方法、採取材料についても検討を行う必要があると考えられた。

小括

本論文第Ⅱ章において、イヌの緑内障症例における特徴的所見として眼房水中の ON 出現レベルの顕著な低下が検出され、ON がイヌの緑内障の病態に何らかの関連因子となっている可能性が示唆された。本章では緑内障症例における眼房水中の ON 出現レベルの変化が眼組織内での ON 発現と関連しているかを確認する目的で、正常眼、原発緑内障症例および続発緑内障症例の眼球を対象に ON に対する免疫組織化学的検索を実施した。

組織学的に正常と判断された 5 頭 5 眼、原発緑内障症例 2 頭 3 眼、続発緑内障症例 2 頭 2 眼について抗 ON 抗体を用いた免疫組織化学的検査を実施した。

正常眼では主に毛様体無色素上皮の核に ON 陽性像が観察され、その他、角結膜上皮、網膜神経節細胞、網膜の内外顆粒層、強膜の実質細胞および血管内皮細胞にも同様な陽性像が観察された。原発緑内障症例では眼球内外の全ての眼組織において ON 陽性像はほとんど認められず、ON 発現の顕著な低下が認められた。続発緑内障症例においては角膜、強膜、眼球結膜といった眼表面組織やぶどう膜、網膜などの眼内組織については原発緑内障症例と同様に明らかな ON 陽性像の低下が認められたが、眼瞼結膜ならびに眼瞼や眼直筋の組織内の血管内皮においては正常眼と同様に ON 陽性像が認められた。

本論文第Ⅱ章では緑内障症例で眼房水中の ON 出現レベルの顕著な低下が認められたが、本章においても原発緑内障症例、続発緑内障症例ともに眼表面組織や眼内組織では ON 発現の明らかな低下が認められ、眼房水中の ON 出現レベルは眼内組織における ON 発現を反映すると考えられた。なお、原発緑内障症例において特異的に認められた眼球外組織の ON 発現

低下は、眼圧の影響を直接受けることはないと考えられた。よって、眼球外組織の ON 発現低下は原発緑内障の病態形成に関連する変化である可能性が示唆され、さらに原発緑内障と正常眼、続発緑内障を鑑別する際の補助診断となる可能性が示唆された。

第IV章 イヌの緑内障における ELISA 法を用いた眼房水中の ON 定量解析

小緒

ヒトの緑内障診断は近年の診断テクノロジーや診断機器の進歩ならびに各種メディアを介しての啓蒙活動による疾患への知識向上により、視野欠損が生じる前の初期段階での早期診断が可能な時代となってきた。いっぽう、イヌの緑内障ではヒトの緑内障診断のような早期診断技術の応用は困難であり、未だ特徴的臨床症状や眼圧測定に頼らざるを得ない。しかしながら、臨床症状が明瞭となり、顕著な眼圧上昇が生じる時点では既に病勢はかなり進行している状態である場合が多く、その結果、適切な治療を行ったとしても、本論文第 I 章において示したように、長期間の視覚維持や眼圧管理は困難である。ヒトの緑内障の治療は点眼薬を主体とした内科的治療により比較的長期間の視覚維持が可能であるのに対して、イヌの緑内障では外科的治療を行わない場合には、内科的治療のみによる視覚予後は不良である。また、イヌの緑内障は原因により先天緑内障、原発緑内障、続発緑内障に分類されるが、病勢がかなり進行した状態となり病変が重度となった場合、病変の観察から緑内障原因を特定、鑑別することは非常に困難である。とくに原発緑内障については対側眼においても発症し、定期検診や予防のための投薬が必要となることから、続発緑内障との鑑別を行うことが非常に重要である[34]。本論文第 II 章では眼房水中の網羅的な蛋白質解析を実施し、正常犬と緑内障症例の比較によって ON を含む 3 種の蛋白質の動態の変化が認められた。とくに正常犬では眼房水中 ON の出現レベルは明瞭に検出されたのに対して、緑内障症例（原発、続発緑内障）では顕著に ON 出現レベルの低下が認められた。また、本論文第 III 章では

免疫組織化学的検索により、眼内組織中では第Ⅱ章の結果と同様に、正常眼では ON の明瞭な発現が認められ、緑内障症例（原発、続発緑内障）では明瞭な低下が認められた。なお、正常眼や続発緑内障症例では眼瞼結膜上皮や眼外組織の血管内皮細胞においても ON 発現は明瞭であったが、原発緑内障症例では特徴的所見として、これら組織の ON 発現の顕著な低下が認められた。以上のことより、イヌの緑内障について ON 発現の検索を行うことは、その診断や緑内障原因の鑑別、さらにはその病態解析についても有益な情報をもたらす可能性が示唆された。なお、本論文第Ⅱ章、第Ⅲ章では 2DE や質量分析、免疫組織化学的検索といった定性的解析法を用いた調査であったこと、また調査頭数が限られた頭数であったことから、今後は統計学的解析が可能な調査頭数を対象として定量的な ON レベルについての調査が必要であると考えられた。

そこで本章では、イヌの緑内障における眼房水中の ON の定量解析を統計学的に分析することを目的として、一定頭数の正常犬と緑内障症例についての眼房水中 ON 濃度を ELISA 法により調査した。

材料と方法

本研究は「どうぶつ眼科 VECS」ならびに酪農学園大学附属動物医療センターにおいて、飼い主の同意のもとで、酪農学園大学動物実験委員会の定めるガイドラインに基づいて実施した。(承認番号：第 VH17B9 号)

1. 正常なイヌの眼房水サンプル採取

酪農学園大学において飼養されている正常なビーグル 13 頭（正常群：オス 7 頭、メス 6 頭、年齢 3.8～9.4 歳）をコントロールとし、それぞれについて威嚇瞬目検査、対光反射、眩目反射、眼圧測定、スリットランプ検査、眼底検査、隅角鏡検査を含めた眼科検査を実施し、眼圧に影響を与えるような眼科疾患（緑内障、水晶体亜脱臼、重度な硝子体の前房内逸脱および重度な白内障）が存在しない事を確認した。眼房水採取は、ミダゾラム 0.15 mg/kg (Midazolam, FujiPharma, Toyama, Japan)、酒石酸ブトルフェノール 0.025 mg/kg (Vetorphale, Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan)、塩酸メデトミジン 0.01 mg/kg (Domitor, ZENOAQ, Fukushima, Japan) の静脈内投与により不動化、鎮静を行い、さらに 0.4% 塩酸オキシブプロカイン点眼液 (Benoxil ophthalmic solution 0.4%, Santen, Osaka, Japan) の点眼麻酔を行った上で角膜輪部より 27G 皮下注射針を前房内へ刺入して採取した。なお、眼房水の採取は各犬よりランダムに選択した片眼のみから実施した。採材終了後は塩酸アチパメゾール 0.05 mg/kg (Antisedan, ZENOAQ, Fukushima, Japan) を静脈内投与して覚醒を確認した。また、眼房水の採取終了後の細菌感染予防として 0.3% オフロキサシン点眼液 (OFLOXACIN Ophthalmic solution 0.3%, KYORIN Rimedio, Toyama, Japan) の点眼投与を 1 日 3 回で 1 週間継続、ぶどう膜炎の予防としてカルプロフェン (Rimadyle, Zoetis JAPAN, Tokyo,

Japan) の経口投与 (4.4 mg/kg) を 1 日 1 回で 3 日間行った。採取した眼房水は分析が行われるまで -80°C で保存した。

2. 緑内障症例からの眼房水サンプル採取

獣医眼科二次診療病院である「どうぶつ眼科 VECS」において原発緑内障と診断された 14 頭 14 眼 (原発緑内障群: オス 6 頭、メス 8 頭、年齢 5.7~15.7 歳)、続発緑内障と診断された 13 頭 13 眼 (続発緑内障群: オス 6 頭、メス 7 頭、年齢 5.6~14.5 歳) について、眼科手術の際に全身麻酔下で外科処置を開始する前に正常群と同様な方法で眼房水を採取し、保存した。眼房水採取を行った際の眼科手術は原発緑内障群では AGV 手術 2 眼、強膜内シリコンボール移植術 6 眼、眼球摘出術 3 眼、硝子体内ゲンタマイシン注入術 3 眼、続発緑内障群では強膜内シリコンボール移植術 11 眼、眼球摘出術 1 眼、硝子体内ゲンタマイシン注入術 1 眼であった。続発緑内障群の原発眼疾患は白内障 7 症例、網膜剥離 4 症例、白内障手術 2 症例、水晶体亜脱臼 1 症例、色素性ぶどう膜炎 1 症例であった。これらの緑内障症例は術前に正常群と同様の眼科検査を行った。

3. ELISA 法による眼房水中の ON 濃度測定

測定にはイヌ ON の ELISA キット (Canine ON ELISA Kit, BlueGene, Shanghai, China) を使用した。この Kit は標識抗体に抗イヌ ON モノクローナル抗体を使用している。その手順は以下の通りである。検体を 1,000xg、 4°C 、15 分で遠心分離し、各ウェルに duplicate で Standard A~F (0.0、1.0、2.5、5.0、10、25ng/mL)、Blank (PBS)、各検体を 100 μL 加えた。それぞれのウェルに Enzyme Conjugate を 50 μL 加えて 30 秒間震盪した。ウェルにシールし、 37°C で 1 時間加温した。1xWash Solution 350 μL で 5 回洗浄した後、

Substrate A を 50 μ L、Substrate B を 50 μ L 加えて 30 秒間震盪した。ウェルにシールし、37 $^{\circ}$ C で 15 分間加温した。Stop Solution を 50 μ L 加えて、マイクロプレートリーダー (UltramarkTM、Bio-rad) を用いて 450nm の波長で吸光値を求めて算出した。

4. 統計学的解析

統計学的解析は全て BellCurve for Excel (Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて実施した。各群の雌雄比については分割表分析により統計学的評価を行った。ELISA 法によって得られた ON 濃度についての各群の比較は Mann-Whitney 検定により実施した。また、ROC 曲線により ELISA 法による ON 濃度測定 of 診断性評価を行ない、統計学解析は帰無仮説を AUC が 0.5 として検定を行った。いずれも有意水準は 5% とした。

結果

各眼房水サンプルのリストならびに ELISA 法による眼房水中の ON 濃度を表 4 に示した。なお、各群の雌雄比については有意差は認められなかった。

表 4. 眼房水サンプルリストと眼房水中の ON 濃度

| No. 検体番号 | ON濃度 (ng/mL) | 年齢 | 性別 | 犬種 | 採材眼 | 眼疾患 | 眼圧 (mmHg) | 罹患期間 (日) | 視覚 | 手術 |
|----------|-----------------|------|----|--------------|-----|-------------------|--------------|-------------|----|-----|
| 1 正常1 | 1.110 | 9.2 | F | ビーグル | 右眼 | なし | 7 | - | あり | なし |
| 2 正常2 | 0.662 | 8.8 | M | ビーグル | 左眼 | なし | 17 | - | あり | なし |
| 3 正常3 | 0.508 | 9.4 | F | ビーグル | 右眼 | なし | 13 | - | あり | なし |
| 4 正常4 | 0.487 | 9.3 | F | ビーグル | 左眼 | なし | 16 | - | あり | なし |
| 5 正常5 | 0.791 | 7.1 | M | ビーグル | 右眼 | なし | 17 | - | あり | なし |
| 6 正常6 | 0.522 | 7.1 | M | ビーグル | 左眼 | なし | 12 | - | あり | なし |
| 7 正常7 | 0.354 | 7.1 | F | ビーグル | 左眼 | なし | 9 | - | あり | なし |
| 8 正常8 | 0.293 | 7.1 | M | ビーグル | 右眼 | なし | 14 | - | あり | なし |
| 9 正常9 | 1.213 | 7.1 | M | ビーグル | 右眼 | なし | 15 | - | あり | なし |
| 10 正常10 | 0.621 | 3.9 | F | ビーグル | 右眼 | なし | 19 | - | あり | なし |
| 11 正常11 | 0.316 | 3.8 | F | ビーグル | 左眼 | なし | 19 | - | あり | なし |
| 12 正常12 | 0.508 | 3.8 | M | ビーグル | 右眼 | なし | 22 | - | あり | なし |
| 13 正常13 | 0.900 | 3.8 | M | ビーグル | 左眼 | なし | 16 | - | あり | なし |
| 14 原発1 | 0.373 | 9.9 | SF | 柴犬 | 右眼 | 原発緑内障 | 84 | 2 | あり | AGV |
| 15 原発2 | 0.478 | 13.5 | CM | ACS | 右眼 | 原発緑内障 | 66 | 18 | なし | GM |
| 16 原発3 | 0.445 | 7.0 | CM | ポメラニアン | 左眼 | 原発緑内障 | 40 | 541 | なし | ISP |
| 17 原発4 | 0.250 | 8.3 | SF | 柴犬 | 右眼 | 原発緑内障 | 67 | 44 | なし | ISP |
| 18 原発5 | 0.636 | 12.2 | CM | 柴犬 | 左眼 | 原発緑内障 | 85 | 93 | なし | ISP |
| 19 原発6 | 0.438 | 10.0 | CM | 柴犬 | 左眼 | 原発緑内障 | 71 | 606 | なし | ISP |
| 20 原発7 | 0.418 | 8.6 | SF | MD | 右眼 | 原発緑内障 | 14 | 200 | なし | 眼摘 |
| 21 原発8 | 0.406 | 5.7 | CM | ACS | 左眼 | 原発緑内障 | 60 | 111 | なし | 眼摘 |
| 22 原発9 | 0.659 | 7.7 | SF | シー・ズー | 左眼 | 原発緑内障 | 20 | 33 | あり | GM |
| 23 原発10 | 0.126 | 7.4 | SF | 柴犬 | 左眼 | 原発緑内障 | 74 | 不明(慢性) | なし | ISP |
| 24 原発11 | 0.787 | 12.7 | CM | ブリュッセル・グリフォン | 左眼 | 原発緑内障 | 38 | 24 | あり | AGV |
| 25 原発12 | 0.677 | 11.5 | F | 柴犬 | 左眼 | 原発緑内障 | 61 | 71 | なし | 眼摘 |
| 26 原発13 | 0.532 | 15.7 | SF | ビーグル | 左眼 | 原発緑内障 | 71 | 262 | なし | GM |
| 27 原発14 | 0.574 | 13.9 | SF | MD | 右眼 | 原発緑内障 | 48 | 19 | なし | ISP |
| 28 続発1 | 0.585 | 10.7 | SF | TP | 左眼 | 続発緑内障(白内障、水晶体亜脱臼) | 77 | 59 | なし | ISP |
| 29 続発2 | 0.770 | 10.1 | M | 雑種 | 左眼 | 続発緑内障(白内障、網膜剥離) | 76 | 16 | なし | ISP |
| 30 続発3 | 0.595 | 11.8 | SF | TP | 左眼 | 続発緑内障(白内障) | 45 | 24 | なし | ISP |
| 31 続発4 | 0.605 | 11.5 | CM | ACS | 左眼 | 続発緑内障(白内障手術) | 86 | 395 | なし | GM |
| 32 続発5 | 0.849 | 11.1 | CM | MD | 左眼 | 続発緑内障(白内障) | 27 | 315 | なし | ISP |
| 33 続発6 | 0.673 | 14.5 | CM | MD | 左眼 | 続発緑内障(白内障) | 53 | 9 | なし | ISP |
| 34 続発7 | 1.294 | 13.5 | SF | シー・ズー | 右眼 | 続発緑内障(白内障手術) | 26 | 236 | なし | ISP |
| 35 続発8 | 0.957 | 9.1 | SF | ACS | 右眼 | 続発緑内障(白内障手術) | 51 | 40 | なし | ISP |
| 36 続発9 | 0.184 | 5.6 | CM | シー・ズー | 右眼 | 続発緑内障(白内障、網膜剥離) | 36 | 7 | なし | 眼摘 |
| 37 続発10 | 1.174 | 11.5 | SF | シー・ズー | 右眼 | 続発緑内障(網膜剥離) | 22 | 不明 | なし | ISP |
| 38 続発11 | 0.390 | 12.6 | CM | ゴールデン・レトリバー | 右眼 | 続発緑内障(色素性ぶどう膜炎) | 50 | 140 | なし | ISP |
| 39 続発12 | 0.449 | 9.7 | F | ACS | 左眼 | 続発緑内障(白内障) | 37 | 115 | なし | ISP |
| 40 続発13 | 1.064 | 10.8 | F | シー・ズー | 左眼 | 続発緑内障(網膜剥離) | 19 | 2554 | なし | ISP |

検体番号は正常：正常群、原発：原発緑内障群、続発：続発緑内障群。
性別は F：メス、M：オス、SF：避妊メス、CM：去勢オス。犬種は ACS：
アメリカン・コッカー・スパニエル、MD：ミニチュア・ダックスフン
ド、TP：トイ・プードル。眼疾患の欄の続発緑内障のカッコ内は原発眼
疾患を示す。眼圧は眼房水採取直前の測定値で示した。罹患期間は診断
後から眼房水採材までの日数を示した。手術は眼房水採材時の手術内容
であり、AGV：AGV手術、GM：硝子体内ゲンタマイシン注入術、ISP：
強膜内シリコンボール移植術、眼摘：眼球摘出術を示した。

ELISA 法によって測定した各群の眼房水中 ON 濃度測定値の分布比較を
図 9 に示した。原発緑内障群では正常群や続発緑内障群に比べて ON 濃度
が低く分布しており、また測定値のばらつきは比較的少ない傾向が認めら
れた。

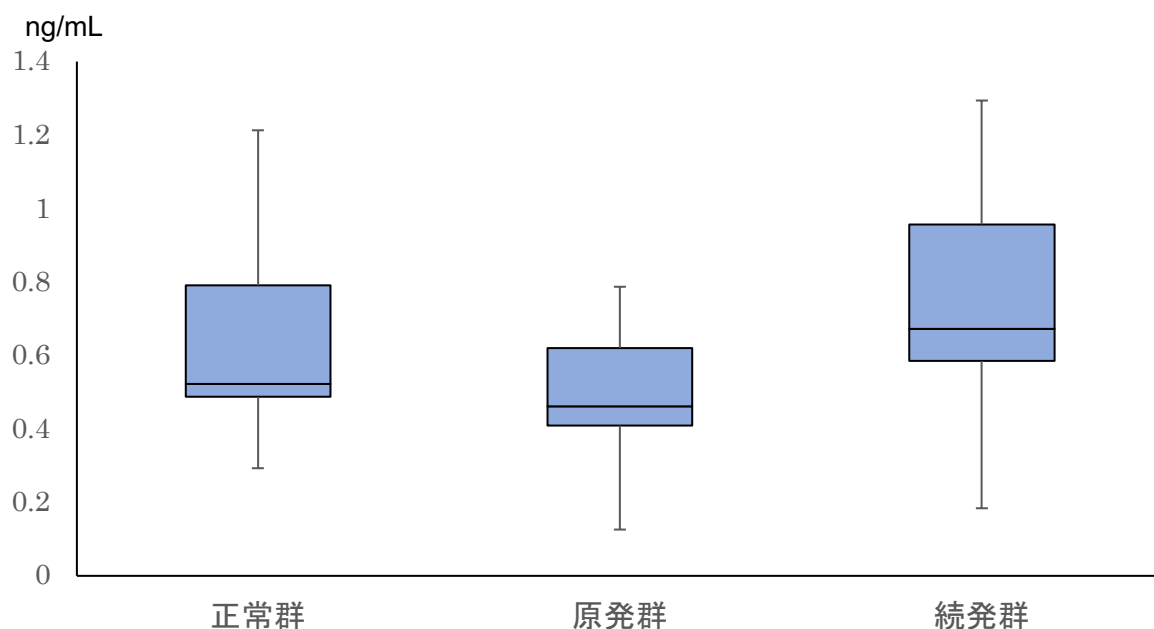


図 9. 各群の眼房水中 ON 濃度測定値の分布比較

原発緑内障群では正常群、続発緑内障群よりも眼房水中 ON 濃度が低く分布している傾向が認められた。また測定値は原発緑内障群では他の群よりもばらつきが小さい傾向が認められた。

さらに各群の平均 ON 濃度は正常群では $0.637 \pm 0.081 \text{ng/mL}$ 、原発緑内障群では $0.486 \pm 0.047 \text{ng/mL}$ 、続発緑内障群では $0.738 \pm 0.089 \text{ng/mL}$ であり、原発緑内障群では正常群や続発緑内障群よりも眼房水中の ON 濃度が低いという傾向が認められた。なお、眼房水中の平均 ON 濃度の統計学的解析では原発緑内障群と続発緑内障群との間にのみ有意差が認められた。

ELISA 法による眼房水中 ON 濃度測定を用いて、各群の鑑別を行った場合の診断性評価についての ROC 曲線を図 10 に示した。AUC は正常群と原発緑内障群、正常群と続発緑内障群、原発緑内障群と続発緑内障群でそれぞれ 0.61、0.64、0.73 であり、原発緑内障群と続発緑内障群との鑑別を行った場合が最も高い値となった。正常群と原発緑内障群の間の診断性評価では、眼房水中 ON 濃度のカットオフ値を 0.478ng/mL とした場合、TPF は 0.57、FPF は 0.25 であり、統計学的な有意性は認められなかった。正常群と続発緑内障群との間の診断性評価では、眼房水中 ON 濃度のカットオフ値を 0.585ng/mL とした場合、TPF は 0.77、FPF は 0.42 であり、統計学的な有意性は認められなかった。いっぽう、原発緑内障群と続発緑内障群の間の診断性評価では、眼房水中 ON 濃度のカットオフ値を 0.574ng/mL とした場合、TPF は 0.69、FPF は 0.23 であり、統計学的な有意性が認められた。

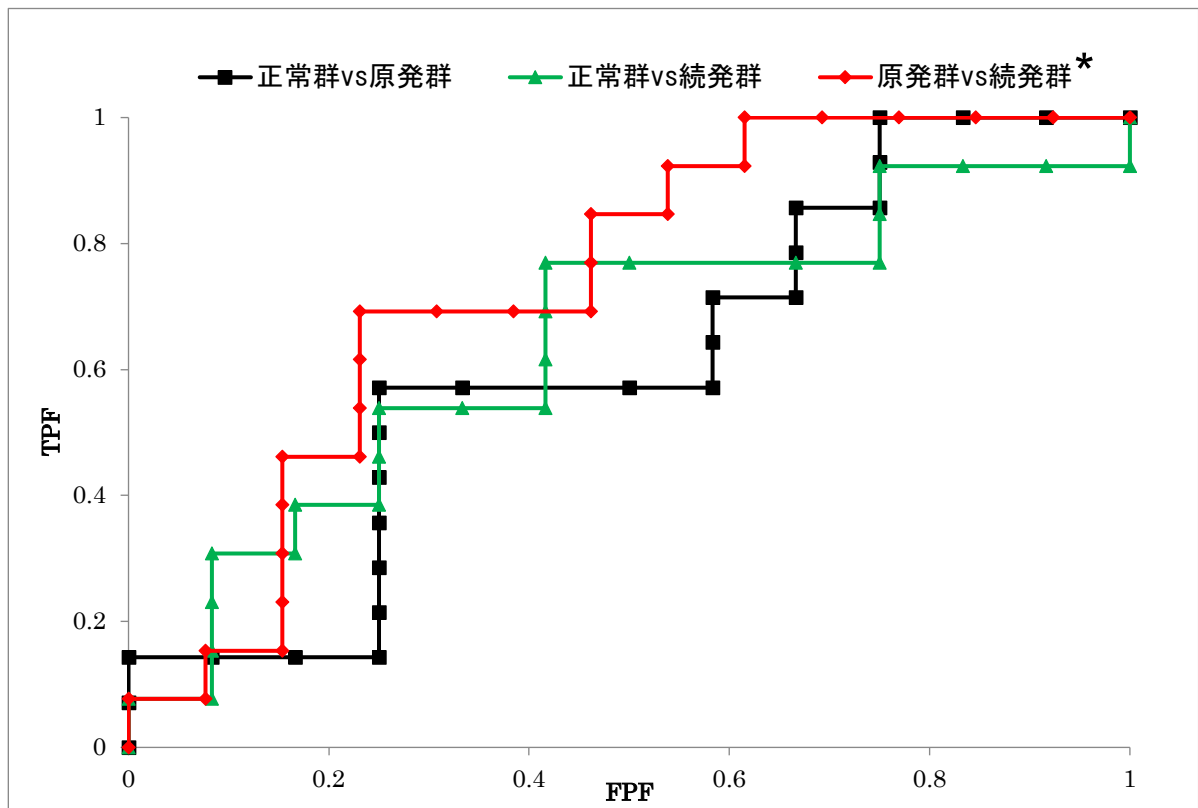


図 10. 眼房水中 ON 濃度測定による各群の鑑別を行った場合の ROC 曲線

原発緑内障群と続発緑内障群の鑑別を行った場合の曲線下面積が最も大きく、正常群と原発緑内障群、正常群と続発緑内障群の鑑別を行った場合よりも信頼性が高いという結果となった。また、有意性は原発緑内障群と続発緑内障群の鑑別の場合にのみ認められた (*)。

考察

本論文の第Ⅱ章においては正常犬よりも緑内障症例において眼房水中の ON 出現レベルの顕著な低下が認められ、また第Ⅲ章における眼組織の免疫組織化学的検索では眼内組織での ON 発現の顕著な低下が認められたため、眼房水中 ON 濃度は正常犬に比べて緑内障症例では低下していると想定された。しかしながら、本章では正常群と原発緑内障群、正常群と続発緑内障群ともに眼房水中の平均 ON 濃度に有意差は認められなかった。また ROC 曲線による診断性評価においても、正常群と緑内障症例（原発緑内障群および続発緑内障群）の間で診断の有意性は示されず、緑内障診断という意味においては十分な方法ではないと評価された。しかし、本章ではそれぞれの群間での鑑別診断評価を TPF、FPF によっても評価した。一般に優れた検査法は感度と特異度が高く評価され、TPF は検査の感度を示し、FPF は 1-特異度で示される。これを考慮すると眼房水中 ON 濃度の測定は、原発緑内障群と続発緑内障群、正常群と続発緑内障群の鑑別という点では検査の感度が高く、正常群と原発緑内障群、原発緑内障群と続発緑内障群の鑑別という点では検査の特異度が高いという傾向が認められた。以上より、正常群と緑内障症例（原発緑内障群および続発緑内障群）の間では、平均 ON 濃度の有意差や ROC 曲線を用いた統計学的な診断性評価は得られなかったものの、検査の感度と特異度を併せて考慮すると、眼房水中 ON 濃度の測定はイヌの緑内障補助診断法として有用である可能性が推測された。また、統計学的有意差は認められなかったものの、正常犬と比べて原発緑内障症例では平均 ON 濃度の低下傾向が認められた。今後はより多くの検体数を用いた統計学的分析を改めて行うことにより、その診断有意性が示される可能性も考えられ、研究の継続が必要であると考えられた。

本章での結果が本論文第Ⅱ章、第Ⅲ章における成績と合致しなかった原因について結論づけることは不可能であるが、第Ⅱ章、第Ⅲ章では対象とした検体数が少なかったことや定性的解析であったこと、また第Ⅱ章の蛋白質解析では眼房水サンプル中の蛋白総量を一律に合わせた上で解析を行ったことが要因であると推測された。今後はより多くの緑内障症例を対象としたウェスタンブロット法などによる定性的な眼房水中 ON の出現レベルの解析や眼組織における ON に対する免疫組織化学的検索を行い、本章で得られた成績との照合を改めて行う必要があると考えられた。

原発緑内障と続発緑内障の鑑別については、眼房水中の平均 ON 濃度や診断性評価で統計学的な有意性が認められ、応用可能な緑内障原因の鑑別方法であると示唆された。また、第Ⅲ章で検出された原発緑内障に特異的な眼瞼結膜などの眼外組織における ON 発現も併せて検査することで、より精度の高い緑内障原因の鑑別を行うことが可能となるのではないかと推測され、今後は同一症例において ON の定量的ならびに定性的解析の両法を行うことでの検証が必要であると考えられた。

本章では第Ⅱ章、第Ⅲ章での調査成績から正常犬と緑内障症例の眼房水 ON の定量解析として ON 濃度の測定を行ったが、本研究のような眼房水中の ON 濃度の測定が行われた報告はなく、著者の知る限り本調査が初めての報告である。よって、本研究により、ELISA 法による ON 濃度測定は眼房水においても応用可能であることが示され、また本研究は今後の調査の基礎研究となると考えられた。とくに ON は様々な疾患において病態形成に重要な介在物質である可能性が示唆されている[42, 53]。よって、今後は本調査において得られた ELISA 法によるイヌの眼房水中の ON 濃度の成績をベースとして、緑内障のみならず他の眼疾患の病態解析などのために応用されることを期待したい。

本章におけるリミテーションは、一点目に緑内障症例の犬種や緑内障ステージ、術前の治療内容が統一されていないことがあげられる。したがって、将来的には対象症例の条件を統一化した研究を行う必要があると考えられた。二点目に検査材料についてである。眼房水は外科的処置を行う際には比較的採取が容易な検査材料ではあるが、採取には鎮静処置や全身麻酔を要するため、病期ステージが進行していない場合は採材が躊躇される。また、外来では侵襲性が強く動物の負担が多いため、容易に採材は困難である。したがって、第Ⅱ章、第Ⅲ章での考察と同様に、今後は病気の潜伏期や病初期などの早期に診断を行うためにも、診療外来の場で動物に可能な限り負担をかけることなく採材可能な検査材料についても検討が必要であると考えられた。

小括

本論文第Ⅱ章では緑内障症例において眼房水中の ON 出現レベルの顕著な低下を示唆する所見が認められ、ON がイヌの緑内障の病態に関連している可能性が示唆された。また、第Ⅲ章では緑内障症例における眼内組織の ON 発現の顕著な低下が認められ、以上の結果から眼房水中の ON 出現レベルは眼内組織における ON 発現状況を反映しており、緑内障症例の眼内組織における ON 発現も病態に関連している可能性が示唆された。なお、これらの研究は 2DE や質量解析、免疫組織化学的検索といった定性的解析法を用いた調査であったため、ON の定量解析が課題として残った。そこで本章では、イヌの緑内障における眼房水中の ON の定量解析を目的として、正常犬と緑内障症例についての眼房水中 ON 濃度を ELISA 法により調査した。

コントロールとして眼圧に影響する疾患を持たないビーグル 13 頭（正常群）の眼房水を採取した。緑内障症例として原発緑内障と診断した 14 症例（原発緑内障群）、続発緑内障と診断した 13 症例（続発緑内障群）より眼科手術時に全身麻酔下で眼房水を採取した。眼房水サンプルにおける ON 濃度を ELISA 法により測定を行い、各群の眼房水中の平均 ON 濃度について Mann-Whitney 検定で、さらに ELISA 法による ON 濃度を用いた診断性能評価を ROC 曲線により統計学的解析を行った。

眼房水中の平均 ON 濃度は正常群 $0.637 \pm 0.081 \text{ ng/mL}$ 、原発緑内障群 $0.486 \pm 0.047 \text{ ng/mL}$ 、続発緑内障群 $0.738 \pm 0.089 \text{ ng/mL}$ であり、原発緑内障群と続発緑内障群との間で有意差が認められた。また眼房水中 ON 濃度を用いた診断性能評価においても原発緑内障群と続発緑内障群の間でのみ有意差が認められた。

本章では正常群と緑内障症例（原発緑内障群および続発緑内障群）の間では眼房水中の平均 ON 濃度の有意差や ROC 曲線を用いた統計学的な診断性評価は得られなかったものの、検査の感度と特異度を併せて考慮すると、眼房水中 ON 濃度の測定はイヌの緑内障診断の補助として有用である可能性が推測された。原発緑内障と続発緑内障の鑑別については、眼房水中の平均 ON 濃度や診断性評価で統計学的な有意性が認められ、応用可能な緑内障原因の鑑別方法であると示唆された。

総括

近年、ヒトの緑内障では診断技術や診断機器の進歩によって緑内障発症リスクの判定や早期診断が可能となってきた。いっぽう、動物、特にイヌの緑内障の診断はヒト医療で用いられる高度な診断技術や診断機器の応用は困難であり、未だに特徴的な臨床症状と眼圧測定に頼らざるを得ず、その結果として診断に至った時点では既に病勢が進行し、重度な視覚障害を生じている、またはすでに失明してことが多い。したがって、イヌの緑内障治療成績向上のためには、より早いステージでの診断が重要であると考えられ、そのためには臨床症状や眼圧測定以外の臨床応用可能で再現性のある客観的な診断パラメーターの作出が重要と考えられる。本研究では、イヌの緑内障についての病態解析ならびに早期診断のための新たな診断パラメーターの作出を目的として、イヌの緑内障症例の眼房水の蛋白質の網羅的解析および眼組織の免疫組織化学的検討を実施した。

第 I 章では、イヌの緑内障診断と治療における課題を検討、確認するために、獣医眼科の二次診療施設におけるイヌの緑内障発生状況と初診時の視覚について調査するとともに、緑内障治療による視覚予後要因について回顧的に調査した。イヌの緑内障発生状況調査ではとくに品種差や性差、続発緑内障における併発眼病変について欧米での調査とは異なる成績となった。いっぽうで柴犬における原発緑内障の好発傾向については日本における以前の調査報告と一致する成績であった。欧米における調査との成績の相違は調査が行われた地域のイヌの飼養状況（品種や環境）の違いが影響している可能性が推測された。また、初診時の視覚維持率は既報に比べると著しく低い成績であり、イヌの緑内障において良好な視覚予後を確保するには、より早期に適切な診断、治療を開始することが重要であると改

めて確認された。よって、特にイヌの緑内障の早期診断のためには眼圧測定以外の客観的で再現性のある補助的診断パラメーターの作出が必要であると考えられた。緑内障治療による視覚予後要因調査では、AGV手術を併用した場合、内科的治療のみよりも視覚予後が良好であること、また、内科的治療のみを行った場合は、柴犬では他の犬種に比べて視覚予後が不良であることが統計学的に確認された。以上より適切な症例で長期の視覚維持を期待する場合には、積極的にAGV手術を行うべきであると考えられ、特に柴犬ではより積極的にAGV手術を検討する必要があると考えられた。

第Ⅱ章では、イヌの緑内障症例における新たな診断パラメーターの作出の第一歩として、まずは眼房水中の蛋白質の網羅的な検索を行うために正常犬と緑内障症例の眼房水サンプルにおける2DEならびに質量分析を用いた蛋白質解析を行った。正常犬と緑内障症例の眼房水サンプルの比較により、ONを含む3種の蛋白質の動態の変化を捉えることができた。これら眼房水中蛋白質の動態の変化、特に緑内障症例におけるON出現レベルの顕著な低下については、イヌの緑内障における診断パラメーター作出を考える上で非常に興味深い変化であると考えられた。

第Ⅲ章では第Ⅱ章で認められた緑内障症例における眼房水中ON出現レベルの顕著な低下について着目し、同様な変化が眼組織内でも生じているかを調査する目的で、正常犬と緑内障症例の眼組織におけるON発現についての免疫組織化学的検索を行った。第Ⅱ章で認められた眼房水中の変化と同様、免疫組織化学的検索では緑内障症例における眼球組織（眼表面ならびに眼内組織）のON発現の顕著な低下が認められ、眼房水中ONの出現レベルは眼球組織のON発現を反映することが示唆された。また、これらのON発現の低下は眼圧上昇やその物理的影響に伴う変化ではないかと推測された。眼瞼結膜や外眼筋を含む眼球外組織は眼表面や眼内組織とは

異なり、眼圧による直接的影響を受けない部位であると考えられる。よって、原発緑内障において特異的に観察された眼球外組織の ON 発現低下は、原発緑内障の病態形成に関連する変化である可能性が考慮され、さらに原発緑内障と正常眼、続発緑内障を鑑別する際の補助診断となる可能性が示唆された。

第IV章では第II章、第III章にて認められた緑内障症例における ON の定性的な変化を定量解析により確認することを目的として、ELISA 法を用いて正常犬と緑内障症例についての眼房水中の ON 濃度の測定を行った。ELISA 法による眼房水中の ON 濃度測定は、正常犬と緑内障症例の間では有意差は認められず、緑内障の診断という意味では統計学的な有意性は認められなかった。しかしながら、検査の感度と特異度を併せて考慮すると、眼房水中 ON 濃度の測定はイヌの緑内障診断の補助として有用である可能性が推測された。原発緑内障と続発緑内障の鑑別については、眼房水中の平均 ON 濃度や診断性評価で統計学的な有意性が認められ、応用可能な緑内障原因の鑑別方法であると示唆された。

以上よりイヌの緑内障症例では眼房水中の ON レベルの低下、眼球組織（眼表面、眼内組織）における ON 発現の低下が認められ、さらに原発緑内障に特徴的な所見として眼外組織における顕著な ON 発現低下、続発緑内障との比較では眼房水中の ON 濃度の低下が認められ、これらの眼房水や眼組織における ON の定性・定量解析はイヌの緑内障診断のための客観的な補助診断パラメーターとして有用であると考えられた。なお、眼房水や眼組織の採取は生体にとって侵襲性が高く、診療外来では採材は困難である。本研究ではその結果、病勢が進行していないステージでの検体が少なく、様々な病期ステージについての検討は困難であった。今後、緑内障の早期診断を検討するにあたっては、より病勢が進行していない病初期ま

たは潜伏期における ON の発現についても検討が必要である。また、本研究において認められた眼房水中や眼組織の ON 変化については、緑内障の病態について何からの関連因子になっているとは考えられたが、病態形成に関連するのか、または緑内障の結果としての変化であるのかは特定に至らなかった。この点を分析するためにもイヌの緑内障における ON の関連性についてはさらに多くの症例を対象とした分析が必要であると考えられた。

本研究はイヌの緑内障の病態解析や早期診断の一助となり、眼圧管理や視覚予後といった治療成績の向上に寄与することが期待される。

謝辞

本論文作成にあたり終始御指導頂いた酪農学園大学大学院獣医学研究科画像診断学 中出哲也教授に感謝致します。また、本研究の遂行と論文作成にあたり御指導、御校閲賜りました本学大学院獣医学研究科獣医臨床腫瘍学 廉澤 剛教授、獣医病理学 松田一哉准教授、獣医眼科学 前原誠也准教授、本学獣医学群獣医学類獣医病理学ユニット 谷山弘行前教授に深く感謝致します。また、丁寧な御校閲を賜りました本学獣医学群獣医保健看護学類動物生体反応研究室 宮庄 拓講師に深く感謝致します。第Ⅱ章の遂行と論文作成にご協力とご指導をいただきました本学大学院獣医学研究科修了生 中村晃三博士（獣医学）、第Ⅲ章の遂行と論文作成にご協力とご指導をいただきました本学獣医学群獣医学類獣医病理学 佐野悠人助教に深く感謝いたします。第Ⅱ章ならびに第Ⅳ章の研究遂行にあたり多大な御協力を頂きました本学大学院獣医学研究科修了生 伊藤洋輔博士（獣医学）、林 美里博士（獣医学）ならびに大学院生 益子亜里沙獣医師に謝意を表します。また、本研究において御協力頂きました本学獣医学部卒業生ならびに学生諸君、そしてどうぶつ眼科 VECS のスタッフ全員に感謝致します。最後に、本研究を進めるにあたり、終始暖かい眼差しで見守り、寛容な心で私を支えてくれた妻 愛と精神的な支えとなってくれた長女 愛瑠、次女 明璃、そして愛犬 ウィル、くるみに心の底から深謝申し上げます。

引用文献

1. Ahonen, S. J., Kaukonen, M., Nussdorfer, F. D., Harman, C. D., Komáromy, A. M. and Lohi, H. 2014. A novel missense mutation in ADAMTS10 in Norwegian Elkhound primary glaucoma. *PLoS. One.* **9**: e111941.
2. Aihara, M., Lindsey, J. D. and Weinreb, R. N. 2003. Ocular hypertension in mice with a targeted type I collagen mutation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**: 1581-1585.
3. Boevé, M. H. and Stades, F. C. 1985. [Glaucoma in dogs and cats. Review and retrospective evaluation of 421 patients. II. Clinical aspects]. *Tijdschr Diergeneeskd.* **110**: 219-227.
4. Bornstein, P. and Sage, E. H. 2002. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14**: 608-616.
5. Bradley, J. M., Vranka, J., Colvis, C. M., Conger, D. M., Alexander, J. P., Fisk, A. S., Samples, J. R. and Acott, T. S. 1998. Effect of matrix metalloproteinases activity on outflow in perfused human organ culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**: 2649-2658.
6. Bras, D. and Maggio, F. 2015. Surgical treatment of canine glaucoma: Cyclodestructive Techniques. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* **45**: 1283-1305.
7. Brekken, R. A. and Sage, E. H. 2001. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix. Biol.* **19**: 816-827.
8. Chiang, S. Y., Tsai, M. L., Wang, C. Y., Chen, A., Chou, Y. C., Hsia, C. W., Wu, Y. F., Chen, H. M., Huang, T. H., Chen, P. H., Liu, H. T. and Shui, H. A. 2012. Proteomic analysis and identification of aqueous humor proteins with a

- pathophysiological role in diabetic retinopathy. *J. Proteomics*. **75**: 2950-2959.
9. Chua, J., Seet, L. F., Jiang, Y., Su, R., Htoon, H. M., Charlton, A., Aung, T. and Wong, T. T. 2008. Increased SPARC expression in primary angle closure glaucoma iris. *Mol. Vis.* **14**: 1886-1892.
 10. Cullen, C. L. 2004. Cullen frontal sinus valved glaucoma shunt: preliminary findings in dogs with primary glaucoma. *Vet. Ophthalmol.* **7**: 311-318.
 11. Duan, X., Xue, P., Wang, N., Dong, Z., Lu, Q. and Yang, F. 2010. Proteomic analysis of aqueous humor from patients with primary open angle glaucoma. *Mol. Vis.* **16**: 2839-2846.
 12. Featherstone, H. J. and Heinrich, C. L. 2013. Ophthalmic examination and diagnostics. pp. 533-613. *In: Veterinary Ophthalmology*, 5th ed. (Gelatt, K. N., Gilger, B. C., and Kern, T. J. eds.), Blackwell Publishing, Ames.
 13. Forman, O. P., Pettitt, L., Komáromy, A. M., Bedford, P. and Mellersh, C. 2015. A Novel Genome-Wide Association Study Approach Using Genotyping by Exome Sequencing Leads to the Identification of a Primary Open Angle Glaucoma Associated Inversion Disrupting ADAMTS17. *PLoS. One.* **10**: e0143546.
 14. Gelatt, K. N., Esson, D. W. and Plummer, C. E. 2011. Surgical procedures for the glaucomas. pp. 284-294. *In: Veterinary Ophthalmic Surgery*. (Gelatt, K. N., and Gelatt, J. P. eds.), Elsevier Saunders, St. Louis.
 15. Gelatt, K. N. and MacKay, E. O. 2004. Prevalence of the breed-related glaucomas in pure-bred dogs in North America. *Vet. Ophthalmol.* **7**: 97-111.
 16. Graham, K. L., Donaldson, D., Billson, F. A. and Billson, F. M. 2017. Use of a 350-mm² Baerveldt glaucoma drainage device to maintain vision and control intraocular pressure in dogs with glaucoma: a retrospective study (2013-2016).

- Vet. Ophthalmol.* **20**: 427-434.
17. Graham, K. L., Hall, E. J. S., Caraguel, C., White, A., Billson, F. A. and Billson, F. M. 2018. Comparison of diode laser trans-scleral cyclophotocoagulation versus implantation of a 350- μm^2 Baerveldt glaucoma drainage device for the treatment of glaucoma in dogs (a retrospective study: 2010-2016). *Vet. Ophthalmol.* **21**: 487-497.
18. Grus, F. H., Joachim, S. C., Sandmann, S., Thiel, S., Bruns, K., Lackner, K. J. and Pfeiffer, N. 2008. Transthyretin and complex protein pattern in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma. *Mol. Vision.* **14**: 1437-1445.
19. Gum, G. G. and MacKay, E. O. 2013. Physiology of the eye. pp. 171-207. *In: Veterinary Ophthalmology*, 5th ed. (Gelatt, K. N., Gilger, B. C., and Kern, T. J. eds.), Blackwell Publishing, Ames.
20. Haddadin, R. I., Oh, D. J., Kang, M. H., Filippopoulos, T., Gupta, M., Hart, L., Sage, E. H. and Rhee, D. J. 2009. SPARC-null mice exhibit lower intraocular pressures. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**: 3771-3777.
21. Hardman, C. and Stanley, R. G. 2001. Diode laser transscleral cyclophotocoagulation for the treatment of primary glaucoma in 18 dogs: a retrospective study. *Vet. Ophthalmol.* **4**: 209-215.
22. Howell, G.R., Macalinao, D. G., Sousa, G. L., Walden, M., Soto, I., Kneeland, S. C., Barbay, J. M., King, B. L., Marchant, J. K., Hibbs, M., Stevens, B., Barres, B. A., Clark, A. F., Libby, R. T. and John, S. W. 2011. Molecular clustering identifies complement and endothelin induction as early events in a mouse model of glaucoma. *J. Clin. Invest.* **121**: 1429-1444.
23. Itoh, Y., Maehara, S., Yamasaki, A., Tsuzuki, K. and Izumisawa, Y. 2010.

- Investigation of fellow eye of unilateral retinal detachment in Shih-Tzu. *Vet. Ophthalmol.* **13**: 289-293.
24. Itoh, Y., Umeda, Y., Wakaiki, S., and Saito, A. 2010. Study of vision maintenance and duration for consultation with veterinary clinic in canine glaucomatous case. *J. Jpn. Vet. Assoc.* **63**: 281-285.
25. Johnsen, D. A., Maggs, D. J. and Kass, P. H. 2006. Evaluation of risk factors for development of secondary glaucoma in dogs: 156 cases (1999-2004). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **229**: 1270-1274.
26. Kanemaki, N., Ichikawa, Y., Kawarai, S. and Ochiai, H. 2015. Classification of clinical findings of glaucoma in dogs presenting at the ophthalmic department of Azabu Veterinary Teaching Hospital. *J. Jpn. Vet. Assoc.* **68**: 55-58.
27. Kanemaki, N., Tchedre, K. T., Imayasu, M., Kawarai, S., Sakaguchi, M., Yoshino, A., Itoh, N., Meguro, A., and Mizuki, N. 2013. Dogs and humans share a common susceptibility gene SRBD1 for glaucoma risk. *PLoS. One.* **8**: e74372.
28. Kato, K., Sasaki, N., Gelatt, K. N., Mackay, E. O. and Shastry, B. S. 2009. Autosomal recessive primary open angle glaucoma (POAG) in beagles is not associated with mutations in the myocilin (MYOC) gene. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **247**: 1435-1436.
29. Kato, K., Sasaki, N., Matsunaga, S., Nishimura, R. and Ogawa, H. 2006. Incidence of canine glaucoma with goniodysplasia in Japan : A retrospective study. *J. Vet. Med. Sci.* **68**: 853-858.
30. Kuchtey, J., Kunkel, J., Esson, D., Sapienza, J. S., Ward, D. A., Plummer, C. E., Gelatt, K. N. and Kuchtey, R. W. 2013. Screening ADAMTS10 in dog

- populations supports Gly661Arg as the glaucoma-causing variant in beagles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**: 1881-1886.
31. Kuehn, M. H., Kim, C. Y., Ostojic, J., Bellin, M., Alward, W. L., Stone, E. M., Sakaguchi, D. S., Grozdanic, S. D. and Kwon, Y. H. 2006. Retinal synthesis and deposition of complement components induced by ocular hypertension. *Exp. Eye. Res.* **83**: 620-628.
32. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
33. Miller, P. E. 2013. The glaucomas. pp. 257-271. *In*: Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology, 5th ed. (Maggs, D. J., Miller, P. E., and Ofri, R. eds.), Elsevier Saunders, St. Louis.
34. Miller, P. E., Schmidt, G. M., Vainisi, S. J., Swanson, J. F. and Herrmann, M. K. 2000. The efficacy of topical prophylactic antiglaucoma therapy in primary closed angle glaucoma in dogs: a multicenter clinical trial. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **36**: 431-438.
35. 日本緑内障学会緑内障診療ガイドライン作成委員会. 2018. 緑内障診療ガイドライン(第4版). 日本眼科学会誌. **122**: 5-53.
36. Oliver, J. A., Forman, O. P., Pettitt, L. and Mellersh, C. S. 2015. Two Independent Mutations in ADAMTS17 Are Associated with Primary Open Angle Glaucoma in the Basset Hound and Basset Fauve de Bretagne Breeds of Dog. *PLoS. One.* **10**: e0140436.
37. Oliver, J. A. C., Rustidge, S., Pettitt, L., Jenkins, C. A., Farias, F. H. G., Giuliano, E. A. and Mellersh, C. S. 2018. Evaluation of ADAMTS17 in Chinese Shar-Pei with primary open-angle glaucoma, primary lens luxation, or both. *Am. J. Vet. Res.* **79**: 98-106.

38. Plummer, C. E., Regnier, A. and Gelatt, K. N. 2013. The canine glaucoma. pp. 1050-1145. *In: Veterinary Ophthalmology*, 5th ed. (Gelatt, K. N., Gilger, B. C., and Kern, T. J. eds.), Blackwell Publishing, Ames.
39. Richter, M., Krauss, A. H., Woodward, D. F. and Lütjen-Drecoll, E. 2003. Morphological changes in the anterior eye segment after long-term treatment with different receptor selective prostaglandin agonists and a prostamide. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**: 4419-4426.
40. Rohen, J. W., Lütjen-Drecoll, E., Flügel, C., Meyer, M. and Grierson, I. 1993. Ultrastructure of the trabecular meshwork in untreated cases of primary open-angle glaucoma. *Exp. Eye. Res.* **56**: 683-692.
41. Sapienza, J. S. and van der Woerd, A. 2005. Combined transscleral diode laser cyclophotocoagulation and Ahmed gonioimplantation in dogs with primary glaucoma: 51 cases (1996-2004). *Vet. Ophthalmol.* **8**: 121-127.
42. Scavelli, K., Chatterjee, A. and Rhee, D. J. Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine in Ocular Tissue. 2015. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **31**: 396-405.
43. Stasi, K., Nagel, D., Yang, X., Wang, R. F., Ren, L., Podos, S. M., Mittag, T. and Danias, J. 2006. Complement component 1Q (C1Q) upregulation in retina of murine, primate, and human glaucomatous eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **47**: 1024-1029.
44. Stastna, M., Behrens, A., Noguera, G., Herretes, S., McDonnell, P. and Van Eyk, J. E. 2007. Proteomics of the aqueous humor in healthy New Zealand rabbits. *Proteomics.* **7**: 4358-4375.
45. Stastna, M., Behrens, A., McDonnell, P. J. and Van Eyk, J. E. 2011. Analysis of protein composition of rabbit aqueous humor following two different cataract surgery incision procedures using 2-DE and LC-MS/MS. *Proteome.*

Sci. **9**: 8.

46. Strom, A. R., Hässig, M., Iburg, T. M. and Spiess, B. M. 2011. Epidemiology of canine glaucoma presented to University of Zurich from 1995 to 2009: Part 1: Congenital and primary glaucoma (4 and 123 cases). *Vet. Ophthalmol.* **14**: 121-126.
47. Strom, A. R., Hässig, M., Iburg, T. M. and Spiess, B. M. 2011. Epidemiology of canine glaucoma presented to University of Zurich from 1995 to 2009: Part 2: Secondary glaucoma (217 cases). *Vet. Ophthalmol.* **14**: 127-132.
48. Tezel, G., Yang, X., Luo, C., Kain, A. D., Powell, D. W., Kuehn, M. H. and Kaplan, H. J. 2010. Oxidative stress and regulation of complement activation in human glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**: 5071-5082.
49. Walde, I. 1982. Glaukom beim Hunde. I. Mitteilung. *Kleintierpraxis.* **27**: 221-268.
50. Weinreb, R. N., Kashiwagi, K., Kashiwagi, F., Tsukahara, S. and Lindsey, J. D. 1997. Prostaglandins increase matrix metalloproteinase release from human ciliary smooth muscle cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**: 2772-2780.
51. Yan, Q., Clark, J. I. and Sage, E. H. 2000. Expression and characterization of SPARC in human lens and in the aqueous and vitreous humors. *Exp. Eye. Res.* **71**: 81-90.
52. Yan, Q., Sage, E. H. and Hendrickson, A. E. 1998. SPARC is expressed by ganglion cells and astrocytes in bovine retina. *J. Histochem. Cytochem.* **46**: 3-10.
53. Yao, J., Liu, X., Yang, Q., Zhuang, M., Wang, F., Chen, X., Hang, H., Zhang, W. and Liu, Q. 2013. Proteomic analysis of the aqueous humor in patients with wet age-related macular degeneration. *Proteomics. Clin. Appl.* **7**: 550-

560.

Occurrence survey and vision outcome, aqueous humor proteome and ocular tissue immunohistochemical study in canine glaucoma.

Akira Kubo

Small Animal Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine,
Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, Japan

In the present study, data of glaucoma dogs were retrospectively evaluated for the occurrence survey and vision outcome by treatment modality, and aqueous humor proteome and ocular tissue immunohistochemical study were performed to search for a new diagnostic parameter of canine glaucoma.

1. Occurrence survey and vision outcome in canine glaucoma (a 6-year retrospective study in Japan).

The present study showed several distinctive epidemiological patterns of canine glaucoma compared to the previous studies reported in North America and other countries particularly in terms of breed and sex predilections. The only breed that was significantly overrepresented was Shiba, and this result is consistent with the previous Japanese studies. These differences from overseas studies and similarity to other Japanese studies suggest that the epidemiology of canine glaucomas may be largely affected by breed preference, the environment and other regional factors. The statistical analysis in the present study showed that vision outcome of AGV implantation was superior to that of medical

therapy alone and that medically treated Shiba dogs showed significantly lower vision preservation rates to vision loss compared to other breeds. Hence, these results suggest that AGV implants should be considered in dogs that are visual at the time of presentation and suitable for surgery, and especially in Shiba dogs with poor vision prognosis.

2. Comprehensive aqueous humor proteome with 2DE and mass spectrometry in glaucomatous dogs.

Three different spots were detected by comparing to 2DE pattern between normal and glaucomatous eyes. ON level of aqueous humor was decreased, complement factor B and unidentified protein levels of aqueous humor were increased in glaucomatous eyes. Because the altered levels of these proteins were detected with the comparative analysis between normal and glaucomatous eyes, the aqueous humor proteome with 2DE and MALDI-TOF MS may be a useful method to search for the new diagnostic parameter of canine glaucoma and comparative analysis between normal and glaucomatous eyes in dogs.

3. Immunohistochemical study of ON in canine glaucomatous eyes.

ON immunostaining of all ocular tissue these decreased remarkably in primary glaucoma cases. In secondary glaucoma cases the immunostaining of intraocular and ocular surface tissue decreased as primary glaucoma cases, however the immunostaining of extraocular tissue was observed similar to normal eyes. Although decreased ON

expression of intraocular and ocular surface tissue in primary and secondary glaucoma cases was thought to be the result of high intraocular pressure, decreased ON expression of extraocular tissue found in only primary glaucoma cases might be the specific finding and pathophysiologic change of primary glaucoma.

4. Quantitative analysis of aqueous humor ON with ELISA in canine glaucoma.

No significant difference of aqueous humor ON concentration between normal and glaucomatous dogs was observed in the present study. Although measurement of aqueous humor ON concentration with ELISA was statistically evaluated as an insufficient method to differentiate between normal and glaucomatous eyes, it might become a useful adjunctive diagnostic method because of good sensitivity and specificity. Furthermore, the measurement of ON concentration of aqueous humor was evaluated as a useful differentiate method between primary and secondary glaucoma statistically.

Occurrence survey and vision outcome in the present study provided beneficial information for the management of canine glaucoma. The ON analysis in glaucoma dogs was considered a useful method as an adjunctive diagnostic parameter of canine glaucoma.

The present study was expected to contribute for etiological analysis, early diagnosis and better vision prognosis in canine glaucoma.