

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10850

研究課題名(和文) 光感受性物質由来蛍光の可視化を応用した加齢黄斑変性の個別化医療の確立

研究課題名(英文) Tailor-made medicine of age-related macular degeneration using fluorescence of verteporfin

研究代表者

飯田 知弘 (Iida, Tomohiro)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：50241881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：滲出型加齢黄斑変性の個別化医療を目指して、光線力学的療法で用いられるベルテポルフィン由来の蛍光を生体眼の眼底から検出可能であることを検索した。眼底カメラにより、マウス眼では正常眼で網膜血管内に蛍光が観察でき、実験的に作成した脈絡膜新生血管にもベルテポルフィンの集積した蛍光が観察できた。しかし、滲出型加齢黄斑変性症例での撮影では、観察に十分な蛍光を検出することができなかった。

研究成果の概要(英文)：Photodynamic therapy using verteporfin is an effective treatment for eyes with exudative age-related macular degeneration. To construct the tailor-made medicine of age-related macular degeneration, we examined fluorescence of verteporfin in vivo. Using fundus camera, we found fluorescence of verteporfin in retinal vessels and experimental choroidal neovascularization in rat eyes. However, we did not find fluorescence of verteporfin using fundus camera in eye with exudative age-related macular degeneration.

研究分野：眼科学

キーワード：ベルテポルフィン 光線力学的療法 滲出型加齢黄斑変性 蛍光撮影 脈絡膜新生血管

1. 研究開始当初の背景

滲出型加齢黄斑変性 (AMD) に対する治療の第一選択は抗血管内皮増殖因子 (VEGF) 薬であるが、治療効果が得られない症例がある。一方で、光感受性物質・ベルテポルフィンを用いる光線力学的療法 (PDT) は、日本を含むアジア人種に多い滲出型 AMD のサブタイプであるポリープ状脈絡膜血管症に対して有効性が高く、今後も治療の中心的な役割を担っていくものと推測される。しかし、滲出型 AMD に対する PDT は脈絡膜新生血管 (CNV) のみならず、周囲の正常組織にも少なからず影響を及ぼす。最も有効かつ安全な PDT 治療とは、CNV に対して最大の治療効果を示すと共に、正常組織に対する侵襲を最小限に抑えることである。

現在用いられている滲出型 AMD に対する PDT の治療プロトコル、すなわち照射レーザー光のエネルギー密度、レーザー照射時間、ベルテポルフィンの投与量や投与速度は仮定の計算式に基づくものであり、決して個々の患者にとって最適なものであるとは限らない。個々の患者に対する PDT 治療の最適化のための大きな障壁となっている原因としては、眼内におけるベルテポルフィンの実際の薬物動態が全く不明であることがあげられる。

我々は、光感受性物質であるベルテポルフィンでは何らかの蛍光活性を有しており、特殊なフィルタ装置を用いることで、眼底での可視化が可能ではないかと推測していた。そして実地臨床に応用するための研究を開始するにあたり、いくつかの予備実験を施行してきた。その結果、市販されている眼底カメラの眼底自発蛍光撮影モードを用いることでベルテポルフィン溶液が観察可能な蛍光を発すること、家兎眼における実験で脈絡膜へのベルテポルフィンの流入を確認することができた。

2. 研究の目的

前述のような背景から、生体内において光感受性物質であるベルテポルフィン可視化し、その動態を分析することで、滲出型 AMD の個別化医療を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規撮影用フィルタの作成

スペクトルアナライザによる分光測定を行い、ベルテポルフィンの吸収特性、蛍光特性を調べた。その結果から、撮影用の励起フィルタと濾過フィルタの組み合わせを検討し作成した。

(2) 動物実験：撮影と組織学的安全性検討

マウスの正常眼とレーザー誘発 CNV モデル眼において、ベルテポルフィンを腹腔内に投与し、新規フィルタを搭載した眼底カメラでベルテポルフィン由来蛍光を撮影した。ベルテポルフィン溶液の投与量はヒトの滲出型 AMD の治療に準じて、体重および体表面積よ

り算出した。撮影後に眼球摘出を行い組織学的に網膜障害の有無を検討した。

(3) 臨床例での撮影

PDT を行った滲出型 AMD 症例に対して、PDT 施行前に新規フィルタを搭載した眼底カメラでベルテポルフィン由来蛍光を撮影した。なお、東京女子医科大学倫理委員会承認を受け、インフォームドコンセントを行った上で施行した。

4. 研究成果

(1) 新規撮影用フィルタの作成

ベルテポルフィンの発光帯を濾過し、脈絡膜の撮影が可能な長波長側の励起光で、かつ偽蛍光が発生しないフィルタの組み合わせを検討した。その結果、透過率 50% における波長値で、励起フィルタ：670~700nm、バリアフィルタ：730nm~ の組み合わせが最適と判断された (図 1)。

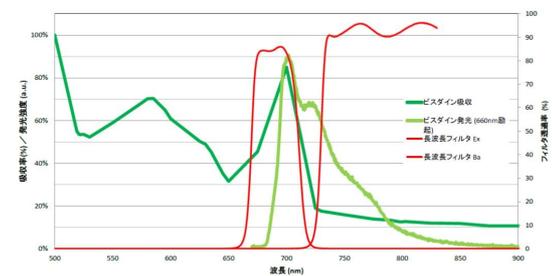


図 1 (ビスダイン分光特性とフィルタ)

(2) 動物実験：撮影と組織学的安全性検討

マウスの正常眼 2 眼とレーザー誘発 CNV モデル眼 2 眼に対して、ビスダイン溶液 1.0ml を腹腔内注射で投与した。正常眼では網膜血管内のビスダイン蛍光を観察可能であった (図 2)。

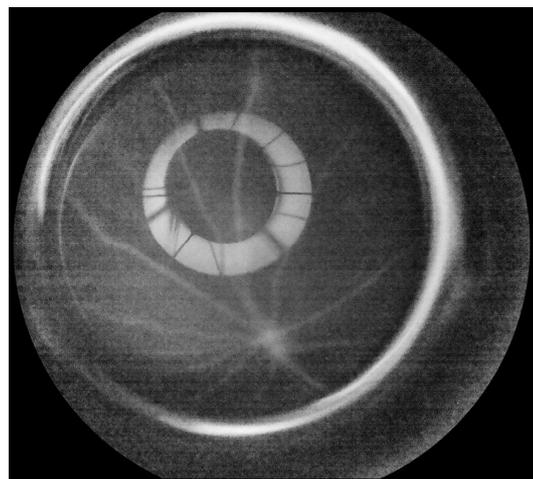


図 2 (正常眼)

網膜血管が明瞭に観察できる

また、レーザー誘発 CNV モデルのマウス眼において、網膜血管内と CNV に蛍光が観察され、CNV に貯留したビスダインを観察できることが示された (図 3)。

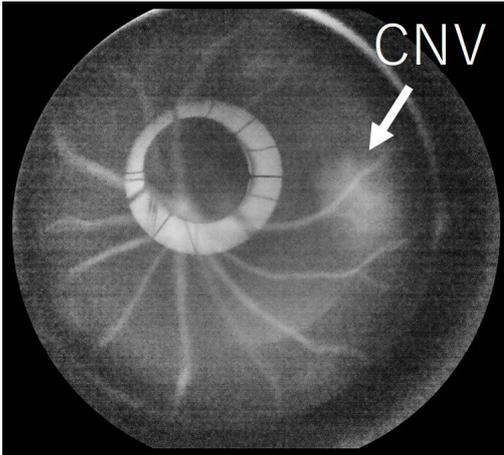


図3 (レーザー誘発 CNV モデル眼)
網膜血管と CNV が観察できる

正常眼での撮影 24 時間後に眼球摘出を行い HE 染色(図4)と TUNEL 染色(図5)で網膜障害の有無を検討したが、正常細胞に対する障害は認められなかった。

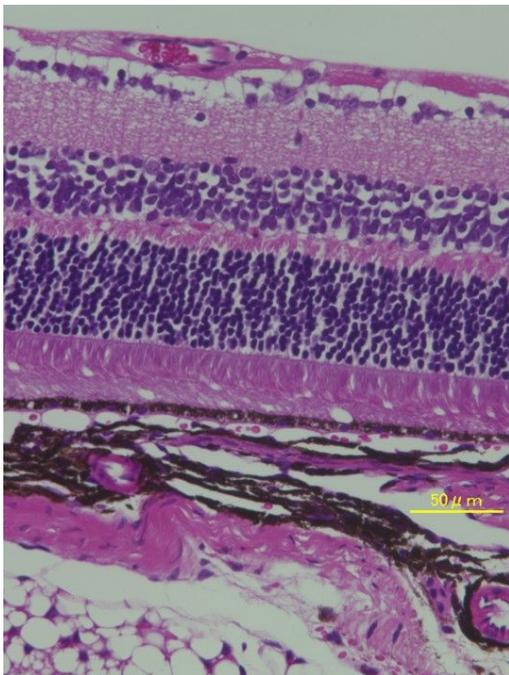


図4 (HE 染色)

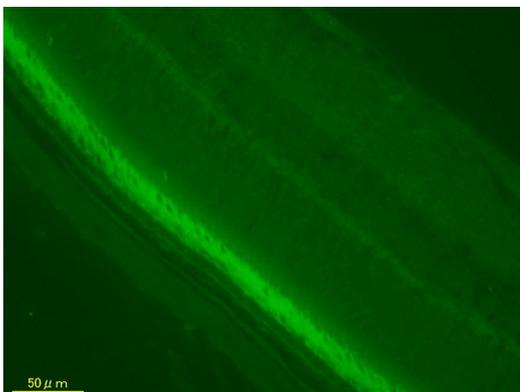


図5 (TUNEL 染色)

以上の動物実験から、(1)で作成したフィルタを搭載した眼底カメラによるビスダイン蛍光撮影は、眼内のビスダインを観察することが可能であり、かつ組織学的に安全であることが証明された。

(3)臨床例での撮影

以上の動物実験の結果を元に、PDT を施行した滲出型 AMD (ポリープ状脈絡膜血管症) 症例 1 例 1 眼に対して、PDT 施行前に同じフィルタを搭載した眼底カメラで撮影を行った。しかし、撮影中に臨床的に十分な光量のビスダイン蛍光を観察することができず、網膜血管と CNV は描出されなかった。さらに撮影後にデジタル撮影画像に対してコントラスト強調や蛍光強度の擬似カラー表示を行ったが明瞭なビスダイン蛍光を観察することはできなかった(図6)。

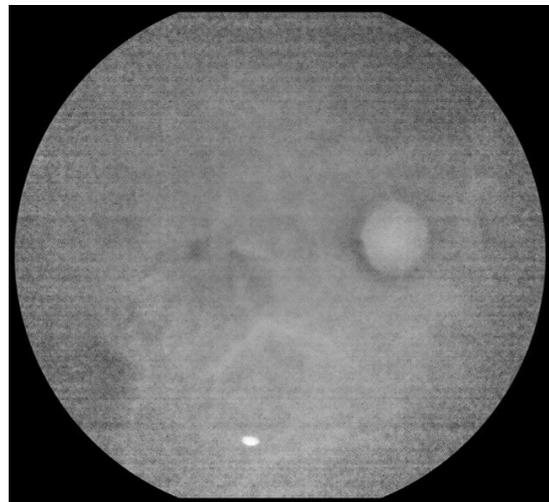


図6 (ポリープ状脈絡膜血管症)

マウス眼では明瞭に観察できたビスダイン蛍光が、なぜ人眼では検出できなかったかの原因の検討と、蛍光観察を可能にするための対策につき研究を継続して行った。

原因として下記3点の可能性が考えられた。

血液中の薬物動態の違いの検討

ヒト血液中においてもベルテポルフィンが蛍光を発することが確認できたことから、マウスとヒトとの血中での薬物動態の違いではないと考えられた。

投与方法についての検討

ヒトでは 10 分間かけて持続静脈内投与を行うのに対して、マウスでは腹腔内のワンショットでの投与を行った。しかし、ワンショットにより血中濃度が高くなったとしても、マウス眼では投与後も経時的に観察できたことから、投与方法による血中濃度の問題ではないと考えられた。

マウス眼と人眼との光学的差異の検討

マウス眼は人眼に比べて小さく眼軸が短いことから、眼内に照射した光は網膜に高い光量で到達する。それに対して、人眼ではマウスよりも眼軸が長いいため眼底での光量が

減衰し、ピスダインを励起するのに十分な光量が達していない可能性がある。

現時点では上記が原因として最も考えられるが、その対策としては眼底カメラの光量を高くするなどの対策が必要である。しかし、撮影機器の改良には網膜への光障害の可能性も考慮するなど安全性を検討する必要があると結論される。

5. 主な発表論文等

- 1) Maruko I, Koizumi H, Hasegawa T, Arakawa H, Iida T. Subthreshold 577 nm micropulse laser treatment for central serous chorioretinopathy. PLoS One. 2017 Aug 29;12(8):e0184112. doi: 10.1371/journal.pone.0184112. eCollection 2017. 査読有
- 2) Yokoyama T, Maruko I, Koizumi H, Ishikawa Y, Iida T. Unmeasurable small size of foveal avascular zone without visual impairment in optical coherence tomography angiography. Eye (Lond). 2018 Feb 5. doi: 10.1038/s41433-017-0005-z. [Epub ahead of print] 査読有
- 3) Sawaguchi S, Maruko I, Mikami Y, Hasegawa T, Koizumi H, Iida T. Optical coherence tomography angiography and fundus autofluorescence in the eyes with choroideremia. Retin Cases Brief Rep. 2017 Fall;11(4):380-382. doi: 10.1097/ICB.0000000000000377. 査読有
- 4) Hasegawa T, Yamashita M, Maruko I, Koizumi H, Kogure A, Ogata N, Iida T. Optical coherence tomographic predictor of retinal nonperfused areas in eyes with macular edema associated with retinal vein occlusion. Br J Ophthalmol 101:569-573, 2017. 査読有
- 5) Izumi T, Koizumi H, Maruko I, Takahashi Y, Sonoda S, Sakamoto T, Iida T. Structural Analyses of Choroid after Half-Dose Verteporfin Photodynamic Therapy for Central Serous Chorioretinopathy. Br J Ophthalmol. 101:433-437, 2017. 査読有
- 6) Saito M, Iida T, Kano M, Itagaki K. Two-year results of combined intravitreal ranibizumab and photodynamic therapy for retinal angiomatous proliferation. Jpn J Ophthalmol 60:42-50, 2016. 査読有
- 7) Maruko I, Arakawa H, Koizumi H, Izumi R, Sunagawa H, Iida T. Age-Dependent Morphologic Alterations in the Outer Retinal and Choroidal Thicknesses Using Swept Source Optical Coherence Tomography. PLoS One. 2016 Jul 28;11(7):e0159439. doi: 10.1371/journal.pone.0159439. eCollection 2016. 査読有
- 8) Kawano H, Sonoda S, Yamashita T, Maruko I, Iida T, Sakamoto T. Relative changes in luminal and stromal areas of choroid

- determined by binarization of EDI-OCT images in eyes with Vogt-Koyanagi-Harada disease after treatment. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 254:421-426, 2016. 査読有
- 9) Koizumi H, Kano M, Yamamoto A, Saito M, Maruko I, Sekiryu T, Okada AA, Iida T. Subfoveal Choroidal Thickness During Aflibercept Therapy for Neovascular Age-related Macular Degeneration: 12-Month Results. Ophthalmology 123:617-624, 2016. 査読有
 - 10) Yamamoto A, Okada AA, Kano M, Koizumi H, Saito M, Maruko I, Sekiryu T, Iida T. One-Year Results of Intravitreal Aflibercept for Polypoidal Choroidal Vasculopathy. Ophthalmology 122:1866-1872, 2015. 査読有
 - 11) Koizumi H, Kano M, Yamamoto A, Saito M, Maruko I, Sekiryu T, Okada AA, Iida T. Aflibercept therapy for polypoidal choroidal vasculopathy: short-term results of a multicentre study. Br J Ophthalmol 99:1284-1288, 2015. 査読有
 - 12) Koizumi H, Kano M, Yamamoto A, Saito M, Maruko I, Kawasaki R, Sekiryu T, Okada AA, Iida T. Short-term changes in choroidal thickness after aflibercept therapy for neovascular age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol 159:627-33, 2015. 査読有
 - 13) Akagi-Kurashige Y, Yamashiro K, Gotoh N, Miyake M, Morooka S, Yoshikawa M, Nakata I, Kumagai K, Tsujikawa A, Yamada R, Matsuda F, Saito M, Iida T, Sugahara M, Kurimoto Y, Cheng CY, Khor CC, Wong TY, Yoshimura N; Nagahama Cohort Research Group. MMP20 and ARMS2/HTRA1 are Associated with Neovascular Lesion Size in Age-Related Macular Degeneration. Ophthalmology 122: 2295-2302.e2, 2015. 査読有
 - 14) Ando Y, Inoue M, Ohno-Matsui K, Kusumi Y, Iida T, Hirakata A. Macular detachment associated with intrachoroidal cavitation in nonpathological myopic eyes. Retina 35:1943-1950, 2015. 査読有
 - 15) Nakao S, Kaizu Y, Yoshida S, Iida T, Ishibashi T. Spontaneous remission of acute zonal occult outer retinopathy: follow-up using adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 253:839-843, 2015. 査読有
 - 16) Maruko I, Iida T, Oyamada H, Sugano Y, Saito M, Sekiryu T. Subfoveal choroidal thickness changes after intravitreal ranibizumab and photodynamic therapy for retinal angiomatous proliferation. Retina 35:648-654, 2015. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 知弘 (Iida, Tomohiro)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：50241881

(2) 研究分担者

丸子 一郎 (Maruko, Ichiro)
東京女子医科大学・医学部・特任講師
研究者番号：10443871

(3) 研究分担者

古泉 英貴 (Koizumi, Hideki)
琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：20551500