

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592579

研究課題名(和文) ショートパルスレーザー光凝固の虚血網膜に対する影響

研究課題名(英文) Molecular mechanism of short pulse laser retinal photocoagulation in ischemic retina

研究代表者

吉田 宗徳 (YOSHIDA, MUNENORI)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60273447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：ショートパルスレーザーは、従来の網膜光凝固よりも短照射時間凝固が可能で、疼痛が少ない点などが利点とされているが、効果が弱いという報告もある。そこで、我々はマウスを用いてショートパルスレーザーの網膜への影響について、そのmolecular mechanismに着目して検討した。マウス網膜において、ショートパルス凝固では、網膜内層の障害が少ないことに加え、網膜内での癒痕形成の割合も70%にとどまっているため、vascular endothelial growth factor (VEGF)の抑制作用が弱く、臨床で使用する場合には、照射数を増やす必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Short pulse duration laser has been reported that induced less damage into inner retina and less pain for patients. However, some researchers reported that retinal photocoagulation with short pulse laser might be less effective than that with conventional laser photocoagulation. The purpose of this study was to determine the efficacy of short pulse laser photocoagulation in ischemic murine retina. Short pulse laser induced less damage to the murine inner retina, and the size of lateral scar formation was 70% of that with conventional laser. And the reduction of VEGF was less with short pulse laser compared with conventional laser. Our findings indicated that we have to perform laser photocoagulation with tighter spacing and more number of treatment spots when we use short pulse laser.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：網膜光凝固 網膜新生血管 網膜虚血 ショートパルスレーザー VEGF

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病網膜症、網膜血管閉塞、未熟児網膜症などの虚血性眼疾患では新生血管の予防及び治療にレーザー網膜光凝固が行われる。近年、従来よりも照射時間を短くしたショートパルスレーザー光凝固が開発され、広く使われてきている(Blumenkranz MS et al: Retina 2006, 26: 370-376)。

(2) ショートパルスレーザーの利点として、網膜内層への障害が少ないこと(Muqit MM et al: Retina 2011, 31: 1669-1707) や疼痛が少ない点があるが(12. Muqit MM et al: Br J Ophthalmol 2010, 94: 1493-1498)、凝固斑が小さく、従来の方法と比べると、効果が低いという報告もあり(Chappelw AV et al: Am J Ophthalmol 2012, 153: 137-142)。同等の効果を得るための至適条件はわかっていない。

(3) レーザー網膜光凝固の奏功機序として、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) の減少が報告されている(Ogata N et al: Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2001, 239: 87-95)。

一方、我々は、以前レーザー網膜光凝固により、一過性に炎症細胞浸潤がおこり、VEGF が、有意に網膜内で増加することを報告した(Itaya M et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 2007, 48: 5677-5683)。この研究では、従来の凝固法で動物実験を行ったが、ショートパルスレーザーでは異なる反応がみられる可能性も考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ショートパルスレーザーを用いた網膜光凝固の虚血網膜への影響を検討し、至適な照射条件を決定するために基礎研究を行い、新生血管の発生を効果的に抑制でき、網膜、視機能への障害の少ない光凝固方法を検討し、臨床的に至適な照射条件の確立をめざすものである。

## 3. 研究の方法

(1) レーザー誘導実験的網膜新生血管モデル

生後8週雄C57BL/6マウスの網膜血管にレーザー照射を行い、血管を閉塞させ、網膜新生血管を誘導するモデルを使用した(Grant MB et al: Nature Med 2002, 8: 607-612)。

(2) 網膜光凝固

上記モデルを用いて、通常凝固法(200ミリ秒)とショートパルス凝固法(20ミリ秒)で網膜光凝固を行い、14日後に眼球を摘出し、網膜組織像を検討した。

(3) VEGF濃度測定

上記モデルを用いて、通常凝固法とショートパルス凝固法によって、硝子体中のVEGF濃度の変化を検討した。

(4) Oxygen-Induced Retinopathy (OIR)モデル

当初、OIRモデルを用いる予定であったが、作成するシステム樹立に時間がかかり、平成25年度から作成して実験に用いた。

OIRモデルは、生後7日目のマウスを5日間75%O<sub>2</sub>の高酸素下にいれ、生後12日にRoom Air下に戻し、生後17日に眼球を摘出する方法をとった。(Smith LE et al: Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 35: 101-111)

(5) 臨床応用

動物実験で得られた結果を元に、ショートパルスレーザーでは照射数を増やして、糖尿病網膜症に対する治療を行い、後ろ向きに臨床成績について、通常凝固法と比較検討した。また未熟児網膜症に対しても、同様にショートパルスレーザーで治療を行い、経過を検討した。

## 4. 研究成果

(1) レーザー誘導実験的網膜新生血管モデルを用いて、通常凝固(200ミリ秒)、ショートパルス凝固(20ミリ秒)で光凝固を行うと、通常凝固では80mWのレーザー出力で照射した場合と、ショートパルス凝固170mWで照射した場合とで、ほぼ同等の凝固斑が得られた。(図1)

14日後に摘出した眼球の網膜組織像を検討すると、ショートパルスでは通常の凝固と比べ網膜の内層の構造が保たれていた。また接線方向への瘢痕形成もショートパルス凝固のほうが、通常凝固の70%と少なかった。

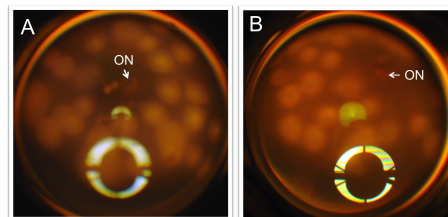


図1 凝固直後のカラー眼底写真

(A) 通常凝固 (B) ショートパルス凝固  
ほぼ同等の凝固斑が得られている。

(ON: 視神経乳頭)

(2) 網膜での新生血管形成に最も深くかかわっているといわれているサイトカイン、VEGFの産生がそれぞれの光凝固によってどの程度抑制されるかを検討した。上記モデル動物の硝子体中には平均 $2.24 \pm 0.33 \text{ ng/ml}$ のVEGFが検出された。これに対して通常光凝固を行った群ではVEGF濃度は約64%減少していた。一方、ショートパルス群では約40%の

減少にとどまった。

この理由としてショートパルス群では瘢痕形成が少ないことが考えられた。また、採取した網膜での免疫染色により、網膜内での VEGF の局在は網膜血管内皮、網膜色素上皮、ミュラー細胞などが主であったが、光凝固後には浸潤したマクロファージと思われる細胞にも局在していた。網膜電図 (ERG) の結果 b 波の振幅は光凝固群で減少していた。特に通常光凝固群では約 52%減少していたが、ショートパルス群では減少率は 22%程度であった。これはショートパルスレーザーでは網膜内層の障害が少ないことに加え、網膜内での瘢痕形成の割合も約 70%にとどまっていることが影響していると思われ、今後の実験ではショートパルスでのレーザー照射数を増やす必要があると考えられた。

(3) OIR モデルが網膜虚血を来しているかを確認するために、VEGF の発現を ELISA で、また Isolectin B4 で染色した網膜フラットマウントで、網膜の虚血範囲 (vaso-oblivation) (VO %)および網膜新生血管 (retinal tuft) を作成した。正常マウスでは、OIR モデルでは網膜虚血は認められなかったが、OIR モデルでは  $11.17 \pm 1.05\%$  の網膜虚血を認めた。(図 2)

また VEGF は、生後 10 日、12 日では Room Air 下のマウスにくらべ、有意に抑制されており、生後 14、17 日には有意に増加していた ( $p < 0.05$ )。また免疫染色では、VEGF は、網膜内層の血管内皮細胞および内境界膜を越えて硝子体内に伸展している網膜新生血管内皮細胞に著明に発現していた。また細胞周期 (G0) を検出する Ki67 染色を行ったところ、VEGF と同様の部位に Ki67 陽性細胞の出現を認め、血管内皮細胞の旺盛な増殖があると推測できた。

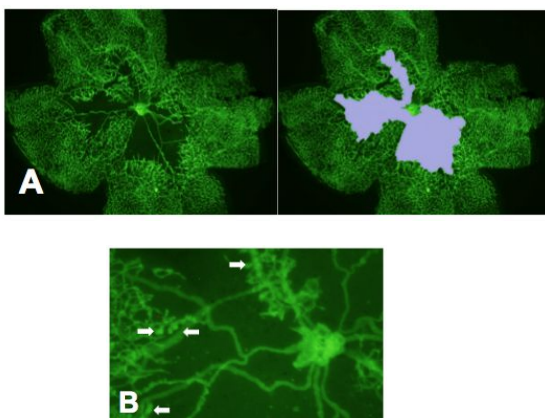


図 2 OIR モデルにおける網膜虚血の定量

- (A)および網膜新生血管 (タフト) の計測 (B)  
(A) 網膜虚血部位は ImageJ を用い、範囲を測定した。  
(B) 網膜新生血管 (タフト) ( ) を ImageJ を用いて計測した。

(4)平成 23 年度、24 年度で得られた結果を元に、ショートパルスレーザーでは照射数を増やして、糖尿病網膜症に対する治療を行ったところ、後ろ向き研究であるが、従来の凝固法と有意な差は認められなかった。

また OIR は、ヒト未熟児網膜症のモデルであるが、Stage 3, zone 2 (plus disease) の症例に対して、ショートパルスレーザーを用いて治療を行った。

当研究で得られた結果をもとに、照射数を従来より増やして施行したところ、網膜症の沈静化が得られた。

以上の結果から、ショートパルス凝固では、網膜内層の障害が少ないことに加え、網膜内での瘢痕形成の割合も約 70%にとどまっているため、VEGF の抑制作用が弱く、臨床では、照射数を増やす必要があると考えられた。OIR モデルの樹立に時間がかかったため、今後もショートパルス凝固の OIR モデルでの molecular mechanism の解明について検討していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

山川めぐみ、野崎実穂、佐藤里奈、森田 裕、吉田宗徳、小椋祐一郎: 糖尿病網膜症に対する汎網膜光凝固術 従来凝固法とパターン凝固の比較. 日眼会誌、査読有、118 巻、2014、362-367

Satoshi Ota, Miho Nozaki, Shuichiro Hirahara, Tomoaki Hattori, Munenori Yoshida, Yuichiro Ogura: A case of retinopathy of prematurity treated by pattern scan laser photocoagulation. Clinical Ophthalmology, 査読有、2014, in press

〔学会発表〕(計 1 件)

山川めぐみ、佐藤里奈、野崎実穂、森田 裕、吉田宗徳、小椋祐一郎: 糖尿病網膜症に対する汎網膜光凝固術 従来凝固法とパターン凝固の比較-、第 36 回日本眼科手術学会総会、2013 年 1 月 27 日、福岡

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 宗徳 (YOSHIDA MUNENORI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・  
准教授  
研究者番号: 60273447

(2) 研究分担者

小椋 祐一郎 (OGURA YUICHIRO)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70191963

野崎 実穂 (NOZAKI MIHO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00295601