

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592605

研究課題名(和文) 緑内障モデルにおける放射光微小血管造影法による球後眼動脈微小血管の描出

研究課題名(英文) Development of a Rat Model for Retrobulbar Angiography of X-Ray Computed Tomography with an Iodine-Containing Polymer

研究代表者

松下 賢治 (Matsushita, Kenji)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40437405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：OCTの進歩により視神経構造が解明されてきたが、赤外線は透過性が低く球後構造の解析には限界がある。一方X線は透過性が高い。そこで我々は球後および視神経の構造解明のため、CT球後造影のためのモデルを作製した。CTにて4週齢SDラットを生体観察した。カテーテルから造影剤やヨウ素含有ポリマーを注入し造影剤をwashoutする。CT値を、ベースライン値、最大造影値、washout値、最大ヨウ素含有ポリマー造影値で記録した。内頸動脈の支配領域を局在化させ、造影剤を眼窩からwashoutしたのちにもポリマーは眼球に残存した。我々はイメージング条件を定めやすい球後造影用のモデルを作製した。

研究成果の概要(英文)：Recent advances in optical coherence tomography allow visualization of the optic nerve structure. However, the infrared light source is limited in its ability to analyze the retrobulbar structure because of insufficient penetration; in contrast, X-rays can penetrate deeper. We developed a model for retrobulbar angiography with computed tomography to reveal the retrobulbar structures around the optic nerve head. Four-week-old SD rats were observed alive with CT. Through the catheter, we had injected a contrast agent, iohexol and an iodine-containing polymer solution. After contrast agent washout, the CT values were recorded at baseline, maximal contrast agent enhancement, washout, and maximal iodine-containing polymer enhancement. We localized the area governed by ICA. The polymer stayed in the eye after the contrast was flushed from the orbit. We developed a model for retrobulbar angiography that makes it easy to adjust the imaging conditions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：医用工学 放射光微小血管造影法 緑内障

1. 研究開始当初の背景

後天性失明性疾患原因の第一位である緑内障は多治見スタディや久米島スタディなどの疫学調査により正常眼圧緑内障が非常に多く、開放隅角緑内障の実に90%におよび、中には眼圧を下降させても緑内障の進行が止まらない病態が存在することがわかってきている。したがって緑内障は眼圧を含む多数の危険因子により進行する多因子疾患と理解するのが現在の考え方である。危険因子の中でも特に注目されているひとつは虚血要因である。緑内障性視神経障害と視神経血流障害の両者には有意な関連があると推測されている。したがって視神経乳頭局所の循環を、定量的に再現性をもって計測することは重要である。

循環と構造の影響は網膜では観察が容易であるが(構造活性相関)、眼球の裏側である球後領域において、これまで十分な観察手段がなく障害が発生する場所における直接の病態解明が困難であった。そこで、球後領域を観察する代わりに眼底検査の中で、視神経に関わる循環状態を検査する試みがこれまでなされてきた。現在までに緑内障患者に臨床応用されている眼血流の測定方法は視神経乳頭部および網膜血流を測定する方法としてレーザースペックル法、レーザードップラー法、色素希釈法がある。しかし、球後領域の血流を測定する方法は超音波カラードップラー法のみで解像度が低い観察にとどまる。光干渉断層計(OCT)により視神経乳頭前面は組織レベルでの解析が可能だが、球後領域の観察手段はMRI/CTのみで解像度の点でOCTと比べはるかに低い。スペクトラルドメイン光干渉断層計や高侵達光干渉断層計により視神経乳頭構造解析を用いても透過性限界により視神経乳頭深部の観察は困難であった。すなわち、視神経疾患の障害を生じる場であるlamina cribrosa近傍は循環観察も構造観察もできず、緑内障性視神経

症で起こっている神経線維欠損が生じる以前に何が起こっているのかを実際の生体観察する方法はなく、成因の解明が進んでいない。このことは、現在まで緑内障に対する根本治療法の確立しない理由のひとつに挙げられる。

一方、放射線は生体深部観察にすぐれ医療の各方面で利用されているが、その解像度はそれほど高くなく、小さな臓器である眼球観察には不向きと考えられてきた。しかし、単色放射光(33.2 KeV)が微小ヨードの検出能に優れ、超高精細撮像系と組み合わせることで主要臓器の微小血管の描出に有用であることを盛らが世界に先駆けて示した(Circulation 1994, Radiology 1996, Am J Physiol 1999)。この技術はこれまでに盛らを含めた複数の研究グループがSPRING8の放射光を用いて、超高解像度(空間分解能5-10 μm)の放射光微小血管造影法を小動物の諸臓器の微小微小血管造影に応用を試みている。心筋内細動脈(血管径20-200 μm)や腎臓の輸入、輸出細動脈および糸球体の脳微小血管の評価が可能である事が確認されつつある。

2. 研究の目的

視神経は乳頭部周囲で短後毛様動脈枝が栄養をつかさどり循環が緑内障発生に関与すると考える大きな根拠となっている。しかし、眼球の裏側である球後領域はこれまで十分な観察手段がなかった。単色放射光は微小ヨードの検出能に優れ、超高精細撮像系と組み合わせ微小血管の描出に有用である。今回、われわれは動物実験および臨床例における球後領域の眼動脈微小血管系の描出をめざし放射光による球後血管系の観察および回転セリウム陽極疑似単色X線診断装置の開発を目指している。そこで、開発に適切なファントムモデルを作成する。これらの技術開発により球後血管系の全体像を高い解像度で観

察でき緑内障視神経疾患の病態解明の一助となる可能性がある。また、深部の乳頭周囲血管の定量的観察が可能で抗緑内障薬や神経保護で用いられる薬剤の乳頭周囲における薬効評価が可能となる。本研究は国際的にも独創的な応用物理学の眼科領域への応用例となり、実臨床での視神経乳頭の球後領域可視化に向けた基盤情報となると思われる。

3. 研究の方法

視神経乳頭を支える篩板構造 (lamina cribrosa) は霊長類と下等哺乳類でやや異なるが球後性眼動脈微小血管の構造は相同性が高い。放射光および回転セリウム疑似単色 X 線造影装置による球後性眼動脈微小血管の開発には中大動物緑内障モデルを用いての実験が必須であるが、生体観察は非常に難易度が高く、生体処置に対する基本的手技の習得と生体観察条件設定の確立がなければ困難である。したがって、ラットやマウスなどの小動物を用いることで実験効率が高めることができる。そこで、4 週齢 SD ラットの造影生体実験モデルを作成する。ラットを全身麻酔下で頸部切開し気道確保ののち総頸動脈、内頸動脈を露出し P10 チューブのカテーテルを内頸動脈に挿入する。内頸動脈分岐後方 1cm で頭蓋内分枝血管を結紮することで血流を眼動脈に局限する。閉創後、CT (R_mCT2, Rigaku Corp.) により生体観察を行う。カテーテルよりイオヘキサール (Omnipaque, Daiichi-Sankyo) およびヨード含有マイクロスフェア (3.5x10⁸ polymers (R=15 μm)/SDS 0.05% Solution, Sekisui Plastics Co.) を充填する。眼球後面に神経があり血管を神経ごと結紮したのち眼球摘出固定しファントムを作成する。

以下の CT 値が記録された。基準点 (A), 最大造影効果時 (B), washout 時 (C), 最大ポリマー造影時 (D)。結果は、Compare Analysis, Rigaku Corp.) で解析した。

眼圧上昇モデルは、(1) 自然発生眼圧上昇緑内障モデル、(2) 血管熱傷による還流障害性眼圧上昇モデル、(3) レーザー誘発性眼圧上昇モデルを試みた。

4. 研究成果

OCT の進歩により視神経構造が解明されてきたが、赤外線は透過性が低く球後構造の解析には限界がある。一方 X 線は透過性が高い。そこで我々は球後および視神経の構造解明のため、CT 球後造影のためのモデルを作製した。CT にて 4 週齢 SD ラットを生体観察した。カテーテルから造影剤やヨード含有ポリマーを注入し造影剤を washout する。CT 値を、ベースライン値、最大造影値、washout 値、最大ヨード含有ポリマー造影値で記録した。眼窩 CT value (oCTv) は、B 時点で 740.71±10.05、それは A 時点の -51.62±1.58 よりも有意に大きかった (P<0.01)。oCTv は D 時点で 209.82±19.90 で C 時点 229.28±18.51 と有意差はなかった (P=0.31)。最大造影 oCTv は 313.60±62.04 でよりポリマー注入時 (90.72±1.42) より高かった (P<0.05)。眼球側の最大造影 CT 値は 143.39±29.40 で、ポリマー注入で 192.27±66.76 となり有意差はなかった (P=0.20)。すなわち、我々は内頸動脈の支配領域を局在化させ、造影剤を眼窩から washout したのちにもポリマーは眼球に残存した。我々はイメージング条件を定めやすい球後造影用のモデルを作製することに成功した。また、眼圧上昇モデルは、3) レーザー誘発性眼圧上昇モデルにおいて安定した眼圧上昇を確認できた。

今後、これまで生体で観察が困難な深部微小血管の描出に成功すれば、直接視神経を支配する循環状態と薬物の影響を正確に捉えることができる。それにより、循環改善を解した神経保護薬の開発に帰すると考えられる

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- 1 . Mayama C, Saito H, Hirasawa H, Konno S, Tomidokoro A, Araie M, Iwase A, Ohkubo S, Sugiyama K, Otani T, Kishi S, Matsushita K, Maeda N, Hangai M, Yoshimura N. Circle- and grid-wise analyses of peripapillary nerve fiber layers by spectral domain optical coherence tomography in early-stage glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Jul 5;54(7):4519-26.
2. Shimo N, Yasuda T, Kitamura T, Matsushita K, Osawa S, Yamamoto Y, Kozawa J, Otsuki M, Funahashi T, Imagawa A, Kaneto H, Nishida K, Shimomura I. A case of aniridia with a heterozygous PAX6 mutation whose pituitary function was partially impaired. *Internal medicine* 2013 on publication
3. Goto S, Koh S, Toda R, Soma T, Matsushita K, Maeda N, Nishida K. Interface fluid syndrome after laser in situ keratomileusis following herpetic keratouveitis. *J Cataract Refract Surg*. 2013 Aug;39(8):1267-70.
4. Hirasawa H, Araie M, Tomidokoro A, Saito H, Iwase A, Ohkubo S, Sugiyama K, Ootani T, Kishi S, Matsushita K, Maeda N, Hangai M, Yoshimura N. Reproducibility of Thickness Measurements of Macular Inner Retinal Layers Using SD-OCT with or without Correction of Ocular Rotation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Apr 5;54(4):2562-70.
5. Iwahashi-Shima C, Miki A, Hamasaki T, Otori Y, Matsushita K, Kiuchi Y, Okada M, Kusaka S. Intraocular pressure elevation is a delayed-onset complication after successful vitrectomy for stages 4 and 5 retinopathy of prematurity. *Retina*. 2012;32(8):1636-1642.
6. Sasamoto Y, Oshima Y, Miki A, Wakabayashi T, Song D, Matsushita K, Hamasaki T, Nishida K : Clinical outcomes and changes in aqueous vascular endothelial growth factor levels after intravitreal bevacizumab for iris neovascularization and neovascular glaucoma: a retrospective two-dose comparative study. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2012 Feb;28(1):41-8.
- 7: Usui S, Ikuno Y, Miki A, Matsushita K, Yasuno Y, Nishida K. Evaluation of the choroidal thickness using high-penetration optical coherence tomography with long wavelength in highly myopic normal-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 2012 Jan;153(1):10-16.e1.
- 8 : 藤本聡子、松下賢治、森本壮、不二門尚、西田幸二 : 良好な近見視力を示した黄斑低形成の一例、*眼科臨床紀要* 5(6), 561-7、2012
9. Ooto S, Hangai M, Tomidokoro A, Saito H, Araie M, Otani T, Kishi S, Matsushita K, Maeda N, Shirakashi M, Abe H, Ohkubo S, Sugiyama K, Iwase A, Yoshimura N. Effects of age, sex, and axial length on the three-dimensional profile of normal macular layer structures. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Nov 11;52(12):8769-79.
10. Miki A, Oshima Y, Otori Y, Matsushita K, Nishida K. One-year results of intravitreal bevacizumab as an adjunct to trabeculectomy for neovascular glaucoma in eyes with previous vitrectomy. *Eye (Lond)*. 2011 May;25(5):658-9.

[学会発表] (計 5 件)

1. Matsushita K, Kawashima R, Nishida K. Development of the model for rat retrobulbar angiography of X ray CT with iode-containing

polymer ARVO2013

2. Kawashima R, Matsushita K, Nishida K.
Functional analysis of cultured astrocytes from
the murine optic nerve head. ARVO2013

3 松下賢治、河嶋瑠美、桑村里佳、臼井審一、
盛英三、西田幸二

ヨード含有ポリマー併用による X 線 CT 視神
経乳頭造影法に対するラットモデルの作成
日本緑内障学会 2013

4 松下賢治、河嶋瑠美、西田幸二 培養視
神経乳頭アストロサイトによる乳頭シンチ
ウム形成の検討 日本眼科学会 2013

5 河嶋瑠美 松下賢治 西田幸二 マウス
視神経乳頭アストロサイトの単離培養 日
本眼科学会 2013

〔図書〕(計 1 件)

1) 松下賢治 「緑内障診断学における生体計
測の進歩」生産と技術 2012・64・3 夏号

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

松下賢治大阪大学講師

(役割: 実験の総括、造影生体モデル作成、
Spring8 実験、データ解析)

研究者番号: 40437405

(2) 研究分担者

三木篤也 大阪大学助教

(役割: 緑内障実験モデルの造影モデル化お
よび実験) 留学のため、2012 年 5 月より辞退

研究者番号: 30437404

(3) 連携研究者

福山直人 東海大学準教授

(微小血管造影動物実験の補佐)

研究者番号: 50349338

静間徹 東海大学専任講師

(役割: 微小血管造影装置の構築)

研究者番号: 20307523