

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2015～2017  
課題番号：15H04996  
研究課題名(和文)総合硝子体学の研究：基盤病態解明と治療の研究

研究課題名(英文)Study of comprehensive vitreology

研究代表者

坂本 泰二 (SAKAMOTO, Taiji)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：10235179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本年度は、硝子体疾患の脈絡膜疾患の関係の研究を行った。規則性に乏しい脈絡膜画像を2値化することで、構造変化と病態を明らかにすることに成功し、同方法により国内外の共同研究を成功させ、商業化された。処理画像の面積測定という単純方法であるが、先駆的方法であり多くの成果を得た。画像を数理パターンの解析することで、通常の画像では気付かれない特徴を抽出することに成功した。さらに、この特徴量を機械学習させることで、脈絡膜の新しい構造パターンを描出した。ここで作り上げたSupport Vector Machineによって脈絡膜の層別化を実現した。これは、脈絡膜の定量化や自動測定が可能になることを意味する。

研究成果の概要(英文)：We focused on the relationship of choroid disease and vitreous disease. By binarizing choroidal image with poor regularity, we succeeded in clarifying relationship between the structural change of choroid and pathological condition change, succeeded in more than 10 collaborative research domestically and overseas by this method, and commercialized. Although this method was a simple method of measuring the area of the processed image, it was a pioneering method and many results were obtained. In the research process, we succeeded in extracting features not noticed in ordinary images by analyzing images mathematically. Furthermore, by learning this feature amount by machine learning, a new structural pattern of the choroid could be obtained. The stratification of the choroid was realized by the Support Vector Machine created here. This means that quantification of choroids and automatic measurement become possible, and we have newly started joint research with domestic companies.

研究分野：眼科学

キーワード：硝子体 サイトカイン 画像処理 機械学習

### 1. 研究開始当初の背景

世界の失明原因の首位は、白内障やトラコーマなどの外眼部疾患であったが、先進国においては、それらの疾患は衛生環境の改善や手術によって克服されつつある。そのため、失明克服研究の主体は、網脈絡膜疾患の研究に移りつつある。我々は、世界に先駆けて硝子体研究を開始して、硝子体特有の様々な現象を明らかにしてきた。その結果、硝子体は単に細胞が少ない透明な組織ではなく、眼内環境を一定に制御する特殊な組織であることがわかった。免疫学的には、硝子体が眼球の不要な免疫反応を抑制する[vitreous cavity associated immune deviation (VCAID)]という新しい概念を提唱した。また、硝子体細胞[hyalocyte (HC)]の培養に初めて成功し、その性質を明らかにした。

今研究期間、薬物治療が網膜硝子体疾患治療の中心になって来ている。その際、硝子体に薬物を投与することが主流になっているものの、硝子体の生理・病理が解明されていない。そこで、今回は薬物が網膜色素上皮細胞周辺の環境に及ぼす影響についてまず研究を行った。

もう一つの問題が、生体モニタリングである。網膜や硝子体の病態解明が進んでも、眼前の患者の状況を正確に把握できなければ治療はできない。これまで、眼底が直接観察可能なために、逆にモニタリング技術は進んでいなかった。近年、光干渉断層計といった非侵襲的検査機器が眼科に導入されており、それらを用いた研究が進んでいる。我々はそれらの画像関連研究についても研究を進める予定である。

### 2. 研究の目的

眼内環境を再現するために in vitro 環境を確立する。その際に各種薬物が環境に及ぼす影響及びメカニズムを探索する。

そこで明らかになったメカニズムを用いた新しい治療法を開発する。

人の眼内環境の変化を非侵襲的にモニターする方法を開発する。

### 3. 研究の方法

以下のように 2 chamber システムを用いて、網膜色素上皮の上面と下面の状況を再現する。Chamber の境界には、孔のある膜を置いて、そこで文化の進んだ網膜色素上皮細胞 (RPE) を培養する。そうすることで、網膜と脈絡膜境界の微小環境を再現した。これは生体下で再現することは不可能である。

そして、図のように上の chamber に各種抗 VEGF 薬を投与した。その際の、下 chamber の薬剤濃度と、VEGF 薬の濃度、および VEGF 自体の濃度、生物学的活性を調べた。さらには、各種シグナル伝達経路防止剤を投与することで、この作用のメカニズム解明を試みた(図1)。

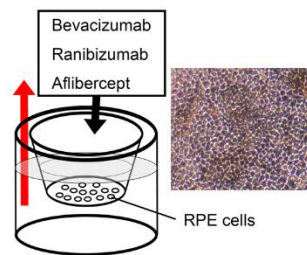


図1 実験で用いた 2 chamber システム

細胞が壊死した際に、damage-associated molecular pattern (DAMP) という細胞壊死物質が細胞外に湧出され、それが周囲の細胞に障害を及ぼすことがある。これは網膜剥離においても同様と思われるので、網膜剥離時の硝子体液を採取し、DAMP の一つである histone の濃度を測定した。その結果、ヒアルロン酸が histone の作用を減弱させることが分かった。そこで白内障手術をブタに行い、その際にどのように眼内の histone が作用するかを検討した。また、ヒアルロン酸の細胞保護的作用を検証するため、ヒアルロン酸を用いた硝子体手術 softshell vitrectomy を行った。

生体モニタリングについては、まずシリコーン摘出後の眼球について、超音波でシリコーン残留量を定量化する方法を考案した。該当する眼球について超音波検査を行い、レイレー現象により大きさが拡大するシリコーン粒子面積を測定して残留量を定量化した。その数値と眼球の構造について、考察を行った。

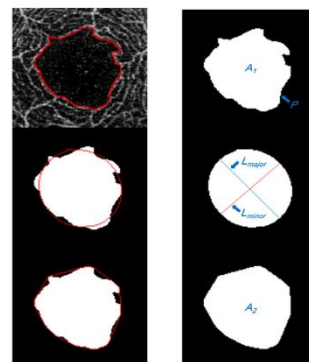


図2 FAZ についての分析方法の図

また、近年開発された血管描出法 OCT angiography についても考察した。各種網膜疾患において機械の特性が異なるので、機種間の差、また、foveal avascular zone (FAZ) の評価を画像解析技術を駆使して行った(図2)。

### 4. 研究成果

RPE を介した薬物送達には活発に行われており、分子レベルでは ranibizumab > aflibercept > bvacizumab の順に透過性が良いことが分かった(図3)。しかし、VEGF の生物活性を抑制する力は、aflibercept が最も強力であった。RPE を通した薬物の移動は、眼局所治療のために行った薬物硝子体投与が全身に影響を及ぼすメカニズムを始めて示した

ものである (図 4)。

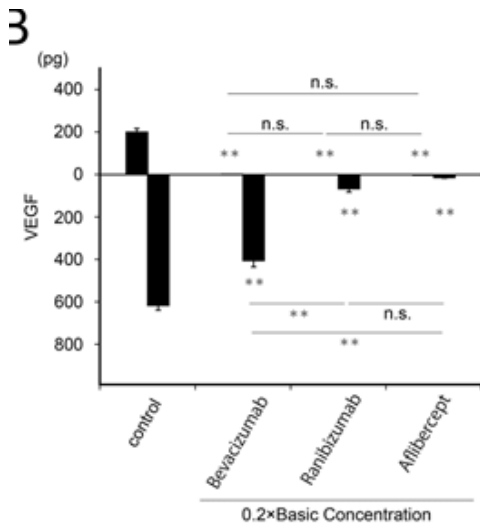
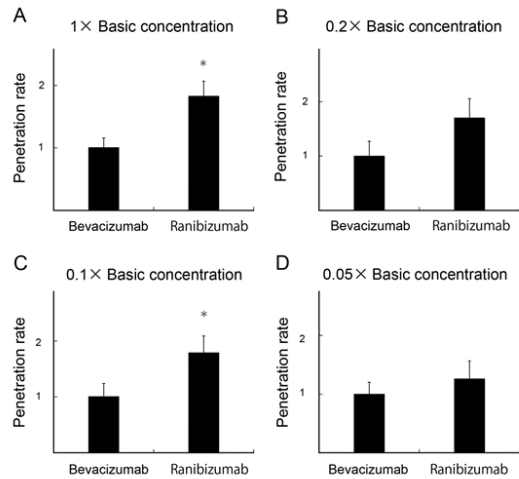


図 3 RPE を透過する各種薬物濃度

DAMP をヒアルロン酸が抑制するという事実から、ヒアルロン酸を硝子体手術に用いることで、手術成績を向上する試みをおこなった。硝子体手術中に網膜に裂孔が形成されると、そこからパーフルオロカーボンが網膜下に移動して、手術操作が困難になる。そこで手術操作の改善と、DAMP を吸着することによる、網膜保護作用を考慮して、soft shell method を考案した (図 4)。その結果、困難症例の視力が大幅に改善することに成功した。

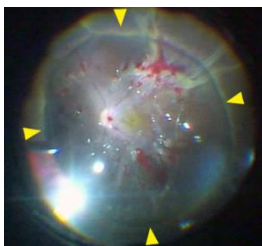


図 4 softshell 法による硝子体手術の術中写真 (Yamakiri et al. Graefe 2016 より改変)

次に、シリコン挿入眼のについて、残余シリコン量の定量を試みた。シリコンを通常方法で摘出した翌日に、眼球全体をエコーグラフィーで撮影した。その画像について、シリコン粒子が硝子体断面に占める面積を

残余シリコン量とした (図 5)。

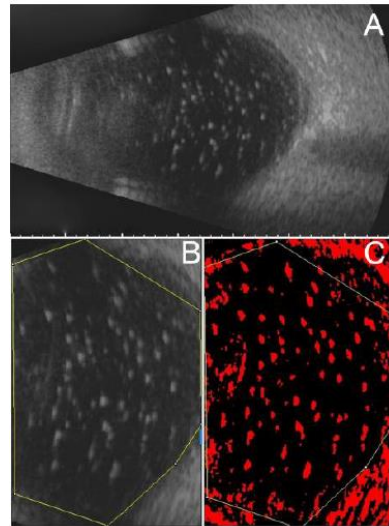


図 5 眼球のエコー像と眼内シリコン粒子

これだけでは、臨床的意味が少ないので、この残余シリコン量に関係ある臨床因子を検討した。

多くの因子を検索したが、シリコン挿入眼の眼軸と相関した (図 6)。

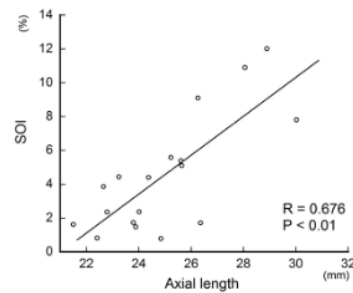


図 6 残存シリコン量と眼軸長の関係。有意で強い相関関係がみられる。

一方、眼内灌流液量、シリコン留置期間などの因子とは相関がなかった。眼軸長が長いことは、網膜表面面積が大きいことを示す。つまり変性シリコンが、より広い面に付着する可能性がありそのため残留量が増加した可能性は高い。硝子体を、先述のように硝子体腔を治療の場として用いエチルが、その生体モニタリングはまだ緒に就いたばかりである。我々が開発した方法で、そのことをモニタリングできた今回の研究は意義が深い。一方、眼圧とも相関していた。シリコン挿入眼で眼圧が高いこと、眼軸長が長いことはその後の合併症を起こすことが多いので、注意が必要であるという臨床上の発見がなされた。

次に生体下の血管モニタリングを OCT angiography について行った。OCT angiography は現在、生体下モニタリングの方法として世界中に広がりつつある。特に、foveal avascular zone は、網膜の機能を間接的に評価する方法として多くの機種が上市されている。しかし、各機種間の機能比較はなされていない。そこで、Triton (Topcon 社), RS3000 (Nidek 社), and CIRRUS (Zeiss 社) の 3 機種について検索した (図 7)。

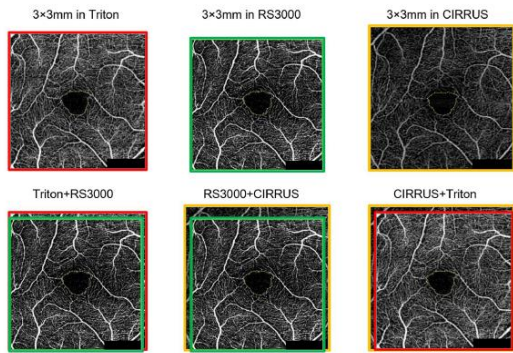


図7 各機種が同じ縮尺として描出したFAZ像。機種によって明らかに差がみられる。

その結果、各機種間に小さいが有意な差が見られた。従来は、機種間の差はないものとして研究がなされてきたが実は大きな差があることがわかった。このことは、今後の、大規模スタディで測定機種選定に大きな配慮が必要なることを示唆する。

これらの差をBland-Altman plotで解析したところ、Zeiss社のCirrusが明らかな他の会社よりも大きめに評価していた(図8)。これは、Zeiss社の器械に眼軸補正機能が付いていないために、近視眼ではmagnification effectを持ってしまうためである。これは、欧米人データを基に機種設計をした器械の限界である。その点、国産器械は眼軸補正機能が付いており、近視人口が多い日本人の測定には優れていると言えた。

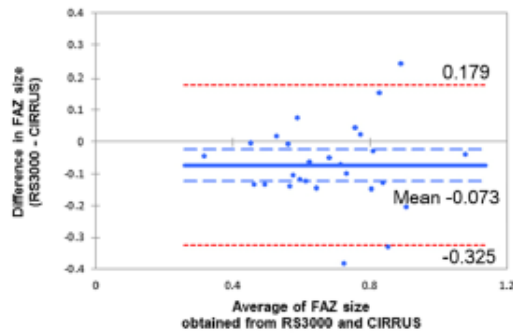


図8 FAZ計測値のBland-Altman plot

以上の研究から、網膜硝子体FAZの研究を深化させるために、面積のみならず多くの解析を行った。今回はトプコン社製のDRI OCTを用いて中央波長1050 nm, an acquisition speed of 100,000 A-scans/sec, and an axial and 水平解像度 7—20  $\mu\text{m}$  の条件を用いた。3 x 3 mm cubes B-scans を行い internal limiting membrane (ILM) 直下 2.6  $\mu\text{m}$  から 15.6  $\mu\text{m}$  の inner plexiform layer (IPL) の断面における血管層に的を絞った。

画像解析には、312×312 pixel PNG images. を用いて ImageJ software によってFAZ (ImageJ version 1.51, National Institutes

of Health, Bethesda, MD; available at: <http://imagej.nih.gov/ij/>). 面積を解析した。clinical information. Area ( $\text{mm}^2$ ), perimeter (mm), Feret's diameter (mm), circularity, aspect ratio, roundness and solidity について既報の通り解析した。

特に形態関連解析法については、Circularity, aspect ratio, roundness, および solidity を行った。Circularity は  $4\pi \times [\text{面積}] / [\text{周囲長}]^2$  という公式を用いた。つまり 1.0 に近づけば、完全円であり、0 に近づけば歪な形である。その結果、女性は有意に大きな面積を持ち、周囲長、Feret's diameter も男性より大きかった ( $P < 0.01$ , each)。眼軸長は、大きな方がより小さなFAZ面積であった ( $R = -0.395$   $P < 0.001$ ), perimeter ( $R = -0.395$   $P = 0.001$ ), Feret's diameter ( $R = -0.424$   $P < 0.001$ )。黄斑網膜厚は以下のパラメータと有意に負の相関関係を示した (area:  $R = -0.756$   $P < 0.001$ , perimeter:  $R = -0.704$   $P < 0.001$ , Feret's diameter:  $R = -0.708$   $P < 0.001$ , circularity:  $R = -0.304$   $P = 0.011$ , axial ratio:  $R = 0.299$   $P = 0.012$ , Roundness:  $R = -0.272$   $P = 0.022$ , Solidity:  $R = -0.380$   $P < 0.001$ ) (図9)。FAZは単に黄斑の血管面積を示すのみならず、黄斑の成熟度を示すものと言える。

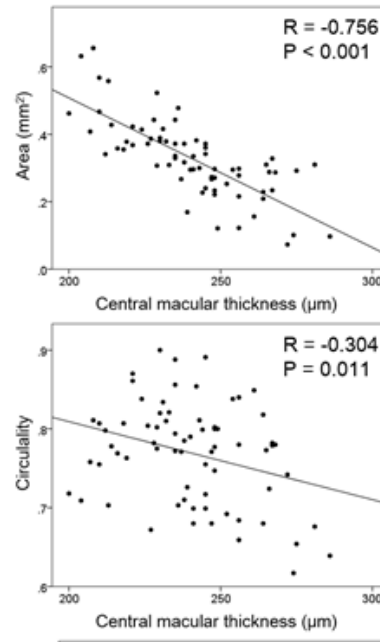


図9 黄斑厚と各種パラメータ解析の相関の一部

以上の他に、多岐にわたる研究を行い、硝子体の生理、病理に関する多くの治験を得ることができた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計86件)

1. Sainohira M, Yamashita T, Terasaki H, Sonoda S, Miyata K, Murakami Y, Ikeda Y, Morimoto T, Endo T, Fujikado T, Kamo J, Sakamoto T. Quantitative analyses of factors related to anxiety and

- depression in patients with retinitis pigmentosa. 査読有  
 PLoS One. 2018 Apr 23;13(4):e0195983.  
 doi: 10.1371/journal.pone.0195983. e
2. Yamashita T, Sakamoto T, et al; writing committee of Japan-Clinical Retina Research Team (J-CREST). Best surgical technique and outcomes for large macular holes: retrospective multicentre study in Japan. *Acta Ophthalmol.* 2018 Apr 19. 査読有  
 doi: 10.1111/aos.13795.
  3. Vavvas DG, Dryja TP, Wilson ME, Olsen TW, Shah A, Jurkunas U, Pineda R, Poulaki V, Palioura S, Veldman P, Moreno-Montañés J, Pinazo-Duran MD, Pastor JC, Tsilimbaris M, Rhee D, Colby K, Hunter DG, Thanos S, Sakamoto T, et al. Lens regeneration in children. *Nature.* 2018 Apr 4;556(7699):E2-E3. 査読有  
 doi: 10.1038/nature26149.
  4. Shiihara H, Terasaki H, Sonoda S, Kakiuchi K, Sakamoto T. Evaluation of shape of foveal avascular zone by optical coherence tomography angiography in eyes with branch retinal vein occlusion *J Vit Ret Dis* (in press 2018 Mar 23) 査読有
  5. Wei X, Sonoda S, Mishra C, Khandelwal N, Kim R, Sakamoto T, Agrawal R. Comparison of Choroidal Vascularity Markers on Optical Coherence Tomography Using Two-Image Binarization Techniques. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018 Mar 1;59(3):1206-1211. 査読有  
 doi: 10.1167/iovs.17-22720.
  6. Shiihara H, Sakamoto T, et al. Effect of fluid-air exchange on reducing residual silicone oil after silicone oil removal. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2017 Sep 査読有  
 doi:10.1007/s00417-017-3701-2.
  7. Shiihara H, Sakamoto T, et al. Reproducibility and differences in area of foveal avascular zone measured by three different optical coherence tomographic angiography instruments. *Sci Rep.* 2017 Aug 29;7(1):9853. 査読有  
 doi: 10.1038/s41598-017-09255-5.
  8. Sakono T, Otsuka H, Shiihara H, Yoshihara N, Sakamoto T. Acute bacterial endophthalmitis after scleral buckling surgery with chandelier endoillumination. *Am J Ophthalmol Case Rep.* 2017 Jul 21;8:7-10. 査読有  
 doi: 10.1016/j.ajoc.2017.07.007
  9. 野崎実穂, 園田祥三, 丸子一朗, 飯田知弘, 坂本泰二, 辻川明孝, 小椋祐一郎. 網脈絡膜疾患における光干渉断層血管撮影と蛍光眼底造影との有用性の比較, 臨床眼科 71(5), 651-659, 2017-05 査読有
  10. Sonoda S, Sakamoto T, Kakiuchi N, Shihara H, Sakoguchi H, Tomita T, Yamashita T, Uchino E. Semi-automated software to measure luminal and stromal areas of choroid on optical coherence tomographic images. *Jpn J Ophthalmol.* 2018 Mar;62(2):179-185. 査読有  
 doi: 10.1007/s10384-017-0558-1. Epub 2017 Dec 21.
  11. Kawano H, Sonoda S, Saito S, Terasaki H, Sakamoto T. Choroidal structure altered by degeneration of retina in eyes with retinitis pigmentosa. *Retina.* 2017 Jan 16. 査読有  
 doi: 10.1097/IAE.0000000000001465.
  12. Chan YK, Lu Y, Czanner G, Wu J, Cheng HC, Hussain R, Sakamoto T, Shum HC, Wong D. In vitro experiment to elucidate the 'soft shell technique' for preventing subretinal migration of perfluoro-octane. *Br J Ophthalmol.* 2017 Jan 5. 査読有  
 doi: 10.1136/bjophthalmol-2016-309856.
  13. Yoshihara N, Terasaki H, Shirasawa M, Kawano K, Sonoda S, Hisatomi S, Ishibashi T, Sakamoto T. Permeability and anti-VEGF effect of bevacizumab, ranibizumab and aflibercept in polarized retinal pigment epithelial layer in vitro. *Retina.* 2017 Jan;37(1):179-190. 査読有  
 doi: 10.1097/IAE.0000000000001117.
  14. Kinoshita T, Mitamura Y, Mori T, Akaiwa K, Semba K, Egawa M, Mori J, Sonoda S, Sakamoto T,. Changes in choroidal structures in eyes with chronic central serous chorioretinopathy after half-dose photodynamic therapy. Changes in choroidal structures in eyes with chronic central serous chorioretinopathy after half-dose photodynamic therapy. *PLoS One.* 2016 Sep 16;11(9):e0163104. 査読有  
 doi: 10.1371/journal.pone.0163104.
  15. Sonoda S, Sakamoto T, et al. Structural changes of inner and outer choroid in central serous chorioretinopathy determined by optical coherence tomography. *PLoS One.* 2016 Jun 15;11(6):e0157190. 査読有  
 doi: 10.1371/journal.pone.0157190.
  16. Kinoshita T, Mitamura Y, Shinomiya K, Egawa M, Iwata A, Fujihara A, Ogushi Y, Semba K, Akaiwa K, Uchino E, Sonoda S, Sakamoto T. Diurnal variations in luminal and stromal areas of choroid in normal eyes. *Br J Ophthalmol.* 2016 Jun 13. pii: bjophthalmol-2016-308594. 査

- 読有  
doi: 10.1136/bjophthalmol-2016-308594.
17. Terasaki H, Yamashita T, Yoshihara N, Kii Y, Tanaka M, Nakao K, Sakamoto T. Location of Tessellations in Ocular Fundus and Their Associations with Optic Disc Tilt, Optic Disc Area, and Axial Length in Young Healthy Eyes. PLoS One. 2016 Jun 8;11(6):e0156842. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0156842. eCollection 2016
18. Sakamoto T. Response to comment on: 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. 2016 Apr 15. 査読有
19. 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. 2016 Mar;254(3):421-6 査読有
20. Shiihara H, Terasaki H, Yoshihara N, Yamashita T, Sakamoto T. Amount of residual silicone oil in vitreous cavity is significantly correlated with axial length. Retina. 2016 Jan;36(1):181-7. 査読有
21. Egawa M, Mitamura Y, Semba K, Naito T, Sonoda S, Sakamoto T. Changes of choroidal structure after treatment of primary intraocular lymphoma. BMC Ophthalmol. 2015 Oct 19;15:136. 査読有
22. Okubo A, Unoki K, Sameshima M, Sakamoto T. Focal choroidal excavation with changes in shape and alterations of inner retina during long follow-up in an eye with polypoidal choroidal vasculopathy. Clin Exp Optom. 2015 Sep;98(5):478-80. 査読有
23. Sonoda S, Sakamoto T, et al. Luminal and stromal areas of choroid determined by binarization method of optical coherence tomographic images. Am J Ophthalmol. 2015 Jun;159(6):1123-1131. e1. 査読有  
doi: 10.1016/j.ajo.2015.03.005.
24. Yamakiri K, Uchino E, Sakamoto T. Soft shell technique during vitrectomy for proliferative vitreoretinopathy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2016 Jun;254(6):1069-73. 査読有
25. Terasaki H, Sakamoto T, et al. Penetration of bevacizumab and ranibizumab through retinal pigment

- epithelial layer *in vitro*. Retina. 2015 May;35(5):1007-15. 査読有
26. Yoshihara N, Sakamoto T, Y. Wider retinal artery trajectories in eyes with macular hole than in fellow eyes of patients with unilateral idiopathic macular hole. PLoS One. 2015 Apr 13;10(4):e0122876. 査読有
27. Yamashita T, Sakamoto T, et al. Circumpapillary course of retinal pigment epithelium can be fit to sine wave and amplitude of sine wave is significantly correlated with ovality ratio of optic disc. PLoS One. 2015 Apr 7;10(4):e0122191. 査読有

[学会発表] (計 60 件)

[図書] (計 6 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 画像処理装置、画像処理方法、診断システム及びプログラム

発明者: 坂本泰二、園田祥三

権利者: 鹿児島大学

種類: 特許

基礎出願番号: 特願 2015-201495

国内出願日: 2015 年 10 月 16 日

国内外の別: 国際

[その他]

ホームページ等

[http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~op/info\\_detail.php?no=41](http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~op/info_detail.php?no=41)

<https://www.facebook.com/ganka.kagoshima>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂本 泰二 (SAKAMOTO Taiji)

鹿児島大学・歯学域医学系・教授

研究者番号: 10235179

### (2) 研究分担者

・丸山 征郎 (MARUYAMA Ikuro)

鹿児島大学・歯学域総合研究科・特任教授

研究者番号: 20082282

・橋口 照人 (HASHIGUCHI Teruto)

鹿児島大学・歯学域医学系・教授

研究者番号: 70250917

・原 博満 (HARA Hiromitsu)

鹿児島大学・歯学域医学系・教授

研究者番号: 70250917

### (3) 連携研究者

・山口 宗一 (YAMAGUCHI Munekazu)

鹿児島大学・歯学域医学系・准教授

研究者番号: 60709301

・園田 祥三 (SONODA Shozo)

鹿児島大学・歯学域附属病院・講師

研究者番号: 20325806