

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20269

研究課題名(和文)非動脈炎性虚血性視神経症ラットモデルによる動物実験

研究課題名(英文)Animal experiment with rodent model of non-arteritic ischemic optic neuropathy

研究代表者

日高 貴子(Hidaka, Takako)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：00751140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：まず正常ラットと非動脈炎性虚血性視神経症ラットモデルの眼圧測定をトノラボ手持眼圧計にて行ったが、正常ラットと有意差は認めなかった。またレーザースペckルフローグラフィ(ソフトウェア社)にて正常ラットと非動脈炎性虚血性視神経症ラットモデルの視神経乳頭血流を測定した。その結果正常ラットにおいて左右眼で血流に有意差なく、非動脈炎性虚血性視神経症ラットモデル急性期および慢性期において有意に左眼の視神経乳頭血流が低下していた。現在このモデル作成を応用し正常眼圧緑内障ラットモデルの作成方法を検討している。

研究成果の概要(英文)：First, we measured intraocular pressure of normal rats and non-arteritic ischemic optic neuropathy rodent models(rNAION) using Tonolab tonometer. There was no significant difference between normal rats and rodent models. Second, we measured optic nerve head blood flow of normal rats and rNAION using Leser speckle flowgraphy. As a result, there was no significant difference of blood flow between right and left eyes in normal rats, and the left optic disc blood flow decreased in the acute and chronic phases of rNAION. Currently we are studying how to make a normal-tension glaucoma rat model by applying rNAION creation.

研究分野：緑内障

キーワード：レーザースペckルフローグラフィ 非動脈炎性虚血性視神経症ラットモデル 正常眼圧緑内障

### 1. 研究開始当初の背景

われわれは、Bernstein らの方法に従って非動脈炎性視神経症(non -arteritic ischemic optic neuropathy: NAION)ラットモデルの作成に成功した。NAION は、急性片眼性発症の視神経疾患の一つであり、原因は視神経乳頭を栄養する短後毛様体動脈の閉塞とされる。われわれは、ラットの尾静脈から 2.5mM ローズベンガル液 1ml/Kg を注入し、その後、アルゴングリーンレーザーを 20 秒間照射し、NAION を生じさせた。ローズベンガルにレーザーを照射することで活性酸素を生じさせ、血管内皮細胞を障害し、血管を閉塞させるとされている。われわれは血管鑄型標本にてラットモデルの短後毛様体動脈の閉塞を証明し、眼底所見、蛍光眼底造影検査、組織検査にてヒト NAION との相同性、短後毛様体動脈の閉塞とそれによる網膜神経節細胞のアポトーシスを確認した。また、VEP、STR にて網膜神経節細胞から視神経の視機能の評価し、その低下とヒト NAION との相同性を確認した。一方緑内障は、慢性的に、同様な神経節細胞のアポトーシスがおこり、網膜神経節細胞から視神経の視機能の低下をきたす疾患である。緑内障は多因子疾患であるが、眼圧が主要な障害因子と考えられている。現時点では、眼圧下降が緑内障治療の唯一の方法である。しかし、眼圧を十分に下げても視神経障害が進行する症例が存在し、眼圧に依存しない因子が存在すると考えられる。眼圧が正常であっても視機能障害が進行する緑内障は、正常眼圧緑内障とよばれ、日本人に多いことが多施設研究で明らかにされた。その危険因子は、蛍光眼底造影検査などから慢性的な短後毛様体動脈の血流低下であることが指摘されている。これまで慢性的な血流低下による正常眼圧緑内障のラットモデルはない。したがって、われわれは、NAION ラットモデルの作成を応用し、ラットの尾静脈からローズベンガル液を注入し、ごく弱いアルゴングリーンレーザーを照射することで慢性的な短後毛様体動脈の血流低下を生じさせ、正常眼圧緑内障ラットモデルを作成する着想に至った。

### 2. 研究の目的

NAION のラットモデルを応用し、正常眼圧緑内障のラットモデルを作成すること。

### 3. 研究の方法

ベースラインとして、正常ラットの時間、日単位の定期的なラットの眼圧測定、視神経乳頭の写真記録、蛍光眼底造影検査所見、血管鑄型標本、光干渉断層検査(OCT)による網膜神経線維層厚の測定、HRT による視神経乳頭リム面積の測定、組織標本による神経節細胞の減少、神経線維層厚の減少、網膜外層の保存、蛍光顕微鏡を用いた網膜神経節細胞の観察、数の測定、網膜電図(ERG)、視覚誘発電位(VEP)、Scotopic Threshold Response (STR) の測定を行い、記録する。次に、ローズベンガル液を注入やアルゴングリーンレーザー照射が上記の観察所見に影響を与

えないかを調べる。最終的にラットの尾静脈からローズベンガル液を注入し、ごく弱いアルゴングリーンレーザーを照射し、正常眼圧緑内障ラットモデルの作成されたかどうかを評価する。ローズベンガル液を注入後にアルゴングリーンレーザーを照射し、上記の観察所見を同様に観察記録し、それぞれを比較検討し、正常ラットのベースラインとの比較、ヒト正常眼圧緑内障との相同性の比較を行う。

#### 1) 正常ラットのベースラインの作成

ラットの眼圧測定を、時間、日単位で行う。眼圧測定は、ペノキシル点眼後、トノペンをういて測定する。3 時間ごとに 1 日眼圧測定を行った後、決まった時刻での眼圧を毎日測定する。眼圧の変化、測定誤差を記録する。ラットの視神経乳頭の写真をとり、記録する。眼底カメラ(digital camera from Topcon, Tokyo, Japan)を用いて撮影するが、ラットの眼球光学系はヒトと異なり屈折力が強いいため、眼底カメラに+20D のレンズを装着して撮影する。蛍光眼底造影検査を行う。蛍光眼底造影検査の際、麻酔は、ケタミン/キシラジン(それぞれ 80 mg/kg, 5 mg/kg)にて筋肉注射を行う。ミドリン P® にて散瞳後、フルオレセイン液 (10%, 100 mg/kg; Alcon, Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, Texas) をラットの尾静脈より静注し、励起フィルターは 465-490 nm の blue-green 光を透過させ、バリアフィルターは 520-530 nm の yellow 光を透過させるフィルターが搭載された眼底カメラ(Topcon, Tokyo, Japan)を用いて撮影する。フルオレセイン液は 1 秒で注入し、撮影は 1 秒ごとに 20 秒間、その後 5 秒ごとに 60 秒間、そして 1 分ごとに 6 分まで撮影する。

血管鑄型標本の作成は、ペントバルビタール 50mg/kg、キシラジン 0.3mg/kg にて深麻酔をかけ、大動脈に 4-0 絹糸を前もって通しておき、下大静脈を切除後、すぐに左心室に 20G カテーテル針を挿入する。脈管を傷つけないようにカテーテルを先行させ、大動脈内に挿入、その後先を鈍にした 22G 針をカテーテル内に挿入し、4-0 シルクにて金属部を結紮する。10ml india ink を注入し、10 秒後に断頭する。その後眼球摘出し、4% PF-PBS(4% paraformaldehyde phosphate buffer solution)中で 24 時間固定を行う。その後、網膜を一部脈絡膜側に残した状態で切除し、顕微鏡で観察する。

光干渉断層検査(OCT)による網膜神経線維層厚の測定は、spectral domain OCT iVUE-100(Optovue Inc, CA, USA)を用いて行う。ヒトの眼とラットの眼との違いは屈折力、眼軸長、瞳孔径で、ラットは強い負の球面収差を持つ。そのため、そのまま撮影しても鮮明な画像がえられない。したがって、眼底写真と同様に achromatic +20D doublet lens を OCT の撮影レンズ前方に固定具とともに装着し、撮影を行う。撮影においては scan quality index(SQI) > 45 を良好とし、データとして用い、3 回の撮影を行い、その平均値で評価す

る。網膜層は内境界膜 (ILM) より内網状層 (IPL) までの網膜内層の厚みで評価を行う。

組織標本による神経節細胞の減少、神経線維層厚の減少、網膜外層の保存の評価は、ラットにソムノペンチルを腹腔内投与し、麻酔死亡させた後眼球摘出し、70%メタノール、8%ホルムアルデヒド混合緩衝液 (Super fix, Kurabo, Japan) にて固定し、約 2 日間冷蔵させる。その後それを視神経横でカミソリ刃にて水平断または矢状断で切断、水晶体を除去してパラフィン包埋する。組織は視神経乳頭を通る断面で 6  $\mu\text{m}$  の厚さで切片作成し、ヘマトキシリン-エオジン (hematoxylin-eosin, H-E) 染色を行い、顕微鏡下にて観察し、また 4 カ所で網膜各層の細胞数の計測を行う。

蛍光顕微鏡を用いた網膜神経節細胞数の測定の観察の方法は、ラットの視覚皮質に相当する部位にドリルで穴をあけ、その皮質をペリスタポンプで吸引すると、ラットの上丘が露出される。ラットでは、網膜神経節細胞約 98% が上丘に投射しており、上丘からのフルオロゴールド逆行性染色では 95% の RGC が識別可能となる。したがってそこにスポンジェルなどに浸透させたフルオロゴールドを塗布し、軟膏で封入させると、逆行性に運ばれ、神経節細胞まで到達する。それを蛍光顕微鏡で観察する。それを視神経乳頭近傍、網膜末梢部、その中間を、上下、耳鼻側 4 象限、計 12 カ所でカウントし、RGC の総数とする。

網膜電図 (ERG) の測定は、12 時間以上の暗順応後、ケタミン (80mg/kg) とキシラジン (5mg/kg) の筋肉麻酔下において測定する。体温は、heating pat を用いて摂氏 37 度に保温する。ペノキシール点眼<sup>®</sup>にて角膜表面麻酔後、ラット用コンタクトレンズ型 LED 電極 (Mayo 社) を閉電極として両眼角膜に設置、不閉電極は針電極を口腔内に、接地電極は尾部に設置する。光刺激はラット用コンタクトレンズ型 LED 電極にて Mayo 社の LED 発光装置 (WLS-20) を用い、輝度 20000cd/m<sup>2</sup>、0.05 秒間で 1 回刺激する。

視覚誘発電位 (VEP) の測定は、3 時間以上の暗順応後、ケタミン (80mg/kg) とキシラジン (5mg/kg) の筋肉麻酔下において測定する。体温は、heating pat を用いて摂氏 37 度に保温する。閉電極および不閉電極は、ラットの後頭葉視皮質に相当する部位に埋め込んだねじ電極として設置し、接地電極は尾部に設置する。光刺激はラット用コンタクトレンズ型 LED 電極にて Mayo 社の LED 発光装置 (WLS-20) を用い、輝度 105cd/m<sup>2</sup>、0.03 秒間、0.98Hz の頻度で、high cut 100Hz、low cut 1.0Hz にて平均 60 回の加算を行う。

Scotopic Threshold Response (STR) の測定は、B.V.Bui らの方法に準じて行う。12 時間以上の暗順応後、ケタミン (80mg/kg) とキシラジン (5mg/kg) の筋肉麻酔下において測定する。体温は、heating pat を用いて摂氏 37 度に保温する。ペノキシール点眼にて角膜表面麻酔後、ラット用コンタクトレンズ型電極 (Mayo 社) を閉電極として両眼角膜に設置、

不閉電極は針電極を鼻部皮下に、接地電極は尾部に設置する。光刺激は Ganzfeld 刺激装置を用い -6.15 ~ -3.3 log (cd · s / m<sup>2</sup>) で弱い刺激から開始、0.2 log unit ずつ増強し、それぞれ平均 30 回加算し、測定を行う。

2) ローズベンガル液、アルゴングリーンレーザー照射の眼圧、視神経乳頭の形態、視神経機能への影響の有無

ローズベンガル液は、2.5 mM、1 ml/kg をラットの尾静脈より静注し、上記と同じ方法で時間、日単位の定期的な眼圧測定、視神経乳頭の写真記録、蛍光眼底造影検査所見、血管鑄型標本、光干渉断層検査 (OCT) による網膜神経線維層厚の測定、組織標本による神経節細胞の減少、神経線維層厚の減少、網膜外層の保存、蛍光顕微鏡を用いた網膜神経節細胞の観察、数の測定、網膜電図 (ERG)、視覚誘発電位 (VEP)、Scotopic Threshold Response (STR) の測定を行い、記録し、ベースラインと比較する。

アルゴングリーンレーザーは、視神経乳頭に 514 nm の波長で 12 秒間照射し、上記と同じ方法で時間、日単位の定期的な眼圧測定、視神経乳頭の写真記録、蛍光眼底造影検査所見、血管鑄型標本、光干渉断層検査 (OCT) による網膜神経線維層厚の測定、組織標本による神経節細胞の減少、神経線維層厚の減少、網膜外層の保存、蛍光顕微鏡を用いた網膜神経節細胞の観察、数の測定、網膜電図 (ERG)、視覚誘発電位 (VEP)、Scotopic Threshold Response (STR) の測定を行い、記録し、ベースラインと比較する。

#### 正常眼圧緑内障ラットモデルの作成

ラットの尾静脈からローズベンガル液を注入し、ごく弱いアルゴングリーンレーザーを照射し、正常眼圧緑内障ラットモデルの作成されたかどうかを評価する。上記と同じ方法で時間、日単位の定期的な眼圧測定、視神経乳頭の写真記録、蛍光眼底造影検査所見、血管鑄型標本、光干渉断層検査 (OCT) による網膜神経線維層厚の測定、組織標本による神経節細胞の減少、神経線維層厚の減少、網膜外層の保存、蛍光顕微鏡を用いた網膜神経節細胞の観察、数の測定、網膜電図 (ERG)、視覚誘発電位 (VEP)、Scotopic Threshold Response (STR) の測定を行い、記録し、ベースラインと比較する。それぞれ、正常ラットのベースラインとの比較、ヒト正常眼圧緑内障との相同性の比較を行う。

安定したモデルが作成されるための適正なローズベンガル液の濃度、量、アルゴングリーンレーザーのパワー、照射時間を検討する。

#### 4. 研究成果

われわれはまず正常ラットとの眼圧測定をトノボ手持ち眼圧計にて行った。その後非動脈炎性虚血性視神経症ラットモデルの眼圧測定を行ったが、正常ラットと有意差を認めなかった。

われわれは正常ラットおよび NAION ラット

モデルにおいて視神経乳頭の眼底写真撮影、蛍光眼底造影検査、spectrum domain OCT iVUE-100(Optovue Inc, CA, USA)により光干渉断層計を用いた網膜神経線維層厚の測定、蛍光顕微鏡を用いた網膜神経節細胞数の測定、網膜電図や視覚誘発電位の測定を行いラットモデルの評価を行なっているが、今回血流低下を示す更なる評価項目としてレーザースペックルフローグラフィ(LSFG)を導入した。LSFGによるラットの視神経乳頭血流の評価の報告は未だ少ないため、われわれはLSFGでラットにおける血流評価の検討をまず行うこととした。

そのためまずレーザースペックルフローグラフィ-LSFG-Microにて正常ラット24匹48眼と非動脈炎性虚血性視神経症ラットモデル14匹28眼の視神経乳頭血流を測定した。

レーザースペックルとは、レーザを生体組織に照射すると反射散乱光が干渉しあい、ランダムな斑点模様が形成されるが、これをスペックルパターンと呼ぶ。赤血球などの粒子が移動し変化することでパターンを解析し血流を評価する。血流の指標にはmean blur rate(MBR)が用いられ、さらに血管血流(the MBR of the tissue vessel:MV)と組織血流(the MBR of the tissue region:MT)で表現される。

まず、正常ラット(n=24)の両側視神経乳頭頭頭血流量を測定し分析した。その結果正常ラットの右眼と左眼の間にMVまたはMTに有意差は認められなかった(p=0.557およびp=0.509)またNAION誘導後、1,3,7,14、および28日目に、両側視神経乳頭頭頭血流量を測定し、分析した。その結果NAION誘導後1日目のMVとMTに、左右眼で有意差が認められた(n=14)(p=0.795×10<sup>-5</sup>、p=0.225×10<sup>-2</sup>)。また3日目、(n=12)(p=0.862×10<sup>-2</sup>およびp=0.862×10<sup>-2</sup>)7日目、(n=14)(p=0.472×10<sup>-2</sup>およびp=0.855×10<sup>-6</sup>)14日目、(n=10)(p=0.101×10<sup>-2</sup>およびp=0.283×10<sup>-2</sup>)28日目でもMVおよびMTに有意差があった(n=10)(p=0.058×10<sup>-2</sup>およびp=0.149×10<sup>-2</sup>)。

さらに、NAION誘導後1,3,7,14、および28日目に、左右MVおよびMT比を計算し、それらと比較したところNAION誘導前のMV値およびMT値およびNAION誘導後の各時点で観察されたMV値およびMT値に有意差があった。しかし、NAION誘導後の時点の間にMVまたはMTに有意差はなかった。その結果正常ラットにおいて左右眼で血流に有意差なく、非動脈炎性虚血性視神経症ラットモデル急性期および慢性期において有意に左眼の視神経乳頭頭頭血流が低下していることが示された。

この結果より、今回レーザースペックルフローグラフィにおいて、LSFG-Microを用いた正常ラットで両眼のMBR値に有意差がないことによって視神経疾患のラットモデルにおける両側視神経乳頭頭頭血流量を評価することは非常に有用であることが示唆された。また非動脈炎性虚血性視神経症ラットモデルの急性および慢性の両方において、罹患眼

のin vivoでの血流低下を示すことができたと考えている。

その後虚血性視神経症ラットモデルを応用して正常眼圧緑内障ラットモデルの作成を行うため安定したモデルが作成されるための適正なローズベンガル液の濃度、量、アルゴングリーンレーザーのパワー、照射時間を様々試案したが、適切な条件を見出すことが未だできていないため、今後更なる研究が必要と考えられる。

## 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1件)

Hidaka T, Chuman H, Nao-i N: Bilateral Rhegmatogenous Retinal Detachment during External Beam Radiotherapy. Case Reports in Ophthalmology 7(2): 315-320 (2016) [査読有] DOI:10.1159/000446603

[学会発表](計16件)

荻野識子, 日高貴子, 尾崎峯生, 直井信久: aflibercept 硝子体注射後に硝子体内異物を認めた症例. 第79回宮崎大学眼科研究会(2017.1.21) 宮崎観光ホテル(宮崎県宮崎市)

日高貴子, 直井信久: 杆体錐体混合応答にて陰性型を示した錐体ジストロフィー. 第64回日本臨床視覚電気生理学学会(2016.10.1) 伊勢志摩ロイヤルホテル(三重県伊勢市)

日高貴子, 中馬秀樹, 直井信久: うつぶせ試験の眼圧上昇にプラトー虹彩が関与していたと思われた一例. 第27回日本緑内障学会(2016.9.18) パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Takako Hidaka, Hideki Chuman, Nobuhisa Nao-i: The focal photopic negative response (PhNR) in patients with various optic nerve diseases. 54<sup>rd</sup> ISCEV Symposium (2016.8.15) Singapore (Singapore)

茂谷翼, 日高貴子, 中馬秀樹: 正常眼と様々な視神経疾患における局所Photopic Negative Response(PhNR)の検討. 第33回九州視機能研究会(2016.7.10) パピヨン24 ガスホール(福岡県福岡市)

日高貴子, 中馬秀樹, 直井信久: プレブナイフを用いた濾過胞再建術の検討. 第32回九州九州緑内障カンファレンス(2016.5.27) アクロス福岡(福岡県福岡市)

Takako Hidaka, H. Chuman, N. Nao-i :  
Evaluation of optic nerve head blood  
flow in normal rats and in a rodent  
model of non-arteritic ischemic optic  
neuropathy using laser speckle  
flowgraphy. ARVO2016 (2016.5.4)  
Seattle(USA)

杉田直大, 高橋圭三, 二見要介, 森山重  
人, 河野尚子, 杉本貴子, 川原亮輝, 日  
高貴子, 直井信久: 抗真菌薬に反応する  
も再燃を繰り返す難治性角膜炎の 1 例.  
角膜カンファランス 2016 第 40 回日本  
角膜学会総会・第 32 回日本角膜移植学  
会 (2016.2.18) 軽井沢プリンスホテル  
ウエスト(長野県北佐久郡軽井沢町)

日高貴子, 中馬秀樹, 茂谷翼, 直井信久:  
正常眼における局所 photopic negative  
response(PhNR)の検討. 第 53 回日本神  
経眼科学会総会 (2015.11.6)大宮ソニ  
ックシティ(埼玉県さいたま市)

Takako Hidaka, Nobuhisa Nao-i:  
Comparison of waveforms of the  
scotopic electroretinogram elicited  
by different methods of stimulation.  
4<sup>th</sup> Japan-Korea Joint Symposium of  
Clinical Electrophysiology of Vision  
and 11<sup>th</sup> KSCEV symposium(2015.10.31)  
Seoul(Korea)

日高貴子, 直井信久: 眼窩外腫瘍に対す  
る放射線治療中に両側裂孔原性網膜剥  
離を生じた 1 例. 第 69 回日本臨床眼科  
学会 (2015.10.23) 名古屋国際会議場  
(愛知県名古屋市)

日高貴子, 中馬秀樹, 直井信久: 2 つの  
刺激方法を用いた暗所閾値電位の比較  
検討. 第 63 回日本臨床視覚電気生理学  
会 (2015.8.29)名古屋・ミッドスクエア  
(愛知県名古屋市)

Takako Hidaka, Hideki Chuman,  
Nobuhisa Nao-i : Comparison of  
waveforms of the scotopic threshold  
response elicited by different  
methods of stimulation. 53<sup>rd</sup> ISCEV  
Symposium (2015.6.25)  
Ljubljana(Slovenia)

日高貴子, 中馬秀樹, 直井信久: 当科に  
おけるバルベルト緑内障インプラント  
手術の治療経験. 第 31 回九州緑内障カ  
ンファランス (2015.5.29) 鹿児島県医  
師会館(鹿児島県鹿児島市)

柘山剰, 日高貴子, 澤田惇, 中馬秀樹,  
直井信久: 眼科領域における工夫した B  
モード検査法(アイカップを用いた水浸  
法). 日本超音波医学会第 88 回学術集会

(2015.5.22) グランドプリンスホテル  
新高輪(東京都港区)

日高貴子, 中馬秀樹, 石原智之, 荻野展  
永, 杉本貴子, 直井信久: 眼窩内腫瘍に  
対するレーザースペックル法を用いた  
乳頭血流評価の試み. 第 119 回日本眼科  
学会総会 (2015.4.16)ロイトン札幌(北  
海道札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

日高 貴子 (HIDAKA TAKAKO)  
宮崎大学・医学部・助教  
研究者番号: 00751140

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし