

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20273

研究課題名(和文)メラニン関連自発蛍光を用いた非侵襲的眼底イメージング手法の開発

研究課題名(英文) Search for the non-invasive fundus imaging modality based on melanin-related autofluorescence.

研究代表者

山岸 哲哉 (Yamagishi, Tetsuya)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：40733572

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)：非侵襲的眼底観察法であるメラニン関連自発蛍光画像(近赤外自発蛍光：NIR-FAF)の臨床利用について研究を重ねた。その中で、1)加齢黄斑変性(AMD)の臨床型とNIR-FAFの脈絡膜血管陰影所見に関連性を認めた。2)NIR-FAFでは従来型眼底自発蛍光に比べ、AMD前駆病変(ドルーゼンやRPE異常)をより早期に検出可能であると発見した。3)萎縮型AMDの前駆病変(drusenoid PED)では既にその出現時点でRPEの萎縮性変化が始まっていることを明らかにした。4)広角NIR-FAF撮影を試み、55°画角でのNIR-FAF撮影が可能であると発見した。

研究成果の概要(英文)：During the period, we elucidated the following. 1) We revealed the significant association between the clinical subtypes of wet age-related macular degeneration (AMD) and the choroidal vessel shadow seen on near-infrared fundus autofluorescence (NIR-FAF). Choroidal vessel shadow may indirectly reflect the integrity of retinal pigment epithelium (RPE). 2) NIR-FAF can detect the prodromal AMD change such as soft drusen or RPE degeneration earlier than the conventional shortwave fundus autofluorescence (SW-FAF). NIR-FAF is thought to be of value in detection of the AMD change. 3) Drusenoid pigment epithelial detachment (drusenoid PED) is known as the prodromal stage of dry AMD. We found the early RPE degeneration already occurs at the clinical onset of drusenoid PED. 4) We tried the 3 view angles of 30, 55, 102 degrees of NIR-FAF, and found that NIR-FAF images of 55 degrees are valuable in the clinical use.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜 非侵襲 イメージング 近赤外 早期発見 予防医学

1. 研究開始当初の背景

網脈絡膜疾患の正確な診断や病態把握は眼科医による眼底検査のみでは不十分であり、フルオレセイン蛍光眼底造影 (FA) やインドシアニングリーン蛍光眼底造影 (ICGA) などの蛍光眼底造影に大いに依存している。しかしながら、これらは、造影剤によるアレルギー性合併症発生のリスクを伴う侵襲的検査であり、検査時間も要するため頻回の検査施行は困難である。眼底自発蛍光は造影剤を用いない新たな非侵襲的眼底観察法である。使用される励起光の波長により、従来型眼底自発蛍光 (SW-FAF) と近赤外眼底自発蛍光 (NIR-FAF) に大別される。眼底自発蛍光の長所は、非侵襲検査ながらも網脈絡膜の機能的な側面を描出することができることである。

SW-FAF は主として網膜色素上皮 (RPE) 細胞内の代謝産物リポフスチン由来の蛍光を捉える。視細胞外節は隣接する RPE 細胞に絶え間なく貪食され、本過程の代謝産物であるリポフスチンが RPE 細胞内に蓄積する。SW-FAF における蛍光強度は RPE 細胞内のリポフスチンの寡多を反映し、RPE 細胞の健全性や障害を顕している。一方、NIR-FAF は SW-FAF に比べ長波長の励起光を用い、より深部の脈絡膜組織の観察が可能である。網膜および脈絡膜に存在するメラニン顆粒やその関連物質を捉える眼底自発蛍光として知られる。メラニン顆粒は網膜では RPE 細胞内、脈絡膜では脈絡膜血管外組織 (脈絡膜間質) に存在し、生体内では抗酸化や遮光など組織保護作用があるとされている。しかしながら、メラニン顆粒の機能や疾患病態との関連はほとんど未解明である。また、現時点で NIR-FAF の画像解析や臨床的有用性に関しては従来型の SW-FAF ほど研究されておらず、また観察対象の物質も SW-FAF とは異なるため、未解明の部分が多い。

2. 研究の目的

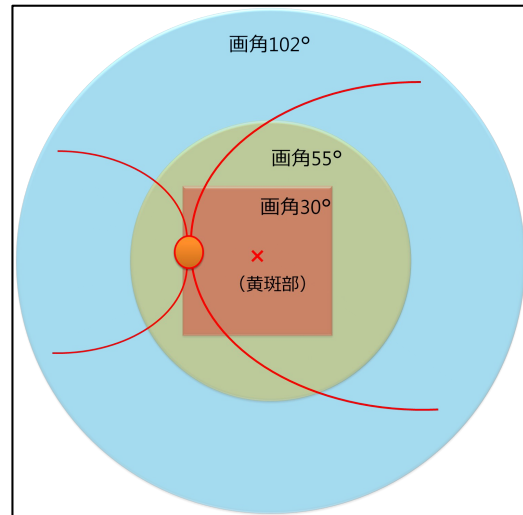
前述のように、眼底に存在するメラニンと疾患や病態との関連は報告、知見も少なく、不明な点が多い。本研究では NIR-FAF を用いて、日本人の種々の網脈絡膜疾患の眼底観察を網羅的に行い、従来の眼底観察法では知りえなかった病態に関連する新たな知見を得ること、またこの非侵襲的眼底観察法である NIR-FAF の臨床的利用法の模索を目的とする。

3. 研究の方法

1) NIR-FAF 画像の作成

撮影にはハイデルベルグエンジニアリング社製共焦点走査レーザー検眼鏡である Heidelberg Retina Angiograph 2 (HRA2) を使用する。励起波長 789nm、バリア波長 800nm のフィルターを使用する。これは本装置のインドシアニンググリーン蛍光眼底造影 (ICGA) 撮影で用いられるのと全く同じものである。通常は ICGA を行う前、すなわち造影剤を経

静脈的に注入する前に 5 秒間動画を撮影し、その動画より画像を 15 枚キャプチャーする。この画像は非常にかすかな自発蛍光信号を描出しているのみであるため、単独では評価困難である。15 枚のキャプチャー画像のアベレーシング (加算平均処理) により鮮明な NIR-FAF 画像を作成する。本段階では再現性や信頼性のある画像作成が可能かを確認する。従来は画角 30° の画像で後極部網膜のみを観察していたが、55° ないし 102° の広角撮影用のレンズを使用することにより (図)、より広画角な画像を取得、黄斑部のみならず、周辺部網脈絡膜まで評価の対象とする。



2) 撮影中の固視微動に対する対策

通常、走査レーザー検眼鏡で NIR-FAF 作成用の動画を撮影する場合は眼球運動や患者の体動により鮮明な画像を得られない状況が起こり得る。それに対し、今回の研究で用いる微細な眼球運動を追尾するアイトラッキングシステムが搭載されている。撮影中に固視微動を伴ったとしてもそれを追尾するため、眼球運動に影響されない撮影が可能かを確認する。

3) 定性的評価

網脈絡膜疾患で網羅的に NIR-FAF を撮影する。同時に撮影した ICGA 画像と比較し NIR-FAF の定性的評価 (過蛍光、低蛍光、蛍光欠損など) を行う。その場合、必要に応じて他の眼底イメージング手法であるフルオレセイン蛍光眼底造影、眼底自発蛍光 (short wave-FAF: SW-FAF)、光干渉断層計 (OCT) による網脈絡膜断層所見などとも比較検討を行う。そのうえで、各病態とメラニン関連自発蛍光所見との特異的な関連の検討を進める。

4) メラニン関連自発蛍光に基づいた病態解釈

定量的・定性的に収集したデータに基づき、メラニン関連自発蛍光と各網脈絡膜疾患との病態の関連を検討する。それを通じて眼底のメラニンの機能を検証する。眼底のメラニン機能 (抗酸化能・組織保護能) に応じた網

脈絡膜疾患の個別化医療や予防防医学の観点からの網脈絡膜疾患ハイリスク眼の早期発見法を模索する。

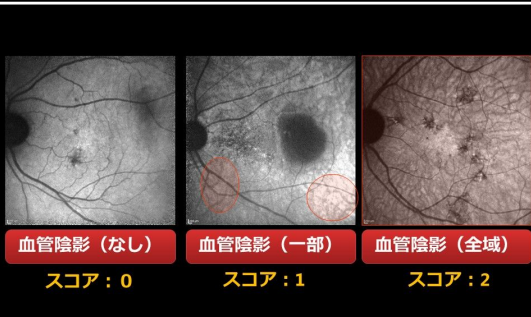
4. 研究成果

1) 【加齢黄斑変性の臨床病形と NIR-FAF 画像所見 (脈絡膜血管陰影) の関連】

加齢黄斑変性 (AMD) は脈絡膜新生血管 (CNV) からの滲出性変化を伴う滲出型 AMD とそれを伴わない萎縮型 AMD に分類される。本邦では滲出型が多数を占めるが、画像診断の進歩・普及に伴い萎縮型も観察される機会が増えつつある。

我々は NIR-FAF 画像において、脈絡膜血管陰影が認められる症例と認められない症例があることを発見し、RPE の組織性状 (健全性・強度) との関係に着目した。具体的には脈絡膜血管陰影の程度を定性的に 3 段階にスコア化し、臨床病形との関連性を検討した。

脈絡膜血管陰影スコアの種類



滲出型 AMD は部位や蛍光眼底造影 (FA) 所見によって classic CNV と occult with no classic CNV (通称 occult CNV) に分類され、それぞれ治療方針が異なる。これまでその病態に関しては幾多の報告がなされているが、その病形の分岐に影響を与えている因子は未解明であった。結果、classic CNV 症例では occult CNV 症例に比べ有意に血管陰影スコアが高いことが明らかとなった。

結果 FA分類との関連

RAP7例を除外した148例

	血管陰影スコア			単位: 眼
	スコア0	スコア1	スコア2	
Classic CNV	13 (30.2%)	17 (39.6%)	13 (30.2%)	
Occult with no classic CNV	57 (54.3%)	31 (29.5%)	17 (16.2%)	

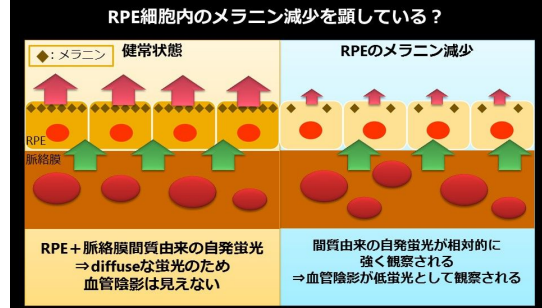
(Mann-Whitney's U test; P<0.01)

- classic CNV 症例は有意に血管陰影を認めやすい
- 逆に occult CNV 症例のうち半数で血管陰影を認めなかった

これらの結果を我々は以下のように考察した。RPE 細胞が健全である場合、細胞内にはメラニンが豊富に分布しており、NIR-FAF 画像では脈絡膜血管陰影はされない。一方、RPE 細胞内のメラニンが減少すると NIR-FAF 画像

上の脈絡膜血管陰影が観察されやすくなる。AMD ではないが classic CNV を伴いやすい近視性新生血管黄斑症や網膜色素線条は RPE やその基底膜であるブルッフ膜が変性を伴い、RPE の組織強度が脆弱であるとされている。

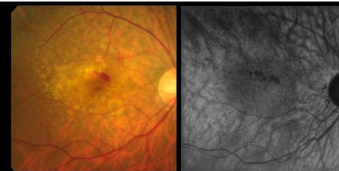
考按①: NIR-FAFで脈絡膜血管陰影を認める機序 (仮説)



これらの症例でも NIR-FAF では脈絡膜血管陰影が高率に観察されている。

加えて、滲出型 AMD の特殊型として治療に難渋する網膜血管腫状増殖 (RAP) でも他のサブタイプに比べ有意に血管陰影スコアが高いことが明らかとなった。RAP では病期が進行すれば脈絡膜と網膜の異常血管が吻合を起すことが知られているが、これも RPE 組

考按③ RAPでは血管陰影が顕著



- 高齢症例が多いため?
- RAP進行例ではretino-choroidal anastomosisが必発
 - 脆弱化したRPEを異常血管が貫通しやすい?

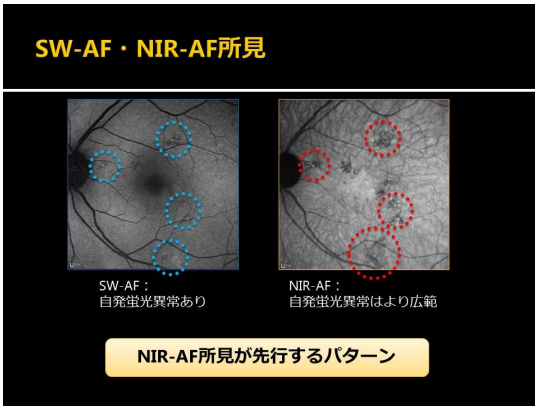
織強度が低下し、異常血管の吻合をきたしやすい環境が関連していると考えられる。

以上のように、NIR-FAF で観察される脈絡膜血管陰影は RPE の組織強度を間接的に示す指標と考えられた。今後は、更に治療効果との関連や臨床経過中での組織障害の起こりやすさとの関連を検討していきたい。

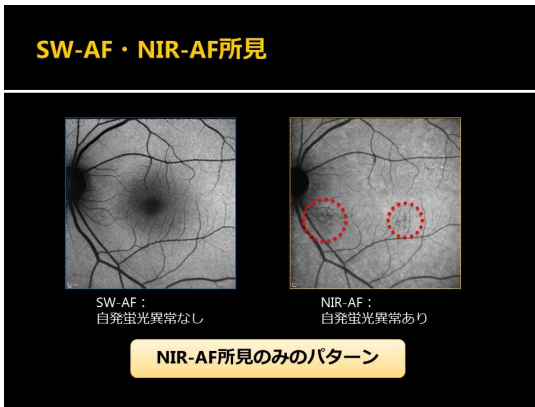
2) 【片眼性の加齢黄斑変性症例の未発症僚眼の NIR-FAF 画像】

加齢黄斑変性発症のハイリスク所見としては、ドルーゼンや網膜色素上皮 (RPE) 異常が挙げられる。これら前駆病変の検眼鏡的検査や従来型眼底自発蛍光 (SW-FAF) での発見が予防医学的にも有用と認識されている。申請者らは片眼性加齢黄斑変性の未発症僚眼 142 眼の従来型眼底自発蛍光 (SW-FAF) と NIR-FAF を撮影し、両者を定性的に比較した。

その結果、 NIR-FAF による異常所見が SW-FAF での異常所見よりも大きい(先行している)パターンと、



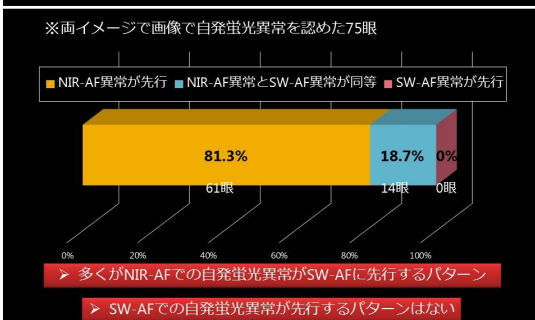
NIR-FAF のみ異常所見を認め、SW-FAF には異常所見がないパターンの2つを認めた。



全症例中、SW-FAF のみに異常所見を認めた症例は認められなかった。

また、NIR-FAF と SW-FAF の両者に異常所見を認めた75例において、両イメージ上の異常所見範囲の大きさを比較した。結果、8割以上の症例において NIR-FAF での異常所見が大きい(SW-FAF での異常所見に先行する)ことが明らかとなった。

結果：自発蛍光異常領域の広さ



続いて、NIR-FAF で異常所見を認めた86例において、それぞれの異常所見がドレーゼンと RPE 異常のいずれに相当するかを眼底カラー写真や光干渉断層計画像、蛍光眼底造影画像より判断し、それぞれの自発蛍光異常パターンを解析した。その結果、ドレーゼンと RPE 異常のいずれにおいても全体的に NIR-FAF での異常が先行しやすい傾向があること、そして多数を占める RPE 異常ではより NIR-FAF で

の異常が先行するパターンを呈しやすい傾向が明らかとなった。

結果 実臨床的所見とAFパターンの関連

※NIR-FAFで異常を認めた86眼
最も広範なNIR-FAFでの異常所見を観察

	ドレーゼン	RPE異常
NIR-FAFが先行	11	62
NIR-FAFとSW-FAFが同等	7	6

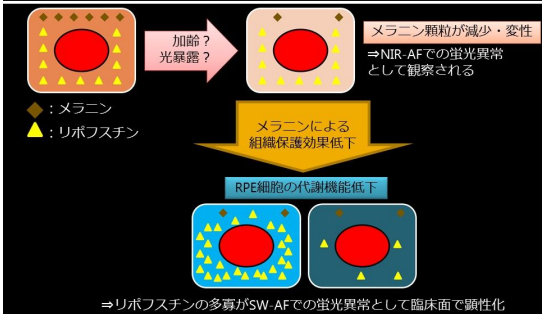
(眼)

ドレーゼンに比べ RPE異常ではよりNIR-FAF先行パターンとなる (chi-square, $P < 0.005$)

➤ 一般的にNIR-FAFがSW-FAFに先行して異常所見を呈する傾向がある

今回の結果より RPE 異常発生のメカニズムに関して仮説が立てられる。加齢や長年の光暴露により RPE 細胞内のメラニン顆粒が減少する。これが NIR-FAF での異常所見として観察される。メラニン顆粒は RPE 細胞を含め組織保護作用を有する。メラニン顆粒減少により組織保護能は減少する。視細胞外節を貪食しては代謝する RPE 細胞の代謝機能が傷害され、代謝物質であるリポフスチンの過剰蓄積または著明な減少が発生し、これが SW-FAF での異常所見として観察される。

仮説：RPE細胞障害のタイムライン



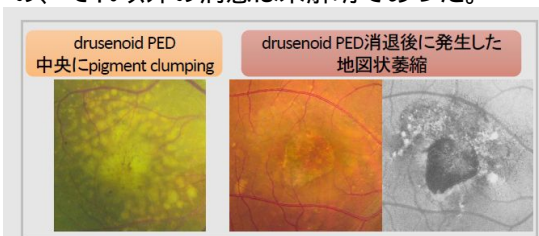
NIR-FAFは従来型のSW-FAFと比べても長波長の撮影光を用いるため、撮影時の羞明感がないという点でより非侵襲的である。そのため、NIR-FAF は今後、加齢黄斑変性前駆病変の早期検出法、スクリーニング法として非常に可能性のあるイメージング手法であると考えられる。

3)【萎縮型加齢黄斑変性前駆病変の NIR-FAF 所見】

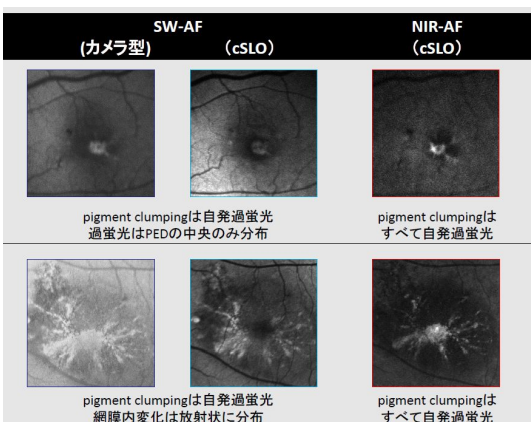
前述のように AMD は CNV を伴う滲出型 AMD とそれを伴わない萎縮型 AMD に分類される。一般的に本邦では滲出型 AMD が多数を占めるとされてきたが、画像診断技術の普及に伴い、一般眼科臨床の場でも萎縮型 AMD を診断する機会が増えてきている。

この萎縮型 AMD の臨床像は境界明瞭な RPE 萎縮であり、現時点では有効な治療法もなく付加逆視力低下をきたすことが多い。この萎縮型 AMD の前駆病変として、黄斑部に蓄積した軟性ドレーゼンが癒合し色素上皮剥離の形態をとるものがあり、一般に drusenoid PED

と呼ばれる。この drusenoid PED はその隆起の頂点に色素性変化 (pigment clumping) を伴うが、その病態は不明であった。また、経時的に比較的急速に消退し、その結果萎縮型 AMD (RPE 萎縮) を発症するとされているものの、それ以外の病態は未解明であった。



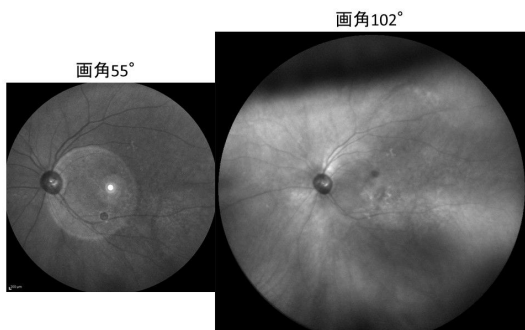
今回我々は drusenoid PED 症例において NIR-FAF 画像を網羅的に撮影し、SW-FAF や他の臨床画像と比較し multimodal に病態を考察した。結果、前駆病変である drusenoid PED の段階ですでに RPE は障害・萎縮をきたしており、組織障害により遊離した RPE 細胞が網膜下・もしくは網膜内に遊走している所見を確認した。この所見が従来 pigment clumping と呼ばれていた色素性変化の実態であることが明らかとなった。



すなわち、これまでの知見ではあくまで前駆病変と考えられていた drusenoid PED 顕性化の時点ですでに RPE 萎縮機転が始まっており、今後の萎縮性 AMD への以降のハイリスク所見となっていることを確認した。

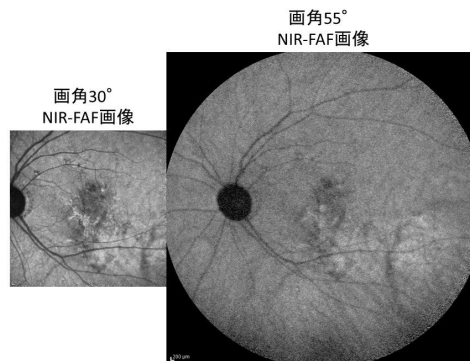
4) 【広角 NIR-FAF の試み】

今研究で用いている共焦点走査型レーザー検眼鏡 (cSLO) では蛍光眼底造影、および従来型自発蛍光 (SW-FAF) に関しては撮影に用いるレンズの変換によって画角 55° および 102° の広角画像撮影が可能である。



今回はこの手法でもって NIR-FAF の広角画像

撮影が可能であることを検討した。結果、55° の NIR-FAF 広角画像は撮影可能であった。画質的に若干画角 30° のものには劣るが、臨床的使用や病態評価には耐えうると考えられる。



一方、102° 広角画像は cSLO の光量ゲインを最大に上げて必要最低限の光量が計測されないため、画像撮影自体が不可能であった。

以上の結果を踏まえ、画角 55° の広角 NIR-FAF 画像は臨床利用が可能であることが明らかとなった。

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)

〔学会発表〕(計3件)

山岸哲哉 他、滲出型加齢黄斑変性の臨床所見と近赤外自発蛍光所見との関連、第54回日本網膜硝子体学会総会/第32回日本眼循環学会合同学会、2015年12月4日、東京国際フォーラム

山岸哲哉 他、drusenoid PED の各種画像所見、第55回日本網膜硝子体学会総会、2016年12月3日、東京(ベルサール渋谷ガーデン)

Tetsuya Yamagishi et al, Near-infrared fundus autofluorescence of the unaffected fellow eyes of patients with unilateral exudative age-related macular degeneration, ARVO2016 annual meeting, Seattle (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岸 哲哉 (YAMAGISHI, Tetsuya)
京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：40733572