

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15732

研究課題名(和文)核磁気共鳴データのパターン認識解析による緑内障線維柱帯切除術の予後予測法の開発

研究課題名(英文)Development of the Method to Predict Surgical Outcomes of Trabeculectomy with Mitomycin C in Patients with Glaucoma Using Nuclear Magnetic Resonance

研究代表者

吉村 長久 (Yoshimura, Nagahisa)

京都大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：70211662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：眼圧以外の発症進行危険因子を有する緑内障症例の識別や、緑内障線維柱帯切除術後の眼圧再上昇症例の事前識別は、現時点では難しい。生体試料を核磁気共鳴(NMR)計測し、ケモメトリクスを用いてデータ解析する手法によって、眼圧以外の危険因子が寄与する緑内障症例の識別や緑内障線維柱帯切除術予後不良症例の識別が可能か検討した。まず、緑内障患者の血清検体の測定に最適なNMR計測値の取得法および信号処理法を開発した。次に、19検体のNMR信号処理を行い、PLS-DA法によるクラス分類を行ったところ、眼圧が高い緑内障群と正常眼圧緑内障群は個々にクラスター化する傾向が見られた。

研究成果の概要(英文)：It is difficult by existing methods to distinguish patients who have intraocular pressure (IOP)-independent risk factors for glaucoma, and is also difficult to distinguish glaucoma patients who show post-operative IOP re-elevation after trabeculectomy. As nuclear magnetic resonance (NMR) signals obtained from biological fluids contain a wealth of physicochemical information, we investigated to ascertain if analysis of NMR spectral data using chemometrics could distinguish these cases from other glaucoma patients. We first determined the optimum way to obtain NMR data and developed the best way of signal processing that is suitable for serum from glaucoma patients. We examined spectral data of serum samples from A) patients with angle closure higher IOP glaucoma and B) patients with open angle normal IOP glaucoma, by partial least squares discriminant analysis and visualized by plotting the scores. The scores obtained from both types of illness tended to cluster separately on the plots.

研究分野：眼科

キーワード：核磁気共鳴法 パターン認識 緑内障 血清

1. 研究開始当初の背景

緑内障とは視神経と視野に特徴的变化(緑内障性視神経障害、緑内障性視野欠損)を有する疾患であり、現在、緑内障に対するエビデンスに基づいた唯一確実な治療法は眼圧下降治療である。眼圧下降によって緑内障の発症も進行も共に抑制されると報告されており、したがって高眼圧は代表的な緑内障発症・進行のリスク因子である。しかし一方で、日本人における疫学調査では、眼圧が正常範囲であるにもかかわらず緑内障を有する「正常眼圧緑内障」の患者が過半数を占めていることが明らかになり、眼圧に依存しない緑内障発症・進行リスクをもつ症例の存在が示唆される。ただし現時点では、眼圧非依存の緑内障発症・進行リスク因子を有する症例の識別は困難である。

また、薬剤やレーザー治療による眼圧下降療法で治療効果が不十分と判断された場合には、観血的緑内障手術による眼圧下降治療が適応となる。眼圧下降手術の代表である線維柱帯切除術は、線維柱帯の一部を切除して強膜内トンネルから結膜下へつながる流水路を作り眼圧を下降させる術式であるが、術後に流水路の癒着化・閉塞による眼圧再上昇すなわち手術不成功に至る症例は少なくない。緑内障患者の前房水中の炎症関連サイトカイン濃度と術後成功率との関連を示唆する既報もあるが、個々の成分の濃度計測から病態全体を把握することは難しく、緑内障に対する線維柱帯切除術の成功例と不成功例を術前に識別することは、現時点では困難である。

生体試料を核磁気共鳴(Nuclear Magnetic Resonance: NMR)計測し、ケモトックスによるデータ解析を行う方法は、生体試料に含まれる豊富な情報を活用して、個々の試料を識別することを可能にする。我々は、臨床に役立つ新規病態解析法を開発することを目的に、生体サンプル由来の NMR 信号の解析手法に関する研究を続け、酸化ストレスや麻酔薬が組織へ及ぼす影響や、鑑別困難な疾患の早期鑑別法の確立、などに関し報告してきた(PLoS ONE 2010, 5(6): e11172, BMC Medical Imaging 2012, 12:28)。そして、近年、血液・臓器等由来の NMR 信号に適した信号処理方式を新たに考案し、NMR 信号の特性を評価・活用して、各生体サンプル固有の物理情報を、精度よく迅速に検出するデータ解析手法を開発した(特願 2012-157593 号)。本手法は、生体試料の分析値を「ひとつのデータとして一括処理する」従来の化学分析による検査法

とは、全く異なる視点にたつものである。この技術は、従来のように試料中の個々の物質を同定・定量するのではなく、計測値全体を単一データとして診断指標とするため、サンプルから得られるすべての情報を活用できるという利点がある。

2. 研究の目的

本研究では、緑内障患者から術前に血清を採取して NMR 計測を行い、緑内障患者血清の NMR 信号の特性を活用したデータ解析を行う方法を確立することを第一の目的とした。

その上でまず、取得したデータを用いた横断的検討として、緑内障発症・進行に眼圧の寄与が大きいと臨床的に推測される症例と、眼圧非依存の緑内障発症・進行リスク因子の寄与があると推測される症例を、NMR 計測・解析をもとに識別できるか検討した。

さらに、線維柱帯切除術後の経過を縦断的に調査して、線維柱帯切除の成功例と不成功例を、術前に採取した試料を用いて取得した NMR 信号とその解析から識別できるかどうかの検討を試みた。

3. 研究の方法

以下に記載する、緑内障患者からの研究目的生体試料採取(術前の静脈血採血)、前向き術後成績調査、生体試料の NMR 計測はいずれも、京都大学大学院医学研究科・医学部及び医学部附属病院 医の倫理委員会の承認を受けて行った。

(1) 対象患者からの血清の採取

初回手術を受ける緑内障患者を今回の検討対象とした。患者から書面による同意を得て、手術前に静脈採血を行い、遠心分離により細胞成分等の不溶成分を除去し、血清を -80 冷凍保存した。

(2) 対象患者からの臨床情報の確定取得

対象患者の術前臨床情報の取得と診断
対象患者について、視力検査、眼圧検査、散瞳眼底検査などの眼科一般検査および、視野検査、視神経乳頭眼底写真撮影、光干渉断層計検査などの緑内障精査目的検査の結果上昇を収集し、複数の緑内障専門医によって緑内障の臨床確定診断を行い、本研究に包含した。

視神経乳頭出血の有無、傍乳頭網脈絡膜萎縮の有無、周辺部虹彩前癒着の有無を含めた隅角虹彩形状の評価、低血圧の有無、片頭痛の有無などの臨床所見・情報から、緑内障の

病型（原発開放隅角緑内障、原発閉塞隅角緑内障、続発性緑内障など）の診断を確定し、眼圧非依存の緑内障発症・進行リスク因子の寄与有無を予測評価した。

対象患者の術後臨床情報の収集

対象患者の術後診察は通常通り、細隙灯顕微鏡検査、眼底検査、眼圧検査は毎回受診時に行い、視力検査、視野検査、光干渉断層計検査は診察医が必要と判断する頻度で行った。

主要エンドポイントとして、術後の眼圧経過と合併症の有無を評価した。21mmHg、18mmHg、15mmHg、手術前眼圧から20%以上の眼圧下降のそれぞれを目標眼圧とした際の目標達成率を調査した。また、術後の合併症有無、時期、程度を調査した。

(3) NMR 計測およびデータ解析

検体の前処理・保存など

対象患者より採取した血清は、前述の如く-80度冷凍保存を行い、NMR計測時に解凍して使用した。

NMR 測定試料の調整

解凍した血清に、内部ロック用重水を加え、ガラス性 NMR 試料管に入れた。

NMR 計測条件の検討およびデータ収集

NMR 装置は7テスラ(300MHz) FT-NMR 装置 (JEOL) を使用し、核種はプロトン(^1H) についての計測を行った。多検体の連続自動測定が可能なケモメトリクス用自動測定プログラムを用い、次元測定、水信号抑制次元測定、CPMG スピンエコー測定等を行った。

NMR 計測値の数値化処理

NMR 装置本体の PC に保存された raw データ (FID 信号) をデータ処理用の PC に転送した。

NMR データの確認および数値化処理

まず、既存の NMR データ処理ソフトウェアである Alice2 ver5.5 (JEOL) を用いて、従来法によって得られる NMR スペクトルを確認した。次に個々の FID 信号を、我々が独自に作成したプログラムを用いて処理を行い、観測周波数範囲の信号強度分布としてデータを数値化し、CSV 形式にて保存した。

ケモメトリクスによる NMR データ解析

上記処理によって得られた NMR データについて、以下の解析を行った。ケモメトリクス用ソフトウェアである Unscrambler[®] ver10.5 (CAMO) を使用し、主成分分析 (PCA) によるデータの可視化を行った後、PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) 法によるクラス分類を行った。

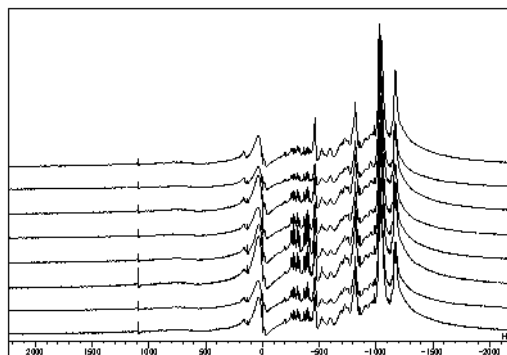
4. 研究成果

緑内障患者試料を用いた NMR 計測について測定検体数は19例であった。症例の内訳は、閉塞隅角機序の1つであるプラトー虹彩形状を有し、眼圧上昇が緑内障発症・進行の主なリスク因子と想定される症例 (プラトー虹彩形状群) 8例と、視神経乳頭出血の既往を有し眼圧も経過中つねに $<20\text{mmHg}$ の正常眼圧であり、眼圧以外の因子も緑内障発症・進行に関与していると想定される症例 (乳頭出血群) 11例であった。

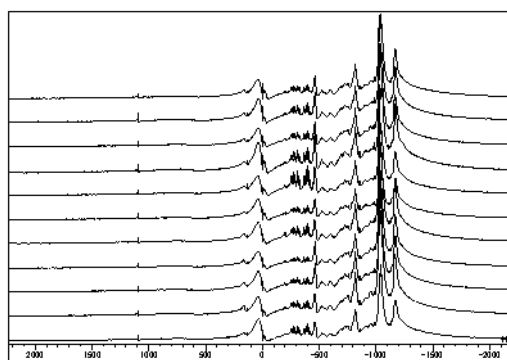
個々の NMR raw データ (FID 信号) について従来法による NMR スペクトル処理を行ったところ、これまで多数施行している他疾患患者の血清と同じ技法・条件で NMR データが得られていることが確認された。

水信号抑制次元測定で得られた19例の血清 NMR スペクトルを下に示す。

「プラトー虹彩形状群 (Plateau)」の ^1H NMR スペクトル



「乳頭出血群 (DH)」の ^1H NMR スペクトル

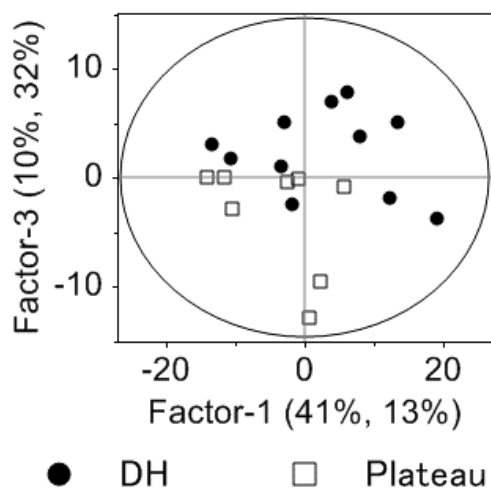


NMR 解析と臨床データを用いた横断的評価について

19例すべての血清の NMR raw データ (FID 信号) について、我々が独自に確立した手法による処理を行い、得られた観測周波数範囲

の信号強度分布データについて、PLS-DA 法による解析を行ったところ、両群は個々にクラスター化し、眼圧依存因子の寄与が高いと考えられるプラトー虹彩形状群と、眼圧非依存因子の寄与が考えられる乳頭出血群の両群が識別される可能性が示唆された。

水信号抑制次元測定で得られた 19 例の血清 NMR 信号データについて PLS-DA 法による解析を行った結果を示す(下図)。



今回は比較的少数例での検討であり、今後は、今回の結果をブラッシュアップし、眼圧非依存の緑内障発症・進行リスクを有する症例を識別するために有用なモデル作成を目指す予定である。

NMR 解析と臨床データを用いた縦断的評価について

予備調査として、今回包含した症例に限らぬ緑内障患者 63 眼について線維柱帯切除術後の成績を後ろ向きに調査したところ、術後 1 年時点で眼圧 6-21mmHg かつ術前から>20% 眼圧下降を維持していたのは 68.7%、6-18mmHg かつ術前から>20%眼圧下降を維持していたのは 65.4%、6-15mmHg かつ術前から>20%眼圧下降を維持していたのは 57.4%であった。

今後、今回包含した症例の術前試料の NMR 情報と、線維柱帯切除術後に取得した臨床情報とを組み合わせるブラッシュアップし、術前に NMR 計測を行うことで線維柱帯切除術の予後予測を可能とするモデル作成を目指す予定である。

5. 主な発表論文等 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 長久 (YOSHIMURA, Nagahisa)
京都大学 医学(系)研究科(研究院)
特命教授
研究者番号: 70211662

(2) 研究分担者

小池 薫 (KOIKE, Kaoru)
京都大学 医学(系)研究科(研究院)
教授
研究者番号: 10267164

(3) 研究分担者

平川 慶子 (HIRAKAWA, Keiko)
日本医科大学 医学部
助教
研究者番号: 30165162

(4) 研究分担者

柚木 知之 (YUNOKI, Tomoyuki)
京都大学 医学(系)研究科(研究院)
助教
研究者番号: 50639094

(5) 研究分担者

赤木 忠道 (AKAGI, Tadamichi)
京都大学 医学(系)研究科(研究院)
講師
研究者番号: 30580112

(6) 研究分担者

中西 秀雄 (NAKANISHI, Hideo)
京都大学 医学(系)研究科(研究院)
助教
研究者番号: 80724278

(7) 研究分担者

池田 華子 (IKEDA, Hanako)
京都大学 医学(系)研究科(研究院)
准教授
研究者番号: 20372162