

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11416

研究課題名(和文)トレハロース点眼の濾過胞維持機能に関する基礎的臨床的研究

研究課題名(英文) Basic and Clinical Researches regarding the effect of trehalose eyedrops on maintaining postoperative filtration blrb

研究代表者

目時 友美 (Metoki, Tomomi)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00400169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：線維柱帯切除術は緑内障に対する代表的な濾過手術であり、濾過胞形成により眼圧下降を可能とする。術後に濾過胞が長期間形成されることが手術の成否を左右する。本研究では手術後にトレハロースを点眼することにより術後の線維化や瘢痕形成を抑制して、手術成績を改善させるか否かを検証することを目的として、当該手術患者12例を対象として6例にトレハロース、6例に偽薬を30日間点眼させ、術後6か月間の濾過胞形成能と眼圧下降度を無作為前向き比較対照試験として実施した。その結果、トレハロース点眼群は術後の濾過胞形成能および眼圧下降度の両者に関して、対照群と比較して有意な差異は見いだすことはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トレハロースは眼結合組織において線維芽細胞と血管内皮細胞の増殖を抑制する。この性質を利用して、線維柱帯切除術後濾過胞の瘢痕化が抑制できるのではないかと発想の元に研究を行った。しかし、現在の定型な術式であるマイトマイシンC併用線維柱帯切除術はそれ自体で術後濾過胞の瘢痕形成を抑制する効果を有しており、その状態にトレハロース点眼が相加的に作用する程の明らかな効果をきたす程ではないことが明らかとなった。また、マイトマイシンCの術後併発症である結膜の菲薄化を回避するためにはさらなる方策を検討する必要があることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Trabeculectomy is a typical filtration surgery for glaucoma, which allows for the reduction of intraocular pressure through the formation of a filtration bleb. The success of the surgery depends on the long-term formation of filtration blebs after the surgery. In this study, I conducted a randomized, prospective, controlled study to determine whether or not trehalose eye drops after surgery can suppress postoperative fibrosis and scar formation and improve the surgical outcome. A randomized, prospective, controlled study was conducted. The results showed that there was no significant difference between the trehalose eye drop group and the control group in terms of both postoperative bleb formation and degree of intraocular pressure reduction.

研究分野：眼科学

キーワード：緑内障 線維柱帯切除術 トレハロース 濾過胞 眼圧

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トレハロースは二糖類の一種で、ショ糖の異性体である。トレハロースには様々な生物活性があり、とくに乾燥状態において細胞の生存を保つ働きがあることが古くから知られ、砂漠地帯に生息する昆虫や植物の生存に不可欠な物質であることが明らかになっている。私の所属する研究室では近年トレハロースが線維芽細胞や血管内皮細胞などの間葉系由来細胞さらには悪性黒色腫細胞に対してアポトーシスを誘導する効果を発揮することを世界で初めて明らかにし (Takeuchi K, et al. *Exp Eye Res* 2010; Takeuchi K, et al. *IOVS* 2011; Kudo T, et al. *ISRN Ophthalmology* 2012)、とくに結膜下組織の術後瘢痕抑制方法については国内特許を取得している (特許第 5685751 号、平成 27 年 1 月 30 日登録、弘前大学)。またトレハロースは点眼薬として用いても人体には副作用を及ぼさないことがすでに知られている (Matsuo T, et al. *JJO* 2004) ほか、実際に硝子体注射に用いる抗 VEGF 薬にも配合されており、眼内にも安全に投与されている物質であることから、生体にとって全くといってよいほど無害なものと考えて良い。トレハロースの作用機序はナノスケールでの乾燥や酸化による細胞ストレス防御であり、それ以外にも細胞膜脂質の二重構造の安定化や、生体成分構造の高次安定化など多くの作用が考えられている。

このような背景から私はトレハロースが線維柱帯切除後の濾過胞線維瘢痕化を抑制し、濾過胞の長期生存に効果的な薬物となり得るのではないかとの発想から本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では緑内障に対する線維柱帯切除術術後の濾過胞の維持に術後のトレハロース点眼を追加することで効果がみられるか否かを明らかにすることを目的として、以下の 2 点を明らかにしたいと考えた。

- (1) 線維柱帯切除術術後にトレハロース点眼を付加することで眼圧下降効果が従来法に比べ良好となるか。
- (2) 同手術術後にトレハロース点眼を付加することで濾過胞の形態が MMC 単独使用に比べてより良好になるか。
- (3) 同手術術後にトレハロース点眼を付加することで適正な眼圧を維持するのに必要だった点眼本数が変化するか。

3. 研究の方法

(1) 線維柱帯切除術術後トレハロース点眼研究の倫理委員会への申請

本研究は対象症例へトレハロース点眼を施行するため、介入研究となる事から倫理委員会での承認を得る必要があった。そして、初年度にその申請手続きを行っていたところ、新たに「臨床研究法」が施行されることとなり、本研究は特定臨床研究に分類されることとなった。このため、2 年目には弘前大学大学院医学研究科に認定臨床研究審査委員会が設置されるのを待った上で同委員会での承認を得ることになった。その後、同委員会での審査結果を厚生労働省へ届けることで本研究を開始することが初めて承認されることとなった。したがって、実際に本研究が開始されたのは 3 年目に入ってからであった。

(2) 線維柱帯切除術

手術は弘前大学医学部附属病院眼科(当科)へ入院の上施行した。全例2%リドカインによるテノン嚢内麻酔にて行い、術野は上耳側または上鼻側の1象限とした。円蓋部基底の結膜切開、3mm×4mmの強膜半層切開作成後中層弁を切除して結膜下と強膜弁下に0.04%MMC液を含んだスポンジを5分間作用させた。その後、200mlの生理食塩水にてMMCを洗浄除去した後、トラベクパンチを使用して線維柱帯組織を部分切除し、周辺虹彩切除を施行した。強膜弁と結膜をそれぞれ10-0ナイロン糸にて縫合し創を閉鎖して手術を終了した。

(3) 線維柱帯切除術のトレハロース点眼

2019年4月1日から2021年3月31日までの間に弘前大学医学部附属病院眼科で線維柱帯切除術を初回施行した50歳以上の緑内障患者を無作為に2群に分け、トレハロース点眼群には手術翌日から5%トレハロース点眼液を1日4回30日間手術眼に点眼した。対照群にはトレハロースに代わり生理食塩水を1日4回手術眼に同様に点眼した。通常の緑内障手術後に使用する非ステロイド抗炎症薬、副腎皮質ステロイド剤および抗菌薬の点眼は通常通り両群とも点眼使用した。対象となった患者には手術前に本試験に対する十分な説明を行った後に文書による同意を得た。

(4) 評価項目

両群の患者について術前、術後1か月、2か月、3か月および6か月の時点での眼圧値、緑内障点眼薬数、濾過胞所見を記録した。治療内容については観察時点での降圧点眼薬の種類を1種類1点とし、炭酸脱水酵素阻害薬(ダイアモックス®)が必要な症例では1錠につき1点を付与した。さらに術後1か月、2か月、3か月および6か月時点での濾過胞中央部断面の所見を光干渉断層計(OCT, Cirrus, Karl-Zeiss, USA)にて撮像した。OCTによる濾過胞の撮像所見から液胞状に観察される箇所面積の合計をImage-Jにて算出し、両群間で統計学的に比較した(図1)。

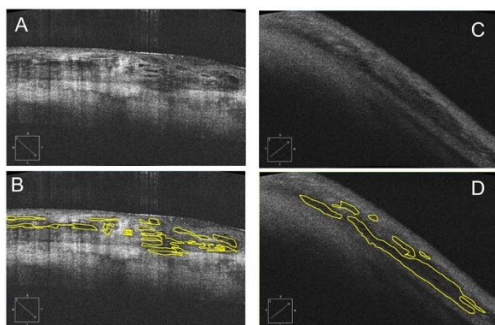


図1. 術後6か月時点での濾過法中央部OCT画像の典型例2例。A: 対照群の1例の濾過胞中央部OCT縦断像。B: Aの画像中にみられた濾過胞内の嚢胞状所見をトレース(黄色線)して総面積をImageJにてピクセル数として計算した。C: トレハロース群の1例の濾過胞中央部OCT縦断像。D: Bと同様の解析をCに対して行った画像。

(5) 統計学的解析法

統計解析にはSPSS (Statistical Package for the Social Science, IBM, USA) ver. 25を用いた。統計量の正規性の有無についてはShapiro-Wilk testを使用し、本研究では多くの統計量に正規性が認められなかったため、両群の数値の比較をノンパラメトリック法であるMann-

Whitney 法を用いて検討した。

(6) 基礎研究

ヒト線維芽細胞を培養し、各種濃度(0~10%)のトレハロースを添加した培地での細胞増殖能を比較した。増殖能に関しては半定量的に観察し、それぞれの増殖能を(-)から(≡)までに実顕顕微鏡下で分類した。

4. 研究成果

(1) 眼圧実測値および下降率

術後 6 か月間の眼圧実測値および眼圧下降率の変化を図 2 に示す。トレハロース群と対照群とは眼圧値および眼圧下降率ともに有意の差は認められなかった。Mann-Whitney テストの結果では眼圧値および眼圧下降率それぞれ 1 か月後 $P = 0.699$, $P = 0.423$, 2 か月後 $P = 0.973$, $P = 0.747$, 3 か月後 $P = 0.394$, $P = 0.873$, 6 か月後 $P = 0.533$, $P = 0.936$ であった。

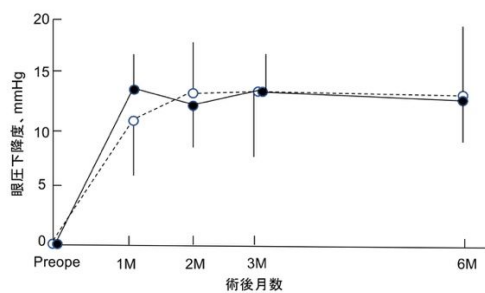


図 2. 術後眼圧下降度を示す。黒丸はトレハロース群(6例)、白丸は対照群(6例)の平均眼圧下降度を表している。縦線は標準誤差を意味する。

(2) 濾過胞形成能

術後 6 か月間の濾過胞中央部における液胞面積の変化を図 3 に示す。両群間に統計学的な有意差はみられなかった。両群間の比較では、Mann-Whitney テストにて術後 1 か月、2 か月、3 か月および 6 か月時点でそれぞれ $P = 0.818$, 0.792 , 1.000 および 1.00 であり、統計学的な有意差はみられなかった。

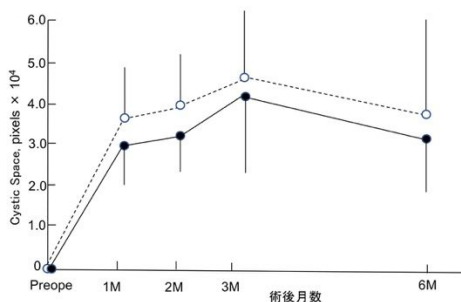


図 3. OCT にて観察された濾過胞内の水疱性間隙の総面積の術後変化を示す。黒丸がトレハロース群で白丸が対照群である。縦線は標準誤差を示す。

(3) 治療内容の変化

治療内容の変化では対照群では術前 5.33 ± 1.93 点であったものが、術後 6 か月には 0.83 ± 1.16 点となったのに対してトレハロース群では術前 6.00 ± 2.00 点が術後 6 か月時点で

0.67 ± 1.21 点となり、両者の間には統計学的な有意差はみられなかった (Mann-Whitney P = 0.863)。

(4) 基礎研究

細胞培養試験ではトレハロース濃度を 0、5 および 10% の 3 種類を調整してそれぞれのトレハロース添加培地での線維芽細胞増殖能をみた結果を図 4 に示す。その結果、5% と 10% 両者でのトレハロース濃度での培養にて線維芽細胞が増殖が抑制されることが判明した。本研究にて線維芽細胞増殖抑制の目的で 5% トレハロース点眼液を使用した根拠が正当化されたものと考えられた。

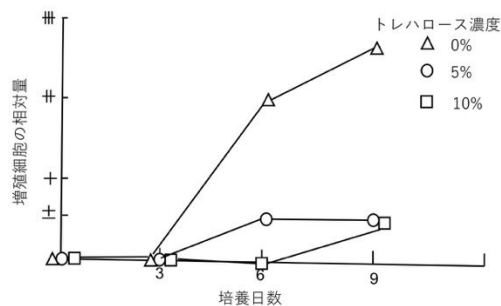


図 4 . 各種濃度のトレハロース添加培養液でのヒト線維芽細胞の培養結果。

(5) 考按

本研究においては定型的な術式である MMC 併用線維柱帯切除術に術後付加的に 5% トレハロース点眼液を 30 日間併用するという治療レジメンにて比較検討を行ったが、元々の性質である MMC の線維芽細胞増殖抑制作用が非常に強力であるために、術後にトレハロース点眼投与を行っても MMC をさらに凌駕するほどの効果を推定できる程の結果を得ることはできなかった。今後、トレハロースの効果をさらに検証するためにはまず第 1 に MMC 非併用での線維柱帯切除術にトレハロースを使用して MMC 併用線維柱帯切除術との比較にて非劣性であることを示すのが有用かと考えられるが、このような試験が倫理上許容されるのか否かについてはさらに第三者による審査が必要とされることになるだろうと思われる。また、第 2 に今回の 6 か月の経過観察期間を 2 年程度に延長して長期の術後経過を比較検討する必要もあるものと思われる。

近年、緑内障に対する手術治療に関しては線維柱帯切除術のような濾過手術以外に、流出路再建術の様々な術式が考案されて急速に実践されてきつつある。本研究発案時には線維柱帯切除術は非常に重要な位置を占めていたが、現在はこれら新しい術式の台頭もあり、線維柱帯切除術の適応患者は減少して来つつある。しかしながら、濾過手術がどうしても必要になる患者は今後も存在することには変わりないと思われ、トレハロースの特徴を生かして緑内障手術に応用する視点は今後も継続して維持する必要があるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sugano E, Tabata K, Takezawa T, Shiraiwa R, Muraoka H, Metoki T, Kudo A, Nakazawa M, Tomita H, Iwama Y	4. 巻 2019
2. 論文標題 N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor degeneration is inhibited by nicotinamide via the blockade of upstream events before the phosphorylation of signaling proteins.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 ID 3238719
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/3238719	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 工藤孝志、江目孝幸、田名部玲子、工藤朝香、目時友美、安達功武、鈴木幸彦、中澤 満	4. 巻 72
2. 論文標題 ぶどう膜炎にてステロイド治療中にニューモシスチス肺炎を併発した死亡例1例を含む3症例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床眼科	6. 最初と最後の頁 775-780
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kudo A, Kudo T, Takahashi D, Metoki T, Suzuki Y, Nakazawa M	4. 巻 10
2. 論文標題 Macular edema associated with intraocular ointment after cataract surgery	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology Case Reports	6. 最初と最後の頁 152-156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoc.2018.02.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木幸彦、安達功武、工藤孝志、鈴木 香、目時友美、中澤 満
2. 発表標題 術前網膜光凝固の有無による糖尿病網膜症の硝子体サイトカインと術後炎症
3. 学会等名 第122回日本眼科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 工藤孝志、鈴木幸彦、目時友美、安達功武、毛内奈津姫、中澤 満
2. 発表標題 内境界膜剥離操作が神経節細胞層に及ぼす影響
3. 学会等名 第122回日本眼科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木幸彦、安達功武、工藤孝志、鈴木 香、目時友美、中澤 満
2. 発表標題 増殖糖尿病網膜症に対する汎網膜光凝固術既往の有無による硝子体サイトカイン濃度の差
3. 学会等名 第121回日本眼科学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 目時友美	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 分担は5ページ（総ページ数 377ページ）
3. 書名 強膜炎（分担執筆） 実戦メディカル眼科治療アップデート	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>弘前大学医学部眼科学教室・診療案内・トレハロースの眼科への応用 http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~ophthal/consult.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------