

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592035

研究課題名（和文） 超高解像度光干渉断層計による緑内障関連動物モデルの視神経傷害の生体内定量的評価

研究課題名（英文） In vivo quantitative evaluation of optic nerve damage in animal models related to glaucoma by a ultrahigh-resolution optical coherence tomography

研究代表者

東出 朋巳 (HIGASHIDE TOMOMI)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：20291370

研究成果の概要（和文）：我々が開発したラット専用光干渉断層計によってラット視神経挫滅モデルの網膜神経線維層厚の経時的変化を調べた。その結果、光干渉断層計による計測値の再現性は良好であり、組織切片での計測値と良好な相関がみられた。さらに、10回加算平均と網膜層厚自動計測プログラムを導入し、エンドセリン硝子体内投与モデルにおいて投与後に網膜内層厚が減少しそれに続いて網膜神経線維層厚が減少することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We examined the changes of the thickness of retinal nerve fiber layer in rat eyes after optic nerve crush by our optical coherence tomography which was optimized to rat eyes. The thickness value measured by the optical coherence tomography showed good repeatability and reproducibility, and was well correlated with that measured by histology. After introduction of multiple scan averaging and an auto-segmentation program, we disclosed that the thickness of the retinal nerve fiber layer decreases following the decrease in the thickness of the inner retinal layer in rat eyes after an intravitreal injection of endothelin-1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：眼科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：光干渉断層計、ラット、緑内障モデル

1. 研究開始当初の背景

①緑内障関連動物モデルにおける視神経傷害の生体内定量的評価法の必要性：最近の疫学調査（多治見スタディ）によると、40歳以上の緑内障有病率は約5%に達し、推定患者数は約300万人とされている。しかも、緑内障は成人中途失明原因の第一位（平成17年発表のデータ）である。日本人では正常眼圧緑内障が約7割を占め、治療法として唯一

エビデンスのある眼圧下降療法によって進行が阻止できない症例が少なくない。そこで、眼圧下降療法を補完するものとして、薬剤などによる種々の神経保護療法が緑内障関連動物モデルを用いて検討されてきた。これらのモデルにおける視神経傷害の定量法は、従来から網膜の伸展標本や組織切片などによる組織学的手法のみであった。しかし、最近、網膜神経節細胞の密度や分布は、個体間ある

いは左右眼においてかなり不均一であると報告された (Danias J, et al. *Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:587-594)。したがって、視神経傷害のわずかな差異を正確に定量するには、膨大な個体数を必要とするという重大な問題がある。これを解決する唯一の方法は、視神経傷害を生体内で経時的に定量評価する方法である。

②国内・国外の研究動向：近年、ラット眼の網膜神経節細胞の生体内観察について、いくつかの方法が報告された。つまり、共焦点レーザー顕微鏡 (Sabel BA, et al. *Nat Med.* 3:244-247, 1997)、蛍光顕微鏡 (Thanos S, et al. *Trends Neurosci.* 25:441-444, 2002)、赤外線底カメラ (Paques M, et al. *Arch Ophthalmol.* 121:367-370, 2003)によって、蛍光色素で逆行染色された網膜神経節細胞が観察可能であった。しかし、いずれの方法においても、視神経傷害の詳細な定量的評価は報告されていない。また、網膜神経節細胞の軸索からなる網膜神経線維層の厚みの変化を定量化した報告もなかった。

③ラット眼の視神経傷害の生体内定量的評価法：われわれのこれまでの研究成果：我々は、眼科臨床に用いられている走査レーザー検眼鏡に着目した。そして、科学研究費補助金基盤研究 C (17591825、平成 17~18 年度)において、ラット視神経挫滅モデルを用いて、網膜神経節細胞と網膜神経線維層の経時変化を走査レーザー検眼鏡によって生体内で定量的に評価する方法を確立した。この成果は、眼科基礎研究の Top Journal である IOVS 誌に掲載され (Higashide T, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:2943-2950, 2006; Kawaguchi I, Higashide T, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:2911-2916, 2006)、最近のこの分野の review (Pang IH, Clark AF. *Rodent models for glaucoma retinopathy and optic neuropathy. J Glaucoma* 16:483-505, 2007) でも高く評価された。

2. 研究の目的

我々が確立した走査レーザー検眼鏡によるラット網膜神経線維層の厚みの定量化は、世界初の試みであった。しかし、アルゴンレーザーによる網膜神経線維層の放射状反射を判別しうる共焦点面の幅を 1 ジオプター単位で決定するものであり、組織切片での網膜神経線維層の厚みとよく相関したが、その絶対値の計測は不可能であった。一方、光干渉断層計 (optical coherence tomography, OCT) は、光を高速でスキャンし光の干渉現象を利用して網膜の断層像を描出する装置である。これは、ヒト眼の網膜神経線維層の厚みを計測しうる代表的な臨床検査機器であり、緑内

障眼での網膜神経線維層の菲薄化を捉えることによって緑内障の診断や経過観察に広く活用されている。そこで、我々はラット眼の網膜神経線維層の厚みを精密に計測しうるように、OCT を超高解像度化かつ最適化し、それを用いて種々の緑内障関連モデルにおいて網膜神経線維層の厚みの変化を生体内で経時的かつ詳細に定量評価し、各種神経保護効果の評価に応用可能かどうか検討した。

3. 研究の方法

(平成 20 年度)

①OCT の高解像度化とラット眼への最適化：

我々は、すでに本研究に使用する OCT (EG-SCANNER, マイクロトモグラフィ株式会社, 現有設備) の SLD 光源 (中心周波数 = 830nm、バンド幅 = 20nm、コヒーレンス長 = 30.4 μ m、空間分解能 = 15.2 μ m、出力 = 6mW) を、より高解像度を実現しうる SLD 光源 (中心周波数 = 890nm、バンド幅 = 150nm、コヒーレンス長 = 4.5 μ m、空間分解能 = 2.2 μ m、出力 = 6mW) に変更し、それに応じた光学系の改造とラット眼の光学系に対応した光路の変更を行い、解像度の向上に成功した。このラット専用 OCT を用いて、ラット網膜神経線維層の厚みの計測を行い、その定量性を以下のように組織切片との比較によって検討した。

②OCT によるラット網膜神経線維層の厚みの計測：再現性と定量性の検討：

Brown Norway ラット (生後約 12 週) を使用した。ペントバルビタールの腹腔内投与 (65mg/kg) による全身麻酔下で、専用のコンタクトレンズ (ユニコン社製) を装着して、網膜断層像を記録した。網膜断層像を画像解析ソフト (Image Pro Plus Ver 6.1, Media Cybernetics 社) に取り込み、網膜神経線維層の厚みを計測した。同一眼で同一スキャンを反復し、測定の実験性を検討した。異なる網膜神経線維層の厚みを計測できるように、研究代表者らの論文 (Higashide T, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:2943-2950, 2006) の方法に準じて視神経挫滅モデルを作成し、経時的に網膜断層像を記録した。ラット網膜の組織学的検討は、研究代表者らの論文 (Kawaguchi I, Higashide T, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:2911-2916, 2006) の方法に準じて行った。OCT によるラット眼底の撮影後に、過量のペントバルビタールの腹腔内麻酔下に両眼を摘出し、パラホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドにて組織を固定し、後部眼杯を作製した。後部眼杯を包埋して網膜のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡用デジタルカメラによってコンピュータに取り込み、画像解析ソフト (Image Pro Plus) にて網膜神経線維層の厚みを計測した。

各眼において OCT と組織切片での網膜神経線維層の厚みを比較した。

(平成 21 年度)

①ラット専用 OCT における網膜神経線維層厚の自動計測：

網膜神経線維層の計測は、現状では外部の画像解析ソフトを利用し、手動計測で行っているため、主観的なバイアスが懸念され、時間と労力を要する点も問題である。そこで、OCT に内蔵されているヒト用の網膜各層厚の自動解析ソフトを変更し、ラットの網膜神経線維層、網膜内層、網膜外層の厚みを自動計測できるか検討した。現状の 1 回スキャンでは、取得画像の感度は 80dB、ダイナミックレンジは 30dB である。この画像で各層厚の自動計測が困難である場合には、複数回のスキャンを加算平均し、S/N 比を改善することで自動計測が可能になるかどうかを検討した。さらなる画像解像度の向上が必要であれば、スキャン時間の短縮、サンプリング数の変更、デジタルフィルタの変更による信号処理の際の分解能劣化防止などを検討を予定した。

②その他のラット緑内障関連モデルの作製：

ラット専用 OCT の網膜神経線維層の定量的評価における有用性を、視神経挫滅以外のモデルにおいて実証するために、高眼圧モデルの作成を試みた。Brown Norway ラットの片眼の前房内にラテックスビーズ（粒子径 10 または $15\mu\text{m}$ ）あるいはヒアルロン酸ナトリウムを注入し、経時的に眼圧を測定した。

(平成 22 年度)

ラット専用 OCT の活用：自動計測プログラムの検証と視神経挫滅以外のモデルでの検討：

平成 21 年度の研究計画にて作成したラット網膜各層厚（網膜神経線維層、網膜内層、網膜外層）の自動計測プログラムを使用して、視神経挫滅モデル以外のモデルにおいてもラット専用 OCT が有用であることの実証を試みた。

平成 21 年度に検討した慢性高眼圧モデルは作製困難であったため、エンドセリン

(ET-1) 硝子体注入モデルを検討した。ET-1 は、軸索輸送障害などにより網膜神経節細胞死を起すことが報告されている。既報に準じた濃度の ET-1 硝子体内注入によってどのような網膜傷害がおこるかを、われわれが開発したラット専用 OCT によって *in vivo* で経時的に網膜各層の厚みを評価することによって検討した。また、網膜神経節細胞死と網膜神経線維層厚との関係を検討するために、硝子体注入後一定の時点において組織学的に網膜神経節細胞数を計測し、網膜神経線維層厚と比較した。これらによって、ET-1 による網膜傷害機序の解明を試みた。

4. 研究成果

(平成 20 年度)

OCT によるラット網膜神経線維層厚の計測：再現性と定量性の検討

Brown Norway ラット（生後約 12 週）を使用し、片眼の視神経挫滅モデルを作成し、ラット専用 OCT によって網膜断層像を経時的に記録した。網膜断層像を画像解析ソフトに取り込み、網膜神経線維層厚を計測した。同一眼で、同一スキャンを同一日あるいは隔週（0～4 週）で反復し、測定の再現性を検討した（ $n=9$ ）。視神経乳頭を中心とした径 $500\mu\text{m}$ のサークルスキャンの coefficient of repeatability は、挫滅眼、対照眼ともに $2.5\mu\text{m}$ 以下であった。また、対照眼において隔週で撮影した断層像の coefficient of reproducibility は $2.5\mu\text{m}$ 以下であった。測定値の再現性は、ヒト臨床での OCT の報告と同等であった。OCT によるラット眼底の撮影後に、網膜のパラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、OCT による視神経乳頭中心から 400、500、 $600\mu\text{m}$ でのリニアスキャンに対応する網膜切片において、画像解析ソフトにて網膜神経線維層厚を計測した。各眼（0 週 5 眼、1 週 3 眼、2 週 5 眼、4 週 9 眼）において OCT と組織切片での網膜神経線維層厚を比較したところ、相関係数 $r=0.90$ 、 $p<0.001$ と良好な正の相関がみられた。以上より、ラット専用 OCT による網膜神経線維層厚の測定の再現性と定量性は良好であると考えられた。

(平成 21 年度)

①ラット専用 OCT における網膜神経線維層厚の自動計測：

網膜層厚の自動計測（オートセグメンテーション）に向けて、スキャン回数の増加による S/N 比の改善の可能性を検討したところ、10 回加算まででは加算回数の増加に伴いスペックルノイズが減少することが確認された。さらに、視神経乳頭周囲のサークルスキャンにおいて、網膜全層、網膜内層（網膜神経線維層～内顆粒層）、網膜外層（外網状層～網膜色素上皮）をオートセグメンテーションするソフトを導入した。加算回数を増加させると、セグメンテーションエラーが減少し、使用可能であると判断された。

②その他のラット緑内障関連モデルの作製：

高眼圧モデルの作成のために Brown Norway ラットの片眼の前房内にラテックスビーズ（粒子径 10 または $15\mu\text{m}$ ）あるいはヒアルロン酸ナトリウムを注入し、経時的に眼圧を測定したところ、注入直後には眼圧上昇はみられたが、1 週間後には眼圧上昇はみられなかった。今後、他の方法による眼圧上昇モデルの作成が可能かどうか検討を要する。

(平成 22 年度)

ラット専用 OCT の活用：自動計測プログラムの検証と視神経挫滅以外のモデルでの検討：

Brown Norway ラット (200~250g, n=5) の片眼の硝子体内に ET-1 (200 pmol) を注入した。他眼にはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を注入した。硝子体内注入前、1、2、4 週後に視神経乳頭を中心とした径 500 μ m のサークルスキャンを行い、10 回加算平均画像において自動セグメンテーションと手動補正によって網膜全層、網膜神経線維層、網膜内層、網膜外層の厚みを計測した。さらに、ET-1 注入 4 週後の OCT 撮影後に網膜伸展標本を作製し、抗 Thy-1 抗体を用いた免疫染色によって網膜神経節細胞数を定量した。

その結果、OCT によって ET-1 硝子体内注入による特徴的な網膜障害を経時的に描出できた。網膜内層厚は ET-1 注入後 1 週目には有意に減少し、2、4 週後にはさらに減少した。網膜神経線維層厚は ET-1 注入後 1 週目には有意に増加したが、その後減少した。網膜伸展標本の Thy-1 陽性細胞数は、ET-1 注入眼 (2466 \pm 405/mm²) の方が PBS 注入眼 (3535 \pm 431/mm²) よりも有意に少なかった (p < 0.001)。ET-1 注入 4 週での網膜神経線維層厚は Thy-1 陽性細胞数と有意に相関した (r = 0.74, p = 0.014)。

以上のように、網膜各層自動計測プログラムは ET-1 硝子体内注入モデルでの OCT によるラット網膜層厚の定量に有用であり、今後他のラット網膜障害モデルにおいても網膜各層の変化を in vivo で経時的に定量できる可能性がある。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Nakatani Y, Higashide T, (他 3 名, 2 番目), Evaluation of Macular Thickness and Peripapillary Retinal Nerve Fiber Layer Thickness for Detection of Early Glaucoma Using Spectral Domain Optical Coherence Tomography. J Glaucoma, 20 (2011), 252-259, 査読有
2. Nitta K, Sugiyama K, Higashide T, (他 3 名, 3 番目), Does the Enlargement of Retinal Nerve Fiber Layer Defects Relate to Disc Hemorrhage or Progressive Visual Field Loss in Normal-tension Glaucoma? J Glaucoma, 20 (2011), 189-195, 査読有
3. Wakabayashi Y, Nishimura A, Higashide T, (他 2 名, 3 番目), Unilateral choroidal excavation in the macula detected by spectral-domain optical coherence tomography. Acta Ophthalmol, 88 (2010),

e87-91, 査読有

4. Okuda T, Higashide T, (他 3 名, 2 番目), Fundus autofluorescence and spectral-domain optical coherence tomography findings of leopard spots in nanophthalmic uveal effusion syndrome. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 248 (2010):1199-1202, 査読有
5. Higashide T, Shimizu F, (他 2 名, 1 番目), Anterior segment optical coherence tomography findings of reverse pupillary block after scleral-fixated sutured posterior chamber intraocular lens implantation. J Cataract Refract Surg, 35 (2009), 1540-1547, 査読有
6. Nagata A, Higashide T, (他 3 名, 2 番目) In vivo quantitative evaluation of the rat retinal nerve fiber layer with optical coherence tomography. Invest Ophthalmol Vis Sci, 50 (2009), 2809-2815, 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1. Higashide T, Nagata A, (他 5 名, 1 番目), In vivo Evaluation of Thickness Changes of Retinal Layers After Intravitreal Injection of Endothelin-1 in Rat Eye, ARVO Annual Meeting 2010, 2010.5.2, Greater Fort Lauderdale/Broward County Convention Center (USA)
2. 長田 敦, 東出朋巳, (他 5 名, 2 番目), ラットエンドセリン硝子体内投与モデルでの網膜神経線維層厚と神経節細胞数の評価, 第 114 回日本眼科学会総会, 2010 年 4 月 15 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)
3. 長田 敦, 東出朋巳, (他 5 名, 2 番目), ラットエンドセリン硝子体内投与モデル網膜の光干渉断層計による生体内定量的評価. 第 20 回日本緑内障学会, 2009 年 11 月 14 日, 沖縄コンベンションセンター (沖縄県)
4. Nagata A, Higashide T, (他 6 名, 2 番目), In vivo quantitative evaluation of rat retinal nerve fiber layer using optical coherence tomography, ARVO Annual Meeting 2008, 2008.5.1, Greater Fort Lauderdale/Broward County Convention Center (USA)
5. 長田 敦, 東出朋巳, (他 5 名, 2 番目), 光干渉断層計によるラット網膜神経線維層の生体内定量的評価の試み, 第 112 回日本眼科学会総会, 2008 年 4 月 18 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東出 朋巳 (HIGASHIDE TOMOMI)
金沢大学・附属病院・講師
研究者番号：20291370