

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592557

研究課題名(和文) ラット専用光干渉断層計による緑内障関連モデルにおける網膜各層の構造的変化の解析

研究課題名(英文) Analysis of structural changes in rat retinal layers by optical coherence tomography in glaucoma-related models

研究代表者

東出 朋巳 (HIGASHIDE, TOMOMI)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：20291370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラット専用光干渉断層計(OCT)がエンドセリン(ET-1)硝子体内注入モデルでの網膜各層の構造的変化の定量的評価と薬物による神経保護効果の判定に有用であるかを検討した。網膜障害を惹起する最小ET-1量は20 pmolであり、OCTによる網膜内層厚が網膜神経節細胞傷害をよく反映した。20 pmol ET-1による網膜障害に対するタフルプロスト1日1回点眼の神経保護効果を検討した結果、タフルプロストによりOCTでの網膜神経線維層厚、網膜内層厚および網膜伸展標本での網膜神経節細胞数の減少が有意に抑制された。我々のOCTがラット緑内障関連モデルにおける神経保護効果の検討に有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：We examined whether our optical coherence tomography (OCT) for rat eyes is useful for quantitative evaluation of structural changes in the retinal layers in a model with intravitreal injection of endothelin-1 (ET-1) and for evaluation of neuroprotective effects of drugs. We found that the minimum dose of ET-1 to cause retinal injuries was 20 pmol, and that the thickness of the inner retinal layer was well correlated with the retinal ganglion cell loss. We further examined the effects of topical tafluprost applied once daily on the retinal injuries by 20 pmol ET-1 in a double blinded manner. Topical tafluprost reduced the thinning of the retinal nerve fiber layer and the inner retinal layer by OCT and retinal ganglion cell loss. These results indicate that our OCT system is useful for evaluation of neuroprotective effects in rat glaucoma-related models.

研究分野：眼科

科研費の分科・細目：外科臨床医学・眼科学

キーワード：ラット 網膜 光干渉断層計 緑内障

## 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 RGC 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網膜神経節細胞(RGC)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、組織標本作製に伴うアーチファクトや個体差のために、RGC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った。これを解決する唯一の方法は、RGC傷害を生体内で経時的に定量評価する方法である。

### (2) ラット緑内障関連動物モデルにおける RGC 生体内定量的評価法とわれわれの研究成果

ラット眼の RGC の生体内観察法として、共焦点レーザー顕微鏡、蛍光顕微鏡あるいは赤外線底カメラによって、蛍光色素で逆行染色された RGC が観察可能であることが報告されたが、いずれの方法においても、RGC 傷害の詳細な定量的評価はその後報告されなかった。さらに、RGC の軸索からなる網膜神経線維層(RNFL)の変化を定量化した報告もなかった。そこで我々は、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、RGC と RNFL 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(Higashide T, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006; Kawaguchi I, Higashide T, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006)。しかし画像取得やその解析に多大な時間と労力を要するため、神経保護薬開発のための薬剤スクリーニングのような大規模な実験プロトコールには適さない問題点があった。

### (3) OCT の可能性とわれわれの研究成果

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。OCT はヒト眼の RNFL 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 RNFL の菲薄化を捉えることによって緑内障の診断に広く活用されている。そこで、我々は科学研究費補助金基盤研究 C (20592035、平成20~22年度)においてラット専用 OCT の開発を試み、ラット RGC 傷害モデルにおける RNFL の生体内定量的評価が

可能であることを報告した(Nagata A, Higashide T, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009)。さらに、OCT データの加算処理により、画像解析の自動化(網膜各層のオートセグメンテーション)に成功した。これによりラット網膜各層のより客観的な画像解析と解析時間の短縮が可能となった。

## 2. 研究の目的

我々が開発したラット専用 OCT によって代表的なラット緑内障関連動物モデルでの網膜各層の構造的変化を定量的に評価する。さらに、組織学的な RGC の定量との比較によって、神経保護の観点から RGC 傷害の評価に適した網膜部位および評価時期を明らかにする。また、モデルによっては薬剤評価に用いるために適した傷害強度も決定したい。

## 3. 研究の方法

### (平成23年度) エンドセリン(ET-1)硝子体内注入モデルにおける網膜傷害の OCT による生体内定量的評価

本年度は、ET-1 硝子体内注入モデルにおいて、ET-1 投与量と網膜傷害の程度との関係、RGC 数と網膜各層厚との相関を検討した。ペントバルビタール(65mg/kg)の腹腔内投与による麻酔下に Brown-Norway ラット(10週齢、200~250g)の片眼の硝子体内に ET-1 を投与した。ET-1 投与量は 0.2、2、20、200 pmol とした。僚眼は無処置の対照眼とした。投与前、投与後1、2週においてラット専用 OCT を用いて視神経乳頭を中心とした半径 500 μm のサークルスキャンを行い、網膜全層、RNFL、網膜内層、網膜外層の厚みを計測した。さらに、ET-1 注入2週後の OCT 撮影後に両側上丘に fluorogold を注入して RGC を逆行染色した後に網膜伸展標本作製し、RGC 数を定量した。

### (平成24年度) ET-1 硝子体内注入モデルにおける眼圧下降薬タフルプロスト点眼の神経保護効果

本年度は、ET-1 硝子体内注入モデルにおいて、眼圧下降薬であるタフルプロスト点眼の神経保護効果を検討した。昨年度の検討により、ET-1 20pmol が網膜傷害を惹起する最小硝子体内投与量であることが判明したため、この用量にて検討した。ペントバルビタール(65mg/kg)の腹腔内投与による麻酔下に Brown-Norway ラット(10週齢、200~250g)の片眼の硝子体内に ET-1 を投与した。2重盲検にてタフルプロストまたは生理食塩水の1日1回点眼を4週間行った(各群12匹)。投与後1、2、4週においてラット専用光干渉断層計(OCT)を用いて視神経乳頭を中心とした半径 500 μm のサークルスキャンを行い、網膜各層厚を計測した。その後、両側上丘に fluorogold を注入して RGC を逆行染色した後に網膜伸展標本作製し、RGC 数を定量した。(平成25年度)

### (1) 神経保護機序の解明のための網膜血流

#### 測定を試み

ET-1 硝子体内注入によるラット網膜傷害は、われわれの検討によって網膜循環障害による網膜内層の傷害であることが判明し、タフルプロスト点眼がそれに対して神経保護効果を示した。そこで、各種点眼や緑内障関連動物モデルにおける網膜血流変化を評価するために、ラットの網膜血流の非侵襲的測定法の確立を試みた。

Laser Speckle Flowgraphy (LSFG、ソフトケア社)を用いてペントバルビタール腹腔内麻酔後(65mg/kg)30分毎に90分後まで視神経乳頭を中心とした網膜血流(MBR)を測定した。同時に眼圧、血圧も測定した。

#### (2)ラット専用OCT装置のさらなる改良 - 眼軸長測定機能の追加 -

OCTではスキヤンの画角は一定であるがスキヤン面積は眼軸長によって影響を受けること、ラット網膜厚は視神経乳頭からの距離によって異なることから、さまざまなモデルにおいて網膜厚を評価する場合に、眼軸長の影響を考慮すべきである。しかし、これまでラット眼での網膜厚に対する眼軸長の影響は報告されていない。そこで、現用OCTを利用して眼軸長を同時に測定する機能の追加を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (平成23年度)ET-1硝子体内注入モデルにおける網膜傷害のOCTによる生体内評価

ET-1投与前に比べて0.2、2.0 pmolのET-1投与では網膜各層厚に有意な変化はみられなかったが、20、200 pmol投与では、経時的に網膜全層厚、内層厚が菲薄化し、RNFL厚は2週後に菲薄化した。一方、RGC数は、ET-1 20、200 pmol投与眼では減少がみられた。網膜各層厚とRGC数との関係では、内層厚がRGC数と最もよく相関した。したがって、ラットET-1投与モデルにおいては、網膜傷害を惹起する最小のET-1量は20 pmolであり、OCTによる網膜内層厚がRGC傷害の評価に有用であることが判明した。これは、緑内障関連モデルであるラットET-1投与モデルにおける網膜保護効果をみるための最適な傷害強度と生体内評価の方法を示した意義あるものである。

##### (平成24年度)ET-1硝子体内注入モデルにおける眼圧下降薬タフルプロスト点眼の神経保護効果

ET-1投与後、両群(タフルプロスト点眼群、生食点眼群)ともにRNFL厚は投与前と比較して1週目に一旦肥厚し、4週後には菲薄化した。内層厚は2週後から菲薄化した。ET-1投与後、RNFL、内層ともにタフルプロスト群が生理食塩水群よりも有意に厚かった。RGC数は視神経乳頭中心から約1500 $\mu$ mの部位ではタフルプロスト群が生理食塩水群よりも有意に多かった。以上より、タフルプロスト点眼はラット眼においてET-1硝子体内投与による網膜傷害を抑制することが明らかに

なった。本年度の成果は、われわれのラット専用OCTがラット緑内障関連モデルにおける神経保護効果の検討に有用であることを示した意義あるものである。この成果は、IOVS誌に掲載された(Invest Ophthalmol Vis Sci. 55:1040-1047, 2014)。

(平成25年度)

#### (1)神経保護機序の解明のための網膜血流測定を試み

LSFGによって経時的、非侵襲的に網膜血流を測定することが可能であった。全身麻酔後30~90分間では網膜血流(MBR)に有意な変化はなかった。眼圧も有意な変化はなかったが、平均血圧は経時的に上昇傾向であった。これは、今後の実験デザインを決めるための重要な基礎データであり、今後、OCTによる網膜構造変化の定量的評価に加えてLSFGによる網膜血流変化の定量的評価を行うことで、神経保護効果とその機序の解明に役立つと考えられる。

#### (2)ラット専用OCT装置のさらなる改良 - 眼軸長測定機能の追加 -

OCTでの参照光路における参照光路長を変化させる電動ステージを移動させることによって角膜と眼底の位置を決定し、ステージ移動量から眼軸長を決定することが可能であった。したがって、今後われわれのラット専用OCTシステムでのラット網膜厚測定の際に同時に眼軸長を測定することが可能となり、ラットの種類、週齢、モデルなどによる眼軸長の違いを考慮した各網膜層厚を評価することが可能となり、より正確な網膜厚評価が可能となる点で意義あるものである。

本年度の成果であるこれらの追加検査によって、今後いろいろな緑内障関連動物モデルでのわれわれのラット専用OCTシステムによる網膜の構造的変化の解析において、循環動態や眼軸長の変化の影響を加味した検討が可能となり新知見をもたらすと考えられる。

#### 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6件)

1. Nagata A, Omachi K, Higashide T, (他5名, 3番目), OCT evaluation of neuroprotective effects of tafluprost on retinal injury after intravitreal injection of endothelin-1 in the rat eye. Invest Ophthalmol Vis Sci. 55:1040-1047, (2014) 査読有, doi: 10.1167/iovs.13-13056.

2. Kawaguchi C, Nakatani Y, Ohkubo S, Higashide T, (他2名, 4番目), Structural and functional assessment by hemispheric asymmetry testing of the macular region in preperimetric glaucoma. Jpn J Ophthalmol. 58:197-204, (2014) 査読有, doi:

10.1007/s10384-013-0293-1.

3. Nakatani Y, Higashide T, (他 3 名, 2 番目), Effect of cataract and its removal on ganglion cell complex thickness and peripapillary retinal nerve fiber layer thickness measurements by fourier-domain optical coherence tomography. J Glaucoma. 22:447-455, (2013) 査読有, doi: 10.1097/IJG.0b013e3182894a16.

4. Yamada M, Ohkubo S, Higashide T, (他 3 名, 3 番目), Differentiation by imaging of superior segmental optic hypoplasia and normal-tension glaucoma with inferior visual field defects only. Jpn J Ophthalmol. 57:25-33.(2013), 査読有, doi: 10.1007/s10384-012-0200-1.

5. Takasaki H, Higashide T, (他 3 名, 2 番目), Relationship between optic disc ovality and horizontal disc tilt in normal young subjects. Jpn J Ophthalmol. 57:34-40. (2013) 査読有, doi: 10.1007/s10384-012-0193-9.

6. Ohkubo S, Higashide T, (他 4 名, 2 番目), Relationship between macular ganglion cell complex parameters and visual field parameters after tumor resection in chiasmal compression. Jpn J Ophthalmol. 56:68-75. (2012) 査読有, doi: 10.1007/s10384-011-0093-4.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Nagata A, Omachi K, Higashide T, (他 5 名, 3 番目), Effects of tafluprost on endothelin-1-induced retinal injury in the rat. ARVO 2013 Annual Meeting, May 5, 2013, Seattle, USA

2. 長田敦, 大町勝美, 東出朋巳, (他 5 名, 3 番目), ラットエンドセリン硝子体内投与モデルにおけるタフルプロストの神経保護効果の検討. 第 23 回日本緑内障学会 平成 24 年 9 月 28 日, 金沢市

3. 東出朋巳. モデル動物評価法: 小動物の生体眼底観察(教育講演), 第 32 回比較眼科学会年次大会 平成 24 年 7 月 21 日, 名古屋

4. 東出朋巳. モデル動物評価法: 小動物の生体眼底観察(教育セミナー), 第 116 回日本眼科学会総会 平成 24 年 4 月 6 日, 東京都

5. Nagata A, Omachi K, Higashide T, (他 5 名, 3 番目), In-vivo evaluation of thickness changes of retinal layers and retinal ganglion cells after intravitreal injection of endothelin-1 in rat eye. World Glaucoma Congress June 29 - July 1, 2011, Paris, France

6. 長田敦, 大町勝美, 東出朋巳, (他 5 名, 3 番目), ラットエンドセリン硝子体内投与による網膜各層の障害と網膜神経節細胞数との関連. 第 115 回日本眼科学会総会 平成

23 年 5 月 13 日, 東京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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