

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592673

研究課題名(和文) 自主開発の手術補助剤を基盤にした手術用観察系の開発と新たな機能探究の包括的研究

研究課題名(英文) Development of a new surgical viewing system and investigation of new efficacy based on a new surgical adjuvant we have already developed.

研究代表者

江内田 寛(Enaida, Hiroshi)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：00363333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：手術中の視認性の確保は重要であり、硝子体手術において各種染色剤を用いた網膜内境界膜の染色と剥離は現在広く行われている。近年我々は安全な新しい染色剤のブリリアントブルーG(BBG)を開発した。本剤はすでにライセンスアウトされEUで上市されている。今回BBGの新しい可能性として、神経保護の可能性を見いだした。また今回我々は手術用の新しい観察システムの開発も行った。医療機器の承認を受けた後に臨床研究でフィルター挿入によりBBG染色の強調効果や各種視認性の改善効果を証明した。さらに我々はBBG染色された内境界膜を安全に剥離するためのマイクロ鑷子も開発した。本鑷子は日本ですでに承認を得て上市されている。

研究成果の概要(英文)：It is important to secure visibility during microsurgery. In vitreous surgery, staining and peeling of the internal limiting membrane (ILM) with vital dyes have been widely performed. Recently we have developed Brilliant Blue G (BBG) as a new safety adjuvant for vitreous surgery. BBG was already approved and marketed in Europe Union. In this study, we found that BBG has a neuroprotective advantages. Our data showed that ATP and P2X7 receptor may induce retinal damage in experimental models, which is effectively inhibit by BBG. In this time, we have developed a new surgical viewing system as a clinical prototype. This system improved intraoperative visibility under air infusion and the BBG staining intensity by sharp cut filter during vitrectomy. Moreover, we developed a new and economical disposable micro forceps for a microincision vitrectomy surgery that has high performance and versatility from BBG stained ILM during surgery.

研究分野：眼科学

キーワード：ブリリアントブルーG(BBG) 神経保護作用 P2X7アンタゴニスト 手術用観察系 マイクロ鑷子 硝子体手術 医師主導治験 補助剤

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで眼科手術における補助剤（アジュバント）に関連した研究を一貫して行ってきた。その過程で Brilliant Blue G (BBG)を見出し、硝子体手術の内境界膜剥離術に必要な内境界膜染色のための、より網膜組織に安全なアジュバント候補として自主開発を行った。ライセンスアウト後、本剤は EU 圏での臨床応用に至っているが（図 1）、日本国内導入にあたり薬事の関係から治験が必要であり、医師主導治験の準備を行っている状況であった。

しかしこれらアジュバントを用いた硝子体手術も、手術システムの変化に伴い、近年では高エネルギーキセノン光の観察下で行われることが一般的になってきている。より明るい環境で手術を行うことは術中の視認性確保の面から、ある程度必要なことではあるが、これらキセノン光源の波長ピークが網膜色素上皮細胞や視細胞における重要なタンパクのメラノプシンなどを障害する波長と一致しており、それに加え総エネルギー量も莫大であるため、時に術中に生じる光障害が問題となることがある。したがってアジュバントそのものの安全性以外にも、手術環境すなわち観察光からの患者や術者の術中の光障害回避など、まだまだ解決されるべき課題が多いのが現状であった。

さらに BBG には本来の色素としての働きのほか、ATP 受容体である P2X7 のアンタゴニストとしての薬理作用を有している。ATP は細胞内化学反応のエネルギー供与体としてだけでなく、情報伝達物質としてもその役割を果たしている。そのイオンチャンネル型 ATP 受容体である P2X は現在 7 つのサブタイプが同定されており、下垂体、副腎皮質、膵臓などの内分泌臓器と神経系に存在し、そのひとつの P2X7 は神経系の組織を中心に、哺乳類の網膜では内顆粒層、内網状層や神経線維層にも発現を認めているがその網膜内でののはたらきはほとんど不明である。さらに P2X7 のアンタゴニストとしての BBG にはこれまで様々な可能性が示唆されているが、眼科領域においてその効

果を証明する報告はなく P2X7 活性化によるアポトーシスを P2X7 のアンタゴニストである BBG により得られる可能性が考えられていた。

図 1 EU にて臨床応用された BBG(ILM-BLUETM)



右) 製剤概観 左) パッケージ

2. 研究目的

眼科領域における手術、特に硝子体手術に際し、各種薬剤をアジュバントとして用いた術中眼内染色は、元来手術中に見えなかった組織を可視化することで、より安全な手術の施行が可能になるだけでなく手術成績の大幅な向上にも寄与している。我々はこれまで、より安全性の高い手術アジュバントである BBG を見出し、その臨床応用に成功した。しかし安全な手術の確立のためには今後解決すべき問題も数多く存在する。そこで本研究では、実際に手術を実施する術者と手術をうける患者双方の視点から、さらなる硝子体手術の安全性と有効性の確立を目指し、BBG 染色を基盤にした硝子体手術用の画期的な観察系（システム）や手術器機などの開発を行うと同時に、BBG の薬理作用に着目した術中染色以外のあたらしい可能性とさらなる安全性の検討についての発展的研究を包括的に行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) あたらしい手術用観察系の開発

各種フィルターの組み合わせからなるシステムユニットの設計と試作を行い、フィルター挿入または組み合わせによるさまざまな眼科用手術光源下での視認性の検討を行う。開発のポイントは観察照度を維持し、すでに確立した技術である BBG を使用した環境下での手術操作がより容易になる

視認性確保可能な最適なフィルターの選択を行うことである。この課程については自記分光光度計を用いフィルターの光学特性についての検討も併せて行う。またフィルターにより分光された光の網膜における安全性評価には、分光放射照度計を用い総光エネルギー量の測定にて行う。その後正確な光学設計と試作機作成が可能な企業との連携を構築する。試作機完成の後には、医療機器の承認を得た後、臨床研究の所属機関での倫理委員会承認後、システムを実際の手術用顕微鏡に設置し、実際の臨床症例において本システム使用による視認性の検討を行う。

(2) あたらしい手術器機の開発

より操作性と安全性の高い硝子体手術用ディスプレイマイクロ鑷子を新たにデザインし、試作品を作製した後、医療機器申請を行い、認可をうけた後に臨床評価を行う。最終的なデザインを決定し再度医療機器の申請を行い、上市を目指す。

(3) BBG の薬理作用の探究とさらなる安全性の検討

これまでの研究で証明してきた BBG の P2X7 アンタゴニストとしての網膜における神経保護効果の可能性に関して、加齢黄斑変性を想定したマウスを用いた網膜下出血モデルを作製し、BBG による網膜の神経保護効果の検討を行う。

さらに、EU で使用されている BBG 製剤を個人輸入し、施設 IRB の承認および患者 IC を得た後、臨床使用を行い、術中に硝子体内注入で投与した薬剤 (BBG) の血中移行に関して HPLC を用いた定量を行う。

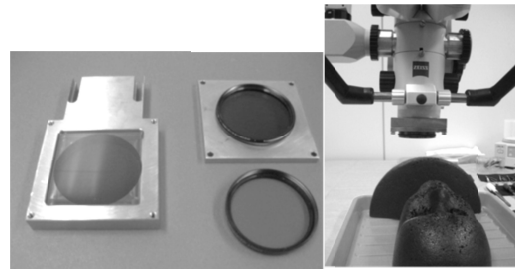
4 . 研究成果

(1) あたらしい手術用観察系の開発

まずは 3 種の異なるフィルターを内蔵したフィルターユニットを作製し (図 2)、実験用手術顕微鏡に取り付け、様々な状況下において術中の視認性向上が得られる条件をその光学特性を含め検討を

行い、臨床に应用可能はフィルターの選択を行った (業績 1)。

図 2 試作したフィルターユニット

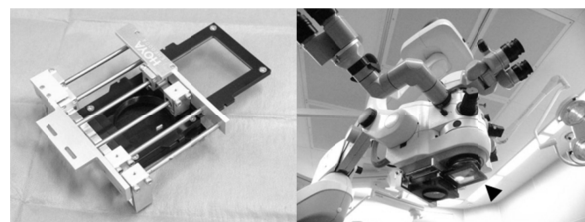


左) 複数のフィルターの組み合わせから構成される 右) 顕微鏡への装着時

実験機でのフィルター特性の検討からシャープカットフィルターが術中の空気灌流下での乱反射や BBG 染色した網膜内境界膜の染色強調効果などに優れると判断し、臨床用のフィルターユニットを再度デザインし作製した (図 3)。医療機器の届け出を行った後 (医療機器届出番号:

13B1X00253900004 号) 所属機関での倫理委員会での承認を得た後に臨床研究を行い、効果の検討を行った。その結果シャープカットフィルターの挿入により、空気灌流下でのシャンデリア照明の乱反射による羞明の抑制や BBG 染色の強調効果が CIELAB を用いた検討により定量的に証明された (業績 2, 3)。尚、本システムについては特許査定も完了している。

図 3 新しい術中観察システム



左) システム概観 右) 手術用顕微鏡にシステムを装着した状態

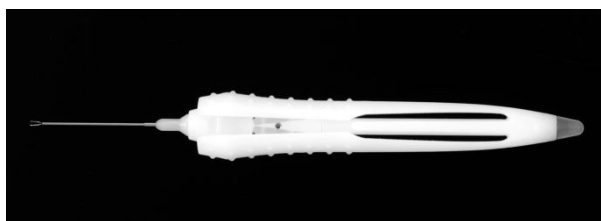
(2) あたらしい手術器機の開発

安全なディスプレイ硝子体手術用マイクロ鑷子作製を目的に、あたらしい鑷子のデザインを行い試作機の作製を行った。医療機器の届け出を行った後 (医療機器届出番号: 第

13B1X00253900002号)臨床評価を行った。試作機は極小切開硝子体手術(MIVS)システム使用時に、剛性と強度については問題なく、現在の先端の形状が球面で、把持面は半円型としたことで、組織把持面積が向上した事による汎用性の実現し、網膜面との接触による損傷が少なく安全に異物(眼内レンズ)摘出からILM剥離までが可能になった。段階的に改良を加え、複数の施設で複数の医師による評価を行った後、最終的なデザインを決定し承認を得た(認証番号:第

224AFBZX00030000号,図4)。現在すでに上市され、臨床応用されている(業績4)。

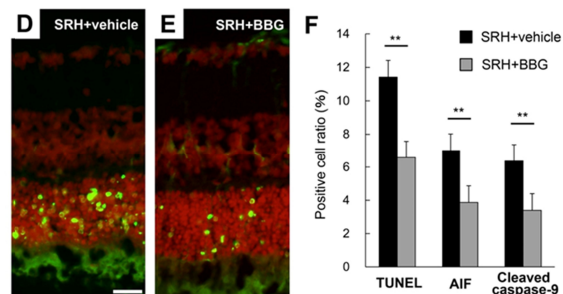
図4 新しい硝子体マイクロ鑷子の外観



(3)BBGの薬理作用の探究とさらなる安全性の検討

マウス自己血を網膜下に注入し加齢黄斑変性による網膜下出血モデルを作製し、コントロール群とBBG投与群で24時間後にTUNEL法にてアポトーシスを評価した。さらにミトコンドリアを介するアポトーシス経路をcaspase-9、AIFの免疫染色にて評価した。網膜下出血により生じる視細胞のアポトーシスはBBGにより抑制された。さらにcaspase-9やAIFの活性の上昇もTUNEL陽性細胞で同時に認められ、それらの活性もまたBBGにより抑制された(図5)。これらより網膜下出血により生じる視細胞のアポトーシスはBBGにより抑制される可能性が示唆された(業績5)。

図5 BBGの網膜神経保護効果



さらに、BBGの安全性を評価する目的で臨床症例において既存のBBG製剤を用い臨床症例6例に手術をおこなった後のBBGの血中移行についてHPLCを用いて定量を行ったところ、いずれの症例も検出限界以下であった(業績6)。本結果は並行して実施していたBBGの医師主導治験において、nonGCPであるが参考資料として使用された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](下記を含み計26件・全て査読有り)

- 1) Enaida H, Hachisuka Y, Yoshinaga Y, Ikeda Y, Hisatomi T ほか4名 Development and preclinical evaluation of a new viewing filter system to control reflection and enhance dye staining during vitrectomy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 251:441-451, 2013 査読有り
- 2) Enaida H, Ikeda Y, Yoshida S, Nakao S, Hachisuka Y ほか5名 Clinical evaluation and feasibility of changing intraoperative visibility with a novel viewing filter system for human eyes. Retina. 33: 1923-1930, 2013 査読有り
- 3) Enaida H, Yoshida S, Nakao S, Ikade Y, Hachisuka Y ほか5名 Improved brilliant blue G staining of the internal limiting membrane with sharp cut filters of a novel viewing filter system. Ophthalmologica.

Suppl 2: 27-32, 2013 査読有り

- 4) Enaida H, Kadonosono K, Emi K, Inoue M, Someya K ほか 1 名 New micro forceps with high utility for various uses in microincision vitrectomy surgery. Retina. 33:244-246, 2013 査読有り
- 5) Notomi S, Hisatomi T, Murakami Y, Terasaki H, Sonoda S, Asato R, Takeda A, Ikeda Y, Enaida H, ほか 2 名 Dynamic increase in extracellular ATP accelerates photoreceptor cell apoptosis via ligation of P2RX7 in subretinal hemorrhage. PLoS One. 8:e53338, 2013 査読有り
- 6) Enaida H, Kumano Y, Ueno A, Yoshida S, Nakao S ほか 3 名 Quantitative analysis of vitreous and plasma concentrations of Brilliant Blue G after use as a surgical adjuvant in chromovitrectomy. Retina.33: 2170-2174, 2013 査読有り

[学会発表] (計 4 件 シンポジウム・特別講演のみ)

- 1) Enaida H: Recent Advances in Chromovitrectomy. World Ophthalmology Congress 2014 Tokyo(東京). Invited symposium 4.3, 2014
- 2) 江内田寛 : 硝子体手術における内境界膜染色・剥離のための新しいアジュバント開発 117 回 日本眼科学会 シンポジウム 06 「日本発の網膜薬物治療」 4.4, 2013 東京都
- 3) 江内田寛 : 硝子体手術の現状とこれから 第 67 回 日本臨床眼科学会 10.31, 2013 横浜市
- 4) 江内田寛 : 研究開発と医師主導治験の実践. 第 84 回九州眼科学会 特別講演 (久留米市). 6.28, 2014 など。

[図書](下記を含み計 10 件)

- 1) Enaida H, Hisatomi T, Nakao S, Ikeda Y, Yoshida S, Ishibashi T. Developments in Ophthalmology vol. 54; Microincision

Vitrectomy Surgery; Chromovitrectomy and Vital Dyes. 120-125. Kalger, 2014

- 2) 江内田寛 : 小切開硝子体手術入門! 薬剤 /Brilliant Blue G (BBG). 52-55. メディカルビュー, 2014
- 3) 江内田寛 : 2013 今日の治療指針 私はこう治療している「黄斑円孔・黄斑上膜」. 1265-1266. 医学書院, 2013
- 4) 江内田寛 : 眼科疾患最新の治療 2013-2015「硝子体黄斑牽引症候群」.186. 南江堂, 2013
- 5) 江内田寛 : 眼手術学 網膜・硝子体 I「内境界膜剥離」.218-224. 文光堂, 2012
- 6) 江内田寛 : 眼手術学 網膜・硝子体 I「プリリアントブルーG (BBG)」.298-310.文光堂, 2012 など。

[産業財産権]

取得状況 (計 1 件)

名称 : 眼内観察用顕微鏡およびフィルタユニット
発明者 : 江内田寛ほか2名

権利者 : HOYA

種類 : 特許

番号 : 特許第5722060号

出願年月日 : 平成23年1月27日

取得年月日 : 平成27年4月3日

国内外の別 : 国内

* 尚、開発した器機等の承認番号等は本文中に記載済。

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

江内田 寛 (ENAIIDA, Hiroshi)

佐賀大学医学部眼科学講座・教授

研究者番号:00363333

(2) 分担研究者

石橋 達朗 (ISHIBASHI, Tatsuro)

九州大学病院・病院長

研究者番号:3150428