

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462704

研究課題名(和文) 新たな治療戦略に向けた眼内増殖性疾患における硝子体細胞の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of vitreous cells in intraocular proliferative disease towards a new treatment strategy

研究代表者

西塚 弘一 (NISHITSUKA, KOICHI)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：60422169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：硝子体細胞の眼内増殖性疾患の病態における関与を調べるために、我々がこれまでに作成したブタ硝子体組織由来細胞、ヒト硝子体組織由来細胞と種々の細胞との共培養系を作成することにより検討した。硝子体細胞は血管内皮細胞やグリア細胞、樹状細胞の細胞応答に影響を与えることがわかり、眼内では硝子体細胞が病態に複雑に関与している可能性が示唆された。臨床検体を用いた研究では、液状化細胞診の技術を硝子体検体に応用を試みた。硝子体腔には樹状細胞を含めた種々の細胞が存在することや、少量の検体からは悪性リンパ腫や硝子体アミロイドーシスの診断が可能であり、液状化細胞診は硝子体検査に有用であった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the the role of hyalocytes on pathogenesis of the intra ocular proliferative diseases, we performed to construct the co-culture system with porcine vitreous derived cells, human vitreous derived cells and the other several kinds of cells include grial cell, endothelial cell and dendritic cell. Hyalocytes effect cell-cell interaction to those cells. It may be concerened that hyalocytes act to the pathogenesis via complicated cell-cell interactions. Liquid based cytology could be applied to clinical vitreous analysi. There were several kinds of cells include dendritic cell in vitreous. Liquid based cytology could also enable clinical diagnosis (malignant lymphoma and vitreous amyloidosis) .

研究分野：眼科学

キーワード：硝子体細胞 増殖糖尿病網膜症 増殖硝子体網膜症 硝子体手術

### 1. 研究開始当初の背景

(1)網膜硝子体疾患の研究は、これまで網膜が中心であった。実際の手術所見などを考慮すると硝子体も病態に深く関与していることが考えられる。我々これまでに硝子体内に存在する硝子体細胞に着目し、ブタ硝子体細胞やヒト硝子体細胞を分離培養し炎症性サイトカインや細胞外マトリックス(主にヒアルロン酸)による細胞応答を調べ、硝子体細胞と網膜硝子体疾患の関連について検討した。ブタ硝子体組織由来細胞、ヒト硝子体組織由来細胞において炎症性サイトカインによりヒアルロン酸の産生調節が認められ、硝子体細胞がヒアルロン酸産生を介して細胞の分化・遊走・増殖を制御し、硝子体細胞と血管内皮細胞を用いた共培養系では、インターロイキン6や血管新生促進因子(VEGF)をはじめとする種々の炎症性サイトカインによる血管内皮細胞の細胞増殖が硝子体細胞の共培養で影響されており、硝子体細胞が血管内皮細胞の機能制御に関与している可能性が考えられた。硝子体細胞と血管内皮細胞を用いた共培養系では、インターロイキン6や血管新生促進因子(VEGF)をはじめとする種々の炎症性サイトカインによる血管内皮細胞の細胞増殖が硝子体細胞の共培養で影響されており、硝子体細胞が血管内皮細胞の機能制御に関与していることも考えられた。

(2)臨床検体の硝子体組織を検討する方法としては、硝子体手術終了時に眼内灌流液を回収しセルブロックを作成する方法や、硝子体手術時に無灌流下にて硝子体を部分切除し回収する方法がある。前者は作成までに組織の消失や検査時間、後者は手術手技の安全性や十分な検体量の確保が課題であった。

### 2. 研究の目的

(1)硝子体の網膜硝子体疾患への関与についての研究を進展させるために、ブタ硝子体組織を用いた検討、ヒト臨床検体を用いた検討を行う。

(2)安全な硝子体検体の採取を目指し、硝子体手術手技の開発を行う。

### 3. 研究の方法

(1)硝子体細胞を用いて、網膜硝子体疾患において眼内で上昇するサイトカインや細胞外マトリックスの細胞応答を調べる。ブタ硝子体組織を生化学的に解析する。硝子体細胞と種々の細胞とを共培養系を作成し、病態における硝子体細胞の細胞間関連について調べる。

(2)安全な硝子体採取手技の確立のために、現在行っている硝子体手術手技の改良、開発を行う。少量の硝子体検体からの病理組織学的な検討を目指し、液状化細胞診の硝子体検

体へ応用する。術中OCTによる病態の観察を行う。

### 4. 研究成果

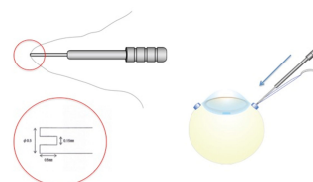
(1)網膜硝子体疾患におけるヒアルロン酸濃度:網膜硝子体疾患における硝子体内のヒアルロン酸濃度の測定を行った。検体中のヒアルロン酸濃度は増殖性糖尿病網膜症、増殖性硝子体網膜症、裂孔原性網膜剥離、眼内炎、眼内異物、黄斑上膜、黄斑円孔などの種々の疾患による差を認めなかった。手術所見における後部硝子体剥離の有無について調べると、後部硝子体剥離のある群では後部硝子体剥離の無い群に比べて有意にヒアルロン酸濃度が低かった。今後ヒアルロン酸・ヒアルロニダーゼ関連の検討が必要と考えられた。

(2)後部硝子体剥離にはヒアルロニダーゼの関与も考えられるため、実際の硝子体組織におけるヒアルロニダーゼ処理の変化を検討した。手術で得られた硝子体組織の炎症性サイトカイン濃度を、ヒアルロニダーゼ処理前後で比較したところ、測定濃度に明らかな変化が見られた。実際の病態ではヒアルロニダーゼによる修飾も検討に入れる必要があり今後の課題となった。

(3)硝子体採取方法の検討:硝子体手術では様々な機器設定条件にて硝子体を切除吸引するこれら機器の設定条件が検体のヒアルロン酸濃度に影響するかどうかをブタ眼を用いて検討した。硝子体カッターのカットレートの違い、ゲージ数の違いについて検討したところ、得られる硝子体組織中のヒアルロン酸濃度に明らかな違いを認めなかった。

(4)硝子体手術法の開発:硝子体手術における安全な検体採取を目指し、新しい眼内レンズ縫着手術法を開発した。鋭針を用いない眼内通糸を行うことが可能な器具を開発し、硝子体手術ポート部を強膜固定部位として使用することにより低侵襲な術式となった。術後成績より良好な視力と、出血などの合併症のリスクが軽減したことを示すことができた(論文にて発表した)。

New device  
-NISHITSUKA thread inserter-



(図)開発した器具

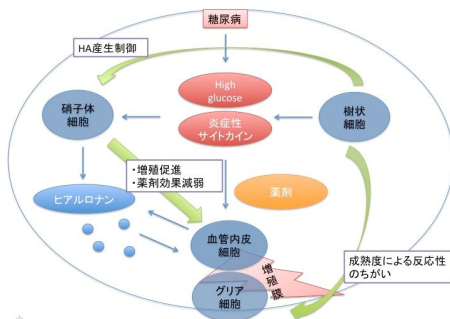
(5)眼内レンズ縫着法のさらなる改良:通常の眼内レンズ縫着術では糸の結び目を眼内に埋没させるために強膜切開を加えるが、小

切開硝子体手術におけるポートの創口部位に糸を埋没するように縫合方法を改良した。このため、新たな切開を加える必要がなくなりより低侵襲な手術手技が完成した。

(6)液状化細胞診の硝子体検体への応用:婦人科領域で用いられる液状化細胞診の手技を硝子体検体に応用した。種々の網膜硝子体疾患における硝子体検体を液状化細胞診にて検討した。免疫組織学的な検討が可能であった。硝子体内には樹状細胞含めた種々の細胞が存在することがわかった(論文して発表した)。

実際の臨床症例においては、眼内悪性リンパ腫の診断やアミロイドーシスの診断に液状化細胞診が有用であった。

(7)硝子体細胞の細胞間相互作用:硝子体腔に存在する細胞は”hyalocytes”と呼ばれ、糖尿病網膜症などの網膜硝子体疾患への関与が考えられている。これまでの研究では我々が作成したブタ硝子体組織由来細胞、ヒト硝子体組織由来細胞において炎症性サイトカインによりヒアルロنانの産生調節が認められ、硝子体細胞がヒアルロナン産生を介して細胞の分化・遊走・増殖を制御し、糖尿病網膜症の主な病態である血管新生へ関与している可能性が考えられる。硝子体細胞と血管内皮細胞を用いた共培養系では、インターロイキン6や血管新生促進因子(VEGF)をはじめとする種々の炎症性サイトカインによる血管内皮細胞の細胞増殖が硝子体細胞の共培養で影響されており、硝子体細胞が血管内皮細胞の機能制御に関与していることも考えられた。硝子体手術から得られる少量の硝子体検体の料理学的検査により、増殖糖尿病網膜症の硝子体腔内には樹状細胞が存在していた。樹状細胞は免疫応答を担う細胞であり、要諦への関与が考えられた。樹状細胞と硝子体細胞の共培養系や、グリア細胞と硝子体細胞の共培養系でも硝子体細胞が樹状細胞やグリア細胞に影響与えていることが観察された。このように硝子体腔内では種々の細胞とヒアルロナンなどの細胞外基質が共存する複雑制御系が細胞間同士を通じて病態形成に関与する可能性が考えられた。(第119回日本眼科学会総会シンポジウムにて発表した。)



(図) 硝子体細胞の細胞間相互作用

(8)術中OCTによる周辺部硝子体の観察:光干渉断層計(OCT)は眼科臨床において不可欠なもので、網膜とくに黄斑部の精密な観察が可能となり病態の把握や治療効果の判定に用いられる。術中OCTは硝子体手術中に病変部のOCTによる観察が可能である。これを用いて

術前では観察できない網膜硝子体周辺部の観察を試みた。硝子体手術中に眼球を圧迫しながら硝子体切除を行う際に同時にOCTによる観察を行った。裂孔原性網膜剥離の症例では周辺部の網膜裂孔の観察がOCTにより可能であった。増殖硝子体網膜症の症例では前部増殖硝子体網膜症の所見を確認することができた。また、増殖糖尿病変網膜症をはじめとする種々の疾患の症例において硝子体基底部付近の硝子体の様子や、周辺部処理後の残存硝子体の観察が可能であった。今後客観性のある周辺部病態の評価への応用の可能性が考えられた。

### 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)

Mari Narumi, Koichi Nishitsuka, Mitsunori

Yamakawa, Hidetoshi Yamashita, A survey of vitreous cell components performed using liquid-based cytology, Acta Ophthalmol., 査読有, 2015 DOI:10.1111/aos.12623.

Koichi Nishitsuka, Hidetoshi Yamashita, Minimally Invasive Scleral Fixation of an IOL Using a Suture Thread Insertor Combined With 25-Gauge Vitrectomy, Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina, 査読有, 45巻, 2014, 318-322

DOI:10.3928/23258160-20140625-02

西塚弘一、【網膜血管疾患アップデート】糖尿病網膜症の手術治療の進歩、あたらしい眼科、査読無、31巻、2014、1089-1095

西塚弘一、山下英俊、【血管内皮と糖尿病とその合併症】血管内皮障害と糖尿病、内分泌・糖尿病・代謝内科、査読無、39巻、2014、472-479

西塚弘一、山下英俊、【糖尿病をめぐる話題と治療の現況】糖尿病網膜症、医学と薬学、医学と薬学、査読無、71巻、2013、67-71

西塚弘一、山下英俊、【高齢者の糖尿病】高齢者糖尿病患者の合併症の管理 細小血管合併症 糖尿病網膜症・黄斑症、日本臨床、査読無、71巻、2013、2005-2009

[学会発表](計 12 件)

Koichi Nishitsuka, Analysis of vitreous hyaluronan status in

vitreoretinal diseases,86 th The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual meeting,2013.5.5～2013.5.9,シアトル(アメリカ)

Koichi Nishitsuka,Minimally invasive scleral fixation of the intraocular lens using suture thread inserter combined with 25-Gauge vitrectomy,26TH INTERNATIONAL CONGRESS OF GERMAN OPHTHALMIC SURGEONS,2013.6.13～2013.6.15,ニュルンベルク(ドイツ)

Koichi Nishitsuka,Treatment outcome of scleral fixation of the intraocular lens using a suture thread inserter,8th APVRS Congress & 52nd Annual Meeting of Japanese Retina and Vitreous Society,2013.12.6～2013.12.8,名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

西塚弘一,網膜硝子体疾患における硝子体内ヒアルロン酸濃度の検討、第117回日本眼科学会総会、2013.4.4～2013.4.7、東京フォーラム(東京都千代田区)

Koichi Nishitsuka,Ophthalmic endoscope-assisted early vitrectomy for endophthalmitis with hazy media,World Ophthalmology Congress 2014,2014.4.2～2014.4.6,東京フォーラム(東京都千代田区)

Koichi Nishitsuka,Effect of human recombinant hyaluronidase in porcine vitreous,87 th The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual meeting,2014.5.4～2014.5.8,オランダ(アメリカ)

Koichi Nishitsuka,A modified scleral IOL fixation technique using a suture thread inserter combined with 25-Gauge vitrectomy,27TH INTERNATIONAL CONGRESS OF GERMAN OPHTHALMIC SURGEONS,2014.5.15～2014.5.17,ニュルンベルク(ドイツ)

西塚弘一,25G トロカール創口に縫合糸結び目を埋没した小切開硝子体手術・眼内レンズ縫着術、第68回日本臨床眼科学会、2014.11.13～2014.11.16、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

西塚弘一,空気タンポナーデを行った裂孔原性網膜剥離に対する硝子体手術、第53回網膜硝子体学会総会、2014.11.28.～2014.11.30,大阪国際会議場(大阪府大阪市)

西塚弘一,糖尿病網膜症の病態に迫る糖尿病網膜症における硝子体細胞と細胞外基質の役割、第119回日本眼科学会総会、2015.4.16～2015.4.19、札幌市教育文化会館(北海道札幌市)

西塚弘一,硝子体細胞診の臨床的意義、第69回日本臨床眼科学会総会、

2015.10.22～2015.10.25、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

西塚弘一,周辺部硝子体処理適正化のための術中 OCT による周辺部硝子体の定量の試み、第54回日本網膜硝子体学会総会、2015.12.4～2015.12.6、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

〔その他〕

ホームページ等

[http://yudb.kj.yamagata-u.ac.jp/html/10000187\\_ja.html](http://yudb.kj.yamagata-u.ac.jp/html/10000187_ja.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西塚 弘一 (NISHITSUKA Koichi)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：60422169

### (2) 連携研究者

山下 英俊 (YAMASHITA Hidetoshi)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：90158163