

201122026B

厚生労働科学研究費補助金  
障害者対策総合研究事業(感覚器障害分野)

# 未熟児網膜症の新規手術法開発後の 治療プロトコルの標準化

平成 21 年度～平成 23 年度 総合研究報告書

研究代表者 東 範 行

平成 24 年(2012 年) 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
障害者対策総合研究事業(感覚器障害分野)

# 未熟児網膜症の新規手術法開発後の 治療プロトコルの標準化

平成 21 年度～平成 23 年度 総合研究報告書

研究代表者 東 範 行

平成 24 年(2012 年) 3 月

## 目 次

### I. 総合研究報告書

未熟児網膜症の新規手術法開発後の治療プロトコールの標準化

東 範行 国立成育医療研究センター 眼科・細胞医療研究室 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 27

III. 研究成果の刊行物、別刷 61

## 未熟児網膜症の新規手術法開発後の治療プロトコールの標準化

研究代表者 東 範行 国立成育医療研究センター 眼科 医長・細胞医療研究室 室長

**研究要旨：**我々は、未熟児網膜症（ROP）の重症型に対する早期硝子体手術を開発し、良好な予後を得ている。重症ROPが増加している現在、本研究はこの新規手術を標準化することを目的とする。併せて、この手術の洗練化、標準化に資する研究も進める。

### I. 未熟児網膜症手術の拠点化

- 1) 早期手術を行える全国拠点施設の構築：手術を行える拠点施設を東京、神奈川、大阪、名古屋、東北、東海、中国・四国、九州に設けた。
- 2) 東北地方における未熟児網膜症拠点病院の創設と集中化モデル事業：医師数が偏在する医療環境において、拠点化された病院の創設と医療ネットワークシステムの確立により十分なROP医療を将来的に提供する。福島県内のROPの治療設備に関しては充足していると考えられるが、診断および標準化にむけては画像記録装置など整備、遠隔地からの搬送手段としてヘリコプター搬送などが必要と考えられた。

### II. 早期手術の効果

- 1) **Aggressive posterior ROP/II型未熟児網膜症に対する早期硝子体手術の新生血管退縮効果：**本手術の効果を解明する目的で、術前と術後に蛍光眼底造影で新生血管退縮を評価した。全例で術後1-2週以内の早期に新生血管の退縮が起こっており、活動性を強く抑制する本手術の有効性が証明された。
- 2) **Aggressive posterior ROP/II型未熟児網膜症に対する早期硝子体手術の予後に関わる因子の統計学的検討：**Aggressive posterior ROP (APROP) に対する早期硝子体手術に関するさまざまな要素について、統計解析を行った。術後に網膜症の再発が起こらない群においては、術前に網膜有血管領域まで踏み込んで光凝固を行った項目のみが有意であった。APROPでは、眼底全体に毛細血管閉塞が存在するので、無血管領域だけでなく有血管領域にまで踏み込んで、十分に光凝固を行うことが、術後の再増殖を抑制し、良好な予後に寄与することが示された。
- 3) **未熟児網膜症の手術成績：**拠点施設での硝子体手術の成績は、網膜復位率がstage 4Aでは98%、stage 5では52.5%であり、stageが進行するにしたがって不良となり、早期に硝子体手術を行うべきである。

### III. 未熟児網膜症に対する抗血管新生因子治療

- 1) **Stage 3 ROPに対する抗vascular endothelial growth factor (VEGF) 治療の効果：**Stage 3ROP 14例20眼にbevacizumab硝子体内投与を行った。網膜光凝固によって病勢が沈静化しない症例は13例18眼、網膜光凝固が施行不能と判断されたのは1例2眼であった。20眼中2眼ではstage 4Aに進行し、硝子体手術を要したが、それ以外の18眼では病勢は沈静化し、その後の治療は不要であった。
- 2) **Stage 3後期ROPに対する抗VEGF治療の効果：**Stage 3期中期から後期5例10眼にbevacizumab硝子体内投与を行った。いずれもレーザー光凝固の適応と考えられたが、レーザー光凝固を施行せず、10眼ともにbevacizumabを硝子体内に注入した。治療後10眼ともに、新生血管は退縮し、網膜血管は周辺部まで伸び、牽引性網膜剥離に至らず、したがって、いずれの症例にもレーザー光凝固は不要であった。
- 3) **Stage 4 ROPに対する抗VEGF治療の効果：**Stage 4A 2例4眼にbevacizumab硝子体内投与を行った。1例2眼では進行が停止し、牽引性網膜剥離の拡大もみとめられなかった。他の1例は両眼ともに進行し、4Bに至る前に硝子体手術を施行した。

1)～3)では、いずれも全身的にも局所的にも副作用は見られなかった。副作用に関して慎重に検討する必要があるが、光凝固治療に反応不良あるいは施行困難な重症例には試みても良い治療法ではないかと考えられた。

4) **抗VEGF治療と無灌流領域：**抗VEGF剤の硝子体内注射は眼内新生血管の活動性を低下させることによってROPの治療として有用であるとされている。しかし最近になり、抗VEGF剤の注射によって網膜での無灌流領域（NPA）が拡大するのではないかと報告がなされた。そうであれば、この治療法はROPの治療薬として望ましくない一面があることになる。そこで、網膜静脈分枝閉塞（BRVO）の患者58名58眼において抗VEGF剤であるベバシズマブ（アバスタチン®）の硝子体内注射（IVB）と注射後1か月におけるNPAの面積を計測した。その結果、NPAの面積はIVBによって拡大していないことがわかった。今回の研究はROPの網膜で計測したものではないが、少なくともBRVOにおいてIVBは網膜のNPAを拡大させることはないことがわかった。

5) **眼内VEGF濃度と網膜電図の変化に関する研究：**ROPの眼内のVEGF濃度を非侵襲的に予測することができれば、ROPの活動性の評価や治療適応に役立つ。網膜中心静脈閉塞（CRVO）から様々なERG反応を記録し、同時に前房水のVEGF濃度を測定し、両者の相関を検討した。杆体-錐体混合成分のb/a

比、錐体成分の b 波潜時、およびフリッカ成分の潜時の 3 つが統計学的に有意に VEGF 濃度と相関し、後者の 2 つの相関が特に高かった。ROP を含む網膜の虚血性疾患において、錐体系 ERG 反応の潜時を計測することによって、おおよその眼内の虚血の程度および VEGF 濃度を予測できる可能性がある。

**6) 抗 VEGF 抗体投与における血中移行:** 網膜光凝固に対する反応が不十分な重症 ROP に対して抗 VEGF 抗体薬 (アバスタチン®) の眼内投与が行われつつあるが、眼内に投与されたアバスタチンの全身への移行など詳細な薬物動態は検討されていない。アバスタチン投与を行った重症 ROP の投与前後のアバスタチン、VEGF の血清濃度を検討した。その結果、アバスタチンは全身に移行し、アバスタチン投与後に血清中アバスタチン濃度は上昇、逆に VEGF 濃度は低下、また、両者には負の相関があることが示された。ROP に対して抗 VEGF 治療を行う際にはこの点に十分配慮すべきである。

**7) 眼内血管新生抑制に対する NSAIDs の効果:** 非ステロイド性抗炎症鎮痛薬 (NSAIDs) は、眼科炎症性疾患に対し広く用いられており、副作用も少ない。NSAIDs により誘導される抗酸化タンパク質 Heme oxygenase-1 (HO-1) と眼内血管新生の関連について検討した。NSAIDs 投与により、ARPE-19 細胞で HO-1 が誘導され、ラット CNV モデルでは、NSAIDs による HO-1 発現に伴い CNV サイズが縮小し、浸潤マクロファージ数も減少した。SnMP による HO-1 阻害で同効果は消失し、眼内 VEGF の上昇がみられた。NSAIDs の抗酸化作用によって眼内血管新生が抑制されると思われる、ROP を含む酸化ストレス疾患に有用な可能性がある。

#### IV. 手術技術の改善

**1) 小切開硝子体手術の有用性:** 早期硝子体手術が主流となりつつある ROP に対して、小切開硝子体手術の有効性と安全性を検討した。本治療術式の治療成績は良好であり、小切開硝子体手術は ROP に対して有効な術式と考えられた。

**2) 硝子体手術における手術補助剤の開発:** 手術補助剤として、網膜内境界膜の染色に適した Brilliant Blue G を開発した。同剤の日本国内への導入を図るべく、日本医師会治験促進センターの支援をうけ、厚生労働科学研究・治験推進研究事業による医師主導治験の準備を進めている。

**3) 硝子体生体染色剤による無菌性眼内炎:** 硝子体手術などに用いるトリアムシノロン眼内投与後に発生する無菌性眼内炎の臨床症状を調査し、そのメカニズムを培養細胞で調べた。投与後 24 時間以内に無痛性の好中球主体の炎症がおこりインターロイキン 8 を中心としたサイトカイン上昇が前房液に認められる。一時的に視力は低下するが、短期間のうちに炎症は消退し、視力予後は良好である。原因としてはトリアムシノロン製剤に含まれる添加剤に加えて、トリアムシノロン顆粒による物理的刺激が誘因となる可能性が示唆された。

**4) 硝子体術後のフィブリン消去:** 硝子体手術直後に発生するフィブリンは術後成績を増悪させる因子であり、非侵襲的に除去する目的で、超音波照射治療に取り組んだ。ラット眼内フィブリンモデルに超音波を照射すると有意にフィブリン分解が促進され、現在人への臨床応用を学内倫理委員会に申請中である。

#### V. 予後評価の検査

**1) 視覚の早期評価:** 小児視力評価を検討し、対光反射の家庭用ビデオ撮影は生後 6 カ月以上の乳幼児で可能である。今後は片眼および両眼の視力不良な乳幼児に対して、Teller Acuity Card、視運動生眼振と併用しながら検査の精度および可能率について検討していく。

**2) 眼圧測定における手持ち眼圧計の有用性:** 術後の眼圧評価として、アイケア手持ち眼圧計と非接触型眼圧計 (NCT) を用いて眼圧測定を検討し、6 歳以下ではアイケア手持ち眼圧計のほうが有意に NCT に比べ測定可能であったことから、アイケア手持ち眼圧計の方が測定に適していると考えられた。

**3) 無侵襲の網膜酸素飽和度測定装置の開発:** 蛍光眼底造影の合併症を克服すべく、ROP 診断に有用な無侵襲の網膜酸素飽和度測定装置の開発を行った。

**4) 黄斑部層別機能解析のための局所網膜電図の応用:** ROP の検査は眼底検査や蛍光眼底造影に加わる新たに無侵襲検査をして、網膜酸素飽和度測定装置を開発した。治療後の網膜機能、特に黄斑部の層別機能についてはほとんど知られておらず、この黄斑部機能を他覚的に記録するために、黄斑部局所網膜電図を記録する装置と、プロトコールについて検討した。赤外線眼底カメラを用いて、全身麻酔の患児を横臥位に寝かせた状態で信頼性のある黄斑部局所 ERG が記録できることを、体重 3kg のサルをモデルとして用いた予備実験で確認した。

**5) 早期硝子体手術における網膜の構造と機能の詳細な評価:** Aggressive posterior ROP/II 型 ROP (APROP) に対する早期硝子体手術は、これまでに良好な網膜復位を得ている。しかし、未熟な発生の段階で血管増殖や部分剥離を起こし、光凝固や硝子体手術を受けた網膜は、正常の構造や機能をもつとは思えない。そこで、治療予後を精密に評価する目的で、全身麻酔下での網膜の微細構造と機能の検査システムを構築した。広画角デジタル眼底カメラ (RetCam) と蛍光眼底造影ユニットで眼底の全体像と循環動態を把握し、光干渉断層計で網膜の断面を観察し、さらに網膜電図 (全視野と黄斑局所) によって機能の評価する。これら無侵襲の検査方法を組み合わせることによって、これまで以上に網膜症の病態の微細構築と機能を理解することができ、手術適応や術後予後判定に役立つことが判明した。

## A. 研究目的

未熟児網膜症 (ROP) は小児の失明原因の第一位を占める。周産期医療の進歩によって一時期は減少していたが、在胎週数・出生体重が極端に少ない超低出生体重児が生存可能になると、近年は却って急速に増加し、小児失明原因の約 40% にまで至っている。我々は重症網膜症に対して、失明を回避する画期的な手術方法を開発したが、この治療プロトコルをさらに改善し、標準化することを目的とする。

ROP には劇症型とも言えるきわめて重症な病型 (厚生省分類Ⅱ型/国際分類 aggressive posterior ROP) が存在する。このⅡ型/aggressive posterior ROP はきわめて難治で、光凝固治療に抵抗し、重篤な網膜剥離に進行する。従来の硝子体手術では、網膜剥離の治癒率が 60% 以下であるが、治療できても網膜がすでに強く障害されており、光覚～手動弁程度の視力しか得られないものが大部分であった。しかしながら、我々の開発した早期手術によって、予後を顕著に改善することができ、患児は盲学校ではなく普通学校へ行ける可能性が開けた。この手術を行う事により現在、未熟網膜症による重篤な失明は消失しつつある。しかしながら、周産期医療と産婦人科医療の進歩に伴い、体重が極端に少ない超低出生体重児が助かる可能性がますます高くなり、重症 ROP の発症は増える一方であろう。そのような背景を鑑み早期手術が開発されたとはいえその予後の改善および普及に努めることは急務である。本研究では、手術の洗練化とともに、全国への普及を目指す。

小児の重症視覚障害において、残存視力を向上させ、早期に社会参加を可能とすることは、少子時代の医療、福祉問題の解決に大きく寄与する。また、この治療プロトコルを社会に発信・普及を目指し、眼科医師のレベルアップにも大きく寄与することができる。障害児教育が特別支援学校で統括して行われることを考慮すれば、早期からロービジョンケアプログラムを実施することは、視覚に応じて有効な教育を受けることが期待できる点も有用である。

## B. 研究方法

### I. 未熟児網膜症手術の拠点化

#### 1) 早期手術を行える全国拠点施設の構築

研究分担者の所属施設において、手術拠点を構築すべく準備した。既に通常の硝子体手術設備は整っており、成人の手術には習熟していたので、観察用コンタクトレンズ等を含む小児用手術器具を揃え、手術ビデオの交換等によって技術を伝

達した。おのおのの施設で、NICU や麻酔科と連携して、近隣の NICU からの体重が少なく全身状態に問題がある患児の移送や、全身麻酔をかけるシステムも検討した。

(倫理面への配慮)

本研究における方法は、いずれも健康保険法上で承認されている医療行為であり、すべてにおいて、患者もしくは保護者に対するインフォームドコンセントを行い、同意を得て行っている。したがって、倫理的な問題はない。

#### 2) 東北地方における未熟児網膜症拠点病院の創設と集中化モデル事業

福島県内の新生児医療施設における、眼科医の勤務状況、施設の整備状況に関して調査を行う。福島県立医大付属病院関連施設での未熟児網膜症の発症頻度、治療状況について調査する。

(倫理面への配慮)

ROP 治療にあたり、患者へのインフォームドコンセントが得られていることを確認し、個人情報を含まない形式での統計解析をおこなう。

## II. 早期手術の効果

### 1) Aggressive posterior ROP/Ⅱ型未熟児網膜症に対する早期硝子体手術の新生血管退縮効果

早期硝子体手術を行った 7 例 11 眼 (男児 1 例、女児 6 例) を対象とした。出生時は、在胎 23-28 週 (平均 25 週)、体重 389-1,194 g (平均 734 g) で、いずれの症例も、AP-ROP は眼底全周に新生血管の立ち上がりが起こっており、早期に十分に光凝固を行っても沈静化せず、網膜剥離が起こり始めたため、硝子体手術を行った。手術前の網膜剥離の程度は、stage 4A が 10 眼、stage 4B が 1 眼であった。術前と、術後 1-2 週、1-3 か月後に蛍光眼底造影を行って、増殖組織の活動性を検討した。

### 2) Aggressive posterior ROP/Ⅱ型未熟児網膜症に対する早期硝子体手術の予後に関わる因子の統計学的検討

対象：2005 年 3 月～2008 年 4 月に国立成育医療研究センターにおいて早期硝子体手術を行った stage 4A あるいは stage 4B に進行した APROP 31 例 50 眼 (女児 19 例、男児 12 例)。

方法：以下の項目について、データを集積した。性別、出生週数、出生体重、Apgar score、挿管期間と酸素投与、重症な全身合併症 (水頭症、動脈管開存、壊死性腸炎など)。

ROP の所見として、術前の stage、zone、増殖組織の硝子体基底部への接着、増殖組織の円周方向での範囲、光凝固開始の修正週数、光凝固の範囲 (有血管領域まで行ったか否か)、早期硝子体手術時の修正週数、術中合併症について検討した。

統計解析には、StatLab, SPSS for windows,

version 16.0 ソフトウェア (SPSS, Inc, Chicago, IL) を用いた。単変量解析によってリスクファクターと早期硝子体手術後の再増殖を、Mann-Whitney U test、*t*-test、Fisher's exact test によって検討した ( $P < 0.2$  を有意とした)。多変量解析によって、硝子体手術後の再増殖に関する因子を検討した ( $P < 0.01$  を有意とした)。

### 3) 未熟児網膜症の手術成績

対象：2006年1月～2009年9月に大阪大学医学部附属病院で硝子体手術を行い、術後3ヶ月以上の経過観察が可能であった重症ROP 76例124眼である。内訳はstage 4A (黄斑部を含まない部分網膜剥離) 52眼、stage 4B (黄斑部を含まない部分網膜剥離) 24眼、stage 5 (網膜全剥離) 48眼である。

方法：各年毎の症例の内訳、治療成績に関して検討した。

(倫理面への配慮)

小児の手術と検査に関しては、個人情報の保護に十分な配慮を施して、検討を行った。

## III. 未熟児網膜症に対する抗血管因子薬治療

### 1) Stage 3 ROP に対する抗 vascular endothelial growth factor (VEGF) 治療の効果

対象：2006年10月～2010年3月に大阪大学医学部附属病院に紹介され、抗VEGF治療 (bevacizumab 硝子体内投与) したstage 3 ROP 14例20眼。内訳は前医で網膜光凝固が十分に施行されたにも関わらず病勢が沈静化せず、牽引性網膜剥離を来す可能性が高いと判断された13例18眼、水晶体血管膜が著明に発達しており網膜光凝固施行が不可能と判断された症例1例2眼で、性別は男性9例14眼、女性5例6眼である。出生週数は23～29 (平均±標準偏差 26.8±2.7) 週、出生体重は454～910 (771.0±186.3)gである。

方法：bevacizumab 0.25-0.5mgを修正週数33～52 (39.8±5.4) 週に硝子体内投与した。投与前後に検眼鏡の検査、広角デジタル眼底撮影、蛍光眼底撮影を行った。

(倫理面への配慮)

今回の検討では個人名が明らかになることは一切ない。また、bevacizumab硝子体内投与に関しては大阪大学先進医療審査会の承認の元、患児の両親から、書面による同意を得た上で行ったため倫理的な問題はないと考えられる。

### 2) Stage 3 後期 ROP に対する抗 VEGF 治療の効果

対象：香川大学でROP stage 3中期から後期における症例でレーザー光凝固の適応と考えられた症例5例10眼。

方法：レーザー光凝固は施行せず、bevacizumab 0.625mg/0.25mlを硝子体に注入した。治療後眼底

の経過を観察した。

(倫理面への配慮)

香川大学医学部附属病院医薬品等臨床研究審査委員会の承認を受け、患者の両親に対して詳細な説明を行った後、同意を得て治療を施行した。

3) Stage 4 ROP に対する抗 VEGF 治療の効果  
対象：香川大学でROP stage3に至り、光凝固を行ったにもかかわらず、進行が停止せず、stage 4Aに至った2例4眼に bevacizumab (アバスタチン® Genentech 社、米国) 0.50mg/0.02mLを角膜輪部より0.5～1.0mmの位置から硝子体内に注入した。その後眼底、蛍光眼底造影で新生血管の活動性、網膜血管の蛇行の変化などを観察した。

(倫理面への配慮)

香川大学医学部附属病院医薬品等臨床研究審査委員会の承認を受け、患者の両親に詳細な説明を行った上で同意を得た。

### 4) 抗 VEGF 治療と無灌流領域

BRVOによる黄斑浮腫による治療目的でIVBを施行した58名58眼 (男性25名、女性55名：年齢41-89歳、平均66.2歳) を対象とした。IVB施行前と施行後1か月の時点で蛍光眼底造影を施行し、NPAの面積をImageNet 1024® (Topcon) を使用して測定した。NPAの面積は、視神経乳頭の面積で除することによって乳頭面積 (DA) で表した。出血によるブロックとNPAを鑑別するために、常に眼底写真と対比してNPAの領域のみを計測するようにした。

(倫理面への配慮)

名古屋大学医学部の倫理委員会の承認を得て行った。患者には今回の研究について十分説明の後に書面による承諾を得て行った。

### 5) 眼内 VEGF 濃度と網膜電図の変化に関する研究

対象：名古屋大学医学部附属病院に受診し、CRVOに伴う黄斑浮腫に対してベバシズマブ注射を施行したCRVOの連続症例20名 (26-78歳、男性13名、女性7名) を対象とした。発症から受診までの期間は、3-54 週 (平均16.3週) であった。矯正視力は、0.01-0.5であり、中心窩網膜厚は469-1625  $\mu\text{m}$  (平均720  $\mu\text{m}$ ) であった。

方法：CRVOに伴う黄斑浮腫に対してベバシズマブ注射を施行する際に、前房水を0.05ml 採取し、ELISA法によってVEGF濃度を計測した。ERGは全視野刺激によって記録した。杆体反応は20分の暗順応後に0.01  $\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ の刺激を用いて記録した。錐体-杆体混合反応は、暗順応後に44  $\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ の刺激を用いて記録した。錐体ERGは10分の明順応後に、68  $\text{cd}/\text{m}^2$ の白色背景光下に4  $\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ の刺激を用いて記録した。30-HzフリッカERGは、68  $\text{cd}/\text{m}^2$ の白色背景光下に0.9  $\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$

の刺激を用いて記録した。

(倫理面への配慮)

名古屋大学医学部倫理委員会の承諾を得て行った。患者には研究の目的と方法について詳細に説明し、口頭と書面にて承諾が得られた患者にのみ検査を施行した。

#### 6) 抗VEGF抗体投与における血中移行

網膜光凝固を行ってもなお病状が沈静化せず、さらに進行して網膜剥離が発症した、あるいは網膜剥離が発症する可能性が極めて高いと判断された11例で、抗VEGF薬(アバスタチン®)を0.25-0.5mg/眼投与し、投与前、投与1, 7, 14日後に採血を行い、血清中のアバスタチン濃度とVEGF濃度をELISA法で測定した。

(倫理面への配慮)

患児は通常の網膜光凝固治療に反応せず、さらに重症化した、あるいは重症化する可能性が極めて高い症例で、アバスタチン投与で病状が改善する可能性が高いと推定された。採血は通常の全身状態を把握するための採血となるべく同時に行うように、かつ少量(0.4ml以下)とし、患児の負担とならないようにした。なお、本研究は倫理審査委員会の承認済みで、両親の書面によるインフォームドコンセントを得て行った。

#### 7) 眼内血管新生抑制に対するNSAIDsの効果

NSAIDs 刺激下のARPE-19における、転写因子NF-E2 related factor 2(Nrf2)と、その下流の抗酸化タンパク質であるHO-1の発現をWestern blotting・免疫染色にて確認した。CNVモデルラットにNSAIDs点眼の投与を行い、CNVサイズ、CNV周囲でのNrf2・HO-1の免疫染色像、ED1陽性マクロファージ数について非投与時と比較した。さらに脈絡膜血管新生におけるHO-1の関連に焦点を当てるため、ラットにHO-1阻害剤であるStannic mesoporphyrin(SnMP)の腹腔内投与を行い、同様の検討に加え眼内溶液中のVEGFの測定を行った。

(倫理面の配慮)

動物を用いた研究は、鹿児島大学の倫理審査委員会の承認を得て行なった(承認番号: MD09091号、MD10076号)。

### IV. 手術技術の改善

#### 1) 小切開硝子体手術の有用性

様々なDuty cycleやCutting Rateを有する25ゲージ硝子体カッターを用いて牽引性網膜剥離患者を対象に線維血管膜の切除を行った。また、シャフト計の異なる3種類の鉗子に同じ負荷をかけてたわみ量を観察した。

次にMIVSの低侵襲性について評価するため、兎眼を対象に20ゲージ、23ゲージ、25ゲージ硝子体手術を行い、手術時間、術後のタンパク濃度、術

中灌流量について比較した。

(倫理面への配慮)

本研究における方法は、いずれも健康保険法上で承認されている医療行為であり、すべてにおいて、患者もしくは保護者に対するインフォームドコンセントを行い、同意を得て行っている。したがって、倫理的な問題はない。動物実験は動物実験倫理委員会の承認を得て、動物実験に関する基本指針に則り施行した。

#### 2) 硝子体手術における手術補助剤の開発

我々の開発した硝子体手術の際に有用な手術補助剤のBrilliant Blue G(BBG)について医師主導治験の導入を図る。

(倫理面への配慮)

九州大学医学部倫理委員会承認のもとで行われた。

#### 3) 硝子体生体染色剤による無菌性眼内炎

鹿児島大学病院で発生したTA硝子体注射後に発生した無菌性眼内炎について臨床症状などを調査した。また、感染性眼内炎診断目的で採取した前房液について、cytometric bead arrayを用いて、interleukin(IL)-1b, tumor necrosis factor-a(TNF-a), IL-6, IL-8, IL-10, IL-12の濃度測定を行った。また、別のサンプルでは細胞診を行った。

次に、培養網膜色素上皮細胞(ARPE-19)、網膜細胞R28、水晶体上皮細胞B3について、TAが及ぼす物理的刺激が、サイトカイン産生に及ぼす影響について検討した。その際に、物理的刺激を及ぼす非活性ステロイドとして11-deoxycortisol(11DC)を用いて検討した。また、lipopolysaccharide(LPS)の影響も検討した。

(倫理面への配慮)

TA治療については、鹿児島大学倫理委員会許可のもとで施行した。また、眼内液は感染性眼内炎診断のために得られたサンプルで、細菌培養に用いた残りを使用している。解析についても鹿児島大学倫理委員会許可、患者同意取得済。

#### 4) 硝子体術後のフィブリン消去

In Vitro 実験: 健常者から得られた血液によりフィブリンに対し超音波発生器(Sonitron 2000; Richmar, Inola, OK)から、frequency of 1.0 MHz,

intensity of 1.0W/cm<sup>2</sup> のパワーで5分間照射した。その際、組織プラスミノゲンアクチベータ(tPA, Cleactor, Eisai, Tokyo, Japan: 40 IU/μl)を加えたものとの比較を行った。フィブリン溶解の指標は、D-dimer assay kit (Diagnostica Stago, Parsippany, NJ)を用いて評価した。

In Vivo 実験: ラット虹彩にYAG laser (Nd:1.2 mJ: YAG, Ellex Japan Inc, Osaka, Japan)を照射して、眼



内フィブリンを作成した Brown-Norway ラット (male; age 8 週 齡, 250 g)。その直後、眼に対して超音波を照射した。超音波強度は(1.0 MHz, intensity of 1.0 W/cm<sup>2</sup>, ISPPA of 0.228 W/cm<sup>2</sup>, duty cycle of 5.2%, pulse repetition frequency of 20 Hz)で5分間施行した。3日後にフィブリン形成の強さを定量した。フィブリン形成の強さは、既報のグレーディングスケールにより4段階にわけた(+3~0)。

(倫理面への配慮)

動物を用いた研究は、鹿児島大学の倫理審査委員会の承認を得て行なった。

## V. 予後評価の検査

### 1) 視覚の早期評価

ビデオ(ソニーHDR-XR500V)にて暗室での瞳孔反応撮影を行い、視反応の早期評価への有用性を評価する。正常乳幼児で、対光反射を記録する。撮影により得られる情報および、検査可能な下限の年齢を探ることを目標とした。

(倫理面への配慮)

現行の眼底カメラの分光分析が主体であり現時点で患者測定を行うことはなく、有害事象は生じ得ない。

### 2) 眼圧測定における手持ち眼圧計の有用性

年齢が6か月から15歳までの180人の小児を対象とした。眼圧測定は点眼麻酔を使わず、また上眼瞼を挙上せず、NCTとアイケア手持ち眼圧計の両方で測定をした。アイケア手持ち眼圧計は、6回眼圧測定後に、ディスプレイ上には「P」の文字に続いて測定値が表示される。この値が6回の平均値であるが、「P」が点滅をしている場合は、測定値の標準偏差が高いことを示しており、バラツキの程度はバーの位置で示されている。バーが無い時は、標準偏差が低く信頼性の高い測定結果であることを意味しており、今回の研究ではバーが表示されなくなるまで眼圧測定をおこなった。両眼の眼圧が測定できたものを眼圧測定可能とした。またNCTとアイケア手持ち眼圧計の有用性についてはマクネマー検定を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究における方法は、健康保険法上で承認されている医療行為であり、研究目的、内容についての十分な説明を行ったうえで、すべての対象者の両親から同意を得た。

### 3) 無侵襲の網膜酸素飽和度測定装置の開発

主に2波長の分光画像を用いた眼底の酸素飽和度の計測の可能性を模索した。このために光学フィルタを用いて1組の分光画像を撮影するための試作撮像装置を開発した。また得られた分光

画像から酸素飽和度を計算するソフトウェアを開発し動脈と静脈の分類実験を行った。

このプロトタイプ機器の欠点を補填すべく新型の測定装置を開発し、血中酸素飽和度変化に伴う動脈血酸素飽和度の変化と、疾患眼における網膜酸素飽和度変化の表示を検討した。

(倫理面への配慮)

九州大学医学部倫理委員会承認のもとで行われた。

### 4) 黄斑部層別機能解析のための局所網膜電図の応用

局所ERGの記録には、コーワ製の局所ERG記録装置(Kowa ER-80)を用いた。横臥位で眼底を観察するために、成人で記録する場合に用いる頭部固定台(顎台)をはずした状態で記録を行った。今回の実験では小児のモデル動物として、生後3年(体重3.0kg)のアカゲザルを用いた。アカゲザルをケタミンとキシラジンの筋肉注射で全身麻酔した状態で、横臥位の体位とした。その後、顎台をはずした局所ERG装置のカメラをサル之眼に接近させ、眼底を赤外線眼底カメラに映し出した状態で黄斑部に直径15度の刺激スポットを照射して黄斑部局所ERGを記録した。

(倫理面への配慮)

名古屋大学医学部の実験動物委員会の承認の下で行なった。動物の苦痛は最小限とし、ARVOの動物実験取り扱い規約を遵守した。

### 5) 早期硝子体手術における網膜の構造と機能の詳細な評価

対象:2010年4月~2011年12月までに、国立成育医療研究センターにおいて、stage 4Aあるいはstage 4B ROPに早期硝子体手術を行い、術後に全身麻酔下検査を行った5例10眼(女児2例、男児3例)。

方法:使用する機器は、広画角デジタル眼底カメラと蛍光眼底造影ユニット(RetCam, Mssie Research Laboratories)、通常の眼底カメラと蛍光眼底造影ユニット(TRC-50LX, TOPCON)、光干渉断層計(RS-3000, NIDEK; iVue, Optovue)、網膜電図(全視野と黄斑局所; MEB-2200, 日本光電; ER-80, Kowa)である。

全身麻酔下で20分の暗順応の後に、仰臥射で全視野ERG検査を行う。次に、側臥位で顔を横に向け、黄斑局所ERGとTRC-50LXによる後極部の眼底撮影、蛍光眼底造影を行う。その後、再度仰臥位にもどし、RetCamで眼底全体の撮影と蛍光造影を行い、必要に応じて手持ち式OCT iVueで、周辺部の構造を観察する。

(倫理面への配慮)

本研究における方法は、健康保険法上で承認されている医療行為であり、研究目的、内容につい

ての十分な説明を行ったうえで、すべての対象者の保護者から同意を得た。

## C. 研究結果および考察

### I. 未熟児網膜症手術の拠点化

#### 1) 早期手術を行える全国拠点施設の構築

研究分担者の所属施設において、東北、神奈川、東海・中部、中国・四国、九州の各地区に手術拠点を構築した。これによって、本新規手術が全国各地で行えるようになった。体重の少ない未熟児は移送が難しいので、従来は、遠隔地から困難を押しつけて移送するか、移送できずに手術を諦める症例もあった。今後は、患児に無理な移動を強いることなく、早期治療を行うことが可能となった。



#### 2) 東北地方における未熟児網膜症拠点病院の創設と集中化モデル事業

福島県内には9施設のNICUがあり7施設には眼科医が常勤している。9施設全てに網膜光凝固装置が配備されていた。福島県立医大の関連施設は6施設である。ROPおよび小児網膜疾患に対する手術施設は、福島県立医科大学のみである。福島県立医科大学関連6施設において未熟児網膜症に対する網膜光凝固は2008年16件、2009年18件であったが、2010年では、31件と増加していた。増加の原因は2施設における対象患者数の増加であった。2009年の両施設のNICU入院者数は758名、極小未熟児数36名(4.7%)であったのに対し、2010年はNICU入院者数672名、極小未熟児数42名(6.3%)であった。NICU入院者数は減少しているものの、極小未熟児は総数および比率ともに増加していることが、光凝固件数増加の一因となっていると考えられた。

ROPに対する硝子体切除術は、福島県立医科大学において2008年2例2眼、2009年1例2眼、2010年0例0眼であった。15才以下の小児に対する網膜手術は福島県立医大で2008年9症例11眼、2009年16例19眼、2010年16例24眼、2011年20例(1月～8月)。2011年は、未熟児網膜症に対する網膜硝子体手術は、2件3眼で行われた。

小児網膜疾患の検査には双眼倒像鏡による眼底検査、Bモード超音波断層検査が主におこなわれていたが、眼底写真撮影は導入されていなかった。福島県内で未熟児網膜症を多く診察している施設は2施設、医師は2名である。現在、網膜光凝固は2施設で多くおこなわれているが、術後経過観察は地元の医師に依頼している状態であり、写真撮影ができる器機の導入が望まれる。小児網膜疾患の検査には双眼倒像鏡による眼底検査、Bモード超音波断層検査が主におこなわれていたが、眼底写真が撮影されていたものは1件もなかった。その理由は、撮影装置が設置されていないためであった。ROP所見に関しては各施設で記載法が異なっており、施設間の連携のためには不十分であった。

ROPの治療装置である網膜光凝固装置は、NICUのある9施設全てに配備されているが、常勤眼科医の勤務状況は変わらず、7施設のみであり、NICUの数に対し、眼科医が不足していると考えられた。

福島県内の未熟児治療の2つの拠点施設の入院者数が減少していることから、未熟児の総数は減少の傾向にあると推定されるにもかかわらず、極小未熟児の頻度は増加しており、今後、未熟児網膜症患者の増加が予想される。現在は、2名の医師が中心となり治療を行っているが、術後経過観察に当たっては、地域の眼科医の協力が必要であり、一般眼科医の教育並びに情報の共有化が必要であると考えられる。情報の共有化に当たっては、眼底撮影器機などの配置が必要であると考えられる。また、治療の標準化を求める社会的ニーズを満たす観点からも眼底撮影器機は必要であると考えられる。今後、山間地域では、県相互の医療協力も進められる傾向にあることから、ROPの治療に関しても、ハード面を含めた、治療の標準化が望まれる。ROPの評価に関しては各施設の担当医または非常勤医師が当たっているが、小児網膜疾患を含めROPに対する研修を受けていない眼科医が担当していることも多く、その評価は、一定しないことも多かった。新規手術基準に基づき治療を展開するに当たっては、病期診断の精度向上、共有化が問題であると考えられた。対策として、卒後研修制度の中でのROP診断治療の必修化、小児眼科医の育成並びにROPに対する研修の強化、小児の眼底写真記録装置の配備による眼底所見の共有化などが必要であると考えられた。小児の硝子体手術に対しては、23ゲージ、25ゲージのスマールゲージ硝子体手術器具が用いられている。手術時の所見は、磁気記録媒体に保存されていた。小児の硝子体手術に対しては、23ゲージ、25ゲージのスマールゲージ硝子体手術器具が

用いられた。本年度、術中の眼底観察のために小口径高屈折硝子体手術用コンタクトレンズが導入された。ROP治療のための生児搬送は2件有り、いずれも車両を用いた搬送であった。地方の医師数の急激な減少にともない、診療科ごとの医師数偏在も著しい。ROPの治療には、産科、小児科、眼科の協力体制が重要であるが、医師が偏在する地方では十分なROP治療を提供することが極めて困難となっている。この問題の解決には、拠点化された病院の創設と医療ネットワークシステムの確立により過不足のないROP医療を将来的に構築することが必要である。ネットワークの構築に当たっては設備の充実や搬送ルートの確保などハード面での整備と連携のための人的配備並びに標準化されたプロトコールに基づく情報共有化などのソフト面での整備が必要である。

手術施設に関しては、関連施設を含めた手術症例が年間1~2症例であることから1施設で対応が十分であると考えられた。今回の対象施設間での対象患児の輸送は、車両による搬送で対応できているが、より広域での運用を視野に入れた場合、ヘリコプター搬送を活用した搬送システムの整備構築が必要であると考えられる。

## II. 早期手術の効果

### 1) Aggressive posterior ROP/II型未熟児網膜症に対する早期硝子体手術の新生血管退縮効果

術前の蛍光眼底造影では、9眼で顕著な、2眼中で中等度の色素漏出が、増殖組織から起こることが観察された。増殖組織内の新生血管が、高い活動性をもつことが示された。網膜血管の強い拡張と蛇行が10眼に、血管シャントが7眼にみられた。硝子体手術後6-12日で、全例で網膜剥離は治癒し、網膜血管の拡張・蛇行は減弱した。また、全例で、増殖組織からの蛍光色素漏出が顕著に減弱した。6-19か月(平均9.2月)の経過観察で、最終的には、血管新生増殖の再度の活動化や網膜の再剥離は起こらなかった。2眼で、残存増殖組織の収縮による網膜の牽引やひだ形成が起こったが、他では起こらず後極網膜は良好に保たれた。

ROPには劇症型とも言えるきわめて重症な病型(厚生省分類II型/国際分類aggressive posterior ROP)が存在し、きわめて難治で、光凝固治療に抵抗し、重篤な網膜剥離に進行する。従来の硝子体手術では、網膜剥離の治癒率が60%以下であるが、治療できても網膜がすでに強く障害されており、光覚~手動弁程度の視力しか得られないものが大部分であった。しかしながら、我々は早期

手術を開発し、これによって予後を顕著に改善することができることを、手術成績によって報告してきた。この手術の効果を解明する目的で、術前と術後経過を追って、蛍光眼底造影で新生血管の活動性を評価した。

術後まもなくの新生血管増殖を検討したところ、予想以上に速やかに増殖の活動性が低下していることが判明した。この経過は、通常のROPの自然寛解や光凝固による沈静・瘢痕化に比べて、はるかに早い。

この早期手術は、効果の機転として、以下の2つが考えられる。まずは、増殖組織への牽引の除去である。本手術の特徴は、新生血管を多く含むと大出血を起こすので、ここに触れることなく、周囲の正常硝子体線維を除去し、増殖が今後進行する足場を除くことにある。従来の血管培養細胞等の研究では、細胞に進展を加えると、増殖能が亢進することが示されている。正常硝子体線維は増殖組織を牽引・伸展する作用があるので、手術によって牽引を除去すれば、増殖能が低下することが考えられる。次に、硝子体腔内の血管新生因子の除去が挙げられる。ROPの増殖において虚血部位から放出される血管新生因子が重要な役割を果たしていることは、周知の事実であり、光凝固はその産生を焼くことによって、産生を抑制するのが目的である。しかしながら、AP-ROPでは虚血状態が強く、血管新生因子の放出が大量であることが示唆されている。硝子体手術の灌流によって、血管新生因子が洗浄、除去されることも、大きな効用と考えられる。

本手術がひとたび行われれば、術前の光凝固が不足して血管新生因子の放出が続かない限り、新生血管増殖の活動性は抑制される。今回の検討によって、本手術の効果が予想以上に高く、かつ早期に発揮されることが判明した。本手術の導入によって、網膜全剥離へ進行するROP症例は、急速に減少しつつある。本術式は硝子体線維を除去するだけなので、従来の瘢痕期になってから増殖組織を除去する硝子体手術に比べて、技術的には簡単である。手術時期が早いために眼球が小さい点では、ある程度の習練を要するが、硝子体手術の専門家であれば、十分に施行可能である。今後は、手術器具や技術の洗練を行うとともに、さらに広く普及に努めるべきである。

### 2) Aggressive posterior ROP/II型未熟児網膜症に対する早期硝子体手術の予後に関わる因子の統計学的検討

31例50眼のうち、網膜無血管領域にさえ十分な光凝固を受けなかった5眼(10%)と既に硝子体基底部に広範囲な増殖組織の癒着が起こって

TABLE 1. Univariate Analysis between Baseline Demographics and Recurrence in the eyes with aggressive posterior retinopathy of prematurity after Early Vitreous Surgery

	Recurrence after Early Vitreous Surgery			P Value (Two-Tailed)
	Total (n = 43)	Yes (n = 8; 19%)	No (n = 35; 81%)	
Baseline characteristic				
No. eyes/patients	43/29	8/6	35/25	
Male, no (%)	13 (30.2)	5 (62.5)	8 (22.9)	0.042*
Gestational age (weeks), mean ± SD	25.1±2.3	24.8±2.0	25.2±2.4	0.703†
Birth weight (grams) mean ± SD	808.7±369.6	789.5±302.2	813.0±387.0	0.873†
Apgar score at 5 min, median (range)	6 (1-10)	6 (2-10)	5 (1-10)	0.311‡
Intubation duration (weeks), mean ± SD	57.0±40.6	60.9±49.2	56.1±39.2	0.767†
Severe systemic complication, no. (%)	12 (27.9)	2 (25.0)	10 (28.6)	1.000*
Follow-up period (mon), mean ± SD	23.8±10.7	22.6±7.8	24.1±11.3	1.000†
ROP findings				
Zone, no. (%)				0.404*
1	29 (67.4)	4 (50.0)	25 (71.4)	
2	14 (32.6)	4 (50.0)	10 (28.6)	
Stage, no. (%)				0.067*
4A	37 (86.0)	5 (62.5)	32 (91.4)	
4B	6 (14.0)	3 (37.5)	3 (8.6)	
Fibrovascular tissue and vitreous base adhesion, no. (%)	5 (11.6)	3 (37.5)	2 (5.7)	0.037*
Clock hours of fibrovascular tissue, median (range)	5 (2-12)	9 (2-12)	5 (2-12)	0.344‡
PMA (weeks) at initial PHC, mean ± SD	32.9±1.8	32.1±0.8	33.1±1.9	0.180†
Interval between initial PHC and vitrectomy (weeks), mean ± SD	6.9±3.2	7.0±2.6	6.3±3.3	0.892†
PMA (weeks) at vitrectomy, mean ± SD	39.7±3.1	39.1±2.9	39.2 ±3.9	0.536†
Intraoperative hemorrhage, no. (%)	13 (30.0)	3 (37.5)	10 (28.6)	1.000*
PHC to both vascularized and nonvascularized retina, no. (%)	27 (62.8)	1 (12.5)	26 (74.3)	0.002*

PMA = postmenstrual age; PHC = photocoagulation; SD = standard deviation. \*Fisher's exact test. †t test; ‡Mann-Whitney U test.

いた2眼(4%)は除外し、29例43眼(86%)で検討した。29例中19例は女児、10例は男児、平均在胎週数25.2±2.3週、平均追跡期間は23.8±10.7月であった。43眼のうちの8眼(18.0%)は手術後に再増殖が起こり、他は再増殖なく網膜は復位した。再増殖は残存硝子体に沿って、手術後2~8週で起こり、段階的に進行し、乳頭との間に牽引性網膜剥離を形成した。8眼のうち3眼は再度の硝子体手術を行った。再増殖組織は網膜に強く接着していたので、十分に切除できず、網膜復位が得られたのは1眼に過ぎなかった。4眼は初回手術の後、部分的な網膜復位が得られた再増殖の強くないもので、1眼は眼球癆に進行して2回目の硝子体手術を行えなかった。

再発群では、男児がやや多かったが、有意差はなかった(P=0.042)。他の全身状態の因子は、再発群と非再発群の間で有意差がなかった。術前に、stage 4Bと硝子体基底部分に対する癒着の発生率は再発群で僅かに高かったが、有意ではなかった(P=0.067とP=0.037)。一方、非再発群は、光凝固を無血管領域のみならず有血管領域まで踏み込んで行った方が、無血管領域のみに行った場合に比べて多く(74.3%対12.5%)、有意に差がみられた(P=0.002)。

多変量解析では、光凝固を無血管領域のみならず有血管領域にも踏み込んで行った場合だけが、非再発に相関がみられた(オッズ比0.049; 95%の信頼区間0.005-0.459; P=0.008)。他の因子との相関はなかった。

APROPに対する早期硝子体手術の主な目的は増殖組織が急速に水晶体面後面あるいは硝子体基底部分に接着する前に、その足場となる硝子体線維構築を取り除くことである、そして、増殖組織と毛様体または硝子体基底部分の間の硝子体様ゲルをできるだけ切除する必要がある。しかし、後部硝子体剥離の網膜への接着は、成人に比べて強いので、若干のゲルは網膜の表面上に残る。加えて、増殖組織より前方にある無血管網膜は密な光凝固によって部分的に液化しており、一方で後方の有血管網膜は硝子体ゲルが残存している。したがって、ROPの活動性が術前に十分抑制されていないと、増殖組織は残存硝子体ゲルに沿って、後方の網膜に向かって再発する。

再増殖が起こった8眼のうち、わずか3眼しか再度の硝子体手術を行えなかった。新生児の網膜に対する硝子体接着は非常に強く、再増殖組織はさらに固く癒着している。ひとたび形成されれば、網膜を傷つけないで牽引を完全除去することは

ほぼ不可能である。今後は、再増殖を予防するための薬物両方を開発しなければならない。

早期硝子体手術は網膜剥離の進行を予防して、APROP の視力予後を劇的に改善するが、本研究は若干の症例で術後に増殖組織の再発が起こり、無血管領域のみならず有血管領域まで踏み込んで網膜光凝固を行うことが、再発の発生率を低下させる最も重要な因子であることを示した。

過去の我々の蛍光眼底造影による研究では、APROP では通常の classic ROP と異なり、有血管領域にも広範な毛細血管閉塞が起こっており、ここから硝子体腔へ大量の血管新生因子が放出されていると考えられる。したがって、APROP では、無血管領域のみならず、有血管領域にも広く密に光凝固を行うことは、網膜症の進行を予防するとともに、硝子体手術に至っても、再増殖の危険性を低下させ、良好な予後を得る上で不可欠である。

広範囲な術前光凝固と早期硝子体手術によって後方の網膜を温存することは、APROP の視覚予後のために現在最も推奨できる方法である。しかし、有血管領域に広範囲かつ密な光凝固を行うことは、夜間視力の低下、不十分な暗順応、周辺視覚の損失、嚢胞状黄斑浮腫などの合併症を起こすことも危惧される。血管新生を阻害する抗血管内皮成長因子薬は過度癥痕化を生じさせるが最も有望な薬物であり、他に TGF ベータ拮抗薬と rho・キナーゼ抑制薬も増殖予防の候補である。APROP は活動性が非常に高いので、効果が少ない可能性があるし、全身への影響が未知な点では光凝固が安全である。

本研究は症例数や対照群の制限があるが、その結果は APROP に対する光凝固と硝子体手術のためのプロトコールとなる。

## 2) 未熟児網膜症の手術成績

研究対象の全期間 (2006~2009 年) で、stage 4A では復位率 98% と良好な成績であったが、stage 4B, 5 と病期が進行したものに關しては徐々に復位率が低下し、特に stage 5 では 52.5% と決して良好とは言えない成績であった。各年毎の症例数 (眼数) と網膜復位率は、各年によって症例数のばらつきが大きい、各年で病期の違いによる手術成績に大きな変動はみられなかった。各年毎の症例数とその内訳で、2009 年が 9 ヶ月間のデータであるが、2007 年をピークとして症例数は徐々に減少傾向にある。また、病期が早い段階 (stage 4A) で紹介される割合が徐々に高くなって来ている。ROP は小児失明原因の上位を占める重要な疾患である。ROP に対する確立された標準的な治療法は網膜光凝固であるが、これを適切に行っても病状の進行が抑えられず、牽引性網膜

剥離を発症し、硝子体手術を要する重症例が数%存在する。これまでは網膜剥離が全体に剥離 (stage 5) し、病状 (血管活動性) が低下してから、すなわち網膜剥離発症から 1, 2 ヶ月経過してから手術を行っていたが、これでは網膜の剥離に伴う変性が強くなり、解剖学的にも機能的にも手術成績は不良であった。

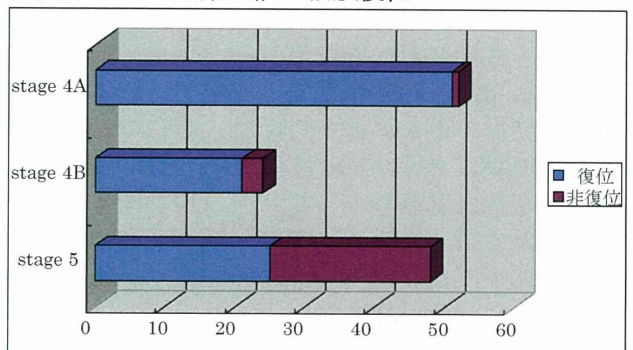
一方、最近、牽引性網膜剥離が一部発生した段階 (stage 4) で手術を行うことが提唱され、良好な成績が報告されている。ただ、現在のところ、ROP に対する早期硝子体手術を行っているのはごく一部の施設であるので、全国の数箇所の拠点病院で治療が行えることを目指して術式を標準化することが研究の目的である。まず、今年度は当院で早期硝子体手術が本格的に導入された 2006 年以降の ROP に対する硝子体手術の治療成績を検討した。

今回の検討では当科で早期硝子体手術が本格的に導入された 2006 年以降、2009 年までの ROP に対する硝子体手術の治療成績に関して検討した。その結果、stage 4A の網膜復位率は 98% と極めて良好であったことが判明した。しかし、病期が進んだ症例では網膜復位率が徐々に低下し、特に stage 5 では半数程度しか網膜復位が得られていないという不良な成績であった。このことから病期が進行する前、すなわち stage 4A で手術を行うべきであると考えられる。

また、多少のばらつきはあるが、今回の研究期間内だけでも進行した stage 5 症例数が減少する傾向がみられた。特に 2009 年では 3 眼 (20%) とこれまでの中で最小の割合となった。これは早期硝子体手術の有用性が論文、学会等で発表されており、ROP の初期治療、すなわち網膜光凝固に携わっている眼科医に対する啓蒙が適切になされつつあるためかと思われた。

対象患者の年齢が小さく、視機能の結果に關してのデータが測定できておらず、今回の手術成績の検討は解剖学的復位率のみで行なわざるを得なかった。Stage 4A で手術を行った症例では (0.4) 以上の視力が得られている症例も多く、今後、患児の成長を待って、詳しい視機能の検討も進めたい。

病期内訳と網膜復位



### Ⅲ. 未熟児網膜症に対する抗血管因子薬治療

#### 1) Stage 3 ROP に対する抗 VEGF 治療の効果

5例10眼全てにおいて、病態の進行は停止し、牽引性網膜剥離を生じることなく新生血管は退縮した。したがって、レーザー光凝固や硝子体手術を行う必要は全例でなかった。なお、経過観察期間は1か月から12か月（中央値4か月）にわたっている。安全性に関しては、全身的にも局所的にもこの治療に関連する副作用はみられなかった。

この結果から、未熟児網膜症の病態にVEGFが大きく関与し、抗VEGF抗体によって病態の進行が停止し、血管の成長が正常化に向かうことが明らかになった。過去の報告においても、今回の結果からも、全身的にも局所的にも有害事象は見られず、安全である可能性が高いと思われる。レーザーや硝子体手術が不要になったことで、このIVBが、将来的に良好な予後が約束される治療となる可能性が示唆された。

#### 2) Stage 3 後期 ROP に対する抗 VEGF 治療の効果

症例1. 26週3日、826gで出生した女児。修正31週0日の時点で後極部血管の拡張・蛇行、網膜出血、シャント血管の形成を認め、Aggressive Posterior Retinopathy of Prematurity (AP-ROP)と診断され、修正31週2日で両眼に3,000発以上の網膜光凝固が前医で施行された。その後、病状が沈静化しないため当科に紹介された。初診時の眼底は、後極部の拡張・蛇行が強く、光凝固斑の後極縁よりやや後極側に充血し、隆起した増殖膜を認めた。放置すれば牽引性網膜剥離を来す可能性が高いと判断し、両親から書面による同意を得て、bevacizumab 0.5mgを修正33週3日で硝子体内に投与した。

投与2日後に、後極部血管の拡張・蛇行は改善し、増殖膜の充血も著明に軽減した。その後、追加治療を行うことなく寛解した。現在、投与後1年であるが経過良好である。

この症例を含め、18例20眼の全例でbevacizumab投与後に病状（後極血管の拡張・蛇行所見、増殖膜の充血所見）の改善がみられたが、2眼で増殖膜の収縮により牽引性剥離が発生し、stage 4Aに進行した。これら2眼では水晶体温存硝子体手術を行うことで網膜復位を得た。また、別の1眼ではやはり増殖膜の収縮によりstage 5に進行し、残念ながら網膜復位が得られなかった。これらstageが進行した3眼はいずれもbevacizumab投与前に増殖膜が広範囲（2象限以上）に存在した症例であった。それ以外、眼局所、全身における副作用は認めなかった。

今回の症例は通常の治療、すなわち網膜光凝固を十分に行ってもなお、病勢が収まらない症例あ

るいは光凝固そのものが著明な水晶体血管膜によって施行できないと判断された症例であった。bevacizumab投与によって全ての症例で病状の改善は得られ、17眼では追加治療を行うことなく、寛解した。しかし、すでに増殖膜が広範囲に存在する症例ではbevacizumabによって増殖膜の線維化、収縮が発生し、牽引性剥離がむしろ急速に進行した。Bevacizumabは増殖膜が広範囲に発生する前に投与すべきであると考えられた。

また、今回の検討では症例数が少なく、経過観察期間も短いため、安全性に関する評価は不十分である。成長が旺盛な乳児に対する薬剤の適応外使用であり、一般化して治療法を行う前に、さらに慎重な検討が必要であることは言うまでもない。

#### 3) Stage 4 ROP に対する抗 VEGF 治療の効果

2例のうち、1例では、両眼ともに、投与後、新生血管の活動性は軽減し、わずかな線維膜を残して、牽引性網膜剥離の拡大は停止した。現在、投与後6か月間経過観察を行っているが、良好である。

他の1例では、両眼ともに、投与後、網膜血管の蛇行は改善し、新生血管の活動性も減弱したが、増殖膜の線維化が進行し、牽引性網膜剥離の拡大がみられたので、投与後1週以内に両眼ともに硝子体手術を行った。1眼は増殖膜の処理をほとんど不要であったが、もう1眼では全周増殖膜の処理が必要でガスによる網膜復位が必要であった。現在術後1か月で経過観察中であるが、今のところ問題はない。

どちらの症例も眼局所、全身ともにアバスチン投与に関連する合併症はみられなかった。

いずれの症例も過去の報告のように、アバスチン投与によって新生血管の活動性が減弱した。しかしながら、1例では、進行が早く、硝子体手術に至ってしまった。もう少し早い時期の投与が望まれた症例であった。もう1例は、投与の時期がよく、網膜症の鎮静化を得ることができた。投与しなければ確実に硝子体手術に至ったとおもわれる重症例であった。

#### 4) 抗 VEGF 治療と無灌流領域

58眼中37眼はIVB前にNPAが存在しなかった。この37眼では、IVB後にNPAが出現したものが3眼あった。それらの面積は、0.13, 0.47, 0.60 DAであった。

58眼中21眼ではIVB前にNPAが存在しており、その面積は $3.45 \pm 4.66$  DAであった。これら21眼のIVB後1か月のNPA面積は、 $3.45 \pm 5.19$  DAであった。両者には統計学的に有意な差はなかった ( $P=0.36$ )。

この21眼のIVB前後のNPA面積の変化は、21

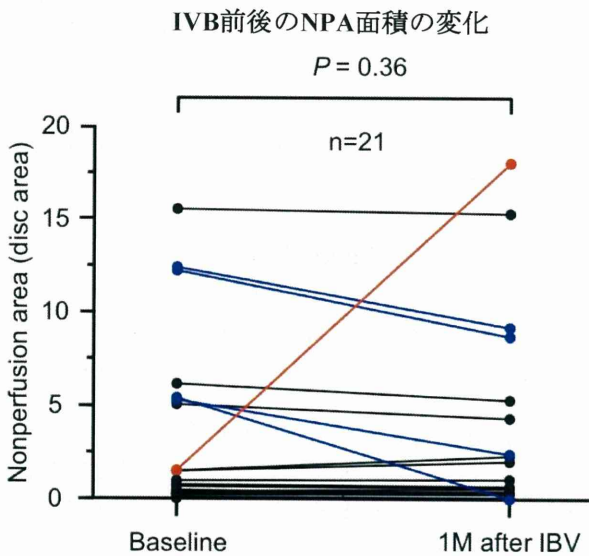
眼中、IVB前後でNPA面積が1DA以上増加したものは1眼のみであった。一方で、IVB前後でNPA面積が1DA以上低下したものは4眼であった。

最近になり、IVB後に網膜に虚血性変化が生じたという報告がいくつかみられる。Kimらは、CRVOの症例でIVB後に非虚血型が虚血型に変化した1例を報告している。また、Papadopoulouらは、抗VEGF剤注射後に網膜血管径が減少したことを報告している。

その一方で、IVBは網膜における虚血性変化をおこさないという報告もある。CRVOとBRVOの29眼における定性的検討を行ったPragerらは、NPA面積はIVB前後で変化なかったと報告しているし、Kookらも糖尿病網膜症の129眼におけるNPAの検討により、その面積は増加していないことを報告している。

もしもIVBによって網膜に急激な虚血変化が引き起こされるのであれば、IVB後1か月の時点でNPAが増加する症例が多くみられるはずであると仮定して今回の研究を行った。その結果今回の我々のBRVO58眼の結果では、IVB前とIVB後で有意なNPA面積の変化はみられなかった。しかも、58眼中、IVB後にNPAが1DA以上増加したのはたったの1眼のみであった。以上により、IVBがNPAを促進させる可能性は低いと結論した。

それでは、なぜ我々の1眼で急激なNPAの増加がみられたのであろうか。Hayrehは、65歳以上のBRVOでは、発症から6か月の経過観察中に約16%の症例において、非虚血型から虚血型に移行することを報告している[参考文献7]。図3に示した症例は、そのような非虚血型から虚血型への移行症例であり、IVBとの関連で生じたものではなかった可能性があると考えられた。



### 5) 眼内 VEGF 濃度と網膜電図の変化

右眼のCRVO患者(60歳、男性)から記録したERG波形では、正常な左眼と比較すると、右眼は全体的にERGの振幅が低下し、潜時が延長していることがわかる。また、杆体-錐体混合反応はa波に対するb波の振幅比(b/a比)が低下していることもわかる。

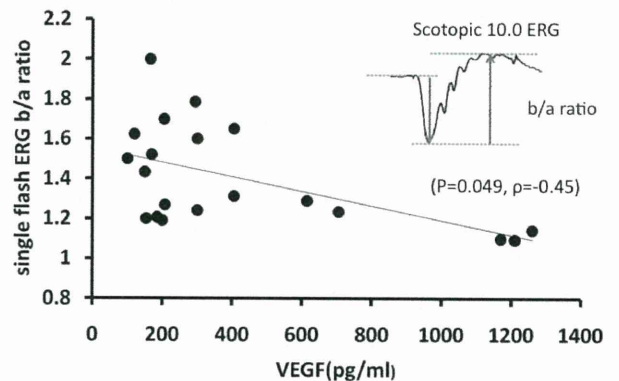
次に、この4つのERGの振幅、潜時およびb/a比と前房水のVEGF濃度の相関を調べた。まず、従来から虚血の指標としてよく使用されている、杆体-錐体混合反応のb/a比については、VEGFと有意な相関を示し、b/a比が低下するほどVEGF濃度が高くなる傾向がみられた(P=0.049, ρ=-0.45)。

また、錐体反応のb波の潜時もVEGF濃度と相関がみられた。つまり、b波の潜時が延長するほどVEGF濃度が高くなる傾向がみられた(P=0.0059, ρ=0.63)。

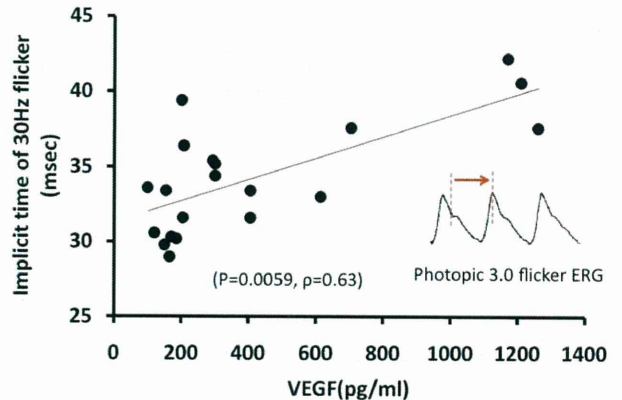
さらに、フリッカ反応の潜時もVEGF濃度と相関がみられた。つまり、フリッカ反応の潜時が延長するほどVEGF濃度が高くなる傾向がみられた(P=0.0059, ρ=0.63)。

最後に、20眼をフリッカ反応の潜時が37 ms未満である群と、37 ms以上である群の2群に分類したところ、37 ms以上である群のほうが有意にVEGF濃度が高いことがわかり、その中央値は202 pg/mlと909 pg/ml、つまり後者のほうが4倍以上高いことがわかった

#### ERGの杆体-錐体混合反応のb/a比とVEGF濃度の相関



#### ERGのフリッカ反応の潜時とVEGF濃度の相関



今回我々は、網膜虚血をきたす眼内血管病変の代表的な疾患であるCRVOにおいて、ERGの各成分と眼内VEGF濃度の相関を調べた。その結果、杆体-錐体混合反応のb/a比、錐体成分のb波潜時、およびフリッカ成分の潜時、の3つが統計学的に有意にVEGF濃度と相関することがわかった。この3つの成分は、これまでも網膜の虚血状態をよく反映することで知られている成分であり、虹彩新生血管の出現を予測できる因子としても有名である。今回の研究によって、ERGを用いた非侵襲的な網膜機能検査でおおよそその眼内VEGF濃度を予測することが可能であることがわかった。

これにより、ROPにおいても、特に錐体系ERG反応の潜時を用いることで、眼内の虚血の程度およびVEGF濃度を予測できる可能性があることがわかった。

### 6) 抗VEGF抗体投与における血中移行

3例は片眼のみ、8例は両眼にアバスチン投与を要した。症例の平均出生週数は25週、平均出生体重は660gであった。全例でアバスチン投与前に網膜光凝固を無血管領域に施行されていた。アバスチン投与は平均38修正週数、平均体重1,720gで施行されていた。

アバスチン投与前後の血清中アバスチン濃度の推移は、投与後2週まで血清中のアバスチン濃度は徐々に上昇していた。

総量として0.5mgのアバスチンを投与した症例の投与前後の血清中VEGF濃度の推移は、血清中のVEGF濃度は投与翌日には投与前の値に比し大きく低下し、投与2週後までこの傾向は続いていた。血清中のアバスチン濃度とVEGF濃度の関係は、負の相関を示した ( $r=-0.575$ ,  $P=0.0125$ , Spearman rank order correlation)。

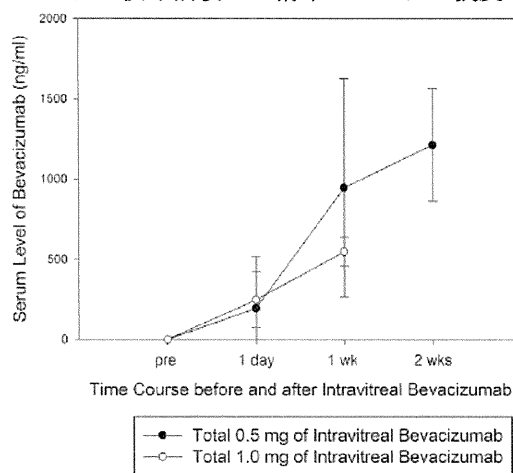
今回の検討によって眼内に投与されたアバスチンは全身に移行し、血清中のアバスチン濃度が上昇し、逆にVEGF濃度は低下、また、両者には負の相関があることが示された。今回の検討では患児の入院期間の制約もあり、投与後2週までしか測定できていないが、より長期にわたってVEGF濃度が抑制されている可能性があり、今後さらに長期のアバスチンおよびVEGF濃度の推移を検討すべきであると思われた。

VEGFは生理的な新生血管に関しても重要な役割を果たすサイトカインであり、もし、これが強く抑制されるようであればアバスチンの眼内投与によって患児の生理的な新生血管が阻害される可能性が高くなる。今回の検討ではVEGF濃度が測定感度以下になるような症例は皆無であり、全症例の最低値は0.5mgを片眼に投与した症例で、投与1週後に106ng/ml (投与前は603ng/ml) であった。このレベルで生理的な新生血管が阻害されて

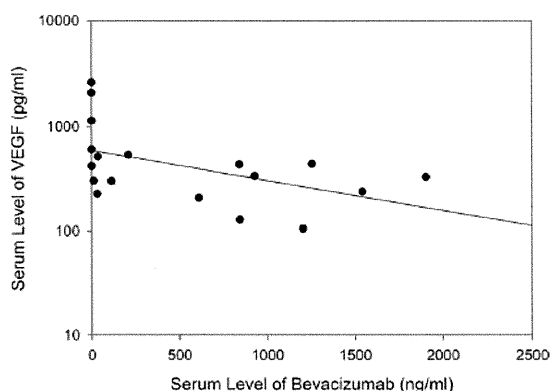
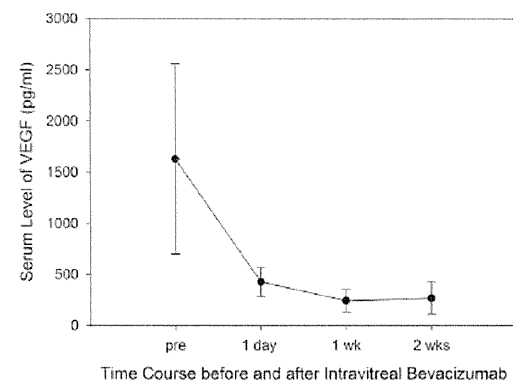
いないかどうかの見解は不十分で今後の検討が必要であるが、今回の対象となった患児ではその後の新生児科医師の診察によって全身所見に特に異常はみられていない。

ROP例の血清中のVEGF濃度に関しては未熟児網膜症を発症していない同年齢の低出生体重児より有意に高いとする報告と有意差がないという報告があり、統一した見解は得られていない。仮にROP例の血清VEGF濃度が正常より病的に高いとすれば、アバスチン投与によって多少VEGF濃度が低下しても全身的には悪影響が出ないと考えることもできよう。ただし、この点に関しては今後、注意深い検討が必要である。

### アバスチン投与前後の血清中アバスチン濃度の推移



### 血清中のアバスチン濃度と VEGF 濃度の関係





## 7) 眼内血管新生抑制に対する NSAIDs の効果

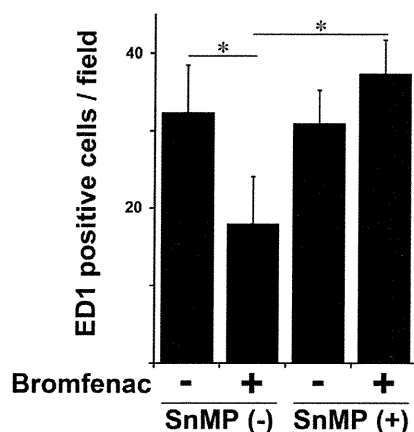
NSAIDs 刺激により、ARPE-19 細胞において、濃度・時間依存的に Nrf2 の核内移行がみられ、HO-1 が誘導された。H2O2 によるアポトーシスを抑制した。

ラット CNV モデルでは NSAIDs 点眼により CNV 周囲の Nrf2 の核内移行と HO-1 発現の増強が認められた。同時に NSAIDs 点眼により CNV サイズが縮小したが SnMP を用いて HO-1 を阻害すると、この効果は消失した。ED1 陽性マクロファージ数は NSAIDs 投与により減少していたが、SnMP 投与を同時に行った場合には、その効果がなくなり、コントロールと同程度のマクロファージの集積が認められた。

眼内容液の検討では SnMP の投与により VEGF の上昇がみられた。

眼内血管新生が NSAIDs 点眼により抑制されるという報告は過去に幾つかあり、NSAIDs の抗炎症作用により網膜 VEGF の発現が抑制されることその機序とされている。今回我々の実験においても、NSAIDs 点眼により眼内容液中の VEGF の低下がみられており、これらの報告と一致していた。一方 ARPE-19 細胞、ラット CNV モデル双方で NSAIDs による Nrf2 の活性化とその下流の抗酸化タンパク質 HO-1 の誘導が確認された。ラットモデルではこれに伴い CNV サイズが縮小し ED1 陽性マクロファージ浸潤も減少していた。NSAIDs によるこれらの効果は HO-1 阻害剤 (SnMP) の追加投与によりなくなり、血管新生抑制における NSAIDs の作用の一部に HO-1 等の抗酸化タンパク質が関連している可能性が示唆された。

病変部におけるマクロファージ数



## IV. 手術技術の改善

### 1) 小切開硝子体手術の有用性

①Duty cycle 39%、Cutting Rate 2500のカッター、②Duty cycle 52%、Cutting Rate 5000の

カッター (Cycles/Minute) の2種類の 25ゲージ硝子体カッター (Alcon社) を使用して合計60眼の増殖膜を有する疾患に対する増殖膜除去を行ったところ、①の器具において2眼で医原性裂孔、1眼で網膜出血を認めたが、②の器具においては全眼で医原性裂孔および網膜出血は見られなかった。また、増殖膜切除が前眼において可能であった。全眼で増殖膜切除が可能であった。器具の剛性についてはシャフト長32mmの鉗子が示したしなり量と比較して、シャフト長27mmでは約半分のしなりを示した。さらにシャフト長27mmにスリーブをつけると約4分の1までしなりが軽減された。

兎眼を用いた動物実験では25ゲージ群において術後1日、3日におけるタンパク濃度が20ゲージ、23ゲージ群と比較して有意に低かった ( $p < 0.001$ )。また25ゲージ群において術中灌流量が有意に少なかった。

小切開硝子体技術は近年向上が目覚ましく、小口径のカッターであっても有効な硝子体処理能力を有しており、また、シャフトの脆弱性も改善されて来ている。特に、ROPに見られる増殖組織は硝子体基底部に接着する前の硝子体線維構築する可能性が強く、これを早期に除去することが重要である。MIVSの最大の欠点は20ゲージ硝子体手術と比較すると器具の剛性が低く、硝子体切除や膜切除などの術中操作が効率よくできないという点であった。したがってROPにおいて活動性の高い増殖組織の剥離操作が困難になることも懸念される。

ROPに対する小切開硝子体手術手技の応用により、その治療成績は向上すると予想される。近年の高精度の器具の開発により、ROPの早期手術はより安全性の高いものに変革してゆくであろう。今回の検討により、小切開硝子体手術の低侵襲性、剛性を高めた道具の使用による操作性ならびに安全性の向上が示された。ROPは網膜の血管病態、VEGFの関与など成人とは全く異なる眼内環境であるが、MIVSは有効な治療手段になり得ると考えられる。しかし、今回の我々の検討は成人眼ならびに動物を対象とした結果から導きだされたものであり、今後は重症ROPに対する症例を重ねながら慎重に有効性を検討していく必要があると思われる。

### 2) 硝子体手術に有用な手術補助剤の開発

我々の開発した硝子体手術の際に有用な手術補助剤のBBGは、網膜内境界膜に対して良好な染色性を有しており、現在オフラベルで用いられているインドシアニングリーン(ICG)の安全面での欠点を克服可能な有用な手術補助剤である。すでにライセンスを終え、2009年オランダのDORC社

によりEU圏で製品化された。現在同剤の日本国内への導入を図るべく、日本医師会治験促進センターの支援をうけ、厚生労働科学研究・治験推進研究事業による医師主導治験の準備を進めている。

#### 製剤化されたBBGと同剤使用による内境界膜染色/剥離



### 3) 硝

#### 体染色剤による無菌性眼内炎

2009年から2011年までの間に、合計21件の、無菌性眼内炎の発生があった。適応症例は、加齢黄斑変性、糖尿病黄斑症、網膜静脈閉塞症などすべてにわたっており、特に関連の有る疾患はなかった。男女差、年齢による傾向は認められなかった。

臨床的に、TA投与後24時間以内に発生した。臨床症状は痛みを伴わない前房および硝子体の炎症であった。視力障害は様々であったが、20例は発症前視力の維持あるいは改善が可能であった。1例で視力低下がおこったが、これは無菌性眼内炎のためではなく原疾患の影響によるものと考えられた。2009年9月からTA液から保存剤をフィルターで除去しているが、その後の発生率は低下した。

比較的特徴的なことは、以前に眼内注射あるいは、白内障や硝子体手術などの眼内手術を受けた既往のある患者が多かったことである。

採取された前房液において、滲出細胞はその99%が成熟好中球であった。TA顆粒あるいはリンパ球が少数認められた。

前房内のサイトカインは、IL-6とIL-8が有意に高かった。他のサイトカインの上昇は見られなかった。

培養細胞においては、IL-6とIL-8の濃度が、TAと直接接触して培養することで明らかに上昇した。フィルターにより直接接触を阻害すると、その変化は消失した。同様な変化は、11-DCにおいてもみられ、直接接触させると、IL-6とIL-8濃度が上昇したが、接触させないとその変化は見られ

なかった。この変化は、ARPE19とB3細胞では明らかであったが、R28細胞では見られなかった

LPSを添加すると同様にIL-6とIL-8の濃度が上昇した。

眼内にTAを投与する治療法は、網膜疾患治療法として、広く世界に定着した方法であり、一定の効果が認められている。ただし、白内障などの有害事象を惹起することがあるとされている。その中の一つに、無菌性眼内炎を惹起することがあることが知られるようになった。

この原因としては、まずTAに含まれる添加剤の影響が考えられる。TAの添加剤には、ベンジルアルコールなどの物質がありそれが関連している可能性はある。ただし、ベンジルアルコール自体が、明らかに細胞毒性を持つことはない。今回の一連の症例で、添加剤をフィルタリングで除くことで、無菌性眼内炎発生率が低下したことは、添加剤が無菌性眼内炎の発症に影響した可能性を示唆した。

ただし、添加剤が無菌性眼内炎の唯一の原因であれば、添加剤を除くことで無菌性眼内炎の発症は消失するはずであるが、添加剤を除いたTAを用いても、無菌性眼内炎の発症はみとめられた。そこで、新たな可能性を調べるために、TA顆粒による物理的的刺激が炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を調べた。その結果、TA顆粒と接触させて培養すると、培養液中に炎症性サイトカインIL-6やIL-8濃度が増加した。この作用は、TAと同じ顆粒状物質であるが、ステロイド作用のない11-DCでも見られた。このことから、この作用はTAのもつステロイド活性によるものではなく、物理的作用によることが示唆された。

IL-8は、好中球浸潤を誘導する強力なサイトカインである。そのため、前房液中の浸潤細胞のほとんどが好中球であったことは、臨床症状と一致する。

上記の作用は、網膜色素上皮細胞で最も顕著に見られたが、実際の眼内注射で顆粒状物質が網膜色素上皮細胞に付着する可能性は極めて小さい。しかし、水晶体上皮細胞であれば、直接付着する可能性がある。特に眼内手術既往眼や硝子体注射既往眼に好発したことは、この理論に合致する。

なお、TA顆粒自体は、眼内投与後に急速に崩壊してゆく。また、ステロイド自体が強力な炎症抑制作用を持つ。そのため、炎症は短期間で消退し、視力予後も良好であった。

#### 4) 硝子体術後のフィブリン消去

In Vitro 実験：超音波照射により、試験管内のフィブリンはただちに溶解した。D-dimerは超音波照射により有意に増加していた。

In Vivo 実験：無治療コントロール群では、平均フ

ィブリン量は  $1.4 \pm 0.21$  であった。tPA 結膜下注入群の平均フィブリン量は  $1.2 \pm 0.19$ 、一方超音波照射群は  $0.75 \pm 0.13$ 、超音波照射+tPA 投与群は  $0.71 \pm 0.11$  であった。コントロール vs 超音波照射;  $P < 0.05$ 、コントロール vs 超音波照射+tPA;  $P < 0.01$ 。超音波照射後の表面温度は、以下の条件下で  $34^\circ\text{C}$  であった: frequency of 1.0 MHz, intensity of 1.0 W/cm<sup>2</sup>, ISPPA of 0.156 W/cm<sup>2</sup>, duty cycle of 100%, pulse repetition frequency of 20 Hz, 5 分間。組織学的検索では、角膜、眼内組織全てにおいて有意な変化は見られなかった。

硝子体手術後炎症は、術後経過を左右する重要な因子である。特に炎症が強くなりフィブリン膜が形成されると、炎症が遷延するのみならず、そこを足場として増殖組織が形成されて、治療が成功しない。未熟児を含む若年者は一般的に術後炎症が強くなり術後フィブリン形成は重要問題である。このフィブリン膜除去のために、眼内に直接薬物注射する方法があるが、眼内注射は侵襲が大きいため汎用され得ない。未熟児や幼年者のように治療協力が得られない場合、施行は不可能ともいえる。

外表超音波照射による血栓溶解法は、体表から超音波を照射して、その機械エネルギーにより血栓を溶解する方法である。同法は、被治療者が苦痛を感じることなく施行可能な方法であり、近年大きな注目を集めている。主に脳血栓の治療に応用研究が進んでいるが、本法を眼科領域に応用した研究はない。本法が臨床応用されれば、未熟児のみならず、認知症患者などの治療にも大きな効果が期待できる。

そこで本研究では、本法を眼内フィブリン治療に応用する基礎研究を行うことを目的とした。未熟児や幼年者では、外科的侵襲後の組織反応が強いことが知られている。眼組織でもこのことは例外でなく、未熟児網膜症治療に用いられている網膜光凝固術、硝子体手術後の炎症は強い。

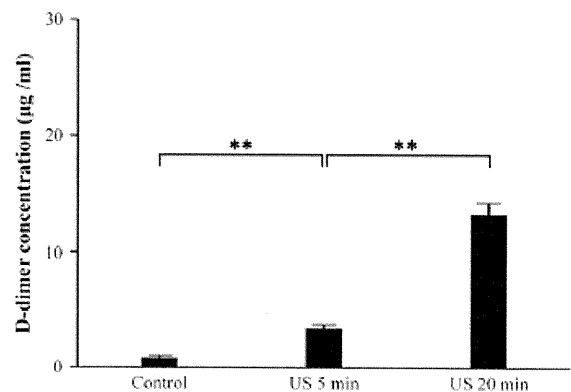
その結果、眼内にフィブリンが析出して、治療成績を不十分なものにしてしている可能性がある。そこでそのフィブリンを非侵襲的方法で消去するために、超音波を用いる方法を考案し基礎研究を行った。その結果、in vitro、in vivo とともに tPA と同等以上の効果が確認された。特に tPA と併用すると、効果は著しく増大した。つまり、超音波照射治療は、眼内フィブリン除去に十分な効果が期待できると言える。

臨床応用の問題点として、超音波照射に特徴的な問題がある。最大のものは、超音波照射による局所温度の上昇である。そこで、実験で用いた最大の強さをラット眼に 5 分間照射したが、最高温

度は  $34^\circ\text{C}$  であり、十分に臨床応用可能なものであった。一方、深部組織の影響を形態学的に解析したが、その結果においても明らかな有害事象は認められなかった。

以上から、本法は臨床応用するのに十分な有効性、安全性を持つ方法であると考えられる。今後は臨床応用の安全性を確立すべく、大型動物あるいは人における応用法を探っていく予定である。

#### 超音波照射後の D-dimer 量の変化



## V. 予後評価の検査

### 1) 視覚の早期評価

正常乳幼児 10 名 (年齢 6 カ月~3 歳) で撮影を試みた。全例で瞳孔の撮影が可能であった。対光反射を撮影すると同時に、撮影した全例から眼底からの反射や角膜反射の撮影と観察が可能だった。

これまでの乳児の視力評価方法としては、VEP や PL 視力検査が行われてきたが、いずれも特殊な装置を必要とし、検査時間が長くかかったり、検査のための鎮静が必要だったりする。そこで、簡便に乳児の視力を評価する方法の開発を行うことを目的とした。近年の家庭用ビデオ撮影装置は、暗室でも撮影が十分可能であることから、瞳孔の撮影および観察に十分に対応可能である。離れたところからのビデオ撮影は、乳児を泣かすことなく可能であることから、他の眼科検査に先だって行うことにより、有用な情報を得る可能性がある。

特に、瞳孔からの反射 (red reflex)、角膜反射を確認することで、眼位および中間透光体の観察までが可能である。今後、瞳孔の大きさや縮瞳の程度を解析することによって、新生児期の重篤な視力障害の早期発見に利用できる可能性がある。

### 2) 眼圧測定における手持ち眼圧計の有用性

アイケア手持ち眼圧計を用いた場合 160 人 (88.9%) の小児で眼圧測定が可能であったが、NCT では 130 人 (72.2%) ( $P < 0.001$ ) であった。6 歳以下ではアイケア手持ち眼圧計のほうが有

意に NCT に比べ眼圧測定可能であったが、7 歳以上では両機器の間に差を認めなかった。アイケア手持ち眼圧計と NCT の平均眼圧差は 右眼で  $0.90 \pm 6.40$  mmHg、左眼で  $1.18 \pm 6.19$  mmHg であった。

ROP は重症な視力障害をきたすが、その治療方法は徐々に進歩している。早期の硝子体手術によって重症 ROP に対する治療が行われ、しばしば日常生活に不自由のない視力が得られるようになった場合、次に視力評価方法が重要となってくる。多数の施設で未熟児 網膜症手術が行われるようになった場合には、より簡便に視力が評価できる方法を開発していくことが必要である。そこで、非接触式眼圧計 (non-contact tonometer: NCT) とアイケア手持ち 眼圧計の小児の眼圧測定における有用性について検討した。

NCT は角膜に空気を噴射させて眼圧を測定するが、小児ではその刺激を嫌う場合がある。それに対し、アイケア手持ち眼圧計は何も感じないうちに眼圧測定が終わることから、今回の結果になったのではないかと考えられる。

#### アイケアと NCT の眼圧測定可能率

	アイケア測定可	NCT測定	P 値
3歳以下	34 (79)	13 (30)	<0.001
4~6歳	56 (86)	46 (71)	0.025
7~9歳	24 (96)	25 (100)	>0.99
10~12歳	37 (97)	37 (97)	>0.99
13~15歳	9 (100)	9 (100)	>0.99
全体	160 (89)	130 (72)	<0.001

### 3) 無侵襲の網膜酸素 飽和度測定装置の開発 <分光イメージング装置の開発>

血中のヘモグロビンが酸素の結合状態によって吸光度が異なる点と変化しない点が存在することを利用して、干渉フィルタ 2 枚(545nm:  $\pm 3.7$ nm, 560nm:  $\pm 4.3$ nm)と眼底カメラ (TOPCON 社)内臓のフラッシュランプを用いて眼底の 2 波長同時撮影装置の開発を行った。545nm はヘモグロビンと酸素の結合状態によらず等しい吸収を有しており、560nm では吸収率が結合状態に依存する。各波長で撮影した眼底画像では、視神経乳頭から延びる静脈と動脈が撮影されていることがわかる。

#### <血中酸素飽和度計測ソフトウェアの開発>

血中酸素飽和度は吸光度の異なる 2 波長の光学密度比 (ODR) に比例するため、分光イメージング装置で得られた画像から血管部の反射強度を測定し、各波長での光学密度(OD)から算出できる。しかし、眼球という生体での計測では光路上の組

織や眼球表面の曲面形状の影響を容易に計測出来ないという点、眼底のメラニン色素なども反射強度に寄与することから、これらの影響を除去しなければ血管内部のヘモグロビンによる反射強度を得ることが出来ない。そこで次の仮定を考える。

- ・ 眼底の表面形状による入射光強度の変化は、血管よりも十分に大きなスケールである。
- ・ 眼底のメラニン色素はほぼ一様で、変動は血管よりも十分に大きなスケールである。
- ・ 眼底表面の血管の反射光強度は、入射光のメラニン色素による減衰とヘモグロビンによる減衰の積に比例する。この仮定では、血中ヘモグロビンによる光学密度はメラニン色素により減衰された光を入射光と仮定し、これと反射光との比率と考えることが出来る。メラニン色素および表面形状の影響は血管よりも十分に大きいとの仮定から、血管上の仮定される入射光は、周囲の血管外の反射光とほぼ等しいと考えることが出来る。そこで分光画像からモフォロジーによる closing 演算の結果を入射光強度  $I_0$  と仮定し、光学密度比を計算した。Closing 演算で得られたそれぞれの波長の  $I_0$  を、OD、Fig.5 に ODR、閾値を 0.77 とした場合の動静脈の分類結果で、動脈、静脈を分類した。

ROP は、網膜血管が未熟な段階で出生した患児が、比較的高濃度の酸素状況に置かれることによって眼内に新生血管や増殖性変化が生じる網膜疾患である。ROP の治療としては、無血管領域に対するレーザー光凝固や手術 (バックリング手術あるいは硝子体手術) が行われる。しかしながら、治療が奏功したとしても患児は様々な程度の視機能障害を残すことが多い。このような ROP の症例の網膜機能、特に治療後の網膜 中心部 (黄斑部) の層別機能の状態についてはこれまでほとんど知られていない。我々の開発した現行機では眼底像からの分光分析で動静脈の分離が可能となった。今後機器の改良を進めると同時に、倫理委員会申請後疾患眼への応用も念頭に研究を進め、本研究の可能性を検討する。

プロトタイプ機器での網膜動静脈の判別や臨床症例への応用を行ってきたが、取得される眼底写真の解像度に問題があり、新たに新型機を開発し、引き続き臨床症例において網膜の酸素飽和度の低下している領域のより詳細な描出にも成功した。網膜の動静脈の識別が可能であることに加え、人為的に呼吸停止を行った際の、末梢の酸素飽和度 (耳介) と網膜動脈の酸素飽和度に相関があるかについて検討を行い、両者に相関が認められ、同時に網膜動脈の酸素飽和度の低下している状態の描出にも成功した。さらに倫理委員会申請