

論 文 要 旨

Sonothrombolysis for intraocular fibrin formation in an animal model

眼内フィブリン動物モデルにおける
超音波照射による血栓溶解促進効果

山下 敏史

【序論および目的】

糖尿病網膜症や網膜動脈閉塞症のような眼血管疾患は、血管炎や血管内血栓が関与しており眼内のフィブリン・血栓は、様々な眼疾患の原因の一つである。

最近、超音波 (US) による血栓溶解促進治療が注目されており、いくつかの臨床領域での応用が研究されているが、眼球への応用についての報告はない。

今回、眼内フィブリンに対する、眼外からの超音波照射による溶解促進効果を研究した。

【材料および方法】

本研究において、超音波照射装置には Sonitoron 2000 (Richmar 社) を使用し、照射条件として、6mm 又は 3mm の非焦点式プローブ、High 又は Low intensity mode、5.2% 又は 100% Duty cycle、5 分又は 20 分の照射時間の元で実験を行った。

in vitro: 試験管内で自然凝固させたヒト血液塊(2ml)を対象に、下記①～②の条件で超音波照射を行い、2 時間後の D-ダイマー値を測定することにより、フィブリン溶解を定量、比較した。

- ① 6mm プローブ、high intensity mode、5.2% Duty cycle、照射時間:5 分 又は 20 分、照射 20 分後の試験管内温度測定も同時に行った。
- ② 6mm プローブ、high intensity mode、5.2% Duty cycle、照射時間:5 分の条件下にて US 照射のみ、組織プラスミノゲン・アクチベータ (tPA) 添加+US 照射、tPA 添加のみ、およびコントロール群に分け各群を比較した。

in vivo: 動物実験に先駆け、各条件での実測超音波強度を計測し、FDA (Food and Drug Administration of the United States Department of Health and Human Services) の掲げる診断的超音波の安全強度基準と比較した。眼内フィブリン動物モデルとして、ラット眼の虹彩に Nd:YAG レーザーを照射し出血を惹起させ、前房フィブリンモデルを作成した。それらを対象眼とし、US 照射のみ、tPA 結膜下注射のみ、US 照射+tPA 結膜下注射、およびコントロール群に分類の上、安全基準を満たす条件 (3mm プローブ、high intensity mode、5.2% Duty cycle) にて 5 分間の超音波を照射した。

前房中の出血・フィブリン塊の量をスコア化し、各群を比較した。また、超音波照射時の眼表面温度を赤外線サーモグラフィにて測定するとともに、組織学的な検討も行った。

【結果】

in vitro : ① D-ダイマー値は US 照射群において有意に上昇($P < 0.01$)し、5 分照射より 20 分照射の方が著明に上昇($P < 0.01$)した。本条件では、20 分照射後に試験管内の温度上昇は見られなかった。

② D-ダイマー値は tPA 添加群、US 照射群において、有意に上昇($P < 0.05$)し、さらに、tPA 添加+US 照射群では著明に上昇($P < 0.01$)した。

in vivo : US 照射のみ群と US+tPA 結膜下注射群では、有意にフィブリンスコアが低下 ($P < 0.05$ vs control、 $P < 0.01$ vs control) した。眼表面温度は 36°C よりも低く、組織学的な障害は観察されなかった。

【結論及び考察】

血栓やフィブリンに超音波照射を行うと、溶解促進効果があるという多数の報告があり、本研究でも同様の結果が得られた。そのメカニズムとしては、キャビテーション効果により、血栓の微細構造を変化させ、薬物の浸透性を高めると考えられているが、不明の点も多く、議論が残されていると共に、今後更なる検討が必要である。

超音波血栓溶解療法は、急性心筋梗塞や脳梗塞などの血管閉塞性疾患における新しい治療法として、既に、臨床応用が研究されている。

超音波の眼球への応用として、遺伝子導入法、緑内障や眼内腫瘍に対する有効性の報告があるが、超音波血栓溶解療法の眼球への応用についての報告はまだない。

一方、過度の超音波照射は、組織にダメージを与えることが知られており、治療的超音波を考える上での懸念材料である。

本研究により、安全域内の超音波を眼外から照射することのより、前房のフィブリン溶解を促進させること可能である事が示された。この結果は、フィブリン形成に関連した眼疾患に対し、超音波血栓溶解法が、治療的価値のあるという事を示す根拠となる。

論文審査の要旨

報告番号	総研第100号		学位申請者	山下 敏史
審査委員	主査	金蔵 拓郎	学位	博士 (医学)
	副査	有田 和徳	副査	丸山 征郎
	副査	黒野 祐一	副査	中尾 久美子

Sonothrombolysis for intraocular fibrin formation in an animal model

(眼内フィブリン動物モデルにおける超音波照射による血栓溶解効果)

近年、低エネルギー超音波によるキャビテーション（気泡発生作用）を利用した超音波療法が注目されており薬物送達、遺伝子導入や血栓溶解療法などへ応用されている。中でも、超音波血栓溶解療法は、心筋梗塞や脳梗塞への治療として既に欧米では臨床応用が開始されている。

眼科領域においても、眼内の血栓・フィブリンは、様々な疾患の原因の一つであるが、超音波血栓溶解の眼球・眼疾患への応用についての報告は、動物実験も含めて存在しない。そこで学位申請者らは、眼内フィブリン動物モデルに対する超音波血栓溶解効果を検討した。in vitro の実験では、ヒト新鮮血血栓に対する超音波血栓溶解効果について、in vivo の実験では、眼内出血・フィブリンモデルを作成して角膜上から超音波を照射し、血栓溶解促進効果について検討した。同時に、血栓溶解剤併用時の溶解促進効果や安全性についても検討した。

結果、以下のような知見が明らかにされた。

- 1) ヒト新鮮血血栓に対する、超音波血栓溶解促進効果、tPA の薬物作用増強作用
- 2) 眼外から照射した超音波が、眼球内に十分に作用していること
- 3) 眼内フィブリン動物モデルにおいて、超音波は血栓溶解促進作用があること
- 4) 至適条件下では、明らかな障害性がないこと

超音波照射により血栓溶解は有意に促進され、明らかな障害性は認めなかった。メカニズムについての更なる検討や副次的な影響についての更なる追及が必要ではあるが、安全域内の低強度の超音波により、眼内の血栓・フィブリン溶解が促進される事が示された。この結果は、フィブリン形成に関連した眼疾患に対し、超音波血栓溶解法が治療法となる可能性を示唆するものである。

本研究は超音波血栓溶解法の眼球への応用を検討した研究である。安全性、障害性についても多方面からの検討を行っており、低強度の超音波により血栓溶解促進効果あることを示した。眼科領域では初の報告であり、大変興味深い。将来的な臨床応用に向けては更なる検討が必要であるが、その基礎になるべく有意義な研究と言える。

よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 100 号	学位申請者	山下 敏史
審査委員	主査	金蔵 拓郎	学位 博士 (医学)
	副査	有田 和徳	副査 丸山 征郎
	副査	黒野 祐一	副査 中尾 久美子
<p>主査および副査の 5 名は、平成 22 年 3 月 4 日、学位申請者 山下 敏史 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問 1 今回使用した超音波プローブは、何を目的として作られた装置なのか。 (回答) 超音波遺伝子導入装置として市販されている、実験用機器である。</p> <p>質問 2 in vitro の実験の際、血栓の入った試験管の外側からの超音波照射ではなく、プローブを試験管内に挿入し内側から照射したのであれば、試験管内の超音波が増強されてしまったのではないか。 (回答) ケイ酸ガラス製の試験管を用い、試験管内から超音波を照射したため、作用が増強された。in vivo の条件とは異なる大きな超音波強度となったと考えられる。in vitro では、既知の報告よりも著明な血栓溶解促進効果が示された原因の一つだと考えられる。</p> <p>質問 3 Nd:YAG レーザーで眼内出血モデルを作成しているが、耳鼻科領域ではこのレーザーを凝固目的に使用する。この操作により、出血と同時に組織の凝固変性が生じることはないのか。 (回答) 眼内出血モデルの作成については、末梢血液を前房内に注入する方法も行ったが、手技的な問題（ラットの眼球が小さい）や再現性を考慮した上、過去の報告を参照にして、Nd:YAG レーザーを用いた。レーザー光の作用は、用いる媒体や波長によって、様々である。本研究では、緑内障治療法の一つであるレーザー虹彩切開術をそのまま利用し、前房出血を惹起させた眼球を眼内出血モデルとした。切開部位の虹彩に凝固変性は少なからず生じていると思うが、研究目的に対する影響はないと考えられる。</p> <p>質問 4 レーザー照射翌日に超音波照射を行ったと記されているが、凝固は時間単位で進むため、もっと厳格にする必要があったのではないか。また 48 時間後など、もう少し時間が経過した場合も効果はあるのか。 (回答) 実際には個体により 7~8 時間の差があった。コントロール群でも示される通り、生体の反応としての自然溶解があるため、指摘のようにもう少し厳格にすべきであった。また、例え時間が経過した場合でも、血栓やフィブリンが存在していれば、効果はあると考えられる。</p> <p>質問 5 Day3 に眼内所見を観察しているが、評価を超音波照射 48 時間後にした根拠は何か。また、超音波照射による長期的な障害発生や、複数回照射による障害は懸念されないのか。 (回答) 予備実験の段階で、数時間後から約 1 週間後まで観察を行い、超音波照射 2 日目の差が明確であったため、48 時間後に設定した。本研究では 3 日目での結果を元に、明らかな組織障害はなかったとしたが、長期的に何らかの組織障害がおこる可能性はあり、複数回照射による障害の可能性も否定はできない。</p> <p>質問 6 血栓溶解剤として、モンテプララーゼ（クリアクター）を選んだ理由は何か。in vivo の実験では、tPA の有無により有意差がなかったが、アルテプララーゼを使用したり、より高濃度の tPA を使用したり、結膜下注射後にしばらく時間をおいてから超音波を照射することにより、溶解促進効果が得られたのではないか。</p>			

最終試験の結果の要旨

(回答) 眼科臨床の中で、網膜下血腫移動術の際にモンテプラーゼの硝子体注入が実施されているということもあり、モンテプラーゼを使用し、また濃度も臨床での硝子体内注入量に準じた。眼内移行という問題にもっと留意していれば、tPA 結膜下注射の有無による有意差が得られた可能性が高い。

質問 7 統計学的解析を paired t-test で行っているが、3 群以上の群間で比較しているの、他の手法で解析した方がよかったのではないか。

(回答) 実際には、多群間の検定法なども行って見たが、結果に大差はなかった。今回においては、超音波照射の有無、tPA の有無による差を明確にしたいという目的の元、paired t-test を用いた。

質問 8 Fig3 で control と tPA alone、tPA alone と US alone には有意差はなかったのか。 そうであれば、US alone でもかなりの効果が示され、臨床応用を考えたときに、US alone でも十分なのではないか。

(回答) control と tPA alone には有意差はなく、tPA alone と US alone には有意差があった（公開審査時のスライドでは示したが、論文中では表記なし）。本結果では、tPA 結膜下注射の効果はほとんどなく、超音波単独で効果が高いと言えるが、結膜下注射による薬物の眼内移行という問題点もあり、本結果のみで臨床応用にまで言及することはできない。また、最近のトピックとしては、超音波作用を増強させる薬剤や標的指向性を備えた特殊製剤の併用による、低侵襲と高効率な超音波療法が模索されている。

質問 9 脳梗塞に対する超音波血栓溶解治療の際、発振する超音波の焦点（指向性）や骨による効力の変化が問題となるが、眼球への照射を考えた際はどうか。

(回答) 今回は非焦点性の超音波を用いたが、ターゲティングという事は大きな課題である。眼球に超音波を照射した際、眼窩壁で超音波が反射する事により、その作用が増強（又は減衰）する事は十分に考えられる。

質問 10 考察に網膜動脈閉塞を想定した治療法であることが記されているが、このモデルは動脈閉塞モデルとは明らかに異なる。動脈閉塞では血管病変も伴うことから、超音波による副損傷を誘発の可能性はないのか。

(回答) 論文中では治療候補と表現 (RAO is good candidate) している。本研究のモデルは動脈閉塞症とは病態が大きく異なる。現状では、網膜血管閉塞モデルというものが全く確立されていないことが理由の一つでもある。本研究は、あくまでも眼内の出血・フィブリンモデルに対する有用性を検討し、過去に報告のない、超音波血栓溶解法の眼球への応用について示した報告である。

質問 11 超音波照射は血管内皮細胞、結膜から tPA を放出させると予想されるがその実験はやらなかったのか。

(回答) tPA は主に血管内皮細胞にて産生され、眼組織では、結膜、線維柱帯や網膜でも産生されることが知られている。超音波により、眼内でも tPA の放出が起こるといことが予想され、検討すべき内容であった。

質問 12 脳梗塞で tPA を使うとプラスミンが産生され、anoikis detachment cell death を起こすと報告されている。これにはプラスミン刺激によるマトリックスメタロプロテナーゼ (MMP) の活性化やアップレギュレーションも関係するといわれているが、このような副作用の可能性はないか。

(回答) MMP は炎症性疾患や脳梗塞の亜急性期にも過剰になることがわかっている。細胞障害を助長する MMP は、プラスミンにより活性化するため、tPA 治療の二次的障害と言える。眼球への応用を考えた際にもこのような副作用が考えられ、十分な配慮が必要である。

質問 13 超音波は VEGF を産生、放出活性するという報告があるが、検討はしなかったのか。

(回答) 治療候補と考える対象眼疾患の中には、VEGF が病因に大きく関与しているものがある。眼球への超音波により VEGF が産生されれば、それは悪影響として働いてしまう。今後検討しなければならない項目である。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士（医学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。