

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫 : 建立小鼠專用眼底動態影像評估系統並用以分析藏紅 *
* 名稱 : 花素(crocin)之眼底視網膜保護功效 *
* ***** *

執行計畫學生： 王炳勳

學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-038-B

研究期間： 104年07月01日至105年02月28日止，計8個月

指導教授： 陳伯易

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學視光學系

中華民國

105年02月03日

建立小鼠專用眼底動態影像評估系統並用以分析藏紅花素(crocin)之眼底視網膜保護功效

壹、摘要：

眼底(Fundus)可以藉由非侵入性檢查，直接觀察眼底視網膜組織與血管型態的眼生理評估指標。在眼科臨床醫學上常藉由眼底影像分析觀察視網膜的色澤、血管型態、黃斑部顏色、以及視神經盤形狀、顏色、凹陷情況來判斷眼睛的健康程度與判斷是否有病變。另外，許多慢性且全身性的健康照護初期判斷，例如高血壓、糖尿病、血管硬化等等，也都可以藉由眼底觀察得知相關病理的變化。眼底血管攝影在眼科醫學依照視網膜需觀察的組織深度基本可以分成兩大種(1)Fluorescein Angiography (FAG)、(2)Indocyanine Green (ICG)。皆是透過靜脈注射螢光染劑來觀察眼底的血流與血液分布狀況，普遍用於眼科醫療體系中。在跨領域整合之眼球疾病動物實驗，我們實驗室已驗證市售球形發光二極體(Light-Emitting Diode, LED)照明系統在長時間曝照之下(正常照度)，會造成小鼠視力明顯下降、瞳孔縮放變慢等視覺功能退化異常情況。並以此小鼠模式導入眼用保健藥物分子開發。本研究規劃利用藏紅花素(crocin)，一種存在於藏紅花中的水溶性類胡蘿蔔素來進行眼底視網膜問題的預防與治療的嘗試性試驗。目前實驗室已建立一系列視覺功能生理測量及評估標準，用以確認藏紅花素(crocin)的護眼保健功效，然而缺乏一套實用的小鼠眼底影像系統能跟其他數據進行相關性統合分析。本計畫的目標為建立一種小鼠眼底動態攝影與影像系統評估，並將系統適當化，用以觀察小鼠活體動態眼底的視網膜退化與視網膜血管病變發展過程，並驗證藏紅花素的預防與治療之效用。本計畫所建立之小鼠眼底攝影與影像系統評估模式，有別於現在的眼用高階儀器，此新建立的系統具有開創性與實用性，並有商品化的潛力，可延伸發展作為眼用健康素材、食品、藥品之功效評估與驗證，助於相關醫藥生技產業的創新。

關鍵字：小鼠眼底攝影系統、護眼保健素材驗證、小鼠動物模式、藏紅花素

貳、研究動機與研究問題：

一. 研究動機

於目前指導教授實驗室之藏紅花素(crocin)在眼球預防保健與治療的相關研究項目中，在眼球系統的外觀觀察與定量標準方面，已經建立起完善的生理視覺功能性評估與分析指標，也能配合組織切片染色技術做進一步的相關聯性討論。但是在整體追蹤與組織型態跟病理學上的考量而言，我們總覺得缺少了一種活體動態追蹤與分析的能力，而在這面向的指標中，又以視網膜眼底的組織型態這個指標最能與視力或是視覺功能之退化作相關性討論。尤其在本次藏紅花素實驗的過程中，考量到我們把藏紅花素的預防與治療目標針對實驗小鼠的眼底視網膜部分，但是在現今的技術與設備下，卻只能透過間接的視覺生理觀察與犧牲後的組織切片分析來驗證藏紅花素的預防與治療功效，對於實驗的設計與動向而言都是不確定的因素，故冀望能藉由本次藏紅花素的實驗中，以一個輔助性的角色建立小鼠專用眼底影像評估系統。

在這方面，市面上的小鼠模式眼底攝影設備並非不常見，且分析系統尚未最佳適當化。普遍有著高單價、操作不便、成像品質與效果差強人意等問題。在實用性與性能價位比的考量上，仍是小鼠動物模式眼底攝影系統普遍性不高的主要原因。在這次大專生計畫中，我們分析討論了數篇參考資料，試圖在前人的挑戰與思維中提出創新與改良，並且結合身為視光學系之物理光學、幾何光學、鏡片光學與眼球生理光學之專長，配合適當的成本與市面上既有的器材設備來設計這組小鼠動物模式眼底攝影系統。期望能在藏紅花素對於眼底視網膜與視覺功能之預防與治療效果實驗中達成活體追蹤、定量定向、影像呈現、以最小的成本達到最高的實用度與接受度等挑戰。

二. 研究方向

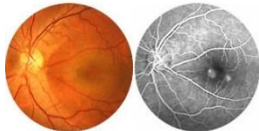
- (1) 建立清晰、重複性高的影像呈現系統
- (2) 活體小鼠眼底追蹤實行之困難與障礙
- (3) 建立完整的眼底組織結構型態評估與分級系統
- (4) 眼底攝影系統之材料取得與改造

叁、文獻回顧與探討：

一. 醫學眼科眼底攝影與功能的探討

(1) Fluorescein Angiography (FAG)

1. 需於手臂注射少量螢光劑
2. 可觀察視網膜色素上皮(RPE)之血管分布與血管型態

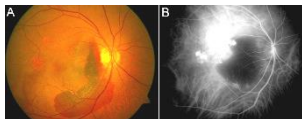


圖片摘自 Angioletti Retina Associates

Diagnostic Fluorescein Angiogram

(2) Indocyanine Green (ICG)

1. 需於手臂注射少量螢光劑：循血綠
2. 釋放的波長比 FAG 長，可以觀察更深層的脈絡膜血管



圖片摘自 Molecular Vision

Li, Mol Vis 2010; 16:231-239. Figure 1

二. 小鼠眼底系統設置之瓶頸與解決項目

- (1) 小鼠需散瞳，散瞳後小鼠晶體會逐漸霧化
- (2) 如何清晰的把內視鏡的影像對焦到照相機 (小鼠眼球小，水晶體大約佔眼球 2/3)
- (3) 客觀、合理的事後分析與定量系統的建構

三. 先前的相關研究探討

在先前的研究中，我們可以發現大多數的小鼠用眼底攝影系統都是建立在獨立或是新設計的零件上，並使用特定的顯微鏡設備或是 CCD 晶片作為影像擷取端的媒介。然而在深入了解這方面的研究後，我們發現少數研究中也出現了利用市面上的數位相機與管道內視鏡作為主要素材來嘗試拍攝小鼠眼底，但是其限制性與較差的成像品質也讓我們感到備受限制，所以在本次的大專生研究計畫中，我們主要考量是在本次實驗室主要的藏紅花對於眼底視網膜的預防保健效果中建立專用的小鼠眼底影像評估系統，所以在成本與成效的考量上，我們選擇以市售的單眼相機配合轉接環與管道內視鏡來改良與擴展其功能。期望能在先前利用同樣組合取得初步成果的研究中，初步達成能觀察到清晰、彩色的眼底與建立實用的評估分類方式，在進一步開發與改良更多附加功能，例如眼底螢光攝影與脂核素(lipofuscin)之觀察與定量等。

肆、研究方法與步驟：

一. 實驗材料：

(1) 市售單眼數位相機：

市售的微型單眼數位相機，目前指導教授實驗室有一組單眼數位相機結合解剖顯微鏡照相系統，我們打算以本相機為影像系統擷取端，拍攝下小鼠實驗模式中的眼底色澤與型態。考量到市售相機的維修跟鏡頭擴充較容易，加上手邊現有的資源，所以選定該相機作為本次計畫中眼底攝影系統的攝影端器材。就長遠觀點而言，市面上任何廠牌與形式的相機在搭配適當的鏡頭與對焦輔助鏡片後，應該都能對應到本計畫中的小鼠專用眼底影像評估系統，故其適性與設備彈性皆能達到相當高的接受度。



(2) 內視鏡 (0 度、4mm X 175mm)：

工業規格的內視鏡(Endoscope)，一般也稱為管道內視鏡，工業上用在檢察機械儀器孔洞或是管道內的機械結構或是異物等等。在本小鼠專用眼底攝影計畫中，我們考量了人眼用的眼底鏡與眼底



攝影系統之構造，定位出了必須具備的項目，如：同軸光源、可加入輔助鏡片改變焦距、輕便、可改變光源特性(不同波長濾片)、方便手持與觀察等。經過一系列的資料蒐集與討論，最後發現工業用的管道內視鏡符合大多數的需求，價格接受度也較高。另外，醫療規格的內視鏡也符合本計畫之需求，但考量到成本與計畫先導實驗的規格，最終選定在符合預算的前提下能發揮最高功能的工業規格管道內視鏡。

(3) 10W 光源把手：

本光源把手為上文提到的工業規格管道內視鏡之配套器材，其構造為一個內裝可重複充電式 18650 充電電池之握把，結合一個 10 W 的 LED 光源燈頭。考量到之後裝載系統後的方便性與機動性，本系統也可透過接上光纖導管與內視鏡結合，或是在輔助照明用的蛇燈燈箱上接上光纖導管與內視鏡接合，有非常多的配合方式與組合方式可以嘗試出最適合本計畫小鼠眼底攝影系統的配套方式，端看於使用者本身的設備條件或是用途習慣等等。

(4) 轉接環 (內視鏡轉接至相機)：

本轉接環為一將內視鏡接到單眼數位相機鏡頭的轉接系統，目前規劃以多個市售的相機轉接環組合來達成這個目的。單眼數位相機的鏡頭口徑規格為 52mm，而內視鏡的目鏡端口徑約為 30.5mm。目前打算以 52mm 轉 42mm 的轉接頭加上 42mm 轉 31mm 的轉接環來完成這個需求。並在轉接環系統中加入一組幫助聚焦用的鏡片，而這部分也使目前系統實用與成像效果最為重要的一環。

二. 動物實驗方法：

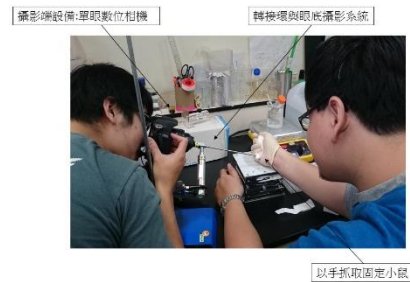
將實驗小鼠以低劑量之麻醉劑及散瞳劑使小鼠穩定下來，並等待散瞳時間，這邊要注意的是小鼠散瞳後，經過一段時間水晶體將會霧化，霧化後須等待數小時不等的時間再次恢復清澈的水晶體，所以拍照手續要快。接下來，把眼底攝影系統的接物端，也就是工業規格內視鏡的鏡頭貼近小鼠的眼睛表面，在瞳孔的位置並且跟角膜表面呈現垂直的角度，前後移動系統聚焦並拍照。將拍照取得的影像上傳至電腦，繼續進一步的分析與評估，並做同一隻小鼠前後對照的比較。



三. 動物實驗流程：

- (1) 將小鼠施以麻醉
- (2) 把散瞳劑滴入麻醉後的小鼠眼睛表面，並拭去多餘的散瞳劑
- (3) 等待並確認小鼠散瞳
- (4) 將小鼠固定，視情況(躁動或體型等)決定，安置在可調整高度的台座或是抓在手上

- (5) 把眼底攝影系統對準小鼠瞳孔的位置，以垂直角度接近並準備拍攝
- (6) 手動調整焦距取得最清晰的成像並拍照
- (7) 上傳影像到電腦分析與討論



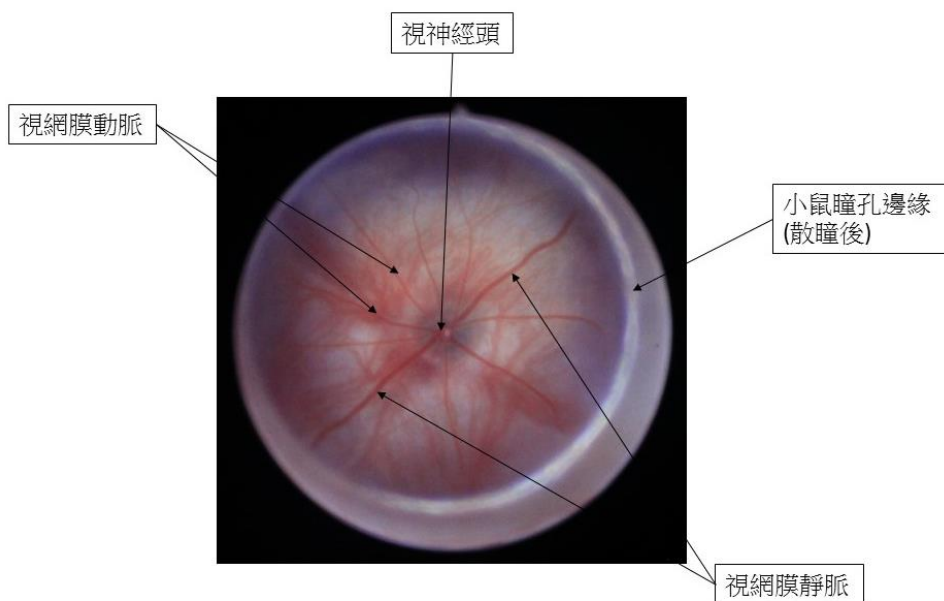
四. 數據的彙整與判讀：

目前主要以對照圖來作為影像的呈現方式:

把小鼠用的眼底攝影系統的圖片作連續性的排列，用來進一步呈現小鼠動物模式實驗以來，在一定間隔的拍攝周期的中產生的變化與趨勢。藉以分析之後實驗的走向與達到更進一步的追蹤實驗動物眼底生理狀況之指標。

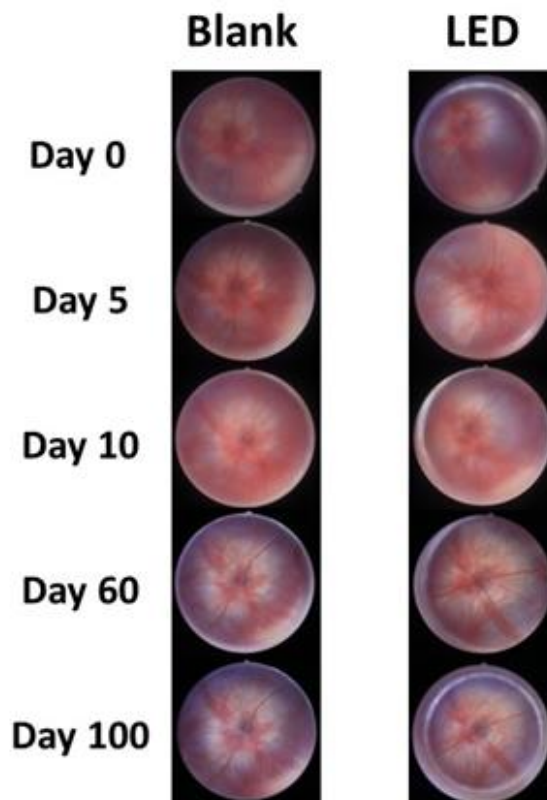
伍、實驗結果與討論：

首先，我們簡單的來說明一下目前小鼠專用眼底動態影像評估系統所得到的照片各部位。



我們可以看到在以 LED 為光源的一般可見光的白光照射下，取得的影像能夠清楚的分辨血管的粗細與分層，且能夠以視神經頭的位置作為中心定位的參考點，進行相片的旋轉與疊圖比較各部位血管之差異。在這樣的解析條件下，也能分辨出一些色素沉澱或是暗斑的形成，進而達到更廣泛的眼底視網膜動態追蹤效果。在這樣的條件下，也能達到減少小鼠犧牲數量與動態評估實驗成效的能力。

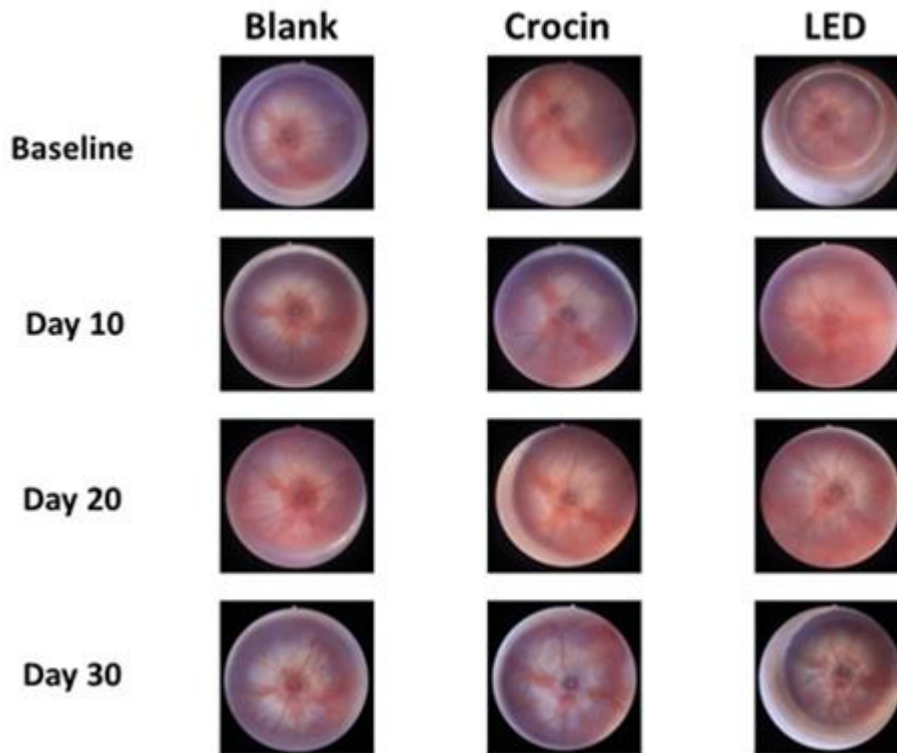
接下來為兩組實驗的結果呈現，分別是用來驗證小鼠專用眼底影像動態評估系統的成效的先遣實驗，與加入特定劑量的藏紅花素來做為預防與治療效果驗證的動物實驗模式中，以眼底影像動態評估系統取得的影像作為比較與實驗成效分析。



一、實驗結果

本實驗結果的分析，單就傷害組與空白組來做比較，在實驗後取得的影像對照圖來說，我們可以發現在實驗期間，每天照射 LED(600-1000lux)光源 8 小時並沒有加以保護的小鼠眼底，陸續出現一些不規則狀的血管型態變化與色斑。照射 100 天之後，出現了一些眼底動靜脈血管窄化的趨勢，可能為眼底視網膜血管退化與不健康的指標。而對照組的正常小鼠眼底，則是在實驗過程的這 100 天中並沒有明顯的變化或是異常。另一方面，在實驗進行的期間，我們持續修正此眼底動態影像評估系統與操作技術，將眼底影像的品質提升至最大化。這次的小鼠專用眼底動態影像評估系統也約在實驗開始的 60 天後，因有效的計算與校正鏡片與鏡頭的聚焦得到更好的影像品質，使系統的實用度與參考價值大幅提升。

二、藏紅花素實驗結果比照圖



在這 30 天的實驗中，我們可以發現空白對照組與餵食藏紅花素的兩組小鼠眼底形態並沒有太大的變化，而每天照射 8 小時 LED 的組別也在 20 天到 30 天這段期間陸續出現一些色素斑或是眼底視網膜動靜脈窄化的趨勢，與的先前的實驗有類似的結果。在服用藏紅花素的部分，配合實驗室的視覺功能評估系統與組織切片，我們可以建立一套更完整的小鼠專用視覺生理與功能性評估系統。將更明確與先進的動物實驗方法普及在更多需要驗證的視覺保健或是醫療相關議題上面。

陸、小鼠專用眼底動態影像評估系統的展望：

小鼠專用眼底影像評估系統應用與開發的附加功能

目前，小鼠專用眼底影像評估系統已經能有效的擷取活體小鼠的眼底攝影影像。在配合適當的照明光源與接收濾鏡以及末端影像接收處理系統的情況下，我們也能把常用在人體的眼底血管螢光造影技術運用在這樣有效率的眼底影像評估系統中。透過不同的螢光顯影劑與影像接收端配合來分析不同分層的血管血液灌流狀態與分佈。也能在一般可見光光源下，利用能夠靈活更換的濾鏡來改變相機接收影像的波長，進而達到強化某些特定特徵的效果，例如利用短波長，如綠色、藍色濾鏡來過濾影像，藉此提高眼底視網膜血管的可分辨度與對比度，都能讓系統更加成熟與廣泛應用。以建立完整的眼底生理與血液灌流評估的系統並實用化。

透過嘗試使用帶通性濾鏡(band-pass filter)與特定的照明光源組合，現在小鼠專用眼底影像動態評估系統正在往血管螢光造影的方向努力中，我們也透過與學校附設醫院眼科醫師的合作中，去尋求一些關於血管螢光造影的靈感與經驗。以求建立一套完整的動態影像評估系統，不僅僅用在固定週期對小鼠的眼底進行追蹤，也能在血管螢光造影的功能下，達到了解小鼠眼底血管血液灌流狀態與分佈、是否有滲漏與阻塞的現象……等等。並與實驗室既有的小鼠視覺功能評估系統作進一步的整合與探討小鼠眼底生理與功能性的關係。

七、系統的獨特性與實用價值：

在其他小鼠用的眼底攝影系統中，普遍存在著價位偏高，導致從事相關視覺保健以及眼底視網膜相關實驗驗證的團隊很多，但是眼底影像的評估卻不能普及；操作與維護不易，往往需要相當的人力物力才能取得影像，而設備維護又是另一筆開銷與人力資源的消耗；影像畫質，較差導致後續判讀有所困難且品質標準不一；功能單一，若想要嘗試新的照相方式需要額外的高昂費用已採購相似構造的設備，差別僅僅在於一些附加的元件交換。這都是我們目前在市面上其他的動物模式眼底攝影系統所發現與遭遇的問題。

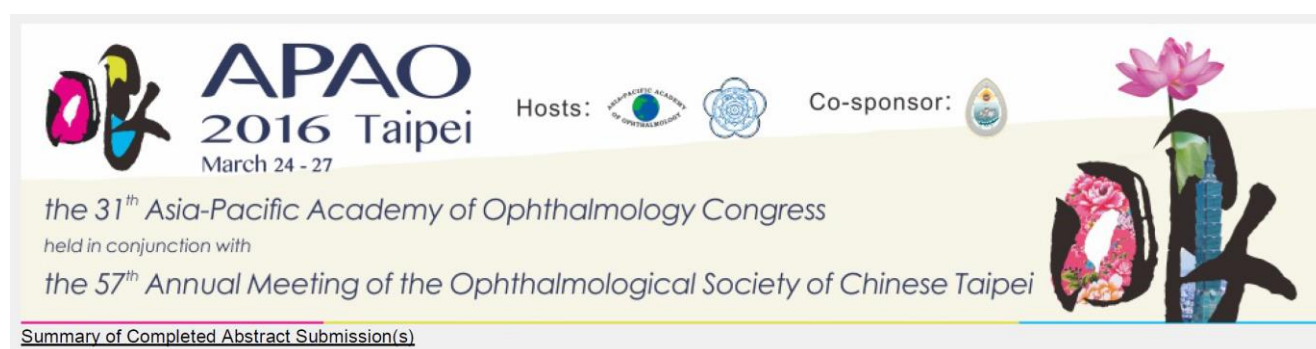
而在我們的小鼠專用眼底動態影像評估系統中，我們的核心部件為高度模組化的系統，可以輕鬆的利用不同的鏡頭轉接環或是套筒配合各個實驗單位的需求，更換其末端影像接收的照相設備，從一般接收可見光譜的各類型數位相機到能接收特殊波長的特殊相機或是電子眼，只要透過轉接環跟套筒的配合都能輕鬆上手。光源部分，也可靈活轉換不同用途的光源做為照明輔助，利用一般常見的氬氣、LED等等可見光照明波段，能夠接收可見光源下的眼底方便辨識色斑與判斷顏色。如果有需要的話，也能夠過限定波長的雷射或是帶通濾光片配合廣域光源達到限制特定波長的照明進入眼底的效果，進而能完成眼底血管螢光造影、眼底脂褐素自體螢光反應……等等特殊的徵兆的觀察。而系統平實的成本與操作的便利性更是一大特色，能提供給需要做快速篩選與檢驗的實驗團隊利用較少的人力與成本達到篩檢的效果，也能讓需要精確眼底影像分析的實驗單位透過設備等級提升與附加模組，例如：眼底血管螢光造影系統……等，進而提高實驗的成效與末端驗證的方式。


捌、參考文獻：




- Fundus Autofluorescence in the Abca4^{-/-} mouse Model of Stargardt Disease—Correlation With Accumulation of A2E, Retinal Function, and Histology**
Peter Charbel Issa, Alun R. Barnard, Mandeep S. Singh, Emma Carter, Zhichun Jiang, Roxana A. Radu, Ulrich Schraermeyer, and Robert E. MacLaren
- 小鼠眼底鏡之設計 Design of Mice Fundus Scope 國立陽明大學醫學工程研究所碩士論文**
研究生:徐明君 Ming-Chun Hsu 指導教授:張寅 Ying Chang Ph.D
- Panretinal, High-Resolution Color Photography of the Mouse Fundus**
Michel Paques, Jean-Laurent Guyomard, Manuel Simonutti, Michel J. Roux, Serge Picaud, Jean-Francois LeGargasson, and Jose´-Alain Sahel
- Imaging retinal blotch laser speckle flowmetry**
Anja I. Srienc, Zeb L. Kurth-Nelson and Eric A. Newman
- Mouse fundus photography and angiography: A catalogue of normal and mutant phenotypes**
Norman L. Hawes, Richard S. Smith, Bo Chang, Muriel Davisson, John R. Heckenlively, Simon W. M. John
- Quantitative Fundus Autofluorescence in Mice: Correlation With HPLC Quantitation of RPE Lipofuscin and Measurement of Retina Outer Nuclear Layer Thickness**
Janet R. Sparrow, Anna Blonska, Erin Flynn, Tobias Duncker, Jonathan P. Greenberg, Roberta Secondi, Keiko Ueda, and Francois C. Delori
- A new procedure for fundus photography and fluorescein angiography in small laboratory animal eyes.**
DiLoreto D Jr, Grover DA, del Cerro C, del Cerro M.
- Optimization of In Vivo Confocal Autofluorescence Imaging of the Ocular Fundus in Mice and Its Application to Models of Human Retinal Degeneration**
Peter Charbel Issa, Mandeep S. Singh, Daniel M. Lipinski, Ngaihang V. Chong, Francois C. Delori, Alun R. Barnard, and Robert E. MacLaren
- Light Damage in Abca4 and Rpe65^{rd12} Mice**
Li Wu, Keiko Ueda, Taka Nagasaki, and Janet R. Sparrow
- Mouse fundus photography and angiography Optic disc imaging in conscious rats and mice.**
Hawes NL, Smith RS, Chang B, et al. Cohan BE, Pearch AC, Jokelainen PT, Bohr DF.
- Monochromatic ophthalmoscopy and fundus photography**
Delori FC, Gragoudas ES, Francisco R, Pruett RC.
- A schematic eye for the mouse, and comparisons with the rat.**
Remtulla S, Hallett PE.
- Toward a miniaturized fundus camera.**
Gliss C, Parel JM, Flynn JT, Pratisto H, Niederer P.
- Functional magnetic resonance imaging of the retina. Invest.**
Duong, T. Q., Ngan, S. C., Ugurbil, K., and Kim, S. G. (2002).
- Noncontact, two-dimensional measurement of retinal microcirculation using laser speckle phenomenon. Invest.**
Tamaki, Y., Araie, M., Kawamoto, E., Eguchi, S., and Fujii, H. (1994).
- Real-time measurement of human optic nerve head and choroid circulation, using the laser speckle phenomenon.**

Tamaki, Y., Araie, M., Tomita, K., Nagahara, M., Tomidokoro, A., and Fujii, H. (1997a).

八、相關研究具體的成果：




APAO
 2016 Taipei
 March 24 - 27

Hosts:  
 Co-sponsor: 

the 31th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress
 held in conjunction with
 the 57th Annual Meeting of the Ophthalmological Society of Chinese Taipei

Summary of Completed Abstract Submission(s)

Ref ID: SP-000434	
Final Acceptance: Poster	
Title	Ginkgo biloba leaf extracts prevents against UVB-induced vision loss and anterior segment inflammation of the eye
Author(s)	<div style="border: 1px solid red; display: inline-block; padding: 2px;">Bo-Yie Chen</div> Chien-Yun Wu Yun-Shan Tsai <div style="border: 1px solid red; display: inline-block; padding: 2px;">Ping-Hsun Wang</div> 王炳勳 Yun-Ping Huang
Abstract	<p>Purpose: UV radiation (UVR) exposure is a risk factor for ocular inflammatory problem. The aim of this study was to investigate the effect of UVR on various histo-physiological parameters related to inflammation and oxidative stress in the anterior segment of eye obtained from female mice, and the influence of administration of Ginkgo biloba leaf extracts (GK; EGb761) on these animals. Methods: Mice were divided into 5 groups: (1) a blank control group (no exposure to UV radiation), (2) a UVB group, (3) a UVB/GK low dose treatment group, (3) a UVB/GK medium dose treatment group, and (4) a UVB/GK high dose treatment group. We investigated the UVB-induced changes in visual acuity (VA) and visual contrast sensitivity (CS). Tissue sections were prepared and histologically stained to evaluate the structural integrity of the cornea and inflammatory damage. The change of inflammatory factors in the cornea were also determined by bead-based ELISA assays. Results: The UVB exposure mice resulted in substantial inflammatory cells infiltration in the anterior segment of eyes, including corneal stroma, corneal limbus, and anterior chamber. Dosing with GK protected anterior eye against inflammatory damage, and protects the visual function against declining</p> <p>of VA and CS. The levels of and inflammatory factors in the cornea were decreased following treated with GK than in untreated mice. Conclusions: The GK is beneficial and protective against UVR-induced corneal inflammation and against its related declining of VA and CS. It is worthy of consideration for a human clinical trial against inflammation of anterior segment of eyes.</p>
Presentation Preference	Poster
Subspecialty	Visual Sciences
Keywords	Ginkgo biloba leaf extracts, Corneal inflammation, Visual acuity, Visual contrast sensitivity, UVB