

プラスミンを用いた化学的硝子体切除の開発

著者	大路 正人
発行年	2006-12
その他の言語のタイトル	Development of chemical vitrectomy with plasminogen
URL	http://hdl.handle.net/10422/6433

プラスミンを用いた化学的硝子体切除の開発

15591855

平成15年度～平成17年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成18年12月

研究代表者 大路正人
滋賀医科大学医学部教授

プラスミンを用いた化学的硝子体切除の開発

15591855

平成15年度～平成17年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成18年12月

研究代表者 大路正人

滋賀医科大学医学部教授

滋賀医科大学附属図書館



2005016387

<はしがき>

プラスミンによる化学的硝子体切除の可能性を検討した。化学的硝子体手術に用いるプラスミンは感染などの危険性を考慮した際には自己血液から精製したプラスミンを用いるのが望ましい。本研究では、人血液から高純度のプラスミンを効率よく精製する方法を確立することを第1の目的とした。さらにプラスミンによる化学的硝子体切除の有効性と安全性を動物実験を通じて検討することを第2の目的とした。本研究を通じて、これらの目的を達成することができたので報告する。

研究組織

研究代表者：大路 正人（滋賀医科大学医学部 教授）

研究分担者：田野 保雄（大阪大学大学院医学系研究科 教授）

研究分担者：瓶井 資弘（大阪大学大学院医学系研究科 助教授）

研究分担者：生野 恭司（大阪大学大学院医学系研究科 助手）

研究分担者：坂口 裕和（大阪大学大学院医学系研究科 助手）

交付決定額（配分額）

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	1,200,000	0	1,200,000
平成16年度	1,100,000	0	1,100,000
平成17年度	1,100,000	0	1,100,000
総計	3,400,000	0	3,400,000

研究発表

(1) 学会誌等

1. Ohji M, Sakaguchi H, Tano Y. Forceps with scale marks for the transconjunctival sutureless vitrectomy system. *Retina* 2006;26(5):583-585..
2. Sakaguchi H, Ohji M, Kamei M, Ikuno Y, Fukushima Y, Gomi F, Oshima Y, Kusaka S, Tano Y. Radial optic neurotomy for the management of hemicentral retinal vein occlusion: Long-Term Follow-Up Study. *Retina* 2006;26(5):555-561.
3. Oshima Y, Ohji M, Tano Y. Surgical outcomes of 25-gauge transconjunctival vitrectomy combined with cataract surgery for vitreoretinal diseases. *Ann Acad Med Singapore* 2006 ;35(3):175-180.
4. Sawa M, Ohji M, Kusaka S, Sakaguchi H, Gomi F, Saito Y, Tano Y. Nonvitrectomizing vitreous surgery for epiretinal membrane long-term follow-up. *Ophthalmology*. 2005 Aug;112(8):1402-8
5. Sakaguchi H, Ohji M, Gomi F, Sawa M, Oshima Y, Ikuno Y, Kamei M, Tano Y. New micro vertical scissors for the surgical ablation of retinal angiomatous proliferation. *Am J Ophthalmol*. 2005;139(2):377-80.
6. Sakaguchi H, Ikuno Y, Choi JS, Ohji M, Tano T. Multiple components of epiretinal tissues detected by triamcinolone and indocyanine green in macular hole and retinal detachment as a result of high myopia. *Am J Ophthalmol*. 2004;138(6):1079-1081.
7. Kamei M, Tano Y, Yasuhara T, Ohji M, Lewis H. Macular translocation with chorioscleral outfolding: 2-year results. *Am J Ophthalmol*. 2004;138:574-581.
8. Oyagi T, Fujikado T, Hosohata J, Ohji M, Kamei M, Bessho K, Tano Y. Foveal sensitivity and fixation stability before and after macular translocation with 360-degree retinotomy. *Retina*. 2004 Aug;24(4):548-55.
9. Cekic O, Morimoto T, Ohji M, Sawa M, Hasegawa T, Sakaguchi H, Ikuno Y, Gomi F, Kamei M, Tano Y. Nonplasmic transfer of indocyanine green into the optic nerve after intravitreal application. *Retina*. 2004 Jun;24(3):412-415.
10. Fang X, Hayashi A, Morimoto T, Usui S, Cekic O, Fujioka S, Hayashi N, Fujikado T, Ohji M, Tano Y. Retinal changes after macular translocation with 360-Degree retinotomy in monkey eyes. *Am J Ophthalmol*. 2004 Jun;137(6):1034-41.
11. Ohji M, Tano Y.: Vitreoretinal surgery with slit-lamp illumination combined with a wide-angle-viewing contact lens. *Am J Ophthalmol*. 2004

May;137(5):955-6.

12. Cekic O, Ohji M, Keserci B, Sawa M, Zheng Y, Hayashi A, Ikuno Y, Nakata K, Gomi F, Tano Y. Evaluation of choroidal perfusion of the new central macular area by dilution analysis of indocyanine green angiography after macular translocation. *Retina*. 2004 Apr;24(2):210-214.
13. Cekic O, Bilgin K, Ohji M, Sawa M, Ikuno Y, Gomi F, Hayashi A, Fujikado T, Tano Y. Macular translocation surgery and retinal circulation times. *Retina* 2004;24(1):51-56.
14. Sato T, Fujikado T, Hosohata J, Ohji M, Tano Y. Development of bilateral, nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy in an eye with diabetic papillopathy. *Jpn J Ophthalmol*. 2004 Mar-Apr;48(2):158-62.
15. Nakata K, Ohji M, Ikuno Y, Kusaka S, Gomi F, Kamei M, Ross DF, Tano Y. Wide-angle viewing lens for vitrectomy. *Am J Ophthalmol*. 2004 Apr;137(4):760-2.
16. Kusaka S, Oshita T, Ohji M, Tano Y. Reduction of the toxic effect of indocyanine green on retinal pigment epithelium during macular hole surgery. *Retina*. 2003 Oct;23(5):733-734.
17. Sawa M, Chan WM, Ohji M, Imai K, Fujikado T, Tano Y, Schachat AP. Successful photodynamic therapy with verteporfin for recurrent choroidal neovascularization beneath the new fovea after macular translocation surgery with 360-degree retinotomy. *Am J Ophthalmol*. 2003 Sep;136(3):560-3.
18. Ikuno Y, Sayanagi K, Oshima T, Gomi F, Kusaka S, Kamei M, Ohji M, Fujikado T, Tano Y. Optical coherence tomographic findings of macular holes and retinal detachment after vitrectomy in highly myopic eyes. *Am J Ophthalmol*. 2003 Sep;136(3):477-81.
19. Cekic O, Ohji M, Zheng Y, Hayashi A, Kusaka S, Tano Y. Experimental study of viscoelastic in the prevention of corneal endothelial desiccation injury from vitreal fluid-air exchange. *Am J Ophthalmol* 2003;135(5):641-7
20. Sou R, Kusaka S, Ohji M, Gomi F, Ikuno Y, Tano Y. Optical coherence tomographic evaluation of a surgically treated traumatic macular hole secondary to Nd:YAG laser injury. *Am J Ophthalmol*. 2003 Apr;135(4):537-9.
21. Cekic O, Ohji M, Tano Y, Chang S. Continuous outflow devices for macular translocation with 360-degree retinotomy. *Am J Ophthalmol* 2003;135(2):241-3

22. Kubota A, Harino S, Ohji M, Tano Y. Modified technique to create retinal detachment during macular translocation surgery. *Am J Ophthalmol* 2003 Jan;135(1):105-6

(2) 口頭発表

1. Oshima U, Sakaguchi H, Gomi F, Kusaka S, Ohji M. 25-Gauge Vitrectomy vs. 20-Gauge Vitrectomy: Comparison of Surgical Outcomes Including the OR Efficiency in Epimacular Proliferation Annual meeting of American Academy of Ophthalmology, 2005/10/14-17
2. Oshima U, Gomi F, Sakaguchi H, Ikuno Y, Ohji M, Vitrectomy for Diffuse Diabetic Macular Edema: Comparison of ILM Peeling Alone vs. ILM Peeling With Intravitreal Triamcinolone Injection Annual meeting of American Academy of Ophthalmology, 2005/10/14-17
3. Kamei M, Matsumura N, Yasuhara T, Sakaguchi H, Oshima Y, Ikuno Y, Gomi F, Ohji M, Tano Y Limited macular translocation with radial outfolding of the sclera. The Annual meeting of American Academy of Ophthalmology. 2004.10.22-27
4. Sawa M, Ohji M, Saito Y, Kusaka S, Tano Y Long-term follow-up results after nonvitrectomizing vitreous surgery for epiretinal membrane. The Annual meeting of American Academy of Ophthalmology. 2004.10.22-27
5. Ikuno Y, Sakaguchi H, Oshima Y, Ohji M, Fujikado T, Tano Y Poor surgical results of vitrectomy for macular holes associated with foveoschisis in highly myopic eyes. The Annual meeting of American Academy of Ophthalmology. 2004.10.22-27
6. Matsumura N, Kamei M, Yasuhara T, Ohji M, Gomi F, Ikuno Y, Oshima Y, Sakaguchi H, Sawa M, Tano Y. Two-year results of limited macular translocation with diagonal choriocleral outfolding: factors in postoperative visual impairment. ARVO 2004.4.25-29
7. Ohji M., Okawa Y., Ikuno Y., Gomi F., Kamei M., Tano Y.. Residual Indocyanine Green at the fovea after Internal Limiting Membrane. American Academy of Ophthalmology. 2003.11.14-15
8. Kusaka S, Oshita T, Ohji M, Tano Y. Residual Indocyanine Green at the fovea after Internal Limiting Membrane. American Academy of Ophthalmology. 2003.11.14-15
9. Sayanagi K, Ikuno Y, Sawa M, Gomi F, Kamei M, Kusaka S, Ohji M, Tano Y. The effect of internal limiting membrane peeling during vitreous surgery for macular hole retinal detachment. ARVO 2003.5.4-8
10. Okawa Y, Ohji M, Nakata K, Hasegawa T, Sakaguchi H, Ikuno Y, Gomi F, Kamei M, Tano Y. Residual indocyanine green after internal limiting membrane peeling and its effect of visual acuity. ARVO 2003.5.4-8

11. Kusaka S, Makino R, Ohji M, Kamei M, Ikuno Y, Gomi F, Saito Y, Hayashi A, Tano Y. Long-term results of pars plana vitrectomy with or without removal of internal limiting membrane. ARVO 2003.5.4-8
12. Cekic O, Morimoto T, Ohji M, Sawa M, Hasegawa T, Sakaguchi H, Ikuno Y, Gomi F, Kamei M, Tano Y. Transfer of indocyanine green into the optic nerve after intravitreal application in the rabbit eye. ARVO 2003.5.4-8
13. 豊川智加、大島佑介、坂口裕和、生野恭司、五味文、瓶井資弘、日下俊次、田野保雄、大路正人 線維性血管膜を伴う増殖糖尿病網膜症に対する25ゲージ経結膜硝子体手術 第29回日本眼科手術学会 2006年1月27-29日
14. 高井美和、瓶井資弘、坂口裕和、大島佑介、生野恭司、五味文、日下俊次、田野保雄、大路正人 加齢黄斑変性以外の新生血管黄斑賞に対する強膜短縮黄斑移動術 第29回日本眼科手術学会 2006年1月27-29日
15. 生野恭司、佐柳香織、十河薫、沢美喜、五味文、坂口裕和、大島佑介、瓶井資弘、日下俊次、田野保雄、大路正人 強度近視に伴う中心窩分離に対する硝子体手術成績 日本網膜硝子体学会 2005年12月2-4日
16. 坂口裕和、大島佑介、生野恭司、瓶井資弘、日下俊次、大路正人、田野保雄 角膜切開白内障手術を併用した25ゲージ硝子体手術の手術成績 日本網膜硝子体学会 2005年12月2-4日
17. 大島佑介、田野保雄、大路正人 25ゲージ経結膜硝子体手術に用いるトロカール固定式無縫合レンズリングの試作 第59回日本臨床眼科学会 2005年10月7-10日
18. 大路正人、田野保雄 25ゲージ経結膜硝子体手術におけるトロカール設置用鑷子の試作 第43回日本網膜硝子体学会 2004年12月3-5日
19. 佐柳香織、生野恭司、坂口裕和、大島佑介、五味文、瓶井資弘、大路正人、田野保雄 硝子体手術後の残存網膜分離症に対する再手術 第27回日本眼科手術学会 2004年1月30日-2月1日
20. 松村永和、生野恭司、大島佑介、五味文、瓶井資弘、大路正人、田野保雄 黄斑円孔を伴う強度近視網膜分離症に対する硝子体手術 第27回日本眼科手術学会 2004年1月30日-2月1日
21. 佐柳香織、生野恭司、沢美喜、大島佑介、五味文、瓶井資弘、日下俊次、大路正人、田野保雄 黄斑円孔剥離術後の黄斑円孔再開 第42回日本網膜硝子体学会 2003年12月12-14日
22. 生野恭司、松村永和、佐柳香織、沢美喜、坂口裕和、大島佑介、五味文、瓶井資弘、大路正人、田野保雄 強度近視に伴う網膜分離症の術中硝子体所見 第42回日本網膜硝子体学会 2003年12月12-14日
23. 佐柳香織、生野恭司、大島佑介、瓶井資弘、日下俊次、大路正人、田野保雄 黄斑円孔網膜剥離における硝子体手術後の円孔拡大 第57回日本臨床眼科学

会 2003年10月31-11月3日

24. 大下貴志、牧野里砂、藤井清美、田中雅子、大路正人、田野保雄 黄斑円孔手術
における粘弾性物質を用いたICGからの黄斑保護 第57回日本臨床眼科
学会 2003年10月31-11月3日
25. チェキチ オスマン、森本壮、大路正人、生野恭司、五味文、瓶井資弘、江睿、田
野保雄 硝子体腔へ注入されたICGの視神経への移行 第107回日本眼
科学会総会 2003年4月17-20日
26. 牧野里砂、日下俊次、大路正人、瓶井資弘、生野恭司、五味文、斉藤喜博、林篤志、
田野保雄 糖尿病黄斑浮腫に対する硝子体手術の長期予後と内境界膜剥離の効
果 第107回日本眼科学会総会 2003年4月17-20日
27. 生野恭司、佐柳香織、沢美喜、五味文、瓶井資弘、大路正人、田野保雄 近視性
黄斑円孔網膜剥離に対する内境界膜剥離の意義 第107回日本眼科学会総
会 2003年4月17-20日

(3) 出版物

1. Saxena S, Holekamp NM, Ohji M, Thomas MA Ophthalmic Surgery: The Cutting Edge. Saxena S Eds, Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd. 2006
2. Sakaguchi H, Ohji M, Kamei M, Tano Y Optical Coherence Tomography in Retinal Diseases. Saxena S and Meredith TA Eds, Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd. 2005
3. Ohji M, Tano Y Myopia and related diseases. Midena E, Eds. 2005, p333-340.
4. Ohji M, Tano Y: Retina Ver 4, Ryan, Chang et al Eds. 2005, p2143-2146.
5. 大路正人 眼科マイクロサージェリー第5版. エルゼビア・ジャパン 2005
6. 坂口裕和、大路正人：黄斑疾患の病態理解と治療 眼科プラクティス Vol 2, p. 290-292。文光堂 2005
7. 坂口裕和、大路正人 黄斑部手術完全マスター 眼科インストラクションコース2
8. 大路正人 スタンダード顕微鏡手術 月刊眼科診療プラクティス Vol. 96 文光堂 2003

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

研究成果

1. ヒト血漿からのプラスミン精製

1. ヒト血漿からのプラスミンの精製

目的

ヒト血液からプラスミンを精製する。精製したプラスミンの活性を測定するとともに、精製度を2次元電気泳動を用いて検討する。

方法

1) プラスミン精製

採取した血液30mlから分離した血漿を plasmin affinity cartridge を通し、血漿中のプラスミノゲンを吸着させた。リン酸緩衝液で余剰な血液中の蛋白を洗浄した後に、イプシロンアミノカプロン酸 (AMICAR液) をカラムに通すことにより吸着しているプラスミノゲンを affinity cartridge から遊離させ、回収した。活性の高いプラスミノゲンを得るために、回収したプラスミノゲンをコンセンレーターカートリッジを通し、濃縮した。最終的に得られた高純度プラスミノゲンをストレプトキナーゼにより活性化し、活性プラスミンを得た。

2) 精製プラスミンの活性測定

精製したプラスミンの活性をリジンバッファーに溶解した基質 D-Val-Leu-Lys PNA を用いて分光吸光度計を用いて測定した。

3) 電気泳動

SDS-PAGE にて精製プラスミノゲンおよび市販プラスミノゲンの精製度を確認するとともに、分子量を計測し、精製を確認する。

結果

1) 精製プラスミンの活性

ヒト血液から精製された最終生成物は 3.75 U/ml のプラスミン活性を有していた。家兎血液を用いて同様の実験を行ったが、プラスミン活性はほとんど得られなかった。

今回の精製法で、患者血液から活性の高いプラスミンが簡便に精製されることが判明した。一方で家兎血液からは本法ではプラスミンは精製できないことが判明した。

2) 精製プラスミンの精製度

SDS-PAGE にて精製プラスミノゲン (図 1) の精製度を確認したところ、分子量 95,000

付近に強い 1 本のバンドが検出された。これはプラスミノゲンの分子量にほぼ一致していた。他には微弱なバンドが見られるのみで、高い精製度がえられていた。また、SDS-PAGEにて市販プラスミノゲン（図 2）の精製度を確認したところ、精製プラスミノゲンと同位置に 1 本のバンドが検出され、精製度は高度であった。同時に市販プラスミンも用いて、電気泳動を行ったところ、分子量 70,000 付近に高度の精製度をもった 1 本のバンドが検出され、これはプラスミンの分子量にほぼ一致していた。

結論

今回用いた affinity cartridge とコンセンレーターにより、十分な活性を持った純度の高いプラスミンが精製できることが判明した。

図1 精製したプラスミノーゲンの電気泳動SDS-PAGE

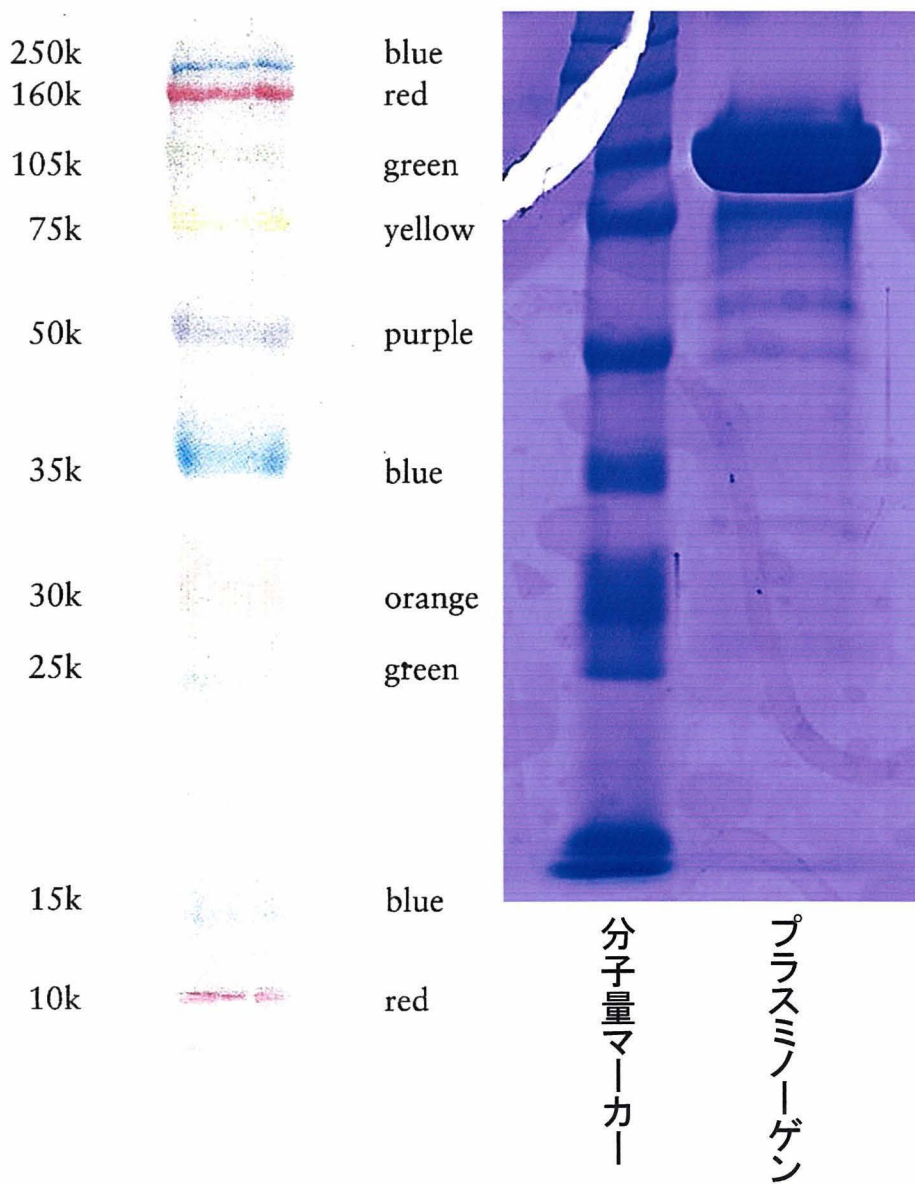
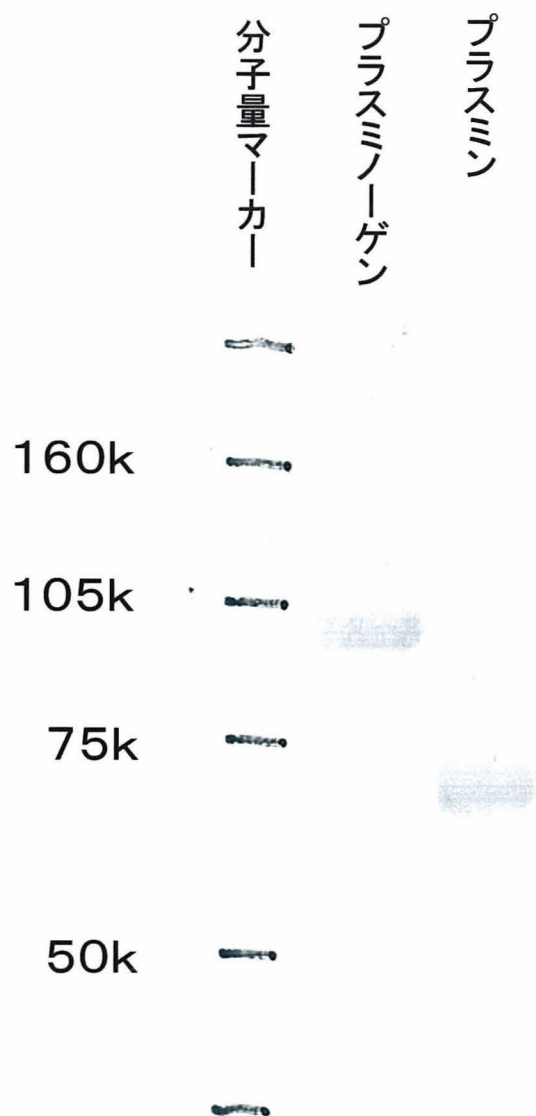


図2 市販プラスミノーゲンの電気泳動 SDS-PAGE



2. 家兎におけるプラスミンを用いた化学的硝子体切除の効果

目的

プラスミンの硝子体内投与による化学的硝子体切除の効果を家兎を用いて検討する。

方法

1) 対象実験動物

本研究には 2.0 から 2.5kg の白色家兎 6 羽を使用した。麻酔にはケタミンおよびザイラジン 7 : 3 混合液の筋肉注射を用いた。

2) プラスミン硝子体内投与

点眼麻酔後、硝子体内に毛様体扁平部より右眼に 4 U / 0.1ml (4 U 群) あるいは 1 U / 0.1ml (1 U 群) のプラスミン (Calbiochem) を注入し、左眼に対照として PBS / 0.1ml (対照群) を注入した。

3) 硝子体の変化の肉眼的観察

プラスミン注入 30 分後に過量のネブタールで安楽死させた後に摘出した眼球を毛様体扁平部で切離し、硝子体を肉眼的に観察した後に硝子体を採取した。

4) 硝子体サンプル調整

採取した硝子体を 6 時間以上かけて透析した。透析操作を 3 回繰り返した後、650nm の吸光度測定を行い、サンプルの蛋白濃度測定を計測し、全蛋白量 100 μ g のサンプルを採取する。

5) 2次元電気泳動

IPGphor に全蛋白量 100 μ g のサンプルをアプライし、PH3-10 の IPG ストリップを用いて、1次元電気泳動を行う。1次元電気泳動終了後、平衡化を行い、2次元電気泳動用ゲル上端に1次元ゲルを接着し、固定する。固定されたことを確認後、2次元電気泳動装置に設置し、電流 20mA で、2次元電気泳動を開始する。30 分間通電後、電流 40mA に上昇し、完了するまで維持する。通電完了後、ゲルを取りはずし、銀染色を行う。銀染色後、ゲルを洗浄し、結果を保存した。

6) 網膜表面硝子体の観察

眼球摘出後、グルタルアルデヒドにて固定後、視神経乳頭を含む 1 x 1 cm 切片を切り出した。切り出した切片は、グルタルアルデヒドおよび四酸化オスミウムにて二重固定した。

タンニンオスミウム法による導電染色、脱水、乾燥の工程を経て、オスミウムプラズマコーティングを施行した。

標本は走査型電子顕微鏡（S-800, Hitachi, Japan）を用いて観察した。

結果

1) 硝子体サンプルの肉眼的観察

硝子体サンプルを採取する際、摘出した眼球を *pars plana* で切離したところ、プラスミン注入眼はプラスミンをコントロール眼に比較し、顕著に硝子体の液化が進んでいた。

2) 硝子体サンプルの2次元電気泳動

2D-PAGEにて精製プラスミン硝子体注入眼（図3）およびコントロール眼（図4）の硝子体内における蛋白分布を比較したところ、精製プラスミン注入眼（図3）において、コントロール眼にみられない、スポット（long arrow）がみられ、このスポットはプラスミンあるいはその代謝産物によるものである可能性が示唆された。一方、コントロール眼（図4）では、精製プラスミン注入眼ではみられない多くのスポットがみられ、そのうちいくつかのスポット（short arrow）は精製プラスミン注入眼では顕著に減少していた。これらの蛋白は精製プラスミンにより、代謝分解されたものと推測された。

3) 網膜表面硝子体の観察

走査電顕による網膜表面の検討では、PBS注入の6眼全てに硝子体線維の付着を認めたが、1U群3眼中2眼および4U群3眼中2眼ではほとんど硝子体線維を認めなかった。（図5）

結論

硝子体内に投与された4Uのプラスミンにより網膜表面の硝子体線維はほとんど完全に消失し、硝子体内のタンパクも分解されることが判明した。

図3 硝子体内にプラスミンを投与された眼の硝子体の電気泳動2D-PAGE

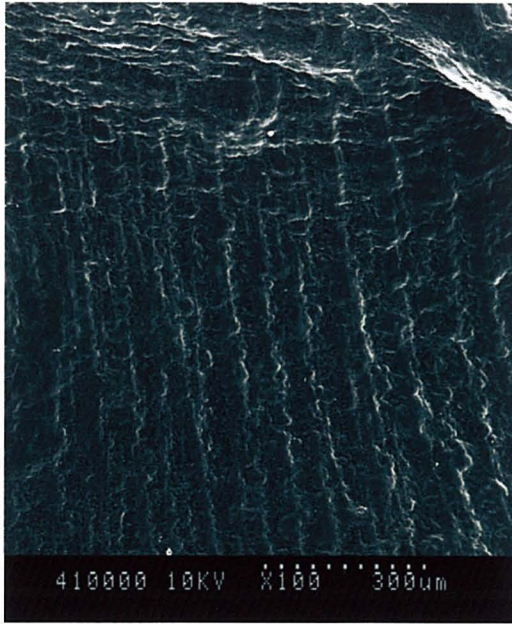


図4 コントロール眼の硝子体の電気泳動 2D-PAGE

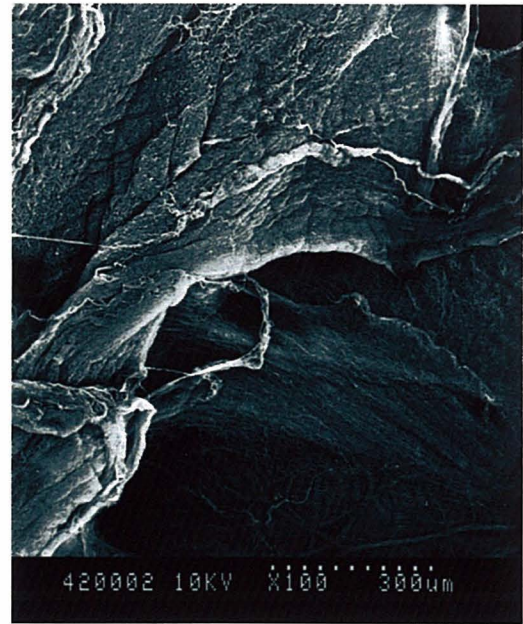


図5 プラスミン硝子体内注入後の網膜表面の走査電子顕微鏡による観察

プラスミン(4U)注入眼 弱拡大



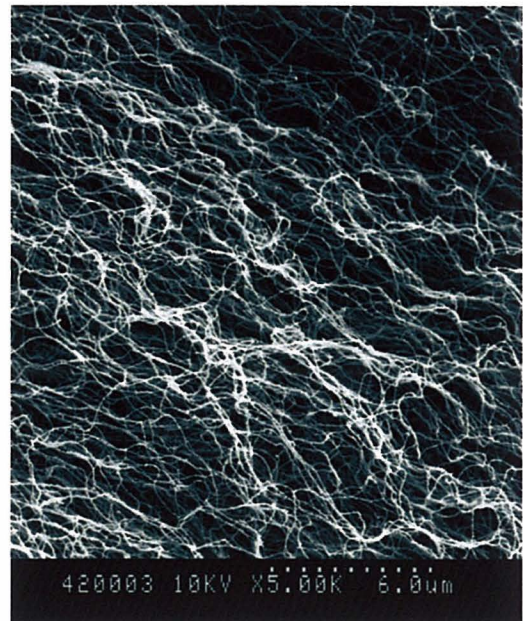
コントロール眼(PBS注入) 弱拡大



プラスミン(4U)注入眼 強拡大



コントロール眼(PBS注入) 強拡大



3. 家兎におけるプラスミンを用いた化学的硝子体切除の安全性に関する研究

目的

プラスミンの硝子体内投与による化学的硝子体切除の安全性を家兎を用いて検討する。

方法

1) 対象実験動物

本研究には2.0から2.5kgの白色家兎6羽を使用した。麻酔にはケタミンおよびザイラジン7:3混合液の筋肉注射を用いた。

2) プラスミン硝子体内投与

点眼麻酔後、硝子体内に毛様体扁平部より右眼に4U/0.1ml(4U群)あるいは1U/0.1ml(1U群)のプラスミン(Calbiochem)を注入し、左眼に対照としてPBS/0.1ml(対照群)を注入した。

3) 眼底および前眼部検査

プラスミン投与日は、網膜電図測定前に眼底および前眼部検査を施行した。プラスミン投与翌日には網膜電図検査後、それぞれに対して炎症、出血などの確認のため、眼底および前眼部検査を施行した。

4) 組織学的検査

プラスミンの硝子体内投与に伴う網膜変化の有無を検討する目的で、組織学的検査を施行した。網膜電図、眼底および前眼部検査後、ペントバルビタール5ml静脈内投与により、永眠させ、眼球摘出後、パラフォルムアルデヒドにより固定し、網膜より強膜にいたる層を含む組織を切り出し、パラフィン切片を作成した。HE染色後、光学顕微鏡にて観察した。

5) 網膜電図 ERG

網膜電図をプラスミンの硝子体内投与前、投与翌日に施行した:麻酔後、フェニレフリンおよびトロピカミドを点眼することにより両眼散瞳させ、そのまま15分暗順応させた。点眼麻酔後、ヒドロキシプロピルメチルセルロースを点入し、コンタクト型電極を片眼に装用した。散瞳点眼後のすべての行程は暗室において施行した。ERG用のライトは白色光を用い、エネルギーを1.2J(SLS-3100:Nihon Kohden, Tokyo, Japan)とし、光源は眼球表面から15cmとした(LS-704B:Nihon Kohden, Tokyo, Japan)。ERGの波形はコンピューター(Neuropack 2, MEB-7202, Nihon Kohden)に記録し、5回測定、加算平均し、分析した。同様に僚眼に対しても網膜電図を施行した。

結果

1) 眼底および前眼部検査

プラスミン投与前の眼底および前眼部検査では、前房に炎症を認めず、硝子体も清澄であった。プラスミン投与翌日においても、対照群では6眼全てで前房に炎症を認めず、硝子体内も清澄であった。1U群3眼中前房炎症を1眼に認めたが、硝子体混濁は認めなかった。4U群3眼中では前房炎症を全例に認め、硝子体混濁も全例に認めた。

2) 組織学的検査

HE染色ではいずれの標本にも網膜に異常を認めなかった。(図6)

3) 網膜電図 ERG

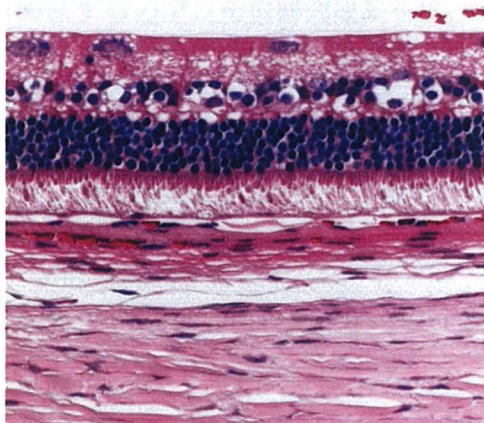
網膜電図の検討では、注入翌日のA波の潜時は4U群 $9.90 \pm 1.08\text{ms}$ 、1U群 $10.50 \pm 1.67\text{ms}$ 、対照群 $9.65 \pm 1.19\text{ms}$ で3群の間に差を認めなかった。注入翌日のB波の潜時は4U群 $35.00 \pm 4.33\text{ms}$ 、1U群 $29.20 \pm 5.28\text{ms}$ 、対照群 $26.65 \pm 4.61\text{ms}$ で4U群では対照群に比して優位に潜時が延長していた ($p=0.035$)。注入翌日のA波の振幅においては3群の間に優位な差を認めなかったが、B波の振幅においては4U群 $66.67 \pm 5.77\mu\text{V}$ 、1U群 $121.11 \pm 22.19\mu\text{V}$ 、対照群 $137.22 \pm 24.08\mu\text{V}$ で、4U群では対照群に比べ優位に低下していた ($p=0.002$)。

結論

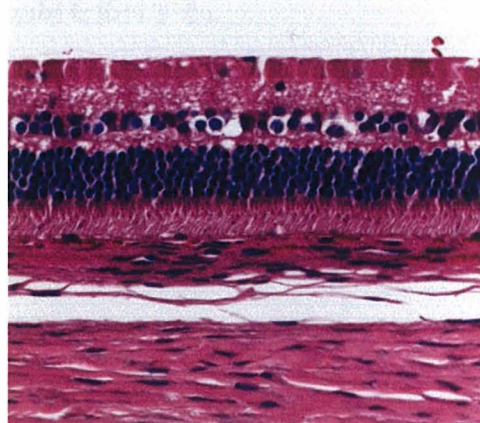
硝子体内に4Uのプラスミンを注入し化学的硝子体切除を行った際には、組織学的には異常を認めなかったものの、前房炎症や硝子体混濁を認めるだけでなく、ERG上も異常を認めた。一方、1Uのプラスミンを注入した際には、組織学的には異常を認めず、眼内の炎症は軽微であり、ERG上も異常を認めなかった。したがって、眼内に用いるプラスミン濃度は1Uが望ましいと考えられた。

図6 プラスミン注入後の網膜(ヘマトキシリン・エオジン染色)

プラスミン(4U)注入眼



コントロール眼(PBS注入)



4. 硝子体内薬物動態に関する研究

内境界膜剥離は黄斑円孔に対する硝子体手術において広く普及しており、黄斑上膜に対する硝子体手術においても行われることがある。内境界膜剥離を安全に効率よく行うためにインドシアニングリーン (ICG)などの染色液が用いられることがある。一方でICGを用いることにより網膜障害を起こす危険性も報告されており、眼内におけるICGの動態の解明は重要な研究である。われわれは家兎を用いて硝子体内投与されたICGの眼内における動態を研究し、硝子体内に投与されたICGが non-plasmic flow で網膜から視神経に移動していくことを解明した。このことは硝子体内に投与された物質の薬物動態の解明に役立ち、本研究の主目的であるプラスミンの硝子体内投与における動態とも関係するので、その研究成果をまとめた論文の別刷を添付する。