

# ハイドロゲルを用いた人工硝子体の研究

奈良県立医科大学眼科学教室

松浦 豊明, 丸岡 真治, 川崎 健輔, 原 嘉昭

九州大学大学院理学研究院化学部門

安中 雅彦

九州工業大学大学院生命体工学研究科

児玉 亮

## RESEARCH OF HYDROGEL AS A VITREOUS SUBSTITUTE

TOYOAKI MATSUURA, SHINJI MARUOKA, KENSUKE KAWASAKI,  
YOSHIAKI HARA, MASAHIKO ANNAKA\* and RYU KODAMA\*\*

*Department of Ophthalmology, Nara Medical University*

*\* Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyusyu University*

*\*\* Department of Biological Functions and Engineering, Faculty of Life Science, Kyusyu Zn stitue of Technology*

Received April 14, 2003

抄録：硝子体手術に用いられる硝子体代用物について、シリコンオイル、ガスなど現在臨床応用されている医療材料の利点と問題点を考え、ハイドロゲルを人工硝子体として考えて研究を行っている。その歴史と展望について述べた。また生体の硝子体は構造と異方性を持ったハイドロゲルであり、そのゲルとしての構造、更に体積相転移が臨床的な網膜、硝子体疾患と関わっていることを示した。

**Key words** : vitreous body, hydrogel, vitreous substitute and PVA

### 1：硝子体(Vitreous body)の構造

硝子体は眼球の体積の8割を占めるゲルでその99%が水分で、約1%が固形成分です。ですから人の組織では最もみずみずしい組織といえます。実際、ステンレスの網目の上におくとぼたぼたと水が落ちてくる程です(図1)。透明で屈折率も水(1.334)に近く、眼球の形を保ち衝撃を吸収していると考えられています。

硝子体の組成はコラーゲン(typeII, collagen)、ヒアルロン酸(hyaluronan, ヒトでは平均分子量  $3\sim 4.5 \times 10^6$ )、から構成されることは生化学的分析から知られています<sup>1)</sup>。ヒトの場合、硝子体は一樣なゲルではありません。図2

に示しますように、一番外側の部分はコラーゲンの線維が密に存在し、皮質(vitreous cortex)と呼ばれています。厚みは約  $100\mu\text{m}$  です。特に硝子体基底部(vitreous base)、すなわち鋸状縁(ora serrata)の2mm前方から3mm後方までの位置ではコラーゲンの線維は3次元的に数ミリの厚さで密になっています<sup>2)</sup>。そして硝子体と網膜の界面は皮質のコラーゲンが錨状体(anchoring part)として働き、網膜のミュラー細胞(Müller cell)外側にある内境界膜(internal limiting membrane: ILM)と結合しています。(図3)その結合の強さは部位によって異なり、硝子体基底部と視神経乳頭部に強い結合のあることが分かっている

Corresponding to : Toyoaki Matsuura, MD, Department of Ophthalmology, Nara Medical University Kashihara 634-8522, Japan ; tel: +81-744-29-8884; fax: +81-744-23-8032; e-mail: tmatsuur@naramed-u.ac.jp

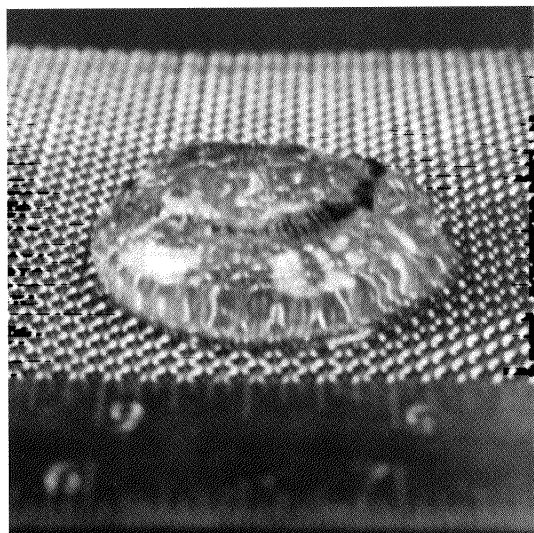


図1. ステンレスメッシュの上においた仔牛の硝子体。上部の黒い色素は毛様体由来。

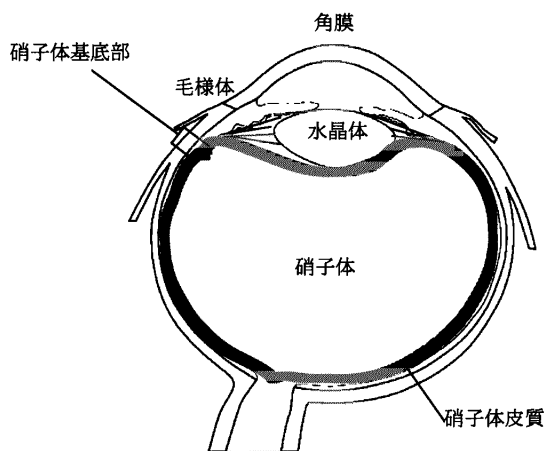


図2. 眼球断面図, 人の眼球の水平断面

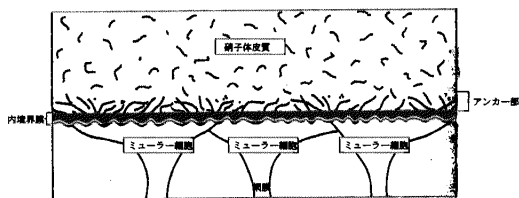


図3. 網膜硝子体界面の模式図, Herrgaard S: Acta Ophthalmologica Scand Suppl 9, 1997

ます。このことが後で述べる硝子体のゲル構造の変化に伴う網膜の変化と密接に関わっています。(硝子体が収縮しても硝子体基底部に硝子体がくっついているの後部硝子体, 視神経の方のみ硝子体との結合がとれる。)更に詳細に硝子体内のコラーゲンの線維を見てみると, ほとんどが type II のコラーゲンで, その直径は細く 10~20nm です。3つの独立した  $\alpha$ -chain が3重らせん構造(triple helix)を作っています。そのらせん構造は向かい合った分枝鎖の残基との間に水素結合を作って安定した状態となっています。違うタイプのコラーゲン(type II, V, XI)もわずかに存在し type II コラーゲンを安定させるように架橋していると考えられています<sup>3)</sup>。このコラーゲンの線維にヒアルロン酸が結合しています。実際のゲルとしての構造はあまりに水分が多いので明確な事は分かっていません。超微細構造としてバナズ(Balazs E.A.)らがコラーゲンの網目と糸巻き状のヒアルロン酸が3次元構造をとっている硝子体の構造モデルを提唱しました<sup>4)</sup>。しかしこの構造予想ではヒアルロン酸が安定して硝子体内で存在できないことは明らかです。そのためコラーゲンとヒアルロン酸はなんらかの多糖類を介して結合していると考えられています。その構造は図4のようであり、その図を見ればトルコのヒツジの焼肉に似ていることからシシカバブ構造と呼ばれています。またマクロな構造としてブルスト(J. G. F. Worst)らは硝子体の中にみかんの中身のような部屋構造(cistern)があることをインクの拡散で示しています<sup>5)</sup>(図5)。さらに共同研究者の児玉らは硝子体の構造には水晶体のタンパクであるクリスタリンがコラーゲンの結合に大きな役割をはたしていることを示し、ヒアルロン酸はコラーゲンとクリスタリンで構成される3次元の網目の表面をコーティングしているのではないかと新しいモデルを提唱しています<sup>6)</sup>(図6)。

また哺乳動物の硝子体には固有の細胞要素として硝子体細胞(hyalurocyte)の存在が知られています。硝子体基底部に多く局在し、ヒアルロン酸の産生を行っていると考えられています。その詳細は明らかではありません。しかしハイドロゲル硝子体置換後の残存硝子体が再生することが我々のデータから見られるので、その再生に大きく関わっていると思います。そして現在、我々のグループは FITC, Nile Red などの蛍光プローブを使って硝子体の構造を解析すること(図7)、固形成分が非常に少ないので、二次元電気泳動を行ってアミノ酸アナライザーや、MADDI-TOFMS(ノーベル賞受賞の田中耕一先生が開発した機器)(MALDIとは、Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization(マトリックス支援レーザー

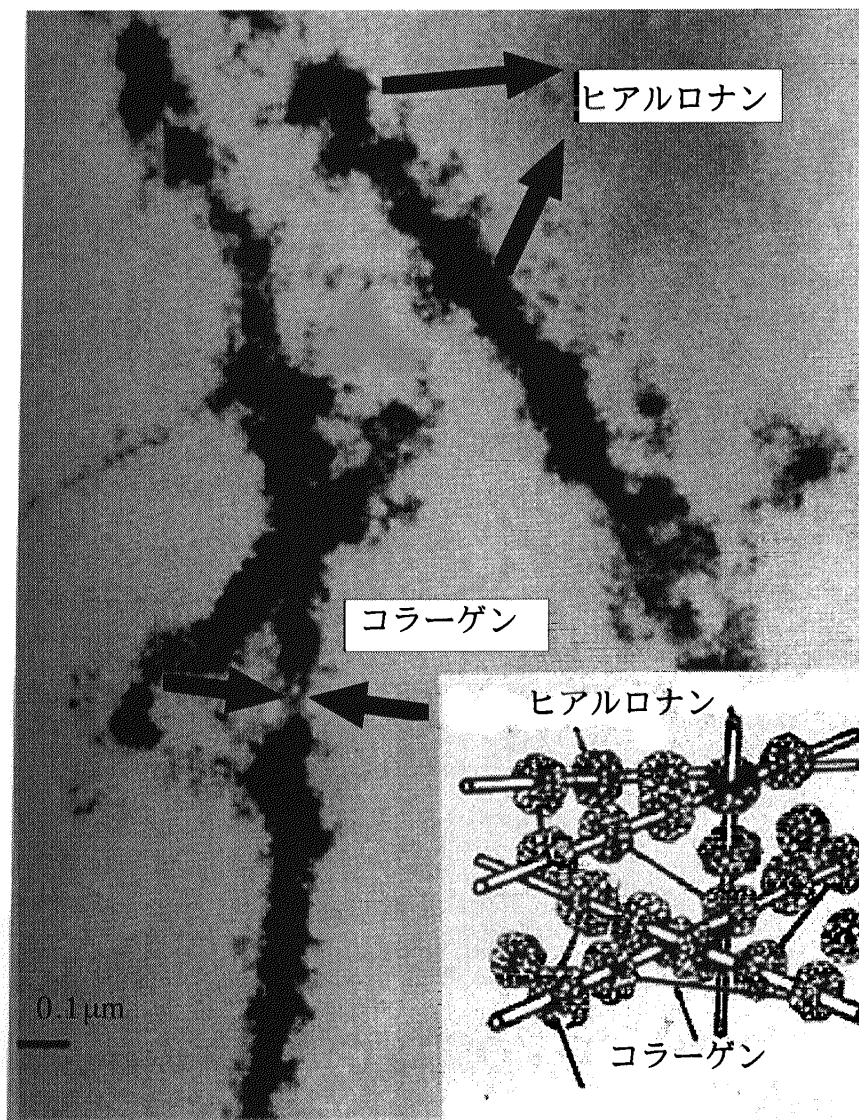


図4. 硝子体界面のシシカバブ構造, Asakura A : Acta Soc Ophthalmol. J 89 :179, 1985 より改変

脱離イオン化法)の略称。TOFMSとは、Time of Flight Mass Spectrometry(飛行時間型質量分析法)の略称)で微量な硝子体の構成成分を解析しています。このような測定機器の進歩によって硝子体の構造が解明されつつあります。

2: 硝子体の変化と網膜疾患とのかかわり

硝子体は加齢, 近視, ブドウ膜炎などの炎症, 増殖性硝子体網膜症, 硝子体出血, そして外傷のような眼内環境の変化によってたやすく構造が変化します。そのよう

な硝子体の変化の中で良く知られているのは硝子体の液化(synchysis)です。これは硝子体中のヒアルロナンが水を保持できなくなることによって生じるゲル構造の崩壊でその空間は液化腔(lacuna)と呼ばれています。しかしその硝子体の液化の仕組みは良く分かっていません。濾過, 遠心分離することでコラーゲンの線維を取り除くこと, コラゲナーゼなどの酵素を用いてコラーゲンの網目を破壊することで, 硝子体の液化は造り出すことができます。しかし実際そのような変化は生体で生じているとは考えにくいです。生化学的推測ではヒアルロナン

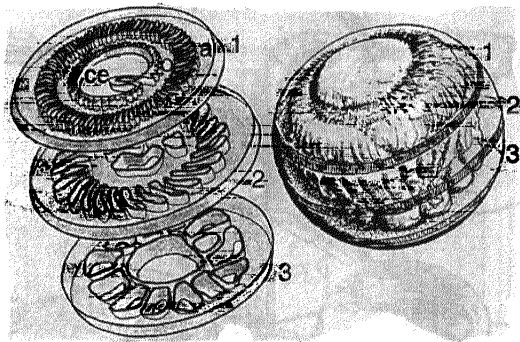


図5. 硝子体の内部構造, J. W. F. Worst: Cisternal anatomy of the vitreous, Kugler Publications, Amsterdam, 1995 より改変  
向かって左は硝子体の全体図, 右はその1, 2そして3の位置での内部構造を示す. 眼球の前方部, 毛様体に近い部位, 1ではその槽(Cistern)の数は72であり, 中央部, 部位2では, 36. そして後部, 3, では16であるという.

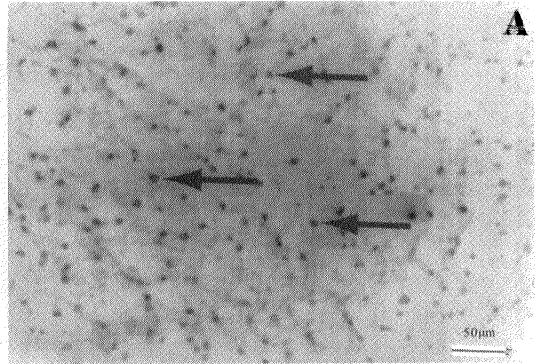


図6. 家兎硝子体の Alcian Blue/van Gieson 2 重染色像. 矢印がクリスタリンの顆粒であることがアミノ酸分析により確認されている. その顆粒をジョイントにして3次元網目構造が確認される.

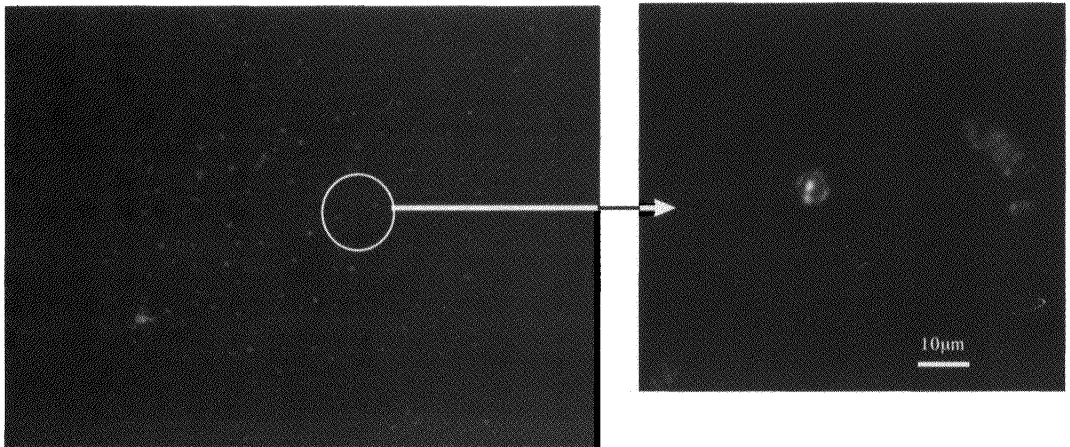


図7. ブタ硝子の体細胞, Nile red にて生体染色を行っている. 硝子体内で細胞の不均一な分布を示す. また細胞の形態も様々で硝子体の再生と関わっていると考えられる.

は構造の中に官能基としてカルボキシル基(-COOH)を持っているため, 水があると酸として作用してグルコシル結合を切って自己分解を起こすはずですが. しかし生体の硝子体内でこの反応が起きないのはなんらかのバッファ作用が働いているためと考えられます. そのバッファ作用がなくなるとヒアルロナンが分解して, いままでヒアルロナンが保っていた水分がゲル構造の外部に出てラクナを形成すると考えられます. このような硝子体ゲルの構造破壊によってコラーゲンは会合し比較的大きな線

維となり, 見えるようになります(図8). また液化と異なり硝子体は体積を急に(不連続に)小さくする. 収縮(shrinkage)することは臨床的によく知られています. この硝子体の収縮によって, 裂孔原性網膜剥離, 硝子体出血, 黄斑円孔, そして黄斑の浮腫が生じることが示されてきました<sup>7-9)</sup>. 特に黄斑円孔は単純に硝子体が眼軸方向に収縮するときの牽引力で生じるだけではなく, 黄斑の前方に液化腔ができて, そのため接線方向の牽引力が生じて黄斑に円孔が形成されることが示されています

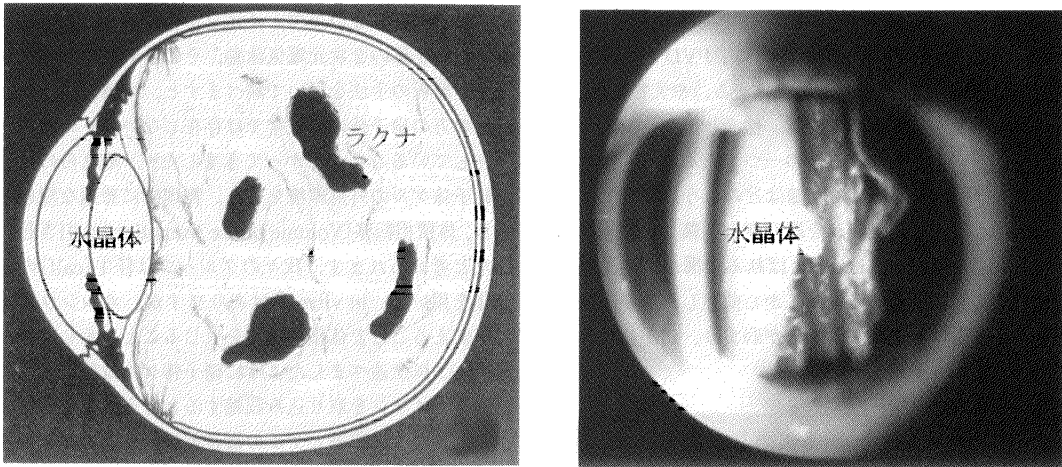
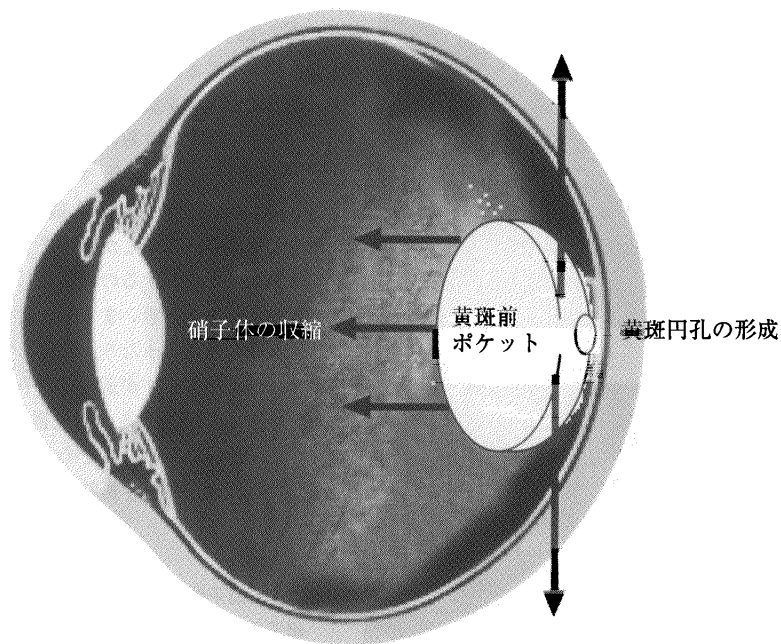


図8. 硝子体ゲルの中の液化腔(ラクナ)の模式図. 向かって右は実際の細隙灯所見.



硝子体の収縮の伴う網膜接線方向の牽引

図9. 硝子体の収縮に伴う黄斑円孔の発生の過程。

Kishi S et al: Tractional evaluation of Henle's fiber layer in idiopathic macular holes. Am J Ophthalmology 120: 486-496, 1995 より作成

(図9). ですから網膜と硝子体の界面に癒着(adhesion), 新生血管(ブドウ膜炎のような網膜の炎症後生じる. また糖尿病網膜症, 中心静脈閉塞症で酸素不足による血管新生が生じる)があると硝子体の収縮によって, 網膜裂孔

が生じたり, 網膜や硝子体の出血が生じたり, 黄斑浮腫が生じることは理解できることであり, 臨床的にこの変化を見ることも稀ではありません. もちろん病的な状態を生じなくとも加齢性的変化として硝子体の収縮がおこ

る時があり後部硝子体剥離(Posterior Vitreous Detachment: PVD)とされています。PVDが生理的飛蚊症(眼球運動につれ細かい影が見える。)や光視現象(網膜の機械刺激による反応の自覚。稲光りのようであるとの訴えが多い。)の大きな原因の一つであることがよく知られています<sup>10</sup>。ではこの収縮はどのようにして生じるのでしょうか。硝子体とそれを取り囲む網膜には網膜血管柵(Blood Retinal Barrier)とよばれる機構があり拡散バリアーとして働いています。しかし前述した炎症、血管新生によりそのバリアーの働きが弱まり、硝子体腔内に

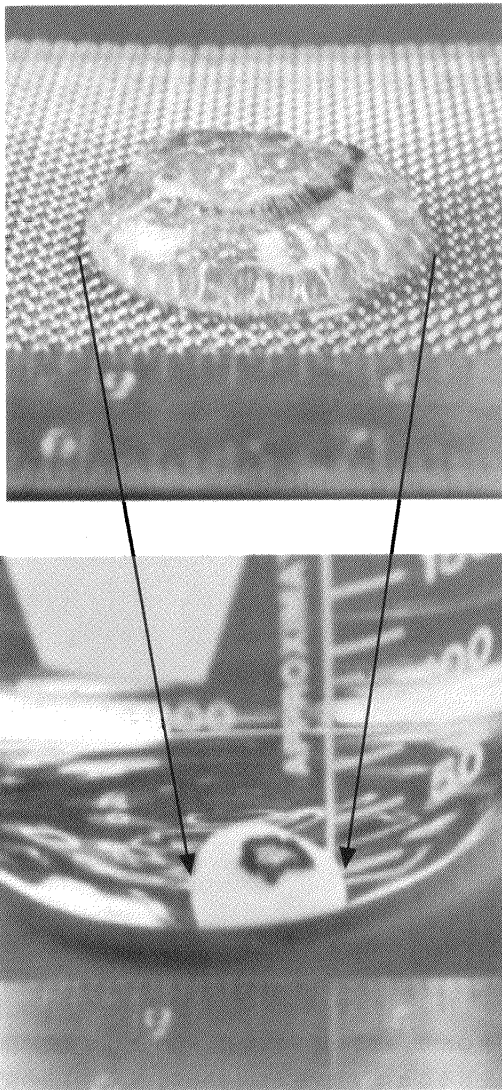


図 10. 硝子体の周囲のカルシウムイオンの濃度を変えることで体積相転移を生じた仔牛の硝子体。

通常では存在しない蛋白、イオンが存在することになります。硝子体の2次元電気泳動、その各スポットのプロビット解析の手法を用いて調べますと、増殖性糖尿病網膜症の方の硝子体には正常では存在しない多くの蛋白が存在していることが分かってきました<sup>11)</sup>。それらの蛋白が硝子体ゲルの外部環境を変え、物理的に普遍的現象である、体積相転移(Volume phase transition)を引き起こしたと考えられます。我々のグループは仔牛(calf)の硝子体を用いて、in vitroではありますが、カルシウム濃度を変えることで体積相転移を生じることを示しました(図 10)。以上述べたように硝子体ゲルは硝子体内に蛋白や、イオンを取り込み収縮すると考えてよいと思います。またその収縮とゲルの構造破壊、液化は混同されて議論される時がありますが、別の状態として評価する必要があります。

### 3: 人工硝子体の必要性

硝子体の中に出血がおこる、硝子体出血、糖尿病、外傷の後に生じる増殖性網膜症そしてそれらの結果生じる網膜剥離は網膜を脈絡膜にとどめておくことができない状態です。現在これらの治療として観血的手術が第一選択で、硝子体を切除することが行われます。(Vitreotomy)そのためよく硝子体は必要の無いものであると極論されることがありますが、正常な状態でない硝子体は、悪さをするので切除しなければならないと考えるべきであると思います。正常で無いとは、混濁したり、炎症細胞が入ったり、収縮して網膜を牽引することです。後で述べますが正常な硝子体はゲルとしてその構造を維持し網膜を然るべき位置に押さえる力(タンポナーデ力)をもっています。そのような正常硝子体の働きをもった人工硝子体が手術時には必要であると我々は考えています。

### 4: 人工硝子体の歴史

硝子体手術の進歩によりこれまでは治療できないと思われた増殖性糖尿病性網膜症増、殖性硝子体網膜症、および巨大裂孔原性網膜剥離等の治療が可能になってきました。これらの疾患に対して空気、ガス、ヒアルロン酸、シリコンオイル、そしてパーフルオロカーボン等の硝子体置換材料が治療効果の上昇をもたらしたこの分野で重要な位置を占めるようになってきました。それぞれの物性の特徴を生かした硝子体置換物質の有用性は評価できますが、それぞれ短所もあっていずれも完全なものとはいえないと思います。著者らは20年来、硝子体置換材料すなわち人工硝子体の開発研究に従事してきたのですが、開発

目的はできるだけ硝子体に近似の特性を有し、しかも半永久的に不活性で透明性を有し眼内で吸収されず眼内タンポナーゼ効果を期待できる合成物を探すことでした。試行錯誤の結果、材料は水溶性高分子であるPVA (Poliviny alcohol)水溶液に一定条件のガンマ線照射をすることで得られる、3次元網状架橋物であるPVAハイドロゲル(PVAgel)を合成しました<sup>13-17)</sup>。研究当初はこれらのPVAgelもすべて理想的ではなかったのですが、近年、我々は新しい製法で生体適合性の優れたPVAハイドロゲルを作成したので現在一般に使用されている他の硝子体置換物質の利点、欠点等と対照させてここに述べたいと思います。

### 1) 気体

網膜硝子体手術に気体を用いられたのは比較的早く、1911年にOhmは網膜下液の排液と空気注入によって一例の網膜剥離複位に成功した報告があります<sup>18)</sup>。さらに、1930年代にRosengrenが裂孔原性網膜剥離の治療に空気を硝子体腔に注入し臨床応用を行なっています。驚くべきことにその複位率は84%とされています<sup>19)</sup>。しかしその後は強膜内陷術や強膜バックル術が主流となってしばらくあまり行なわれなくなりました。しかし1970年代になってNortonらは硝子体腔にて24時間後約2倍に膨張するSF<sub>6</sub>(Sulfer hexafluoride)を使用してよい成績を残しています<sup>20)</sup>。1980年になるとLincoffによりさらに分子量が大きく硝子体腔で膨張するC<sub>3</sub>F<sub>8</sub>(Perfluoropropane)が使用され始めます。そして、現在は空気のほか、SF<sub>6</sub>、C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>が色々な濃度で使われています。ガスによる眼内タンポナーゼ効果はその気体により硝子体側から網膜を圧迫し、裂孔への光凝固や冷凍凝固による裂孔閉鎖をより促進させることです。またガスはそれ自身として網膜裂孔にたいする圧迫効果も考えられ、さらに剥離した網膜をローラーで引き伸ばすような効果も考えられます。そのため、適応としては上方の裂孔による網膜剥離で後部硝子体剥離があつて硝子体による牽引が強くない症例が適切です。それにたいして下方の裂孔による網膜剥離は術後の体位の保持が困難なので適応となりにくいです。特に下方の広範な網膜変性をもつ症例や後部硝子体剥離が完成していない症例には新しい裂孔を作る恐れがあるので十分注意する必要があります。ガスによる硝子体の置換の問題点は術後の何日かを不自然な、多くはうつ向きの姿勢を取る必要があること、さらに大きな問題として硝子体混濁の増強、水晶体の混濁、そして眼内の増殖性網膜症の悪化が知られています。その機序は明らかではありませんがガスの組織に対する接

触や乾燥による機械的刺激が考えられます。特に水晶体の後嚢はこのことで膜機能が低下すると考えられます。特に眼内に長くとどまる傾向のあるC<sub>3</sub>F<sub>8</sub>では白内障や網膜の障害の程度が大きいことからこのことは推測されます。

### 2) シリコンオイル(Silicon Oil)

1962年Cibisらによって始めて臨床的に網膜剥離眼にシリコンオイルが注入されました<sup>21)</sup>。それ以後シリコンオイルは比較的長期にわたる硝子体腔内タンポナーゼ物質として用いられています。ここで述べるシリコンオイルは医療用Polydimethyl siloxaneであり重合度の違いによって1000cs, 5000csそして12500csの物性のものがよく使用されています。シリコンオイル自身は透明で、屈折率は1.40であり水との差がそれほど大きくないので眼内の操作中の視認性はガスに比べるとはるかに良好です。また、表面張力は40dyne/cm<sup>2</sup>であり比重は0.97で水よりわずかに軽くそのためにガスに比べるとそのタンポナーゼ効果は少ないが眼内での操作性は良好です。しかし臨床的に用いたときシリコンオイルは長期的には必ずしも理想的とは言えません<sup>22)</sup>。その問題点を列記すると次のようになります。

- (1) とくに5000cs以上の粘性をもったシリコンオイルは硝子体腔中に注入することが困難で特殊な器具を使用しなければならない。さらにシリコンオイルを抜去するのはさらに困難でかなりの量が残存すると考えられる。
- (2) 長期にわたって硝子体腔にシリコンオイルが存在した症例では白内障がほとんどの場合生じる。
- (3) とくに問題となるのはシリコンオイルの乳化である。乳化によってミセルとなったシリコンオイルは混濁を生じるのみならず硝子体腔から逸脱し、2次性の緑内障の原因となる<sup>23)</sup>。
- (4) とくに出血傾向のある、糖尿病性網膜症の患者の場合、術中であれ、術後であれ硝子体腔の出血がシリコンと混ざった場合、これもまたミセルとして泡沫状になる。
- (5) 長期で考えたときシリコンオイル自体に網膜毒性がある。

Scottらはシリコンオイルの硝子体への注入量が少ないことがこのような合併症を生じる原因と考えシリコンオイルをできるだけ大量に注入し眼内での移動性を央させシリコンオイルの乳化を押さえ比較的良い成績を発表しました<sup>24)</sup>。以上のような理由から硝子体腔に置換されたシリコンオイルはできるだけ早く(3ヶ月以内)に抜去することが望ましいと考えられ、長期に使用するものではないと考えています。

## 3) 液体パーフルオロカーボン (liquid perfluorocarbon)

液体パーフルオロカーボンは疎水性で粘性が低く比重が水よりも大きいという点でこれまで広く用いられてきたシリコンオイルと異なります。そのためこれまで困難と考えられてきた巨大裂孔等の周辺部網膜剥離、増殖性硝子体網膜症の網膜の複位的手段として近年用いられるようになりました<sup>25, 26)</sup>。つまりシリコンにせよガスにせよこれまでの剥離網膜の伸展はその比重差から考えると周辺部から後局部への伸展であるのに対しパーフルオロカーボンによる伸展は後局部から周辺部への伸展です。そのため視機能に重要な後局部の伸展が意図的な排液孔を作ることなく比較的楽に行なえるということになります。パーフルオロカーボンにも何種類かあるのですが現在主に使用されているのはperfluorodecaline (C<sub>10</sub>F<sub>18</sub>)、(比重: 1.94, 屈折率: 1.31, 粘度: 2.7cs, 表面張力; 16dyne/cm<sup>2</sup>), perfluoro-n-octane (C<sub>8</sub>F<sub>18</sub>)、(比重: 1.76, 屈折率: 1.27, 粘度: 0.8cs, 表面張力; 14dyne/cm<sup>2</sup>)そしてperfluorophenanthrene (C<sub>14</sub>F<sub>24</sub>)、(比重: 2.03, 屈折率: 1.28, 粘度: 8.0cs, 表面張力; 16dyne/cm<sup>2</sup>) (Vitreon; Vitrophago社)です。またシリコンオイルとperfluorophenanthreneの混合物も用いられています<sup>26)</sup>。そして、これらパーフルオロカーボンに共通する問題点としてはシリコンより早期に生じるとされる網膜毒性です。そのため現在は手術中の一時的な使用にのみ使用されています。その原因はパーフルオロカーボンに含まれる窒素を含んだ不純物(コンタミネーション)のためとも考えられますが詳細は不明です。高分子は一般に分子量の異なるものが混在しています。そして多くの高分子は合成の過程で網目の構成成分以外の物質や未反応のモノマーが混じっています。これらが不純物と考えられ、生体にとって望ましくない反応を引き起こすと考えられるのです。つまり生体置換する物質として用いる場合分子量分布を少なくし、不純物を除去することが重要です。このことは次に述べますハイドロゲルでも同じ事がいえます。

## 4) PVA (polyvinyl alcohol)ハイドロゲル: PVAgel

1970年代始めから本学の神谷貞義教授指導の元に西岡啓介助教授、西信元嗣講師、原嘉昭助手及び工業技術院繊維高分子研究所の山内愛造博士、松沢康夫博士(以上当時)らによってガンマ線架橋したPVAgelが水晶体と似ていることを発見し、その応用のひとつとして代用硝子体として動物実験が始められました。そして一連の家兎に対する硝子体置換後の結果から以下のような問題点

が指摘されました<sup>28, 29)</sup>。

1: 術後の観察期間に48%に検眼鏡的な硝子体混濁を認めた。そのうち49%に毛様体細胞侵潤を認め、21%に脈絡膜の異常、13%に網膜細胞侵潤、そして5%に網膜異物巨細胞の異常所見が見られた。家兎は人などと比べると水晶体が球に近く硝子体腔が狭く、また当時は実験に今日のような精密な硝子体手術の器械が利用できなかったため術中の硝子体出血、そして手術侵襲が大きかったとも考えられるが、病理組織学的な異常所見、組織球、異物巨細胞の侵潤が見られること、からPVAgelに対する異物反応の可能性が考えられた。

2: PVAgelを注入した群では術後眼圧の上昇がほぼ全例に生じた。この原因はゲルがその体積を増加させるので眼圧が上昇するのではないかと初めは考えました。それは術後3-6時間で置換したPVAgelと元からの硝子体の屈折率が等しくなることと、置換したPVAgelの赤外線吸収スペクトルから硝子体の構成成分であるムコポリサッカライドがPVAgelの網目のなかに浸透していることが確認されたためです。しかし術後24時間後からPVAgelの屈折率が上昇すること、またその眼圧上昇が術後48時間で最高になることからやはり術後の炎症所見の現われと見るほうが適切であると何度かの実験のち結論しました。しかしながらPVAgelの屈折率が上昇することはゲル中への高分子、恐らくムコ多糖の溶液の浸透だけでなく炎症による蛋白成分の硝子体腔への浸透によると思われる。さらに約20%の症例では術後全く硝子体混濁が生じず病理的にも問題がなかったことから現在はこの炎症を引き起こすものはPVAgelの網目のなかにある未反応のモノマー、コンタミネーションによる蛋白成分、ではないかと考えています。

そして1980年後半からこのPVAgelをカニクイザルに家兎のときと同じように硝子体置換を行なった<sup>30)</sup>。その結果は家兎でいまままで得られた所見を強調するようなものでした。網膜上に微小な肉芽の形成が認められリンパ球が網膜の内顆粒層や内外網状層に侵潤して外顆粒細胞が減少しているものが認められました。硝子体そのものには著変を見いださなかったが、1例に硝子体辺縁にリンパ球をともなったフィブリンを認めた。またやはりカニクイザルでも眼圧の上昇を認めました。

このようなPVAgel自身に問題があると考えられる結果への反省から、1990年より西信元嗣教授のもとで新たに生体適合性の良いPVAgelの合成を行ないました。これまでのものとの製法の違いは以下に記します。

1) ゲル合成時に使用する水はすべて滅菌した超純水を用いている。



- 2)ゲル合成の全過程において清潔操作を行なった。
- 3)特にガンマ線架橋後のゲルに対して遠心分離を2度行ないゲルの網目の中の未反応のモノマー、コンタミネーションを除去した。

このようにして作製したPVAgelとこれまでの合成法によるPVAgelを多核白血球の遊走性を指標として、生体適合性を調べました。(PVAは補体系の活性を比較的高めやすいとの報告がある<sup>31)</sup>。しかし我々の硝子体のガスクロマトグラフィの結果から補体系の活性を引き起こすほどの蛋白の濃度が高くないことがわかった。そこで考えられるのが何らかの遊走因子によって多核白血球、マクロファージそしてリンパ球がゲルと網膜との界面に遊走して検眼鏡的に白斑となったのではないかとということです。走査型電顕写真では多核白血球と考えられるものの集まりが白斑に一致することが認められています)。この結果、白斑の原因である多核白血球、マクロファージをこれまでのPVAgelは遊走を引き起こし、今回の新しいPVAgelは引き起こさない、ということを示しました。新しい製法によって作成したPVAgelを用いた一連の実験において眼圧、網膜電図、前房の蛋白濃度そして眼底の所見、病理所見が非常に良好でありました<sup>32)</sup>。

5: ハイドロゲルを用いた人工硝子体

そのほか、現在まで報告は、Polyvinylpyrrolidone (PVP), Polyacrylamide, Poly (glyceryl methacrylate) (PGMA), Poly(2-hydroxyethyl acrylate) (PHEA), Poly (methyl 2-acrylamido-2-methoxyacetate) などがある<sup>33)</sup>。しかし我々が示しているような良好な結果は示しておらず、論文の結論としてハイドロゲル人工硝子体を否定する形となっている。それはモノマーでかなり毒性のあるゲルを用いていることが一つ、さらに合成の過程でコンタミネーションが多かったのではないかと類推している。

6: 生体模倣(Biomimic)したハイドロゲル人工硝子体<sup>34)</sup>

最後に生体を模倣した人工硝子体、すなわち、 $\gamma$ 線架橋したポリビニールアルコールゲルにヒアルロン酸を取り込ませた複合ゲルを作成し、家兎でその有用性を調べました。まず $\gamma$ 線の照射量と、ポリビニールアルコールゲル単体およびヒアルロン酸を包含した複合ゲルの膨潤率の違いを示します。1:ヒアルロン酸を包含したPVAゲルの膨潤比はPVAのみのその6倍以上に増加する。2:包含されたヒアルロン酸を分解すると膨潤比はもとに戻る。このことからこの人工硝子体の構造は次のように

予想できます。ヒアルロン酸はPVAgelの網目に取り込まれている。そしてヒアルロン酸は $\gamma$ 線で破壊されていない。おそらく、ヒアルロン酸は硝子体内によりヒアルロンダーゼで短期間に分解される。しかし、PVAgelの網目は残り残存硝子体と共存する。そしてゲルの網目とヒアルロン酸は電荷でイオン結合を作っている可能性がある(図11)。試料作成の留意点としては今まで繰り返し述べているように、コンタミネーションをできるだけ排除し、かつ無菌的に全ての操作を行うことです。次にin vivoでの評価です。有色家兎にvitrectomyをおこないました。

ケナコルトで硝子体を可視化し後部硝子体剥離を作成したのち、十分に硝子体腔にPVAgelを注入しました。評価の手段としては、眼底の見え、眼圧、網膜電図、前房タンパク濃度、病理を行っています。術後のフレアセルメーターの結果から現在臨床で用いられる、シリコンオイルより網膜血管襻の破壊が少ない事が分かりました<sup>35)</sup>。眼圧も問題ありません。

眼内の代表的な部位、毛様体、網膜、脈絡膜、そして硝子体腔に病理学的検索からとくに問題を認めませんでした(図12)。もっと詳細に見てみますと、置換したゲルと硝子体はその界面に炎症細胞の浸潤などが見られず安定した状態です。ゲルは約1年にわたって硝子体腔に留まることを確認しています。

今回のヒアルロン酸との複合ゲルはしっかりと残存硝子体を通して網膜を圧平している像が見て取れます(図

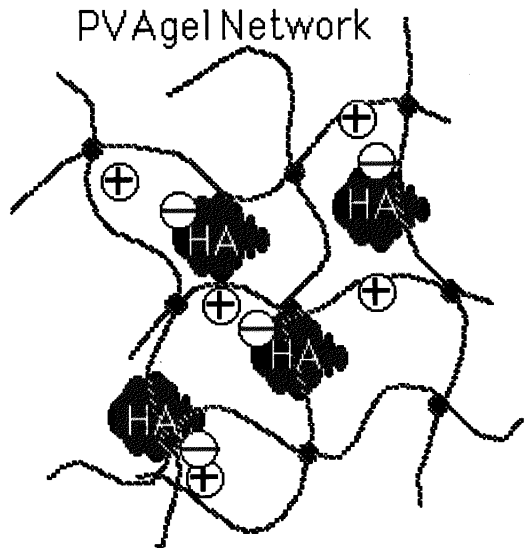


図11. ヒアルロン酸を包含したPVAgelの構造予想

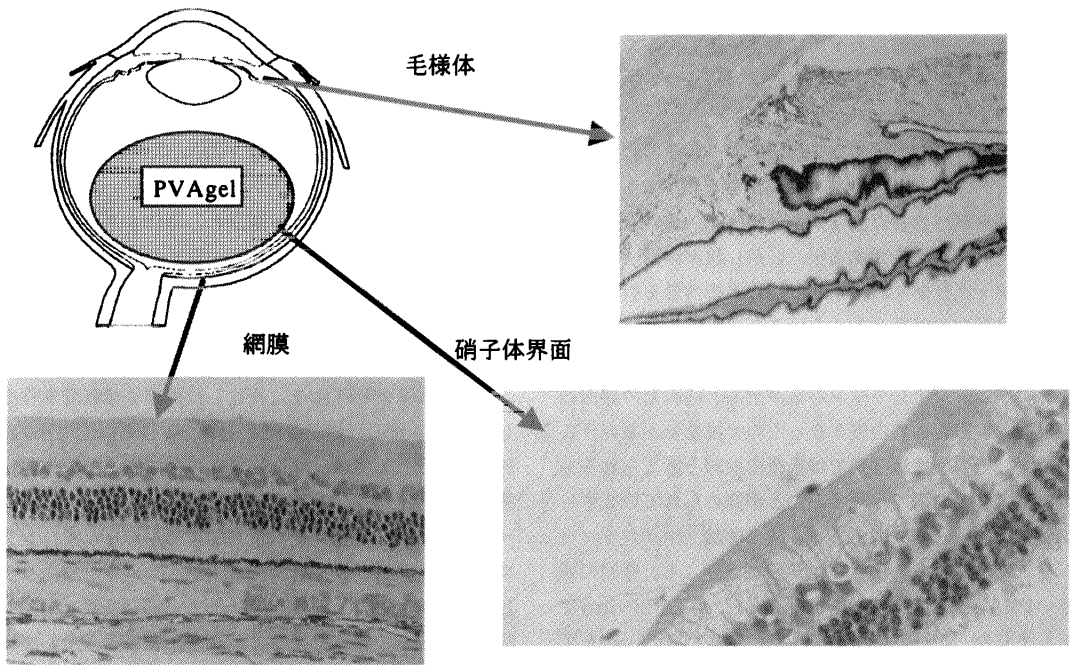


図 12. PVAgel を硝子体腔に注入した1年後の毛様体, 網膜, 硝子体界面の病理所見. ヘマトキシリン, エオジン染色 (X200)

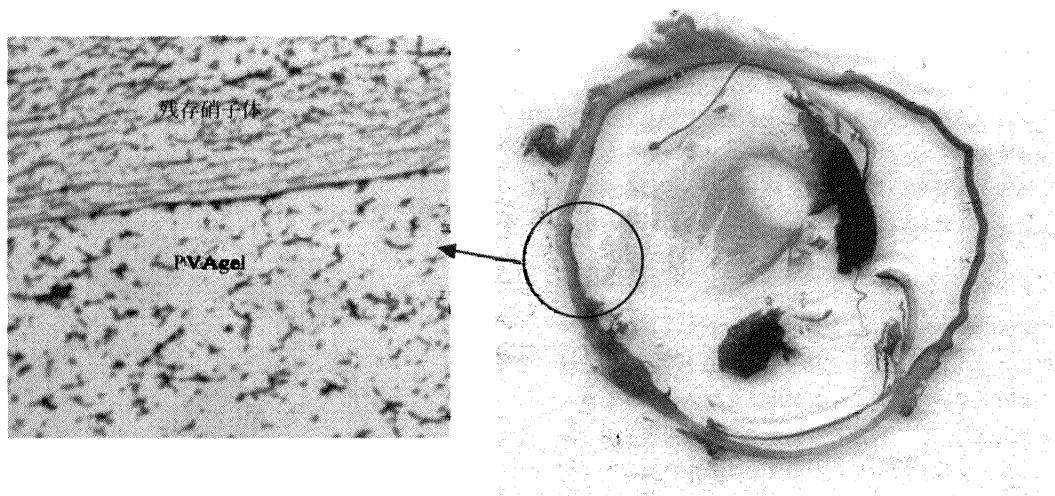


図 13. 硝子体内での PVAgel と残存硝子体.

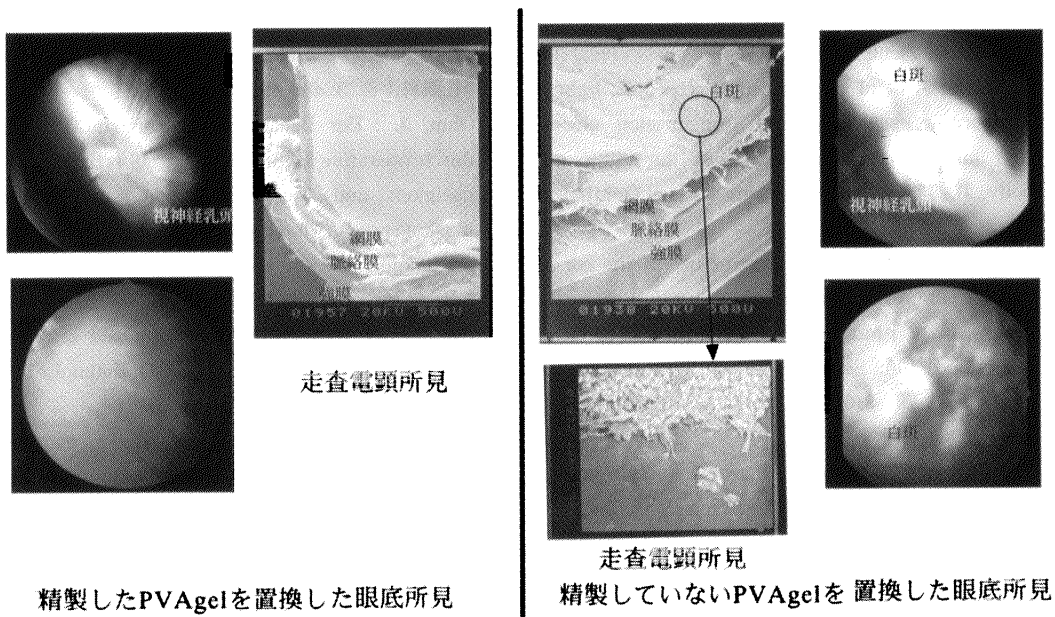


図 14. 新しい製法の PVAgel とこれまでの PVAgel の網膜に対する生体適合性の比較

13). もちろんその界面には問題を認めません. PVAgel の硝子体腔で安藤らが経験した<sup>36)</sup>網膜上の滲出物は今回追加治験の結果, 有色家兎で認められた. しかしこれは精製されていないゲルを硝子体に置換した時のみに認められ, ゲル内の夾雑物が免疫反応を引き起こしたと考えています. このことは報告済みであるが再度確認を行いました. 図 14 はそれを示す, 眼底写真および病理組織像ですが, 今回のようにコンタミネーションを除去した場合, 網膜上に滲出物は見られませんでした. また, ハイドロゲルは親水性であり疎水性のシリコンオイルに比べて表面張力が少ないのでタンポナーデ力が無いと言う意見<sup>36)</sup>についてですが, ゲルでもある程度架橋点を増加させると内部の水の移動は少なくなり網膜裂孔の閉鎖効果は生じるしそれにより剥離網膜と脈絡膜の接着効果も期待できると思います. シリコンオイルのような疎水性の物質でも界面から水分は侵入しており裂孔閉鎖の意義は網膜色素上皮が吸収できうる量以下の水分に減らせば良いと考えられるからです. 実際 PVAgel は *in vitro* で剥離網膜を引き延ばす効果が十分に認められることから, 疎水性の素材とは異なった観点から網膜を復位させる作用があると考えています. 特に架橋したゲルの構造は残りそのタンポナーデ作用は持続すると考えています.

6: 展望

多くの生体材料ゲルはモノマーの状態では生体適合性

は良好ではありません. ゲルを遠心操作や他の物質の混入を防止した系で注意深く合成しその網目に含まれているモノマーやコンタミネーションを取り除くことは生体適合性の良好なゲルを作るため必要と思われる. 最後に, 硝子体の長期にわたる代用物を作りだすことは硝子体手術の画期的な進歩を促すと考えられますが, 現在, ガスやシリコンオイルという疎水性の生体から見ると性質のことなる合成物質が用いられています. そして疎水性ゆえに色々な問題点, 乳化による組織障害, 長期的な網膜毒性が生じていると考えられます. そしてタンポナーゼ効果は表面張力に因るものです. しかし生体を考えてみるとハイドロゲル, 硝子体とその網目の体積効果によってタンポナーゼ効果を示します. PVAgel は生体と同様にゲルの網目の体積効果によってタンポナーゼ効果を得ようとするものです. この異なった考えから作られている PVAgel であるが, 非常に精製された, 生体硝子体と同様な網目の PVAgel は生体反応も良好で現在, 臨床応用を目指し, その年単位での長期予後も含めて, 猿での最終実験を行なっています. また PVAgel が硝子体の再生を積極的に生じさせる結果も得られており, 硝子体置換後の経時的な硝子体の再生を観察中です. ヒトでもこのことが確認できれば, 究極的な代用硝子体となると考えています.

文 献

- 1) **Berman, E.** : Biochemistry of the eye, New York, 1991, Plenum Press.
- 2) **Faulborn, J. et al** : Combined microscopic, light microscopic, scanning, and transmission electron microscopic investigation of the vitreous body. II. The anterior vitreous cortex. *Ophthalmic Res.* **14** : 117-123, 1982.
- 3) **Sebag, J.** : Macromolecular structure of the corpus vitreum, *Prog. Polym. Sci.* **23** : 415, 1998.
- 4) **Balazs, E. A.** : Molecular morphology of the vitreous body. In: Smelser GK(ed) The structure of the Eye, 293-310, New York, Academic Press, 1961.
- 5) **JGF Worst** : Cisternal anatomy of the vitreous, New York, 1995, Kugler Publications.
- 6) **児玉亮**ほか:第2回日本再生医療学会総会講演予稿集, 神戸, 2003.
- 7) **Jaffe, N.** : Complications of acute posterior vitreous detachment. *Arch. Ophthalmol.* **79** : 568, 1968.
- 8) **Linder, B.** : Acute posterior vitreous detachment and its retinal complications. A clinical biomicroscopic study. *Arch. Ophthalmol.* **87** : 65, 1966.
- 9) **Tasman, W.** : Posterior vitreous detachment and peripheral retinal brakes. *Tras. Amer. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.* **72** : 217, 1968.
- 10) **広川博之**:飛蚊症, 光視症:Practical Ophthalmology **15** : 35-41, 1999.
- 11) **桂弘**ら:二次元電気泳動による硝子体可溶性蛋白の分析:日本眼科紀要:Vol. 39, No 12, 2287-2294, 1988.
- 12) Biomacromolecules, 2003 掲載予定
- 13) **原嘉昭, 西岡啓介, 神谷貞義**:代用硝子体の実験的研究(1)PVA 眼水ゲルの硝子体置換方法とその後の臨床経過. *臨眼.* **29** :79-83, 1975.
- 14) **原嘉昭, 西岡啓介, 神谷貞義, 山内愛造, 松沢康夫**:白色家兎における PVA 橋かけ含水ゲルの硝子体置換手術. *眼紀.* **30** : 385-389, 1979.
- 15) **山内愛造, 松沢康夫, 原嘉昭, 神谷貞義, 西岡啓介, 西信元嗣, 中尾圭一**:白色家兎硝子体における PVA 橋かけ含水ゲルの挙動(Ⅲ). *眼紀.* **29**: 1922-1926, 1978.
- 16) **原徳子, 原嘉昭, 西信元嗣, 山内愛造**:人工硝子体 PVA ゲルの眼圧におよぼす影響. *臨眼.* **80** : 1901-1904, 1986.
- 17) **山内愛造**:眼科手術における生体材料.硝子体置換材料, *眼科手術* **3**: 485-492, 1990.
- 18) **Ohm, J.** : Der Behandlung denetzhaublosung durch operative Entkeering der subertinalen Flüssigkeit und Einsprizung von Luft in der glaskokrper. : *Albrecht von Grafe's Arch. Klin. Ophthalmol.* **79** : 442-450, 1911.
- 19) **Rosengren, B.** : Result of treatment of detachment of the retina with diathermy and injection of air into the vitreous. *Acta. Ophthalmol.* **16** : 573-579, 1938.
- 20) **Norton, E. D. W.** : Intraocular gas in management of selected retinal detachments. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol.* **77** : 8598, 1973.
- 21) **Cibis, P. A., Becker, B. and Okun, E.** : The use of liquid silicon in retinal detachment surgery. *Arch Ophthalmol.* **68** : 590-599, 1962.
- 22) **Gray, R. H. B. and Leaver, P. K.** : Silocon oil in the treatment of massive preretinal retraction. 1. Results in 105 eyes. *Brit. J. Ophthalmol.* **63** : 335-360, 1979.
- 23) **中村公俊, M. F. Refojo, D. V. Crabtree, 坂西明郎, 土橋敏明**:眼内におけるシリコンオイルの乳化機序について. *眼紀.* **42** : 972-982, 1991.
- 24) **Scott, J. D.** : A rationale for the use of liquid silicon. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.* **97** : 235-237, 1977.
- 25) **Chang, S.** : Low viscosity liquid fluorochemicals in viterous surgery. *Am. J. Ophthalmol.* **103** : 38-43, 1987.
- 26) **Chang, S., Ozmett, E. Zimmerman, N. J.** : Intraoperative perfluorocarbon liquids in the management of proliferative vitreoretinopathy . *Am. J. Ophthalmol.* **106** : 668-674, 1988.
- 27) **Peymann G. A., Conway M. D.** : Long-term vitreous replacement in primates with intravitreal vitreou or vitreou plus silicone. *Ophthalmic Surg.* **22** : 657-664, 1991.
- 28) **山内愛造**.家兎硝子体置換材料としてのPVA ハイドロゲルの構造と性質:奈良医学雑誌. 33 巻, 第5号, 349-354, 1982.
- 29) **原嘉昭**.白色家兎における人工硝子体としてのポリビニールアルコールハイドロゲルに関する研究:奈良医学雑誌. 39 巻, 第3号, 319-333, 1988.

- 30) 原徳子. 試作人工硝子体ポリビニールアルコールハイドロゲルに対する猿眼の病理組織学的評価: 奈良医学雑誌 .44 卷, 第 6 号, 393-404, 1993.
- 31) 松田武久, 新延道夫, 岩田博夫: 合成高分子表面における補体系の活性化と免疫担当細胞への影響. 人工臓器 **16** :1045-1050, 1987.
- 32) 原嘉昭, 松浦豊明, 竹谷太, 塚本光雄, 名和良晃, 児玉亮, 山内愛造, 西信元嗣, 硝子体置換物質としてのポリビニールアルコールの生体適合性: 日本眼科学会雑誌第 102(4), p 247-255, 1998.
- 33) Traian V. Chirila, Sjakon Tahija, Ye Hong, Sarojini Vijayasekaran and Ian J. Constable : Synthetic Polymers as Materials for Artificial Vitreous Body: Review and Recent Advances. *Biomaterials Applications* **9** : 121-137, 1994.
- 34) Hara Y., Matsuura T., Tsukamoto M., Yamauchi A., Saishin M. and Kodama R. : Hydrogel Vitreous Substitute Containing Hyaluronic Acid: *Transactions of Materials Research Society of Japans* **25**(3) : 795-798, 2000.
- 35) 山本和則: 家兎における硝子体腔内気体注入による房水フレアーの経時的变化- 前房フレアー強度の変化と臨床像: 日眼会誌. **95** : 515-521, 1991.
- 36) 月刊眼科診療プラクティス 81, PVA ゲル, 安藤文隆, Vol.5, No.4, 2002.