

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591952

研究課題名（和文）眼科手術用灌流液への水素ガス応用の研究

研究課題名（英文）The effect of Hydrogen gas in irrigating solution in ophthalmic surgery

研究代表者

高橋 浩（TAKAHASHI HIROSHI）

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：00188046

研究成果の概要（和文）：

眼科手術において水素ガスを含む灌流液が、抗酸化ストレス効果により組織障害軽減に有効であるかを検討した。白内障手術に関しては現行の予防手段よりすぐれた効果は証明できなかったが、網膜に関しては障害が軽減される組織学的結果が得られつつある。今後機能解析を含めたさらなる検討を進める方針とした。

研究成果の概要（英文）：

The anti-oxidative effect of irrigating solution containing hydrogen gas in the ophthalmic surgery was investigated. The effect was not clearly shown in phacoemulsification, while the protective influence was found in the vitro-retinal surgery.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

白内障超音波乳化吸引術における角膜内皮障害の原因として近年、フリーラジカルの発生も無視できない要因であることが明らかにされている。また硝子体手術は光障害などの操作手技そのものが網膜細胞への酸化ストレスとなる可能性がある。一方、水素ガスが組織・細胞種を問わず自由に拡散する新しい概念の抗酸化物質であり酸化ストレス障害を抑制することが報告された。

これをうけて我々はラット網膜の虚血 - 再還流障害モデルにおいて水素ガスが網膜厚の菲薄化を抑制することを見いだした。以上より、水素ガス含有灌流液の眼科手術における組織保護効果を検討するという発想に至った。

2. 研究の目的

内眼手術という酸化ストレス産生の可能性が高い操作に対し局所で速やかに対処す

る方法として水素ガス応用の妥当性を検討するものである。眼科領域でも各種組織における酸化ストレス障害に対し、様々なラジカルスカベンジャーの有効性が報告されているが、投与方法や薬剤の分子量などにより組織到達性には限界があり、副作用の可能性も否定できない。その点、水素ガスは生体内での拡散能が高く、組織における傷害性もほぼ皆無と言える。安価で眼内灌流液に溶解することも容易であるため臨床応用はすぐにでも可能である。本研究により組織保護効果が明らかにし眼科手術の安全性向上に寄与することを目的とした。

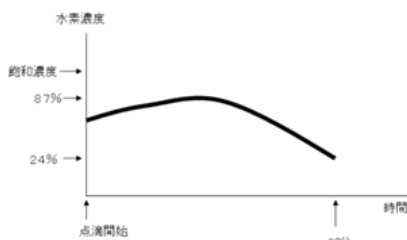
3. 研究の方法

白内障手術については、灌流液中の水素ガスがヒドロキシルラジカル発生に与える効果を電子スピン共鳴法により検討し、さらに、動物シミュレーションモデルにて水素ガスの組織酸化ストレス予防効果を組織学的、免疫組織化学的に経時観察する。硝子体手術については、水素ガス点眼液の効果を検討した網膜虚血 - 再還流障害モデルでの経験に準拠し、神経節細胞の酸化ストレス障害による細胞死、それに引き続く網膜厚の菲薄化などの形態学的変化や網膜電図における波形の減弱などの機能的変化について、コントロール群と比較することにより水素ガス溶解灌流液の効果を明らかにする。

4. 研究成果

全体的な成果としては、眼科手術において水素水を含む灌流液が、酸化ストレス効果により組織障害軽減に有効であるかを検討した結果、白内障手術に関しては現行の予防手段よりすぐれた効果は証明できなかったが、網膜に関しては障害が軽減される組織学的結果が得られつつある。今後機能解析を含めたさらなる検討を進める方針とした。

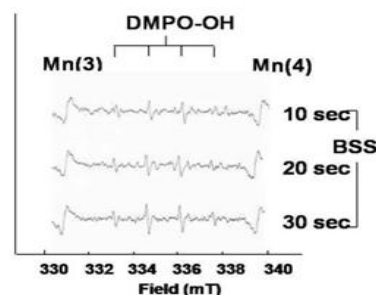
まず水素分子溶解法は安全確実に規定した溶解濃度を得る方法を確立できた。



500mlボトルで約20分のバブリングにより水素ガス濃度は飽和し、その後上図のこ

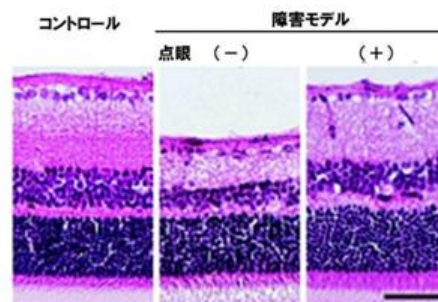
とく点滴モードにてボトルが空になる約25分後までの間25%から85%程度の濃度に保たれることが確認できた。我々の水素溶解液点眼によるラット網膜の虚血 - 再還流障害モデルにおいて効果が得られた硝子体中水素ガス濃度は10%程度であったことから、濃度として十分であり、これまでの形態学的検証でもその裏付けが得られているが、ボトルとして供給される状況、さらには点眼での投与を考えると水素濃度の低下による効果への影響を確認する必要があった。ボトル中の水素濃度の時間による遞減状況の確認により、効果が得られる水素濃度の最低基準値を得ることが以降の実験および将来的な臨床応用を考えた時に必須の検討項目であると考えていたが、おおむね再現性を得たと考える。

現在までのところ、白内障超音波乳化吸引術モデルにおいては通常用いられる手術補助剤・粘弾性物質が強力なフリーラジカルスカベンジャーであるために、これを凌駕するほどの有用性が明らかになっていない。

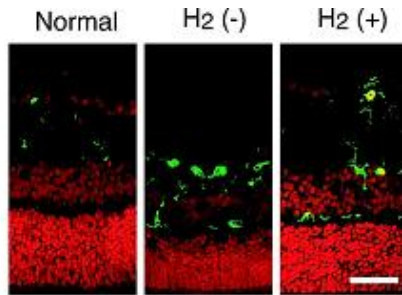


上図はヒドロキシルラジカルの発生を電子スピン共鳴で補足したものであるがこれらの活性は通常用いられる手術補助剤でもかなり抑制されるため水素分子による付加的效果を確認することは困難であった。

しかし、手術局所において前眼部手術のように簡単にスカベンジャーを使用できない硝子体手術モデルにおいては、本法の有用性が見いだせると考えた。



水素ガス点眼液の効果を検討した網膜虚血 - 再還流障害モデル (上図) に準拠し、硝子体手術モデルにおける神経節細胞の酸化ストレス障害による細胞死、それに引き続く網膜厚の菲薄化などの形態学的変化を検討の結果、コントロール群と比較して水素ガス溶解灌流液の効果が組織学的には明らかになりつつある。



上図は網膜抗Iba-1陽性細胞を示すが、ストレスに対する傷害マーカーであるグリア細胞活性化が水素分子により抑制されていることがわかる。より明確なエビデンスを得るため、網膜電図による生理学的検討、8-OHdG、MDA などの酸化ストレスマーカーによる細胞生物学的検証、さらに、酸化ストレス関連遺伝子であるglutathione peroxidase-1 (GPx1)、catalase などの分子生物学的検討を展開し、組織学的検討に加えて本法の有用性に対する生理学的および分子・細胞生物学的裏付けを得つつある。硝子体手術における酸化ストレスの原因となり得るものとして、通常の手術用光源による障害の検討を主に行ってきたが、今後はさらに眼球圧迫に伴う一過性の虚血再灌流に準ずる障害の検討を行う予定である。また、将来性、臨床現場での利便性等から内眼手術における水素水持続点眼による効果を、灌流液と同様の観点から検討することを計画中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Igarashi T, Miyake K, Asakawa N, Miyake N, Shimada T, Takahashi H, Direct comparison of the administration routes

for AAV8-mediated ocular gene therapy. *Curr Eye Res.* 査読有、2013、 569-77

- ② Kabuto T, Takahashi H, Goto-Fukuura Y, Igarashi T, Akahori M, Kameya S, Iwata T, Mizota A, Yamaki K, Miyake Y, Takahashi H. A new mutation in RP1L1 gene in occult macular dystrophy patient associated with a depolarizing pattern of focal macular ERG. *Molecular Vision.* 査読有、2012、 1031-9

- ③ Suzuki H, Shiwa T, Oharazawa H, Igarashi T, Takahashi H. Simultaneous treatment of pterygium and temporal conjunctivochalasis. *Journal of Nippon Medical School.* 査読有、2013、 74-77

- ④ Igarashi T, Nakazato Y, Kunishige T, Fujita M, Yamada Y, Fujimoto C, Okubo K, Takahashi H. Mometasone Furoate Nasal Spray Relieves the Ocular Symptoms of Seasonal Allergic Rhinoconjunctivitis. *Journal of Nippon Medical School.* 査読有、2013、 182-189

[学会発表] (計 6 件)

- ① 鈴木久晴、大木孝太郎、志和利彦、高橋 浩、Ellips FX (AMO) を用いた超音波乳化吸引における切開創の温度と前房温度の検討、第 27 回日本眼内レンズ学会、2012

- ② Tomoyuki Kunishige, Hisaharu Suzuki, Toshihiko Shiwa, Hiroshi Takahashi, Antiseptic Effect of Ozonated Solution During Cataract Surgery, ASCRS, 2012

- ③ Hisaharu Suzuki, Toshihiko Shiwa, Hideaki Oharazawa, Hiroshi Takahashi, Semicircle-shaped capsulotomy marker. ASCRS, 2012

- ④ 鈴木久晴、坂西京子、稲毛道憲、志和利彦、高橋 浩 Ellips FX (AMO) による虹彩色素脱出を予防するための曲り超音波チップの効果 第 66 回日本臨床眼科学会、2012

- ⑤ 鈴木久晴、稲毛道憲、志和利彦、高橋浩 老視治療としての水晶体再建術における眼内レンズの現在と今後の展望. 第 4 回先

進医療フォーラム, 2012

- ⑥五十嵐勉、三宅弘一、浅川なぎさ、三宅紀子、島田隆、高橋浩 異なる投与方法によるAAVtype8 ベクターの遺伝子導入効率と安全性の比較検討 第 51 回日本網膜硝子体学会, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 浩 (TAKAHASHI HIROSHI)
日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授
研究者番号 : 00188046

(2) 研究分担者

小原澤 英彰 (OHARAZAWA HIDEAKI)
日本医科大学・医学部・その他
研究者番号 : 20350035

五十嵐 勉 (IGARASHI TUTOMU)
研究者番号 : 10421190
日本医科大学・医学部・講師

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :