

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592684

研究課題名(和文) 緑内障手術後の瘢痕癒着抑制に向けた薬剤徐放システムの構築

研究課題名(英文) Establishment of sustained drug delivery system to inhibit scarring and synechia after glaucoma surgery

研究代表者

小島 祥太 (Kojima, Shota)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：10388259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障手術モデルをビーグル犬6匹に施行し、マイトマイシンC(MMC)包含ゼラチンハイドロゲル(GH)を片眼に留置し(GH-MMC)、僚眼に0.04%MMC包含スポンジを5分間だけ留置し(MMC)で抜去したところ、両眼(群)とも眼圧下降および濾過胞形成は4週にわたって同等であった。結膜/強膜面積は有意差が無く、コラーゲン密度、線維芽細胞密度、血管密度はMMC群で有意に低値であった。PCNA陽性細胞などは両群間に有意差はなかった。これらの結果からMMC包含GHを緑内障手術モデルに用いることで、従来のMMC術中結膜下曝露と比較して同等の眼圧下降効果および濾過胞維持効果とより高い安全性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Glaucoma surgery models were made in six beagles. A maitomycin C (MMC)-loaded gelatin hydrogel (GH) was implanted under the conjunctiva of one eye (GH-MMC group) and 0.04% MMC-soaked sponges were placed under the conjunctiva of the other eye (MMC group) for 5 minutes.

In both groups, IOP reduction and bleb formation were maintained in a similar manner for 4 weeks postoperative. No significant difference in the ratio of conjunctival area to scleral area was found between the two groups. Collagen density and the numbers of fibroblasts and vessels were significantly lower in the MMC-treated group than in the GH-MMC treated group. No significant difference in PCNA-positive cells was found between the two groups.

Implantation of MMC-loaded GH ameliorated toxicity to conjunctiva compared with the 5-minute placement of MMC, whereas its effect on IOP reduction and bleb formation was similar. These results suggest that using GH for the application of MMC is a safer method.

研究分野：医歯薬学

キーワード：緑内障 濾過手術 ハイドロゲル マイトマイシンC 徐放 濾過胞 安全 眼圧

1. 研究開始当初の背景

緑内障の治療は眼圧下降が最も効果的であり、代表的な眼圧下降手術である線維柱帯切除術は濾過胞を形成させるが、時に濾過不全を生じる。この原因としてテノン囊組織における創傷治癒により結膜下での線維化を生じる機序が考えられている。強力な線維芽細胞増殖抑制薬であるマイトマイシンC (MMC) などの使用により緑内障手術成績は向上しているが、無血管濾過胞形成、濾過胞からの房水漏出、感染性眼内炎のような随伴する副作用の危険性が問題となり、より安全な線維芽細胞増殖抑制の方法が求められている。

再生医療の分野で臨床応用が開始されつつあるゼラチンハイドロゲル(以下 GH)は薬物の徐放キャリアとして利用されている。またキマーゼは肥満細胞の分泌顆粒に存在し、好中球、好酸球、その他炎症細胞の集積を誘導する。すでに我々は GH や、キマーゼ阻害薬(CI) 包含 GH を緑内障濾過手術時に結膜下に挿入することにより、4週間、有意に持続的に眼圧が下降し、結膜下組織の癒痕化が生じにくくなることを示し、さらには GH 単独と CI 包含 GH の作用を3ヶ月間比較し、CI 阻害薬包含 GH がより長期間の眼圧下降作用と癒痕化抑制作用が生じ、その組織では肥満細胞数の減少と、増殖細胞集団から増殖細胞集団への移行の指標である PCNA (Proliferation cell nuclear antigen:核内増殖抗原)染色細胞の減少が生じていることが示された。これらにより GH から徐放された CI がより長期の結膜癒痕抑制作用を及ぼすことが示された。

2. 研究の目的

ヒト線維芽細胞増殖抑制作用をもつ薬剤や、GH に注目し、イヌ緑内障手術モデルを用いて GH に浸透した薬剤の結膜癒痕癒着抑制効果を調べ、GH を利用した薬剤徐放システムを構築することを目的とする。今回は、実際に臨床で使用されている MMC を、術中結膜下曝露と同濃度で GH に浸透させてから徐放し、その眼圧下降効果、結膜増殖抑制作用、および結膜組織に対する作用を、通常の MMC 術中曝露と比較検討することとした。

3. 研究の方法

(1) MMC 包含 GH

GH を 0.04%MMC 溶液に 4°Cで一晩浸透させ (MMC 包含 GH) HPLC 法にて GH 中の MMC 量を測定した。

(2) 緑内障手術モデル作成。

全身麻酔下のビーグル犬 (n=6) の角膜輪部結膜を 6mm 切開し、強膜を止血した後に 1x4mm で角膜輪部で強膜を開窓して周辺虹彩切除術を行い 10-0 ナイロンにて結膜縫合して緑内障手術モデルとした。強膜切開前に、スポンジに浸透させた 0.04%MMC を結膜下に留置して 5 分間曝露してから除去し生理食塩水で洗浄した群を MMC 単独群、結膜縫合前に MMC 包含 GH を結膜下に留置した群を GH-MMC 群と

し、両群を比較検討した。

(3) 眼圧、濾過胞スコア

術前、2週間後、4週間後に眼圧、濾過胞スコアを計測した。

(4) 組織学的検討

術4週後の眼圧、濾過胞スコアを計測後にイヌを屠殺してから眼球摘出をおこなって濾過胞の癒着スコアを計測し、濾過手術を行った部位を中心に組織を切り出して組織学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) MMC 包含 GH 中の MMC 濃度

5 x 5 x 1.5 mm の GH 中に 0.012 mg の MMC が含まれることが分かった。これから、GH 中の MMC 濃度は約 0.32 mg/m と計算された。

(2) MMC 包含 GH の眼圧におよぼす影響

MMC 包含 GH 眼も、MMC 単独眼も術後2週、4週と有意に眼圧が下降し両眼間に有意差はなかった。

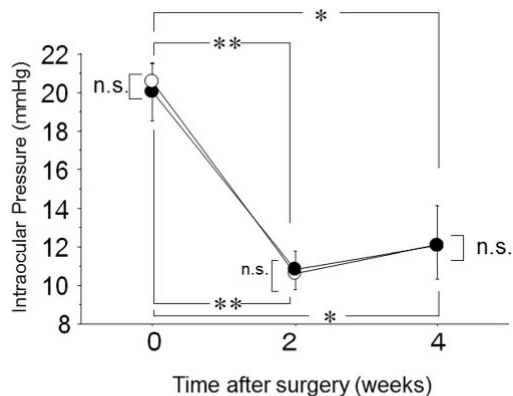


FIGURE 1. Intraocular pressure changes in the eyes treated with GH-MMC (●) or a 5-minute placement of MMC alone (○). Data are shown as the mean ± SE for six dogs. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ versus initial values (paired t -test). n.s.: $P \geq 0.05$ (paired t -test). No significant difference was found between the eyes ($P = 0.94$, repeated-measures ANOVA).

(図1) 論文1から引用

(3) 濾過胞スコア

濾過胞スコアは両群とも術後4週まで高く両群間に有意差はなかった。

(4) 組織学的検討

結膜断面面積/強膜断面面積は両群間で有意差はなかったが(図2、表1)、結膜のコラーゲン密度はMMC単独群と比較しMMC包含GH群が有意に密度が高く(図3、表1)、線維芽細胞密度も高かった(表1)。

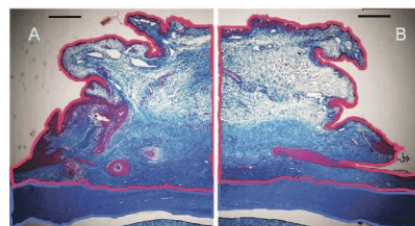


FIGURE 2. Representative photomicrographs of the sections obtained from eyes treated with GH-MMC (A) and MMC alone (B) at 4 weeks postoperative and stained with azan stain. The conjunctiva and the sclera are surrounded by red and blue lines, respectively. Scale bars: 1 mm.

(図2) 論文1から引用

	GH-MMC	MMC Alone	P
Ratio of the conjunctival area to the scleral area	1.7 ± 0.8	1.8 ± 0.6	0.90
Collagen density, %	79.9 ± 5.4	54.9 ± 14.8	0.011
Density of fibroblasts, per mm ²	133.3 ± 54.1	53.3 ± 32.6	0.005
Density of vessels, per mm ²	19.0 ± 6.2	8.0 ± 9.0	0.016
Density of PCNA-positive cells, per mm ²	13.2 ± 18.2	14.2 ± 17.3	0.92

Data are shown as the mean ± SD for six dogs. *P*-values were obtained by use of the paired *t*-test.

(表 1) 論文 1 から引用

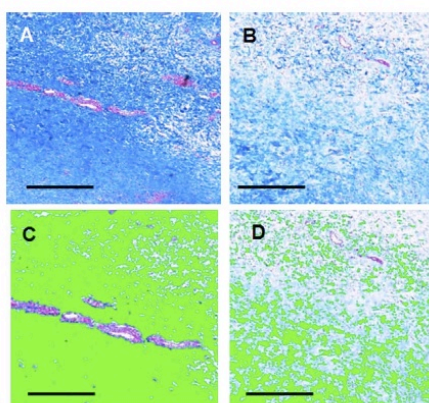


FIGURE 3. Representative photomicrographs of the conjunctiva obtained from the eyes treated with GH-MMC (A) and MMC alone (B) at 4 weeks postoperative and stained with azan stain. The area in green identified by use of the color extraction method illustrates collagen in the conjunctiva in the eyes treated with GH-MMC (C) and that in the eyes treated with MMC alone (D). Scale bars: 500 μm.

(図 3) 論文 1 から引用

ビメンチン陽性細胞密度も MMC 単独群と比較し MMC 包含 GH 群が有意に密度が高かった。

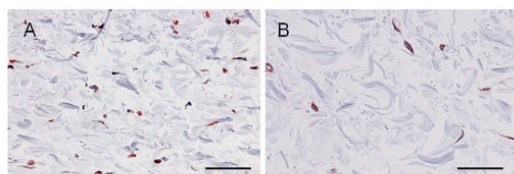


FIGURE 4. Representative immunohistochemical staining of section for vimentin in the eyes treated with GH-MMC (A) and those treated with MMC alone (B). Scale bars: 50 μm.

(図 4) 論文 1 から引用

毛細血管密度も MMC 包含 GH 群の方が有意に高かった。

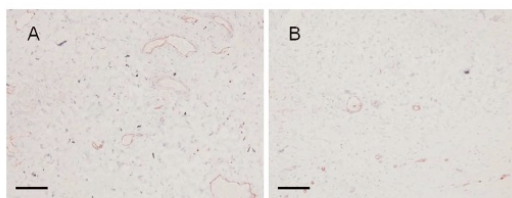


FIGURE 5. Representative photomicrographs of vessel distribution in sections obtained from the eyes treated with GH-MMC (A) and those treated with MMC alone (B). Scale bars: 100 μm.

(図 5) 論文 1 から引用

しかし PCNA 細胞密度は両群間で有意差がなかった (表 1)。

(結論) これらのことから MMC 包含 GH を緑内障濾過手術モデルに応用することにより、

従来の MMC 術中結膜下曝露と同様の眼圧下降作用、濾過胞維持作用をもつことが分かった。さらに組織学的検討から MMC 包含 GH をもちいると、MMC 単独と比較してコラーゲン密度、線維芽細胞密度、毛細血管密度が多かったことから、より組織障害が少なくなることが示唆された。MMC 包含 GH から徐放される MMC は通常の MMC 単独での濃度より薄いものではあるが生物学的活性を有する濃度である。したがって低濃度 MMC を徐放させることにより、通常の濃度の MMC 一回曝露と同等の効果でより副作用が少なくなる可能性があり、緑内障濾過手術の新たな術式としての可能性が示唆された。

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) Kojima S, Sugiyama T, Takai S, Jin D, Ueki M, Oku H, Tabata Y, Ikeda T. Effects of Gelatin Hydrogel Loading Mitomycin C on Conjunctival Scarring in a Canine Filtration Surgery Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015 Mar 26. doi: 10.1167/iovs.15-16486. PMID: 25813997 査読有り

(2) Suzuki H, Oku H, Horie T, Morishita S, Tonari M, Oku K, Okubo A, Kida T, Mimura M, Fukumoto M, Kojima S, Takai S, Ikeda T. Changes in expression of aquaporin-4 and aquaporin-9 in optic nerve after crushing in rats. *PLoS One*. 2014 Dec 5;9(12):e114694. doi: 10.1371/journal.pone.0114694. PMID: 25479407 査読有り

(3) Miki M, Ueki M, Sugiyama T, Kojima S, Ikeda T. A case involving an Ahmed glaucoma valve transferred from the vitreous into the anterior chamber of the eye with a silicone oil tamponade for the treatment of neovascular glaucoma. *Clin Ophthalmol* 7: 2013, 449-453. 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

(1) 小嶋祥太, 杉山哲也, 植木麻理, 池田恒彦, 金徳男, 高井真司. マイトマイシン C (MMC) 包含 Gelatin Hydrogel の 緑内障濾過手術への応用: MMC 単独との比較. 第 118 回日本眼科学会総会. 2014. 4. 6. 東京国際フォーラム.

(2) 小嶋祥太, 杉山哲也, 柴田真帆, 植木麻理, 池田恒彦. ビマトプロスト単回点眼の正常眼における視神経乳頭血流におよぼす影響. 第 66 回日本臨床眼科学会総会. 2012. 10. 25-28. 国立京都国際会館・グラントプリンスホテル京都.

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

大阪医科大学眼科学教室

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/opt/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小嶋祥太 (Kojima Shota)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：10388259

(2) 研究分担者

杉山哲也 (Sugiyama Tetsuya)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：20298764

(3) 連携研究者

高井真司 (Takai Shinji)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：80288703

(4) 連携研究者

金 徳男 (Jin Denan)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：90319533

(5) 連携研究者

田畑泰彦 (Tataba Yasuhiko)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：50211371