

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592576

研究課題名(和文)徐放作用を有する網膜接着糊を用いた網膜剥離および虚血性網膜疾患の治療法

研究課題名(英文) Feasibility of using bio adhesives to repair retinal detachment and ischemic retinal diseases.

研究代表者

平田 憲 (Hirata, Akira)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：60295144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：網膜剥離は治療成績が向上したが、現在でも改善の余地がある。本研究では、網膜接着剤の開発を目的とし、細菌由来トランスグルタミナーゼ(mTG)を用い、家兎眼による実験的網膜剥離モデルにおいて、網膜被覆効果を検討した。手術後1週以上、混合液が網膜上に残存し、網膜裂孔を被覆していた。網膜剥離は全て復位した。眼科用粘弾性物質を用い、同様の検討を行ったところ網膜は復位し、粘弾性物質は速やかに吸収除去された。さらに硬性内視鏡を用いた眼底観察法による臨床応用を行った。無水晶体眼、眼内レンズ挿入眼では鋸状縁部までの眼底観察が可能であることがわかり、先天性隅角形成異常患者の隅角観察にも有用であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Although surgical strategies for rhegmatogenous retinal detachment treatments developed, there is still room for improvement. In this project, we investigated the effect of using gelatin-microbial transglutaminase (gelatin-mTG) complex for treating experimental retinal detachment. Gelatin-mTG complex covered the retinal tear for more than 7 days after the vitrectomy with less prominent inflammation. Reattachment of the retina occurred in all treated eyes. In addition, we investigated the temporary tamponade effects of an ophthalmic viscosurgical device (OVD) for experimental retinal detachment. The OVD on the retinal surface had disappeared and the retina was reattached. Furthermore, the usefulness of rigid endoscopy placed on the corneal surface to observe the peripheral retina was evaluated. This technique was simple to manipulate and useful for observing the peripheral retina, in particular, in aphakic and pseudo-phakic eyes.

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：網膜剥離 トランスグルタミナーゼ 眼科用粘弾性物質 硬性内視鏡

1. 研究開始当初の背景

裂孔原性網膜剥離(以下網膜剥離)は眼科領域の主要な疾患の一つである。手術技術の進歩、手術機器の発展により治癒率は近年高くなり、手術に要する時間も短縮され、術中の患者へのストレスは軽減された一方で、網膜の復位とレーザー光凝固の癒痕化形成を目的とした術後の1-2週間の腹臥位による安静保持は多大なストレスをもたらす、中にはうつ状態をもたらす場合もある。したがって、現在の主流である網膜光凝固や冷凍凝固による炎症性の機械的接着法にかわる生体接着剤が求められる。網膜裂孔が術中に閉鎖できれば術後の腹臥位の必要はなく、増殖硝子体網膜症の危険性も低くなる。申請者は新たな手術補助剤としてヒアルロン酸とメチルセルロースの合剤であるセプラフィルム®を用いた網膜剥離手術治療の研究を行い、家兎眼における手術治療において有意な効果をもたらしたことを発表した。術後の眼圧上昇、早期のセプラフィルム®脱落などその本格的臨床応用には限界があり、新規の代替品の開発が望まれるところである。

一方、糖尿病網膜症、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞症などの網膜循環障害による眼疾患も治療に苦慮する疾患群である。特に続発黄斑浮腫はその頻度も多く、光凝固療法や後部硝子体剥離を目的とした硝子体手術、トリアムシノロン注入、抗 VEGF 抗体の硝子体腔内注入などの治療が報告されているものの、その効果については短期的であるか、統計学的エビデンスを持たないのが現状である。網膜循環障害に対する治療概念は循環障害により虚血に陥った網膜から産生される VEGF などのサイトカイン放出による二次的障害、例えば血管透過性の亢進、血管内皮の増殖、新生血管の発生を抑制することであり、途絶した血管を回復させ、本来の機能を回復させるという根本的治療とは異なる。Bevacizumab 注入に代表される特定のサイトカイン抑制をターゲットとした治療法は、サイトカインの持つ本来の生理的機能をも侵しかねない危険性ははらんでいる。一方で、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞症などは側副血行路の発達により自然治癒する例も散見されることより、適切な環境下では新生血管や既存の血管の拡張により少なくとも循環の改善が期待できる可能性があるといえる。本研究の第一の目的である、新規の網膜糊に網膜循環に作用する種々のサイトカイン、薬剤を混合貼付することにより選択的に局所の循環改善をもたらすことを第二の目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、3年間の研究期間に、1. 網膜剥離モデル眼を用いた新規の網膜接着糊を用いた基礎的実験、2. 網膜静脈閉塞症の実験モデルの確立と徐法作用を伴う網膜接着糊による局所網膜血管再構築の基礎的研

究、3. そして臨床に現在用いられている粘弾性物質を用いた網膜裂孔閉鎖法の臨床応用も並行を行う予定である。

3. 研究の方法

初年度では細菌由来のトランスグルタミナーゼ(mTG)を用い開発元の味の素株式会社との共同研究で新規の網膜接着剤開発に着手する。従来から広く用いられているフィブリン接着剤は、フィブリノーゲンを酵素と反応させて分解したフィブリンが持つ再凝固作用を利用して接着する。安全性は高いが接着力に乏しく、血液製剤であるため感染症の問題が懸念される。一方 mTG はフィブリン糊に用いられる XIII 因子と異なり Ca 非依存性であるため、いかなる条件下でも使用可能であり、汎用性が高いと考えられる。本研究で動物実験を行い、将来への臨床応用へと発展する可能性を探る。また、これまで研究を行ってきたセプラフィルムを用いた基礎研究も発展させていく。

mTG の毒性試験、適正濃度、基剤の決定:

家兎眼の硝子体腔内に 0.01U/0.1ml, 0.1U/0.1ml, 1ml/0.1ml の mTG を注入し、1、3、7、14 日後に網膜電図を測定し、網膜の機能的評価を行い、また実験動物を安楽死させ、眼球を摘出し、光学顕微鏡切片を作製し組織学的検討を行う。さらに新鮮摘出豚眼を用い、赤道部で半切し、硝子体を除去した後に、バックフラッシュニードルで網膜裂孔を作製し、液体パーフルオロカーボンを滴下し、網膜を伸展させる。種々の基剤と 0.01U/0.1ml, 0.1U/0.1ml, 1ml/0.1ml の mTG を 20 分間混合し、接着剤として網膜裂孔表面に塗布する。さらに 20 分静置し、パーフルオロカーボンを除去し、浸漬固定の後組織学的に検討する。網膜への接着性、接着剤としての粘性を判定基準として適正濃度、基剤を決定する。

家兎眼に対する手術:

静注および筋注による麻酔、23G システムによる硝子体切除、人工的後部硝子体剥離の作製、23G バックフラッシュニードルによる意図的網膜裂孔および網膜剥離の作製、液体パーフルオロカーボンによる網膜伸展、および液空気置換による灌流液除去、基剤と mTG 混合液の網膜裂孔表面への貼付、パーフルオロカーボンの除去と硝子体腔内への灌流液充填、縫合を行い、手術後は 1、3、7 日に topical endoscopy fundus imaging 法による眼底観察を行い、網膜剥離の有無を確認する。術後 7、14、28 日目に実験動物を安楽死させ、眼内に固定液を灌流し、眼球を摘出する。摘出眼は光学顕微鏡、および走査型電子顕微鏡用に標本作製し、網膜裂孔部の閉鎖過程を検討する。

二年目以降では、実験的網膜静脈分枝閉塞症モデルラットを用いて、網膜循環障害に対する正常なレスポンスを形態学的、分子生物学的に究明する。特に再疎通までの経時

的变化、血管構築の差異、網膜に発現するサイトカインの差異を検証する。初年度に検討を行った、網膜接着糊の研究結果を踏まえ、徐放剤としての検討を行う。
臨床研究としてヒアルロン酸コンドロイチン硫酸合剤(ピスコート®)を用いた裂孔閉鎖法の臨床応用を試みる。ピスコート®は空間保持を目的として白内障手術に用いられる薬剤であるが、従来の粘弾性物質と異なり、組織親和性が高いことが特徴である。本剤を用いることで短期間の網膜接着効果が期待できるため、腹臥位による安静保持を軽減もしくは不要にできることが期待できる。
三年目では二年目に引き続き、初年度に検討を行った、網膜接着糊の研究結果を踏まえ、徐放剤としての検討を継続して検討する。

4. 研究成果

1. mTG の毒性試験、適正濃度、基剤の決定:

家兎眼の硝子体腔内に 0.01U/0.1ml, 0.1U/0.1ml, 1ml/0.1ml の mTG を注入し、1、3、7、14 日後に網膜電図を測定し、網膜の機能的評価を行った。いずれの濃度においても網膜電気生理学的異常は認められなかった。眼摘後の光学顕微鏡的検討においても、形態的異常を認めなかった。新鮮摘出豚眼を用いた網膜接着剤としての探索を目的とした検討では、bovine gelatin のみが有用であると判明した。

2. mTG を用いた家兎眼における実験的網膜剥離に対する手術効果: 眼科学教室に設置した硝子体手術システムを用い、1. 麻酔、2. 23G システムによる硝子体切除、人工的後部硝子体剥離の作製、3. 23G バックフラッシュニードルによる意図的網膜裂孔および網膜剥離の作製、4. 液体パーフルオロカーボンによる網膜伸展、および液空気置換による灌流液除去、5. 基剤と mTG 混合液の網膜裂孔表面への貼付、6. パーフルオロカーボンの除去と硝子体腔内への灌流液充填、縫合 の手順を行った。手術後は 1、3、7 日に、topical endoscopy fundus imaging 法による眼底観察と光干渉断層計による検討を行い、摘出眼の光学顕微鏡、および走査型電子顕微鏡的評価を行った。手術後 1 週以上におよび基剤(gelatin)と mTG 混合液が網膜上に残存し、網膜裂孔部位を被覆していた。網膜剥離は検討した個体全てで復位を認めた。一方基材のみを塗布した個体では網膜裂孔の被覆には至らなかった。

3. 実験的網膜静脈分枝閉塞症モデルでのサイトカインおよび薬剤含有網膜糊貼付による網膜血管再構築における影響の検証:

adult male rat を用い、実験的網膜静脈分枝閉塞症モデルを作製し、網膜糊貼付による網膜硝子体界面の変化と、血管再構築の変化を血管内皮の構造(内皮細胞間の gap 構造、fenestration の有無、vesico-vacuolar organella の有無)と血管の成熟化の指標となる基底膜、pericyte の存在とその構造につ

いても比較検討を行った。結果として、対照眼と比べ網膜糊注入眼では有意な炎症性変化が認められ、血管再構築を評価するに十分なデータが得られなかった。採用する網膜糊の量が、眼球容積に比較し、大量であったこと、網膜糊の基質となるゼラチンに対する炎症反応が強かったことが推察された。

4. 眼科用粘弾性物質(ピスコート®)を用いた網膜裂孔閉鎖法の検証: 家兎眼を硝子体腔内に PFC を滴下し、剥離網膜伸展させる。PFC と網膜の間に 27G 針を挿入し、ピスコート®を塗布する。網膜裂孔が十分ピスコート®で覆われたのを確認した後、PFC を吸引除去し、液空気置換を行い、手術を終了し、術後経過を OCT を用い観察した。ピスコート®により、網膜は復位し、ピスコート®は速やかに吸収除去された。

5. 硬性内視鏡を用いた眼底観察法の臨床応用: 本研究の実験手技である硬性内視鏡を用いた眼底観察法は、眼底周辺部の観察に加え、前房隅角の観察に有用である点をふまえ、臨床研究審査委員会の承認のもと臨床応用を開始した。無水晶体眼、眼内レンズ挿入眼では鋸状縁部までの眼底観察が可能であることがわかり、先天性隅角形成異常患者の隅角観察にも有用であることがわかった。

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 10 件)

1. Hirata A, Yamamoto S, Okinami S: Use of an ophthalmic viscosurgical device for experimental retinal detachment in rabbit eyes. J Funct Biomater 4: 6-13, 2013 (査読有)
2. Yamamoto S, Hirata A, Ishikawa S, Okinami S, Ohta K, et al.: Feasibility of using gelatin-microbial transglutaminase complex to repair experimental retinal detachment in rabbit eyes. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 251: 1109-1114, 2013 (査読有)
3. Hirata A, Iwakiri R, Okinami S: A simulated eye for vitreous surgery using Japanese quail eggs. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 251: 1621-1624, 2013 (査読有)
4. Hirata A, Ishikawa S, Okinami S: Observation of peripheral retina by topical endoscopic imaging method - a preliminary study - Ophthalmol Ther 2: 11-18, 2013 (査読有)
5. Nakao I, Hirata A, Okinami S, Kojima K A case of Self-insertion of a foreign object into the lacrimal sac. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 251: 1443-1444, 2013 (査読有)
6. Hirata A: Eccrine Hidrocystoma Arising at

- the Tarsal Plate during Childhood. Case Rep Ophthalmol 4:61-3, 2013 (査読有)
7. Hirata A, Mine T: A simple and easy method using rigid endoscope to detect iridocorneal and keratolenticular adhesions in peters' anomaly. Case Rep Ophthalmol 4:238-42, 2013 (査読有)
 8. Ishikawa S, Hirata A, Nakabayashi J, Iwakiri R, Shimomura Y, Okinami S: Neuroprotective effect of small interfering RNA targeted to caspase-3 on rat retinal ganglion cell loss induced by ischemia and reperfusion injury. Curr Eye Res 37: 907-913, 2012 (査読有)
 9. Hirata A, Okinami S: Viability of topical endoscopic imaging system for vitreous surgery in rabbit eyes. Ophthalmic Surg Lasers Imaging 43: e64-67, 2012 (査読有)
 10. Hirata A, Okinami S, Hayashi K: Occurrence of capsular delamination in the dislocated in-the-bag intraocular lens. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 249: 1409-1415, 2011 (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

1. Ishikawa S, Hirata A, Nakabayashi J, Iwakiri R, Okinami S: Neuroprotective effects of siRNA, targeted caspase 3 on rat retinal damage induced by different time course of transient Ischemic Injury. ARVO annual meeting at Fort Lauderdale. May, 2013
2. Ishikawa S, Hirata A, Nakabayashi J, Iwakiri R, Okinami S: Neuroprotective Effects of siRNA, Targeted Caspase9, And Atelocollagen Complex on Rat Retinal Damage Induced By Transient Ischemic Injury. ARVO annual meeting at Fort Lauderdale. May, 2012
3. Ishikawa S, Hirata A, Nakabayashi J, Iwakiri R, Okinami S: Neuroprotective Effects of siRNA, Targeted Caspae 3, And Atelocollagen Complex on Rat Retinal Damage Induced By Transient Ischemic Injury. ARVO annual meeting at Fort Lauderdale. May, 2011

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:

国内外の別:
 取得状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 平田 憲 (Hirata, Akira)
 (佐賀大学・医学部・准教授)

研究者番号: 60295144

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: