

光重合性ポリエチレングリコール合成生体
接着剤による網膜裂孔閉鎖の有用性と
網膜毒性の検討

2014

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

星 崇仁

目次

論文概要	・・・ 2
背景	・・・ 5
方法	・・・ 7
シーラント材料	
in vitroでの検討	
網膜接着性の検討	
pHに対する影響の検討	
in vivoでの検討	
硝子体注射	
眼科検査	
網膜電図検査	
組織学的検査	
実験的網膜剥離モデルに対する	
FocalSeal®を用いた硝子体手術	
硝子体手術	
術後検査	
結果	・・・ 11
考察	・・・ 13
引用文献	・・・ 19
図表	・・・ 23
参考論文	・・・ 34

論文概要

目的：

裂孔原性網膜剥離に対する現行の手術治療では、ガスなどによる眼内タンポナーデが必要であるが、術後の体位制限や、網膜裂孔の開放に伴う硝子体腔への色素上皮細胞散布といった問題がある。裂孔原性網膜剥離の治療において、何らかの物質を用いて網膜裂孔を接着閉鎖するという方法は、これらの問題を解決する合理的な方法であると考えられる。しかしながら、これまでに網膜接着閉鎖材料として検討された物質には、眼毒性、眼内への供給困難、接着力の不足、炎症反応の惹起、肉芽組織の形成反応などの欠点があり、今日まで網膜裂孔接着閉鎖材料を用いた裂孔原性網膜剥離治療は実現していない。

FocalSeal®は、ポリエチレングリコール合成吸収性ハイドロゲルで、肺切除術における空気漏出防止用シーリング剤として米国Food & Drug Administration (FDA)に承認されているシーラントである。キセノン光源による可視光線の照射により、40から60秒以内に重合硬化し、透明、柔軟で、組織接着性の高い物質に変化することで空気や液体の漏出を防止する効果を発揮する。本研究では、より効果的な網膜裂孔接着閉鎖材料として、すでに他臓器で臨床応用されているFocalSeal®の有用性および、その網膜毒性について検討した。

対象と方法：

網膜接着性の検討 (in vitro)

まず、眼灌流液中におけるFocalSeal®の網膜接着性の検討を行った。摘出豚眼の前眼部および硝子体を除去して眼球カップを作製し、網膜裂孔を作製した。FocalSeal®を、網膜裂孔を覆うように塗布し、キセノン光を40秒間光照射し重合した後、眼灌流液で眼球カップを満たし、24時間放置した。

続いて、FocalSeal®の網膜に対する接着強度の検討を行った。摘出豚眼から眼球壁片を作製し、網膜裂孔を作製した。FocalSeal®を、網膜裂孔を覆うように塗布し、

光照射し重合した。眼灌流液を、FocalSeal®を塗布した網膜裂孔に勢いよく噴射した。対照として、同様の実験を、FocalSeal®を塗布しなかった網膜裂孔に対して行った。

pHに対する影響の検討 (in vitro)

FocalSeal®を浸漬した眼灌流液を37°Cに恒温放置し72時間まで経時的にpHを測定した。

網膜毒性の検討 (in vivo)

FocalSeal®の網膜毒性評価のため、FocalSeal®溶液を有色家兎眼に硝子体注射し(FocalSeal®群)、経時的な前・後眼部眼科検査および、硝子体注射前後の網膜電図記録を行った。硝子体注射後に家兎眼球を摘出し組織学的検討を行った。対照群の家兎には眼灌流液を硝子体注射し、同様の評価を行った。

実験的網膜剥離モデルに対するFocalSeal®を用いた硝子体手術

有色家兎眼に硝子体手術を行って実験的網膜剥離を作製し、FocalSeal®を用いて網膜裂孔を閉鎖し、液置換にて手術を終了した。術後、網膜再剥離を来さないか3ヶ月目まで観察を行った。

結 果 :

眼球カップの網膜裂孔にFocalSeal®を塗布し、眼灌流液中に放置した実験では、24時間後もFocalSeal®が網膜に接着した状態を保っており、網膜への良好な接着性を示した。網膜への接着強度を検討した実験では、FocalSeal®を塗布しなかった網膜裂孔では眼灌流液の噴射により直ちに網膜剥離が生じたのに対して、同接着剤を塗布した網膜裂孔では網膜剥離を生じなかった。

FocalSeal®のpHに対する影響を検討した実験では、いずれの時点においても、pHは7.2から8.2の範囲内であった。

FocalSeal®溶液の硝子体注射後、28日目の観察期間において、前・後眼部眼科検査で眼炎症を示唆する所見はみられなかった。網膜電図検査では、FocalSeal®溶液の硝子体注射前後の全ての測定において、典型的な網膜電位波形を示した。FocalSeal®硝子体注射前後および、FocalSeal®群と対照群との間で、網膜電図のa波、b波、律動様小波の振幅および潜時に統計学的有意差を認めなかった。光学

顕微鏡を用いた組織学的検査では、硝子体注射後28日目において、FocalSeal®群および対照群の、いずれの実験眼においても、炎症を含めた異常所見を認めなかった。

実験的網膜剥離モデルに対してFocalSeal®を用いて硝子体手術を行った実験では、術後3ヶ月目まで網膜再剥離を来さず、接着剤で網膜裂孔を閉鎖し、実験的網膜剥離を治療できた。

考 察 :

裂孔原性網膜剥離の治療における網膜裂孔接着閉鎖材料として、これまでに、シアノアクリレートやフィブリンのり、ヒアルロン酸ナトリウム／カルボキシメチルセルロース生体吸収性フィルム、貝類由来接着タンパク、ベータ型変異増殖因子、ポリシロキサンなどを用いた研究が報告されている。しかしながら、これらの材料は、眼毒性、眼内への供給困難、接着力の不足、炎症反応の惹起、肉芽組織の形成反応などの欠点があり、臨床での実用化に至っていない。

一方、FocalSeal®は投与後に光照射によって重合を行うので、重合のタイミングおよび重合速度のコントロールが容易である点、重合後は柔軟なシート状に成形する性質を持つ点、また、27ゲージ針を用いて眼内へ容易にデリバリーすることができる点、長期に高い組織接着性を示す点などから、これまでに報告されてきた他の接着剤と比較して、操作性に優れた網膜裂孔閉鎖材料となり得ると考えられる。また、本研究により、網膜毒性がないことが示された。

結 論 :

本研究により、光重合性ポリエチレングリコール合成生体接着剤FocalSeal®は効果的に網膜裂孔を閉鎖し、眼毒性がないことが示された。FocalSeal®は網膜閉鎖材料として有用である可能性があることが示唆された。

光重合性ポリエチレングリコール合成生体接着剤による 網膜裂孔閉鎖の有用性と網膜毒性の検討

In vivo and in vitro feasibility studies of intraocular use of a synthetic bioadhesive to
close retinal breaks in porcine and rabbit eyes

[背景]

裂孔原性網膜剥離は、網膜に裂孔または円孔が開き、液化硝子体はその孔を通して網膜下に入り込むことで発生する。(図1) 一般に、発症初期は網膜剥離の範囲は小さく、時間経過とともに徐々にその範囲は拡大するが、巨大裂孔の場合は急速に進行することが多い。進行すると網膜全剥離となり、失明に至る疾患である。網膜裂孔または円孔形成の原因としては、加齢に伴う硝子体の液化および収縮や網膜萎縮、外傷等がある。本邦では年間1万人に1人程度の頻度で発症し、全年齢で発症するが、好発年齢は20代と50代の二峰性の分布をとる^{1,2}。生産年齢にも発症し、その活動に支障をきたすため、社会的損失を引き起こす疾患であると言える。遠視眼、正視眼に比べ近視眼に、より高頻度で発症する。網膜剥離の前駆症状としては飛蚊症や光視症があり、網膜剥離が進行すると視野欠損や視力低下をきたす。放置すれば失明に至るため、外科的治療を要する。

硝子体手術は、裂孔原性網膜剥離に対する手術療法として広く普及している治療である。角膜輪部から約4mmの強膜、すなわち毛様体扁平部にあたる位置に強膜ポートを作製し、眼内にアプローチする。強膜ポートは、従来20ゲージの創口が用いられてきたが、近年、小切開化が進み23ゲージや25ゲージの創口での手術が普及しつつある。3つの強膜ポートのうち、一つを眼内灌流ポートとし、その他のポートから硝子体カッター、眼内照明を挿入して硝子体手術を行う。(図2) 裂孔原性網膜剥離に対する硝子体手術では、硝子体を切除し、硝子体の網膜への牽引を解除することが、網膜を復位させるために重要な操作である。硝子体を切除し、網膜への牽引を解除した後、眼内灌流を灌流液から空気に切り替え、眼内を空気に置換する。

このとき、硝子体カッターを用いて眼内の灌流液および剥離した網膜下の液を吸引除去することで、剥離した網膜を復位させる。復位した網膜の裂孔周囲にレーザープローブを用いて網膜光凝固を行い、網膜裂孔周囲の癒着瘢痕化を促進する。必要に応じて眼内に六フッ化硫黄(SF_6)や八フッ化プロパン(C_3F_8)等の長期滞留ガスを注入し、眼内タンポナーデを得た上で手術を終了する。

上記の通り、硝子体手術は裂孔原性網膜剥離に対する治療法として広く普及しているが、現行の手術法では多くの場合、ガスなどを眼内に充満してタンポナーデを行う必要があり、さらに冷凍凝固や網膜光凝固の併施が必要である^{3,4}。しかし、現行の手術法では、術後、眼内タンポナーデ効果維持のため、裂孔部にガスが当たるように伏臥位などの体位保持が必要となり、患者は体位制限による苦痛を伴う上、約2週間の入院期間が必要となる。また、この方法では裂孔自体は硝子体腔に開放されているため、術後の重大な合併症である増殖性硝子体網膜症の原因となる網膜色素上皮細胞の硝子体腔への散布も問題といえる。硝子体手術中に実施される網膜光凝固は、網膜裂孔のサイズによってその数や凝固範囲が変わるが、網脈絡膜に炎症を惹起して癒着瘢痕を促すため、手術侵襲が増大し、術後の炎症を増大する。術後の過剰な炎症は、増殖硝子体網膜症の発症のリスク要因である。さらに、現在行われている手術方法では、一部の症例において網膜復位を得られない場合がある。特に、増殖硝子体網膜症や、傍乳頭ぶどう腫などの網膜先天奇形に伴う裂孔原性網膜剥離、未熟児網膜症に伴う後極部網膜裂孔などの難症例においては、現行の手術方法でも治癒に至らない症例が存在する。

裂孔原性網膜剥離の治療において、何らかの物質を用いて網膜裂孔を接着閉鎖するという方法は理論的に正しいと考えられる。すなわち、この方法により、硝子体液が網膜裂孔を通過して網膜下へ流入することを防ぎ、また増殖硝子体網膜症を引き起こす、網膜色素上皮細胞やその他の細胞の硝子体腔への散布を防ぐことができるからである⁵。さらに、網膜と脈絡膜を物理的に接着させるため、網脈絡膜の癒着瘢痕による接着を必要とせず、手術侵襲の増大につながる網膜光凝固が不要となる可能性がある。

裂孔原性網膜剥離の治療における網膜裂孔接着閉鎖材料として、これまでにシア

ノアクリレート⁶⁻¹²やフィブリンのり^{13,14}、ベータ型変異増殖因子¹⁵、貝類由来接着タンパク¹⁶、ヒアルロン酸ナトリウム／カルボキシメチルセルロース生体吸収性フィルム¹⁷、ポリシロキサン⁸などを用いた研究が報告されている。しかしながら、シアノアクリレートは、わずかな水分と反応して急速に重合する性質を持つため、眼内での操作性が悪く、また重合して硬い塊状物を形成するため、網膜裂孔の閉鎖材料として最適とは言い難い。フィブリンのりは、網膜への接着力が十分とは言えず、また血液製剤であるため潜在的な感染症伝播リスクがある。その他の材料についても、眼毒性、眼内への供給困難、接着力の不足、炎症反応の惹起、肉芽組織の形成反応などの欠点があり、今日まで網膜裂孔接着閉鎖材料を用いた裂孔原性網膜剥離治療は実現していない。

本研究では、より効果的な網膜裂孔接着閉鎖材料として、ヒトの肺切除手術において切除部位からの空気漏出を防ぐシーリング剤として臨床応用されているFocalSeal® (Genzyme Corporation, Cambridge, MA)の有用性と網膜毒性について検討した。

[方法]

シーラント材料

FocalSeal®は、ポリエチレングリコール合成吸収性ハイドロゲルで、肺切除術における空気漏出防止用シーリング剤として米国Food & Drug Administration (FDA)に承認されているシーラントである。キセノン光源(波長450-500nm, 青緑)による可視光線の照射により、40から60秒以内に重合硬化し、透明、柔軟で、組織接着性の高い物質に変化することで空気や液体の漏出を防止する効果を発揮する。この材料は6から9ヶ月で加水分解され体外に排泄される^{18,19}。

In vitroでの検討

網膜接着性の検討

まず、眼灌流液中におけるFocalSeal®の網膜接着性の検討を行った。食肉加工業者から屠殺後1日以内の新鮮な豚眼を入手した。角膜、虹彩、水晶体を含む前眼部組織を切除し、硝子体を除去して半球状の眼球カップを作製した。眼球カップの網膜に裂孔を作製し、網膜剥離を作製した。FocalSeal®を、27ゲージ針を用いて網膜裂孔全体を覆うように塗布し、キセノン光源Accurus® Xenon Illuminator (Alcon, Inc.)を用いて40秒間光照射し(波長420-700nm)重合した。その後、眼灌流液で眼球カップを満たし24時間放置した。(図3)

次に、FocalSeal®の網膜に対する接着強度の検討を行った。摘出豚眼を解剖して、網膜、脈絡膜、強膜を含む眼球壁片を作製し、固定板上にピンで固定した。固定した眼球壁片に網膜裂孔を作製した。FocalSeal®を、27ゲージ針を用いて網膜裂孔全体を覆うように塗布し、前述と同様の手順で光照射し重合した。20ゲージ針を接続したシリンジを用いて、10mLの眼灌流液を、FocalSeal®を塗布した網膜裂孔に勢いよく噴射した。対照として、同様の実験を、FocalSeal®を塗布しなかった網膜裂孔に対して行った。

pHに対する影響の検討

眼灌流液BSS Plus® (Alcon, Inc.)にFocalSeal®を浸漬し、pHを経時的に測定した。BSS Plus®のpHは約7.4であり、BSS® (Alcon, Inc.)のpH 7.0に比較してヒトの生体環境により近いいため、今回の検討ではBSS Plus®を用いた。試験管にBSS Plus® 5mLを注入し、光重合したFocalSeal® 0.2mLを加えたサンプル、光重合していないFocalSeal® 0.2mLを加えたサンプル、何も加えないサンプルをそれぞれ3サンプルずつ、計9サンプル準備した。全てのサンプルを37℃に恒温放置した。実験開始から1、3、6、12、24、36、48、72時間後のpHを、pHメーターを用いて測定した。

In vivoでの検討

2.0から3.0kgの正常有色家兔を実験に用いた。本実験は、筑波大学動物実験倫理委員会の承認を受け、The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)の動物実験取り扱い倫理規約に則して実施した。

硝子体注射

全ての実験手技は、手術用顕微鏡下において、滅菌操作で行われた。12匹のウサギを、FocalSeal®群6匹、対照群6匹の2群に分けた。左眼を実験眼とし、0.5%フェニレフリンおよび0.5%トロピカマイドの点眼により散瞳を得た。ウサギの全身麻酔は、ケタミン塩酸塩(35mg/kg)およびキシラジン(5mg/kg)筋肉内投与で行った。さらに、0.4%オキシブプロカイン点眼により局所麻酔を行った。FocalSeal® 0.2mLを眼灌流液5mLに溶解してFocalSeal®溶液を作製し、同溶液 0.1mLを実験眼(左眼)の硝子体に注射した。硝子体注射は、30ゲージ針を用いて毛様体扁平部から刺入し、実験眼にコンタクトレンズを装着した上で、手術用顕微鏡下で硝子体腔を観察しながら、視神経乳頭付近に可能な限り網膜に近い位置まで注射針を進めて行った。同様の手技でFocalSeal®を含まない眼灌流液 0.1mLを対照群の実験眼(左眼)に硝子体注射した。

眼科検査

硝子体注射前および硝子体注射後1、7、14、28日目に、細隙灯顕微鏡と倒像眼底鏡を用いて眼内の観察を行った。

網膜電図検査

硝子体注射前および硝子体注射後28日目に、全身および局所麻酔を前述の方法で得た後、散瞳状態で網膜電図検査を施行した。網膜電位計用LED角膜電極(LW-102; Mayo, Inazawa, Japan)を両眼の角膜に装着し、接地電極を耳に装着した。網膜電図検査は、網膜電位計(LE-3000; Tomey, Nagoya, Japan)を用いて、両眼同時

に施行した。この装置は、刺激装置と増幅器、記録装置が一体となった装置である。波長帯は0.3から300Hzとした。光刺激は360、3000、20000cd/m² の3種類の輝度で行い、刺激時間は1ミリ秒とした。

30分間の暗順応の後、弱い刺激から網膜電図検査を開始した。背景光は使用しなかった。それぞれの輝度につき40秒毎に4回の光刺激を行い、加算平均した。同時に記録した左右眼の振幅と潜時それぞれの値の比をとり、振幅比、潜時比とした。硝子体注入前後の比較には対応のある両側t検定を用いて統計学的検討を行った。FocalSeal®群と対照群との比較には対応のないt検定を用いて統計学的検討を行った。

組織学的検査

硝子体注射後28日目に、ペントバルビタール過量投与により実験動物の安楽死を得た後、眼球を摘出した。摘出した眼球を2%パラフォルムアルデヒドおよび2.5%グルタルアルデヒド溶液で固定し、段階的にアルコール脱水した後、パラフィン包埋した。4 μm厚の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行って、光学顕微鏡で観察した。

実験的網膜剥離モデルに対するFocalSeal®を用いた硝子体手術

2.0から3.0kgの正常有色家兔を実験に用いた。本実験は、筑波大学動物実験倫理委員会の承認を受け、The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)の動物実験取り扱い倫理規約に則して実施した。

硝子体手術

全ての実験手技は、手術用顕微鏡下において、滅菌操作で行われた。ウサギ(有色家兔)1羽の左眼を実験眼とし、0.5%フェニレフリンおよび0.5%トロピカマイドの点眼により散瞳を得た。ウサギの全身麻酔は、ケタミン塩酸塩(35mg/kg)およびキシラジン(5mg/kg)筋肉内投与で行った。さらに、0.4%オキシブプロカイン点眼により局所麻

酔を行った。手術用顕微鏡下に25ゲージトロカールシステムを用いて角膜輪部より約1mmの位置に強膜ポートを作製し、3ポート硝子体手術を行った。トリウムシノロン懸濁液を硝子体注入して硝子体を可視化したのち、硝子体カッターで可能な範囲で硝子体切除を行った。視神経乳頭下方の網膜の一部をジアテルミーで凝固し、直径約2mmの意図的網膜裂孔を作製した。27ゲージ針を用いて眼内灌流液を作製した網膜裂孔に吹きかけ、眼灌流液を、網膜裂孔を通して網膜下に流入させることで、直径約3乳頭径大の網膜剥離を作製した。続いて、眼内灌流を灌流液から空気に切り替え、液-空気置換を行った。バックフラッシュニードルを用いて網膜下に残存する眼灌流液を可能な限り吸引し、網膜を復位させた。FocalSeal®を27ゲージ針を用いて、作製した網膜裂孔を完全に覆うように塗布した後、キセノン光源 Accurus® Xenon Illuminator (Alcon, Inc.)を用いて40秒間光照射し(波長420-700nm)重合した。眼内灌流を再び空気から灌流液に切り替え、空気-液置換を行った。トロカールを抜去し、強膜ポートを8-0絹糸で縫合閉鎖した。27ゲージ針を用いて、ベサメタゾン2mg およびゲンタマイシン20mgを結膜下注射し、抗菌薬眼軟膏を点入して手術を終了した。

術後検査

術翌日、術後1週目、1、3ヶ月目に細隙灯顕微鏡と倒像眼底鏡を用いて眼内の観察を行い、さらに眼底写真撮影および光干渉断層計による網膜裂孔周囲の網膜形態の観察を行った。

[結果]

In vitroでの検討

眼球カップの網膜裂孔にFocalSeal®を塗布し、眼灌流液中に放置した実験では、24時間後もFocalSeal®が網膜に接着した状態を保っており、網膜への良好な接着性

を示した。(図4) 網膜への接着強度を検討した実験では、FocalSeal®を塗布しなかった網膜裂孔では眼灌流液の噴射により直ちに網膜剥離が生じたのに対して、同接着剤を塗布した網膜裂孔では網膜剥離を生じなかった。(図5)

FocalSeal®のpHに対する影響を検討した実験では、いずれの時点においても、すべてのサンプルで、pHは7.2から8.2の間であった。(図6)

In vivoでの検討

FocalSeal®溶液の硝子体注射後28日目の観察期間において、眼炎症を示唆する所見はみられなかった。細隙灯顕微鏡および眼底倒像鏡による観察では、どの時点においても、全ての実験眼で角膜、前房、水晶体、硝子体、網膜の所見は正常であった。

網膜電図検査では、FocalSeal®溶液の硝子体注射前後の全ての測定において、典型的な網膜電位波形を示した。すなわち、a波(a-wave)と、それに続いて速やかな電位上昇を示すb波(b-wave)、およびb波の電位上昇に伴ってみられる律動様小波(op-wave)が観察された。図7にFocalSeal®溶液の硝子体注射後28日目に両眼同時に記録した網膜電図を示す(FocalSeal®群)。FocalSeal®群と対照群とで、それぞれの波形成分の振幅比、潜時比に統計学的有意差を認めなかった。また硝子体注射前後においても、それぞれの波形成分の振幅比、潜時比に統計学有意差を認めなかった。(図8)

光学顕微鏡を用いた組織学的検査では、硝子体注射後28日目においていずれの実験眼においても炎症を含めた異常所見を認めなかった。(図9)

実験的網膜剥離モデルに対するFocalSeal®を用いた硝子体手術

術中、FocalSeal®を網膜裂孔に塗布し閉鎖した後、眼内を液置換したが、網膜復位を維持していた。図10に術翌日、術後1週目、1、3ヶ月目に撮影した眼底写真および光干渉断層計画像を示す。観察期間を通じて網膜は復位した状態を維持し、網膜

再剥離を認めなかった。術後7日目までは倒像眼底鏡による観察で、作製した網膜裂孔上に無色透明の接着剤を認めたが、それ以降の観察では同定できなかった。光干渉断層計ではいずれの時点においても、接着剤を観察することはできなかった。光干渉断層計による観察では、術翌日から術後7日目にかけて作製した網膜裂孔の辺縁の網膜が持ち上がっている所見を認めた。(図10 *) しかし、術後1ヶ月以降は観察されていた網膜裂孔辺縁の持ち上がりが消失し、脈絡膜に接着していた。(図10 **) 術翌日から術後7日目にかけて作製した網膜裂孔が拡大している所見を認めた。また、術翌日から全観察期間を通して、作製した網膜裂孔の周囲、すなわち、おおよそ接着剤を塗布した範囲の外縁に網膜すう壁を認めた。(図10 矢印)

[考察]

FocalSeal®は可溶性ポリエチレングリコール合成ハイドロゲル接着材料であり、キセノン照明により光重合し、透明、柔軟な接着性ハイドロゲルを形成する。今回の実験では、FocalSeal®は27ゲージ針を通して網膜裂孔に塗布することが可能であり、光重合させることで網膜裂孔を接着閉鎖した。FocalSeal®で網膜裂孔を接着閉鎖した状態では、網膜裂孔への眼灌流液の噴射によっても網膜再剥離を来すことはなかった。

シアノアクリレートは多くの研究者により網膜接着材料としての検討がなされ^{5-7,20-25}、これまでに穿孔性眼外傷による巨大網膜裂孔の症例⁸や、下方網膜裂孔や網膜切除に伴う増殖硝子体網膜症の症例⁹、脈絡膜コロボーマ内の網膜裂孔に伴う網膜剥離の症例^{10,11}、黄斑円孔再発症例^{10,12}、未熟児網膜症に対する硝子体手術における網膜前膜切除後の網膜裂孔の症例¹⁰などに臨床応用されてきた。しかしながら、シアノアクリレートは投与後、急速に重合する性質を持つため、オイルと混合するなどして重合をより緩徐にしても、眼内へのデリバリーや塗布が非常に困難である。さらに、シアノアクリレートは重合により、硬い、シート状というよりはむしろ塊状に成形する性質を持つため、大きな網膜裂孔を接着閉鎖するには不向きである。一方、

FocalSeal®は投与後に光照射によって重合を行うので、重合のタイミングおよび重合速度のコントロールが容易である。加えて、重合後は硬い塊状物というよりは柔軟なシート状に成形する性質を持つため、網膜裂孔閉鎖材料としてはシアノアクリレートよりも優れていると考えられる。

ヒアルロン酸ナトリウム／カルボキシメチルセルロース生体吸収性フィルム (Seprafilm®; Genzyme Corporation, Cambridge, MA)は毒性がなく、不活性で、抗原性のない生体適合性フィルムで、湿性組織に強く接着する性質を持つ。末田らは以前に、このフィルムが網膜によく接着することを、摘出牛眼を用いた実験で示した²⁶。しかしながら、このフィルムは乾燥した状態で適応部位にデリバリーする必要があり、硝子体腔への供給はごく小さなサイズでなければデリバリーが困難である。すなわち、このフィルムでは周辺部の網膜裂孔や大きな網膜裂孔の閉鎖は難しく、後極部の小さな網膜裂孔に適応に限られる。一方、FocalSeal®は27ゲージ針を用いて眼内へ容易にデリバリーすることができ、この点においてヒアルロン酸ナトリウム／カルボキシメチルセルロース生体吸収性フィルムより優れていると言える。

フィブリンのりは、多くはウシ血清もしくはヒト自己血清から精製され、比較的異物反応が起きにくい材料であるが、その網膜への接着性は十分とは言えない^{13,27}。Colemanらは巨大網膜裂孔の症例に硝子体手術を行い、網膜裂孔の辺縁にフィブリンのりを塗布することで網膜裂孔の接着閉鎖を試みた。しかし、フィブリンのりは4から6日しか網膜に対する持続的な接着効果を示さなかったため、全ての症例で術後の網膜再剥離を生じた¹⁴。ベータ型変異増殖因子は網膜裂孔を接着閉鎖することが可能だが、冷凍凝固や眼内タンポナーデの併用が不可欠であった。ベータ型変異増殖因子およびフィブリンのりの接着効果は、一時的なものであると言わざるを得ない¹⁵。一方、FocalSeal®は肺切除術における空気漏出防止用シーリング剤として開発され、長期に高い組織接着性を示すため、この点においてフィブリンのりおよびベータ型変異増殖因子よりも優れていると考えられる。

FocalSeal®を眼灌流液に浸漬しpHを経時的に測定した実験では、FocalSeal®を硝子体内投与するにあたって許容範囲内の変動であった。今回行ったpHに関する実験の方法は、以前ヒアルロン酸ナトリウム／カルボキシメチルセルロース生体吸収

性フィルムにおいて行われた実験方法と同様であり、その実験でも実験材料(ヒアルロン酸ナトリウム／カルボキシメチルセルロース生体吸収性フィルム)は硝子体内投与するにあたって許容範囲内であるとの結論を得ている²⁶。

FocalSeal®溶液をウサギの硝子体に注射した後、眼科検査および組織学的検討を行った結果、炎症反応を含めた明らかな眼組織の障害は認められなかった。網膜電図検査でも、FocalSeal®群と対照群とで各波成分の振幅比、潜時比に有意差はみられず、FocalSeal®溶液の硝子体注射は網膜機能に影響を与えないことが示された。末田らは、ヒアルロン酸ナトリウム／カルボキシメチルセルロース生体吸収性フィルムについて、今回と同様の実験方法で網膜機能に与える影響を検討する実験を行っており、実験材料(ヒアルロン酸ナトリウム／カルボキシメチルセルロース生体吸収性フィルム)の網膜毒性はなかったと結論づけている²⁶。一方、シアノアクリレートは網膜に対して重大な毒性、および組織反応性を示したと報告されている¹⁰⁻¹²。

その他、貝類由来接着タンパク、およびポリシロキサン⁸の網膜接着剤としての有用性を評価した報告がある^{8,16}。貝類由来接着タンパク(Cell-Tak®; Becton Dickinson, Bedford, MA)は炎症反応を引き起こすと報告された¹⁶。ポリシロキサンは眼灌流液中でのデリバリーが可能という利点があるが、局所での肉芽形成反応を認めたと報告されている⁸。

これまでに報告された各種の生体接着剤が、網膜接着材料としては、その接着性やデリバリー性、安全性に難点が指摘されている一方で、FocalSeal®を含めたポリエチレングリコールハイドロゲルは、より優れた網膜接着材料であると考えられている。Margalitらは、3種類のポリエチレングリコールハイドロゲル、精製フィブリンのり、自己血清フィブリンのり、貝類由来接着タンパク、および3種類の光硬化性接着剤を用いて眼科手術用材としての適正を検討し、ポリエチレングリコールハイドロゲルが粘度や接着性、安定性、非透過性、安全性において他の材料より優れていることを示した²⁷。これまでの報告から、ポリエチレングリコールハイドロゲルの網膜接着材料としての欠点は主に次の二点が考えられる。一点目は、液状の重合開始剤とゲルの2剤を混合する必要があること²⁶、二点目は重合にかかる時間が2から3分と、比較的長いことである²⁷。これらの欠点のために、ポリエチレングリコールハイドロゲルの

塗布範囲は眼底後極部に限定され、周辺部の網膜裂孔に塗布した場合には、重力により後極部方向に流れ落ちてしまう。さらに、液状の重合開始剤は網膜裂孔に塗布されると網膜下に流れ込んでしまうという問題がある。末田らは、重合時間が8から10秒のポリエチレングリコールハイドロゲル、DuraSeal® dural sealant (Confluent Surgical, Waltham, MA, US)を、ダブルシリンジシステムを用いて塗布することで、問題の解決を試みた¹⁷⁾。しかし、彼らの実験的網膜剥離に対する手術では、網膜下に接着剤が流れ込む症例がみられ、問題の解決はなお困難であった。

FocalSeal®は液状の重合開始剤を必要とせず、ゲル剤を光照射により重合するという性質をもつため、上述の問題を根本的に解決できる可能性がある。すなわち、網膜裂孔に塗布した際に液状の接着剤が網膜下に流れ込むことがないため、網膜裂孔が周辺部に存在する場合でも周辺部網膜に接着剤を塗布することが可能と考えられる。さらに、重合のための光照射には現行の手術で汎用されている眼内キセノン照明を使用することが可能であるため、現行の手術との親和性も高い。

本研究では、実際に有色家兎を用いて実験的網膜剥離を作製し、硝子体手術において接着剤を用いて網膜裂孔を閉鎖し、液置換した状態で手術を終了する実験を行い、術後3ヶ月目まで網膜復位を維持することができた。実験は1羽1眼のみで行われたため、今後、対象を増やして検討することが不可欠であるが、裂孔原性網膜剥離に対する術後タンポナーデ、さらには網膜光凝固を必要としない術式の可能性を示す重要な結果であると考えられる。術翌日から術後7日目にかけて、光干渉断層計での観察により、作製した網膜裂孔の拡大が見られた。また、術後の全観察期間を通して、接着剤を塗布した範囲の辺縁に網膜すう壁の形成が認められた。これらの所見は、接着剤の膨張により生じたものと推察される。FocalSeal®は生体に投与して光重合した後、周囲の水分を吸収し、約24時間で300%程度の体積に膨張することが知られている。本接着剤に限らず、ハイドロゲル製剤は一般的に水分を吸収して膨張する性質があり、網膜裂孔閉鎖剤としての使用に際しては、膨張率を許容できる範囲内にとどめた、もしくは非膨張性の材料が必要であるかもしれない。また、術後7日目まで見られていた網膜裂孔縁の持ち上がりが、術後1ヶ月目では消失していたことについても、実験数を増やして、網膜裂孔閉鎖に接着剤を用いた場合の経

時的な裂孔閉鎖メカニズムを明らかにする必要があると考えられる。

本研究の主なlimitationは、網膜上に塗布し光重合した接着剤が、接着した部位の網膜に直接与える影響を評価できていないことである。ただし、図10の眼底写真に示すように接着剤を塗布した部位の網膜に明らかな組織の萎縮所見を認めず、光干渉断層計画像でも明らかな網膜菲薄化は認められないことから、その影響は限定的であると考えられる。また、従来の手術法では網膜裂孔周囲に網膜光凝固を施行するため網膜への侵襲性は高く、それに比して接着剤の網膜への影響は小さいものと推測される。いずれにせよ、今後FocalSeal®を用いた硝子体手術を複数の実験モデルを用いて行い、組織学的評価および網膜電図検査などによる網膜機能評価を行う必要があると考えられる。

本研究により、FocalSeal®を網膜裂孔接着閉鎖材料として用いた硝子体手術で裂孔原性網膜剥離を治療できる可能性が示されたが、臨床応用へはさらなるいくつかのステップが必要である。人体に用いる手術用接着剤は、薬事法の定める高度管理医療機器(クラスⅣ)に該当するため、厚生労働省の製造販売承認を取得することが求められる。まず、接着剤の有効性、安全性を基礎実験および動物実験により明らかにする必要があり、本研究はこの初段階にあると考えられる。この段階で必須と思われる未実施の実験は、網膜色素上皮培養細胞を用いた毒性試験であり、また、実験動物に対するFocalSeal®を用いた硝子体手術をより多くの実験動物を使用して行い、その有効性、安全性についてのデータを蓄積する必要がある。続いて、薬事法上の承認を目的とした臨床試験、すなわち治験を行う必要があるが、これには薬事法および医療機器GCP省令を含む法令が適応される。網膜剥離に対する網膜接着材料を用いた硝子体手術ではタンポナーデが不要となり、術後伏臥位の維持から解放されるという利点があり、もちろん全ての網膜剥離症例に対してその術後QOLを改善し得ると期待されるが、本術式は従来の手術法では治療の困難な症例、すなわち種々の理由により術後伏臥位の維持が困難な症例や、シリコンオイルを用いたタンポナーデを行っても網膜再剥離を繰り返す症例などに対して特に有用であると考えられるため、臨床試験の初期段階においては医師主導の臨床研究として、そのような症例に本治療法を施行し、その有効性、安全性を評価することも検討

すべきであると考えられる。

本研究により、光重合性ポリエチレングリコール合成生体接着剤FocalSeal®は効果的に網膜裂孔を閉鎖し、眼毒性がないことが示された。FocalSeal®は網膜裂孔接着閉鎖材料として有用である可能性があることが示唆された。

[引用文献]

1. 岸 章治. 裂孔原生網膜剥離の病態. 日本の眼科. 2005;76:11-5
2. 河野 眞一郎. 網膜剥離. 日本眼科学会雑誌. 2006;109:227-40
3. Schepens CL, Hartnett ME, Hirose T. Schepens' retinal detachment and allied diseases. Butterworth, Heinemann, Boston, 2000.
4. Brinton DA, Wilkinson CP. Retinal detachment principles and practice. Third Edition, Oxford University press, 2009.
5. Gilbert CE, Grierson I, McLeod D. Retinal patching: a new approach to the management of selected retinal breaks. *Eye*. 1989;3:19-26.
6. McCuen BW II, Hida T, Sheta SM, Isbey EK III, Hahn DK, Hickingbotham D. Experimental transvitreal cyanoacrylate retinopexy. *Am J Ophthalmol*. 1986;102:199-207.
7. Hida T, Sheta SM, Proia AD, McCuen BW II. Retinal toxicity of cyanoacrylate tissue adhesive in the rabbit. *Retina*. 1988;8:148-53.
8. Faulborn J, Witschel H. Intraocular application of tissue adhesive (histoacryl) in retinal detachment surgery. A clinicopathologic report of two cases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1978;207:15-20.
9. McCuen BW II, Hida T, Sheta SM. Transvitreal cyanoacrylate retinopexy in the management of complicated retinal detachment. *Am J Ophthalmol*.

1987;104:127–32.

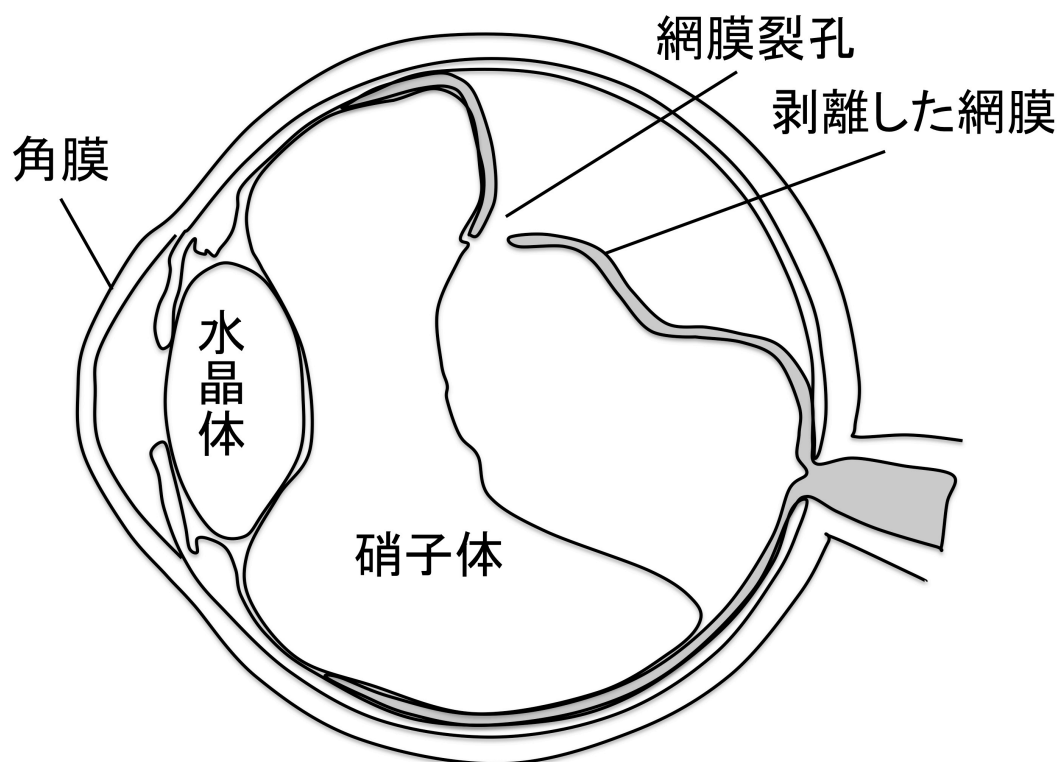
10. Hartnett ME, Hirose T. Cyanoacrylate glue in the repair of retinal detachment associated with posterior retinal breaks in infants and children. *Retina*. 1998;18:125–9.
11. Hotta K, Hirakata A, Hida T. The management of retinal detachments associated with choroidal colobomas by vitrectomy with cyanoacrylate retinopexy. *Jpn J Ophthalmol*. 1998;42:323–6.
12. Sheta SM, Hida T, McCuen BW II. Cyanoacrylate tissue adhesive in the management of recurrent retinal detachment caused by macular hole. *Am J Ophthalmol*. 1990;109:28–32.
13. Nasaduke I, Peyman GA. The use of autogenous rabbit fibrin sealant to plug retinal holes in experimental detachments. *Ann Ophthalmol*. 1986;18:324–7.
14. Coleman DJ, Lucas BC, Fleischman JA, et al. A biologic tissue adhesive for vitreoretinal surgery. *Retina*. 1988;8:250–6.
15. Smiddy WE, Glaser BM, Green WR, et al. Transforming growth factor beta. A biologic chorioretinal glue. *Arch Ophthalmol*. 1989;107:577–80.
16. Liggett PE, Cano M, Robin JB, Green RL, Lean JS. Intravitreal biocompatibility of mussel adhesive protein. A preliminary study. *Retina*. 1990;10:144–7.
17. Sueda J, Fukuchi T, Usumoto N, Okuno T, Arai M, Hirose T. Intraocular use of hydrogel tissue adhesive in rabbit eyes. *Jpn J Ophthalmol*. 2007;51:89–95.

18. Ranger WR, Halpin D, Sawhney AS, Lyman M, Locicero J. Pneumostasis of experimental air leaks with a new photopolymerized synthetic tissue sealant. *Am Surg.* 1997;63:788–95.
19. Macchiarini P, Wain J, Almy S, Darteville P. Experimental and clinical evaluation of a new synthetic, absorbable sealant to reduce air leaks in thoracic operations. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;117:751–8.
20. Gilbert CE. Adhesives in retinal detachment surgery. *Br J Ophthalmol.* 1991;75:309–10.
21. Spitznas M, Lassagk H, Vogel M, Joussem F. Intraocular histocompatibility and adhesive strength of butyl-2-cyanoacrylate. Prospective value in retinal detachment surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1973;187:102–10.
22. Spitznas M, Lossagk H, Vogel M, Joussem F. Intraocular use of butyl-2-cyanoacrylate in retinal detachment surgery. A preliminary report. *Mod Probl Ophthalmol.* 1974;12:183–8.
23. Sheta SM, Hida T, McCuen BW II. Experimental transvitreal cyanoacrylate retinopexy through silicone oil. *Am J Ophthalmol.* 1986;102:717–22.
24. Hida T, Sheta SM, Proia AD, McCuen BW II. Experimental transvitreal cyanoacrylate retinopexy in a primate model. *Am J Ophthalmol.* 1987;103:782–9.

25. Kurokawa K. Experimental studies on the retinopexy using cyanoacrylate in rabbit's eye, III: Studies on histology and electroretinography. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*. 1973;77:88–98.
26. Sueda J, Sakuma T, Nakamura H, et al. In vivo and in vitro feasibility studies of intraocular use of seprafilm to close retinal breaks in bovine and rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:1142–8.
27. Margalit E, Fujii GY, Lai JC, et al. Bioadhesives for intraocular use. *Retina*. 2000;20:469–77.

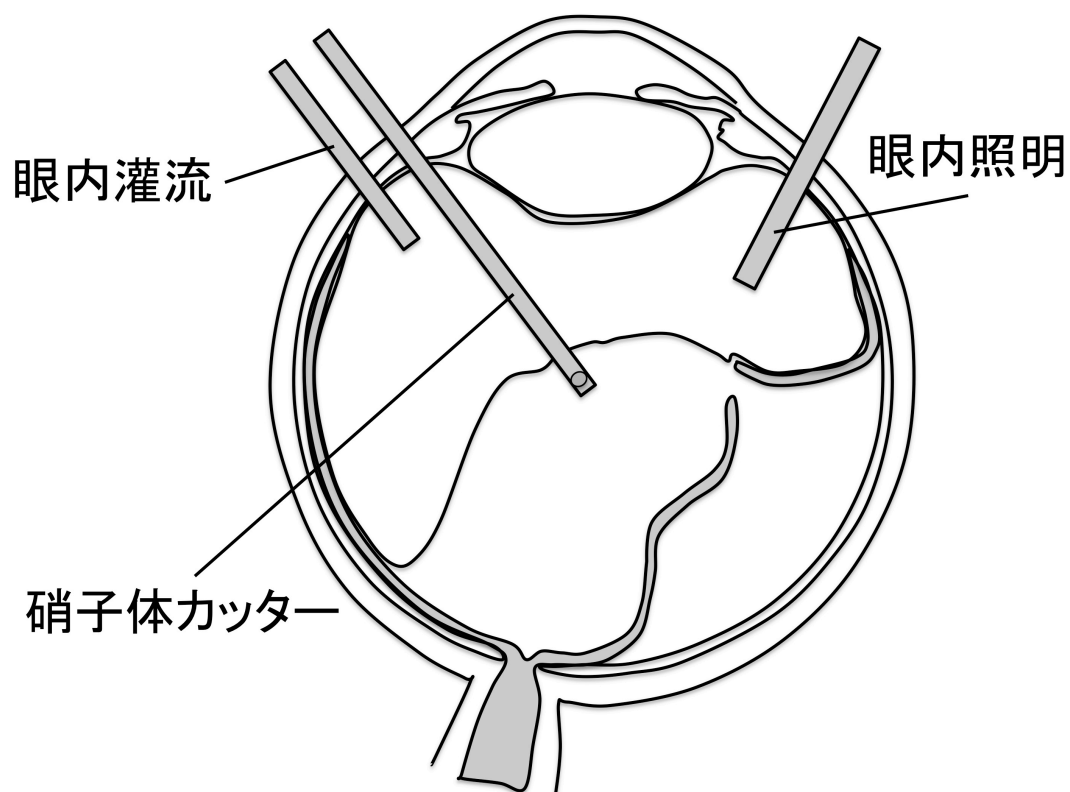
[図表]

図1



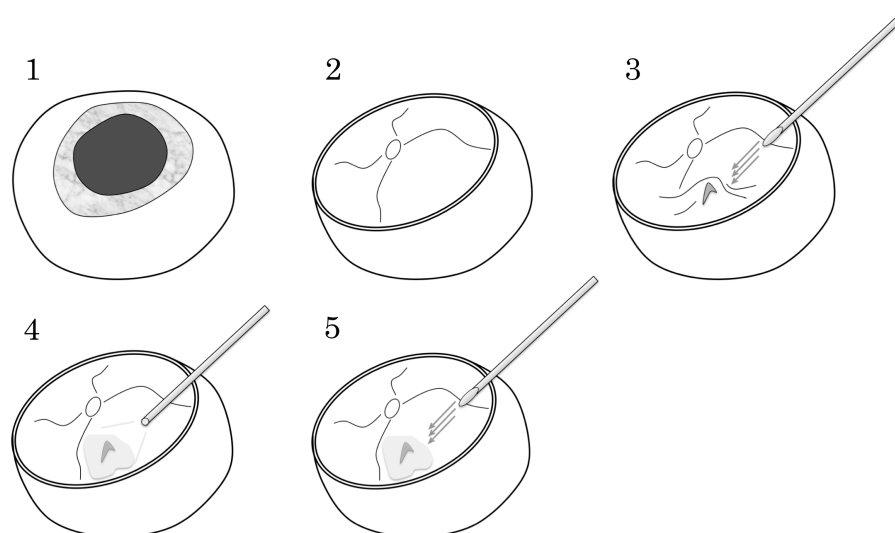
裂孔原性網膜剥離は、網膜に裂孔または円孔が開き、液化硝子体がその孔を通過して網膜下に入り込むことで発生する。網膜裂孔または円孔形成の原因としては、加齢に伴う硝子体の液化および収縮や、網膜萎縮、外傷等がある。網膜剥離が進行すると視野欠損や視力低下をきたす。放置すれば失明に至るので、外科的治療を要する。

図2



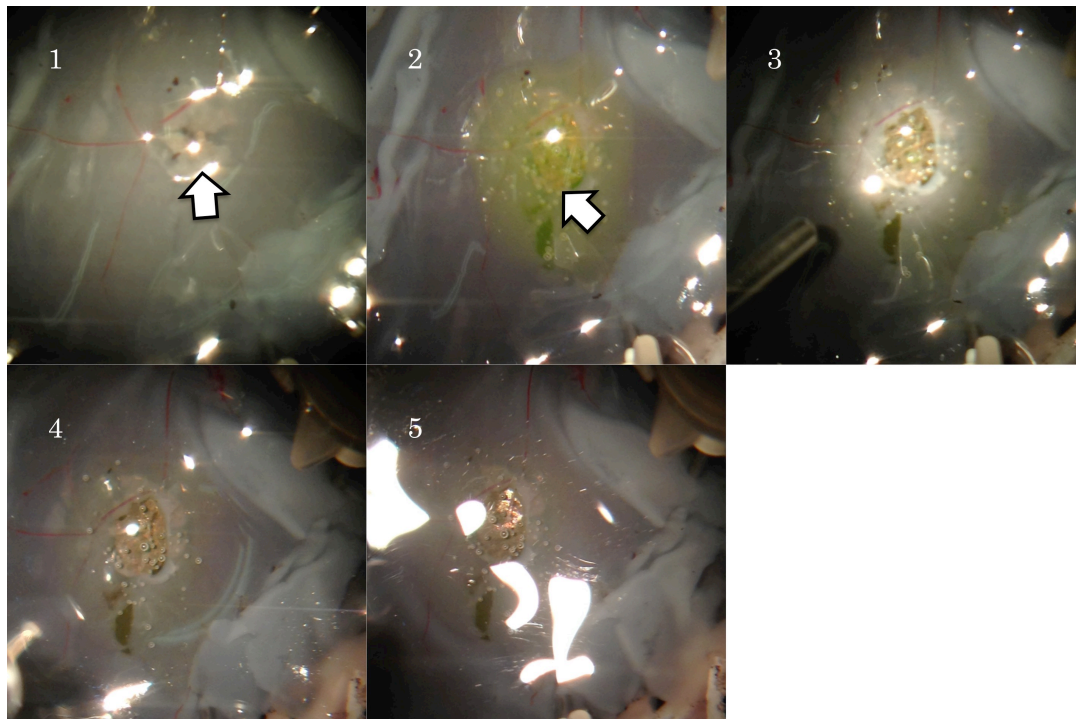
角膜輪部から約4mmの強膜、すなわち毛様体扁平部にあたる位置に強膜ポートを作製し、眼内にアプローチする。3つの強膜ポートのうち、一つを眼内灌流ポートとし、その他のポートから硝子体カッター、眼内照明を挿入して硝子体手術を行う。硝子体を切除し、硝子体の網膜への牽引を解除する。眼内灌流を灌流液から空気に切り替え、眼内を空気に置換する。硝子体カッターを用いて眼内の灌流液および剥離した網膜下の液を吸引除去することで、剥離した網膜を復位させる。復位した網膜の裂孔周囲にレーザープローブを用いて網膜光凝固を行い、網膜裂孔周囲の癒着瘢痕化を促進する。必要に応じて眼内に六フッ化硫黄(SF_6)や八フッ化プロパン(C_3F_8)等の長期滞留ガスを注入し、眼内タンポナーデを得た上で手術を終了する。

図3



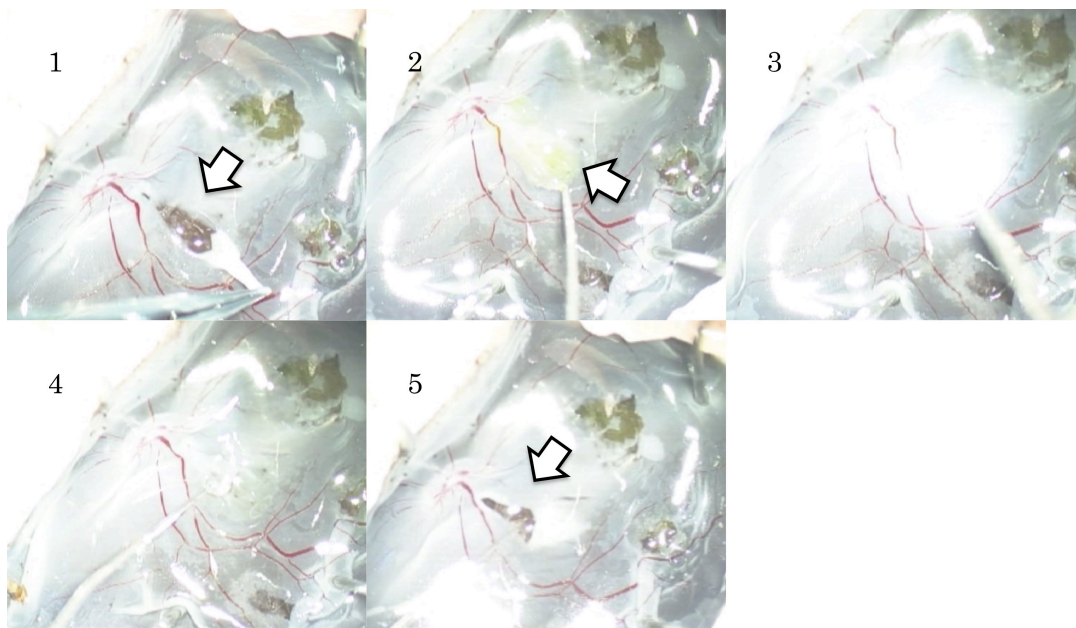
眼灌流液中におけるFocalSeal®の網膜接着性の検討(実験図)。(1)(2)豚眼の角膜、虹彩、水晶体を含む前眼部組織を切除し、硝子体を除去して半球状の眼球カップを作製した。(3)眼球カップの網膜に裂孔を作製し、網膜剥離を作製した。(4)FocalSeal®を、27ゲージ針を用いて網膜裂孔全体を覆うように塗布し、キセノン光源 Accurus® Xenon Illuminator (Alcon, Inc.)を用いて40秒間光照射し(波長420-700nm)、重合した。(5)その後、眼灌流液で眼球カップを満たし、24時間放置した。

図4



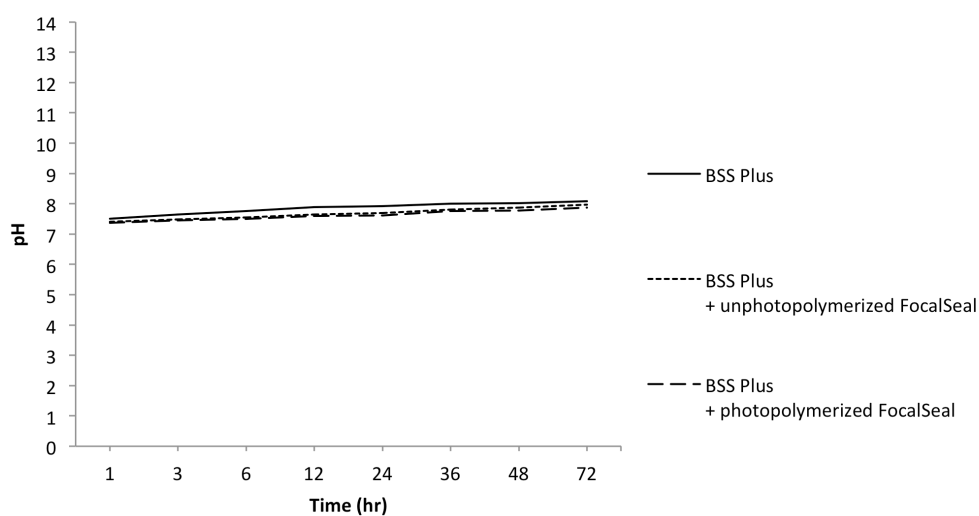
眼球カップの網膜裂孔にFocalSeal®を塗布し、眼灌流液中に放置した実験(写真)。
(1)網膜剥離を伴う網膜裂孔を矢印で示す。FocalSeal®は塗布されていない。(2)続いてFocalSeal®を網膜裂孔に塗布した(矢印)。(3)キセノン照明でFocalSeal®を重合した。(4)眼灌流液を眼球カップに注入した。(5)24時間後も、網膜裂孔はFocalSeal®により接着閉鎖した状態を保ち、網膜再剥離を来さなかった。

図5



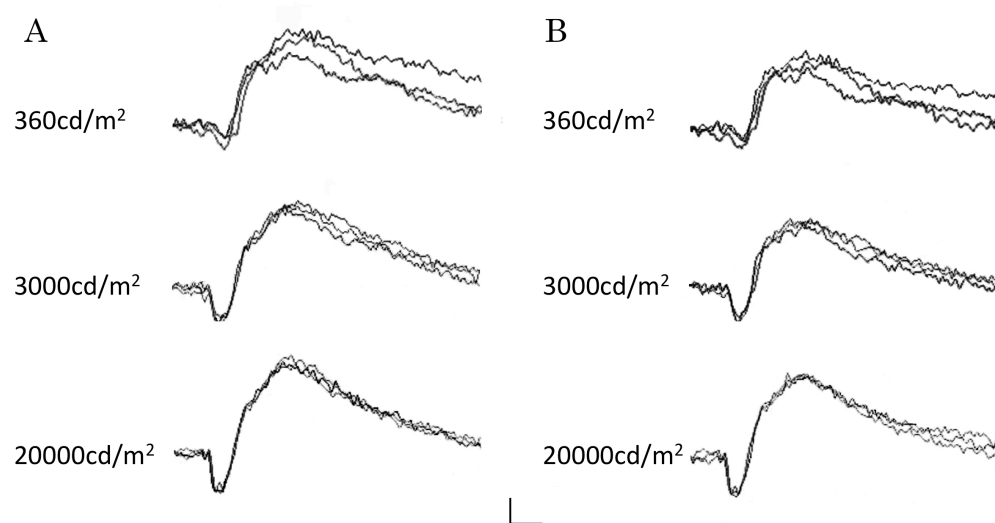
眼球壁片の網膜裂孔に眼灌流液を噴射し、FocalSeal®の網膜への接着強度を検討した実験(写真)。(1)網膜剥離を伴う網膜裂孔を矢印で示す。FocalSeal®は塗布されていない。(2) 続いてFocalSeal®を網膜裂孔に塗布した(矢印)。(3) キセノン照明でFocalSeal®を重合した。(4)FocalSeal®を塗布した網膜裂孔に向けて眼灌流液を勢いよく噴射したが、FocalSeal®は網膜裂孔を接着閉鎖し、網膜剥離は生じなかった。(5)FocalSeal®を塗布しなかった網膜裂孔では、眼灌流液の噴射により直ちに網膜剥離が生じた(矢印)。

図6



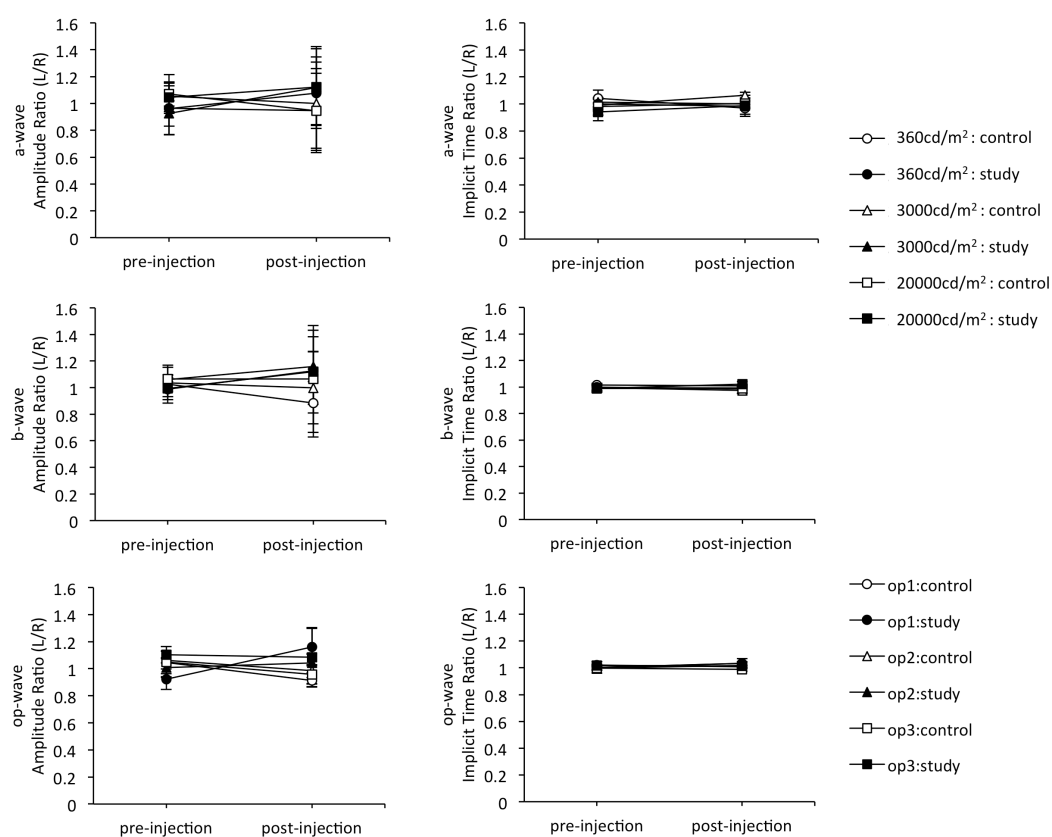
眼灌流液BSS Plus® (Alcon, Inc.)にFocalSeal®を浸漬し、pHを経時的に測定した(グラフ)。破線は、BSS Plus® 5mLに光重合したFocalSeal® 0.2mLを加えたサンプル (BSS Plus® + photopolymerized FocalSeal®)、点線は、BSS Plus® 5mLに光重合していないFocalSeal® 0.2mLを加えたサンプル (BSS Plus® + unphotopolymerized FocalSeal®)、実線は、BSS Plus® 5mLに何も加えないサンプル (BSS Plus®)を示す。それぞれ3サンプルずつを測定し、平均値をグラフに示した。全てのサンプルのpHは、いずれの時点においても7.2から8.2の範囲内であった。

図7



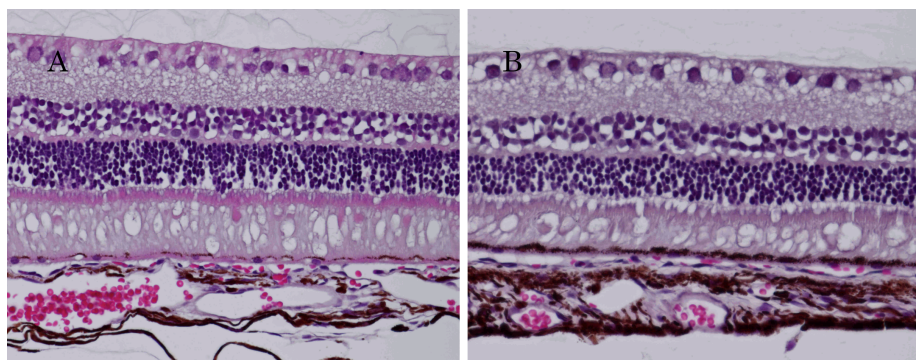
FocalSeal®溶液の硝子体注射後28日目に両眼同時記録した網膜電図波形。(A)非実験眼(右眼)および(B)実験眼(FocalSeal®溶液硝子体注射眼、左眼)の網膜電図を示す。各光刺激において3回測定して記録した波形を重ね合わせて示す。実験眼、非実験眼ともに典型的な網膜電位波形を示している。波形の左に光刺激輝度を示す。Bar: 100 μ V, 25ミリ秒

図8



硝子体注射前後の各波形成分(a波 : a-wave、b波 : b-wave、律動様小波 : op-wave)の振幅比、潜時比をグラフに示す。FocalSeal®群(黒印 : study)および対照群(白印 : control)において、硝子体注射前後の、それぞれの波形成分の振幅比、潜時比に、統計学的有意差を認めなかった。

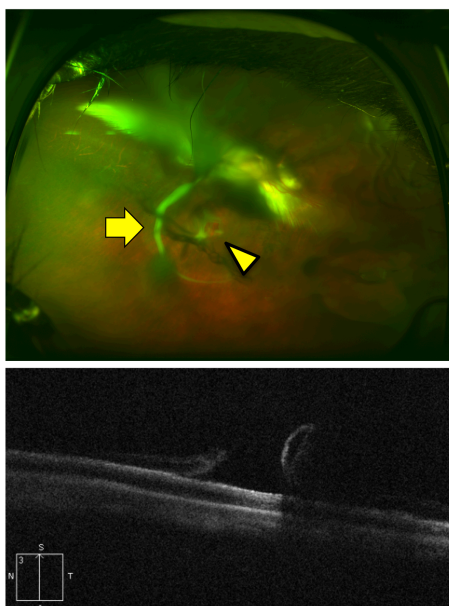
図9



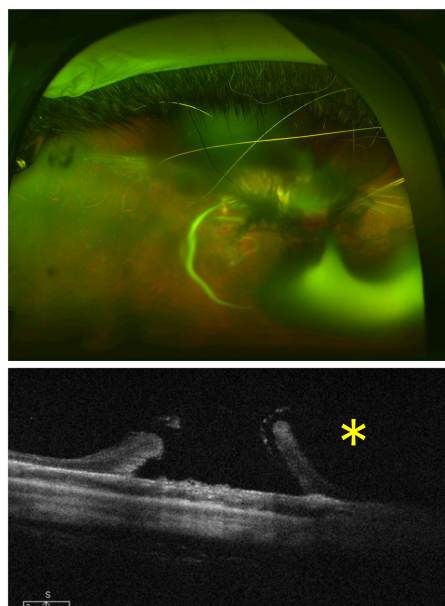
光学顕微鏡を用いた組織学的検査では、硝子体注射後28日目において、(A)対照群および、(B)FocalSeal®群の、いずれの実験眼においても、炎症を含めた異常所見を認めなかった。

図10

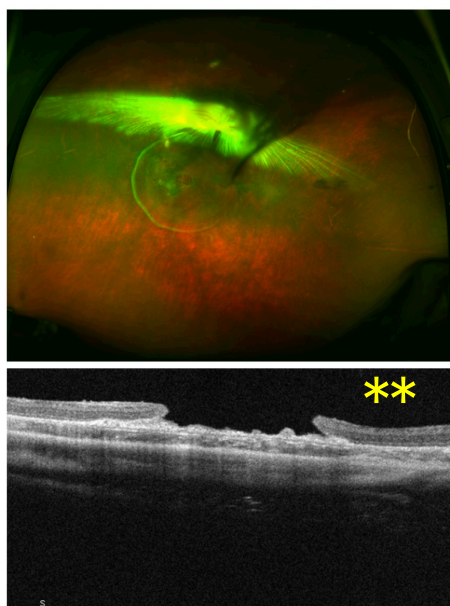
術後1日目



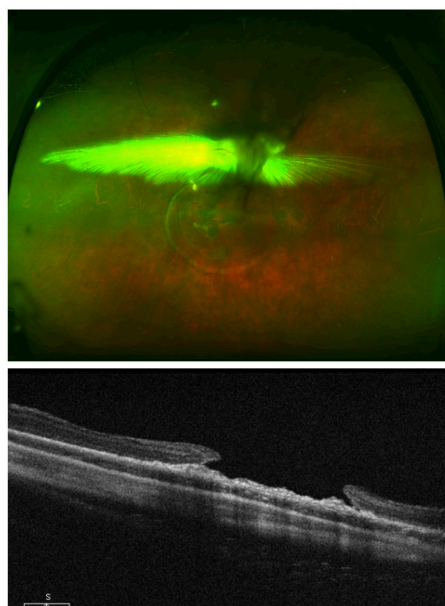
術後7日目



術後1ヶ月目



術後3ヶ月目



(図10)

実験的網膜剥離モデルに対するFocalSeal®を用いた硝子体手術の術翌日、術後1週目、1、3ヶ月目に撮影した眼底写真および光干渉断層計画像。眼底写真では作製した網膜裂孔を確認できる。(矢頭) 観察期間を通じて網膜は復位した状態を維持し、網膜再剥離を認めなかった。光干渉断層計ではいずれの時点においても、接着剤を観察することはできなかった。光干渉断層計による観察では、術翌日から術後7日目にかけて作製した網膜裂孔の辺縁の網膜が持ち上がっている所見を認めた。(*) しかし、術後1ヶ月以降は観察されていた網膜裂孔辺縁の持ち上がりが消失し、脈絡膜に接着していた。(**) 術翌日から術後7日目にかけて作製した網膜裂孔が拡大している所見を認めた。また、術翌日から全観察期間を通して、作製した網膜裂孔の周囲、すなわち、おおよそ接着剤を塗布した範囲の外縁に、網膜すう壁を認めた。(矢印)