

前眼部手術補助剤としてのコラーゲン粘弾性物質の研究 —家兎眼前房内置換による眼刺激試験—

森本 厚子, 金井 淳

順天堂大学医学部眼科学教室

要 約

目 的：前眼部手術用粘弾性物質として開発したコラーゲン溶液の前房保持力と眼刺激性を検討する。

対象と方法：家兎摘出眼の前房をコラーゲン溶液で満たし、5分後の前房深度を測定した。眼刺激性試験は、家兎眼の前房水をコラーゲン溶液、ヒアルロン酸ナトリウム溶液 (HEALON®)、リン酸緩衝液 (PB) で置換し、前眼部所見、眼圧、角膜厚、角膜内皮細胞を7日または28日間、経時的に観察した。観察終了の後に、前房水の電気泳動検査、角膜内皮細胞の電子顕微鏡観察、他の眼組織の光学顕微鏡観察を行った。

結 果：コラーゲンは2.5%と3%の濃度で良好な前房保持力を示した。コラーゲン溶液で前房置換後の前眼

部所見、角膜厚はヒアルロン酸ナトリウム群およびPB群と有意差はなく、前房水、角膜内皮細胞、その他の眼組織の異常もなかった。眼圧は用いたコラーゲン濃度では上昇せず、ヒアルロン酸ナトリウムでは有意に上昇した。

結 論：今回用いたコラーゲン溶液は前眼部手術用粘弾性物質として十分な前房保持力を有し、家兎眼への影響も少なく、臨床応用の可能性があると思われた。(日眼会誌 104 : 458—465, 2000)

キーワード：コラーゲン、粘弾性物質、前房水置換、眼刺激性、家兎

Study on Collagen Viscoelastic Substance as an Auxiliary Agent in Anterior Segment Surgery —Ocular Irritation Study by Replacement of the Aqueous Humor in Rabbits—

Atsuko Morimoto and Atsushi Kanai

Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine

Abstract

Purpose : Collagen solution was assessed as a possible viscoelastic substance in anterior segment surgery, in terms of the depth of the anterior chamber and ocular irritation.

Methods : The depth of the anterior chamber of enucleated rabbit eyes was evaluated 5 minutes after injection of collagen solution. For ocular irritation test, the aqueous humor of rabbits was replaced with collagen using sodium hyaluronate (HEALON®) and phosphate buffer (PB) as controls. Follow-up clinical examinations with hand-slit-lamp-microscopy, tonometry, pachymetry, and specular microscopy were performed for 7 days or 28 days, and then aqueous humor, corneal endothelium, and eye tissues were evaluated by gel electrophoresis, scanning electron microscopy, and light microscopy, respectively.

Results : 2.5% to 3% collagen solution was found

to be optimal for maintaining the depth of the anterior chamber. No significant differences in clinical findings such as anterior chamber and corneal thickness or in biochemical and histological findings were observed among collagen-, hyaluronate- and PB-treated groups, except for intraocular pressure which was increased in the hyaluronate-treated group, but not in the collagen-treated group.

Conclusion : Collagen specifically prepared for this study seems to be an excellent auxiliary agent for anterior segment surgery, providing an appropriate anterior chamber with little ocular irritation. (J Jpn Ophthalmol Soc 104 : 458—465, 2000)

Key words : Collagen, Viscoelastic substance, Aqueous humor replacement, Ocular irritation, Rabbit

別刷請求先：113-8431 東京都文京区本郷3-1-3 順天堂大学医学部眼科学教室 森本 厚子
(平成11年10月4日受付, 平成12年2月7日改訂受理)

Reprint requests to: Atsuko Morimoto, M.D. Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine, 3-1-3 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8431, Japan

(Received October 4, 1999 and accepted in revised form February 7, 2000)

I 緒 言

眼科手術用の粘弾性物質は Balazs らが代用硝子体として精製したヒアルロン酸ナトリウム(HA)を Miller ら¹⁾が前眼部手術に応用して以来、角膜移植術、眼内レンズ挿入術、白内障摘出術の他に緑内障濾過術、眼外傷などに広く利用されている。需要の増大につれて、これまでに分子量や製造法の異なる HA 製品が数種発売されている。その他にメチルセルロース、コンドロイチン硫酸を用いたもの、ヒト胎盤由来のコラーゲン溶液²⁾などがあるが、これらは各々粘弾性、体内代謝、原料の入手法に問題があり、依然として HA 製品が多く使用されている³⁾。HA は優れた粘弾性物質であるが、術後に一過性の眼圧上昇を来す場合があること⁴⁾、大量生産が困難であるため高価なことが今後の課題と思われる。

コラーゲン溶液は透明で粘弾性が高く、粘弾性物質として必要な条件を備えている。また、材料が仔牛の真皮から得られることから、大量生産が容易なため医療経済にも貢献できる。さらに、コラーゲンの分子量は約 30 万と従来の粘弾性物質に比較して大変小さいので、手術後の前房水の流出率を妨げずに眼外に排出され得ると思われる。前回、我々はコラーゲン溶液の眼科手術用粘弾性物質への応用を目的として、アルカリ可溶性コラーゲン溶液を作製し、その前房保持力と角膜内皮保護作用を検討し報告⁵⁾した。

今回、我々はさらに高純度のコラーゲン溶液(KK-981)を精製し、その前房保持力を検討した上で、さらに、本剤の安全性について白色家兎の前房水を本剤で置換した後に、前眼部所見、眼圧、角膜厚、角膜内皮細胞所見、眼病理組織学的変化を観察して眼組織に及ぼす影響を検討したのでここに報告する。

II 実験方法

1. コラーゲン溶液

本剤は仔牛の真皮から得た I 型コラーゲンの透明溶液である。本剤と前回報告⁵⁾したコラーゲン溶液との主な違いは、本剤は原料の仔牛の真皮をいったんペプシンで可溶化してアテロコラーゲンにしてから、さらにアルカリ処理した点と、アルカリの濃度を世界保健機関(WHO)のプリオン失活の基準に基づき 1 M にしたこと⁶⁾の 2 点である。本剤は粘弾性が高く(図 1)、抗原決定基⁶⁾、細菌、ウイルス、プリオン、パイロジェンなどはほぼ完全に除去または失活している。本剤は約 34°C 以上の温度で徐々に変性が進行する。3% 濃度の本剤を 35°C にすると、1 時間で約 70% が変性して(図 2)分子量約 10 万のポリペプチド鎖となる⁷⁾。

2. 前房保持作用

白色家兎 9 匹 18 眼を用いた。被験物質として、2.5、3% および 3.5% のコラーゲン溶液を用いた。対照物質とし

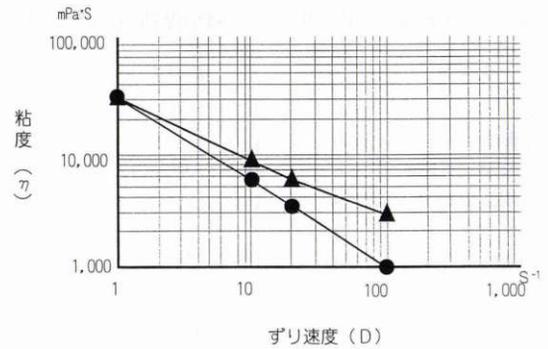


図 1 コラーゲン溶液(KK-981)の粘度。
20°C において E 型粘度計で計測した。▲: 3% KK-981,
●: HEALON®

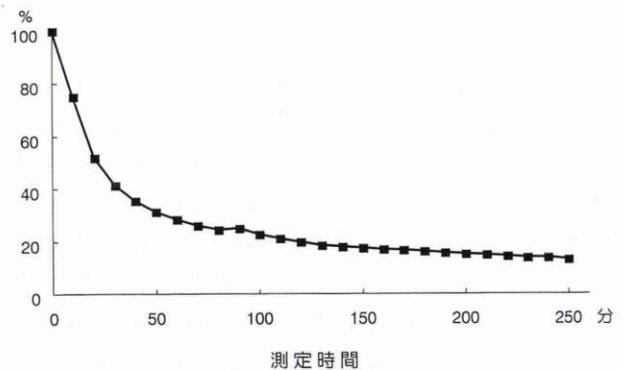


図 2 3% コラーゲン溶液(KK-981)の変性曲線。
35°C における旋光度の変化を測定した。変性前の旋光度を 100%、完全変性後の旋光度を 0% として変性率に換算した。

て、HA (HEALON®, ファルマシア・アップジョン社)と本剤の溶媒であるリン酸緩衝液(PB)を用いた。前回と同様の方法で⁵⁾白色家兎の摘出眼球に 3 mm 切開を加え、試料を前房内に注入して満杯にした。5 分間静置後に創口をドライアイスで凍結閉塞後、眼球全体を液体窒素で凍結した。クライオスタットで中央半断面を作製し、前房深度を計測した。

3. 前房置換後の眼球への影響

1) 試料と実験動物

被験物質として 3% コラーゲン溶液を、対照物質として HA (HEALON®) と PB を用いた。

1997 年に国際標準化機構 (ISO) の出した前眼部手術用粘弾性物質の眼内移植術試験の方法についての草案⁸⁾では、実験動物として家兎が推奨されている。今回、我々も実験動物として、健全な雌の白色家兎(体重 2.5~2.9 kg) 20 匹 40 眼を用いた。飼育は室温 21~25°C、湿度 40~70%、照明時間 12 時間、換気回数 12 回/時間の動物室で行った。予備飼育は 7 日間行った。20 匹の家兎を、処置後 7 日目に眼球を摘出する群 10 匹と、28 日目に眼球摘出する群 10 匹の 2 群に分けた。各群 10 匹のうち、5 匹の 1 眼はコラーゲン溶液で置換し、他眼は PB で置換するか、ま

表1 Hogan 分類を基にした前眼部所見のスコア

項目	スコア				
充血	0	1	2	3	4
角膜障害	0	1	2	3	4
角膜後面沈着物*	0	1	2	3	
前房内微塵**	0	1	2	3	4
フィブリン	0	1	2	3	4
瞳孔偏位	0	1			

* : 個数をゼロ, 少数, 中等度, 多数に分類

** : フレアーのスコア分類に準じた

たは無処置とした。残りの5匹の1眼はHAで、他眼はPB置換または無処置とした。左右眼はランダムに用いた。

2) 前房置換方法

術前1時間前からミドリンP®(参天)点眼を4回、アトロピン点眼を1回行い極大散瞳にした。麻酔は5%塩酸ケタミン(ケタラル®、三共)と2%キシラジン塩酸塩(セラクター®, バイエル)を5:1に混合したものを50 mg/kg 筋肉内注射した。点眼麻酔剤として0.4%塩酸オキシプロカイン(ベノキシル®, 参天)を使用した。手術用顕微鏡下で1 ml注射筒付30 G針を12時の輪部から刺入して前房水を0.1 ml吸引した。吸引後、直ちに注射筒を試料の入ったものに付け替えて試料を0.1 ml注入した。置換する物質の量は、前述のISOの草案⁸⁾では、前房容量の50%以上が望ましいこと、ただし、眼圧上昇を検討する場合は前房容量の25%の量の粘弾性物質の置換が適当であるとしているので、今回の実験は、これを考慮して0.1 mlの置換量とした。手術操作中は角膜内皮、虹彩、水晶体に接触しないよう十分に注意した。術後と眼科的検査後は抗生物質点眼液(トブラマイシン®, 塩野義)とプロスタグランディン合成阻害剤点眼液(ジクロード®, わかもと)を点眼した。

3) 前眼部の観察、眼圧および角膜厚の測定

前眼部所見は、ハンドスリットランプ(コーワ社)で置換前と置換後の1, 3, 5, 8時間後および1, 3, 5, 7日後に、そして28日観察群ではさらに14, 21, 28日後に観察した。前眼部所見は、Hoganの分類⁹⁾を基準にスコアで記載した(表1)。眼圧の測定は電子眼圧計(トノベンXL, Cilco社)、角膜厚の測定は超音波パキメータ(Villase-nor®, Cilco社)を用いて、前眼部観察に引き続いて行い、各々5回測定して最高値と最低値を除いた3回の平均値を用いた。有意差検定は二元配置分散分析とBonferroni多重比較を用いて有意水準は5%とした。外眼部の写真撮影を置換前と置換後8時間後に行った。

4) 角膜内皮細胞数の測定

角膜中央部の内皮細胞数の測定は接触型スペキュラーマイクロスコープ(甲南キラー社)で40倍に拡大撮影した。置換前と置換後7日後または28日後の観察終了時

に筋肉注射麻酔と点眼麻酔下で行った。セル・アナライザー(甲南カメラ研究所社)を用いて頂点入力法で50個の細胞を測定して、平均細胞面積、細胞密度と六角形細胞率を解析した。

5) 前房水生化学的検査

すべての観察終了後に麻酔下で前房水を約0.2 ml回収した。ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)(Laemmli法)で蛋白分画を検査した。ゲルは蛋白質分画分子量範囲10~200 kDaのもの(HOG-0520, マリソル社)を使用し、分子量マーカーとして0.05%ウシアルブミンを用いた。

6) 病理組織学的検査

前房水を回収後、直ちに十分量のペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®, ダイナボット)の静脈注射により致死させ眼球を摘出した。2.5%グルタルアルデハイド液で固定し、角膜片はエポキシ包埋して電子顕微鏡観察に、他の眼組織はパラフィン包埋してヘマトキシリン・エオジン(HE)染色後に光学顕微鏡で観察した。

4. 血液房水柵機能に及ぼす影響

白色家兎12匹24眼を用いた。試料として3%コラーゲン溶液、HA(HEALON®)、PB、生理食塩液を用いた。上記の前房置換術と同様の方法で前房水0.1 mlと各々の試料0.1 mlを置換した。前眼部の観察と眼圧測定を置換前と置換後1, 2, 4時間後に行った。4時間後に2%エバンスブルー(Sigma社)1.5 ml/kgを耳静脈から注射した。その15分後にペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®)の静脈注射により致死させた後に前房水を約0.2 ml回収した。96穴マイクロプレートに検量線用の各濃度勾配のエバンスブルー液とそれぞれの前房水を入れて波長620 nmの吸光度を測定し、前房水中のエバンスブルー濃度を算出した。

III 結 果

1. 前房保持作用

正常眼の前房深度は 2.42 ± 0.39 (平均値 \pm 標準偏差) mmで、2.5, 3, 3.5%の各濃度のコラーゲン群の前房深度は、それぞれ 2.15 ± 0.38 mm, 2.56 ± 0.07 mm, 3.04 ± 0.44 mmであった(図3)。HAは 2.15 ± 0.37 mm, PBは 0.98 ± 0.15 mmであった。一元配置分散分析ではPB群のみ有意に浅前房であり($p < 0.05$)、その他の群では有意差はなかった。

2. 前房置換後の眼球への影響

1) 前眼部所見

結膜充血は前房置換術当日は全例に生じ、24時間後にはほとんど回復した。コラーゲン群とPB群の28日後には充血例があったが、二元配置分散分析での有意差はなかった。角膜は麻酔中の乾燥性上皮障害や穿刺部の軽度の混濁が生じた例があったが、角膜浮腫やデスメ膜皺裂形成はなかった。角膜後面沈着物はなかった。炎症細胞と

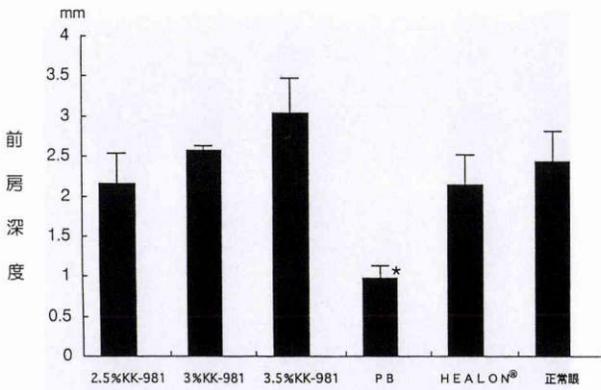


図3 前房深度(平均値±標準偏差)(n=3).
*: p<0.05(一元配置分散分析)

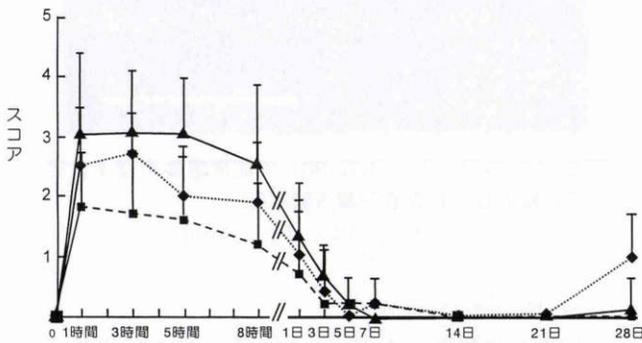


図4 前眼部炎症スコアの合計(平均値±標準偏差)(7日後まで n=10, 14日後から 28日後まで n=5).
二元配置分散分析により試料間について有意差あり (p<0.001). 時間について有意差あり (p<0.001). Bonferroni 多重比較により試料間では 3, 5, 8 時間後の PB と HEALON® に有意差あり (p<0.05). 時間では 24 時間後まで有意差あり (p<0.05).
◆ : 3% KK-981, ■ : HEALON®

フレアーは、今回のハンドスリットランプでは明確に区別することが困難であったので、前房内微塵としてフレアーのスコア分類に準じて記載したが、これはコラーゲン群の 9 例, PB 群の 10 例, HA 群の 5 例にスコア 1 程度に出現し、それらは 24 時間以内に消失した。瞳孔偏位はコラーゲン群で 1 時間後に 1 例, PB 群では 1~8 時間後にかけて 3 例にあり、いずれも極めて軽度であった。フィブリンはコラーゲン群の 9 例に最高スコア 2 で最長 3 日後まで, PB 群では 9 例に最高スコア 3 で最長 5 日後まで, HA 群は 6 例に最高スコア 2 で最長 24 時間後まで観察された。前房内微塵やフィブリンは、ほとんどが術後 1 時間後には出現して、5~8 時間後以降から徐々に減少した。その他の白内障や、前眼部組織の異常はなかった。また、全身状態に異常を来したものはなかった。前眼部炎症のスコア値をトータルすると、PB 群で最も高く、コラーゲン群, HA 群の順であった(図 4)。二元配置分散分析で時間および試料間について有意差があり、Bonferroni の多重比較検定では、時間における有意差は 24 時間後まで

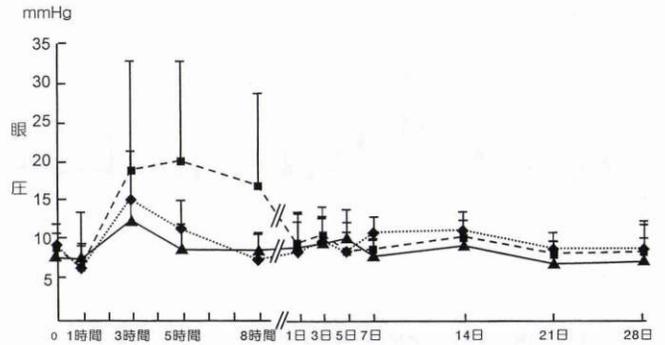


図5 眼圧(平均値±標準偏差)(7日後まで n=10, 14日後から 28日後まで n=5).
二元配置分散分析により試料間について有意差あり (p<0.01). 時間について有意差あり (p<0.001). Bonferroni 多重比較により試料間では 5 時間後の PB と HEALON® に有意差あり (p<0.05). 時間では 3, 5, 8 時間後に有意差あり (p<0.05).

あり (p<0.05), 72 時間後以降は、術前との有意差はなくなった。試料間における有意差は、3, 5, 8 時間後の PB 群と HA 群間にあった (p<0.05)。

なお、コラーゲン溶液で置換後 7 日間観察する予定眼のうち、1 眼において前房置換術当日は角膜びらんと結膜充血を 1+, フレアーを 1+, フィブリンを 1+, 瞳孔偏位を + に生じて、翌日も角膜びらんと前眼部の炎症症状が持続し、3 日後からは角膜びらは消退したが、炎症が結膜充血 3+, 角膜浮腫 1+, フィブリン 2+ と増強し、以後徐々に軽快しながらも 7 日後まで持続した例があった。眼圧は最高 40 mmHg まで上昇した。7 日後に採取した前房水の細菌培養では細菌は検出されなかったが、前眼部所見からは、原因として置換実験中か術直後の感染が疑われた。今回の実験以前に行った多くの予備のコラーゲン溶液置換術や、今回の他の例と比較して、この 1 眼の経過は際立って異なり、また眼圧を今回の他の眼圧とスミルノフ棄却検定を行い棄却されたので、これを除外し新たに 1 眼を追加した。

2) 眼圧

眼圧の変化を図 5 に示す。コラーゲン群の最高眼圧は 23 mmHg で、20 mmHg 以上の眼圧になった例は 2 例あった。平均眼圧のピークは術後 3 時間後で、15.0±6.3 (平均値±標準誤差) mmHg であった。PB 群では 20 mmHg 以上の眼圧になったのは 2 例あり、最高眼圧は 28 mmHg であった。3 時間後の平均眼圧が最も高く 12.5±6.7 mmHg であった。HA 群の最高眼圧は 48 mmHg で、20 mmHg 以上の眼圧は 5 例あった。HA 群の平均眼圧のピークは術後 5 時間後で 20.1±12.8 mmHg であった。二元配置分散分析で時間および試料間について有意差があり、Bonferroni の多重比較検定では 5 時間後の HA 群と PB 群との間に有意差があった (p<0.05)。

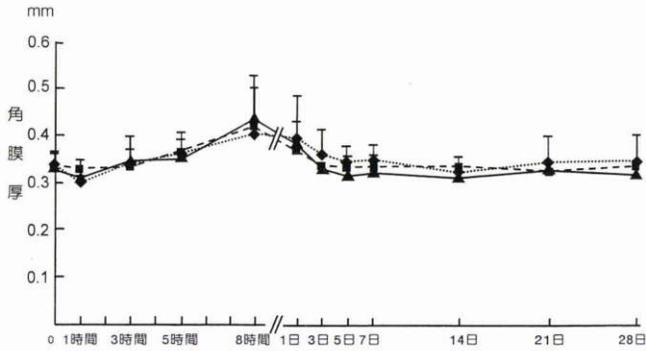


図6 角膜厚(平均値±標準偏差)(7日後まで n=10, 14 ~28日後まで n=5).

二元配置分散分析により試料間について有意差なし. 時間について有意差あり (p<0.001). Bonferroni 多重比較により 8, 24 時間後に有意差あり (p<0.001).

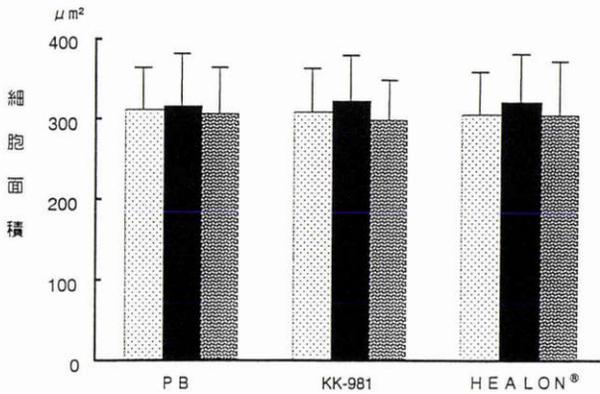


図7 角膜内皮細胞面積(平均値±標準偏差) (n=5).

二元配置分散分析により試料間の有意差なし. 時間の有意差なし.

☐: 置換術前, ■: 置換術後 7 日後, ▨: 置換術後 28 日後

3) 角膜厚

各群ともに術後一過性の角膜厚の増加があり, 二元配置分散分析と Bonferroni の多重比較検定で 8 および 24 時間後に有意差があった (p<0.001). 各試料間での有意差はなかった (図 6).

4) 角膜内皮細胞測定

置換術前の角膜内皮細胞面積は各群間に差はなかった. 術後 7 日後および 28 日後ともに角膜内皮細胞面積の変化はなかった (図 7). また, 六角形細胞出現率にも異常はなかった.

5) 角膜内皮細胞走査電子顕微鏡

各群ともに角膜内皮細胞はほぼ規則正しく配列し, 細胞間結合や微絨毛に異常はなかった (図 8).

6) 前房水生化学的検査

術後 7 日目および 28 日目ともに無処置眼と比較して差はなく, コラーゲンの残留やその他の房水の組成の変化を示すバンドはなかった (図 9).

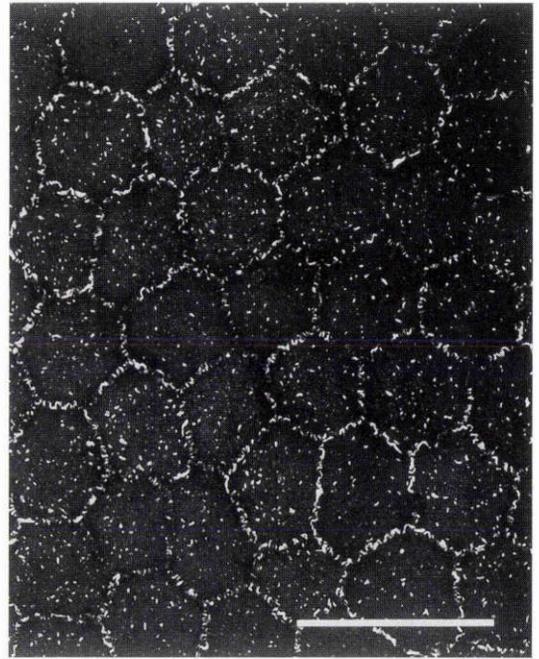


図8 3% コラーゲン(KK-981)で前房置換術後 7 日後の角膜内皮の走査電子顕微鏡写真.

特に著変はない. バーは 30 μm

7) 病理組織学的検査

光学顕微鏡観察では, コラーゲン群を含めてすべての眼球の虹彩, 毛様体, 隅角組織, 水晶体, 網脈絡膜, 視神経などの眼組織に異常所見はなかった (図 10).

3. 血液房水柵機能に及ぼす影響

前房中に漏出したエバンスブルーの濃度は, いずれの試料においても個々のばらつきが大きかった. 一元配置分散分析の結果, 試料間の有意差はなかった (図 11). 血液房水柵機能検査を行った家兎群の前眼部所見や眼圧の結果は, 置換後 7 日または 28 日間観察した群の所見と類似の傾向があった. すなわち, 前眼部炎症スコアは PB 群に比べてコラーゲン群, HA 群の順に低値を示し, 眼圧は HA 群において特に上昇した例があった. このような前眼部炎症の程度や眼圧上昇とエバンスブルーの濃度との間に特に強い関連性はなかった.

IV 考 按

粘弾性物質に要求される条件としては, ①十分な粘弾性を持つこと, ②眼内や体内において蓄積しないこと, ③純度が高く, 無菌であり抗原性がないこと, ④眼組織や眼内液に対する生体適合性に優れ, 組織障害性がないことなどがいわれている¹⁰⁾.

コラーゲンは, 現在では I~XIX 型まで 19 種類が発見されているが, このうち, I 型コラーゲンは生体内に最も多量に存在し, 利用されることが多い. 生体内では線維として存在するコラーゲンを酸やアルカリ, ペプシンなどで処理すると, 可溶化されて精製, 加工することができる. バイオマテリアルとして利用する場合もこのような

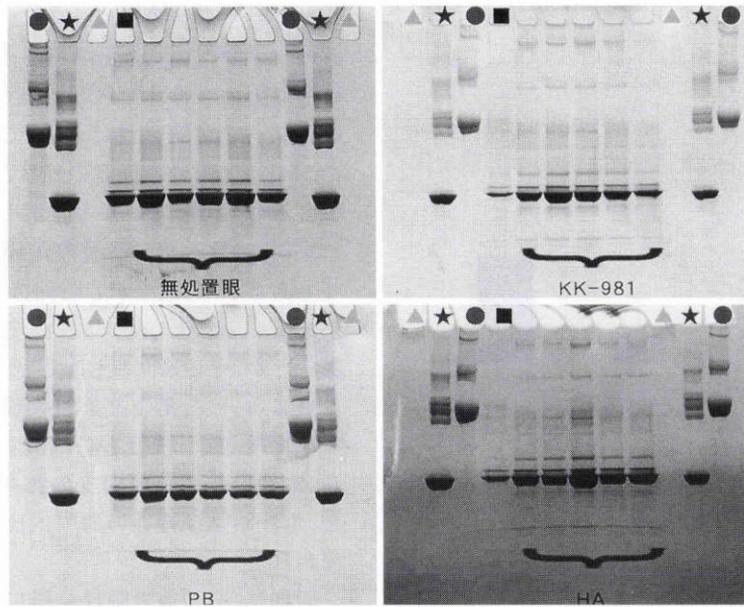


図 9 前房置換術後 28 日後の前房水の電気泳動.

3% コラーゲン (KK-981) で置換した群の前房水 (n=5) と他群 (n=5) の前房水との差はない.

●: 対照 3% KK-981, ★: 対照 0.05% ウシアルブミン溶液, ▲: 対照 HEALON®, ■: 対照正常前房水

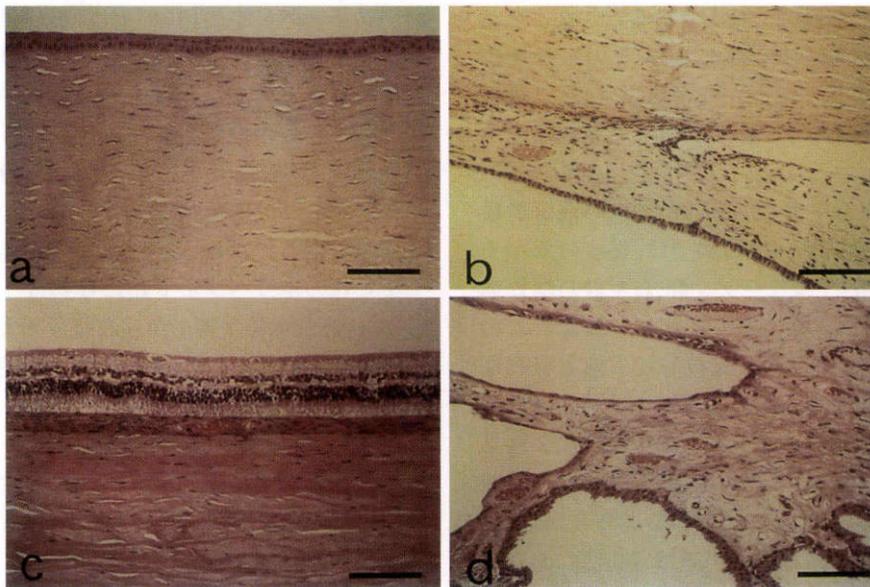


図 10 3% コラーゲン (KK-981) で前房置換術後 7 日後の家兎眼の光学顕微鏡写真.

特に著変はない. a: 角膜上皮および実質, b: 隅角, c: 網脈絡膜, d: 毛様体, バーは 100 μm

可溶化コラーゲンを用いることが多く,すでに I 型コラーゲンは止血剤,縫合糸,創傷カバー材,皮下注入用コラーゲンなどとして市販されている¹¹⁾.

コラーゲンの溶液は粘度が高く¹²⁾,これは剪断速度が高くなるにつれて低い粘度を示す非ニュートン流体である.コラーゲンの分子量は約 30 万と,現在我が国で市販されている HA 製剤の 60~350 万に比較して小さいが,HA が大きなランダムコイルの分子が互いに絡まっているのに対して,コラーゲン溶液はその分子形が細長い棒状であり,その形状がかなり硬くしっかりと保たれてい

るために小さい分子でも高い粘度を示す.そして,コラーゲン溶液は生体内で代謝吸収される.つまり,コラーゲン溶液は粘弾性物質に要求される条件の①と②の条件を備えている.前回,我々はアルカリ可溶化コラーゲン溶液の前眼部手術への応用の可能性を報告した.今回,我々が用いたコラーゲン溶液 (KK-981) はペプシン処理とアルカリ処理の両方を用い,アルカルの濃度を高め,濾過フィルタの目を細かいものにするなどして,さらに高純度に精製し,無菌で,発熱反応や抗原反応を防止して,粘弾性物質に要求される条件の③を高めたものである.

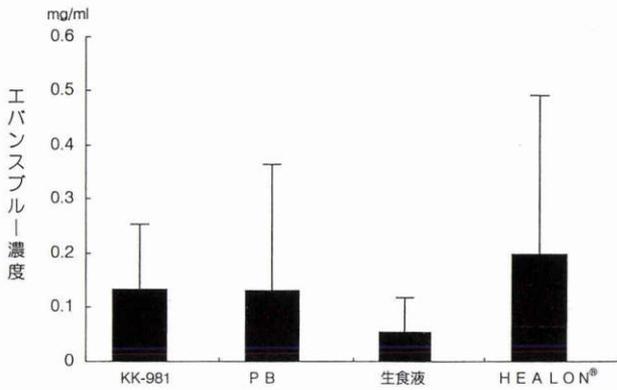


図 11 前房置換術後 4 時間後の前房水のエバンスブルー濃度(平均値±標準偏差)(n=6).

一元配置分散分析により試料間の有意差なし. 生食液: 生理食塩液, PB: リン酸緩衝液

前房置換試験に先立って行った前房保持試験の結果では, 本剤は 2.5% の濃度で HEALON® と同程度の前房保持力を示した. しかし, 本剤は 35°C にすると 5 分後に 15%, 10 分後に 25% が変性すること, 前房内温度は室温 23°C で体温よりも 2°C ほど低い¹³⁾ 温度であることなどを考慮して, 前囊切開や眼内レンズ (IOL) 挿入といった操作の間は十分な粘弾性を保つことができるように, 以後の試料としては 3% の濃度のコラーゲン溶液を用いることにした.

3% コラーゲン溶液を使用して行った今回の前房置換試験の前眼部のスリットランプ観察では, 炎症のトータルスコアは PB 群で高く, コラーゲン群, HA 群の順に低値となり, その差は前房内微塵やフィブリンによるものであった. 家兎眼は他の哺乳類に比較しても前房穿刺などの外傷による血液房水柵が傷害を生じやすく¹⁴⁾, PB 群にみられる前眼部炎症はこの血液房水柵の傷害によるものとみられる. それではコラーゲン群, HA 群における前眼部所見が PB 群より軽度なのはなぜであろうか. 置換物質によるこのような前眼部所見の差は家兎眼においても¹⁵⁾ サル眼においても¹⁶⁾¹⁷⁾ 観察されている. 原因として, 第 1 に粘弾性物質による血液房水柵の傷害自体の抑制, 第 2 に房水内におけるフィブリノーゲンからフィブリンへの変換の凝固系の抑制, 第 3 には粘弾性物質があるためにフィブリンの前房内への流入が妨げられる, などの可能性が考えられる. そこで, 血液房水柵の傷害を比較するために, エバンスブルーの漏出試験を行った結果, 漏出したエバンスブルー濃度の有意差はなかった. 2 番目の凝固系への作用はコラーゲン線維は創傷治癒促進作用がありフィブリン生成を促す方向に働くが¹⁸⁾, 今回用いているようなコラーゲン分子やゼラチンにおいては凝固系への影響はないと思われ, また, HA の抗炎症作用についても異論がある¹⁹⁾. これらのことから, また, エバンスブルーの測定濃度が高くても, 前房所見は軽度に観察され

た粘弾性物質置換眼もあることから, コラーゲン群, HA 群のフィブリンの析出が PB 群より少ないのは, 考えられる原因の 3 番目である高粘弾性溶液によりフィブリンの前房への流入が妨げられたためではないかと思われた. そして, 両者の程度の差は, 分子量と分子の形状の差によるものではないかと推測した.

次に, コラーゲン溶液の角膜内皮細胞への影響についてであるが, 角膜厚が 8 時間後と 24 時間後に一時的に増加していることから, 角膜内皮の手術操作による変化があったが, その後回復したと思われる. スペキュラマイクロスコープ, 走査電子顕微鏡による角膜内皮の観察では 7 日後, 28 日後ともに異常はなかった. 以上のことから, 本剤は家兎角膜内皮の修復を遅延させておらず, また, 急性および慢性の角膜内皮障害も及ぼしていないと思われた.

同様に, その他の眼球組織にも無処置眼と比較して著明な変化はなく, 本剤は組織障害性はないものと思われる. また, 前房水の電気泳動結果では本剤は少なくとも 7 日以内に房水から消失し, その後の前房水の組成には影響はなかった.

コラーゲン群と PB 群では置換術後の炎症のピークである 3 時間後に若干の眼圧の上昇傾向はあったものの, 術前眼圧との有意差はなかった. HA 群は術当日に眼圧上昇を来した例があり有意差があった. コラーゲン分子は直径 1.5 nm, 長さ 300 nm の棒状蛋白である²⁰⁾. この大きさであれば隅角線維柱帯の 1~20 μm の間隙を容易に通過できるであろう. 変性して分子量のもっと小さな糸まり状のポリペプチド鎖になればなおさらである. このことは, 緑内障手術や角膜移植手術などで, 粘弾性物質を吸引除去できない場合には特に有用になると思われる.

以上のことから, 今回新しく精製した 3% コラーゲン溶液は, 白色家兎眼の前房内に注入しても PB を注入した以上の影響は生ぜず, なおかつ HA にみられるような一過性の眼圧上昇も低く, 今後の臨床応用が期待されるものと思われる.

なお, 1 例において置換術後の感染を疑い除外した例があった. 今後も本剤を用いて家兎眼での前房置換術を複数回繰り返して施行するなどの *in vivo* 検査を予定しているため, こういった例があれば報告するつもりである.

稿を終えるに当たり, 本研究に際してご助言とご校閲を賜りました高研バイオサイエンス研究所所長永井裕博士に深謝いたします. 研究にご助言とご協力をいただきました順天堂大学医学部眼科学教室の土至田宏先生に感謝いたします. また, 研究にご協力いただいた, 同教室の金 玉順先生, 玄 真先生, 高研バイオサイエンス研究所の田中晶子氏, 根本一樹氏に厚く御礼申し上げます.

文 献

- 1) **Miller D, Stegmann R**: Use of Na-hyaluronate in anterior segment eye surgery. *Am Intra-Ocular Implant Soc J* 6: 13—15, 1980.
- 2) **Bleckmann H, Vogt R, Garus HJ**: Collagel-a new viscoelastic substance for ophthalmic surgery. *J Cataract Refract Surg* 18: 20—26, 1992.
- 3) **Liesegang TJ**: Viscoelastic substances in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 34: 268—293, 1990.
- 4) **Cherfan GM, Rich WJ, Wright G**: Raised intra-ocular pressure and other problems with sodium hyaluronate and cataract surgery. *Trans Ophthalmol Soc UK* 103: 277—279, 1983.
- 5) **森本厚子, Milan GG, 金井 淳, 伊藤 博, 宮田暉夫**: 前眼部手術補助剤としてのコラーゲンの有用性の検討. *眼科手術* 11: 219—222, 1998.
- 6) **Timpl R**: Immunology of the collagens. In: Piez KA, et al(Eds): *Extracellular matrix biochemistry*. Elsevier, New York, 159—190, 1984.
- 7) **Boedtker H, Doty P**: The native and denatured states of soluble collagen. *J Am Chem Soc* 78: 4267—4280, 1956.
- 8) **ISO/TC 172/SC 7/WG 7 N 153**: Preliminary working draft: Ophthalmic viscosurgical devices for use in the anterior segment-Version 3, 1997.
- 9) **Hogan MJ, Kimura SJ, Thygeson P**: Signs and symptoms of uveitis. I: Anterior uveitis. *Am J Ophthalmol* 47: 155—170, 1959.
- 10) **宮内 聡**: 粘弾性物質の基礎. *眼科手術* 1: 123—134, 1988.
- 11) **宮田暉夫**: コラーゲンの応用(I). *フレグランスジャーナル* 17: 99—103, 1989.
- 12) **宮田暉夫**: コラーゲンの基礎(III). *フレグランスジャーナル* 17: 115—123, 1989.
- 13) **Freeman RD, Fatt I**: Environmental influences on ocular temperature. *Invest Ophthalmol* 12: 596—602, 1973.
- 14) **Bito LZ**: Species differences in the responses of the eye to irritation and trauma: A hypothesis of divergence in ocular defense mechanisms, and the choice of experimental animals for eye research. *Exp Eye Res* 39: 807—829, 1984.
- 15) **森本美香, 宮内 聡, 高橋 響, 水野祥二, 堀江克之**: 1% Sodium hyaluronate 溶液(SI-4402)のウサギにおける眼刺激性試験 2. 1回前房内置換による眼刺激性試験. *応用薬理* 50: 13—18, 1995.
- 16) **矢島輝雄, Ando EK, 松原正男, 水流忠彦, 上野則夫, 山内秀泰**: ヒアルロン酸ナトリウム(SPH)に関する実験的研究—猿眼眼圧, 角膜厚, 角膜内皮, 及び隅角線維柱帯内皮に及ぼす影響—. *日眼会誌* 89: 391—400, 1985.
- 17) **宮田和典, 石田耕一, 村尾元成, 矢島輝雄**: ヒアルロン酸ナトリウムの安定性に関する研究. *日眼会誌* 92: 1705—1711, 1988.
- 18) **宮田暉夫**: コラーゲンの応用(VI). *フレグランスジャーナル* 18: 99—108, 1990.
- 19) **三宅謙作, 水野勝義**: Healon(sodium hyaluronate)と血液房水柵. *眼臨* 80: 1347—1349, 1986.
- 20) **Rich A, Crick FHC**: The molecular structure of collagen. *J Mol Biol* 3: 483—506, 1961.