

前眼部手術用コラーゲン粘弾性物質の安全性試験 —血中抗コラーゲン抗体と前房内コラーゲン残留濃度の測定—

森本 厚子¹⁾, 金井 淳¹⁾, 田中 晶子²⁾, 永井 裕²⁾

¹⁾順天堂大学医学部眼科学教室, ²⁾高研バイオサイエンス研究所

要 約

目的: 前眼部手術用粘弾性物質として開発したアルカリ可溶性コラーゲンの抗原性と角膜への影響を検討する。

対象と方法: 家兎眼の前房水をコラーゲン溶液で3回置換し, 血中抗コラーゲン抗体の測定と, 前眼部所見, 眼圧, 角膜厚, 角膜内皮細胞の経時的観察, 病理組織学的検査を行った。また, 家兎眼前房をコラーゲン溶液で満たし1, 3, 5, 8, 24, 72時間後の前房水中の残留コラーゲン濃度を測定するとともに, 投与コラーゲンの角膜への影響を, 溶媒濃度, 化学的修飾を変えた各種コラーゲン溶液を用いて, 透過電子顕微鏡の観察により調べた。

結果: 3回前房置換後の抗コラーゲン抗体産生はさ

れず, 前眼部炎症, 全身状態に変化はなかった。前房を満たしたコラーゲン溶液は, 5時間後には97.4%が眼外へ排出された。角膜片雲を生じる例があったが, 溶媒中のリン酸濃度を下げ, コラーゲンを化学修飾してサクシニル化することにより改良された。

結論: 今回用いたコラーゲン溶液の抗原性は少なく, 前房に留まる時間も短時間であった。角膜への影響に対して, 改良点を検討した。(日眼会誌 105: 750-759, 2001)

キーワード: コラーゲン, 抗原性, 抗コラーゲン抗体, 粘弾性物質, 前房水置換

Safety Studies on Collagen Viscoelastic Substance as an Auxiliary Agent in Anterior Segment Surgery —Assays of Anti-collagen Antibodies in Blood and Residual Concentration of Collagen in the Anterior Chamber of Rabbits—

Atsuko Morimoto¹⁾, Atsushi Kanai¹⁾, Akiko Tanaka²⁾ and Yutaka Nagai²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine

²⁾Koken Bioscience Institute

Abstract

Purpose: Alkali-soluble collagen solution was assessed as a possible viscoelastic substance in anterior segment surgery, in terms of its safe applicability by assaying antigenicity, disappearance rate of collagen from the anterior chamber, and histopathological effect on the corneal tissue.

Methods: The aqueous humor of rabbits was replaced with collagen solution three times. Then, follow-up clinical examinations with hand-slit-lamp-microscopy, tonometry, pachymetry, and specular microscopy as well as ophthalmic histopathological examination were performed. Remaining collagen concentration in the aqueous humor at 1, 3, 5, 8, 24 and 72 hours after injection was determined to evaluate the disappearance rate of collagen from the aqueous humor with time. *In vivo* effects of chemical modification of collagen and buffer concentration on the corneal tissue were further studied by using transmission electron microscope (TEM) to find an optimum condition for collagen application.

Results: Neither anti-collagen antibody formation, nor inflammatory responses in the anterior segment and systemic symptoms were observed even after 3 injections of collagen solution, except for 1 case which showed corneal opacity. As much as 97.4% of the collagen injected into the anterior chamber disappeared from the eyeball. On the basis of TEM findings, succinylated collagen in diluted phosphate buffer seems to be superior to alkali soluble collagen in terms of corneal tissue protection.

Conclusion: Collagen specifically prepared for this study showed no antigenicity and disappeared promptly from the anterior chamber. The optimal form of collagen in terms of corneal protection was discussed. (J Jpn Ophthalmol Soc 105: 750-759, 2001)

Key words: Collagen, Viscoelastic substance, Antigenicity, Anti-collagen antibody, Aqueous humor replacement

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13年2月1日受付, 平成13年4月27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 February 1, 2001 and accepted in revised form April 27, 2001)

I 緒 言

眼科手術用の粘弾性物質は、前房を保持し、手術時侵襲から眼組織を保護する目的で、前眼部の手術に欠くことのできないものとして広く用いられ、その需要は増大してきている。現在使用されている粘弾性物質はヒアルロン酸ナトリウム(HA)製剤のものが多く、これらは大変に優れたものであるが、術後に一過性の眼圧上昇が稀にあること¹⁾と、高価であることが今後の課題と思われる。

一方、我々は仔牛の真皮由来の I 型コラーゲン溶液が粘弾性が高く、中性下で透明であり、生体内吸収性がよく、細菌やウイルス、プリオン、パイロジェンなどは除去または失活されているといった眼科手術用粘弾性物質に必要な性質を持っていることに着目した。さらに、コラーゲン溶液は、分子量が約 30 万と小さいので線維柱網状組織を容易に通過し得ること、材料が豊富なので大量生産が可能であること、などの利点もあり、その眼科臨床応用を検討してきた。そして、コラーゲンの濃度を調整することによって分子量約 250 万の HA 製剤と同等以上の前房保持作用と角膜内皮保護作用を得られることを報告²⁾した。また、前回はペプシンとアルカリ処理で得たアルカリ可溶化コラーゲン溶液(KK-981)を用いた白色家兎の前房内注入による観察で、眼組織に及ぼす影響が少なく、術後の一過性眼圧上昇も僅かであることを報告³⁾した。

今回は、コラーゲンの抗原性は低いとされてはいるが⁴⁾、異種蛋白である本剤の抗原性の有無は重要な問題と思われるので、本コラーゲン溶液と家兎眼前房水との置換試験を 3 回繰り返して行い、血中の本コラーゲンに対する抗体産生の有無を血清を用いて調べるとともに、その間の全身状態、前眼部所見、眼圧、角膜厚、角膜内皮細胞所見の観察、病理学的検査を行った。加えて、前房内に注入された本剤が前房から眼外に排出するのに要する時間も免疫反応の重要な要素であるので、その測定も行った。

また、今回の実験中に、本コラーゲン溶液で置換した眼球に角膜片雲を生じた例があったので、追試、検討を行い、コラーゲン溶液の改良を行った。それについても報告する。

II 実験方法

1. 3 回前房水置換後の血中抗コラーゲン抗体値測定と眼球への影響

1) 材料

被験物質は、前回報告³⁾したものと同様の、3% アルカリ可溶化コラーゲン溶液(KK-981)を使用した。対照物質として、本剤の溶媒であるリン酸緩衝液(PB)と HA (HEALON[®], ファルマシア・アップジョン社)を用い

た。

実験動物として、成熟白色家兎 10 匹を使用した。これを 2 群に分けて、5 匹はコラーゲン溶液置換群とし、1 眼をコラーゲン溶液で置換し、他眼は PB で置換したもの 3 眼と無処置 2 眼とした。残りの 5 匹は HA 置換群とし、1 眼は HA で置換して、他眼は PB 置換が 2 眼と無処置が 3 眼とした。予備飼育を 7 日間行い、左右眼はランダムに注入した。

2) 前房水置換手術方法

前房水置換手術は、前回³⁾と同様の方法で行った。すなわち、筋肉内注射麻酔と点眼麻酔を行い、極大散瞳にしてから、手術用顕微鏡下で 1 ml 注射筒付 30 G 針を輪部から刺入して前房水を 0.05 ml 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 0.05 ml 注入した。家兎眼では外傷による前眼部炎症が強く生じるが、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⁵⁾では、実験動物として家兎が推奨されており、その場合、置換する物質の量は前房容量の 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% 量での粘弾性物質置換が適当であるとしている。そこで、前回の実験は 0.1 ml の置換量で行い、今回の実験は手術侵襲による炎症を最小限に抑え、コラーゲン置換群と PB や HA 置換群眼との比較や、コラーゲン置換眼の 1 回目置換後と、2, 3 回目置換後との比較をする際に、僅かな前眼部炎症の差や眼圧の差も検出できるように置換量を 0.05 ml 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。この手術を 3 週間の間隔をあけて、3 回繰り返して施行した。

3) 血中抗体値の測定

3 回目の置換術後、1 週間後と 3 週間後に耳静脈から約 10 ml 採血した。その血清を検体として本コラーゲン溶液に対する抗体値を enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) で測定した⁶⁾。本コラーゲン溶液を 0.1 M PB で 10 μ g/ml に希釈したものを抗原液として、96 マイクロプレート (Greiner 社) に 50 μ l 加え、4°C で一晩放置した。洗浄用バッファーには 0.05% Tween 20 添加 Dulbecco's リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用い、6 回洗浄した。次に、ブロッキング剤としてヤギ血清を 0.1 M 塩化ナトリウム添加 0.1 M Tris 緩衝液 (pH 8.0) (0.1 M Tris・0.1 M NaCl) で 2 倍希釈したものを 100 μ l 加えて 37°C で 30 分反応させた後、洗浄用バッファーで 6 回洗浄した。一次抗体となる被検血清の希釈液にはヤギ血清を 0.1 M Tris・0.1 M NaCl で 4 倍希釈したものを 100 μ l 加えて、室温で 2 時間反応させた。洗浄用バッファーで 6 回洗浄した。陽性対照としてウサギ抗ウシ I 型コラーゲン抗体液 (LSL 社) を、陰性対照として HA 置換した 5 匹の家兎静脈血と 1 匹の正常家兎静脈血

を使用した。二次抗体液として、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン G (IgG) 抗体液 (Jackson ImmunoResearch Laboratories 社) の 10^4 希釈液を $100 \mu\text{l}$ 加えて、室温で 2 時間反応させた後に 6 回洗浄した。基質として 0.05% O-フェニレンジアミンと 0.012% 過酸化水素をクエン酸-リン酸 2 ナトリウムバッファー (pH 5.0) に加えたものを用い、 $100 \mu\text{l}$ 加えて室温で 30 分間反応させた。2.5 M 硫酸を $50 \mu\text{l}$ 加えて反応を止めた後、マイクロプレート用分光光度計で 492 nm の吸光度を測定した。有意差検定は一元配置分散分析を用いて有意水準は 5% とした。

4) 前眼部の観察, 眼圧, 角膜厚および角膜内皮細胞数の測定

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 時間と 1, 3, 5, 7, 14, 21 日に観察した。前眼部炎症の程度は前回³⁾と同様に、Hogan の分類を基準に 0-4 のスコア値で記載した。眼圧の測定は電子眼圧計 (トノペン XL, Cilco 社), 角膜厚の測定は超音波パキメータ (Villasenor[®], Cilco 社) で、前眼部観察に引き続いて行った。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 時間に行った。

角膜中央部の内皮細胞数の測定は 3 回の置換術前と観察終了時の計 4 回、接触型スペキュラーマイクロスコープ (甲南キラー社) で行った。40 倍に拡大撮影したものをセル・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、平均細胞面積、細胞密度と六角形細胞率を解析した。

5) 病理組織学的検査

すべての観察終了後に眼球を摘出し、2.5% グルタルアルデヒド液で固定した。角膜片は 1% オスミウム酸リン酸固定液で再固定後にエポキシ包埋して角膜内皮の走査電子顕微鏡で観察し、他の眼組織はパラフィン包埋後ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色により光学顕微鏡で観察した。

2. コラーゲン溶液の前房からの排出速度測定

白色家兎 10 匹 20 眼の前房水を上記と同様の方法で、3% アルカリ可溶化コラーゲン溶液 (KK-981) と 0.2 ml 置換した。置換術後 1, 3, 5, 8, 24, 72 時間後に、筋肉注射麻酔と点眼麻酔下で前房水を全量採取した。採取した前房水はコラーゲンに特異なアミノ酸であるヒドロキシプロリン量を吸光度 558 nm で測定し、その値を既知濃度のヒドロキシプロリンの検量線から換算することにより、前房水中のコラーゲン濃度を求めた⁷⁾。

3. コラーゲン溶液で置換後の角膜変化の検討

実験 1 の 3 回置換実験中に 3% アルカリ可溶化コラーゲン溶液 (KK-981) で置換した 5 眼のうち、1 眼に角膜片雲を残した例があったので、本剤と角膜片雲の関連

性についての再検討を行った。

最初に、本剤での角膜片雲の再現性とその原因を知るために、白色家兎 11 匹を用いて幾つか条件を変えながら前房水置換手術を行った。まず、家兎 3 匹の片眼に 3% アルカリ可溶化コラーゲン溶液、他眼に生理食塩水を置換量 0.1 ml で、炎症を強く生じるように虹彩を刺激しながら前房水置換手術を行った。次に家兎 4 匹を用いて 6 眼に本剤、2 眼に生理食塩水で置換量を 0.2 ml に増加して、これも炎症を強く生じるように虹彩を刺激しながら行った。残り 4 匹の家兎は術後のフィブリン析出を抑える目的でヘパリン 1,000 U/ml/kg を静脈注射してから、5 眼に本剤、3 眼に生理食塩水で置換量を 0.2 ml で虹彩を刺激しないように慎重な操作で置換手術した。術後はハンドスリットランプで角膜所見を経時的に観察した。置換手術の 2~23 日後に眼球を摘出して、角膜の一部は透過電子顕微鏡 (TEM) 観察し、その他の部分は、HE 染色、リンタングステン酸ヘマトキシリン (PTAH) 染色、アザン染色をして光学顕微鏡で観察した。1 眼の角膜は電子顕微鏡用の標本から元素分析用の切片を作り、ニッケルメッシュの上に載せて、日立 EMAX Energy X 線分析装置を備えた TEM で元素分析を行った。

その後、新たに 3 種類のコラーゲン溶液を作製して前房水置換手術を行い、角膜の変化を検討した。新たな 3 種類のコラーゲン溶液の 1 つは、従来のアルカリ可溶化コラーゲン溶液は溶媒として 0.1 M の PB を使用していたが、その溶媒のリン酸濃度を 0.02 M に下げたものである (A)。2 つ目のコラーゲン溶液とは、コラーゲンの側鎖を化学修飾してサクシニル化したものである (B)。このサクシニル化コラーゲン溶液のバイオマテリアルとしての性質は従来のアルカリ可溶化コラーゲン溶液とほぼ同じであるが、特徴として従来のものよりもフィブリン形成能が弱いとされている⁸⁾⁹⁾。3 つ目のコラーゲン溶液は、溶媒のリン酸濃度を 0.02 M に下げるとともにコラーゲン溶液もサクシニル化コラーゲン溶液に変えたものである (C)。

そして、白色家兎 4 匹を用いて、片眼にコラーゲンを変えた溶液 (B)、他眼にコラーゲン溶液と溶媒の両方を変えたもの (C) を 0.2 ml の置換量で、炎症が生じるような操作で前房水置換手術を行い、術後のハンドスリットランプ観察と、光学的顕微鏡観察、TEM で観察した。

最後に、白色家兎 4 匹を用いて、片眼に溶媒のみを変えた溶液 (A)、他眼にコラーゲンと溶媒の両方を変えた溶液 (C) で、0.2 ml の前房水置換手術を炎症が生じるような操作で、2 週間の間隔で 2 回繰り返して施行した。術後の前眼部所見をハンドスリットランプで経時的に観察し、2 回目の置換手術 8 日または 14 日後に眼球を摘出して角膜を TEM で観察した。

III 結 果

1. 3 回前房水置換後の血中抗コラーゲン抗体値測定と眼球への影響

本実験の全経過中において、家兎の全身状態に異常を来したものはなかった。

1) 血中抗コラーゲン抗体値測定

図 1 A に 3 回目置換術の 1 週間後、図 1 B に 3 回目置換術の 3 週間後に採血した血清の ELISA 結果を示す。492 nm の吸光度は本剤で置換した家兎群の血清も HA 置換群や正常家兎の血清もすべて 20 倍希釈で 0.23 以下、160 倍希釈では 0.05 以下であった。これらの測定値は非特異的の反応や非特異的な吸着で起こる範囲内であり、また、一元配置分散分析でコラーゲン置換群と HA 置換群間の有意差はなかった ($p > 0.05$)。

2) 前眼部所見

前眼部所見では、結膜充血は前房置換術当日には全例に生じたが翌日にはほぼ消失し、遷延した例や再燃した例はなかった。角膜浮腫やデスメ膜皺襞形成は PB 群で 1 眼あった。麻酔中の乾燥性角膜上皮障害がすべての群の何例かに生じて、その治癒過程で一時的な角膜上皮混濁が生じた例がコラーゲン群と無処置群にあった。コラーゲン群の 1 眼では 1 回目の置換後に小片雲を残した。角膜後面沈着物は PB で置換した 1 眼で 2 回目と 3 回目の置換 24 時間以内にスコア 1 で観察された。瞳孔偏位はなかった。炎症細胞とフレアはまとめて前房内微塵としてフレアのスコア分類に準じて記載したが、これはすべての群の 1~4 例にスコア 1 以内の程度にあった。また、フィブリンもすべての群で 2~4 例にスコア 2 以下でみられ、ほとんどが術後 1 時間後から出現して、5~8 時間後以降から徐々に減少し、最長 3 日後まで観察された。その他の白内障や、前眼部組織の異常はなかった。前眼部炎症のスコア値をトータルして、3 回の置換手術後の経過各々について二元配置分散分析で検定した結果、試料間の有意差があり、Bonferroni 多重比較検定では、2 回目置換 72 時間後の PB のみ有意差があった ($p < 0.05$)。また、コラーゲン溶液置換眼の経過は 1, 2, 3 回目の間に有意差はなかった (図 2 A)。

3) 眼圧

眼圧の変化を図 2 B に示す。コラーゲン群の最高眼圧は 19 mmHg、PB 群の最高眼圧は 15 mmHg で、両者では眼圧の上昇はほとんどなかった。一方、HA 群の最高眼圧は 30 mmHg で、20 mmHg 以上の眼圧になったものが延べ 6 例あり、術後 5 時間後をピークに一過性の眼圧上昇を起こす傾向があった。しかし、二元配置分散分析では時間および試料間の有意差はなかった。

4) 角膜厚

各群ともに術後 8 時間後をピークに一過性に角膜厚が増す傾向がみられたが、二元配置分散分析では時間およ

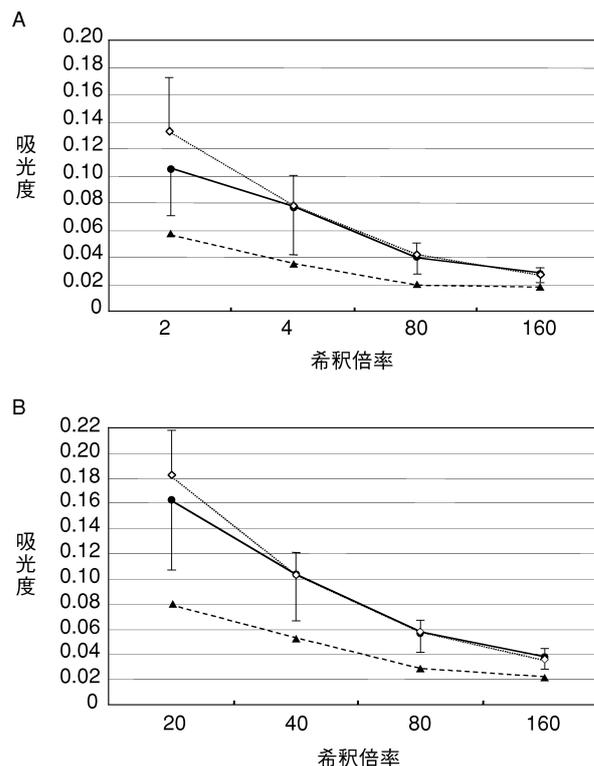


図 1 3 回目置換手術後の血中抗コラーゲン抗体値(平均値±標準偏差)。

A : 3 回目置換 1 週間後の血中抗コラーゲン抗体値。3% アルカリ可溶性コラーゲン溶液(KK-981)置換群と HEALON® 置換群の静脈血は、どの希釈倍率でも enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) の吸光度で一元配置分散分析による有意差はない ($p > 0.05$)。

B : 3 回目置換 3 週間後の血中抗コラーゲン抗体値。3% KK-981 置換群と HEALON® 置換群は一元配置分散分析により有意差なし ($p > 0.05$)。

● : 3% アルカリ可溶性コラーゲン溶液(KK-981) (n=5), ◇ : HEALON® (n=5), ▲ : 正常家兎前房水 (n=1)

び試料間に有意差はなかった (図 2 C)。

5) 角膜内皮細胞測定

置換術前の角膜内皮細胞密度は各群間に差はなかった。3 回の置換術の各々で、術後 3 週間後の角膜内皮細胞密度は術前と有意差はなかった (図 3)。また、六角形細胞出現率にも異常はなかった。

6) 角膜内皮細胞走査電子顕微鏡と病理組織学的検査
各群ともに角膜内皮細胞の配列はほぼ規則正しく、細胞間結合や微絨毛に異常はなかった (図 4)。

光学顕微鏡観察でも、コラーゲン群を含めてすべての眼球の角膜、輪部、虹彩、毛様体、隅角、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 5)。

2. コラーゲン溶液の前房からの排出速度測定

前房水中のヒドロキシプロリン量を吸光度 558 nm で測定してコラーゲン濃度に換算した値は、1 (n=3), 3

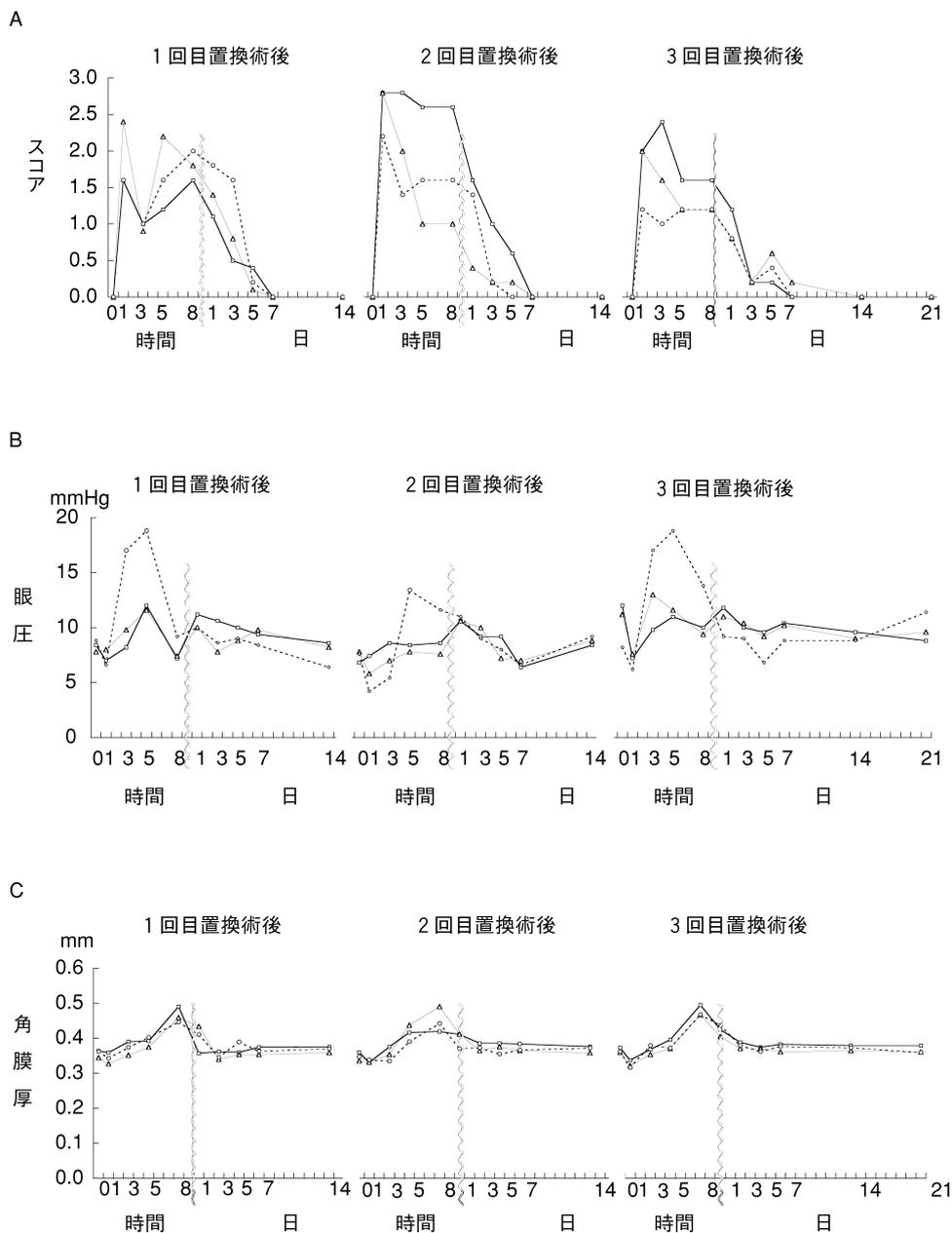


図 2

A：前眼部炎症スコア合計値の経過(平均値)。前眼部各部位の炎症の程度をスコア値で表して、合計したものの。二元配置分散分析により試料間について有意差あり($p < 0.05$)。Bonferroni 多重比較検定で、2回目置換 3日後のリン酸緩衝液(PB)に有意差あり($p < 0.05$)。コラーゲン溶液(KK-981)置換眼は、1, 2, 3回目の間に有意差はなし。

B：眼圧の経過(平均値)。二元配置分散分析により時間および試料間の有意差なし。

C：角膜厚の経過(平均値)。二元配置分散分析により時間および試料間の有意差なし。

△：3% KK-981(n=5)，○：HEALON® (n=5)，□：PB(n=5)

(n=3), 5(n=4), 8(n=3), 24(n=3), 72(n=4)時間、および正常家兎前房水(n=2)では、 7.72 ± 3.69 (平均値 ± 標準偏差) mg/ml, 2.55 ± 0.44 mg/ml, 0.78 ± 0.29 mg/ml, 0.41 ± 0.37 mg/ml, 0.01 ± 0.01 mg/ml, 0.04 ± 0.03 mg/ml, 0.06 ± 0.02 mg/ml となった(図 6)。

使用したコラーゲン溶液の濃度は3%、すなわち 30 mg/ml であり、0.2 ml 置換した時点では残りの前房水や後房水が僅かにあるのみで、前房の大部分は本コラー

ゲンで満たされている。それが、1時間後には74%、5時間後には97.4%が眼外に排出され、24時間後には正常眼と同じレベルになった。

3. コラーゲン溶液で置換後の角膜変化

今回の3回置換実験中に3%アルカリ可溶性コラーゲン溶液置換群のうち、1眼に角膜片雲を残した例があった。この現象の再現性をみるために、家兎3匹の片眼に従来のアルカリ可溶性コラーゲン溶液、他眼に生理食

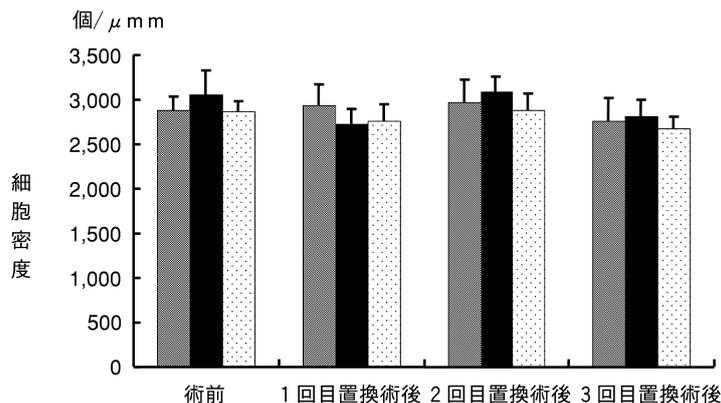


図 3 角膜内皮細胞密度(平均値±標準偏差).
 二元配置分散分析により時間および試料間の有意差なし.
 ■: 3% KK-981 (n=5), ■: HEALON® (n=5), □: PB (n=5)

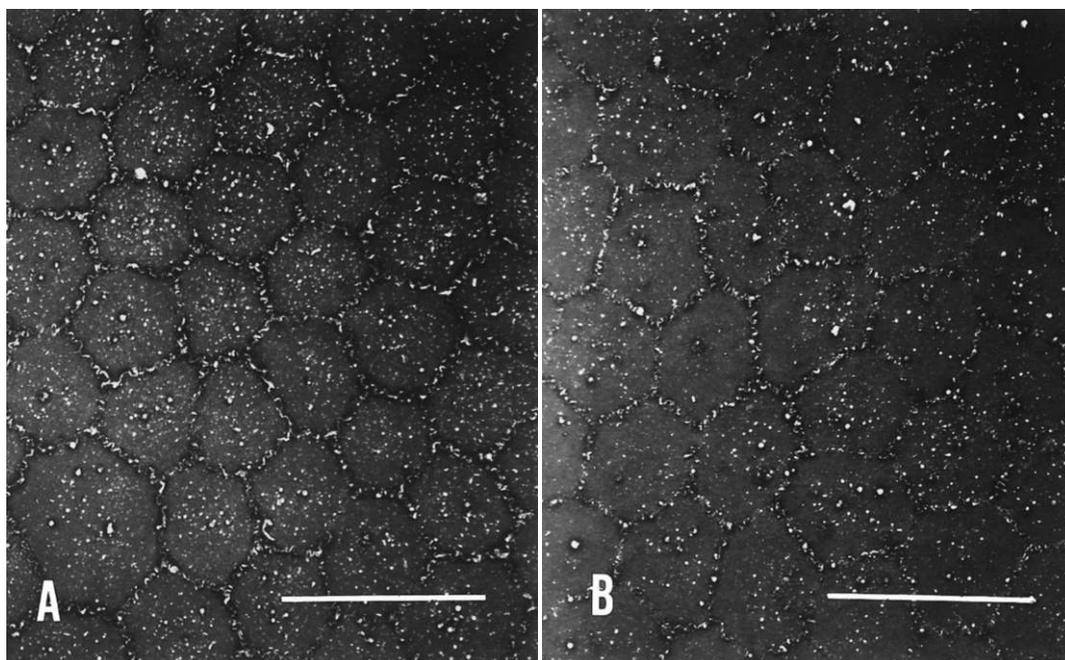


図 4 3回前房置換術 21 日後の角膜内皮細胞走査電子顕微鏡写真.
 特に著変はない.
 A: 3% コラーゲン(KK-981)置換眼. B: A の片眼で, PB 置換眼. バーは 30 μm

塩水を 0.1 ml ずつ, 炎症が強く生じるように虹彩を刺激しながら置換した結果, コラーゲン溶液置換した 3 眼ともに角膜深層に薄い混濁を生じた. そこで, 次に家兎 4 匹を用いて 6 眼に本コラーゲン溶液, 2 眼に生理食塩水で 0.2 ml 置換した. 家兎眼球は術直後から強い炎症反応を起こし, 多量のフィブリンの析出が術後 3~7 日後まで続いた. 本コラーゲン溶液で置換した眼では前房内のフィブリンが消退してゆく過程で, 角膜内皮の裏面に薄い膜のようなものが付着し, 3~7 日後にはデスメ膜付近の淡い灰白色の混濁がみられ, その後に灰白色の角膜実質片雲を生じた. それは 3 回置換実験をした家兎眼の 1 眼にみられた片雲と同様のもので, より大きいサ

イズであった. HE 染色, PTAH 染色, アザン染色した光学顕微鏡観察では角膜の異常は確認できなかったが, TEM では片雲のある部位の角膜組織内に微細な結晶から成る沈着物の存在が確認された(図 7). TEM の沈着物は, 置換手術の 2 日後では内皮細胞の内外に, その後はデスメ膜や実質深層に, 14 日後には実質深層から表層までの細胞外にあった. 沈着物のあった標本で元素分析を行った. 沈着物質の部位では, リン(P)とカルシウム(Ca)および塩素(Cl)のピークがあった. 沈着物のない部位では, Cl とオスミウム(Os)のピークがあった(図 8). 生理食塩水置換眼では強いフィブリンの出現はあったが, 角膜内皮裏面の膜状の付着や, 角膜片雲は

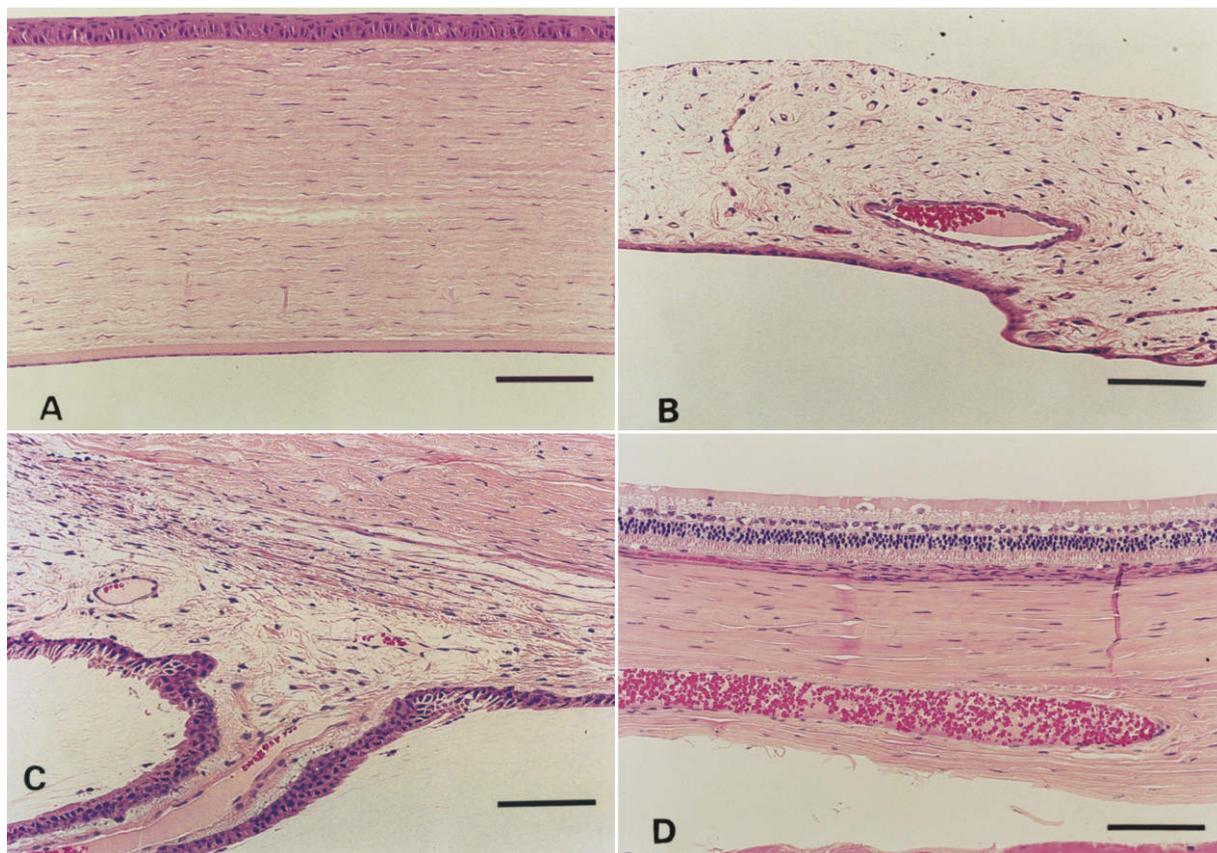


図 5 3% コラーゲン(KK-981)で3回前房置換術 21 日後の家兎眼の光学顕微鏡写真。
 ヘマトキシリン・エオジン染色。特に著変はない。
 A：角膜。 B：虹彩。 C：毛様体。 D：網脈絡膜。 バーは 100 μ m

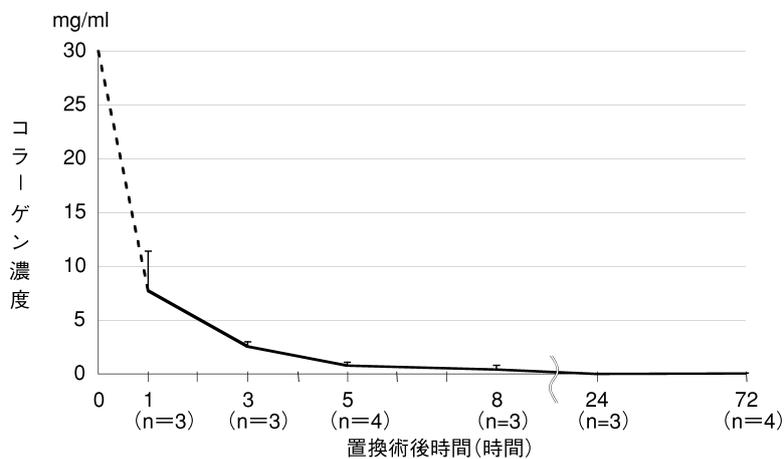


図 6 前房内注入後の前房水中コラーゲン残留量(平均値±標準偏差)。
 コラーゲン置換眼(n=5)の前房水中コラーゲン量は、24 時間後には同時に測定した、正常家兎前房水(n=2)の測定値 0.06±0.02(平均値±標準偏差)mg/ml と同程度になった。

なかった。次いで、4 匹の家兎にヘパリンを静脈注射して 5 眼に本コラーゲン溶液、3 眼に生理食塩水で 0.2 ml 置換術を施行した。本コラーゲン溶液置換眼では角膜内皮の裏面に薄い膜様物の付着に続いて深層の混濁、片雲の出現などの角膜変化はあったが、ヘパリンを注射しなかったものに比較して、生じた片雲は小さかった。

これらの結果を基に、コラーゲン溶液について溶媒のリン酸濃度を低くすることと、コラーゲンをサクシニル化することによってフィブリンとの反応を少なくすることの 2 点の改良を行った。白色家兎 4 匹を用いて、1 眼にサクシニル化コラーゲン(B)を用い、他眼はコラーゲンと溶媒の両方を変えた(C)で各々 0.2 ml 前房水と置換

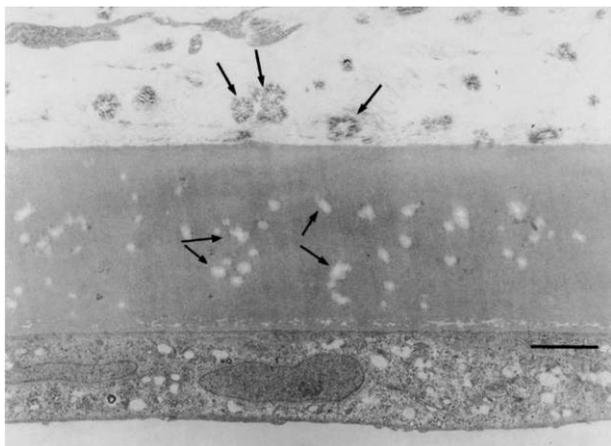


図 7 3% コラーゲン(KK-981)置換眼に生じた角膜片雲の透過電子顕微鏡写真。
コラーゲン 0.2 ml で置換後 7 日目の角膜混濁部分。デスメ膜，角膜実質の膠原線維間に不規則な電子密度を示す沈着物がみられる。バーは 3.3 μm

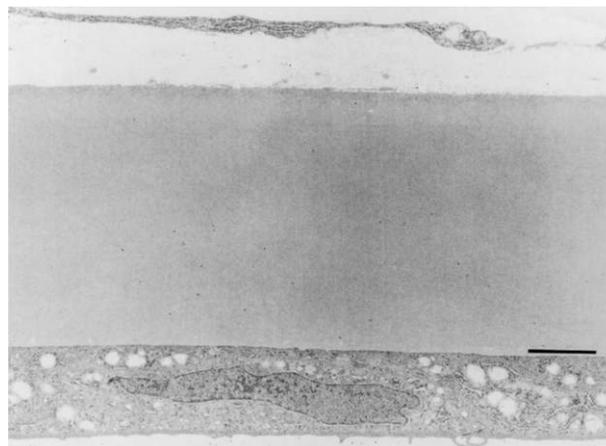


図 9 0.02 M のリン酸緩衝生理食塩水を溶媒にしたサクシニル化アテロコラーゲン溶液 0.2 ml で 2 回前房置換術後 14 日目の透過電子顕微鏡写真。
沈着物はみられない。バーは 2.5 μm

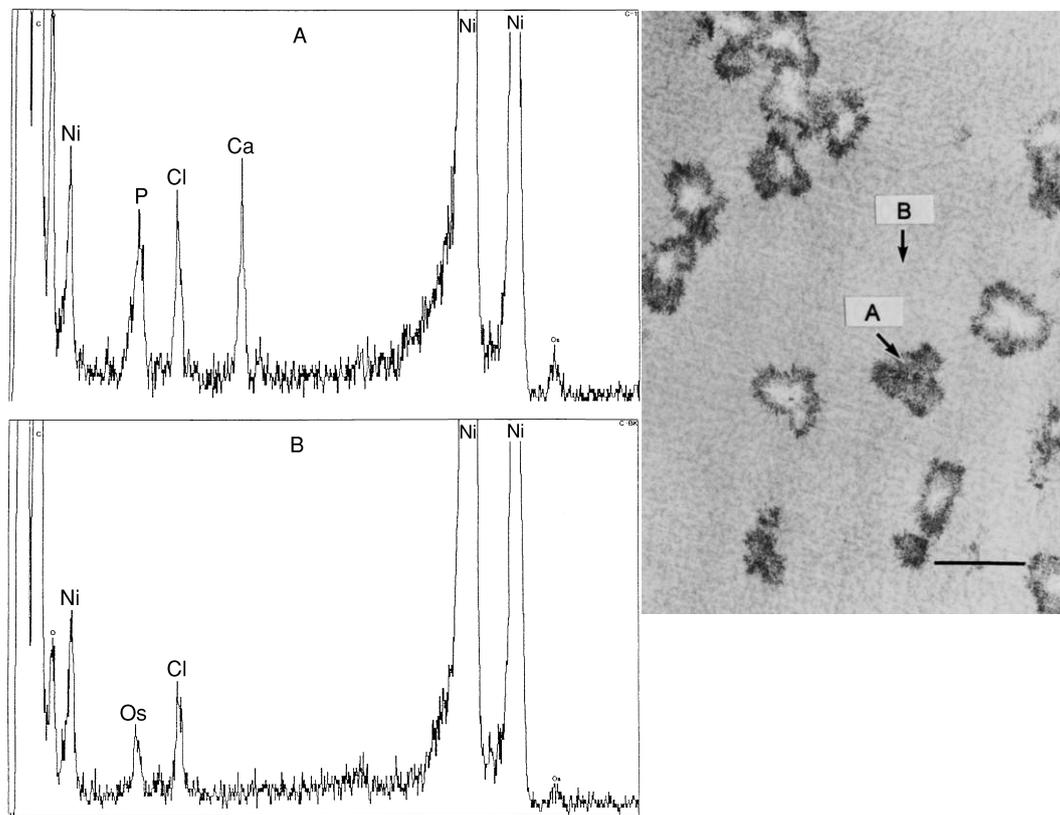


図 8 3% コラーゲン(KK-981)置換眼に生じた角膜片雲の元素分析結果。
ニッケル(Ni)メッシュの上で分析した。角膜実質中の沈着物質(A)では、リン(P)、塩素(Cl)とカルシウム(Ca)のピークがある。沈着物のない部分(B)ではオスミウム(Os)とClのピークがある。バーは 1 μm

した結果、(B)では4眼ともに角膜片雲を生じたが、従来のアルカリ可溶性コラーゲン溶液の場合に比較すると格段に小さくなった。(C)では4眼とも角膜片雲は起こらなかった。そして、家兎4匹の片眼に溶媒のみを変えた(A)、他眼に(C)を2週間の間隔で2回、0.2 ml の前

房水置換手術を施行し、2回目の置換手術8日または14日後に眼球を摘出し、角膜をTEMで観察した。(A)では4眼中2眼に点状の片雲が生じ、同部位のTEMで沈着物がみられた。(C)では4眼とも角膜の異常は残らず、TEMでも沈着物はなかった(図9)。

IV 考 按

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の生体材料として医療分野でも広く使用されているが、このように多く利用されている理由の一つに、他の蛋白に比べて抗原性が非常に低いことがあげられる⁴⁾¹⁰⁾。コラーゲンの抗原性の大部分は、コラーゲン分子を作っている3本のポリペプチド鎖の両末端にあるテロペプチドと呼ばれる部分にある¹¹⁾¹²⁾。テロペプチド以外のコラーゲン分子の抗原性もあるがほとんど問題にはならず、テロペプチドがコラーゲンの主要な抗原決定基であるという¹³⁾¹⁴⁾。今回我々が用いたコラーゲンの溶液(KK-981)は、材料である仔牛の真皮をペプシンとアルカリで処理をしてある。ペプシン処理するとコラーゲン分子からテロペプチドが消化切断される¹⁵⁾。アルカリ処理の過程ではテロペプチドの他に、ウイルス、細菌、パイロジェン、プリオンなどコラーゲン分子のらせん構造以外のすべての蛋白が溶解する¹⁶⁾。つまり、本剤は抗原決定基を取り除いたコラーゲン溶液といえる。しかし、異種蛋白である本剤の抗原性については慎重に検討されるべき問題であると思う。抗原を眼内に直接注入して、異物に対する過敏性反応による実験的ぶどう膜炎を作製することは、主に硝子体に注入する方法で古くから行われてきた。眼内に注入された抗原は血流に入って、まず脾臓やリンパ節で免疫適格細胞を感作し、感作リンパ球が眼内に戻って抗原と反応するという¹⁷⁾¹⁸⁾。感作リンパ球が眼内で抗原と接触すると、抗原の質と量によってタイプの異なるぶどう膜炎を生じ、ぶどう膜炎発症時期の眼組織は角膜輪部、虹彩、虹彩根部、毛様体突起、毛様体扁平部、水晶体嚢、脈絡膜、視神経乳頭周囲網膜に細胞浸潤があるとしている¹⁹⁾²⁰⁾。そこで、今回我々は白色家兎眼を用いて、前眼部手術の場合と同じ投与部位である前房内に本剤を注入する操作を3回繰り返して施行し、血中抗体値を測定するとともに、前眼部所見、眼圧、角膜内皮、眼病理組織学的検討を行った。その結果、血液中の本剤に対する抗体価は、3回目に本剤を前房内に注入した1週間後と3週間後ともに対照群と有意差はなく、抗体は産生されていなかった。前眼部所見では、家兎は手術侵襲によって生ずる眼内の炎症が強いので手術操作は極力眼球に負担がかからないように行い、その後の前眼部の観察も毛様充血、前房内炎症などを注意深く行った。その結果、コラーゲン置換群と、PB置換群やHA置換群との間での炎症スコアの差はなく、また、コラーゲン置換眼の1回目と2、3回目との間の炎症スコアの差もなかった。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も著明な変化はなかった。組織学的検査でも虹彩、網膜、脈絡膜などに細胞浸潤、血管炎、細胞破壊などの炎症を示す異常

はなかった。今回、5匹での観察ではあるが、3回繰り返して、前房内に注入しても眼の炎症所見はなく、全身症状もショック症状などは起こらなかった。このことは、本剤の抗原性が低いことを示していると思われる。

また、本剤は、前房からの排出速度の測定では8時間でほとんど排出されていた。家兎の前房水の流出量はヒトより若干高めの2~3 $\mu\text{l}/\text{min}$ であり、本剤はほぼ房水と同じ半減期で排出されていることになる。本剤の分子量は約30万、変性してゼラチンになれば分子量は10万となり、従来のHA粘弾性物質に比較すると大変に小さく、そのために速やかに前房から排出されることが予測されていたが、それを裏付ける結果となった。このことは、前房内置換した後の一過性の眼圧上昇がHAに比べて少ないという利点となり、そして免疫反応の観点からは、抗原と成り得る異物が長く局所に留まらないので免疫反応が生じにくいといった利点ともなる。

以上のように、抗原性については良い結果をもたらした今回の実験であったが、1例において角膜片雲を生じた。そこで、この問題の追試験をすることにした。Liangら²¹⁾はメチル化コラーゲンを白色家兎の前房内に注入して、眼組織や眼圧に異常はなかったが、角膜内皮や水晶体表面への沈着物があり、それは徐々に消失したと報告し、原因に手術侵襲をあげている。しかし、我々の追試験の結果、片雲形成は再現性があることがわかった。片雲の程度は、置換したコラーゲン溶液の量に比例する傾向があり、同じ置換量ならばヘパリン静脈注射をすると抑制され、術直後の炎症の程度にも関係した。TEMでは片雲部位には沈着物が観察され、元素分析の結果では沈着部でPとCaを検出した。そこで、本剤の溶媒として使ったPBのPと前房水中のCaがリン酸カルシウムとなって沈着した可能性もあるので、溶媒のリン酸濃度をできる限り低くしたコラーゲン溶液を作った。また、前眼部炎症の強さも片雲形成に関係していると思われた点については、コラーゲンとフィブリノーゲンとの反応も考慮して、よりフィブリノーゲンとの反応が少なくなるようにコラーゲンをサクシニル化した。その結果、0.02 MのPBSを溶媒にしたサクシニル化アテロコラーゲンでは、ハンドスリットランプ検査で角膜の片雲などの変化はなくなり、TEMでも沈着物がみられなくなった。現在は沈着物の同定をさらに詳しく行い、角膜変化の原因を解明中である。そして、安全性と有効性に満足のゆくコラーゲン溶液を開発する予定である。

稿を終えるに当たり、研究に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魯文男先生、Dr. Marilou G Ha、高研バイオサイエンス研究所の阿蘇雄氏、増淵寛志氏に感謝いたします。

文 献

- 1) **Jeffrey GG, Dale RM, Alan LR, Alfred AF, James SK** : Increased intraocular pressure in the immediate postoperative period after extracapsular cataract extraction. *Am J Ophthalmol* 105 : 466—469, 1988.
- 2) **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.
- 3) **森本厚子, 金井 淳** : 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—. *日眼会誌* 104 : 458—465, 2000.
- 4) **宮田暉夫** : コラーゲンの新しい利用—医学方面への応用を主として—. *皮革化学* 15 : 167—179, 1970.
- 5) **ISO/TC 172/SC 7/WG 7 N 153** : Preliminary working draft : Ophthalmic viscosurgical devices for use in the anterior segment-Version 3, 1997.
- 6) **Fujii K, Tsuji M, Murota K, Terato K, Shimozuru Y, Nagai Y** : An improved enzyme-linked immunosorbent assay of anti-collagen antibodies in human serum. *J Immunol Methods* 124 : 63—70, 1989.
- 7) **Bergman I, Loxley R** : Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal Chem* 35 : 1961—1965, 1963.
- 8) **Duckert F, Nyman D** : Factor XIII, fibrin and collagen. *Suppl Thromb Haemost* 63 : 391—396, 1978.
- 9) **Miyata T, Schwartz A, Wang CL** : Deposition of platelets and fibrin on chemically modified collagen hollow fibers. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 22 : 261—268, 1976.
- 10) **Wallace DG, McPherson JM, Ellingsworth L, Cooperrman L, Armstrong R, Piez A** : Immunology of collagen. In : *Nimni ME*(Ed) : Collagen Volume III Biotechnology. CRC Press, Florida, 136—138, 1988.
- 11) **Knapp TR, Luck E, Daniels JR** : Behavior of solubilized collagen a bioimplant. *J Surg Res* 23 : 96—105, 1977.
- 12) **Timpl R, Beil W, Furthmayr W, Meigel W, Pontz B** : Characterization of conformation independent antigenic determinants in the triple-helical part of calf and rat collagen. *Immunology* 21 : 1017—1030, 1971.
- 13) **Pontz B, Meigel W, Rauterberg J, Kuhn K** : Localization of two species specific antigenic determination on the peptide chains of calf skin collagen. *Eur J Biochem* 16 : 50—54, 1970.
- 14) **Steffen C, Timpl R, Wolff I** : Immunogenicity and specificity of collagen. V. Demonstration of three different antigenic determinants on calf collagen. *Immunology* 15 : 135—144, 1968.
- 15) **宮田暉夫** : コラーゲン. *高分子* 19 : 355—361, 1970.
- 16) **Kemp GD, Tristram GR** : The preparation of an alkali-soluble collagen from demineralized bone. *Biochem J* 124 : 915—919, 1971.
- 17) **Smith RE, Jensen AD, Silverstein AM** : Antibody formation by single cells during experimental immunogenic uveitis. *Invest Ophthalmol* 8 : 373—380, 1969.
- 18) **Silverstein AM** : Effect of x-irradiation on the development of immunogenic uveitis. *Invest Ophthalmol* 2 : 58—62, 1963.
- 19) **Zimmerman LE, Silverstein AM** : Experimental ocular hypersensitivity : Histopathologic changes observed in rabbits receiving a single injection of antigen into the vitreous. *Am J Ophthalmol* 48 : 447—465, 1959.
- 20) **Aronson SB** : Patterns in experimental uveitis. *Arch Ophthalmol* 76 : 763—767, 1968.
- 21) **Liang C, Peyman GA, Serracarbassa P, Calixto N, Chow AA, Rao P** : An evaluation of methylated collagen as a substitute for vitreous and aqueous humor. *Intern Ophthalmol* 22 : 13—18, 1998.