

## 酵素を用いた硝子体手術に用いる自己血由来プラスミンの 作製法の改良とその臨床応用

佐久間俊郎<sup>1)</sup>, 田中 稔<sup>1)</sup>, 惣宇利正善<sup>2)</sup>, 一瀬 白帝<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>順天堂大学医学部附属順天堂浦安病院眼科

<sup>2)</sup>山形大学医学部分子病態学講座

### 要 約

**目的**：網膜硝子体疾患治療および硝子体手術時に用いる自己血由来プラスミンをより安全、かつ高純度に精製し、これを臨床に応用して良好な結果を得たので報告する。

**方法**：臨床応用に先立って、動物実験で従来の方法を追試した。有色家兎の片眼にヒト由来プラスミン 0.1 ml (1 IU) を注入し、注入後 15, 30 分, 24 時間, 7 日後に、各種眼科検査, 光学および透過電子顕微鏡検査, 走査電子顕微鏡検査を行った。加えて、プラスミン注入後の硝子体腔内の活性を経時的に測定した。高純度のプラスミノゲンの精製に当たり、蛋白質変性を極力抑制するため、アプロチニンとベンザミジンを用いた。細菌などの汚染の有無を確認するため、製剤を 48 時間培養した。実際の臨床例、すなわち特発性黄斑円孔、糖尿病黄斑症に応用した。

**結果**：家兎において、病理組織学的に、プラスミンは副作用なく硝子体を網膜内境界膜から剝離せしめるこ

とを確認した。硝子体腔内の比活性は 5~10 分でピークに達し、以後急速に消失した。蛋白変性抑制剤を加えることで高比活性のプラスミンが得られた。細菌汚染は全くみられなかった。実際の臨床例では、2 例とも完全な硝子体剝離ができ、本剤の目的が達成できた。プラスミノゲンの活性化にウロキナーゼを用いた。

**結論**：2 例の臨床例において、0.2 IU (0.1 ml) のプラスミン注入で、安全確実に硝子体剝離を作製できた。実際の臨床で用いるためには、蛋白変性抑制剤を用いて精製したプラスミノゲンをウロキナーゼで活性化し、これを用いることで安全、かつ確実に硝子体剝離が作製できると思われ、臨床上今後大変有用であると思われた。(日眼会誌 107 : 709-718, 2003)

**キーワード**：プラスミン, 硝子体剝離, 硝子体手術, 特発性黄斑円孔, 糖尿病黄斑症

## Preparation of High-purity and Safe Autologous Plasmin and its Clinical Application

Toshiro Sakuma<sup>1)</sup>, Minoru Tanaka<sup>1)</sup>, Masayoshi Souri<sup>2)</sup> and Akitada Ichinose<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Juntendo University Urayasu Hospital

<sup>2)</sup>Department of Molecular Patho-Biochemistry and Patho-Biology, Faculty of Medicine Yamagata University

### Abstract

**Purpose** : To report an improved preparation of safer and highly-purified autologous plasmin and to demonstrate its clinical applications.

**Methods** : Prior to clinical application, animal experiments were carried out. In addition, the activity of plasmin in the vitreous cavity after injection was measured serially. In preparation for clinical use, the proteinase inhibitors aprotinin and benzamidine were used for suppression of protein denaturation. The samples were incubated for 48 hours to check for contamination. The preparation was applied to patients with idiopathic macular hole and diabetic macular edema.

**Results** : The plasmin detached the vitreous body from the inner limiting membrane of the retina without any ill effects in animal experiments. The specific activity reached a peak in 5~10 minutes and decreased rapidly thereafter. By adding a suppressor

of protein denaturation in the purification process, 0.2 IU (0.1 ml) of high-purity plasmin could be prepared from each patient. No bacterial contamination was noted. Complete vitreous detachment could be induced in two clinical cases. Urokinase was used instead of streptokinase to activate plasminogen.

**Conclusions** : Vitreous detachment is considered to be induced safely and consistently by injection of plasmin prepared using a protein denaturation suppressor and activated with urokinase. This method is expected to be of clinical value.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 107 : 709-718, 2003)

**Key words** : Plasmin, Posterior vitreous detachment, Vitrectomy, Idiopathic macular hole, Diabetic maculopathy

別刷請求先：279-0021 浦安市富岡 2-1-1 順天堂大学医学部附属順天堂浦安病院眼科 佐久間俊郎  
(平成 14 年 8 月 15 日受付, 平成 15 年 4 月 8 日改訂受理)

Reprint requests to: Toshiro Sakuma, M.D. Department of Ophthalmology, Juntendo University Urayasu Hospital, 2-1-1 Tomioka, Urayasu 279-0021, Japan

(Received August 15, 2002 and accepted in revised form April 8, 2003)

## I 緒 言

ほとんどの網膜硝子体疾患の硝子体手術時には、硝子体を網膜内境界膜から安全、確実に剝離せしめることが重要である。従来の方法で機械的に硝子体を内境界膜から剝離する際に、網膜出血、視神経線維層の障害、網膜裂孔などを発症することもあり<sup>1)</sup>、特に若年者ではその癒着が成人よりも強く、剝離に難渋することもある<sup>2)</sup>。硝子体膜と網膜内境界膜間には、フィブロネクチンやラミニンなどのグリコプロテインが存在し、存在様式は年齢によっても異なる<sup>3)</sup>。米国では、この網膜硝子体界面の癒着を安全に剝離するために、自己血由来のプラスミンが用いられてきており、良好な結果が報告<sup>4)~8)</sup>されてきている。しかし、我が国ではこれまで自己血由来のプラスミンを用いた硝子体手術の報告はない。

我々は本法を追試し、臨床に応用するために自己血からのプラスミノゲンをより高純度に精製し、より安全なプラスミンを作製するために今までの報告<sup>4)~8)</sup>を検討し、さらなる改良を試みた。臨床応用に先立って動物実験を行い、網膜硝子体界面でのプラスミンの作用について、検眼鏡的、電気生理学的、病理組織学的に確認し、実際の眼内でのプラスミン注入後の活性の経時的変化を観察した。臨床例では、特発性黄斑円孔、糖尿病黄斑症の2種の症例に応用し、従来の方法の問題点を把握し、今後の本法の改良後の有用性についても確認したので、ここに報告する。臨床応用に先立って、インフォームド・コンセントをも含め学内倫理委員会に申請し許可を得たので、この手続きについても言及する。

## II 方 法

### 1. 学内倫理委員会への申請およびインフォームド・コンセント

倫理委員会申請に当たって、表1のごとき内容について検討を依頼し、条件付きで許可された。治験期間はまず1年で、終了後詳細な報告を義務付けられた。これらの内容について、患者にも十分な説明を行い同意を得て治験を開始した。インフォームド・コンセントについては、治療における従来の方法、すなわち硝子体切除を行い完全に硝子体剝離を作製し、場合によってはガス注入、そして俯きの姿勢をとる必要があること、また、手術、特に硝子体を網膜から解離させるときの合併症につき説明した。プラスミンを用いると、この硝子体剝離が容易となり合併症も少なくなるであろうこと、また、自己血由来の無菌のものであるゆえ、安心して注入可能であることを説明し、同意を得た。

### 2. プラスミンの作製

精製に際し、蛋白質分解を抑制するために10 U/ml アプロチニン、5 mM ベンザミジン、1 mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)を血漿に添加した。lysine-

表 1 学内倫理委員会申請項目

1. 新治療名	8. 予定する使用期間
2. 目的	9. 予想される効果
3. 対象疾患	10. 予想される副作用
4. 従来の方法	11. 予定症例数
5. 申請する治療内容	12. 患者の同意
6. 投与薬物の名称	13. 患者の費用負担
7. 予定する用法、用量	14. 参考文献

表 2 プラスミン精製のフローチャート

1. 自己血から血漿の分離
2. アフィニティークロマトグラフィー
2-1 吸着
2-2 洗浄
2-3 溶出
3. 脱塩
4. 濃縮
5. 除菌
6. プラスミノゲンの検出と定量
7. プラスミノゲンアクチペーターによるプラスミンへの活性化

sepharose 4 B(アマシャム ファルマシア バイオテック)に吸着したプラスミノゲンを0.2 Mε アミノカプロン酸(EACA)で溶出後、sephadex G-25(アマシャム ファルマシア バイオテック)を用いてEACAを除去した。プラスミンの作製は、眼科専用の手術室で室温を18°Cに設定し、手指の消毒を行い、ガウンテクニックで実際の手術時と同様の清潔度で施行した。作製前に室内の空中落下菌の検査を行い、室内が一般の手術室と同等の清潔度を保っていることも確認した。プラスミンの作製は、表2のごとく、まず患者の肘静脈から50 ml採血しこれを遠心し、血漿を分離した。Lysine-sepharose 4 B(アマシャム ファルマシア バイオテック)を用い、血漿からプラスミノゲンを精製した。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によりプラスミノゲンの純度を検出した。プラスミノゲンの細菌汚染を防ぐため0.22 μmのミリポアフィルター(マイルクスGS®)を通し、また、嫌気性菌も含め、汚染のないことを確認するために、血液寒天培地、チョコレート寒天培地、チオグリコレート培地を使用し、使用前48時間の細菌培養を行った。プラスミノゲンは冷凍保存し、使用直前にストレプトキナーゼ(日本レダグリー)もしくはウロキナーゼ(三菱ウェルファーマ)で活性化プラスミンとし、硝子体腔内に注入した。使用前に活性を測定し、眼内で十分効果を発揮することも確認した。

### 3. 動物実験

すべての動物実験はPrinciples of laboratory animal care(NIH publication No. 86-23 revised 198)に従って施行した。用いた動物は、体重2 kgの有色家兎8匹で

ある。右眼に 1 U (0.1 ml) のプラスミンを注入し、左眼には balanced salt solution (BSS) 0.1 ml を注入し対照とした。プラスミンは Sigma 社から入手した。活性は 1 IU である。これを 0.1 ml の BSS で溶解した。注入には 30 ゲージ針を用い、硝子体腔中央に注入した。注入したプラスミンが硝子体腔内を拡散する様子を手術用顕微鏡下で観察した。すなわち、フルオレスチンを混ぜた 0.1 ml BSS を硝子体腔中央にゆっくりと注入すると、中央付近に滞らずに均等に網膜に向かって眼内に流れ去っていった。注入後 30, 60 分, 24 時間, 7 日後に下記の検査を施行した。すなわち、細隙灯顕微鏡 (Kowa SL-14) 検査, 眼底検査および写真撮影 (Kowa GENESIS), 超音波 B-mode 検査 (ULTRASCAN® DIGITALB™ 4000), および 1 時間暗順応後の網膜電図検査 (トーマー LE-1000) を行った。眼球を摘出し、2% グルタルアルデヒド、およびパラフォルムアルデヒドの混合液で眼球を固定し、アイカップを作製した。実体顕微鏡下で硝子体剥離の有無を確認した。後に組織を細切し、光学顕微鏡、走査電子顕微鏡および透過電子顕微鏡検査を施行した。組織片の一部はアルコール系列で脱水後パラフィンに包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色に加え、硝子体線維染色の目的でペンタ染色も行った。透過電子顕微鏡検査には、2% オスミウムで後固定し、エポキシ樹脂 (EPOK 812) に包埋し切片を作製し、トルイジンブルーで染色し光学顕微鏡で観察した。引き続き超薄切片を作製し、タンニン酸と鉛で二重染色し JEM-1200 EX 型電子顕微鏡で観察した。走査電子顕微鏡検査では、イオンコーターで蒸着後 S-800 型走査電子顕微鏡で観察した。

眼内に注入されたプラスミンの活性を経時的に調べるため、別に 6 匹の有色家兎を用い実験を行った。すなわち、0.1 ml のプラスミンを注入後、5, 10, 15, 30, 60 分後、24 時間それぞれで硝子体腔内のプラスミン活性も測定した。活性の測定はテストチーム発色性合成基質 S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA) を用いた。

### III 結 果

#### 1. プラスミンの精製と活性

実際の臨床上の患者のプラスミンの作製前に著者の自己血液を採血し、これを用いて高純度のプラスミノゲンの精製を検討した。頻回に実験を行った結果、プロテアーゼ阻害剤を未添加の場合、精製過程での分解もあって回収率や活性は満足できるものは得られなかったが、蛋白の変性を抑えるため、アプロチニン、ベンザミジンを追加することで、純度の高い十分な量の、高い比活性を示すプラスミノゲンが得られた。得られた結果を図 1 に示す。また、得られたプラスミノゲンを 48 時間培養した結果、菌の増殖はなかった。すなわち、得られたプラスミノゲンは十分な比活性を持ち、細菌汚染の

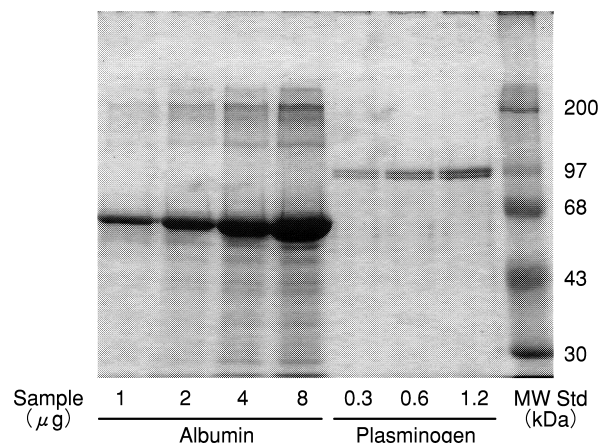


図 1 プラスミノゲンの電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動 (SDS-PAGE)。

純度の高いプラスミノゲンが得られた。



図 2 有色家兎におけるプラスミン注入直後の実体顕微鏡所見。

硝子体腔中に軽度の混濁がみられた。

ない高純度のものであった。眼内に注入可能な量は 0.1 ml と設定し、活性測定の結果、0.1 ml で、0.2 IU の活性を持つプラスミンが得られた。

#### 2. 動物実験

細隙灯顕微鏡検査で注入直後に、一過性の眼圧上昇のため角膜上皮浮腫が観察されたが、直ちに消失した。注入後 7 日までの間に前房内に炎症所見は全くみられなかった。眼底検査で注入直後から硝子体腔中に軽度の混濁がみられたが (図 2)、24 時間後には消失した。アイカップを作製後にフルオレスチンを硝子体上に滴下し、水洗し硝子体を観察すると、硝子体は網膜から解離していた。以後 7 日までの間にも検眼鏡的にも網膜硝子体に著変はみられなかった。網膜電図 (ERG) において、対照と比較して、注入 30 分後に振幅が低下し、7 日目には正常波形に回復した (図 3 A~C)。超音波 B-mode 検査で、注入 30 分後には対照眼と比較して硝子体腔後方に棘波をみたが、はっきりとした後部硝子膜によると思

われる画像は得られなかった(図4 A, B).

図5 A, Bに, 注入30分後に作製した走査電子顕微鏡写真を示す. 対照眼に比較して, プラスミン注入眼では硝子体線維がほぼ消失し, 平滑な網膜内境界膜上にごく少量の線維性成分のみられるようになっていた. この所見は注入後7日までのすべての眼球にみられた. 光学顕微鏡所見では, 硝子体をより明確に染色するためにペンタ染色を行った. 図6 A, Bのごとく対照眼では網膜面上に多くの硝子体が残存していたが, プラスミン注入眼では硝子体線維を確認することができなかった. 同様の部位を透過電子顕微鏡で観察すると, 対照眼と比較して内境界膜上にはほとんど硝子体線維はみられなかった(図7 A, B).

### 3. プラスミンの硝子体腔内での経時的活性測定

プラスミンを注入後5分では活性値は極大に達し, 以後急速にその活性は低下し, 24時間ではほぼ消失していた(図8). すなわち, 5分後は0.148 IU/ml, 15分後は0.123 IU/ml, 30分後は0.101 IU/ml, 60分後は0.062 IU/mlと漸減した. 24時間では測定不能となった.

## IV 臨床例報告

### 1. 症例1

54歳, 女性. 主訴は右眼の視力低下である. 近医で特発性黄斑円孔の診断を受け手術目的のため当科紹介となった. 家族歴・既往歴に特記すべきことはない. 初診は2002年3月13日で, 視力は右眼が0.4(矯正不能), 左眼が1.2(矯正不能)で, 右眼のGass分類stage3の特発性黄斑円孔と診断した(図9 A, B). 光干渉断層計(OCT)では円孔縁で網膜内層の厚みが増し, 多少のfluid cuffを示した. ERG検査は正常で, 超音波B-mode検査で硝子体剥離はなかった. 十分なインフォームド・コンセントを得て, 2002年4月26日, 自己血由来プラ

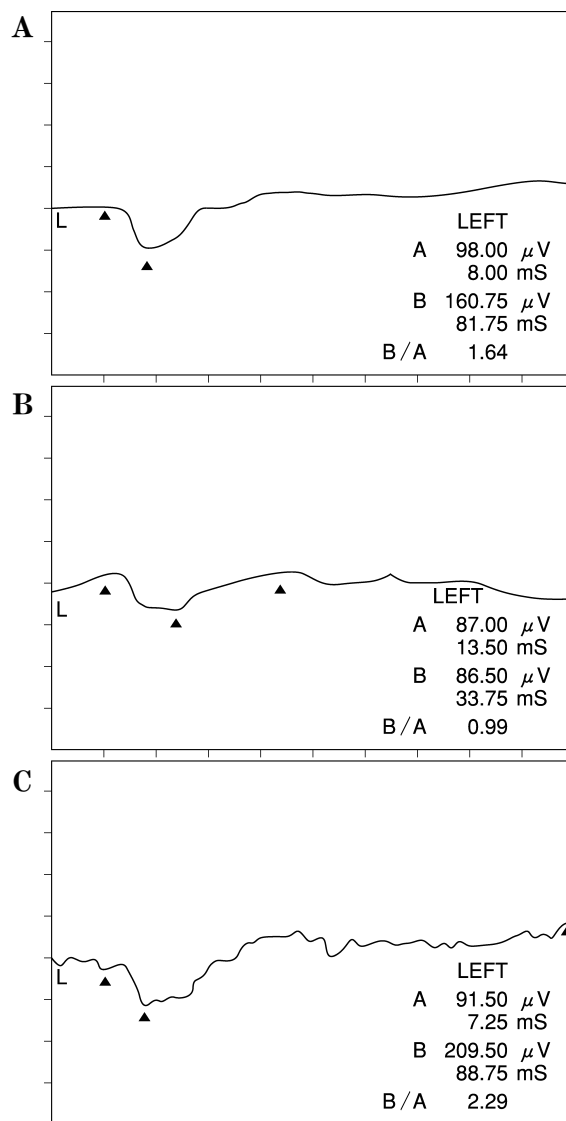


図3 有色家兎におけるプラスミン注入後における網膜電図(ERG)の変化.

A: プラスミン注入前, B: プラスミン注入30分後に振幅の低下がみられたが, C: 注入後7日目には, 波形は回復している.

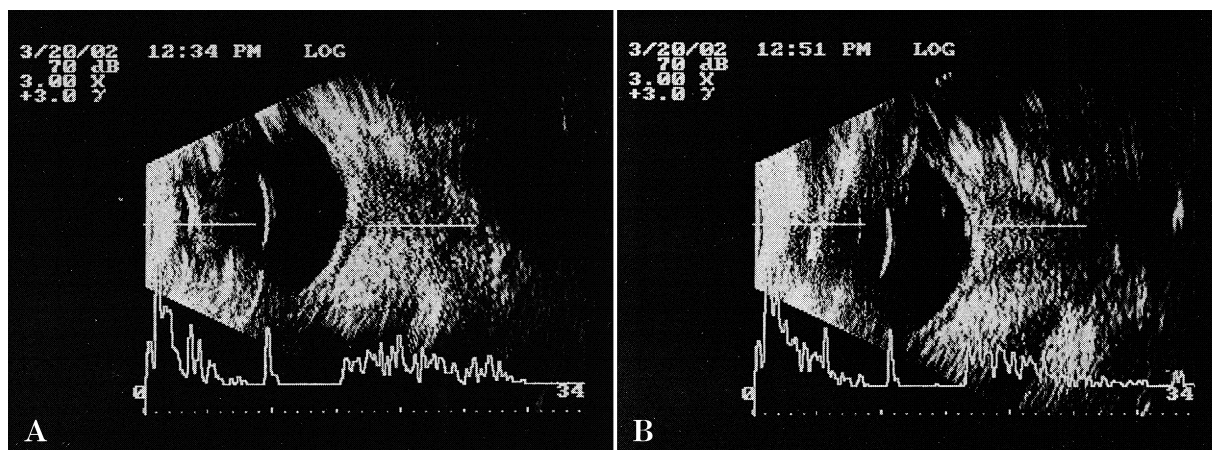


図4 有色家兎におけるプラスミン注入後における超音波B-mode検査の変化.

対照眼(A)と比較して硝子体後方に棘波(B)がみられるが, はっきりとした後部硝子体膜によると思われる画像は得られなかった.



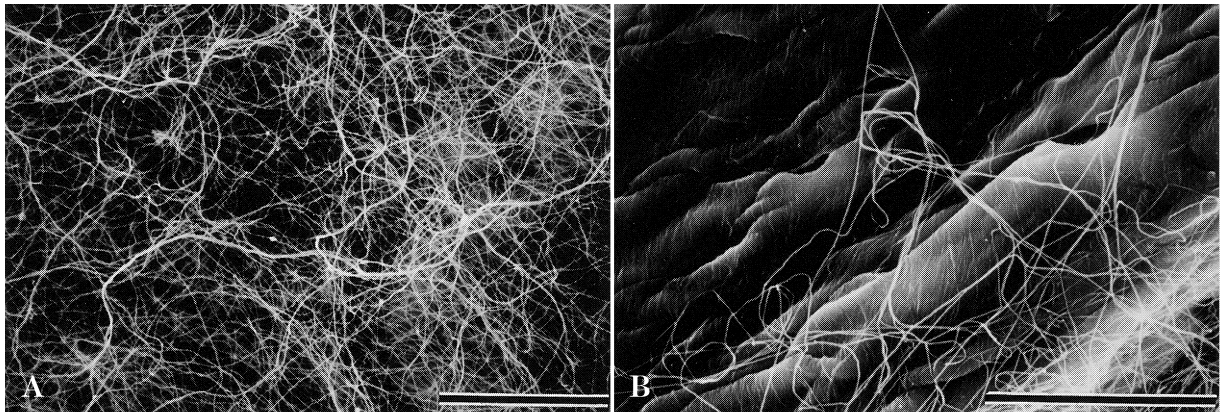


図 5 有色家兎におけるプラスミン注入眼と対照眼の走査電子顕微鏡所見。

対照眼(A)と比較してプラスミン注入眼(B)では硝子体線維がほぼ消失し、平滑な網膜内境界膜上にごく少数の繊維性成分が観察される。バーは5 $\mu$ m

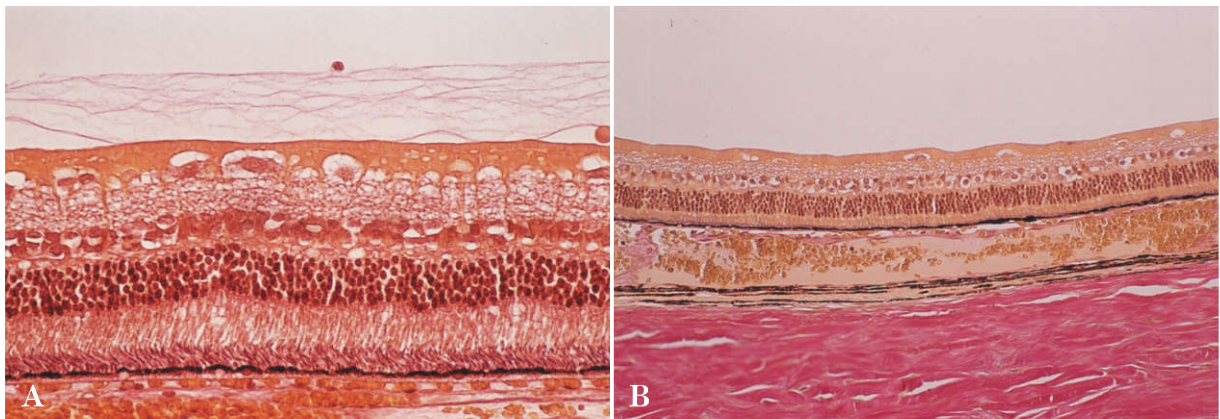


図 6 有色家兎におけるプラスミン注入眼と対照眼の光学顕微鏡所見。

対照眼(A)と比較して、注入眼では硝子体線維が消失していた(B)。ペンタ染色 200 $\times$

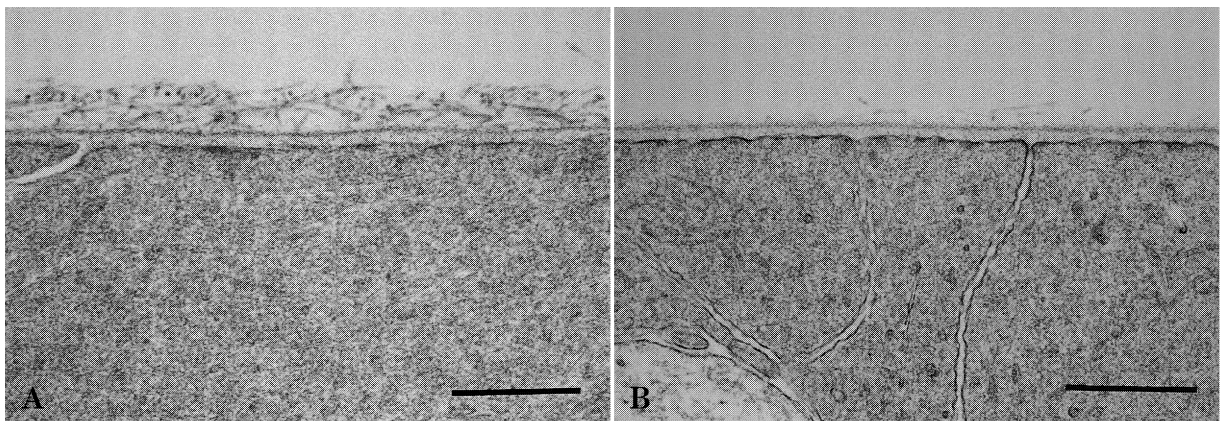


図 7 有色家兎におけるプラスミン注入眼と対照眼の透過電子顕微鏡所見。

対照眼(A)と比較して、注入眼では硝子体線維はほぼ消失していた(B)。バーは0.5 $\mu$ m

スミン 0.1 ml (0.2 IU) を硝子体腔中央に注入した。本症例ではプラスミノーゲン活性化のためにウロキナーゼを用いた。注入後から綿密に眼底検査、細隙灯検査、OCT 検査、ERG 検査、超音波検査を施行した。注入後

1 時間で OCT 像で後部硝子膜がみられ、目的は達成されたため、二次的な操作は加えず OCT での経過観察を続けた。ERG 検査で注入前と比較して変化はなかった。超音波検査で硝子体剥離が確認できた(図 10)。三面鏡



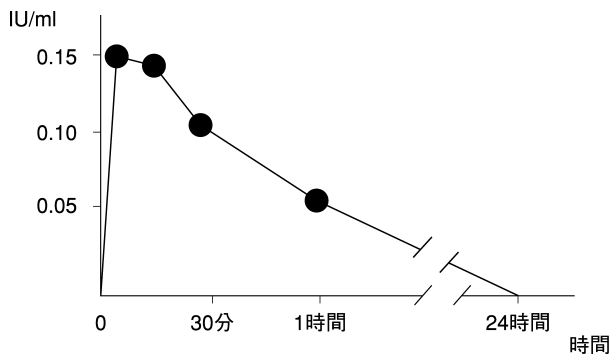


図 8 プラスミンの硝子体腔内での経時変化。注入後 5 分で活性は最大となり、以降急速に消失した。

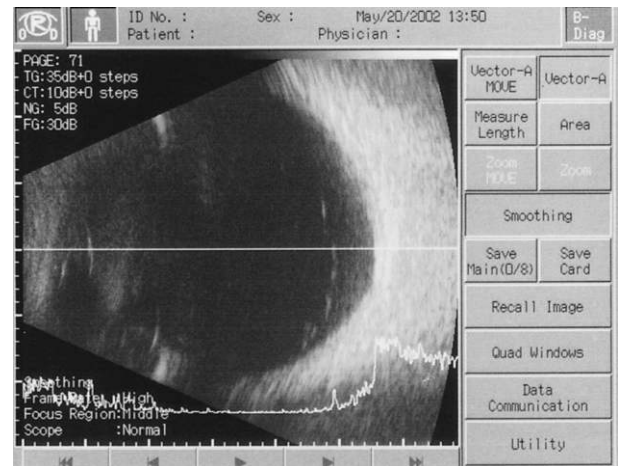


図 10 症例 1 におけるプラスミン注入後の超音波 B-mode 検査所見。

後部硝子体剥離の所見が得られた。

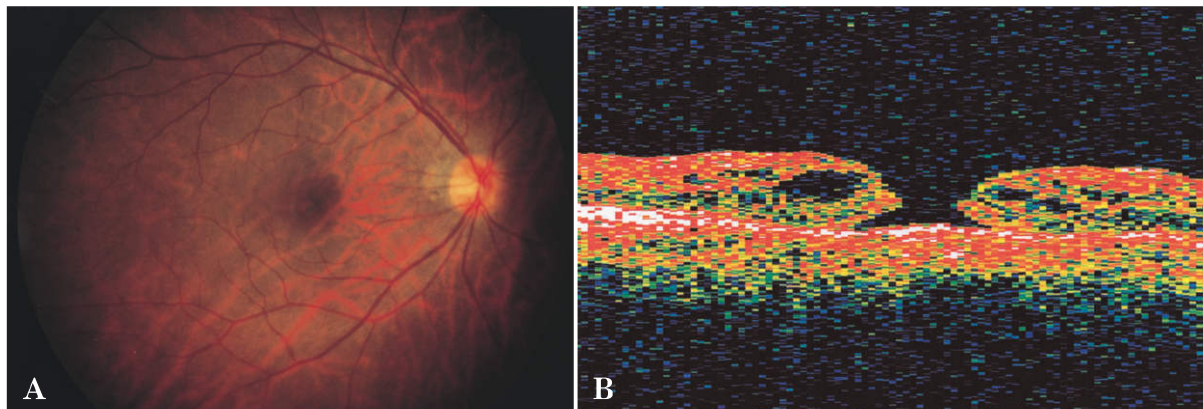


図 9 症例 1 特発性黄斑円孔の眼底 (A) および光干渉断層計 (OCT) (B) 所見。黄斑円孔は、Gass 分類で stage 3 であった。

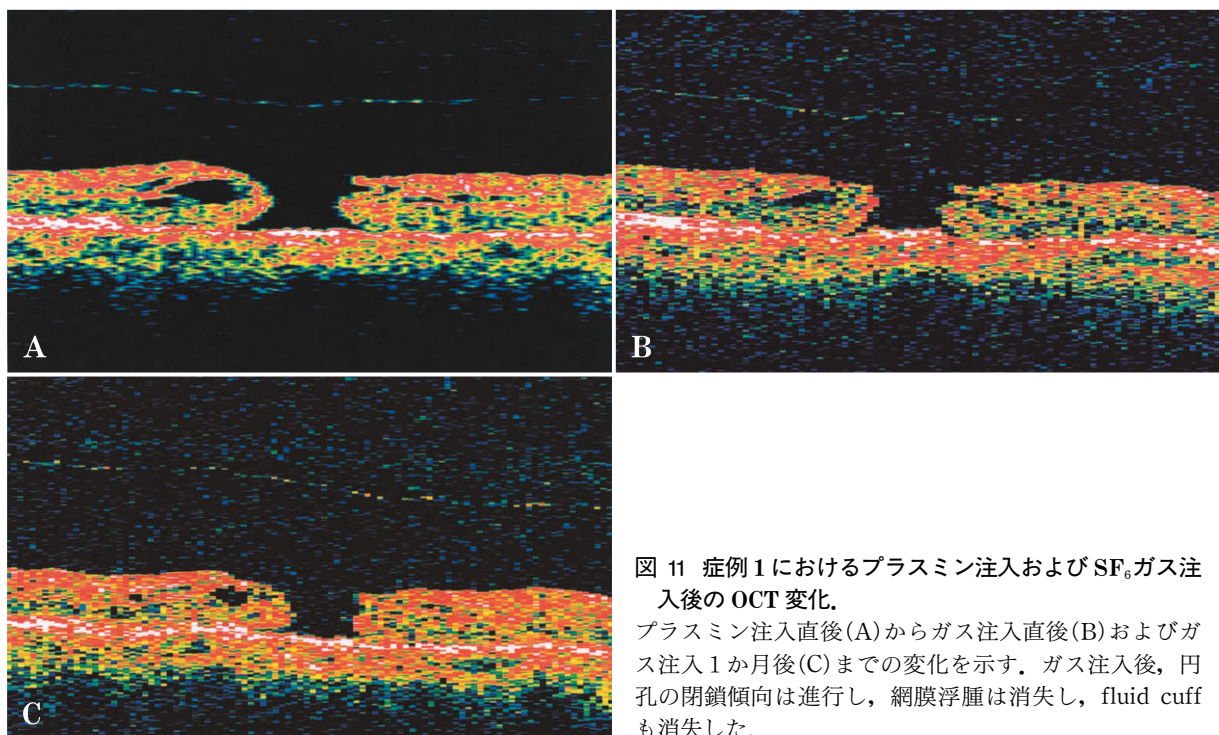


図 11 症例 1 におけるプラスミン注入および SF<sub>6</sub> ガス注入後の OCT 変化。

プラスミン注入直後 (A) からガス注入直後 (B) およびガス注入 1 か月後 (C) までの変化を示す。ガス注入後、円孔の閉鎖傾向は進行し、網膜浮腫は消失し、fluid cuff も消失した。

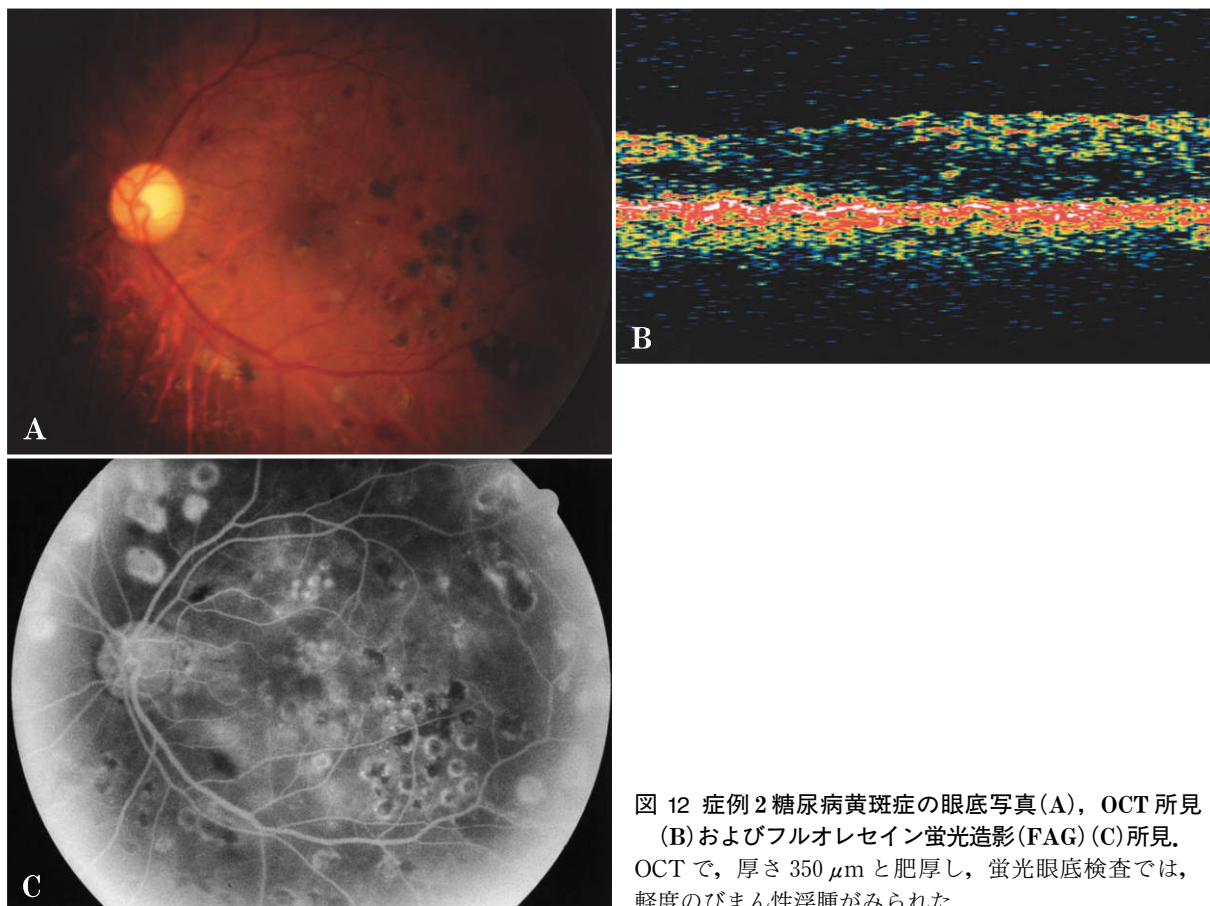


図 12 症例 2 糖尿病黄斑症の眼底写真(A), OCT 所見 (B)およびフルオレセイン蛍光造影(FAG)(C)所見。OCTで、厚さ  $350\ \mu\text{m}$  と肥厚し、蛍光眼底検査では、軽度のびまん性浮腫がみられた。

で円孔は上方から閉鎖がはじまってきたが、注入 2 週間後もまだ開存しているため、早期の閉鎖目的で患者と相談の上、20% SF<sub>6</sub> ガス 0.5 ml を前房水 0.2 ml 採取後に注入し俯き姿勢をとった。ガス注入後さらに円孔の閉鎖傾向は進行し、ガス注入後 1 日では網膜浮腫は消失し fluid cuff も消失した。図 11 A~C に注入からガス注入前までの OCT 像の変化、およびガス注入から 1 か月後までの OCT 像の変化を示す。現在注入から 3 か月が経ち、黄斑所見は改善してはいるものの、視力は 0.4 のままで未だ完全に閉鎖はしていないため、硝子体手術を予定している。

## 2. 症例 2

63 歳、女性。主訴は両眼の視力低下である。近医で糖尿病黄斑症の診断で手術目的に当科紹介された。糖尿病病歴は不明で、治療はインスリンノボレット R(12-10-10) で良好で、HbA<sub>1c</sub> は 5.8% であった。初診は 2002 年 1 月 16 日で、初診時視力は、右眼が 0.04(0.2×3.5 D○cyl-2.0 A×90°)、左眼が 0.04(0.2×-1.50 D○cyl-1.00 DA×90°) で、水晶体を含め前眼部に異常はなかった。眼底検査で右眼に黄斑浮腫がみられた。OCT では厚さ約  $350\ \mu\text{m}$  と肥厚していた(図 12 A, B)。蛍光眼底検査でびまん性浮腫が観察されたが、軽度であった(図 12 C)。ERG 検査は軽度の振幅の低下で、超音波 B-

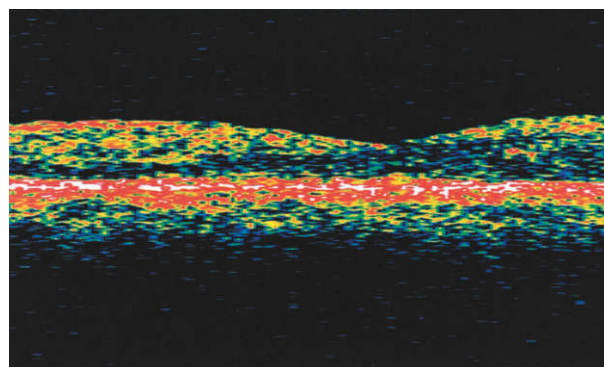


図 13 症例 2 の術後 OCT 所見。

術後翌日から黄斑形態の回復がみられ視力は 1.0 に改善した。

mode 検査で硝子体剥離はみられなかった。症例 1 と同様、十分なインフォームド・コンセントを得て 2002 年 5 月 9 日、自己血由来プラスミンを 0.1 ml(0.2 IU) 注入した。本症例も、ストレプトキナーゼは用いずに、ウロキナーゼを用いてプラスミノノーゲンの活性化を行った。本症例の目的もプラスミン注入のみで治癒せしめることであったが、糖尿病を基礎疾患として持ち、また、本症では、硝子体腔中にあると思われる様々な起炎物質と、プラスミンとの反応による予期せぬ反応も危惧されたた



め、注入後 15 分待ち、直ちに水晶体超音波乳化吸引術、眼内レンズ挿入術を施行した。すなわち、プラスミン注入後約 30 分経って硝子体切除術を開始した。ポート作製時に液化した硝子体が流出した。術中硝子体腔中に炎症所見は全くなかった。硝子体は水晶体後嚢とも十分に解離していた。水晶体後嚢近くから硝子体を切除していき、眼球後方で軽く吸引をかけると、硝子体はすでに解離しており、後部硝子体膜は波打って浮遊するように前方に移動しはじめ、後部硝子体剝離が完成されていたことが確認できた。硝子体剝離は、症例 1 と同様周辺部まで完成されていた。すなわち、単純硝子体切除のみで手術が終了した。術翌日にはすでに OCT 像で黄斑形態が回復しており、視力は 1.0 に回復した(図 13)。術後の ERG でも術前と変化がなかった。プラスミンを注入したことにより容易に硝子体手術を終了できた症例であった。術後の蛍光眼底検査で黄斑部の浮腫は消失した。現在注入から 2 か月が経っており、黄斑症の悪化はみられていない。

## V 考 按

酵素を用いた硝子体手術の発想と試みは以前からなされ、動物実験に加えて様々な酵素の臨床応用の可能性も推定されてきた<sup>9)~11)</sup>。目的は硝子体を液化させ、例えば硝子体出血の吸収を促進せしめたり<sup>12)~15)</sup>、また、コラーゲンを消化せしめて増殖膜の摘出をより容易にするといったことである<sup>16)17)</sup>。いずれにしても、臨床にはプロテアーゼを安全な型で、かつ効果的な量を眼内に注入するためには相当の注意を要する。すなわち、活性、毒性、細菌汚染などについては十分な検討を行わない限り、臨床には用いられない。現在のところ、これらをクリアして臨床に応用されているのは、ヒアルロニダーゼと自己血由来のプラスミンのみである。

プラスミンはヒト由来、各種動物由来のものが市販されているが、いずれも実験用であり、そのまま臨床に用いられるものではない。血液成分であることから、自己以外の血液由来のものを注入することにも倫理上の問題もある。自己血由来のプラスミンを作製し、臨床応用に供することはすでに行われていて<sup>5)~8)</sup>良好な成績を挙げているが、それらの報告に従って作製してみたところ、高度の変性が多くみられ、眼内で活性を呈するものではないと考えられた。そこで変性を抑制する物質を添加したところ、高純度の製剤が得られた。また、プラスミノーゲンのプラスミンへの活性化についてウロキナーゼを用いた。インフォームド・コンセントにおいて、細菌由来のストレプトキナーゼを用いることにも抵抗があり、ウロキナーゼは生体内物質であることから患者への説明時にも問題はなかった。眼内に注入する量は 0.1 ml が限界で、それ以上の注入は角膜浮腫を発現する。0.1 ml を注入するにもゆっくりと注入することも大切

であると思われる。前房穿刺とともに行えば一過性眼圧上昇を来すことはないが、前房穿刺による急激な眼圧下降は、眼球に対する刺激を最小限にするために避けた方がよいと思われる。すなわち、注入量を 0.1 ml と定めると活性は 0.2 IU となった。従来の報告で用いられた 0.4 IU の活性の程度は詳細な既述がないため不明であり、また、過剰のストレプトキナーゼを使用しているとも思われた。正しく作製し正確に活性を測定すれば 0.2 IU が最適活性値であると思われ、また、臨床的にも十分な効果を示した。すなわち、プラスミン作製に当たり蛋白質分解抑制剤を添加すること、プラスミノーゲンの活性にはウロキナーゼが安全であること、また、注入単位は 0.2 IU (0.1 ml) で十分であろうと考えられた。

動物実験については、従来の報告<sup>4)</sup>を追試し確認するために行った。検眼鏡的に硝子体混濁が軽度発症したが、これについては Verstraeten ら<sup>4)</sup>も観察しており、彼らはプラスミンにより消化された物質に対して多核白血球が遊走し、これがエラストラーゼを活性化し、IV型コラーゲンに作用するのであろうとしているが不明である。混濁の原因を異種間の問題として考えることもできる。彼らの実験も、ヒト由来のプラスミンを異種であるウサギ硝子体腔中に注入しており、これは我々の実験系と同様である。一方、同種すなわちブタ由来のプラスミンをブタ硝子体に注入しても、硝子体の混濁など炎症所見はみられなかったとの報告<sup>18)</sup>もある。我々の症例 1 と 2 においても、自己血である故、炎症や混濁が起きなかったとすると、やはり同種のプラスミンを注入することが根本的に重要なこととも考えられる。ERG について従来の報告<sup>4)</sup>で動物実験では振幅の減弱が観察され、徐々に回復するものの、これはプラスミンの浸透圧(930 mOsm)によるものと考えられている。しかし、我々の臨床例では 2 例とも振幅の減少などはみられなかった。したがって、ERG 上もまた同種のそれも自己血由来であることから、動物実験では異常所見が観察されたが、臨床的には問題ないと思われた。

注入したプラスミンの活性の経時的変化については、我々の実験系でも活性は 5 分でピークに達し、これは従来の報告<sup>4)</sup>とも同様で、臨床的にも 15 分で硝子体剝離が発症したことも考え合わせ、今後とも注入 15 分を実際の治療のマニュアルとして良いと考えられた。

自己血由来プラスミンの眼科臨床への応用はすべて、硝子体を網膜内境界膜から剝離せしめることにある。硝子体手術に先立って注入するときには、手術すなわち硝子体剝離をより安全、容易に行うために有用であると思われる。これまで本法は、外傷性黄斑円孔<sup>5)6)</sup>、特発性黄斑円孔<sup>8)</sup>および糖尿病網膜症<sup>9)</sup>に応用されてきた。我々も同じく特発性黄斑円孔と糖尿病網膜症に応用してみた。外傷性黄斑円孔については、Margherio ら<sup>5)</sup>は 14 歳以下の 4 眼に本法を応用し、全例において円孔の閉鎖



を得たとしている。外傷により黄斑に円孔が形成されることは珍しいが<sup>19)</sup>、もし円孔が形成された場合、多くは若年であるため、その治療特に硝子体手術時に難渋することは少なくない<sup>20)</sup>。それは、やはり硝子体と網膜との癒着の強さに他ならない。本症の治療には、これまで硝子体手術時に T 細胞ベータ成長因子(TGF- $\beta$ )-2 を用いた方法の報告<sup>21)</sup>があるが、現在では行われていない。Garcia ら<sup>22)</sup>は円孔を閉鎖せしめるために硝子体剥離の重要性を報告している。外傷性黄斑円孔は自然閉鎖する症例もあることから、治療の適応やタイミングに苦慮することがある<sup>20)</sup>。幼児であれば弱視の原因となることもあり、閉鎖傾向のない症例では、自己血由来プラスミンを用いた硝子体手術の治療は効果的であると思われた。

一方、特発性黄斑円孔については、Kelly ら<sup>23)</sup>と Wendel ら<sup>24)</sup>が硝子体手術が有効であると報告してから、これが治療の本流となっている。この手術治療の根本も後部硝子体剥離の作製であるが、同時に膨張性ガス注入や内境界膜の剥離が必要なこともある。我々は症例 1 すなわち本症に対し、まずプラスミン注入のみで治癒せしめることを試みた。注入翌日には硝子体が剥離したことが OCT で確認された。徐々に円孔は閉鎖に向かったが、2 週間後に未だ閉鎖せず、視力も不変であることから、より早期に閉鎖せしめるために膨張性ガスの注入を追加した。ガス注入から 2 週目で閉鎖傾向は強まったが、3 か月後も完全に閉鎖せず、視力は 0.4 と不変である。硝子体切除をせずに stage 2~3 の硝子体剥離のない症例は、プラスミンおよびガス注入のみで治癒せしめることが可能かもしれないと思われたが、本症例では硝子体手術を行うことになるかもしれない。プラスミンで後部硝子体剥離が作製されたとしても、注入したガスが硝子体ごと黄斑を圧迫していたことも考えられる。また、手術を引き続き行うにしても、より容易に手術を終了することが可能であると思われるが、硝子体剥離がプラスミンで完成されたにもかかわらず、何故円孔が閉鎖しないのであろうか。この症例に追加手術をする際に、単純切除のみで閉鎖するのか、それとも内境界膜を剥離除去しなければいけないのか不明である。症例を集め、さらに検討すべきと思われた。

糖尿病網膜症に対して、Williams ら<sup>7)</sup>は 7 例について自己血由来プラスミンの注入を硝子体手術直前に行い、硝子体剥離完成と網膜浮腫の軽減と視力の向上をみたとしている。いずれも硝子体手術が容易に安全に行えたとしている。近年、糖尿病黄斑症に対して、後極に形成された肥厚した膜を除去することで病態の改善が得られるとされ<sup>25)</sup>、また、後部硝子体剥離を作製すること<sup>26)</sup>、また、それに内境界膜をも除去することでさらに成績は向上するとされてきている<sup>27)</sup>。我々の症例は、黄斑浮腫は 350  $\mu$ m と網膜厚が増加し視力は 0.4 であった。ただし、糖尿病の治療は良好で、蛍光眼底検査でもびまん性

浮腫は軽度で類嚢胞様変性には至っていなかった。プラスミン注入翌日には黄斑の形態が完全に回復し、視力が 1.0 に回復した。ガス注入やレーザーの術中追加も行っていない。糖尿病黄斑症の原因は、硝子体が癒着していることのみでは説明ができないが、本症例はプラスミンが効果的に作用し、術中、硝子体剥離が完成されており、単純切除で終わることができた。今後本症に対しても症例を蓄積し、適応を考慮していく必要があるが、黄斑に浮腫が発症した時点で、ともかくも自己血由来プラスミンを注入し、硝子体剥離を作製しておくことが大きな適応の一つとなると思われる。

最後に、現時点で自己血由来プラスミンを自分達の手で作製することは容易ではないが、精製法の改善により高純度、高活性の製剤を作ることが可能になった。今回の臨床応用はパイロットスタディではあるが、硝子体剥離を作製するには大変有効な酵素であり、各種疾患に應用でき得るものと思われる。患者にとっても我々医療側にとってもメリットは多い。自己血を使用する点からは、我が国ではプラスミノゲン分子異常症が多く<sup>28)</sup>、酵素活性の低い症例があることも危惧される。プラスミノゲンを簡単に作製できるキットの開発およびコンビナントの作製も含め、製品としての開発が強く望まれる。

最後に、現時点ではプラスミン注入は、後部硝子体剥離作製が難しい症例に対して補助的に用いることに最大の利点があると思われる。

## 文 献

- 1) Hutton WL, Fuller DG, Snyder WB, Fellman RL, Swanson WH: Visual field defects after macular hole surgery. A new finding. *Ophthalmology* 103: 2152-2158, 1996.
- 2) Sebag J: Age-related differences in the human vitreoretinal interface. *Arch Ophthalmol* 109: 966-971, 1991.
- 3) Kohno T, Sorgente N, Ishibashi T, Goodnight R, Ryan SJ: Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 506-514, 1987.
- 4) Verstraeten TC, Chapman C, Hartzler M, Winkler BS, Trese MT, Williams GA: Pharmacologic induction of posterior vitreous detachment in the rabbit. *Arch Ophthalmol* 111: 849-854, 1993.
- 5) Margherio AR, Margherio RR, Hartzler M, Trese MT, Williams GA, Ferrone PJ: Plasmin enzyme-assisted vitrectomy in traumatic pediatric macular holes. *Ophthalmology* 105: 1617-1620, 1998.
- 6) Chow DR, Williams GA, Trese MT, Margherio RR, Ruby AJ, Ferrone PJ: Successful closure of traumatic macular holes. *Retina* 19: 405-409, 1999.

- 7) **Williams JG, Trese MT, Williams GA, Hartzler MK** : Autologous plasmin enzyme in the surgical management of diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 108 : 1902—1906, 2001.
- 8) **Trese MT, Williams GA, Hartzler MK** : A new approach to stage 3 macular holes. *Ophthalmology* 107 : 1607—1611, 2000.
- 9) **Sebag J** : Pharmacological vitreolysis. *Retina* 18 : 1—3, 1998.
- 10) **Tanaka M, Qui H** : Pharmacological vitrectomy. *Semin Ophthalmol* 15 : 51—61, 2000.
- 11) **Bhistkul RB** : Anticipation for enzymatic vitreolysis. *Br J Ophthalmol* 85 : 1—3, 2001.
- 12) **Tanaka M, Hadeyama T, Takahashi K** : Studies on enzyme assisted vitrectomy with hyaluronidase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : (s)656, 1995.
- 13) **Harooni M, McMillan, Refojo M** : Efficacy and safety of enzymatic posterior vitreous detachment by intravitreal injection of hyaluronidase. *Retina* 18 : 16—22, 1998.
- 14) 羽出山勉, 高橋康造, 中川正昭, 小林康彦, 田中稔 : ヒアルロニダーゼを用いた硝子体手術. *臨眼* 47 : 804—805, 1993.
- 15) **Hikich T, Kado M, Yoshida A** : Intravitreal injection of hyaluronidase cannot induce posterior vitreous detachment in the rabbit. *Retina* 20 : 195—198, 2000.
- 16) **Moorhead LC, Redtke N** : Enzyme-assisted vitrectomy with bacterial collagenase. Pilot human studies. *Retina* 5 : 98—100, 1985.
- 17) 高橋康造, 中川正昭, 二宮久子, 小林康彦, 田中稔 : コラゲナーゼを用いた硝子体手術の検討. *臨眼* 47 : 802—803, 1993.
- 18) **Gandorfer A, Putz E, Welge-Lussen U, Gruterich M, Ulbig M, Kampik A** : Ultrastructure of the vitreoretinal interface following plasmin assisted vitrectomy. *Br J Ophthalmol* 85 : 6—10, 2001.
- 19) **Aaberg TM, Blair CJ, Gass DJD** : Macular holes. *Am J Ophthalmol* 69 : 555—562, 1970.
- 20) 佐久間俊郎, 田中 稔, 葉田野宜子, 清川正敏, 北川 均, 篠原 泉, 他 : 外傷性黄斑円孔の治療方針について. *眼科手術* 15 : 249—255, 2002.
- 21) **Rubin JS, Glaser BM, Thompson JT, Sjaarda RN, Pappas SS, Murphy RP** : Vitrectomy, fluid-gas exchange and transforming growth factor- $\beta$ -2 for the treatment of traumatic macular holes. *Ophthalmology* 102 : 1840—1845, 1995.
- 22) **Garcia-Arumi J, Corcostegui B, Cavero L, Sararols L** : The role of vitreoretinal surgery in the treatment of posttraumatic macular hole. *Retina* 17 : 372—377, 1997.
- 23) **Kelly NE, Wendel RT** : Vitreous surgery for idiopathic macular holes. Results of a pilot study. *Arch Ophthalmol* 109 : 654—659, 1991.
- 24) **Wendel RT, Patel AC, Kelly NE, Salzano TC, Wells JW, Novack GD** : Vitreous surgery for macular holes. *Ophthalmology* 100 : 1671—1676, 1993.
- 25) **Harbour JW, Smiddy WE, Flynn HW Jr, Rubsamens PE** : Vitrectomy for diabetic macular edema associated with a thickened and taut posterior hyaloid membrane. *Am J Ophthalmol* 121 : 405—413, 1996.
- 26) **Tachi N, Ogino N** : Vitrectomy for diffuse macular edema in cases of diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 122 : 258—260, 1996.
- 27) **Gandorfer A, Messmer EM, Ulbig MW, Kampik A** : Resolution of diabetic macular edema after surgical removal of the posterior hyaloid and the inner limiting membrane. *Retina* 20 : 126—133, 2000.
- 28) **Ooe A, Kida M, Yamazaki T, Sang-Chul P, Hamaguchi H, Ichinose A, et al** : Common Mutation(Ala 601-Thr) of Plasminogen Detected in Three Asian Populations by an Amplification Refractory Mutation System(ARMS) and Rapid Automated Capillary Electrophoresis(RACE). *Thromb Haemost* 82(4) : 1342—1346, 1999.