

実験的硝子体切除眼への液体フルオロカーボンの影響 (図14)

寺内 博夫¹⁾・沖波 聡²⁾・湖崎 淳¹⁾ (1) 天理よろづ相談所病院眼科2) 京都大学医学部眼科学教室
谷原 秀信¹⁾・永田 誠・瀬川 義朗³⁾ (3) 天理よろづ相談所病院臨床病理

要 約

白色家兎14羽28眼を硝子体切除のみを施行した群, 切除後液体フルオロカーボン(Perfluorotributylamine)を1時間のみ眼内に留置して抜去した群, 注入したまま留置した群に分け, 術後4週間網膜に対する毒性を電気生理学および組織学的に観察した。1時間後に抜去した群では各週とも電気生理学および組織学的にコントロールと大きな差はなかった。注入のまま留置した群では, ERG各波は時間の経過と共に振幅が低下する傾向があり, 術後2週で著明に低下した例が8例中2例あった。術後4週ではさらに2例, 計4例で振幅が著明に低下した。また組織学的には, 術後2週で主に視細胞外節に変性が認められたが, 術後4週では視細胞内節や網膜内層にも変性が及んでいた。これらのことから今回使用した液体フルオロカーボンは, 比重の大きいことを利用し術中に器具として使用できるが, 手術終了時には必ず抜去しなければならないと思われた。(日眼会誌 93: 294-301, 1989)

キーワード: フロリナート®, 硝子体手術, 網膜毒性, 視細胞外節, 硝子体手術器具

Experimental Study on the Effects of a Replacement of the Vitreous Body with Perfluorotributylamine on the Rabbit Eye

Hiroo Terauchi, Satoshi Okinami, Zyun Kozaki,

Hidenobu Tanihara, Makoto Nagata, Yoshiaki Segawa,

Department of Ophthalmology, Tenri Hospital

Department of Ophthalmology, Kyoto University Faculty of Medicine

Department of Clinical Pathology, Tenri Hospital

Abstract

The effects of replacement of the vitreous body with perfluorotributylamine on albino rabbit eyes were studied. Twenty eight eyes were divided into three groups. In the first group (n=14), which was used as a control, only vitrectomy was performed. In the second group (n=6), the vitreous was temporarily substituted with perfluorotributylamine after the vitrectomy. One hour after the operation, the injected perfluorotributylamine was again replaced with a balanced salt solution (SM-A2). In the third group (n=8), the injected perfluorotributylamine was left in the eye until the time of enucleation. The eyes were evaluated both electrophysiologically and histopathologically, at predetermined time intervals ranging from one to four weeks after operation. All the eyes in the second group did not show any histopathological changes until four weeks after the operation. The ERGs obtained from these eyes exhibited dominant a- and b-waves similar to those of the control group at all intervals after operation. However, the eyes in the third group showed progressive

別刷請求先: 632 奈良県天理市三島町200 天理よろづ相談所病院眼科 寺内 博夫
(昭和63年11月14日受付, 平成元年1月23日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroo Terauchi, M.D. Department of Ophthalmology, Tenri Hospital
Tenri 632, Japan

(Received November 14, 1988 and accepted in revised form January 23, 1989)

deterioration with elapsed of time. At the two weeks after operation, b-wave amplitudes moderately decreased in two eyes. These eyes showed an initial slight degeneration in the outer segment layer. At four weeks after the operation, the a- and b-waves further decreased in amplitude with a significantly prolonged peak latency. The outer segments were severely damaged, and the histopathological changes extended to the inner segment layer as well as the RPE layer. From these findings, we concluded that perfluorotributylamine produces an irreversible toxic effects on the rabbit retina when it remaining in the vitreous cavity over one or two weeks, but temporary use during vitrectomy does not cause significant harmful effects. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93 : 294-301, 1989)

Key words : Perfluorotributylamine, Vitrectomy, Toxicity, Outer segment layer, Inner segment layer

I 緒 言

近年、硝子体手術の普及に伴い、従来では手術の対象とならなかった症例にも手術が試みられるようになり、これらの難治例に対する手術手技や手術器具も色々と工夫され改良されつつある。その一つに、代用硝子体や硝子体腔への充填物がある。現在はシリコンオイルが充填物として広く用いられているが、網膜のタンポナーデ効果を期待する上で、その第一の欠点は比重が小さいことにある。この点で、液体フルオロカーボン[®]は、完全にフッ素化された不活性な液体で、比重1.86 (25°C) とシリコンオイルより有利である。しかし、動物実験ではその組織毒性は数日間の硝子体腔への注入留置で網膜に影響を及ぼすとの報告もある¹⁾。今回われわれは、人眼への使用に先立ちその組織毒性について動物実験を行い、電気生理学および組織学的に網膜への影響を検討した。

II 実験方法

正常成熟白色家兎(体重2.0~2.5kg)14羽を用いた。液体フルオロカーボンとして Perfluorotributylamine (フロリナート[®]) を使用した(図1)。

Sodium-5-ethyl-5-barbiturate(ソムノベンチル[®]) 静脈麻酔下に、Ocutome II または System VI の硝子体手術装置を用いて硝子体手術を行った。術式は左右眼とも外眼角方向の角膜輪部より1mm後方に infusion tube を固定し(右眼の場合9時方向、左眼の場合は3時方向)、まず6時の方向から約10分間硝子体を切除し、次に対側の12時の方向から同様に10分間切除した。家兎水晶体は眼球全体に比して大きく、硝子体内に突出しているため、一カ所からの切除では不十分なため対側からの切除も追加した(図2)。なお、術中硝子体

C4F9	
N	
/ \	
F9C4	C4F9
Molecular weight 671	
Boiling point 177°C	
Freezing point -50°C	
Density at 25°C 1.86g/ml	
Surface tension at 25°C 16.1dynes/cm	
Refractive index at 25°C 1.29	

図1 Perfluorotributylamine (フロリナート[®]) の概要。

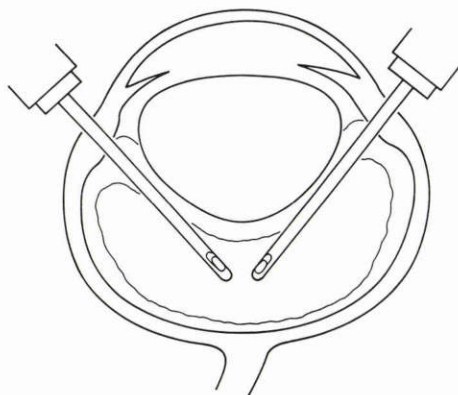


図2 硝子体切除器具の挿入部位(硝子体切除は後方に突出した水晶体を避け6時と12時方向から行った)

腔に少量の10%フルオレスセインを注入して黄染した硝子体を切除の目標とした。眼内灌流液にはオベガード®(SM-A2)を使用し、灌流量は50~100mlであった。家兎眼では硝子体手術用コンタクトレンズを使用すれば、同軸照明のみで眼底が明瞭に観察できるため眼内照明は使用していない。

一眼には硝子体切除のみを施行し、他眼には硝子体切除後にフロリナート®を注入した。フロリナート®は、12時方向の強膜切開から26ゲージ針で直視下で注入した。灌流液を止めた状態で注入すると強膜創からまず眼内の灌流液があふれ出し、フロリナート®が眼内に充満すると小さなパブルが強膜創から出てくる。この方法で約1.5~2.0mlのフロリナート®を注入することができた。またフロリナート®の抜去は、Ocutome II または System VI のチャールズニードルを使用し直視下で抜去した。フロリナート®は、眼内ではその表面張力により一塊となるため、ニードルの先を眼球中央に固定し灌流液を注入しながら吸引すると、後極部に小さな塊となって残りこれをさらに吸引するとはほぼ完全に抜去することができた。6例ではフロリナート®を注入してから1時間後に抜去したが、8例はフロリナート®を注入したままとした。このように硝子体切除のみを施行した群(V群)、硝子体切除後1時間フロリナート®を注入し抜去した群(R群)、硝子体切除後フロリナート®を注入留置した群(I群)の3群に分け、電気生理学および組織学的に検討した。

なお、術中に白内障、網膜裂孔、網膜剝離などを生じた例や、術後感染を起こした例は対象から全て除外した。

ERG検査の方法としては、増幅器にはメデレック社製のMS6筋電計を用い時定数0.2secで使用した。電極には京都コンタクト社製ウサギERG用白金電極を使用し、光刺激には日本光電工業社製ERG光刺激装置を用い、暗順応3分後角膜面から10cmの距離より20Joulesのxenon光で刺激した。検査は、術前、術後1週から1週毎に術後4週までの計5回検査し、ERG成分の計測には、a波振幅は基線よりa波の頂点までb波振幅はa波の頂点からb波の頂点までをそれぞれ測定した(図3)。

光頭および電頭標本を作製するためには、ソムノベンチル®静脈麻酔後、眼球を摘出し直ちに2.5%グルタルアルデヒド-カコジレート緩衝液(pH 7.4)で約2時間固定した。固定中、眼球を赤道部で前後に半切

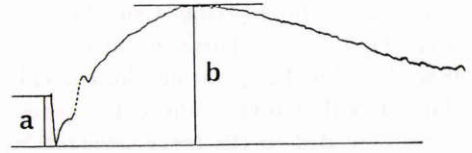


図3 ERG各波振幅の測定法

しさらに視神経乳頭の下方で赤道部との中間部の網膜を脈絡膜を含むように細切した。これらの組織片を2%四酸化オスミウム-カコジレート緩衝液(pH 7.4)で後固定し、エタノール系列で脱水、エポック812樹脂に包埋した。光頭には1 μ 厚の切片を作製し1%トルイジンブルーで染色を行った後に鏡検した。電頭には超薄切片に酢酸ウラニール・クエン酸鉛で二重染色し、日立H-500型透過電子顕微鏡にて観察した。

III 結果

1. ERG所見

a波の平均頂点潜時は各群とも著明に変化した例はなかった(図4)。b波平均頂点潜時はa波同様著明に変化しなかったが、フロリナート®を注入後留置した群でやや短縮する傾向があった(図5)。これはb波の波形が平坦になり頂点が確認しにくくなった例があったためと思われる。

a波の平均振幅は硝子体切除群(V群)、フロリナー

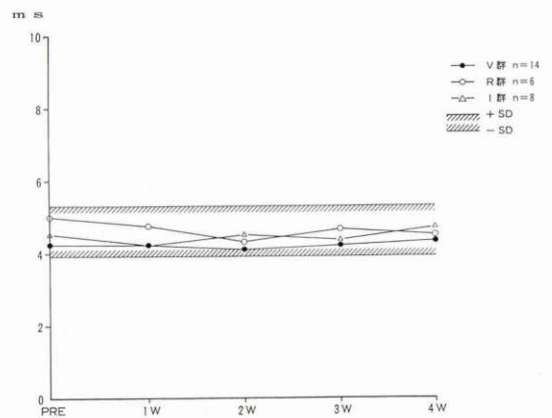


図4 各群のa波平均頂点潜時

V群は硝子体切除のみを施行した群、R群は硝子体切除後フロリナート®を1時間注入し抜去した群、I群は硝子体切除後フロリナート®を注入し留置した群を示している。値は各群の平均値で上下の直線で囲まれた範囲は術前の平均値 ± 1 SDを示している。(図5~図7も同様)

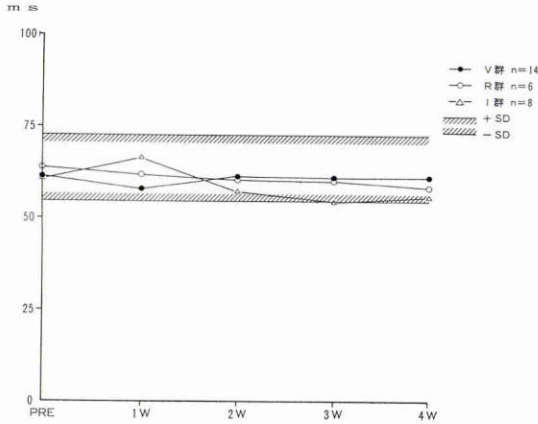


図5 各群のb波平均頂点潜時

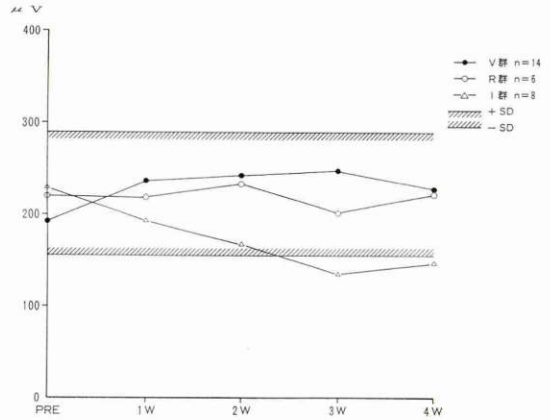


図7 各群のb波平均振幅

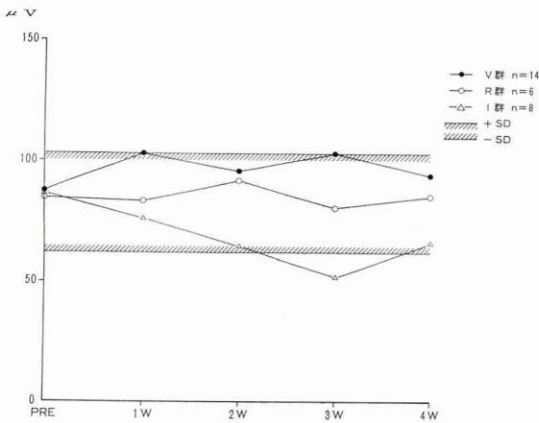


図6 各群のa波平均振幅

ト®注入後抜去群 (R群) では著明に低下した例はなかったが、フロリナート®留置群 (I群) では時間の経過と共に低下する傾向があり、なかには術後2週以降で急速に低下する例があった (図6)。b波の平均振幅はa波同様硝子体切除群 (V群)、フロリナート®抜去群 (R群) では著明な変化はなく、フロリナート®留置群 (I群) では時間の経過と共に低下し術後2週以降で急速に低下する例がみられた (図7)。

各群の術前と術後2週のERG波形を比較してみると、硝子体切除群とフロリナート®抜去群ではa, b波とも頂点潜時はほぼ一定で振幅が大きく低下した例はなかったが、フロリナート®抜去群でa, b波とも振幅がやや増大する例があった。この2群の差が手術手技によるものかフロリナート®によるものかは、今回の実験では症例数が少なく判定するまでには至らなかった (図8a, b)。フロリナート®留置群 (I群8例) で

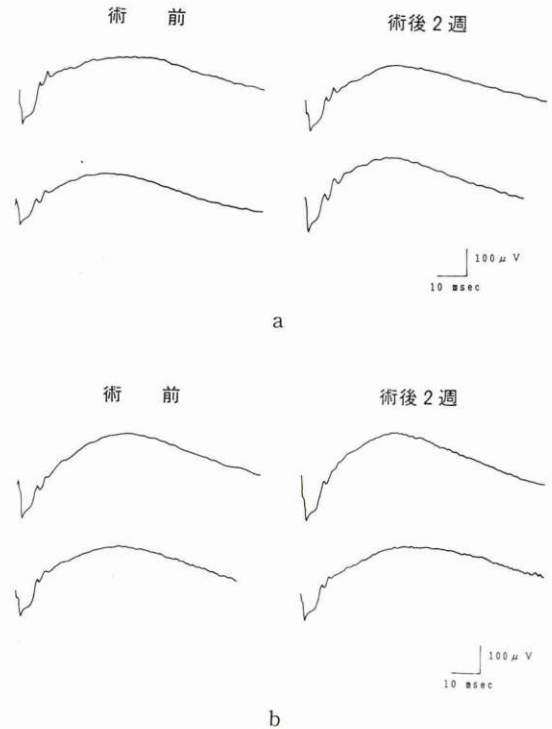


図8 術前と術後2週のERG波形の比較

8a: 硝子体切研のみの群 (上段—症例 No. 1, 下段—症例 No. 2), 8b: フロリナート®を1時間留置し抜去した群 (上段—症例 No. 1, 下段—症例 No. 2)

はa波, b波ともあまり変化しない6例と、振幅が大きく低下する2例に分けられた (図9)。このような著明な低下はV群やR群ではみられず、フロリナート®留置による変化と思われた。

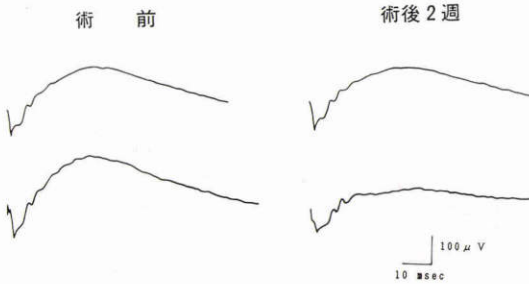


図9 術前と術後2週のERG波形の比較
フロリナート®を留置したままの群（上段—症例 No. 1, 下段—症例 No. 4）

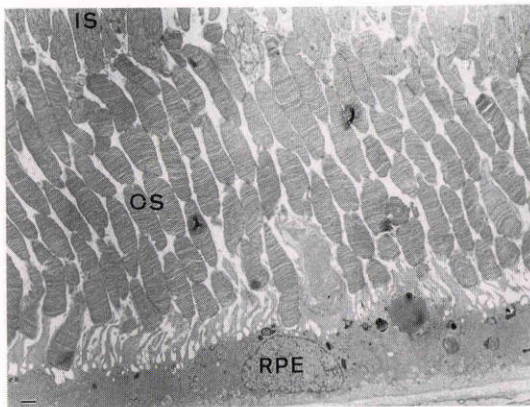


図10 硝子体切除のみを施行した家兎眼の術後2週の電顕写真（3,500倍）。網膜色素上皮の各小器官の形態や数に大きな変化はない。視細胞外節の一部にごく軽度の変性を認めるが配列に大きな乱れはない。視細胞内節のミトコンドリアには軽度の膨化が認められる。（RPE：網膜色素上皮，OS：視細胞外節，IS：視細胞内節）

2. 組織学的所見

ERGでは術後2週で波形に変化が現われたため、この時点で各群とも数羽ずつ眼球を摘出し組織学的に検索した。V群では、網膜色素上皮細胞の各小器官の形態や数に大きな変化は認められなかった。視細胞名節には一部で軽度の変性を認めたが配列に大きな乱れはなかった。内節にはミトコンドリアの軽度の膨化が認められた(図10)。R群では、網膜色素上皮細胞および視細胞はV群と同程度の変化に留まっていた(図11)。しかしI群では網膜色素上皮細胞の一部のミトコンドリアに膨化と空胞化が認められ、頂部では部位によって小胞体の空胞化がみられた。視細胞の外節は破壊され配列は乱れ、数も減少し丈の短縮がみられた。内節

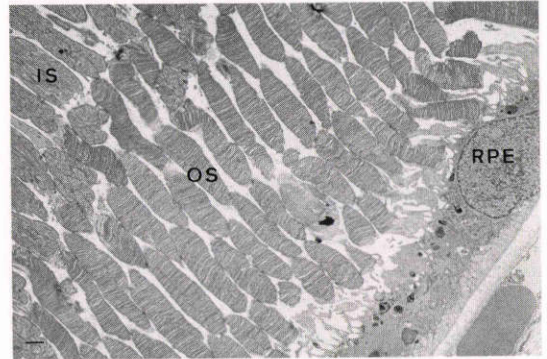


図11 硝子体切除後1時間のみフロリナート®を注入して抜去した家兎眼の術後2週の電顕写真（5,000倍）
網膜色素上皮の形態や数に大きな変化はない。視細胞外節はごく軽度の膨化を認めるが、配列や数に変化はない。視細胞内節のミトコンドリアには軽度の膨化が認められる。

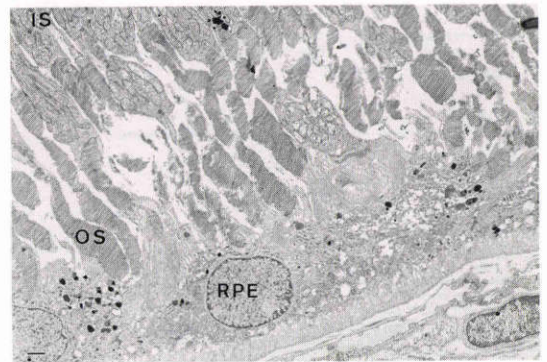
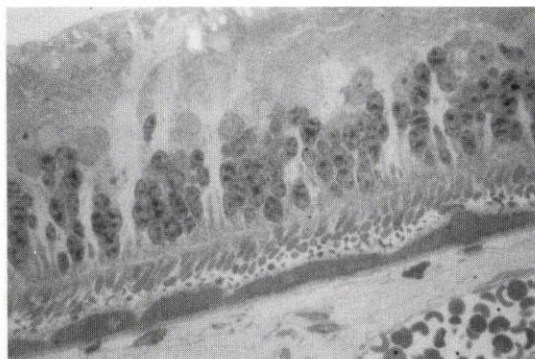


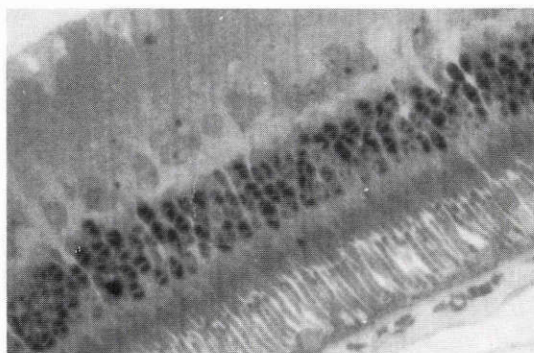
図12 硝子体切除後フロリナート®を注入し留置した家兎眼の術後2週の電顕写真（5,000倍）
網膜色素上皮のミトコンドリアには膨化と空胞化が認められ、頂部では部位によっては小胞体の空胞化がみられる。視細胞外節は破壊され配列は乱れ、数も減少し丈の短縮が認められる。視細胞内節の一部のミトコンドリアには膨化が認められる。

の変化にはV群と大きな差は認められなかった(図12)。

フロリナート®を留置したまま術後4週まで経過を観察したI群のうち、ERGのa波、b波の振幅が時間の経過とともに低下し、4週ではほぼ消失した家兎眼では、光顕および電顕的に、変化は視細胞外節だけに留まらず内節、網膜内層にも強い変性が起こっていた(図13a, b)。これに対しフロリナート®を1時間後に抜去した群の中では、4週後にもERGの振幅が低下した



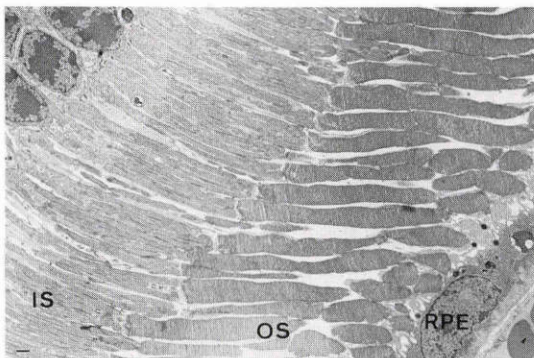
a



a



b



b

図 13a, b 硝子体切除後フロリナート®を注入し留置した家兎眼の術後 4 週の光顕および電顕写真 (a—150倍, b—3,500倍).
網膜色素上皮細胞の形態は比較的保たれているが、視細胞外節はほぼ消失し視細胞内節も数の減少が認められる。また網膜内層にも強い変性が認められる。

図 14a, b 硝子体切除後 1 時間のみフロリナート®を注入して抜去した家兎眼の術後 4 週の光顕および電顕写真 (a—150倍, b—3,500倍).
網膜色素上皮, 視細胞外節, 視細胞内節ともほぼ正常の所見である。

家兎眼はなく、組織学的に大きな異常はみられなかった (図 14a, b)。

IV 考 按

硝子体手術は混濁した硝子体を除去し視力回復をはかる試みとして考案されたが、時代と共に技術は進歩し適応も広がり、現在では混濁硝子体の切除だけではなく、網膜剝離や眼内増殖組織への治療手段ともなっている。

硝子体手術の眼組織への影響は主に機械的刺激によると考えられるが、それ以外に手術式、器具、時間、灌流液、眼圧、照明などさまざまな要因があげられる。組織学的には網膜外層の変化が主体とされ、何等かの

炎症性 mediator の関与が考えられている²⁾。また電気生理学的には ERG 各波の振幅が低下し、網膜細胞活動に必要なイオン勾配が灌流液によって障害されるとされている³⁾⁴⁾。しかしこれらの変化は可逆的で、術後数日から数週ではほぼ術前の状態に回復したと報告されている。本実験においても硝子体手術のみを施行した群の術後 2 週では、ERG 所見、組織学的所見とも正常と考えられる所見であった。これらのことは諸家の報告と一致するが、家兎を使用した実験で注意しなければいけない点は水晶体の大きさである。水晶体摘出を併用した場合硝子体切除は容易になるが眼組織への影響はかなり強いと考えられる。また水晶体を温存するため角膜輪部より 6mm 後方に冷凍凝固を行い、そこから硝子体切除器具を挿入する方法が考案されている⁵⁾。やはり冷凍凝固術の眼組織への影響は無視でき

ないと思われる。しかし今回われわれが用いた術式は two port system で、6時と12時の方向から交互に硝子体を切除すれば硝子体の大きな取り残しはなく、水晶体を温存して無理なく目的が達せられる。またフロリナート®は、強膜創から細い注射針で容易に注入でき、抜去は眼内で一塊となるため完全に抜去できた。しかし今回の実験中、眼球摘出時の眼底検査で直径数 mm のバブル状のフロリナート®の残存が認められた例があった。これは実験眼が全例有水晶体眼であったため、術中 Zinn 小帯などに付着し術後遊離したものと考えられた。しかしいずれも小さく、術後観察が比較的短期間であったため眼組織への影響は認められなかった。臨床への応用を考え治療を目的とした場合このことは非常に大きな問題で、有水晶体眼には使用しないかあるいは注入量を赤道部までとするか今後慎重に検討されるべきである。

現在までに網膜剝離に対する硝子体手術にはさまざまな方法が考案されている。空気灌流装置やシリコンオイル等を使用したり、なかには腹臥位で眼内に空気を注入する工夫もある。シリコンオイルをはじめとした硝子体腔充填物の組織毒性についてはすでに多くの報告がある^{6)~14)}。しかしこれらの多くはシリコンオイルに関するもので、フルオロカーボンに関する報告は非常に少ない。今回実験に使用したフルオロカーボンは Perfluorotributylamine で、この液体は完全にフッ素化されているため不活性で無色透明、比重1.86、屈折率1.29、水の溶解量7ppm である。シリコンオイルと比較すると比重が大きく硝子体術へ応用範囲が広いと思われたが、その網膜毒性についてはシリコンオイルより強いと思われる結果であった。

硝子体切除後フロリナート®を注入したままの群では、ERG の波形は時間の経過と共に振幅が低下した。そのなかでも2例は術後2週で、さらに別の2例は術後4週で a 波、b 波の振幅が著しく低下した。これら家兎眼の組織所見をみると、術後2週では主に網膜外層のみが変性していたが、術後4週では網膜内外層に変性が及んでいた。しかし術後4週の時点で ERG 各波に著変のない例もあり、これらが個体差によるものか他の要因によるものかは、今回の実験だけでは明確な解答が得られるには到らなかった。硝子体切除後1週間だけフロリナート®を眼内に留置し抜去した群では、術後各週とも電気生理学のおよび組織学的に硝子体切除のみを施行した群と大きな差はなかった。組織学的変化が網膜外層から始まることについては

Chang らの報告¹⁾と一致するが、そのメカニズムについては今後さらに検討が必要である。

これらのことから、家兎眼では完全な硝子体切除が不可能なため網膜とフロリナート®が直接接触はしていないものの、術中短時間の使用であれば網膜に不可逆的な変化を及ぼす可能性は少ないと思われた。臨床的には比重の大きいことを利用し、例えば網膜下液の排液に際したな医原性裂孔を後極部に作らずに、既存の周辺裂孔からの排液が可能である。また網膜前増殖膜の除去に際しては網膜を十分に伸展させ、残存した網膜前膜を明瞭な視界の下で除去することが可能である。しかしフロリナート®が網膜下に侵入した場合は、除去のため新たな医原性裂孔を作らねばならない。また眼内からの除去については、毛様体付近に残存することもあり水晶体の有無や注入量に注意する必要がある。網膜毒性を考えれば、他の方法で解決できない場合のみに使用し手術終了時には必ず抜去しなければならないと思われた。

稿を終わるにあたり、京都市大熊正人博士の御助言と梶間清隆、吉田四男美、山崎 恵氏をはじめ医学研究所、臨床病理部、薬剤部の諸氏、ならびにフロリナート®を提供していただいた大塚製薬、硝子体手術器具を貸与していただいた高田クーパービジョン社の御協力に深謝致します。

文 献

- 1) Chang S, Zimmerman NJ, et al: Experimental vitreous replacement with perfluorotributylamine. *Am J Ophthalmol* 103: 29-37, 1987.
- 2) 島田宏之: 硝子体手術に関する基礎的研究. *眼紀* 33: 878-890, 1982.
- 3) 小森樹夫, 魚谷 純他: 硝子体手術の実験的研究. *眼紀* 34: 2597-2602, 1983.
- 4) Moorhead LC, Redburn DA, et al: The effects of intravitreal irrigation during vitrectomy on the electroretinogram. *Am J Ophthalmol* 88: 239-245, 1979.
- 5) 本田孔士: 硝子体置換, 硝子体外科の基礎としての電気生理学的研究の重要性. 硝子体環境変化の網膜機能に及ぼす影響について. *眼科* 20: 541-550, 1978.
- 6) Abrams GW, Topping T, Machemer R: An improved method for practice vitrectomy. *Arch Ophthalmol* 96: 521-528, 1978.
- 7) Gonrers M, Hornung JP, et al: The effect of liquid silicone on the rabbit retina histologic and ultrastructural study. *Arch Ophthalmol* 104: 1057, 1986.
- 8) Lee PF, Donovan RH, et al: Intravitreal injection of silicone: I clinical picture and

- histology. *Ann Ophthalmol* 1: 15—25, 1969.
- 9) **Mukai N, Lee PF**, et al: Intravitreal injection of silicone an experimental study: II. Histochemistry and electron microscopy. *Ann Ophthalmol* 4: 273—278, 1972.
 - 10) **Ni C, Wang W-J**, et al: Intravitreal silicone injection. Histopathologic findings in a human eye after 12 years. *Arch Ophthalmol* 101: 1399—1401, 1983.
 - 11) **Laroche L, Parlakis C**, et al: Ocular findings following intravitreal silicone injection. *Arch Ophthalmol* 101: 1422—1425, 1983.
 - 12) **Miyamoto K, Refojo MF**, et al: Perfluoroether liquid as a longterm vitreous substitute. *Retina* 4: 264—268, 1984.
 - 13) **Miyamoto K, Refojo MF**, et al: Fluorinated oils as experimental vitreous substitute. *Arch Ophthalmol* 104: 1053—1056, 1986.
 - 14) **Haidt SJ, Clark LC**, et al: Liquid perfluorocarbon replacement of the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22: 233, 1982.
-