

前房内注入によるヒアルロン酸ナトリウム(SL-1010)の 安全性に関する研究

澤 充¹⁾, 村尾 元成²⁾, 柳 雅史³⁾, 白鳥 耕也³⁾, 森田 晴夫⁴⁾

¹⁾東京大学医学部附属病院角膜移植部, ²⁾東京大学医学部眼科学教室,

³⁾資生堂安全性・分析センター, ⁴⁾前臨床医学研究所

要 約

発酵法により *Streptococcus zooepidemicus* を用い生産された1%ヒアルロン酸ナトリウム(平均分子量181万)の安全性についてサル眼を用いて検討した。対象のカニクイザルの1眼の前房水を150 μ l採取しつつ同量の被験薬と置換した。対照はその他眼に被験薬の溶媒である等張化リン酸緩衝液(pH 7.4)を同様に注入した。細隙顕微鏡による前眼部所見, 角膜厚, 眼圧, 角膜内皮像を処置前, 処置後7日間経時的に検討を行い, 7日目に組織学的検討を行った。処置後9時間において被験薬注入眼の眼圧に有意の上昇が認められた以外, 細隙顕微鏡所見, 角膜厚, 角膜内皮細胞所見, 光顕, 透過および走査電顕所見について両群間に有意の変化を認めなかった。被験薬は生物学的に安全な薬剤であるとの結論が得られた。(日眼会誌 97: 448-454, 1993)

キーワード: 発酵法, ヒアルロン酸ナトリウム, サル, 前房水置換, 眼毒性

Study on Safety of Sodium Hyaluronate (SL-1010) by Injection in the Anterior Chamber

Mitsuru Sawa¹⁾, Motonari Murao²⁾, Masashi Yanagi³⁾

Kohya Shiratori³⁾ and Haruo Morita⁴⁾

¹⁾Section of Corneal Transplantation, University Hospital, University of Tokyo School of Medicine

²⁾Department of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine

³⁾Shiseido Safety & Analytical Research Center

⁴⁾Preclinical Research Laboratories

Abstract

We investigated effects of a newly developed sodium hyaluronate (SL-1010) on the anterior segment of the eye. The tested sodium hyaluronate was biosynthesized using *Streptococcus zooepidemicus*. Under an operating microscope, we replaced the aqueous humor of *Macaca fascicularis* ($n=3$) with 150 μ l of 1% sodium hyaluronate solution without loss of the anterior chamber. The opposite eye was treated as a control and its aqueous was replaced with the same volume of the vehicle, isotonic phosphate buffer solution. We performed follow-up clinical examination with slit-lamp microscopy, pachymetry, pneumotonometer, and specular microscopy. On the 7th day, we performed histological study by light microscopy, transmission and scanning electron microscopy. Although the

別刷請求先: 173 板橋区大谷口上町 30-1 日本大学医学部眼科学教室 澤 充
(平成4年5月27日受付, 平成4年10月15日改訂受理)

Reprint requests to: Mitsuru Sawa, M.D. Department Ophthalmology, Nihon University School of Medicine,
30-1 Oyaguchi Kamimachi Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan

(Received May 27, 1992 and accepted in revised form October 15, 1992)

sodium hyaluronate group showed a significant increase of intraocular pressure at 9 hours after the treatment over the control, there were no significant differences in clinical findings between the sodium hyaluronate and the control groups. Histological studies demonstrated nothing particular except for slight swelling of mitochondria of corneal endothelial cells in both groups. It was concluded that the newly developed sodium hyaluronate is a biologically inactive and safe biomaterial. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 448-454, 1993)

Key words: Biosynthesis, Sodium hyaluronate, Monkey, Aqueous humor replacement, Ocular toxicity

I 緒 言

ヒアルロン酸はMeyerら¹⁾によりウシの硝子体から初めて分離されたN-アセチル-D-グルコサミンとD-グルクロン酸が交互に β 結合した高分子ムコ多糖で、生体内に広く分布しており、硝子体、皮下組織、臍帯、鶏冠、滑膜組織など結合組織での細胞外マトリックスの重要な構成成分であることが知られている²⁾。

眼科領域においては、ヒアルロン酸が硝子体の主成分であることから、1960年頃³⁾より手術への適用が検討されてきた。当初、ヒアルロン酸ナトリウムは硝子体手術などへの適用が試みられ、硝子体に関する研究^{4,5)}が主に行われたが、その後、角膜内皮細胞など前眼部組織への影響⁶⁻¹⁰⁾についても詳細な検討がなされて、手術時の機械的損傷からの角膜内皮保護、前房保持を目的として、眼内レンズ挿入術、角膜移植術を中心とする前眼部手術¹¹⁻¹⁶⁾に臨床応用されている。

従来のヒアルロン酸ナトリウムが鶏冠から抽出・精製されたものであるのに対し、醗酵法による微生物起原のヒアルロン酸ナトリウム(SL-1010)の大量生産法が開発された¹⁷⁾。

今回我々は、SL-1010の眼科手術用製剤としての安全性を確認するために、カニクイザルを用い前房内注入による検討を行ったので報告する。

II 実験方法

被験物質は、等張化リン酸緩衝液に溶解した1%ヒアルロン酸ナトリウム(SL-1010; 平均分子量181万, pH 7.4, 浸透圧比1.06, Lot No. CO 1-004 M 1)であり、対照物質は溶媒である等張化リン酸緩衝液を用いた。

実験動物はカニクイザル(*Macaca fascicularis*, 体重3.4~4.1 kg) 3頭(雌1頭, 雄2頭)を用い、馴化期間および前房水置換後観察期間終了まで室温

24~27°C, 湿度41~76%, 換気回数12~14回/時および照明時間18時間の環境下で個別ケージにて飼育した。なお、馴化期間中には、一般状態観察、ツベルクリンテストおよび腸内細菌検査などを実施し、健康状態を管理した。飼料はビタミンC 30 mgを添加した固型飼料(CMK-1, 日本クレア, 東京)100 gを1日1回給与し、飲料水は自動給水にて水道水を自由に摂取させた。

実験は検査法の再現性を検討する目的としての前房水非置換予備実験と被験物質の安全性の検討を目的とした前房水置換実験を行った。前房水非置換予備実験では以下の前房水置換実験の際の前房内被験物質または対照物質投与を除く全身麻酔、検査を同様に実施した。即ち、全身麻酔は5%塩酸ケタミンと2%キシラジン塩酸塩を容量比10:1に混合し、これを1頭あたり約1 mlを筋肉内投与、局所麻酔には0.4%塩酸オキシブプロカインを点眼し、散瞳薬としてミドリンP®を用いた。前房水置換実験には27 G針付ツベルクリン注射筒を用い、上記麻酔下にて手術用顕微鏡下で注射針を2時および10時の2か所の輪部近傍角膜より角膜内皮、虹彩および水晶体に接触しないよう刺入し、前房水を0.15 ml徐々に吸引しつつ、前房が消失しないように左眼に同量の1% SL-1010溶液、右眼に溶媒のみを注入した。

前眼部の検査、角膜厚および眼圧の測定は、前房水置換前および置換後観察期間の開始日の0, 3, 9時間目および1, 2, 3, 5, 7日目に行った。前眼部の検査は細隙燈顕微鏡を用いて行い、角膜厚の測定は、前眼部の検査に引き続いて超音波パキメーター(Vil-lasenor® ultrasonic pachymeter, Cilco社, U.S.A., 音速1,550 m/sec)を用いて角膜中央部の厚さを5回測定し、その平均値を用いた。眼圧の測定は、角膜厚の測定と同時に空圧庄平式眼圧計(Alcon Applanation Pneumatograph®, 日本アルコン, 東京)を用

いて行った。角膜内皮細胞密度の測定は、前房水置換前観察の開始日、7日目および置換後7日目に広視野スベキュラーマイクロスコプ(甲南キラー, 東京)を用いて行った。角膜中央部の角膜内皮細胞を撮影倍率40倍で撮影し、最終倍率200倍の写真上に一辺2cmの正方形の区画を設け、5区画の角膜内皮細胞数を測定し1mm²あたりの角膜内皮細胞密度を算出した。なお、上記検査のうち角膜内皮細胞密度の測定日は全身および局所麻酔下で、それ以外の検査日は局所麻酔にて行った。

前房水置換後7日目の検査終了後、チオペンタールナトリウム静注全身麻酔下に頸動脈から放血屠殺して眼球を摘出し、眼球および周辺組織の肉眼的観察を行った。次いで眼球全体を3%グルタルアルデヒドで固定し、さらに、角膜輪部より固定液注入による灌流固定を行った。電顕用として角膜を分割し、透過電顕用は、2%四酸化オスミウムで再固定、脱水後、エポキシ樹脂(Poly/Bed 812®, ポリサイエンス社)に包埋し、酢酸ウラニル・クエン酸鉛の二重染色後、観察(日立 H-800 透過電子顕微鏡)した。また走査電顕用は2%四酸化オスミウムで再固定、脱水後、酢酸イソamilで置換し、乾燥(日立 HCP-AUTO 型臨界点乾燥装置)、金蒸着(EIKO IB-3 イオンコーター)後、角膜内皮を観察(日立 S-450 走査電子顕微鏡)した。残りの眼組織については光顕用として2.5%緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色後鏡検した。

統計学的解析は、角膜厚、眼圧および角膜内皮細胞密度についてはStudent-t検定またはCochran-Cox法(危険率1および5%)による検定を行った。また、前房水非置換予備実験と置換本実験との比較も行った。

III 結 果

1. 前房水非置換予備実験

予備実験期間においては角膜上皮細胞、前房所見には変化を認めなかった。表1は予備実験の角膜厚、眼圧および角膜内皮細胞密度を示したもので、いずれの項目においても左右差は認められなかった。また、角膜内皮細胞密度は検査前と終了時の間に有意差をみなかった。

2. 前房水置換実験

前房水置換眼全例において術中、術後を通じて前房消失はなかった。角膜は穿刺部に軽度の混濁が術後5

表1 前房水非置換予備実験の角膜厚、眼圧および角膜内皮細胞密度(3頭6眼)

角 膜 厚	0.387±0.034 mm (0.349~0.455 mm)
眼 圧	11.7±1.4 mmHg (9~15 mmHg)
角膜内皮細胞密度	3,077±418 cells/mm ² (検査開始時)
	3,163±359 cells/mm ² (検査終了時)

平均値±標準偏差(角膜厚および眼圧は8回の測定結果)

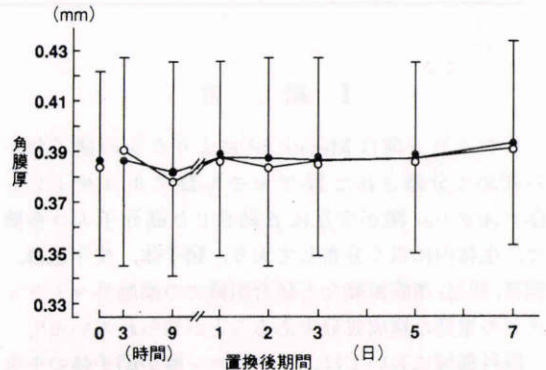


図1 SL-1010 および等張化リン酸緩衝液置換後の角膜中央部の厚さの経時的変化。
●: SL-1010, ○: 等張化リン酸緩衝液(バーは標準偏差)。

日程みられる例があったが、上皮障害、角膜浮腫、虹彩癒着、毛様充血、瞳孔変形および白内障は認めなかった。細隙燈顕微鏡にて置換後9時間目において、SL-1010群の1眼の前房内に細胞が数個/視野存在したが、1日目には1~2個に減少し、2日目には消失していた。フレアーおよびフィブリンはSL-1010群、対照群のいずれにも認められなかった。このほか、置換後9時間目でSL-1010群の2眼にごく軽度の散瞳が認められたが、1日目には回復していた。

前房水置換処置前の角膜厚はSL-1010群は0.386±0.036 mm、対照群は0.384±0.035 mmであり、置換後も含めて図1に示すように両群の角膜厚には有意差はなかった。

前房水置換実験における眼圧の経時変化を示したものが図2である。置換後3および9時間目では、SL-1010群の眼圧はそれぞれ19±6 mmHg、19±3 mmHgに上昇し、9時間目で対照群(10±1 mmHg)との間に有意差(p<0.01)があったが、この期間以外には置換術前の眼圧と有意差はなかった。

前房水置換実験終了時の角膜内皮細胞密度は、SL-

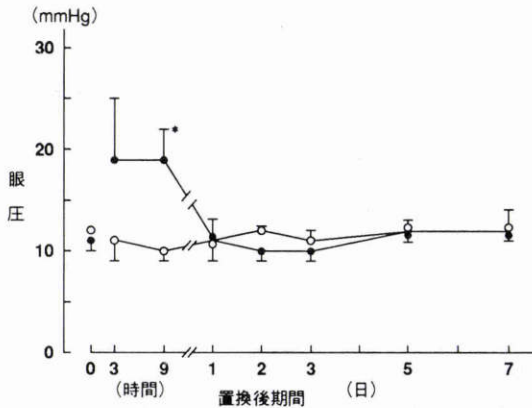


図 2 SL-1010 および等張化リン緩衝液置換後の眼圧の経時的変化。

●：SL-1010, ○：等張化リン緩衝液(バーは標準偏差, * $p < 0.01$).

1010 群は $3,127 \pm 428$ cells/mm², 対照群は $3,180 \pm 402$ cells/mm² で群間に有意差はみられず, また, 両群ともに表 1 に示す非置換予備実験における細胞密度と有意差はなかった。

眼球およびその周囲組織の肉眼観察, 光学顕微鏡観察では, SL-1010 群および対照群のいずれにも異常所見はなかった。透過電子顕微鏡による角膜内皮細胞の観察では, 図 3, 4 に示すごとく両群ともに細胞内のミトコンドリアの膨潤が認められたが, 細胞膜, 核, ミトコンドリア以外の細胞内小器官およびデスメ膜などには両群とも異常所見は観察されなかった。走査電子顕微鏡による観察では, 図 5, 6 に示すごとく両群ともに角膜内皮細胞はほぼ六角形を呈し, 規則正しく配列しており, また, 微絨毛および細胞間結合にも異常所見は観察されなかった。

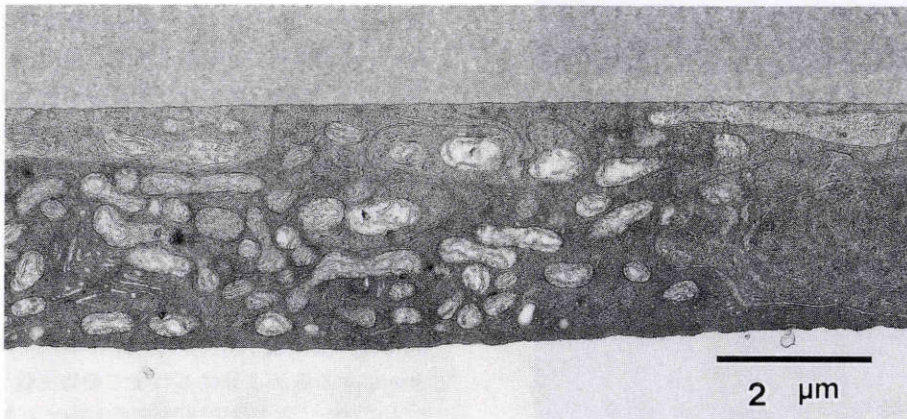


図 3 SL-1010 置換後 7 日目の角膜内皮細胞の透過電子顕微鏡写真。

個体番号：748 雌左眼, 倍率： $\times 10,000$

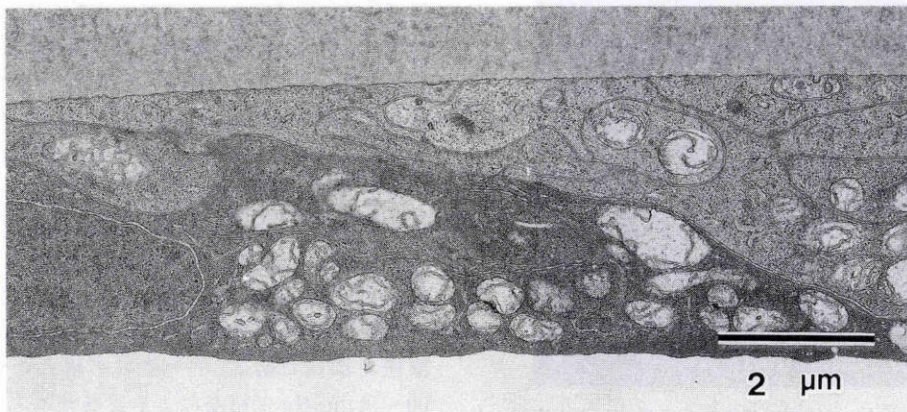


図 4 等張化リン緩衝液置換後 7 日目の角膜内皮細胞の透過電子顕微鏡写真。

個体番号：713 雄右眼, 倍率： $\times 10,000$

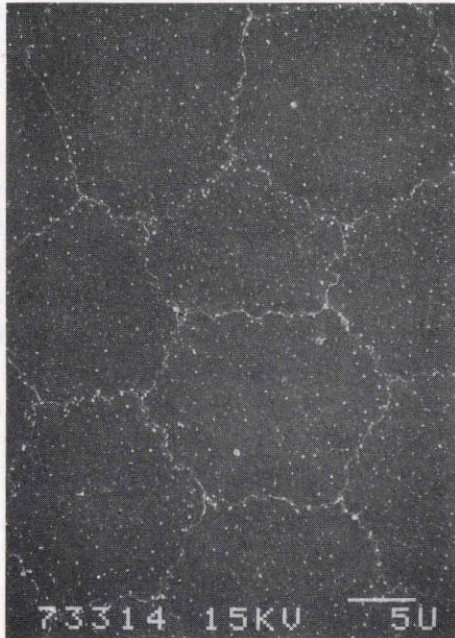


図5 SL-1010 置換後7日目の角膜内皮細胞の走査電子顕微鏡写真。

個体番号：733 雌左眼，倍率： $\times 1,700$

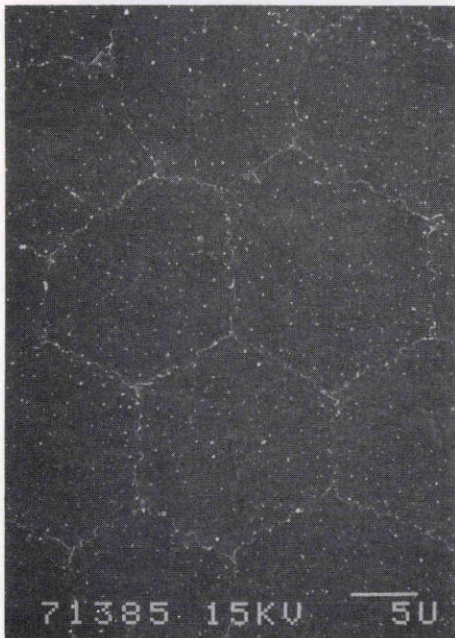


図6 等張化リン酸緩衝液置換後7日目の角膜内皮細胞の走査電子顕微鏡写真。

個体番号：713 雄右眼，倍率： $\times 1,700$

IV 考 按

前眼部の検査において、置換後9時間目にSL-1010群の1眼で前房内に数個の細胞が観察されたが、2日目には消失していた。谷島ら⁹⁾はカニクイザルを用いた分子量約82万のヒアルロン酸ナトリウム、宮田ら¹⁰⁾は分子量200万のヒアルロン酸ナトリウムを用いた前房水置換実験で前房内細胞を観察しており、前者では細胞の消失はヒアルロン酸ナトリウム群において対照群に比し遅れると報告し、後者では前房水置換後24時間目ではヒアルロン酸ナトリウム群の方が対照群よりも細胞の出現が多かったが、消失がみられたのは両群とも7日目であったと報告している。釣巻ら¹⁸⁾は異なるヒアルロン酸と術後炎症度の比較検討を行い、術後炎症度には製剤に含まれる夾雑蛋白質濃度が関与している可能性を報告している。本実験で、SL-1010群の所見は前述の報告と比べて、細胞の出現頻度および前房内からの消失までの時間は短く、SL-1010の前眼部組織に及ぼす影響、特に前眼部炎症惹起性は極めて軽微なものであると考えられた。また、置換後9時間目にSL-1010群の2眼にみられた散瞳の原因は不明であった。通常、眼内刺激に対しては縮瞳傾向を示すことから、少なくとも本剤処置により強い炎症が生じているとは考えられなかった。

前房水置換後3時間目に19 mmHg、9時間目に19 mmHgと眼圧上昇がみられたが、ヒアルロン酸ナトリウムによる眼圧上昇はこれまで動物実験²⁾⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾においても、また、臨床報告^{12)19)~23)}においても術後一過性にみられることが報告されている。サルを用いた本実験と同様な実験で、眼圧上昇24~67 mmHgとその程度には報告²⁾⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾で違いがみられるが、本実験での眼圧上昇はこれと比べても軽度であると考えられた。ヒアルロン酸ナトリウムで置換後の眼圧上昇はその粘度による房水流出率の低下に起因し、その程度はヒアルロン酸ナトリウムの粘度に依存するとの報告が多くみられる⁹⁾¹⁰⁾²⁴⁾が、岩田ら²⁵⁾はウサギを用いた実験から粘度には依存しないとしている。一方、Schubertら²⁶⁾はヨザルを用いて、房水の77%および48%を10,000, 41,000, 106,000, 236,000, 291,000, 930,000 cpsの各粘度のヒアルロン酸ナトリウムとそれぞれ置換して眼圧を調べた結果、77%置換の場合の最高眼圧は60~70 mmHgで粘度による影響はみられないが、48%置換の場合の最高眼圧は10,000 cpsを除いては30~45 mmHgで77%置換の場合よりも低く、眼圧上

昇には置換容量も影響すると述べている。この中で48%置換の場合には、10,000 cpsで最も高い眼圧を示し、41,000 cps以上では粘度が高くなるに従って置換後の最高眼圧は低下する傾向がみられたと報告している。この原因として、低粘度のヒアルロン酸ナトリウムの方が新たに産生された房水と混合しやすく、この結果混合液が速やかに房水流出路に達して眼圧上昇を引き起こすが、高粘度では房水との混合が円滑でなく、むしろ分離した状態にあり、房水流出路を通過するのはわずかにヒアルロン酸ナトリウムを含んだ房水が主であるためとしている。このようにヒアルロン酸ナトリウム置換による眼圧上昇の機序については粘度との関係でいくつかの考えがみられる。本実験に用いた1%SL-1010溶液の局方毛細管粘度計(粘度管定数106)による25℃での粘度は25,800 cps、コーンプレート型粘度計による25℃でのゼロ剪断速度における粘度は約50,000 cpsであり、測定条件により測定値にかなりの差がみられた。したがって、既報における粘度と眼圧の関係を比較検討する際には置換容量のほかに粘度の測定条件も合わせて検討し比較する必要があると考えられた。

透過電子顕微鏡による角膜内皮細胞の観察において、ミトコンドリアの膨潤がSL-1010群および対照群の両群に認められたが、両群の所見には差がみられず、また、走査電子顕微鏡による角膜内皮細胞の所見、角膜厚および角膜内皮細胞密度のいずれにおいても両群間に有意差がないことから、この内皮細胞像の変化はSL-1010に起因するものではないと考えられた。谷島ら⁹⁾および宮田ら¹⁰⁾の置換後7日目の透過電子顕微鏡による角膜内皮細胞の観察においてもヒアルロン酸ナトリウム群と対照群の両群で角膜内皮細胞にミトコンドリアの膨潤を認め、この変化は置換手術による機械的侵襲により生じたものと考えている。本実験におけるミトコンドリアの所見はこれらの報告とほぼ同一であることから、その要因には機械的侵襲または組織固定中の問題が考えられた。

以上より、本実験に用いた微生物起原のヒアルロン酸ナトリウムは、一過性の軽度の眼圧上昇がみられた以外はカニクイザルの眼に対して影響を与えず十分に高い安全性を有すると考えられた。

稿を終えるにあたり本実験に御教示、論文の御校閲をいただきました東大眼科増田寛次郎教授に深謝致します。

文 献

- 1) Meyer K, Palmer JW: The polysaccharide of

the vitreous humor. J Biol Chem 107: 629—634, 1934.

- 2) Balazs EA, Freeman MI, Kloti R, Meyer-Schwickerath G, Regnault F, Sweeney DB: Hyaluronic acid and replacement of vitreous and aqueous humor. Mod Probl Ophthalmol 10: 3—21, 1972.
- 3) Balazs EA: Physiology of the Vitreous Body. CV Mosby, St Louis, 29—48, 1960.
- 4) Denlinger JL, Balazs EA: Replacement of the liquid vitreous with sodium hyaluronate in monkeys. I. Short-term evaluation. Exp Eye Res 31: 81—89, 1980.
- 5) Denlinger JL, El-Mofty AAM, Balazs EA: Replacement of the liquid vitreous with sodium hyaluronate in monkeys. II. Long-term evaluation. Exp Eye Res 31: 101—117, 1980.
- 6) Graue EL, Polack FM, Balazs EA: The protective effect of Na-hyaluronate to corneal endothelium. Exp Eye Res 31: 119—127, 1980.
- 7) MacRae SM, Edelhauser HF, Hyndiuk RA, Burd EM, Schultz RO: The effects of sodium hyaluronate, chondroitin sulfate, and methylcellulose on the corneal endothelium and intraocular pressure. Am J Ophthalmol 95: 332—341, 1983.
- 8) 田村邦嘉, 池部 均, 小玉裕司, 中路 裕, 佐々本研二, 糸井素一: ヒアルロン酸ナトリウム前房内注入による角膜内皮細胞の変化. 眼紀 34: 927—929, 1983.
- 9) 谷島輝雄, 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: 153—162, 1985.
- 10) 宮田和典, 石田耕一, 村尾元成, 谷島輝雄: ヒアルロン酸ナトリウムの安全性に関する研究. 日眼会誌 92: 1705—1711, 1988.
- 11) Pape LG, Balazs EA: The use of sodium hyaluronate (Healon®) in human anterior segment surgery. Ophthalmology 87: 699—705, 1980.
- 12) Pape LG: Intracapsular and extracapsular technique of lens implantation with Healon®. Am intra-ocular Implant Soc J 6: 342—343, 1980.
- 13) Miller D, Stegmann R: Use of sodium hyaluronate in human IOL implantation. Ann Ophthalmol 13: 811—815, 1980.
- 14) Binkhorst CD: Inflammation and intraocular pressure after the use of Healon® in intraocular lens surgery. Am Intra-Ocular

- Implant Soc J 6: 340—341, 1980.
- 15) **Polack FM**: Sodium-hyaluronate (Healon®) in keratoplasty. Am Academy of Ophthalmology Meetings (November), 1—6, 1980.
 - 16) **Stegman R, Miller D**: Protective function of sodium hyaluronate in corneal transplantation. J Ocul Ther Surg 1: 28—31, 1981.
 - 17) 赤坂日出道, 瀬戸 進, 柳 光男, 福島正二, 光井 武夫: Streptococcus zooepidemicus によるヒアルロン酸の工業生産に関する研究. J Soc Cosmet Chem Jpn 22: 35—42, 1988.
 - 18) **Tsurimaki Y, Shimizu H**: Effects of residual sodium hyaluronate on postsurgical blood-
aqueous barrier. Jpn J Ophthalmol 35: 446—452, 1991.
 - 19) **Percival SPB**: Complications from use of sodium hyaluronate (Healonid) in anterior segment surgery. Br J Ophthalmol 66: 714—716, 1982.
 - 20) **Cherfan GM, Rich WJ, Wright G**: Raised intraocular pressure and other problems with sodium hyaluronate and cataract surgery. Trans Ophthal Soc UK 103: 277—279, 1983.
 - 21) **Passo MS, Ernest JT, Goldstick TK**: Hyaluronate increases intraocular pressure when used in cataract extraction. Br J Ophthalmol 69: 572—575, 1985.
 - 22) **Barron BA, Busin M, Page C, Bergsma DR, Kaufman HE**: Comparison of the effects of Viscoat and Healon on postoperative intraocular pressure. Am J Ophthalmol 100: 377—384, 1985.
 - 23) 増田寛次郎, 北澤克明, 金井 淳, 深道義尚: 各種前眼部手術におけるヒアルロン酸ナトリウムの臨床比較試験. 眼臨 79: 1396—1409, 1985.
 - 24) **Berson FG, Patterson MM, Epstein DL**: Obstruction of aqueous human eyes. Am J Ophthalmol 95: 668—672, 1983.
 - 25) **Iwata S, Miyauchi S, Takehana M**: Biochemical studies on the use of sodium hyaluronate in the anterior eye segment. I. Variation of protein and ascorbic acid concentration in rabbit aqueous humor. Curr Eye Res 3: 605—610, 1984.
 - 26) **Schubert HD, Denlinger JL, Balazs EA**: Exogenous Na-hyaluronate in the anterior chamber of the owl monkey and its effect on the intraocular pressure. Exp Eye Res 39: 137—152, 1984.