

In vitro モデルによる硝子体液化の研究

—第1報 血漿による影響—

松井 孝明, 林 英之, 大島 健司

福岡大学医学部眼科学教室

要 約

硝子体出血による硝子体液化変性の機序を、豚眼硝子体を用いた *in vitro* モデルにより検討した。豚眼硝子体を単離し、試料液の中で一定時間振盪させた。振盪前後にゲル硝子体の重量を測定し、減少した重量のパーセントを硝子体液化度とした。全血、血漿では、24時間振盪時の硝子体液化度はそれぞれ50.7%、48.8%であり、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 14.9%、血球成分21.1%、溶血液20.5%と比べ有意に高値を示した。血漿中では1時間後からPBSより有意に高く、24時間まで時間経過とともに高値を示した。一方、PBSでは1時間後から24

時間以内では変化なかった。血漿をPBSで希釈すると、濃度と比較した液化度の変化が確認された。以上から、本実験における硝子体液化は血漿成分との接触により促進されることが明らかとなり、眼内の出血や炎症で起こる硝子体液化変性には、血漿中の蛋白分解酵素系の関与が示唆された。(日眼会誌 99:149-153, 1995)

キーワード：硝子体、液化、血漿成分、*In vitro* モデル、蛋白分解酵素

A Study of Vitreous Liquefaction Using *In vitro* Models

—1. The Effect of Plasma on Vitreous Liquefaction—

Takaaki Matsui, Hideyuki Hayashi and Kenji Oshima

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Fukuoka

Abstract

To study the mechanism of vitreous liquefaction following vitreous hemorrhage, an *in vitro* study was done. We isolated whole vitreous gel of pig eyes, then weighed, incubated it with sample solution and shook it at room temperature. The ratio of weight loss after shaking to initial weight were calculated as vitreous liquefaction rate (VLR). There was no significant difference in VLR between samples incubated with whole blood (50.7%) and with plasma (48.8%), and it was significantly higher than control incubated with isotonic phosphate buffered physiological saline (PBS)(14.8%) after 24 hours shaking. There were no significant differences between con-

trol and samples incubated with blood cells (21.1%) and with hemoglobin (20.5%). The VLR of samples incubated with plasma gradually increased with time whereas controls incubated with PBS showed no changes until 24 hours. The VLR and concentration of plasma were highly correlated. These results indicated that contact of plasma with vitreous gel encourages liquefaction possibly by enzymatic digestive action with proteases. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:149-153, 1995)

Key words: Vitreous, Liquefaction, Plasma, Animal model, Protease

I 緒 言

硝子体は眼内容積の約2/3を占める透明ゲル状構造物で、多量の水を保持したヒアルロン酸とコラーゲン線維が網の目状の三次元構造を成していると考えられてい

る¹⁾²⁾。Duke-Elder³⁾によると、この硝子体のゲル状構造は、加齢や近視、眼内の炎症あるいは出血などにより崩壊し、液化硝子体を生じるとされている。臨床的にも外傷などで硝子体内に多量の血液が流入した際、硝子体の液化変性およびそれに引き続く後部硝子体剥離が認めら

別刷請求先：814-01 福岡県福岡市城南区七隈7-45-1 福岡大学医学部眼科学教室 松井 孝明

(平成5年10月25日受付、平成6年8月18日改訂受理)

Reprint requests to: Takaaki Matsui, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Fukuoka University, 7-45-1 Nanakuma, Jounan-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka-ken 814-01, Japan

(Received October 25, 1993 and accepted in revised form August 18, 1994)

れることも少なくない⁴⁾。動物実験においても、硝子体中に自家血液を注入すると硝子体の液化を生じる^{5)~8)}。しかし、この液化変性がどのような機序で起こっているか明確な結論は得られていない。動物眼に全血のかわりにヘモグロビン⁹⁾¹⁰⁾、鉄イオン¹¹⁾を注入しても同様の変化が生じるため、出血による液化変性の主な原因は、鉄イオンによるヒアルロン酸の脱重合であると考えられている。しかし、血液中に含まれる蛋白分解酵素などの影響についてはあまり着目されていない。また、動物眼への注入実験では眼内に試料を注入することにより硝子体周囲の眼組織の反応が引き起こされる可能性があり、生じた液化変性が単に硝子体と試料との反応によるものか、周囲組織の反応による二次的なものか明確に区別ができない。そこで、今回我々は生体側からの影響を除外するため *in vitro* のモデルを作製し、ゲル構造を保持している硝子体が血液成分との接触により液化するかどうかを検討したので報告する。

II 実験方法

今回の *in vitro* モデルは、岩田の方法¹²⁾に基づき改変したもので、硝子体の重量減少を硝子体液化の指標とした。実験には、生後半年、体重 110~120 kg で食肉用に屠殺されたブタから摘出した豚眼計 118 個を用いた。豚眼の角膜を輪部から除去し、輪部側から強膜、脈絡膜、網膜を切除し、次に毛様体および水晶体を、硝子体にできるだけ傷がつかないように鈍的に除去し、硝子体のみを一塊にして分離摘出した。摘出したゲル硝子体の重量を測定した後、手早くプラスチック製のメッシュかご（直径 2.7 cm、高さ 1 cm の円柱形で円形面に 1 mm×1 mm の 86 メッシュがあるもの）（図 1）に入れた。このメッシュかごに入れたゲル硝子体を各試料液 9 ml の入った瓶の中に完全に浸した（図 2）。その後、瓶を室温でロータリーシェーカーに置き、1 分間に 60 回転の速度で振盪させた。一定時間振盪させた後、硝子体を取り出し、再度ゲル構造を保った部分の重量を測定した。そして、次式のように減少した重量のパーセントを硝子体液化度とした。

$$\text{VLR (\%)} = \frac{\text{before VW (g)} - \text{after VW (g)}}{\text{before VW (g)}} \times 100$$

(VLR: 硝子体液化度, before VW: 摘出直後のゲル硝子体の重量, after VW: 振盪後のゲル硝子体の重量)

なお、細菌による腐敗分解を防ぐため、器具、試薬は滅菌し、かつ、すべての操作は無菌的条件下で行った。

実験 1: 血液の血漿成分、細胞成分およびヘモグロビンの影響の検討

試料液として、下記のように作製した全血、血漿、血球成分浮遊液、溶血液および対照として pH 7.3、浸透圧 315 mOsm のリン酸緩衝生理食水 (PBS) を用いた。反応時間を 24 時間として、各試料液での硝子体液化度の算

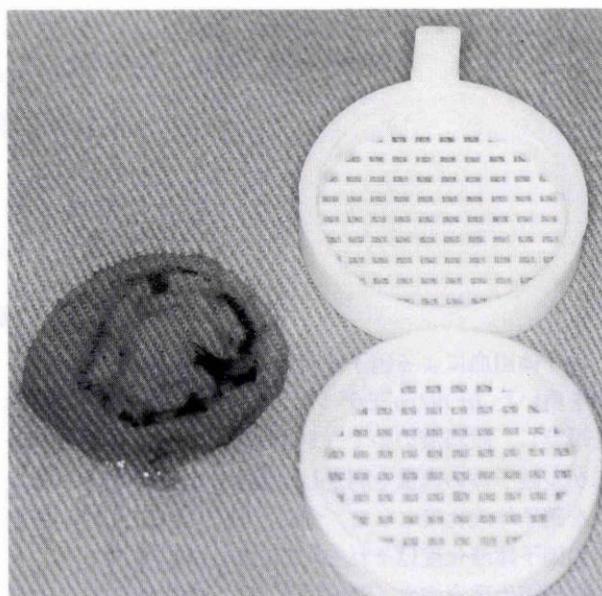


図 1 摘出した豚眼硝子体ゲルとプラスチック製メッシュかご。

118 個の硝子体ゲルの摘出直後の重量は平均 3.43 ± 0.25 g であった。

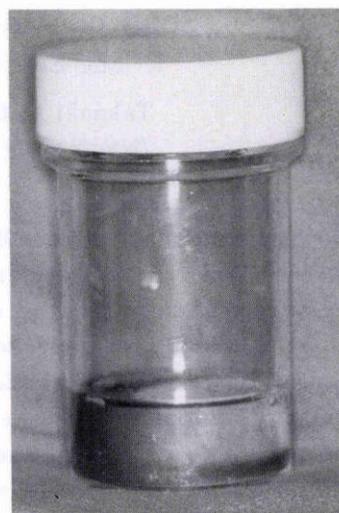


図 2 血漿 9 ml 中に硝子体ゲルの入ったメッシュかごを浸したところ。

定を行った。

試料液の作製法

全血は、ヒト末梢静脈血を ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 入り採血管で採血したものをそのまま用いた。血漿は、EDTA 入り採血管で採血した血液を 1,500 回転、15 分間の遠心分離を行って採取した。血球成分は、血漿を除去して残った血球成分をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、除去した血漿と等量の PBS を加えて血球成分浮遊液を作製し使用した。ヘモグロビンの影響を検討するため、血漿除去後の血球成分を PBS で洗浄し、除去した血漿の半量の蒸留水を加え 10 分間放置し赤血球を破壊させ、蒸留水と等量の 2 倍濃度の PBS を

加え、溶血液を作製した。

実験2：血漿による硝子体液化度の時間経過の検討

試料液に血漿を用い、反応時間で1, 3, 6, 9, 12時間と5つのグループに分け硝子体液化度を算定し、実験1で求めた24時間のものも含めて硝子体液化度と反応時間との関係を見た。対照としてPBSを用い、同様に時間経過により5つのグループに分けて行った。

実験3：血漿の濃度と硝子体液化度の関係の検討

試料液に血漿をPBSで50%, 25%, 12.5%, 8.3%, 5.0%, 2.5%に希釈したものを用い、反応時間を24時間として硝子体液化度の算定を行った。

III 結 果

実験1：血液の血漿成分、細胞成分およびヘモグロビンの影響

使用した豚眼は34個で、摘出直後のゲル硝子体の重量は 3.47 ± 0.24 gであった。図3に全34個の硝子体液化度をプロットしたものを示す。表1に各試料液による24時間後の硝子体液化度の平均値を示す。血球成分、溶血液ではPBSと同様に液化度は約20%であったが、全血と血漿では液化度は約50%と高値を示した。

実験2：血漿による硝子体液化の時間経過

使用した豚眼は52個で、摘出直後のゲル硝子体の重量は 3.40 ± 0.26 gであった。図4に実験1で算定した17個を含む全69個の硝子体液化度を、表2に反応時間ごと

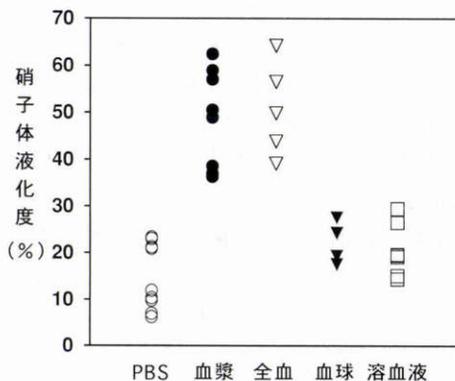


図3 各試料液による24時間振盪時の硝子体液化度の比較。

PBS: phosphate buffered saline

表1 24時間後の硝子体液化度の比較

試料液	硝子体液化度
全血	$50.7 \pm 10.0\%$ (n=5)
血球成分	$21.1 \pm 4.5\%$ (n=5)
溶血液	$20.5 \pm 5.6\%$ (n=7)
血漿	$48.8 \pm 10.4\%$ (n=8)
PBS	$14.8 \pm 7.1\%$ (n=9)

平均値±標準偏差

PBS: phosphate buffered saline

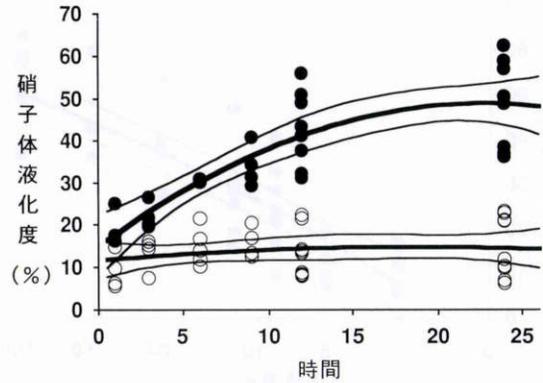


図4 血漿とPBSの硝子体液化度と反応時間との関係。

黒丸は血漿、白丸はPBS、太線は二次回帰曲線、細線は95%信頼限界。

表2 反応時間と硝子体液化度の関係

反応時間	硝子体液化度	
	PBS	血漿
1時間	$10.6 \pm 4.9\%$ (n=5)	$19.7 \pm 4.7\%$ (n=3)
3時間	$13.5 \pm 3.5\%$ (n=5)	$22.1 \pm 3.1\%$ (n=4)
6時間	$14.8 \pm 4.5\%$ (n=5)	$30.5 \pm 0.4\%$ (n=5)
9時間	$15.9 \pm 3.7\%$ (n=4)	$34.0 \pm 5.0\%$ (n=4)
12時間	$13.1 \pm 5.6\%$ (n=9)	$42.8 \pm 8.9\%$ (n=8)
24時間	$14.8 \pm 7.1\%$ (n=9)	$48.8 \pm 10.4\%$ (n=8)

平均値±標準偏差 PBS: phosphate buffered saline

の硝子体液化度の平均値を示す。PBSは反応時間が24時間以内では液化度に変化なく、平均で20%を超えることはなかった。血漿では反応時間が長くなるに従い液化度は高値を示し、24時間で平均48.8%となった。

実験3：血漿の濃度と硝子体液化度の関係

使用した豚眼は32個で、摘出直後のゲル硝子体の重量は 3.45 ± 0.26 gであった。各濃度における血漿の硝子体液化度を図5および表3に示す。血漿濃度が50%では100%血漿と有意差はなく、25%, 12.5%, 8.3%と血漿濃度を低くするに従い液化度も低下した。血漿濃度が5.0%以下では、液化度はPBSとほぼ同様の値を示し、有意差は認められなかった。

また、採血管に入っているEDTAの影響の可能性も考えられたので、PBSにEDTAを入れて同様に行ったが、硝子体液化度は24時間で12.8%と、PBSのみのもとの有意差はなかった。また、浸透圧の影響をみるため、蒸留水および10倍濃度PBSでも同様の実験を行ったが、蒸留水で15.0%、10倍濃度PBSで19.5%とどちらもPBSと有意差はなかった。

IV 考 按

硝子体の液化変性を促進させる因子として、これまでヒアルロン酸の酸化、脱重合を起こす鉄イオンやフリーラジカルの関与が重視されている。動物眼の硝子体内に

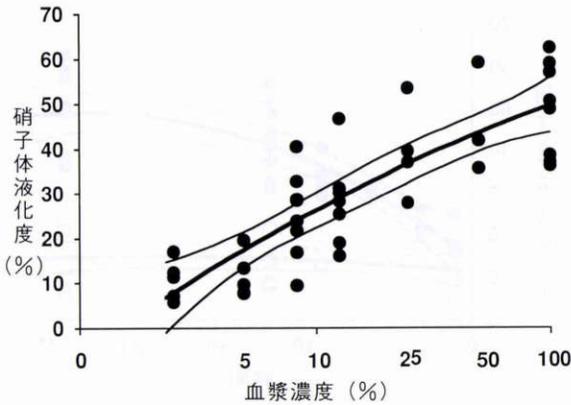


図5 血漿の濃度と硝子体液化度の関係。
太線は二次回帰曲線，細線は95%信頼限界。

表3 血漿濃度と硝子体液化度の関係

血漿濃度	硝子体液化度
100%	48.8±10.4% (n=8)
50%	45.5±12.2% (n=3)
25%	39.5±10.6% (n=4)
12.5%	28.2±10.0% (n=7)
8.3%	25.3±9.6% (n=8)
5.0%	11.7±4.9% (n=5)
2.5%	10.8±4.5% (n=5)

平均値±標準偏差

自家血液を注入し、硝子体の変化をみる実験は数多くなされており、注入後1週間以内に硝子体の変化^{6)~8)}あるいは粘度の著明な低下¹³⁾が認められる。Squireら⁹⁾はヘモグロビンを注入することでも硝子体液化が起こることを明らかにし、硝子体出血後の液化変性には溶血により放出される鉄イオンが影響している可能性を示唆した。Hofmanら¹⁴⁾は*in vitro*でフリーラジカルおよび鉄イオンが牛硝子体ヒアルロン酸の粘度を低下させることを示し、Huiら¹¹⁾は*in vivo*で家兎眼硝子体内に鉄イオンを注入し、硝子体が液化することを報告している。また、Burke¹⁵⁾は家兎眼硝子体内にヘモグロビンを注入し、3週間後頃に硝子体内に侵入してくる細胞が硝子体中のsuperoxide anionのレベルを超過させていることを示し、これが硝子体の液化を起しているのではないかと報告している。加齢による硝子体の液化変性においてもフリーラジカルが関与しているのではないかと推測されており、Uenoら¹⁶⁾は光力学作用(photodynamic action)によって生じたフリーラジカルが*in vitro*で牛硝子体を液化させることを示し、秋葉¹⁷⁾はそれを家兎眼を用いて*in vivo*で証明している。

しかし、硝子体はそのような酸化作用を持つ物質に限らず、コラゲナーゼやヒアルロニダーゼなどの蛋白分解酵素処理でも液化が促進する¹²⁾¹⁶⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。血漿には細胞外基質を分解し得る蛋白分解酵素やその活性化物質が多く含まれており、炎症や出血に伴って血管外に移行し、か

つ活性が増加し、組織に存在するコラゲナーゼやメタロプロテアーゼなど蛋白分解酵素とともに組織の分解に働く²⁰⁾。このような蛋白分解酵素系が硝子体液化の進行に関与することは十分考えられるが、その点は従来あまり重要視されていない。今回、*in vitro*で豚眼のゲル硝子体を血液中あるいは血漿中で振盪すると、PBS内におけるよりも高度に液化し、かつ、その効果には一定の濃度反応関係を確認できた。一方、同一条件下で血球成分浮遊液および溶血液の中では、PBSと有意差はなく液化は促進されなかった。このことから、本実験における液化は血漿成分との接触によるものであることが明らかとなった。Maberleyら²¹⁾は、家兎眼硝子体内に自家血液とともに線溶系酵素を注入することにより、さらに硝子体液化が促進することを示し、Verstraetenら²²⁾は家兎眼に、内境界膜の構成成分であるラミニンやフィブロネクチンを分解するプラスミンを注入することにより後部硝子体剝離が生じることを報告したが、これらも血液の血球外成分中の因子による硝子体液化の可能性を強く示唆している。

血漿成分と硝子体との接触は硝子体出血だけに限らない。臨床的には、糖尿病や眼内の炎症、手術や網膜の凝固によりblood-retinal barrier (BRB)の破綻が一過性あるいは持続的に生じていることが明らかにされており²³⁾²⁴⁾、その際には破綻したBRBからの血漿成分の眼内への注入と硝子体との接触が生じていると考えられる。そのような時にも硝子体の液化変性が進行することが知られている²⁵⁾。動物実験においても、水晶体摘出や網膜の冷凍凝固、ジアテルミー凝固を行っても、硝子体粘度は低下する¹³⁾。外科的処置以外でもNaphthaleneの全身投与によっても硝子体は著明に液化するが、このとき同時に硝子体中には血漿由来と思われる蛋白質が急増していると報告²⁶⁾されている。すなわち、何らかの原因によるBRBの破綻、血漿成分と硝子体の接触が硝子体の液化変性を引き起こす要因となっているのではないかと考えられ、多くの疾患における硝子体の液化はこれにより説明され得ると思われる。

今回の実験では、従来からいわれているヘモグロビンの影響は、24時間という短い時間経過の中では確認されなかった。溶血液中で振盪した硝子体はゲル中にヘモグロビンが入ったと思われるようなゲルの赤色の染色が見られ、長時間の観察では液化度にも変化がでるかも知れないと思われたが、少なくとも短時間で起こるような直接的な影響は少ないように思われた。

従来の研究の多くは、先に述べたように試料を硝子体内に直接注入している。その多くは自家血成分であり、必要以上の炎症を惹起することはないと思われるし、生理食塩水との対照も行われている。しかし、鉄イオンは網膜に対しても毒性を示すことが知られており²⁷⁾、BRBに影響を与えないとはいえない。その点から、*in vitro*も

含めたさらなる追試を要すると思われる。今回行った方法は岩田の方法¹²⁾に準じており、硝子体ゲルからの離水を指標とするため、生体眼の液化度とは必ずしも一致しないが、周囲組織の変化による影響は全くない。この実験モデルは様々な病的変化や薬物による硝子体液化のメカニズムを探索するのに有用であると考え、今後、さらなる検討を加えたいと思う。

文 献

- 1) **Balazs EA**: The molecular biology of the vitreous. In: MaPherson A (Ed): New and Controversial Aspects of Retinal Detachment. Hoeber, New York, 3—15, 1968.
- 2) **Sebag J, Balazs EA**: Morphology and ultrastructure of human vitreous fibers. Invest Ophthalmol 30: 1867—1871, 1989.
- 3) **Duke-Elder WS**: Text-book of Ophthalmology. Vol. III. Diseases of the Inner Eye. CV Mosby, St. Louis, 3245—3272, 1941.
- 4) **Harby K**: Clinical observation of vitreous change. In: Schepens CL (Ed): Importance of the Vitreous Body in Retinal Surgery with Special Emphasis on Reoperations. CV Mosby, St. Louis, 94—111, 1960.
- 5) **Freilich DB, Lee PF, Freeman HM**: Experimental retinal detachment. Arch Ophthalmol 76: 432—436, 1966.
- 6) **Boyer HK, Suran A, Hogan MJ, Scott KG, McEwen WK**: Studies on simulated vitreous hemorrhages. I: Rate of disappearance of radiochromium-tagged red cells. Arch Ophthalmol 59: 232—234, 1958.
- 7) **Forrester JV, Grierson I, Lee WR**: The pathology of vitreous hemorrhage. II: Ultrastructure. Arch Ophthalmol 97: 2368—2374, 1979.
- 8) **上野明広**: 硝子体出血についての実験的研究。第1報。硝子体内にみられる変化について。日眼会誌 84: 257—269, 1980.
- 9) **Squire C, McEwen WK**: The effect of iron compounds on rabbit vitreous. Am J Ophthalmol 46: 356—358, 1958.
- 10) **Regnault FR**: Vitreous hemorrhage: An experimental study. II: Hemoglobin degradation. Arch Ophthalmol 83: 466—469, 1970.
- 11) **Hui YN, Sorgente N, Ryan SJ**: Liquefaction of rabbit vitreous by ferrous ions. Curr Eye Res 7: 655—660, 1988.
- 12) **岩田修造**: 硝子体液化に関する生化学的考察。日眼会誌 85: 1969—1974, 1981.
- 13) **Kawano S, Honda Y, Negi A**: Effect of biological stimulation the viscosity of the vitreous. Acta Ophthalmol 60: 977—991, 1982.
- 14) **Hofman H, Schmut O**: The inability of superoxide dismutase to inhibit the depolymerization of hyaluronic acid by ferrous ions and ascorbate. Graef's Arch Clin Exp Ophthalmol 214: 181—185, 1980.
- 15) **Burke JM**: Vitreal superoxide and superoxide dismutase after hemorrhagic injury: The role of invasive cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 20: 435—441, 1981.
- 16) **Ueno N, Sebag J, Hirokawa H, Chakrabarti B**: Effects of visible light irradiation on vitreous structure in the presence of a photosensitizer. Exp Eye Res 44: 863—870, 1987.
- 17) **秋葉 純**: 光力学作用 (photodynamic action) による硝子体の液化。日眼会誌 96: 731—736, 1992.
- 18) **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の検討 (その3)。臨眼 47: 804—805, 1993.
- 19) **O'Neill R, Shea M**: The effects of bacterial collagenase in rabbit vitreous. Canad J Ophthalmol 8: 366—370, 1973.
- 20) **長内和弘, 高橋敬治**: 食細胞とプロテアーゼ。早川修 (編): プロテアーゼとそのインヒビター, 生理的意義および病態との関連。メディカルビュー社: 210—216, 1993.
- 21) **Maberley AL, Chisholm LDJ**: The effect of a fibrinolytic agent on vitreous hemorrhage in rabbit. Canad J Ophthalmol 5: 55—63, 1970.
- 22) **Verstraeten TH, Chapman C, Hartzer M, Winkler BS, Trese MT, Williams GA**: Pharmacologic induction of posterior vitreous detachment in the rabbit. Arch Ophthalmol 111: 849—854, 1993.
- 23) **塩瀬芳彦**: 眼内 barrier 機構とその臨床的意義。臨眼 31: 875—887, 1977.
- 24) **吉田晃敏**: Vitreous fluorophotometry. 眼科 32: 1029—1035, 1990.
- 25) **Sebag J**: The Vitreous. Springer-Verlag, 105—147, 1989.
- 26) **岩田修造, 池本文彦, 竹鼻 真**: 水晶体の混濁化とその環境動態。日眼会誌 80: 741—748, 1976.
- 27) **Cibis PA, Yamashita T**: Experimental aspect of ocular siderosis and hemosiderosis. Am J Ophthalmol 48: 465—480, 1959.