◆診断・技術講座◆

眼科領域のプラスミン療法

佐久間俊郎, 田中 稔

The plasmin therapy on ophthalmology

Toshiro SAKUMA, M.D. Minoru TANAKA, M.D.

Key words: plasmin, vitreous detachment, urokinase, vitreoretinal interface

佐久間俊郎

1995年 順天堂大学医学部卒業
2003年 山形大学分子病態学講座国内留学
2003年 Schepens Eye Research Institute, HARVARD Medical School 留学
2005年 順天堂大学医学部眼科教室助手
現在に至る。

田中 稔

1971年 順天堂大学医学部卒業
1976年 東京大学医科学研究所微細形態研究部国内留学
1977年 アメリカ合衆国国立衛生研究所(NIH)留学(Visiting Associate)
1997年 順天堂大学医学部眼科教室教授
現在に至る。

はじめに

1970年, 初めて近代的な硝子体手術が開発され, その結果, 眼底疾患の発症, 進展, 増悪に硝子体の関与が極めて大きいことが次第にわかって来た。

硝子体と網膜の関わり合いは当初, 単なる物理的なもののように考えられていたが, その後の研究の進歩により, 細胞成長因子や血液眼内柵などの関わり合いが深い事も判明して来ている。それに従って硝子体の手術も単なる切除や増殖膜の除去などの物理的なものから, 更に進んで細胞成長因子の利用や血液眼内柵の破綻に対する処置の工夫が行われている。そのため手術の適応疾患はなお次第に増加しつつある現況である。

硝子体手術において硝子体をいかに網膜内境界膜から安全に剥離除去することが重要であり, 網膜面での硝子体の存在は細胞増殖, 血管新生, 慢性的牽引の原因となることから, 手術における手技の基本は後部硝子体剥離作成といっても過言ではない。硝子体手術の技術は年々向上してきているが, 合併症は避けられず, そ

の多くが網膜面からの硝子体等の剥離時に発生する。従来の方法で機械的に硝子体を内境界膜から剥離する際に, 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, 特に若年者ではその癒着が成人よりも強く, 剥離に難渋することもある。それに重症増殖網膜症の病変は網膜と硝子体の境界面にあり, 境界面で互いに強く癒着しているため, 実際の手技は容易ではない。

そこで我々は, 自己血からプラスミノゲン抽出し, プラスミノゲンアクチベーターにてプラスミンへと活性を行い, 手術操作で解離困難な後部硝子体の剥離作製, もしくは手術による機械的除去をより容易にするためにプラスミンを利用し良好な結果が得られたので, これまでの結果をふまえて報告する。

1. プラスミンの精製法 (表1)

現在プラスミンは, 製剤として発売されておらず, 使用するにあたり患者自身の自己血よりプラスミンの精製を行っている。自己血よりプラスミンを作製するにあたり, 患者の肘静脈か

順天堂大学医学部附属順天堂浦安病院眼科学 [〒279-0021 千葉県浦安市富岡 2-1-1]

Department of Ophthalmology, Juntendo University Urayasu Hospital. [2-1-1 Tomioka, Urayasu Chiba 279-0021, Japan.]

Tel: 047-353-3111 Fax: 047-355-5949 e-mail: eyeofjun@mb.infoweb.ne.jp

表 1

Plasmin purification of autologous plasminogen
1. 自己血から plasma の分離
2. アフィニティ クロマトグラフィー 吸着 洗浄 溶出
3. 脱塩
4. 濃縮 (透析)
5. 除菌
6. プラスミノーゲンの検出と定量
7. 培養
8. プラスミノーゲンアクチベーター (SK,UK,tPA) に よるプラスミンへの活性

ら 30 ml 採血しこれを遠心し, プラズマを分離する. そこで蛋白変性を抑制するために 10 IU/ml アプロチニン, 5 mM ペンザミジン, 1 mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸) を加え, リジンセファロースを利用したアフィニティークロマトグラフィーを行った. 溶出に, エプシロンアミノカプロン酸を使用したので, 脱塩目的にセファデックス G250 を利用したゲル濾過クロマトグラフィーを行った. 濃縮には, 透析膜を利用し, 精製されたプラスミノーゲンの細菌汚染を防ぐために 0.22 μm のミリポアフィルターを通し, また, 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, 嫌気性菌も含め使用前 48 時間の細菌培養を行った. プラスミノーゲンは冷凍保存し, 使用直前にウロキナーゼにて活性化プラスミンとして使用した. プラスミンの活性は, D-val-leu-lys-p-nitroanilide (S-2251) を利用した 405 nm での吸光度を求め測定した. 純度に関しては, 電気泳動 (SDS-PAGE) を行い, 純度の高いプラスミノーゲンが得られているのを確認した.

これまで精製時間に 7~8 時間かかり, 最近では簡便に精製するキットを開発し精製時間の短縮および再現性を確保できるようになった¹⁾²⁾.

2. 網膜硝子体界面における プラスミンの作用機序

網膜硝子体界面とは, 網膜内境界膜と硝子体膜とで作られる界面の名称であり, 2 層からなる. その一つは凝集した硝子体繊維とヒアルロン酸の結合した後部硝子膜で, 他の一つはいわゆる内境界膜である. この内境界膜には, 硝子体細繊維が付着もしくは入り込んで界面を形成している. 内境界膜は, ミューラー細胞の基底膜であり, 1 型, 4 型, コラーゲン, ラミニン, ファイブロネクチン, プロテオグリカンなどで構成され, これらの物質は硝子体皮質と内境界膜を架橋するコラーゲン繊維間を束ねる役目をしている. ラミニンは主に基底膜構成成分と 4 型コラーゲンに関与しており, フィブロネクチンは, 主に血管の存在する部位に多い.

プラスミンは, 線溶系の活性化に関与する蛋白分解酵素であり, ラミニンやファイブロネクチンといった多くのグリコプロテインを加水分解する. このため硝子体皮質と内境界膜を架橋するコラーゲン繊維間において接着力が弱まることにより, 硝子体膜と内境界膜で剥離が生じやすくなると思われる.

しかしながら, この界面構造のまわりには, いまだ解明されていない生化学的構造や結合があり, 代謝が行われている. また, プラスミンの作用は, 有効であると思われるが, 消化された物質への起炎反応, TGF (transforming growth factor) $-\beta$ や fibroblast growth factor の活性化などの作用が考えられ, その点についても念頭に置いておかねばならない³⁾⁻⁵⁾.

3. 過去の臨床報告について

これまでに外傷性黄斑円孔, 糖尿病網膜症, 特発性黄斑円孔にプラスミンを使用して, 良好な結果が報告されている⁶⁾⁻⁹⁾. 外傷性黄斑円孔については, 6 カ月以上経過観察できた 4 例の小児において後部硝子体剥離が容易にでき, 円

孔が閉じ、視力も良好であったとの報告がある⁶⁾。進行した糖尿病網膜症7例に対して後部硝子体剥離が自発的あるいは容易に作製でき、網膜内浮腫の消失および視力の改善も得られ硝子体手術の補助薬として有効であると報告されている⁷⁾⁹⁾。また、ステージ3の特発性黄斑円孔においても9例に対して後部硝子体剥離が容易に作製でき、すべての症例で円孔閉鎖が得られたとの報告がある⁸⁾。

4. 臨床応用について

これまでの筆者らの経験した臨床例のまとめを示す。

1. 糖尿病網膜症

1) 糖尿病黄斑症

糖尿病黄斑症では、後部硝子体剥離がない症例での手術において、後部硝子体剥離形成を試みるが、黄斑円孔例のように速やかに後部硝子体剥離が形成される症例は多くないように思われる。さらに視神経乳頭近くに増殖組織や新生血管があると視神経乳頭上で強引に硝子体膜を吸引することになりいきなり網膜裂孔を作りかねない。そこで、より低侵襲で有効な方法として、自己血よりプラスミンを作製し、補助薬として硝子体手術に応用した。術中硝子体へのプラスミンの影響については、硝子体の一部液化が認められ、後部硝子体剥離が容易に行えた。NVD（乳頭新生血管）やNVE（網膜新生血管）を認めるものの局所的な癒着に関しては、剥離は起こらなかったが、処理が容易に行えた。

現在のところ糖尿病黄斑症に対する硝子体手術の適応基準ははっきりせず、また奏効機序についてもはっきりした機序は不明であるが、複数の因子が絡み合って作用していると思われる。硝子体手術によって血管透過性亢進作用を有するサイトカインを除去することで取り除かれ、黄斑部に前後および接線方向の牽引力を及ぼすことで黄斑浮腫を引き起こすと考えられている。硝子体や肥厚した後部硝子体膜も硝子体

手術により除去される結果、黄斑浮腫は軽減すると考えられる。

2) 増殖糖尿病網膜症

増殖糖尿病網膜症に対する手術療法の目標は、網膜を牽引から解放し、網膜を復位させ、硝子体出血を取り除き血管閉塞領域に対して光凝固を行うことである。その目標に対する手術手技のなかでプラスミン療法の可能性について考察すると、硝子体切除および膜処理のなかの可能性が秘められている。周辺部硝子体剥離が生じていない症例や若年者の症例では硝子体の切除および後部硝子体剥離が容易ではなく、また周辺部硝子体切除をスムーズに行うために、プラスミン療法は有用であると思われる。実際に、新生血管、増殖膜の癒着の強いところでは、網膜と硝子体膜の剥離は不可能であるが、膜処理の基本となる膜分割、膜分層が容易にできたように思われた。また、癒着の軽いところでは、膜剥離を行うこともできた。実際に手術操作が容易になり、視力の改善が得られ、合併症は認められていない。

2. 特発性黄斑円孔

黄斑円孔に対する硝子体手術の後眼部合併症は、比較的多く遭遇する¹²⁾。その多くが後部硝子体剥離作製時に起こることが多いと思われる。そこでプラスミンを使用して後部硝子体剥離を作製し、また手術時間を短縮し、もし可能であればプラスミンのみもしくはガス注入併用にて治療できないものか検討中である。

3. 外傷性黄斑円孔

自然閉鎖する症例もあり、手術適応について難渋することが多い。手術になっても大多数が若年層の症例であり、後部硝子体剥離が容易に作製できず悩むことが多いと思われる¹¹⁾。そこでプラスミンを利用することにより、よりストレスを少なく後部硝子体剥離を作製することが可能であると思われる。

4. 網膜硝子体牽引症候群, 増殖硝子体網膜症
硝子体手術の補助薬としてプラスミンを使用した
が, 周辺部硝子体切除が容易にできており,
手術操作が容易に行えた. 今後もし可能で
あれば, プラスミン注入単独で治療できないも
のか検討していきたい.

4. おわりに

眼科領域において, 線溶療法はさまざまな形
で利用され治療効果を発揮している. 最近で
は, 硝子体手術への外科的な利用法も普及し始
め, 多数の症例に用いられ良好な結果が得られ
ている.

自己血由来プラスミンは硝子体手術への応用
に対して安全に硝子体剥離が作製でき, 硝子体
手術の補助薬としても有用であり, 患者および
医療側の負担軽減効果があると思われる. しか
し, プラスミンの作製が容易ではなく容易に使
用可能な商品の開発が望まれ, 今後の症例の蓄
積, 適応基準の設定と合併症に対する対策が必
要であると思われる. 筆者らは, 関連会社と共
同してキットを作製した. また, リコンビナント
商品の出現も近いと思われる.

これまで硝子体を人工的に液化させること,
また手術操作で切除不能な後部硝子体膜の消
化, もしくは機械的除去をより容易にせしめる
ための酵素の使用の試みがなされてきている.
プラスミン以外にも臨床応用が行われてきてい

るものもある. 今後, 酵素の応用は, 現在行わ
れている硝子体手術をさらに安全により確実に
行えること, 場合によっては硝子体手術を行わ
ずにある種の疾患を治療できることなどを期待
して行う一つの考え方であり, その可能性は少
なくないと思われる.

今後の研究により, 線溶療法の眼科への応用
が進み, さまざまな治療法へと新たな道が開か
れるものと期待している.

文 献

- 1) 佐久間俊郎, 田中稔, 惣宇利正善, 一瀬白帝: 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. 日本眼科学会雑誌 **107**(11): 709-18. 2003.
- 2) 佐久間俊郎, 田中稔: Plasmin-Plasmin を用いた Chemical Vitrectomy-. 眼科手術 **16**(2): 165-169, 2003.
- 3) 田中稔: 網膜硝子体界面 (症候群). 日本の眼科 **69**: 1145-1150, 1988.
- 4) 石田晋, 東範行: プラスミンによる網膜硝子体界面の解離. : 眼科プラクティス **38**: 84-85, 1998.
- 5) Tanaka M, Qui H. Pharmacological vitrectomy. Semin Ophthalmol. **15**(1): 51-61. 2000.
- 6) Margherio AR, Margherio RR, Hartzler MK, et al: Plasmin enzyme-assisted vitrectomy in traumatic pediatric macular holes. Ophthalmology, **105**: 1617-1620, 1998.
- 7) Williams JG, Trese MT, Williams GA: Autologous plasmin enzyme in the surgical management of diabetic retinopathy. Ophthalmology, **108**: 1902-1905, 2001.
- 8) Trese MT, Williams GA, Hartzler MK: A new approach to stage 3 macular holes. Ophthalmology, **107**: 1607-1611, 2000.
- 9) 佐久間俊郎, 田中稔: プラスミンによる糖尿病網膜症の手術とは. 総合臨床 **51**(10): 2891-2892, 2002.
- 10) 佐久間俊郎, 田中稔, 葉田野宣子ほか: 特発性黄斑円孔の手術成績および後眼部合併症について. 眼科手術 **16**: 117-122. 2003.
- 11) 佐久間俊郎, 田中稔, 葉田野宣子ほか: 外傷性黄斑円孔の治療方針について. 眼科手術 **15**: 249-255. 2002.