



Ascorbic acid concentration in rabbit vitreous measured by microdialysis with HPLC-electrochemical detection before and after vitreous surgery

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小出, 健郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/352

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 4 2 8 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 5 月 1 9 日
氏 名	小 出 健 郎		
論文題目	Ascorbic acid concentration in rabbit vitreous measured by microdialysis with HPLC-electrochemical detection before and after vitreous surgery (硝子体手術前後での家兎硝子体腔内アスコルビン酸濃度の変化－HPLC-マイクロダイアリス法による－)		

博士(医学) 小 出 健 郎

論文題目

Ascorbic acid concentration in rabbit vitreous measured by microdialysis with HPLC-electrochemical detection before and after vitreous surgery

(硝子体手術前後での家兎硝子体腔内アスコルビン酸濃度の変化—マイクロダイアリシス法による—)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

HPLC-マイクロダイアリシス法によって*in vivo*で種々の細胞外液を測定することが可能であり、さまざまな領域で応用されている。実験動物やヒトの手術検体から繰り返し硝子体液を抽出して種々の測定がなされているが、経時的な観察には限界がある。我々は、HPLC-マイクロダイアリシス法を用いた硝子体腔内アスコルビン酸(AA)の*in vivo*での継続的測定方法を開発し、硝子体液中のAAの経時的な観察を可能にした。さらにこの方法によって光線力学的反応から生じる活性酸素に対するAAの消去作用を確認した。

眼科領域における近年の硝子体手術の進歩はめざましく、増殖糖尿病網膜症、巨大裂孔網膜剥離等を含む多くの難治性疾患の治療が可能になっている。また最近の硝子体手術では、消炎目的や、硝子体ゲルの可視化目的で副腎皮質ステロイド薬であるトリアムシノロンアセトニド(TA)がしばしば使用されるようになっている。しかし、硝子体の切除やTAの投与による硝子体液の生化学的変化を経時的に検討した報告はない。HPLC-マイクロダイアリシス法によって、硝子体手術やTA投与による硝子体液のAAの経時的変化を検討した。

〔方法〕

白色家兎(3.3~4.5 kg)の片眼の硝子体中に7 mmの透析膜部位を含むマイクロダイアリシス法用のprobe(10 mm)を挿入し、眼球および皮下を通して頭部に固定した。マイクロダイアリシス法により、probeから回収した透析液中のAA濃度をHPLC-ECD 300 (Eicom)により測定した。全体をコントロール群(n=4)、硝子体手術群(n=6)、TA投与群に分類し、さらにTA投与群を4つのグループ(各n=4)に分類した。コントロール群は、probe装着手術後4~5日で測定値が安定してからさらに10日間測定し、硝子体手術群は、コントロール群と同様に測定値が安定してから硝子体手術を施行し、その後10日間測定を行った。TA投与群は、コントロール群と同様に測定値が安定してからテノン嚢下にTA(20 mg)注入(グループ1)、硝子体腔内にTA(4 mg)注入(グループ2)、硝子体手術後、さらにテノン嚢下にTA(20 mg)を注入(グループ3)、硝子体手術後、さらに硝子体腔内にTA(4 mg)を注入(グループ4)した。4つのグループ共にその後10日間測定を行った。

〔結果〕

硝子体手術群では硝子体手術後2日目からAAの濃度は減少し始め、7日目で最も低下しコントロールに対し49.5%減少した。7日目以降、AAの濃度に少し回復が見られたが、コントロールの値には戻らなかった。テノン嚢下にTA(20 mg)注入(グループ1)、硝子体腔内にTA(4 mg)注入(グループ2)したグループでは、投与方法によらずコントロール群と比較しAA濃度に有意差を認めなかった。硝子体手術後

に、テノン嚢下にTAを注入したグループ3では硝子体手術群と比較してAA濃度は有意に高かった。硝子体手術後に、硝子体腔内にTAを注入したグループ4では、AAはさらに高い濃度であった。

〔考察と結論〕

AAは抗酸化物質で、生体内の防御的役割をするといわれている。眼内のAA濃度は種々の動物で血漿の濃度より高いことが知られており、房水中、水晶体、網膜のAAは、光障害からそれぞれの組織を防御する働きがあると考えられている。血漿のAAは、虹彩や毛様体上皮細胞を通して後房へ能動輸送され、そこから硝子体へ拡散していく。硝子体手術は、網膜の酸化的ストレスを引き起こし、活性酸素を産生することが報告されている。今回の結果では、AA濃度は硝子体手術翌日ではなく、2日目から減少しはじめ、7日目まで減り続けた。このことは、手術によるAAの単なる除去ではなく、硝子体手術侵襲により生じた活性酸素に対してAAが消去作用をしていると考える。したがって、硝子体手術によってAAが低下することは、炎症等によって代償不能な大きな血液房水嚢の破綻を引き起こすことが考えられた。また、硝子体手術後に高率に核白内障が合併することが知られ、最近硝子体手術後の硝子体中の酸素濃度の上昇が関与しているのではないかという報告があるが、我々の結果からAAの低下が核白内障の原因に関与していることが考えられた。

TAは、抗炎症薬として種々の眼疾患に用いられている。今回の結果では、TA投与のみでは、硝子体腔内AA濃度に影響を与えなかった。硝子体手術後にはAA濃度は低下するが、硝子体手術後にTAを投与すると、硝子体手術群と比較して術後早期に硝子体腔内AA濃度が回復することが明らかになった。また、投与方法として、硝子体腔内への注入の方が、テノン嚢下注入より効果が大きかった。このことは、硝子体手術の侵襲がAAを産生している血液房水嚢に傷害を与えたが、TAにより早期に血液房水嚢機能が正常化し、AA産生能が回復したことが推測された。そして、硝子体腔中のTA濃度がより高くなる硝子体腔中への注入の方が正常化しやすいことが考えられた。

硝子体手術後に硝子体腔中AA濃度は著明に低下し、これは酸化的ストレスが関与していることが考えられる。したがって、硝子体手術による重篤な合併症を防ぐためには、術中や術後に抗酸化薬や、抗炎症薬を投与することが有用であると考ええる。

論文審査の結果の要旨

硝子体手術は、狭い眼内空間での透明な硝子体ゲルの切除が要求され、難易度が高く、手術侵襲の危険性も高い。しかしながら、最近になって、非水溶性の抗炎症剤であるトリアムシノロンアセトニド(TA)(ステロイド懸濁液)を硝子体腔内に直接注入することにより、ゲルを可視化出来ることから、硝子体手術手技の安全性が一段と向上した。また血液-房水嚢の傷害もより軽減され、白内障や網膜裂孔などの合併症の発生頻度も著しく低下した。このTAを硝子体に直接注入する方法は現在では広く普及している。

ところで、硝子体手術は硝子体内酸素濃度の上昇をもたらすことが昨年明らかにされ、術後の白内障の発生に酸化ストレスの関与が強く示唆されている。一方、眼内特に硝子体に多量に含まれるアスコルビン酸は酸化ストレスから水晶体や網膜を防御する重要な役割を担うことがすでによく知られている。したがって、硝子体手術による硝子体腔内酸素濃度の上昇にアスコルビン酸濃度の減少が関係する可能性がある。また、TAはアスコルビン酸濃度の低下を防ぐのではないかと考えられる。そこで申請者は、これらの可能性を検討するために(1)家兎の硝子体手術によって硝子体内アスコルビン酸濃度が変化する

かどうか、(2) TAの投与はこれを抑制するかどうかについてマイクロダイアリシス法を用いて調べた。

対象の選定と方法は以下の通りである。

白色家兎26羽を用いた。片眼の硝子体に膜長7mmのマイクロダイアリシスプローブを慢性的に留置した。プローブを介して回収したアスコルビン酸の濃度は、オートインジェクターを接続した高速液体クロマトグラフにより、15分間隔で3時間に亘って測定した。測定は家兎を固定器に入れて行った。家兎は硝子体手術とTA投与(テノン嚢下または硝子体腔内のいずれか)の組み合わせにより、以下の6群に分けた。

I 群：硝子体非手術+薬物非投与 (n=4)

II 群：硝子体非手術+テノン嚢下TA (20 mg) 投与 (n=4)

III 群：硝子体非手術+硝子体腔内TA (4 mg) 投与 (n=4)

IV 群：硝子体手術+薬物非投与 (n=6)

V 群：硝子体手術+テノン嚢下TA (20 mg) 投与 (n=4)

VI 群：硝子体手術+硝子体腔内TA (4 mg) 投与 (n=4)

おもな結果は以下の通りである。

(1) 硝子体非手術 (I 群) 家兎のアスコルビン酸濃度は、プローブ挿入手術後4~5日目から安定した値 ($93.3 \pm 10.7 \mu\text{M}$ (平均±標準偏差)) を示し、長期間(平均17日間)にわたって測定可能であった。(2) また、硝子体非手術 (II および III 群) 家兎では、TAは、テノン嚢下あるいは硝子体内のいずれの投与でも、アスコルビン酸濃度に何等の影響を与えなかった。(3) 一方、硝子体手術 (IV 群) により、アスコルビン酸濃度の著明な低下が認められた。すなわち、アスコルビン酸濃度は術前値から最大50% (7日目) の減少を示した。さらに、アスコルビン酸濃度の減少は、投与後10日目においてもなお持続した。(4) しかしながら、硝子体手術に伴うアスコルビン酸濃度の非可逆的減少はTAの投与により著明に抑制された (V および VI 群)。

申請者はこれらの結果に基づいて、硝子体手術の侵襲はアスコルビン酸を産生する血液-房水柵に傷害を与えるが、TAにより速やかに修復され、アスコルビン酸産生能が回復すると結論している。

審査委員会では、本研究が硝子体腔内アスコルビン酸濃度に及ぼす硝子体手術の影響を長期にわたって *in vivo* 測定した初めての報告であること、および、TAが術後の硝子体腔内アスコルビン酸濃度の低下に対する防御作用を有することを *in vivo* で初めて示唆した知見であることを高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は主として次のような質問を行った。

- 1) 房水の流入路としてtranscellular pathwayはないか
- 2) 白内障の発生頻度はどのくらいか
- 3) TAの副作用は何か
- 4) TAの動物実験から臨床適用までに10年余を要した理由は
- 5) アスコルビン酸の硝子体腔内直接注入、あるいはアスコルビン酸とTAの組み合わせ注入の効果はどうか
- 6) テノン嚢下投与と硝子体投与効果の違いはあるか
- 7) フリーラジカルによるtight junctionの傷害モデルを使った*in vitro*の実験データはあるか
- 8) 酸化ストレスがあると血液-房水柵の蛋白質に対する透過性が増加するという証拠はあるか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。。

論文審査担当者	主査	中	原	大	一	郎	
	副査	今	野	弘	之		副査 渡 邊 裕 司