

学位論文
Doctor's Thesis

論文名：家兎眼における硝子体手術時の空気灌流による網膜障害の検討
(Investigation of retinal damage by air infusion during vitreous surgery in
rabbit eyes)

著者名：蓮村 直
Tadashi Hasumura

指導教官名：眼科学講座教授
谷原 秀信
眼科学講座元教授
根木 昭

審査委員名：耳鼻咽喉科学講座担当教授	湯本 英二
解剖学第一講座担当教授	兎玉 公道
病理学第一講座担当教授	吉永 秀
分子病理学講座担当教授	山本 哲郎

2002年3月

目次

1	要旨	1
2	発表論文	3
3	謝辞	4
4	略語一覧	5
5	研究の背景と目的	6
5-1)	硝子体の構造及び硝子体手術	6
5-2)	硝子体手術と術後合併症	7
5-3)	硝子体手術後合併症としての周辺視野欠損	8
5-4)	硝子体手術後視野欠損と眼内空気灌流	9
5-5)	本研究の目的	11
6	実験方法	12
6-1)	動物	12
6-2)	手術手技	12
6-3)	灌流空気量の測定	15
6-4)	走査電子顕微鏡用組織標本作製	15
6-5)	光学顕微鏡用組織標本作製	15
6-6)	形態学的変化の測定	16
7	実験結果	17
7-1)	肉眼所見	17
7-2)	走査電子顕微鏡による所見	19
7-3)	網膜表面における障害の面積比較	23
7-4)	光学顕微鏡による所見	28
7-5)	灌流空気量の測定	30

8	考察	3 1
8 - 1)	液空気置換、空気灌流と網膜障害	3 1
8 - 2)	灌流空気と網膜障害	3 1
8 - 3)	網膜障害と視野欠損	3 2
8 - 4)	硝子体手術術式との関連	3 6
9	結語	3 7
1 0	参考文献	3 8

1 要旨

液空気置換を伴う硝子体手術後に周辺視野欠損がしばしば認められる。硝子体手術中におこなう空気の灌流による網膜への影響を解明するため、今回家兎を用いた実験モデルを作成し、灌流空気による網膜の形態的变化と灌流空気圧の違いによる差について調査した。

日本白色家兎 18羽 18眼に対し全麻下に硝子体手術を施行した。手術は絨毛様体扁平部水晶体切除と単純硝子体切除を行い、人工的後部硝子体剥離を作成した。12眼は液空気置換の際、加湿した空気を 25もしくは 40 mmHg の空気圧で 30秒間眼内に灌流させた。液空気置換と空気灌流を施行しなかった6眼を対照群とした。その後創を閉鎖し、直後に眼球を摘出、固定した。標本はそれぞれ光学顕微鏡、走査電子顕微鏡にて網膜の形態的变化を検討した。

走査電子顕微鏡による観察では、液空気置換を行った群の全ての眼で灌流ポートの対側に当たる網膜に境界鮮明な組織学的障害を認めた。障害部では内境界膜 (ILM) がしばしば剥離し、神経線維束が露出している箇所もあった。光学顕微鏡では網膜内層がもっとも障害され、内網状層や内顆粒層が膨化した所見を認めた。さらに視細胞外節側に網膜色素上皮細胞が付着した網膜剥離といった、網膜外層における障害も認めた。灌流空気圧を上げることでこれらの障害の面積は有意に大きくなった。液空気置換と空気灌流を行わなかった対照群ではいずれも上記の組織学的所見は認められなかった。

灌流空気が機械的に家兎網膜の全層を障害することが組織学的に明らかとなった。この障害の程度は空気灌流圧に依存していた。ヒト眼においても同様の機序が視野欠損の原因となりうることが示唆された。

Summary

Visual field defects after vitrectomy can be seen after any surgery involving fluid-air exchange. To elucidate the effect during surgery of the infused air on the retina, the present study investigated the changes in the morphology of the rabbit retina induced by air infusion and the changes resulting from varying amounts of infused air pressure.

Eighteen eyes of 18 rabbits were used. A standard three-port vitrectomy with artificial posterior vitreous detachment followed by fluid-air exchange was performed in 12 eyes. During the fluid-air exchange, humidified air was infused with an air pressure of 25 or 40 mmHg for 30 seconds. As a control, vitrectomy without fluid-air exchange was performed in six eyes. The eyes were enucleated and fixed immediately. Specimens were processed and examined by light (LM) and scanning electron microscopy (SEM).

With SEM, sharply demarcated retinal lesions were observed at the opposite side from the infusion cannula in all eyes in which a fluid-air exchange was performed. At the lesion, the internal limiting membrane was often detached, and the underlying nerve fiber layer was exposed. LM revealed that the inner retina was most affected, with concomitant swelling of the inner plexiform layer and the inner granular layer. In addition, the retina was often focally detached with adhesion of some retinal pigment epithelial cells to the photoreceptor cells. Increased infused air pressure was accompanied by a significant increase in the area of retinal damage. In contrast, no morphologic change was observed in the control eyes.

Air infusion during vitrectomy can cause mechanical retinal damage in the rabbit retina. The extent of these damage may depend on the infusion air pressure. The mechanical damage may result in a visual field defect after vitrectomy.

2 発表論文

1. Tadashi Hasumura, Naoko Yonemura, Akira Hirata, Yasuhiro Murata, and Akira Negi. **Retinal Damage by Air Infusion during Vitrectomy in Rabbit Eyes.** Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2000;41:4300-4304.
2. Akira Hirata, Naoko Yonemura, Tadashi Hasumura, Yasuhiro Murata, and Akira Negi. **Effect of Infusion Air Pressure on Visual Field Defects After Macular Hole Surgery.** American Journal of Ophthalmology, 2000;130:611-616.
3. Naoko Yonemura, Akira Hirata, Tadashi Hasumura, and Akira Negi. **Fundus Changes Corresponding to Visual Field Defects after Vitrectomy for Macular Hole.** Ophthalmology, 2001;108:1638-1643.

3 謝辞

本研究をおこなうにあたり、御指導下さいました熊本大学大学院医学研究科眼科学講座 根本昭前教授（現神戸大学医学部眼科学講座教授）、同谷原秀信教授に深く感謝いたします。また、研究方法に関して直接御指導を頂いた熊本大学大学院医学研究科眼科学講座平田憲講師に深く感謝いたします。また、共同研究者であり、硝子体手術術式について多くの助言を頂いた米村尚子先生に深く感謝いたします。研究を遂行するにあたり、様々な御指導、御支援を頂いた熊本大学大学院医学研究科眼科学講座村田恭啓講師をはじめとする眼科学講座の皆さまに厚く感謝いたします。

最後に、私の勉強を精神的に支えてくれた妻カオリ、息子韻に感謝いたします。

4 略語一覽

ILM: internal limiting membrane (内境界膜)

5 研究の背景と目的

5-1) 硝子体の構造及び硝子体手術

硝子体手術は眼球の体積のほぼ4/5を占める硝子体を対象にした手術である。ヒト硝子体は重量にして96～99%が水であり、そのほかは硝子体線維、ヒアルロン酸などのプロテオグリカン、硝子体線維以外の微量蛋白および少数の硝子体細胞からなるゲル状の構造物である。ヒトの硝子体線維はⅡ型コラーゲンに分類され、分子間架橋線維により立体的なネットワークを構築している。硝子体のもう一つの主な成分であるヒアルロン酸はコイル状構造となり、コラーゲンネットワークの間隙や、コラーゲンそのものに巻き付いて存在すると考えられている。この両者の分子の間隙に多量の水分子が取り込まれることでゲル構造を維持している(1)。

硝子体は眼球前方では水晶体後面と、後方では網膜表面と接している。硝子体と網膜の間には一定の接着があり、網膜硝子体界面を形成している。網膜の最内層(硝子体側)は、網膜内グリア細胞としてのMüller細胞の基底膜である内境界膜(以下ILM)である。他の組織に存在する基底膜と同様に、ILMは主にⅣ型コラーゲンより成っている。硝子体ゲルはフィブロネクチン、ラミニンなどのグリコサミノグリカンを介してILMのコラーゲンと結合している。胎生期には網膜全体で強い接着が見られ、後極側では年齢とともに弱くなっていく。しかし成人でも鋸状縁周辺での接着は強く残り、硝子体基底部と呼ばれている。

ヒトではⅡ型コラーゲン、ヒアルロン酸ともに20歳代以降には眼内での産生が見られなくなる。そして50歳代以降になるとそれらの量は徐々に減少していく。コラーゲンネットワーク、ヒアルロン酸の消失に伴い液化腔が生じ、さらに進行するとゲル構造が虚脱、収縮して、硝子体が眼球後半部の網膜から分離する。これを後部硝子体剥離と呼ぶ。

硝子体やそれに接する網膜に発症する疾患は原発性、続発性に関わらず非常に多く、その多くが硝子体手術の適応となっている。硝子体手術の基本的操作は硝子体を切除、吸引

することであるが、その対象疾患が多様であるため、手術の目的や意義も様々である。硝子体出血や硝子体混濁を除去するだけの単純硝子体切除から、網膜硝子体界面に発生した増殖膜の除去や、炎症の場としての硝子体ゲルを除去することで疾病の治癒を図るというものまである。このような目的に応じて様々な手技が組み合わさっていて、眼科的治療における視力予後改善のための大きな選択枝となっている。

5-2) 硝子体手術と術後合併症

現在、硝子体手術は小さな術創から行うことが出来るようになり、以前に比べ術後合併症の起きる頻度は低くなったといえる。しかし複雑で微細な手技を必要とする術式であり、様々な術後合併症が見られる。

頻度の高い術後合併症として、網膜裂孔、網膜剥離がある。前述の如く硝子体基底部分において硝子体と網膜の接着は強く、手術操作によって硝子体を牽引することで、網膜に裂孔を形成するためである。術後は硝子体ゲルによるタンポナーデがなくなるために、術中に形成された網膜裂孔から大きな網膜剥離を起こしやすくなる(2)。

同じく頻度の高い術後合併症は、水晶体の核硬化の進行（核白内障）である。Ogura らは硝子体手術後の水晶体変化に対してプロスペクティブに検討した結果、核白内障の進行は術後経過が長くなるほど、高齢者であるほど頻度が高くなっていたと報告した(3)。このため Kotecha らのように高齢者に対して硝子体手術と同時に水晶体乳化吸引と眼内レンズの移植を行う施設が多い(4)。

黄斑の網膜色素上皮の変性が術後合併症としてみられることもある。この変性は不可逆的で治療法もないため、視力がほとんど改善せず、予後として深刻である。原因としては長時間の眼内照明による光障害(5)、黄斑部における手術操作として網膜下液の吸引をおこなった時の機械的障害(6)などが考えられている。

その他にも網膜血管閉塞(7)、黄斑上膜(8)、眼内炎(9)などの合併症が頻度は少ないながらも報告されている。

5-3) 硝子体手術後合併症としての周辺視野欠損

新たな硝子体手術後の合併症として、1995年にMelbergらが特発性黄斑円孔および網膜下新生血管に対する手術後に周辺視野欠損が見られたことを初めて報告した(10)。その後同様に、硝子体手術後に周辺視野欠損が生じたとする報告が相次いだ(11-21)。視野欠損は特発性黄斑円孔に対する手術後に耳側に現れるという報告がほとんどで、経過観察中に治癒または悪化拡大することのないものであった。

硝子体手術が適応となる疾患は特発性黄斑円孔以外にも、硝子体出血、増殖糖尿病網膜症、増殖硝子体網膜症、外傷、眼内異物、巨大裂孔を伴う網膜剥離、黄斑上膜、網膜下出血、網膜静脈閉塞症による黄斑浮腫などさまざまである。これらの疾患のほとんどに対して、特発性黄斑円孔に対してよりも以前から硝子体手術が行われてきた。しかし、ほぼ同じ術式であるにも関わらず、以前は術後合併症としての周辺視野欠損は全く報告がなかった。その大きな理由としては、黄斑円孔を除くいずれの疾患も高い割合で網膜や脈絡膜に広範囲の障害を認め、視野の正確な評価ができなかったからであると考えられる。しかし特発性黄斑円孔は合併症がない限り、中心窩の円孔以外には網脈絡膜に障害はない。そのため、術前に認められなかった周辺視野欠損が術後に現れることは、手術中の何らかの手法によってもたらされると考えられた。

これまでの様々な臨床報告の中で周辺視野欠損の原因についての仮説があげられてきた。Melbergらは、術中操作で網膜に触れることは全くなかったが、何らかの機械的障害が視神経乳頭に対しておよんでいる可能性がある」と指摘した(10)。Huttonらは視野欠損を生じた症例に神経線維層が障害されているものがあり、人工的後部硝子体剥離作製時の視神経乳頭上での操作が原因である可能性がある」と報告した(16)。Kerrisonらは視神経乳頭の蒼白化を認めたことより、その原因として眼圧上昇による虚血、球後麻酔による視神経に対する障害、視神経に対する直接的機械的な障害、視神経乳頭近傍での強い吸引による傍乳頭軸索や血管の断裂などが考えられるとした(11)。初期に臨床例が報告された頃は、特発

性黄斑円孔に対する硝子体手術だけに用いられる特殊な手術手技によって視神経乳頭への何らかの障害が起こることが原因であるという考えが大半を占めていた。

1996年に Boldt らが臨床例を報告した際には、視野欠損が生じる機序として様々な仮説を列記していた。人工的後部硝子体剥離作製時の機械的外傷、ガスによる機械的圧迫、ガスタンボナーデの毒性、液空気置換時の器械操作による外傷、後毛様動脈の閉塞、眼圧上昇による緑内障性障害、網膜光障害である(14)。しかしいずれの仮説も推測によるものであり、単一の機序で臨床症状を明確に説明できるものはないとしていた。また1997年には Malinowski らが、術後視野欠損を生じた一例に網膜動脈分枝閉塞症が併発していたと報告した(22)が、その発症機序は不明であった。

1998年に Ishigooka らは網膜剥離に対する硝子体術後にも、剥離部位とは無関係の位置に視野欠損が現れた症例を報告した(23)。これらの症例はいずれも液空気置換を併用していたことが今までの報告と同じであった。液空気置換とは、剥離した網膜を気体の浮力を利用して圧迫、復位させるために用いられるごく一般的な手技である。そのため術後視野欠損は対象疾患の違いに関わらず、液空気置換を伴う硝子体手術に起こりうると考えられるようになった。また液空気置換時の器械操作が注目されたが、これが原因であるとはっきり裏付ける所見は報告されなかった。

5-4) 硝子体術後視野欠損と眼内空気灌流

1997年 Welch(24)、1999年 Takenaka ら(25)によって、眼内灌流用のインフュージョンカニューラの取り付け位置を変えると術後視野欠損の位置も変わるという報告がなされた。通常は術野確保の都合上、左右眼のどちらにおいてもインフュージョンカニューラは常に耳側にくるように設置されるのが一般的であった。また、それまで報告されてきた術後視野欠損の位置はほぼ耳側に限られていた。この位置は網膜上では鼻側に当たるため、鼻側網膜～鼻側視神経乳頭上における術中の何らかの障害が原因としてもっとも有力視されてきていた。しかしこれらの報告では意図的にインフュージョンカニューラを鼻側

～鼻下側に設置したところ、視野欠損はいずれも今までの報告と反対の位置になる鼻側～鼻下側にかけて生じていた。また Takenaka らは術後しばらく経過してから耳上側網膜に変性病巣を認めたと報告した(25)。これらの結果より、灌流ポートからの灌流液あるいは灌流空気が網膜に何らかの影響を及ぼし、術後視野欠損の原因となっていることが示唆された。

灌流空気による障害としては、温度変化、網膜表面の乾燥、圧や流量などによる機械的障害があげられ、灌流液による障害としては同様に温度変化、圧や流量などによる機械的障害があげられる。術後視野欠損をみとめた症例は前述の如くいずれも液空気置換を行っていたため、特に灌流空気に注目が集まった。

網膜の温度変化であるが、灌流液を低温にして使用することによって網膜の活動性を抑制し(26)、術中の虚血に対する障害や術後炎症を軽減することが可能であるという考えがある(27)。特に、家兎眼を用いた実験によって、低温の灌流液を使用することで虚血に対する網膜障害を軽減させたという報告があった(28)。同じことが灌流空気にも当てはめて考えることができ、室温で維持されている灌流空気による網膜の温度変化は、網膜に障害を及ぼすものではないと考えられた。

Welch は灌流空気による網膜表面の乾燥が原因であると推測し(24)、Ohji らはその仮説に基づき灌流空気の加湿の有無による術後視野欠損の発生を比較したところ、灌流空気を加湿した症例では視野欠損を生じなかったと報告した(29)。しかし Hirata らは臨床例において Ohji らが示した方法を用いて同様に灌流空気を加湿していたにもかかわらず視野欠損の発生が認められたことを報告した(30)。すべての手術症例において灌流空気は加湿されていたため、加湿によって術後視野欠損の発生頻度を抑制するかどうかは不明だったが、網膜表面の乾燥だけが術後視野欠損の原因ではないことが明らかとなった。

Hirata らはさらに灌流空気圧に着目し、従来からの 50mmHg の灌流空気圧の症例と新たに 30mmHg の灌流空気圧に設定した症例を比較検討したところ、より低い灌流空気圧によって術後視野欠損の発生が有意に抑えられることを明らかにした(30)。灌流空気を同じように加湿していながら術後視野欠損の発生率が灌流空気圧に依存していることから、

灌流空気の湿度よりも物理的な力が術後視野欠損の成因に重要な関係があると推測することが出来る。

5-5) 本研究の目的

硝子体手術後の視野欠損は、①発生が手術対象である疾患に無関係であること、②液空気置換を併用したときにのみ見られること、③灌流ポートの位置を変えることで位置が変わること、④灌流空気の加湿だけでは発生を抑えることができないこと、⑤発生率が灌流空気圧に依存していることから、灌流空気の物理的外力が直接作用して網膜に何らかの組織学的障害が発生することで起こるのではないかと考えた。さらに灌流空気圧を下げた外力を抑制することで網膜のダメージを軽減し、臨床的にもこの合併症の発生を予防することが可能であると考えた。これを実験的に明らかにするために、家兎眼に対して液空気置換を伴う硝子体手術をおこない、眼組織の形態学的変化について灌流空気圧との関係も含め、走査電子顕微鏡及び光学顕微鏡を用いて組織学的に検討した。

6 実験方法

6-1) 動物

12週齢の日本白色家兎（体重2.0～2.5kg）（九動、熊本）18羽18眼を使用した。いずれも倒像鏡眼底検査を行い、眼底異常の無いことを確認した。実験動物は、「熊本大学動物実験指針」、「動物の保護及び保管に関する法律」（法律第105号）、「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、「動物の処分方法に関する指針」（総理府告示）の各規制に従って取り扱われた。

6-2) 手術手技

家兎の片眼に0.5%トロピカミド、0.5%フェニレフリン混合溶液（ミドリンP[®]；参天製薬、大阪）を点眼して散瞳させた。続いて耳静脈よりヘントバルピタール（20mg/kg、ネンブタール[®]；大日本製薬、大阪）を静注し、下肢大腿部に塩酸ケタミン（20mg/kg、ケタラール50[®]；三共製薬、東京）を筋注して全身麻酔をかけた。局所麻酔として2%塩酸リドカイン（キシロカイン[®]；アストラゼネカ、大阪）を数回点眼および外眼角への皮下注射をおこない、眼角切開を加えた。翼膜を切除し、開瞼器を装着、上耳側結膜を約180度にあわせて角膜輪部より切開した。上直筋も付着部より切断した。次に鼻側（右眼：3時、左眼：9時）方向の、角膜輪部より3mmの位置に強膜刀にて眼球の中心に向けて穿刺し強膜ポートを作成した。強膜刀の先端が水晶体に触れず、硝子体腔内にあることを確認して強膜刀を抜き、インフュージョンカニューラ（20ゲージ、内径0.6mm、4mm長）を挿入して縫着した。インフュージョンカニューラには延長チューブおよび輸液用チューブを介して眼内灌流液（オベガードMA[®]；千寿製薬、大阪）を接続した。灌流液面の高さが家兎眼より60cmの高さ（水銀柱換算：44mmHg）になるよう調節して、眼内に一定の圧力が加わるようにした。その後同様に10時と2時の方向に2カ所の

強膜ポートを作成し、硝子体カッターと眼内照明用プローブの挿入口とした（図1A）。硝子体手術装置（Ocutome[®] 8000；CooperVision Systems、Irvine、CA）に接続した硝子体カッターを用いて、手術用顕微鏡下に水晶体嚢を含む水晶体切除（図1B）、硝子体ゲルの切除（中心部硝子体切除）（図1C）、および後部硝子体膜の剥離除去（人工的後部硝子体剥離；PVD）（図1D）を行った。

引き続き行われた操作によって、実験眼を以下の3群に分けた。すなわち、まず12眼は、硝子体カッターを先端にシリコンチューブの付いたブラシバックフラッシュニードルに替えて、自動眼内空気灌流装置（PS-100；Takata CooperVision、東京）からインフュージョンカニューラを介して眼内に空気を送り、液空気置換を行った（図1E）。自動眼内空気灌流装置とインフュージョンカニューラの間眼内灌流液を置き、灌流空気を液体内に一度通すことで加湿した。

その時に、空気灌流装置の圧設定を25mmHgにしたものをA群とし、同じく40mmHgにしたものをB群としてそれぞれ6眼ずつ割り当てて液空気置換をおこなった。その後、ブラシバックフラッシュニードルを抜いた（硝子体カッター挿入用のポートを開放した）状態でそれぞれの灌流圧で30秒間空気灌流を行い（図1F）、直ちに強膜プラグで栓をした。残った6眼は対照群として液空気置換、空気灌流を行わずに次の手順に進んだ。

10時と2時のポートを縫合、閉鎖し、漏れのないことを確認した。静脈より致死量のペントバルビタールを注射して安楽死させたあと、直ちに眼球を摘出した。眼球摘出後、2.5%グルタルアルデヒドと2%パラフォルムアルデヒドの混合固定液（0.1Mリン酸塩緩衝液、pH7.4）を灌流ポートより硝子体腔内に10分間注入して、内腔を固定した。続いて角膜輪部より3mmの位置で強膜を円周に切開し、角膜、虹彩毛様体を除去した後眼部のみの半球体標本として、再び同固定液にて1時間浸析した。

各グループ6眼ずつのうち、2眼ずつは光学顕微鏡にて、残り4眼ずつは走査電子顕微鏡にて組織学的に検討した。

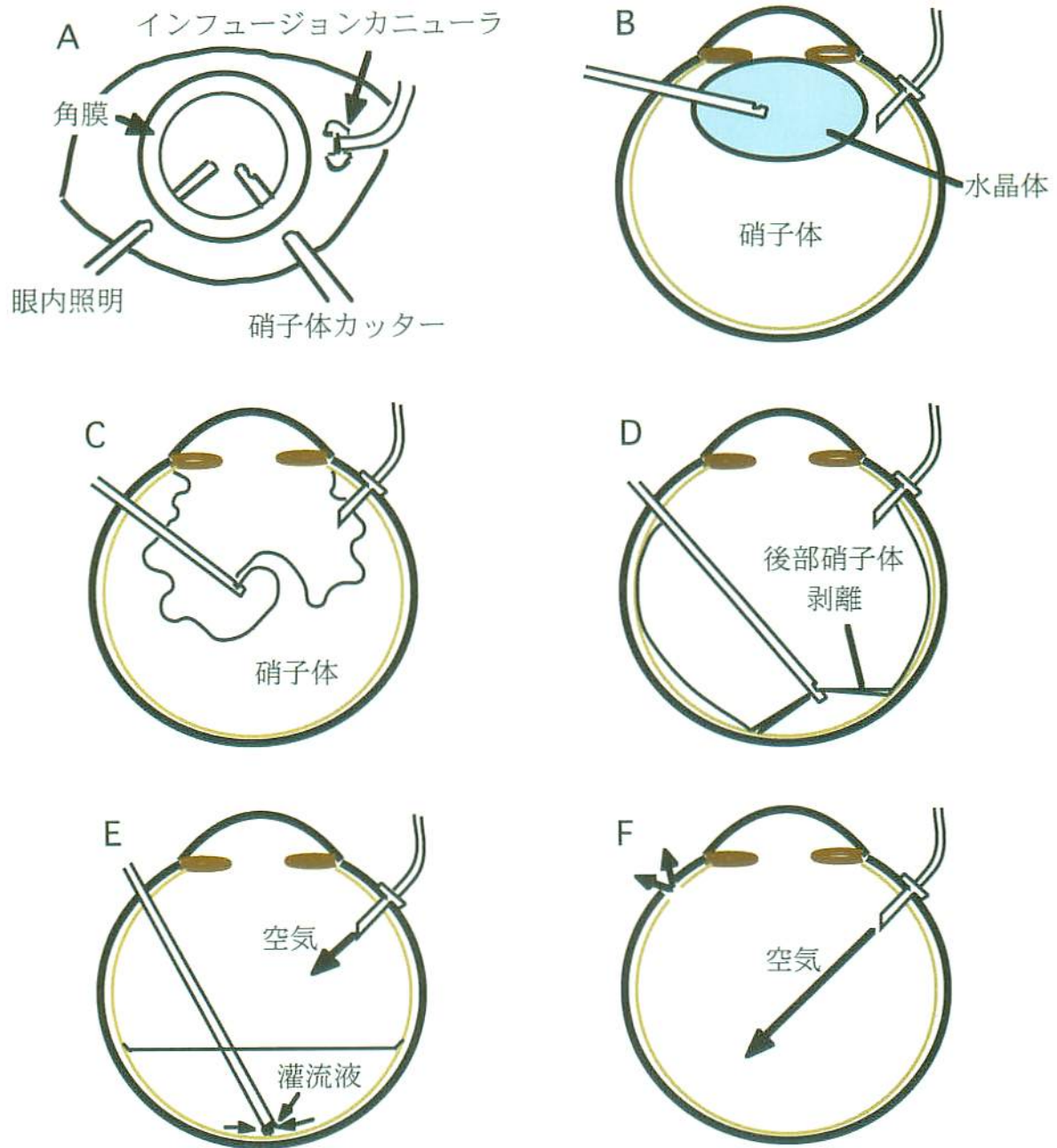


図1 硝子体手術の模式図

A：術者側から見た各ポートの位置関係（右眼）。B：硝子体カッターによる水晶体切除。C：硝子体カッターによる中心部硝子体切除、吸引。D：後部硝子体剥離。硝子体カッターにて網膜面上の硝子体を吸引、除去する。E：液空気置換。ブラシバックフラッシュニードルにて眼内灌流液を吸引して眼内を空気に置換する。F：片方のポート開放による眼内空気灌流。

6-3) 灌流空気量の測定

空気灌流をおこなった群において、自動眼内空気灌流装置からの空気の流れを流量計 (Floline SEF-21A、エステック、京都) を経由させて、硝子体カッター挿入用のポートを 30 秒間開放したときの灌流空気流量を測定し、平均±標準偏差(SD)を計算して比較検討した。

6-4) 走査電子顕微鏡用組織標本作製

試料を 30 分間蒸留水で洗浄した後、導電染色をおこなった。室温で一晩 2% タンニン酸 (和光、大阪) 溶液に浸したあと、蒸留水にて 20 分毎 6 回洗浄し、4℃ の 1% 四酸化オスミウム (TAAB, Aldermaston, England) 溶液にて後固定をおこなった。蒸留水で 3 回洗浄したあと、50%、70%、90%、95% の各濃度のエタノールにそれぞれ 10 分間 (95% エタノールは 2 回) 浸して組織を脱水し、最終的に 100% t-ブタノールに 10 分毎 3 回浸して組織内を完全に t-ブタノールで置換した。これを 5℃ 以下に急速凍結し、t-ブタノール凍結乾燥装置 (VFD-21S: 真空デバイス、茨城) にて t-ブタノールを昇華して観察用標本とした。これを円筒形のアルミニウム台の上に固定し、スパッターコーティングをおこなった。走査電子顕微鏡 (JSM 6400FK: JEOL、東京) を用いて、電子加速電圧を 15~20 kV として、網膜表面を観察した。

6-5) 光学顕微鏡用組織標本作製

試料を 30 分間蒸留水で洗浄した後、70%、80%、95% の各濃度のエタノールにそれぞれ 2 時間、100% エタノールに 2 時間毎 3 回浸して組織を脱水、透徹した。次にキシレンに 1 時間毎 3 回浸して脱アルコールし、60℃ の溶解パラフィンに 2 時間毎 3 回浸した後、パラフィンブロックに包埋した。髄翼に対して垂直の方向になるよう、2 μ

mの厚さに薄切してスライドグラスに乗せた。キシレン10分毎3回、100%エタノール10秒毎3回にて脱パラ後、Mayerのヘマトキシリンおよびエオジン(H-E)で染色した。再び80%、90%、100%の各濃度のエタノールにそれぞれ10秒間(100%エタノールは2回)とキシレンに10秒毎2回浸して脱水し、油性封入剤(Entellan[®]neu; Merck, Darmstadt, Germany)で封入後、光学顕微鏡にて観察した。

6-6) 形態的变化の測定

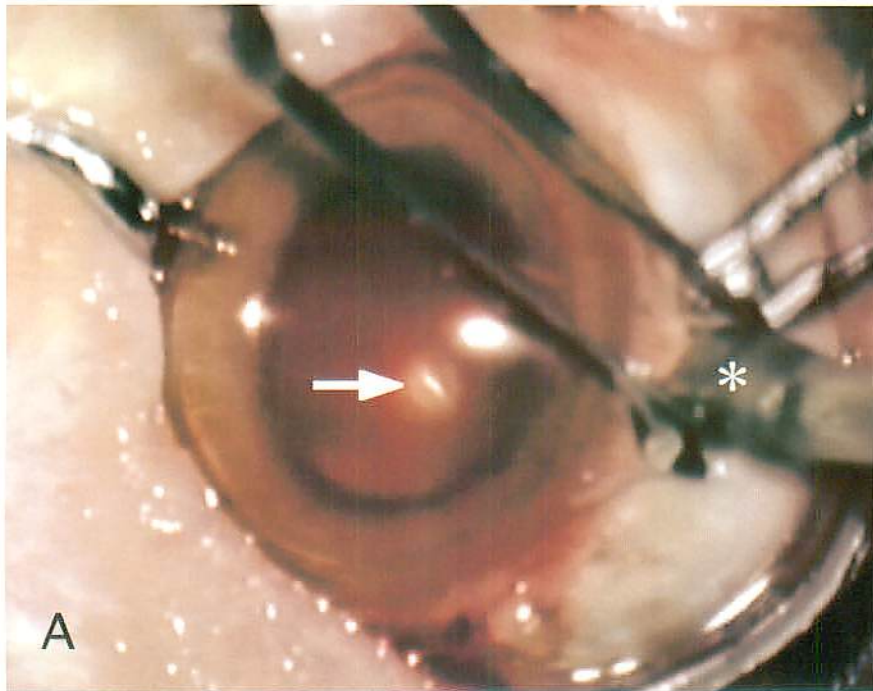
走査電子顕微鏡の観察によって得られた網膜表面の形態的变化を、50倍~100倍の拡大で写真撮影した。これらの写真をスキャナを経由してコンピュータに取り込んだのち、形態測定解析ソフト(NIH image; National Institutes of Health, Bethesda, MD)を用いて変化部分の実寸面積を計算し、それぞれの形態学的変化について平均±SDを算出した。また、それぞれの変化において条件の違いによる面積の差があるかを有意水準5%で検定し(Kruskal-Wallis検定)、有意差があったものについては対比較をおこない(Scheffe検定)、各群間で面積の平均値に差があるか同じく有意水準5%で検定した。

7 実験結果

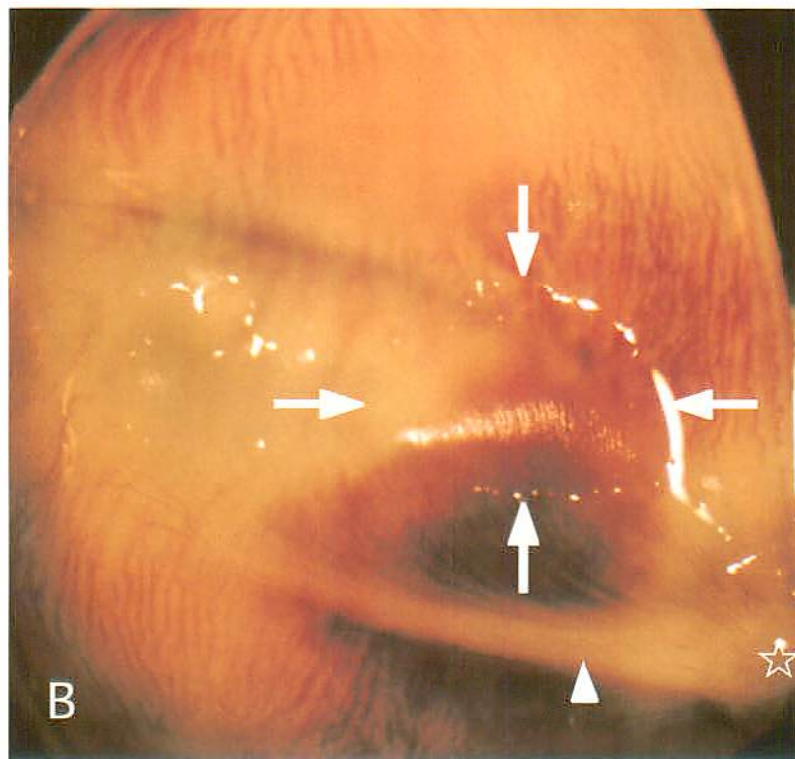
7-1) 肉眼所見

対照群については、いずれも手術中を通して網膜表面は平滑であり、異常所見は現れなかった。また眼球を摘出し角膜、虹彩を除去した後に肉眼的に網膜表面を観察したが、色調や形に異常は認められなかった。

一方、液空気置換、空気灌流を行った群では、空気灌流中に灌流ポートの対側に当たる領域の網膜表面がさざ波状に乱れ、さらに楕円形に白濁する所見を認めるものもあった(図2A)。眼球摘出後には、同部位を含む網膜が剥離していた。しかし、その原因となるような明らかな網膜裂孔は認められなかった(図2B)。



A



B

図2 空気灌流を行った眼の術中、術後における網膜表面の肉眼所見
 A：手術操作中のVTR記録。空気灌流中に、インフュージョンカニューラ（*）から対側にあたる網膜表面が楕円形に白濁する所見（矢印）をみとめた。B：眼球摘出後の固定標本。半球体の標本をさらに視神経乳頭（☆）を通り、髄翼（矢頭）に垂直となる経線で半割している。灌流ポートの対側にあたる網膜表面に裂孔のない網膜剥離（矢印）を認めた。

7-2) 走査電子顕微鏡による所見

対照群では、肉眼所見と同様に、網膜表面は平滑で、裂孔や隆起などの所見は見あたらなかった(図3A)。強拡大では、網膜神経線維の走向に一致して、ILM 表面にほぼ並行して走る細い溝状構造物があることがわかった(図3B)。有髄神経によって構成される髄翼上には強固に絡み合う硝子体線維を認めたが(図3A)、その他の領域では硝子体線維はなく、人工的後部硝子体剥離が完全であることが認められた。

A 群(灌流空気が2.5 mmHg の群)では、灌流ポートの対側に当たる領域(肉眼所見で異常を認めた領域と同じ部位)に、部分的に ILM 表面がわずかに乱れた所見を認めた。またいくつかの眼では同心円状に ILM が波打っている所見も見られた。これらの部分では対照群で見られた細い溝状構造物が消失しており、ILM のわずかな剥離であると考えられた(図4)。

さらに B 群(灌流空気が1.0 mmHg の群)では、ILM の乱れは顕著になり、斑状の紋理として認められた。この障害部位の中心では、ILM が剥離して Müller 細胞の足突起が露出していた。4眼中3眼ではさらに Müller 細胞の足突起も消失して網膜神経線維が露出しており、網膜のより深い部位への障害が示唆された(図5)。いずれの障害も灌流ポートの対側に当たる領域でのみ認められ、そのほかの部位の網膜表面は平滑であった。

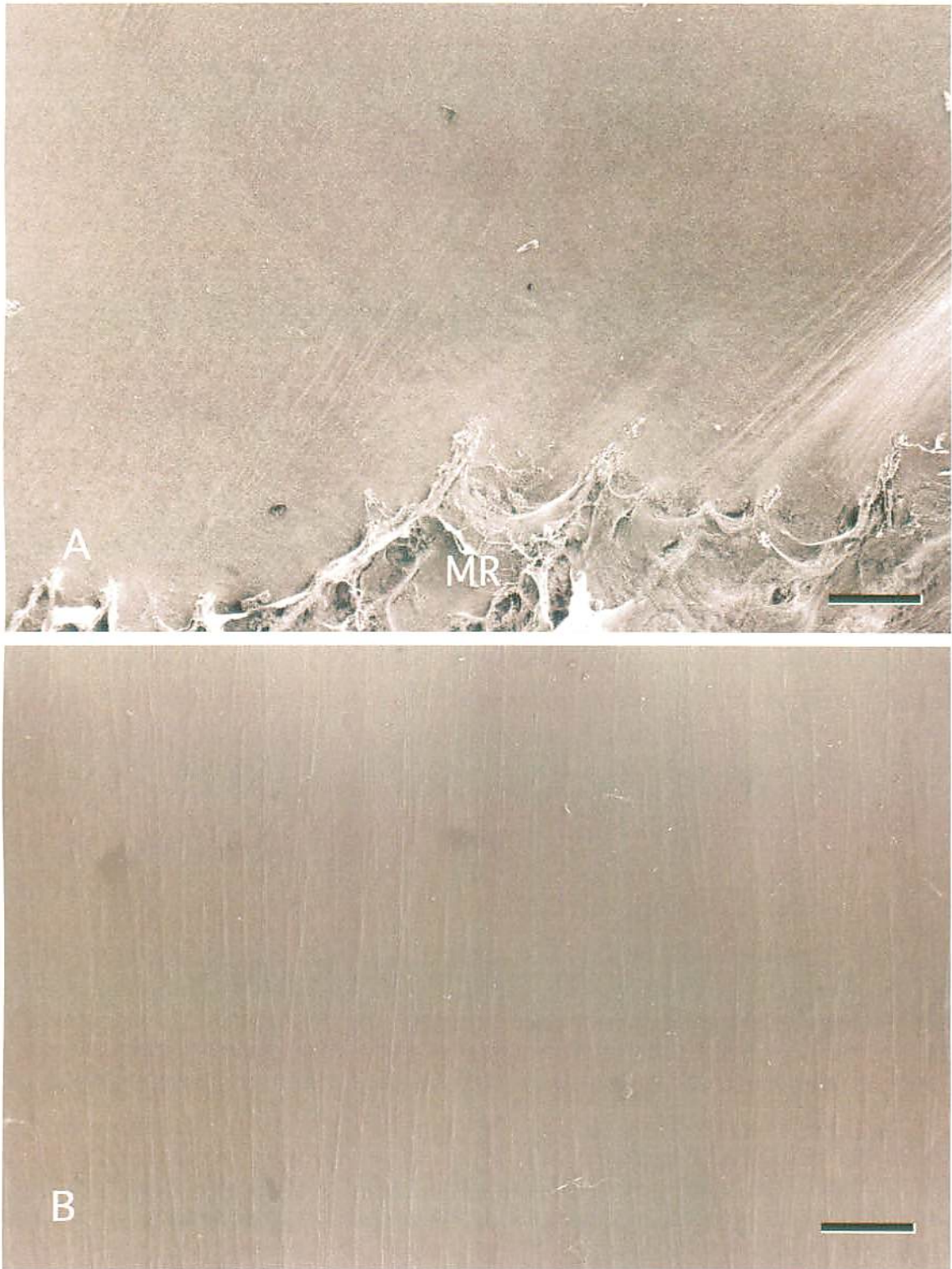


図3 硝子体手術後の家兎眼網膜表面の走査電子顕微鏡写真
(対照群)

A：後極の髄翼付近の網膜。表面は平滑であり、髄翼(MR)より拡がる細い溝状構造を認めた。B：周辺部の網膜。同様に溝状構造が見られ、その間隔は拡大していた。
バー：100 μ m

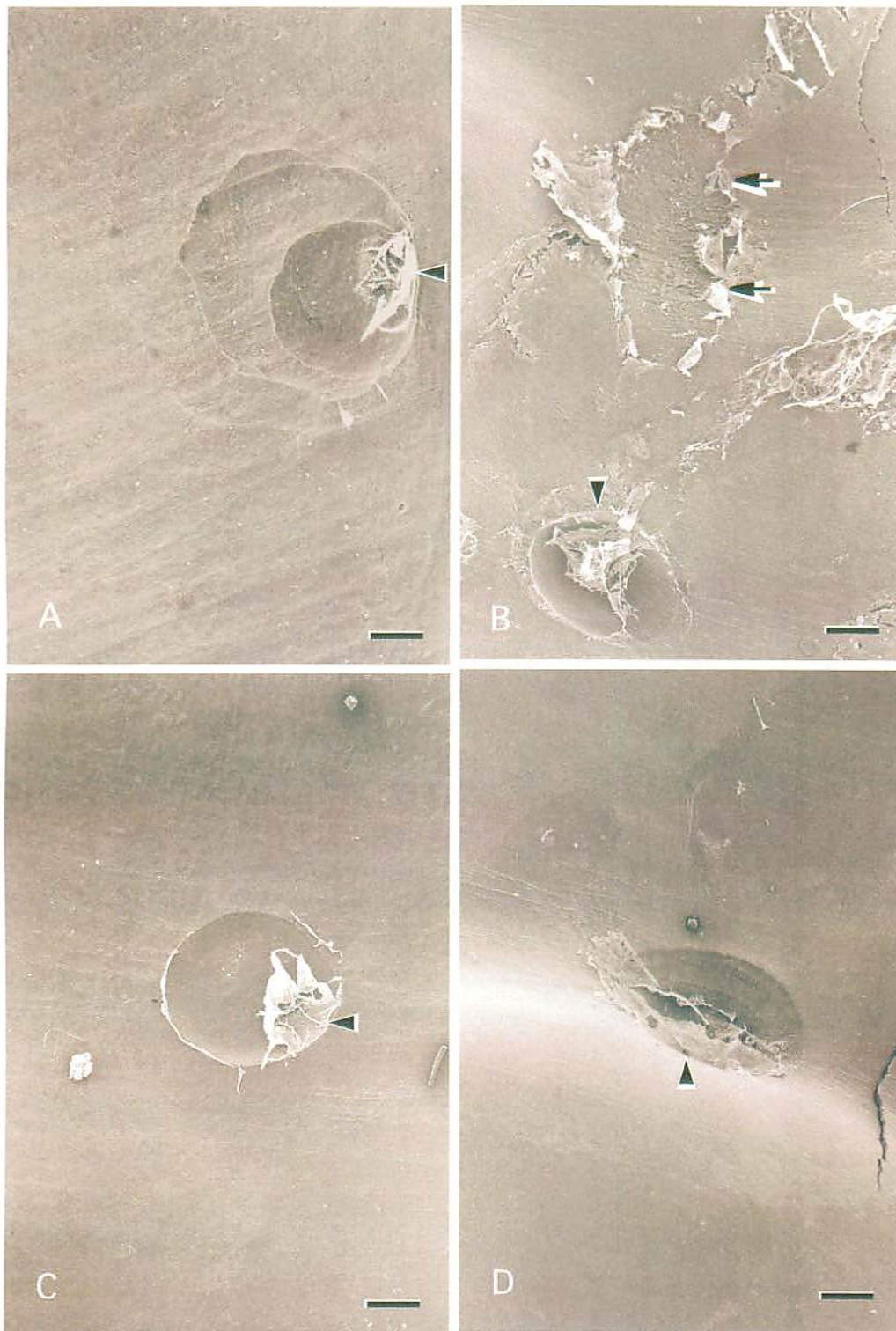


図4 硝子体手術後の家兎眼網膜表面の走査電子顕微鏡写真
(灌流空気圧25mmHgの群)

A : 同心円状のILMの不整を認めた。中心部は円形にILMが剥離していた (矢頭)。
 B : ILMが剥離し、Müller細胞の足突起が露出していた (矢印)。類円形のILM不整もあり、内部に剥離したILMが見られた (矢頭)。
 C : 同様な円形のILM不整。一部のILMが剥離していた (矢頭)。
 D : 楕円形に広がるILM不整を認め、ILM剥離も見られた (矢頭)。

バー : 100 μ m

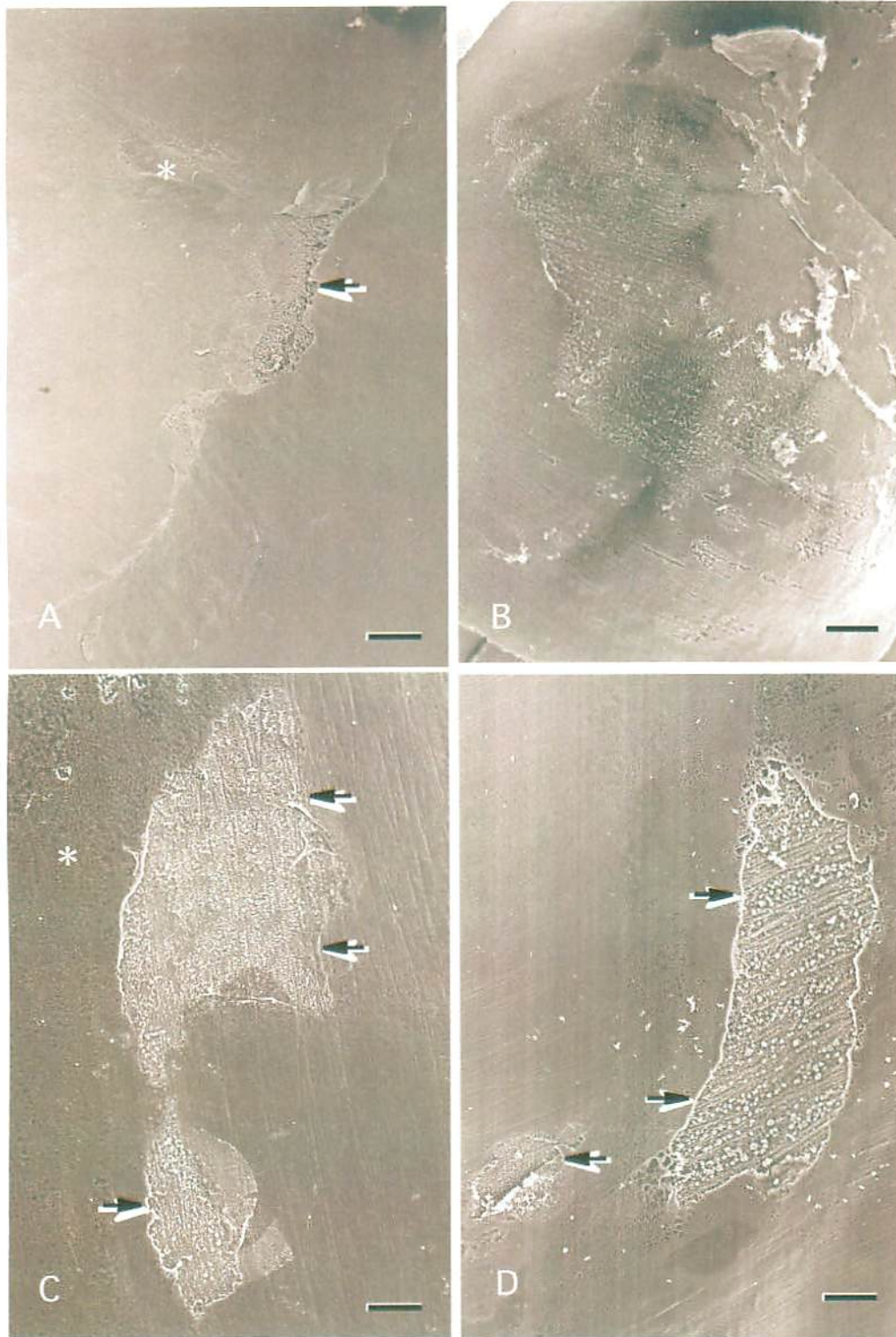


図5 硝子体手術後の家兎眼網膜表面の走査電子顕微鏡写真
(灌流空気圧40mmHgの群)

A : ILM不整 (*), ILM剥離 (矢印) を認めた。B : 大きなILM剥離があり、Müller細胞の足突起が露出していた。C : 広範囲にILM不整があり (*), その一部のILMが大きく剥離してMüller細胞の足突起や網膜神経線維が露出していた (矢印)。D : ILMが完全に剥離し (矢印)、網膜神経線維の走行をはっきりと見ることができた。
バー : 100 μ m

7-3) 網膜表面における障害の面積比較

定量的比較のために走査電子顕微鏡で認めた所見を、①ILMの不整(図6A)、②ILM剥離(Müller細胞足突起の露出)(図6B)、③神経線維層の露出(図6C)に分け、それぞれ計測した(図7)。各群4眼ずつにおいてこの3種類の障害の面積を測定したところ表1のような結果が得られた。

対照群ではいずれの障害も認められなかったため、すべて0mm²となった。A群(灌流空気圧が25mmHgの群)では、平均0.45mm²のILMの不整、平均0.05mm²のILM剥離をみとめた。神経線維層の露出は認めなかった。B群(灌流空気圧が40mmHgの群)では、平均1.91mm²のILMの不整、平均0.67mm²のILM剥離、平均0.23mm²の神経線維層の露出をみとめた。3種類全ての障害において、3群間での統計学的な有意差を認めた(p=0.006、p=0.009、p=0.028; Kruskal-Wallis検定)。さらに、B群でのILMの不整、ILM剥離の面積は、それぞれ対照群(p=0.002、p=0.003)、A群(p=0.015、p=0.004)のものよりも統計学的に有意に広いことが認められた(それぞれScheffe検定)(図8)。

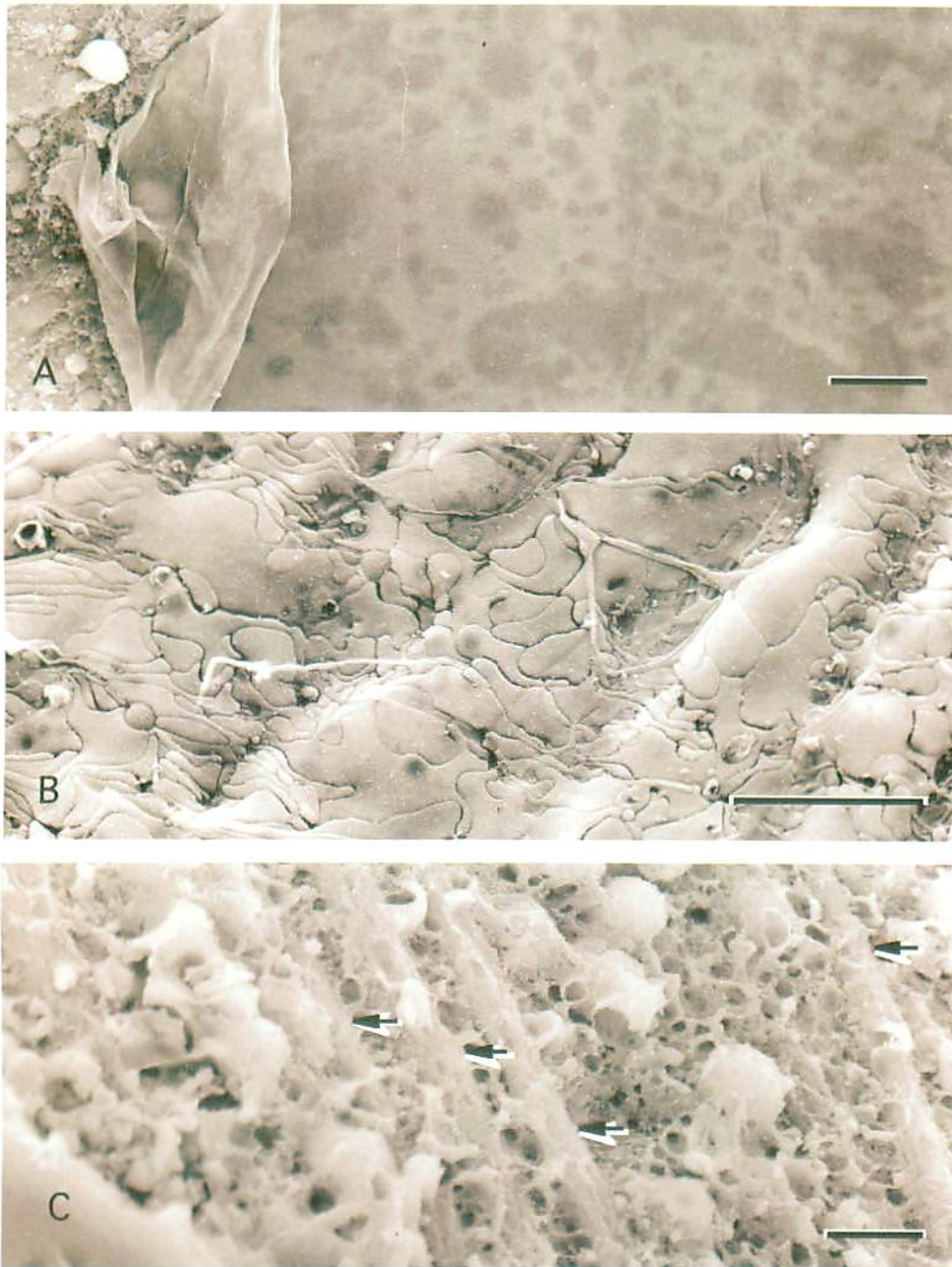


図6 網膜内層に見られた障害の分類

A：右側の暗色の大小斑点や細い溝状構造の消失といったILMの不整。

B：ILMの剥離によるMüller細胞足突起の露出。

C：網膜神経線維（矢印）の露出。

バー：10 μ m

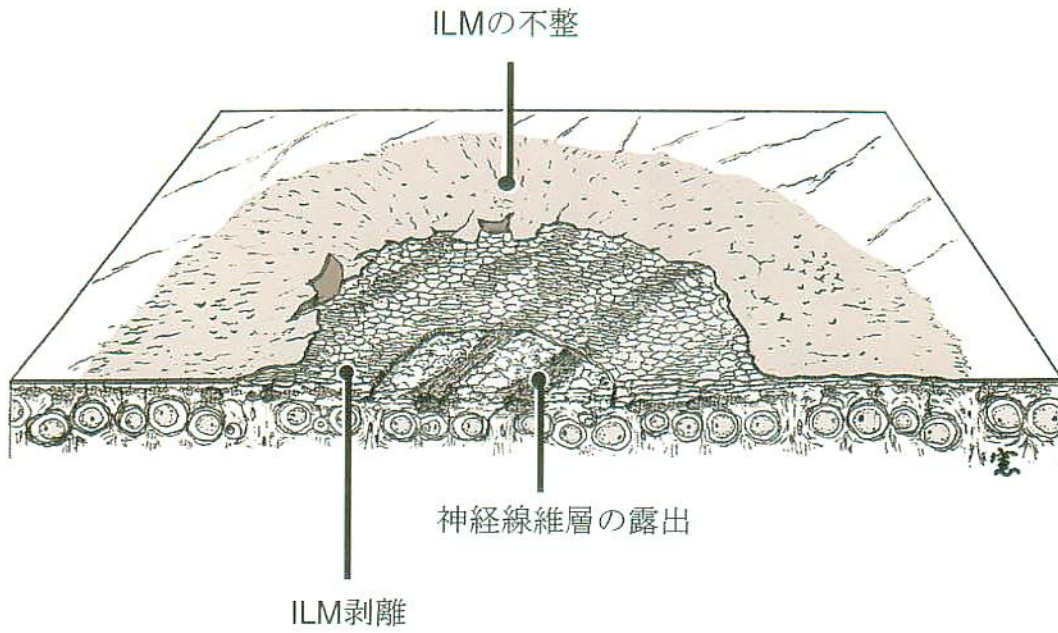


図7 空気灌流によって起きた網膜内層の障害の模式図
網膜表面からILMの不整、ILM剥離、神経線維層の露出（それぞれ図6のA、
B、Cに相当）の順に、より深層へ達する障害が起きたと考えられる。

灌流空気圧		ILMの不整	ILM剥離	神経線維層の露出
空気灌流 (-) (対照群)	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	0
	mean ±SD	0 ±0	0 ±0	0 ±0
25mmHg (A群)	1	0.70	0	0
	2	0.48	0.18	0
	3	0.11	0	0
	4	0.51	0	0
	mean ±SD	0.45 ±0.25	0.05 ±0.09	0 ±0
40mmHg (B群)	1	1.43	0.74	0.40
	2	1.82	1.07	0.09
	3	3.13	0.54	0.54
	4	1.24	0.32	0
	mean ±SD	1.91 ±0.85	0.67 ±0.32	0.26 ±0.25

表1 各標本眼にみられた網膜障害の面積及び平均値 (単位: mm²)

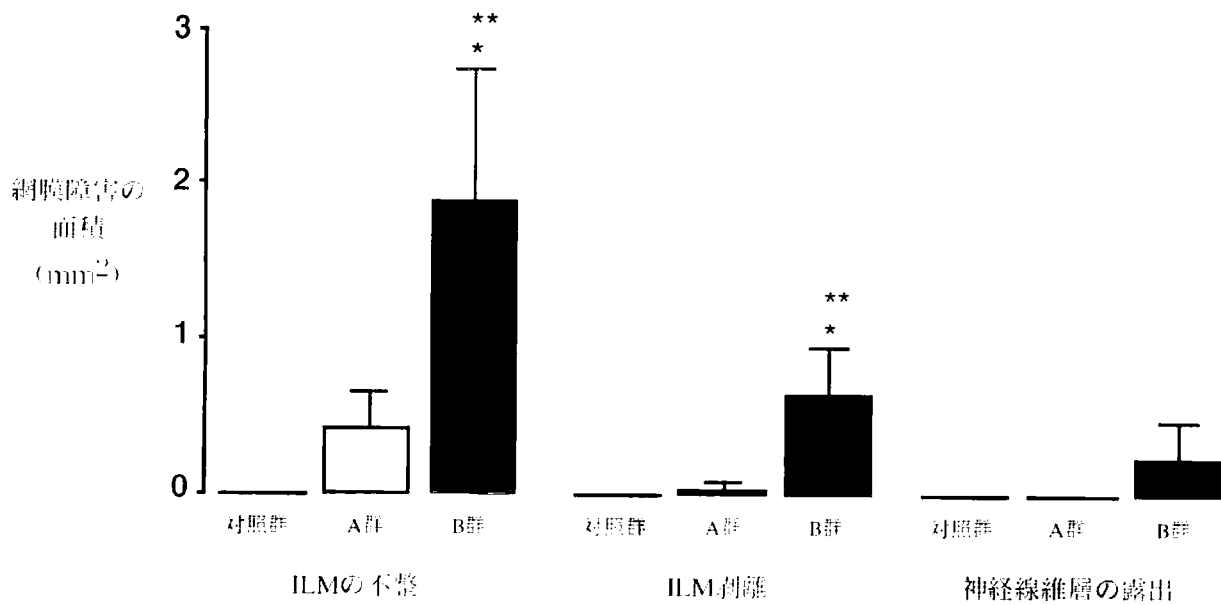


図4 網膜内層における各障害別面積の比較
 値は平均±SDである (n=4)。B群において、*は対照群との間に、
 **はA群との間にそれぞれ統計学的有意差をみとめた (p<0.05)。

7-4) 光学顕微鏡による所見

対照群では全領域において、網膜剥離をはじめとする異常所見は全く認められず、網膜の層構造の乱れはなかった (図9A)。

空気灌流をおこなった群では、走査電子顕微鏡で異常がみられた領域 (灌流ポートの対側に当たる領域) に一致して光学顕微鏡でも異常所見を認めた。全ての眼において広範囲の網膜剥離があり、いくつかの色素顆粒を伴った網膜色素上皮細胞の一部が分離して視細胞外節側に付着していた (図9B、C)。A群 (灌流空気圧が2.5 mmHgの群) では、剥離網膜の一部に内網状層の膨化、肥厚した部位があり、内顆粒層は空隙が目立った (図9B)。B群 (灌流空気圧が4.0 mmHgの群) では上記の所見に加え、ILMと神経線維層の一部が剥離している所見を認めた (図9C)。いずれの眼においても網膜剥離の無い領域では網膜の層構造は良く保たれており、組織や細胞の脱落や肥厚などは認めなかった。

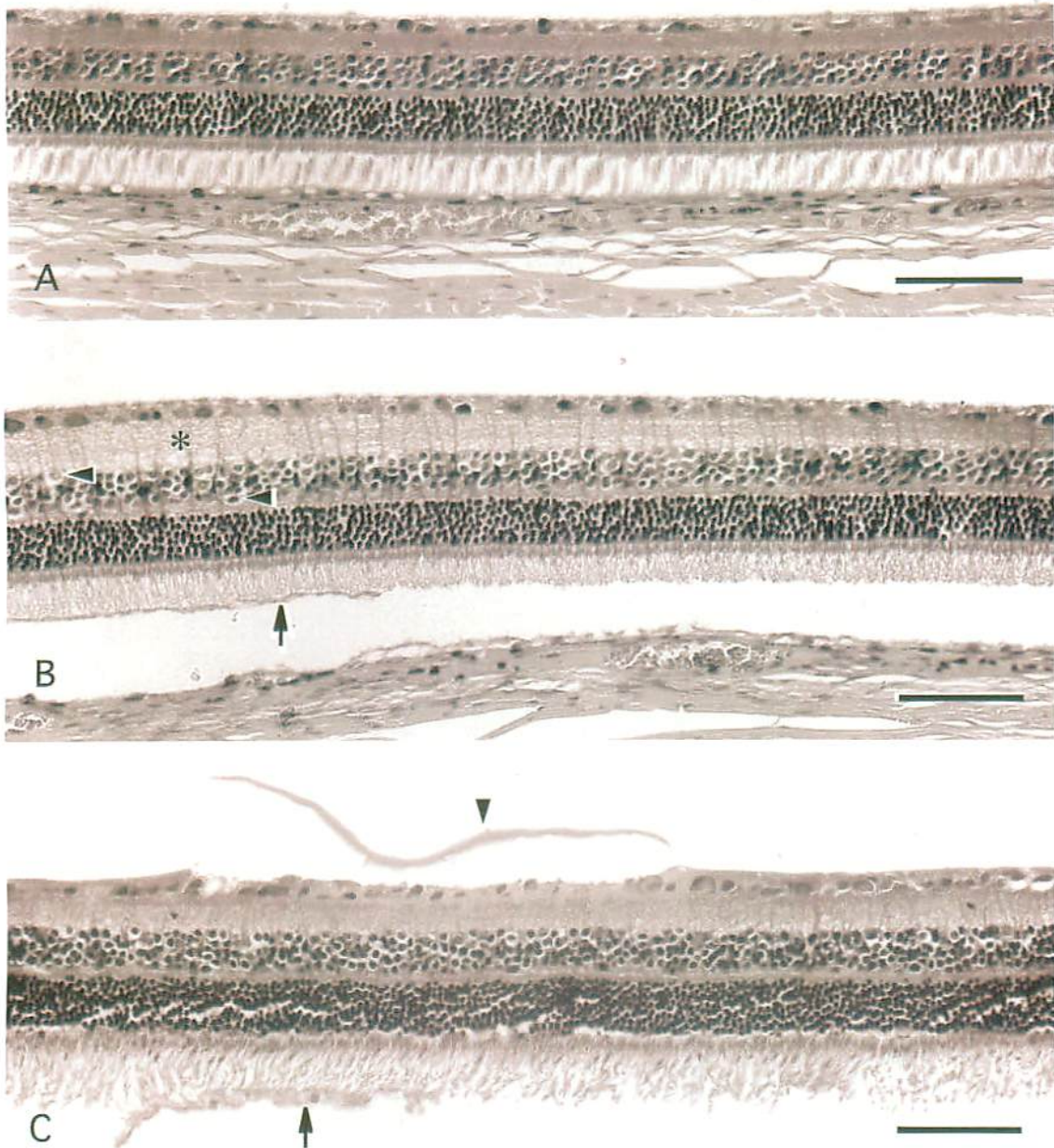


図9 家兔眼網脈絡膜組織切片の光学顕微鏡写真
(ヘマトキシリン・エオジン染色)

A：対照群の眼では網膜全層の配列構造に乱れはなく、組織学的な異常所見を認めない。B：A群の眼の網膜は脈絡膜より剥離していた。さらにその一部領域では、膨化、肥厚した内網状層（*）、空隙が目立ち配列の乱れた内顆粒層（矢頭）を認めた。また色素顆粒を伴った網膜色素上皮細胞が剥離し、視細胞外節側に付着していた（矢印）。C：B群の眼の網膜には、ILMから神経線維層にかけての剥離（矢頭）を認めた。またA群と同様に、剥離した視細胞外節に色素顆粒を伴った網膜色素上皮細胞が一部付着していた（矢印）。

バー：50 μ m

7-5) 灌流空気量の測定

硝子体カッター挿入用のホートを30秒間開放したときの灌流空気流量は、A群（灌流空気圧が25 mmHgの群）では瞬時流量にして 200 ± 7 ml/min、B群（灌流空気圧40 mmHg）では 338 ± 6 ml/min であり、2群間の平均流量には統計学的な有意差が認められた（ $p < 0.0001$: t 検定）。これを元にインフュージョンカニューラ開口部直後での流速 v (m/sec) を求めた。瞬時流量を V (ml/min)、インフュージョンカニューラ内径を R (=0.6mm) とすると、

$$v = V / \pi (R/2)^2$$

で求めることができ、その結果、灌流空気圧が25 mmHgの時には $v_1 = 11.8$ m/sec、灌流空気圧が40 mmHgの時には $v_2 = 19.9$ m/sec となり、その比は $v_2 / v_1 = 1.69$ であった。

8 考察

8-1) 液空気置換、空気灌流と網膜障害

我々は今回の研究で、硝子体手術時の空気灌流により家兎眼の網膜に形態学的変化が起きることを明らかにできた。具体的には、走査電子顕微鏡では ILM の乱れ、ILM 剥離、Müller 細胞足突起や網膜神経線維束の露出、光学顕微鏡では ILM 剥離、内網状層の膨化、内顆粒層の空隙がみられた。これらはいずれも網膜内層における障害である。また、通常の網膜剥離は視細胞外節と網膜色素上皮細胞との間で起こるのに対し、今回見られた網膜剥離では光学顕微鏡にて一部の色素上皮細胞が視細胞外節に付着していることも明らかとなり、網膜外層における障害も認められた。さらに眼内を灌流液でのみ灌流し、空気灌流することのなかった対照群すべてでこれら網膜内層、外層における障害が認められなかったことで、通常使用の範囲内で灌流液による灌流では少なくとも網膜への組織学的な急性変化は起こさないと結論づけられた。またこれらの障害が、全ての眼において灌流ポートの対側に当たる領域にのみ認められ、それ以外の領域には全く生じなかったことより、灌流空気が障害の直接的原因であり、その他の因子は除外できると考えた。

8-2) 灌流空気と網膜障害

網膜にこのような組織学的障害をおこすための灌流空気の要素としては、温度、湿度、圧や流量などの物理的外力が考えられる。Patel らは灌流空気によって起こる網膜障害には2つの機序が考えられるとした(31)。一つは網膜の乾燥であり、もう一つは空気の灌流による直接的な機械的障害である。

Welch は網膜の乾燥による障害が視野欠損を引き起こす可能性があるかと推測した(24)。また Ohji らは灌流空気を加湿することによって臨床的に視野欠損の発生を完全に押さえることが出来たと発表した(29)。今回の研究では Ohji らの臨床報告で示されたのと同様の

方法で空気を加湿して、すべての液空気置換、空気灌流の時に使用した。それにもかかわらず空気灌流によって網膜の全層にわたる組織学的障害が認められた。このことより、網膜表面の乾燥による障害は可能性として否定はできないが重要な因子ではなく、灌流空気を加湿するだけでは術後に認めた網膜障害の発生を予防しきれないことが明らかとなった。

家兎眼の網膜の厚さ（網膜色素上皮細胞基底部～ILM）は部位によっても異なるがおおよそ90～160 μm であり(32)、ヒト眼の網膜の厚さ100～560 μm (33)に比べるとかなり薄いことがわかる。そのため家兎眼の網膜の方が物理的な外力に対してより影響を受けやすくなると推察される。本研究開始当初は、灌流空気圧を実際の臨床における硝子体手術時の条件と同じ50 mmHg に設定していたが、大きな裂孔を伴う網膜剥離が見られ、標本作製および観察には不適切であった。強い空気の流れによる力が網膜を引き裂く方向に働き裂孔を形成したと考え、灌流空気圧を少し下げて40 mmHg および25 mmHg に設定して比較することとした。しかしいずれの圧においても、灌流空気が直接作用した部位には網膜剥離が見られ、光学顕微鏡の所見では網膜色素上皮細胞の一部が分離して視細胞外節側に付着していた。これは空気の流れが直接当たった部位の網膜に対し急激で強い外力が短時間のうちに加わったことを意味していると考えられた。

一方、灌流空気圧を40 mmHg から25 mmHg に下げることで網膜内層の組織学的障害の面積や程度は有意に小さくなることが明らかとなった。また、圧を下げることでインフュージョンカニューラ開口部直後での空気の流速が有意に遅くなることも認められた。これは灌流空気圧と灌流空気の持つ物理的エネルギーが比例していることを意味している。これらのことより網膜内層における障害と灌流空気の圧力の関係が明らかになったことで、灌流空気による網膜への直接的な機械的障害がおきていることを裏付けることができた。

8-3) 網膜障害と視野欠損

自覚症状としての視野欠損は、網脈絡膜の障害による直接の暗点や、緑内障のように網膜神経節細胞の軸索（網膜神経線維層）が障害を受け途絶することによる暗点であるとさ

れる。つまり網膜のある一部分に全層にわたる障害が発生すれば、その部分そのものが暗点として自覚されるばかりでなく、障害部分を通る網膜神経線維の元をたどった先の網膜神経節細胞の広がり一致した暗点（周辺視野欠損）が生じることになる（図10）。

今回の研究でみられた網膜内層の障害は、最内層である ILM から神経線維層、神経節細胞層にかけて局所的に破壊された所見が特に目立った。臨床的には、Hutton らが硝子体術後に視野欠損を認めた症例において網膜神経線維層の厚みの減少を認めたことを報告した(16)。また Ozawa らは同様に臨床例を対象に多局所網膜電図を記録して解析した結果、網膜内層に対する障害が視野欠損を引き起こすのではないかという結論に達したことを報告した(34)。これらの結果は、我々が見つけた網膜内層の形態学的変化が硝子体手術後の視野欠損の原因となることを裏付けるものである。

一方、他の臨床報告では網膜血管あるいは脈絡膜血管の循環障害が原因であると仮定するものもあった(13,14,22)。また Yonemura らは、視野欠損を起こした臨床例を長期にわたって経過観察したところ、平均術後6ヶ月以降に視野欠損領域に一致して網膜下線維組織の増殖、網膜色素上皮細胞の萎縮が現れることを見つけ、これを報告した(35)。これは網膜のより外層での障害を示唆するものであるが、今回の研究の結果においてみられた網膜外層における組織学的障害と深く関与していると思われる。

また Hirata らは臨床において灌流空気圧を50 mmHg から30 mmHg に下げることが術後の視野欠損発生抑制に有効であることを報告した(30)。多施設における統計学的研究でも、灌流空気圧を30 mmHg 以下であると視野欠損の発生率が有意に低下したとの報告がある(36)。これは、今回の研究における灌流空気圧の低下が組織学的な網膜の障害を有意に低減させたという結果と一致していた。

以上より臨床例においても液空気置換中あるいは後に、今回の研究で認めたものと同様の網膜全層にわたる障害が発生し、術後の暗点（視野欠損）の出現につながったと考えられ、その障害の主たる原因は灌流空気圧の物理的外力であることを明らかにすることができた。

今回認めることのできた障害はいずれも手術直後の変化であり、長期的な経過は未だ不

明である。しかし臨床症例において術後視野欠損の大きさ、程度は長期経過後も不変であることから、空気灌流によって起こる網膜内層、外層の組織学的障害が長期的にも何らかの形で残っていくと考えられる。今後、長期経過観察を目標とした研究をおこなうことで明らかにしていくことができると思われる。

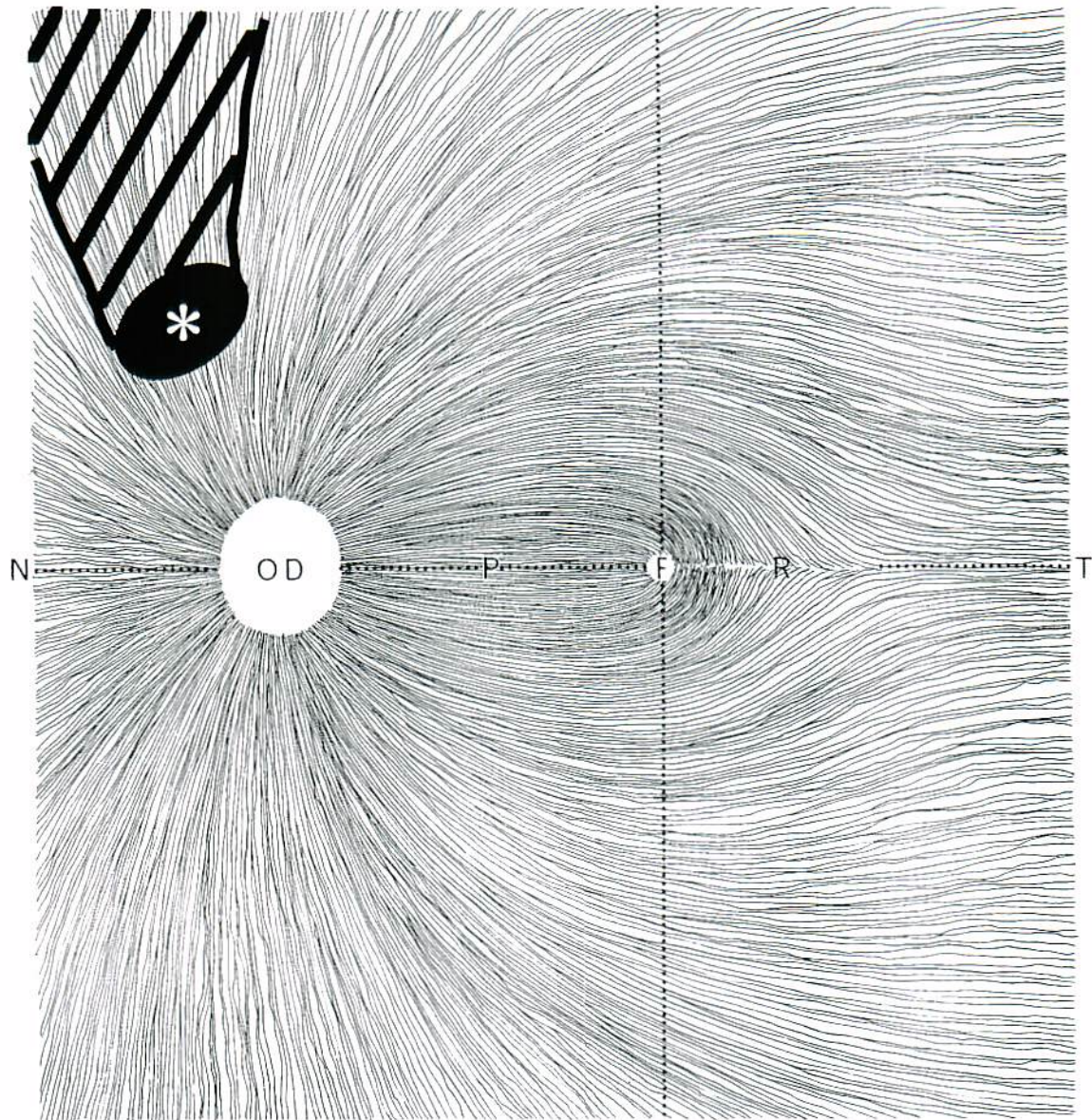


図10 網膜における神経線維の走行の模式図（左眼）および視野欠損
 網膜神経節細胞の軸索である神経線維の走行を、左眼を例に模式的に描いたもの。
 網膜の一部が全層にわたって障害を受けるとその部分は暗点になる（*）。
 またその部分を通る神経線維の広がりに応じた領域も視野欠損となる（斜線部分）。
 OD：視神経乳頭、F：中心窩、R：水平縫線、P：黄斑乳頭線維、N：鼻側、T：耳側
 （文献32より抜粋、改変）

8-4) 硝子体手術術式との関連

現在、糖尿病網膜症や網膜静脈閉塞症における黄斑浮腫や難治性の黄斑円孔に対して意図的な ILM 剥離術が併用され症状の改善をみたという報告(37-39)があり、この手技が併用される硝子体手術症例が増えている。しかし剥離した ILM に Müller 細胞の一部が付着していたという報告(40)や、最近では黄斑局所網膜電図を用いた電気生理学的研究により人工的 ILM 剥離によって神経線維層への影響を認めたという報告(41)もあり、ILM を剥離した部分が病理組織学的にどう変化しているのかという検討を慎重に行っていくべきとされている。本研究で認めた障害は ILM 剥離にとどまらず網膜の外層にまで及んでおり、単純にヒトにおける ILM 剥離術との比較はできないものの、今回の結果を踏まえると、この手技によって神経線維層に対する機械的障害が起こりうること、それによって視野欠損が合併症として起こりうることが示唆される。

臨床において液空気置換を伴う硝子体手術後の視野欠損の発生を予防するためには、術中の灌流空気による直接的な物理的外力が網膜に加わることを防ぐことがもっとも重要であることがわかった。その方法の一つとして灌流空気圧を下げることは、今回おこなった研究と臨床症例の前向き研究により有用であることが証明された。その他にも、灌流空気の流れが直接網膜に到達しないよう分散させたり、空気灌流の時間を極力短縮したりすることも有用であると考えられる。今後は、術式の工夫や手術器具の改良によってこの合併症はほとんど見ることがなくなるものと期待できる。

9 結語

本研究は、硝子体手術に液空気置換を併用したときに発症することのある術後視野欠損の原因について、動物実験を用いることで明らかにすることができた。術中、術後合併症には後遺症を残すことなく治療できるものから、対応策がなく視力予後不良となるものまでさまざまである。硝子体手術後の周辺視野欠損は視力予後という観点からみると決して不良ではないが、患者の自覚がはっきりしており、明確な治療法が存在せず、治癒が望めない。このためこの合併症は発症を未然に防ぐためのアプローチをとることがより一層重要になってくる。今回の研究によって術後視野欠損発症の重要な因子を解明したことで、今後臨床において発症予防の対策へ繋ぐことが可能になったといえる。

1 0 参考文献

1. Mayme R, Brewton RG, Ren ZX. Vitreous body and zonular apparatus. In: Harding JJ, ed. *Biochemistry of the Eye*. London: Chapman & Hall; 1997:135-143.
2. Sjaarda RN, Glaser BM, Thompson JT, Murphy RP, Hanham A. Distribution of iatrogenic retinal breaks in macular hole surgery. *Ophthalmology*. 1995;102:1387-1392.
3. Ogura Y, Takanashi T, Ishigooka H, Ogino N. Quantitative analysis of lens changes after vitrectomy by fluorophotometry. *Am J Ophthalmol*. 1991;111:179-183.
4. Kotecha AV, Sinclair SH, Gupta AK, Tipperman R. Pars plana vitrectomy for macular holes combined with cataract extraction and lens implantation. *Ophthalmic Surg Lasers*. 2000;31:387-393.
5. Poliner LS, Tomambe PE. Retinal pigment epitheliopathy after macular hole surgery. *Ophthalmology*. 1992;99:1671-1677.
6. Charles S. Retinal pigment epithelial abnormalities after macular hole surgery. *Retina*. 1993;13:176.
7. Wendel RT, Patel AC, Kelly NE, Salzano TC, Wells JW, Novack GD. Vitreous surgery for macular holes. *Ophthalmology*. 1993;100:1607-1608.
8. Margherio RR, Trese MT, Margherio AR, Cartright K. Surgical management of vitreomacular traction syndromes. *Ophthalmology*. 1989;96:1437-1445.
9. Park SS, Marcus DM, Duker JS, Pesavento RD, Topping TM, Frederick AR Jr, D'Amico DJ. Posterior segment complications after vitrectomy for macular hole. *Ophthalmology*. 1995;102:775-781.
10. Melberg NS, Thomas MA. Visual field loss after pars plana vitrectomy with air/fluid exchange. *Am J Ophthalmol*. 1995;120:386-388.
11. Kerrison JB, Haller JA, Elman M, Miller NR. Visual field loss following vitreous surgery. *Arch Ophthalmol*. 1996;114:564-569.

12. Ezra E, Arden GB, Riordan-Eva P, Aylward GW, Gregor ZJ. Visual field loss following vitrectomy for stage 2 and 3 macular holes. *Br J Ophthalmol*. 1996;80:519-525.
13. Pendergast SD, McCuen BW 2nd. Visual field loss after macular hole surgery. *Ophthalmology*. 1996;103:1069-1077.
14. Boldt HC, Munden PM, Folk JC, Mehaffey MG. Visual field defect after macular hole surgery. *Am J Ophthalmol*. 1996;122:371-381.
15. Otsuka S, Uemura A, Sakoda Y. Visual field defect following macular hole surgery (in Japanese). *J Jpn Ophthalmol Soc*. 1996;100:911-915.
16. Hutton WL, Fuller DG, Snyder WB, Fellman RL, Swanson WH. Visual field defects after macular hole surgery. A new finding. *Ophthalmology*. 1996;103:2152-2159.
17. Bopp S, Lucke K, Hille U. Peripheral visual field loss after vitreous surgery for macular holes. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1997;235:362-371.
18. Paques M, Massin P, Santiago PY, Spielmann AC, Gaudric A. Visual field loss after vitrectomy for full-thickness macular holes. *Am J Ophthalmol*. 1997;124:88-94.
19. Hotta K, Hirakata A, Shinoda K, Miki D, Hida T. Posterior segment complications after macular hole surgery. *J Jpn Ophthalmol Soc*. 1997;101:808-813.
20. Yan H, Dhurjon L, Chow DR, Williams D, Chen JC. Visual field defect after pars plana vitrectomy. *Ophthalmology*. 1998;105:1612-1616.
21. Arima T, Uemura A, Otsuka S, Doi N, Nakao K. Macular hole surgery-associated peripheral visual field loss. *Jpn J Ophthalmol*. 1998;42:476-483.
22. Malinowski SM, Pesin SR. Visual field loss caused by retinal vascular occlusion after vitrectomy surgery. *Am J Ophthalmol*. 1997;123:707-708.
23. Ishigooka H, Akita J, Hashimoto T, Ogino N. Three eyes developed visual field defect due to retinochoroidal circulatory disturbance after vitrectomy for retinal detachments. *Jpn J Clin Ophthalmol*. 1998;52:465-468.
24. Welch JC. Dehydration injury as a possible cause of visual field defect after pars plana

- vitrectomy for macular hole. *Am J Ophthalmol.* 1997;124:698-699.
25. Takenaka H, Maeno T, Mano T, Mitsuda H. Causes of visual field defects after vitrectomy. *J Jpn Ophthalmol Soc.* 1999;103:399-403.
 26. Horiguchi M, Miyake Y. Effect of temperature on electroretinogram readings during closed vitrectomy in humans. *Arch Ophthalmol.* 1991;109:1127-1129.
 27. Nabil MJ, Charles, Sheldon MB. Local ocular hypothermia in experimental intraocular surgery. *Ophthalmology.* 1988;95:1687-1690.
 28. Tamai K, Toumoto E, Majima A. Protective effects of local hypothermia in vitrectomy under fluctuating intraocular pressure. *Exp Eye Res.* 1997;65:733-738.
 29. Ohji M, Nao-i N, Saito Y, Hayashi A, Tano Y. Prevention of visual field defect after macular hole surgery by passing air used for fluid-air exchange through water. *Am J Ophthalmol.* 1999;127:62-66.
 30. Hirata A, Yonemura N, Hasumura T, Murata Y, Negi A. Effect of infusion air pressure on visual field defects after macular hole surgery. *Am J Ophthalmol.* 2000;130:611-616.
 31. Patel SC, Sjaarda RN, Piomelli U, Thompson JT. Fluid dynamics of fluid-gas exchange: possible role in post-vitrectomy visual field loss [ARVO Abstract]. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:S767. Abstract nr 4051.
 32. Prince JH. *The Rabbit in Eye Research.* Springfield: Charles C. Thomas; 1964:386-388.
 33. Hogan JH, Alvarado JA, Weddel JE. *Histology of the Human Eye.* Philadelphia: WB Saunders; 1971:401-402.
 34. Ozawa S, Katsura H, Betsuin Y, Ishida S, Shinoda K, Inoue M, Ohde H, Oguchi Y. Electrophysiological evaluation of visual field defect after vitrectomy. *Folia Ophthalmol Jpn.* 1999;50:199-202.
 35. Yonemura N, Hirata A, Hasumura T, Negi A. Fundus changes corresponding to visual field defects after vitrectomy for macular hole. *Ophthalmology.* 2001;108:1638-1643.
 36. Ishigooka H, Mawatari Y, Ogawa K, Akita J, Matsui Y, Ogino N, Hirata A, Negi A, Demizu S.

- Atsumi K. Prophylactic trials for prevention of visual field defects after vitrectomy for macular hole. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:S343. Abstract nr 1799.
37. Gandorfer A, Messmer EM, Ulbig MW, Kampik A. Resolution of diabetic macular edema after surgical removal of the posterior hyaloid and the inner limiting membrane. *Retina.* 2000;20:126-133.
38. Park DW, Sipperley JO, Sneed SR, Dugel PU, Jacobson J. Macular hole surgery with internal-limiting membrane peeling and intravitreal air. *Ophthalmology.* 1999;106:1392-1398.
39. Brooks HL Jr. Macular hole surgery with and without internal limiting membrane peeling. *Ophthalmology.* 2000;107:1939-1949.
40. Gandorfer A, Haritoglou C, Gass CA, Ulbig MW, Kampik A. Indocyanine green-assisted peeling of the internal limiting membrane may cause retinal damage. *Am J Ophthalmol.* 2001;132:431-433.
41. Terasaki H, Miyake Y, Nomura R, Piao CH, Hori K, Niwa T, Kondo M. Focal macular ERGs in eyes after removal of macular ILM during macular hole surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:229-234.